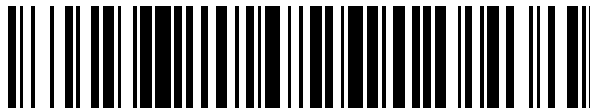


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 161**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2012 PCT/EP2012/060906**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12168435**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12729421 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2718437**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento de amaurosis congénita de Leber**

30 Prioridad:

10.06.2011 EP 11305735

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.09.2018

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (16.7%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (16.7%);
GENETHON (16.7%);
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (16.7%);
ENSCP - CHIMIE PARISTECH ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DE CHIMIE DE PARIS (16.7%) y
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS (16.7%)**

72 Inventor/es:

**ROZET, JEAN-MICHEL;
KICHLER, ANTOINE;
PERRAULT, ISABELLE;
KAPLAN, JOSSELINE;
GERARD, XAVIER;
SCHERMAN, DANIEL y
MUNNICH, ARNOLD**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 683 161 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de tratamiento de amaurosis congénita de Leber

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al tratamiento de la amaurosis congénita de Leber. En particular, se utiliza la estrategia de la omisión de exón.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La amaurosis congénita de Leber (ACL, MIM204000) es una causa común de ceguera en la infancia (10 %). Es la distrofia retiniana hereditaria más grave, responsable de la ceguera o deficiencia visual profunda en el nacimiento o en los primeros meses de vida. En los meses siguientes, la enfermedad estará presente como una enfermedad de conos y bastones considerablemente grave y estacionaria con una agudeza visual extremadamente pobre (AV \leq percepción de la luz; tipo I) o una distrofia de conos y bastones progresiva, pero grave, con una agudeza visual medible en la primera década de vida (20/200 \leq VA \leq 60/200; tipo II)².

[0003] Hasta ahora, las alteraciones de 16 genes con patrones altamente variables de distribución tisular y funciones han sido notificadas en ACL (Kaplan, J. Ophthalmic Genet. 29, 92-8 (2008); den Hollander, AI y col. Prog Retin Eye Res. 27, 391-419 (2008).). En los países occidentales, las mutaciones que afectan a la proteína centrosómica 290 (CEP290) son la principal causa de la enfermedad (20 %) (den Hollander, AI y col. Am J Hum Genet. 79, 556-61 (2006); Perrault, I y col. Hum Mutat. 28, 416 (2007).). Entre ellas, la mutación c.2291+1655 A>G representa más del 10 % de todos los casos, por lo que este cambio supone una importante diana para la terapia. La mutación c.2291+1655 A>G se ubica en la parte profunda del intrón 26 en el que se crea un sitio de corte y empalme donante de 5 pb aguas abajo de un fuerte sitio de corte y empalme aceptor críptico. Como resultado, un exón críptico de 128 pb que codifica un codón de terminación se inserta en el ARNm del CEP290, entre los exones 26 y 27 (den Hollander, AI y col. Am J Hum Genet. 79, 556-61 (2006)).

30 RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para restaurar la función de CEP290 en una célula que contiene la mutación c.2291+1655 A>G presente en el gen CEP290, en el que dicho procedimiento comprende la etapa que consiste en prevenir el corte y empalme del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2291+1655 A>G mutante, en el que dicho procedimiento se lleva a cabo usando al menos un oligonucleótido antisentido que es complementario a la secuencia en el pre-ARNm del CEP290 c.2291+1655 A>G mutante que se requiere para un corte y empalme correcto de dicho exón críptico diana y en el que dicha secuencia se selecciona entre el grupo que consiste en secuencias exónicas que potencian el corte y empalme (ESE) de dicho exón críptico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0005] La amaurosis congénita de Leber (ACL) es una grave distrofia retiniana hereditaria responsable de la ceguera congénita o de aparición temprana. La mutación causante de la enfermedad más común (>10 %) se ubica en la parte profunda del CEP290 en el intrón 26 (c.2291+1655 A>G), en el que se crea un sitio de corte y empalme donante fuerte y conduce a la inserción de un exón críptico que codifica un codón de terminación prematuro. En la presente invención, los inventores notifican los datos que apoyan la viabilidad de una estrategia de omisión de exón mediada por un oligonucleótido antisentido para corregir el corte y empalme. La invención proporciona así el uso de dicha estrategia de omisión de exón para el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber.

[0006] El término "CEP290" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una proteína codificada por el gen CEP390. CEP290 es un componente integral de la puerta ciliar que une la zona de transición entre los cilios y el citoplasma. La proteína desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural de esta puerta, y por lo tanto, tiene un papel crucial en el mantenimiento de la función ciliar (9. Craige, B y col. The Journal of Cell Biology. 190, 927-40 (2010)). El término puede incluir "CEP290" de origen natural y variantes y formas modificadas del mismo. El CEP290 puede proceder de cualquier fuente, pero normalmente es un CEP290 de mamífero (por ejemplo, primate humano y no humano), en particular un CEP290 humano. Una secuencia de aminoácidos de CEP290 humano nativo a modo de ejemplo se proporciona en la base de datos GenPept con el número de acceso [EAW97414.1] y una secuencia de ácido nucleico humana nativa que codifica CEP290 a modo de

ejemplo se proporciona en la base de datos GenBank con el número de acceso [NM_025114.3].

[0007] Un primer objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para restaurar la función de CEP290 en una célula que contiene la mutación c.2991+1655 A>G presente en el gen CEP290, en el que dicho procedimiento comprende la etapa de prevención de corte y empalme del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2291+1655 A>G mutante, en el que dicho procedimiento se lleva a cabo usando al menos un oligonucleótido antisentido que es complementario a la secuencia en el pre-ARNm del CEP290 c.2991+1655 A>G mutante que se requiere para un corte y empalme correcto de dicho exón críptico diana y en el que dicha secuencia se selecciona entre el grupo que consiste en secuencias exónicas que potencian el corte y empalme (ESE) de dicho exón críptico.

[0008] Los expertos en la materia reconocerán que existen numerosas formas de determinar o medir un nivel de funcionalidad de una proteína, y de determinar un nivel de aumento o disminución de la funcionalidad, por ejemplo en respuesta a un protocolo de tratamiento. Tales procedimientos incluyen, entre otros, medir o detectar una actividad de la proteína, etc. Tales mediciones se realizan generalmente en comparación con un patrón o control o muestra "normal". Además, cuando la falta de la funcionalidad de la proteína está implicada en un proceso de la enfermedad, los síntomas de la enfermedad pueden ser controlados y/o medidos con el fin de detectar indirectamente la presencia o ausencia de una proteína que funciona correctamente, o con el fin de medir el éxito de un protocolo de tratamiento que tiene por objeto remediar la falta de funcionamiento de la proteína.

[0009] En particular, la funcionalidad de CEP290 puede medirse por varios procedimientos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, la mejora del montaje y/o mantenimiento de cilios puede determinarse como se describe en el EJEMPLO.

[0010] Por consiguiente, la estrategia de omisión de exón como se describe anteriormente da como resultado una mejora de los síntomas de amaurosis congénita de Leber (es decir, la restauración de la función o la estabilidad de la proteína) en el intervalo de al menos aproximadamente 10 %, de manera preferente aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso el 100 %, en comparación con un caso de un paciente no tratado. Tales síntomas pueden observarse en un nivel micro (es decir, la restauración y/o la localización de la expresión de proteínas evaluada por inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, análisis de membrana Western; restauración/mejora de la funcionalidad de la proteína evaluada por la mejora del montaje y/o mantenimiento de cilios, restauración/mejora de la funcionalidad de conos ...) o en un nivel macro (es decir, mejora/restauración de los síntomas clínicos, tales como agudeza visual).

[0011] En general, la eliminación del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2291+1655 A>G mutante se lleva a cabo usando los oligonucleótidos (ONAs) antisentido.

[0012] La expresión "oligonucleótido antisentido" se refiere a una sola cadena de ADN o ARN que es complementaria a una secuencia elegida. El ARN antisentido puede ser usado para prevenir la traducción de proteínas de determinadas cadenas de ARNm mediante la unión a ellos. El ADN antisentido se puede usar para dirigirse a un ARN específico, complementario (codificante o no codificante).

[0013] Los oligonucleótidos están diseñados para complementar secuencias adecuadas, por lo general las secuencias de ARN en la molécula pre-ARNm que son necesarias para el corte y empalme correcto del exón diana, bloqueando de este modo las reacciones de corte y empalme que incorporarían el exón diana en ARNm maduro. Un ONA se une normalmente a la secuencia que complementa e impide estéricamente la reacción de corte y empalme. Las secuencias se seleccionan de manera que sean específicas, es decir, los ONAs son complementarios únicamente a las secuencias del pre-ARNm y no a otras secuencias de ácidos nucleicos. Los ONAs usados en la práctica de la invención pueden ser de cualquier tipo adecuado, por ejemplo oligodesoxirribonucleótidos, oligorribonucleótidos, morfolinos, oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN, ONAs mediados por U7 o U1 o productos conjugados de los mismos tales como ONAs conjugados por un péptido o complejados por nanopartículas. Los ONAs empleados en la práctica de la invención tienen generalmente una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, y pueden tener una longitud por ejemplo, de aproximadamente 10 o menos, o aproximadamente 15, o aproximadamente 20 o aproximadamente 30 nucleótidos o más. La longitud óptima de ONAs de una secuencia complementaria diana se encuentra generalmente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud dependiendo de la cadena principal química usada y de la secuencia diana. Normalmente, los ONAs morfolinos tienen aproximadamente una longitud de 25 nucleótidos, los ONAs basados en 2'PMO tiene una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos, y ONAs de triciclo tienen una longitud de aproximadamente 15 nucleótidos.

[0014] En una realización particular, dos o incluso más ONAs también pueden usarse al mismo tiempo; esto puede ser particularmente interesante cuando el ONA se vectoriza en un casete de expresión (como por ejemplo, por casetes U7 o U1).

5 **[0015]** En consecuencia, un objeto adicional de la invención se refiere a un oligonucleótido antisentido capaz de inducir una omisión de exón y restaurar la función de CEP290 en una célula que contiene la mutación c.2991-1655 A>G presente en el gen CEP290, que consiste en una secuencia complementaria a una secuencia de ácido nucleico del gen CEP290 que es necesaria para el corte y empalme correcto del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2291+1655 A>G mutante, en el que dicha secuencia de ácido nucleico del gen CEP290 se selecciona
10 entre el grupo que consiste en las secuencias ESE de dicho exón críptico.

[0016] En una realización particular, los oligonucleótidos antisentido comprenden una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 (ESE(+90+120)) y SEQ ID NO: 2 (ESE(+50+70)). Normalmente, dichos oligonucleótidos antisentido tienen una longitud de al menos 15 nucleótidos.

15

[0017] En una realización más particular, dicho oligonucleótido antisentido puede ser seleccionado entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 1 (ESE(+90+120)) y SEQ ID NO: 2 (ESE(+50+70)).

[0018] Una combinación de dichos oligonucleótidos antisentido también se puede usar según la invención
20 para un corte y empalme correcto del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2291+1655 A>G mutante.

[0019] Para su uso en la presente invención, los ONAs de la invención pueden ser sintetizados *de novo* usando cualquier serie de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento de b-cianoetil fosforamidita (Beaucage y col., 1981); el procedimiento del nucleósido H-fosfonato (Garegg y col., 1986; Froehler y col., 1986, Garegg y col., 1986, Gaffney y col., 1988). Estas químicas se pueden realizar por una variedad de sintetizadores de ácidos nucleicos automatizados disponibles en el mercado. Estos ácidos nucleicos pueden ser referidos como ácidos nucleicos sintéticos. Alternativamente, los ONAs se pueden producir a gran escala en plásmidos (véase Sambrook, y col., 1989). Los ONAs se pueden preparar a partir de secuencias de ácido nucleico existentes usando técnicas conocidas, tales como las que emplean enzimas de restricción, exonucleasas o
25 endonucleasas. Los ONAs preparados de esta manera pueden ser referidos como ácidos nucleicos aislados.
30

[0020] Para su uso *in vivo*, los ONAs pueden ser estabilizados o se estabilizan. Un ONA "estabilizado" se refiere a un ONA que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo a través de una exo- o endonucleasa). La estabilización puede ser una función de la longitud o estructura secundaria. Alternativamente, la
35 estabilización de ONA puede lograrse a través de modificaciones de la cadena principal de fosfato. El ONA estabilizado preferente de la presente invención tiene una cadena principal modificada, por ejemplo, tiene enlaces fosforotioato para proporcionar una actividad máxima y proteger el ONA de la degradación por exo- y endonucleasas intracelulares. Otras posibles modificaciones de estabilización incluyen modificaciones de fosfodiéster, combinaciones de fosfodiéster y modificaciones de fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-
40 etoxi, y combinaciones de los mismos. Las versiones modificadas químicamente estabilizadas de ONAs también incluyen "morfolinos" (oligómeros morfolino fosforodiamidato, OMFs), oligómeros a base de 2'-O-met, ADNs de triciclo (tc), ARNs pequeño nuclear (pn) U7, o moléculas oligoantisentido de ADN de triciclo (solicitud de patente provisional estadounidense n.1 de serie 61/212.384 para: Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides, Compositions and Methods for the Treatment of Disease, presentada el 10 de abril de 2009, cuyo contenido completo se incorpora
45 en la presente memoria por referencia).

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

[0022] Otras formas de ONAs que pueden ser usadas para este efecto son secuencias de ONA acopladas a moléculas de ARN pequeño nuclear tal como U1 o U7 en combinación con un procedimiento de transferencia viral basado en, pero no limitado a, lentivirus o virus adenoasociados (Denti, MA, y col., 2008; Goyenville, A, y col.,
55 2004).

[0023] En otra realización particular, los oligonucleótidos antisentido de la invención son nucleótidos a base de 2'-O-metil-fosforotioato.

[0024] Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar una amaurosis congénita de Leber en un paciente que porta la mutación c.2991+1655 A>G en el gen CEP290, que comprende la etapa que consiste en administrar a dicho paciente al menos un oligonucleótido antisentido complementario a secuencias de ácidos nucleicos que son necesarias para la prevención del corte y empalme del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2291+1655 A>G mutante.

[0025] En una realización particular, la invención se refiere a dicho procedimiento en el que el oligonucleótido antisentido es complementario a una secuencia de ácido nucleico que es necesaria para la prevención del corte y empalme del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2291+1655 A>G mutante.

[0026] La invención se refiere además a un oligonucleótido antisentido complementario a una secuencia de ácido nucleico del gen CEP290 que es necesaria para el corte y empalme correcto del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2991+1655 A>G mutante, en el que dicha secuencia de ácido nucleico del gen CEP290 es seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias ESE de dicho exón críptico para su uso en un procedimiento de tratamiento de una amaurosis congénita de Leber en un paciente que porta la mutación c.2991+1655 A>G en el gen CEP290.

[0027] En una realización particular; los oligonucleótidos antisentido de la invención se pueden administrar *in vivo* solo o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido antisentido de la invención a las células. Preferentemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con una degradación reducida en relación con el grado de degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, entre otros, plásmidos desnudos, sistemas de administración no viral (electroporación, sonoporación, agentes de transfección catiónicos, liposomas, etc.), fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de los oligonucleótidos antisentido complementario a secuencias de ácido nucleico. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen, entre otros, secuencias de ácidos nucleicos a partir de los siguientes virus: virus de ARN tales como retrovirus (como por ejemplo virus de la leucemia murina Moloney y vectores derivados lentivirales), virus del sarcoma murino de Harvey, virus de tumor mamario murino, y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociados; virus de tipo SV40; poliomavirus; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus de la vacuna; virus de la polio. Uno puede emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

[0028] Los vectores virales preferidos según la invención incluyen adenovirus y virus adenoasociados (AAV), que son virus de ADN que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. En realidad, se conocen 12 serotipos diferentes de AAV (AAV1 a 12), cada uno con diferentes tropismos tisulares (Wu, Z Mol Ther 2006; 14: 316-27). Los AAV recombinantes se derivan de AAV dependiente de parvovirus (Choi, VW J Virol 2005; 79: 6801-07). El virus adenoasociado de tipo 1 a 12 puede diseñarse para ser deficiente en replicación y es capaz de infectar un amplio intervalo de tipos celulares y especies (Wu, Z Mol Ther 2006; 14: 316-27). Tiene además ventajas tales como estabilidad en disolventes térmico y lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hemopoyéticas; y la falta de inhibición de la superinfección permitiendo así múltiples series de transducciones. Además, las infecciones por virus adenoasociados de tipo silvestre se han seguido en cultivos tisulares durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un evento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de manera extracromosómica.

[0029] Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo Sambrook y col., 1989. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han utilizado como vacunas de ADN para la administración de genes que codifican antígenos a las células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto ya que no tienen los mismos problemas de seguridad como con muchos de los vectores virales. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un péptido a partir de un gen operativamente codificado en el plásmido. Algunos plásmidos usados comúnmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40, y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la materia. Adicionalmente, los plásmidos pueden ser diseñados usando enzimas de restricción y reacciones de ligamiento para eliminar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos pueden ser administrados por una variedad de vías parenteral, mucosal y tópica. Por ejemplo, el ADN plasmídico se puede inyectar por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea, o por otras vías. También se puede administrar por aerosoles o gotas intranasales, supositorio rectal y por vía oral. Preferentemente, dicho ADN plasmídico se inyecta a través de una ruta intraocular (intravítrea, subretinal, supracoroidal ...). También se puede administrar en la epidermis o en una superficie mucosa usando una pistola

génica. Los plásmidos se pueden administrar en una solución acuosa, secarse sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN incluyendo, entre otros, liposomas, dendrímeros, cocleato y microencapsulación.

5 **[0030]** En una realización preferida, el oligonucleótido antisentido correspondiente a una secuencia de ácido nucleico está bajo el control de una región reguladora heteróloga, por ejemplo, un promotor heterólogo. El promotor también puede ser, por ejemplo, un promotor viral, tal como el promotor CMV o cualquier promotor sintético.

10 **[0031]** La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene un oligonucleótido antisentido de la invención para el tratamiento de una amaurosis congénita de Leber en un paciente que porta la mutación c.2991+1655 A>G en el gen CEP290.

15 **[0032]** Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable, tal como solución salina, fosfato sódico, etc. Las composiciones estarán generalmente en forma de un líquido, aunque esto no siempre será el caso. Los vehículos, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfatos de calcio, alginato, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, metilcelulosa, metil y propilhidroxibenzoatos, aceite mineral, etc. Las formulaciones también pueden incluir agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, conservantes, agentes tamponantes, etc. Los expertos en la materia también reconocerán que los ácidos nucleicos son administrados a menudo en conjunto con lípidos (por ejemplo, lípidos catiónicos o lípidos neutros o mezclas de estos), frecuentemente en forma de liposomas u otros materiales micro- o nanoestructurados adecuados (por ejemplo, micelas, lipocomplejos, dendrímeros, emulsiones, fases cúbicas, etc.).

25 **[0033]** Normalmente, los oligonucleótidos antisentido de la invención se pueden administrar en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de tal manera que el oligonucleótido antisentido de la invención pueda penetrar en las regiones corneales e internas del ojo, como por ejemplo la cámara anterior, la cámara posterior, el cuerpo vítreo, el humor acuoso, el humor vítreo, la córnea, el iris/ciliar, el cristalino, la coroides/retina y la esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede, por ejemplo, ser una pomada, aceite vegetal o un material encapsulante. Alternativamente, los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden ser inyectados directamente en el humor vítreo, humor acuoso, tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o los músculos extraoculares, la retina (por ejemplo, después de un desprendimiento de retina) o incluso en el espacio supracoroideo. Los medios de electroporación o sonoporación también pueden ser adecuados para la administración de los oligonucleótidos antisentido de la invención.

35 **[0034]** Un experto en la materia reconocerá que la cantidad de un ONA que se va a administrar será una cantidad que es suficiente para inducir la mejora de los síntomas no deseados de enfermedades. Tal cantidad puede variar entre otras cosas dependiendo de factores tales como el sexo, edad, peso, condición física general, del paciente, etc., y puede determinarse sobre una base de caso por caso. La cantidad también puede variar según el tipo de afección a tratar, y los otros componentes de un protocolo de tratamiento (por ejemplo, la administración de otros medicamentos, tales como esteroides, etc.).

40 **[0035]** Si se elige una administración de ONAs a base de virus, las dosis adecuadas dependerán de diferentes factores, tales como la cepa viral que se emplea, la vía de administración (intramuscular, intravenosa, 45 intraarterial u otras).

50 **[0036]** Los expertos en la materia reconocerán que estos parámetros son normalmente elaborados durante los ensayos clínicos. Además, los expertos en la materia reconocerán que, mientras que los síntomas de la enfermedad pueden estar completamente aliviados por los tratamientos descritos en la presente memoria, esto no es siempre así. Incluso un alivio parcial o intermitente de los síntomas puede ser de gran beneficio para el receptor. Además, el tratamiento del paciente normalmente no es un solo evento. Más bien, los ONAs de la invención probablemente serán administrados en múltiples ocasiones, que puede ser, dependiendo de los resultados obtenidos, varios días de diferencia, varias semanas de diferencia, o varios meses de diferencia, o incluso varios años de diferencia. Esto es especialmente cierto cuando se refiere al tratamiento de la amaurosis congénita de Leber ya que la enfermedad no se cura por este tratamiento, es decir, el gen que codifica la proteína aún será defectuoso y la proteína codificada aún poseerá una característica no deseada desestabilizadora tal como un sitio de reconocimiento proteolítico expuesto, a menos que se administren los ONAs de la invención.

[0037] La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos

ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

FIGURAS

5 [0038]

Figura 1 Representación esquemática de los transcritos de CEP290 de tipo silvestre y mutante y secuencias de ONAs. Cuatro ONAs fueron diseñados para dirigirse a secuencias ESE en el exón crítico usando el programa ESEfmdr 3.0 disponible en <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/>.

10

Figura 2 Efecto de la omisión de exón mediada por ONA del exón CEP290 crítico mutante en el ARN mensajero, expresión de la proteína y de cilios primarios. Todas las medidas se registraron en fibroblastos tratados (+) o sin tratar (-) derivados de biopsias cutáneas de los individuos de control (C₁-C₄), heterocigotos portadores no afectados (S₁-S₃) y/o pacientes (P₁-P₄). Las barras de error representan la desviación típica de la media de tres experimentos independientes. a) Los niveles de expresión relativa de mensajeros de c.2291+1655 A>G de tipo silvestre (barras lisas) y mutante (barras rayadas) se determinaron por RT-qPCR. Los resultados se normalizaron usando el software geNorm tomando como referencia los genes RPLP0 y GUSB o TBP, RPLP0 y GUSB. Los niveles de expresión basal de los mensajeros del CEP290 de tipo silvestre se redujeron notablemente en las estirpes celulares de los pacientes en comparación con los controles. Las transfecciones con el oligonucleótido antisentido pero no con el sentido complementario a ESE (+50+70) (paneles superior e inferior, respectivamente) dieron como resultado un aumento estadísticamente significativo en la expresión del alelo de tipo silvestre en CEP290 en pacientes y heterocigotos portadores (p<0,0001). b) Correlación entre la interferencia génica del mensajero mutante y la síntesis de la proteína de CEP290 de tipo silvestre. La expresión de las proteínas CEP290 en estirpes celulares antes (-) y después del tratamiento (+) con el ONA complementario a ESE (+50+70) se determinó por membrana Western. Las variaciones relativas en concentraciones de CEP290 (panel central) se determinaron mediante un análisis por densitometría computarizada de CEP290 y expresión de α -tubulina en cada muestra. El análisis por RT-qPCR de muestras de pacientes usadas para el análisis de membrana Western confirmó la omisión eficaz de exón en todas las estirpes celulares tratadas (panel inferior). Los resultados de RT-qPCR se normalizaron por el software geNorm tomando como referencia tres genes TBP, RPLP0 y GUSB. c) Efecto de la omisión de exón en la ciliogénesis. Los núcleos, cilios y cuerpos basales de estirpes celulares no tratadas y fibroblastos transfectados con oligonucleótidos complementarios a ESE (+50+70) y ESE sentido (+50+70) se tiñeron usando DAPI (azul), anticuerpos anti-tubulina acetilada (verde) y anti- γ -tubulina (rojo), respectivamente (panel derecho). Las proporciones de los fibroblastos que presentan un cilio primario entre las células se calcularon mediante la numeración de al menos 200 células (se dan números individuales en cada barra; panel izquierdo). Las barras de error representan la desviación típica a partir de los recuentos de al menos 4 campos (media n = 9) registrados a partir de dos experimentos independientes. La omisión de exón mediada por ONA del exón CEP290 crítico mutante en los ARNs mensajeros resultó en un aumento de las proporciones de células que portan un cilio primario para los cuatro pacientes (estadísticamente significativo en las estirpes celulares de 3/4 pacientes P₁, P₂, P₃).

40 **Figura 3.** (a) Expresión de los transcritos de tipo silvestre y mutante (c.2991 1655 A>G) del gen CEP290 en las células del paciente (P₂) y control (C₄) después de la transfección o no (=afección "sin tratar") de cinco oligonucleótidos antisentido diferentes. Los resultados de RT-qPCR se normalizaron usando el software geNorm y usando como referencia los dos siguientes genes: GUSB y RPLP0. El gráfico muestra las cantidades de tipo silvestre (TS CEP290, barras negras) y mutante transcritas (CEP290 mutante, barras sombreadas). (b) Eficacia de la omisión de exón crítico en los mutantes de ARN mensajero del CEP290. Todas las mediciones se realizaron en las células no transfectadas (-) o transfectadas (+) por oligonucleótidos antisentido HD26 (7-18) y ESE (90 120). Las células usadas son fibroblastos derivados de individuos sanos (C₁-C₄), portadores heterocigotos de no pacientes (S₁-S₃) e individuos con ACL (P₁-P₄). Las barras de error representan la desviación típica de la media derivada de tres experimentos independientes. Los niveles de expresión de ARNm c.2991 1655A>G de tipo silvestre (CEP290 TS, barras negras) y mutante (CEP290 mutante; barras sombreadas) se determinaron mediante RT-qPCR. Los resultados se normalizaron usando un software geNorm y usando como referencia los genes RPLP0 y GUSB.

55 **EJEMPLO 1: LA OMISIÓN DEL EXÓN MEDIADA POR UN OLIGONUCLEÓTIPO ANTISENTIDO PERMITE LA CORRECCIÓN EFICAZ DEL CORTE Y EMPALME DE CEP290 ANORMAL EN AMAUROSIS CONGÉNITA DE LEBER DEBIDO A LA MUTACIÓN FRECUENTE C.2291+1655 A>G EN CEP290**

Materiales y procedimientos:

Agente de transfección y ONA:

[0039] El péptido de transfección catiónica de 26 residuos de longitud LAH4-L1¹ se preparó mediante síntesis en fase sólida automatizada en Millipore 9050 o sintetizadores ABI 431 usando química fmoc (una especie de regalo de AJ Mason y B. Bechinger). Los agentes de transfección Lipofectamine2000 y DOTAP se obtuvieron en 5 (Invitrogen) y (Sigma-Aldrich), respectivamente. Los oligonucleótidos a base de 2'-O-metilfosforotioato se obtuvieron en Sigma.

Cultivo celular y transfección de ONA:

10 **[0040]** Las biopsias cutáneas se obtuvieron de 4 pacientes con ACL que portan la mutación c.2291+1655 A>G (3/4 de homocigotos, P1, P2, P4; 1/4 de compuestos heterocigotos con la mutación P3 c.5850delT, p.Phe1950LeuFsX14) 3 heterocigotos portadores no afectados (S₁ a S₃) e individuos de control (C₁ a C₄). Se obtuvo el consentimiento por escrito para cada individuo y la investigación fue aprobada por el comité de revisión institucional.

15

[0041] Los fibroblastos primarios se aislaron por tripsinización selectiva y proliferaron a 37 °C, 5 % de CO₂ en medio Opti-MEM Glutamax I (Invitrogen) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Invitrogen), 1 % de suero sustituto ultrosor G (Pall Francia) y 1 % de estreptomycin/penicilina (Invitrogen). Los fibroblastos entre el pase 7 y 9 se sembraron en placas en 4x10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos 24 horas antes de la transfección. Las 20 células a una confluencia de 80 % se transfectaron con ONAs a base de 2'-OMePS (150 nM) en Opti-MEM usando LAH4-L1 a una relación 1:10 (p:p) ONA:péptido. Después de 3 horas de incubación a 37 °C, el medio de transfección se reemplazó por medio de cultivo reciente.

[0042] Para la inhibición de la degradación mediada sin sentido, se añadieron 25 µg/ml de hidrato de 25 dihidrocloruro emetina (Sigma-Aldrich) al medio durante 12 horas.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc:

[0043] Veinticuatro horas después de la transfección, se recuperaron las células transfectadas y no tratadas. 30 El ARN total se extrajo usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen) según el protocolo del fabricante. Todas las muestras eran DNasa tratada por el conjunto de DNasa libre de RNasa (Qiagen). La concentración y pureza del ARN total se evaluó usando el espectrofotómetro Nanodrop-8000 (NanoDrop Technologies) antes de su almacenamiento a -80 °C. El análisis cualitativo de ARN total se realizó usando el Bioanalyzer 2220 (RNA 6000 Nano kit; Agilent) para verificar que el RIN se comprendía entre 8 y 10. La síntesis de ADNc de primera cadena se realizó a partir de 500 ng 35 de ARN total extraído usando el kit de ADNc Verso (Thermo Fisher Scientific) con hexámero:cebadores oligo(dT) al azar a una relación 3:1 (v:v) según las instrucciones del fabricante. Una reacción sin RT (sin enzima) para una muestra se usó como control y también se analizó por qPCR.

PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR):

40

[0044] Para medir el nivel de expresión de los mensajeros del *CEP290*, los alelos de tipo silvestre y mutante se amplificaron como fragmentos de 93 pb y 117 pb, respectivamente. Las regiones de 132 pb, 80 pb, 84 pb, 101 pb y 95 pb en el ARNm de la proteína de unión a caja TATA humano (*TBP*, NM_003194), el ARNm de beta-2-microglobulina humano (*B2M*, NM_004048.2), el ARNm de beta glucuronidasa humano (*GUSB*, NM_000181.3), el 45 ARNm de hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 humano (*HPRT1*, NM_000194) y el ARNm de la gran proteína ribosomal P0 humano (*RPLP0*, NM_001002.3) se usaron para la normalización, respectivamente. Un fragmento de 99 pb del gen de la albúmina humana (*ALB*, NM_000477) se usó para controlar la no contaminación de los ADNc por el ADN genómico. Los cebadores fueron diseñados usando el software Oligo Primer Analysis v.7 disponible en <http://oligo.net>. La especificidad de los pares de cebadores con secuencias molde de PCR se comprobó contra la 50 base de datos de CNIB usando el software Primer-BLAST disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast.

[0045] Los ADNc (5 µl de una dilución 1:25 en agua libre de nucleasa) se sometieron a amplificación por PCR en tiempo real en un tampón (20 µl) que contenía Master Mix Plus qPCR de MESA BLUE para un ensayo Sybr (Eurogentec) y 300 nM de cebadores directo e inverso, en un sistema de PCR en tiempo real rápida Taqman 7900 HT (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 50 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 65 °C. La especificidad de los productos de amplificación se determinó a partir de la fusión de análisis de la curva realizado al final de cada ensayo usando un ciclo a 95 °C durante 15 s, 65 °C durante 15 s y 95 °C durante 15 s. Los datos fueron analizados usando el software SDS 2.3 (Applied Biosystems).

[0046] Para cada muestra de ADNc, la media de los valores del ciclo de cuantificación (C_c) se calculó a partir de triplicados (desviación típica DT < 0,5 C_c). Los niveles de expresión de CEP290 se normalizaron con el "factor de normalización" obtenido del software geNorm para Microsoft Excel² que usa los genes de referencia más estables y estimaciones de eficiencia de amplificación calculadas para cada par de cebadores usando 4 veces curvas de dilución en serie (1:5, 1:25, 1:125, 1:625). Se usaron reacciones de transcriptasa no inversa (no RT), sin molde (NTC) y sin contaminación de los ADNc por el ADN genómico (ALBh) como controles negativos en cada análisis (valores C_c NTC = no determinado, sin RT > 40 y ALBh > 40).

[0047] Los datos cuantitativos son las medias ± EEM de tres experimentos independientes y estos se presentan como la relación entre los valores de ARNm individuales. La significancia de las variaciones entre las muestras se calculó usando la diferencia mínima significativa protegida (DMSP) de Fisher según la significancia de análisis de varianza (ensayo de ANOVA).

Análisis de membrana Western:

[0048] 24 h después de la transfección, las células se recolectaron y se sometieron a lisis en un tampón Triton/SDS (pH 7,8 Tris-base 25 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, 15 % de glicerol, MgCl₂ 8 mM, 1 % de Triton y 1 % de SDS) que contiene un cóctel inhibidor de la proteasa completo (Roche) en hielo durante 30 min con una mezcla repetida. El ADN liberado se fragmentó durante 20 s en el homogeneizador Ultra-Turrax (Ika-Werke) y se centrifugaron los lisados (15.000 g a 4 °C durante 10 min). Las concentraciones de proteína se determinaron a partir de las fracciones de detergente soluble usando el kit de ensayo de proteínas DC™ según el protocolo del fabricante (Bio-Rad). Las proteínas (125 µg) fueron desnaturalizadas a 90 °C durante 10 minutos en 4X de tampón de muestra de proteína premezclada (tampón de muestra XT, Biorad) y se separaron por electroforesis (50 voltios durante 30 minutos, seguido de 140 voltios durante 90 minutos a temperatura ambiente) en 3-8 % en geles de tris acetato NuPAGE (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron (100 voltios, 2 h a 4 °C) a membranas Immobilon-P PVDF (Millipore). Las membranas se bloquearon con TFS 0,5 % Tween-20/5 % de leche en polvo seca y se incubaron durante la noche a 4 °C bajo agitación con anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-humano CEP290 (Novus Biologicals) o monoclonales de ratón anti-α-tubulina (Sigma) en 1:1800 y 1:500000 diluciones, respectivamente. Las membranas se lavaron tres veces en solución de TFS 0,5 % Tween-20 (15 min) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios e inmunoglobulinas de burro anti-conejo y de oveja anti-ratón conjugados con PRP (Amersham GE Healthcare) en 1:10000 diluciones, respectivamente. Los reactivos de detección de membrana Western y CLP (Amersham GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante y la membrana se expuso a CLP Amersham Hyperfilm (Amersham GE Healthcare). La expresión relativa de la proteína CEP290 se estimó mediante densitometría usando α-tubulina como referencia en una G:Caja a partir de Syngene con los software GeneSnap y GeneTool.

Citometría de flujo:

[0049] ONA sentido complementario a ESE (+50+70) y antisentido complementario a ESE (+50+70) que lleva un grupo fluoresceína en el extremo 3' se obtuvieron de Sigma. Los fibroblastos se transectaron como se describió anteriormente. Después de 3 h de incubación, las células se tripsinizaron, se lavaron dos veces en TFS, y se mantuvieron en TFS que contenía 3 % de suero. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FacsCalibur (Becton Dickinson, Grenoble, Francia) usando el software CELLQuest. Los porcentajes de células fluorescentes se calcularon a partir de 20.000 células morfológicamente intactas.

Microscopia de inmunofluorescencia:

[0050] Los fibroblastos se sembraron en 2,5 x 10⁵ células/pocillo en cubreobjetos de vidrio en placas de 12 pocillos 24 horas antes de la transfección con los ONAs sentido complementarios a ESE (+50+70) y ESE (+50+70), en las condiciones descritas anteriormente. Diez horas después de la transfección, las células se lavaron con TFS y se incubaron 30 h en medio libre de suero (37 °C, 5 % de CO₂). Los fibroblastos no tratados fueron procesados en las mismas condiciones. Posteriormente, las células se fijaron en metanol enfriado con hielo (5 minutos a -20 °C) y se lavaron dos veces en TFS. Las células se permeabilizaron en TFS suplementado con 3 % de ASB y 0,1 % de Triton durante 1 hora a temperatura ambiente antes de ser incubadas durante la noche a 4 °C en tampón de permeabilización que contiene (anticuerpos primarios de conejo anti-γ-tubulina (1:1.000), monoclonales de ratón anti-acetilado tubulina (1:1000); Sigma-Aldrich). Después de tres lavados con TFS, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de permeabilización que contiene anticuerpos secundarios (IgG de cabra anti-conejo conjugada con Alexa-Fluor 594 y Alexa-Fluor 488 (1:1000) e IgG de cabra anti-ratón (1:1000); Molecular Probes), seguido de tres lavados con TFS. Un medio de montaje que contiene DAPI (DAPI Fluoromount G;

SouthernBiotech) se usó para los núcleos del marcador. Las imágenes por inmunofluorescencia se obtuvieron usando un microscopio Leica DM IRBE y una cámara 3.3 RTV MicroPublisher (Q-Imaging). Las imágenes finales se generaron usando la versión 7.2.3 de Cartograph (Microvision Instruments) e ImageJ (National Institutes of Health). El porcentaje de células ciliadas se calculó a partir de dos experimentos independientes ($n > 300$ células para cada 5 estirpe celular). La significancia de variaciones entre las muestras se calculó usando DMSP de Fisher según la significancia del ensayo de ANOVA.

Resultados

10 **[0051]** La amaurosis congénita de Leber (ACL, MIM204000) es una causa común de ceguera en la infancia (10 %)¹. Es la distrofia retiniana hereditaria más grave, responsable de la ceguera o deficiencia visual profunda en el nacimiento o en los primeros meses de vida. En los meses siguientes, la enfermedad, se presentará como una enfermedad de conos y bastones considerablemente grave y estacionaria con una agudeza visual extremadamente pobre (AV \leq percepción de la luz; tipo I) o una distrofia de conos y bastones progresiva, pero grave, con una 15 agudeza visual medible en la primera década de vida ($20/200 \leq VA \leq 60/200$; tipo II)².

[0052] Hasta ahora, las alteraciones de 16 genes con patrones altamente variables de distribución tisular y funciones han sido notificadas en ACL¹,³. En los países occidentales, las mutaciones que afectan a la proteína centrosómica 290 (*CEP290*) son la principal causa de la enfermedad (20 %)⁴,⁵. Entre ellas, la mutación c.2291+1655 20 A>G representa más del 10 % de todos los casos, por lo que este cambio supone una importante diana para la terapia.

[0053] La mutación c.2291+1655 A>G se ubica en la parte profunda del intrón 26 en el que se crea un sitio de corte y empalme donante de 5 pb aguas abajo de un fuerte sitio de corte y empalme aceptor críptico (**Fig. 1**). Como 25 resultado, un exón críptico de 128 pb que codifica un codón de terminación se inserta en el ARNm del *CEP290*, entre los exones 26 y 27⁴. Teniendo en cuenta el gran potencial de omisión del exón como una terapia para derivar las lesiones génicas por truncamiento de proteínas⁶,⁷, se evaluó la posibilidad de usar oligonucleótidos antisentido (ONA) para ocultar el sitio de corte y empalme donador críptico creado por la mutación c.2291+1655 A>G de la maquinaria de corte y empalme, y corregir el corte y empalme anormal en las estirpes celulares de los pacientes 30 portadores.

[0054] Los fibroblastos se derivaron de biopsias cutáneas de los controles (C1-C4), heterocigotos portadores no afectados (S₁-S₃) y homocigotos (P1, P2 y P4) o pacientes heterocigotos compuestos (P3).

35 **[0055]** La eficacia de la estrategia de omisión se evaluó después de la optimización de las secuencias de ONA modificadas con 2'O-metil fosforotioato (**Fig. 1**) y concentraciones, condiciones de transfección y tiempo de tratamiento (no mostrados). Los niveles de expresión de ARNms del *CEP290* de tipo silvestre y mutante se midieron mediante PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR) en fibroblastos sin tratar y células transfectadas con un ONA diseñado para dirigirse a secuencias exónicas que potencian el corte y empalme (ESE) (ESE(+50+70)) o 40 una versión sentido (ESE sentido (+50+70)).

[0056] Los fibroblastos del paciente no tratado expresaron niveles significativamente reducidos del alelo de *CEP290* de tipo silvestre en comparación con los controles y heterocigotos portadores (**Fig. 2a**). Cuando las células 45 se transfectaron con el ONA complementario a ESE (+50+70), los pacientes, portadores no afectados y los controles de fibroblastos expresaron los mensajeros de tipo silvestre a niveles equivalentes, lo que sugiere la omisión altamente eficiente del exón críptico mutante (**Fig. 2a**). El aumento de la expresión del alelo de tipo silvestre fue sorprendentemente mayor que la disminución en la expresión del alelo mutante. Estos datos sugirieron la degradación de los mensajeros mutantes a través de procesos de control de calidad de ARNm celular, en particular, la degradación mediada por secuencias sin sentido (DMS). El aumento significativo de los niveles de ARNm 50 mutante, pero no de los niveles de tipo silvestre en los fibroblastos de un paciente homocigoto (P1) tratado con DMS con el inhibidor de emetina⁸ mostró un fuerte apoyo a esta hipótesis.

[0057] El corte y empalme se mantuvo sin cambios cuando las estirpes celulares fueron tratadas con el oligonucleótido sentido (**Fig. 2a**). Para cerciorarse de que la ausencia de efecto de la versión sentido de ONA en el 55 corte y empalme de *CEP290* no era debido a una eficiencia de administración reducida, la estirpe celular del paciente P1 se transfectó usando ONAs sentido y antisentido complementarios a ESE marcados con fluorescencia (+50+70), respectivamente. La evidencia de la eficacia de transfección similar con ambos ONA mostró un fuerte apoyo a la omisión dependiente del exón críptico *CEP290*. A este respecto, cabe destacar que se alcanzaron niveles similares de omisión cuando las estirpes celulares se trataron con ONAs antisentido diseñados para dirigirse a un

sitio SECE predicho aguas abajo de la secuencia 50+70+ (ESE (+90+120)) (**Fig. 1**). Estos datos indican que diferentes ONAs pueden permitir la omisión eficaz del exón críptico insertado en ARNm del *CEP290* c.2291+1655 A>G mutante.

- 5 **[0058]** Se identificaron otros tres ONA (Tabla 1) que son capaces de inducir la omisión del exón.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos a base de 2'OMe-PS

ONA	Secuencia
H26D (+10-11)	5' - gguaugagauacucacaauuac - 3 (SEQ ID NO:5)
H26D (+19-11)	5' - gguaugagauacucacaauuacaacuggggc -3' (SED ID NO:6)
H26D (+7-18)	5' - gggauagguaugagauacucacaau -3 (SEQ ID NO :4)

- 10 **[0059]** Para determinar si la omisión de exón inducida por ONA en los fibroblastos de los pacientes influyó en los niveles de proteína CEP290, se realizó un análisis de membrana Western usando un anticuerpo policlonal que reconoce el extremo C-terminal de la proteína CEP290. Los niveles elevados de la proteína CEP290 de tipo silvestre se evidenciaron cuando las estirpes celulares de los pacientes y portadores no afectados se trataron con el oligonucleótido antisentido pero no con la versión sentido.

- 15 **[0060]** CEP290 es un componente integral de la puerta ciliar que une la zona de transición entre los cilios y el citoplasma. La proteína desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural de esta puerta, y por lo tanto tiene un papel crucial en el mantenimiento de la función ciliar⁹. Se notificó anteriormente que las células epiteliales nasales de pacientes con ACL que portan mutaciones de CEP290, incluyendo el cambio c.2991+1655 A>G, presentan cilios cortos y anomalías axonemales heterogéneas indicativos de un defecto en el montaje o mantenimiento de cilios¹⁰. Aquí, se muestra que después de la inanición por suero, la expresión de cilios primarios se reduce significativamente en los fibroblastos de pacientes con ACL que portan el cambio c.2991+1655 A>G en comparación con las estirpes celulares de control (media_{P1-P4} = 48,6 % ± 6,5 % frente a media_{C1, C3} = 83,6 % ± 3,2 %; p = 0,0097; **Figura 2c**).

- 25 **[0061]** Curiosamente, tras la transfección con el ONA complementario a ESE(+50+70) pero no el oligonucleótido sentido complementario a ESE(+50+70), la proporción de células ciliadas de pacientes aumentó significativamente, alcanzando niveles similares a los controles: media_{P1-P4+ESE (+50+70)} = 75,3 % ± 3,5 % vs media_{P1-P4+ESEsentido (+50+70)} = 58,75 % ± 8,77 %, p <0,01; media_{P1-P4+ESE (+50+70)} vs media_{C1,C3+ESE (+50+70)} = 78,3 % ± 3,4 %; p = 0,624 (**Fig. 2c**). Esto sugiere que la omisión de exón mediada por ONA resultó en una mejora significativa de montaje y/o mantenimiento de cilios.

- 30 **[0062]** Las mutaciones de *CEP290* son la causa más común de ACL, sin embargo, no existe un tratamiento curativo. Nuestros resultados actuales muestran el potencial terapéutico de la omisión de exón para el tratamiento de la mutación c.2291+1655 A>G que representa solo el 10 % de todos los casos de ACL.

35 **REFERENCIAS**

- 40 **[0063]** A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM GENETHON

- 45 <120> PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO DE AMAUROSIS CONGÉNITA DE LEBER

<130> 09533

<160> 6

- 50 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 31

<212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> ONA complementario a ESE (+90+120)

 <400> 1
 cuggggccag gugcgguggc ucacaucugu a 31
 10
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> ONA complementario a ESE (+50+70)

 <400> 2
 20 ccgaggcggg uggaucacga g 21

 <210> 3
 <211> 21
 <212> ARN
 25 <213> Artificial

 <220>
 <223> ONA sentido complementario a ESE (+50+70)

 30 <400> 3
 cucgugaucc acccgccucg g 21

 <210> 4
 <211> 24
 35 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ONA H26D(+7-18)
 40
 <400> 4
 ggauagguau gagauacuca caau 24

 <210> 5
 45 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> ONA H26D(+10-11)

 <400> 5
 ggauaggau acucacaaau ac22

 55 <210> 6
 <211> 31
 <212> ARN
 <213> Artificial

ES 2 683 161 T3

<220>

<223> ONA H26D(+19-11)

<400> 6

5 gguaugagau acucacaauu acaacugggg c 31

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para restaurar la función de CEP290 en una célula que contiene la mutación c.2991+1655 A>G presente en el gen CEP290, en el que dicho procedimiento comprende la etapa que
5 consiste en evitar el corte y empalme del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2991+1655 A>G mutante, en el que dicho procedimiento se lleva a cabo usando al menos un oligonucleótido antisentido que es complementario a una secuencia en el pre-ARNm del CEP290 c.2991+1655 A>G mutante que se requiere para un corte y empalme correcto de dicho exón secreto críptico diana y en el que dicha secuencia se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias exónicas que potencian el corte y empalme (ESE) de dicho exón críptico.
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho al menos oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- 15 3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho oligonucleótido antisentido se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
4. Un oligonucleótido antisentido capaz de inducir una omisión del exón y restaurar la función de CEP290 en una célula que contiene la mutación c.2991+1655 A>G presente en el gen CEP290, que consiste en una
20 secuencia complementaria de una secuencia de ácido nucleico del gen CEP290 eso es necesaria para el corte y empalme correcto del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2991+1655 A>G mutante, en el que dicha secuencia de ácido nucleico del gen CEP290 se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias ESE de dicho exón críptico.
- 25 5. El oligonucleótido antisentido según la reivindicación 4 que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
6. El oligonucleótido antisentido según la reivindicación 4 o 5 que consiste en una secuencia de ácido nucleico que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- 30 7. El oligonucleótido antisentido según la reivindicación 4 o 5, en el que dicho oligonucleótido antisentido posee una longitud comprendida entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 nucleótidos.
8. Un oligonucleótido antisentido que consiste en una secuencia complementaria a una secuencia de
35 ácido nucleico del gen CEP290 que es necesaria para el corte y empalme correcto del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2991+1655 A>G mutante, en el que dicha secuencia de ácido nucleico del gen CEP290 se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias ESE de dicho exón críptico, para su uso para restaurar la función de CEP290 en una célula que contiene la mutación c.2991+1655 A>G presente en el gen CEP290 en un paciente portador de dicha mutación.
- 40 9. El oligonucleótido antisentido según la reivindicación 8 para su uso según la reivindicación 8, en el que dicha célula que contiene la mutación c.2991+1655 A>G presente en el gen CEP290 es una célula retiniana.
10. Un oligonucleótido antisentido complementario a una secuencia de ácido nucleico del gen CEP290
45 que es necesaria para el corte y empalme correcto del exón críptico insertado en el ARNm del CEP290 c.2991+1655 A>G mutante, en el que dicha secuencia de ácido nucleico del gen CEP290 se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias ESE de dicho exón críptico, para su uso en un procedimiento de tratamiento de una amaurosis congénita de Leber en un paciente portador de la mutación c.2991+1655 A>G en el gen CEP290.
- 50 11. El oligonucleótido antisentido para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho oligonucleótido antisentido es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
12. El oligonucleótido antisentido según las reivindicaciones 8 a 11 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 mediante una inyección intravítrea de dicho oligonucleótido antisentido.
- 55 13. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.

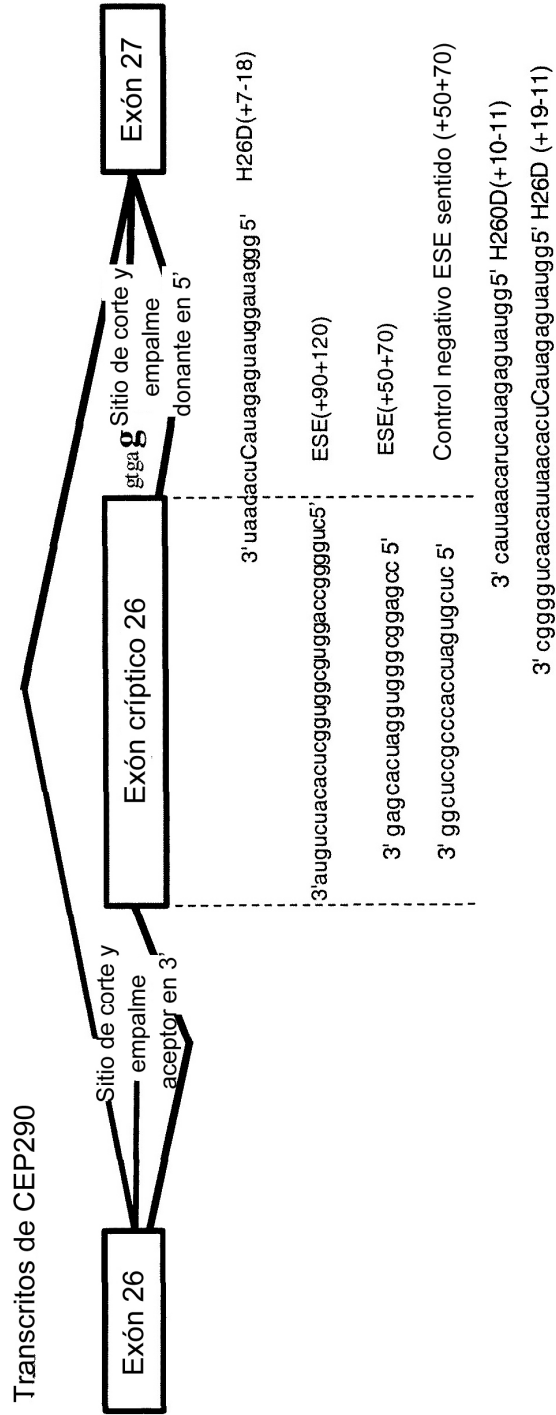


Figura 1

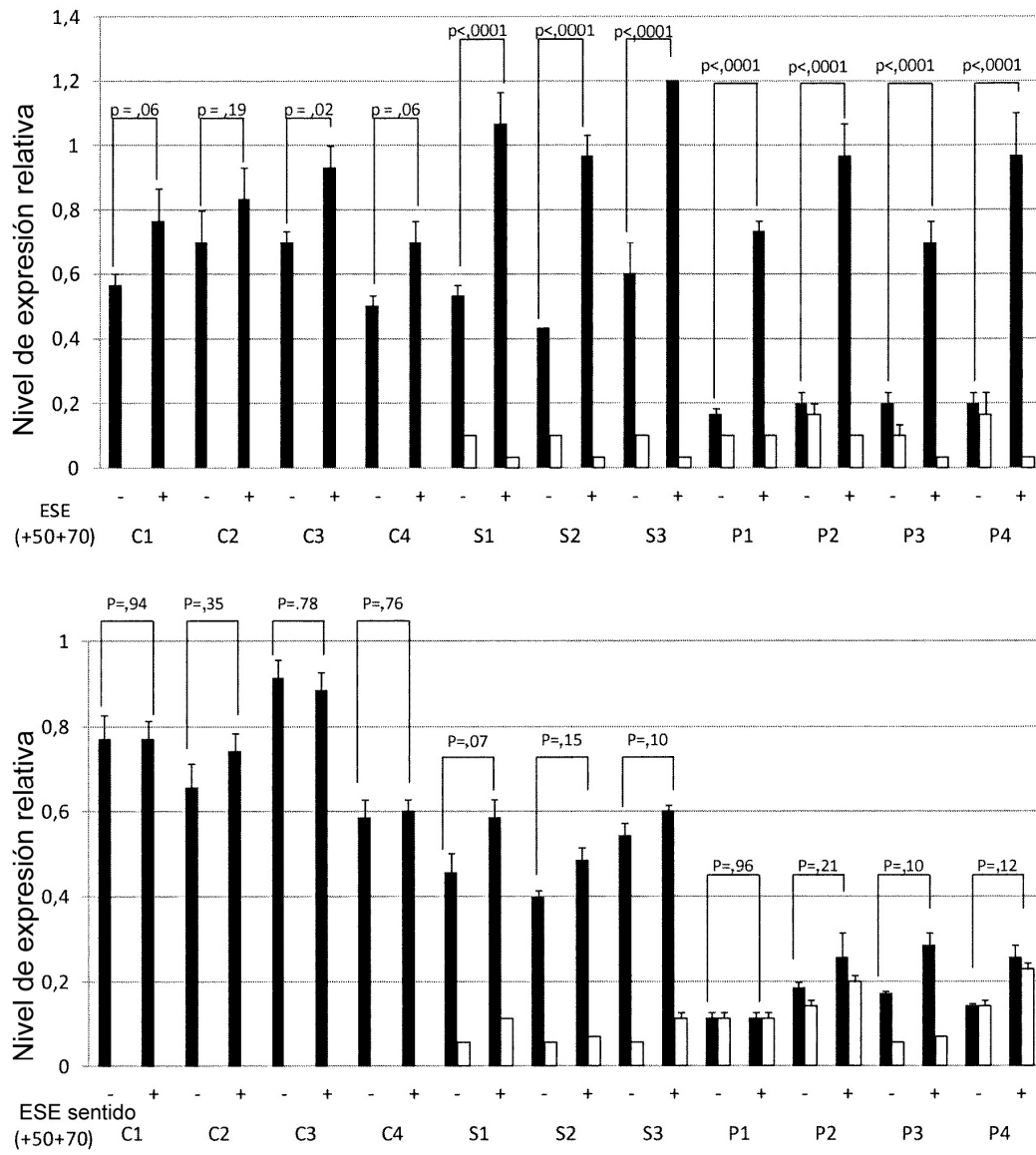


Figura 2A

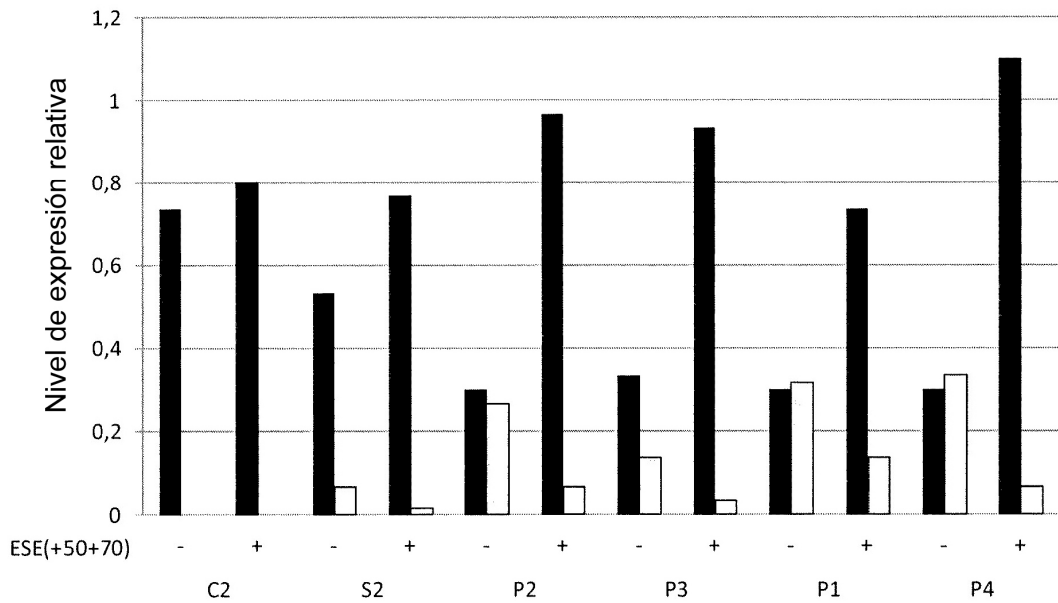
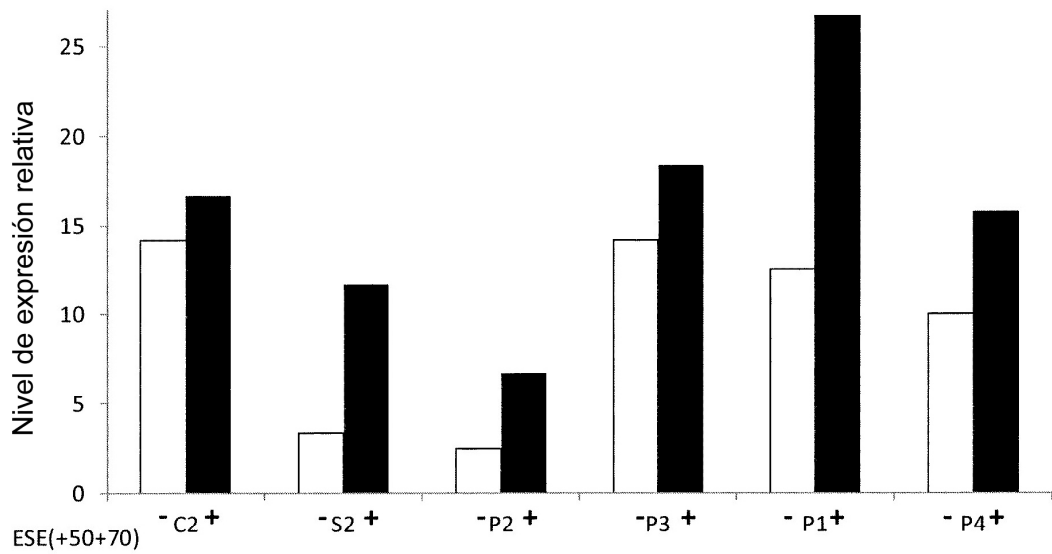
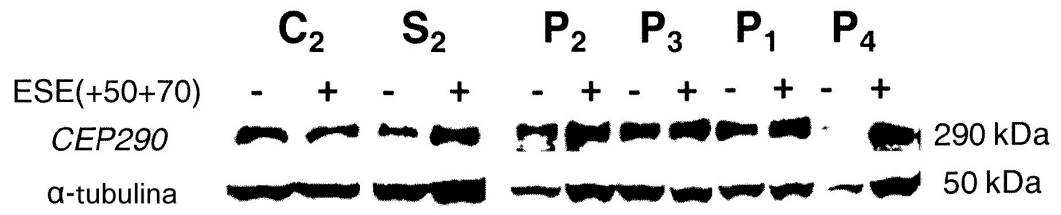


Figura B

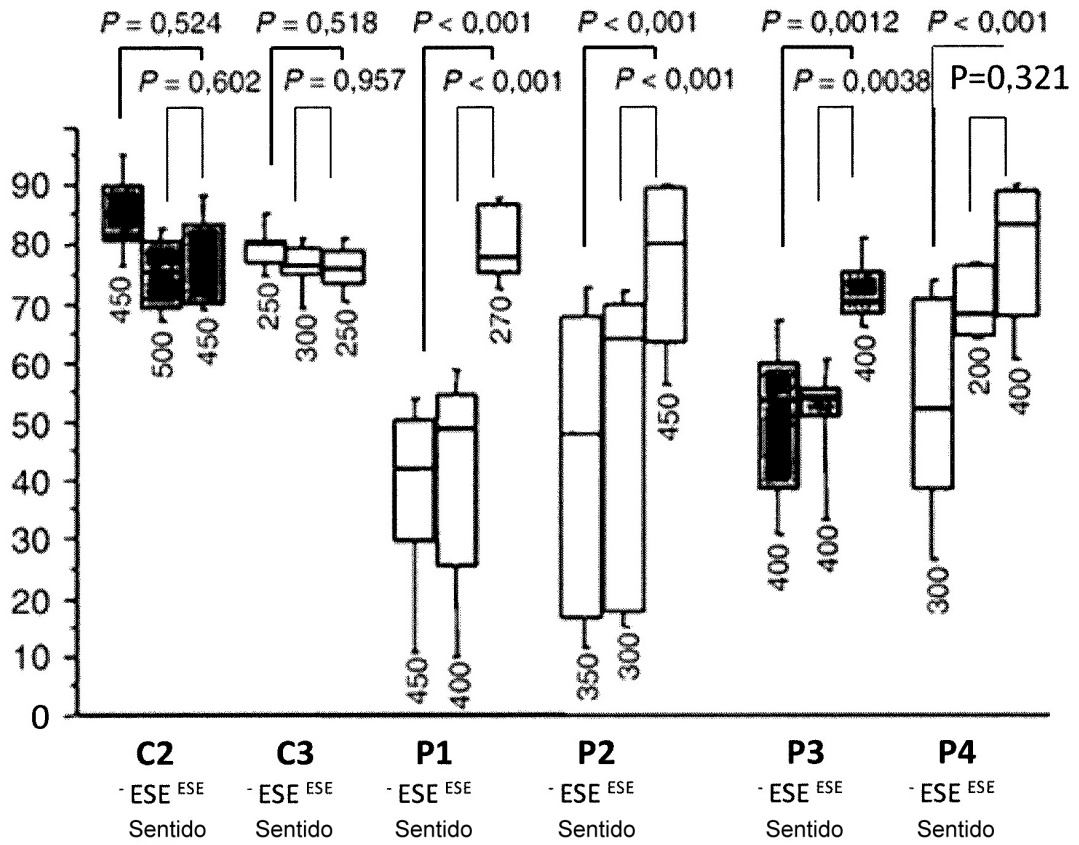


Figura 2C

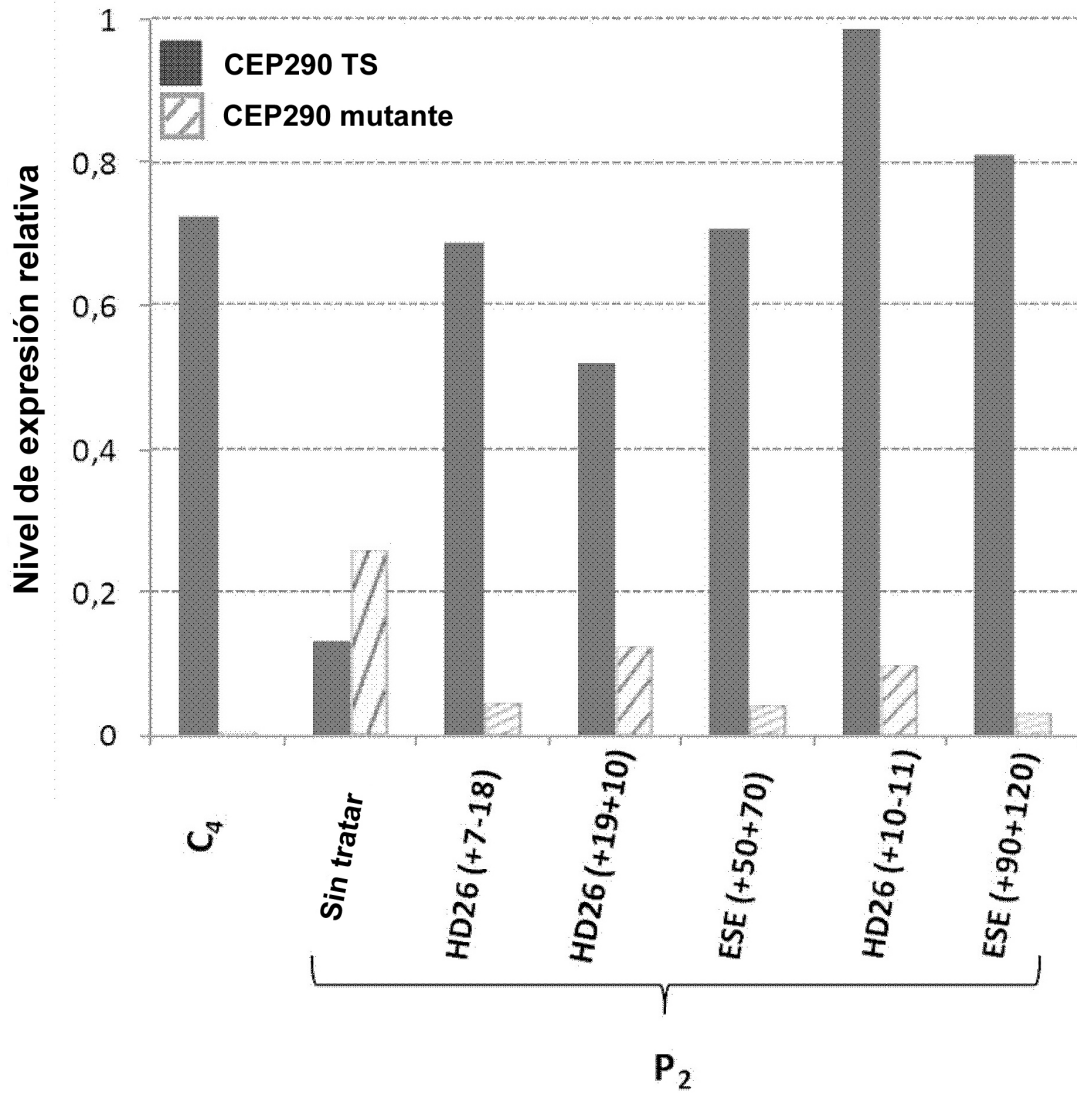


Figura 3A

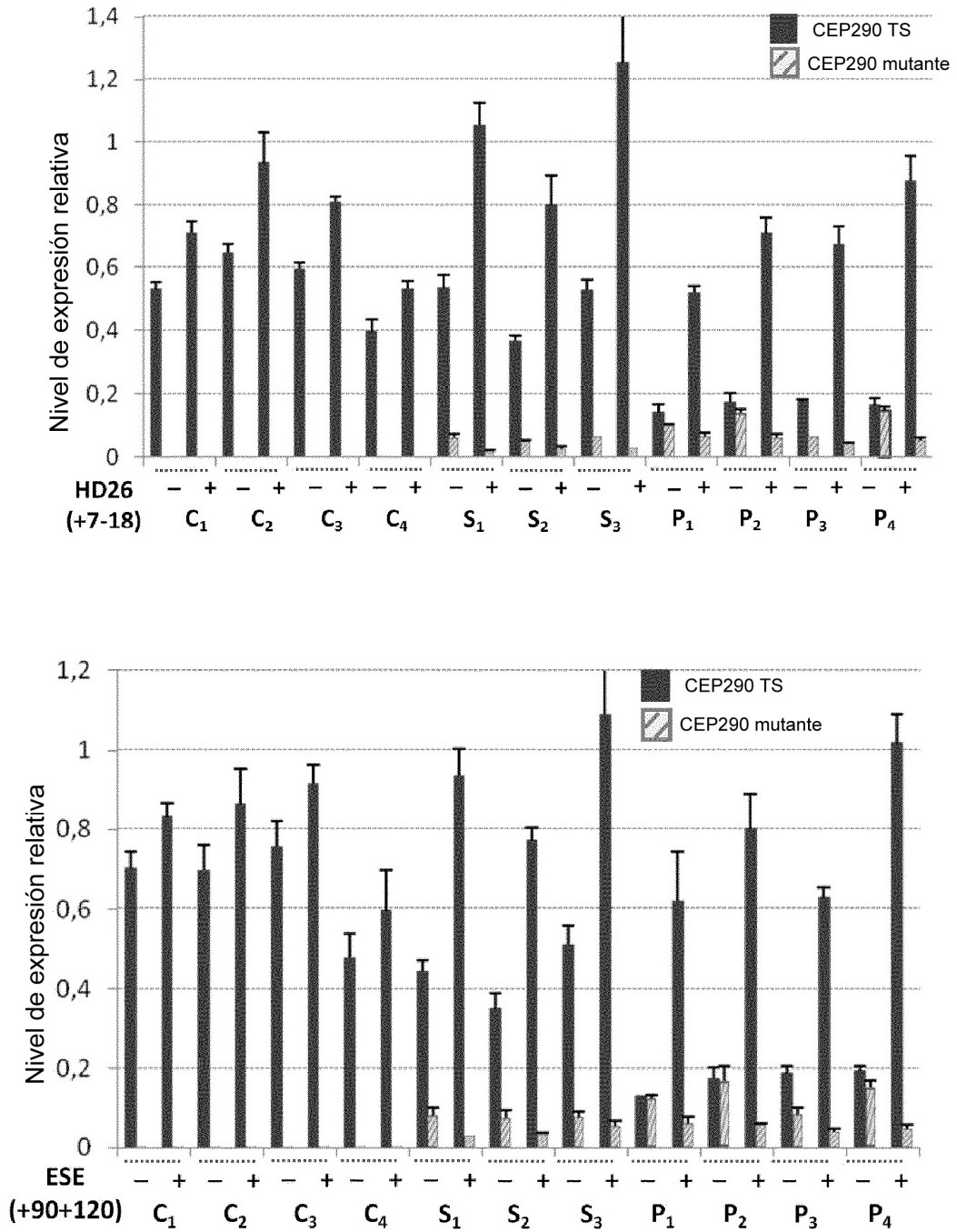


Figura 3B