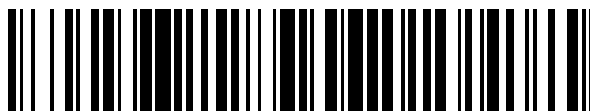


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 499**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2014** **PCT/EP2014/064604**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015** **WO15004133**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2014** **E 14737236 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 3019610**

54 Título: **Procedimientos de realización de la omisión de exón mediada por oligonucleótidos antisentido en la retina de un sujeto que lo necesita**

30 Prioridad:

08.07.2013 EP 13305968

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.11.2020

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

FONDATION IMAGINE (25.0%);

UNIVERSITÉ DE PARIS (25.0%) y

ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS

(APHP) (25.0%)

72 Inventor/es:

ROZET, JEAN-MICHEL;

PERRAULT, ISABELLE;

GERARD, XAVIER;

KAPLAN, JOSSELINE y

MUNNICH, ARNOLD

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 794 499 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de realización de la omisión de exón mediada por oligonucleótidos antisentido en la retina de un sujeto que lo necesita

CAMPO DE LA INVENCION:

[0001] La presente invención se refiere a procedimientos para realizar la omisión de exón mediada por oligonucleótidos antisentido en la retina de un sujeto que lo necesita.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

[0002] El genoma humano consiste en 20.000 a 25.000 genes que codifican proteínas, pero el repertorio de secuencias de ARNm y proteínas codificadas es mucho mayor como resultado de múltiples isoformas de ARN generadas a partir de cada gen. La diversidad de transcritos de ARN evoluciona a partir de varios mecanismos, pero el splicing alternativo de ARN representa un factor principal que impulsa la diversidad fenotípica en eucariotas superiores. De hecho, los eventos de splicing son altamente prevalentes, se estima que se producen para el 95 % de todos los genes multiexón. Se observan numerosos modos de splicing alternativo de ARN, de los cuales el más común es la omisión de exón. En este modo, un exón particular puede incluirse en ARNm en algunas condiciones o en tejidos particulares, y omitirse del ARNm en otras. La mayoría de los eventos de splicing alteran la proteína codificada, provocando más de la mitad un cambio en el marco de lectura del ARNm. Las variantes genéticas comunes pueden permitir cambios en el splicing alternativo dentro de un intervalo fisiológico "normal". Sin embargo, las variaciones anormales en el splicing están implicadas en una gran proporción de los trastornos genéticos humanos, y en particular las enfermedades de la retina; más del 50 % de las enfermedades con componentes genéticos implican mutaciones de splicing. Las mutaciones que causan el splicing aberrante típicamente resultan en una proteína no funcional o una desintegración de ARN mediada sin sentido, si un cambio de fase de codón introduce señales de terminación prematura.

[0003] Las mutaciones en genes específicos de la capa interna de la retina pueden provocar enfermedades retinianas hereditarias (IRD), por ejemplo, ceguera nocturna congénita estacionaria (células bipolares), neuropatías ópticas hereditarias (células ganglionares de la retina), pero en la mayoría de los casos la causa es la mutación en los genes expresados en el fotorreceptor o las células epiteliales de pigmento retiniano (RPE). Se han identificado mutaciones en más de 200 genes que causan IRD (<http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>) con un intervalo de patrones de herencia exhibidos. La IRD más común es la retinitis pigmentaria, para la cual se han asociado al menos 30 genes. Alrededor del 10 % de los casos de enfermedad retiniana son el resultado de la distrofia retiniana de inicio temprano. Por ejemplo, la amaurosis congénita de Leber (LCA, MIM204000) es una causa común de ceguera en la infancia (10 %). Es la distrofia retiniana hereditaria más grave, responsable de la ceguera o la deficiencia visual profunda al nacer o en los primeros meses de vida. En los meses siguientes, la enfermedad se presentará como una enfermedad de cono-bastón considerablemente grave y estacionaria con agudeza visual extremadamente pobre ($AV \leq$ percepción de luz; tipo I) o una distrofia progresiva, pero grave, de cono-bastón con agudeza visual mensurable la primera década de la vida ($20/200 \leq AV \leq 60/200$; tipo II). Hasta ahora, se han presentado alteraciones de 18 genes con patrones muy variables de distribución y funciones tisulares en LCA (Kaplan, J. Ophthalmic Genet. 29, 92-8 (2008); den Hollander, Al y col. Prog Retin Eye Res. 27, 391-419 (2008); Perrault, I y col. Nat Genet (2012)). En los países occidentales, las mutaciones que afectan la proteína centrosomal 290 (CEP290) son la causa principal de la enfermedad (20 %) (den Hollander, Al y col. Am J Hum Genet. 79, 556-61 (2006); Perrault, I y col. Hum Mutat. 28, 416 (2007)). Entre ellas, la mutación c.2991+1655 A > G representa más del 10 % de todos los casos de LCA, lo que hace que este cambio sea una diana importante para la terapia. La mutación se encuentra en el interior del intrón 26 y crea un fuerte sitio de splicing de donantes aguas abajo de un fuerte sitio de splicing aceptor críptico. Como resultado, además de los mensajeros de tipo silvestre, los ARNm mutantes se transcriben del alelo mutante. Los ARNm mutantes incluyen un exón adicional que codifica un codón de parada.

[0004] Teniendo en cuenta el potencial de la omisión de exón como un medio para evitar los truncamientos de proteínas resultantes de una mutación, la estrategia de omisión de exón mediada por oligonucleótidos antisentido se investiga actualmente para corregir el splicing aberrante en la retina de un sujeto que padece una enfermedad de la retina. Esta estrategia parece particularmente prometedora. De hecho: 1) recientemente se presentaron resultados espectaculares en pacientes con distrofia muscular de Duchenne que recibieron inyecciones musculares de oligonucleótidos antisentido terapéuticos para omitir los exones mutantes de DMD (Heemskerk y col., Ann NY Acad Sci. 2009), 2) la proteína de tipo silvestre es expresada a partir del alelo mutante (en pequeñas cantidades) que evita el riesgo de respuesta inmune después de la omisión de exón. Así, recientemente se presentó la prueba de concepto de omisión de exón mediada por oligonucleótidos antisentido para corregir la mutación CEP290 intrónica profunda común en fibroblastos de pacientes con LCA que recuperaron el control del ARNm de tipo silvestre y la capacidad de abundancia de proteínas y ciliación (Gerard y col., 2012 MTNA), 3) el ojo es un órgano pequeño, confinado e inmune privilegiado y, por lo tanto, se requieren dosis bajas de AON para obtener un efecto terapéutico, reduciendo así el riesgo de diseminación del producto en la circulación general, 4) en murinos, conejos y primates las inyecciones intravítreas de oligonucleótidos antisentido estabilizados permite una amplia distribución con concentraciones

sostenidas en toda la capa retiniana durante varias semanas (Rakoczy y col., 1996; Leeds y col., 1998; Shen y col., 2002), 5) la seguridad y eficacia de las inyecciones intravítreas repetidas de AON Vitravene® aprobados por la FDA para interferir con el ARNm de citomegalovirus en pacientes inmunocomprometidos se vio afectada por la retinitis y 6) los AON se pueden suministrar alternativamente utilizando inyecciones intravítreas únicas, o inyecciones subretinianas cuya eficacia y seguridad a medio plazo se ha demostrado en ensayos clínicos de RPE65 (Bainbridge y col., N Engl J Med. 2008; Hauswirth y col., Hum Gene Ther., 2008; Maguire y col., N Engl J Med., 2008; Maguire y col., Lancet., 2009).

[0005] Los principales inconvenientes del suministro adenoviral de AON en las células de la retina externa (fotorreceptores y RPE) son 1) prejuicio técnico: solo es posible alcanzar la transducción de las células de la retina externa a través de una inyección subretiniana que provoca el desprendimiento de la retina con posibles efectos adversos graves, 2) limitaciones técnicas: desprendimiento de retina limitado y, por lo tanto, distribución limitada de partículas adenovirales; necesidad de adaptar el serotipo AAV que transduce eficientemente las células retinianas diana y (Dalkara y col., Gene Ther., 2012) 3) incertidumbres médicas: ausencia de aclaramiento de la partícula adenoviral en la retina; posible expresión ectópica de una proteína específica de la retina (Stieger y col., Mol Ther., 2008) que podría conducir al aumento de anticuerpos que podrían atacar la retina (por ejemplo, retinopatía asociada al cáncer debido a la expresión ectópica de recobro por el tumor, Matsubara y col., Br J Cancer., 1996).

RESUMEN DE LA INVENCION:

[0006] Los inventores ahora superan los prejuicios y las limitaciones demostrando sorprendentemente que es posible realizar la omisión de exón mediada por oligonucleótidos antisentido en la retina con inyecciones intravítreas del oligonucleótido antisentido. Los resultados, aunque preliminares, proporcionan evidencia primera y muy convincente para la prueba de concepto del uso de esta estrategia para modificar el splicing de pre-ARNm en el núcleo de todas las capas de células de retina, incluidas las células fotorreceptoras. En consecuencia, la presente invención está definida por las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

30 Definiciones:

[0007] Como se usa en esta invención, los términos "ARNm precursor" o "pre-ARNm" se refieren a una cadena única inmadura de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que contiene una o más secuencias intervinientes (intrones). El pre-ARNm se transcribe por una ARN polimerasa de una plantilla de ADN en el núcleo celular y está compuesto por secuencias alternas de intrones y regiones codificantes (exones). Una vez que un pre-ARNm ha sido completamente procesado por el splicing de intrones y la unión de exones, se lo denomina "ARN mensajero" o "ARNm", que es un ARN compuesto exclusivamente por exones. Los pre-ARNm eucarióticos existen solo de forma transitoria antes de procesarse completamente en ARNm. Cuando un pre-ARNm se ha procesado adecuadamente en una secuencia de ARNm, se exporta fuera del núcleo y con el tiempo se traduce en una proteína por los ribosomas en el citoplasma.

[0008] Como se usa en esta invención, el término "splicing" se refiere a la modificación de un pre-ARNm después de la transcripción, en el que se eliminan los intrones y se unen los exones. El splicing se produce en una serie de reacciones que son catalizadas por un gran complejo de ARN-proteína compuesto por cinco pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP) denominadas spliceosoma y más de otros 100 factores (Will et Lihmann, Curr Opin Cell Biol. 2001). Dentro de un intrón, se requieren un sitio de splicing de 3', un sitio de splicing de 5' y un sitio de ramificación para el splicing. Los cofactores de splicing (por ejemplo, proteínas serina-arginina, SR; las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas, hnRNP) se unen a su motivo de reconocimiento en el pre-ARNm (secuencias intrónicas y exónicas) para gestionar el reclutamiento de UsnRNP. Los componentes de ARN de las snRNP interactúan con el intrón y pueden participar en la catálisis. El splicing del pre-ARNm implica dos reacciones bioquímicas secuenciales. Ambas reacciones implican la transesterificación spliceosomal entre nucleótidos de ARN. En una primera reacción, el 2'-OH de un nucleótido de punto de ramificación específico dentro de un intrón, que se define durante el ensamblaje del spliceosoma, realiza un ataque nucleofílico en el primer nucleótido del intrón en el sitio de splicing 5' formando un intermediario lariat. En una segunda reacción, el 3'-OH del exón 5' liberado realiza un ataque nucleofílico en el último nucleótido del intrón en el sitio de splicing 3', uniéndose así a los exones y liberando el lariat del intrón. El splicing del pre-ARNm también está regulado por una secuencia reguladora intrónica y exónica, es decir, silenciador de secuencia intrónica (ISS), potenciador de secuencia intrónica (ISE), silenciador de secuencia exónica (ESS), potenciador de secuencia exónica (ESE), y secuencias del bucle del tallo terminal (TSL). Como se usa en esta invención, los términos "silenciador de secuencia intrónica (ISS)", "potenciador de secuencia intrónica (ISE)", "silenciador de secuencia exónica (ESS)", "potenciador de secuencia exónica (ESE)" y "bucle de tallo terminal (TSL)" se refieren a elementos de secuencia dentro de intrones o exones que controlan el splicing alternativo mediante la unión de factores de proteínas de acción trans dentro de un pre-ARNm, lo que da como resultado el uso diferencial de sitios de splicing. Típicamente, las secuencias silenciadoras intrónicas tienen entre 8 y 16 nucleótidos y están menos conservadas que los sitios de splicing en las uniones exón-intrón. Las secuencias del bucle del tallo terminal están típicamente entre 12 y 24 nucleótidos y forman una estructura de bucle secundaria debido a la complementariedad y,

por lo tanto, a la unión, dentro de la secuencia de 12-24 nucleótidos. La existencia de otras secuencias de regulación también se ha demostrado e incluye *Exonic Splicing Enhancer* (ESE) y *Exonic Splicing Silencer* (ESS) (Liu y col., Genes Dev., 1998; Cartegni et Krainer, Nat Genet, 2002; Wang et Burge, RNA, 2008).

5 **[0009]** Como se usa en esta invención, la expresión "omisión de exón" se refiere a la modificación del splicing del pre-ARNm mediante la dirección del donante y/o aceptor de splicing y los sitios de ramificación dentro de un pre-ARNm con uno o más oligonucleótidos antisentido complementarios (AON). Al bloquear el acceso de un spliceosoma a uno o más sitios de donante, aceptor o sitio de ramificación, un AON puede evitar una reacción de splicing, causando así la exclusión de uno o más exones de un ARNm completamente procesado. La omisión de exón se logra en el
10 núcleo durante el procedimiento de maduración de los pre-ARNm. Incluye el enmascaramiento de secuencias clave involucradas en el splicing de exones dirigidos mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (AON) que son complementarios al donante/aceptor de splicing, secuencias de punto de ramificación y/o al solapar ESE (en exón)/ISE (en intrón) dentro de un pre-ARNm.

15 **[0010]** Como se usa en esta invención, el término "oligonucleótido antisentido (AON)" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de interactuar y/o hibridarse con un pre-ARNm o un ARNm que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria, modificando así la expresión génica. Típicamente, el oligonucleótido antisentido es complementario a la secuencia de ácido nucleico que es necesaria para evitar el splicing del exón diana incluyendo el exón crítico, el exón suplementario, el pseudo-exón o la secuencia de intrón retenida después del splicing.

20 **[0011]** Como se usa en esta invención, "complementario" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno con otra molécula de ácido nucleico mediante el emparejamiento de bases Watson-Crick tradicional u otros tipos de emparejamiento no tradicionales (por ejemplo, Hoogsteen o enlace de hidrógeno Hoogsteen invertido) entre nucleósidos o nucleótidos complementarios. En referencia al AON de la presente descripción, la energía libre de unión para un AON con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que continúe la función relevante del AON y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del AON a secuencias no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de un tratamiento terapéutico *in vivo*. La determinación de las energías libres de unión para las moléculas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Turner y col., CSH
25 Symp. Quant. Biol. 1/7: 123-133 (1987); Frier y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83: 9373-77 (1986) y Turner y col., J. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785 (1987)). Por lo tanto, "complementario" (o "específicamente hibridable") son términos que indican un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de manera que se produce una unión estable y específica entre un AON y una diana de pre-ARNm o ARNm. Se entiende en la técnica que una molécula de ácido nucleico no necesita ser 100 % complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana para ser
35 específicamente hibridable. Es decir, dos o más moléculas de ácido nucleico pueden ser menos que completamente complementarias. La complementariedad está indicada por un porcentaje de residuos contiguos en una molécula de ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno con una segunda molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, si una primera molécula de ácido nucleico tiene 10 nucleótidos y una segunda molécula de ácido nucleico tiene 10 nucleótidos, a continuación, el emparejamiento de bases de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos entre la primera y la segunda
40 molécula de ácido nucleico representa el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 % de complementariedad, respectivamente. Moléculas de ácido nucleico complementarias "perfectamente" o "completamente" significa aquellas en las que todos los residuos contiguos de una primera molécula de ácido nucleico se unirán por hidrógeno con el mismo número de residuos contiguos en una segunda molécula de ácido nucleico, donde ambas moléculas de ácido nucleico tienen la misma cantidad de nucleótidos (es decir, la misma longitud) o las dos moléculas tienen diferentes
45 longitudes.

[0012] En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en esta invención, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso, o prevenir el trastorno o afección a la que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección (por ejemplo, enfermedades degenerativas o estacionarias de la retina).

50 **[0013]** Según la invención, el término "sujeto" o "paciente que lo necesita" está destinado a un mamífero humano o no humano afectado o que pueda verse afectado por una enfermedad de la retina.

Procedimientos de la invención:

55 **[0014]** La presente invención se refiere a un procedimiento para realizar la omisión de exón mediada por oligonucleótidos antisentido en una célula fotorreceptora de un sujeto que lo necesita, que comprende la etapa de inyectar en el vítreo del sujeto una cantidad del oligonucleótido antisentido, donde el sujeto padece una enfermedad de la retina causada por una mutación que modificaba el splicing y/o crea una terminación prematura en un gen
60 importante para el funcionamiento y/o la supervivencia de la célula fotorreceptora y donde el oligonucleótido antisentido desnudo realiza la omisión de exón mediada por oligonucleótidos antisentido en el pre-ARN del gen cuya mutación causa la enfermedad de la retina, en la célula fotorreceptora del sujeto.

[0015] El procedimiento es particularmente adecuado para el tratamiento de una enfermedad de la retina. De
65 hecho, el procedimiento de la invención es particularmente adecuado para un gen mutado que causa una enfermedad

de la retina. Por ejemplo, las enfermedades de la retina incluyen, pero no se limitan a las enfermedades presentadas en la tabla A. En una realización, la enfermedad de la retina es una enfermedad estacionaria de la retina o una enfermedad degenerativa de la retina.

5 **[0016]** La enfermedad degenerativa de la retina incluye, pero no se limita a, la retinitis pigmentaria, la degeneración macular relacionada con la edad, el síndrome de Bardet-Biedel, el síndrome de Bassen-Kornzweig, la enfermedad de Best, la coroidema, la atrofia del giro, la amaurosis congénita de Leber, el síndrome de Refsum, la enfermedad de Stargardt, el síndrome de Usher o las neuropatías ópticas hereditarias (HON). La enfermedad estacionaria de la retina incluye, pero no se limita a, la ceguera nocturna congénita estacionaria (CSNB), la
10 discromatopsia o la acromatopsia.

[0017] En una realización, la enfermedad de la retina es la amaurosis congénita de Leber asociada con la mutación c.2991+1655 A > G.

15 **[0018]** Los AON usados en la práctica de la invención pueden ser de cualquier tipo adecuado, por ejemplo, oligodesoxirribonucleótidos, oligoribonucleótidos, morfolinos, oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN, AON mediados por U7 o U1 o productos conjugados de los mismos, tales como AON conjugados con péptidos o en complejo con nanopartículas. Los AON empleados en la práctica de la invención tienen generalmente una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, y pueden tener, por ejemplo, aproximadamente 10 o menos,
20 o aproximadamente 15, o aproximadamente 20 o aproximadamente 30 nucleótidos o más de longitud. La longitud óptima de los AON para una secuencia complementaria dirigida está generalmente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de largo dependiendo de la cadena principal química utilizada y de la secuencia diana. Típicamente, los morfolino-AON tienen aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, los 2'PMO-AON tienen aproximadamente 20 nucleótidos de longitud y los triciclo-AON tienen aproximadamente 15 nucleótidos de longitud.

25 **[0019]** Para su uso en la presente invención, los AON de la invención pueden sintetizarse *de novo* usando cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento de b-cianoetil fosforamidita (Beaucage y col., 1981); el procedimiento de nucleósido H-fosfonato (Garegg y col., 1986; Froehler y col., 1986, Garegg y col., 1986, Gaffney y col., 1988). Estas químicas pueden realizarse mediante una diversidad de sintetizadores automáticos de ácido nucleico disponibles en el mercado. Estos ácidos nucleicos pueden denominarse
30 ácidos nucleicos sintéticos. Alternativamente, los AON se pueden producir a gran escala en plásmidos (véase Sambrook, y col., 1989). Los AON pueden prepararse a partir de secuencias de ácido nucleico existentes utilizando técnicas conocidas, tales como las que emplean enzimas de restricción, exonucleasas o endonucleasas. Los AON preparados de esta forma pueden denominarse ácidos nucleicos aislados.

35 **[0020]** Para su uso *in vivo*, los AON pueden estar o están estabilizados. Un AON "estabilizado" se refiere a un AON que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, a través de una exo o endo-nucleasa). La estabilización puede ser una función de longitud o estructura secundaria. Alternativamente, la estabilización de AON se puede lograr a través de modificaciones de la cadena principal de fosfato. Los AON estabilizados preferidos de la
40 presente invención tienen una cadena principal modificada, por ejemplo, tienen enlaces de fosforotioato para proporcionar una actividad máxima y proteger el AON de la degradación por exo y endo-nucleasas intracelulares. Otras posibles modificaciones estabilizadoras incluyen modificaciones de fosfodiéster, combinaciones de modificaciones de fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-etoxi y combinaciones de los mismos. Las versiones químicamente estabilizadas y modificadas de los AON también incluyen
45 "morfolinos" (oligómeros de morfolino fosforodiamidato, PMO), oligómeros 2'-O-Met, los triciclo (tc)-ADN, los ARN pequeño nuclear (pn) U7, o moléculas oligoantisentido de triciclo-ADN (solicitud de patente provisional de los EE.UU. serie n.º 61/212.384 para: Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides, Compositions and Methods for the Treatment of Disease, depositada el 10 de abril de 2009, cuyo contenido completo se incorpora en esta invención como referencia).

50 **[0021]** En una realización particular, los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden ser oligonucleótidos de quimera 2'-O-Me ARN/ENA (Takagi M, Yagi M, Ishibashi K, Takeshima Y, Surono A, Matsuo M, Koizumi M. Design of 2'-O-Me RNA/ENA chimera oligonucleotides to induce exon skipping in dystrophin pre-mRNA. Nucleic Acids Symp Ser (Oxf). 2004(48):297-8).

55 **[0022]** Otras formas de AON que pueden usarse para este efecto son las secuencias de AON acopladas a moléculas de ARN pequeño nuclear como U1 o U7 en combinación con un procedimiento de transferencia viral basado, pero no se limita a, en lentivirus o virus adenoasociado (Denti, MA, y col., 2008; Goyenvallé, A, y col., 2004).

[0023] En una realización particular, los AON también pueden estar acoplados a un péptido (por ejemplo, péptido penetrante) para facilitar la captación celular (Fletcher y col. Mol Ther 2007).
60

[0024] En otra realización particular, los oligonucleótidos antisentido de la invención son oligonucleótidos de 2'-O-metil-fosforotioato.

65 **[0025]** Un experto en la materia puede identificar fácilmente el oligonucleótido antisentido que puede ser

adecuado para llevar a cabo el procedimiento de la invención. Muchos procedimientos y dichos han sido desarrollados para diseñar un AON que pueda dirigir al exón de interés. Por ejemplo, se pueden utilizar el software mfold y el programa ESEfmdr (para más detalles, véase: Gerard y col., 2012). Además, muchos oligonucleótidos antisentido adecuados también se han descrito en la técnica anterior. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido descritos en el documento WO2012168435 pueden ser adecuados para dirigir c.2991+1655 A >G.

[0026] Una característica esencial de la invención es que el oligonucleótido antisentido no se administra en asociación con un vector viral. En consecuencia, el oligonucleótido antisentido se inyecta solo (es decir, "desnudo") en el vítreo del paciente y, por lo tanto, el uso de vectores virales queda excluido del alcance de la invención. Típicamente, los vectores virales incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: virus de ARN tales como un retrovirus (como, por ejemplo, el virus de la leucemia murina de Moloney y los vectores derivados lentivirales), el virus del sarcoma murino de Harvey, el virus del tumor mamario murino y el virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociado; virus de tipo SV40; virus de polio; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes virus vaccinia; virus de la polio. En particular, el uso de adenovirus y virus adenoasociados (VAA), que son virus de ADN que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica quedan excluidos del alcance de la invención.

[0027] Típicamente, el oligonucleótido antisentido se inyecta en el vítreo del paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. Como se usa en esta invención, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de AON que es suficiente, en el sujeto (por ejemplo, humano) al que se administra, para tratar o prevenir la enfermedad de la retina. Un experto en la materia reconocerá que la cantidad de un AON que se administrará será una cantidad suficiente para inducir la mejora de los síntomas de la enfermedad no deseados. Tal cantidad puede variar, entre otras cosas, dependiendo de factores tales como el sexo, la edad, el peso, la condición física general del paciente, etc., y puede determinarse caso por caso. La cantidad también puede variar según el tipo de afección a tratar y los otros componentes de un protocolo de tratamiento (por ejemplo, la administración de otros medicamentos tales como los esteroides, etc.).

[0028] Los expertos en la materia reconocerán que dichos parámetros normalmente se resuelven durante los ensayos clínicos. Además, los expertos en la materia reconocerán que, aunque los síntomas de la enfermedad pueden aliviarse completamente mediante los tratamientos descritos en esta invención, este no tiene por qué ser el caso. Incluso un alivio parcial o intermitente de los síntomas puede ser de gran beneficio para el receptor. Además, el tratamiento del paciente generalmente no es un evento único. Más bien, los AON de la invención probablemente se inyectarán en múltiples ocasiones, que pueden ser, dependiendo de los resultados obtenidos, de varios días de diferencia, varias semanas de diferencia, o varios meses de diferencia, o incluso varios años de diferencia. De hecho, pueden ser necesarias inyecciones intravítreas crónicas del oligonucleótido antisentido para alcanzar un efecto terapéutico a largo plazo. Esto es especialmente cierto cuando se trata el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber, ya que la enfermedad no se cura con este tratamiento, es decir, el gen que codifica la proteína seguirá siendo defectuoso y la proteína codificada seguirá teniendo una característica desestabilizadora no deseada, tal como la exposición de un sitio de reconocimiento proteolítico, a menos que se administren los AON de la invención.

[0029] La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene un oligonucleótido antisentido para su uso en la invención que es compatible para inyección intravítrea. Típicamente, las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención incluyen un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable tal como solución salina, fosfato de sodio, etc., aunque esto no siempre tiene que ser el caso. Los vehículos, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfatos de calcio, alginato, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, metilcelulosa, metil y propilhidroxibenzoatos, aceite mineral, etc. Las formulaciones también pueden incluir agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, conservantes, agentes tamponantes, etc.

[0030] La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

FIGURAS:

[0031]

Figura 1: Representación esquemática de la omisión del exón 23 (A) y el exón 36 (B) inducida por oligonucleótidos 2'-OMePS en el pre-ARNm de *Cep290* de tipo silvestre en ratón. Para cada exón mencionado, se diseñaron dos AON para dirigir al sitio del splicing del donante y una secuencia potenciadora del splicing exónico (ESE). Los m23D AON (+11-18)5'-GUUUU- CAAAAUAUAAUACCUUAGGUAUUC-3' (SEQ ID NO:28), m23ESE(+50+70) 5'-GAUGACGAAUCACUGCAAAC- 3' (SEQ ID NO:29), m36D(+8-16) 5'-GUUCUCAGAAUCUUAACUGAGCUG-3' (SEQ ID NO:30) y m36ESE, (+23+44) 5'-CAUGAAGGUCUCCUCAUGC-3' (SEQ ID NO:31) se denominaron m23D, m23ESE, m36D y m36ESE, respectivamente a partir de entonces. El m23ESEsense es una versión sensorial de m23ESE(+50+70) 5'-GUUUGCAGU- GAUUCGUCAUC-3' (SEQ ID NO:32) y se utiliza como control.

Figura 2: Efecto de la omisión mediada por AON del exón 23 y 36 de *Cep290* sobre el ARN mensajero de tipo silvestre (ARNm). (A) Presentación del análisis de RCP de ARNm extraído de NIH3T3 no tratado y después de 24 horas de transfección celular con 150 nM de m23ESE y m23D AON, así como control de m23ESEsense ON [izquierda]; y células transfectadas con 150 nM de m36ESE y m36D [derecha], respectivamente. Las bandas se analizaron mediante secuenciación para garantizar la omisión específica de los exones 23 y 36 después del tratamiento. (B) Análisis RCPc-TR que muestra la expresión relativa de transcripciones de tipo silvestre (TS) y mutantes (Δ ex23 [izquierda]; Δ ex36 [derecha]) del gen *Cep290* en células transfectadas en comparación con NIH3T3 no tratado, en las mismas condiciones que los mencionados anteriormente. Las barras de error representan la desviación estándar de la media derivada de tres experimentos independientes. Los resultados se normalizaron utilizando los genes *Gusb* y *Ppia* como referencia. (C) Análisis Western blot (WB) usando un anticuerpo policlonal de conejo producido contra los residuos C-terminales de *cep290* (+). Debido a que el análisis de Western blot clásico de 150 μ g de proteína total de células NIH3T3 no tratadas o 24 horas después de la transfección con m23ESE AON no dio resultados adecuados (-), 800 μ g de proteína total para ambas condiciones se sometieron a precipitación inmunológica (PI) (+). Se obtuvieron resultados similares de al menos tres experimentos independientes.

Figura 3: Cinética de AON después de una sola inyección en el vítreo de ratones C57BL/6J. (A) Análisis RCPc-TR de ARNm de *Cep290* extraído de no tratados y retinas inyectadas con 1 μ l de solución salina que contiene 10 nmol de m23D AON que se tomaron 2, 6 o 10 días después de la inyección, respectivamente. La banda superior representa el producto de splicing *Cep290* de tipo silvestre, mientras que la banda inferior representa el producto de splicing *Cep290* mutante Δ ex23. Las bandas se analizaron mediante secuenciación para garantizar la omisión específica del exón 23 después del tratamiento. (B) Series de 1, 2 o 3 ratones C57BL/6J que no fueron tratados o inyectados, como se describió anteriormente. Análisis RCPc-TR que muestra la expresión relativa de transcritos de tipo silvestre (TS) y mutantes (Δ ex23) del gen *Cep290* en el control y las retinas inyectadas. Los resultados se normalizaron utilizando los genes *Tbp* y *Hprt1* como referencia.

Figura 4: Efecto dependiente de la dosis y distribución de AON dos días después de la inyección. Se inyectaron series de 2 o 3 ratones C57BL/6J con 1 μ l de solución salina que contenía 1 nmol, 5 nmol o 10 nmol de m23D AON marcado con fluorescencia (6-FAM) en el vítreo. Análisis RCPc-TR que muestra la expresión relativa de transcritos de tipo silvestre (TS) y mutantes (Δ ex23) del gen *Cep290* en el control y las retinas inyectadas. Los resultados se normalizaron utilizando los genes *Tbp* y *Hprt1* como referencia.

Figura 5: Omisión de exón en fotorreceptores. Presentación del análisis de RCP del ARNm extraído de la retina de dos ratones diferentes, 2, 6 y 10 días después de la inyección de 10 nmol de AON en comparación con la retina no inyectada contralateral. Las bandas se analizaron mediante secuenciación para garantizar un efecto específico sobre el transcrito de *Abca4* después del tratamiento.

EJEMPLOS:

[0032] Aquí, los inventores describen un nuevo procedimiento para tratar pacientes que padecen una enfermedad de la retina debido a una mutación que modifica el splicing y/o crea una terminación prematura, en un gen importante para el funcionamiento y/o la supervivencia de un tipo de célula retiniana dada. El procedimiento consiste en omitir una secuencia nucleotídica mediante inyecciones intravítreas de un oligonucleótido antisentido estabilizado para alcanzar toda la superficie retiniana y dirigir al pre-ARNm de un gen cuya mutación causa enfermedades retinianas hereditarias.

[0033] Para demostrar la viabilidad de esta novedosa estrategia terapéutica, los investigadores han optado por dirigir a genes expresados con ratón y a genes que albergan un patrón de expresión específico de células retinianas.

- *CEP290*: Este gen abarca 54 exones y se transcribe como un ARNm de 7,9 kb que codifica una proteína centrosomal de 290 kDa. En la retina, se expresa en al menos la capa de células ganglionares, la capa nuclear interna y la capa de células fotorreceptoras (Baye y col., 2011). Con respecto a las células fotorreceptoras, la proteína juega un papel crucial en el mantenimiento de la estructura y función del cilio de conexión que permite el tráfico molecular entre los segmentos interno y externo. *CEP290* es el más frecuentemente involucrado en la amaurosis congénita de Leber, que es la distrofia retiniana más temprana y más grave (Perrault y col., 2007).

- *ABCA4*: Este gen consiste en 50 exones y se transcribe en un mensajero de 7,3 kb que codifica una proteína que tiene una masa molecular de 256 kDa. La expresión de *ABCA4* se limita a las células fotorreceptoras (bastones y conos). La enfermedad de Stargardt, la distrofia macular más común, es causada por mutaciones en el gen que codifica *ABCA4*, un transportador de casete de unión al ATP (ABC) fotorreceptor. La proteína interviene como una flipasa que facilita la eliminación de compuestos retinianos potencialmente tóxicos de los fotorreceptores después de la fotoexcitación (Molday y col., 2004).

- *TMEM126A*: Este gen que consiste en 5 exones se transcribe en un mensajero de 0,7 kb que codifica una proteína mitocondrial transmembrana de 21,5 kDa. En la retina, *TMEM126A* tiene una fuerte expresión en la capa de células

ganglionares, la cabeza del nervio óptico, la capa nuclear interna y la capa plexiforme externa, que están particularmente enriquecidas en las mitocondrias. Hasta la fecha, se desconoce la función de *TMEM126A*, pero su alteración es responsable de la neuropatía óptica autosómica recesiva caracterizada por la degeneración de las fibras del nervio óptico (Hanein y col., 2013).

-*GRM6*: el gen metabotrópico 6 del receptor de glutamato contiene 10 exones y se transcribe en un mensajero de 6 kb que codifica una proteína que tiene un peso molecular esperado de 95,5 kDa. La localización de *GRM6* se limita a la terminación postsináptica de las células bipolares. Este receptor de glutamato está involucrado en la transmisión de señales desde los fotorreceptores a las células bipolares adyacentes, cuya interrupción conduce a la ceguera nocturna congénita estacionaria (Maddox y col., 2008).

Ejemplo 1: Modulación de splicing de ARNm de Cep290

Materiales y procedimientos

[0034] Identificación de secuencias diana para la omisión del exón 23 y el exón 36 de Cep290. Los análisis bioinformáticos para encontrar secuencias dirigibles dentro del exón 23 y el exón 36 del pre-ARNm de *Cep290* y sus secuencias intrónicas circundantes (sitios de splicing), se realizaron utilizando <http://mfold.rna.albany.edu/> y <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>.

[0035] Cultivos de fibroblastos murinos. Las células NIH-3T3 (línea celular de fibroblastos de ratón) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, Maryland). Estas células se cultivaron en un medio estándar que consiste en DMEM (Invitrogen) que contiene FCS al 10 %, 50 U/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomycin (Invitrogen). Solo se utilizaron cultivos celulares con un pasaje inferior a 15 en los estudios de los investigadores.

[0036] AON y transfección. El programa ESEfinder 3.0 identificó oligonucleótidos antisentido específicos para sitios de splicing de donantes y ESE alrededor de los dos exones (Cartegni y Krainer, 2003). Las secuencias seleccionadas correspondientes se representan en la figura 1. Todos los AON fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, Francia) y contienen 2'-O-metil ARN y cadenas principales de fosforotioato de longitud completa. Las células NIH-3T3 al 80 % de confluencia se transfectaron en DMEM usando Lipofectamine2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Cada 2'-OMePS AON se transfectó a 150 nmol/l en al menos tres experimentos separados. Se usó una versión de sentido de cada AON de ESE como control para evaluar la especificidad de los AON (figura 1). Después de 4 horas de incubación a 37 °C, el medio de transfección se reemplazó por medio de cultivo fresco.

[0037] Eficiencia de transfección. Las células NIH-3T3 se sembraron en cubreobjetos de vidrio en placas de 12 pocillos, 24 horas antes de la transfección. Los oligonucleótidos antisentido m23D(xx), m23ESE(xx), m36D(xx) y sentido m23ESEsense(xx) que llevan un grupo de fluoresceína de extremo 5' se obtuvieron de Sigma Aldrich. Los fibroblastos se transfectaron como se describió anteriormente. Los fibroblastos no tratados se procesaron en las mismas condiciones. Después de 4 h de incubación, las células se fijaron con PFA al 4 % (15 minutos a temperatura ambiente) y se lavaron dos veces en PBS. Se utilizó un medio de montaje que contenía 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (reactivo antifade ProLong Gold con DAPI; Invitrogen) para marcar los núcleos. Las imágenes de inmunofluorescencia se obtuvieron usando un microscopio confocal ZEISS LSM700 (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes finales se generaron usando ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA). El porcentaje de células fluorescentes se calculó (se marcó más del 90 % del total de células) a partir de tres experimentos independientes para cada transfección de oligonucleótidos (células contadas para cada transfección n > 100).

[0038] Inyección intravítrea AON de animales de experimentación. Todos los experimentos con animales se adhirieron a la declaración de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología para el uso de animales en la investigación oftálmica y de visión. Se usaron ratones C57BL/6J de ocho semanas de edad para estos experimentos. Los animales fueron anestesiados por inyección intramuscular de solución de mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Las pupilas se dilataron con fenilefrina al 10 % y tropicamida al 0,5 %. Se usó una aguja de calibre 30 para realizar una punción inicial de la esclerótica. A través de este orificio, se pasó una aguja de calibre 33 unida a una jeringa Hamilton de 5 µl en la cavidad vítrea. El avance de la aguja se observó directamente bajo un binocular cuando la punta de la aguja se encontraba en la cavidad vítrea. Los ojos izquierdos fueron inyectados con 1 µl de solución salina (NaCl 9 g/l, pH = 8,7) que contiene 1, 5 o 10 nmol de oligonucleótidos 6-FAM (m23D), respectivamente, en el vítreo. La aguja se mantuvo en la cavidad vítrea durante aproximadamente 20 segundos, a continuación, se retiró suavemente y se aplicó un ungüento antibiótico para prevenir la infección. Los ojos derechos no se inyectaron y se usaron como controles contralaterales. Los ojos inyectados y contralaterales se enuclearon a los 2, 6 o 10 días después de la inyección y se procesaron para su posterior análisis. Los ojos muestreados se sumergieron en PFA al 4 % para cortarlos y montarlos en portaobjetos de vidrio y examinarlos por microscopía confocal (ZEISS LSM700) después de marcar los núcleos usando DAPI (reactivo antifade ProLong Gold con DAPI; Invitrogen); o las retinas se extrajeron para recuperar ARN como se describe a continuación. Se utilizaron entre 2 y 5 animales para cada configuración experimental.

[0039] Extracción de ARN y síntesis de ADNc. Veinticuatro horas después de la transfección, se procesaron las células transfectadas y no tratadas. De manera similar, el ARN de las retinas a los 2, 6 y 10 días después de la inyección para los ojos inyectados y no inyectados se obtuvo de la siguiente manera. El ARN total se extrajo usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) según el protocolo del fabricante. Todas las muestras fueron tratadas con DNasa por el conjunto de DNasa sin RNasa (Qiagen, Courtaboeuf, Francia). La concentración y la pureza del ARN total se evaluó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Fisher Scientific, Illkirch, Francia) antes del almacenamiento a -80 °C. La síntesis de ADNc de primera cadena se realizó a partir de 500 ng de ARN total extraído usando el kit de ADNc Verso (Thermo Fisher Scientific) con cebadores aleatorios hexámero:oligo (dT) en una relación 3:1 (vol:vol) según las instrucciones del fabricante. Se preparó una reacción no TI (sin enzima) para una muestra para servir como control en experimentos RCPc-TR.

[0040] RCP con transcripción inversa (RCP-TI). Para evaluar la eficacia de la omisión de exón mediada por AON, los ADNc (5 µl) se amplificaron en 50 µl de tampón IX Phusion HF que contenía dNTP 5 mM (Fischer Scientific, Illkirch, Francia), 0,02 unidades de ADN polimerasa Phusion de alta fidelidad (Fischer Scientific, Illkirch, Francia) y 10 µM de cada cebador *Cep290*(ex22) directo, 5'-gaccaccttgagaaggaac-3' (SEQ ID NO:1) y *Cep290*(ex24) inverso, 5'-catcctgctcagcttgatc-3' (SEQ ID NO:2) o *Cep290*(ex35) directo, 5'-cccaccaaactattgccaac-3' (SEQ ID NO:3) y *Cep290*(ex37) inverso, 5'-gagagtcattctgttctgtac-3' (SEQ ID NO:4). Las RCP se llevaron a cabo en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 98 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 10 segundos a 98 °C, recocido de 30 segundos a 60 °C y extensión de 30 segundos a 72 °C. Los productos de RCP se separaron (20 µl) por electroforesis en un gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luces UV. No se utilizaron reacciones de plantilla (NTC) como control negativo. La confirmación final de la identidad de estos productos se realizó mediante secuenciación de Sanger para establecer que se han mantenido las uniones de exón correctas y esperadas.

[0041] RCP cuantitativa en tiempo real (RCPc-TR). Para medir el nivel de expresión de los ARNm de *Cep290*, los transcritos de tipo silvestre y mutante se amplificaron como fragmentos de 102 y 75 pb (omisión del exón 23), respectivamente; o los transcritos de tipo silvestre y mutante se amplificaron como fragmentos de 100 y 62 pb (omisión del exón 36), respectivamente. El ARNm de la proteína de unión a la caja TATA de ratón (*Tbp*), el ARNm de la β-2-microglobulina de ratón (*B2m*), el ARNm de la β-glucuronidasa de ratón (*Gusb*), el ARNm de la hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 de ratón (*Hprt1*) y el ARNm de la peptidilproil isomerasa A de ratón (*Ppia*) se utilizaron para la normalización. El gen de albúmina de ratón (*Alb*) se usó para controlar la no contaminación de ADNc por ADN genómico. Los cebadores se diseñaron utilizando el software Oligo Primer Analysis v.7 disponible en <http://www.oligo.net>. La especificidad de los pares de cebadores con las secuencias de plantilla de RCP se comparó con la base de datos NCBI utilizando el software Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Las secuencias del cebador fueron las siguientes: *Cep290ex23wt* directo, 5'-tgactgctaagtacaggagcatct tg-3' (SEQ ID NO:5); *Cep290ex23wt* inverso, 5'-aggagatgttt- tcactaccaggt-3' (SEQ ID NO:6); *Cep290ex23mt* directo, 5'-ctggccccagtgtaattgtga-3' (SEQ ID NO:7); *Cep290ex23mt* inverso, 5'-ctgttcccaggctgttcaatagt-3' (SEQ ID NO:8); *Cep290ex36wt* directo, 5'-tgactgctaagtacaggagcatct tg-3' (SEQ ID NO:9); *Cep290ex36wt* inverso, 5'-aggagatgttttcactaccaggt-3' (SEQ ID NO:10); *Cep290ex36mt* directo, 5'-ct- ggccccagtgtaattgtga-3' (SEQ ID NO:11); *Cep290ex36mt* inverso, 5'-ctgttcccaggctgttcaatagt-3' (SEQ ID NO:12); genes de referencia *Tbp* directos, 5'-tgacctaaagaccattgcacttcgt-3' (SEQ ID NO:13); *Tbp* inverso, 5'-ctgcagcaaatcgcttgga-3' (SEQ ID NO:14); *B2m* directo, 5'-cctgtatgctatccagaaaaccct-3' (SEQ ID NO:15); *B2m* inverso, 5'-cgtagcagttcagtatgttcg-gctt-3' (SEQ ID NO: 16); *Gusb* directo, 5'-ctgcggtgtgatgtgtgtctgt-3' (SEQ ID NO:17); *Gusb* inverso, 5'-tgtgggtgatcagcgtct- taaagt-3' (SEQ ID NO:18); *Hprt1* directo, 5'-gttgatacaggccagactttgt-3' (SEQ ID NO:19); *Hprt1* inverso, 5'-aaacgtgat- tcaaatccctgaagta-3' (SEQ ID NO:20); *Ppia* directo, 5'-ccaaacacaaacggttcccagt-3'(SEQ ID NO:21); *Ppia* inverso, 5'-gcttgccatccagccattca-3' (SEQ ID NO:22); *Alb* directo, 5'-gggacagtgagtaccagacatcta-3' (SEQ ID NO:23); *Alb* inverso, 5'-ccagacttggtgttgatgctt-3' (SEQ ID NO:24). Los ADNc (5 µl de una dilución 1:25 en agua libre de nucleasas) se sometieron a amplificación por RCP en tiempo real en un tampón (20 µl) que contiene SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia) y 300 nmol/l de cebadores directos e inversos, en un MasterCycler epgadients Realplex² (Eppendorf, Alemania) en las siguientes condiciones: activación de la polimerasa Taq y desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos, seguido de 50 ciclos durante 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 62 °C. La especificidad de los productos de amplificación se determinó a partir del análisis de la curva de fusión realizada al final de cada ejecución utilizando un ciclo a 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 15 segundos y 95 °C durante 15 segundos. Los datos se analizaron utilizando el software Realplex (Eppendorf, Alemania). Para cada muestra de ADNc, la media de los valores del ciclo de cuantificación (Cc) se calculó por triplicado (DE <0,5 Cc). Los niveles de expresión de *Cep290* se normalizaron al "factor de normalización" obtenido del software geNorm para Microsoft Excel que utiliza los genes de referencia más estables y las estimaciones de eficiencia de amplificación calculadas para cada par de cebadores utilizando curvas de dilución en serie cuádruple (1:5, 1:25, 1:125, 1:625). No se utilizaron transcriptasa inversa (no TI), no hubo reacciones de control de plantilla (NTC) y no hubo contaminación de ADNc por ADN genómico (ALBh) como controles negativos en cada ejecución (valores de Cc NTC = indeterminado, no TI > 38 y ALBh > 38). Los datos cuantitativos son las medias ± DE tres experimentos independientes y se presentan como una relación entre los valores de los ARNm individuales.

[0042] Extracción de proteínas, inmunoprecipitación y análisis de Western blot. Las células se

cosecharon 24 horas después de la transfección y se lisaron en tampón RIPA (Sigma) que contenía un cóctel inhibidor de proteasa completo (1 %; Sigma) en hielo durante 1 hora con mezcla repetida. La lisis se realizó mediante 15 segundos de tratamiento con ultrasonidos en hielo (Biorblock Scientific VibraCell 72434) y los lisados se centrifugaron (13.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos). Se analizaron 800 µg de extractos de proteínas por inmunoprecipitación (IP) 5 utilizando columnas de separación mMac y microperlas de proteína G (Miltenyi Biotec) con un conejo policlonal anti-cep290 (1:100; Novus Biologicals, Littleton, CO), según las recomendaciones del proveedor. Se calentaron 150 µg de extractos de proteínas iniciales (resuspendidos con tampón de muestra LDS 1X (Life Technologies, EE. UU.) Con β-mercaptoetanol al 10 %) y los inmunoprecipitados se calentaron a 90 °C durante 10 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida prefabricada Mini-PROTEAN TGX al 4-15 % (BioRad). Después de la electroforesis, las proteínas 10 se transfirieron a una membrana de PVDF de 0,2 µm utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (BioRad) que se probó con el siguiente anticuerpo primario: conejo policlonal anti-Cep290 humano (1:1800; Novus Biologicals, Littleton, CO) y anticuerpo secundario: cabra anti-IgG-HRP de conejo (1:5.000, Abeam, Francia). Las transferencias se pusieron de manifiesto con el uso del sustrato de duración extendida SuperSignal® West Dura (Thermo Scientific, EE. UU.) y el sistema de formación de imágenes ChemiDoc XRS + (Bio-Rad, EE. UU.). Las imágenes de Western blot 15 se adquirieron y analizaron con Image Lab Software 3.0.1 build 18 (Bio-Rad, EE. UU.).

Resultados

Evaluación de la seguridad y la eficacia de la inyección intravítrea única de AON terapéuticos

20 **[0043]** Teniendo en cuenta que la línea de ratón transgénico alberga el intrón mutante humano 26(c.2991 + 1655A>G) aún no está disponible, los investigadores diseñaron secuencias AON para omitir los exones de ratón de tipo silvestre. Los investigadores eligieron omitir el exón 23 y el exón 36, respectivamente. Se espera que la omisión del exón 23 provoque un cambio en el marco de lectura y la producción, si es estable, de una proteína truncada (figura 25 1A). En contraste, se espera que la omisión del exón 36 conserve el marco de lectura (figura 1B).

[0044] Los oligonucleótidos antisentido específicos para sitios de splicing de donantes y ESE alrededor de los dos exones (m23ESE, m23D, m36ESE, m36D; figura 2) se probaron *in vitro* utilizando la línea de fibroblastos de ratón NIH-3T3 según el protocolo de los investigadores presentado en MTNA (Gerard y col., 2012). El potencial de los AON 30 para inducir la omisión se determinó primero por análisis de RCP con transcripción inversa (RCP-TI) usando ARNm extraído de células NIH-3T3 no tratadas y transfectadas. Las células de transfección NIH-3T3 que usan 150 nM de AON dieron como resultado la omisión como se muestra por la aparición de bandas de RCP más cortas cuya secuenciación de Sanger demostró la pérdida del exón 23 y 36 respectivamente.

35 **[0045]** Las eficiencias de omisión se cuantificaron utilizando RCP cuantitativa en tiempo real (RCPc-TR) midiendo el nivel de expresión de los transcritos de tipo silvestre y mutante en fibroblastos NIH3T3 no transfectados frente a transfectados. En comparación con las células no transfectadas o las células transfectadas con ON sentido, las células NIH-3T3 tratadas con AON exhibieron una expresión de ARNm de tipo silvestre significativamente 40 disminuida que apoya la omisión eficiente. En consecuencia, se detectaron ARNm mutantes en líneas celulares tratadas. La abundancia de ARNm mutante que carece del exón 23 podría subestimarse debido a la posible descomposición de ARNm mediada sin sentido, NMD (omisión de desplazamiento de marco con la aparición de un codón de terminación prematuro). Además, las células NIH-3T3 se transfectaron usando oligonucleótidos antisentido m23D y m36D marcados con fluorescencia y oligonucleótidos con sentido m23ESE para asegurarse de que estos 45 resultados no se debían a la administración reducida del oligonucleótido sentido. Se midieron eficiencias de transfección similares (> 90 %).

[0046] Los análisis de Western blot de cep290 inmunoprecipitado (ensayo desplegable) mostraron que la transfección de células que usan el m23ESE AON causó una disminución en la abundancia de cep290, lo que respalda la opinión de que la disminución de los niveles de transcritos de tipo silvestre resultó en las cantidades de proteína. 50

[0047] En conjunto, los resultados de los investigadores demuestran que la efectividad y la capacidad dependiente de la secuencia identificaron AON para inducir la omisión.

Modificación inducida por AON en el ARNm de Cep290 en fotorreceptores de ratón

55 **[0048]** Para evaluar la eficacia de omisión *in vivo* después de las inyecciones intravítreas, los investigadores utilizaron el m23D AON marcado con fluorescencia. Se inyectaron diez nmol de AON en el vítreo del ojo izquierdo de ratones C57BL/6J de 8 semanas de edad. Los animales se sacrificaron los días 2, 6 y 10 después de la inyección y se diseccionaron los ojos inyectados (izquierdo) y no inyectados (derecho) para aislar las neurorretinas. Los ARN 60 mensajeros se prepararon a partir de retinas tratadas y no tratadas. Las RCP-TI se realizaron utilizando cebadores capaces de amplificar los transcritos Cep290 tanto de tipo silvestre como modificados, mientras que las RCP-TI se realizaron usando cebadores específicos para el ARNm de tipo silvestre y el transcrito mutante que carece del exón 23. Los productos del análisis por electroforesis en gel de agarosa de RCP-TI mostraron que, en contraste con los ojos no inyectados, los ojos tratados los días 2, 6 y 10 exhibieron un producto de menor tamaño además del producto 65 de tipo silvestre (figura 3A). La secuenciación de Sanger confirmó la identidad de ambos productos (ARNm mutante y

de tipo silvestre que carece del exón 23).

[0049] El análisis de RCPc-TR fue consistente con los resultados de RCP-TI con una expresión disminuida de ARNm de tipo silvestre en ojos tratados en comparación con ojos no tratados y ARNm mutantes detectables en ojos tratados, pero no en los no tratados (figura 3B).

[0050] Posteriormente, se inyectaron dosis crecientes de m23D AON marcado con fluorescencia (1, 5, 10 nmol) usando el mismo procedimiento. Los animales se sacrificaron el día 2 después de la inyección. Los ojos inyectados y no inyectados fueron extraídos, disecados para recuperar las retinas o fijados en PFA e incluidos en parafina para análisis histológico. El análisis RCPc-TR evidenció una correlación entre la eficiencia de omisión y la dosis inyectada de AON (figura 4). El análisis histológico mostró una gran distribución de secciones retinianas completas de AON (se programa el análisis histológico de las retinas de montaje completo).

[0051] *Cep290* se expresa de forma ubicua (Papon y col., 2010). En la retina, se expresa en varias capas celulares, incluida la capa de células ganglionares, la capa nuclear interna y la capa celular de fotorreceptores (Baye y col., 2011). Pero es en esta última capa celular de la retina donde la cantidad de proteína CEP290 es la más abundante (Chang y col., 2006). El análisis histológico de la distribución de AON fluorescentes en la retina demostró la presencia de fluorescencia en la capa nuclear de fotorreceptores (figura 4B). Sin embargo, para confirmar que se produjo una omisión en los fotorreceptores, los investigadores han establecido una colaboración con MP Felder (Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, CNRS UPR 3212, Universidad de Estrasburgo) para aislar la capa de fotorreceptores de ojos no inyectados e inyectados utilizando vibratomo. Esto se realizará en las próximas semanas.

[0052] En conjunto, los resultados de los investigadores demuestran la efectividad de m23ESE AON para inducir la omisión en las células de la retina.

Ejemplo 2: Modulación de splicing de ARNm de *Abca4*

Materiales y procedimientos

[0053] **Identificación de secuencias diana para la omisión del exón 10 de *Abca4*.** Los análisis bioinformáticos para encontrar secuencias dirigibles dentro del exón 10 del pre-ARNm de *Abca4* y sus secuencias intrónicas circundantes (sitios de splicing), se realizaron utilizando <http://mfold.rna.albany.edu/> y <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>.

[0054] **AON.** El oligonucleótido antisentido específico para los sitios ESE en el exón 10 fue identificado por el programa ESEfinder 3.0 (Cartegni y Krainer, 2003). La secuencia seleccionada correspondiente: m10ESE (+60+88) 5'-CAAAGAAGTACCAGATCT-GGGGCCCTAC-3' (SEQ ID NO:25). El AON fue sintetizado por Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, Francia) y contiene 2'-O-metil ARN y cadenas principales de fosforotioato de longitud completa.

[0055] **Inyección intravítrea AON de animales de experimentación.** Todos los experimentos con animales se adhieron a la declaración de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología para el uso de animales en la investigación oftálmica y de visión. Se usaron ratones C57BL/6J de ocho semanas de edad para estos experimentos. Los animales fueron anestesiados por inyección intramuscular de solución de mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Las pupilas se dilataron con fenilefrina al 10 % y tropicamida al 0,5 %. Se usó una aguja de calibre 30 para realizar una punción inicial de la esclerótica. A través de este orificio, se pasó una aguja de calibre 33 unida a una jeringa Hamilton de 5 µl en la cavidad vítrea. El avance de la aguja se observó directamente bajo un binocular cuando la punta de la aguja se encontraba en la cavidad vítrea. Los ojos izquierdos fueron inyectados con 1 µl de solución salina (NaCl 9 g/l, pH = 8,7) que contiene 10 nmol de oligonucleótidos (m10ESE) en el vítreo. La aguja se mantuvo en la cavidad vítrea durante aproximadamente 20 segundos, a continuación, se retiró suavemente y se aplicó un ungüento antibiótico para prevenir la infección. Los ojos derechos no se inyectaron y se usaron como controles contralaterales. Los ojos inyectados y contralaterales se enuclearon a los 2, 6 o 10 días después de la inyección y se procesaron para su posterior análisis. Las retinas se extrajeron para recuperar ARN como se describe a continuación. Se utilizaron dos 2 animales para cada configuración experimental.

[0056] **Extracción de ARN y síntesis de ADNc.** El ARN total de las retinas a los 2, 6 y 10 días después de la inyección para los ojos inyectados y no inyectados se extrajo usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) según el protocolo del fabricante. Todas las muestras fueron tratadas con DNasa por el conjunto de DNasa sin RNasa (Qiagen, Courtaboeuf, Francia). La concentración y la pureza del ARN total se evaluó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Fisher Scientific, Illkirch, Francia) antes del almacenamiento a -80 °C. La síntesis de ADNc de primera cadena se realizó a partir de 500 ng de ARN total extraído usando el kit de ADNc Verso (Thermo Fisher Scientific) con cebadores aleatorios hexámero:oligo (dT) en una relación 3:1 (vol:vol) según las instrucciones del fabricante.

[0057] **RCP con transcripción inversa (RCP-TI).** Para evaluar la eficacia de la omisión de exón mediada por AON, los ADNc (5 µl) se amplificaron en 50 µl de tampón IX Phusion HF que contenía dNTP 5 mM (Fischer Scientific, Illkirch, Francia), 0,02 unidades de ADN polimerasa Phusion de alta fidelidad (Fischer Scientific, Illkirch, Francia) y 10

µM de cada cebador *Abca4(ex9)* directo, 5'-tgatccagagcctggagtgcaa-3' (SEQ ID NO:26) y *Abca4(ex11)* inverso, 5'-ttcttctccgagctgcctatt-3' (SEQ ID NO:27). Las RCP se llevaron a cabo en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 98 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 10 segundos a 98 °C, recocido de 30 segundos a 60 °C y extensión de 30 segundos a 72 °C. Los productos de RCP se separaron (20 µl) por electroforesis en un gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luces UV. No se utilizaron reacciones de plantilla (NTC) como control negativo. La confirmación final de la identidad de estos productos se realizó mediante secuenciación de Sanger para establecer que se han mantenido las uniones de exón correctas y esperadas.

10 Resultados

Modificación inducida por AON en el ARNm de *Abca4* en fotorreceptores de ratón

[0058] Los investigadores han diseñado un AON 2'-OMePS para interferir con el splicing del pre-ARNm del gen *Abca4* específico de fotorreceptores (Molday y col., 2000). Usando el software mfold y el programa ESEfinder (para más detalles véase: Gerard y col., 2012), los investigadores diseñaron un AON dirigido al exón 10. Como no hay una línea celular fotorreceptora disponible en el laboratorio, los investigadores procedieron a inyecciones intravítreas de 10 nmol de 2'-OMePS AON en el vítreo del ojo izquierdo de ratones C57BL/6J sin previa validación *in vitro*. Los ratones se sacrificaron a los 2, 6 y 10 días después de la inyección y las retinas de los ojos inyectados y no inyectados se prepararon como anteriormente. La omisión se analizó mediante análisis RCP-TI utilizando cebadores diseñados en el exón 9 (directo) y el exón 11 (inverso), respectivamente. La electroforesis en gel de agarosa apoyó la omisión exitosa en todos los ojos tratados con la aparición de un producto de RCP más corto ausente en los ojos no tratados (figura 5) que fue confirmado por la secuenciación de Sanger.

25 TABLA A: Selección de patologías monogénicas para las cuales una modulación del splicing alternativo, que conduce a un cambio en la proporción de isoformas, puede tener consecuencias terapéuticas.

Gen	Nb exones	Enfermedad	Descripción
ABCA4	50		
		ARMD2	distrofia macular relacionada con la edad 2 (defecto <i>ABCA4</i> heterocigoto), véase también STGD1
		CORD4	distrofia de cono-bastón 4, caracterizada por la pérdida inicial de agudeza visual y atrofia coriorretiniana macular, seguida de una constricción del campo visual periférico
		RP19	retinitis pigmentaria 19, distrofia retiniana de cono-bastón autosómica recesiva caracterizada por ceguera nocturna inicial en la primera década, seguida de una disminución de la agudeza visual en la segunda década con características distintivas de atrofia coriocapilar
		STGD1	enfermedad de Stargardt, distrofia macular juvenil 1 autosómica recesiva, caracterizada por disminución de la visión central, atrofia de la mácula y epitelio pigmentario retiniano subyacente y frecuentes "manchas de flavimaculatus" amarillo en el polo posterior de la retina, incluido el fondo flavimaculatus de inicio tardío
AIPL1	6		
		CORD3	distrofia retiniana de cono-bastón 3
		LCA4	amaurosis congénita de Leber tipo 4 autosómica recesiva, caracterizada por ceguera congénita no evolutiva, con nistagmo pendular, queratocono anterior, movimientos oculares errantes, búsqueda ocular ausente y punción ocular, fotofobia grave, hipermetropía, fondo normal al nacer seguido de aspecto de sal y pimienta de retina y RP típico, ERG no registrable
APC	15		
		CHRPE	hipertrofia congénita del epitelio pigmentario retiniano, síndrome de Gardner, incluido el síndrome de Turcot (con asociación con tumor maligno del SNC)

(continuación)

Gen	Nb exones	Enfermedad	Descripción
CDH23	13		
		USH1D	síndrome de Usher tipo ID, caracterizado por sordera neurosensorial congénita profunda, disfunción vestibular constante y retinitis pigmentaria de inicio prepuberal que conduce a la ceguera
COL11A1	66		
		AOM2	síndrome de Stickler 2 autosómico dominante, caracterizado por un fenotipo vítreo membranoso o tipo 1 asociado con miopía congénita, hendidura de la línea media, apariencia aplanada de la cara media, sordera neurosensorial e hiper movilidad articular y una artropatía degenerativa más adelante en la vida (artrooftalmopatía)
		MRSH	síndrome de Marshall caracterizado por hipoplasia de la cara media, nariz ensillada, miopía, catarata de inicio temprano, sordera neurosensorial progresiva predominantemente coclear sin morfogénesis defectuosa del laberinto óseo, baja estatura
CRB1	11		
		LCA8	amaurosis congénita de Leber tipo 8 autosómica recesiva, caracterizada por ceguera congénita no evolutiva, con nistagmo pendular, queratocono anterior, movimientos oculares errantes, búsqueda ocular ausente y punción ocular, fotofobia grave, hipermetropía, fondo normal al nacer seguido de aspecto de sal y pimienta de retina y RP típico, ERG no registrable
		RP12	retinitis pigmentaria 12 autosómica recesiva de inicio temprano con preservación paraarteriolar del RPE
DMD	86		
		OED	ceguera nocturna congénita estacionaria 2, algunas formas incompletas, con persistencia de la función de bastón leve (defecto de distrofina)
EYA1	16		
		ASMD4	disgenesia mesenquimal del segmento anterior ocular 4, incluida la anomalía de Peters y la catarata congénita autosómica dominante
GUCY2D	20		
		CORD6	distrofia retiniana de cono bastón 6, caracterizada por la pérdida inicial de agudeza visual y visión anormal del color seguida de ceguera nocturna y pérdida periférica del campo visual
		LCA1	amaurosis congénita de Leber tipo 1 autosómica recesiva, caracterizada por ceguera congénita no evolutiva, con nistagmo pendular, movimientos oculares errantes, búsqueda ocular ausente y punción ocular, fotofobia e hipermetropía graves, fondo de ojo normal al nacer seguido de aspecto de sal y pimienta de la retina y RP típico, ERG no registrable
LCAT	6		
		FED	distrofia corneal dislipoproteinémica FED, enfermedad de ojo de pez
		LCAT	hipercolesterolemia no esterificada, caracterizada por opacidades corneales, anemia hemolítica de células diana, proteinuria con insuficiencia renal, enfermedad de Norum, incluida la susceptibilidad a la hiperlipemia combinada familiar y la enfermedad coronaria prematura

(continuación)

Gen	Nb exones	Enfermedad	Descripción
MYO7A	49		
		USH1B	síndrome de Usher tipo IB autosómico recesivo, caracterizado por sordera neurosensorial congénita profunda, disfunción vestibular constante y retinitis pigmentaria de inicio prepuberal que conduce a ceguera (véase DFNB2)
NDP	3		
		COATS	síndrome de Coats, caracterizado por un desarrollo anormal de la retina (telangiectasia retiniana) que resulta en una acumulación masiva de lípidos subretinianos (desprendimiento de retina exudativo), casi siempre aislado, unilateral y visto en hombres, una mujer con una variante que da a luz a un hijo afectado con la enfermedad de Norrie
		EVR2	vitreo-retinopatía, forma exudativa rara ligada al cromosoma X (alélica a NDP puede estar involucrando un gen ligado en casos raros)
		NDP	enfermedad de Norrie (pseudoglioma), caracterizada por displasia congénita de la retina, retraso mental y sordera
NPHP1	4?20?		
		SLSN1	síndrome de Senior-Loken 1, nefronofisis juvenil con distrofia retiniana diferente de la amaurosis congénita de Leber
PANK2	8		
		HARP	hipoprebetalipoproteinemia, acantocitosis, retinitis pigmentaria y degeneración palidal
		PANK2	enfermedad de Hallervorden-Spatz con distonía de rigidez progresiva, retinitis pigmentaria, acumulación de hierro en el cerebro, incluidas formas con acumulación extensa de tau y alfa-sinucleína. HARP síndrome caracterizado por hipoprebetalipoproteinemia, acantocitosis, retinitis pigmentaria y degeneración palidal
PAX6	14		
		AN	aniridia homóloga al ojo pequeño de ratón, Drosophila sin ojos, que también incluye fenotipos atípicos tales como el coloboma ocular, así como anoftalmia, hipoplasia foveal y defecto del sistema nervioso central en heterocigotos compuestos
		ASMD3	disgenesia mesenquimal del segmento ocular anterior 3, incluida la anomalía de Peters, la anomalía de Axenfeld, la distrofia corneal asociada con catarata congénita autosómica dominante
		ECTP	ectopia pupilar
		FVH	hipoplasia foveal aislada
		OPNAB	hipoplasia y aplasia del nervio óptico bilateral, incluida la anomalía del disco de la gloria de la mañana
		WAGR	síndrome del gen contiguo caracterizado por predisposición al nefroblastoma (tumor de Wilms), aniridia, anomalías genitourinarias, retraso mental
PDE6B	22		
		ARRP2	retinitis pigmentaria autosómica recesiva 2 (PDE6B), homólogo de ratón rd
		CSNB3	ceguera nocturna congénita estacionaria 3 autosómica dominante

(continuación)

Gen	Nb exones	Enfermedad	Descripción
PEX7	10		
		PBD7	enfermedad de Refsum, deficiencia de oxidasa de ácido fitánico, neuropatía hereditaria motora y sensorial 4 con ataxia, retinitis pigmentaria y grupo de complementación de polineuropatía 11 o R
PITX2	3		
		IHG2	hipoplasia autosómica dominante del iris con presión intraocular elevada por goniodisgenesia (iridogoniodisgenesia) y glaucoma secundario (véase RIEG1)
		RIEG1	disgenesia mesenquimal del segmento anterior ocular, síndrome de Axenfeld Rieger, incluido embriotoxón posterior, hipoplasia del estroma del iris y anomalías de la forma de la pupila (corectopia) y número (policoria) y glaucoma secundario asociado con otras anomalías con mayor frecuencia anodoncia/hipodoncia, hipoplasia maxilar, hernia umbilical debido a un fallo de involución de la piel periumbilical, véase también IHG2
RDS	3		
		MDBS1	distrofia macular autosómica dominante, distrofia macular pigmentaria en forma de mariposa 1, incluida la distrofia macular de Zermatt, la retinitis pigmentaria con maculopatía de ojo de buey y otras distrofias de patrón
		RP7	retinitis pigmentaria 7, incluida la retinitis punctata albescens
RHO	5		
		ARRP1	retinitis pigmentaria 1 autosómica recesiva 1
		CSNB6	ceguera nocturna congénita estacionaria 6 autosómica dominante
		RP4	retinitis pigmentaria 4 autosómica dominante tipo I y otras, incluidas algunas retinitis punctata albescens, el primer locus ADRP más común (20-31 %)
RLBP1	9		
		ARRP7	retinitis pigmentaria autosómica recesiva 8 de inicio temprano con atrofia del disco óptico y degeneración macular
		NFRCD	distrofia de news foundland de cono-bastón, distrofia retiniana de inicio temprano grave con ceguera precoz
		RPALB	retinitis punctata albescens, caracterizada por ceguera nocturna estacionaria congénita y regeneración anormalmente lenta de pigmentos visuales con puntos blancos y amarillos uniformes dispersos a través de la retina autosómica recesiva, incluida la distrofia de Botnia (alta prevalencia en el norte de Suecia)
RPE65	14		
		LCA2	amaurosis congénita de Leber tipo 2 autosómica recesiva, caracterizada por ceguera congénita con nistagmo pendular, movimientos oculares errantes, ausencia de búsqueda ocular y punción ocular, ceguera nocturna, fondo de ojo normal al nacer seguido de aspecto de sal y pimienta de la retina y aspecto típico de RP, ERG no registrable, que presenta una mejora transitoria durante la evolución
		RP20	distrofia retiniana de expresión variable de inicio en la infancia autosómica recesiva 8 que afecta a los fotorreceptores de bastón y cono

(continuación)

Gen	Nb exones	Enfermedad	Descripción
RPGR	19		
		CORDX1	distrofia de cono-bastón 1 (excluidos RP2 y RP3), degeneración progresiva de la retina, caracterizada por fotofobia progresiva, disminución de la visión central y discromatopsia
		MDXA1	degeneración macular atrófica recesiva ligada a X
		RP15	retinitis pigmentaria 15 dominante ligada al cromosoma X, que se caracteriza por una pérdida inicial de agudeza visual y visión del color seguida de ceguera nocturna y pérdida del campo visual periférico (véase OMIM 300029)
		RP3	retinitis pigmentaria 3 forma recesiva ligada al cromosoma X de degeneración coroidoretiniana que se distingue de otros tipos por la presencia en mujeres heterocigotas de un reflejo retiniano similar al tapetal, incluida la retinitis pigmentaria con infecciones respiratorias recurrentes
TULP1	14		
		LCA10	amaurosis congénita de Leber tipo 10 autosómica recesiva con nistagmo, ceguera nocturna, deficiencia visual profunda, sin hipermetropía, distrofia de cono bastón
		RP14	retinitis pigmentaria autosómica recesiva 4 grave de inicio temprano, caracterizada por nistagmo, disminución de la agudeza visual, alteraciones de la visión del color, maculopatía de ojo de buey y retinopatía pigmentaria periférica asociada con un ERG no registrable
USH2A	21		
		ARRP15	retinitis pigmentaria autosómica recesiva 15 no sindrómica
		USH2A	síndrome de Usher tipo IIA autosómico recesivo congénito, sordera neurosensorial moderada a grave progresiva con la edad, función vestibular normal y retinitis pigmentaria que exhibe variación fenotípica, incluidos casos atípicos con disfunción vestibular, incluidos casos de retinitis pigmentaria no sindrómica

LISTADO DE SECUENCIAS

[0059]

5 <110> INSERM

<120> PROCEDIMIENTOS DE REALIZACIÓN DE LA OMISIÓN DE EXÓN MEDIADA POR OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO EN LA RETINA DE UN SUJETO QUE LO NECESITA

10 <130> BI013099 ROZET / MC

<160> 27

<170> Versión de PatentIn 3.3

15

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> cebador

<400> 1

25

gaccaccttg agaaggaaac 20

<210> 2

<211> 19

30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

35

<400> 2

catcctgctc agcttgatc 19

40

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

45

<220>

<223> cebador

<400> 3

50

cccaccaaac tattgccaac 20

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

55

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

60

<400> 4

gagagtcatc ttgttctgct ac 22

<210> 5
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 5
 10 tgactgctaa gtacaggac atcttg 26
 <210> 6
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 6
 aggagatgtt ttcacactcc aggt 24
 25 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 7
 35 ctggccccag ttgtaattg tga 23
 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 8
 ctgttcccag gctgttcaa tagt 24
 <210> 9
 50 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> cebador
 <400> 9
 tgactgctaa gtacaggac atct 24
 60 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 10
 aggagatggtt ttcacactcc aggt 24
 10 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 11
 20 ctggccccag ttgtaattg tga 23
 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 12
 ctgttcccag gcttggtcaa tagt 24
 <210> 13
 35 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 13
 tgacctaaag accattgcac ttctg 25
 45 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 14
 55 ctgcagcaaa tcgcttgga 20
 <210> 15
 <211> 25
 60 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

 <400> 15
 5 cctgtatgct atccagaaaa cccct 25

 <210> 16
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 16

 cgtagcagtt cagtatgttc ggctt 25

 20 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 17

 30 ctgcggtgt gatgtgtct gt 22

 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 40 <400> 18

 tgtgggtgat cagcgtctta aagt 24

 <210> 19
 45 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> cebador

 <400> 19

 gttggataca ggccagactt tggt 24
 55
 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> cebador

<400> 20

aaacgtgatt caaatccctg aagta 25

5

<210> 21

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> cebador

<400> 21

15

ccaaacacaa acggttccca gt 22

<210> 22

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

25

<400> 22

gcttgccatc cagccattca 20

<210> 23

30 <211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> cebador

<400> 23

gggacagtga gtaccagac atcta 25

40

<210> 24

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

45

<220>

<223> cebador

<400> 24

50

ccagacttgg tgttgatgc tt 22

<210> 25

<211> 28

55 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Antisentido

60

<400> 25

ES 2 794 499 T3

caaagaagta ccagatctgg ggcctac 28

<210> 26

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

10

<400> 26

tgatccagag cctggagtca a 21

15 <210> 27

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> cebador

<400> 27

25 ttcttctccg agctgcctat t 21

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido antisentido desnudo para su uso en el tratamiento de una enfermedad de la retina causada por una mutación que modifica el splicing y/o crea una terminación prematura en un gen importante para el funcionamiento y/o la supervivencia de una célula fotorreceptora, en un sujeto que lo necesita, donde dicho oligonucleótido antisentido desnudo se inyecta en el vítreo del sujeto, donde el oligonucleótido antisentido desnudo realiza la omisión de exón mediada por oligonucleótidos antisentido en el pre-ARN del gen cuya mutación causa la enfermedad de la retina, en una célula fotorreceptora del sujeto.
2. El oligonucleótido antisentido desnudo para el uso según la reivindicación 1, donde el oligonucleótido antisentido desnudo realiza la omisión de exón mediada por oligonucleótidos antisentido en el núcleo de una célula fotorreceptora del sujeto.
3. El oligonucleótido antisentido desnudo para el uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad de la retina se selecciona de distrofia macular relacionada con la edad 2 (ARMD2), distrofia de cono-bastón 4 (CORD4), retinitis pigmentaria 19 (RP19), enfermedad de Stargardt (STGD1), distrofia retiniana de cono-bastón 3 (CORD3), amaurosis congénita de Leber tipo 4 (LCA 4), hipertrofia congénita del epitelio pigmentario retiniano (CHRPE), síndrome de Usher tipo 1D (USH1D), síndrome de Stickler 2 autosómico dominante (AOM2), síndrome de Marshall (MRSH), amaurosis congénita de Leber tipo 8 (LCA 8), retinitis pigmentaria 12 (RP12), ceguera nocturna congénita estacionaria 2 (OED), disgenesia mesenquimal del segmento anterior ocular 4 (ASMD4), distrofia retiniana de cono bastón 6 (CORD6), amaurosis congénita de Leber tipo 1 (LCA 1), enfermedad del ojo de pez (FED), hipercolesterolemia no esterificada, **caracterizada por** opacidades corneales (LCAT), síndrome de Usher tipo IB (USH1B), síndrome de Coats (COATS), vitreoretinopatía forma exudativa rara ligada al cromosoma X (EVR2), enfermedad de Norrie (NDP), síndrome de Senior-Loken 1 (SLSN1), hipoprebetalipoproteinemia, acantocitosis, retinitis pigmentaria y degeneración palidal (HARP), enfermedad de Hallervorden-Spatz (PANK2), aniridia (AN), disgenesia mesenquimal del segmento ocular anterior 3 (ASMD3), ectopia pupilar (ECTP), hipoplasia foveal aislada (FVH), hipoplasia y aplasia del nervio óptico (OPNAB), síndrome del gen contiguo (WAGR), retinitis pigmentaria autosómica recesiva 2 (ARRP2), ceguera nocturna congénita estacionaria 3 autosómica dominante (CSNB3), enfermedad de Refsum (PBD7), hipoplasia autosómica dominante del iris con presión intraocular elevada por goniodisgenesia (iridogoniodisgenesia) y glaucoma secundario (IHG2), síndrome de Axenfeld Rieger (RIEG1), distrofia macular autosómica dominante, distrofia macular pigmentaria en forma de mariposa 1 (MDBS1), retinitis pigmentaria 7 (RP7), retinitis pigmentaria 1 autosómica recesiva 1 (ARRP1), ceguera nocturna congénita estacionaria 6 autosómica dominante (CSNB6), retinitis pigmentaria 4 (RP4), retinitis pigmentaria autosómica recesiva 8 (ARRP7), distrofia de news foundland de cono-bastón (NFRCD), retinitis punctata albescens (RPALB), amaurosis congénita de Leber tipo 2 (LCA 2), distrofia retiniana de expresión variable de inicio en la infancia autosómica recesiva 8 (RP20), distrofia de cono-bastón 1 (CORDX1), degeneración macular atrófica recesiva ligada a X (MDXA1), retinitis pigmentaria 15 (RP15), retinitis pigmentaria 3 (RP3), amaurosis congénita de Leber tipo 10 (LCA 10) retinitis pigmentaria autosómica recesiva 4 (RP14), retinitis pigmentaria autosómica recesiva 15 (ARRP15) y síndrome de Usher tipo IIA (USH2A).
4. El oligonucleótido antisentido desnudo para el uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad de la retina es una enfermedad degenerativa o estacionaria de la retina.
5. El oligonucleótido antisentido desnudo para el uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad de la retina se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentaria, degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de Bardet-Biedel, síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best, coroidema, atrofia de giro, amaurosis congénita de Leber, síndrome de Refsum, enfermedad de Stargardt, síndrome de Usher, neuropatías ópticas hereditarias, ceguera nocturna congénita estacionaria y discromatopsia y acromatopsia.
6. El oligonucleótido antisentido desnudo para el uso según la reivindicación 1, donde el oligonucleótido antisentido desnudo se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA), oligonucleótidos morfolinos, oligonucleótidos antisentido triciclo-ADN, oligonucleótidos de quimera de 2'-O-Me ARN/ENA y oligonucleótidos de 2'-O-metilfosforotioato.
7. El oligonucleótido antisentido desnudo para el uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad de la retina es la enfermedad de Stargardt y el oligonucleótido antisentido desnudo es la SEQ ID NO:25.
8. El oligonucleótido antisentido desnudo para el uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad de la retina es la amaurosis congénita de Leber y la omisión de exón mediada por oligonucleótidos antisentido se realiza en el exón 36 del pre-ARN de *Cep290*.
9. El oligonucleótido antisentido desnudo para el uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad de la retina es la amaurosis congénita de Leber y el oligonucleótido antisentido desnudo comprende una secuencia que consiste en 5'-GUUCUCAGAAUCU- UACCUGAGCUG-3' (SEQ ID NO:30) o 5'-CAUGAAGGUCUCCUCAUGC-3' (SEQ ID NO:31).

10. El oligonucleótido antisentido desnudo para el uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad de la retina es la amaurosis congénita de Leber y el oligonucleótido antisentido desnudo consiste en 5'-GUUCUCAGAAUCUUACCUGAGCUG-3' (SEQ ID NO:30) o 5'-CAUGAAGGUCUCCUCAUGC-3' (SEQ ID NO:31).

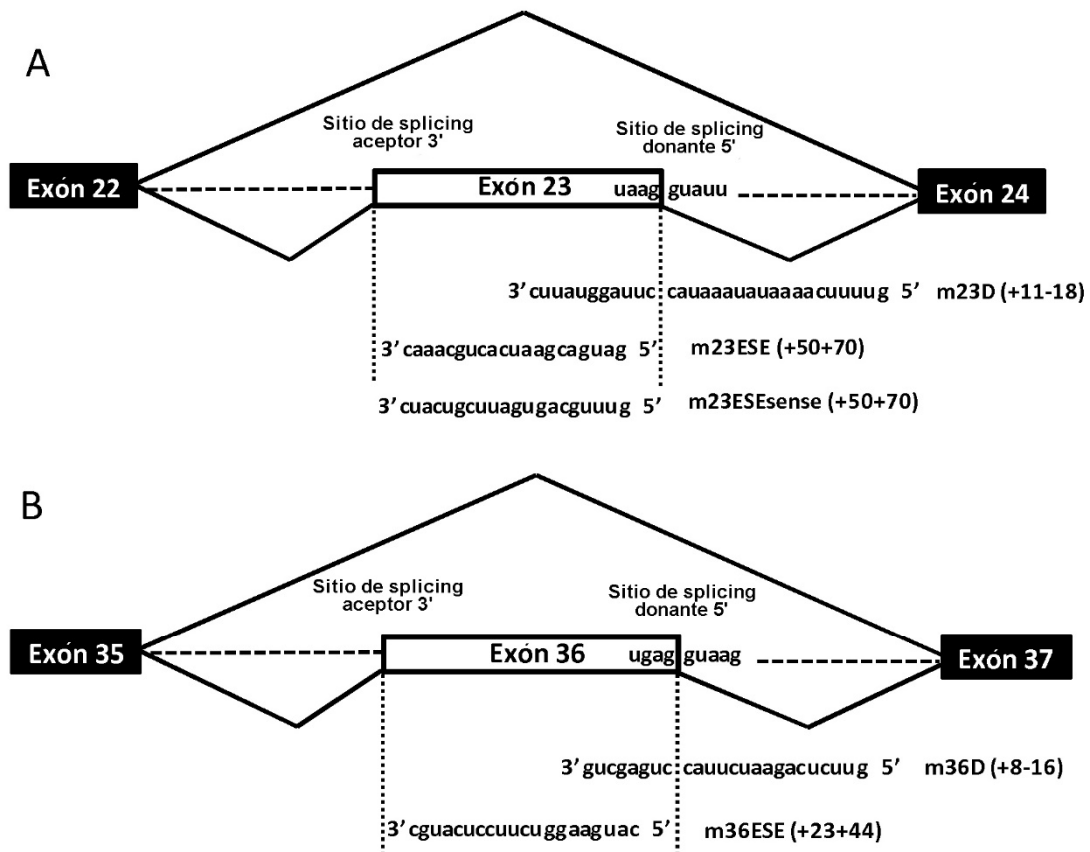


Figura 1

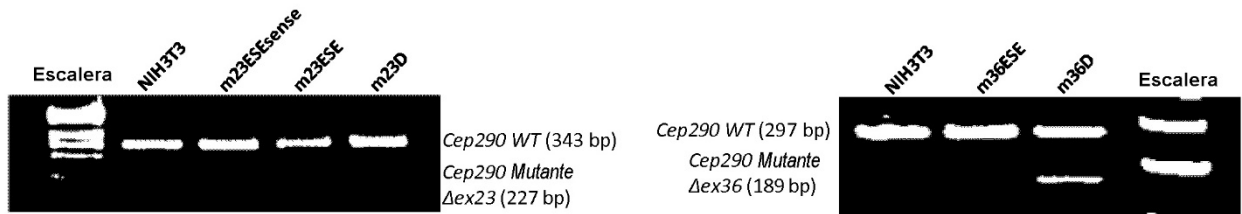


Figura 2A

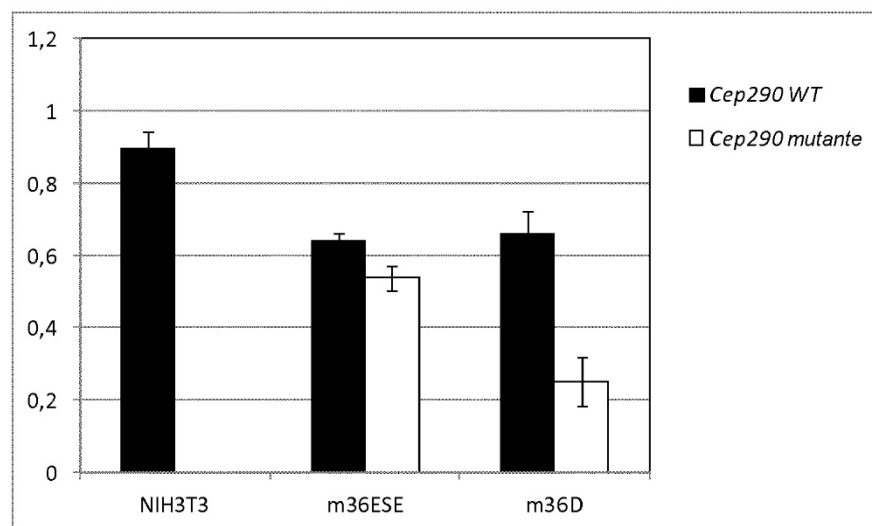
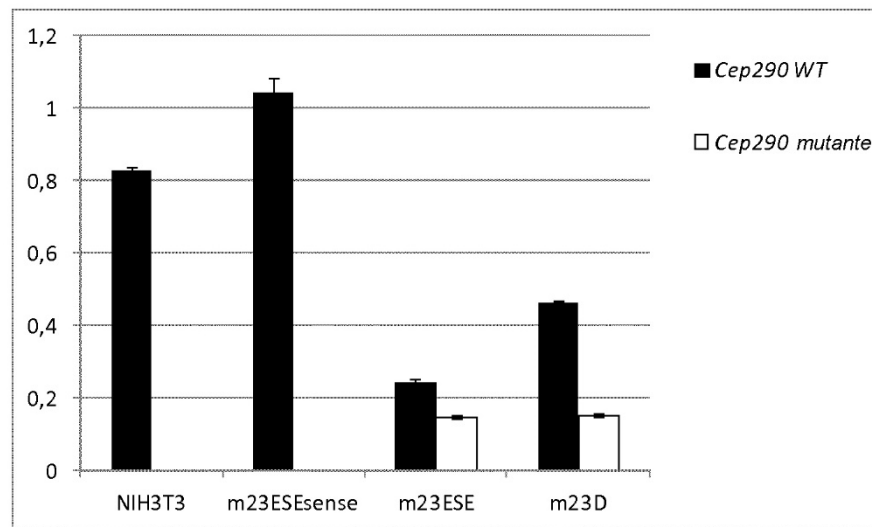


Figura 2B

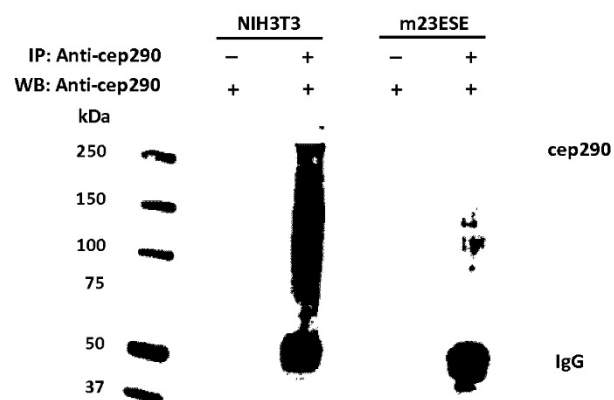


Figura 2C

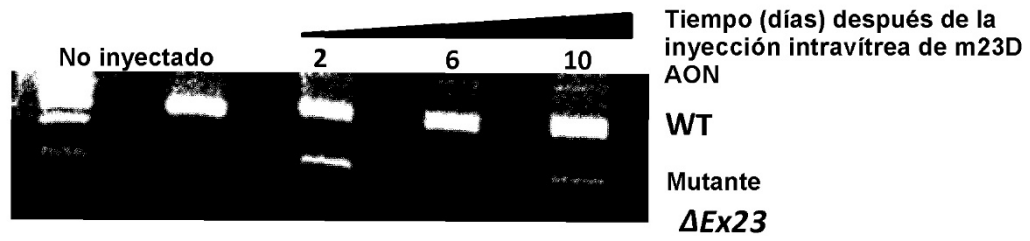


Figura 3A

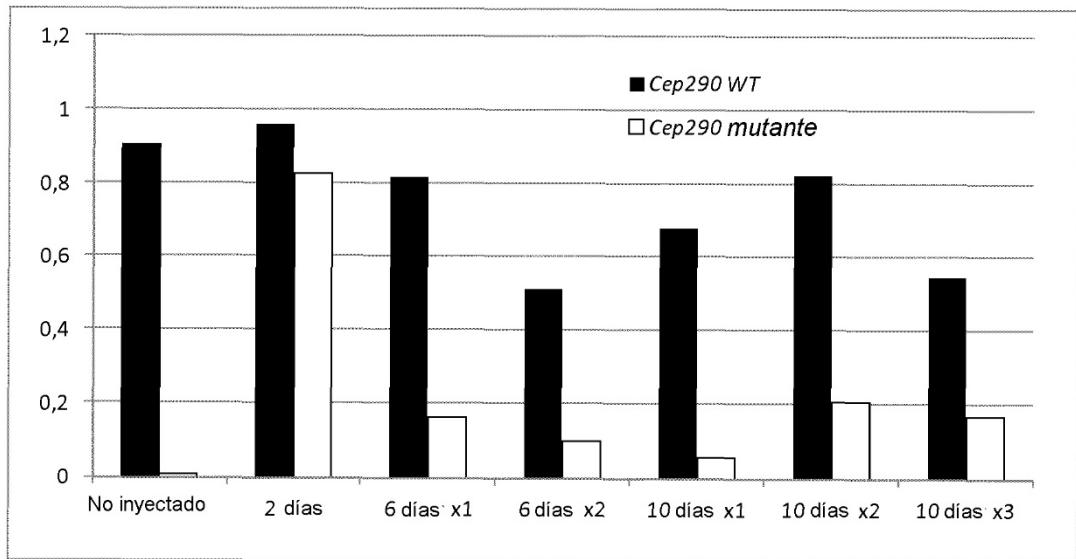


Figura 3B

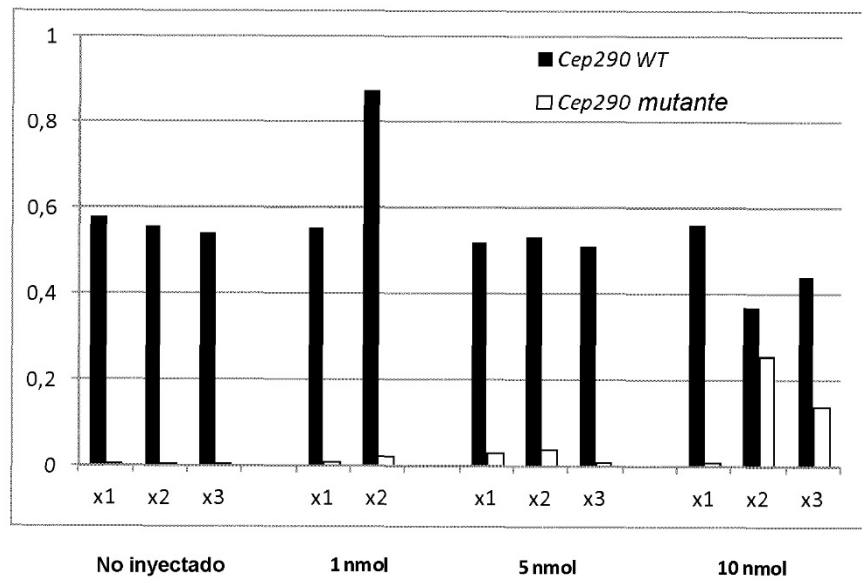


Figura 4

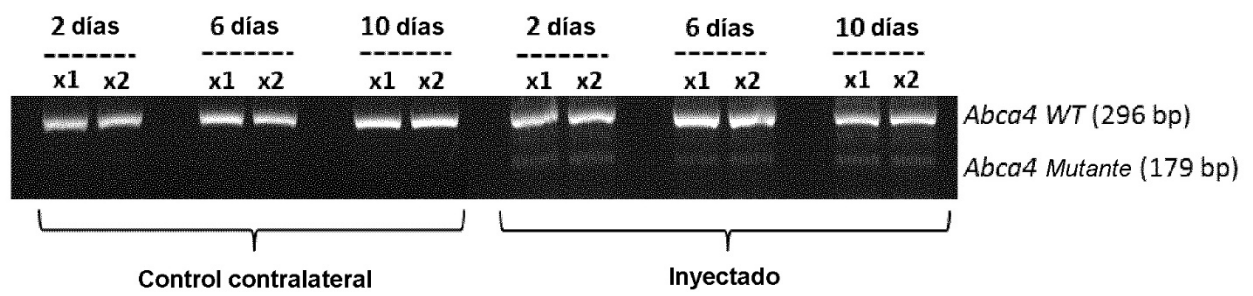


Figura 5