

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 243777 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **422094**

(22) Data zgłoszenia: **2013.09.02**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2015.03.16 BUP 06/15**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.10.09 WUP 41/2023**

(51) MKP:

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

(62) Numer zgłoszenia, z którego nastąpiło
wydzielenie:
405224

(73) Uprawniony z patentu:
**INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Poznań, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:
**WŁODZIMIERZ KRZYŻOSIAK, Poznań, PL
MARTA OLEJNICZAK, Poznań, PL
PAULINA GAŁKA-MARCINIAK,
Zduńska Wola, PL
AGNIESZKA FISZER, Dąbrówka, PL**

(74) Pełnomocnik:
Marta Kawczyńska, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Cząsteczka kwasu nukleinowego, kaseta ekspresyjna, wektor ekspresyjny, komórka eukariotycznego gospodarza i zastosowanie cząsteczki kwasu nukleinowego w terapii chorób wywoływanych ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń typu CAG

PL 243777 B1

Opis wynalazku

Przedmiotami wynalazku są cząsteczka kwasu nukleinowego, kaseta ekspresyjna, wektor ekspresyjny, komórka eukariotycznego gospodarza i zastosowanie cząsteczki kwasu nukleinowego do wytwarzania leku do leczenia chorób wywoływanych ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń typu CAG. Rozwiązanie dotyczy nowej koncepcji leczenia dziedzicznych chorób neurologicznych człowieka wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych typu CAG, z wykorzystaniem technologii interferencji RNA.

Przeważająca część ludzkiego genomu składa się z sekwencji powtarzających się różnego typu. Elementy te występują zarówno w sekwencjach kodujących, w niekodujących regionach genów, jak i w obszarach pozagenowych. Ekspansja niestabilnych ciągów powtórzeń trójnukleotydowych w pojedynczych genach jest przyczyną ponad 20 różnych chorób dziedzicznych, znanych pod wspólną angielską nazwą Triplet Repeat Expansion Diseases (TREDs). Są to choroby neurodegeneracyjne, jak dotąd nieuleczalne.

Większość genów związanych z TREDs zawiera powtórzenia trypletu CAG w regionie kodującym, a wywołująca chorobę liczba powtórzeń mieści się najczęściej w zakresie od około 40 do 100. Przykładami takich chorób jest choroba Huntingtona (HD) oraz szereg ataksji rdzeniowo-mózdkowych, np. ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3). W wyniku translacji zmutowanego transkryptu powstaje białko zawierające toksyczny ciąg poliglutaminowy, zmieniający prawidłową funkcję białka. Wydłużone ciągi powtórzeń CAG mogą również aktywować mechanizmy patogenezы na poziomie RNA, w tym konfiskowanie specyficznych białek przez zmutowane transkrypty.

Większość chorób wywoływanych ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń jest warunkowana w sposób autosomalny dominujący. Każda komórka zawiera zarówno wariant normalny genu jak i zmutowany. Produkty zmutowanego genu, transkrypt i białko są toksyczne dla komórki, zatem ich usunięcie powinno przeciwdziałać chorobie. Białko normalne jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki zatem strategie terapeutyczne powinny polegać na allelo-selektywnej eliminacji wariantu zmutowanego. Efekt ten można osiągnąć poprzez celowanie reagentami terapeutycznymi w regiony rozróżniające oba allele genu, polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP) lub regiony powtórzeń (STR). Opublikowane dotychczas sposoby eliminacji zmutowanego transkryptu i białka wykorzystują głównie oligonukleotydy antisensowe oraz reagenty technologii interferencji RNA typu siRNA (krótkie interferujące RNA).

Interferencja RNA (RNAi) jest naturalnym procesem komórkowym uczestniczącym w regulacji ekspresji genów, a także mechanizmem obrony przed wirusami oraz ruchomymi elementami genomu. Podstawą interferencji RNA jest udział krótkich dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA), długości od 20 do 30 nukleotydów, w selektywnym wyciszaniu ekspresji genów. Cząsteczki te, posiadają sekwencje komplementarne do sekwencji w obrębie mRNA, a w wyniku oddziaływania z nimi, dochodzi w zależności od stopnia komplementarności, do degradacji transkryptu bądź inhibicji translacji. dsRNA uczestniczące w szlaku interferencji RNA powstają w komórce w wyniku obróbki dłuższych cząsteczek prekursorowych, posiadających strukturę typu spinki do włosów, przez endogenną maszynę enzymatyczną. Technologia RNAi wykorzystuje syntetyczne reagenty typu siRNA (ang. short interfering RNA), reagenty wektorowe typu shRNA (ang. short hairpin RNA, reagenty naśladujące prekursor mikroRNA) czy sh-miR (reagenty naśladujące pierwotne transkrypty mikroRNA). Nić działająca dupletu siRNA nazywana jest nicią wiodącą (ang. guide strand), natomiast nić komplementarna do niej nicią pasażerską (ang. passenger strand). Zastosowanie odpowiednich wektorów oraz promotorów daje możliwość regulacji ekspresji interferujących RNA typu shRNA i sh-miR, selektywnego dostarczania ich do tkanek docelowych i przede wszystkim długotrwałego efektu wyciszania.

W publikacjach Yu D. et al. [1] oraz Lima WF. et al. [2] wykazano allelo-selektywne wyciszenie zmutowanego genu *HTT* odpowiedzialnego za chorobę Huntingtona stosując chemicznie modyfikowane oligonukleotydy, celujące w zmutowany ciąg CAG. W publikacjach Hu et al. [3,4] zastosowano krótkie, syntetyczne duplety RNA do selektywnej inhibicji zmutowanej huntingtyny przy udziale mechanizmu interferencji RNA.

W zgłoszeniu patentowym WO 2010/014592 (opublikowanym 2010-02-04) opisano metodę selektywnej inhibicji ekspresji białka zawierającego wydłużony ciąg poliglutaminowy z użyciem chemicznie modyfikowanych oligonukleotydów. Opisane analogi kwasów nukleinowych są długości 7–30 zasad i są nacelowane na wydłużony ciąg powtórzeń CAG zmutowanego transkryptu. Zgłoszenie w szczególności dotyczy oligomerów PNA i LNA oraz ich potencjalnego użycia w inhibicji translacji następujących białek związanych z chorobami poliglutaminowymi: huntingtyny, ataksyny-3, ataksyny-1, ataksyny-2 i atrofiny 1.

Zgłoszenie patentowe WO 2011/097641 (opublikowane 2011-08-11) obejmuje chemicznie modyfikowane oligonukleotydy, długości 13–22 zasad i o sekwencji w pełni komplementarnej do regionu powtórzeń CAG. Ujęte w zgłoszeniu cząsteczki mogą mieć modyfikowane wiązanie internukleozydowe lub część cukrową. Obejmuje to możliwość zastosowania szeregu podstawników w dowolnych pozycjach, a w szczególności obejmuje modyfikacje LNA, Cet, ENA, MOE. Ich użycie jest zastrzeżone dla wszystkich chorób poliglutaminowych.

W zgłoszeniu patentowym WO 2011/097388 (opublikowanym 2011-08-11) opisano użycie dwuniciowego RNA do selektywnej inhibicji ekspresji białka zawierającego ciąg poliglutaminowy. Ujęte w zgłoszeniu cząsteczki to dwuniciowe RNA długości 15–30 zasad celujące w wydłużony ciąg powtórzeń CAG. Sekwencja oligonukleotydów jest znamienna tym, że zawiera nie więcej niż jedną substytucję w sekwencji *seed* oraz od 1 do 5 dowolnie ulokowanych substytucji w pozostałym regionie cząsteczki. Ujęty zgłoszeniem dwuniciowy RNA może zawierać jedną lub więcej modyfikowaną chemicznie zasadę. Zgłoszenie dotyczy potencjalnego użycia tych cząsteczek w inhibicji translacji następujących białek związanych z chorobami poliglutaminowymi: huntingtyny, ataksyny-3, ataksyny-1, ataksyny-2 i atrofiny 1. Zgłoszenie obejmuje stosowanie opisanych cząsteczek do inhibicji poliglutaminowych białek w komórkach oraz różnych metod ich podawania *in vivo*.

Zgłoszenie patentowe WO 2013/033223 (opublikowane 2013-03-07) dotyczy metody zastosowania pojedynczoniciowych oligonukleotydów o sekwencji komplementarnej do wydłużonego regionu powtórzeń trójnukleotydowych (CAG, CUG, CGG, GCC i GAA). Ujęte zgłoszeniem oligonukleotydy mogą być długości 13–30 zasad oraz zawierać szereg chemicznych modyfikacji (stabilizujących grupę fosforanową 5'-końcowego nukleotydu, podstawników w wiązaniu internukleozydowym oraz części cukrowej). Dodatkowo oligonukleotyd może zawierać od 1 do 5 substytucji w sekwencji, które powodują tworzenie niekanonicznych par zasad w oddziaływaniu z sekwencją docelową ciągu powtórzeń. Wskazane jest wykazywanie co najmniej 5-krotnej selektywności w wyciszaniu ekspresji allelu zmutowanego, w porównaniu do allelu normalnego. Użycie opisanych oligonukleotydów jest zastrzeżone zarówno dla hodowli komórkowych, modeli zwierzęcych jak i pacjentów.

W zgłoszeniach patentowych US2005255086 (opublikowanym 2005-11-17), WO2006031267 (opublikowanym 2006-03-23) przedstawiona została metoda wykorzystująca RNA i *in vivo* w terapii chorób neurodegeneracyjnych dominujących. Rozwiązanie dotyczy krótkich interferujących RNA skierowanych przeciwko genowi choroby Huntingtona i ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 1 (SCA1), sposoby wykorzystania i systemy wektorowe dla tych cząsteczek.

W zgłoszeniach patentowych WO2004047872 (opublikowanym 2004-06-10), EP2145628 (opublikowanym 2012-03-21) opisano sposób leczenia chorób neurodegeneracyjnych poprzez domózgowe dostarczenie siRNA. W rozwiązaniu przedstawiono metodę, krótkie interferujące RNA oraz procedurę leczenia chorób neurodegeneracyjnych obejmującą etapy chirurgicznego wszczepienia cewnika, tak by jego część uwalniająca ułożona była przylegle do określonego obszaru infuzji w mózgu, i uwalniała poprzez część emitującą cewnika określoną dawkę przynajmniej jednej substancji zdolnej do hamowania wytwarzania przynajmniej jednego białka neurodegeneracyjnego. Niniejszy wynalazek opisuje również wektory kodujące krótkie interferujące RNA oraz sposoby leczenia chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona, ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 1, 2 i 3 i/lub DRPLA (zanik jądra zębatego, czerwienno, gałki bladej oraz jądra Luysa).

W zgłoszeniach patentowych US2006270623 (opublikowanym 2006-11-30), US2005277133 (opublikowanym 2005-12-15) opisano oparty o zjawisko RNAi sposób leczenia chorób związanych z ekspansją powtórzeń poliglutaminowych z wykorzystaniem krótkiego interferującego kwasu nukleinowego (siNA). Rozwiązanie to dotyczy związków, ich składu, sposobów badań, diagnozy, leczenia chorób oraz uwarunkowań związanych z różnymi wariantami allelicznymi powtórzeń poliglutaminowych, odpowiadających za modulację ekspresji genu i/lub ich aktywności. W szczególności rozwiązanie to dotyczy cząsteczek krótkich kwasów nukleinowych, takich jak krótkie interferujące kwasy nukleinowe (siNA), krótkie interferujące RNA (siRNA), dwuniciowe RNA (dsRNA), mikro-RNA (miRNA) i krótkie spinki RNA (shRNA), cząsteczek zdolnych do pośredniczenia w procesie interferencji RNA nakierowanym na ekspresję genów związanych z chorobami lub alleli kodujących sekwencje poliQ.

W zgłoszeniu patentowym WO2012109667 (opublikowanym 2012-18-16), opisano sposób wprowadzania terapeutycznych reagentów RNAi do komórek dotkniętych patogenezą w chorobie Huntingtona. Szczegółowo opisano sposób konstrukcji kaset ekspresyjnych służących do uwalniania terapeutycznych cząsteczek siRNA z możliwością wprowadzania ich do komórek w postaci wektorów wirusowych. W opisanym podejściu do konstrukcji kaset ekspresyjnych wykorzystano sekwencje naturalnych prekursorów

miRNA zapewniających zmniejszenie toksyczności uwalnianych z nich cząsteczek siRNA poprzez obniżenie zdolności wywoływania zależnych od sekwencji efektów ubocznych (ang. off-target effect).

W zgłoszeniach patentowych US2013065298 (opublikowanym 2013-03-14), US2004241854 (opublikowanym 2004-12-02), US2011244561 (opublikowanym 2011-10-06), US8329890 (opublikowanym 2012-12-11) opisano oparty na zjawisku RNAi sposób allelo-selektywnego wyciszania ekspresji zmutowanych wariantów genów będących przyczyną grupy chorób dziedziczonych w sposób dominujący, w tym choroby Huntingtona oraz szeregu ataksji rdzeniowo-mózdkowych. Opisany wynalazek zakłada wykorzystanie reagentów w postaci siRNA, shRNA lub miRNA celujących w region mRNA oddalony od ciągu powtórzeń trójnukleotydowych, a zawierający polimorficzne nukleotydy (ang. Single Nucleotide Polymorphism – SNP) umożliwiające rozróżnienie allelu zmutowanego od normalnego a następnie preferencyjne wyciszanie jego ekspresji.

W zgłoszeniach patentowych US2011212520 (opublikowanym 2011-09-01) oraz US2008274989 (opublikowanym 2008-11-06) opisano sposób zastosowania reagentów RNAi do terapii chorób neurodegeneracyjnych *in vivo*. Zgłoszenia te, zawierają opis sposobu zastosowania reagentów RNAi w celu zapobiegania akumulacji zmutowanych białek: huntingtyny oraz ataksyny-1. Rozwiązanie to dotyczy również wprowadzania cząsteczek terapeutycznych, zarówno w postaci RNA jak i wektorów genetycznych (w tym wirusowych -AAV), do różnych obszarów ośrodkowego układu nerwowego, w których obserwowane są zmiany chorobowe.

W zgłoszeniu patentowym US2008/0015158 A1 (opublikowanym 2008-01-17) opisano metodę inhibicji ekspresji genu *HTT* przy użyciu inhibitorów dsRNA, celujących w sekwencję specyficzną genu *HTT*, znajdującą się tuż przed ciągiem powtórzeń CAG.

Pomimo istniejących do tej pory rozwiązań opisujących sposoby zastosowania reagentów RNAi w terapii chorób neurodegeneracyjnych istnieje ciągle potrzeba dostarczenia rozwiązania dającego możliwość allelo-selektywnego wyciszania genów, zawierających zmutowane ciągi CAG przy zastosowaniu reagentów wektorowych, celujących bezpośrednio w region powtórzeń.

Celem niniejszego wynalazku jest uzyskanie selektywnego wyciszania ekspresji zmutowanych genów, występujących w chorobach poliglutaminowych poprzez celowanie w region powtórzeń CAG w transkryptach (uniwersalny charakter rozwiązania) przy pomocy reagentów wektorowych technologii interferencji RNA (długotrwały efekt terapeutyczny). Rozwiązanie według wynalazku obejmuje inhibitory typu shRNA (krótkie spinki RNA) oraz sh-miR (ang. artificial miRNA), przypominające strukturą cząsteczki prekursorowe miRNA (odpowiednio pre-miRNA oraz pri-miRNA), z których w wyniku komórkowej biogenezy uwalniana jest pula heterogennych interferujących RNA, inhibujących ekspresję zmutowanych genów, takich jak *HTT* i *ATXN3*.

Nieoczekiwanie okazało się, że rozwiązanie według wynalazku dotyczy nowej koncepcji leczenia dziedzicznych chorób neurologicznych człowieka wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych typu CAG, z wykorzystaniem technologii interferencji RNA.

Komórkowa biogeneza interferujących RNA typu shRNA i sh-miR obejmuje m.in. transkrypcję przy pomocy polimerazy RNA II lub III i powstawanie cząsteczek o strukturze spinki do włosów. Struktury te są docinane w komórkach przez endogenne białka kompleksu. Mikroprocesora (dotyczy reagentów typu sh-miR), transportowane z jądra do cytoplazmy i docinane przez nukleazę Dicer (dotyczy reagentów typu shRNA, sh-miR) do puli krótkich dupleksów RNA o długości ok. 21–23 par zasad. W następnym etapie krótkie dupleksy RNA są wiązane przez specyficzne białka, a jedna z nici dupleksu (nić wiodąca) służy do rozpoznania sekwencji w docelowym transkrypcje.

Przedmiotem wynalazku jest cząsteczka kwasu nukleinowego, złożona z dupleksu i pętli, w której jedna z nici dupleksu – nie wiodąca zawiera sekwencję określoną sekwencją SEQ. ID No. 2, a druga z nici dupleksu – nie pasażerska jest do niej komplementarna przynajmniej w 80%, przy czym cząsteczka kwasu nukleinowego tworzy w komórce strukturę typu spinki.

Korzystnie, gdy region dupleksu ma 19–30 par zasad długości.

Korzystnie, gdy pierwsza i druga nie dupleksu są połączone za pomocą pętli o długości od 4 do 15 nt.

Korzystnie, gdy pętla określona jest sekwencją SEQ. ID No. 23.

Korzystnie, gdy cząsteczka zawiera w nici wiodącej modyfikowane powtórzenia typu CUG, zawierające 1, 2, 3 lub 4 substytucje powodujące powstawanie niekanonicznych par zasad w oddziaływaniu z celowaną sekwencją CAG w transkryptach.

Korzystnie, gdy cząsteczka zawiera sekwencje oskrzydłujące 5' i 3' pochodzące od naturalnego miRNA, przy czym naturalnej długości sekwencje flankujące prekursora są skrócone lub nie.

Korzystnie, gdy cząsteczka zawiera sekwencję pętli pochodzącą od naturalnego miRNA.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kasetka ekspresyjna zawierająca regulowany lub konstytutywny promotor, charakteryzująca się tym, że jest on powiązany funkcjonalnie z sekwencją kodującą kwas nukleinowy określony powyżej.

Korzystnie, gdy promotorem jest promotor polII albo polIII RNA.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest wektor ekspresyjny charakteryzujący się tym, że zawiera kasetę ekspresyjną określoną powyżej.

Korzystnie, gdy stanowi wektor adenowirusowy, lentiwirusowy, adeno-associated (AAV), poliovirus lub HSV.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest komórka eukariotycznego gospodarza charakteryzująca się tym, że zawiera cząsteczkę kwasu nukleinowego określonego powyżej.

Korzystnie, gdy komórka zawiera kasetę ekspresyjną określoną powyżej.

Korzystnie, gdy komórka zawiera wektor ekspresyjny określony powyżej.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie cząsteczki kwasu nukleinowego określonej zastrzeżeniami powyżej, kasety ekspresyjnej określonej powyżej, wektora określonego powyżej lub komórek określonych powyżej do wytwarzania leku do leczenia chorób neurologicznych wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych CAG.

Korzystnie, gdy zastosowanie jest w terapii chorób neurodegeneracyjnych człowieka, takich jak choroba Huntingtona i ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3, wywoływanych przez mutacje trypletu CAG w pojedynczych genach.

Opisano tu także transgenicznego ssaka zawierającego cząsteczkę kwasu nukleinowego określoną powyżej, kasetę ekspresyjną określoną powyżej, wektor określony powyżej.

Opisano tu także sposób indukowania interferencji RNA w eukariotycznym gospodarzu, charakteryzujący się tym, że obejmuje dostarczanie do obiektu badań efektywnej dawki cząsteczki kwasu nukleinowego określonego powyżej, kasety ekspresyjnej określonej powyżej, wektora określonego powyżej.

W celu lepszego zobrazowania wynalazku na rysunku:

Figura 1 przedstawia przykłady sekwencji i struktury interferujących RNA typu shRNA i sh-miR.

Interferujące RNA powstają w komórkach w wyniku transkrypcji. Tworzą one strukturę typu spinki, z dwuniciowym trzonem i pętlą. Interferujące RNA typu shRNA zawierają na końcu 3' kilka reszt urydylowych a sekwencja nici wiodącej rozpoznającej sekwencję docelową (kolor czerwony) jest umieszczona preferencyjnie w ramieniu 3' trzonu spinki. Interferujące RNA typu sh-miR zawierają dodatkowo pętlę i sekwencje oskrzydłujące 5' i 3' naturalnego prekursora mikroRNA.

Figura 2 przedstawia obróbkę interferujących RNA w komórkach HEK293 przez RNazę Dicer. Cząsteczki interferujących RNA nacelowane na zmutowane ciągi CAG w transkryptach są wprowadzane do komórek w postaci kaset ekspresyjnych, zawierających obok sekwencji kodującej shRNA czy sh-miR również sekwencję genów reporterowych, takich jak copGFP i GFP. Metodą wysokorozdzielczej hybrydyzacji typu northern potwierdzono powstawanie transkryptów w komórkach (pre-) oraz ich docinanie przez RNazę Dicer do puli krótkich dupleksów RNA (siRNA). Zarówno powstający transkrypt jak i krótkie dupleksy siRNA są heterogenne. M1 i M2 oznaczają markery długości RNA; siA2 – syntetyczny siRNA transfekowany do komórek.

Figura 3 przedstawia allelo-selektywne wyciszanie białka huntingtyny i ataksyny 3 (Western blot) oraz transkryptu genu *HTT* (RT-PCR) przez interferujące RNA typu shRNA.

- A) Ludzkie fibroblasty wyprowadzone od pacjenta z chorobą Huntingtona (17/68 CAG) były transdukowane wektorami lentiwirusowymi kodującymi interferujące RNA typu shRNA. Komórki były infekowane ilością MOI 10 wirusa (multiplicity of infection) i badane 7 dni po infekcji. shLuc – kontrola negatywna, shRNA celujący w gen Luc; sh2.4 – kontrola pozytywna, shRNA celujący w sekwencję specyficzną genu *HTT*; intensywności sygnałów pochodzących od białka huntingtyny zostały znormalizowane do poziomu białka pektyny i kontroli shLuc, do porównań zastosowano analizy statystyczne (one-sample *t*-test). Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe. Wartości (*p*-value) istotne statystycznie zaznaczono gwiazdką.
- B) Ludzkie fibroblasty wyprowadzone od pacjenta z ataksją rdzeniowo-mózdkową typu 3 (18/69 CAG) były transdukowane wektorami lentiwirusowymi kodującymi interferujące RNA typu shRNA (shA2R i shA2R1). Komórki były infekowane dwoma stężeniami wirusa (MOI 1 i 10) i badane 7 dni po infekcji. shLuc – kontrola negatywna, shRNA celujący w gen Luc; K – komórki nie transdukowane wirusem. GAPDH – białko referencyjne

Figura 4 przedstawia analizę selektywności wyciszania interferujących RNA tworzących niesparowania z sekwencją docelową CAG.

- a) Analiza Western blot poziomu białek ATXN3, TBP, FOXP2, EIF2AK3, RPL14 i LRP8 w fibroblastach HD 72 h po transfekcji 50 nM dupleksami RNA złożonymi z modyfikowanych powtórzeń CUG, tworzących niesparowania z sekwencją docelową CAG (reagenty referencyjne: d7, P9b i W13/16). Sekwencje nukleotydowe ciągów powtórzeń w genach kodujących analizowane białka obejmują: ciąg w TBP
(CAG)3(CAA)3(CAG)9(CAA)(CAG)(CAA)(CAG)20 i FOXP2:(CAG)4(CAA)(CAG)4(CAA)2(CAG)2(CAA)2(CAG)3(CAA)5(CAG)2(CAA)2(CAG)5(CAA)(CAG)5.
C – wartość referencyjna oznaczająca poziom ekspresji w komórkach transfekowanych kontrolnym siRNA. Intensywności sygnałów zostały znormalizowane do poziomu białka referencyjnego GAPDH i porównane testem statystycznym (one-sample *t*-test). Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe. Wartość istotnie statystycznie zaznaczono gwiazdką (* $p < 0.05$).
- b) w porównaniu do niemodyfikowanych cząsteczek CAG/CUG, modyfikacje ciągu powtórzeń CAG w nici pasażerskiej interferujących RNA, zmniejszyły możliwość ich wiązania się i niespecyficznego działania w ścieżce RNAi na transkrypty CUG; mfe – energia wiązania nici dupleksu (minimum free energy).

W celu lepszego zrozumienia poniżej przedstawiono przykładowe rozwiązania według wynalazku.

Przykłady

Interferujące RNA typu shRNA i sh-miR zawierające modyfikowane sekwencje CAG/CUG w strukturze trzonu spinki są substratami dla RNazy Dicer.

Aby określić, czy interferujące RNA podlegają obróbce w komórkach przez białka szlaku RNAi, komórki HEK293 transfekowano wektorami ekspresyjnymi, kodującymi cząsteczki shRNA i sh-miR (Figura 2). Po 24 h wyizolowano całkowity RNA, rozdzielono go w żelu poliakrylamidowym i przeprowadzono hybrydyzację z sondą w celu wizualizacji transkryptów i produktów ich docinania (analiza northern blot). Stwierdzono, że powstające w komórkach interferujące RNA są docinane przez RNazę Dicer do puli krótkich heterogennych cząsteczek siRNA. Co więcej, powstające spod promotora polimerazy III RNA – H1 cząsteczki shRNA są heterogenne już na etapie transkryptu (oznaczone jako pre-), co wynika głównie z obecności różnej długości reszt urydylowych na końcu 3'.

Interferujące RNA typu shRNA wyciszają allelo-selektywnie zmutowane białka huntingtinę i ataksynę 3.

W celu sprawdzenia efektywności działania interferujących RNA typu shRNA, tworzących selektywne niesparowania z sekwencją docelową CAG skonstruowano wektory lentiwirusowe, kodujące cząsteczki shA2R i shA2R1 (zawierające sekwencje ID. NO.1 i ID. NO.2 z Tabeli). Ludzkie fibroblasty wyprowadzone od pacjentów z chorobą Huntingtona i ataksją rdzeniowo-mózdkową typu 3 były transdukowane lentiwirusami w stężeniu MOI 10 lub 1 i analizowane 7 dni po transdukcji (Figura 3). Wyizolowane białko poddano analizie typu Western blot i określono stopień wyciszenia wariantu zmutowanego i normalnego względem białka referencyjnego i kontroli negatywnych. Oba analizowane reagenty wyciszają allelo-selektywnie zmutowaną huntingtinę, pozostawiając białko niezmutowane na normalnym poziomie (Figura 3A). Analiza transkryptu genu *HTT* potwierdziła selektywność wyciszania zmutowanej formy. Sprawdzono również efektywność działania interferujących RNA na innym modelu chorób poliglutaminowych – SCA3 (Figura 3B). Badane cząsteczki wyciszają allelo-selektywnie zmutowaną ataksynę 3 w obu analizowanych stężeniach wirusa (MOI 1 i MOI 10).

Metody

Hodowle komórkowe i transfekcja

Fibroblasty wyprowadzone od pacjentów z HD (GM04281 – 17/68 CAG) i SCA3 (GM06153 – 18/69 CAG) uzyskano z Coriell Cell Repositories (Camden, New Jersey, USA). Hodowlę prowadzono w pożywce MEM (Lonza; Basel, Switzerland) wzbogaconej w 8% surowicę FBS (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA), antybiotyki: penicylina, streptomycyna, amfoterycyna B (Sigma-Aldrich) i aminokwasy (nr. Kat. M7145, Sigma-Aldrich). Transfekcję prowadzono przy użyciu Lipofectaminy 2000 (Life Technologies; Grand Island, NY, USA) zgodnie z zaleceniami producenta.

Western blot

Analiza Western blot dla białka HTT (ciąg 17/68Q). W skrócie, 25 µg całkowitego białka rozdzielano w żelu poliakryloamidowym z SDS (1.5 cm, 4% żel zagęszczający / 4.5 cm, 5% żel rozdzielający, stosunek akrylamidu do bisakrylamidu 35:1) w buforze XT Tricine (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) przy 140 V, w łaźni wodnej. Następnie białka były transferowane na membranę nitrocelulozową (Sigma-Aldrich). Wszystkie kroki immunodetekcji były przeprowadzone w systemie SNAPid (Millipore; Billerica, MA, USA) w buforze PBS/0.9% NaCl/0.1% Tween-20 oraz 0.25% mleku odtłuszczonego. Reakcja immunofluorescencyjna była wykrywana przy pomocy substratu ECL Western Blotting Substrate (ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Prążki białkowe były skanowane bezpośrednio z membrany przy użyciu kamery i analizowane programem Gel-Pro Analyzer. Analiza Western blot dla białka ATXN3 – 25 µg całkowitego białka rozdzielano w żelu poliakryloamidowym z SDS (5% żel zagęszczający, 12% żel rozdzielający) w buforze Laemmli przy 120V. Pozostałe etapy analizy jak powyżej.

Northern blot

Cząsteczki efektorowe uwalniane z wektorów były wykrywane przy pomocy hybrydyzacji typu northern. Całkowity RNA był izolowany z komórek HEK293T przy pomocy odczynnika TRI Reagent (BioShop; Burlington, Canada) zgodnie z instrukcją producenta. RNA (35 µg) rozdzielano w denaturującym żelu poliakryloamidowym (12% PAA, 19:1 akrylamid/bis, 7.5 M mocznik) w buforze 0.5X TBE. RNA był transferowany na membranę hybrydyzacyjną GeneScreen Plus (PerkinElmer) używając techniki elektrotransferu półsuchego (Sigma-Aldrich). Membrana była hybrydyzowana z radioaktywnie wyznakowaną sondą DNA komplementarną do cząsteczki interferującego RNA. Sygnały radioaktywne były ilościowane przy pomocy skanera laserowego FLA5100 (Multi Gauge v3.0, Fujifilm).

Izolacja RNA i RT-PCR

Całkowity RNA był izolowany z komórek przy pomocy odczynnika TRI Reagent (BioShop; Burlington, Canada) zgodnie z instrukcją producenta. Stężenie RNA mierzono przy użyciu Spektrofotometru NanoDrop. Do odwrotnej transkrypcji używano 500 ng RNA, reakcję prowadzono w 55°C używając zestawu Superscript III (Life Technologies) i randomicznych heksamerów (Promega; Madison, WI, USA). Produkty PCR rozdzielano w 1.5% żelach agarozowych w buforze 0.5XTBE i wybarwiano je bromkiem etydydny.

Plazmidy i wektory wirusowe

Kasety ekspresyjne kodujące interferujący RNA zawierały promotor H1, sekwencję nici sensowej, sekwencję pętli, sekwencję nici antysensowej oraz sekwencję terminatorową składającą się z 5 urydyn. Wektor kodował również sekwencję genu reporterowego copGFP z promotora CMV lub GFP z promotora EF1α. Kasety ekspresyjne kodujące interferujący RNA były wygenerowane przy użyciu oligonukleotydów DNA (Sigma-Aldrich). Pary oligonukleotydów DNA były ligowane do plazmidu ekspresyjnego pGreenPuro (System Biosciences), a sekwencję konstruktu potwierdzano poprzez sekwencjonowanie.

Składanie wirusa i transdukcja fibroblastów

W celu produkcji lentiwirusów plazmidy zawierające kasety ekspresyjne z interferującym RNA były kotransfekowane do komórek HEK293TN z plazmidami pakującymi pPACKH1-GAG, pPACKH1-REV i pVSV-G (System Biosciences). Pożywkę z lentiwirusem zbierano dnia 2 i 3, filtrowano, zagęszczano cząstki lentiwirusowe używając roztworu PEGit Virus Precipitation Solution (System Biosciences). Wektory lentiwirusowe zawieszano w pożywce Opti-MEM (Gibco), i określano ilość cząstek wirusowych (TU/ml) przy pomocy cytometrii przepływowej (Accuri C6, BD Biosciences) bazując na ekspresji genu reporterowego copGFP lub GFP. Fibroblasty były transdukowane stosując MOI (multiplicity of infection) 1 i 10 w obecności polybrenu (4 µg/ml).

Podsumowanie

W opisanych dotychczas publikacjach i patentach brak rozwiązania pokazującego zastosowanie reagentów wektorowych technologii RNAi do selektywnego wyciszania zmutowanych genów zawierających wydłużone ciągi CAG, celując bezpośrednio w region mutacji. W odróżnieniu do rozwiązań proponowanych dotychczas, będące przedmiotem zgłoszenia interferujące RNA działa w sposób wysoce allelo-selektywny, preferencyjnie wyciszając ekspresję alleli zmutowanych, celując w powtórzenia CAG. Efekt ten uzyskano dzięki wprowadzeniu specyficznych substytucji w sekwencję interferujących RNA, co powoduje powstanie niekanonicznych par zasad w oddziaływaniu z docelową sekwencją CAG. Powstająca w wyniku komórkowej biogenezy pula interferujących RNA selektywnie obniża poziom zmuto-

wanych białek przy pozostawieniu białek niezmutowanych na normalnym poziomie. Proponowane rozwiązanie ogranicza również efekt off-target, polegający na niespecyficznym działaniu interferujących RNA na inne transkrypty zawierające krótkie powtórzenia CAG i CUG. Zastosowanie wektorów wirusowych daje możliwość dostarczenia interferujących RNA do trudnodostępnych tkanek, takich jak mózg. Co więcej, w odróżnieniu do podejść wykorzystujących syntetyczne cząsteczki RNAi, pozwala na długotrwałą ekspresję interferujących RNA w chorej tkance bez potrzeby ich wielokrotnego podawania.

Podejścia terapeutyczne wykorzystujące celowanie w sekwencje powtórzeń w chorobach poliQ są bardziej uniwersalne w porównaniu do celowania w sekwencje specyficzne genów, a tym bardziej w sekwencje polimorficzne SNP. Uniwersalność wynalazku polega na tym, że interferujące RNA są naczelowane na zmutowane sekwencje powtórzeń CAG, występujące przynajmniej w 9 chorobach poliglutaminowych.

Lista sekwencji

SEQ. ID No.	Sekwencja nici wiodącej 5'-3'	Liczba niesparowań z docelową sekwencją CAG	Rodzaj niesparowania z sekwencją docelową
1	CUGCUGCAGCUGCUGCUGC	1	A:A
2	GCUGCUGCAGCUGCUGCUCU	1	A:A
3	CUGCUGCAGCUGCUGCAGCUGC	2	A:A
4	GCUGCUGCAGCUGCAGCUGCUCU	2	A:A
5	GCUGCUGCUGCAGCAGCUGCUCU	2	A:A
6	UGCUGCUGCUGCAGCAGCUG	2	A:A
7	GCUGCUGCUGAAAGCAGCUGCUCU	4	A:A
8	CUGCUGCAGCUGCUGCAGCUGC	1	A:G
9	GCUGCUGCAGCUGCUGCAGCUCU	1	A:G
10	CUGCUGCAGCUGCUGCAGCUGC	2	A:G
11	GCUGCUGCAGCUGCUGCAGCUCU	2	A:G
12	GCUGCUGCAGCUGCUGCAGCUCU	2	A:G
13	UGCUGCUGCUGCAGCAGCUG	2	A:G
14	CUGCUGCAGCUGCUGCAGCUGC	3	A:G
15	GCUGCUGCAGCUGCUGCAGCUCU	3	A:G
16	UGCUGCUGCAGCAGCAGCUG	3	A:G
17	GCUGCUGCAGCAGCAGCAGCUCU	3	A:G
18	UGCUGCUGCAGCAGCAGCAGCUG	3	A:G
19	CUGCUGCAGCAGCAGCAGCUGC	3	A:G
20	UGCUGCUGCAGCAGCAGCAGCUG	4	A:G
21	CUGCUGCAGCAGCAGCAGCUGC	4	A:G
22	GCUGCUGCAGCAGCAGCAGCUCU	4	A:G

SEQ. ID No. 23

5'CUUCCUGUCA3'

WYKAZ SEKWENCJI

<110> Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

<120> Cząsteczka kwasu nukleinowego, kaseta ekspresyjna, wektor ekspresyjny, komórka eukariotycznego gospodarza i zastosowanie cząsteczki kwasu nukleinowego w terapii chorób wywoływanych ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń typu CAG

<130> 17P47017PL00

<140> PLP.422094

<141> 2013-09-02

<160> 23

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cugcugcagc ugcugcugcu gc

22

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gcugcugcag cugcugcugc u

21

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cugcugcagc ugcugcagcu gc

22

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gcugcugcag cugcagcugc u

21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gcugcugcug cagcagcugc u

21

<210> 6

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ugcugcugcu gcagcagcug

20

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 7
gcugcugcua aagcagcugc u 21

<210> 8
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
cugcugcggc ugcugcugcu gc 22

<210> 9
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
gcugcugcgg cugcugcugc u 21

<210> 10
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
cugcugcagc ugcugcggu gc 22

<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
gcugcugcgg cugcggcugc u 21

<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
gcugcugcug cggcggcugc u 21

<210> 13
<211> 20
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
ugcugcugcu gggcggcug 20

<210> 14
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
cugcugcggc ggcugcggu gc 22

<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 15

gcugcugcgg cugcgggcgc u 21

<210> 16

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

ugcugcugcg gggcggcug 20

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

gcugcugcug cggcgggcgc u 21

<210> 18

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

ugcugcugcu gggcgggcgg 20

<210> 19

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

cugcugcugc uggcgggcgc gc 22

<210> 20

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

ugcugcugcg gcggcggcgg

20

<210> 21

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

cugcugcugc ggcggcggcg gc

22

<210> 22

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

gcugcugcug gggcggcugc u

21

<210> 23

<211> 10

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

cuuccuguca

10

Referencje:

1. Yu D, Pendergraft H, Liu J, et al, Single-Stranded RNAs Use RNAi to Potently and Allele-Selectively Inhibit Mutant Huntingtin Expression. Cell 2012; 150:895–908,.
2. Lima WF, Prakash TP, Murray HM, et al. Single-stranded siRNAs activate RNAi in animals. Cell 2012;150:883–894.
3. Hu J, Liu J, Corey DR. Allele-selective inhibition of huntingtin expression by switching to an miRNA-like RNAi mechanism, Chem Biol. 2010 Nov 24; 17(11): 1183–8.
4. Hu J, Liu J, Yu D, Chu Y, Corey DR. Mechanism of allele-selective inhibition of huntingtin expression by duplex RNAs that target CAG repeats: function through the RNAi pathway. Nucleic Acids Res. 2012 Dec; 40(22):11270–80.

Zastrzeżenia patentowe

1. Częsteczka kwasu nukleinowego, złożona z dupleksu i pętli, w której jedna z nici dupleksu – nić wiodąca zawiera sekwencję określoną sekwencją SEQ. ID No. 2, a druga z nici dupleksu – nić pasażerska jest do niej komplementarna przynajmniej w 80%, przy czym częsteczka kwasu nukleinowego tworzy w komórce strukturę typu spinki.
2. Częsteczka według zastrz. 1 **znamienna tym**, że region dupleksu ma 19–30 par zasad długości.
3. Częsteczka według zastrz. 2, **znamienna tym**, że pierwsza i druga nić dupleksu są połączone za pomocą pętli o długości od 4 do 15 nt.
4. Częsteczka według zastrz. 2, **znamienna tym**, że pętla określona jest sekwencją SEQ. ID No. 23.
5. Częsteczka według zastrz. 1, **znamienna tym**, że zawiera sekwencje oskrzydłujące 5' i 3' pochodzące od naturalnego miRNA, przy czym naturalnej długości sekwencje flankujące prekursora są skrócone lub nie.
6. Częsteczka według zastrz. 5, **znamienna tym**, że zawiera sekwencję pętli pochodzącą od naturalnego miRNA.
7. Kasetę ekspresyjną zawierającą regulowany lub konstytutywny promotor, **znamienna tym**, że jest on powiązany funkcjonalnie z sekwencją kodującą kwas nukleinowy określony zastrzeżeniami 1 do 6.
8. Kasetę ekspresyjną według zastrz. 7, **znamienna tym**, że promotorem jest promotor polIII albo polIII RNA.
9. Wektor ekspresyjny **znamienny tym**, że zawiera kasetę ekspresyjną określoną zastrzeżeniami 7 do 8.
10. Wektor według zastrz. 9, **znamienny tym**, że stanowi wektor adenowirusowy, lentiwirusowy, adeno-associated (AAV), poliovirus lub HSV.
11. Komórka eukariotycznego gospodarza **znamienna tym**, że zawiera częsteczkę kwasu nukleinowego określonego zastrzeżeniami 1 do 6.
12. Komórka według zastrz. 11, **znamienna tym**, że zawiera kasetę ekspresyjną określoną zastrzeżeniami 7 do 8.
13. Komórka według zastrz. 11, **znamienna tym**, że zawiera wektor ekspresyjny określony zastrzeżeniami 9 do 10.
14. Zastosowanie częsteczki kwasu nukleinowego określonego zastrzeżeniami 1 do 6, kasety ekspresyjnej określonej zastrzeżeniami 7 do 8, wektora określonego zastrzeżeniami 9 do 10 lub komórki określonej zastrzeżeniami 11 do 13 do wytwarzania leku do leczenia chorób neurologicznych wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych CAG.
15. Zastosowanie według zastrz. 14 w terapii chorób neurodegeneracyjnych człowieka, wybranych spośród choroby Huntingтона i ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, wywoływanych przez mutacje trypletu CAG w pojedynczych genach.

Rysunki

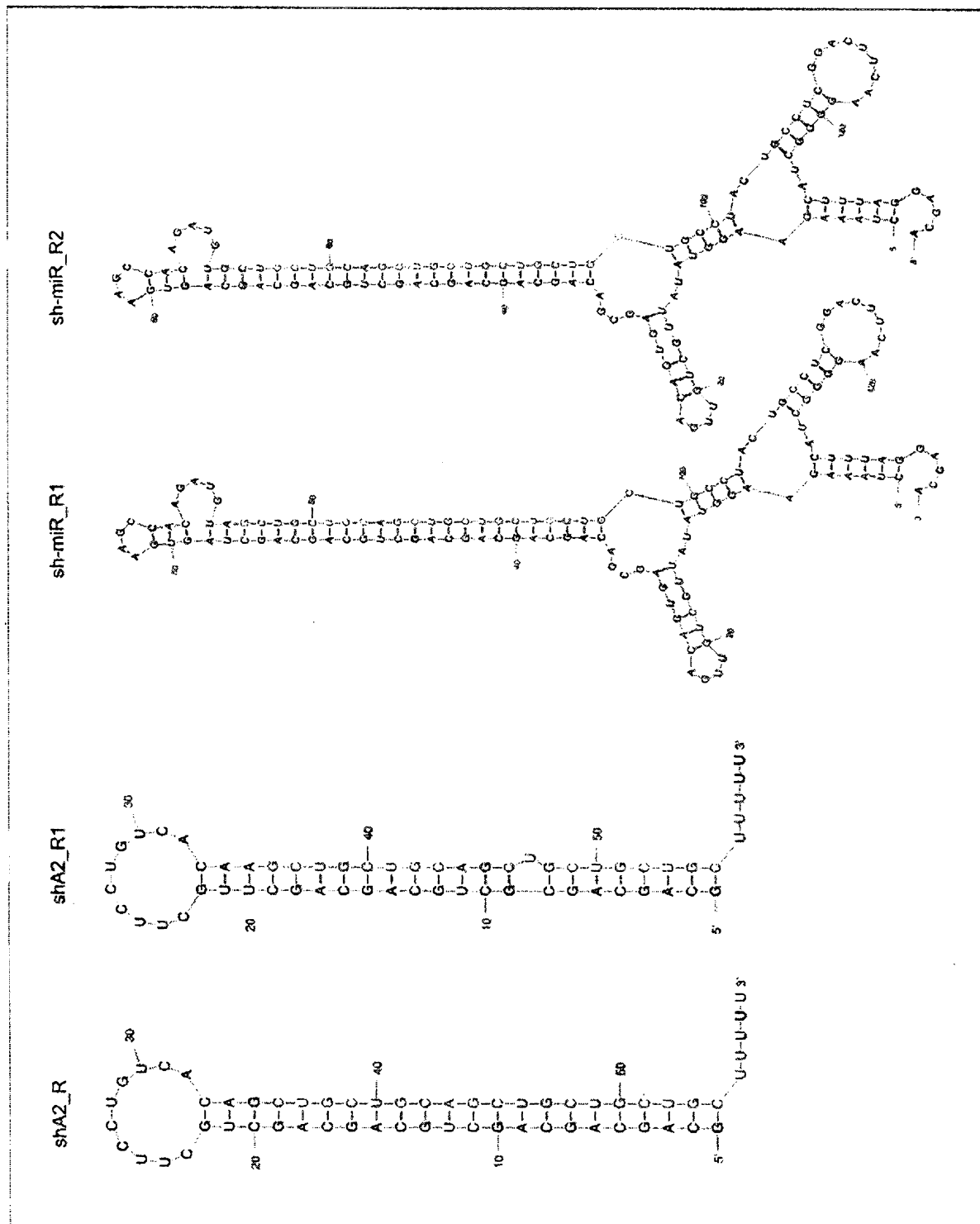


Fig. 1

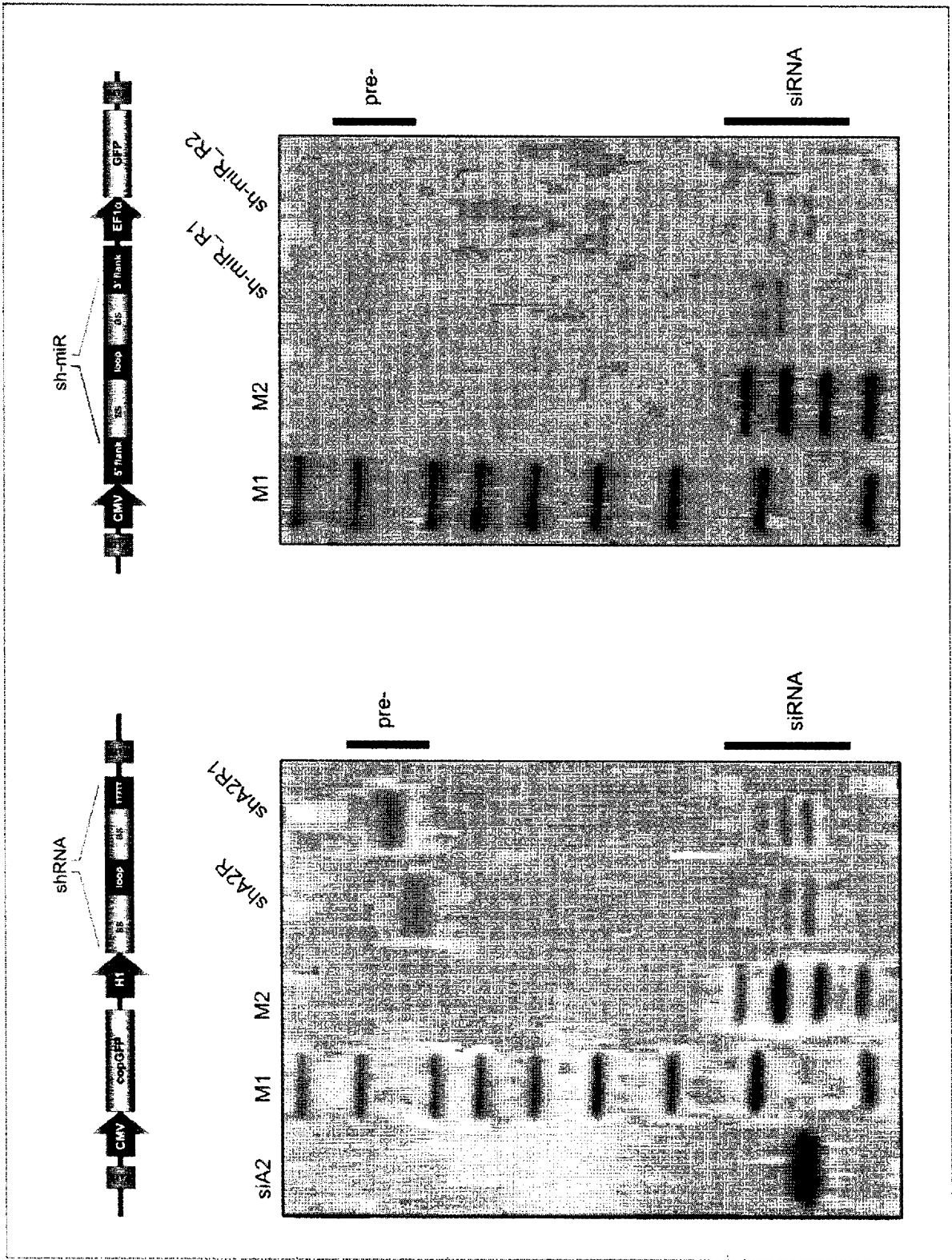
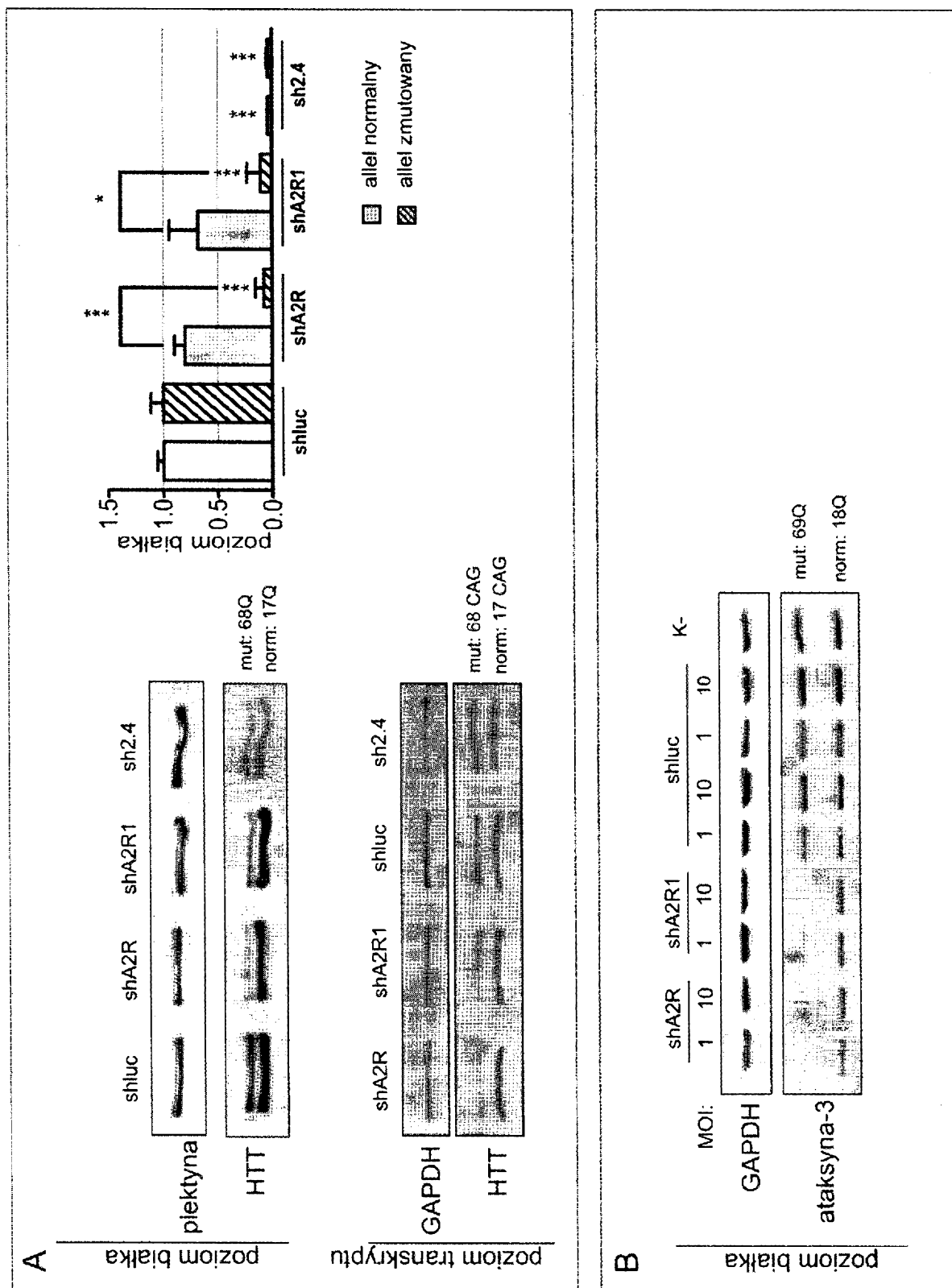


Fig. 2



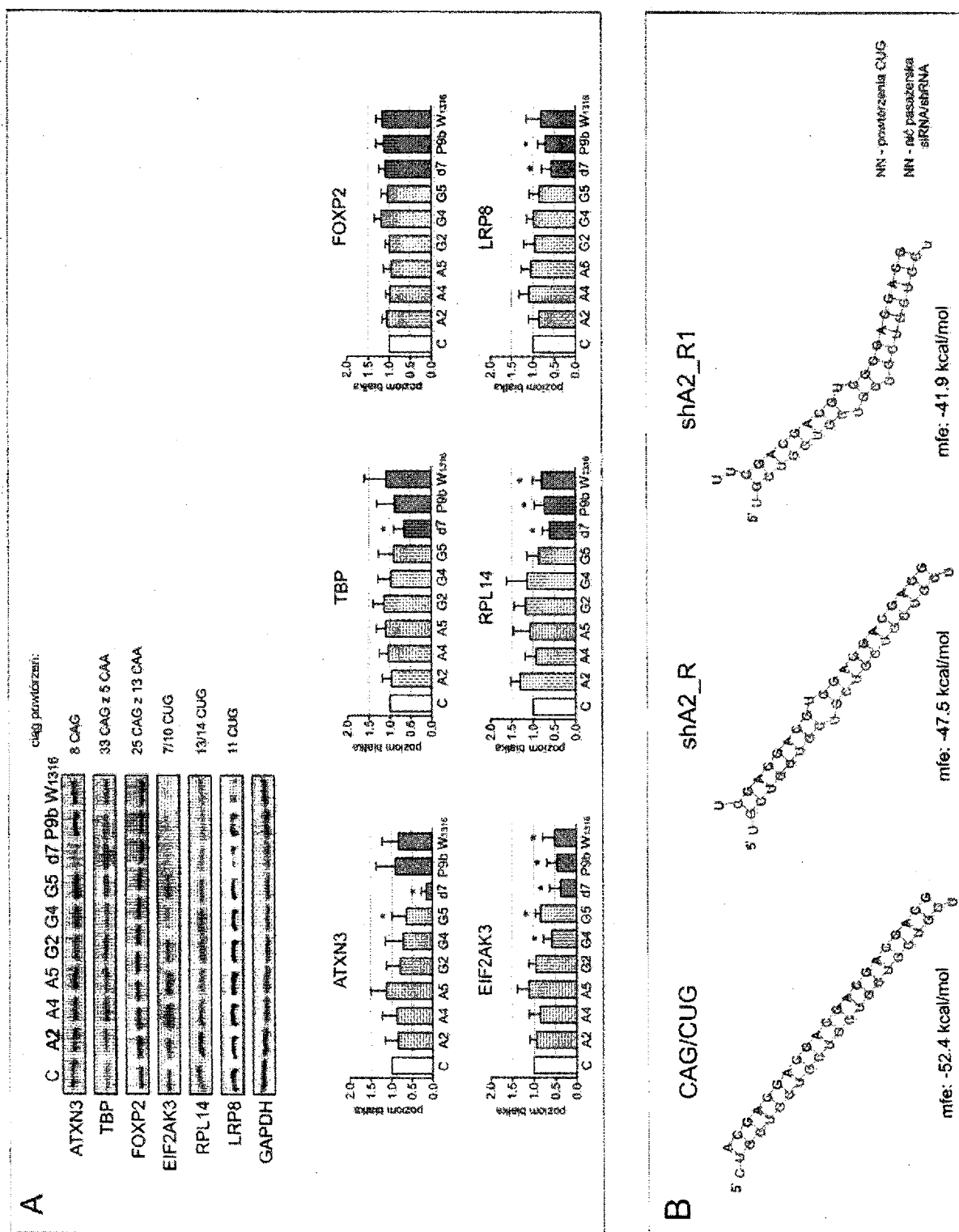


Fig. 4