



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119137274 A

(43) 申请公布日 2024.12.13

(21) 申请号 202380028701.3

(22) 申请日 2023.01.26

(30) 优先权数据

63/303,577 2022.01.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2023/050096 2023.01.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/141710 EN 2023.08.03

(71) 申请人 阿尔伯塔大学理事会

地址 加拿大阿尔伯塔省

申请人 俄勒冈州立大学

(72) 发明人 横田敏文 横田-丸山里香

洪·M·莫尔顿

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理

有限公司 11006

专利代理师 徐金国 吴启超

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 47/64 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书4页 说明书38页

序列表(电子公布) 附图44页

(54) 发明名称

用于治疗疾病的调控前体mRNA剪接的肽缀合的反义治疗剂

(57) 摘要

本公开内容总体上涉及用于治疗杜氏肌营养不良症和脊髓性肌萎缩症的DG9肽缀合的剪接调控疗法。

1. 一种缀合物,其包含附接到细胞穿透肽(CPP)的能够调控前体mRNA的外显子剪接的反义寡核苷酸,所述细胞穿透肽包含以下氨基酸序列:

YArVRRrGPRGYArVRRrGPRr;

大写:L-氨基酸,小写:D-氨基酸。

2. 如权利要求1所述的缀合物,其中所述反义寡核苷酸能够调控人肌营养不良蛋白前体mRNA或SMN2前体mRNA的外显子剪接。

3. 一种缀合物,其包含共价附接到细胞穿透肽(CPP)的能够诱导人肌营养不良蛋白中外显子跳跃的反义寡核苷酸,所述细胞穿透肽包含以下氨基酸序列:

YArVRRrGPRGYArVRRrGPRr;

大写:L-氨基酸,小写:D-氨基酸。

4. 如权利要求3所述的缀合物,其中所述反义寡核苷酸结合人肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子44、外显子45、外显子46、外显子47、外显子48、外显子49、外显子50、外显子51、外显子52、外显子53、外显子54和/或外显子55中的靶标。

5. 如权利要求3所述的缀合物,其中所述反义寡核苷酸包含或由以下寡核苷酸中的任一个组成:

5'-AAAACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTC-3'、

5'-GACAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCATC-3'、

5'-AGTTGCTGCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGGG-3'、

5'-GTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGGGGCAACT-3'、

5'-CAATTTCTCCTTGTTTCTCAGGTAAAGCTC-3'、

5'-CAGATGATTTAACTGCTCTTCAAGGTCTTC-3'、

5'-ATCTCTTCCACATCCGGTTGTTTAGCTTGA-3'、

5'-GTAAACGGTTTACCGCCTTCCACTCAGAGC-3'、

5'-GTGTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG-3'、

5'-GGTAATGAGTTCTTCCAAGTGGGGACGCCT-3'、

5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTC-3'、

5'-GAGAAAGTTTCAGGGCCAAGTCATTTGCCAC-3'和

5'-TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC-3'。

6. 一种组合物,其包含第一缀合物,所述第一缀合物包含共价附接到细胞穿透肽(CPP)的能够诱导人肌营养不良蛋白中外显子跳跃的第一反义寡核苷酸,所述细胞穿透肽包含以下氨基酸序列:

YArVRRrGPRGYArVRRrGPRr;

大写:L-氨基酸,小写:D-氨基酸,以及第二缀合物,所述第二缀合物包含共价附接到细胞穿透肽(CPP)的能够诱导人肌营养不良蛋白中外显子跳跃的第二反义寡核苷酸。

7. 如权利要求6所述的组合物,其还包含至少一种其他缀合物,所述缀合物包含共价附接到细胞穿透肽(CPP)的能够诱导人肌营养不良蛋白中外显子跳跃的另一种反义寡核苷酸。

8. 如权利要求7所述的组合物,其包含靶向外显子45的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子46的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子47的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子48

的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子49的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子50的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子51的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子52的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子53的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子54的肽缀合的反义寡核苷酸和靶向外显子55的肽缀合的反义寡核苷酸。

9. 如权利要求7所述的组合物,其包含靶向外显子45的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子47的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子49的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子51的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子53的肽缀合的反义寡核苷酸和靶向外显子55的肽缀合的反义寡核苷酸。

10. 如权利要求7所述的组合物,其包含靶向外显子45的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子47的肽缀合的反义寡核苷酸和靶向外显子53的肽缀合的反义寡核苷酸。

11. 如权利要求7所述的组合物,其包含:

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-GACAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCATC-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-AGTTGCTGCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGGG-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-GTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGGGGCAACT-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-CAATTTCTCCTTGTTTCTCAGGTAAAGCTC-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-CAGATGATTAACTGCTCTTCAAGGTCTTC-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-ATCTCTCCACATCCGGTTGTTTAGCTTGA-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-GTAAACGGTTTACCGCCTTCCACTCAGAGC-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-GTGTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-GGTAATGAGTTCTTCCAACTGGGGACGCCT-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTC-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-GAGAAGTTTCAGGGCCAAGTCATTTGCCAC-3'和

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC-3';其中所述序列中的一个或多个胸腺嘧啶任选地被尿嘧啶替换。

12. 如权利要求7所述的组合物,其包含:

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸:

5'-GACAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCATC-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-GTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGGGGCAACT-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-ATCTCTCCACATCCGGTTGTTTAGCTTGA-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-GTGTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTC-3'和

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC-3'；其中所述序列中的一个或多个胸腺嘧啶任选地被尿嘧啶替换。

13. 如权利要求7所述的组合物，其包含：

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-GACAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCATC-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-GTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGGGGCAACT-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-ATCTCTCCACATCCGGTTGTTTAGCTTGA-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTC-3'和

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC-3'；其中所述序列中的一个或多个胸腺嘧啶任选地被尿嘧啶替换。

14. 如权利要求7所述的组合物，其包含：

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-GACAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCATC-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-ATCTCTCCACATCCGGTTGTTTAGCTTGA-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-GTAAACGGTTTACCGCCTTCCACTCAGAGC-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-GGTAATGAGTTCTTCCAACTGGGGACGCCT-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTC-3'和

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC-3'；其中所述序列中的一个或多个胸腺嘧啶任选地被尿嘧啶替换。

15. 如权利要求7所述的组合物，其包含：

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-GACAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCATC-3'、

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-GTAAACGGTTTACCGCCTTCCACTCAGAGC-3'和

具有以下序列的肽缀合的反义寡核苷酸：

5'-TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC-3'；其中所述序列中的一个或多个胸腺嘧啶任选地被尿嘧啶替换。

16. 一种药物组合物，其包含如权利要求1至5中任一项所述的肽缀合物或如权利要求6至15所述的组合物，以及药学上可接受的赋形剂。

17. 一种治疗患有DMD的受试者的方法，其包括：施用治疗有效量的如权利要求1至5中任一项所述的肽缀合物或如权利要求6至15所述的组合物。

18. 如权利要求17所述的方法，其中所述受试者是人。

19. 一种缀合物，其包含共价附接到细胞穿透肽(CPP)的能够诱导人SMN2基因中外显子包含的反义寡核苷酸，所述细胞穿透肽包含以下氨基酸序列：

YArVRRrGPRGYArVRRrGPRr；

大写：L-氨基酸，小写：D-氨基酸。

20. 如权利要求19所述的缀合物，其中所述反义结合SMN2前体mRNA的内含子剪接沉默子N1。

21. 如权利要求19所述的缀合物，其中所述反义寡核苷酸包含或由序列5'-TCACTTTCATAATGCTGG-3'组成，并且其中所述胸腺嘧啶任选地被尿嘧啶替换。

22. 如权利要求19-21中任一项所述的缀合物，其中所述反义寡核苷酸是磷酸二胺吗啉代寡聚体。

23. 一种治疗受试者的脊髓性肌萎缩症(SMA)的方法，其包括：施用治疗有效量的如权利要求19-22中任一项所述的缀合物。

用于治疗疾病的调控前体mRNA剪接的肽缀合的反义治疗剂

[0001] 本申请要求2022年1月27日提交的美国临时申请序列号63/303,577的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本发明总体上涉及用于治疗疾病的调控前体mRNA剪接的肽缀合的反义治疗剂,特别是用于治疗杜氏肌营养不良症(DMD)和脊髓性肌萎缩症(SMA)的肽缀合的反义治疗剂。

背景技术

[0003] 反义治疗剂通过诱导外显子剪接或通过与前信使RNA结合抑制外显子剪接功能来调控前信使RNA剪接,已被批准用于治疗各种疾病,包括杜氏肌营养不良症和脊髓性肌萎缩症。

[0004] 杜氏肌营养不良症(DMD)是一种致命的X连锁隐性障碍,由DMD基因突变引起,这导致肌肉中缺乏肌营养不良蛋白。肌营养不良蛋白通过形成膜相关糖蛋白复合物将细胞骨架肌动蛋白桥接到细胞外基质来稳定肌膜[1,2]。肌营养不良蛋白丧失会导致全身肌肉逐渐退化,在十几岁之前失去行走能力,在二十几岁时出现心肺功能障碍,通常会导致死亡[3]。每100,000名雄性新生儿中就有19.8名患有DMD,是全世界最常见的遗传性神经肌肉障碍[4]。

[0005] 大多数患者(约70%)在DMD中有大的框外缺失[5]。基于外显子跳跃的治疗剂基于这样的观察,即至少约90%的时间,DMD的框内突变产生较轻微的表型,如Becker肌营养不良症(BMD)中所发现的[5,6]。通过使用反义寡核苷酸从DMD转录物中排除框外外显子,外显子跳跃将框外突变转化为框内突变,产生截短但部分有功能的肌营养不良蛋白。四种外显子跳跃治疗剂已获得美国FDA批准:eteplirsen/Exondys 51(Sarepta)[7]、golodirsen/Vyondys 53(Sarepta)[8]、viltolarsen/Viltepso(NS Pharma)[9]和casimersen/Amondys45(Sarepta)[10]。全部都是磷酸二胺吗啉代寡聚体(PMO)反义寡核苷酸。

[0006] 然而,由于DMD的突变特异性,单外显子跳跃的适用性有限。上述疗法最多只能治疗所有患者的8-13%[11]。多外显子跳跃克服了这个问题,特别是跳跃外显子45-55。外显子45-55是DMD基因中的突变热点,患者中66%的大(≥ 1 个外显子)缺失和15%的大重复(5)。理论上,外显子45-55跳跃可以治疗超过40%的所有DMD患者[12]。

[0007] 外显子45-55的缺失也通常与无症状至轻度表型有关。在Leiden DMD数据库中,外显子45-55缺失的90%患者患有BMD;在其他数据库中,包括UMD-TREAT-NMD和临床研究,在所有检查病例中,缺失与BMD或无症状个体有关[12-15]。

[0008] 已经开发出外显子45-55跳跃混合物,其恢复营养不良小鼠肌肉中的肌营养不良蛋白合成[16]。已经开发出一种在永生患者肌管和人源化DMD小鼠中跳跃人DMD外显子45-55的PMO混合物[13,17]。观察到的平均跳跃效率分别为27-61%和15-22%,治疗在体外产生了高达正常水平14%的肌营养不良蛋白[13,17]。然而,这种混合物每个外显子使用一个PMO(外显子48除外,它需要两个)来跳跃外显子45-55。由于所有PMO必须存在于相同的细

胞核中以诱导跳跃外显子45-55,因此功效降低,脱靶效应增加。

[0009] 基于PMO的外显子跳跃疗法的功效受到其从血液中快速清除、肌肉吸收不良以及无法从内体逃逸的影响[19,20]。例如,在接受30或50mg/kg/周剂量治疗180周后,Eteplirsen仅使患者的肌营养不良蛋白恢复到正常水平的0.93%[7]。

[0010] 因此,需要改进外显子跳跃疗法来治疗杜氏肌营养不良症。

[0011] 脊髓性肌萎缩症(SMA)是一种破坏性的神经退行性障碍,影响脊髓前角的运动神经元[45]。SMA可导致进行性肌肉无力、呼吸窘迫甚至瘫痪,是婴儿死亡的主要遗传原因之一[46]。SMA的特征是端粒运动神经元1(SMN1)基因的存活突变,导致其纯合缺失[47]。SMN蛋白的完全丧失在胚胎上是致命的[48,49]。人类拥有SMN1的旁系同源物SMN2,使患者能够出生[47,50]。然而,由于外显子7中的C转换到T,SMN2不能完全补偿SMN1丧失,导致其被排除在外。

[0012] 虽然全长SMN2(FL-SMN2)转录物可以产生稳定的功能蛋白(约10%),但没有外显子7的转录物(Δ 7SMN2)是不稳定的,产生的蛋白质会迅速降解(约90%)[51]。SMN2外显子7的排除是由于与阻遏蛋白hnRNP A1(异质核糖核蛋白A1)结合的ISS-N1(内含子剪接沉默子N1)[52-54]。

[0013] 所有SMA患者都缺乏功能性SMN1基因,因此依赖于SMN2基因产生生存所需的SMN蛋白。因此,SMN2的拷贝数是SMA的有效遗传修饰因子,其拷贝数与SMA的严重程度呈负相关[55,56]。SMN2无法补偿SMN1丧失是运动神经元优先退化的原因[51,57]。尽管SMA的病理特征是运动神经元退化,但最近的研究强调了外周组织的缺陷[58-60]。此外,体内小鼠研究报告了心动过缓和扩张型心肌病,随着SMN水平的恢复而改善[61-63]。虽然原因尚不清楚,但运动神经元特别容易丧失SMN[64]。

[0014] 目前,三种SMA修饰疗法已获得美国食品和药物管理局(FDA)批准:nusinersen(商品名Spinraza)、onasemnogene abeparvovec(商品名Zolgensma)和risdiplam(商品名Evrysdi)。然而,这三种药物有几个相关的问题。Onasemnogene abeparvovec是一种基因治疗药物,仅批准用于2岁以下的患者[65]。Risdiplam是一种口服小分子药物。然而,由于其对前体mRNA剪接的相关脱靶效应,存在安全问题[66]。

[0015] Nusinersen是一种剪接切换反义寡核苷酸(AO),具有2'-O-甲氧基乙基(MOE)硫代磷酸酯化学性质。它通过靶向ISS-N1调控SMN2剪接,并促进外显子7的包含。由于nusinersen不能穿过血脑屏障(BBB),因此需要重复鞘内给药,以确保SMN蛋白主要强健地恢复至中枢神经系统(CNS)组织[67]。尽管提供了安全性,但近三分之一的治疗患者患有脊柱侧弯、持续的腰椎漏液、血小板减少症和其他凝血缺陷[68,69]。

[0016] 为了克服与鞘内注射相关的问题,已经研究了几种AO化学物质和修饰,例如磷酸二胺吗啉代寡聚体(PMO)、锁定核酸(LNA)和限制乙基(c-Et)[70]。不带电的骨架、低蛋白结合亲和力和核酸酶稳定性使PMO化学物质成为理想的候选者,因为多项研究表明,可以以最小的毒性实现多次高剂量施用[70,71]。然而,与PMO相关的主要缺陷是疗效低,这与其从血液中快速清除、在骨骼肌等组织中吸收不良以及内体捕获有关[72,73]。为了改善PMO向靶组织中细胞核的递送并减少施用剂量,正在研究许多细胞穿透肽(CPP)缀合的PMO。其中一些肽促进PMO穿过BBB,从而确保非侵入性施用治疗神经元障碍的可能性[74]。Hammond等人表明,将来自PMO内化肽(Pip)家族的肽Pip6a全身施用到成年小鼠体内,增加了FL-SMN2在

外周和CNS组织中的表达[71]。然而,A0在CNS中的定位和分布仍然未知。此外,已知Pip肽具有高毒性[74]。

[0017] 因此,需要改进的剪接调控疗法来治疗脊髓性肌萎缩症。

发明内容

[0018] 本发明提供了用于治疗疾病的调控前体mRNA剪接的肽缀合的反义治疗剂。

[0019] 在本发明的一方面,提供了一种缀合物,其包含附接到细胞穿透肽(CPP)的能够调控前体mRNA的外显子剪接的反义寡核苷酸,所述细胞穿透肽包含以下氨基酸序列:

[0020] YArVRRrGPRGYArVRRrGPRr;

[0021] 大写:L-氨基酸,小写:D-氨基酸。

[0022] 在本发明的另一方面,提供了一种缀合物,其包含共价附接到细胞穿透肽(CPP)的能够诱导人肌营养不良蛋白中外显子跳跃的反义寡核苷酸,所述细胞穿透肽包含以下氨基酸序列:

[0023] YArVRRrGPRGYArVRRrGPRr;

[0024] 大写:L-氨基酸,小写:D-氨基酸。

[0025] 在一些实施方式中,能够诱导人肌营养不良蛋白中外显子跳跃的缀合物具有反义寡核苷酸,该反义寡核苷酸结合人肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子44、外显子45、外显子46、外显子47、外显子48、外显子49、外显子50、外显子51、外显子52、外显子53、外显子54和/或外显子55中的靶标。

[0026] 在一些实施方式中,能够诱导人肌营养不良蛋白中外显子跳跃的缀合物具有反义寡核苷酸,其包含或由以下寡核苷酸中的任一个组成:

[0027] 5'-AAAACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTC-3'、

[0028] 5'-GACAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCATC-3'、

[0029] 5'-AGTTGCTGCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGGG-3'、

[0030] 5'-GTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGGGGCAACT-3'、

[0031] 5'-CAATTTCTCCTTGTTTCTCAGGTAAAGCTC-3'、

[0032] 5'-CAGATGATTAACTGCTCTTCAAGGTCTTC-3'、

[0033] 5'-ATCTCTTCCACATCCGTTGTTTAGCTTGA-3'、

[0034] 5'-GTAAACGGTTTACCGCCTTCCACTCAGAGC-3'、

[0035] 5'-GTGTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG-3'、

[0036] 5'-GGTAATGAGTTCTTCCAAGTGGGGACGCCT-3'、

[0037] 5'-CCTCCGTTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTC-3'、

[0038] 5'-GAGAAGTTTCAGGGCCAAGTCATTTGCCAC-3'和

[0039] 5'-TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC-3'。

[0040] 根据本发明的另一方面,提供了一种组合物,其包含第一缀合物,所述第一缀合物包含共价附接到细胞穿透肽(CPP)的能够诱导人肌营养不良蛋白中外显子跳跃的第一反义寡核苷酸,所述细胞穿透肽包含以下氨基酸序列:

[0041] YArVRRrGPRGYArVRRrGPRr;

[0042] 大写:L-氨基酸,小写:D-氨基酸,以及第二缀合物,所述第二缀合物包含共价附接

到细胞穿透肽 (CPP) 的能够诱导人肌营养不良蛋白中外显子跳跃的第二反义寡核苷酸。

[0043] 在一些实施方式中,该组合物还包含至少一种其他缀合物,该缀合物包含共价附接到细胞穿透肽 (CPP) 的能够诱导人肌营养不良蛋白中外显子跳跃的另一种反义寡核苷酸。

[0044] 在一些实施方式中,能够诱导人肌营养不良蛋白中多外显子跳跃的组合物包含靶向外显子45的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子46的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子47的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子48的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子49的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子50的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子51的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子52的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子53的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子54的肽缀合的反义寡核苷酸和靶向外显子55的肽缀合的反义寡核苷酸。

[0045] 在一些实施方式中,能够诱导人肌营养不良蛋白中多外显子跳跃的组合物包含靶向外显子45的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子47的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子49的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子51的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子53的肽缀合的反义寡核苷酸和靶向外显子55的肽缀合的反义寡核苷酸。

[0046] 在一些实施方式中,能够诱导人肌营养不良蛋白中多外显子跳跃的组合物包含靶向外显子45的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子47的肽缀合的反义寡核苷酸和靶向外显子53的肽缀合的反义寡核苷酸。

[0047] 根据本发明的一方面,提供了一种治疗患有DMD的受试者的方法,其包括施用治疗有效量的一种或多种能够诱导人肌营养不良蛋白中外显子跳跃的本发明的肽缀合物。

[0048] 根据本发明的另一方面,提供了一种缀合物,其包含共价附接到细胞穿透肽 (CPP) 的能够诱导人SMN2基因中外显子包含的反义寡核苷酸,所述细胞穿透肽包含以下氨基酸序列:

[0049] YArVRRrGPRGYArVRRrGPRr;

[0050] 大写:L-氨基酸,小写:D-氨基酸。

[0051] 在一些实施方式中,包含能够诱导人SMN2基因中外显子包含的反义寡核苷酸的缀合物与SMN2前体mRNA的内含子剪接沉默子N1结合。

[0052] 在一些实施方式中,包含能够诱导人SMN2基因中外显子包含的反义寡核苷酸的缀合物包括反义寡核苷酸,其包含或由序列5'-TCACTTTCATAATGCTGG-3'组成,并且其中胸腺嘧啶任选地被尿嘧啶替换,任选地其中反义寡核苷酸是磷酸二胺吗啉代寡聚体。

[0053] 根据本发明的另一方面,提供了一种治疗受试者的脊髓性肌萎缩症 (SMA) 的方法,其包括施用治疗有效量的本发明的包含能够诱导人SMN2基因中外显子包含的反义寡核苷酸的缀合物。

[0054] 根据本发明的另一方面,提供了一种药物组合物,其包含一种或多种本发明的肽缀合物和药学上可接受的赋形剂。

附图说明

[0055] 现在将参考附图仅通过示例描述本发明的实施方式。

[0056] 图1显示了在永生化患者肌管中测试最小化的外显子45-55跳跃混合物。(A) “全”

混合物及其衍生物靶向的DMD外显子由圆圈表示。(B) 永生化患者肌管中PMO转染的培养方案。(C) 在KM155、KM571、6594和6311肌管中转染PMO混合物后,RT-PCR外显子45-55跳跃效率结果。黑色(上)箭头表示天然/未跳跃的带,蓝色(下)箭头表示外显子45-55跳跃的带。GAPDH在以下显示为对照。量化显示在底部。(D) 使用各种抗体(ab15277、DYS1、MANEX45A、MANEX4850E)对PMO治疗和未治疗(NT)KM571肌管中的肌营养不良蛋白进行蛋白质印迹。对于经治疗和NT样品,蛋白质提取物的负载量为40 μ g,对于野生型KM155样品(WT),按指定百分比。结蛋白被检测为负载对照。(E) (D)中DYS1信号相对于12.5%WT带强度的量化。(对于C-E, n=3) 误差:S.E.M.* $p<0.05$,** $p<0.005$,*** $p<0.001$ 单因素方差分析和Dunnett检验,与模拟相比,[¶] $p<0.05$,^{¶¶} $p<0.001$ 单因素方差分析和Dunnett检验,与“全”相比。

[0057] 图2显示了使用DG9-PMO的单剂量外显子51跳跃治疗。(A) 向雄性3个月大hMDMdel52;mdx小鼠单次眼眶后注射(1 $\times$ r.o.) 盐水、50mg/kg PMO或等摩尔64mg/kg DG9-PMO用于外显子51跳跃。一周后收集组织。(B) 在各种肌肉中治疗后的RT-PCR外显子51跳跃效率结果,右侧为定量结果。Gapdh显示为对照。(C) 肌营养不良蛋白(DYS1)的蛋白质印迹,以野生型(WT)为参考。对于盐水注射和经治疗的肌肉,蛋白质提取物的负载量为40 μ g,而对于WT胫骨前部样品,按指定百分比。结蛋白和肌球蛋白重链(MyHC)用作负载对照。肌营养不良蛋白信号的量化显示为相对于5%WT带强度。(D) 肌营养不良蛋白(DYS1,绿色)和细胞核(DAPI,蓝色)在各种肌肉和治疗条件下的代表性免疫荧光图像。比例尺:100 μ m。(对于B-D, n=3/组) 误差:S.E.M.* $p<0.05$,** $p<0.005$,*** $p<0.001$ 单因素方差分析和Tukey检验。TA/T, 胫骨前部;GAS/G, 腓肠肌;QUA/Q, 股四头肌;DIA/D, 横膈膜;HRT/H, 心脏。

[0058] 图3显示了使用DG9-PMO的重复剂量外显子51跳跃治疗。(A) 向雄性2个月大hMDMdel52;mdx小鼠三次每周一次眼眶后注射(3 $\times$ r.o.) 盐水或30mg/kg DG9-PMO用于外显子51跳跃。紫色箭头表示功能测试。2周后收集组织。(B) 在各种肌肉中治疗后的RT-PCR外显子51跳跃效率结果,右侧为定量结果。Gapdh显示为对照。(C) 各种骨骼肌或(D) 心脏中肌营养不良蛋白(DYS1)的蛋白质印迹,相应的野生型(WT)样品作为参考。对于盐水注射和经治疗的肌肉,蛋白质提取物的负载量为40 μ g,而对于WT,按指定百分比。结蛋白和肌球蛋白重链(MyHC)用作负载对照。肌营养不良蛋白信号的量化显示为相对于5%WT带强度。(对于B-D, n=3/组) 误差:S.E.M.* $p<0.05$,*** $p<0.001$ 对于(B)至(D)为非配对双尾t检验。(E) 肌营养不良蛋白(DYS1,绿色)和细胞核(DAPI,蓝色)在各种肌肉和条件下的代表性免疫荧光图像。比例尺:100 μ m。(n=3/组)(F) 在整个实验中盐水和DG9-PMO治疗的小鼠的体重。(G) 盐水和DG9-PMO治疗的小鼠的前肢握力,归一化为体重。与基线相比的变化%位于右侧。(H) 与(G)相似,但针对全肢握力。(对于F-H, n=11-14, WT; n=4, 盐水; n=6, DG9-PMO) 误差:S.E.M.* $p<0.05$,** $p<0.005$ 对于(G)至(H)为单因素方差分析和Tukey检验。TA/T, 胫骨前部;QUA/Q, 股四头肌;DIA/D, 横膈膜;HRT/H, 心脏。

[0059] 图4显示了使用最小化的“块”DG9-PMO外显子45-55跳跃混合物进行局部治疗。(A) 向雄性5-6个月大hMDMdel52;mdx小鼠在右胫骨前部(R)中注射5 μ g/DG9-PMO的DG9缀合的“块”混合物(总剂量25 μ g),并在左胫骨前部(L)中注射盐水。一周后收集组织。(B) 治疗后的RT-PCR外显子45-55跳跃效率结果,右侧为定量结果。Gapdh显示为对照。(C) 肌营养不良蛋白(DYS1)的蛋白质印迹,使用野生型(WT)和未治疗(NT)胫骨前部样品作为参考。对于NT、盐水和DG9-PMO治疗的肌肉,蛋白质提取物的负载量为40 μ g,而对于WT,按指定百分比。结蛋白

和肌球蛋白重链(MyHC)用作负载对照。肌营养不良蛋白信号的量化显示为相对于1%WT带强度。(D)肌营养不良蛋白(DYS1,绿色)和细胞核(DAPI,蓝色)的代表性免疫荧光图像。比例尺:100 μ m。(n=3,野生型;n=6,盐水;n=6,DG9-PMO)误差:S.E.M.*p<0.05,***p<0.001非配对双尾t检验。

[0060] 图5详细说明了最小化外显子45-55跳跃混合物的初步测试。生成“全”外显子45-55跳跃PMO混合物的最小化衍生物并在永生化肌管中测试。(A)最小化策略#1涉及两轮连续从“全”混合物中去除单个PMO。(B)策略#2涉及基于人中外显子45-55区域的内源性剪接制备“全”混合物衍生物。RT-PCR外显子45-55跳跃效率结果如(A)和(B)所示。(n=3)误差条:S.E.M.*p<0.05,**p<0.005,***p<0.001单因素方差分析和Dunnett检验,与模拟相比,[°]p<0.05,^{°°}p<0.005,^{°°°}p<0.001单因素方差分析和Dunnett检验,与“全”相比。NT,未治疗。

[0061] 图6显示了使用DG9-PMO单剂量外显子51跳跃治疗的组织学数据。向雄性3个月大hMDd152;mdx小鼠眼眶后注射一次盐水、50mg/kg PMO或等摩尔64mg/kg DG9-PMO用于外显子51跳跃。1周后收集组织进行评估,切片并用苏木精和曙红(HE)染色。(A)野生型、盐水、PMO和DG9-PMO治疗小鼠的胫骨前部和横膈膜的代表性HE图像。比例尺:100 μ m (B) HE图像中的中心成核纤维(CNF)定量。误差条:S.E.M。(C)胫骨前部和(D)横膈膜的HE图像中的最小Feret直径定量。左侧显示频率分布,右侧显示单个纤维的定量。方框边缘,第25和第75百分位数;中心线、中位数;须线,范围。(对于A-D,n=3/组,每组胫骨前部计数719-854根纤维,横膈膜计数962-1,479根纤维)**p<0.005,***p<0.001单因素方差分析和Tukey检验。

[0062] 图7显示了使用DG9-PMO重复剂量外显子51跳跃治疗的功能和组织学数据。向雄性2个月大hMDd152;mdx小鼠眼眶后注射三次盐水或30mg/kg DG9-PMO用于外显子51跳跃,每周一次,持续3周。在基线和最后一次注射后2周进行功能测试。(A)转棒测试结果显示了平均和峰值跌倒时间,以及它们相对于基线的各自变化值%。(B)跑步至筋疲力尽测试结果显示了在跑步机上行进的总距离,右侧为相对于基线的变化%。(野生型,n=8-11;盐水,n=2;DG9-PMO,n=6)误差条:S.E.M.*p<0.05,非配对双尾t检验。(C)治疗后功能测试后收集组织,并用苏木精和曙红(HE)染色。显示了野生型、盐水和DG9-PMO治疗小鼠的胫骨前部和横膈膜的代表性HE图像。比例尺:100 μ m (D) HE图像中的中心成核纤维(CNF)定量。误差条,SIM。(E)胫骨前部和(F)横膈膜的最小Feret直径定量,如图6所示。(对于C-F,n=3/组,每组胫骨前部计数610-865根纤维,横膈膜计数1,167-1,412根纤维)**p<0.005,***p<0.001单因素方差分析和Tukey检验。

[0063] 图8显示了单剂量和重复剂量外显子51跳跃治疗研究的肝脏和肾脏组织学。显示了来自(A)单剂量和(B)重复剂量实验的野生型和hMDd152;mdx肝脏和肾脏的代表性苏木精和曙红染色图像。比例尺:100 μ m。(n=3/组)

[0064] 图9显示了出生后第0天皮下施用DG9-PMO延长了严重SMA小鼠的存活期并改善了运动功能。(A)在PD0以40或80mg/kg的剂量注射的杂合小鼠(Het)、未治疗(NT)、未缀合PMO(PMO)、DG9-PMO和MOE的存活曲线。对于40mg/kg研究,n=15(Het),n=22(NT),n=49(未缀合PMO),n=14(DG9-PMO),n=29(MOE)。对于80mg/kg研究,n=15(Het),n=22(NT),n=7(未缀合PMO),n=6(DG9-PMO),n=4(MOE)(p $\leq$ 0.0001,对数秩Mantel Cox检验)。(B)在PD7施用40或80mg/kg剂量的小鼠的体重。每个点(符号)表示一只新生幼崽。(C)后肢悬挂测定

(HLS)。在PD0时用40mg/kg A0治疗小鼠。评分基于悬挂在猎鹰管上时后肢的位置。(D) 翻正反射测试。在PD0时用40mg/kg A0治疗小鼠。在PD2至PD20之间每隔一天测量一次小鼠用爪子翻正自己的能力(左)。还显示了PD6和PD8的平均翻正反射时间(右:箱须图)。方框边缘,第25和第75百分位数;中心线、中位数;须线,范围。(E) 40mg/kg治疗组中成年小鼠在PD30和PD60时测量的前肢握力,归一化为体重。在B、D(箱须图)和E中,进行单因素方差分析,然后进行事后Tukey检验。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ 。在C和D中,双因素方差分析,然后在A和B中采用Sidak多重比较。 $*p<0.03$, $**p<0.002$, $***p<0.0002$ 。 $*NT$, $\#PMO$, $@DG9-PMO$, $\&MOE$ 。误差条:SEM

[0065] 图10显示了出生后第0天皮下施用DG9-PMO增加了SMN表达。(A) 通过qPCR测量的全长SMN2(FL-SMN2)与缺失SMN2转录物($\Delta 7SMN2$)的相对表达水平。(B) 蛋白质印迹的代表性图像和相对于 β -微管蛋白的SMN蛋白水平定量。将杂合小鼠用作对照,将相对SMN表达设置为1。在PD 0时注射40mg/kg A0。在PD7时收集组织。进行单因素方差分析,随后进行事后Tukey检验。 $*NT$, $\#PMO$, $@DG9-PMO$, $\&MOE$ 。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ 。误差条,SEM。

[0066] 图11显示了DG9-PMO治疗改善了SMA小鼠出生后第7天的呼吸功能。(A) P7幼崽在常氧(左栏)和缺氧(11%O₂,右栏)下的全身体积描记器记录的代表性轨迹(各n=6)。(B) 呼吸频率fR。(C) 常氧条件下潮气量(VT)相对于杂合子的平均值(100%)。(D) 常氧条件下分钟通气量(VE)相对于杂合子的平均值(100%)。(E) 频率变异系数(CV)。(F) 总呼吸暂停持续时间(一分钟内的秒数)。对于那些通过正态性检验(Shapiro-Wilk)和等方差检验(Brown-Forsythe)的数据(B-E中的fR、VT、VE和CV),采用参数统计和双因素重复方差分析,然后使用Holm-Sidak方法。数据未通过正态性检验,采用非参数统计。(G) 呼吸频率与体重之间的相关性。将杂合子的呼吸频率与体重作图(n=10),相关系数为0.303(p=0.394)。纯合子(n=43)的相关系数为0.791(p<0.001)。在PD 0时注射40mg/kg A0。常氧或缺氧差异的比较采用对秩进行kruskal-Wallis单因素方差分析进行,然后采用Dunn方法。缺氧和常氧之间的差异采用符号秩检验进行。 $p<0.05$ 被认为具有统计学显著差异;与指定组($*NT$, $\#PMO$, $@DG9-PMO$, $\&MOE$)相比, $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$;与常氧相比, $\$<0.05$, $\$\$<0.01$, $\$\$\$<0.001$ 。

[0067] 图12显示了DG9-PMO的全身施用改善了SMA小鼠的肌肉病理。(A) 杂合组、NT对照组和治疗组在PD7时股四头肌(顶行)、横膈膜(中行)和肋间肌(底行)的H&E染色的代表性图像。比例尺:100 μ m。(B) 单个肌纤维的最小Feret直径(μ m)的频率分布(顶部)和定量(底部)。方框边缘,第25和第75百分位数;中心线、中位数;须线,范围(每组n=3-7)。测量了股四头肌的1292-1653根纤维、横膈膜的917-1746根纤维和肋间肌的642-1127根纤维。(C) 从H&E图像量化的中心成核纤维(%)。在PD 0时注射40mg/kg A0。采用单因素方差分析进行统计,随后进行事后Tukey检验。 $*NT$, $\#PM$, $@DG9-PMO$, $\&MOE$ 。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ 。误差条,SEM。

[0068] 图13显示了DG9-PMO治疗导致神经肌肉接头(NMJ)的改善。(A) PD30时收集的股四头肌和肋间肌中神经肌肉接头(NMJ)染色的代表性共聚焦图像。比例尺:100 μ m。突触后终板用 α -银环蛇毒素(红色, α -BTX)染色,而神经丝(2H3)和突触小泡(SV2)指示神经元(绿色)。去神经终板可被鉴定为没有重叠突触素染色轴突的 α -BTX终板,而部分去神经终板被鉴定为终板中突触前神经末梢的占有率<50%。白色箭头:完全神经支配。黄色箭头:部分神经支配。蓝色箭头:去神经。白色箭头:塌陷的NMJ。(B) 神经支配特征:从每组(n=3-7)至少300-

500个NMJ中定量完全神经支配、部分神经支配、去神经、塌陷的NMJ,并绘制为分析的总NMJ的百分比。(C)对塌陷囊泡(扁平、非椒盐卷饼形)的数量进行定量(每组 $n=4-6$)。在(B)中,使用双因素方差分析,然后进行Sidak多重比较。 $*p<0.03$; $**p<0.002$; $***p<0.0002$ 。在c中,采用单因素方差分析进行统计,随后进行事后Tukey检验。 $\#PM0, @DG9-PM0, \&MOE$ 。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ 。误差条:SEM。在PD 0时注射40mg/kg A0。

[0069] 图14显示了在PD0时皮下施用后,DG9增加了靶组织中PM0的吸收。(A)使用亲和素-生物素亲和系统通过ELISA检测PM0浓度(pM),并在股四头肌、肝脏、心脏、肾脏、大脑和脊髓中以40mg/kg剂量在DG9-PM0和未缀合的-PM0治疗之间比较(每组 $n=3-7$)。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 非配对双尾学生t检验。误差条,SEM。(B)在PD0时皮下注射荧光标记的DG9-PM0后,PD7心脏、股四头肌、大脑和脊髓的代表性免疫组织化学图像。绿色:荧光素-DG9-PM0。洋红色:DAPI。采用不带荧光标签的DG9-PM0作为阴性对照。白色箭头表示DG9-PM0与细胞核(DAPI)重叠。 $n=3$ 。比例尺:50 μ m。

[0070] 图15显示了DG9-PM0在轻度SMA模型中穿透血脑屏障并增加FL-SMN2表达。(A)F0小鼠($Smn^{-/-}SMN2^{+/+}$) 在PD5时皮下施用荧光标记的DG9-PM0(绿色)后,PD7时股四头肌、心脏、大脑和脊髓的代表性免疫组织化学图像。洋红色:DAPI。每组 $n=3$ 。白色箭头表示DG9-PM0与细胞核(DAPI)重叠。比例尺:50 μ m。(B)使用亲和素-生物素亲和系统通过ELISA检测PD7时的PM0浓度(pM),并在较轻度的SMA模型中在PD5时注射40mg/kg在DG9-PM0和未缀合的-PM0治疗之间比较(每组 $n=3-6$)。使用非配对双尾学生t检验进行统计。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ (C)在股四头肌、肝脏、心脏、脾脏、大脑和脊髓中全长SMN2(FL-SMN2)与缺失SMN2转录物($\Delta 7SMN2$)的相对表达水平。将盐水、未缀合的PM0和DG9-PM0皮下注射到PD5小鼠体内(每组 $n=3-6$)。在PD7时收集组织。在c中,进行单因素方差分析,随后进行事后Tukey检验。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ 。误差条,SEM。

[0071] 图16显示了DG9-PM0治疗在SMA小鼠中以剂量依赖性方式诱导SMN表达。(A)在80mg/kg A0治疗后,通过qPCR测量的NT和治疗小鼠的股四头肌、肝脏、心脏、大脑和脊髓中全长SMN2(FL-SMN2)与缺失SMN2转录物($\Delta 7SMN2$)的相对表达水平。(B)蛋白质印迹的代表性图像和相对于 β -微管蛋白的SMN蛋白水平定量。将杂合小鼠用作对照,将相对SMN表达设置为1。在PD7时收集80mg/kg治疗小鼠的组织。在A-B中,进行单因素方差分析,随后进行事后Tukey检验。 $*NT, \#PM0, @DG9-PM0, \&MOE$ 。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ 。误差条,SEM。

[0072] 图17显示了DG9-PM0在出生后第30天维持SMA小鼠的SMN水平。蛋白质印迹的代表性图像和SMN水平定量。相对于 β -微管蛋白,在PD30时从40mg/kg组收集组织。将杂合小鼠用作对照,将相对SMN表达设置为1。采用单因素方差分析进行统计,随后进行事后Tukey检验。 $\#PM0, @DG9-PM0, \&MOE$ 。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ 。误差条,SEM。

[0073] 图18显示了DG9-PM0治疗的成年SMA小鼠的肌肉强度和运动功能测试。(A)在PD30时测量成年雄性和雌性的前肢握力。在PD0时注射40mg/kg A0。(B)前肢握力归一化到体重。在PD30和PD60时测量。在PD0时注射80mg/kg A0。(C)具有加速度曲线的转棒测试。在PD 30-35时测量。每只老鼠接受三次试验,彼此间隔20分钟。记录下在梁上的最长时间。在PD0时注射40mg/kg A0。进行单因素方差分析,随后进行事后Tukey检验。 $*NT, \#PM0, @DG9-PM0, \&MOE$ 。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ 。误差条,SEM。

[0074] 图19显示了DG9-PM0在出生后第7天改善了SMA小鼠的肌肉病理。在PD7时收获的股

四头肌、横膈膜和肋间肌的横截面积(CSA) (μm^2) 的频率分布和单个肌纤维的定量。方框边缘,第25和第75百分位数;中心线、中位数;须线,范围(每组 $n=3-7$),股四头肌约1292-1653根纤维,横膈膜约917-1746根纤维,肋间肌约642-1127根纤维。采用单因素方差分析进行统计,随后进行事后Tukey检验。*NT, #PM, @DG9-PMO, &MOE。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$ 。误差条, SEM。

[0075] 图20显示了DG9-PMO治疗的小鼠在出生后第30天的肌肉病理。(A) 杂合组、NT对照组和治疗组在PD30时股四头肌(顶行)、横膈膜(中行)和肋间肌(底行)的H&E染色的代表性图像。在PD0时注射40mg/kg A0。比例尺:100 μm 。(B) 在PD30时收集的组织中最小Ferret直径(μm)的频率分布和单个肌纤维的定量如下所示。(C) 横截面积(CSA) (μm^2) 的频率分布和单个肌纤维的定量如下所示。方框边缘,第25和第75百分位数;中心线、中位数;须线,范围(每组 $n=3-6$),股四头肌约960-1868根纤维,横膈膜约983-1436根纤维,肋间肌约800-1802根纤维。在PD0时注射40mg/kg A0。采用单因素方差分析进行统计,随后进行事后Tukey检验。#PMO, @DG9-PMO, &MOE。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$ 。误差条, SEM。

[0076] 图21显示了DG9-PMO治疗不会导致明显的免疫反应和毒性。(A) 在PD7时股四头肌中CD68⁺巨噬细胞(绿色)和DAPI(蓝色)免疫染色的代表性图像。(B) 每个切片平均CD68⁺细胞数。使用来自每只小鼠的股四头肌的3-5个切片进行分析。(每组 $n=3-5$)。比例尺:100 μm 。(C) 血清中ALP、ALT、AST、总胆红素、GGT、BUN、肌酐、CK、总蛋白、白蛋白和球蛋白的分析。在PD30时收集血清。(每组 $n=2-7$)。(D) 在PD30时肝脏(顶行)和肾脏(底行)的H和E染色的代表性图像。健康杂合对照组和治疗组之间没有观察到明显的形态差异。比例尺:100 μm 。在PD0时注射40mg/kg A0。进行单因素方差分析,随后进行事后Tukey检验。*NT, #PM, @DG9-PMO, &MOE。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$ 。误差条, SEM。

[0077] 图22显示了DG9 PMO在转基因斑马鱼模型中诱导心脏特异性外显子跳跃。(A) 使用To12转座子系统,通过在双荧光蛋白开关侧接To12反向末端重复序列(ITR),产生转基因斑马鱼系。无处不在的mRNA是使用鲤鱼 β -肌动蛋白启动子、非编码外显子和迷你内含子1(β -act)产生普遍存在的mRNA。mRNA将由两个外显子产生。第一个外显子包含完整的蓝色荧光蛋白(BFP)开放阅读框,其中包括终止密码子。第二个外显子包括红色荧光蛋白(RFP)开放阅读框及其终止密码子、多聚腺苷酸化信号和转录终止子。这种双顺反子mRNA通常只会产生功能性BFP。然而,在存在靶向BFP剪接受体(来源于鲤鱼 β -肌动蛋白基因的外显子2)的PMO的情况下,BFP外显子将被跳跃,并产生更短的mRNA。RFP可以从这种较短的mRNA翻译而来。从BFP表达到RFP的转换将与细胞核中的PMO活性相对应,并表明成功递送到细胞中。B. qPCR数据显示检测到从DG9PPMO治疗的斑马鱼组(15个月大,每条约8条鱼,通过静脉途径注射1剂25mg/Kg PPMO)收集的RFP转录物。RFP转录物的 ΔCT 图:在所有测试的器官中,心脏是唯一能检测到RFP的器官。C. 对qPCR产物进行凝胶电泳,以观察RFP转录物。对心脏中检测到的约100bp条带进行测序,其结果与所需产物一致。

[0078] 图23显示了与R6-PMO相比,DG9-PMO治疗SMA小鼠后疗效有所提高。(A) 在PD0时以40mg/kg的剂量注射的杂合小鼠(Het)、未治疗(NT)、未缀合的PMO(PMO)、DG9-PMO、MOE和R6G-PMO的存活曲线。 $n=15$ (Hets), $n=22$ (NT), $n=49$ (未缀合的PMO), $n=14$ (DG9-PMO), $n=29$ (MOE)和 $n=6$ (R6G-PMO), ($p\leq 0.0001$,对数秩Mantel Cox检验)。(B) 杂合小鼠、用80mg/kg或40mg/kg DG9-PMO治疗的小鼠、注射未缀合的PMO(40mg/kg)的小鼠和盐水治疗的NT小鼠

在PD7时的代表性图像(从左到右)。(C)在PD7施用40或80mg/kg剂量的小鼠的体重。每个点(符号)表示一只新生幼崽。(D)后肢悬挂测定(HLS)。在PD0时用40mg/kg A0治疗小鼠。评分基于悬挂在猎鹰管上时后肢的位置。(E)翻正反射测试。在PD0时用40mg/kg A0治疗小鼠。在PD2至PD20之间每隔一天测量一次小鼠用爪子翻正自己的能力(左)。还显示了PD6和PD8的平均翻正反射时间(右:箱须图)。方框边缘,第25和第75百分位数;中心线、中位数;须线,范围。(F)在40mg/kg AS0或PBS治疗后,通过qPCR测量的全长SMN2(FL-SMN2)与缺失SMN2转录物(Δ 7SMN2)相比的相对表达水平。在C、E(箱须图)和F中,进行单因素方差分析,然后进行事后Tukey检验。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.005$ 。在D和E中,进行双因素方差分析,然后进行Sidak多重比较 $*p<0.03$; $**p<0.002$; $***p<0.0002$ 。 $*NT$, $\#PM0$, $@DG9-PM0$, $\&MOE$, $\wedge R6-PM0$ 。误差条:SEM

具体实施方式

[0079] 本发明提供了任选地适合于全身递送的调控前体mRNA剪接的治疗剂。该治疗剂包含与源自人Hph-1转录因子的蛋白质转导结构域(PTD)的细胞穿透肽缀合的反义寡核苷酸。

[0080] 该治疗剂旨在促进外显子跳跃或外显子包含。该治疗剂包括用于治疗杜氏肌营养不良症(DMD)和脊髓性肌萎缩症(SMA)的肽缀合的反义治疗剂。

[0081] DMD治疗剂促进外显子跳跃。任选地,这种治疗剂包含多于一种缀合物并且被配置成促进多外显子跳跃。任选地,治疗剂包含两种、三种、四种、五种、六种、七种或更多种不同的缀合物,其中每种缀合物包含与源自人Hph-1转录因子的蛋白质转导结构域(PTD)的细胞穿透肽缀合的反义寡核苷酸。在一些实施方式中,每种不同的缀合物靶向不同的外显子。在一些实施方式中,不同的缀合物靶向相同的外显子。

[0082] SMA治疗剂促进外显子包含。

[0083] 缀合物:

[0084] 本发明的缀合物包含附接到细胞穿透肽(CPP)的能够调控前体mRNA的外显子剪接的反义寡核苷酸。本发明的细胞穿透肽,也称为DG9,促进缀合的反义寡核苷酸的递送并且比R6G细胞穿透肽具有更高的活性。在一些实施方式中,本发明的缀合物用于静脉递送。

[0085] 本发明的细胞穿透肽源自人HPH-1转录因子的蛋白质转导结构域,并包含以下氨基酸序列:

[0086] YARVRRRGPRGYARVRRRGPRR。

[0087] 任选地,在一些实施方式中,一个或两个氨基被缺失或取代。任选地,氨基酸被非天然存在的氨基酸取代。

[0088] 在一些实施方式中,为了增加血清稳定性,一个或多个L-氨基酸被D-氨基酸替换。在一些实施方式中,两个、三个、四个、五个或六个L-氨基酸被D-氨基酸替换。任选地,两个、三个、四个、五个或六个L-精氨酸被D-精氨酸替换。

[0089] 在一些实施方式中,细胞穿透肽(CPP)具有以下氨基酸序列:

[0090] YArVRRrGPRGYArVRRrGPRr;

[0091] 其中大写表示L-氨基酸,小写表示D-氨基酸。

[0092] 在一些实施方式中,CPP与寡核苷酸的5'末端缀合。在其他实施方式中,CPP与寡核苷酸的3'缀合。

[0093] 如本文可互换使用的,“反义寡核苷酸”、“反义治疗剂”、“A0”、“寡核苷酸”、“寡聚体”是指亚基序列,每个亚基具有携带在骨架亚基上的碱基,其中骨架基团通过亚基间键连接,这些亚基间键允许化合物中的碱基通过沃森-克里克碱基配对与核酸中的靶序列杂交,从而在靶序列内形成核酸:寡核苷酸异源双链体。寡核苷酸可以具有与靶序列的精确序列互补性或足够的互补性以选择性地结合靶序列。

[0094] 反义寡核苷酸的长度为约20至约50个核苷酸,包括至少10、12、15、17或20个与靶序列互补的连续核苷酸。

[0095] 在一个实施方式中,反义寡核苷酸的长度为20至30或24至28个核苷酸。

[0096] 在一些实施方式中,反义寡核苷酸是反义寡核苷酸类似物。

[0097] 术语“寡核苷酸类似物”和“核苷酸类似物”分别指本领域已知的寡核苷酸或核苷酸的任何修饰的合成类似物。

[0098] 寡核苷酸类似物的示例包括但不限于肽核酸(PNA)、吗啉代寡核苷酸、硫代磷酸寡核苷酸、二硫代磷酸寡核苷酸、烷基磷酸寡核苷酸、酰基磷酸寡核苷酸、亚磷酰胺寡核苷酸、三环DNA和2'甲氧基乙基寡核苷酸。

[0099] 在一些实施方式中,反义寡核苷酸包含吗啉代亚基。

[0100] 在一些实施方式中,反义寡核苷酸是吗啉代反义寡核苷酸。

[0101] 在一些实施方式中,反义寡核苷酸包含通过含磷连接连接在一起的吗啉代亚基。在一个具体示例中,反义寡核苷酸是磷酰胺或磷二酰胺吗啉代反义寡核苷酸。

[0102] 术语“吗啉代反义寡核苷酸”或“PMO”(磷酰胺或磷二酰胺吗啉代寡核苷酸)是指由吗啉代亚基结构组成的反义寡核苷酸类似物,其中(i)结构通过含磷连接连接在一起,例如长度为一至三个原子,例如长度为两个原子,并且例如不带电或带阳离子,将一个亚基的吗啉代氮与相邻亚基的5'环外碳连接,以及(ii)每个吗啉代环带有嘌呤或嘧啶碱基配对部分,其通过碱基特异性氢键有效结合到多核苷酸中的碱基上。

[0103] 在一些实施方式中,反义寡核苷酸包含含磷亚基间连接,其将一个亚基的吗啉代氮与相邻亚基的5'环外碳连接。

[0104] 任选地,可以对亚基间连接进行改变,只要这些改变不干扰结合或活性即可。例如,附接到磷上的氧可以被硫取代(硫代磷二酰胺)。5'氧可以被氨基或低级烷基取代的氨基取代。附接到磷上的侧氮可以是未取代的、被(任选取代的)低级烷基单取代的或二取代的。

[0105] 反义寡核苷酸可以通过众所周知的固相合成技术制成。

[0106] 在一些实施方式中,缀合物还包含标记。标记提供直接或间接的可检测信号。合适的标记是本领域中已知的并且包括荧光标记或放射性标记。

[0107] 将CPP缀合到寡核苷酸上的方法是本领域已知的,或者可以商业制备缀合物。

[0108] 杜氏肌营养不良症(DMD)缀合物

[0109] 提供了用于治疗杜氏肌营养不良症的外显子跳跃肽缀合的反义治疗剂。使用肽缀合的反义治疗剂治疗DMD恢复DMD患者的部分功能性肌营养不良蛋白。

[0110] “功能性”肌营养不良蛋白是指与患有肌肉疾病如DMD的患者体内存在的缺陷型肌营养不良蛋白相比,具有足够的生物活性以减缓肌肉组织的进行性退化的肌营养不良蛋白,否则这是肌营养不良症的特征。

[0111] 在一些实施方式中,功能性肌营养不良蛋白可以具有野生型肌营养不良蛋白的体外或体内生物活性的约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。肌营养不良蛋白在体外肌肉培养中的活性可以根据肌管大小、肌原纤维组织、收缩活动和乙酰胆碱受体的自发聚集来测量。

[0112] 因此,在一些实施方式中,本发明的肽缀合的反义治疗剂用于通过诱导人肌营养不良蛋白前体mRNA中的外显子跳跃来恢复功能性肌营养不良蛋白表达来治疗DMD。

[0113] 在一个实施方式中,治疗剂包含一个肽缀合的反义寡核苷酸。在替代的实施方式中,治疗剂包含一个以上的肽缀合的反义寡核苷酸,其中每个肽缀合的反义寡核苷酸靶向肌营养不良蛋白前体mRNA中的不同序列。

[0114] 如本文所述,提供了肽缀合的反义治疗剂,其可在治疗上有效用于人肌营养不良蛋白(DMD)基因中外显子44、外显子45、外显子46、外显子47、外显子48、外显子49、外显子50、外显子51、外显子52、外显子53、外显子54和/或外显子55中的一个或多个的外显子跳跃疗法跳跃。

[0115] 在一些实施方式中,肽缀合的反义治疗剂包含多个肽缀合的反义寡核苷酸并且促进外显子45-55的跳跃。

[0116] 在一些实施方式中,肽缀合的反义治疗剂包含靶向外显子45的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子46的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子47的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子48的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子49的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子50的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子51的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子52的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子53的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子54的肽缀合的反义寡核苷酸和靶向外显子55的肽缀合的反义寡核苷酸。

[0117] 在其他实施方式中,肽缀合的反义治疗剂包含靶向外显子45的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子47的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子49的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子51的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子53的肽缀合的反义寡核苷酸和靶向外显子55的肽缀合的反义寡核苷酸。

[0118] 在又其他实施方式中,肽缀合的反义治疗剂包含靶向外显子45的肽缀合的反义寡核苷酸、靶向外显子47的肽缀合的反义寡核苷酸和靶向外显子53的肽缀合的反义寡核苷酸。

[0119] 在一些实施方式中,肽缀合的反义治疗剂的反义寡核苷酸与人肌营养不良蛋白(DMD)基因的外显子44、外显子45、外显子46、外显子47、外显子48、外显子49、外显子50、外显子51、外显子52、外显子53、外显子54或外显子55中的靶序列结合。任选地,靶序列靠近前体mRNA中的外显子受体剪接位点。在一些实施方式中,靶序列位于外显子受体剪接位点、外显子剪接位点的10个碱基以内、外显子剪接位点的15个碱基以内、外显子剪接位点的20个碱基以内、外显子剪接位点的30个碱基以内、外显子剪接位点的40个碱基以内、外显子剪接位点的50个碱基以内、外显子剪接位点的75个碱基以内或外显子剪接位点的100个碱基以内。

[0120] 在一些实施方式中,缀合物的反义寡核苷酸包含或由以下序列中任一个的至少10、12、14、16、18或20个连续核苷酸组成,其中序列中的胸腺嘧啶碱基任选为尿嘧啶:

[0121]	<table><tr><td>ID*</td><td>序列,5' 至3'</td></tr></table>	ID*	序列,5' 至3'
ID*	序列,5' 至3'		

Ex45_Ac9	GACAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCATC
Ex46_Ac93	AGTTGCTGCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGGG
Ex47_Ac13	GTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGGGGCAACT
Ex48_Ac7	CAATTTCTCCTTGTTTCTCAGGTAAAGCTC
Ex48_Ac78	CAGATGATTTAACTGCTCTTCAAGGTCTTC
Ex49_Ac17	ATCTCTTCCACATCCGGTTGTTTAGCTTGA
Ex50_Ac19	GTAAACGGTTTACCGCCTTCCACTCAGAGC
Ex51_Ac0	GTGTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG
Ex52_Ac24	GGTAATGAGTTCTTCCAACCTGGGGACGCCT
Ex53_Ac26	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTC
Ex54_Ac42	GAGAAGTTTCAGGGCCAAGTCATTTGCCAC
Ex55_Ac0	TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC

[0122] *表示为:外显子靶标_距靶外显子受体位点的距离。

[0123] 任选地,反义寡核苷酸是磷酸二胺吗啉代寡聚体(PMO)。

[0124] 在一些实施方式中,缀合物增加向心脏细胞的递送、吸收或保留。

[0125] 脊髓性肌萎缩症(SMA)

[0126] 提供了用于治疗脊髓性肌萎缩症的外显子包含肽缀合的反义治疗剂。用肽缀合的反义治疗剂治疗SMA会产生稳定的SMN2,来补偿SMN1的丧失。

[0127] 肽缀合的反义治疗剂包含与DG-9缀合的反义寡核苷酸,该反义寡核苷酸与SMN2前体mRNA的内含子剪接沉默子N1结合。任选地,反义寡核苷酸包含或由序列5'-TCACTTTCATAATGCTGG-3'组成,并且其中胸腺嘧啶任选地被尿嘧啶替换。

[0128] 在一些实施方式中,反义寡核苷酸是磷酸二胺吗啉代寡聚体。

[0129] 药学上可接受的赋形剂

[0130] 在一方面,描述了一种药物组合物,其包含一个或多个本发明的反义寡核苷酸或其缀合物,还包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0131] 在一些实施方式中,药物组合物以本领域已知的方式制备,其中使用药学上惰性的无机和/或有机赋形剂。

[0132] 术语“药学上可接受的”是指生理上可耐受的分子和组合物,当施用于患者时,通常不会产生过敏或类似的不良反应。

[0133] 在一些实施方式中,药物组合物可以配制为丸剂、片剂、包衣片剂、硬明胶胶囊、软明胶胶囊和/或栓剂、溶液和/或糖浆、注射溶液、微胶囊、植入物和/或棒等。

[0134] 在一些实施方式中,药物组合物可以配制为注射溶液。

[0135] 在一些实施方式中,用于制备丸剂、片剂、包衣片剂和硬明胶胶囊的药学上可接受的赋形剂可以选自以下中的任一种:乳糖、玉米淀粉和/或其衍生物、滑石、硬脂酸和/或其盐等。

[0136] 在一些实施方式中,用于制备软明胶胶囊和/或栓剂的药学上可接受的赋形剂可以选自脂肪、蜡、半固体和液体多元醇、天然和/或硬化油等。

[0137] 在一些实施方式中,用于制备溶液和/或糖浆的药学上可接受的赋形剂可以选自水、蔗糖、转化糖、葡萄糖、多元醇等。

[0138] 在一些实施方式中,用于制备注射溶液的药学上可接受的赋形剂可以选自水、盐水、醇、甘油、多元醇、植物油等。

[0139] 在一些实施方式中,用于制备微胶囊、植入物和/或棒的药学上可接受的赋形剂可以选自混合聚合物,例如乙醇酸和乳酸等。

[0140] 在一些实施方式中,药物组合物可以包含脂质体制剂。

[0141] 在一些实施方式中,任选地,药物组合物可以包含两个或更多个不同的反义寡核苷酸或其缀合物。

[0142] 在一些实施方式中,任选地,反义寡核苷酸和/或缀合物可以作为生理学上耐受的盐存在于药物组合物中。

[0143] 适当地,生理学上耐受的盐保留了反义寡核苷酸和/或其缀合物的所需生物活性并且不会产生不期望的毒理学效应。对于反义寡核苷酸,药学上可接受的盐的合适示例包括(a)与阳离子形成的盐,例如钠、钾、铵、镁、钙、多胺例如精胺和亚精胺等;(b)与无机酸形成的酸加成盐,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等;(c)与有机酸形成的盐,例如乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、葡萄糖酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、单宁酸、棕榈酸、藻酸、聚谷氨酸、萘磺酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、聚半乳糖醛酸等;以及(d)由元素阴离子(例如氯、溴和碘)形成的盐。

[0144] 在一些实施方式中,除了活性成分和赋形剂外,药物组合物还可以包含添加剂,例如填充剂、增量剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、润湿剂、稳定剂、乳化剂、防腐剂、甜味剂、染料、调味剂或芳香剂、增稠剂、稀释剂或缓冲物质,此外,以及溶剂和/或增溶剂和/或用于实现缓释效果的药剂,以及用于改变渗透压的盐、包衣剂和/或抗氧化剂。合适的添加剂可以包括Tris-HCl、醋酸盐、磷酸盐、吐温80、聚山梨醇酯80、抗坏血酸、焦亚硫酸钠、Thimersol、苯甲醇、乳糖、甘露醇等。

[0145] 施用

[0146] 在一些实施方式中,一个或多个肽缀合的反义寡核苷酸和/或药物组合物用于局部、肠内或肠胃外施用。

[0147] 在一些实施方式中,一个或多个肽缀合的反义寡核苷酸和/或药物组合物可以用于口服、透皮、静脉内、鞘内、肌肉内、皮下、鼻腔、透粘膜等施用。

[0148] 在一些实施方式中,一个或多个反义寡核苷酸和/或药物组合物用于肌肉内施用。

[0149] 在一些实施方式中,一个或多个反义寡核苷酸和/或药物组合物用于通过注射肌肉内施用。

[0150] “有效量”或“治疗有效量”是指对受试者施用的反义寡核苷酸的量,无论是单次剂量还是一系列剂量的一部分,都有效地在受试者体内产生所需的生理反应或治疗效果。

[0151] 在一些实施方式中,一个或多个反义寡核苷酸或其缀合物每天施用一次、每2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天施用一次、每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12周施用一次、或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月施用一次。

[0152] 在一些实施方式中,反义寡核苷酸或其缀合物可以在一天中以适当的间隔单独以两、三、四、五、六或更多个亚剂量施用,任选地以单位剂型施用。

[0153] 为了更好地理解本文所述的本发明,提出了以下实施例。应当理解,这些实施例仅用于说明目的。因此,它们不应以任何方式限制本发明的范围。

[0154] 实施例

[0155] 实施例1:肽缀合的PMO治疗杜氏肌营养不良症

[0156] 杜氏肌营养不良症 (DMD) 主要是由肌营养不良蛋白基因的框外缺失引起的。使用磷酸二胺吗啉代寡聚体 (PMO) 进行外显子跳跃将框外突变转化为框内突变,产生部分功能性肌营养不良蛋白。跳跃外显子45-55可以治疗所有患者的40-47%,并与改善临床结果有关。报道了用于外显子45-55跳跃的肽缀合的PMO的开发。对永生患者肌管进行的实验表明,通过靶向少至5个外显子,可以跳跃外显子45-55。将细胞穿透肽DG9与PMO缀合改善hDMDdel152;mdx小鼠中的单外显子51跳跃、肌营养不良蛋白恢复和肌肉功能。局部施用最小化外显子45-55跳跃DG9-PMO混合物恢复肌营养不良蛋白产生。

[0157] 结果

[0158] 最小化外显子45-55跳跃混合物

[0159] 使用两种策略将跳跃DMD外显子45-55所需的PMO数量最小化。

[0160] 首先,从先前开发的外显子45-55跳跃混合物中去除靶向该区域中外显子的PMO (或多个PMO) [13] (表1)。完整混合物,其中PMO靶向外显子45-55内的所有外显子,被称为“全”混合物(图1a)。将“全”混合物及其衍生物转染到健康永生患者来源的KM155肌管中(图1b),只有“全”混合物跳跃的外显子45-55明显高于模拟($p < 0.005$) (图5a)。其缺失导致跳跃显著下降的PMO被保留作为最小化混合物的一部分,即靶向外显子45、47和53的PMO。靶向外显子49、51和55的PMO也被保留。这种最小化混合物被称为“基础”混合物,并在永生患者外显子52缺失的患者来源的KM571肌管中进行另一轮最小化。与模拟相比,“基础”混合物显示出明显的外显子45-55跳跃($p < 0.05$),以及其衍生物,其中外显子47($p < 0.05$)或51($p < 0.05$)不被靶向(图5a)。“基础”和“基础-51”混合物在该批次中显示出最高的跳跃效率(图1a)。

[0161] 对于第二种策略,制备了基于DMD外显子45-55的内源性剪接的最小化混合物。一个模型提出,外显子45-49、50-52和53-55首先被剪接,之后这些组被剪接在一起以完成外显子45-55区域(25)。设计了来自“全”混合物的衍生混合物,其中PMO靶向这三组的末端外显子。转染到健康KM155肌管中发现,三种衍生混合物跳跃外显子45-55明显高于模拟($p < 0.05$) (图5b),跳跃效率与“全”混合物没有显著差异。基于此,选择靶向外显子45、49、50、52、53和55的混合物(“块”混合物)以及靶向外显子45、50和55(“3-PMO”混合物)进行进一步实验(图1a)。

[0162] 最小化外显子跳跃混合物在各种患者细胞中有效跳跃外显子45-55

[0163] 随后在以下永生患者来源的肌细胞系中测试了“全”、“基础”、“基础-51”、“块”和“3-PMO”外显子45-55跳跃混合物:KM155 (健康)、KM571 ($\Delta ex52$)、6594 ($\Delta ex48-50$) 和6311 ($\Delta ex45-52$) (图1a)。每种细胞系都使用了突变定制版本的混合物,去除了不必要的PMO。在转染到肌管中(图1b)和RT-PCR分析后,与模拟相比,“全”混合物在所有系中显著跳跃外显子45-55($p < 0.005$ 或 $p < 0.001$) (图1c)。与模拟相比,“基础-51”、“块”和“3-PMO”混合物在KM155、KM571和6594肌管中诱导了显著的外显子45-55跳跃(至少 $p < 0.05$);“基础”混合物仅在KM155细胞中显示出显著的跳跃($p < 0.001$)。在6594肌管中,“3-PMO”混合物诱导的跳跃显著高于“全”混合物。有趣的是,所有最小化混合物在6594肌管中均未显示任何外显子45-55跳跃。

[0164] 评估了“块”和“3-PMO”混合物在KM571肌管中的肌营养不良蛋白恢复能力,因为这些混合物在此系中诱导了最高水平的外显子45-55跳跃。使用针对肌营养不良蛋白的棒(DYS1,外显子26-30)和C末端结构域(ab15277)的抗体进行的蛋白质印迹在用“全”和“块”混合物治疗后检测到肌营养不良蛋白,但用“3-PMO”混合物没有检测到(图1d)。DYS1信号的定量表明,“块”混合物治疗恢复了野生型肌营养不良蛋白水平的平均2.94%,略高于“全”混合物恢复的平均2.33%肌营养不良蛋白,并且与模拟中0.10%肌营养不良蛋白水平相比有所升高($p<0.001$) (图1e)。使用MANEX45A(对应外显子45-46)和MANEX4850E(对应外显子48-50)抗体进行的蛋白质印迹在治疗肌管中未检测到肌营养不良蛋白(图1d),这表明治疗后诱导的肌营养不良蛋白可能来自外显子45-55跳跃转录物。

[0165] 使用DG9-PMO单次静脉治疗比未缀合的PMO在骨骼肌和心脏中诱导更高的肌营养不良蛋白产生

[0166] 为了评估DG9作为最小化外显子45-55跳跃混合物的缀合物,评估了其应用于单外显子跳跃的体内功效。将DG9与Ex51_Ac0缀合,Ex51_Ac0是“全”混合物中外显子51跳跃PMO,在体外恢复肌营养不良蛋白产生方面比eteplirsen有效高达7倍[13,26]。向3个月大的hMDMdel52;mdx小鼠单次眼眶后注射盐水、50mg/kg未缀合的PMO或64mg/kg DG9-PMO(与PMO剂量等摩尔),并在一周后进行评估(图2a)。DG9-PMO治疗的小鼠在各种骨骼肌(至少 $p<0.05$)和心脏($p<0.001$)中的外显子51跳跃水平显著高于盐水或PMO治疗组(图2b)。与未缀合的PMO相比,DG9-PMO在骨骼肌中诱导的跳跃平均高2.2至12.3倍,在心脏中跳跃高14.4倍。与盐水($p<0.005$)和PMO($p<0.05$)治疗相比,DG9-PMO治疗在腓肠肌和股四头肌中显著恢复肌营养不良蛋白产生,达到野生型水平的至多3%(图2c)。在心脏中,DG9-PMO恢复了野生型肌营养不良蛋白水平的平均2.5%,显著高于盐水或PMO组($p<0.05$)。与PMO治疗的小鼠相比,接受DG9-PMO的小鼠在骨骼肌和心脏中的肌营养不良蛋白水平分别平均高出1.5至3.4倍和4.5倍。

[0167] 在DG9-PMO治疗的小鼠的胫骨前部、横膈膜和心脏中观察到广泛的肌营养不良蛋白阳性纤维,在盐水或PMO治疗的小鼠中很少甚至没有(图2d)。然而,组织学分析表明,PMO或DG9-PMO治疗后,胫骨前部和横膈膜中的中心成核纤维(CNF,累积肌肉再生的标志物)的百分比没有降低(图6a,b),肌纤维大小也没有任何改善(图6a,c,d)。

[0168] 使用DG9-PMO反复静脉治疗改善营养不良小鼠的肌营养不良蛋白产生、肌肉功能和纤维大小

[0169] 进行了一项重复剂量治疗研究,以更深入地了解DG9-PMO外显子跳跃疗法在改善营养不良症状方面的功效。向2个月大的hMDMdel52;mdx小鼠眼眶后注射盐水或30mg/kg DG9-PMO,每周一次,持续3周。在基线和最后一次注射后2周进行功能评估,然后收集组织(图3a)。再次,与盐水对照组相比,DG9-PMO治疗在骨骼肌和心脏中以高水平显著诱导外显子51跳跃(平均55-71%) ($p<0.001$) (图3b)。这导致在各种骨骼肌中显著的肌营养不良蛋白产生,平均为2.8-3.9%,而盐水治疗的小鼠为0.1-0.3%(至少 $p<0.05$) (图3c),以及在心脏中平均为7.7%,而盐水组为0.5% ($p<0.001$) (图3d)。免疫荧光证实在胫骨前部、横膈膜和心脏中存在广泛的肌营养不良蛋白阳性纤维(图3e)。

[0170] 在治疗过程中,组间体重没有显著差异(图3f)。最令人印象深刻的是,重复DG9-PMO治疗显著提高了hMDMdel52;mdx小鼠的前肢($p<0.05$) (图3g)和全肢($p<0.005$) (图3h)握

力,因此它们与野生型对照组没有显著差异。几乎所有小鼠的前肢/全肢握力都比基线有所改善,只有一只小鼠在治疗后前肢握力差异为-0.3%。这与盐水对照相反,盐水对照没有显示出变化方向(图3g)或与基线相比没有变化(图3h)。转棒和跑步机测试显示了类似的改善;特别是,与盐水对照小鼠相比,治疗小鼠的跑步机行走距离与基线相比显著改善(图7a, b)。

[0171] 组织学分析仍然没有显示胫骨前部和横膈膜中的CNF有任何显著减少(图7c, d)。然而,观察到DG9-PMO治疗后纤维大小显著增加($p<0.001$) (图7e, f), 胫骨前部中大多数纤维的最小Feret直径为45-50 μm ,在横膈膜中为25-30 μm 。这与盐水对照肌肉中大多数纤维的直径分别为30-35 μm 和20-25 μm 形成对比。对单次和重复剂量治疗小鼠的肝脏和肾脏进行定性组织学分析,但未发现PMO或DG9-PMO治疗引起的毒性证据(图8a, b)。

[0172] 使用DG9缀合的最小化外显子45-55跳跃混合物进行局部治疗诱导了成功的跳跃和肌营养不良蛋白产生

[0173] 最后,将DG9与最小化“块”外显子45-55跳跃混合物的每个PMO缀合,用于体内测试。选择“块”混合物是因为它在KM571肌管中诱导高水平的外显子45-55跳跃和肌营养不良蛋白恢复(图1c-e)。因此,向5至6个月大的hDMDdel52;mdx小鼠的胫骨前部肌肉注射盐水或突变定制的DG9缀合形式的“块”混合物(5种DG9-PMO, 5 μg /DG9-PMO, 总剂量25 μg),并在一周后进行评估(图4a)。与盐水对照相比,观察到显著的外显子45-55跳跃($p<0.001$) (图4b)。蛋白质印迹显示,DG9-PMO治疗的肌肉中肌营养不良蛋白的恢复平均为野生型水平的0.76%,显著高于盐水治疗的肌肉的0.46% ($p<0.05$) (图4c)。由于同一只小鼠的一条腿接受了DG9-PMO,而对侧腿部接受了盐水,因此纳入了未治疗小鼠的蛋白质,以解释腿之间可能的渗漏。未治疗的胫骨前部肌肉的肌营养不良蛋白为野生型水平的0.12%,低于盐水对照中的水平。在DG9-PMO治疗的肌肉中观察到一些分散的肌营养不良蛋白阳性纤维,在盐水对照中很少甚至没有,证实了肌营养不良蛋白恢复(图4d)。

[0174] 讨论

[0175] 开发出一种最小化的外显子45-55跳跃混合物,其诱导永生患者细胞和营养不良的hDMDdel52;mdx小鼠中的肌营养不良蛋白恢复。对于外显子52缺失的DMD转录物,用于外显子45-55跳跃的PMO数量从“全”中的11个减少到“块”混合物中的5个(图1a),PMO含量减少了50%以上。虽然大多数最小化的混合物在KM571($\Delta\text{ex}52$)和6594($\Delta\text{ex}48-50$)肌管中显著跳跃外显子45-55,但显然6311肌管($\Delta\text{ex}45-52$)中所有剩余的外显子都必须作为靶标。“块”混合物将肌营养不良蛋白的产生恢复到野生型水平的约3%,接近“全”混合物的量(图1e)。

[0176] 证明了DG9与PMO缀合在单外显子和多外显子跳跃应用中的功效。与未缀合的PMO相比,DG9-PMO治疗导致体内单外显子跳跃和肌营养不良蛋白恢复水平更高(图2b-d),与其他细胞穿透肽的广泛观察结果相似(20, 28)。重复治疗导致所有受检组织(尤其是心脏)中的肌营养不良蛋白恢复更明显,从野生型水平的2.5%到7.7% (图2c, 3d)。

[0177] 与其他肽相比,DG9的优势在于其潜在的更好的毒性特征。肽缀合的PMO在临床前研究中诱导了剂量依赖性毒性作用,包括嗜睡、体重减轻和肾损伤(20)。这与细胞穿透肽的膜破坏性有关,而膜破坏性在很大程度上受到其氨基酸组成的影响(20, 29)。将DG9中的某些L-精氨酸残基转化为D-精氨酸,因为这提高了肽缀合的PMO治疗细胞在体外的活力(30)。

DG9也不含任何与毒性增加有关的6-氨基己酸残基(30)。与DG9相比,先前的肽大多使用L-精氨酸并含有多个6-氨基己酸残基,但长度和总精氨酸含量相似(20)。尽管上述修饰降低了肽缀合的PMO的反义活性,但它具有提高安全性的好处。必须在肽缀合的PMO的功效和安全性之间取得平衡,因为太频繁或太高的剂量会增加毒性(20,29)。没有发现DG9-PMO对肝脏和肾脏造成毒性的证据(图8)。

[0178] 就功效而言,尽管我们的DG9-PMO诱导了高外显子51跳跃,但观察到的肌营养不良蛋白恢复通常低于其他肽缀合的PMO所实现的(20,29)。这可能是由于策略的不同,因为大多数肽缀合的PMO研究都进行了外显子23跳跃(20)。Aoki等人(2010)(其使用PMO跳跃外显子51(31))和Aupy等人(2020)(其也跳跃外显子51,但使用腺相关病毒递送的U7小核RNA(32))观察到外显子跳跃和体内肌营养不良蛋白恢复水平之间存在类似的差异。外显子51跳跃的转录物或蛋白质可能不如外显子23跳跃的对应物稳定,导致观察到的肌营养不良蛋白水平降低。一项使用各种内部截短的肌营养不良蛋白的体外研究表明,外显子51跳跃的肌营养不良蛋白大多与全长肌营养不良蛋白一样稳定(33),这支持转录物稳定性降低的假设。虽然先前的研究表明DMD转录物稳定性对肌营养不良蛋白的产生有影响(34,35),但这是否解释了外显子23和外显子51跳跃转录物的情况下的差异仍有待确定。另一个因素是用于测试的动物模型。由于人源化营养不良小鼠如hDMDde152;mdx最近才开发出来,因此在这些模型中表征人DMD转录物和蛋白质的稳定性是非常重要的,以确定这是否会对测试的外显子跳跃疗法的功效产生影响。

[0179] 尽管其活性相对降低,但在给予重复剂量DG9-PMO的小鼠中观察到功能改善(图3g,h,图7a,b)。经治疗的hDMDde152;mdx小鼠的骨骼肌中的平均肌营养不良蛋白恢复水平为野生型的2.8-3.9%(图3c)。这伴随着纤维大小的改善,如胫骨前部和横膈膜所示(图7c,e,f)。这发现支持了这样一种观点,即可能不需要太多的肌营养不良蛋白来实现体内功能益处。事实上,先前对非随机X染色体失活的mdx小鼠(mdx-Xist^{Δhs})的研究表明,只要正常水平的3-14%的肌营养不良蛋白就足以将线挂和握力测试的表现提高到野生型水平(36)。

[0180] 在多重外显子跳跃方面,有希望的是,DG9缀合版本的最小化“块”混合物以9.5%效率成功跳跃外显子45-55,并将hDMDde152;mdx小鼠中的肌营养不良蛋白产生平均恢复到接近野生型水平的0.8%(图4b,c)。先前已表明,以1.67μg/PMO的剂量肌肉治疗不同的人源化DMD小鼠模型后,“全”混合物诱导15%的外显子45-55跳跃效率[13]。显然需要更高剂量的“块”混合物来体内诱导与“全”混合物相当的跳跃水平。由于“块”混合物中DG9-PMO的人和小鼠转录物靶序列有70-93%相同,因此在hDMDde152;mdx小鼠中表达的小鼠Dmd转录物可能已经整合了一些施用的DG9-PMO。将hDMDde152转基因与小鼠Dmd无效背景杂交[37]将消除这种可能性,并可能产生更具代表性的功效结果。

[0181] 方法

[0182] 细胞培养。所有永生化的人肌肉细胞均由MRC神经肌肉疾病中心生物库(NHS研究伦理委员会参考号06/Q0406/33,HTA许可证号12198)通过Francesco Muntoni博士友情提供。使用以下永生化患者来源的成肌细胞系:KM155(健康)、KM571(DMD Δ ex52)、6594(DMD Δ ex48-50)和6311(DMD Δ ex45-52)。表2总结了这些细胞系的信息。使成肌细胞在含有20%胎牛血清(Sigma)、1瓶骨骼肌生长补充剂混合物(Promocell)、50U/mL青霉素和50μg/mL链霉素的DMEM/F12培养基(含HEPES;Gibco)中生长。然后将成肌细胞以 0.53×10^5 个细胞/cm²的

密度接种到1型胶原包被的12孔板中。一旦90%汇合,通过用分化培养基(含有2%马血清[GE Healthcare]、 $1 \times$ ITS溶液[Sigma]、50U/mL青霉素和50 μ g/mL链霉素的DMEM/F12)替换生长培养基,将成肌细胞分化为肌管。所有细胞均在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂下孵育。

[0183] PMO转染。表1总结了所使用的PMO,这些PMO来源于我们先前出版物[1]中的混合物组3。转染前,将PMO(Gene Tools)在65 $^{\circ}$ C下加热15分钟以去除聚集物。然后在分化后3天,在分化培养基中使用6 μ M Endoport^{er}试剂(Gene Tools),将PMO转染到肌纤维中。在所有实验中,混合物中的每个PMO都以5 μ M最终浓度转染。将细胞在PMO中孵育2天,之后收获RNA和蛋白质(图1a)。使用随机对照25-N(Gene Tools)进行模拟治疗。对于未治疗的样品,按照Endoport^{er}的描述进行转染,只是没有使用任何PMO。

[0184] 动物治疗。仅使用hDMDde152转基因杂合的雄性hDMDde152;mdx小鼠(C57BL/6J背景)(2,3)。对于单外显子跳跃研究,DG9(序列N-YArVRRrGPRGYArVRRrGPRr-C;大写:L-氨基酸,小写:D-氨基酸)与Ex51_Ac0的3'末端缀合(表1),Ex51_Ac0是我们先前开发的人DMD外显子51跳跃PMO[1,4]。我们进行了两个实验:单剂量和重复剂量治疗。对于单剂量治疗,向3个月大的hDMDde152;mdx小鼠眼眶后注射磷酸盐缓冲盐水(PBS)、PMO(50mg/kg,未缀合的Ex51_Ac0)或DG9-PMO(64mg/kg,与50mg/kg PMO等摩尔),一周后实施安乐死以收集组织。对于重复剂量治疗,向2个月大的hDMDde152;mdx小鼠三次眼眶后注射PBS或DG9-PMO(30mg/kg),每周一次,持续3周。在整个治疗过程中记录体重,并在第一次注射前和最后一次注射后2周对小鼠进行肌肉功能测试,如功能测试所述。在功能测试后对小鼠进行安乐死以收集组织。解剖后,将组织安装在软木塞上的黄蜡胶中,并在液氮冷却的异戊烷中快速冷冻。

[0185] 对于多外显子跳跃,将DG9与最小化“块”外显子45-55跳跃混合物的每个PMO缀合(图1a)。然后将该DG9-PMO混合物(每次DG9-PMO 5 μ g,总剂量25 μ g)肌肉施用到5至6个月大的hDMDde152;mdx小鼠的胫骨前部;对侧腿注射PBS。一周后,如上所述,对小鼠实施安乐死以收集组织。所有注射(眼眶后注射和肌肉注射)均在异氟烷麻醉下进行。收集年龄匹配的野生型雄性C57BL/6J小鼠的组织作为对照。

[0186] 功能测试。根据TREAT-NMD SOP DMD_M.2.2.001,盲法人员使用Chatillon DFE II握力计(Columbus Instruments)进行了前肢和全肢握力测试。每只小鼠使用三个最一致读数的平均值,并将结果归一化为体重。使用AccuRotor 4通道转棒(Omnitech Electronics, Inc.)进行转棒测试。首先将小鼠放置在以5rpm的稳定速度旋转的杆上。一旦所有小鼠就位,在300s内将旋转从5加速到45rpm[5]。跌倒时间由软件自动记录。软件会自动记录跌倒时间。进行了三次试验,间隔15分钟,并使用这些试验的平均或峰值跌倒时间进行分析。根据TREAT-NMD SOP DMD_M.2.1.003,使用Exer 3/6动物跑步机(Columbus Instruments)进行跑步至筋疲力尽测试。小鼠在跑步机上按照以下程序跑步:5m/min,持续5min,然后每分钟速度增加1m/min,直到筋疲力尽。筋疲力尽被认为是指小鼠在反复轻推后10秒内没有回到跑步机上。最长测试持续时间设定为15min。所有测试均在基线(接受治疗前)和接受最终治疗后2周进行。使用年龄匹配的野生型雄性C57BL/6J小鼠作为对照。

[0187] RT-PCR和外显子跳跃评估。按照制造商的说明,使用Trizol(Invitrogen)从细胞和20 μ m组织切片中提取总RNA。

[0188] 对于外显子45-55跳跃分析,使用了含有PlatinumTM Taq(Invitrogen)的SuperScriptTM III一步RT-PCR系统。简而言之,在含有 $1 \times$ 反应混合物、DMD或GAPDH/Gapdh的

正向和反向引物各0.2 μ M(表3)和1 μ L SuperScript III RT/Platinum Taq的25 μ L溶液中,使用200ng总RNA作为模板。反应在以下条件下进行:1) 50 $^{\circ}$ C, 5min, 2) 94 $^{\circ}$ C, 2min, 3) 35个循环的94 $^{\circ}$ C, 15s; 60 $^{\circ}$ C, 30s; 68 $^{\circ}$ C, 33-118s, 4) 68 $^{\circ}$ C 5min, 5) 4 $^{\circ}$ C, 保持。

[0189] 对于外显子51跳跃分析,按照制造商的说明,使用SuperScriptTM IV逆转录酶(Invitrogen)和2.5 μ M随机六聚体(Invitrogen)在20 μ L反应中从750-1000ng总RNA合成cDNA。由此,在25 μ L反应中,使用8 μ L cDNA与1 $\times$ GoTaq[®] Green Master Mix (Promega)和DMD或Gapdh的正向和反向引物各0.3 μ M(表3)进行PCR。反应如下进行:1) 95 $^{\circ}$ C, 2min, 2) 40个循环的95 $^{\circ}$ C, 30s; 60 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 35s, 3) 72 $^{\circ}$ C 5min, 和4) 4 $^{\circ}$ C, 保持。所有PCR产物(外显子45-55或外显子51跳过)均在1 $\times$ tris-EDTA缓冲液中的1.5%琼脂糖凝胶中进行,条带强度通过Image J(NIH)定量。使用以下公式计算成功外显子跳跃的百分比:(所需跳跃条带的强度/未跳跃、中间和所需跳跃条带的总强度) $\times$ 100。

[0190] 蛋白质印迹。根据我们先前发表的方案(6),使用补充了完整、迷你、无EDTA的蛋白酶抑制剂混合物(Roche)的RIPA缓冲液(Sigma)从细胞中提取总蛋白。另一方面,也根据先前的方案(7),使用在水中含有10% SDS、70mM Tris-HCl(pH 6.7)、5mM EDTA(pH8.0)、5% β -巯基乙醇和完全蛋白酶抑制剂混合物的高SDS裂解缓冲液从20 μ m组织切片中提取总蛋白。分别使用PierceTM BCA试剂盒(Thermo Scientific)或PierceTM考马斯亮蓝(Bradford)试剂盒(Thermo Fisher)对蛋白质进行定量。

[0191] 在准备蛋白质印迹时,将蛋白质与NuPAGETM LDS样品缓冲液(Invitrogen;1 $\times$ 终浓度)和NuPAGETM样品还原剂(Invitrogen;1 $\times$ 终浓度)混合,然后在70 $^{\circ}$ C下加热10分钟。使用预制的NuPAGETM 3-8% Tris-乙酸盐Midi凝胶(Invitrogen)进行SDS-PAGE,在150V下运行75min。然后使用半干印迹系统在20V下将蛋白质转移到PVDF膜(Millipore)上,持续70min。在4 $^{\circ}$ C下摇晃的同时,将膜在2% ECL Prime封闭剂(GE Healthcare)中封闭过夜;在室温下用PageBlue蛋白质染色溶液(Thermo Scientific)对转移后凝胶染色1小时,以检测肌球蛋白重链条带。封闭后,切下膜并在室温下在封闭剂中的以下一种一抗中孵育1小时:1:200NCL-DYS1(Leica)、1:2,500抗肌营养不良蛋白C末端(Abcam, ab15277)、1:100MANEX45A(发育研究杂交瘤库;DSHB)、(8) 1:100MANEX4850E(MDA单克隆抗体资源, Wolfson遗传神经肌肉疾病中心)(8)、或1:4,000抗结蛋白(Abcam, ab8592)。然后用含有0.05% Tween 20的PBS(PBST)洗涤膜三次,每次10min,然后在适当的情况下在抗小鼠IgG2a、抗小鼠IgG1或抗兔IgG(H+L)辣根过氧化物酶缀合的二抗(Invitrogen)中孵育,所有抗体均在PBST中为1:10,000。然后用PBST类似地洗涤膜,并用ECL选择检测试剂(GE Healthcare)检测。使用Image LabTM软件v.6.0.1(Bio-Rad)定量DYS1条带强度,并相对于一系列中浓度最低的野生型样品的强度表示肌营养不良蛋白水平。

[0192] 肌营养不良蛋白免疫荧光。将冷冻的肌肉和心脏样品切成7- μ m厚的切片,并放置在聚-L-赖氨酸包被的载玻片上。在室温下解冻30min后,在室温下将切片在含有10%山羊血清和0.1% Triton X-100的PBS中封闭2小时。然后将切片与1:50NCL-DYS1在封闭剂中在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。第二天,用PBS洗涤切片三次,每次5min,随后在室温下与Alexa 488缀合的山羊抗小鼠IgG2a二抗(Life Technologies)孵育30min。再次用PBS洗涤切片,并用含有DAPI的Vectashield HardSet防褪色封固介质(Vector Laboratories)封固。不了解治疗情况的工作人员使用Zeiss LSM 710共聚焦显微镜在200倍放大倍数下观察样品中的肌营养

不良蛋白和DAPI。

[0193] 组织学。将冷冻的肌肉切成7- μm 厚的切片,并放置在聚-L-赖氨酸包被的载玻片上。在室温下解冻30min后,将载玻片用Mayer苏木精(Electron Microscopy Sciences)染色15min,用自来水洗涤15min,然后用曙红Y(Electron Microscopy Sciences)染色10min。然后用乙醇系列(70%-90%-99%)脱水切片,用二甲苯替代品清除,并用Permount™(Fisher Scientific)封固。设盲工作人员使用Optika B-290TB显微镜在200倍放大倍数下在明场下观察样品,每个样品随机选取三个视场。CNF百分比通过($\text{CNF}/\text{总纤维数}$) $\times 100$ 计算,使用Image J手动计数纤维。获取每个样品所有视场的平均CNF百分比。设盲工作人员分两步量化最小Ferret直径。首先,使用基于Open-CSAM的内部开发的Image J macro对图像进行半自动测量(9)。由于Open-CSAM最初是为免疫荧光图像开发的,因此我们不得不对其进行大量修改,以兼容苏木精和曙红染色图像,这需要使用颜色反卷积2插件[10,11]。其次,通过半自动测量的图像被手动整理以校正纤维边界。考虑对样品进行单个纤维测量以进行分析。对于CNF和最小Ferret直径量化,不考虑接触图像边缘的纤维。

[0194] 统计分析。所有统计检验均使用Prism v.9.0.1(GraphPad软件)进行。根据需要,进行非配对双尾t检验,或单因素方差分析与事后Tukey或Dunnett多重比较检验。P值<0.05被认为具有统计学显著性。

[0195] 表1.本研究中使用的PMO序列列表。

ID*	序列,5'至3'
Ex45_Ac9	GACAACAGTTTGGCGCTGCCCAATGCCATC
Ex46_Ac93	AGTTGCTGCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGGG
Ex47_Ac13	GTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGGGGCAACT
Ex48_Ac7	CAATTTCTCCTTGTTCCTCAGGTAAAGCTC
Ex48_Ac78	CAGATGATTTAACTGCTCTTCAAGGTCTTC
Ex49_Ac17	ATCTCTTCCACATCCGGTTGTTTAGCTTGA
Ex50_Ac19	GTAAACGGTTTACCGCTTCCACTCAGAGC
Ex51_Ac0	GTGTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG
Ex52_Ac24	GGTAATGAGTTCTTCCAAGTGGGACGCTT
Ex53_Ac26	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTC
Ex54_Ac42	GAGAAGTTTCAGGGCCAAGTCATTTGCCAC
Ex55_Ac0	TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC

[0197] *表示为:外显子靶标_距靶外显子受体位点的距离

[0198] 表2.有关本研究中使用的永生化细胞系的信息。

细胞系	DMD 突变	来源组织	患者性别	患者年龄
KM155	n/a (健康)	右半腱肌	男	25 岁
KM571	$\Delta\text{ex}52$	阔筋膜	男	10 岁
6594	$\Delta\text{ex}48-50$	左股四头肌	男	20 个月
6311	$\Delta\text{ex}45-52$	左股四头肌	男	23 个月

[0201] 表3.本研究中使用的引物和序列列表。

靶标	序列, 5'至 3'	产物大小/s, bp
[0202]	<i>hDMD</i> (ex45-55) F: GACAAGGGCGATTTGACAG (ex43/44) R: TCCGAAGTTCACTCCACTTG (ex56)	2088 (野生型), 1970 (Δ ex52), 1691 (Δ ex48-50), 866 (Δ ex45- 52), 309 (Δ ex45-55)
	<i>hDMD</i> (ex51) F: CAGCCAGTGAAGAGGAAGTTAG (ex49/50) R: CCAGCCATTGTGTTGAATCC (ex53)	453 (Δ ex52), 220 (Δ ex51-52)
	<i>hGAPDH</i> F: TCCCTGAGCTGAACGGGAAG R: GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT	218
	<i>mGapdh</i> F: CAACTTTGGCATTGTGGAAGG R: GAAGAGTGGGAGTTGCTGTT	381

[0203] 表4. 用于外显子44跳跃的PMO序列列表

名称	寡聚物序列
hEx44_Ac7	AAAACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTC
hEx44_Ac2	GCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAATC
hEx44_Ac14	CATAATGAAAACGCCGCCATTTCTCAACAG
hEx44_Ac0	CGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAATCGC
hEx44_Ac18	ATATCATAATGAAAACGCCGCCATTTCTCA
hEx44_Ac56	ACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGATTAA
hEx44_Ac118	CTTAAGATACCATTTGTATTTAGCATGTTC
hEx44_Ac85	ATTCTCAGGAATTTGTGTCTTTCTGAGAAA

[0205] 实施例2: 肽缀合的PMO治疗脊髓性肌萎缩症

[0206] 脊髓性肌萎缩症 (SMA) 是由存活运动神经元1 (SMN1) 基因突变引起的婴儿死亡的最常见遗传原因。人有SMN1旁系同源物SMN2。然而, SMN2不能挽救SMA表型, 因为SMN2 mRNA中90%的外显子7是由于单个C-T核苷酸转换而被剪接。目前批准的反义寡核苷酸 (AO) nusinersen (商品名Spinraza) 靶向SMN2, 并通过促进外显子7包含来诱导SMN表达。然而, 将AO递送到中枢神经系统 (CNS) 和全身组织是困难的。尽管目前的方法仅限于使用高度侵入性的鞘内注射并主要治疗运动神经元, 但最近的研究表明, SMA是一种多器官疾病, 需要全身范围治疗方法。为了绕过鞘内注射, 一种名为DG9的新型细胞穿透肽在单次皮下使用后显著增加AO的吸收。已表明, DG9缀合的AO (DG9-PMO) 延长了SMA小鼠的寿命并改善了呼吸功能障碍, 这是SMA最常见的死亡原因。DG9-PMO治疗导致外周和中枢神经系统组织中全长SMN2表达和SMN蛋白水平显著增加。此外, 该治疗还改善了骨骼肌和神经肌肉接头的病理。最后, 我们表明DG9-PMO穿透完全发育的血脑屏障, 并可在全身注射后分布在CNS中。

[0207] 结果

[0208] 皮下使用DG9-PMO以剂量依赖性方式提高严重SMA小鼠的存活率并增加SMN2表达。

[0209] 为了检查DG9肽是否可以提高PMO的功效, 将DG9肽与序列与nusinersen相同的18聚体PMO缀合。将DG9缀合的PMO和未缀合的PMO以及2'-O-甲氧基乙基-RNA (MOE) 注射到SMA模型小鼠体内。我们使用了中国台湾SMA小鼠模型 ($Smn^{-/-}SMN2^{Tg/+}$), 该模型表现出严重表型, 中位存活期为8天 (d) [77, 78]。

[0210] 小鼠在出生后第0天 (PD0) 以两种不同的剂量40mg/kg或80mg/kg皮下注射AO或盐水 (NT)。记录存活情况, 直至达到人道终点。对于40mg/kg剂量, 中位存活期为12天 (未缀合PMO), 15.5天 (MOE), 增加到58天 (DG9-PMO治疗) (图9a)。对于80mg/kg的较高剂量, 中位存活

期增加到57天(未缀合PMO)、121天(DG9-PMO)和64天(MOE)(图9a)。这结果表明,DG9-PMO可以比未修饰的PMO更有效地延长SMA小鼠的寿命。对于这两种剂量,DG9-PMO治疗的小鼠在出生后第7天(PD7)明显比NT、未缀合PMO治疗的同窝仔更重,与用作健康对照的年龄匹配的杂合同窝仔(Het) ($Smn^{+/-}SMN2^{Tg/-}$) 相比,体重没有显著差异,表现出正常的野生型(WT)样特征(图9b)。DG9-PMO治疗的小鼠看起来与Het非常相似,而未缀合的PMO治疗的新生儿看起来表现出与NT小鼠相似的弱表型(图16)。

[0211] 接下来,在PD7时使用实时定量PCR(RT-qPCR)评估FL-SMN2相对于 $\Delta 7SMN2$ 转录物的表达。在两种剂量下,DG9-PMO治疗导致外周和CNS组织中FL-SMN2表达比NT对照高4至30倍(图10a)。在大多数组织中,与未缀合PMO和MOE治疗相比,它还导致FL-SMN2表达增加了约5倍(图10a,图16a)。这些数据表明,DG9-PMO比未修饰的PMO更有效地诱导FL-SMN2表达。使用蛋白质印迹在蛋白质水平上验证了这些发现,其中DG9-PMO治疗增加了外周和CNS组织中的SMN蛋白水平。(图10b,图16b)。我们还发现,皮下施用40mg/kg的DG9-PMO导致PD30时SMN表达的持续水平(图17)。DG9-PMO和MOE治疗在所研究的组织中具有相似的SMN水平。这些结果表明,DG9-PMO的功效大于未缀合PMO,具有剂量依赖性效应。

[0212] 皮下施用DG9-PMO改善SMA小鼠的运动功能和肌肉强度。

[0213] 为了评估全身DG9-PMO治疗对肌肉强度和运动神经元功能的作用,使用了几种功能测试来比较治疗小鼠和NT小鼠在不同时间点的运动功能。在生命的早期几周进行后肢悬挂(HLS)测定和翻正反射测试。PD6后,NT小鼠的HLS得分下降,因为它们在尾巴悬挂时无法伸展后肢(图9c)。这些小鼠在管上的潜伏期也表现出减少。在PD12,DG9-PMO治疗的新生儿表现出与Het相当的后肢强度,与未缀合的PMO和NT小鼠相比,其得分明显更高,在管上的潜伏期更长(图9c)。在翻正反射测试中,DG9-PMO小鼠在PD6-PD10之间用爪子翻正的时间明显缩短,表明肌肉强度和协调性得到改善(图9d)。存活超过PD12的未缀合PMO和MOE治疗的小鼠在性能上有所提高,但仍然比DG9-PMO小鼠花费更长时间。值得注意的是,这些结果略有偏差,因为只有最健康的未缀合PMO和MOE治疗的小鼠存活到了这些时间点。DG9-PMO治疗的小鼠在PD30时的前肢握力评估进一步支持了这改善(图9e)。DG9-PMO治疗的小鼠表现出与Het相当的前肢握力,并且显著高于未缀合的PMO和MOE治疗的小鼠(图9e)。我们还评估了PD30时前肢数据与性别之间的关系。令人惊讶的是,在各组中没有观察到雄性之间的显著差异,但在雌性中观察到显著差异(图18a)。在PD60时,Het和经治疗的小鼠表现出的性能没有显著差异(图9e)。未缀合PMO小鼠未能存活至PD60,并被排除在这部分研究之外。我们在80mg/kg剂量研究中在PD30和PD60时观察到了类似结果(图18b)。我们还对40mg/kg组进行了转棒测试PD30,以评估他们的整体肌肉协调和平衡。所有组的小鼠在旋转梁上协调和平衡的能力各不相同,未检测到显著性[36](图18c)。基于这些功能测试的结论性发现,全身注射DG9-PMO改善SMA小鼠的运动功能和肌肉强度。

[0214] DG9-PMO治疗改善新生SMA小鼠的呼吸功能

[0215] 大多数SMA患者呼吸功能受损,并依赖外部呼吸支持。为了评估DG9-PMO治疗对呼吸功能的影响,我们在常氧(21%O₂)和缺氧(11%O₂)条件下在PD7时进行了全身体积描记器记录(图11a)。在常氧条件下,Het没有表现出呼吸表型。另一方面,NT小鼠呼吸缓慢且不规律,表现为较高的频率变异系数(CoV,相对变异性的量度)和明显的呼吸暂停(在相当于或大于两个完整呼吸周期的时间段内没有气流/压力变化)(图11b,f)。与NT对照相比,一半

的未缀合PMO小鼠 (n=14) 表现出NT小鼠中所示的参数,而另一半则类似于Het,表现出呼吸频率 (fR, 每分钟呼吸次数)、分钟通气量 (VE) 和潮气量 (VT, 每个呼吸周期流入或流出肺部的空气量) 的增加 (图11b,d)。在相同的常氧条件下,大多数DG9-PMO (n=11) 和MOE (n=10) 治疗的小鼠没有表现出任何呼吸表型,并与Het相似 (图11b-f)。

[0216] 当切换到缺氧环境时,Het、DG9-PMO和MOE治疗的小鼠相对于常氧表现出呼吸参数-fR、VE和VT的增加 (图11b-d)。尽管缺氧减少了呼吸暂停的次数,但呼吸仍然缓慢且不规律,如NT小鼠中高CoV所示 (图11e)。与NT小鼠相比,大多数未缀合PMO新生儿的呼吸参数相对于常氧有所增加,对呼吸暂停没有影响,但与Het相比,他们的呼吸仍然缓慢、微弱和不规律 (图11b-d)。通过使用Pearson积矩相关t检验来检查呼吸表型严重程度 (fR或VE降低) 与体重降低的相关性 (图11g)。我们在Het中没有观察到fR与体重之间的相关性,但在NT和经治疗的小鼠 (分组为纯合子) 中发现了很强的相关性。通过降低CoV和显著改善呼吸参数,DG9-PMO治疗改善了SMA小鼠的呼吸功能障碍。

[0217] DG9-PMO治疗改善SMA小鼠的肌肉病理和神经肌肉接头 (NMJ) 特征。

[0218] 萎缩性肌肉组织是SMA的典型特征,骨骼肌纤维大小减小。为了确定治疗对肌肉病理的影响,我们在PD7和PD30时评估了两个受影响肌肉群 (股四头肌和肋间肌) 以及受影响较小的横膈膜的肌纤维的生理和结构 [79, 80]。我们在PD7和PD30时使用苏木精和曙红 (H&E) 染色对每种治疗的每块肌肉至少500根肌纤维的横截面积 (CSA)、最小feret直径和中心成核纤维定量 (图12a,b,图19和20)。

[0219] 在PD7时,与NT对照相比,DG9-PMO治疗后所有三个肌肉组的肌纤维的feret直径和CSA均显著增大 (图12b,图19)。在股四头肌中,Het和DG9-PMO治疗的肌纤维大小之间没有显著差异。另一方面,未缀合的PMO和MOE股四头肌肌纤维明显小于DG9-PMO。在横膈膜和肋间肌中,所有三个治疗组都表现出相似的肌纤维大小 (图12b,图19)。此外,DG9-PMO治疗确实导致中心成核纤维百分比显著下降,表明萎缩肌纤维中的肌纤维退化。(图12c)。DG9-PMO的效果在PD30时持续存在 (图20)。与DG9-PMO相比,未缀合的PMO和MOE治疗的小鼠在所有三种组织类型中的肌纤维明显较小以及中心核百分比比较高 (图20c)。

[0220] SMA小鼠通常在PD4-PD5左右开始表现出神经病理学缺陷,随着疾病的进展,神经肌肉接头 (NMJ) 去神经和塌陷 [37]。评估PD30时股四头肌和肋间肌的NMJ结构,以了解我们在PD0时注射后的表型拯救 (图13a)。DG9-PMO治疗恢复了NMJ的完整性,增加了终板大小,减少了去神经,并表现出与Het相似的神经支配模式 (图13a-c)。DG9-PMO治疗的肌肉中的外周突触显示出超过60%的完全神经支配,而未缀合的PMO和MOE治疗接近40-50%的神经支配 (图13b)。未缀合的PMO治疗的小鼠表现出较小的终板和塌陷的囊泡,尤其在肋间肌中 (图11c)。这些数据表明,DG9-PMO治疗改善了SMA小鼠的NMJ表型。这些发现证实了我们的假设,即DG9-PMO治疗通过改善NMJ的肌肉病理和特征来挽救肌肉和神经元之间的串扰。

[0221] 单次皮下施用后,DG9肽增加全身和CNS组织对PMO的吸收

[0222] 为了确定DG9肽在增加PMO吸收方面的作用,我们评估了未缀合的PMO和DG9-PMO在外周和CNS组织中的生物分布 [82]。我们使用了一种公认的基于杂交的ELISA测定,专门用于检测PMO,以比较经治疗的PD7小鼠组织中DG9-PMO和未缀合PMO的浓度 [82]。DG9与PMO的缀合导致除肝脏之外的大多数组织中显著更高的吸收,平均A0检测为12202pM (股四头肌, (n=5))、 2×10^8 pM (肝脏 (n=5))、8359pM (脑 (n=5))、13907pM (脊髓 (n=4))、8886pM (心脏

($n=4$)和 2×10^7 pM(肾脏($n=6$))(图14a)。未缀合的PMO和DG9-PMO在负责代谢和清除PMO的肝脏和肾脏中都显示出较高的水平。

[0223] PMO吸收是由肌管中的小窝蛋白依赖性途径介导的[83]。一些CPP-PMO经常被困在内体中,限制了剪接校正的效率[84]。为了证明DG9-PMO的细胞内定位,我们将荧光标签附接在DG9-PMO上。SMA小鼠在PD0时接受皮下注射(40mg/kg),并进行免疫组织化学(IHC),以检查DG9-PMO在PD7时收集的冷冻组织切片中的定位。一些DG9-PMO定位在心脏和股四头肌的细胞核中,在较小程度上定位在CNS组织中(图14b)。该实验表明,DG9在单次皮下施用后促进外周和CNS组织对PMO的吸收,从而全面提高了SMN水平并改善了SMA表型。

[0224] DG9-PMO在轻度SMA模型中穿透血脑屏障

[0225] 为了研究DG9-PMO是否可以穿过完全发育的BBB,在PD5时用DG9-PMO或荧光标记的DG9-PMO注射较温和的SMA模型(F0)($Smn^{-/-}$ $SMN2^{+/+}$)。这些小鼠的寿命正常,通常只在8-12周龄左右出现尾巴和耳朵坏死。在PD7时收获组织。首先,我们观察到荧光标记的DG9-PMO在外周和CNS组织的细胞核内的定位(图15a)。这支持了我们的假设,即DG9-PMO可以穿透BBB。进行ELISA,以获得未缀合PMO和DG9-PMO的生物分布。尽管在PD5时皮下施用,但DG9显著增加了CNS和外周组织中PMO的吸收(图15b)。最终,分析了归一化为注射盐水的小鼠(NT对照)的FL-SMN2水平,并观察到脊髓和其他外周组织中FL-SMN2表达的增加(图15c)。这些发现表明,DG9-PMO可以穿透完全发育的BBB,并确保A0广泛分布到外周和CNS组织。

[0226] DG9-PMO治疗挽救SMA表型,无明显毒性

[0227] 肽通常可以作为抗原,导致免疫反应。因此,我们通过观察CD68阳性细胞($CD68^{+}$)来检查DG9-PMO在新生儿早期引起免疫激活的易感性, $CD68^{+}$ 指示PD7时股四头肌切片中的循环和组织巨噬细胞(图21a)。由于SMA中的萎缩肌肉组织,NT对照小鼠表现出 $CD68^{+}$ 巨噬细胞水平升高。

[0228] 与Het相比,未缀合的PMO和MOE治疗的肌肉具有显著更高数量的 $CD68^{+}$ 巨噬细胞,而NT和DG9-PMO小鼠没有显著差异(图21a)。DG9-PMO治疗后循环巨噬细胞的明显减少可能是由于萎缩肌肉组织的改善,这将弥补治疗本身引起的任何升高。

[0229] 为了进一步阐明长期毒性的可能性,在PD 30-35时收集了Het和治疗小鼠的血清。对碱性磷酸酶(ALP)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、肌酸激酶(CK)、肌酐、总胆红素、总蛋白、白蛋白、球蛋白和 γ -谷氨酰转移酶(GGT)的水平进行了毒理学评估。所有检查的指标在组间具有可比性,表明没有明显的毒性作用(图21b)。我们还对肝脏和肾脏进行了定性组织学分析,没有发现可观察到的毒性迹象(图21c)。这些发现强调,DG9-PMO与小鼠无明显毒性和免疫功能障碍有关。

[0230] 讨论

[0231] 端粒SMN1基因的重复和突变导致其旁系同源物着丝粒SMN2基因的形成,仅在几个核苷酸上存在差异[85]。由于SMN2可以产生少量功能性SMN,因此它是治疗SMA患者的可行靶标。95% SMA患者的SMN1基因突变,使SMN2基因成为A0治疗几乎所有SMA患者的候选。

[0232] 我们部署了与A0(PMO)缀合的CPP,因为一些研究的CPP可以将生物货物递送到细胞中,也可以穿过BBB[86,73]。一些肽也显示出神经保护作用,将毒性和副作用的风险降至最低,使其适合临床应用[87]。由于nusinersen仍存在问题,SMA治疗仍需要一种解决侵入性施用、免疫反应、毒性和其他不良事件的疗法。

[0233] 在这项研究中,我们评估了新型肽DG9的功效,该肽是在斑马鱼模型系统中筛选几种肽后确定的[75]。为了克服侵入性鞘内注射并确保SMN蛋白在全身范围内的恢复,我们在PD0时向新生SMA小鼠皮下注射40mg/kg的DG9-PMO、未缀合的PMO、MOE或盐水。DG9-PMO治疗显著延长了存活期,增加了体重,FL-SMN2表达以及外周和CNS组织中的SMN水平。

[0234] DG9-PMO治疗的新生和成年小鼠在肌肉强度和协调性方面显示出显著改善,在功能测试中也有显著改善。我们还观察到,当向小鼠施用更高剂量的80mg/kg A0时,存活期和FL-SMN2表达呈剂量依赖性增加,DG9-PMO治疗的小鼠即使在PD60时也能维持运动功能的改善。

[0235] DG9肽导致PMO持续递送到骨骼肌和呼吸肌,进而减少具有中心核的肌纤维数量并增加肌纤维大小。在PD30时,未缀合的PMO小鼠的肋间肌和股四头肌中的肌纤维明显较小,这暗示了呼吸受损的可能性,肌纤维萎缩是早期死亡的原因。虽然出生正常,但SMA小鼠在PD7时开始表现出呼吸频率降低和呼吸暂停频率增加,这通常是由于吸气和呼气肌肉减弱所致[88]。我们在常氧和缺氧条件下PD7时的体积描记器记录表明,NT SMA小鼠的呼吸微弱、缓慢且不规律。我们没有进行统计来单独比较治疗,但与Het相比,一半的PMO小鼠表现出严重的呼吸表型,呼吸不规律和呼吸暂停,而大多数MOE小鼠表现出正常的呼吸功能。结果的可变性,特别是在未缀合的PMO小鼠中,表明了对SMA呼吸功能障碍的更深入理解,导致了它们的突然死亡。在常氧和缺氧条件下,DG9-PMO小鼠与Het相似,呼吸结果明显优于NT PD7小鼠。这些发现为DG9-PMO在挽救SMA小鼠早期呼吸功能障碍方面的有效性提供了证据。

[0236] 在PD30时,DG9-PMO小鼠的NMJ结构有所改善,塌陷结构减少,神经支配模式增加。另一方面,未缀合的PMO小鼠具有更多数量的去神经终板和塌陷的NMJ,表明存在明显的SMA表型。NMJ和运动神经元发育是齐头并进的,尽管这种联系还没有得到稳固确立。NMJ缺陷是运动神经元疾病的早期病理,需要SMN进行适当的神经支配[81,89,90]。我们的治疗改善了NMJ神经支配,这与肌肉萎缩呈负相关[94],从而在功能测试中表现更好。

[0237] 与单独未缀合的PMO相比,当与DG9肽缀合时,外周和CNS组织对PMO的吸收明显更高,这为肽确保A0广泛分布到大脑和脊髓提供了证据。由于我们的小鼠模型的中位存活期仅为8天,因此无法完全阐明晚发症状期治疗的确切效果。为了证明DG9穿透小鼠完全发育的BBB的能力,我们使用了一种寿命正常的更温和模型($Smn^{-/-}; SMN2^{Tg/Tg}$)。我们观察到在PD5时单次皮下注射后,PMO的强烈吸收和DG9肽在CNS组织中的定位。然而,从治疗的角度来看,有必要在其他具有多拷贝SMN2的温和SMA模型中详细证实我们的发现,这些模型可以作为治疗III-IV型晚发SMA或症状性临床阶段I-II型患者的模型。

[0238] 与阳离子肽缀合的PMO相关的毒性通常在施用后24小时内出现。接受A0皮下注射的新生儿没有明显的生理差异。他们很活跃,与健康的同龄人相似。我们还定量了PD7时股四头肌中CD68⁺细胞的数量,这表明在施用A0后,体内免疫反应期间巨噬细胞被激活。SMA小鼠患有免疫失调,免疫细胞数量增加。虽然DG9-PMO和NT小鼠的CD68⁺细胞数量相似,但我们认为,尽管DG9-PMO治疗可能会引起免疫反应,但肌肉病理学的同时改善和萎缩肌肉的改善减少了循环巨噬细胞的总数。根据PD30时的血清和组织学分析,未观察到肝脏或肾脏的明显毒性。

[0239] 材料和方法

[0240] DG9-PMO的合成

[0241] 合成DG9 (序列N-YArVRRrGPRGYArVRRrGPRr-C; 大写:L-氨基酸, 小写:D-氨基酸) 并共价缀合到PMO的3'末端。靶向ISS-N1内含子7 (5'-TCACTTTCATAATGC TGG-3') 的PMO购自Gene Tools LLC。2' MOE购自美国Eurogentec North America。

[0242] 动物模型

[0243] 所有动物实验均在阿尔伯塔大学进行, 并经阿尔伯塔大学研究伦理办公室动物护理和使用委员会批准。SMA转基因小鼠 (JAX库存编号005058FVB.Cg-Tg (SMN2) 2HungSmn1^{tm1Hung}/J (Smn^{-/-}; SMN2^{Tg/Tg}), 也称为中国台湾小鼠) 购自杰克逊实验室 (美国缅因州巴尔港)。将Smn1杂合小鼠 (Smn1^{+/-}; SMN2^{-/-}) 与Smn1 Smn^{-/-}; SMN2^{Tg/Tg}纯合小鼠杂交以获得SMA小鼠 (Smn^{-/-}; SMN2^{Tg/-}) 或杂合健康对照 (Smn1^{+/-}; SMN2^{Tg/-})。SMA小鼠表现出与SMAI型患者相似的严重显性表型。根据制造商的说明, 使用Phire Tissue Direct PCR试剂盒 (ThermoFisher) 对从尾部活检中分离的基因组DNA进行PCR测定, 对小鼠进行基因分型。使用表5中描述的引物, 在条件小鼠Smn下扩增DNA: 98°C/5min→98°C/5s_58°C/10_72°C/10s×35个循环→72°C/1min。

[0244] 处理

[0245] 使用30号Hamilton注射器进行注射。SMA新生儿在P0时皮下注射40或80mg/kg的AO, 而NT和杂合对照小鼠每组注射盐水 (n=10-25)。收集包括股四头肌、肝脏、肾脏、脾脏、横膈膜、肋间肌、心脏、大脑和脊髓在内的组织, 在干冰冷却的异戊烷中快速冷冻, 然后储存在-80°C下。

[0246] 实时定量PCR (RT-qPCR)

[0247] 在P7时收获的冷冻组织使用低温恒温器 (Leica CM 1950, Leica) 切成20μm切片。使用TRIzol 10试剂 (Invitrogen) 从这些切片中提取RNA。按照制造商的说明, 使用superscript IV逆转录酶 (ThermoFisher) 和oligo (dT) 引物 (ThermoFisher) 从50ng/μl RNA合成cDNA。使用SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad) 和QuantStudio3实时PCR系统 (Applied Biosystems) 进行qPCR反应。将全长SMN2相对于没有外显子7的缺失SMN2转录物的相对基因表达归一化为NT对照样品, 并使用ΔΔCt方法进行分析。

[0248] 蛋白质印迹

[0249] 通过使用RIPA缓冲液 (Sigma) 和不含EDTA的完整迷你蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma) 从P7或P30时收获的冷冻组织中提取总蛋白。使用Pierce BCA蛋白质测定试剂盒 (ThermoFisher) 定量蛋白质浓度。对于SDS-PAGE, 每孔5-10μg蛋白质在NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Midi蛋白凝胶 (Life Technologies) 中每孔在150V下运行60分钟, 然后在20V下半干转移30分钟。将聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜用5%脱脂乳和0.05% Tween20的PBS溶液 (PBST) 封闭过夜。在室温 (RT) 搅拌下, 将膜与小鼠纯化的抗SMN抗体 (BD Biosciences) (1:10,000) 一起孵育一小时。用PBST洗涤膜三次 (每次洗涤10分钟), 并在室温搅拌下与HRP缀合的山羊抗小鼠 (IgG H+L) 一起孵育1小时。使用Amersham ECL Select蛋白质印迹检测试剂盒 (GE Healthcare) 检测条带, 并通过ChemiDoc Touch成像系统 (BioRad) 进行可视化。对于β-微管蛋白, 在室温下将膜与剥离缓冲液 (15g甘氨酸、1g SDS、10ml Tween20 pH 2.2) 一起孵育10分钟, 然后在PBS中洗涤两次 (每次10分钟), 在tris缓冲盐水和0.05% Tween20 (TBST) 中洗涤二次 (每次5分钟)。与第一抗体方案类似, 随后将膜封闭过夜, 第二天在室温

搅拌下与 β -微管蛋白兔抗体 (Abcam ab6046, 1:5000) 一起孵育1小时。使用的第二抗体是针对微管蛋白的HRP缀合的山羊抗兔 (IgG H+L) (BioRad, 1:10000)。如前所述, 这些条带被可视化。

[0250] 酶联免疫吸附测定 (ELISA)

[0251] 如前所述进行ELISA[83, 96]。简而言之, 使用RIPA缓冲液 (Sigma) 和不含EDTA的完整迷你蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma) 从冷冻组织切片 (约20 μ m) 中提取蛋白质。探针 (Integrated DNA Technologies) 被设计为与PMO序列互补, 在5'和3'末端具有硫代磷酸酯骨架。5'和3'末端分别用地高辛和生物素标记。将组织裂解物 (0.02mg/ml蛋白质浓度) 在37 $^{\circ}$ C下用含有10mM CaCl₂的2.5mg/mL胰蛋白酶预处理过夜, 以消化DG9肽。将探针加入样品中, 并在37 $^{\circ}$ C下杂交30分钟。探针-PMO杂交后, 将杂交样品加入Pierce NeutrAvidin包被的96孔板, 黑色 (Thermo Fisher Scientific) 中, 以允许板和探针之间的亲和素-生物素相互作用。使用0.1凝胶单位/ μ l的微球菌核酸酶 (New England Biolabs) 消化未杂交的探针。随后加入与碱性磷酸酶缀合的抗地高辛抗体 (1:5000, Roche Applied Sciences)。将Attophos AP荧光底物 (Promega) 添加到PMO/DG9-PMO探针中, 使用单色仪SpectraMax M3平板读数器 (Molecular Devices) 在444nm激发和555nm发射下检测荧光。

[0252] 组织学和免疫组织化学

[0253] H和E染色

[0254] 将股四头肌、横膈膜和肋间肌的7 μ m冷冻切片用Meyer的H&E试剂 (Electron Microscopy Reagents) 染色[97]。对于中心成核纤维和肌纤维大小, 每次治疗每块肌肉随机选择500-800根。使用Image J对横截面积和最小Feter直径进行定量。所有H和E分析均以盲法进行。

[0255] NMJ染色

[0256] NMJ染色如前所述[98]。简而言之, 将股四头肌和肋间肌在4%多聚甲醛 (PFA) 中固定2小时。用PBS快速洗涤肌肉, 并在室温下用5%山羊血清和2%Triton-X的PBS溶液封闭1小时。然后在4 $^{\circ}$ C下与第一小鼠单克隆抗体抗神经丝2H3 (1:100) 和抗突触素 (1:500) (DSHB, 爱荷华州) 孵育过夜。随后, 将肌肉在黑暗中与Alexafluor 488-山羊抗小鼠IgG1 (1:1000) (Life Technologies) 和Alexafluor 594-银环蛇毒素 (1:5000) (ThermoFisher Scientific) 一起孵育。使用共聚焦显微镜 (Zeiss LSM 710) 和Zeiss Zen软件对至少300个NMJ进行z堆叠和可视化, 以分析去神经和横截面积。使用image J定量突触面积。所有分析均以盲法进行。

[0257] 巨噬细胞检测

[0258] 将股四头肌的7 μ m冷冻切片用4%PFA固定。将切片与大鼠抗小鼠CD68抗体 (BioRad, MCA1957T) 一起孵育。在20倍放大倍数下, 以随机间隔对每个样品至少5个切片进行CD68⁺细胞数量的计数和取平均值。

[0259] 功能测试

[0260] 翻正反射测试

[0261] 从P2到断奶阶段P20, 测试了小鼠自我翻正的自发能力。将新生儿仰卧, 并记录了重新定位和将所有四只爪子放在地上所需的时间。记录时间最长为60秒。每个新生儿接受三次试验, 试验之间至少休息10分钟。数据表示为完成翻正反射测试的平均时间 $\pm$ SEM。

[0262] 后肢悬挂测定(管测试)

[0263] 如Treat NMD方案SMA_M.2.2.001所述,对P2-P12的新生小鼠进行该测试。简单来说,将新生小鼠的后肢悬挂在管子上。根据后肢的位置对它们进行评分,并以30秒的截止时间记录它们的跌倒潜伏期。每只新生幼崽接受三次试验,试验之间休息15分钟。对该测试不知情的观察者记下平均得分。

[0264] 前肢握力

[0265] 该测定按照Treat NMD方案SMA_M.2.1.002中所述进行。简而言之,将小鼠放在自动握力计(Columbus Instruments)的金属网格上,使得只有前爪抓住金属网格。借助尾巴稳步拉动小鼠,使其完全脱离网格。使用P30和P60小鼠。每只小鼠都接受了三次试验。

[0266] 转棒测试

[0267] 如前所述,对P30-P40小鼠进行转棒测试(AccuScan Instruments),使用300s的加速度曲线[99]。

[0268] 毒理学

[0269] 在解剖过程中,从P30-P40左右的小鼠中收集血液(每组n=4-10)。将血液在室温下放置30分钟,并在2000rcf下离心。将所得上清液(血清)转移到新的1.5ml试管中,并储存在-20℃下。通过Idexxx Bioanalytics分析血清样品。对一组标准毒性标志物进行评估:葡萄糖、总胆红素、血尿素氮(BUN)、肌酸激酶(CK)、肌酐、碱性磷酸酶(ALP)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)、球蛋白、白蛋白和总蛋白。

[0270] 全身体积描记器记录

[0271] 在全身圆柱形透明有机玻璃体积描记器中进行测量,该体积描记器具有一个流入口和两个流出口,用于连续输送新鲜室内空气和去除呼出的二氧化碳[100,101]。用于测量呼吸参数的体积描记器容量分别为10ml(对于体重小于2.5g的P7小鼠,内径:1.9cm,长度:3.5cm)、30ml(对于体重大于2.5g的P7小鼠,内径:2.6cm,长度:5.6cm)和80ml(对于P30,内径:3.8cm,长度:7cm),流速分别为15、45、120ml/min。气体通过气体混合器(GSM-3,CWE Inc,USA)混合,从压缩纯氧和纯氮罐中输送,使用0-200ml/min气体调节器(Porter Instrument Company,美国)进行监测。

[0272] 通过将流入气体从常氧(21%氧气,由氮气平衡)切换到缺氧(11%氧气,由氮气平衡),在不对动物进行物理处理的情况下,连续监测体积描记器记录,进行缺氧挑战(11%氧气,持续5min)。气体交换完成约需1分钟,通过气体分析仪(型号:ML206,ADI Instruments)进行确认。对于P7,体积描记器放置在婴儿孵化器(Isolette,型号C-86;Air-Shields/Dräger Medical,美国)中,以将环境温度维持在约32℃的巢温。对于P30,体积描记器在约22℃的室温下记录。使用压力传感器(型号DP 103;Validyne,美国)、信号调节器(CD-15;Validyne)检测压力变化,并通过模拟数字板(Digidata 1322A)用数据采集软件(Axoscope)记录。信号经过高通滤波(0.01kHz),取样率为1kHz。呼吸频率和潮气量(VT)使用Labchart 8(ADI Instruments Inc.,美国)在血压设置下测量。设置爆发的阈值水平,然后自动检测爆发,得到频率(根据周期持续时间计算)和潮气量(根据最大压力减去最小压力计算)。

[0273] 值得注意的是,我们的体积描记器对于研究呼吸频率(fR)和检测呼吸暂停是有效的。呼吸暂停被定义为在相当于或大于两个完整呼吸周期的时间内没有气流(压力变化)。我们的全身体积描记系统提供了潮气量(VT,mL/g)和分钟通气量的半定量测量,从中我们

报告了相对于野生型常氧的变化 (Ren等人, 2009, 2015)。频率变异系数 (相对变异性的量度) 是标准偏差与平均值 (平均值) 的比率。比率越小, 呼吸越规律。实验是在上午10点到下午5点之间进行的。实验后, 动物被送回动物设施。

[0274] 在平均1分钟的连续体积描记记录中计算呼吸参数。呼吸参数VT和VE相对于常氧下杂合子的平均值 (100%) 来报告。假设检验的性质是双尾的。我们首先进行了正态性检验 (Shapiro-Wilk) 和等方差检验 (Brown-Forsythe)。

[0275] 对于通过两项检验的数据 (图6B-E: fR、VT、VE和CV), 使用参数统计和双向重复测量变异分析 (ANOVA), 然后使用Holm-Sidak方法 (两个因素: 不同治疗和不同条件)。p<0.05 被视为具有统计学显著差异; n是指动物数量, 以动物为分析单位进行统计检验。对于那些未通过正态性检验或等方差检验的数据 (总呼吸暂停持续时间, 图6F), 应用了非参数统计。常氧或缺氧差异的比较采用对秩进行kruskal-Wallis单因素方差分析进行, 然后采用Dunn方法。缺氧和常氧之间的差异是通过符号秩检验进行的。为了检查呼吸表型的严重程度 (呼吸频率或VE的降低) 是否与体重下降相关, 我们使用了皮尔逊积差相关t检验 (图6G)。对于全身体积描记记录, 数据表示为平均值±SD, 或第一四分位距25%, 中位数50%和第三四分位距75% (Sigmaplot 11Systat Software Inc., 美国)。

[0276] 统计分析

[0277] 所有数据的所有统计分析 (呼吸分析除外) 均使用GraphPad Prism 9软件进行。根据需要, 使用单因素方差分析和Tukey检验进行多重比较, 或使用长秩Mantel-Cox检验进行存活分析。研究前没有进行统计功效计算。样品大小基于我们先前对这些实验方案的经验。

[0278] 表5: 本研究中使用的引物列表

靶标	序列(5'-3')
<i>Smn-S1</i>	ATAACACCACCCTCTTACTC
<i>Smn-S2</i>	GTAGCCGTGATGCCATTGTCA
<i>Smn-H1</i>	AGCCTGAAGAACGAGATCAGC
[0279] FL-SMN2	F: GCTATCATACTGGCTATTATATGGGTTTT
	R: CTCTATGCCAGCATTCTCCTTAAT
ΔSMN2	F: TCTGGACCACCAATAATTCCCC
	R: ATGCCAGCATTCCATATAATAGCC
mGAPDH	F: GAGAAACCTGCCAAGTA
	R: CAGTGTAGCCCAAGATG

[0280] 参考文献

[0281] 1.Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 51(6):919-928.

[0282] 2.Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL (1993) Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. Proc Natl Acad Sci U S A 90(8):3710-3714.

[0283] 3.Manzur A, Kinali M, Muntoni F (2008) Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. Arch Dis Child 93(11):986-990.

[0284] 4.Crisafulli S, et al. (2020) Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an

[0285] updated systematic review and meta-analysis. Orphanet J Rare Dis 15

(1):141.

[0286] 5. Bladen CL, et al. (2015) The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Hum Mutat* 36(4):395-402.

[0287] 6. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2(1):90-95.

[0288] 7. Lim KRQKRQ, Maruyama R, Yokota T (2017) Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther* 11:533-545.

[0289] 8. Anwar S, Yokota T (2020) Golodirsen for Duchenne muscular dystrophy. *Drugs of Today* 56(8):491-504.

[0290] 9. Roshmi, R R, Yokota T (2019) Viltolarsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drugs of Today* 55(10):627.

[0291] 10. Shirley M (2021) Casimersen: First Approval. *Drugs*. doi:10.1007/s40265-021-01512-2.

[0292] 11. Aartsma-Rus A, et al. (2009) Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* 30(3):293-299.

[0293] 12. Bérout C, et al. (2007) Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mutat* 28(2):196-202.

[0294] 13. Echigoya Y, et al. (2019) Exons 45-55 Skipping Using Mutation-Tailored Cocktails of Antisense Morpholinos in the DMD Gene. *Mol Ther* 27(11):2005-2017.

[0295] 14. Lim KRQ, Nguyen Q, Yokota T (2020) Genotype-Phenotype Correlations in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Patients from the Canadian Neuromuscular Disease Registry. *J Pers Med* 10(4):241.

[0296] 15. Nakamura A, et al. (2017) Comparison of the phenotypes of patients harboring in-frame deletions starting at exon 45 in the Duchenne muscular dystrophy gene indicates potential for the development of exon skipping therapy. *J Hum Genet* 62(4):459-463.

[0297] 16. Aoki Y, et al. (2012) Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(34):13763-13768.

[0298] 17. Echigoya Y, Mouly V, Garcia L, Yokota T, Duddy W (2015) In Silico Screening Based on Predictive Algorithms as a Design Tool for Exon Skipping Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* 10(3):e0120058.

[0299] 18. Lim KRQ, et al. (2019) Efficacy of Multi-exon Skipping Treatment in Duchenne Muscular Dystrophy Dog Model Neonates. *Mol Ther* 27(1):76-86.

- [0300] 19. Lehto T, et al. (2014) Cellular trafficking determines the exon skipping activity of Pip6a-PMO in mdx skeletal and cardiac muscle cells. *Nucleic Acids Res* 42(5):3207-3217.
- [0301] 20. Tsoumpira MK, et al. (2019) Peptide-conjugate antisense based splice-correction for Duchenne muscular dystrophy and other neuromuscular diseases. *EBioMedicine* 45:630-645.
- [0302] 21. Kim J, Clark K, Barton C, Tanguay R, Moulton H (2018) A Novel Zebrafish Model for Assessing In Vivo Delivery of Morpholino Oligomers, pp 293-306.
- [0303] 22. Veltrop M, et al. (2018) A dystrophic Duchenne mouse model for testing human antisense oligonucleotides. *PLoS One* 13(2):e0193289.
- [0304] 23. Yavas A, et al. (2020) Detailed genetic and functional analysis of the hDMDdel52/mdx mouse model. *PLoS One* 15(12):e0244215.
- [0305] 24. Sicinski P, et al. (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 244(4912):1578-1580.
- [0306] 25. Suzuki H, et al. (2016) Endogenous Multiple Exon Skipping and Back-Splicing at the DMD Mutation Hotspot. *Int J Mol Sci* 17(10):1722.
- [0307] 26. Echigoya Y, et al. (2017) Quantitative Antisense Screening and Optimization for Exon 51 Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther*. doi:10.1016/j.ymthe.2017.07.014.
- [0308] 27. Choi J-M, et al. (2006) Intranasal delivery of the cytoplasmic domain of CTLA-4 using a novel protein transduction domain prevents allergic inflammation. *Nat Med* 12(5):574-579.
- [0309] 28. Lehto T, Ezzat K, Wood MJA, El Andaloussi S (2016) Peptides for nucleic acid delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 106(Pt A):172-182.
- [0310] 29. Moulton HM, Moulton JD (2010) Morpholinos and their peptide conjugates: Therapeutic promise and challenge for Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* 1798(12):2296-2303.
- [0311] 30. Wu RP, et al. (2007) Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity. *Nucleic Acids Res* 35(15):5182-5191.
- [0312] 31. Aoki Y, et al. (2010) In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. *Mol Ther* 18(11):1995-2005.
- [0313] 32. Aupy P, et al. (2020) Long-Term Efficacy of AAV9-U7snRNA-Mediated Exon 51 Skipping in mdx52 Mice. *Mol Ther-Methods Clin Dev* 17:1037-1047.
- [0314] 33. McCourt JL, et al. (2015) In vitro stability of therapeutically relevant, internally truncated dystrophins. *Skelet Muscle* 5(1):13.
- [0315] 34. Spitali P, et al. (2013) DMD transcript imbalance determines dystrophin levels. *FASEB J* 27(12):4909-4916.

- [0316] 35. Anthony K, et al. (2014) Biochemical Characterization of Patients With In-Frame or Out-of-Frame DMD Deletions Pertinent to Exon 44 or 45 Skipping. *JAMA Neurol* 71(1):32.
- [0317] 36. van Putten M, et al. (2012) The Effects of Low Levels of Dystrophin on Mouse Muscle Function and Pathology. *PLoS One* 7(2):e31937.
- [0318] 37. Kudoh H, et al. (2005) A new model mouse for Duchenne muscular dystrophy produced by 2.4Mb deletion of dystrophin gene using Cre-loxP recombination system. *Biochem Biophys Res Commun* 328(2):507-516.
- [0319] 38. Aartsma-Rus A, van Putten M (2014) Assessing Functional Performance in the Mdx Mouse Model. *J Vis Exp*(85):51303.
- [0320] 39. Lim KRQ, Yokota T (2018) Quantitative evaluation of exon skipping in immortalized muscle cells in vitro. *Exon Skipping and Inclusion Therapies: Methods and Protocols*, eds Yokota T, Maruyama R Springer, New York), pp 127-140.
- [0321] 40. Maruyama R, et al. (2017) Systemic Delivery of Morpholinos to Skip Multiple Exons in a Dog Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Methods Mol Biol* 1565:201-213.
- [0322] 41. Thanh LT, et al. (1995) Characterization of genetic deletions in becker muscular dystrophy using monoclonal antibodies against a deletion-prone region of dystrophin. *Am J Med Genet* 58(2):177-186.
- [0323] 42. Desgeorges T, et al. (2019) Open-CSAM, a new tool for semi-automated analysis of myofiber cross-sectional area in regenerating adult skeletal muscle. *Skelet Muscle* 9(1):2.
- [0324] 43. Landini G, Martinelli G, Piccinini F (2020) Colour deconvolution: stain unmixing in histological imaging. *Bioinformatics*:btaa847.
- [0325] 44. Ruifrok AC, Johnston DA (2001) Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 23(4):291-299.
- [0326] 45. Lunn MR, Wang CH (2008) Spinal muscular atrophy. *Lancet* 371 (9630):2120-2133. doi:10.1016/S0140-6736(08)60921-6
- [0327] (9630):2120-2133. doi:10.1016/S0140-6736(08)60921-6
- [0328] 46. D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD et al. (2011) Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis* 6:71. doi:10.1186/1750-1172-6-71
- [0329] 47. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80(1):155-165. doi:10.1016/0092-8674(95)90460-3
- [0330] 48. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW et al. (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8(7):1177-1183. doi:10.1093/hmg/8.7.1177
- [0331] 49. Schrank B, Gotz R, Gunnensen JM et al. (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci*

U S A 94(18):9920-9925.doi:10.1073/pnas.94.18.9920

[0332] 50.Schmutz J,Martin J,Terry A et al.(2004)The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome Nature 431(7006):268-274.doi:10.1038/nature02919

[0333] 51.Vitte J,Fassier C,Tiziano FD et al.(2007)Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products.Am J Pathol 171(4):1269-1280.doi:10.2353/ajpath.2007.070399

[0334] 52.Singh NK SN,Androphy EJ,Singh RN(2006)Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron.Mol Cell Biol 26(4):13.doi:10.1128/MCB.26.4.1333-1346.2006

[0335] 53.Sumner CJ,Crawford TO(2018)Two breakthrough gene-targeted treatments for spinal muscular atrophy:challenges remain.J Clin Invest 128(8):3219-3227.doi:10.1172/JCI121658

[0336] 54.Li Q(2020)Nusinersen as a Therapeutic Agent for Spinal Muscular Atrophy.Yonsei Med J 61(4):273-283.doi:10.3349/ymj.2020.61.4.273

[0337] 55.Lorson CL,Hahnen E,Androphy EJ et al.(1999)A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy.Proc Natl Acad Sci U S A 96(11):6307-6311.doi:10.1073/pnas.96.11.6307

[0338] 56.Campbell L,Potter A,Ignatius J et al.(1997)Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy:implications for disease process and clinical phenotype.Am J Hum Genet 61(1):40-50.doi:10.1086/513886

[0339] 57.Hua Y,Vickers TA,Okunola HL et al.(2008)Antisense masking of an hnRNP A1/A2intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice.Am J Hum Genet 82(4):834-848.doi:10.1016/j.ajhg.2008.01.014

[0340] 58.Hamilton G,Gillingwater TH(2013)Spinal muscular atrophy:going beyond the motor neuron.Trends Mol Med 19(1):40-50.doi:10.1016/j.molmed.2012.11.002

[0341] 59.Nash LA,Burns JK,Chardon JW et al.(2016)Spinal Muscular Atrophy:More than a Disease of Motor Neurons?Curr Mol Med 16(9):779-792.doi:10.2174/1566524016666161128113338

[0342] 60.Deguisse MO,De Repentigny Y,McFall E et al.(2017)Immune dysregulation may contribute to disease pathogenesis in spinal muscular atrophy mice.Hum Mol Genet 26(4):801-819.doi:10.1093/hmg/ddw434

[0343] 61.Rudnik-Schoneborn S,Heller R,Berg C et al.(2008)Congenital heart disease is a feature of severe infantile spinal muscular atrophy.J Med Genet 45(10):635-638.doi:10.1136/jmg.2008.057950

[0344] 62.Bevan AK,Hutchinson KR,Foust KD et al.(2010)Early heart failure in the SMNDelta7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal

scAAV9-SMN delivery. *Hum Mol Genet* 19(20):3895-3905.doi:10.1093/hmg/ddq300

[0345] 63.Heier CR,Satta R,Lutz C et al.(2010)Arrhythmia and cardiac defects are a feature of spinal muscular atrophy model mice.*Hum Mol Genet* 19(20):3906-3918.doi:10.1093/hmg/ddq330

[0346] 64.Kolb SJ,Kissel JT(2011)Spinal muscular atrophy:a timely review.*Arch Neurol* 68(8):979-984.doi:10.1001/archneurol.2011.74

[0347] 65.Kim JK,Jha NN,Feng Z et al.(2020)Muscle-specific SMN reduction reveals motor neuron-independent disease in spinal muscular atrophy models.*J Clin Invest*130(3):1271-1287.doi:10.1172/JCI131989

[0348] 66.Lowery S,Oliver A(2008)Incidence of postdural puncture headache and backache following diagnostic/therapeutic lumbar puncture using a 22G cutting spinal needle,and after introduction of a 25G pencil point spinal needle.*Paediatr Anaesth* 18(3):230-234.doi:10.1111/j.1460-9592.2008.02414.x

[0349] 67.Hache M,Swoboda KJ,Sethna N et al.(2016)Intrathecal Injections in Children With Spinal Muscular Atrophy:Nusinersen Clinical Trial Experience.*J Child Neurol* 31(7):899-906.doi:10.1177/0883073815627882

[0350] 68.Hoy SM(2019)Onasemnogene Apeparvovec:First Global Approval.*Drugs* 79(11):1255-1262.doi:10.1007/s40265-019-01162-5

[0351] 69.Van Alstyne M,Tattoli I,Delestree N et al.(2021)Gain of toxic function by long-term AAV9-mediated SMN overexpression in the sensorimotor circuit.*Nat Neurosci*.doi:10.1038/s41593-021-00827-3

[0352] 70.Singh RN,Ottesen EW,Singh NN(2020)The First Orally Deliverable Small Molecule for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy.*Neurosci Insights*15:2633105520973985.doi:10.1177/2633105520973985

[0353] 71.Dhillon S(2020)Risdiplam:First Approval.*Drugs* 80(17):1853-1858.doi:10.1007/s40265-020-01410-z

[0354] 72.Ratni H,Ebeling M,Baird J et al.(2018)Discovery of Risdiplam,a Selective Survival of Motor Neuron-2(SMN2)Gene Splicing Modifier for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy(SMA).*J Med Chem* 61(15):6501-6517.doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00741

[0355] 73.Sheng L,Rigo F,Bennett CF et al.(2020)Comparison of the efficacy of MOE and PMO modifications of systemic antisense oligonucleotides in a severe SMA mouse model.*Nucleic Acids Res* 48(6):2853-2865.doi:10.1093/nar/gkaa126

[0356] 74.Hammond SM,Hazell G,Shabanpoor F et al.(2016)Systemic peptide-mediated oligonucleotide therapy improves long-term survival in spinal muscular atrophy.*Proc Natl Acad Sci U S A* 113(39):10962-10967.doi:10.1073/pnas.1605731113

[0357] 75.Shabanpoor F,Hammond SM,Abendroth F et al.(2017)Identification of

a Peptide for Systemic Brain Delivery of a Morpholino Oligonucleotide in Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy. *Nucleic Acid Ther* 27(3):130-143.doi:10.1089/nat.2016.0652

[0358] 76.Wesolowski D,Tae HS,Gandotra N et al. (2011)Basic peptide-morpholino oligomer conjugate that is very effective in killing bacteria by gene-specific and nonspecific modes.*Proc Natl Acad Sci U S A* 108(40):16582-16587.doi:10.1073/pnas.1112561108

[0359] 77.Choi JM,Ahn MH,Chae WJ et al. (2006)Intranasal delivery of the cytoplasmic domain of CTLA-4 using a novel protein transduction domain prevents allergic inflammation.*Nat Med* 12(5):574-579.doi:10.1038/nm1385

[0360] 78.Hsieh-Li HM,Chang JG,Jong YJ et al. (2000)A mouse model for spinal muscular atrophy.*Nat Genet* 24(1):66-70.doi:10.1038/71709

[0361] 79.Gogliotti RG,Hammond SM,Lutz C et al. (2010)Molecular and phenotypic reassessment of an infrequently used mouse model for spinal muscular atrophy.*Biochem Biophys Res Commun* 391(1):517-522.doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.090

[0362] 80.Nizzardo M,Simone C,Salani S et al. (2014)Effect of combined systemic and local morpholino treatment on the spinal muscular atrophy Delta7 mouse model phenotype.*Clin Ther* 36(3):340-356 e345.doi:10.1016/j.clinthera.2014.02.004

[0363] 81.Crawford TO,Pardo CA(1996)The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy.*Neurobiol Dis* 3(2):97-110.doi:10.1006/nbdi.1996.0010

[0364] 82.Sumner CJ(2006)Therapeutics development for spinal muscular atrophy.*NeuroRx*3(2):235-245.doi:10.1016/j.nurx.2006.01.010

[0365] 83.Burki U,Keane J,Blain A et al. (2015)Development and Application of an Ultrasensitive Hybridization-Based ELISA Method for the Determination of Peptide-Conjugated Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotides.*Nucleic Acid Ther* 25(5):275-

[0366] 284.doi:10.1089/nat.2014.0528

[0367] 84.Miyatake S,Mizobe Y,Tsoumpra MK et al. (2019)Scavenger Receptor Class A1Mediates Uptake of Morpholino Antisense Oligonucleotide into Dystrophic Skeletal Muscle.*Mol Ther Nucleic Acids* 14:520-535.doi:10.1016/j.omtn.2019.01.008

[0368] 85.Gait MJ,Arzumanov AA,McClore G et al. (2019)Cell-Penetrating Peptide Conjugates of Steric Blocking Oligonucleotides as Therapeutics for Neuromuscular Diseases from a Historical Perspective to Current Prospects of Treatment.*Nucleic Acid Ther* 29(1):1-12.doi:10.1089/nat.2018.0747

[0369] 86.Kariya S,Park GH,Maeno-Hikichi Y et al. (2008)Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal

muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 17(16):2552-2569.doi:10.1093/hmg/ddn156

[0370] 87.Rochette CF,Gilbert N,Simard LR(2001)SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids:SMN2 is unique to *Homo sapiens*.*Hum Genet* 108(3):255-266

[0371] 88.Zou LL,Ma JL,Wang T et al.(2013)Cell-penetrating Peptide-mediated therapeutic molecule delivery into the central nervous system.*Curr Neuropharmacol* 11(2):197-208.doi:10.2174/1570159X11311020006

[0372] 89.Tsoumpra MK,Fukumoto S,Matsumoto T et al.(2019)Peptide-conjugate antisense based splice-correction for Duchenne muscular dystrophy and other neuromuscular diseases.*EBioMedicine* 45:630-645.doi:10.1016/j.ebiom.2019.06.036

[0373] 90.Meloni BP,Mastaglia FL,Knuckey NW(2020)Cationic Arginine-Rich Peptides(CARPs):A Novel Class of Neuroprotective Agents With a Multimodal Mechanism of Action.*Front Neurol* 11:108.doi:10.3389/fneur.2020.00108

[0374] 91.Hua Y,Sahashi K,Rigo F et al.(2011)Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model.*Nature* 478(7367):123-126.doi:10.1038/nature10485

[0375] 92.Michaud M,Arnoux T,Bielli S et al.(2010)Neuromuscular defects and breathing disorders in a new mouse model of spinal muscular atrophy.*Neurobiol Dis* 38(1):125-135.doi:10.1016/j.nbd.2010.01.006

[0376] 93.Hensel N,Kubinski S,Claus P(2020)The Need for SMN-Independent Treatments of Spinal Muscular Atrophy(SMA)to Complement SMN-Enhancing Drugs.*Front Neurol* 11:45.doi:10.3389/fneur.2020.00045

[0377] 94.Boido M,Vercelli A(2016)Neuromuscular Junctions as Key Contributors and Therapeutic Targets in Spinal Muscular Atrophy.*Front Neuroanat* 10:6.doi:10.3389/fnana.2016.00006

[0378] 95.Zhang Z,Pinto AM,Wan L et al.(2013)Dysregulation of synaptogenesis genes antecedes motor neuron pathology in spinal muscular atrophy.*Proc Natl Acad Sci U S A* 110(48):19348-19353.doi:10.1073/pnas.1319280110

[0379] 96.Echigoya Y,Nakamura A,Nagata T et al.(2017)Effects of systemic multiexon skipping with peptide-conjugated morpholinos in the heart of a dog model of Duchenne muscular dystrophy.*Proc Natl Acad Sci U S A* 114(16):4213-4218.doi:10.1073/pnas.1613203114

[0380] 97.Echigoya Y,Aoki Y,Miskew B et al.(2015)Long-term efficacy of systemic multiexon skipping targeting dystrophin exons 45-55with a cocktail of vivo-morpholinos in mdx52 mice.*Mol Ther Nucleic Acids* 4:e225.doi:10.1038/mtna.2014.76

[0381] 98.Passini MA,Bu J,Roskelley EM et al.(2010)CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular

atrophy. J Clin Invest 120(4):1253-1264.doi:10.1172/JCI41615

[0382] 99. Donadon I, Bussani E, Riccardi F et al. (2019) Rescue of spinal muscular atrophy mouse models with AAV9-Exon-specific U1 snRNA. Nucleic Acids Res 47(14):7618-7632.doi:10.1093/nar/gkz469

[0383] 100. Ren J, Ding X, Funk GD et al. (2009) Ampakine CX717 protects against fentanyl-induced respiratory depression and lethal apnea in rats. Anesthesiology 110(6):1364-1370.doi:10.1097/ALN.0b013e31819faa2a

[0384] 101. Ren J, Ding X, Greer JJ (2015) 5-HT1A receptor agonist Befiradol reduces fentanyl-induced respiratory depression, analgesia, and sedation in rats. Anesthesiology 122(2):424-434.doi:10.1097/ALN.0000000000000490

[0385] 本文所述的实施方式旨在是示例性的。本领域技术人员可以对特定实施方式进行修改、修改和变化。权利要求的范围不应受到本文所述特定实施方式的限制，而应以与整个说明书一致的方式进行解释。

[0386] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都表明了本发明所属领域的技术人员的技能水平，并通过引用并入本文，其程度与每个单独的出版物专利或专利申请被具体和单独地表示为通过引用并入的程度相同。

[0387] 如此描述本发明，很明显，本发明可以以多种方式进行改变。这些变化不应被视为偏离本发明的精神和范围，并且本领域技术人员显而易见的所有这些修改都旨在包括在所附权利要求的范围内。

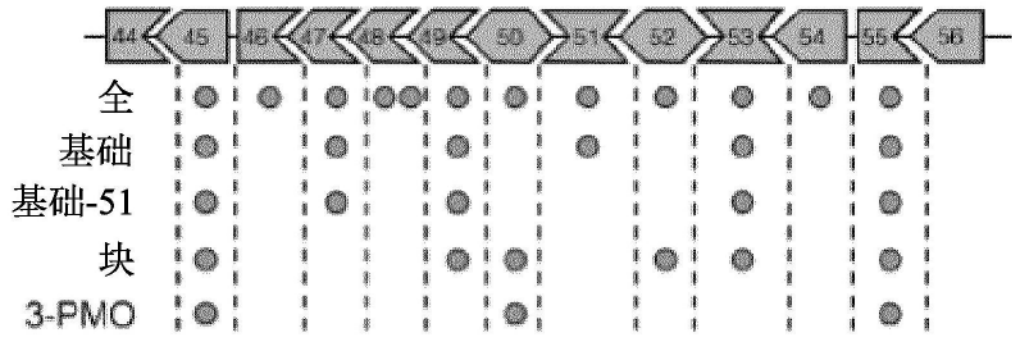
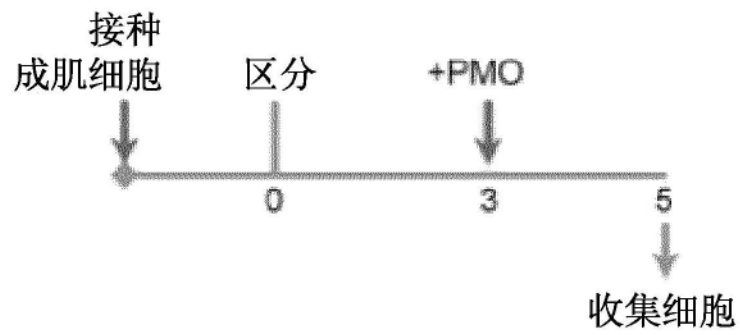
A**B**

图1

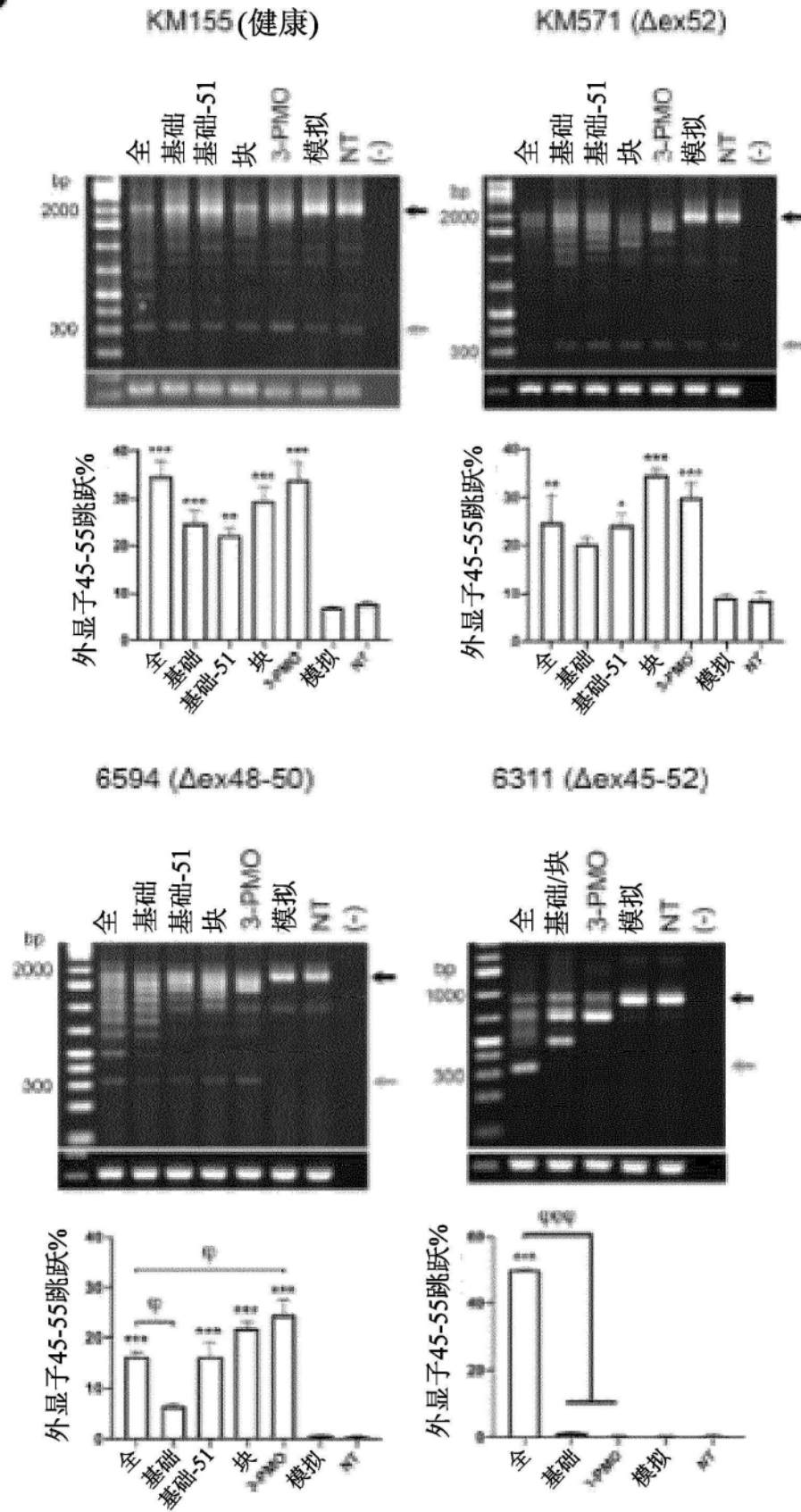
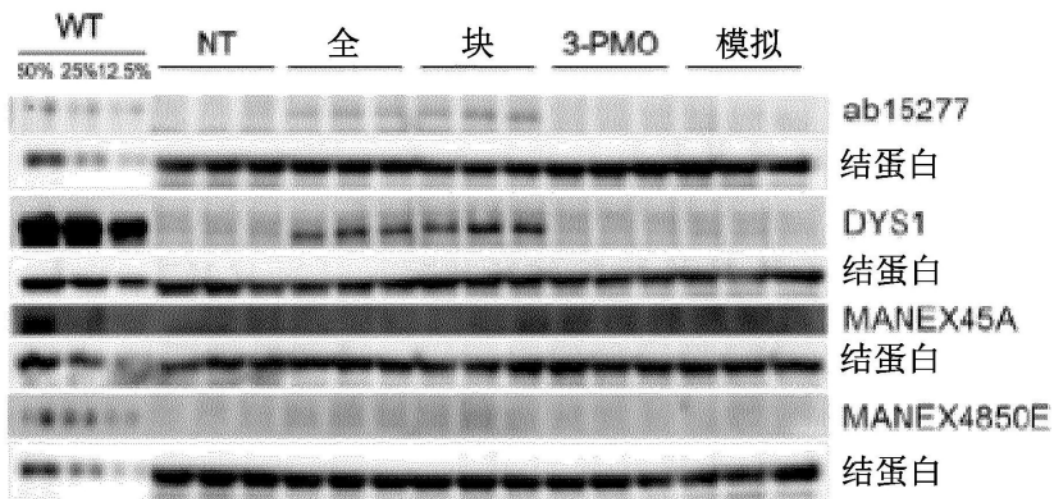
C

图1 (续)

D



E

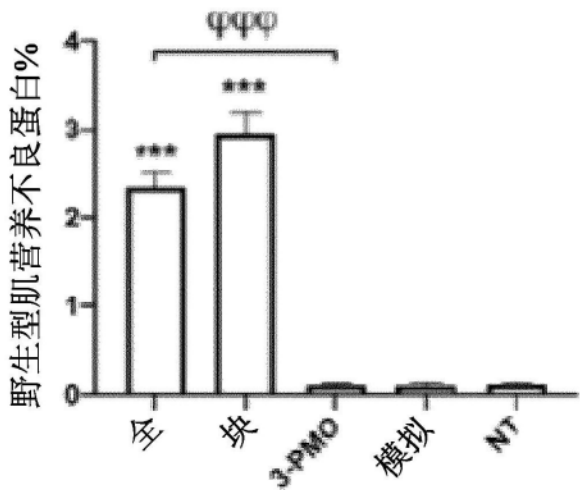


图1 (续)

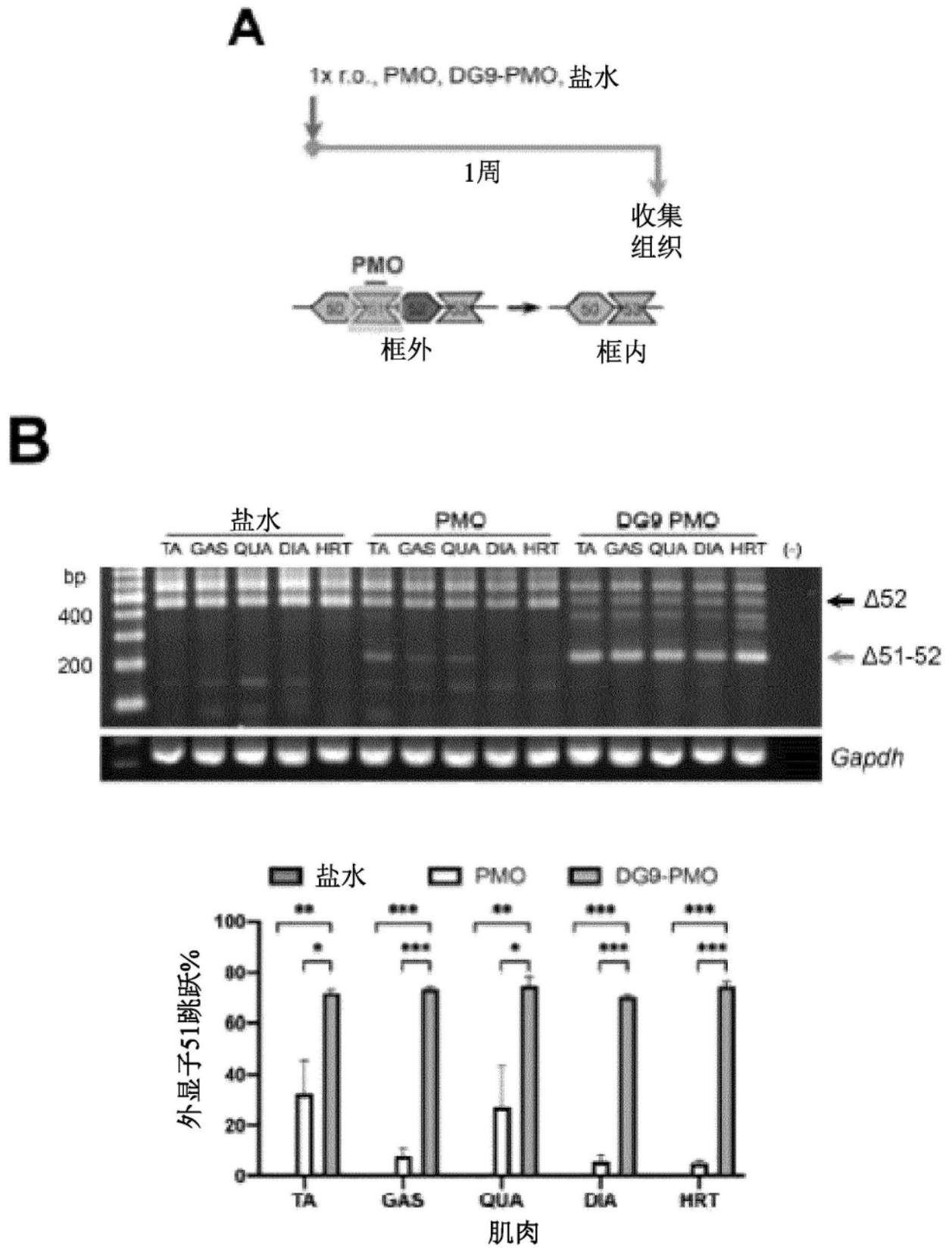


图2

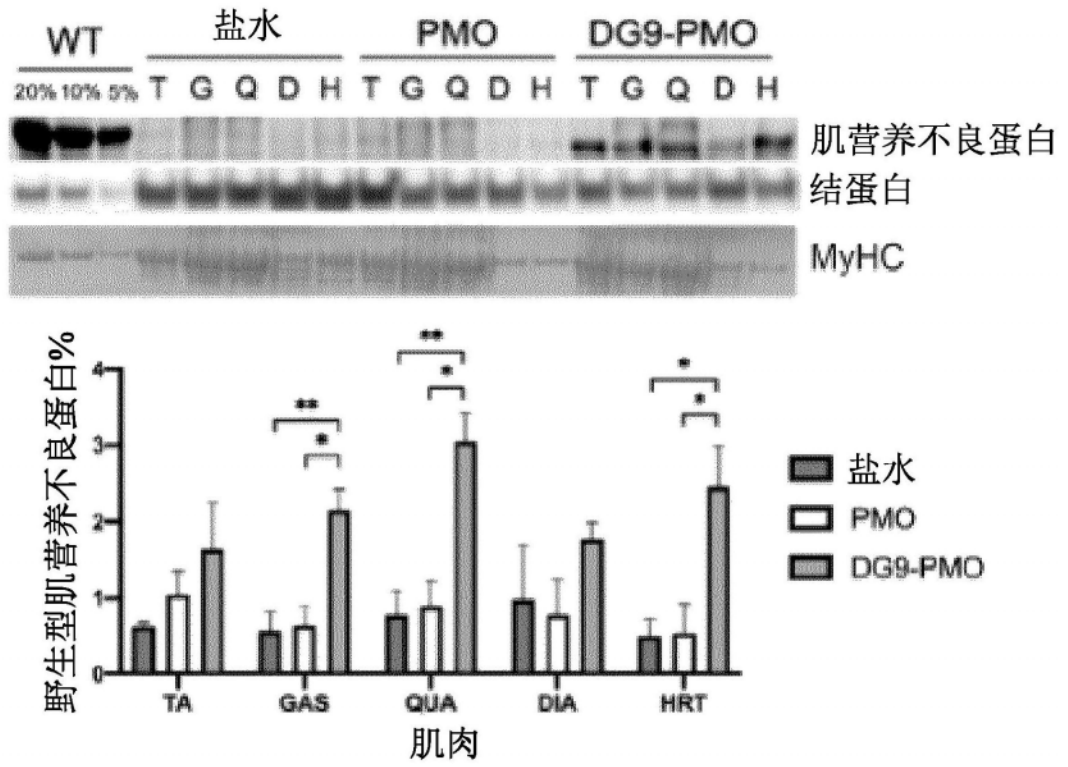
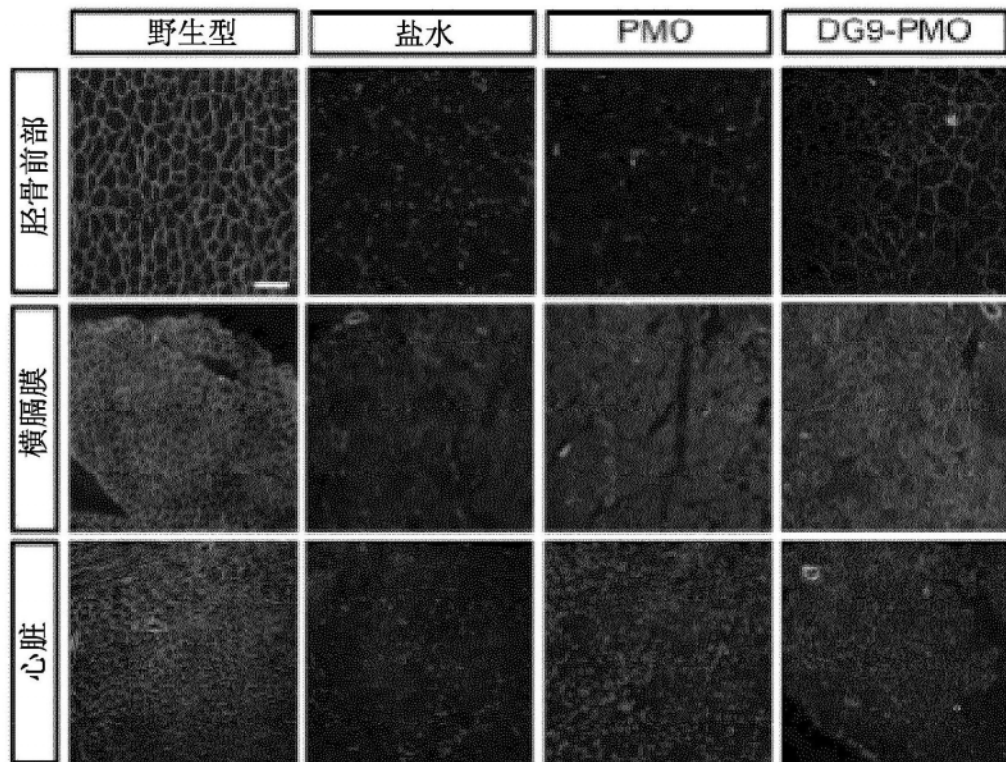
C**D**

图2(续)

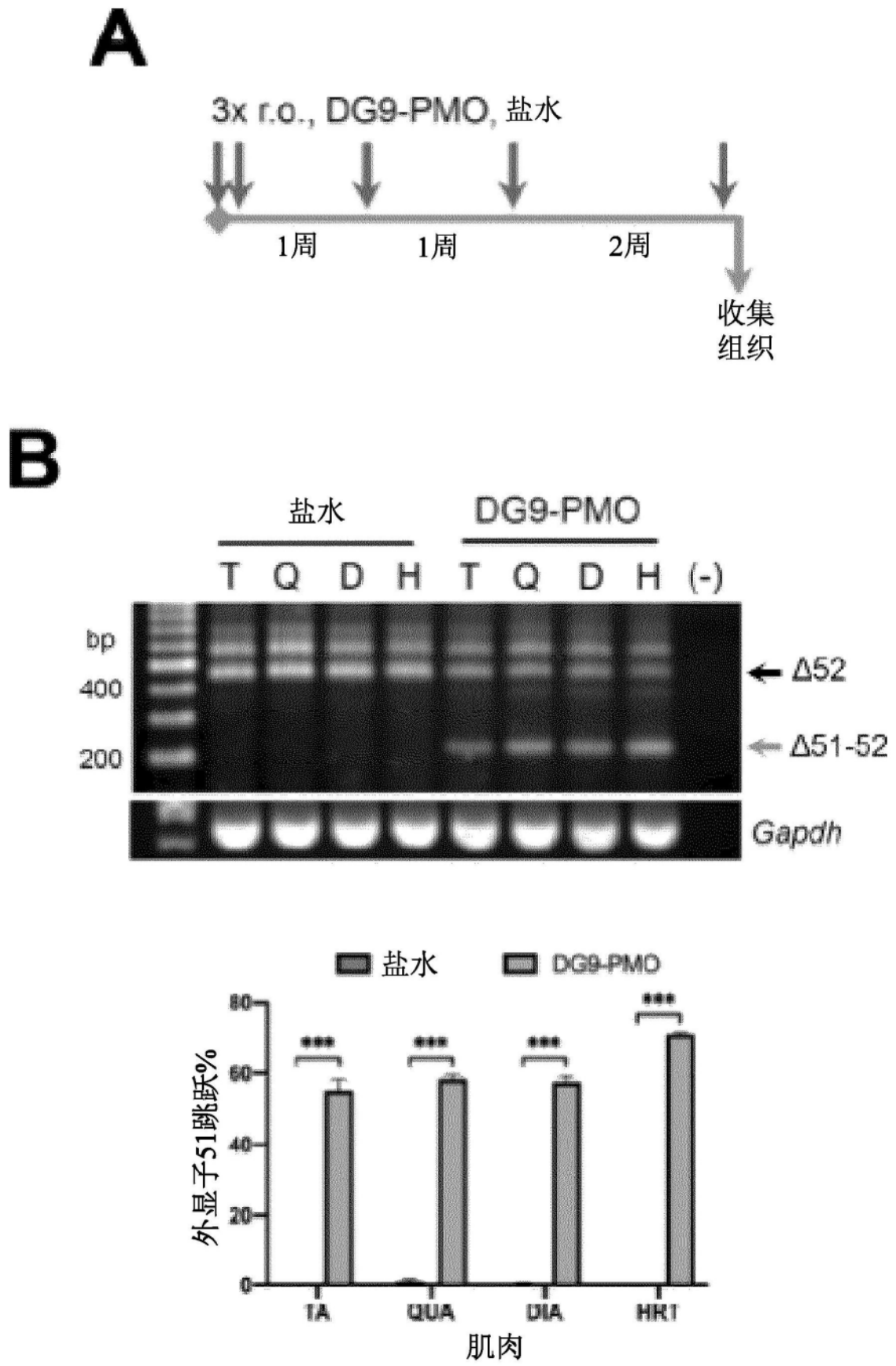


图3

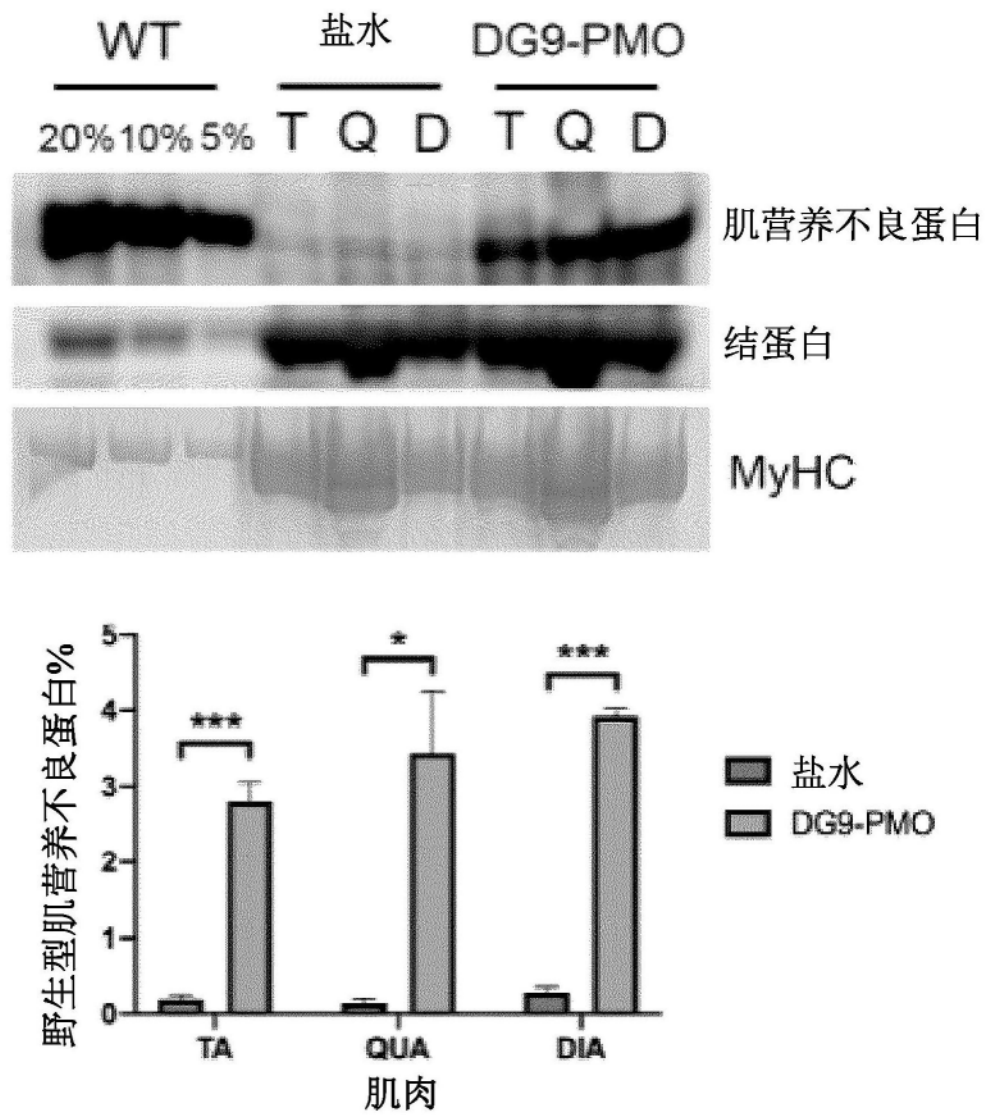
C

图3 (续)

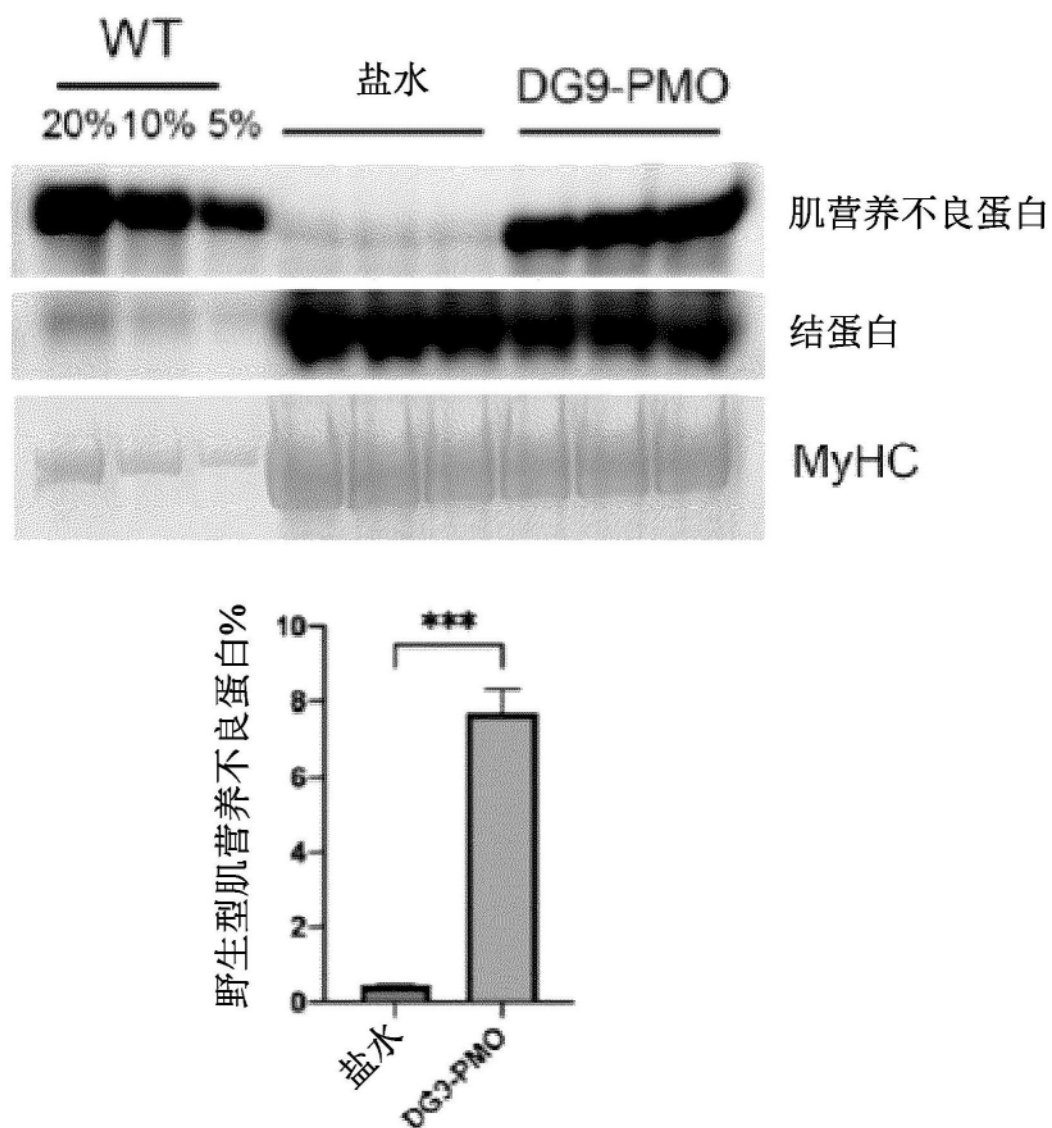
D

图3(续)

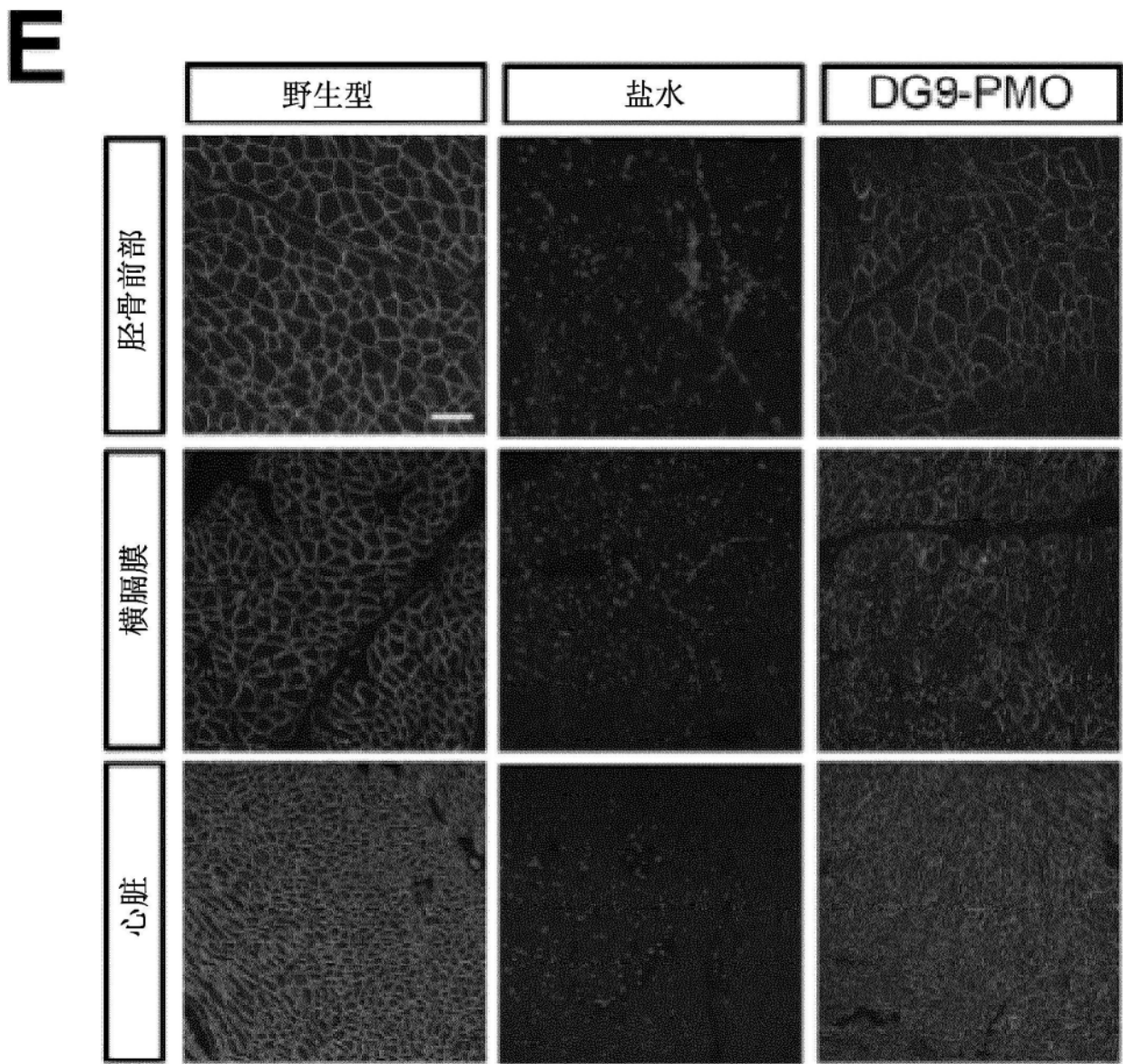


图3(续)

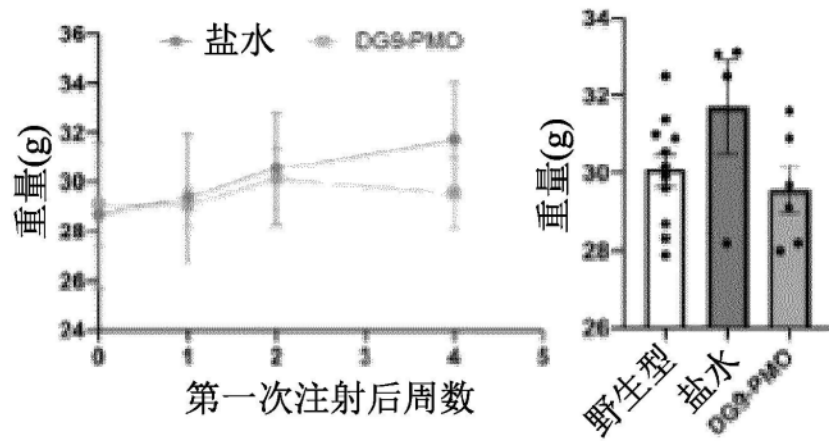
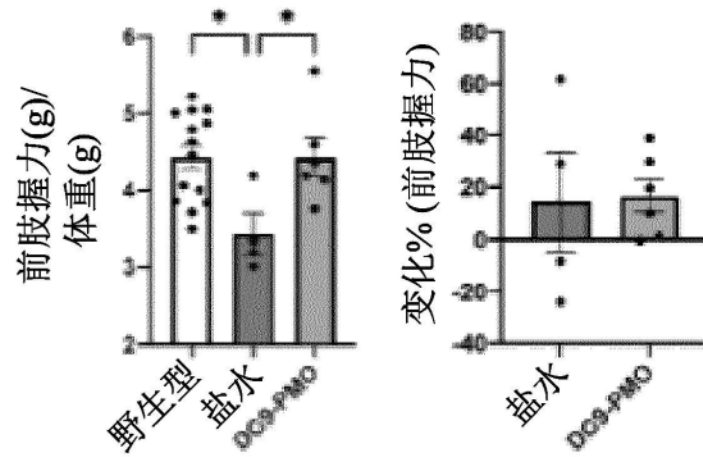
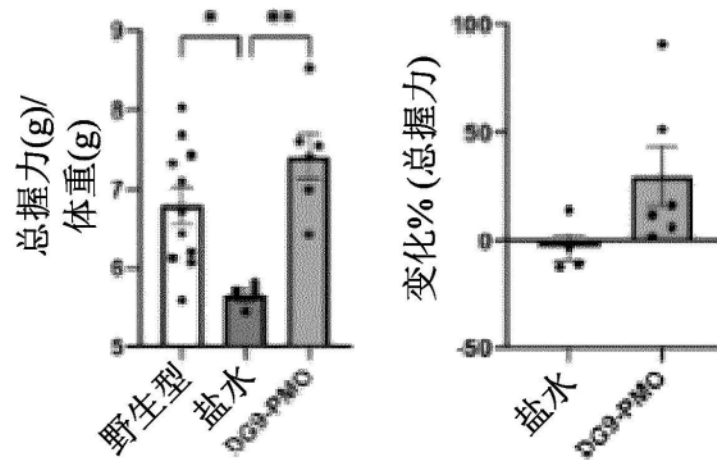
F**G****H**

图3 (续)

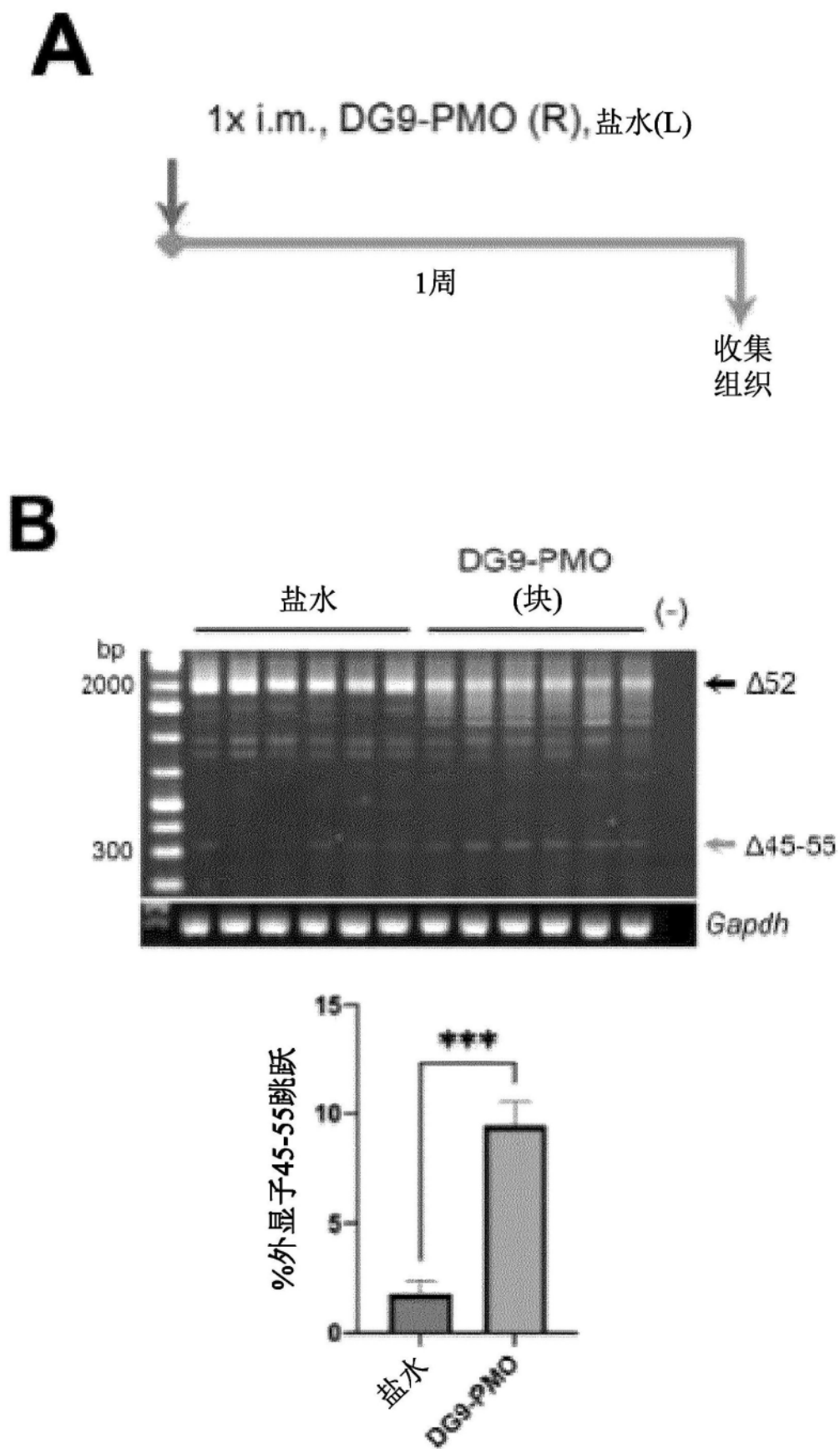


图4

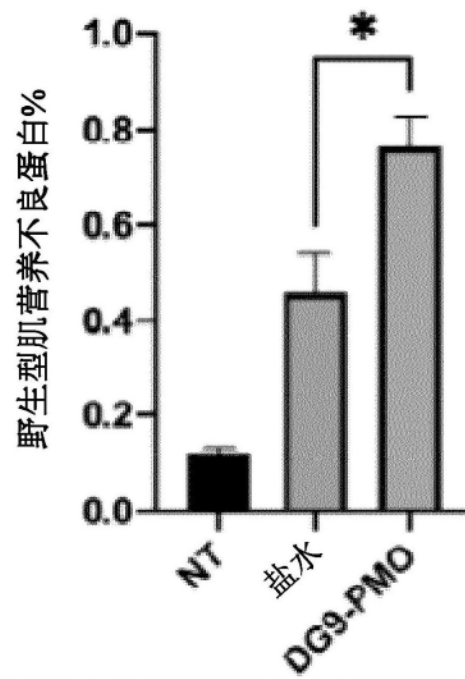
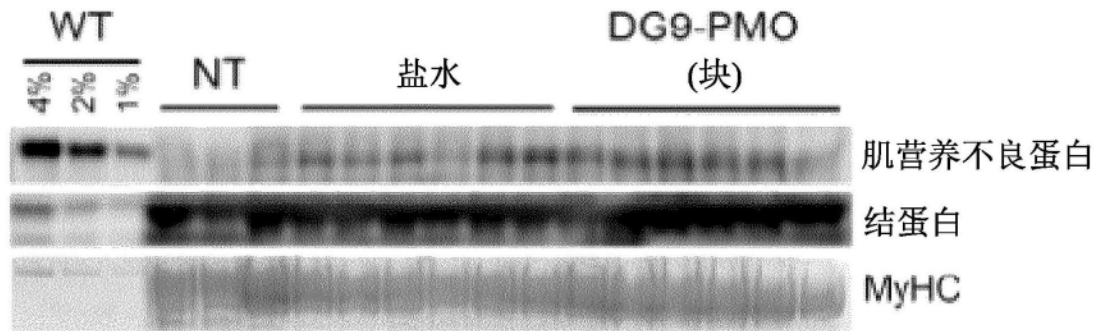
C

图4 (续)

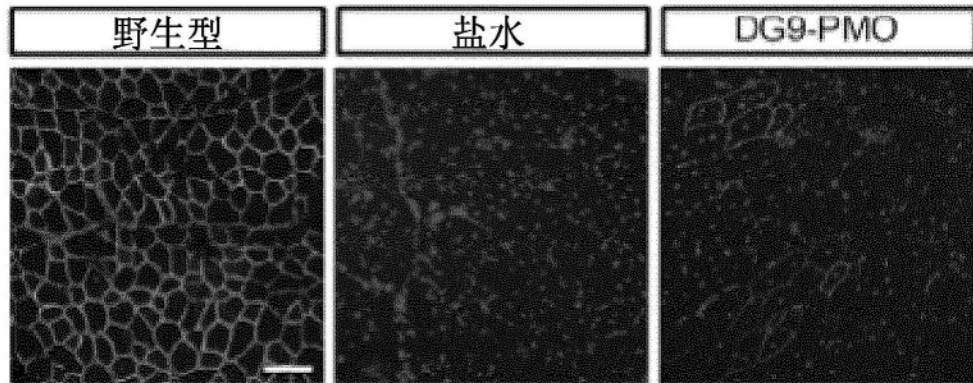
D

图4(续)

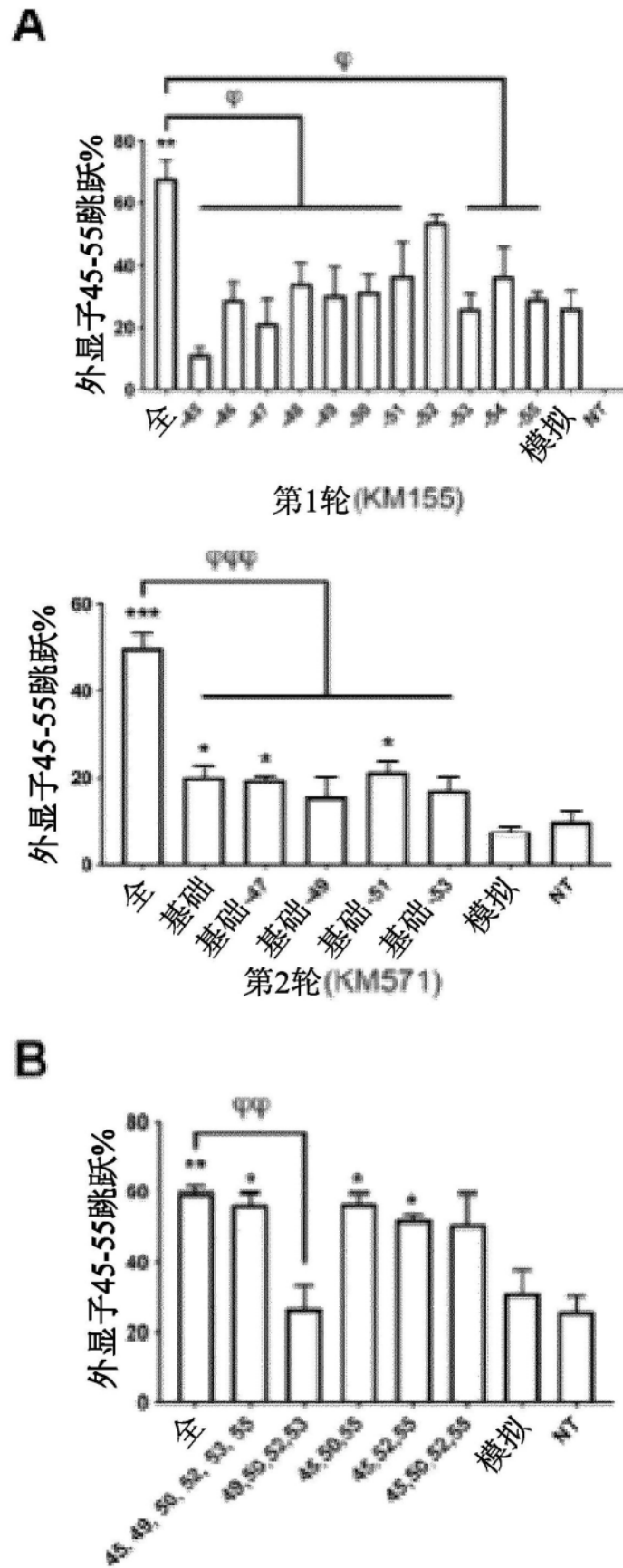


图5

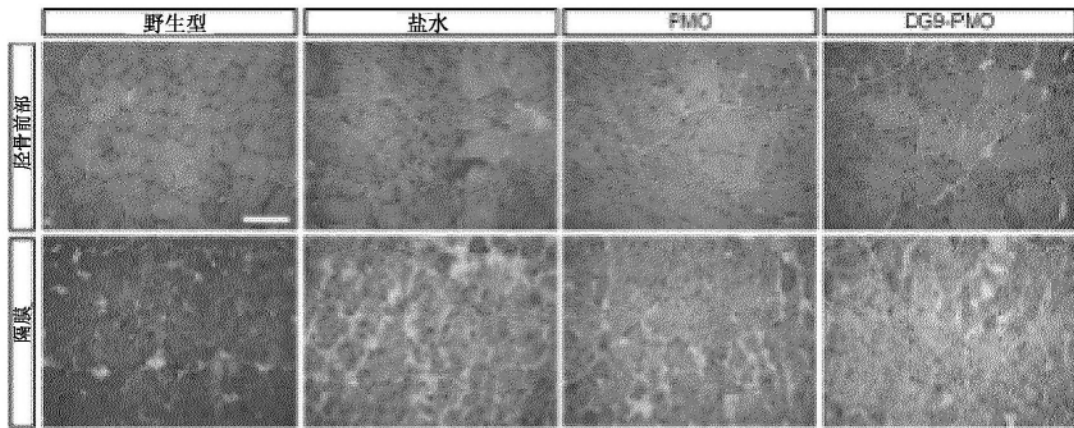
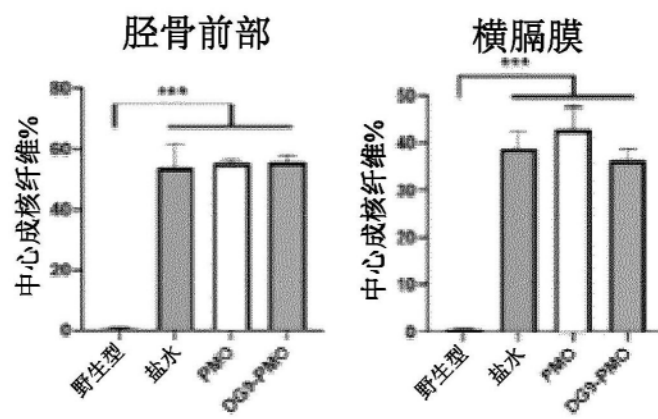
A**B**

图6

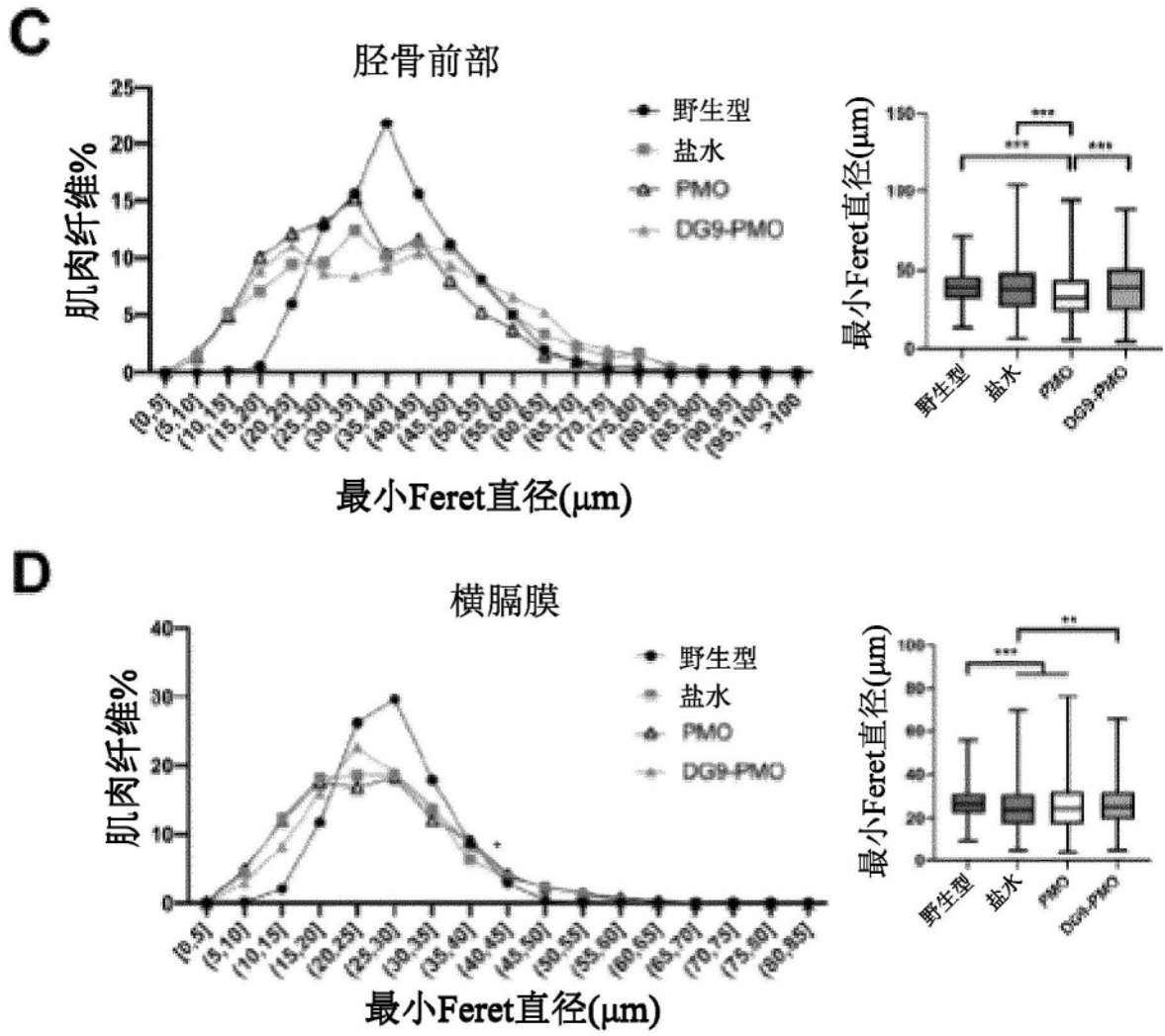


图6(续)

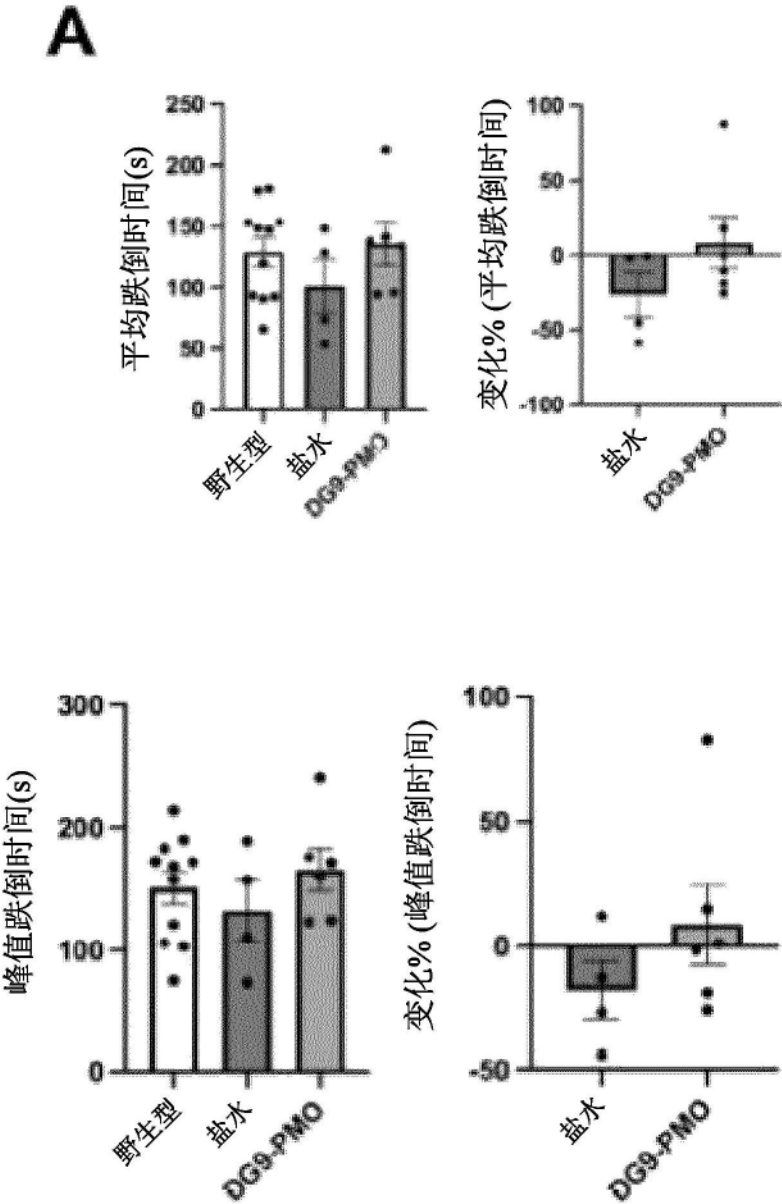


图7

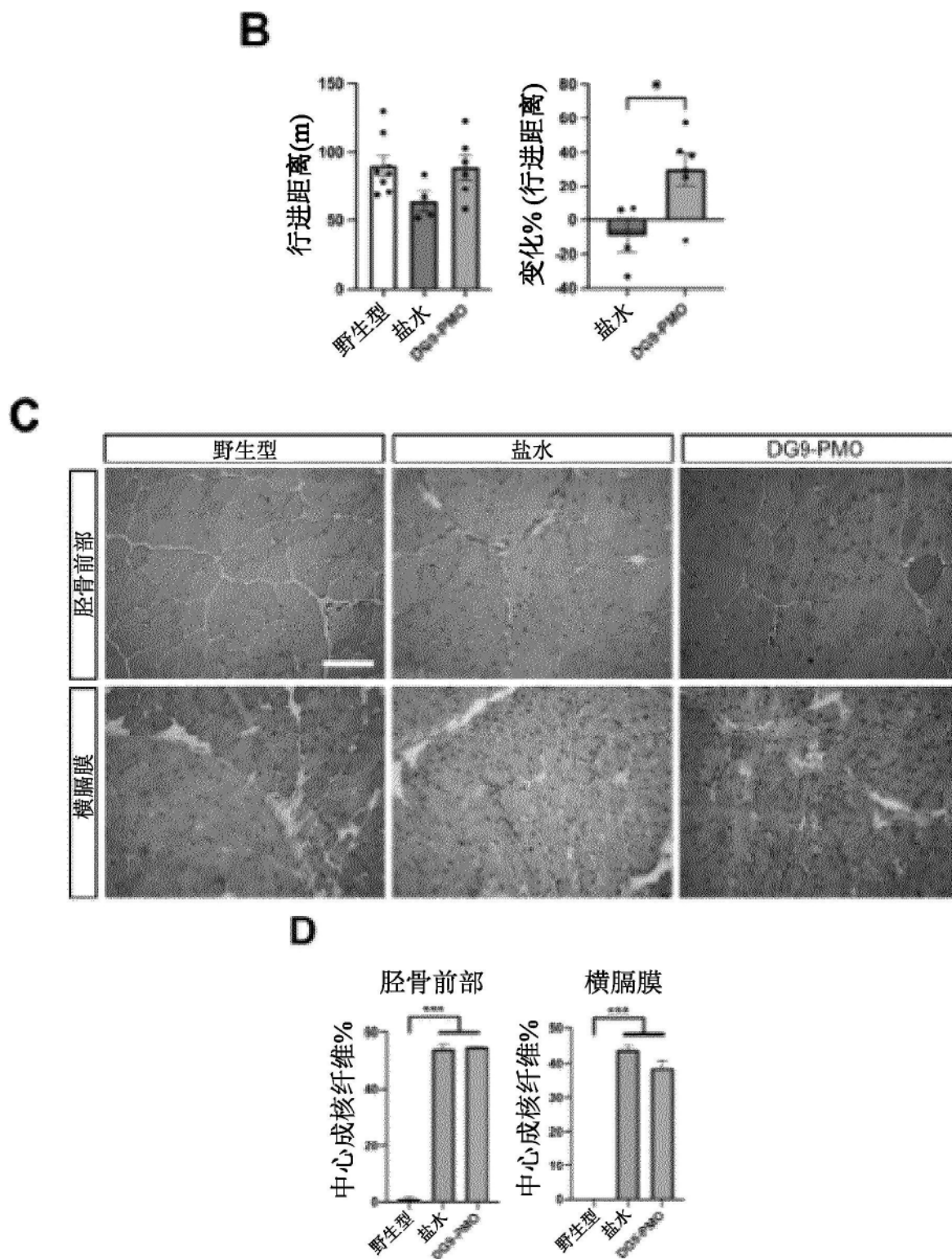
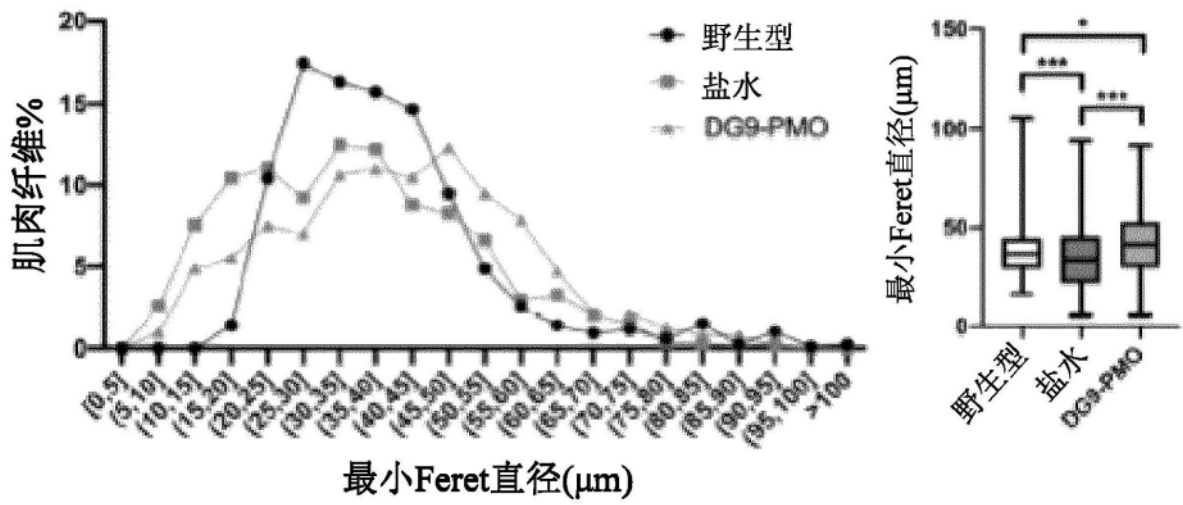


图7 (续)

E

胫骨前部

**F**

横膈膜

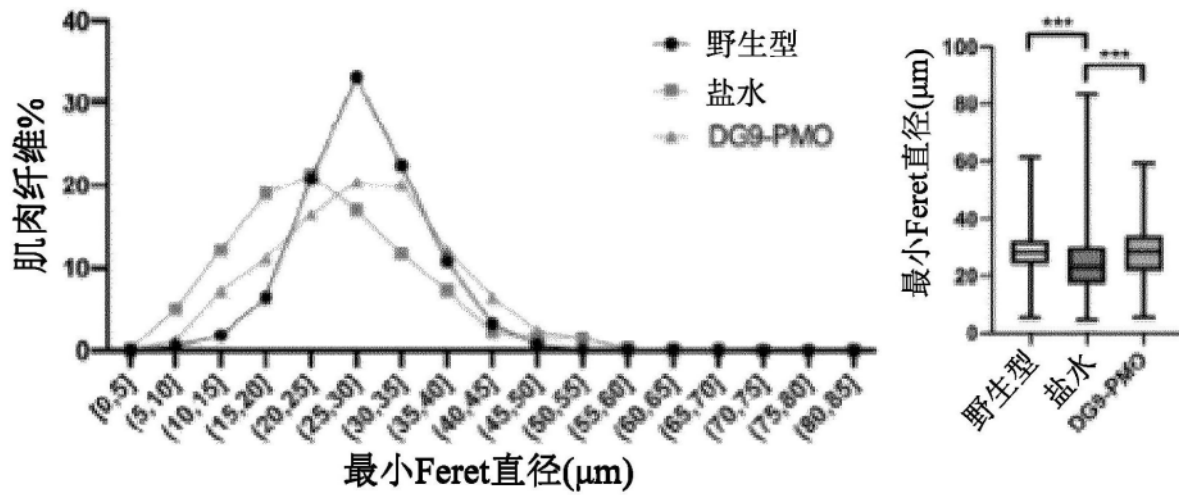


图7 (续)

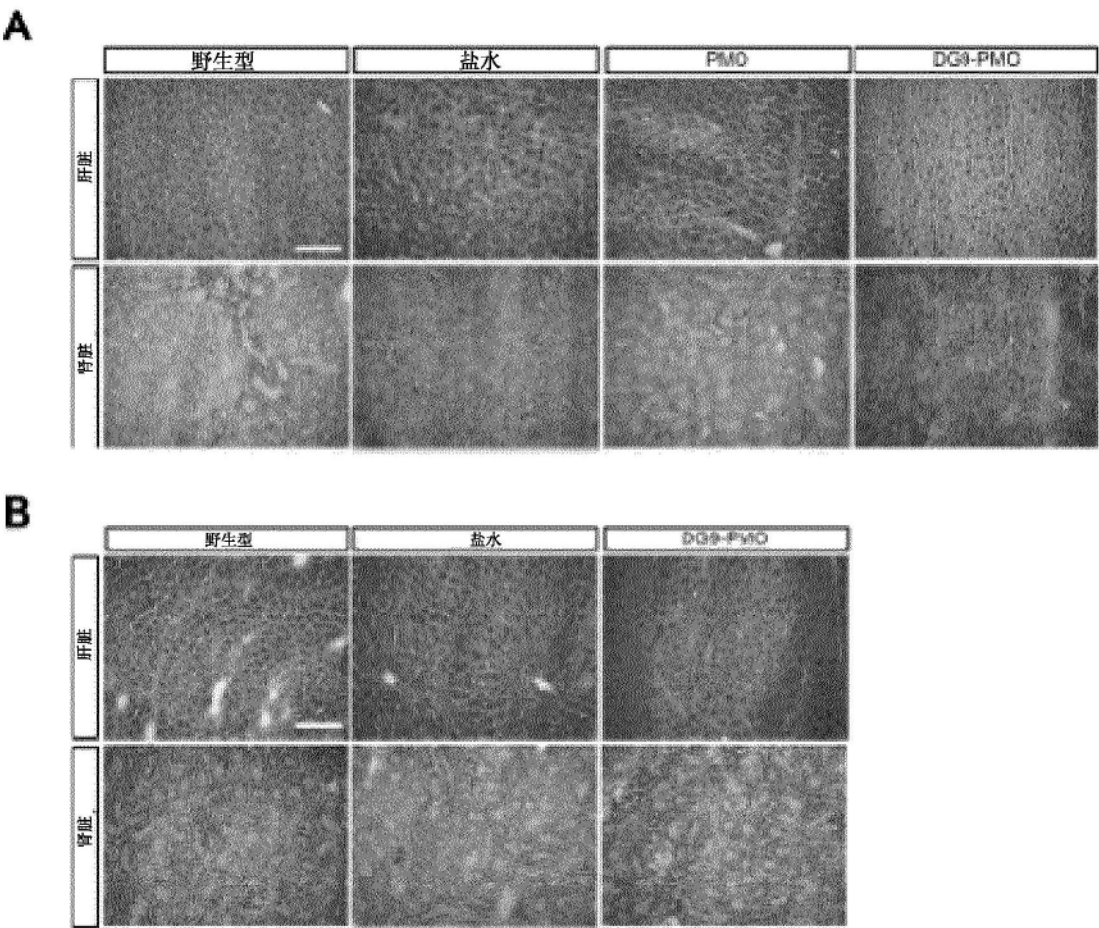


图8

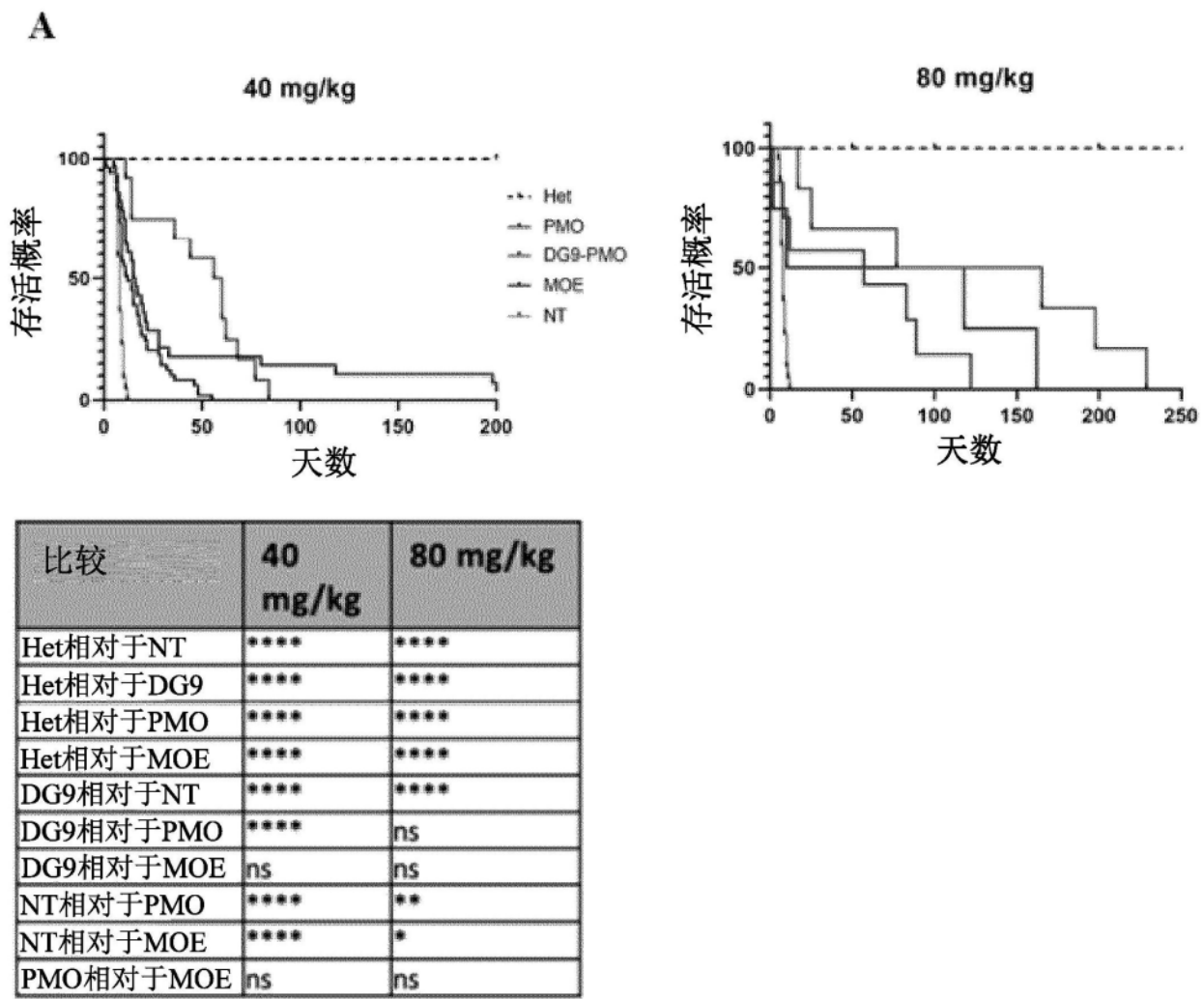


图9

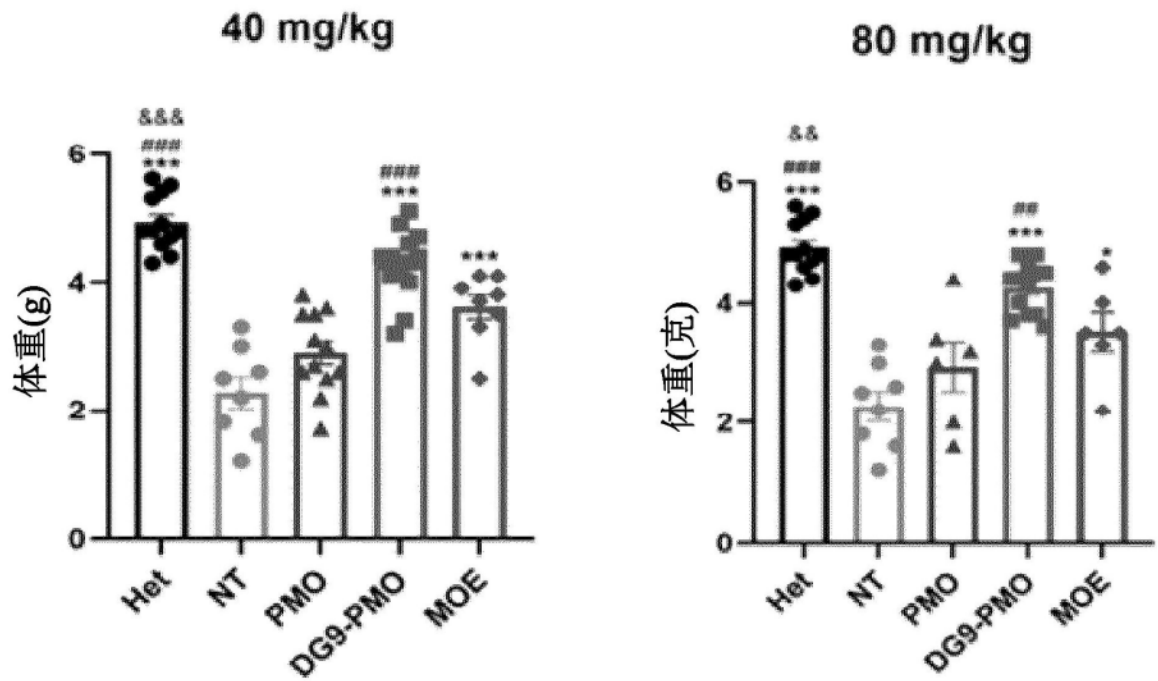
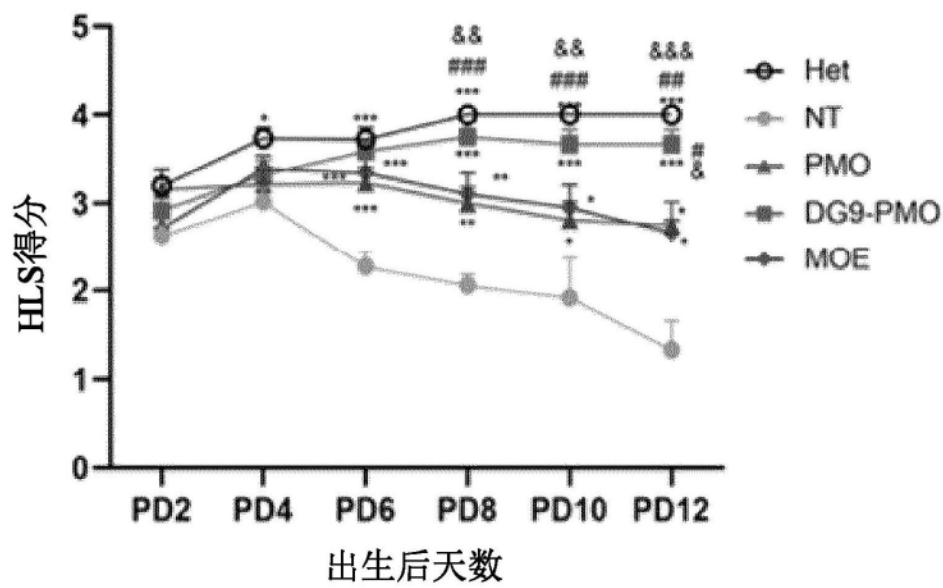
B**C**

图9(续)

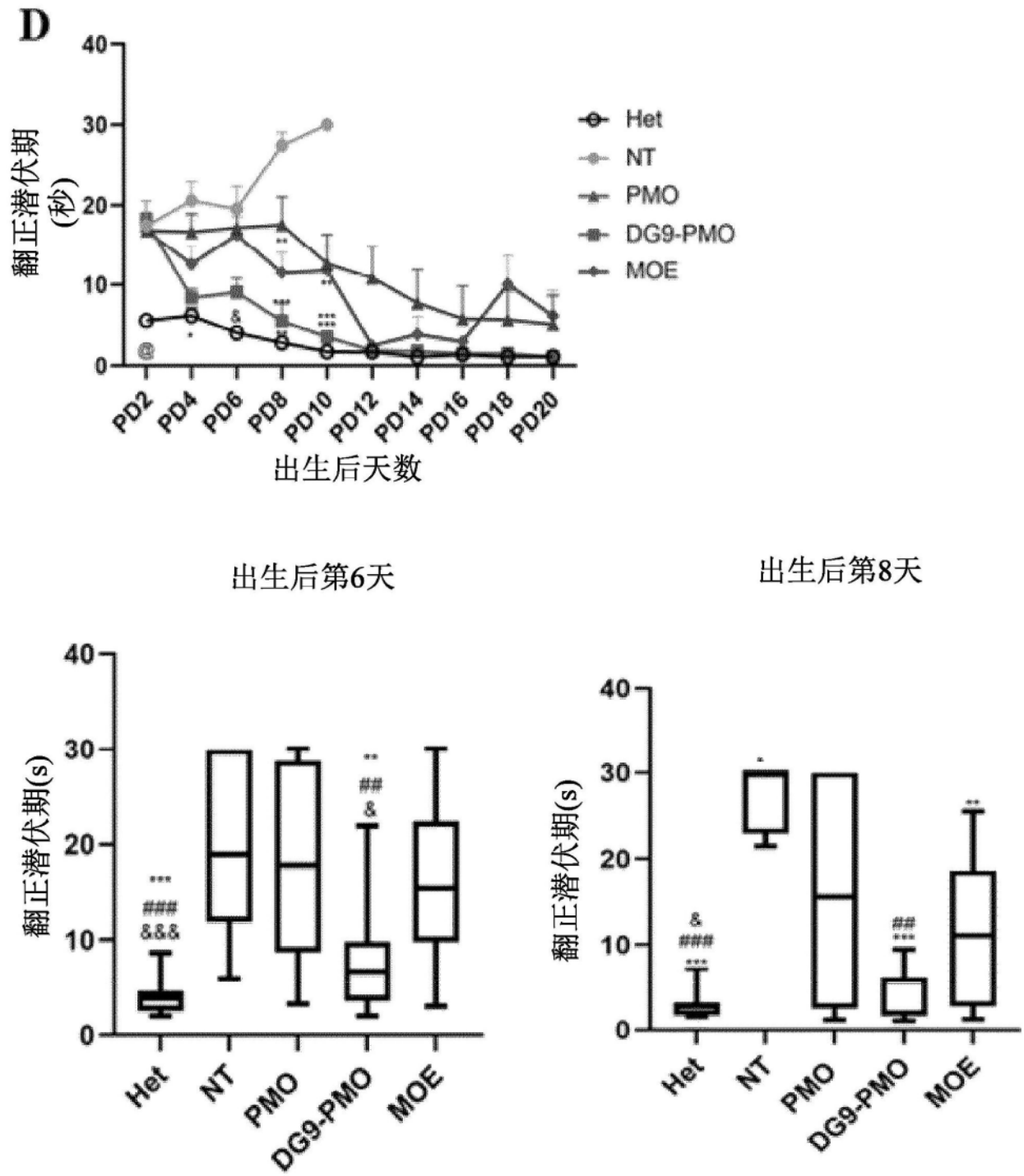


图9 (续)

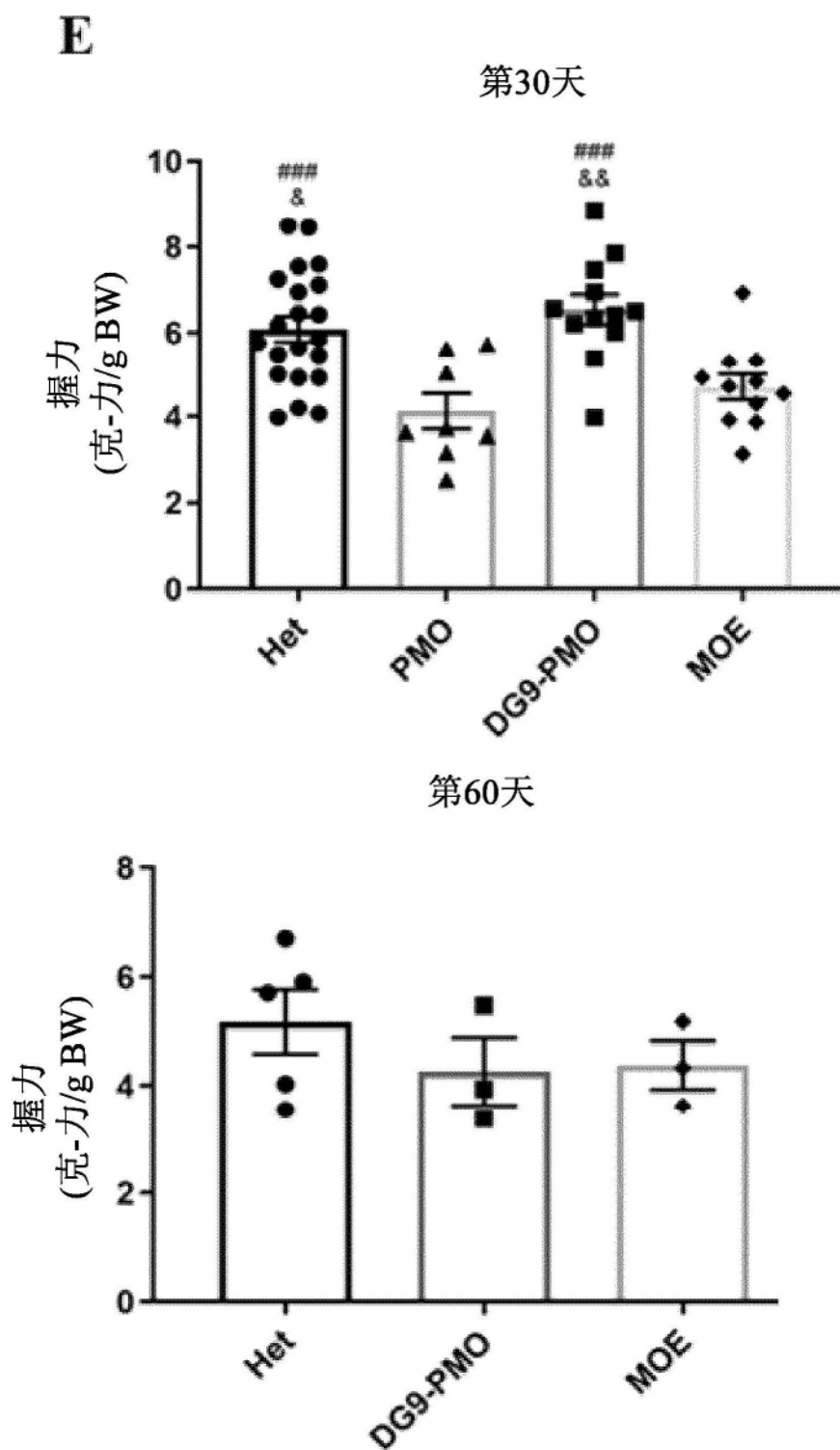


图9(续)

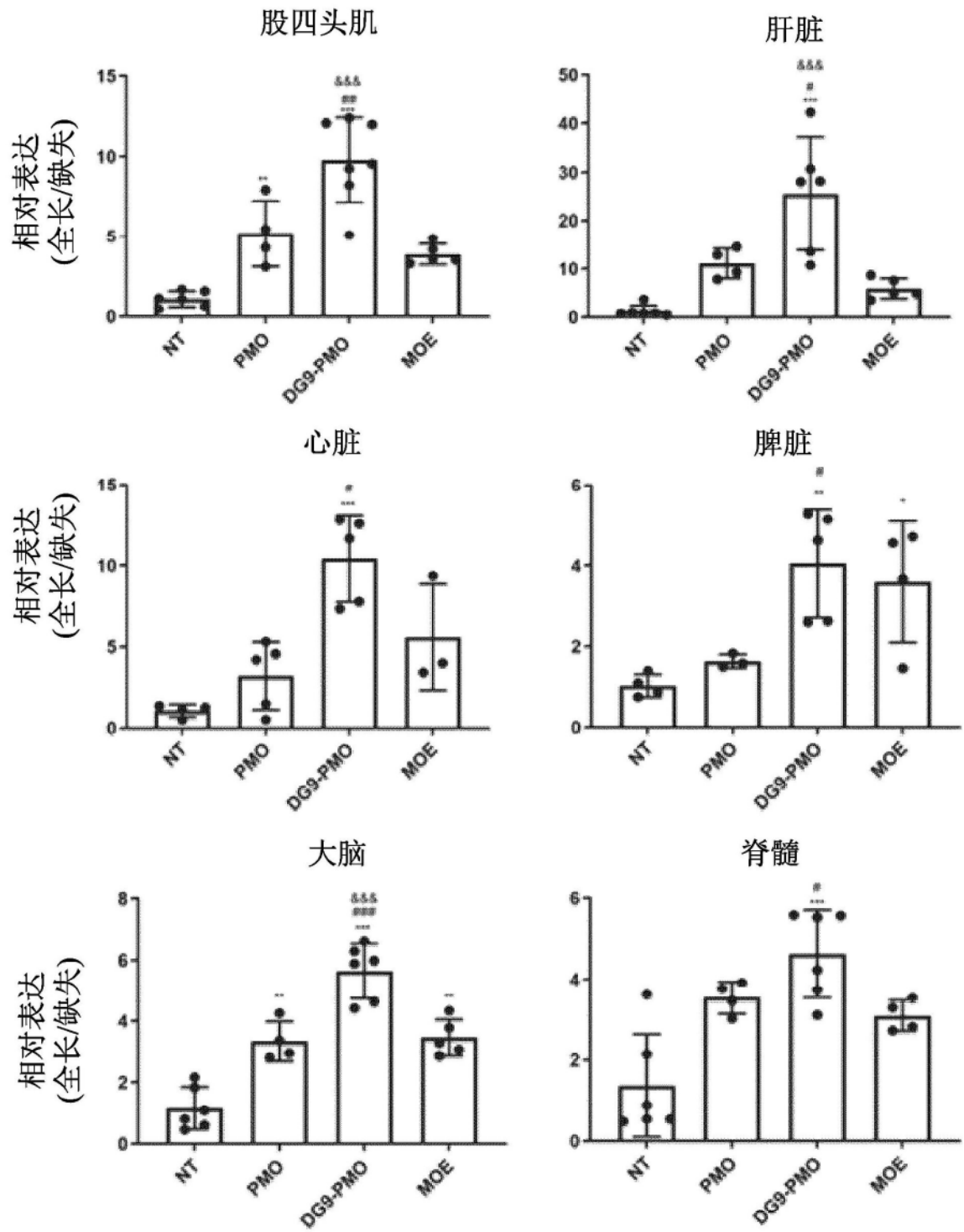
A

图10

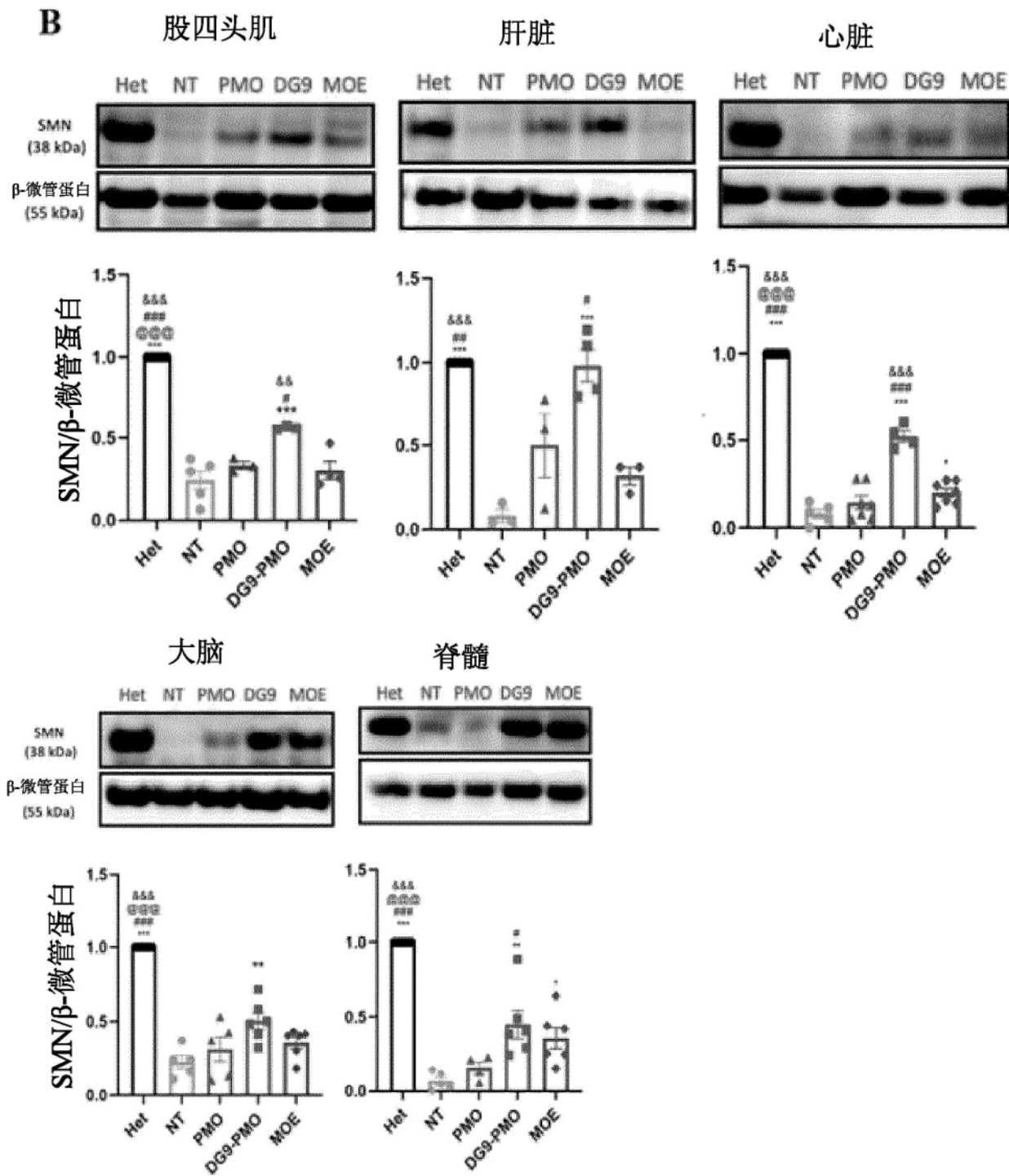


图10(续)

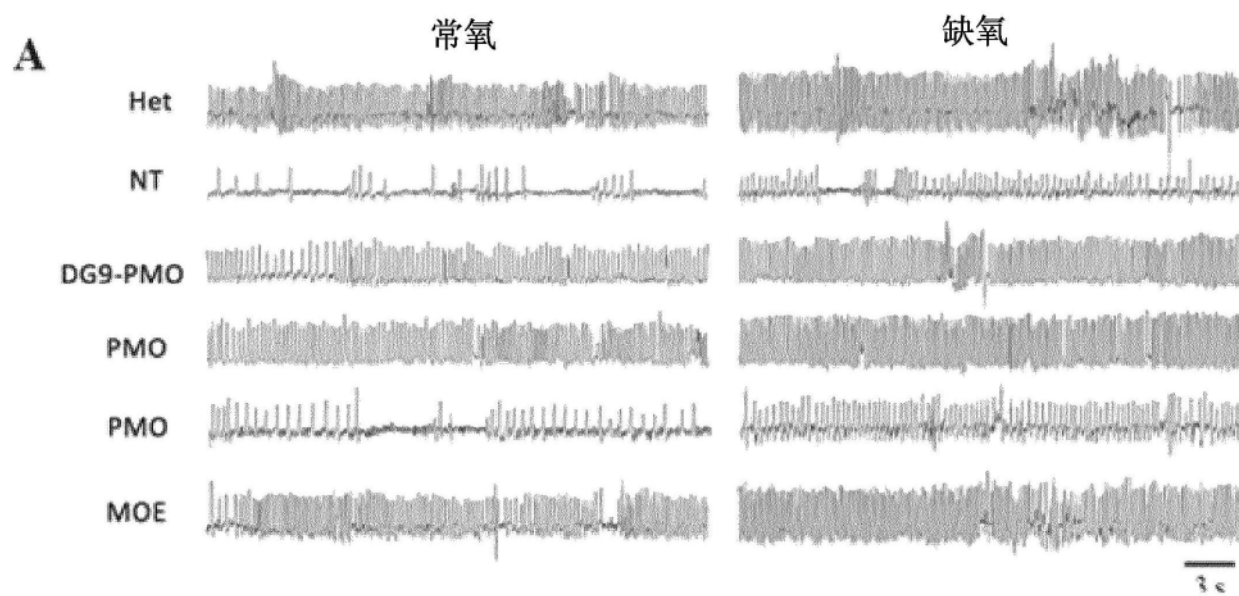


图11

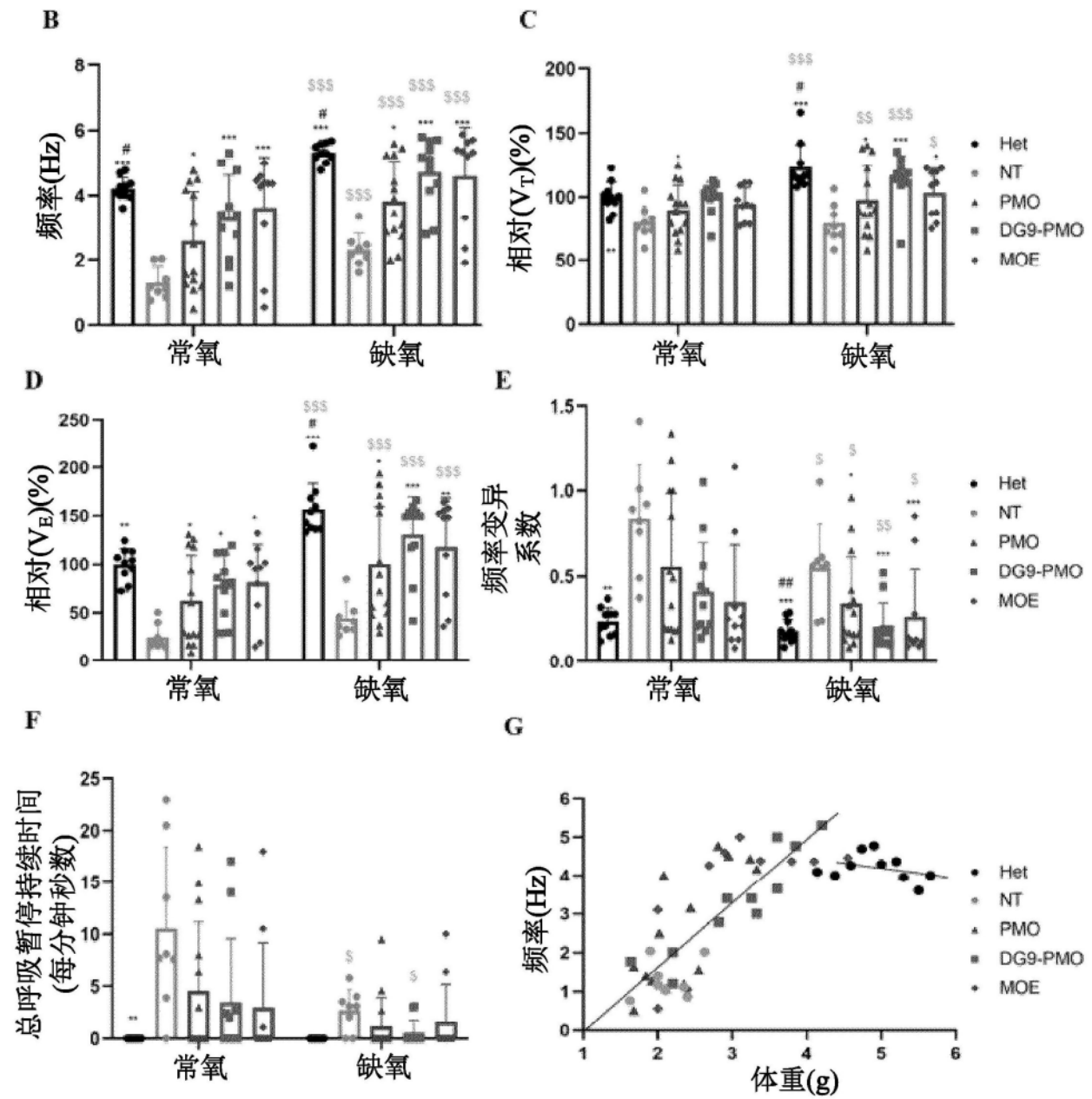


图11(续)

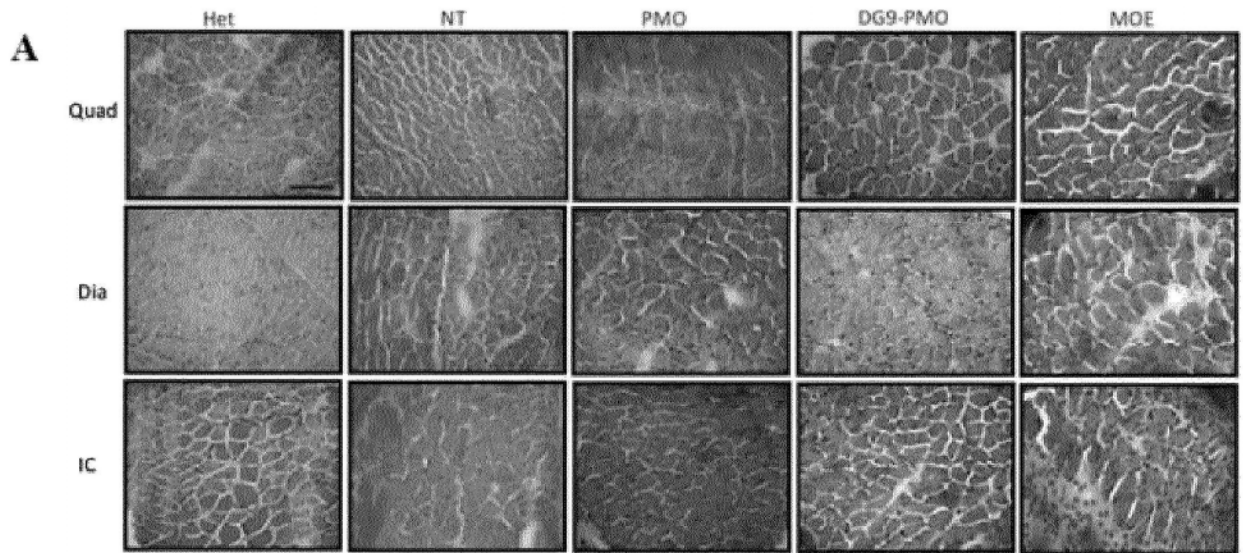


图12

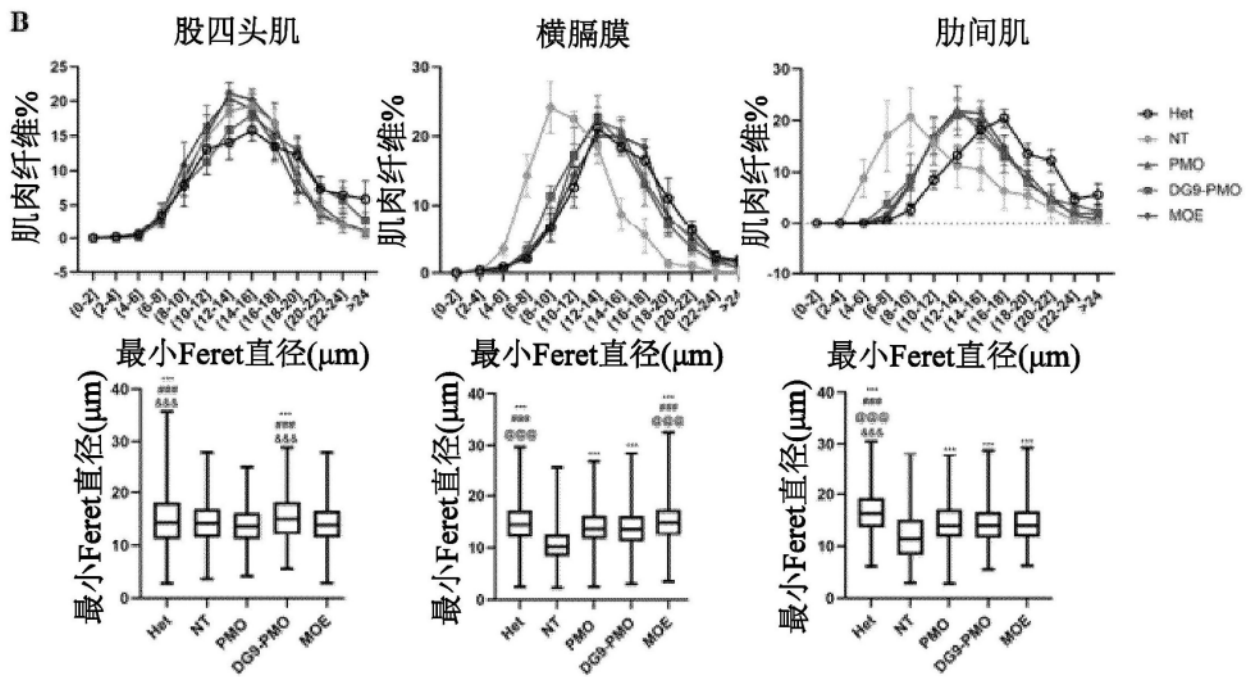


图12(续)

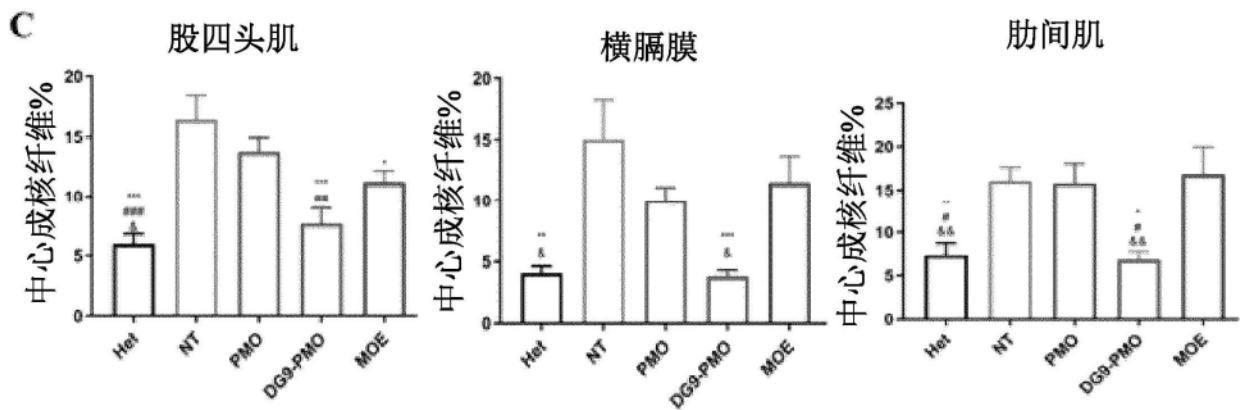


图12(续)

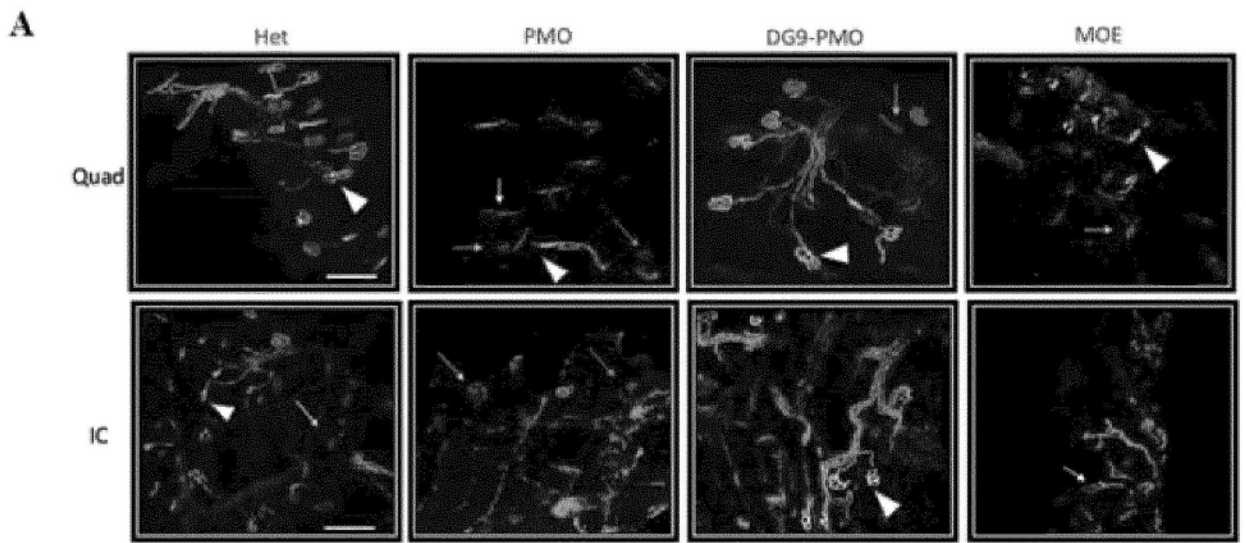


图13

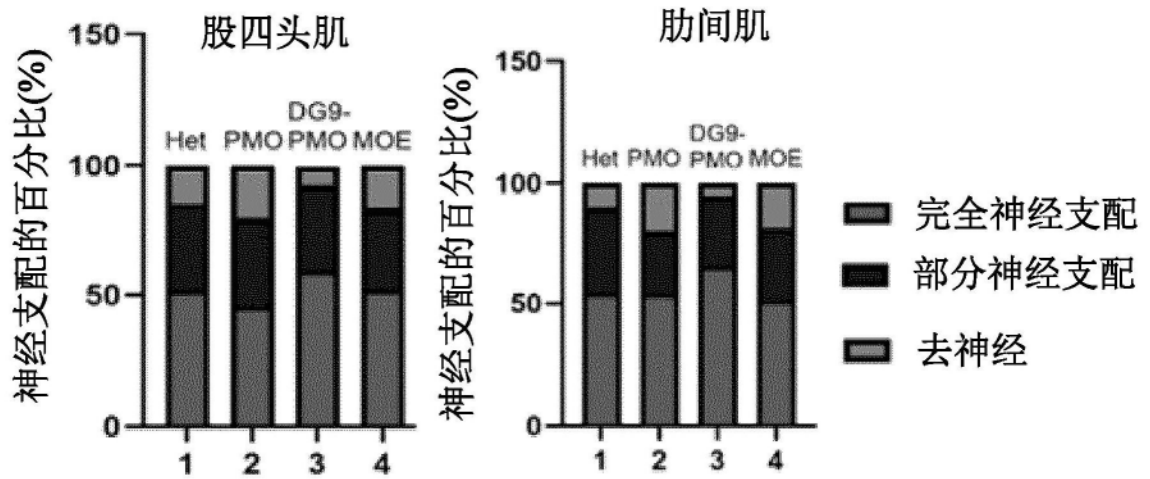
B

图13 (续)

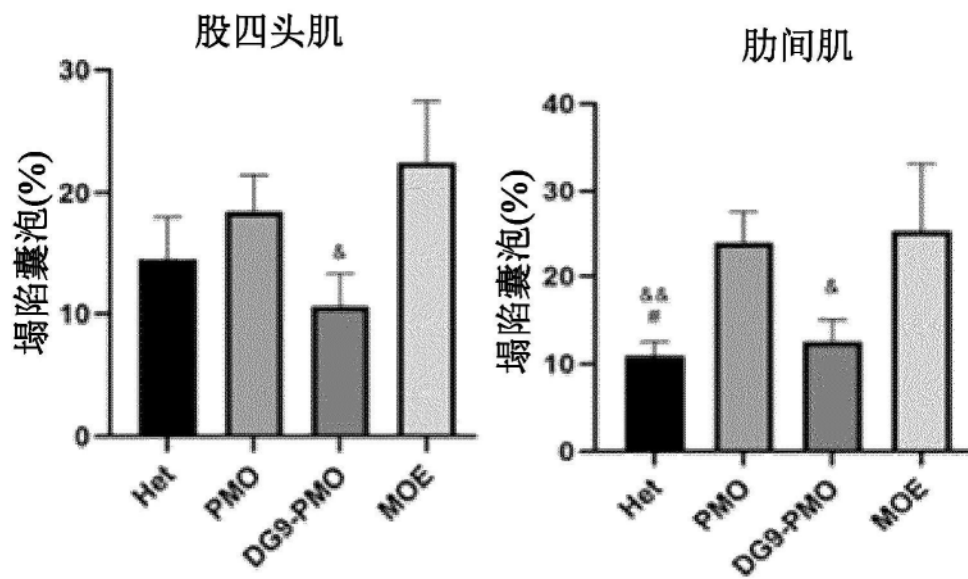
C

图13 (续)

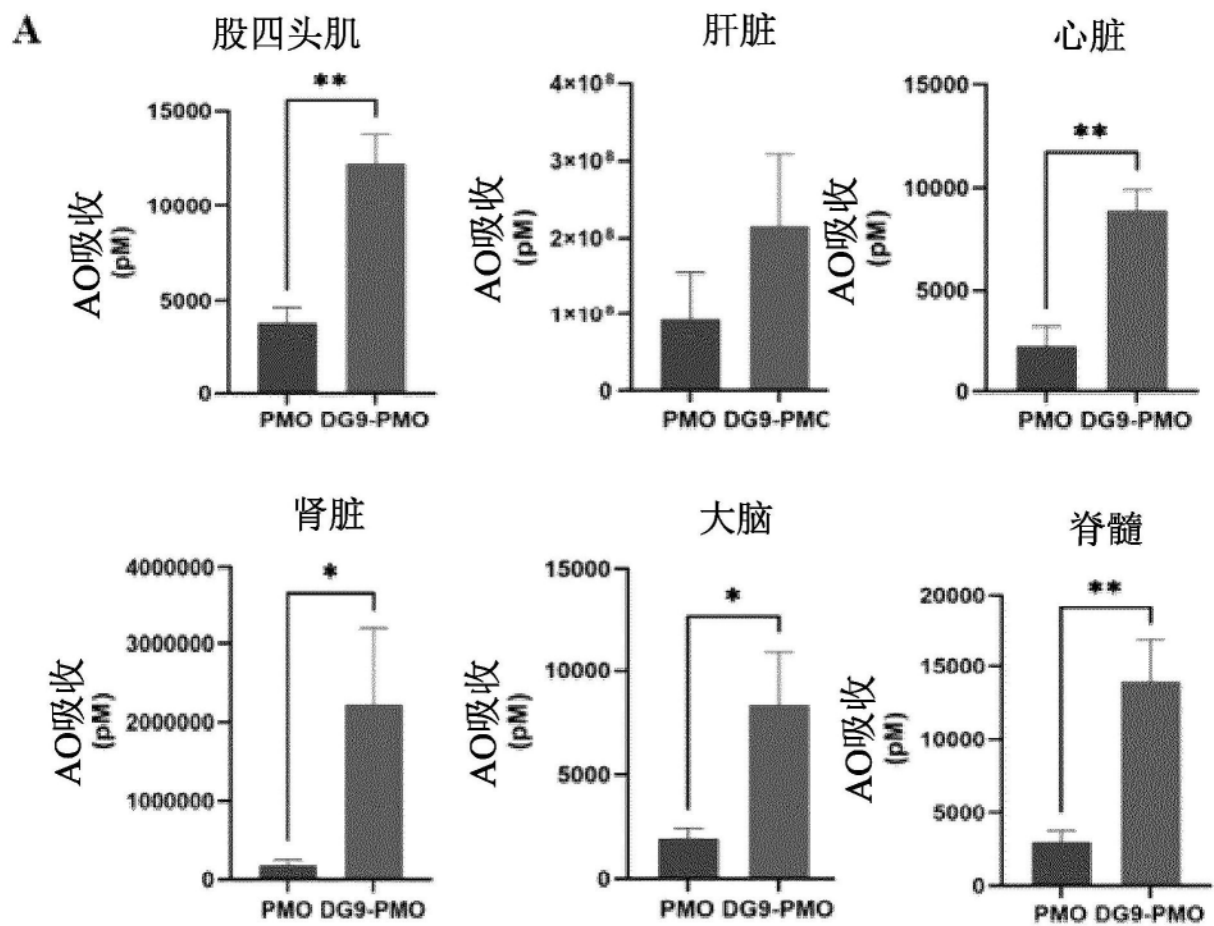


图14

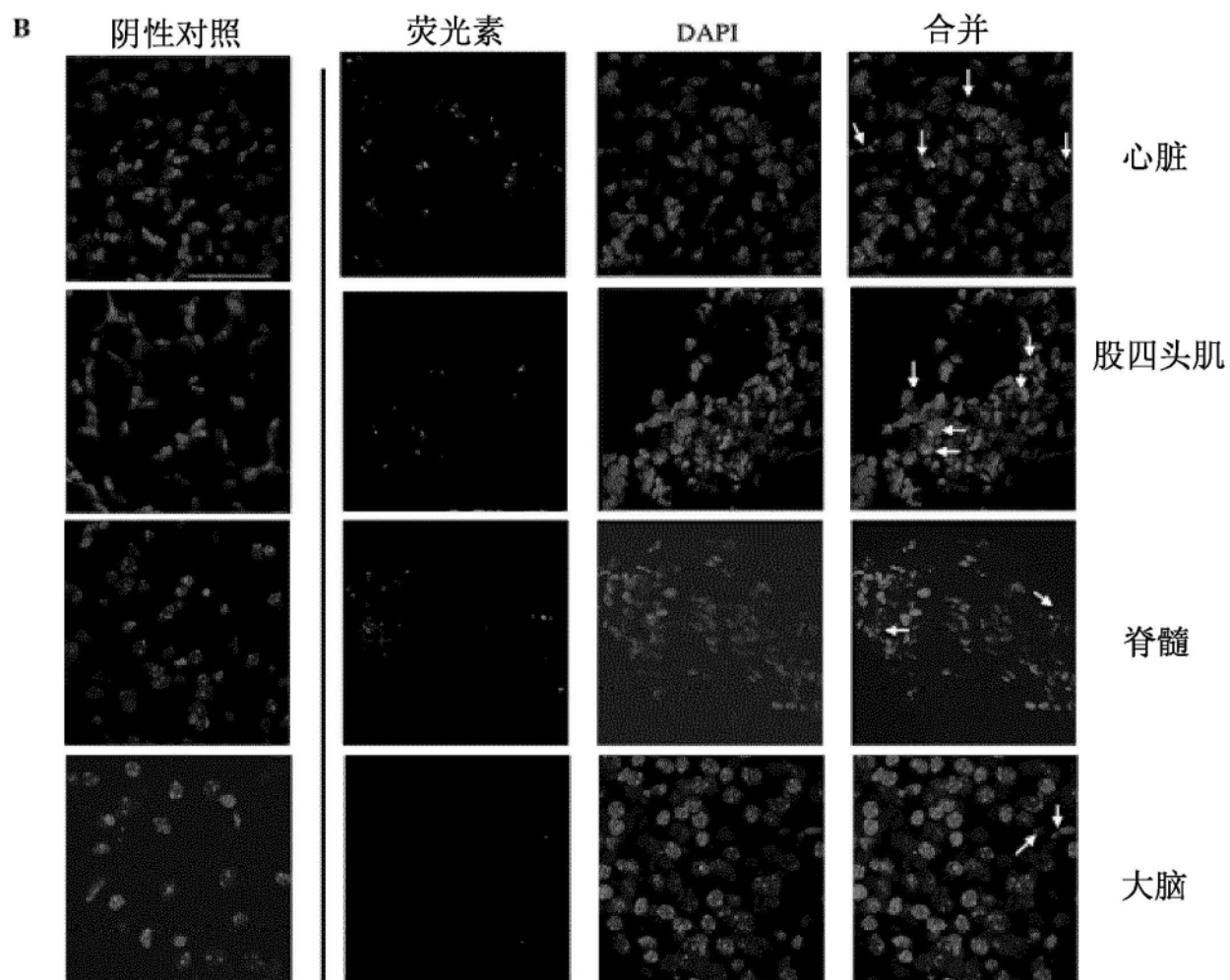


图14(续)

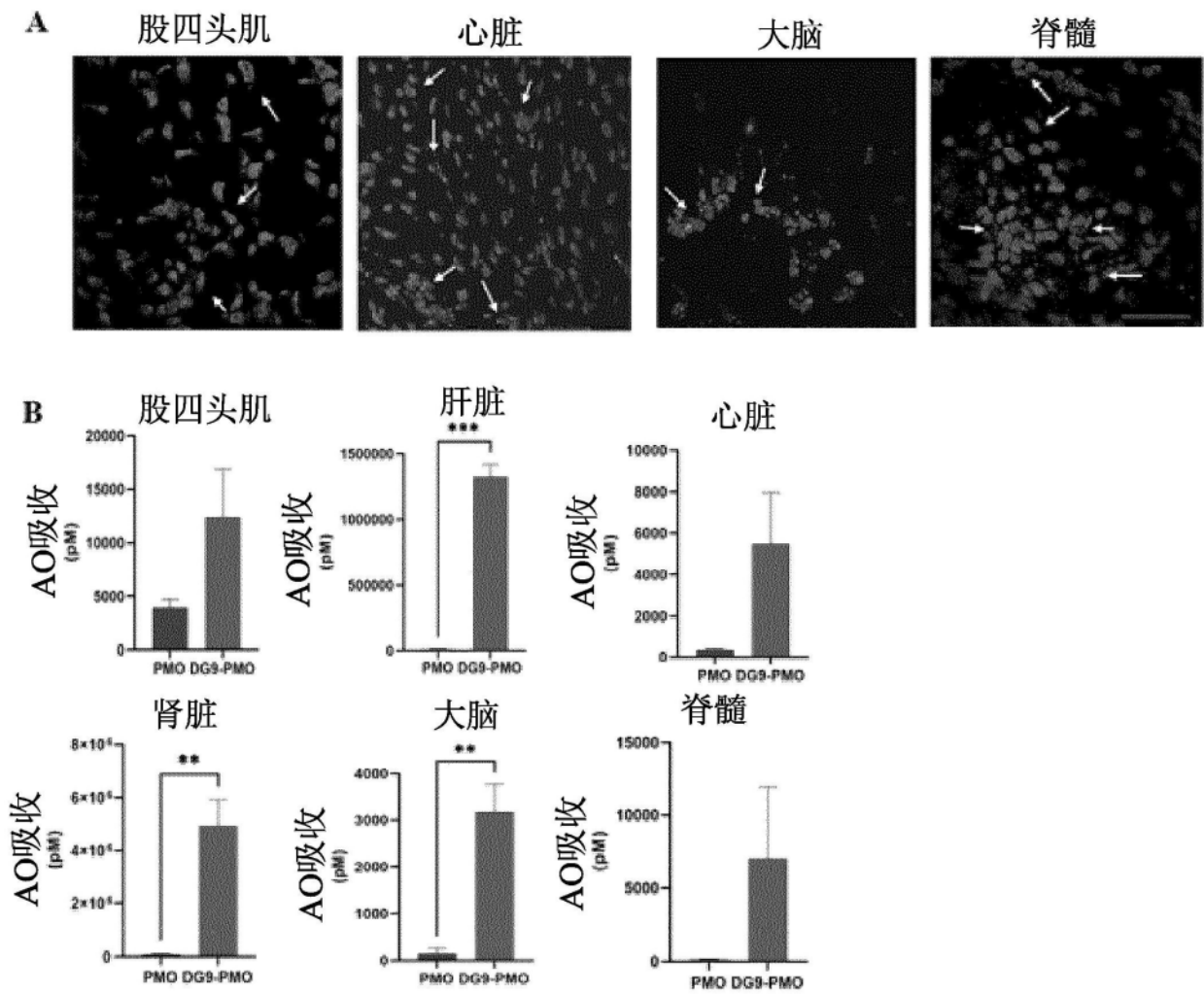


图15

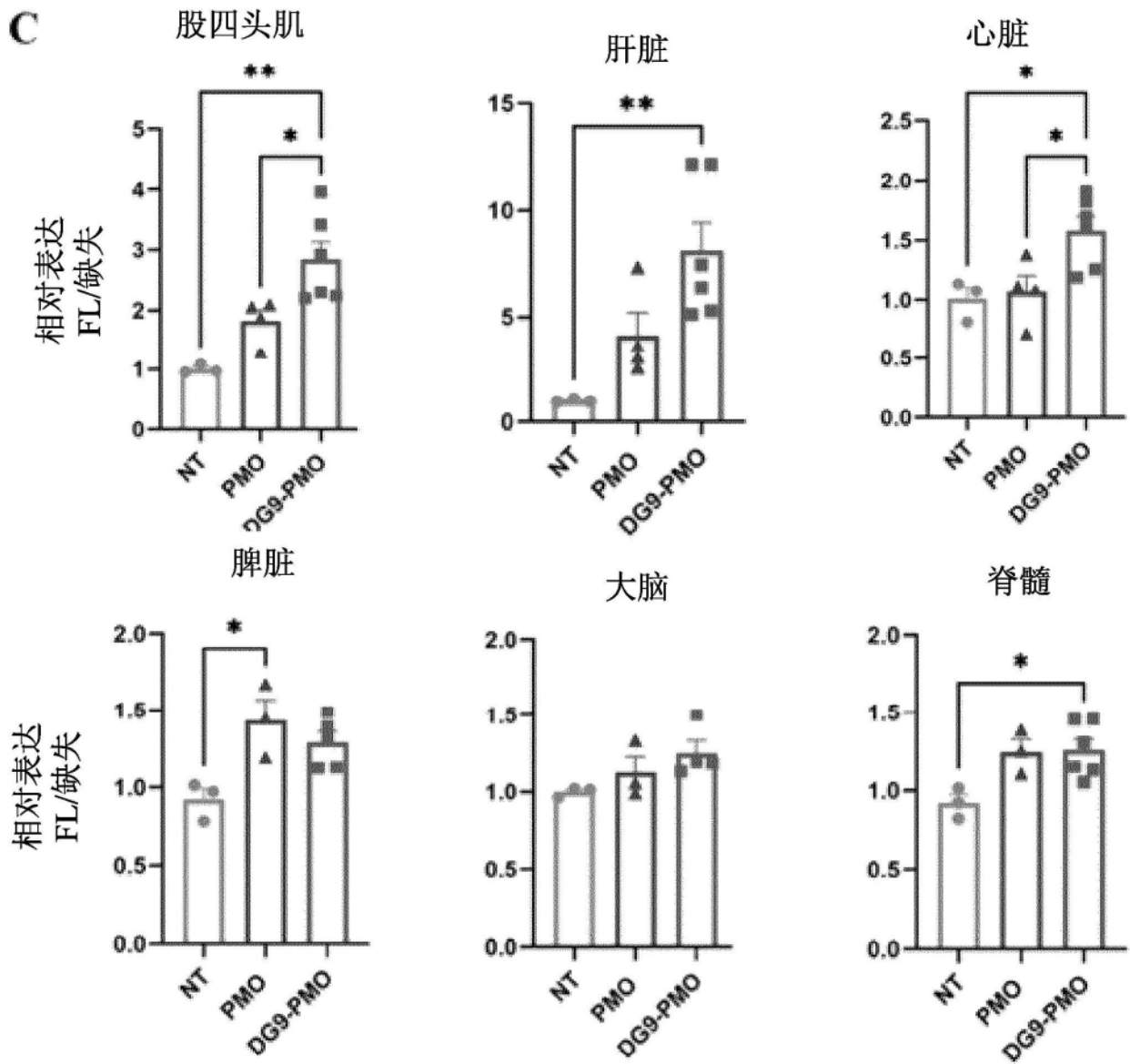


图15(续)

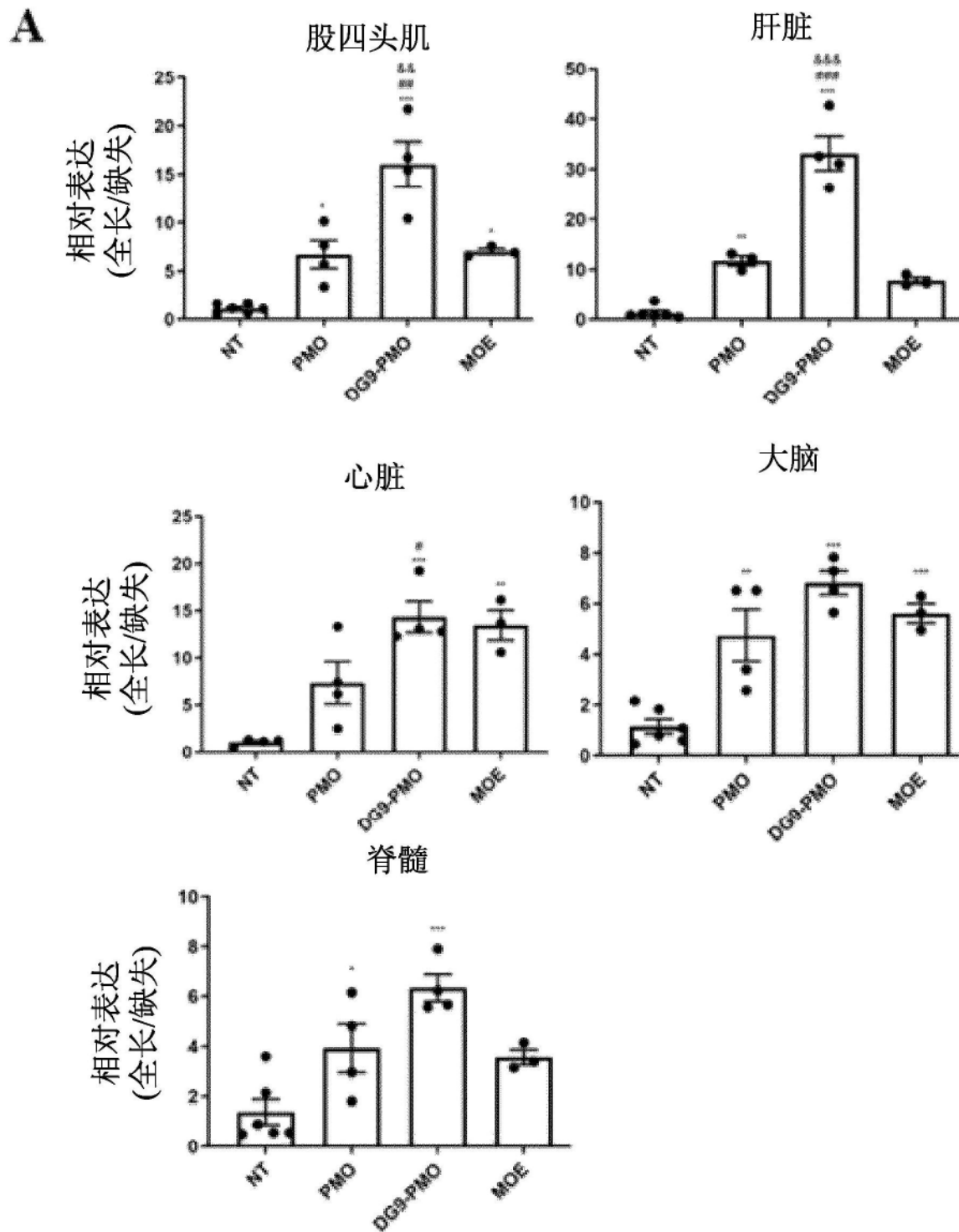


图16

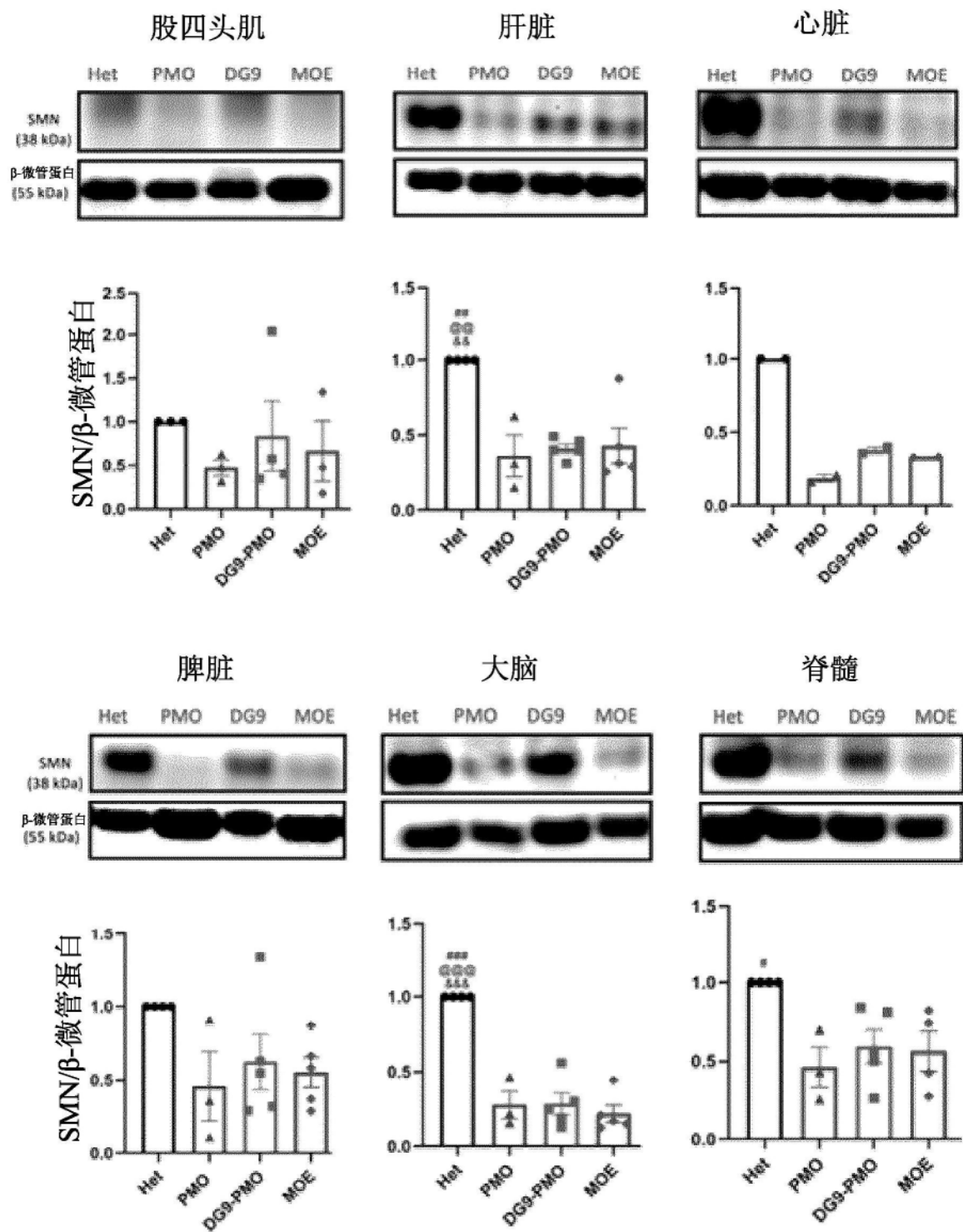
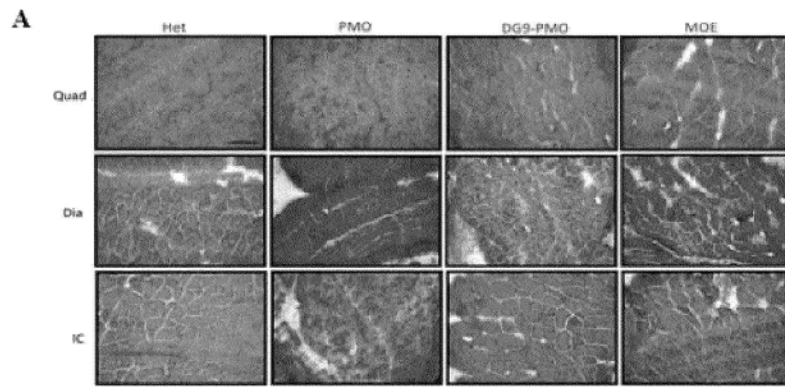


图17



图

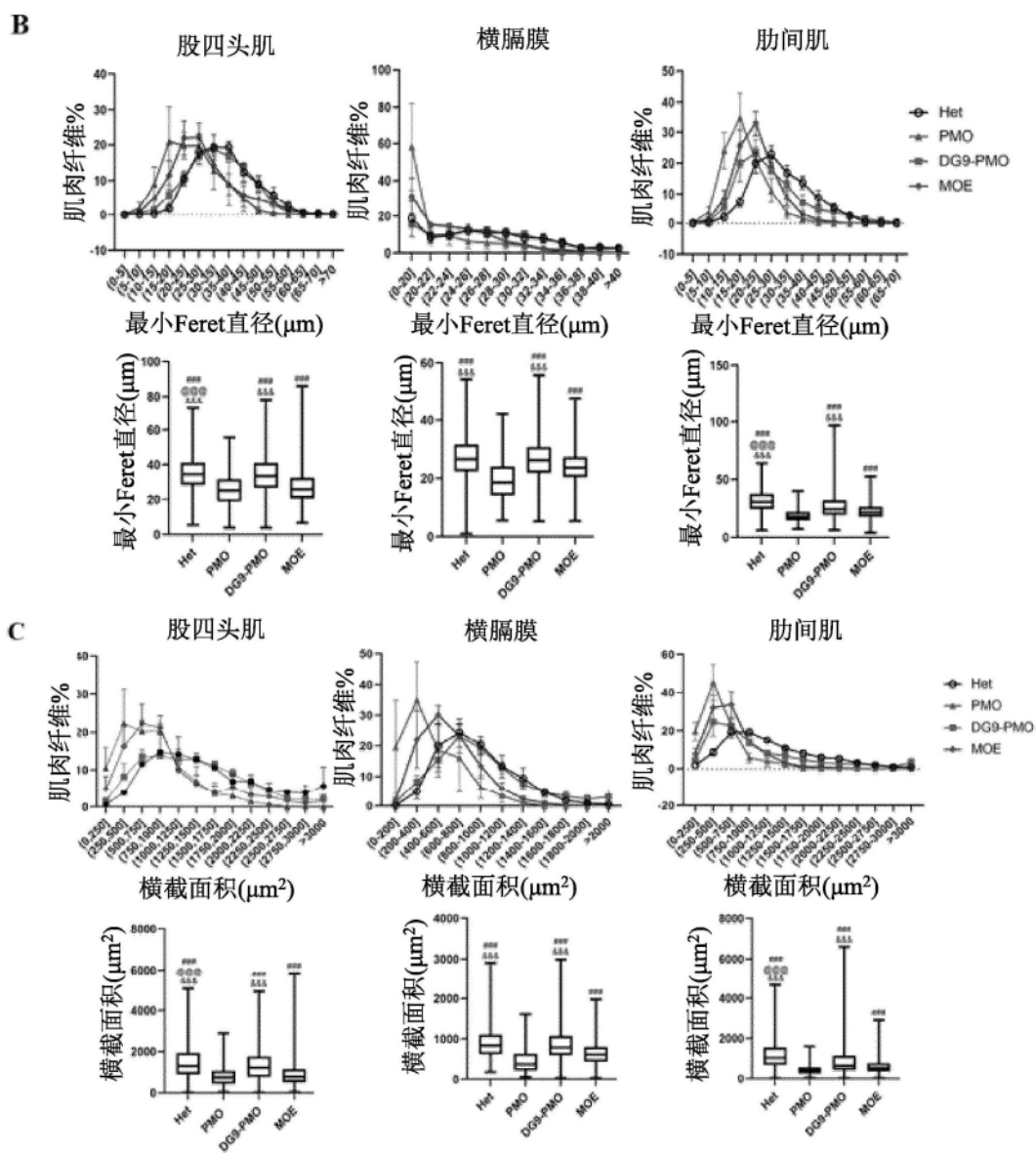


图20(续)

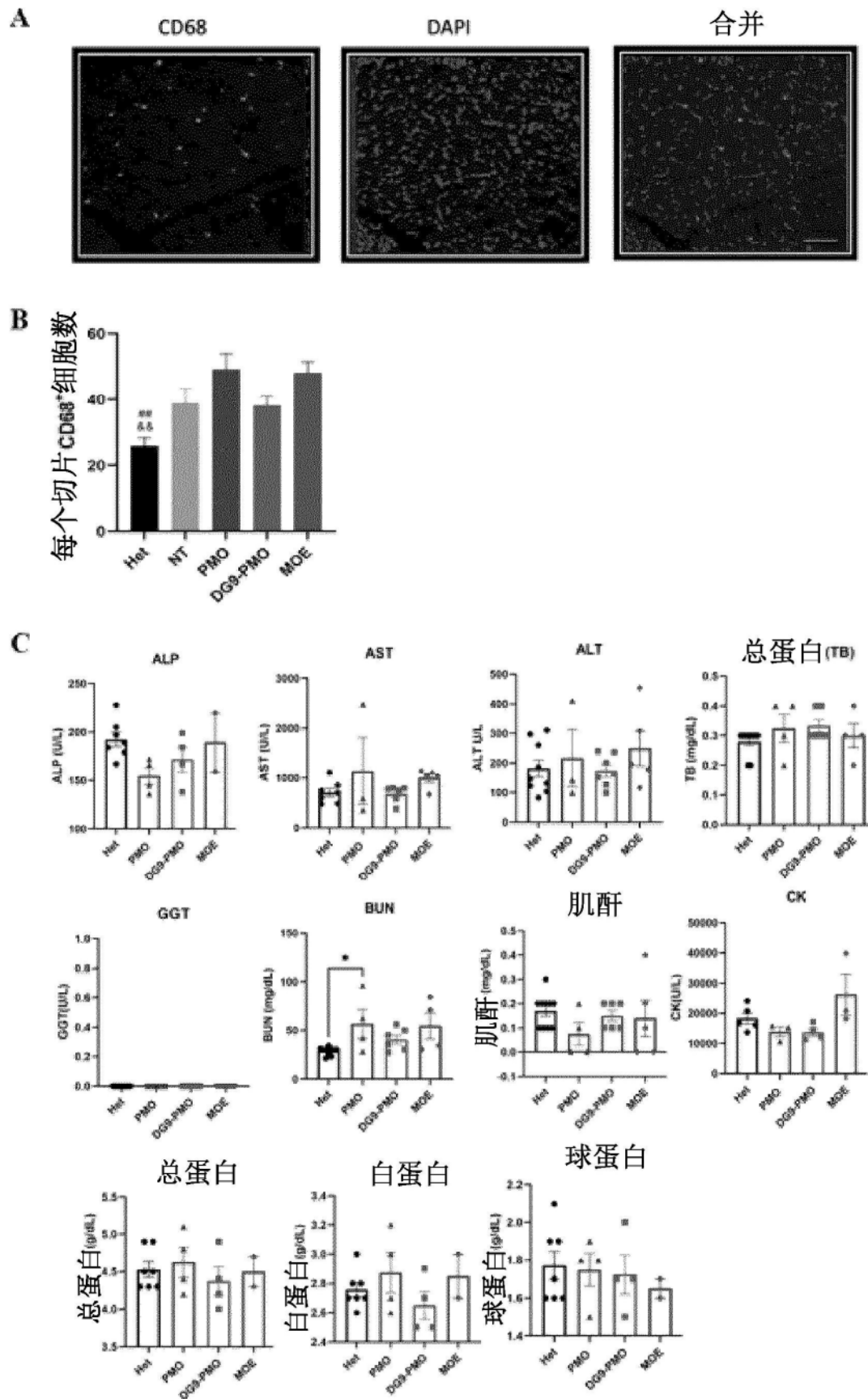


图21

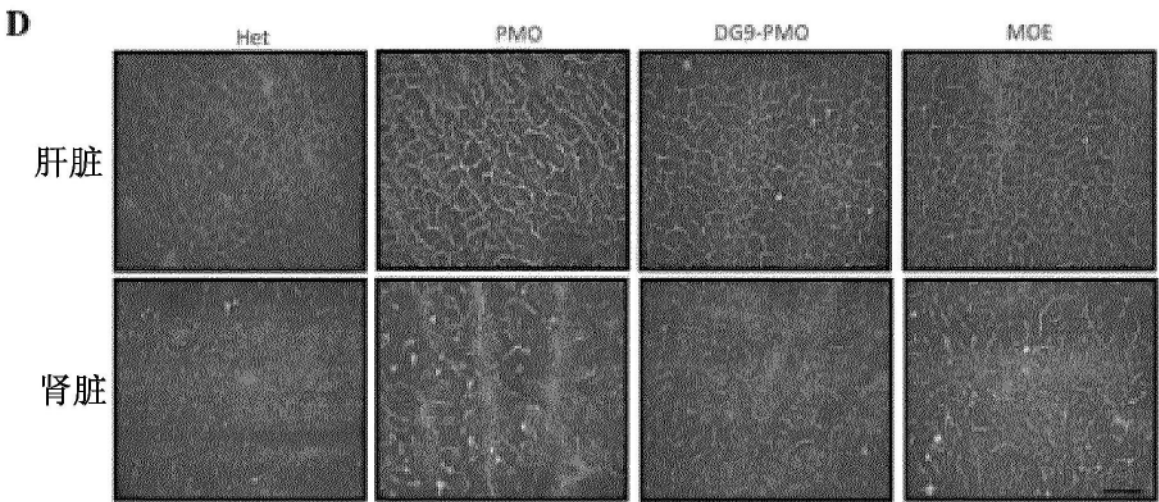


图21(续)

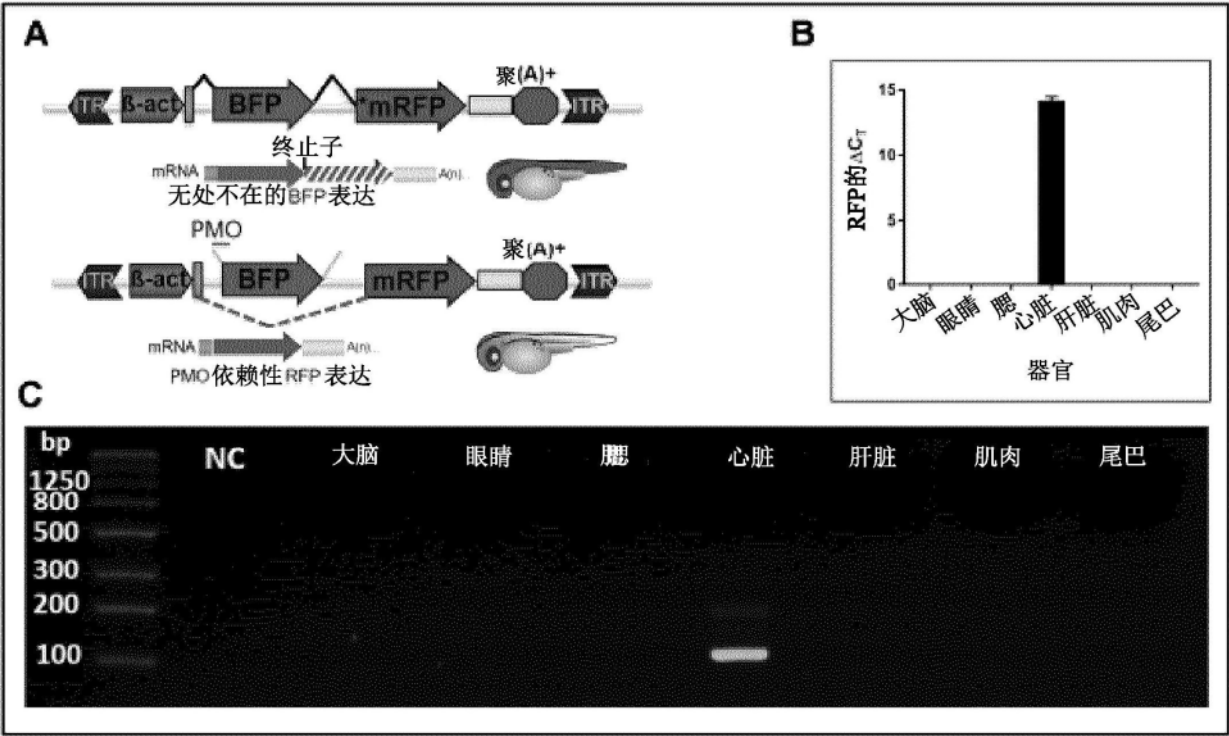


图22

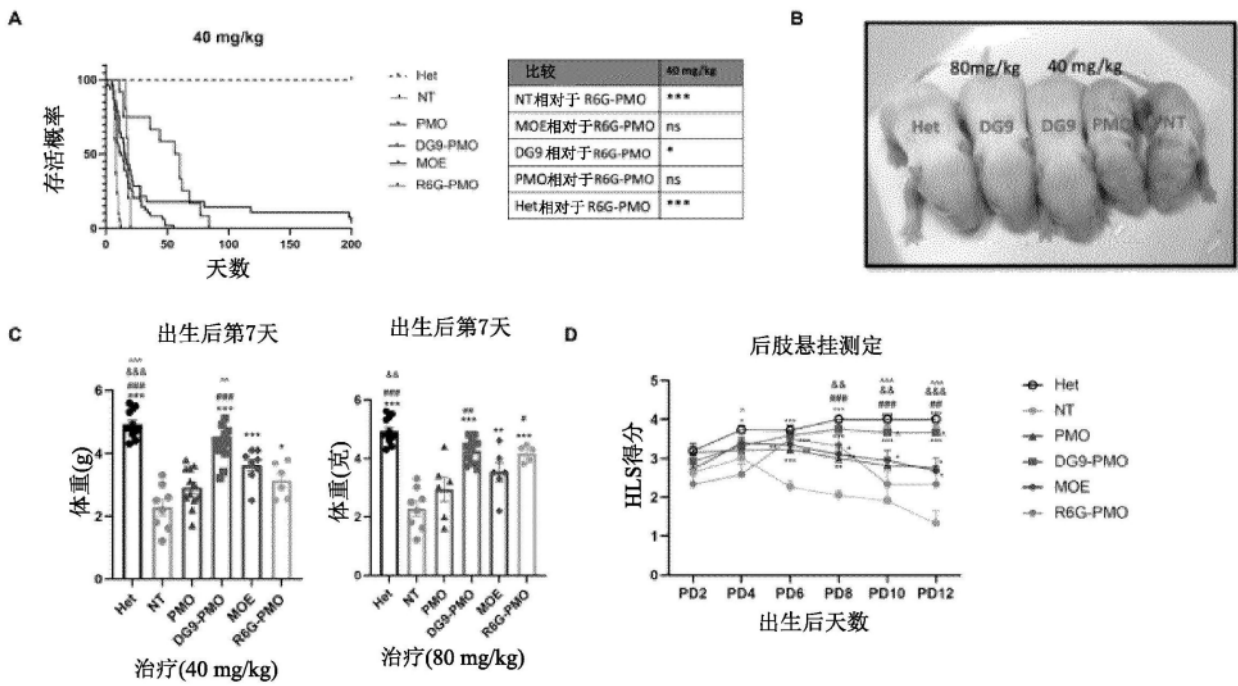


图23

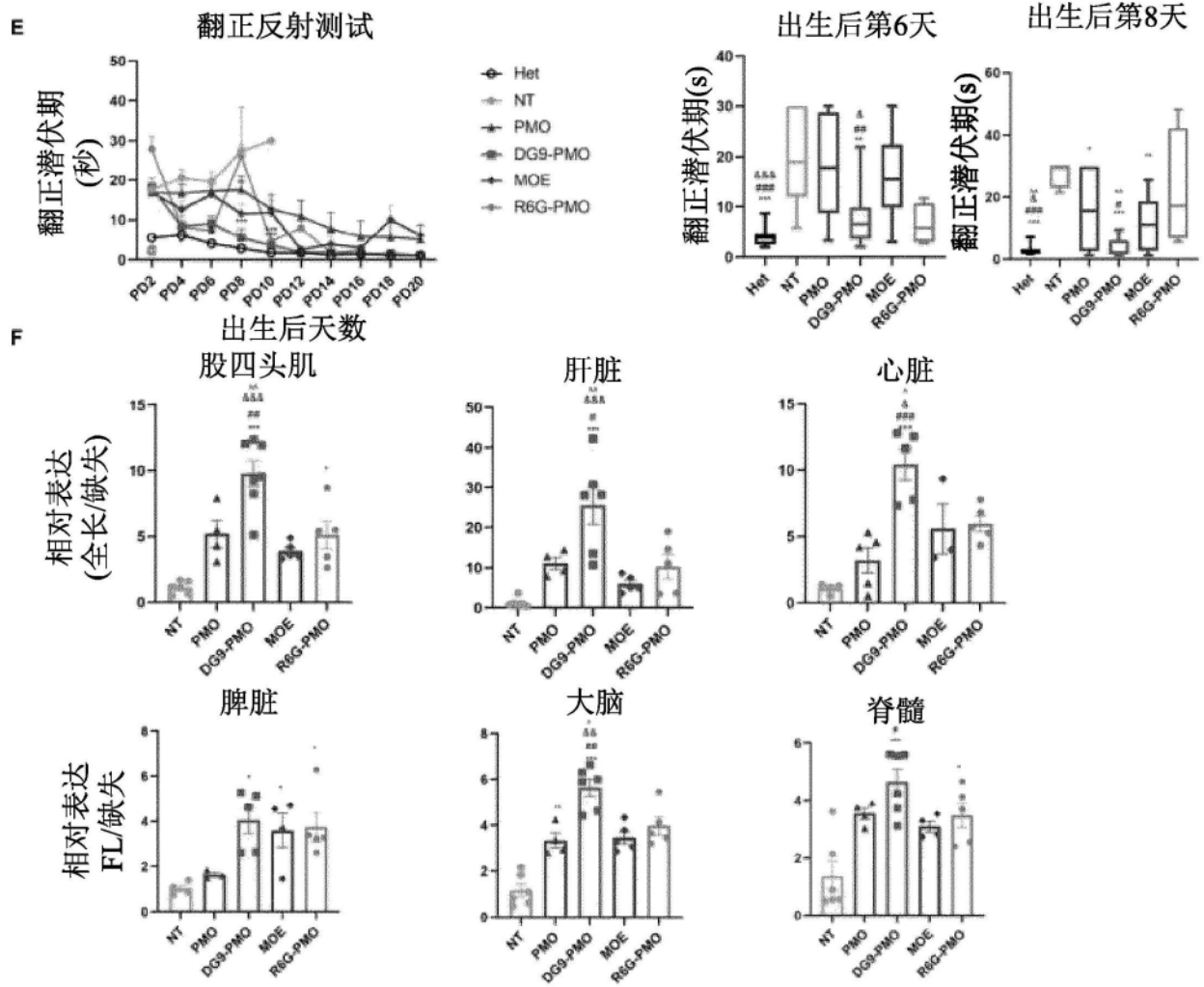


图23(续)