

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 801 823**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2017 PCT/EP2017/059830**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017 WO17186739**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2017 E 17721984 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3448999**

54 Título: **Oligonucleótidos para tratar una enfermedad ocular**

30 Prioridad:
25.04.2016 GB 201607141

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.01.2021

73 Titular/es:
**PROQR THERAPEUTICS II B.V. (100.0%)
Zernikedreef 9
2333 CK Leiden, NL**

72 Inventor/es:
**VAN DIEPEN, HESTER CATHARINA;
CHAN, HEE LAM y
TURUNEN, JANNE JUHA**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 801 823 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

Oligonucleótidos para tratar una enfermedad ocular

5 Campo de la Invención

La invención se refiere a los campos de la medicina y la inmunología. En particular, se refiere a nuevos oligonucleótidos antisentido para el tratamiento, prevención y/o retraso del síndrome de Usher de tipo II y/o la degeneración retiniana no sindrómica asociada a USH2A.

10 Antecedentes de la Invención

El síndrome de Usher (SU) y la retinitis pigmentaria no sindrómica (RPNS) son enfermedades degenerativas de la retina. El SU es clínica y genéticamente heterogéneo y, con mucho, el tipo más común de sordera hereditaria en los seres humanos. La discapacidad auditiva en pacientes con SU es predominantemente estable y congénita, y puede compensarse en parte con audífonos o implantes cocleares. La RPNS es más frecuente que el SU, y se da en 1 de cada 4.000 individuos. La degeneración de las células fotorreceptoras en el SU y la RPNS es progresiva, y a menudo lleva a la ceguera completa entre la tercera y cuarta década de la vida, lo que deja tiempo para la intervención terapéutica. La causa más frecuente de ambos trastornos reside en mutaciones en el gen *USH2A*. El abanico de mutaciones se extiende a lo largo de los 72 exones del *USH2A* y sus secuencias intrónicas flanqueantes, y contiene mutaciones sin sentido y mutaciones de sentido erróneo ("missense", en inglés), deleciones, duplicaciones, grandes reordenamientos y variantes de corte y empalme. El exón más frecuentemente mutado, con mucho, es el exón 13, que contiene dos mutaciones fundadoras (c.2299delG (p.E767SfsX21) en pacientes con síndrome de Usher de tipo II (SU2) y c.2276G>T (p.C759F) en pacientes con RPNS). Para el exón 50 se han descrito quince mutaciones patogénicas, de las cuales al menos ocho son claramente truncadoras de proteína. Vaché *et al.* (2012. Hum Mutat 33:104-8) describieron la primera mutación intrónica profunda en el intrón 40 de *USH2A* (c.7595-2144A>G). Esta mutación crea un sitio donante críptico de corte y empalme de alta calidad en el intrón 40, que da lugar a la inclusión de un exón aberrante de 152 pb en el ARNm del *USH2A* mutante, y conduce a la terminación prematura de la traducción (véanse las Figuras 1A y B del documento WO 2016/005514).

El SU y otras distrofias retinianas han sido consideradas durante mucho tiempo trastornos incurables. Sin embargo, varios ensayos clínicos de fase I/II con uso de terapia de aumento génico han conducido a resultados prometedores en grupos seleccionados de pacientes con ACL/RP/SU y mutaciones en los genes RPE65 y MYO7A. El tamaño de la secuencia codificante (15.606 pb) y el corte y empalme alternativo del gen *USH2A* y el ARNm, respectivamente, obstaculizan la terapia de aumento génico, debido a la actual limitación del tamaño de la carga de muchos vectores disponibles (p. ej., vectores adenoasociados (VAA) y lentivíricos).

A pesar del amplio potencial clínico de la terapia basada en oligonucleótidos antisentido (OAS), no se utiliza con frecuencia en el ojo de vertebrados. Los OAS son moléculas polinucleotídicas pequeñas (de 16-25 nucleótidos) que pueden interferir con el corte y empalme, ya que su secuencia es complementaria a la de moléculas pre-ARNm diana. Tras la unión de un OAS, la región diana del pre-ARNm ya no está disponible para factores de corte y empalme, lo que da como resultado la omisión del exón al que está dirigido el OAS. Terapéuticamente, esta metodología se puede emplear de dos maneras: a) para redirigir el corte y empalme normal de genes en los cuales las mutaciones activan sitios crípticos de corte y empalme y b) para omitir exones que portan mutaciones (truncadoras de proteína), de manera que el marco de lectura del ARNm permanece intacto y se genera una proteína (parcialmente) funcional. Para el gen *USH2A*, potencialmente se pueden omitir 28 de los 72 exones sin perturbar el marco de lectura general del transcrito. Los dos métodos basados en OAS se están aplicando con éxito en pacientes con trastornos genéticos graves. Liquori *et al.* (2016. Hum Mutat 37:184-193) han demostrado que un OAS podría evitar la inclusión, en el ARNm del gen *USH2A*, de un pseudoexón 50 (PE 50) de 155 pb originado por la mutación c.9959.4159A>G en el intrón 50.

Es un objetivo de la invención proveer una estrategia terapéutica conveniente para la prevención, tratamiento o retraso del SU y/o la RPNS causados por la mutación c.7595-2144A>G presente en el intrón entre el exón 40 y el 41 del gen *USH2A* humano. Se ha sugerido con anterioridad (Vaché *et al.* 2012), y posteriormente demostrado (documento WO 2016/005514), que los OAS pueden bloquear el corte y empalme aberrante de pre-ARNm de *USH2A* provocado por esta mutación, que conduce a la inclusión del pseudoexón 40: PE40. En particular, existe la necesidad de otras alternativas mejoradas que funcionen mejor y que tengan propiedades beneficiosas adicionales. Un objetivo de la presente invención es proveer tales alternativas.

Compendio de la Invención

La presente invención se refiere a un oligonucleótido antisentido (OAS) que es capaz de inducir la omisión del pseudoexón 40 (PE40) de pre-ARNm de *USH2A* humano, donde la inclusión del pseudoexón se debe a la c.7595-2144A>G en el gen *USH2A*, y donde dicho OAS comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de los siguientes grupos de secuencias: (i) SEQ ID NO: 6, 4, 8, 23, 30, 31, 32, 37; (ii) SEQ ID NO: 3, 5, 7, 19, 24, 25, 26, 34, 35, 36; y (iii) SEQ ID NO: 21, 27, 28, 29. En otra realización, la invención se refiere también a un OAS que es capaz de inducir la omisión de PE40 de pre-ARNm de *USH2A* humano, donde dicho OAS comprende una secuencia que es complementaria a al menos 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 45, 46 o 47. En una realización preferida, el OAS de la presente invención tiene una longitud de 18 a 143 nucleótidos,

preferiblemente de 18 a 40 nucleótidos, más preferiblemente de 18 a 30 nucleótidos, incluso más preferiblemente de 18 a 24 nucleótidos, y lo más preferiblemente consiste en una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 6, 3, 4, 5, 7, 8, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36 y 37, preferiblemente seleccionada de las SEQ ID NO: 6, 3, 4, 5, 7, 8, 26, 34, 35 y 37, más preferiblemente seleccionada de las SEQ ID NO: 6, 3, 4, 5, 7, 8, 26 y 35. En otra realización preferida, el OAS conforme a la invención comprende un oligonucleótido antisentido de 2'-*O*-alquilfosforotioato, tal como 2'-*O*-metil(ribosa modificada) (ARN), 2'-*O*-etil(ribosa modificada), 2'-*O*-propil(ribosa modificada) y/o derivados sustituidos de estas modificaciones, tales como derivados halogenados. Uno o varios nucleótidos dentro del OAS de la presente invención pueden estar modificados con una modificación 2'-*O*-metoxietilo. La invención se refiere además a un conjunto de OAS que comprende al menos dos OAS según se reivindican en la presente memoria. En otra realización, la invención se refiere también a un vector vírico que expresa un OAS conforme a la invención cuando se pone en condiciones propicias para la expresión del OAS. En otra realización más, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un OAS conforme a la invención o un conjunto de OAS conformes a la invención o un vector vírico conforme a la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención se refiere además a un OAS, un conjunto, un vector o una composición conformes a la invención, para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección relacionadas con USH2A, tal como el síndrome de Usher de tipo II, que requiera modular el corte y empalme de pre-ARNm de USH2A.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta los resultados de transcriptasa inversa del ensayo discriminante inicial de siete oligonucleótidos antisentido alternativos, que se han comparado en cuanto a eficacia de omisión del exón PE40 con dos oligonucleótidos antisentido conocidos en la técnica (AON1 y AON2: R1 y R2 respectivamente) y un oligonucleótido testigo no relacionado (testigo), utilizando un constructo informador en células HEK293, y muestra un claro incremento de la señal después de la administración de los USH2a-PE40-3, -5 y -7. El cuadro inferior muestra las posiciones aproximadas de los distintos OAS con respecto a la secuencia PE40.

La Figura 2 muestra la secuencia PE40 (en negrita y subrayada, y dividida en dos partes) desde 5' hacia 3', y los sitios de unión para los diferentes OAS ensayados en la presente memoria. Entre paréntesis se indica la SEQ ID NO de cada OAS ensayado, y los nombres están expuestos en la Tabla 1. El primer nucleótido aguas abajo de la secuencia PE40 es una guanosina (G) que representa la mutación c.7595-2144A>G. Las posiciones para el AON1 (1) y el AON2 (2) se indican directamente debajo de la secuencia de PE40. Las secuencias en cursiva son secuencias aguas arriba y aguas abajo de PE40. Las tres zonas de interés, tal como se subraya en los ejemplos y según se reivindica en la presente memoria, rodean a USH2a-PE40-3 (SEQ ID NO: 19, en negrita), USH2a-PE40-5 (SEQ ID NO: 21, en negrita) y USH2a-PE40-7 (SEQ ID NO: 23, en negrita), respectivamente.

La Figura 3 presenta los resultados de transcriptasa inversa del ensayo discriminante de omisión de PE40 para un conjunto de oligonucleótidos basados en los USH2a-PE40-3, -5 y -7, que se muestran en las Figuras 1 y 2. Claramente, los OAS USH2a-PE40-8 y -11 (basados en USH2a-PE40-3) y el USH2a-PE40-17 (basado en

USH2a-PE40-7) mostraron una intensidad adicionalmente incrementada, lo que sugiere una mejora adicional con respecto a los oligonucleótidos conocidos en la técnica.

La Figura 4 presenta los resultados de transcriptasa inversa del ensayo discriminante de omisión de PE40 para un conjunto de oligonucleótidos que han sido llevados un paso más allá y se basan en los USH2a-PE40-8, -11 y -17.

La nota "corto" significa "más corto que el original". 5mC significa 5-metilcitosina (véase también la Tabla 1). DAP significa 2,6-diaminopurina.

La Figura 5 muestra un diagrama de barras que representa el número de gotas que expresan PE40 (barras de la izquierda para cada OAS) en comparación con productos de tipo natural (barras de la derecha para cada OAS), corregido en cuanto a la expresión de beta-glucuronidasa debida al gen GUSB (gen de mantenimiento) como patrón, y como es utilizado frecuentemente por las personas expertas en la técnica, en fibroblastos de pacientes con SU2, tratados con ocho oligonucleótidos diferentes, según se reseña en el Ejemplo 1.

La Figura 6 presenta los resultados de una evaluación de inmunogenicidad e inmunotoxicidad de los OAS de USH2a-PE40 que se indican, en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas. A. "Mapa de calor" que representa los cambios en órdenes de magnitud y los niveles de significancia de las concentraciones de citocina en el sobrenadante de cultivo después de estimulación durante 24 h de CMSP humanas con oligonucleótidos tal como se describe en la presente memoria, o los testigos positivos LPS (100 ng/ml) y R848 (1 μ M), en comparación con CMSP humanas tratadas con solución salina. Cada cuadrado muestra el cambio en órdenes de magnitud para cada condición de tratamiento y para cada citocina medida.

B. Número relativo de CMSP viables, expresado como cambio en órdenes de magnitud de la fluorescencia de resorufina, en comparación con CMSP tratadas con solución salina después de exposición durante 24 h a cuatro diferentes oligonucleótidos antisentido USH2a-PE40 de la presente invención, o a los testigos positivos. La evaluación de las células viables se efectuó con el kit CellTiter-Blue® (Promega), haciendo uso de los protocolos del fabricante. Para todas las réplicas biológicas individuales, los cambios en órdenes de magnitud se calcularon normalizando las unidades de fluorescencia relativa (UFR) medidas frente a la media geométrica del testigo con solución salina, triplicado, correspondiente. Se exponen los resultados para cada donante individual como media \pm ETM (error típico de la media) del cambio en órdenes de magnitud, por

triplicado, normalizado frente a la media de su correspondiente testigo con solución salina (línea de trazos). Se realizó ANOVA unidireccional de medidas repetidas con prueba de Dunnett para correcciones múltiples (en comparación con solución salina).

La Figura 7 muestra los resultados de omisión de PE40 en pre-ARNm de *USH2A* en cúpulas ópticas generadas a partir de fibroblastos obtenidos de un paciente heterocigoto de SU2, tras el tratamiento con USH2a-PE40-24.

Las cuatro pistas de la izquierda muestran los resultados en cúpulas ópticas generadas a partir de fibroblastos de un donante sano, y las tres pistas siguientes muestran los resultados en cúpulas ópticas procedentes de los fibroblastos del paciente con SU2. El oligonucleótido testigo es un oligonucleótido no relacionado que no es complementario con pre-ARNm de *USH2A*. El testigo negativo a la derecha no contiene material de ácido nucleico. La pista testigo 5 muestra dos bandas dominantes, la banda superior que representa el ARNm que comprende la secuencia PE40 y la banda gruesa inferior que representa el ARNm que carece de la secuencia PE40. El tratamiento con USH2a-PE40-24 da como resultado la omisión completa de PE40 del pre-ARNm, ya que no se detectan bandas superiores.

Descripción detallada

Para los fines de la invención se consideran sinónimas las expresiones "inclusión de pseudoexón aberrante", "inclusión de pseudoexón 40 aberrante" o "inclusión de pseudoexón nucleotídico aberrante de 152 pb", y se considera que significan la inclusión del pseudoexón 40 (PE40) del gen *USH2A* en el ARNm, o la inclusión de una parte del mismo o una secuencia que comprende 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de esa secuencia en el ARNm de *USH2A*.

La expresión "omisión de exón" se define en la presente memoria como la inducción, producción o incremento de la producción, dentro de una célula, de un ARNm maduro que no contiene un exón particular que estaría presente en el ARNm maduro en ausencia de la omisión de exón. La omisión de exón se consigue al proporcionar, a una célula que expresa el pre-ARNm de dicho ARNm maduro, una molécula capaz de interferir con secuencias tales como, por ejemplo, la secuencia donante (críptica) de corte y empalme o la secuencia aceptora (críptica) de corte y empalme, requeridas para permitir el proceso enzimático de corte y empalme, o una molécula que es capaz de interferir con una señal de inclusión de exón requerida para reconocer un tramo de nucleótidos como exón que ha de ser incluido en el ARNm maduro; a tales moléculas se les denomina en la presente memoria "moléculas para omisión de exón". En la presente invención, la omisión de exón se refiere a la omisión de PE40.

El término "pre-ARNm" se refiere a un ARNm precursor sin procesar o parcialmente procesado que es sintetizado por transcripción a partir de una plantilla de ADN de una célula, por ejemplo en el núcleo.

La expresión "retención de exón" se refiere a la producción, dentro de una célula, de un ARNm maduro que incluye un exón particular cuando no se ha producido omisión de exón de ese exón durante el procesamiento del pre-ARNm a través de la reacción de corte y empalme. En lo que se refiere a la presente invención, el PE40 que normalmente no está presente en el ARNm maduro del gen *USH2A* humano cuando es de tipo natural, permanece en el ARNm maduro del gen *USH2A* humano cuando una mutación particular hace que el PE40 no sea eliminado por corte y empalme del pre-ARNm, como sucede en presencia de la mutación c.7595-2144A>G según se aborda con detalle en la presente memoria. El objetivo de la presente invención es prevenir, inhibir o reducir la retención de exón del PE40 en el ARNm de *USH2A* humano, con lo que se previene, se retrasa y/o se trata el síndrome de Usher de tipo II.

Se entiende que la expresión "oligonucleótido antisentido" (OAS) se refiere a una secuencia nucleotídica que es sustancialmente complementaria a una secuencia nucleotídica diana en una molécula de pre-ARNm, una molécula de ARN nuclear heterogéneo (ARNnh) o una molécula de ARNm. En la presente memoria se proporcionan las secuencias diana de los oligonucleótidos de la presente invención. Preferiblemente, el grado de complementariedad (o de complementariedad sustancial) de la secuencia antisentido es tal que una molécula que comprende la secuencia antisentido puede formar, en condiciones fisiológicas, un híbrido estable con la secuencia nucleotídica diana de la molécula de ARN. En la presente memoria se emplean indistintamente la expresión "oligonucleótido antisentido", su abreviatura "OAS" y el término "oligonucleótido", y se entiende que se refieren a un oligonucleótido que comprende una secuencia antisentido. Preferiblemente, el oligonucleótido antisentido es monocatenario y preferiblemente no se autohibrida, ni consigo mismo ni con otro OAS del mismo tipo.

La expresión "sustancialmente complementario", usada en el contexto de la invención, indica que están permitidos algunos emparejamientos erróneos en la secuencia antisentido siempre que la funcionalidad, es decir, la inducción de la omisión de PE40, sea todavía aceptable.

La expresión "omisión de pseudoexón" se define en la presente memoria como la inducción, estímulo, causa, intensificación, producción o incremento de la producción, dentro de una célula, de un ARNm maduro que no contiene una región intrónica o pseudoexón particular que estaría presente en el ARNm maduro en ausencia de la omisión de pseudoexón. La omisión de pseudoexón se consigue al proporcionar, a una célula que expresa el pre-ARNm de dicho ARNm maduro, una molécula capaz de interferir con secuencias tales como, por ejemplo, la secuencia donante (críptica) de corte y empalme o la secuencia aceptora (críptica) de corte y empalme, requeridas

para permitir el proceso enzimático de corte y empalme, o una molécula que es capaz de interferir con una señal de inclusión de pseudoexón requerida para reconocer un tramo de nucleótidos como pseudoexón que ha de ser incluido en el ARNm maduro; a tales moléculas se las denomina en la presente memoria "moléculas para omisión de pseudoexón".

5 Preferiblemente, la complementariedad alcanza de 90 % a 100 %. En general, esto permite 1 o 2 emparejamientos erróneos en un oligonucleótido de 20 nucleótidos o 1, 2, 3 o 4 emparejamientos erróneos en un oligonucleótido de 40 nucleótidos, o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 emparejamientos erróneos en un oligonucleótido de 60 nucleótidos, etc.

10 En una realización, un OAS para omisión de exón, según se define en la presente memoria, puede ser un compuesto que se une y/o es complementario a una secuencia especificada. En los documentos WO 2002/024906, US 6.875.736 y WO 2016/005514, por ejemplo, que se incorporan en la presente memoria por referencia, se describen métodos para ensayar discriminadamente OAS que se unen a secuencias nucleotídicas específicas. La unión a secuencias específicas, preferiblemente en el contexto del pseudoexón 40 (PE40) aberrante de 152 nucleótidos de USH2A, puede evaluarse mediante técnicas conocidas por la persona experta. Una técnica preferida es el ensayo de cambio de movilidad en gel, según se describe en el documento EP1619249. En una realización preferida, se dice que un OAS para omisión de (pseudo)exón está unido cuando, en un ensayo de cambio de movilidad en gel, se puede detectar una unión de dicha molécula a una secuencia marcada.

20 En todas las realizaciones de la invención, una "molécula para omisión de (pseudo)exón" es un OAS. El diseño de un OAS para el propósito de la presente invención tiene particular relevancia. En un método preferido, se debe tener en cuenta al menos uno de los siguientes aspectos para diseñar o mejorar dicha molécula para omisión de exón: (1) que, preferiblemente, el OAS no contenga una CpG o un tramo de motivos CpG; y (2) que el OAS tenga una cinética de unión a ARN y/o propiedades termodinámicas aceptables. La presencia de CpG o de un tramo de motivos CpG en un oligonucleótido está asociada generalmente con una inmunogenicidad aumentada de dicho oligonucleótido. La inmunogenicidad se puede evaluar en un modelo animal determinando la presencia de células CD4+ y/o CD8+ y/o la infiltración por mononucleocitos inflamatorios. También se puede evaluar en la sangre de un animal o de un ser humano tratado con un oligonucleótido de la invención mediante la detección de la presencia de un anticuerpo neutralizante y/o de un anticuerpo que reconozca dicho oligonucleótido, haciendo uso de un inmunoensayo estándar conocido por la persona experta. Se puede evaluar una reacción inflamatoria, la producción de interferón de tipo I, la producción de IL-12 y/o un incremento de la inmunogenicidad, mediante la detección de la presencia de un anticuerpo neutralizante o de una cantidad incrementada del mismo, o de un anticuerpo que reconozca dicho oligonucleótido, haciendo uso de un inmunoensayo estándar.

35 La invención se refiere a un OAS con una cinética de unión a ARN y/o propiedades termodinámicas aceptables. La cinética de unión a ARN y/o las propiedades termodinámicas están determinadas, al menos en parte, por la temperatura de fusión (Tf) de un oligonucleótido (calculada con el calculador de propiedades de oligonucleótidos (www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html) para ARN monocatenario utilizando la Tf básica y el modelo vecino más cercano), y/o la energía libre del complejo de OAS y exón diana (utilizando RNAstructure, versión 4.5). Si la Tf es demasiado elevada, se espera que el oligonucleótido sea menos específico. Una Tf y energía libre aceptables dependen de la secuencia del oligonucleótido. Por lo tanto, es difícil indicar intervalos preferidos para cada uno de estos parámetros. Una Tf aceptable puede estar en el intervalo entre 35 y 70 °C, y una energía libre aceptable puede estar en el intervalo entre 15 y 45 kcal/mol.

45 En una realización preferida se dice que un OAS induce la omisión del pseudoexón 40 aberrante de 152 nucleótidos de USH2A (SEQ ID NO: 5 en el documento WO 2016/005514), cuando el porcentaje de omisión del pseudoexón 40 aberrante de 152 nucleótidos de USH2A, medido mediante análisis por reacción en cadena de polimerasa (RCP) cuantitativa en tiempo real (TR), es al menos 30 %, o al menos 35 %, o al menos 40 %, o al menos 45 %, o al menos 50 %, o al menos 55 %, o al menos 60 %, o al menos al menos 65 %, o al menos 70 %, o al menos 75 %, o al menos 80 %, o al menos 85 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %, o 100 %. Los ensayos preferidos para determinar la omisión de exón y/o la retención de exón se describen en los ejemplos de la presente memoria.

55 Preferiblemente, un OAS conforme a la invención comprende una secuencia que es complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia nucleotídica de PE40 (SEQ ID NO: 9 en la presente memoria) o una parte de la misma, de manera que la parte (sustancialmente) complementaria constituye al menos 50 % de la longitud del oligonucleótido conforme a la invención, más preferiblemente al menos 60 %, incluso más preferiblemente al menos 70 %, incluso más preferiblemente al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 90 % o incluso más preferiblemente al menos 95 %, o incluso más preferiblemente 98 % o incluso más preferiblemente al menos 99 %, o incluso más preferiblemente 100 %. Preferiblemente, un OAS conforme a la invención comprende, o consiste en, una secuencia que es complementaria a una parte de la SEQ ID NO: 9, que se muestra a continuación:

65

Pseudoexón 40: PE40

5' – CTTCTCTCCAGAATCACACAAGTTAAAGGACCCTTCTGCAACAAGAGCAGCG
 AATCTACTCAGCCAGAGCAGGAAGCTAATAAAATGTATGCTGGCTTTTAAGGGGA
 AACAAATCATGAAATTGAAATTGAACACCTCTCCTTTCCCAAG – 3' (SEQ ID NO:9)

5 A modo de ejemplo, un OAS puede comprender una secuencia que sea complementaria a parte de la SEQ ID NO: 9 y secuencias flanqueantes adicionales, en especial el sitio de corte y empalme en el extremo 3' de PE40. En una realización más preferida, la longitud de dicha parte complementaria de dicho OAS es al menos 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 141, 142 o 143 nucleótidos. Se pueden emplear secuencias flanqueantes adicionales para modificar la unión, o para modificar una propiedad termodinámica del OAS, más preferiblemente para modificar la afinidad de unión al ARN diana. La persona experta sabe que, por lo tanto, no es absolutamente necesario que todas las bases de la región de complementariedad sean capaces de emparejarse con bases de la cadena opuesta. Por ejemplo, cuando se diseña el OAS puede desearse incorporar, por ejemplo, un resto que no forme pareja de bases con la base de la cadena complementaria. Se pueden permitir hasta cierto punto los emparejamientos erróneos si, en las circunstancias de la célula, el tramo de nucleótidos es suficientemente capaz de hibridarse con la parte complementaria. En este contexto, "suficientemente" significa preferiblemente que, si se utiliza un ensayo de cambio de movilidad en gel según se describe en el ejemplo 1 del documento EP1619249, se puede detectar la unión de un OAS.

20 Como opción, se puede ensayar adicionalmente dicho OAS mediante transfección a fibroblastos o células retinianas de pacientes. La omisión de un exón diana puede evaluarse mediante RCP-TR (por ejemplo, según se describe en el documento EP1619249). Preferiblemente, las regiones complementarias están diseñadas de manera que, cuando se combinan, son específicas para el exón del pre-ARNm. Esta especificidad se puede crear con diversas longitudes de regiones complementarias, ya que ello depende de las secuencias reales en otras moléculas (pre)-ARNm del sistema. El riesgo de que el OAS también sea capaz de hibridarse con una o más moléculas pre-ARNm disminuye al aumentar el tamaño del OAS. Está claro que se pueden utilizar en la invención los OAS que comprenden emparejamientos erróneos en la región de complementariedad, pero conservan la capacidad de hibridarse y/o unirse a la región o regiones diana del pre-ARNm. No obstante, preferiblemente al menos las partes complementarias no comprenden tales emparejamientos erróneos, ya que los OAS que carecen de emparejamientos erróneos en la parte complementaria tienen típicamente una eficacia y especificidad mayores que los OAS que presentan tales emparejamientos erróneos en una o más regiones complementarias. Se cree que mayores intensidades de hibridación (es decir, un número más alto de interacciones con la cadena opuesta) resultan favorables para incrementar la eficacia del proceso de interferir con la maquinaria de corte y empalme del sistema. Preferiblemente, la complementariedad alcanza de 90 % a 100 %.

35 Un OAS para omisión de pseudoexón, de la invención, se encuentra preferiblemente en forma aislada. Un OAS para omisión de pseudoexón conforme a la invención, preferido, tiene una longitud de 18 a 143 nucleótidos, más preferiblemente de 18 a 60, más preferiblemente de 18 a 40 nucleótidos, más preferiblemente de 18 a 30 nucleótidos, más preferiblemente de 18 a 24 nucleótidos, lo más preferiblemente 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos o 24 nucleótidos. En otra realización preferida, el OAS de la invención consta de 18 a 143 nucleótidos, más preferiblemente de 18 a 40 nucleótidos, más preferiblemente de 18 a 30 nucleótidos, más preferiblemente de 18 a 20 nucleótidos, o consta preferiblemente de 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 141, 142 o 143 nucleótidos.

45 Se prefiere que un OAS para omisión de exón, de la invención, comprenda uno o más restos que están modificados para aumentar la resistencia a nucleasa y/o aumentar la afinidad del OAS hacia la secuencia diana. Por lo tanto, en una realización preferida, la secuencia OAS comprende al menos un análogo de nucleótido o equivalente, donde un análogo de nucleótido o equivalente se define como un resto que tiene una base modificada y/o una cadena principal modificada y/o un enlace internucleosídico no natural, o una combinación de estas modificaciones.

55 En una realización preferida, el análogo de nucleótido o equivalente comprende una cadena principal modificada. Proporcionan ejemplos de tales cadenas principales las cadenas principales de morfolino, cadenas principales de carbamato, cadenas principales de siloxano, cadenas principales de sulfuro, de sulfóxido y de sulfona, cadenas principales de formacetilo y de tioformacetilo, cadenas principales de metilformacetilo, cadenas principales de riboacetilo, cadenas principales que contienen alqueno, cadenas principales de sulfamato, de sulfonato y de sulfonamida, cadenas principales de metilnimino y de metilhidrazino, y cadenas principales de amida. Los oligómeros de fosfordiamidatomorfolino son oligonucleótidos con cadena principal modificada que han sido estudiados con anterioridad como agentes antisentido. Los oligonucleótidos de morfolino tienen una cadena principal sin carga en la cual el azúcar desoxirribosa del ADN ha sido reemplazado por un anillo de seis miembros y el enlace fosfodiéster ha sido reemplazado por un enlace fosfordiamidato. Los oligonucleótidos de morfolino son resistentes a la degradación enzimática y parecen funcionar como agentes antisentido al detener la traducción o interferir con el

5 corte y empalme de pre-ARNm, más que por activar la RNasa H. Se han administrado con éxito oligonucleótidos de morfolino a células de cultivo de tejido, mediante métodos que rompen físicamente la membrana celular, y un estudio que comparaba varios de estos métodos descubrió que la carga por raspado era el método de administración más eficaz; sin embargo, debido a que la cadena principal de morfolino no está cargada, los lípidos catiónicos no son mediadores eficaces de la captación de oligonucleótidos de morfolino en células. Un informe reciente ha demostrado la formación de tríplexes por un oligonucleótido de morfolino, y estos estudios han revelado que el oligonucleótido de morfolino, debido a su cadena principal no iónica, era capaz de formar tríplexes en ausencia de magnesio. Se prefiere además que el enlace entre los restos de una cadena principal no incluya un átomo de fósforo, como en un enlace formado por enlaces internucleosídicos de alquilo de cadena corta o cicloalquilo, enlaces internucleosídicos mixtos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos de cadena corta o heterocíclicos. Un análogo de nucleótido o equivalente, preferido, comprende un ácido nucleico peptídico (ANP) que tiene una cadena principal de poliamida modificada. Las moléculas basadas en ANP son verdaderas imitaciones de las moléculas de ADN en términos de reconocimiento de pares de bases. La cadena principal de un ANP está compuesta por unidades de N-(2-aminoetil)glicina unidas por enlaces peptídicos, estando enlazadas las nucleobases a la cadena principal a través de enlaces metilencarbonilo. Una cadena principal alternativa comprende un monómero de ANP de pirrolidina extendido en un carbono. Dado que la cadena principal de una molécula de ANP no contiene grupos fosfato cargados, los híbridos ANP-ARN suelen ser más estables que los híbridos ARN-ARN o ARN-ADN, respectivamente. Una cadena principal preferida adicional comprende un análogo de nucleótido de morfolino o equivalente, en el cual el azúcar ribosa o desoxirribosa ha sido reemplazado por un anillo de morfolino de 6 miembros. Un análogo de nucleótido o equivalente, sumamente preferido, comprende un oligómero de fosforodiamidatomorfolino (PMO, por sus siglas en inglés), en el cual el azúcar ribosa o desoxirribosa ha sido reemplazado por un anillo de morfolino de 6 miembros, y el enlace fosfodiéster aniónico entre anillos de morfolino adyacentes ha sido reemplazado por un enlace fosforodiamidato no iónico. En otra realización adicional, un análogo de nucleótido o equivalente de la invención comprende una sustitución de uno de los oxígenos no puenteantes del enlace fosfodiéster. Esta modificación desestabiliza ligeramente el emparejamiento de bases, pero añade resistencia significativa a la degradación por nucleasas. Un análogo de nucleótido o equivalente, preferido, comprende fosforotioato, fosforotioato quiral, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, H-fosfonato, metil- y otros alquilfosfonatos, entre ellos 3'-alquilenfosfonato, 5'-alquilenfosfonato y fosfonato quiral, fosfinato, fosforamidato, que incluye 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidato, tionofosforamidato, tionoalquilfosfonato, tionoalquilfosfotriéster, selenofosfato o boranofosfato. Otro análogo de nucleótido o equivalente de la invención, preferido, comprende uno o más restos de azúcar que están mono o disustituídos en la posición 2', 3' y/o 5' con, por ejemplo, un -OH; -F; alquilo inferior (C1-C10) sustituido o sin sustituir, lineal o ramificado, alqueno, alquino, alcarilo, alilo o aralquilo, que pueden estar interrumpidos por uno o más heteroátomos; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; O-, S- o N-alilo; O-alquil-O-alquilo, -metoxi, -aminopropoxi; metoxietoxi; dimetilaminoetoxi y -dimetilaminoetoxietoxi. El resto de azúcar puede ser una piranosa o derivado de la misma, o una desoxipranosa o derivado de la misma, preferiblemente ribosa o derivado de la misma, o desoxirribosa o derivado de la misma. Un resto de azúcar derivatizado preferido comprende un ácido nucleico bloqueado (ANB), en el cual el átomo de carbono 2' está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar, formando así un resto de azúcar bicíclico. Un ANB preferido comprende ácido nucleico puenteado con etileno entre 2'-O y 4'-C. Estas sustituciones hacen al análogo de nucleótido o equivalente resistente a RNasa H y a nucleasa, e incrementan la afinidad hacia el ARN diana. En otra realización, un análogo de nucleótido o equivalente de la invención comprende una o más modificaciones o sustituciones de bases. Las bases modificadas comprenden bases sintéticas y naturales tales como inosina, xantina, hipoxantina y otros derivados de aza, deaza, hidroxí, halo, tio, tiol, alquilo, alqueno, alquino y tioalquilo de bases pirimidínicas y purínicas, que son o serán conocidos en la técnica. Una persona experta entenderá que no es necesario que todas las posiciones de un OAS estén modificadas de manera uniforme. Además, más de uno de los análogos o equivalentes mencionados en lo que antecede pueden estar incorporados en un único OAS o incluso en una única posición dentro de un OAS. En ciertas realizaciones, un OAS de la invención tiene al menos dos tipos diferentes de análogos o equivalentes.

50 Un OAS para omisión de pseudoexón conforme a la invención, preferido, es un OAS de 2'-O-alquilfosforotioato, tal como 2'-O-metil(ribosa modificada) (ARN), 2'-O-etil(ribosa modificada), 2'-O-propil(ribosa modificada) y/o derivados sustituidos de estas modificaciones, tales como derivados halogenados. Un OAS eficaz conforme a la invención comprende una 2'-O-metilribosa con una cadena principal de fosforotioato.

55 Una persona experta también comprenderá que para omitir eficazmente el pseudoexón aberrante de 152 nucleótidos de *USH2A* se pueden combinar distintos OAS. En una realización preferida, se utiliza en un método de la invención una combinación (o conjunto) de al menos 2, 3, 4, 5 o 6 OAS.

60 Un OAS puede estar unido a un resto que intensifica la captación del OAS en células, preferiblemente células retinianas. Son ejemplos de tales restos colesterolos, carbohidratos, vitaminas, biotina, lípidos, fosfolípidos, péptidos de penetración en células, que incluyen, pero sin limitación, antennapedia, TAT, transportano y aminoácidos cargados positivamente tales como oligoarginina, poliarginina, oligolisina o polilisina, dominios de unión a antígeno tales como los proporcionados por un anticuerpo, un fragmento Fab de un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno monocatenario tal como un dominio de unión a antígeno de dominio único cameloide.

Un OAS conforme a la invención puede ser administrado indirectamente utilizando medios adecuados conocidos en la técnica. Puede ser proporcionado, por ejemplo, a un individuo o a una célula, tejido u órgano de dicho individuo en forma de un vector de expresión, donde el vector de expresión codifica un transcrito que comprende dicho OAS. El vector de expresión es introducido preferiblemente en una célula, tejido, órgano o individuo a través de un vehículo para administración de genes. En una realización preferida se provee un vector de expresión basado en virus que comprende un casete de expresión o un casete de transcripción que promueve la expresión o transcripción de una molécula para omisión de exón según se identifica en la presente memoria. En consecuencia, la invención provee un vector vírico que expresa un OAS conforme a la invención cuando se le pone en condiciones propicias para la expresión del OAS. Se puede proporcionar a una célula un OAS capaz de interferir con secuencias esenciales que dan como resultado una omisión altamente eficaz del pseudoexón aberrante de 152 nucleótidos de *USH2A* a causa de la expresión de OAS derivado de plásmido o la expresión vírica originada por vectores basados en adenovirus o virus adenoasociados. La expresión puede ser promovida por un promotor de polimerasa II (Pol II) tal como un promotor U7, o un promotor de polimerasa III (Pol III) tal como un promotor de ARN U6. Un vehículo preferido de administración es un vector vírico tal como un vector de virus adenoasociado (AAV), o un vector retrovírico tal como un vector de lentivirus y similares, todo ello según se describe con detalle en el documento WO 2016/005514. También se pueden aplicar adecuadamente, para administrar un oligonucleótido según se define en la presente memoria, plásmidos, cromosomas artificiales, plásmidos utilizables para recombinación homóloga dirigida e integración en el genoma humano de células. Se prefieren para la presente invención aquellos vectores en los cuales la transcripción es promovida por promotores Pol-III, y/o en los cuales los transcritos están en forma de fusiones con transcritos U1 o U7, que dan buenos resultados en la administración de pequeños transcritos. Está dentro de la habilidad del artesano el diseñar transcritos adecuados. Se prefieren transcritos promovidos por Pol-III, preferiblemente en forma de un transcrito de fusión con un transcrito U1 o U7.

El OAS conforme a la invención puede ser administrado tal cual. Sin embargo, el vector vírico también puede codificar el OAS. Típicamente, esto se da en forma de un transcrito de ARN que comprende la secuencia de un OAS conforme a la invención en una parte del transcrito.

Considerando el progreso conseguido hasta la fecha, se prevén mejoras en los medios para proporcionar un OAS conforme a la invención a un individuo o a una célula, tejido u órgano de dicho individuo. Tales mejoras futuras podrán incorporarse, por supuesto, para lograr el efecto mencionado sobre la reestructuración de ARNm haciendo uso de un método de la invención. Un OAS conforme a la invención puede ser administrado tal cual a un individuo o a una célula, tejido u órgano de dicho individuo. Cuando se administra un OAS conforme a la invención, se prefiere que la molécula esté disuelta en una solución que sea compatible con el método de administración. Se puede proporcionar un plásmido para la expresión de OAS a células de la retina o del oído interno proporcionando el plásmido en una solución acuosa o a través de un vector vírico o de nanopartículas, todo ello según se describe con detalle en el documento WO 2016/005514. Preferiblemente, a las células de la retina o del oído interno se administran vectores víricos o nanopartículas. La persona experta puede seleccionar y adaptar cualquiera de los excipientes y sistemas de administración conocidos y/u otros alternativos, comercialmente disponibles, para empaquetar y administrar un OAS para uso en la presente invención con el fin de administrarlo para la prevención, tratamiento o retraso de una enfermedad o afección relacionada con *USH2A*. Preferiblemente, en la presente memoria se define "prevención, tratamiento o retraso de una enfermedad o afección relacionada con *USH2A*" como la prevención, detención, cese de la progresión, o reversión, de una deficiencia visual o ceguera parcial o completa, así como la prevención, detención, cese de la progresión, o reversión, de una deficiencia auditiva o sordera parcial o completa, que estén causadas por un defecto genético en el gen *USH2A*.

En una realización preferida, se formula un OAS conforme a la invención en una composición o un medicamento o una composición a los que se dota de al menos un excipiente y/o un ligando de direccionamiento para la administración, y/o un dispositivo de administración de los mismos a una célula y/o de intensificación de su administración intracelular.

Se entenderá que, si una composición comprende un constituyente adicional tal como un compuesto adjunto, cada constituyente de la composición puede no estar formulado en una única combinación o composición o preparación. La persona experta sabrá qué tipo de formulación es la más apropiada para cada componente, según se define en la presente memoria, dependiendo de la identidad del mismo. En caso necesario, mediante la adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable se pueden incorporar en una mezcla farmacéuticamente activa un OAS conforme a la invención o un vector, preferiblemente un vector vírico, que expresen un OAS conforme a la invención.

En consecuencia, la invención también provee una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende un OAS conforme a la invención, o un vector vírico conforme a la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal composición puede comprender un único OAS o vector vírico conforme a la invención, pero también puede comprender múltiples OAS o vectores víricos distintos conformes a la invención. Tal composición farmacéutica puede comprender cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable, entre ellos un vehículo, carga, conservante, adyuvante, solubilizante y/o diluyente.

Constituye una vía de administración preferida la inyección intravítrea de una solución acuosa o una formulación especialmente adaptada para la administración intraocular. El documento EP2425814 describe una emulsión de

aceite en agua especialmente adaptada para la administración intraocular (intravítrea) de fármacos peptídicos o de ácido nucleico. Esta emulsión es menos densa que el humor vítreo, de modo que la emulsión flota sobre el vítreo, evitando que el fármaco inyectado afecte a la visión.

- 5 Si se utilizan múltiples OAS distintos conformes a la invención, la concentración o la dosis definidas en la presente memoria se pueden referir a la concentración o la dosis total de todos los oligonucleótidos utilizados o bien a la concentración o la dosis de cada molécula para omisión de exón utilizada o añadida. Por lo tanto, en una realización se provee una composición en la cual cada uno o la totalidad de los OAS conformes a la invención que se utilizan, están dosificados en una cantidad situada en el intervalo de 0,01 a 20 mg/kg, preferiblemente de 0,05 a 20 mg/kg.
- 10 Una dosis intravítrea adecuada se situaría entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 5 mg, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1 mg por ojo, por ejemplo aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 mg por ojo.

15 Un OAS conforme a la invención, preferido, está destinado al tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con USH2A en un individuo. En todas las realizaciones de la invención se entiende que el término "tratamiento" incluye la prevención y/o el retraso de la enfermedad o afección relacionada con USH2A. A un individuo al que se le puede tratar con un OAS conforme a la invención, se le puede haber diagnosticado ya que padece una enfermedad o afección relacionada con USH2A. Como alternativa, a un individuo al que se le puede tratar con un OAS conforme a la invención puede que aún no se le haya diagnosticado que padece una enfermedad o afección relacionada con USH2A, pero puede ser un individuo que tenga un riesgo acrecentado de desarrollar en el futuro una enfermedad o afección relacionada con USH2A, dados sus antecedentes genéticos. Un individuo preferido es un ser humano. En una realización preferida, la enfermedad o afección relacionada con USH2A es el síndrome de Usher de tipo II. Así pues, la invención provee además un OAS conforme a la invención o un vector vírico conforme a la invención o una composición conforme a la invención, para uso como medicamento para tratar una enfermedad o afección relacionada con USH2A que requiera modular el corte y empalme de pre-ARNm de *USH2A* y para uso como medicamento para la prevención, tratamiento o retraso de una enfermedad o afección relacionada con USH2A.

20 La invención provee además el uso de un OAS conforme a la invención o de un vector vírico conforme a la invención o una composición conforme a la invención para la preparación de un medicamento, para preparar un medicamento para tratar una enfermedad o afección relacionada con USH2A que requiera modular el corte y empalme de pre-ARNm de *USH2A* y para preparar un medicamento para la prevención, el tratamiento o el retraso de una enfermedad o afección relacionada con USH2A. Por lo tanto, en un aspecto adicional se provee el uso de un OAS, vector vírico o composición para la preparación de un medicamento, según se definen en la presente memoria, para preparar un medicamento para tratar una afección que requiere modular el corte y empalme de pre-ARNm de *USH2A* y para preparar un medicamento para la prevención, tratamiento o retraso de una enfermedad o afección relacionada con USH2A. En un uso o en un método conformes a la invención, un tratamiento se aplica al menos una vez, dura una semana, un mes, varios meses, un año, 2, 3, 4, 5, 6 años o más, por ejemplo toda la vida. Cada OAS según se define en la presente memoria para su uso conforme a la invención puede ser adecuado para la administración directa a una célula, tejido y/u órgano *in vivo* de individuos ya afectados o en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección relacionada con USH2A, y puede ser administrado directamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. La frecuencia de administración de un OAS, composición, compuesto o compuesto adjunto de la invención puede depender de diversos parámetros tales como la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, la mutación del paciente, el número de OAS (es decir, la dosis), la formulación de dicha molécula, la vía de administración, etc. La frecuencia puede variar entre diaria, semanal, al menos una vez cada dos semanas o cada tres semanas o cuatro semanas o cinco semanas, o un período de tiempo más largo.

25 Preferiblemente, los intervalos de dosis de un OAS conforme a la invención se diseñan en base a estudios de dosis creciente en ensayos clínicos (uso *in vivo*) para los cuales existen rigurosos requisitos de protocolo. Un OAS según se define en la presente memoria puede ser empleado a una dosis en el intervalo de 0,01 a 20 mg/kg, preferiblemente de 0,05 a 20 mg/kg. Una dosis intravítrea adecuada estaría entre 0,05 mg y 5 mg, preferiblemente entre 0,1 y 1 mg por ojo, por ejemplo aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 mg por ojo. En una realización preferida se utiliza una concentración de un OAS, según se define en la presente memoria, que está en el intervalo de 0,1 nM a 1 μ M. Preferiblemente, este intervalo vale para uso *in vitro* en un modelo celular tal como células retinianas o tejido retiniano. Más preferiblemente, la concentración utilizada está en el intervalo de 1 a 400 nM, incluso más preferiblemente de 10 a 200 nM, incluso más preferiblemente de 50 a 100 nM. Si se utilizan varios OAS, esta concentración o dosis puede referirse a la concentración o dosis total de OAS o a la concentración o dosis de cada OAS añadido. En una realización preferida, un vector vírico, preferiblemente un vector AAV según se ha descrito más arriba en la presente memoria, en calidad de vehículo de administración para una molécula conforme a la invención, es administrado en una dosis en el intervalo de 1×10^9 - 1×10^{17} partículas víricas por inyección, más preferiblemente 1×10^{10} - 1×10^{12} partículas víricas por inyección. Los intervalos de concentración o dosis de OAS, como se han indicado en lo que antecede, son concentraciones o dosis preferidas para usos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. La persona experta comprenderá que la concentración o dosis del OAS utilizado puede variar aún más, dependiendo del OAS utilizado, la célula diana a tratar, el gen diana y sus niveles de expresión, el medio utilizado y las condiciones de transfección y de incubación, y puede requerir ser optimizada adicionalmente.

65 La invención provee además un método para modular el corte y empalme de pre-ARNm de *USH2A* en una célula,

que comprende poner en contacto la célula, preferiblemente una célula retiniana, con un OAS conforme a la invención o un vector vírico conforme a la invención o una composición conforme a la invención. Las características de este aspecto son, preferiblemente, las definidas más arriba en la presente memoria. Poner en contacto la célula con un OAS conforme a la invención o un vector vírico conforme a la invención o una composición conforme a la invención puede realizarse por cualquier método conocido por la persona experta en la materia. Se incluye el uso de los métodos que se describen en la presente memoria para administrar OAS, vectores víricos y composiciones. La puesta en contacto puede ser directa o indirecta, y puede ser *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

La invención provee además un método para el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con USH2A que requiere modular el corte y empalme de pre-ARNm de USH2A (por ejemplo, el síndrome de Usher de tipo II) en un individuo que lo necesita, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula de dicho individuo, preferiblemente una célula retiniana, con un OAS conforme a la invención o un vector vírico conforme a la invención o una composición conforme a la invención. Las características de este aspecto son preferiblemente las definidas más arriba en la presente memoria. La puesta en contacto de la célula, preferiblemente una célula retiniana, con un OAS conforme a la invención o un vector vírico conforme a la invención o una composición conforme a la invención, puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido por la persona experta en la técnica. Está incluido el uso de los métodos que se describen en la presente memoria para administrar OAS, vectores víricos y composiciones. La puesta en contacto puede ser directa o indirecta, y puede ser *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Una enfermedad o afección relacionada con USH2A preferida es el síndrome de Usher de tipo II. Salvo que se indique otra cosa, cada una de las realizaciones descritas en la presente memoria puede ser combinada con otra realización descrita en la presente memoria.

La presente invención se refiere a un oligonucleótido antisentido (OAS) que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 6, 3, 4, 5, 7, 8, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36 y 37, preferiblemente seleccionada de las SEQ ID NO: 6, 3, 4, 5, 7, 8, 26, 34, 35 y 37, más preferiblemente seleccionada de las SEQ ID NO: 6, 3, 4, 5, 7, 8, 26 y 35. Los OAS de la presente invención son capaces de inducir, estimular o intensificar la omisión del pseudoexón 40 (PE40) en el pre-ARNm de *USH2A*, donde la inclusión del PE40 es debida o causada por la c.7595-2144A>G que se encuentra frecuentemente en pacientes con SU2. Debe entenderse, y esto se detalla adicionalmente en los ejemplos, así como en la Figura 1-5, y en la Tabla 1, que los OAS no se eligen de manera aleatoria, sino que forman tres "grupos derivados" basados en los tres nuevos OAS denominados respectivamente USH2a-PE40-3, -5 y -7, como sigue:

- Los OAS basados en USH2a-PE40-3 (SEQ ID NO: 19) son los OAS de las SEQ ID NO: 3, 5, 7, 24, 25, 26, 34, 35 y 36, funcionando mejor USH2a-PE40-8 (SEQ ID NO: 3), USH2a-PE40-11 (SEQ ID NO: 26), USH2a-PE40-20 (SEQ ID NO: 5), USH2a-PE40-22 (SEQ ID NO: 35) y USH2a-PE40-28 (SEQ ID NO: 7) (véanse las Figuras 4 y 5).
- Los OAS basados en USH2a-PE40-5 (SEQ ID NO: 21) son los OAS de las SEQ ID NO: 27, 28 y 29.
- Los OAS basados en USH2a-PE40-7 (SEQ ID NO: 23) son los OAS de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 30, 31, 32 y 37, funcionando mejor USH2a-PE40-17 (SEQ ID NO: 4), USH2a-PE40-24 (SEQ ID NO: 6) y USH2a-PE40-29 (SEQ ID NO: 8) (véanse las Figuras 4 y 5), donde incluso USH2a-PE40-17 y -24 superan en funcionamiento a todos los demás OAS.

La secuencia solapante que está presente en los OAS muy eficaces de las SEQ ID NO: 6, 4, 8, 23, 30, 31, 32 y 37 es 5'-AGAUGAUCUCUUA-3' (SEQ ID NO: 42), donde una citosina puede haber sido reemplazada por una 5-metilcitosina (5mC).

La secuencia solapante que está presente en los OAS muy eficaces de las SEQ ID NO: 3, 5, 7, 19, 24, 25, 26, 34, 35 y 36 es 5'-CGCUGC-3' (SEQ ID NO: 43), donde una citosina puede haber sido reemplazada por una 5-metilcitosina (5mC).

La secuencia solapante que está presente en los OAS muy eficaces de las SEQ ID NO: 21, 27, 28 y 29 es 5'-AUUUCAAUUUCAUGAUUU-3' (SEQ ID NO: 44), donde una citosina puede haber sido reemplazada por una 5-metilcitosina (5mC).

Así pues, la invención se refiere también a un OAS que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 42, 43 y 44.

La región diana de los OAS muy eficaces de las SEQ ID NO: 6, 4, 8, 23, 30, 31, 32 y 37, que incluye la frontera de corte y empalme en el extremo 3' de la secuencia de PE40, es

5'-UCCCAAGGUAAGAGAUCAUCUUUAAGAAAAGG-3' (SEQ ID NO: 45).

La región diana de los OAS muy eficaces de las SEQ ID NO: 3, 5, 7, 19, 24, 25, 26, 34, 35 y 36 es 5'-UCUGCAACAAGAGCAGCGAAUCUACUCAGC-3' (SEQ ID NO: 46). La región diana de los OAS muy eficaces de las SEQ ID NO: 21, 27, 28 y 29 es 5'-GGAAACAAAUCAUGAAAUUGAAAUUGAACAA-3' (SEQ ID NO: 47).

El OAS más corto que está dirigido hacia cualquier secuencia de las SEQ ID NO: 45, 46 y 47 tenía 18 nucleótidos de

longitud (USH2a-PE40-23 (SEQ ID NO: 36)). Por lo tanto, la invención también se refiere a un OAS que es capaz de inducir la omisión del pseudoexón 40 (PE40) de pre-ARNm de *USH2A* humano, donde dicho OAS comprende una secuencia que es complementaria a al menos 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 45, 46 o 47.

5 En otra realización de la invención, esta se refiere a un OAS que es capaz de inducir, causar, estimular y/o intensificar la omisión de PE40 de pre-ARNm de *USH2A* humano, donde dicho OAS comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada de cualquiera de los siguientes grupos de secuencias: (i) SEQ ID NO: 6, 4, 8, 23, 30, 31, 32 y 37; (ii) SEQ ID NO: 3, 5, 7, 19, 24, 25, 26, 34, 35 y 36; y (iii) SEQ ID NO: 21, 27, 28 y 29. En una realización preferida dicho OAS comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada de cualquiera de los siguientes grupos de secuencias: (i) SEQ ID NO: 6, 4 y 8; y (ii) SEQ ID NO: 3, 5, 7, 26 y 35. En una realización sumamente preferida dicho OAS comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 6 y 4. En un aspecto particular, la retención del PE40 en el pre-ARNm de *USH2A* (o la presencia del PE40 en el ARNm después de que se ha completado el corte y empalme) se debe a la mutación c.7595-2144A>G en el gen *USH2A*, aunque no se puede excluir que existan otras mutaciones (identificadas o hasta la fecha no identificadas) en el gen *USH2A* que también originen la presencia de PE40 en el ARNm de *USH2A*. Preferiblemente, el OAS de la presente invención es un oligorribonucleótido (oligonucleótido de ARN) que comprende al menos una modificación 2'-O-alquilo, tal como una 2'-O-metilo (2'-O-Me), una 2'-O-etilo o una 2'-O-propilo. Otra modificación preferida es 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE). En un aspecto preferido, todos los nucleótidos del OAS de la presente invención están modificados con 2'-O-metilo. Preferiblemente, el OAS de la presente invención tiene al menos un enlace fosforotioato y, más preferiblemente, todos los nucleótidos secuenciales dentro del OAS de la presente invención están interconectados por enlaces fosforotioato.

25 En una realización preferida, el OAS de la presente invención tiene una longitud de 18 a 143 nucleótidos, preferiblemente de 18 a 40 nucleótidos, más preferiblemente de 18 a 30 nucleótidos, incluso más preferiblemente de 18 a 24 nucleótidos. En un aspecto preferido, el OAS conforme a la invención comprende un oligonucleótido antisentido de 2'-O-alquilfosforotioato, tal como 2'-O-metil(ribosa modificada) (ARN), 2'-O-etil(ribosa modificada), 2'-O-propil(ribosa modificada) y/o derivados sustituidos de estas modificaciones, tales como derivados halogenados. Para incrementar el efecto terapéutico puede ser útil aplicar múltiples OAS de la presente invención. Por lo tanto, en otra realización preferida la invención se refiere a un conjunto de OAS, comprendiendo dicho conjunto al menos dos OAS conformes a la invención. En otro aspecto, la invención se refiere a un vector vírico que expresa un OAS según la presente invención, cuando se le pone en condiciones propicias para la expresión del OAS. La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un OAS, un conjunto de OAS o un vector vírico conformes a la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica está destinada a la administración intravítrea y se dosifica en una cantidad en el intervalo de 0,05 mg a 5 mg de OAS total por ojo. Más preferiblemente, dicha composición farmacéutica está destinada a la administración intravítrea y se dosifica en una cantidad en el intervalo de 0,1 a 1 mg de OAS total por ojo, por ejemplo aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 mg de OAS totales por ojo. En otro aspecto más, la invención se refiere a un OAS conforme a la invención, un conjunto de OAS conformes a la invención y según se reivindican en la presente memoria, un vector conforme a la invención o una composición conforme a la invención, para uso como medicamento, preferiblemente para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección relacionada con *USH2A* que requiere modular el corte y empalme de pre-ARNm de *USH2A*. En otro aspecto más, la invención se refiere al uso de un OAS conforme a la invención, un conjunto de OAS conforme a la invención, un vector conforme a la invención o una composición conforme a la invención, en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección relacionada con *USH2A* que requiere modular el corte y empalme de pre-ARNm de *USH2A*.

50 La presente invención se refiere además a un método para modular el corte y empalme de pre-ARNm de *USH2A* en una célula, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un OAS conforme a la invención, un conjunto conforme a la invención, un vector conforme a la invención o una composición conforme a la invención. Dicha célula puede ser una célula *in vitro*, una célula *ex vivo* o una célula *in vivo*. Dicha célula utilizada en dicho método estaría preferiblemente presente en, o se habría obtenido de, el ojo de un sujeto (humano) que padece un trastorno relacionado con *USH2A* o que está en riesgo de sufrirlo. Por lo tanto, en otro aspecto preferido, la invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con *USH2A* que requiere modular el corte y empalme de pre-ARNm de *USH2A*, tal como el síndrome de Usher de tipo II, en un individuo que lo padece, comprendiendo dicho método poner en contacto un célula de dicho individuo con un OAS conforme a la invención, un conjunto conforme a la invención, un vector conforme a la invención o una composición conforme a la invención.

60 En otro aspecto más, la invención se refiere a un oligonucleótido antisentido para omisión de pseudoexón conforme a la invención, un uso conforme a la invención o un método conforme a la invención, donde la enfermedad o afección relacionada con *USH2A* que requiere modular el corte y empalme de *USH2A* es el síndrome de Usher de tipo II. En un aspecto sumamente preferido, el pseudoexón que es omitido a causa del uso de los oligonucleótidos antisentido de la presente invención es el pseudoexón 40 (PE40; SEQ ID NO: 9) según se describe en la presente memoria.

65

En la presente memoria y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus formas de conjugación se utilizan en su sentido no limitante, para expresar que están incluidos los elementos que siguen a la palabra, pero no están excluidos los elementos no específicamente mencionados. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un", "uno" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, salvo que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "el" o "la" significa generalmente "al menos uno". La palabra "aproximadamente", cuando se emplea asociada con un valor numérico (p. ej., aproximadamente 10), significa preferiblemente que el valor puede ser el valor indicado (10) más o menos 0,1 % del valor.

10 Ejemplos

Ejemplo 1. *Selección de oligonucleótidos antisentido que tienen propiedades de omisión de exón mejoradas.* La mutación de intrón de *USH2A* (c.7595-2144A>G) crea un sitio donante críptico de corte y empalme que da como resultado la inclusión de un exón aberrante (PE40) en el ARNm de *USH2A* (véase la Figura 1AB del documento WO 2016/005514). La adición de OAS dirigidos contra el exón aberrante evitaría la inserción de este exón al evitar la unión de factores que son esenciales para el corte y empalme, tales como los complejos RNPnp U1 y U2, y proteínas ricas en serina-arginina, restaurando así el corte y empalme de *USH2A* y la síntesis proteica normales (Figura 1C del documento WO 2016/005514). Los OAS pueden estar dirigidos a sitios de corte y empalme y también a secuencias de exón. Se ha sugerido que existe una correlación positiva entre la capacidad de los OAS para inducir la omisión de exón y la presencia de sitios de unión de factor SC35 de corte y empalme predichos en la secuencia diana. Para diseñar un OAS con alto potencial de omisión de exón, se examinó el exón aberrante de *USH2A* (secuencia de exón de 152 nucleótidos más 15 nucleótidos de secuencia de intrón en cada lado) en busca de motivos de unión de potenciador de corte y empalme de exón, utilizando el programa ESEfinder 3.0. Dentro del exón aberrante se predijeron dos regiones con respectivamente tres y dos motivos de unión de SC35 (datos no mostrados). Por lo tanto, se diseñaron dos OAS, denominados AON1 (SEQ ID NO: 1) y AON2 (SEQ ID NO: 2), para que abarcasen estas regiones con motivos SC35 y fuesen complementarios al ARNm de *USH2A*. El potencial de omisión de exón de los AON1 y AON2 fue investigado en el documento WO 2016/005514 (véase la Figura 2 del mismo).

En el presente ejemplo se muestra que se pueden identificar, generar y utilizar OAS aún más potentes que parecen tener un potencial de omisión de exón aún más intenso que los AON1 y AON2 que han sido ensayados con anterioridad. En la Tabla 1 se ofrece una perspectiva general de todos los oligonucleótidos ahora ensayados. Todos los oligonucleótidos antisentido utilizados en la presente memoria fueron adquiridos de Eurogentec, MicroSynth o TriLink, y estaban diseñados con una Tf de 58 °C y modificados con un grupo 2'-O-metilo en la cadena de azúcar y con una cadena principal de fosforotioato (PS), y antes de su uso se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato.

En el primer paso de ensayo discriminante, se probó el efecto de los OAS utilizando un constructo de indicador de corte y empalme pCI-Neo-USH2a-PE40 (documento WO 2016/005514). Este constructo contiene la secuencia de PE40 rodeada por 500 nucleótidos de secuencia intrónica, que ha sido insertada en un intrón entre los exones 3 y 5 derivados del gen de rodopsina. En primer lugar, se transfectaron los plásmidos informadores a células HEK293, seguido de una transfección de OAS separada. Los plásmidos informadores se transfectaron utilizando MaxPEI como reactivo de transfección, y las posteriores transfecciones de OAS se realizaron utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Después de 24 horas de incubación, se cosecharon las células y se extrajo el ARN utilizando el kit de minipreparación de ARN ReliaPrep (Promega), y se preparó el ADNc usando el kit de síntesis de ADNc Maxima (Thermo, #EP0734). La inclusión del PE40 en el ARNm maduro se analizó mediante RCP-TR, con cebadores ubicados en los exones de rodopsina flanqueantes 3 y 5.

La Figura 1 muestra el ensayo discriminante inicial de los USH2a-PE40-1 a -7, que se realizó utilizando la construcción de informador en células HEK293, comparado con un oligonucleótido testigo y con los dos OAS conocidos del documento WO 2016/005514 (AON1 y AON2). En este análisis discriminante inicial, los USH2a-PE40-1, -2, -4 y -6 no evidenciaron ninguna mejora en la omisión de exón de PE40 con respecto a lo determinado para AON1 y AON2 (indicados en esta figura como R1 y R2, respectivamente). Sin embargo, sorprendentemente, los USH2a-PE40-3, -5 y -7 resultaron ser significativamente más eficaces que los AON1 y AON2, siendo el más eficaz USH2a-PE40-7.

La Figura 2 muestra la secuencia de PE40 (como ARN desde 5' hacia 3') y las posiciones de complementariedad de los OAS ensayados en la presente memoria. USH2a-PE40-1 (SEQ ID NO: 17), USH2a-PE40-2 (SEQ ID NO: 18) y USH2a-PE40-4 (SEQ ID NO: 20) se solapan con las posiciones de AON1 (SEQ ID NO: 1) y AON2 (SEQ ID NO: 2). Los sitios de unión de los más eficaces USH2a-PE40-3 (SEQ ID NO: 19), USH2a-PE40-5 (SEQ ID NO: 21) y USH2a-PE40-7 (SEQ ID NO: 23) están claramente ubicados en regiones diferentes a las de AON1 y AON2, y se solapan con ESE putativos (USH2a-PE40-3 y -5), y con el sitio de corte y empalme aguas abajo (USH2a-PE40-7; véase también el cuadro inferior de la Figura 1). Se observa que el sitio de unión para USH2a-PE40-6 (SEQ ID NO: 22) también está fuera de una región limitada por AON1 o AON2, pero se solapa con el sitio de unión de USH2a-PE40-5 (SEQ ID NO: 21), lo que sugiere que la región de direccionamiento más potente se encuentra hacia el extremo 5' de la secuencia de PE40 en lo que respecta a esa zona.

Basándose en el experimento inicial de la Figura 1, que mostró claramente que existen otras regiones dentro de la secuencia de PE40 que parecían ser "puntos calientes" más eficaces para la omisión de PE40 que los objetivos de los OAS de la técnica, se diseñó un conjunto adicional de OAS basándose en las tres zonas identificadas, y también para mejorar la facilidad de síntesis, captación, eficacia e inmunogenicidad reducida: se acortaron o se desplazaron los OAS para que tuvieran menos estructura secundaria interna. Se modificaron aún más los OAS al incluir cambios en las bases que se sabe mejoran la afinidad de unión: 5-metilcitosina (5mC) en lugar de citosina y 2,6-diaminopurina (DAP) en lugar de adenina, véase la Tabla 1. También se esperaba que la modificación con 5mC mejorase la seguridad del OAS, ya que se la ha implicado en la disminución de la inmunogenicidad de ARN y OAS. Los USH2a-PE40-8, -9, -10 y -11 estaban basados en USH2a-PE40-3. Los USH2a-PE40-12, -13 y -14 estaban basados en USH2a-PE40-5. Los USH2a-PE40-15, -16, -17 y -18 estaban basados en USH2a-PE40-7. Los USH2a-PE40-20 y -21 estaban basados en USH2a-PE40-8. Los USH2a-PE40-22 y -23 estaban basados en USH2a-PE40-11. Los USH2a-PE40-24, -25, -26 y -27 estaban basados en USH2a-PE40-17. En la Figura 2 se indican también las posiciones de los distintos OAS ahora diseñados. En las Figuras 3 y 4 se ofrecen los resultados de los OAS adicionales. Se observa que las modificaciones con DAP han originado una eficacia menor (véanse USH2a-PE40-26 y -27) y, por lo tanto, se abandonó este enfoque. En contraste, los OAS modificados con 5mC presentaron generalmente una eficacia similar a los OAS correspondientes con citosina normal. No obstante, se pueden observar pequeñas diferencias en ambas direcciones: el USH2a-PE40-21 modificado con 5mC era ligeramente menos eficaz que el USH2a-PE40-8 correspondiente. Se encontró que el USH2a-PE40-25 era ligeramente más eficaz que el USH2a-PE40-17 original. Además, los dos OAS que habían sido acortados en dos nucleótidos (USH2a-PE40-20 y -24, correspondientes a -8 y -17, respectivamente) mostraron esencialmente el mismo efecto que sus homólogos más largos originales. Aunque no eran más eficaces que los OAS originales, de mayor longitud, las versiones acortadas se consideraron superiores debido al hecho de que son más fáciles de sintetizar y podrían tener potencialmente una mejor captación. En base a esto, los OAS más eficaces de estos experimentos parecen ser los oligonucleótidos acortados USH2a-PE40-20 y -24 (SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente) y los USH2a-PE40-22 (SEQ ID NO : 35) y USH2a-PE40-25 (SEQ ID NO: 37), modificados con 5mC.

Tabla 1. Detalles de secuencia de oligonucleótidos antisentido ensayados en la presente memoria. PE40-AON1 y PE40-AON2 han sido descritos con anterioridad en el documento WO 2016/005514. X = 5-metilcitosina (5mC) en lugar de citosina (C); Z = 2,6-diaminopurina (DAP) en lugar de adenina (A).

Nombre de OAS	SEQ ID NO	Secuencia (desde 5' hacia 3')
PE40-AON1	1	GUGUGAUUCUGGAGAGGAAGCUG
PE40-AON2	2	CCCUUAAAAGCCAGCAUACA
USH2a-PE40-1	17	GGAGAGGAAGCUGAAAGCAG
USH2a-PE40-2	18	GAAGGGUCCUUUAACUUGUG
USH2a-PE40-3	19	AGAUUCGCUGCUCUUGUUG
USH2a-PE40-4	20	CAUUUUUUUAGCUUCCUGCU
USH2a-PE40-5	21	UUCAUUUCAUUUCAUGAUUUUGU
USH2a-PE40-6	22	GAGGUGUUCAAUUUCAUUUC
USH2a-PE40-7	23	CUUAAAGAUGAUCUCUJACCUU
USH2a-PE40-8	3	UUCGCUGCUCUUGUUGCAGA
USH2a-PE40-9	24	GAUUCGCUGCUCUUGUUGCA
USH2a-PE40-10	25	GUAGAUUCGCUGCUCUUGUU
USH2a-PE40-11	26	GAGUAGAUUCGCUGCUCUUG
USH2a-PE40-12	27	AUUUCAUUUCAUGAUUUGUUUCC
USH2a-PE40-13	28	CAAUUUCAUUUCAUGAUUUGUUU
USH2a-PE40-14	29	UGUUCAUUUCAUUUCAUGAUUU
USH2a-PE40-15	30	AAGAUGAUCUCUJACCUUGGGA
USH2a-PE40-16	31	UAAAGAUGAUCUCUJACCUUGG
USH2a-PE40-17	4	UUCUJAAAGAUGAUCUCUJACC
USH2a-PE40-18	32	CCUUUUUUUAAAAGAUGAUCUCUUA
USH2a-PE40-19	33	CAAACCCCCACAUAACACAGC

USH2a-PE40-20	5	CGCUGCUCUUGUUGCAGA
USH2a-PE40-21	34	UUXGXUGXUXUUGUUGXAGA
USH2a-PE40-22	35	GAGUAGAUUXGXUGXUXUUG
USH2a-PE40-23	36	GCUGAGUAGAUUCGCUGC
USH2a-PE40-24	6	CUUAAAGAUGAUCUCUJACC
USH2a-PE40-25	37	UUXUUAAAGAUGAUXUXUUAXX
USH2a-PE40-26	38	UUCUZZZZGZUGZUCUCUJZCC
USH2a-PE40-27	39	UUXUUZZZZGZUGZUXUXUUJZXX
USH2a-PE40-28	7	XGXUGXUXUUGUUGXAGA
USH2a-PE40-29	8	XUUAAAGAUGAUXUXUUAXX

Se ensayaron adicionalmente los USH2a-PE40-8, -17, -20, -24, -28 y -29 (SEQ ID NO: 3 a 8) en cuanto a su eficacia en las capacidades de omisión de exón y su inmunogenicidad *in vitro*. La secuencia nucleotídica diana para los oligonucleótidos USH2a-PE40-8, -20 y -28 (con la cual se solapan (en parte) los oligonucleótidos) es la siguiente: 5'-TCTGCAACAAGAGCAGCGAA-3' (SEQ ID NO: 10), ubicada dentro de PE40. La secuencia nucleotídica diana para los oligonucleótidos USH2a-PE40-17, -24 y -29 (con la cual se solapan (en parte) los oligonucleótidos) es la siguiente: 5'-AGG*TAAGAGATCATCTTTAAGAA-3' (SEQ ID NO: 11), ubicada en parte en PE40 (AG subrayadas) y su región flanqueante que comprende la mutación c.7595-2144A>G (guanósina en negrita con asterisco). Se extrajeron fibroblastos de un paciente con SU2 que era portador de la mutación de USH2A heterocigótica compuesta c.7595-2144A>G y c.2391_2392del. Se mantuvieron las células a 37 °C en medio DMEM AQ que contenía 20 % de FBS y 1 % de NaPyr (Sigma Life Sciences). Se extendieron en placas las células a una densidad de 1,0x10⁶ células/pocillo. Se complejaron los OAS con Lipofectamine 2000 (Life Technologies, lote: 1699509) en OptiMem (lote: 1697387) durante 30 minutos y luego se añadieron a los fibroblastos a una concentración de 100 nM. La incubación se prolongó otras 24 h. Al final del período de incubación de 24 h se trataron las células con ciclohexamida durante 4 h, para inhibir la degradación de ARNm mediada por sin sentido. Tras 24 h de incubación se cosecharon células y se extrajo ARN utilizando el kit de minipreparación de ARN ReliaPrep (Promega), siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación se preparó ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc Maxima (Thermo, #EP0734, lote: 00335736), conforme al esquema de la Tabla 2 y siguiendo los protocolos del fabricante. Los niveles de PE40 y ADNc de tipo natural se determinaron utilizando una RCP digital basada en gotas (ddPCR, por sus siglas en inglés) (lector de gotas QX2000) aplicando el esquema de pipeteo de la Tabla 3 y los cebadores de la Tabla 4. Los datos fueron analizados con Quanta Life Software y Excel. Se utilizó GUSB (Applied Biosystems, lote: P160210-006 E01) como gen de mantenimiento, utilizando métodos conocidos para la persona experta en la materia.

La Figura 5 muestra el número de gotas que expresan PE40 frente al tipo natural, corregido teniendo en cuenta los niveles de expresión de GUSB en fibroblastos de pacientes tratados con los ocho distintos OAS, junto con una muestra no tratada (NT). Claramente, y en especial los AON1, AON2, USH2a-PE40-17 (SEQ ID NO: 4) y USH2a-PE40-24 (SEQ ID NO: 6), indicados abreviadamente en esta Figura 5 como USH-PE0-17 y USH-PE40-24, resultaron ser más eficaces para intensificar la aparición de los niveles de tipo natural y superar a los dos oligonucleótidos conocidos AON1 y AON2, mientras que los otros cuatro OAS fueron menos eficaces. Es importante destacar que se observó además que USH2a-PE40-17 y USH2a-PE40-24 fueron capaces de reducir los niveles de PE40, un efecto que no se observó con AON1 y AON2, lo que demuestra que estos dos nuevos oligonucleótidos antisentido para omisión de pseudoexón (USH2a-PE40-17 y USH2a-PE40-24) funcionan en este contexto incluso mejor que los dos oligonucleótidos conocidos. Se observa además que los otros cuatro oligonucleótidos (USH2a-PE40-8, -20, -28 y -29 son asimismo capaces de reducir los niveles de PE40 en comparación con los dos oligonucleótidos conocidos AON1 y AON2, lo que hace que estos cuatro oligonucleótidos también superen a los oligonucleótidos de la técnica.

Tabla 2: preparación de ADNc

	Por muestra	
	Específico para el gen	Hexám. aleatorio
Tampón de síntesis de ADNc 5X Mezcla de dNTP ddPCR.USH2a-PE40.Rv2 Hexámeros aleatorios	4 µl 2 µl 1 µl	4 µl 2 µl 1 µl

(continuación)

	Por muestra	Por muestra
	Específico para el gen	Hexám. aleatorio
Mezcla de enzimas Maxima Plantilla (150-600 ng de ARN)	1 µl	1 µl
Agua, libre de nucleasas	hasta 20 µl con agua	hasta 20 µl con agua
Volumen total	20 µl	20 µl
<i>Se utilizaron cebadores específicos para gen en el caso de las muestras y hexámeros aleatorios para el mantenimiento con GUSB</i>		

5

Tabla 3.

Esquema de pipeteo para ddPCR		
	Experimento	Testigo
Supermix para sondas	11 µl	11 µl
Cebador 1	450 nM	450 nM
Cebador 2	450 nM	450 nM
Sonda 1	250 nM	250 nM
Sonda 2	250 nM	250 nM
Plantilla	hasta 330 ng	0 µl
Agua	añádase hasta un volumen final de 22 µl	añádase hasta un volumen final de 22 µl
Total	22 µl por muestra	22 µl por muestra

Tabla 4.

Cebadores y sondas para ddPCR en múltiplex	
ddPCR.USH2a-PE40.Fw1 SEQ ID NO:12	5'- TCCAATGGATTTGGCAGTGC -3'
ddPCR.USH2a-PE40.Rv2 SEQ ID NO:13	5'- GTTCTCAAGTATAGACGGCC -3'
ddPCR.USH2a-PE40.Rv4 SEQ ID NO:14	5'- GCCAGGTGACCAACATCATT -3'
ddPCR.USH2a-PE40.FAM SEQ ID NO:15	5'- /56-FAM / CAGCCAGAGCAGGAAGCT / 3BHQ_1 / 3'
ddPCR.USH2a-WT.HEX SEQ ID NO:16	5'- /5HEX / GCAGAGGACAAACCTGGA / 3BHQ_1 / 3'

10

Ejemplo 2. *Toxicidad in vitro de los nuevos oligonucleótidos antisentido.*

15

Los oligonucleótidos tienen el potencial de provocar la activación de los denominados receptores de reconocimiento de patrón (RRP) del sistema inmunitario innato de los vertebrados (Bauer *et al.* 2008. Immunobiology 213:315-328). La familia de receptores RRP mejor estudiada son los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés). Los TLR son una clase de proteínas que desempeñan una función clave en el sistema inmunitario innato. Son receptores no catalíticos únicos, que se extienden por membranas y que generalmente están expresados en macrófagos y células dendríticas, que reconocen moléculas estructuralmente conservadas derivadas de microbios. Los TLR que son activados por diferentes tipos de ácidos nucleicos son aquellos que están ubicados en endosomas: TLR3 reconoce ARN bicatenario; TLR7/8 reconoce ARN bicatenario y monocatenario.

20

25

Tras el reconocimiento de estos componentes por los RRP, se activa una respuesta inmunitaria "antimicrobiana" específica. La activación de los TLR da como resultado la activación del factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas (NF-κB, por sus siglas en inglés), el factor 3 regulador de interferón (IRF-3) y la proteína activadora 1 (AP-1) (Kawasaki 2014. Front Immunol 25:461). La activación de AP-1, IRF-3 y NF-κB da como resultado la producción de citocinas inflamatorias, interferones de tipo I y otros mediadores de la respuesta inmunitaria innata. Estos procesos no solo desencadenan respuestas defensivas inmediatas del anfitrión, tales como

inflamación, sino que también preparan y orquestan respuestas inmunitarias adaptativas específicas para antígeno.

Se utilizó la exposición *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas primarias para evaluar las respuestas inmunitarias (sistémicas) específicas para el fármaco y la inmunotoxicidad, como se ha descrito con anterioridad (Lankveld 2010. *Methods Mol Biol* 598:401-423). El ensayo *in vitro* con CMSP es un ensayo preclínico arraigado que utiliza la producción de citocinas (inflamatorias) como marcador sustituto de las respuestas inmunitarias sistémicas. El ensayo con CMSP permite predecir la tolerabilidad como un factor del potencial de inmunogenicidad y alergenidad de compuestos en investigación, y podría permitir una estimación de un intervalo de dosis seguro para estos compuestos.

Para estudiar los USH2a PE40-20, USH2a PE40-24, USH2a PE40-28 y USH2a PE40-29 se utilizaron CMSP aisladas internamente, tomadas de capas leucocíticas de donantes sanos de banco de sangre. La producción de las citocinas proinflamatorias clave en el sobrenadante de cultivo se evaluó después de 24 h de estimulación con oligonucleótidos a concentraciones 1 y 4 μM . Se analizó además la viabilidad de las CMSP después del tratamiento con los oligonucleótidos, midiendo la resorufina fluorescente en el sobrenadante de cultivo para evaluar el posible efecto citotóxico de los OAS de USH2a-PE40. Las células viables convierten la resazurina no fluorescente en resorufina fluorescente (O'Brien *et al.* 2000. *Eur J Biochem* 267:5421-5426).

La estimulación de CMSP humanas con los testigos positivos LPS (agonista de TLR4) a 100 ng/ml y R848 (agonista de TLR7/8) a 1 μM , dio lugar a concentraciones significativamente incrementadas de todas las citocinas medidas, MCP-1, en el sobrenadante de cultivo. Además, la estimulación con R848 indujo un patrón similar de citocinas, aunque en menor medida. En la Figura 6A se muestra un "mapa de calor" que representa los niveles de significancia de las concentraciones de citocina en el sobrenadante de cultivo tras la estimulación con los oligonucleótidos de la presente invención o los testigos positivos, en comparación con CMSP humanas tratadas con solución salina. Es importante destacar que la estimulación de CMSP humanas con los oligonucleótidos de la presente invención a concentraciones 1 y 4 μM no originó concentraciones incrementadas ni resultados de concentraciones muy levemente incrementadas de ninguna de las citocinas medidas en el sobrenadante de cultivo. Por último, no se apreciaron signos de citotoxicidad 24 h después del tratamiento con los oligonucleótidos (Figura 6B).

Ejemplo 3. *Omisión de PE40 en pre-ARNm de USH2A en cúpulas ópticas generadas a partir de un paciente con SU2*. Por razones obvias, no se pueden obtener retinas de pacientes con SU2 y utilizarlas para estudios *in vitro*. Como alternativa para investigaciones preclínicas de este tipo, es posible generar organoides que se asemejan a dicho material retiniano del paciente, a los que en la presente memoria se les denomina cúpulas ópticas y, a veces, también se les denomina cúpulas oculares. Se utilizaron para la generación de cúpulas ópticas fibroblastos de pacientes con síndrome de Usher de tipo II, que presentaban las mutaciones de *USH2A* c.7595-2144A>G (p.Lys2532Thrfs*56) y c.2299delG (p.Glu767Serfs*21) en heterocigosidad compuesta. Se reprogramaron los fibroblastos utilizando cuatro lentivirus que expresaban Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc, generosamente proporcionados por el Centro de tecnología de células madre Radboud UMC Stem Cell Technology Center. Se crioconservaron los clones en torno al pasaje 6, y se analizaron adicionalmente para determinar mediante inmunocitoquímica la expresión de los marcadores de células madre pluripotentes SSEA-4, NANOG, TRA1-81 y OCT3/4. En total se generaron y se conservaron 3 clones individuales. Estos clones pasaron todos los controles de calidad definidos (activación de marcadores de células madre (RCP cuantitativa en tiempo real, RCPq-TR) y expresión de marcadores de células madre y de pluripotencia (IHC) (datos no mostrados). Se cultivó la línea de células madre pluripotentes inducidas (CMPi) para producir cúpulas ópticas como se ha descrito con anterioridad (Zhong *et al.* 2014. *Nature Comm* 5: 4047;1-12). Se diferenciaron las CMPi en pequeños cúmulos y se cultivaron en suspensión con medio mTeSR1 y blebbistatina 10 μM (Sigma) para inducir la formación de agregados. Se traspararon los agregados a medio de inducción neural que contenía DMEM/F12, 1 % de suplemento N2, 1 x aminoácidos no esenciales (AANE) de medio esencial mínimo y heparina 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Sigma). Se sembraron los agregados en placas revestidas con Matrigel. El medio se cambiaba cada día. Tras cuatro semanas de diferenciación, se separaron manualmente dominios de retina neural y se cultivaron en suspensión en medio DMEM/F12 suplementado con 2 % de B27, 1 x AANE y 1 % de antibiótico-antimicótico, en una incubadora humidificada a 37 °C. El medio se cambiaba dos veces por semana. En la incubadora formaron gradualmente cúpulas ópticas 3D. Después de la generación satisfactoria de cúpulas ópticas derivadas de CMPi, se trataron con USH2a-PE40-24 durante un mes a razón de 2 μM y 10 μM , renovando cada dos días el medio que contenía el OAS. Se realizó análisis de transcripto de *USH2A* para determinar la inclusión de PE40 en el ARNm maduro, con cebadores 5'-GCTCTCCCAGATACCAACTCC-3' (SEQ ID NO: 40) y 5'-GATTCACATGCCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO: 41) ubicados respectivamente en los exones flanqueados 39 y 42. Se aisló el ARN total de las CMPi y las cúpulas ópticas usando el kit de aislamiento Nucleospin RNA II (MACHEREY-NAGEL #740955.50, Düren-Alemania), siguiendo el protocolo proporcionado. Después se utilizaron 0,5-1,0 μg de ARN total para la síntesis de ADNc con el kit de transcriptasa inversa SuperScript VILO (ThermoFisher Scientific; n.º de catálogo 11755050; n.º de lote 1718541). Posteriormente se amplificaron *USH2A*, *LIN28A*, *OCT3/4*, *NANOG* y *SOX2* utilizando cebadores directos e inversos. Se utilizó como referencia el gen de mantenimiento GUSB. Se utilizó GoTaq (Promega A6001) para amplificar por triplicado ADNc de *USH2A*, *LIN28A*, *OCT3/4*, *NANOG*, *SOX2* y *GUSB* en una máquina de RCP cuantitativa (RCPq). Las cúpulas ópticas no tratadas revelarían una banda de tipo natural (900 pb) y una banda que contendría la secuencia PE40 (1052 pb), fácilmente distinguibles en el gel.

El resultado que se ofrece en la Figura 7 muestra que ambas concentraciones (2 μ M y 10 μ M) del oligonucleótido USH2a-PE40-24 (SEQ ID NO: 6), utilizadas en las cúpulas ópticas generadas a partir de fibroblastos de pacientes con SU2, fueron suficientes para inducir la omisión completa de PE40, ya que no se pudo detectar ningún transcrito que comprendiera PE40. No está claro qué es la débil última banda superior, no específica, en la pista "testigo".

5

De estos resultados se concluye que un oligonucleótido antisentido, y en este caso particular USH2a-PE40-24, es capaz de omitir eficazmente PE40 de pre-ARNm de *USH2A* en organoides que se asemejan a la retina de un paciente (heterocigoto para PE40) que padece síndrome de Usher de tipo II.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido antisentido (OAS) que es capaz de inducir omisión del pseudoexón 40 (PE40) de pre-ARNm de *USH2A* humano, donde dicho OAS comprende una secuencia que es complementaria a al menos 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NO: 45, 46 o 47.
- 10 2. Un oligonucleótido antisentido (OAS) que es capaz de inducir omisión del pseudoexón 40 (PE40) de pre-ARNm de *USH2A* humano, donde dicho OAS comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de los siguientes grupos de secuencias:
- (i) SEQ ID NO: 6, 4, 8, 23, 30, 31, 32, 37;
(ii) SEQ ID NO: 3, 5, 7, 19, 24, 25, 26, 34, 35, 36; y
(iii) SEQ ID NO: 21, 27, 28, 29.
- 15 3. Un OAS según la reivindicación 1 o 2, donde la aparición de PE40 en ARNm de *USH2A* se debe a la mutación c.7595-2144A>G en el gen *USH2A*.
- 20 4. Un OAS según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho OAS es un oligorribonucleótido (oligonucleótido de ARN) que comprende al menos una modificación 2'-O-alquilo, tal como una 2'-O-metilo, una 2'-O-etilo o una 2'-O-propilo.
5. Un OAS según la reivindicación 4, donde todos los nucleótidos de dicho OAS están modificados con 2'-O-metilo.
- 25 6. Un OAS según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho OAS tiene al menos un enlace fosforotioato.
7. Un OAS según la reivindicación 6, donde todos los nucleótidos secuenciales están interconectados por enlaces fosforotioato.
- 30 8. Un vector vírico que expresa un OAS según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cuando se le pone en condiciones propicias para la expresión del OAS.
- 35 9. Una composición farmacéutica que comprende un OAS según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un vector vírico según la reivindicación 8, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la composición farmacéutica está destinada a la administración intravítrea.
- 40 10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 9, donde la composición farmacéutica está destinada a la administración intravítrea y se dosifica en una cantidad en el intervalo de 0,05 mg a 5 mg, preferiblemente de 0,1 a 1 mg de OAS total por ojo, por ejemplo aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 mg de OAS totales por ojo.
11. Un OAS según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un vector según la reivindicación 8 o una composición según la reivindicación 9 o 10, para uso como medicamento.
- 45 12. Un OAS según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un vector según la reivindicación 8 o una composición según la reivindicación 9 o 10, para el tratamiento, prevención o retraso de una enfermedad relacionada con *USH2A*, tal como el síndrome de Usher de tipo II, o una afección que requiere la omisión de PE40 del pre-ARNm de *USH2A*.
- 50 13. Un método para omitir PE40 de pre-ARNm de *USH2A* humano en una célula *in vitro*, comprendiendo dicho método administrar a dicha célula un OAS según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un vector según la reivindicación 8 o una composición según la reivindicación 9 o 10; y permitir que el OAS induzca, provoque o estimule la omisión de PE40 del pre-ARNm de *USH2A* humano.

Fig. 1

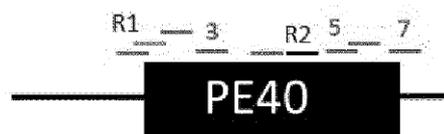
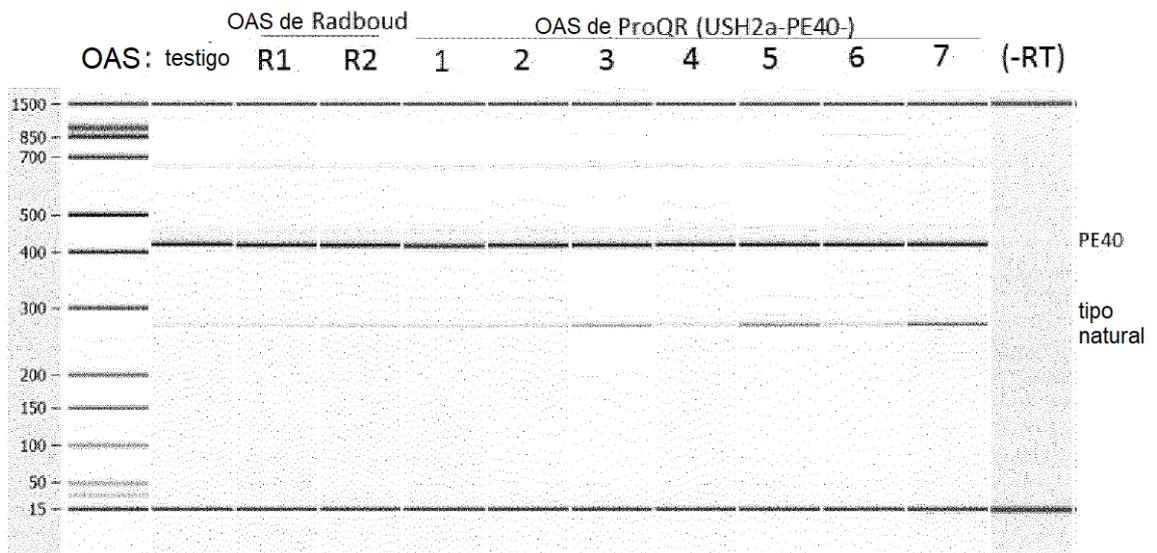


Fig.2

5' - CUGCUUUUCAGGCUUCCUCACCAAGAAUCACACAAGUUAAAGGACCCUUCUGCAACAAGAGCAGCAGAAUUAUCUCAGCCAGCAGGAGCUAAUA
 3' - GUCGAAGGAGAGGUUUAGUGUG-5' (1)
 3' - GACGAAAGUCGAAGGAGAGG-5' (17)
 3' - GUGUUCAAUUUCCUGGGAAG-5' (18)
 (20) 3' - UCGUCCUUCGAUUUU
 3' - AGCGUUGUUCUGCGCUU-5' (3)
 3' - AGCGUUGUUCUGCGC-5' (5)
 3' - AGXGUUGUUXGUXG-5' (7)
 3' - GUUGUUCUGCGCUUAGA-5' (19)
 3' - ACGUUGUUCUGCGCUUAG-5' (24)
 3' - UUGUUCUGCGCUUAGAUG-5' (25)
 3' - GUUCUGCGCUUAGAUGAG-5' (26)
 3' - AGXGUUGUUXGUXGUU-5' (34)
 3' - GUUXGUXGUUAGAUGAG-5' (35)
 3' - CGUCGUUAGAUGAGUCG-5' (36)

AAUUGUAGCUGGCUUUUAAAGGGGAAACAAAUCAUUGAAAUUGAAACACCUCUCCUUCUCCCAAG *GUAAAGAGAUCAUCUUUUAAGAAAAGG*
 3' - ACAUACGACCGAAAUUCCC-5' (2)
 UUUAC-5' (20)
 3' - UGUUUAGUACUUUUAACUUUAACUU-5' (21)
 3' - CUUUAACUUUAACUUGGGAG-5' (22)
 3' - CCUUUGUUUAGUACUUUUAACUUUA-5' (27)
 3' - UUUUGUUUAGUACUUUUAACUUUUAAC-5' (28)
 3' - UUUAGUACUUUUAACUUUUAACUUGU-5' (29)
 3' - CCAUUCUCUAGUAGAAAUCUU-5' (4)
 3' - CCAUUCUCUAGUAGAAAUC-5' (6)
 3' - XXAUUXUUAAGUAGAAAUX-5' (8)
 3' - UCCAUUCUCUAGUAGAAAUC-5' (23)
 3' - AGGUUCCAUUCUCUAGUAGAA-5' (30)
 3' - GGUUCCAUUCUCUAGUAGAAU-5' (31)
 3' - AUUCUCUAGUAGAAAUCUUUCC-5' (32)
 3' - XXAUUXUUAAGUAGAAAUXU-5' (37)

Fig. 3

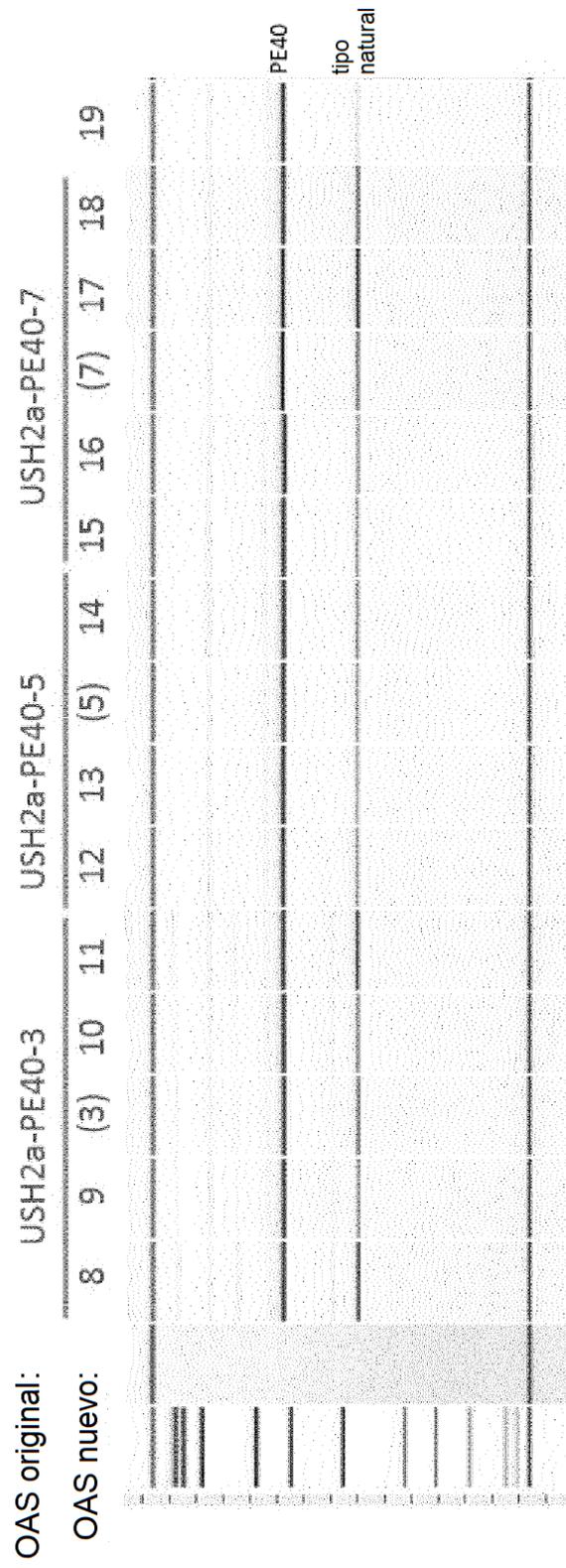


Fig.4

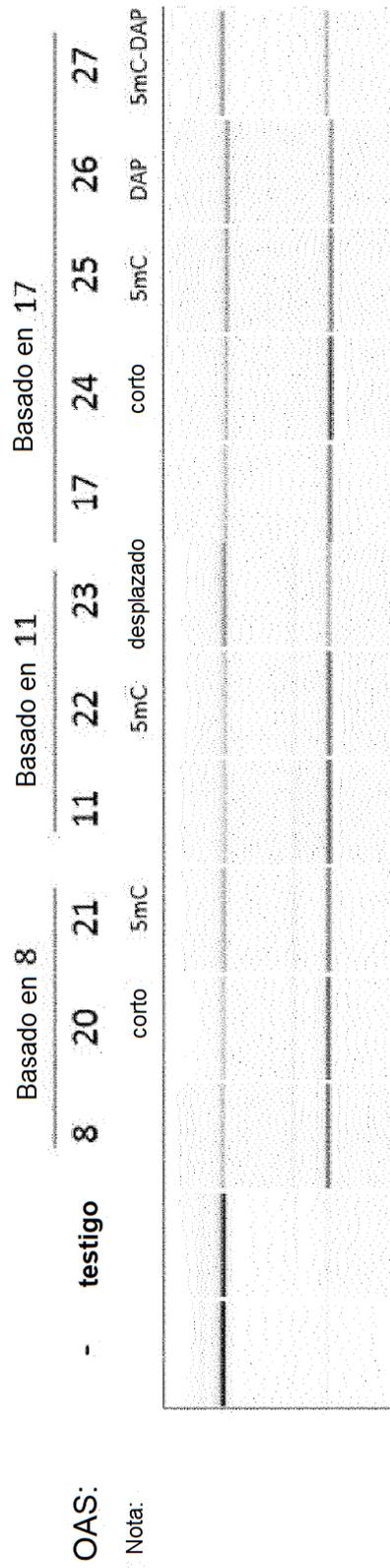


Fig.5

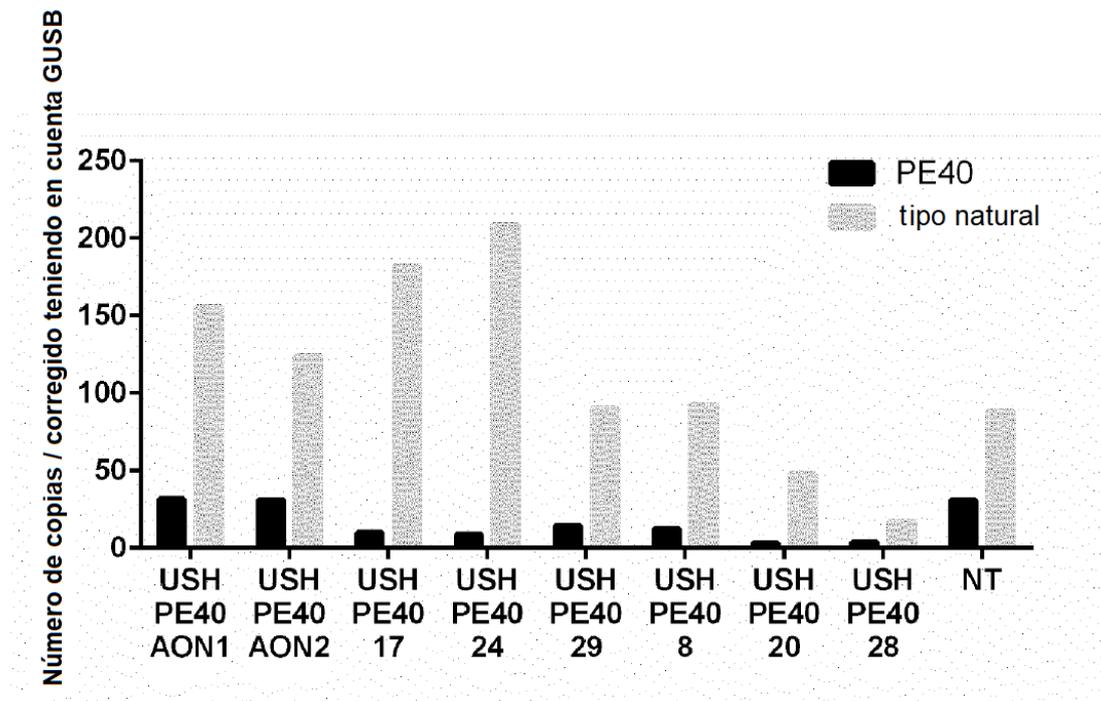


Fig.6

A

	USH2a PE40-20		USH2a PE40-24		USH2a PE40-28		USH2a PE40-29		LPS	R848
	1 μ M	4 μ M	100 ng/ml	1 μ M						
IL-6	2,11	1,96	2,00	1,97	1,57	1,40	2,28	1,55	1172,88	602,93
IL-1 β	2,46	2,28	1,88	2,33	1,64	1,79	2,06	1,81	1740,65	751,67
IL-17	1,84	1,81	1,78	1,86	1,43	1,61	1,79	1,67	5,65	5,27
IL-8	1,74	1,99	1,62	1,24	1,40	1,51	1,72	1,36	5,99	4,18
MIP-1 β	1,89	2,05	1,64	1,82	1,35	1,58	1,60	1,52	7,17	8,37
TNF- α	1,74	1,84	1,45	1,69	1,20	1,32	1,45	1,37	341,31	136,70
IFN- γ	1,41	1,22	1,48	1,39	1,32	1,21	1,55	1,29	16,93	15,39
IL-4	1,51	1,41	1,49	1,50	1,28	1,29	1,54	1,39	9,41	7,79
IL-12 p70	1,24	1,37	1,38	1,67	1,15	1,46	1,37	1,46	5,56	6,14
MCP-1	0,92	0,94	0,98	2,16	0,90	0,87	0,88	1,44	1,09	1,07

B

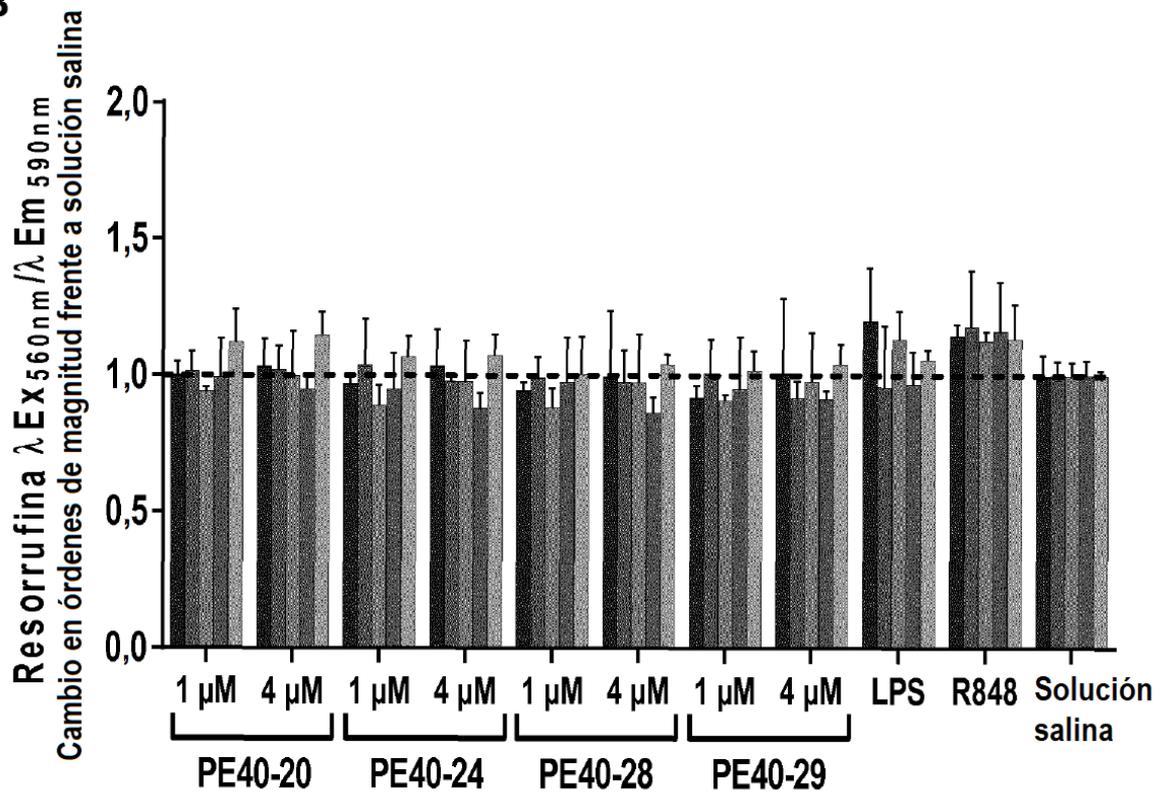


Fig.7

