

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035732**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.31

(21) Номер заявки
201791986

(22) Дата подачи заявки
2016.03.11

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)

(54) ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, СООТВЕТСТВУЮЩИЕ ЭКЗОНУ 73 ГЕНА COL7A1, ДЛЯ ТЕРАПИИ БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА

(31) **1504124.7**

(32) **2015.03.11**

(33) **GB**

(43) **2018.01.31**

(86) **PCT/EP2016/055360**

(87) **WO 2016/142538 2016.09.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВИНГС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Хаисма Элизабет Марлен, Потман
Марко, Бемер Вутер, Бринкс Вера
(NL)**

(74) Представитель:
**Строкова О.В., Гизатуллина Е.М.,
Угрюмов В.М., Карпенко О.Ю. (RU)**

(56) **WO-A1-2013053819**

DATABASE Geneseq [Online], 15 April 2004 (2004-04-15), "Human tumour suppression/reversion-related DNA sequence SeqID1712". XP002758383, retrieved from EBI accession no. GSN:ADI49209, Database accession, no. ADI49209, sequence

DATABASE Geneseq [Online], 3 February 2011 (2011-02-03), "Human organ specific protein related DNA SEQ:60255", XP002758384, retrieved from EBI accession no. GSN:AUN58914, Database accession no. AUN58914, sequence

DATABASE EMBL [Online], 18 August 2010 (2010-08-18), "Sequence 513357 from Patent EP2213738", XP002758385, retrieved from EBI accession no. EM_PAT:HD636641, Database accession no. HD636641, sequence

TURCZYNSKI SANDRINA ET AL.: "Antisense-mediated exon skipping to reframe transcripts", EXON SKIPPING: METHODS AND PROTOCOLS; [METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY; ISSN 1940-6029; VOL. 867], HUMANA PR, NEW YORK [U.A.], vol. 867, 2012, pages 221-238, XP008177335, ISBN: 978-1-61779-766-8, the whole document

NINGNING DANG ET AL.: "Mutation analysis and characterization of COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa", EXPERIMENTAL DERMATOLOGY, vol. 17, no. 7, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 553-568, XP055019941, ISSN: 0906-6705, DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00723.x, the whole document

(57) Антисмысловые олигонуклеотиды, способные предотвращать или уменьшать включение экзона 73 в мРНК COL7A1 человека, которые характеризуются различным образом: (a) последовательность данного олигонуклеотида включает в себя не более двух последовательностей CpG; (b) данный олигонуклеотид имеет длину не более 24 нуклеотидов; (c) данный олигонуклеотид способен гибридизоваться с элементом (SRp40/SC35 связывание/ESE) в экзоне 73. Данные олигонуклеотиды могут с сохранением полезных свойств быть олигорибонуклеотидами с модифицированными межнуклеозидными связями, например с фосфоротиоатными связями.

B1**035732****035732****B1**

Заявка на данное изобретение испрашивает преимущество патентной заявки Соединенного Королевства 1504124.7, поданной 11 марта 2015 г., полное содержание которой включено таким образом в настоящее описание посредством ссылки для всех целей.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, подходящим для применения при лечении болезней человека. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антисмысловым олигонуклеотидам, подходящим для лечения дистрофического буллезного эпидермолиза.

Сведения о заболевании

Буллезный эпидермолиз (Epidermolysis Bullosa; EB) представляет собой группу наследуемых кожных заболеваний, которые характеризуются хроническими хрупкостью и вздутием кожи и слизистых оболочек. В зависимости от подтипа, спектр симптомов EB очень широк, варьируя от минимальной хрупкости кожи до очень тяжелых симптомов с общими осложнениями. Во всем мире около 350000 пациентов подвержены данному заболеванию. Некоторые формы EB могут также затрагивать ногти, волосы и зубы. Основные типы EB включают простой EB (Simplex (EBS)), пограничный (Junctional) EB (JEB), дистрофический (Dystrophic) EB (DEB) и синдром Киндлера (Kindler) (KS).

От DEB страдают около 25% больных с диагнозом EB, он может наследоваться либо по доминантному, либо по рецессивному типу и включает в себя дефекты коллагена VII-го типа (ген COL7A1, omim (Online Mendelian Inheritance in Man) 120120). Ген COL7A1 кодирует альфа-1-цепь коллагена VII типа. Коллаген VII типа функционирует как анкерная фибрилла, прикрепляющая верхнюю часть дермы к плотной пластинке (lamina densa) (части базальной мембраны). После посттрансляционной модификации три идентичные альфа-1 цепи укладываются вместе, образуя трехспиральный коллагеновый домен. Затем образуются антипараллельные димеры, которые выравниваются с образованием анкерных фибрилл. Коллаген VII типа синтезируется в коже кератиноцитами и дермальными фибробластами. Степень тяжести заболевания DEB приблизительно коррелирует с уровнем экспрессии коллагена VII типа в зоне базальной мембраны.

Характерные особенности доминантного дистрофического EB (DDEB) включают образование пузырей, которые могут быть локализованы на руках, ногах, локтях и коленях или по всему телу. Для данного подтипа обычно характерны рубцевание, милии, повреждение слизистой оболочки и аномальные или отсутствующие ногти. Рecessивный дистрофический EB (RDEB) обычно более генерализован и развивается тяжелее, чем DDEB. В дополнение к характерным особенностям DDEB, другие распространенные проявления RDEB включают недоедание, анемию, остеопороз, стриктуры пищевода, замедление роста, сращение или слияние пальцев рук и ног, вызывающие деформацию мышц (псевдосиндактилия), развитие мышечных контрактур, мальформацию зубов, микростомию и рубцевание глаза. В данной группе значительно возрастает риск плоскоклеточного рака, а также смерти от метастатической карциномы роговых клеток.

Известно более 400 различных мутаций, встречающихся в гене COL7A1. Одним из наиболее часто поражаемых экзонов (18% пациентов) является экзон 73, для которого известно около 40 мутаций, чаще всего миссенс-мутаций или мутаций, приводящих к преждевременным стоп-кодонам (premature termination codons (PTC)) и глициновым заменам.

В настоящее время DEB не лечится, осуществляется только паллиативная помощь. Тяжелые формы RDEB отягощают бюджет здравоохранения общества высокими затратами: средняя стоимость повязок и медикаментов составляет около 200000€ на одного пациента в год.

Заявка WO 2013/053819 Национального института здравоохранения и медицинских исследований (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)) раскрывает два антисмысловых олигонуклеотида, нацеленных на экзон 73, применение которых приводит к пропуску всего экзона в мРНК. Экзон-73-дефицитная мРНК транслируется с образованием функционального полипептида, который, хотя и будучи короче, чем белок дикого типа, ведет себя очень подобно коллагену VIIа дикого типа. Один описанный олигонуклеотид имеет длину в 25 нуклеотидов, показывая эффективность пропуска 69%, в то время как другой олигонуклеотид имеет длину в 30 нуклеотидов, показывая эффективность пропуска 93%.

Сущность изобретения

Хотя более длинный, приводящий к пропуску экзона, антисмысловый олигонуклеотид (antisense oligonucleotide (AON)) в WO 2013/053819, как показано, демонстрирует удовлетворительную эффективность пропуска экзона, его длина и некоторые другие характерные особенности делают его менее предпочтительным с точки зрения разработки такой молекулы для терапевтического применения у человека. Кроме того, оказывается, что применение данного олигонуклеотида приводит к появлению промежуточных полос РНК, которые не представляют ни мРНК дикого типа, ни мРНК, у которых отсутствует экзон 73. Хотя и неизвестно, обладают ли образующие данные полосы продукты клинической значимостью, получение побочных продуктов является менее предпочтительным как с точки зрения возможности регулирования, так и из соображений безопасности. Следовательно, остается потребность в дальнейших и улучшенных способах лечения DEB.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает антисмысловой олигонуклеотид, способный предотвращать или уменьшать включение экзона 73 в мРНК COL7A1 человека в том случае, когда упомянутая мРНК образуется при сплайсинге из пре-мРНК в клетке млекопитающего, характеризующийся тем, что (а) последовательность данного олигонуклеотида включает в себя более двух последовательностей CpG и/или (b) данный олигонуклеотид имеет в длину не более 24 нуклеотидов. Преимущественно, данный олигонуклеотид обладает обоими свойствами (а) и (b).

Настоящее изобретение также обеспечивает антисмысловой олигонуклеотид, способный предотвращать или уменьшать включение экзона 73 в мРНК COL7A1 человека в том случае, когда упомянутая мРНК образуется при сплайсинге из пре-мРНК в клетке млекопитающего, характеризующийся тем, что данный олигонуклеотид способен гибридизоваться с элементом (соединение SRp40/SC35/ESE) в экзоне 73, который характеризуется последовательностью 5'-UUUCCUGG-3' (SEQ ID NO: 4). Данный олигонуклеотид может иметь свойства (а) и/или (b), как описано выше.

Олигонуклеотиды по изобретению могут с сохранением полезных свойств быть олигорибонуклеотидами с модифицированными межнуклеозидными связями, например с фосфоротиоатными связями. Они также могут иметь модифицированные сахара, например, с 2'-О-метилзамещенными сахарными остатками. Данные и другие подробности строения олигонуклеотидов обсуждаются ниже.

Описание фигур

На фиг. 1 показана последовательность экзона 73 в Col7A1 человека (SEQ ID NO: 1; прописные буквы) с 5'- и 3'-границами фланкирующих интронов (SEQ ID NO: 2 и 3; строчные буквы).

На фиг. 2 показано расположение SR белок-связывающих сайтов в экзоне 73 и расположение олигонуклеотидов AON.

На фиг. 3 показаны результаты анализа с помощью лаборатории на чипе (lab-on-a-chip) на пропуск экзона, полученные на клетках первичных фибробластов человека (HPF). Полноразмерная мРНК дает полосу при ~350 п.н., тогда как мРНК с исключенным экзоном 73 соответствует ~150 п. н.

На фиг. 4 показаны гистологические результаты доставки mh-AON1, сформулированного в PBS с использованием *ex vivo* модели свиной кожи. (a, b) показаны результаты воздействия 25 мкг mh-AON на неповрежденную кожу в течение 24 ч, (c-f) показаны результаты воздействия 25 мкг mh-AON1 на пузырчатую кожу, полностью лишенную эпидермиса; (c, d): инкубация в течение 24 ч; (e-f): инкубация в течение 48 ч. mh-AON1 окрашен (красный). Масштабная шкала соответствует 100 мкм.

На фиг. 5 показаны гистологические результаты доставки mh-AON1, сформулированного в трех различных гидрогелях, с использованием той же *ex vivo* модели свиной кожи, что и на фиг. 4.

На фиг. 5a, 5b показаны результаты, полученные со свиной кожей, обработанной контролями с физиологическим раствором, (a) с интактным эпидермисом и (b) с удаленным эпидермисом. 5c-5d показывают свиную кожу, обработанную 50 мкг mh-AON1-Cy5, смешанного в Flaminal™, (c) с интактным эпидермисом и (d) с удаленным эпидермисом. 5e-5f показывают результаты, полученные со свиной кожей, обработанной 50 мкг mh-AON1-Cy5, смешанного в гидрогеле карбомера, (e) с интактным эпидермисом и (f) с удаленным эпидермисом. 5g, 5h показывают результаты, полученные со свиной кожей, обработанной 50 мкг mh-AON1-Cy5, смешанного в гидрогеле гипромеллозы, (g) с неповрежденной кожей и (h) с удаленным эпидермисом. Масштабная панель показывает 100 мкм. mh-AON1 окрашен (красный).

На фиг. 6 показаны результаты анализа с помощью лаборатории на чипе продуктов сплайсинга мРНК COL7A1 после обработки с mh-AON1 или скремблированным вариантом (SCRM) в качестве контрольного олигонуклеотида. Авторы тестировали два различных типа клеток (HeLa и HPF), оба с 100 нМ олигонуклеотида в течение либо 24 ч (четыре дорожки слева), либо 40 ч (4 дорожки справа). Различные продукты мРНК COL7A1 образуются после обработки с mh-AON1 или контрольным олигонуклеотидом (включающим экзон 73 и с исключенным экзоном 73). Различные образцы мРНК анализировали на длину; 350-нуклеотидный фрагмент представляет дикий тип, полноразмерную мРНК, и 150-нуклеотидный фрагмент представляет модулированный продукт мРНК.

На фиг. 7 показана конструкция праймеров для анализа ddPCR. Были сконструированы две различные комбинации праймеров, либо только для PCR-продукта дикого типа (вверху), либо для PCR-продукта Δ экон 73 (внизу). Верхняя строка: пара праймеров для дикого типа; нижний ряд: пара праймеров для пропущенного экзона 73.

Фиг. 8 показывает абсолютную количественную оценку (% от общего количества копий, y-ось) транскриптов мРНК COL7A1, включая экзон 73 и за исключением экзона 73, в клетках HPF, которые несут неизмененную последовательность COL7A1. Анализ доза-ответ был выполнен с mh-AON1, с 50, 100 и 200 нМ (x-ось). Результаты показаны через 24 ч (слева) или 40 ч (справа) после трансфекции олигонуклеотидом. Черные прямоугольники представляют собой полноразмерный продукт, и серые прямоугольники представляют собой транскрипт Δ 73.

На фиг. 9 показаны результаты оценки иммуногенности и иммунотоксичности mh-AON1 в PBMC человека, (a) Двухмерная цветовая карта (heat map), показывающая уровни значимости концентраций цитокинов в надосадочной жидкости культуры после 24-часовой стимуляции PBMC человека с помощью mh-AON1 (10, 100 или 1 мкМ) или положительных контролей Poly(I:C) (1 мкг/мл), CpG (10 мкг/мл), LPS

(100 нг/мл) и R848 (1 мкМ), по сравнению с обработанными физиологическим раствором PBMC человека. Каждый квадрат показывает достигнутый уровень значимости на каждое состояние лечения (среднее геометрическое для пяти человеческих доноров с выполненными в трех повторах измерениями для каждого) для каждого измеренного цитокина. (b) Кратность изменения концентрации IFN- α 2 в надосадочной жидкости культуры клеток после 24-часовой стимуляции PBMC с помощью mh-AON1 или положительных контролей по сравнению с PBMC, обработанными физиологическим раствором. Столбики изображают среднее значение с SEM выполненных в трех повторах измерений для одного человека-донора (в различных серых тонах). Пунктирная линия, соответствующая 1, показывает относительную концентрацию цитокинов в PBMC, обработанных физиологическим раствором. Р-значения в (a) и (b) определяли с использованием теста Фридмана с апостериорным тестом Данна (c) Относительное число жизнеспособных PBMC, выраженное как кратность изменения флуоресценции резорурфина, по сравнению с PBMC, обработанными физиологическим раствором, после 24-часового воздействия mh-AON1 или положительных контролей. Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием набора CellTiter-Blue. Для всех отдельных биологических повторов значения кратности изменения были рассчитаны путем нормирования измеренного RFU по отношению к среднему геометрическому результатов соответствующих измерений в трех повторах с контрольным физиологическим раствором. Результаты показаны для каждого индивидуального донора как среднее $\pm$ SEM для рассчитанной в трех повторах кратности изменения, нормализованное по отношению к среднему для соответствующего контрольного физиологического раствора (пунктирная линия). Был проведен односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) для повторных измерений с тестом Даннета (Dunnett) для множественных поправок (по сравнению с физиологическим раствором). (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

На фиг. 10 показаны результаты оценки иммуногенности и иммунотоксичности mh-AON1 и AON73.24.5 в человеческих клетках Ramos-Blue. (a) Активация NF- κ B/AP-1 в клетках Ramos-Blue после 24-часовой инкубации с mh-AON1 или AON73.24.5 (в нескольких концентрациях) и с TLR-агонистами Poly(I:C) (1 мкг/мл), CpG (10 мкг/мл), LPS (100 нг/мл) и R848 (1 мкМ). (b) Относительное количество жизнеспособных клеток Ramos-Blue, выраженное в виде кратности изменения флуоресценции резорфина по сравнению с обработанными физиологическим раствором клетками Ramos-Blue после 24-часового воздействия mh-AON1, AON73.24.5 или положительных контролей. Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием набора CellTiter-Blue. Для всех отдельных биологических повторов значения кратности изменения были рассчитаны путем нормирования измеренных O.D (в a) или RFU (в b) по отношению к среднему геометрическому результатов соответствующих измерений в трех повторах с контрольным физиологическим раствором. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM для рассчитанной в трех повторах кратности изменения, нормализованного по отношению к среднему для соответствующего контрольного физиологического раствора (пунктирная линия). Значения кратности изменения были подвергнуты одностороннему дисперсионному анализу (ANOVA) для повторных измерений с тестом Даннета (Dunnett) для множественных поправок. (**** $P < 0,0001$).

Подробное описание изобретения

Неожиданно, авторы изобретения обнаружили, что могут быть сконструированы антисмысловые олигонуклеотиды, которые удовлетворяют требованиям, предъявляемым к AON, для разработки их в качестве терапевтических препаратов для лечения болезни у человека, в частности, дистрофического буллезного эпидермолиза (DEB).

Хотя AON 73.3, раскрытый в WO 2013/053819, как представляется, является удовлетворительным с точки зрения уменьшения степени включения экзона 73 в мРНК COL7A1, данный олигонуклеотид является слишком длинным с его длиной 30 п. н., что является менее предпочтительным с точки зрения технологичности, СМС и стоимости товаров. Кроме того, олигонуклеотиды INSERM содержат несколько CpG-повторов, что является менее предпочтительным с точки зрения иммуногенности. Известно, что CpG, особенно их повторы, взаимодействуют с рецептором TLR9, тем самым вызывая иммунный ответ в получавшем лечение индивидууме, что может нанести ущерб производительности и/или причинить вред тканям, подвергшихся обработке олигонуклеотидом.

Предпочтительные AON по настоящему изобретению имеют менее 25, предпочтительно менее 24 нуклеотидов в длину, обладая способностью предотвращать или, по меньшей мере, уменьшать включение экзона 73 в мРНК COL7A1 с высокой эффективностью и, по сравнению с предшествующим уровнем техники, имеют меньше (и предпочтительно не имеют) структур или последовательностей, которые могли бы препятствовать функциональности.

Укороченная мРНК, в которой, в результате обработки с использованием AON по настоящему изобретению, отсутствует весь экзон 73, будет транслироваться в более короткий, но функциональный белок COL VII.

AON по настоящему изобретению предпочтительно содержат не более двух (предпочтительно только одну или даже ни одной) последовательностей CpG и/или диапазон длины от 16 до 24 нуклеотидов, при достижении эффективностей пропуска экзона более чем 60% (например, более чем 70%, в идеале более чем 75% или 80%, предпочтительно более чем 85% и еще более предпочтительно более чем

90%), как измерено в клетках HeLa.

В другом аспекте настоящего изобретения были разработаны AON, способные гибридизоваться с 8-мерным мотивом, который был до сих пор не признан как имеющий важное значение при выборе акцепторного 5'-сайта сплайсинга, фланкирующего экзон 73. Утверждается, что данный 8-мерный мотив представляет собой ранее упущенный из виду экзонный энхансер сплайсинга (exonic splicing enhancer, ESE), который может подвергаться целенаправленному воздействию для предотвращения или, по меньшей мере, уменьшения включения экзона 73 в мРНК COL7A1. Авторы изобретения использовали методику microwalk, чтобы определить местоположение данного обнаруженного предполагаемого

ESE, используя AON, способные гибридизоваться со всем мотивом или частью мотива, конструируя различные, все более и более короткие AON с тем, чтобы сократить перекрытие с данным мотивом до тех пор, пока способность к пропуску экзона не будет полностью утеряна. Действуя подобным образом, авторы изобретения идентифицировали мотив 5'-UUUCCUGG-3' (SEQ ID NO: 4) в 5'-области экзона 73 (см. фиг. 1), который представляет собой превосходную новую мишень для AON, позволяющую вызывать предотвращение или, по меньшей мере, уменьшение включения экзона 73 в мРНК COL7A1.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к AON, который способен эффективно предотвращать или, по меньшей мере, уменьшать включение экзона 73 в мРНК COL7A1 как у мышей, так и у людей. Данный AON (mh-AON1) полностью комплементарен пре-мРНК-мишени как у мышей, так и у людей. Преимущество данного AON заключается в том, что он может быть использован в доказательных концептуальных и токсикологических исследованиях у мышей с использованием точно такой же молекулы, как та, которая со временем будет разработана для терапевтического применения в организме человека.

Ни один из AON по настоящему изобретению, по-видимому, не приводит к появлению промежуточных полос РНК; в клетках, обработанных AON по изобретению, появляются только продукты, соответствующие мРНК дикого типа, или продукты, соответствующие мРНК, в которой полностью отсутствует экзон 73.

Дополнительным предпочтительным свойством AON в соответствии с настоящим изобретением является то, что они не содержат G-тетрад или G-повторов (3 или более последовательных гуанозинов), таким образом, позволяя избежать проблемы, связанные с мультиплексированием и/или растворимостью.

Табл. 1 показывает для каждого AON эффективность пропуска экзона 73 в клетках HeLa, нуклеотидную последовательность и SEQ ID NO предпочтительных AON в соответствии с изобретением (от AON1 до AON25 и m-hAON1), AON, используемых в методике microwalk для идентификации нового ESE-мотива (AON26-30) и усеченных версий AON, для которых было найдено, что они связывают данный ESE-мотив, в котором отсутствуют нежелательные структуры, такие как G-тетрады (от AON24.1 до 24.5), в то же время показывая удовлетворительные эффективности пропуска экзона. Более подробная информация о AON, их эффективности в других клетках и сравнении с AON предыдущего уровня техники приведена в примере 1.

Таблица 1

Эффективность исключения экзона 73 из мРНК.
Клетки HPF и HeLa обрабатывали в течение 24 ч 100 нМ AON

	HeLa	Последовательность AON 5'-3'	SEQ ID NO
AON1	86%	UCUCCAGGAAAGCCGAUGGGGCCC	5
AON2	85%	AGCCCGCGUUCUCCAGGAAAGCCGA	6
AON3	92%	GUCGCCCUUCAGCCCGCGUUCUCCA	7
AON4	83%	ACGGUCGCCCUUCAGCCCGCGUU	8
AON5	3%	CCCCUGAGGGCCAGGGUCUCCACGG	9
AON6	0%	CAGACCAGGUGGCCCCUGAGGGCCA	10
AON7	0%	CCAAGGGCCAGACCAGGUGGCCCC	11
AON8	0%	CCAGACCAGGUGGCCCCUGAGGGCC	12
AON9	0%	UCUCCCCAAGGGCCAGACCAGG	13
AON10	0%	GGAAGGCCCGGGGGGGCCCCUCUC	14
AON11	6%	CCGGCAAGGCCGGAAGGCCCGGGG	15
AON12	0%	AGGCUUCCAGGCUCCCCGGCAAG	16
AON13	2%	CGGGAAUACCAGGCUUCCAGGCU	17
AON14	25%	UGCCUGGGAGCCCCGGAAUACCA	18
AON15	8%	CCCACACCCCCAGCCUGCCUGGG	19
AON16	0%	CCUCUCCACACCCCCAGCCCU	20
AON17	9%	UCUCUCCUGGCCUUCUGCCUCU	21
AON18	13%	CACCUCUCUCCUGGCCUUCU	22
AON19	7%	CCAGCCUCACCCUCUCUCCUGG	23
AON20	100%	CUCCAGGAAAGCCGAUGGGGCCC	24
AON21	89%	UCCAGGAAAGCCGAUGGGGCCC	25
AON22	85%	CCAGGAAAGCCGAUGGGGCCC	26
AON23	83%	CUCCAGGAAAUCCGAUGGGGCCcu	27
AON24	93%	UCCAGGAAAGCCGAUGGGGCCcug	28
AON24.1	73%	UCCAGGAAAGCCGAUGGG	39
AON24.2	88%	UCCAGGAAAGCCGAUGG	40

AON24.3	79%	UCCAGGAAAGCCGAUG	41
AON24.4	86%	CUCCAGGAAAGCCGAUGG	42
AON24.5	89%	UCUCCAGGAAAGCCGAUG	43
AON25	92%	CCAGGAAAGCCGAUGGGGCCcugc	29
AON26	49%	AGGAAAGCCGAUGGGGCCcugcag	30
AON27	37%	GAAAGCCGAUGGGGCCcugcagga	31
AON28	47%	AAGCCGAUGGGGCCcugcaggagu	32
AON29	0%	GCCGAUGGGGCCcugcaggagugg	33
AON30	7%	GAUGGGGCCcugcaggaguggaa	34
mh-AON 1	91%	CGUUCUCCAGGAAAGCCGAUG	35

Один вариант осуществления относится к антисмысловому олигонуклеотиду, который способен предотвращать или уменьшать включение экзона 73 в мРНК COL7A1 млекопитающих (предпочтительно человека), в том случае, когда упомянутая мРНК образуется при сплайсинге из пре-мРНК в клетке млекопитающего, характеризующемуся тем, что последовательность данного олигонуклеотида имеет по меньшей мере одно из свойств (а) и/или (b): (а) она включает в себя не более двух последовательностей CpG и/или (b) имеет длину не более 24 нуклеотидов. Что касается свойства (а), данный олигонуклеотид предпочтительно включает не более одной последовательности CpG и может включать только одну.

Другой вариант осуществления относится к антисмысловому олигонуклеотиду, который способен предотвращать или уменьшать включение экзона 73 в мРНК COL7A1 млекопитающих (предпочтительно человека), в том случае, когда упомянутая мРНК образуется при сплайсинге из пре-мРНК в клетке млекопитающего, характеризующемуся тем, что данный олигонуклеотид способен гибридизоваться с мотивом последовательности 5'-UUUCCUGG-3' (SEQ ID NO: 4) в 5'-ближней части экзона 73 (фиг. 1). Не желая связывать себя теорией, постулируется, что данный мотив представляет SRX40/SC35-связывающий элемент экзонного энхансера сплайсинга (ESE). AON согласно данному варианту осуществления предпочтительно характеризуются тем, что последовательность олигонуклеотида имеет одно или оба из свойств (а) и/или (b), как описано выше. Для того чтобы иметь оптимальный эффект, олигонуклеотид должен гибридизоваться со всем 8-мерным мотивом; в том случае, когда для какого-либо конкретного сценария приемлемы уровни эффективности пропуска экзонов ниже 60%, то может быть приемлемой гибридизация с составляющими большинство 6 или 7 5'-нуклеотидами 8-мерного мотива.

Другими предпочтительными AON согласно изобретению являются те, которые характеризуются признаком (а), заключающимся в том, что олигонуклеотид включает не более одной последовательности CpG, и/или признаком (b), заключающимся в том, что олигонуклеотид имеет длину не более 24 нуклеотидов, предпочтительно от 12 до 24 нуклеотидов, более предпочтительно от 16 до 24 нуклеотидов, например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида, еще более предпочтительно менее 23 нуклеотидов, еще более предпочтительно от 16 до 23 нуклеотидов, например 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 нуклеотида. В соответствии с наиболее предпочтительными вариантами осуществления изобретения олигонуклеотиды характеризуются тем, что они обладают обоими свойствами: (а) не более двух последовательностей CpG, предпочтительно не более одной, например одной CpG, и (b) длиной не более 24 нуклеотидов, предпочтительно от 12 до 24 нуклеотидов, более предпочтительно от 16 до 24 нуклеотидов, например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида, еще более предпочтительно менее 23 нуклеотидов, еще более предпочтительно от 16 до 23 нуклеотидов, например 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 нуклеотидов.

Необязательной дополнительной функцией AON в соответствии с настоящим изобретением является то, что в их последовательности отсутствует участок из трех или более последовательных гуанозинов.

Конкретный предпочтительный AON по изобретению имеет нуклеотидные последовательности AON1, AON2, AON3, AON4, AON20, AON21, AON22, AON23, AON24, AON24.1, AON24.2, AON24.3, AON24.3, AON24.4, AON24.5, AON25 и mh-AON1, как описано в табл. 1. Более предпочтительно для данных олигонуклеотидов все рибозные остатки являются 2'-О-метилованными, и по существу все межнуклеозидные связи являются фосфоротиоатами.

Во всех вариантах осуществления настоящего изобретения термины "предотвращение или, по меньшей мере, уменьшение включения экзона" и "пропуск экзона" являются синонимами. В отношении COL7A1 "предотвращение или, по меньшей мере, уменьшение включения экзона" и "пропуск экзона" должны быть истолкованы как исключение экзона 73 (SEQ ID NO: 1 или его аллельные формы) из мРНК человека COL7A1 (см. фиг. 1). Термин "пропуск экзона" определяется здесь как индукция

внутри клетки зрелой мРНК, которая не содержит конкретный экзон, который будет присутствовать в зрелой мРНК без пропуска экзона. Пропуск экзона достигается посредством обеспечения клетки, экспрессирующей пре-мРНК упомянутой зрелой мРНК, молекулой, способной мешать последовательно-стям, таким как, например, последовательность донора сплайсированного фрагмента или акцептора сплайсированного фрагмента, требуемая для обеспечения биохимического процесса сплайсинга, или молекулой, которая способна взаимодействовать с сигналом включения экзона, необходимым для распознавания участка нуклеотидов в качестве экзона, который должен быть включен в зрелую мРНК; такие молекулы в данном описании упоминаются как молекулы пропуска экзона.

Термин "пре-мРНК" относится к необработанному или частично обработанному предшественнику мРНК, который синтезируется из матричной ДНК в клетке с помощью транскрипции.

Термин "антисмысловой олигонуклеотид" понимают как нуклеотидную последовательность, которая комплементарна целевой нуклеотидной последовательности в молекуле пре-мРНК, hnRNA (гетерогенная ядерная РНК) или молекуле мРНК, так что она способна гибридизоваться с соответствующей целевой последовательностью.

Используемый в данном описании термин "комплементарный" включает "полностью комплементарный" и "по существу комплементарный", что означает, что степень комплементарности между олигонуклеотидом и его соответствующей целевой последовательностью обычно будет составлять более 80%, предпочтительно более 85%, еще больше предпочтительно более 90%, наиболее предпочтительно более 95%. Например, для олигонуклеотида длиной 20 нуклеотидов с одним несоответствием между его последовательностью и его целевой последовательностью степень комплементарности составляет 95%.

Степень комплементарности антисмысловой последовательности предпочтительно такова, что молекула, содержащая антисмысловую последовательность, может гибридизоваться с целевой нуклеотидной последовательностью в молекуле РНК в физиологических условиях, тем самым облегчая пропуск экзона. Специалисту в данной области техники известно, что некоторые несоответствия являются более допустимыми, чем другие, поскольку некоторые несоответствия оказывают меньшее влияние на прочность связывания, выраженную в терминах температуры плавления или T_m , между АОН и целевой последовательностью, чем другие. Некоторые некомплементарные пары оснований могут образовывать так называемые "неоднозначности (wobbles)", которые разрушают общее связывание в меньшей степени, чем истинные несовпадения. Длина АОН также играет роль в прочности связывания, причем более длинные АОН, как правило, имеют более высокие температуры плавления, чем более короткие АОН, и содержание G/C в олигонуклеотиде также является фактором, определяющим силу связывания, чем выше содержание G/C, тем выше температура плавления для любой заданной длины. Определенные химические модификации нуклеотидных оснований или сахарофосфатного остова, как предусмотрено настоящим изобретением, также могут влиять на прочность связывания, так что степень комплементарности является только одним фактором, который следует учитывать при разработке олигонуклеотида в соответствии с изобретением.

Наличие одной последовательности CpG или множества (двух или более) CpG в олигонуклеотиде, как правило, ассоциируется с повышенной иммуногенностью упомянутого олигонуклеотида (Dorn & Kirpenberger, 2008). Такая увеличенная иммуногенность является нежелательной, так как это может вызвать повреждение ткани, подлежащей лечению, т.е. кожи (дермы и/или эпидермиса).

Настоящее изобретение позволяет конструировать олигонуклеотид с приемлемой кинетикой связывания с РНК и/или термодинамическими свойствами. Кинетика связывания с РНК и/или термодинамические свойства, по меньшей мере, частично определяются температурой плавления олигонуклеотида (T_m , рассчитываемой с помощью калькулятора свойств олигонуклеотидов (www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html) для одноцепочечной РНК с использованием базовой T_m и моделей ближайших соседей) и/или свободной энергией экзонного комплекса АОН-мишень (с использованием структуры РНК версии 4.5). Если T_m слишком высока, ожидается, что олигонуклеотид будет менее специфичным. Приемлемая T_m и свободная энергия зависят от последовательности олигонуклеотида, химического состава остова (фосфодиэфир, фосфотиоат, фосфорамидат, пептид-нуклеиновая кислота и т.д.), характера сахарного остатка (рибоза, дезоксирибоза, замещенная рибоза, внутримолекулярный мост) и химической модификации нуклеинового основания. Поэтому диапазон T_m может сильно варьироваться.

В соответствии с одним аспектом изобретения новые АОН обеспечиваются в соответствии с изобретением путем microwalking 5'-области экзона 73 с помощью АОН. Таким образом, был идентифицирован новый 8-нуклеотидный мотив (предполагаемый ESE), который образует подходящую мишень для конструирования АОН согласно изобретению.

Длина олигонуклеотида, выбранная авторами настоящего изобретения, составляла от 16 до 24 нуклеотидов, но также возможна и другая длина. Предпочтительно иметь длину, которая является достаточной, чтобы обеспечить стабильное взаимодействие с целевой РНК и специфичность для целевой последовательности, но не длиннее, чем необходимо, поскольку более длинные олигонуклеотиды являются более дорогими в производстве и более сложными с аналитической точки зрения. 5'-область экзона 73 можно проверять на молекулы эффективного пропуска экзона, делая серию перекрывающихся олиго-

нуклеотидов, которые тестируют в анализе *in vitro* в отношении их эффективности пропуска экзона - как проиллюстрировано в примерах. Затем AON, которые устанавливают удовлетворительную эффективность пропуска экзона, дополнительно выбирают на основе критериев технологичности, иммуногенности и других критериев удобства использования.

Возможна также противоположная стратегия. В соответствии с данной стратегией олигонуклеотиды сначала конструируют на основе технологичности, иммуногенности и других критериев удобства использования, обеспечиваемых настоящим изобретением, и затем тестируют на эффективность пропуска экзона. Функциональная активность упомянутого олигонуклеотида предпочтительна, чтобы вызвать пропуск экзона 73 (SEQ ID NO: 1) в определенной степени и/или, по меньшей мере, уменьшить продукцию мРНК, содержащей экзон 73, тем самым увеличивая продукцию более короткого, чем дикий тип, но еще функционального коллагенового белка.

Процент или эффективность пропуска экзона может быть вычислен путем определения концентрации амплифицированной полосы дикого типа, разделенной на концентрацию укороченной (экзон 73-свободной) амплифицированной полосы, после заданного количества циклов PCR, умноженной на 100%, для любого заданного набора праймеров, при условии, что количество циклов таково, что амплификация все еще находится в экспоненциальной фазе. Количественное определение может быть выполнено с использованием устройства Bioanalyzer DNA1000.

Предпочтительными AON согласно изобретению являются те, которые показывают процент пропуска более 70% в AON-обработанных клетках по сравнению с необработанными клетками, более предпочтительно более 80%, еще более предпочтительно более 90%, как измерено с помощью анализа RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией).

Предпочтительно AON согласно изобретению, который содержит последовательность, которая является комплементарной к нуклеотидной последовательности, как показано в SEQ ID NO: 1, является таким, что комплементарная часть по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95%, наиболее предпочтительно на 100% комплементарна целевой последовательности. При этом совершенно необязательно, чтобы все основания в области комплементарности были способны спариваться с основаниями в противоположной нити. Например, при разработке олигонуклеотида может потребоваться включить, например, остаток, который не образует пару спариванием с основанием на комплементарной цепи. Несоответствия могут в некоторой степени допускаться, если при сложившихся обстоятельствах, в клетке, участок нуклеотидов способен в достаточной степени гибридизоваться с комплементарной частью. В данном контексте "в достаточной степени" означает, что AON в соответствии с изобретением способны индуцировать пропуск экзона 73. Пропуск целевого экзона может быть легко оценен с помощью RT-PCR. Комплементарные области предпочтительно сконструированы таким образом, что, при объединении, они специфичны для экзона в пре-мРНК. Такая специфичность может быть создана с разными длинами комплементарных областей, поскольку это зависит от реальных последовательностей в других молекулах (пре-)мРНК в системе. Риск того, что олигонуклеотид также сможет гибридизоваться с одной или более другими молекулами пре-мРНК, уменьшается с увеличением размера олигонуклеотида, тогда как длина не должна быть слишком длинной, чтобы не создавать проблемы с технологичностью, очисткой и/или аналитикой.

Понятно, что олигонуклеотиды, содержащие несоответствия в области комплементарности, но сохраняющие способность к гибридизации и/или связыванию с целевой областью(областями) в пре-мРНК, могут быть использованы в настоящем изобретении. Однако предпочтительно, чтобы, по меньшей мере, комплементарные части не содержали таких несоответствий, поскольку они обычно имеют более высокую эффективность и более высокую специфичность, чем олигонуклеотиды, имеющие такие несоответствия в одной или более комплементарных областях. Считается, что более сильная гибридизация (т.е. увеличение числа взаимодействий с противоположной нитью) благоприятна для повышения эффективности процесса вмешательства в сплайсинговый механизм системы. Предпочтительно, комплементарность составляет от 90 до 100%. В общем случае это допускает 1 или 2 несоответствия в олигонуклеотиде из 20 нуклеотидов.

Молекула пропуска экзона по изобретению предпочтительно представляет собой (антисмысловый) олигонуклеотид, который комплементарен SEQ ID NO: 1.

Предпочтительно, чтобы длина комплементарной части олигонуклеотида была такой же, что и длина олигонуклеотида, означая, что нет 5'- или 3'-концов олигонуклеотида, которые не образовывали бы пару оснований с целевой РНК. Таким образом, предпочтительная длина олигонуклеотида по изобретению составляет 24 нуклеотидов или менее, например 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов.

Особенно хорошие результаты были получены с AON, имеющими длину от 16 до 24 нуклеотидов.

Молекула пропуска экзона в соответствии с изобретением может содержать один из многих остатков ДНК (следовательно, остаток РНК "и" будет остатком "t" в качестве ДНК-аналога) или один или более остатков РНК и/или один или более нуклеотидных аналогов или эквивалентов, как будет дополнительно описано ниже. SEQ ID NO: 5-35 и 39-43 представляют собой последовательности РНК, но настоящее изобретение также включает в себя каждую из данных последовательностей в виде ДНК, а так-

же ДНК/РНК-гибриды данных последовательностей.

Предпочтительно, что молекула пропуска экзона по изобретению содержит один или более остатков, которые модифицированы, чтобы увеличить устойчивость к действию нуклеаз и/или для увеличения аффинности антисмыслового олигонуклеотида к целевой последовательности. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления последовательность антисмыслового нуклеотида содержит по меньшей мере один нуклеотидный аналог или эквивалент, причем нуклеотидный аналог или эквивалент определяется как остаток, имеющий модифицированное основание, и/или модифицированный остов, и/или неприродную межнуклеозидную связь, или сочетание данных модификаций.

В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидный аналог или эквивалент содержит модифицированный остов. Примеры таких остовов обеспечиваются морфолиновыми остовами, карбаматными остовами, силоксановыми остовами, сульфидными, сульфоксидными и сульфоновыми остовами, формацетильными и тиоформацетильными остовами, метиленформацетильными остовами, рибоацетильными остовами, алкен-содержащими остовами, сульфаматными, сульфонатными и сульфонамидными остовами, метилениминовыми и метиленгидразиновыми остовами, и амидными остовами. Морфолинофосфородиамидатные олигомеры представляют собой олигонуклеотиды с модифицированными остовами, которые ранее были исследованы в качестве антисмысловых агентов. Морфолиновые олигонуклеотиды имеют незаряженную основную цепь, в которой дезоксирибозный сахар ДНК заменяется на 6-членное кольцо и фосфодиэфирная связь заменяется на фосфородиамидатную связь. Морфолиновые олигонуклеотиды устойчивы к ферментативной деградации и, как представляется, функционируют в качестве антисмысловых агентов, останавливая трансляцию или препятствуя сплайсингу пре-мРНК, а не путем активации РНКазы Н. Морфолиновые олигонуклеотиды были успешно доставлены в клетки культуры ткани с помощью способов, которые физически разрушают клеточную мембрану, и одно исследование, сравнивающее некоторые из данных способов, установило, что загрузка путем соскоба была наиболее эффективным способом доставки; однако, поскольку морфолиновый остов незаряжен, катионные липиды не являются эффективными посредниками поглощения морфолиновых олигонуклеотидов в клетках.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения связь между остатками в остове не включает атом фосфора, например связь, которая образована короткой алкильной цепью, или циклоалкильные межнуклеозидные связи, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные межнуклеозидные связи, или межнуклеозидные связи, образованные одной или более короткой цепью гетероатомов, или гетероциклические межнуклеозидные связи.

В соответствии с данным вариантом осуществления предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент включает пептидную нуклеиновую кислоту (Peptide Nucleic Acid (PNA)), имеющую модифицированный полиамидный остов (Nielsen et al. (1991), *Science*, 254, 1497-1500). Молекулы на основе PNA являются истинными миметиками молекул ДНК с точки зрения распознавания пар оснований. Остов PNA состоит из звеньев N-(2-аминоэтил)глицина, соединенных пептидными связями, в котором нуклеиновые основания соединены с остовом с помощью метиленкарбонильных связей. Альтернативный остов включает в себя удлиненный на один атом углерода пирролидиновый PNA-мономер (Govindaraju and Kumar (2005), *Chem. Commun.*, 495-497). Поскольку остов молекулы PNA не содержит заряженные фосфатные группы, гибриды PNA-РНК, как правило, более стабильны, чем РНК-РНК или гибриды РНК-ДНК соответственно (Egholm et al. (1993), *Nature*, 365, 566-568).

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения остов содержит морфолиновые аналоги нуклеотидов аналог или их эквиваленты, в котором рибозный или дезоксирибозный сахар заменен на 6-членное морфолиновое кольцо. Наиболее предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент содержит фосфородиамидатный морфолиновый олигомер (phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO)), в котором рибозный или дезоксирибозный сахар заменен на 6-членное морфолиновое кольцо и анионная фосфодиэфирная связь между соседними морфолиновыми кольцами заменена неионной фосфородиамидатной связью.

В еще одном дополнительном варианте осуществления нуклеотидный аналог или эквивалент по настоящему изобретению включает в себя замену одного из не-мостиковых атомов кислорода в фосфодиэфирной связи. Данная модификация слегка дестабилизирует спаривание оснований, но добавляет значительную устойчивость к нуклеазной деградации. Предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент содержит фосфоротиоат, хиральный фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфотриэфир, аминоалкилфосфотриэфир, Н-фосфонат, метил и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонат, 5'-алкиленфосфонат и хиральный фосфонат, фосфинат, фосфорамидат, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфородиамидат, тионофосфородиамидат, тионоалкилфосфонат, тионоалкилфосфотриэфир, селенофосфат или боранофосфат.

Еще один предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент по настоящему изобретению содержит один или более сахарных фрагментов, которые являются моно- или дизамещенными в положении 2', 3' и/или 5' такими заместителями, как -ОН; -F; замещенный или незамещенный, линейный или разветвленный низший (C_1 - C_{10})алкил, алкенил, алкинил, алкарил, аллил или аралкил, углеродные цепи которых могут включать один или несколько гетероатомов; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил;

О-, S- или N-алкинил; О-, S- или N-аллил; О-алкил-О-алкил, метокси, -аминопропокси; метоксиэтокси; -диметиламинооксиэтокси и -диметиламиноэтоксиэтокси. Остаток сахара может быть фуранозой или ее производным, или дезоксифуранозой или ее производным, предпочтительно рибозой или ее производным, или дезоксирибозой или ее производным. Предпочтительный дериватизированный фрагмент сахара содержит блокированную нуклеиновую кислоту (Locked Nucleic Acid (LNA)), в которой атом углерода в положении 2' связан с 3'- или 4'-углеродным атомом сахарного кольца, таким образом, образуя бициклическую сахарную группировку. Предпочтительная LNA содержит 2'-О,4'-С-этилен-мостиковую нуклеиновую кислоту (Morita et al. 2001. Nucleic Acid Res Supplement No. 1: 241-242). Данные замены придают нуклеотидному аналогу или эквиваленту устойчивость к действию РНКазы Н и нуклеазы и увеличивают сродство к целевой РНК.

Специалисту в данной области техники понятно, что необязательно, чтобы все межнуклеозидные связи в антисмысловом олигонуклеотиде были модифицированы. Например, некоторые межнуклеозидные связи могут быть немодифицированными, в то время как другие межнуклеозидные связи являются модифицированными. AON, содержащие основную цепь, состоящую из одной формы (модифицированных) межнуклеозидных связей, множественных форм (модифицированных) межнуклеозидных связей, равномерно или неравномерно распределенных по длине AON, все охватываются настоящим изобретением. Кроме того, любая модальность модификации остова (однородная, неоднородная, моноформа или многообразная и все ее перестановки) может быть объединена с любой формой или модификациями или аналогами сахара или нуклеозидов, упомянутыми ниже.

Особенно предпочтительным остовом для AON в соответствии с настоящим изобретением является однородный (весь) фосфоротиоатный (phosphorothioate (PS)) остов.

В другом варианте осуществления нуклеотидный аналог или эквивалент по настоящему изобретению включает в себя одну или более модификаций или замен оснований. Модифицированные основания включают в себя синтетические и природные основания, такие как инозин, ксантин, гипоксантин и другие -аза, -деаза, -гидрокси, -галоген, -тио, тиол, -алкильные, -алкенильные, -алкинильные, тиоалкильные производные пиримидиновых и пуриновых оснований, которые известны или будут известны в данной области техники.

Специалисту в данной области техники понятно, что необязательно, чтобы все позиции в антисмысловом олигонуклеотиде были модифицированы равномерно. Кроме того, более чем один из вышеупомянутых аналогов или их эквивалентов могут быть включены в один антисмысловой олигонуклеотид или даже в одном положении в пределах антисмыслового олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид по изобретению имеет по меньшей мере два различных типа аналогов или эквивалентов.

Согласно другому варианту осуществления, AON в соответствии с изобретением содержат 2'-О-алкилированный (предпочтительно низшим алкилом) фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид, такой как 2'-О-метил-модифицированная рибоза (РНК), 2'-О-метоксиэтил-модифицированная рибоза, 2'-О-этил-модифицированная рибоза, 2'-О-пропил-модифицированная рибоза, и/или замещенные производные данных модификаций, такие как галогенированные производные.

Эффективный и предпочтительный формат антисмыслового олигонуклеотида в соответствии с изобретением содержит остатки модифицированной введением 2'-О-метильного радикала рибозы с фосфоротиоатным остовом, причем предпочтительно по существу все рибозные остатки являются 2'-О-метильными, и по существу все межнуклеозидные связи представляют собой фосфоротиоатные связи.

Специалисту в данной области техники следует также понимать, что различные антисмысловые олигонуклеотиды могут быть объединены для эффективного пропуска экзона 73 гена COL7A1. Объединение двух антисмысловых олигонуклеотидов может быть использовано в способе по настоящему изобретению, например два антисмысловых олигонуклеотида, три различных антисмысловых олигонуклеотида, четыре различных антисмысловых олигонуклеотида или пять различных антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на одинаковые или различные области экзона 73 (фиг. 1), до тех пор, пока по меньшей мере один AON является одним в соответствии с настоящим изобретением.

Антисмысловой олигонуклеотид может быть связан с фрагментом, который улучшает поглощение антисмыслового олигонуклеотида в клетках, предпочтительно клетках кожи. Примерами таких фрагментов являются холестерин, углеводы, витамины, биотин, липиды, фосфолипиды, клеточные проникающие пептиды, включая, но не ограничиваясь ими, antennapedia, TAT, transportan, и положительно заряженные аминокислоты, такие как олигоаргинин, полиаргинин, олиголизин или полилизин, антигенсвязывающие домены, например антитело, Fab-фрагмент антитела или одноцепочечный антигенсвязывающий домен, такой как антигенсвязывающий участок, состоящий из одного домена антитела верблюдовых.

Молекула пропуска экзона в соответствии с изобретением может быть "голым" (gymnotic) антисмысловым олигонуклеотидом, или находиться в виде конъюгата, или экспрессироваться из вектора (векторный AON). Молекулу пропуска экзона можно вводить с помощью соответствующего средства, известного в данной области техники. Когда молекула пропуска экзона представляет собой векторный

AON, она может доставляться индивидууму в клетку, ткань или орган упомянутого индивидуума в виде вектора экспрессии, причем вектор экспрессии кодирует транскрипт, содержащий упомянутый олигонуклеотид. Вектор экспрессии предпочтительно вводят в клетку, ткань, орган или индивидуум через средство доставки генов, такое как вирусный вектор. В предпочтительном варианте осуществления изобретения обеспечивается экспрессионный вектор на основе вируса, содержащий экспрессионную кассету или транскрипционную кассету, которая приводит в действие экспрессию или транскрипцию молекулы пропуска экзона, как определено в данном описании. Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает вирусный вектор, экспрессирующий молекулу пропуска экзона согласно изобретению при нахождении в условиях, способствующих экспрессии молекулы пропуска экзона. Клетка может быть снабжена молекулой пропуска экзона, способной интерферировать с последовательностями, необходимыми для включения или, по меньшей мере, способствующими включению экзона 73, таким образом, что такое вмешательство предотвращает или, по меньшей мере, уменьшает включение экзона 73 в мРНК COL7A1, например, путем происходящей в плазмиде экспрессии антисмыслового олигонуклеотида или вирусной экспрессии, обеспечиваемой векторами на основе аденовируса или аденоассоциированного вируса. Экспрессия может приводиться в действие с помощью промотора полимеразы III (PolIII), такого как промотор U1, U6 или U7 РНК.

Предпочтительное средство доставки представляет собой вирусный вектор, такой как аденоассоциированный вирусный вектор (adeno-associated virus vector (AAV)) или ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор и т.п. Кроме того, плазмиды, искусственные хромосомы, плазмиды, подходящие для целенаправленной гомологичной рекомбинации и интеграции в геном клеток млекопитающего (предпочтительно человека), могут применяться соответствующим образом для доставки олигонуклеотида, как определено в настоящем изобретении. Предпочтительными для настоящего изобретения являются те векторы, в которых транскрипция приводится в действие от PolIII промоторов и/или в которых транскрипты находятся в виде конструкций, слитых с транскриптами U1 или U7, что дает хорошие результаты для доставки небольших транскриптов. Разработка подходящих транскриптов находится в пределах квалификации специалиста в данной области техники. Предпочтительными являются PolIII-ведомые транскрипты, предпочтительно в виде транскрипта, слитого с транскриптом U1 или U7. Такие слитые конструкции могут быть получены, как описано в данной области техники (e.g. vide: Gorman L. et al., 1998 or Suter D et al., 1999).

Одна из предпочтительных систем экспрессии антисмыслового олигонуклеотида представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Были разработаны одноцепочечные и двухцепочечные векторы на основе AAV, которые могут быть использованы для длительной экспрессии антисмысловых нуклеотидных последовательностей для высокоэффективного пропуска экзона 73 гена COL7A1.

Предпочтительный вектор на основе AAV, например, содержит экспрессионную кассету, которая приводится в действие с помощью полимеразы III-промотора (PolIII). Предпочтительным PolIII-промотором является, например, промотор U1, U6 или U7 РНК.

Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает вектор на основе вируса, содержащий приводимую в действие PolIII-промотором экспрессионную кассету для экспрессии антисмыслового олигонуклеотида по изобретению для индукции пропуска экзона 73 гена COL7A1.

AAV-вектор в соответствии с настоящим изобретением представляет собой рекомбинантный AAV-вектор и означает AAV-вектор, содержащий часть AAV-генома, содержащую закодированную молекулу пропуска экзона в соответствии с изобретением, инкапсидированную в белковой оболочке капсидного белка, полученного из AAV-серотипа, как изложено в настоящем описании в другом месте. Часть AAV-генома может содержать инвертированные концевые повторы (inverted terminal repeats (ITR)), полученные из серотипа аденоассоциированного вируса, такого как AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9 и др. Белковая оболочка, которая состоит из капсидного белка, может быть получена из AAV-серотипа, такого как AAV1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 и др. Белковая оболочка также может быть названа капсидной белковой оболочкой. У AAV-вектора могут быть удалены один или предпочтительно все гены AAV дикого типа, но он все еще может содержать функциональные ITR-нуклеинокислотные последовательности. Функциональные ITR-последовательности необходимы для репликации, спасения и упаковки AAV-вирионов. Последовательности ITR могут представлять собой последовательности дикого типа, или могут иметь по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 100% идентичности последовательности с последовательностями дикого типа, или могут быть изменены, например, посредством вставки, мутации, делеции или замены нуклеотидов до тех пор, пока они остаются функциональными. В данном контексте функциональность относится к способности направлять упаковку генома в капсидную оболочку, а затем обеспечить проведение экспрессии в инфицированной клетке-хозяине или клетке-мишени. В контексте настоящего изобретения капсидная белковая оболочка может быть серотипа, отличного от ITR генома AAV-вектора. AAV-вектор в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, может быть составлен из капсидной белковой оболочки, т.е. икосаэдрического капсида, который включает в себя капсидные белки (VP1, VP2 и/или VP3) одного AAV-серотипа, например AAV-серотип 2, в то время как ITR-последовательности, содержащиеся в данном AAV5-векторе, могут быть любого из AAV серотипов,

описанных выше, включая AAV2-вектор. "AAV2-вектор", таким образом, включает в себя белковую капсидную оболочку AAV серотипа 2, в то время как, например, "AAV5-вектор" включает в себя белковую капсидную оболочку AAV серотипа 5, посредством чего в капсид может быть помещена последовательность ITR генома любого AAV-вектора в соответствии с настоящим изобретением.

Предпочтительно рекомбинантный AAV-вектор в соответствии с настоящим изобретением включает в себя белковую капсидную оболочку AAV серотипа 2, 5, 8 или AAV серотипа 9, причем AAV-геном или ITR, присутствующие в упомянутом AAV-векторе, получены из AAV серотипа 2, 5, 8 или AAV серотипа 9; такой AAV-вектор называется вектором AAV2/2, 2/5, AAV AAV2/8, AAV2/9, AAV5/2, AAV5/5, AAV5/8, AAV 5/9, AAV8/2, AAV 8/5, AAV8/8, AAV8/9, AAV9/2, AAV9/5, AAV9/8 или AAV9/9 соответственно.

Более предпочтительно рекомбинантный вектор AAV в соответствии с настоящим изобретением имеет тропизм к дермальным и эпидермальным клеткам и содержит белковую капсидную оболочку AAV серотипа 5 или 8. AAV-геном или ITR-последовательности, присутствующие в упомянутом векторе, могут быть получены из одного и того же или другого серотипа, такого как AAV серотип 2; такой вектор называется вектором AAV 2/5 или AAV 2/8. AAV с капсидом серотипа 5 имеет тропизм к кожным и эпидермальным клеткам, таким как базиллярные и супрабазиллярные кератиноциты и дермальные фибробласты. Векторы AAV с капсидом типа 5 демонстрируют значительно более высокую эффективность трансдукции по сравнению с AAV с капсидом типа 2 (Keswani et al. Wound Repair Regen. 2012; 20(4): 592-600). Точно так же AAV с капсидом серотипа 8 показывают тропизм к дермальным фибробластам и (в основном) супрабазиллярным кератиноцитам. Более того, AAV 2/8 имеют тенденцию к более эффективной трансдукции млекопитающих, предпочтительно, человеческих дермальных и эпидермальных клеток, чем AAV 2/5. Однако эффективность трансдукции, как представляется, зависит от времени введения во время заживления ран, причем AAV 2/2 показывает более высокую эффективность трансдукции по сравнению с AAV 2/5 и AAV 2/8 в более поздние моменты времени (Keswani et al., см. выше).

Следовательно, AAV 2/2, AAV x/5 и AAV x/8 являются предпочтительными AAV для доставки AON в соответствии с изобретением, и их выбор может быть определен с учетом времени введения и типов клеток, которые будут таргетированы. Подобные детали могут быть легко проработаны специалистом в данной области техники, в доклинических или клинических исследованиях.

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением, представленная последовательностью нуклеиновой кислоты по выбору, предпочтительно вставляется между AAV-геномом или ITR-последовательностями, как определено выше, например экспрессионная конструкция, содержащая регуляторный элемент экспрессии, функционально связанный с кодирующей последовательностью, и 3'-терминирующая последовательность.

"AAV хелперные функции", в целом, относятся к соответствующим функциям AAV, необходимым для репликации и упаковки AAV, поставляемым в векторе AAV in trans. AAV хелперные функции дополняют функции AAV, которые отсутствуют в AAV-векторе, но им не хватает ITR-последовательностей из AAV (которые предусмотрены в геноме AAV-вектора). AAV хелперные функции включают в себя две основных области ORF из AAV, а именно, кодирующую область реп и кодирующую область сар или функциональные, по существу идентичные их последовательности. Области Rep и Cap хорошо известны в данной области техники, см., например, Chiorini et al. (1999, J. of Virology, Vol. 73(2): 1309-1319) или US 5139941, включено в настоящее описание посредством ссылки. AAV хелперные функции могут быть предоставлены на конструкции AAV хелпера, которая может представлять собой плазмиду. Введение конструкции хелпера в клетку-хозяина может происходить, например, путем трансформации, трансфекции или трансдукции до или одновременно с введением AAV генома, присутствующего в AAV-векторе, как это определено в данном описании. AAV хелперные конструкции согласно изобретению, таким образом, могут быть выбраны так, что они производят желаемое сочетание серотипов для белковой капсидной оболочки в AAV-векторе, с одной стороны, и для AAV-генома, представляя в упомянутом AAV-векторе репликацию и упаковку, с другой стороны.

"AAV хелперный вирус" предоставляет дополнительные функции, необходимые для репликации и упаковки AAV. Подходящие AAV хелперные вирусы включают аденовирусы, вирусы простого герпеса (такие как ВПГ типы 1 и 2) и коровьи вирусы. Дополнительные функции, предоставляемые хелперным вирусом, также могут быть введены в клетку-хозяина с помощью векторов, как описано в патенте США 6,531,456, включенном в данное описание посредством ссылки.

Предпочтительно, AAV-геном, как присутствует в рекомбинантном AAV-векторе в соответствии с настоящим изобретением, не содержит каких-либо нуклеотидных последовательностей, кодирующих вирусные белки, таких как AAV-гены гер (репликации) или сар (капсида). AAV-геном может дополнительно включать маркерный ген или репортер, такой как ген, например кодирующий ген устойчивости к антибиотику, флуоресцентный белок (например, gfp), или ген, кодирующий химически, ферментативно или иным образом обнаруживаемый и/или селективируемый продукт (например, lacZ, aph и т.д.), известный в данной области техники.

Предпочтительный вектор AAV в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вектор AAV, предпочтительно вектор AAV2/5, AAV2/8, AAV2/9 или AAV2/2, экспрессирующий молекулу пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением, содержащую антисмысловой олигонуклеотид, причем упомянутый антисмысловой олигонуклеотид содержит или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из AON1, AON2, AON3, AON4, AON20, AON21, AON22, AON23, AON24, AON24.1, AON24.2, AON24.3, AON24.3, AON.24.4, AON.24.5, AON25 и mh-AON1, как описано в табл. 1.

Можно ожидать появления улучшенных средств для обеспечения индивидуума или клетки, ткани, органа упомянутого индивидуума молекулой пропуска экзона согласно изобретению, учитывая прогресс, который до сих пор уже был достигнут. Такие будущие усовершенствования могут, конечно, быть задействованы для достижения вышеупомянутого воздействия на перестройку мРНК с использованием способа по изобретению. Молекула пропуска экзона в соответствии с изобретением может быть доставлена индивидууму, в клетку, ткань или орган упомянутого индивидуума. При введении молекулы пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно, чтобы молекула растворялась в растворе, который совместим со способом доставки.

Gymnotic AON легко поглощаются большинством клеток *in vivo*, и, как правило, растворение AON в соответствии с изобретением в изотоническом растворе (физиологический раствор) будет достаточно, чтобы достичь целевых клеток, таких как клетки кожи (дермы и эпидермиса). В качестве альтернативы, gymnotic AON по изобретению могут быть приготовлены с использованием фармацевтически приемлемых наполнителей, добавок, стабилизаторов, растворителей, красителей и тому подобного. В дополнение или в качестве альтернативы, gymnotic AON могут быть приготовлены с любым из средств для трансфекции, упомянутых ниже.

В клетки кожи (дермы и эпидермиса) плазида для экспрессии антисмысловых олигонуклеотидов может быть доставлена в водном растворе, например изотоническом растворе (физиологическом растворе). Альтернативно, плазида может быть доставлена путем трансфекции с использованием известных трансфекционных агентов.

Для внутривенного, подкожного, внутримышечного, интратекального и/или внутрикожного введения является предпочтительным, чтобы раствор представлял собой изотонический раствор (физиологический раствор). Особенно предпочтительным в данном изобретении является применение эксципиента или трансфекционных агентов, которые помогут в доставке каждого из компонентов, как определено в настоящем описании, к клетке и/или в клетку, предпочтительно клетку кожи (дермы и эпидермиса). Предпочтительными являются эксципиенты или трансфекционные агенты, способные образовывать комплексы, наночастицы, мицеллы, везикулы и/или липосомы, которые доставляют каждый компонент, как определено в настоящем описании, в комплексе или захваченным в везикулу или липосому, через клеточную мембрану. Многие из таких эксципиентов известны в данной области техники. Подходящие эксципиенты или трансфекционные агенты включают полиэтиленимин (PEI; ExGen500 (MBI Fermentas)), LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen) или их производные или сходные катионные полимеры, включая полипропиленимин или сополимеры полиэтиленимина (polyetilenimine copolymers (PEC)) и их производные, синтетические амфифилы (SAINT-18), липофектин™, DOTAP и/или вирусные капсидные белки, которые способны к самосборке в частицы, которые могут доставить каждый компонент, как определено в настоящем описании, к клетке, предпочтительно клетке кожи (дермы или эпидермиса). Такие эксципиенты, как были показано, служат для эффективной доставки олигонуклеотида, такого как антисмысловые нуклеиновые кислоты, в разнообразные культивируемые клетки, включая клетки кожи (дермы и эпидермиса). Их высокий потенциал трансфекции объединен с от приемлемо низкой до средней токсичностью с точки зрения общей выживаемости клеток. Возможность легкой структурной модификации может быть использована для выполнения последующих модификаций и анализа их дополнительных (*in vivo*) характеристик в отношении переноса нуклеиновых кислот и токсичности.

Липофектин представляет собой пример липосомального трансфекционного агента. Он состоит из двух липидных компонентов, катионного липида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония хлорида (DOTMA) (ср. DOTAP который представляет собой метилсульфатную соль) и нейтрального липида диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Нейтральный компонент опосредует внутриклеточное высвобождение. Другая группа систем доставки представляет собой полимерные наночастицы.

Поликатионы, такие как диэтиламиноэтиламиноэтил (ДЭАЭ)-декстран, которые хорошо известны в качестве реагента трансфекции ДНК, могут быть объединены с бутилцианоакрилатом (PBCA) и гексилцианоакрилатом (PHCA) для выработки катионных наночастиц, которые могут доставить каждый компонент, как определено в настоящем описании, предпочтительно олигонуклеотид, через клеточные мембраны в клетки.

В дополнение к данным общеизвестным материалам, представляющим собой наночастицы, катионный пептид протамин предлагает альтернативный подход к приготовлению препарата олигонуклеотида с коллоидами. Данная коллоидная система наночастиц может образовывать так называемые proticles, ко-

которые могут быть получены с помощью простого процесса самосборки для упаковки и опосредуют внутриклеточное высвобождение олигонуклеотида. Специалист в данной области техники может выбрать и приспособить любой из вышеупомянутых или других коммерчески доступных альтернативных эксципиентов и систем доставки для упаковки и доставки молекулы пропуска экзона для применения в настоящем изобретении, чтобы доставить ее для профилактики, лечения или задержки заболевания или состояния, связанного с мутированным экзоном 73 в гене COL7A1.

Молекула пропуска экзона в соответствии с изобретением может быть ковалентно или нековалентно связана с направляющим лигандом, специально предназначенным для облегчения поглощения в клетку (особенно клетку кожи (дермы)), цитоплазму и/или ее ядро. Такой лиганд может содержать (i) соединение (включая, но не ограничиваясь ими, пептидо(-подобные) структуры), распознающее конкретные элементы клетки, ткани или органа, для облегчения клеточного поглощения и/или (ii) химическое соединение, способное облегчить поглощение в клетках и/или внутриклеточное высвобождение олигонуклеотида из везикул, например эндосом или лизосом.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления молекула пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением составлена в композиции или лекарственном средстве или композиции, которая снабжена, по меньшей мере, эксципиентом и/или нацеливающим лигандом для доставки и/или устройства доставки его в клетку и/или улучшения его внутриклеточной доставки.

Предпочтительная доставка осуществляется через местное введение. Как указано в прилагаемых примерах, такая доставка может осуществляться посредством применения фармацевтически приемлемого гидрогеля, такого как Flaminal hydro™, который представляет собой (1) гидрогель, уже используемый в уходе за больным, (2) гидрогель гипромеллозы или (3) гидрогель карбомера. Композиции для местного применения, которые могут быть использованы для местной доставки олигонуклеотидов по настоящему изобретению, представляют собой:

Кремы, приготовленные в виде эмульсии вода-в-масле или в виде эмульсии масло-в-воде; последние являются более косметически и эстетически приемлемыми. Примерами могут служить кремы на основе Softisan или кремы цетомакрогол.

гели: растворы или суспензии, которые содержат желирующее средство, которое равномерно распределено по всей жидкой фазе. Примерами могут служить гидрогели, включая, но не ограничиваясь ими, гипромеллозу, карбомер и альгинат;

мази. Они обычно содержат <20% воды и >50% углеводов, восков или полиолов в качестве носителя. При нанесении на кожу они кажутся более жирными, чем кремы;

пасты: Они содержат большое количество (высокий процент) придающих жесткость мелкодисперсных твердых веществ;

суспензии, которые являются жидкими препаратами, которые содержат твердые частицы, распределенные в жидком носителе. Некоторые из них могут называться лосьонами;

лосьоны. Лосьоны представляют собой жидкие, несколько вязкие (эмульсия) препараты, которые имеют много общих характерных черт с суспензиями, гелями низкой вязкости и растворами;

пены, которые представляют собой эмульсии, которые имеют пенистую консистенцию при выпуске;

аэрозоли, которые состоят из мелких капелек жидкости, генерируемых соплом;

растворы, которые представляют собой жидкие продукты, которые, как правило, являются водными растворами, но могут содержать другие растворители, такие как спирты.

Следует понимать, что, если композиция содержит дополнительный компонент, такой как вспомогательное соединение, определенное в данном описании, каждый компонент композиции может быть приготовлен в одной комбинации или композиции или препарате. В зависимости от их природы, специалист в данной области техники будет знать, какой тип препарата является наиболее подходящим для каждого компонента, как определено в данном описании. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к композиции или препарату, который находится в виде набора частей, содержащих молекулу пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением и дополнительное вспомогательное соединение, как определено в данном описании.

При необходимости, молекула пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением или вектор, предпочтительно вирусный вектор, экспрессирующий молекулу пропуска экзона согласно изобретению, могут быть введены в фармацевтический активную смесь путем добавления фармацевтический приемлемого носителя.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к композиции, предпочтительно к фармацевтической композиции, содержащей молекулу пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением, такую как gymnotic AON или вирусный вектор согласно изобретению, и фармацевтически приемлемый наполнитель. Такая композиция может содержать одну молекулу пропуска экзона в соответствии с изобретением, но может также включать в себя несколько различных молекул пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением. Такая фармацевтическая композиция может содержать любой фармацевтический приемлемый эксципиент, включая носитель, наполнитель, консервант, адъювант, растворитель и/или разбавитель. Такой фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель, консервант,

адьювант, растворитель и/или разбавитель может быть найден, например, в Remington, 2000. Каждый признак упомянутой композиции ранее был определен в данном описании.

Если используют несколько различных молекул пропуска экзона согласно изобретению, то концентрация или доза, которая определена в настоящем описании, может относиться к общей концентрации или дозе всех используемых олигонуклеотидов или концентрации или дозе каждой используемой или добавленной молекулы пропуска экзона. Поэтому в одном варианте осуществления обеспечивается композиция, в которой каждый или общий объем используемых молекул пропуска экзона в соответствии с изобретением дозируется в количестве, которое варьируется от 0,0001 до 100 мг/кг, предпочтительно от 0,001 до 50 мг/кг, еще более предпочтительно от 0,01 до 20 мг/кг.

Предпочтительная молекула пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением предназначена для лечения DEB или, в более общем плане, связанного с мутированным экзоном 73 гена COL7A1 заболевания или состояния индивидуума. Во всех вариантах осуществления настоящего изобретения термин "лечение", как его понимают, включает предотвращение и/или задержку заболевания или состояния. Индивидууму, который может подвергаться лечению с использованием молекулы пропуска экзона согласно изобретению, возможно, уже был поставлен диагноз DEB или заболевания или состояния, связанного с экзоном 73 гена COL7A1. В качестве альтернативы индивидууму, который может подвергаться лечению с использованием молекулы пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением, возможно, диагноз до сих пор не был поставлен, но он может быть индивидуумом, имеющим повышенный риск развития DEB, или связанного с экзоном 73 гена COL7A1 заболевания или состояния в будущем, учитывая его или ее генетический фон. Предпочтительным индивидуумом является человек. В предпочтительном варианте осуществления заболевание или состояние, связанное с мутированным экзоном 73 гена COL7A1, представляет собой DEB.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает молекулу пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением, такую как AON, или вектор, кодирующий AON, такой как вирусный вектор в соответствии с изобретением, или композицию, содержащую AON или вектор, кодирующий AON, в соответствии с настоящим изобретением для применения в качестве лекарственного средства, например, для применения при лечении DEB или, в более общем случае, связанного с мутированным экзоном 73 гена COL7A1 заболевания или состояния индивида (как обсуждалось выше).

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению молекулы пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением, такой как AON, или вектора, кодирующего AON, такого как вирусный вектор, в соответствии с изобретением, или композиции, содержащей AON или вектор, кодирующий AON согласно изобретению, при изготовлении лекарственного средства для лечения DEB или, в более общем случае, связанного с мутированным экзоном 73 гена COL7A1 заболевания или состояния индивида (как обсуждалось выше).

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения млекопитающего (предпочтительно человека), несущего в своем геноме мутацию в экзоне 73 гена COL7A1, вызывающую заболевание или расстройство, включая DEB, содержащему введение упомянутому млекопитающему (человеку) AON, (вирусного) вектора или фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Данные пациенты могут страдать или быть подвержены риску развития DEB или связанного расстройства. Связанное расстройство, заболевание или состояние включает в себя также, например, рак кожи (плоскоклеточный рак) или другие карциномы, которые могут возникнуть в результате дефицита или аномалии коллагена VII в коже или других органах индивидуума, вызванного или связанного с мутацией в экзоне 73 гена COL7A1.

Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения представляют собой AON, вирусные векторы, кодирующие AON, и фармацевтические композиции, содержащие AON в соответствии с настоящим изобретением, для применения в качестве лекарственного средства для лечения млекопитающего (предпочтительно человека), несущего в своем геноме мутацию в экзоне 73 гена COL7A1.

Молекулы пропуска экзона согласно изобретению могут быть введены пациенту системно, локально, местно, посредством введения, которое является пероральным, внутриглазным, внутрилегочным, интраназальным, внутримышечным, подкожным, внутрикожным, ректальным, путем проглатывания, путем инъекции, ингаляции, инфузии, распыления, в виде растворов (водных), суспензий, эмульсий (масло-в-воде), мазей, пастилок, таблеток и т.д.

Дозирование может быть ежедневным, еженедельным, ежемесячным, ежеквартальным, один раз в год, в зависимости от способа введения и потребности пациента.

Из-за раннего начала заболевания пациентов, страдающих или рискующих развитием заболевания, расстройства или состояния, вызванного или связанного с мутированным экзоном 73 гена COL7A1, включая DEB, можно лечить в утробе матери, непосредственно после рождения, в возрасте от 1, 2, 3, 6 месяцев, в возрасте от одного года, в возрасте от 3 лет в возрасте от 5 лет до или после появления симптомов, чтобы облегчить, замедлить развитие, остановить или обратить вспять симптомы болезни и т.п.

Лечение в применении или в способе согласно изобретению продолжается по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере один месяц, по меньшей мере несколько месяцев, по меньшей мере один год, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 лет или хронически, даже на протяжении всей жизни пациента. Каждая мо-

лекула пропуска экзона или каждый олигонуклеотид пропуска экзона или его эквивалент, как определено в настоящем описании, для применения в соответствии с изобретением могут быть подходящими для прямого введения в клетку, ткань и/или орган *in vivo* индивидуумов, уже затронутых или с риском развития расстройства, заболевания или состояния, связанного с мутированным экзоном 73 гена COL7A1, а также могут быть введены непосредственно *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Частота введения олигонуклеотида, композиции, соединения или вспомогательного соединения по настоящему изобретению может зависеть от нескольких параметров, таких как возраст пациента, природа молекулы пропуска экзона (например, *gymnotic* AON или векторный AON, такие как AAV-вектор или лентивирусный вектор, экспрессирующие AON), доза, формулировка упомянутой молекулы и тому подобного.

Диапазоны дозы молекулы пропуска экзона, предпочтительно олигонуклеотида в соответствии с изобретением, предпочтительно разработаны на основании исследований повышения дозы в клинических испытаниях (применение *in vivo*), для которых существуют строгие требования протокола. Олигонуклеотид, как определено в настоящем описании, может быть использован в диапазоне доз от 0,0001 до 100 мг/кг, предпочтительно от 0,01 до 20 мг/кг. Режим дозирования и лечения может варьироваться в широких пределах в зависимости от многих факторов, включая, но не ограничиваясь ими, путь введения (например, системный по сравнению с местным), вводится ли олигонуклеотид в виде *gymnotic* AON или в виде векторного AON, схемы дозирования, возраста и массы пациента и т.д.

В предпочтительном варианте осуществления вирусный вектор, предпочтительно AAV-вектор, как описано в настоящем документе ранее, в качестве средства доставки для молекулы согласно изобретению вводят в дозе в диапазоне от 1×10^9 до 1×10^{17} вирусных частиц на инъекцию, более предпочтительно от 1×10^{10} до 1×10^{14} и наиболее предпочтительно от 1×10^{10} до 1×10^{12} вирусных частиц на инъекцию.

Специалисту, имеющему обычную квалификации в данной области техники, к которой относится данное изобретение, будет ясно, что детали лечения по необходимости будут утверждены в соответствии с такими факторами и в зависимости от таких факторов, как последовательность и химия олигонуклеотида(ов), путь введения, препарат, доза, режим дозирования, формат (вирусный вектор или *gymnotic* олигонуклеотид), возраст и масса пациента, стадия заболевания и т.д., которые могут потребовать дополнительного неклинического и клинического расследования.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу предотвращения или, по меньшей мере, уменьшения, включения экзона 73 гена COL7A1 в клетку, включающему контактирование клетки, предпочтительно клетки кожи (кожные фибробласты), с молекулой пропуска экзона в соответствии с настоящим изобретением, такой как *gymnotic* AON или (вирусный) вектор, кодирующий AON в соответствии с настоящим изобретением, или композиция в соответствии с настоящим изобретением. Признаки данного аспекта предпочтительно являются теми, которые определены в настоящем описании ранее.

Если не указано иначе, каждый вариант осуществления, описанный в настоящем изобретении, может быть объединен с другим вариантом осуществления, как описано в настоящем изобретении.

Способность молекулы пропуска экзона, такой как AON, в соответствии с настоящим изобретением или (вирусного) вектора, кодирующего такой AON, предотвращать или, по меньшей мере, уменьшать, включение мутированного экзона 73 гена COL7A1, когда ген COL7A1 экспрессируется в клетке млекопитающих (предпочтительно человека), а также связываться с пре-мРНК COL7A1 млекопитающих (человека) в физиологических условиях в области, влияющей на выбор 5'-акцептора сплайсинга, и тем самым, уменьшить включение мутированного экзона 73 в мРНК COL7A1, может быть на практике оценена с помощью анализов, описанных в экспериментальной части в настоящем изобретении. В частности, молекулу пропуска экзона можно инкубировать с клеткой, содержащей экзон 73 (необязательно мутированный) гена COL7A1, чтобы оценить его способность снижать продукцию клеткой мРНК, которая включает экзон 73, например с помощью RT-PCR (которая может быть определена количественно с использованием устройства Bioanalyzer), как описано в настоящем изобретении в экспериментальной части и в примерах.

Как можно заметить в экспериментальной части и в примерах, приведенных в настоящем изобретении, на уровне РНК, добавление различных AON в соответствии с изобретением, направленных на экзон 73 гена COL7A1, действительно, давало мРНК с нехваткой экзона 73, приводя к получению более короткого, но функционального белка коллагена VII типа.

В фибробластах (которые могут быть получены из дермальной части кожи) коллаген VII типа экспрессируется в избытке. Поэтому следует ожидать, что добавление AON к культуре фибробластов от пациентов с DEB приведет к увеличению количества укороченного, но функционального белка коллагена VII типа, который обнаруживается на Вестерн-блоттинге, и, как таковое, будет демонстрировать, что терапия на основе AON будет не только перенаправлять сплайсинг мРНК COL7A1, но также приведет к восстановлению функции коллагена VII типа.

Термины "аденин", "гуанин", "цитозин", "тимин", "урацил" и гипоксантин (нуклеиновое основание в инозине) относятся к нуклеиновым основаниям как таковым.

Термины аденозин, гуанозин, цитидин, тимидин, уридин и инозин относятся к нуклеиновым основаниям, связанным с (дезоксир)рибозильным сахаром.

Термин "нуклеозид" относится к нуклеиновому основанию, связанному с (дезокси)рибозильным сахаром.

В данном документе и в формуле изобретения глагол "содержать" и его спряжения используется в не ограничивающем его смысле, это означает, что включены пункты, следующие за данным словом, но пункты, не упомянутые конкретно, не исключены. Кроме того, ссылка на элемент с использованием единственного числа не исключает возможности того, что присутствует более чем один из элементов, если контекст не требует, чтобы был один и только один из элементов, и как правило, означает "по меньшей мере один".

Слово "включать" и все его времена и спряжения следует читать как "включает в себя, но не ограничивается".

Слово "молекула пропуска экзона" означают включение gymnotic AON и векторного AON, включая вирусные векторы, способные экспрессировать AON в совместимой клетке.

Слово "около" или "приблизительно", когда используется в сочетании с числовым значением (например, около 10), предпочтительно означает, что значение может быть заданным значением (10) плюс или минус 5% от величины.

Информация о последовательности, предоставленная в настоящем изобретении, не должна быть настолько узко истолкована, чтобы потребовать включения ошибочно идентифицированных оснований. Специалист в данной области техники способен идентифицировать такие ошибочно идентифицированные основания и знает, как исправить такие ошибки. В случае ошибок последовательности, должна обладать последовательность полипептида, получаемого экспрессией гена, присутствующего в SEQ ID NO: 1, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид.

Примеры

Пример 1. Анализ мРНК экзона 73.

Чтобы обнаружить присутствие мРНК экзона 73 в мРНК гена COL7A1, были использованы экстрагированные мРНК обоих типов клеток HeLa и человеческих первичных фибробластов (human primary fibroblasts (HPF)). Культивирование клеток проводили в (a) модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (fetal bovine serum (FBS)) для HeLa или (b) DMEM AQE с добавлением 20% FBS и 1% пирувата натрия для клеток HPF. Все клетки выращивали при 37°C с 5% CO₂.

Для того чтобы определить эффективность пропуска экзона описанных AON, клетки высевали при плотности 60000 клеток/лунку (HeLa) в 12-луночных планшетах или 150000 клеток/лунку (HPF) в 6-луночные планшеты. После 24 ч роста клеток клетки трансфицировали 100 нм комплекса AON-mxPei. Выделение РНК проводили с системой ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega), затем синтезировали кДНК с использованием набора Thermo Scientific Verso. PCR для экзона 73 выполняли с FW-праймером (5'-GCTGGCATCAAGGCATCT-3'; SEQ ID NO: 51), расположенным на границе экзона 71-72, и RV-праймером (5'-TCCTTTCTCTCCCCGTTCTC-3'; SEQ ID NO: 52), расположенным в экзоне 74. PCR-продукты визуализировали с прибором Bioanalyzer с использованием чипов DNA1000 и для анализа длины продукта использовали программное обеспечение Expert 2100.

Эффективности пропуска приведены в табл. 2, и на фиг. 3 показаны результаты анализа "лаборатории-на-чипе". AON согласно изобретению, обозначенные как от AON1 до AON4, от AON20 до AON25 (включая AON от 24.1 до 24.5) и m-h AON1, имеют лучшую эффективность, с >70% мРНК, из которой удален экзон 73. Эффективные AON нацелены на 5'-конец пре-мРНК.

Таблица 2

Эффективность исключения экзона 73 из мРНК в клетках HPF и HeLa

	HPF	HeLa	Последовательность AON 5'-3'	SEQ ID NO:	Замечания
ESE73.3	82%	96%	UCUCCAC <u>CG</u> UUCGCCCCUUCAGCC <u>CGCG</u> UUCU	37	
ESE73.7	80%	73%	UCUCCAC <u>CG</u> UUCGCCCCUUCAGCC <u>CGC</u>	38	
AON1	67%	86%	UCUCCAGGAAAGCC <u>GA</u> UGGGGCCC	5	
AON2	69%	85%	AGCC <u>CGCG</u> UUCUCCAGGAAAGCC <u>GA</u>	6	
AON3	67%	92%	GU <u>CG</u> CCCUUCAGCC <u>CGCG</u> UUCUCCA	7	
AON4	91%	83%	A <u>CGG</u> U <u>CG</u> CCCUUCAGCC <u>CGCG</u> UU	8	
AON5	10%	3%	CCCCUGAGGGCCAGGGUCCAC <u>CGG</u>	9	
AON6	2%	0%	CAGACCAGGUGGCCCCUGAGGGCCA	10	
AON7	4%	0%	CCAAGGGCCAGACCAGGUGGCCCC	11	
AON8	0%	0%	CCAGACCAGGUGGCCCCUGAGGGCC	12	
AON9	0%	0%	UCUCCCAAGGGCCAGACCAGG	13	
AON10	0%	0%	GGAAGGCC <u>CG</u> GGGGGGCCCCUCUC	14	
AON11	6%	6%	<u>CCGG</u> CAAGGCC <u>CG</u> GAAGGCC <u>CGGG</u>	15	
AON12	0%	0%	AGGCUUCCAGGCUCCCC <u>CG</u> GCAAG	16	
AON13	0%	2%	<u>CGGG</u> AAUACCAGGCUUCCAGGCU	17	
AON14	17%	25%	UGCCUGGGAGCC <u>CGGG</u> AAUACCA	18	
AON15	8%	8%	CCCACACCCCAGCCCUGCCUGGG	19	
AON16	8%	0%	CCUCUCCACACCCCAGCCCU	20	
AON17	9%	9%	UCUCUCCUGGCCUUCUGCCUCU	21	
AON18	11%	13%	CACCCUCUCUCCUGGCCUCCU	22	
AON19	0%	7%	CCAGCCUCACCCUUCUCCUGG	23	
AON20	74%	100%	CUCCAGGAAAGCC <u>GA</u> UGGGGCCC	24	AON1-1N на 3''
AON21	58%	89%	UCCAGGAAAGCC <u>GA</u> UGGGGCCC	25	AON1-2N на 3''
AON22	64%	85%	CCAGGAAAGCC <u>GA</u> UGGGGCCC	26	AON1-3N на 3''
AON23	64%	83%	CUCCAGGAAAUC <u>CG</u> AUGGGGCC <u>cu</u>	27	AON1-N на 3' + 1 на 5'
AON24	72%	93%	UCCAGGAAAGCC <u>GA</u> UGGGGCC <u>cug</u>	28	AON1-2N на 3' + 2 на 5'

AON24.1	32%	73%	UCCAGGAAAGCCGAUGGG	39	
AON24.2	50%	88%	UCCAGGAAAGCCGAUGG	40	
AON24.3	49%	79%	UCCAGGAAAGCCGAUG	41	
AON24.4	53%	86%	CUCCAGGAAAGCCGAUGG	42	
AON24.5	66%	89%	UCUCCAGGAAAGCCGAUG	43	
AON25	54%	92%	CCAGGAAAGCCGAUGGGGCCcugc	29	AON1-3N на 3'+3 на 5'
AON26	22%	49%	AGGAAAGCCGAUGGGGCCcugcag	30	2N сдвиг в сторону 5'
AON27	40%	37%	GAAAGCCGAUGGGGCCcugcagga	31	4N сдвиг в сторону 5'
AON28	20%	47%	AAGCCGAUGGGGCCcugcaggagu	32	6N сдвиг в сторону 5'
AON29	5%	0%	GCCGAUGGGGCCcugcaggagugg	33	8N сдвиг в сторону 5'
AON30	6%	7%	GAUGGGGCCcugcaggaguggaa	34	11N сдвиг в сторону 5'
AON31	0%	0%	UCCAGGAAAG	44	
m-hAON	76%	91%	CGUUCUCCAGGAAAGCCGAUG	35	
m-hAON	0%	16%	CCUGAGGGGCCAGGGUCUCCACG	36	

Два из AON, которые показали удовлетворительные эффективности пропуска экзона, были усечены путем удаления различного числа нуклеотидов на 3'-конце с тем, чтобы избежать возникновения нежелательных G-тетрад. Данные AON приведены в табл. 3.

Таблица 3

Усеченные версии AON24 и AON31

Название	AON-последовательность	SEQ ID NO	РНК-связывающая последовательность	SEQ ID NO	Длина
AON 24.1	UCCAGGAAAGCCGAUGGG	39	CCCAUCGGCUUUCUGGA	45	18
24.2	UCCAGGAAAGCCGAUGG	40	CCAUCGGCUUUCUGGA	46	17
24.3	UCCAGGAAAGCCGAUG	41	CAUCGGCUUUCUGGA	47	16
24.4	CUCCAGGAAAGCCGAUGG	42	CCAUCGGCUUUCUGGAG	48	18
24.5	UCUCCAGGAAAGCCGAUG	43	CAUCGGCUUUCUGGAGA	49	18
AON 31	UCCAGGAAAG	44	CUUUCUGGA	50	10

Данные AON эффективно снижали включение экзона 73 в мРНК COL7A1 (табл. 1), в то же время будучи лишены каких-либо последовательностей, которые являются менее желательными с точки зрения технологичности, очистки и аналитической точки зрения или шанса общей потери функции в связи с мультиплексированием.

Функциональность коллагена VII без экзона 73 может быть выяснена с помощью нескольких способов *in vitro*, описанных в литературе.

1. Анализ белка с оценкой как размера, так и правильности сборки α1-коллагеновых цепей с использованием Вестерн-блоттинга (Titeux et al., 2010). Следует отметить, что из-за небольшого размера пропущенного экзона и большого размера белка дикого типа видимое различие в размерах белка не мо-

жет быть подобрано.

2. Термический анализ устойчивости гомотримера коллагена VII с помощью Вестерн-блоттинга в невосстановительных условиях. Коллаген VII, дикого типа, состоит из трех $\alpha 1$ -коллагеновых цепей и имеет T_m , равную 41°C (Mecklenbeck et al., 2002).

3. Анализ миграции клеток с использованием коллоидного золота или анализа мазком. Сравнение подвижности фибробластов и/или кератиноцитов, которые экспрессируют коллаген VII дикого типа, по сравнению с клетками с укороченными белками без экзона 73 (Chen et al., 2002).

4. Может быть проведена оценка клеточной адгезии к различным компонентам внеклеточного матрикса, например к коллагену IV, ламинину-332, ламинину-1 или фибронектину (Chen et al., 2002).

Авторы изобретения постулируют, что AON, которые показали себя наиболее эффективными с точки зрения предотвращения или, по меньшей мере, уменьшения включения экзона 73 в мРНК COL7A1 млекопитающего (предпочтительно человека), обеспечат удовлетворительные результаты с точки зрения функциональности коллагена VII, что может быть легко оценено с использованием вышеупомянутых способов из предшествующего уровня техники. Кроме того, AON, которые содержат не более двух последовательностей CpG (предпочтительно не более одной, например, одну), будут удовлетворительными с точки зрения иммуногенности *in vivo*. Таким образом, наиболее предпочтительные AON по изобретению являются кандидатами для разработки на их основе терапевтических препаратов, подходящих для лечения людей, страдающих или подверженных риску заболеть формами дистрофического буллезного эпидермолиза, связанными с мутациями в экзоне 73 гена COL7A1.

Пример 2. Местная доставка mh-AON1 с использованием *ex vivo* модели свиной кожи.

Современное лечение ран для пациентов с DEB в основном сосредоточено на уходе за ранами, лечении зуда и боли и ранней диагностике плоскоклеточного рака. Уход за ранами включает в себя очистку и стерилизацию ран с помощью (хлоридных) ванн, использование хлоргексидина в качестве дезинфицирующего средства и других противомикробных кремов. Кроме того раны гидратируют и увлажняют с использованием гидрогелей, чтобы уменьшить боль и зуд. И, наконец, уход за ранами включает перевязки с различными типами перевязочных/силиконовых пен для защиты и снижения трения на коже, чтобы предотвратить загрязнение, предотвратить прилипание материала, для поглощения жидкости из раны, чтобы предотвратить рост пузырей, пузыри прокалывают и осушают, чтобы уменьшить давление изнутри.

Местная доставка mh-AON1 обеспечивает несколько преимуществ, во-первых, благодаря локальной доставке будет осуществляться прямая поставка к целевым клеткам, кератиноцитам и фибробластам. Во-вторых, благодаря местному введению системное всасывание будет лишь незначительным, что приводит к уменьшению системной токсичности (Wraight & White Pharmacol Ther 2001 Apr; 90(1):89-104). Наконец, было показано, что после местного введения олигонуклеотидов местные концентрации в дерме и эпидермисе могут быть до 150 (для дермы) и 4000 (для эпидермиса) раз выше, чем после системного введения (Metha et al., J Invest Dermatol. 2000 Nov; 115(5):805-12).

Для исследования местной доставки mh-AON1, исследователями была создана *ex vivo* модель свиной кожи. Свиная кожа считается очень похожей на кожу человека, с одинаковой эпидермальной толщиной и барьерными свойствами рогового слоя. Для исследований по доставке получали свиную *ex vivo* кожу, срезали до толщины от 0,8 до 1,4 мм и культивировали на границе воздух-жидкость с апикальной стороной, обращенной к воздуху. В ранах больных с диагнозом DEB эпидермис полностью отделен от дермы, поэтому данные раны имитировали, механически полностью удаляя эпидермис. Для оценки проникновения mh-AON1 в кожу, как интактную, так и *ex vivo* имитирующую пузырчатую свиную кожу, олигонуклеотид был приготовлен либо в PBS, либо в гидрогеле, части стандартного ухода за ранами при заболевании DEB. После воздействия mh-AON1 кусочки кожи фиксировали в 4% формалине, обрабатывали и заливали в парафин для гистологической оценки с использованием гематоксилина в качестве контрастного окрашивания для морфологического анализа. Так как олигонуклеотид был конъюгирован с меткой Cy5, местонахождение mh-AON1 может быть визуализировано с помощью флуоресцентной микроскопии.

mh-AON1, приготовленный в PBS.

Кусочки свиной кожи, как интактной, так и *ex vivo* имитирующей пузырчатую, инкубировали с 25 мкг mh-AON1, приготовленного в PBS, в течение 24 ч, после чего их обработали для анализа. Результаты показывают, что mh-AON1, нанесенные на кусочки интактной свиной кожи, не проникают в роговой слой (фиг. 4a-b). Однако, когда препарат mh-AON1 инкубируют на имитирующей пузырчатую свиную кожу, наблюдалось проникновение олигонуклеотида в дерму (фиг. 4c-f).

mh-AON1, приготовленный в гидрогелях.

Нанесение на раны пациента облегчается включением mh-AON1 в мазь или гель. Поскольку пациенты с DEB используют гидрогели как часть ухода за ранами, например, чтобы увлажнить раны и, тем самым, уменьшить боль и зуд, было проведено испытание с целью выяснения, можно ли mh-AON1 также включать в гидрогель. Для данной цели были использованы три различных гидрогеля: (1) flaminol™, который представляет собой гидрогель, уже используемый в уходе за больным, (2) гидрогель гипромелло-

зы и (3) гидрогель карбомера, оба приготовленные в лаборатории авторов изобретения. Все гидрогели уже широко используются в клинических условиях. Гидрогелевые составы были приготовлены с олигонуклеотидом и без олигонуклеотида, и их наносили на кусочки кожи, 25 мкг mh-AON1 было добавлено в 50 мг геля для каждого кусочка кожи, что дает конечную концентрацию олигонуклеотида, равную 0,5 мг/мл.

Наблюдения показали что mh-AON1, добавленный к гидрогелям flaminol™, гипромеллозы или карбомера, ни в одном случае не смог проникнуть в интактный роговой слой *ex vivo* свиных кусков кожи (фиг. 5a, c, e, g). Тем не менее, все три гидрогеля оказались способны доставить олигонуклеотид в дерму пузырчатой свиной кожи, где эпидермис был удален (фиг. 5b, d, f, h). Оптимизация гидрогелей продолжается, и выбор конечного состава будет основан на глубине дермального проникновения, местной переносимости, Ph комбинации mh-AON1, стабильности состава гидрогеля-mh-AON1 и высвобождения mh-AON1 из гидрогеля.

Вывод.

Пациенты с DEB испытывают сильные страдания от хрупкой кожи из-за вздутий, ран и изъязвлений. Кроме того, они нуждаются в постоянном уходе за ранами. Поэтому mh-AON1 оценивали, используя местный путь доставки. Пузырчатую кожу имитировали, удаляя эпидермис, включая роговой слой, что имитирует кожу пациента с DEB. Было показано, что mh-AON1, приготовленный в PBS или гидрогеле, способен проникать в пузырчатую кожу и достигать дермы. Данные результаты подтверждают, что местное введение в раны на коже пациента является возможным подходом для доставки mh-AON1 в клетки-мишени кожи. Кроме того, полученные данные подтверждают, что препарат, напоминающий стандартные препараты по уходу, использующиеся при EB, представляется подходящим для доставки mh-AON1.

Пример 3. Испытание эффективности на уровне мРНК.

Два различных типа клеток были использованы для оценки эффективности mh-AON1: (1) HeLa и (2) полученные из кожи первичные фибробласты человека (HPF) от здоровых индивидуумов. Оба типа клеток экспрессируют мРНК COL7A1 и производят белок коллаген типа VII. mh-AON1, как раскрыто в настоящем описании, был разработан, чтобы исключить экзон 73 из мРНК COL7A1 и, таким образом, исключить мутации из транскрипта. Так как mh-AON1 нацелен на процесс сплайсинга, наиболее прямым измеримым результатом эффективности является профилирование и количественное определение транскриптов COL7A1 (дикого типа и $\Delta 73$) с добавлением и без добавления mh-AON1.

Профилирование и количественное определение уровня мРНК COL7A1 посредством полимеразной цепной реакции (PCR).

PCR является простой технологией, которая обеспечивает логарифмическую амплификацию последовательности специфической ДНК (кДНК). Специфические к последовательности COL7A1 праймеры, фланкирующие экзон 73, были использованы для проведения реакции PCR. Образующиеся при этом продукты визуализировали с использованием технологии "лаборатории на чипах", что позволяет распознавать продукты с различными длинами фрагментов и провести количественный анализ, основанный на выходе продукта.

Для экспериментов с пропуском экзона 73 клетки HPF и HeLa подвергали трансфекции с mh-AON1 при концентрации 100 нМ с использованием полиэтиленimina (Poly I:C) в качестве переносчика для трансфекции. Через 24 или 40 ч после трансфекции клетки собирали, выделяли всю мРНК, синтезировали кДНК и проводили PCR с использованием COL7A1-специфических праймеров, одного в экзоне 69 и одного в экзоне 74. В качестве отрицательного контроля была взята скремблированная (SCRM) версия олигонуклеотида mh-AON1.

Результаты показывают, что обработка с помощью mh-AON1 приводит к эффективному исключению экзона 73 из мРНК COL7A1 по сравнению с SCRM-обработанными клетками (фиг. 6), как определено с помощью PCR. Кроме того, уровень мРНК дикого типа в необработанных клетках был сопоставим с уровнем общей мРНК COL7A1 в обработанных клетках. Поскольку способ PCR/Bioanalyzer является информативным, но не абсолютно количественным, после данных первоначальных наблюдений были проведены анализы с использованием капельной цифровой PCR, которая обеспечивает высокую точность и абсолютную количественную оценку фрагментов нуклеиновых кислот.

Профилирование и количественное определение транскриптов мРНК COL7A1 с капельной цифровой PCR.

Капельная цифровая PCR (droplet digital PCR (ddPCR)) обеспечивает высокую точность и абсолютную количественную оценку нуклеиновых кислот путем разделения образца PCR на тысячи капель. Ввод мРНК/кДНК COL7A1 в систему PCR обеспечивали таким образом, что каждая капля содержала либо одну, либо ни одной молекулы кДНК COL7A1. Чтобы сделать возможной детекцию матрицы, к смеси PCR добавляли зонд, специфичный для дикого типа или для COL7A1 $\Delta 73$. Расположение данных зондов показано на фиг. 7. Один из зондов является специфичным для продукта дикого типа, а другой зонд является специфичным только для продукта COL7A1 $\Delta 73$. Данный зонд после связывания с матрицей гидролизуются и начинают флуоресцировать, так что после проведения PCR-амплификации можно пересчи-

тать флуоресцентные капли, содержащие последовательность-мишень. Применяя статистический анализ по Пуассону к количествам капель в образце, давших положительную и отрицательную реакцию, можно рассчитать абсолютное количество молекул мРНК дикого типа или мРНК COL7A1 Δ 73.

HeLa клетки были трансфицированы либо 50, 100, либо 200 нМ mh-AON1, чтобы создать профиль доза-реакция для mh-AON1. Результаты, полученные через 24 ч после трансфекции, показывают, что обработка mh-AON1 дает как транскрипты COL7A1 дикого типа, так и транскрипты COL7A1 без экзона 73. Данные результаты подтверждают наблюдения, сделанные при использовании PCR. Доза 50 нМ уже дает почти максимальный эффект после 24 ч. Через 40 ч небольшое увеличение в % транскриптов без экзона 73 наблюдалось для трансфекции при 50 и 200 нМ (фиг. 8).

Пример 4. *In vitro* тесты на иммуногенность.

Олигонуклеотиды имеют потенциал для того, чтобы вызвать активацию паттерн-распознающих рецепторов (pattern recognition receptors (PRR)) врожденной иммунной системы позвоночных. Лучшее всего изученное семейство PRR-рецепторов представляет собой толл-подобные рецепторы (toll-like receptors (TLRs)). TLR представляют собой класс белков, которые играют ключевую роль в иммунной системе. Они являются одиночными, мембранными, некаталитическими рецепторами, которые, как правило, экспрессируются в макрофагах и дендритных клетках, которые распознают молекулы с консервативной структурой микробного происхождения. TLR, которые активируются различными типами нуклеиновых кислот, являются теми рецепторами, которые расположены на эндосомах: TLR 3 (распознает двухцепочечную РНК); TLR7/8 (распознает двухцепочечную и одноцепочечную РНК) и TLR9 (распознает CpG-ДНК).

После распознавания данных компонентов PRR-рецепторами срабатывает специфический "анти-микробный" иммунный ответ. Активация TLR приводит к активации энхансера гена ядерного фактора каппа-легкой цепи из активированных В-клеток (NF- κ B), интерферон-регуляторного фактора 3 (IRF-3) и активатора протеина 1 (AP-1). Активация AP-1, IRF-3 и NF- κ B приводит к продукции воспалительных цитокинов, интерферонов типа I и других медиаторов врожденного иммунного ответа. Данные процессы вызывают не только немедленные защитные реакции хозяина, такие как воспаление, но также первичные и совместные антигенспецифические адаптивные иммунные реакции.

In vitro воздействие первичных мононуклеарных клеток периферической крови человека (peripheral blood mononuclear cells (PBMC)) на mh-AON1 было использовано для оценки (системных) лекарство-специфических иммунных ответов и иммуноотоксичности. *In vitro* анализ с использованием PBMC является принятым методом доклинических испытаний с использованием продукции (воспалительных) цитокинов в качестве суррогатных маркеров для системных иммунных ответов. Анализ на PBMC позволяет прогнозировать переносимость, связанную с иммуногенностью и потенциалом аллергенности исследуемых соединений, а также может позволить оценить безопасный диапазон дозирования для данных соединений.

Для исследований mh-AON1 были использованы изолированные в лаборатории авторов изобретения PBMC, полученные из светлого слоя лейкоцитов от здоровых доноров банка крови. Продукцию основных провоспалительных цитокинов в надосадочной жидкости культуры клеток оценивали через 24 ч стимуляции с mh-AON1 при концентрациях в диапазоне от 10 нМ до 1 мкМ. Кроме того, использовали репортерную клеточную линию Ramos-Blue (Invivogen, В-клетки человека) с хромосомной интеграцией репортерной конструкции секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы, индуцируемой NF- κ B и/или AP-1, для оценки общей PPR-опосредованной иммунной активации mh-AON1 и AON73.24.5. Клетки Ramos-Blue экспрессируют соответствующий набор TLR, включая TLR3, -7/8 и -9. Активацию NF- κ B и/или AP-1 измеряли через 24 ч стимуляции с mh-AON1 или AON73.25.4 в диапазоне концентраций от 10 нМ до 1 мкМ. Кроме того, жизнеспособность PBMC и Ramos-Blue после обработки mh-AON1 анализировали путем измерения содержания флуоресцентного резорфина в надосадочной жидкости культуры клеток, чтобы оценить потенциальный цитотоксический эффект mh-AON1. Жизнеспособные клетки преобразуют нефлуоресцентный резазурин в флуоресцентный ресорурфин.

Результаты с PBMC человека.

Стимуляция PBMC человека положительными контролями LPS (TLR4-агонист) и R848 (TLR7/8-агонист) приводила к значительному повышению концентраций всех измеряемых цитокинов, за исключением IL-3, в надосадочной жидкости культуры клеток. Кроме того, стимуляция с CpG ДНК (TLR9-агонист) или Poly (I:C) (TLR3-агонист) индуцирует аналогичную картину цитокинов, хотя и в меньшей степени. Цветовая двухмерная карта, показывающая уровни значимости концентрации цитокинов в надосадочной жидкости культуры клеток после стимуляции mh-AON1 или значения положительных контролей по сравнению с обработанным физиологическим раствором PBMC человека, показана на фиг. 9. Важно отметить, что стимуляция PBMC человека mh-AON1 в диапазоне концентраций от 10 нМ до 1 мкМ не приводит к увеличению концентрации любого из измеренных цитокинов в надосадочной жидкости культуры клеток, за исключением IFN- α 2 при самой низкой концентрации mh-AON1 (фиг. 9a). Однако, поскольку увеличение концентрации IFN- α 2 в надосадочной жидкости после стимуляции mh-AON1 не зависит от дозы, это рассматривалось в качестве экспериментального отклонения или тех-

нической ошибки (фиг. 9b). И, наконец, не было никаких признаков цитотоксичности через 24 ч после обработки mh-AON1 (фиг. 9c). Напротив, имело место незначительное увеличение выживаемости, которое наблюдалось после обработки с R848 или 10 нМ и 100 нМ mh-AON1, что позволяет предположить повышенную выживаемость клеток, увеличение клеточного метаболизма или даже увеличение пролиферации/дифференцировки.

Результаты на клетках Ramos-Blue.

Результаты анализа иммуногенности, проводимого в человеческой клеточной линии Ramos-Blue, не показали активации NF-κB и/или AP-1 после 24 ч обработки с mh-AON1 или AON73.24.5 при концентрациях в диапазоне от 10 нМ до 1 мкМ (фиг. 10a). В противоположность этому, положительные контроли Poly(I:C) (1 мкг/мл), CpG (10 мкг/мл) и R848 (1 мкМ) действительно индуцировали активацию NF-κB и/или AP-1. LPS не оказывал никакого эффекта, так как TLR4 не экспрессируется на клетках Ramos-Blue. Кроме того, не было никаких признаков цитотоксичности через 24 ч после обработки с mh-AON1 (фиг. 10b), что подтверждают результаты, полученные на PBMC человека.

Следует понимать, что настоящее изобретение описано выше только в качестве примера, и могут быть сделаны модификации, оставаясь в пределах объема и сущности настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигорибонуклеотид, способный предотвращать или уменьшать включение экзона 73 в мРНК COL7A1 (альфа-1-цепь коллагена VII типа) человека в том случае, когда упомянутая мРНК образуется при сплайсинге из пре-мРНК в клетке человека, характеризующийся тем, что данный олигорибонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 35, 39, 40, 41, 42 и 43, причем олигорибонуклеотид имеет длину от 16 до 24 нуклеотидов.

2. Антисмысловой олигорибонуклеотид по п.1, характеризующийся тем, что он содержит не более одной последовательности CpG.

3. Антисмысловой олигорибонуклеотид по п.1, характеризующийся тем, что данный олигорибонуклеотид выбран из группы, состоящей из антисмысловых олигонуклеотидов (AON) SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 35, 39, 40, 41, 42 и 43.

4. Антисмысловой олигорибонуклеотид по любому из пп.1-3, в котором межнуклеозидные связи химически модифицированы.

5. Антисмысловой олигорибонуклеотид по п.4, в котором модификация межнуклеозидной связи представляет собой фосфоротиоатную связь.

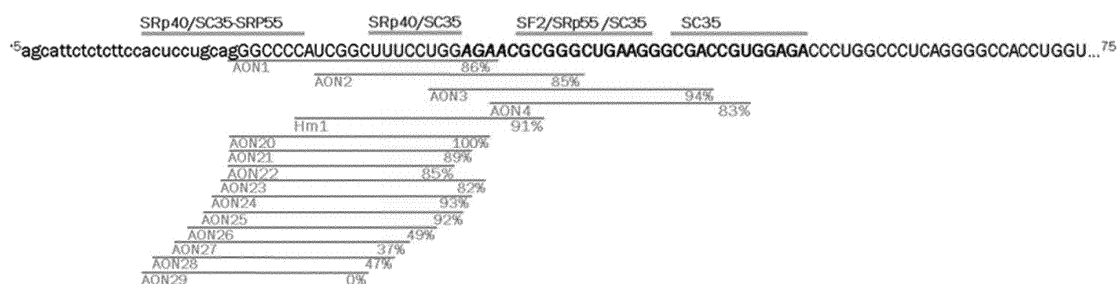
6. Антисмысловой олигорибонуклеотид по любому из пп.1-5, характеризующийся тем, что сахарные остатки олигорибонуклеотида представляют собой низший 2'-О-алкил.

7. Антисмысловой олигорибонуклеотид по п.6, в котором 2'-О-алкил представляет собой 2'-О-метилзамещенный сахарный остаток.

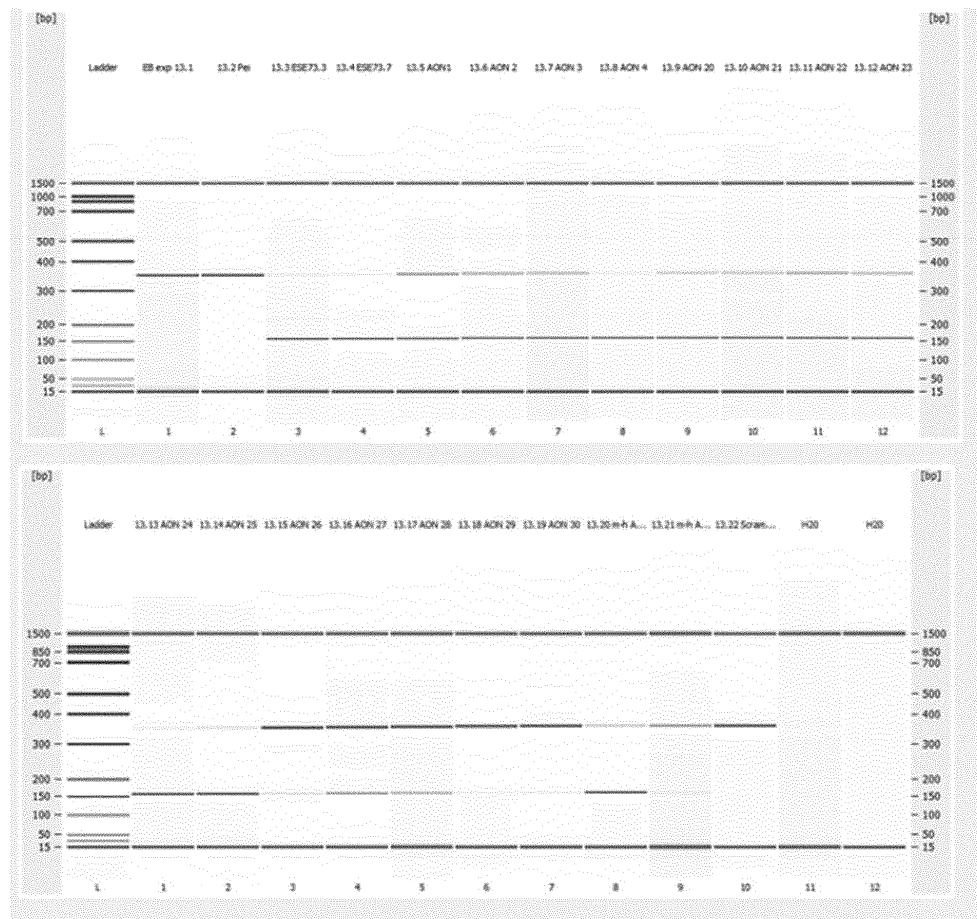
Экзон 73 (201b) человека

5'...agcattctctcttccactctctgagGGCCCATCGGCTTCTCGGAGAACGCGGGCTGAAGGGCGACCGTGG
AGACCCCTGGCCCTCAGGGGCCACCTGGTCTGGCCCTTGGGGAGAGGGGGCCCCCGGGCCTTCCGGCC
TTGCCGGGGAGCCTGGAAAGCCTGGTATTCGGGGCTCCAGGCAGGGCTGGGGGTGTGGGAGAGGC
AGGAAGGCCAGGAGAGAGGGgtgaggctggggctggccaggaga...3'

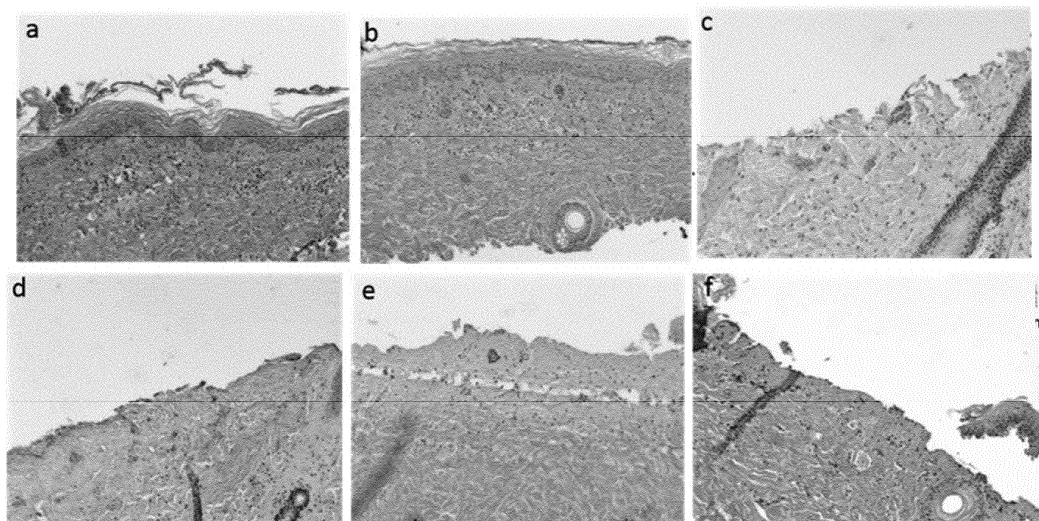
Фиг. 1



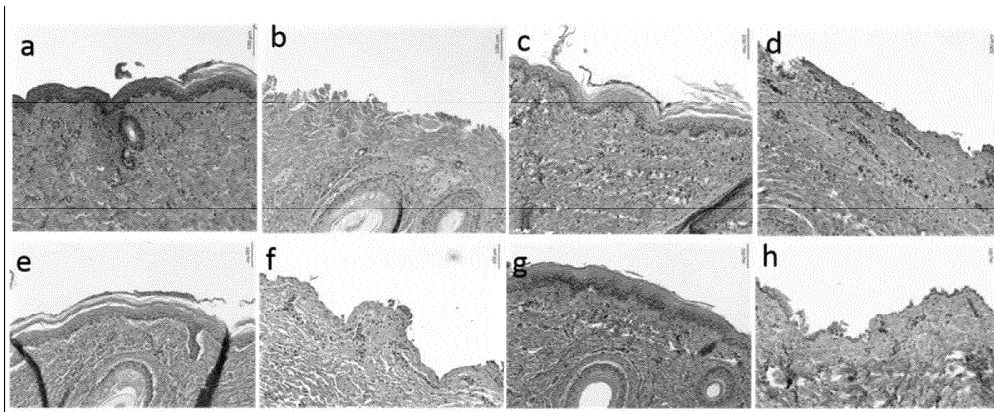
Фиг. 2



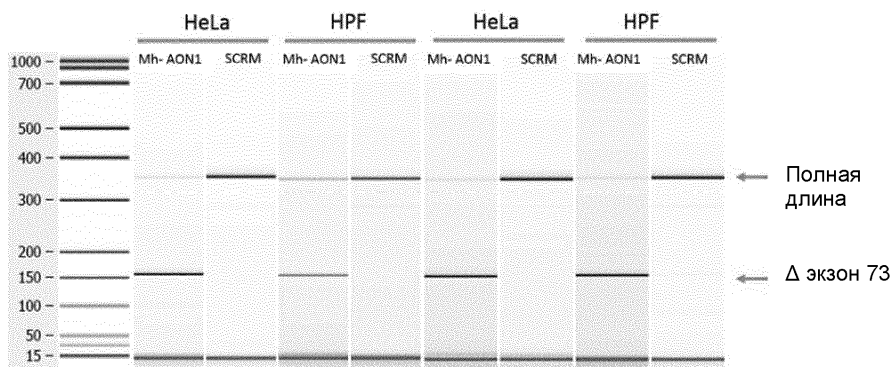
Фиг. 3



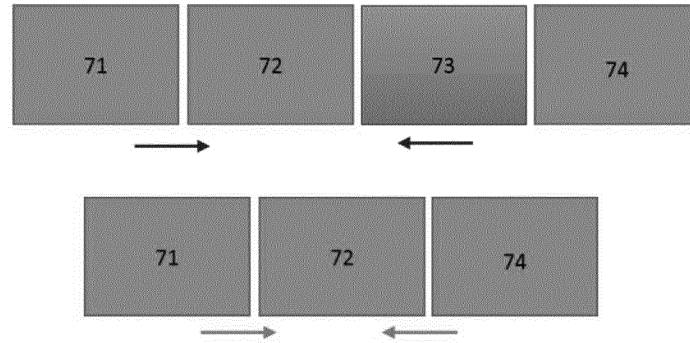
Фиг. 4



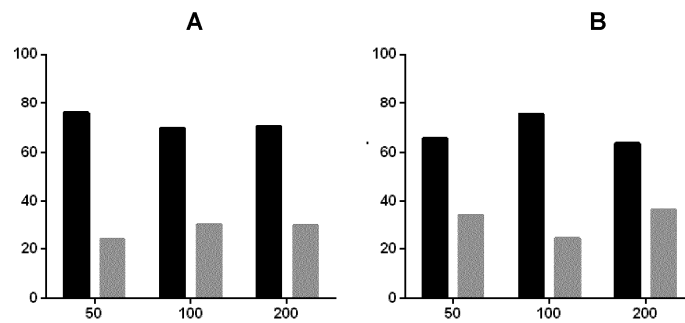
Фиг. 5



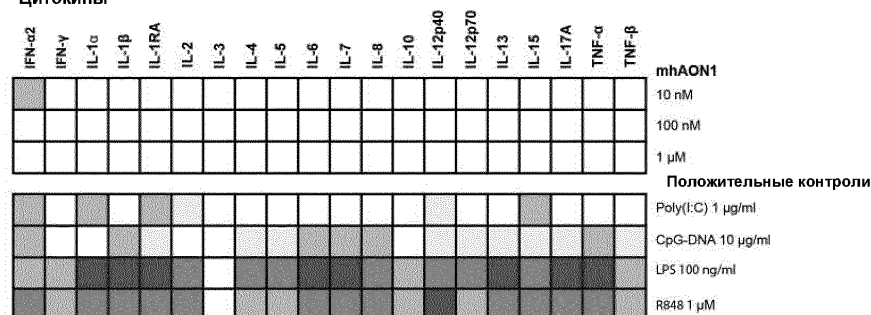
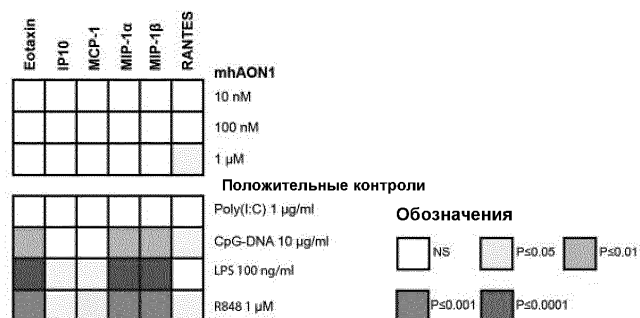
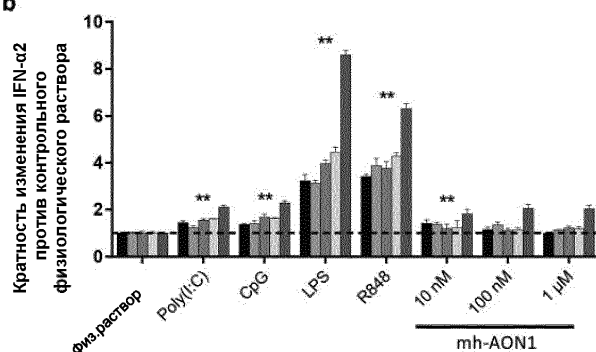
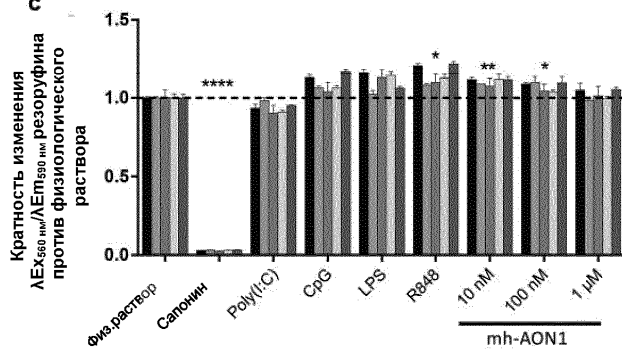
Фиг. 6



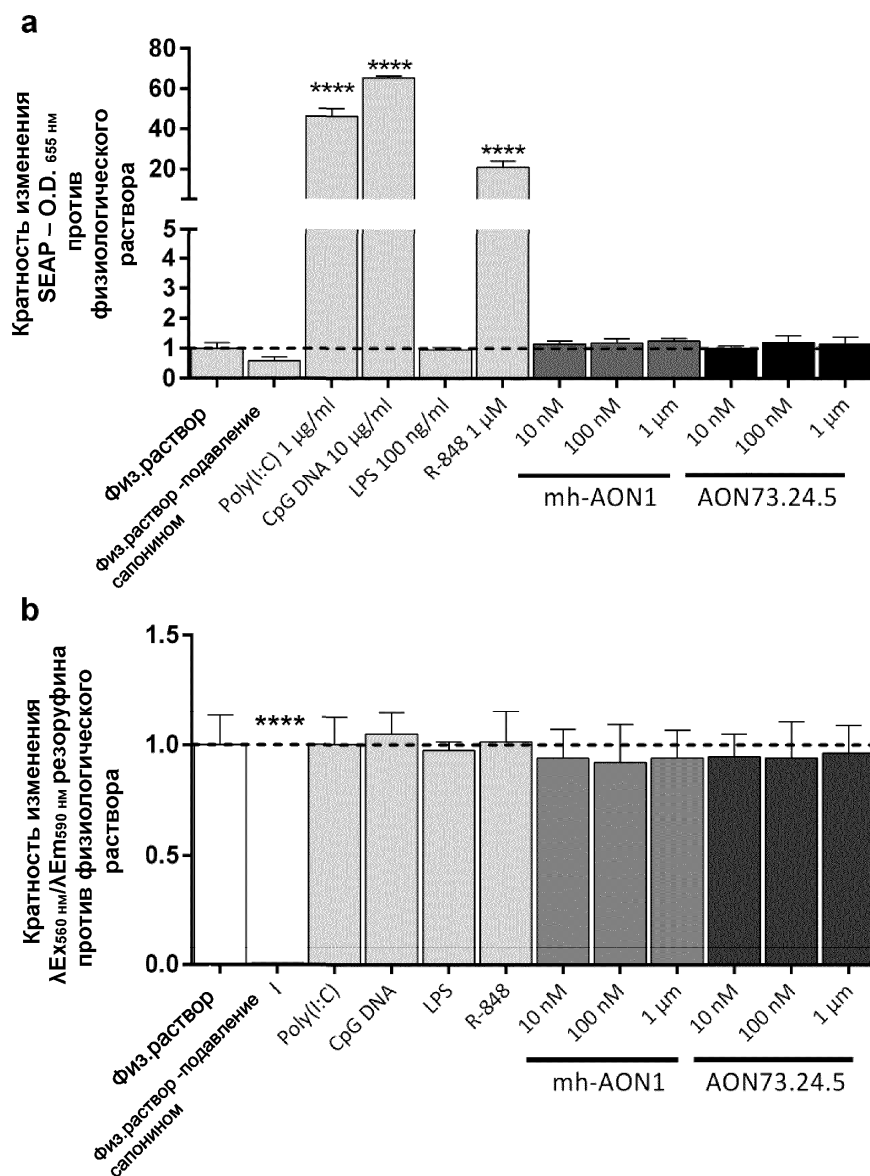
Фиг. 7



Фиг. 8

а Цитокины**Хемокины****б****в**

Фиг. 9



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2