(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 045521 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.30

(21) Номер заявки
202090584

(22) Дата подачи заявки
2018.08.24

(51) Int. Cl. ***C12Q 1/68*** (2018.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(54) АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОМЕРЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СОСТОЯНИЙ И ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) **62/550,462; 62/575,901; 62/667,356; 62/671,745**
(32) **2017.08.25; 2017.10.23; 2018.05.04; 2018.05.15**
(33) **US**
(43) **2020.06.05**
(86) **PCT/US2018/048031**
(87) **WO 2019/040923 2019.02.28**

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

(72) Изобретатель:
Азнарез Изабель, Хань Чжоу (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2017106377
VERRET el al., "Inhibitory Interneuron Deficit Links Altered Network Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Model", Cell, 27 April 2012, Vol. 149, No 3, pg. 708-721. Especially Abstract; pg. 717, col. 1, para 2

(57) В изобретении альтернативные события сплайсинга в гене SCN1A могут приводить к непродуктивным транскриптам мРНК, которые, в свою очередь, могут приводить к аберрантной экспрессии белка, а терапевтические средства, которые могут нацеливаться на альтернативные события сплайсинга в гене SCN1A, могут модулировать уровень экспрессии функциональных белков у пациентов с синдромом Драве и/или ингибировать аберрантную экспрессию белка. Такие терапевтические средства могут быть использованы для лечения состояния, вызванного дефицитом белка SCN1A, SCN8A или SCN5A.

045521 B1

045521 B1

Ссылка

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/550462, поданной 25 августа 2017 г., предварительной заявкой на патент США № 62/575901, поданной 23 октября 2017 г., предварительной заявкой на патент США № 62/667356, поданной 4 мая 2018 г., предварительной заявкой на патент США № 62/671745, поданной 15 мая 2018 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники изобретения

Нарушения нервной системы часто связаны с каналопатией, характеризующейся нарушенной функцией ионных каналов, которые опосредуют возбудимость нейронов, нейрональные взаимодействия и функции головного мозга в целом. Мутации в гене SCN1 A, входящем в кластер генов SCN1A-SCN2A-SCN3A, который кодирует альфа-поры образующие субъединицы нейронного потенциалзависимого натриевого канала, связаны с развитием большого числа заболеваний и состояний, таких как синдром Драве (DS) (Miller, et al., 1993-2015, GeneReviews, Eds. Pagon RA, et al. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, Bookshelf ID: NBK1318 и Mulley, et al., 2005, Hum. Mutat. 25: 535-542).

Краткое раскрытие изобретения

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрыт способ модулирования экспрессии белка SCN1A в клетке, содержащей мРНК, которая содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (мРНК с экзоном NMD) и кодирует белок SCN1A, способ предусматривает контактирование терапевтического средства с клеткой, при этом терапевтическое средство модулирует сплайсинг экзона NMD из кодирующей белок SCN1A мРНК с экзоном NMD, тем самым модулируя содержание процесированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, и модулируя экспрессию белка SCN1A в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство (a) связывается с целевой частью кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD; (b) модулирует связывание фактора, участвующего в сплайсинге мРНК с экзоном NMD или (c) выполняет комбинацию подпунктов (a) и (b). Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство препятствует связыванию фактора, участвующего в сплайсинге экзона NMD из области целевой части. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть является проксимальной по отношению к экзону NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится самое большее приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов выше против хода транскрипции от 5'-конца экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится по меньшей мере приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов, приблизительно на 40 нуклеотидов, приблизительно на 30 нуклеотидов, приблизительно на 20 нуклеотидов, приблизительно на 10 нуклеотидов, приблизительно на 5 нуклеотидов, приблизительно на 4 нуклеотида, приблизительно на 2 нуклеотида, приблизительно на 1 нуклеотид выше против хода транскрипции от 5'-конца экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится самое большее приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3'-конца экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится по меньшей мере приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов, приблизительно на 40 нуклеотидов, приблизительно на 30 нуклеотидов, приблизительно на 20 нуклеотидов, приблизительно на 10 нуклеотидов, приблизительно на 5 нуклеотидов, приблизительно на 4 нуклеотида, приблизительно на 2 нуклеотида, приблизительно на 1 нуклеотид ниже по ходу транскрипции от 3'-конца экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть расположена в интронной области между двумя каноническими экзонными областями кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD, и причем интронная область содержит экзон NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть по меньшей мере частично перекрывается с экзоном NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть по

меньшей мере частично перекрывается с интроном выше против хода транскрипции от экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть содержит 5'-соединение экзона NMD-интрона или 3'-соединение экзона NMD-интрона. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится в пределах NMD экзона. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть содержит приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более последовательных нуклеотидов экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления кодирующая SCN1A мРНК с экзоном NMD содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 2 или 7-10. Согласно некоторым вариантам осуществления кодирующая SCN1A мРНК с экзоном NMD кодируется генетической последовательностью с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к SEQ ID NO: 1 или 3-6. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится самое большее приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов выше против хода транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов, приблизительно на 40 нуклеотидов, приблизительно на 30 нуклеотидов, приблизительно на 20 нуклеотидов, приблизительно на 10 нуклеотидов, приблизительно на 5 нуклеотидов, приблизительно на 4 нуклеотида, приблизительно на 2 нуклеотида, приблизительно на 1 нуклеотид выше против хода транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится самое большее приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863740. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов, приблизительно на 40 нуклеотидов, приблизительно на 30 нуклеотидов, приблизительно на 20 нуклеотидов, приблизительно на 10 нуклеотидов, приблизительно на 5 нуклеотидов, приблизительно на 4 нуклеотида, приблизительно на 2 нуклеотида, приблизительно на 1 нуклеотид ниже по ходу транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863740. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к области, содержащей по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 2 или 7-10. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 21-67, 210-256 или 304-379. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD находится в пределах индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20x SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 42-50 или 231-239. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD находится выше против хода транскрипции или ниже по ходу транскрипции от индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20x SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 21-38, 53-67, 210-227 или 242-256. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть мРНК с экзоном NMD содержит экзон-интронное соединение экзона 20x SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), при-

чем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 39-41, 51, 52, 228-230, 240 или 241. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство способствует исключению экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с исключением экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство повышает содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления количество процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство увеличивает экспрессию SCN1A белка в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления количество SCN1A, производимого в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством SCN1A, производимым в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство ингибирует исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, уменьшается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизи-

тельно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с исключением экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство снижает содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления количество процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, уменьшается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство уменьшает экспрессию белка SCN1A в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления количество SCN1A, производимого в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, уменьшается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством SCN1A, производимым в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер содержит модификацию остова, содержащую фосфоротиоатную связь или фосфородиамидную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем антисмысловой олигомер содержит фосфородиамидат морфолино, блокированную нуклеиновую кислоту, пептидную нуклеиновую кислоту, Т - О-метил-, 2'-фторо- или 2'-О-метоксиэтиловый фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем антисмысловой олигомер содержит по меньшей мере один модифицированный фрагмент сахара. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый фрагмент сахара представляет собой модифицированный фрагмент сахара. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем антисмысловой олигомер состоит из от 8 до 50 нуклеотидных

оснований, от 8 до 40 нуклеотидных оснований, от 8 до 35 нуклеотидных оснований, от 8 до 30 нуклеотидных оснований, от 8 до 25 нуклеотидных оснований, от 8 до 20 нуклеотидных оснований, от 8 до 15 нуклеотидных оснований, от 9 до 50 нуклеотидных оснований, от 9 до 40 нуклеотидных оснований, от 9 до 35 нуклеотидных оснований, от 9 до 30 нуклеотидных оснований, от 9 до 25 нуклеотидных оснований, от 9 до 20 нуклеотидных оснований, от 9 до 15 нуклеотидных оснований, от 10 до 50 нуклеотидных оснований, от 10 до 40 нуклеотидных оснований, от 10 до 35 нуклеотидных оснований, от 10 до 30 нуклеотидных оснований, от 10 до 25 нуклеотидных оснований, от 10 до 20 нуклеотидных оснований, от 10 до 15 нуклеотидных оснований, от 11 до 50 нуклеотидных оснований, от 11 до 40 нуклеотидных оснований, от 11 до 35 нуклеотидных оснований, от 11 до 30 нуклеотидных оснований, от 11 до 25 нуклеотидных оснований, от 11 до 20 нуклеотидных оснований, от 11 до 15 нуклеотидных оснований, от 12 до 50 нуклеотидных оснований, от 12 до 40 нуклеотидных оснований, от 12 до 35 нуклеотидных оснований, от 12 до 30 нуклеотидных оснований, от 12 до 25 нуклеотидных оснований, от 12 до 20 нуклеотидных оснований или от 12 до 15 нуклеотидных оснований. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем антисмысловой олигомер по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% комплементарен целевой части кодирующей белок мРНК с экзоном NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает оценку экспрессии мРНК или белка SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки находятся ex vivo.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта путем модуляции экспрессии белка SCN1A в клетке субъекта, предусматривающий: контактирование клетки субъекта с терапевтическим средством, которое модулирует сплайсинг индуцирующего нонсенс-опосредованный распад мРНК экзона (экзона NMD) из мРНК в клетке, которая содержит экзон NMD и кодирует SCN1A, тем самым модулируя содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, и модулируя экспрессию белка SCN1A в клетке субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство (a) связывается с целевой частью кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD; (b) модулирует связывание фактора, участвующего в сплайсинге мРНК с экзоном NMD или (c) выполняет комбинацию подпунктов (a) и (b). Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство препятствует связыванию фактора, участвующего в сплайсинге экзона NMD из области целевой части. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть является проксимальной по отношению к экзону NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится самое большее приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов выше против хода транскрипции от 5'-конца экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится по меньшей мере приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов, приблизительно на 40 нуклеотидов, приблизительно на 30 нуклеотидов, приблизительно на 20 нуклеотидов, приблизительно на 10 нуклеотидов, приблизительно на 5 нуклеотидов, приблизительно на 4 нуклеотида, приблизительно на 2 нуклеотида, приблизительно на 1 нуклеотид выше против хода транскрипции от 5'-конца экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится самое большее приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3'-конца экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится по меньшей мере приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов, приблизительно на 40 нуклеотидов, приблизительно на 30 нуклеотидов, приблизительно на 20 нуклеотидов, приблизительно на 10 нуклеотидов, приблизительно на 5 нуклеотидов, приблизительно на 4 нуклеотида, приблизительно на 2 нуклеотида, приблизительно на 1 нуклеотид ниже по ходу транскрипции от 3'-конца экзона NMD.

Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть расположена в интронной области между двумя каноническими экзоновыми областями кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD, и причем интронная область содержит экзон NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть по меньшей мере частично перекрывается с экзоном NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть по меньшей мере частично перекрывается с интроном выше против хода транскрипции от экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть содержит 5'-соединение экзона NMD-интрона или 3'-соединение экзона NMD-интрона. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится в пределах экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть содержит приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более последовательных нуклеотидов экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления кодирующая SCN1A мРНК с экзоном NMD, содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 2 или 7-10. Согласно некоторым вариантам осуществления кодирующая SCN1A мРНК с экзоном NMD кодируется генетической последовательностью с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к SEQ ID NO: 1 или 3-6. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится самое большее приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов выше против хода транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов, приблизительно на 40 нуклеотидов, приблизительно на 30 нуклеотидов, приблизительно на 20 нуклеотидов, приблизительно на 10 нуклеотидов, приблизительно на 5 нуклеотидов, приблизительно на 4 нуклеотида, приблизительно на 2 нуклеотида, приблизительно на 1 нуклеотид выше против хода транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится самое большее приблизительно на 1500 нуклеотидов, приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863740. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть находится приблизительно на 1000 нуклеотидов, приблизительно на 800 нуклеотидов, приблизительно на 700 нуклеотидов, приблизительно на 600 нуклеотидов, приблизительно на 500 нуклеотидов, приблизительно на 400 нуклеотидов, приблизительно на 300 нуклеотидов, приблизительно на 200 нуклеотидов, приблизительно на 100 нуклеотидов, приблизительно на 80 нуклеотидов, приблизительно на 70 нуклеотидов, приблизительно на 60 нуклеотидов, приблизительно на 50 нуклеотидов, приблизительно на 40 нуклеотидов, приблизительно на 30 нуклеотидов, приблизительно на 20 нуклеотидов, приблизительно на 10 нуклеотидов, приблизительно на 5 нуклеотидов, приблизительно на 4 нуклеотида, приблизительно на 2 нуклеотида, приблизительно на 1 нуклеотид ниже по ходу транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863740. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к области, содержащей по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 2 или 7-10. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 21-67, 210-256 или 304-379. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD находится в пределах индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20x SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 42-50 или 231-239. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD находится выше против хода транскрипции или ниже по ходу транскрипции от индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20x SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем ASO содержит по-

следовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 21-38, 53-67, 210-227 или 242-256. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть мРНК с экзоном NMD содержит экзон-интронное соединение экзона 20х SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 39-41, 51, 52, 228-230, 240 или 241. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство способствует исключению экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления исключение NMD экзона из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с исключением экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство повышает содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления количество процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство увеличивает экспрессию белка SCN1A в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления количество SCN1A, производимого в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством SCN1A, производимым в контрольной клетке. Согласно некоторым

вариантам осуществления терапевтическое средство ингибирует исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей SCN1A белок. Согласно некоторым вариантам осуществления исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, уменьшается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с исключением экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство снижает содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления количество процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством уменьшается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство уменьшает экспрессию белка SCN1A в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления количество SCN1A, производимое в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, уменьшается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством SCN1A, производимым в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем антисмысловой олигомер содержит модификацию остова, содержащую фосфоротиоатную связь или фосфородиамидную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем антисмысловой олигомер содержит фосфородиамидат морфолино, блокированную нуклеиновую кислоту, пептидную нуклеиновую кислоту, 2'-О-метил, 2'-фторо- или 2'-О-метоксиэтиловый фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысло-

вой олигомер (ASO), и причем антисмысловой олигомер содержит по меньшей мере один модифицированный фрагмент сахара. Согласно некоторым вариантам осуществления каждый фрагмент сахара представляет собой модифицированный фрагмент сахара. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем антисмысловой олигомер состоит из от 8 до 50 нуклеотидных оснований, от 8 до 40 нуклеотидных оснований, от 8 до 35 нуклеотидных оснований, от 8 до 30 нуклеотидных оснований, от 8 до 25 нуклеотидных оснований, от 8 до 20 нуклеотидных оснований, от 8 до 15 нуклеотидных оснований, от 9 до 50 нуклеотидных оснований, от 9 до 40 нуклеотидных оснований, от 9 до 35 нуклеотидных оснований, от 9 до 30 нуклеотидных оснований, от 9 до 25 нуклеотидных оснований, от 9 до 20 нуклеотидных оснований, от 9 до 15 нуклеотидных оснований, от 10 до 50 нуклеотидных оснований, от 10 до 40 нуклеотидных оснований, от 10 до 35 нуклеотидных оснований, от 10 до 30 нуклеотидных оснований, от 10 до 25 нуклеотидных оснований, от 10 до 20 нуклеотидных оснований, от 10 до 15 нуклеотидных оснований, от 11 до 50 нуклеотидных оснований, от 11 до 40 нуклеотидных оснований, от 11 до 35 нуклеотидных оснований, от 11 до 30 нуклеотидных оснований, от 11 до 25 нуклеотидных оснований, от 11 до 20 нуклеотидных оснований, от 11 до 15 нуклеотидных оснований, от 12 до 50 нуклеотидных оснований, от 12 до 40 нуклеотидных оснований, от 12 до 35 нуклеотидных оснований, от 12 до 30 нуклеотидных оснований, от 12 до 25 нуклеотидных оснований, от 12 до 20 нуклеотидных оснований или от 12 до 15 нуклеотидных оснований. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем антисмысловой олигомер по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% комплементарен целевой части кодирующей белок мРНК с экзоном NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает оценку экспрессии мРНК или белка SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние индуцируется мутацией с потерей функции в $Na_v1.1$. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние связано с гаплонедостаточностью гена SCN1A, и причем субъект содержит первый аллель, кодирующий функциональный SCN1A, и второй аллель, из которого SCN1A не производится или производится в сниженном количестве, или второй аллель, кодирующий нефункциональный SCN1A или частично функциональный SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой энцефалопатию. Согласно некоторым вариантам осуществления энцефалопатия представляет собой эпилептическую энцефалопатию. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой синдром Драве (DS); тяжелую миоклоническую эпилепсию младенчества (SMEI) - пограничную форму (SMEB); фебрильные судороги (FS); эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс (GEFS); эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13; криптогенную генерализованную эпилепсию; криптогенную фокальную эпилепсию; эпилепсию с миоклонико-астатическими приступами; синдром Леннокса-Гасто; синдром Веста; идиопатические спазмы; раннюю миоклоническую энцефалопатию; прогрессирующую миоклоническую эпилепсию; альтернирующую гемиплегию детского возраста; неклассифицированную эпилептическую энцефалопатию; внезапную неожиданную смерть при эпилепсии (SUDEP); синдром слабости синусового узла 1; аутизм или злокачественные миграционные парциальные приступы младенчества. Согласно некоторым вариантам осуществления GEFS+ представляет собой эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс, типа 2. Согласно некоторым вариантам осуществления фебрильные судороги представляют собой фебрильные судороги, семейные, 3A. Согласно некоторым вариантам осуществления SMEB представляет собой SMEB без генерализованной спайк-волны (SMEB-SW), SMEB без миоклонических судорог (SMEB-M), SMEB без более чем одного признака SMEI (SMEB-O) или стойкую эпилепсию детей с генерализованными тонико-клоническими судорогами (ICEGTC). Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство способствует исключению экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, и повышает экспрессию SCN1A в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% комплементарна любой из SEQ ID NO: 22-24, 26, 27, 29-35, 37-62, 64-67 или 304-379. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние индуцируется мутацией с приобретением функции в $Na_v1.1$. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект содержит аллель, из которого SCN1A производится в повышенном количестве, или аллель, кодирующий мутантный SCN1A, который индуцирует повышенную активность $Na_v1.1$ в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой мигрень. Согласно некоторым вариантам осуществления мигрень представляет собой мигрень, семейную гемиплегическую, 3. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой генетическую эпилепсию $Na_v1.1$. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство ингибирует исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, и уменьшает экспрессию SCN1A в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), и причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% комплементарна любой из SEQ

ID NO: 21, 25, 28, 36 или 63. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой отличное от человека животное. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой плод, эмбрион или ребенка. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство вводят посредством интратекальной инъекции, интрацеребровентрикулярной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, интравитреальной или внутривенной инъекции субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение субъекту второго терапевтического средства. Согласно некоторым вариантам осуществления второе терапевтическое средство представляет собой небольшую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления второе терапевтическое средство представляет собой ASO. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% комплементарна любой из SEQ ID NO: 115-161. Согласно некоторым вариантам осуществления второе терапевтическое средство корректирует удерживание интрона. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, энцефалопатию SCN2A, энцефалопатию SCN8A или аритмию SCN5A. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, энцефалопатию SCN2A, энцефалопатию SCN8A или аритмию SCN5A. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки находится ex vivo.

Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и заявки на патент, указанные в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, в какой каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была специально и индивидуально указана как включенная посредством ссылки.

Краткое описание графических материалов

Новые особенности настоящего изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание особенностей и преимуществ настоящего изобретения будет получено со ссылкой на следующее подробное описание, которое содержит иллюстративные варианты осуществления, в которых использованы принципы настоящего изобретения, и сопровождающие графические материалы, на которых: На фиг. 1 показано схематическое представление целевой мРНК, которая содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (мРНК с экзоном NMD) и опосредованное терапевтическим средством исключение индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона для увеличения экспрессии полноразмерного целевого белка или функциональной РНК. На фиг. 1A показана клетка, разделенная на ядерный и цитоплазматический компартменты. В ядре транскрипт пре-мРНК целевого гена подвергается сплайсингу для получения мРНК, и эта мРНК экспортируется в цитоплазму и транслируется в целевой белок. Для этого целевого гена некоторая часть мРНК содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (мРНК с экзоном NMD), который деградирует в цитоплазме, таким образом, не приводя к производству целевого белка. На фиг. 1B показан пример той же клетки, разделенной на ядерный и цитоплазматический компартменты. Лечение терапевтическим средством, таким как антисмысловой олигомер (ASO), способствует исключению индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона и приводит к увеличению мРНК, которая, в свою очередь, транслируется в более высокие количества целевого белка. Фиг. 1C представляет собой схематическое представление опосредованного терапевтическим ASO исключения индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона, который превращает непродуктивную мРНК в продуктивную мРНК и увеличивает экспрессию полноразмерного целевого белка из продуктивной мРНК.

На фиг. 2 изображена идентификация иллюстративного индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК (NMD) экзона в гене SCN1A. Идентификация NMD-индуцирующего экзона в гене SCN1A с использованием сравнительной геномики показана посредством визуализации в браузере генома UCSC. На верхней панели показано графическое представление гена SCN1A для масштабирования. Уровень сохранения для 100 видов позвоночных показан в виде пиков. Самые высокие пики соответствуют экзонам (чёрные прямоугольники), в то время как для большинства интронов (линии со стрелками) пики не наблюдаются. Пики сохранения были идентифицированы в интроне 20 (NM_006920), показанном на средней панели. Осмотр консервативных последовательностей выявил экзоноподобную последовательность 64 п.н. (нижняя панель, последовательность, выделенная серым цветом), фланкированную 3'- и 5'-сайтами сплайсинга (подчеркнутая последовательность). Включение этого экзона приводит к сдвигу рамки и введению кодона преждевременной терминации в экзон 21, делая транскрипт мишенью NMD.

На фиг. 3A показано подтверждение NMD-индуцирующего экзона путем обработки циклогексимидом. Анализ ОТ-ПЦР с использованием цитоплазматической РНК из обработанных ДМСО (CHX-) или обработанных циклогексимидом (CHX+) Neuro 2A (нейронные клетки-предшественники мыши) и праймеров в экзоне 21 и экзоне ниже по ходу транскрипции подтвердил наличие полосы, соответствующей NMD-индуцирующему экзону (21x). Идентичность продукта подтверждали секвенированием. Денситометрический анализ полос проводили для вычисления процента включения экзона 21x от общего числа транскриптов SCN1A. Обработка Neuro 2A циклогексимидом (CHX+) для ингибирования NMD приводила к 2-кратному увеличению продукта, соответствующего NMD-индуцирующему экзону 21x, в цито-

плазматической фракции (сравните светло-серую полосу, CHX-, с темно-серой полосой, CHX+). На фиг. 3B показано подтверждение NMD-индуцирующего экзона путем обработки циклогексимидом. Анализ ОТ-ПЦР с использованием цитоплазматической РНК из обработанных ДМСО (CHX-) или обработанных циклогексимидом (CHX+) RenCell BM (нервные клетки-предшественники человека) и праймеров в экзоне 20 и экзоне 23 подтвердил наличие полосы, соответствующей NMD-индуцирующему экзону (20x). Идентичность продукта подтверждали секвенированием. Денситометрический анализ полос проводили для вычисления процента включения экзона 20x от общего числа транскриптов SCN1A. Обработка RenCell BM циклогексимидом (CHX+) для ингибирования NMD приводила к 2-кратному увеличению продукта, соответствующего NMD-индуцирующему экзону 20x, в цитоплазматической фракции (сравните светлосерую полосу, CHX-, с темно-серой полосой, CHX+).

На фиг. 4 изображена иллюстративная прогулка с ASO области экзона 20x SCN1A. Показано графическое представление прогулки с ASO, выполняемой для нацеленных на область экзона 20x SCN1A последовательностей, выше против хода транскрипции от 3'-сайта сплайсинга через 3'-сайт сплайсинга, экзон 20x, через 5'-сайт сплайсинга и ниже по ходу транскрипции от 5'-сайта сплайсинга с использованием 2'-MOE ASO, остова PS. ASO разрабатывали для покрытия этих областей путем смещения 5 нуклеотидов одновременно.

На фиг. 5A изображена прогулка с ASO области экзона 20x SCN1A, оцениваемая с помощью ОТ-ПЦР. Иллюстративный ПААГ показывает окрашенные SYBR-safe продукты ОТ-ПЦР, обработанные имитацией SCN1A (плацебо), обработанные ASO контрольные SMN (SMN) или обработанные 2'-MOE ASO, нацеленным на область экзона 20x, как описано в настоящем документе в примерах и в описании фиг. 4, при концентрации 20 мкМ в клетках RenCell BM с помощью поглощения гимнозисом. Количественно оценивали два продукта, соответствующих включению экзона 20x (верхняя полоса) и полной длине (исключение экзона 20x, нижняя полоса). На фиг. 5B изображен график, изображающий процент включения экзона 20x из данных на фиг. 5A. Черная линия указывает на отсутствие изменений в отношении плацебо.

На фиг. 5C изображен график полноразмерных продуктов, нормализованных к внутреннему контролю RPL32, и построен график кратности изменения относительно плацебо. Черная линия указывает на отношение 1 и отсутствие изменения по отношению к плацебо.

На фиг. 6 изображена иллюстративная прогулка с ASO области экзона 20x SCN1A, оцениваемая с помощью ОТ-кПЦР. Результаты амплификации SCN1A SYBR-green ОТ-кПЦР, нормализованные к RPL32, полученные с использованием того же эксперимента поглощения ASO, который оценивали посредством SYBR-safe ОТ-ПЦР, как показано на фиг. 5, нанесены на график как кратное изменение относительно плацебо, подтверждая результаты SYBR-safe ОТ-ПЦР. Черная линия указывает на отношение 1 (без изменения по отношению к плацебо).

На фиг. 7A изображена таблица с представителями альфа-субъединицы потенциалзависимого натриевого канала. Стрелки соответствуют цветам полос на фиг. 7B. X означает, что экспрессия не обнаружена.

На фиг. 7B изображены отобранные ASO, оцененные кПЦР Taqman SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN8A и SCN9A, чтобы оценить целевую селективность. Результаты амплификации Taqman-кПЦР, нормализованные к RPL32, полученные с использованием ASO Ex20x+1, IVS20x+18 и IVS20x+33, наносили на график в виде кратных изменений относительно плацебо. Черная линия указывает на отношение 1 (без изменения по отношению к плацебо).

На фиг. 8A изображен иллюстративный дозозависимый эффект выбранного ASO в клетках, обработанных CXH. Показан репрезентативный ПААГ, показывающий окрашенные SYBR-safe продукты ОТ-ПЦР Scnla мыши, обработанные имитацией (имитация, только RNAiMAX), или обработанные ASO Ex21x+1 2'-MOE, нацеленным на экзон 21x (номенклатура мыши, соответствует человеческому экзону 20x), в концентрациях 30 нм, 80 нм и 200 нм в клетки Neuro 2A (нейробластома мыши) трансфекцией RNAiMAX. Ex21x+1 (мышиная номенклатура) и Ex20x+1 (человеческая номенклатура) идентичны. Количественно оценивали два продукта, соответствующих включению экзона 20x (верхняя полоса) и полной длине (исключение экзона 20x, нижняя полоса).

На фиг. 8B изображен график, изображающий процент включения экзона 20x из данных на фиг. 7A. Черная линия указывает на отсутствие изменений в отношении плацебо.

На фиг. 8C изображен иллюстративный график полноразмерных продуктов, нормализованных к внутреннему контролю Hprt и кратному изменению относительно плацебо. Черная линия указывает на отношение 1 и без изменения по отношению к плацебо.

На фиг. 9A показаны иллюстративные результаты интравитреальной (IVT) инъекции выбранных ASO у мышей C57BL6J (самцы, возраст 3 месяца). Показаны гели ПААГ окрашенных SYBR-safe продуктов ОТ-ПЦР Scnla мыши из введенного PBS (1 мкл) в левый глаз (-) или IVS20x-21, Ex21x+1, IVS21x+18, IVS21x+33 или Cep290 (отрицательный контроль ASO; Gerard et al, Mol. Ther. Nuc. Ac, 2015) 2'-MOE ASO-введенных (1 мкл) в правый глаз (+) в концентрации 10 мМ. Ex21x+1, IVS21x+18 и IVS21x+33 (мышиная номенклатура) и Ex20x+1, IVS20x+18 и IVS20x+33 (человеческая номенклатура) идентичны. Количественно оценивали два продукта, соответствующих включению экзона 21x (верхняя

полоса) и полной длине (исключение экзона 21x, нижняя полоса).

На фиг. 9B изображен график, изображающий процент включения экзона 21x из данных на фиг. 9A. Белые полосы соответствуют глазам с введенным ASO, а серые полосы соответствуют глазам с введенным PBS, n=5 в каждой группе.

На фиг. 9C изображен график нормализации полноразмерных продуктов для внутреннего контроля Gapdh и кратность изменения в глазах с введенным ASO, относительно глаз с введенным PBS. Черная линия указывает на отношение 1 и отсутствие изменений по отношению к PBS, n=5 в каждой группе.

На фиг. 10A показаны иллюстративные результаты внутрибрюшинной (ICV) инъекции выбранных ASO мышам C57BL6J (самцы, возраст 3 месяца). Показаны гели ПААГ окрашенных SYBR-safe продуктов ОТ-ПЦР мыши Scnla из головного мозга без введения (-, контроль без ASO) или после введения 300 мкг Cep290 (отрицательный контроль ASO; Gerard et al, Mol. Ther. Nuc. Ac, 2015), Ex21x+1, IVS21x+18, IVS21x+33 2'-MOE ASO. Ex21x+1, IVS21x+18 и IVS21x+33 (мышиная номенклатура) и Ex20x+1, IVS20x+18 и IVS20x+33 (человеческая номенклатура) идентичны. Количественно оценивали два продукта, соответствующих включению экзона 21x (верхняя полоса) и полной длине (исключение экзона 21x, нижняя полоса).

На фиг. 10B изображен график, изображающий процент включения экзона 21x из данных на фиг. 10A, n=6 (каждый нацеливающий ASO), n=5 (Cep290 ASO), n=1 (без введения, контроль без ASO).

На фиг. 10C изображен график из результатов анализа кПЦР Taqman, проведенного с использованием двух различных зондов, охватывающих соединение экзонов 21 и 22. Продукты нормализовали по внутреннему контролю Gapdh и строили график кратности изменения в головном мозге с введенным ASO относительно головного мозга с введенным Cep290. Черная линия указывает на отношение 1 и отсутствие изменений по отношению к Cep290, n=6 (каждый нацеливающий ASO), n=5 (ASO Cep290), n=1 (без введения, контроль без ASO).

На фиг. 11A показаны иллюстративные результаты внутрибрюшинной (ICV) инъекции выбранных ASO у мышей C57BL6J (самцы, возраст 3 месяца). Представлены гели ПААГ окрашенных SYBR-safe продуктов ОТ-ПЦР Scnla мыши из головного мозга после введения 300 мкг Cep290 (отрицательный контроль ASO; Gerard et al, Mol. Ther. Nuc. Ac, 2015) или 33 мкг, 100 мкг и 300 мкг 1 Ex21x+1 2'-MOE ASO. Ex21x+1 (мышиная номенклатура) и Ex20x+1 (человеческая номенклатура) идентичны. Количественно оценивали два продукта, соответствующих включению экзона 21x (верхняя полоса) и полной длине (исключение экзона 21x, нижняя полоса).

На фиг. 11B изображен график, изображающий процент включения экзона 21x из данных на фиг. 11A, n=5 (каждая группа).

На фиг. 11C изображен график из результатов анализа кПЦР Taqman, проведенного с использованием двух различных зондов, охватывающих соединение экзонов 21 и 22. Продукты нормализовали по внутреннему контролю Gapdh и строили график кратности изменения в головном мозге после введения ASO относительно введенного Cep290. Черная линия указывает на отношение 1 и отсутствие изменений по отношению к Cep290, n=5 (каждая группа).

На фиг. 12A показаны иллюстративные результаты внутрибрюшинной инъекции (ICV) выбранного мышам ASO C57BL6J (день 2 после рождения). Показаны ПАГ-гели окрашенных SYBR-safe продуктов ОТ-ПЦР мыши Scnla из головного мозга без введения (-, контроль без ASO) или после введения 20 мкг Ex21x+1 2'-MOE ASO.

Количественно оценивали два продукта, соответствующих включению экзона 21x (верхняя полоса) и полной длине (исключение экзона 21x, нижняя полоса). Ex21x+1 (мышиная номенклатура) и Ex20x+1 (человеческая номенклатура) идентичны.

На фиг. 12B изображен график, изображающий процент включения экзона 21x из данных на фиг. 12A, n=4 (каждая группа).

На фиг. 12C изображен график из результатов анализа кПЦР Taqman, проведенного с использованием двух различных зондов, охватывающих соединение экзонов 21 и 22. Продукты нормализовали по внутреннему контролю Gapdh и строили график кратности изменения в головном мозге после введения ASO относительно контроля без ASO. Черная линия указывает на отношение 1 и отсутствие изменений по отношению к контролю без ASO, n=4 (каждая группа).

На фиг. 13A изображен график, изображающий процент включения экзона 21x в указанных образцах ЦНС мыши.

На фиг. 13B изображен график, изображающий процент включения экзона 20x в указанных образцах ЦНС человека.

На фиг. 14A изображен график, показывающий процентное снижение включения экзона 21x при указанных дозах.

На фиг. 14B изображен график, показывающий процентное увеличение мРНК Scnla при указанных дозах.

На фиг. 14C изображен график, показывающий процентное увеличение содержания белка Nav 1.1 при указанных дозах.

На фиг. 15A изображен график, показывающий процентное снижение включения экзона 21x при указанных дозах.

На фиг. 15B изображен график, показывающий процентное увеличение мРНК Scnla при указанных дозах.

На фиг. 16 изображен отобранный нацеленный на Scnla ASO, вводимый в дозе 10 мкг через инъекцию ICV мышам в день 2 после рождения, оцененный в день 5 после инъекции посредством кПЦР Taqman SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN5A, SCN7A, SCN8A, SCN9A, SCN10A и SCN11A, чтобы оценить целевую селективность. Результаты амплификации Taqman-кПЦР, нормализованные к Gapdh, полученные с использованием Ex20x+1 ASO, нанесены на график кратности изменения относительно мышей, которым вводили PBS.

На фиг. 17 изображены иллюстративные результаты внутрибрюшинной (ICV) инъекции в послеродовой день 2 выбранного ASO в указанной дозе у мышей дикого типа (WT) или гетерозиготных по синдрому Драве мышей (HET) F1 из скрещиваний 129S-Scnla^{tm1Kea} × C57BL/6J через 3 дня после инъекции.

На фиг. 17A изображен график из результатов анализа кПЦР Taqman, проведенного с использованием зонда, охватывающего экзоны 21 и 22. Продукты нормализовали по внутреннему контролю Gapdh и строили график кратности изменения в головном мозге после введения ASO относительно головного мозга после введения PBS.

На фиг. 17B изображен график из результатов вестерн-блота, выполненного с использованием антитела к Nav1.1. Продукты нормализовали по полосам, окрашенным Ponceau, и строили график кратности изменения в головном мозге после введения ASO относительно головного мозга после введения PBS.

На фиг. 18 изображены иллюстративные результаты микропрохода ASO области экзона 20x SCN1A в RenCell посредством свободного поглощения. ASO были разработаны для покрытия областей вокруг трех ранее идентифицированных нацеливающих ASO на фиг. 6 (помеченных звездами) путем смещения 1 нуклеотида за раз (6-41) или путем уменьшения длины ASO 17 (1-5). График показывает процент включения экзона 20x, измеренный посредством SYBR-green кПЦР. Черная линия указывает на отсутствие изменений относительно ASO (-).

Фиг. 19 представляет собой график увеличения содержания мРНК Scnla в корональных срезах головного мозга мышей в течение времени после инъекции нацеленного на SCN1A ASO. Как показано, повышение содержания мРНК Scnla поддерживалось в течение по меньшей мере 80 дней после инъекции.

Фиг. 20 представляет собой иллюстративную кривую выживаемости, демонстрирующую 100% выживаемость, обеспечиваемую нацеленным на SCN1A ASO в мышиной модели синдрома Драве. +/+ обозначает генотип WT, а +/- обозначает гетерозиготный генотип 129S-scnla^{tm1Kea} (модель мыши с синдромом Драве); A обозначает лечение PBS, а B обозначает лечение ASO. Как показано, мыши в группе +/- (мыши с синдромом Драве, получающие лечение PBS) начинали умирать приблизительно с дня 16 после рождения, тогда как все мыши других трех групп, включая в себя группу B +/- (мыши с синдромом Драве, получающие лечение ASO), выживали по меньшей мере в течение 35 дней после рождения.

Подробное описание изобретения

Сплайсинг и нонсенс-опосредованный распад мРНК.

Разделительные последовательности или интроны удаляют большим и очень динамическим комплексом РНК-белок, который называют сплайсосомой, которая организует сложные взаимодействия между первичными транскриптами, малыми ядерными РНК (snRNA) и большим количеством белков. Сплайсосомы собираются ad hoc на каждом интроне упорядоченным образом, начиная с узнавания 5'-сайта сплайсинга (5'ss) с помощью snRNA U1 или 3'-сайта сплайсинга (3'ss) с помощью пути U2, который включает в себя связывания вспомогательного фактора U2 (U2AF) с областью 3' ss, чтобы облегчить связывание U2 с последовательностью точки разветвления (BPS). U2AF представляет собой стабильный гетеродимер, состоящий из кодируемой субъединицы U2AF2 размером 65 кДа (U2AF65), которая связывает полипиримидиновый тракт (PPT), и кодируемой субъединицы U2AF1 размером 35 кДа (U2AF35), которая взаимодействует с высококонсервативными динуклеотидами AG в 3'ss и стабилизирует связывание U2AF65. В дополнение к блоку BPS/PPT и 3'ss/5'ss, точный сплайсинг требует вспомогательных последовательностей или структур, которые активируют или подавляют распознавание сайта сплайсинга, известных как интронные или экзонные энхансеры или сайленсеры сплайсинга. Эти элементы позволяют распознавать подлинные сайты сплайсинга среди огромного избытка крипто- или псевдосайтов в геноме высших эукариот, которые имеют те же последовательности, но превосходят аутентичные сайты на порядок величины. Хотя они часто имеют регуляторную функцию, точные механизмы их активации или репрессии плохо понятны.

Решение о том, следует ли подвергать сплайсингу или нет, как правило, можно смоделировать как посредством стохастического, а не детерминированного процесса, так что даже наиболее определенные сигналы сплайсинга иногда могут сращивать неправильно. Однако при нормальных условиях сплайсинг пре-мРНК происходит с удивительно высокой точностью. Это отчасти объясняется активностью соседних цис-действующих вспомогательных экзонных и интронных регуляторных элементов сплайсинга (ESR или ISR). Как правило, эти функциональные элементы классифицируют как либо экзонные или интронные энхансеры сплайсинга (ESE или ISE), либо сайленсеры сплайсинга (ESS или ISS) на основании их способности стимулировать или ингибировать сплайсинг, соответственно. Хотя в настоящее вре-

мя имеются доказательства того, что некоторые вспомогательные цис-действующие элементы могут действовать, воздействуя на кинетику сборки сплайсосомы, такую как расположение комплекса между U1 snRNP и 5'ss, представляется весьма вероятным, что многие элементы функционируют совместно с транс-действующими РНК-связывающими белками (RBP). Например, богатое серином и аргинином семейство RBP (SR-белки) представляет собой консервативное семейство белков, которые играют ключевую роль в определении экзонов. Белки SR стимулируют распознавание экзона путем рекрутинга компонентов пре-сплайсосомы к соседним сайтам сплайсинга или путем антагонизма эффектов ESS вблизи. Репрессивные эффекты ESS могут быть опосредованы представителями семейства гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnRNP) и могут изменять рекрутинг коровых факторов сплайсинга к соседним сайтам сплайсинга. В дополнение к их роли в регуляции сплайсинга предлагается, чтобы элементы сайленсера играли роль в подавлении псевдо-экзонов, наборов интронных сайтов-ловушей сплайсинга с типичным интервалом экзона, но без функциональной открытой рамки считывания. ESE и ESS в сотрудничестве с их родственными транс-действующими RBP представляют собой важные компоненты в наборе средств контроля сплайсинга, которые определяют, как, где и когда мРНК собираются из своих предшественников.

Последовательности обозначающие границы экзон-интрона представляют собой дегенеративные сигналы различной силы, которые могут происходить с высокой частотой в генах человека. В генах мульти-экзона различные пары сайтов сплайсинга могут быть связаны вместе во множестве различных комбинаций, создавая разнообразный массив транскриптов из одного гена. Это, как правило, называют альтернативным сплайсингом пре-мРНК. Хотя большинство изоформ мРНК, производимых альтернативным сплайсингом, можно экспортировать из ядра и транслировать в функциональные полипептиды, различные изоформы мРНК из одного гена могут сильно варьировать в своей эффективности трансляции. Эти изоформы мРНК с кодонами преждевременной терминации (PTC) по меньшей мере на 50 п.н. выше против хода транскрипции от комплекса экзонового соединения, вероятно, являются мишенями для деградации посредством нонсенс-опосредованного распада мРНК (NMD). Мутации в традиционных (BPS/PPT/3'ss/5'ss) и вспомогательных мотивах сплайсинга могут вызывать аберрантный сплайсинг, например, перепрыгивание экзона или включение криптического (или псевдо-) экзона или активацию сайта сплайсинга, и в значительной степени способствуют заболеваемости и смертности людей. Как аберрантные, так и альтернативные схемы сплайсинга могут подвергаться влиянию природных вариантов ДНК в экзонах и интронах. С учетом того, что границы экзона-интрона могут происходить в любой из трех позиций кодона, ясно, что только подмножество альтернативных событий сплайсинга может поддерживать каноническую открытую рамку считывания. Например, только экзоны, равномерно разделенные на 3, могут быть пропущены или включены в мРНК без какого-либо изменения рамки считывания. События сплайсинга, которые не имеют совместимых фаз, будут вызывать сдвиг рамки. Если не обратить вспять события ниже по ходу транскрипции, сдвиги рамки, безусловно, могут привести к одному или нескольким PTC, что, вероятно, приведет к последующей деградации в результате NMD. NMD представляет собой механизм, связанный с трансляцией, который устраняет мРНК, содержащие PTC. NMD может функционировать как контрольный процесс, который существует у всех эукариот. NMD может уменьшать ошибки в экспрессии генов, устраняя транскрипты мРНК, которые содержат преждевременные стоп-кодоны. Трансляция этих аберрантных мРНК может в некоторых случаях приводить к вредному усилению функции или доминантно-отрицательной активности полученных в результате белков. NMD нацеленно воздействует не только на транскрипты с PTC, но также и на широкий массив изоформ мРНК, экспрессируемых многими эндогенными генами, что говорит о том, что NMD является главным регулятором, который обеспечивает как тонкую, так и грубую регулировку содержания РНК в клетке в устойчивом состоянии.

NMD-индуцирующий экзон (NIE) представляет собой экзон или псевдоэкзон, который представляет собой область внутри интрона и может активировать путь NMD, если он включен в зрелый РНК-транскрипт. В конститутивных событиях сплайсинга интрон, содержащий NIE, как правило, сплайсирует, но интрон или его часть (например, NIE) может удерживаться во время альтернативных или аберрантных событий сплайсинга. Зрелые мРНК-транскрипты, содержащие такой NIE, могут быть непродуктивными вследствие сдвига рамки, который индуцирует путь NMD. Включение NIE в зрелые РНК-транскрипты может понижающе регулировать экспрессию генов. мРНК-транскрипты, содержащие NIE, в настоящем документе могут называться "NIE-содержащие мРНК" или "мРНК с экзоном NMD".

Криптические (или псевдо) сайты сплайсинга характеризуются теми же последовательностями распознавания сплайсинга, что и подлинные сайты сплайсинга, но не используются в реакциях сплайсинга. Они превосходят подлинные сайты сплайсинга в геноме человека на порядок и, как правило, репрессируются до сих пор плохо понятными молекулярными механизмами. Криптические 5'-сайты сплайсинга содержат консенсусную NNN/GUNNN или NNN/GCNNN, где N представляет собой любой нуклеотид и/или является границей экзон-интрона. Криптические 3'-сайты сплайсинга содержат консенсус NAG/N. На их активацию положительно влияют окружающие нуклеотиды, которые делают их более похожими на оптимальный консенсус аутентичных сайтов сплайсинга, а именно MAG/GURAGU и YAG/G, соответственно, где M представляет собой C или A, R представляет собой G или A, а Y представляет собой C или U.

Сайты сплайсинга и их регуляторные последовательности могут быть легко идентифицированы специалистом с использованием подходящих алгоритмов, общедоступных, перечисленных, например, в Kralovicova, J. and Vorechovsky, I. (2007) Global control of aberrant splice site activation by auxiliary splicing sequences: evidence for a gradient in exon and intron definition. Nucleic Acids Res., 35, 6399-6413,(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095810/pdf/gkm680.pdf). Криптические сайты сплайсинга или регуляторные последовательности сплайсинга могут конкурировать за РНК-связывающие белки, такие как U2AF, с сайтом сплайсинга NIE. Согласно одному варианту осуществления средство может связываться с криптическим сайтом сплайсинга или регуляторными последовательностями сплайсинга, чтобы предотвратить связывание РНК-связывающих белков и тем самым способствовать использованию сайтов сплайсинга NIE.

Согласно одному варианту осуществления криптический сайт сплайсинга может не содержать 5'- или 3'-сайт сплайсинга NIE. Криптический сайт сплайсинга может находиться по меньшей мере на 10 нуклеотидов выше против хода траскрипции от 5'-сайта сплайсинга NIE. Криптический сайт сплайсинга может находиться по меньшей мере на 20 нуклеотидов выше против хода траскрипции от 5'-сайта сплайсинга NIE. Криптический сайт сплайсинга может находиться по меньшей мере на 50 нуклеотидов выше против хода траскрипции от 5'-сайта сплайсинга NIE. Криптический сайт сплайсинга может находиться по меньшей мере на 100 нуклеотидов выше против хода траскрипции от 5'-сайта сплайсинга NIE. Криптический сайт сплайсинга может находиться по меньшей мере на 200 нуклеотидов выше против хода траскрипции от 5'-сайта сплайсинга NIE.

Криптический сайт сплайсинга может находиться по меньшей мере на 10 нуклеотидов ниже по ходу траскрипции от 3'-сайта сплайсинга NIE. Криптический сайт сплайсинга может находиться по меньшей мере на 20 нуклеотидов ниже по ходу траскрипции от 3'-сайта сплайсинга NIE. Криптический сайт сплайсинга может находиться по меньшей мере на 50 нуклеотидов ниже по ходу траскрипции от 3'-сайта сплайсинга NIE. Криптический сайт сплайсинга может находиться по меньшей мере на 100 нуклеотидов ниже по ходу траскрипции от 3'-сайта сплайсинга NIE. Криптический сайт сплайсинга может находиться по меньшей мере на 200 нуклеотидов ниже по ходу траскрипции от 3' -сайта сплайсинга NIE. Целевые транскрипты

Согласно некоторым вариантам осуществления способы по настоящему изобретению используют присутствие NIE в пре-мРНК, транскрибируемой из гена SCN1A. Сплайсинг идентифицированных форм пре-мРНК ЖЕ SCN1A для получения функциональной зрелой мРНК SCN1A может быть индуцирован с использованием терапевтического средства, такого как ASO, который стимулирует пропускание экзона NIE. Индукция пропуска экзона может привести к ингибированию пути NMD. Получающаяся в результате зрелая мРНК SCN1A может нормально транслироваться без активации пути NMD, тем самым увеличивая количество белка SCN1A в клетках пациента и облегчая симптомы состояния, связанного с дефицитом SCN1A, такого как синдром Драве (DS); эпилепсия, генерализованная, с фебрильными судорогами плюс, типа 2; фебрильные судороги, семейные, 3A; аутизм; эпилептическая энцефалопатия, раннего младенчества, 13; синдром слабости синусового узла 1; болезнь Альцгеймера или SUDEP.

Согласно различным вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрено терапевтическое средство, которое может быть нацелено на мРНК-транскрипты SCN1A для модуляции, например, усиления или ингибирования, сплайсинга или уровня экспрессии белка. Терапевтическое средство может представлять собой малую молекулу, полинуклеотид или полипептид. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой ASO. Различные области или последовательности на пре-мРНК SCN1A могут быть нацелены терапевтическим средством, таким как ASO. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на транскрипт пре-мРНК SCN1A, содержащий NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность в NIE транскрипта пре-мРНК SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную выше против хода транскрипции (или 5') от 5'-конца NIE (3'ss) транскрипта пре-мРНК SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную ниже по ходу транскрипции (или 3' от 3'-конца NIE (5'ss) транскрипта пре-мРНК SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, которая находится внутри интрона, фланкирующего 5'-конец NIE транскрипта пре-мРНК SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, которая находится внутри интрона, фланкирующего 3'-конец NIE транскрипта пре-мРНК SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, содержащую границу NIE-интрон транскрипта пре-мРНК SCN1A. Граница NIE-интрон может относиться к соединению интронной последовательности и области NIE. Интронная последовательность может фланкировать 5'-конец NIE или 3'-конец NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность в экзоне транскрипта пре-мРНК SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность в интроне транскрипта пре-мРНК SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, содержащую как часть интрона, так и часть экзона.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе терапевтическое средство модулирует связывание фактора, участвующего в сплайсинге мРНК с экзоном NMD.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе терапевтическое средство препятствует связыванию фактора, участвующего в сплайсинге мРНК с экзоном NMD.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе терапевтическое средство предотвращает связывание фактора, участвующего в сплайсинге мРНК с экзоном NMD.

Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство нацелено на целевую часть, расположенную в интронной области между двумя каноническими экзоновыми областями кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD, и причем интронная область содержит экзон NMD.

Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство нацелено на целевую часть, которая по меньшей мере частично перекрывается с экзоном NMD.

Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство нацелено на целевую часть, которая по меньшей мере частично перекрывается с интроном выше против хода транскрипции от экзона NMD.

Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство нацелено на целевую часть в экзоне NMD.

Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство нацелено на целевую часть, содержащую по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более последовательных нуклеотидов экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство нацелено на целевую часть, содержащую не более чем приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более последовательных нуклеотидов экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство нацелено на целевую часть, содержащую приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более последовательных нуклеотидов экзона NMD. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство нацелено на целевую часть, проксимальную к экзону NMD.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 4 до приблизительно 300 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от 5'-конца NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 1 до приблизительно 20 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 50 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 100 до приблизительно 150 нуклеотидов, от приблизительно 150 до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 200 до приблизительно 250 нуклеотидов, от приблизительно 250 до приблизительно 300, от приблизительно 250 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 350 до приблизительно 400 нуклеотидов, от приблизительно 450 до приблизительно 500 нуклеотидов, от приблизительно 550 до приблизительно 600 нуклеотидов, от приблизительно 650 до приблизительно 700 нуклеотидов, от приблизительно 750 до приблизительно 800 нуклеотидов, от приблизительно 850 до приблизительно 900 нуклеотидов, от приблизительно 950 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 1050 до приблизительно 1100 нуклеотидов, от приблизительно 1150 до приблизительно 1200 нуклеотидов, от приблизительно 1250 до приблизительно 1300 нуклеотидов, от приблизительно 1350 до приблизительно 1400 нуклеотидов или от приблизительно 1450 до приблизительно 1500 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от 5'-конца области NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO может быть нацелен на последовательность, расположенную более чем на 300 нуклеотидов выше против хода транскрипции от 5'-конца NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 4 до приблизительно 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции (или 3') от 3'-конца NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 1 до приблизительно 20 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 50 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 100 до приблизительно 150 нуклеотидов, от приблизительно 150 до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 200 до приблизительно 250 нуклеотидов, от приблизительно 250 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 350 до приблизительно 400 нуклеотидов, от приблизительно 450 до приблизительно 500 нуклеотидов, от приблизительно 550 до приблизительно 600 нуклеотидов, от приблизительно 650 до приблизительно 700 нуклеотидов, от приблизительно 750 до приблизительно 800 нуклеотидов, от приблизительно 850 до приблизительно 900 нуклеотидов, от приблизительно 950 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 1050 до приблизительно 1100 нуклеотидов, от приблизительно 1150 до приблизительно 1200 нуклеотидов, от приблизительно 1250 до приблизительно 1300 нуклеотидов, от приблизительно 1350 до приблизительно 1400 нуклеотидов или от приблизительно 1450 до приблизительно 1500 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3'-конца NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную более чем на 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3'-конца NIE.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 4 до приблизительно 300 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от 5'-конца NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на после-

довательность, расположенную по меньшей мере приблизительно на 1 нуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 10 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 20 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 80 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 85 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 90 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 95 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 96 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 97 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 98 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 99 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 100 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 101 нуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 102 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 103 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 104 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 105 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 110 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 120 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 150 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 200 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 300 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 400 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 500 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 600 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 700 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 800 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 900 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно на 1000 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от 5'-конца области NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от 4 до 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции (или 3') от 3'-конца NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную по меньшей мере приблизительно на 1 нуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 10 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 20 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 80 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 85 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 90 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 95 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 96 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 97 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 98 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 99 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 100 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 101 нуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 102 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 103 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 104 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 105 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 110 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 120 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 150 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 200 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 300 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 400 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 500 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 600 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 700 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 800 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 900 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно на 1000 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3'-конца NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную более чем на 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3'-конца NIE.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 4 до приблизительно 300 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от 5'-конца NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную не более чем приблизительно на 10 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 20 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 50 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 80 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 85 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 90 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 96 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 97 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 98 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 99 не более чем приблизительно на 100 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 101 нуклеотид, не более чем приблизительно на 102 нуклеотида, не более чем приблизительно на 103 нуклеотида, не более чем приблизительно на 104 нуклеотида, не более чем приблизительно на 105 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 110 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 120 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 150 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 200 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 300 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 400 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 500 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 600 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 700 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 800 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 900 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1000 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1100 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1200 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1300 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1400 нуклеотидов или не более чем приблизительно на 1500 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от 5'-конца области NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от 4 до 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции (или 3') от 3'-конца NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную не более чем приблизительно на 10 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 20 нуклеотидов, не более чем при-

близительно на 50 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 80 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 85 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 90 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 95 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 96 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 97 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 98 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 99 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 100 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 101 нуклеотид, не более чем приблизительно на 102 нуклеотида, не более чем приблизительно на 103 нуклеотида, не более чем приблизительно на 104 нуклеотида, не более чем приблизительно на 105 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 110 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 120 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 150 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 200 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 300 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 400 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 500 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 600 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 700 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 800 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 900 нуклеотидов или не более чем приблизительно на 1000 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1100 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1200 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1300 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1400 нуклеотидов или не более чем приблизительно на 1500 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3'-конца NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную более чем на 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3'-конца NIE.

Согласно некоторым вариантам осуществления NIE, как описано в настоящем документе, находится между GRCh37/hg19: chr2:166863740 и GRCh37/hg19: chr2:166863803, как показано на фиг. 2. Согласно некоторым вариантам осуществления 5'-конец NIE расположен в GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления 3'-конец NIE расположен в GRCh37/hg19: chr2:166863740. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 4 до приблизительно 300 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную от приблизительно 1 до приблизительно 20 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 50 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 100 до приблизительно 150 нуклеотидов, от приблизительно 150 до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 200 до приблизительно 250 нуклеотидов, от приблизительно 250 до приблизительно 300, от приблизительно 250 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 350 до приблизительно 400 нуклеотидов, от приблизительно 450 до приблизительно 500 нуклеотидов, от приблизительно 550 до приблизительно 600 нуклеотидов, от приблизительно 650 до приблизительно 700 нуклеотидов, от приблизительно 750 до приблизительно 800 нуклеотидов, от приблизительно 850 до приблизительно 900 нуклеотидов, от приблизительно 950 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 1050 до приблизительно 1100 нуклеотидов, от приблизительно 1150 до приблизительно 1200 нуклеотидов, от приблизительно 1250 до приблизительно 1300 нуклеотидов, от приблизительно 1350 до приблизительно 1400 нуклеотидов или от приблизительно 1450 до приблизительно 1500 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO может быть нацелен на последовательность, расположенную более чем на 300 нуклеотидов выше против хода транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 4 до приблизительно 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции (или 3') от GRCh37/hg19: chr2:166863740. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 1 до приблизительно 20 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 50 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 100 до приблизительно 150 нуклеотидов, от приблизительно 150 до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 200 до приблизительно 250 нуклеотидов, от приблизительно 250 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 350 до приблизительно 400 нуклеотидов, от приблизительно 450 до приблизительно 500 нуклеотидов, от приблизительно 550 до приблизительно 600 нуклеотидов, от приблизительно 650 до приблизительно 700 нуклеотидов, от приблизительно 750 до приблизительно 800 нуклеотидов, от приблизительно 850 до приблизительно 900 нуклеотидов, от приблизительно 950 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 1050 до приблизительно 1100 нуклеотидов, от приблизительно 1150 до приблизительно 1200 нуклеотидов, от приблизительно 1250 до приблизительно 1300 нуклеотидов, от приблизительно 1350 до приблизительно 1400 нуклеотидов или от приблизительно 1450 до приблизительно 1500 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от GRCh37/hg19: chr2:166863740. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную более чем на 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от GRCh37/hg19: chr2:166863740.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 4 до приблизительно 300 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную по меньшей мере приблизительно на 1

нуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 10 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 20 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 80 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 85 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 90 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 95 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 96 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 97 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 98 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 99 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 100 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 101 нуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 102 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 103 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 104 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 105 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 110 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 120 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 150 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 200 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 300 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 400 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 500 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 600 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 700 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 800 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 900 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно на 1000 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 4 до приблизительно 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции (или 3') от GRCh37/hg19: chr2:166863740. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную по меньшей мере приблизительно на 1 нуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 10 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 20 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 80 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 85 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 90 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 95 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 96 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 97 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 98 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 99 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 100 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 101 нуклеотид, по меньшей мере приблизительно на 102 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 103 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 104 нуклеотида, по меньшей мере приблизительно на 105 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 110 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 120 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 150 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 200 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 300 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 400 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 500 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 600 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 700 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 800 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно на 900 нуклеотидов или, по меньшей мере приблизительно на 1000 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от GRCh37/hg19: chr2:166863740. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную более чем на 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от GRCh37/hg19: chr2:166863740.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 4 до приблизительно 300 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную не более чем приблизительно на 10 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 20 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 50 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 80 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 85 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 90 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 95 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 96 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 97 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 98 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 99 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 100 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 101 нуклеотид, не более чем приблизительно на 102 нуклеотида, не более чем приблизительно на 103 нуклеотида, не более чем приблизительно на 104 нуклеотида, не более чем приблизительно на 105 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 110 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 120 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 150 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 200 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 300 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 400 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 500 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 600 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 700 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 800 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 900 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1000 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1100 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1200 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1300 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1400 нуклеотидов или не более чем приблизительно на 1500 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 4 до приблизительно 300 нуклеотидов

ниже по ходу транскрипции (или 3') от GRCh37/hg19: chr2:166863740. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную не более чем приблизительно на 10 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 20 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 50 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 80 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 85 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 90 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 95 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 96 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 97 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 98 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 99 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 100 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 101 нуклеотид, не более чем приблизительно на 102 нуклеотида, не более чем приблизительно на 103 нуклеотида, не более чем приблизительно на 104 нуклеотида, не более чем приблизительно на 105 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 110 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 120 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 150 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 200 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 300 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 400 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 500 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 600 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 700 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 800 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 900 нуклеотидов или не более чем приблизительно на 1000 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1100 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1200 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1300 нуклеотидов, не более чем приблизительно на 1400 нуклеотидов или не более чем приблизительно на 1500 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от GRCh37/hg19: chr2:166863740. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную более чем на 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от GRCh37/hg19: chr2:166863740.

Как описано в настоящем документе в примерах, ген SCN1A (SEQ ID NO: 1) анализировали на NIE и включение части интрона 20 (SEQ ID NO: 4) (эта часть упоминается как экзон 20x в настоящем раскрытии). Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе ASO нацелены на содержащую NIE пре-мРНК (SEQ ID NO. 2), транскрибированную из геномной последовательности SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на содержащий NIE транскрипт пре-мРНК из геномной последовательности SCN1A, содержащей часть интрона 20. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на содержащий NIE транскрипт пре-мРНК из геномной последовательности SCN1A, содержащей экзон 20x (SEQ ID NO: 6). Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на содержащий NIE транскрипт пре-мРНК SEQ ID NO. 2 или 12. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на содержащий NIE транскрипт пре-мРНК SEQ ID NO. 2 или 12, содержащий NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на содержащий NIE транскрипт пре-мРНК SEQ ID NO. 2, содержащий экзон 20x (SEQ ID NO: 10). Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе ASO нацелены на последовательность пре-мРНК SCN1A (SEQ ID NO: 2 или 12). Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность пре-мРНК SCN1A, содержащую NIE (SEQ ID NO. 10 или 20). Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность пре-мРНК SCN1A в соответствии с любой из SEQ ID NO: 7-10 или 17-20. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO характеризуется последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 21-67. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO характеризуется последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 68-114. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO характеризуется последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 115-209. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO характеризуется последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 210-256. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO характеризуется последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 257-303. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO характеризуется последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 304-341. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO характеризуется последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 342-379.

Согласно некоторым вариантам осуществления содержащий NIE транскрит пре-мРНК SCN1A кодируется генетической последовательностью с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по отношению к SEQ ID NO.: 1 или 11. Согласно некоторым вариантам осуществления содержащий NIE транскрит пре-мРНК SCN1A содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 2-10 и 12-20.

Согласно некоторым вариантам осуществления содержащий NIE транскрипт пре-мРНК SCN1A (или мРНК с экзоном NMD) содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 2, 7-10, 12 и 17-20. Согласно некоторым вариантам осуществления содержащий NIE транскрипт пре-мРНК SCN1A (или мРНК с экзоном NMD) кодируется последовательностью с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к SEQ ID NO: 1, 3-6, 11 и 13-16. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть мРНК с экзоном NMD содержит последовательность с идентичностью последовательно-

сти, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к области, содержащей по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 2, 7-10, 12 и 17-20.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на экзон 20 содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, содержащей экзон 20x NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность экзона 21 ниже по ходу транскрипции (или 3') от экзона 20x NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от 4 до 300 нуклеотидов выше против хода транскрипции (или 5') от 5'-конца экзона 20x. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность, расположенную на расстоянии от приблизительно 4 до приблизительно 300 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции (или 3') от 3'-конца экзона 20x. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO характеризуется последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 21-67. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO характеризуется последовательностью в соответствии с любой из SEQ ID NO: 210-256. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность выше против хода транскрипции от 5' конца NIE. Например, ASO, нацеленные на последовательность выше против хода транскрипции от 5'-конца NIE (например, экзон 20x в SCN1A человека или экзон 21x в SCN1A мыши), могут содержать последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 21-38. В другом примере ASO, нацеленные на последовательность выше против хода транскрипции от 5'-конца NIE (например, экзон 20x в SCN1A человека или экзон 21x в SCN1A мыши), могут содержать последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 68-85. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелены на последовательность, содержащую границу экзона с интроном (или соединение). Например, ASO, нацеленные на последовательность, содержащую границу экзона с интроном, могут содержать последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 39-41, 51, 52, 228-230, 240 или 241. В другом примере ASO, нацеленные на последовательность, содержащую границу экзона с интроном, могут содержать последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 86-88 и 98-99. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелены на последовательность ниже по ходу транскрипции от 3'-конца NIE. Например, ASO, нацеленные на последовательность, расположенную ниже по ходу транскрипции от 3'-конца NIE (например, экзон 20x в SCN1A человека или экзон 21x в SCN1A мыши), могут содержать последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 53-67. В другом примере ASO, нацеленные на последовательность, расположенную ниже по ходу транскрипции от 3'-конца NIE (например, экзон 20x в SCN1A человека или экзон 21x в SCN1A мыши), могут содержать последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 100-114. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелены на последовательность в NIE. Например, ASO, нацеленные на последовательность в NIE (например, экзон 20x в SCN1A человека или экзон 21x в SCN1A мыши), могут содержать последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 42-50 или 231-239. В другом примере ASO, нацеленные на последовательность в NIE (например, экзон 20x в SCN1A человека или экзон 21x в SCN1A мыши), могут содержать последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 89-97.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на экзон 20x в содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, содержащей экзон 20x. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность экзона 20x ниже по ходу транскрипции (или 3') от 5'-конца экзона 20x пре-мРНК SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO нацелен на последовательность экзона 20x выше против хода транскрипции (или 5') от 3'-конца экзона 20x пре-мРНК SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть содержащей NIE пре-мРНК SCN1A находится в интроне 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 (нумерация интронов соответствует последовательности мРНК в NM_006920). Согласно некоторым вариантам осуществления гибридизация ASO с целевой частью пре-мРНК с NIE приводит к пропуску экзона по меньшей мере одного из NIE в интроне 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25, и последующему производству SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления гибридизация ASO с целевой частью пре-мРНК с NIE ингибирует или блокирует пропускание экзона по меньшей мере одного из NIE внутри интрона 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 и впоследствии снижает производство белка SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть содержащей NIE пре-мРНК SCN1A находится в интроне 20. Специалист в настоящей области техники может определить соответствующий номер интрона в любой изоформе на основе последовательности интрона, представленной в настоящем документе, или с использованием номера, представленного в отношении последовательности мРНК, в NM_006920, NM_001202435, NM_001165964 или

NM_001165963. Специалист в настоящей области технике также может определить последовательности фланкирующих экзонов в любой изоформе SCN1A для нацеливания с использованием способов по настоящему изобретению на основе интронной последовательности, представленной в настоящем документе, или с использованием интронного номера, представленного в отношении последовательности мРНК в NM_006920, NM_001202435, NM_001165964 или NM_001165963.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы и композиции по настоящему изобретению используются для модуляции, например, увеличения или уменьшения, экспрессии SCN1A путем индукции или ингибирования пропускания экзона псевдоэкзона содержащей NIE пре-мРНК SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления псевдоэкзон представляет собой последовательность в пределах любого из интронов 1-25. Согласно некоторым вариантам осуществления псевдоэкзон представляет собой последовательность в пределах любого из интронов 2, 4, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24 и 25. Согласно некоторым вариантам осуществления псевдоэкзон представляет собой последовательность в пределах любого из интронов 15, 18 и 19. Согласно некоторым вариантам осуществления псевдоэкзон может представлять собой любой интрон SCN1A или его часть. Согласно некоторым вариантам осуществления псевдоэкзон находится в пределах интрона 20. Используемая в настоящем документе нумерация интронов SCN1A соответствует последовательности мРНК в NM_006920. Понятно, что нумерация интронов может изменяться по отношению к другой последовательности изоформы SCN1A.

Белок SCN1A.

Ген SCN1A может кодировать белок SCN1A (натриевый канал, потенциалзависимый, тип I, альфа-субъединица), который также можно назвать альфа-субъединицей потенциалзависимого натриевого канала $Na_v1.1$. Также описанные выше мутации SCN1A в DS распространяются по всему белку. Более 100 новых мутаций были идентифицированы по всему гену с более деструктивными возникающими de novo. Они содержат усечения (47%), миссенс-мутации (43%), делеции (3%) и мутации сайта сплайсинга (7%). Процент субъектов, несущих мутации SCN1A, колеблется от 33 до 100%. Большинство мутаций представляют собой новые изменения (88%). Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе способы используются для модуляции, например, увеличения или уменьшения, производства функционального белка SCN1A. Используемый в настоящем документе термин "функциональный" относится к величине активности или функции белка SCN1A, которая необходима для устранения любого одного или нескольких симптомов подвергаемого лечению состояния, например, синдром Драве (DS); эпилепсия, генерализованная, с фебрильными судорогами плюс, типа 2; фебрильные судороги, семейные, 3A; аутизм; эпилептическая энцефалопатия, раннего младенчества, 13; синдром слабости синусового узла 1; болезнь Альцгеймера или SUDEP. Согласно некоторым вариантам осуществления способы используются для увеличения производства частично функционального белка SCN1 A. Используемый в настоящем документе термин "частично функциональный" относится к любому количеству активности или функции белка SCN1A, которое меньше, чем количество активности или функции, которое необходимо для устранения или предотвращения любого одного или нескольких симптомов заболевания или состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления частично функциональный белок или РНК будет характеризоваться по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% меньшей активностью по отношению к полностью функциональному белку или РНК.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ представляет собой способ увеличения экспрессии белка SCN1A клетками субъекта, характеризующегося наличием содержащей NIE пре-мРНК, кодирующей белок SCN1A, причем у субъекта имеется синдром Драве, вызванный недостаточным количеством активности белка SCN1A, и причем недостаточное количество белка SCN1A вызвано гаплонедостаточностью белка SCN1A. Согласно такому варианту осуществления субъект содержит первый аллель, кодирующий функциональный белок SCN1A, и второй аллель, из которого белок SCN1A не производится. Согласно другому такому варианту осуществления субъект содержит первый аллель, кодирующий функциональный белок SCN1A, и второй аллель, кодирующий нефункциональный белок SCN1A. Согласно другому такому варианту осуществления субъект содержит первый аллель, кодирующий функциональный белок SCN1A, и второй аллель, кодирующий частично функциональный белок SCN1A. Согласно любому из этих вариантов осуществления антисмысловой олигомер связывается с целевой частью содержащей NIE пре-мРНК, транскрибируемой из второго аллеля, тем самым индуцируя пропускание экзона псевдоэкзона из пре-мРНК, и вызывая повышение содержания зрелой мРНК, кодирующей функциональный белок SCN1 A, и увеличение экспрессии белка SCN1A в клетках субъекта.

Согласно родственным вариантам осуществления способ представляет собой способ применения ASO для увеличения экспрессии белка или функциональной РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO используют для увеличения экспрессии белка SCN1A в клетках субъекта, характеризующегося наличием содержащей NIE пре-мРНК, кодирующей белок SCN1A, причем субъект имеет дефицит в количестве или функции белка SCN1A, например, синдром Драве (DS) (накже известный как SMEI); тяжелую миоклоническую эпилепсию младенцев (SMEI) - пограничную форму (SMEB); феб-

рильные судороги (FS); эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс (GEFS+); эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13; криптогенную генерализованную эпилепсию; криптогенную фокальную эпилепсию; эпилепсию с миоклонико-астатическими приступами; синдром Леннокса-Гасто; синдром Веста; идиопатические спазмы; раннюю миоклоническую энцефалопатию; прогрессирующую миоклоническую эпилепсию; альтернирующую гемиплегию детского возраста; неклассифицированную эпилептическую энцефалопатию; внезапную неожиданную смерть при эпилепсии (SUDEP); синдром слабости синусового узла 1; раннюю инфантильную SCN1A энцефалопатию; раннюю инфантильную эпилептическую энцефалопатию (EIEE) или аутизм. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO применяют для увеличения экспрессии белка SCN1A в клетках субъекта, причем субъект характеризуется недостаточностью, например, эпилептической энцефалопатией, ранней детской, 13; в количестве или функции белка SCN8A. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO применяют для увеличения экспрессии белка SCN1A в клетках субъекта, причем субъект характеризуется дефицитом, например, при синдроме слабости синусового узла 1, в количестве или функции белка SCN5A.

Согласно некоторым вариантам осуществления на содержащий NIE транскрипт пре-мРНК, кодирующий белок, который является причиной заболевания или состояния, нацеливаются описанные в настоящем документе ASO. Согласно некоторым вариантам осуществления на содержащий NIE транскрипт пре-мРНК, который кодирует белок, который не является причиной заболевания, нацеливаются ASO. Например, заболевание, которое является результатом мутации или дефицита первого белка в конкретном пути, может быть ослаблено путем нацеливания на содержащую NIE пре-мРНК, которая кодирует второй белок, тем самым увеличивая производство второго белка. Согласно некоторым вариантам осуществления функция второго белка способна компенсировать мутацию или дефицит первого белка (который является причиной заболевания или состояния). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект содержит:

(a) первый мутантный аллель, из которого (i) белок SCN1A производится в сниженном количестве по сравнению с производством из аллеля дикого типа, (ii) белок SCN1A производится в форме, характеризующейся пониженной функцией по сравнению с эквивалентным белком дикого типа, или (iii) белок SCN1A или функциональная РНК не производится; и

(b) второй мутантный аллель, из которого (i) белок SCN1A производится в сниженном количестве по сравнению с производством из аллеля дикого типа, (ii) белок SCN1A производится в форме, характеризующейся пониженной функцией по сравнению с эквивалентным белком дикого типа, или (iii) белок SCN1A не производится, и причем содержащая NIE пре-мРНК транскрибируется из первого аллеля и/или второго аллеля. Согласно этим вариантам осуществления ASO связывается с целевой частью содержащей NIE пре-мРНК, транскрибируемой из первого аллеля или второго аллеля, тем самым индуцируя пропускание экзона псевдоэкзона из содержащей NIE пре-мРНК, и вызывая увеличение содержания мРНК, кодирующей белок SCN1A, и увеличение экспрессии целевого белка или функциональной РНК в клетках субъекта. Согласно этим вариантам осуществления целевой белок или функциональная РНК, характеризующаяся повышенным уровнем экспрессии в результате пропуска экзона псевдоэкзона из содержащей NIE пре-мРНК, либо находится в форме, характеризующейся пониженной функцией по сравнению с эквивалентным белком дикого типа (частично функциональным), либо характеризующейся полной функцией по сравнению с эквивалентным белком дикого типа (полностью функциональным).

Согласно некоторым вариантам осуществления содержание мРНК, кодирующей белок SCN1A, увеличивается в 1,1-10 раз, по сравнению с количеством мРНК, кодирующей белок SCN1A, который производится в контрольной клетке, например, клетке, не обработанной антисмысловым олигомером, или клетке, обработанной антисмысловым олигомером, который не связывается с целевой частью содержащей NIE пре-мРНК SCN1A.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, подвергнутый лечению с использование способов по настоящему раскрытию, экспрессирует частично функциональный белок SCN1A из одного аллеля, причем частично функциональный белок SCN1A вызван мутацией сдвига рамки, нонсенс-мутацией, миссенс-мутацией или частичной делецией гена. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, подвергнутый лечению с использованием способов по настоящему изобретению, экспрессирует нефункциональный белок SCN1A из одного аллеля, причем нефункциональный белок SCN1A вызван мутацией сдвига рамки, нонсенс-мутацией, миссенс-мутацией или частичной делецией гена в одном аллеле. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, подвергнутый лечению с использованием способов по настоящему изобретению, характеризуется делецией целого гена SCN1A в одном аллеле. Согласно некоторым вариантам осуществления способ представляет собой способ уменьшения экспрессии белка SCN1A клетками субъекта, имеющего содержащую NIE пре-мРНК, кодирующую белок SCN1A, и причем субъект имеет мутацию с приобретением функции в $Na_v1.1$. Согласно такому варианту осуществления у субъекта имеется аллель, из которого белок SCN1A производится в повышенном количестве, или аллель, кодирующий мутантный SCN1A, который индуцирует повышенную активность $Na_v1.1$ в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления повышенная активность $Na_v1.1$ характеризуется пролонгированным или почти стойким натриевым потоком, опосредованным мутант-

ным каналом $Na_v1.1$, замедлением быстрой инактивации, положительным сдвигом в стационарной инактивации, более высокой доступностью канала при повторяющейся стимуляции, увеличением неинактивированных деполяризационно-индуцированных постоянных токов натрия, замедленным входом в инактивацию, ускоренным восстановлением после быстрой инактивации и/или спасением от дефектов укладки путем инкубации при более низкой температуре или совместной экспрессии взаимодействующих белков. Согласно любому из этих вариантов осуществления антисмысловой олигомер связывается с целевой частью содержащей NIE пре-мРНК, транскрибируемой из второго аллеля, таким образом, ингибируя или блокируя пропускание экзона псевдоэкзона из пре-мРНК, и вызывая снижение содержания зрелой мРНК, кодирующей функциональный белок SCN1 A, и снижение экспрессии белка SCN1A в клетках субъекта.

Согласно родственным вариантах осуществления способ представляет собой способ применения ASO для уменьшения экспрессии белка или функциональной РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO применяют для уменьшения экспрессии белка SCN1A в клетках субъекта, имеющего содержащую NIE пре-мРНК, кодирующую белок SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется наличием мутации с приобретением функции в $Na_v1.1$, например, мигрени. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO применяется для уменьшения экспрессии белка SCN1A в клетках субъекта, который характеризуется наличием мутации с приобретением функции в $Na_v1.1$, например, мигрени, наследственной гемиплегической, 3.

Согласно некоторым вариантам осуществления содержание мРНК, кодирующей белок SCN1A, снижается в 1,1-10 раз, по сравнению с количеством мРНК, кодирующей белок SCN1A, который производится в контрольной клетке, например, клетке, не обработанной антисмысловым олигомером, или клетке, обработанной антисмысловым олигомером, который не связывается с целевой частью содержащей NIE пре-мРНК SCN1A.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, подвергнутый лечению с использование способов по настоящему раскрытию, экспрессирует мутантный белок SCN1A из одного аллеля, причем мутантный белок SCN1A вызван мутацией сдвига рамки, нонсенс-мутацией, миссенс-мутацией или частичной делецией гена, и причем мутантный белок SCN1A вызван повышенным уровнем активности $Na_v1.1$. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, подвергнутый лечению с использованием способов по настоящему раскрытию, экспрессирует повышенное количество белка SCN1A из одного аллеля из-за мутации сдвига рамки, нонсенс-мутации, миссенс-мутации или частичной делеции гена.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения субъект может характеризоваться наличием мутации в SCN1A. Мутации в SCN1A могут распространяться по всему указанному гену. Белок SCN1A может состоять из четырёх доменов. Указанные домены SCN1A могут содержать трансмембранные сегменты. Мутации в указанном белке SCN1A могут возникать во всем указанном белке. Указанный белок SCN1A может состоять по меньшей мере из двух изоформ. Мутации в SCN1A могут включать в себя R931C, R946C, M934I, R1648C или R1648H. В некоторых случаях мутации могут наблюдаться на С-конце белка SCN1A. Мутации в белке SCN1A также могут быть обнаружены в петлях между сегментами 5 и 6 первых трех доменов указанного белка SCN1A. В некоторых случаях мутации могут наблюдаться на N-конце белка SCN1A. Иллюстративные мутации в SCN1A включают в себя, без ограничения, R222X, R712X, I227S, R1892X, W952X, R1245X, R1407X, W1434R, c.4338+1G>A, S1516X, L1670fsX1678 или K1846fsX1856. Мутации, которые могут быть нацелены в настоящем изобретении, также могут кодировать поры ионного канала.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе способы и композиции могут быть использованы для лечения DS. Согласно другим вариантам осуществления описанные в настоящем документе способы и композиции могут быть использованы для лечения тяжелой миоклонической эпилепсии младенчества (SMEI). Согласно другим вариантам осуществления описанные в настоящем документе способы и композиции могут быть использованы для лечения пограничной формы синдрома Драве (DS); эпилепсии, генерализованной, с фебрильными судорогами плюс, типа 2; фебрильных судорог, наследственных, 3A; мигрени, наследственной гемиплегической, 3; аутизма; эпилептической энцефалопатии, раннего младенчества, 13; синдрома слабости синусового узла 1; болезни Альцгеймера или SUDEP. Описанные в настоящем документе способы и композиции также могут быть использованы для лечения пограничной формы SMEI. Кроме того, описанные в настоящем документе способы и композиции могут быть использованы для лечения генерализованной эпилепсии с фебрильными судорогами плюс (GEFS+). GEFS+ может быть связана с мутациями в субъединицах ионных каналов, связанных с эпилепсией, таких как SCN1B или GABRG2. Описанные в настоящем документе способы и композиции также могут быть использованы для лечения натриевых каналопатий. Натриевые каналопатии могут быть связаны с мутациями в SCN1A. Натриевые каналопатии также могут быть связаны с субъединицами SCN1A, такими как бета-субъединица, SCN1B. В некоторых случаях дополнительные заболевания, связанные с мутациями SCN1A, также могут быть подвергнуты лечению по настоящему раскрытию. К сопутствующим заболеваниям SCN1A, связанным с мутациями SCN1A, относятся, без ограничения, атипичная врожденная миотония, гиперкалемический периодический паралич и врожденная парамиотония.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, характеризующийся наличием любой му-

тации SCN1A, известной в настоящей области техники и описанной в литературе, указанной выше (например, Hamdan, et al., 2009, Mulley, et al., 2005), может быть подвергнут лечению с использованием описанных в настоящем документе способов и композиций. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация находится в пределах любого интрона или экзона SCN1A.

Включение экзона.

Используемый в настоящем документе термин "содержащая NIE пре-мРНК" представляет собой транскрипт пре-мРНК, который содержит по меньшей мере один псевдоэкзон. Альтернативный или аберрантный сплайсинг может привести к включению по меньшей мере одного псевдоэкзона в зрелые транскрипты мРНК. Термины "зрелая мРНК" и "полностью сплайсированная мРНК" используются в настоящем документе взаимозаменяемо для описания полностью процессированной мРНК. Включение по меньшей мере одного псевдоэкзона может представлять собой непродуктивную мРНК и приводить к NMD зрелой мРНК. Содержащая NIE зрелая мРНК может иногда приводить к аберрантной экспрессии белка.

Согласно некоторым вариантам осуществления включенный псевдоэкзон представляет собой наиболее распространенный псевдоэкзон в популяции содержащих NIE пре-мРНК, транскрибируемых из гена, кодирующего целевой белок в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления включенный псевдоэкзон представляет собой наиболее распространенный псевдоэкзон в популяции содержащих NIE пре-мРНК, транскрибируемых из гена, кодирующего целевой белок в клетке, причем популяция содержащих NIE пре-мРНК содержит два или более включенных псевдоэкзонов. Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигомер, нацеленный на самый распространенный псевдоэкзон в популяции содержащих NIE пре-мРНК, кодирующих целевой белок, индуцирует пропуск экзона одного или двух или более псевдоэкзонов в популяции, включая в себя псевдоэкзон, на который нацелен антисмысловой олигомер или с которым он связывается. Согласно вариантам осуществления целевая область находится в псевдоэкзоне, который является наиболее распространенным псевдоэкзоном в содержащей NIE пре-мРНК, кодирующей белок SCN1A.

Степень включения экзона может быть выражена как процент включения экзона, например, процент транскриптов, в которые включен данный псевдоэкзон. Вкратце, процент включения экзона можно рассчитать как процент количества транскриптов РНК с включением экзона от суммы среднего количества транскриптов РНК с включением экзона плюс среднее количество транскриптов РНК с исключением экзона. Согласно некоторым вариантам осуществления включенный псевдоэкзон представляет собой экзон, который идентифицируется как включенный псевдоэкзон на основе определения включения, составляющего по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45% или по меньшей мере приблизительно 50%. Согласно вариантам осуществления включенный псевдоэкзон представляет собой экзон, который идентифицируется как включенный псевдоэкзон на основе определения включения, составляющего от приблизительно 5% до приблизительно 100%, от приблизительно 5% до приблизительно 95%, от приблизительно 5% до приблизительно 90%, от приблизительно 5% до приблизительно 85%, от приблизительно 5% до приблизительно 80%, от приблизительно 5% до приблизительно 75%, от приблизительно 5% до приблизительно 70%, от приблизительно 5% до приблизительно 65%, от приблизительно 5% до приблизительно 60%, от приблизительно 5% до приблизительно 55%, от приблизительно 5% до приблизительно 50%, от приблизительно 5% до приблизительно 45%, от приблизительно 5% до приблизительно 40%, от приблизительно 5% до приблизительно 35%, от приблизительно 5% до приблизительно 30%, от приблизительно 5% до приблизительно 25%, от приблизительно 5% до приблизительно 20%, от приблизительно 5% до приблизительно 15%, от приблизительно 10% до приблизительно 100%, от приблизительно 10% до приблизительно 95%, от приблизительно 10% до приблизительно 90%, от приблизительно 10% до приблизительно 85%, от приблизительно 10% до приблизительно 80%, от приблизительно 10% до приблизительно 75%, от приблизительно 10% до приблизительно 70%, от приблизительно 10% до приблизительно 65%, от приблизительно 10% до приблизительно 60%, от приблизительно 10% до приблизительно 55%, от приблизительно 10% до приблизительно 50%, от приблизительно 10% до приблизительно 45%, от приблизительно 10% до приблизительно 40%, от приблизительно 10% до приблизительно 35%, от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 10% до приблизительно 25%, от приблизительно 10% до приблизительно 20%, от приблизительно 15% до приблизительно 100%, от приблизительно 15% до приблизительно 95%, от приблизительно 15% до приблизительно 90%, от приблизительно 15% до приблизительно 85%, от приблизительно 15% до приблизительно 80%, от приблизительно 15% до приблизительно 75%, от приблизительно 15% до приблизительно 70%, от приблизительно 15% до приблизительно 65%, от приблизительно 15% до приблизительно 60%, от приблизительно 15% до приблизительно 55%, от приблизительно 15% до приблизительно 50%, от приблизительно 15% до приблизительно 45%, от приблизительно 15% до приблизительно 40%, от приблизительно 15% до приблизительно 35%, от приблизительно 15% до приблизительно 30%, от приблизительно 15% до приблизительно 25%, от приблизительно 20% до приблизительно 100%, от приблизительно 20% до приблизительно 95%,

от приблизительно 20% до приблизительно 90%, от приблизительно 20% до приблизительно 85%, от приблизительно 20% до приблизительно 80%, от приблизительно 20% до приблизительно 75%, от приблизительно 20% до приблизительно 70%, от приблизительно 20% до приблизительно 65%, от приблизительно 20% до приблизительно 60%, от приблизительно 20% до приблизительно 55%, от приблизительно 20% до приблизительно 50%, от приблизительно 20% до приблизительно 45%, от приблизительно 20% до приблизительно 40%, от приблизительно 20% до приблизительно 35%, от приблизительно 20% до приблизительно 30%, от приблизительно 25% до приблизительно 100%, от приблизительно 25% до приблизительно 95%, от приблизительно 25% до приблизительно 90%, от приблизительно 25% до приблизительно 85%, от приблизительно 25% до приблизительно 80%, от приблизительно 25% до приблизительно 75%, от приблизительно 25% до приблизительно 70%, от приблизительно 25% до приблизительно 65%, от приблизительно 25% до приблизительно 60%, от приблизительно 25% до приблизительно 55%, от приблизительно 25% до приблизительно 50%, от приблизительно 25% до приблизительно 45%, от приблизительно 25% до приблизительно 40% или от приблизительно 25% до приблизительно 35%. Данные ENCODE (описанные, например, Tilgner, et al., 2012, "Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs," Genome Research 22(9): 1616-25) могут использоваться, чтобы помочь в идентификации включения экзона.

Согласно некоторым вариантам осуществления контактирование клеток с ASO, который комплементарен целевой части транскрипта пре-мРНК SCN1A, приводит к увеличению количества производимого белка SCN1A по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 1000%, по сравнению с количеством белка, производимого клеткой при отсутствии ASO/отсутствии лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления общее количество белка SCN1A производимого клеткой, с которой контактирует антисмысловой олигомер, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с количеством целевого белка, производимого контрольным соединением. Контрольное соединение может представлять собой, например, олигонуклеотид, который не комплементарен целевой части пре-мРНК. Согласно некоторым вариантам осуществления контактирование клеток с ASO, который комплементарен целевой части транскрипта пре-мРНК SCN1A, приводит к уменьшению количества производимого белка SCN1A по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 1000%, по сравнению с количеством белка, производимого клеткой при отсутствии ASO/отсутствии лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления общее количество белка SCN1A производимое клеткой, с которой контактирует антисмысловой олигомер, уменьшается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с количеством целевого белка, производимого контрольным соединением. Контрольное соединение может представлять собой, например, олигонуклеотид, который не комплементарен целевой части пре-мРНК. Согласно некоторым вариантам осуществления контактирование клеток с ASO, который комплементарен целевой части транскрипта пре-мРНК SCN1A, приводит к увеличению

количества кодирующей SCN1A мРНК, включая в себя зрелую мРНК, кодирующую целевой белок. Согласно некоторым вариантам осуществления количество мРНК, кодирующей белок SCN1A, или зрелой мРНК, кодирующей белок SCN1A, увеличивается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 1000%, по сравнению с количеством белка, производимого клеткой при отсутствии ASO/отсутствии лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления общее количество мРНК, кодирующей белок SCN1A, или зрелой мРНК, кодирующей белок SCN1A, производимое в клетке, с которой контактирует антисмысловой олигомер, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с количеством зрелой РНК, производимой в непроцессированной клетке, например, необработанной клетке или клетке, обработанной контрольным соединением. Контрольное соединение может представлять собой, например, олигонуклеотид, который не комплементарен целевой части содержащей NIE пре-мРНК SCN1A.

Согласно некоторым вариантам осуществления контактирование клеток с ASO, который комплементарен целевой части транскрипта пре-мРНК SCN1A, приводит к уменьшению количества кодирующей SCN1A мРНК, включая в себя зрелую мРНК, кодирующую целевой белок. Согласно некоторым вариантам осуществления количество мРНК, кодирующей белок SCN1A, или зрелой мРНК, кодирующей белок SCN1A, уменьшается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 1000%, по сравнению с количеством белка, производимого клеткой при отсутствии ASO/отсутствии лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления общее количество мРНК, кодирующей белок SCN1A, или зрелой мРНК, кодирующей белок SCN1A, производимой в клетке, с которой контактирует антисмысловой олигомер, уменьшается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с количеством зрелой РНК, производимой в непроцессированной клетке, например, необработанной клетке или клетке, обработанной контрольным соединением. Контрольное соединение может представлять собой, например, олигонуклеотид, который не комплементарен целевой части содержащей NIE пре-мРНК SCN1A.

NIE может быть любой длины. Согласно некоторым вариантам осуществления NIE содержит полную последовательность интрона, в этом случае его можно отнести к удерживанию интрона. Согласно некоторым вариантам осуществления NIE может представлять собой часть интрона. Согласно некоторым вариантам осуществления NIE может представлять собой 5'-концевую часть интрона, включающую в себя последовательность 5'ss. Согласно некоторым вариантам осуществления NIE может представлять собой 3'-концевую частью интрона, включающую в себя последовательность 3'ss. Согласно некоторым вариантам осуществления NIE может представлять собой часть интрона без включения последовательности 5'ss Согласно некоторым вариантам осуществления NIE может представлять собой часть интрона без включения последовательности 3'ss. Согласно некоторым вариантам осуществления NIE может представлять собой часть в интроне без включения последовательности 5'ss или 3'ss. Согласно некоторым

вариантам осуществления NIE может составлять от 5 нуклеотидов до 10 нуклеотидов в длину, от 10 нуклеотидов до 15 нуклеотидов в длину, от 15 нуклеотидов до 20 нуклеотидов в длину, от 20 нуклеотидов до 25 нуклеотидов в длину, от 25 нуклеотидов до 30 нуклеотидов в длину, от 30 нуклеотидов до 35 нуклеотидов в длину, от 35 нуклеотидов до 40 нуклеотидов в длину, от 40 нуклеотидов до 45 нуклеотидов в длину, от 45 нуклеотидов до 50 нуклеотидов в длину, от 50 нуклеотидов до 55 нуклеотидов в длину, от 55 нуклеотидов до 60 нуклеотидов в длину, от 60 нуклеотидов до 65 нуклеотидов в длину, от 65 нуклеотидов до 70 нуклеотидов в длину, от 70 нуклеотидов до 75 нуклеотидов в длину, от 75 нуклеотидов до 80 нуклеотидов в длину, от 80 нуклеотидов до 85 нуклеотидов в длину, от 85 нуклеотидов до 90 нуклеотидов в длину, от 90 нуклеотидов до 95 нуклеотидов в длину или от 95 нуклеотидов до 100 нуклеотидов в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления NIE может составлять по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 20 нуклеотидов, по меньшей мере 30 нуклеотидов, по меньшей мере 40 нуклеотидов, по меньшей мере 50 нуклеотидов, по меньшей мере 60 нуклеотидов, по меньшей мере 70 нуклеотидов, по меньшей мере 80 нуклеотидов в длину, по меньшей мере 90 нуклеотидов или по меньшей мере 100 нуклеотидов в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления NIE может составлять от 100 до 200 нуклеотидов в длину, от 200 до 300 нуклеотидов в длину, от 300 до 400 нуклеотидов в длину, от 400 до 500 нуклеотидов в длину, от 500 до 600 нуклеотидов в длину, от 600 до 700 нуклеотидов в длину, от 700 до 800 нуклеотидов в длину, от 800 до 900 нуклеотидов в длину, от 900 до 1000 нуклеотидов в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления NIE может составлять в длину более чем 1000 нуклеотидов. Включение псевдоэкзона может приводить к сдвигу рамки и введению кодона преждевременной терминации (PIC) в зрелый транскрипт мРНК, делающий транскрипт мишенью NMD. Зрелый транскрипт мРНК, содержащий NIE, может представлять собой непродуктивный транскрипт мРНК, который не приводит к экспрессии белка. PIC может находиться в любом положении после NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления PIC может присутствовать в любом экзоне после NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления PIC может присутствовать в NIE. Например, включение экзона 20х в транскрипт мРНК, кодируемый геном SCN1A, может индуцировать PIC в транскрипте мРНК, например PIC в экзоне 21 транскрипта мРНК.

Терапевтические средства.

Согласно различным вариантам осуществления настоящего раскрытия предусмотрены композиции и способы, содержащие терапевтическое средство для модуляции уровня экспрессии белка SCN1A. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции и способы модулирования альтернативного сплайсинга пре-мРНК SCNA1. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрены композиции и способы индуцирования пропуска экзона при сплайсинге пре-мРНК SCN1A, например, для индуцирования пропуска псевдоэкзона во время сплайсинга пре-мРНК SCN1A. Согласно другим вариантам осуществления терапевтические средства могут быть использованы для индуцирования включения экзона с целью снижения уровня экспрессии белка.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе терапевтическое средство представляет собой небольшую молекулу, полипептид или полимер полинуклеиновой кислоты. В некоторых случаях терапевтическое средство представляет собой небольшую молекулу. В некоторых случаях терапевтическое средство представляет собой полипептид. В некоторых случаях терапевтическое средство представляет собой полимер полинуклеиновой кислоты. В некоторых случаях терапевтическое средство представляет собой репрессор. В дополнительных случаях терапевтическое средство представляет собой энхансер.

Описанное в настоящем документе терапевтическое средство может представлять собой репрессор NIE. Терапевтическое средство может содержать полимер полинуклеиновой кислоты.

В соответствии с одним аспектом настоящего раскрытия в настоящем документе предложен способ лечения или профилактики состояния, связанного с дефицитом функционального белка SCN1A, предусматривающий введение средства-репрессора NIE субъекту с повышением содержания функционального белка SCN1A; причем средство связывается с областью транскрипта пре-мРНК для уменьшения включения NIE в зрелый транскрипт. Например, в настоящем документе представлен способ лечения или профилактики состояния, связанного с дефицитом функционального белка SCN1A, предусматривающий введение репрессора NIE субъекту для повышения содержания функционального белка SCN1A, причем средство связывается с областью интрона, содержащей NIE (например, интрон 20 в гене SCN1A человека) транскрипта пре-мРНК или с NIE-активирующей регуляторной последовательности в том NIE самом интроне. Когда делается ссылка на уменьшение включения NIE в зрелую мРНК, снижение может быть полным, например, 100%, или может быть частичным. Снижение может быть клинически значительным. Снижение/коррекция может быть относительно уровня включения NIE у субъекта без лечения или относительно количества включения NIE в популяцию аналогичных субъектов. Снижение/коррекция может быть по меньшей мере на 10% меньше включения NIE относительно среднего субъекта или субъекта до лечения. Снижение может быть по меньшей мере на 20% меньше включения NIE относительно среднего субъекта или субъекта до лечения. Снижение может быть по меньшей мере на 40% меньше включения NIE относительно среднего субъекта или субъекта до лечения. Снижение может быть по меньшей мере

на 50% меньше включения NIE относительно среднего субъекта или субъекта до лечения. Снижение может быть по меньшей мере на 60% меньше включения NIE относительно среднего субъекта или субъекта до лечения. Снижение может быть по меньшей мере на 80% меньше включения NIE относительно среднего субъекта или субъекта до лечения. Снижение может быть по меньшей мере на 90% меньше включения NIE относительно среднего субъекта или субъекта до лечения.

Когда делается ссылка на увеличение содержания активного белка SCN1A, увеличение может быть клинически значительным. Увеличение может быть относительно содержания активного белка SCN1A у субъекта без лечения или относительно количества активного белка SCN1A в популяции подобных субъектов. Увеличение может быть по меньшей мере на 10% больше активного белка SCN1A по сравнению со средним субъектом или субъектом до лечения. Увеличение может быть по меньшей мере на 20% больше активного белка SCN1A по сравнению со средним субъектом или субъектом до лечения. Увеличение может быть по меньшей мере на 40% больше активного белка SCN1A по сравнению со средним субъектом или субъектом до лечения. Увеличение может быть по меньшей мере на 50% больше активного белка SCN1A по сравнению со средним субъектом или субъектом до лечения. Увеличение может быть по меньшей мере на 80% больше активного белка SCN1A по сравнению со средним субъектом или субъектом до лечения. Увеличение может быть по меньшей мере на 100% больше активного белка SCN1A по сравнению со средним субъектом или субъектом до лечения. Увеличение может быть по меньшей мере на 200% больше активного белка SCN1A по сравнению со средним субъектом или субъектом до лечения. Увеличение может быть по меньшей мере на 500% больше активного белка SCN1A по сравнению со средним субъектом или субъектом до лечения.

Согласно вариантам осуществления, в которых средство-репрессор NIE содержит полимер полинуклеиновой кислоты, полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 50 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 45 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 40 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 35 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 30 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 24 нуклеотида. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 25 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 20 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 19 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 18 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 17 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 16 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 15 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 14 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 13 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 12 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 11 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину приблизительно 10 нуклеотидов.

Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину от приблизительно 10 до приблизительно 50 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину от приблизительно 10 до приблизительно 45 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину от приблизительно 10 до приблизительно 40 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину от приблизительно 10 до приблизительно 35 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину от приблизительно 10 до приблизительно 30 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину от приблизительно 10 до приблизительно 25 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину от приблизительно 10 до приблизительно 20 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину от приблизительно 15 до приблизительно 25 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов. Полимер полинуклеиновой кислоты может составлять в длину от приблизительно 12 до приблизительно 30 нуклеотидов.

Последовательность полимера полинуклеиновой кислоты может характеризоваться комплементарностью, составляющей по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% по отношению к целевой последовательности транскрипта мРНК, например, частично процессированному транскрипту мРНК. Последовательность полимера полинуклеиновой кислоты может быть на 100% комплементарна целевой последовательности транскрипта пре-мРНК.

Последовательность полимера полинуклеиновой кислоты может иметь 4 или меньше несоответствий с целевой последовательностью транскрипта пре-мРНК. Последовательность полимера полинуклеиновой кислоты может иметь 3 или менее несоответствий с целевой последовательностью транскрипта пре-мРНК. Последовательность полимера полинуклеиновой кислоты может иметь 2 или менее несоответствий с целевой последовательностью транскрипта пре-мРНК. Последовательность полимера полинуклеиновой кислоты может иметь 1 или менее несоответствий с целевой последовательностью транс-

крипта пре-мРНК. Последовательность полимера полинуклеиновой кислоты может не иметь несоответствий с целевой последовательностью транскрипта пре-мРНК.

Полимер полинуклеиновой кислоты может специфически гибридизоваться с целевой последовательностью транскрипта пре-мРНК. Например, полимер полинуклеиновой кислоты может характеризоваться комплементарностью последовательности, составляющей 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% по отношению к целевой последовательности транскрипта пре-мРНК. Гибридизация может осуществляться в условиях высокой строгости гибридизации. У полимера полинуклеиновой кислоты может быть последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% по отношению к последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 21-67. Полимер полинуклеиновой кислоты может иметь последовательность со 100% идентичностью последовательности по отношению к последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-67. В некоторых случаях у полимера полинуклеиновой кислоты может быть последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% по отношению к последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 68-114. В некоторых случаях полимер полинуклеиновой кислоты может иметь последовательность со 100% идентичностью последовательности по отношению к последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 68-114.

Когда делается ссылка на последовательность полимера полинуклеиновой кислоты, специалисту в настоящей области техники будет понятно, что может быть допустима одна или несколько замен, необязательно могут быть допустимы две замены в последовательности, так что она сохраняет способность гибридизоваться с целевой последовательностью; или когда замена находится в целевой последовательности, способность распознавать как целевую последовательность. Ссылки на идентичность последовательности могут быть определены выравниванием последовательности BLAST с использованием параметров стандарт/дефолт. Например, последовательность может характеризоваться идентичностью 99% и все еще функционировать в соответствии с настоящим изобретением. Согласно другим вариантам осуществления последовательность может характеризоваться идентичностью 98% и все еще функционировать в соответствии с настоящим раскрытием. Согласно другому варианту осуществления последовательность может характеризоваться идентичностью 95% и все еще функционировать в соответствии с настоящим раскрытием. Согласно другому варианту осуществления последовательность может характеризоваться идентичностью 90% и все еще функционировать в соответствии с настоящим раскрытием.
Антисмысловые олигомеры

В настоящем документе предусмотрена композиция, содержащая антисмысловой олигомер, который индуцирует пропуск экзона путем связывания с целевой частью содержащей NIE пре-мРНК SCN1A. Используемые в настоящем документе термины "ASO" и "антисмысловой олигомер" используются взаимозаменяемо и относятся к олигомеру, такому как полинуклеотид, содержащему нуклеозиды, которые гибридизуются с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты (например, содержащей NIE пре-мРНК SCN1A) путем уотсон-криковского спаривания оснований или неоднозначного спаривания оснований (G-U). ASO может иметь точную последовательность, комплементарную целевой последовательности или близкой комплементарности (например, достаточную комплементарность для связывания целевой последовательности и усиления сплайсинга в сайте сплайсинга). ASO сконструированы таким образом, что они связываются (гибридизуются) с целевой нуклеиновой кислотой (например, целевой частью транскрипта пре-мРНК) и остаются гибридизованными в физиологических условиях. Как правило, если они гибридизуются с сайтом, отличным от предполагаемой (целевой) последовательности нуклеиновой кислоты, они гибридизуются с ограниченным числом последовательностей, которые не являются целевой нуклеиновой кислотой (с несколькими сайтами, отличными от целевой нуклеиновой кислоты). Дизайн ASO может принимать во внимание появление последовательности нуклеиновой кислоты целевой части транскрипта пре-мРНК или достаточно похожей последовательности нуклеиновой кислоты в других местах генома или клеточной пре-мРНК или транскриптомы, так что вероятность того, что ASO будет связываться с другими сайтами и вызывать "нецелевые" эффекты, ограничена. Любые антисмысловые олигомеры, известные в настоящей области техники, например, в заявке PCT No PCT/US2014/054151, опубликованной как WO 2015/035091, под названием "Reading Sterepth-Mediated mRNA Decay", включенной в настоящий документ посредством ссылки, могут быть использованы для практического применения описанных в настоящем документе способов.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO "специфически гибридизуются" или являются "специфическими" для целевой нуклеиновой кислоты или целевой части содержащей NIE пре-мРНК. Как правило, такая гибридизация происходит с T_m, существенно превышающей 37°C, предпочтительно по меньшей мере 50°C и, как правило, от 60°C до приблизительно 90°C. Такая гибридизация предпочтительно соответствует строгим условиям гибридизации. При данной ионной силе и pH T_m представляет собой температуру, при которой 50% целевой последовательности гибридизуется с комплементарным олигонуклеотидом.

Олигомеры, такие как олигонуклеотиды, являются "комплементарными" друг другу, когда гибридизация происходит в антипараллельной конфигурации между двумя одноцепочечными полинуклеотидами. Двухцепочечный полинуклеотид может быть "комплементарным" другому полинуклеотиду, если гибридизация может происходить между одной из цепей первого полинуклеотида и второго. Комплементарность (степень, в которой один полинуклеотид комплементарен другому) поддается количественной оценке с точки зрения пропорции (например, процента) оснований в противоположных цепях, которые, как ожидается, образуют водородные связи друг с другом в соответствии с общепринятыми правилами спаривания оснований. Последовательность антисмыслового олигомера (ASO) не обязательно должна быть на 100% комплементарной последовательности его целевой нуклеиновой кислоты для гибридизации. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO могут содержать последовательность, комплементарную по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% по отношению к целевой области в целевой последовательности нуклеиновой кислоты, на которую они нацелены. Например, ASO, в котором 18 из 20 нуклеотидных оснований олигомерного соединения комплементарны целевой области и поэтому должны специфически гибридизоваться, будут представлять 90% комплементарности. В этом примере оставшиеся не комплементарные нуклеозиды могут быть сгруппированы вместе или переплетены с комплементарными нуклеотидными основаниями и не обязательно должны быть смежными друг с другом или с комплементарными нуклеотидными основаниями. Процент комплементарности ASO с областью целевой нуклеиновой кислоты может быть определен обычным образом с использованием программ BLAST (основные средства поиска локального выравнивания) и программ PowerBLAST, известных в настоящей области техники (Altschul, et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). ASO не нуждается в гибридизации со всеми нуклеотидными основаниями в целевой последовательности, и нуклеотидные основания, с которыми он гибридизуется, могут быть смежными или несмежными. ASO могут гибридизоваться над одним или несколькими сегментами транскрипта пре-мРНК, так что промежуточные или соседние сегменты не участвуют в событии гибридизации (например, может быть образована петлевая структура или структура шпильки). Согласно некоторым вариантам осуществления ASO гибридизуется с несмежными нуклеотидными основаниями в целевом транскрипте пре-мРНК. Например, ASO может гибридизоваться с нуклеотидными основаниями в транскрипте пре-мРНК, которые разделены одной или несколькими нуклеотидными основаниями, с которыми ASO не гибридизуется. Описанные в настоящем документе ASO содержат нуклеотидные основания, которые комплементарны нуклеотидным основаниям, присутствующим в целевой части содержащей NIE пре-мРНК. Термин ASO включает в себя олигонуклеотиды и любую другую олигомерную молекулу, которая содержит нуклеотидные основания, способные гибридизоваться с комплементарным нуклеотидным основанием на целевой мРНК, но не содержит фрагмент сахара, такой как пептидная нуклеиновая кислота (PNA). ASO могут содержать встречающиеся в природе нуклеотиды, нуклеотидные аналоги, модифицированные нуклеотиды или любую комбинацию двух или трех из предшествующих. Термин "природные нуклеотиды" включает в себя дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды" включает в себя нуклеотиды с модифицированными или замещенными группами сахара и/или содержащие модифицированный остов. Согласно некоторым вариантам осуществления все нуклеотиды ASO представляют собой модифицированные нуклеотиды. Химические модификации ASO или компоненты ASO, которые совместимы со способами и композициями, описанными в настоящем документе, будут очевидны специалисту в настоящей области техники и могут быть найдены, например, в патенте США № 8258109 B2, патенте США № 5656612, публикации патента США № 2012/0190728 и в Dias and Stein, Mol. Cancer Ther. 2002, 347-355, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки.

Один или несколько нуклеотидных оснований ASO могут представлять собой любые природные немодифицированные нуклеотидные основания, такие как аденин, гуанин, цитозин, тимин и урацил, или любые синтетические или модифицированные нуклеотидные основания, которые достаточно похожи на немодифицированные нуклеотидные основания, так что они способны к водородной связи с нуклеотидными основаниями, присутствующими на целевой пре-мРНК. Примеры модифицированных нуклеотидных оснований включают в себя, без ограничения, гипоксантин, ксантин, 7-метилгуанин, 5,6-дигидроурацил, 5-метилцитозин и 5-гидроксиметоилцитозин. Описанные в настоящем документе ASO также содержат структуру остова, которая соединяет компоненты олигомера. Термины "структура остова" и "олигомерные связи" могут быть использованы взаимозаменяемо и относятся к соединению между мономерами ASO. В природных олигонуклеотидах остов содержит 3'-5' фосфодиэфирную связь, соединяющую фрагменты сахара олигомера. Структура остова или олигомерные связи описанных в настоящем документе ASO могут включать в себя (но без ограничения), фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфораниладат, фосфорамидат и т.п. Смотрите, например, LaPlanche, et al., Nucleic Acids Res. 14:9081 (1986); Stec, et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein, et al., Nucleic Acids Res. 16:3209 (1988), Zon, et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon, et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford Uni-

versity Press, Oxford England (1991)); Stec, et al., патент США № 5151510; Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990). Согласно некоторым вариантам осуществления структура остова ASO не содержит фосфора, а, скорее, содержит пептидные связи, например, в пептидной нуклеиновой кислоте (PNA) или связывающих группах, включающих в себя карбамат, амиды и линейные и циклические углеводородные группы. Согласно некоторым вариантам осуществления модификация остова представляет собой фосфотиоатную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления модификация остова представляет собой фосфорамидатную связь.

Согласно вариантам осуществления стереохимия каждой из фосфорных межнуклеотидных связей остова ASO является случайной. Согласно вариантам осуществления стереохимия в каждой из фосфорных межнуклеотидных связей остова ASO контролируется и не является случайной. Например, в публикации заявки на патент США № 2014/0194610, "Способы синтеза функционализированных нуклеиновых кислот", включенной в настоящий документ посредством ссылки, описаны способы независимого выбора хиральности у каждого атома фосфора в олигомере нуклеиновой кислоты. Согласно вариантам осуществления используемый в способах по настоящему изобретению ASO, включая в себя, без ограничения, любой из ASO, представленных в настоящем документе в таблицах 5 и 6, включает в себя ASO, содержащий фосфорные межнуклеотидные связи, которые не являются случайными. Согласно вариантам осуществления композиция, используемая в способах по настоящему изобретению, содержит чистый диастереомерный ASO. Согласно вариантам осуществления композиция, используемая в способах по настоящему изобретению, включает в себя ASO, который характеризуется диастереомерной чистотой, составляющей по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99%, приблизительно 100%, от приблизительно 90% до приблизительно 100%, от приблизительно 91% до приблизительно 100%, от приблизительно 92% до приблизительно 100%, от приблизительно 93% до приблизительно 100%, от приблизительно 94% до приблизительно 100%, от приблизительно 95% до приблизительно 100%, от приблизительно 96% до приблизительно 100%, от приблизительно 97% до приблизительно 100%, от приблизительно 98% до приблизительно 100% или от приблизительно 99% до приблизительно 100%.

Согласно вариантам осуществления ASO имеет неслучайную смесь конфигураций Rp и Sp в своих фосфорных межнуклеотидных связях. Например, было высказано предположение о том, что в антисмысловых олигонуклеотидах требуется смесь Rp и Sp для достижения баланса между хорошей активностью и нуклеазной стабильностью (Wan, et al., 2014, "Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages," Nucleic Acids Research 42(22): 13456-13468, включенная в настоящий документ посредством ссылки). Согласно вариантам осуществления используемый в способах по настоящему изобретению ASO, включая в себя, без ограничения, любой из ASO, представленных в настоящем документе в SEQ ID NO: 21-114, содержит приблизительно 5-100% Rp, по меньшей мере приблизительно 5% Rp, по меньшей мере приблизительно 10% Rp, по меньшей мере приблизительно 15% Rp, по меньшей мере приблизительно 20% Rp, по меньшей мере приблизительно 25% Rp, по меньшей мере приблизительно 30% Rp, по меньшей мере приблизительно 35% Rp, по меньшей мере приблизительно 40% Rp, по меньшей мере приблизительно 45% Rp, по меньшей мере приблизительно 50% Rp, по меньшей мере приблизительно 55% Rp, по меньшей мере приблизительно 60% Rp, по меньшей мере приблизительно 65% Rp, по меньшей мере приблизительно 70% Rp, по меньшей мере приблизительно 75% Rp, по меньшей мере приблизительно 80% Rp, по меньшей мере приблизительно 85% Rp, по меньшей мере приблизительно 90% Rp или по меньшей мере приблизительно 95% Rp, с оставшейся частью Sp, или приблизительно 100% Rp. Согласно вариантам осуществления используемый в способах по настоящему изобретению ASO, включая в себя, без ограничения, любой из ASO, представленных в настоящем документе в SEQ ID NO: 21-114, содержит от приблизительно 10% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 15% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 20% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 25% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 30% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 35% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 40% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 45% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 50% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 55% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 60% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 65% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 70% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 75% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 80% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 85% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 90% до приблизительно 100% Rp или от приблизительно 95% до приблизительно 100% Rp, от приблизительно 20% до приблизительно 80% Rp, от приблизительно 25% до приблизительно 75% Rp, от приблизительно 30% до приблизительно 70% Rp, от приблизительно 40% до приблизительно 60% Rp или от приблизительно 45% до приблизительно 55% Rp, с оставшейся частью Sp.

Согласно вариантам осуществления используемый в способах по настоящему изобретению ASO,

включая в себя, без ограничения, любой из ASO, представленных в настоящем документе в SEQ ID NO: 21-114, содержит приблизительно 5-100% Sp, по меньшей мере приблизительно 5% Sp, по меньшей мере приблизительно 10% Sp, по меньшей мере приблизительно 15% Sp, по меньшей мере приблизительно 20% Sp, по меньшей мере приблизительно 25% Sp, по меньшей мере приблизительно 30% Sp, по меньшей мере приблизительно 35% Sp, по меньшей мере приблизительно 40% Sp, по меньшей мере приблизительно 45% Sp, по меньшей мере приблизительно 50% Sp, по меньшей мере приблизительно 55% Sp, по меньшей мере приблизительно 60% Sp, по меньшей мере приблизительно 65% Sp, по меньшей мере приблизительно 70% Sp, по меньшей мере приблизительно 75% Sp, по меньшей мере приблизительно 80% Sp, по меньшей мере приблизительно 85% Sp, по меньшей мере приблизительно 90% Sp или по меньшей мере приблизительно 95% Sp, с оставшейся частью Rp, или приблизительно 100% Sp. Согласно вариантам осуществления используемый в способах по настоящему изобретению ASO, включая в себя, без ограничения, любой из ASO, представленных в настоящем документе в SEQ ID NO: 21-114, содержит от приблизительно 10% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 15% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 20% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 25% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 30% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 35% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 40% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 45% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 50% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 55% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 60% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 65% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 70% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 75% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 80% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 85% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 90% до приблизительно 100% Sp или от приблизительно 95% до приблизительно 100% Sp, от приблизительно 20% до приблизительно 80% Sp, от приблизительно 25% до приблизительно 75% Sp, от приблизительно 30% до приблизительно 70% Sp, от приблизительно 40% до приблизительно 60% Sp или от приблизительно 45% до приблизительно 55% Sp, с оставшейся частью Rp.

Любой из описанных в настоящем документе ASO может содержать фрагмент сахара, который содержит рибозу или дезоксирибозу, присутствующую в природных нуклеотидах, или модифицированный фрагмент сахара или аналог сахара, включая в себя морфолиновое кольцо. Неограничивающие примеры модифицированных фрагментов сахара включают в себя 2' замещения, такие как 2'-O-метил (2'-O-Me), 2'-O-метоксиэтил (2'MOE), 2'-O-аминоэтил, 2'F; N3'->P5' фосфорамидат, 2'диметиламиноксиэтокси, 2'-диметиламиноэтокси, 2'-гуанидин, 2'-O-гуанидинэтил, модифицированные карбаматом сахара и бициклические модифицированные сахара. Согласно некоторым вариантам осуществления модификацию фрагмента сахара выбирают из 2'-O-Me, 2'F и 2'MOE. Согласно некоторым вариантам осуществления модификация фрагмента сахара представляет собой дополнительную мостиковую связь, такую как в блокированной нуклеиновой кислоте (LNA). Согласно некоторым вариантам осуществления аналог сахара содержит морфолиновое кольцо, такое как фосфородиамидат морфолино (PMO). Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент сахара содержит модификацию рибофуранозила или 2'-дезоксирибофуранозила. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент сахара содержит 2'4'-конформационно затрудненные модификации 2'-O-метилоксиэтил (cMOE). Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент сахара содержит cEt 2',4'-конформационно затрудненные модификации 2'-O этил BNA. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент сахара содержит модификации трициклоДНК (tcDNA). Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент сахара содержит модификации этиленовой нуклеиновой кислоты (ENA). Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент сахара содержит модификации MCE. Модификации известны в настоящей области техники и описаны в литературе, например, в Jarver, et al., 2014, "A Chemical View of Oligonucleotides for Exon Skipping and Related Drug Applications," Nucleic Acid Therapeutics 24(1): 37-47, включенной для этой цели посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам осуществления каждый мономер ASO модифицирован таким NIE образом, например, каждая связь остова ASO содержит фосфоротиоатную связь или каждый фрагмент рибозного сахара содержит модификацию 2'-O-метил. Такие модификации, которые присутствуют на каждом из мономерных компонентов ASO, называются "однородными модификациями". В некоторых примерах может быть желательна комбинация различных модификаций, например, ASO может содержать комбинацию фосфородиамидных связей и фрагментов сахара, содержащих морфолиновые кольца (морфолино). Комбинации различных модификаций ASO называют "смешанными модификациями" или "смешанными химическими соединениями". Согласно некоторым вариантам осуществления ASO содержит одну или несколько модификаций остова. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO содержит одну или несколько модификаций фрагмента сахара. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO содержит одну или несколько модификаций остова и одну или несколько модификаций фрагмента сахара. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO содержит модификацию 2'MOE и фосфортиоатный остов. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO содержит фосфородиамидат морфолино (PMO). Согласно некоторым вариантам осуществления ASO содержит пептидную нуклеиновую кислоту (PNA). Любой из ASO или любой компонент ASO (например, нуклеотидное основа-

ние, фрагмент сахара, остов), описанный в настоящем документе, может быть модифицирован для достижения желаемых свойств или активности ASO или уменьшения нежелательных свойств или активности ASO. Например, ASO или один или несколько компонентов любого ASO могут быть модифицированы для усиления аффинности связывания с целевой последовательностью на транскрипте пре-мРНК; уменьшения связывания с любой нецелевой последовательностью; уменьшения деградации клеточными нуклеазами (т.е. RNase H); улучшения поглощения ASO в клетку и/или в ядро клетки; изменения фармакокинетики или фармакодинамики ASO и/или модулирования периода полураспада ACO.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO состоят из 2'-O-(2-метоксиэтил) (MOE) фосфоротиоат-модифицированных нуклеотидов. ASO, состоящие из таких нуклеотидов, особенно хорошо подходят для описанных в настоящем документе способов; было показано, что олигомеры, имеющие такие модификации, обладают значительно повышенной устойчивостью к деградации нуклеазами и повышенной биодоступностью, что делает их подходящими, например, для пероральной доставки согласно некоторым описанным в настоящем документе вариантам осуществления. Смотрите, например, Geary, et al., J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296(3):890-7; Geary, et al., J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296(3):898-904.

Способы синтеза ASO будут известны специалисту в настоящей области техники. Альтернативно или в дополнение, ASO могут быть получены из коммерческого источника.

Если не указано иное, левый конец последовательности одноцепочечной нуклеиновой кислоты (например, транскрипт пре-мРНК, олигонуклеотид, ASO и т.д.) представляет собой 5'-конец и левое направление последовательности одно- или двухцепочечных последовательностей нуклеиновой кислоты называется направлением 5'. Аналогично, правый конец или направление последовательности нуклеиновой кислоты (одноцепочечной или двухцепочечной) представляет собой 3'-конец или направление. Как правило, область или последовательность, которая находится 5' по отношению к контрольной точке в нуклеиновой кислоте, называется "выше против хода транскрипции", а область или последовательность, которая находится 3' по отношению к контрольной точке в нуклеиновой кислоте, называется "ниже по ходу транскрипции". Как правило, 5' направление или конец мРНК находится там, где расположен инициирующий или стартовый кодон, в то время как 3'-конец или направление находится там, где расположен терминальный кодон. Согласно некоторым аспектам нуклеотиды, которые находятся выше против хода транскрипции от контрольной точки в нуклеиновой кислоте, могут быть обозначены отрицательным числом, в то время как нуклеотиды, которые находятся ниже по ходу транскрипции от контрольной точки, могут быть обозначены положительным числом. Например, контрольная точка (например, экзон-экзоновое соединение в мРНК) может быть обозначена как "нулевой" сайт, а нуклеотид, который находится непосредственно рядом и выше против хода транскрипции от контрольной точки, обозначен как "минус один", например, "-1", в то время как нуклеотид, который находится непосредственно рядом и ниже по ходу транскрипции от контрольной точки, обозначен как "плюс один", например, "+1".

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO комплементарны (и связывают) целевой части содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, которая находится ниже по ходу транскрипции (в направлении 3') от 5'-сайта сплайсинга (или 3'-конца NIE) включенного экзона в содержащей NIE пре-мРНК SCN1A (например, направлении, обозначенном положительными числами относительно 5'-сайта сплайсинга). Согласно некоторым вариантам осуществления ASO комплементарны целевой части содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, которая находится в пределах области от приблизительно +1 до приблизительно +500 относительно 5'-сайта сплайсинга (или 3'-конца) включенного экзона. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO могут быть комплементарны целевой части содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, которая находится в пределах области между нуклеотидами +6 и +496 относительно 5'-сайта сплайсинга (или 3'-конца) включенного экзона. Согласно некоторым аспектам ASO комплементарны целевой части, которая находится в пределах области от приблизительно +1 до приблизительно +500, от приблизительно +1 до приблизительно +490, от приблизительно +1 до приблизительно +480, от приблизительно +1 до приблизительно +470, от приблизительно +1 до приблизительно +460, от приблизительно +1 до приблизительно +450, от приблизительно +1 до приблизительно +440, от приблизительно +1 до приблизительно +430, от приблизительно +1 до приблизительно +420, от приблизительно +1 до приблизительно +410, от приблизительно +1 до приблизительно +400, от приблизительно +1 до приблизительно +390, от приблизительно +1 до приблизительно +380, от приблизительно +1 до приблизительно +370, от приблизительно +1 до приблизительно +360, от приблизительно +1 до приблизительно +350, от приблизительно +1 до приблизительно +340, от приблизительно +1 до приблизительно +330, от приблизительно +1 до приблизительно +320, от приблизительно +1 до приблизительно +310, от приблизительно +1 до приблизительно +300, от приблизительно +1 до приблизительно +290, от приблизительно +1 до приблизительно +280, от приблизительно +1 до приблизительно +270, от приблизительно +1 до приблизительно +260, от приблизительно +1 до приблизительно +250, от приблизительно +1 до приблизительно +240, от приблизительно +1 до приблизительно +230, от приблизительно +1 до приблизительно +220, от приблизительно +1 до приблизительно +210, от приблизительно +1 до приблизительно +200, от приблизительно +1 до приблизительно +190, от приблизительно +1 до приблизительно +180, от приблизительно +1 до приблизительно +170, от приблизительно +1 до приблизительно +160, от приблизительно +1 до приблизительно +150, от приблизительно +1 до приблизительно +140, от приблизительно +1 до приблизительно +130, от прибли-

зительно +1 до приблизительно +120, от приблизительно +1 до приблизительно +110, от приблизительно +1 до приблизительно +100, от приблизительно +1 до приблизительно +90, от приблизительно +1 до приблизительно +80, от приблизительно +1 до приблизительно +70, от приблизительно +1 до приблизительно +60, от приблизительно +1 до приблизительно +50, от приблизительно +1 до приблизительно +40, от приблизительно +1 до приблизительно +30 или от приблизительно +1 до приблизительно +20 относительно 5'-сайта сплайсинга (или 3'-конца) включенного экзона. Согласно некоторым аспектам ASO комплементарны целевой части, которая находится в пределах области от приблизительно +1 до приблизительно +100, от приблизительно +100 до приблизительно +200, от приблизительно +200 до приблизительно +300, от приблизительно +300 до приблизительно +400 или от приблизительно +400 до приблизительно +500 относительно 5'-сайта сплайсинга (или 3'-конца) включенного экзона.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO комплементарны (и связывают) целевой части содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, которая находится выше против хода транскрипции (в направлении 5') 5'-сайта сплайсинга (или 3'-конца) включенного экзона в содержащей NIE пре-мРНК SCN1A (например, направлении, обозначенном отрицательными числами относительно 5'-сайта сплайсинга). Согласно некоторым вариантам осуществления ASO комплементарны целевой части содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, которая находится в пределах области от приблизительно -4 до приблизительно -270 относительно 5'-сайта сплайсинга (или 3'-конца) включенного экзона. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO могут быть комплементарны целевой части содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, которая находится в пределах области между нуклеотидами -1 и -264 относительно 5'-сайта сплайсинга (или 3'-конца) включенного экзона. Согласно некоторым аспектам ASO комплементарны целевой части, которая находится в пределах области от приблизительно -1 до приблизительно -270, от приблизительно -1 до приблизительно -260, от приблизительно -1 до приблизительно -250, от приблизительно -1 до приблизительно -240, от приблизительно -1 до приблизительно -230, от приблизительно -1 до приблизительно -220, от приблизительно -1 до приблизительно -210, от приблизительно -1 до приблизительно -200, от приблизительно -1 до приблизительно -190, от приблизительно -1 до приблизительно -180, от приблизительно -1 до приблизительно -170, от приблизительно -1 до приблизительно -160, от приблизительно -1 до приблизительно -150, от приблизительно -1 до приблизительно -140, от приблизительно -1 до приблизительно -130, от приблизительно -1 до приблизительно -120, от приблизительно -1 до приблизительно -110, от приблизительно -1 до приблизительно -100, от приблизительно -1 до приблизительно -90, от приблизительно -1 до приблизительно -80, от приблизительно -1 до приблизительно -70, от приблизительно -1 до приблизительно -60, от приблизительно -1 до приблизительно -50, от приблизительно -1 до приблизительно -40, от приблизительно -1 до приблизительно -30 или от приблизительно -1 до приблизительно -20 относительно 5'-сайта сплайсинга (или 3'-конца) включенного экзона. Согласно некоторым аспектам ASO комплементарны целевой части, которая находится в пределах области от приблизительно -1 до приблизительно -50, от приблизительно -50 до приблизительно -100, от приблизительно -100 до приблизительно -150, от приблизительно -150 до приблизительно -200 или от приблизительно -200 до приблизительно -250 относительно 5'-сайта сплайсинга (или 3'-конца) включенного экзона.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO комплементарны целевой части содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, которая находится выше против хода транскрипции (в направлении 5') от 3'-сайта сплайсинга (или 5'-конца) включенного экзона в содержащей NIE пре-мРНК SCN1A (например, в направлении, обозначенном отрицательными числами). Согласно некоторым вариантам осуществления ASO комплементарны целевой части содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, которая находится в пределах области от приблизительно -1 до приблизительно -500 относительно 3'-сайта сплайсинга (или 5'-конца) включенного экзона. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO комплементарны целевой части содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, которая находится в пределах области от -1 до -496 относительно 3'-сайта сплайсинга включенного экзона. Согласно некоторым аспектам ASO комплементарны целевой части, которая находится в пределах области от приблизительно -1 до приблизительно -500, от приблизительно -1 до приблизительно -490, от приблизительно -1 до приблизительно -480, от приблизительно -1 до приблизительно -470, от приблизительно -1 до приблизительно -460, от приблизительно -1 до приблизительно -450, от приблизительно -1 до приблизительно -440, от приблизительно -1 до приблизительно -430, от приблизительно -1 до приблизительно -420, от приблизительно -1 до приблизительно -410, от приблизительно -1 до приблизительно -400, от приблизительно -1 до приблизительно -390, от приблизительно -1 до приблизительно -380, от приблизительно -1 до приблизительно -370, от приблизительно -1 до приблизительно -360, от приблизительно -1 до приблизительно -350, от приблизительно -1 до приблизительно -340, от приблизительно -1 до приблизительно -330, от приблизительно -1 до приблизительно -320, от приблизительно -1 до приблизительно -310, от приблизительно -1 до приблизительно -300, от приблизительно -1 до приблизительно -290, от приблизительно -1 до приблизительно -280, от приблизительно -1 до приблизительно -270, от приблизительно -1 до приблизительно -260, от приблизительно -1 до приблизительно -250, от приблизительно -1 до приблизительно -240, от приблизительно -1 до приблизительно -230, от приблизительно -1 до приблизительно -220, от приблизительно -1 до приблизительно -210, от приблизительно -1 до приблизительно -200, от приблизительно -1 до приблизительно -190, от приблизительно -1 до приблизительно -180, от приблизительно -1 до приблизительно -170, от приблизи-

тельно -1 до приблизительно -160, от приблизительно -1 до приблизительно -150, от приблизительно -1 до приблизительно -140, от приблизительно -1 до приблизительно -130, от приблизительно -1 до приблизительно -120, от приблизительно -1 до приблизительно -110, от приблизительно -1 до приблизительно -100, от приблизительно -1 до приблизительно -90, от приблизительно -1 до приблизительно -80, от приблизительно -1 до приблизительно -70, от приблизительно -1 до приблизительно -60, от приблизительно -1 до приблизительно -50, от приблизительно -1 до приблизительно -40 или от приблизительно -1 до приблизительно -30 относительно 3'-сайта сплайсинга включенного экзона. Согласно некоторым аспектам ASO комплементарны целевой части, которая находится в пределах области от приблизительно -1 до приблизительно -100, от приблизительно -100 до приблизительно -200, от приблизительно -200 до приблизительно -300, от приблизительно -300 до приблизительно -400 или от приблизительно -400 до приблизительно -500 относительно 3'-сайта сплайсинга включенного экзона.

Согласно некоторым вариантам осуществления ASO комплементарны целевой области содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, которая находится ниже по ходу транскрипции (в направлении 3') от 3'-сайта сплайсинга (5'-конца) включенного экзона в содержащей NIE пре-мРНК SCN1A (например, в направлении, обозначенном положительными числами). Согласно некоторым вариантам осуществления ASO комплементарны целевой области содержащей NIE пре-мРНК SCN1A, которая находится в области от приблизительно +1 до приблизительно +100 относительно 3'-сайта сплайсинга включенного экзона. Согласно некоторым аспектам ASO комплементарны целевой части, которая находится в области от приблизительно +1 до приблизительно +90, от приблизительно +1 до приблизительно +80, от приблизительно +1 до приблизительно +70, от приблизительно +1 до приблизительно +60, от приблизительно +1 до приблизительно +50, от приблизительно +1 до приблизительно +40, от приблизительно +1 до приблизительно +30, от приблизительно +1 до приблизительно +20 или от приблизительно +1 до приблизительно +10 относительно 3'-сайта сплайсинга включенного экзона.

Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть содержащей NIE пре-мРНК SCN1A находится в области от +100 относительно 5'-сайта сплайсинга (3'-конец) включенного экзона до -100 относительно 3'-сайта сплайсинга. (5'-конец) включенного экзона. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть содержащей NIE пре-мРНК SCN1A находится в пределах NIE. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая часть содержащей NIE пре-мРНК SCN1A содержит границу псевдоэкзона и интрона.

ASO могут характеризоваться любой длиной, подходящей для специфического связывания и эффективного усиления сплайсинга. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO состоят из от 8 до 50 нуклеотидных оснований. Например, ASO может составлять 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45 или 50 нуклеотидных оснований в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO состоят из более чем 50 нуклеотидных оснований. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO составляет от 8 до 50 нуклеотидных оснований, от 8 до 40 нуклеотидных оснований, от 8 до 35 нуклеотидных оснований, от 8 до 30 нуклеотидных оснований, от 8 до 25 нуклеотидных оснований, от 8 до 20 нуклеотидных оснований, от 8 до 15 нуклеотидных оснований, от 9 до 50 нуклеотидных оснований, от 9 до 40 нуклеотидных оснований, от 9 до 35 нуклеотидных оснований, от 9 до 30 нуклеотидных оснований, от 9 до 25 нуклеотидных оснований, от 9 до 20 нуклеотидных оснований, от 9 до 15 нуклеотидных оснований, от 10 до 50 нуклеотидных оснований, от 10 до 40 нуклеотидных оснований, от 10 до 35 нуклеотидных оснований, от 10 до 30 нуклеотидных оснований, от 10 до 25 нуклеотидных оснований, от 10 до 20 нуклеотидных оснований, от 10 до 15 нуклеотидных оснований, от 11 до 50 нуклеотидных оснований, от 11 до 40 нуклеотидных оснований, от 11 до 35 нуклеотидных оснований, от 11 до 30 нуклеотидных оснований, от 11 до 25 нуклеотидных оснований, от 11 до 20 нуклеотидных оснований, от 11 до 15 нуклеотидных оснований, от 12 до 50 нуклеотидных оснований, от 12 до 40 нуклеотидных оснований, от 12 до 35 нуклеотидных оснований, от 12 до 30 нуклеотидных оснований, от 12 до 25 нуклеотидных оснований, от 12 до 20 нуклеотидных оснований, от 12 до 15 нуклеотидных оснований, от 13 до 50 нуклеотидных оснований, от 13 до 40 нуклеотидных оснований, от 13 до 35 нуклеотидных оснований, от 13 до 30 нуклеотидных оснований, от 13 до 25 нуклеотидных оснований, от 13 до 20 нуклеотидных оснований, от 14 до 50 нуклеотидных оснований, от 14 до 40 нуклеотидных оснований, от 14 до 35 нуклеотидных оснований, от 14 до 30 нуклеотидных оснований, от 14 до 25 нуклеотидных оснований, от 14 до 20 нуклеотидных оснований, от 15 до 50 нуклеотидных оснований, от 15 до 40 нуклеотидных оснований, от 15 до 35 нуклеотидных оснований, от 15 до 30 нуклеотидных оснований, от 15 до 25 нуклеотидных оснований, от 15 до 20 нуклеотидных оснований, от 20 до 50 нуклеотидных оснований, от 20 до 40 нуклеотидных оснований, от 20 до 35 нуклеотидных оснований, от 20 до 30 нуклеотидных оснований, от 20 до 25 нуклеотидных оснований, от 25 до 50 нуклеотидных оснований, от 25 до 40 нуклеотидных оснований, от 25 до 35 нуклеотидных оснований или от 25 до 30 нуклеотидных оснований в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO составляют в длину 18 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO составляют в длину 15 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO составляют в длину 25 нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам осуществления используют два или более ASO с различными химическими соединениями, но комплементарными одной и той NIE целевой части содержащей NIE пре-

мРНК. Согласно некоторым вариантам осуществления используют два или более ASO, которые комплементарны различным целевым частям содержащей NIE пре-мРНК.

Согласно вариантам осуществления антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению химически связаны с одним или несколькими фрагментами или конъюгатами, например, нацеливающим фрагментом или другим конъюгатом, который усиливает активность или клеточное поглощение олигонуклеотида. Такие фрагменты включают в себя, без ограничения, липидный фрагмент, например, как холестериновый фрагмент, холестерильный фрагмент, алифатическую цепь, например, додекандиольные или ундецильные остатки, полиамин или полиэтиленгликолевую цепь или адамантановую уксусную кислоту. Олигонуклеотиды, содержащие липофильные фрагменты и способы получения, описаны в опубликованной литературе. Согласно вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид конъюгирован с фрагментом, включающим в себя, без ограничения, нуклеотид с удаленным азотистым основанием, простой полиэфир, полиамин, полиамид, пептиды, углевод, например, N-ацетилгалактозамин (GalNAc), N-Ac-глюкозамин (GluNAc) или маннозу (например, маннозу-6-фосфат), липид или полиуглеродное соединение. Конъюгаты могут быть связаны с одним или несколькими из любых нуклеотидов, содержащих антисмысловой олигонуклеотид, в любом из нескольких положений на сахаре, основании или фосфатной группе, как понятно в настоящей области техники и описано в литературе, например, с использованием линкера. Линкеры могут включать в себя двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер. Согласно вариантам осуществления конъюгат присоединяется к 3'-концу антисмыслового олигонуклеотида. Способы получения олигонуклеотидных конъюгатов описаны, например, в патенте США № 8450467, "Углеводные конъюгаты в качестве средств доставки олигонуклеотидов", включенном в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновая кислота, которая должна быть нацелена на ASO, представляет собой содержащую NIE пре-мРНК SCN1A, экспрессируемую в клетке, такой как эукариотическая клетка. Согласно некоторым вариантам осуществления термин "клетка" может относиться к популяции клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка находится у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления клетку выделяют из субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка находится ex vivo. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка представляет собой релевантную для состояния или заболевания клетку или клеточную линию. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка находится in vitro (например, в клеточной культуре).

Фармацевтические композиции.

Фармацевтические композиции или составы, содержащие средство, например, антисмысловой олигонуклеотид, описанных композиций и для применения в любом из описанных способов, могут быть получены в соответствии с общепринятыми технологиями, хорошо известными в фармацевтической промышленности и описанными в опубликованной литературе. Согласно вариантам осуществления фармацевтическая композиция или состав для лечения субъекта содержит эффективное количество любого антисмыслового олигомера, как описано в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата, гидрата или сложного эфира. Фармацевтический состав, содержащий антисмысловой олигомер, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

Фармацевтически приемлемые соли пригодны для применения в контакте с тканями человека и низших животных без излишней токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.д. и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск (смотрите, например, публикацию S.M. Berge, et al., J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977), включенную в настоящий документ посредством ссылки для этой цели). Соли могут быть получены in situ во время окончательного выделения и очистки соединений или отдельно взаимодействием функции свободного основания с подходящей органической кислотой. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных солей присоединения кислот являются соли аминогрупп, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с использованием других задокументированных методик, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают в себя адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканоат, валентные соли и т.п. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают в себя натрий, литий, калий, кальций, магний и т.п. Другие фармацевтически приемлемые соли включают в себя, когда это уместно, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат.

Согласно вариантам осуществления композиции составлены в виде любой из многих возможных лекарственных форм, таких как, без ограничения, таблетки, капсулы, гелевые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Согласно вариантам осуществления композиции составляют в виде суспензий в водной, неводной или смешанной среде. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая в себя, например, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Суспензия может также содержать стабилизаторы. Согласно вариантам осуществления фармацевтический состав или композиция по настоящему изобретению включает в себя, без ограничения, раствор, эмульсию, микроэмульсию, пену или содержащий липосомы состав (например, катионные или некатионные липосомы).

Описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция или состав может содержать один или несколько усилителей проникновения, носителей, вспомогательных веществ или других активных или неактивных ингредиентов, как это уместно и хорошо известно специалистам в настоящей области техники или описано в опубликованной литературе. Согласно вариантам осуществления липосомы также включают в себя стерически стабилизированные липосомы, например, липосомы, содержащие один или несколько специализированных липидов. Эти специализированные липиды приводят к липосомам с увеличенным временем циркуляции. Согласно вариантам осуществления стерически стабилизированная липосома содержит один или несколько гликолипидов или является производной с одним или несколькими гидрофильными полимерами, такими как фрагмент полиэтиленгликоля (PEG). Согласно вариантам осуществления поверхностно-активное вещество включено в фармацевтический состав или композиции. Использование поверхностно-активных веществ в лекарственных продуктах, составах и эмульсиях хорошо известно в настоящей области техники. Согласно вариантам осуществления настоящее изобретение использует усилитель проникновения для осуществления эффективной доставки антисмыслового олигонуклеотида, например, для содействия диффузии через клеточные мембраны и/или усиления проницаемости липофильного лекарственного средства. Согласно вариантам осуществления усилителями проникновения являются поверхностно-активное вещество, жирная кислота, соль желчной кислоты, хелатирующее средство или не хелатирующее не поверхностно-активное средство.

Согласно вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит множество антисмысловых олигонуклеотидов. Согласно вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид вводят в комбинации с другим лекарственным средством или терапевтическим средством.

Комбинированная терапия.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем раскрытии ASO могут быть использованы в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько дополнительных терапевтических средств могут содержать небольшую молекулу. Например, одно или несколько дополнительных терапевтических средств могут содержать малую молекулу, описанную в WO2016128343A1, WO2017053982A1, WO2016196386A1, WO201428459A1, WO201524876A2, WO2013119916A2 и WO2014209841A2, которые полностью включены посредством ссылок в настоящий документ. Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько дополнительных терапевтических средств содержат ASO, который может быть использован для коррекции удержания интрона. Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько других средств выбраны из ASO, перечисленных в табл. 1a или 1b.

Таблица 1a

Иллюстративные ASO для корректировки удержания интронов

SEQ ID NO:	Название	Последовательность (5'-3')	Удержанный интрон
115	SCN1A-IVS21+6	CAGAGAAAAUAGUGUUCA	21
116	SCN1A-IVS21+11	AUAUUCAGAGAAAAUAGU	21
117	SCN1A-IVS21+16	UAAAAAUAUUCAGAGAAA	21
118	SCN1A-IVS21+21	AACAAUAAAAAUAUUCAG	21
119	SCN1A-IVS21+26	UUCCAAACAAUAAAAAUA	21
120	SCN1A-IVS21+31	UAUUAUUCCAAACAAUAA	21
121	SCN1A-IVS21+36	UUUGUUAUUAUUCCAAAC	21
122	SCN1A-IVS21+41	AUUAUUUUGUUAUUAUUC	21
123	SCN1A-IVS21+46	AUGUCAUUAUUUUGUUAU	21
124	SCN1A-IVS21+51	GAUGUAUGUCAUUAUUUU	21
125	SCN1A-IVS21+56	UAAUAGAUGUAUGUCAUU	21
126	SCN1A-IVS21+61	CUAAAUAAUAGAUGUAUG	21
127	SCN1A-IVS21+66	AGGAACUAAAUAAUAGAU	21
128	SCN1A-IVS21+71	UUCUUAGGAACUAAAUAA	21
129	SCN1A-IVS21+76	ACUUUUUCUUAGGAACUA	21

130	SCN1A-IVS21+81	UAUAUACUUUUUCUUAGG	21
131	SCN1A-IVS21-16	UGCAUGUUUUACUUUGGA	21
132	SCN1A-IVS21-21	GUUUUACUUUGGAGUAAA	21
133	SCN1A-IVS21-26	ACUUUGGAGUAAAAAUAA	21
134	SCN1A-IVS21-31	GGAGUAAAAAUAAUUUAG	21
135	SCN1A-IVS21-36	AAAAAUAAUUUAGACCUG	21
136	SCN1A-IVS21-41	UAAUUUAGACCUGAUGUU	21
137	SCN1A-IVS21-46	UAGACCUGAUGUUUAAUA	21
138	SCN1A-IVS21-51	CUGAUGUUUAAUAAAAUAU	21
139	SCN1A-IVS21-56	GUUUAAUAAAUAUUCUUA	21
140	SCN1A-IVS21-61	AUAAAUAUUCUUACUGAU	21
141	SCN1A-IVS21-66	UAUUCUUACUGAUAUAAU	21
142	SCN1A-IVS21-71	UUACUGAUAUAAUUUUCA	21
143	SCN1A-IVS21-76	GAUAUAAUUUUCAAAAGG	21
144	SCN1A-IVS21-81	AAUUUUCAAAAGGGAAUA	21
145	SCN1A-IVS21-27	CUUUGGAGUAAAAAUAAU	21
146	SCN1A-IVS21-28	UUUGGAGUAAAAAUAAUU	21
148	SCN1A-IVS21-29	UUGGAGUAAAAAUAAUUU	21
149	SCN1A-IVS21-30	UGGAGUAAAAAUAAUUUA	21
150	SCN1A-IVS21-32	GAGUAAAAAUAAUUUAGA	21
151	SCN1A-IVS21-33	AGUAAAAAUAAUUUAGAC	21
152	SCN1A-IVS21-34	GUAAAAAUAAUUUAGACC	21
153	SCN1A-IVS21-35	UAAAAAUAAUUUAGACCU	21
154	SCN1A-IVS21-72	UACUGAUAUAAUUUUCAA	21
155	SCN1A-IVS21-73	ACUGAUAUAAUUUUCAAA	21
156	SCN1A-IVS21-74	CUGAUAUAAUUUUCAAAA	21
157	SCN1A-IVS21-75	UGAUAUAAUUUUCAAAAG	21
158	SCN1A-IVS21-77	AUAUAAUUUUCAAAAGGG	21
159	SCN1A-IVS21-78	UAUAAUUUUCAAAAGGGA	21
160	SCN1A-IVS21-79	AUAAUUUUCAAAAGGGAA	21
161	SCN1A-IVS21-80	UAAUUUUCAAAAGGGAAU	21
162		CAAGGAUUAAAGGUAGCA	21

Таблица 1b

Иллюстративные ASO для корректировки удержания интронов

SEQ ID NO:	Название	Последовательность (5'-3')	Удержанный интрон
163	SCN1A-IVS21+6	CAGAGAAAATAGTGTTCA	21
164	SCN1A-IVS21+11	ATATTCAGAGAAAATAGT	21
165	SCN1A-IVS21+16	TAAAAATATTCAGAGAAA	21
166	SCN1A-IVS21+21	AACAATAAAAATATTCAG	21
167	SCN1A-IVS21+26	TTCCAAACAATAAAAATA	21
168	SCN1A-IVS21+31	TATTATTCCAAACAATAA	21
169	SCN1A-IVS21+36	TTTGTTATTATTCCAAAC	21
170	SCN1A-IVS21+41	ATTATTTTGTTATTATTC	21
171	SCN1A-IVS21+46	ATGTCATTATTTTGTTAT	21
172	SCN1A-IVS21+51	GATGTATGTCATTATTTT	21
173	SCN1A-IVS21+56	TAATAGATGTATGTCATT	21
174	SCN1A-IVS21+61	CTAAATAATAGATGTATG	21

175	SCN1A-IVS21+66	AGGAACTAAATAATAGAT	21
176	SCN1A-IVS21+71	TTCTTAGGAACTAAATAA	21
177	SCN1A-IVS21+76	ACTTTTTCTTAGGAACTA	21
178	SCN1A-IVS21+81	TATATACTTTTTCTTAGG	21
179	SCN1A-IVS21-16	TGCATGTTTTACTTTGGA	21
180	SCN1A-IVS21-21	GTTTTACTTTGGAGTAAA	21
181	SCN1A-IVS21-26	ACTTTGGAGTAAAAATAA	21
182	SCN1A-IVS21-31	GGAGTAAAAATAATTTAG	21
183	SCN1A-IVS21-36	AAAAATAATTTAGACCTG	21
184	SCN1A-IVS21-41	TAATTTAGACCTGATGTT	21
185	SCN1A-IVS21-46	TAGACCTGATGTTTAATA	21
186	SCN1A-IVS21-51	CTGATGTTTAATAAATAT	21
187	SCN1A-IVS21-56	GTTTAATAAATATTCTTA	21
188	SCN1A-IVS21-61	ATAAATATTCTTACTGAT	21
189	SCN1A-IVS21-66	TATTCTTACTGATATAAT	21
190	SCN1A-IVS21-71	TTACTGATATAATTTTCA	21
191	SCN1A-IVS21-76	GATATAATTTTCAAAAGG	21
192	SCN1A-IVS21-81	AATTTTCAAAAGGGAATA	21
193	SCN1A-IVS21-27	CTTTGGAGTAAAAATAAT	21
194	SCN1A-IVS21-28	TTTGGAGTAAAAATAATT	21
195	SCN1A-IVS21-29	TTGGAGTAAAAATAATTT	21
196	SCN1A-IVS21-30	TGGAGTAAAAATAATTTA	21
197	SCN1A-IVS21-32	GAGTAAAAATAATTTAGA	21
198	SCN1A-IVS21-33	AGTAAAAATAATTTAGAC	21
199	SCN1A-IVS21-34	GTAAAAATAATTTAGACC	21
200	SCN1A-IVS21-35	TAAAAATAATTTAGACCT	21
201	SCN1A-IVS21-72	TACTGATATAATTTTCAA	21
202	SCN1A-IVS21-73	ACTGATATAATTTTCAAA	21
203	SCN1A-IVS21-74	CTGATATAATTTTCAAAA	21
204	SCN1A-IVS21-75	TGATATAATTTTCAAAAG	21
205	SCN1A-IVS21-77	ATATAATTTTCAAAAGGG	21
206	SCN1A-IVS21-78	TATAATTTTCAAAAGGGA	21
207	SCN1A-IVS21-79	ATAATTTTCAAAAGGGAA	21
208	SCN1A-IVS21-80	TAATTTTCAAAAGGGAAT	21
209		CAAGGATTAAAGGTAGCA	21

Лечение субъектов.

Любая из представленных в настоящем документе композиций может быть введена индивидууму. "Индивидуум" может использоваться взаимозаменяемо с "субъектом" или "пациентом". Индивидуум может представлять собой млекопитающее, например, человека или животное, такое как нечеловекообразный примат, грызун, кролик, крыса, мышь, лошадь, осел, коза, кошка, собака, корова, свинья или овца. Согласно вариантам осуществления индивидуум представляет собой человека. Согласно вариантам осуществления индивидуум представляет собой плод, эмбрион или ребенка. Согласно другим вариантам осуществления индивидуум может представлять собой другой эукариотический организм, такой как растение. Согласно некоторым вариантам осуществления композиции, представленные в настоящем документе, вводят в клетку ex vivo.

Согласно некоторым вариантам осуществления представленные в настоящем документе композиции вводят индивидууму как способ лечения заболевания или нарушения. Согласно некоторым вариантам осуществления индивидуум имеет генетическое заболевание, такое как любое из описанных в настоящем документе заболеваний. Согласно некоторым вариантам осуществления индивидуум подвержен риску заболевания, такого как любое из описанных в настоящем документе заболеваний. Согласно некоторым вариантам осуществления индивидуум подвергается повышенному риску заболевания или нарушения, вызванного недостаточным количеством белка или недостаточной активностью белка. Если человек "подвержен повышенному риску" заболевания или нарушения, вызванного недостаточным количеством белка или недостаточной активностью белка, способ предусматривает превентивное или профилактическое лечение. Например, индивидуум может подвергаться повышенному риску возникновения такого заболевания или нарушения из-за семейного анамнеза заболевания. Как правило, люди с повышенным риском возникновения такого заболевания или нарушения получают пользу от профилактического лечения (например, путем предотвращения или задержки начала или прогрессирования заболевания или нарушения). Согласно вариантам осуществления плод подвергается лечению внутриутробно, например, путем введения композиции ASO плоду прямо или косвенно (например, через мать).

Подходящие пути введения ASO по настоящему изобретению могут варьировать в зависимости от типа клеток, в которые желательна доставка ASO. Множество тканей и органов поражаются вследствие синдрома Драве (DS); эпилепсии, генерализованной, с фебрильными судорогами плюс, типа 2; фебрильных судорог, семейных, 3A; мигрени, наследственной гемиплегической, аутизма; эпилептической энцефалопатии, раннего младенчества, 13; синдрома слабости синусового узла 1; болезни Альцгеймера или SUDEP, причем головной мозг представляет собой наиболее значительно пораженную ткань. ASO по настоящему изобретению можно вводить пациентам парентерально, например, путем интратекальной инъекции, интрацеребровентрикулярной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутримышечной инъ-

екции, подкожной инъекции, интравитреальной инъекции или внутривенной инъекции.

Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние индуцируется мутацией в $Na_v1.1$ (белок, кодируемый геном SCN1A). В некоторых случаях мутация представляет собой мутацию с потерей функции в $Na_v1.1$. В некоторых случаях мутация с потерей функции в $Na_v1.1$ включает в себя одну или несколько мутаций, которые уменьшают или ухудшают функцию $Na_v1.1$ (например, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) относительно функции $Na_v1.1$ дикого типа. В некоторых случаях мутация с потерей функции в $Na_v1.1$ включает в себя одну или несколько мутаций, которые приводят к фенотипу заболевания. Иллюстративные мутации с потерей функции включают в себя, без ограничения, R859C, T875M, V1353L, I1656M, R1657C, A1685V, M1841T и R1916G.

В других случаях мутация представляет собой мутацию с приобретением функции в $Na_v1.1$. В таких случаях мутация с приобретением функции включает в себя одну или несколько мутаций, которые продлевают активацию $Na_v1.1$ (например, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) относительно функции $Na_v1.1$ дикого типа. В таких случаях мутация с приобретением функции в $Na_v1.1$ включает в себя одну или несколько мутаций, которые приводят к фенотипу заболевания. Иллюстративные мутации с приобретением функции включают в себя, без ограничения, D188V, W1204R, R1648H и D1866Y.

Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой энцефалопатию. В некоторых случаях энцефалопатия вызывается мутацией с потерей функции в $Na_v1.1$.

Согласно некоторым вариантам осуществления энцефалопатия представляет собой эпилептическую энцефалопатию. Иллюстративные эпилептические энцефалопатии включают в себя, без ограничения, синдром Драве (DS) (также известный как тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества или SMEI); тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества (SMEI) - пограничная форма (SMEB); фебрильные судороги (FS); эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс (GEFS+); эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13; криптогенную генерализованную эпилепсию; криптогенную фокальную эпилепсию; эпилепсию с миоклонико-астатическими приступами; синдром Леннокса-Гасто; синдром Веста; идиопатические судороги; раннюю миоклоническую энцефалопатию; прогрессирующую миоклоническую эпилепсию; альтернирующую гемиплегию детского возраста; неклассифицированную эпилептическую энцефалопатию; внезапную неожиданную смерть при эпилепсии (SUDEP); раннюю детскую энцефалопатию SCN1A; раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию (EIEE) или синдром слабости синусового узла 1. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой эпилептическую энцефалопатию, необязательно выбранную из синдрома Драве (DS) (также известного как тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества или SMEI); тяжелой миоклонической эпилепсии младенчества (SMEI) - пограничной формы (SMEB); фебрильных судорог (FS); эпилепсии, генерализованной с фебрильными судорогами плюс (GEFS+); эпилептической энцефалопатии, ранней детской, 13; криптогенной генерализованной эпилепсии; криптогенной фокальной эпилепсии; эпилепсии с миоклонико-астатическими приступами; синдрома Леннокса-Гасто; синдрома Веста; идиопатических судорог; ранней миоклонической энцефалопатии; прогрессирующей миоклонической эпилепсии; альтернирующей гемиплегии детского возраста; неклассифицированной эпилептической энцефалопатии; внезапной неожиданной смерти при эпилепсии (SUDEP) и синдрома слабости синусового узла 1.

В некоторых случаях GEFS+ представляет собой эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс, типа 2.

В некоторых случаях фебрильные судороги представляют собой фебрильные судороги, семейные, 3A.

В некоторых случаях SMEB представляет собой SMEB без генерализованной спайк-волны (SMEB-SW), SMEB без миоклонических судорог (SMEB-M), SMEB без более чем одного признака SMEI (SMEB-O) или стойкую эпилепсию детей с генерализованными тонико-клоническими судорогами (ICE-GTC).

Согласно некоторым вариантам осуществления заболевания или состояния, вызванные мутацией с потерей функции в $Na_v1.1$, включают в себя, без ограничения, синдром Драве (DS) (также известный как SMEI); тяжелую миоклоническую эпилепсию младенчества (SMEI) - пограничную форму (SMEB); фебрильные судороги (FS); эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс (GEFS+); эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13; криптогенную генерализованную эпилепсию; криптогенную фокальную эпилепсию; эпилепсию с миоклонико-астатическими приступами; синдром Леннокса-Гасто; синдром Веста; идиопатические судороги; раннюю миоклоническую энцефалопатию; прогрессирующую миоклоническую эпилепсию; альтернирующую гемиплегию детского возраста; неклассифицированную эпилептическую энцефалопатию; внезапную неожиданную смерть при эпилепсии (SUDEP); синдром слабости синусового узла 1; раннюю детскую энцефалопатию SCN1A; раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию (EIEE); аутизм или злокачественные мигрирующие парциальные приступы младенчества.

Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние индуцируется мутацией с приобретением функции в $Na_v1.1$. Иллюстративные заболевания или состояния, связанные с мутацией с приобретением функции в $Na_v1.1$, включают в себя, без ограничения, мигрень. В некоторых случаях за-

болеванием или состоянием, вызванным мутацией с приобретением функции $BNa_v1.1$, является мигрень. В некоторых случаях мигрень является мигренью, семейной гемиплегической, 3. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой генетическую эпилепсию $Na_v1.1$. Генетическая эпилепсия $Na_v1.1$ может включать в себя мутацию с потерей функции в $Na_v1.1$ или мутацию с приобретением функции в $Na_v1.1$. В некоторых случаях генетическая эпилепсия $Na_v1.1$ включает в себя одну или несколько наследственных мутаций. В других случаях генетическая эпилепсия $Na_v1.1$ включает в себя одну или несколько мутаций de novo. В некоторых случаях генетическая эпилепсия $Na_v1.1$ включает в себя синдром Драве (DS) (также известный как тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества или SMEI); тяжелую миоклоническую эпилепсию младенчества (SMEI) - пограничную форму (SMEB); фебрильные судороги (FS); эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс (GEFS+); эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13; криптогенную генерализованную эпилепсию; криптогенную фокальную эпилепсию; эпилепсию с миоклонико-астатическими приступами; синдром Леннокса-Гасто; синдром Веста; идиопатические судороги; раннюю миоклоническую энцефалопатию; прогрессирующую миоклоническую эпилепсию; альтернирующую гемиплегию детского возраста; неклассифицированную эпилептическую энцефалопатию; раннюю детскую энцефалопатию SCN1A; раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию (EIEE); внезапную неожиданную смерть при эпилепсии (SUDEP) или злокачественные мигрирующие парциальные приступы младенчества. В некоторых случаях генетическая эпилепсия $Na_v1.1$, связанная с мутацией с потерей функции в $Na_v1.1$, включает в себя синдром Драве (DS) (также известный как тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества или SMEI); тяжелую миоклоническую эпилепсию младенчества (SMEI) -пограничную форму (SMEB); фебрильные судороги (FS); эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс (GEFS+); эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13; криптогенную генерализованную эпилепсию; криптогенную фокальную эпилепсию; эпилепсию с миоклонико-астатическими приступами; синдром Леннокса-Гасто; синдром Веста; идиопатические судороги; раннюю миоклоническую энцефалопатию; прогрессирующую миоклоническую эпилепсию; альтернирующую гемиплегию детского возраста; неклассифицированную эпилептическую энцефалопатию; раннюю детскую энцефалопатию SCN1A; раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию (EIEE); внезапную неожиданную смерть при эпилепсии (SUDEP) или злокачественные мигрирующие парциальные приступы младенчества. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние связано с гаплонедостаточностью гена SCN1A. Иллюстративные заболевания или состояния, связанные с гаплонедостаточностью гена SCN1A, включают в себя, без ограничения, синдром Драве (DS) (также известный как SMEI); тяжелую миоклоническую эпилепсию младенчества (SMEI) - пограничную форму (SMEB); фебрильные судороги (FS); эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс (GEFS+); эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13; криптогенную генерализованную эпилепсию; криптогенную фокальную эпилепсию; эпилепсию с миоклонико-астатическими приступами; синдром Леннокса-Гасто; синдром Веста; идиопатические судороги; раннюю миоклоническую энцефалопатию; прогрессирующую миоклоническую эпилепсию; альтернирующую гемиплегию детского возраста; неклассифицированную эпилептическую энцефалопатию; внезапную неожиданную смерть при эпилепсии (SUDEP); синдром слабости синусового узла 1; раннюю детскую энцефалопатию SCN1A; раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию (EIEE) или злокачественные мигрирующие парциальные приступы младенчества. В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой синдром Драве (DS) (также известный как SMEI); тяжелую миоклоническую эпилепсию младенчества (SMEI) - пограничную форму (SMEB); фебрильные судороги (FS); эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс (GEFS+); эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13; криптогенную генерализованную эпилепсию; криптогенную фокальную эпилепсию; эпилепсию с миоклонико-астатическими приступами; синдром Леннокса-Гасто; синдром Веста; идиопатические судороги; раннюю миоклоническую энцефалопатию; прогрессирующую миоклоническую эпилепсию; альтернирующую гемиплегию детского возраста; неклассифицированную эпилептическую энцефалопатию; внезапную неожиданную смерть при эпилепсии (SUDEP); синдром слабости синусового узла 1; раннюю детскую энцефалопатию SCN1A; раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию (EIEE) или злокачественные мигрирующие парциальные приступы младенчества.

В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой синдром Драве (DS).

Синдром Драве (DS), также известный как тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества (SMEI), представляет собой эпилептическую энцефалопатию, проявляющуюся на первом году жизни. Синдром Драве представляет собой все более узнаваемую эпилептическую энцефалопатию, при которой клинический диагноз подтверждается обнаружением мутаций гена натриевого канала приблизительно у 70-80% пациентов. Мутации генов ионных каналов играют основную роль в патогенезе ряда синдромов эпилепсии, что приводит к тому, что некоторые эпилепсии рассматриваются как каналопатии. Потенциалзависимые натриевые каналы (VGSC) играют важную роль в возбудимости нейронов; поэтому неудивительно, что многие мутации, связанные с DS, были идентифицированы в гене, кодирующем субъединицу VGSC. Заболевание описано, например, Mulley, et al., 2005, и описании заболевания в 0MIM # 607208 (Online Mendelian Inheritance in Man, Johns Hopkins University, 1966-2015), оба включены в настоящий документ посредством ссылки.

От 70% до 80% пациентов характеризуются аномалиями гена α1-субъединицы натриевого канала (SCN1A), а мутации усечения составляют приблизительно 40% и характеризуются значительной корреляцией с более ранним возрастом приступов. Мутации секвенирования обнаруживаются приблизительно в 70% случаев и включают в себя мутации усечения (40%) и миссенс-мутации (40%) с остальными изменениями сайта сплайсинга. Большинство мутаций происходят de novo, но семейные мутации встречаются в 5-10% случаев и, как правило, представляют собой миссенс-мутации по природе. Остальные мутации SCN1A включают в себя мутации сайта сплайсинга и миссенс, большинство из которых попадают в порообразующую область натриевого канала. В настоящее время более 500 мутаций связаны с DS и случайным образом распределены по гену (Mulley, et al., Neurol. 2006, 67, 1094-1095).

Ген SCN1A расположен в кластере генов натриевого канала на хромосоме человека 2q24 и кодирует образующие альфа-пору субъединицы, известные как Nav1.1, нейронального потенциалзависимого натриевого канала. Ген SCN1A охватывает приблизительно 100 т.п.н. геномной ДНК и включает в себя 26 экзонов. Белок SCN1A состоит из четырех доменов, каждый с шестью трансмембранными сегментами. Были идентифицированы два варианта сплайсинга, которые приводят к длинной и короткой изоформе, которые отличаются наличием или отсутствием 11 аминокислот в цитоплазматической петле между доменами 1 и 2 в экзоне 11 (Miller, et al., 1993-2015 и Mulley, et al., 2005, 25, 535-542, включенные в настоящий документ посредством ссылки). Альтернативные события сплайсинга в гене SCN1A могут приводить к непродуктивным транскриптам мРНК, которые, в свою очередь, могут приводить к аберрантной экспрессии белка, а терапевтические средства, которые могут нацеливаться на альтернативные события сплайсинга в гене SCN1A, могут модулировать уровень экспрессии функциональных белков у пациентов с DS и/или подавлять аберрантную экспрессию белка. Такие терапевтические средства могут быть использованы для лечения состояния, вызванного дефицитом белка SCN1 A.

Одним из альтернативных событий сплайсинга, которые могут привести к непродуктивным транскриптам мРНК, является включение дополнительного экзона в транскрипт мРНК, который может индуцировать нонсенс-опосредованный распад мРНК.

В настоящем раскрытии предусмотрены композиции и способы модуляции альтернативного сплайсинга SCN1A для увеличения производства кодирующей белок зрелой мРНК и, таким образом, транслированного функционального белка SCN1A. Эти композиции и способы предусматривают антисмысловые олигомеры (ASO), которые могут вызывать пропуск экзонов и стимулировать конститутивный сплайсинг пре-мРНК SCN1A. Согласно различным вариантам осуществления функциональный белок SCN1A может быть увеличен с использованием способов по настоящему изобретению для лечения состояния, вызванного дефицитом белка SCN1A.

В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой SMEB.

В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой GEFS+.

В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой фебрильные судороги (например, фебрильные судороги, семейные, 3A).

В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой аутизм (также известный как расстройство аутистического спектра или ASD).

В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой мигрень (например, мигрень, наследственную гемиплегическую, 3).

В некоторых случаях заболевание или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера.

Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой энцефалопатию SCN2A.

Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой энцефалопатию SCN8A.

Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой аритмию SCN5A.

Согласно вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид вводят с одним или несколькими средствами, способными стимулировать проникновение рассматриваемого антисмыслового олигонуклеотида через гематоэнцефалический барьер любым способом, известным в настоящей области техники. Например, доставка средств путем введения аденовирусного вектора в двигательные нейроны мышечной ткани описана в патенте США № 6632427, "Перенос гена, опосредованного аденовирусным вектором, в медуллярные моторные нейроны", включенном в настоящий документ посредством ссылки. Доставка векторов непосредственно в головной мозг, например, стриатум, таламус, гиппокамп или черную субстанцию, описана, например, в патенте США № 6756523 "Аденовирусные векторы для переноса чужеродных генов в клетки центральной нервной системы, особенно в головном мозге", включенном в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно вариантам осуществления антисмысловые олигонуклеотиды связаны или конъюгированы со средствами, которые обеспечивают желательные фармацевтические или фармакодинамические свойства. Согласно вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид связан с веществом, известным в настоящей области техники для стимулирования проникновения или транспорта через гематоэнцефалический барьер, например, антителом к рецептору трансферрина. Согласно вариантам осуществле-

ния антисмысловой олигонуклеотид связан с вирусным вектором, например, чтобы сделать антисмысловое соединение более эффективным или увеличить транспорт через гематоэнцефалический барьер. Согласно вариантам осуществления осмотическому разрушению гематоэнцефалического барьера помогает инфузия Сахаров, например, мезоэритрита, ксилита, D(+) галактозы, D(+) лактозы, D(+) ксилозы, дульцитола, мио-инозита, L(-) фруктозы, D(-) маннита, D(+) глюкозы, D(+) арабинозы, D(-) арабинозы, целлобиозы, D(+) мальтозы, D(+) рафинозы, L(+) рамнозы, D(+) мелибиозы, D(-) рибозы, адонита, D(+) арабита, L(-) арабита, D(+) фукозы, L(-) фукозы, D(-) ликсозы, L(+) ликсозы и L(-) ликсозы, или аминокислоты, например, глутамина, лизина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, лейцина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, тирозина, валина и таурина. Способы и материалы для усиления проникновения через гематоэнцефалический барьер описаны, например, в патенте США № 9193969, "Композиции и способы селективной доставки молекул олигонуклеотидов к специфическим типам нейронов", патенте США № 4866042, "Способ доставки генетического материала через гематоэнцефалический барьер", патенте США № 6294520, "Материал для прохождения через гематоэнцефалический барьер" и патенте США № 6936589 "Парентеральные системы доставки", каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно вариантам осуществления ASO по настоящему изобретению соединяют с ингибитором обратного захвата дофамина (DRI), селективным ингибитором обратного захвата серотонина (SSRI), ингибитором обратного захвата норадреналина (NRI), ингибитором обратного захвата норэпинефрина-дофамина (NDRI) и ингибитором обратного захвата серотонина-норэпинефрина-дофамина (SNDRI) с использованием способов, описанных, например, в патенте США № 9193969, включенном в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно вариантам осуществления субъекты, которых подвергают лечению с использованием способов и композиций, оценивают на улучшение состояния с использованием любых способов, известных и описанных в настоящей области техники. Способы идентификации дополнительных ASO, которые вызывают пропуск экзонов Также в рамках настоящего раскрытия находятся способы идентификации или определения ASO, которые индуцируют пропуск экзонов содержащей NIE пре-мРНК SCN1A. Например, способ может предусматривать идентификацию или определение ASO, которые вызывают пропуск псевдоэкзона содержащей NIE пре-мРНК SCN1. ASO, которые специфически гибридизуются с различными нуклеотидами в целевой области пре-мРНК, могут быть подвергнуты скринингу для выявления или определения ASO, которые улучшают частоту и/или степень сплайсинга целевого интрона. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO может блокировать или создавать помехи сайту(ам) связывания репрессора(ов)/сайленсера сплайсинга. Любой способ, известный в настоящей области техники, может использоваться для идентификации (определения) ASO, который при гибридизации с целевой областью экзона приводит к желаемому эффекту (например, пропуску псевдоэкзона, производству белка или функциональной РНК). Эти способы также могут быть использованы для идентификации ASO, которые вызывают пропуск включенного экзона путем связывания с целевой областью в интроне, фланкирующем включенный экзон, или в не включенном экзоне. Пример способа, который можно использовать, представлен ниже.

Раунд скрининга, называемый "прогулкой" с ASO, может выполняться с использованием ASO, которые были разработаны для гибридизации с целевой областью пре-мРНК. Например, ASO, используемые в прогулке с ASO, могут быть разбиты на каждые 5 нуклеотидов от приблизительно 100 нуклеотидов выше против хода транскрипции от 3'-сайта сплайсинга включенного экзона (например, часть последовательности экзона, расположенная выше против хода транскрипции от целевого/включенного экзона) до приблизительно 100 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3'сайта сплайсинга мишени/включенного экзона и/или от приблизительно 100 нуклеотидов выше против хода транскрипции от 5' сайта сплайсинга включенного экзона до приблизительно 100 нуклеотидов ниже по ходу траскрипции от 5'сайта сплайсинга целевого/включенного экзона (например, часть последовательности экзона, расположенная ниже по ходу транскрипции от целевого/включенного экзона). Например, первый ASO длиной 15 нуклеотидов может быть разработан для специфической гибридизации с нуклеотидами от +6 до +20 относительно 3'-сайта сплайсинга целевого/включенного экзона. Второй ASO может быть разработан для специфической гибридизации с нуклеотидами от +11 до +25 относительно 3'-сайта сплайсинга целевого/включенного экзона. ASO разрабатывают как таковые, охватывающие целевую область пре-мРНК. Согласно вариантам осуществления ASO могут располагаться более тесно, например, через каждые 1, 2, 3 или 4 нуклеотида. Кроме того, ASO могут быть разбиты на фрагменты от 100 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 5'-сайта сплайсинга до 100 нуклеотидов выше против хода транскрипции от 3'-сайта сплайсинга. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO могут быть размещены в виде мозаики от приблизительно 1160 нуклеотидов выше против хода транскрипции от 3'-сайта сплайсинга до приблизительно 500 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 5'-сайта сплайсинга. Согласно некоторым вариантам осуществления ASO могут располагаться в виде мозаики от приблизительно 500 нуклеотидов выше против хода транскрипции от 3'-сайта сплайсинга до приблизительно 1920 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3-сайта сплайсинга.

Один или несколько ASO или контрольный ASO (ASO со скремблированной последовательностью,

последовательностью, которая не ожидается, что будет гибридизоваться с целевой областью), доставляется, например, путем трансфекции, в соответствующую заболеванию клеточную линию, которая экспрессирует целевую пре-мРНК (например, содержащую NIE пре-мРНК, описанную в настоящем документе). Эффекты пропуска экзонов каждого из ASO могут быть оценены любым способом, известным в настоящей области техники, например, с помощью ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ)-ПЦР с использованием праймеров, которые охватывают точку сплайсинга, как описано в примере 4. Уменьшение или отсутствие более длинного продукта ОТ-ПЦР, полученного с использованием праймеров, охватывающих область, содержащую включенный экзон (например, включая в себя фланкирующие экзоны NIE) в клетках, обработанных ASO, по сравнению с контрольными клетками, обработанными ASO, указывает на то, что сплайсинг целевого NIE был усилен. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективность пропуска экзонов (или эффективность сплайсинга для сплайсинга содержащего интрон NIE), отношение сплайсированной пре-мРНК к несплайсированной, частота сплайсинга или степень сплайсинга могут быть улучшены с использованием описанных в настоящем документе ASO. Количество белка или функциональной РНК, которая кодируется целевой пре-мРНК, также можно оценить, чтобы определить, достиг ли каждый ASO желаемого эффекта (например, усиленного производства функционального белка). Может быть использован любой способ, известный в настоящей области техники, для оценки и/или количественной оценки производства белка, такой как вестерн-блоттинг, проточная цитометрия, иммунофлуоресцентная микроскопия и ELISA.

Второй раунд скрининга, называемый "микропрогулкой" с ASO, может быть выполнен с использованием ASO, которые были разработаны для гибридизации с целевой областью пре-мРНК. ASO, используемые в микропрогулке с ASO, располагаются мозаикой по 1 нуклеотиду для дальнейшего уточнения последовательности нуклеиновой кислоты пре-мРНК, которая при гибридизации с ASO приводит к пропуску экзона (или усиленному сплайсингу NIE).

Области, определенные ASO, которые способствуют сплайсингу целевого интрона, исследуются более подробно с помощью "микропрогулки" с ASO, включающей в себя ASO, разнесенные с шагом 1 нуклеотид, а также более длинные ASO, как правило, 18-25 нуклеотидов.

Как описано для прогулки с ASO выше, микропрогулка с ASO выполняется посредством доставки одного или нескольких ASO или контрольного ASO (ASO со скремблированной последовательностью, последовательность, которая не должна гибридизоваться с целевой областью), например, путем трансфекции в соответствующую клеточную линию, которая экспрессирует целевую пре-мРНК. Индуцирующие сплайсинг эффекты каждого из ASO могут быть оценены любым способом, известным в настоящей области техники, например, с помощью ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ)-ПЦР с использованием праймеров, которые охватывают NIE, как описано в настоящем документе (смотрите, например, пример 4). Уменьшение или отсутствие более длинного продукта ОТ-ПЦР, полученного с использованием праймеров, охватывающих NIE в клетках, обработанных ASO, по сравнению с контрольными клетками, обработанными ASO, указывает на то, что пропуск экзона (или сплайсинг целевого интрона, содержащего NIE) был улучшен. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективность пропуска экзонов (или эффективность сплайсинга для сплайсинга интрона, содержащего NIE), отношение сплайсированной к несплайсированной пре-мРНК, частота сплайсинга или степень сплайсинга могут быть улучшены с использованием описанных в настоящем документе ASO. Количество белка или функциональной РНК, которая кодируется целевой пре-мРНК, также можно оценить, чтобы определить, достиг ли каждый ASO желаемого эффекта (например, усиленного производства функционального белка). Может быть использован любой способ, известный в настоящей области техники, для оценки и/или количественной оценки производства белка, такой как вестерн-блоттинг, проточная цитометрия, иммунофлуоресцентная микроскопия и ELISA.

ASO, которые при гибридизации с областью пре-мРНК приводят к пропуску экзона (или усиленному сплайсингу интрона, содержащего NIE) и увеличению производства белка, могут быть исследованы in vivo с использованием моделей на животных, например, моделей трансгенных мышей, у которых был включен полноразмерный человеческий ген, или в гуманизированных мышиных моделях заболевания. Подходящие пути введения ASO могут варьировать в зависимости от заболевания и/или типов клеток, в которые желательна доставка ASO. ASO можно вводить, например, путем интратекальной инъекции, интрацеребровентрикулярной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, интравитреальной инъекции или внутривенной инъекции. После введения клетки, ткани и/или органы модельных животных могут быть оценены для определения эффекта лечения ASO, например, путем оценки сплайсинга (эффективности, частоты, степени) и производства белка способами, известными в настоящей области техники и описанными в настоящем документе. Модели на животных также могут быть любым фенотипическим или поведенческим признаком заболевания или тяжести заболевания. Как описано в настоящем документе в различных примерах, экзон 20х в гене SCN1A человека эквивалентен экзону 21х в гене SCN1A мыши.

Также в объем настоящего раскрытия входит способ идентификации или проверки индуцирующего NMD экзона в присутствии ингибитора NMD, например, циклогексимида. Иллюстративный способ представлен на фиг. 3 и в примере 2.

Конкретные варианты осуществления

Вариант осуществления 1. Способ модулирования экспрессии белка SCN1A в клетке, имеющей мРНК, которая содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (мРНК с экзоном NMD) и кодирует белок SCN1A, причем этот способ предусматривает контакт терапевтического средства с клеткой, посредством чего терапевтическое средство модулирует сплайсинг экзона NMD из кодирующей белок SCN1A мРНК с экзоном NMD, тем самым модулируя содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, и модулируя экспрессию белка SCN1A в клетке.

Вариант осуществления 2. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта путем модулирования экспрессии белка SCN1A в клетке субъекта, предусматривающий: контактирование клетки субъекта с терапевтическим средством, которое модулирует сплайсинг индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона (экзона NMD) из мРНК в клетке, которая содержит экзон NMD и кодирует SCN1A, тем самым модулируя содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, и модулируя экспрессию белка SCN1A в клетке субъекта.

Вариант осуществления 3. Способ по варианту осуществления 1 или 2, при котором терапевтическое средство:

(a) связывается с целевой частью содержащей экзон NMD мРНК, кодирующей SCN1A;

(b) модулирует связывание фактора, участвующего в сплайсинге содержащей экзон NMD мРНК или

(c) представляет собой комбинацию (a) и (b).

Вариант осуществления 4. Способ по варианту осуществления 3, при котором терапевтическое средство препятствует связыванию фактора, участвующего в сплайсинге экзона NMD из области целевой части.

Вариант осуществления 5. Способ по варианту осуществления 3 или 4, при котором целевая часть проксимальна по отношению к экзону NMD.

Вариант осуществления 6. Способ по любому из вариантов осуществления 3-5, при котором целевая часть находится на расстоянии самое большее приблизительно 1500 нуклеотидов, приблизительно 1000 нуклеотидов, приблизительно 800 нуклеотидов, приблизительно 700 нуклеотидов, приблизительно 600 нуклеотидов, приблизительно 500 нуклеотидов, приблизительно 400 нуклеотидов, приблизительно 300 нуклеотидов, приблизительно 200 нуклеотидов, приблизительно 100 нуклеотидов, приблизительно 80 нуклеотидов, приблизительно 70 нуклеотидов, приблизительно 60 нуклеотидов, приблизительно 50 нуклеотидов выше против хода транскрипции от 5'-конца экзона NMD.

Вариант осуществления 7. Способ по любому из вариантов осуществления 3-6, при котором целевая часть находится на расстоянии по меньшей мере приблизительно 1500 нуклеотидов, приблизительно 1000 нуклеотидов, приблизительно 800 нуклеотидов, приблизительно 700 нуклеотидов, приблизительно 600 нуклеотидов, приблизительно 500 нуклеотидов, приблизительно 400 нуклеотидов, приблизительно 300 нуклеотидов, приблизительно 200 нуклеотидов, приблизительно 100 нуклеотидов, приблизительно 80 нуклеотидов, приблизительно 70 нуклеотидов, приблизительно 60 нуклеотидов, приблизительно 50 нуклеотидов, приблизительно 40 нуклеотидов, приблизительно 30 нуклеотидов, приблизительно 20 нуклеотидов, приблизительно 10 нуклеотидов, приблизительно 5 нуклеотидов, приблизительно 4 нуклеотида, приблизительно 2 нуклеотида, приблизительно 1 нуклеотид выше против хода транскрипции от 5'-конца экзона NMD.

Вариант осуществления 8. Способ по любому из вариантов осуществления 3-5, при котором целевая часть находится на расстоянии самое большее приблизительно 1500 нуклеотидов, приблизительно 1000 нуклеотидов, приблизительно 800 нуклеотидов, приблизительно 700 нуклеотидов, приблизительно 600 нуклеотидов, приблизительно 500 нуклеотидов, приблизительно 400 нуклеотиды, приблизительно 300 нуклеотидов, приблизительно 200 нуклеотидов, приблизительно 100 нуклеотидов, приблизительно 80 нуклеотидов, приблизительно 70 нуклеотидов, приблизительно 60 нуклеотидов, приблизительно 50 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3'-конца экзона NMD.

Вариант осуществления 9. Способ по любому из вариантов осуществления 3-5 или 8, при котором целевая часть находится на расстоянии по меньшей мере приблизительно 1500 нуклеотидов, приблизительно 1000 нуклеотидов, приблизительно 800 нуклеотидов, приблизительно 700 нуклеотидов, приблизительно 600 нуклеотидов, приблизительно 500 нуклеотидов, приблизительно 400 нуклеотидов, приблизительно 300 нуклеотидов, приблизительно 200 нуклеотидов, приблизительно 100 нуклеотидов, приблизительно 80 нуклеотидов, приблизительно 70 нуклеотидов, приблизительно 60 нуклеотидов, приблизительно 50 нуклеотидов, приблизительно 40 нуклеотидов, приблизительно 30 нуклеотидов, приблизительно 20 нуклеотидов, приблизительно 10 нуклеотидов, приблизительно 5 нуклеотидов, приблизительно 4 нуклеотида, приблизительно 2 нуклеотида, приблизительно 1 нуклеотид ниже по ходу транскрипции от 3'-конца экзона NMD.

Вариант осуществления 10. Способ по любому из вариантов осуществления 3-9, при котором целевая часть расположена в интронной области между двумя каноническими экзонными областями кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD и при котором интронная область содержит экзон NMD.

Вариант осуществления 11. Способ по любому из вариантов осуществления 3-10, при котором целевая часть по меньшей мере частично перекрывается с экзоном NMD.

Вариант осуществления 12. Способ по любому из вариантов осуществления 3-11, при котором целевая часть по меньшей мере частично перекрывается с интроном выше против хода транскрипции от экзона NMD.

Вариант осуществления 13. Способ по любому из вариантов осуществления 3-12, при котором целевая часть содержит 5'-соединение экзон NMD-интрон или 3'-соединение экзон NMD-интрон.

Вариант осуществления 14. Способ по любому из вариантов осуществления 3-13, при котором целевая часть находится в пределах экзона NMD.

Вариант осуществления 15. Способ по любому из вариантов осуществления 3-14, при котором целевая часть содержит приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более последовательных нуклеотидов экзона NMD.

Вариант осуществления 16. Способ по любому из вариантов осуществления 1-15, при котором кодирующая SCN1A мРНК с экзоном NMD содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 2 или 7-10.

Вариант осуществления 17. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, при котором кодирующая SCN1A мРНК с экзоном NMD кодируется генетической последовательностью с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к SEQ ID NO: 1 или 3-6.

Вариант осуществления 18. Способ по любому из вариантов осуществления 3-17, при котором целевая часть находится на расстоянии самое большее приблизительно 1500 нуклеотидов, приблизительно 1000 нуклеотидов, приблизительно 800 нуклеотидов, приблизительно 700 нуклеотидов, приблизительно 600 нуклеотидов, приблизительно 500 нуклеотидов, приблизительно 400 нуклеотидов, приблизительно 300 нуклеотидов, приблизительно 200 нуклеотидов, приблизительно 100 нуклеотидов, приблизительно 80 нуклеотидов, приблизительно 70 нуклеотидов, приблизительно 60 нуклеотидов, приблизительно 50 нуклеотидов выше против хода транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803.

Вариант осуществления 19. Способ по любому из вариантов осуществления 3-18, при котором целевая часть находится на расстоянии приблизительно 1000 нуклеотидов, приблизительно 800 нуклеотидов, приблизительно 700 нуклеотидов, приблизительно 600 нуклеотидов, приблизительно 500 нуклеотидов, приблизительно 400 нуклеотидов, приблизительно 300 нуклеотидов, приблизительно 200 нуклеотидов, приблизительно 100 нуклеотидов, приблизительно 80 нуклеотидов, приблизительно 70 нуклеотидов, приблизительно 60 нуклеотидов, приблизительно 50 нуклеотидов, приблизительно 40 нуклеотидов, приблизительно 30 нуклеотидов, приблизительно 20 нуклеотидов, приблизительно 10 нуклеотидов, приблизительно 5 нуклеотидов, приблизительно 4 нуклеотидов, приблизительно 2 нуклеотида, приблизительно 1 нуклеотид выше против хода транскрипции геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803.

Вариант осуществления 20. Способ по любому из вариантов осуществления 3-17, при котором целевая часть находится на расстоянии самое большее приблизительно 1500 нуклеотидов, приблизительно 1000 нуклеотидов, приблизительно 800 нуклеотидов, приблизительно 700 нуклеотидов, приблизительно 600 нуклеотидов, приблизительно 500 нуклеотидов, приблизительно 400 нуклеотидов, приблизительно 300 нуклеотидов, приблизительно 200 нуклеотидов, приблизительно 100 нуклеотидов, приблизительно 80 нуклеотидов, приблизительно 70 нуклеотидов, приблизительно 60 нуклеотидов, приблизительно 50 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863740.

Вариант осуществления 21. Способ по любому из вариантов осуществления 3-17 или 20, при котором целевая часть находится на расстоянии приблизительно 1000 нуклеотидов, приблизительно 800 нуклеотидов, приблизительно 700 нуклеотидов, приблизительно 600 нуклеотидов, приблизительно 500 нуклеотидов, приблизительно 400 нуклеотидов, приблизительно 300 нуклеотидов, приблизительно 200 нуклеотидов, приблизительно 100 нуклеотидов, приблизительно 80 нуклеотидов, приблизительно 70 нуклеотидов, приблизительно 60 нуклеотидов, приблизительно 50 нуклеотидов, приблизительно 40 нуклеотидов, приблизительно 30 нуклеотидов, приблизительно 20 нуклеотидов, приблизительно 10 нуклеотидов, приблизительно 5 нуклеотидов, приблизительно 4 нуклеотида, приблизительно 2 нуклеотида, приблизительно 1 нуклеотид ниже по ходу транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863740.

Вариант осуществления 22. Способ по любому из вариантов осуществления 3-21, при котором целевой участок кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере с 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к области, содержащей по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых кислот SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2 или 7-10.

Вариант осуществления 23. Способ по варианту осуществления 22, при котором терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO) и при котором ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 21-67, 210-256 или 304-379.

Вариант осуществления 24. Способ по любому из вариантов осуществления 3-21, при котором целевая часть кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD находится в пределах индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20x SCN1A.

Вариант осуществления 25. Способ по варианту осуществления 24, при котором терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 42-50 или 231-239.

Вариант осуществления 26. Способ по любому из вариантов осуществления 3-21, при котором целевая часть кодирующей SCN1A мРНК с экзоном NMD находится выше против хода транскрипции или ниже по ходу транскрипции от индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20х SCN1 A.

Вариант осуществления 27. Способ по варианту осуществления 26, при котором терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 21-38, 53-67, 210-227 или 242-256.

Вариант осуществления 28. Способ по любому из вариантов осуществления 3-21, при котором целевая часть мРНК с экзоном NMD содержит экзон-интронное соединение экзона 20х SCN1A.

Вариант осуществления 29. Способ по варианту осуществления 28, при котором терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 39-41, 51, 52, 228-230, 240 или 241.

Вариант осуществления 30. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, при котором терапевтическое средство способствует исключению экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A.

Вариант осуществления 31. Способ по варианту осуществления 30, при котором исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз по сравнению с исключением экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1 A, в контрольной клетке.

Вариант осуществления 32. Способ по варианту осуществления 30 или 31, при котором терапевтическое средство повышает содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке.

Вариант осуществления 33. Способ по любому из вариантов осуществления 30-32, при котором количество процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в контрольной клетке.

Вариант осуществления 34. Способ по любому из вариантов осуществления 30-33, при котором терапевтическое средство увеличивает экспрессию белка SCN1A в клетке.

Вариант осуществления 35. Способ по любому из вариантов осуществления 30-34, при котором количество SCN1A, производимого в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, увеличивает-

ся в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством производимого SCN1A в контрольной клетке.

Вариант 36. Способ по любому из вариантов осуществления 2-35, при котором заболевание или состояние индуцируется мутацией с потерей функции в $Na_v1.1$.

Вариант осуществления 37. Способ по любому из вариантов осуществления 2-36, при котором заболевание или состояние связано с гаплонедостаточностью гена SCN1A, причем у субъекта имеется первый аллель, кодирующий функциональный SCN1A, и второй аллель, из которого SCN1A не производится или производится в сниженном количестве, или второй аллель, кодирующий нефункциональный SCN1A или частично функциональный SCN1A.

Вариант осуществления 38. Способ по любому из вариантов осуществления 2-37, при котором заболевание или состояние представляет собой энцефалопатию.

Вариант осуществления 39. Способ по варианту осуществления 38, при котором энцефалопатия представляет собой эпилептическую энцефалопатию.

Вариант осуществления 40. Способ по любому из вариантов осуществления 2-37, при котором заболевание или состояние представляет собой синдром Драве (DS); тяжелую миоклоническую эпилепсию младенчества (SMEI) - пограничную форму (SMEB); фебрильные судороги (FS); эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс (GEFS); эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13; криптогенную генерализованную эпилепсию; криптогенную фокальную эпилепсию; эпилепсию с миоклонико-астатическими приступами; синдром Леннокса-Гасто; синдром Веста; идиопатические спазмы; раннюю миоклоническую энцефалопатию; прогрессирующую миоклоническую эпилепсию; альтернирующую гемиплегию детского возраста; неклассифицированную эпилептическую энцефалопатию; внезапную неожиданную смерть при эпилепсии (SUDEP); синдром слабости синусового узла 1; аутизм или злокачественные миграционные парциальные приступы младенчества.

Вариант осуществления 41. Способ по варианту осуществления 40, при котором GEFS+ представляет собой эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс, типа 2.

Вариант осуществления 42. Способ по варианту осуществления 40, при котором фебрильные судороги представляют собой фебрильные судороги, семейные, 3A.

Вариант осуществления 43. Способ по варианту осуществления 40, при котором SMEB представляет собой SMEB без генерализованной спайк-волны (SMEB-SW), SMEB без миоклонических судорог (SMEB-M), SMEB без более чем одного признака SMEI (SMEB-O) или стойкую эпилепсию детей с генерализованными тонико-клоническими судорогами (ICEGTC).

Вариант осуществления 44. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, при котором терапевтическое средство способствует исключению экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1 A, и увеличивает экспрессию SCN1A в клетке.

Вариант осуществления 45. Способ по любому из вариантов осуществления 1-44, при котором терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95 %, 97% или 100% комплементарна любой из SEQ ID NO: 22-24, 26, 27, 29-35, 37-62, 64-67 или 304-379.

Вариант осуществления 46. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, при котором терапевтическое средство ингибирует исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A.

Вариант осуществления 47. Способ по варианту осуществления 46, при котором исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, уменьшается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1

до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с исключением экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в контрольной клетке.

Вариант осуществления 48. Способ по варианту осуществления 46 или 47, при котором терапевтическое средство снижает содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке.

Вариант осуществления 49. Способ по любому из вариантов осуществления 46-48, при котором количество процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, уменьшается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, в контрольной клетке.

Вариант осуществления 50. Способ по любому из вариантов осуществления 46-49, при котором терапевтическое средство уменьшает экспрессию белка SCN1A в клетке.

Вариант осуществления 51. Способ по любому из вариантов осуществления 46-50, при котором количество SCN1A, производимого в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, уменьшается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством производимого SCN1A в контрольной клетке.

Вариант осуществления 52. Способ по любому из вариантов осуществления 2-29 или 46-49, при котором заболевание или состояние индуцируется мутацией с приобретением функции в Nav1.1.

Вариант осуществления 53. Способ по варианту осуществления 52, при котором у субъекта имеется аллель, из которого производится SCN1A в повышенном количестве, или аллель, кодирующий мутантный SCN1A, который индуцирует повышенную активность Nav1.1 в клетке.

Вариант осуществления 54. Способ по варианту осуществления 52 или 53, при котором заболевание или состояние представляет собой мигрень.

Вариант осуществления 55. Способ по варианту осуществления 54, при котором мигрень представляет собой мигрень, наследственную гемиплегическую, 3.

Вариант 56. Способ по любому из вариантов 2-49, при котором заболевание или состояние представляет собой генетическую эпилепсию Nav1.1.

Вариант осуществления 57. Способ по любому из вариантов осуществления 46-56, при котором терапевтическое средство ингибирует исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, и снижает экспрессию SCN1A в клетке.

Вариант осуществления 58. Способ по любому из вариантов осуществления 46-57, при котором терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% комплементарна любой из SEQ ID NO: 21, 25, 28, 36 или 63.

Вариант осуществления 59. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при котором терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер содержит модификацию остова, содержащую фосфоротиоатную связь или фосфородиамидатную связь.

Вариант осуществления 60. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при котором терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер содержит фосфородиамидат морфолино, блокированную нуклеиновую кислоту, пептидную нуклеиновую кислоту, 2'-O-метил, 2'-фтор или 2'-O-метоксиэтильный фрагмент.

Вариант осуществления 61. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при котором терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер содержит по меньшей мере один модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 62. Способ по варианту осуществления 61, при котором каждый фрагмент сахара представляет собой модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 63. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при котором терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер состоит из от 8 до 50 нуклеотидных оснований, от 8 до 40 нуклеотидных оснований, от 8 до 35 нуклеотидных оснований, 8 до 30 нуклеотидных оснований, от 8 до 25 нуклеотидных оснований, от 8 до 20 нуклеотидных оснований, от 8 до 15 нуклеотидных оснований, от 9 до 50 нуклеотидных оснований, от 9 до 40 нуклеотидных оснований, от 9 до 35 нуклеотидных оснований, от 9 до 30 нуклеотидных оснований, от 9 до 25 нуклеотидных оснований, от 9 до 15 нуклеотидных оснований, от 10 до 50 нуклеотидных оснований, от 10 до 40 нуклеотидных оснований, от 10 до 35 нуклеотидных оснований, от 10 до 30 нуклеотидных оснований, от 10 до 25 нуклеотидных оснований, от 10 до 20 нуклеотидных оснований, от 10 до 15 нуклеотидных оснований, от 11 до 50 нуклеотидных оснований, 11 до 35 нуклеотидных оснований, от 11 до 30 нуклеотидных оснований, от 11 до 25 нуклеотидных оснований, от 11 до 20 нуклеотидных оснований, от 11 до 15 нуклеотидных оснований, от 12 до 50 нуклеотидных оснований, от 12 до 40 нуклеотидных оснований, от 12 до 35 нуклеотидных оснований, от 12 до 30 нуклеотидных оснований, от 12 до 25 нуклеотидных оснований, от 12 до 20 нуклеотидных оснований или от 12 до 15 нуклеотидных оснований.

Вариант осуществления 64. Способ по любому из вариантов осуществления 3-63, при котором терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% комплементарен целевой части кодирующей белок мРНК с экзоном NMD.

Вариант осуществления 65. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем способ дополнительно предусматривает оценку экспрессии мРНК или белка SCN1A.

Вариант осуществления 66. Способ по любому из вариантов осуществления 2-65, при котором субъект представляет собой человека.

Вариант осуществления 67. Способ по любому из вариантов осуществления 2-65, при котором субъект представляет собой отличное от человека животное.

Вариант осуществления 68. Способ по любому из вариантов осуществления 2-65, при котором субъект представляет собой плод, эмбрион или ребенка.

Вариант осуществления 69. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при котором клетки находятся ex vivo.

Вариант осуществления 70. Способ по любому из вариантов осуществления 2-69, при котором терапевтическое средство вводят субъекту посредством интратекальной инъекции, интрацеребровентрикулярной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, интравитреальной или внутривенной инъекции.

Вариант осуществления 71. Способ по любому из вариантов осуществления 2-65, причем способ дополнительно предусматривает введение второго терапевтического средства субъекту.

Вариант осуществления 72. Способ по варианту осуществления 71, при котором второе терапевтическое средство представляет собой небольшую молекулу.

Вариант осуществления 73. Способ по варианту осуществления 71, при котором второе терапевтическое средство представляет собой ASO.

Вариант осуществления 74. Способ по варианту осуществления 73, при котором ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% комплементарна любой из SEQ ID NO: 115-161.

Вариант осуществления 75. Способ по варианту осуществления 71, при котором второе терапевтическое средство корректирует удержание интрона.

Вариант осуществления 76. Способ по любому из вариантов осуществления 2-65, при котором заболевание или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, энцефалопатию SCN2A, энцефалопатию SCN8A или аритмию SCN5A.

Вариант осуществления 77. Способ по варианту осуществления 30, 32 или 34, при котором заболевание или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, энцефалопатию SCN2A, энцефалопатию SCN8A или аритмию SCN5A.

Вариант осуществления 78. Способ лечения синдрома Драве (DS); эпилепсии, генерализованной с фебрильными судорогами плюс, типа 2; фебрильных судорог, семейных, 3A; мигрени, наследственной гемиплегической, 3; аутизма; эпилептической энцефалопатии, ранней детской, 13; синдрома слабости синусового узла 1; болезни Альцгеймера или внезапной неожиданной смерти при эпилепсии (SUDEP) у нуждающегося в этом субъекта путем увеличения экспрессии целевого белка или функциональной РНК клеткой субъекта, причем клетка имеет мРНК, которая содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (мРНК с экзоном NMD), и причем мРНК с экзоном NMD кодирует целевой белок или функциональную РНК, причем способ предусматривает контактирование клетки субъекта с терапевтическим средством, которое связывается с целевой частью мРНК с экзоном NMD, кодирующей целевой белок или функциональную РНК, посредством чего индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон исключается из мРНК с экзоном NMD, кодирующей целевой белок или функциональную РНК, тем самым увеличивая содержание процессированной мРНК, кодирующей целевой белок или функциональную РНК, и увеличивая экспрессию целевого белка или функциональной РНК в клетке субъекта.

Вариант осуществления 79. Способ по варианту осуществления 78, при котором целевой белок представляет собой SCN1A.

Вариант осуществления 80. Способ увеличения экспрессии белка SCN1A клеткой, имеющей мРНК, которая содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (мРНК с экзоном NMD) и кодирует белок SCN1A, причем способ предусматривает контактирование клетки со средством, которое связывается с целевой частью кодирующей белок SCN1A мРНК с экзоном NMD, посредством чего индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон исключается из кодирующей белок SCN1A мРНК с экзоном NMD, тем самым увеличивая содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, и увеличивая экспрессию белка SCN1A в клетке.

Вариант осуществления 81. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта путем увеличения экспрессии белка SCN1A в клетке субъекта, предусматривающий: контактирование клетки субъекта с терапевтическим средством, которое связывается с целевой частью мРНК с индуцирующим нонсенс-опосредованный распад РНК экзоном, кодирующей белок SCN1A или функциональную РНК SCN1A, посредством чего индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон исключается из мРНК с экзоном NMD, кодирующей белок SCN1A или функциональную РНК SCN1A, тем самым увеличивая содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A или функциональную РНК SCN1A, и увеличивая экспрессию белка SCN1A или функциональной РНК SCN1A в клетке субъекта; причем заболевание или состояние связано с мутацией гена, отличного от гена SCN1A, аберрантной экспрессией белка, кодируемого геном, отличным от гена SCN1A, или аберрантной экспрессией РНК, кодируемой геном, отличным от гена SCN1A.

Вариант осуществления 82. Способ по варианту осуществления 81, при котором симптом заболевания или состояния уменьшается приблизительно в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более.

Вариант осуществления 83. Способ по варианту осуществления 81 или 82, при котором симптом заболевания или состояния уменьшается приблизительно на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% с увеличением экспрессии белка SCN1A.

Вариант осуществления 84. Способ по любому из вариантов осуществления 81-83, при котором прогрессирование заболевания или состояния снижается приблизительно в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более с увеличением экспрессии белка SCN1A.

Вариант осуществления 85. Способ по любому из вариантов осуществления 81-84, при котором прогрессирование заболевания или состояния уменьшается приблизительно на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% с увеличением экспрессии белка SCN1A.

Вариант осуществления 86. Способ по любому из вариантов осуществления 81-85, при котором увеличение экспрессии белка SCN1A или функциональной РНК SCN1A компенсирует мутацию гена, отличного от гена SCN1A, аберрантную экспрессию белка, кодируемого геном, отличным от гена SCN1A, или аберрантную экспрессию РНК, кодируемой геном, отличным от гена SCN1 A.

Вариант осуществления 87. Способ по любому из вариантов осуществления 81-86, при котором заболевание или состояние представляет собой эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13.

Вариант осуществления 88. Способ по любому из вариантов осуществления 81-87, при котором субъект характеризуется наличием мутации в гене SCN8A.

Вариант осуществления 89. Способ по любому из вариантов осуществления 81-86, при котором заболевание или состояние представляет собой синдром слабости синусового узла 1.

Вариант осуществления 90. Способ по любому из вариантов осуществления 81-86 или 88, при котором субъект характеризуется наличием мутации в гене SCN5A.

Вариант осуществления 91. Способ по любому из вариантов осуществления 81-86, при котором заболевание или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера.

Вариант осуществления 92. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту композиции, содержащей антисмысловой олигомер, причем антисмысловой олигомер содержит последовательность по меньшей мере из 8 смежных нуклеотидов, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% комплементарна интрону 20 SCN1A.

Вариант осуществления 93. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту композиции, содержащей антисмысловой олигомер, причем антисмысловой олигомер содержит последовательность по меньшей мере из 8 смежных нуклеотидов, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% комплементарна любой из SEQ ID NO: 7-10.

Вариант осуществления 94. Способ по любому из вариантов осуществления 78-93, при котором индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон подвергают сплайсингу из мРНК с экзоном NMD, кодирующей целевой белок или функциональную РНК.

Вариант осуществления 95. Способ по любому из вариантов осуществления 78-94, при котором целевой белок не содержит аминокислотную последовательность, кодируемую индуцирующим нонсенс-опосредованный распад РНК экзоном.

Вариант осуществления 96. Способ по любому из вариантов осуществления 78-95, при котором целевой белок представляет собой полноразмерный целевой белок.

Вариант осуществления 97. Способ по любому из вариантов осуществления 78-96, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), комплементарный целевой части мРНК с экзоном NMD.

Вариант осуществления 98. Способ по любому из вариантов осуществления 78-97, при котором мРНК представляет собой пре-мРНК.

Вариант осуществления 99. Способ по любому из вариантов осуществления 78-98, при котором контактирование предусматривает контактирование терапевтического средства с мРНК, причем мРНК находится в ядре клетки.

Вариант осуществления 100. Способ по любому из вариантов осуществления 78-99, при котором целевой белок или функциональная РНК исправляет дефицит целевого белка или функциональной РНК у субъекта.

Вариант осуществления 101. Способ по любому из вариантов осуществления 78-100, при котором клетки находятся в субъекте или получены от субъекта с состоянием, вызванным недостаточным количеством или активностью белка SCN1 A.

Вариант осуществления 102. Способ по любому из вариантов осуществления 78-101, при котором недостаточное количество целевого белка вызвано гаплонедостаточностью целевого белка, причем у субъекта имеется первый аллель, кодирующий функциональный целевой белок, и второй аллель, из которого целевой белок не производится или производится в сниженном количестве, или второй аллель, кодирующий нефункциональный или частично функциональный целевой белок, и причем антисмысловой олигомер связывается с целевой частью мРНК с экзоном NMD, транскрибированной с первого аллеля.

Вариант осуществления 103. Способ по любому из вариантов осуществления 78-101, при котором у субъекта имеется состояние, вызванное нарушением, которое является результатом дефицита количества или функции целевого белка, причем субъект характеризуется наличием:

(a) первого мутантного аллеля, из которого:

(i) целевой белок производится в сниженном количестве по сравнению с производством аллеля дикого типа,

(ii) целевой белок производится в форме, обладающей пониженной функцией по сравнению с эквивалентным белком дикого типа, или

(iii) целевой белок не производится, и

(b) второго мутантного аллеля, из которого:

(i) целевой белок производится в сниженном количестве по сравнению с производством аллеля дикого типа,

(ii) целевой белок производится в форме, обладающей пониженной функцией по сравнению с эквивалентным белком дикого типа, или (iii) целевой белок не производится, и причем когда у субъекта есть первый мутантный аллель (a)(iii), второй мутантный аллель представляет собой (b)(i) или (b)(ii), и причем когда у субъекта есть второй мутантный аллель (b)(iii), первый мутантный аллель представляет собой (a)(i) или (a)(ii), и причем мРНК с экзоном NMD транскрибируется либо из первого мутантного ал-

леля, который представляет собой (a)(i) или (a)(ii), и/или из второго аллеля, который представляет собой (b)(i) или (b)(ii).

Вариант осуществления 104. Способ по варианту осуществления 103, при котором целевой белок производится в форме, обладающей сниженной функцией по сравнению с эквивалентным белком дикого типа.

Вариант осуществления 105. Способ по варианту осуществления 103, при котором целевой белок производится в форме, которая является полностью функциональной по сравнению с эквивалентным белком дикого типа.

Вариант осуществления 106. Способ по любому из вариантов осуществления 78-105, при котором целевая часть мРНК с экзоном NMD находится в индуцирующем нонсенс-опосредованный распад РНК экзоне.

Вариант осуществления 107. Способ по любому из вариантов осуществления 78-105, при котором целевая часть мРНК с экзоном NMD находится либо выше против хода транскрипции, либо ниже по ходу транскрипции от индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона.

Вариант осуществления 108. Способ по любому из вариантов осуществления 78-107, при котором мРНК с экзоном NMD содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 2, 7-10, 12 и 17-20.

Вариант осуществления 109. Способ по любому из вариантов осуществления 78-107, при котором мРНК с экзоном NMD кодируется генетической последовательностью с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к SEQ ID NO: 1, 3-6, 11 и 13-16.

Вариант осуществления 110. Способ по любому из вариантов осуществления 78-107, при котором целевая часть мРНК с экзоном NMD содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к области, содержащей по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 2, 7-10, 12 и 17-20.

Вариант осуществления 111. Способ по любому из вариантов осуществления 78-110, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 21-114.

Вариант осуществления 112. Способ по любому из вариантов осуществления 78-105, при котором целевая часть мРНК с экзоном NMD находится в пределах индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20x SCN1A.

Вариант осуществления 113. Способ по варианту осуществления 112, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 42-50 или 231-239.

Вариант осуществления 114. Способ по любому из вариантов осуществления 78-105, при котором целевая часть мРНК с экзоном NMD находится выше против хода транскрипции или ниже по ходу транскрипции от индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20x SCN1A.

Вариант осуществления 115. Способ по варианту осуществления 114, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 21-38, 53-67, 210-227 или 242-256.

Вариант осуществления 116. Способ по любому из вариантов осуществления 78-105, при котором целевая часть мРНК с экзоном NMD содержит экзон-интронное соединение экзона 20x SCN1A.

Вариант осуществления 117. Способ по варианту осуществления 116, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 39-41, 51, 52, 228-230, 240 или 241.

Вариант осуществления 118. Способ по любому из вариантов осуществления 78-105, при котором целевая часть мРНК с экзоном NMD находится в пределах индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 21x Scn1a.

Вариант осуществления 119. Способ по варианту осуществления 118, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 89-97.

Вариант осуществления 120. Способ по любому из вариантов осуществления 78-105, при котором целевая часть мРНК с экзоном NMD находится либо выше против хода транскрипции, либо ниже по ходу транскрипции от индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 21x Scn1a.

Вариант осуществления 121. Способ по варианту осуществления 120, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по

меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 68-85 и 100-114.

Вариант осуществления 122. Способ по любому из вариантов осуществления 78-105, при котором целевая часть мРНК с экзоном NMD содержит экзон-интронное соединение экзона 21x Scn1a.

Вариант осуществления 123. Способ по варианту осуществления 122, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 86-88 и 98-99.

Вариант осуществления 124. Способ по любому из вариантов осуществления 78-123, при котором производимый целевой белок представляет собой полноразмерный белок или белок дикого типа.

Вариант осуществления 125. Способ по любому из вариантов осуществления 78-124, при котором общее количество процессированной мРНК, кодирующей целевой белок или функциональную РНК, производимой в клетке, контактирующей с антисмысловым олигомером, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством процессированной мРНК, кодирующей целевой белок или функциональную РНК, производимой в контрольной клетке.

Вариант осуществления 126. Способ по любому из вариантов осуществления 78-124, при котором общее количество целевого белка, производимого клеткой, контактирующей с антисмысловым олигомером, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством целевого белка, производимого контрольной клеткой.

Вариант осуществления 127. Способ по любому из вариантов осуществления 78-126, причем средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер содержит модификацию остова, содержащую фосфоротиоатную связь или фосфородиамидатную связь.

Вариант осуществления 128. Способ по любому из вариантов осуществления 78-127, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер содержит фосфородиамидат морфолино, блокированную нуклеиновую кислоту, пептидную нуклеиновую кислоту, 2'-O-метил, 2'-фтор или 2-O-метоксиэтильный фрагмент.

Вариант осуществления 129. Способ по любому из вариантов осуществления 78-128, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер содержит по меньшей мере один модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 130. Способ по варианту осуществления 129, при котором каждый фрагмент сахара представляет собой модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 131. Способ по любому из вариантов осуществления 78-130, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер состоит из от 8 до 50 нуклеотидных оснований, от 8 до 40 нуклеотидных оснований, от 8 до 35 нуклеотидных

оснований, от 8 до 30 нуклеотидных оснований, от 8 до 25 нуклеотидных оснований, от 8 до 20 нуклеотидных оснований, от 8 до 15 нуклеотидных оснований, от 9 до 50 нуклеотидных оснований, от 9 до 40 нуклеотидных оснований, от 9 до 35 нуклеотидных оснований, от 9 до 30 нуклеотидных оснований, от 9 до 20 нуклеотидных оснований, от 9 до 15 нуклеотидных оснований, от 10 до 50 нуклеотидных оснований, от 10 до 40 нуклеотидных оснований, от 10 до 35 нуклеотидных оснований, от 10 до 30 нуклеотидных оснований, от 10 до 25 нуклеотидных оснований, от 10 до 20 нуклеотидных оснований, от 10 до 15 нуклеотидных оснований, от 11 до 40 нуклеотидных оснований, от 11 до 35 нуклеотидных оснований, от 11 до 30 нуклеотидных оснований, от 11 до 25 нуклеотидных оснований, от 11 до 20 нуклеотидных оснований, от 11 до 15 нуклеотидных оснований, от 12 до 50 нуклеотидных оснований, от 12 до 40 нуклеотидных оснований, от 12 до 35 нуклеотидных оснований, от 12 до 30 нуклеотидных оснований, от 12 до 25 нуклеотидных оснований, от 12 до 20 нуклеотидных оснований или от 12 до 15 нуклеотидных оснований.

Вариант осуществления 132. Способ по любому из вариантов осуществления 78-131, при котором средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% комплементарен целевой части кодирующей белок мРНК с экзоном NMD.

Вариант осуществления 133. Способ по любому из вариантов осуществления 78-132, причем способ дополнительно предусматривает оценку экспрессии мРНК или белка SCN1A.

Вариант осуществления 134. Способ по любому из вариантов осуществления 1-113, при котором подвергается лечению синдром Драве; эпилепсия, генерализованная с фебрильными судорогами плюс, типа 2; фебрильные судороги, семейные, 3A; мигрень, наследственная гемиплегическая, 3; аутизм; эпилептическая энцефалопатия, ранняя детская, 13; синдром слабости синусового узла 1; болезнь Альцгеймера или внезапная неожиданная смерть при эпилепсии (SUDEP), и при котором антисмысловой олигомер связывается с целевой частью мРНК SCN1A с экзоном NMD, причем целевая честь находится в последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 7-10 и 17-20.

Вариант осуществления 135. Способ по любому из вариантов осуществления 78-134, при котором субъект представляет собой человека.

Вариант осуществления 136. Способ по любому из вариантов осуществления 78-135, при котором субъект представляет собой отличное от человека животное.

Вариант осуществления 137. Способ по любому из вариантов осуществления 78-136, при котором субъект представляет собой плод, эмбрион или ребенка.

Вариант осуществления 138. Способ по любому из вариантов осуществления 78-137, при котором клетки находятся ex vivo.

Вариант осуществления 139. Способ по любому из вариантов осуществления 78-138, при котором терапевтическое средство вводят субъекту путем интратекальной инъекции, интрацеребровентрикулярной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, интравитреальной инъекции или внутривенной инъекции.

Вариант осуществления 140. Способ по любому из вариантов осуществления 78-139, причем способ дополнительно предусматривает введение второго терапевтического средства субъекту.

Вариант осуществления 141. Способ по варианту осуществления 140, при котором второе терапевтическое средство представляет собой небольшую молекулу.

Вариант осуществления 142. Способ по варианту осуществления 140, при котором второе терапевтическое средство представляет собой ASO.

Вариант осуществления 143. Способ по варианту осуществления 142, при котором ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 115-161.

Вариант осуществления 144. Способ по любому из вариантов осуществления 140-142, при котором второе терапевтическое средство корректирует удержание интрона.

Вариант осуществления 145. Антисмысловой олигомер, используемый в способе любого из вариантов осуществления 78-144.

Вариант осуществления 146. Антисмысловой олигомер, содержащий последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 21-114.

Вариант осуществления 147. Фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигомер по варианту осуществления 145 или 146 и вспомогательное вещество.

Вариант осуществления 148. Способ лечения нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение фармацевтической композиции по варианту осуществления 147 субъекту, причем введение представляет собой интратекальную инъекцию, интрацеребровентрикулярную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, внутримышечную инъекцию, подкожную инъекцию, интравитреальную инъекцию или внутривенную инъекцию.

Вариант осуществления 149. Композиция, содержащая терапевтическое средство для применения в способе увеличения экспрессии целевого белка или функциональной РНК клетками для лечения заболе-

вания или состояния, связанного с дефектным белком или дефектной функциональной РНК, у нуждающегося в этом субъекта, причем дефектный белок или дефектная функциональная РНК характеризуются недостаточным количеством или активностью у субъекта, причем целевой белок представляет собой:

(a) дефектный белок или

(b) компенсирующий белок, который функционально увеличивает или заменяет дефектный белок у субъекта;

и причем функциональная РНК представляет собой:

(c) дефектную РНК или

(d) компенсирующую функциональную РНК, которая функционально увеличивает или заменяет дефектную функциональную РНК у субъекта; причем терапевтическое средство усиливает исключение индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона из мРНК с экзоном NMD, кодирующей целевой белок или функциональную РНК, тем самым увеличивая производство или активность целевого белка или функциональной РНК у субъекта.

Вариант осуществления 150. Композиция, содержащая терапевтическое средство для применения в способе лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, причем способ предусматривает стадию модуляции экспрессии белка SCN1A клетками субъекта, причем клетки имеют мРНК, которая содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (мРНК с экзоном NMD) и кодирует белок SCN1A, причем этот способ предусматривает контактирование клеток с терапевтическим средством, посредством чего модулируется исключение индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона из мРНК с экзоном NMD, кодирующей белок SCN1A, тем самым модулируя содержание процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, и модулируя экспрессию белка SCN1A в клетках субъекта.

Вариант осуществления 151. Композиция по варианту осуществления 150, причем заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из: синдрома Драве (DS); тяжелой миоклонической эпилепсии младенчества (SMEI) - пограничной формы (SMEB); фебрильных судорог (FS); эпилепсии, генерализованной, с фебрильными судорогами плюс (GEFS+); эпилептической энцефалопатии, ранней детской, 13; криптогенной генерализованной эпилепсии; криптогенной фокальной эпилепсии; эпилепсии с миоклонико-астатическими приступами; синдрома Леннокса-Гасто; синдрома Веста; идиопатических спазмов; ранней миоклонической энцефалопатии; прогрессирующей миоклонической эпилепсии; альтернирующей гемиплегии детского возраста; неклассифицированной эпилептической энцефалопатии; внезапной неожиданной смерти при эпилепсии (SUDEP); синдрома слабости синусового узла 1; аутизма или мигрени, наследственной гемиплегической, 3 и болезни Альцгеймера.

Вариант осуществления 152. Композиция по любому из вариантов осуществления 150-151, в которой белок SCN1A и мРНК с экзоном NMD кодируются геном SCN1A.

Вариант осуществления 153. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-152, в которой индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон сплайсирован из мРНК с экзоном NMD, кодирующей белок SCN1A.

Вариант осуществления 154. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-153, в которой белок SCN1A не содержит аминокислотную последовательность, кодируемую индуцирующим нонсенс-опосредованный распад РНК экзоном.

Вариант осуществления 155. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-154, в которой белок SCN1A представляет собой полноразмерный белок SCN1A.

Вариант осуществления 156. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-155, в которой терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), комплементарный целевой части мРНК с экзоном NMD.

Вариант осуществления 157. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-156, в которой терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер нацелен на часть мРНК с экзоном NMD, которая находится в индуцирующем нонсенс-опосредованный распад РНК экзоне.

Вариант осуществления 158. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-156, в которой терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер нацелен на часть мРНК с экзоном NMD, которая находится выше против хода транскрипции или ниже по ходу транскрипции от индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона.

Вариант осуществления 159. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-158, в которой целевой белок представляет собой SCN1A.

Вариант осуществления 160. Композиция по варианту осуществления 159, в которой мРНК с экзоном NMD содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 2, 7-10, 12 и 17-20.

Вариант осуществления 161. Композиция по варианту осуществления 159, в которой мРНК с экзоном NMD кодируется генетической последовательностью с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% относительно SEQ ID

NO: 1, 3-6, 11 и 13-16.

Вариант осуществления 162. Композиция по варианту осуществления 159, в которой целевая часть мРНК с экзоном NMD содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% по отношению к области, содержащей по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 2, 7-10, 12 и 17-20.

Вариант осуществления 163. Композиция по любому из вариантов осуществления 159-162, в которой целевая часть мРНК с экзоном NMD (i) находится в индуцирующем нонсенс-опосредованный распад РНК экзоне 20х, (ii) находится выше против хода транскрипции или ниже по ходу транскрипции от индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20х или (iii) содержит экзон-интронное соединение индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20х.

Вариант осуществления 164. Композиция по любому из вариантов осуществления 159-163, в которой терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95 %, 97% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 21-114.

Вариант осуществления 165. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-164, причем заболевание или состояние индуцируется мутацией с потерей функции в Nav1.1.

Вариант осуществления 166. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-165, причем заболевание или состояние связано с гаплонедостаточностью гена SCN1A, и причем у субъекта имеется первый аллель, кодирующий функциональный SCN1A, и второй аллель, из которого SCN1A не производится или производится в сниженном количестве, или второй аллель, кодирующий нефункциональный SCN1A или частично функциональный SCN1A.

Вариант осуществления 167. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-116, причем заболевание или состояние представляет собой энцефалопатию, необязательно индуцированную мутацией с потерей функции в Nav1.1.

Вариант осуществления 168. Композиция по варианту осуществления 167, причем энцефалопатия представляет собой эпилептическую энцефалопатию.

Вариант осуществления 169. Композиция по варианту осуществления 165 или 166, причем заболевание или состояние представляет собой синдром Драве (DS); тяжелую миоклоническую эпилепсию младенчества (SMEI) - пограничную форму (SMEB); фебрильные судороги (FS); эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс (GEFS+); эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13; криптогенную генерализованную эпилепсию; криптогенную фокальную эпилепсию; эпилепсию с миоклонико-астатическими приступами; синдром Леннокса-Гасто; синдром Веста; идиопатические судороги; раннюю миоклоническую энцефалопатию; прогрессирующую миоклоническую эпилепсию; альтернирующую гемиплегию детского возраста; неклассифицированную эпилептическую энцефалопатию; внезапную неожиданную смерть при эпилепсии (SUDEP); синдром слабости синусового узла 1; аутизм или злокачественные мигрирующие парциальные приступы младенчества.

Вариант осуществления 170. Композиция по варианту осуществления 168, причем GEFS+ представляет собой эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс, типа 2.

Вариант осуществления 171. Композиция по варианту осуществления 168, причем фебрильные судороги представляют собой фебрильные судороги, семейные, 3А.

Вариант осуществления 172. Композиция по варианту осуществления 168, причем SMEB представляет собой SMEB без генерализованной спайк-волны (SMEB-SW), SMEB без миоклонических судорог (SMEB-M), SMEB без более чем одного признака SMEI (SMEB-O) или стойкую эпилепсию детей с генерализованными тонико-клоническими судорогами (ICEGTC).

Вариант осуществления 173. Композиция по любому из вариантов осуществления 165-172, в которой терапевтическое средство способствует исключению экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, и увеличивает экспрессию SCN1A в клетке.

Вариант осуществления 174. Композиция по любому из вариантов осуществления 165-173, в которой терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% комплементарна любой из SEQ ID NO: 22-24, 26, 27, 29-35, 37-62 или 64-67.

Вариант осуществления 175. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-164, причем заболевание или состояние индуцируется мутацией с приобретением функции в Nav1.1.

Вариант осуществления 176. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-164 или 175, причем у субъекта имеется аллель, из которого производится SCN1A в повышенном количестве, или аллель, кодирующий мутантный SCN1A, который индуцирует повышенную активность Nav1.1 в клетке.

Вариант осуществления 177. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-164, 175 или 176, причем заболевание или состояние представляет собой мигрень.

Вариант осуществления 178. Композиция по варианту осуществления 177, причем мигрень представляет собой мигрень, наследственную гемиплегическую, 3.

Вариант осуществления 179. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-164, 175 или 176, причем заболевание или состояние представляет собой генетическую эпилепсию Nav1.1.

Вариант осуществления 180. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-164 или от 175 до 179, причем терапевтическое средство ингибирует исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1A, и снижает экспрессию SCN1A в клетке.

Вариант осуществления 181. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-164 или 175-180, причем терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% комплементарна любой из SEQ ID NO: 21, 25, 28, 36 или 63.

Вариант осуществления 182. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-181, причем процессированная мРНК, кодирующая целевой белок или функциональную РНК, представляет собой полноразмерную зрелую мРНК или зрелую мРНК дикого типа.

Вариант осуществления 183. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-182, причем производимый целевой белок представляет собой полноразмерный белок или белок дикого типа.

Вариант осуществления 184. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-183, в которой терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер содержит модификацию остова, включающую фосфоротиоатную связь или фосфородиамидатную связь.

Вариант осуществления 185. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-184, в которой терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем указанный антисмысловой олигомер представляет собой антисмысловой олигонуклеотид.

Вариант осуществления 186. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-185, в которой терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер содержит фосфородиамидат морфолино, блокированную нуклеиновую кислоту, пептидную нуклеиновую кислоту, 2'-O-метил, 2'-фтор или 2'-O-метоксиэтильный фрагмент.

Вариант осуществления 187. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-186, в которой терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер содержит по меньшей мере один модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 188. Композиция по варианту осуществления 187, в которой каждый фрагмент сахара представляет собой модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 189. Композиция по любому из вариантов осуществления 149-188, в которой терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO), причем антисмысловой олигомер состоит из от 8 до 50 нуклеотидных оснований, от 8 до 40 нуклеотидных оснований, от 8 до 35 нуклеотидных оснований, от 8 до 30 нуклеотидных оснований, от 8 до 25 нуклеотидных оснований, от 8 до 20 нуклеотидных оснований, от 8 до 15 нуклеотидных оснований, от 9 до 50 нуклеотидных оснований, от 9 до 40 нуклеотидных оснований, от 9 до 35 нуклеотидных оснований, от 9 до 30 нуклеотидных оснований, от 9 до 20 нуклеотидных оснований, от 9 до 15 нуклеотидных оснований, от 10 до 50 нуклеотидных оснований, от 10 до 40 нуклеотидных оснований, от 10 до 35 нуклеотидных оснований, от 10 до 30 нуклеотидных оснований, от 10 до 25 нуклеотидных оснований, от 10 до 20 нуклеотидных оснований, от 10 до 15 нуклеотидных оснований, от 11 до 40 нуклеотидных оснований, от 11 до 35 нуклеотидных оснований, от 11 до 30 нуклеотидных оснований, от 11 до 25 нуклеотидных оснований, от 11 до 20 нуклеотидных оснований, от 11 до 15 нуклеотидных оснований, от 12 до 50 нуклеотидных оснований, от 12 до 40 нуклеотидных оснований, от 12 до 35 нуклеотидных оснований, от 12 до 30 нуклеотидных оснований, от 12 до 20 нуклеотидных оснований или от 12 до 15 нуклеотидных оснований.

Вариант осуществления 190. Композиция, содержащая антисмысловой олигомер, причем антисмысловой олигомер содержит последовательность по меньшей мере из 8 смежных нуклеотидов, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% комплементарна интрону 20 в SCN1A.

Вариант осуществления 191. Композиция, содержащая антисмысловой олигомер, причем антисмысловой олигомер содержит последовательность по меньшей мере из 8 смежных нуклеотидов, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 100% комплементарна любой из SEQ ID NO: 7-10.

Вариант осуществления 192. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтическое средство любой из композиций вариантов осуществления с 149 по 191 и вспомогательное вещество.

Вариант осуществления 193. Способ лечения нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 192, причем введение представляет собой интратекальную инъекцию, интрацереброventрикулярную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, внутримышечную инъекцию, подкожную инъекцию, интравитреальную инъекцию или внутривенную инъекцию.

Вариант осуществления 194. Фармацевтическая композиция, содержащая: антисмысловой олигомер, который гибридизуется с целевой последовательностью транскрипта мРНК SCN1A, причем транскрипт мРНК SCN1A содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон, причем антисмысловой олигомер индуцирует исключение индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона из транскрипта мРНК SCN1A; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Вариант осуществления 195. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194, причем транскрипт мРНК SCN1A представляет собой транскрипт мРНК с экзоном NMD SCN1A.

Вариант осуществления 196. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194 или 195, причем целевая часть транскрипта мРНК с экзоном NMD SCN1A (i) находится в пределах индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20x, (ii) находится выше против хода транскрипции или ниже по ходу транскрипции от индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20x или (iii) содержит экзон-интронное соединение индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона 20x.

Вариант осуществления 197. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194 или 196, причем транскрипт мРНК SCN1A с экзоном NMD кодируется генетической последовательностью с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 1, 3-6, 11 и 13-16.

Вариант осуществления 198. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194 или 196, причем транскрипт мРНК SCN1A с экзоном NMD содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 2, 7-10, 12 и 17-20.

Вариант осуществления 199. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194, причем антисмысловой олигомер содержит модификацию остова, содержащую фосфоротиоатную связь или фосфородиамидатную связь.

Вариант осуществления 200. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194, причем антисмысловой олигомер представляет собой антисмысловой олигонуклеотид.

Вариант осуществления 201. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194, причем антисмысловой олигомер содержит фосфородиамидат морфолино, блокированную нуклеиновую кислоту, пептидную нуклеиновую кислоту, 2'-O-метил, 2'-фтор или 2'-O-метоксиэтильный фрагмент.

Вариант осуществления 202. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194, причем антисмысловой олигомер содержит по меньшей мере один модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 203. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194, в которой антисмысловой олигомер содержит от 8 до 50 нуклеотидных оснований, от 8 до 40 нуклеотидных оснований, от 8 до 35 нуклеотидных оснований, от 8 до 30 нуклеотидных оснований, от 8 до 25 нуклеотидных оснований, 8 до 15 нуклеотидных оснований, от 9 до 50 нуклеотидных оснований, от 9 до 40 нуклеотидных оснований, от 9 до 35 нуклеотидных оснований, от 9 до 30 нуклеотидных оснований, от 9 до 25 нуклеотидных оснований, от 9 до 20 нуклеотидных оснований, от 10 до 50 нуклеотидных оснований, от 10 до 40 нуклеотидных оснований, 10 до 35 нуклеотидных оснований, от 10 до 30 нуклеотидных оснований, от 10 до 25 нуклеотидных оснований, от 10 до 20 нуклеотидных оснований, от 10 до 15 нуклеотидных оснований, от 11 до 50 нуклеотидных оснований, от 11 до 40 нуклеотидных оснований, от 11 до 35 нуклеотидных оснований, от 11 до 30 нуклеотидных оснований, от 11 до 25 нуклеотидных оснований, 11 до 20 нуклеотидных оснований, от 11 до 15 нуклеотидных оснований, от 12 до 50 нуклеотидных оснований, от 12 до 40 нуклеотидных оснований, от 12 до 35 нуклеотидных оснований, от 12 до 30 нуклеотидных оснований, от 12 до 25 нуклеотидных оснований или от 12 до 15 нуклеотидных оснований.

Вариант осуществления 204. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194 или 195, в которой антисмысловой олигомер по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% комплементарен целевой части транскрипта мРНК SCN1A с экзоном NMD.

Вариант осуществления 205. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194 или 195, в которой целевая часть транскрипта мРНК SCN1A с экзоном NMD находится в последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 7-10, 12 и 17-20.

Вариант осуществления 206. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194, в которой антисмысловой олигомер содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 21-114.

Вариант осуществления 207. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 194, в которой антисмысловой олигомер содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21-114.

Вариант осуществления 208. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 194-207, причем фармацевтическая композиция составлена для интратекальной инъекции, интрацеребровентрикулярной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, интравитреальной инъекции или внутривенной инъекции.

Вариант осуществления 209. Способ индуцирования процессинга дефектного транскрипта мРНК SCN1A для облегчения удаления индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона для получения полностью процессированного транскрипта мРНК SCN1A, который кодирует функциональную форму белка SCN1A, способ, предусматривающий:

(a) контактирование антисмыслового олигомера с целевой клеткой субъекта; (b) гибридизацию антисмыслового олигомера с дефектным транскриптом мРНК SCN1A, причем дефектный транскрипт мРНК SCN1A способен кодировать функциональную форму белка SCN1A и содержит по меньшей мере

один индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон;

(c) удаление по меньшей мере одного индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона из дефектного транскрипта мРНК SCN1A для получения полностью процессированного транскрипта мРНК SCN1A, который кодирует функциональную форму белка SCN1 A; и

(d) трансляцию функциональной формы белка SCN1A из полностью процессированного транскрипта мРНК SCN1A.

Вариант осуществления 210. Способ лечения субъекта, характеризующегося наличием состояния, вызванного недостаточным количеством или активностью белка SCN1A, предусматривающий введение субъекту антисмыслового олигомера, содержащего нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по отношению к любой из SEQ ID NO: 24-114.

Вариант осуществления 211. Способ скрининга средства, которое увеличивает экспрессию гена целевого белка или функциональной РНК клеткой, причем клетка содержит мРНК, которая содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (мРНК с экзоном NMD), и причем мРНК с экзоном NMD кодирует целевой белок или функциональную РНК, причем способ предусматривает:

(a) контактирование исследуемого средства, которое нацеливает мРНК с экзоном NMD, с первой клеткой;

(b) контактирование контрольного средства со второй клеткой;

(c) определение первого содержания в первой клетке, причем первое содержание представляет собой содержание: (i) транскрипта РНК, кодируемого мРНК с экзоном NMD, который не содержит индуцирующего распад РНК экзона, или (ii) кодируемого белка мРНК с экзоном NMD, который не содержит аминокислотную последовательность, кодируемую индуцирующим распад РНК экзоном;

(d) определение второго содержания во второй клетке, причем второе содержание представляет собой содержание (i) транскрипта РНК, кодируемого мРНК с экзоном NMD, который не содержит индуцирующий распад РНК экзон, или (ii) кодируемого белка мРНК с экзоном NMD, который не содержит аминокислотную последовательность, кодируемую индуцирующим распад РНК экзоном;

причем первое содержание выше, чем второе содержание; и

(e) выбор исследуемого средства.

Вариант осуществления 212. Способ скрининга средства, которое увеличивает экспрессию гена целевого белка или функциональной РНК клеткой, причем клетка содержит мРНК, которая содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (мРНК с экзоном NMD), и причем мРНК с экзоном NMD кодирует целевой белок или функциональную РНК, причем способ предусматривает

(a) контактирование исследуемого средства, которое нацеливает мРНК с экзоном NMD, с первой клеткой;

(b) контактирование контрольного средства со второй клеткой;

(c) определение первого содержания в первой клетке, причем первое содержание представляет собой содержание (i) транскрипта РНК, кодируемого мРНК с экзоном NMD, который не содержит индуцирующий распад РНК экзон, или (ii) кодируемого белка мРНК с экзоном NMD, который не содержит аминокислотную последовательность, кодируемую индуцирующим распад РНК экзоном;

(d) определение второго содержания во второй клетке, причем второе содержание представляет собой содержание: (i) транскрипта РНК, кодируемого мРНК с экзоном NMD, который не содержит индуцирующий распад РНК экзон, или (ii) кодируемого белка мРНК с экзоном NMD, который не содержит аминокислотную последовательность, кодируемую индуцирующим распад РНК экзоном;

причем первое содержание выше, чем второе содержание; и

(e) выбор исследуемого средства.

Вариант осуществления 213. Способ по варианту осуществления 211 или 212, причем способ предусматривает контактирование ингибитора синтеза белка с первой клеткой и второй клеткой; причем первое содержание представляет собой содержание транскрипта РНК, кодируемого мРНК с экзоном NMD, который содержит индуцирующий распад РНК экзон; и причем второе содержание представляет собой содержание транскрипта РНК, кодируемого мРНК с экзоном NMD, который содержит индуцирующий распад РНК экзон.

Вариант осуществления 214. Способ лечения синдрома Драве (DS), эпилепсии, генерализованной, с фебрильными судорогами плюс, типа 2; фебрильных судорог, семейных, 3A; мигрени, наследственной гемиплегической, 3; аутизма; эпилептической энцефалопатии, ранней детской, 13; синдрома слабости синусового узла 1; болезни Альцгеймера или SUDEP (внезапной неожиданной смерти при эпилепсии) у нуждающегося в этом субъекта путем увеличения экспрессии целевого белка или функциональной РНК клеткой субъекта, причем клетка содержит мРНК, которая содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (мРНК с экзоном NMD), и причем мРНК с экзоном NMD кодирует целевой белок или функциональную РНК, причем способ предусматривает контактирование клетки субъекта с терапевтическим средством, которое модулирует сплайсинг мРНК с экзоном NMD, кодирующей целевой белок или функциональную РНК, посредством которого индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон исключается из мРНК с экзоном NMD, кодирующей целевой белок

или функциональную РНК, тем самым увеличивая содержание процессированной мРНК, кодирующей целевой белок или функциональную РНК, и увеличивая экспрессию целевого белка или функциональной РНК в клетке субъекта.

Вариант осуществления 215. Способ увеличения экспрессии белка SCN1A клеткой, содержащей мРНК, которая содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (мРНК с экзоном NMD) и кодирует белок SCN1A, причем способ предусматривает контактирование клетки со средством которое модулирует сплайсинг мРНК с экзоном NMD, кодирующей белок SCN1A, посредством чего индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон исключается из мРНК с экзоном NMD, кодирующей белок SCN1A, тем самым увеличивая уровень процессированной мРНК, кодирующей белок SCN1 A, и увеличивая экспрессию белка SCN1A в клетке. Вариант осуществления 216. Способ по варианту осуществления 214 или 215, при котором средство:

(a) связывается с целевой частью мРНК с экзоном NMD, кодирующей целевой белок или функциональную РНК;

(b) связывается с одним или несколькими компонентами сплайсосомы или

(c) является комбинацией (a) и (b).

Хотя предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были показаны и описаны в настоящем документе, специалистам в настоящей области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Специалистам в настоящей области техники будет понятно, что будут происходить многочисленные вариации, изменения и замены без отступления от настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы описанным в настоящем документе вариантам осуществления могут быть использованы при практическом применении настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения и что таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема формулы изобретения и их эквивалентов.

Примеры

Настоящее изобретение будет более конкретно проиллюстрировано следующими примерами. Однако следует понимать, что настоящее изобретение никоим образом не ограничивается этими примерами.

Пример 1. Идентификация событий включения индуцирующих NMD экзонов в транскриптах SCN1A с помощью RNAseq с использованием секвенирования следующего поколения.

Секвенирование способом дробовика всего транскриптома проводили с использованием секвенирования следующего поколения, чтобы выявить снимок транскриптов, производимых геном SCN1A, для идентификации событий включения NIE.

Для этой цели выделяли полиА+ РНК из ядерной и цитоплазматической фракций HCN (нейронов коры человека) и создавали библиотеки кДНК с использованием набора для приготовления библиотеки Illumina's TruSeq Stranded mRNA library Prep Kit. Библиотеки секвенировали парным концом, что приводило к 100-нуклеотидным прочтениям, которые сопоставляли с геномом человека (февраль 2009 г., сборка GRCh37/hg19). Результаты секвенирования для SCN1A показаны на фиг. 2. Вкратце, на фиг. 2 показаны сопоставленные прочтения, визуализированные с использованием браузера генома UCSC (под управлением UCSC Genome Informatics Group (Центр биомолекулярной науки и техники, университет Калифорнии, Санта-Крус, 1156 High Street, Santa Cruz, CA 95064) и описаны, например, Rosenbloom, et al., 2015, "The UCSC Genome Browser database: 2015 update," Nucleic Acids Research 43, Database Issue, doi: 10.1093/nar/gku1177), и охват и количество операций прочтения могут быть выведены из пиковых сигналов. Высота пиков указывает на уровень экспрессии, определяемый плотностью прочтений в конкретной области. На верхней панели показано графическое представление гена SCN1A в масштабе. Уровень консервативности 100 видов позвоночных показан в виде пиков. Самые высокие пики соответствуют экзонам (черные прямоугольники), в то время как для большинства интронов пиков не наблюдается (линии со стрелками). Пики консервативности идентифицировали в интроне 20 (NM_006920), показанном на средней панели. Проверка консервативных последовательностей позволила идентифицировать экзоноподобную последовательность размером 64 п.н. (нижняя панель, последовательность выделена серым цветом), фланкированную 3'- и 5'-сайтами сплайсинга (подчеркнутая последовательность). Включение этого экзона приводит к сдвигу рамки и введению кодона преждевременной терминации в экзоне 21, что делает транскрипт мишенью NMD.

Иллюстративные последовательности гена SCN1A, пре-мРНК, экзона и интрона суммированы в табл. 2. Последовательность для каждого экзона или интрона суммирована в табл. 3.

Таблица 2

Перечень последовательностей целевых генов SCN1A и пре-мРНК

Вид	SEQ ID NO.	Тип последовательности
Человек	SEQ ID NO. 1	Ген SCN1A (NC_000002.12)
	SEQ ID NO. 2	Пре-мРНК SCN1A (кодирующая, например, мРНК SCN1A NM_006920.5)
	SEQ ID NO. 3	Ген экзона 20
	SEQ ID NO. 4	Ген интрона 20
	SEQ ID NO. 5	Ген экзона 21
	SEQ ID NO. 6	Ген экзона 20x
	SEQ ID NO. 7	Пре-мРНК экзона 20
	SEQ ID NO. 8	Пре-мРНК интрона 20
	SEQ ID NO. 9	Пре-мРНК экзона 21
	SEQ ID NO. 10	Пре-мРНК экзона 20x
Мышь	SEQ ID NO. 11	Ген SCN1A (NC_000068.7)
	SEQ ID NO. 12	Пре-мРНК SCN1A (кодирующая, например, мРНК SCN1A NM_001313997.1)
	SEQ ID NO. 13	Ген экзона 21
	SEQ ID NO. 14	Ген интрона 21
	SEQ ID NO. 15	Ген экзона 22
	SEQ ID NO. 16	Ген экзона 21x
	SEQ ID NO. 17	Пре-мРНК экзона 21
	SEQ ID NO. 18	Пре-мРНК интрона 21
	SEQ ID NO. 19	Пре-мРНК экзона 22
	SEQ ID NO. 20	Пре-мРНК экзона 21x

Таблица 3

Последовательности целевого экзона или интрона в транскриптах пре-мРНК SCN1A

SEQ ID NO.	Тип последовательности	Последовательность
SEQ ID NO. 7	Пре-мРНК экзона 20	GUUUCAUUGGUCAGUUUAACAGCAAAUGCCUUGGGUUACUCAGAACUUGGAGCCAUCAAAUCUCUCAGGACACUAAGAGCUCUGAGACCUCUAAGAGCCUUAUCUCGAUUUGAAGGGAUGAGG
SEQ ID NO. 8	Пре-мРНК интрона 20	guaagaaaaaugaaagaaccugaaguauuguauauagccaaaauuaaacuaaauuaaauuuagaaaaaggaaaaucuaugcaugcaaaaggaauggcaaauucuugcaaaauugcuacuuuauuguuuuaucuguugcauauuuacuucuaggugauaugcaagagaaauagccucucuugaaaugauauaauaucauuuaucugcugugcuuauuuaaaugacuuuauuuccuaauccaucuugggaguuuccuuacaaaucuauauacaaaaaaaagcugaugcauuauuaaaguacuaugugauaaugauauaaugguaaucuaaaguaaaauucuauaucagguacuuauucuuugugaugauauacuguacuuaacgaguuuuccugaaaauaaugugaaucacacaugugccuaaguaugaguguuaagaaaaaaaugaaaggaguuguuaaaacuuuugucuguauaaugccaaaguuugcauuauuugaauauauucaagauuagaugguagauauuaaguguugacugaauuuauaaaacuaguaaauacuaacuuaaagauuacauacaaauccacaucauuuuuauaacaauaaaguaaaacacuuauaaugaacagaaaauauaauuuugacucauuacuauagguaauuuauacauuaaccuuaacuugcaucuuauuggucagagucacacaaaauguuauuuuauccuuuucaaagaugcaauaaucauuuuccaucaugcauaacagauuagaaauuuugccauuauugacuuauuuuccaugccuuuuuuacggcaugaagcauuaguuuauagauauauaauauaaaaauuaguucugcu

		uuuuuuuaaaaaaaaauauuaucaaaacaaaacacugaauugugugauuccaauagaa aaacacugcucuuucaccuccuaagguguaguuacuuuuauggaaacuaagcuguau uguagacuuccauuugcacuuuguagauuguuuauagccuuauguucucuucucaa gucuuauuauaaaugucacuuuguaagaacguaggacuugucuucgauuucccuaac auauaugaaaacuuuguccucauuaucgacaacucagaacaauauaauacaaguaguc cucuuuuauuucucacagagagccucaaauuuucaccaaaauguuaacagaaauuauc ucugggguguauaagaauuaagucuguuuuccaauuaaaugucacuuuguuuuguu ucagacuggcaguuucaguucuggagaaaaaaaaugucauuuguguacauucuacuu gaaaacauguugccugaaucaaaauaauauauuuuauauggcuuugugaaaucugaac aaugcuaaacauuugaaaauauuauaaaccuuuuacauuugaccauuugaaaguuua uuaaauucauuggucaagugcucagauauuuccauacauuacacuucauuucuauaa aaaagcugaucuuaucgguauacuuuuaauuuucucagaaauaaccauaucuauaau uauuaaucaauaaugccuuuuauauuaaaagagguuaguuuuugaaacuuggaguuu uagacauaaaaauccuuauaaaugcugauagugauauaacuaauaguuuaaaugguca gauuuaugaauaugguucuauucccucauaaugacaacauacacacagcacuaaaauga cuaaucucuucaauacguguuuggcauuguagagucaaaauaacguuauaauugauu cuauuuuuuauacuucuaguguuuggauauuuuauuuuguaaaaauauaaucauga augauggugagguuggauauaagaaugaugauuaugauuggggaagugagauuugaa caugcucagaaacucucauuuaauucuuugcccuagcagcauaaaaucacaauagcug cgucaaagcguaacucaggcacucauuuuauuuuuguuguucuguuauuuuuucaaa gcaugugcuuuuaugcaacauuacugaauaaagcauguuguacagugcuugauaaga aguuagaaaguaacaaauaaauuaucaucacguugcacuuuguguuuugcauguuuu augcacauuucuggcugacagcuuuuaaacauuuauuguauuucaaauuuccagucc aaauuuuucaacuuguaaaauuaaacugagugaauugaugucgugaauaucuagggu aaaauaaaauuuguguuuaaauuuguauuuuuaauuuccuaaccuaggaaaucuuaa auaccuucuuuuucaaaagaacucaagucuuaauggauagggaaacagacggagagca ucaugaacaaaaaguaacaccaaauguucugucauaucagauuucuaacuaauaacaa acuauauauuucuauuuuguauaggauaaucuugcuccaacuuggaugggguggag cgcugguuccucccccugagcccuuuauuauggguacuguauuaccccuuuugcuacc uuuaaauccuugcacugugacuuauguguaguggggugagggagggauugggaaggg uacuauuauuugcaccacaguagggaaaauacauuauuuuacauccuaauccccucuuuu caauugucuuaaauuucauuugaaaaaaaaaaaaaccuuuaugaauuuacccucugug gauuuuaaccccaaugguugauaucuuuauuaaguuucauugaauaugauuuaguua uguguauauggaguuauccaucuuuggggagauuacuggauuggugagggcgggggg acccuggguguagaaugauuaugugaaaaaacaauuuaacuuguuaagcucaugauac uguuugaggcauacagccccugcuguuuaguacauuggucuggguccugaaaauuac caguuagauaccaucaguugauuauugauauguaugagcagauacuagggugcaaua uuucaggauucauaagacugguauugauugugaccacucucauuuuuuauugugua aguucauauggggguuauuuucaaaauguuaacaaggcaaaaauauauuuaagaaauag uugaauaagcacaugugaauuguguuguaaacaaaaaguuagaauaaaaaaaauccacu uauuugaauuaugcagaauagaauacauaccuagaaauaaaacaaaaacgucuuauca ugaguauuaagauaaaauuuaaggcauaaacucacuucuuagaauaaguaacucccaa cuaacuuucuaggauuuuaaaacauaacacagugaaaacauacauaaacauaacucua cauuuuauuuauucuuaaaguuuaaguguauuauacaagaagaagaguuuauauucg agagacagaaaaagucagaauuuuuguuuggaucaccaauauaucauagcuuacaaaa aaacugucuuaauuaaaacccacaacauaauuuuuuuagauuuuuaagaaagauucua uuauucuucuuuauacuuaaaaauggaugauucctacuuugcccacuuuuauuuuua uucacauagauuuucuuuauuucuauuagagaagcacuagaauucaugaauaguguu gauuugaaguucaaaguaauuaauucagauaaaaagacauuucugcauguaugaaaa uuucuaaugugaauuugcauauuuaauuaucaauccuucauuuaguguagacuuauu uuuaaaaaugcagguaaugaaccagaaauagaauuggguugugcuagaguagagaaac uuuauuugaugauuguuuugaaaaaaagcuucugagaagaaacaaccucuaguaca

		guauuaauucauuaagauagcuccuuucucagacauuuccuuucauguagccugaaa guucaauuugaaauuuguucuuuccaauuuauucagacuaauucugccuacuuucuu ccccccauaagaaccaauuacugcagcuuuauugagacugaaaaagguuaauacaccu ccuucuuugcugaaccaaggaauggcuuggaacucuugggaaaagacaaucuuuucu augaucuuucauugucuaauuuaauacaucauaaauaugacuauagcuuuguauaau aaacucccaauacugugccagauguuuucuaagauaaaguuauuuuauguucacaa aaaaaauaaaacuuuucucugggccaaauguaugccaacuuugcaaaucauauccuga agugcacugcugcagaguacaugcuugcgucauaaauuccauagaguucgcuuuaac ucuaaaucaaucccagguuucaaaguaaaccucucaaacauauuaccuaagcacaaacu ucucccugugcucaguuccuuaauuauucucaucccauauucagaaauaacauuuaaa aauuaugcuuugaucaauaaaauacuaaucuaaacuuugcuucauuaacccauucauu uuugucaaccauuauuuuauuccuauauucaaagcucucugguauguucuuauauuc aagacacucaaggcccuggaagauucacgaacauauguuugcaucuuaaauuuuuag aaaaucuuacaaucugucaggauuacacugaacucuaguacagaguaauauggguacc agauaaguggggagcaacucuuccacguagacuggaaacagcacuaaaugcuauuuaua ggcuacuuucugaacuuaacuuguuuuaaccucauuuuucucauaugccaaaugaga acgcaauacugaauuaucuguacaguucuguucaguacuagaauucugauucuugaa uucaaaggggaaaacauucccucuuuauuuuggaggcuaaacuggggggacaaaguuag gcuccaugaaagaagugcuauuugaacuaaagccuuuaagaggggagaguauuucag aagaggagcuauuagacaaggaauuucaauguaaaauggcaucucaaucaccuggcaau uauauuagcacacgguuauuauauuaauugaaguggcaugaaguauagaugaccagg gaaguuaaaacuggaaauauagauuguggagugaugugaauaccaagguaagaaaaa uauuuguuaguuaccagagagccaauaaauaacuuucaagugggacuuggggaagau uaauucaucuuacauagauuaaaugaaggagaaggguuaggagacagaugacagugca aguaugaaauaacagagggcaguucuaggugggugacugugagaauggaaaagaggug gcaaagcugagaaacguuucaaagaaaaaaugugagacagguaaugugaaaagaaaau cgagaaauagguauagauaaucaguguucugcucauacucuaaauuggguguugaag gcaaaauacguauuuuaauuaguacucuguguauacacacuagaaacagcauuguaa ucuggauaguggacaaaauauucagaaaagaagggaaauaguaacuugauuucaauu uccaaaucucuaaucugaaagaaaucuaauucuauucauccauuuaaaauaaauuaua uaacgagaauuuaugaaguccauuguauuaaugcagacagucagaugagauaaggca aagugucacgugucagcuugguaguugcaucggccacaucauuugguucugccugga uaacucaaccaaauuaauuuuucauacucaucccccuccaccuuugucauuacugguau ucuuauuuucuuuggcccacuuaucacacuguuuuauguucccagaaggccuagag uucuuuacaggcuuuaaacagggaucagaaguauaagaaauuggcucauguauuuuu uuuucagacaggcaguuaaaaaaaauuguucuaaaaauacacuggcaucaaauggcaa auagaagauguuuugacgacuacuuccauuggaucagacugacaagaauaauacaagc acauagguggaauuaaacuuagcuauuaauguccaaguuugaggcagcugccccuua uaagcauuuuagggucuguuuuuagcuucccucuuagccacuccugugcagcuccag ugggagguauggaggaaaaagcaaggaagccaucccuauguuguuuccaaacaugaa cacucaagauuuuuaacuagugguccagaaguaaagaggggaaaacauccuucuau agaaaaaaaaaaaaguagauaauaauuugaacacagaacuucauguugaucacaucagau uugagaacuauguauggcaucccucuuuuucuuauuuuccuaagaaaugauuucuau uauguuucauuugaaauaaguuuuuugaauuaaacucaguaaaugaaacaacugaca ugacuggagcuugaaauaaacgaugugaugaucuaaugaaauacauaaugcaaauug ucuugcuucuuaugcaaaaauuauuagucauagcaaugcaugaauaauuaaagacaa uuauauuagguauuuaauaauauuuuuuauauuuaucaucugaauuuuuaaguuau uuuaaaaauauauuggucaaaucaacucagguccaaauguuuuaguuuuguucuuua auauauugccuuuuuaaaaugaguuaaacuucuguauaggcuuuuuaacuuuucuu uauucugauaacacaauucugacuucaucuggcagcaaguuccucugauuuuccuuu uccuuuaaccuuuuaaugcuucucccucccuuuuuuuuaaaaacauuuuuguuucau uucuuggguuauauugccuauaguuguuuuccuaaguguauugcuuaagaaaaaaaaa

		ugaauuuuaagauuuuuuugaaccuugcuuuuacauauccuagaauaaaauagcauug auagaaaaaaagaauggaaagaccagagauuacuaggggaauuuuuuuucuuuauua acagauaagaauucugacuuuucuuuuuuuccauuuguguauuag
SEQ ID NO. 9	Пре-мРНК экзона 21	gauaaucuugcuccaacuuggaugggguggagcgcugguuccuccccugagcccuuu auuaugg
SEQ ID NO. 10	Пре-мРНК экзона 20х	GUGGUUGUGAAUGCCCUUUUAGGAGCAAUUCCAUCCAU CAUGAAUGUGCUUCUGGUUUGUCUUAUAUUCUGGCUAA UUUUCAGCAUCAUGGGCGUAAAUUUGUUUGCUGGCAAA UUCUACCACUGUAUUAACACCACAACUGGUGACAGGUU UGACAUCGAAGACGUGAAUAAUCAUACUGAUUGCCUAA AACUAAUAGAAAGAAAUGAGACUGCUCGAUGGAAAAAU GUGAAAGUAAACUUUGAUAAUGUAGGAUUUGGGUAUC UCUCUUUGCUUCAAGUU
SEQ ID NO. 17	Пре-мРНК экзона 21	GUUUCAUUGGUCAGUUUAACAGCAAAUGCCUUGGGUUA CUCUGAACUCGGGGCCAUCAAAUCCCUAAGGACACUAA GAGCUCUGAGACCCCUAAGAGCCUUAUCACGAUUUGAA GGGAUGAGG
SEQ ID NO. 18	Пре-мРНК интрона 21	guaagaaaaaggaaaacucugcagcguuguauauugucaaagcuaggcugaguucaa cuuaacuaacgaaaaacacgugcaugcaaaaggaauggcaacccuuugcaaacuugcu acuuuacccuuuucucuguugcauauuuacuucuugugauaugcaagagaaaaucg gccucuuugaaaaugauuuaauaucauuuaucugcuuugcuaauuaaaaugaccuua guucauaaucgaucuugggaguuuccuuauaauuccuaauacaaaggggagggcca gauacucucuuaaagaacuaaguugagucauguaauaauuaccuagagauaauuuug uuucauaucguucuccucuaugacagcccaucaguacuuaagggauccuauggaaag uaaugugaaucacaaaugugguaugaauacaaaggaaaaaaugaagaauuguuaaaug uuuugucuuuacaaugccaaaauucucauuauuugaauauauccaagggcagauauu aaccauugacuggaguauaauaauacugccucaacuguaacuaaauuaaugacauuga auaaguaagacacuaauuuaauuacuauaaaauacauacacaucuuaugacaauacagc ugauaaggaaaaagaacauguauuuuuauucauugccauacauggcucgucaaccuu aacuuaaaccucgguucucaguuacacagaguuuuauguugcucuuuugagcaaagc auuauucccucuccauaauucaacacguaucagauuuuugcauuuauuggcucauu guuaugaugauuauuucaaagcauuauacaaucauuuauagaagaugugccguguga aaauuauuuuuuuauuaagauccaaaauuuacgcucuuuaaaccaaucagaugaaau guauaaggcaaagagugcucauuguccugacacuuacaaaccaaggcuccaacaaaca ggcucccucucugcaccacauagagggcuuucagccuguguccccccauaaaaaccuau uauaaaauuuuauuauacuauacuguaagaaaccugucccaauuuuuaauuucucuagc acauaugaaaacuucucuucaguagauccaaguaagcacaaaggagcuuugauucuca cacaagaaaucacauuuguauuaaaaauguaucauaaauuuucucccaauuaugcaaa acuuaaaugcuuuuccaauuaaaagagcacuuucguuucagaauagcaauuucaguu gucaaggaaaacauuguuuuuauacauuuuauauaaaaauacaugagcuaaauuuaa auucacauuuuuucaacuuuuuaugguuuuuuuauguuucuuuuucuuucgcauuuu uuaacaauccagccauuaccucuccucccuguccccucccuauaguuucucaucucau uccuccucccccuugccucugagaggaugcucccucccucacuaggccucccucuucc ccagggcuucaaguuccucaaggauuauacacaucuucucccacugagaccaggccag gcaguccucugcuucugcccagccuguguauguuccugcuugguagcucagucucug gaagcucccuggggucuggguuaguugggacugcugguccuuccuauggaguuaccc ucccccuucaacuucuucaauccuucccccuaauucaaccacagguauccagacuucagu ccaaugguugaguguaaauauuggcaucugucucugucagcuguuguuaggggcuc agaggacagccaugcuaggcuccugccuacaagcagcacaccauaacaucaguaauag ugucaggccuuuaaugaauaaugcuacguauauaagguuguuagauuauacuucaac uuugaucuuuuagaauauuauuaaauccagucguuuauuuuuuauauguaauauug acuuuccauaacaaaugagucuauuuuccuuuuguguagaaauaacuuuaucaauua

		uuguuaauaaugcuuuugucaauuauuguugauaugcuucucuuuuuuaaaacugg agucaucaaaacaaaaauucuggguagauauuacgaagcugacuccuuggucagcuu ggcacauagugagaccacaaauaucucaaggucacggcaauucccucaccaccaguuug gcauugugaagucaaaaccaaccuucuguugauucugguuuuuguauuucuaguau gagacauuuucuacuuuguaagaguauauaacuguggauggcggcgaggguugggca ugaugaugauuguaagcgggaagugagcuagaguaucuucagaaacucucacuuuau ccuccuuggcagcauagaaccgcaaucgcuguguccgagugucaaccaggcagucau uuuguuuuggguuuuuugucacucuuucaaagcaugugcuucuacgcaacacuacca aacacagcaugcugcauagugcuugagaaggaguuagaaaguaacaaacgaguuauca ucacguugcccuuuguguuuugcaugucuuaugcacacuuuuggcugacagcuuuu gaacauuuauuguauuucaaauuuccaguccaaauuuuuuuuuucaacuugugaaauu gaacggaaugaaccgaugucgugaauaccuagggucaaauaaaacuuguauuuaaau ucguaguuuuaauuucccaagcugggaaaaucguaaaaaccuuuuccaaagaacucaa gucuuaguugcuagggaaacaggcagugagcaucauauacaaaaaguaacaccaaaug uucugucauaucagcuuucuaacuaauaauaaacuauauauuucuauuuuauauagg auaaucuugcuccaacuuggaugggguggagcgguggguuccucccccucagcccuuua uuauggguacuguauuacccuuuugcuaccuuuaauccuugcacugugacuuaugu guagugggauugagggagggaguggggaaggguacaauugcaccacaguagggacaau acaggauuuauuuccaaauccacuacuuuuaaugagcuuaaacuucuuuuggggaaaa aaaaaguuaucucugacuuaccaucuguggauuauaaaccccagaaguacauaucuuua uuacguuucacugaauaugauuuagcuauuuuauacuucauuguccauuuaugggggaa auuacucaauuggugagggugggggacccuggguguaggaugcugaugaaaacguuu ucauuugucaagcucaugguagugacagagcauauaguccuuauuuuuucaacacac ugcucuggucccucaaugggccagucacauuccaucaguugaucguugauguugcg agcaguggcuaaagguacaacaggccaggguaucucaggguugccaauggguuaugauc auucucaucuuuauugcauaaaaaugugguuauuugcagaaaguagcaaggcaagauc ccugugaaacaagggaauacaaaaaaaaaaaaagaugugcuuuaaguuauaaaaccaa aacaugugaaaagucaacuucauugaaguauaaagaauaggauaugcaugaaaaacaa aaaaaucaugagcacuaagaaauuggguguauaagccaacuccuuguaagcuaccccaa uuaacuucccagaaucuuagaaggcaucacagugcaccccaaaauaaaaagccaaacu gacacuucugcuuccucuuaaaauguaggagucuuggauaagaaagauaauuuuuuau uguuuggaagaaaaaaaaauuguuuggauaaauugaggcauuuaucuaucaaaaauau uuaucuuaauaaaauuucacaacacugauuuaguuguuggcuuuucuaaaaauuuuu uauauuucauauuaagaacucaugauuuuuacuuuccauuuuuuaaauucuuauuca cauaugguuuuucucuauuucuuagaaaagcuauagaacccaugguuuccggugacu uaaaaaacuaaucuaaaugucuucacuuagaugauacuuucaaaugcacugaaauuuc uaauaucaacaagaauauuugccugguccuaauuuuuucacugauuuaauaaaaagua ugaacccuaaagaagaaauagacuugaagaacugguuguguacaauacagaaauucu gcugggagauguccuuuuaaaacauuguuagaagagacaaccucuacaauccacccau uaagcauacuucucucuuagacaucuccuuuuauguaccuuauaaccucaaugugu cuuuccaauugacuuagaccaacacuucccagcgcaucccacaugggagccaauuacu gacucucccuagagacugcaaagaauuaauauuguagaaccaagggaugguuggcu cuugggagaggcaauccguuugugaucuuuugcucuggauguuaaugaaaucgcaac uuuaaguggauuuucaguggcaaauccucugauccuaugccaaauguucucuaagac aaacauccuuguaaaauaaaugucucacugggccaaaucuauggcaaauuugcacguu uuccugaacugcauucccuauauaguauuugccauccugaauucacuaaugggcauua cuuuuaauucaaaaccaguccuucuucaaaggaaaucucucccauuuauuacauuau gcaaacugcuuucuuaugcaguggguuaaaucccuagccaggcaaguaugaggacugg aauuuggauauccagaacccucagaaaugucggaugggcauaguagcuuacauguaa uuccagagcuagaaagaugaaacuagcccugucccucaagcucugaauucaguuggug caauaaauaagaaagaaucccccccccccgacccuacaucucuuucccucuacaucuaua cauguauuucccauacagcucuaugcuuccacauauaugcucacauaugugcaugcac

		acuugcacacauauguacacuugacacauugaagcaucauaaaucuaacaauuggaaua uaagaaaauauuuaacuuucacacagagcagucagagaaaaccauaagagguugaaac ucuugaaaaaacuugcaggauaaacagaaaagaguaugagaugccaauucuggucuac uuucugaaccuaacuuguuuuaccuucauuagucuaaauuuuccaaaugaaccccaag caccaaauuguccuuauugcucuuuccaguacuaaaauuauaauuccucaauucgaag gcaaacacucucaucuuuguuaaggauguguagaguuagacucaauaaacgacaugu auauuugagcuaaagccuggaggagggagauuauuucaagggcaaguacuuggcagg gaguuucaaagaaagaaggcucucaauucucagacuaacaccuuagcguggagugac ugucacagaggagggugaaguguaugucaccaguuagggaagcugaaaggggaaaug uaucaggcuugugagaauccuucagcagccaagucuagcaccugagcacaauccccag aacugaccccacauggugggaaaggagaggaauaauccugcaaauuuuccugugacc uccacccaagugcuauagaaaaugcaugcaugcccacaugcacacacaaauaaacauag uugcaaacuguuuugaggaaaauaaccucacaaacugucgagugauguaaaugccaaa gaaagagaaauguuuucuaauggcuagagaaccauuaaggaauuuuucaaaauggga caugggauagauaaauuuagauauccauacugaaagaaggcaagcaaauaaaaucugau aagaauguaauucuuagauaaccgaggacagagcgaagauagagaacagggccaauggc caaggugggaaaggguuugaaggaagcagcaugaaaccuacagacuuguaccaaaaugu ucaguucaugaguguuaaaagugaaaagcuugcauguuaguauggauuucauaucc ucggcagacagagcaccucacugugaguggggagaugaaguauucagaaaugagaaac aacuacucaauuucaguguucauaucucaaauccaauaaacaacuuuagggguacaau uuuuuaaaaaauuacauuaaaaauguuuuuaaaaucucuucuuaauaauuuaaaaauua aauugaaaauaacuuuaaaaaguaauauauacaggaaagccugugugcuaauuuuuu agggaggccauaaagggagauaguugcucauuaauuucuacacaucagccuaucuuu ggcuucugccuugauagcgcacucugaauuaucuucuucauguucaucccucaucuu uauuguuacugguuucauuucccuuggccacauagcccacuauuuuguauucccaa uggauauuguuccuuacaaaguucagccagggcucagaaguacaaggaauuggcucu uauacuucugucagacaggcaaaaacuucuaaaauuauacuauaauaaaaaaucaaaga gaugauauucauaauuaaacuaacaaaaguggcaggccccccucccccaacaugagu agaauuaaucugacguccauguucaagucugaaacacacuugccaauuaagagcacau uagggccagccuuuaucucccucuuaguuacuaaugugcaguucaauggugagcuau agagaaggaagccaagacuaccauaugucaaauauaaaaaaaaaaaucccauuuuaaa ucuguagucccgaauuaaggacaagagagagggaaauaucuuugacauuagaaaaug gagaaaauauuuuagcacaggacuuuacucagucacaucagaguugauaaguacgua ugacaucccucuuuuuccuguuuuccugagaaaaugaucucucuaguguuucauuua agauaaguuuauugaauuaaacucaguaaaugaaacaacugacaugacuggagcuug aaauaaacgaugugaugaucuacugaaauacaugaugcuaaauuugucuugcuucuua ugcaaaaacuacuauuagguuauagcaaugcauggauaauuaaggccaaaaauauauua gauguuaaaaauaguuuuauauuuauacaucugaauuuuaauuuauauuuaaaguau auugguccaaucaauucaugcccaaauguuuuaguucuauucuuugagauacuguuu uguuuuggggauuuuuuuuuuaugagcuaauucucuugccuaggaguuccuacuucucu cuccuccuuuuauuuuuuucuaauaaacuacacaugugucuucauccaggagcuaacu ucucccauuuugcuuuuccuuuagcaccuuuuuuauauuagauuucuuucuuuucu ccaucucuuugcauauugccuauauuucuuuuccuaagcauaauauuuaaaaaagac ugaguuuuauguuaagauuauuucugcuuugcucuuacacagauaggauaaguagu cuugauagaaaauaaaucaaugauuccuaggggguagucuuuuugcuuuuaaucaau aaggauucugacuucucuuucucuccauuuguguauuag
SEQ ID NO. 19	Пре-мРНК экзона 22	gauaaucuugcuccaacuuggaugggguggagcgguggguuccucccccucagcccuuu auuaugg
SEQ ID NO. 20	Пре-мРНК экзона 21x	GUGGUUGUGAAUGCCCUGUUAGGAGCAAUUCCAUCCAU CAUGAAUGUGCUUCUGGUUUGCCUUAUAUUCUGGCUAA UUUUCAGCAUCAUGGGCGUAAAUUUGUUUGCUGGCAAA UUCUACCACUGUGUUAACACCACAACUGGUGACAUAUU
		UGAGAUCAGCGAAGUCAAUAAUCAUUCUGAUUGCCUAA AACUAAUAGAAAGAAAUGAGACCGCCCGGUGGAAAAAU GUGAAAGUAAACUUUGAUAAUGUAGGAUUUGGGUAUC UUUCUUUGCUUCAAGUU

Пример 2. Подтверждение NIE с помощью обработки циклогексимидом.

ОТ-ПЦР-анализ с использованием цитоплазматической РНК из обработанных ДМСО (CHX-) или обработанных циклогексимидом (CHX+) мышиных клеток Neuro 2A (фиг. 3A) и RenCell VM (нейропрогениторные клетки человека) (фиг. 3B) и праймеров в экзоне 20 и экзоне 23 подтверждал наличие полосы, соответствующей NMD-индуцирующему экзону (20x). Идентичность продукта подтверждали секвенированием. Денситометрический анализ полос проводили для расчета процента включения экзона 20x общего транскрипта SCN1A. Обработка RenCell VM циклогексимидом (CHX+) для ингибирования NMD приводила к 2-кратному увеличению продукта, соответствующего NMD-индуцирующему экзону 20x, в цитоплазматической фракции (смотрите светлосерый столбец, CHX-, темно-серый столбец, CHX+).

Пример 3. Обход ASO области экзона 20x SCN1A.

Графическое представление прогулки с ASO, выполненного для последовательностей нацеливания на область экзона 20x SCN1A, непосредственно перед 3'-сайтом сплайсинга, через 3'-сайт сплайсинга, экзон 20x, через 5'-сайт сплайсинга и ниже по ходу транскрипции от 5'-сайта сплайсинга с использованием 2'-MOE ASO, остов PS, показано на фиг. 4. ASO разрабатывали для охвата этих областей путем сдвига 5 нуклеотидов за раз. Перечень ASO, нацеленных на SCN1A, суммирован в табл. 4. Последовательности ASO суммированы в табл. 5a и 5b и 6a и 6b.

Таблица 4

Список ASO, нацеленных на SCN1A

Ген **SEQ ID NO.**	**Пре-мРНК** **SEQ ID NO.**	**ASO** **SEQ ID NO.**	**NIE**
SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2	SEQ ID NO: 21-67, 210-256	Экзон 20x
SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12	SEQ ID NO: 68-114, 257-303	Экзон 21x

Таблица 5a

Последовательности ASO, нацеленные на SCN1A человека

SEQ ID NO.	Название последовательности	Последовательность ASO
21	SCN1A-IVS19X-81	GATGCTCTCCGTCTGTTT
22	SCN1A-IVS19X-76	TTCATGATGCTCTCCGTC
23	SCN1A-IVS19X-71	TTTTGTTCATGATGCTCT
24	SCN1A-IVS19X-66	TTACTTTTTGTTCATGAT
25	SCN1A-IVS19X-61	TGGTGTTACTTTTTGTTC
26	SCN1A-IVS19X-56	ACATTTGGTGTTACTTTT
27	SCN1A-IVS19X-51	ACAGAACATTTGGTGTTA
28	SCN1A-IVS19X-46	ATATGACAGAACATTTGG
29	SCN1A-IVS19X-41	ATCTGATATGACAGAACA
30	SCN1A-IVS19X-36	TAGAAATCTGATATGACA
31	SCN1A-IVS19X-31	TTAGTTAGAAATCTGATA
32	SCN1A-IVS19X-26	TGTTATTAGTTAGAAATC
33	SCN1A-IVS19X-21	TAGTTTGTTATTAGTTAG
34	SCN1A-IVS19X-16	ATATATAGTTTGTTATTA
35	SCN1A-IVS19X-11	TAGAAATATATAGTTTGT
36	SCN1A-IVS19X-6	CAAAATAGAAATATATAG
37	SCN1A-IVS19X-3	ATACAAAATAGAAATATA
38	SCN1A-IVS19X-1	CTATACAAAATAGAAATA
39	SCN1A-I19X/E20X+2	TCCTATACAAAATAGAAA
40	SCN1A-I19X/E20X+4	TATCCTATACAAAATAGA
41	SCN1A-I19X/E20X+6	ATTATCCTATACAAAATA
42	SCN1A-Ex20X+1	AGTTGGAGCAAGATTATC
43	SCN1A-Ex20X+6	ATCCAAGTTGGAGCAAGA
44	SCN1A-Ex20X+11	ACCCCATCCAAGTTGGAG
45	SCN1A-Ex20X+16	GCTCCACCCCATCCAAGT
46	SCN1A-Ex20X+21	CCAGCGCTCCACCCCATC
47	SCN1A-Ex20X-24	GAACCAGCGCTCCACCCC
48	SCN1A-Ex20X-19	GGGAGGAACCAGCGCTCC
49	SCN1A-Ex20X-3	ATAATAAAGGGCTCAGGG
50	SCN1A-Ex20X-1	CCATAATAAAGGGCTCAG
51	SCN1A-E20X/I20X-6	GTAATACAGTACCCATAA
52	SCN1A-E20X/I20X-4	GGGTAATACAGTACCCAT
53	SCN1A-IVS20X+13	TTAAAGGTAGCAAAAGGG
54	SCN1A-IVS20X+18	AAGGATTAAAGGTAGCAA
55	SCN1A-IVS20X+23	AGTGCAAGGATTAAAGGT
56	SCN1A-IVS20X+28	GTCACAGTGCAAGGATTA
57	SCN1A-IVS20X+33	CATAAGTCACAGTGCAAG
58	SCN1A-IVS20X+38	CTACACATAAGTCACAGT
59	SCN1A-IVS20X+43	CCCCACTACACATAAGTC
60	SCN1A-IVS20X+48	CCTCACCCCACTACACAT
61	SCN1A-IVS20X+53	CCCTCCCTCACCCCACTA
62	SCN1A-IVS20X+58	CCAATCCCTCCCTCACCC
63	SCN1A-IVS20X+63	CCTTCCCAATCCCTCCCT
64	SCN1A-IVS20X+68	AGTACCCTTCCCAATCCC
65	SCN1A-IVS20X+73	ATAATAGTACCCTTCCCA
66	SCN1A-IVS20X+78	GTGCAATAATAGTACCCT
67	SCN1A-IVS20X+83	CTGTGGTGCAATAATAGT

Таблица 5b

Последовательности ASO, нацеленные на SCN1A человека

SEQ ID NO.	Название последовательности	Последовательность ASO
210	SCN1A-IVS19X-81	GAUGCUCUCCGUCUGUUU
211	SCN1A-IVS19X-76	UUCAUGAUGCUCUCCGUC
212	SCN1A-IVS19X-71	UUUUGUUCAUGAUGCUCU
213	SCN1A-IVS19X-66	UUACUUUUUGUUCAUGAU
214	SCN1A-IVS19X-61	UGGUGUUACUUUUUGUUC
215	SCN1A-IVS19X-56	ACAUUUGGUGUUACUUUU
216	SCN1A-IVS19X-51	ACAGAACAUUUGGUGUUA
217	SCN1A-IVS19X-46	AUAUGACAGAACAUUUGG
218	SCN1A-IVS19X-41	AUCUGAUAUGACAGAACA
219	SCN1A-IVS19X-36	UAGAAAUCUGAUAUGACA
220	SCN1A-IVS19X-31	UUAGUUAGAAAUCUGAUA
221	SCN1A-IVS19X-26	UGUUAUUAGUUAGAAAUC
222	SCN1A-IVS19X-21	UAGUUUGUUAUUAGUUAG
223	SCN1A-IVS19X-16	AUAUAUAGUUUGUUAUUA
224	SCN1A-IVS19X-11	UAGAAAUAUAUAGUUUGU
225	SCN1A-IVS19X-6	CAAAAUAGAAAUAUAUAG
226	SCN1A-IVS19X-3	AUACAAAAUAGAAAUAUA
227	SCN1A-IVS19X-1	CUAUACAAAAUAGAAAUA
228	SCN1A-I19X/E20X+2	UCCUAUACAAAAUAGAAA
229	SCN1A-I19X/E20X+4	UAUCCUAUACAAAAUAGA
230	SCN1A-I19X/E20X+6	AUUAUCCUAUACAAAAUA
231	SCN1A-Ex20X+1	AGUUGGAGCAAGAUUAUC
232	SCN1A-Ex20X+6	AUCCAAGUUGGAGCAAGA
233	SCN1A-Ex20X+11	ACCCCAUCCAAGUUGGAG
234	SCN1A-Ex20X+16	GCUCCACCCCAUCCAAGU
235	SCN1A-Ex20X+21	CCAGCGCUCCACCCCAUC
236	SCN1A-Ex20X-24	GAACCAGCGCUCCACCCC
237	SCN1A-Ex20X-19	GGGAGGAACCAGCGCUCC
238	SCN1A-Ex20X-3	AUAAUAAAGGGCUCAGGG
239	SCN1A-Ex20X-1	CCAUAAUAAAGGGCUCAG
240	SCN1A-E20X/I20X-6	GUAAUACAGUACCCAUAA
241	SCN1A-E20X/I20X-4	GGGUAAUACAGUACCCAU
242	SCN1A-IVS20X+13	UUAAAGGUAGCAAAAGGG
243	SCN1A-IVS20X+18	AAGGAUUAAAGGUAGCAA
244	SCN1A-IVS20X+23	AGUGCAAGGAUUAAAGGU
245	SCN1A-IVS20X+28	GUCACAGUGCAAGGAUUA
246	SCN1A-IVS20X+33	CAUAAGUCACAGUGCAAG
247	SCN1A-IVS20X+38	CUACACAUAAGUCACAGU
248	SCN1A-IVS20X+43	CCCCACUACACAUAAGUC
249	SCN1A-IVS20X+48	CCUCACCCCACUACACAU
250	SCN1A-IVS20X+53	CCCUCCCUCACCCCACUA
251	SCN1A-IVS20X+58	CCAAUCCCUCCCUCACCC
252	SCN1A-IVS20X+63	CCUUCCCAAUCCCUCCCU
253	SCN1A-IVS20X+68	AGUACCCUUCCCAAUCCC
254	SCN1A-IVS20X+73	AUAAUAGUACCCUUCCCA
255	SCN1A-IVS20X+78	GUGCAAUAAUAGUACCCU
256	SCN1A-IVS20X+83	CUGUGGUGCAAUAAUAGU

Таблица 6a

Последовательности ASO, нацеленные на SCN1A мыши

SEQ ID NO.	Название последовательности	Последовательность ASO
68	mScn1a-IVS20X-81	GATGCTCACTGCCTGTTT
69	mScn1a-IVS20X-76	TATATGATGCTCACTGCC
70	mScn1a-IVS20X-71	TTTTGTATATGATGCTCA
71	mScn1a-IVS20X-66	TTACTTTTTGTATATGAT
72	mScn1a-IVS20X-61	TGGTGTTACTTTTTGTAT
73	mScn1a-IVS20X-56	ACATTTGGTGTTACTTTT
74	mScn1a-IVS20X-51	ACAGAACATTTGGTGTTA
75	mScn1a-IVS20X-46	ATATGACAGAACATTTGG
76	mScn1a-IVS20X-41	AGCTGATATGACAGAACA
77	mScn1a-IVS20X-36	TAGAAAGCTGATATGACA
78	mScn1a-IVS20X-31	TTAGTTAGAAAGCTGATA
79	mScn1a-IVS20X-26	TATTATTAGTTAGAAAGC
80	mScn1a-IVS20X-21	TAGTTTATTATTAGTTAG
81	mScn1a-IVS20X-16	ATATATAGTTTATTATTA
82	mScn1a-IVS20X-11	TAGAAATATATAGTTTAT
83	mScn1a-IVS20X-6	TAAAATAGAAATATATAG
84	mScn1a-IVS20X-3	ATATAAAATAGAAATATA
85	mScn1a-IVS20X-1	CTATATAAAATAGAAATA
86	mScn1a-I20X/E21X+2	TCCTATATAAAATAGAAA
87	mScn1a-I20X/E21X+4	TATCCTATATAAAATAGA
88	mScn1a-I20X/E21X+6	ATTATCCTATATAAAATA
89	mScn1a-Ex21X+1	AGTTGGAGCAAGATTATC
90	mScn1a-Ex21X+6	ATCCAAGTTGGAGCAAGA
91	mScn1a-Ex21X+11	ACCCCATCCAAGTTGGAG
92	mScn1a-Ex21X+16	GCTCCACCCCATCCAAGT
93	mScn1a-Ex21X+21	CCACCGCTCCACCCCATC
94	mScn1a-Ex21X-24	GAACCACCGCTCCACCCC
95	mScn1a-Ex21X-19	GGGAGGAACCACCGCTCC
96	mScn1a-Ex21X-3	ATAATAAAGGGCTGAGGG
97	mScn1a-Ex21X-1	CCATAATAAAGGGCTGAG
98	mScn1a-E21X/I21X-6	GTAATACAGTACCCATAA
99	mScn1a-E21X/I21X-4	GGGTAATACAGTACCCAT
100	mScn1a-IVS21X+13	TTAAAGGTAGCAAAAGGG
101	mScn1a-IVS21X+18	AAGGATTAAAGGTAGCAA
102	mScn1a-IVS21X+23	AGTGCAAGGATTAAAGGT
103	mScn1a-IVS21X+28	GTCACAGTGCAAGGATTA
104	mScn1a-IVS21X+33	CATAAGTCACAGTGCAAG
105	mScn1a-IVS21X+38	CTACACATAAGTCACAGT
106	mScn1a-IVS21X+43	TCCCACTACACATAAGTC
107	mScn1a-IVS21X+48	CTCAATCCCACTACACAT
108	mScn1a-IVS21X+53	CCTCCCTCAATCCCACTA
109	mScn1a-IVS21X+58	CACTCCCTCCCTCAATCC
110	mScn1a-IVS21X+63	CTTCCCACTCCCTCCCTC
111	mScn1a-IVS21X+68	GTACCCTTCCCACTCCCT
112	mScn1a-IVS21X+73	CAATTGTACCCTTCCCAC
113	mScn1a-IVS21X+78	TGGTGCAATTGTACCCTT
114	mScn1a-IVS21X+83	TACTGTGGTGCAATTGTA

Таблица 6b

Последовательности ASO, нацеленные на SCN1A мыши

SEQ ID NO.	Название последовательности	Последовательность ASO
257	mScn1a-IVS20X-81	GAUGCUCACUGCCUGUUU
258	mScn1a-IVS20X-76	UAUAUGAUGCUCACUGCC
259	mScn1a-IVS20X-71	UUUUGUAUAUGAUGCUCA
260	mScn1a-IVS20X-66	UUACUUUUUGUAUAUGAU

261	mScn1a-IVS20X-61	UGGUGUUACUUUUUGUAU
262	mScn1a-IVS20X-56	ACAUUUGGUGUUACUUUU
263	mScn1a-IVS20X-51	ACAGAACAUUUGGUGUUA
264	mScn1a-IVS20X-46	AUAUGACAGAACAUUUGG
265	mScn1a-IVS20X-41	AGCUGAUAUGACAGAACA
266	mScn1a-IVS20X-36	UAGAAAGCUGAUAUGACA
267	mScn1a-IVS20X-31	UUAGUUAGAAAGCUGAUA
268	mScn1a-IVS20X-26	UAUUAUUAGUUAGAAAGC
269	mScn1a-IVS20X-21	UAGUUUAUUAUUAGUUAG
270	mScn1a-IVS20X-16	AUAUAUAGUUUAUUAUUA
271	mScn1a-IVS20X-11	UAGAAAUAUAUAGUUUAU
272	mScn1a-IVS20X-6	UAAAAUAGAAAUAUAUAG
273	mScn1a-IVS20X-3	AUAUAAAAUAGAAAUAUA
274	mScn1a-IVS20X-1	CUAUAUAAAAUAGAAAUA
275	mScn1a-I20X/E21X+2	UCCUAUAUAAAAUAGAAA
276	mScn1a-I20X/E21X+4	UAUCCUAUAUAAAAUAGA
277	mScn1a-I20X/E21X+6	AUUAUCCUAUAUAAAAUA
278	mScn1a-Ex21X+1	AGUUGGAGCAAGAUUAUC
279	mScn1a-Ex21X+6	AUCCAAGUUGGAGCAAGA
280	mScn1a-Ex21X+11	ACCCCAUCCAAGUUGGAG
281	mScn1a-Ex21X+16	GCUCCACCCCAUCCAAGU
282	mScn1a-Ex21X+21	CCACCGCUCCACCCCAUC
283	mScn1a-Ex21X-24	GAACCACCGCUCCACCCC
284	mScn1a-Ex21X-19	GGGAGGAACCACCGCUCC
285	mScn1a-Ex21X-3	AUAAUAAAGGGCUGAGGG
286	mScn1a-Ex21X-1	CCAUAAUAAAGGGCUGAG
287	mScn1a-E21X/I21X-6	GUAAUACAGUACCCAUAA
288	mScn1a-E21X/I21X-4	GGGUAAUACAGUACCCAU
289	mScn1a-IVS21X+13	UUAAAGGUAGCAAAAGGG
290	mScn1a-IVS21X+18	AAGGAUUAAAGGUAGCAA
291	mScn1a-IVS21X+23	AGUGCAAGGAUUAAAGGU
292	mScn1a-IVS21X+28	GUCACAGUGCAAGGAUUA
293	mScn1a-IVS21X+33	CAUAAGUCACAGUGCAAG
294	mScn1a-IVS21X+38	CUACACAUAAGUCACAGU
295	mScn1a-IVS21X+43	UCCCACUACACAUAAGUC
296	mScn1a-IVS21X+48	CUCAAUCCCACUACACAU
297	mScn1a-IVS21X+53	CCUCCCUCAAUCCCACUA
298	mScn1a-IVS21X+58	CACUCCCUCCCUCAAUCC
299	mScn1a-IVS21X+63	CUUCCCACUCCCUCCCUC
300	mScn1a-IVS21X+68	GUACCCUUCCCACUCCCU
301	mScn1a-IVS21X+73	CAAUUGUACCCUUCCCAC
302	mScn1a-IVS21X+78	UGGUGCAAUUGUACCCUU
303	mScn1a-IVS21X+83	UACUGUGGUGCAAUUGUA

Пример 4. Прогулка с ASO по области экзона 20x SCN1A, оцененная с помощью ОТ-ПЦР.

Последовательности прогулки с ASO можно оценивать, например, с помощью ОТ-ПЦР. На фиг. 5A на иллюстративном ПААГ показаны окрашенные SYBR-safe продукты ОТ-ПЦР, обработанные имитацией SCN1A (плацебо), обработанные SMN-контролем ASO (SMN) или обработанные 2'-MOE ASO, нацеленными на область экзона 20x, как описано в настоящем документе в примере 3 и в описании фиг. 4, в концентрации 20 мкМ в клетках RenCell VM посредством гимнозиса. Два продукта, соответствующие включению экзона 20x (верхняя полоса) и полной длины (исключение экзона 20x, нижняя полоса), количественно определяли, и процентное включение экзона 20x нанесено на гистограмму (фиг. 5B). Черная линия указывает на отсутствие изменений по отношению к плацебо. Полноразмерные продукты также

нормализовали к внутреннему контролю RPL32, и кратные изменение относительно плацебо изображены на гистограмме (фиг. 5C). Черная линия показывает соотношение 1 и отсутствие изменений по отношению к плацебо.

Пример 5. Прогулка с ASO по области экзона 20x SCN1A, оцененная с помощью ОТ-кПЦР.

Результаты амплификации SCN1A SYBR-green ОТ-кПЦР, нормализованные по RPL32, полученные с использованием того NIE эксперимента по поглощению ASO, который оценивали с помощью SYBR-safe ОТ-ПЦР, как показано на фиг. 6, представлены в виде кратности изменения относительно плацебо, подтверждающего результаты SYBR-safe ОТ-ПЦР. Черная линия указывает на соотношение 1 (без изменений по отношению к плацебо).

Пример 6. Дозозависимый эффект выбранного ASO в обработанных CXH клетках.

На фиг. 8A на типичном ПААГ показаны окрашенные SYBR-safe продукты ОТ-ПЦР мышей Sen1a, подвергнутых обработке имитацией (плацебо, только RNAiMAX), или обработанных Ex21x+1 2'-MOE ASO, нацеленным на экзон 21x (номенклатура мыши, соответствует экзону 20x человека), в концентрациях 30 нМ, 80 нМ и 200 нМ в клетках Neuro 2A (нейробластома мыши) посредством трансфекции RNAiMAX. Ex21x+1 (номенклатура мыши) и Ex20x+1 (номенклатура человека) идентичны. Количественно определяли два продукта, соответствующие включению экзона 21x (верхняя полоса) и полной длине (исключение экзона 21x, нижняя полоса), и процентное включение экзона 21x нанесено на гистограмму (фиг. 8B). Полноразмерные продукты также нормализовали к внутреннему контролю HPRT, и кратные изменения по отношению к плацебо нанесены на гистограмму (фиг. 8C). Черная линия показывает соотношение 1 и отсутствие изменений по отношению к плацебо.

Пример 7. Интравитреальное (IVT) введение выбранных ASO.

На фиг. 9A показаны ПААГ окрашенных SYBR-safe продуктов ОТ-ПЦР мышиных Scn1a из левого глаза (-), в который вводили PBS (1 мкл), или правого глаза (+), в который вводили IVS20x-21, Ex21x+1, IVS21x+18, IVS21x+33 или Cep290 (отрицательный контроль ASO; Gerard et al, Mol. Ther. Nuc. Ac, 2015) 2'-MOE ASO (1 мкл) в концентрации 10 мМ. Ex21x+1, IVS21x+18 и IVS21x+33 (номенклатура мышей) и Ex20x+1, IVS20x+18 и IVS20x+33 (номенклатура человека) идентичны. Два продукта, соответствующие включению экзона 21x (верхняя полоса) и полной длине (исключение экзона 21x, нижняя полоса), количественно определяли, и процент включения экзона 21x представлен на фиг. 9B. Белые столбцы соответствуют глазам с инъекцией ASO, а серые столбцы соответствуют глазам с инъекцией PBS, n=5 в каждой группе. Полноразмерные продукты нормализовали к внутреннему контролю GAPDH, и кратное изменение глаза с инъекцией ASO относительно глаза с инъекцией PBS показано на фиг. 9C. Черная линия показывает соотношение 1 и отсутствие изменений по отношению к PBS, n=5 в каждой группе.

Пример 8. Внутрицеребровентрикулярная (ICV) инъекция выбранных ASO.

На фиг. 10A показаны ПААГ окрашенных SYBR-safe продуктов ОТ-ПЦР мышиных Scn1a из головного мозга без инъекции (-, контроль ASO отсутствует) или с инъекцией 300 мкг Cep290 (отрицательный контроль ASO; Gerard et al, Mol. Ther. Nuc. Ac, 2015), Ex21x+1, IVS21x+18, IVS21x+33 2'-MOE ASO. Ex21x+1, IVS21x+18 и IVS21x+33 (номенклатура мышей) и Ex20x+1, IVS20x+18 и IVS20x+33 (номенклатура человека) идентичны. Количественно определяли два продукта, соответствующие включению экзона 21x (верхняя полоса) и полной длине (исключение экзона 21x, нижняя полоса), и процент включения экзона 21x нанесен на гистограмму на фиг. 10B, n=6 (каждый нацеленный ASO), n=5 (Cep290 ASO), n=1 (без введения, контроль ASO отсутствует). ПЦР Taqman выполняли с использованием двух разных зондов, охватывающих соединения экзонов 21 и 22, и продукты нормализовали по внутреннему контролю GAPDH, и кратность изменения головного мозга с инъекцией ASO относительно головного мозга с инъекцией Cep290 наносили на гистограмму на фиг. 10C. Черная линия указывает на соотношение 1 и отсутствие изменений по отношению к Cep290, n=6 (каждый нацеленный ASO), n=5 (Cep290 ASO), n=1 (без введения, контроль ASO отсутствует).

На фиг. 11 показан иллюстративный дозозависимый ответ от инъекции ICV отобранных ASO мышам C57BL6J (самцы, 3 месяца). На фиг. 11A показаны гели ПААГ окрашенных SYBR-safe продуктов ОТ-ПЦР Scn1a мышей из головного мозга с инъекцией 300 мкг Cep290 (отрицательный контроль ASO; Gerard et al, Mol. Ther. Nuc. Ac, 2015) или головного мозга с инъекцией 33 мкг, 100 мкг и 300 мкг Ex21x+1 2'-MOE ASO. Ex21x+1 (номенклатура мыши) и Ex20x+1 (номенклатура человека) идентичны. Два продукта, соответствующие включению экзона 21x (верхняя полоса) и полной длине (исключение экзона 21x, нижняя полоса), определяли количественно. На фиг. 11B изображен график, показывающий процент включения экзона 21x из данных на фиг. 11A, n=5 (каждая группа). На фиг. 11C изображен график из результатов анализа Taqman кПЦР, выполненного с использованием двух разных зондов, охватывающих соединения экзонов 21 и 22. Продукты нормализовали к внутреннему контролю Gapdh и наносили кратное изменение головного мозга с инъекцией ASO относительно головного мозга с инъекцией Cep290. Черная линия указывает на соотношение 1 и отсутствие изменений по отношению к Cep290, n=5 (каждая группа).

На фиг. 12 представлены иллюстративные результаты инъекции ICV выбранного ASO мышам C57BL6J (день 2 после рождения). На фиг. 12A показаны гели ПААГ для окрашенных SYBR-safe продуктов ОТ-ПЦР Scnla мыши из головного мозга без инъекции (-, контроль ASO отсутствует) или голов-

ного мозга с инъекцией 20 мкг Ex21x+1 2'-MOE ASO. Два продукта, соответствующие включению экзона 21x (верхняя полоса) и полной длине (исключение экзона 21x, нижняя полоса), определяли количественно. Ex21x+1 (номенклатура мышей) и Ex20x+1 (номенклатура человека) идентичны. На фиг. 12B изображен график, показывающий процент включения экзона 21x из данных на фиг. 12A, n=4 (каждая группа). На фиг. 12C изображен график из результатов анализа Taqman кПЦР, выполненного с использованием двух разных зондов, охватывающих соединения экзонов 21 и 22. Продукты нормализовали к внутреннему контролю Gapdh, и нанесено кратное изменение головного мозга с инъекцией ASO относительно головного мозга без контроля ASO. Черная линия указывает на соотношение 1 и отсутствие изменений по отношению к контролю без ASO, n=4 (каждая группа).

Пример 9. Целевое увеличение продукта ядерного гена для лечения синдрома Драве.

Синдром Драве (DS) представляет собой разрушительное детское генетическое заболевание, характеризующееся тяжелыми приступами, когнитивными и двигательными нарушениями и смертью. Основной причиной DS является снижение экспрессии альфа-субъединицы потенциалзависимого натриевого канала 1-го типа (Nav1.1). Непродуктивное событие сплайсинга SCN1A сохраняется у человека и мыши. На фиг. 13A представлен график, показывающий процент включения экзона 21x в указанных образцах ЦНС мыши. На фиг. 13B изображен график, показывающий процент включения экзона 20x в указанных образцах ЦНС человека. В этом исследовании терапия антисмысловыми олигонуклеотидами (ASO) использовалась для увеличения продуктивной мРНК Scn1a и, следовательно, для восстановления содержания белка Nav1.1.

На фиг. 14A представлен график, показывающий процент снижения включения экзона 21x при указанных дозах (n=3-6 на группу). На фиг. 14B изображен график, показывающий процент увеличения мРНК Scn1a при указанных дозах (n=3-6 на группу). На фиг. 14C изображен график, показывающий процентное увеличение содержания белка Nav1.1 при указанных дозах (n=2 на группу).

На фиг. 15A изображен график, показывающий процент снижения включения экзона 21x при указанных дозах (n=4 на группу). На фиг. 15B представлен график, показывающий процент увеличения мРНК Scn1a при указанных дозах (n=4 на группу).

На фиг. 16 изображен выбранный нацеленный на Scn1a ASO, вводимый в дозе 10 мкг посредством инъекции ICV у мышей постнатального 2-го дня, оцениваемых на 5-й день после инъекции посредством Taqman кПЦР SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN5A, SCN7A, SCN8A, SCN9A, SCN10A и SCN11A для оценки целевой селективности. Результаты амплификации Taqman-qPCR, нормализованные по Gapdh, полученные с использованием Ex20x+1 ASO, представлены в виде кратного изменения относительно мышей, которым вводили PBS (n=3-6 на группу).

На фиг. 17 представлены иллюстративные результаты интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции в постнатальный день 2 выбранной ASO в указанной дозе у мышей F1 дикого типа (WT) или гетерозиготных по синдрому Драве мышей (HET) от скрещиваний 129S-Scn1a^{tm1Kea} × C57BL/6J через 3 дня после инъекции (n =9-14 на группу). На фиг. 17A изображен график из результатов анализа Taqman кПЦР, выполненного с использованием зондов, охватывающих экзоны 21 и 22. Продукты нормализовали по внутреннему контролю Gapdh, и нанесено кратное изменение головного мозга с инъекцией ASO относительно головного мозга с инъекцией PBS. На фиг. 17B изображен график из результатов вестерн-блоттинга, выполненного с использованием антитела к Nav1.1. Продукты нормализовали к полосам, окрашенным Понсо, и нанесено кратное изменение головного мозга с инъекцией ASO относительно головного мозга с инъекцией PBS.

Фиг. 19 представляет собой график, показывающий увеличение содержания мРНК Scn1a во фронтальных срезах головного мозга мышей в течение времени после ICV-инъекции нацеленного на SCN1A ASO. Как изображено, повышение содержания мРНК Scn1a, количественно определяемое с помощью Taqman кПЦР, поддерживалось в течение по меньшей мере 80 дней после инъекции (n=3-9 на группу). Фиг. 20 представляет собой иллюстративную кривую выживания, демонстрирующую 100% преимущество в выживании, обеспечиваемое нацеленным на SCN1A ASO в мышиной модели синдрома Драве. Мыши WT и гетерозиготные по синдрому Драве мыши (+/-), потомство F1 от скрещиваний 129S-scn1a^{tm1Kea} × C57BL/6J, получали однократную инъекцию ICV 20 мкг PBS или ASO вслепую (лечение, обозначенное как A или B) в постнатальный день 2, и за их выживанием следили. Как изображено, мыши в группе A +/- (мыши с синдромом Драве, получающие лечение PBS) начали умирать приблизительно с 16 дня после рождения, тогда как все мыши других трех групп, включая группу B +/- (мыши с синдромом Драве, получающие лечение ASO), выживали по меньшей мере в течение 35 дней после рождения (n=32-39 на группу). На фиг. 18 показаны иллюстративные результаты микропрогулки с ASO по области экзона 20x SCN1A в RenCells посредством свободного поглощения. ASO разрабатывали для охвата областей вокруг трех ранее идентифицированных целевых ASO на фиг. 6 (отмечены звездочками) путем смещения 1 нуклеотида за раз (6-41) или уменьшения длины ASO 17 (1-5). На графике показано процентное включение экзона 20x, измеренное с помощью SYBR-green кПЦР. Черная линия указывает на отсутствие изменений по отношению к отсутствию ASO (-). Последовательности ASO суммированы в табл. 7a и 7b.

Таблица 7а

Последовательности ASO, нацеленные на SCN1A человека

ID ASO	Последовательность 5'-3'	SEQ ID NO:
1	TTGGAGCAAGATTATC	304
2	GTTGGAGCAAGATTATC	305
3	GTTGGAGCAAGATTAT	306
4	AGTTGGAGCAAGATTAT	307
5	AGTTGGAGCAAGATTA	308
6	GATTATCCTATACAAAAT	309
7	AGATTATCCTATACAAAA	310
8	AAGATTATCCTATACAAA	311
9	CAAGATTATCCTATACAA	312
10	GCAAGATTATCCTATACA	313
11	AGCAAGATTATCCTATAC	314
12	GAGCAAGATTATCCTATA	315
13	GGAGCAAGATTATCCTAT	316
14	TGGAGCAAGATTATCCTA	317
15	GTTGGAGCAAGATTATCC	318
16	TTGGAGCAAGATTATCCT	319
18	AAGTTGGAGCAAGATTAT	320
19	CAAGTTGGAGCAAGATTA	321
20	CCAAGTTGGAGCAAGATT	322
21	TCCAAGTTGGAGCAAGAT	323
22	AGTACCCATAATAAAGGG	324
23	AATACAGTACCCATAATA	325
24	ATTAAAGGTAGCAAAAGG	326
25	GATTAAAGGTAGCAAAAG	327
26	GGATTAAAGGTAGCAAAA	328
27	AGGATTAAAGGTAGCAAA	329
29	CAAGGATTAAAGGTAGCA	330
30	GCAAGGATTAAAGGTAGC	331
31	TGCAAGGATTAAAGGTAG	332
32	GTGCAAGGATTAAAGGTA	333
33	AGTCACAGTGCAAGGATT	334
34	AAGTCACAGTGCAAGGAT	335
35	TAAGTCACAGTGCAAGGA	336
36	ATAAGTCACAGTGCAAGG	337
38	ACATAAGTCACAGTGCAA	338
39	CACATAAGTCACAGTGCA	339
40	ACACATAAGTCACAGTGC	340
41	TACACATAAGTCACAGTG	341

Таблица 7b

Последовательности ASO, нацеленные на SCN1A человека

ID ASO	Последовательность 5'-3'	SEQ ID NO:
1_U	UUGGAGCAAGAUUAUC	342
2_U	GUUGGAGCAAGAUUAUC	343
3_U	GUUGGAGCAAGAUUAU	344
4_U	AGUUGGAGCAAGAUUAU	345
5_U	AGUUGGAGCAAGAUUA	346
6_U	GAUUAUCCUAUACAAAAU	347
7_U	AGAUUAUCCUAUACAAAA	348
8_U	AAGAUUAUCCUAUACAAA	349
9_U	CAAGAUUAUCCUAUACAA	350
10_U	GCAAGAUUAUCCUAUACA	351
11_U	AGCAAGAUUAUCCUAUAC	352
12_U	GAGCAAGAUUAUCCUAUA	353
13_U	GGAGCAAGAUUAUCCUAU	354
14_U	UGGAGCAAGAUUAUCCUA	355
15_U	GUUGGAGCAAGAUUAUCC	356
16_U	UUGGAGCAAGAUUAUCCU	357
18_U	AAGUUGGAGCAAGAUUAU	358
19_U	CAAGUUGGAGCAAGAUUA	359
20_U	CCAAGUUGGAGCAAGAUU	360
21_U	UCCAAGUUGGAGCAAGAU	361
22_U	AGUACCCAUAAUAAAGGG	362
23_U	AAUACAGUACCCAUAAUA	363
24_U	AUUAAAGGUAGCAAAAGG	364
25_U	GAUUAAAGGUAGCAAAAG	365
26_U	GGAUUAAAGGUAGCAAAA	366
27_U	AGGAUUAAAGGUAGCAAA	367
29_U	CAAGGAUUAAAGGUAGCA	368
30_U	GCAAGGAUUAAAGGUAGC	369
31_U	UGCAAGGAUUAAAGGUAG	370
32_U	GUGCAAGGAUUAAAGGUA	371
33_U	AGUCACAGUGCAAGGAUU	372
34_U	AAGUCACAGUGCAAGGAU	373
35_U	UAAGUCACAGUGCAAGGA	374
36_U	AUAAGUCACAGUGCAAGG	375
38_U	ACAUAAGUCACAGUGCAA	376
39_U	CACAUAAGUCACAGUGCA	377
40_U	ACACAUAAGUCACAGUGC	378
41_U	UACACAUAAGUCACAGUG	379

Хотя предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были показаны и описаны в настоящем документе, специалистам в настоящей области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Специалистам в настоящей области техники понятно, что будут происходить многочисленные вариации, изменения и замены без отступления от настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления, описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения и что таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема формулы

изобретения и их эквивалентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ усиления экспрессии белка Nav1.1 в клетке, содержащей пре-мРНК, которая содержит индуцирующий нонсенс-опосредованный распад РНК экзон (экзон NMD) и кодирует белок Nav1.1, предусматривающий контакт терапевтического средства с клеткой, посредством чего терапевтическое средство способствует исключению экзона NMD из кодирующей белок Nav1.1 пре-мРНК, тем самым увеличивая содержание процессированной мРНК, кодирующей белок Nav1.1,

причем терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO) или вектор, содержащий последовательность, кодирующую ASO;

ASO содержит последовательность, которая комплементарна целевой части пре-мРНК, которая содержит NMD экзон и которая кодирует белок Nav1.1;

экзон NMD расположен в области от GRCh37/hg19: chr2:166,863,740 до GRCh37/hg19: chr2:166,863,803; и

причем целевая часть:

(i) находится внутри интронной последовательности, фланкирующей экзон NMD;

(ii) по меньшей мере, частично перекрывается с экзоном NMD или

(iii) находится в пределах экзона NMD.

2. Способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта путем усиления экспрессии белка Nav1.1 в клетке субъекта, предусматривающий контактирование клетки субъекта с терапевтическим средством, которое способствует исключению индуцирующего нонсенс-опосредованный распад РНК экзона (экзона NMD) из пре-мРНК в клетке, которая содержит экзон NMD и кодирует белок Nav1.1, тем самым увеличивая содержание процессированной мРНК, кодирующей белок Nav1.1, и увеличивая экспрессию белка Nav1.1 в клетке субъекта;

причем заболевание или состояние связано со сниженной экспрессией или функцией белка Nav1.1, кодируемого геном SCN1A, у субъекта;

терапевтическое средство представляет собой антисмысловой олигомер (ASO) или вектор, содержащий последовательность, кодирующую ASO;

ASO содержит последовательность, которая комплементарна целевой части пре-мРНК, которая содержит NMD экзон и которая кодирует белок Nav1.1;

экзон NMD расположен в области от GRCh37/hg19: chr2:166,863,740 до GRCh37/hg19: chr2:166,863,803; и

причем указанная целевая часть:

(i) находится внутри интронной последовательности, фланкирующей экзон NMD;

(ii) по меньшей мере, частично перекрывается с экзоном NMD или

(iii) находится в пределах экзона NMD.

3. Способ по п.1 или 2, при котором терапевтическое средство:

(a) связывается с указанной целевой частью;

(b) модулирует связывание фактора, вовлеченного в исключение экзона NMD из пре-мРНК; или

(c) является комбинацией (a) и (b).

4. Способ по п.3, при котором терапевтическое средство препятствует связыванию фактора, участвующего в исключении экзона NMD из области целевой части.

5. Способ по п.3, при котором целевая часть проксимальна к экзону NMD.

6. Способ по п.5, при котором целевая часть находится самое большее приблизительно на 500, приблизительно на 400, приблизительно на 300, приблизительно на 200, приблизительно на 100, приблизительно на 80, приблизительно на 70, приблизительно на 60, приблизительно на 50 нуклеотидов выше против хода транскрипции от 5'-конца экзона NMD.

7. Способ по п.5, при котором целевая часть находится по меньшей мере приблизительно на 500, приблизительно на 400, приблизительно на 300, приблизительно на 200, приблизительно на 100, приблизительно на 80, приблизительно на 70, приблизительно на 60, приблизительно на 50, приблизительно на 40, приблизительно на 30, приблизительно на 20, приблизительно на 10, приблизительно на 5 нуклеотидов, приблизительно на 4, приблизительно на 2, приблизительно на 1 нуклеотид выше против хода транскрипции от 5'-конца экзона NMD.

8. Способ по п.5, при котором целевая часть находится самое большее приблизительно на 500, приблизительно на 400, приблизительно на 300, приблизительно на 200, приблизительно на 100, приблизительно на 80, приблизительно на 70, приблизительно на 60, приблизительно на 50 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от 3'-конца экзона NMD.

9. Способ по п.5, при котором целевая часть находится по меньшей мере приблизительно на 500, приблизительно на 400, приблизительно на 300, приблизительно на 200, приблизительно на 100, приблизительно на 80, приблизительно на 70, приблизительно на 60, приблизительно на 50, приблизительно на 40, приблизительно на 30, приблизительно на 20, приблизительно на 10, приблизительно на 5 нуклеоти-

дов, приблизительно на 4, приблизительно на 2, приблизительно на 1 нуклеотид ниже по ходу транскрипции от 3'-конца экзона NMD.

10. Способ по п.3, при котором целевая часть расположена в интронной области между двумя каноническими экзонными областями кодирующей Nav1.1 мРНК с экзоном NMD, и причем интронная область содержит экзон NMD.

11. Способ по п.3, при котором целевая часть, по меньшей мере, частично перекрывается с экзоном NMD.

12. Способ по п.3, при котором целевая часть, по меньшей мере, частично перекрывается с интроном выше против хода транскрипции от экзона NMD.

13. Способ по п.3, при котором целевая часть содержит 5'-соединение экзона NMD с интроном или 3'-соединение экзона NMD с интроном.

14. Способ по п.3, при котором целевая часть находится в пределах экзона NMD.

15. Способ по п.3, при котором целевая часть содержит приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более последовательных нуклеотидов экзона NMD.

16. Способ по п.1 или 2, при котором кодирующая белок Nav1.1 пре-мРНК содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80, 85, 90, 95, 97 или 100% по отношению к любой из SEQ ID NO: 2 или 7-10.

17. Способ по п.1 или 2, при котором кодирующая белок Nav1.1 пре-мРНК кодируется генетической последовательностью с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере приблизительно 80, 85, 90, 95, 97 или 100% по отношению к SEQ ID NO: 1 или 3-6.

18. Способ по п.5, при котором целевая часть находится самое большее приблизительно на 500, приблизительно на 400, приблизительно на 300, приблизительно на 200, приблизительно на 100, приблизительно на 80, приблизительно на 70, приблизительно на 60, приблизительно на 50 нуклеотидов выше против хода транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803.

19. Способ по п.5, при котором целевая часть находится приблизительно на 500, приблизительно на 400, приблизительно на 300, приблизительно на 200, приблизительно на 100, приблизительно на 80, приблизительно на 70, приблизительно на 60, приблизительно на 50, приблизительно на 40, приблизительно на 30, приблизительно на 20, приблизительно на 10, приблизительно на 5 нуклеотидов, приблизительно на 4, приблизительно на 2, приблизительно на 1 нуклеотид выше против хода транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863803.

20. Способ по п.5, при котором целевая часть находится самое большее приблизительно на 500, приблизительно на 400, приблизительно на 300, приблизительно на 200, приблизительно на 100, приблизительно на 80, приблизительно на 70, приблизительно на 60, приблизительно на 50 нуклеотидов ниже по ходу транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863740.

21. Способ по п.5, при котором целевая часть находится приблизительно на 500, приблизительно на 400, приблизительно на 300, приблизительно на 200, приблизительно на 100, приблизительно на 80, приблизительно на 70, приблизительно на 60, приблизительно на 50, приблизительно на 40, приблизительно на 30, приблизительно на 20, приблизительно на 10, приблизительно на 5 нуклеотидов, приблизительно на 4, приблизительно на 2, приблизительно на 1 нуклеотид ниже по ходу транскрипции от геномного сайта GRCh37/hg19: chr2:166863740.

22. Способ по п.3, при котором целевая часть кодирующей белок Nav1.1 пре-мРНК содержит последовательность с идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 97 или 100% по отношению к области, содержащей по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых кислот с последовательностью SEQ ID NO: 2 или 7-10.

23. Способ по п.1 или 2, причем ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80, 85, 90, 95, 97 или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 32-35, 39, 40, 42-45, 49-51, 54-59, 66, 221-224, 228, 229, 231-234, 238-240, 243-248, 255, 304-308, 312-316, 318-324, 326-335, 337-346, 350-354, 356-362, 364-373 или 375-379.

24. Способ по п.3, при котором целевая часть кодирующей белок Nav1.1 пре-мРНК находится в экзоне NMD.

25. Способ по п.3, при котором целевая часть кодирующей белок Nav1.1 пре-мРНК с экзоном NMD находится выше против хода транскрипции или ниже по ходу транскрипции от экзона NMD.

26. Способ по п.3, при котором целевая часть пре-мРНК содержит экзон-интронное соединение экзона NMD.

27. Способ по п.1, при котором исключение экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок Nav1.1, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до

приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1, по меньшей мере приблизительно в 1,5, по меньшей мере приблизительно в 2, по меньшей мере приблизительно в 2,5, по меньшей мере приблизительно в 3, по меньшей мере приблизительно в 3,5, по меньшей мере приблизительно в 4, по меньшей мере приблизительно в 5 или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с исключением экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок Nav1.1, в контрольной клетке.

28. Способ по п.1, при котором терапевтическое средство повышает содержание процессированной мРНК, кодирующей белок Nav1.1, в клетке.

29. Способ по п.1, при котором количество процессированной мРНК, кодирующей белок Nav1.1, в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1, по меньшей мере приблизительно в 1,5, по меньшей мере приблизительно в 2, по меньшей мере приблизительно в 2,5, по меньшей мере приблизительно в 3, по меньшей мере приблизительно в 3,5, по меньшей мере приблизительно в 4, по меньшей мере приблизительно в 5 или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством процессированной мРНК, кодирующей белок Nav1.1 в контрольной клетке.

30. Способ по п.1, при котором терапевтическое средство увеличивает экспрессию белка Nav1.1 в клетке.

31. Способ по п.1, при котором количество белка Nav1.1, производимого в клетке, контактирующей с терапевтическим средством, увеличивается в число раз, составляющее от приблизительно 1,1 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 10 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 1,1 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 2 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 9 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 7 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 8 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,1, по меньшей мере приблизительно в 1,5, по меньшей мере приблизительно в 2, по меньшей мере приблизительно в 2,5, по меньшей мере приблизительно в 3, по меньшей мере приблизительно в 3,5, по меньшей мере приблизительно в 4, по меньшей мере приблизительно в 5 или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, по сравнению с общим количеством белка Nav1.1, производимого в контрольной клетке.

32. Способ по п.2, при котором заболевание или состояние индуцируется мутацией с потерей функции в Nav1.1.

33. Способ по п.32, при котором заболевание или состояние связано с гаплонедостаточностью гена SCN1A, причем у субъекта имеется первый аллель, кодирующий функциональный SCN1A, и второй аллель, из которого SCN1A не производится или производится в сниженных количествах, или второй аллель, кодирующий нефункциональный SCN1A или частично функциональный SCN1A.

34. Способ по п.32, при котором заболевание или состояние представляет собой энцефалопатию.

35. Способ по п.34, при котором энцефалопатия представляет собой эпилептическую энцефалопатию.

36. Способ по п.32, при котором заболевание или состояние представляет собой синдром Драве (DS); тяжелую миоклоническую эпилепсию младенчества (SMEI) - пограничную форму (SMEB); фебрильные судороги (FS); эпилепсию, генерализованную, с фебрильными судорогами плюс (GEFS+); эпилептическую энцефалопатию, раннюю детскую, 13; криптогенную генерализованную эпилепсию; криптогенную фокальную эпилепсию; эпилепсию с миоклонико-астатическими приступами; синдром Лен-

нокса-Гасто; синдром Веста; идиопатические судороги; раннюю миоклоническую энцефалопатию; прогрессирующую миоклоническую эпилепсию; альтернирующую гемиплегию детского возраста; неклассифицированную эпилептическую энцефалопатию; внезапную неожиданную смерть при эпилепсии (SUDEP); синдром слабости синусового узла 1; аутизм или злокачественные мигрирующие парциальные приступы младенчества.

37. Способ по п.36, при котором GEFS+ представляет собой генерализованную эпилепсию с фебрильными судорогами плюс типа 2.

38. Способ по п.36, при котором фебрильные судороги представляют собой фебрильные судороги, семейные, 3A.

39. Способ по п.36, при котором SMEB представляет собой SMEB без генерализованной спайк-волны (SMEB-SW), SMEB без миоклонических судорог (SMEB-M), SMEB без более чем одного признака SMEI (SMEB-O) или стойкую эпилепсию детей с генерализованными тонико-клоническими судорогами (ICEGTC).

40. Способ по п.32, при котором терапевтическое средство способствует исключению экзона NMD из процессированной мРНК, кодирующей белок Nav1.1, и увеличивает экспрессию SCN1A в клетке.

41. Способ по п.1 или 2, при котором ASO содержит модификацию остова, содержащую фосфоротиоатную связь или фосфородиамидатную связь.

42. Способ по п.1 или 2, при котором ASO содержит фосфородиамидат морфолино, блокированную нуклеиновую кислоту, пептидную нуклеиновую кислоту, 2'-O-метил, 2'-фтор или 2'-O-метоксиэтильный фрагмент.

43. Способ по п.1 или 2, при котором ASO содержит по меньшей мере один модифицированный фрагмент сахара.

44. Способ по п.1 или 2, при котором ASO состоит из от 8 до 50, от 8 до 40, от 8 до 35, от 8 до 30, от 8 до 25, от 8 до 20, от 8 до 15, от 9 до 50, от 9 до 40, от 9 до 35, от 9 до 30, от 9 до 25, от 9 до 20, от 10 до 50, от 10 до 40, от 10 до 35, от 10 до 30, от 10 до 25, от 10 до 20, от 10 до 15, от 11 до 50, от 11 до 40, от 11 до 35, от 11 до 30, от 11 до 25, от 11 до 20, от 11 до 15, от 12 до 50, от 12 до 40, от 12 до 35, от 12 до 30, от 12 до 25 или от 12 до 15 нуклеотидных оснований.

45. Способ по п.3, при котором ASO по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 98, по меньшей мере на 99 или на 100% комплементарен целевой части кодирующей белок Nav1.1 пре-мРНК.

46. Способ по п.1, причем способ дополнительно предусматривает оценку экспрессии мРНК или белка SCN1A.

47. Способ по п.2, при котором субъект представляет собой человека.

48. Способ по п.2, при котором субъект представляет собой отличного от человека животного.

49. Способ по п.2, при котором субъект представляет собой плод, эмбрион или ребенка.

50. Способ по п.1 или 2, при котором клетки находятся ex vivo.

51. Способ по п.2, при котором терапевтическое средство вводят субъекту путем интратекальной инъекции, интрацеребровентрикулярной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутримышечной инъекции, подкожной инъекции, интравитреальной или внутривенной инъекции.

52. Способ по п.2, причем способ дополнительно предусматривает введение второго терапевтического средства субъекту.

53. Способ по п.52, при котором второе терапевтическое средство представляет собой небольшую молекулу.

54. Способ по п.52, при котором второе терапевтическое средство представляет собой ASO.

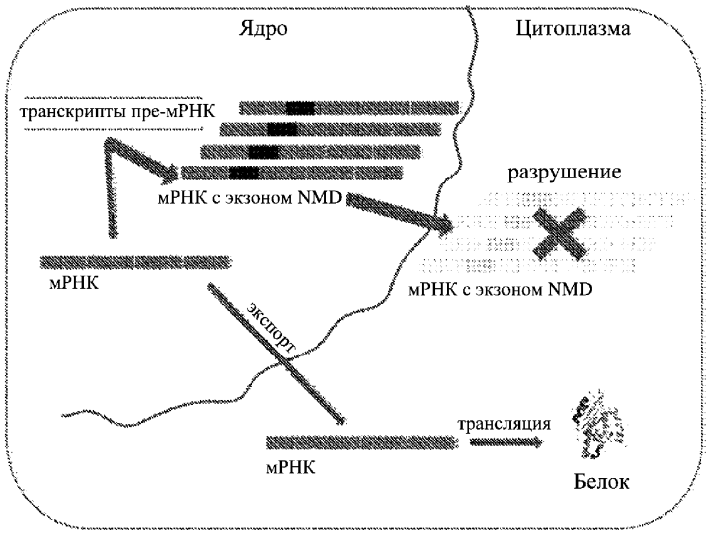
55. Способ по п.54, при котором ASO содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80, 85, 90, 95, 97 или 100% комплементарна любой из SEQ ID NO: 115-161.

56. Способ по п.52, при котором второе терапевтическое средство устраняет удержание интрона.

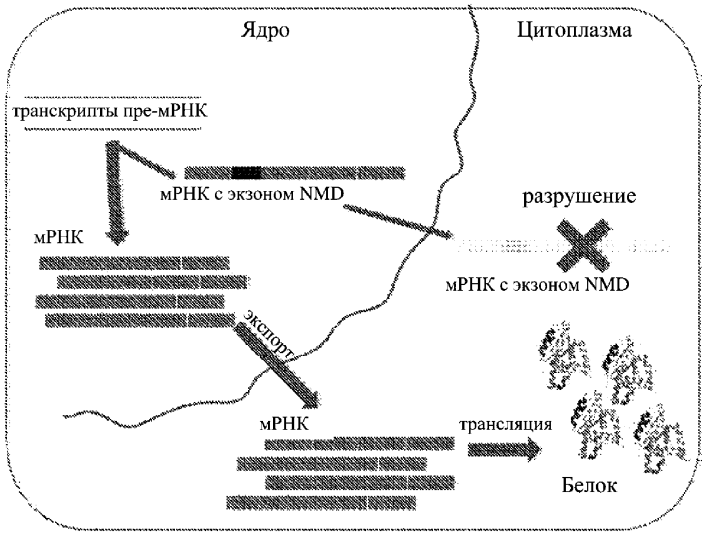
57. Способ по п.2, при котором заболевание или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, энцефалопатию SCN2A, энцефалопатию SCN8A или аритмию SCN5A.

58. Способ по п.28 или 30, при котором заболевание или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера, энцефалопатию SCN2A, энцефалопатию SCN8A или аритмию SCN5A.

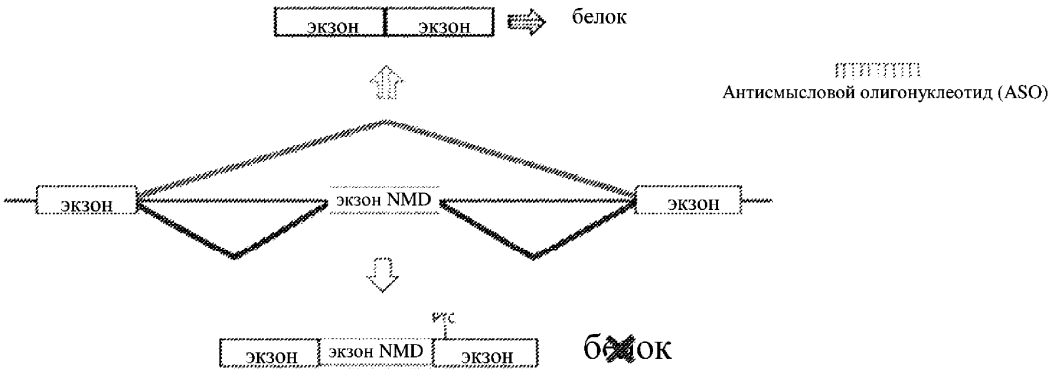
59. Способ по п.1 или 2, при котором ASO связан с фрагментом, который включает в себя нуклеотид с удаленным азотистым основанием, простой полиэфир, полиамин, полиамид, пептид, углевод, липид или полиуглеродное соединение или антитело к рецептору трансферрина.



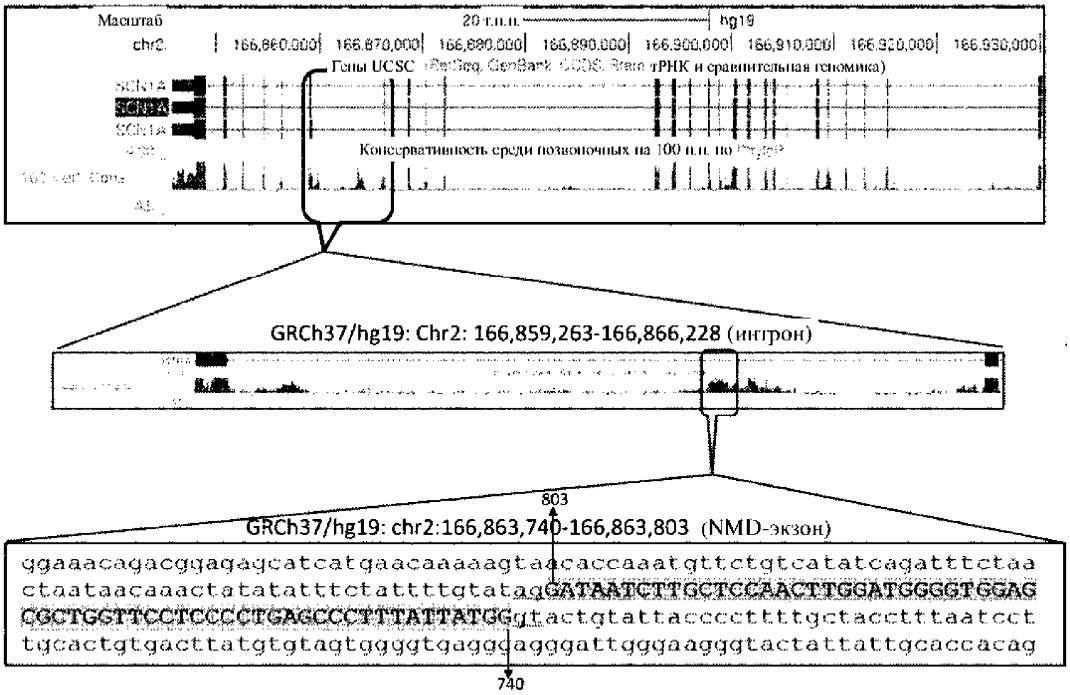
Фиг. 1A



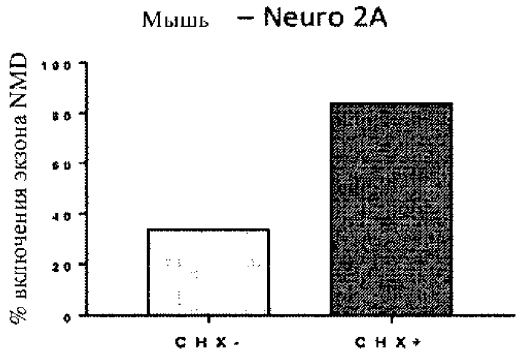
Фиг. 1B



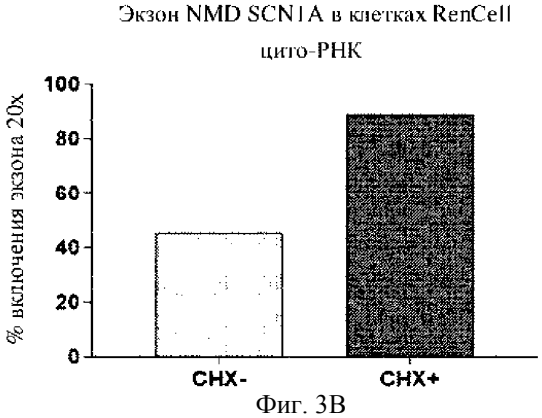
Фиг. 1C



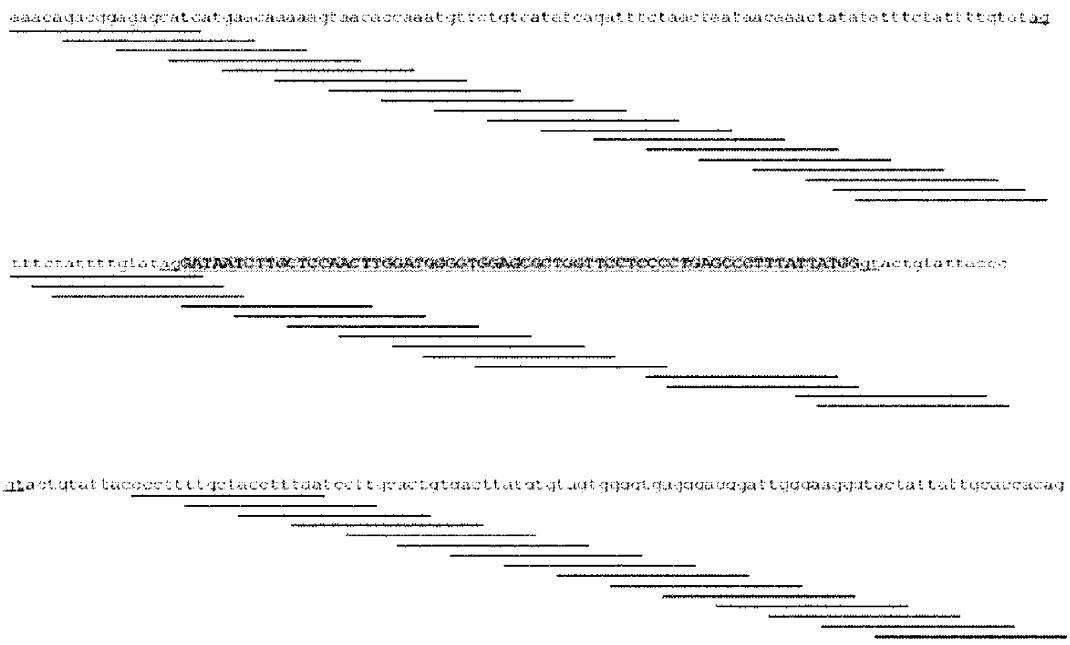
Фиг. 2



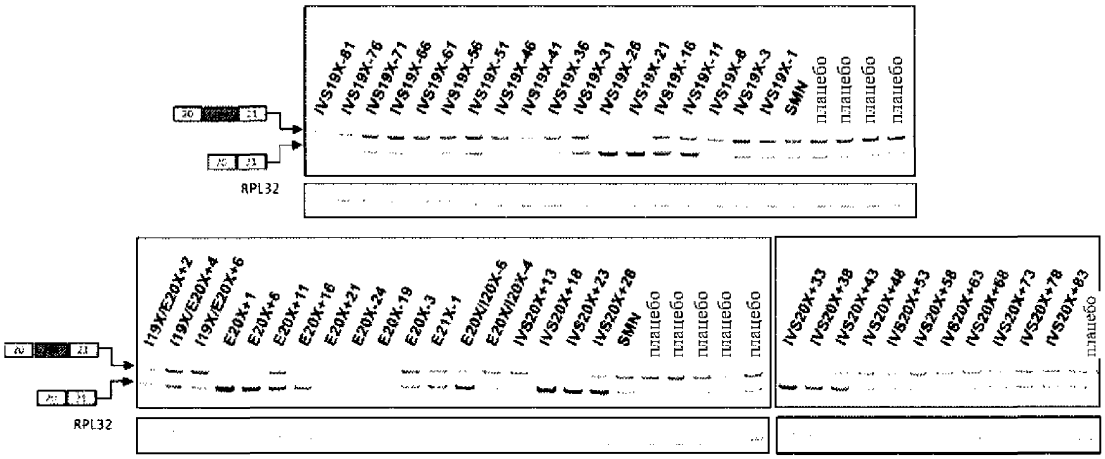
Фиг. 3A



Фиг. 3B



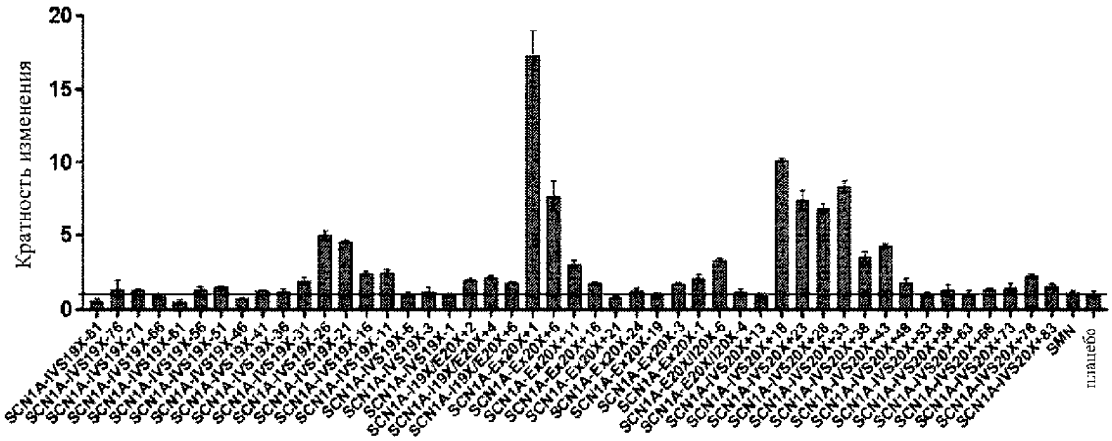
Фиг. 4



Фиг. 5A

Фиг. 5B

Фиг. 5C



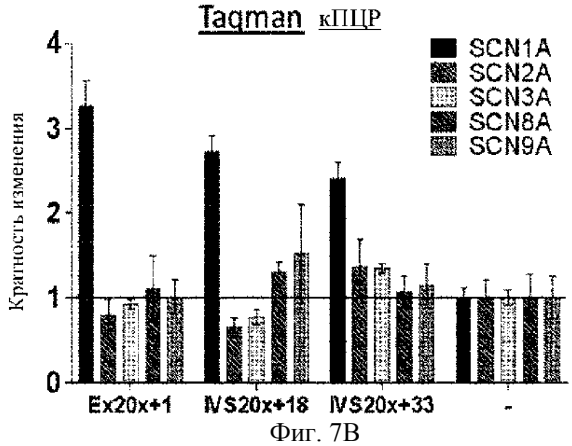
Фиг. 6

Альфа-субъединица натриевого потенциалзависимого канала

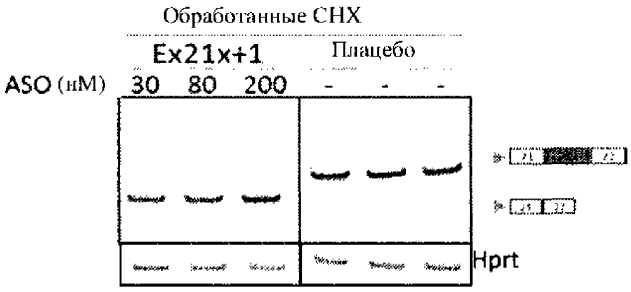
Ген	Утвержденное название	Хромосома	
SCN1A	Альфа-субъединица 1 натриевого потенциалзависимого канала	2q24.3	←
SCN2A	Альфа-субъединица 2 натриевого потенциалзависимого канала	2q24.3	←
SCN3A	Альфа-субъединица 3 натриевого потенциалзависимого канала	2q24.3	←
SCN7A	Альфа-субъединица 7 натриевого потенциалзависимого канала	2q24.3	X
SCN8A	Альфа-субъединица 8 натриевого потенциалзависимого канала	12q13.13	←
SCN9A	Альфа-субъединица 9 натриевого потенциалзависимого канала	2q24.3	←
SCN10A	Альфа-субъединица 10 натриевого потенциалзависимого канала	3p22.2	X
SCN11A	Альфа-субъединица 11 натриевого потенциалзависимого канала	3p22.2	X

X: экспрессия не обнаружена

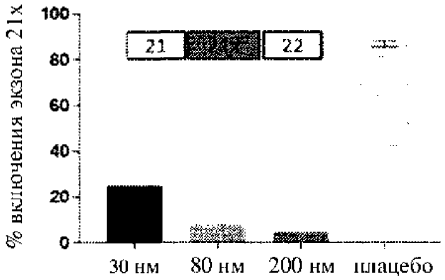
Фиг. 7A



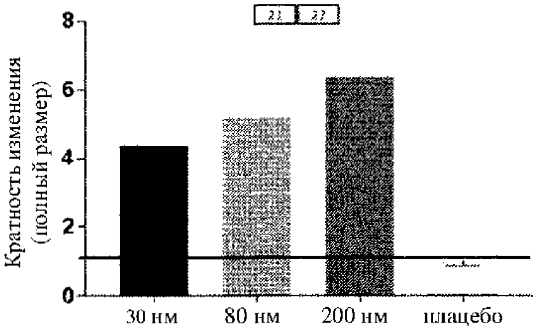
Фиг. 7B



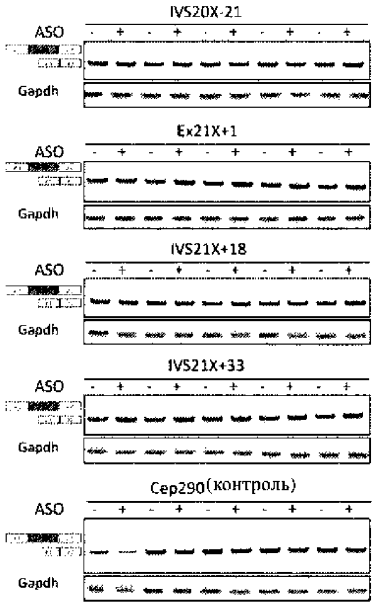
Фиг. 8A



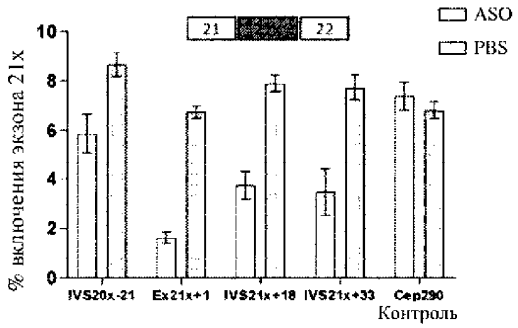
Фиг. 8B



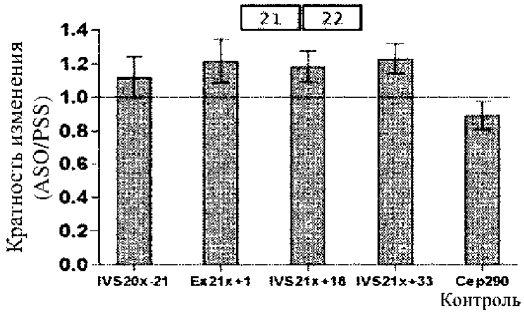
Фиг. 8C



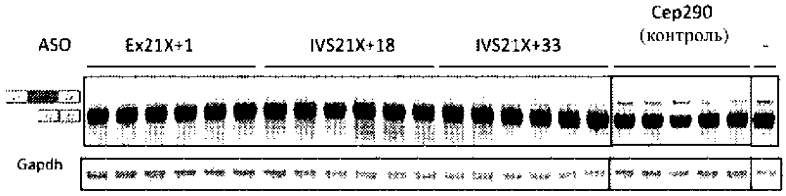
Фиг. 9A



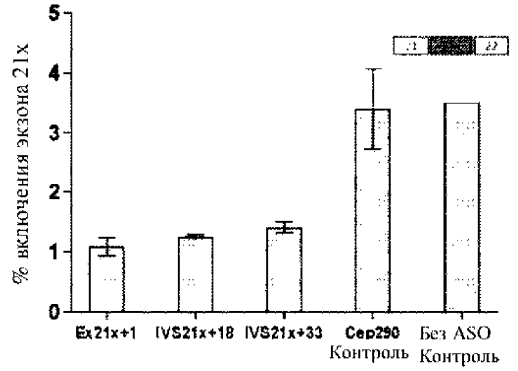
Фиг. 9B



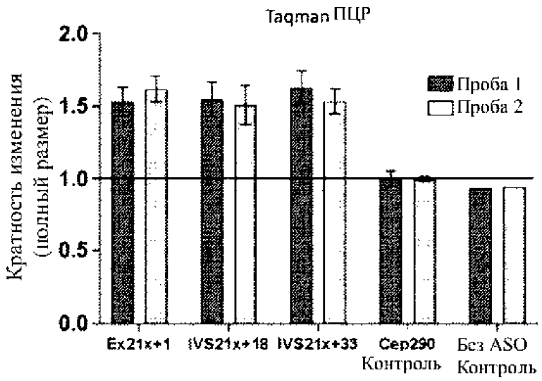
Фиг. 9C



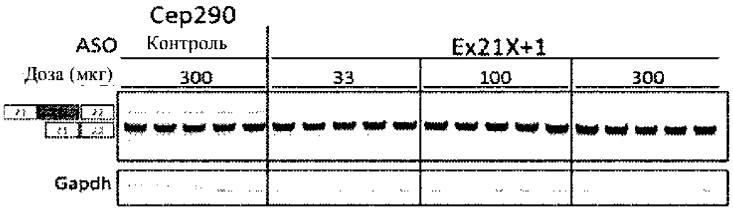
Фиг. 10A



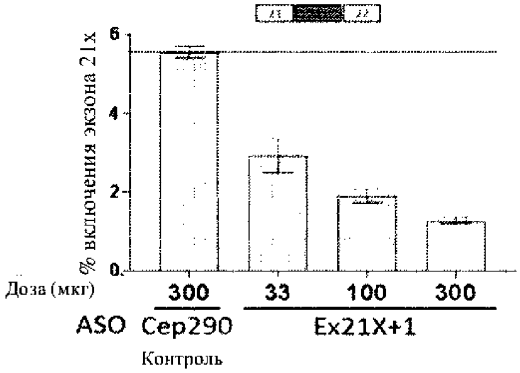
Фиг. 10B



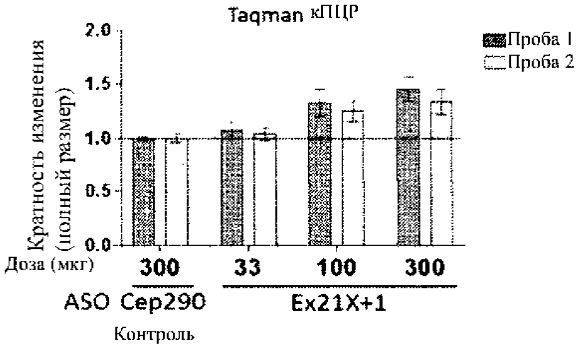
Фиг. 10C



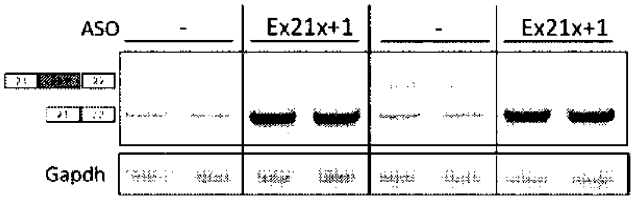
Фиг. 11A



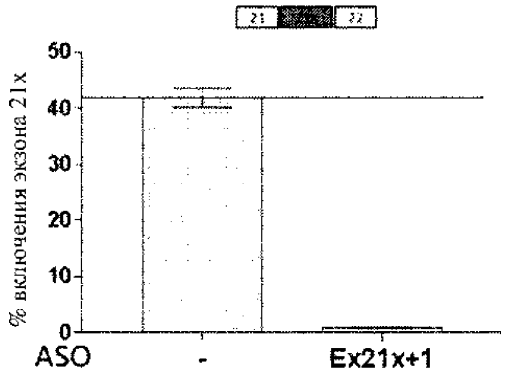
Фиг. 11B



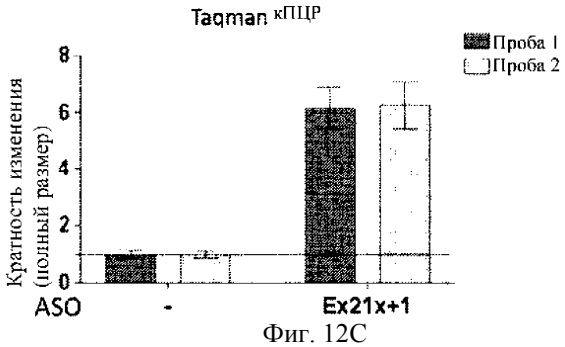
Фиг. 11C



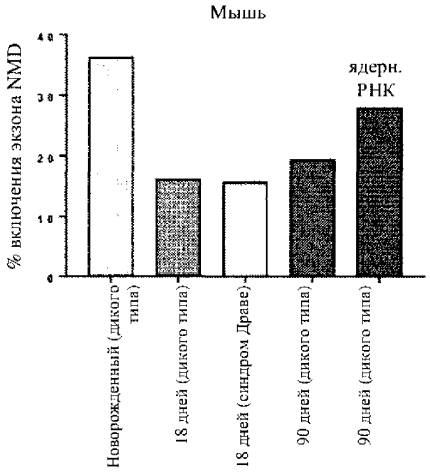
Фиг. 12A



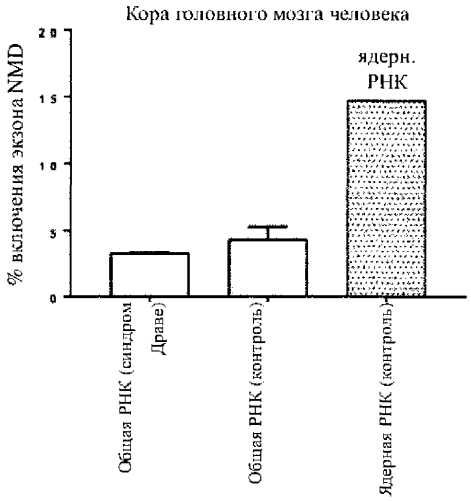
Фиг. 12B



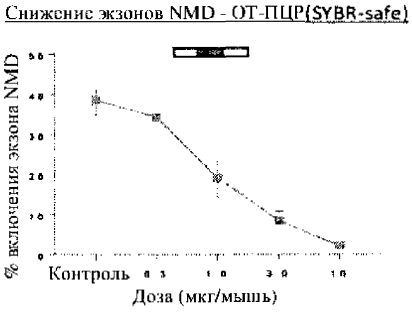
Фиг. 12C



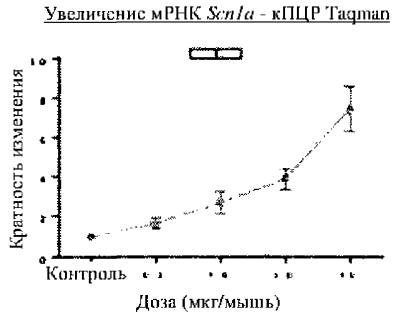
Фиг. 13A



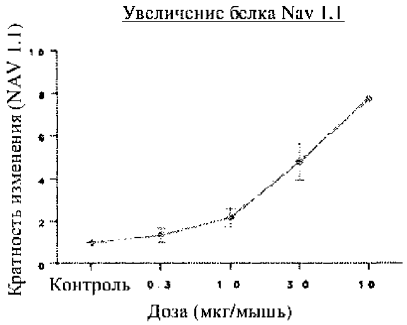
Фиг. 13B



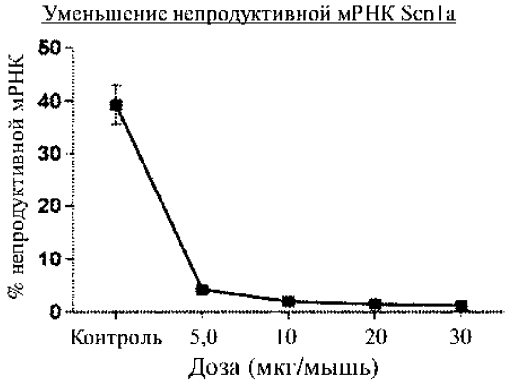
Фиг. 14A



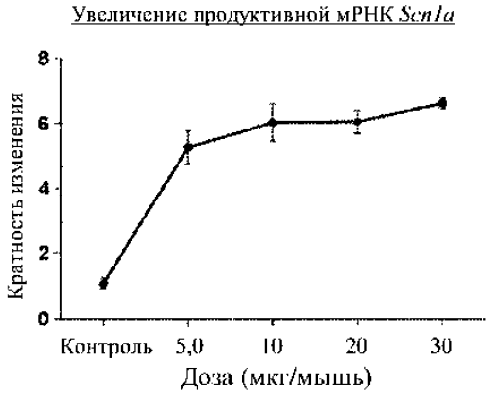
Фиг. 14B



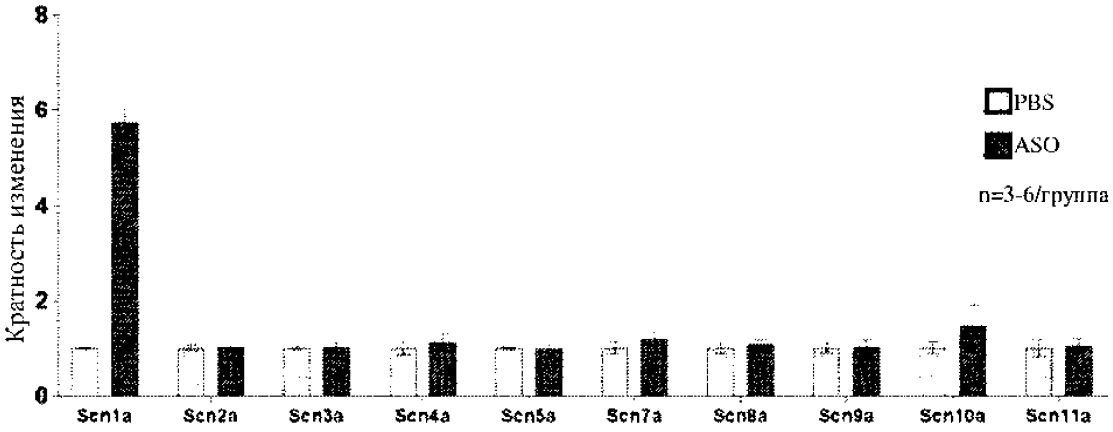
Фиг. 14C



Фиг. 15A

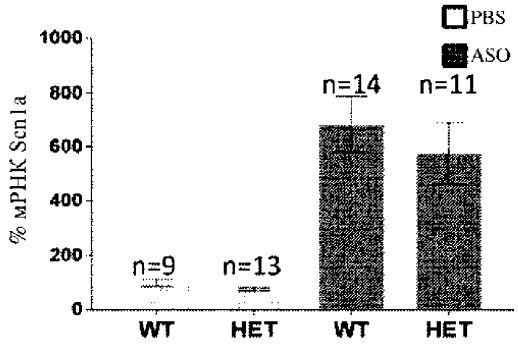


Фиг. 15B



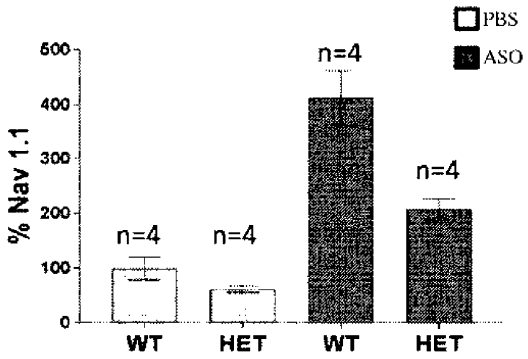
Фиг. 16

Увеличение мРНК *Scn1a* - кПЦР Taqman

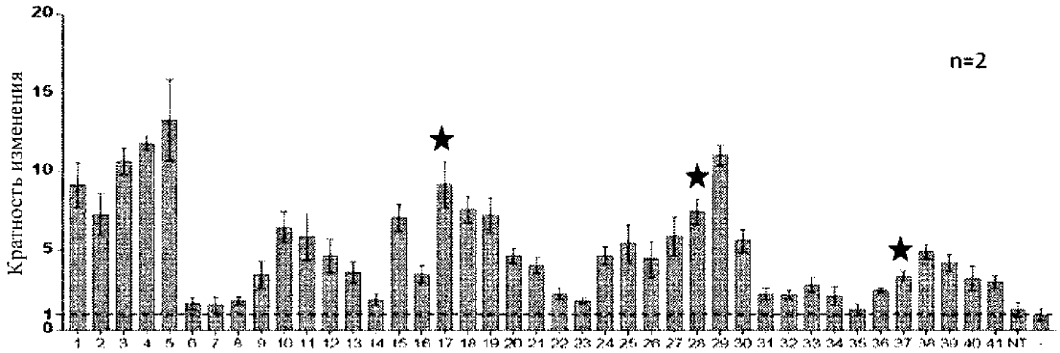


Фиг. 17A

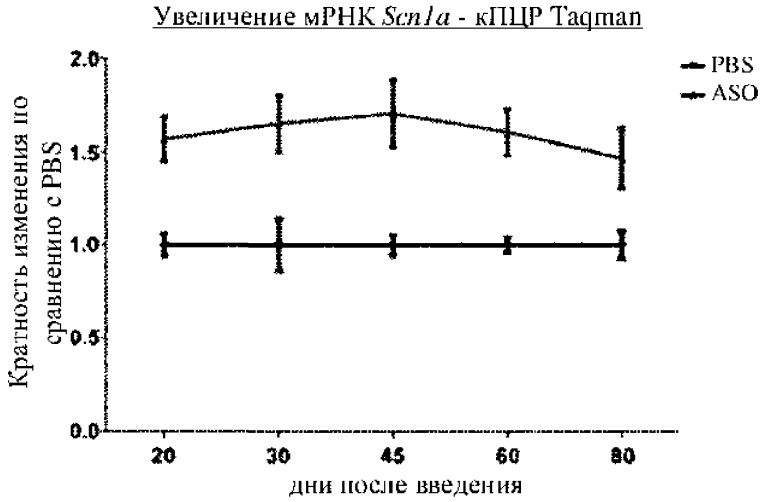
Увеличение белка Na_v 1.1 - Вестерн блоттинг



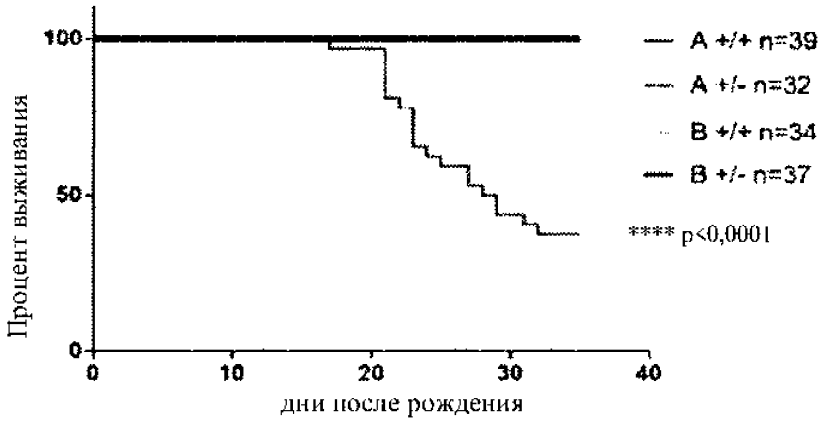
Фиг. 17B



Фиг. 18


Увеличение мРНК *Scn1a* - кПЦР Taqman
PBS
ASO
Кратность изменения по сравнению с PBS
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
20
30
45
60
80
дни после введения

Фиг. 19


A +/+ n=39
A +/- n=32
B +/+ n=34
B +/- n=37
**** p<0,0001
Процент выживания
100
50
0
0
10
20
30
40
дни после рождения

Фиг. 20