

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036393**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.05

(21) Номер заявки
201792406

(22) Дата подачи заявки
2016.05.20

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(54) АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИСТРОФИЧЕСКОГО БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА

(31) **1508733.1; 1516505.3**

(32) **2015.05.21; 2015.09.17**

(33) **GB**

(43) **2018.04.30**

(86) **PCT/EP2016/061495**

(87) **WO 2016/185041 2016.11.24**

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

(72) Изобретатель:
**Хайсма Элизабет Марлен, Потман
Марко, Платенбург Герардус
Йоханнес (NL)**

(74) Представитель:
Строкова О.В. (RU)

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

AARTSMA-RUS ANNEMIEKE ET AL.:
"Antisense-mediated exon skipping: A versatile tool with therapeutic and research applications", RNA, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, vol. 13, no. 10, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 1609-1624, XP009144451, ISSN: 1355-8382

TURCZYNSKI SANDRINA ET AL.:
"Antisense-mediated exon skipping to reframe transcripts", 1 January 2012 (2012-01-01), EXON SKIPPING: METHODS AND PROTOCOLS; [METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY; ISSN 1940-6029; VOL. 867], HUMANA PR, NEW YORK [U.A.], PAGE(S) 221-238, XP008177335, ISBN: 978-1-61779-766-8 [retrieved on 2012-02-24]

(57) Антисмысловой олигонуклеотид, способный предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, и способы предотвращения или уменьшения включения экзона 80 в мРНК COL7A1 человека.

B1

036393

036393 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к олигонуклеотидам, подходящим для применения в лечении заболеваний у человека. В частности, изобретение относится к антисмысловым олигонуклеотидам (AON), подходящим для лечения дистрофического буллезного эпидермолиза.

Краткое описание заболевания

Буллезный эпидермолиз (EB) представляет собой группу наследственных заболеваний кожи, которые характеризуются хронической ранимостью кожи и образованием пузырей на коже и слизистых оболочках. В зависимости от подтипа спектр симптомов EB очень широк, от минимальной ранимости кожи до очень тяжелых симптомов с общими осложнениями. Во всем мире поражено около 350000 человек. В некоторых формах EB также могут затрагиваться ногти, волосы и зубы. Основные типы EB включают простой EB (EBS), пограничный EB (JEB), дистрофический EB (DEB) и синдром Киндлера (KS) (Fine et al., 2014).

Дистрофический EB (DEB) поражает около 25% пациентов с EB, может наследоваться доминантно или рецессивно и включает дефекты коллагена VII типа (COL7A1, OMIM 120120). COL7A1 кодирует цепь альфа-1 коллагена VII. Коллаген VII функционирует в качестве якорной фибриллы, связывающей верхний слой дермы с плотной пластинкой (частью базальной мембраны). После посттрансляционной модификации три идентичные цепи альфа-1 закручиваются вместе с их коллагеновым тройным спиральным доменом. Затем образуются антипараллельные димеры, которые соединяются между собой "бок о бок" с образованием якорных фибрилл. Коллаген VII синтезируется в коже кератиноцитами и дермальными фибробластами. Тяжесть заболевания DEB в целом коррелирует с уровнем экспрессии коллагена VII типа в зоне базальной мембраны.

Характеристики доминантного дистрофического EB (DDEB) включают пузыри, которые могут быть локализованы в руках, стопах, локтях и коленях или являются генерализованными. Общие признаки включают рубцевание, милию, вовлечение слизистой оболочки и аномальные или отсутствующие ногти. Рецессивный дистрофический EB (RDEB, приблизительно у 50% пациентов с DEB) обычно является более генерализованным и тяжелым, чем DDEB. Дополнительно к симптомам DDEB другие распространенные проявления RDEB включают недостаточность питания, анемию, остеопороз, стриктуры пищевода, замедление роста, сращение или слияние пальцев рук и ног, вызывающее деформацию мышц (псевдосиндактилия), развитие миогенных контрактур, мальформацию зубов, микростому и рубцевание глаза. Риск плоскоклеточной карциномы значительно возрастает в этой группе, а также смерти от метастатической плоскоклеточной карциномы.

Известно более 400 различных мутаций в гене COL7A1. Одним из наиболее распространенных затронутых экзонов (7% RDEB) является экзон 80 с более чем 3 различными мутациями, миссенс мутациями или мутациями, приводящими к появлению преждевременных стоп-кодонов (PTC). Так как большинство экзонов гена COL7A1 находятся в рамке считывания, пропуск экзона представляет потенциально возможную стратегию для избавления от экзонов с мутациями PTC, при этом сохраняя функцию белка (Goto et dr. 2006).

В настоящее время лечение для DEB отсутствует и проводится только симптоматическая терапия. Тяжелые формы RDEB требуют высоких расходов бюджета на здравоохранение: средние расходы на перевязочные материалы и медикаменты составляют около € 200000 на одного пациента в год. Предполагаемая продолжительность жизни для пациентов с DEB составляет около 30-40 лет.

В WO 2013/053819 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) раскрыты два 24-мерных антисмысловых олигонуклеотида, содержащих 22 нуклеотида, которые комплементарны экзону 80, и 2 нуклеотида, которые комплементарны вышележащему интрону, что вызывает пропуск всего экзона в мРНК (см. также фиг. 1)

ESE80.3 GGCC UCUU GGAC CCUG CAGA CCCU (SEQ ID NO: 2)

ESE80.3-Q2170X GGCC UCUU GGAC CUA CAGA CCCU (SEQ ID NO: 3)

Экзон-80-дефицитная мРНК с наибольшей вероятностью транслируется в функциональный полипептид, который хотя и является более коротким, чем белок дикого типа, ведет себя подобно коллагену VII дикого типа. Авторы настоящего изобретения провели тестирование олигонуклеотидов, раскрытых в WO 2013/053819, в человеческих первичных фибробластах (HPF) и клетках HeLa, чтобы оценить их эффективность пропуска. Оказалось, что оба AON в условиях тестирования проявляют эффективность пропуска, составляющую менее 50%, при этом ESE80.3 демонстрирует немного лучшие результаты, чем ESE80.3-Q2170X. Несмотря на то что эти олигонуклеотиды, вызывающие пропуск экзона, обеспечивают перспективный первый шаг в борьбе с этим страшным заболеванием, по-прежнему существует очевидная необходимость в дополнительных альтернативных олигонуклеотидах для повышения эффективности пропуска экзона 80.

Краткое описание изобретения

В изобретении предлагаются различные AON, которые способны предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из пре-мРНК в клетке млекопитающего (например, в человеческой клетке in vivo). В первом аспекте олиго-

нуклеотид (а) содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна части экзона 80, и (b) имеет длину менее чем 24 нуклеотида. Таким образом, эти олигонуклеотиды являются выгодным образом более короткими, чем олигонуклеотиды, раскрытые в предшествующем уровне техники.

Во втором аспекте олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна 3' части экзона 80 и 5' части нижележащего интрона. AON, расположенные на границе между экзоном 80 и его нижележащим интроном, ранее не были описаны, но, как показано в настоящем документе, являются эффективными в отношении содействия пропуску экзона. Например, эти AON могут включать 5'-UCACCACU-3', 5'-ACCACUGG-3' и/или 5'-ACUCACCA-3'.

В третьем аспекте олигонуклеотид не гибридизуется с интроном, который расположен выше экзона 80. Например, олигонуклеотид может быть комплементарен экзону 80 (его части), но не его вышележащему интрону, т.е. гибридизация будет происходить только в пределах нижележащего интрона. Аналогичным образом, олигонуклеотид может содержать область комплементарности с экзоном 80 (его частью), но комплементарность не распространяется на вышележащий интрон (и в некоторых вариантах осуществления не распространяется даже на любой интрон, который фланкирует экзон 80). Таким образом, при выравнивании с экзоном 80 в соответствии со спариванием оснований (например, как показано на фиг. 1) олигонуклеотид не будет включать какие-либо пары оснований с вышележащим интроном (и в некоторых вариантах осуществления ни с вышележащим, ни с нижележащим интроном). Напротив, AON предшествующего уровня техники перекрывают экзон 80 и его вышележащий интрон (смотри олигонуклеотиды "ESE" на фиг. 1).

В четвертом аспекте олигонуклеотид содержит область комплементарности с экзоном 80, которая имеет длину не более 20 нуклеотидов (например, не более 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов; такую как не более 11-17 нуклеотидов). Напротив, известные в данной области AON включают 22-мерную последовательность в пределах экзона. Олигонуклеотиды с 11-14 нуклеотидами, комплементарными экзону 80, как показано здесь, являются высокоэффективными.

Таким образом, антисмысловой олигонуклеотид согласно изобретению может содержать: (а) область комплементарности с экзоном 80, которая имеет длину не более 20 нуклеотидов, например длину 11-17 нуклеотидов, и (b) область, которая комплементарна транскрипту РНК в интроне, расположенном выше или ниже экзона 80 (предпочтительно, в нижележащем интроне).

AON согласно изобретению выгодным образом имеют длину не более 24 нуклеотидов, например длину 20-23 нуклеотида. AON согласно изобретению предпочтительно представляют собой AON РНК. По сравнению с природными нуклеиновыми кислотами они могут иметь химически модифицированные межнуклеозидные связи (например, фосфоротиоатные связи) и могут содержать модифицированные сахара (например, с 2'-О-алкильными замещениями).

AON согласно изобретению могут быть составлены в фармацевтические композиции для применения в терапии человека и могут быть использованы в способах предотвращения или уменьшения включения экзона 80 в мРНК COL7A1 млекопитающего, предпочтительно человека.

Описание фигур

На фиг. 1 показан фрагмент (SEQ ID NO: 1) гена COL7A1 человека, включающий экзон 80 (верхний регистр жирным шрифтом; SEQ ID NO: 18) с его 5' и 3' границами фланкирующих интронов (нижний регистр; SEQ ID NO: 19 вышележащий и SEQ ID NO: 20 нижележащий), и ниже показаны различные тестируемые в настоящем документе антисмысловые олигонуклеотиды (AON) (представлены в ориентации 3'-5'). ESE80.3 и ESE80.3_Q2170X описаны в WO 2013/053819; другие AON представляют собой антисмысловые олигонуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением. Подчеркнутые нуклеотиды в экзоне 80 транскрипта РНК представляют наиболее часто встречающиеся мутации экзона 80, обнаруживаемые у пациентов с ЕВ. Нижний и верхний регистр используется только для облегчения распознавания последовательностей и границ экзона (верхний регистр) и интрона (нижний регистр), а также для облегчения выравнивания олигонуклеотидов с их комплементарной последовательностью-мишенью. SEQ ID NO: 22, 23 и 24 представляют собой последовательности, которые находятся в пределах различных AON согласно настоящему изобретению или частично перекрываются с ними;

на фиг. 2 - результаты анализа методом "лаборатория-на-чипе" (lab-on-a-chip) пропуска экзона на первичных фибробластах человека (HPF), обработанных AON, описанными в настоящем документе. Полосы полной длины и полосы с пропуском экзона 80 указаны стрелками. Линии 1-16 слева направо представляют собой: пустой контроль; контроль maxPei; ESE80.3; ESE80.3_Q2170X; AON80.1; AON80.2; AON80.3; AON80.4; AON80.5; AON80.6; AON80.7; AON80.8; AON80.9; AON80.10; AON80.11; и AON80.12. Верхняя стрелка указывает на продукт мРНК полной длины, нижняя стрелка указывает на продукт мРНК с исключенным экзоном 80;

на фиг. 3 - результаты анализа методом "лаборатория-на-чипе" пропуска экзона на клетках HeLa, обработанных AON. Расположение полосы полной длины и полосы с пропуском экзона 80 такое же, как на фиг. 2, как и линий 1-16;

на фиг. 4 - результаты анализа методом "лаборатория-на-чипе" AON, оптимизированных из AON80.5 и тестированных на HPF. AON80.5.1, AON80.5.2 и AON80.13 имеют более высокую эффективность сплайсинга, чем AON80.5.3, AON80.5.4 и AON80.5.5. Для определения конкретной последователь-

ности всего образовавшегося продукта выполняли анализ последовательности. Дополнительные продукты, видимые после анализа на биоанализаторе (верхние две стрелки), представляют собой такие продукты, которые имеют интрон 82, включенный в мРНК (обнаружено с помощью анализа секвенирования). Присутствие интрона 82 приводит к присутствию стоп-кодона, что, по-видимому, приведет к деградации белка. FL = полная длина;

на фиг. 5 - результаты анализа методом "лаборатория-на-чипе" пропуска экзона на HPF, обработанных оптимизированными AON, по сравнению с AON80.5. Верхняя стрелка указывает на мРНК полной длины, и нижняя стрелка указывает на мРНК, где экзон 80 является исключенным. Линии 1-7 представляют собой: AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.7, AON80.5.8 и AON80.13.

на фиг. 6 - иммуногенность (активация NF-κB и/или AP-1) в ответ на указанные обработки, включая три дозы для каждого из AON80.5 и AON80.5.1. По оси Y показана активность SEAP (OD_{655nm} в условных единицах), указывающая на кратное изменение относительно солевого раствора. **** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$;

на фиг. 7 - жизнеспособность клеток RAW-blue макрофагов после указанных обработок, включая три дозы каждого из AON80.5 и AON80.5.1. По оси Y показаны уровни резорфуина ($\lambda_{Ex560nm}/\lambda_{Em590nm}$), указывающие на кратное изменение относительно солевого раствора. **** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

Подробное описание изобретения

Удивительным образом были получены антисмысловые олигонуклеотиды (AON), обладающие сходными или улучшенными характеристиками пропуска экзона в анализах, описанных здесь, по сравнению с антисмысловыми олигонуклеотидами, раскрытыми в предшествующем уровне техники. Эти AON согласно настоящему изобретению можно применять в качестве активных лекарственных субстанций в терапиях для лечения заболеваний человека, в частности, буллезного эпидермолиза (ЕВ), а именно ЕВ, связанного с мутациями в экзоне 80 COL7A1. Эти AON можно применять в качестве единственной активной лекарственной субстанции, в комбинации с другими AON, нацеленными на экзон 80 COL7A1 (включая описанные в настоящем документе) и/или в комбинации с другими активными лекарственными субстанциями для лечения заболевания ЕВ. Такие другие лекарственные субстанции могут представлять собой другие AON, например такие, которые нацелены на мутации в других экзонах (включая экзоны 73, 74 или 3), или не относящиеся к AON активные лекарственные субстанции. Комбинированная терапия может быть в форме единой композиции или множества композиций, вводимых одновременно или последовательно.

Настоящее изобретение относится к AON, способному предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из пре-мРНК в клетке, при этом указанный AON содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части экзона 80 и которая не комплементарна интрону, расположенному выше экзона 80 гена COL7A1; или которая комплементарна по меньшей мере части экзона 80 и имеет длину меньше чем 24 нуклеотида. В предпочтительном варианте осуществления AON в соответствии с изобретением содержит область комплементарности с экзонам 80, при этом указанная область комплементарности имеет длину не более 20 нуклеотидов, предпочтительно 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 нуклеотидов. Более предпочтительно указанный AON содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна 3' части экзона 80 и 5' части нижележащего интрона. Еще более предпочтительно AON содержит нуклеотидную последовательность 5'-UCACCACU-3', 5'-ACCACUGG-3' или 5'-ACUCACCA-3'. Более предпочтительно AON в соответствии с изобретением содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 7, 8, 25, 26, 28, 31 и 32.

В другом варианте осуществления изобретение относится к AON в соответствии с изобретением, который имеет длину менее чем 24 нуклеотида, предпочтительно содержит 20, 21, 22 или 23 нуклеотида. Предпочтительно указанный AON содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или 5, более предпочтительно указанный AON содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или AON содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

AON в соответствии с изобретением - помимо их эффективности - обладают определенными преимуществами по сравнению с описанными в предшествующем уровне техники с точки зрения технологичности, аналитических методов и/или стоимости продуктов, в том смысле, что AON согласно изобретению являются предпочтительно более короткими по сравнению с описанными в известном уровне техники.

Предпочтительные AON согласно изобретению имеют длину менее чем 24, например 20, 21, 22 или 23 нуклеотида. В случаях, когда AON комплементарен только экзону 80 и не комплементарен ни одному из фланкирующих его интронов (как показано здесь), он может иметь любую длину, вплоть до длины всего экзона, составляющей 36 нуклеотидов (например, AON80.13).

Укороченная мРНК, лишенная всего экзона 80 в результате обработки с использованием AON согласно изобретению, будет транслироваться в более короткий, но функциональный белок COL VII. Однако в некоторых случаях использование определенных AON согласно настоящему изобретению также приведет к образованию более длинных транскриптов (например, последовательностей из интрона 82),

что может привести к экспрессии (нефункционального и легко деградируемого) белка наряду с более коротким (функциональным) белком.

Удивительным образом были идентифицированы AON, которые способны предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из пре-мРНК в клетке млекопитающего, при этом последовательность указанного олигонуклеотида комплементарна 3' части экзона 80 и 5' части нижележащего интрона (например, (частично) комплементарна 24-мерной 5'-CCTGGCCAGTGgtgagtagccaa-3' (SEQ ID NO: 21), которая содержит 12 нуклеотидов экзона и 12 нуклеотидов интрона). Ранее не были описаны AON, которые расположены на границе между экзоном 80 и его нижележащим интроном. Такие AON могут содержать, например: (i) последовательность 5'-UCACCACU-3' (SEQ ID NO: 22), включая, таким образом, по меньшей мере 4 нуклеотида с каждой стороны границы экзон/интрон; (ii) последовательность 5'-ACCACUGG-3' (SEQ ID NO: 23), включая, таким образом, по меньшей мере 2 нуклеотида со стороны границы с интроном и по меньшей мере 6 нуклеотидов со стороны экзона; и/или (iii) последовательность 5'-ACUCACCA-3' (SEQ ID NO: 24), включая, таким образом, по меньшей мере 6 нуклеотидов со стороны границы с интроном и по меньшей мере 2 нуклеотида со стороны экзона. Примерами таких AON являются AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 и AON80.5.8 (см. ниже). AON этого типа предпочтительно включает по меньшей мере 2 нуклеотида с каждой стороны границы (например, по меньшей мере 4 или 6 нуклеотидов с каждой стороны), но не обязательно должен содержать одинаковое количество нуклеотидов с каждой стороны (например, он может иметь нечетное число нуклеотидов, например, серии AON80.5).

Иными словами, впервые были описаны AON, которые комплементарны 3' части экзона 80, включая его 3' участок сплайсинга, и 5' части нижележащего интрона, и способны предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из пре-мРНК в клетке млекопитающего. Эти AON, несмотря на то, что являются полезными как таковые, считаются хорошими кандидатами для комбинирования с другими AON, способными предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из пре-мРНК в клетке млекопитающего, особенно с такими AON, которые комплементарны другой части экзона 80, такой как внутренняя часть экзона 80, или 5' части экзона 80 и/или 5' границе экзона 80 и его вышележащего интрона. Такие комбинации считаются выгодными, при необходимости, для повышения эффективности пропуска экзона 80.

Однако в других вариантах осуществления AON согласно изобретению может гибридизоваться только с экзоном 80, таким образом, не включая область, которая гибридизуется с интронами, расположенными выше и ниже экзона 80. AON80.3 является примером такого AON, как и AON80.13 (см. ниже).

В других вариантах осуществления AON может гибридизоваться с экзоном 80, но не с его вышележащим интроном. Примерами таких AON являются AON80.3, AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7, AON80.5.8 и AON80.13 (при этом AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 и AON80.5.8 являются примерами AON, которые гибридизуются также с интроном, расположенным непосредственно ниже экзона 80).

В других вариантах осуществления AON содержит область комплементарности с экзоном 80, которая имеет длину не более 20 нуклеотидов (тогда как экзон-комплементарные области AON предшествующего уровня техники имеют длину 22 нуклеотида). Каждый из AON80.1, AON80.2, AON80.3, AON80.4 и AON80.5 (см. табл. 1 ниже) является примером таких AON, имеющих удлинения, состоящие из 10, 17, 20, 12 и 12 экзон-комплементарных нуклеотидов, соответственно. Серии AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 и AON80.5.8 являются дополнительными примерами (с перекрытиями экзонов в 9-14 нуклеотидов). Таким образом, область комплементарности с экзоном 80 может иметь длину в диапазоне от 8 до 20 (например, от 10 до 20 нуклеотидов), такую как от 11 до 17 нуклеотидов, такую как 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 нуклеотидов.

Для таких AON, дополнительно к экзон-комплементарной области, которая имеет длину ≤ 20 нуклеотидов, может существовать область, которая комплементарна интрону, расположенному выше или ниже экзона 80. Таким образом, такие AON включают единичное, по существу, непрерывное удлинение комплементарности с зарождающимся транскриптом РНК, который расположен на границе между экзоном 80 и одним из его соседних интронов.

Специфические предпочтительные AON согласно изобретению представляют собой AON80.1, AON80.2, AON80.3, AON80.4 и AON80.5, описанные в табл. 1 и 2 ниже. Другие предпочтительные AON согласно изобретению представляют собой AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.4, AON80.5.7, AON80.5.8 и AON80.13, описанные в табл. 1 и 2. Наиболее предпочтительные AON согласно настоящему изобретению представляют собой AON80.2 (SEQ ID NO: 5), AON80.5 (SEQ ID NO: 8), AON80.5.1 (SEQ ID NO: 25), AON80.5.2 (SEQ ID NO: 26), AON80.5.7 (SEQ ID NO: 31), AON80.5.8 (SEQ ID NO: 32) и AON80.13 (SEQ ID NO: 30). В другом предпочтительном варианте осуществления все фрагменты рибозы являются 2'-О-метилированными, и, по существу, все межнуклеозидные связи представляют собой фосфоротиоаты.

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" или "пропуск экзона" должны истолковываться как исключение экзона 80 (SEQ ID NO: 18 или ее аллельные формы) из мРНК COL7A1 человека (см. фиг. 1). Термин "пропуск экзона" в настоящем документе определяется как индукция внутри клетки зрелой мРНК, которая не содержит конкретный экзон, который будет присутствовать в зрелой мРНК без пропуска экзона. Пропуск экзона достигается путем обеспечения клетки, экспрессирующей пре-мРНК указанной зрелой мРНК, молекулой, способной препятствовать последовательностям, таким как, например, последовательность донора сплайсинга или акцептора сплайсинга, требуемым для обеспечения биохимического процесса сплайсинга, или молекулой, способной препятствовать сигналу включения экзона, требуемому для узнавания удлинения нуклеотидов в качестве экзона, подлежащего включению в зрелую мРНК; такие молекулы в данном описании называются как молекулы, вызывающие пропуск экзона.

Термин "пре-мРНК" относится непротранскрибированному или частично протранскрибированному предшественнику мРНК, который синтезируется на матрице ДНК в клетке в ходе транскрипции.

Термин "антисмысловой олигонуклеотид" относится к нуклеотидной последовательности, которая комплементарна нуклеотидной последовательности-мишени в молекуле пре-мРНК, гРНК (гетерогенная ядерная РНК) или молекуле мРНК, таким образом, что она способна к отжигу с ее соответствующей последовательностью-мишенью.

Используемый здесь термин "комплементарный" включает "полностью комплементарный" и "по существу комплементарный", что означает, что степень комплементарности между олигонуклеотидом и его соответствующей последовательностью-мишенью будет, как правило, составлять более 80%, предпочтительно более 85%, еще больше предпочтительно более 90%, наиболее предпочтительно более 95%. Например, для олигонуклеотида длиной 20 нуклеотидов с одним мисматчем между его последовательностью и его последовательностью-мишенью степень комплементарности составляет 95%.

Степень комплементарности антисмысловой последовательности предпочтительно такова, что молекула, содержащая антисмысловую последовательность, может быть подвергнута отжигу с нуклеотидной последовательностью-мишенью в молекуле РНК в физиологических условиях, тем самым способствуя пропуску экзона. Специалисту в данной области известно, что определенные мисматчи являются допустимыми в большей степени, чем другие, поскольку определенные мисматчи оказывают меньшее, чем другие, влияние на прочность связывания между АОН и последовательностью-мишенью, что подтверждается температурой плавления или T_m . Определенные некомплементарные пары оснований могут образовывать так называемые "колебания", которые нарушают общее связывание в меньшей степени, чем истинные мисматчи. Длина АОН также влияет на прочность связывания, при этом более длинные АОН, как правило, имеют более высокие температуры плавления, чем более короткие АОН, и содержание G/C в олигонуклеотиде также является фактором, определяющим прочность связывания, при этом чем выше содержание G/C, тем выше температура плавления для любой заданной длины. Определенные химические модификации нуклеобаз или сахаро-фосфатного остова, как предусмотрено настоящим изобретением, также могут влиять на прочность связывания, так что степень комплементарности является лишь одним из факторов, который следует учитывать при дизайне олигонуклеотида в соответствии с изобретением.

Присутствие CpG или множества (двух или более) CpG в олигонуклеотиде обычно связано с повышенной иммуногенностью указанного олигонуклеотида (Dorn and Kippenberger, 2008). Эта повышенная иммуногенность нежелательна, так как может вызывать повреждение ткани, подлежащей лечению, т.е. кожи (дермы и/или эпидермиса). Таким образом, предпочтительно, чтобы АОН согласно настоящему изобретению включал не более 1 или 2 динуклеотидных последовательностей CpG (предпочтительно только одну).

Изобретение позволяет осуществить дизайн олигонуклеотида 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 ; рассчитанной с помощью программы для расчета свойств олигонуклеотидов (www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html) для одноцепочечной РНК с использованием основных моделей T_m и ближайших соседей), и/или свободной энергией комплекса АОН-экзон-мишень (с использованием структуры РНК версии 4.5). Если T_m является слишком высокой, ожидается, что олигонуклеотид будет обладать более низкой специфичностью. Приемлемые величины T_m и свободной энергии зависят от последовательности олигонуклеотида, химического состава остова (фосфодиэфир, фосфотриоат, фосфоамидат, пептидо-нуклеиновая кислота и т.д.), природы сахарного фрагмента (рибоза, дезоксирибоза, замещенная рибоза, внутримолекулярный мостик) и химической модификации нуклеобаз. Поэтому диапазон T_m может сильно варьироваться.

Процент или эффективность пропуска экзона можно вычислить путем определения концентрации амплифицированной полосы дикого типа, деленной на концентрацию амплифицированной укороченной полосы (не содержащей экзона 80) после заданного количества циклов PCR, умноженной на 100%, для любого заданного набора праймеров, при условии, что количество циклов таково, что амплификация еще

находится в экспоненциальной фазе. Количественное определение может быть выполнено с использованием биоанализатора Agilent 2100 Bioanalyzer в комбинации с набором DNA1000.

Предпочтительно, AON в соответствии изобретением, который содержит последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, является таким, что комплементарная часть по меньшей мере на около 80%, более предпочтительно по меньшей мере на около 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на около 95%, наиболее предпочтительно на около 100% комплементарна последовательности-мишени. Поэтому абсолютно необязательно, чтобы все основания в области комплементарности были способны спариваться с основаниями в противоположной цепи. Например, при дизайне олигонуклеотида может возникнуть необходимость включения, например, остатка, который не спаривается с основанием на комплементарной цепи. Мисматчи могут в некоторой степени допускаться, если под воздействием условий в клетке удлинение нуклеотидов в достаточной мере способно гибридизоваться с комплементарной частью. В этом контексте "в достаточной мере" означает, что AON в соответствии с изобретением способен индуцировать пропуск экзона 80. Пропуск экзона-мишени может быть легко оценен с помощью PCR/Bioanalyzer, необязательно ddPCR. Комплементарные области предпочтительно сконструированы таким образом, что при объединении они являются специфичными для экзона в пре-мРНК. Такая специфичность может быть создана с различными длинами комплементарных областей, поскольку это зависит от фактических последовательностей в других молекулах (пре-)мРНК в системе. Риск того, что олигонуклеотид также сможет гибридизоваться с одной или несколькими другими молекулами пре-мРНК, снижается с увеличением размера олигонуклеотида, при этом длина не должна быть слишком большой, что может создать проблемы, связанные с технологичностью, очисткой и/или аналитической обработкой данных.

Очевидно, что в настоящем изобретении могут быть использованы олигонуклеотиды, содержащие мисматчи в области комплементарности, но сохраняющие способность гибридизации и/или связывания с целевой областью (областями) в пре-мРНК. Однако предпочтительно, чтобы, по меньшей мере, комплементарные части не содержали таких мисматчей, поскольку они обычно обладают более высокой эффективностью и более высокой специфичностью, чем олигонуклеотиды, имеющие такие мисматчи в одной или нескольких комплементарных областях. Считается, что более высокая сила гибридизации (т.е. увеличение числа взаимодействий с противоположной цепью) благоприятна для повышения эффективности процесса нарушения механизма сплайсинга системы. Предпочтительно, чтобы комплементарность составляла от 90 до 100%. В общем случае допускается 1 или 2 мисматча в олигонуклеотиде, состоящем из 20 нуклеотидов.

Молекула, вызывающая пропуск экзона, согласно изобретению предпочтительно представляет собой (антисмысловый) олигонуклеотид, который комплементарен последовательности экзона 80 (SEQ ID NO: 18) в пределах SEQ ID NO: 1.

Предпочтительно длина комплементарной части олигонуклеотида является такой же, как длина олигонуклеотида, что означает, что не существует 5' или 3' концов олигонуклеотида, которые не образуют пару оснований с РНК-мишенью. Таким образом, предпочтительная длина олигонуклеотида согласно изобретению составляет 23 нуклеотида или меньше, например 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23.

Особенно хорошие результаты были получены с AON, имеющими длину 20, 21 или 23 нуклеотидов.

В случае, когда AON является комплементарным только экзону 80 и не является комплементарным ни одному из его фланкирующих интронов, он может иметь любую длину, например, 12-36 нуклеотидов, например, 20-мерные (например, AON80.3) или 36-мерные (например, AON80.13).

Молекула, вызывающая пропуск экзона, в соответствии с изобретением может содержать один или более остатков ДНК (соответственно, остаток "u" РНК будет представлять собой остаток "t" в качестве контрпартнера ДНК), или один или более остатков РНК, и/или один или более нуклеотидных аналогов или эквивалентов, как будет описано более подробно ниже. Последовательности SEQ ID NO: 4-15 и 25-32 являются последовательностями РНК, но изобретение также охватывает каждую из этих последовательностей в форме ДНК, а также химерные AON ДНК/РНК этих последовательностей.

Предпочтительно, чтобы молекула, вызывающая пропуск экзона, согласно изобретению содержала один или более остатков, которые модифицированы для повышения устойчивости к нуклеазе, и/или для увеличения сродства антисмыслового олигонуклеотида к последовательности-мишени. Поэтому в предпочтительном варианте осуществления последовательность антисмыслового нуклеотида содержит по меньшей мере один нуклеотидный аналог или эквивалент, при этом нуклеотидный аналог или эквивалент определяется как остаток, имеющий модифицированное основание и/или модифицированный остов, и/или неприродную межнуклеозидную связь, или комбинацию этих модификаций.

В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидный аналог или эквивалент содержит модифицированный остов. Примерами таких остовов являются морфолиновые остовы, карбаматные остовы, силоксановые остовы, сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы, формацетилловые и тиоформацетилловые остовы, метилен формацетилловые остовы, рибоацетилловые остовы, алкен-содержащие остовы, сульфаматные, сульфонатные и сульфонамидные остовы, метилениминовые и метиленигидрази-

новые остовы, и амидные остовы. Фосфородиамидатные морфолиновые олигомеры представляют собой олигонуклеотиды с модифицированным остовом, ранее исследованные в качестве антисмысловых агентов. Морфолиновые олигонуклеотиды имеют незаряженный остов, в котором сахар дезоксирибоза в ДНК заменена на шестичленное кольцо, и фосфодиэфирная связь заменена на фосфородиамидатную связь. Морфолиновые олигонуклеотиды устойчивы к ферментативному разложению и, как оказалось, функционируют как антисмысловые агенты скорее путем подавления трансляции или нарушения сплайсинга пре-мРНК, а не активации RNase H. Морфолиновые олигонуклеотиды успешно доставляли в клетки культуры тканей с помощью способов, физически разрушающих клеточную мембрану, и в одном исследовании, сравнивающем некоторых из этих способов, было обнаружено, что введение при соскабливании является наиболее эффективным способом доставки; однако, так как морфолиновый остов не заряжен, катионные липиды не являются эффективными медиаторами поглощения клетками морфолиновых олигонуклеотидов.

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения связь между остатками в остове не включает атом фосфора, например, связь, образованная короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, сочетанием гетероатома и алкила, или циклоалкильными межнуклеозидными связями, или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями.

В соответствии с этим вариантом осуществления предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент содержит пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), имеющую модифицированный полиамидный остов (Nielsen et al., 1991). Молекулы на основе PNA являются истинными миметиками молекул ДНК с точки зрения узнавания пар оснований. Остов PNA состоит из N-(2-аминоэтил)глициновых звеньев, соединенных пептидными связями, при этом нуклеоснования связаны с остовом метиленкарбонильными связями. Альтернативный остов содержит удлиненный на один атом углерода пирролидиновый мономер PNA (Govindaraju and Kumar, 2005). Поскольку остов молекулы PNA не содержит заряженных фосфатных групп, гибриды PNA-РНК являются, как правило, более стабильными, чем гибриды РНК-РНК или РНК-ДНК соответственно (Egholm et al., 1993).

В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения остов содержит аналог или эквивалент морфолинового нуклеотида, в котором сахар рибоза или дезоксирибоза заменен на 6-членное кольцо морфолино. Наиболее предпочтительный аналог или эквивалент нуклеотида содержит фосфородиамидат морфолино олигомер (РМО), в котором сахар рибоза или дезоксирибоза заменен на 6-членное кольцо морфолино, и анионная фосфодиэфирная связь между соседними кольцами морфолино заменена на неионную фосфородиамидатную связь.

В еще одном варианте осуществления аналог или эквивалент нуклеотида согласно изобретению содержит замену одного из немоستيковых атомов кислорода в фосфодиэфирной связи. Эта модификация слегка дестабилизирует спаривание оснований, но добавляет значительную устойчивость к деградации под действием нуклеаз. Предпочтительный аналог или эквивалент нуклеотида включает фосфоротиоат, хиральный фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфотриэфир, аминоалкил-фосфотриэфир, Н-фосфонат, метил- и другие алкильные фосфонаты, включая 3'-алкилен фосфонат, 5'-алкилен фосфонат и хиральный фосфонат, фосфинат, фосфорамидат, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидат, тионофосфорамидат, тионоалкилфосфонат, тионоалкилфосфотриэфир, селенофосфат или боронофосфат.

Еще один предпочтительный аналог или эквивалент нуклеотида согласно изобретению содержит один или более сахарных фрагментов, которые являются моно- или дизамещенными в положении 2', 3' и/или 5', таких как -ОН; -F; замещенный или незамещенный, линейный или разветвленный низший (C₁-C₁₀)алкил, алкенил, алкинил, алкарил, аллил или аралкил, которые могут быть прерваны одним или несколькими гетероатомами; О-, S- или N-алкил; О-, S- или N-алкенил; О-, S- или N-алкинил; О-, S- или N-аллил; О-алкил-О-алкил, -метокси, -аминопропокси; метоксиэтокси; диметиламинооксиэтокси; и -диметиламиноэтоксиэтокси. Сахарный фрагмент может представлять собой фуранозу или ее производное, либо дезоксифуранозу или ее производное, предпочтительно рибозу или ее производное, либо дезоксирибозу или ее производное. Предпочтительный дериватизированный сахарный фрагмент представляет собой закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), в которой 2'-атом углерода связан с 3' или 4' атомом углерода сахарного кольца, таким образом, образуя бициклический сахарный фрагмент. Предпочтительная LNA представляет собой нуклеиновую кислоту с 2'-О, 4'-С-этиленовым мостиком (Morita et al., 2001. *Nucleic Acid Res. Supplement*, No. 1: 241-242). Эти замены наделяют аналог или эквивалент нуклеотида устойчивостью к действию RNase H и нуклеаз, и увеличивают сродство к РНК-мишени.

Специалисту в данной области будет понятно, что необязательно, чтобы все межнуклеозидные связи в антисмысловом олигонуклеотиде были модифицированы. Например, некоторые межнуклеозидные связи могут быть немодифицированными, тогда как другие межнуклеозидные связи являются модифицированными. АОН, содержащие остов, состоящий из одной формы (модифицированных) межнуклеозидных связей, множества форм (модифицированных) межнуклеозидных связей, равномерно или неравномерно распределенных по длине АОН, все охвачены настоящим изобретением. Кроме того, любая модальность модификации остова (равномерная, неравномерная, моноформа или множество форм, и все их пермутации) может быть комбинирована с любой формой сахарных или нуклеозидных модификаций,

или аналогами, указанными ниже.

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

В другом варианте осуществления аналог или эквивалент нуклеотида согласно изобретению содержит 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, -гидроксиды, -галогены, -тио-, -тиольные, -алкильные, -алкенильные, -алкинильные, -тиоалкильные производные пиримидиновых и пуриновых оснований, которые известны или будут известны в данной области.

Специалисту в данной области будет понятно, что необязательно, чтобы все положения в антисмысловом олигонуклеотиде были модифицированы равномерно. Кроме того, более одного из вышеуказанных аналогов или эквивалентов может быть встроено в один антисмысловый олигонуклеотид или даже в одно положение в пределах антисмыслового олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления антисмысловый олигонуклеотид согласно изобретению имеет по меньшей мере два различных типа аналогов или эквивалентов.

В соответствии с другим вариантом осуществления AON в соответствии с изобретением содержат 2'-О (предпочтительно низший) алкилфосфоротиоатный антисмысловый 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 этих модификаций, такие как галогенированные производные.

Эффективный и предпочтительный формат антисмыслового олигонуклеотида в соответствии с изобретением содержит 2'-О-метил-модифицированные рибозные фрагменты с фосфоротиоатным остовом, при этом предпочтительно, по существу, все рибозные фрагменты представляют собой 2'-О-метил и, по существу, все межнуклеозидные связи представляют собой фосфоротиоатные связи.

Специалисту в данной области будет также понятно, что различные AON могут быть комбинированы для эффективного пропуска экзона 80 гена COL7A1. Комбинацию двух AON можно использовать в способе согласно изобретению, например двух AON, трех различных AON, четырех различных AON или пяти различных AON, нацеленных на одни и те же или различные области экзона 80 (фиг. 1), при условии, что по меньшей мере один AON представляет собой AON в соответствии с настоящим изобретением.

AON может быть связан с фрагментом, который усиливает поглощение AON клетками, предпочтительно клетками кожи. Примеры таких фрагментов включают холестерин, углеводы, витамины, биотин, липиды, фосфолипиды, проникающие в клетки пептиды, включая, но без ограничения, Antennapedia, TAT, Transportan, и положительно заряженные аминокислоты, такие как олигоаргинин, полиаргинин, олиголизин или полилизин, антигенсвязывающие домены, такие как обеспеченные антителом, Fab-фрагментом антитела, или одноцепочечным антигенсвязывающим доменом, таким как верблюжий одноцепочечный антигенсвязывающий домен.

Молекула, вызывающая пропуск экзона, в соответствии с изобретением может представлять собой "голый" (gymnotic) AON или находиться в форме конъюгата, или экспрессироваться из вектора (векторный AON). Молекулу, вызывающую пропуск экзона, можно вводить с использованием подходящих средств, известных в данной области. В случае, когда молекула, вызывающая пропуск экзона, представляет собой векторный AON, она может быть, например, доставлена индивидууму, или в клетку, ткань или орган указанного индивидуума в форме экспрессионного вектора, при этом экспрессионный вектор кодирует транскрипт, содержащий указанный олигонуклеотид. Экспрессионный вектор предпочтительно вводят в клетку, ткань, орган или индивидууму посредством носителя для доставки генов, такого как вирусный вектор. В предпочтительном варианте осуществления предлагается экспрессионный вектор на основе вируса, содержащий кассету экспрессии или кассету транскрипции, которая управляет экспрессией или транскрипцией молекулы, вызывающей пропуск экзона, как определено в настоящем документе. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает вирусный вектор, экспрессирующий молекулу, вызывающую пропуск экзона, в соответствии с изобретением при помещении в условия, способствующие экспрессии молекулы, вызывающей пропуск экзона. Клетка может быть обеспечена молекулой, вызывающей пропуск экзона, способной препятствовать последовательностям, важным для включения или по меньшей мере способствующим включению экзона 80, таким образом, что такое вмешательство предотвращает или по меньшей мере уменьшает включение экзона 80 в мРНК COL7A1, например, путем экспрессии AON, доставляемого плазмидой, или вирусной экспрессии, обеспеченной векторами на основе аденовируса или аденоассоциированного вируса. Экспрессия может находиться под контролем промотора полимеразы III, такого как промотор РНК U1, U6 или U7. Предпочтительный носитель для доставки представляет собой вирусный вектор, такой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) или ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор и т.п. Кроме того, плазмиды, искусственные хромосомы, плазмиды, пригодные для направленной гомологичной рекомбинации и интеграции в геном клеток млекопитающих (предпочтительно человека), могут быть подходящим образом использованы для доставки олигонуклеотида, как определено в настоящем документе. Предпочтительными для настоящего изобретения являются такие векторы, в которых транскрипция находится под контролем промоторов Pol-III, и/или в которых транскрипты находятся в форме слияний с транскриптами U1 или

U7, что дает хорошие результаты в отношении доставки малых транскриптов. Конструирование подходящих транскриптов находится в компетенции специалиста в данной области. Предпочтительными являются транскрипты под контролем Pol-III. Предпочтительно в форме транскрипта слияния с транскриптом U1 или U7. Такие слияния могут быть созданы, как описано в данной области (например, см. Gorman L. et al., 1998 или Suter D. et al., 1999).

Одной предпочтительной системой экспрессии AON является вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Разработаны одноцепочечные и двухцепочечные векторы на основе AAV, которые могут быть использованы для длительной экспрессии последовательностей AON для высокоэффективного пропуска экзона 80 COL7A1. Предпочтительный вектор на основе AAV, например, содержит экспрессионную кассету, которая находится под контролем промотора полимеразы III (Pol III). Предпочтительный промотор Pol III представляет собой, например, промотор РНК U1, U6 или U7. Таким образом, изобретение также обеспечивает вектор на основе вируса, содержащий экспрессионную кассету под контролем промотора Pol III, для экспрессии AON согласно изобретению для индукции пропуска экзона 80 COL7A. Вектор AAV в соответствии с настоящим изобретением представляет собой рекомбинантный вектор AAV и относится к вектору AAV, содержащему часть генома AAV, несущую кодируемую молекулу, вызывающую пропуск экзона, в соответствии с изобретением, заключенную в белковую оболочку капсидного белка, полученного из серотипа AAV, как указано в другом месте в настоящем документе. Часть генома AAV может содержать инвертированные концевые повторы (ITR), полученные из серотипа аденоассоциированного вируса, такого как AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9 и др. Белковая оболочка, состоящая из капсидного белка, может быть получена из серотипа AAV, такого как AAV1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 и др. Белковая оболочка может быть также называться оболочкой капсидного белка. Вектор AAV может иметь один или предпочтительно все гены AAV дикого типа, которые удалены, но все еще может содержать функциональные последовательности ITR нуклеиновых кислот. Функциональные последовательности ITR необходимы для репликации, спасения и упаковки вирионов AAV. Последовательности ITR могут представлять собой последовательности дикого типа или могут иметь по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 100% идентичность последовательностей с последовательностями дикого типа, или могут быть изменены, например, путем вставки, мутации, делеции или замены нуклеотидов, при условии, что они остаются функциональными. В этом контексте функциональность относится к способности направлять упаковку генома в капсидную оболочку, а затем обеспечивать возможность экспрессии в клетке-хозяине, подлежащей инфицированию, или клетке-мишени. В контексте настоящего изобретения оболочка капсидного белка может состоять из серотипа, отличного от генома ITR вектора AAV. Таким образом, вектор AAV в соответствии с настоящим изобретением может состоять из оболочки капсидного белка, т.е. икосаэдрального капсида, который содержит капсидные белки (VP1, VP2 и/или VP3) одного серотипа AAV, например AAV серотипа 2, тогда как последовательности ITR, содержащиеся в этом векторе AAV5, могут быть любого из серотипов AAV, описанных выше, включая вектор AAV2. Таким образом, "вектор AAV2" содержит оболочку капсидного белка AAV серотипа 2, тогда как, например, "вектор AAV5" содержит оболочку капсидного белка AAV серотипа 5, при этом каждый может заключать в капсид любую ITR генома вектора AAV в соответствии с изобретением. Предпочтительно, рекомбинантный вектор AAV в соответствии с настоящим изобретением содержит оболочку капсидного белка AAV серотипа 2, 5, 8 или AAV серотипа 9, при этом геном AAV или ITR, присутствующие в указанном векторе AAV, получены из AAV серотипа 2, 5, 8 или AAV серотипа 9; такой вектор AAV называется вектором AAV2/2, AAV 2/5, 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 обладает тропизмом к дермальным и эпидермальным клеткам и содержит оболочку капсидного белка AAV серотипа 5 или 8. Геном AAV или ITR, присутствующие в указанном векторе, могут быть получены из одного и того же или отличного серотипа, такого как серотип 2 AAV; такой вектор называется вектором AAV 2/5 или AAV 2/8. AAV с капсидом серотипа 5 обладает тропизмом к дермальным и эпидермальным клеткам, таким как базальные и супрабазальные кератиноциты и дермальные фибробласты. Векторы AAV с капсидом 5 типа проявляют значительно более высокую эффективность трансдукции по сравнению с AAV с капсидом 2 типа (Keswani et al., 2012). Аналогичным образом AAV с капсидом серотипа 8 демонстрируют тропизм к дермальным фибробластам и (главным образом) супрабазальным кератиноцитам. Кроме того, AAV 2/8 имеют тенденцию быть более эффективными в отношении трансдукции дермальных и эпидермальных клеток млекопитающего, предпочтительно человека, чем AAV 2/5. Однако оказалось, что эффективность трансдукции зависит от времени введения во время заживления ран, при этом AAV 2/2 показал более высокую эффективность трансдукции по сравнению с AAV 2/5 и AAV 2/8 в более поздние моменты времени (Keswani et al., 2012). Таким образом, 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, подлежащих нацеливанию. Эти данные могут быть легко определены специалистом в данной области в доклинических или клинических исследованиях.

Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу, вызывающую пропуск экзона, в соответствии с настоящим изобретением, представленную последовательностью нуклеиновой кислоты выбора,

предпочтительно вставляют между последовательностями генома AAV или ITR, как определено выше, например, экспрессионную конструкцию, содержащую регулирующий экспрессию элемент, функционально связанный с кодирующей последовательностью и 3'-концевой последовательностью.

В целом, выражение "хелперные функции AAV" относится к соответствующим функциям AAV, требуемым для репликации и упаковки AAV, поставляемого в вектор AAV *in trans*. Хелперные функции AAV дополняют функции AAV, которые пропущены в векторе AAV, но они лишены ITR AAV (которые обеспечиваются геномом вектора AAV). Хелперные функции AAV включают две основных ORF AAV, а именно кодирующую область гер и кодирующую область сар или их функциональные, по существу, идентичные последовательности. Области Rep и Cap хорошо известны в данной области, см., например, Chiorini et al. (1999) или US 5139941, включенные в настоящий документ посредством ссылки. Хелперные функции AAV могут предоставляться на хелперную конструкцию AAV, которая может представлять собой плазмиду. Введение хелперной конструкции в клетку-хозяина может происходить, например, путем трансформации, трансфекции или трансдукции до или одновременно с введением генома AAV, присутствующего в векторе AAV, как это определено в настоящем документе. Таким образом, хелперные конструкции AAV согласно изобретению могут быть выбраны так, что они продуцируют желательную комбинацию серотипов для оболочки капсидного белка вектора AAV, с одной стороны, и для репликации и упаковки генома AAV, присутствующего в указанном векторе AAV, с другой стороны.

"Хелперный вирус AAV" обеспечивает дополнительные функции, требуемые для репликации и упаковки AAV. Подходящие хелперные вирусы AAV включают аденовирусы, вирусы простого герпеса (такие как HSV типа 1 и 2) и вирусы коревой оспы. Дополнительные функции, обеспеченные хелперным вирусом, также могут быть введены в клетку-хозяина посредством векторов, как описано в патенте США 6531456, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Предпочтительно геном AAV, присутствующий в рекомбинантном векторе AAV в соответствии с настоящим изобретением, не содержит каких-либо нуклеотидных последовательностей, кодирующих вирусные белки, например, гены гер (ген, кодирующий белок инициации репликации) или сар (ген, кодирующий белок вирусного капсида) AAV. Геном AAV может, кроме того, содержать маркерный или репортерный ген, такой как ген, например, кодирующий устойчивость к антибиотикам, флуоресцентный белок (например, g/p), или ген, кодирующий химически, ферментативно или иным образом детектируемый и/или селективируемый продукт (например, lacZ, aph, и т.д.), известный в данной области. 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, вызывающую пропуск экзона, в соответствии с настоящим изобретением, представляющую собой антисмысловой олигонуклеотид, при этом указанный антисмысловой олигонуклеотид содержит или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из AON80.1, AON80.2, AON80.3, AON80.4 и AON80.5, как описано ниже в табл. 1. Прогнозируются усовершенствования средств обеспечения индивидуума или клетки, ткани, органа указанного индивидуума молекулой, вызывающей пропуск экзона, в соответствии с изобретением, принимая во внимание достигнутый прогресс. Такие будущие усовершенствования могут без сомнения быть включены для достижения указанного эффекта на перестройку мРНК с использованием способа согласно изобретению. Молекула, вызывающая пропуск экзона, в соответствии с изобретением может быть доставлена как таковая индивидууму, в клетку, ткань или орган указанного индивидуума. При введении молекулы, вызывающей пропуск экзона, в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно молекулу растворить в растворе, совместимом со способом доставки.

"Gymnotic" ("голые") AON легко поглощаются большинством клеток *in vivo* и обычно растворение AON в соответствии с изобретением в изотоническом (солевом) растворе будет достаточным для достижения клеток-мишеней, таких как клетки кожи (дермы и эпидермиса). В качестве альтернативы, "gymnotic" AON согласно изобретению могут быть составлены с использованием фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, добавок, стабилизаторов, растворителей, красителей и т.п. В дополнение или в качестве альтернативы "gymnotic" AON могут быть составлены с любыми из добавок для трансфекции, указанных ниже.

Клетки кожи (дермы и эпидермиса) могут быть обеспечены плазмидой для экспрессии антисмысловых олигонуклеотидов путем обеспечения плазмиды в водном растворе, таком как изотонический (солевой) раствор. Альтернативно, плазида может быть обеспечена путем трансфекции с использованием известных реагентов для трансфекции.

Для внутривенного, подкожного, внутримышечного, интратекального и/или внутрижелудочкового введения предпочтительно, чтобы раствор представлял собой изотонический (солевой) раствор. Особенно предпочтительным в данном изобретении является использование вспомогательного вещества или реагентов для трансфекции, которые будут содействовать доставке каждого из компонентов, как определено здесь, к клетке и/или в клетку, предпочтительно клетку кожи (дерма и эпидермис). Предпочтительными являются вспомогательные вещества или реагенты для трансфекции, способные образовывать комплексы, наночастицы, мицеллы, везикулы и/или липосомы, которые доставляют каждый компонент, как определено здесь, в виде комплекса или заключенным внутри везикулы или липосомы через клеточную мембрану. Многие из этих вспомогательных веществ известны в данной области. Подходящие

вспомогательные вещества или реагенты для трансфекции включают полиэтиленмин (PEI; ExGen500 (MBI Fermentas)), LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen) или их производные, или сходные катионные полимеры, включая сополимеры полипропиленмина или полиэтиленмина (PEC) и производные, синтетические амфилилы (SAINT-18), липофектин™, DOTAP и/или вирусные капсидные белки, способные к самосборке в частицы, которые могут доставлять каждый компонент, как определено здесь, к клетке, предпочтительно клетке кожи (дерма или эпидермис). Такие вспомогательные вещества продемонстрировали способность эффективно доставлять олигонуклеотид, такой как антисмысловые нуклеиновые кислоты, к широкому ряду культивированных клеток, включая клетки кожи (дерма и эпидермис). Их высокий потенциал трансфекции сочетается с токсичностью от приемлемо низкой до средней с точки зрения общей выживаемости клеток. Легкость структурной модификации может быть использована для обеспечения дополнительных модификаций и анализа их дополнительных (in vivo) характеристик, связанных с переносом нуклеиновых кислот, и токсичности.

Липофектин является примером реагента для липосомальной трансфекции. 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 метилсульфат) и нейтрального липида диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Нейтральный компонент опосредует внутриклеточное высвобождение. Другой группой систем доставки являются полимерные наночастицы.

Поликатионы, такие как диэтиламиноэтиламиноэтил (BEAE)-декстран, которые хорошо известны в качестве реагента для трансфекции ДНК, могут быть комбинированы с бутилцианоакрилатом (PBCA) и гексилцианоакрилатом (PHCA) для составления катионных наночастиц, которые могут доставлять каждый компонент, как определено здесь, предпочтительно олигонуклеотид, через клеточные мембраны в клетки.

В дополнение к этим общим материалам, состоящим из наночастиц, катионный пептид протамин предлагает альтернативный подход к составлению олигонуклеотида с коллоидами. Эта коллоидная система, состоящая из наночастиц, может образовывать так называемые частицы "proticles", которые могут быть получены с помощью процесса простой самосборки для упаковки и опосредуют внутриклеточное высвобождение олигонуклеотида. Специалист в данной области может выбрать и адаптировать любое из указанных выше вспомогательных веществ или другие коммерчески доступные альтернативные вспомогательные вещества и системы доставки для упаковки и доставки молекулы, вызывающей пропуск экзона, для применения в настоящем изобретении путем ее доставки с целью предупреждения, лечения или задержки возникновения заболевания или состояния, связанного с мутантным экзоном 80 в гене COL7A1.

Молекула, вызывающая пропуск экзона, в соответствии с изобретением может быть ковалентно или нековалентно связана с нацеливающим лигандом, специально сконструированным для содействия поглощению клеткой (особенно клеткой кожи (дермой)), цитоплазмой и/или ее ядром. Такой лиганд может содержать (i) соединение (включая, но без ограничения, пептид(подобные) структуры), узнающее клетку, ткане- или органоспецифические элементы, содействующее клеточному поглощению, и/или (ii) химическое соединение, способное содействовать поглощению клетками и/или внутриклеточному высвобождению олигонуклеотида из везикул, например эндосом или лизосом.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления молекула, вызывающая пропуск экзона, в соответствии с изобретением составлена в композицию или лекарственное средство, или композицию, содержащую, по меньшей мере, вспомогательное вещество и/или нацеливающий лиганд для доставки, и/или устройство для доставки в клетку и/или усиления внутриклеточной доставки.

Следует понимать, что если композиция содержит дополнительный компонент, такой как вспомогательное соединение, как определено здесь далее, каждый компонент композиции может быть составлен в одну единую комбинацию или композицию, или препарат. В зависимости от их идентичности специалист в данной области будет знать, какой тип лекарственной формы является наиболее подходящим для каждого компонента, как определено здесь. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение обеспечивает композицию или препарат, представленный в форме набора, содержащего молекулу, вызывающую пропуск экзона, в соответствии с изобретением и, кроме того, вспомогательное соединение, как определено здесь далее.

При необходимости, молекула, вызывающая пропуск экзона, в соответствии с изобретением или вектор, предпочтительно вирусный вектор, экспрессирующий молекулу, вызывающую пропуск экзона, в соответствии с изобретением, может быть включен в фармацевтически активную смесь путем добавления фармацевтически приемлемого носителя.

Таким образом, изобретение также обеспечивает композицию, предпочтительно фармацевтическую композицию, содержащую молекулу, вызывающую пропуск экзона, в соответствии с настоящим изобретением, такую как "gymnotic" AON или вирусный вектор в соответствии с изобретением и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Такая композиция может содержать одну молекулу, вызывающую пропуск экзона, в соответствии с изобретением, но может также содержать множество отдельных молекул, вызывающих пропуск экзона, в соответствии с изобретением. Такая фармацевтическая

композиция может содержать любое фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, включающее носитель, вспомогательное вещество, стабилизатор, реагент для трансфекции, гелеобразующий агент, буфер, наполнитель, консервант, адъювант, солюбилизатор и/или разбавитель. Такие фармацевтически приемлемые компоненты можно найти, например, в Remington, 2000. Каждый признак указанной композиции ранее был определен в настоящем документе.

В случае использования множества отдельных молекул, вызывающих пропуск экзона, в соответствии с изобретением концентрация или доза, определенная здесь, может относиться к общей концентрации или дозе всех используемых олигонуклеотидов или концентрации или дозе каждой используемой или добавленной молекулы, вызывающей пропуск экзона. Таким образом, в одном варианте осуществления предлагается композиция, в которой количество каждой или всех используемых молекул, вызывающих пропуск экзона, в соответствии с изобретением составляет 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, вызывающая пропуск экзона, в соответствии с изобретением предназначена для лечения DEB или, в более общем плане, заболевания или состояния у индивидуума, которое связано с мутантным экзоном 80 COL7A1. Во всех вариантах осуществления настоящего изобретения термин "лечение" обозначает предупреждение и/или задержку возникновения заболевания или состояния. Индивидуум, который может быть подвергнут лечению с использованием молекулы, вызывающей пропуск экзона, в соответствии с изобретением, может быть уже диагностирован как имеющий DEB, или заболевание или состояние, связанное с экзоном 80 COL7A1. Альтернативно, у индивидуума, который может быть подвергнут лечению с использованием молекулы, вызывающей пропуск экзона, в соответствии с изобретением, может еще не быть диагностировано заболевание, но в будущем он может иметь повышенный риск развития DEB или заболевания, или состояния, связанного с экзоном 80 COL7A1, учитывая его или ее генетический фон. Предпочтительным индивидуумом является человек. В предпочтительном варианте осуществления заболевание или состояние, связанное с мутантным экзоном 80 COL7A1, представляет собой дистрофический буллезный эпидермолиз (DEB).

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается молекула, вызывающая пропуск экзона, в соответствии с изобретением, такая как AON, или вектор, кодирующий AON, такой как вирусный вектор, в соответствии с изобретением, или композиция, содержащая AON или вектор, кодирующий AON, в соответствии с изобретением для применения в качестве лекарственного средства, например, для применения в лечении DEB или, в более общем плане, заболевания или состояния у индивидуума, связанного с мутантным экзоном 80 COL7A1 (как описано выше).

Кроме того, в изобретении предлагается применение молекулы, вызывающей пропуск экзона, в соответствии с изобретением, такой как AON, или вектора, кодирующего AON, такого как вирусный вектор, в соответствии с изобретением, или композиции, содержащей AON или вектор, кодирующий AON, в соответствии с изобретением для изготовления лекарственного средства для лечения DEB или, в более общем плане, заболевания или состояния у индивидуума, связанного с мутантным экзоном 80 COL7A1 (как описано выше).

Кроме того, в изобретении предлагается способ лечения млекопитающего (предпочтительно человека), несущего в своем геноме мутацию в экзоне 80 гена COL7A1, вызывающую заболевание или расстройство, в том числе DEB, включающий введение млекопитающему (человеку) AON, (вирусного) вектора или фармацевтической композиции согласно изобретению. Эти пациенты могут страдать DEB или иметь риск его развития или связанного расстройства. Связанное расстройство, заболевание или состояние включает в себя также, например, рак кожи (меланому) или другие карциномы, которые могут возникать как следствие дефицита коллагена VII или аномалии в коже или других органах индивидуума, вызванные или связанные с мутацией в экзоне 80 гена COL7A1.

Дополнительные варианты осуществления изобретения представляют собой AON, вирусные векторы, кодирующие AON, и фармацевтические композиции, содержащие AON в соответствии с изобретением, для применения в качестве лекарственного средства для лечения млекопитающего (предпочтительно человека), несущего в своем геноме мутацию в экзоне 80 гена COL7A1.

Молекулы, вызывающие пропуск экзона, в соответствии с изобретением можно вводить пациенту системно, локально, местно, путем введения, которое выполняют перорально, интраокулярно, внутривенно, интраназально, внутримышечно, подкожно, внутрикожно, ректально, путем проглатывания, инъекции, ингаляции, инфузии, распыления, в форме (водных) растворов, суспензий, эмульсий (масло-в воде), мазей, таблеток для рассасывания, драже и т.д.

Одним предпочтительным способом введения AON в соответствии с изобретением является наложение повязок, покрытых AON, способных высвобождать AON. Особенно полезными являются многослойные (послойные, LbL) покрытые повязки, такие как раскрытые в WO 2014/150074. В международной заявке на патент, поданной от имени MIT, описано длительное и эффективное высвобождение способствующей заживлению ран siRNA из лейкопластырной повязки, покрытой многослойной пленкой, содержащей указанную siRNA. Повязка, которая может быть подходящим образом использована в комбинации с AON в соответствии с изобретением, представляет собой Tegaderm®. Подходящие многослойные покрытия для доставки siRNA, которые также могут быть использованы в комбинации с AON в соответ-

ствии с изобретением, содержат послойную структуру, содержащую Laponite®. Могут быть также использованы другие повязки, отличные от Tegaderm®, способные высвобождать терапевтические средства на основе нуклеиновых кислот. Также могут быть использованы неклеящие повязки, поскольку они, вероятно, будут менее болезненными для пациента, так как повязка находится в тесном контакте с кожей или участком раны. Содержащие AON пленки LBL для доставки AON в соответствии с изобретением в комбинации с повязками описаны в WO 2014/150074.

Дозирование можно проводить один раз в день, один раз в неделю, один раз в месяц, один раз каждые три месяца, один раз в год в зависимости от пути введения и потребности пациента.

Из-за раннего начала заболевания пациентов, имеющих заболевание, нарушение или патологическое состояние, или риск его развития, вызванное или связанное с мутантным экзоном 80 гена COL7A1, включая DEB, можно лечить в утробе матери, сразу 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 способствовать устранению симптомов заболевания и т.п.

Лечение согласно применению или способу в соответствии с изобретением составляет 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 длительный период времени, даже в течение всей жизни пациента. Каждая молекула, вызывающая пропуск экзона, или олигонуклеотид, вызывающий пропуск экзона, или его эквивалент, как определено здесь, для применения в соответствии с изобретением, может быть подходящим для непосредственного введения в клетку, ткань и/или орган *in vivo* индивидуумов, уже пораженных или имеющих риск развития нарушения, заболевания или состояния, связанного с мутантным экзоном 80 COL7A1, и может быть введен непосредственно *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Частота введения AON, композиции, соединения или вспомогательного соединения согласно изобретению может зависеть от нескольких параметров, таких как возраст пациента, природа молекулы, вызывающей пропуск экзона (например "gymnotic" AON или векторный AON, такой как AAV или лентивирусный вектор, экспрессирующий AON), дозы, лекарственной формы указанной молекулы и т.п.

Диапазоны доз молекулы, вызывающей пропуск экзона, предпочтительно олигонуклеотида в соответствии с изобретением предпочтительно разработаны на основе клинических испытаний с увеличением доз (применение *in vivo*), в соответствии со строгими требованиями протокола. Олигонуклеотид, как определено здесь, можно применять в дозе от 0,0001 до 100 мг/кг, предпочтительно от 0,01 до 20 мг/кг. Доза и режим лечения могут изменяться в широких пределах в зависимости от многих факторов, включая, но без ограничения, путь введения (например, системное или местное), введения олигонуклеотида в виде "gymnotic" AON или векторного AON, режима дозирования, возраста и веса пациента и т.д.

В предпочтительном варианте осуществления вирусный вектор, предпочтительно вектор AAV, как описано здесь ранее, в качестве носителя для доставки молекулы в соответствии с изобретением вводят в дозе в диапазоне 1×10^9 - 1×10^{17} вирусных частиц на инъекцию, более предпочтительно в диапазоне 1×10^{10} - 1×10^{14} и наиболее предпочтительно в диапазоне 1×10^{10} - 1×10^{12} вирусных частиц на инъекцию.

Специалисту в области, к которой относится данное изобретение, будет ясно, что подробная информация о методах лечения будет установлена в соответствии и в зависимости от таких факторов, как последовательность и химия олигонуклеотида(ов), путь введения, лекарственная форма, доза, режим дозирования, формат (вирусный вектор или "gymnotic" олигонуклеотид), возраст и вес пациента, стадия заболевания и т.д., которые могут потребовать дополнительного неклинического и клинического исследования.

В изобретении, кроме того, предлагается способ предотвращения или, по меньшей мере, уменьшения включения экзона 80 COL7A1 в клетку, включающий приведение в контакт клетки, предпочтительно клетки кожи (дермы) с молекулой, вызывающей пропуск экзона, в соответствии с изобретением, такой как "gymnotic" AON или (вирусный) вектор, кодирующий AON в соответствии с изобретением, или композицией в соответствии с изобретением. Отличительные признаки этого аспекта предпочтительно представляют собой такие, которые определены ранее в настоящем документе.

Если не указано иное, каждый вариант осуществления, описанный в настоящем документе, может быть объединен с другим вариантом осуществления, как описано здесь.

Настоящее изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду, способному предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из пре-мРНК в клетке млекопитающего; отличающемся тем, что олигонуклеотид: (a) содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна части экзона 80, и (b) имеет длину менее чем 24 нуклеотида.

В другом аспекте изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду, способному предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из пре-мРНК в клетке млекопитающего; отличающемся тем, что олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна 3' части экзона 80 и 5' части нижележащего интрона. Предпочтительно указанный олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна SEQ ID NO: 21. Например, указанный олигонуклеотид содержит

последовательность

SEQ ID NO: 22 (5'-UCACCACU-3'), SEQ ID NO: 23 (5'-ACCACUGG-3') и/или SEQ ID NO: 24 (5'-ACUCACCA-3').

В другом аспекте изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду, способному предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из пре-мРНК в клетке млекопитающего; отличающемся тем, что олигонуклеотид содержит последовательность

SEQ ID NO: 22 (5'-UCACCACU-3'), SEQ ID NO: 23 (5'-ACCACUGG-3') и/или SEQ ID NO: 24 (5'-ACUCACCA-3').

Предпочтительно олигонуклеотид в соответствии с настоящим изобретением имеет длину менее чем 24 нуклеотида, в определенных вариантах осуществления предпочтительно от 20 до 23 нуклеотидов. Таким образом, предпочтительно, чтобы указанный олигонуклеотид имел длину 20, 21, 22 или 23 нуклеотидов.

В предпочтительном аспекте олигонуклеотид выбран из группы, состоящей из AON80.1, AON80.2, AON80.3, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 и AON80.5.8. Предпочтительно указанный олигонуклеотид выбран из группы, состоящей из:

- (i) AON80.2 и AON80.5;
- (ii) AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4 и AON80.5.5; или
- (iii) AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 и

AON80.5.8.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления олигонуклеотид выбран из группы, состоящей из AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 и AON80.5.8.

Настоящее изобретение также относится к антисмысловому олигонуклеотиду, способному предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из транскрипта РНК в клетке млекопитающего, отличающемся тем, что антисмысловой олигонуклеотид не гибридизуется с интроном, расположенным выше экзона 80. Предпочтительно указанная клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. Предпочтительно последовательность указанного олигонуклеотида содержит последовательность олигонуклеотида, выбранного из группы, состоящей из AON80.3, AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7, AON80.5.8 и AON80.13.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду, способному предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из транскрипта РНК в клетке млекопитающего, отличающемся тем, что указанный антисмысловой олигонуклеотид комплементарен экзону 80, но не его вышележащим или нижележащим интронам. В еще одном варианте осуществления изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду, способному предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из пре-мРНК в клетке млекопитающего; при этом олигонуклеотид содержит область комплементарности с экзоном 80, которая не распространяется на интроны, фланкирующие экзон 80. В таких вариантах осуществления олигонуклеотид предпочтительно представляет собой AON80.3 или AON80.13.

Настоящее изобретение также относится к антисмысловому олигонуклеотиду, способному предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда мРНК образуется путем сплайсинга из транскрипта РНК в клетке млекопитающего, отличающемся тем, что антисмысловой олигонуклеотид содержит область комплементарности с экзоном 80, которая имеет длину не более чем 20 нуклеотидов. Предпочтительно указанный олигонуклеотид содержит последовательность олигонуклеотида, выбранного из группы, состоящей из AON80.1, AON80.2, AON80.3, AON80.4, AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 и AON80.5.8. Предпочтительно указанная область комплементарности с экзоном 80 имеет длину не более чем 9-17 нуклеотидов, такую как 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 нуклеотидов. Более предпочтительно, когда олигонуклеотид имеет область комплементарности с интроном, расположенным непосредственно ниже экзона 80, область комплементарности с экзоном 80 имеет длину от 9 до 14 нуклеотидов, такую как 9, 10, 11, 12, 13 или 14 нуклеотидов. Когда область комплементарности с экзоном 80 составляет не более 12 нуклеотидов, олигонуклеотид предпочтительно выбран из группы, состоящей из AON80.1, AON80.4, AON80.5, AON80.5.3, AON80.5.4, AON80.5.5, AON80.5.7 и AON80.5.8. В другом предпочтительном аспекте антисмысловой олигонуклеотид содержит: (а) область комплементарности с экзоном 80, которая имеет длину не более чем 20 нуклеотидов, и (б) область, которая комплементарна транскрипту РНК в интроне, расположенном выше или ниже экзона 80. Еще более предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид содержит часть, которая комплементарна транскрипту РНК в интроне, расположенном ниже экзона 80. В одном варианте осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит часть, которая комплементарна части экзона

80, состоящей из десяти самых крайних нуклеотидов с 3'-конца последовательности SEQ ID NO: 18 (т.е. нуклеотиды 27-36 последовательности SEQ ID NO: 18). В еще одном варианте осуществления часть комплементарности с экзон 80 состоит из *n* самых крайних нуклеотидов с 3'-конца последовательности SEQ ID NO: 18, где *n* равно от 9 до 20; такое как 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, или 9 самых крайних нуклеотидов с 3'-конца последовательности SEQ ID NO: 18. В более предпочтительном варианте осуществления часть экзона 80 состоит из 12 самых крайних нуклеотидов с 3'-конца экзона 80 (т.е. нуклеотиды 25-36 последовательности SEQ ID NO: 18). Когда олигонуклеотид комплементарен части экзона 80, его последовательность предпочтительно имеет длину не более чем 24 нуклеотида.

В отношении всех антисмысловых олигонуклеотидов в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид представляет собой олигорибонуклеотид, более предпочтительно олигорибонуклеотид, в котором межнуклеозидные связи химически модифицированы, предпочтительно представляют собой фосфоротиоатные связи. В еще одном предпочтительном аспекте сахарные фрагменты олигонуклеотида представляют собой низший 2'-О-алкил, предпочтительно сахарные фрагменты, замещенные 2'-О-метилом.

Изобретение относится также к олигонуклеотиду, содержащему или состоящему из: (i) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-17 и 25-32; (ii) нуклеотидной последовательности РНК, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-15 и 25-32; или (iii) нуклеотидной последовательности ДНК, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-15 и 25-32, в которой любой U заменен на Т.

Изобретение также относится к композиции, содержащей олигонуклеотид в соответствии с изобретением, необязательно содержащей один или более из носителя, вспомогательного вещества, стабилизатора, реагента для трансфекции, разбавителя, гелеобразующего агента или буфера. Предпочтительно указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию для применения в лечении человека, более предпочтительно для применения в лечении дистрофического буллезного эпидермолиза (DEB), еще более предпочтительно для применения в лечении человека, страдающего DEB, вызванного мутацией в экзоне 80 гена COL7A1. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду в соответствии с изобретением для применения в лечении субъекта-человека, страдающего заболеванием, вызванным включением мутантного экзона 80 в ген COL7A1.

Изобретение также относится к способу предотвращения или уменьшения включения экзона 80 в мРНК COL7A1 млекопитающего, предпочтительно человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из транскрипта РНК в клетке млекопитающего, предпочтительно человека; включающему стадии доставки к клетке, ткани, *in vitro* или *ex vivo*, или живому животному, включая человека, содержащему такую клетку, антисмыслового олигонуклеотида по любому из пп.1-27 или композиции по п.29 или п.30 в условиях, способствующих поглощению такого олигонуклеотида такой клеткой, и обеспечения возможности протекания процесса сплайсинга.

Способность молекулы, вызывающей пропуск экзона, такой как AON в соответствии с изобретением, или (вирусного) вектора, кодирующего такой AON, предотвращать или по меньшей мере уменьшать включение мутантного экзона 80 COL7A1, когда ген COL7A1 экспрессируется в клетке млекопитающего (предпочтительно человека), и связываться с пре-мРНК COL7A1 млекопитающего (человека) в физиологических условиях в области, оказывающей влияние на выбор 5'-акцепторного сайта сплайсинга, и тем самым уменьшать включение мутантного экзона 80 в мРНК COL7A1, может быть легко оценена с использованием анализов, описанных в экспериментальной части в настоящем документе. В частности, молекулу, вызывающую пропуск экзона, можно инкубировать с клеткой, содержащей экзон 80 (необязательно мутантный) гена COL7A1, для оценки ее способности уменьшать продуцирование клеткой мРНК, включающей экзон 80, например методом RT-PCR (что можно количественно оценить с использованием биоанализатора (Bioanalyzer)), как описано в документе в экспериментальной части и в примерах.

В экспериментальной части и примерах, приведенных в настоящем документе, можно наблюдать, что на уровне РНК добавление различных AON в соответствии с изобретением, нацеленных на экзон 80 гена COL7A1, действительно вызывает продуцирование мРНК, лишенной экзона 80, что приводит к получению более короткого, но функционального белка коллагена VII.

В фибробластах (которые могут быть получены из клеток кожи), коллаген VII экспрессируется в большом количестве. Таким образом, предполагается, что добавление AON к культивированным фибробластам от пациентов с DEB приведет к образованию повышенного количества укороченного, но функционального белка коллагена VII, детектируемого методом Вестерн-блота, и доказывает то, что терапия на основе AON будет не только перенаправлять сплайсинг мРНК COL7A1, но также приведет к восстановлению функциональности коллагена VII.

Термины "аденин", "гуанин", "цитозин", "тимин", "урацил" и гипоксантин (нуклеобазы в инозине) относятся к нуклеобазам как таковым.

Термины аденозин, гуанозин, цитидин, тимидин, уридин и инозин относятся к нуклеобазам, связанным с сахаром (дезоксирибозидом).

Термин "нуклеозид" относится к нуклеобазе, связанной с сахаром (дезоксирибозидом).

В этом документе и в его формуле изобретения глагол "содержать" и его спряжения используется в

неограничивающем смысле для обозначения того, что понятия, следующие за этим словом, включены, но при этом понятия, которые специально не указаны, не исключены. Кроме того, ссылка на элемент в единственном числе не исключает возможности того, что присутствует более одного такого элемента, если контекст явным образом не требует наличия одного и только одного такого элемента. Единственное число, таким образом, обычно обозначает "по меньшей мере один".

Слово "включать" и все его временные формы и спряжения следует читать как "включают, но без ограничения".

Слово "молекула, вызывающая пропуск экзона" означают включение "gymnotic" AON и векторных AON, включая вирусные векторы, способные экспрессировать AON в совместимой клетке.

Слово "около" или "приблизительно" при использовании в сочетании с числовым значением (например, около 10) предпочтительно означает, что значение может представлять собой заданное значение (10) плюс или минус 5% от значения.

Информация о последовательностях, представленная в настоящем документе, не должна быть настолько узко интерпретирована, чтобы требовалось включение ошибочно идентифицированных оснований. Специалист в данной области может идентифицировать такие ошибочно идентифицированные основания и знает, как скорректировать такие ошибки. В случае ошибок последовательностей последовательность полипептида, получаемого путем экспрессии последовательности, присутствующей в SEQ ID NO: 1, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, должна иметь преимущественную силу.

Примеры

Пример 1. Анализ мРНК экзона 80.

Для детекции присутствия мРНК экзона 80 в мРНК COL7A1 использовали экстрагированную тотальную РНК клеток HeLa и клеток первичных фибробластов человека (HPF). Культивирование клеток выполняли в (а) модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) для HeLa, или (б) DMEM AQE, дополненной 20% FBS и 1% пируватом натрия для клеток HPF. Все клетки выращивали при 37°C, 5% CO₂. Для определения эффективности AON в отношении пропуска экзона клетки высевали при 60000 клеток/лунку (HeLa) в 12-луночные планшеты или 150000 клеток/лунку (LFB1) в 6-луночные планшеты. После 24 ч выращивания клетки трансфицировали 100 нм комплекса AON-maxPei. Выделение РНК выполняли с помощью ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega). Затем кДНК синтезировали с использованием набора Thermo Scientific Verso kit. PCR для экзона 80 выполняли с использованием праймера FW (5'-CAAGGTCCCAAAGGAGACAG-3'; SEQ ID NO: 16), локализованного в экзоне 77, и праймера RV, который представляет собой праймер RV с последовательностью 5'-AGTCCCACAGCTCCAGTAGG-3' (SEQ ID NO: 17), локализованный в экзоне 84, или праймер RV с последовательностью 5'-GAAGGGGGAGCCTGGAGA-3' (SEQ ID NO: 33), локализованный на границе экзонов 82/83. Продукты PCR визуализировали с помощью биоанализатора (Bioanalyzer) с использованием чипов DNA1000, и программное обеспечение Expert 2100 использовали для анализа длины продукта. В результате дизайна исходного олигонуклеотида получили двенадцать олигонуклеотидов AON80.1-AON80.12, и в табл. 1 для каждого из этих AON показаны результаты полуколичественного анализа эффективности в отношении пропуска экзона 80 в первичных фибробластах человека (HPF) и клетках HeLa. В результате последующей работы по дизайну на основе 21-мерного AON80.5 получили пять производных, а именно AON80.5.1-AON80.5.5 (все 21-мерные). Кроме того, сконструировали 36-мерный олигонуклеотид (AON80.13) по всему экзону 80. Данные для этих дополнительных AON также включены в табл. 1, наряду с нуклеотидной последовательностью и SEQ ID NO: предпочтительных AON в соответствии с изобретением (AON80.1-AON80.5 и AON80.5.n серии, и AON80.13). Два 20-мерных олигонуклеотида (AON80.5.7 и AON80.5.8) тестировали в 3 экспериментах. Результаты представлены в табл. 2 и демонстрируют сопоставимые результаты.

Таблица 1. Эффективность исключения экзона 80 из мРНК

AON	HPF	HeLa	Последовательность 5' – 3'	SEQ ID NO
ESE80.3	+++	++++	GGCCUCUUGGACCCUGCAGACCCU	2
ESE80.3_Q2170 X	++	++++	GGCCUCUUGGACCCUACAGACCCU	3
AON80.1	+	+	CCUGCAGACCCUACAUAGAG	4
AON80.2	++++	++++	CUUGGACCCUGCAGACCCUA	5
AON80.3	++	++	GGGCCUCUUGGACCCUGCAG	6
AON80.4	++	+++	UUGGGUACUCACCACUGGGCCAGG	7
AON80.5	++++++	++	GGUACUCACCACUGGGCCAGG	8
AON80.5.1	++++++	++++++	GUACUCACCACUGGGCCAGGG	25
AON80.5.2	+++++	++++	UACUCACCACUGGGCCAGGGG	26
AON80.5.3	-	-	GGGUACUCACCACUGGGCCAG	27
AON80.5.4	++	++	UGGGUACUCACCACUGGGCCA	28
AON80.5.5	-	-	UUGGGUACUCACCACUGGGCC	29
AON80.6	-	-	GGCAAGACAGGUGAAGGUUCUUGG	9
AON80.7	-	-	CAGGGCACAGGAUGGGGGCAAGAC A	10
AON80.8	-	-	GUCACUGGGGCAGGGCACAGGAUG G	11
AON80.9	-	-	CUUGGGCCUGUCCCAACCUCUGGG	12
AON80.10	-	-	AUCUGGGCCUCACUUGGGCCUG	13
AON80.11	-	-	AGGGCACUGAUGAGCCUCAUCUGG	14
AON80.12	-	-	CAUAGAGAGGGGCACUGAUGAGCCUC	15
AON80.13	++++++	++++++ +	CACUGGGCCAGGGGGGCCUCUUGGACCCUG CAGACC	30

Клетки обрабатывали в течение 24 ч 100 нМ AON. Для сравнения использовали ESE-80.3 и ESE-80.3_Q2170X из WO 2013/053819. Данные представлены в виде: - (без исключения экзона 80), + (1-10% исключения экзона), ++ (11-20% исключения экзона 80), +++ (21-30% исключения экзона 80) и т.д.

Таблица 2. Эффективность исключения экзона 80 из мРНК

AON	HPF	HeLa	Последовательность 5' – 3'	SEQ ID NO
AON80.5	++++++	++++++	GGUACUCACCACUGGGCCAGG	8
AON80.5.1	++++++	++++++	GUACUCACCACUGGGCCAGGG	25
AON80.5.2	+++++	+++++	UACUCACCACUGGGCCAGGGG	26
AON80.5.3	+	-	GGGUACUCACCACUGGGCCAG	27
AON80.5.4	++	++	UGGGUACUCACCACUGGGCCA	28
AON80.5.5	-	-	UUGGGUACUCACCACUGGGCC	29
AON80.5.7	+++++	+++++	GUACUCACCACUGGGCCAGG	31
AON80.5.8	+++++	+++++	GGUACUCACCACUGGGCCAG	32
AON80.13	++++++	++++++ +	CACUGGGCCAGGGGGGCCUCUUGGACCCUG CAGACC	30

Средние результаты показаны для трех независимых экспериментов, выполненных так же, как для табл. 1, с двумя новыми AON (AON80.5.7 и AON80.5.8) и в сравнении с AON, тестируемыми ранее (см. выше). Данные представлены в том же виде, как в табл. 1.

На фиг. 2-5 показаны результаты анализа методом "лаборатория-на-чипе" для AON из табл. 1 и 2. AON в соответствии с изобретением, обозначенные AON80.1-AON80.5, обладают хорошей эффективностью, AON80.2, AON80.4 и AON80.5 показывают более высокие результаты. После дальнейшей работы по дизайну оказалось, что AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.7, AON80.5.8 и AON80.13 обладают наилучшей эффективностью сплайсинга из подвергнутых тестированию AON. Наиболее предпочтительные AON в соответствии с изобретением представляют собой AON80.5, AON80.5.1, AON80.5.2, AON80.5.7 и AON80.5.8.

Для оценки конкретной последовательности всех образованных продуктов выполняли анализ последовательностей. Дополнительные продукты, видимые после анализа на биоанализаторе, включали интрон 82 в мРНК (по данным анализа секвенирования). Если этот интрон будет транслироваться в белок, при этом стоп-кодон будет включен, это приведет к образованию усеченного белка коллагена, кото-

рый вероятнее всего будет деградировать.

Для оценки иммуногенного эффекта AON может быть выполнена следующая экспериментальная процедура *in vitro* с использованием клеток RAW-Blue фирмы Invivogen. Эти клетки RAW-Blue получены из мышинных макрофагов RAW 264.7 и имеют интегрированную репортерную конструкцию секретрируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), индуцируемой NF-κB и AP-1. Присутствие агонистов всех TLR (за исключением TLR5), NOD1, NOD2, RIG-I, MDA или DECTIN-1 индуцирует сигнальные пути, приводящие к активации NF-κB и AP-1 и последующему продуцированию SEAP. Уровни SEAP могут быть детектированы, указывая, таким образом, на иммуногенную активацию. На фиг. 6 показаны результаты такого тестирования через 24 ч *in vitro* стимуляции. Положительные контроли CpG-DNA, LPS и R848 активировали NF-κB и/или AP-1. В противоположность этому не наблюдалось активации NF-κB и/или AP-1 для тестируемых AON по сравнению с обработанными солевым раствором клетками RAW-blue, за исключением того, что AON80.5.1 индуцировал незначительное увеличение SEAP при конечной концентрации 1 мкМ, что может предполагать активацию NF-κB и/или AP-1. Детектированные величины сравнивали с солевым раствором с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с Holm-Sidak-тестом для множественных сравнений для измерений SEAP (OD).

Иммунотоксичность AON во время 24-часовой *in vitro* стимуляции также тестировали с использованием клеток RAW-Blue, наблюдая за увеличением уровней резорфуина (что может объясняться повышенной пролиферацией, приводящей к увеличению количества клеток, и/или ускоренным клеточным метаболизмом вследствие активации PPR). Не наблюдалось эффекта на жизнеспособность клеток после стимуляции любым из AON (фиг. 7). Только положительный контроль CpG-DNA показал значительно повышенные уровни синтезированного резорфуина (но отсутствие эффекта для LPS и R848 может быть связано с использованием старых партий). Детектированные величины сравнивали с солевым раствором с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с Holm-Sidak-тестом для множественных сравнений для измерений резорфуина.

Функциональность, например стабильность белка и образование якорных фибрилл, коллагена VII без экзона 80 может быть определена с использованием способов *in vitro*, описанных в литературе.

1) Анализ белка, размера и корректной сборки α1-коллагеновых цепей с использованием Вестерн-блоттинга (Titeux et al., 2010). Следует иметь в виду, что вследствие малого размера пропущенного экзона и большого размера белка дикого типа, кажущееся различие в размере белка может быть не зафиксировано.

2) Анализ термической стабильности гомотримера коллагена VII путем использования Вестерн-блоттинга в невозстановительных условиях. Коллаген VII дикого типа состоит из трех цепей α1-коллагена и имеет температуру плавления (T_m), равную 41°C (Mecklenbeck, 2002).

3) Анализ клеточной миграции с использованием коллоидного золота или Radius™ 24-Well Cell Migration Assay. Сравнение подвижности фибробластов и/или кератиноцитов, которые экспрессируют коллаген VII дикого типа, в сравнении с укороченным белком без экзона 80 (Chen et al., 2002). Или сравнение подвижности кератиноцитов в присутствии обработанной и необработанной среды для культивирования мутантных фибробластов человека.

4) Адгезия клеток к различным компонентам внеклеточного матрикса может быть оценена, например, к коллагену IV, ламинину-332, ламинину-1 или фибронектину (Chen et al., 2002).

Авторы настоящего изобретения утверждают, что AON, которые продемонстрировали свою эффективность в отношении предотвращения или по меньшей мере уменьшения включения экзона 80 в мРНК COL7A1 млекопитающего (предпочтительно человека), будут обеспечивать удовлетворительные результаты в плане функциональности коллагена VII, которую можно легко оценить с использованием указанных выше способов предшествующего уровня техники.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигонуклеотид (AON), способный предотвращать или уменьшать включение экзона 80 в мРНК цепи альфа-1 коллагена VII типа (COL7A1) человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из пре-мРНК в клетке, характеризующийся тем, что указанный AON содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 25, 26, 31 и 32.

2. AON по п.1, отличающийся тем, что AON содержит область комплементарности с экзоном 80, при этом указанная область комплементарности имеет длину не более 20 нуклеотидов.

3. AON по п.2, отличающийся тем, что AON содержит область комплементарности с экзоном 80, которая имеет длину 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 нуклеотидов.

4. AON по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что AON имеет длину менее чем 24 нуклеотида.

5. AON по п.4, отличающийся тем, что AON имеет длину 20, 21, 22 или 23 нуклеотида.

6. AON по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что AON представляет собой олигорибонуклеотид.

7. AON по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что межнуклеозидные связи являются химически

модифицированными.

8. AON по п.7, отличающийся тем, что межнуклеозидные связи представляют собой фосфоротионатные связи.

9. AON по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что AON содержит один или более сахарных фрагментов, замещенных низшим 2'-О-алкилом.

10. AON по п.9, отличающийся тем, что сахарные фрагменты, замещенные низшим 2'-О-алкилом, представляют собой сахарные фрагменты, замещенные 2'-О-метилом.

11. AON по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что AON содержит один или более сахарных фрагментов, которые содержат замещение в одном или двух из положений 2', 3' и 5'.

12. AON по п.11, отличающийся тем, что замещение выбрано из следующего: -ОН; -F; замещенного или незамещенного, линейного или разветвленного низшего (C₁-C₁₀)алкила, алкенила, алкинила, алкари-ла, аллила или аралкила, которые могут быть прерваны одним или более гетероатомами; O-, S- или N-алкила; O-, S- или N-алкенила; O-, S- или N-алкинила; O-, S- или N-аллила; O-алкил-O-алкила, -метокси, -аминопропокси; метоксиэтокси; -диметиламинооксиэтокси; и -диметиламиноэтоксиэтокси.

13. AON по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что AON состоит из нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 8, 25, 26, 31 и 32.

14. AON по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что AON содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8.

15. AON по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что AON содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 25.

16. AON по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что AON содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 26.

17. AON по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что AON содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 31.

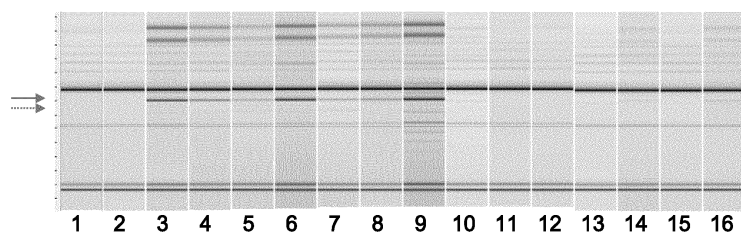
18. AON по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что AON содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 32.

19. Фармацевтическая композиция для лечения млекопитающего, несущего в своем геноме мутацию в экзоне 80 гена COL7A1, содержащая AON по любому из пп.1-18 и один или более из носителя, вспомогательного вещества, стабилизатора, реагента для трансфекции, разбавителя, гелеобразующего агента или буфера.

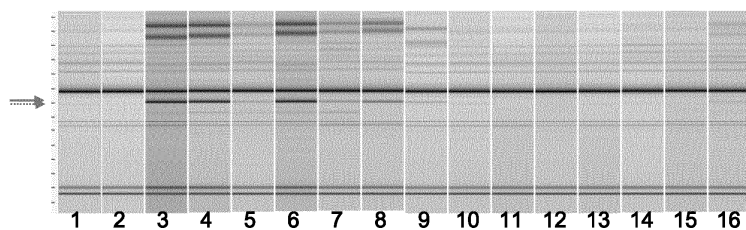
20. Способ предотвращения или уменьшения включения экзона 80 в мРНК COL7A1 человека, когда указанная мРНК образуется путем сплайсинга из транскрипта РНК в клетке человека, указанный способ включает стадии доставки к: (i) данной клетке *in vitro* или *ex vivo*; (ii) ткани, содержащей данную клетку, *in vitro* или *ex vivo*; или (iii) живому человеку, содержащему данную клетку, AON по любому из пп.1-18 или композиции по п.19 в условиях, способствующих поглощению данного AON данной клеткой, и обеспечения возможности протекания процесса сплайсинга.

	Название	SEQ ID NO:
aacaggcccaagtgaaggccagattgaggctcatcagtgccctctctatgtagGGTCTGCAAGGTTCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGgtgagtacccaagaaccttcacctgtctgtcc-3'		1
aacaggcccaagtgaaggccagattgaggctcatcagtgccctctctatgtag-3'		19
GGTCTGCAAGGTTCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTG-3'		18
gtgagtacccaagaaccttcacctgtctgtcc-3'		20
CCTGGCCCAAGTGgtgagtaccca-3'		21
AONs		
uCCAGAGCAGUCCAGGUUCUCCGG-5'	ESE80.3	2
uCCAGAGCAUCCAGGUUCUCCGG-5'	ESE80.3-Q2I70X	3
gagauacauCCAGAGUCC-5'	AON80.1	4
auCCAGAGCAGUCCAGGUUC-5'	AON80.2	5
GACGUCCAGGUUCUCCGG-5'	AON80.3	6
GGACCGGGUACcacucaugggu-5'	AON80.4	7
GGACCGGGUACcacucaugg-5'	AON80.5	8
GGGACCGGGUACcacucaug-5'	AON80.5.1	25
GGGACCGGGUACcacucau-5'	AON80.5.2	26
GACCGGGUACcacucaugg-5'	AON80.5.3	27
ACCGGGUACcacucaugggu-5'	AON80.5.4	28
CCGGGUACcacucaugggu-5'	AON80.5.5	29
GGACCGGGUACcacucaug-5'	AON80.5.7	31
GACCGGGUACcacucaugg-5'	AON80.5.8	32
CCAGAGCAGUCCAGGUUCUCCGGGGGACCGGGUAC-5'	AON80.13	30
UACcacu-5'		22
GGUACCa-5'		23
ACcacuca-5'		24
gguucuuuggaaggacagaaagg-5'		9

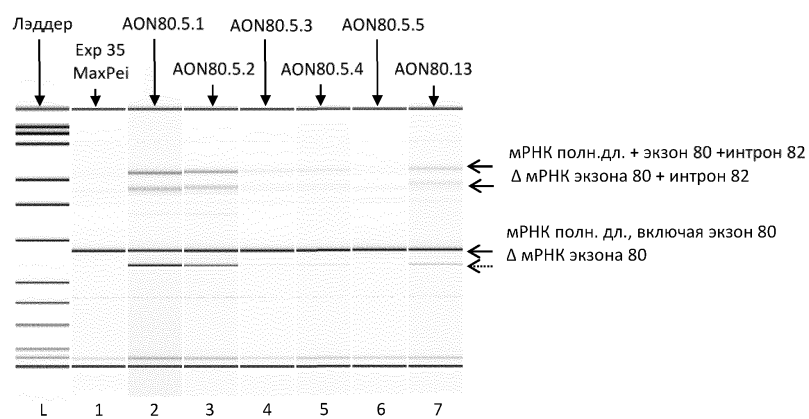
Фиг. 1



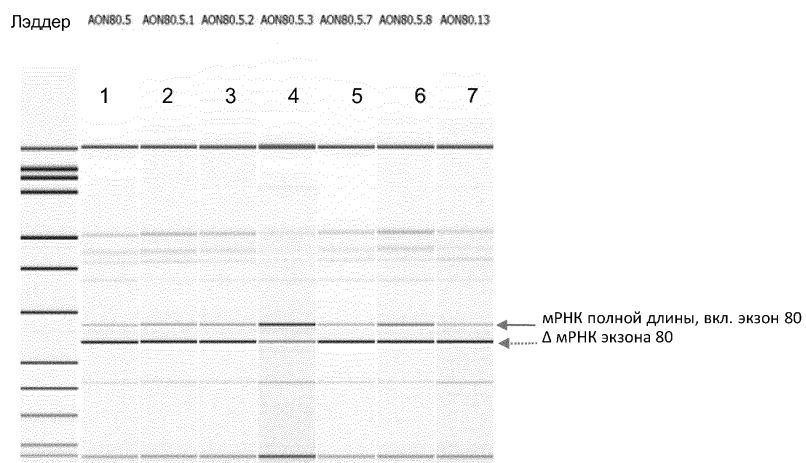
Фиг. 2



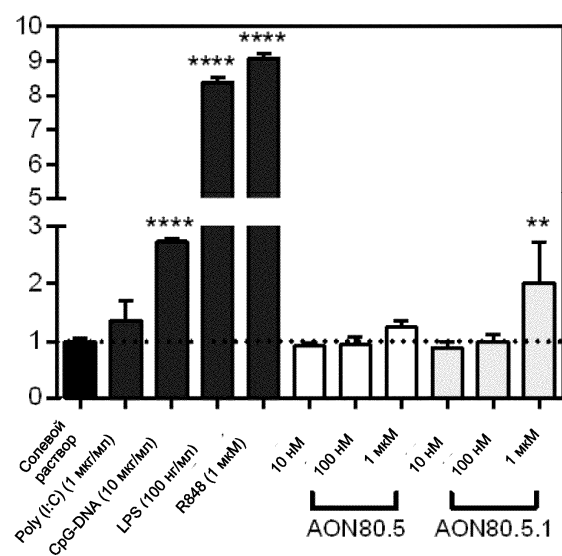
Фиг. 3



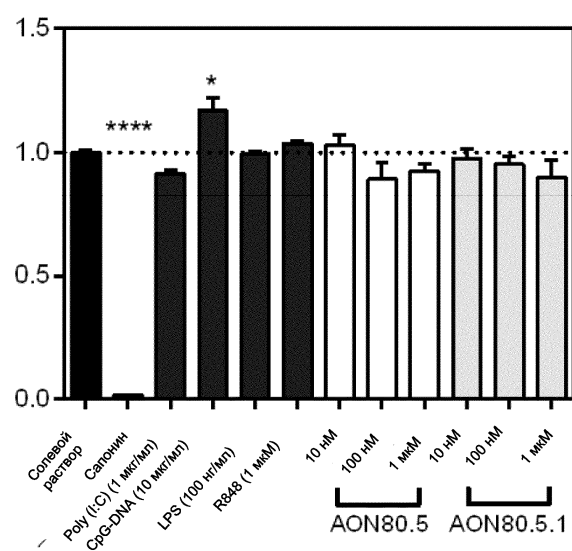
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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