



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114645048 A

(43) 申请公布日 2022. 06. 21

(21) 申请号 202210295595.2

(22) 申请日 2018.08.24

(30) 优先权数据

62/550,462 2017.08.25 US

62/575,901 2017.10.23 US

62/667,356 2018.05.04 US

62/671,745 2018.05.15 US

(62) 分案原申请数据

201880069980.7 2018.08.24

(71) 申请人 斯托克制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 伊莎贝尔·阿兹纳雷兹 韩舟

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

专利代理师 贺淑东 武晶晶

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/06 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

A61P 25/12 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

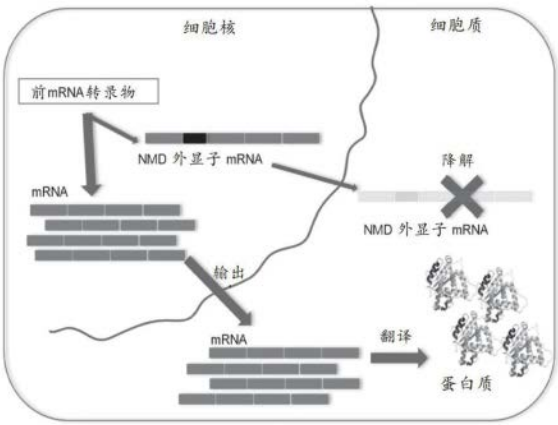
权利要求书1页 说明书80页 附图34页

(54) 发明名称

用于治疗病况和疾病的反义寡聚体

(57) 摘要

SCN1A基因中的另路剪接事件可导致非生产性mRNA转录物,其进而可导致异常的蛋白质表达,并且可靶向SCN1A基因中的另路剪接事件的治疗剂可调节Dravet综合征患者中功能性蛋白质的表达水平,并且/或者抑制异常蛋白质表达。此类治疗剂可用来治疗由SCN1A、SCN8A或SCN5A蛋白缺乏引起的病况。



1. 一种调节SCN1A蛋白在细胞中的表达的方法,该细胞具有的mRNA含有无义介导的RNA降解诱导外显子(NMD外显子mRNA)并且编码SCN1A蛋白,该方法包括使治疗剂与所述细胞接触,由此所述治疗剂调节从编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA剪接所述NMD外显子,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节SCN1A蛋白在所述细胞中的表达。

2. 一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法,该方法包括:使所述受试者的细胞与调节从所述细胞中的mRNA剪接无义介导的mRNA降解诱导外显子(NMD外显子)的治疗剂接触,该细胞中的mRNA含有NMD外显子并且编码SCN1A,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节SCN1A蛋白在所述受试者的细胞中的表达。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述治疗剂

- (a) 与编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合;
- (b) 调节参与所述NMD外显子mRNA的剪接的因子的结合;或
- (c) (a) 和 (b) 的组合。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述治疗剂干扰参与从所述靶向部分的区域剪接所述NMD外显子的因子的结合。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述靶向部分邻近所述NMD外显子。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NMD外显子5'末端上游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。

7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NMD外显子5'末端上游至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。

8. 根据权利要求5所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NMD外显子3'末端下游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。

9. 根据权利要求5所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NMD外显子3'末端下游至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。

10. 根据权利要求3所述的方法,其中所述靶向部分位于编码SCN1A的NMD外显子mRNA的两个规范外显子区域之间的内含子区域中,并且其中所述内含子区域含有所述NMD外显子。

## 用于治疗病况和疾病的反义寡聚体

本申请是申请日为2018年08月24日、申请号为201880069980.7、发明名称为“用于治疗病况和疾病的反义寡聚体”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2018年08月24日、申请号为PCT/US2018/048031)的分案申请。

### 交叉引用

[0001] 本申请要求2017年8月25日提交的第62/550,462号美国临时申请、2017年10月23日提交的第62/575,901号美国临时申请、2018年5月4日提交的第62/667,356号美国临时申请和2018年5月15日提交的第62/671,745号美国临时申请的权益,所述临时申请中的每一个均通过引用整体并入本文。

### 背景技术

[0002] 神经系统紊乱通常与离子通道病相关,其特征为介导神经元兴奋性、神经元相互作用和整个大脑功能的离子通道的功能受到干扰。SCN1A基因——其为编码神经元电压门控钠通道的 $\alpha$ -孔形成亚单位的SCN1A-SCN2A-SCN3A基因簇的一部分——中的突变与诸如Dravet综合征(DS)等疾病和病况的疾病程度进展相关(Miller等人,1993-2015, GeneReviews, Pagon RA等人编著, Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 书架ID: NBK1318, 和Mulley等人, 2005, Hum. Mutat. 25:535-542)。

### 发明内容

[0003] 在某些实施方案中,本文公开了一种调节SCN1A蛋白在细胞中的表达的方法,该细胞具有的mRNA含有无义介导的RNA降解诱导外显子(NMD外显子mRNA)并且编码SCN1A蛋白,该方法包括使治疗剂与所述细胞接触,由此所述治疗剂调节从编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA剪接所述NMD外显子,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节SCN1A蛋白在所述细胞中的表达。在一些实施方案中,所述治疗剂(a)与编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合;(b)调节参与所述NMD外显子mRNA的剪接的因子的结合;或(c) (a)和(b)的组合。在一些实施方案中,所述治疗剂干扰参与从所述靶向部分的区域剪接所述NMD外显子的因子的结合。在一些实施方案中,所述靶向部分邻近所述NMD外显子。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NMD外显子5'末端上游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NMD外显子5'末端上游至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NMD外显子3'末端下游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核

核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NMD外显子3'末端下游至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分位于编码SCN1A的NMD外显子mRNA的两个规范外显子区域之间的内含子区域中,并且其中所述内含子区域含有所述NMD外显子。在一些实施方案中,所述靶向部分与所述NMD外显子至少部分重叠。在一些实施方案中,所述靶向部分与所述NMD外显子上游的内含子至少部分重叠。在一些实施方案中,所述靶向部分包含5' NMD外显子-内含子接合点或3' NMD外显子-内含子接合点。在一些实施方案中,所述靶向部分在所述NMD外显子内。在一些实施方案中,所述靶向部分包含所述NMD外显子的约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个连续核苷酸。在一些实施方案中,编码SCN1A的NMD外显子mRNA包含与SEQ ID NO:2或7-10中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,编码SCN1A的NMD外显子mRNA由与SEQ ID NO:1或3-6具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的基因序列编码。在一些实施方案中,所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803上游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803上游约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,740下游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,740下游约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分包含与包含SEQ ID NO:2或7-10的至少8个连续核酸的区域具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:21-67、210-256或304-379中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。在一些实施方案中,所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分在SCN1A的无义介导的RNA降解诱导外显子20x内。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ

ID N0:42-50或231-239中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。在一些实施方案中,所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分在SCN1A的无义介导的RNA降解诱导外显子20x的上游或下游。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID N0:21-38、53-67、210-227或242-256中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。在一些实施方案中,所述NMD外显子mRNA的靶向部分包含SCN1A的外显子20x的外显子-内含子接合点。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID N0:39-41、51、52、228-230、240或241中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。在一些实施方案中,所述治疗剂促进所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除。在一些实施方案中,与对照细胞中所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂增加所述细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平。在一些实施方案中,与对照细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂增加所述细胞中的SCN1A蛋白的表达。在一些实施方案中,与对照细胞中产生的SCN1A蛋白的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中产生的SCN1A蛋白的量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂抑制所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除。在一些实施方案中,与对照细胞中所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除降低约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂降低所述细胞中所述

经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平。在一些实施方案中,与对照细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的量降低约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂降低所述细胞中的SCN1A蛋白的表达。在一些实施方案中,与对照细胞中产生的SCN1A蛋白的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中产生的SCN1A的量降低约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义低聚物包含骨架修饰,该骨架修饰包含硫代磷酸酯键或二氨基磷酸酯键。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含二氨基磷酸酯吗啉代、锁定核酸、肽核酸、2'-O-甲基、2'-氟或2'-O-甲氧基乙基部分。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含至少一个修饰的糖部分。在一些实施方案中,每个糖部分是修饰的糖部分。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体由8至50个核碱基、8至40个核碱基、8至35个核碱基、8至30个核碱基、8至25个核碱基、8至20个核碱基、8至15个核碱基、9至50个核碱基、9至40个核碱基、9至35个核碱基、9至30个核碱基、9至25个核碱基、9至20个核碱基、9至15个核碱基、10至50个核碱基、10至40个核碱基、10至35个核碱基、10至30个核碱基、10至25个核碱基、10至20个核碱基、10至15个核碱基、11至50个核碱基、11至40个核碱基、11至35个核碱基、11至30个核碱基、11至25个核碱基、11至20个核碱基、11至15个核碱基、12至50个核碱基、12至40个核碱基、12至35个核碱基、12至30个核碱基、12至25个核碱基、12至20个核碱基或12至15个核碱基组成。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体与编码所述蛋白质的NMD外显子mRNA的靶向部分至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%互补。在一些实施方案中,所述方法进一步包括评估SCN1AmRNA或蛋白质表达。在一些实施方案中,所述细胞是离体的。

[0004] 在某些实施方案中,本文公开了一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法,该方法包括:使所述受试者的细胞与调节从所述细胞中的mRNA剪接无义介导的mRNA降解诱导外显子(NMD外显子)的治疗剂接触,该细胞中的mRNA含有NMD外显子并且编码SCN1A,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节SCN1A蛋白在所述受试者的细胞中的表达。在一些实施方案中,所述治疗剂(a)与编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合;(b)调节参与所述NMD外显子mRNA的剪接的因子的结合;或(c) (a)和(b)的组合。在一些实施方案中,所述治疗剂干扰参与从所述靶向部分的区域剪接所述NMD外显子的因子的结合。在一些实施方案中,所述靶向部分邻近所述

NMD外显子。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NMD外显子5'末端上游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NMD外显子5'末端上游至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NMD外显子3'末端下游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NMD外显子3'末端下游至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分位于编码SCN1A的NMD外显子mRNA的两个规范外显子区域之间的内含子区域中,并且其中所述内含子区域含有所述NMD外显子。在一些实施方案中,所述靶向部分与所述NMD外显子至少部分重叠。在一些实施方案中,所述靶向部分与所述NMD外显子上游的内含子至少部分重叠。在一些实施方案中,所述靶向部分包含5' NMD外显子-内含子接合点或3' NMD外显子-内含子接合点。在一些实施方案中,所述靶向部分在所述NMD外显子内。在一些实施方案中,所述靶向部分包含所述NMD外显子的约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个连续核苷酸。在一些实施方案中,编码SCN1A的NMD外显子mRNA包含与SEQ ID NO:2或7-10中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,编码SCN1A的NMD外显子mRNA由与SEQ ID NO:1或3-6具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的基因序列编码。在一些实施方案中,所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803上游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803上游约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,740下游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:

chr2:166,863,740下游约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分包含与包含SEQ ID NO:2或7-10的至少8个连续核酸的区域具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:21-67、210-256或304-379中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。在一些实施方案中,所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分在SCN1A的无义介导的RNA降解诱导外显子20x内。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:42-50或231-239中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。在一些实施方案中,所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分在SCN1A的无义介导的RNA降解诱导外显子20x的上游或下游。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:21-38、53-67、210-227或242-256中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。在一些实施方案中,所述NMD外显子mRNA的靶向部分包含SCN1A的外显子20x的外显子-内含子接合点。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:39-41、51、52、228-230、240或241中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。在一些实施方案中,所述治疗剂促进所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除。在一些实施方案中,与对照细胞中所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂增加所述细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平。在一些实施方案中,与对照细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂增加所述细胞中的SCN1A蛋白的表达。在一些实施方案中,与对照细胞中产生的SCN1A蛋白的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中产生的SCN1A蛋白的量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约



4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂抑制所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除。在一些实施方案中,与对照细胞中所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除降低约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂降低所述细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平。在一些实施方案中,与对照细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的量降低约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂降低所述细胞中的SCN1A蛋白的表达。在一些实施方案中,与对照细胞中产生的SCN1A蛋白的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中产生的SCN1A的量降低约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义低聚物包含骨架修饰,该骨架修饰包含硫代磷酸酯键或二氨基磷酸酯键。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含二氨基磷酸酯吗啉代、锁定核酸、肽核酸、2'-O-甲基、2'-氟或2'-O-甲氧基乙基部分。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含至少一个修饰的糖部分。在一些实施方案中,每个糖部分是修饰的糖部分。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体由8至50个核碱基、8至40个核碱基、8至35个核碱基、8至30个核碱基、8至25个核碱基、8至20个核碱基、8至15个核碱基、9至50个核碱基、9至40个核碱基、9至35个核碱基、9至30个核碱基、9至25个核碱基、9至20个核碱基、9至15个核碱基、10至50个核碱基、10至40个核碱基、10至35个核碱基、10至30个核碱基、10至25个核碱基、10至20个核碱基、10至15个核碱基、11至50个核碱基、11至40个核碱基、11至35个核碱基、11至30个核碱基、11至25个核碱基、11至20个核碱基、11至15个核碱基、12至50个核碱基、12至40个核碱基、12至35个核碱基、12至30个核碱基、12至25个核碱基、12至20个核碱基或12至15个核碱基组成。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体与编码所述蛋白质的NMD外显子mRNA的靶向部分至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%

或100%互补。在一些实施方案中,所述方法进一步包括评估SCN1A mRNA或蛋白质表达。在一些实施方案中,所述疾病或病况是由 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能失去突变诱导的。在一些实施方案中,所述疾病或病况与所述SCN1A基因的单倍性不足相关,并且其中所述受试者具有编码功能性SCN1A的第一等位基因,以及不产生或以降低的水平产生SCN1A的第二等位基因,或编码非功能性SCN1A或部分功能性SCN1A的第二等位基因。在一些实施方案中,所述疾病或病况是脑病。在一些实施方案中,所述疾病或病况是癫痫性脑病。在一些实施方案中,所述疾病或病况是Dravet综合征(DS);婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)-边界(SMEB);发热性惊厥(FS);全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+);早期幼儿癫痫性脑病,13;隐源性全身性癫痫;隐源性局限性癫痫;肌阵挛性无定向癫痫;Lennox-Gastaut综合征;West综合征;特发性痉挛;早期肌阵挛性脑病;进行性肌阵挛性癫痫;儿童交替性偏瘫;未分类的癫痫性脑病;癫痫猝死(SUDEP);病窦综合征1;自闭症;或婴儿期恶性迁移性部分发作。在一些实施方案中,GEFS+是全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型。在一些实施方案中,所述发热性惊厥是家族性发热性惊厥,3A。在一些实施方案中,SMEB是不具有广泛棘波的SMEB(SMEB-SW)、不具有肌阵挛性发作的SMEB(SMEB-M)、缺乏多于一种SMEI特征的SMEB(SMEB-O)或顽固性儿童癫痫伴全身性强直性阵挛性发作(ICEGTC)。在一些实施方案中,所述治疗剂促进所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除,并且增加所述细胞中SCN1A的表达。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:22-24、26、27、29-35、37-62、64-67或304-379中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%互补的序列。在一些实施方案中,所述疾病或病况是由 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能获得突变诱导的。在一些实施方案中,所述受试者具有以升高的水平产生SCN1A的等位基因,或编码诱导细胞中 $\text{Na}_v1.1$ 活性增加的突变SCN1A的等位基因。在一些实施方案中,所述疾病或病况是偏头痛。在一些实施方案中,所述偏头痛是家族性偏瘫性偏头痛,3。在一些实施方案中,所述疾病或病况是 $\text{Na}_v1.1$ 遗传性癫痫。在一些实施方案中,所述治疗剂抑制所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除,并且降低所述细胞中SCN1A的表达。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:21、25、28、36或63中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%互补的序列。在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述受试者是非人类动物。在一些实施方案中,所述受试者是胎儿、胚胎或儿童。在一些实施方案中,所述治疗剂通过所述受试者的鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射、琉璃体内或静脉内注射来施用。在一些实施方案中,所述方法进一步包括向所述受试者施用第二治疗剂。在一些实施方案中,所述第二治疗剂是小分子。在一些实施方案中,所述第二治疗剂是ASO。在一些实施方案中,所述ASO包含与SEQ ID NO:115-161中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%互补的序列。在一些实施方案中,所述第二治疗剂纠正内含子保留。在一些实施方案中,所述疾病或病况是阿尔茨海默病、SCN2A脑病、SCN8A脑病或SCN5A心律失常。在一些实施方案中,所述疾病或病况是阿尔茨海默病、SCN2A脑病、SCN8A脑病或SCN5A心律失常。在一些实施方案中,所述细胞是离体的。

#### 援引并入

[0005] 本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度犹如具体地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请均通过引用而并入。

## 附图说明

[0006] 本发明的新颖特征在所附权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及附图,将会对本发明的特征和优点获得更好的理解,在这些附图中:

[0007] 图1A-图1C描绘了含有无义介导的RNA降解诱导外显子(NMD外显子mRNA)的靶mRNA和治疗剂介导的无义介导的mRNA降解诱导外显子的排除以增加全长靶蛋白或功能性RNA表达的示意图。图1A显示了分为细胞核和细胞质区室的细胞。在细胞核中,靶基因的前mRNA转录物经历剪接以生成mRNA,并且该mRNA被输出到细胞质并翻译为靶蛋白。对于该靶基因,mRNA的一些部分含有在细胞质中降解的无义介导的mRNA降解诱导外显子(NMD外显子mRNA),因此导致无靶蛋白产生。图1B示出了分为细胞核和细胞质区室的相同细胞的实例。用诸如反义寡聚体(ASO)等治疗剂处理促进了无义介导的mRNA降解诱导外显子的排除并导致mRNA的增加,该增加的mRNA继而翻译为更高水平的靶蛋白。图1C是治疗性ASO介导的无义介导的mRNA降解诱导外显子的排除的示意图,其将非生产性mRNA转变为生产性mRNA,并且增加了全长靶蛋白从该生产性mRNA的表达。

[0008] 图2描绘了SCN1A基因中示例性无义介导的mRNA降解(NMD)诱导外显子的鉴定。显示了使用比较基因组学鉴定SCN1A基因中的NMD诱导外显子,在UCSC基因组浏览器中可视化。上图按比例示出了SCN1A基因的图示。在100个脊椎动物物种中的保守水平作为峰示出。最高的峰对应于外显子(黑框),而对于大多数内含子(带箭头的线)未观察到峰。在内含子20(NM\_006920)中鉴定了保守的峰,在中间图中示出。对保守序列的检查鉴定出侧翼为3'和5'剪接位点(带下划线的序列)的64bp的外显子样序列(下图,以灰色突出显示的序列)。包含该外显子导致移码和在外显子21中引入提前终止密码子,使转录物成为NMD的靶标。

[0009] 图3A描绘了通过环己酰亚胺处理确认NMD诱导外显子。使用来自DMSO处理的(CHX-)或环己酰亚胺处理的(CHX+)Neuro 2A(小鼠神经祖细胞)的细胞质RNA以及外显子21和下游外显子中的引物进行的RT-PCR分析,证实了存在对应于NMD诱导外显子(21x)的条带。通过测序确认了产物的身份。对条带进行光密度测定分析,以计算总SCN1A转录物的外显子21x包含百分比。用环己酰亚胺(CHX+)处理Neuro 2A以抑制NMD导致与细胞质部分中的NMD诱导外显子21x相对应的产物增加了2倍(比较浅灰色条,CHX-,与深灰色条,CHX+)。

[0010] 图3B描绘了通过环己酰亚胺处理确认NMD诱导外显子。使用来自DMSO处理的(CHX-)或环己酰亚胺处理的(CHX+)RenCell VM(人神经祖细胞)的细胞质RNA以及外显子20和外显子23中的引物进行的RT-PCR分析,证实了存在对应于NMD诱导外显子(20x)的条带。通过测序确认了产物的身份。对条带进行光密度测定分析,以计算总SCN1A转录物的外显子20x包含百分比。用环己酰亚胺(CHX+)处理RenCell VM以抑制NMD导致与细胞质部分中的NMD诱导外显子20x相对应的产物增加了2倍(比较浅灰色条,CHX-,与深灰色条,CHX+)。

[0011] 图4描绘了示例性SCN1A外显子20x区域ASO步移。示出了使用2'-MOE ASO、PS骨架,针对3'剪接位点上游、3'剪接位点中、外显子20x、5'剪接位点中和5'剪接位点下游的SCN1A外显子20x区域靶向序列进行的ASO步移的图示。将ASO设计为通过一次移位5个核苷酸来覆盖这些区域。

[0012] 图5A描绘了通过RT-PCR评价的SCN1A外显子20x区域ASO步移。代表性的PAGE显示了通过gymnotic摄取,在RenCell VM细胞中以20 $\mu$ M的浓度,进行假处理(Sham)、SMN对照ASO

处理 (SMN) 或如本文实施例中以及图4的说明中所述用靶向外显子20x区域的2'-MOE ASO处理的SCN1A的SYBR-safe染色的RT-PCR产物。将与外显子20x包含(顶部条带)和全长(外显子20x排除,底部条带)相对应的两种产物进行定量。

[0013] 图5B描绘了根据图5A中的数据绘出外显子20x包含百分比的图。黑色线表示相对于Sham没有变化。

[0014] 图5C描绘了相对于RPL32内部对照进行归一化的全长产物的图,并绘出了相对于Sham的变化倍数。黑色线表示相对于Sham的比例为1且没有变化。

[0015] 图6描绘了通过RT-qPCR评价的示例性SCN1A外显子20x区域ASO步移。使用相同ASO摄取实验获得、如图5所示通过SYBR-safe RT-PCR进行评价、相对于RPL32进行归一化的SYBR-green RT-qPCR SCN1A扩增结果,以相对于Sham的变化倍数作图,从而确认了SYBR-safe RT-PCR结果。黑色线表示比例为1(相对于Sham没有变化)。

[0016] 图7A描绘了具有钠电压门控通道 $\alpha$ 亚单位成员的成员的表格。箭头对应于图7B中的条颜色。X表示未检测到表达。

[0017] 图7B描绘了通过SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN8A和SCN9A的Taqman qPCR所评价的所选ASO,以评估靶标选择性。使用Ex20x+1、IVS20x+18和IVS20x+33ASO获得的相对于RPL32进行归一化的Taqman-qPCR扩增结果作为相对于Sham的变化倍数作图。黑色线表示比例为1(相对于Sham没有变化)。

[0018] 图8A描绘了所选ASO在CXH处理的细胞中的示例性剂量依赖性作用。示出了代表性的PAGE,其显示通过RNAiMAX转染,在Neuro2A(小鼠神经母细胞瘤)细胞中假处理的(Sham,仅RNAiMAX)或以30nM、80nM和200nM的浓度用靶向外显子21x(小鼠命名法,对应于人类外显子20x)的Ex21x+1 2'-MOE ASO处理的小鼠Scn1a的SYBR-safe染色的RT-PCR产物。Ex21x+1(小鼠命名法)与Ex20x+1(人类命名法)相同。将与外显子20x包含(顶部条带)和全长(外显子20x排除,底部条带)相对应的两种产物进行定量。

[0019] 图8B描绘了根据图7A中的数据绘出外显子20x包含百分比的图。黑色线表示相对于Sham没有变化。

[0020] 图8C描绘了相对于Hprt内部对照进行归一化的全长产物的示例性图,并绘出了相对于Sham的变化倍数。黑色线表示相对于Sham比例为1且没有变化。

[0021] 图9A描绘了在C57BL6J小鼠(雄性,3个月大)中玻璃体内(IVT)注射选定ASO的示例性结果。示出了来自以10mM浓度注射PBS(1 $\mu$ L)的左眼(-)或者注射IVS20x-21、Ex21x+1、IVS21x+18、IVS21x+33或Cep290(阴性对照ASO;Gerard等人,Mol. Ther. Nuc. Ac., 2015) 2'-MOE ASO(1 $\mu$ L)的右眼(+)的小鼠Scn1a的SYBR-safe染色的RT-PCR产物的PAGE凝胶。Ex21x+1、IVS21x+18和IVS21x+33(小鼠命名法)与Ex20x+1、IVS20x+18和IVS20x+33(人类命名法)相同。将与外显子21x包含(顶部条带)和全长(外显子21x排除,底部条带)相对应的两种产物进行定量。

[0022] 图9B描绘了根据图9A中的数据绘出外显子21x包含百分比的图。白色条对应于注射ASO的眼,而灰色条对应于注射PBS的眼,每组n=5。

[0023] 图9C描绘了相对于Gapdh内部对照进行归一化的全长产物的图,并绘出了注射ASO的眼相对于注射PBS的眼的变化倍数。黑色线表示相对于PBS的比例为1且没有变化,每组n=5。

[0024] 图10A描绘了在C57BL6J小鼠(雄性,3个月大)中脑室内(ICV)注射选定AS0的示例性结果。示出了来自未注射(-,无AS0对照)或者注射300 $\mu$ g Cep290(阴性对照AS0;Gerard等人,Mol.Ther.Nuc.Ac.,2015)、Ex21x+1、IVS21x+18、IVS21x+33 2'-MOE AS0的大脑的小鼠Scn1a的SYBR-safe染色的RT-PCR产物的PAGE凝胶。Ex21x+1、IVS21x+18和IVS21x+33(小鼠命名法)与Ex20x+1、IVS20x+18和IVS20x+33(人类命名法)相同。将与外显子21x包含(顶部条带)和全长(外显子21x排除,底部条带)相对应的两种产物进行定量。

[0025] 图10B描绘了根据图10A中的数据绘出外显子21x包含百分比的图,n=6(各自靶向AS0),n=5(Cep290 AS0),n=1(未注射的,无AS0对照)。

[0026] 图10C描绘了使用跨越外显子21和22接合点的两种不同探针进行的Taqman qPCR测定的结果的图。将产物相对于Gapdh内部对照进行归一化,并绘出注射AS0的大脑相对于注射Cep290的大脑的变化倍数。黑色线表示相对于Cep290的比例为1且没有变化,n=6(各自靶向AS0),n=5(Cep290 AS0),n=1(未注射的,无AS0对照)。

[0027] 图11A描绘了在C57BL6J小鼠(雄性,3个月大)中脑室内(ICV)注射选定AS0的示例性结果。来自注射300 $\mu$ g Cep290(阴性对照AS0;Gerard等人,Mol.Ther.Nuc.Ac.,2015)或33 $\mu$ g、100 $\mu$ g和300 $\mu$ g Ex21x+12'-MOE AS0的大脑的小鼠Scn1a的SYBR-safe染色的RT-PCR产物的PAGE凝胶。Ex21x+1(小鼠命名法)与Ex20x+1(人类命名法)相同。将与外显子21x包含(顶部条带)和全长(外显子21x排除,底部条带)相对应的两种产物进行定量。

[0028] 图11B描绘了根据图11A中的数据绘出外显子21x包含百分比的图,n=5(每组)。

[0029] 图11C描绘了使用跨越外显子21和22接合点的两种不同探针进行的Taqman qPCR测定的结果的图。将产物相对于Gapdh内部对照进行归一化,并绘出注射AS0的大脑相对于注射Cep290的大脑的变化倍数。黑色线表示相对于Cep290的比例为1且没有变化,n=5(每组)。

[0030] 图12A描绘了在C57BL6J小鼠(出生后第2天)中脑室内(ICV)注射选定AS0的示例性结果。示出了来自未注射(-,无AS0对照)或者注射20 $\mu$ g Ex21x+1 2'-MOE AS0的大脑的小鼠Scn1a的SYBR-safe染色的RT-PCR产物的PAGE凝胶。将与外显子21x包含(顶部条带)和全长(外显子21x排除,底部条带)相对应的两种产物进行定量。Ex21x+1(小鼠命名法)与Ex20x+1(人类命名法)相同。

[0031] 图12B描绘了根据图12A中的数据绘出外显子21x包含百分比的图,n=4(每组)。

[0032] 图12C描绘了使用跨越外显子21和22接合点的两种不同探针进行的Taqman qPCR测定的结果的图。将产物相对于Gapdh内部对照进行归一化,并绘出注射AS0的大脑相对于注射无AS0对照的大脑的变化倍数。黑色线表示相对于无AS0对照的比例为1且没有变化,n=4(每组)。

[0033] 图13A描绘了绘出所示小鼠CNS样品中的外显子21x包含百分比的图。

[0034] 图13B描绘了绘出所示人CNS样品中的外显子20x包含百分比的图。

[0035] 图14A描绘了绘出在所示剂量下的外显子21x包含减少百分比的图。

[0036] 图14B描绘了绘出在所示剂量下的Scn1a mRNA增加百分比的图。

[0037] 图14C描绘了绘出在所示剂量下的Nav 1.1蛋白水平增加百分比的图。

[0038] 图15A描绘了绘出在所示剂量下的外显子21x包含减少百分比的图。

[0039] 图15B描绘了绘出在所示剂量下的Scn1a mRNA增加百分比的图。

[0040] 图16描绘了在出生后第2天的鼠中通过ICV注射以10ug剂量施用的选定的Scn1a靶向ASO,在注射后第5天通过SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN4A、SCN5A、SCN7A、SCN8A、SCN9A、SCN10A和SCN11A的Taqman qPCR进行评价,以评估靶标选择性。将使用Ex20x+1ASO获得的相对于Gapdh归一化的Taqman-qPCR扩增结果作为相对于注射PBS的鼠的变化倍数作图。

[0041] 图17A-图17B描绘了在野生型(WT)鼠或由129S-Scn1a<sup>tm1Koa</sup> x C57BL/6J杂交产生的杂合Dravet鼠(HET) F1鼠中,在出生后第2天以所示剂量脑室内(ICV)注射选定ASO在注射后3天的示例性结果。

[0042] 图17A描绘了使用跨越外显子21和22的探针进行的Taqman qPCR测定的结果的图。将产物相对于Gapdh内部对照进行归一化,并绘出注射ASO的大脑相对于注射PBS的大脑的变化倍数。

[0043] 图17B描绘了来自使用抗Nav1.1抗体进行的western印迹法的结果的图。将产物相对于丽春红染色的条带进行归一化,并绘出注射ASO的大脑相对于注射PBS的大脑的变化倍数。

[0044] 图18描绘了通过自由摄取在RenCells中的SCN1A外显子20x区域ASO微步移的示例性结果。通过一次移动1个核苷酸(6-41)或者通过缩短ASO 17的长度(1-5),将ASO设计为覆盖图6中的三个先前鉴定的靶向ASO周围的区域(以星号标出)。该图描绘了通过SYBR-green qPCR测量的外显子20x包含百分比。黑色线表示相对于无ASO(-)没有变化。

[0045] 图19是相对于注射SCN1A靶向ASO后的时间,绘出鼠冠状脑切片中Scn1a mRNA水平增加的图。如图所示,注射后Scn1a mRNA水平的增加至少维持80天。

[0046] 图20是示例性存活曲线,其证明了在Dravet鼠模型中由SCN1A靶向ASO提供的100%存活益处。+/+代表WT基因型,而+/-代表129S-sc1a<sup>tm1Koa</sup>杂合基因型(Dravet鼠模型);A代表PBS处理,而B代表ASO治疗。如图所示,A+/-组的小鼠(接受PBS处理的Dravet鼠)大约从出生后第16天开始死亡,而包括B+/- (接受ASO治疗的Drave鼠)组在内的其他三组的所有小鼠都存活至少超过出生后第35天。

## 具体实施方式

### 剪接和无义介导的mRNA降解

[0047] 间插序列或内含子被称为剪接体的大型且高度动态的RNA蛋白质复合物去除,该复合物协调初级转录物、小核RNA(snRNA)和大量蛋白质之间的复杂相互作用。剪接体以有序的方式在每个内含子上专门装配,开始于U1 snRNA对5'剪接位点(5' ss)的识别或U2途径对3'剪接位点(3' ss)的识别,这涉及U2辅助因子(U2AF)与3' ss区域的结合,以促进U2与分支点序列(BPS)的结合。U2AF是一种稳定的异二聚体,由结合聚嘧啶束(PPT)的U2AF2编码的65kD亚单位(U2AF65)和与3' ss处高度保守的AG二核苷酸相互作用并稳定U2AF65结合的U2AF1编码的35kD亚单位(U2AF35)组成。除了BPS/PPT单元和3' ss/5' ss之外,准确的剪接还需要激活或阻抑剪接位点识别的辅助序列或结构,这被称为内含子或外显子剪接增强子或沉默子。这些元件使得真正的剪接位点可以在高等真核生物基因组中的大量过剩的隐蔽位点或伪位点中得到识别,这些隐蔽位点或伪位点具有相同的序列,但是数目比真正的位点多一个数量级。尽管它们通常具有调节功能,但对其激活或阻抑的确切机制知之甚少。

[0048] 一般可以将是否进行剪接的决定建模为随机过程而不是确定性过程,使得即使是

最明确的剪接信号有时也可能会不正确地剪接。然而,在正常条件下,前mRNA剪接以惊人的高保真度进行。这部分地归因于相邻顺式作用辅助外显子和内含子剪接调节元件(ESR或ISR)的活性。通常,这些功能元件根据其刺激或抑制剪接的能力而分别被分类为外显子或内含子剪接增强子(ESE或ISE)或沉默子(ESS或ISS)。尽管现在有证据表明某些辅助顺式作用元件可能通过影响剪接体装配的动力学如U1 snRNP与5' ss之间复合物的排列来发挥作用,但似乎许多元件很有可能与反式作用RNA结合蛋白(RBP)配合起作用。例如,富含丝氨酸和精氨酸的RBP(SR蛋白)家族是保守的蛋白质家族,它们在定义外显子中具有关键作用。SR蛋白通过将前剪接体的组分募集到相邻剪接位点或通过拮抗附近ESS的作用来促进外显子识别。ESS的阻抑作用可以由核内不均一核糖核蛋白(hnRNP)家族成员介导,并且可以改变核心剪接因子向相邻剪接位点的募集。除了其在剪接调节中的作用外,还提出沉默子元件在伪外显子的阻抑中起作用,伪外显子是数组具有典型外显子间距但没有功能性开放阅读框的诱饵内含子剪接位点。ESE和ESS,与它们的同源反式作用RBP协同,代表了一组剪接控制中的重要组成部分,这些剪接控制指定如何、在何处以及何时从其前体装配mRNA。

[0049] 标记外显子-内含子边界的序列是不同强度的简并信号,这些信号可以在人类基因内高频率地发生。在多外显子基因中,不同的剪接位点对可以以许多不同的组合连接在一起,从而从单个基因创建出一系列多样的转录物。这通常被称为另路前mRNA剪接。尽管通过另路剪接产生的大多数mRNA同种型可以从细胞核输出并翻译为功能性多肽,但是来自单个基因的不同mRNA同种型在其翻译效率上可能有很大差异。在外显子连接复合物上游至少50bp处具有提前终止密码子(PTC)的那些mRNA同种型可能被无义介导的mRNA降解(NMD)途径靶向以供降解。传统(BPS/PPT/3' ss/5' ss)和辅助剪接基序中的突变可导致异常剪接,如外显子跨越或隐蔽(或伪)外显子包含或剪接位点激活,并显著地助长了人类发病率和死亡率。异常剪接模式和另路剪接模式均可受到外显子和内含子中的天然DNA变异的影响。

[0050] 鉴于外显子-内含子边界可以出现在密码子的三个位置中的任何一个位置,显然只有一部分另路剪接事件可以维持规范的开放阅读框。例如,只有可被3整除的外显子可以被跨越或包含在mRNA中而没有任何阅读框改变。没有兼容相的剪接事件将诱导移码。除非被下游事件逆转,否则移码肯定会导致一个或多个PTC,可能导致随后被NMD降解。NMD是一种翻译偶联机制,其消除含有PTC的mRNA。NMD可以作为存在于所有真核生物中的监督途径起作用。NMD可以通过消除含有提前终止密码子的mRNA转录物来减少基因表达中的错误。在一些情况下,这些异常mRNA的翻译可导致所得蛋白质的有害功能获得或显性失活活性。NMD不仅靶向具有PTC的转录物,而且还靶向从许多内源基因表达的大量mRNA同种型,提示NMD是驱动细胞中稳态RNA水平的微调和粗调的主要调节物。

[0051] 诱导NMD的外显子(NIE)是作为内含子内的区域的外显子或伪外显子,并且如果包含在成熟RNA转录物中,则可以激活NMD途径。在组成性剪接事件中,通常会剪接出含有NIE的内含子,但内含子或其一部分(例如,NIE)可以在另路或异常剪接事件期间得到保留。含有这样的NIE的成熟mRNA转录物由于诱导NMD途径的移码而可能是非生产性的。在成熟RNA转录物中包含NIE可以下调基因表达。在本公开中,含有NIE的mRNA转录物可以被称为“含有NIE的mRNA”或“NMD外显子mRNA”。

[0052] 隐蔽(或伪剪接位点)具有与真正的剪接位点相同的剪接识别序列,但不在剪接反应中使用。它们的数目比人类基因组中真正的剪接位点多一个数量级,并且通常被迄今尚

未充分了解的分子机制所阻抑。隐蔽的5'剪接位点具有共有的NNN/GUNNNN或NNN/GCNNNN,其中N是任何核苷酸,而/是外显子-内含子边界。隐蔽的3'剪接位点具有共有的NAG/N。它们的激活受到周围核苷酸的正面影响,这些核苷酸使得它们更类似于真正剪接位点的最佳共有序列,分别是MAG/GURAGU和YAG/G,其中M为C或A,R为G或A,而Y为C或U。

[0053] 技术人员可以使用可公开获得的合适的算法,例如在Kralovicova,J.和Vorechovsky,I.(2007)Global control of aberrant splice site activation by auxiliary splicing sequences:evidence for a gradient in exon and intron definition.Nucleic Acids Res.,35,6399-6413(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095810/pdf/gkm680.pdf>)中列出的那些,容易地鉴定剪接位点及其调节序列。

[0054] 隐蔽的剪接位点或剪接调节序列可以与NIE的剪接位点竞争RNA结合蛋白,如U2AF。在一个实施方案中,药剂可以与隐蔽的剪接位点或剪接调节序列结合,以防止RNA结合蛋白的结合,从而有利于NIE剪接位点的利用。

[0055] 在一个实施方案中,隐蔽的剪接位点可以不包含NIE的5'或3'剪接位点。隐蔽的剪接位点可以在NIE 5'剪接位点上游至少10个核苷酸处。隐蔽的剪接位点可以在NIE 5'剪接位点上游至少20个核苷酸处。隐蔽的剪接位点可以在NIE 5'剪接位点上游至少50个核苷酸处。隐蔽的剪接位点可以在NIE 5'剪接位点上游至少100个核苷酸处。隐蔽的剪接位点可以在NIE 5'剪接位点上游至少200个核苷酸处。

[0056] 隐蔽的剪接位点可以在NIE 3'剪接位点下游至少10个核苷酸处。

隐蔽的剪接位点可以在NIE 3'剪接位点下游至少20个核苷酸处。隐蔽的剪接位点可以在NIE 3'剪接位点下游至少50个核苷酸处。隐蔽的剪接位点可以在NIE 3'剪接位点下游至少100个核苷酸处。隐蔽的剪接位点可以在NIE 3'剪接位点下游至少200个核苷酸处。

#### 目标转录物

[0057] 在一些实施方案中,本公开的方法利用了从SCN1A基因转录的前mRNA中NIE的存在。可以使用刺激NIE的外显子跨越的治疗剂如ASO来诱导所鉴定的SCN1A NIE前mRNA种类的剪接以产生功能性成熟SCN1A mRNA。外显子跨越的诱导可导致NMD途径的抑制。所产生的成熟SCN1A mRNA可以在不激活NMD途径的情况下正常翻译,从而增加患者细胞中SCN1A蛋白的量,并减轻与SCN1A缺乏相关的病况的症状,如Dravet综合征(DS);全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型;家族性发热性惊厥,3A;自闭症;早期幼儿癫痫性脑病,13;病窦综合征1;阿尔茨海默病;或SUDEP。

[0058] 在多个实施方案中,本公开提供了可以靶向SCN1A mRNA转录物以调节,例如增强或抑制剪接或蛋白质表达水平的治疗剂。该治疗剂可以是小分子、多核苷酸或多肽。在一些实施方案中,该治疗剂是ASO。SCN1A前mRNA上的各个区域或序列可以被治疗剂如ASO所靶向。在一些实施方案中,该ASO靶向含有NIE的SCN1A前mRNA转录物。

在一些实施方案中,该ASO靶向SCN1A前mRNA转录物的NIE内的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向SCN1A前mRNA转录物的NIE(3'ss)的5'末端上游(或5')的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向SCN1A前mRNA转录物的NIE(5'ss)的3'末端下游(或3')的序列。

在一些实施方案中,该ASO靶向位于SCN1A前mRNA转录物的NIE的5'端侧翼的内含子内的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向位于SCN1A前mRNA转录物的NIE的3'端侧翼的内



含子内的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向包含SCN1A前mRNA转录物的NIE-内含子边界的序列。NIE-内含子边界可以指内含子序列与NIE区域的接合处。内含子序列可以位于NIE的5'末端或NIE的3'末端的侧翼。在一些实施方案中,该ASO靶向SCN1A前mRNA转录物的外显子内的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向SCN1A前mRNA转录物的内含子内的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向既包含内含子的一部分又包含外显子的一部分的序列。

[0059] 在一些实施方案中,本文所述的治疗剂调节参与NMD外显子mRNA的剪接的因子的结合。

[0060] 在一些实施方案中,本文所述的治疗剂干扰参与NMD外显子mRNA的剪接的因子的结合。

[0061] 在一些实施方案中,本文所述的治疗剂阻止参与NMD外显子mRNA的剪接的因子的结合。

[0062] 在一些实施方案中,治疗剂靶向位于编码SCN1A的NMD外显子mRNA的两个规范外显子区域之间的内含子区域中的靶向部分,并且其中该内含子区域含有NMD外显子。

[0063] 在一些实施方案中,治疗剂靶向与NMD外显子至少部分重叠的靶向部分。

[0064] 在一些实施方案中,治疗剂靶向与NMD外显子上游的内含子至少部分重叠的靶向部分。

[0065] 在一些实施方案中,治疗剂靶向在NMD外显子内的靶向部分。

[0066] 在一些实施方案中,治疗剂靶向包含NMD外显子的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个连续核苷酸的靶向部分。在一些实施方案中,治疗剂靶向包含NMD外显子的至多约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个连续核苷酸的靶向部分。在一些实施方案中,治疗剂靶向包含NMD外显子的约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个连续核苷酸的靶向部分。

[0067] 在一些实施方案中,治疗剂靶向邻近NMD外显子的靶向部分。

[0068] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的5'末端上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE区域的5'末端上游(或5')约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸或约1450至约1500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO可靶向NIE的5'末端上游超过300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游(或3')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸或约1450至约1500个核苷酸处的

序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游超过300个核苷酸处的序列。

[0069] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的5'末端上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE区域的5'末端上游(或5')至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸或至少约1000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游(或3')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸或至少约1000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游超过300个核苷酸处的序列。

[0070] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的5'末端上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE区域的5'末端上游(或5')至多约10个核苷酸、至多约20个核苷酸、至多约50个核苷酸、至多约80个核苷酸、至多约85个核苷酸、至多约90个核苷酸、至多约95个核苷酸、至多约96个核苷酸、至多约97个核苷酸、至多约98个核苷酸、至多约99个核苷酸、至多约100个核苷酸、至多约101个核苷酸、至多约102个核苷酸、至多约103个核苷酸、至多约104个核苷酸、至多约105个核苷酸、至多约110个核苷酸、至多约120个核苷酸、至多约150个核苷酸、至多约200个核苷酸、至多约300个核苷酸、至多约400个核苷酸、至多约500个核苷酸、至多约600个核苷酸、至多约700个核苷酸、至多约800个核苷酸、至多约900个核苷酸、至多约1000个核苷酸、至多约1100个核苷酸、至多约1200个核苷酸、至多约1300个核苷酸、至多约1400个核苷酸或至多约1500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游(或3')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游至多约10个核苷酸、至多约20个核苷酸、至多约50个核苷酸、至多约80个核苷酸、至多约85个核苷酸、至多约90个核苷酸、至多约95个核苷酸、至多约96个核苷酸、至多约97个核苷酸、至多约98个核苷酸、至多约99个核苷酸、至多约100个核苷酸、至多约101个核苷酸、至多约102个核苷酸、至多约103个核苷酸、至多约104个核苷酸、至多约105个核苷酸、至多约110个核苷酸、至多约120个核苷酸、至多约150个核苷酸、至多约200个核苷酸、至多约300个核苷酸、至多约400个核苷酸、至多约500个核苷酸、至多约600个核苷酸、至多约700个核苷酸、至多约800个核苷酸、至多约900个核苷酸、或至多约1000个核苷酸、至多约1100个核苷酸、至多约1200个核苷酸、至多约1300个核苷酸、至多约1400个核苷

酸或至多约1500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游超过300个核苷酸处的序列。

[0071] 在一些实施方案中,如本文所述的NIE位于GRCh37/hg19:chr2:166,863,740与GRCh37/hg19:chr2:166,863,803之间,如图2所示。在一些实施方案中,该NIE的5'末端位于GRCh37/hg19:chr2:166,863,803处。在一些实施方案中,该NIE的3'末端位于GRCh37/hg19:chr2:166,863,740处。

[0072] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803的上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803的上游(或5')约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸或约1450至约1500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO可靶向基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803的上游超过300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向GRCh37/hg19:chr2:166,863,740的下游(或3')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向GRCh37/hg19:chr2:166,863,740的下游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸或约1450至约1500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向GRCh37/hg19:chr2:166,863,740的下游超过300个核苷酸处的序列。

[0073] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803的上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803的上游(或5')至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸或至少约1000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向GRCh37/hg19:chr2:166,863,740的下游(或3')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向GRCh37/hg19:chr2:166,863,740的下游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约

103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸或至少约1000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向GRCh37/hg19:chr2:166,863,740的下游超过300个核苷酸处的序列。

[0074] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803的上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803的上游(或5')至多约10个核苷酸、至多约20个核苷酸、至多约50个核苷酸、至多约80个核苷酸、至多约85个核苷酸、至多约90个核苷酸、至多约95个核苷酸、至多约96个核苷酸、至多约97个核苷酸、至多约98个核苷酸、至多约99个核苷酸、至多约100个核苷酸、至多约101个核苷酸、至多约102个核苷酸、至多约103个核苷酸、至多约104个核苷酸、至多约105个核苷酸、至多约110个核苷酸、至多约120个核苷酸、至多约150个核苷酸、至多约200个核苷酸、至多约300个核苷酸、至多约400个核苷酸、至多约500个核苷酸、至多约600个核苷酸、至多约700个核苷酸、至多约800个核苷酸、至多约900个核苷酸、至多约1000个核苷酸、至多约1100个核苷酸、至多约1200个核苷酸、至多约1300个核苷酸、至多约1400个核苷酸或至多约1500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向GRCh37/hg19:chr2:166,863,740的下游(或3')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向GRCh37/hg19:chr2:166,863,740的下游至多约10个核苷酸、至多约20个核苷酸、至多约50个核苷酸、至多约80个核苷酸、至多约85个核苷酸、至多约90个核苷酸、至多约95个核苷酸、至多约96个核苷酸、至多约97个核苷酸、至多约98个核苷酸、至多约99个核苷酸、至多约100个核苷酸、至多约101个核苷酸、至多约102个核苷酸、至多约103个核苷酸、至多约104个核苷酸、至多约105个核苷酸、至多约110个核苷酸、至多约120个核苷酸、至多约150个核苷酸、至多约200个核苷酸、至多约300个核苷酸、至多约400个核苷酸、至多约500个核苷酸、至多约600个核苷酸、至多约700个核苷酸、至多约800个核苷酸、至多约900个核苷酸、至多约1000个核苷酸、至多约1100个核苷酸、至多约1200个核苷酸、至多约1300个核苷酸、至多约1400个核苷酸或至多约1500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向GRCh37/hg19:chr2:166,863,740的下游超过300个核苷酸处的序列。

[0075] 如本文实施例中所述,分析了SCN1A基因(SEQ ID NO.1)的NIE,并观察到内含子20(SEQ ID NO.4)的一部分(在整个本公开中,该部分被称为外显子20x)的包含。在一些实施方案中,本文公开的ASO靶向由SCN1A基因组序列转录的含有NIE的前mRNA(SEQ ID NO.2)。在一些实施方案中,该ASO靶向来自包含内含子20一部分的SCN1A基因组序列的含有NIE的前mRNA转录物。在一些实施方案中,该ASO靶向来自包含外显子20x(SEQ ID NO.6)的SCN1A基因组序列的含有NIE的前mRNA转录物。在一些实施方案中,该ASO靶向SEQ ID NO.2或12的含有NIE的前mRNA转录物。在一些实施方案中,该ASO靶向包含NIE的SEQ ID NO.2或12的含有NIE的前mRNA转录物。在一些实施方案中,该ASO靶向包含外显子20x的SEQ ID NO.2(SEQ ID NO.10)的含有NIE的前mRNA转录物。在一些实施方案中,本文公开的ASO靶向SCN1A前mRNA序列(SEQ ID NO.2或12)。在一些实施方案中,该ASO靶向包含NIE的SCN1A前mRNA序列(SEQ ID NO.10或20)。在一些实施方案中,该ASO靶向根据SEQ ID NO:7-10或17-20中的任一个的SCN1A前mRNA序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:21-67中的任一个

的序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:68-114中的任一个的序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:115-209中的任一个的序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:210-256中的任一个的序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:257-303中的任一个的序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:304-341中的任一个的序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:342-379中的任一个的序列。

[0076] 在一些实施方案中,所述含有NIE的SCN1A前mRNA转录物由与SEQ ID NO:1或11具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的基因序列所编码。在一些实施方案中,该SCN1A NIE前mRNA转录物包含与SEQ ID NO:2-10和12-20中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0077] 在一些实施方案中,所述含有NIE的SCN1A前mRNA转录物(或NMD外显子mRNA)包含与SEQ ID NO:2、7-10、12和17-20中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,含有NIE的SCN1A前mRNA转录物(或NMD外显子mRNA)由与SEQ ID NO:1、3-6、11和13-16具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列所编码。在一些实施方案中,该NMD外显子mRNA的靶向部分包含与包含SEQ ID NO:2、7-10、12和17-20的至少8个连续核酸的区域具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0078] 在一些实施方案中,所述ASO靶向包含NIE外显子20x的含有NIE的SCN1A前mRNA的外显子20。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE外显子20x下游(或3')的外显子21序列。在一些实施方案中,该ASO靶向外显子20x的5'末端上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向外显子20x的3'末端下游(或3')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:21-67中的任一个的序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:210-256中的任一个的序列。

[0079] 在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的5'末端上游的序列。例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子20x或小鼠SCN1A中的外显子21x)5'末端上游序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:21-38中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。再例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子20x或小鼠SCN1A中的外显子21x)5'末端上游序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:68-85中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向含有外显子-内含子边界(或接合点)的序列。例如,靶向含有外显子-内含子边界的序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:39-41、51、52、228-230、240或241中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。例如,靶向含有外显子-内含子边界的序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:86-88和98-99中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游的序列。例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子20x或小鼠SCN1A中的外显子21x)3'末端下游序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:53-67中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子20x或小鼠SCN1A中的外显子21x)3'末端下游序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:100-114中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同

一性的序列。在一些实施方案中,ASO靶向NIE内的序列。例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子20x或小鼠SCN1A中的外显子21x)内的序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:42-50或231-239中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。再例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子20x或小鼠SCN1A中的外显子21x)内的序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:89-97中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0080] 在一些实施方案中,所述ASO靶向包含外显子20x的含有NIE的SCN1A前mRNA中的外显子20x。在一些实施方案中,该ASO靶向SCN1A前mRNA的外显子20x的5'末端下游(或3')的外显子20x序列。在一些实施方案中,该ASO靶向SCN1A前mRNA的外显子20x的3'末端上游(或5')的外显子20x序列。

[0081] 在一些实施方案中,所述含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分在内含子1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25中(内含子编号对应于NM\_006920处的mRNA序列)。在一些实施方案中,ASO与NIE前mRNA的靶向部分的杂交导致内含子1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25内的至少一个NIE的外显子跨越,随后增加SCN1A蛋白的产生量。在一些实施方案中,ASO与NIE前mRNA的靶向部分的杂交抑制或阻断内含子1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25内的至少一个NIE的外显子跨越,随后降低SCN1A蛋白的产生量。在一些实施方案中,所述含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分在内含子20中。本领域技术人员可基于本文提供的内含子序列或利用参照NM\_006920、NM\_001202435、NM\_001165964或NM\_001165963处的mRNA序列所提供的编号来确定任何同种型中的相应内含子编号。本领域技术人员还可基于本文提供的内含子序列或利用参照NM\_006920、NM\_001202435、NM\_001165964或NM\_001165963处的mRNA序列所提供的内含子编号,使用本发明的方法来确定用于靶向的任何SCN1A同种型中侧翼外显子的序列。

[0082] 在一些实施方案中,本公开的方法和组合物用来通过诱导或抑制含有NIE的SCN1A前mRNA的伪外显子的外显子跨越来调节,例如增加或减少SCN1A的表达。在一些实施方案中,该伪外显子是内含子1-25中的任一个内的序列。在一些实施方案中,该伪外显子是内含子2、4、6、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24和25中的任一个内的序列。在一些实施方案中,该伪外显子是内含子15、18和19中的任一个内的序列。在一些实施方案中,该伪外显子可以是任何SCN1A内含子或其一部分。在一些实施方案中,该伪外显子在内含子20内。本文使用的SCN1A内含子编号对应于NM\_006920处的mRNA序列。应当理解,内含子编号可以参照不同的SCN1A同种型序列而改变。

#### SCN1A蛋白

[0083] SCN1A基因可以编码SCN1A(钠通道,电压门控,I型, $\alpha$ 亚单位)蛋白,其也可以被称为电压门控钠通道 $\text{Na}_v1.1$ 的 $\alpha$ -亚单位。同样如上所述,DS中的SCN1A突变遍布整个蛋白质。在整个基因中已经鉴定出超过100个新的突变,其中更致病性的(debilitating)是全新(de novo)产生的。这些新突变包括截短(47%)、错义(43%)、缺失(3%)和剪接位点突变(7%)。携带SCN1A突变的受试者的百分比在33%至100%之间不等。大多数突变是新的变化(88%)。

[0084] 在一些实施方案中,本文所述的方法用来调节,例如增加或减少功能性SCN1A蛋白

的产生量。如本文所用的,术语“功能性”是指消除所治疗病况的任何一种或多种症状所必需的SCN1A蛋白的活性或功能量,该病况例如是Dravet综合征;全身性癫痫伴发热性惊厥+, 2型;家族性发热性惊厥, 3A;自闭症;早期幼儿癫痫性脑病, 13;病窦综合征1;阿尔茨海默病;或SUDEP。在一些实施方案中,所述方法用来增加部分功能性SCN1A蛋白的产生量。如本文所用的,术语“部分功能性”是指SCN1A蛋白的活性或功能的任何量低于消除或预防疾病或病况的任何一种或多种症状所需的活性或功能的量。在一些实施方案中,部分功能性蛋白质或RNA将具有比完全功能性蛋白质或RNA低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的活性。

[0085] 在一些实施方案中,所述方法是一种增加具有编码SCN1A蛋白的含有NIE的前mRNA的受试者细胞表达SCN1A蛋白的方法,其中该受试者患有由SCN1A蛋白的活性量不足引起的Dravet综合征,并且其中该SCN1A蛋白的量不足由该SCN1A蛋白的单倍性不足引起。在这样的实施方案中,该受试者具有编码功能性SCN1A蛋白的第一等位基因和不产生该SCN1A蛋白的第二等位基因。在另一个这样的实施方案中,该受试者具有编码功能性SCN1A蛋白的第一等位基因和编码非功能性SCN1A蛋白的第二等位基因。在另一个这样的实施方案中,该受试者具有编码功能性SCN1A蛋白的第一等位基因和编码部分功能性SCN1A蛋白的第二等位基因。在这些实施方案中的任何实施方案中,所述反义寡聚体与从第二等位基因转录的含有NIE的前mRNA的靶向部分结合,从而诱导伪外显子从该前mRNA的外显子跨越,并引起编码功能性SCN1A蛋白的成熟mRNA的水平增加,以及受试者细胞中SCN1A蛋白的表达增加。

[0086] 在相关的实施方案中,所述方法是一种利用ASO增加蛋白质或功能性RNA的表达的方法。在一些实施方案中,ASO用来在SCN1A蛋白的量或功能方面增加具有编码SCN1A蛋白的含有NIE的前mRNA的受试者细胞中SCN1A蛋白的表达,其中该受试者具有缺陷,例如,Dravet综合征(DS)(也称为SMEI);婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)-边界(SMEB);发热性惊厥(FS);全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+);早期幼儿癫痫性脑病, 13;隐源性全身性癫痫;隐源性局限性癫痫;肌阵挛性无定向癫痫;Lennox-Gastaut综合征;West综合征;特发性痉挛;早期肌阵挛性脑病;进行性肌阵挛性癫痫;儿童交替性偏瘫;未分类的癫痫性脑病;癫痫猝死(SUDEP);病窦综合征1;早期幼儿SCN1A脑病;早期幼儿癫痫性脑病(EIEE);或自闭症。在一些实施方案中,ASO用来在SCN8A蛋白的量或功能方面增加受试者细胞中SCN1A蛋白的表达,其中该受试者具有缺陷,例如,早期幼儿癫痫性脑病, 13。在一些实施方案中,ASO用来在SCN5A蛋白的量或功能方面增加受试者细胞中SCN1A蛋白的表达,其中该受试者具有缺陷,例如,病窦综合征1。

[0087] 在一些实施方案中,编码引起疾病或病况的蛋白质的含有NIE的前mRNA转录物被本文所述的ASO所靶向。在一些实施方案中,编码不引起疾病的蛋白质的含有NIE的前mRNA转录物被所述ASO所靶向。例如,作为特定途径中第一蛋白质突变或缺乏的结果的疾病可通过靶向编码第二蛋白质的含有NIE的前mRNA,从而增加该第二蛋白质的产生量来改善。在一些实施方案中,第二蛋白质的功能能够补偿第一蛋白质的突变或缺乏(其引起疾病或病况)。

[0088] 在一些实施方案中,受试者具有:

(a) 第一突变等位基因,由其

- (i) 产生所述SCN1A蛋白的水平与由野生型等位基因产生相比降低,
- (ii) 产生与等价的野生型蛋白质相比功能降低的形式的所述SCN1A蛋白,或者
- (iii) 不产生所述SCN1A蛋白或功能性RNA;以及
- (b) 第二突变等位基因,由其
- (i) 产生所述SCN1A蛋白的水平与由野生型等位基因产生相比降低,
- (ii) 产生与等价的野生型蛋白质相比功能降低的形式的所述SCN1A蛋白,或者
- (iii) 不产生所述SCN1A蛋白,并且

其中所述含有NIE的前mRNA由第一等位基因和/或第二等位基因转录。在这些实施方案中,所述ASO与由第一等位基因或第二等位基因转录的含有NIE的前mRNA的靶向部分结合,从而诱导伪外显子从该含有NIE的前mRNA的外显子跨越,并引起编码SCN1A蛋白的mRNA的水平增加以及受试者细胞中靶蛋白或功能性RNA的表达增加。在这些实施方案中,由伪外显子从含有NIE的前mRNA的外显子跨越导致表达水平增加的靶蛋白或功能性RNA是与等价的野生型蛋白质相比功能降低的形式(部分功能性),或与等价的野生型蛋白质相比具有完全功能的形式(完全功能性)。

[0089] 在一些实施方案中,与编码在对照细胞(例如,未用反义寡聚体处理的细胞或用不与含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分结合的反义寡聚体处理的细胞)中产生的SCN1A蛋白的mRNA的量相比,编码SCN1A蛋白的mRNA的水平增加1.1至10倍。

[0090] 在一些实施方案中,使用本公开的方法治疗的受试者从一个等位基因表达部分功能性SCN1A蛋白,其中该部分功能性SCN1A蛋白由移码突变、无义突变、错义突变或部分基因缺失所引起。在一些实施方案中,使用本发明的方法治疗的受试者从一个等位基因表达非功能性SCN1A蛋白,其中该非功能性SCN1A蛋白由一个等位基因中的移码突变、无义突变、错义突变、部分基因缺失所引起。在一些实施方案中,使用本发明的方法治疗的受试者在一个等位基因中具有SCN1A全基因缺失。

[0091] 在一些实施方案中,所述方法是一种降低具有编码SCN1A蛋白的含有NIE的前mRNA的受试者细胞表达SCN1A蛋白的方法,并且其中该受试者在 $Na_v1.1$ 中具有功能获得突变。在这样的实施方案中,该受试者具有以升高的量产生SCN1A蛋白的等位基因,或编码诱导细胞中 $Na_v1.1$ 活性增加的突变SCN1A的等位基因。在一些实施方案中, $Na_v1.1$ 活性增加的特征在于由突变 $Na_v1.1$ 通道介导的延长或接近持久的钠电流、快速失活的减慢、稳态失活的正位移、重复刺激过程中较高的通道利用度、非灭活的去极化诱导的持久钠电流增加、延迟进入失活、从快速失活中的恢复加速和/或通过较低温度下孵育或相互作用蛋白质的共表达对折叠缺陷的挽救。在这些实施方案中的任何实施方案中,所述反义寡聚体与从第二等位基因转录的含有NIE的前mRNA的靶向部分结合,从而抑制或阻断伪外显子从该前mRNA的外显子跨越,并引起编码功能性SCN1A蛋白的成熟mRNA的水平降低,以及受试者细胞中SCN1A蛋白的表达降低。

[0092] 在相关的实施方案中,所述方法是一种利用ASO降低蛋白质或功能性RNA的表达的方法。在一些实施方案中,ASO用来降低具有编码SCN1A蛋白的含有NIE的前mRNA的受试者细胞中SCN1A蛋白的表达。在一些实施方案中,该受试者在 $Na_v1.1$ 中具有功能获得突变,例如偏头痛。在一些实施方案中,ASO用来降低受试者细胞中SCN1A蛋白的表达,该受试者在 $Na_v1.1$ 中具有功能获得突变,例如偏头痛、家族性偏瘫,3。



[0093] 在一些实施方案中,与编码在对照细胞(例如,未用反义寡聚体处理的细胞或用不与含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分结合的反义寡聚体处理的细胞)中产生的SCN1A蛋白的mRNA的量相比,编码SCN1A蛋白的mRNA的水平降低1.1至10倍。

[0094] 在一些实施方案中,使用本公开的方法治疗的受试者从一个等位基因表达突变SCN1A蛋白,其中该突变SCN1A蛋白由一个等位基因中的移码突变、无义突变、错义突变或部分基因缺失所引起,并且其中该突变SCN1A蛋白引起Na<sub>v</sub>1.1活性水平升高。在一些实施方案中,使用本公开的方法治疗的受试者由于移码突变、无义突变、错义突变或部分基因缺失,从一个等位基因表达升高量的SCN1A蛋白。

[0095] 在本发明的实施方案中,受试者可具有SCN1A中的突变。SCN1A中的突变可以遍布所述基因。SCN1A蛋白可以由四个结构域组成。所述SCN1A结构域可具有跨膜区段。所述SCN1A蛋白中的突变可在整个所述蛋白质中出现。所述SCN1A蛋白可以由至少两种同种型组成。SCN1A中的突变可包含R931C、R946C、M934I、R1648C或R1648H。在一些情况下,可在SCN1A蛋白的C末端观察到突变。也可在所述SCN1A蛋白的前三个结构域的区段5与区段6之间的环中发现SCN1A蛋白中的突变。在一些情况下,可在SCN1A蛋白的N末端观察到突变。SCN1A内的示例性突变包括但不限于R222X、R712X、I227S、R1892X、W952X、R1245X、R1407X、W1434R、c.4338+1G>A、S1516X、L1670fsX1678或K1846fsX1856。本发明可靶向的突变还可以编码离子通道的孔。

[0096] 在一些实施方案中,本文所述的方法和组合物可用来治疗DS。在其他实施方案中,本文所述的方法和组合物可用来治疗婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)。在其他实施方案中,本文所述的方法和组合物可用来治疗边界Dravet综合征;全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型;家族性发热性惊厥,3A;家族性偏瘫性偏头痛,3;自闭症;早期幼儿癫痫性脑病,13;病窦综合征1;阿尔茨海默病或SUDEP。本文所述的方法和组合物还可用来治疗边界SMEI。另外,本文所述的方法和组合物可用来治疗全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+)。GEFS+可与癫痫相关离子通道亚单位如SCN1B或GABRG2中的突变相关。本文所述的方法和组合物还可用来治疗钠通道病。钠通道病可与SCN1A中的突变相关。钠通道病还可与SCN1A的亚单位如β亚单位SCN1B相关。在一些情况下,与SCN1A突变相关的其他疾病也可以用本公开来治疗。与SCN1A突变相关的有关SCN1A疾病包括但不限于非典型性先天性肌强直、高钾性周期性麻痹和先天性副肌强直。

[0097] 在一些实施方案中,可以使用本文所述的方法和组合物治疗具有本领域已知的和在以上引用的文献(例如,Hamdan等人,2009,Mulley等人,2005)中描述的任何SCN1A突变的受试者。在一些实施方案中,该突变在任何SCN1A内含子或外显子内。

#### 外显子包含

[0098] 如本文所用的,“含有NIE的前mRNA”是含有至少一个伪外显子的前mRNA转录物。另路或异常剪接可导致在成熟mRNA转录物中包含至少一个伪外显子。术语“成熟mRNA”和“完全剪接的mRNA”在本文中可互换使用,用来描述完全加工的mRNA。包含至少一个伪外显子可以是非生产性mRNA,并且导致成熟mRNA的NMD。含有NIE的成熟mRNA有时可导致异常的蛋白质表达。

[0099] 在一些实施方案中,所包括的伪外显子是从细胞中编码靶蛋白的基因转录的含有NIE的前mRNA群体中最丰富的伪外显子。在一些实施方案中,所包括的伪外显子是从细胞中

编码靶蛋白的基因转录的含有NIE的前mRNA群体中最丰富的伪外显子,其中该含有NIE的前mRNA群体包含两个或更多个所包括的伪外显子。在一些实施方案中,靶向编码靶蛋白的含有NIE的前mRNA群体中最丰富的伪外显子的反义寡聚体诱导该群体中一个或两个或更多个伪外显子的外显子跨越,包括该反义寡聚体所靶向或结合的伪外显子。在实施方案中,所靶向的区域在伪外显子中,该伪外显子是编码SCN1A蛋白的含有NIE的前mRNA中最丰富的伪外显子。

[0100] 外显子包含的程度可以被表示为外显子包含百分比,例如,其中包括给定伪外显子的转录物的百分比。简言之,可以将外显子包含百分比计算为具有外显子包含的RNA转录物的量相对于具有外显子包含的RNA转录物的平均量加上具有外显子排除的RNA转录物的平均量之总和的百分比。

[0101] 在一些实施方案中,所包括的伪外显子是基于确定至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%或至少约50%包含而被鉴定为所包括的伪外显子的外显子。在实施方案中,所包括的伪外显子是基于确定约5%至约100%、约5%至约95%、约5%至约90%、约5%至约85%、约5%至约80%、约5%至约75%、约5%至约70%、约5%至约65%、约5%至约60%、约5%至约55%、约5%至约50%、约5%至约45%、约5%至约40%、约5%至约35%、约5%至约30%、约5%至约25%、约5%至约20%、约5%至约15%、约10%至约100%、约10%至约95%、约10%至约90%、约10%至约85%、约10%至约80%、约10%至约75%、约10%至约70%、约10%至约65%、约10%至约60%、约10%至约55%、约10%至约50%、约10%至约45%、约10%至约40%、约10%至约35%、约10%至约30%、约10%至约25%、约10%至约20%、约15%至约100%、约15%至约95%、约15%至约90%、约15%至约85%、约15%至约80%、约15%至约75%、约15%至约70%、约15%至约65%、约15%至约60%、约15%至约55%、约15%至约50%、约15%至约45%、约15%至约40%、约15%至约35%、约15%至约30%、约15%至约25%、约20%至约100%、约20%至约95%、约20%至约90%、约20%至约85%、约20%至约80%、约20%至约75%、约20%至约70%、约20%至约65%、约20%至约60%、约20%至约55%、约20%至约50%、约20%至约45%、约20%至约40%、约20%至约35%、约20%至约30%、约25%至约100%、约25%至约95%、约25%至约90%、约25%至约85%、约25%至约80%、约25%至约75%、约25%至约70%、约25%至约65%、约25%至约60%、约25%至约55%、约25%至约50%、约25%至约45%、约25%至约40%或约25%至约35%包含而被鉴定为所包括的伪外显子的外显子。ENCODE数据(例如由Tilgner等人,2012,“Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs,”Genome Research 22(9):1616-25描述的)可用来帮助鉴定外显子包含。

[0102] 在一些实施方案中,使细胞接触与SCN1A前mRNA转录物的靶向部分互补的ASO,与不存在该ASO/不存在处理的情况下由细胞产生的蛋白质的量相比,导致所产生的SCN1A蛋白的量增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、80%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或1000%。在一些实施方案中,与对照化合物产生的靶蛋白的量相比,该反义寡聚体所接触的细胞产生的SCN1A蛋白的总量增加约1.1倍至约10倍、约1.5倍至约10倍、约2倍至约10倍、约3倍至约10倍、约4倍至约10倍、约1.1倍至约5倍、约

1.1倍至约6倍、约1.1倍至约7倍、约1.1倍至约8倍、约1.1倍至约9倍、约2倍至约5倍、约2倍至约6倍、约2倍至约7倍、约2倍至约8倍、约2倍至约9倍、约3倍至约6倍、约3倍至约7倍、约3倍至约8倍、约3倍至约9倍、约4倍至约7倍、约4倍至约8倍、约4倍至约9倍,至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。对照化合物可以是,例如,不与前mRNA的靶向部分互补的寡核苷酸。

[0103] 在一些实施方案中,使细胞接触与SCN1A前mRNA转录物的靶向部分互补的ASO,与在不存在该ASO/不存在处理的情况下由细胞产生的蛋白质的量相比,导致所产生的SCN1A蛋白的量降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、80%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或1000%。在一些实施方案中,与对照化合物产生的靶蛋白的量相比,该反义寡聚体所接触的细胞产生的SCN1A蛋白的总量降低约1.1倍至约10倍、约1.5倍至约10倍、约2倍至约10倍、约3倍至约10倍、约4倍至约10倍、约1.1倍至约5倍、约1.1倍至约6倍、约1.1倍至约7倍、约1.1倍至约8倍、约1.1倍至约9倍、约2倍至约5倍、约2倍至约6倍、约2倍至约7倍、约2倍至约8倍、约2倍至约9倍、约3倍至约6倍、约3倍至约7倍、约3倍至约8倍、约3倍至约9倍、约4倍至约7倍、约4倍至约8倍、约4倍至约9倍,至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。对照化合物可以是,例如,不与前mRNA的靶向部分互补的寡核苷酸。

[0104] 在一些实施方案中,使细胞接触与SCN1A前mRNA转录物的靶向部分互补的ASO,导致编码SCN1A的mRNA(包括编码靶蛋白的成熟mRNA)的量增加。在一些实施方案中,与在不存在该ASO/不存在处理的情况下由细胞所产生的蛋白质的量相比,编码SCN1A蛋白的mRNA或编码SCN1A蛋白的成熟mRNA的量增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、80%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或1000%。在一些实施方案中,与未处理的细胞例如未处理的细胞或用对照化合物处理的细胞中产生的成熟RNA的量相比,在反义寡聚体所接触的细胞中产生的编码SCN1A蛋白的mRNA或编码SCN1A蛋白的成熟mRNA的总量增加约1.1倍至约10倍、约1.5倍至约10倍、约2倍至约10倍、约3倍至约10倍、约4倍至约10倍、约1.1倍至约5倍、约1.1倍至约6倍、约1.1倍至约7倍、约1.1倍至约8倍、约1.1倍至约9倍、约2倍至约5倍、约2倍至约6倍、约2倍至约7倍、约2倍至约8倍、约2倍至约9倍、约3倍至约6倍、约3倍至约7倍、约3倍至约8倍、约3倍至约9倍、约4倍至约7倍、约4倍至约8倍、约4倍至约9倍,至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。对照化合物可以是,例如,不与含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分互补的寡核苷酸。

[0105] 在一些实施方案中,使细胞接触与SCN1A前mRNA转录物的靶向部分互补的ASO,导致编码SCN1A的mRNA(包括编码靶蛋白的成熟mRNA)的量降低。在一些实施方案中,与在不存在该ASO/不存在处理的情况下由细胞所产生的蛋白质的量相比,编码SCN1A蛋白的mRNA或编码SCN1A蛋白的成熟mRNA的量降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、80%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或1000%。在一些实施方案中,与未处理的细胞例如未处理的细胞或用对照化合物处理的细胞中产生的成熟RNA的量相比,在反义寡聚体所接触的细胞中产生的编码SCN1A蛋白的mRNA或编码SCN1A蛋白的成熟mRNA的总量降低约1.1倍至约10倍、约1.5倍至约10倍、约2倍至约10倍、约3倍至约10倍、约4倍至约10倍、约1.1倍至约5倍、约1.1倍至约6倍、约1.1倍至约7倍、约1.1倍至约8倍、约1.1倍至约9

倍、约2倍至约5倍、约2倍至约6倍、约2倍至约7倍、约2倍至约8倍、约2倍至约9倍、约3倍至约6倍、约3倍至约7倍、约3倍至约8倍、约3倍至约9倍、约4倍至约7倍、约4倍至约8倍、约4倍至约9倍,至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。对照化合物可以是,例如,不与含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分互补的寡核苷酸。

[0106] 所述NIE可以是任何长度。在一些实施方案中,该NIE包含内含子的完整序列,在这种情况下,这可以被称为内含子保留。在一些实施方案中,该NIE可以是内含子的一部分。在一些实施方案中,该NIE可以是包括5' ss序列的内含子的5'末端部分。在一些实施方案中,该NIE可以是包括3' ss序列的内含子的3'末端部分。在一些实施方案中,该NIE可以是不包含5' ss序列的内含子内的一部分。在一些实施方案中,该NIE可以是不包含3' ss序列的内含子内的一部分。在一些实施方案中,该NIE可以是不包含5' ss或3' ss序列的内含子内的一部分。在一些实施方案中,该NIE的长度可以是5个核苷酸至10个核苷酸、10个核苷酸至15个核苷酸、15个核苷酸至20个核苷酸、20个核苷酸至25个核苷酸、25个核苷酸至30个核苷酸、30个核苷酸至35个核苷酸、35个核苷酸至40个核苷酸、40个核苷酸至45个核苷酸、45个核苷酸至50个核苷酸、50个核苷酸至55个核苷酸、55个核苷酸至60个核苷酸、60个核苷酸至65个核苷酸、65个核苷酸至70个核苷酸、70个核苷酸至75个核苷酸、75个核苷酸至80个核苷酸、80个核苷酸至85个核苷酸、85个核苷酸至90个核苷酸、90个核苷酸至95个核苷酸或95个核苷酸至100个核苷酸。在一些实施方案中,该NIE的长度可以是至少10个核苷酸、至少20个核苷酸、至少30个核苷酸、至少40个核苷酸、至少50个核苷酸、至少60个核苷酸、至少70个核苷酸、至少80个核苷酸、至少90个核苷酸或至少100个核苷酸。在一些实施方案中,该NIE的长度可以是100至200个核苷酸、200至300个核苷酸、300至400个核苷酸、400至500个核苷酸、500至600个核苷酸、600至700个核苷酸、700至800个核苷酸、800至900个核苷酸、900至1,000个核苷酸。在一些实施方案中,该NIE的长度可以比1,000个核苷酸长。

[0107] 伪外显子的包含可导致移码以及在成熟mRNA转录物中引入提前终止密码子(PIC),从而使该转录物成为NMD的靶标。含有NIE的成熟mRNA转录物可以是不导致蛋白质表达的非生产性mRNA转录物。该PIC可以存在于NIE下游的任何位置。在一些实施方案中,该PIC可以存在于NIE下游的任何外显子中。在一些实施方案中,该PIC可以存在于NIE内。例如,在由SCN1A基因编码的mRNA转录物中包含外显子20x可以诱导mRNA转录物中的PIC,例如mRNA转录物的外显子21中的PIC。

#### 治疗剂

[0108] 在本公开的多个实施方案中,提供了包含治疗剂的组合物和方法,以调节SCN1A的蛋白质表达水平。在一些实施方案中,本文提供了用来调节SCN1A前mRNA的另路剪接的组合物和方法。在一些实施方案中,本文提供了用来在SCN1A前mRNA的剪接中诱导外显子跨越,例如在SCN1A前mRNA的剪接期间诱导伪外显子的跨越的组合物和方法。在其他实施方案中,治疗剂可用来诱导外显子的包含,以便降低蛋白质表达水平。

[0109] 在一些实施方案中,本文公开的治疗剂是小分子、多肽或多核酸聚合物。在一些情况下,该治疗剂是小分子。在一些情况下,该治疗剂是多肽。在一些情况下,该治疗剂是多核酸聚合物。在一些情况下,该治疗剂是阻抑剂。在一些情况下,该治疗剂是增强剂。

[0110] 本文公开的治疗剂可以是NIE阻抑剂。治疗剂可包含多核酸聚合物。

[0111] 根据本公开的一个方面,本文提供了一种治疗或预防与功能性SCN1A蛋白缺乏相关的病况的方法,其包括向受试者施用NIE阻抑剂,以增加功能性SCN1A蛋白的水平,其中该试剂与前mRNA转录物的区域结合,以减少成熟转录物中NIE的包含。例如,本文提供了一种治疗或预防与功能性SCN1A蛋白缺乏相关的病况的方法,其包括向受试者施用NIE阻抑剂,以增加功能性SCN1A蛋白的水平,其中该试剂与前mRNA转录物的含有NIE的内含子(例如,人SCN1A基因中的内含子20)的区域结合,或与同一内含子中的NIE激活调节序列结合。

[0112] 当提及减少成熟mRNA中的NIE包含时,该减少可以是完全的,例如100%,或者可以是部分的。该减少可以是临床上有意义的。该减少/纠正可以相对于未经治疗的受试者中的NIE包含水平,或者相对于相似受试者的群体中的NIE含量。该减少/纠正可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少低10%的NIE包含。该减少可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少低20%的NIE包含。该减少可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少低40%的NIE包含。该减少可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少低50%的NIE包含。该减少可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少低60%的NIE包含。该减少可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少低80%的NIE包含。该减少可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少低90%的NIE包含。

[0113] 当提及增加活性SCN1A蛋白水平时,该增加可以是临床上有意义的。该增加可以相对于未经治疗的受试者中的活性SCN1A蛋白水平,或者相对于相似受试者的群体中的活性SCN1A蛋白量。该增加可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少多10%的活性SCN1A蛋白。该增加可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少多20%的活性SCN1A蛋白。该增加可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少多40%的活性SCN1A蛋白。该增加可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少多50%的活性SCN1A蛋白。该增加可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少多80%的活性SCN1A蛋白。该增加可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少多100%的活性SCN1A蛋白。该增加可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少多200%的活性SCN1A蛋白。该增加可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少多500%的活性SCN1A蛋白。

[0114] 在其中NIE阻抑剂包含多核酸聚合物的实施方案中,该多核酸聚合物的长度可以是约50个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约45个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约40个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约35个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约30个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约24个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约25个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约20个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约19个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约18个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约17个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约16个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约15个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约14个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约13个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约12个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约11个核苷酸。

该多核酸聚合物的长度可以是约10个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约50个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约45个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约40个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约35个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约30个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以

是约10个至约25个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约20个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约15个至约25个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约15个至约30个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约12个至约30个核苷酸。

[0115] 该多核酸聚合物的序列可以与mRNA转录物的靶序列,例如部分加工的mRNA转录物至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%互补。该多核酸聚合物的序列可以与前mRNA转录物的靶序列100%互补。

[0116] 该多核酸聚合物的序列可以与前mRNA转录物的靶序列具有4个或更少的错配。该多核酸聚合物的序列可以与前mRNA转录物的靶序列具有3个或更少的错配。该多核酸聚合物的序列可以与前mRNA转录物的靶序列具有2个或更少的错配。该多核酸聚合物的序列可以与前mRNA转录物的靶序列具有1个或更少的错配。该多核酸聚合物的序列可以与前mRNA转录物的靶序列不具有错配。

[0117] 该多核酸聚合物可以与前mRNA转录物的靶序列特异性杂交。例如,该多核酸聚合物可以与前mRNA转录物的靶序列具有91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%的序列互补性。该杂交可以在高严格性杂交条件下。

[0118] 该多核酸聚合物可以具有与选自SEQ ID NO:21-67的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%序列同一性的序列。该多核酸聚合物可以具有与选自SEQ ID NO:21-67的序列具有100%序列同一性的序列。在一些情况下,该多核酸聚合物可以具有与选自SEQ ID NO:68-114的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%序列同一性的序列。在一些情况下,该多核酸聚合物可以具有与选自SEQ ID NO:68-114的序列具有100%序列同一性的序列。

[0119] 当提及多核酸聚合物序列时,技术人员将理解,在该序列中可以容许一个或多个置换,任选地两个置换,以使其保持与靶序列杂交的能力;或者在该置换处于靶序列中的情况下,被识别为靶序列的能力。可以通过BLAST序列比对,使用标准/默认参数,来确定对序列同一性的提及。例如,根据本公开,该序列可以具有99%的同一性并且仍然起作用。在其他实施方案中,根据本公开,该序列可以具有98%的同一性并且仍然起作用。在另一个实施方案中,根据本公开,该序列可以具有95%的同一性并且仍然起作用。在另一个实施方案中,根据本公开,该序列可以具有90%的同一性并且仍然起作用。

#### 反义寡聚体

[0120] 本文提供了一种包含反义寡聚体的组合物,该反义寡聚体通过与含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分结合而诱导外显子跨越。如本文所用的,术语“ASO”和“反义寡聚体”可互换使用,并且指包含核碱基的寡聚体如多核苷酸,该寡聚体通过Watson-Crick碱基配对或摆动碱基配对(G-U)与靶核酸(例如,含有NIE的SCN1A前mRNA)序列杂交。ASO可具有互补于靶序列的确切序列或近似的互补性(例如,足以结合靶序列并加强剪接位点处的剪接的互补性)。将ASO设计为使得它们与靶核酸(例如,前mRNA转录物的靶向部分)结合(杂交)并在生理条件下保持杂交。通常,如果它们与预期(靶向)核酸序列之外的位点杂交,则它们与有限数目的非靶核酸的序列(除靶核酸之外的一些位点)杂交。ASO的设计可以考虑存在前mRNA转录物的靶向部分的核酸序列,或基因组或细胞前mRNA或转录组中其他位置上足够类

似的核酸序列,使得ASO将结合其他位点并引起“脱靶”效应的可能性受到限制。本领域已知的,例如在作为W0 2015/035091公开的名称为“Reducing Nonsense-Mediated mRNA Decay”的PCT申请PCT/US2014/054151(其通过引用并入本文)中的任何反义寡聚体可用来实施本文所述的方法。

[0121] 在一些实施方案中,ASO与靶核酸或含有NIE的前mRNA的靶向部分“特异性杂交”或对其为“特异性的”。通常,此类杂交的发生伴随着基本大于37℃,优选至少50℃,并且通常为60℃至约90℃的 $T_m$ 。这样的杂交优选对应于严格杂交条件。在给定的离子强度和pH下, $T_m$ 为50%的靶序列与互补寡核苷酸杂交时的温度。

[0122] 当杂交在两个单链多核苷酸之间以反平行构型发生时,寡聚体如寡核苷酸彼此“互补”。如果杂交可在第一多核苷酸的一条链与第二多核苷酸之间发生,则双链多核苷酸可以与另一个多核苷酸“互补”。互补性(一个多核苷酸与另一个多核苷酸互补的程度)是按照相对链中根据普遍接受的碱基配对原则预计彼此形成氢键的碱基的比例(例如,百分比)而可量化的。反义寡聚体(ASO)的序列不必与其靶核酸的序列100%互补才能杂交。在某些实施方案中,ASO可包含与其靶向的靶核酸序列内的靶区域至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列互补性。例如,寡聚体化合物的20个核碱基中的18个与靶区域互补并将因此特异性杂交的ASO将表现出90%的互补性。在该实例中,其余非互补的核碱基可以聚集在一起或散布于互补的核碱基,而不必彼此相接或与互补的核碱基相接。可以常规地使用BLAST程序(基本局部比对检索工具)和本领域已知的PowerBLAST程序(Altschul等人,J.Mol.Biol.,1990,215,403-410;Zhang和Madden,Genome Res.,1997,7,649-656)来确定ASO与靶核酸的区域的互补性百分比。

[0123] ASO不需要与靶序列中的所有核碱基都杂交,并且与之杂交的核碱基可以是连续的或不连续的。ASO可以在前mRNA转录物的一个或多个区段上杂交,使得间插或相邻的区段不参与该杂交事件(例如,可形成环结构或发夹结构)。在某些实施方案中,ASO与目标前mRNA转录物中的不连续核碱基杂交。例如,ASO可以与前mRNA转录物中被不与ASO杂交的一个或多个核碱基隔开的核碱基杂交。

[0124] 本文所述的ASO包含与在含有NIE的前mRNA的靶向部分中存在的核碱基互补的核碱基。术语ASO体现为寡核苷酸以及其他任何包含能够与靶mRNA上的互补核碱基杂交的核碱基但不含糖部分如肽核酸(PNA)的寡聚体分子。ASO可包含天然存在的核苷酸、核苷酸类似物、修饰的核苷酸或前述两个或三个的任意组合。术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“修饰的核苷酸”包括具有修饰的或取代的糖基团和/或具有修饰的骨架的核苷酸。在一些实施方案中,ASO的所有核苷酸都是修饰的核苷酸。与本文所述的方法和组合物相容的ASO的化学修饰或ASO的组分对于本领域技术人员将是显而易见的,并且可见于例如美国专利8,258,109B2、美国专利5,656,612、美国专利公开2012/0190728以及Dias和Stein,Mol.Cancer Ther.2002,347-355,其通过引用整体并入本文。

[0125] ASO的一个或多个核碱基可以是任何天然存在的、未修饰的核碱基,如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶,或任何合成或修饰的核碱基,其十分类似于未修饰的核碱基,使其能够与靶前mRNA上存在的核碱基发生氢键键合。修饰的核碱基的实例包括但不限于次黄嘌呤、黄嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5,6-二氢尿嘧啶、5-甲基胞嘧啶和5-羟甲基胞嘧啶。

[0126] 本文所述的ASO还包含连接寡聚体的组分的骨架结构。术语“骨架结构”和“寡聚体连接”可互换使用,并指ASO的单体之间的连接。在天然存在的寡核苷酸中,骨架包含连接寡聚体的糖部分的3'-5'磷酸二酯键。本文所述的ASO的骨架结构或寡聚体连接可包括(但不限于)硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、phosphoroanilothioate、phosphoraniladate、氨基磷酸酯等。参见,例如,LaPlanche等人,Nucleic Acids Res.14:9081 (1986);Stec等人,J.Am.Chem.Soc.106:6077 (1984),Stein等人,Nucleic Acids Res.16:3209 (1988),Zon等人,Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991);Zon等人,Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach,pp.87-108 (F.Eckstein,Ed.,Oxford University Press,Oxford England (1991));Stec等人,美国专利5,151,510;Uhlmann和Peyman,Chemical Reviews 90:543 (1990)。在一些实施方案中,ASO的骨架结构不含磷而含有肽键,例如在肽核酸(PNA)中,或含有连接基团,包括氨基甲酸酯、酰胺以及直链和环状烃基团。在一些实施方案中,骨架修饰是硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,骨架修饰是氨基磷酸酯键。

[0127] 在实施方案中,在ASO骨架的每个磷核苷酸间键处的立体化学是随机的。在实施方案中,在ASO骨架的每个磷核苷酸间键处的立体化学是受控的并且不是随机的。例如,公开号为2014/0194610的美国专利申请,“Methods for the Synthesis of Functionalized Nucleic Acids”(其通过引用并入本文)描述了用于独立选择核酸寡聚体中每个磷原子处手性(chirality)的偏性(handedness)的方法。在实施方案中,在本发明方法中使用的ASO(包括但不限于本文表5和表6中所示的任何ASO)包括具有非随机的磷核苷酸间键的ASO。在实施方案中,在本发明方法中使用的组合物包含纯的非对映异构ASO。在实施方案中,在本发明方法中使用的组合物包含非对映异构体纯度为至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、约100%、约90%至约100%、约91%至约100%、约92%至约100%、约93%至约100%、约94%至约100%、约95%至约100%、约96%至约100%、约97%至约100%、约98%至约100%或约99%至约100%的ASO。

[0128] 在实施方案中,所述ASO在其磷核苷酸间键处具有Rp和Sp构型的非随机混合物。例如,已经提出,在反义寡核苷酸中需要Rp和Sp的混合物以实现良好活性与核酸酶稳定性之间的平衡(Wan等人,2014,“Synthesis,biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages,”Nucleic Acids Research 42(22):13456-13468,其通过引用并入本文)。在实施方案中,在本发明的方法中使用的ASO(包括但不限于本文SEQ ID NO:21-114中所示的任何ASO)包含约5%-100%Rp、至少约5%Rp、至少约10%Rp、至少约15%Rp、至少约20%Rp、至少约25%Rp、至少约30%Rp、至少约35%Rp、至少约40%Rp、至少约45%Rp、至少约50%Rp、至少约55%Rp、至少约60%Rp、至少约65%Rp、至少约70%Rp、至少约75%Rp、至少约80%Rp、至少约85%Rp、至少约90%Rp或至少约95%Rp(其余为Sp),或约100%Rp。在实施方案中,在本发明的方法中使用的ASO(包括但不限于本文SEQ ID NO:21-114中所示的任何ASO)包含约10%至约100%Rp、约15%至约100%Rp、约20%至约100%Rp、约25%至约100%Rp、约30%至约100%Rp、约35%至约100%Rp、约40%至约100%Rp、约45%至约100%Rp、约50%至约100%Rp、约55%至约100%Rp、约60%至约100%Rp、约65%



至约100%Rp、约70%至约100%Rp、约75%至约100%Rp、约80%至约100%Rp、约85%至约100%Rp、约90%至约100%Rp或约95%至约100%Rp、约20%至约80%Rp、约25%至约75%Rp、约30%至约70%Rp、约40%至约60%Rp或约45%至约55%Rp,其余为Sp。

[0129] 在实施方案中,在本发明的方法中使用的ASO(包括但不限于本文SEQ ID NO:21-114中所示的任何ASO)包含约5%-100%Sp、至少约5%Sp、至少约10%Sp、至少约15%Sp、至少约20%Sp、至少约25%Sp、至少约30%Sp、至少约35%Sp、至少约40%Sp、至少约45%Sp、至少约50%Sp、至少约55%Sp、至少约60%Sp、至少约65%Sp、至少约70%Sp、至少约75%Sp、至少约80%Sp、至少约85%Sp、至少约90%Sp或至少约95%Sp(其余为Rp),或约100%Sp。在实施方案中,在本发明的方法中使用的ASO(包括但不限于本文SEQ ID NO:21-114中所示的任何ASO)包含约10%至约100%Sp、约15%至约100%Sp、约20%至约100%Sp、约25%至约100%Sp、约30%至约100%Sp、约35%至约100%Sp、约40%至约100%Sp、约45%至约100%Sp、约50%至约100%Sp、约55%至约100%Sp、约60%至约100%Sp、约65%至约100%Sp、约70%至约100%Sp、约75%至约100%Sp、约80%至约100%Sp、约85%至约100%Sp、约90%至约100%Sp或约95%至约100%Sp、约20%至约80%Sp、约25%至约75%Sp、约30%至约70%Sp、约40%至约60%Sp或约45%至约55%Sp,其余为Rp。

[0130] 本文所述的任何ASO可含有包含如天然存在的核苷酸中存在的核糖或脱氧核糖的糖部分,或含有包括吗啉环在内的经修饰的糖部分或糖类似物。经修饰的糖部分的非限制性实例包括2'取代,如2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2' MOE)、2'-O-氨基乙基、2' F;N3'->P5' 氨基磷酸酯、2' 二甲基氨基氧基乙氧基、2' 二甲基氨基乙氧基乙氧基、2'-胍、2'-O-胍乙基、氨基甲酸酯修饰的糖和双环修饰的糖。在一些实施方案中,该糖部分修饰选自2'-O-Me、2' F和2' MOE。在一些实施方案中,该糖部分修饰是额外的桥键,如在锁定核酸(LNA)中。在一些实施方案中,该糖类似物含有吗啉环,如二氨基磷酸酯吗啉代(PMO)。在一些实施方案中,该糖部分包含呋喃核糖基或2' 呋喃脱氧核糖基修饰。在一些实施方案中,该糖部分包含2' 4'-约束的2' O-甲基氧基乙基(cMOE)修饰。在一些实施方案中,该糖部分包含cEt 2',4'约束的2' O-乙基BNA修饰。在一些实施方案中,该糖部分包含三环DNA(tcDNA)修饰。在一些实施方案中,该糖部分包含乙烯核酸(ENA)修饰。在一些实施方案中,该糖部分包含MCE修饰。修饰是本领域已知的并且描述在文献中,例如,Jarver等人,2014,“A Chemical View of Oligonucleotides for Exon Skipping and Related Drug Applications,” Nucleic Acid Therapeutics 24(1):37-47,其为了本文中的目的通过引用并入本文。

[0131] 在一些实施方案中,ASO的每个单体以相同的方式进行修饰,例如ASO的骨架的每个连接包含硫代磷酸酯键,或者每个核糖糖部分包含2' O-甲基修饰。存在于ASO的每个单体组分上的此类修饰被称为“均一修饰”。在一些实例中,可能需要不同修饰的组合,例如,ASO可包含二氨基磷酸酯键和含有吗啉环(吗啉代)的糖部分的组合。ASO的不同修饰的组合被称为“混合修饰”或“混合化学”。

[0132] 在一些实施方案中,所述ASO包含一个或多个骨架修饰。在一些实施方案中,该ASO包含一个或多个糖部分修饰。在一些实施方案中,该ASO包含一个或多个骨架修饰和一个或多个糖部分修饰。在一些实施方案中,该ASO包含2' MOE修饰和硫代磷酸酯骨架。在一些实施方案中,该ASO包含二氨基磷酸酯吗啉代(PMO)。在一些实施方案中,该ASO包含肽核酸(PNA)。本文所述的任何ASO或ASO的任何组分(例如,核碱基、糖部分、骨架)均可被修饰,以

便获得ASO的所需性质或活性,或减少ASO的不希望的性质或活性。例如,ASO或任何ASO的一种或多种组分可被修饰为增强对前mRNA转录物上的靶序列的结合亲和力;减少与任何非靶序列的结合;减少被细胞核酸酶(即,RNA酶H)的降解;改善ASO向细胞中和/或向细胞的细胞核中的吸收;改变ASO的药代动力学或药效学;以及/或者调节ASO的半衰期。

[0133] 在一些实施方案中,所述ASO由2'-O-(2-甲氧基乙基)(MOE)硫代磷酸酯修饰的核苷酸组成。由此类核苷酸组成的ASO尤其适合于本文公开的方法;具有此类修饰的寡聚体已显示出具有显著增强的对核酸酶降解的抗性和增加的生物利用度,使得它们适合于例如在本文所述的一些实施方案中的口服递送。参见,例如,Geary等人,J Pharmacol Exp Ther.2001;296(3):890-7;Geary等人,J Pharmacol Exp Ther.2001;296(3):898-904。

[0134] 本领域技术人员会知晓合成ASO的方法。备选地或另外地,ASO可从商业来源获得。

[0135] 除非另外指出,否则单链核酸(例如,前mRNA转录物、寡核苷酸、ASO等)序列的左手端为5'末端,并且单链或双链核酸序列的左手方向被称为5'方向。类似地,核酸序列(单链或双链)的右手端或右手方向为3'末端或3'方向。通常,核酸中在参考点的5'侧的区域或序列被称为“上游”,而核酸中在参考点的3'侧的区域或序列被称为“下游”。通常,mRNA的5'方向或5'末端是启动或起始密码子所处的位置,而3'末端或3'方向是终止密码子所处的位置。在一些方面,核酸中在参考点上游的核苷酸可以用负数表示,而在参考点下游的核苷酸则可以用正数表示。例如,参考点(例如,mRNA中的外显子-外显子接合点)可以被表示为“零”位点,并且与该参考点直接相邻且在其上游的核苷酸被表示为“负一”,例如,“-1”,而与该参考点直接相邻且在其下游的核苷酸被表示为“正一”,例如,“+1”。

[0136] 在一些实施方案中,所述ASO互补于(且结合)含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分,该靶向部分在含有NIE的SCN1A前mRNA中所包括的外显子的5'剪接位点(或NIE的3'末端)的下游(在3'方向)(例如,相对于5'剪接位点的以正数表示的方向)。在一些实施方案中,该ASO互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分,该靶向部分在相对于所包括的外显子的5'剪接位点(或3'末端)的约+1至约+500区域内。在一些实施方案中,该ASO可互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分,该靶向部分在相对于所包括的外显子的5'剪接位点(或3'末端)的+6至+496核苷酸之间的区域内。在一些方面,该ASO互补于在相对于所包括的外显子的5'剪接位点(或3'末端)的约+1至约+500、约+1至约+490、约+1至约+480、约+1至约+470、约+1至约+460、约+1至约+450、约+1至约+440、约+1至约+430、约+1至约+420、约+1至约+410、约+1至约+400、约+1至约+390、约+1至约+380、约+1至约+370、约+1至约+360、约+1至约+350、约+1至约+340、约+1至约+330、约+1至约+320、约+1至约+310、约+1至约+300、约+1至约+290、约+1至约+280、约+1至约+270、约+1至约+260、约+1至约+250、约+1至约+240、约+1至约+230、约+1至约+220、约+1至约+210、约+1至约+200、约+1至约+190、约+1至约+180、约+1至约+170、约+1至约+160、约+1至约+150、约+1至约+140、约+1至约+130、约+1至约+120、约+1至约+110、约+1至约+100、约+1至约+90、约+1至约+80、约+1至约+70、约+1至约+60、约+1至约+50、约+1至约+40、约+1至约+30或约+1至约+20区域内的靶向部分。在一些方面,该ASO互补于在相对于所包括的外显子的5'剪接位点(或3'末端)的约+1至约+100、约+100至约+200、约+200至约+300、约+300至约+400或约+400至约+500区域内的靶向部分。

[0137] 在一些实施方案中,所述ASO互补于(且结合)含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分,该靶向部分在含有NIE的SCN1A前mRNA中所包括的外显子的5'剪接位点(或3'末端)的上游

(在5' 方向)(例如,相对于5' 剪接位点的以负数表示的方向)。在一些实施方案中,该ASO互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分,该靶向部分在相对于所包括的外显子的5' 剪接位点(或3' 末端)的约-4至约-270区域内。在一些实施方案中,该ASO可互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分,该靶向部分在相对于所包括的外显子的5' 剪接位点(或3' 末端)的-1至-264核苷酸之间的区域内。在一些方面,该ASO互补于在相对于所包括的外显子的5' 剪接位点(或3' 末端)的约-1至约-270、约-1至约-260、约-1至约-250、约-1至约-240、约-1至约-230、约-1至约-220、约-1至约-210、约-1至约-200、约-1至约-190、约-1至约-180、约-1至约-170、约-1至约-160、约-1至约-150、约-1至约-140、约-1至约-130、约-1至约-120、约-1至约-110、约-1至约-100、约-1至约-90、约-1至约-80、约-1至约-70、约-1至约-60、约-1至约-50、约-1至约-40、约-1至约-30或约-1至约-20区域内的靶向部分。在一些方面,该ASO互补于在相对于所包括的外显子的5' 剪接位点(或3' 末端)的约-1至约-50、约-50至约-100、约-100至约-150、约-150至约-200或约-200至约-250区域内的靶向部分。

[0138] 在一些实施方案中,所述ASO互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分,该靶向部分在含有NIE的SCN1A前mRNA中所包括的外显子的3' 剪接位点(或5' 末端)的上游(在5' 方向)(例如,以负数表示的方向)。在一些实施方案中,该ASO互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分,该靶向部分在相对于所包括的外显子的3' 剪接位点(或5' 末端)的约-1至约-500区域内。在一些实施方案中,该ASO互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分,该靶向部分在相对于所包括的外显子的3' 剪接位点的-1至-496区域内。在一些方面,该ASO互补于在相对于所包括的外显子的3' 剪接位点的约-1至约-500、约-1至约-490、约-1至约-480、约-1至约-470、约-1至约-460、约-1至约-450、约-1至约-440、约-1至约-430、约-1至约-420、约-1至约-410、约-1至约-400、约-1至约-390、约+1至约+380、约-1至约-370、约-1至约-360、约-1至约-350、约-1至约-340、约-1至约-330、约-1至约-320、约-1至约-310、约-1至约-300、约-1至约-290、约-1至约-280、约-1至约-270、约-1至约-260、约-1至约-250、约-1至约-240、约-1至约-230、约-1至约-220、约-1至约-210、约-1至约-200、约-1至约-190、约-1至约-180、约-1至约-170、约-1至约-160、约-1至约-150、约-1至约-140、约-1至约-130、约-1至约-120、约-1至约-110、约-1至约-100、约-1至约-90、约-1至约-80、约-1至约-70、约-1至约-60、约-1至约-50、约-1至约-40或约-1至约-30区域内的靶向部分。在一些方面,该ASO互补于在相对于所包括的外显子的3' 剪接位点的约-1至约-100、约-100至约-200、约-200至约-300、约-300至约-400或约-400至约-500区域内的靶向部分。

[0139] 在一些实施方案中,所述ASO互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分,该靶向部分在含有NIE的SCN1A前mRNA中所包括的外显子的3' 剪接位点(5' 末端)的下游(在3' 方向)(例如,以正数表示的方向)。在一些实施方案中,该ASO互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分,该靶向部分在相对于所包括的外显子的3' 剪接位点的约+1至约+100区域内。在一些方面,该ASO互补于在相对于所包括的外显子的3' 剪接位点的约+1至约+90、约+1至约+80、约+1至约+70、约+1至约+60、约+1至约+50、约+1至约+40、约+1至约+30、约+1至约+20或约+1至约+10区域内的靶向部分。

[0140] 在一些实施方案中,含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分在相对于所包括的外显子的5' 剪接位点(3' 末端)的+100至相对于所包括的外显子的3' 剪接位点(5' 末端)的-100的区域内。在一些实施方案中,所述含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分在NIE内。在一些实施

方案中,所述含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分包含伪外显子和内含子边界。

[0141] 所述ASO可以是适合于特异性结合和有效增强剪接的任何长度。在一些实施方案中,该ASO由8至50个核碱基组成。例如,该ASO的长度可以是8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45或50个核碱基。在一些实施方案中,该ASO由多于50个核碱基组成。在一些实施方案中,该ASO的长度为8至50个核碱基、8至40个核碱基、8至35个核碱基、8至30个核碱基、8至25个核碱基、8至20个核碱基、8至15个核碱基、9至50个核碱基、9至40个核碱基、9至35个核碱基、9至30个核碱基、9至25个核碱基、9至20个核碱基、9至15个核碱基、10至50个核碱基、10至40个核碱基、10至35个核碱基、10至30个核碱基、10至25个核碱基、10至20个核碱基、10至15个核碱基、11至50个核碱基、11至40个核碱基、11至35个核碱基、11至30个核碱基、11至25个核碱基、11至20个核碱基、11至15个核碱基、12至50个核碱基、12至40个核碱基、12至35个核碱基、12至30个核碱基、12至25个核碱基、12至20个核碱基、12至15个核碱基、13至50个核碱基、13至40个核碱基、13至35个核碱基、13至30个核碱基、13至25个核碱基、13至20个核碱基、14至50个核碱基、14至40个核碱基、14至35个核碱基、14至30个核碱基、14至25个核碱基、14至20个核碱基、15至50个核碱基、15至40个核碱基、15至35个核碱基、15至30个核碱基、15至25个核碱基、15至20个核碱基、20至50个核碱基、20至40个核碱基、20至35个核碱基、20至30个核碱基、20至25个核碱基、25至50个核碱基、25至40个核碱基、25至35个核碱基或25至30个核碱基。在一些实施方案中,该ASO的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,该ASO的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,该ASO的长度为25个核苷酸。

[0142] 在一些实施方案中,使用具有不同化学但与含有NIE的前mRNA的相同靶向部分互补的两个或更多个ASO。在一些实施方案中,使用与含有NIE的前mRNA的不同靶向部分互补的两个或更多个ASO。

[0143] 在实施方案中,本发明的反义寡核苷酸经化学连接至一个或多个部分或缀合物,例如,增强该寡核苷酸的活性或细胞摄取的靶向部分或其他缀合物。此类部分包括但不限于脂质部分,例如,胆固醇部分、胆固醇基部分、脂肪链,例如,十二烷二醇或十一烷基残基、多胺或聚乙二醇链或金刚烷乙酸。在公开的文献中已经描述了包含亲脂性部分的寡核苷酸和制备方法。在实施方案中,该反义寡核苷酸与某部分缀合,该部分包括但不限于无碱基核苷酸、聚醚、多胺、聚酰胺、肽、碳水化合物,例如,N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)、N-Ac-葡萄糖胺(GluNAc)或甘露糖(例如,甘露糖-6-磷酸)、脂质或聚烃化合物。如本领域所理解的和文献中所描述的,例如可使用连接体将缀合物与构成反义寡核苷酸的任何核苷酸中的一个或多个在糖、碱基或磷酸基团上若干位置中的任何位置处连接。连接体可包括二价或三价分支连接体。在实施方案中,该缀合物附接至该反义寡核苷酸的3'末端。制备寡核苷酸缀合物的方法描述于例如美国专利8,450,467,“Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides”中,其通过引用并入本文。

[0144] 在一些实施方案中,被ASO靶向的核酸是在细胞如真核细胞中表达的含有NIE的SCN1A前mRNA。在一些实施方案中,术语“细胞”可指细胞群体。在一些实施方案中,该细胞在受试者中。在一些实施方案中,该细胞从受试者中分离。在一些实施方案中,该细胞是离体的。在一些实施方案中,该细胞是病况或疾病相关的细胞或细胞系。在一些实施方案中,该细胞是体外的(例如,在细胞培养物中)。

### 药物组合物

[0145] 包含所述组合物的药剂,例如反义寡核苷酸且用于任何所述方法的药物组合物或制剂可根据制药工业中公知的和公开文献中描述的常规技术进行制备。在实施方案中,用于治疗受试者的药物组合物或制剂包含有效量的本文所述的任何反义寡聚体,或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或酯。包含反义寡聚体的药物制剂可进一步包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0146] 药学上可接受的盐适用于与人和低等动物的组织相接触而没有不当的毒性、刺激、变态反应等,并且对应合理的受益/风险比。参见,例如,S.M.Berge等人,J.Pharmaceutical Sciences,66:1-19(1977),其为了此目的通过引用并入本文。所述盐可以在化合物的最终分离和纯化期间原位制备,或通过使游离碱官能与合适的有机酸反应而单独制备。药学上可接受的、无毒的酸加成盐的实例是氨基与诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸等无机酸或与诸如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸等有机酸所形成的盐,或通过利用其他记录的方法如离子交换形成的盐。其他药学上可接受的盐包括己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐(pectinate)、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁盐等。适当时,另外的药学上可接受的盐包括利用诸如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低级烷基磺酸根和芳基磺酸根等抗衡离子与铵、季铵和胺阳离子形成的无毒盐。

[0147] 在实施方案中,将组合物配制为许多可能剂型中的任何一种,例如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。在实施方案中,将组合物在水性、非水性或混合介质中配制为悬浮液。水性悬浮液可进一步含有增加该悬浮液的粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。该悬浮液还可以含有稳定剂。在实施方案中,本发明的药物制剂或组合物包括但不限于溶液、乳液、微乳液、泡沫或含脂质体的制剂(例如,阳离子型或非阳离子型脂质体)。

[0148] 本文所述的药物组合物或制剂可包含适当的且本领域技术人员公知的或公开文献中描述的一种或多种渗透促进剂、载体、赋形剂或其他活性或非活性成分。在实施方案中,脂质体还包括空间稳定的脂质体,例如,包含一种或多种特化脂质的脂质体。这些特化脂质导致具有延长的循环寿命的脂质体。在实施方案中,空间稳定的脂质体包含一种或多种糖酯,或用一种或多种亲水性聚合物如聚乙二醇(PEG)部分来衍生化。在实施方案中,所述药物制剂或组合物中包含表面活性剂。在药物产品、制剂和乳液中使用表面活性剂是本领域公知的。在实施方案中,本发明采用渗透促进剂来实现反义寡核苷酸的有效递送,例如,以帮助跨细胞膜的扩散和/或加强亲脂性药物的渗透性。在实施方案中,该渗透促进剂是表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂或非螯合非表面活性剂。

[0149] 在实施方案中,所述药物制剂包含多种反义寡核苷酸。在实施方案中,该反义寡核

苷酸与另一种药物或治疗剂联合施用。

#### 联合疗法

[0150] 在一些实施方案中,本公开中公开的ASO可以与一种或多种另外的治疗剂联合使用。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂可包含小分子。例如,所述一种或多种另外的治疗剂可包含W02016128343A1、W02017053982A1、W02016196386A1、W0201428459A1、W0201524876A2、W02013119916A2和W02014209841A2中描述的小分子,这些申请通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂包含可用来纠正内含子保留的ASO。在一些实施方案中,所述一种或多种其他治疗剂选自表1a或表1b中列出的ASO。

表1a. 用来纠正内含子保留的示例性ASO

SEQ ID NO:	名称	序列(5'-3')	保留的内含子
115	SCN1A-IVS21+6	CAGAGAAAAUAGUGUUCA	21
116	SCN1A-IVS21+11	AUAUUCAGAGAAAAUAGU	21
117	SCN1A-IVS21+16	UAAAAAUUUCAGAGAAA	21
118	SCN1A-IVS21+21	AACAAUAAAAAUUUCAG	21
119	SCN1A-IVS21+26	UUCCAAACAAUAAAAUA	21
120	SCN1A-IVS21+31	UAUUAUUCCAAACAAUAA	21
121	SCN1A-IVS21+36	UUUGUUAUUUUCCAAAC	21
122	SCN1A-IVS21+41	AUUUUUUUGUUAUUUUC	21
123	SCN1A-IVS21+46	AUGUCAUUUUUUGUUAU	21
124	SCN1A-IVS21+51	GAUGUAUGUCAUUUUUU	21
125	SCN1A-IVS21+56	UAAUAGAUGUAUGUCAU	21
126	SCN1A-IVS21+61	CUAAAUAAUAGAUGUAUG	21
127	SCN1A-IVS21+66	AGGAACUAAAUAAUAGAU	21
128	SCN1A-IVS21+71	UUCUUAGGAACUAAUAA	21
129	SCN1A-IVS21+76	ACUUUUUCUUAGGAACUA	21
130	SCN1A-IVS21+81	UAUAUACUUUUUCUUAGG	21
131	SCN1A-IVS21-16	UGCAUGUUUUACUUUGGA	21
132	SCN1A-IVS21-21	GUUUUACUUUGGAGUAAA	21
133	SCN1A-IVS21-26	ACUUUGGAGUAAAAUAA	21
134	SCN1A-IVS21-31	GGAGUAAAAUAAUUUAG	21
135	SCN1A-IVS21-36	AAAAAUAAUUUAGACCUG	21
136	SCN1A-IVS21-41	UAAUUUAGACCUGAUGUU	21

SEQ ID NO:	名称	序列(5'-3')	保留的内含子
137	SCN1A-IVS21-46	UAGACCUGAUGUUUAAUA	21
138	SCN1A-IVS21-51	CUGAUGUUUAAUAAAU	21
139	SCN1A-IVS21-56	GUUUAAUAAAUUUCUUA	21
140	SCN1A-IVS21-61	AUAAAUUUCUACUGAU	21
141	SCN1A-IVS21-66	UAUUCUACUGAUUAAU	21
142	SCN1A-IVS21-71	UUACUGAUUAAUUUCA	21
143	SCN1A-IVS21-76	GAUAAUUUUCAAAGG	21
144	SCN1A-IVS21-81	AAUUUCAAAGGGAAUA	21
145	SCN1A-IVS21-27	CUUUGGAGUAAAAUAAU	21
146	SCN1A-IVS21-28	UUUGGAGUAAAAUAAU	21
148	SCN1A-IVS21-29	UUGGAGUAAAAUAAUU	21
149	SCN1A-IVS21-30	UGGAGUAAAAUAAUUUA	21
150	SCN1A-IVS21-32	GAGUAAAAUAAUUAGA	21
151	SCN1A-IVS21-33	AGUAAAAUAAUUAGAC	21
152	SCN1A-IVS21-34	GUAAAAUAAUUAGACC	21
153	SCN1A-IVS21-35	UAAAAUAAUUAGACCU	21
154	SCN1A-IVS21-72	UACUGAUUAAUUUCA	21
155	SCN1A-IVS21-73	ACUGAUUAAUUUCA	21
156	SCN1A-IVS21-74	CUGAUUAAUUUCA	21
157	SCN1A-IVS21-75	UGAUUAAUUUCAAG	21
158	SCN1A-IVS21-77	AUAUAAUUUCAAGGG	21
159	SCN1A-IVS21-78	UAUAAUUUCAAGGGA	21
160	SCN1A-IVS21-79	AUAUUUCAAGGGAA	21
161	SCN1A-IVS21-80	UAUUUCAAGGGAAU	21
162		CAAGGAUAAAGGUAGCA	21

表1b. 用来纠正内含子保留的示例性ASO

SEQ ID NO:	名称	SeqTence (5'-3')	保留的内含子
163	SCN1A-IVS21+6	CAGAGAAAATAGTGTTC	21
164	SCN1A-IVS21+11	ATATTCAGAGAAAATAGT	21
165	SCN1A-IVS21+16	TAAAAATATTCAGAGAAA	21
166	SCN1A-IVS21+21	AACAATAAAAATATTCAG	21
167	SCN1A-IVS21+26	TTCCAAACAATAAAAATA	21
168	SCN1A-IVS21+31	TATTATTCCAAACAATAA	21
169	SCN1A-IVS21+36	TTTGTATTATTCCAAAC	21
170	SCN1A-IVS21+41	ATTATTTTGTATTATTC	21
171	SCN1A-IVS21+46	ATGTCATTATTTGTAT	21
172	SCN1A-IVS21+51	GATGTATGTCATTATTTT	21
173	SCN1A-IVS21+56	TAATAGATGTATGTCATT	21
174	SCN1A-IVS21+61	CTAAATAATAGATGTATG	21
175	SCN1A-IVS21+66	AGGAATAATAATAGAT	21
176	SCN1A-IVS21+71	TTCTTAGGAATAATAA	21
177	SCN1A-IVS21+76	ACTTTTCTTAGGAATA	21
178	SCN1A-IVS21+81	TATATACTTTTCTTAGG	21
179	SCN1A-IVS21-16	TGCATGTTTACTTTGGA	21
180	SCN1A-IVS21-21	GTTTACTTTGGAGTAAA	21

SEQ ID NO:	名称	SeqTence (5'-3')	保留的内含子
181	SCN1A-IVS21-26	ACTTTGGAGTAAAAATAA	21
182	SCN1A-IVS21-31	GGAGTAAAAATAATTTAG	21
183	SCN1A-IVS21-36	AAAAATAATTTAGACCTG	21
184	SCN1A-IVS21-41	TAATTTAGACCTGATGTT	21
185	SCN1A-IVS21-46	TAGACCTGATGTTTAATA	21
186	SCN1A-IVS21-51	CTGATGTTTAATAAATAT	21
187	SCN1A-IVS21-56	GTTTAATAAATATTCTTA	21
188	SCN1A-IVS21-61	ATAAATATTCTTACTGAT	21
189	SCN1A-IVS21-66	TATTCTTACTGATATAAT	21
190	SCN1A-IVS21-71	TTACTGATATAATTTTCA	21
191	SCN1A-IVS21-76	GATATAATTTTCAAAAGG	21
192	SCN1A-IVS21-81	AATTTTCAAAAGGGAATA	21
193	SCN1A-IVS21-27	CTTTGGAGTAAAAATAAT	21
194	SCN1A-IVS21-28	TTTGGAGTAAAAATAATT	21
195	SCN1A-IVS21-29	TTGGAGTAAAAATAATTT	21
196	SCN1A-IVS21-30	TGGAGTAAAAATAATTTA	21
197	SCN1A-IVS21-32	GAGTAAAAATAATTTAGA	21
198	SCN1A-IVS21-33	AGTAAAAATAATTTAGAC	21
199	SCN1A-IVS21-34	GTAAAAATAATTTAGACC	21
200	SCN1A-IVS21-35	TAAAAATAATTTAGACCT	21
201	SCN1A-IVS21-72	TACTGATATAATTTTCAA	21
202	SCN1A-IVS21-73	ACTGATATAATTTTCAAA	21
203	SCN1A-IVS21-74	CTGATATAATTTTCAAAA	21
204	SCN1A-IVS21-75	TGATATAATTTTCAAAAG	21
205	SCN1A-IVS21-77	ATATAATTTTCAAAAGGG	21
206	SCN1A-IVS21-78	TATAATTTTCAAAAGGGA	21
207	SCN1A-IVS21-79	ATAATTTTCAAAAGGGAA	21
208	SCN1A-IVS21-80	TAATTTTCAAAAGGGAAT	21
209		CAAGGATTAAAGGTAGCA	21

#### 受试者的治疗

[0151] 可将本文提供的任何组合物施用于个体。“个体”可与“受试者”或“患者”互换使用。个体可以是哺乳动物，例如人或动物，如非人灵长类动物、啮齿动物、兔、大鼠、小鼠、马、驴、山羊、猫、狗、牛、猪或绵羊。在实施方案中，该个体是人。在实施方案中，该个体是胎儿、胚胎或儿童。在其他实施方案中，该个体可以是另一种真核生物体，如植物。在一些实施方案中，将本文提供的组合物施用于离体细胞。

[0152] 在一些实施方案中，将本文提供的组合物施用于个体作为治疗疾病或病症的方法。在一些实施方案中，该个体患有遗传病，如本文所述的任何疾病。在一些实施方案中，该个体处于患有疾病如本文所述的任何疾病的风险中。在一些实施方案中，该个体患上由蛋白质的量不足或蛋白质的活性不足引起的疾病或病症的风险增加。如果个体患上由蛋白质的量不足或蛋白质的活性不足引起的疾病或病症的“风险增加”，则该方法包括预防性或防范性处理。例如，个体可能由于该疾病的家族史而导致患上这样的疾病或病症的风险增加。通常，患上这样的疾病或病症的风险增加的个体受益于预防性处理（例如，通过预防或延迟该疾病或病症的发作或进展）。在实施方案中，在子宫内对胎儿进行治疗，例如通过直接或间接地（例如，通过母体）将ASO组合物施用于胎儿。

[0153] 用于施用本发明的ASO的合适的途径可根据ASO需要递送至的细胞类型而不同。多



种组织和器官受Dravet综合征;全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型;家族性发热性惊厥,3A;家族性偏瘫性偏头痛,3;自闭症;早期幼儿癫痫性脑病,13;病窦综合征1;阿尔茨海默病或SUDEP的影响,大脑是受影响最严重的组织。本发明的ASO可经肠胃外,例如通过鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射、玻璃体内注射或静脉内注射施用于患者。

[0154] 在一些实施方案中,所述疾病或病况由 $\text{Na}_v1.1$  (由SCN1A基因编码的蛋白质) 中的突变诱发。在一些情况下,该突变是 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能失去突变。在一些情况下,该 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能失去突变包括一种或多种相对于野生型 $\text{Na}_v1.1$ 的功能降低或损害 $\text{Na}_v1.1$ 功能(例如,降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)的突变。在一些情况下,该 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能失去突变包括导致疾病表型的一种或多种突变。示例性的功能失去突变包括但不限于R859C、T875M、V1353L、I1656M、R1657C、A1685V、M1841T和R1916G。

[0155] 在其他情况下,所述突变是 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能获得突变。在这样的情况下,该功能获得突变包括一种或多种相对于野生型Nav1.1的功能延长Nav1.1的活化(例如,延长10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)的突变。在这样的情况下,该Nav1.1中的功能获得突变包括导致疾病表型的一种或多种突变。示例性的功能获得突变包括但不限于D188V、W1204R、R1648H和D1866Y。

[0156] 在一些实施方案中,所述疾病或病况是脑病。在一些情况下,该脑病是由 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能失去突变诱导的。

[0157] 在一些实施方案中,所述脑病是癫痫性脑病。示例性的癫痫性脑病包括但不限于Dravet综合征(DS)(也称为婴儿严重肌阵挛性癫痫或SMEI);婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)-边界(SMEB);发热性惊厥(FS);全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+);早期幼儿癫痫性脑病,13;隐源性全身性癫痫;隐源性局限性癫痫;肌阵挛性无定向癫痫;Lennox-Gastaut综合征;West综合征;特发性痉挛;早期肌阵挛性脑病;进行性肌阵挛性癫痫;儿童交替性偏瘫;未分类的癫痫性脑病;癫痫猝死(SUDEP);早期幼儿SCN1A脑病;早期幼儿癫痫性脑病(EIEE);或病窦综合征1。在一些实施方案中,所述疾病或病况是任选地选自以下的癫痫性脑病:Dravet综合征(DS)(也称为婴儿严重肌阵挛性癫痫或SMEI);婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)-边界(SMEB);发热性惊厥(FS);全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+);早期幼儿癫痫性脑病,13;隐源性全身性癫痫;隐源性局限性癫痫;肌阵挛性无定向癫痫;Lennox-Gastaut综合征;West综合征;特发性痉挛;早期肌阵挛性脑病;进行性肌阵挛性癫痫;儿童交替性偏瘫;未分类的癫痫性脑病;癫痫猝死(SUDEP);和病窦综合征1。

[0158] 在一些情况下,GEFS+是全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型。

[0159] 在一些情况下,该发热性惊厥是家族性发热性惊厥,3A。

[0160] 在一些情况下,SMEB是不具有广泛棘波的SMEB(SMEB-SW)、不具有肌阵挛性发作的SMEB(SMEB-M)、缺乏多于一种SMEI特征的SMEB(SMEB-O)或顽固性儿童癫痫伴全身性强直性阵挛性发作(ICEGTC)。

[0161] 在一些实施方案中,由 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能失去突变诱导的疾病或病况包括但不限于Dravet综合征(DS)(也称为SMEI);婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)-边界(SMEB);发热性惊厥(FS);全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+);早期幼儿癫痫性脑病,13;隐源性全身性癫痫;隐源性局限性癫痫;肌阵挛性无定向癫痫;Lennox-Gastaut综合征;West综合征;特发性痉挛;早期肌阵挛性脑病;进行性肌阵挛性癫痫;儿童交替性偏瘫;未分类的癫痫性脑病;癫痫猝

死 (SUDEP) ; 病窦综合征1; 早期幼儿SCN1A脑病; 早期幼儿癫痫性脑病 (EIEE) ; 自闭症; 或婴儿期恶性迁移性部分发作。

[0162] 在一些实施方案中, 所述疾病或病况是由 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能获得突变诱导的。与 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能获得突变相关的示例性疾病或病况包括但不限于偏头痛。在一些情况下, 由 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能获得突变诱导的疾病或病况是偏头痛。

[0163] 在一些情况下, 所述偏头痛是家族性偏瘫性偏头痛, 3。

[0164] 在一些实施方案中, 所述疾病或病况是 $\text{Na}_v1.1$ 遗传性癫痫。该 $\text{Na}_v1.1$ 遗传性癫痫可包括 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能失去突变或 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能获得突变。在一些情况下, 该 $\text{Na}_v1.1$ 遗传性癫痫包括一个或多个遗传性突变。在其他情况下, 该 $\text{Na}_v1.1$ 遗传性癫痫包括一个或多个从头突变。在一些情况下, 该 $\text{Na}_v1.1$ 遗传性癫痫包括Dravet综合征 (DS) (也称为婴儿严重肌阵挛性癫痫或SMEI) ; 婴儿严重肌阵挛性癫痫 (SMEI) - 边界 (SMEB) ; 发热性惊厥 (FS) ; 全身性癫痫伴发热性惊厥+ (GEFS+) ; 早期幼儿癫痫性脑病, 13; 隐源性全身性癫痫; 隐源性局限性癫痫; 肌阵挛性无定向癫痫; Lennox-Gastaut综合征; West综合征; 特发性痉挛; 早期肌阵挛性脑病; 进行性肌阵挛性癫痫; 儿童交替性偏瘫; 未分类的癫痫性脑病; 早期幼儿SCN1A脑病; 早期幼儿癫痫性脑病 (EIEE) ; 癫痫猝死 (SUDEP) ; 或婴儿期恶性迁移性部分发作。在一些情况下, 与 $\text{Na}_v1.1$ 中的功能失去突变相关的 $\text{Na}_v1.1$ 遗传性癫痫包括Dravet综合征 (DS) (也称为婴儿严重肌阵挛性癫痫或SMEI) ; 婴儿严重肌阵挛性癫痫 (SMEI) - 边界 (SMEB) ; 发热性惊厥 (FS) ; 全身性癫痫伴发热性惊厥+ (GEFS+) ; 早期幼儿癫痫性脑病, 13; 隐源性全身性癫痫; 隐源性局限性癫痫; 肌阵挛性无定向癫痫; Lennox-Gastaut综合征; West综合征; 特发性痉挛; 早期肌阵挛性脑病; 进行性肌阵挛性癫痫; 儿童交替性偏瘫; 未分类的癫痫性脑病; 早期幼儿SCN1A脑病; 早期幼儿癫痫性脑病 (EIEE) ; 癫痫猝死 (SUDEP) ; 婴儿期恶性迁移性部分发作。

[0165] 在一些实施方案中, 所述疾病或状况与SCN1A基因的单倍性不足相关。示例性的与SCN1A基因的单倍性不足相关的疾病或病况包括但不限于Dravet综合征 (DS) (也称为SMEI) ; 婴儿严重肌阵挛性癫痫 (SMEI) - 边界 (SMEB) ; 发热性惊厥 (FS) ; 全身性癫痫伴发热性惊厥+ (GEFS+) ; 早期幼儿癫痫性脑病, 13; 隐源性全身性癫痫; 隐源性局限性癫痫; 肌阵挛性无定向癫痫; Lennox-Gastaut综合征; West综合征; 特发性痉挛; 早期肌阵挛性脑病; 进行性肌阵挛性癫痫; 儿童交替性偏瘫; 未分类的癫痫性脑病; 癫痫猝死 (SUDEP) ; 病窦综合征1; 早期幼儿SCN1A脑病; 早期幼儿癫痫性脑病 (EIEE) ; 或婴儿期恶性迁移性部分发作。在一些情况下, 该疾病或病况是Dravet综合征 (DS) (也称为SMEI) ; 婴儿严重肌阵挛性癫痫 (SMEI) - 边界 (SMEB) ; 发热性惊厥 (FS) ; 全身性癫痫伴发热性惊厥+ (GEFS+) ; 早期幼儿癫痫性脑病, 13; 隐源性全身性癫痫; 隐源性局限性癫痫; 肌阵挛性无定向癫痫; Lennox-Gastaut综合征; West综合征; 特发性痉挛; 早期肌阵挛性脑病; 进行性肌阵挛性癫痫; 儿童交替性偏瘫; 未分类的癫痫性脑病; 癫痫猝死 (SUDEP) ; 病窦综合征1; 早期幼儿SCN1A脑病; 早期幼儿癫痫性脑病 (EIEE) ; 或婴儿期恶性迁移性部分发作。

[0166] 在一些情况下, 所述疾病或病况是Dravet综合征 (DS) 。

[0167] Dravet综合征 (DS) , 也称为婴儿严重肌阵挛性癫痫 (SMEI) , 是在生命的第一年出现的癫痫性脑病。Dravet综合征是逐渐被认识到的癫痫性脑病, 通过在大约70-80%的患者中发现钠通道基因突变来支持临床诊断。离子通道基因的突变在一系列癫痫综合征的发病

机理中起主要作用,导致一些癫痫被认为是离子通道病。电压门控钠通道 (VGSC) 在神经元兴奋性中起关键作用;因此,在编码VGSC亚单位的基因中鉴定出与DS相关的许多突变并不意外。该疾病由例如Mulley等人,2005和在OMIM#607208 (Online Mendelian Inheritance in Man, Johns Hopkins University, 1966-2015) 中的疾病说明进行了描述,以上两篇文献均通过引用并入本文。

[0168] 70%至80%的患者携带钠通道 $\alpha 1$ 亚单位基因 (SCN1A) 异常,并且截短突变占约40%,且与癫痫发作的早期年龄具有显著相关性。在约70%的病例中发现了测序突变,且该测序突变包括截短突变(40%)和错义突变(40%),其余突变为剪接位点改变。大多数突变是从头的,但家族性突变发生在5-10%的病例中,并且在本质上通常是错义突变。其余的SCN1A突变包括剪接位点突变和错义突变,其中大部分突变落入钠通道的孔形成区域。目前,超过500个突变已经与DS相关联,并且沿基因随机分布 (Mulley等人, *Neurol.* 2006, 67, 1094-1095)。

[0169] SCN1A基因位于人类染色体2q24上的钠通道基因簇中,并且编码被称为神经元电压门控钠通道的Nav1.1的 $\alpha$ -孔形成亚单位。SCN1A基因跨越基因组DNA的大约100kb且包含26个外显子。SCN1A蛋白由四个结构域组成,每个结构域具有六个跨膜区段。已经鉴定了两种剪接变体,它们导致长同种型和短同种型,这两种同种型的差异在于在外显子11中是否存在或不在于结构域1与结构域2之间的细胞质环中的11个氨基酸 (Miller等人, 1993-2015, 和 Mulley等人, 2005, 25, 535-542, 通过引用并入本文)。

[0170] SCN1A基因中的另路剪接事件可导致非生产性mRNA转录物,其进而可导致异常的蛋白质表达,并且可靶向SCN1A基因中的另路剪接事件的治疗剂可调节DS患者中功能性蛋白质的表达水平,并且/或者抑制异常蛋白质表达。此类治疗剂可用来治疗由SCN1A蛋白缺乏引起的病况。

[0171] 可以导致非生产性mRNA转录物的另路剪接事件之一是在mRNA转录物中包含额外的外显子,它可以诱导无义介导的mRNA降解。本公开提供了用于调节SCN1A的另路剪接以增加编码蛋白质的成熟mRNA以及因此翻译的功能性SCN1A蛋白的产生量的组合物和方法。这些组合物和方法包括反义寡聚体 (ASO), 其可引起外显子跨越并促进SCN1A前mRNA的组成性剪接。在多个实施方案中,可以使用本公开的方法来增加功能性SCN1A蛋白,以治疗由SCN1A蛋白缺乏引起的病况。

[0172] 在一些情况下,所述疾病或病况是SMEB。

[0173] 在一些情况下,所述疾病或病况是GEFS+。

[0174] 在一些情况下,所述疾病或病况是发热性惊厥 (例如,家族性发热性惊厥, 3A)。

[0175] 在一些情况下,所述疾病或病况是自闭症 (也称为自闭症谱系障碍或ASD)。

[0176] 在一些情况下,所述疾病或病况是偏头痛 (例如,家族性偏瘫性偏头痛, 3)。

[0177] 在一些情况下,所述疾病或病况是阿尔茨海默病。

[0178] 在一些实施方案中,所述疾病或病况是SCN2A脑病。

[0179] 在一些实施方案中,所述疾病或病况是SCN8A脑病。

[0180] 在一些实施方案中,所述疾病或病况是SCN5A心律失常。

[0181] 在实施方案中,所述反义寡核苷酸通过本领域已知的任何方法与能够促进该反义寡核苷酸跨越血脑屏障渗透的一种或多种药剂一起施用。例如,美国专利6,632,427,

“Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons”中描述了通过将腺病毒载体施用于肌肉组织中的运动神经元来递送药剂,其通过引用并入本文。例如,美国专利6,756,523,“Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain”中描述了将载体直接递送至脑,例如,纹状体、丘脑、海马体或黑质,其通过引用并入本文。

[0182] 在实施方案中,所述反义寡核苷酸与提供所需药物或药效学性质的药剂连接或缀合。在实施方案中,该反义寡核苷酸与本领域已知的物质例如转铁蛋白受体的抗体偶联,以促进跨越血脑屏障的渗透或转运。在实施方案中,该反义寡核苷酸与病毒载体连接,例如,以使该反义化合物更有效或增加跨越血脑屏障的转运。在实施方案中,通过输注糖,例如内消旋赤藓醇、木糖醇、D(+) 半乳糖、D(+) 乳糖、D(+) 木糖、卫矛醇、肌醇、L(-) 果糖、D(-) 甘露醇、D(+) 葡萄糖、D(+) 阿拉伯糖、D(-) 阿拉伯糖、纤维二糖、D(+) 麦芽糖、D(+) 棉子糖、L(+) 鼠李糖、D(+) 蜜二糖、D(-) 核糖、侧金盏花醇、D(+) 阿拉伯糖醇、L(-) 阿拉伯糖醇、D(+) 岩藻糖、L(-) 岩藻糖、D(-) 来苏糖、L(+) 来苏糖和L(-) 来苏糖,或氨基酸,例如谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、缬氨酸和牛磺酸,来帮助渗透性血脑屏障破坏。用于增强血脑屏障渗透的方法和材料描述于例如美国专利9,193,969,“Compositions and methods for selective delivery of oligonucleotide molecules to specific neuron types”,美国专利4,866,042,“Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier”,美国专利6,294,520,“Material for passage through the blood-brain barrier”,以及美国专利6,936,589,“Parenteral delivery systems”,上述每一个专利均通过引用并入本文。

[0183] 在实施方案中,利用在例如美国专利9,193,969(其通过引用并入本文)中描述的方法,将本发明的ASO与多巴胺再摄取抑制剂(DRI)、选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)、去甲肾上腺素再摄取抑制剂(NRI)、去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(NDRI)和5-羟色胺-去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(SNDRI)偶联。

[0184] 在实施方案中,利用本领域已知和描述的任何方法评价使用所述方法和组合物治疗的受试者的病况改善。

#### 鉴定诱导外显子跨越的其他ASO的方法

[0185] 本公开的范围还包括用于鉴定或确定诱导含有NIE的SCN1A前mRNA的外显子跨越的ASO的方法。例如,一种方法可以包括鉴定或确定诱导含有NIE的SCN1A前mRNA的伪外显子跨越的ASO。可筛选与前mRNA的靶区域内的不同核苷酸特异性杂交的ASO,以鉴定或确定改善靶内含子的剪接速率和/或程度的ASO。在一些实施方案中,该ASO可以阻断或干扰剪接阻抑物/沉默子的结合位点。可利用本领域已知的任何方法来鉴定(确定)当与外显子的靶区域杂交时导致所需效果(例如,伪外显子跨越、蛋白质或功能性RNA产生)的ASO。这些方法还可用于鉴定通过与位于所包括的外显子侧翼的内含子中或非包括的外显子中的靶向区域结合而诱导所包括的外显子的外显子跨越的ASO。以下提供了可以使用的方法的实例。

[0186] 被称为ASO“步移”的一轮筛选可采用被设计为与前mRNA的靶区域杂交的ASO来进行。例如,ASO步移中所用的ASO可从所包括的外显子的3'剪接位点上游约100个核苷酸(例如,位于目标/所包括的外显子上游的外显子序列的一部分)至该目标/所包括的外显子的

3' 剪接位点下游约100个核苷酸,和/或从所包括的外显子的5' 剪接位点上游约100个核苷酸至该目标/所包括的外显子的5' 剪接位点下游约100个核苷酸(例如,位于该目标/所包括的外显子下游的外显子序列的一部分),以每5个核苷酸进行平铺。例如,长度为15个核苷酸的第一ASO可被设计为与相对于目标/所包括的外显子的3' 剪接位点的+6至+20核苷酸特异性杂交。第二ASO可被设计为与相对于目标/所包括的外显子的3' 剪接位点的+11至+25核苷酸特异性杂交。将ASO设计为跨越前mRNA的靶区域。在实施方案中,ASO可更紧密地平铺,例如,每1、2、3或4个核苷酸。此外,ASO可从5' 剪接位点下游的100个核苷酸至3' 剪接位点上游的100个核苷酸进行平铺。在一些实施方案中,ASO可从3' 剪接位点上游的约1,160个核苷酸至5' 剪接位点下游的约500个核苷酸进行平铺。在一些实施方案中,ASO可从3' 剪接位点上游的约500个核苷酸至3' 剪接位点下游的约1,920个核苷酸进行平铺。

[0187] 例如,通过转染将一个或多个ASO或对照ASO(具有杂乱序列——预期不与靶区域杂交的序列——的ASO)递送至表达目标前mRNA(例如,本文所述的含有NIE的前mRNA)的疾病相关细胞系中。如实施例4所述,可通过本领域已知的任何方法,例如通过采用跨越剪接合点的引物的逆转录酶(RT)-PCR,评估每个ASO的外显子跨越效果。与在对照ASO处理的细胞中相比,在ASO处理的细胞中采用跨越含有所包括的外显子(例如,包括NIE的侧翼外显子)的区域的引物所产生的更长RT-PCR产物的减少或不存在,表明靶NIE的剪接已经得到增强。在一些实施方案中,可利用本文所述的ASO来改善外显子跨越效率(或剪接含有NIE的内含子的剪接效率)、已剪接的与未剪接的前mRNA之比、剪接速率或剪接程度。还可以评估由目标前mRNA编码的蛋白质或功能性RNA的量,以确定每个ASO是否均获得了所需效果(例如,增强的功能性蛋白质产生)。可以使用本领域已知用于评估和/或量化蛋白质产生量的任何方法,如Western印迹法、流式细胞术、免疫荧光显微术和ELISA。

[0188] 可使用被设计为与前mRNA的靶区域杂交的ASO来进行被称为ASO“微步移”的第二轮筛选。在ASO微步移中使用的ASO以每隔1个核苷酸进行平铺,以进一步精修当与ASO杂交时导致外显子跨越(或增强的NIE剪接)的前mRNA的核苷酸序列。

[0189] 借助于ASO“微步移”——其涉及以1-nt步长间隔的ASO以及更长的ASO,一般为18-25nt,更详细地探讨了由促进靶内含子剪接的ASO所限定的区域。

[0190] 如以上对于ASO步移所述,通过将一个或多个ASO或对照ASO(具有杂乱序列——预期不与靶区域杂交的序列——的ASO)例如通过转染递送至表达目标前mRNA的疾病相关细胞系中来进行ASO微步移。如本文所述(参见,例如,实施例4),可通过本领域已知的任何方法,例如通过使用跨越NIE的引物的逆转录酶(RT)-PCR,来评估每个ASO的剪接诱导效果。与在对照ASO处理的细胞中相比,在ASO处理的细胞中使用跨越NIE的引物所产生的更长RT-PCR产物的减少或不存在,表明外显子跨越(或含有NIE的靶内含子的剪接)已经得到增强。在一些实施方案中,可利用本文所述的ASO来改善外显子跨越效率(或剪接含有NIE的内含子的剪接效率)、已剪接的与未剪接的前mRNA之比、剪接速率或剪接程度。还可以评估由目标前mRNA编码的蛋白质或功能性RNA的量,以确定每个ASO是否均获得了所需效果(例如,增强的功能性蛋白质产生)。可以使用本领域已知用于评估和/或量化蛋白质产生量的任何方法,如Western印迹法、流式细胞术、免疫荧光显微术和ELISA。

[0191] 当与前mRNA的区域杂交时导致外显子跨越(或含有NIE的内含子的剪接增强)和蛋白质产生量增加的ASO,可利用动物模型,例如已敲入全长人类基因的转基因小鼠模型,或

在疾病的人源化小鼠模型中进行体内测试。合适的ASO施用途径可根据需要递送ASO的疾病和/或细胞类型而不同。例如,可通过鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射、玻璃体注射或静脉内注射来施用ASO。施用后,可以评估模型动物的细胞、组织和/或器官,以通过例如由本领域已知和本文所述的方法评价剪接(效率、速率、程度)和蛋白质产生量来确定ASO治疗的效果。该动物模型还可以是疾病或疾病严重程度的任何表型或行为指示。

[0192] 如本文在多个实例中所述,人SCN1A基因中的外显子20x等同于小鼠SCN1A基因中的外显子21x。

[0193] 在本公开的范围还包括在NMD抑制剂如环己酰亚胺的存在下鉴定或验证NMD诱导外显子的方法。图3和实施例2中提供了示例性的方法。

[0194] 具体实施方案

[0195] 实施方案1.一种调节SCN1A蛋白在细胞中的表达的方法,该细胞具有的mRNA含有无义介导的RNA降解诱导外显子(NMD外显子mRNA)并且编码SCN1A蛋白,该方法包括使治疗剂与所述细胞接触,由此所述治疗剂调节从编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA剪接所述NMD外显子,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节SCN1A蛋白在所述细胞中的表达。

[0196] 实施方案2.一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法,该方法包括:使所述受试者的细胞与调节从所述细胞中的mRNA剪接无义介导的mRNA降解诱导外显子(NMD外显子)的治疗剂接触,该细胞中的mRNA含有NMD外显子并且编码SCN1A,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节SCN1A蛋白在所述受试者的细胞中的表达。

[0197] 实施方案3.根据实施方案1或2所述的方法,其中所述治疗剂

- (a) 与编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合;
  - (b) 调节参与所述NMD外显子mRNA的剪接的因子的结合;
- 或
- (c) (a) 和 (b) 的组合。

[0198] 实施方案4.根据实施方案3所述的方法,其中所述治疗剂干扰参与从所述靶向部分的区域剪接所述NMD外显子的因子的结合。

[0199] 实施方案5.根据实施方案3或4所述的方法,其中所述靶向部分邻近所述NMD外显子。

[0200] 实施方案6.根据实施方案3至5中任一项所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NMD外显子5'末端上游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。

[0201] 实施方案7.根据实施方案3至6中任一项所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NMD外显子5'末端上游至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约

1个核苷酸。

[0202] 实施方案8.根据实施方案3至5中任一项所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NMD外显子3'末端下游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。

[0203] 实施方案9.根据实施方案3至5或8中任一项所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NMD外显子3'末端下游至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。

[0204] 实施方案10.根据实施方案3至9中任一项所述的方法,其中所述靶向部分位于编码SCN1A的NMD外显子mRNA的两个规范外显子区域之间的内含子区域中,并且其中所述内含子区域含有所述NMD外显子。

[0205] 实施方案11.根据实施方案3至10中任一项所述的方法,其中所述靶向部分与所述NMD外显子至少部分重叠。

[0206] 实施方案12.根据实施方案3至11中任一项所述的方法,其中所述靶向部分与所述NMD外显子上游的内含子至少部分重叠。

[0207] 实施方案13.根据实施方案3至12中任一项所述的方法,其中所述靶向部分包含5' NMD外显子-内含子接合点或3' NMD外显子-内含子接合点。

[0208] 实施方案14.根据实施方案3至13中任一项所述的方法,其中所述靶向部分在所述NMD外显子内。

[0209] 实施方案15.根据实施方案3至14中任一项所述的方法,其中所述靶向部分包含所述NMD外显子的约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个连续核苷酸。

[0210] 实施方案16.根据实施方案1至15中任一项所述的方法,其中所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA包含与SEQ ID NO:2或7-10中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0211] 实施方案17.根据实施方案1至16中任一项所述的方法,其中所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA由与SEQ ID NO:1或3-6具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的基因序列编码。

[0212] 实施方案18.根据实施方案3至17中任一项所述的方法,其中所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803上游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。

[0213] 实施方案19.根据实施方案3至18中任一项所述的方法,其中所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803上游约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、

约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。

[0214] 实施方案20.根据实施方案3至17中任一项所述的方法,其中所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,740下游至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。

[0215] 实施方案21.根据实施方案3至17或20中任一项所述的方法,其中所述靶向部分处于基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,740下游约1000个核苷酸、约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。

[0216] 实施方案22.根据实施方案3至21中任一项所述的方法,其中所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分包含与包含SEQ ID NO:2或7-10的至少8个连续核酸的区域具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0217] 实施方案23.根据实施方案22所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:21-67、210-256或304-379中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0218] 实施方案24.根据实施方案3至21中任一项所述的方法,其中所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分在SCN1A的无义介导的RNA降解诱导外显子20x内。

[0219] 实施方案25.根据实施方案24所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:42-50或231-239中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0220] 实施方案26.根据实施方案3至21中任一项所述的方法,其中所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分在SCN1A的无义介导的RNA降解诱导外显子20x的上游或下游。

[0221] 实施方案27.根据实施方案26所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:21-38、53-67、210-227或242-256中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0222] 实施方案28.根据实施方案3至21中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分包含SCN1A的外显子20x的外显子-内含子接合点。

[0223] 实施方案29.根据实施方案28所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:39-41、51、52、228-230、240或241中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0224] 实施方案30.根据实施方案1至29中任一项所述的方法,其中所述治疗剂促进所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除。

[0225] 实施方案31.根据实施方案30所述的方法,其中与对照细胞中所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述NMD



外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0226] 实施方案32. 根据实施方案30或31所述的方法, 其中所述治疗剂增加所述细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平。

[0227] 实施方案33. 根据实施方案30至32中任一项所述的方法, 其中与对照细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的总量相比, 在与所述治疗剂接触的细胞中, 所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0228] 实施方案34. 根据实施方案30至33中任一项所述的方法, 其中所述治疗剂增加所述细胞中的SCN1A蛋白的表达。

[0229] 实施方案35. 根据实施方案30至34中任一项所述的方法, 其中与对照细胞中产生的SCN1A蛋白的总量相比, 在与所述治疗剂接触的细胞中产生的SCN1A的量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0230] 实施方案36. 根据实施方案2至35中任一项所述的方法, 其中所述疾病或病况是由Nav1.1中的功能失去突变诱导的。

[0231] 实施方案37. 根据实施方案2至36中任一项所述的方法, 其中所述疾病或病况与所述SCN1A基因的单倍性不足相关, 并且其中所述受试者具有编码功能性SCN1A的第一等位基因, 以及不产生或以降低的水平产生SCN1A的第二等位基因, 或编码非功能性SCN1A或部分功能性SCN1A的第二等位基因。

[0232] 实施方案38. 根据实施方案2至37中任一项所述的方法, 其中所述疾病或病况是脑病。

[0233] 实施方案39. 根据实施方案38所述的方法, 其中所述脑病是癫痫性脑病。

[0234] 实施方案40. 根据实施方案2至37中任一项所述的方法, 其中所述疾病或病况是Dravet综合征(DS); 婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)-边界(SMEB); 发热性惊厥(FS); 全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+); 早期幼儿癫痫性脑病, 13; 隐源性全身性癫痫; 隐源性局限性癫痫; 肌阵挛性无定向癫痫; Lennox-Gastaut综合征; West综合征; 特发性痉挛; 早期肌阵挛性脑病; 进行性肌阵挛性癫痫; 儿童交替性偏瘫; 未分类的癫痫性脑病; 癫痫猝死(SUDEP);

病窦综合征1;自闭症;或婴儿期恶性迁移性部分发作。

[0235] 实施方案41.根据实施方案40所述的方法,其中GEFS+是全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型。

[0236] 实施方案42.根据实施方案40所述的方法,其中所述发热性惊厥是家族性发热性惊厥,3A。

[0237] 实施方案43.根据实施方案40所述的方法,其中SMEB是不具有广泛棘波的SMEB (SMEB-SW)、不具有肌阵挛性发作的SMEB (SMEB-M)、缺乏多于一种SMEI特征的SMEB (SMEB-O)或顽固性儿童癫痫伴全身性强直性阵挛性发作 (ICEGTC)。

[0238] 实施方案44.根据实施方案1至43中任一项所述的方法,其中所述治疗剂促进所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除,并且增加所述细胞中SCN1A的表达。

[0239] 实施方案45.根据实施方案1至44中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体 (ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:22-24、26、27、29-35、37-62、64-67或304-379中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%互补的序列。

[0240] 实施方案46.根据实施方案1至29中任一项所述的方法,其中所述治疗剂抑制所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除。

[0241] 实施方案47.根据实施方案46所述的方法,其中与对照细胞中所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除降低约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0242] 实施方案48.根据实施方案46或47所述的方法,其中所述治疗剂降低所述细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平。

[0243] 实施方案49.根据实施方案46至48中任一项所述的方法,其中与对照细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的量降低约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0244] 实施方案50.根据实施方案46至49中任一项所述的方法,其中所述治疗剂降低所述细胞中的SCN1A蛋白的表达。

[0245] 实施方案51.根据实施方案46至50中任一项所述的方法,其中与对照细胞中产生的SCN1A蛋白的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中产生的SCN1A的量降低约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约

6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0246] 实施方案52.根据实施方案2至29或46至49中任一项所述的方法,其中所述疾病或病况是由Nav1.1中的功能获得突变诱导的。

[0247] 实施方案53.根据实施方案52所述的方法,其中所述受试者具有以升高的水平产生SCN1A的等位基因,或编码诱导细胞中Nav1.1活性增加的突变SCN1A的等位基因。

[0248] 实施方案54.根据实施方案52或53中任一项所述的方法,其中所述疾病或病况是偏头痛。

[0249] 实施方案55.根据实施方案54所述的方法,其中所述偏头痛是家族性偏瘫性偏头痛,3。

[0250] 实施方案56.根据实施方案2至49中任一项所述的方法,其中所述疾病或病况是Nav1.1遗传性癫痫。

[0251] 实施方案57.根据实施方案46至56中任一项所述的方法,其中所述治疗剂抑制所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除,并且降低所述细胞中SCN1A的表达。

[0252] 实施方案58.根据实施方案46至57中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:21、25、28、36或63中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%互补的序列。

[0253] 实施方案59.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义低聚物包含骨架修饰,该骨架修饰包含硫代磷酸酯键或二氨基磷酸酯键。

[0254] 实施方案60.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含二氨基磷酸酯吗啉代、锁定核酸、肽核酸、2'-O-甲基、2'-氟或2'-O-甲氧基乙基部分。

[0255] 实施方案61.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含至少一个修饰的糖部分。

[0256] 实施方案62.根据实施方案61所述的方法,其中每个糖部分均为经修饰的糖部分。

[0257] 实施方案63.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体由8至50个核碱基、8至40个核碱基、8至35个核碱基、8至30个核碱基、8至25个核碱基、8至20个核碱基、8至15个核碱基、9至50个核碱基、9至40个核碱基、9至35个核碱基、9至30个核碱基、9至25个核碱基、9至20个核碱基、9至15个核碱基、10至50个核碱基、10至40个核碱基、10至35个核碱基、10至30个核碱基、10至25个核碱基、10至20个核碱基、10至15个核碱基、11至50个核碱基、11至40个核碱基、11至35个核碱基、11至30个核碱基、11至25个核碱基、11至20个核碱基、11至15个核碱基、12至50个核碱基、12至40个核碱基、12至35个核碱基、12至30个核碱基、12至25个核碱基、12至20个核碱基或12至15个核碱基组成。

[0258] 实施方案64.根据实施方案3至63中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡

聚体 (ASO), 并且其中所述反义寡聚体与编码所述蛋白质的NMD外显子mRNA的靶向部分至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%互补。

[0259] 实施方案65. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包括评估SCN1A mRNA或蛋白质表达。

[0260] 实施方案66. 根据实施方案2至65中任一项所述的方法, 其中所述受试者是人。

[0261] 实施方案67. 根据实施方案2至65中任一项所述的方法, 其中所述受试者是非人类动物。

[0262] 实施方案68. 根据实施方案2至65中任一项所述的方法, 其中所述受试者是胎儿、胚胎或儿童。

[0263] 实施方案69. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述细胞是离体的。

[0264] 实施方案70. 根据实施方案2至69中任一项所述的方法, 其中所述治疗剂通过所述受试者的鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射、琉璃体内或静脉内注射来施用。

[0265] 实施方案71. 根据实施方案2至65中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包括向所述受试者施用第二治疗剂。

[0266] 实施方案72. 根据实施方案71所述的方法, 其中所述第二治疗剂是小分子。

[0267] 实施方案73. 根据实施方案71所述的方法, 其中所述第二治疗剂是ASO。

[0268] 实施方案74. 根据实施方案73所述的方法, 其中所述ASO包含与SEQ ID NO:115-161中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%互补的序列。

[0269] 实施方案75. 根据实施方案71所述的方法, 其中所述第二治疗剂纠正内含子保留。

[0270] 实施方案76. 根据实施方案2至65中任一项所述的方法, 其中所述疾病或病况是阿尔茨海默病、SCN2A脑病、SCN8A脑病或SCN5A心律失常。

[0271] 实施方案77. 根据实施方案30、32或34所述的方法, 其中所述疾病或病况是阿尔茨海默病、SCN2A脑病、SCN8A脑病或SCN5A心律失常。

[0272] 实施方案78. 一种通过增加受试者细胞表达靶蛋白或功能性RNA来治疗有需要的受试者中的Dravet综合征 (DS); 全身性癫痫伴发热性惊厥+, 2型; 家族性发热性惊厥, 3A; 家族性偏瘫性偏头痛, 3; 自闭症; 早期幼儿癫痫性脑病, 13; 病窦综合征1; 阿尔茨海默病或癫痫猝死 (SUDEP) 的方法, 其中所述细胞具有含有无义介导的RNA降解诱导外显子的mRNA (NMD外显子mRNA), 并且其中所述NMD外显子mRNA编码所述靶蛋白或功能性RNA, 该方法包括使所述受试者的细胞与结合编码所述靶蛋白或功能性RNA的NMD外显子mRNA的靶向部分的治疗剂接触, 由此从编码所述靶蛋白或功能性RNA的NMD外显子mRNA中排除所述无义介导的RNA降解诱导外显子, 从而增加经加工的编码所述靶蛋白或功能性RNA的mRNA的水平, 并增加所述靶蛋白或功能性RNA在所述受试者细胞中的表达。

[0273] 实施方案79. 根据实施方案78所述的方法, 其中所述靶蛋白是SCN1A。

[0274] 实施方案80. 一种增加细胞表达SCN1A蛋白的方法, 该细胞具有的mRNA含有无义介导的RNA降解诱导外显子 (NMD外显子mRNA) 并且编码SCN1A蛋白, 该方法包括使所述细胞与结合编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA的靶向部分的药剂接触, 由此从编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA中排除所述无义介导的RNA降解诱导外显子, 从而增加经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平, 并增加SCN1A蛋白在所述细胞中的表达。

[0275] 实施方案81.一种通过增加受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗有需要的受试者的疾病或病况的方法,该方法包括:使受试者的细胞与治疗剂接触,该治疗剂结合编码SCN1A蛋白或功能性SCN1A RNA的无义介导的RNA降解诱导外显子mRNA的靶向部分,由此从编码SCN1A蛋白或功能性SCN1A RNA的NMD外显子mRNA中排除所述无义介导的RNA降解诱导外显子,从而增加经加工的编码SCN1A蛋白或功能性SCN1A RNA的mRNA的水平,并增加SCN1A蛋白或功能性SCN1A RNA在所述受试者细胞中的表达;其中所述疾病或病况与SCN1A基因以外的基因的突变、由SCN1A基因以外的基因编码的蛋白质的异常表达或由SCN1A基因以外的基因编码的RNA的异常表达相关。

[0276] 实施方案82.根据实施方案81所述的方法,其中所述疾病或病况的症状减少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多。

[0277] 实施方案83.根据实施方案81或82所述的方法,其中所述疾病或病况的症状减少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%,伴有SCN1A蛋白的表达增加。

[0278] 实施方案84.根据实施方案81至83中任一项所述的方法,其中所述疾病或病况的进展减少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多,伴有SCN1A蛋白的表达增加。

[0279] 实施方案85.根据实施方案81至84中任一项所述的方法,其中所述疾病或病况的进展减少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%,伴有SCN1A蛋白的表达增加。

[0280] 实施方案86.根据实施方案81至85中任一项所述的方法,其中增加所述SCN1A蛋白或功能性SCN1A RNA的表达补偿了SCN1A基因以外的基因的突变、由SCN1A基因以外的基因编码的蛋白质的异常表达或由SCN1A基因以外的基因编码的RNA的异常表达。

[0281] 实施方案87.根据实施方案81至86中任一项所述的方法,其中所述疾病或病况是早期幼儿癫痫性脑病,13。

[0282] 实施方案88.根据实施方案81至87中任一项所述的方法,其中所述受试者具有SCN8A基因中的突变。

[0283] 实施方案89.根据实施方案81至86中任一项所述的方法,其中所述疾病或病况是病窦综合征1。

[0284] 实施方案90.根据实施方案81至86或88中任一项所述的方法,其中所述受试者具有SCN5A基因中的突变。

[0285] 实施方案91.根据实施方案81至86中任一项所述的方法,其中所述疾病或病况是阿尔茨海默病。

[0286] 实施方案92.一种治疗有需要的受试者的疾病或病况的方法,其包括向该受试者施用包含反义寡聚体的组合物,该反义寡聚体包含至少8个连续核苷酸的序列,该序列与SCN1A的内含子20至少80%、85%、90%、95%、97%或100%互补。

[0287] 实施方案93.一种治疗有需要的受试者的疾病或病况的方法,其包括向该受试者施用包含反义寡聚体的组合物,该反义寡聚体包含至少8个连续核苷酸的序列,该序列与SEQ ID NO:7-10中的任一个至少80%、85%、90%、95%、97%或100%互补。

[0288] 实施方案94.根据实施方案78至93中任一项所述的方法,其中所述无义介导的RNA降解诱导外显子从编码靶蛋白或功能性RNA的NMD外显子mRNA中剪接出来。

[0289] 实施方案95.根据实施方案78至94中任一项所述的方法,其中所述靶蛋白不包含由所述无义介导的RNA降解诱导外显子编码的氨基酸序列。

[0290] 实施方案96.根据实施方案78至95中任一项所述的方法,其中所述靶蛋白是全长靶蛋白。

[0291] 实施方案97.根据实施方案78至96中任一项所述的方法,其中所述药剂是与NMD外显子mRNA的靶向部分互补的反义寡聚体(ASO)。

[0292] 实施方案98.根据实施方案78至97中任一项所述的方法,其中所述mRNA是前mRNA。

[0293] 实施方案99.根据实施方案78至98中任一项所述的方法,其中所述接触包括使所述治疗剂与所述mRNA接触,其中所述mRNA在所述细胞的细胞核中。

[0294] 实施方案100.根据实施方案78至99中任一项所述的方法,其中所述靶蛋白或功能性RNA纠正所述受试者中所述靶蛋白或功能性RNA的缺乏。

[0295] 实施方案101.根据实施方案78至100中任一项所述的方法,其中所述细胞在受试者中或来自受试者,该受试者具有由SCN1A蛋白的量或活性不足引起的病况。

[0296] 实施方案102.根据实施方案78至101中任一项所述的方法,其中所述靶蛋白的量的不足由所述靶蛋白的单倍性不足所导致,其中所述受试者具有编码功能性靶蛋白的第一等位基因,以及不产生或以降低的水平产生所述靶蛋白的第二等位基因,或编码非功能性或部分功能性靶蛋白的第二等位基因,并且其中所述反义寡聚体与由第一等位基因转录的NMD外显子mRNA的靶向部分结合。

[0297] 实施方案103.根据实施方案78至101中任一项所述的方法,其中所述受试者患有由病症引起的病况,该病症由所述靶蛋白的量或功能不足所导致,其中所述受试者具有(a)第一突变等位基因,由其

- (i) 产生所述靶蛋白的水平与由野生型等位基因产生相比降低,
- (ii) 产生与等价的野生型蛋白质相比功能降低的形式的所述靶蛋白,或者
- (iii) 不产生所述靶蛋白,以及
- (b) 第二突变等位基因,由其
- (i) 产生所述靶蛋白的水平与由野生型等位基因产生相比降低,
- (ii) 产生与等价的野生型蛋白质相比功能降低的形式的所述靶蛋白,或者
- (iii) 不产生所述靶蛋白,并且

其中当所述受试者具有第一突变等位基因(a) (iii)时,所述第二突变等位基因为(b) (i) 或(b) (ii),并且其中当所述受试者具有第二突变等位基因(b) (iii)时,所述第一突变等位基因为(a) (i) 或(a) (ii),并且其中所述NMD外显子mRNA由所述第一突变等位基因(a) (i) 或(a) (ii) 和/或所述第二等位基因(b) (i) 或(b) (ii) 转录。

[0298] 实施方案104.根据实施方案103所述的方法,其中产生与所述等价的野生型蛋白质相比功能降低的形式的所述靶蛋白。

[0299] 实施方案105.根据实施方案103所述的方法,其中产生与所述等价的野生型蛋白质相比为完全功能性形式的所述靶蛋白。

[0300] 实施方案106.根据实施方案78至105中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分在所述无义介导的RNA降解诱导外显子之内。

[0301] 实施方案107.根据实施方案78至105中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分在所述无义介导的RNA降解诱导外显子的上游或下游。

[0302] 实施方案108.根据实施方案78至107中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA包含与SEQ ID NO:2、7-10、12和17-20中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0303] 实施方案109.根据实施方案78至107中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA由与SEQ ID NO:1、3-6、11和13-16具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的基因序列编码。

[0304] 实施方案110.根据实施方案78至107中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分包含与包含SEQ ID NO:2、7-10、12和17-20的至少8个连续核酸的区域具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0305] 实施方案111.根据实施方案78至110中任一项所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:21-114中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0306] 实施方案112.根据实施方案78至105中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分在SCN1A的无义介导的RNA降解诱导外显子20x内。

[0307] 实施方案113.根据实施方案112所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:42-50或231-239中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0308] 实施方案114.根据实施方案78至105中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分在SCN1A的无义介导的RNA降解诱导外显子20x的上游或下游。

[0309] 实施方案115.根据实施方案114所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:21-38、53-67、210-227或242-256中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0310] 实施方案116.根据实施方案78至105中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分包含SCN1A的外显子20x的外显子-内含子接合点。

[0311] 实施方案117.根据实施方案116所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:39-41、51、52、228-230、240或241中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0312] 实施方案118.根据实施方案78至105中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分在Scn1a的无义介导的RNA降解诱导外显子21x内。

[0313] 实施方案119.根据实施方案118所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:89-97中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0314] 实施方案120.根据实施方案78至105中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分在Scn1a的无义介导的RNA降解诱导外显子21x的上游或下游。

[0315] 实施方案121.根据实施方案120所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:68-85和100-114中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0316] 实施方案122.根据实施方案78至105中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分包含Scn1a的外显子21x的外显子-内含子接合点。

[0317] 实施方案123.根据实施方案122所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:86-88和98-99中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0318] 实施方案124.根据实施方案78至123中任一项所述的方法,其中所产生的靶蛋白是全长蛋白质或野生型蛋白质。

[0319] 实施方案125.根据实施方案78至124中任一项所述的方法,其中与编码在对照细胞中产生的靶蛋白或功能性RNA的经加工的mRNA的总量相比,编码在与所述反义寡聚体接触的细胞中产生的靶蛋白或功能性RNA的经加工的mRNA的总量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0320] 实施方案126.根据实施方案78至124中任一项所述的方法,其中与对照细胞中产生的靶蛋白的总量相比,在与所述反义寡聚体接触的细胞中产生的靶蛋白的总量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0321] 实施方案127.根据实施方案78至126中任一项所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义低聚物包含骨架修饰,该骨架修饰包含硫代磷酸酯键或二氨基磷酸酯键。

[0322] 实施方案128.根据实施方案78至127中任一项所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含二氨基磷酸酯吗啉代、锁定核酸、肽核酸、2'-O-甲基、2'-氟或2'-O-甲氧基乙基部分。

[0323] 实施方案129.根据实施方案78至128中任一项所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含至少一个修饰的糖部分。

[0324] 实施方案130.根据实施方案129所述的方法,其中每个糖部分是修饰的糖部分。

[0325] 实施方案131.根据实施方案78至130中任一项所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体由8至50个核碱基、8至40个核碱基、8至35个核碱基、8至30个核碱基、8至25个核碱基、8至20个核碱基、8至15个核碱基、9至50个核碱基、9至40个核碱基、9至35个核碱基、9至30个核碱基、9至25个核碱基、9至20个核碱基、9至15个核碱基、10至50个核碱基、10至40个核碱基、10至35个核碱基、10至30个核碱基、10至25个核碱基、10至20个核碱基、10至15个核碱基、11至50个核碱基、11至40个核碱基、11至35个核碱基、11至30个核碱基、11至25个核碱基、11至20个核碱基、11至15个核碱基、12至50个核碱基、12至40个核碱基、12至35个核碱基、12至30个核碱基、12至25个核碱基、12至20个核碱基



或12至15个核碱基组成。

[0326] 实施方案132.根据实施方案78至131中任一项所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体与编码所述蛋白质的NMD外显子mRNA的靶向部分至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%互补。

[0327] 实施方案133.根据实施方案78至132中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括评估SCN1A mRNA或蛋白质表达。

[0328] 实施方案134.根据实施方案1至133中任一项所述的方法,其中治疗Dravet综合征;全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型;家族性发热性惊厥,3A;家族性偏瘫性偏头痛,3;自闭症;早期幼儿癫痫性脑病,13;病窦综合征1;阿尔茨海默病或癫痫猝死(SUDEP),并且其中所述反义寡聚体与SCN1A NMD外显子mRNA的靶向部分结合,其中所述靶向部分在选自SEQ ID NO:7-10和17-20的序列内。

[0329] 实施方案135.根据实施方案78至134中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

[0330] 实施方案136.根据实施方案78至135中任一项所述的方法,其中所述受试者是非人类动物。

[0331] 实施方案137.根据实施方案78至136中任一项所述的方法,其中所述受试者是胎儿、胚胎或儿童。

[0332] 实施方案138.根据权利要求78至137中任一项所述的方法,其中所述细胞是离体的。

[0333] 实施方案139.根据实施方案78至138中任一项所述的方法,其中所述治疗剂通过所述受试者的鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射、琉璃体内注射或静脉内注射来施用。

[0334] 实施方案140.根据实施方案78至139中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用第二治疗剂。

[0335] 实施方案141.根据实施方案140所述的方法,其中所述第二治疗剂是小分子。

[0336] 实施方案142.根据实施方案140所述的方法,其中所述第二治疗剂是ASO。

[0337] 实施方案143.根据实施方案142所述的方法,其中所述ASO包含与SEQ ID NO:115-161中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0338] 实施方案144.根据实施方案140至142中任一项所述的方法,其中所述第二治疗剂纠正内含子保留。

[0339] 实施方案145.在实施方案78至144中任一项的方法中使用的反义寡聚体。

[0340] 实施方案146.一种反义寡聚体,其包含与SEQ ID NO:21-114中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0341] 实施方案147.一种药物组合物,其包含实施方案145或146的反义寡聚体和赋形剂。

[0342] 实施方案148.一种治疗有需要的受试者的方法,其包括向该受试者施用实施方案147的药物组合物,其中所述施用是通过鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射、琉璃体内注射或静脉内注射。

[0343] 实施方案149.一种包含治疗剂的组合物,其在增加细胞表达靶蛋白或功能性RNA以治疗有需要的受试者中与缺乏蛋白质或缺乏功能性RNA相关的疾病或病况的方法中使

用,其中所述缺乏蛋白质或缺乏功能性RNA在所述受试者中的量或活性不足,其中所述靶蛋白为:

- (a) 所述缺乏蛋白质;或
- (b) 在功能上增加或代替所述受试者中的缺乏蛋白质的补偿蛋白质;  
并且其中所述功能性RNA为:
- (c) 所述缺乏RNA;或
- (d) 在功能上增加或代替所述受试者中的缺乏功能性RNA的补偿功能性RNA;

[0344] 其中所述治疗剂增强从编码所述靶蛋白或功能性RNA的NMD外显子mRNA中排除无义介导的RNA降解诱导外显子,从而增加所述受试者中所述靶蛋白或功能性RNA的产生或活性。

[0345] 实施方案150.一种包含治疗剂的组合物,其在治疗有需要的受试者的疾病或病况的方法中使用,该方法包括调节所述受试者的细胞表达SCN1A蛋白的步骤,其中所述细胞具有的mRNA含有无义介导的RNA降解诱导外显子(NMD外显子mRNA)并且编码SCN1A蛋白,该方法包括使所述细胞与治疗剂接触,由此调节从编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA中排除无义介导的RNA降解诱导外显子,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节SCN1A蛋白在所述受试者细胞中的表达。

[0346] 实施方案151.根据实施方案150所述的组合物,其中所述疾病或病况选自:Dravet综合征(DS);婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)-边界(SMEB);发热性惊厥(FS);全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+);早期幼儿癫痫性脑病,13;隐源性全身性癫痫;隐源性局限性癫痫;肌阵挛性无定向癫痫;Lennox-Gastaut综合征;West综合征;特发性痉挛;早期肌阵挛性脑病;进行性肌阵挛性癫痫;儿童交替性偏瘫;未分类的癫痫性脑病;癫痫猝死(SUDEP);病窦综合征1;自闭症;或家族性偏瘫性偏头痛,3;和阿尔茨海默病。

[0347] 实施方案152.根据实施方案150至151中任一项所述的组合物,其中所述SCN1A蛋白和NMD外显子mRNA由所述SCN1A基因编码。

[0348] 实施方案153.根据实施方案149至152中任一项所述的组合物,其中所述无义介导的RNA降解诱导外显子从编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA中剪接出来。

[0349] 实施方案154.根据实施方案149至153中任一项所述的组合物,其中所述SCN1A蛋白不包含由所述无义介导的RNA降解诱导外显子编码的氨基酸序列。

[0350] 实施方案155.根据实施方案149至154中任一项所述的组合物,其中所述SCN1A蛋白是全长SCN1A蛋白。

[0351] 实施方案156.根据实施方案149至155中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是与NMD外显子mRNA的靶向部分互补的反义寡聚体(ASO)。

[0352] 实施方案157.根据实施方案149至156中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体靶向在所述无义介导的RNA降解诱导外显子内的NMD外显子mRNA的一部分。

[0353] 实施方案158.根据实施方案149至156中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体靶向在所述无义介导的RNA降解诱导外显子上游或下游的NMD外显子mRNA的一部分。

[0354] 实施方案159.根据实施方案149至158中任一项所述的组合物,其中所述靶蛋白是

SCN1A。

[0355] 实施方案160.根据实施方案159所述的组合物,其中所述NMD外显子mRNA包含与SEQ ID NO:2、7-10、12和17-20中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0356] 实施方案161.根据实施方案159所述的组合物,其中所述NMD外显子mRNA由与SEQ ID NO:1、3-6、11和13-16具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的基因序列编码。

[0357] 实施方案162.根据实施方案159所述的组合物,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分包含与包含SEQ ID NO:2、7-10、12和17-20的至少8个连续核酸的区域具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0358] 实施方案163.根据实施方案159至162中任一项所述的组合物,其中所述NMD外显子mRNA的靶向部分(i)在无义介导的RNA降解诱导外显子20x内,(ii)在无义介导的RNA降解诱导外显子20x的上游或下游,或者(iii)包含无义介导的RNA降解诱导外显子20x的内含子-外显子接合点。

[0359] 实施方案164.根据实施方案159至163中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:21-114中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0360] 实施方案165.根据实施方案149至164中任一项所述的组合物,其中所述疾病或病况是由Nav1.1中的功能失去突变诱导的。

[0361] 实施方案166.根据实施方案149至165中任一项所述的组合物,其中所述疾病或病况与所述SCN1A基因的单倍性不足相关,并且其中所述受试者具有编码功能性SCN1A的第一等位基因,以及不产生或以降低的水平产生SCN1A的第二等位基因,或编码非功能性SCN1A或部分功能性SCN1A的第二等位基因。

[0362] 实施方案167.根据实施方案149至166中任一项所述的组合物,其中所述疾病或病况是任选地由Nav1.1中的功能失去突变诱导的脑病。

[0363] 实施方案168.根据实施方案167所述的组合物,其中所述脑病是癫痫性脑病。

[0364] 实施方案169.根据实施方案165或166所述的组合物,其中所述疾病或病况是Dravet综合征(DS);婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)-边界(SMEB);发热性惊厥(FS);全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+);早期幼儿癫痫性脑病,13;隐源性全身性癫痫;隐源性局限性癫痫;肌阵挛性无定向癫痫;Lennox-Gastaut综合征;West综合征;特发性痉挛;早期肌阵挛性脑病;进行性肌阵挛性癫痫;儿童交替性偏瘫;未分类的癫痫性脑病;癫痫猝死(SUDEP);病窦综合征1;自闭症;或婴儿期恶性迁移性部分发作。

[0365] 实施方案170.根据实施方案168所述的组合物,其中GEFS+是全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型。

[0366] 实施方案171.根据实施方案168所述的组合物,其中所述发热性惊厥是家族性发热性惊厥,3A。

[0367] 实施方案172.根据实施方案168所述的组合物,其中SMEB是不具有广泛棘波的SMEB(SMEB-SW)、不具有肌阵挛性发作的SMEB(SMEB-M)、缺乏多于一种SMEI特征的SMEB(SMEB-O)或顽固性儿童癫痫伴全身性强直性阵挛性发作(ICEGTC)。

[0368] 实施方案173.根据实施方案165至172中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂促进所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除,并且增加所述细胞中SCN1A的表达。

[0369] 实施方案174.根据实施方案165至173中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:22-24、26、27、29-35、37-62或64-67中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%互补的序列。

[0370] 实施方案175.根据实施方案149至164中任一项所述的组合物,其中所述疾病或病况是由Nav1.1中的功能获得突变诱导的。

[0371] 实施方案176.根据实施方案149至164或175中任一项所述的组合物,其中所述受试者具有以升高的水平产生SCN1A的等位基因,或编码诱导细胞中Nav1.1活性增加的突变SCN1A的等位基因。

[0372] 实施方案177.根据实施方案149至164、175或176中任一项所述的组合物,其中所述疾病或病况是偏头痛。

[0373] 实施方案178.根据实施方案177所述的组合物,其中所述偏头痛是家族性偏瘫性偏头痛,3。

[0374] 实施方案179.根据实施方案149至164、175或176中任一项所述的组合物,其中所述疾病或病况是Nav1.1遗传性癫痫。

[0375] 实施方案180.根据实施方案149至164或175至179中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂抑制所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除,并且降低所述细胞中SCN1A的表达。

[0376] 实施方案181.根据实施方案149至164或175至180中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述ASO包含与SEQ ID NO:21、25、28、36或63中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%互补的序列。

[0377] 实施方案182.根据实施方案149至181中任一项所述的组合物,其中所述经加工的编码所述靶蛋白或功能性RNA的mRNA是全长成熟mRNA或野生型成熟mRNA。

[0378] 实施方案183.根据实施方案149至182中任一项所述的组合物,其中所产生的靶蛋白是全长蛋白质或野生型蛋白质。

[0379] 实施方案184.根据实施方案149至183中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义低聚物包含骨架修饰,该骨架修饰包含硫代磷酸酯键或二氨基磷酸酯键。

[0380] 实施方案185.根据实施方案149至184中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体是反义寡核苷酸。

[0381] 实施方案186.根据实施方案149至185中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含二氨基磷酸酯吗啉代、锁定核酸、肽核酸、2'-O-甲基、2'-氟或2'-O-甲氧基乙基部分。

[0382] 实施方案187.根据实施方案149至186中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含至少一个修饰的糖部分。

[0383] 实施方案188.根据实施方案187所述的组合物,其中每个糖部分是修饰的糖部分。

[0384] 实施方案189.根据实施方案149至188中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是

反义寡聚体 (ASO), 并且其中所述反义寡聚体由8至50个核碱基、8至40个核碱基、8至35个核碱基、8至30个核碱基、8至25个核碱基、8至20个核碱基、8至15个核碱基、9至50个核碱基、9至40个核碱基、9至35个核碱基、9至30个核碱基、9至25个核碱基、9至20个核碱基、9至15个核碱基、10至50个核碱基、10至40个核碱基、10至35个核碱基、10至30个核碱基、10至25个核碱基、10至20个核碱基、10至15个核碱基、11至50个核碱基、11至40个核碱基、11至35个核碱基、11至30个核碱基、11至25个核碱基、11至20个核碱基、11至15个核碱基、12至50个核碱基、12至40个核碱基、12至35个核碱基、12至30个核碱基、12至25个核碱基、12至20个核碱基或12至15个核碱基组成。

[0385] 实施方案190. 一种包含反义寡聚体的组合物, 该反义寡聚体包含至少8个连续核苷酸的序列, 该序列与SCN1A的内含子20至少80%、85%、90%、95%、97%或100%互补。

[0386] 实施方案191. 一种包含反义寡聚体的组合物, 该反义寡聚体包含至少8个连续核苷酸的序列, 该序列与SEQ ID NO:7-10中的任一个至少80%、85%、90%、95%、97%或100%互补。

[0387] 实施方案192. 一种药物组合物, 其包含实施方案149至191的任何组合物的治疗剂和赋形剂。

[0388] 实施方案193. 一种治疗有需要的受试者的方法, 其包括向该受试者施用实施方案192的药物组合物, 其中所述施用是通过鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射、琉璃体内注射或静脉内注射。

[0389] 实施方案194. 一种药物组合物, 其包含: 与SCN1AmRNA转录物的靶序列杂交的反义寡聚体, 其中所述SCN1A mRNA转录物包含无义介导的RNA降解诱导外显子, 其中所述反义寡聚体诱导从所述SCN1A mRNA转录物中排除所述无义介导的RNA降解诱导外显子; 以及药学上可接受的赋形剂。

[0390] 实施方案195. 根据实施方案194所述的药物组合物, 其中所述SCN1A mRNA转录物是SCN1A NMD外显子mRNA转录物。

[0391] 实施方案196. 根据实施方案194或195所述的药物组合物, 其中所述SCN1A NMD外显子mRNA转录物的靶向部分 (i) 在无义介导的RNA降解诱导外显子20x内, (ii) 在无义介导的RNA降解诱导外显子20x的上游或下游, 或者 (iii) 包含无义介导的RNA降解诱导外显子20x的内含子-外显子接合点。

[0392] 实施方案197. 根据实施方案194或196所述的药物组合物, 其中所述SCN1A NMD外显子mRNA转录物由与SEQ ID NO:1、3-6、11和13-16中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的基因序列编码。

[0393] 实施方案198. 根据实施方案194或196所述的药物组合物, 其中所述SCN1ANMD外显子mRNA转录物包含与SEQ ID NO:2、7-10、12和17-20中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0394] 实施方案199. 根据实施方案194所述的药物组合物, 其中所述反义寡聚体包含骨架修饰, 该骨架修饰包含硫代磷酸酯键或二氨基磷酸酯键。

[0395] 实施方案200. 根据实施方案194所述的药物组合物, 其中所述反义寡聚体是反义寡核苷酸。

[0396] 实施方案201. 根据实施方案194所述的药物组合物, 其中所述反义寡聚体包含二

氨基磷酸酯吗啉代、锁定核酸、肽核酸、2'-O-甲基、2'-氟或2'-O-甲氧基乙基部分。

[0397] 实施方案202.根据实施方案194所述的药物组合物,其中所述反义寡聚体包含至少一个修饰的糖部分。

[0398] 实施方案203.根据实施方案194所述的药物组合物,其中所述反义寡聚体包含8至50个核碱基、8至40个核碱基、8至35个核碱基、8至30个核碱基、8至25个核碱基、8至20个核碱基、8至15个核碱基、9至50个核碱基、9至40个核碱基、9至35个核碱基、9至30个核碱基、9至25个核碱基、9至20个核碱基、9至15个核碱基、10至50个核碱基、10至40个核碱基、10至35个核碱基、10至30个核碱基、10至25个核碱基、10至20个核碱基、10至15个核碱基、11至50个核碱基、11至40个核碱基、11至35个核碱基、11至30个核碱基、11至25个核碱基、11至20个核碱基、11至15个核碱基、12至50个核碱基、12至40个核碱基、12至35个核碱基、12至30个核碱基、12至25个核碱基、12至20个核碱基或12至15个核碱基。

[0399] 实施方案204.根据实施方案194或195所述的药物组合物,其中所述反义寡聚体与所述SCN1A NMD外显子mRNA转录物的靶向部分至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%互补。

[0400] 实施方案205.根据实施方案194或195所述的药物组合物,其中所述SCN1A NMD外显子mRNA转录物的靶向部分在选自SEQ ID NO:2、7-10、12和17-20的序列内。

[0401] 实施方案206.根据实施方案194所述的药物组合物,其中所述反义寡聚体包含与SEQ ID NO:21-114中的任一个具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。

[0402] 实施方案207.根据实施方案194所述的药物组合物,其中所述反义寡聚体包含选自SEQ ID NO:21-114的核苷酸序列。

[0403] 实施方案208.根据实施方案194至207中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射、琉璃体内注射或静脉内注射。

[0404] 实施方案209.一种诱导缺乏的SCN1A mRNA转录物的加工以促进去除无义介导的RNA降解诱导外显子以产生编码SCN1A蛋白功能性形式的完全加工的SCN1AmRNA转录物的方法,该方法包括:

[0405] (a) 使反义寡聚体与受试者的靶细胞接触;

[0406] (b) 使所述反义寡聚体与缺乏的SCN1A mRNA转录物杂交,其中所述缺乏的SCN1A mRNA转录物能够编码SCN1A蛋白的功能性形式,并且包含至少一个无义介导的RNA降解诱导外显子;

[0407] (c) 从所述缺乏的SCN1A mRNA转录物中除去所述至少一个无义介导的RNA降解诱导外显子,以产生编码SCN1A蛋白功能性形式的完全加工的SCN1A mRNA转录物;以及

[0408] (d) 从所述完全加工的SCN1AmRNA转录物翻译SCN1A蛋白的功能性形式。

[0409] 实施方案210.一种治疗患有由SCN1A蛋白的量或活性不足引起的病况的受试者的方法,该方法包括向所述受试者施用包含与SEQ ID NO:24-114中的任一个具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列的反义寡聚体。

[0410] 实施方案211.一种筛选增加细胞的靶蛋白或功能性RNA的基因表达的药剂的方

法,其中所述细胞具有含有无义介导的RNA降解诱导外显子的mRNA (NMD外显子mRNA),并且其中所述NMD外显子mRNA编码所述靶蛋白或功能性RNA,该方法包括

- (a) 使靶向所述NMD外显子mRNA的测试剂与第一细胞接触;
- (b) 使对照剂与第二细胞接触;

(c) 确定第一细胞中的第一水平,其中第一水平是(i) 由不包含所述RNA降解诱导外显子的NMD外显子mRNA所编码的RNA转录物的水平,或(ii) 由不包含由所述RNA降解诱导外显子编码的氨基酸序列的NMD外显子mRNA所编码的蛋白质的水平;

(d) 确定第二细胞中的第二水平,其中第二水平是(i) 由不包含所述RNA降解诱导外显子的NMD外显子mRNA所编码的RNA转录物的水平,或(ii) 由不包含由所述RNA降解诱导外显子编码的氨基酸序列的NMD外显子mRNA所编码的蛋白质的水平;

其中第一水平高于第二水平;以及

- (e) 选择所述测试剂。

[0411] 实施方案212. 一种筛选增加细胞的靶蛋白或功能性RNA的基因表达的药剂的方法,其中所述细胞具有含有无义介导的RNA降解诱导外显子的mRNA (NMD外显子mRNA),并且其中所述NMD外显子mRNA编码所述靶蛋白或功能性RNA,该方法包括

- (a) 使靶向所述NMD外显子mRNA的测试剂与第一细胞接触;
- (b) 使对照剂与第二细胞接触;

(c) 确定第一细胞中的第一水平,其中第一水平是(i) 由包含所述RNA降解诱导外显子的NMD外显子mRNA所编码的RNA转录物的水平,或(ii) 由包含由所述RNA降解诱导外显子编码的氨基酸序列的NMD外显子mRNA所编码的蛋白质的水平;

(d) 确定第二细胞中的第二水平,其中第二水平是(i) 由包含所述RNA降解诱导外显子的NMD外显子mRNA所编码的RNA转录物的水平,或(ii) 由包含由所述RNA降解诱导外显子编码的氨基酸序列的NMD外显子mRNA所编码的蛋白质的水平;

其中第一水平低于第二水平;以及

- (e) 选择所述测试剂。

[0412] 实施方案213. 根据实施方案211或212所述的方法,其中该方法包括使蛋白质合成抑制剂与所述第一细胞和第二细胞接触;其中所述第一水平是由包含所述RNA降解诱导外显子的NMD外显子mRNA所编码的RNA转录物的水平;并且其中所述第二水平是由包含所述RNA降解诱导外显子的NMD外显子mRNA所编码的RNA转录物的水平。

[0413] 实施方案214. 一种通过增加受试者细胞表达靶蛋白或功能性RNA来治疗有需要的受试者中的Dravet综合征(DS);全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型;家族性发热性惊厥,3A;家族性偏瘫性偏头痛,3;自闭症;早期幼儿癫痫性脑病,13;病窦综合征1;阿尔茨海默病或SUDEP(癫痫猝死)的方法,其中所述细胞具有含有无义介导的RNA降解诱导外显子的mRNA (NMD外显子mRNA),并且其中所述NMD外显子mRNA编码所述靶蛋白或功能性RNA,该方法包括使所述受试者的细胞与调节编码所述靶蛋白或功能性RNA的NMD外显子mRNA的剪接的治疗剂接触,由此从编码所述靶蛋白或功能性RNA的NMD外显子mRNA中排除所述无义介导的RNA降解诱导外显子,从而增加经加工的编码所述靶蛋白或功能性RNA的mRNA的水平,并增加所述靶蛋白或功能性RNA在所述受试者细胞中的表达。

[0414] 实施方案215. 一种增加细胞表达SCN1A蛋白的方法,该细胞具有的mRNA含有无义

介导的RNA降解诱导外显子 (NMD外显子mRNA) 并且编码SCN1A蛋白,该方法包括使所述细胞与调节编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA的剪接的药剂接触,由此从编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA中排除所述无义介导的RNA降解诱导外显子,从而增加经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并增加SCN1A蛋白在所述细胞中的表达。

[0415] 实施方案216.根据实施方案214或215所述的方法,其中所述药剂

- (a) 与编码所述靶蛋白或功能性RNA的NMD外显子mRNA的靶向部分结合;
- (b) 与剪接体的一种或多种组分结合;或者
- (c) (a) 和 (b) 的组合。

[0416] 虽然本文已经示出并描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员明显的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下现将想到许多变化、改变和替代。应当理解,在实施本发明的过程中可以采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本发明的范围,并由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

#### 实施例

[0417] 本发明将通过以下实施例更具体地加以说明。然而,应当理解,本发明不以任何方式由这些实施例来限制。

实施例1:使用下一代测序通过RNAseq鉴定SCN1A转录物中的NMD诱导外显子包含事件

[0418] 使用下一代测序进行全转录组鸟枪法测序,以显示由SCN1A基因产生的转录物的快照,从而鉴定NIE包含事件。为此,从HCN (人皮质神经元) 的细胞核和细胞质部分中分离出多聚A+RNA,并使用Illumina的TruSeq Stranded mRNA文库制备试剂盒来构建cDNA文库。对该文库进行对-端测序,从而产生定位到人类基因组的100个核苷酸的读取(2009年2月,GRCh37/hg19装配体)。SCN1A的测序结果在图2中示出。简言之,图2显示了利用UCSC基因组浏览器(由UCSC基因组信息学小组(生物分子科学与工程中心(Center for Biomolecular Science&Engineering),University of California,Santa Cruz,1156High Street,Santa Cruz,CA 95064)运行并由例如Rosenbloom等人,2015,“The UCSC Genome Browser database:2015update,”Nucleic Acids Research 43,Database Issue,doi:10.1093/nar/gku1177描述)可视化的定位读取,并且可通过峰信号推断读取的覆盖范围和数目。峰高指示由特定区域中读取的密度给出的表达水平。上图按比例示出了SCN1A基因的图示。在100个脊椎动物物种中的保守水平作为峰示出。最高的峰对应于外显子(黑框),而对于大多数内含子(带箭头的线)未观察到峰。在内含子20 (NM\_006920) 中鉴定了保守的峰,在中间图中示出。对保守序列的检查鉴定出侧翼为3'和5'剪接位点(带下划线的序列)的64bp的外显子样序列(下图,以灰色突出显示的序列)。包含该外显子导致移码和在外显子21中引入提前终止密码子,使转录物成为NMD的靶标。

[0419] 示例性SCN1A基因、前mRNA、外显子和内含子序列总结于表2中。各个外显子或内含子的序列总结于表3中。

表2.靶SCN1A基因和前mRNA序列的列表。



物种	SEQ ID NO.	序列类型
人	SEQ ID NO. 1	SCN1A 基因(NC_000002.12)
	SEQ ID NO. 2	SCN1A 前 mRNA (例如, 编码 SCN1A mRNA NM_006920.5)
	SEQ ID NO. 3	外显子 20 基因
	SEQ ID NO. 4	内含子 20 基因
	SEQ ID NO. 5	外显子 21 基因
	SEQ ID NO. 6	外显子 20x 基因
	SEQ ID NO. 7	外显子 20 前 mRNA
	SEQ ID NO. 8	内含子 20 前 mRNA
	SEQ ID NO. 9	外显子 21 前 mRNA
	SEQ ID NO. 10	外显子 20x 前 mRNA
小鼠	SEQ ID NO. 11	SCN1A 基因(NC_000068.7)
	SEQ ID NO. 12	SCN1A 前 mRNA (例如, 编码 SCN1A mRNA NM_001313997.1)
	SEQ ID NO. 13	外显子 21 基因
	SEQ ID NO. 14	内含子 21 基因
	SEQ ID NO. 15	外显子 22 基因
	SEQ ID NO. 16	外显子 21x 基因
	SEQ ID NO. 17	外显子 21 前 mRNA
	SEQ ID NO. 18	内含子 21 前 mRNA
	SEQ ID NO. 19	外显子 22 前 mRNA
	SEQ ID NO. 20	外显子 21x 前 mRNA

表3. SCN1A前mRNA转录物中的靶外显子或内含子的序列

[illegible]





	uuucauauucguucuccucuaugacagcccaucaguacuuagggauccuauaggaaag uaauugugaauacaaauguguauaauacaaaggaaaaauagaauuuguaaaug uuuuugucuuaaauagccaaaauucucuuuuuugaauauauccaaggcgagauuu aaccuuugacugggaguauaauaacugccuacuguaacuaaaauaagacauuag auaagaaagacacuaauuuuauacuauaaaauacauacacauuauagcaauacagc ugauaaaggaaaaagaacauguauuuuuauucuuugccauacauaggcugcuaaccuu aacuuaaaaccucgguucucaguuacacagaguuuuauugucuuuuugagcaaaagc auuuuuccccucuccauuuuacaacagauuuuugcauuuuuugcucuuuuugcucuu guuuagauaguuuuucaaagcauuuauacaauuuuauagaagauugccguguga aaaauuuuuuuuuuuuagaauccaaaauuacgcucuuuuuaccaaucagauaau guauaaggcaagagugcuaauuguccugacacuuacaaccaaaggcuccaacaaca ggcuccucucugcaccacauagaggcuuucagccugugucccccauaaaaccuau uauaaaauuuuauuacuaucuguaagaaaccuguccaauuuuuuauuucucuaagc acauaugaaaacuuucucucagugauccaaagaaagcacaagagcguuuuagauuca cacaagaaucacauuuugauuuuuuauaaucauuuuuuuucccauuuauagcaaa acuuuuuagcuuuuccaauuuuagagcacuuucguuucagaaugcauuuucaguu gucaagggaauuauuuuuuauacuuuuuauuuuuuauuuuuuauuuuuuauuuu auucacauuuuuuacuuuuuauuuuuuauuuuuuauuuuuuauuuuuuauuuuu uuuacaauccagccauuaccucuccuccuguccccuccuauuaguuuucacucacau uccuccuccccuugccucugagaggauuguccuccuccucacuaaggccuccucuucc ccaggggcuucaaaguuuccucaaaggauuauacacauuucuccacugagaccaggccag gcaguccucugcuuucugcccagccugugauuuguccuugguagcucagucucug gaagcucccuggggucuggguuuaguuugggacugcugggucuuuccuauaggaguuacc uccccuuaacuuuucuaauccuucccuuuuacaaucacacagguuaccagacuucagu ccaauugguuaguguaaaauuuggcaucugucucugcagcuguuuagggggcuc agaggacagccauugcuaaggcuccugccuacaagcagcacacauaacacaguuauag ugucaggccuuuauuagaaauuagcuacguauauaaggguuugauuauuacuuacac uuuugaucuuuuuagaaauuauuuuauuauuauuauuauuauuauuauuauuauu acuuuccauaaacaaugagucuaauuuuccuuuuguguaagaaauaacuuuaucauuu uuuuuauuauuagcuuuuuguaauuauuuguaauugcuuucuuuuuuuuuuuuuuuu agucacuaaaacaaaaauuucugguagauuuuacgaagcugacuccuuggucagcuu ggcacauagugagaccacaaauuucuaagguacagcgcaauuccacaccaguuuug gcauuuguaagucuaaaacaaaccuucuguuuauuucuguuuuuugauuuuucuaau gagacauuuuacuuuuguaagaguuauuauuacuguggaugggcgagguuugggca ugaugaugauuugaaagcgggaagugagcuagaguuuacagaaacucucacuuuau ccuccuuggcagcauagaaccgaaucgcuguguccgaguguaaccaggcagucuu uuuuguuuuggguuuuuuugcucucuuucaaagcaugugcuuucacgaacacuaacca aacacagcaugcugcauagugcuugagaaggaguuagaaagaaacaaacaguuauca ucacguugcccuuuguuuuugcaugcuuauugcacacuuuuuggcugacagcuuuu gaacauuuuauuuguaauucaaauuuccaguccaaauuuuuuuuacuuuugugaaau gaacgggaauagaaaccgugucguuauuaccuagggucaaaauuuuuuuuuuuuuuu ucguuaguuuuuuuuuuuuccaagcuggggaaauuuguaaaacuuuuuuccaaagaaacuaa gucuuuaguuugcuagggaacagcgagugagcauauuacaaaaguuuacacaaauug uucugucuuuagcuuucuaacuaauuauuauuauuauuauuauuauuauuauuauu auuuuugcuuacuuuacccuuuuuugcuuacuuuauuauuacuuuugcaguuuauuau guuuggggcuuaggggaggggaguggggaggggagaaauuugcaccacaguuagggaau acaggauuuuuuuccaaauccacuuuuuuuauuagagcuuuaacuuuuuuggggaaa aaaaaguuuauucucugacuuaaccuugugguuuuauuacccagaaguuuacuuuuuu uuacguuucacugaaauuaguuuagcuuuuauuacuuuauuuccauuuuauuagggaa auuacuaauuugugaggguaggguaggccuuguguaaggauugcugauuagaaacuuuu
--	---



		aaauugaaaaaacuuaaaaaaguaauauauacaggaaagccugugucuaauuuuuu agggagggccauaaaggagauaguugcucuaauuuuacacaucagccuauuuu ggcuucugccuugauagcgcacucugaaauaucuucuauguuacuccucacuu uauuguuacugguuucauuuccuugggccacauagcccacuaauuuuguaaucccaa uggauauuuguccuuaacaaagucagccagggcucagaagacaaggaaugggcucu uauacuucugucagacaggcaaaaacuucuaaaaaauauacuauaauaaaaaacaaga gaugauauucuaauuaaaacuaacaaaaguggcagggccccccuccccaacaugagu agaauuaaucugacgucacauucaagucugaaacacacuugcgaauuaagagcaca uagggccagccuuuauuccucuaaguuacuaaagucgagucaauaggugagcuau agagaaggagccaagacuaccuauagucuaauuaaaaaaaaaaaucccauuuuuaa ucuguaguccgaauuaaggacaagagagagggaauaucuuugacauuagaaaug gagaaaauuuuagcacaggacuuacucagucacaucagaguugauaaguacgua ugacaucccucuuuuuccuguuuuccugagaaaugaucucucuauguuuacuuua agauaaguuuauugaauaaacucaguaaaugaaacaacugacauagucggagcuug aaauaaacgaugugaugaucuacugaaauacaugaucuaaaauugucuugcucua ugcaaaaacuacuauuaguuauagcaaugcauggaauuaaaggccaaaaauauua gauguuuaaaauaguuuuauuuuauacaucugaauuuuauuuauuuuaaaguu auugguccaaucaauuacugcccaauuuuaguucuaauucuuugagauacuguuu uguuuugggaauuuuuuuuauagagcuauucucuuugccuaggaguuccuacucuc cuccuccuuuuuuuuuuuacuaauaaacuacacauugucucuaucaggagcuacu ucucccauuuugcuuuuccuuuagcaccuuuuuuauauuagauuuuucuuuuu ccaucucuuugcauauugccuauuuuucuuuuuacagcauauuuuaaaagac ugauuuuauguuaagauuuuucugcuuugcucuuacacagauaggauaaguagu cuugauagaaaaaaaucauagauuccuagggggaugucuuuuugcuuuuaacaau aagggaucugacuucucuuucuccauuuuguguaauag
SEQ ID NO. 19	外显子 22 前 mRNA	gauaaucuuugcuccaacuuggauggggaggagcggugguuccuccccucagccuuu auuaugg
SEQ ID NO. 20	外显子 21x 前 mRNA	GUGGUUGUGAAUGCCCGUUAAGGAGCAAUCCAUCU CAUGAAUGUGCUUCUGGUUUGCCUUAUAUUCUGGCUAA UUUUCAGCAUACUGGGCGUAAAUUUGUUUGCUGGCAAA UUCUACCACUGUGUUAACACCACAACUGGUGACAUUU UGAGAUCAGCGAAGUCAUAUAUCAUUCUGAUUGCCUAA AACUAAUAGAAAGAAAUGAGACCGCCCGUGGAAAAAU GUGAAAGUAAACUUUGAUAAUGUAGGAUUUGGGUAUC UUUCUUUGCUUCAAGUU

### 实施例2：通过环己酰亚胺处理确认NIE

[0420] 使用来自DMSO处理的(CHX-)或环己酰亚胺处理的(CHX+)小鼠Neuro 2A细胞(图3A)和RenCell VM(人类神经祖细胞)(图3B)的细胞质RNA以及外显子20和外显子23中的引物进行的RT-PCR分析,证实了存在对应于NMD诱导外显子(20x)的条带。通过测序确认了产物的身份。对条带进行光密度测定分析,以计算总SCN1A转录物的外显子20x包含百分比。用环己酰亚胺(CHX+)处理RenCell VM以抑制NMD导致与细胞质部分中的NMD诱导外显子20x相对应的产物增加了2倍(比较浅灰色条,CHX-,与深灰色条,CHX+)。

### 实施例3：SCN1A外显子20x区域ASO步移

[0421] 在图4中显示了使用2'-MOE ASO、PS骨架,针对3'剪接位点直接上游、3'剪接位点中、外显子20x、5'剪接位点中和5'剪接位点下游的SCN1A外显子20x区域靶向序列进行的ASO步移的图示。将ASO设计为通过一次移位5个核苷酸来覆盖这些区域。靶向SCN1A的ASO的列表总结在表4中。ASO的序列总结在表5a和表5b以及表6a和表6b中。

表4. 靶向SCN1A的ASO的列表

基因 SEQ ID NO.	前 mRNA SEQ ID NO.	ASO SEQ ID NO.	NIE
SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.2	SEQ ID NO: 21-67, 210-256	外显子 20x
SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO: 68-114, 257-303	外显子 21x

表5a. 靶向人SCN1A的ASO的序列

SEQ ID NO.	序列名称	ASO 序列
21	SCN1A-IVS19X-81	GATGCTCTCCGTCTGTTT
22	SCN1A-IVS19X-76	TTCATGATGCTCTCCGTC
23	SCN1A-IVS19X-71	TTTTGTTTCATGATGCTCT
24	SCN1A-IVS19X-66	TTACTTTTTGTTTCATGAT
25	SCN1A-IVS19X-61	TGGTGTTACTTTTTGTTC
26	SCN1A-IVS19X-56	ACATTTGGTGTTACTTTT
27	SCN1A-IVS19X-51	ACAGAACATTTGGTGTTA
28	SCN1A-IVS19X-46	ATATGACAGAACATTTGG
29	SCN1A-IVS19X-41	ATCTGATATGACAGAACAA
30	SCN1A-IVS19X-36	TAGAAATCTGATATGACA
31	SCN1A-IVS19X-31	TTAGTTAGAAATCTGATA
32	SCN1A-IVS19X-26	TGTTATTAGTTAGAAATC
33	SCN1A-IVS19X-21	TAGTTTGTTATTAGTTAG
34	SCN1A-IVS19X-16	ATATATAGTTTGTTATTA
35	SCN1A-IVS19X-11	TAGAAATATATAGTTTGT
36	SCN1A-IVS19X-6	CAAAATAGAAATATATAG
37	SCN1A-IVS19X-3	ATACAAAATAGAAATATA
38	SCN1A-IVS19X-1	CTATACAAAATAGAAATA
39	SCN1A-I19X/E20X+2	TCCTATACAAAATAGAAA
40	SCN1A-I19X/E20X+4	TATCCTATACAAAATAGA



SEQ ID NO.	序列名称	ASO 序列
41	SCN1A-I19X/E20X+6	ATTATCCTATACAAAATA
42	SCN1A-Ex20X+1	AGTTGGAGCAAGATTATC
43	SCN1A-Ex20X+6	ATCCAAGTTGGAGCAAGA
44	SCN1A-Ex20X+11	ACCCCATCCAAGTTGGAG
45	SCN1A-Ex20X+16	GCTCCACCCCATCCAAGT
46	SCN1A-Ex20X+21	CCAGCGCTCCACCCATC
47	SCN1A-Ex20X-24	GAACCAGCGCTCCACCCC
48	SCN1A-Ex20X-19	GGGAGGAACCAGCGCTCC
49	SCN1A-Ex20X-3	ATAATAAAGGGCTCAGGG
50	SCN1A-Ex20X-1	CCATAATAAAGGGCTCAG
51	SCN1A-E20X/I20X-6	GTAATACAGTACCCATAA
52	SCN1A-E20X/I20X-4	GGGTAATACAGTACCCAT
53	SCN1A-IVS20X+13	TTAAAGGTAGCAAAAGGG
54	SCN1A-IVS20X+18	AAGGATTAAAGGTAGCAA
55	SCN1A-IVS20X+23	AGTGCAAGGATTAAAGGT
56	SCN1A-IVS20X+28	GTCACAGTGCAAGGATTA
57	SCN1A-IVS20X+33	CATAAGTCACAGTGCAAG
58	SCN1A-IVS20X+38	CTACACATAAGTCACAGT
59	SCN1A-IVS20X+43	CCCCACTACACATAAGTC
60	SCN1A-IVS20X+48	CCTCACCCCACTACACAT
61	SCN1A-IVS20X+53	CCCTCCCTCACCCCACTA
62	SCN1A-IVS20X+58	CCAATCCCTCCCTCACCC
63	SCN1A-IVS20X+63	CCTTCCCAATCCCTCCCT
64	SCN1A-IVS20X+68	AGTACCCTTCCCAATCCC
65	SCN1A-IVS20X+73	ATAATAGTACCCTTCCCA
66	SCN1A-IVS20X+78	GTGCAATAATAGTACCCT
67	SCN1A-IVS20X+83	CTGTGGTGCAATAATAGT

表5b. 靶向人SCN1A的ASO的序列

SEQ ID NO.	序列名称	ASO 序列
210	SCN1A-IVS19X-81	GAUGCUCUCCGUCUGUUU
211	SCN1A-IVS19X-76	UUCAUGAUGCUCUCCGUC
212	SCN1A-IVS19X-71	UUUUGUUCAUGAUGCUCU
213	SCN1A-IVS19X-66	UUACUUUUUGUUCAUGAU
214	SCN1A-IVS19X-61	UGGUGUUACUUUUUGUUC
215	SCN1A-IVS19X-56	ACAUUUGGUGUUACUUUU
216	SCN1A-IVS19X-51	ACAGAACAUUUGGUGUUA
217	SCN1A-IVS19X-46	AUAUGACAGAACAUUUGG
218	SCN1A-IVS19X-41	AUCUGAUAUGACAGAAC
219	SCN1A-IVS19X-36	UAGAAAUCUGAUAUGACA
220	SCN1A-IVS19X-31	UUAGUUAGAAAUCUGAUA
221	SCN1A-IVS19X-26	UGUUAUUAGUUAGAAAUC

SEQ ID NO.	序列名称	ASO 序列
222	SCN1A-IVS19X-21	UAGUUUGUUAUUAGUUAG
223	SCN1A-IVS19X-16	AUAUAUAGUUUGUUAUUA
224	SCN1A-IVS19X-11	UAGAAAUUAUAGUUUGU
225	SCN1A-IVS19X-6	CAAAAUAGAAAUUAUAG
226	SCN1A-IVS19X-3	AUACAAAUAAGAAUAUA
227	SCN1A-IVS19X-1	CUAUACAAAUAAGAAUA
228	SCN1A-I19X/E20X+2	UCCUAUACAAAUAAGAAA
229	SCN1A-I19X/E20X+4	UAUCCUAUACAAAUAAGA
230	SCN1A-I19X/E20X+6	AUUAUCCUAUACAAAUA
231	SCN1A-Ex20X+1	AGUUGGAGCAAGAUUAUC
232	SCN1A-Ex20X+6	AUCCAAGUUGGAGCAAGA
233	SCN1A-Ex20X+11	ACCCCAUCCAAGUUGGAG
234	SCN1A-Ex20X+16	GCUCCACCCCAUCCAAGU
235	SCN1A-Ex20X+21	CCAGCGCUCCACCCCAUC
236	SCN1A-Ex20X-24	GAACCAGCGCUCCACCCC
237	SCN1A-Ex20X-19	GGGAGGAACCAGCGCUCC
238	SCN1A-Ex20X-3	AUAAUAAAGGGCUCAGGG
239	SCN1A-Ex20X-1	CCAUAUAAAGGGCUCAG
240	SCN1A-E20X/I20X-6	GUAAUACAGUACCCAUAA
241	SCN1A-E20X/I20X-4	GGGUAAUACAGUACCCAU
242	SCN1A-IVS20X+13	UUAAGGUAGCAAAAGGG
243	SCN1A-IVS20X+18	AAGGAUUAAGGUAGCAA
244	SCN1A-IVS20X+23	AGUGCAAGGAUUAAGGU
245	SCN1A-IVS20X+28	GUCACAGUGCAAGGAUUA
246	SCN1A-IVS20X+33	CAUAAGUCACAGUGCAAG
247	SCN1A-IVS20X+38	CUACACAUAAAGUCACAGU
248	SCN1A-IVS20X+43	CCCCACUACACUAAGUC
249	SCN1A-IVS20X+48	CCUCACCCACUACACAU
250	SCN1A-IVS20X+53	CCCUCCCUACCCCAUA
251	SCN1A-IVS20X+58	CCAUUCCCUCCUCACCC
252	SCN1A-IVS20X+63	CCUCCCAUCCCUCCCU
253	SCN1A-IVS20X+68	AGUACCCUCCCAUCC
254	SCN1A-IVS20X+73	AUAUAGUACCCUCCCA
255	SCN1A-IVS20X+78	GUGCAAUAUAGUACCCU
256	SCN1A-IVS20X+83	CUGUGGUGCAAUAUAGU

表6a. 靶向小鼠SCN1A的ASO的序列

SEQ ID NO.	序列名称	ASO 序列
68	mScn1a-IVS20X-81	GATGCTCACTGCCTGTTT
69	mScn1a-IVS20X-76	TATATGATGCTCACTGCC
70	mScn1a-IVS20X-71	TTTTGTATATGATGCTCA
71	mScn1a-IVS20X-66	TTACTTTTTGTATATGAT
72	mScn1a-IVS20X-61	TGGTGTACTTTTTGTAT

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

表6b. 靶向小鼠SCN1A的ASO的序列

SEQ ID NO.	序列名称	ASO 序列
257	mScn1a-IVS20X-81	GAUGCUCACUGCCUGUUU
258	mScn1a-IVS20X-76	UAUAUGAUGCUCACUGCC
259	mScn1a-IVS20X-71	UUUUGUAUAUGAUGCUCA
260	mScn1a-IVS20X-66	UUACUUUUUGUAUAUGAU
261	mScn1a-IVS20X-61	UGGUGUUACUUUUUGUAU
262	mScn1a-IVS20X-56	ACAUUUGGUGUUACUUUU
263	mScn1a-IVS20X-51	ACAGAACAUUUGGUGUUA
264	mScn1a-IVS20X-46	AUAUGACAGAACAUAUUGG
265	mScn1a-IVS20X-41	AGCUGAUUAUGACAGAACAA
266	mScn1a-IVS20X-36	UAGAAAGCUGAUUAUGACA
267	mScn1a-IVS20X-31	UUAGUUAGAAAGCUGAUA
268	mScn1a-IVS20X-26	UAUUAUUAGUUAGAAAGC
269	mScn1a-IVS20X-21	UAGUUUAUUAUUAGUUAG
270	mScn1a-IVS20X-16	AUAUAUAGUUUAUUAUUA
271	mScn1a-IVS20X-11	UAGAAUAUAUAGUUUAU
272	mScn1a-IVS20X-6	UAAAAUAGAAUAUAUAG
273	mScn1a-IVS20X-3	AUAUAAAAUAGAAUAUA
274	mScn1a-IVS20X-1	CUAUUAUAAAAUAGAAUA
275	mScn1a-I20X/E21X+2	UCCUAUAUAAAAUAGAAA
276	mScn1a-I20X/E21X+4	UAUCCUAUAUAAAAUAGA
277	mScn1a-I20X/E21X+6	AUUAUCCUAUAUAAAAUA
278	mScn1a-Ex21X+1	AGUUGGAGCAAGAUUAUC
279	mScn1a-Ex21X+6	AUCCAAGUUGGAGCAAGA
280	mScn1a-Ex21X+11	ACCCCAUCCAAGUUGGAG
281	mScn1a-Ex21X+16	GCUCCACCCCAUCCAAGU
282	mScn1a-Ex21X+21	CCACCGCUCCACCCCAUC
283	mScn1a-Ex21X-24	GAACCACCGCUCCACCCC
284	mScn1a-Ex21X-19	GGGAGGAACCACCGCUCC
285	mScn1a-Ex21X-3	AUAAUAAAGGGCUGAGGG
286	mScn1a-Ex21X-1	CCAUAAUAAAGGGCUGAG
287	mScn1a-E21X/I21X-6	GUAUACAGUACCCAUA
288	mScn1a-E21X/I21X-4	GGGUAAUACAGUACCCA
289	mScn1a-IVS21X+13	UUAAAGGUAGCAAAAGGG
290	mScn1a-IVS21X+18	AAGGAUUAAGGUAGCAA
291	mScn1a-IVS21X+23	AGUGCAAGGAUUAAGGU
292	mScn1a-IVS21X+28	GUCACAGUGCAAGGAUUA
293	mScn1a-IVS21X+33	CAUAAGUCACAGUGCAAG
294	mScn1a-IVS21X+38	CUACACAUAAAGUCACAGU
295	mScn1a-IVS21X+43	UCCCACUACACAUAAAGUC
296	mScn1a-IVS21X+48	CUCAAUCCCACUACACAU
297	mScn1a-IVS21X+53	CCUCCCUCAAUCCCACUA
298	mScn1a-IVS21X+58	CACUCCCUCCCUCAAUCC

SEQ ID NO.	序列名称	ASO 序列
299	mScn1a-IVS21X+63	CUUCCCACUCCCUC
300	mScn1a-IVS21X+68	GUACCCUCCCACUCCCU
301	mScn1a-IVS21X+73	CAAUUGUACCCUCCCCAC
302	mScn1a-IVS21X+78	UGGUGCAAUUGUACCCUU
303	mScn1a-IVS21X+83	UACUGUGGUGCAAUUGUA

#### 实施例4:通过RT-PCR评价的SCN1A外显子20x区域ASO步移

[0422] ASO步移序列可以通过例如RT-PCR来评价。在图5A中,代表性的PAGE显示了通过gymnotic摄取,在RenCell VM细胞中以20 $\mu$ M的浓度,进行假处理(Sham)、SMN对照ASO处理(SMN)或如本文实施例3中以及图4的说明中所述用靶向外显子20x区域的2'-MOE ASO处理的SCN1A的SYBR-safe染色的RT-PCR产物。将与外显子20x包含(顶部条带)和全长(外显子20x排除,底部条带)相对应的两种产物进行定量,并且外显子20x包含百分比以条形图绘出(图5B)。黑色线表示相对于Sham没有变化。全长产物也相对于RPL32内部对照进行归一化,并且相对于Sham的变化倍数以条形图绘出(图5C)。黑色线表示相对于Sham的比例为1且没有变化。

#### 实施例5:通过RT-qPCR评价的SCN1A外显子20x区域ASO步移

[0423] 使用相同ASO摄取实验获得、如图6所示通过SYBR-safe RT-PCR进行评价、相对于RPL32进行归一化的SYBR-green RT-qPCR SCN1A扩增结果,以相对于Sham的变化倍数作图,从而确认了SYBR-safe RT-PCR结果。黑色线表示比例为1(相对于Sham没有变化)。

#### 实施例6:所选ASO在CXH处理的细胞中的剂量依赖性作用。

[0424] 在图8A中,代表性的PAGE显示了通过RNAiMAX转染,在Neuro2A(小鼠神经母细胞瘤)细胞中假处理的(Sham,仅RNAiMAX)或以30nM、80nM和200nM的浓度用靶向外显子21x(小鼠命名法,对应于人类外显子20x)的Ex21x+1 2'-MOE ASO处理的小鼠Scn1a的SYBR-safe染色的RT-PCR产物。Ex21x+1(小鼠命名法)与Ex20x+1(人类命名法)相同。将与外显子21x包含(顶部条带)和全长(外显子21x排除,底部条带)相对应的两种产物进行定量,并且外显子21x包含百分比以条形图绘出(图8B)。全长产物也相对于HPRT内部对照进行归一化,并且相对于Sham的变化倍数以条形图绘出(图8C)。黑色线表示相对于Sham比例为1且没有变化。

#### 实施例7:所选ASO的玻璃体内(IVT)注射。

[0425] 图9A显示了来自以10mM浓度注射PBS(1 $\mu$ L)的左眼(-)或者注射IVS20x-21、Ex21x+1、IVS21x+18、IVS21x+33或Cep290(阴性对照ASO;Gerard等人,Mol. Ther. Nuc. Ac., 2015) 2'-MOE ASO(1 $\mu$ L)的右眼(+)的小鼠Scn1a的SYBR-safe染色的RT-PCR产物的PAGE。Ex21x+1、IVS21x+18和IVS21x+33(小鼠命名法)与Ex20x+1、IVS20x+18和IVS20x+33(人类命名法)相同。将与外显子21x包含(顶部条带)和全长(外显子21x排除,底部条带)相对应的两种产物进行定量,并且外显子21x包含百分比在图9B中绘出。白色条对应于注射ASO的眼,而灰色条对应于注射PBS的眼,每组n=5。将全长产物相对于GAPDH内部对照进行归一化,并且注射ASO的眼相对于注射PBS的眼的变化倍数在图9C中绘出。黑色线表示相对于PBS的比例为1且没有变化,每组n=5。

#### 实施例8:所选ASO的脑室内(ICV)注射。

[0426] 图10A显示了来自未注射(-,无ASO对照)或者注射300 $\mu$ gCep290(阴性对照ASO; Gerard等人,Mol. Ther. Nuc. Ac., 2015)、Ex21x+1、IVS21x+18、IVS21x+33 2'-MOE ASO的大

脑的小鼠Scn1a的SYBR-safe染色的RT-PCR产物的PAGE。Ex21x+1、IVS21x+18和IVS21x+33 (小鼠命名法) 与Ex20x+1、IVS20x+18和IVS20x+33 (人类命名法) 相同。将与外显子21x包含 (顶部条带) 和全长 (外显子21x排除, 底部条带) 相对应的两种产物进行定量, 并且外显子21x包含百分比在图10B中以条形图绘出,  $n=6$  (各自靶向ASO),  $n=5$  (Cep290 ASO),  $n=1$  (未注射的, 无ASO对照)。使用跨越外显子21和22接合点的两种不同的探针进行Taqman PCR, 并将产物相对于GAPDH内部对照进行归一化, 并且注射ASO的脑相对于注射Cep290的脑的变化倍数在图10C中以条形图绘出。黑色线表示相对于Cep290的比例为1且没有变化,  $n=6$  (各自靶向ASO),  $n=5$  (Cep290 ASO),  $n=1$  (未注射的, 无ASO对照)。

[0427] 图11描绘了在C57BL6J小鼠 (雄性, 3个月大) 中ICV注射选定ASO的示例性剂量依赖性响应。图11A显示了来自注射300 $\mu$ g Cep290 (阴性对照ASO; Gerard等人, Mol. Ther. Nuc. Ac., 2015) 或33 $\mu$ g、100 $\mu$ g和300 $\mu$ g Ex21x+1 2'-MOE ASO的大脑的小鼠Scn1a的SYBR-safe染色的RT-PCR产物的PAGE凝胶。Ex21x+1 (小鼠命名法) 与Ex20x+1 (人类命名法) 相同。将与外显子21x包含 (顶部条带) 和全长 (外显子21x排除, 底部条带) 相对应的两种产物进行定量。图11B描绘了根据图11A中的数据绘出外显子21x包含百分比的图,  $n=5$  (每组)。图11C描绘了使用跨越外显子21和22接合点的两种不同探针进行的Taqman qPCR测定的结果的图。将产物相对于Gapdh内部对照进行归一化, 并绘出注射ASO的大脑相对于注射Cep290的大脑的变化倍数。黑色线表示相对于Cep290的比例为1且没有变化,  $n=5$  (每组)。

[0428] 图12描绘了在C57BL6J小鼠 (出生后第2天) 中ICV注射选定ASO的示例性结果。图12A显示了来自未注射 (-, 无ASO对照) 或者注射20 $\mu$ g Ex21x+1 2'-MOE ASO的大脑的小鼠Scn1a的SYBR-safe染色的RT-PCR产物的PAGE凝胶。将与外显子21x包含 (顶部条带) 和全长 (外显子21x排除, 底部条带) 相对应的两种产物进行定量。Ex21x+1 (小鼠命名法) 与Ex20x+1 (人类命名法) 相同。图12B描绘了根据图12A中的数据绘出外显子21x包含百分比的图,  $n=4$  (每组)。图12C描绘了使用跨越外显子21和22接合点的两种不同探针进行的Taqman qPCR测定的结果的图。将产物相对于Gapdh内部对照进行归一化, 并绘出注射ASO的大脑相对于注射无ASO对照的大脑的变化倍数。黑色线表示相对于无ASO对照的比例为1且没有变化,  $n=4$  (每组)。

[0429] 实施例9: 用于治疗Dravet综合征的核基因输出的靶向增强

[0430] Dravet综合征 (DS) 是一种可怕的儿童遗传病, 其特征在于严重的癫痫发作、认知和运动损害以及死亡。DS的主要原因是钠电压门控通道1型 $\alpha$ 亚单位 (Nav1.1) 的表达降低。SCN1A非生产性剪接事件在人与小鼠之间保守。图13A描绘了绘出所示小鼠CNS样品中的外显子21x包含百分比的图。图13B描绘了绘出所示人CNS样品中的外显子20x包含百分比的图。在该研究中, 利用反义寡核苷酸 (ASO) 疗法来增加生产性Scn1a mRNA, 随后恢复Nav1.1蛋白的水平。

[0431] 图14A描绘了绘出在所示剂量下的外显子21x包含减少百分比的图 (每组 $n=3-6$ )。图14B描绘了绘出在所示剂量下的Scn1a mRNA增加百分比的图 (每组 $n=3-6$ )。图14C描绘了绘出在所示剂量下的Nav 1.1蛋白水平增加百分比的图 (每组 $n=2$ )。

[0432] 图15A描绘了绘出在所示剂量下的外显子21x包含减少百分比的图 (每组 $n=4$ )。15B描绘了绘出在所示剂量下的Scn1a mRNA增加百分比的图 (每组 $n=4$ )。

[0433] 图16描绘了在出生后第2天的小鼠中通过ICV注射以10 $\mu$ g剂量施用的选定的Scn1a

靶向ASO,在注射后第5天通过SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN4A、SCN5A、SCN7A、SCN8A、SCN9A、SCN10A和SCN11A的Taqman qPCR进行评价,以评估靶标选择性。将使用Ex20x+1ASO获得的相对于Gapdh归一化的Taqman-qPCR扩增结果作为相对于注射PBS的小鼠的变化倍数作图(每组n=3-6)。

[0434] 图17A-图17B描绘了在野生型(WT)小鼠或由129S-Scn1a<sup>tm1K<sup>ea</sup></sup> x C57BL/6J杂交产生的杂合Dravet小鼠(HET)F1小鼠中,在出生后第2天以所示剂量脑室内(ICV)注射选定ASO在注射后3天的示例性结果(每组n=9-14)。图17A描绘了使用跨越外显子21和22的探针进行的Taqman qPCR测定的结果的图。将产物相对于Gapdh内部对照进行归一化,并绘出注射ASO的大脑相对于注射PBS的大脑的变化倍数。图17B描绘了来自使用抗Nav1.1抗体进行的western印迹法的结果的图。将产物相对于丽春红染色的条带进行归一化,并绘出注射ASO的大脑相对于注射PBS的大脑的变化倍数。

[0435] 图19是相对于ICV注射SCN1A靶向ASO后的时间,绘出小鼠冠状脑切片中Scn1a mRNA水平增加的图。如图所示,如通过Taqman qPCR所定量的,注射后Scn1a mRNA水平的增加至少维持80天(每组n=3-9)。

[0436] 图20是示例性存活曲线,其证明了在Dravet小鼠模型中由SCN1A靶向ASO提供的100%存活益处。WT和杂合Dravet小鼠(+/-)——来自129S-scn1a<sup>tm1K<sup>ea</sup></sup> x C57BL/6J杂交的F1子代,在出生后第2天盲法接受20μg PBS或ASO的单剂量ICV注射(标记为A或B的治疗),并监测其存活情况。如图所示,A+/-组的小鼠(接受PBS处理的Dravet小鼠)大约从出生后第16天开始死亡,而包括B+/- (接受ASO治疗的Drave小鼠)组在内的其他三组的所有小鼠都在出生后存活至少35天(每组n=32-39)。

[0437] 图18描绘了通过自由摄取在RenCells中的SCN1A外显子20x区域ASO微步移的示例性结果。通过一次移动1个核苷酸(6-41)或者通过缩短ASO 17的长度(1-5),将ASO设计为覆盖图6中的三个先前鉴定的靶向ASO周围的区域(以星号标出)。该图描绘了通过SYBR-green qPCR测量的外显子20x包含百分比。黑色线表示相对于无ASO(-)没有变化。

[0438] ASO的序列总结在表7a和表7b中。

表7a. 靶向人SCN1A的ASO的序列

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

表7b. 靶向人SCN1A的ASO的序列



ASO ID	序列 5'-3'	SEQ ID NO:
<b>1_U</b>	UUGGAGCAAGAUUAUC	342
<b>2_U</b>	GUUGGAGCAAGAUUAUC	343
<b>3_U</b>	GUUGGAGCAAGAUUAU	344
<b>4_U</b>	AGUUGGAGCAAGAUUAU	345
<b>5_U</b>	AGUUGGAGCAAGAUUA	346
<b>6_U</b>	GAUUAUCCUAUACAAAAU	347
<b>7_U</b>	AGAUUAUCCUAUACAAAA	348
<b>8_U</b>	AAGAUUAUCCUAUACAAA	349
<b>9_U</b>	CAAGAUUAUCCUAUACAA	350
<b>10_U</b>	GCAAGAUUAUCCUAUACA	351
<b>11_U</b>	AGCAAGAUUAUCCUAUAC	352
<b>12_U</b>	GAGCAAGAUUAUCCUAUA	353
<b>13_U</b>	GGAGCAAGAUUAUCCUAU	354
<b>14_U</b>	UGGAGCAAGAUUAUCCUA	355
<b>15_U</b>	GUUGGAGCAAGAUUAUCC	356
<b>16_U</b>	UUGGAGCAAGAUUAUCCU	357
<b>18_U</b>	AAGUUGGAGCAAGAUUAU	358

<b>19_U</b>	CAAGUUGGAGCAAGAUUA	359
<b>20_U</b>	CCAAGUUGGAGCAAGAUU	360
<b>21_U</b>	UCCAAGUUGGAGCAAGAU	361
<b>22_U</b>	AGUACCCAUAUAAAAGGG	362
<b>23_U</b>	AAUACAGUACCCAUAUA	363
<b>24_U</b>	AUUAAGGUAGCAAAAAGG	364
<b>25_U</b>	GAUUAAGGUAGCAAAAAG	365
<b>26_U</b>	GGAUUAAGGUAGCAAAA	366
<b>27_U</b>	AGGAUUAAGGUAGCAAAA	367
<b>29_U</b>	CAAGGAUUAAGGUAGCA	368
<b>30_U</b>	GCAAGGAUUAAGGUAGC	369
<b>31_U</b>	UGCAAGGAUUAAGGUAG	370
<b>32_U</b>	GUGCAAGGAUUAAGGUA	371
<b>33_U</b>	AGUCACAGUGCAAGGAUU	372
<b>34_U</b>	AAGUCACAGUGCAAGGAU	373
<b>35_U</b>	UAAGUCACAGUGCAAGGA	374
<b>36_U</b>	AUAAGUCACAGUGCAAGG	375
<b>38_U</b>	ACAUAAGUCACAGUGCAA	376
<b>39_U</b>	CACAUAGUCACAGUGCA	377
<b>40_U</b>	ACACUAAGUCACAGUGC	378
<b>41_U</b>	UACACUAAGUCACAGUG	379

[0439] 虽然本文已经示出并描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员明显

的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下现将想到许多变化、改变和替代。应当理解,在实施本发明的过程中可以采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本发明的范围,并由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

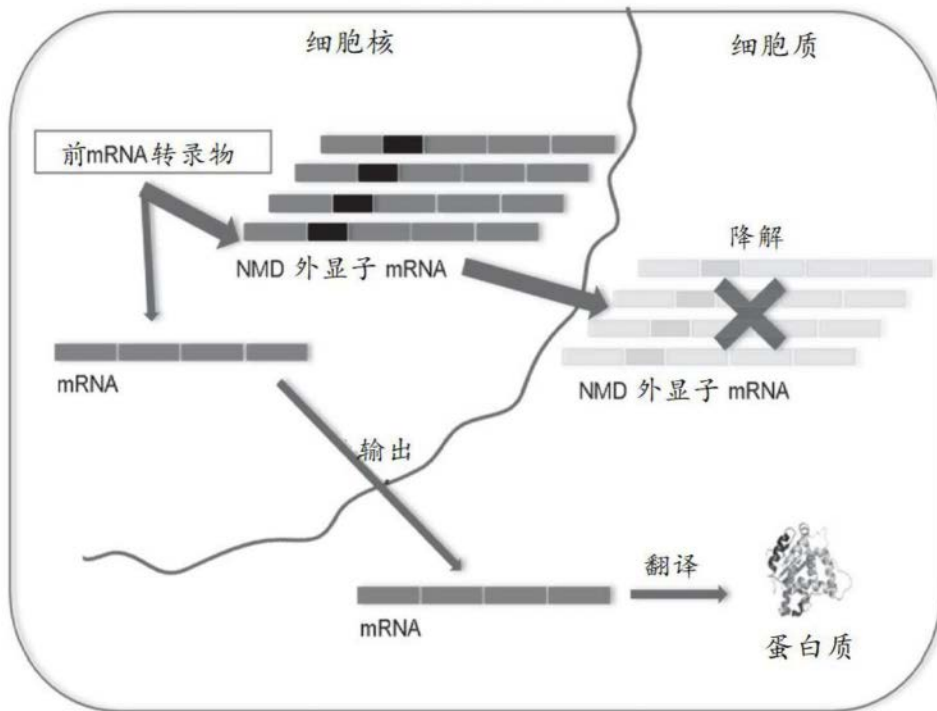


图1A

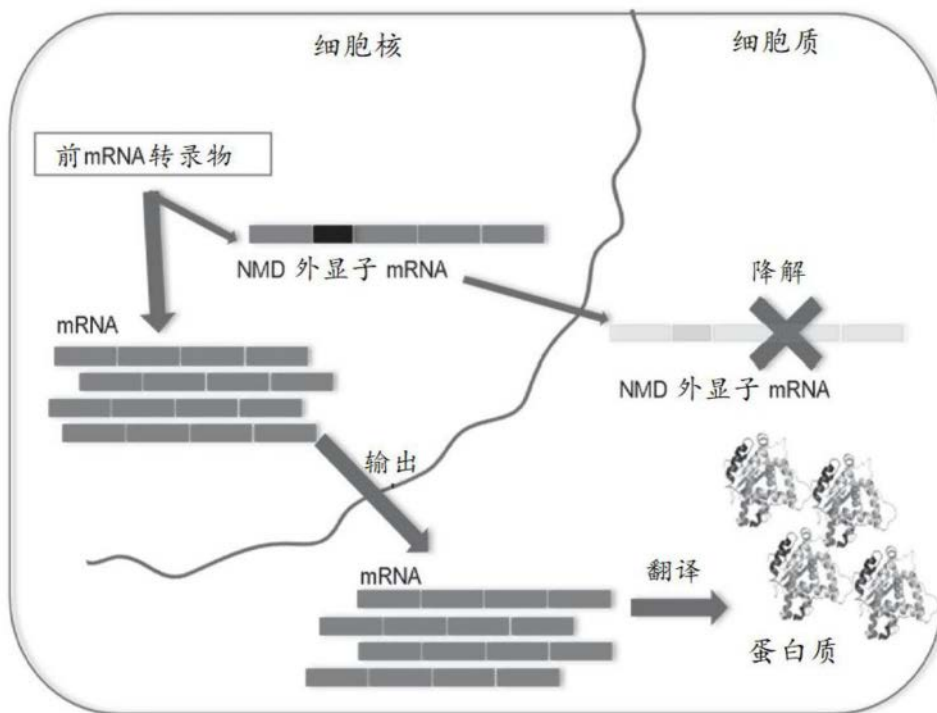


图1B

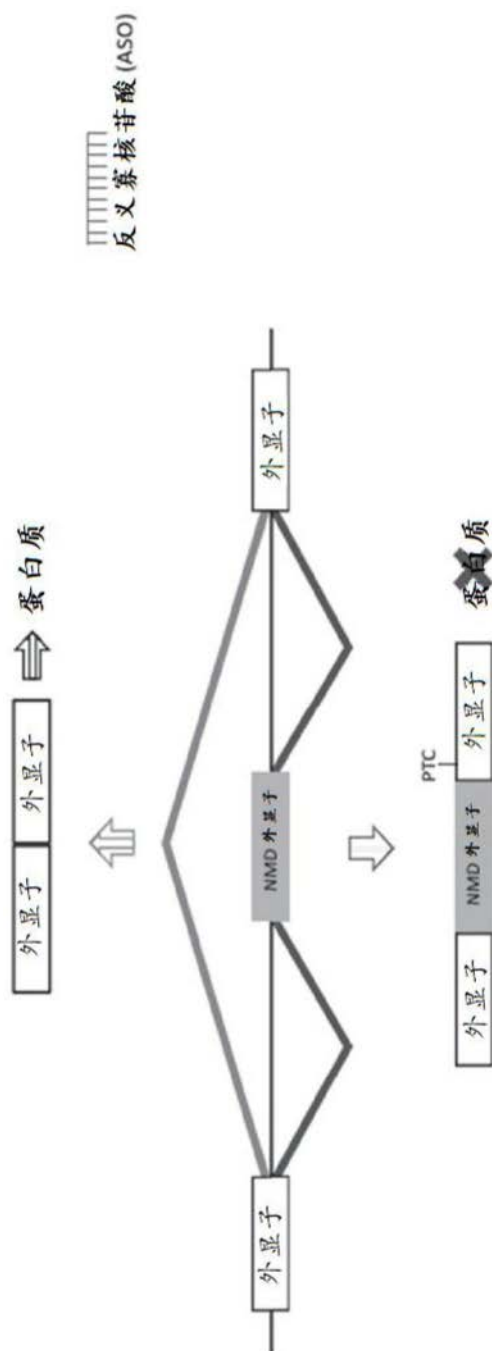


图1C



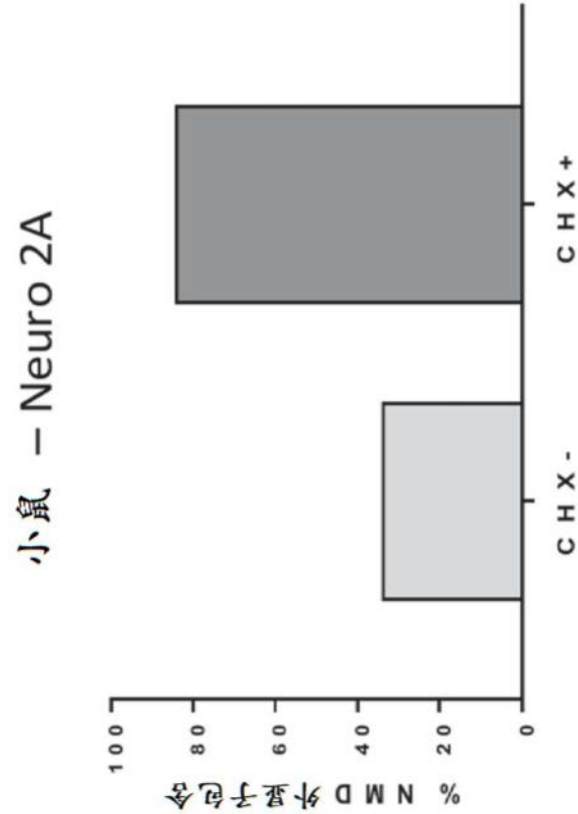


图3A

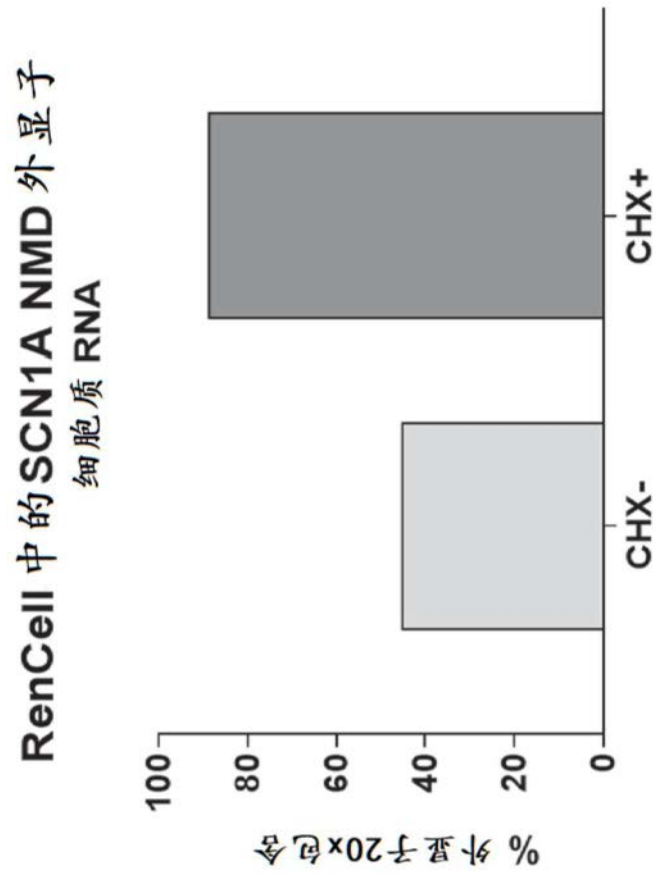


图3B

aaacagacgagagcatcatgaacaaaaagtaacaccaaagtctgtcataatcagatttctaactaataaacaactatatatttctattttgtatag  
tttctattttgtatagGATAATCTTGCTCCAAC TTGGATGGGGTGGAGCGCTGGTTCTCTCCCCTGAGCCCTTTATTATGGGtactgtattaccc  
gtactgtattaccccttttgctacctttaatccttgcaactgtgacttatgtgtagtggtgaggaggattgggaagggtactattatgcaccacag

图4



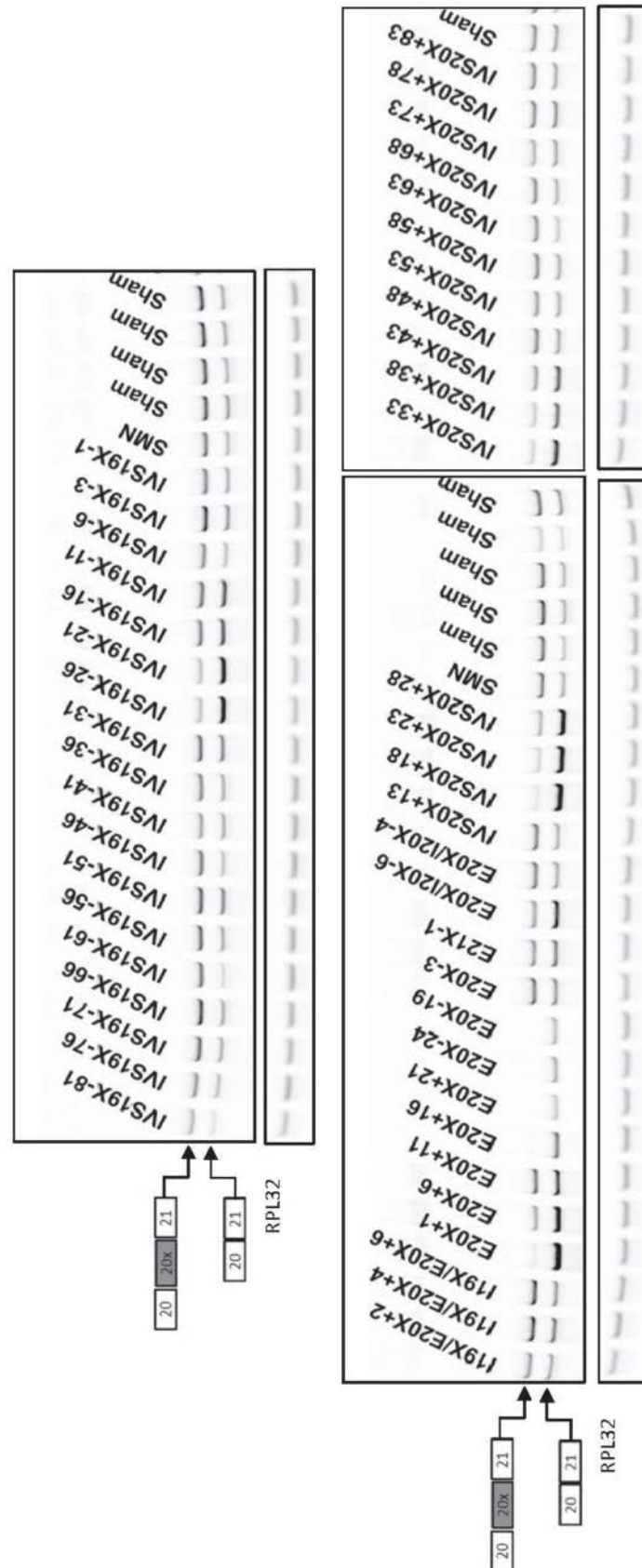


图5A

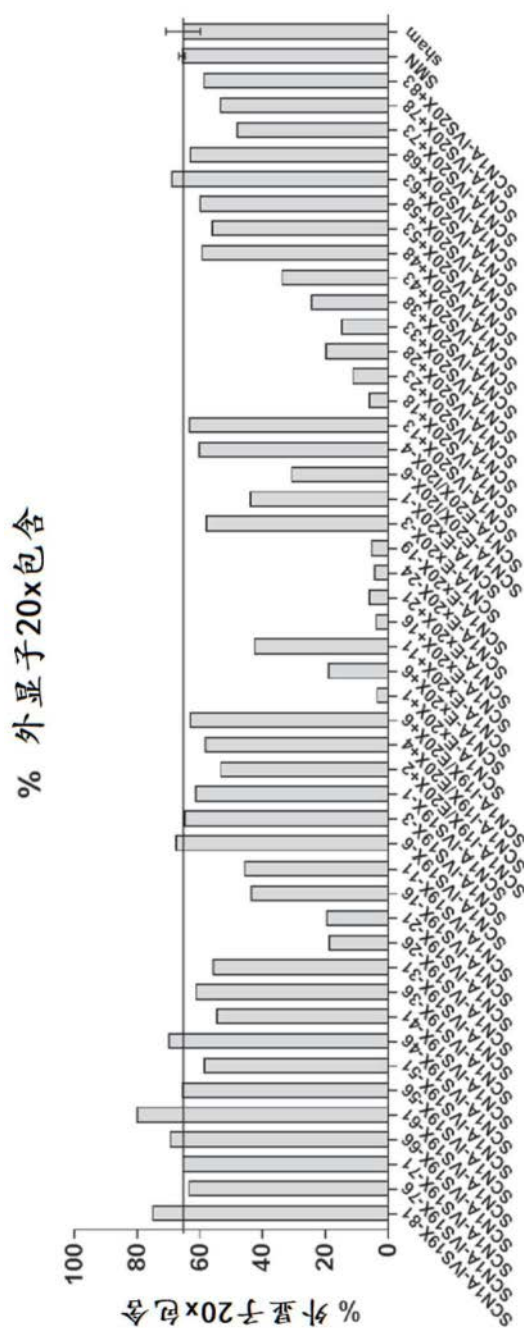


图5B

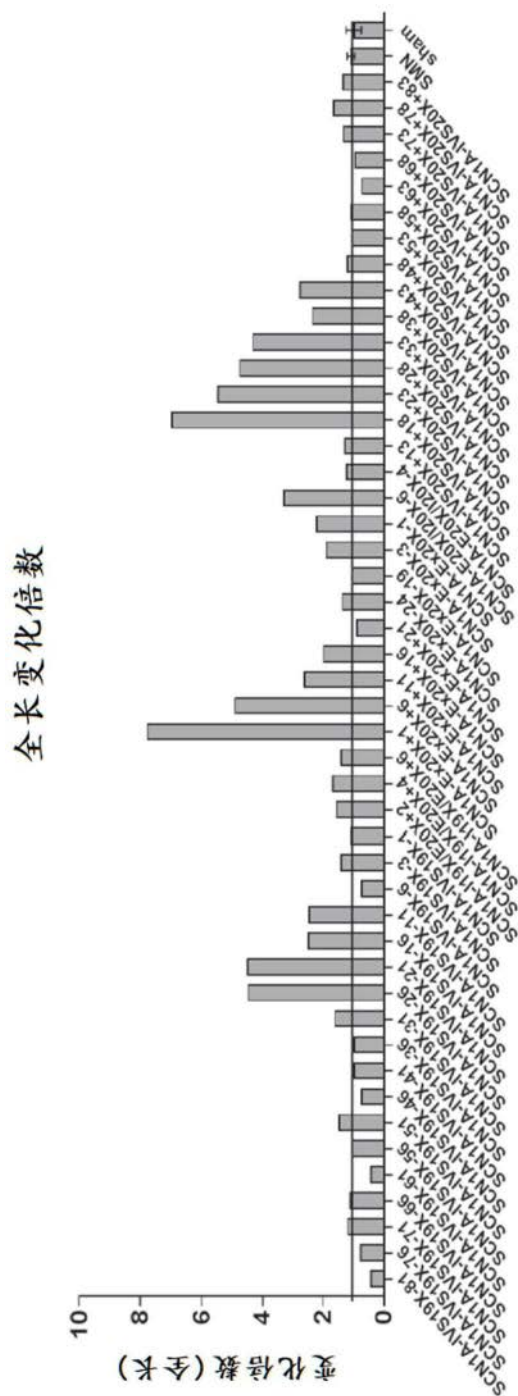


图5C

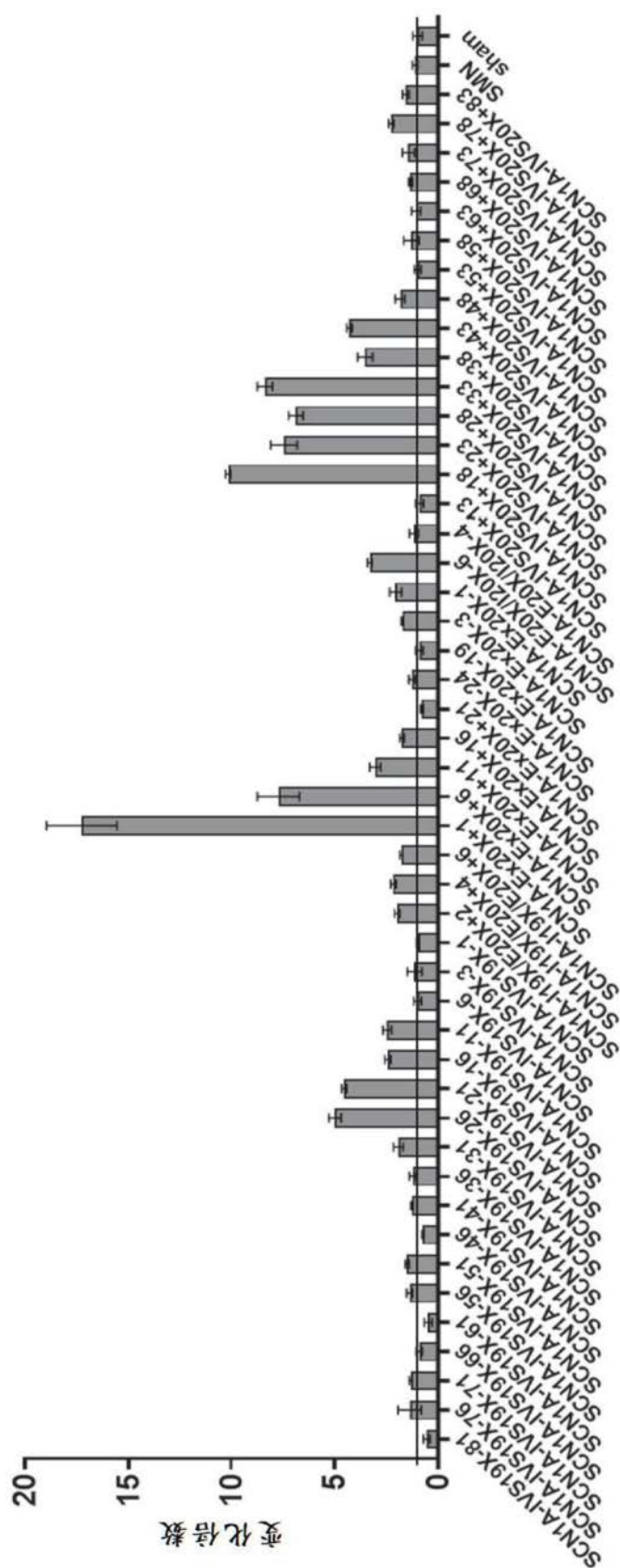


图6

钠电压门控通道 $\alpha$ 亚单位

基因	通用名	染色体	
SCN1A	钠电压门控通道 $\alpha$ 亚单位1	2q24.3	←
SCN2A	钠电压门控通道 $\alpha$ 亚单位2	2q24.3	←
SCN3A	钠电压门控通道 $\alpha$ 亚单位3	2q24.3	←
SCN7A	钠电压门控通道 $\alpha$ 亚单位7	2q24.3	X
SCN8A	钠电压门控通道 $\alpha$ 亚单位8	12q13.13	←
SCN9A	钠电压门控通道 $\alpha$ 亚单位9	2q24.3	←
SCN10A	钠电压门控通道 $\alpha$ 亚单位10	3p22.2	X
SCN11A	钠电压门控通道 $\alpha$ 亚单位11	3p22.2	X

X: 未检测到表达

图7A

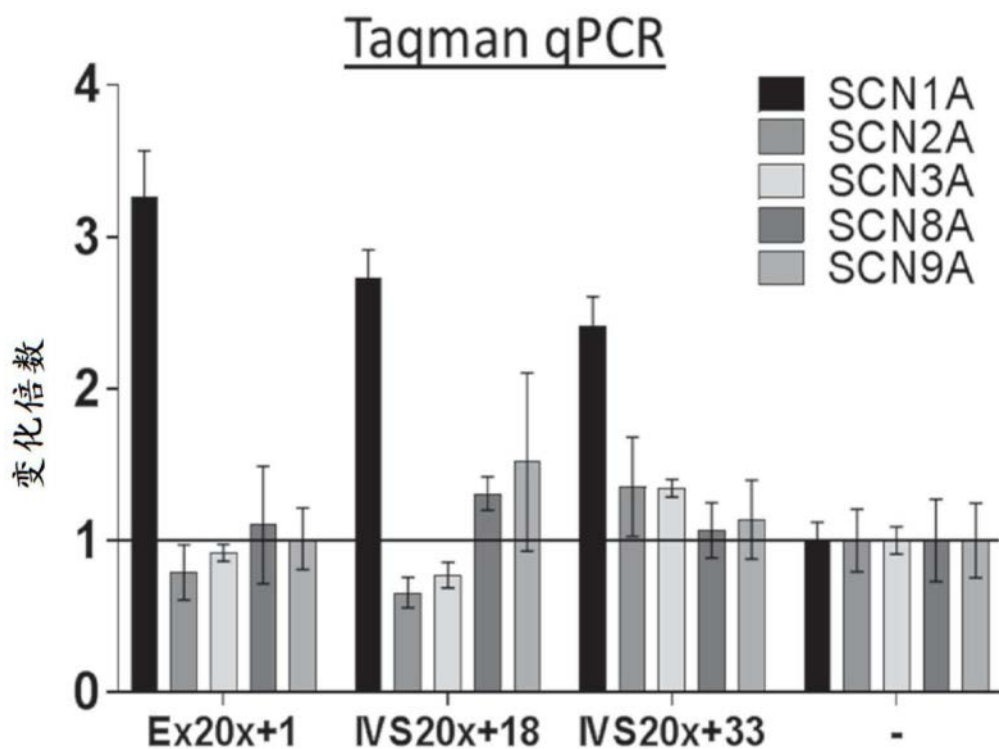


图7B

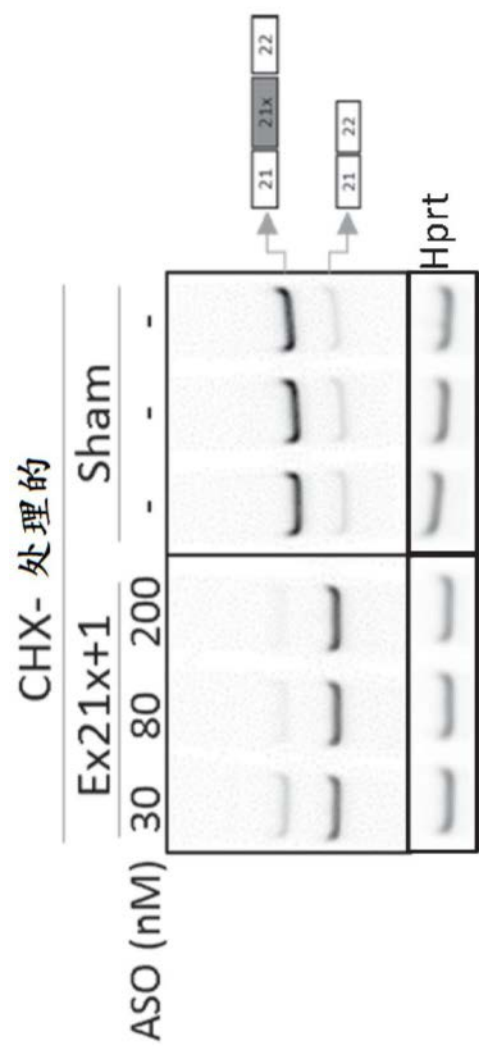


图8A

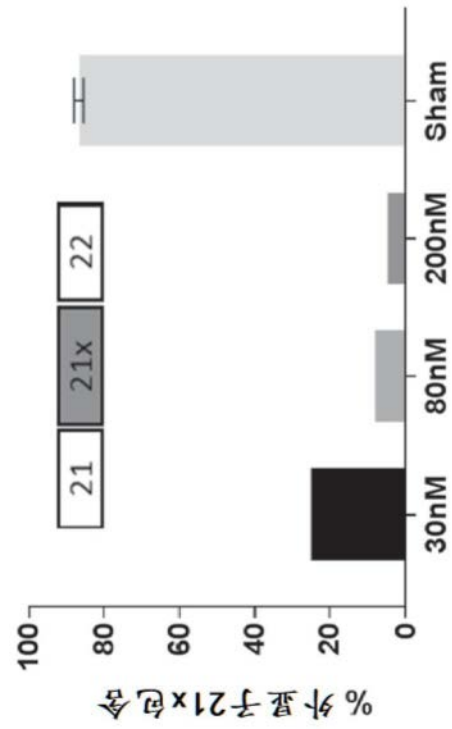


图8B

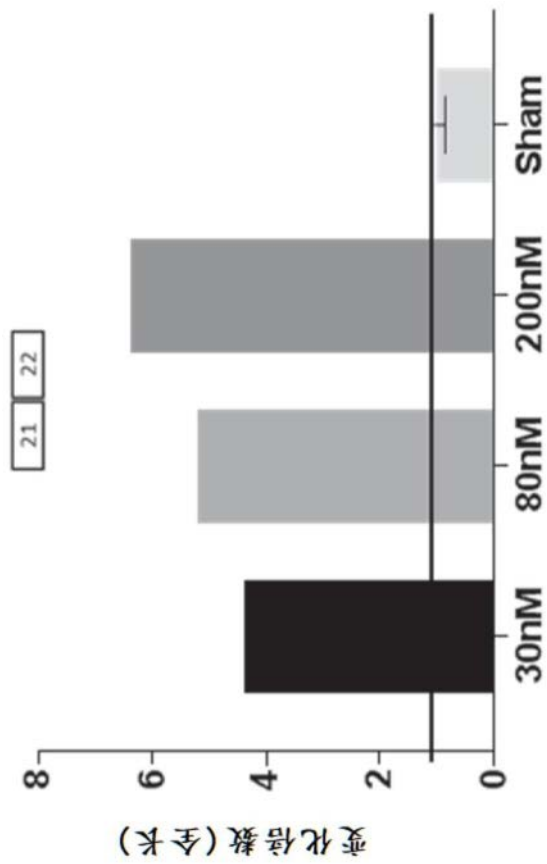


图8C

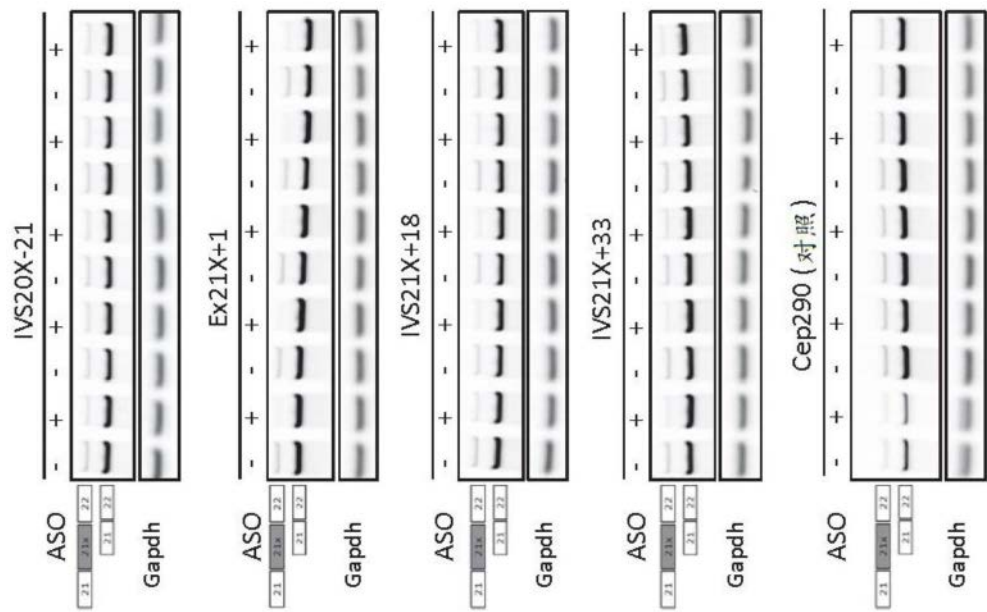


图9A

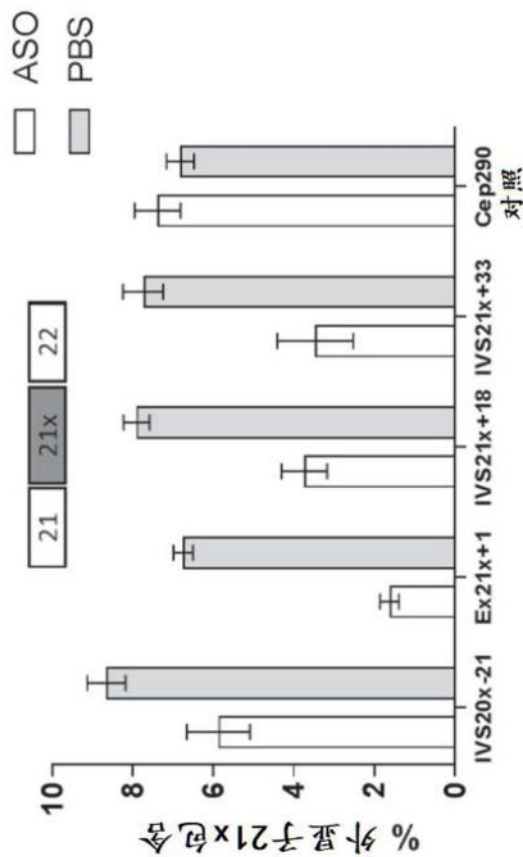


图9B



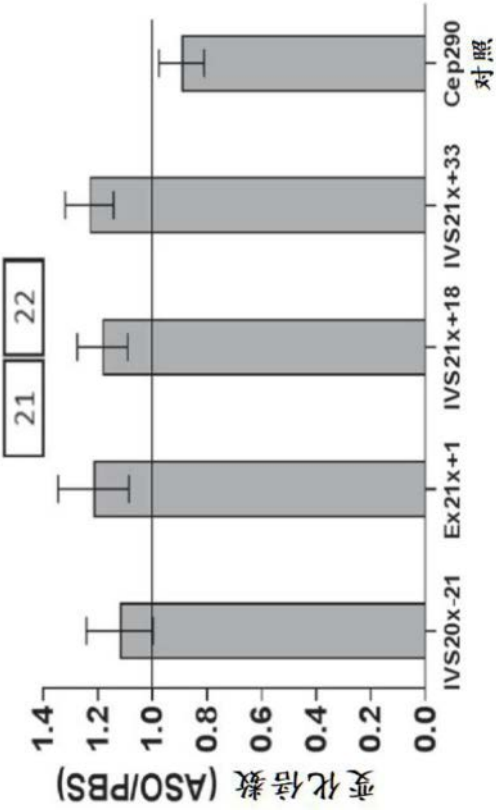


图9C

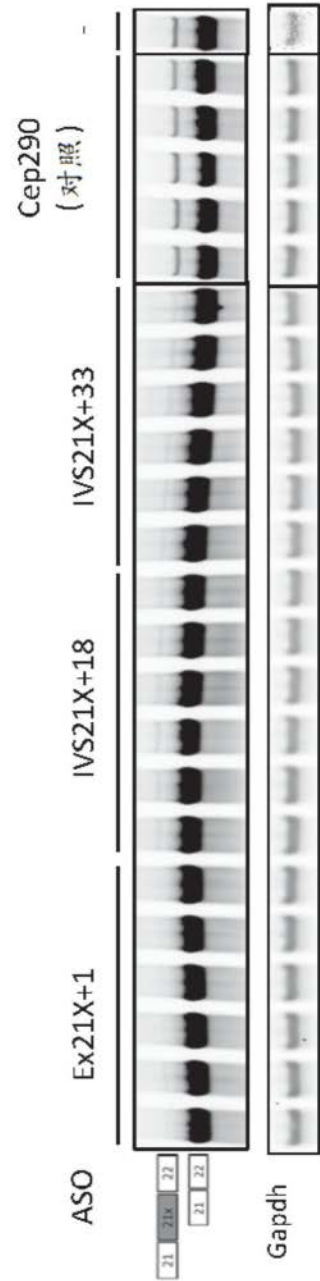


图10A

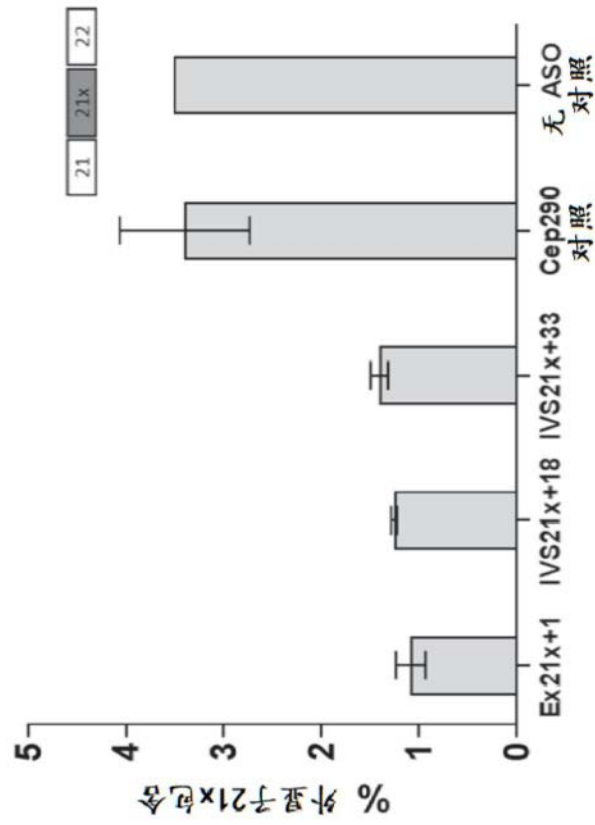


图10B

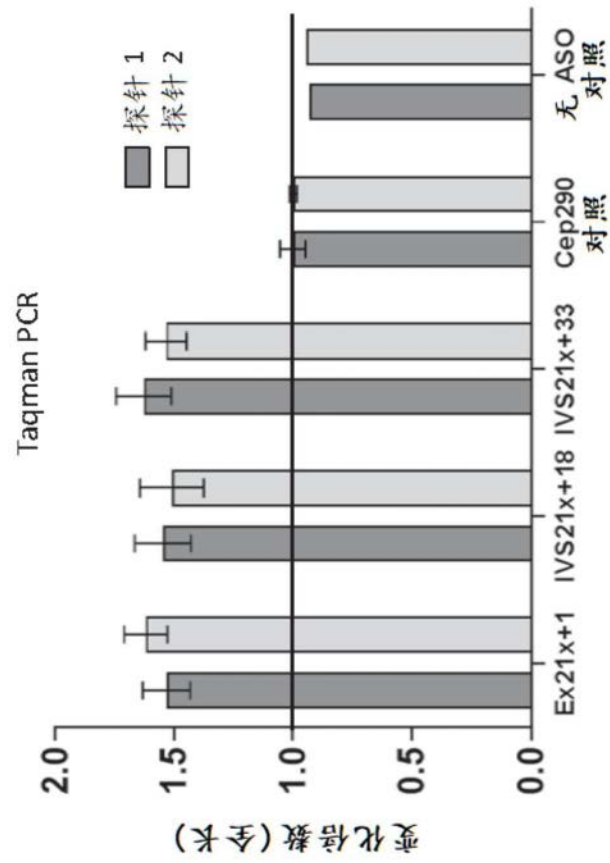


图10C



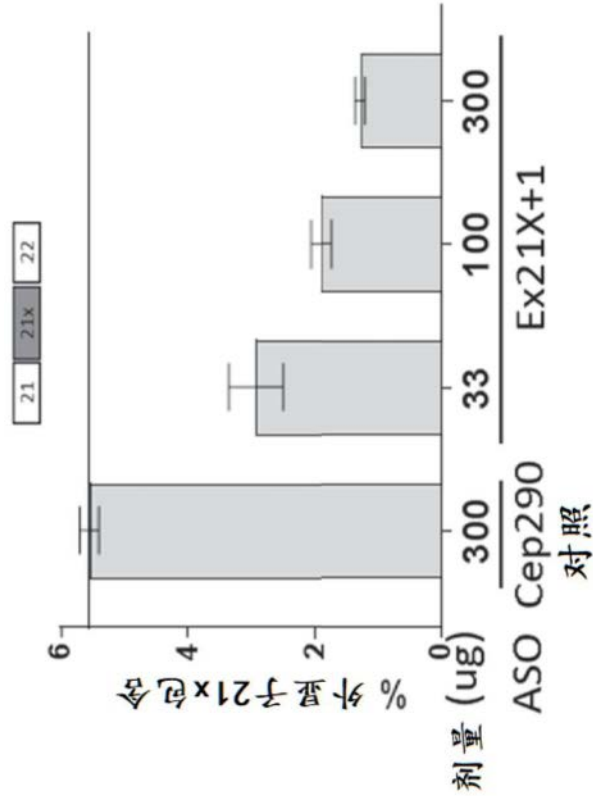


图11B

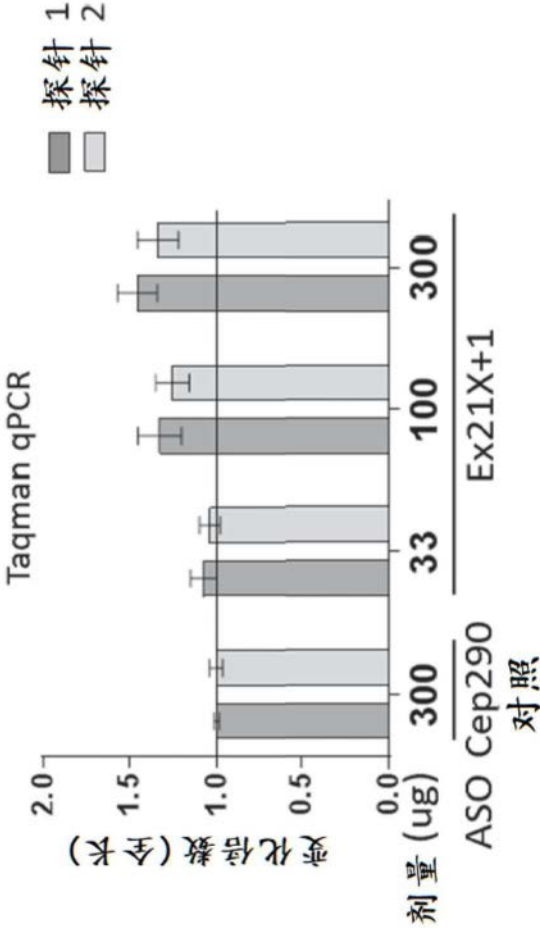


图11C



图12A



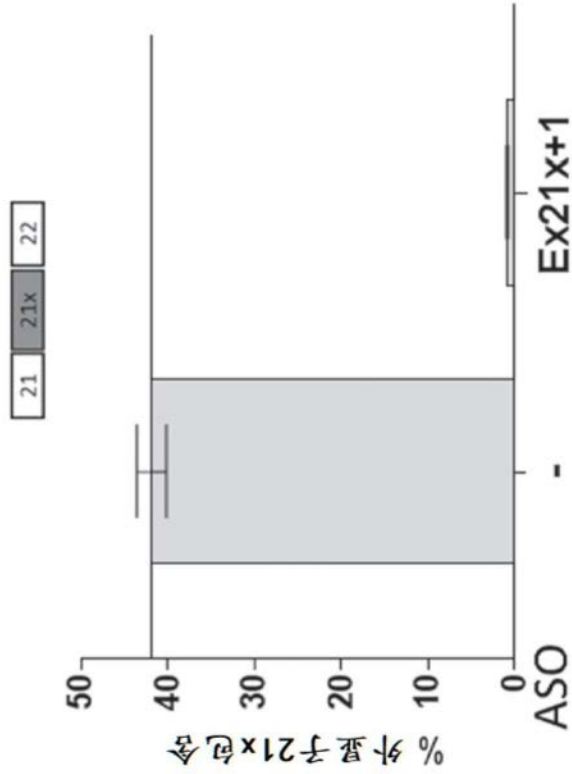


图12B

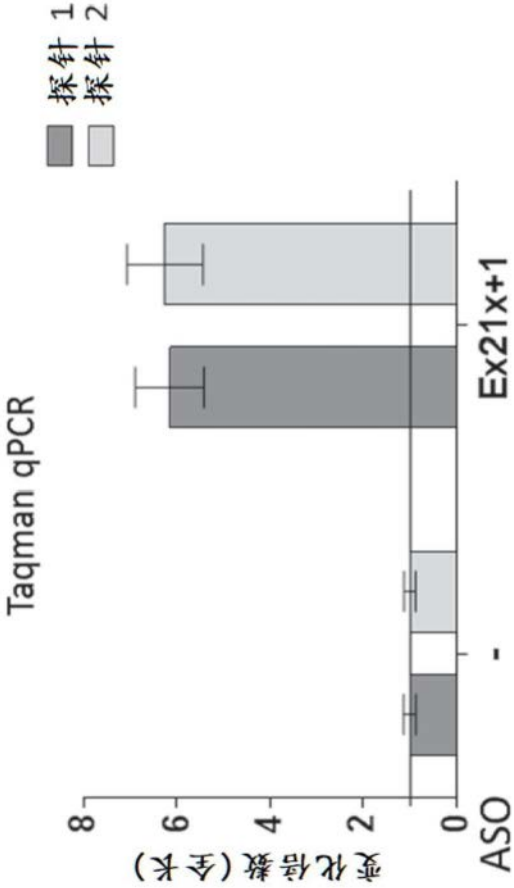


图12C

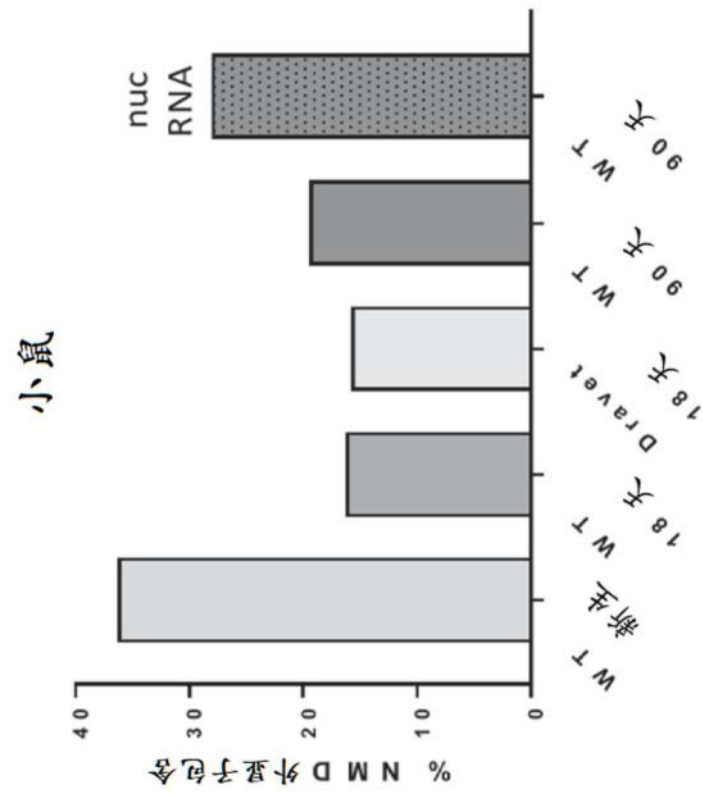


图13A

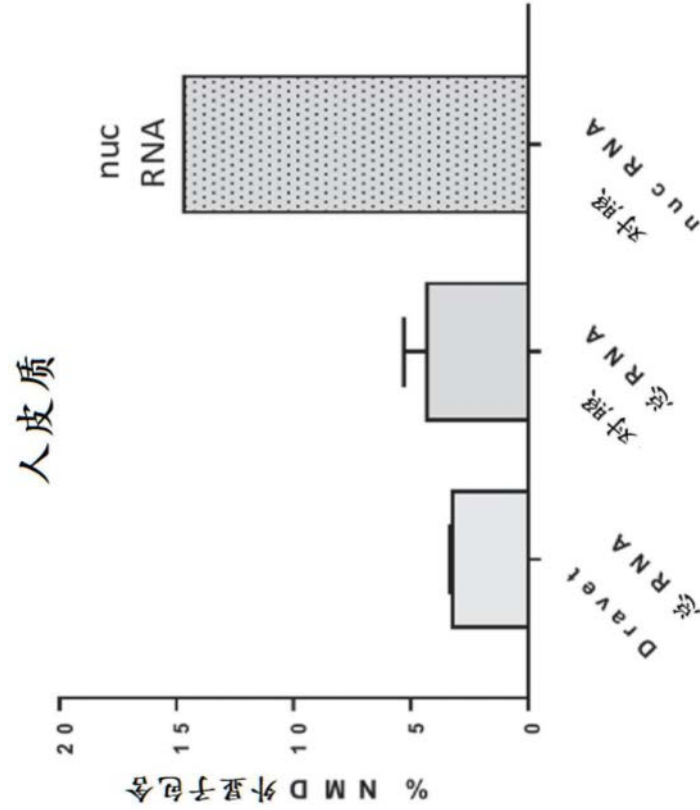


图13B

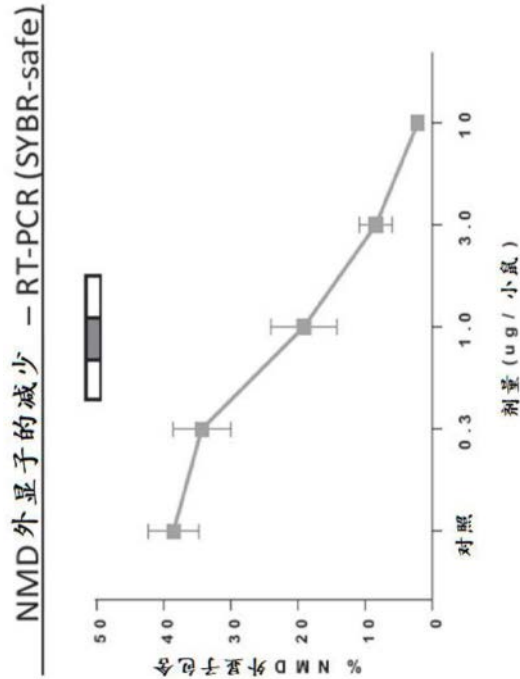


图14A

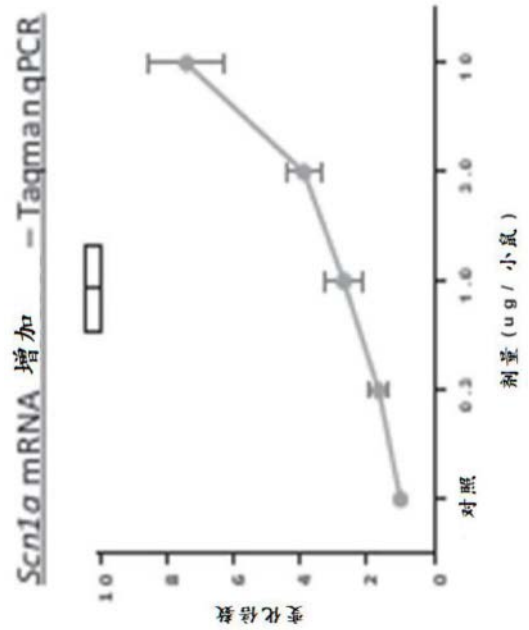


图14B

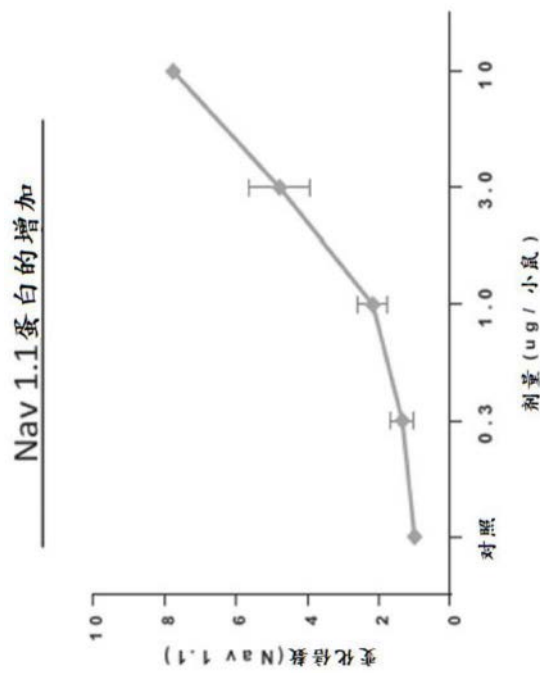


图14C

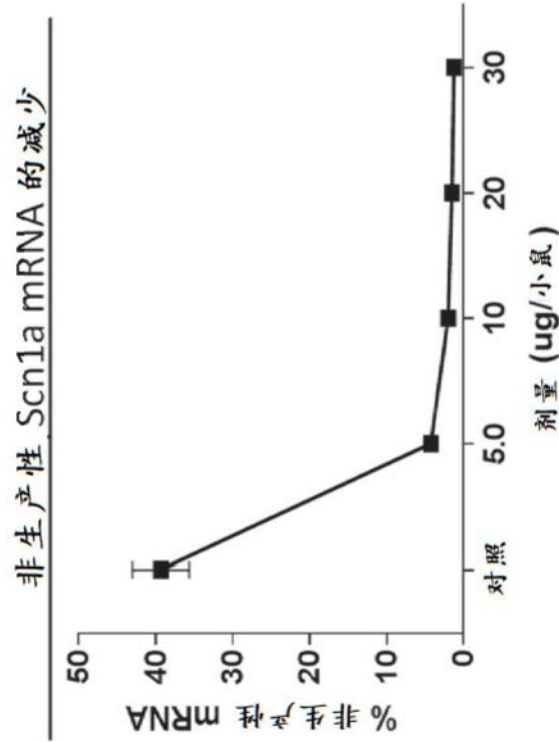


图15A

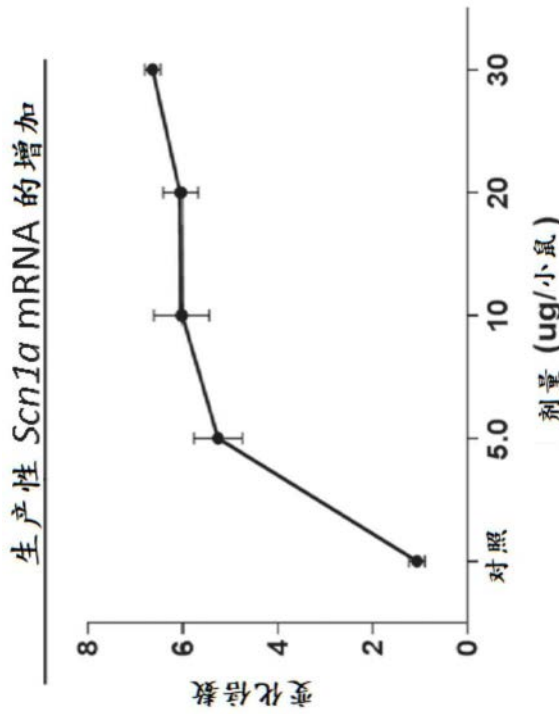


图15B

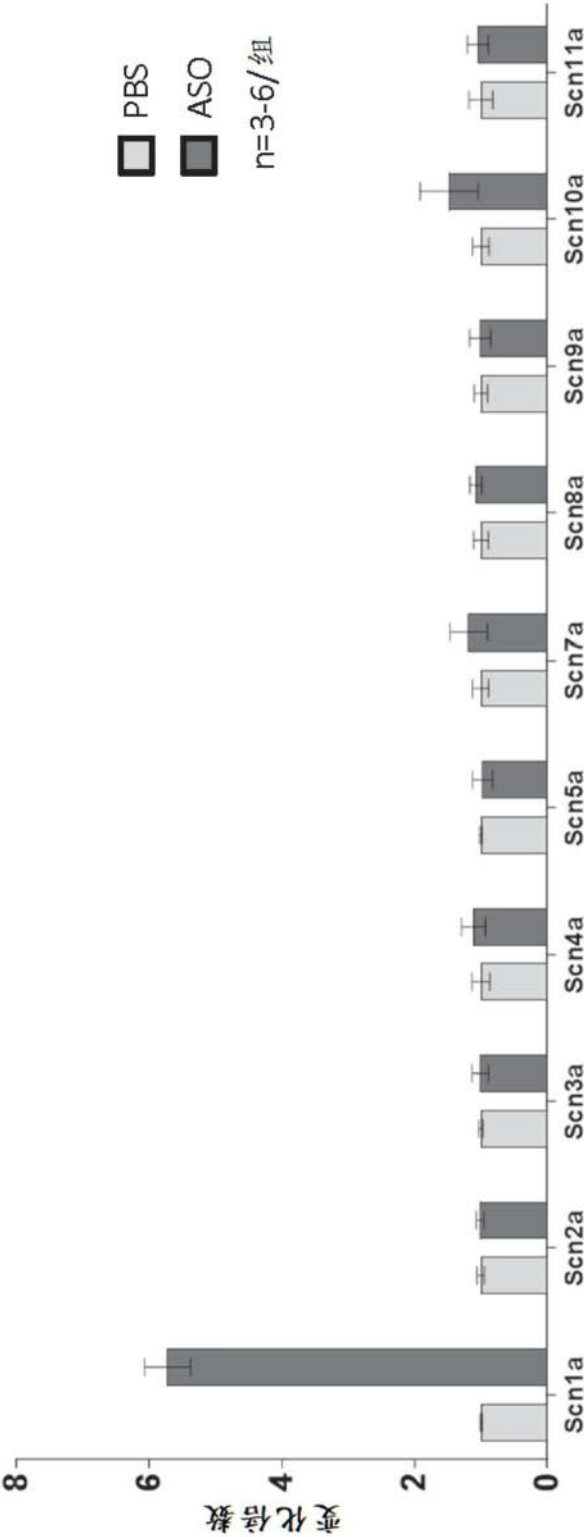


图16

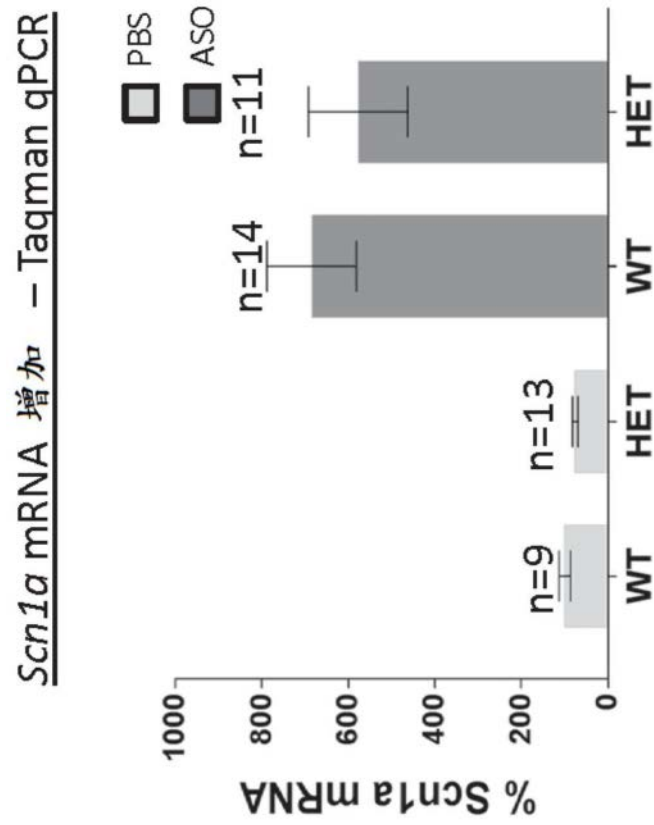


图17A



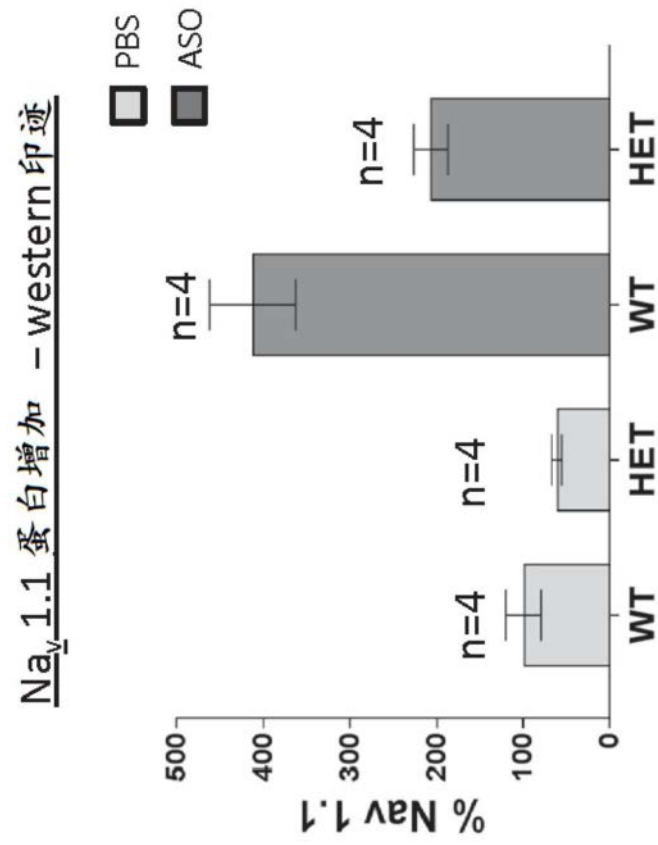


图17B

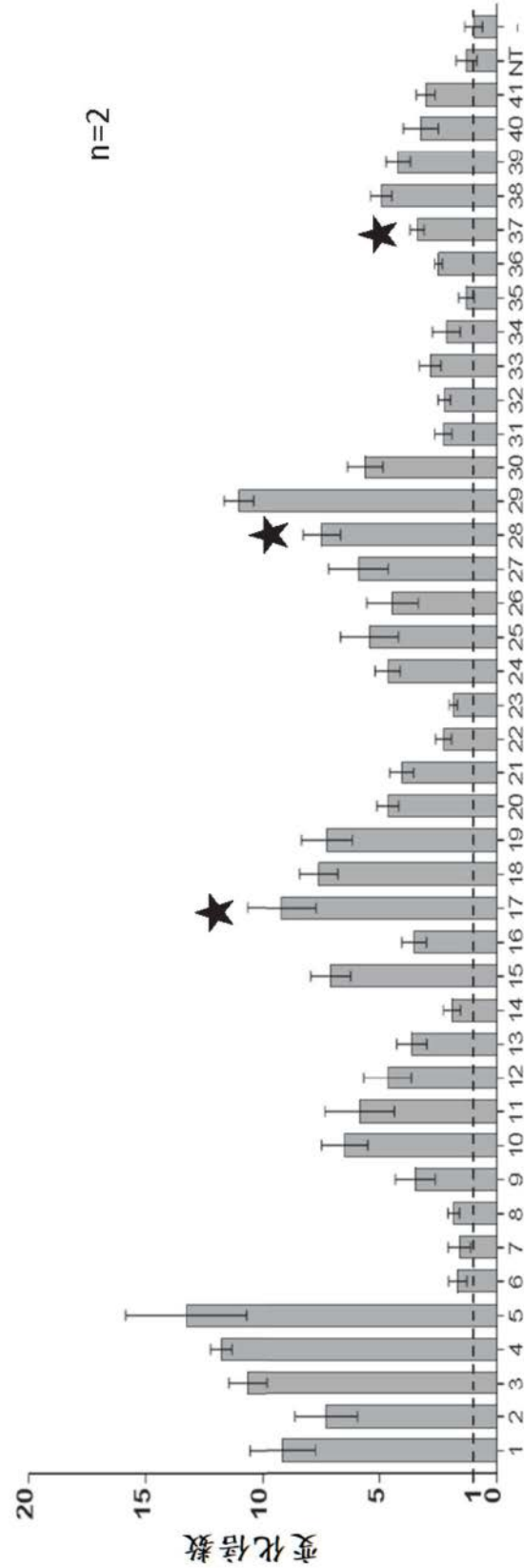


图18

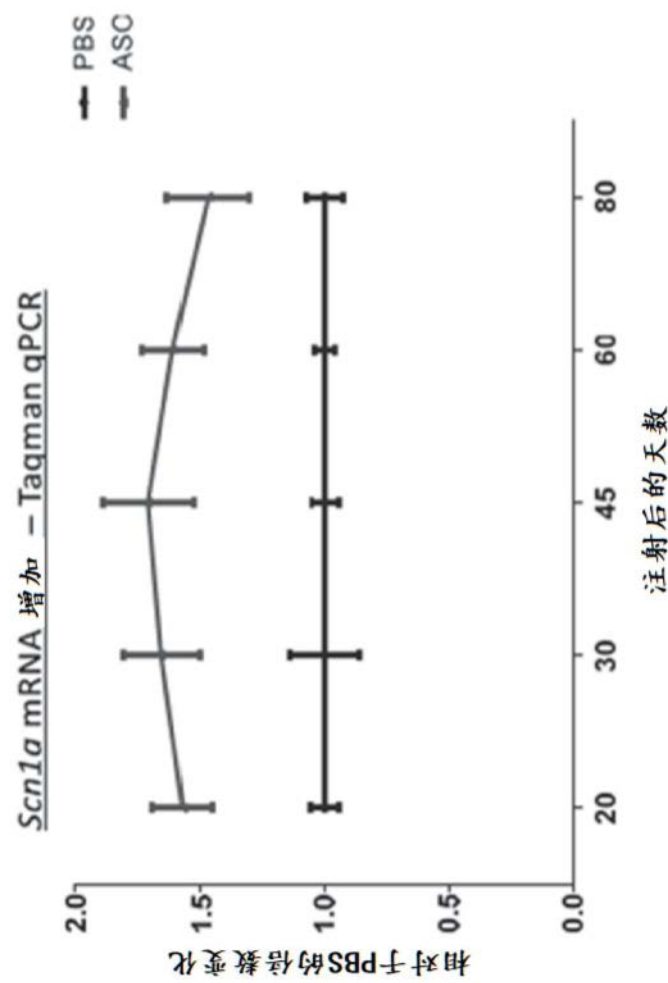


图19

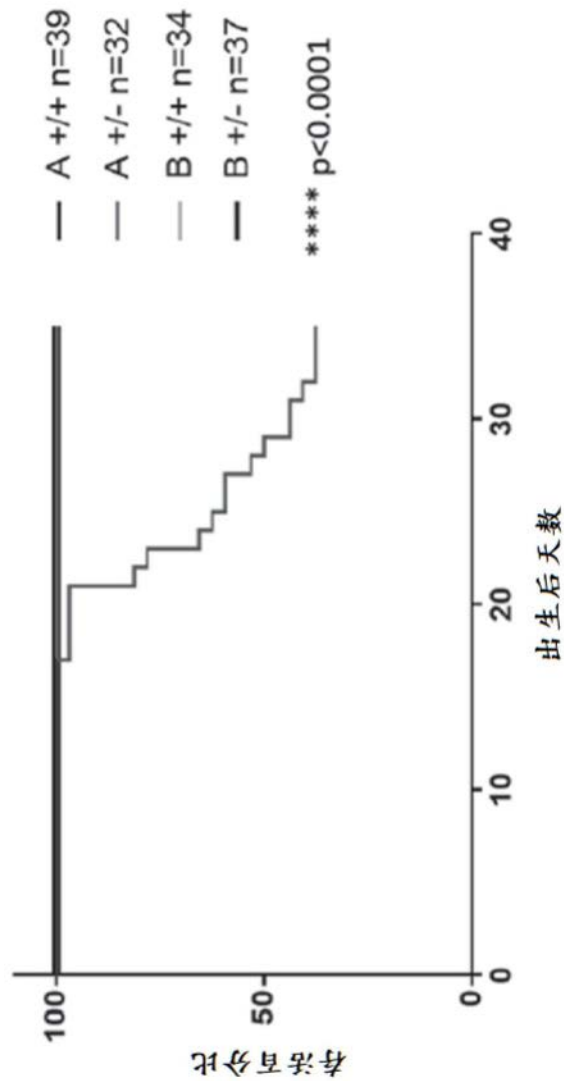


图20