



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.22

(21) Номер заявки
201791820

(22) Дата подачи заявки
2016.02.26

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

(54) ОЛИГОНУКЛЕОТИДНАЯ ТЕРАПИЯ ВРОЖДЕННОГО АМАВРОЗА ЛЕБЕРА

(31) 1503408.5

(32) 2015.02.27

(33) GB

(43) 2017.12.29

(86) PCT/EP2016/054164

(87) WO 2016/135334 2016.09.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПРОКР ТЕРАПЕУТИКС П Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Бьясутто Патрисия Коромото, Чан Хи Лам (NL)

(74) Представитель:
Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О., Карпенко О.Ю., Строкова О.В., Христофоров А.А. (RU)

(56) WO-A1-2012168435
ROB W.J. COLLIN ET AL.: "Antisense Oligonucleotide (AON)-based Therapy for Leber Congenital Amaurosis Caused by a Frequent Mutation in CEP290", MOLECULAR THERAPY - NUCLEIC ACIDS, vol. 1, no. 3, 1 March 2012 (2012-03-01), page e14, XP055088070, DOI: 10.1038/mtna.2012.3, page 4; table 1; compounds AON-2, -3 and -4
WO-A1-2013036105

XAVIER GERARD ET AL.: "AON-mediated Exon Skipping Restores Ciliation in Fibroblasts Harboring the Common Leber Congenital Amaurosis CEP290 Mutation", MOLECULAR THERAPY - NUCLEIC ACIDS, vol. 1, no. 6, 1 June 2012 (2012-06-01), page e29, XP055088066, ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1038/mtna.2012.21, figure 2

DATABASE EMBL [Online] 18 August 2010 (2010-08-18), "Sequence 854314 from Patent EP2213738", XP002758303, retrieved from EBI accession no. EM_PAT:HD977598, Database accession no. HD977598, sequence

DATABASE EMBL [Online] 25 January 2015 (2015-01-25), "Sequence 478723 from Patent EP1572962", XP002758304, retrieved from EBI accession no. EM_PAT:JD497699, Database accession no. JD497699, sequence

DATABASE EMBL [Online] 18 August 2010 (2010-08-18), "Sequence 410497 from Patent EP2213738", XP002758305, retrieved from EBI accession no. EM_PAT:HD533781, Database accession no. HD533781, sequence

GARANTO ALEJANDRO ET AL.: "AAV-mediated antisense oligonucleotide delivery is an effective therapeutic approach for CEP290-associated LCA", HUMAN GENE THERAPY, vol. 25, no. 11, P075, November 2014 (2014-11), page A80, XP008180460, the whole document & ESGCT AND NVGCT COLLABORATIVE CONGRESS; THE HAGUE, NETHERLANDS; OCTOBER 23-26, 2014
WO-A1-2016034680

(57) Изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду, способному снизить абберантный сплайсинг, ассоциированный с мутацией с.2991+1655A>G в интроне 26 гена CEP290 человека, характеризующемуся тем, что последовательность олигонуклеотида состоит из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12. Кроме того, изобретение предусматривает вирусный вектор, экспрессирующий указанный олигонуклеотид, фармацевтическую композицию, его содержащую, а также применение олигонуклеотида и вектора для лечения врожденного амавроза Лебера у человека и способ блокирования или снижения абберантного сплайсинга скрытого 128 п.н. экзона в пре-иРНК CEP290.

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с заявкой на выдачу патента Великобритании № 1503408.5, поданной 27 февраля 2015 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Область техники

Настоящее изобретение относится к области олигонуклеотидов и их применения для лечения заболевания. В частности, настоящее изобретение относится к новым антисмысловым олигонуклеотидам, которые можно использовать в лечении врожденного амавроза Лебера.

Уровень техники

Врожденный амавроз Лебера (LCA) представляет собой наиболее распространенную форму врожденной детской слепоты с оцениваемой распространенностью, составляющей приблизительно 1 на 50000 новорожденных во всем мире (Koenekoop et al., 2007; Stone, 2007). Он сопровождается дистрофией сетчатки. Начало симптомов заболевания наступает уже в первые месяцы или годы жизни (Leber, T., 1869). Генетически LCA представляет собой гетерогенное заболевание с пятнадцатью генами, идентифицированными к настоящему времени, мутации в которых являются причинами LCA (den Hollander et al., 2008; Estrada-Cuzcano et al., 2011). Наиболее часто подвергается мутации при LCA ген представляет собой CEP290, ген, расположенный на плече Q хромосомы 12, кодирующий центросомный белок 290, который характеризуется важной ролью в развитии центросомы и цилий. Мутации в гене CEP290 отвечают приблизительно за 15% всех случаев LCA (Stone, 2007; den Hollander, 2008; den Hollander, 2006; Perrault et al., 2007).

Безусловно наиболее часто встречающаяся мутация CEP290, связанная с дистрофией сетчатки, особенно в европейских странах и США, представляет собой изменение в интроне 26 гена CEP290 (с.2991+1655A>G) (Stone, 2007; den Hollander et al., 2006; Perrault et al., 2007; Liitink et al., 2010). Указанная мутация создает скрытый донорный сайт сплайсинга в интроне 26, который приводит к включению aberrантного экзона длиной 128 п.н. в мутантную мРНК CEP290 и вставкам преждевременного стоп-кодона (p.C998X) (см. фиг. 1). У пациентов с указанной мутацией продолжает производиться транскрипт дикого типа, в котором отсутствует aberrантный экзон, что объясняет гипоморфную природу указанной мутации (Estrada-Cuzcano et al., 2011).

Согласно международным патентным публикациям № WO 2013/036105 (Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen) и № WO 2012/168435 (Inserm et al.) раскрыты антисмысловые олигонуклеотиды для лечения или задержки возникновения LCA, нацеленные на указанную интронную мутацию в CEP290.

Сущность изобретения

Несмотря на то что антисмысловые олигонуклеотиды, раскрытые в международных патентных публикациях №№ WO2013/036105 и WO2012/168435, снижают выбор скрытого сайта сплайсинга, ассоциированного с мутацией, тем самым снижая создание сплайсированных мРНК CEP290, содержащих последовательность aberrантного экзона длиной 128 п.н. (что также называется "пропуск экзона"), сами по себе олигонуклеотиды характеризуются определенными ограничениями в отношении выполнимости производства и/или ограничениями с иммунологической точки зрения, что может ограничивать их применение в терапевтическом плане для лечения людей. В связи с этим, цель настоящего изобретения представляет собой обеспечение новых антисмысловых олигонуклеотидов, которые нацеленно воздействуют на мутацию в интроне 26 гена CEP290, которые не страдают от некоторых недостатков олигонуклеотидов предшествующего уровня техники, при этом эффективно снижая включение aberrантного экзона в мРНК CEP290.

Соответственно согласно настоящему изобретению предусмотрен антисмысловый олигонуклеотид, способный снизить aberrантный сплайсинг, ассоциированный с мутацией с.2991+1655A>G в интроне 26 гена CEP290 человека, характеризующийся тем, что последовательность олигонуклеотида состоит из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.

Согласно одному аспекту олигонуклеотид содержит фосфоротиоатный остов.

Согласно еще одному аспекту олигонуклеотид представляет собой олигорибонуклеотид, содержащий модифицированную 2'-О-низи́м алкилом, алкенилом, алкинилом или алкокси рибозу.

Согласно еще одному аспекту все рибозы в олигонуклеотиде модифицированы 2'-О-метилом.

Согласно еще одному аспекту олигонуклеотид содержит модифицированную 2'-О-метоксиэтилом рибозу.

Кроме того, настоящее изобретение также предусматривает вирусный вектор, экспрессирующий вышеуказанный олигонуклеотид, будучи помещенным в условия, способствующие экспрессии олигонуклеотида в клетке человека.

В другом варианте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения врожденного амавроза Лебера у человека, несущего в своем геноме мутацию с.2991+1655A>G в интроне 26 гена CEP290, причем указанная фармацевтическая композиция содержит вышеуказанный олигонуклеотид или вирусный вектор и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного олигонуклеотида или вектора в качестве лекарственного средства для лечения врожденного амавроза Лебера у человека, несущего в своем геноме мутацию с.2991+1655A>G в интроне 26 гена

СЕР290.

Наконец, настоящее изобретение предусматривает *in vitro* и/или *ex vivo* способ блокирования или снижения aberrантного сплайсинга скрытого 128 п.н. экзона в пре-иРНК СЕР290, причем указанный aberrантный сплайсинг обусловлен мутацией с.2991+1655A>G в интроне 26 гена СЕР290 человека в клетке, причем указанный способ предусматривает контакт указанной клетки с олигонуклеотидом, вирусным вектором или фармацевтической композицией, как описано выше.

Описание чертежей

Фиг. 1 - смысловая цепь генома человека (SEQ ID NO: 30) включая в себя 128 п.н. скрытый экзон (подчеркнутый; SEQ ID NO: 1) вместе с 30 п.н. по ходу транскрипции. Положение антисмысловых олигонуклеотидов согласно настоящему изобретению также является известным (SEQ ID NO: 2-12), как и AON предшествующего уровня техники (SEQ ID NO: 13-22). Мутация с.2991+1655A>G, ниже по ходу транскрипции от скрытого экзона, показана строчными буквами в последовательности генома.

Фиг. 2 - профили сплайсинга мРНК СЕР290 необработанных клеток пациента (NT), клеток пациента, обработанных некомплемментарными (смысловыми) олигонуклеотидами (SON-3; SEQ ID NO: 29) или комплементарными антисмысловыми олигонуклеотидами согласно настоящему изобретению (AONP) по сравнению с AON предшествующего уровня техники. Фрагмент дикого типа соответствует полосе, которая мигрирует приблизительно на 109 п.н., тогда как мутированный фрагмент соответствует полосе, которая мигрирует приблизительно на 237 п.н. Фрагменты, мигрирующие выше 237 п.н. фрагмента, как полагают, представляют собой другие формы aberrантного сплайсинга. Здоровый контроль проявляет только профиль дикого типа, тогда как пациент демонстрирует присутствие как фрагментов дикого типа, так и мутированных фрагментов. Обозначенные олигонуклеотиды могут эффективно индуцировать пропуск экзона целевой мутантной последовательности и, следовательно, восстанавливать профиль мРНК дикого типа.

Фиг. 3 - экспрессия мРНК СЕР290 в образцах пациента после обработки с помощью AON, показанная на оси x. Кратность изменения (ось y) рассчитывали с использованием сравнительного Ct способа. Содержания мРНК дикого типа (черные столбики) и мутантной мРНК (серые столбики) сравнивали с необработанным образцом. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение среднего. Статистический анализ различия между содержанием транскрипта дикого типа в необработанных образцах пациента по сравнению с обработанными образцами пациента проводили с использованием парного t-критерия. Результаты показывают значимое различие ($p < 0,05$) содержаний транскрипта дикого типа после обработки с помощью антисмыслового олигонуклеотида, но не после обработки тем же смысловым олигонуклеотидом (SON-3 $p = 0,2507$, AONP4 $p = 0,0002$, AONP13 $p = 0,0001$, AONP26 $p < 0,0001$, AON-3 $p = 0,0034$, ESE(+50+70) $p = 0,0193$).

Подробное описание изобретения

В настоящем документе раскрыт олигонуклеотид, способный снизить выбор в качестве сайта сплайсинга aberrантного сайта сплайсинга, ассоциированного с мутацией с.2991+1655A>G в интроне 26 гена СЕР290 человека, если указанный ген экспрессируется в клетке человека; где последовательность олигонуклеотида характеризуется по меньшей мере одним из свойств (a)-(d):

- (a) она включает в себя не больше чем 3 последовательно расположенных гуанозина;
- (b) она содержит не больше чем 60% гуанозиновых нуклеиновых оснований;
- (c) она включает в себя не больше чем одну последовательность CpG и/или
- (d) она не характеризуется потенциалом образовывать шпильку, содержащую 3 или больше последовательно расположенных комплементарных пар нуклеотидов, при условии, что олигонуклеотид (i) не состоит из SEQ ID NO: 16 и/или (ii) состоит из 21 или меньше нуклеотидов, и предпочтительно состоит из 20 или меньше нуклеотидов.

Не связываясь с теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что комплементарность олигонуклеотида по отношению к пре-мРНК СЕР290 человека означает, что он способен связываться с ней при физиологических условиях в области, влияющей на выбор aberrантного сайта сплайсинга, и при связывании с указанной областью он снижает выбор сайта сплайсинга клеточным аппаратом сплайсинга.

Олигонуклеотиды могут обладать комбинациями двух, трех или даже четырех признаков (a)-(d), определенных выше. Такие комбинации описаны более подробно ниже.

Длина олигонуклеотидов, как правило, является короче чем 30 нуклеотидов, например ≤ 25 , ≤ 21 , ≤ 20 нуклеотидов. Они могут составлять 16-19 нуклеотидов в длину, например 17 нуклеотидов в длину.

Конкретные представляющие интерес олигонуклеотидные последовательности представляют собой SEQ ID NO: 2-12.

Олигонуклеотиды предпочтительно содержат химические модификации по сравнению с природной РНК, например фосфоротиоатный остов, модифицированные 2'-О-низшим алкилом фрагменты рибозы и т.д.

Олигонуклеотиды можно доставить напрямую в клетку или можно доставить опосредованно с помощью *in situ* транскрипции, например, из вирусного вектора. Несмотря на то, как они доставлены, их можно использовать для обеспечения терапевтического эффекта *in vivo* для лечения человека, несущего

в своем геноме мутацию (с.2991+1655A>G) в интроне 26 гена CEP290.

Неожиданно в настоящем документе продемонстрировали, что можно разработать антисмысловые олигонуклеотиды (AON), которые способны блокировать или снижать aberrантный сплайсинг скрытого 128 п.н. экзона в пре-иРНК CEP290 и которые удовлетворяют требованиям для терапевтического применения у людей.

Таким образом, AON согласно настоящему изобретению являются не только функциональными, но, что в равной степени важно и в отличие от обеспечивающих пропуск экзона AON предшествующего уровня техники, лишены последовательностей, которые склонны к образованию агрегатов или мультплексов, таких как репрезентативные G (3 или больше G, включая в себя 4 или больше G, которые также называются G-тетрады или квадруплексы), которые вызывают проблемы с очисткой (примеси) и проведением анализов после производства нерасфасованной продукции, растворимостью (например, вследствие стэкинга G-тетрад), биораспределением, клеточным поглощением, иммуногенностью и/или общей потерей функции.

AON согласно настоящему изобретению не содержат больше чем 60%, более предпочтительно не больше чем 50%, еще более предпочтительно не больше чем 40% гуанозиновых нуклеотидов.

Более того, AON согласно настоящему изобретению содержат не больше чем одну последовательность CpG, предпочтительно ни одну последовательность CpG, которая, как известно, индуцирует иммунную систему человека посредством опосредованной TLR9 реакции.

Кроме того, в отличие от некоторых обеспечивающих пропуск экзона AON, раскрытых в предшествующем уровне техники, AON согласно настоящему изобретению не содержат длинные инвертированные повторы (последовательности, которые могут создавать шпильки или другие двухцепочечные структуры), которые могут создавать проблемы с очисткой и проведением анализов и ассоциированы с иммуногенностью, сниженным клеточным поглощением и/или общей потерей функции.

Соответственно согласно первому аспекту согласно настоящему изобретению предусмотрен олигонуклеотид, способный снизить выбор в качестве сайта сплайсинга aberrантного сайта сплайсинга, ассоциированного с мутацией с.2991+1655A>G в интроне 26 гена CEP290 человека, если указанный ген экспрессируется в клетке человека, причем олигонуклеотид является комплементарным и способным связываться при физиологических условиях с пре-иРНК CEP290 человека в области, влияющей на выбор aberrантного сайта сплайсинга, и при связывании с указанной областью снижает выбор указанного сайта сплайсинга аппаратом сплайсинга в указанной клетке;

где последовательность олигонуклеотида характеризуется по меньшей мере одним из свойств (a)-(d):

- (a) она включает в себя не больше чем 3 последовательно расположенных гуанозина;
- (b) она содержит не больше чем 60% гуанозиновых нуклеиновых оснований;
- (c) она включает в себя не больше чем одну последовательность CpG и/или
- (d) она не характеризуется потенциалом образовывать шпильку, содержащую 3 или больше последовательно расположенных комплементарных пар нуклеотидов,

при условии, что олигонуклеотид не состоит из SEQ ID NO: 16.

Согласно свойству (a) олигонуклеотид может включать в себя динуклеотидную последовательность GpG, но в последовательности находится не больше чем 3 последовательно расположенных гуанозиновых нуклеиновых основания. Таким образом, гуанозиновые тетрады отсутствуют, поскольку они представляют собой более длинные участки гуанозиновых повторов.

Согласно свойству (b) олигонуклеотид может включать в себя гуанозиновые нуклеиновые основания, но не больше чем 60% отдельных нуклеиновых оснований в олигонуклеотиде могут представлять собой гуанозин. Оптимально не больше чем 50% нуклеиновых оснований представляют собой гуанозин, и предпочтительно не больше чем 40%.

Согласно свойству (c) олигонуклеотид может включать в себя одну динуклеотидную последовательность CpG, но не больше. Согласно некоторым вариантам осуществления олигонуклеотид не включает в себя ни одну динуклеотидную последовательность CpG.

Согласно свойству (d) олигонуклеотид не содержит последовательности из 3 нуклеотидов или больше, которые являются самокомплементарными и которые, таким образом, могут гибридизироваться друг с другом в пределах олигонуклеотида с образованием шпилек из 3 пар нуклеотидов или больше (внутримолекулярные дуплексы), или могут гибридизироваться друг с другом в различных олигонуклеотидах с образованием межмолекулярных дуплексов.

Также предпочтительным является то, что последовательность олигонуклеотида должна содержать не больше чем 3 последовательно расположенных цитидиновых нуклеиновых основания. Более типично согласно некоторым вариантам осуществления последовательность олигонуклеотида не включает в себя какой-либо участок из 3 или больше последовательно расположенных идентичных нуклеиновых оснований, например она не включает в себя какие-либо тринуклеотиды ApApA, CpCpC, GpGpG или UpUpU.

Согласно второму аспекту согласно настоящему изобретению предусмотрен олигонуклеотид, способный снизить выбор в качестве сайта сплайсинга aberrантного сайта сплайсинга, ассоциированного с мутацией с.2991+1655A>G в интроне 26 гена CEP290 человека, если указанный ген экспрессируется в

клетке человека, причем олигонуклеотид является комплементарным и способным связываться при физиологических условиях с пре-иРНК СЕР290 человека в области, влияющей на выбор аберрантного сайта сплайсинга, и при связывании с указанной последовательностью снижает выбор указанного сайта сплайсинга аппаратом сплайсинга в указанной клетке; где олигонуклеотид состоит из 21 или меньше нуклеотидов (предпочтительно 20 или меньше) и его последовательность характеризуется по меньшей мере одним из свойств (a)-(d):

- (a) она включает в себя не больше чем 3 последовательно расположенных гуанозина;
- (b) она содержит не больше чем 60% гуанозиновых нуклеиновых оснований;
- (c) она включает в себя не больше чем одну последовательность CpG и/или
- (d) она не характеризуется потенциалом образовывать шпильку, содержащую 3 или больше последовательно расположенных комплементарных пар нуклеотидов.

Кроме того, согласно третьему аспекту настоящего изобретения предусмотрен олигонуклеотид, способный снизить выбор в качестве сайта сплайсинга аберрантного сайта сплайсинга, ассоциированного с мутацией с.2991+1655A>G в интроне 26 гена СЕР290 человека, если указанный ген экспрессируется в клетке человека, причем 5'- или 3'-концевой нуклеотид олигонуклеотида представляет собой цитидин в положении, которое является бессмысленным относительно мутации с.2991+1655A>G. Указанный олигонуклеотид также может характеризоваться по меньшей мере одним из свойств (a)-(d).

Согласно четвертому аспекту настоящего изобретения предусмотрен олигонуклеотид, способный снизить выбор в качестве сайта сплайсинга аберрантного сайта сплайсинга, ассоциированного с мутацией с.2991+1655A>G в интроне 26 гена СЕР290 человека, если указанный ген экспрессируется в клетке человека, причем олигонуклеотид включает в себя последовательность по меньшей мере из 10 нуклеотидов, которая является комплементарной по меньшей мере части последовательности 5'-atggtgtcgatctctgaactctgga-3' (SEQ ID NO: 31; нуклеотиды 31-56 SEQ ID NO: 1). Этот олигонуклеотид, таким образом, может отжигаться с любой частью SEQ ID NO: 31, но всегда будет включать в себя по меньшей мере один нуклеотид, который является комплементарным его центральному 8-меру, а именно 5'-atctcttg-3' (SEQ ID NO: 32), который представляет собой потенциальную последовательность - энхансер сплайсинга. AONP11, 12 и 13 представляют собой примеры таких олигонуклеотидов, каждый из которых включает в себя по меньшей мере один нуклеотид из центрального 8-мера 5'-caggagat-3' (SEQ ID NO: 36; см. фиг. 1). Этот олигонуклеотид также может характеризоваться по меньшей мере одним из свойств (a)-(d).

Оптимально олигонуклеотид согласно настоящему изобретению характеризуется больше чем одним из указанных свойств (a)-(d). Например, он может характеризоваться свойствами: (a) и (b); (a) и (c); (a) и (d); (b) и (c); (b) и (d); (a), (b) и (c); (a), (b) и (d); (a), (c) и (d) или всеми четырьмя из (a)-(d).

В следующей таблице представлены AON предшествующего уровня техники, демонстрирующие (жирным шрифтом) признаки, которых следует избегать для предотвращения связанных с ними проблем с производством, очисткой, проведением анализов, образованием агрегатов, иммуногенностью и/или потерей функции:

Последовательность предшествующего уровня техники	Название AON и/или SEQ ID согласно предшествующему уровню техники	SEQ ID
cugggggccaaggugcgguuggcucacaucugua	ESE(+90+120); WO2012/168435 SEQIDNO: 1	13
ccgaggcggguggaucaagag	ESE(+50+70); WO2012/168435 SEQIDNO: 2	15
gggaugagguagagauacucacaaau	H26D(+7-18); WO2012/168435 SEQIDNO: 4	14
gguaugagauacucacaaauaac	H26D(+10-11); WO2012/168435 SEQIDNO: 5	16
gguaugagauacucacaaauacaacuggggc	H26D(+19-11); WO2012/168435 SEQIDNO: 6	17
gggcccaggtgcggtgg	AON-2; WO2013/036105 SEQIDNO: 10	19
aactggggccaggtgcg	AON-3; WO2013/036105 SEQIDNO: 11	20
tacaactggggccaggtg	AON-4; WO2013/036105 SEQIDNO: 12	21

Предпочтительные AON согласно настоящему изобретению представлены в таблице ниже: AONP2 (SEQ ID NO: 2), AONP3 (SEQ ID NO: 3), AONP4 (SEQ ID NO: 4), AONP11 (SEQ ID NO: 5), AONP12 (SEQ ID NO: 6), AONP13 (SEQ ID NO: 7), AONP19 (SEQ ID NO: 8), AONP20 (SEQ ID NO: 9), AONP23 (SEQ ID NO: 10), AONP24 (SEQ ID NO: 11) и AONP26 (SEQ ID NO: 12):

AON	Олигонуклеотидная последовательность	SEQ ID NO:
AONP2	GCGGUGGCUCACAUCUG	2
AONP3	GGUGGCUCACAUCUGUA	3
AONP4	GGCUCACAUCUGUAAUC	4
AONP11	UCAGGAGAU <u>C</u> GACACCA	5
AONP12	CACGAGUUCAGGAGAU <u>C</u>	6
AONP13	GGUGGAUCACGAGUUA <u>C</u> A	7
AONP19	UGGCUCACAUCUGUAAU	8
AONP20	UGC <u>G</u> GGUGGCUCACAUCU	9
AONP23	CUCACAAUUAACACUGG	10
AONP24	GGUAUGAGAUAC <u>C</u> UACA	11
AONP26	GGUAUGGUAUGAGAUAC	12

В AON в таблице по существу все рибозные фрагменты являются 2'-О-метилованными и по существу все межнуклеозидные связи представляют собой фосфотиоаты.

Более предпочтительные AON согласно настоящему изобретению представляют собой AON, характеризующиеся последовательностью AONP4, AONP13 и AONP26, еще более предпочтительные AON, характеризующиеся по существу всеми 2'-О-метилрибозными фрагментами и по существу всеми фосфотиоатными межнуклеозидными связями.

Согласно всем вариантам осуществления настоящего изобретения термины "модулирующий сплайсинг" и "пропуск экзона" являются синонимами. В отношении CER290 "модулирующий сплайсинг" или "пропуск экзона" следует рассматривать как исключение aberrantного 128-нуклеотидного экзона (SEQ ID NO: 1 или ее аллельные формы) из мРНК CER290 (см. фиг. 1). Термин "пропуск экзона" в настоящем документе определяют как индукцию в пределах клетки зрелой мРНК, которая не содержит конкретный экзон, который присутствовал бы в зрелой мРНК без пропуска экзона. Пропуск экзона достигают путем обеспечения клетки, экспрессирующей пре-мРНК указанной зрелой мРНК, молекулой, способной создавать помехи для таких последовательностей, как, например, (скрытая) донорная или (скрытая) акцепторная последовательность сплайсинга, необходимых для обеспечения возможности биохимического процесса сплайсинга, или молекулой, которая способна создавать помехи для сигнала включения экзона, необходимого для распознавания участка нуклеотидов в качестве экзона, подлежащего включению в зрелую мРНК; такие молекулы в настоящем документе называются "обеспечивающие пропуск экзона молекулы".

Термин "пре-иРНК" относится к непротранскрибированному или частично протранскрибированному предшественнику мРНК, синтезированному из матрицы ДНК в клетке путем транскрипции.

Термин "антисмысловой олигонуклеотид" понимают как относящийся к нуклеотидной последовательности, которая является комплементарной целевой нуклеотидной последовательности в молекуле пре-иРНК, молекуле гРНК (гетерогенная ядерная РНК) или мРНК, так что она способна отжигаться со своей соответствующей целевой последовательностью.

Используемый в настоящем документе термин "комплементарный" включает в себя "полностью комплементарный" и "по существу комплементарный", означая, что, как правило, будет существовать степень комплементарности между олигонуклеотидом и его соответствующей целевой последовательностью, составляющая больше чем 80, предпочтительно больше чем 85, еще более предпочтительно больше чем 90, наиболее предпочтительно больше чем 95%. Например, для олигонуклеотида из 20 нуклеотидов в длину с одним несовпадением между его последовательностью и его целевой последовательностью степень комплементарности составляет 95%.

Степень комплементарности антисмысловой последовательности предпочтительно является такой, чтобы молекула, содержащая антисмысловую последовательность, могла отжигаться с целевой нуклеотидной последовательностью в молекуле РНК при физиологических условиях, тем самым облегчая пропуск экзона. Специалисту в настоящей области техники хорошо известно, что определенные несовпадения являются более допустимыми, чем другие, поскольку определенные несовпадения характеризуются меньшим эффектом на силу связывания, что выражается в терминах температуры плавления, или T_m , между AON и целевой последовательностью, чем другие. Определенные некомплементарные пары нуклеотидов могут образовывать нестрогие соответствия, которые нарушают общее связывание в меньшей степени, чем настоящие несовпадения. Длина AON также играет роль в силе связывания, при этом более длинные AON характеризуются, как правило, более высокими температурами плавления, чем более короткие AON, и содержание G/C олигонуклеотида также представляет собой фактор, который определяет силу связывания, при этом чем выше содержание G/C, тем выше температура плавления для любой данной длины. Определенные химические модификации нуклеиновых оснований или сахарофосфатного остова, предусмотренные настоящим изобретением, также могут влиять на силу связывания, так что степень комплементарности представляет собой лишь один фактор, который следует учитывать при разра-

ботке олигонуклеотида согласно настоящему изобретению.

Присутствие CpG или множества (двух или больше) CpG в олигонуклеотиде, как правило, связано с увеличенной иммуногенностью указанного олигонуклеотида (Dorn and Kippenberger, 2008). Указанная увеличенная иммуногенность является нежелательной, поскольку она может вызывать повреждение ткани, подлежащей лечению, т.е. глаза.

Настоящее изобретение обеспечивает возможность разработать олигонуклеотид с приемлемой кинетикой связывания и/или термодинамическими свойствами РНК. Кинетику связывания и/или термодинамические свойства РНК, по меньшей мере, частично определяют по температуре плавления олигонуклеотида (T_m ; рассчитанная с помощью калькулятора свойств олигонуклеотида (www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html) для одноцепочечной РНК с использованием основной T_m и моделей ближайших соседей), и/или свободной энергии комплекса AON-целевой экзон (с использованием RNA structure версии 4.5). Если T_m является слишком высокой, предполагают, что олигонуклеотид является менее специфичным. Приемлемая T_m и свободная энергия зависят от последовательности олигонуклеотида, химической структуры остова (сложный фосфодиэфир, фосфоротиоат, фосфорамидат, пептидо-нуклеиновая кислота и т.д.), природы сахарного фрагмента (рибоза, дезоксирибоза, замещенная рибоза, внутримолекулярный мостик) и химической модификации нуклеинового основания. Следовательно, диапазон T_m может широко варьировать.

Согласно настоящему изобретению предусмотрен способ разработки AON согласно настоящему изобретению путем "микропрогулки" по полному скрытому экзону с помощью олигонуклеотидов конкретной длины. Длина олигонуклеотида, выбранного авторами настоящего изобретения, составляла 17 нуклеотидов, но другая длина также возможна. Предпочтительно, чтобы он характеризовался длиной, которая является достаточно длинной, чтобы обеспечить возможность стабильного взаимодействия с целевой РНК и специфичность в отношении целевой последовательности, но не длиннее, чем необходимо, поскольку более длинные олигонуклеотиды являются более дорогостоящими в производстве и более сложными с аналитической точки зрения. Впоследствии полный скрытый экзон или его часть можно исследовать в отношении эффективных обеспечивающих пропуск экзона молекул, создавая серию перекрывающихся олигонуклеотидов, которые исследуют в *in vitro* анализе в отношении их эффективности пропуска экзона, как проиллюстрировано в примерах. Согласно альтернативному подходу скрытый экзон исследуют в отношении потенциальных усиливающих сплайсинг мотивов и разрабатывают спектр AON, направленных на указанные мотивы. AON, которые проявляют удовлетворительную эффективность пропуска экзона, затем дополнительно подвергают селекции на основании выполнимости производства, иммуногенности и других критериев применимости, предусмотренных в настоящем документе.

Также возможна противоположная стратегия. Согласно этой стратегии олигонуклеотиды вначале разрабатывают на основании выполнимости производства, иммуногенности и других критериев применимости, предусмотренных настоящим изобретением, и затем исследуют в отношении эффективности пропуска экзона. Функциональная активность указанного олигонуклеотида заключается предпочтительно в индукции пропуска аберрантного 128-нуклеотидного экзона CEP290 (SEQ ID NO: 1) до определенной степени и/или, по меньшей мере, частично в снижении производства аберрантной мРНК CEP290, тем самым увеличивая производство мРНК CEP290 дикого типа. Согласно предпочтительному варианту осуществления считают, что олигонуклеотид индуцирует пропуск аберрантного 128-нуклеотидного экзона CEP290 (SEQ ID NO: 1), если процентное отношение пропуска аберрантного 128-нуклеотидного экзона CEP290 (SEQ ID NO: 1), как измерено с помощью анализа количественной ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой) в реальном времени, составляет по меньшей мере 30, или по меньшей мере 35, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 45, или по меньшей мере 50, или по меньшей мере 55, или по меньшей мере 60, или по меньшей мере 65, или по меньшей мере 70, или по меньшей мере 75, или по меньшей мере 80, или по меньшей мере 85, или по меньшей мере 90, или по меньшей мере 95, или по меньшей мере 99%.

Процентное отношение пропуска (или эффективность пропуска сайта сплайсинга) можно рассчитать путем определения концентрации амплифицированной полосы дикого типа, деленной на концентрацию амплифицированной мутантной полосы, после заданного количество циклов ПЦР, умножая на 100%, для любого заданного набора праймеров, если число циклов таково, что амплификация все еще находится в экспоненциальной фазе.

Предпочтительные AON согласно настоящему изобретению представляют собой AON, показывающие процентное отношение пропуска, составляющее больше чем 70% в обработанных AON клетках по сравнению с необработанными клетками, более предпочтительно больше чем 80%, еще более предпочтительно больше чем 90%, как измерено с помощью анализа ОТ-ПЦР.

Предпочтительно AON согласно настоящему изобретению, который содержит последовательность, которая является комплементарной нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, является таким, что комплементарная часть является по меньшей мере на 80, более предпочтительно по меньшей мере на 90, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95, наиболее на 100% комплементарной целевой последовательности. Длина указанной комплементарной части указанного олигонуклеотида составляет предпочтительно по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,

25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. Согласно более предпочтительному варианту осуществления длина комплементарной части составляет от приблизительно 12 до приблизительно 25 нуклеотидов, более предпочтительно от 14 до приблизительно 20 нуклеотидов, наиболее предпочтительно 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов. Предпочтительно длина комплементарной части олигонуклеотида представляет собой такую же длину, как и длина олигонуклеотида, что означает, что отсутствуют 5'- или 3'-концы олигонуклеотида, которые не образуют пару нуклеотидов с целевой РНК. Таким образом, предпочтительная длина для олигонуклеотида согласно настоящему изобретению составляет 30 нуклеотидов или меньше, например <25, <20 или 16-19 нуклеотидов.

Таким образом, не является абсолютно необходимым, чтобы все основания в области комплементарности являлись способными к образованию пары с основаниями в противоположной цепи. Например, при разработке олигонуклеотида может потребоваться включить, например, остаток, который не образует пару с основанием на комплементарной цепи. Несоответствия могут быть в некоторой степени разрешены, если при условиях, наблюдаемых в клетке, участок нуклеотидов является в достаточной мере способным к гибридизации с комплементарной частью. В этом контексте "в достаточной мере" означает, что AON согласно настоящему изобретению способны индуцировать пропуск экзона скрытого 128 п.н. экзона. Пропуск целевого (скрытого) экзона можно легко оценить с помощью ОТ-ПЦР. Комплементарные области предпочтительно разрабатывают так, чтобы они при комбинировании являлись специфическими в отношении экзона в пре-иРНК. Такую специфичность можно создать с различными длинами комплементарных областей, поскольку она зависит от фактических последовательностей в других молекулах (пре-)мРНК в системе. Риск того, что олигонуклеотид также будет способен гибридизоваться с одной или несколькими другими молекулами пре-иРНК, снижается с увеличением размера олигонуклеотида. Ясно, что олигонуклеотиды, содержащие несовпадения в области комплементарности, но сохраняющие способность гибридизоваться и/или связываться с целевой(ыми) областью(ями) в пре-иРНК, можно использовать в настоящем изобретении. Тем не менее, по меньшей мере, комплементарные части предпочтительно не содержат такие несовпадения, так как они, как правило, характеризуются повышенной эффективностью и повышенной специфичностью, чем олигонуклеотиды, характеризующиеся такими несовпадениями в одной или нескольких комплементарных областях. Считают, что повышенные силы гибридизации (т.е. увеличенное количество взаимодействий с противоположной цепью) являются благоприятными в увеличении эффективности процесса создания помех аппарату сплайсинга системы. Предпочтительно комплементарность составляет от 90 до 100%. Как правило, это допускает 1 или 2 несовпадения в олигонуклеотиде из 20 нуклеотидов или 1, 2, 3 или 4 несовпадения в олигонуклеотиде из 40 нуклеотидов или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 несовпадений в олигонуклеотиде из 60 нуклеотидов и т.д.

Обеспечивающая пропуск экзона молекула согласно настоящему изобретению представляет собой предпочтительно (антисмысловой) олигонуклеотид, который является комплементарным SEQ ID NO: 1.

Согласно таким вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых обеспечивающая пропуск экзона молекула содержит или состоит из антисмыслового олигонуклеотида, который связывает или является комплементарным по меньшей мере части SEQ ID NO: 1, которая содержит мутацию с.2991+1655A>G, указанная обеспечивающая пропуск экзона молекула предпочтительно содержит нуклеотид "C" в положении, комплементарном мутированному нуклеотиду "G" в SEQ ID NO: 1.

Согласно определенным вариантам осуществления согласно настоящему изобретению предусмотрена обеспечивающая пропуск экзона молекула, содержащая или предпочтительно состоящая из антисмыслового олигонуклеотида, выбранного из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления согласно настоящему изобретению предусмотрена обеспечивающая пропуск экзона молекула, содержащая или предпочтительно состоящая из антисмыслового олигонуклеотида SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 11. Обнаружено, что указанные AON являются очень эффективными в модуляции сплайсинга аберрантного 128-нуклеотидного экзона CEP290, при этом они не содержат G-тетрады, композицию гуанозиновых нуклеиновых оснований, составляющую больше чем 60% (50 или 40%), (больше чем) одну последовательность CpG или последовательности, которые могут образовывать "шпильчатые" структуры, содержащие больше чем 3 последовательно расположенные пары нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам осуществления олигонуклеотид согласно настоящему изобретению не состоит из SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам осуществления олигонуклеотид согласно настоящему изобретению не включает в себя SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам осуществления олигонуклеотид согласно настоящему изобретению не представляет собой РНК, которая состоит из последовательности gcgguaggcscasacuguaa (SEQ ID NO: 33), gggcgcgguaggcscasacugua (SEQ ID NO: 34) или scggguaggcscasacugu (SEQ ID NO: 35).

Обеспечивающая пропуск экзона молекула согласно настоящему изобретению может содержать один или несколько остатков ДНК (следовательно, остаток "и" РНК будет представлять собой остаток "i" в качестве эквивалента ДНК), или один или несколько остатков РНК, и/или один или несколько аналогов или эквивалентов нуклеотидов, что будет подробнее изложено в настоящем документе ниже. SEQ ID

NO: 2-12 представляют собой последовательности РНК, но согласно настоящему изобретению также предусмотрена каждая из указанных последовательностей в форме ДНК, а также ДНК/РНК гибриды указанных последовательностей.

Предпочтительным является то, что обеспечивающая пропуск экзона молекула согласно настоящему изобретению содержит один или несколько остатков, которые являются модифицированными для увеличения устойчивости к нуклеазам и/или для увеличения аффинности антисмыслового олигонуклеотида в отношении целевой последовательности. Следовательно, согласно предпочтительному варианту осуществления антисмысловая нуклеотидная последовательность содержит по меньшей мере один аналог или эквивалент нуклеотида, причем аналог или эквивалент нуклеотида определяют как остаток, характеризующийся модифицированным основанием, и/или модифицированным остовом, и/или не встречающийся в природе межнуклеозидной связью, или комбинацией указанных модификаций.

Согласно предпочтительному варианту осуществления аналог или эквивалент нуклеотида содержит модифицированный остов. Примеры таких остовов представлены следующим: морфолиновые остовы, карбаматные остовы, силоксановые остовы, сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы, форм-ацетиловые и тиоформацетиловые остовы, метиленформацетиловые остовы, рибоацетиловые остовы, содержащие алкен остовы, сульфаматные, сульфонатные и сульфонамидные остовы, метилениминовые и метиленигидразиновые остовы и амидные остовы. Фосфородиамида-морфолиновые олигомеры представляют собой олигонуклеотиды с модифицированным остовом, которые ранее были исследованы как антисмысловые средства. Морфолиновые олигонуклеотиды характеризуются незаряженным остовом, в котором дезоксирибозный сахар ДНК замещен шестичленным кольцом и фосфодиэфирная связь замещена фосфородиамидатной связью. Морфолиновые олигонуклеотиды устойчивы к ферментативному разложению и, как оказалось, функционируют в качестве антисмысловых агентов путем остановки трансляции или создания помех сплайсингу пре-иРНК, а не путем активации РНКазы Н. Морфолиновые олигонуклеотиды были успешно доставлены в клетки тканевой культуры с помощью способов, которые физически разрушают клеточную мембрану, и в одном исследовании, в котором сравнивали некоторые из этих способов, обнаружили, что введение при соскабливании представляло собой наиболее эффективный способ доставки; тем не менее, поскольку морфолиновый остов является незаряженным, катионные липиды не являются эффективными медиаторами поглощения морфолиновых олигонуклеотидов в клетки. Недавно опубликованная статья продемонстрировала образование триплекса морфолиновым олигонуклеотидом, и вследствие неионного остова указанные исследования показали, что морфолиновый олигонуклеотид являлся способным к образованию триплекса при отсутствии магния.

Кроме того, предпочтительно, чтобы связь между остатками в остове не включала в себя атом фосфора, такая как связь, которая образована короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями.

Предпочтительный аналог или эквивалент нуклеотида содержит пептидо-нуклеиновую кислоту (PNA), характеризующуюся модифицированным полиамидным остовом (Nielsen, et al. (1991) Science 254, 1497-1500). Молекулы на основе PNA являются настоящими имитаторами молекул ДНК с точки зрения распознавания пар нуклеотидов. Остов PNA состоит из структурных единиц N-(2-аминоэтил)глицина, соединенных пептидными связями, при этом нуклеиновые основания соединены с остовом с помощью метиленкарбонильных связей. Альтернативный остов содержит удлиненный на один атом углерода мономер пирролидин-PNA (Govindaraju and Kumar (2005) Chem. Commun, 495-497). Поскольку остов молекулы PNA не содержит заряженные фосфатные группы, гибриды PNA-РНК, как правило, являются более стабильными, чем гибриды РНК-РНК или РНК-ДНК соответственно (Egholm et al. (1993) Nature 365, 566-568).

Дополнительный предпочтительный остов содержит аналог или эквивалент морфолинового нуклеотида, в котором сахар рибоза или дезоксирибоза замещены 6-членным морфолиновым кольцом. Наиболее предпочтительный аналог или эквивалент нуклеотида содержит фосфородиамида-морфолиновый олигомер (РМО), в котором сахар рибоза или дезоксирибоза замещены 6-членным морфолиновым кольцом, и анионная фосфодиэфирная связь между соседними морфолиновыми кольцами замещена неионной фосфородиамидатной связью.

Согласно дополнительному варианту осуществления аналог или эквивалент нуклеотида согласно настоящему изобретению содержит замещение одного из атомов кислорода, не участвующих в образовании мостика, в фосфодиэфирной связи. Эта модификация слегка дестабилизирует спаривание оснований, но добавляет существенную устойчивость к разложению нуклеазами. Предпочтительный аналог или эквивалент нуклеотида содержит фосфоротиоат, хиральный фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфотриэфир, аминоклфосфотриэфир, Н-фосфонат, метил и другой алкилфосфонат, включая в себя 3'-алкиленфосфонат, 5'-алкиленфосфонат и хиральный фосфонат, фосфинат, фосфорамидат, включая в себя 3'-аминофосфорамидат и аминоклфосфорамидат, тионофосфорамидат, тионоалкилфосфонат, тионоалкилфосфотриэфир, селенофосфат или боранофосфат.

Дополнительный предпочтительный аналог или эквивалент нуклеотида согласно настоящему изобретению

бретению содержит один или несколько фрагментов сахара, которые являются моно- или дизамещенными в 2', 3' и/или 5' положении, такие как -ОН; -F; замещенный или незамещенный, неразветвленный или разветвленный низший (C_1 - C_{10}) алкил, алкенил, алкинил, алкарил, аллил или аралкил, который может являться прерванным одним или несколькими гетероатомами; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; O-, S- или N-аллил; O-алкил-O-алкил, -метокси, -аминопропокси; метоксиэтокси; -диметиламинооксиэтокси; и диметиламиноэтоксиэтокси. Фрагмент сахара может представлять собой фуранозу или ее производное, или дезоксифуранозу или ее производное, предпочтительно рибозу или ее производное, или дезоксирибозу или ее производное. Предпочтительный дериватизированный фрагмент сахара содержит закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), в которой 2' атом углерода соединен с 3' или 4' атомом углерода кольца сахара, тем самым образуя бициклический фрагмент сахара. Предпочтительная LNA содержит соединенную 2'-O,4'-C-этиленовым мостиком нуклеиновую кислоту (Morita et al. 2001. *Nucleic Acid Res Supplement* No. 1: 241-242). Указанные замещения делают аналог или эквивалент нуклеотида устойчивым к РНКазе H и нуклеазе и увеличивают аффинность в отношении целевой РНК.

Согласно другому варианту осуществления аналог или эквивалент нуклеотида согласно настоящему изобретению содержит один или несколько модификаций или замещений оснований. Модифицированные основания содержат синтетические и природные основания, такие как инозин, ксантин, гипоксантин и другие -аза, деаза, -гидрокси, -гало-, -тио-, тиольные, -алкил-, -алкенил-, -алкинил-, тиоалкильные производные пиримидиновых и пуриновых оснований, которые известны или станут известными в настоящей области техники.

Специалисту в настоящей области техники понятно, что не обязательно, чтобы все положения в антисмысловом олигонуклеотиде были модифицированы одинаково. Кроме того, больше чем один из вышеупомянутых аналогов или эквивалентов можно встроить в один антисмысловой олигонуклеотид или даже в одно положение в пределах антисмыслового олигонуклеотида. Согласно определенным вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере два различных типа аналогов или эквивалентов.

Согласно другому варианту осуществления AON согласно настоящему изобретению содержат 2'-O(предпочтительно низший)алкилфосфотиоатный антисмысловой олигонуклеотид, такой как модифицированная 2'-O-метилом рибоза (RNA), модифицированная 2'-O-метоксиэтилом рибоза, модифицированная 2'-O-этилом рибоза, модифицированная 2'-O-пропилом рибоза, и/или замещенные производные указанных модификаций, такие как галогенированные производные.

Эффективный и предпочтительный антисмысловой олигонуклеотид согласно настоящему изобретению содержит фрагменты модифицированной 2'-O-метилом рибозы с фосфотиоатным остовом, предпочтительно при этом по существу все фрагменты рибозы являются модифицированными 2'-O-метилом и по существу все межнуклеозидные связи представляют собой фосфотиоатные связи.

Кроме того, специалисту в настоящей области техники понятно, что различные антисмысловые олигонуклеотиды можно комбинировать для эффективного пропуска аберрантного 128-нуклеотидного экзона СЕР290. Комбинацию двух антисмысловых олигонуклеотидов можно использовать в способе согласно настоящему изобретению, например двух антисмысловых олигонуклеотидов или пяти различных антисмысловых олигонуклеотидов, четырех различных антисмысловых олигонуклеотидов или пяти различных антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленно воздействующих на одну и ту же или различные области скрытого экзона (фиг. 1).

Антисмысловой олигонуклеотид можно соединить с фрагментом, который усиливает поглощение антисмыслового олигонуклеотида в клетках, предпочтительно клетках сетчатки. Примеры таких фрагментов представляют собой следующее: холестерин, углеводы, витамины, биотин, липиды, фосфолипиды, проникающие в клетку пептиды, включая в себя без ограничения Antennapedia, TAT, транспортан и положительно заряженные аминокислоты, такие как олигоаргинин, полиаргинин, олиголизин или полилизин, антигенсвязывающие домены, такие как обеспеченные антителом, Fab-фрагмент антитела или одноцепочечный антигенсвязывающий домен, такой как верблужий одноцепочечный антигенсвязывающий домен.

Обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению можно вводить опосредованно с использованием подходящих средств, известных в настоящей области техники. Если обеспечивающая пропуск экзона молекула представляет собой олигонуклеотид, ее можно, например, доставить в организм индивидуума или в клетку, ткань или орган указанного индивидуума в форме экспрессионного вектора, причем экспрессионный вектор кодирует транскрипт, содержащий указанный олигонуклеотид. Экспрессионный вектор предпочтительно вводят в клетку, ткань, орган или организм индивидуума посредством носителя для доставки генов. Согласно предпочтительному варианту осуществления предусмотрен экспрессионный вектор на основе вируса, содержащий экспрессионную кассету или транскрипционную кассету, которая управляет экспрессией или транскрипцией обеспечивающей пропуск экзона молекулы, идентифицированной в настоящем документе. Соответственно согласно настоящему изобретению предусмотрен вирусный вектор, экспрессирующий обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению, будучи помещенным в условия, способствующие экспрессии обеспечивающей пропуск экзона молекулы. В клетку можно доставить обеспечивающую

пропуск экзона молекулу, способную создать помехи для критически важных последовательностей, что приводит к высокоэффективному пропуску aberrантного 128-нуклеотидного экзона CER290 с помощью управляемой плазмидой экспрессии антисмыслового олигонуклеотида или вирусной экспрессии, обеспеченной векторами на основе аденовируса или аденоассоциированного вируса. Экспрессией может управлять промотор полимеразы III, такой как РНК-промотор U1, U6 или U7. Предпочтительный носитель для доставки представляет собой вирусный вектор, такой как вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), или ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор и подобное. Кроме того, плазмиды, искусственные хромосомы, плазмиды, применимые для нацеленной гомологичной рекомбинации и интеграции в геном клеток человека, можно подходящим образом применять для доставки олигонуклеотида, как определено в настоящем документе. Предпочтительными для настоящего изобретения являются те векторы, в которых транскрипцией управляют промоторы Pol III и/или в которых транскрипты находятся в форме слияний с транскриптами U1 или U7, которые дают на выходе хорошие результаты для доставки небольших транскриптов. Разработка подходящих транскриптов находится в пределах навыков специалиста в настоящей области. Предпочтительными являются управляемые Pol III транскрипты. Предпочтительно в форме транскрипта слияния с транскриптом U1 или U7. Такие слияния можно получить, как описано (Gorman L et al., 1998 или Suter D et al., 1999).

Одна предпочтительная экспрессионная система антисмыслового олигонуклеотида представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Были разработаны одноцепочечные и двухцепочечные векторы на основе AAV, которые можно использовать для пролонгированной экспрессии небольших антисмысловых нуклеотидных последовательностей для высокоэффективного пропуска aberrантного 128-нуклеотидного экзона CER290.

Предпочтительный вектор на основе AAV, например, содержит экспрессионную кассету, которой управляет промотор полимеразы III (Pol III). Предпочтительный промотор Pol III представляет собой, например, РНК-промотор U1, U6 или U7.

Следовательно, согласно настоящему изобретению также предусмотрен вектор на основе вируса, содержащий управляемую промотором Pol III экспрессионную кассету для экспрессии антисмыслового олигонуклеотида согласно настоящему изобретению для индукции пропуска aberrантного 128-нуклеотидного экзона CER290.

AAV вектор согласно настоящему изобретению представляет собой рекомбинантный AAV вектор и относится к AAV вектору, содержащему часть генома AAV, содержащую кодированную обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению, заключенную в белковую оболочку капсидного белка, полученного из серотипа AAV, как указано в другом месте настоящего документа. Часть генома AAV может содержать инвертированные концевые повторы (ITR), полученные из такого серотипа аденоассоциированного вируса, как AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9 и другие. Белковую оболочку, состоящую из капсидного белка, можно получить из такого серотипа AAV, как AAV1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 и другие. Белковая оболочка также может носить название белковая оболочка капсида. У AAV вектора один или предпочтительно все гены AAV дикого типа могут быть подвергнуты делеции, но он может все еще содержать функциональные последовательности нуклеиновой кислоты ITR. Функциональные последовательности ITR необходимы для репликации, сохранения и упаковку вирионов AAV. Последовательности ITR могут представлять собой последовательности дикого типа или могут характеризоваться по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 100% идентичностью последовательности относительно последовательностей дикого типа или могут являться измененными с помощью, например, вставки, мутации, делеции или замены нуклеотидов, при условии, что они остаются функциональными. В этом контексте, функциональность относится к способности к прямой упаковке генома в оболочку капсида и затем обеспечению возможности экспрессии в клетке-хозяине, подлежащей инфицированию, или целевой клетке. В контексте настоящего изобретения белковая оболочка капсида может происходить из другого серотипа, чем ITR генома AAV вектора. AAV вектор согласно настоящему изобретению, таким образом, может состоять из белковой оболочки капсида, т.е. икосаэдрического капсида, который содержит капсидные белки (VP1, VP2, и/или VP3) одного серотипа AAV, например серотипа 2 AAV, тогда как последовательности ITR, содержащиеся в этом векторе AAV5, могут относиться к любому из серотипов AAV, описанных выше, включая в себя вектор AAV2. "Вектор AAV2", таким образом, содержит белковую оболочку капсида серотипа 2 AAV, тогда как, например, "вектор AAV5" содержит белковую оболочку капсида серотипа 5 AAV, вследствие чего любой может заключать в капсид любой ITR генома AAV вектора согласно настоящему изобретению.

Предпочтительно рекомбинантный AAV вектор согласно настоящему изобретению содержит белковую оболочку капсида серотипа 2, 5, 8 AAV или серотипа 9 AAV, причем геном AAV или ITR, присутствующие в указанном AAV векторе, происходят из серотипа 2, 5, 8 AAV или серотипа 9 AAV; такой AAV вектор носит название вектор AAV2/2, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/9, AAV5/2, AAV5/5, AAV5/8, AAV5/9, AAV8/2, AAV8/5, AAV8/8, AAV8/9, AAV9/2, AAV9/5, AAV9/8 или AAV9/9.

Более предпочтительно рекомбинантный AAV вектор согласно настоящему изобретению содержит белковую оболочку капсида серотипа 2 AAV, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном векторе, происходят из серотипа 5 AAV; такой вектор носит название вектор AAV2/5.

Более предпочтительно рекомбинантный AAV вектор согласно настоящему изобретению содержит белковую оболочку капсида серотипа 2 AAV, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном векторе, происходят из серотипа 8 AAV; такой вектор носит название вектор AAV2/8.

Более предпочтительно рекомбинантный AAV вектор согласно настоящему изобретению содержит белковую оболочку капсида серотипа 2 AAV, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном векторе, происходят из серотипа 9 AAV; такой вектор носит название вектор AAV2/9.

Более предпочтительно рекомбинантный AAV вектор согласно настоящему изобретению содержит белковую оболочку капсида серотипа 2 AAV, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном векторе, происходят из серотипа 2 AAV; такой вектор носит название вектор AAV2/2.

Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению, представленную предпочтительной последовательностью нуклеиновой кислоты, предпочтительно вводят между геномом AAV или последовательностями ITR, идентифицированными выше, например экспрессионный конструкт, содержащий экспрессионный регуляторный элемент, функционально соединенный с кодирующей последовательностью и 3' терминирующей последовательностью.

Термин "вспомогательные функции AAV", как правило, относится к соответствующим функциям AAV, необходимым для репликации и упаковки AAV, которые доставляют на AAV вектор *in trans*. Вспомогательные функции AAV дополняют функции AAV, которые являются утраченными в AAV векторе, но они не содержат ITR AAV (которые обеспечены геномом AAV вектора). Вспомогательные функции AAV включают в себя две главных ORF AAV, а именно, кодирующую гер область и кодирующую сар область или функциональные по существу идентичные им последовательности. Области Rep и Cap хорошо известны в настоящей области техники, см., например, Chiorini et al. (1999, J. of Virology, Vol 73(2): 1309-1319) или патент США № 5139941, включенные в настоящий документ посредством ссылки. Вспомогательные функции AAV можно доставить на хелперном AAV конструкте, который может представлять собой плазмиду. Введение хелперного конструкта в клетку-хозяина может происходить, например, путем трансформации, трансфекции или трансдукции перед или одновременно с введением генома AAV, присутствующего в AAV векторе, идентифицированном в настоящем документе. Хелперные AAV конструкты согласно настоящему изобретению, таким образом, можно выбрать так, чтобы они производили требуемую комбинацию серотипов для белковой оболочки капсида AAV вектора, с одной стороны, и для генома AAV, присутствующего в репликации и упаковке указанного AAV вектора, в другой стороны.

"Хелперный вирус AAV" обеспечивает дополнительные функции, необходимые для репликации и упаковки AAV. Подходящие хелперные вирусы AAV включают в себя аденовирусы, вирусы простого герпеса (такие как типы 1 и 2HSV) и вирусы осповакцины. Дополнительные функции, обеспечиваемые хелперным вирусом, также можно ввести в клетку-хозяина посредством векторов, как описано в патенте США № 6531456, включенном в настоящий документ посредством ссылки.

Предпочтительно геном AAV, как присутствующий в рекомбинантном AAV векторе согласно настоящему изобретению, не содержит какие-либо нуклеотидные последовательности, кодирующие вирусные белки, такие как гены гер (репликация) или сар (капсид) AAV. Геном AAV может дополнительно содержать маркерный или репортерный ген, такой как ген, например кодирующий ген устойчивости к антибиотику, флуоресцентный белок (например, gfp) или ген, кодирующий химически, ферментативно или иным образом обнаруживаемый и/или селективируемый продукт (например, lacZ, aph и т.д.), известный в настоящей области техники.

Предпочтительный AAV вектор согласно настоящему изобретению представляет собой AAV вектор, предпочтительно вектор AAV2/5, AAV2/8, AAV2/9 или AAV2/2, экспрессирующий обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению, содержащую антисмысловой олигонуклеотид, причем указанный антисмысловой олигонуклеотид содержит или состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12.

Учитывая прогресс, который уже был достигнут к настоящему времени, ожидаются улучшения в средствах обеспечения индивидуума или клетки, ткани, органа указанного индивидуума обеспечивающей пропуск экзона молекулой согласно настоящему изобретению. Разумеется, такие будущие улучшения можно включить для достижения упомянутого эффекта на реструктуризацию мРНК с использованием способа согласно настоящему изобретению. Обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению можно доставить в исходном виде в организм индивидуума, клетку, ткань или орган указанного индивидуума. При введении обеспечивающей пропуск экзона молекулы согласно настоящему изобретению предпочтительно, чтобы молекула являлась растворенной в растворе, который является совместимым со способом доставки. В клетки сетчатки можно доставить плазмиду для экспрессии антисмыслового олигонуклеотида путем обеспечения плазмиды в водном растворе. Альтернативно, плазмиду можно доставить с помощью трансфекции с использованием известных трансфекционных средств. Для внутривенного, подкожного, внутримышечного, интратекального и/или интравентрикуляр-

ного введения предпочтительно, чтобы раствор представлял собой физиологический солевой раствор. Особенно предпочтительным согласно настоящему изобретению является применение вспомогательного вещества или трансфекционных средств, которые будут содействовать доставке каждого из компонентов, определенных в настоящем документе, к клетке и/или в клетку, предпочтительно клетку сетчатки. Предпочтительными являются вспомогательные вещества или трансфекционные средства, способные образовывать комплексы, наночастицы, мицеллы, носители и/или липосомы, которые доставляют каждый компонент, определенный в настоящем документе, находящийся в составе комплекса или внутри везикулы или липосомы, через клеточную мембрану. Многие из указанных вспомогательных веществ известны в настоящей области техники. Подходящие вспомогательные вещества или трансфекционные средства содержат полиэтиленимин (PEI; ExGen500 (MBI Fermentas)), LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen) или их производные, или сходные катионные полимеры, включая в себя полипропилиенимин или сополимеры полиэтиленимина (ПЕС) и производные, синтетические амфифилы (SAINT-18), липофектин™, DOTAP и/или вирусные капсидные белки, которые способны к самосборке в частицы, которые могут доставлять каждый компонент, определенный в настоящем документе, к клетке, предпочтительно клетке сетчатки. Было показано, что такие вспомогательные вещества эффективно доставляют олигонуклеотид, такой как антисмысловые нуклеиновые кислоты к широкому спектру культивируемых клеток, включая в себя клетки сетчатки. Их высокий трансфекционный потенциал комбинируют с предполагаемой низкой - умеренной токсичностью с точки зрения общей выживаемости клеток. Простоту структурной модификации можно использовать для обеспечения дополнительных модификаций и анализа их дополнительных характеристик (in vivo) переноса нуклеиновой кислоты и токсичности.

Липофектин представляет собой пример липосомного трансфекционного средства. Он состоит из двух липидных компонентов, катионного липида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмонийхлорид (DOTMA) (по сравнению с DOTAP, который представляет собой метилсульфатную соль) и нейтрального липида диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE). Нейтральный компонент опосредует внутриклеточное высвобождение. Другая группа систем доставки представляет собой полимерные наночастицы.

Такие поликатионы, как диэтиламиноэтиламиноэтил (DEAE)-декстран, которые хорошо известны как реагент для трансфекции ДНК, можно комбинировать с бутилцианоакрилатом (BCA) и гексилцианоакрилатом (HCA) для составления катионных наночастиц, которые могут доставлять каждый компонент, определенный в настоящем документе, предпочтительно олигонуклеотид, через клеточные мембраны в клетки.

В дополнение к указанным распространенным материалам наночастиц, катионный пептид протамин обеспечивает альтернативный подход к составлению олигонуклеотида с коллоидами. Указанная система коллоидных наночастиц может образовывать наночастицы на основе протамин (так называемые "proticle"), которые можно получить с помощью процесса простой самосборки, чтобы упаковать и опосредовать внутриклеточное высвобождение олигонуклеотида. Специалист в настоящей области техники может выбрать и адаптировать любое из указанных выше или другие коммерчески доступные альтернативные вспомогательные вещества и системы доставки для упаковки и доставки обеспечивающей пропуск экзона молекулы для применения в настоящем изобретении для ее доставки для профилактики, лечения или задержки возникновения связанного с CER290 заболевания или состояния. "Профилактику, лечение или задержку возникновения связанного с CER290 заболевания или состояния" в настоящем документе предпочтительно определяют как предотвращение, остановку, прекращение прогрессирования или обратное развитие частичного или полного нарушения зрения или слепоты, которые вызваны генетическим дефектом в гене CER290.

Кроме того, обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению можно ковалентно или нековалентно соединить с нацеленно действующим лигандом, специально разработанным для облегчения поглощения в клетку, цитоплазму и/или ее ядро. Такой лиганд может содержать (i) соединение (включая в себя без ограничения пептид(-подобные) структуры), распознающие клетку, ткань или орган специфические элементы, облегчающие клеточное поглощение и/или (ii) химическое соединение, способное облегчить поглощение в клетки и/или внутриклеточное высвобождение олигонуклеотида из везикул, например эндосом или лизосом.

Следовательно, согласно предпочтительному варианту осуществления обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению вводят в состав композиции или лекарственного средства или композиции, которая обеспечена, по меньшей мере, вспомогательным веществом и/или нацеленно действующим лигандом для доставки и/или устройством для ее доставки к клетке и/или усиления ее внутриклеточной доставки.

Следует понимать, что, если композиция содержит дополнительный компонент, такой как вспомогательное соединение, как определено ниже в настоящем документе, каждый компонент композиции может быть необязательно составлен в одной отдельной комбинации или композиции или препарате. В зависимости от их идентичности, специалист в настоящей области техники будет знать, какой тип состава является наиболее подходящим для каждого компонента, определенного в настоящем документе. Со-

гласно предпочтительному варианту осуществления согласно настоящему изобретению предусмотрена композиция или препарат, которые находятся в форме набора частей, содержащих обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению и дополнительное вспомогательное соединение, как определено ниже в настоящем документе.

При необходимости обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению или вектор, предпочтительно вирусный вектор, экспрессирующий обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению, можно ввести в фармацевтически активную смесь путем добавления фармацевтически приемлемого носителя.

Соответственно согласно настоящему изобретению также предусмотрена композиция, предпочтительно фармацевтическая композиция, содержащая обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению или вирусный вектор согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Такая композиция может содержать единственную обеспечивающую пропуск экзона молекулу согласно настоящему изобретению, но может также содержать многочисленные, различные обеспечивающие пропуск экзона молекулы согласно настоящему изобретению. Такая фармацевтическая композиция может содержать любое фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, включая в себя носитель, наполнитель, консервант, адъювант, солюбилизатор и/или разбавитель. Такой фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель, консервант, адъювант, солюбилизатор и/или разбавитель можно найти, например, в Remington, 2000. Каждый признак указанной композиции был определен ранее в настоящем документе.

Если используют многочисленные, различные обеспечивающие пропуск экзона молекулы согласно настоящему изобретению, концентрация или доза, определенные в настоящем документе, могут относиться к общей концентрации или дозе всех используемых олигонуклеотидов или к концентрации или дозе каждой используемой или добавленной обеспечивающей пропуск экзона молекулы. Следовательно, согласно одному варианту осуществления предусмотрена композиция, в которой каждую или общее количество используемых обеспечивающих пропуск экзона молекул согласно настоящему изобретению дозируют в количестве в диапазоне от 0,0001 до 20 мг/кг, предпочтительно от 0,01 до 20 мг/кг.

Предпочтительная обеспечивающая пропуск экзона молекула согласно настоящему изобретению предусмотрена для лечения связанного с CER290 заболевания или состояния индивидуума. Согласно всем вариантам осуществления настоящего изобретения термин "лечение" понимают как включающий в себя профилактику и/или задержку возникновения связанного с CER290 заболевания или состояния. Индивидуум, которого можно лечить с использованием обеспечивающей пропуск экзона молекулы согласно настоящему изобретению, может быть к настоящему моменту диагностирован как характеризующийся наличием связанного с CER290 заболевания или состояния. Альтернативно, индивидуум, которого можно лечить с использованием обеспечивающей пропуск экзона молекулы согласно настоящему изобретению, возможно, еще не был диагностирован как характеризующийся связанным с CER290 заболеванием или состоянием, но может представлять собой индивидуума, характеризующегося повышенным риском развития связанного с CER290 заболевания или состояния в будущем, учитывая его или ее генетический фон. Предпочтительный индивидуум представляет собой человека. Согласно предпочтительному варианту осуществления связанное с CER290 заболевание или состояние представляет собой врожденный амавроз Лебера.

Соответственно согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрена обеспечивающая пропуск экзона молекула согласно настоящему изобретению, или вирусный вектор согласно настоящему изобретению, или композиция согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства, для лечения связанного с CER290 заболевания или состояния, требующего модуляции сплайсинга CER290, и для применения в качестве лекарственного средства для профилактики, лечения или задержки возникновения связанного с CER290 заболевания или состояния. Предпочтительное связанное с CER290 заболевание или состояние представляет собой врожденный амавроз Лебера. Каждый признак указанного применения определен ранее в настоящем документе.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено применение обеспечивающей пропуск экзона молекулы согласно настоящему изобретению, или вирусного вектора согласно настоящему изобретению, или композиции согласно настоящему изобретению для лечения связанного с CER290 заболевания или состояния, требующего модуляции сплайсинга CER290. Согласно предпочтительному варианту осуществления связанное с CER290 заболевание или состояние представляет собой врожденный амавроз Лебера.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрена обеспечивающая пропуск экзона молекула согласно настоящему изобретению, или вирусный вектор согласно настоящему изобретению, или композиция согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрен способ лечения человека, несущего в своем геноме мутацию в интроне 26 гена CER290 (с. 2991+1655A>G), предусматривающий введение человеку AON, вирусного вектора или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Указанные пациенты могут страдать от врожденного амавроза Лебера.

Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения представляют собой AON, ви-

русные векторы, кодирующие AON, и фармацевтические композиции, содержащие AON согласно настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства для лечения человека, несущего в своем геноме мутацию в интроне 26 гена CER290 (с. 2991+1655A>G).

Согласно дополнительному варианту осуществления настоящего изобретения предусмотрен *in vitro* и/или *ex vivo* способ модуляции сплайсинга CER290 в клетке, причем указанный способ предусматривает контакт указанной клетки с олигонуклеотидом, вирусным вектором, кодирующим олигонуклеотид, или фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению.

Обеспечивающие пропуск экзона молекулы согласно настоящему изобретению можно вводить пациенту системно, локально, местно, посредством такого введения, как оральное, интраокулярное, интраплевральное, интраназальное, внутримышечное, подкожное, интрадермальное, ректальное, путем проглатывания, инъекции, ингаляции, инфузии, распыления, в форме (водных) растворов, суспензий, (масло-в-воде) эмульсий, мазей, леденцов, драже и т.д. Предпочтительный путь введения заключается в интравитреальной инъекции водного раствора или специально разработанного состава для внутриглазного введения. Например, в европейском патенте EP 2425814 раскрыта эмульсия масло-в-воде, специально разработанная для внутриглазного (интравитреального) введения пептидных или нуклеиновокислотных лекарственных средств. Указанная эмульсия является менее плотной, чем стекловидная жидкость, поэтому она плавает поверх стекловидного тела, избегая ухудшения зрения за счет инъекционного лекарственного средства.

Введение доз можно осуществлять ежедневно, раз в неделю, раз в месяц, раз в квартал, один раз в год в зависимости от пути введения и потребности пациента.

Вследствие раннего начала заболевания пациенты, характеризующиеся LCA или риском развития симптомов LCA, включая в себя детскую слепоту, могут получать лечение внутритрубно, непосредственно после рождения, начиная с возраста 1, 2, 3, 6 месяцев, начиная с возраста одного года, начиная с возраста 3 лет, начиная с возраста 5 лет, перед или после появления симптомов, чтобы облегчить, задержать развитие, остановить или вызвать обратное развитие симптомов заболевания и подобное.

Лечение в применении или в способе согласно настоящему изобретению 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 в течение всей жизни пациента. Каждая обеспечивающая пропуск экзона молекула или обеспечивающий пропуск экзона олигонуклеотид или его эквивалент согласно представленному в настоящем документе определению для применения согласно настоящему изобретению могут являться подходящими для прямого введения в клетку, ткань и/или орган *in vivo* индивидуумам, уже пораженным или характеризующихся риском развития связанного с CER290 заболевания или состояния, и их можно вводить напрямую *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Частота введения олигонуклеотида, композиции, соединения или вспомогательного соединения согласно настоящему изобретению может зависеть от некоторых параметров, таких как возраст пациента, природа обеспечивающей пропуск экзона молекулы (например, "голый" AON или находящийся в векторе AON, такие как экспрессируемые в AAV или лентивирусном векторе AON), доза, состав указанной молекулы и подобное.

Диапазон доз обеспечивающей пропуск экзона молекулы, предпочтительно олигонуклеотида согласно настоящему изобретению предпочтительно разрабатывают на основе исследований с возрастающими дозами в клинических испытаниях (*in vivo* применение), для которых существуют строгие требования протокола. Олигонуклеотид согласно представленному в настоящем документе определению можно использовать в диапазоне доз, составляющем от 0,0001 до 20 мг/кг, предпочтительно от 0,001 до 20 мг/кг. Доза и схема лечения могут варьировать в широких пределах в зависимости от многих факторов, включая в себя без ограничения путь введения (например, системный или местный, такой как напрямую в глаз), тот факт, вводят ли олигонуклеотид в виде "голового" AON, или в виде находящегося в векторе AON, режим введения доз, возраст и массу тела пациента и т.д.

Согласно предпочтительному варианту осуществления вирусный вектор, предпочтительно AAV вектор, описанный ранее в настоящем документе, в виде носителя для доставки молекулы согласно настоящему изобретению, вводят в дозе в диапазоне, составляющем 1×10^9 - 1×10^{17} вирусных частиц на инъекцию, более предпочтительно 1×10^{10} - 1×10^{14} и наиболее предпочтительно 1×10^{10} - 1×10^{12} вирусных частиц на инъекцию.

Специалисту в настоящей области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение, будет ясно, что подробности лечения будет необходимо установить в соответствии и в зависимости от таких факторов, как последовательность и химический состав олигонуклеотида(ов), путь введения, состав, доза, режим введения доз, формат (вирусный вектор или "голый" олигонуклеотид), возраст и масса тела пациента, стадия заболевания и т.п., которые могут требовать дополнительного неклинического и клинического исследования.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрен способ модуляции сплайсинга CER290 в клетке, предусматривающий контакт клетки, предпочтительно клетки сетчатки, с обеспечивающей пропуск экзона молекулой согласно настоящему изобретению, или вирусным вектором согласно настоящему изобретению, или композицией согласно настоящему изобретению. Признаки настоящего

аспекта предпочтительно являются такими, как определены ранее в настоящем документе. Контакт клетки с обеспечивающей пропуск экзона молекулой согласно настоящему изобретению, или вирусным вектором согласно настоящему изобретению, или композицией согласно настоящему изобретению можно провести с помощью любого способа, известного специалисту в настоящей области техники. Предусмотрено применение способов доставки обеспечивающих пропуск экзона молекул, вирусных векторов и композиций, описанных в настоящем документе. Контакт можно осуществить напрямую или опосредованно и можно осуществить *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*.

Если не указано иное, каждый вариант осуществления, описанный в настоящем документе, можно комбинировать с другим вариантом осуществления, описанным в настоящем документе.

Способность олигонуклеотида снижать выбор в качестве сайта сплайсинга аберрантного сайта сплайсинга, ассоциированного с мутацией с.2991+1655A>G в интроне 26 гена CEP290 человека, если указанный ген экспрессируется в клетке человека, и связываться с пре-мРНК CEP290 человека при физиологических условиях в области, влияющей на выбор аберрантного сайта сплайсинга, и тем самым снижать выбор аберрантного сайта сплайсинга клеточным аппаратом сплайсинга, можно легко оценить с использованием анализов, раскрытых в экспериментальной части в настоящем документе. В частности, олигонуклеотид можно инкубировать с клеткой, содержащей мутацию с.2991+1655A>G, и ее способность снижать производство клеткой мРНК, которая включает в себя аберрантный экзон, можно оценить, например, с помощью ОТ-ПЦР.

Как можно наблюдать в экспериментальной части в настоящем документе, на уровне РНК, добавление различных AON, нацеленно воздействующих на аберрантный экзон CEP290, действительно приводило к превращению аберрантно сплайсированной мРНК CEP290 в правильно сплайсированную мРНК CEP290. Это превращение будет совпадать с увеличенным синтезом белка CEP290 дикого типа.

В фибробластах (которые можно получить из клеток кожи) CEP290 экспрессируется в большом количестве. Следовательно, следует ожидать, что добавление AON к культивируемым фибробластам от пациентов с LCA будет приводить к увеличенному количеству белка CEP290 дикого типа, что можно обнаружить на вестерн-блоттинге, и, таким образом, продемонстрирует, что терапия на основе AON будет не только переориентировать сплайсинг мРНК CEP290 в нормальный, но также будет приводить к восстановлению функции белка CEP290.

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

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

Термин "нуклеозид" относится к нуклеиновому основанию, соединенному с (дезоксир)рибозильным сахаром.

В настоящем документе и в настоящей формуле изобретения глагол "содержать" и его спряжения используют в его неограничивающем смысле для обозначения того, что признаки, следующие за словом, включены, но не исключены признаки, не упомянутые конкретно. Кроме того, ссылка на элемент в единственном числе не исключает возможности наличия более одного элемента, если только контекст явно не требует наличия одного и только одного из элементов. Форма единственного числа, таким образом, как правило, означает "по меньшей мере один".

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

Предоставленная в настоящем документе информация о последовательностях не должна быть настолько узко истолкована, что требует включения ошибочно идентифицированных оснований. Специалист в настоящей области техники способен идентифицировать такие ошибочно идентифицированные основания и знает, как исправить такие ошибки. В случае ошибок в последовательности последовательность полипептида, получаемого путем экспрессии гена, представленного в SEQ ID NO: 1, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, должна иметь приоритетное значение.

Материалы и методы.

1. Клетки.

Все клеточные линии представляют собой фибробласты человека, полученные из кожных биоптатов. LFB1 (CL10-00008) и LFB2 (CL12-00027) относятся к дикому типу и представляют контрольные клеточные линии, как LFB3 (CL12-00035), так и LFB4 (CL12-00036) являются гомозиготными мутантами в отношении мутации в CEP290 (с.2991+1655A>G).

2. AON.

AON разрабатывали с использованием подхода "прогулка по гену", в котором 17-мерные AON разрабатывают, чтобы перекрыть скрытый 128 п.н. экзон, с перекрывающейся областью между AON, составляющими приблизительно 10 п.н. в длину. Разработанные РНК AON, с 2'-О-метилфосфоротиоатной химической структурой, получали от Integrated ДНК Technologies (IDT).

3. Культивирование клеток и трансфекция.

Все клеточные линии выращивали в среде DMEM-AQE (Sigma), дополненной 20% FBS и 1% пируватом натрия. За день до трансфекции клетки высевали с плотностью, составляющей 2×10^5 клеток/лунка, на 6-луночный планшет в общем объеме, составляющем 2,5 мл среды. В день трансфекции AON, подлежащий исследованию, добавляли к каждой лунке в конечной концентрации, составляющей 100 нМ, с использованием maxPEI (Polysciences) в качестве трансфекционного средства (все в PBS), с массовым отношением олигонуклеотид: maxPEI, составляющим 1:4. Через 24 ч клетки отмывали с помощью PBS и клеточный лизат собирали с использованием буфера BL+TG, дополненного с помощью набора ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega). Клеточные лизаты замораживали при -80°C до последующего применения.

4. Определение профилей CER290 дикого типа и мутированного CER290 в образцах.

а) Выделение РНК: РНК выделяли из клеточных лизатов, которые хранили при -80°C , с использованием набора ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) согласно протоколу производителя. Общую РНК количественно определяли с использованием спектрофотометра Nanodrop 2000 (Nanodrop Technologies) перед ее хранением при -80°C .

б) Синтез кДНК: 400 нг РНК использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК с использованием набора для синтеза кДНК Verso (Thermoscientific) с праймерами oligodT согласно инструкциям производителя. Не-ОТ образец (без фермента) включали в качестве контроля и анализировали вместе с остальными образцами.

в) ПЦР: для визуализации и количественного определения различных профилей мРНК CER290, присутствующей в образцах фрагмент мРНК CER290, включающий в себя экзон 26-экзон 27, специально амплифицировали с использованием ПНР. Для этой цели кДНК (2 мкл разведения в 2,5 раза) использовали в качестве матрицы и амплификацию целевой последовательности проводили с использованием следующих праймеров:

ex26_Fw: 5'-TGCTAAGTACAGGGACATCTTGC-3' (SEQ ID NO: 23)

ex27_Rv: 5'-AGACTCCACTTGTCTTTTAAGGAG-3' (SEQ ID NO: 24).

Реакцию проводили с использованием ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® 360 (Life technologies; № по кат.: 4398833).

Программа		
ПЦР		
выдержать	5 мин	95°C
денатурировать	30 с	95°C
отжечь	30 с	58°C
удлинить	35 с	72°C
конечное		
удлинение	7 мин	72°C
выдержать	неограниченно	4°C

35 циклов

Фрагменты ПЦР анализировали с использованием Bioanalyzer 2100 (набор DNA 1000, Agilent Technologies). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения 2100 Expert (Agilent Technologies).

д) ОТ-кПЦР: для измерения уровня экспрессии мРНК CER290 транскрипты дикого типа и мутантные транскрипты амплифицировали в виде 93 и 117 п.н. фрагментов соответственно. мРНК большого рибосомного белка Р0 человека (RPLP0) использовали для нормирования. Для этого кДНК (2 мкл 10× разведения) амплифицировали в буфере для кПЦР (18 мкл), содержащем мастер-микс SYBR select (Life Technologies) и 400 нМ прямых и обратных праймеров (SEQ ID NO: 25-28). Система, используемая для амплификации, представляла собой систему детекции ПЦР в реальном времени CFX96 (BioRad), и условия являлись следующими: стадия активации UDG при 50°C в течение 2 мин, далее первая стадия денатурации при 95°C в течение 2 мин с последующими 50 циклами при 95°C в течение 15 с и при $62,5^\circ\text{C}$ в течение 1 мин. Анализ кривой плавления проводили в конце каждой серии для определения специфичности продуктов амплификации. Данные визуализировали и обрабатывали с использованием программного обеспечения Bio-rad и расчеты кратности изменений проводили с использованием сравнительного Ct способа (также известного как $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ способ).

Используемые праймеры являются следующими:

wt_Fw: 5'-TGCTGCTAAGTACAGGGACATCTTG-3' (SEQ ID NO: 25)

wt-Rv: 5'-AGGAGATGTTTTTCACACTCCAGGT-3' (SEQ ID NO: 26)

mt_Fw: 5'-CTGGCCCCAGTTGTAATTTGTGA-3' (SEQ ID NO: 27)

mt_Rv: 5'-CTGTTCCAGGCTTGTTCGAATAGT-3' (SEQ ID NO: 28)

Для этой реакции мастер-микс SYBR select (Life Technologies) вместе с кДНК, разведенной в 10 раз,

использовали в качестве матрицы.

Результаты и обсуждение.

Эффекты на модуляцию РНК разработанных олигонуклеотидов оценивали после оптимизации в отношении эффективности трансфекции и времени и концентрации обработки (данные не показаны).

Эффективность пропуска экзона, индуцированного разработанными 2'-О-метилфосфоротиоатными АОН, подвергали скринингу с использованием выбранной амплификации фрагмента СЕР290, включающего в себя экзон 26-экзон 27. Визуализацию и количественное определение фрагментов ПЦР проводили с использованием Bioanalyzer 2100. Авторы настоящего изобретения задались вопросом, возможно ли разработать АОН, которые индуцируют пропуск экзона, что устанавливали путем определения содержания фрагмента ПЦР, соответствующего мутированной сплайсированной мРНК, по сравнению со сплайсированной мРНК дикого типа, с эквивалентной или лучшей эффективностью, чем АОН, описанные в предшествующем уровне техники, при этом не содержащие структуры, которые могли бы препятствовать их производству или терапевтическому применению. Эта работа идентифицировала 11 олигонуклеотидов, которые удовлетворяют указанным критериям (см. фиг. 2, табл. 1 и 2).

Анализ уровня экспрессии транскриптов дикого типа и мутантных транскриптов мРНК СЕР290 посредством кПЦР подтвердил результаты, полученные с помощью Bioanalyzer 2100. Расчеты кратности изменений показывают, что обработка с помощью антисмысловых олигонуклеотидов согласно настоящему изобретению восстанавливает экспрессию транскриптов дикого типа до уровней, равных или превышающих уровни, достигнутые с помощью АОН, описанных в предшествующем уровне техники.

Поскольку нет необходимости в том, чтобы АОН согласно настоящему изобретению являлись более эффективными в отношении пропуска экзона, чем АОН предшествующего уровня техники, достаточной эффективности в индукции пропуска экзона достаточно. АОН согласно настоящему изобретению, раскрытые в примерах, представляют собой лишь предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения. Можно разработать другие АОН, которые удовлетворяют требованиям настоящего изобретения, как заявлено в формуле изобретения, которые охватываются настоящим изобретением.

Таблица 1

Количественное определение (нг/мкл) профилей мРНК в образцах пациента с использованием Bioanalyzer 2100

	NT	SON-3	AON-3	ESE (+50+70)	AONP 2	AONP 3	AONP 4	AONP 11	AONP 12	AONP 13	AONP 19	AONP 20	AONP 23	AONP 24	AONP 26
WT полоса	8,2	7,72	11,2	9,3	8,9	12,12	12,76	11,01	10,07	11,72	10,32	10,75	13,56	11,09	13,9
MT полоса	1,62	3,13	0,09	0,22	0,11	0,08	0,06	0,06	0,1	0,07	0,04	0,05	0,21	0,15	0,16
Дополнительная полоса 1	0,2	0,48	0	0,05	0	0	0	0	0,01	0	0,02	0	0,02	0,02	0
Дополнительная полоса 2	0,19	0,45	0	0,06	0	0	0	0	0,01	0	0,02	0	0,02	0,02	0,02
В общем	10,21	11,78	11,29	9,63	9,01	12,2	12,82	11,07	10,19	11,79	10,4	10,8	13,81	11,28	14,08

MT - Мутантная полоса; полоса 1 и полоса 2 представляют собой наблюдаемые побочные продукты aberrantного сплайсинга SON-3=cgcaccuggccscaguu (SEQ ID NO: 29, ранее раскрытая в международной патентной публикации WO 2013/036105 и Collin et al., 2012).

Таблица 2

Относительные количества (%) необработанных мРНК СЕР290 клеток пациентов (NT), клеток пациентов, обработанных с помощью некомплементарного (смыслового) олигонуклеотида (SON-3) или комплементарных антисмысловых олигонуклеотидов согласно настоящему изобретению (AONP) по сравнению с АОН предшествующего уровня техники

	NT	SON-3	AON-3	ESE (+50+70)	AONP 2	AONP 3	AONP 4	AONP 11	AONP 12	AONP 13	AONP 19	AONP 20	AONP 23	AONP 24	AONP 26
WT полоса	80,31	65,53	99,20	96,57	98,78	99,34	99,53	99,46	98,82	99,41	99,23	99,54	98,19	98,32	98,72
MT полоса	15,87	26,57	0,80	2,28	1,22	0,66	0,47	0,54	0,98	0,59	0,38	0,46	1,52	1,33	1,14
Дополнительная полоса 1	1,96	4,07	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,19	0,00	0,14	0,18	0,00
Дополнительная полоса 2	1,86	3,82	0,00	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,19	0,00	0,14	0,18	0,14

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигонуклеотид, способный снизить aberrantный сплайсинг, ассоциированный с мутацией с.2991+1655A>G в интроне 26 гена СЕР290 человека, характеризующийся тем, что последовательность олигонуклеотида состоит из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.
2. Олигонуклеотид по п.1, который содержит фосфоротиоатный остов.
3. Олигонуклеотид по п.1 или 2, который представляет собой олигорибонуклеотид, содержащий модифицированную 2'-О-низиш алкилом, алкенилом, алкинилом или алкокси рибозу.
4. Олигонуклеотид по любому из пп.1-3, в котором все рибозы модифицированы 2'-О-метилом.
5. Олигонуклеотид по любому из пп.1-3, содержащий модифицированную 2'-О-метоксиэтилом рибозу.
6. Вирусный вектор, экспрессирующий олигонуклеотид по п.1, будучи помещенным в условия, способствующие экспрессии олигонуклеотида в клетке человека.
7. Фармацевтическая композиция для лечения врожденного амавроза Лебера у человека, несущего в

своем геноме мутацию с.2991+1655A>G в интроне 26 гена CEP290, причем указанная фармацевтическая композиция содержит олигонуклеотид по любому из пп.1-5 или вирусный вектор по п.6 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

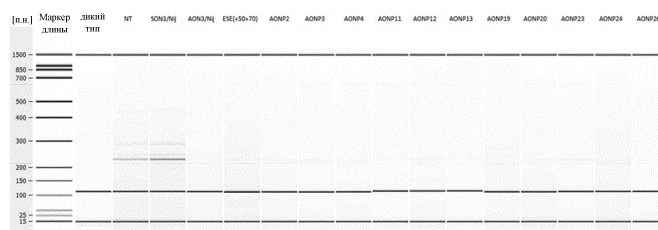
8. Применение олигонуклеотида по любому из пп.1-5 в качестве лекарственного средства для лечения врожденного амавроза Лебера у человека, несущего в своем геноме мутацию с.2991+1655A>G в интроне 26 гена CEP290.

9. Применение вирусного вектора по п.6 в качестве лекарственного средства для лечения врожденного амавроза Лебера у человека, несущего в своем геноме мутацию с.2991+1655A>G в интроне 26 гена CEP290.

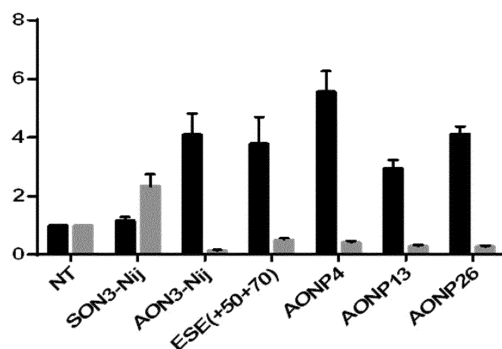
10. In vitro и/или ex vivo способ блокирования или снижения aberrантного сплайсинга скрытого 128 п.н. экзона в пре-иРНК CEP290, причем указанный aberrантный сплайсинг обусловлен мутацией с.2991+1655A>G в интроне 26 гена CEP290 человека в клетке, причем указанный способ предусматривает контакт указанной клетки с олигонуклеотидом по любому из пп.1-5, вирусным вектором по п.6 или фармацевтической композицией по п.7.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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