

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290278** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.20

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.08.07

**(54) АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, ВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ
АБЕРРАНТНЫЙ СПЛАЙСИНГ ABCA4**

(31) **19190673.4**

(32) **2019.08.08**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2020/072246**

(87) **WO 2021/023863 2021.02.11**

(71) Заявитель:
**ЮСИЭЛ БИЗНЕС ЛТД (GB);
СТИХТИНГ РАДБАУД
ЮНИВЕРСИТАЙР МЕДИС
ЦЕНТРУМ (NL)**

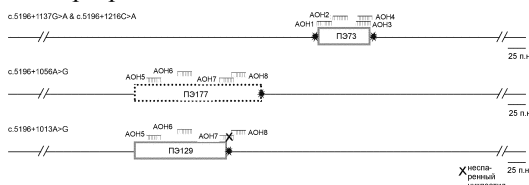
(72) Изобретатель:

**Коллин Роберт Вильгельмус Йоханна,
Гаранто Иглесиас Алехандро, Кремерс
Францискус Петер Мария (NL),
Читем Майкл Эдвард (GB)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к области медицины. В частности, оно относится к новым антисмысловым олигонуклеотидам, которые могут применяться для лечения, предотвращения и/или замедления прогрессирования болезни Штаргардта.



202290278

A1

A1

202290278

Антисмысловые олигонуклеотиды восстанавливающие aberrantный сплайсинг *ABCA4*

Область техники

5 Изобретение относится к области медицины и иммунологии. В частности, оно относится к новым антисмысловым олигонуклеотидам, которые могут применяться для лечения, предотвращения и/или замедления прогрессирования заболеваний, ассоциированных с геном *ABCA4*.

10 Уровень техники

Аутосомные рецессивные мутации в гене *ABCA4* являются причиной болезни Штаргардта, прогрессирующего заболевания, характеризующегося потерей центрального зрения и часто ведущего к полной слепоте. Типичным признаком болезни Штаргардта является присутствие многочисленных желтых пятен (пятнышек), распределенных по всему глазному дну пациентов. Ген *ABCA4* состоит из 50 экзонов и кодирует белок, состоящий из 2273 аминокислот. Указанный белок экспрессируется во внешних сегментах фоторецепторных клеток (палочек и колбочек) и играет важную роль в удалении продуктов жизнедеятельности после фототрансдукции. Кроме STGD1 (Stargardt disease 1, болезнь Штаргардта), варианты *ABCA4* могут также быть причиной других подтипов заболеваний сетчатки от макулопатии по типу «бычьего глаза» до аутосомной рецессивной палочко-колбочковой дистрофии (autosomal recessive cone-rod dystrophy (arCRD); Cremers et al, 1998; Maugeri et al, 2000) и панретиальной дистрофии (Cremers et al, 1998; Martinez-Mir et al, 1998) в зависимости от степени тяжести заболевания, ассоциированного с конкретным аллелем.

Биаллельные варианты *ABCA4* могут быть обнаружены приблизительно в 80% случаев STGD1 (Allikmets et al, 1997; Fujinami et al, 2013; Lewis et al, 1999; Maugeri et al, 1999; Rivera et al, 2000; Schulz et al, 2017; Webster et al, 2001; Zernant et al, 2011; Zernant et al, 2017) и 30% случаев arCRD (Maugeri et al, 2000, см. выше) после секвенирования кодирующих областей и примыкающих сайтов сплайсинга. В целом, пациенты с arCRD или панретиальной дистрофией являются носителями двух аллелей *ABCA4*, ассоциированных с тяжелыми формами заболевания, тогда как пациенты с STGD1 являются носителями двух аллелей, ассоциированных с заболеваниями средней тяжести или комбинацией аллелей, ассоциированных с легкими и тяжелыми формами заболевания (Maugeri et al, 1999; van Driel et al, 1998). Была выдвинута гипотеза, что большинство неизвестных вариантов *ABCA4* у

пациентов с STGD1 находятся в интронных областях гена, и, действительно, в течение последних лет несколько групп показали существование таких глубоких интронных вариантов (Bauwens et al, 2015; Bax et al, 2015; Braun et al, 2013; Lee et al, 2016; Schulz et al, 2017; Albert et al, 2018, Sangermano et al 2019 and Bauwens et al., 2019). Многие из этих глубоких интронных мутаций активируют скрытые донорные или акцепторные сайты сплайсинга или изменяют экзонные энхансеры сплайсинга или мотивы сайленсеров; все это приводит к включению псевдоэкзона (ПЭ) в значительную часть транскриптов *ABCA4*. Степень включения ПЭ может различаться у вариантов *ABCA4*, но она также зависит от того, на какой ткани проводилось исследование, т. е. степень включения ПЭ может быть пропорционально выше в «ретиноподобных» тканях. Тогда как большая часть *ABCA4* мутаций распределены по всей протяженности гена *ABCA4*, некоторые мутации имеют тенденцию образовывать кластеры, включая ряд вариантов интрона 36 данного гена. В частности, авторы изобретения обнаружили 4 варианта интрона 36 (с.5196+10134>G; с.5196+10564>G; с.5196+1137G>A; с.5196+12164>G), которые приводят к включению псевдоэкзонов в *ABCA4* пре-мРНК, и, следовательно, прогнозируемой потере функции белка *ABCA4*.

То обстоятельство, что значительное количество мутаций *ABCA4* затрагивает сплайсинг пре-мРНК, делает ее притягательной мишенью для модуляционной терапии, основанной на антисмысловых олигонуклеотидах (АОН). Соответственно, существует насущная потребность в создании АОН для модуляции сплайсинга гена *ABCA4*, чтобы обеспечить экспрессию функционального белка *ABCA4* у субъектов, страдающих болезнью Штаргардта.

25 Краткое описание изобретения

В первом аспекте, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду для перенаправления сплайсинга, который связывается и/или комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, как показано в SEQ ID NO: 4. Предпочтительно, антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 9 и 10. Более предпочтительно, антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6 и 7. Еще более предпочтительно, антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 41, и 42.

Во втором аспекте, настоящее изобретение относится к вирусному вектору, экспрессирующему антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга, как определено в настоящем изобретении при помещении вектора в условия, способствующие экспрессии молекулы.

- 5 В третьем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с изобретением или вирусный вектор в соответствии с изобретением и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

- В четвертом аспекте, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, вектору в соответствии с изобретением или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением для применения в качестве лекарственного средства. Предпочтительно, для применения в качестве лекарственного средства для лечения *ABCA4*-ассоциированного заболевания и
- 10 состояния, требующего модуляции сплайсинга *ABCA4*. Предпочтительно, *ABCA4*-ассоциированного заболевания или такого состояния, как болезнь Штаргардта.

- В пятом аспекте, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, вектору в соответствии с настоящим изобретением или
- 20 фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением для лечения *ABCA4*-ассоциированного заболевания или состояния, требующего модуляции сплайсинга *ABCA4*.

- В шестом аспекте, настоящее изобретение относится к способу модуляции сплайсинга *ABCA4* в клетке, указанный способ включает приведение указанной
- 25 клетки в контакт с антисмысловым олигонуклеотидом для перенаправления сплайсинга, как определено в настоящем изобретении, вектором в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтической композицией в соответствии с настоящим изобретением.

30 **Подробное описание изобретения**

- По определению, антисмысловые олигонуклеотиды (АОН) в значительной степени комплементарны (содержат антисмысловую последовательность) своей мишени, что позволяет им связываться с соответствующей молекулой пре-РНК; таким образом, без привязки к конкретной теории, АОН препятствуют связыванию белков,
- 35 необходимых для сплайсинга. Как правило, такое отсутствие связывания приводит

к пропуску экзона-мишени, как показали для нескольких мутаций в гене *ABCA4* раннее авторы настоящего изобретения (WO2018/109011).

Кроме того, АОН могут перенаправлять аппарат сплайсинга на соседние донорные и акцепторные сайты. Это убедило авторов изобретения отобрать такие мутации

5 *ABCA4*, которые могли бы также дать ответ на модуляционную терапию сплайсинга на основе АОН. Это были глубокие интронные мутации, которые создавали новые донорные сайты сплайсинга, акцепторные сайты сплайсинга или сайты связывания энхансеров сплайсинга в экзонах, что приводило к включению псевдоэкзонов в мРНК соответствующего гена. АОН будут применяться для блокировки распознавания

10 псевдоэкзона (и посредством этого приводить к его пропуску), таким образом полностью восстанавливая транскрипт дикого типа и соответствующую белковую функцию.

Следующие мутации были отобраны:

- с.5196+1013A>G. Указанная мутация приводит к включению 129-нуклеотидного

15 псевдоэкзона между экзонами 36 и 37 *ABCA4*.

- с.5196+1056A>G. Указанная мутация приводит к включению 177-нуклеотидного псевдоэкзона между экзонами 36 и 37 *ABCA4*.
- с.5196+1137G>A. Указанная мутация приводит к включению 73-нуклеотидного псевдоэкзона между экзонами 36 и 37 *ABCA4*.

20 - с.5196+1216A>G. Указанная мутация приводит к включению 73-нуклеотидного псевдоэкзона между экзонами 36 и 37 *ABCA4*.

Указанные четыре варианта *ABCA4* в интроне 36 были обнаружены у нескольких пациентов, в частности, вариант с.5196+1137G>A был найден в форме гетерозиготы в 15 описанных и 19 неопубликованных случаях STGD1. Два из четырех вариантов

25 приводят к появлению похожих псевдоэкзонов, следовательно, те же молекулы АОН могут корректировать дефект, вызванный двумя различными мутациями. Авторы настоящего изобретения показывают, что отдельные АОН могут восстанавливать aberrantный сплайсинг *ABCA4*, вызванный вариантами интрона 36.

Авторы изобретения предлагают АОН для коррекции сплайсинга некоторых классов мутаций, указанных выше; в настоящем изобретении взаимозаменяемо

30 используются термины «модулировать сплайсинг» и «перенаправлять сплайсинг» и включают основанную на АОН модуляционную терапию сплайсинга мутаций, указанных выше. Термин «перенаправление сплайсинга» в настоящем изобретении определен как перенаправление сплайсинга *ABCA4* пре-мРНК, дающее

35 первоначальный транскрипт.

Соответственно, настоящее изобретение предлагает антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга, который связывается и/или комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, как показано в SEQ ID NO: 4; предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 9 и 10; более предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6 и 7; еще более предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 41, и 42.

В настоящем изобретении взаимозаменяемо используются термины «антисмысловой(ые) олигонуклеотид(ы)» или «АОН», которые обозначают олигонуклеотидную молекулу, состоящую из нуклеотидной последовательности, которая в значительной степени комплементарна нуклеотидной последовательности – мишени в молекуле пре-мРНК, гяРНК (гетерогенной ядерной РНК) или молекуле мРНК. Степень комплементарности (или значительной комплементарности) антисмысловой последовательности предпочтительно такая, чтобы молекула, содержащая антисмысловую последовательность, могла сформировать стабильный гибрид с нуклеотидной последовательностью – мишенью в молекуле РНК при физиологических условиях. Связывание АОН со своей мишенью может быть легко оценено специалистом в данной области техники с помощью метода, известного в данной области техники как анализ подвижности в геле, как описано в EP1619249.

Термин «комплементарный», используемый в контексте настоящего изобретения, означает, что допускаются некоторые ошибки спаривания нуклеотидов в антисмысловой последовательности, если сохраняется функциональность, т. е. обеспечивается перенаправление сплайсинга. Предпочтительно комплементарность составляет от 90% до 100%. В целом, это допускает 1 или 2 ошибки спаривания нуклеотидов в АОН из 20 нуклеотидов, или 1, 2, 3 или 4 ошибки спаривания нуклеотидов в АОН из 40 нуклеотидов, или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 ошибок спаривания нуклеотидов в АОН из 60 нуклеотидов и т. д. Необязательно указанный АОН можно дополнительно протестировать трансфекцией ретиноподобных клеток пациентов. Комплементарные области предпочтительно конструировать таким образом, чтобы после гибридизации они были специфичны к псевдозкзону в пре-мРНК. Такая специфичность может быть создана за счет различной длины

комплементарных областей, поскольку это зависит от фактических последовательностей других молекул (пре-)мРНК в системе. Риск того, что АОН сможет гибридизоваться с другими молекулами пре-мРНК снижается по мере увеличения размера АОН. Очевидно, что АОН, содержащий ошибки спаривания нуклеотидов в области комплементарности, но сохраняющий возможность гибридизоваться и/или связываться с областью-мишенью в пре-мРНК, может применяться в настоящем изобретении. Однако предпочтительно, чтобы по меньшей мере комплементарные части не содержали ошибки спаривания нуклеотидов, так как АОН, не имеющий ошибок спаривания нуклеотидов в комплементарной части, обычно имеет более высокую эффективность и специфичность, чем АОН, у которого есть ошибки спаривания нуклеотидов в одной или более комплементарной области. Предполагается, что более высокая интенсивность гибридизации (т. е. возрастающее число взаимодействий с противоположенной цепью) благоприятна для повышения эффективности процесса подавления аппарата сплайсинга в системе.

АОН согласно настоящему изобретению предпочтительно не содержит участок CpG, более предпочтительно не содержит какой-либо CpG. Присутствие CpG или участка CpG в олигонуклеотиде обычно ассоциировано с повышенной иммуногенностью указанного выше олигонуклеотида (Dorn and Kippenberger, 2008). Повышенная иммуногенность не желательна, поскольку она может вызвать повреждение обрабатываемой ткани, т. е. глаза. Иммуногенность может быть оценена на модели лабораторных животных путем оценки наличия CD4+ и/или CD8+ клеток и/или воспалительного моноядерного инфильтрата. Иммуногенность может быть также оценена по крови лабораторного животного или человека, прошедшего лечение АОН в соответствии с данным изобретением, путем выявления присутствия нейтрализующих антител и/или антител, распознающих указанный выше АОН с использованием стандартного иммунологического анализа, известного специалистам. Воспалительная реакция, образование интерферона I типа, образование интерлейкина 12 (interleukin 12, IL12) и/или повышение иммуногенности могут быть также оценены путем выявления присутствия или увеличения количества нейтрализующих антител или антител, распознающих указанный выше АОН с использованием стандартного иммунологического анализа.

Кроме того, АОН в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно должен иметь приемлемую кинетику связывания РНК и/или термодинамические свойства. Кинетика связывания РНК и/или термодинамические свойства по меньшей мере частично определяются температурой плавления олигонуклеотида (T_m ,

температура плавления; рассчитывается при помощи калькулятора свойств олигонуклеотида (www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index) для одноцепочечной РНК с использованием базовой T_m и модели ближайшего соседа), и/или свободной энергией комплекса АОН-экзон-мишень (с использованием РНК структуры версия 4.5). Если температура плавления слишком высокая, предполагается, что АОН будет менее специфичным. Допустимая температура плавления и свободная энергия зависят от последовательности АОН. Следовательно, сложно привести предпочтительный интервал каждого из этих параметров. Допустимая температура плавления может быть в интервале от 35 до 70°C, и допустимая свободная энергия может быть в интервале от 15 до 45 ккал/моль.

Во всех вариантах реализации нуклеотид в антисмысловом олигонуклеотиде в соответствии с настоящим изобретением может быть остатком РНК, остатком ДНК или аналогом нуклеотида, или эквивалентом, или их комбинацией.

Предпочтительно АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с данным изобретением имеет длину от приблизительно 8 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно от приблизительно 16 до приблизительно 23 нуклеотидов, например 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида.

В одном варианте реализации антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с данным изобретением содержит или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35 и 39.

В предпочтительном варианте реализации АОН для перенаправления аберрантного сплайсинга *ABCA4*, который вызван мутацией с.5196+1013A>G, содержит или состоит из SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 31.

В другом предпочтительном варианте реализации АОН для перенаправления аберрантного сплайсинга *ABCA4*, который вызван мутацией с.5196+1056A>G, содержит или состоит из АОН, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 39. Более предпочтительно, АОН для перенаправления аберрантного сплайсинга *ABCA4*, который вызван мутацией с.5196+1056A>G, выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 35.

В другом предпочтительном варианте АОН для перенаправления аберрантного сплайсинга *ABCA4*, который вызван мутацией с.5196+1137G>A, содержит или состоит из АОН, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 23. Более предпочтительно, АОН для перенаправления аберрантного

сплайсинга *ABCA4*, который вызван мутацией с.5196+1137G>A, содержит или состоит из SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 19.

В еще одном предпочтительном варианте реализации АОН для перенаправления аберрантного сплайсинга *ABCA4*, который вызван мутацией 5196+1216C>A, 5 содержит или состоит из АОН, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 23. Более предпочтительно, АОН для перенаправления аберрантного сплайсинга *ABCA4*, который вызван мутацией с.5196+1216C>A, состоит из SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 15.

Предпочтительно, АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с 10 настоящим изобретением содержит один или более остатков, которые модифицированы так, чтобы повысить устойчивость к нуклеазам и/или повысить аффинность антисмыслового олигонуклеотида к последовательности-мишени. Следовательно, в предпочтительном варианте реализации АОН содержит по меньшей мере один нуклеотидный аналог или эквивалент, причем нуклеотидный 15 аналог или эквивалент определяются как остаток с модифицированным основанием и/или модифицированным остовом, и/или неприродной межнуклеозидной связью, или комбинацией указанных модификаций.

В предпочтительном варианте реализации нуклеотидный аналог или эквивалент содержит модифицированный остов. Примерами таких остовов являются 20 морфолиновые остовы, карбаматные остовы, силоксановые остовы, сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы, формацетильные и тиоформацетильные остовы, метиленаформацетильные остовы, рибоацетильные остовы, алкенсодержащие остовы, сульфаматные, сульфонатные и сульфонамидные остовы, метилениминовые и метиленигидразиновые остовы и амидные остовы. 25 Фосфородиамидатные морфолиновые олигомеры – это олигонуклеотиды с модифицированным остовом, которые ранее были исследованы как антисмысловые агенты.

Морфолиновые олигонуклеотиды имеют незаряженный остов, в котором дезоксирибоза (сахар ДНК) заменена на шестичленное кольцо и фосфодиэфирная 30 связь заменена на фосфородиамидатную. Морфолиновые олигонуклеотиды устойчивы к ферментативному расщеплению и, по-видимому, выполняют функцию антисмысловых агентов путем остановки трансляции или интерференции со сплайсингом пре-мРНК, а не путем активации РНКазы Н. Морфолиновые олигонуклеотиды были успешно доставлены внутрь клеток в культуре с помощью 35 методов, которые физически разрушают клеточную мембрану; исследование, сравнившее несколько таких методов, установило, что наиболее эффективным

методом доставки является метод соскоба и загрузки; однако, поскольку морфолиновый остов является незаряженным, катионные липиды не могут быть эффективными медиаторами захвата морфолинового олигонуклеотида клетками. Недавно было показано образование триплекса морфолиновым олигонуклеотидом, эти исследования показали, что морфолиновый олигонуклеотид может образовывать триплекс в отсутствие магния из-за наличия неионного остова.

Более того предпочтительно, чтобы связь между остатками остова не содержала атом фосфора, как например, связь, которая формируется короткой алкильной цепью или циклоалкильные межнуклеозидные связи, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные межнуклеозидные связи, или одна или более короткоцепочечная гетероатомная или гетероциклическая межнуклеозидная связь. Предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент включает пептидно-нуклеиновую кислоту (ПНК) с модифицированным полиамидным остовом (Nielsen et al., 1991). Молекулы на основе ПНК точно копируют молекулы ДНК в плане распознавания комплементарных оснований. Остов ПНК состоит из N-(2-аминоэтил)-глициновых единиц, связанных пептидными связями, при этом азотистые основания связаны с остовом метиленкарбонильными связями. Другой вариант остова включает мономер ПНК на основе пирролидина с одним добавочным углеродом (Govindaraju and Kumar, 2005). Поскольку остов молекулы ПНК не содержит заряженные фосфатные группы, гибриды ПНК-РНК обычно более стабильны, чем гибриды РНК-РНК или РНК-ДНК соответственно (Egholm et al., 1993). Более предпочтительный остов включает аналог морфолинового нуклеотида или эквивалента, в котором рибоза или дезоксирибоза заменена шестичленным морфолиновым кольцом. Наиболее предпочтительный аналог нуклеотида или эквивалент включает фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (ФМО), в котором рибоза или дезоксирибоза заменена шестичленным морфолиновым кольцом, и анионовая фосфодиэфирная связь между соседними морфолиновыми кольцами заменена неионной фосфородиамидатной связью.

В еще одном варианте реализации аналог нуклеотида или эквивалент в соответствии с настоящим изобретением содержит замену одного из атомов кислорода, не образующих мостик в фосфодиэфирной связи. Указанная модификация немного дестабилизирует спаривание оснований, но привносит значительную устойчивость к расщеплению нуклеазами. Предпочтительный аналог нуклеотида или эквивалент включает фосфоротиоат, хиральный фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфоротриэфир, аминокалкил фосфоротриэфир, Н-фосфонат, метил- и другой алкилфосфонат, включая 3'-алкилен фосфонат, 5'- алкилен

фосфонат и хиральный фосфонат, фосфинат, фосфорамидат, включая в себя 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидат, тионофосфорамидат, тиоалкилфосфонат, тиоалкилфосфотриэфир, селенофосфат или боранофосфат.

- 5 Более предпочтительный аналог нуклеотида или эквивалент в соответствии с настоящим изобретением содержит одну (или более) часть молекулы сахара с одним или двумя замещениями в позициях 2', 3' и/или 5', например, OH; -F; замещенные или незамещенные, линейные или разветвленные низкомолекулярные (C1-C10) алкил, алкенил, алкинил, алкарил, аллил или аралкил, которые могут быть
- 10 прерваны одним или более гетероатомом; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S-или N-алкинил; O-, S- или N- аллил; O-алкил-O-алкил, -метокси, -аминопропокси; метоксиэтокси; диметиламинооксиэтокси и – диметиламинозтоксиэтокси. Сахарной группой может быть пираноза или ее производное, или дезоксипираноза или ее производное, предпочтительно, рибоза
- 15 или ее производное, или дезоксирибоза или ее производное. Предпочтительный дериватизированный сахар включает заблокированную нуклеиновую кислоту (ЗНК), в которой 2' атом углерода связан с 3' или 4' атомом углерода сахарного кольца, таким образом формируя бициклическую сахарную группу. Предпочтительная ЗНК включает нуклеиновую кислоту с 2'-O, 4'-C-этиленовым мостиком (Morita et al., 2001).
- 20 Указанные замещения придают нуклеотидному аналогу или эквиваленту устойчивость к РНКазе H или нуклеазе и повышают аффинность к РНК-мишени.

В другом варианте реализации аналог нуклеотида или эквивалент в соответствии с настоящим изобретением содержит одну или более модификацию основания или замещение. Модифицированные основания включают синтетические и природные

- 25 основания, например, инозин, ксантин, гипоксантин и другие -аза, деаза, -гидрокси, -гало, -тио, тиол, -алкил, -алкенил, -алкинил, тиоалкил производные пиримидиновых и пуриновых оснований, которые известны или будут известны в данной области техники.

Специалистам в данной области техники понятно, что нет необходимости одинаково

- 30 модифицировать все позиции в АОН. Кроме того, более чем один из указанных выше аналогов или эквивалентов может быть включен в отдельный АОН или даже в отдельную позицию в одном АОН. В некоторых вариантах реализации АОН в соответствии с настоящим изобретением включает по меньшей мере два различных типа аналогов или эквивалентов.
- 35 Соответственно, в предпочтительном варианте реализации антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим

изобретением включает по меньшей мере один 2'-О алкил фосфоротиоат антисмысловой олигонуклеотид, например, 2'-О-метил модифицированную рибозу, 2'-О-этил модифицированную рибозу, 2'-О-пропил модифицированную рибозу, и/или замещенные производные этих модификаций, например, галогенированные производные; предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид содержит по меньшей мере 2'-О-пропил модифицированную рибозу.

В другом предпочтительном варианте реализации антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением содержит 2'-О алкил фосфоротиоат антисмысловой олигонуклеотид, например, 2'-О-метил модифицированную рибозу, 2'-О-этил модифицированную рибозу, 2'-О-пропил модифицированную рибозу, и/или замещенные производные указанных модификаций, например, галогенированные производные; предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид содержит 2'-О-пропил модифицированную рибозу.

В другом предпочтительном варианте реализации антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением содержит фосфотионатный остов.

В одном варианте реализации АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из SEQ ID NO: 11 и содержит 2'-О-метил модифицированную рибозу (PHK) и фосфоротионатный остов.

В одном варианте реализации АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из SEQ ID NO: 15 и содержит 2'-О-метил модифицированную рибозу (PHK) и фосфоротионатный остов.

В одном варианте реализации АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из SEQ ID NO: 19 и содержит 2'-О-метил модифицированную рибозу (PHK) и фосфоротионатный остов.

В одном варианте реализации АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из SEQ ID NO: 23 и содержит 2'-О-метил модифицированную рибозу (PHK) и фосфоротионатный остов.

В одном варианте реализации АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из SEQ ID NO: 27 и содержит 2'-О-метил модифицированную рибозу (PHK) и фосфоротионатный остов.

В одном варианте реализации АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из SEQ ID NO: 31 и содержит 2'-О-метил модифицированную рибозу (PHK) и фосфоротионатный остов.

В одном варианте реализации АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из SEQ ID NO: 35 и

содержит 2'-О-метил модифицированную рибозу (РНК) и фосфоротионатный остов

В одном варианте реализации АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из SEQ ID NO: 39 и
5 содержит 2'-О-метил модифицированную рибозу (РНК) и фосфоротионатный остов. Специалистам в данной области техники также понятно, что различные антисмысловые олигонуклеотиды могут комбинироваться для эффективного перенаправления сплайсинга. В предпочтительном варианте реализации
10 изобретение включает набор АОН для перенаправления сплайсинга *ABCA4* в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно, чтобы такой набор содержал по меньшей мере два АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно, чтобы такой набор содержал по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре
15 антисмысловых олигонуклеотида, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35 и 39.

АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением может быть введен в организм непрямыми методами с применением подходящих способов, известных в данной области техники. АОН может быть доставлен,
20 например, в организм человека или клетку, ткань или орган указанного организма человека, например, в виде так называемого «голого» АОН. АОН может быть также введен в форме вектора экспрессии, при этом вектор экспрессии кодирует транскрипт РНК, содержащий указанный выше АОН в соответствии с настоящим изобретением. Вектор экспрессии предпочтительно вводят в клетку, ткань, орган или
25 организм человека при помощи посредника для доставки гена. В предпочтительном варианте реализации присутствует вектор экспрессии на основе вируса, содержащий кассету экспрессии или кассету транскрипции, которая направляет экспрессию или транскрипцию АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением. Соответственно, настоящее изобретение
30 обеспечивает вирусный вектор, экспрессирующий антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением при помещении в условия, благоприятные для экспрессии молекулы.

АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением может быть доставлен в клетку посредством экспрессии антисмыслового
35 нуклеотида на основе плазмиды или вируса на основе аденовирусных или аденоассоциированных векторов. Экспрессия может направляться промотором для

РНК-полимеразы II (RNA polymerase II, Pol II), например, РНК промотором U7 или промотором РНК-полимеразы III (RNA polymerase III, Pol III), например, РНК промотором U6. Предпочтительным средством доставки является вирусный вектор, например, аденоассоциированный вирусный вектор (adeno-associated virus vector, AAVV), или ретровирусный вектор, например, лентивирусный вектор и подобные ему. Также плазмиды, искусственные хромосомы, плазмиды, используемые для направленной гомологичной рекомбинации и интеграции в геном человеческих клеток могут быть соответствующим образом применены для доставки АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением.

Предпочтительными для данного изобретения являются те вектора, где транскрипция промоторов направляется РНК-полимеразой III, и/или, где транскрипты синтезируются в форме соединений с U1 или U7 транскриптами, которые дают хорошие результаты для доставки коротких транскриптов. Возможность сконструировать подходящий транскрипт ограничивается квалификацией специалиста. Предпочтительными являются транскрипты, где транскрипция промоторов направляется РНК-полимеразой III, предпочтительно в форме соединений с U1 или U7 транскриптами. Такие соединения могут быть получены, как было показано ранее (Gorman et al., 1998).

Предпочтительной системой экспрессии АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением является вектор на основе аденоассоциированного вируса (adeno-associated virus, AAV). Были разработаны одно- и двухцепочечные векторы на основе AAV для длительной экспрессии антисмысловой нуклеотидной последовательности для высокоэффективного перенаправления сплайсинга. Предпочтительный вектор на основе AAV, например, содержит кассету экспрессии, которая направляется промотором РНК полимеразы III (Pol III) или промотором РНК полимеразы II (Pol II). Предпочтительным РНК промотором является, например, промотор Pol III U6 РНК или промотор Pol II U7 РНК.

Настоящее изобретение, соответственно, обеспечивает вектор на основе вируса, содержащий промотор Pol II или Pol III, направляющий экспрессию кассеты АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением.

AAV вектором в соответствии с настоящим изобретением является рекомбинантный AAV вектор и относится к AAV вектору, содержащему часть AAV генома, содержащую закодированный АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, заключенный в белковую оболочку, состоящую из капсидного белка, полученную из серотипа AAV, как показано в

настоящем изобретении. Часть генома AAV может содержать инвертированные концевые повторы (inverted terminal repeats, ITR), происходящие из различных серотипов аденоассоциированных вирусов, таких как AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9 и другие. Белковая оболочка состоит из капсидного белка, который может происходить из таких серотипов AAV, как AAV1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 и другие. Белковая оболочка может также быть названа капсидная белковая оболочка. Из AAV вектора может быть удален один или, предпочтительно, все гены дикого типа, но он может тем не менее содержать функциональные ITR последовательности нуклеиновых кислот. Функциональные ITR последовательности необходимы для репликации, высвобождения и упаковки AAV вирионов. ITR последовательности могут быть последовательностями дикого типа или могут иметь по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95 или 100% идентичности последовательности с последовательностями дикого типа или могут быть изменены, например, вставкой, мутацией, делецией или заменой нуклеотидов до тех пор, если они остаются функциональными. В данном контексте функциональность определяется как способность направлять упаковку генома в капсидные оболочки и далее делать возможным экспрессию генов в инфицированной клетке-хозяине или клетке-мишени. В контексте данного изобретения капсидная белковая оболочка может иметь другой серотип, чем ITR генома вектора AAV. AAV вектор в соответствии с настоящим изобретением может, следовательно, состоять из капсидной белковой оболочки, т. е. икосаэдрического капсида, который содержит капсидные белки (VP1, VP2 и/или VP3) одного из AAV серотипов, например, AAV серотип 2, тогда как ITR последовательности, содержащиеся в AAV5 векторе, могут относиться к любому AAV серотипу, описанному выше, включая вектор AAV2. «Вектор AAV2», следовательно, содержит капсидную белковую оболочку серотипа 2 AAV, тогда как, например, «вектор AAV5» содержит капсидную белковую оболочку серотипа 5 AAV, в соответствии с чем любой капсидный белок может образовывать капсид вокруг любого ITR генома вектора AAV в соответствии с настоящим изобретением.

Предпочтительно рекомбинантный AAV вектор в соответствии с настоящим изобретением содержит капсидную белковую оболочку серотипов 2, 5, 8 AAV или серотипа 9 AAV, где геном AAV или ITR, присутствующий в указанном выше AAV векторе, получен из серотипов 2, 5, 8 AAV или серотипа 9 AAV; для таких AAV векторов используют обозначения AAV2/2, AAV 2/5, AAV2/8, AAV2/9, AAV5/2, AAV5/5, AAV5/8, AAV5/9, AAV8/2, AAV8/5, AAV8/8, AAV8/9, AAV9/2, AAV9/5, AAV9/8, или AAV9/9 вектор.

Более предпочтительно рекомбинантный AAV вектор в соответствии с настоящим изобретением содержит капсидную белковую оболочку серотипа 2 AAV, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном выше AAV векторе, получены из серотипа 5 AAV, для такого AAV вектора используют обозначение AAV2/5 вектор.

- 5 Более предпочтительно рекомбинантный AAV вектор в соответствии с настоящим изобретением содержит капсидную белковую оболочку серотипа 2 AAV, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном выше AAV векторе, получены из серотипа 8 AAV, для такого AAV вектора используют обозначение AAV2/8 вектор.

- Более предпочтительно рекомбинантный AAV вектор в соответствии с настоящим изобретением содержит капсидную белковую оболочку серотипа 2 AAV, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном выше AAV векторе, получены из серотипа 9 AAV, для такого AAV вектора используют обозначение вектор AAV2/9.

- Более предпочтительно рекомбинантный AAV вектор в соответствии с настоящим изобретением содержит капсидную белковую оболочку серотипа 2 AAV, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном выше AAV векторе, получены из серотипа 2 AAV, для такого вектора используют обозначение AAV2/2 вектор.

- Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты по выбору и, предпочтительно, должна быть вставлена между геномом AAV или ITR последовательностями, как было определено выше, например, конструкт для экспрессии, содержащий регуляторный элемент экспрессии, оперативно связанный с кодирующей последовательностью и 3' терминационной последовательностью.

- Термин «вспомогательные (хелперные) функции AAV» обычно используют для обозначения соответствующих функций AAV, необходимых для репликации и упаковки, поставляемых AAV вектору *ин транс*. Вспомогательные функции AAV дополняют функции AAV, которые отсутствуют в AAV векторе, но у них нет AAV ITRs (которые предоставляются геномом AAV вектора). Вспомогательные функции AAV включают две главные открытые рамки считывания (open reading frame, ORF) AAV, а именно, область, кодирующую *геп*, и область, кодирующую *сар*, или по существу функционально идентичные им последовательности. Области *Рер* и *Сар* хорошо известны в данной области техники, см., например, US 5139941, включенный в настоящее изобретение посредством ссылки. Вспомогательные функции AAV могут быть предоставлены вспомогательному конструкту AAV, который может быть плазмидой. Введение вспомогательного конструкта в клетку-хозяина может происходить, например, путем трансформации, трансфекции или трансдукции

перед или одновременно с введением генома AAV, присутствующего в AAV векторе, как определено в настоящем изобретении. Вспомогательные конструкции AAV в соответствии с настоящим изобретением могут, следовательно, быть выбраны таким образом, чтобы они производили желательное сочетание серотипов, с одной стороны, для белков капсидной оболочки AAV вектора и, с другой стороны, для генома AAV, участвующего в репликации и упаковке вышеупомянутого вектора AAV.

«Вирус-помощник AAV» обеспечивает дополнительные функции, необходимые для репликации и упаковки AAV. Подходящие вирусы-помощники AAV включают аденовирусы, вирусы простого герпеса (*Herpes simplex virus*, HSV) (например, HSV тип 1 и 2) и вирусы коровьей оспы. Дополнительные функции, предоставленные вирусом-помощником, могут быть также введены в клетку-хозяина при помощи векторов, как описано в US 6531456, включенном в настоящее изобретение посредством ссылки.

Предпочтительно геномы AAV, присутствующие в рекомбинантном AAV векторе в соответствии с настоящим изобретением, не содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие вирусные белки, например, гены *rep* (replication, репликация) или *cap* (capsid, капсид) AAV. Геном AAV может дополнительно содержать ген-маркер или ген-репортер, например, ген устойчивости к антибиотику, флуоресцентный белок (например, GFP, green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок) или ген, кодирующий продукт (например, бета-галактозидаза, щелочная фосфатаза и т. д.), который можно обнаружить и/или выделить химическим, энзиматическим или каким-то другим методом, известным в данной области техники.

Предпочтительно вектор AAV в соответствии с настоящим изобретением сконструирован и изготовлен по методу Garanto et al., 2016, включенному в настоящее изобретение посредством ссылки.

Предпочтительным вектором AAV в соответствии с настоящим изобретением является вектор AAV, предпочтительно, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/9 или AAV2/2 вектор, экспрессирующий АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, который представляет собой АОН, содержащий или, предпочтительно, состоящий из последовательности, которая комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, как показано в SEQ ID NO: 4, предпочтительно, антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 9 и 10. Более предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO:

- 5, 6 и 7. Еще более предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 41 и 42.
- 5 Ожидается усовершенствование способов доставки в организм человека или клетку, ткань, орган указанного выше организма человека АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, принимая во внимание прогресс, который уже был достигнут. Такие будущие усовершенствования могут, несомненно, быть использованы для достижения указанного эффекта
- 10 реструктуризации РНК при применении способа в соответствии с настоящим изобретением. АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением может быть доставлен в организм человека, клетку, ткань или орган указанного выше организма человека АОН в форме такого «голового» АОН. При введении АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим
- 15 изобретением, предпочтительно, чтобы молекула была растворена в растворе, совместимым со способом доставки. Плазмида для экспрессии антисмыслового олигонуклеотида может быть доставлена в клетки сетчатки в водном растворе. В качестве альтернативы, предпочтительным способом доставки АОН для перенаправления сплайсинга или плазмиды для экспрессии такого АОН являются
- 20 вирусный вектор или наночастицы. Предпочтительно, вирусные векторы или наночастицы доставляют в клетки сетчатки или другие соответствующие клетки. Такая доставка в клетки сетчатки или другие соответствующие клетки может осуществляться *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*, см. Garanto et al., 2016 (включено в настоящее изобретение посредством ссылки).
- 25 В качестве альтернативы, плазмида может быть доставлена методом трансфекции с использованием известных трансфекционных агентов. Для внутривенного, подкожного, внутримышечного, интратекального и/или внутрижелудочкового введения, предпочтительно использовать физиологический солевой раствор. В частности предпочтительно для данного изобретения применение
- 30 вспомогательного вещества или трансфекционных агентов, которые будут содействовать доставке каждого компонента, установленного в настоящем изобретении, к клетке и/или внутрь клетки, предпочтительно, в клетку сетчатки. Предпочтительными являются вспомогательные вещества или трансфекционные агенты, способные к формированию комплексов, наночастиц, мицелл, пузырьков
- 35 и/или липосом, которые доставляют через клеточную мембрану каждый компонент, определенны в настоящем изобретении, образующие комплексы или заключенные

в пузырек или липосому. Многие из указанных вспомогательных веществ известны в данной области техники. Подходящие вспомогательные вещества или трансфекционные агенты включают полиэтиленимин (polyethylenimine, PEI; ExGen500 (MBI Fermentas)), липофектамин 2000 (LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen))

5 или их производные, или подобные катионные полимеры, включая полипропилениминовые или полиэтилениминовые сополимеры и производные, синтетические амфифилы (SAINT-18), липофектин, DOTAP и/или вирусные капсидные белки, имеющие способность к самосборке в частицы, которые могут доставлять каждый компонент, определенный в настоящем изобретении, в клетку,

10 предпочтительно, в клетку сетчатки. Было показано, что такие вспомогательные вещества эффективно доставляют олигонуклеотид, например, АОН, к широкому ряду клеток в культуре, включая клетки сетчатки. Высокий потенциал трансфекции объединен с токсичностью в интервале от исключительно низкой до умеренной с точки зрения общей выживаемости клеток. Простота структурной модификации

15 может быть использована для обеспечения возможности дополнительных модификаций и анализа их дополнительных (*in vivo*) характеристик для переноса нуклеиновых кислот и токсичности.

Липофектин является примером липосомального трансфекционного агента. Он состоит из двух липидных компонентов, катионного липида N-[1-(2,3

20 диолеилокси)пропил]-N, N, N- триметиламмоний хлорид (N-[1-(2,3 dioleoyloxy)propyl]-N, N, N- trimethylammonium chloride (DOTMA)) (ср. DOTAP, который является метилсульфатной солью) и нейтрального липида диолеифосфатидилэтаноламин (dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE)). Нейтральный компонент является посредником выхода во внутриклеточное

25 пространство. Другой группой систем доставки являются полимерные наночастицы. Поликатионы, например, диэтиламиноэтиламиноэтил (diethylaminoethylaminoethyl (DEAE))-декстран, хорошо известный реагент для трансфекции ДНК, могут быть объединены с бутилцианоакрилатом (butylcyanoacrylate (PBCA)) и гексилцианоакрилатом (hexylcyanoacrylate (PHCA)) для разработки катионных

30 наночастиц, которые могут доставлять каждый компонент, определенный в настоящем изобретении, предпочтительно АОН в соответствии с настоящим изобретением, сквозь клеточные мембраны в клетки.

В дополнение к обычному материалу наночастиц катионный пептид протамин дает возможность альтернативного подхода, заключающегося в разработке

35 олигонуклеотида с коллоидами. Эта система коллоидных наночастиц может формировать так называемые протиклы, которые могут быть получены простым

процессом самосборки для упаковки и выхода олигонуклеотида во внутриклеточное пространство. Специалист в данной области может выбрать и адаптировать любые из указанных выше или любые другие доступные в продаже альтернативные вспомогательные вещества и системы доставки упаковки и доставки молекулы, удерживающей экзон, для применения в настоящем изобретении, чтобы доставить ее для предотвращения, лечения и замедления прогрессирования заболеваний и состояний, ассоциированных с *ABCA4* геном. «Предотвращение, лечение и замедление прогрессирования заболеваний и состояний, ассоциированных с *ABCA4* геном» предпочтительно определяется в настоящем изобретении, как предотвращение и прекращение прогрессирования или частичное или полное восстановление повреждения зрения или слепоты, которые были вызваны генетическим дефектом в гене *ABCA4*.

Кроме того, АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением может быть ковалентно или нековалентно связан с направляющим лигандом, специально разработанным, чтобы способствовать захвату клеткой, цитоплазмой и/или ядром. Такой лиганд может включать (i) вещество (включающее, но не ограничивающиеся пептидными или пептидоподобными структурами), распознающее клеточные, тканевые или органоспецифические элементы, способствующие клеточному поглощению и/или (ii) химическое вещество, способное облегчать поглощение клетками и/или внутриклеточное высвобождение олигонуклеотида из пузырьков, например, эндосом или лизосом.

Следовательно, в предпочтительном варианте реализации АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением представляет собой композицию или лекарственное средство или композицию, которая доставляется вместе с по меньшей мере одним вспомогательным веществом и/или направляющим лигандом для доставки и/или устройством для его доставки в клетку и/или улучшения доставки внутри клетки.

Следует понимать, что если композиция содержит дополнительное вещество, такое как вспомогательное соединение, как далее определено в настоящем изобретении, каждый компонент композиции может не быть представлен надлежащим образом в единственной комбинации или композиции или препарате. В зависимости от их идентичности и особых признаков специалист в данной области техники будет знать, какой тип состава наилучшим образом подходит для каждого компонента, как определено в настоящем изобретении. В предпочтительном варианте реализации изобретение обеспечивает композицию или препарат в форме набора частей, включающих в себя АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с

настоящим изобретением и добавочные вспомогательные соединения, как далее определено в настоящем изобретении.

Если требуется и/или есть соответствующее желание, АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением или вектор, предпочтительно, вирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением может быть включен в состав фармацевтически активной смеси путем добавления фармацевтически приемлемого носителя.

Соответственно, настоящее изобретение также обеспечивает композицию, предпочтительно, фармацевтическую композицию, содержащую антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением или вирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель. Такое соединение может включать единственный АОН для перенаправления сплайсинга или вирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением, но может также включать многочисленные индивидуальные АОН для перенаправления сплайсинга или вирусные векторы в соответствии с настоящим изобретением. Такое фармацевтическое соединение может включать любое фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, включая носитель, консервант, вспомогательное вещество, солюбилизатор и/или растворитель. Такой фармацевтически приемлемый носитель, консервант, вспомогательное вещество, солюбилизатор и/или растворитель может быть найден, например, в Remington, 2000. Каждое свойство вышеупомянутого соединения было определено в настоящем изобретении ранее.

Предпочтительным способом введения является интравитреальная инъекция водного раствора или специально адаптированной композиции для интравитреального введения. EP2425 814 описывает эмульсию масла в воде, специально адаптированную для внутриглазного (интравитреального) введения препаратов пептидов или нуклеиновых кислот. Указанная эмульсия менее плотная, чем стекловидная жидкость, так что эмульсия плавает на поверхности стекловидного тела, не допуская того, чтобы инъецированный препарат повредил зрение. Следовательно, в одном варианте реализации предложена фармацевтическая композиция, подходящая для интравитреального введения и дозируемая в диапазоне от 0,01 до 20 мг/кг, предпочтительно, от 0,05 и 20 мг/кг общего количества антисмыслового нуклеотида на глаз. Предложена подходящая интравитреальная доза, которая содержит от 0,05 мг до 5 мг, предпочтительно, от 0,1 до 1 мг общего количества антисмыслового нуклеотида на глаз, например, около 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 и 1,0 мг на глаз.

Предпочтительный АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением применяется для лечения *ABCA4*-ассоциированных заболеваний и состояний человека. Во всех вариантах реализации изобретения термин «лечение» понимается как включающий предотвращение и/или замедление

5 *ABCA4*-ассоциированного заболевания и состояния. У пациента, которому может быть проведено лечение с применением АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, может быть уже диагностировано *ABCA4*-ассоциированное заболевание и состояние.

В качестве альтернативы, у пациента, которому может быть проведено лечение с

10 применением АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, может не быть диагностировано *ABCA4*-ассоциированное заболевание и состояние, но это может быть пациент с повышенным риском развития *ABCA4*-ассоциированного заболевания и состояния с учетом его или ее генетического фона. Предпочтительно пациент является человеком. Во всех

15 вариантах реализации предпочтительно *ABCA4*-ассоциированным заболеванием и состоянием является болезнь Штаргарда.

Соответственно, изобретение дополнительно обеспечивает антисмысловой нуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением или вирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением или

20 (фармацевтическую) композицию в соответствии с настоящим изобретением для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно, в качестве лекарственного средства для лечения *ABCA4*-ассоциированного заболевания или состояния, требующего модуляции сплайсинга *ABCA4* и для применения в качестве лекарственного средства для предотвращения, лечения или замедления

25 прогрессирования заболеваний и состояний, ассоциированных с геном *ABCA4*. Каждый признак всех вариантов медицинского применения был определен ранее в настоящем изобретении и предпочтительно является тем признаком, который был определен ранее в настоящем изобретении.

Изобретение дополнительно обеспечивает применение АОН для перенаправления

30 сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, вектор в соответствии с настоящим изобретением или (фармацевтическую) композицию в соответствии с настоящим изобретением для лечения *ABCA4*-ассоциированного заболевания или состояния, требующего модуляции сплайсинга *ABCA4*. Каждый признак всех вариантов медицинского применения был определен ранее в настоящем

35 изобретении и предпочтительно является тем признаком, который был определен ранее в настоящем изобретении.

- Изобретение дополнительно обеспечивает способ лечения *ABCA4*-ассоциированного заболевания или состояния, требующего модуляции сплайсинга *ABCA4*, включающего указанный выше способ, включающий взаимодействие указанного выше пациента с АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии
- 5 с настоящим изобретением, вектором в соответствии с настоящим изобретением или (фармацевтической) композицией в соответствии с настоящим изобретением. Каждый признак всех вариантов медицинского применения был определен ранее в настоящем изобретении и предпочтительно является тем признаком, который был определен ранее в настоящем изобретении.
- 10 Изобретение дополнительно обеспечивает применение АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, вектор в соответствии с настоящим изобретением или (фармацевтическую) композицию в соответствии с настоящим изобретением для изготовления лекарственного средства для лечения
- 15 *ABCA4*-ассоциированного заболевания или состояния, требующего модуляции сплайсинга *ABCA4*. Каждый признак всех вариантов медицинского применения изобретения был определен ранее в настоящем изобретении и предпочтительно является тем признаком, который был определен ранее в настоящем изобретении. Изобретение дополнительно обеспечивает антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, способ
- 20 применения для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением или способ для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением в случае *ABCA4*-ассоциированного заболевания или состояния такого как заболевание Штаргардта.
- Лечение или применение способа в соответствии с настоящим изобретением
- 25 предпочтительно проводить по меньшей мере один раз, предпочтительно, на протяжении по меньшей мере одной недели, одного месяца, нескольких месяцев, одного года, 2, 3, 4, 5, 6 лет или дольше, например, пожизненно. Каждый АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением или эквивалент, как было определено в настоящем изобретении, для применения в
- 30 соответствии с настоящим изобретением, может применяться для прямого введения в клетку, ткань и/или орган организма человека *in vivo*, уже пораженный или имеющий риск развития *ABCA4*-ассоциированного заболевания или состояния или может быть введен напрямую *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Частота введения АОН, состав, соединение или вспомогательное соединение в соответствии с настоящим
- 35 изобретением может зависеть от нескольких параметров, например, степени тяжести заболевания, возраста пациента, мутации пациента, количества АОН для

- перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением (т. е. дозы), композиции АОН, композиции, соединения или вспомогательного соединения в соответствии с настоящим изобретением, пути введения и так далее. Частота введения может варьировать между ежедневно, еженедельно, по меньшей мере
- 5 один раз в две недели, или три недели, или четыре недели, или пять недель, или более длительный промежуток времени.
- Интервал доз АОН, композиции, соединения или вспомогательного соединения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно разрабатывать на основе изучения возрастающих доз в клинических испытаниях (применение *in vivo*),
- 10 для которых существуют требования точного протокола. АОН в соответствии с настоящим изобретением может составлять дозу, находящуюся в интервале от 0,01 до 20 мг/кг, предпочтительно от 0,05 до 20 мг/кг. Подходящая интравитреальная доза может составлять от 0,05 мг до 5 мг, предпочтительно, от 0,1 до 1 мг на глаз, например, около 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 и 1,0 мг на глаз.
- 15 В предпочтительном варианте реализации используется концентрация олигонуклеотидов, как было определено в настоящем изобретении, находящаяся в интервале от 0,1 нМ до 1 мкМ. Предпочтительно использовать этот диапазон *in vitro* на клеточной модели, например, клеток сетчатки или ткани сетчатки. Более предпочтительно использовать концентрацию, находящуюся в интервале от 1 до
- 20 400 нМ, более предпочтительно использовать концентрацию, находящуюся в интервале от 10 до 200 нМ, более предпочтительно от 50 до 100 нМ. Если используются многочисленные индивидуальные АОН, данная концентрация или доза может относиться к общей концентрации или дозе АОН или концентрации или дозе каждого используемого АОН.
- 25 В предпочтительном варианте реализации вирусный вектор, предпочтительно AAV вектор, как было описано ранее в настоящем изобретении, в качестве средства переноса молекулы в соответствии с настоящим изобретением, вводят в дозе в интервале от 1×10^9 — 1×10^{17} вирусных частиц на инъекцию, более предпочтительно 1×10^{10} — 1×10^{12} вирусных частиц на инъекцию.
- 30 Интервалы концентрации или дозы АОН, как обозначено выше, являются предпочтительными концентрациями или дозами для применения *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. Специалисту в данной области техники понятно, что в зависимости от используемых АОН, клеток-мишеней, гена-мишени и его уровня экспрессии, использованной среды и условий трансфекции и инкубации, концентрация или доза
- 35 использованных АОН может варьировать и может нуждаться в дополнительной оптимизации.

АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, или вирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением, или соединение в соответствии с настоящим изобретением для применения в соответствии с настоящим изобретением может быть введено в клетку, ткань и/или орган организма человека *in vivo*, уже пораженный или имеющий риск развития ABCA4-ассоциированного заболевания или состояния, и может быть введен *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, или вирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением, или соединение в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены прямо или опосредованно *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Поскольку болезнь Штаргардта имеет выраженный фенотип в клетках сетчатки, предпочтительно, чтобы вышеупомянутые клетки-мишени были клетками сетчатки, дополнительно предпочтительно, чтобы вышеупомянутой тканью была сетчатка и дополнительно предпочтительно указанный выше орган включает глаз.

Изобретение дополнительно обеспечивает способ модуляции сплайсинга ABCA4 в клетке, указанный выше способ включает взаимодействие клетки, предпочтительно клетки сетчатки, с антисмысловым олигонуклеотидом для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, или вирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением, или фармацевтическое соединение в соответствии с настоящим изобретением. Свойства этих подходов были установлены в настоящем изобретении ранее. Взаимодействие клетки с АОН для перенаправления сплайсинга в соответствии с настоящим изобретением, или вирусным вектором в соответствии с настоящим изобретением, или соединением в соответствии с настоящим изобретением может быть выполнено любым способом, известным специалисту в данной области техники. Взаимодействие может быть прямым или косвенным и может осуществляться *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Если не указано иначе, каждый вариант реализации, описанный в настоящем изобретении, может быть объединен с другим вариантом реализации, описанным в настоящем изобретении.

30

Определения

В настоящем документе и в формуле изобретения, глагол «содержать» и его формы спряжения используются в неограниченном смысле, который означает, что компоненты, следующие за этим словом, включены, но компоненты, не указанные конкретно, не исключены. Кроме того, отсылка к элементу с неопределенным артиклем "а" или "an" не исключает возможности присутствия более чем одного

35

элемента, если контекст явным образом не подразумевает присутствия одного и только одного элемента. Неопределенный артикль "а" или "an", следовательно, обычно означает «по меньшей мере один».

Слова «около» или «приблизительно», когда используется в связи с численным значением (например, около 10), преимущественно означают, что значение может
5 быть в интервале на 5% выше или ниже данного значения (10).

Информация о последовательностях, представленная в настоящем изобретении, не должна быть истолкована так узко, поскольку необходимо исключение ошибочно определенных оснований. Специалист в данной области техники может
10 идентифицировать такие ошибочно определенные основания и исправить такие ошибки. В случае ошибок в последовательности последовательность полипептида, полученного экспрессией гена, представленного SEQ ID NO: 1, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, должна иметь приоритет.

15 Все ссылки на патенты и литературные источники в настоящем описании включены в описание в полном объеме посредством ссылок.

Описание фигур

Фигура 1. Схематическое изображение вариантов интрона 36 *ABCA4*, которые лежат
20 в основе STGD1, и вставок псевдоэкзонов (ПЭ), к которым они приводят. Варианты с.5196+1013A>G и с.5196+1056A>G приводят к перекрытию ПЭ с тем же самым акцепторным сайтом сплайсинга, но другим донорным сайтом сплайсинга.

Фигура 2. Анализ вставок ПЭ, вызванных разными мутациями *ABCA4*, и
25 относительных позиций восьми АОН, которые были разработаны. Отмечается, что АОН7 содержит ошибку спаривания по отношению к 129-нуклеотидному ПЭ, образованному за счет вставки варианта с.5196+1013A>G, поскольку он был разработан специально для 177-нуклеотидного ПЭ, образованного за счет вставки мутации с.5196+1056A>G.

30 Фигура 3. ОТ-ПЦР анализ НЕК293Т клеток, трансфицированных *ABCA4* мидигенами либо дикого типа, либо мутантными, также с/без АОН или смыслового олигонуклеотида (СОН, отрицательный контроль). Ген RHO был амплифицирован, чтобы показать одинаковую эффективность трансфекции мидигенов. MQ: MilliQ
35 water, вода милликью. А) с.5196+1216A, В) с.5196+1056G, С) с.5196+1013G.

- Фигура 4. ОТ-ПЦР анализ клеток-предшественников фоторецепторов (photoreceptor precursor cells, PPCs), трансфецированных или нетрансфецированных АОН или СОН. Пациент с STGD1 был сложным гетерозиготным по варианту с.5196+1137G>A в сочетании с делецией и миссенс мутацией другого аллеля. Актин был амплифицирован, чтобы показать, что было внесено равное количество кДНК. СНХ: cycloheximide, циклогексимид, MQ: MilliQ water, вода милликью.

Описание последовательностей

Таблица 1: Последовательности

SEQ ID NO:	Название
1	Геномная последовательность ДНК ABCA4
2	Последовательность мРНК ABCA4
3	ABCA4 последовательность белка
4	ABCA4 полный экзон 36, интрон 36 и экзон 37
5	129-нт псевдозкзон (ПЭ)
6	177- нт ПЭ
7	73- нт ПЭ
8	Область-мишень с.5196+1013A>G
9	Область-мишень с.5196+1056A>G
10	Область-мишень с.5196+1137G>A и с.5196+1217C>A
11	АОН 1
12	АОН 1 мишень
13	АОН 1 мишень +5
14	АОН 1 мишень +10
15	АОН 2
16	АОН 2 мишень
17	АОН 2 мишень +5
18	АОН 2 мишень +10
19	АОН 3
20	АОН 3 мишень
21	АОН 3 мишень +5
22	АОН 3 мишень +10
23	АОН 4
24	АОН4 мишень
25	АОН 4 мишень +5

26	АОН 4 мишень +10
27	АОН 5
28	АОН 5 мишень
29	АОН 5 мишень +5
30	АОН 5 мишень +10
31	АОН 6
32	АОН 6 мишень
33	АОН 6 мишень +5
34	АОН 6 мишень +10
35	АОН 7
36	АОН 7 мишень
37	АОН 7 мишень +5
38	АОН 7 мишень +10
39	АОН 8
40	АОН 8 мишень
41	АОН 8 мишень +5
42	АОН 8 мишень +10
43	СОН
44	Мидиген дикого типа (контроль)
45	с.5196+1013G мидиген
46	с.5196+1056G мидиген
47	с.5196+1216А мидиген
48	Прямой праймер (forward (FW) primer) к экзону 36
49	Обратный праймер (reverse (RV) primer) к экзону 37
50	FW праймер к экзону 5 родопсина
51	RV праймер к экзону 5 родопсина
52	FW праймер актина (actin (ACTB))
53	RV праймер актина

Примеры

Авторы изобретения оценили *in vitro* эффективность ряда АОН для перенаправления сплайсинга *ABCA4* в клетках. Для этого авторы использовали

5 конструкторы мидигенов, т. е. плазмиды, несущие последовательность части гена *ABCA4*, обычно, интересующую область с/без мутации и фланкированную с каждой стороны по меньшей мере 100 парами оснований *ABCA4* последовательности

дикого типа. В дополнение к анализу с использованием мидигенов, для мутации с.5196+1137G>A авторы также использовали технологию иСПК (индуцированные стволовые плюрипотентные клетки; iPSC, induced pluripotent stem cells), чтобы оценить эффективность АОН, нацеленных на указанную мутацию.

5

Материалы и методы

Разработка АОН

Для разработки АОН, для каждой из мутаций была выбрана небольшая интересующая область. Область-мишень для мутации с.5196+1013A>G представлена в SEQ ID NO: 8, область-мишень для мутации с.5196+1056A>G представлена в SEQ ID NO: 9, область-мишень для мутаций с.5196+1137G>A и с.5196+1217C>A представлена в SEQ ID NO: 10. Для всех олигонуклеотидов был проведен *in silico* анализ структуры РНК, из которых восемь олигонуклеотидов были
15
выбраны для дальнейшей работы.

Таблица 2. АОН

АОН#	Последовательность АОН (5'->3')	ПЭ-мишень	Мутация-мишень
АОН1	CGUGCAUUUAUGAGUGUUUCC	73	с.5196+1137G>A & с.5196+1216C>A
АОН 2	CUUUCAGGUUCUGACCUCC	73	
АОН 3	CCUGCAGUUGAUGCUCUUAUC	73	
АОН 4	UACCUGCAGUUGAUGCUCU	73	
АОН 5	GAAAUUGGAGGCUCAUGUUG	129 & 177	с.5196+1013A>G & с.5196+1056A>G
АОН 6	CAUUUGUGUUGGUCUCCAUC	129 & 177	
АОН 7	CAGGAUUCCAAUAUUCACCAUC	177 & 129	с.5196+1056A>G & с.5196+1013A>G?
АОН 8	GAAAUCAUAUCUUCAGGAUUCC	177 & 129	

Исследование АОН в HEK293T

После разработки АОН клетки HEK293T были трансфецированы мидигенами, которые содержали либо часть гена *ABCA4* дикого типа (SEQ ID NO: 44), либо мутантные формы, несущие различные мутации интрона-мишени 36, как показано в Таблице 2, т. е. с.5196+1013A>G, с.5196+1056A>G и с.5196+1216C>A (SEQ ID NO: 45, 46 и 47). Для каждой мутации клетки дикого типа или мутантные клетки, трансфецированные мидигенами, обрабатывали без АОН (NT, negative control; отрицательный контроль), или АОН, разработанными для отдельных ПЭ (АОН1-4
25

для с.5196+1216C>A, и АОН5-8 для с.5196+1013A>G, и с.5196+1056A>G), или смысловым олигонуклеотидом (СОН) в качестве отрицательного контроля (SEQ ID NO: 43). Через сорок восемь часов после трансфекции клетки собирали и выделяли РНК. Далее был выполнен ОТ-ПЦР анализ, чтобы определить, какие АОН могут

5 исправить дефект сплайсинга.

ОТ-ПЦР анализ

Общая РНК была выделена при помощи набора НуклеоСпин для очистки РНК (номер по каталогу 740955-50; Macherey-Nagel, Дюрен, Германия) в соответствии с

10 протоколом изготовителя. После измерения количества РНК кДНК синтезировали с использованием 1 мкг РНК при помощи набора для синтеза кДНК айСкрипт (номер по каталогу 1708891; Bio-Rad, Херкулес, Калифорния, США) в соответствии с протоколом изготовителя. В заключение эффективность АОН оценивали выполнением гнездовой ПЦР с использованием праймеров, представленных в SEQ

15 ID NO: 48 и SEQ ID NO: 49. Чтобы оценить эффективность трансфекции, экзон 5 родопсина амплифицировали при помощи пары праймеров SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51.

Результаты

20 Как показано на Фигуре 3, для каждой вставки ПЭ АОН могут полностью или по меньшей мере частично восстанавливать дефект сплайсинга. В частности, для варианта с.5196+1216C>A, как АОН1 так и АОН2, полностью преобразуют абберрантно сплайсированный мидиген в правильно сплайсированный, тогда как АОН3 и АОН4 существенно восстанавливают дефект сплайсинга-(Фигура 3А). Для

25 мутации с.5196+1056A>G АОН5, по-видимому, является наиболее эффективным. АОН7 и в меньшей степени АОН6 также могут преобразовать большую часть ПЭ-содержащих транскриптов. АОН8 может частично восстанавливать дефект сплайсинга (Фигура 3В). И наконец для мутации с.5196_1013A>G АОН5 и АОН6, по-видимому, являются наиболее эффективными. АОН7, несмотря на одну ошибку

30 спаривания нуклеотида между АОН (разработанного для другого варианта) и ПЭ, все же может частично перенаправлять сплайсинг. Для мутации с.5196_1013A>G АОН8 не показал эффективности, что не является неожиданным с учетом его позиции вне 129-нуклеотидного ПЭ, включенного указанным вариантом (Фигура 3С).

35 Исследование АОН

Поскольку полученный вариант ПЭ, вызванного мутацией с.5196+1137G>A, слабо обнаруживался методом анализа мидигена, для оценки эффективности АОН, нацеленных на указанный ПЭ, использовали технологию иПСК. Клетки крови, взятые у пациента с STGD1, несущего вариант с.5196+1137G>A в сочетании с

5 частичной делецией *ABCA4* и миссенс мутацией (с.[2918+775_3328+640del;4462T>C] р.[Ser974Glnfs*64;Cys1488Arg]) на другом аллеле были перепрограммированы в иПСК (Sangermano et al, 2016) и позднее дифференцированы в клетки-предшественники фоторецепторов (photoreceptor precursor cells (PPCs)) в течение тридцати дней. На двадцать восьмой день АОН 1-4

10 (или СОН) были добавлены к клеткам в конечной концентрации 1 μ M. На двадцать девятый день циклогексимид (cycloheximide, CHX) был добавлен, чтобы заблокировать нонсенс-опосредованный распад транскриптов, несущих преждевременные стоп кодоны. И наконец на тридцатый день клетки собирали и проводили анализ РНК (как описано выше). В этом случае актин (*actin (ACTB)*) был

15 амплифицирован, чтобы нормализовать образцы с использованием FW праймера к экзону 3, как показано в SEQ ID NO: 52 и RV праймера к экзону 4, как показано в SEQ ID NO: 53.

Результаты

20 Как можно отметить на Фигуре 4 вставка ПЭ легче обнаруживается в PPCs. Кроме того, два из четырех исследованных АОН (АОН2 и 3) успешно преобразуют ПЭ-содержащий *ABCA4* транскрипт в правильно сплайсированные продукты.

Заключение

25 Для всех различных ПЭ (77-нуклеотидный, 129- нуклеотидный и 177- нуклеотидный) было определено, что АОН может эффективно восстанавливать дефект сплайсинга. Для с.5196+1013A>G АОН5 и АОН6, по-видимому, являются наиболее эффективными, тогда как для с.5196+1056A>G вставка ПЭ, по-видимому, лучше всего предотвращается АОН5, АОН6 и АОН7. Для с.5196+1137G>A, АОН2 и АОН3,

30 по-видимому, являются наиболее эффективными по меньшей мере в PPCs. И наконец для с.5196+1216C>A АОН1 и АОН2 полностью восстановили дефект сплайсинга, но АОН3 и АОН4 также показали исправление сплайсинга.

Список литературы

- Albert, S., Garanto, A., Sangermano, R., Khan, M., Bax, N.M., Hoyng, C.B., Zernant, J., Lee, W., Allikmets, R., Collin, R.W. and Cremers, F.P., 2018. Identification and rescue of splice defects caused by two neighboring deep-intronic ABCA4 mutations underlying Stargardt disease. *The American Journal of Human Genetics*, 102(4), pp.517-527.
- Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N. F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K. L., Lewis, R. A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M. & Lupski, J. R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* 15, 236-246 (1997), doi:10.1038/ng0397-236.
- Bauwens, M., De Zaeytijd, J., Weisschuh, N., Kohl, S., Meire, F., Dahan, K., Depasse, F., De Jaegere, S., De Ravel, T., De Rademaeker, M., Loeys, B., Coppieters, F., Leroy, B. P. & De Baere, E. An augmented *ABCA4* screen targeting noncoding regions reveals a deep intronic founder variant in Belgian Stargardt patients. *Hum. Mutat.* 36, 39-42 (2015), doi:10.1002/humu.22716.
- Bauwens, M., Garanto, A., Sangermano, R., Naessens, S., Weisschuh, N., De Zaeytijd, J., Khan, M., Sadler, F., Balikova, I., Van Cauwenbergh, C. and Rosseel, T., 2019. *ABCA4*-associated disease as a model for missing heritability in autosomal recessive disorders: novel noncoding splice, cis-regulatory, structural, and recurrent hypomorphic variants. *Genetics in Medicine*, p.1.
- Bax, N. M., Sangermano, R., Roosing, S., Thiadens, A. A., Hoefsloot, L. H., van den Born, L. I., Phan, M., Klevering, B. J., Westeneng-van Haaften, C., Braun, T. A., Zonneveld-Vrieling, M. N., de Wijs, I., Mutlu, M., Stone, E. M., den Hollander, A. I., Klaver, C. C., Hoyng, C. B. & Cremers, F. P. M. Heterozygous deep-intronic variants and deletions in *ABCA4* in persons with retinal dystrophies and one exonic *ABCA4* variant. *Hum. Mutat.* 36, 43-47 (2015), doi:10.1002/humu.22717.
- Braun, T. A., Mullins, R. F., Wagner, A. H., Andorf, J. L., Johnston, R. M., Bakall, B. B., Deluca, A. P., Fishman, G. A., Lam, B. L., Weleber, R. G., Cideciyan, A. V., Jacobson, S. G., Sheffield, V. C., Tucker, B. A. & Stone, E. M. Non-exonic and synonymous variants in *ABCA4* are an important cause of Stargardt disease. *Hum. Mol. Genet.* 22, 5136-5145 (2013), doi:10.1093/hmg/ddt367.

- Cremers, F. P. M., van de Pol, D. J., van Driel, M., den Hollander, A. I., van Haren, F. J., Knoers, N. V., Tijmes, N., Bergen, A. A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A. J., Deutman, A. F. & Hoyng, C. B. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod
5 dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. Hum. Mol. Gen. 7, 355-362 (1998).
- Fujinami, K., Zernant, J., Chana, R. K., Wright, G. A., Tsunoda, K., Ozawa, Y., Tsubota, K., Webster, A. R., Moore, A. T., Allikmets, R. & Michaelides, M. *ABCA4* gene screening
10 by next-generation sequencing in a British cohort. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54, 6662-6674 (2013), doi:10.1167/iovs.13-12570.
- Garanto A, Chung DC, Duijkers L, Corral-Serrano JC, Messchaert M, Xiao R, Bennett J, Vandenberghe LH, Collin RWJ (2016). In vitro and in vivo rescue of aberrant splicing in
15 CEP290-associated LCA by antisense oligonucleotide delivery. Hum Mol Genet, 25: 2552-2563.
- Lewis, R. A., Shroyer, N. F., Singh, N., Allikmets, R., Hutchinson, A., Li, Y., Lupski, J. R., Leppert, M. & Dean, M. Genotype/Phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. Am. J. Hum. Genet. 64,
20 422-434 (1999), doi:10.1086/302251.
- Maugeri, A., van Driel, M. A., van de Pol, D. J., Klevering, B. J., van Haren, F. J., Tijmes, N., Bergen, A. A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A. J., Dahl, N., Brunner,
25 H. G., Deutman, A. F., Hoyng, C. B. & Cremers, F. P. M. The 2588G-->C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease. Am. J. Hum. Genet. 64, 1024-1035 (1999).
- Maugeri, A., Klevering, B. J., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Brunner, H. G., Deutman, A. F., Hoyng, C. B. & Cremers, F. P. M. Mutations in the *ABCA4* (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. Am. J. Hum. Genet. 67,
30 960-966 (2000), doi:10.1086/303079.
- Martinez-Mir, A., Paloma, E., Allikmets, R., Ayuso, C., del Rio, T., Dean, M., Vilageliu, L., Gonzalez-Duarte, R. & Balcells, S. Retinitis pigmentosa caused by a homozygous

- mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat. Genet.* 18, 11-12 (1998), doi:10.1038/ng0198-11.
- Rivera, A., White, K., Stohr, H., Steiner, K., Hemmrich, N., Grimm, T., Jurklies, B., Lorenz, B., Scholl, H. P., Apfelstedt-Sylla, E. & Weber, B. H. A comprehensive survey of sequence variation in the *ABCA4* (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 800-813 (2000), doi:10.1086/303090.
- Sangermano, R., Bax, N.M., Bauwens, M., Van den Born, L.I., De Baere, E., Garanto, A., Collin, R.W., Goercharn-Ramlal, A.S., den Engelsman-van Dijk, A.H., Rohrschneider, K. and Hoyng, C.B., 2016. Photoreceptor progenitor mRNA analysis reveals exon skipping resulting from the *ABCA4* c. 5461-10T→C mutation in Stargardt disease. *Ophthalmology*, 123(6), pp.1375-1385.
- Sangermano, R., Garanto, A., Khan, M., Runhart, E.H., Bauwens, M., Bax, N.M., van den Born, L.I., Khan, M.I., Cornelis, S.S., Verheij, J.B. and Pott, J.W.R., 2019. Deep-intronic *ABCA4* variants explain missing heritability in Stargardt disease and allow correction of splice defects by antisense oligonucleotides. *Genetics in Medicine*, p.1.
- Schulz, H. L., Grassmann, F., Kellner, U., Spital, G., Ruther, K., Jagle, H., Hufendiek, K., Rating, P., Huchzermeyer, C., Baier, M. J., Weber, B. H. & Stohr, H. Mutation spectrum of the *ABCA4* gene in 335 Stargardt disease patients from a multicenter German cohort-impact of selected deep intronic variants and common SNPs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 394-403 (2017), doi:10.1167/iovs.16-19936.
- van Driel, M. A., Maugeri, A., Klevering, B. J., Hoyng, C. B. & Cremers, F. P. M. ABCR unites what ophthalmologists divide(s). *Ophthalmic Genet.* 19, 117-122 (1998).
- Webster, A. R., Heon, E., Lotery, A. J., Vandenburg, K., Casavant, T. L., Oh, K. T., Beck, G., Fishman, G. A., Lam, B. L., Levin, A., Heckenlively, J. R., Jacobson, S. G., Weleber, R. G., Sheffield, V. C. & Stone, E. M. An analysis of allelic variation in the *ABCA4* gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1179-1189 (2001).
- Zernant, J., Lee, W., Collison, F. T., Fishman, G. A., Sergeev, Y. V., Schuerch, K., Sparrow, J. R., Tsang, S. H. & Allikmets, R. Frequent hypomorphic alleles account for a

significant fraction of *ABCA4* disease and distinguish it from age-related macular degeneration. *J. Med. Genet.* 54, 404-412 (2017), doi:10.1136/jmedgenet-2017-104540.

- 5 Zernant, J., Schubert, C., Im, K. M., Burke, T., Brown, C. M., Fishman, G. A., Tsang, S. H., Gouras, P., Dean, M. & Allikmets, R. Analysis of the *ABCA4* gene by next-generation sequencing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 8479-8487 (2011), doi:10.1167/iovs.11-8182.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга, который связывается и/или комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 4, предпочтительно, антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 9 и 10, более предпочтительно, антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6 и 7, еще более предпочтительно, антисмысловой олигонуклеотид связывается или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 41 и 42.
2. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по п. 1, где нуклеотид в антисмысловом олигонуклеотиде может представлять собой остаток РНК, остаток ДНК или аналог или эквивалент нуклеотида.
3. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по п. 1, где антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от приблизительно 8 до приблизительно 40 нуклеотидов, предпочтительно, от приблизительно 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно, от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно, от приблизительно 16 до приблизительно 23 нуклеотидов, например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида.
4. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по любому из предшествующих пунктов, где антисмысловой олигонуклеотид содержит или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35 и 39.
5. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по любому из пп. 1-4, содержащий по меньшей мере один 2'-О алкил фосфоротионатный антисмысловой олигонуклеотид, например, 2'-О-метил модифицированную рибозу, 2'-О-этил модифицированную рибозу, 2'-О-пропил модифицированную рибозу, и/или замещенные производные указанных модификаций, например, галогенированные производные, предпочтительно,

антисмысловой олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере одну 2'-О пропил модифицированную рибозу.

5 6. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по любому из предшествующих пунктов, содержащий фосфоротиоатный остов.

10 7. Вирусный вектор, экспрессирующий антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга, как определено в любом из пп. 1-4, при помещении в условия, благоприятные для экспрессии молекулы.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по любому из пп. 1-4, или вирусный вектор по п. 7 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

15 9. Фармацевтическая композиция по п. 8, где указанная фармацевтическая композиция применяется для интравитреального введения и дозирована в интервале от 0,05 мг до 5 мг общего количества антисмысловых олигонуклеотидов.

20 10. Фармацевтическая композиция по пп. 8 или 9, где указанная фармацевтическая композиция применяется для интравитреального введения и дозирована в интервале от 0,1 до 1 мг общего количества антисмысловых олигонуклеотидов для перенаправления сплайсинга на глаз, например, около
25 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг общего количества антисмысловых олигонуклеотидов для перенаправления сплайсинга на глаз.

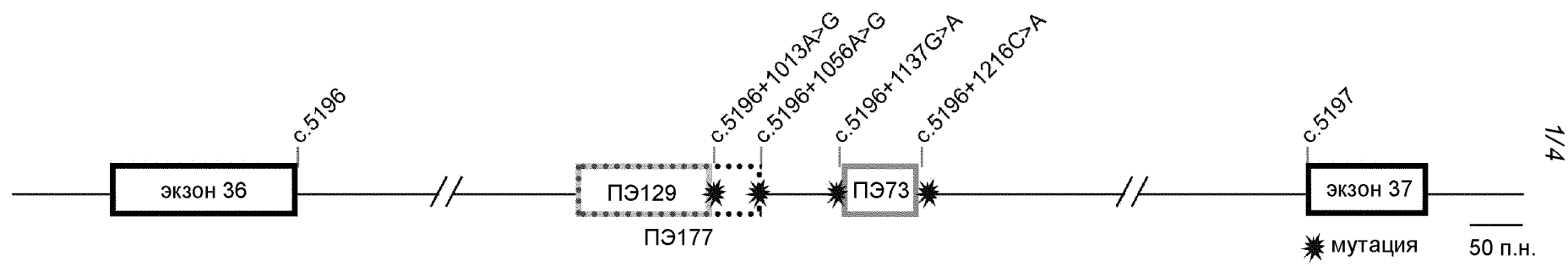
30 11. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по любому из пунктов 1-4, вектор по п. 7 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 8-10 для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для применения в качестве лекарственного средства для лечения ABCA4-ассоциированного заболевания или состояния, требующего модуляции сплайсинга ABCA4.

35 12. Применение антисмыслового олигонуклеотида для перенаправления сплайсинга по пп. 1-4, вектора по п. 7 или фармацевтической композиции по

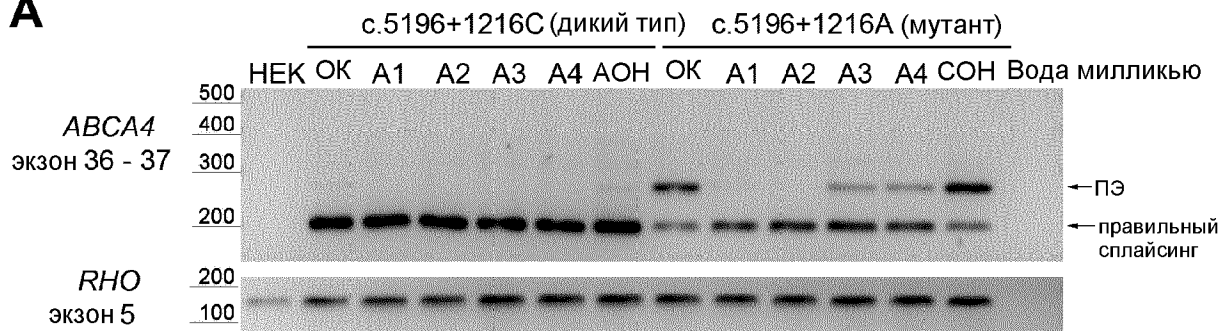
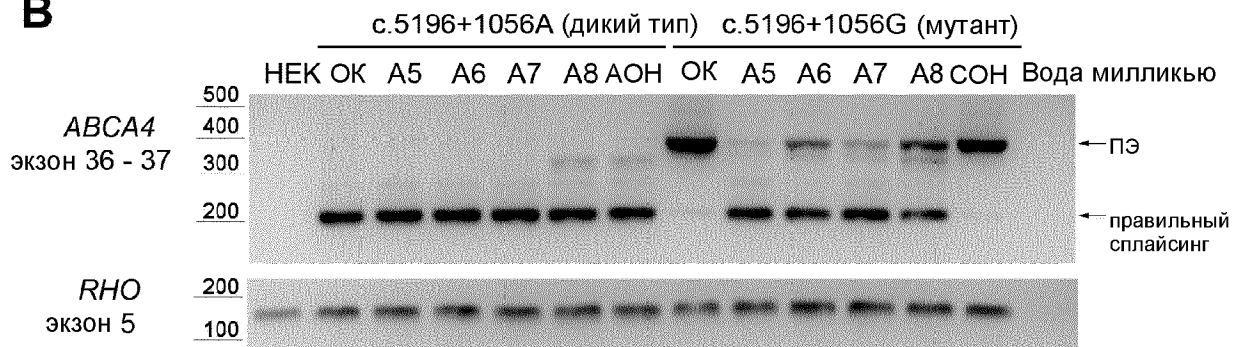
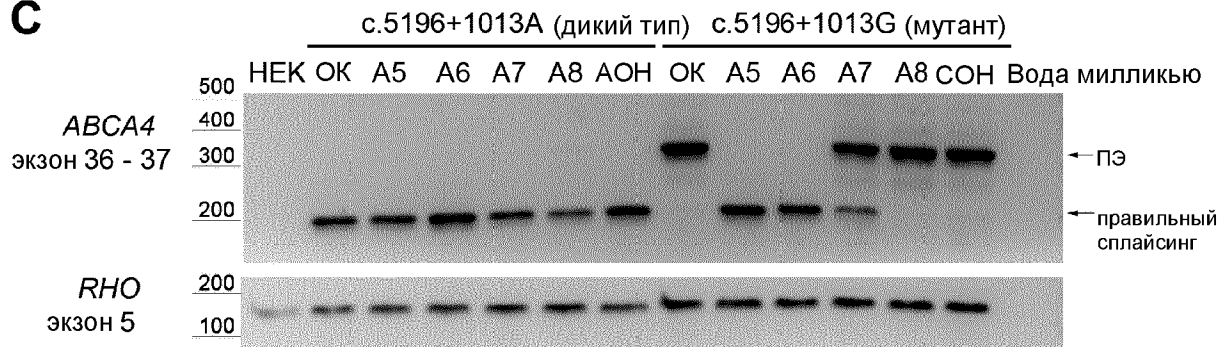
любому из пп. 8-10 для лечения *ABCA4*-ассоциированного заболевания или состояния, требующего модуляции сплайсинга *ABCA4*.

- 5 13. Способ модуляции сплайсинга *ABCA4* в клетке, причем указанный способ включает приведение указанной клетки в контакт с антисмысловым олигонуклеотидом для перенаправления сплайсинга, как определено в любом из пп. 1-4, вектором по п. 7 или фармацевтической композицией по любому из пп. 8-10.
- 10 14. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга для применения по п. 11, применение по п. 12 или способ по п. 13, где *ABCA4*-ассоциированным заболеванием или состоянием является болезнь Штаргардта.

Фиг. 1



Фиг. 3

A**B****C**

Фиг. 4

