

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292568 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.03

(22) Дата подачи заявки
2021.03.11

(51) Int. Cl. *A61K 31/137* (2006.01)
A61K 31/138 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/222 (2006.01)
A61K 31/27 (2006.01)
A61K 31/4168 (2006.01)

(54) ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ NMNAT1-АССОЦИИРОВАННОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ

(31) 62/988,260

(32) 2020.03.11

(33) US

(86) PCT/US2021/021936

(87) WO 2021/183779 2021.09.16

(71) Заявитель:

МАССАЧУСЕТС АЙ ЭНД ИЭР
ИНФЕРМЭРИ; ДЗЕ ШЕПЕНС АЙ
РИСЕРЧ ИНСТИТЮТ, ИНК. (US)

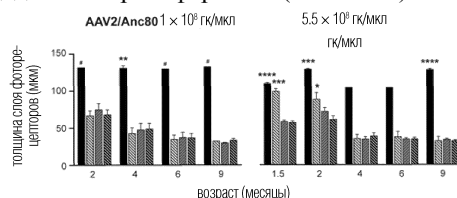
(72) Изобретатель:

Пирс Эрик А., Ванденберге Люк Х.,
Гринвальд Скотт, Браун Эмили (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Способы и композиции для генной терапии дегенерации сетчатки, связанной с мутациями никотинамидмононуклеотидденилитрансферазы 1 (NMNAT1).



A1

202292568

202292568

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575618EA/081

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ NMNAT1-АССОЦИИРОВАННОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ

Заявление об установлении приоритета

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/988260, поданной 11 марта 2020 г. Полное содержание вышеуказанной заявки включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Исследования или разработки, финансируемые из федерального бюджета

Настоящее изобретение было создано при поддержке правительства по гранту № EY012910, предоставленному Национальным институтом здравоохранения. Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для генной терапии дегенерации сетчатки, связанной с мутациями никотинамидмононуклеотидаденилилтрансферазы 1 (NMNAT1).

Предпосылки создания изобретения

NMNAT1-ассоциированная дегенерация сетчатки представляет собой рецессивное заболевание с ранним началом, вызывающее тяжелую потерю зрения¹⁻⁴ в течение первого или второго десятилетия жизни⁵. Пораженный ген, никотинамидмононуклеотидаденилилтрансфераза 1 (NMNAT1), кодирует повсеместно экспрессируемый фермент, необходимый для регенерации NAD^+ в ядрах клеток.^{1,6} Ядерный пул NAD^+ важен для многих клеточных процессов, в том числе связанных с репарацией ДНК, экспрессией генов, передачей клеточных сигналов и клеточным старением.⁷⁻¹⁰ По меньшей мере тридцать четыре мутации в NMNAT1 связаны с дегенерацией сетчатки,^{10,11} каждая из которых, как предполагают, снижает ферментативную активность в различной степени.⁴ Поскольку наследование полностью нефункциональных аллелей *tabtwo* считается летальным для эмбриона на основании исследований на мышах с нокаутом *Nmnat1*, серьезная, но неполная потеря ядерного NAD^+ , вероятно, вызывает заболевание.¹² В то время как две другие NMNAT изоформы, NMNAT2 и NMNAT3, имеют одинаковую функцию NAD^+ синтазы в цитозоле и митохондриях, соответственно,^{8,13} очевидно, что ни одна из них не может компенсировать потерю NMNAT1,¹² по меньшей мере в сетчатке. Изолированную природу этого заболевания можно частично объяснить тем, что, как было недавно обнаружено, нейроны сетчатки мышей *Nmnat1*^{V9M/V9M} той же модели, которую использовали в настоящем исследовании, имеют пониженные уровни NAD^+ (сопровожденные повышенным уровнем предшественника), тогда как уровни в других тканях, включая ткань головного мозга, остаются неизменными (Greenwald et al., RD2018 abstract). Однако основная причина того, что сетчатка имеет эту уникальную уязвимость, остается неясной.

Сущность изобретения

В настоящей заявке представлены способы лечения дегенерации сетчатки, вызванной мутациями в гене никотинамидмононуклеотидаденилилтрансферазы 1 (*NMNAT1*), у человека. Как правило, способы включают доставку в глаз субъекта терапевтически эффективного количества вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), включающего последовательность, кодирующую NMNAT1 человека (например, последовательность по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO:3), функционально связанную с промотором, который управляет экспрессией в клетках сетчатки, предпочтительно в фоторецепторах.

В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой CAG, CASI, CMV, RHO или родопсинкиназный промотор (GRK1).

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая NMNAT1, по меньшей мере на 80% идентична последовательности дикого типа (SEQ ID NO:2) или кодон-оптимизированной последовательности (SEQ ID NO:1).

В некоторых вариантах осуществления вектор доставляется путем субретинальной инъекции.

Также в настоящей заявке представлены способы для повышения экспрессии NMNAT1 в глазу субъекта-человека. Способы включают доставку в глаз субъекта терапевтически эффективного количества вектора на основе аденоассоциированного вируса типа 2 (AAV2), включающего последовательность, кодирующую NMNAT1 человека, функционально связанную с промотором, который управляет экспрессией в сетчатке, предпочтительно в фоторецепторных клетках.

В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой CAG, CASI, CMV, RHO или родопсинкиназный промотор (GRK1).

В некоторых вариантах осуществления последовательность NMNAT1 является кодон-оптимизированной.

В некоторых вариантах осуществления вектор доставляется путем субретинальной инъекции.

Также в настоящей заявке представлен вектор на основе аденоассоциированного вируса типа 2 (AAV2), включающий последовательность, кодирующую NMNAT1 человека, функционально связанную с промотором, который управляет экспрессией в сетчатке, предпочтительно в фоторецепторных клетках.

В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой CAG, CASI, CMV, RHO или родопсинкиназный промотор (GRK1).

В некоторых вариантах осуществления последовательность NMNAT1 является кодон-оптимизированной. В некоторых вариантах осуществления NMNAT1-кодирующая последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности дикого типа (SEQ ID NO:2) или кодон-оптимизированной последовательности (SEQ ID NO:1).

Также представлены фармацевтические композиции, включающие описанные в настоящей заявке векторы, сформулированные для доставки путем субретинальной инъекции.

Векторы и композиции, описанные в настоящей заявке, можно использовать, например, для лечения дегенерации сетчатки, вызванной мутациями в NMNAT1 в глазу субъекта-человека, и/или для повышения экспрессии NMNAT1 в глазу субъекта-человека.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение. В настоящей заявке описаны методы и материалы для использования в настоящем изобретении; также могут быть использованы другие подходящие методы и материалы, известные в данной области. Материалы, методы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Все публикации, патентные заявки, патенты, последовательности, записи баз данных и другие ссылки, приведенные в настоящей заявке, полностью включены в качестве ссылки. В случае противоречий настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу.

Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и чертежей, а также из формулы изобретения.

Описание чертежей

Фиг. 1А-Е. Последовательность трансгена NMNAT1 и вирусные реагенты. А) Кодон-оптимизированная последовательность кДНК NMNAT1 человека из 840 нуклеотидов (черный текст, SEQ ID NO:1) имеет 174 "молчащих" замены (выделены жирным шрифтом), а идентичности соответствующих нуклеотидов дикого типа показаны ниже (WT последовательность представлена в настоящей заявке как SEQ ID NO:2). В) NMNAT1, управляемый промотором CASI и упакованный в SC.AAV2/9, доставляется мышам совместно с репортерной конструкцией EGFP, управляемой тем же промотором, за которой следует WPRE, и упакованной в SS.AAV2/9. С) Идентично панели А, за исключением того, что обе конструкции упакованы в SS.AAV2/9. D) Саморасщепляющаяся слитая конструкция NMNAT1-EGFP, управляемая промотором CAG и за которой следует WPRE, упакована в вектор AAV2/Anc80. Е) NMNAT1, управляемый промотором CASI и упакованный в SS.AAV7m8. Аббревиатуры: bGH - сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста; EGFP - усиленный зеленый флуоресцентный белок; WPRE - посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков; T2A - саморасщепляющаяся последовательность вируса *thossea asigna* 2A.

Фиг. 2. Визуализация *in vivo*. На светлопольных изображениях глазного дна, показывающих сетчатку четырехмесячной мыши *Nmnat1*^{V9M/V9M} после инъекции (левая колонка) и без инъекции (правая колонка), показаны плоскости для измерений слоя фоторецепторов на OCT изображениях. Белые пунктирные линии: нижняя часть сетчатки (проксимально к месту инъекции инъецированной сетчатки); желтая пунктирная линия: верхний слой сетчатки (дистально к месту инъекции инъецированного глаза); стрелка указывает на место инъекции (верхний ряд). EGFP виден только в инъецированной сетчатке (средний ряд). Репрезентативные OCT изображения поперечного сечения, показывающие, что сетчатка после инъекции реагентом SC.AAV2/9 в концентрации 2×10^9

гк/мкл (слева), толще, чем сетчатка без инъекции (справа).

Фиг. 3А-С. Визуализация *in vivo* показывает, что реагент SC.AAV2/9 обеспечивает стабильное структурное восстановление сетчатки. А) Толщина слоя фоторецепторов из ОСТ изображений в девятимесячном возрасте после инъекции реагента SC.AAV2/9 при 1×10^7 гк/мкл, 1×10^8 гк/мкл и 2×10^9 гк/мкл показывают восстановление при более высоких дозах. Сравнения нижней области неинъецированных сетчаток Nmnat1^{V9M/V9M} с нижней и верхней областями инъецированных сетчаток другого глаза и нижней областью неинъецированных контрольных сетчаток однопометников дикого типа (верхний ряд). Измерения толщины слоя фоторецепторов нижней области неинъецированных сетчаток дикого типа по сравнению с верхней и нижней областями инъецированных сетчаток указывают на минимальную токсичность реагента (нижний ряд). В) Измерения толщины слоя фоторецепторов не показали заметного восстановления реагентом SS.AAV2/9 при 1×10^8 гк/мкл в возрасте двух месяцев. С) Измерения толщины слоя фоторецепторов не показали заметного восстановления реагентом AAV2/7m8 при 3×10^8 гк/мкл в возрасте двух месяцев, но измерения толщины слоя фоторецепторов показали временное восстановление с использованием AAV2/Anc80 при $5,5 \times 10^8$ гк/мкл в четырехмесячном возрасте. Планки погрешностей представляют S.E.M.; * $p < 0,05$, ** $p < 0,1$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фиг. 4. Имеющий высокий титр Anc80/Anc80 реагент токсичен для сетчатки. В отличие от неинъецированных мышей дикого типа (первая колонка) и мышей, инъецированных дозой $5,5 \times 10^8$ гк/мкл (вторая колонка), светлопольные изображения глазного дна (верхний ряд), показывающие инъецированную сетчатку дикого типа (третья колонка) и инъецированную сетчатку Nmnat1^{V9M/V9M} (четвертая колонка), показывают образование складок сетчатки и кровоизлияние (красный цвет). Трансдукцию клеток в инъецированных сетчатках подтверждали экспрессией EGFP (средний ряд). У инъецированных мышей ОСТ изображения (нижний ряд) показывают отслоение сетчатки, разрушение слоя нервных волокон сетчатки и клеточную инфильтрацию стекловидного тела (видимую как гиперрефлективные точки непосредственно над слоем нервных волокон сетчатки). Мышей подвергали визуализации в шестинедельном возрасте.

Фиг. 5А-В. Визуализация *ex vivo* показывает структурное восстановление на клеточном уровне в сетчатке обработанных реагентом SC.AAV2/9 мышей. Изображения сетчатки девятимесячных Nmnat1^{V9M/V9M} и мышей дикого типа показаны в левой и правой группе панелей, соответственно. А) Окрашивание гематоксилин-эозином неинъецированных (левая панель) и инъецированных (средняя и правая панели) сетчаток. Средняя и правая панели показывают морфологическую изменчивость, связанную с инъекцией (больше повреждений, средняя панель; меньше повреждений, правая панель) в первичной области трансдукции. Черная стрелка указывает на умеренную неровность краев изображения ONL (наружного ядерного слоя). 40-кратное увеличение, масштабная метка 75 мкм. В) Неинъецированная сетчатка (левая колонка, обе группы панелей) не показывает ни реактивности α -NMNAT1 антитела (красный), ни экспрессии EGFP

(зеленый), тогда как инъецированные сетчатки другого глаза мышей показывают и то, и другое (центральная колонка, обе панели). DAPI представляет собой контрастное окрашивание (синее) на слитых изображениях. Монтажи, показывающие всю полноту каждого среза сетчатки, помечены α -NMNAT1 антителом и контрастно окрашены DAPI (правая панель из групп левой и правой панелей), чтобы показать степень экспрессии трансгена в сетчатке. Белые стрелки указывают место инъекции. 63-кратное увеличение, масштабная метка 50 мкм.

Фиг. 6. Валидация поликлонального антитела против человеческого NMNAT1. В клетках ARPE-19, полученных от человека (верхний ряд) α -NMNAT1 мечение (красный цвет, левая колонка) и DAPI-окрашенные ядра клеток (синий цвет, центральная колонка) локализованы совместно (правая колонка). Сетчатка мышей дикого типа показала минимальную перекрестную реактивность с эндогенным мышинным NMNAT1 (средний ряд). В сетчатке мыши, экспрессирующей NMNAT1 человека, после инъекции AAV иммунореактивность была обнаружена в ядрах клеток (нижний ряд). Увеличение 20х; масштабная метка: 100 мкм.

Фиг. 7А-В. ERG показывает сохранение функции сетчатки при обработке реагентом SC.AAV2/9. А) Сетчатки от мышей $Nmnat1^{V9M/V9M}$, обработанных дозой 2×10^9 гк/мкл SC.AAV2/9, показывают значительно бóльшие палочковые, смешанные палочко-колбочковые и колбочковые отдельные ERG, чем необработанные сетчатки другого глаза мышей, как измерено по b-волне ERG. Измерения из неинъецированных сетчаток $Nmnat1^{V9M/V9M}$ сравнивают с инъецированными сетчатками другого глаза мышей и с неинъецированными и инъецированными сетчатками мышей дикого типа (верхний ряд). Репрезентативные формы волны ERG от шестимесячной обработанной мыши $Nmnat1^{V9M/V9M}$ (обработанная сетчатка, серый след; необработанная сетчатка, светло-серый след) и однопометника дикого типа такого же возраста (черный след) (нижний ряд). В) ERG измерения до девяти месяцев у мышей, инъецированных SC.AAV2/9 при дозе 1×10^8 гк/мкл, показывают более слабый уровень восстановления, чем для дозы 2×10^9 гк/мкл (верхний ряд), и ERG измерения до возраста 4 месяцев с AAV2/Anc80 при дозе $5,5 \times 10^8$ гк/мкл указывают на отсутствие эффективности (нижний ряд). Планки погрешностей представляют S.E.M.; * $p < 0,05$, ** $p < 0,1$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фиг. 8А-С. Для успешной терапии необходима ранняя экспрессия трансгена в фоторецепторах. А) Через 14 дней после инъекции в сетчатку (особенно в ONL), инъецированной реагентом SC.AAV2/9 (левая колонка), наблюдали плотную иммунореактивность α -NMNAT1 (красный цвет), тогда как этот сигнал был разреженным в сетчатке соответствующего возраста, инъецированной либо реагентом SS.AAV2/9 (центральная колонка), либо реагентом AA2/Anc80 (правая колонка). 40-кратное увеличение, масштабная метка 75 мкм. В) Репрезентативная сетчатка от 5,5-недельной мыши дикого типа, инъецированной AAV2/Anc80 в р1, показывает сильную иммунореактивность α -NMNAT1 (красный цвет) практически во всех типах клеток, кроме палочковых фоторецепторов. Верхний ряд меченных клеток в ONL являются колбочками

(между стрелками), а DAPI (синий цвет) представляет собой контрастное окрашивание. 20-кратное увеличение, масштабная метка представляет собой 100 мкм. С) Интравитреальная инъекция AAV2/7m8 (3×10^8 гк/мкл) в двухнедельном возрасте контрольной мыши вызывает сильную экспрессию NMNAT1 (красный цвет) в INL и GCL, но не в ONL, через четыре недели после инъекции. DAPI представляет собой контрастное окрашивание; 20-кратное увеличение, масштабная метка 100 мкм.

Подробное описание изобретения

В настоящее время не существует лечения NMNAT1-ассоциированной дегенерации сетчатки. Поскольку у пациентов происходит значительная потеря зрения в течение первых лет жизни, но ожидается, что они будут иметь нормальную продолжительность жизни, то раннее вмешательство может сохранить зрение на многие десятилетия. Поскольку это заболевание имеет рецессивный тип наследования¹⁰ и поскольку NMNAT1 является относительно небольшим геном¹⁴, лечение с использованием аденоассоциированный вирус (AAV)-опосредованной терапии генной аугментации является привлекательной стратегией. При размере 840 п.н. кДНК NMNAT1 человека находится в пределах максимальной емкости $\sim 4,7$ т.п.н. для одноцепочечного AAV (SS.AAV)¹⁵ и максимальной емкости $\sim 2,2$ т.п.н. для самокомплементарного AAV (SC.AAV)¹⁶. Этот подход добавления к клеткам нормальной копии мутантного гена через AAV вектор для поддержания жизнеспособности клеток сетчатки в настоящее время используется в качестве одобренной FDA терапии (Luxturna) у пациентов для лечения RPE65-ассоциированной дегенерации сетчатки¹⁷. Кроме того, в настоящее время продолжаются клинические испытания AAV-опосредованной терапии генной аугментации при хориодеремии,¹⁸ ахроматопсии (clinicaltrials.gov, по состоянию на 11/7/2019), MERTK-пигментном ретините,¹⁹ X-сцепленном пигментном ретините (recruting, clinicaltrials.gov, по состоянию на 11/7/2019) и X-сцепленном ретиношизисе,²⁰ среди прочих,¹⁵ а также многочисленные доклинические исследования других наследственных дегенераций сетчатки²¹⁻²⁴.

Когда в 2012 году впервые было сообщено о NMNAT1 как о гене заболевания, не было подходящей животной модели для оценки потенциальных методов лечения *in situ*. Традиционные мыши с *Nmnat1*-нокаутом были нежизнеспособны,¹² и животные с условным нокаутом с удаленным *Nmnat1* в клетках-мишенях сетчатки не отражали бы точно физиологию заболевания. Авторы изобретения недавно сообщили о характеристике мышинной модели NMNAT1-ассоциированного заболевания сетчатки, которая является гомозиготной по мутации p.Val9Met (V9M) в *Nmnat1*,²⁵ аллеле, который, как было обнаружено, вызывает заболевание сетчатки у членов неродственных семей.^{4,10} Основатель этой мышинной линии был идентифицирован в процессе скрининга мутагенеза ENU. У гомозиготного мутантного потомства (*Nmnat1*^{V9M/V9M}) неизменно развивается изолированное заболевание сетчатки с ранним началом без очевидного ущерба для продолжительности жизни, подвижности или когнитивных функций, как и у людей, которых они моделируют. Мыши *Nmnat1*^{V9M/V9M} имеют полностью зрелую сетчатку и

стабильную реакцию на свет, как определено на основании электроретинограммы (ERG), в возрасте трех недель, но через неделю в слое фоторецепторов появляются признаки дегенерации, сопровождающиеся снижением функции. Примерно к четырем месяцам сетчатка сильно дегенерирует, и реакция на свет часто не определяется.²⁵ Учитывая, что мутация у этой мыши присутствует в популяции пациентов и есть возможность вмешательства в течение первого месяца жизни, эта модель подходит для тестирования терапий, направленных на защиту сетчатки от NMNAT1-ассоциированного заболевания.

С целью разработки терапии для сохранения зрения у людей с *Nmnat1*-ассоциированной дегенерацией сетчатки, авторы изобретения использовали мышиную модель *p.V9M-Nmnat1* для проверки гипотезы, что обеспечение клеток сетчатки нормальной копией NMNAT1 предотвращает прогрессирование заболевания. Для этого кДНК NMNAT1 человека доставляли в сетчатку мышей *Nmnat1*^{V9M/V9M} посредством нескольких рекомбинантных векторов AAV2, которые независимо оценивали. Эффективность варьировалась в зависимости от вирусных препаратов и экспериментальных условий, и поэтому авторы изобретения стремились понять, почему определенные переменные были связаны с успехом или неудачей, и как эти уроки могут быть обобщены, чтобы помочь в разработке других AAV-опосредованных генных терапий.

Морфологические и функциональные данные, полученные от мышей *Nmnat1*^{V9M/V9M}, получавших лечение с использованием AAV-опосредованной генной аугментации, являются первой демонстрацией любого типа терапии, направленной на NMNAT1-ассоциированную дегенерацию сетчатки. Из-за узкого терапевтического окна в этой мышинной модели потребовался самокомплементарный вирусный вектор, чтобы трансген экспрессировался достаточно рано для спасения уязвимых клеток. Самокомплементарный AAV отличается от одноцепочечного вектора тем, что он содержит геном с инвертированным повтором, который складывается, образуя двухцепочечную ДНК.⁴² Таким образом, вирус способен обходить ограничивающую скорость стадию синтеза второй цепи ДНК, которая обычно требуется перед экспрессией трансгена^{31, 43}, а также обходить геномную нестабильность вектора, которая быстро следует за репликацией ДНК.⁴⁴ Кроме того, самокомплементарные векторы не требуют ни транспорта в ядро, ни сбрасывания оболочки из капсида перед экспрессией трансгена.¹⁶ В этой модели одноцепочечные векторы, включая тот, который имел тот же AAV серотип/капсид (AAV2/9) и содержал идентичную геномную нагрузку, дали неблагоприятные результаты; однако такие одноцепочечные векторы могут быть использованы для других видов, включая человека.

Терапевтическое окно мышей *Nmnat1*^{V9M/V9M} было ограничено биологией развития палочковых фоторецепторов⁴⁵ на ранней стороне и началом дегенерации в возрасте немногим менее четырех недель на поздней стороне.²⁵ Логично предположить, что как можно более раннее вмешательство было бы предпочтительным, подразумевая лечение сразу после рождения. Однако наблюдение, что палочки не демонстрируют сильную

экспрессию трансгена после неонатальных инъекций, согласуется с недавними сообщениями других групп, описывающих, что развивающиеся палочковые фоторецепторы у P0-P1 мышей не могут быть трансдуцированы AAV.^{45,46} Необходимость экспрессии трансгена в фоторецепторах стала ясной в ходе эксперимента, в котором двухнедельным мышам вводили интравитреальные инъекции AAV2/7m8. Это лечение не дало терапевтического эффекта, несмотря на сильный и широкий охват внутренних слоев клеток сетчатки. Используя самокомплементарный AAV5, Petit et al. сообщили о трансдукции примерно в два раза больше палочек, если инъекцию осуществляют в P21, а не в P10.⁴⁵

Однако, поскольку SC.AAV2/9 требуется более одной недели для экспрессии NMNAT1 в сетчатке мыши, отсрочка вмешательства до P21 позволила бы бесспорно прогрессировать заболеванию в течение периода инкубации вируса. Вместо этого инъекции осуществляли на ~P16, что давало время, необходимое для инициации экспрессии трансгена, при этом сохраняя возможность трансдукции значительной части популяции палочек. В этом случае количество фоторецепторов, которые были сохранены в результате лечения, было достаточным для поддержания ~80% толщины ONL по сравнению с однопометниками дикого типа того же возраста. Следует отметить, что, хотя это сохранение структуры сетчатки было незамедлительным, восстановление функции не было заметно по ERG до 3,5 месяцев после инъекции.

В способах по настоящему изобретению доставку осуществляют во время терапевтического окна у пациентов-людей. Восстановленные сетчатки у мышей *Nmnat1*^{V9M/V9M} показали сохранение функции колбочковых и палочковых фоторецепторов, которая была стабильной на протяжении месяцев. В то время как ERG данные для глаз, обработанных SC.AAV2/9, составляли примерно пятьдесят процентов от того, что было измерено в неинъектированных сетчатках дикого типа, эта разница согласуется с предыдущими наблюдениями, что субретинальные инъекции ослабляют ERG ответ, вероятно, из-за механического повреждения, полученного во время хирургической процедуры.⁵⁰ Эта возможность подтверждается тем фактом, что инъектированные сетчатки однопометников дикого типа также имели тенденцию к уменьшению амплитуды b-волны, хотя обычно менее выраженному, и имели области, в которых слой фоторецепторов был тоньше после инъекции. Кроме того, дегенерация фоторецепторов, которая, по-видимому, произошла во время инкубационного периода вируса, также могла способствовать снижению сигнала. Альтернативная гипотеза состоит в том, что некоторые клетки были увеличены так, что они сверхэкспрессировали NMNAT1, и что это несовместимо с жизнеспособностью. Однако причина такого эффекта насыщения на терапевтический индекс для дополнения NMNAT1/NAD⁺ не очевидна. У мутантных мышей самая высокая доза (2×10⁹ гк/мкл) реагента давала наилучший результат, но из-за производственных ограничений было невозможно проверить эффекты еще более высоких доз.

В способах по настоящему изобретению можно использовать универсально активирующие промоторы или клеточные типоспецифические промоторы.

Характеристика мышинной модели p.V9M-Nmnat1 показала, что фоторецепторы были первыми клетками, поражаемыми болезнью, за которыми следуют внутренние клетки сетчатки и RPE,²⁵ и авторы изобретения знают из описанных в настоящей заявке экспериментов, что фоторецепторы необходимо лечить, если сетчатка должна быть сохранена. Таким образом, в некоторых способах для сохранения сетчатки используют фоторецептор-специфический промотор. Однако другие типы клеток могут дегенерировать медленнее в ответ на низкий уровень NAD^+ в ядре, вызывая вторичную дегенерацию, которую нельзя уменьшить лечением только фоторецепторов. В этом случае можно было бы использовать ганглионарные клетки, биполярные и специфичные для глиии Мюллера промоторы.

Как показано в настоящей заявке, иллюстративный реагент SC.AAV2/9 с CASI, который управляет экспрессией NMNAT1, продемонстрировал успешное использование терапии генной аугментации у пациентов с NMNAT1-ассоциированной дегенерацией сетчатки. В некоторых вариантах осуществления оптимальной стратегией является быстрое инициирование экспрессии трансгена с использованием самокомплементарного вектора.

Эта терапия может обеспечить зрение на многие десятилетия людям во всем мире, которые в противном случае пострадали бы от серьезной ранней потери зрения.

Векторы

В настоящей заявке описаны целевые векторы экспрессии для трансфекции *in vivo* и экспрессии полинуклеотида, который кодирует полипептид NMNAT1, как описано в настоящей заявке, в сетчатке, например в фоторецепторах, например преимущественно или только в фоторецепторах. В некоторых вариантах осуществления экспрессия также происходит во внутренних клетках сетчатки или клетках RPE. Экспрессионные конструкции таких компонентов можно вводить в любом эффективном носителе, например в любом составе или композиции, способной эффективно доставлять ген компонента в клетки *in vivo*. Подходы включают вставку гена в вирусные векторы, включая рекомбинантные ретровирусы, аденовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус и вирус простого герпеса-1, альфавирус, вирус коровьей оспы или рекомбинантные бактериальные или эукариотические плазмиды; предпочтительным вирусным вектором является аденоассоциированный вирус типа 2 (AAV2). Вирусные векторы трансфицируют клетки непосредственно; плазмидная ДНК может быть доставлена в чистом виде или при помощи, например, катионных липосом (липофектамина) или дериватизированных (например, конъюгированных с антителами), катионных дендримеров, неорганических векторов (например, магнитофекцией на основе оксида железа), липидоидов, проникающих в клетку пептидов, циклодекстринового полимера (CDP), полилизиновых конъюгатов, грамацидина S, искусственных вирусных оболочек или других подобных внутриклеточных носителей, а также прямой инъекцией генной конструкции или преципитацией CaPO_4 , осуществляемой *in vivo*.

Иллюстративный подход для введения нуклеиновой кислоты в клетку *in vivo*

представляет собой использование вирусного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, например кДНК. Инфицирование клеток вирусным вектором имеет то преимущество, что большая часть клеток-мишеней может получать нуклеиновую кислоту. Кроме того, молекулы, кодированные в вирусном векторе, например посредством кДНК, содержащейся в вирусном векторе, эффективно экспрессируются в клетках, которые поглощают нуклеиновую кислоту вирусного вектора.

Вирусные векторы можно использовать в качестве системы доставки рекомбинантных генов для переноса экзогенных генов *in vivo*, в частности людям. Эти векторы обеспечивают эффективную доставку генов в клетки, а в ряде случаев перенесенные нуклеиновые кислоты стабильно интегрируются в хромосомную ДНК хозяина. Протоколы для получения рекомбинантных вирусов и инфицирования клеток *in vitro* или *in vivo* такими вирусами можно найти в Ausubel, et al., eds., *Gene Therapy Protocols Volume 1: Production and In Vivo Applications of Gene Transfer Vectors*, Humana Press, (2008), pp. 1-32 и других стандартных лабораторных руководствах.

Предпочтительной вирусной векторной системой, применимой для доставки нуклеиновых кислот, является аденоассоциированный вирус (AAV). Аденоассоциированный вирус представляет собой встречающийся в природе дефектный вирус, которому требуется другой вирус, такой как аденовирус или вирус герпеса, в качестве вируса-помощника для эффективной репликации и продуктивного жизненного цикла. (См. обзор в Muzyczka et al., *Curr. Topics in Micro and Immunol.* 158:97-129 (1992); см. также Domenger and Grimm, *Human Molecular Genetics*, 28(R1):R3-R14 (October 2019)). AAV векторы эффективно трансдуцируют различные типы клеток и могут вызывать длительную экспрессию трансгенов *in vivo*. Хотя AAV векторные геномы могут сохраняться внутри клеток в виде эписом, наблюдается векторная интеграция (см., например, Deyle and Russell, *Curr Opin Mol Ther.* 2009 Aug; 11(4): 442-447; Asokan et al., *Mol Ther.* 2012 April; 20(4): 699-708; Flotte et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356 (1992); Samulski et al., *J. Virol.* 63:3822-3828 (1989); and McLaughlin et al., *J. Virol.* 62:1963-1973 (1989)). AAV векторы, особенно AAV2, широко использовались для аугментации или замены генов и показали терапевтическую эффективность в ряде животных моделей, а также в клинике; см., например, Mingozzi and High, *Nature Reviews Genetics* 12, 341-355 (2011); Deyle and Russell, *Curr Opin Mol Ther.* 2009 Aug; 11(4): 442-447; Asokan et al., *Mol Ther.* 2012 April; 20(4): 699-708. AAV векторы, содержащие всего 300 пар оснований AAV, могут быть упакованы и могут обеспечивать экспрессию рекомбинантного белка. Пространство для экзогенной ДНК ограничено примерно 4,5 т.п.н. Например, AAV1, 2, 4, 5 или 8 вектор можно использовать для введения ДНК в сетчатку, например в фоторецепторы, внутренние клетки сетчатки или клетки RPE (например, описанные в Maguire et al. (2008). *Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis.* *N Engl J Med* 358: 2240-2248. Maguire et al. (2009). *Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial.* *Lancet* 374: 1597-1605; Bainbridge et al. (2008). *Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital*

amaurosis. N Engl J Med 358: 2231-2239; Hauswirth et al. (2008). Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. Hum Gene Ther 19: 979-990; Cideciyan et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. Proc Natl Acad Sci USA 105: 15112-15117. Cideciyan et al. (2009). Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 361: 725-727; Simonelli et al. (2010). Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. Mol Ther 18: 643-650; Acland, et al. (2005). Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. Mol Ther 12: 1072-1082; Le Meur et al. (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. Gene Ther 14: 292-303; Stieger et al. (2008). Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. Mol Ther 16: 916-923; and Vandenberghe et al. (2011). Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. Sci Transl Med 3: 88ra54). В некоторых вариантах осуществления AAV вектор может включать (или включать последовательность, кодирующую) AAV капсидный полипептид, описанный в WO 2015054653; например, вирусную частицу, содержащую AAV капсидный полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 17, из WO 2015054653, и NMNAT1-кодирующую последовательность, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления AAV капсидный полипептид представлен в Таблице 1 WO 2015054653, воспроизведенной ниже:

Таблица 1

Узел	Полипептид (SEQ ID NO)	Нуклеиновая кислота (SEQ ID NO)
Anc80	1	2
Anc81	3	4
Anc82	5	6
Anc83	7	8
Anc84	9	10
Anc94	11	12
Anc113	13	14
Anc126	15	16
Anc127	17	18

В некоторых вариантах осуществления AAV капсидный полипептид представляет собой полипептид Anc80, например иллюстративный полипептид, показанный в SEQ ID NO: 19 (Anc80L27); SEQ ID NO: 20 (Anc80L59); SEQ ID NO: 21 (Anc80L60); SEQ ID NO: 22 (Anc80L62); SEQ ID NO: 23 (Anc80L65); SEQ ID NO: 24 (Anc80L33); SEQ ID NO: 25 (Anc80L36); и SEQ ID NO:26 (Anc80L44).

Различные нуклеиновые кислоты вводили в различные типы клеток с использованием AAV векторов (см., например, ссылки, приведенные выше, и ссылки, процитированные в Asokan et al., Molecular Therapy (2012); 20 4, 699-708; и Hermonat et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1985); Wondisford et al., Mol. Endocrinol. 2:32-39 (1988); Tratschin et al., J. Virol. 51:611-619 (1984); и Flotte et al., J. Biol. Chem. 268:3781-3790 (1993).

В некоторых вариантах осуществления используют самокомплементарный AAV, который содержит геном с инвертированным повтором, который складывается с образованием двухцепочечной ДНК.

В некоторых вариантах осуществления ген, кодирующий NMNAT1, заключен в липосомы, несущие положительный заряд на своей поверхности (например, липофектины), которые могут быть помечены антителами против антигенов клеточной поверхности ткани-мишени (Mizuno et al., No Shinkei Geka 20:547-551 (1992); публикация РСТ WO 91/06309; заявка на патент Японии 1047381; и публикация европейского патента EP-A-43075).

Векторы также могут включать промоторы, энхансеры (например, CMV энхансер), другие цис-регуляторные элементы и/или варианты серотипа капсида. Что касается промоторов, векторы могут включать промоторы, которые управляют экспрессией во многих типах клеток (например, CAG, CMV или CASI) и фоторецепторных клетках (RHO, родопсинкиназа (GRK1) и колбочковый аррестин (CAR)) или RPE клетках (например, промоторы для RPE-специфических белков, таких как VMD2, RPE65, RLBP1, RGR или TIMP3) (Esumi et al., Journal Biological Chemistry. 2004;279:19064-73; Guziewicz et al., PLoS One. 2013;8:e75666; Allocca et al., J Virol. 2007;81:11372-80; см. также Domenger and Grimm, Human Molecular Genetics, 28(R1):R3-R14 (October 2019)). Можно также использовать синтетические промоторы ProC1 и ProD5, см., например, Jüttner et al.. Nat Neurosci. 2019 Aug;22(8):1345-1356. Другие цис-регуляторные элементы могут включать посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE) или интрон минутного вируса мышей (MVM) (см. Domenger and Grimm, Human Molecular Genetics, 28(R1):R3-R14 (October 2019)).

Фармацевтический препарат геннотерапевтической конструкции может состоять в основном из системы доставки гена (вирусный вектор и любые ассоциированные агенты, такие как хелперные вирусы, белки, липиды и т.д.) в приемлемом разбавителе или может включать матрицу с медленным высвобождением, в которую встроен носитель доставки генов. Альтернативно, когда полная система доставки генов может быть получена интактной из рекомбинантных клеток, например ретровирусных векторов, фармацевтический препарат может содержать одну или несколько клеток, которые продуцируют систему доставки генов.

Последовательности

Способы по настоящему изобретению включают доставку последовательностей, кодирующих NMNAT1 человека. Примеры последовательностей никотинамиднуклеотидаденилилтрансферазы 1 (NMNAT1) человека показаны в следующей таблице:

Транскрипт	Белок	Кодируемая	Вариант
------------	-------	------------	---------

		изоформа	
4	NM_022787.	NP_073624.2	изоформа 1
78.1	NM_0012977	NP_00128470	изоформа 1
79.2	NM_0012977	NP_00128470	изоформа 2

Вариант 1 кодирует более длинную изоформу (1). Вариант (2) отличается по 5'-UTR от варианта 1. Варианты 1 и 2 кодируют одну и ту же изоформу (1). Вариант (3) не имеет экзона и содержит альтернативный 3'-концевой экзон, что приводит к другой 3'-кодирующей области и 3'-UTR по сравнению с вариантом 1. Кодированная изоформа (2) имеет отличимый С-конец и короче, чем изоформа 1.

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая NMNAT1, включает SEQ ID NO:2 или последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO:2.

Последовательность, кодирующая NMNAT1 человека

atggaaaattccgagaagactgaagtgggtctccttgcttggttcattcaatcccatcaccaacatgcacctcaggttggtgagc
 tggccaaggactacatgaatggaacaggaaggtacacagttgtcaaaggcatcatctcctgttggtgatgcctacaagaagaaggact
 cattctgcctatcacccgggtcatcatggcagaacttgctaccaagaattctaaatgggtggaagtgatacatgggaaagtctcagaagga
 gtggaagagactctgaaggtgctaagacacatcaagagaaattggaggctagtactgtgatcaccagcagaactcacctactctaga
 aggcctggaaggaagaggaagtgactgaaacacaagattctagtcaaaagaaatccctagagccaaaaacaaaagctgtgccaaaggt
 caagctgctgtgtggggcagattattggagtccttgctgttcccaatttggaagagtgaagacatcacccaaatcgtggccaactatggg
 ctcatatgtgttactcgggctggaaatgatgctcagaagttatctatgaatcggatgtgctgtggaacaccggagcaacattcacgtggtga
 atgaatggatcgctaatacatctcatccaaaaatccggagagccctcagaaggggcccagagcattcgctacttggtaccagatctgtc
 caagaatacattgaaaagcataattgtacagctctgagagtgaagacaggaatgctgggggtcatcctggccccttgagagaaacactgc
 agaagctaagacatag (SEQ ID NO:2)

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая NMNAT1, может быть кодон-оптимизированной, чтобы ее можно было более эффективно транслировать в аминокислотную последовательность. Таблицы использования кодонов для различных организмов известны в данной области. Типичная кодон-оптимизированная последовательность, кодирующая NMNAT1, представлена на Фиг. 1A/SEQ ID NO:1.

Последовательности, используемые в способах по настоящему изобретению, векторах и композициях, включают те, которые кодируют белок NMNAT1 человека или белок, который по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичен белку NMNAT1 человека. Типичная последовательность белка NMNAT1 человека представлена в NP_073624.2 и показана в настоящей заявке как SEQ ID NO:3.

Пример последовательности белка NMAT1 человека

MENSEKTEVLLACGSFNPITNMHLRLFELAKDYMNNGTGRYTVVKGIIISPVGDA
 YKKKGLIPAYHRVIMAEATKNSKWVEVDTWESLQKEWKETLKVLRHHQEKLEASDC
 DHQQNSPTLERPGRKRKWTETQDSSQKKSLEPKTKAVPKVKLLCGADLLESFAVPNLW

KSEDTQIVANYGLICVTRAGNDAQKFIYESDVLWKHRSNIHVNEWIANDISSTKIRRALRRGQSIRYLVDPDLVQEYIEKHNLYSSESEDRNAGVILAPLQRNTAEAKT (SEQ ID NO:3)

В некоторых вариантах осуществления можно использовать изоформу 2 белка NMNAT1 человека, например, как представлено в GenBank Ref. No. NP_001284708.1.

Белок NMNAT1 человека может включать одну или несколько мутаций, например, мутации до 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20% остатков. Такие варианты должны сохранять активность белка дикого типа, например способность участвовать в регенерации NAD^+ в ядрах клеток. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой консервативную замену. Такие изменения включают использование изолейцина (I), валина (V) и лейцина (L) вместо любой другой из этих гидрофобных аминокислот; аспарагиновой кислоты (D) вместо глутаминовой кислоты (E) и наоборот; глутамина (Q) вместо аспарагина (N) и наоборот; и серина (S) вместо треонина (T) и наоборот. Другие замены также можно считать консервативными, в зависимости от окружения конкретной аминокислоты и ее роли в трехмерной структуре белка. Например, глицин (G) и аланин (A) часто могут быть взаимозаменяемыми, как и аланин (A) и валин (V). Метионин (M), который является относительно гидрофобным, часто может быть взаимозаменяемым с лейцином и изолейцином, а иногда и с валином. Лизин (K) и аргинин (R) часто являются взаимозаменяемыми в положениях, в которых существенным признаком аминокислотного остатка является его заряд, а различные значения pK этих двух аминокислотных остатков не имеют значения. Другие изменения можно считать "консервативными" в определенных окружениях (см., например, Таблицу III в US20110201052; стр. 13-15 "Biochemistry" 2nd ED. Stryer ed (Stanford University); Henikoff et al., PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei et al., J Biol Chem 1995 May 19; 270(20):11882-6).

Чтобы определить процент идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновых кислот, последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, гэпы могут быть введены в одну или обе из первой и второй последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания, а негомологичные последовательности можно не учитывать для целей сравнения). В предпочтительном варианте осуществления длина эталонной последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 80% от длины эталонной последовательности, а в некоторых вариантах осуществления составляет по меньшей мере 90% или 100%. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы идентичны в этом положении (как используется в настоящей заявке, "идентичность" аминокислот или нуклеиновых кислот эквивалентна "гомологии" аминокислот или нуклеиновых кислот). Процентная идентичность между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей, с учетом количества

гэпов и длины каждого гэта, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществить с использованием математического алгоритма. Например, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша ((1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453), который был включен в программу GAP в пакете программ GCG (доступном во всемирной сети на сайте gcg.com) с использованием параметров по умолчанию, например, матрица оценок Blossum 62 со штрафом за гэт 12, штрафом за удлинение гэта 4 и штрафом за сдвиг рамки 5.

Способы

В клинических условиях векторы можно вводить субъекту любым из ряда способов, каждый из которых известен в данной области. Хотя могут быть использованы и другие способы, в некоторых вариантах осуществления предпочтительным путем доставки геннотерапевтических векторов в сетчатку является субретинальная инъекция. Это обеспечивает доступ к RPE и фоторецепторным клеткам сетчатки. Было показано, что различные серотипы AAV эффективно трансдуцируют эти клеточные популяции после субретинальной инъекции в исследованиях на животных (Vandenberghe et al., *PLoS One*. 2013;8:e53463. PMID: 3559681; Vandenberghe and Auricchio, *Gene Therapy*. 2012;19:162-8; Vandenberghe et al., *Science translational medicine*. 2011;3:88ra54; Dinculescu et al., *HumGene Ther.* 2005;16:649-63; Boye et al., *Mol Ther.* 2013;21:509-19; Alexander and Hauswirth, *Adv Exp Med Biol.* 2008;613:121-8). Подход на основе субретинальной инъекции используется в текущих клинических испытаниях терапии генной аугментации для дегенерации сетчатки, вызванной генетическим заболеванием с мутациями в генах RPE65 и CNM (Maguire et al., *New England Journal of Medicine*. 2008;358:2240-8; Bainbridge et al., *New England Journal of Medicine*. 2008;358:2231-9; Cideciyan et al., *Proceedings National Academy Sciences USA*. 2008;105:15112-7; Maguire et al., *Lancet*. 2009;374:1597-605; Jacobson et al., *Archives Ophthalmology*. 2012;130:9-24; Bennett et al., *Science translational medicine*. 2012;4:120ra15; MacLaren et al., *Lancet*. 2014;383:1129-37). Субретинальные инъекции можно вводить с использованием стандартного хирургического подхода (например, как описано в Maguire et al., 2008, выше; Bainbridge et al., 2008, выше; Cideciyan et al., 2008, выше; MacLaren et al., 2014, выше).

Субъекты

Способы по настоящему изобретению можно использовать для лечения субъектов с NMNAT1-ассоциированной ретинопатией/дегенерацией сетчатки, например, врожденным амаврозом Лебера или тяжелой дистрофией сетчатки с ранним началом (EOSRD). Такие субъекты могут быть идентифицированы специалистом в данной области и на основании диагноза, подтвержденного генетическим тестированием (например, секвенированием для выявления наличия мутации в гене NMNAT1 субъекта). См., например, Kumaran et al., "Leber Congenital Amaurosis/Early-Onset Severe Retinal Dystrophy

Overview” in Gene Reviews, Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020; Kumaran et al., Retin Cases Brief Rep. 2018 Jul 11. doi: 10.1097/ICB.0000000000000754.

ПРИМЕРЫ

Изобретение далее описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

Материалы и методы

В приведенных ниже примерах использовали следующие материалы и методы.

Мышиные линии

Мышиную линию p.V9M-Nmnat1 получали ранее в результате скрининга мутагенеза с использованием N-этил-N-нитрозомочевина (ENU).²⁵ С целью повышения плодовитости исходную линию C57Bl/6J поочередно скрещивали с мышами 129S6/SvEvTac дикого типа (Taconic, Rensselaer, NY) и мышами C57BL/6J дикого типа (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) для поддержания смешанного генетического фона C57Bl/6J-129S6. Мышей дикого типа CD1-IGS (Charles River, Wilmington, MA), которых использовали только для скрининга на токсичность компонентов реагентов, содержали отдельно. Самцов и самок мышей использовали в экспериментах без предпочтения.

Содержание животных

Мышей разводили и содержали в учреждении по уходу за животными Научно-исследовательского института глаз Шепенса, где они получали корм для грызунов с 4% содержанием жира и воду без ограничений, и их содержали в условиях с циклом 12 часов свет/12 часов темнота. Это исследование соответствовало Заявлению Ассоциации по исследованиям зрения и офтальмологии об использовании животных в исследованиях в области офтальмологии и зрения, и все процедуры были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Научно-исследовательского института глаза Шепенса.

Генотипирование

Биопсию ткани получали для полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием буфера для лизиса Allele-In-One Mouse Tail Direct Lysis Buffer (Allele Biotech, San Diego, CA) в соответствии с инструкциями изготовителя. ПЦР осуществляли с использованием прямого праймера 5'-CATGGCTGTGCTGAGGTG-3' (интрон 1; SEQ ID NO:4) и обратного праймера 5'-AACAGCCTGAGGTGCATGTT-3' (экзон 2; SEQ ID NO:5) для амплификации 691 п.н. области Nmnat1, которая включает кодон 9. Реакции ПЦР объемом 20 мкл имели конечные концентрации 200 мкмоль/л для каждого праймера, 200 нмоль/л для каждого из dNTP (dATP, dGTP, dTTP и dCTP), 2 ммоль/л MgCl₂ и 1 единицу ДНК-полимеразы Hot FirePol (Solis BioDyne, Tartu, Estonia). Протокол термоциклирования был следующим: 95°C в течение 14 минут; 30 циклов: 95°C в течение 45 секунд, 53°C в течение 45 секунд, 72°C в течение 30 секунд; 72°C в течение 7 минут. Далее амплифицированный продукт подвергали секвенированию по Сэнгеру с использованием праймера 5'-ACGTATTTGCCCCACCTGTCT-3'; SEQ ID NO:6, и электрофореграммы

анализировали при с.25 для идентификации каждой мыши как мыши дикого типа, гетерозиготной или гомозиготной по *Nmnat1*^{V9M}.

ДНК конструкция и получение AAV вектора

Кодон-оптимизированную кДНК NMNAT1 человека (Фиг. 6А), разработанную DNA 2.0 (Menlo Park, CA) и синтезированную в виде генного фрагмента gBlock (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), включали в конструкции, которые затем упаковали в рекомбинантные AAV вирусные векторы.

Плазмиды, содержащие полные конструкции, были созданы с использованием стандартных методов молекулярного клонирования без эндотоксина и проверены путем секвенирования NMNAT1 и областей, пересекающих сайты лигирования.

AAV был получен в Grousbeck Gene Therapy Center of Massachusetts Eye and Ear, как описано ранее.³⁴ Очищенный вирус собирали в конечном буфере, содержащем 1x PBS, 35 mM NaCl и 0,001% поверхностно-активного вещества Pluronic F68, а затем титровали. Тот же буфер использовали для дальнейшего разбавления вируса, если это требовалось, для достижения целевой дозы. Для облегчения процедуры инъекции в рабочий раствор в качестве метки добавляли <0,25% флуоресцеина (AK-Fluor, Akorn, Lake Forest, IL).

Для решения проблемы токсичности AAV2/Anc80 реагента инъекции осуществляли с использованием определенных модификаций: 1) AAV2/Anc80 изготавливали с поверхностно-активным веществом, добавляемым только после получения, 2) AAV2/Anc80 разбавляли буфером для разбавления с низким содержанием соли, 3) только физиологический раствор (вектор удален), 4) физиологический раствор плюс 100x концентрация поверхностно-активного вещества (вектор удален), 5) физиологический раствор (вектор удален) с флуоресцеином.

Общая анестезия

Для общей анестезии вводили путем интраперитонеальной инъекции смесь кетамина/ксилазина. Двухнедельные мыши получали дозу 37,5 мг/кг кетамина и 3,8 мг/кг ксилазина, а взрослые мыши получали дозу 100 мг/кг кетамина и 20 мг/кг ксилазина. Для противодействия образованию постоянных помутнений роговицы, вызываемых анестезией, подкожно вводили дозу 2 мг/кг йохимбина гидрохлорида (Wedgewood Pharmacy, Swedesboro, NJ) сразу после каждой восстановительной процедуры, в которой использовали кетамин/ксилазин (т.е. AAV инъекция, визуализация *in vivo*, ERG).^{51,52} У новорожденных мышей общую анестезию путем гипотермии индуцировали опосредованным воздействием льда.⁵³

Доставка вируса

У мышей двухнедельного возраста микроинъекционный насос Micro4 с набором RPE (World Precision Instruments, Sarasota, FL) использовали для доставки вирусных реагентов либо в субретинальное пространство, либо в стекловидную камеру. Зрачки расширяли с использованием либо тропикамида (1%), либо смеси в равных частях тропикамида (0,25%), фенэфрина гидрохлорида (0,25%) и циклопенталата (1%). Мышей глубоко анестезировали смесью кетамина/ксилазина, локально применяли местную

анестезию с использованием пропаракаина гидрохлорида (0,5%). Затем глаз протозировали, и для прокола верхней височной склеры и сетчатки непосредственно позади эписклеральных сосудов лимба использовали шприц с иглой 30g для обеспечения входного пути для 33-г канюли с тупым концом.

Для субретинальных инъекций прохождение канюли через стекловидную камеру визуализировали с использованием стереомикроскопа через расширенный зрачок, а кончик канюли располагали в субретинальном пространстве задней части нижнего назального квадранта глаза. Вводили четыре последовательных 185,5 нл болюса реагента (всего 0,75 мкл), и образование пузырька жидкости подтверждали визуализацией, которую усиливали флуоресцеиновой меткой. Канюлю удерживали на месте примерно в течение трех секунд после инъекции, чтобы избежать рефлюкса реагента, а затем осторожно извлекали из глаза. В завершение входную рану обрабатывали тампонадой с использованием ватного тампона. Затем глаза увлажняли искусственной слезой (Blink Tears, Abbott Laboratories, Chicago, IL) и мышей выводили из наркоза на грелке.

Процедура интравитреальной инъекции двухнедельным мышам была идентична, за исключением того, что кончик канюли во время инъекции располагали в центре стекловидной камеры.

Субретинальные инъекции новорожденным вводили с использованием системы микроинъекций FemtoJet 4i (Eppendorf, Hamburg, Germany). Пока мышей анестезировали на льду, кончик иглы для подкожных инъекций 30g использовали для разделения верхнего и нижнего века. Глаз протозировали, и специальную стеклянную иглу со скошенной кромкой (кат# C060609, Origio, Trumbull, CT) вводили непосредственно через склеру и помещали в нижележащее субретинальное пространство. Один болюс 0,5 мкл реагента вводили под давлением 330 гПа в течение 6 секунд, после чего иглу удерживали на месте примерно в течение трех секунд, чтобы избежать рефлюкса, а затем осторожно удаляли. Мышей выводили из наркоза на грелке.

Визуализация сетчатки in vivo

Изображения сетчатки анфас и в поперечном сечении получали с использованием фотографии глазного дна и спектральной оптической когерентной томографии (ОСТ) (Фиг. 7), как описано ранее.²⁵ Дополнением к процедуре фотографирования глазного дна было то, что некоторые изображения получали через фильтр, который делает возможной визуализацию EGFP и, следовательно, раннюю оценку качества инъекции. Кроме того, прямоугольные объемные сканирования осуществляли в нескольких местах сетчатки, чтобы можно было точно измерить нижние и верхние области, и десять сканов регистрировали/усредняли для получения окончательных изображений. С использованием программного обеспечения InVivoVue OST (Bioptogen) осуществляли четыре приблизительно равноотстоящих измерения штангенциркулем от наружного плексиформного слоя до пигментного эпителия сетчатки для измерения толщины слоя фоторецепторов.

Электроретинография

Собирали данные, полученные методом общей флэш-электроретинографии у мышей, как описано ранее.²⁵ Вкратце, мышей адаптировали к темноте в течение ночи, и палочковые и смешанные палочко-колбочковые ответы генерировали с использованием широкополосных световых стимулов $0,01 \text{ кд}\cdot\text{с}/\text{м}^2$ (скотопический) и $10 \text{ кд}\cdot\text{с}/\text{м}^2$ (скотопический), соответственно. Затем мышей адаптировали к свету путем воздействия постоянного широкополосного света с интенсивностью $30 \text{ кд}/\text{м}^2$ (фотопический) в течение 10 минут, и этот свет оставался включенным на заднем плане в процессе получения колбочко-изолированных ответов на широкополосный световой стимул $20 \text{ кд}\cdot\text{с}/\text{м}^2$ (фотопический).

Статистика

Статистические анализы осуществляли в Prism версии 8.2.1 (GraphPad, San Diego, CA). Для OCT и электроретинограмм (ERG) в динамике по времени осуществляли двухсторонний ANOVA с использованием регрессионной модели со смешанными эффектами. При анализе эффекта лечения нижнюю часть сетчатки неинъектированного глаза использовали в качестве отрицательного контроля, с которым сравнивали средние значения всех других измерений. Апостериорный критерий Даннетта использовали для учета ошибки типа I, возникающей при использовании критерия множественных сравнений. При анализе эффектов инъекции все количественные данные представлены как среднее значение $\pm$ S.E.M.

Разработка специально созданного антитела против NMNAT1 человека

Очищенный полноразмерный NMNAT1 человека был использован лабораторией Aves Labs (Tigard, OR) в качестве антигена для получения специально созданного поликлонального антитела у цыплят. Это антитело сильно реагирует против NMNAT1 человека с минимальной перекрестной реактивностью с мышинным ортологом. На **Фиг. 8** ядра клеток ARPE-19 человеческого происхождения⁵⁴, контрастно окрашенные DAPI, показали устойчивое мечение антителом, соответствующее локализации NMNAT1 (верхний ряд). В сетчатке мыши иммунофлуоресценция была минимальной (средний ряд), если только не обрабатывали при помощи AAV таким образом, чтобы он экспрессировал NMNAT1 человека (нижний ряд); в последнем случае иммунореактивность была сильной и локализована в ядрах клеток.

Визуализация сетчатки ex vivo

Иммуногистохимия

Мышей подвергали эвтаназии путем асфиксии с использованием CO_2 и немедленно осуществляли перфузию через сердце с использованием перистальтического насоса Masterflex (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL). Каждое животное сначала перфузировали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) $0,13 \text{ моль}/\text{л}$, pH 7,2-7,4, который содержал 2 Ед. гепарина/мл, до тех пор, пока перфузат не становился прозрачным, после чего следовала перфузия с использованием $\sim 40 \text{ мл}$ 2% параформальдегида (PFA). Оба раствора нагревали до $\sim 37^\circ\text{C}$ во время перфузии. Прижигатель для малых сосудов (#18000-00, Fine Science Tools, Foster City, CA) использовали для маркировки роговицы непосредственно

перед верхним лимбом. Глаза энуклеировали, инкубировали в 2% PFA в течение 0,5 ч при комнатной температуре, передний сегмент удаляли, а затем оставшуюся глазную чашу еще раз инкубировали в 2% PFA в течение 0,5 ч при комнатной температуре, а затем погружали в 30% раствор сахарозы при комнатной температуре по меньшей мере на один час. Глазные чаши фиксировали, делали срезы толщиной 10 мкл путем криотомии, подвергали иммунному мечению и окрашиванию, а затем визуализировали либо в режиме флуоресценции, либо в режиме светлого поля с использованием флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti (Nikon, Tokyo, Japan), как описано ранее,²⁵ если только не использовали для визуализации конфокальный микроскоп TCS SP8 (Leica, Wetzlar, Germany).

Окрашивание гематоксилином и эозином

Глаза энуклеировали после эвтаназии путем асфиксии CO₂, промывали в PBS, немедленно погружали в фиксатор ткани O-fix [<70% этанола, <5% метанола, <7% уксусной кислоты, <4% уксусной кислоты и 4% формальдегида] (Leica, 3800676) и инкубировали в фиксаторе в течение ночи. Затем образцы обезжизивали в ряде этиловых спиртов повышающей концентрации, очищали в ксилолах и заливали в парафин (Paraplast Plus, McCormick Scientific, Richmond, IL). Срезы толщиной 6 мкм подготавливали с использованием микротомы Leica RM2145 (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) и затем предметные стекла окрашивали Gill #2 гематоксилином и эозином-у (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA USA) перед тем, как их покрывали покровным стеклом с использованием среды для заключения препаратов Permount.

Пример 1. ДНК-конструкция и получение AAV реагента

Кодон-оптимизированную кДНК NMNAT1 человека (Фиг. 1А) включали в конструкции, которые затем упаковали в рекомбинантные вирусные векторы AAV. Было обнаружено, что оптимизация кодонов улучшает уровень и продолжительность экспрессии генов человека в трансдуцированных клетках без изменения аминокислотной последовательности белкового продукта²⁶⁻³⁰. Подобным образом, все 174 нуклеотидные замены, введенные в кДНК NMNAT1 размером 840 п.н., были молчащими, определяя нормальную последовательность белка человека.

Четыре ДНК конструкции и шесть подтипов AAV векторов использовали в комбинации для создания четырех реагентов, которые доставляли мышам в рамках этого исследования. Конструкцию, в которой NMNAT1 управляется повсеместно экспрессирующимся промотором CASI, упаковывали как в самокомплементарный (SC), так и в одноцепочечный (SS) вариант AAV2/9. Для тестирования выбирали SC вектор, поскольку он активирует экспрессию генов быстрее, чем традиционные SS векторы.³¹ Кроме того, конструкцию, содержащую репортерный ген EGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок), управляемый также промотором CASI, за которым следует WPRE (посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков), который служит для усиления AAV2-опосредованной трансдукции в сетчатке мыши,³² упаковывали в SS.AAV2/9. К этому EGFP реагенту добавляли реагент SC.AAV2/9 (Фиг. 1В) и реагент

SS.AAV2/9 (**Фиг. 1C**) при 1×10^8 геномных копий на микролитр (гк/мкл) непосредственно перед доставкой мышам таким образом, чтобы экспрессию генов можно было подтвердить визуализацией *in vivo* и *ex vivo*. Получали другую конструкцию, в которой NMNAT1 управлялся повсеместно экспрессирующим промотором CAG, за которым следовала последовательность расщепления T2A, EGFP, а затем WPRE. После трансляции в клетке слитый белок NMNAT1-EGFP ферментативно разделяли по сайту расщепления T2A³³, чтобы избежать нарушения номинальной конформации и кинетики белка. Эту конструкцию упаковывали в AAV2/Anc80, синтетический AAV2, который был создан путем направленной эволюции для обхода врожденного иммунитета и который, как было показано, эффективно трансдуцирует клетки сетчатки у мышей (**Фиг. 1D**).³⁴ Наконец, ту же самую конструкцию CASI.NMNAT1, описанную выше, упаковывали в AAV2/7m8 вектор, который, в отличие от других векторов, может доставляться во все слои сетчатки путем интравитреальной инъекции (**Фиг. 1E**).³⁵

Пример 2. Генная аугментация с использованием самокомплементарного вектора сохраняет структуру сетчатки

Введение терапии генной аугментации мышам $Nmnat1^{V9M/V9M}$ в возрасте двух недель с использованием самокомплементарного (SC) реагента AAV2/9 (SC.AAV2/9) стабильно сохраняло структуру сетчатки у мышей $Nmnat1^{V9M/V9M}$ дозозависимым образом. Это определяли по результатам измерений толщины слоя фоторецепторов, полученными *in vivo* методом оптической когерентной томографии (ОСТ). Для инъектированных глаз измерения проводились проксимально относительно места инъекции в нижней области сетчатки, где, как предполагали, восстановление будет наиболее активным, и в верхней области сетчатки, находящейся дистально от места инъекции. Измерения в неинъектированном другом глазе мышей $Nmnat1^{V9M/V9M}$ и в неинъектированных глазах контрольных однопометников того же возраста осуществляли в нижней области сетчатки в плоскости, эквивалентной той, в которой осуществляли измерения в инъектированных глазах (**Фиг. 2**).

Средне- и высокотитровая инъекция, 1×10^8 (гк/мкл) и 2×10^9 гк/мкл, соответственно, обе обеспечивали значительное восстановление инъектированной сетчатки (**Фиг. 3A**, верхний ряд). Например, в возрасте девяти месяцев глаза, инъектированные дозой 2×10^9 гк/мкл, имели толщину нижнего и верхнего слоя фоторецепторов $100,0 \text{ мкм} \pm 4,8$ (разница 68,7 мкм, $p < 0,0001$) и $96,1 \text{ мкм} \pm 6,4$ (разница 64,8 мкм, $p < 0,0001$), соответственно, по сравнению с толщиной нижней области неинъектированного другого глаза $31,3 \text{ мкм} \pm 0,8$. Обработанные сетчатки обычно были в пределах $\sim 20\%$ толщины нижней области сетчатки мышей дикого типа. Толщина слоя фоторецепторов, как правило, была одинаковой ($p > 0,05$) между нижней частью сетчатки (проксимальной к месту инъекции) и верхней частью сетчатки (дистальной от места инъекции) после введения дозы 2×10^9 гк/мкл. Однако толщина сетчатки уменьшалась на $\sim 20\%$ по мере удаления от места инъекции после введения дозы 1×10^8 гк/мкл. Авторы изобретения не могли проверить, будут ли дозы выше 2×10^9 гк/мкл давать дополнительное преимущество,

поскольку это был концентрированный препарат.

При 1×10^7 (гк/мкл), самой низкой протестированной дозировке этого реагента, наблюдали умеренное восстановление толщины слоя фоторецепторов в нижней области (проксимальной к месту инъекции) сетчатки $Nmnat1^{V9M/V9M}$, по сравнению с неинъецированной сетчаткой другого глаза мышей. Этот результат достигал статистической значимости только через четыре и шесть месяцев, показав отличие $25,8 \text{ мкм} \pm 6,5$ ($p=0,014$) и $30,2 \text{ мкм} \pm 7,9$ ($p=0,035$) от нижней области сетчатки другого глаза мышей, соответственно. Слой фоторецепторов восстановленной области имел только примерно половину толщины эквивалентной области неинъецированной сетчатки контрольных однопометников дикого типа, и ни в какой момент времени область сетчатки, расположенная дистально от места инъекции (т.е., верхняя область сетчатки), не демонстрировала признаков восстановления.

Поскольку потеря активности NMNAT1 может сильно различаться в зависимости от мутации, нужно понять, важна ли сверхэкспрессия NMNAT1. Для этого мышам дикого типа вводили реагент SC.AAV2/9 в тех же титрах, что и мутантным однопометникам. При всех дозировках и во всех временных точках толщина слоя фоторецепторов обычно не изменялась, при этом статистически значимые различия были отмечены только в трех случаях (Фиг. 3А, нижний ряд).

Наибольшее несоответствие наблюдали в верхней области инъектированной сетчатки через девять месяцев после инъекции 2×10^9 гк/мкл, при которой было определено уменьшение $17,9 \text{ мкм} \pm 6,9$ ($p=0,039$). Однако, учитывая, что нижняя область (проксимальная к месту инъекции) той же самой сетчатки не была затронута, маловероятно, что это уменьшение было из-за токсичности.

Пример 3. Одноцепочечные векторы не влияют на фенотип заболевания

В отличие от реагента SC.AAV2/9, реагенты SS.AAV2/9, AAV2/7m8 и AAV2/Anc80 не обеспечивали стабильного структурного восстановления сетчатки $Nmnat1^{V9M/V9M}$. В возрасте двух месяцев нижняя область мутантной сетчатки, инъектированной реагентом SS.AAV2.9, показала очень умеренное восстановление $11,4 \text{ мкм} \pm 4,3$ ($p=0,033$) по сравнению с той же областью другого неинъецированного глаза (Фиг. 3В), а реагент AAV2/7m8 не имел никакого эффекта. Доза $5,5 \times 10^8$ гк/мкл реагента AAV2/Anc80 вызывала временное восстановление мутантной сетчатки, которое не сохранялось после двухмесячного возраста и ограничивалось нижней областью. В точках времени 1,5 и 2 месяца, соответственно, нижняя область AAV2/Anc80-обработанных сетчаток имела толщину слоя фоторецепторов на $42,0 \text{ мкм} \pm 3,7$ ($p=0,0005$) и $27,5 \text{ мкм} \pm 9,9$ ($p=0,045$) больше по сравнению с необработанными сетчатками другого глаза животных (Фиг. 3С). Никакого восстановления не наблюдали, когда дозировку снижали до 1×10^8 гк/мкл, а увеличение дозы AAV2/Anc80 реагента до $\geq 1 \times 10^9$ гк/мкл не было успешным из-за токсичности. Как в сетчатке мышей дикого типа, так и в сетчатке $Nmnat1^{V9M/V9M}$ высокотитровые инъекции реагента AAV2/Anc80 вызывали дегенерацию сетчатки, появление интравитреальных клеточных инфильтратов^{36,37} и тяжелую отслойку сетчатки к

шестинедельному возрасту (**Фиг. 4**). Чтобы проверить, способствовали ли компоненты буфера для разведения, используемого с реагентом AAV2/Anc80, этому результату, компоненты этого раствора вводили мышам дикого типа в различных условиях. Модулирование концентраций поверхностно-активного вещества, соли и флуоресцеина не вызывало повреждения сетчатки, обнаруживаемого ОСТ или гистологией (*данные не представлены*).

Структурное восстановление сетчатки $Nmnat1^{V9M/V9M}$, связанное с реагентом SC.AAV2, наблюдаемое при помощи ОСТ, было подтверждено *ex vivo* с использованием световой микроскопии. Окрашивание гематоксилин-эозином (H&E) подтвердило, что, в отличие от необработанной мутантной сетчатки, хорошо трансдуцированные области восстановленной сетчатки имели все клеточные типы интактными и имели развитые внешние сегменты фоторецепторов (**Фиг. 5A**). Однако слои сетчатки обработанной мутантной сетчатки казались немного тоньше, чем в необработанной сетчатке дикого типа, что согласуется с вышеуказанными данными ОСТ изображений. В то время как инъецированные сетчатки дикого типа часто были неотличимы от неинъецированных сетчаток другого глаза мышей, существовали области, где внешние сегменты фоторецепторов были частично втянуты, а другие слои сетчатки были тоньше. Эксперименты с иммуномечением показали, что экспрессия трансгена обнаруживается в ядре почти каждого типа клеток сетчатки как в инъецированных мутантных, так и в сетчатках дикого типа (**Фиг. 5B**).

Кроме того, пан-ретиальная экспрессия трансгена часто выходила за пределы двух третей ткани (**Фиг. 3B**). Иммуное мечение осуществляли с использованием специально созданного куриного поликлонального антитела против человеческого NMNAT1, которое имеет минимальную перекрестную реактивность с мышинным NMNAT1 (**Фиг. 6**).

Пример 4. Генная аугментация с использованием самокомплементарного вектора сохраняет функцию сетчатки

Чтобы оценить, насколько структурное восстановление сетчатки привело к сохранению функции, отдельные ответы палочек, смешанных палочек/колбочек и колбочек на световую стимуляцию были измерены *in vivo* методом ERG - неинвазивной процедуры, используемой для измерения электрического ответа сетчатки на световую стимуляцию. В частности, амплитуду b-волны ERG, которая опосредуется ON биполярными клетками,^{38,39} использовали как косвенный показатель ответа фоторецепторов⁴⁰, а также как меру внутренней функции сетчатки. В сетчатках, обработанных реагентом SC.AAV2/9, b-волна была значительно больше, чем в другом необработанном глазу животных к возрасту четырех месяцев, и оставалась такой до возраста шести месяцев для фототопических стимулов и по меньшей мере девяти месяцев для скотопических и смешанных палочковых/колбочковых стимулов. Фотопические ERG, как правило, были больше в обработанной мутантной сетчатке в возрасте девяти месяцев, чем в необработанной сетчатке другого глаза (**Фиг. 7A**, верхний ряд). Например, через

шесть месяцев ответ обработанной мутантной сетчатки превышал ответ необработанной сетчатки другого глаза для каждого условия: $156,1 \text{ мкВ} \pm 23,4$ против $36,0 \text{ мкВ} \pm 7,1$ ($p=0,0013$) для ответа палочек, $293,6 \text{ мкВ} \pm 51,1$ против $62,0 \pm 11,8$ ($p=0,0034$) для смешанных ответов палочек/колбочек и $101,3 \text{ мкВ} \pm 18,6$ против $25,3 \pm 6,2$ ($p=0,0067$) для ответа колбочек.

Более того, ответы, связанные со спасением, были постоянно ниже по сравнению с необработанными сетчатками дикого типа. Этот эффект мог иметь два источника. Во-первых, ОСТ и гистологические изображения показали, что даже самое стабильное структурное восстановление было неполным.

Во-вторых, сама инъекция, по-видимому, ослабляла сигналы ERG, поскольку инъекцированные сетчатки дикого типа генерировали ERG с амплитудами, которые, как правило, были меньше по сравнению с сетчаткой другого глаза.

Несмотря на это, для каждого условия стимуляции структура и латентность восстановленных сигналов ERG были нормальными (Фиг. 7А, нижний ряд). Реагент SC.AAV2 при 1×10^8 гк/мкл показал признаки восстановления в инъекцированной мутантной сетчатке (Фиг. 7В, верхний ряд), тогда как никаких признаков восстановления при использовании реагента AAV2/Anc80 не наблюдалось в возрасте двух месяцев, когда сохранялась структура Фиг. 7В, нижний ряд).

Пример 5. Самокомплементарный вектор активирует экспрессию NMNAT1 раньше, чем одноцепочечные векторы

Чтобы понять, почему структура и функция сетчатки сохранялись в большей степени, когда трансген доставлялся через вектор SC.AAV2/9, авторы изобретения охарактеризовали ранние профили экспрессии NMNAT1. Через четырнадцать дней после инъекции иммуномечение NMNAT1, доставляемого SC.AAV2/9, обнаруживалось во всех слоях сетчатки, с особенно высокой плотностью в наружном ядерном слое (ONL) (Фиг. 8А). Наоборот, в сетчатках, инъекцированных SS.AAV2/9 и AAV2/Anc80, обнаружение NMNAT1 было редким с относительно небольшим числом меченых фоторецепторов, даже несмотря на то, что вектор SS.AAV2/9 несет идентичный карго, а вектор AAV2/Anc80, как было показано, трансдуцирует фоторецепторы сетчатки мыши с широким охватом.³⁴ NMNAT1 не обнаруживался через семь дней после инъекции, независимо от используемого вектора доставки.

Пример 9. Для успешного вмешательства необходима трансдукция фоторецепторов

Кроме того, чтобы определить, приведет ли более раннее вмешательство к большей эффективности реагента AAV2/Anc80, инъекции вводили новорожденным мышам в постнатальный день 0 (P0) до P2. В то время как большинство типов клеток демонстрировали сильную экспрессию NMNAT1, включая колбочковые фоторецепторы, экспрессия в палочковых фоторецепторах была чрезвычайно слабой (Фиг. 8В); колбочковые фоторецепторы отличались расположением их ядер в самых дальних рядах ONL.⁴¹ Аналогичным образом, сохранение слоя фоторецепторов не наблюдалось через

четыре недели после интравитреальной доставки NMNAT1 посредством AAV2/7m8 у двухнедельных мышей по данным ОСТ, и методом иммуногистохимии было определено, что экспрессия NMNAT1 отсутствовала в наружной части сетчатки, несмотря на сильный сигнал во внутренней сетчатке (Фиг. 8С).

Литература

1. Chiang, PW, Wang, J, Chen, Y, Fu, Q, Zhong, J, Chen, Y, et al. (2012). Exome sequencing identifies NMNAT1 mutations as a cause of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 44: 972-974.
2. Koenekoop, RK, Wang, H, Majewski, J, Wang, X, Lopez, I, Ren, H, et al. (2012). Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nat Genet* 44: 1035-1039.
3. Perrault, I, Hanein, S, Zanlonghi, X, Serre, V, Nicouveau, M, Defoort-Delhemmes, S, et al. (2012). Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy. *Nat Genet* 44: 975-977.
4. Falk, MJ, Zhang, Q, Nakamaru-Ogiso, E, Kannabiran, C, Fonseca-Kelly, Z, Chakarova, C, et al. (2012). NMNAT1 mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 44: 1040- 1045.
5. Nash, BM, Symes, R, Goel, H, Dinger, ME, Bennetts, B, Grigg, JR, et al. (2018). NMNAT1 variants cause cone and cone-rod dystrophy. *Eur J Hum Genet* 26: 428-433.
6. Garavaglia, S, D'Angelo, I, Emanuelli, M, Carnevali, F, Pierella, F, Magni, G, et al. (2002). Structure of human NMN adenylyltransferase. A key nuclear enzyme for NAD homeostasis. *J Biol Chem* 277: 8524-8530.
7. Belenky, P, Bogan, KL, and Brenner, C (2007). NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci* 32: 12-19.
8. Lau, C, Niere, M, and Ziegler, M (2009). The NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) protein family. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14: 410-431.
9. Chiarugi, A, Dolle, C, Felici, R, and Ziegler, M (2012). The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* 12: 741-752.
10. Sasaki, Y, Margolin, Z, Borgo, B, Havranek, JJ, and Milbrandt, J (2015). Characterization of Leber's Congenital Amaurosis-associated NMNAT1 Mutants. *J Biol Chem*.
11. Coppieters, F, Todeschini, AL, Fujimaki, T, Baert, A, De Bruyne, M, Van Cauwenbergh, C, et al. (2015). Hidden Genetic Variation in LCA9-Associated Congenital Blindness Explained by 5'UTR Mutations and Copy-Number Variations of NMNAT1. *Hum Mutat* 36: 1188-1196.
12. Conforti, L, Janeckova, L, Wagner, D, Mazzola, F, Cialabrini, L, Di Stefano, M, et al. (2011). Reducing expression of NAD⁺ synthesizing enzyme NMNAT1 does not affect the rate of Wallerian degeneration. *FEBS J* 278: 2666-2679.
13. Berger, F, Lau, C, Dahlmann, M, and Ziegler, M (2005). Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem* 280: 36334-36341.

14. Carvalho, LS, and Vandenberghe, LH (2015). Promising and delivering gene therapies for vision loss. *Vision Res* 111: 124-133.
15. Ong, T, Pennesi, ME, Birch, DG, Lam, BL, and Tsang, SH (2019). Adeno-Associated Viral Gene Therapy for Inherited Retinal Disease. *Pharm Res* 36: 34.
16. McCarty, DM (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* 16: 1648-1656.
17. Lloyd, A, Piglowska, N, Ciulla, T, Pitluck, S, Johnson, S, Buessing, M, et al. (2019). Estimation of impact of RPE65-mediated inherited retinal disease on quality of life and the potential benefits of gene therapy. *Br J Ophthalmol* 103: 1610-1614.
18. Lam, BL, Davis, JL, Gregori, NZ, MacLaren, RE, Girach, A, Verriotto, JD, et al. (2019). Choroideremia Gene Therapy Phase 2 Clinical Trial: 24-Month Results. *Am J Ophthalmol* 197: 65-73.
19. Ghazi, NG, Abboud, EB, Nowilaty, SR, Alkuraya, H, Alhommadi, A, Cai, H, et al. (2016). Treatment of retinitis pigmentosa due to MERTK mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: results of a phase I trial. *Hum Genet* 135: 327-343.
20. Cukras, C, Wiley, HE, Jeffrey, BG, Sen, HN, Turriff, A, Zeng, Y, et al. (2018). Retinal AAV8- RS1 Gene Therapy for X-Linked Retinoschisis: Initial Findings from a Phase I/IIa Trial by Intravitreal Delivery. *Mol Ther* 26: 2282-2294.
21. Dyka, FM, Molday, LL, Chiodo, VA, Molday, RS, and Hauswirth, WW (2019). Dual ABCA4- AAV Vector Treatment Reduces Pathogenic Retinal A2E Accumulation in a Mouse Model of Autosomal Recessive Stargardt Disease. *Hum Gene Ther* 30: 1361-1370.
22. McCullough, KT, Boye, SL, Fajardo, D, Calabro, K, Peterson, JJ, Strang, CE, et al. (2019). Somatic Gene Editing of GUCY2D by AAV-CRISPR/Cas9 Alters Retinal Structure and Function in Mouse and Macaque. *Hum Gene Ther* 30: 571-589.
23. Alves, CH, and Wijnholds, J (2018). AAV Gene Augmentation Therapy for CRB1-Associated Retinitis Pigmentosa. *Methods Mol Biol* 1715: 135-151.
24. Ofri, R, Averbukh, E, Ezra-Elia, R, Ross, M, Honig, H, Obolensky, A, et al. (2018). Six Years and Counting: Restoration of Photopic Retinal Function and Visual Behavior Following Gene Augmentation Therapy in a Sheep Model of CNGA3 Achromatopsia. *Hum Gene Ther*.
25. Greenwald, SH, Charette, JR, Staniszewska, M, Shi, LY, Brown, SD, Stone, L, et al. (2016). Mouse Models of NMNAT1-Leber Congenital Amaurosis (LCA9) Recapitulate Key Features of the Human Disease. *Am J Pathol* 186: 1925-1938.
26. Burgess-Brown, NA, Sharma, S, Sobott, F, Loenarz, C, Oppermann, U, and Gileadi, O (2008). Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expr Purif* 59: 94-102.
27. Gustafsson, C, Govindarajan, S, and Minshull, J (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 22: 346-353.
28. Ill, CR, and Chiou, HC (2005). Gene therapy progress and prospects: recent progress

in transgene and RNAi expression cassettes. *Gene Ther* 12: 795-802.

29. Foster, H, Sharp, PS, Athanasopoulos, T, Trollet, C, Graham, IR, Foster, K, et al. (2008). Codon and mRNA sequence optimization of microdystrophin transgenes improves expression and physiological outcome in dystrophic mdx mice following AAV2/8 gene transfer. *Mol Ther* 16: 1825-1832.

30. Sack, BK, Merchant, S, Markusic, DM, Nathwani, AC, Davidoff, AM, Byrne, BJ, et al. (2012). Transient B cell depletion or improved transgene expression by codon optimization promote tolerance to factor VIII in gene therapy. *PLoS One* 7: e37671.

31. McCarty, DM, Monahan, PE, and Samulski, RJ (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8: 1248-1254.

32. Patricio, MI, Barnard, AR, Orlans, HO, McClements, ME, and MacLaren, RE (2017). Inclusion of the Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances AAV2-Driven Transduction of Mouse and Human Retina. *Mol Ther Nucleic Acids* 6: 198-208.

33. Kim, JH, Lee, SR, Li, LH, Park, HJ, Park, JH, Lee, KY, et al. (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* 6: e18556.

34. Zinn, E, Pacouret, S, Khaychuk, V, Turunen, HT, Carvalho, LS, Andres-Mateos, E, et al. (2015). In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector. *Cell Rep* 12: 1056-1068.

35. Dalkara, D, Byrne, LC, Klimczak, RR, Visel, M, Yin, L, Merigan, WH, et al. (2013). In vivo- directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med* 5: 189ra176.

36. Zarranz-Ventura, J, Keane, PA, Sim, DA, Llorens, V, Tufail, A, Sadda, SR, et al. (2016). Evaluation of Objective Vitritis Grading Method Using Optical Coherence Tomography: Influence of Phakic Status and Previous Vitrectomy. *Am J Ophthalmol* 161: 172-180 e171-174.

37. Saito, M, Barbazetto, IA, and Spaide, RF (2013). Intravitreal cellular infiltrate imaged as punctate spots by spectral-domain optical coherence tomography in eyes with posterior segment inflammatory disease. *Retina* 33: 559-565.

38. Stockton, RA, and Slaughter, MM (1989). B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol* 93: 101-122.

39. Bush, RA, and Sieving, PA (1996). Inner retinal contributions to the primate photopic fast flicker electroretinogram. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 13: 557-565.

40. Greenwald, SH, Kuchenbecker, JA, Roberson, DK, Neitz, M, and Neitz, J (2014). S-opsin knockout mice with the endogenous M-opsin gene replaced by an L-opsin variant. *Vis Neurosci* 31: 25-37.

41. Carter-Dawson, LD, and LaVail, MM (1979). Rods and cones in the mouse retina. II. Autoradiographic analysis of cell generation using tritiated thymidine. *J Comp Neurol* 188: 263-272.

42. Carter, BJ, Khoury, G, and Rose, JA (1972). Adenovirus-associated virus

multiplication. IX. Extent of transcription of the viral genome in vivo. J Virol 10: 1118-1125.

43. Sipo, I, Fechner, H, Pinkert, S, Suckau, L, Wang, X, Weger, S, et al. (2007). Differential internalization and nuclear uncoating of self-complementary adeno-associated virus pseudotype vectors as determinants of cardiac cell transduction. Gene Ther 14: 1319- 1329.

44. Wang, J, Xie, J, Lu, H, Chen, L, Hauck, B, Samulski, RJ, et al. (2007). Existence of transient functional double-stranded DNA intermediates during recombinant AAV transduction. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 13104-13109.

45. Petit, L, Ma, S, Cheng, SY, Gao, G, and Punzo, C (2017). Rod Outer Segment Development Influences AAV-Mediated Photoreceptor Transduction After Subretinal Injection. Hum Gene Ther 28: 464-481.

46. Xiong, W, MacColl Garfinkel, AE, Li, Y, Benowitz, LI, and Cepko, CL (2015). NRF2 promotes neuronal survival in neurodegeneration and acute nerve damage. J Clin Invest 125: 1433-1445.

47. Geller, AM, Sieving, PA, and Green, DG (1992). Effect on grating identification of sampling with degenerate arrays. J Opt Soc Am A 9: 472-477.

48. Geller, AM, and Sieving, PA (1993). Assessment of foveal cone photoreceptors in Stargardt's macular dystrophy using a small dot detection task. Vision Res 33: 1509- 1524.

49. Xiong, W, Wu, DM, Xue, Y, Wang, SK, Chung, MJ, Ji, X, et al. (2019). AAV cis-regulatory sequences are correlated with ocular toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 116: 5785-5794.

50. Pawlyk, BS, Bulgakov, OV, Liu, X, Xu, X, Adamian, M, Sun, X, et al. (2010). Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis. Hum Gene Ther 21: 993-1004.

51. Turner, PV, and Albassam, MA (2005). Susceptibility of rats to corneal lesions after injectable anesthesia. Comp Med 55: 175-182.

52. Koehn, D, Meyer, KJ, Syed, NA, and Anderson, MG (2015). Ketamine/Xylazine-Induced Corneal Damage in Mice. PLoS One 10: e0132804.

53. Phifer, CB, and Terry, LM (1986). Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. Physiol Behav 38: 887-890.

54. Dunn, KC, Aotaki-Keen, AE, Putkey, FR, and Hjelmeland, LM (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. Exp Eye Res 62: 155-169.

Другие варианты осуществления

Должно быть понятно, что хотя изобретение было описано вместе с его подробным описанием, представленное выше описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения дегенерации сетчатки, вызванной мутациями в гене никотинамидмононуклеотидаденилилтрансферазы 1 (NMNAT1), у субъекта-человека, при этом способ включает доставку в глаз субъекта терапевтически эффективного количества вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV), включающего последовательность, кодирующую NMNAT1 человека, функционально связанную с промотором, который управляет экспрессией в клетках сетчатки, предпочтительно в фоторецепторах.

2. Способ по пункту 1, где промотор представляет собой CAG, CASI, CMV, RHO или родопсинкиназный (GRK1) промотор.

3. Способ по пункту 2, где NMNAT1-кодирующая последовательность по меньшей мере на 80% идентична последовательности дикого типа (SEQ ID NO:2) или кодон-оптимизированной последовательности (SEQ ID NO:1).

4. Способ по пунктам 1-3, где вектор доставляется путем субретинальной инъекции.

5. Способ повышения экспрессии NMNAT1 в глазу субъекта-человека, при этом способ включает доставку в глаз субъекта терапевтически эффективного количества вектора на основе аденоассоциированного вируса типа 2 (AAV2), включающего последовательность, кодирующую NMNAT1 человека, функционально связанную с промотором, который управляет экспрессией в сетчатке, предпочтительно в фоторецепторных клетках.

6. Способ по пункту 5, где промотор представляет собой CAG, CASI, CMV, RHO или родопсинкиназный (GRK1) промотор.

7. Способ по пункту 5, где последовательность NMNAT1 является кодон-оптимизированной.

8. Способ по пунктам 5-7, где вектор доставляется путем субретинальной инъекции.

9. Вектор на основе аденоассоциированного вируса типа 2 (AAV2), включающий последовательность, кодирующую NMNAT1 человека, функционально связанную с промотором, который управляет экспрессией в сетчатке, предпочтительно в фоторецепторных клетках.

10. Вектор по пункту 9, где промотор представляет собой CAG, CASI, CMV, RHO или родопсинкиназный (GRK1) промотор.

11. Вектор по пункту 9, где последовательность NMNAT1 является кодон-оптимизированной.

12. Фармацевтическая композиция, включающая вектор по пунктам 9-11, сформулированная для доставки путем субретинальной инъекции.

13. Вектор по пунктам 9-11 для применения в лечении дегенерации сетчатки, вызванной мутациями в NMNAT1 в глазу субъекта-человека.

14. Вектор по пунктам 9-11 для применения для повышения экспрессии NMNAT1 в

глазу субъекта-человека.

15. Фармацевтическая композиция по пункту 12 для применения в лечении дегенерации сетчатки, вызванной мутациями в NMNAT1 в глазу субъекта-человека.

16. Фармацевтическая композиция по пункту 12 для применения для повышения экспрессии NMNAT1 в глазу субъекта-человека.

Кодон-оптимизированная кДНК NMNAT1

1-75 ATGGA~~AA~~ATTCAGAGAA~~AA~~ACTGAAGTGGT**GCTGTTGG**CATGTGGAT**CGTT**CAACCCCATCACCAACATGCATCTG
 C G T CC T T T A T C C

76-150 **CGCCTCTTTGA**ACTGGCCAA**AG**ACTACATGAATGGA**ACTGGA**AGATACACTGT**GGT**CAAAGGCATCATCTCC**CA**
 A T G G G A A T T T

151-225 GT**GGGG**GATGCATACAAGAAGAAGGG**CTTG**ATCCCTGCCTACCACCGGGTCATCATGGCT**TGAGCTGGCC**ACCAAG
 T T C A AC C T T A A T T

226-300 **AACTC**AA~~AA~~ATGGGTGGAAGTGGACACCTGGGAG**TC**ACT**GC**AA~~AA~~AGGAGTGGAAGGAAAC**CC**TTAAAGTCC**TGCGG**
 T T T T A AAGT T G A G T G G G AA A

301-375 CATCACCAGGAA~~AA~~AGCTGGA**AGCCTCGG**ACTGTGACCACCAGCAGAAC**AGCCCC**ACCCTTGAACG**CCCAGGG**GAGA
 C T A G AT G TAGT T TCA T T A A G T A G

376-450 AAG**CGC**AAAGTGGACTGAGAC**CCA**AGACTCAAGCCAGAAGAAG**TCGCTGGA**ACCCAAGACCAAGCTGTCC**CA**AAAG
 A G A A T T T A A C A G A A A G

451-525 GT**GAA**ACTCCTCTGTGGAGCTGAC**CTCCTGGA**ATCGTTTGCTGTGCCTAATCTCTGGAAG**TCGGA**AGATATCACC
 C G G G G A TT AT G C T C T G AGT C

526-600 CAAATTGTGGCCA**ACTATGGCCTGATCTGTGTGACTAG**AGCTGGTAATGATGCCAGAA**ATT**CATCTATGAATCA
 C G C A T C G A T G T G

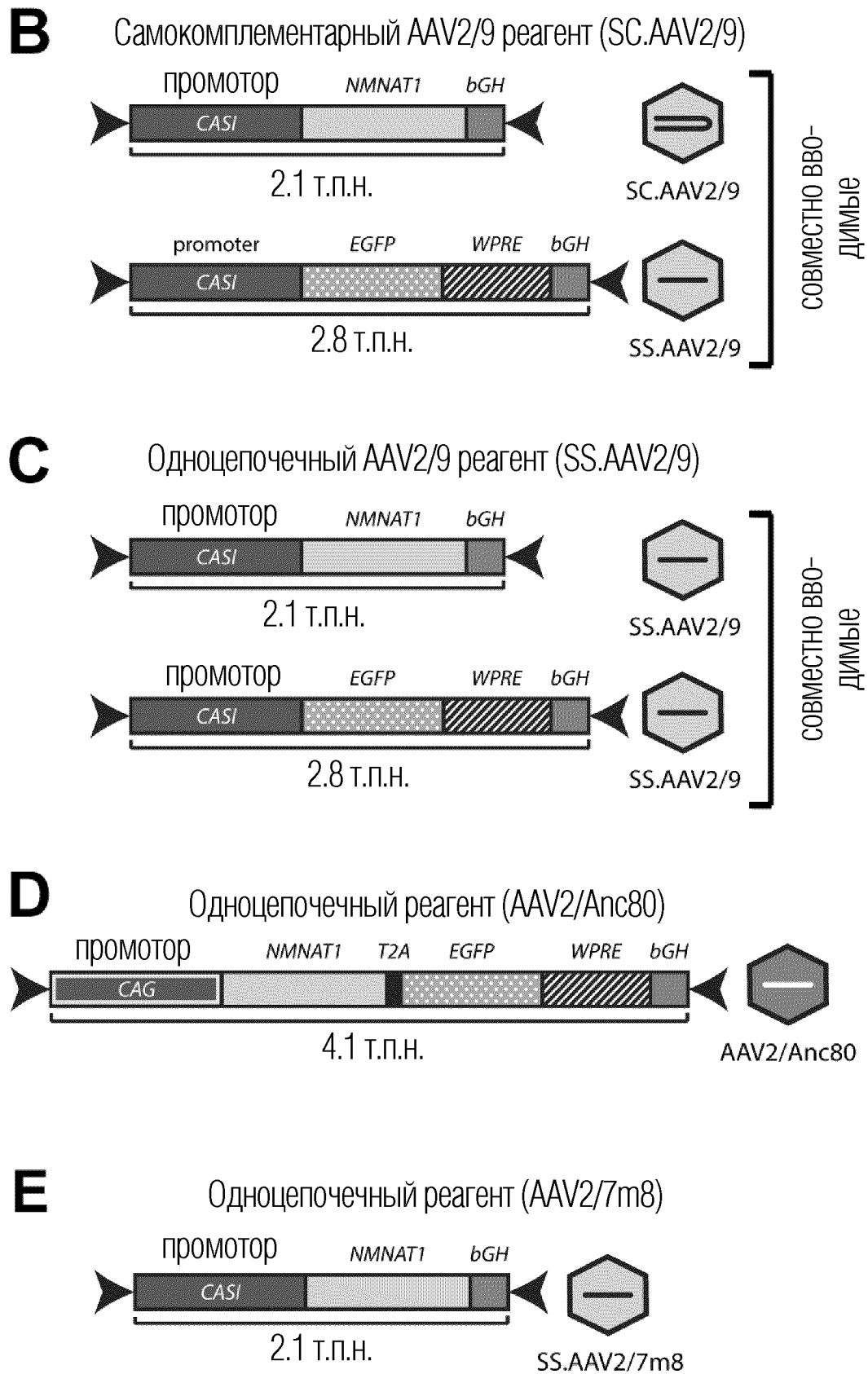
601-675 GATGTGCTGTGGAAGCACCGGAGCAACAT**CCATGTGGTCAATGAGTGGATTGC**AAATGACATCTCCTCCACCAAG
 A T C G A C T A A A

676-750 ATC**AGA**AAGGGCCCTGAGGCGGGGACAG**TCGATCAGG**TACTTGGTCCCAGACCTTGTCCAAGAGTACATTGAAAAG
 C G A C AA C AGC TC C A T A

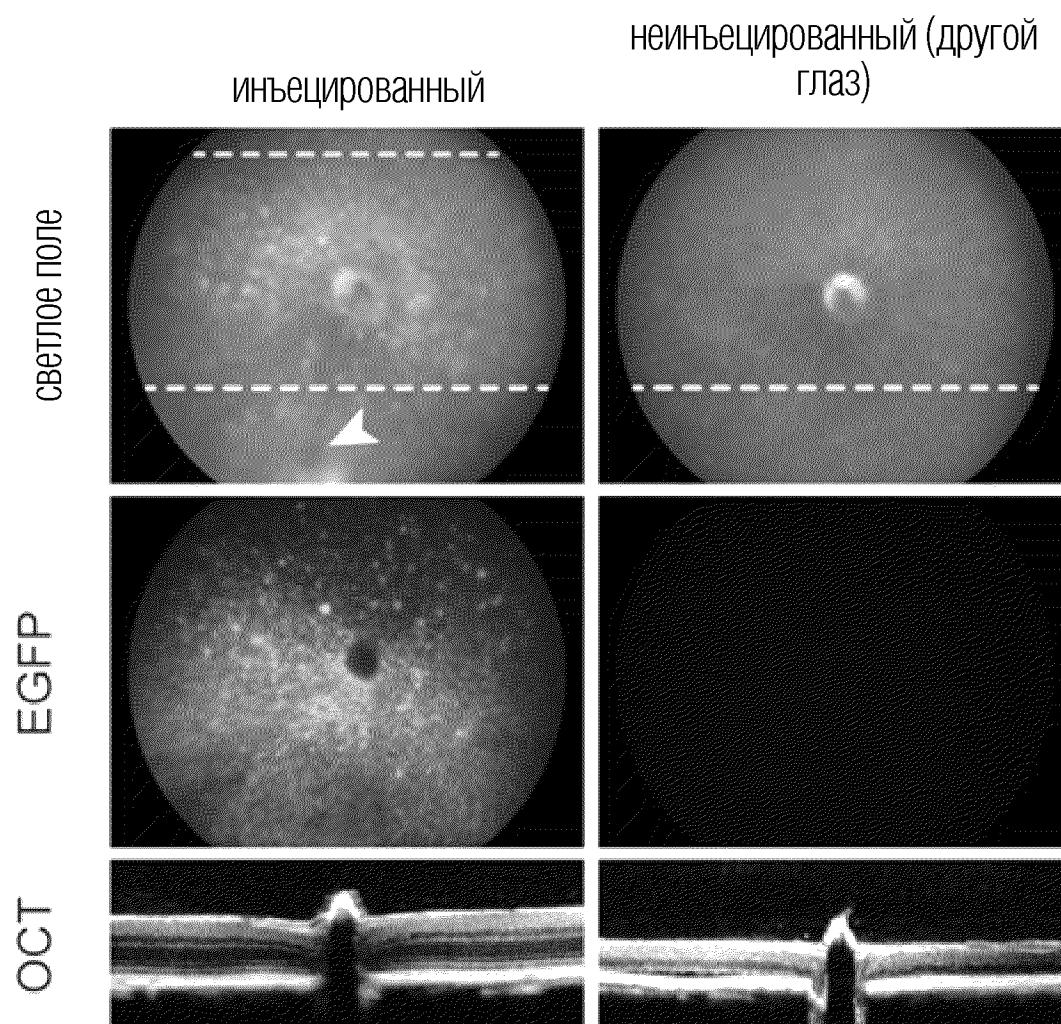
751-825 CACA**ACCTCT**ACAGCTCAGAG**TCAGAGGATCG**CAATGCAGGAGTGATCCTGGCC**CTCTCCAGCGGA**ACACTGCA
 T TT G T AGT A CA G T G C T G A A

826-840 GAGGCCAAGACTTAG
 A T A

ФИГ. 1А

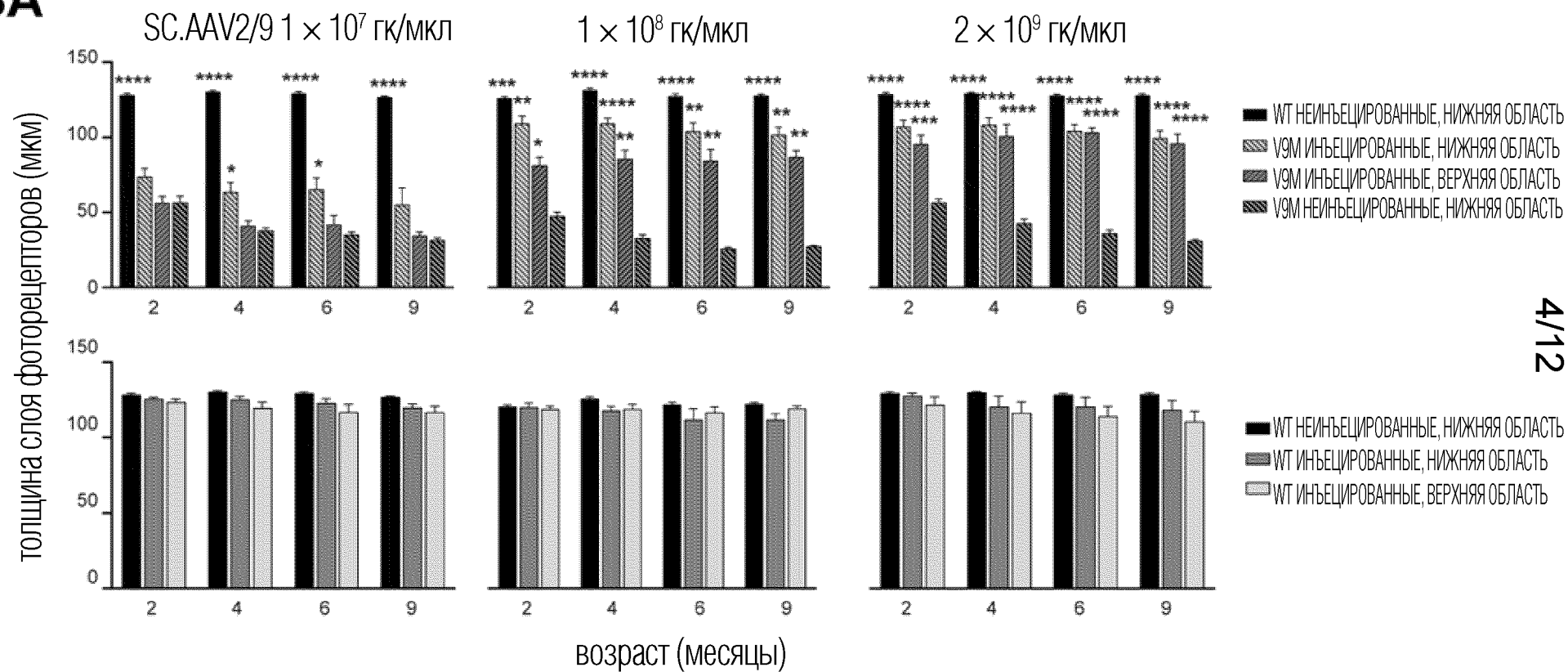


ФИГ. 1В-Е



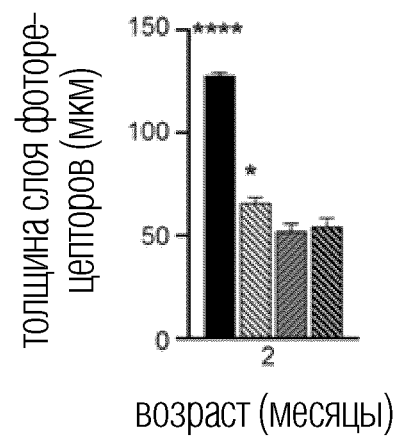
ФИГ. 2

3A

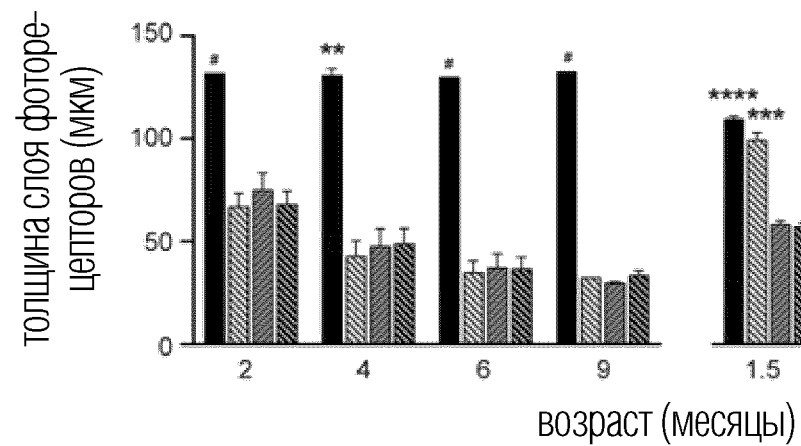


ФИГ. 3А

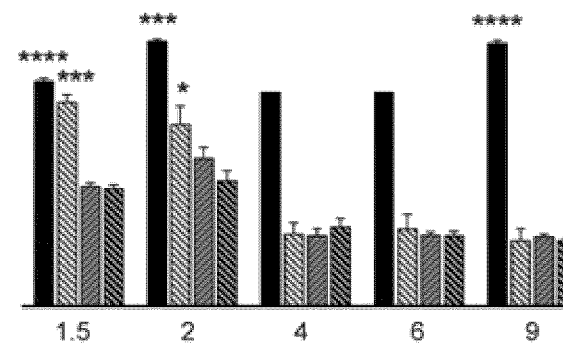
B SS.AAV2/9 1×10^6 гк/мкл



C AAV2/Anc80 1×10^8 гк/мкл



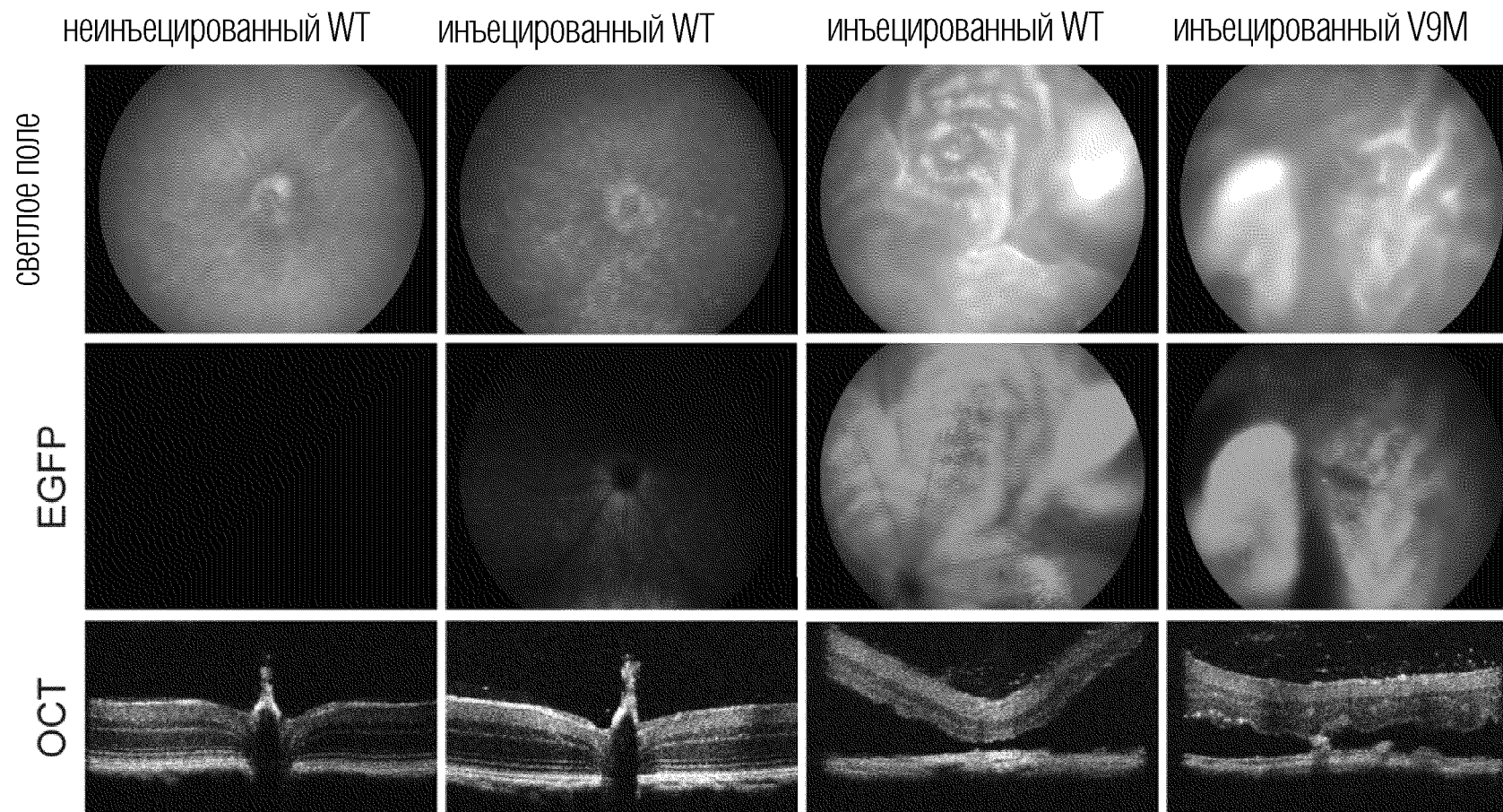
5.5×10^8 гк/мкл



ФИГ. 3В-С

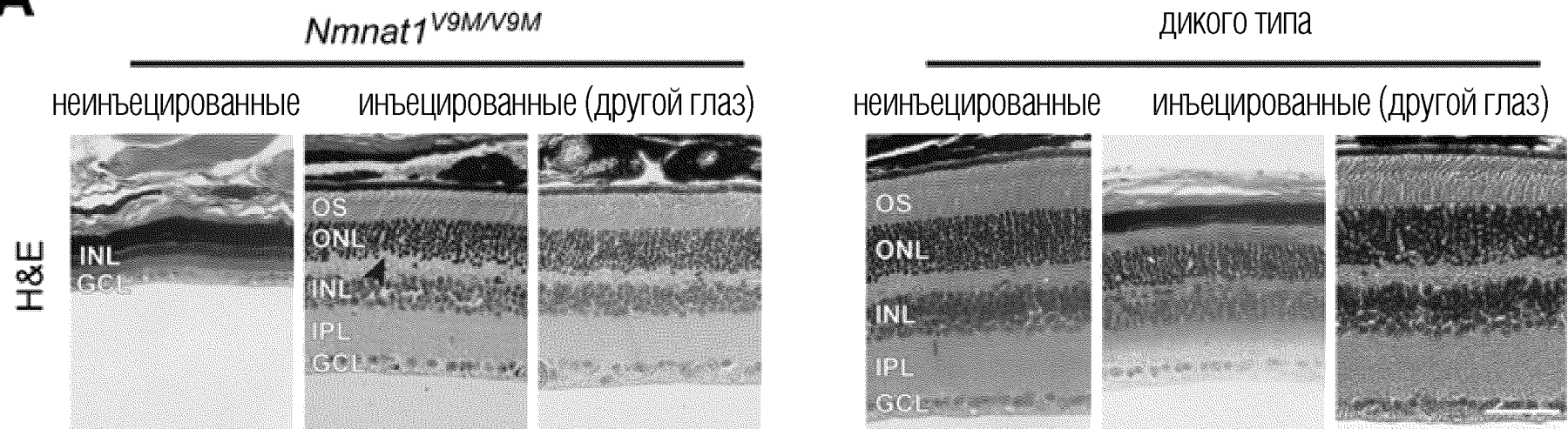
4

AAV2/Anc80

 5.5×10^8 гк/мкл 1×10^9 гк/мкл

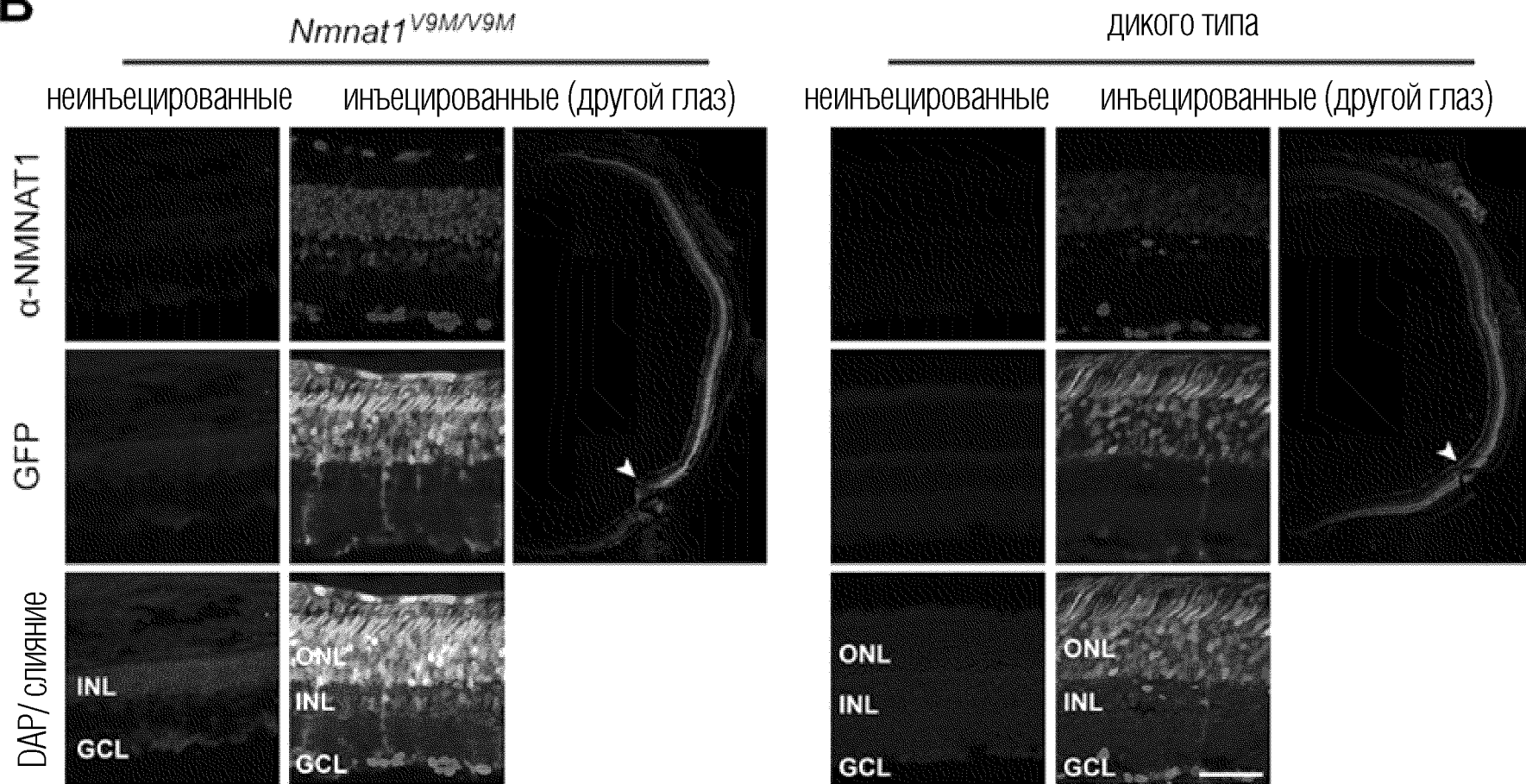
ФИГ. 4

5A



ФИГ. 5A

B



ФИГ. 5В

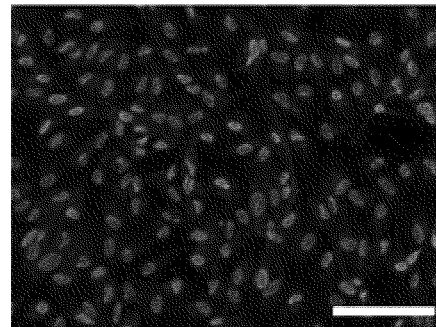
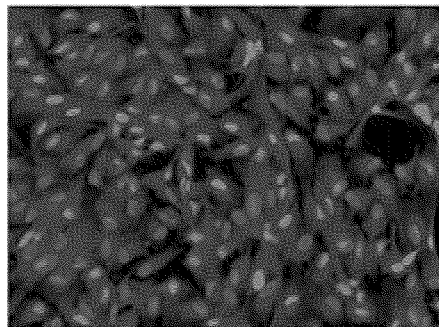
6

ARPE-19 клетки,
полученные от чело-
века

α -NMNAT1

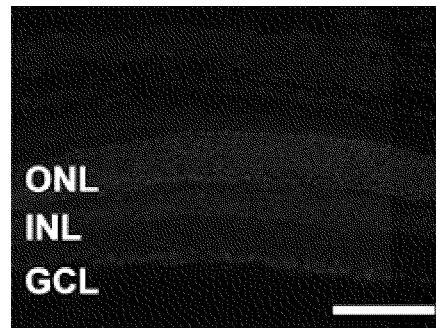
DAPI

слияние

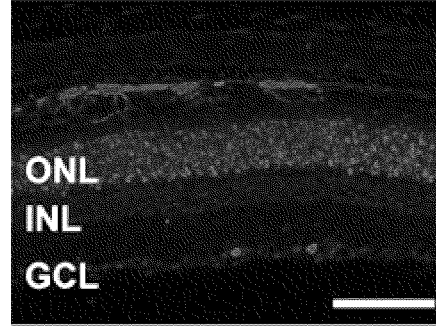
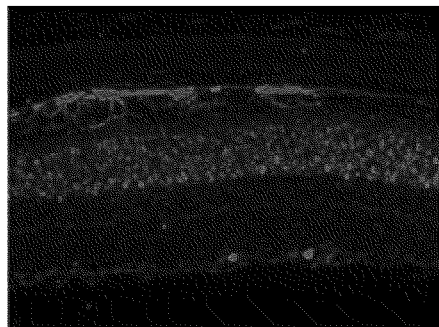


сетчатка мыши дикого типа

неинъецированная

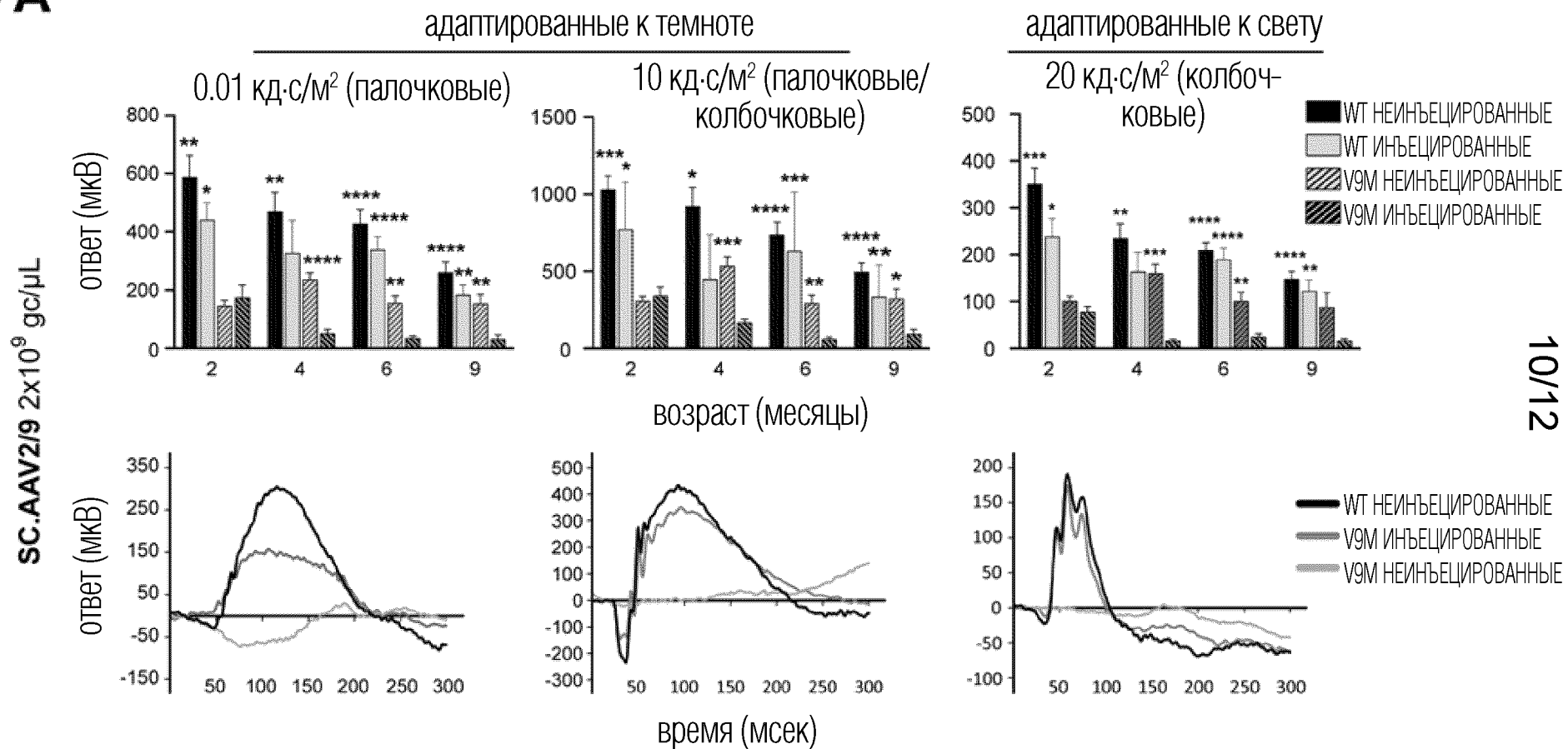


инъецированная



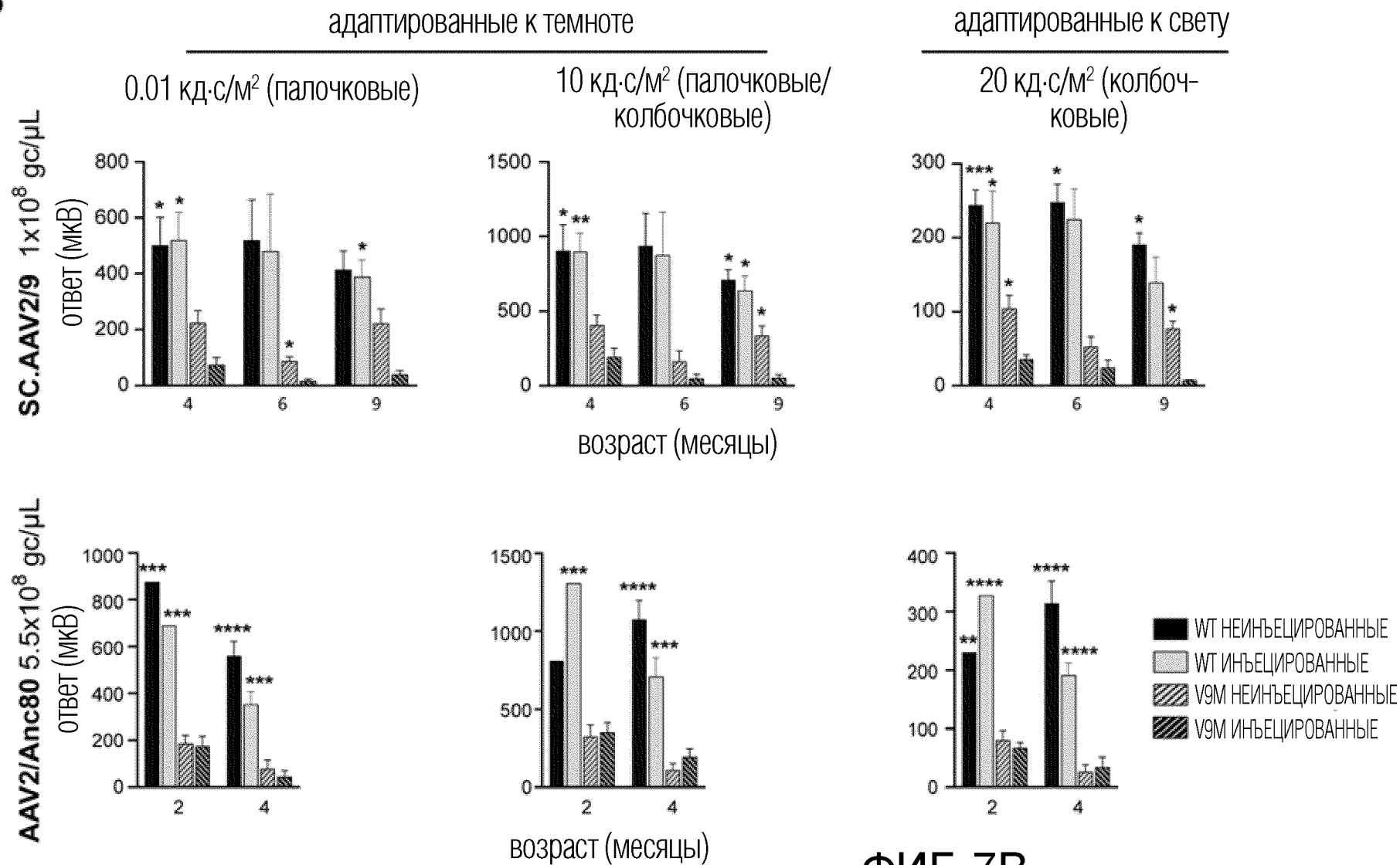
ФИГ. 6

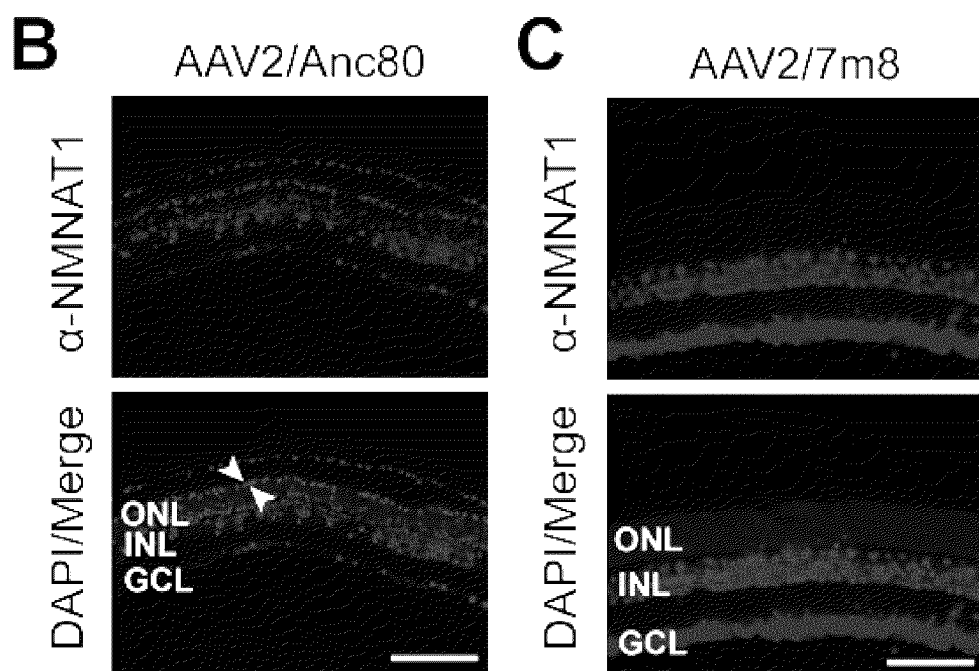
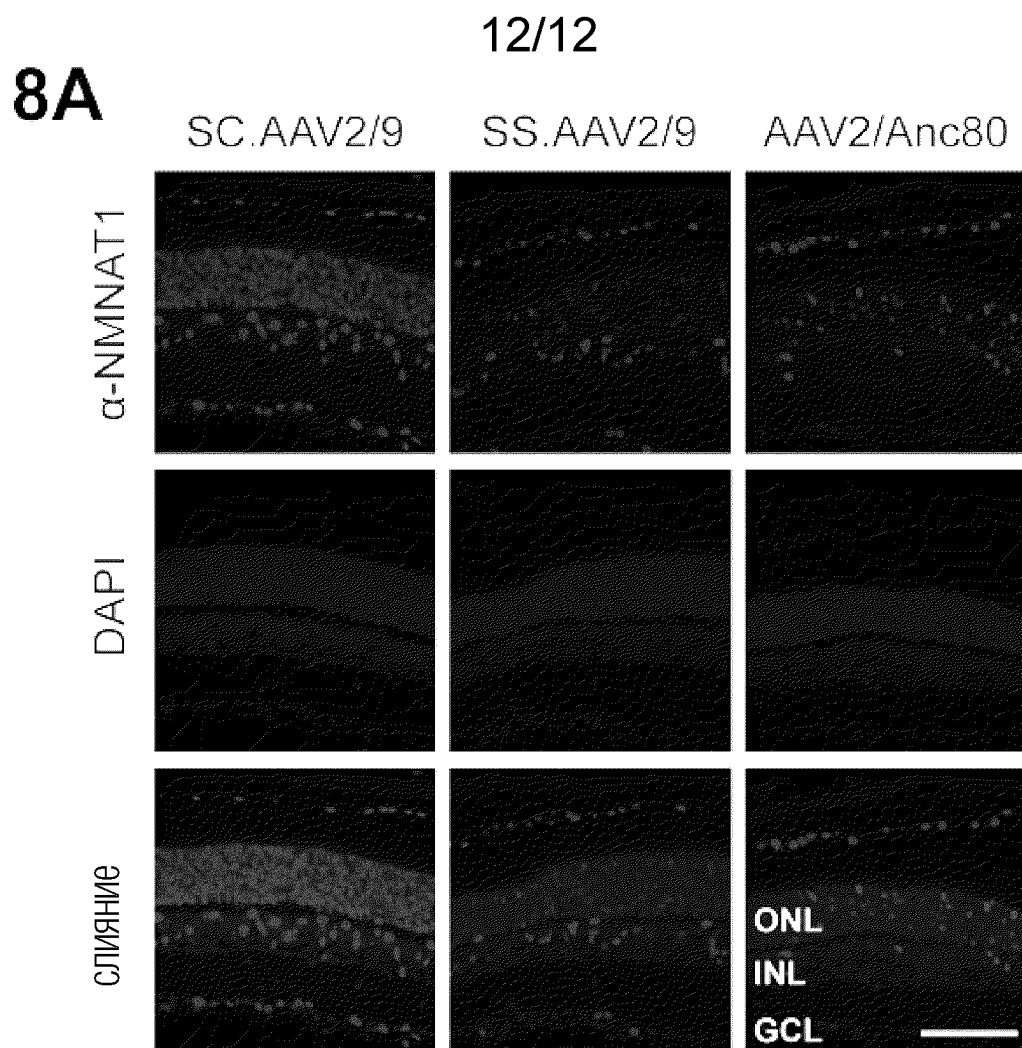
7A



ФИГ. 7А

B





ФИГ. 8A-C