Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

АНОО ВО «Университет «Сириус»

ОТЧЕТНЫЙ ОБЗОР

ПО КОНКУРСУ “ЧТОБЫ ВИДЕТЬ”

Применение современных генетических технологий для терапии синдрома Штрадгарда

Руководитель проекта:

Младший научный сотрудник Направления Генная Терапия,

Аспирант 4-го года обучения по направлению 1.5.3. Молекулярная биология

Бровин Андрей Николаевич

_____/_____

“30” апреля 2025 года

п.г.т. Сириус - 2025

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель направления Генная Терапия	_____ (подпись, дата)	Карабельский А.В.	Введение
Младший научный сотрудник Направления Генная Терапия, Аспирант 4-го года обучения по направлению 1.5.3. Молекулярная биология	_____ (подпись, дата)	Бровин А.Н.	Основная часть: Описание выбранной мишени, Актуальностьь, Методы терапии, Заключение
Магистрант 2-го года обучения по программе “Молекулярная медицина”	_____ (подпись, дата)	Сабанцев М.О.	Основная часть: Методы терапии, Предлагаемое решение по разработке препарата, Ключевые этапы и сроки при разработке препарата Предварительная стоимость разработки 30 Технологическая база для реализации разработки в РФ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A2PE - фосфатидил-пиридиний-бисретиноид

A2E - бисретиноида N-ретинил-N-ретинилиден этаноламина

ABC - ATP-binding cassette –АТФ-связывающие транспортные белки

ABCA4 – ATP Binding Cassette Transporter A4 - АТФ-связывающие транспортные белки семейства A4

ABCC7 – ATP Binding Cassette Transporter C7 - АТФ-связывающие транспортные белки семейства C7

ASO - антисмысловые олигонуклеотиды

CMV – Cytomegalovirus – Цитомегаловирус

CRISPR-CAS – clustered regularly interspaced short palindromic repeats - короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами

ECD - extracellular domain – внеклеточный домен

EGFP - Enhanced Green Fluorescent Protein - улучшенный зеленый флуоресцентный белок

ELOVL4 – ген/белок элонгазы жирных кислот с длинной цепью 4

FFM - fundus flavimaculatus – желтое пятно

HEK293 - Human Embryonic Kidney 293 – клетки почки эмбриона человека

HPO - Human Phenotype Ontology – антологический справочник фенотипов человека

MYO7A - myosin VIIA - ген/белок миозина 7

NBD - nucleotide-binding domain - нуклеотид-связывающий домен

N-Ret-PE – N-ретинилиден-фосфатидилэтаноламин

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man – онлайн база данных генетических заболеваний человека

RHO - rhodopsin - ген/белок родопсин

PE – фосфатидилэтаноламина

PROM1 – ген/белок проминина 1

STGD1/2/3 – болезнь Штаргардта 1/2/3 типа

TMD - trans membrane domain - трансмембранный домен

АТФ - аденозинтрифосфат

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ИПСК - индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ 9
1. Описание выбранной мишени 9
2. Актуальность 10
3. Методы терапии 13
3.1.Терапия с помощью малых молекул 14
3.2.Невирусные методы доставки терапевтических конструкций 15
3.2.1.Наночастицы для доставки терапевтических молекул 15
3.2.2.Применение геномных редакторов для исправления точечных мутаций 17
3.2.3. Препараты на основе антисмысловых олигонуклеотидов 19
3.3.Вирусные методы доставки терапевтических конструкций 20
3.3.1. Терапия на основе лентивирусных векторов 21
3.3.2.Терапия на основе адено-ассоциированных вирусных векторов 23
3.3.3. Доставка сокращенных версий ABCA4 23
3.3.4. Доставка полноразмерных версий ABCA4 24
3.4. Выводы по разделу 28
4. Предлагаемое решение по разработке препарата 28
5. Ключевые этапы и сроки при разработке препарата 30
6. Предварительная стоимость разработки 33
7. Технологическая база для реализации разработки в РФ 34
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 37
Список источников 38

ВВЕДЕНИЕ

За последние 30 лет развитие генетических технологий позволило человечеству перевернуть представление о фундаментальных основах в области биологии и генетики, развить и успешно применить новые отрасли генной инженерии и биотехнологии для еще более эффективного получения полезных ресурсов и материалов, а также усовершенствовать медицину для ранней диагностики и терапии ранее неизлечимых заболеваний. Отдельно принято выделять группу орфанные или наследственные заболевания, большая часть которых имеет генетическую природу в ходе наследования или возникновения новых спонтанных мутаций. Основной причиной возникновения данных заболевания являются мутации, которые возникают из-за несовершенного молекулярного механизма передачи наследственной информации как в ходе мейоза и естественной рекомбинации генов [1], так и под воздействием внешних факторов физической (повышенный уровень радиации и электромагнитного изучения), химической (мутагены) [2] и биологической природы (интегративные вирусы) [3].

С увеличением общего уровня развития техносферной среды и увеличения количества вредных факторов, а также развитием технологий геномного анализа количество описанных наследственных заболеваний растет с каждым десятилетием, что может быть хорошо продемонстрировано на примере каталога наследственных заболеваний MIM, который далее был преобразован в электронную базу данных OMIM [4]. Начатый в 1966 году каталог с 1000 записей каталог расширялся по экспоненциальному закону и на момент 2006 года перешел в электронный формат с 15 000 позициями. Сейчас база данных [5] насчитывает 27 650 записей, которые хранят информацию о 17 500 генов, 6 950 генетических синдромов с известными молекулярными причинами, 1 500 генетических синдромов с неизвестными причинами и 1700 фенотипов различных заболеваний.

На текущий момент база OMIM является одним из ключевых источников для медицинских генетиков и аналитиков данных, а также основой для создания новых баз данных, комбинирующих информацию из дополнительных медицинских источников. Анализ депонированных и сгруппированных данных является отдельной нетривиальной задачей, однако даже из поверхностного анализа можно получить неочевидные закономерности. Далее перечислим два взаимодополняющих вывода из работ по аналитике OMIM.

В работе Hekselman [6] исследователи объединили данные из базы OMIM и HPO для создания гибридной базы ODiseA, которая позволяет связать генетические мутации с фенотипами. По результату объединения получилась небольшая база с распределением 2000 генетических заболеваний по органам, из которых 31% поражает мозг, 28% дыхательные пути и легкие, 22% кровеносную систему, 19% сердечно-сосудистую систему, 18% почки и остальные органы с частотой менее 10%.

Второе исследование [7] касается аналитики базы OMIM и Pfarm, в котором исследователи объединили данные о 23 тысячах мутациях с последовательностями 2,5 тысяч белков человека. Дальнейшая кластеризация данных с объединением белков по суперсемействам показала, что чаще всего мутации возникают в белках, отвечающих за ионный транспорт - 1020, соединительные белки (коннексины) - 319, эпидермальный фактор роста - 301, синтез трипсина - 258 и АТФ зависимый транспорт (ABC белки) - 236.

Информация о количестве мутаций с распределением по суперсемействам в комбинации их с группировкой по физиологическим системам человека подробнее раскрывает вывод, полученный в статье Hekselman. Примечательно, что практически каждое суперсемейство вносит значительный вклад в работу нервной системы, однако самое заметное влияние на нее оказывают мембранные белки ионного и АТФ-зависимого транспорта, обеспечивающие работу синаптической передачи сигналов между клетками нервной ткани [8]. Также мембранные белки ионных каналов широко представлены в мышечной ткани и вместе с коннексинами регулируют сокращение скелетной и сердечной мышечной ткани. [9] Еще одной широкой группой мембранных белков, осуществляющих более сложный и совершенный АТФ зависимый транспорт веществ в клетку, является группа ABC-белков, которые влияют на работу практически всех систем организма и регулируют общий метаболизм [10].

ABC-белки — это обширная группа АТФ-зависимых мембранных белков, осуществляющих транспорт и регуляцию специфических веществ через различные мембранные системы клетки. Данные мембранные белки присутствуют практически во всех доменах жизни от бактерий (79 вариантов ABC-белков) до человека (48 вариантов ABC-белков) и растений (несколько сотен вариантов ABC-белков) [11]. Несмотря на огромное разнообразие все белки данного семейства имеют практически полностью идентичную структуру из двух общих NBD домен, которые гидролизуют АТФ и осуществляют селективный перенос веществ через два TMD домена на мембране клетки

[12]. При этом чем меньше рассматриваемое подсемейство ABC белка, тем выше уровень гомологии между структурными доменами и вероятность подобрать общий лиганд для двух рецепторов многократно повышается.

Неочевидную закономерность сначала обнаружили на этапе выравнивания аминокислотных последовательностей белков ABCA4 (участвует в метаболизме витамина А в фоторецепторах) и ABCC7 (участвует в транспорте ионов хлора в легких и кишечнике) в исследовании [13]. Далее в работе [14] применили результат предшественников и использовали препарат VX-809, одобренный для терапии муковисцидоза при мутации A1038V (NBD1) и G1961E (NBD2), в случае мутации в гене ABCA4 для терапии одной из форм наследственной слепоты.

Перечисленные факты, отражающие одновременно функциональное многообразие и структурное сходство белков ABC, открывают возможности для исследований терапии как отдельных локализованных в конкретных тканях заболеваний и мутаций, так и для терапии обширных метаболических каскадов, влияющих на состояние всего организма.

Дальнейшее внимание сосредоточим на терапии одной из форм наследственной слепоты, а именно на синдроме Штаргардта, вызываемого мутацией в гене ABCA4. Глаз является удобной изолированной системой от общего иммунитета и других внутренних органов, что существенно упрощает задачу исследователя в процессе поиска терапевтических молекул и методов их введения.

Также наследственные ретинопатии отличаются высоким разнообразием в виде 300 различных синдромов наследственной слепоты, которые не являются летальными, но существенно ухудшают качество жизни каждого пациента. Исследования и разработка перспективных методов лечения генетических заболеваний является важным шагом для Российской Федерации при формировании современной отечественной персонализированной медицины в ближайшем будущем. Успешный опыт предшественников из зарубежных стран показал, что наиболее успешно реализуемыми и эффективными были препараты для терапии наследственных ретинопатий, поэтому в данном обзоре мы предлагаем рассмотреть нашу разработку потенциального препарата терапии болезни Штаргардта, которую возможно реализовать на территории России.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Описание выбранной мишени

В качестве основной мишени для заместительной генной терапии нами был выбран ген ABCA4, который кодирует мембранный белок-транспортер семейства ABC специфичный для сетчатки глаза человека. Данный ген обладает несколькими важными особенностями, что делает данную мишень крайне востребованной в области разработки генно-терапевтических препаратов.

В первую очередь рассмотрим особенности гена с точки зрения медицинской генетики. Ген ABCA4 охватывает 128,3 килобаз геномной ДНК, имеет два транскрипта кодирующей ДНК длиной 7106 (NM_001425324.1) и 7328 (NM_000350.3) пар оснований и состоит из 50 экзонов [15]. Основной транскрипт NM_000350.3 кодирует 2273 аминокислоты, которые формируют белок с молекулярной массой в 250 кДа [16].

Белок ABCA4 является членом суперсемейства АТФ-связывающих (ABC) транспортеров, поэтому содержит в своей структуре две неидентичных, но гомологичных части, каждая из которых содержит трансмембранный домен (TMD) с шестью мембраноспаренными спиралями, нуклеотидсвязывающий домен (NBD) и экзоцитоплазматический домен (ECD) [17].

Высокая протяженность кодирующей ДНК приводит к образованию многочисленных мутаций, часть из которых имеет нейтральный или негативный эффект [18]. В зависимости от используемой базы данных количество известных вариантов ABCA4 транскрипта варьируется от 1 072 (ClinVar) до 6 540 (LOVD), из которых 690 мутаций считаются потенциально патогенными. Аннотация позиций обозначенных мутаций на доменную структуру не позволяет однозначно определить точечную локализацию в конкретном домене белка [19], однако каждая из патогенных мутаций нарушает структуру и функцию транспортера.

В норме ABCA4 функционирует как импортер липидов, перенося продукты цикла фототрансдукции (N-ретинилиден-фосфатидилэтаноламин - N-Ret-PE) и фосфатидилэтаноламина (PE)) из цитоплазматической мембраны в наружный слой дисков фоторецепторов, где происходит дальнейший гидролиз метаболитов до транс-ретиналя.

Эта транспортная активность обеспечивает эффективный метаболизм транс-ретиналя и 11-цис-ретиналя из фоторецепторов в ходе цикла фототрансдукции, образующегося при возбуждении палочек и колбочек [20].

В случае патогенных мутаций происходит накопление перечисленных метаболитов, которые конденсируются и образуют фосфатидил-пиридиний-бисретиноид (A2PE) в мембране дисков фоторецепторов. Затем наружные сегменты фоторецептора отторгаются и фагоцитируются RPE, а A2PE гидролизуется лизосомальными ферментами до бисретиноида N-ретинил-N-ретинилиден этаноламина (A2E), который не может быть метаболизирован дальше [21]. В результате A2E накапливается в пигментном эпителии и образует основной компонент липофусцина, который является токсичным для клеток, что приводит к дегенерации и последующей гибели палочек и колбочек [22].

Недавно было установлено, что ABCA4 также связан с уменьшением избытка 11-цис-ретиналя, который также обратимо реагирует с фосфатидилэтаноламина с образованием N-11-цис-ретинилиден-фосфатидилэтаноламина, который, в свою очередь, также транспортируется белком ABCA4, что означает, что накопление 11-цис-ретиналя также может быть связано с болезнью Штаргардта [23].

Генная терапия синдрома Штаргардта наряду с диагностикой заболевания также осложнена высокая протяженностью кодирующей ДНК, которая накладывает ряд ограничений на применение некоторых технологий доставки генетического материала. Подробнее основные подходы к терапии данного заболевания будут рассмотрены в разделе опыт поиска терапии.

2. Актуальность

Болезнь Штаргардта (STGD1, OMIM# 248200), известная также как макулярная (ювенильная) дистрофия Штаргардта или fundus flavimaculatus, что дословно переводится как “желтое пятно”, является одной из наиболее распространенных причин наследственных заболеваний сетчатки [24].

Впервые заболевание было описано Карлом Штаргардтом в 1909 году в ходе анализа двух семей с выраженной макулярной дистрофией в виде желто-белых пятен на дне глазного дна [25]. Далее термин fundus flavimaculatus (сокращенно FFM) был использован швейцарским офтальмологом Адольф Франческетти в 1965 при фенотипическом

описании одной из форм дегенерации сетчатки [26], однако связать данный фенотип с генотипом удалось только в 1997 году с развитием технологий геномного секвенирования [27]. Тогда же было установлено три формы макулярной дистрофии: STGD1 с мутацией в ABCA4 (OMIM# 248200), STGD3 с мутацией в ELOVL4 (OMIM# 60376) и STGD4 с мутацией в PROM1 (600110). Из перечисленных генов ABCA4 является наиболее специфичным для тканей глаза и цикла фототрансдукции, поэтому далее подробно будет рассматриваться вариант болезни Штаргардта STGD1.

Фенотипически болезнь Штаргардта проявляется в трех основных вариантах: пятна на дне глазного дна, макулярная атрофия и нарушение остроты и цветовосприятия центрального зрения. Основные патологические изменения происходят по накопительному принципу с интервалом в 10-15 лет. Так пятна на дне глазного дна могут быть обнаружены в возрасте 6-9 лет, однако острота зрения с годами падает от 1 до 0,1 в возрасте 20 лет, 0,05 в возрасте 40 лет и 0,01 в возрасте 60 лет [28]. Функции периферической сетчатки, как правило, сохраняются у большинства больных на протяжении всей жизни, несмотря на стабильное и прогрессирующее снижение остроты зрения. Симптомы могут не проявляться долгие годы, что является основной проблемой для своевременной генетической диагностики заболевания.

Другой проблемой диагностики болезни Штаргардта является крайне высокое разнообразие мутаций в протяженном транскрипте ABCA4. На сегодняшний день известно около семисот различных патогенных вариантов мутаций в транскрипте ABCA4, из которых четыре однонуклеотидных замены встречают чаще всего в разных этнических группах. Примечательно также, что большая часть популяции (примерно 60-70%) разных этнических групп является гетерозиготным носителем мутации, поэтому частота встречаемости заболевания частота колеблется от 1 на 8000 до 1 на 10 000 случаев в зависимости от этноса [29]. Статус аутосомно-рецессивного заболевания в случае STGD1 снижает вероятность возникновения мутантного варианта гомозиготы, однако существенно увеличивает процент носительства мутаций в популяции до соотношения 1 к 20.

В нескольких исследованиях, проведенных среди пациентов с клинически подтвержденным диагнозом болезни Штаргардта, были выявлены мутации гена ABCA4, имеющие значительное распространение в российской популяции. В одном из них, проведенном среди 51 пациента из 10 этнических групп, было установлено, что 70,5%

случаев ретинопатий были связаны с мутациями в гене транспортера. Это подтверждает важность ABCA4 как ключевого гена, ассоциированного с болезнью Штаргардта в России. Более того, 8 из 10 новых мутаций, которые были обнаружены в рамках этого исследования, характерны для неславянских популяций, что подчеркивает необходимость изучения специфичных для региона мутаций [30-33].

Исследования показывают, что в российской популяции существует широкий спектр мутаций, ассоциированных с болезнью Штаргардта, с фенотипической вариабельностью. Например, среди 38 пациентов с клинически подтверждённым диагнозом STGD1, были выявлены 12 мутаций, которые ранее не описывались в международной литературе. Эти мутации могут быть специфичны для российской популяции, что подтверждает необходимость проведения более широких исследований, направленных на идентификацию новых мутаций, характерных для региона. Кроме того, фенотипическая вариабельность заболевания также велика, что делает диагностику и лечение болезни более сложными. У пациентов наблюдаются как классические формы заболевания с ранним началом, так и более поздние формы с медленным прогрессированием [31].

Одним из ключевых результатов исследования стало выявление двух мутаций, которые имеют высокий уровень распространённости в российской популяции. Это комплексный аллель c.[1622T>C;3113C>T] и вариант c.5882G>A. Эти мутации были обнаружены у значительного числа пациентов и ассоциируются с различными клиническими проявлениями болезни. Например, комплексный аллель c.[1622T>C;3113C>T] был выявлен у 38,5% пациентов с заболеваниями сетчатки, что подчеркивает его важность как основной мутации для этой патологии в российской популяции. В то же время, мутация c.5882G>A была выявлена у 5,7% пациентов, что подтверждает её значимость в патогенезе болезни. У пациентов с такими мутациями наблюдается более позднее начало заболевания и медленное его прогрессирование, что может оказывать влияние на клиническую практику. Сочетание этих мутаций может приводить к более позднему и менее агрессивному проявлению болезни [33].

Таким образом, распространённость болезни Штаргардта в Российской Федерации имеет свои особенности, связанные с определёнными мутациями гена ABCA4, которые чаще всего встречаются в российской популяции. Наиболее распространёнными

являются мутации c.[1622T>C;3113C>T] и c.5882G>A, которые играют ключевую роль в патогенезе заболевания. Однако значительная часть случаев остаётся без молекулярного объяснения, что подчёркивает необходимость проведения дополнительных исследований для выявления новых мутаций и улучшения диагностики.

3. Методы терапии

В настоящее время не существует лекарства от данного заболевания, однако научным сообществом предложено несколько перспективных решений в области разработки препаратов передовой терапии.

Долгое время врачебное сообщество назначало рекомендации, которые незначительно корректировали отдельно взятые симптомы заболевания. В качестве основных и самых простых рекомендаций ранее использовались: применение светофильтров для уменьшения коротковолновой и ультрафиолетовой составляющей видимого светового спектра, пищевые ограничения в употреблении продуктов, содержащих избыточное количество производных витамина А, назначение ретиламина и докозагексаеновой кислоты [28]. Все перечисленные рекомендации частично и не эффективно облегчали симптомы, однако в случае генетических заболеваний необходимо вмешательство на уровне генетического материала для устранения причин. Применение генной терапии обсуждалось в качестве перспективного и недостижимого метода, однако на сегодняшний день первый отечественный препарат (ANB-002-1/SAFRAN) для терапии Гемофилии Б данного класса проходит III стадию клинических испытаний [34]. Преодоление данного технологического барьера поспособствует более интенсивному развитию препаратов передовой терапии и адаптации экспериментальных методов лечения.

Помимо широко известной заместительной генной терапии [35] на текущий момент также актуальны и эффективны методы ex-vivo клеточной терапии на основе перепрограммирования ИПКС и МСК [36,37], применение липидных наночастиц для доставки антисмысловых олигонуклеотидов (ASO), мРНК [38-39] и геномных редакторов [40-41] для однократного и точного исправления мутаций. Последние варианты применения генетических инструментов для редактирования мутаций пока являются исключительно исследовательскими для работы с культурами клеток

человека, однако возрастающая популярность и перспективность данных методов способна изменить общественное мнение в сторону снятия запрета на редактирование генома человека.

Перечисленные передовые подходы направлены на создание новых препаратов терапии заболеваний, которые способны качественно улучшить жизнь пациентов с наследственными заболеваниями. Далее перечислим основные механизмы, на основе которых предполагается терапевтическое действие препаратов, чтобы обозначить их достоинства и недостатки при клиническом применении. Основной фокус будет сосредоточен на препаратах, которые проходят клинические испытания, а также предложим разрабатываемый нами метод для терапии болезни Штаргардта.

3.1. Терапия с помощью малых молекул

В начале перечислим ряд подходов с самым простым с точки зрения биологии методом воздействия на основе малых молекул. Данный класс веществ направлен на выведение токсичных для клеток метаболитов цикла фототрансдукции таких как: транс-ретиналь, бисретониды и N-ретинилиден-фосфатидилэтаноламин.

Для применения терапии ранее использовали различные органические лиганды: ингибитор ретиноидной изомерогидролазы (эмиксустат гидрохлорид), фенретинид (Sirion Therapeutics), дейтерированный витамин А [17]. Из перечисленных соединений только эмиксустат гидрохлорид показал эффективность для восстановления функций фоторецепторов при ежедневном пероральном применении в количестве 10 мг на протяжении месяца [42]. На сегодняшний день завершена третья фаза клинических испытаний препарата препарата Emixustat, однако результаты пока не были анонсированы на момент написания материала [43]. Очевидным недостатком применения данной молекулы является необходимость в ежедневном приеме препарата и при восстановлении функции фоторецепторов не гарантирует уменьшения вероятности развития географической атрофии. Так препарат способен восстанавливать отдельные селективные нарушения метаболизма цис-ретиналя в цикле фототрансдукции, но не способен предотвратить макулярную атрофию и прогрессирующее общее ухудшение остроты зрения при синдроме Штаргардта.

Еще один препарат, который ранее разрабатывался от возрастной макулярной атрофии, антамер-ингибитор белка C5 системы комплемента (Izervay, Zimura) был ранее также проверен и для терапии STGD1. По результатам второй фазы клинических испытаний при интерветриальной инъекции 2-4 мг антител наблюдалось значимое уменьшение темпов развития географической атрофии [44]. Тем не менее необходимость ежемесячной внутриглазной инъекции препарата увеличивает риск травматизации тканей глаза и не восстанавливает все функции фоторецепторов, характерные для комплексного проявления болезни Штаргардта.

Таким образом, избирательность действия каждой молекулы на отдельный элемент каскада фототрансдукции приводит к необходимости применения постоянной комплексной терапии, которая способна замедлять и снимать симптомы. Отмена препаратов приведет к еще более заметному проявляю заболевания, поэтому от препаратов передовой терапии требуется максимально пролонгированный эффект при возможности однократного введения и далее рассмотрим возможные варианты.

3.2. Невирусные методы доставки терапевтических конструкций

Теперь сосредоточим внимание на методах, включающих в себя применение генетических конструкций, обеспечивающим более комплексное и пролонгированное действие. В этом случае ключевой сложностью терапии является адресная доставка в целевые клетки организма, которые отличаются иммунологической толерантностью и клеточным ответом по отношению к внешним молекулам-носителям трансгенов. Долгое время в качестве доставщиков использовали рекомбинантные вирусы как самую естественную природную форму передачи генетической информации. Однако в последнее время благодаря развитию коллоидной химии для исследователей стали доступны наночастицы из различных биосовместимых материалов.

3.2.1. Наночастицы для доставки терапевтических молекул

Основное достоинство наночастиц заключается в высокой вариабельности размеров и состава частиц, а также возможности поверхностной модификации для увеличения селективности доставки генетического материала. Особенно популярны и известны стали наночастицы от компании Moderna благодаря производству

высокоэффективной вакцины от коронавирусной инфекции на основе мРНК, инкапсулированной в липидные наночастицы [45].

В качестве основы для синтеза наночастиц используется группа материалов из липидов природного (фосфолипиды) и синтетического (ПЭГилованные, ионизируемые липиды) происхождения, а также молекулы холестерина, которые создают каркас частицы [46]. Использование биосовместимых материалов позволяет существенно уменьшить токсичность и иммуногенность, а применение мРНК сокращает путь синтеза белка до этапа трансляции целевой молекулы. Второе важное преимущество наночастиц заключается в возможности простой вариации размеров частиц в диапазоне от 20 до 100 нанометров, что позволяет подстроиться под размер доставляемого трансгена без существенных ограничений. Данное свойство позволяет существенно расширить количество терапевтических механизмов от доставки целых транскриптов до геномных редакторов, корректирующих единичные или протяженные мутации. Рассмотрим основные примеры применения наночастиц, которые уже были использованы для экспериментальной терапии болезни Штаргардта.

В первую очередь рассмотрим прогресс в области доставки целых транскриптов ABCA4. Группа американских ученых под руководством Sun Da за последние 5 лет [47-48] добилась существенного прогресса по доставке генетического материала гена ABCA4 в клетки ARPE19 с помощью pH чувствительных наночастиц на основе аминолипида ECO [49].

Используемый дизайн частиц на основе заряженных аминолипидов позволил увеличить эффективность проникновения малой интерферирующей РНК через мембрану клетки с результирующим терапевтическим эффектом на 80% клеток. Далее разработанные частицы были использованы для доставки плазмидной ДНК гена ABCA4 под универсальным цитомегаловирусным промотором (CMV) и тканеспецифичным промотором родопсина (RHO). В результате in-vitro экспериментов на культуре человеческих клеток пигментного эпителия ARPE19 разница между промоторами не была была обнаружена, однако по результатам in-vivo экспериментов при субретинальном введении в сетчатке глаза мыши была продемонстрирована наглядная 10-ти кратная эффективность конструкции с RHO [47].

Далее этой же научной группой была проведена модификация как для липидного состава с помощью добавления ПЭГилированных молекул для увеличения времени экспрессии гена с плазмидной ДНК, так и для генетического состава самой плазмиды при замене промотора с RHO на GRK1 и добавлением энхансера S/MAR. В результате модификации на этапе in-vitro с флуоресцентным белком было показана эффективность доставки, сопоставимая с трансдукций AAV2 на момент 48 часов. Однако основное преимущество наночастиц было показано в ходе in-vivo эксперимента при доставке плазмиды с ABCA4. По результату эксперимента было показано, что трехкратное введение препарата способно в 3 раза увеличить уровень экспрессируемой мРНК и в 4 раза уменьшить уровень A2E через 11 месяцев после инъекций [48].

Данный результат наглядно демонстрирует преимущества использования наночастиц по сравнению с рекомбинантными вирусами по эффективности доставки крупных генов, однако длительность экспрессии в случае in-vivo терапии на человеке вызывает дискуссии. По опыту применения вакцины Moderna известно, что терапевтический эффект сохраняется в течение трех месяцев, однако эффект длительной памяти в случае иммунной системы отсутствует. Тем не менее сравнение постоянно обновляющихся клеток крови и высокодифференцированных клеток сетчатки глаза некорректно, однако на текущий момент большинство клинических испытаний сосредоточено вокруг применения мРНК и наночастиц для терапии онкологических заболеваний, где требуется эффективный и кратковременный эффект. В случае уже орфанных заболеваний требуется более стабильная и длительная экспрессия целевого трансгена, что может быть ключевым потенциальным ограничением применения данной технологии при доставке ДНК или РНК молекул.

3.2.2. Применение геномных редакторов для исправления точечных мутаций

Научным трендом последних пяти лет является комбинирование технологии доставки на основе наночастиц и терапии на основе геномного редактирования. Очередная итерация применения геномных редакторов с момента их первого открытия в 2012 году связана с применением различных модификаций CRISPR-CAS системы, которые многократно увеличивают точность и протяженность редактируемой области. Эволюцию редакторов можно наглядно проследить от последовательного усложнения редакторов единичных оснований до прайм-эдиторов от первого до седьмого поколения,

которые позволяют редактировать фрагменты от 20 до 150 пар оснований с увеличением эффективности и точности при каждой новой итерации [50].

Несмотря на недавний срок открытия редакторы уже успели применить к самым распространенным генетическим заболеваниям и болезнь Штаргардта в их числе. На момент написания отчетного документа опубликовано несколько обзорных работ по поиску потенциальных мишеней для редактирования и несколько экспериментальных статей, в которых проводилось редактирование самых частых мутаций.

В первой работе от 2022 года [51] проводилась коррекция единичного основания c.5197-557G>T в интронной последовательности, которая нарушает корректный сплайсинг 36 и 37 экзонов. В качестве клеточных моделей использовались HEK293T для подбора гидовых РНК и дифференцированные до состояния фоторецепторов пациентские стволовые клетки крови. Эффективность редактирования варьировалась от 30 до 60% в зависимости от выбранной гидовой РНК и временных точек анализа на 7 и 35 дней после электропорации клеток.

В следующем исследовании 2023 года [52] были скорректированы мутации в области 28 интрона c.4253+4C>T. В этом случае эффективность редактирования дифференцированных пациентских клеток составила в случае c.4253+4C>T 5% до оптимизации условий и 70% после оптимизации.

В последней работе от 2025 года [53] обсуждается редактирование самой распространенной мутации c.5882G>A с помощью редактора оснований уже на животных моделях мышей и приматов. Благодаря разделенной системе доставки редактора на мышах удалось получить эффективность редактирования в диапазоне от 50 до 80%, а на макаках в диапазоне от 4 до 40% в зависимости от дозы.

Уменьшение эффективности редактирования от 80% на клетках до 40% на самых близких к человеку животных моделях, пока не позволяет строить реалистичные планы в области разработки препаратов на основе редакторов с условием возможных офф-таргет эффектов. Оценка вероятности и локализации ложного срабатывания редакторов является обязательной процедурой при разработке подобных систем, поскольку помимо терапевтического редактирования возможно возникновение новых мутаций при неспецифической работе редактора.

Необходимость в оптимизации условий редактирования и сокращение вероятности офф-таргет эффекта являются на текущий момент лимитирующими условиями для исследования данной технологии, однако возможность отредактировать мутацию в целевых тканях позволит в будущем создать препарат для однократного применения.

Переведем фокус от самых передовых методов к более релевантным, на основе которых ранее создавались препараты и проводились клинические испытания.

3.2.3. Препараты на основе антисмысловых олигонуклеотидов

Параллельно с развитием заместительной генной терапии, в ходе которой доставляются полноразмерные копии функциональных транскриптов, активно использовалась альтернативная методика по доставке коротких фрагментов нуклеиновых кислот для регуляции сплайсинга мРНК и синтеза целевого белка.

Технология называемая антисес или антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) чаще всего представляет собой синтетические короткие цепочки нуклеиновых кислот длиной 16-20 оснований (чаще всего короткие фрагменты мРНК или микроРНК), которые гибридизуются на целевой транскрипт и далее полученный комплекс уже перестает быть функциональным. Таким методом можно заблокировать синтез отдельно взятых белков, что широко используется при терапии онкологии и уменьшении воспалительных процессов отдельных тканях.

Альтернативный механизм работы антисмысловых олигонуклеотидов задействует микроРНК для регуляции сплайсинга экзонов, что было использовано при создании сокращенных версий транскриптов в случае гена SMN1 при терапии спинально мышечной атрофии и гена DMD при терапии дистрофии Дюшена. На сегодняшний день технология отмечает свое двадцатилетие с количественным показателями: 8 зарегистрированных препаратов, 12 на третьей стадии КИ, 62 на второй стадии КИ [54]. Обратимся к испытаниям наиболее релевантным к терапии болезни Штаргардта.

Одним из наиболее ярких примеров применения ASO в лечении болезни Штаргардта является препарат QR-1011, разработанный компанией ProQR Therapeutics [55]. QR-1011 направлен на коррекцию сплайсинга при мутации ABCA4 c.5461-10T>C, одной из наиболее распространенных у пациентов с STGD1. Этот ASO способствует восстановлению нормального сплайсинга и повышению уровня функционального белка ABCA4 в клетках сетчатки. Исследования показали, что QR-1011 может существенно улучшить восстановление темновой адаптации и снизить накопление липофусцина, вредного для фоторецепторов. Однако, несмотря на перспективные результаты, для окончательной оценки клинической эффективности препарата необходимы дальнейшие исследования и испытания.

Несмотря на максимально безопасный и простой механизм терапия антисмысловыми нуклеотидами имеет ряд ограничений. Главная проблема также заключается специфической доставке нуклеотидов, поскольку при системном введении требуются высокие дозы, что может привести к избыточному накоплению в печени, почках. Таргетирование антисмысловых нуклеотидов возможно с помощью наночастиц и рекомбинантных вирусов, которые будут рассмотрены далее. Второй существенный минус применения ASO заключается в постоянном и пожизненном применении препарата для поддержания эффекта, что отбрасывает разработку на более низкий технологический уровень малых молекул.

Таким образом, анализ невирусных методов доставки подчеркивает их основные ограничения в виде проблем таргетирования молекул, ограниченного и короткого срока действия, а также непредсказуемость последствий в случае геномных редакторов. В качестве положительных сторон стоит отметить долгий срок испытаний препаратов на основе малых молекул и антисмысловых олигонуклеотидов с доказанной краткосрочной эффективностью, а также потенциальной возможностью однократного введения при использовании редакторов. В будущем технология геномного редактирования способна в корне изменить подход к терапии наследственных заболеваний, однако пока технология не изучена в полной мере на стадии in-vivo и требует серьезных этапов оптимизации на этапе in-vitro.

3.3. Вирусные методы доставки терапевтических конструкций

Далее рассмотрим наиболее изученные методы терапии наследственных заболеваний, которые используют рекомбинантные вирусные частицы для доставки терапевтических трансгенов. В данном методе вирусы используются по своему прямому природному назначению - доставки и распространение генетического материала в максимально большое число клеток. В отличие от природных вирусов, которые несут генетическую информацию для воспроизведения вирусного цикла, рекомбинантные вирусы выполняют роль селективного транспортера в виде белковой оболочки, способной эффективно проникать в таргетированную ткань.

Ключевым отличием производства вирусных частиц от липидных частиц является необходимость их биологического пути синтеза в клетке с помощью отдельных вспомогательных генетических элементов, кодирующих структурную и репликативную информацию вируса [56]. Собранные частицы очищаются от сборочных плазмид и полученный вирус выполняет функцию уже векторной системы для доставки целевого генетического материала в эукариотические организмы, после чего деградирует и метаболизируется как белковая частица. Естественным ограничением для работы вирусных частиц являются нейтрализующие антитела организма на самые распространенные инфекционные штаммы. Поэтому в разработке чаще всего используют крайне редкие штаммы или вирусы, полученные от других биологических видов [57].

Вторым важным ограничением со стороны иммунной системы является размер вирусной частицы, которая из-за сложной структуры чаще всего превышает ограничение в 100 нанометров и переходит в класс субмикронных частиц. Частицы такого класса уже намного эффективнее распознаются иммунной системой и вызывают сильный иммунный ответ, воспаление и избыточную нагрузку на внутренние органы. Тем не менее размер частицы чаще всего сопряжен с емкостью доставляемого трансгена, что накладывает ограничение уже со стороны дизайна экспрессионной кассеты [58].

Среди самых распространенных классов вирусных частиц можно отметить лентивирусы (размер частицы - 130 нм, емкость - 9 килобаз), аденовирусы (размер частицы - 120 нм, емкость - 8 килобаз) и адено-ассоциированные вирусы (размер частицы - 20 нм, емкость - 5 килобаз). На текущий момент количество клинических испытаний препаратов генной терапии на основе перечисленных классов вирусов превышает 1200 испытаний и 8 препаратов уже зарегистрировано FDA [59]. Рассмотрим далее варианты применения вирусов для терапии болезни Штаргардта.

3.3.1. Терапия на основе лентивирусных векторов

Лентивирусы в генной терапии используют множество вирусных векторов, которые являются частью ретровирусного семейство. Отличительными особенностями данного семейства являются наличие внешней и внутренней оболочки, внутри которой располагается вирусная РНК. Как и большинство РНК вирусов лентивирусы обладают высокой трансдуцирующией способностью, высокой скоростью репликации и

интегративностью в геном клетки-хозяина. Последнее свойство позволяет вносить необратимые направленные корректировки в геном, однако велика вероятность и спонтанных интеграция, способных вызывать онкогенез. Ключевым преимуществом данной платформы является стабильный и необратимый эффект интеграции в геном, а недостатками крайне высокая иммуногенность и вероятность внесения неспецифических мутаций. К самым известным используемым представителям ретровирусов относятся вирус иммунодефицита человека (ВИЧ или HIV) и вирус инфекционной анемии лошадей (ИНАН или EIAV) [60].

Одной из первых попыток генетических терапий болезни Штаргардта заключалась в использовании EIAV для доставки гена ABCA4, поскольку вирус обладал необходимой пакующей емкостью в 8 килобаз. Первые экспериментальные in-vivo результаты появились в 2006 году, в которых отмечался эффект после субретинальной инъекции у мышей с дозой в 1×105 трансдукционных единиц (TU) на глаз, а у макак с дозой в 1×106 трансдукционных единиц (TU) на глаз через две недели после инъекции. Эффект от трансдукции у мышей сохранялся на протяжении года после инъекции, количество A2E значимо снижалось, а уровень экспрессии функционального ABCA4 увеличивался в фоторецепторных и клетках пигментного эпителия [61]. Положительный эффект послужил основанием для клинических испытаний 1-2 фазы КИ препарата StarGene компанией Oxford BioMedica [62].

В ходе клинических испытаний пациентам проводились субретинальные инъекции под местной анестезией с использованием витреоретинальной хирургии, гидравлической ретиномии и трех доз препарата от $1{,}0 \times 10^6$ до $1{,}8 \times 10^6$ трансдукционных единиц (TU) на глаз. Всего в исследовании приняло участие 27 пациентам, при этом не наблюдалось серьезных побочных эффектов, но в 2019 году исследование было завершено по завершению финансирования исследования.

Клиническая эффективность не была подтверждена и только в единичном случае наблюдалось значительное снижение числа липофусциновых отложений на макуле в обработанном глазу по сравнению с необработанным, а в 27% случаев наблюдалось ухудшение состояния пигментного эпителия сетчатки в обработанном глазу, что может быть связано с механическим воздействием при инъекции [62]. Все пациенты, получившие лечение, были переведены на программу поддержки в течение следующих 15-ти лет. За продолжительное время от начала клинических испытаний разработчики биотехнологических препаратов активно развивали платформу на основе

аденоассоциированных вирусов, которая требовала применения дополнительных технологических решений для преодоления пакующей емкости AAV.

3.3.2. Терапия на основе аденоассоциированных вирусных векторов

Аденоассоциированный вирус является одной из самых распространенных платформ для терапии наследственных заболеваний. Предпосылок для его использования изначально было несколько, однако самым очевидным является его крайне низкая иммуногенность, поскольку вирус был обнаружен в качестве сателлита аденовируса в человекоподобных обезьянах. Малый размер в 20 нанометров, многообразие серотипов с разной тканеспецифичностью и отсутствие нейтрализующих антител у человека делает данный вирус крайне популярным при разработке генно-терапевтических препаратов из-за высокой клинической эффективности и безопасности [64]. Подтверждением последнего тезиса является факт регистрации 8 препаратов на основе AAV, которые были зарегистрированы FDA и один отечественный препарат, который находиться на третьей стадии клинических испытаний [59].

Несмотря на достоинства у AAV платформы с самого начала была известна проблема в ограничении доставляемого трансгена всего в 4,5 килобазы, что накладывает ограничение на терапию около 1 тысячи генов человека. Специфично к офтальмологии таким генам относятся ABCA4, USH2A, CEP290, однако самым востребованным остается именно болезнь Штаргардта, которая имеет четко выраженный и локализованный в тканях глаза фенотип, а также размер трансгена, который может быть упакован в два разных вируса. В связи с известными особенностями было предложено несколько стратегий для преодоления имеющегося ограничения, которые будут рассмотрены далее.

3.3.3. Доставка сокращенных версий ABCA4

Самое очевидное техническое решение проблемы крупных генов является создание сокращенных функциональных версий их транскриптов для упаковки в единичный вектор. Однако с точки зрения дизайна конструкций данное решение является крайне нетривиальным, поскольку требует детального анализа структуры белка конечного белка и сокращения повторяющихся или дублирующихся областей. По

такому принципу были ранее успешно созданы миди, мини и микроверсии гена дистрофина, последний из которых используется в качестве препарата от дистрофии Дюшена [65].

Аналогичный опыт был воспроизведен и для мини-гена ABCA4, который включал в себя отельные экзоны первой половины белка, поскольку его структура содержит две функционально гомологичных части. Полученный мини-ген был доставлен в сетчатку мышей с помощью AAV-вектора второго серотипа. Результаты показали восстановление функции фоторецепторов и снижение накопления липофусцина, что является характерным признаком STGD1[66].

Таким образом, использование мини-гена ABCA4 представляет собой перспективный подход в терапии болезни Штаргардта, позволяя эффективно доставлять функциональный ген в сетчатку и частично восстанавливать нормальную функцию [67]. Единственное ограничение данного метода заключается в измерении активности получаемого белка, которое может произойти при изменении доменного и структурного состава. Данное исследование требует отдельной разработки клеточных тестов на основе первичных клеток фоторецепторов, что является отдельной технически сложной задачей. Далее рассмотрим подходы, которые позволяют получить полноразмерные транскрипты ABCA4 и их белковые продукты.

3.3.4. Доставка полноразмерных версий ABCA4

Вторая стратегия заключается в раздельной доставке генетического материала ABCA4 и сборке целого в доставляемой клетке. Из обзорных статей [68] известно, что данную задачу можно решить на трех уровнях организации генетического материала: ДНК, РНК и белка. Ген ABCA4 подходит для эффективного разделения на две части, поэтому к нему уже были применены все известные методы. Далее рассмотрим некоторые технические особенности реализации каждого метода, чтобы нагляднее подчеркнуть все достоинства и недостатки каждого метода.

Сплайсинг на уровне нуклеиновых кислот

Явление гибридизации нуклеиновых кислот по правилу комплементарности широко используется в молекулярной биологии для создания рекомбинантных ДНК, например на этапе синтеза генов из фрагментов в ходе ПЦР реакции. Сборка очищенных от примесей фрагментов ДНК в оптимальной буферной системе чаще всего не вызывает трудностей, однако тоже действие в живой клетке происходит с намного меньшей вероятностью и эффективностью. Чтобы увеличить вероятность взаимодействия молекул ДНК к ним добавляют различные сигнальные последовательности, которые должны указать вспомогательным ферментам порядок и очередность связывания частей между собой.

Итоговая наиболее результативная стратегия заключается в последовательном применении инвертированных терминальных повторов для конкатенации геномов AAV в ядре клетки, дальнейшей рекомбинации донорно-акцепторных последовательностей (пара SA-SD) на уровне РНК сплайсинга усиленных действием щелочной фосфатазы [69]. Комбинация всех трех механизмов позволила провести раздельную доставку и сборку генов EGFP, ABCA4 и MYO7A сначала на клеточных культурах, а потом на мышиных нокаутных моделях. По результату данной работы был зарегистрирован международный патент [70], что является самой близкой заявкой на создание препарата от итальянского коллектива авторов.

Отметим также, что еще один европейский коллектив также использовал механизм РНК сплайсинга для создания препарата VG801 от компании ViGeneron [71]. Основной особенностью заявленного препарата является капсид vgAAV, разработанный ViGeneron, который обладает улучшенной тропностью к клеткам сетчатки и способствует более равномерному распределению терапевтического материала в тканях глаза, повышая эффективность трансдукции. Усиленный механизм РНК сплайсинга на основе расширения акцепторной области до 50 пар оснований с добавлением третьего регуляторного элемента (в итоге последовательность была названа SAS) позволило получить более эффективный вариант транс-сплайсинга, чем у конкурентов. В итоге препарат VG801 был одобрен FDA для проведения I-II фазы клинических испытаний в декабре 2024 года, что свидетельствует о высоком потенциале препарата и стратегической значимости его разработки.

Единственным недостатком сплайсинга на основе нуклеиновых кислот является время и вероятность, при которой произойдет рекомбинация фрагментов. В случае ДНК направленного сплайсинга вероятность рекомбинации намного ниже, чем у РНК, однако вероятность образования белковых полупродуктов практически нулевая. В случае с РНК высокая вероятность синтеза белка с каждой из разделенных частей, что может теоретически увеличить цитотоксическую нагрузку на клетку со стороны белка и РНК. Однако вероятность последнего события крайне мала и будет достоверно известна после клинических испытаний VG801.

Сплайсинг на уровне белковых молекул

Следующий метод является альтернативой РНК сплайсингу на уровне молекулярного механизма, однако именно это отличие кратно увеличивает эффективность и скорость образования конечного белкового продукта. Речь идет о применении белкового транс-сплайсинга на основе интеинов, которые зарекомендовали себя как универсальный и многофункциональный биотехнологический инструмент для работы с белковыми молекулами.

В основе метода лежит уникальное свойство интеинов - вспомогательных белков, выполняющих функцию белковых интронов для соединения двух раздельных трансляционных единиц в одну функциональную полипептидную цепь после самовыщепления. При этом важно отметить, что в отличие от сплайсинга нуклеиновых кислот, реакция проходит на уровне белков по принципу автокаталитической реакции по принципам сначала аффинных, а потом энергетических взаимодействий между белковыми интерфейсами. В результате реакция не требует дополнительных катализаторов и условий, поскольку основная механика реакции проходит на уровне аминокислотных последовательностей. Ключевой проблемой при использовании данной технологии является необходимость проводить дизайн генетической конструкции индивидуально к каждому белку, поскольку на эффективность сплайсинга будет равнозначно влиять аминокислотный состав и конформация молекулы, что было продемонстрировано в нашей экспериментальной работе [72].

Первенство в использовании технологии интеинового транс-сплайсинга также принадлежит итальянскому коллективу Trapani, которые в 2019 году применили интеин NpuDnaE для раздельной доставки EGFP и CEP290 в клетки HEK293 и глаза нокаутных мышей [73]. По результату in-vivo исследований на гистологических срезах на примере EGFP была наглядно продемонстрирована многократная эффективность интеинового транс-сплайсинга по сравнению с ДНК сплайсингом.

Далее изучение интеинового транс-сплайсинга было расширено в работе китайского коллектива от 2023 года, которые провели расширенный скрининг наиболее актуальных интеинов (Npu, Ssp, Rma и Cfa) уже для раздельной доставки ABCA4 [74]. В результаты было выявлено три сайта, которые разделяют один белок в разных положениях, и два интеина, которые эффективно восстанавливают структуру и функции полноразмерного ABCA4. Функциональность была подтверждена в in-vivo условиях с помощью поведенческих тестов, а также по изменению уровня A2E через год после введения 1×108 вирусных частиц на глаз.

Единственный недостаток применяемой технологии заключается в накоплении прореагировавших между собой интеинов, поскольку они принадлежат к классу белков простейших эукариот. Метаболизм данных белковых структур уже невозможен в более эволюционно далеких организмах, поэтому для безопасного выведения коллектив итальянских первооткрывателей предложил в 2021 году использование дегронов [75]. Полученные из других простейших последовательности дегронов эффективно устраняют остаточные продукты реакции белкового транс-сплайсинга, направляя интеины в протеасомы для безопасного метаболизма. Авторами отмечается возможное снижение эффективности реакции транс-сплайсинга из-за увеличения последовательности N интеина и преждевременном протеолизе N фрагмента, однако на текущий момент данное решение является единственным для повышения биологической безопасности препарата. На момент написания статьи данных о возможном токсическом действии интеинов для эукариот пока неприводится, поскольку in-vivo эксперименты стартовали недавно. Технология уже зарекомендовала себя как крайне эффективная и нашла еще одно применение в области сборки геномных редакторов.

3.4. Выводы по разделу

Резюмируя, анализ известных подходов к терапии болезни Штрадграда можно сделать следующие выводы. Долгое время большая часть клинических испытаний направлена на поиск и применение препаратов на основе малых молекул, которые частично облегчают симптомы, но не воздействуют на причину заболевания и требуют постоянного и ежедневного применения. За последние четыре года ситуация в корне изменилась с приходом технологий геномного редактирования, доставки с помощью наночастиц, получения новых инженерных серотипов AAV, эффективного применения технологии РНК и белкового сплайсинга. Каждая из технологий имеет ряд достоинств и недостатков, однако платформа доставки трансгенов на основе аденоассоциированных вирусов пока является наиболее перспективной с учетом нескольких зарегистрированных и применяемых офтальмологических препаратов. Конкретный терапевтический механизм пока еще не выбран, однако антисмысловые олигонуклеотиды, РНК и белковый спалайсинг пока имеют наибольшие шансы на результативное применение. Далее рассмотрим в качестве одного из примеров условия реализации технологии в Российской Федерации на текущий момент.

4. Предлагаемое решение по разработке препарата

Используя опыт предыдущих разработок, мы выбрали применение интеинового транс-сплайсинга в качестве основной технологии для раздельной доставки частей гена ABCA4. На основе работы [74] нами был выбран 1147 сайт для разделения белка, в качестве интеинов были выбраны представители семейства DnaE (Ssp, Npu, Ava), в качестве серотипа нами рассматривается 8-ой природный серотип и модифицированный 2-ой серотип с вариантом K91 [76]. Далее перечислим обоснования к выбранным модификациям.

В первую очередь отметим высокую эффективность (до 80%) в сборке конечного белкового продукта при использовании белкового транс-сплайсинга. Данный метод также предотвращает возможные неспецифические варианты мутаций или ошибок, которые потенциально могут произойти в ходе рекомбинации двух молекул на основе нуклеиновых кислот. Пролонгированный положительный терапевтический эффект уже был функционально продемонстрирован на мышах, поэтому нами была выбрана данная технология в качестве основы для разработки.

В ходе изучения самих интеинов мы также обнаружили особенности, о которых редко упоминают в литературе. В первую очередь стоит напомнить об уникальном свойстве, которое заключается в реакции автокатализа на основе энергетического взаимодействия аминокислот. Данное свойство было продемонстрировано нами на примере сборки и разделения молекулы EGFP по трем сайтам, специфичным для интеинов группы DnaE [72].

Экспериментально было доказано, что данный модельный белок можно эффективно разделить только в единственном варианте, чтобы далее получить функциональную молекулу. Эта особенность заключается в уникальном составе и состоянии аминокислот, которые находятся на стыке целевого белка и интеина. Только в варианте, когда композиция аминокислот находится в энергетически невыгодной цис конформации с каждой из N и C частей, происходит эффективный сплайсинг по выбранному сайту. Для определения оптимального сайта нами был использован и адаптирован алгоритм поиска потенциальных сайтов разделения белков для интеинов группы DnaE. В случае ABCA4 наши расчетные данные совпали с литературными, что дает нам уверенность в результативности применяемого метода для интеинов группа DnaE. При этом важно отметить, что использование интеинов другой ферментативной группы изменит состав аминокислот и положение сайтов для разделения.

Выбор интеинов группы DnaE был связан с высокой степенью изученности природных интеинов данной ферментативной группы, а также высокими выходами в результате реакции транс-сплайсинга. Углубленное изучение свойств интеинов позволило экспериментально подтвердить высокую эффективность реконструкции EGFP с помощью интеина NpuDnaE как после контрансфекции, так и после котрансдукции. Дополнительно нами был произведен комплекс исследований по оптимизации выходов реакции транс-сплайсинга, который включал подбор оптимальной концентрации реактивов, рациональный мутагенез аминокислотной последовательности интеинов и изучение свойств кросс-реактивности. По каждому из пунктов далее планируется публикация от нашего авторского коллектива, однако предварительно мы получили комбинацию интеиновой пары, которая способна увеличить эффективность транс-сплайсинга на 10% относительно природной комбинации по результату восстановления количества функционального EGFP. Полученная модификация может быть далее запатентована после подтверждения результатов при эффективной сборке белка ABCA4.

Помимо эффективности мы планируем модифицировать конструкцию путем добавления дегрона, чтобы увеличить безопасность разрабатываемого препарата. Комбинирование и оценка эффектов от модификаций на основе рационального мутагенеза и добавления дегронов по параметрам эффективности и безопасности является на текущий момент основной целью нашей экспериментальной работы на этапе in-vitro тестирования.

Также в нашей лаборатории уже не первый год проводятся эксперименты по генно-инженерной модификации второго серотипа AAV. Ранее нами сообщалось о высокой трансдуцирующей способности капсида AAV2 7M8 по отношению к клеткам пигментного эпителия [77]. На сегодняшний день мы планируем использовать новую модификацию второго серотипа K91, которая увеличивает трансдуцирующую способность уже в отношении фоторецепторов. Мы планируем использовать обозначенное сочетание эффективной доставки и используемого нами механизма белкового транс-сплайсинга для создания улучшенного препарата терапии болезни Штаргардта. Теперь обратимся к срокам реализации предлагаемого нами решения.

5. Ключевые этапы и сроки при разработке препарата

С учетом нашего предыдущего опыта оптимизации белкового транс-сплайсинга, мы можем предложить следующую дорожную карту проекта, представленную на рисунке 1, учитывающую актуальные сроки реализации. Коротко перечислим основные этапы.

Перечисленные выше предложения по модификации генетических конструкций требуют ресурсо-временных затрат по дизайну модификаций и синтезу олигонуклеотидов, который производится на платформе Университета Сириус группа олигосинтеза в течение одного месяца.

Далее научными сотрудниками направления Генная терапия проводится сборка ДНК фрагментов и предварительное клонирование в пустой вектор для получения конструкций без мутаций. С учетом известных проблем в ходе сборки и корректировки мутаций данная процедура также занимает от четырех до шести недель.

После проверки составных частей производится поэтапное клонирование вспомогательных конструкций и частей целевого транскрипта ABCA в упаковочный вектор pAAV-CMV-MCS. Процедура клонирования в этом случае занимает ориентировочно от двух до четырех недель, однако далее необходимо полноплазмидное

секвенирование, которое также занимает от также от двух до четырех недель с учетом анализа данных.

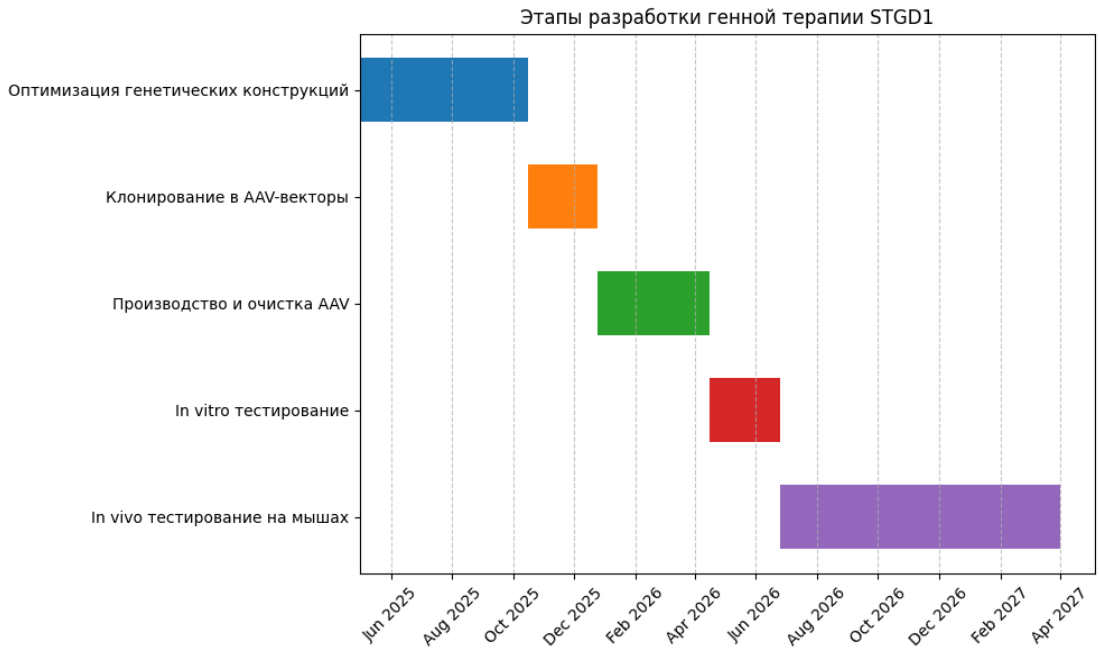

Рис.1.Основные временные сроки разработки препарата генной терапии болезни Штаргардта.

В случае успешного клонирования следующим этапом является оптимизация методики наработки AAV в суспензионных клетках HEK293, которая выполняется сотрудниками ресурсного центра биотехнологических препаратов в течение двух месяцев под каждый отдельный препарат индивидуально с учетом заполненности экспрессионной кассеты и выбранного серотипа.

Далее выполняется физико-химическая аналитика наиболее успешной серии препарата сотрудниками ресурсного центра аналитических методов в течение месяца. В ходе исследования применяются методы гель-электрофореза для подтверждения подлинности капсидов, трансмиссионная электронная микроскопия для оценки соотношения пустых и полных капсидов, высокоэффективная жидкостная хроматография для оценки чистоты препарата, малоугловое светорассеяние для оценки физического титра вирусных частиц, иммуноферментативный анализ для оценки белкового титра вирусных частиц, количественная ПЦР для оценки геномного титра вирусных частиц. В случае если требуется обогащение или доочистка препарата

вирусных частиц применяется ультрацентрифугирование или аноинообменная хроматография и повторная аналитика в течение месяца.

Следующим этапом является проверка биологической активности и трансдукцирующей способности полученных вирусов in-vitro на клеточных культурах человека HEK293 и ARPE19. В ходе клеточных тестов подбирается оптимальная доза для трансдукции, изучается эффективность доставки и профиль выживаемости клеток с помощью проточной цитометрии, локализация целевых белков в клетках с помощью конфокальной микроскопии и иммуногистохимии, корректность сборки итогового белкового продукта с помощью Вестерн-блоттинга. Суммарно in-vitro исследования могут занимать от четырех до шести недель с учетом использования нескольких экспериментальных, биологических и технических повторов для накопления статистических данных.

Завершающим этапом доклинических испытаний является in-vivo эксперименты на нокаутных мышиных моделях по гену ABCA, в которых необходимо оценить биологическую эффективность вирусных частиц и безопасность инетинов, подобрать и отработать метод внутриглазных инъекций и далее определить локализацию доставляемых конструкций в ткани глаза с помощью иммуногистохимии, провести оптомоторные тесты для определения остроты зрения и снять электроретинограмму для регистрации электрической активности сетчатки в ответ на световые стимулы, а также оценить концентрацию накапливаемого A2E. Все перечисленные тесты необходимо провести на трех временных точках: 3, 6 и 12 месяцев, поэтому на данный этап закладывается минимум полгода или год в зависимости от получаемых результатов.

Таким образом, до завершения доклинической стадии и готовности к переходу к клиническим исследованиям требуется в среднем от полутора до двух с половиной лет. При выходе на клинический этап дополнительно потребуется еще 1–2 года на масштабирование производства по стандартам GMP, проведение токсикологических исследований и подготовку всей необходимой документации для подачи заявки на начало клинических испытаний. Итоговый срок от начала проекта до старта первой фазы клиники - около 3–4 лет.

6. Предварительная стоимость разработки

Проведем предварительную оценку финансовой части разработки. Распределение стоимости каждого из этапов представлено на рисунке 2.

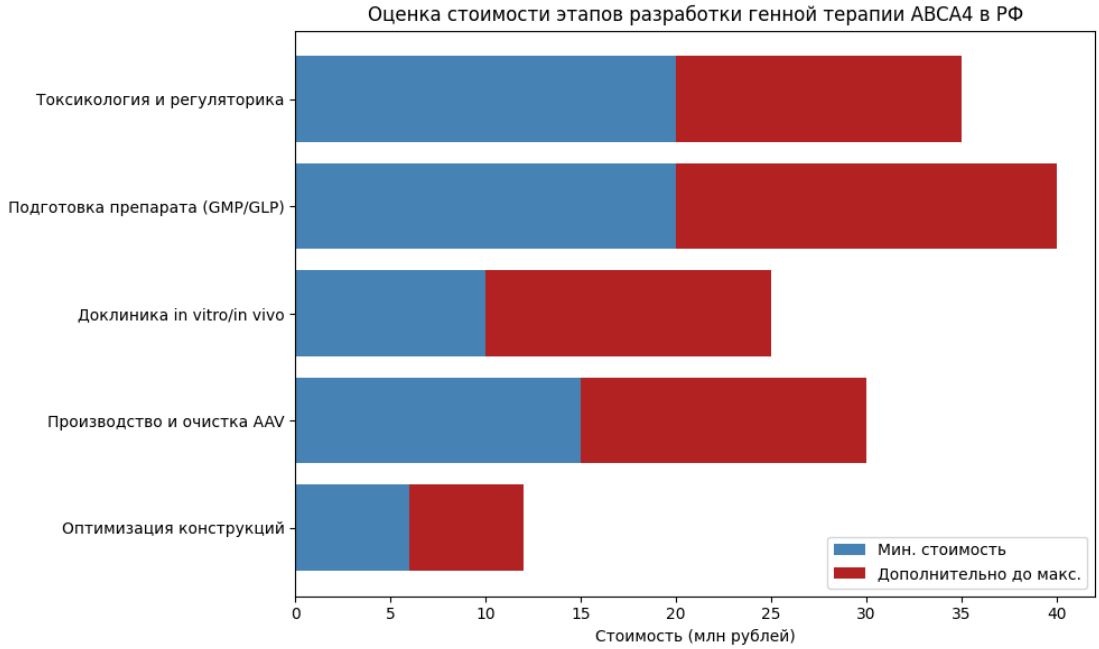

Рис.2.Оцениваемая стоимость основных этапов разработки препарата генной терапии болезни Штаргардта.

Самых больших финансовых вложений требует подготовка препарата по правилам GMP и GLP производства. Большую часть вложений требует специальное оборудование помещений под заданный класс чистоты и стерильности, а также закупка дорогостоящего оборудования. Данную статью расходов можно существенно сократить, если использовать готовые производственные помещения на базе крупных фармацевтических заводов, которые имеют все необходимые лицензии на работу в стерильных условиях.

Следующая статья расходов касается стадии уже клинических испытаний, где требуется широкий профиль аналитики в долгосрочной перспективе подтверждающих безопасность и эффективность препарата. Отдельным аспектом является регуляторика в области проведения клинических испытаний на людях, что требует постоянного поддержания пациентов, решения регуляторных аспектов и других затрат в перспективе на 5-10 лет. Отдельную сложность составляет набор экспериментальных групп,

поскольку количество отобранных добровольцев пока не превышало 30 человек, что делает практически невозможной третью стадию клинических испытаний.

Третья статья расходов направлена на закупку расходных материалов и реактивов на производство и характеризацию AAV частиц. Большая часть расходов связана с культивацией клеточных культур в производственном формате и использованием одноразовых стерильных расходных материалов. Также большой статьей расходов являются реактивы для очистки вирусных частиц в виде сорбентов для хроматографий, систем фильтрации и концентрирования. Примерно четверть стоимости от производства составляет аналитика для подтверждения физико-химического качества получаемого препарата.

Расходы на доклинические испытания в основном связаны с долгосрочным содержанием животных из-за фенотипа наследственного заболевания. Для оценки динамики в случае болезни Штаргардта требуется минимум полгода-год для регистрации значимых изменений прижизненно или посмертно с имеющимися расходными материалами для гистологии.

Получение и оптимизация генетических конструкций требует наименьших вложений, однако стоимость при получении кодон-оптимизированных конструкций прямо пропорциональна длине целевого трансгена. В остальном работа заключается в применении ферментов генной инженерии и работы с бактериями, что не требует масштабных вложений.

Стоимость отдельных этапов может быть существенно сокращена, если использовать уже готовые научно-производственные площадки, которые имеют необходимые производственные мощности для выпуска фармсубстанций, проведения клинических и доклинических испытаний.

7. Технологическая база для реализации разработки в РФ

В качестве технологической базы на ранних этапах разработки фармацевтических препаратов может быть использован Университет Сириус, который обладает широким парком высокотехнологичного оборудования, наличием квалифицированных специалистов и высокоорганизованной структурой научных и ресурсных центров.

Научный центр трансляционной медицины Университета Сириус совместно с ресурсным центром Аналитических методов и Биотехнологических препаратов третий год занимаются разработкой внутренних препаратов и технологическим сопровождением внешних препаратов, которые поступают от технологических партнеров университета, в списке которых ведущие фармкомпании Генериум, Р-фарм, Биокад. В ресурсных центрах сосредоточено все необходимое оборудование для производства олигонуклеотидов, рекомбинантных плазмид и белков, моноклональных антител, вирусных частиц в помещениях GMP класса, что может существенно снизить стоимость разработки на этапах разработки и in-vitro тестирования молекулы.

Для масштабирования производства препарата сейчас завершаются работы по строительству университетской аптеки, где планируется переход от лабораторных форматов до малых производственных. Увеличение производственной мощности при серийном производстве возможно по договоренности с фармкомпаниями партнерами Генериум, Р-фарм, Биокад имеющими соответствующие методики. Также на базе Университета Сириус возможно составление всех необходимых методик выпускного контроля, которые далее могут быть транслированы на производства.

Через год на платформе Университета Сириус планируется открытие собственного вивария для работы с лабораторными животными: мыши, крысы, кролики. Совместно с Курчатовский комплекс медицинской приматологии НИЦ "Курчатовский институт" возможно расширение доклинических исследований до приматов.

Через два года на платформе Университета Сириус должна появиться инновационная клиника, которая будет внедрять разработки университета в реальную клинику и проводить экспериментальное лечение. Особый статус федеральной территории позволяет вводить правовые исключения, что должно способствовать развитию современной медицины с применением экспериментальной терапии и передовых препаратов.

Важным аспектом также является тот факт, что университет несет и образовательную миссию для подготовки кадров, способных реализовывать инновационных разработки не только на территории университета, но и по всей стране. Поэтому в ближайшем будущем возможно также создание компаний стартапов, которые

будут поддержаны современными инновационными центрами такими как Сколково, Иннополис, Алабуга, Хайпарк ИТМО, инновационный центр МГУ.

На сегодняшний день Университет Сириус является одним из ведущих центров по привлечению современных научных и технических специалистов по мегагрантовым программам поддержки востребованных исследований в области наук о жизни. С каждым годом инфраструктура университета расширяется, что открывает новые возможности для развития научных достижений и интеграции их современную практику.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на текущий момент генозаместительная терапия с использованием двойных адено-ассоциированных вирусов (AAV) с применением белкового транс-сплайсинга является наиболее перспективной технологией для разработки препарата, поскольку сочетает в себе параметры эффективности и безопасности.

Наше предложение по модификации технологии включает создание серотипа K91, специфичного для трансдукции фоторецепторов на основе второго сеортипа, и модификации интеинов с помощью дегронов и направленных мутаций. В результате мы ожидаем получить препарат, который обладает высокой трансдуцирующей способностью, эффективным восстановлением функций метаболизма A2E и биологической безопасностью для клеток тканей глаза.

Для реализации предложения требуется финансирование на протяжении 2 лет в объеме 40-50 млн рублей для проведения основных этапов разработки до завершения доклинических испытаний на мышах. В качестве платформы для реализации мы предлагаем научный центр Трансляционной медицины Университета Сириус, который обладает уникальной научной и приборной базой, необходимой для разработки, тестирования и производства генотерапевтических препаратов на основе AAV. Инфраструктура Сириуса позволяет проводить все ключевые этапы разработки, включая синтез и очистку вирусных векторов, трансфекцию клеток, а также доклинические исследования на клеточных моделях и животных. В дальнейшем, успешные разработки могут быть перенесены на клинические испытания, что значительно ускоряет процесс перехода от лаборатории к пациентам.

В завершении отметим, что интерес к разработке геннотерапевтических препаратов в РФ с каждыми годом все больше растет и высока вероятность экспоненциального роста в ближайшие 5-10 лет после регистрации первого отечественного геннотеравтического препарата для терапии Гемофилии Б. Текущий уровень развития и разнообразия технологий позволяет строить позитивный прогноз на получения даже нескольких методов лечения ранее неизлечимых заболеваний, которые смогут выбрать пациенты в ближайшем будущем.

Список источников

1. Kuliev A., Verlinsky Y. Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis //Human reproduction update. – 2004. – Т. 10. – №. 5. – С. 401-407.
2. Basu A. K., Essigmann J. M. Establishing linkages among DNA damage, mutagenesis, and genetic diseases //Chemical research in toxicology. – 2022. – Т. 35. – №. 10. – С. 1655-1675.
3. Kenney A. D. et al. Human genetic determinants of viral diseases //Annual review of genetics. – 2017. – Т. 51. – №. 1. – С. 241-263.
4. McKusick V. A. Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM //The American Journal of Human Genetics. – 2007. – Т. 80. – №. 4. – С. 588-604.
5. Статистика записей // OMIM URL: https://www.omim.org/statistics/entry (дата обращения: 02.02.25).
6. Hekselman I. et al. The organ-disease annotations (ODiseA) database of hereditary diseases and inflicted tissues //Journal of Molecular Biology. – 2022. – Т. 434. – №. 11. – С. 167619.
7. Savojardo C. et al. Mapping OMIM disease–related variations on protein domains reveals an association among variation type, Pfam models, and disease classes //Frontiers in molecular biosciences. – 2021. – Т. 8. – С. 617016.
8. Kumar P. et al. Ion channels in neurological disorders //Advances in protein chemistry and structural biology. – 2016. – Т. 103. – С. 97-136.
9. Rodríguez-Sinovas A. et al. Connexins in the heart: regulation, function and involvement in cardiac disease //International journal of molecular sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 9. – С. 4413.
10. Allikmets R. et al. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database //Human molecular genetics. – 1996. – Т. 5. – №. 10. – С. 1649-1655.
11. Srikant S. Evolutionary history of ATP-binding cassette proteins //FEBS letters. – 2020. – Т. 594. – №. 23. – С. 3882-3897.
12. Zolnerciks J. K. et al. Structure of ABC transporters //Essays in biochemistry. – 2011. – Т. 50. – С. 43-61.

13. Sabirzhanova I. et al. Rescuing trafficking mutants of the ATP-binding cassette protein, ABCA4, with small molecule correctors as a treatment for Stargardt eye disease //Journal of Biological Chemistry. – 2015. – Т. 290. – №. 32. – С. 19743-19755.
14. Liu Q. et al. The CFTR corrector, VX-809 (lumacaftor), rescues ABCA4 trafficking mutants: a potential treatment for Stargardt disease //Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. – 2019. – Т. 53. – №. 2. – С. 400.
15. ABCA4 Gene - ATP Binding Cassette Subfamily A Member 4 // GeneCards URL: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCA4&keywords=ABCA4#domains_families (дата обращения: 02.03.25).
16. ABCA4 Gene - ATP Binding Cassette Subfamily A Member 4 // National Center for Biotechnology Information URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24 (дата обращения: 02.03.25).
17. Al-Khuzaei S. et al. An overview of the genetics of ABCA4 retinopathies, an evolving story //Genes. – 2021. – Т. 12. – №. 8. – С. 1241.
18. P78363 · ABCA4_HUMAN // Uniprot URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/P78363/variant-viewer?loadVariants=true (дата обращения: 02.03.25).
19. Piotter E., McClements M. E., MacLaren R. E. The Scope of Pathogenic ABCA4 Mutations Targetable by CRISPR DNA Base Editing Systems—A Systematic Review //Frontiers in Genetics. – 2022. – Т. 12. – С. 814131.
20. Wang L. et al. Updates on emerging interventions for autosomal recessive ABCA4-associated Stargardt disease //Journal of Clinical Medicine. – 2023. – Т. 12. – №. 19. – С. 6229.
21. Sparrow J. R. et al. A2E, a pigment of RPE lipofuscin, is generated from the precursor, A2PE by a lysosomal enzyme activity //Recent Advances in Retinal Degeneration. – New York, NY : Springer New York, 2008. – С. 393-398.
22. Molday R. S. Insights into the molecular properties of ABCA4 and its role in the visual cycle and Stargardt disease //Progress in molecular biology and translational science. – 2015. – Т. 134. – С. 415-431.
23. Quazi F., Molday R. S. ATP-binding cassette transporter ABCA4 and chemical isomerization protect photoreceptor cells from the toxic accumulation of excess 11-cis-retinal //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Т. 111. – №. 13. – С. 5024-5029.

24. STARGARDT DISEASE 1 // OMIM URL: https://omim.org/entry/248200 (дата обращения: 02.03.25).
25. Stargardt K. Über familiäre, progressive Degeneration in der Maculagegend des Auges //Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie. – 1909. – Т. 71. – С. 534-550.
26. Franceschetti A., Francois J. Fundus flavimaculatus //Archives d'ophtalmologie et revue generale d'ophtalmologie. – 1965. – Т. 25. – №. 6. – С. 505-530.
27. Allikmets R. et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Starqardt macular dystrophy //Nature genetics. – 1997. – Т. 15. – №. 3. – С. 236-246.
28. Зольникова И. В., Рогатина Е. В. Дистрофия Штаргардта: клиника, диагностика, лечение //Клиницист. – 2010. – №. 1. – С. 33-38.
29. Zaneveld J. et al. Comprehensive analysis of patients with Stargardt macular dystrophy reveals new genotype–phenotype correlations and unexpected diagnostic revisions //Genetics in Medicine. – 2015. – Т. 17. – №. 4. – С. 262-270.
30. Zolnikova I. V. et al. Stargardt disease-associated mutation spectrum of a Russian Federation cohort //European Journal of Medical Genetics. – 2017. – Т. 60. – №. 2. – С. 140-147.
31. Zolnikova I. V. et al. Clinical and genetic correlations of inherital retinal disease with mutations in the abca4 gene by patients of the russian population //Ophthalmology in Russia. – 2021. – Т. 18. – №. 4. – С. 897-907.
32. Zol'nikova I. V. et al. The spectrum of mutations in the patients presenting with ABCA4-associated Stargardt's disease in a Russian population //Russian Pediatric Ophthalmology. – 2016. – Т. 11. – №. 1. – С. 14-22.
33. Kadyshev V. V. et al. Major contribution of c.[1622T> C; 3113C> T] complex allele and c. 5882G> A variant in ABCA4-related retinal dystrophy in an Eastern European population //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 22. – С. 16231.
34. ANB-002-1/SAFRAN // Биокад клинические исследования URL: https://ct.biocad.ru/nozology/anb-002-1safran (дата обращения: 28.04.25).
35. Kolesnik V. V. et al. Optimization strategies and advances in the research and development of AAV-based gene therapy to deliver large transgenes //Clinical and Translational Medicine. – 2024. – Т. 14. – №. 3. – С. e1607.
36. Ahmed I., Johnston Jr R. J., Singh M. S. Pluripotent stem cell therapy for retinal diseases //Annals of translational medicine. – 2021. – Т. 9. – №. 15. – С. 1279.

37. Liu H. et al. Towards stem/progenitor cell-based therapies for retinal degeneration //Stem Cell Reviews and Reports. – 2024. – Т. 20. – №. 6. – С. 1459-1479.
38. Huang D., McLenachan S., Chen F. K. Advances towards personalized therapies for Stargardt disease //Expert Review of Ophthalmology. – 2023. – Т. 18. – №. 5. – С. 315-325.
39. Huang D. et al. Stargardt disease and progress in therapeutic strategies //Ophthalmic genetics. – 2022. – Т. 43. – №. 1. – С. 1-26.
40. Siles L, Ruiz-Nogales S, Navinés-Ferrer A, Méndez-Vendrell P, Pomares E. Efficient correction of ABCA4 variants by CRISPR-Cas9 in hiPSCs derived from Stargardt disease patients. Mol Ther Nucleic Acids. 2023 Mar 3;32:64-79. doi: 10.1016/j.omtn.2023.02.032. PMID: 36969552; PMCID: PMC10034418.
41. Muller, A., Sullivan, J., Schwarzer, W. et al. High-efficiency base editing in the retina in primates and human tissues. Nat Med 31, 490–501 (2025). https://doi.org/10.1038/s41591-024-03422-8
42. Kubota R. et al. Randomised study evaluating the pharmacodynamics of emixustat hydrochloride in subjects with macular atrophy secondary to Stargardt disease //British Journal of Ophthalmology. – 2022. – Т. 106. – №. 3. – С. 403-408.
43. Safety and Efficacy of Emixustat in Stargardt Disease // Clinical Trials.gov URL: https://clinicaltrials.gov/study/NCT03772665 (дата обращения: 28.04.25).
44. Zhou J. et al. Complement activation by photooxidation products of A2E, a lipofuscin constituent of the retinal pigment epithelium //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – Т. 103. – №. 44. – С. 16182-16187.
45. Moderna Announces Advancements in mRNA Platform Science for Application Across Multiple Diseases at Science and Technology Day // Moderna URL: https://investors.modernatx.com/news/news-details/2022/Moderna-Announces-Advancements-in-mRNA-Platform-Science-for-Application-Across-Multiple-Diseases-at-Science-and-Technology-Day/default.aspx (дата обращения: 28.04.25).
46. Hou X. et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery //Nature Reviews Materials. – 2021. – Т. 6. – №. 12. – С. 1078-1094.
47. Sun, D., Schur, R. M., Sears, A. E., Gao, S.-Q., Vaidya, A., Sun, W., Maeda, A., Kern, T., Palczewski, K., & Lu, Z.-R. (2020). Non-viral Gene Therapy for Stargardt Disease with ECO/pRHO-ABCA4 Self-Assembled Nanoparticles. Molecular Therapy, 28(1), 293–303. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.09.010

48. Sun D. et al. Effective gene therapy of Stargardt disease with PEG-ECO/pGRK1-ABCA4-S/MAR nanoparticles //Molecular Therapy-Nucleic Acids. – 2022. – Т. 29. – С. 823-835.

49. Malamas A. S. et al. Design and evaluation of new pH-sensitive amphiphilic cationic lipids for siRNA delivery //Journal of controlled release. – 2013. – Т. 171. – №. 3. – С. 296-307.
50. Yan J. et al. Improving prime editing with an endogenous small RNA-binding protein //Nature. – 2024. – Т. 628. – №. 8008. – С. 639-647.
51. De Angeli P. et al. Effective splicing restoration of a deep-intronic ABCA4 variant in cone photoreceptor precursor cells by CRISPR/SpCas9 approaches //Molecular Therapy-Nucleic Acids. – 2022. – Т. 29. – С. 511-524.
52. Siles L. et al. Efficient correction of ABCA4 variants by CRISPR-Cas9 in hiPSCs derived from Stargardt disease patients //Molecular Therapy-Nucleic Acids. – 2023. – Т. 32. – С. 64-79.
53. Muller A. et al. High-efficiency base editing in the retina in primates and human tissues //Nature Medicine. – 2025. – С. 1-12.
54. Bennett C. F. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age //Annual review of medicine. – 2019. – Т. 70. – №. 1. – С. 307-321.
55. Kaltak M. et al. Antisense oligonucleotide therapy corrects splicing in the common Stargardt disease type 1-causing variant ABCA4 c. 5461-10T> C //Molecular Therapy-Nucleic Acids. – 2023. – Т. 31. – С. 674-688.
56. El Andari J., Grimm D. Production, processing, and characterization of synthetic AAV gene therapy vectors //Biotechnology journal. – 2021. – Т. 16. – №. 1. – С. 2000025.
57. Hastie E., Samulski R. J. Adeno-associated virus at 50: a golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success—a personal perspective //Human gene therapy. – 2015. – Т. 26. – №. 5. – С. 257-265.
58. Imai E. Gene therapy for renal diseases: its potential and limitation //Journal of the American Society of Nephrology. – 2003. – Т. 14. – №. 4. – С. 1102-1104.
59. Approved Cellular and Gene Therapy Products // FDA URL: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products (дата обращения: 28.04.25).
60. Escors D., Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential //Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. – 2010. – Т. 58. – С. 107-119.
61. Kong J. et al. Efficient delivery of genes into photoreceptors by lentiviral vectors: Application for treatment of Stargardt disease //Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2007. – Т. 48. – №. 13. – С. 1679-1679.

62. Phase I/IIA Study of SAR422459 in Participants With Stargardt's Macular Degeneration // Clinical trails.gov URL: https://clinicaltrials.gov/study/NCT01367444 (дата обращения: 28.04.25).
63. Parker M. A. et al. Three-Year Safety Results of SAR422459 (EIAV-ABCA4) Gene Therapy in Patients With ABCA4-Associated Stargardt Disease: An Open-Label Dose-Escalation Phase I/IIa Clinical Trial, Cohorts 1-5 //American journal of ophthalmology. – 2022. – Т. 240. – С. 285-301.
64. Becker J., Fakhiri J., Grimm D. Fantastic AAV gene therapy vectors and how to find them—random diversification, rational design and machine learning //Pathogens. – 2022. – Т. 11. – №. 7. – С. 756.
65. Duan D. Systemic AAV micro-dystrophin gene therapy for Duchenne muscular dystrophy //Molecular Therapy. – 2018. – Т. 26. – №. 10. – С. 2337-2356.
66. Sangermano R. et al. Size matters: ABCA4 midigenes facilitate accurate RNA splicing analysis of non-canonical splice site variants in Stargardt disease //Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2017. – Т. 58. – №. 8. – С. 5581-5581.
67. Колесник В. В. и др. Рациональный дизайн минимальных функционирующих копий генов USH2A, DFNB31 и ABCA4 для заместительной генной терапии наследственных заболеваний сетчатки //XXII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии. – 2023. – С. 108-109.
68. Tornabene P., Trapani I. Can adeno-associated viral vectors deliver effectively large genes? //Human gene therapy. – 2020. – Т. 31. – №. 1-2. – С. 47-56.
69. Trapani I. et al. Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors //EMBO molecular medicine. – 2014. – Т. 6. – №. 2. – С. 194-211.
70. US20220002749A1 // Google Patents URL: https://patents.google.com/patent/US10494645B2/ru (дата обращения: 28.04.25).
71. Riedmayr L. M. et al. Enigmatic rhodopsin mutation creates an exceptionally strong splice acceptor site //Human Molecular Genetics. – 2020. – Т. 29. – №. 2. – С. 295-304.
72. Brovin A. et al. Protein trans-splicing: optimization of intein-mediated GFP assembly as a model for the development of gene therapy //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2024. – Т. 12. – С. 1488912.
73. Tornabene P. et al. Intein-mediated protein trans-splicing expands adeno-associated virus transfer capacity in the retina //Science translational medicine. – 2019. – Т. 11. – №. 492. – С. eaav4523.
74. Li R. et al. Split AAV8 mediated ABCA4 expression for gene therapy of mouse stargardt disease (STGD1) //Human Gene Therapy. – 2023. – Т. 34. – №. 13-14. – С. 616-628.

75. Tornabene P. et al. Inclusion of a degron reduces levels of undesired inteins after AAV-mediated protein trans-splicing in the retina //Molecular Therapy Methods & Clinical Development. – 2021. – T. 23. – C. 448-459.
76. Xi Z. et al. Quantitative single-cell transcriptome-based ranking of engineered AAVs in human retinal explants //Molecular Therapy Methods & Clinical Development. – 2022. – T. 25. – C. 476-489.
77. Gurtsieva D. et al. Engineered AAV2. 7m8 serotype shows significantly higher transduction efficiency of ARPE-19 and HEK293 cell lines compared to AAV5, AAV8 and AAV9 serotypes //Pharmaceutics. – 2024. – T. 16. – №. 1. – C. 138.