



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102203253 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 06

(21) 申请号 200980142321. 2

W0 2007/133812 A2, 2007. 11. 22,

(22) 申请日 2009. 10. 23

W0 2004/083446 A2, 2004. 09. 30,

(30) 优先权数据

审查员 王莉

61/108, 416 2008. 10. 24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 04. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/061960 2009. 10. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/048586 EN 2010. 04. 29

(73) 专利权人 萨雷普塔治疗公司

地址 美国俄勒冈州

(72) 发明人 彼得·萨扎尼 瑞斯扎德·科勒

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2006/000057 A1, 2006. 01. 05,

权利要求书2页 说明书60页

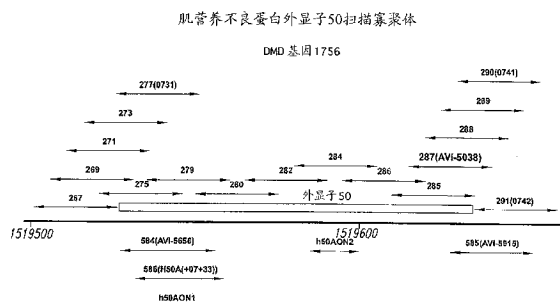
序列表125页 附图36页

(54) 发明名称

用于 DMD 的多外显子跳跃组合物

(57) 摘要

提供了能够结合人肌营养不良蛋白基因中特定的靶位点以便诱导外显子跳跃的反义分子, 和使用其治疗肌营养不良的方法。



1. 吗啉代寡聚体, 含有 20-35 个通过不带电磷酸二氨酯亚基间连接而连接的吗啉代亚基, 所述连接将一个亚基的嗎啉代氮与相邻亚基的 5' 环外碳连接, 其中所述嗎啉代寡聚体包含 SEQ ID NOS:287、290 或 291 所示的碱基序列, 其中所述嗎啉代寡聚体与人肌营养不良蛋白的 mRNA 前体结合以诱导外显子 50 跳跃。

2. 如权利要求 1 所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体包含由 SEQ ID NOS:287 组成的碱基序列。

3. 如权利要求 1 所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体包含由 SEQ ID NOS:290 组成的碱基序列。

4. 如权利要求 1 所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体包含由 SEQ ID NOS:291 组成的碱基序列。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的嗎啉代寡聚体, 其具有尿嘧啶碱基 (U) 代替胸腺嘧啶碱基 (T)。

6. 如权利要求 1-4 中任一项所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体与具有选自 SEQ ID NOS:570-578 的序列的富含精氨酸的肽偶联。

7. 如权利要求 1-4 中任一项所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体与增强所述嗎啉代寡聚体在水性介质中溶解度的部分偶联, 其中所述嗎啉代寡聚体任选地通过连接体部分与溶解度增强部分偶联。

8. 如权利要求 1-4 中任一项所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体与聚乙二醇部分偶联。

9. 如权利要求 1-4 中任一项所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体与三乙二醇部分偶联。

10. 如权利要求 7 所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述寡核苷酸通过连接体部分与与溶解度增强部分偶联, 并且其中所述连接体部分是哌嗪部分。

11. 如权利要求 1 所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体包含 SEQ ID NO:287 所示的碱基序列, 并且其中所述嗎啉代寡聚体通过哌嗪部分与三乙二醇部分偶联。

12. 如权利要求 11 所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体与具有选自 SEQ ID NOS:570-578 的序列的富含精氨酸的肽偶联。

13. 如权利要求 1 所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体包含 SEQ ID NO:290 所示的碱基序列, 并且其中所述嗎啉代寡聚体通过哌嗪部分与三乙二醇部分偶联。

14. 如权利要求 13 所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体与具有选自 SEQ ID NOS:570-578 的序列的富含精氨酸的肽偶联。

15. 如权利要求 1 所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体包含 SEQ ID NO:291 所示的碱基序列, 并且其中所述嗎啉代寡聚体通过哌嗪部分与三乙二醇部分偶联。

16. 如权利要求 15 所述的嗎啉代寡聚体, 其中所述嗎啉代寡聚体与具有选自 SEQ ID NOS:570-578 的序列的富含精氨酸的肽偶联。

17. 组合物, 其包含 (i) 权利要求 1-4 中任一项所述的嗎啉代寡聚体和 (ii) 药学上可接受的载体。

18. 组合物, 其包含 (i) 嗎啉代寡聚体, 含有 20-35 个通过不带电磷酸二氨酯亚基间连接而连接的嗎啉代亚基, 所述连接将一个亚基的嗎啉代氮与相邻亚基的 5' 环外碳连接, 其

中所述吗啉代寡聚体包含 SEQ ID NO:287 所示的碱基序列,其中所述吗啉代寡聚体与人肌营养不良蛋白的 mRNA 前体结合以诱导外显子 50 跳跃,并且其中所述吗啉代寡聚体通过嘧啶部分与三乙二醇部分偶联;和 (ii) 药学上可接受的载体。

19. 组合物,其包含 (i) 吗啉代寡聚体,含有 20-35 个通过不带电磷酸二氨酯亚基间连接而连接的吗啉代亚基,所述连接将一个亚基的吗啉代氮与相邻亚基的 5' 环外碳连接,其中所述吗啉代寡聚体包含 SEQ ID NO:290 所示的碱基序列,其中所述吗啉代寡聚体与人肌营养不良蛋白的 mRNA 前体结合以诱导外显子 50 跳跃,并且其中所述吗啉代寡聚体通过嘧啶部分与三乙二醇部分偶联;和 (ii) 药学上可接受的载体。

20. 组合物,其包含 (i) 吗啉代寡聚体,含有 20-35 个通过不带电磷酸二氨酯亚基间连接而连接的吗啉代亚基,所述连接将一个亚基的吗啉代氮与相邻亚基的 5' 环外碳连接,其中所述吗啉代寡聚体包含 SEQ ID NO:291 所示的碱基序列,其中所述吗啉代寡聚体与人肌营养不良蛋白的 mRNA 前体结合以诱导外显子 50 跳跃,并且其中所述吗啉代寡聚体通过嘧啶部分与三乙二醇部分偶联;和 (ii) 药学上可接受的载体。

21. 权利要求 1-4 中任一项所述的吗啉代寡聚体在制备用于在人肌营养不良蛋白基因预加工的 mRNA 的加工中产生外显子跳跃的药物中的应用,其中所述外显子为外显子 50。

22. 权利要求 11 所述的吗啉代寡聚体在制备用于在人肌营养不良蛋白基因预加工的 mRNA 的加工中产生外显子跳跃的药物中的应用,其中所述外显子为外显子 50。

23. 权利要求 13 所述的吗啉代寡聚体在制备用于在人肌营养不良蛋白基因预加工的 mRNA 的加工中产生外显子跳跃的药物中的应用,其中所述外显子为外显子 50。

24. 权利要求 15 所述的吗啉代寡聚体在制备用于在人肌营养不良蛋白基因预加工的 mRNA 的加工中产生外显子跳跃的药物中的应用,其中所述外显子为外显子 50。

25. 权利要求 1-4 中任一项所述的吗啉代寡聚体在制备用于治疗肌营养不良的药物中的应用。

26. 如权利要求 25 所述的应用,其中所述肌营养不良是杜兴肌营养不良 (DMD)。

27. 权利要求 17 所述的组合物在制备用于治疗肌营养不良的药物中的应用。

28. 权利要求 18 所述的组合物在制备用于治疗肌营养不良的药物中的应用。

29. 权利要求 19 所述的组合物在制备用于治疗肌营养不良的药物中的应用。

30. 权利要求 20 所述的组合物在制备用于治疗肌营养不良的药物中的应用。

31. 权利要求 11 所述的吗啉代寡聚体在制备用于治疗杜兴肌营养不良 (DMD) 的药物中的应用。

32. 权利要求 13 所述的吗啉代寡聚体在制备用于治疗杜兴肌营养不良 (DMD) 的药物中的应用。

33. 权利要求 15 所述的吗啉代寡聚体在制备用于治疗杜兴肌营养不良 (DMD) 的药物中的应用。

用于 DMD 的多外显子跳跃组合物

[0001] 引用的相关申请

[0002] 按照 35 U.S.C. § 119(e) 的规定,本申请要求 2008 年 10 月 24 日提交的美国临时专利申请第 61/108,416 号的优先权,其中该临时申请通过引用整体并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 本申请提供了文本格式的相关序列表用于替代纸件拷贝,这些序列表通过引用并入本说明书中。含有这些序列表的文本文件的名称是 120178_410PC_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件为 156KB,于 2009 年 10 月 23 日创建,是通过 EFS-Web 以电子方式提交。

发明领域

[0005] 本申请涉及适合促进人肌营养不良蛋白基因的外显子跳跃的新反义化合物和组合物。还提供了使用适合用于本发明方法的反义组合物诱导外显子跳跃的方法。

[0006] 发明背景

[0007] 使用多种化学制剂在不同水平上(转录、剪接、稳定性、翻译)影响基因表达,发展了反义技术。这类研究中有许多在指征的宽泛范围内专注于使用反义化合物校正或补偿异常或疾病相关基因。反义分子能够特异性地抑制基因表达,因此,许多研究,其致力于作为基因表达调节剂的寡核苷酸,已关注于抑制靶向基因(targeted gene)的表达或顺式作用元件的功能。在一些病毒 RNA 靶标的情况下,反义寡核苷酸通常针对 RNA,或正义链(如 mRNA)或是负链。为了实现特定基因减量调节的期望效果,寡核苷酸通常促进靶向 mRNA 的降解,阻断 mRNA 的翻译或阻断顺式作用 RNA 元件的功能,由此有效地防止靶蛋白的从头合成或病毒 RNA 的复制。

[0008] 然而,如果目的是上调天然蛋白的产生或补偿诱导翻译的提前终止的突变,例如无义或移码突变,则这些技术不起作用。在这些情况中,缺陷型基因转录物不会进行靶向降解(targeted degradation)或空间抑制,所以反义寡核苷酸化学制剂不会促进靶 mRNA 降解或阻断翻译。

[0009] 在许多遗传疾病中,突变对基因最终表达的影响可通过剪接过程中靶向外显子跳跃的过程进行调节。该剪接过程受复杂多成分机制的指导,该机制使 mRNA 前体(pre-mRNA)中的相邻外显子-内含子连接紧密相连并切割内含子末端的磷酸二酯键,伴随着它们在要剪接在一起的外显子之间的后续改造。这个复杂且高度精确过程是通过 mRNA 前体中的序列基元介导的,所述序列基元是相对半保守的 RNA 片段,参与之后剪接反应的许多核剪接因子都与其结合。通过改变剪接机制读取或识别参与 mRNA 前体加工的基元的方式,可以产生差异化的剪接 mRNA 分子。现在已认识到大部分人基因在正常基因表达过程中可选地剪接,尽管仍未鉴定出相关机制。

[0010] 在正常功能蛋白因突变而提前终止的情况中,通过反义技术恢复一些功能蛋白产生的方式已经表明,在剪接过程通过干扰是可能的,并且如果与致病突变相关的外显子可被从一些基因中特异性地缺失,则有时会产生缩短的蛋白产物,其具有与天然蛋白相似的生物特性或具有足以改善由与外显子相关的突变导致的疾病的生物活性(Sierakowska,

Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Aartsma-Rus, Janson et al. 2004)。Kole 等(美国专利第 5,627,274 号、第 5,916,808 号、第 5,976,879 号以及第 5,665,593 号)公开了使用不会促进靶向 mRNA 前体降解的修饰的反义寡核苷酸类似物与异常剪接斗争的方法。Bennett 等(美国专利第 6,210,892 号)描述了野生型细胞 mRNA 加工的反义调控也使用不会诱导 RNase H- 介导的靶 RNA 切割的反义寡核苷酸类似物。

[0011] 靶向外显子跳跃的过程可能特别可用于长基因,在所述长基因中,有许多外显子和内含子,有多余的外显子的基因组成或蛋白无需一个或多个特定外显子就能够发挥功能。使基因加工重定向用于治疗与各种基因中的突变所导致的截短相关的遗传疾病的努力,致力于使用以下反义寡核苷酸:其(1)与参与剪接过程的元件完全或部分重叠;或(2)在足够接近元件位置上与 mRNA 前体结合以阻止正常介导在该元件中发生的特定剪接反应的剪接因子的结合和功能。

[0012] 杜兴肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是由于肌营养不良蛋白表达上的缺陷导致的。编码该蛋白的基因含有遍布于超过 2 百万个核苷酸的 DNA 中的 79 个外显子。任何外显子突变,会改变外显子读码框(reading frame),或引入终止密码子,或特征在于去除完整的框外外显子或多个外显子或一个或多个外显子的副本,因此都可能有潜力干扰功能性肌营养不良蛋白的产生,从而导致 DMD。

[0013] 肌营养不良不太严重的形式是贝克肌营养不良(Becker muscular dystrophy, BMD),据发现,其发生的原因在于,突变通常是一个或多个外显子的缺失导致沿着整个肌营养不良蛋白转录物的正确读码框,使得 mRNA 翻译为蛋白不会提前终止。如果在突变的肌营养不良蛋白 mRNA 前体加工中,上游和下游外显子的连接保持了基因的正确读码框,则结果是编码具有短的内部缺失的蛋白的 mRNA,所述蛋白保留了导致贝克表型的一些活性。

[0014] 一个外显子或多个外显子的缺失不会改变肌营养不良蛋白的读码框,但会引起 BMD 表型,而导致移码的外显子缺失将引起 DMD(Monaco, Bertelson et al. 1988)。通常,肌营养不良蛋白突变包括改变读码框从而阻断正常蛋白翻译的点突变和外显子缺失,因而导致 DMD。还应该指出,一些 BMD 和 DMD 患者具有覆盖多个外显子的外显子缺失。

[0015] 尽管反义分子可以为治疗杜兴肌营养不良(DMD)提供工具,使用反义分子诱导外显子跳跃的尝试成效不一。使用定向于外显子内的侧翼接剪接位点或基元的多种反义分子成功实现了肌营养不良蛋白外显子 19 从肌营养不良蛋白 mRNA 前体的跳跃,所述外显子包含在如 Errington 等(Errington, Mann et al. 2003)所述的外显子定义中。

[0016] Wilton 等(Wilton, Lloyd et al. 1999)首次报道了在 mdx 小鼠模型中特异性的可重复的外显子跳跃的实例。通过使反义分子定向于供体剪接位点,在将培养的细胞处理 6 小时之内,在肌营养不良蛋白 mRNA 中诱导了外显子 23 跳跃。Wilton 等还描述了用更长的反义寡核苷酸靶向小鼠肌营养不良蛋白 mRNA 前体的受体区域。尽管定向于内含子 23 供体剪接位点的第一反义寡核苷酸诱导了原代培养的成肌细胞(primary cultured myoblast)中的外显子跳跃,但是发现该化合物在表达更高水平的肌营养不良蛋白的永生细胞培养物中效力低得多。

[0017] 尽管有这些努力,仍需要用于 DMD 治疗应用的靶向多个肌营养不良蛋白外显子的改善的反义寡聚体和改善的肌递送组合物和方法。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明的实施方案通常涉及能够结合选定的靶标以诱导外显子跳跃的反义化合物, 和使用所述反义化合物诱导外显子跳跃的方法。在某些实施方案中, 可以将本发明的两个或多个反义寡核苷酸组合在一起, 来诱导单个或多个外显子跳跃。

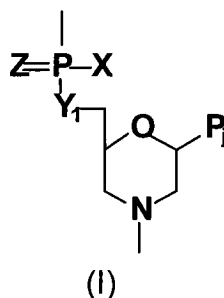
[0020] 在某些实施方案中, 可以通过将两个或多个反义寡核苷酸分子共价连接在一起, 改善单个或多个外显子的外显子跳跃 (参见例如 Aartsma-Rus, Janson et al. 2004)。

[0021] 在某些实施方案中, 本发明的反义化合物诱导了人肌营养不良蛋白基因中的外显子跳跃, 由此使得肌肉细胞产生功能性肌营养不良蛋白。

[0022] 本发明的反义寡核苷酸化合物 (在本文中也称为寡聚体) 通常: (i) 包含吗啉代亚基和将一个亚基的吗啉代氮与相邻亚基的 5' 环外碳连接的含磷亚基间连接, (ii) 含有 10-40 个碱基, 优选 20-35 个碱基, (iii) 包含可有效地与肌营养不良蛋白 mRNA 前体中靶序列的至少 12 个连续碱基交杂并诱导外显子跳跃的碱基序列。

[0023] 在某些实施方案中, 根据下述结构 (I), 本发明的反义化合物可包含含磷亚基间连接, 所述连接将一个亚基的吗啉代氮与相邻亚基的 5' 环外碳连接:

[0024]



[0025] 其中:

[0026] Y_1 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 或 $-CH_2-$;

[0027] Z 是 O 或 S ;

[0028] P_j 是通过碱基特异性氢键合有效地与多核苷酸碱基结合的嘌呤或嘧啶碱基对部分; 和

[0029] X 是氟, 任选地取代的烷基, 任选地取代的烷氧基, 任选地取代的硫代烷氧基, 氨基, 任选地取代的烷氨基, 或任选地取代的杂环基。

[0030] 在某些实施方案中, 不带电的上述亚基间连接可以散布着在生理 pH 中带正电荷的连接, 其中正电荷的连接的总数在 2 和不大于连接总数一半之间。例如, 带正电荷的连接可具有上述结构, 其中 X 是任选地取代的 1- 哌嗪基。在其他实施方案中, 带正电荷连接可具有上述结构, 其中 X 是取代的 1- 哌嗪基, 其中 1- 哌嗪基是在 4 位上被任选地取代的烷基胍基部分取代。

[0031] 如果给予的反义化合物可有效地靶向预加工的人肌营养不良蛋白的剪接位点, 则它可具有与含有预加工的信使 RNA (mRNA) 人肌营养不良蛋白转录物中的至少 12 个连续碱基的靶区域互补的碱基序列。示例性反义序列包括 SEQ ID NOS: 1-569 和 612-633 所确定的那些序列。

[0032] 在某些实施方案中, 本发明的反义序列包含于:

[0033] (a) SEQ ID NOS: 1-20, 优选地 SEQ ID NOS: 4、8、11 和 12, 和更优选地 SEQ ID NO:

12 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 44 跳跃;

[0034] (b)SEQ ID NOS :21-76 和 612-624,优选地 SEQ ID NOS :27、29、34 和 39,和更优选地 SEQ IDNO :34 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 45 跳跃;

[0035] (c)SEQ ID NOS :77-125,优选地 SEQ ID NOS :21-53,和更优选地 SEQ IDNO :82、84-87、90、96、98、99 和 101 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 46 跳跃;

[0036] (d)SEQ ID NOS :126-169,优选地 SEQ ID NOS :126-149,和更优选地 SEQ IDNO :126、128-130、132、144 和 146-149 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 47 跳跃;

[0037] (e)SEQ ID NOS :170-224 和 634,优选地 SEQ ID NOS :170-201 和 634,和更优选地 SEQ IDNO :176、178、181-183、194 和 198-201 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 48 跳跃;

[0038] (f)SEQ ID NOS :225-266,优选地 SEQ ID NOS :225-248,和更优选地 SEQ IDNO :227、229、234、236、237 和 244-248 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 49 跳跃;

[0039] (g)SEQ ID NOS :267-308,优选地 SEQ ID NOS :277、287 和 290,和更优选地 SEQ IDNO :287 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 50 跳跃;

[0040] (h)SEQ ID NOS :309-371,优选地 SEQ ID NOS :324、326 和 327,和更优选地 SEQ IDNO :327 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 51 跳跃;

[0041] (i)SEQ ID NOS :372-415,优选地 SEQ ID NOS :372-397,和更优选地 SEQ IDNO :379-382、384、390 和 392-395 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 52 跳跃;

[0042] (j)SEQ ID NOS :416-475 和 625-633,优选地 SEQ ID NOS :428、429 和 431,和更优选地 SEQ IDNO :429 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 53 跳跃;

[0043] (k)SEQ ID NOS :476-519,优选地 SEQ ID NOS :476-499,和更优选地 SEQ IDNO :479-482、484、489 和 491-493 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 54 跳跃;

[0044] (l)SEQ ID NOS :520-569 和 635,优选地 SEQ ID NOS :520-546 和 635,和更优选地 SEQ IDNO :524-528、537、539、540、542 和 544 所确定的任何序列,用于在人肌营养不良蛋白预加工的 mRNA 的加工中产生外显子 55 跳跃;

[0045] 在某些实施方案中,化合物可与能有效促进细胞吸收化合物的富含精氨酸的多肽偶联。示例性肽,除了本文所述的其他肽外,还包括 SEQ ID NOS :570-578 所确定的肽。

[0046] 在一个示例性实施方案中,富含精氨酸的多肽在其 N 末端或 C 末端残基与反义化合物的 3' 或 5' 端共价偶联。还在示例性实施方案中,反义化合物由吗啉代亚基和将一个

亚基的嘌呤代氮与相邻亚基的 5' 环外碳连接的含磷亚基间连接组成。

[0047] 通常,肽-寡聚体偶联物还可包含对选定的哺乳动物组织即与细胞穿透肽所靶向的相同组织具有选择性的导向肽(homing peptide)。该偶联物可以是以下形式:细胞穿透肽-导向肽-反义寡聚体,或更优选以下形式:导向肽-细胞穿透肽-反义寡聚体。例如如上所述用于治疗杜兴肌营养不良的肽偶联化合物还可包含对肌肉组织具有选择性的导向肽,例如具有 SEQ ID NO:579 所确定的序列的肽,其与细胞穿透肽偶联。这种类型的示例性偶联物包括本文中表示为 CP06062-MSP-PMO(细胞穿透肽-导向肽-反义寡聚体)和表示为 MSP-CP06062-PMO(导向肽-细胞穿透肽-反义寡聚体)(参见 SEQ ID NOs:580-583)的那些偶联物。

[0048] 在一些实施方案中,肽通过连接体部分与寡聚体偶联。在某些实施方案中,连接体部分可包含任选地取代的哌嗪部分。在其他实施方案中,连接体部分还可包含 β 丙氨酸和/或 6-氨基己酸亚基。仍然在其他实施方案中,肽直接与寡聚体偶联,而无需连接体部分。

[0049] 肽与寡聚体的偶联可以位于任何适合在肽和寡聚体之间或在连接体部分和寡聚体之间形成共价键的位置。例如,在一些实施方案中,肽的偶联可以位于寡聚体的 3' 端。在其他实施方案中,肽与寡聚体的偶联可以位于寡聚体的 5' 端。仍然在其他实施方案中,肽可以通过任何亚基间连接与寡聚体偶联。

[0050] 在一些实施方案中,肽在寡聚体的 5' 端与寡聚体偶联。在包含含磷亚基间连接的实施方案中,肽可以通过与末端连接基团的磷的共价键与寡聚体偶联。这种方式的偶联可能需要或不需要上述连接体部分。

[0051] 仍然在其他实施方案中,肽在寡聚体的 3' 端与寡聚体偶联。在一些其他实施方案中,肽与寡聚体 3' 末端嘌呤代基团的氮原子偶联。在这方面,肽可以直接或通过上述连接体部分与寡聚体偶联。

[0052] 在一些实施方案中,寡聚体可以与能增强寡聚体在水性介质中溶解度的部分偶联。在一些实施方案中,能增强寡聚体在水性介质中溶解度的部分是聚乙二醇。仍然在其他实施方案中,能增强寡聚体在水性介质中溶解度的部分是三乙二醇(triethylene glycol)。例如,在一些实施方案中,能增强在水性介质中溶解度的部分可以在寡聚体的 5' 端与寡聚体偶联。能增强寡聚体在水性介质中溶解度的部分与寡聚体的偶联可以是直接的或通过上述连接体部分。

[0053] 本发明的某些实施方案提供了选定和/或适合辅助遗传疾病的预防性治疗或治疗性治疗的反义分子,其包含至少一个具有适合递送至患者形式的反义分子。

[0054] 本发明的某些实施方案提供了治疗患有遗传疾病的患者的方法,其中,在编码特定蛋白的基因中存在突变且突变的影响可通过外显子跳跃消除,其包括以下步骤:(a) 按照本文所述方法选择反义分子;和(b) 将分子给予需要这种治疗的患者。本发明也包括纯化和分离的本发明反义寡核苷酸在制备用于治疗遗传疾病的药物中的用途。

[0055] 某些实施方案提供了治疗肌营养不良例如特征为杜兴肌营养不良的疾病状况的方法,该方法包括给予需要治疗的患者有效量的如本文所述的适当设计的反义寡核苷酸,该反义寡核苷酸与该患者中的具体基因病变相关。而且,某些实施方案提供了预防性治疗患者以便预防或至少最小化包括杜兴肌营养不良在内的肌营养不良的方法,其包括以下步骤:给予患者有效量的反义寡核苷酸或包含一种或多种这些生物分子的药物组合物。

[0056] 某些实施方案涉及治疗个体的肌营养不良的方法,其包括给予患者有效量的基本不带电的反义化合物,该反义化合物含有 20-35 个通过含磷亚基间连接而连接的吗啉代亚基,该连接将一个亚基的吗啉代氮与相邻亚基的 5' 环外碳连接,该反义化合物包含选自 SEQ ID NOS :1-569 和 612-635 且能够与肌营养不良蛋白基因外显子中的互补 mRNA 序列在所述化合物和 mRNA 之间形成 T_m 为至少 45°C 的异源双链体的序列,其中该外显子选自外显子 44-55。

[0057] 在某些实施方案中,肌营养不良是杜兴肌营养不良 (DMD)。在某些实施方案中,肌营养不良是贝克肌营养不良 (BMD)。

[0058] 在某些实施方案中,序列选自 SEQ ID NOS :1-20,且外显子是外显子 44。在某些实施方案中,序列选自 SEQ ID NOS :21-76 和 612-624,且外显子是外显子 45。

[0059] 在某些实施方案中,序列选自 SEQ ID NOS :77-125,且外显子是外显子 46。在某些实施方案中,序列选自 SEQ ID NOS :126-169,且外显子是外显子 47。

[0060] 在某些实施方案中,序列选自下组 SEQ ID NOS :170-224 和 634,且外显子是外显子 48。在某些实施方案中,序列选自 SEQ ID NOS :225-266,且外显子是外显子 49。

[0061] 在某些实施方案中,序列选自 SEQ ID NOS :267-308,且外显子是外显子 50。在某些实施方案中,序列选自下组 SEQ ID NOS :309-371,且外显子是外显子 51。

[0062] 在某些实施方案中,序列选自下组 SEQ ID NOS :372-415,且外显子是外显子 52。在某些实施方案中,序列选自 SEQ ID NOS :416-475 和 625-633,且外显子是外显子 53。在某些实施方案中,序列选自 SEQ ID NOS :476-519,且外显子是外显子 54。在某些实施方案中,序列选自 SEQ ID NOS :520-569 和 635,且外显子是外显子 55。在某些实施方案中,序列包含 SEQ ID NOS :287 或基本上由其组成。

[0063] 某些实施方案提供了治疗遗传疾病的试剂盒,该试剂盒包含被包装在适宜容器中的至少一种本发明的反义寡核苷酸,及其使用说明。

[0064] 结合附图阅读以下本发明的详细说明将会更深入地理解这些和其他目的和特征。

[0065] 附图简要说明

[0066] 图 1A 显示了具有磷酸二氨酯连接的示例性吗啉代寡聚体结构。

[0067] 图 1B 显示了本发明实施方案的富含精氨酸的肽与反义寡聚体的偶联物。

[0068] 图 1C 显示了如图 1B 的偶联物,其中主链连接含有一个或多个带正电荷的基团。

[0069] 图 1D-G 显示了示例性吗啉代寡核苷酸的重亚基片段,其称为 D-G。

[0070] 图 2A 显示了经设计诱导人肌营养不良蛋白外显子 51 跳跃的反义寡聚体外显子 51 扫描的相对位置和结果。

[0071] 图 2B-C 显示了相对于可有效诱导外显子 51 跳跃的序列 (AVI-5658 ;SEQ ID NO : 588 和 h51 AON1 ;SEQ ID NO :594),选自外显子 51 扫描的三个最佳寡聚体 (SEQ ID NOS : 324、326 和 327) 在培养的人横纹肌肉瘤 (RD) 细胞和人原代骨骼肌细胞中的相对活性。图 2D 显示了与某些序列相比,三个选定的寡聚体在外显子 51 内的相对位置。

[0072] 图 3A 显示了与诱导外显子 50 跳跃的其他序列相比,经设计诱导人肌营养不良蛋白外显子 50 跳跃的反义寡聚体外显子 50 扫描的相对位置和结果。

[0073] 图 3B 显示了与其他序列 (SEQ ID NOS :584 和 585) 相比,选自外显子 50 扫描的反义序列 (SEQ ID NOS :277、287、290 和 291) 的相对位置和活性。

[0074] 图 4A 显示了经设计诱导人肌营养不良蛋白外显子 53 跳跃的反义寡聚体外显子 53 扫描的相对位置和结果。图 4B 显示了用于比较选定为在外显子 53 扫描中最有活性的那些寡聚体的外显子跳跃活性的某些序列的相对位置。

[0075] 图 4C-F 显示了使用选定为在外显子 53 扫描中最有效的寡聚体 (SEQ ID NOS :422、428、429 和 431) 的剂量范围研究结果,其总结在图 4G 中。

[0076] 图 4H 和 4I 显示了与在 RD 细胞和人原代骨骼肌细胞中最有活性的外显子 53 跳跃寡聚体 (SEQ ID NO :429) 的活性相比,某些序列 (SEQ ID NOS :608-611) 的相对活性。

[0077] 图 5A 显示了经设计诱导人肌营养不良蛋白外显子 44 跳跃的反义寡聚体外显子 44 扫描的相对位置和结果。图 5B 显示了用于比较选定为在外显子 44 扫描中最有活性的那些寡聚体的外显子跳跃活性的某些序列在外显子 44 内的相对位置。

[0078] 图 5C-G 显示了使用选定为在外显子 44 扫描中最有效的寡聚体 (SEQ ID NOS :4、8、11、12 和 13) 的剂量范围研究结果,其总结在图 5H 中。

[0079] 图 5I 和 5J 显示了与在 RD 细胞和人原代骨骼肌细胞中最有活性的外显子 53 跳跃寡聚体 (SEQ ID NO :12) 的活性相比,某些序列 (SEQ ID NOS :600-603) 的相对活性。

[0080] 图 6A 显示了经设计诱导人肌营养不良蛋白外显子 45 跳跃的反义寡聚体外显子 45 扫描的相对位置和结果。图 6B 显示了用于比较选定为在外显子 45 扫描中最有活性的那些寡聚体的外显子跳跃活性的某些序列在外显子 45 内的相对位置。

[0081] 图 6C-F 显示了使用选定为在外显子 45 扫描中最有效的寡聚体 (SEQ ID NOS :27, 29, 34 和 39) 的剂量范围研究结果,其总结在图 6H 中。图 6G 使用相对非活性的寡聚体 (SEQ ID NO :49) 作为阴性对照。

[0082] 图 6I 和 6J 显示了与在 RD 细胞和人原代骨骼肌细胞中最有活性的外显子 53 跳跃寡聚体 (SEQ ID NO :34) 的活性相比,某些序列 (SEQ ID NOS :604-607) 的相对活性。

[0083] 发明的详细描述

[0084] 本发明的实施方案通常涉及经特别设计诱导肌营养不良蛋白基因中的外显子跳跃的改善的反义化合物,及其使用方法。肌营养不良蛋白在肌肉功能中发挥极其重要的作用,并且各种肌肉相关疾病特征都在于这个基因的突变形式。因此,在某些实施方案中,本文所述的改善的反义化合物诱导突变形式的人肌营养不良蛋白基因中的外显子跳跃。例如在杜兴肌营养不良 (DMD) 和贝克肌营养不良 (BMD) 中发现的突变的肌营养不良蛋白基因。

[0085] 由于突变所导致异常 mRNA 剪接事件,这些突变的人肌营养不良蛋白基因或表达缺陷型肌营养不良蛋白或表达几乎测量不到的肌营养不良蛋白,这是导致多种形式的肌营养不良的疾病状况。为了治疗这种疾病状况,本发明的反义化合物通常与突变的人肌营养不良蛋白基因的预加工 RNA 的选定区域杂交,在以别的方式异常剪接的该肌营养不良蛋白 mRNA 中诱导外显子跳跃和差异化剪接,由此使肌细胞产生编码功能性肌营养不良蛋白的 mRNA 转录物。在某些实施方案中,得到的肌营养不良蛋白不一定是“野生型”形式的肌营养不良蛋白,而是截短的,然而功能性或半功能性形式的肌营养不良蛋白。

[0086] 通过提高肌细胞中功能性肌营养不良蛋白的水平,这些及相关实施方案可用于预防和治疗肌营养不良,特别是,诸如 DMD 和 BMD 的这些形式的肌营养不良,它们的特征在于由于异常的 mRNA 剪接表达缺陷型肌营养不良蛋白。本文所述的具体寡聚体还提供了超过

其他在用的寡聚体的改善的肌营养不良蛋白外显子特异性靶向,由此提供了优于治疗肌营养不良相关形式的可选方法的明显的实际优势。

[0087] 除非另有规定,本文所用的所有技术和科技术语与本发明所属领域普通技术人员通常理解的具有相同的含义。尽管类似于或等同于本文所述的方法和材料的任何方法和材料都可用于实践或检验本发明,仍描述了优选的方法和材料。出于本发明的目的,下文定义了以下术语。

[0088] 定义

[0089] 本文所用的冠词“a(一个)”和“an(一个)”是指一个或多于一个(即至少一个)的该冠词的语法对象。通过举例的方式,“一个元件”表示一个元件或多于一个元件。

[0090] “约”表示变动范围高达参考数量、水平、值、数量、频率、百分比、维数、大小、量、重量或长度的 30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1% 的数量、水平、值、数量、频率、百分比、维数、大小、量、重量或长度。

[0091] “编码序列”表示促进基因的多肽产物编码的任何核苷酸序列。相对而言,术语“非编码序列”是指不促进基因的多肽产物编码的任何核苷酸序列。

[0092] 在本说明书全文中,除非上下文另有要求,词语“包含(comprise)”、“包含(comprises)”和“包含(comprising)”都应理解为表示包括所述步骤或元件或步骤或元件组,但是不排除任何其他步骤或元件或步骤或元件组。

[0093] “由……组成”表示包括并限于短语“由……组成”之内的任何事物。因此,短语“由……组成”表示所列元件是必需的或强制的,且不存在其他元件。“基本由……组成”表示包括短语内所列的任何元件,并限于不会干扰或促进所列元件在公开中指定的活性或作用的其他元件。因此,短语“基本由……组成”表示所列元件是必需的或强制的,但其他元件是任选的且可以存在或不存在,这取决于它们本质上是否影响所列元件的活性或作用。

[0094] 术语“互补”和“互补性”是指通过碱基配对规律而相关联的多核苷酸(即核苷酸的序列)。例如,序列“A-G-T”与序列“T-C-A”互补。互补性可以是“部分的”,其中仅一些核酸碱基按照碱基配对规律匹配。或,在核酸之间可以存在“完全”或“全部”的互补性。核酸链之间互补性程度对核酸链之间的杂交效能和强度有明显影响。尽管通常期望完美的互补性,但是一些实施方案可以包括一个或多个但是优选 6、5、4、3、2 或 1 个与靶 RNA 的错配。包括在寡聚体内任何位置的变异。在某些实施方案中,接近寡聚体末端的序列上的变异通常比内部变异更可取,并且如果存在,通常处于 5' 和 / 或 3' 末端约 6、5、4、3、2 或 1 个核苷酸之内。

[0095] 术语“细胞穿透肽”或“CPP”可交替使用,是指阳离子细胞穿透肽,也称为运输肽、载体肽或肽转导结构域。本文所示的该肽能在 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100% 的给定的细胞培养群中诱导细胞穿透,包括之间的所有整数,并允许大分子在全身给药后在体内多个组织内迁移。

[0096] 术语“反义寡聚体”或“反义化合物”可交替使用,是指通过亚基间连接而连接的环状亚基序列,每个亚基都携带碱基配对部分,该亚基连接使碱基配对部分与核酸(通常是 RNA)中的靶序列通过沃森-克里克碱基配对交杂,在靶序列内形成核酸:寡聚体异源双链体。环状亚基是基于核糖或其他戊糖,或在优选实施方案中,基于吗啉代基团(参见以下

的吗啉代寡聚体的说明)。

[0097] 这种反义寡聚体可以设计为阻断或抑制 mRNA 的翻译或抑制天然 mRNA 前体的剪接加工,可以认为是“定向”或“靶向”与其杂交的靶序列。在某些实施方案中,靶序列包括含有 mRNA 的 AUG 起始密码子、预加工的 mRNA 的 3' 或 5' 剪接位点或分支点的区域。靶序列可以位于外显子或内含子内。剪接位点的靶序列可包括在其 5' 端具有位于预加工的 mRNA 的正常剪接位点受体联结处下游的 1 到约 25 个碱基对的 mRNA 序列。用于剪接的优选靶序列是包括剪接位点或被整体包含在外显子编码序列之内或横跨剪接受体或供体位点的预加工的 mRNA 的任何区域。当寡聚体以上述方式靶向靶标的核酸时,所述寡聚体更常被称为“靶向”生物相关靶标,例如蛋白、病毒或细菌。所包括的反义寡聚体包含 SEQ ID NOS :1-569 和 612-635 中的一个或多个,或基本由 SEQ ID NOS :1-569 和 612-635 中的一个或多个组成,或由 SEQ ID NOS :1-569 和 612-635 中的一个或多个组成。还包括这些反义寡聚体的变体,包括与 SEQ ID NOS :1-569 和 612-635 中任一个具有 80%、85%、90%、95%、97%、98% 或 99% (包括之间的所有整数) 序列同一性或序列同源性的变异的寡聚体,和 / 或与这些序列差异为约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个核苷酸的变体,优选诱导一个或多个选定的人肌营养不良蛋白外显子外显子跳跃的那些变体。还包括 SEQ ID NOS :584-611 和 634-635 的中任一个或多个的寡聚体,如本文所述,其包含适宜数量的带电连接,例如每 2-5 个不带电连接高达约 1 个,例如每 10 个不带电连接约 4-5 个,和 / 或如本文所述,其包含与其连接的富含 Arg 的肽。

[0098] 术语“吗啉代寡聚体”或“PMO”(氨基磷酸酯(phosphoramidate)或磷酸二氨酯吗啉代寡聚体)是指由吗啉代亚基结构组成的寡核苷酸类似物,其中(i)所述结构通过含磷的连接而连接,所述含磷的连接,其长度为 1-3 个原子,优选 2 个原子,优选不带电或是阳离子,将一个亚基的吗啉代氮与相邻亚基的 5' 环外碳连接,和(ii)每个吗啉代环携带通过碱基特异性氢键合有效地与多核苷酸上的碱基结合的嘌呤或嘧啶碱基配对部分。参见例如图 1A 的结构,其显示了优选的磷酸二氨酯连接类型。这个连接可以进行变化只要不会干扰结合或活性。例如,连接于磷上的氧可被硫取代(硫代磷酸二氨酯(thiophosphorodiamidate))。5' 氧可被氨基或低级烷基取代的氨基取代。连接于磷上的悬挂氮(pendant nitrogen)可以是非取代的或被低级烷基单取代或双取代(任选取代)的。参见以下阳离子连接的讨论。吗啉代寡聚体的合成、结构和结合特征详述于美国专利第 5,698,685 号、第 5,217,866 号、第 5,142,047 号、第 5,034,506 号、第 5,166,315 号、第 5,521,063 号和第 5,506,337 号以及 PCT 申请第 PCT/US07/11435(阳离子连接体)号中,所有上述专利文献通过引用并入本文。

[0099] 嘌呤或嘧啶碱基配对部分通常是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶或次黄嘌呤。也包括以下碱基:诸如 4-吡啶酮、2-吡啶酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯(trimellithoxy benzene)、3-甲基尿嘧啶、二氢尿苷、萘基、氨基苯基、5-烷基胞苷(如 5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(如核糖胸腺嘧啶核苷)、5-卤代尿苷尿苷(如 5-溴代尿苷)或 6-氮杂嘧啶或 6-烷基嘧啶(如 6-甲基尿苷)、丙炔、Q 核苷(quesosine)、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、怀丁苷、怀丁氧苷(wybutoxosine)、4-乙酰胞苷(acetyltydine)、5-(羧基羟基甲基)尿苷、5'-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-羧基甲基氨基甲基尿苷、 β -D-半乳糖苷 Q 核苷(queosine)、1-甲基腺苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟苷、3-甲基胞

苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鸟苷、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-甲基氨基甲基尿苷、5-甲基羰基乙基尿苷 (5-methylcarbonylmethyluridine)、5-甲基氧代尿苷、5-甲基-2-硫代尿苷、2-甲基硫代-N6-异戊烯基腺苷、 β -D-甘露糖基 Q 核苷 (queosine)、尿苷-5-氧代乙酸、2-硫代胞嘧啶、苏氨酸衍生物以及其它 (Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, 同上)。在这方面,“修饰碱基”表示除了腺嘌呤 (A)、鸟嘌呤 (G)、胞嘧啶 (C)、胸腺嘧啶 (T) 和尿嘧啶 (U) 之外的核苷酸碱基,如上所述的;这些碱基可用在反义分子的任何位置。本领域技术人员应当认识到,根据所用的寡聚体, Ts 和 Us 是可以互换的。例如,更像 RNA 的其他反义化学制剂,例如 2'-O-甲基反义寡核苷酸, T 碱基可表示为 U (参见例如序列 Sequence ID 列表 (Sequence ID listing, 标识符列表))。

[0100] “氨基酸亚基”或“氨基酸残基”是指 α -氨基酸残基 (如 $-\text{CO}-\text{CHR}-\text{NH}-$) 或 β -或其他氨基酸残基 (如 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n\text{CHR}-\text{NH}-$), 其中 R 是侧链 (其可包括氢) 且 n 是 1-6, 优选 1-4。

[0101] 术语“天然存在的氨基酸”是指天然发现的蛋白中存在的氨基酸,例如在蛋白生物合成期间所用的 20 种 (L)-氨基酸以及诸如 4-羟脯氨酸、羟赖氨酸、锁链赖氨酸、异锁链赖氨酸、高半胱氨酸、瓜氨酸和鸟氨酸的前体氨基酸。术语“非天然氨基酸”是指天然发现的蛋白中不存在的氨基酸,实例包括 β -丙氨酸 (β -Ala; 或 B)、6-氨基己酸 (Ahx) 和 6-氨基戊酸。”“非天然氨基酸”的其他实例包括但不限于 (D)-氨基酸、正亮氨酸、正缬氨酸、p-氟苯丙氨酸、乙硫氨酸等等,这些都是本领域技术人员已知的。

[0102] “有效量”或“有效治疗量”是指作为单次剂量或系列剂量的一部分给予哺乳动物个体的诸如反义寡聚体的治疗化合物的量,该量可有效地在所述个体中产生期望的生理反应或治疗效果。期望的生理反应的一个实例包括与反义寡聚体或对照寡聚体相比,相对功能性或生物活性形式的肌营养不良蛋白的表达增强,其主要是在含有缺陷型肌营养不良蛋白或没有肌营养不良蛋白的肌肉组织或细胞中。期望的治疗效果的实例包括但不限于肌营养不良症状或病状的改善、减轻肌营养不良症状或病状的发展和减缓肌营养不良症状或病状的发作,以及其他。这种症状的实例包括疲劳、智力低下、肌无力、运动技能困难 (如奔跑、弹跳、跳跃)、频繁摔倒和步行困难。肌营养不良病理特征在于,例如肌纤维损伤和膜渗漏。对于反义寡聚体,这种效果通常通过改变选定靶序列 (如肌营养不良蛋白) 的剪接加工例如诱导外显子跳跃所带来的。

[0103] “外显子”是指编码蛋白的核酸的限定部分,或在通过剪接去除预加工的 RNA (前体) 任一部分之后以成熟形式的 RNA 分子为代表的核酸序列。成熟 RNA 分子可以是信使 RNA (mRNA) 或功能性形式的非编码 RNA,例如 rRNA 或 tRNA。人肌营养不良蛋白基因具有约 75 个外显子。

[0104] “内含子”是指不被翻译成蛋白的核酸区域 (基因内)。内含子是转录成前体 mRNA (mRNA 前体) 之后在形成成熟 RNA 期间通过剪接而去除的非编码部分。

[0105] “外显子跳跃”通常是这样一个过程:通过该过程,整个外显子或其部分从给定的预加工的 RNA 中去除,由此被排除在成熟 RNA 例如被翻译成蛋白的成熟 mRNA 之外。因此,由跳跃的外显子编码的蛋白部分不存在于蛋白的表达形式中,通常形成改变的但仍是功能性形式的蛋白。在某些实施方案中,被跳跃的外显子是来自人肌营养不良蛋白基因的异常

外显子,在其序列上可含有以其他方式导致异常剪接的突变或其他改变。在某些实施方案中,被跳跃的外显子是肌营养不良蛋白基因外显子 1-75 中的任一个或多个,尽管优选人肌营养不良蛋白基因外显子 44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54 和 / 或 55 中的任一个或多个。

[0106] “肌营养不良蛋白”是杆状细胞质蛋白,并且是通过细胞膜将肌纤维的细胞主链与周围胞外基质连接的蛋白复合物的重要部分。肌营养不良蛋白含有多个功能性结构域。例如,肌营养不良蛋白含有在约氨基酸 14-240 处的肌动蛋白结合结构域和在氨基酸 253-3040 处的中心杆状结构域。这个大的中心结构域是由约 109 个氨基酸的 24 个膜收缩蛋白样三螺旋元件形成的,它们与 α 肌动蛋白和膜收缩蛋白具有同源性。这些重复通常被四个富含脯氨酸的非重复片段间断,该非重复片段也称为铰链区。重复 15 和 16 被 18 个氨基酸一段序列隔离,该序列看起来为肌营养不良蛋白的蛋白水解切割提供主要位点。大部分重复之间的序列同一性范围为 10-25%。一个重复含有三个 α 螺旋:1、2 和 3。 α 螺旋 1 和 3 每个都由 7 个螺旋转角形成,该螺旋转角可能通过疏水界面作为卷曲螺旋相互作用。 α 螺旋 2 具有更为复杂的结构,并且由被甘氨酸或脯氨酸残基隔离的四个和三个螺旋转角的片段形成。两个外显子编码一个重复,所述外显子通常被在 α 螺旋 2 的第一部分中的氨基酸 47 和 48 之间的内含子所间断。在重复的其他位置发现其他内含子,通常分散在螺旋 3 中。肌营养不良蛋白也含有在约氨基酸 3080-3360 处的富含半胱氨酸的结构域,其包括显示出与粘液菌(盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)) α 肌动蛋白的 C 末端结构域具有同源性的富含半胱氨酸的片段(即在 280 个氨基酸的 15 个半胱氨酸)。羧基末端结构域位于约氨基酸 3361-3685 处。

[0107] 肌营养不良蛋白的氨基末端与 F-肌动蛋白结合而羧基末端与肌膜上的肌营养不良蛋白相关蛋白复合物(dystrophin-associated protein complex, DAPC)结合。DAPC 包括肌营养不良蛋白聚糖、肌膜聚糖、整联蛋白和小窝蛋白,并且这些成分中任何成分内的突变导致常染色体遗传的肌营养不良。若缺乏肌营养不良蛋白则 DAPC 是不稳定的,这会引起膜蛋白水平降低,然后导致渐进性纤维损伤和膜渗漏。在多种形式的肌营养不良中,例如在杜兴肌营养不良(DMD)和贝克肌营养不良(BMD)中,肌肉细胞产生改变的和功能性缺陷型形式的肌营养不良蛋白,或根本不产生肌营养不良蛋白,主要是由于导致非正确剪接的基因序列突变造成的。缺陷型肌营养不良蛋白的优势表达,或肌营养不良蛋白或肌营养不良样蛋白的完全缺乏,导致肌肉变性的快速发展,如上所述。在这方面,“缺陷型”肌营养不良蛋白特征在于,在本领域已知的某些 DMD 或 BMD 个体中产生的肌营养不良形式或特征在于缺乏可检测的肌营养不良蛋白。

[0108] 表 A 提供多种肌营养不良蛋白结构域、包含这些结构域的氨基酸残基以及编码它们的外显子的说明。

[0109] 表 A

[0110]

结构域	亚结构域	残基编号	外显子
肌动蛋白结合结构域		14-240	2-8
中心杆状结构域		253-3040	8-61
	铰链 1	253-327	(8)-9
	重复 1	337-447	10-11
	重复 2	448-556	12-14
	重复 3	557-667	14-16
	铰链 2	668-717	17
	重复 4	718-828	(17)-20
	重复 5	829-934	20-21
	重复 6	935-1045	22-23
	重复 7	1046-1154	(23)-(26)
	重复 8	1155-1263	26-27
	重复 9	1264-1367	28-(30)
	重复 10	1368-1463	30-32
	重复 11	1464-1568	32-(34)
	重复 12	1569-1676	34-35
	重复 13	1677-1778	36-37
	重复 14	1779-1874	38-(40)
	重复 15	1875-1973	40-41
	间断	1974-1991	42
	重复 16	1992-2101	42-43

[0111]

	重复 17	2102-2208	44-45
	重复 18	2209-2318	46-48
	重复 19	2319-2423	48-50
	铰链 3	2424-2470	50-51
	重复 20	2471-2577	51-53
	重复 21	2578-2686	53-(55)
	重复 22	2687-2802	55-(57)
	重复 23	2803-2931	57-59
	重复 24	2932-3040	59-(61)
	铰链 4	3041-3112	61-64
富含半胱氨酸的结构域		3080-3360	63-69
	肌营养不良蛋白聚糖结合位点	3080-3408	63-70
	WW 结构域	3056-3092	62-63
	EF-手 1	3130-3157	65
	EF-手 2	3178-3206	65-66
	ZZ 结构域	3307-3354	68-69
羧基末端结构域		3361-3685	70-79
	α -肌营养不良蛋白结合蛋白 (syntrophin) 结合位点	3444-3494	73-74
	β 1-肌营养不良蛋白结合蛋白结合位点	3495-3535	74-75
	(Leu)6-七个重复	3558-3593	75

[0112] 如本文所用的,术语“功能”和“功能性”等是指生物、酶促或治疗功能。

[0113] “功能性”肌营养不良蛋白通常是指,通常与存在于某些患有 DMD 或 BMD 个体中的改变的或“缺陷型”形式的肌营养不良蛋白相比,具有足以降低肌肉组织渐进性变性的生物活性的肌营养不良蛋白,这是肌营养不良的特征。在某些实施方案中,功能性肌营养不良蛋白可具有约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100% (包括之间的所有整数) 的野生型肌营养不良蛋白的体内或体外生物活性,这可根据本领域常规技术测量。作为一个实例,可按照肌管大小、肌原纤维组织状态 (或分解)、收缩活性和乙酰胆碱受体的自发成簇测量体外肌肉培养物中肌营养不良蛋白相关活性 (参见如 Brown et al.,

Journal of Cell Science. 112 :209-216, 1999)。动物模型也是研究疾病病理的重要资源，其提供了检测肌营养不良蛋白相关活性的手段。DMD 研究使用最广泛的两个动物模型是 mdx 小鼠和金毛猎犬肌营养不良 (golden retriever muscular dystrophy, GRMD) 狗，这两者都是肌营养不良蛋白阴性 (参见如 Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84 :165-172, 2003)。这些和其他动物模型可用于测量各种肌营养不良蛋白的功能活性。包括截断形式的肌营养不良蛋白，例如本发明的某些外显子跳跃反义化合物所产生的那些形式。

[0114] “基因”表示占据染色体上特定位置的遗传单位，其由转录和 / 或翻译调控序列和 / 或编码区域和 / 或非翻译序列 (即内含子、5' 和 3' 非翻译序列) 组成。

[0115] “分离”表示基本或实质不含有在其天然状态通常伴随它的成分的物质。例如本文所用的“分离的多核苷酸”是指纯化的或在其天然存在状态已从位于其侧翼的序列去除的多核苷酸，例如已经从通常与其相邻的序列去除的 DNA 片段。

[0116] “增强 (enhance)”或“增强 (enhancing)”，或“增加 (increase)”或“增加 (increasing)”，或“刺激 (stimulate)”或“刺激 (stimulating)”通常是指与无反义化合物或对照化合物导致的反应相比，一个或多个反义化合物或组合物在细胞或个体中产生或导致更多生理反应 (即下游效果) 的能力。除了根据本领域理解和本文描述显而易见的其他反应外，可测量的生理反应还可以包括功能性形式的肌营养不良蛋白的表达增加，或肌肉组织中肌营养不良蛋白相关生物活性的增加。增加的肌肉功能也可测量，包括肌肉功能增加或改善约 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100%。表达功能性肌营养不良蛋白的肌纤维百分比也是可以测量的，包括在约 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或 100% 的肌纤维中肌营养不良蛋白表达增加。例如，已显示如果 25-30% 的纤维表达肌营养不良蛋白则会发生约 40% 的肌肉功能改善 (参见例如 DelloRusso et al, Proc Natl Acad Sci USA 99 :12979-12984, 2002)。“增加”或“增强”量通常是“统计显著”量，可包括增加由无反义化合物 (缺乏试剂) 或对照化合物产生的量的 1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50 或更多倍 (如 500、1000 倍) (包括所有整数，和在中间大于 1 以的小数点)，如 1.5、1.6、1.7、1.8 等)。

[0117] 术语“降低”或“抑制”通常是指本发明的一个或多个反义化合物“减少”相关生理或细胞反应的能力，例如本文所述的疾病症状或疾病状况，这可按照诊断领域的常规技术测量。相关生理或细胞反应 (体内或体外) 对于本领域技术人员是显而易见的，可包括肌营养不良症状或病状的降低，或缺陷型形式的肌营养不良蛋白表达的降低，例如在患有 DMD 或 BMD 个体中表达的改变形式的肌营养不良蛋白。与无反义化合物或对照化合物相比，反应的“减少”是统计显著的，并且可包括减少 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100%，包括之间所有整数。

[0118] “同源性”是指相同或构成保守取代的氨基酸百分比数。使用诸如 GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395) 的序列对比程序可确定同源性。以

此方式,与本文所引用那些序列的长度相似或实质不同的序列可通过在比对中插入缺口,通过例如 GAP 所用的比对算法所确定此类缺口进行比较。

[0119] 如本文所用的“序列同一性”或例如包含“与……50%相同的序列”是指在比较窗中核苷酸对核苷酸基础上或氨基酸对氨基酸基础上序列相同的程序。因此“序列同一性百分比”可通过如下计算:在比较窗中比较两个最佳比对的序列,确定在两个序列中都存在相同核酸碱基(如 A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(如 Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys and Met)的位置的数目以产生匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗中的位置总数(即窗口大小),并将该结果乘以 100 产生序列同一性百分比。

[0120] 用于描述两个或多个多核苷酸或多肽之间序列关系的术语包括“参照序列”、“比较窗”、“序列同一性”、“序列同一性百分比”和“实质同一性”。“参照序列”是长度为至少 8 或 10 个但经常是 15-18 个且通常是至少 25 个单体单位,包括核苷酸和氨基酸残基。因为两个多核苷酸每个都包含(1)两个多核苷酸之间相似的序列(即仅完整多核苷酸序列的一部分),和(2)两个多核苷酸之间不同的序列,两个(或多个)多核苷酸之间的序列比较通常是通过在“比较窗”中比较两个多核苷酸序列以确定和比较序列相似性的局部区域来实施。“比较窗”是指至少 6 个连续位置,通常是大约 50-100,更通常是大约 100-150 的概念片段,其中在进行最佳比对后,将该序列与具有相同数目的连续位置的参照序列进行比较。对于两个序列的最佳比对,与参照序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗可包含约 20%或更少的添加或缺失(即缺口)。用于比对比较窗的序列的最佳比对可通过计算机执行算法(GAP、BESTFIT、FASTA、和 TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA)或通过检查和任何多种选定方法生成的最佳比对(即在比较窗中获得最高百分比同源性)进行操作。也可以参考例如 Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25 :3389 公开的 BLAST 族程序。序列分析的详细讨论可见于 Unit 19.3 of Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology,” John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15。

[0121] 个体(如哺乳动物,例如人)或细胞的“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”可包括用在试图改变个体或细胞自然进程的任何类型的干扰。治疗包括但不限于给予药物组合物,可以是预防性的,或开始发病或与病原体接触之后实施。治疗包括对于如在某些形式的肌营养不良中与肌营养不良蛋白相关的疾病或疾病状况的症状或病理的任何期望影响,可包括例如所治疗疾病或疾病状况的一个或多个可测量标记的最小变化或改善。也包括“预防性”治疗,其可涉及降低所治疗的疾病或疾病状况的发展速度,或延迟该疾病或疾病状况的发作,或降低其发作的严重性。“治疗”或“预防”不一定表示完全根除、治愈或预防疾病或疾病状况,或其相关症状。

[0122] 因此,包括治疗肌营养不良例如 DMD 和 BMD 的方法,通过给予有需要的个体一种或多种本发明的反义寡聚体(如 SEQ ID NOS :1-569 和 612-635,及其变体),任选地作为药物制剂或剂型的一部分。也包括通过给予一种或多种反义寡聚体诱导个体外显子跳跃的方法,其中外显子是肌营养不良基因,优选人肌营养不良基因的外显子 44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、和 / 或 55 之一。如本文所用的“个体”包括表现出症状,或处于表现症状的风险中并可用本发明反义化合物治疗的任何动物,例如患有 DMD 或 BMD 或与这些疾病状

况相关的任何症状（如肌纤维损失）或处于患有 DMD 或 BMD 与这些疾病状况相关的任何症状（如肌纤维损失）风险的个体。适宜的个体（患者）包括实验动物（例如小鼠、大鼠、兔或豚鼠）、耕作动物和家畜（domestic animal）或宠物（例如猫或狗）。包括非人灵长类和优选人患者。

[0123] 还包括载体递送系统，其能够表达本发明的低聚肌营养不良蛋白靶向序列，例如表达包含本文所述的 SEQ ID NOS:1-569 和 612-635 中任一个或其变体的多核苷酸序列的载体。“载体”或“核酸构建体”表示来自例如可以插入或克隆多核苷酸的质粒、噬菌体、酵母或病毒的多核苷酸分子，优选 DNA 分子。载体优选含有一个或多个独特的限制性位点并能够在限定的宿主细胞中自主复制，包括靶细胞或组织或其祖细胞或组织，或能够与限定的宿主细胞的基因组整合，以便克隆的序列可繁殖。因此，载体可以是自主复制载体，即作为染色体外实体而存在的载体，其复制独立于染色体的复制，例如线性或闭环质粒，染色体外元件，微型染色体，或人工染色体。载体可含有确保自我复制的任何手段。可选地，载体可以是当被导入宿主细胞内能整合至基因组并与其所整合的染色体一起复制的载体。

[0124] 载体或核酸构建体系统可包含单个载体或质粒，两个或多个载体或质粒，它们一起含有要导入宿主细胞基因组的总 DNA 或转座子。载体的选择通常取决于载体与要导入载体的宿主细胞的相容性。在这种情况下，载体或核酸构建体优选是在哺乳动物细胞例如肌肉细胞中具有可操作地发挥功能的载体。载体也可包括选择标记，如抗生素或药物抗性基因，或报告基因（即绿色荧光蛋白，荧光素酶），其可用于选择或鉴别适宜的转化体或转染子。示例性递送系统可包括病毒载体系统（即病毒介导的转导）包括但不限于逆转录病毒（如慢病毒）载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和疱疹病毒载体，除本领域已知的其他载体外。

[0125] 本文所用的术语“可操作地连接”表示将寡聚体编码序列置于启动子的可调控控制下，所述启动子随后控制所述寡聚体的转录。

[0126] 野生型基因或基因产物是在种群中最常见的因而任意地设计“正常”或“野生型”形式的基因。

[0127] “烷基”或“烷撑 (alkylene)”都是指含有 1-18 个碳的饱和的直链或支链烃基。实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、n-戊基和 n-己基。术语“低级烷基”是指如本文所定义的含有 1-8 个碳的烷基。

[0128] “烯基”是指含有 2-18 个碳并包含至少一个碳碳双键的不饱和的直链或支链烃基。实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、异丙烯基、丁烯基、异丁烯基、叔丁烯基、n-戊烯基和 n-己烯基。术语“低级烯基”是指如本文所定义的含有 2-8 个碳的烯基。

[0129] “炔基”是指含有 2-18 个碳并包含至少一个碳碳三键的不饱和的直链或支链烃基。实例包括但不限于乙炔基、丙炔基、异丙炔基、丁炔基、异丁炔基、叔丁炔基、戊炔基和己炔基。术语“低级炔基”是指如本文所定义的含有 2-8 个碳的炔基。

[0130] “环烷基”是指单或多环烷基。实例包括但不限于环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0131] “芳基”是指含有 5-18 个碳形成的一个或多个闭环的环状芳烃部分。实例包括但不限于苯基、苄基、萘基、蒽基、菲基 (phenanthracenyl) 和联苯基。

[0132] “芳烷基”是指式 RaRb 的基团，其中 Ra 是上文所定义的烷撑链而 Rb 是一个或多个

如上所定义的芳基,例如苄基、二苯甲基等。

[0133] “硫代烷氧基”是指式 $-SR_c$ 的基团,其中 R_c 是本文所定义的烷基。术语“低级硫代烷氧基”是指含有 1-8 个碳的本文所定义的烷氧基。

[0134] “烷氧基”是指式 $-OR_{da}$ 的基团,其中 R_d 是本文所定义的烷基。术语“低级烷氧基”是指含有 1-8 个碳的本文所定义的烷氧基。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基和乙氧基。

[0135] “烷氧基烷基”是指被烷氧基取代的烷基。

[0136] “羰基”是指 $-C(=O)-$ 基团。

[0137] “胍基 (Guanidynyl)”是指 $H_2N(C=NH_2)-NH-$ 基团。

[0138] “脒基 (Amidiny)”是指 $H_2N(C=NH_2)CH-$ 基团。

[0139] “氨基”是指 $-NH_2$ 基团。

[0140] “烷氨基”是指式 $-NHR_d$ 或 $-NR_dR_d$ 的基团,其中每个 R_d 独立地是本文所定义的烷基。术语“低级烷氨基”是指含有 1-8 个碳的本文所定义的烷氨基。

[0141] “杂环”表示 5-7 元单环或 7-10 元双环、杂环,其是饱和、不饱和或芳族的,且其含有 1-4 个独立选自氮、氧和硫的杂原子,其中氮和硫杂原子任选地是氧化的,氮杂原子任选地被季铵化,包括任何上述杂环被稠合至苯环的双环。杂环可通过任何杂原子或碳原子连接。杂环包括如下所定义的杂芳基。因而,除了以下所列杂芳基之外,杂环也包括吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基 (piperizynyl)、乙内酰脲基、戊内酸氨基 (valerolactamyl)、环氧乙基、环氧丁基 (oxetanyl)、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢硫苯基、四氢硫代吡喃基、四氢嘧啶基、四氢硫代吡喃基等等。

[0142] “杂芳基”表示具有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子并含有至少 1 个碳原子的 5-10 元芳族杂环,包括单环和双环系统。代表性杂芳基是吡啶基、呋喃基、苯并呋喃基、苯硫基、苯并苯硫基、喹啉基、吡咯基、吡唑基、恶唑基、苯并恶唑基、咪唑基、苯并咪唑基、噻唑基、苯并噻唑基、异恶唑基、吡唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、噌啉基、酞嗪基和喹啉基。

[0143] 术语“任选地取代的烷基”、“任选地取代的烯基”、“任选地取代的烷氧基”、“任选地取代的硫代烷氧基”、“任选地取代的烷氨基”、“任选地取代的低级烷基”、“任选地取代的低级烯基”、“任选地取代的低级烷氧基”、“任选地取代的低级硫代烷氧基”、“任选地取代的低级烷氨基”和“任选地取代的杂环基”表示,被取代时至少一个氢原子被取代基所取代。如果是含氧取代基 ($=O$) 的情况,则两个氢原子都被取代。在这方面,取代基包括: 氘、任选地取代的烷基、任选取代取代的烯基、任选地取代的炔基、任选地取代的芳基、任选地取代的杂环、任选地取代的环烷基、氧 (oxo)、卤素、 $-CN$ 、 $-OR_x$ 、 NR_xR_y 、 $NR_xC(=O)R_y$ 、 $NR_xSO_2R_y$ 、 $-NR_xC(=O)NR_xR_y$ 、 $C(=O)R_x$ 、 $C(=O)OR_x$ 、 $C(=O)NR_xR_y$ 、 $-SO_mR_x$ 和 $-SO_mNR_xR_y$, 其中 m 是 0、1 或 2, R_x 和 R_y 是相同或不同且独立的氢、任选地取代的烷基、任选地取代的烯基、任选地取代的炔基、任选地取代的芳基、任选地取代的杂环或任选地取代的环烷基,且每个所述任选地取代的烷基、任选地取代的烯基、任选地取代的炔基、任选地取代的芳基、任选地取代的杂环和任选地取代的环烷基取代基可以被氧、卤素、 $-CN$ 、 $-OR_x$ 、 NR_xR_y 、 $NR_xC(=O)R_y$ 、 $NR_xSO_2R_y$ 、 $-NR_xC(=O)NR_xR_y$ 、 $C(=O)R_x$ 、 $C(=O)OR_x$ 、 $C(=O)NR_xR_y$ 、 $-SO_mR_x$ 和 $-SO_mNR_xR_y$ 中的一个或多个进一步取代。

[0144] 构建反义寡核苷酸

[0145] 具有含磷主链连接的吗啉代寡核苷酸的实例如图 1A-1C 所示。特别优选的是磷酸二氨酯连接的吗啉代寡核苷酸例如图 1C 所示的,按照在本发明的一方面,其修饰为优选在其 10-50%的主链连接上含有带正电荷的基团。具有不带电主链连接的吗啉代寡核苷酸包括反义寡核苷酸及其制备在例如 (Summerton and Weller 1997) 和共同拥有美国专利第 5,698,685 号、第 5,217,866 号、第 5,142,047 号、第 5,034,506 号、第 5,166,315 号、第 5,185,444 号、第 5,521,063 号和 5 第,506,337 号中有详细描述,明确地将它们通过引用并入本文。

[0146] 基于吗啉代的亚基的重要特性包括:1) 在寡聚体形式中通过稳定的不带电或带正电的主链连接连接的能力;2) 支撑核苷酸碱基(如腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶和次黄嘌呤)以便所形成的聚合物可与碱基互补靶核苷酸杂交的能力,包括靶 RNA,在相对短的寡核苷酸(如 10-15 个碱基)中 T_m 值高于大约 45°C;3) 寡核苷酸主动或被动运输至哺乳动物细胞内的能力;和 4) 反义寡核苷酸:RNA 异源双链体分别抵抗 RNase 和 RNaseH 降解的能力。

[0147] 要求保护主题的反义寡核苷酸的示例性主链结构包括图 1D-G 所示的吗啉代亚基类型,每个都通过不带电或带正电的含磷亚基连接而连接。图 1D 显示了形成五个原子重复单元主链的含磷连接,其中吗啉代环通过 1-原子磷酰胺连接而连接。图 1E 显示了产生 6 原子重复单元主链的连接。在这个结构中,连接 5' 吗啉代碳和磷基团的原子 Y 可以是硫、氮、碳,或优选是氧。悬挂在磷上的 X 部分可以是氟、烷基或取代的烷基、烷氧基或取代的烷氧基、硫代烷氧基或取代的硫代烷氧基,或非取代、单取代或双取代的氮,包括环状结构例如吗啉或哌啶。烷基、烷氧基和硫代烷氧基优选包括 1-6 个碳原子。Z 部分是硫或氧,优选是氧。

[0148] 图 1F 和 1G 所示的连接是为 7 原子单元长度主链而设计的。在结构 1F 中,X 部分如结构 1E 所示,而 Y 部分可以是亚甲基、硫,或优选是氧。在结构 1G 中,X 和 Y 部分如结构 1E 所示。特别优选的吗啉代寡核苷酸包括由图 1E 所示吗啉代亚基结构形式所组成的那些,其中 $X = NH_2$ 、 $N(CH_3)_2$ 、任选地取代的 1-哌嗪基,或其它带电基团, $Y = O$,和 $Z = O$ 。

[0149] 如上所述的,按照本发明的一个方面,不带电或基本不带电的寡核苷酸被修饰成包括带电连接,例如例如每 2-5 个不带电连接中高达约 1 个带电连接,例如每 10 个不带电连接体中约 4-5 个带电连接。当约 25%主链连接是阳离子包括约 20%-30%时,可以观察到对反义活性的最佳改善。还包括寡聚体中约 35%、40%、45%、50%、55%、60%(包括之间所有整数)或更多主链连接是阳离子。小数目例如 5%或 10%-20%的阳离子连接,也可观察到增强。

[0150] 在寡核苷酸类似物中的基本不带电的含磷主链通常是在生理 pH 下大部分亚基连接,如其中 50%-100%的连接,通常至少 60%-100%或 75%或 80%的连接不带电并含有单个磷原子。

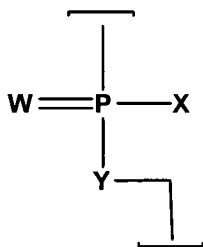
[0151] 支持本发明而进行的其他实验表明,添加阳离子主链电荷观察到的增强在一些情况下可通过使大多数电荷接近反义寡核苷酸“中心区域”主链连接体分布在如具有 8 个阳离子主链连接的 20mer 寡核苷酸中,其具有至少 70%这些带电连接定位于 10 个最中心连接中。

[0152] 反义化合物可通过逐步的固相合成,采用上文所以引用的参考文献中详述的方法

和下文关于具有混合的不带电和阳离子主链连接的寡核苷酸的合成而制备。在一些情况中,可以期望在反义化合物中添加其他化学部分,以便如增强药代动力学或促进化合物的捕捉或检测。按照标准合成方法,这些部分可以共价连接于,通常是连接于寡聚体的末端。例如,添加聚乙二醇部分或其他亲水聚合物如具有 10-100 个单体亚基的亲水聚合物,可用于增强溶解性。一个或多个带电基团如带电基团,例如诸如有机酸的阴离子带电基团,可增强细胞摄取。为检测目的,可连接报告部分例如荧光素或放射标记基团。可选地,连接于寡聚体的报告标记可以是能够结合标记的抗体或链霉抗生物素的配体,例如抗原或抗生素。在用于连接或修饰反义化合物的部分中,当然通常期望选择生物可相容的,可能被个体耐受且无非期望的副作用的化合物集合。

[0153] 如上所示的,反义化合物可被构建成为含有选定数量的阳离子连接,所述连接分散着上述不带电的连接类型中。亚基间连接,包括不带电和阳离子连接,优选是含磷连接,其具有结构 (II):

[0154]



(II)

[0155] 其中:

[0156] W 是 -S- 或 -O-, 并优选是 -O-,

[0157] X = -NR¹R² 或 -OR⁶,

[0158] Y = -O- 或 -NR⁷, 和

[0159] 寡聚体中每个所述连接选自:

[0160] (a) 不带电连接 (a), 其中 R¹、R²、R⁶ 和 R⁷ 中每个都独立地选自氢和低级烷基;

[0161] (b1) 阳离子连接体 (b1), 其中 X = -NR¹R² 和 Y = -O-, 和 -NR¹R² 代表任选地取代的哌嗪部分, 这样 R¹R² = -CHRCHRN(R³)(R⁴)CHRCHR-, 其中:

[0162] 每个 R 都独立地是 H 或 -CH₃,

[0163] R⁴ 是 H、-CH₃ 或电子对, 和

[0164] R³ 是选自 H、任选地取代的低级烷基、-C(=NH)NH₂、-Z-L-NHC(=NH)NH₂ 和 [-C(=O)CHR'NH]_mH, 其中: Z 是 -C(=O)- 或直接结, L 是长度高达 18 个原子的任选的连接体, 优选长度高达 12 个原子, 更优选高达 8 个原子, 具有选自任选地取代的烷基、任选地取代的烷氧基和任选地取代的烷氨基的键, R' 是天然存在的氨基酸的侧链或其一碳或二碳类似物, 和 m 是 1-6, 优选 1-4。

[0165] (b2) 阳离子连接 (b2), 其中 X = -NR¹R² 和 Y = -O-, R¹ = H 或 -CH₃, 和 R² = LNR³R⁴R⁵, 其中 L、R³ 和 R⁴ 如上文所定义, 和 R⁵ 是 H、任选地取代的低级烷基或任选地取代的低级(烷氧基)烷基; 和

[0166] (b3) 阳离子连接 (b3), 其中 Y = -NR⁷ 和 X = -OR⁶, 和 R⁷ = -LNR³R⁴R⁵, 其中 L、R³、

R^4 和 R^5 如上文所定义,和 R^6 是H或任选地取代的低级烷基;和

[0167] 至少一个所述连接选自阳离子连接 (b1)、(b2) 和 (b3)。

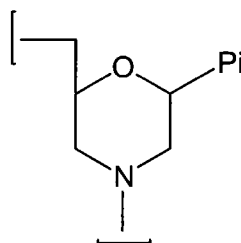
[0168] 优选,寡聚体包括类型 (a) (即不带电的连接) 的至少两个连续连接。在其他实施方案中,寡聚体至少 5% 的连接是阳离子连接 (即 (b1)、(b2) 或 (b3) 类型);例如,10% -60%、优选 20-50% 的连接可以是阳离子连接。

[0169] 在一个实施方案中,至少一个连接是 (b1) 类型的连接,其中优选每个 R 都是 H, R^4 是 H、 $-CH_3$ 或电子对,和 R^3 是选自 H、任选地取代的低级烷基、 $-C(=NH)NH_2$ 和 $-C(=O)-L-NHC(=NH)NH_2$ 。 R^3 的后两个实施方案提供了胍基部分,其分别直接连接于嘧啶环上,或悬垂在连接体基团 L 上。为了易于合成, R^3 中的变量 Z 优选是所示的 $-C(=O)-$ 。

[0170] 如上文所述,连接体基团 L 在其主链中含有选自任选地取代的烷基、任选地取代的烷氧基和任选地取代的烷氨基的键,其中 L 的末端原子 (如邻近羰基或氮的那些) 是碳原子。尽管分支的连接是可能的,但连接体优选是不分支的。在一个实施方案中,连接体是线性烷基连接体。这种连接体可具有结构 $-(CH_2)_n-$,其中 n 是 1-12,优选 2-8,更优选 2-6。

[0171] 吗啉代亚基具有以下结构 (III) :

[0172]

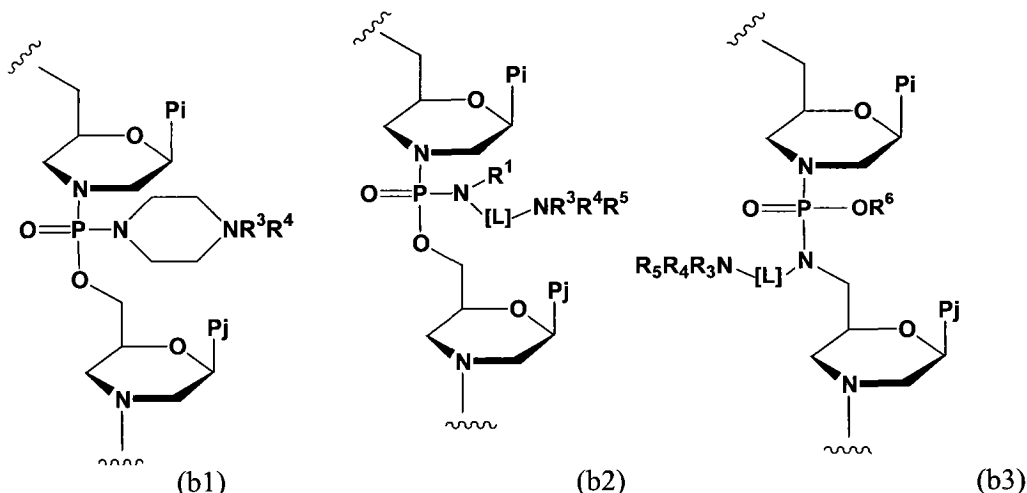


(III)

[0173] 其中 Pi 是碱基配对部分,以上所述的连接将 (III) 的氮原子与相邻亚基的 5' 碳连接。碱基配对部分 Pi 可以相同或不同,通常设计成提供与靶核酸结合的序列。

[0174] 使用上文的 (b1)、(b2) 和 (b3) 连接类型的实施方案连接吗啉代亚基 (III),按以下进行了图示说明:

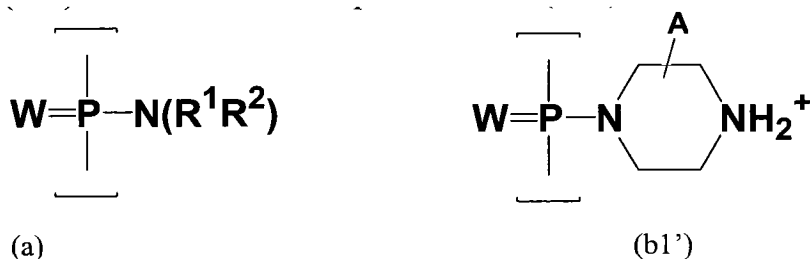
[0175]



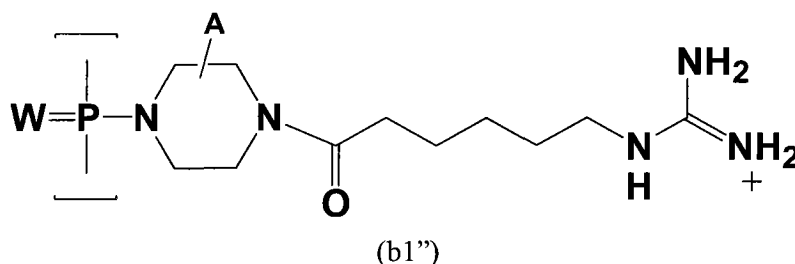
[0176] 优选地,寡聚体中所有阳离子连接是相同类型的;即所有 (b1) 类型,所有 (b2) 类型,或所有 (b3) 类型。

[0177] 在其他实施方案中,阳离子连接选自下文所示的连接(b1')和(b1''),其中(b1')在本文中成为“Pip”连接,且(b1'')在本文中称为“GuX”连接:

[0178]



[0179]



[0180] 在以上结构中, W 是 S 或 O, 优选是 O; R¹ 和 R² 中的每一个独立地选自氢和任选地取代的低级烷基, 并且优选是甲基; 和 A 代表在 (b1') 和 (b1'') 中一个或多个碳原子上的氢或非干扰取代基 (即不会对寡聚体结合其预定靶标的能力产生消极影响的取代基)。优选地, 哌嗪环中的环碳原子是非取代的; 但是, 哌嗪环的环碳原子可包括非干扰取代基, 例如甲基或氟。优选地, 至多一个或两个碳原子是这样取代的。

[0181] 在其他实施方案中, 至少 10% 的连接是 (b1') 或 (b1'') 类型; 例如 10% -60%、优选 20% -50% 的连接可以是 (b1') 或 (b1'') 类型。

[0182] 在其他实施方案中, 寡聚体不含有上文本 (b1') 类型的连接。可选地, 寡聚体不含有上文 (b1) 类型的连接, 其中每个 R 第一是 H, R³ 是 H 或 -CH₃, 且 R⁴ 是 H、-CH₃, 或电子对。

[0183] 如下文所述, 吗啉代亚基也可以通过基于非磷亚基间连接而连接, 其中至少一个连接被上文所述的悬垂阳离子基团修饰。

[0184] 可以使用其他寡核苷酸类似物连接, 其在它们的非修饰状态时不带电但也可携带悬垂氨基取代基。例如, 吗啉代环上的 5' 氮原子可以用在磺胺连接或脲连接中 (其中磷分别被碳或硫取代) 且修饰方式类同于以上结构 (b3) 中的 5' 氮原子。

[0185] 提供了具有任何数目的阳离子连接的寡聚体, 包括完全是阳离子连接的寡聚体。然而, 优选地, 寡聚体是部分带电的, 具有例如 10% -80%。在优选实施方案中, 约 10% -60% 优选 20% -50% 的连接是阳离子的。

[0186] 在一个实施方案中, 阳离子连接是分散在主链上。部分带电的寡聚体优选含有至少两个连续不带电的连接; 换言之, 寡聚体优选沿其整个长度都不具有严格交替的模式。

[0187] 也可考虑具有阳离子连接块和不带电连接体区 (block) 的寡聚体; 例如不带电连接的中心侧翼可以是阳离子连接区, 或反之亦然。在一个实施方案中, 寡聚体具有约等长的 5'、3' 和中心区, 在中心域的阳离子连接百分比大于约 50%, 优选大于约 70%。

[0188] 用于反义应用的寡聚体的长度通常是约 10-约 40 个亚基, 更优选约 10-约 30 个亚基, 并且通常 15-25 个碱基, 包括具有 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、36、37、38、39 或 40 个碱基的那些。在某些实施方案中,本发明具有 19-20 个亚基的寡聚体,该长度可用于反义化合物中,可理想地具有 2-10,例如,4-8 个阳离子连接,剩余的是不带电的连接。有 14-15 个亚基的寡聚体理想地具有 2-7 如 3-5 个阳离子连接,剩余的是不带电的连接。

[0189] 每个吗啉代环结构支撑碱基配对部分,以便形成碱基配对部分的序列,该序列通常被设计成可与要治疗的细胞或个体中选定的反义靶标杂交。碱基配对部分可以是在天然 DNA 或 RNA (如 A、G、C、T 或 U) 或诸如次黄嘌呤(核苷肌苷的成分)或 5-甲基胞嘧啶的类似物中发现的嘌呤或嘧啶。

[0190] 肽转运蛋白

[0191] 本发明的反义化合物可包括与能有效增强化合物向细胞转运的富含精氨酸的肽转运部分偶联的寡核苷酸部分。转运部分优选连接于寡聚体的末端,例如如图 1B 和 1C 所示。肽转运部分优选包含 6-16 个选自 X' 亚基、Y' 亚基和 Z' 亚基的亚基,

[0192] 其中:

[0193] (a) 每个 X' 亚基独立地代表赖氨酸、精氨酸或精氨酸类似物,所述类似物是包含结构 $R^1N=C(NH_2)R^2$ 的侧链的阳离子 α -氨基酸,其中 R^1 是 H 或 R; R^2 是 R、 $-NH_2$ 、 $-NHR$ 或 $-NR_2$, 其中 R 是任选地取代的低级烷基或任选地取代的低级烯基; R^1 和 R^2 可连接在一起形成环; 且侧链是通过 R^1 或 R^2 与所述氨基酸连接;

[0194] (b) 每个 Y' 亚基独立地代表中性氨基酸 $-C(=O)-(CHR)_n-NH-$, 其中 n 是 2-7, 且每个 R 都独立地是 H 或甲基; 和

[0195] (c) 每个 Z' 亚基都独立地代表具有中性芳烷基侧链的 α -氨基酸;

[0196] 其中肽包含由 $(X'Y'X')_p$ 、 $(X'Y')_m$ 和 / 或 $(X'Z'Z')_p$ 中至少一个所代表的序列, 其中 p 是 2-5 和 m 是 2-8。特定实施方案包括独立选自 $(X'Y'X')_p$ 、 $(X'Y')_m$ 和 / 或 $(X'Z'Z')_p$ 的多种组合, 包括例如具有序列 $(X'Y'X')(X'Z'Z')(X'Y'X')(X'Z'Z')$ (SEQ ID NO:637) 的肽。

[0197] 在选定的实施方案中,对于每个 X', 侧链部分是胍基,如在氨基酸亚基精氨酸(Arg)中。在某些实施方案中,每个 Y' 都独立地是 $-C(=O)-(CH_2)_n-CHR-NH-$, 其中 n 是 2-7 而 R 是 H。例如,当 n 是 5 且 R 是 H 时, Y' 是 6-氨基己酸亚基,在本文中缩写成 Ahx; 当 n 是 2 且 R 是 H 时, Y' 是 β -丙氨酸亚基,在本文中缩写成 B。某些实施方案涉及具有不同中性氨基酸组合的载体肽,包括例如包含序列 $-RahxRRBRRAhxRRBRAhx-B-$ (SEQ ID NO:578) 的肽,其含有 β -丙氨酸和 6-氨基己酸两者。

[0198] 优选的这类型肽包括包含与单个 Y' 亚基交替的精氨酸二聚体的那些肽,其中 Y' 优选是 Ahx 或 B 或两者。实例包括具有式 $(RY'R)_p$ 和 / 或式 $(RRY')_p$ 的肽,其中 p 是 1-2-5 而其中 Y' 优选是 Ahx。在一个实施方案中, Y' 是 6-氨基己酸亚基, R 是精氨酸而 p 是 4。某些实施方案包括至少两个 $(RY'R)_p$ 和 $(RRY')_p$ 的多种线性组合,包括例如,具有序列 $(RY'R)(RRY')(RY'R)(RRY')(RY'R)(RRY')(RY'R)(RRY')$ (SEQ ID NO:638), 或 $(RRY')(RY'R)(RRY')(RY'R)(RRY')(RY'R)(RRY')(RY'R)$ (SEQ ID NO:639) 的说明性的肽。考虑了其他组合。在另一说明性实施方案中,每个 Z' 都是苯丙氨酸,且 m 是 3 或 4。

[0199] 偶联的肽优选通过连接体 Ahx-B 与寡聚体末端连接,其中 Ahx 是 6-氨基己酸亚基,而 B 是 β -丙氨酸亚基,如图 1B 和 1C 所示。

[0200] 在选定的实施方案中,对于每个 X',侧链部分独立地选自:胍基(HN=C(NH₂)NH-)、脒基(HN=C(NH₂)CH-)、2-氨基二氢嘧啶、2-氨基四氢嘧啶、2-氨基嘧啶和 2-氨基嘧啶,其优选选自胍基和脒基。在一个实施方案中,侧链部分是如氨基酸亚基精氨酸(Arg)中的胍基。

[0201] 在某些实施方案中,Y'亚基可以是连续的,因为在 Y'亚基之间没有 X'亚基干扰,或在 X'亚基之间单独散布。在某些实施方案,连接亚基可以在 Y'亚基之间。在一个实施方案中,Y'亚基是在转运蛋白的末端;在其他实施方案中,它们的侧翼是 X'亚基。在另一优选实施方案中,每个 Y'都是 -C(=O)-(CH₂)_n-CHR-NH-,其中 n 是 2-7 而 R 是 H。例如,当 n 是 5 和 R 是 H 时,Y'是 6-氨基己酸亚基,在本文中缩写成 Ahx。在这些基团选定的实施方案中,每个 X'都包含如精氨酸亚基的胍基侧链部分。优选的这类型肽包括包含与单个 Y'亚基交替的精氨酸二聚体的那些肽,其中 Y'优选是 Ahx。实例包括具有式 (RY'R)₄或式 (RRY')₄的肽,其中 Y'优选是 Ahx。在后面的情况中,核酸类似物优选与末端 Y'亚基相连,优选在 C-末端,例如如图 1B 和 1C 所示。优选的连接体具有 AhxB 结构,其中 Ahx 是 6-氨基己酸亚基而 B 是 β-丙氨酸亚基。

[0202] 相对于不存在连接的转运部分时寡聚体的摄取,和相对于缺乏疏水亚基 Y'的连接的转运部分的摄取,上述的运输部分表现出极大地增强所连接寡聚体进入细胞。相对于缺乏亚基 Y'的连接的转运部分对试剂的摄取,在哺乳动物细胞对化合物的摄取上,这种增强摄取被证明优选增加至少 2 倍,优选增加 4 倍。相对于非偶联化合物,摄取优选增强至少 20 倍,更优选 40 倍。

[0203] 转运部分的另一优势在于其稳定反义化合物与其靶核酸序列之间双链体的预期能力,推测借助于带正电的转运部分和带负电的核酸之间的静电作用。如上所述,转运蛋白中带电亚基的数目小于 14,优选 8-11 之间,因为太高数目的带电亚基可导致序列特异性降低。

[0204] 使用富含精氨酸的肽转运蛋白(即细胞穿透肽)特别可用于实施本发明。已经证明某些肽转运蛋白可非常有效地将反义化合物递送至初级细胞(primary cell)包括肌肉细胞中(Marshall,Oda et al. 2007;Jearawiriyapaisarn,Moulton et al. 2008;Wu,Moulton et al. 2008)。而且,与其他肽转运蛋白例如 Penetratin 和 Tat 肽相比,本文所述的肽转运蛋白,当与反义 PMO 偶联时,表现出增强的改变几个基因转录物的剪接的能力(Marshall,Oda et al. 2007)。特别优选的是下表 3 所列的 P007、CP06062 和 CP04057 转运肽(分别是 SEQ ID NOS:573、578 和 577)。

[0205] 示例性的肽转运蛋白,包括连接体(B或 AhxB)在内,在下表 B 中给出。优选的序列是称为 CP06062(SEQ ID NO:578)、P007(SEQ ID NO:573)和 CP04057(SEQ ID NO:577)的序列。

[0206] 表 B. 用于细胞内递送 PMO 的示例性肽转运蛋白

[0207]

肽	序列(N-末端至 C-末端)	SEQ ID NO:
---	----------------	---------------

[0208]

rTAT	RRRQRRKKRC	570
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFFC	571
(RAhx) ₄ B	RAhxRAhxRAhxRAhxB	572
(RAhxR) ₄ AhxB; (P007)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	573
(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	574
(RAhx) ₆ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	575
(RAhx) ₈ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	576
(RAhxR) ₅ AhxB (CP05057)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	577
(RAhxRRBR) ₂ AhxB; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	578
MSP	ASSLNIA	579

[0209] 制剂

[0210] 在某些实施方案中,本发明提供了适宜于治疗递送本文所述反义寡聚体的制剂和组合物。因此,在某些实施方案中,本发明提供了药物可接受的组合物,其包含治疗有效量的一种或多种本文所述寡聚体,所述寡聚体与一种或多种药物可接受载体(添加剂)和/或稀释剂配制在一起。尽管可以单独给予本发明的寡聚体,但优选以药物制剂(组合物)给予所述化合物。

[0211] 递送核酸分子的方法描述于例如 Akhtar et al.,1992, Trends Cell Bio., 2:139; 和 Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivan et al.,PCT WO 94/02595 中。这些或其他方案可用于递送实际上任何核酸分子,包括本发明的分离的寡聚体。

[0212] 如下文所详述的,本发明的药物组合物可特别地制剂成用于固体或液体形式给药,包括适用于以下的那些:(1)口服给药,例如兽用顿服药(drench,水性或非水性溶液或悬浮液),片剂,如靶向颊、舌下和全身吸收的那些片剂,大药丸,粉剂,颗粒,应用于舌头的糊剂(paste);(2)通过皮例如下、肌肉内、静脉内或脑膜注射肠胃外给药,例如无菌溶液或悬浮液,或持续释放的制剂;(3)局部应用,例如作为应用于皮肤的乳剂、膏剂(ointment),或控制释放的贴剂或喷雾;(4)经阴道或直肠的,例如阴道栓剂、乳剂或泡沫;(5)舌下的;(6)经眼睛的;(7)经皮的;或(8)经鼻的。

[0213] 术语“药物可接受的”在本文用于表示,在合理医学判断范围之内,适宜用于与人类和动物组织接触且无过量毒性、炎症、过敏反应或其他问题或并发症,具有合理的优势/风险比的那些化合物、物质、组合物和/或剂型。

[0214] 本文所用的术语“药物可接受的载体”表示药物可接受的物质、组合物或媒介,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制备辅剂(如润滑剂、云母、硬脂酸镁、钙或锌,或硬脂酸),或溶剂封装物质,参与将主题化合物从一个器官,或身体一部分携带或转运至另一器官,或身体其他部分。每个载体在与制剂的其他成分相容的意义上必须是“可接受的”且

对患者无害。

[0215] 可作为药物可接受的载体的物质的一些实例包括但不限于：(1) 糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和纤维素乙酸酯；(4) 粉末状黄蓍胶；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 云母；(8) 赋形剂，例如可可油和栓蜡；(9) 油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 乙二醇，例如丙二醇；(11) 多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 褐藻酸；(16) 无热源水；(17) 等渗盐水；(18) 林格氏溶液；(19) 乙醇；(20) pH 缓冲溶液；(21) 聚酯、聚碳酸酯和 / 或聚酸酐；和 (22) 药物制剂中所用的其他非毒性相容物质。

[0216] 适宜与本发明反义寡聚体一起配制的试剂的其他非限制性实例包括：PEG 偶联的核酸，磷脂偶联的核酸，含亲脂部分的核酸，硫代磷酸酯，可以增强药物进入多种组织的 P-糖蛋白抑制剂（例如 Pluronic P85）；生物可降解聚合物，例如植入后持续释放递送的聚（DL-乳酸-钴乙交酯）微球（Emerich, DF et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58）Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.；和装载的纳米微粒，例如由聚丁基氰基丙烯酸酯制成的纳米微粒，其可递送药物穿过血管脑屏障并改变神经元吸收机制（Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999）。

[0217] 本发明特征还在于包含含有聚（乙烯乙二醇）脂质的表面修饰脂质体（PEG-修饰的、分支和不分支或其组合，或长循环脂质体或隐形脂质体）的用途。本发明的寡聚体也可包含多种分子量的共价连接的 PEG 分子。这些制剂提供了增强药物在靶组织中累积的方法。这类药物载体抵抗单核噬菌体系统（MPS 或 RES）的调理和清除，由此实现封装药物更长的血液循环时间和增强的组织暴露（Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627；Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011）。已经表明，这些脂质体选择性地累积于肿瘤中，推测这借助于溢出和捕获于新血管形成的靶组织中（Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276；Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90）。特别是与已知在 MPS 组织中累积的常规阳离子脂质体相比，长循环脂质体增强 DNA 和 RNA 的药代动力学和药物效力学（Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 270, 24864-24870；Choi et al., International PCT Publication No. WO 96/10391；Ansell et al., International PCT Publication No. WO 96/10390；Holland et al., International PCT Publication No. WO 96/10392）。基于它们避免在代谢活跃的 MPS 组织例如肝和脾中累积的能力，与阳离子脂质体相比，长循环脂质体也可能更大程度地保护药物免受核酸酶降解。

[0218] 在另一实施方案中，本发明包括制备用于递送的寡聚体组合物，如美国专利第 6,692,911 号、第 7,163,695 号和第 7,070,807 号所述。在这方面，在一个实施方案中，本发明提供了在含有如美国专利第 7,163,695 号、第 7,070,807 号和第 6,692,911 号所述的赖氨酸和组氨酸（HK）共聚物的组合物中的本发明寡聚体，其是单独的或与 PEG（如分支或不分支的 PEG 或两者的混合）组合，与 PEG 和靶向部分组合或前述任何与交联剂的组合。在某些实施方案中，本发明提供了在包含葡萄糖酸修饰的聚组氨酸或葡萄糖化-聚组氨酸 / 运铁蛋白-聚组氨酸的组合物中的反义寡聚体。本领域技术人员也应当认识到，组合物内具有与 His 和 Lys 类似特性的氨基酸可被取代。

[0219] 本文所述寡聚体的某些实施方案可含有碱性功能基团，例如氨基或烷氨基，因而

能够与药物可接受的酸形成药物可接受的盐。在这方面,术语“药物可接受的盐”是指本发明化合物的相对无毒性的无机和有机酸加成盐。这些盐可在给药媒介或剂型制备过程中原位制备,或通过使纯化的本发明化合物以其游离碱性形式与适宜的有机或无机酸个别反应,并分离在后续纯化期间所形成的酸来制备。代表性盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、二硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、延胡索酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐(naphylate)、甲磺酸盐、葡萄糖庚酸盐、乳糖酸盐和十二烷基磺酸盐等等(参见如 Berge et al. (1977) “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66 :1-19)。

[0220] 主题寡聚体的药物可接受的盐包括所述化合物的常规无毒性盐或季铵盐,如来自无毒性有机酸或无机酸。例如,这些常规无毒性盐包括衍生于无机酸的盐,所述无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、磺胺酸、磷酸、硝酸等;和由有机酸的制备盐,所述有机酸如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、棕榈酸、马来酸、羟基马来酸、苯基乙酸、谷氨酸、苯甲酸、脂环酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲烷磺酸、乙烷二磺酸、草酸、异硫酸等制备的盐。

[0221] 在某些实施方案,本发明的寡聚体可含有一个或多个酸性功能基团,因而其能够与药物可接受的碱形成药物可接受的盐。在这些情况中,术语“可接受的盐”是指本发明化合物的相对无毒性的无机和有机碱加成盐。这些盐同样可在给药媒介或剂型制备过程中原位制备,或通过使纯化的化合物以其游离的酸形式,与诸如药物可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或重碳酸盐的适宜的碱,与氨,或与药物可接受的有机伯胺、仲胺或叔胺个别反应,来制备。代表性碱性或碱土盐包括锂、钠、钾、钙、镁和铝盐等。可用于形成碱加成盐的代表性有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等。(参见如 Berge et al., 同上)。

[0222] 润湿剂、乳化剂和润滑剂,例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、隔离剂、包衣、甜味剂、风味剂和增香剂、防腐剂和抗氧化剂,也可存在于组合物中。

[0223] 药物可接受抗氧化剂的实例包括:(1) 水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2) 油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、丙基五倍子酸盐、 α -生育酚等;和(3) 金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0224] 本发明制剂包括适宜口服、鼻、局部(包括颊和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外给药的那些制剂。制剂可便利地存在于单位剂型中并通过药物领域公知的任何方法制备。可与载体物质组合产生单剂型的活性成分的量会根据要治疗的宿主、具体给药模式而变化。可与载体物质组合产生单剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的化合物的量。通常,在百分率中,该量的范围通常为约 0.1% -99% 的活性成分,优选约 5% -70%,最优选约 10% -30%。

[0225] 在某些实施方案中,本发明制剂包含选自环状糊精、纤维素、脂质体、诸如胆汁酸的胶束形成剂和诸如聚酯和聚酸酐的聚合载体的赋形剂;和本发明的寡聚体。在某些实施方案中,前述制剂使本发明的寡聚体是口服生物有效的。

[0226] 制备这些制剂或组合物的方法包括使本发明寡聚体与载体和任选的一种或多种辅助成分结合的步骤。通常,制剂是通过以下制备:使本发明化合物与液体载体或精细固体

载体或两者均匀且密切地结合,然后如果需要使产物成型。

[0227] 适宜口服给药的本发明制剂可以是胶囊、药包(cachet)、丸剂、片剂、糖锭(使用风味基质,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉剂、颗粒形式或作为在水性或非水性液体中的溶液或悬浮液,或作为水包油或油包水液体乳剂,或作为酞剂或糖浆,或作为锭剂(使用惰性基质,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口剂等,每个都含有预定量的本发明化合物作为活性成分。本发明寡聚体也可以作为大药丸、舔剂或贴剂给药。

[0228] 在用于口服给药的本发明固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣片、粉剂、颗粒、trouches等)中,活性成分可与一种或多种诸如柠檬酸钠或磷酸二钙的药物可接受的载体和/或任何以下物质混合:(1)填充剂或增补剂例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)润湿剂,例如甘油;(4)崩解剂,例如琼脂-琼脂、碳酸钙,马铃薯或木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)溶液阻滞剂例如石蜡;(6)吸收加速剂,例如季铵化合物和表面活性剂,例如泊洛沙姆和月桂基硫酸钠;(7)润湿剂,例如十六烷基醇、单硬脂酸甘油酯和非离子表面活性剂;(8)吸收剂,例如高岭土和皂粘土;(9)润滑剂,例如云母、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙烯二醇、月桂基硫酸钠、硬脂酸锌、硬脂酸钠、硬脂酸以及其混合物;(10)着色剂;和(11)控释剂,例如交聚维酮(crospovidone)或乙基纤维素。在胶囊/片剂和丸剂的情况下,药物组合物也可包含缓冲剂。相似类型的固体组合物也可用作软和硬壳胶囊的填充剂,其使用如乳糖或奶糖类以及高分子量聚乙烯二醇等的赋形剂。

[0229] 通过任选地与一种或多种辅助成分压缩或成型可制备片剂。压缩片剂的制备可使用粘合剂(如明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,淀粉羟乙酸钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性或分散剂。成型片剂可通过在适宜机械中将用惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物的混合物成型进行制备。

[0230] 本发明药物组合物的片剂和其他固体剂型,例如糖衣片,胶囊和颗粒可任选地与包衣和壳例如肠溶衣和药物制剂领域公知的其他包衣压痕或制备。它们也可使用例如提供期望释放特征的不同比例的羟丙基甲基纤维素、其他聚合基质、脂质体和/或微球体配制,以便提供其中活性成分的缓释或控释。它们可制剂成快速释放,如冻干。它们可以通过细菌保持过滤器(bacteria-retaining filter)过滤或者通过并入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,所述灭菌剂可在使用前立即溶解于无菌水或一些其他无菌可注射介质中。这些组合物也可任选含有遮光剂(opacifying agent),可以是这样的组合物:其任选地以延迟方式的组合物仅释放活性成分,或优选在胃肠道的某些部分中。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。活性成分可以是微胶囊形式,如果适合,与一种或多种上述赋形剂一起的微胶囊形式。

[0231] 用于口服给予本发明化合物的液体剂型包括药物可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酞剂。除了活性成分之外,液体剂型可含有本领域常用的惰性稀释剂,例如水,或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是,棉籽油、落花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯,及其混合物。

[0232] 除了惰性稀释剂,口服组合物也可含有佐剂,例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、风味剂、着色剂、增香剂和防腐剂。

[0233] 悬浮液除了活性化合物之外还可含有悬浮剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨聚糖酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝 (aluminum metahydroxide)、皂粘土 (bentonite)、琼脂-琼脂和黄耆胶,及其混合物。

[0234] 用于直肠或阴道给药的制剂可以呈现为栓剂,其可通过将一种或多种本发明化合物与一种或多种适宜的包含例如可可油、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸的无刺激赋形剂或载体混合而制备,所述栓剂在室温下是固体,但在体温下为液体,因此会在直肠或阴道腔内融化并释放活性化合物。

[0235] 用于局部或经皮肤给予本文所提供的寡聚体的制剂或剂型包括粉剂、喷雾、膏剂、糊剂、乳剂、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。活性寡聚体可以在无菌条件下与药物可接受的载体,和与任何必需的防腐剂、缓冲剂、推进剂混合。除本发明活性化合物之外,膏剂、糊剂,乳剂和凝胶可含有赋形剂,例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄耆胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、皂粘土、硅酸、云母和氧化锌,或其混合物。

[0236] 除本发明活性寡聚体之外,粉剂和喷雾可含有赋形剂,例如乳糖、云母、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。喷雾可额外含有常规推进剂,例如氯氟代烃,和挥发性非取代烃,例如丁烷和丙烷。

[0237] 经皮贴剂具有控制递送本发明寡聚体至身体的额外优势。这种剂型可通过将寡聚体溶解或分散在适当介质而制备。吸收增强剂可也用于增加试剂穿过皮肤的流动。除了本领域已知其他方法外,这种流动的速度还可以通过提供速度控制膜或将试剂分散在聚合物基质或凝胶中来控制。

[0238] 适宜胃肠外给药的药物组合物可包含一种或多种本发明寡聚体和一种或多种药物可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳化液,或在使用前马上复原成无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末,可注射溶液或分散液可以含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预定受体的血液等渗的溶质或悬浮或增稠剂。可用于本发明药物组合物的适宜的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和其适宜混合物,植物油,例如橄榄油,和可注射有机酯,例如油酸乙酯。通过使用包衣物质,例如卵磷脂,通过在分散液的情况下维持必要的颗粒大小和通过使用表面活性剂,可以维持适当流动性。

[0239] 这些组合物也可含有佐剂例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。预防微生物对主题寡聚体的作用,可通过包含多种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等来确保。也可期望将等渗剂,例如糖、氯化钠等包含于组合物中。此外,通过包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以实现可注射药物形式的延长吸收。

[0240] 在一些情况中,为了延长药物效果,期望减缓皮下或肌肉注射的药物的吸收。除了本领域已知的其他方法外,这可以通过使用具有弱水溶性的结晶或无定形物质的液体悬浮液来实现。药物的吸收速度随后取决于其溶解速度,而溶解速度反过来取决于晶体大小和结晶形式。可选地,胃肠外给予的药物形式的延迟吸收可通过将药物溶解或悬浮在油媒介中来实现。

[0241] 可注射的贮库 (depot) 形式可通过在生物可降解聚合物例如聚乳酸-聚乙二醇中形成主题寡聚体的微胶囊基质来制备。根据寡聚体和聚合物的比例,以及所用特定聚合物的特性,可以控制寡聚体释放速度。其他生物可降解聚合物的实例包括聚(原酸酯

(orthoester)) 和聚(酸酐)。贮库可注射制剂也可通过将药物陷入与身体组织相容的脂质体或微乳剂来制备。

[0242] 当本发明寡聚体作为药物给予人和动物时,它们可以给予本身或作为药物组合物给予,所述药物组合物含有例如与药物可接受载体组合的 0.1-99% (优选 10-30%) 的活性成分。

[0243] 如上所述,本发明制剂或制品可以口服、胃肠外、局部或直肠给予。它们以适宜每种给药途径的形式给予。例如,它们以片剂或胶囊形式通过注射、吸入、眼睛洗剂、膏剂、栓剂等给药,通过注射、输注或吸入;通过洗剂或膏剂局部给药;和栓剂直肠给药。

[0244] 本文所用的短语“胃肠外给药 (parenteral administration)”和“胃肠外给药 (administered parenterally)”表示除肠和局部给药外的给药模式,通常通过注射,包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0245] 本文所用的短语“全身给药”,“全身地给药”,“外周给药”和“外周地给药”表示除了向中枢神经系统直接给药外,化合物、药物或其他物质的给药,例如皮下给药,以便它进入患者全身,因而进行代谢和其他类似过程。

[0246] 无论所选给药途径,以适宜水合形式使用的本发明寡聚体,和/或本发明药物组合物可以通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药物可接受的剂型。本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平是可以变化的,以便获得对于特定患者、组合物和给药模式而言有效实现期望治疗反应且对患者无不可接受毒性的活性成分的量。

[0247] 选定的剂量水平会取决于多种因素,包括所用的本发明具体寡聚体或其酯、盐或酰胺的活性,给药途径,给药时间,所用具体寡聚体的排泄或代谢速度,吸收速度和吸收程度,治疗持续时间,与所用的具体寡聚体组合使用的其他药物、化合物和/或物质,所治疗患者的年龄、性别、体重、疾病状况、整体健康和先前病历,以及医学领域公知的类似因素。

[0248] 具有本领域普通技术的医生或兽医可容易地确定和规定所需要的药物组合物的有效量。例如,医生或兽医可以以比所需的水平低的水平开始药物组合物中所用的本发明化合物的剂量,以便实现期望治疗效果并逐渐增加剂量直至实现期望效果。通常本发明化合物适宜的每日剂量是该化合物有效产生治疗效果的最低剂量。这种有效剂量通常取决于上述因素。通常,当用于指定效果时,对于患者而言,本发明化合物的口服、静脉内、脑室内和皮下剂量是每天每千克体重约 0.0001mg 至约 100mg。

[0249] 如果期望,活性化合物的有效每日剂量可以在全天,任选地以单位剂型,作为以适当间隔单独给予的两个、三个、四个、五个、六个或更多亚剂量给予。在某些情况下,每天进行一次剂量给药。在某些实施方案中,按照需要每 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 天,或每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 周,或每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 月进行一次或多次剂量给药,以维持功能性肌营养不良蛋白的期望表达。

[0250] 核酸分子可通过熟悉本领域的人所已知的多种方法给予细胞,包括但不限于如本领域已知和本文所述的通过电离子渗透法,或通过并入其他媒介,例如水溶胶,环状糊精,生物可降解纳米胶囊,和生物粘附微球封装在脂质体内。在某些实施方案中,微乳化技术可用于改善亲脂性(不溶于水)药剂的生物有效性。实例包括 Trimetrine (Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991 and REV

5901 (Sheen, P. C., et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991)。除了其他优势外,微乳化还提供了通过优选将吸收定向至淋巴系统而非循环系统增强的生物有效性,这由此绕过肝并防止化合物在肝胆循环中被破坏。

[0251] 在本发明的一个方面,制剂含有本文提供的寡聚体和至少一种两性载体所形成的微团,其中该微团的平均直径小于约 100nm。更优选的实施方案提供了平均直径小于约 50nm 的微团,还更优选的实施方案提供了平均直径小于约 30nm,或甚至小于约 20nm 的微团。

[0252] 尽管考虑了所有适宜两性载体,但目前优选的载体通常是具有公认安全 (GRAS) 状态的那些两性载体,并且其能够溶解本发明的化合物并在当溶液开始与复合水相 (complex water phase,例如在人胃肠道所发现的) 接触的稍后阶段将其微乳化。通常,满足这些要求的两性成分的 HLB (亲水比亲脂平衡值) 为 2-20,它们的结构含有 C-6 至 C-20 的直链脂族基。实例是聚乙烯-乙二醇化的脂肪酸甘油酯和聚乙二醇。

[0253] 两性载体实例包括饱和和单不饱和聚乙烯乙二醇化脂肪酸甘油酯,例如由完全或部分氢化的多种植物油获得的那些。这类油优选由三、双和单脂肪酸甘油酯和相应脂肪酸的双和单聚乙烯乙二醇酯组成,特别优选的脂肪酸组成包括癸酸 4-10、癩酸 3-9、月桂酸 40-50、肉豆蔻酸 14-24、棕榈酸 4-14 和硬脂酸 5-15%。另类一可用的两性载体包括部分酯化的山梨聚糖和 / 或山梨醇,具有饱和或单不饱和脂肪酸 (SPAN 系列) 或相应的乙氧基化类似物 (TWEEN 系列 (TWEEN-series))。

[0254] 特别可用的是商购可获得的两性载体,包括 Gelucire 系列、Labrafil, Labrasol 或 Lauroglycol (都是由 Gattefosse Corporation, Saint Priest, France 制造和销售)、PEG- 单 - 油酸酯、PEG- 双 - 油酸酯、PEG- 单 - 月桂酸酯和双 - 月桂酸酯、卵磷脂、聚山梨醇酯 80 等 (USA 和全世界的许多公司都生产和销售)。

[0255] 在某些实施方案中,递送可通过使用脂质体、纳米胶囊、微粒、微球、脂质颗粒、囊泡等进行,用于将本发明组合物导入适宜的宿主细胞内。特别是,本发明组合物可配制用于通过封装在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球、纳米颗粒等进行递送。制剂和这种递送媒介的使用可使用已知和常规技术实施。

[0256] 适宜用于本发明的亲水性聚合物这样的亲水性聚合物:其易溶于水,可以共价连接于形成囊泡的脂质上,并且在体内可以是耐受的且无毒性作用 (即是生物相容的)。适宜的聚合物包括聚乙二醇 (PEG)、聚乳酸 (也称为聚交酯)、聚乙醇酸 (也称为聚乙醇酸交酯)、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物和聚乙烯醇。在某些实施方案中,聚合物的分子量是约 100 或 120 道尔顿,高达约 5000 或 10000 道尔道,或约 300 道尔道至约 5000 道尔道。在其他实施方案中,聚合物是分子量为约 100 至约 5000 道尔道,或约 300 至约 5000 道尔道的聚乙二醇。在某些实施方案中,聚合物是 750 道尔道的聚乙二醇 (PEG(750))。聚合物也可以由其单体数目来定义;本发明的优选实施方案利用至少约 3 个单体的聚合物,这种 PEG 聚合物由三个单体 (约 150 道尔道) 组成。

[0257] 适宜用于本发明的其他亲水聚合物包括聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基恶唑啉 (polymethoxazoline)、聚乙基恶唑啉 (polyethyloxazoline)、聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺 (polyhydroxypropyl methacrylamide)、聚甲基丙烯酸酰胺、聚二甲基丙烯酸酰胺 (polydimethylacrylamide) 和衍生纤维素,例如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0258] 在某些实施方案中,本发明的制剂包含生物相容的聚合物,其选自以下组:聚酰胺、聚碳酸酯、聚烯烃 (polyalkylene)、丙烯酸和甲基丙烯酸酯的聚合物、聚乙烯聚合物、聚乙醇酸交酯、聚硅氧烷、聚亚安酯及其共聚物、纤维素、聚丙烯、聚乙烯,聚苯乙烯、乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酐、聚(原)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(乳酸-钴-己内酯)、多糖、蛋白、聚透明质酸、聚氰基丙烯酸酯和它们的掺合物、混合物或共聚物。

[0259] 环状糊精是由分别称为希腊字母 α 、 β 或 γ 的 6、7 或 8 个葡萄糖单元组成的环状寡糖。葡萄糖单元通过 1,4 糖苷键连接。作为糖单元椅型构象的结果,所有仲羟基(在 C-2, C-3) 都位于环的一侧,而在 C-6 的所有伯羟基都位于另一侧。结果,外部面是亲水性的,使得环状糊精是水溶性的。相反,环状糊精的腔内是疏水性的,因为它们通过 C-3 和 C-5 原子的氢和通过酯样的氧而连接。这些基质实现了与多种相对疏水性化合物的复合,包括例如类固醇化合物,例如 17 α -雌二醇(参见如 van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113(1994))。由范德华相互作用和形成氢键实现复合。环状糊精化学性质的概览参见 Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822(1994)。

[0260] 环状糊精衍生物的物化特性强烈地取决于取代的种类和程度。例如它们在水中的溶解度从不溶(如三乙酰- β -环状糊精)至 147%的可溶(w/v)(G-2- β -环状糊精)。此外,它们可溶于许多有机溶剂。环状糊精的特性使得可通过增加或减少它们的溶解度来控制多种制剂成分的溶解度。

[0261] 许多环状糊精及其制备方法已有描述。例如 Parmeter(I), et al. (U. S. Pat. No. 3, 453, 259) 和 Gramera, et al. (U. S. Pat. No. 3, 459, 731) 描述了电中性环状糊精。其他衍生物包括具有阳离子特性的环状糊精 [Parmeter(II), U. S. Pat. No. 3, 453, 257]、不溶的交联环状糊精 (Solms, U. S. Pat. No. 3, 420, 788) 和具有阴离子特性的环状糊精 [Parmeter(III), U. S. Pat. No. 3, 426, 011]。具有阴离子特性的环状糊精衍生物中,羧酸、亚磷酸 (phosphorous acid)、三价膦酸、膦酸、磷酸、硫代膦酸、硫代磺酸和磺酸可附加在母环状糊精上 [参见 Parmeter(III), supra]。而且, Stella, et al. 描述了硫烷基醚环状糊精衍生物(美国专利第 5, 134, 127 号)。

[0262] 脂质体由至少一种密封水性内部空间的脂质双层膜组成。脂质体的特征在于膜类型和大小。小单层囊泡 (small unilamellar vesicles, SUVs) 具有单层膜,其直径通常在 0.02-0.05 μm 之间;大单层囊泡 (large unilamellar vesicles, LUVs) 通常大于 0.05 μm 。几层大囊泡和多层大囊泡具有多层通常同中心膜层,并且通常大于 0.1 μm 。具有几个非同中心膜的脂质体即在较大囊泡中含有几个较小囊泡,被称为多囊泡囊泡。

[0263] 本发明的一个方面涉及包含含有本发明寡聚体的脂质体的制剂,其中脂质体膜制剂成可提供携带性能增强的脂质体。可选地或另外,本发明化合物可包含在在脂质体的脂质体双层内或吸附在其上。本发明的寡聚体可用脂质表面活性剂聚集并在脂质体内部空间运载;在这些情况中,脂质体膜被制剂成可抵御活性剂-表面活性剂聚集体的破坏作用。

[0264] 根据本发明的一个实施方案,脂质体的脂质双层含有用聚乙二醇 (PEG) 衍生的脂质,以便 PEG 链从脂质双层内表面延伸至被脂质体密封的内部空间,并从脂质双层的外部延伸至周围环境。

[0265] 包含在本发明脂质体内的活性剂是溶解形式的。表面活性剂和活性剂(例如含有感兴趣活性剂的乳剂或微团)的聚集体可以陷入本发明所述脂质体的内部空间。表面活性

剂的作用是分散和溶解活性剂,并可选自任何适宜的脂肪族、脂环族或芳族表面活性剂,包括但不限于生物相容的不同链长的溶血磷脂酰胆碱(LPCs)(例如从约C14至约C20)。聚合物衍生脂质,例如PEG-脂质,也可用于微团形成,因为它们的作用是抑制微团/膜融合,因为添加聚合物至表面活性剂分子减少了表面活性剂的CMC并辅助微团的形成。优选的是具有微摩尔范围的CMCs的表面活性剂;更高CMC表面活性剂可用于制备陷入本发明脂质体内的微团。

[0266] 本发明所述脂质体可通过本领域已知的任何多种技术制备。参见如美国专利第4,235,871号、公开的PCT申请WO 96/14057、New RRC, *Liposomes: A practical approach*, IRL Press, Oxford(1990), pages 33-104; Lasic DD, *Liposomes from physics to applications*, Elsevier Science Publishers B V, Amsterdam, 1993。例如,本发明脂质体可通过将亲水性聚合物衍生的脂质扩散到预成型的脂质体内来制备,例如以对应于脂质体所需的衍生的脂质的最终摩尔百分比的脂质浓度,通过将预成型的脂质体暴露于由脂质接枝聚合物组成的微团。含有亲水性聚合物的脂质体也可通过本领域已知的均质、脂质场水合作用(lipid-field hydration)或挤压技术形成。

[0267] 在另一示例性制剂程序中,首先通过在易于溶解疏水性分子的溶血磷脂酰胆碱或其他低CMC表面活性剂(包括聚合物接枝脂质)中通过超声处理分散活性剂。然后将制得的活性剂的微团悬浮液用于再水合干燥的脂质样品,所述干燥的脂质样品含有聚合物接枝脂质或胆固醇的适宜的摩尔百分比。然后使用本领域已知的挤压技术将脂质和活性剂悬浮液形成在脂质体,通过标准柱分离将所得的脂质体与未封装的溶液分离。

[0268] 在本发明的一个方面,脂质体被制备成在选定大小范围内具有基本均匀的大小。一个有效的控制大小方法涉及挤压脂质体的水性悬浮液使其通过一系列具有选定的统一孔径的聚碳酸膜;膜的孔径大小会大致符合挤压通过该膜所产生的脂质体的最大大小。参见如美国专利第4,737,323号(1988年4月12日)。在某些实施方案中,诸如DharmaFECT[®]和Lipofectamine[®]的试剂可用于将多核苷酸或蛋白导入细胞。

[0269] 本发明制剂的释放特征取决于封装物质、封装的药物的浓度、释放修饰剂的存在。例如,释放可操作成pH依赖性的,例如使用仅在低pH如在胃中或更高pH如在肠道中释放的pH选择性包衣。肠包衣可用于防止释放的发生,直至通过胃之后。封装在不同物质中的多包衣或氰胺混合物可用于获取胃中初始释放,之后在肠道的后期释放。也可通过包含盐或孔形成剂操作释放,它们可通过从胶囊扩散增强药物的水摄取或释放。修饰药物溶解度的赋形剂也可用于控制释放速度。也可以并入增强基质降解或从基质释放的试剂。根据化合物,它们也可添加至药物中,所添加的作为分离相(即微粒),或共溶解在聚合物相中。在大部分情况中量应该介于0.1-30%(w/w 聚合物)。降解增强剂的类型包括无机盐,例如硫酸铵和氯化铵;有机酸例如,柠檬酸、苯甲酸和抗坏血酸;无机碱,例如碳酸钠、碳酸钾、碳酸钙、碳酸锌和氢氧化锌;和有有机碱,例如鱼精蛋白硫酸盐、精胺、胆碱、乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺;和表面活性剂,例如Tween[®]和Pluronic[®]。添加孔形成剂(即水溶性化合物例如无机盐和糖),作为颗粒,其向基质添加微结构。范围通常为1%-30%(w/w 聚合物)。

[0270] 吸收也可通过改变颗粒在消化道中的驻留时间来操作。这可通过例如用或选择作为封装物质即粘膜粘附聚合物包被颗粒来实现。实例包括大部分具有游离羧基的聚合物,例如壳聚糖、纤维素,特别是聚丙烯酸酯(如本文所用的,聚丙烯酸酯是指包括丙烯酸酯基

团和修饰的丙烯酸酯基团的聚合物,例如氰基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯)。

[0271] 通过,寡聚体可配制成包含在外科手术或医学装置或植入物中,或适于通过外科手术或医疗装置或植入物释放。在某些方面,植入物可以包被或用寡聚体处理。例如,水凝胶或其他聚合物,例如生物相容和/或生物可降解聚合物,可以用于包被具有本发明组合物的植入物(即通过使用水凝胶或其他聚合物,组合物可适合与医疗装置一起使用)。用于包被具有试剂的医疗装置的聚合物和共聚物是本领域公知的。植入物的实例包括但不限于支架、药物洗脱支架、缝合线、假体、血管导管、透析导管、血管移植物、人工心脏瓣膜、心脏起搏器,可植入的心律转变器除颤器、IV 针,用于骨骼框架和形成的装置例如针状物(pin)、螺钉(screw)、钢板(plate)和其他装置,以及用于创伤愈合的人工组织基质。

[0272] 除了本文提供的方法之外,通过由其他药物类推,本发明所用的寡聚体可制剂成以任何常规方式给药,用于人和动物医学中。在肌营养不良的治疗中,反义寡聚体和它们相应的制剂可单独给药或与其他治疗策略组合给药,例如成肌细胞移植、干细胞治疗、氨基糖苷类抗生素给药、蛋白体抑制剂,和上调治疗(如上调肌营养不良蛋白相关蛋白,即肌营养不良蛋白的常染色体旁系同源物(paralogue))。

[0273] 本说明书引用的所有出版物和专利申请都通过引用并入本文,就如单个出版物或专利申请特别且单独指出通过引用并入。

[0274] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过说明和实例的方式对前述发明进行了一些详细描述,但在本发明的教导基础上,对本领域普通技术人员显而易见的是,可以对本发明做出某些变化和修饰而不偏离所附权利要求的实质或范围。仅通过说明性而非限制性方式提供了以下实施例。本领域技术人员应当容易地认识到可以变化或修饰许多非关键参数,以产生实质类似的结果。

[0275] 参考文献

[0276] Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, et al. (2004). “Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. (杜兴肌营养不良的反义诱导多外显子跳跃)” *Am J Hum Genet* 74(1):83-92.

[0277] Dunckley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997). “Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides. (通过反义寡核糖核苷酸调控DMD基因的剪接)” *Nucleosides & Nucleotides* 16(7-9):1665-1668.

[0278] Dunckley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). “Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides. (通过反义寡核糖核苷酸在培养Mdx肌肉细胞中修饰肌营养不良蛋白基因的剪接)” *Hum Mol Genet* 7(7):1083-90.

[0279] Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). “Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene. (诱导肌营养不良蛋白基因外显子跳跃的反义寡核苷酸的靶标选择)” *J Gene Med* 5(6):518-27.

[0280] Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). “Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice. (在mdx小鼠肌肉中通过肽偶联吗啉代寡聚体诱导持续的肌营养不良蛋白表达)” *Mol Ther*.

- [0281] Lu, Q. L., C. J. Mann, et al. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. (在mdx肌营养不良小鼠中跳跃突变外显子产生功能量的肌营养不良蛋白)" Nat Med 9(8):1009-14.
- [0282] Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. (改善的反义寡核苷酸在肌营养不良 mdx 小鼠模型中诱导的外显子跳跃)" J Gene Med 4(6):644-54.
- [0283] Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing. (富含精氨酸细胞穿透肽促进反义寡聚体递送至鼠类白细胞并改变 pre-mRNA 剪接)" Journal of Immunological Methods 325(1-2):114-126.
- [0284] Matsuo, M., T. Masumura, et al. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe. (由于杜兴肌营养不良 kobe 的肌营养不良蛋白基因中内外显子删除的肌营养不良蛋白 mRNA 前体剪接期间外显子跳跃)" J Clin Invest 87(6):2127-31.
- [0285] Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. (承受 DMD 转座子部分删除的患者之间表型差异的解释)" Genomics 2(1):90-5.
- [0286] Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. (通过转染与外显子识别序列互补的反义寡脱氧核苷酸在成淋巴细胞中诱导肌营养不良蛋白转录物的外显子跳跃)" Biochem Biophys Res Commun 226(2):445-9.
- [0287] Sazani, P., R. Kole, et al. (2007). "Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. (TNF 总族受体的剪接转换寡聚体及其治疗疾病的应用)" PCT WO2007058894, University of North Carolina
- [0288] Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. (通过反义核苷酸修复哺乳动物细胞中的地中海贫血人 β 球蛋白 mRNA)" Proc Natl Acad Sci U S A 93(23):12840-4.
- [0289] Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. (吗啉代反义寡聚体: 设计, 制备和特性)" Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7(3):187-95.
- [0290] Takeshima, Y., H. Nishio, et al. (1995). "Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe. (通过修饰从肌营养不良蛋白 kobe 的肌营养不良蛋白基因中删除的内外显子序列调控体外上游内含子的剪接)" J Clin Invest 95(2):515-20.
- [0291] van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout, et al. (2001). "Antisense-induced exon

skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. (反义诱导的外显子跳跃恢复 DMD 患者源的肌肉细胞中肌营养不良蛋白的表达)”Hum Mol Genet 10(15):1547-54.

[0292] van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). “Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PR0051. (反义寡核苷酸 PR0051 恢复局部肌营养不良蛋白)”N Engl J Med 357(26):2677-86.

[0293] Wilton, S. D., A. M. Fall, et al. (2007). “Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript. (反义寡核苷酸诱导的穿越人肌营养不良蛋白基因转录物的外显子跳跃)”Mol Ther 15(7):1288-96.

[0294] Wilton, S. D., F. Lloyd, et al. (1999). “Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. (使用反义寡核苷酸从 mdx 肌营养不良蛋白 mRNA 中特异性地去除反义突变)”Neuromuscul Disord 9(5):330-8.

[0295] Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). “Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer. (肌营养不良蛋白的有效援救通过修饰的吗啉代寡聚体改善肌营养不良蛋白缺陷小鼠的心脏功能)”Proc Natl Acad Sci U S A 105(39):14814-9.

[0296] Yin, H., H. M. Moulton, et al. (2008). “Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function. (细胞穿透肽偶联反义寡核苷酸恢复全身肌肉和心脏肌营养不良蛋白表达和功能)”Hum Mol Genet 17(24):3909-18.

实施例

[0297] 材料与方法

[0298] 细胞和组织培养处理条件

[0299] 以低传代数保存在 5% DMSO 溶液 (Sigma) 中的人横纹肌肉瘤细胞 (ATCC, CCL-136; RD 细胞) 在 37°C 水浴中解冻, 直至不再能看见冰银色 (ice sliver) 为止。将细胞以 1.5×10^6 细胞 / 烧瓶接种到组织培养处理的 T75 烧瓶 (Nunc) 内, 烧瓶中含有 24mL 具有 L-谷氨酰胺 (HyClone)、10% 胎牛血清和 1% 青霉素 - 链霉素抗生素溶液 (CelGro) 的加热的 DMEM; 24 小时之后, 吸出培养基, 并用加热的 PBS 将细胞洗涤一次, 添加新鲜培养基。在 37°C 培养箱中, 在 5.0% CO₂ 下, 使细胞生长至 80% 汇合。

[0300] 从 T75 烧瓶中吸出培养基; 用加热的 PBS 将细胞洗涤一次并吸出。在每个 T75 中添加于 37°C 水浴加热的 3mL 胰蛋白酶 / EDTA。在 37°C, 将细胞孵育 52-5 分钟并温和振荡, 直至它们从烧瓶中释放。将细胞悬浮液转移至 15.0mL 圆锥管中; 用 1.0mL 胰蛋白酶 / EDTA 溶液洗涤烧瓶以收集剩余细胞。用 Vi- 细胞 XR 细胞计数器 (Beckman Coulter) 对细胞进行计数。以每孔 2.0×10^5 活细胞, 将细胞接种在组织培养处理的 12 孔板 (Falcon) 中, 每孔含有 1.0mL 培养基。细胞在 37°C 培养箱中于 5.0% CO₂ 下, 孵育过夜。

[0301] 检查十二孔接种板的平坦细胞分布和板粘附。将冻干的肽偶联的磷酸二氨酯吗啉代寡聚体 (PPMOs) 以 2.0mM 重悬在无核酸酶的水 (Ambion) 中, 在细胞处理期间保持在

冰上;为了验证摩尔浓度,使用 NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific),测量 PPMOs。PPMO 处理之前,直接吸出培养基,用加热的 PBS 洗涤细胞。用加热的培养基将 PPMOs 稀释至期望的摩尔浓度;以每孔总计 1.0mL PPMO,处理细胞。检测 PPMOs,一式三份。对于未处理的对照,添加 1.0mL 总体积的新鲜的加热的培养基。将细胞在 37℃ 培养箱中于 5.0% CO₂ 下,孵育 48 小时。

[0302] RNA 提取

[0303] 吸出培养基,用加热的 PBS 洗涤细胞。按照供应商的推荐方案用 QuickGene-Mini80 系统,QuickGene RNA 培养的细胞 HC 试剂盒 S,和具有陶瓷珠均质化的 MagNalyser 提取 RNA。简而言之,用 350uL LRP(每 100uL LRP 添加 10uL β-巯基乙醇)的裂解缓冲液将细胞裂解在处理板中;温和研碎匀浆以确保完全裂解,并将其转移至 MagNalyser 管中。在 MagNalyser 中将管以 2800rpm 旋转 30 秒,以确保完全均质化,并短暂冰冻。添加 50uL SRP 增溶缓冲液并将匀浆涡旋 60 秒。每管添加 170uL > 99% 乙醇,并将匀浆涡旋 60 秒。将匀浆快速旋转并转移至 Mini80RNA 盒中,对样品加压并丢弃流通物。用 750uL WRP 洗涤缓冲液洗涤盒并加压。将 40uL DNase(脱氧核糖核酸酶)溶液(1.25uL Qiagen DNaseI,35uL RDD 缓冲液,3.75uL 无核酸酶水)直接添加至盒膜中;将盒在室温下孵育 4 分钟。用 750uL WRP 将盒洗涤两次,每次洗涤之后加压。将盒置于无核酸酶的管上。向每个膜添加 50uL CRP 的洗脱缓冲液;将膜在室温下孵育 5 分钟。对盒加压并收集洗脱物。将待定量的 RNA 存储在 -80℃。使用 NanoDrop™ 2000 分光光度计对 RNA 进行定量。

[0304] 巢式 RT-PCR

[0305] 使用下表 1 所示的每个肌营养不良蛋白外显子的引物对组实施引物特异性、外显子特异性最佳巢式 RT-PCR 扩增。

[0306] 表 1. 用于 PCR 扩增人肌营养不良蛋白 mRNA 以检测外显子跳跃的引物对组

[0307]

名称	F/R	I/O	序列(5'-3')	外显子	目的	SEQ ID NO:
PS170	F	O	CCAGAGCTTTACCTGAGAAACAAG	48	检测人肌营养不良蛋白中外显子 50 和 51 跳跃	640
PS172	F	I	CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG	49		641
PS174	R	I	CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC	52		642
PS176	R	O	CATTTCATTCAACTGTTGCCTCCG	53		643
PS186	F	O	CAATGCTCCTGACCTCTGTGC	42	检测人肌营养不良蛋白中外显子 44 和 45 跳跃	644
PS187	F	I	GTCTACAACAAAGCTCAGGTCTG	43		645
PS189	F	I	GCAATGTTATCTGCTTCCTCCAACC	46		646
PS190	R	O	GCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGG	46		647
PS192	F	O	CTTGACAGAACTTACCGACTGG	51	检测人肌营养不良蛋白中外显子 53 跳跃	648
PS193	F	I	GCAGGATTTGGAACAGAGGCG	52		649
PS195	R	I	CATCTACATTTGTCTGCCACTGG	54		650
PS197	R	O	GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTCG	55		651

[0308] 所示的引物对表示为分别对应初次或二次扩增的正向或反向 (F/R) 和外部或内部引物对 (I/O)。引物靶标的位置表示在外显子栏中而目的表示可以检测的外显子跳跃事件。例如 PS170 和 PS176 引物在初次扩增中扩增外显子 48-53 区域。然后引物 PS172 和 PS174 在二次扩增中扩增外显子 49-52 区域。这种巢式 PCR 反应将检测外显子 50 和 / 或外

显子 51 两者的外显子跳跃。特异性巢式 RT-PCR 反应条件提供于下文。

[0309] 对于所有样品,将从处理的细胞中提取的 RNA(如上所述)稀释成 20ng/ul。

[0310] 表 2:RT-PCR 和初次扩增的反应设置 (50ul 反应)

[0311]

2x 反应混合物	25 μ l
PS XXX 正向引物 (30 μ M) (参见表 1)	0.5 μ l
PS XXX 反向引物 (30 μ M) (参见表 1)	0.5 μ l
Superscript III 铂 Taq 混合物	2 μ l
模板 RNA (20ng/ μ l)	10 μ l
无核酸酶的水 (50 μ l 总体积)	12 μ l

[0312] 表 3:RT-PCR 和初次扩增程序

[0313]

	温度	时间	
逆转录	55°C	30 分钟	
RT 灭活	94°C	2 分钟	
变性	94°C	1 分钟	8 个循环
退火	59°C	1 分钟	
延伸	68°C	1 分钟	
	4°C	∞	

[0314] 表 4:巢式二次扩增的反应设置 (50ul 反应)

[0315]

10x PCR 缓冲液	5 μ l
dNTP 溶液(10 mM)	0.5 μ l
50 mM MgCl	1.5 μ l
PS XXX 正向引物(30 μ M) (参见表 1)	0.33 μ l
PS XXX 反向引物(30 μ M) (参见表 1)	0.33 μ l
铂 Taq DNA 聚合酶	0.2 μ l

[0316]

0.1 mM Cy5-dCTP	1 μ l
RT-PCR 产物(来自步骤 1)	1 μ l
无核酸酶的水(50 μ l 总体积)	40.15 μ l

[0317] 表 5 :巢式二次扩增程序

[0318]		温度	时间	28-30 个 循环
	初次变性	94℃	3 分钟	
	变性	94℃	45 秒	
	退火	59℃	30 秒	
	延伸	68℃	1 分钟	
		4℃	∞	

[0319] 凝胶电泳分析

[0320] 每 50 微升巢式 RT-PCR 反应添加 10 微升 5x Ficol1 加样染料 (loading dye)。将 15 微升 PCR/ 染料混合物在 10% TBE 凝胶中于 300 伏特下运行 30 分钟。电泳之后,用 diH₂O 将凝胶洗涤至少一个小时,每 30 分钟换水。然后在 Typhoon 三变量模式成像系统 (Typhoon Trio Variable Mode Imager, GE Healthcare) 中扫描凝胶。对于外显子 44 跳跃,来自全长肌营养不良蛋白转录物的巢式 RT-PCR 产物是 571bp,且 423bp 来自外显子 44 跳跃的 mRNA (外显子 44 是 148bp)。对于外显子 45,来自全长肌营养不良蛋白转录物的巢式 RT-PCR 产物是 571bp,且 395bp 来自外显子 45 跳跃的 mRNA (外显子 45 是 176bp)。对于外显子 53,来自全长肌营养不良蛋白转录物的巢式 RT-PCR 产物是 365bp,且 153bp 来自外显子 53 跳跃的 mRNA (外显子 53 是 212bp)。

[0321] 通过与外显子跳跃产物相比较,测量全长 PCR 产物的带亮度对凝胶图像进行定量分析。在一些情况中,在固定 PPMO 浓度 (如 3 微摩尔) 下的跳跃百分比用于确定一系列 PPMO 诱导给定外显子的外显子跳跃的相对活性。在其他情况中,PPMO 剂量范围用于处理细胞 (如 0.1、0.3、1.0、3.0 和 10 微摩尔),并根据每个浓度所诱导的跳跃百分比计算 EC₅₀。

[0322] 实施例 1

[0323] 外显子 51 扫描

[0324] 设计并合成了一系列靶向人肌营养不良蛋白外显子 51 的重叠反义 PPMOs,并用它们处理人横纹肌肉瘤细胞 (RD 细胞) 或原代人骨骼肌细胞。该策略被称为“外显子扫描”并同样用于以下所述的其他几个肌营养不良蛋白外显子。使用 CP06062 肽 (SEQ ID NO :578) 和 3' 末端 PMO 连接将所有 PPMOs 合成为肽偶联的 PMO (PPMO)。对于外显子 51,制备了一系列 26 个 PPMOs (SEQ ID NOS :309-311、314、316、317、319、321、323、324、326、327、329-331、333、335、336、338-345),每个长度都为 26 个碱基,如图 2A 所示。通过在如上材料和方法所述的不同浓度下处理 RD 细胞,评估 PPMOs 的外显子跳跃效能。鉴别了 3 个有效诱导外显子跳跃的 PPMOs (SEQ ID NOS :324、326 和 327),并选定用于其他评估。RD 细胞和原代人骨骼肌细胞的剂量范围实验用于确认这 3 个 PPMO 序列的相对效能。表明 SEQ ID NOS :327 最有

效地诱导外显子 51 跳跃,如图 2B 和 2C 所示。

[0325] 在如上所述,在 RD 细胞和原代人骨骼肌细胞中实施了 SEQ ID NOS :327 与其他靶向外显子 51 的反义序列相对效力的比较。使用 CP06062 肽 (SEQ ID NO :578),将所有评估的序列制备成肽偶联的 PMOs。这允许直接比较反义序列的相对效力,而不必考虑反义化学性质或细胞递送。与 SEQ ID NO :327 相比的某些靶向外显子 51 的寡聚体的相对位置如图 2D 所示。如图 2C 所示,存在外显子跳跃效力的等级,SEQ ID NO :327 是最有效的,与其他序列相比至少几倍。

[0326] 实施例 2

[0327] 外显子 50 扫描

[0328] 设计并合成了一系列靶向人肌营养不良蛋白外显子 50 的重叠反义 PPMOs。对于外显子 50,制备了一系列 17 个 PPMOs (SEQ ID NOS :267、269、271、273、275、277、279、280、282 和 284-291),每个长度都为 25 个碱基,如图 3A 所示。通过在如上材料和方法所述的不同浓度下处理 RD 细胞,评估 PPMOs 的外显子跳跃效能。鉴别了 4 个有效诱导外显子跳跃的 PPMOs (SEQ ID NOS :277、287、290 和 291),并选定用于其他评估。RD 细胞的剂量范围实验用于确认这 4 个 PPMO 序列的相对效能。表明 SEQ ID NOS :584 (AVI-5656) 和 287 (AVI-5038) 最有效地诱导外显子 50 跳跃,如图 3B 所示。由剂量范围实验导出 EC_{50} 值,其代表当相对于含外显子 50 的 mRNA 所产生的 PCR 产物,50% 的 PCR 产物来自缺乏外显子 50 的 mRNA 时的计算浓度。其他序列 (参见如 SEQ ID NOS :584 和 585 分别对应 W02006/000057 中的 SEQ ID NOS :173 和 175), AVI-5038 (SEQ ID NO :287) 相比,在 RD 细胞试验中,在诱导外显子跳跃活性方面,是等效的或更好的,如图 3B 所示。

[0329] 实施例 3

[0330] 外显子 53 扫描

[0331] 设计并合成了一系列靶向人肌营养不良蛋白外显子 53 的重叠反义 PPMOs。对于外显子 53,制备了一系列 24 个 PPMOs (SEQ ID NOS :416、418、420、422、424、426、428、429、431、433、434、436、438-440 和 443-451),每个长度都为 25 个碱基,如图 4A 所示。通过在如上材料和方法所述的不同浓度下处理 RD 细胞和原代人骨骼肌细胞,评估 PPMOs 的外显子跳跃效能。鉴别了 3 个有效诱导外显子跳跃的 PPMOs (SEQ ID NOS :428、429 和 431),并选定用于其他评估。RD 细胞的剂量范围实验用于确认这 3 个 PPMO 序列的相对效能。表明 SEQ ID NOS :429 最有效地诱导外显子 53 跳跃,如图 4B-F 所示。但是,当与其他外显子 53 反义序列比较时,SEQ ID NOS :429 被证明与 H53A(+23+47) 相同,其在 W02006/000057 中列为 SEQ ID NO :195 而在本申请列为 SEQ ID NO :609。将其他序列与 SEQ ID NO :429 进行比较,包括 H53A(+39+69) 和 H53A(-12+10) (在 W02006/000057 中分别列为 SEQ ID NOS :193 和 199) 和 h53AON1 (在美国申请第 11/233,507 号中列为 SEQ ID NO :39) 在内,本申请中分别列为 SEQ ID NOS :608、611 和 610。使用 CP06062 肽 (SEQ ID NO :578) 将所有评估的序列制备成肽偶联的 PMOs。这允许直接比较反义序列的相对效力,而不必考虑反义化学性质或细胞递送。如图 4I 和 4G-H 所示的,表明 SEQ ID NO :429 优于这四种序列中的每一种。

[0332] 实施例 4

[0333] 外显子 44 扫描

[0334] 设计并合成了一系列靶向人肌营养不良蛋白外显子 44 的重叠反义 PPMOs。对于外

显子 44, 制备了一系列 PPMOs (SEQ ID NOS :1-20), 每个长度都为 25 个碱基, 如图 5A 所示。通过在如上材料和方法所述的不同浓度下处理 RD 细胞, 评估 PPMOs 的外显子跳跃效能。鉴别了 5 个有效诱导外显子跳跃的 PPMOs (SEQ ID NOS :4、8、11、12 和 13), 并选定用于其他评估。RD 细胞的剂量范围实验用于确认这 5 个 PPMO 序列的相对效能, 如图 5C-5H 所示。表明 SEQ ID NOS :8、11 和 12 最有效地诱导外显子 44 跳跃, 如图 5H 所示, SEQ ID NOS :12 被证明是最有效的。

[0335] 在 RD 细胞和人原代骨骼肌细胞中都进行了 SEQ ID NOS :12 与其他外显子 44 反义序列的比较。使用 CP06062 肽 (SEQ ID NO :578), 将所有评估的序列制备成肽偶联的 PMOs。这允许直接比较反义序列的相对效力, 而不必考虑反义化学性质或细胞递送。

[0336] 序列 (SEQ ID NOS :600、601、602 和 603) 与 SEQ ID NOS :4、8、11 和 12 的比对如图 5B 所示。在 W02006/000057 中, SEQ ID NOS :601 和 603 列为 SEQ ID NOS :165 和 167。在 W02004/083446 中列出了 SEQ ID NO :602, 其在美国申请第 11/233, 507 号中列为 SEQ ID NO :21。SEQ ID NO :600 公开于 2007 年 (Wilton, Fall et al. 2007)。在 RD 细胞中的比较表明, SEQ ID NOS :602 和 603 都优于 SEQ ID NO :12 (图 5I)。但是, 如图 5J 所示, 在人原代骨骼肌细胞中, SEQ ID NO :12 (8.86% 外显子跳跃) 优于 SEQ ID NO :602 (6.42%)。用 SEQ ID NO :603 实施了类似实验。

[0337] 实施例 5

[0338] 外显子 45 扫描

[0339] 设计并合成了一系列靶向人肌营养不良蛋白外显子 45 的重叠反义 PPMOs。对于外显子 45, 制备了一系列 22 个 PPMOs (SEQ ID NOS :21、23、25、27、29、31、32、34、35、37、39、41、43 和 45-53), 每个长度都为 25 个碱基, 如图 6A 所示。通过在如上材料和方法所述的不同浓度下处理 RD 细胞和人原代骨骼肌细胞, 评估 PPMOs 的外显子跳跃效能。鉴别了 4 个有效诱导外显子跳跃的 PPMOs (SEQ ID NOS :27、29、34 和 39), 并选定用于其他评估。RD 细胞的剂量范围实验用于确认这 4 个 PMO 序列的相对效能, 如图 6C-G 所示, 并总结在图 6H 中。SEQ ID NOS :49 在这些实验中用作阴性对照。表明 SEQ ID NOS :29 和 34 最有效地诱导外显子 45 跳跃, 如图 6H 所示。

[0340] 在 RD 细胞和人原代骨骼肌细胞中都进行了 SEQ ID NOS :34 与其他外显子 45 反义序列的比较。使用 CP06062 肽 (SEQ ID NO :578), 将所有评估的序列制备成肽偶联的 PMOs。这允许直接比较反义序列的相对效力, 而不必考虑反义化学性质或细胞递送。序列 (SEQ ID NOS :604、605、606 和 607) 与 SEQ ID NOS :27、29、34 和 39 的比对如图 6B 所示。在 W02006/000057 中, SEQ ID NOS :604 和 607 分别列为 SEQ ID NOS :211 和 207。在美国申请第 11/233, 507 号中 SEQ ID NOS :605 和 606 分别列为 SEQ ID NO :23 和 1。在 RD 细胞中的比较表明, SEQ ID NOS :34 优于评估的所有四种序列, 如图 6I 所示。如上所述, 在不同的人原代骨骼肌细胞群中实施了这些化合物的检测。

[0341] Sequence ID 列表

[0342] 使用 DNA 常见的核苷酸碱基符号 A、G、C 和 T 表示序列。其他反应化学制剂, 例如 2'-O-甲基, 用 U 代替 T。任何碱基可被次黄核苷 (I) 所取代, 特别是在 3 个或多个 G 残基的一段序列中。

[0343]

名称	序列	SEQ ID NO.
<u>寡聚体靶向序列(5'至3'):</u>		
人 DMD 外显子(Hu. DMD. Exon) 44.25.001	CTGCAGGTAAAAGCATATGGATCAA	1
人 DMD 外显子 44.25.002	ATCGCCTGCAGGTAAAAGCATATGG	2
人 DMD 外显子 44.25.003	GTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGCA	3
人 DMD 外显子 44.25.004	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	4
人 DMD 外显子 44.25.005	CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCA	5
人 DMD 外显子 44.25.006	TTTCTCAACAGATCTGTCAAATCGC	6
人 DMD 外显子 44.25.007	CCATTCTCAACAGATCTGTCAAAT	7
人 DMD 外显子 44.25.008	ATAATGAAAACGCCGCCATTCTCA	8

[0344]

人 DMD 外显子 44.25.009	AAATATCTTTATATCATAATGAAAA	9
人 DMD 外显子 44.25.010	TGTTAGCCACTGATTAAATATCTTT	10
人 DMD 外显子 44.25.011	AAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	11
人 DMD 外显子 44.25.012	TTGTGTCTTTCTGAGAAACTGTTCA	12
人 DMD 外显子 44.25.013	CCAATTCTCAGGAATTTGTGTCTTT	13
人 DMD 外显子 44.25.014	GTATTTAGCATGTTCCCAATTCTCA	14
人 DMD 外显子 44.25.015	CTTAAGATACCATTTGTATTTAGCA	15
人 DMD 外显子 44.25.016	CTTACCTTAAGATACCATTTGTATT	16
人 DMD 外显子 44.25.017	AAAGACTTACCTTAAGATACCATTT	17
人 DMD 外显子 44.25.018	AAATCAAAGACTTACCTTAAGATAC	18
人 DMD 外显子 44.25.019	AAAACAAATCAAAGACTTACCTTAA	19
人 DMD 外显子 44.25.020	TCGAAAAAACAATCAAAGACTTAC	20
人 DMD 外显子 45.25.001	CTGTAAGATACCAAAAAGGCAAAAC	21
人 DMD 外显子 45.25.002	CCTGTAAGATACCAAAAAGGCAAAA	22
人 DMD 外显子 45.25.002.2	AGTTCCTGTAAGATACCAAAAAGGC	23
人 DMD 外显子 45.25.003	GAGTTCCTGTAAGATACCAAAAAGG	24
人 DMD 外显子 45.25.003.2	CCTGGAGTTCCTGTAAGATACCAAA	25
人 DMD 外显子 45.25.004	TCCTGGAGTTCCTGTAAGATACCAA	26
人 DMD 外显子 45.25.004.2	GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATA	27
人 DMD 外显子 45.25.005	TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	28
人 DMD 外显子 45.25.005.2	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA	29
人 DMD 外显子 45.25.006	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT	30
人 DMD 外显子 45.25.006.2	GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	31
人 DMD 外显子 45.25.007	CGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTT	32
人 DMD 外显子 45.25.008	AACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCA	33
人 DMD 外显子 45.25.008.2	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA	34
人 DMD 外显子 45.25.009	GTTGCATTCAATGTTCTGACAACAG	35
人 DMD 外显子 45.25.010	GCTGAATTATTTCTTCCCCAGTTGC	36
人 DMD 外显子 45.25.010.2	ATTATTTCTTCCCCAGTTGCATTCA	37
人 DMD 外显子 45.25.011	GGCATCTGTTTTTGAGGATTGCTGA	38
人 DMD 外显子 45.25.011.2	TTTGAGGATTGCTGAATTATTTCTT	39
人 DMD 外显子 45.25.012	AATTTTTCCTGTAGAATACTGGCAT	40
人 DMD 外显子 45.25.012.2	ATACTGGCATCTGTTTTTGAGGATT	41
人 DMD 外显子 45.25.013	ACCGCAGATTCAGGCTTCCCAATTT	42

[0345]

人 DMD 外显子 45.25.013.2	AATTTTTCCTGTAGAATACTGGCAT	43
人 DMD 外显子 45.25.014	CTGTTTGCAGACCTCCTGCCACCGC	44
人 DMD 外显子 45.25.014.2	AGATTCAGGCTTCCCAATTTTCCT	45
人 DMD 外显子 45.25.015	CTCTTTTTTCTGTCTGACAGCTGTT	46
人 DMD 外显子 45.25.015.2	ACCTCCTGCCACCGCAGATTCAGGC	47
人 DMD 外显子 45.25.016	CCTACCTCTTTTTTCTGTCTGACAG	48
人 DMD 外显子 45.25.016.2	GACAGCTGTTTGCAGACCTCCTGCC	49
人 DMD 外显子 45.25.017	GTCGCCCTACCTCTTTTTTCTGTCT	50
人 DMD 外显子 45.25.018	GATCTGTCGCCCTACCTCTTTTTTC	51
人 DMD 外显子 45.25.019	TATTAGATCTGTGCGCCCTACCTCTT	52
人 DMD 外显子 45.25.020	ATTCCTATTAGATCTGTGCGCCCTAC	53
人 DMD 外显子 45.20.001	AGATACCAAAAAGGCAAAAC	54
人 DMD 外显子 45.20.002	AAGATACCAAAAAGGCAAAA	55
人 DMD 外显子 45.20.003	CCTGTAAGATACCAAAAAGG	56
人 DMD 外显子 45.20.004	GAGTTCCTGTAAGATACCAA	57
人 DMD 外显子 45.20.005	TCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	58
人 DMD 外显子 45.20.006	TGCCATCCTGGAGTTCCTGT	59
人 DMD 外显子 45.20.007	CCCAATGCCATCCTGGAGTT	60
人 DMD 外显子 45.20.008	CGCTGCCCAATGCCATCCTG	61
人 DMD 外显子 45.20.009	CTGACAACAGTTTGCCGCTG	62
人 DMD 外显子 45.20.010	GTTGCATTCAATGTTCTGAC	63
人 DMD 外显子 45.20.011	ATTATTTCTTCCCCAGTTGC	64
人 DMD 外显子 45.20.012	TTTGAGGATTGCTGAATTAT	65
人 DMD 外显子 45.20.013	ATACTGGCATCTGTTTTTGA	66
人 DMD 外显子 45.20.014	AATTTTTCCTGTAGAATACT	67
人 DMD 外显子 45.20.015	AGATTCAGGCTTCCCAATTT	68
人 DMD 外显子 45.20.016	ACCTCCTGCCACCGCAGATT	69
人 DMD 外显子 45.20.017	GACAGCTGTTTGCAGACCTC	70
人 DMD 外显子 45.20.018	CTCTTTTTTCTGTCTGACAG	71
人 DMD 外显子 45.20.019	CCTACCTCTTTTTTCTGTCT	72
人 DMD 外显子 45.20.020	GTCGCCCTACCTCTTTTTTC	73
人 DMD 外显子 45.20.021	GATCTGTCGCCCTACCTCTT	74
人 DMD 外显子 45.20.022	TATTAGATCTGTGCGCCCTAC	75
人 DMD 外显子 45.20.023	ATTCCTATTAGATCTGTGCG	76

[0346]

人 DMD 外显子 46.25.001	GGGGGATTTGAGAAAATAAAATTAC	77
人 DMD 外显子 46.25.002	ATTTGAGAAAATAAAATTACCTTGA	78
人 DMD 外显子 46.25.002.2	CTAGCCTGGAGAAAGAAGAATAAAA	79
人 DMD 外显子 46.25.003	AGAAAATAAAATTACCTTGACTTGC	80
人 DMD 外显子 46.25.003.2	TTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAA	81
人 DMD 外显子 46.25.004	ATAAAATTACCTTGACTTGCTCAAG	82
人 DMD 外显子 46.25.004.2	TTTTGTTCTTCTAGCCTGGAGAAAG	83
人 DMD 外显子 46.25.005	ATTACCTTGACTTGCTCAAGCTTTT	84
人 DMD 外显子 46.25.005.2	TATTCTTTTGTCTTCTAGCCTGGA	85
人 DMD 外显子 46.25.006	CTTGACTTGCTCAAGCTTTTCTTTT	86
人 DMD 外显子 46.25.006.2	CAAGATATTCTTTTGTCTTCTAGC	87
人 DMD 外显子 46.25.007	CTTTTAGTTGCTGCTCTTTTCCAGG	88
人 DMD 外显子 46.25.008	CCAGGTTCAAGTGGGATACTAGCAA	89
人 DMD 外显子 46.25.008.2	ATCTCTTTGAAATTCTGACAAGATA	90
人 DMD 外显子 46.25.009	AGCAATGTTATCTGCTTCCTCCAAC	91
人 DMD 外显子 46.25.009.2	AACAAATTCATTAAATCTCTTTGA	92
人 DMD 外显子 46.25.010	CCAACCATAAAACAAATTCATTAA	93
人 DMD 外显子 46.25.010.2	TTCTCCAACCATAAAACAAATTCA	94
人 DMD 外显子 46.25.011	TTTAAATCTCTTTGAAATTCTGACA	95
人 DMD 外显子 46.25.012	TGACAAGATAATCTTTTGTCTTCT	96
人 DMD 外显子 46.25.012.2	TTCAAGTGGGATACTAGCAATGTTA	97
人 DMD 外显子 46.25.013	AGATATTCTTTTGTCTTCTAGCCT	98
人 DMD 外显子 46.25.013.2	CTGCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGGG	99
人 DMD 外显子 46.25.014	TTCTTTTGTCTTCTAGCCTGGAGA	100
人 DMD 外显子 46.25.014.2	CTTTTCTTTTAGTTGCTGCTCTTTT	101
人 DMD 外显子 46.25.015	TTGTTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAA	102
人 DMD 外显子 46.25.016	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAATA	103
人 DMD 外显子 46.25.017	AGCCTGGAGAAAGAAGAATAAAATT	104
人 DMD 外显子 46.25.018	CTGGAGAAAGAAGAATAAAATTGTT	105
人 DMD 外显子 46.20.001	GAAAGAAGAATAAAATTGTT	106
人 DMD 外显子 46.20.002	GGAGAAAGAAGAATAAAATT	107
人 DMD 外显子 46.20.003	AGCCTGGAGAAAGAAGAATA	108
人 DMD 外显子 46.20.004	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAA	109
人 DMD 外显子 46.20.005	TTGTTCTTCTAGCCTGGAGA	110

[0347]

人 DMD 外显子 46.20.006	TTCTTTTGTCTCTAGCCT	111
人 DMD 外显子 46.20.007	TGACAAGATATTCTTTTGT	112
人 DMD 外显子 46.20.008	ATCTCTTTGAAATTCTGACA	113
人 DMD 外显子 46.20.009	AACAAATTCATTAAATCTC	114
人 DMD 外显子 46.20.010	TTCTCTCAACCATAAAACAA	115
人 DMD 外显子 46.20.011	AGCAATGTTATCTGCTTCCT	116
人 DMD 外显子 46.20.012	TTCAAGTGGGATACTAGCAA	117
人 DMD 外显子 46.20.013	CTGCTCTTTTCCAGGTTCAA	118
人 DMD 外显子 46.20.014	CTTTTCTTTTAGTTGCTGCT	119
人 DMD 外显子 46.20.015	CTTGACTTGCTCAAGCTTTT	120
人 DMD 外显子 46.20.016	ATTACCTTGACTTGCTCAAG	121
人 DMD 外显子 46.20.017	ATAAAATTACCTTGACTTGC	122
人 DMD 外显子 46.20.018	AGAAAATAAAATTACCTTGA	123
人 DMD 外显子 46.20.019	ATTTGAGAAAATAAAATTAC	124
人 DMD 外显子 46.20.020	GGGGGATTTGAGAAAATAAA	125
人 DMD 外显子 47.25.001	CTGAAACAGACAAATGCAACAACGT	126
人 DMD 外显子 47.25.002	AGTAACTGAAACAGACAAATGCAAC	127
人 DMD 外显子 47.25.003	CCACCAGTAACTGAAACAGACAAAT	128
人 DMD 外显子 47.25.004	CTCTTCCACCAGTAACTGAAACAGA	129
人 DMD 外显子 47.25.005	GGCAACTCTTCCACCAGTAACTGAA	130
人 DMD 外显子 47.25.006	GCAGGGGCAACTCTTCCACCAGTAA	131
人 DMD 外显子 47.25.007	CTGGCGCAGGGGCAACTCTTCCACC	132
人 DMD 外显子 47.25.008	TTTAATTGTTTGAGAATCCCTGGC	133
人 DMD 外显子 47.25.008.2	TTGTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGG	134
人 DMD 外显子 47.25.009	GCACGGGTCCTCCAGTTTCATTAA	135
人 DMD 外显子 47.25.009.2	TCCAGTTTCATTTAATTGTTTGAGA	136
人 DMD 外显子 47.25.010	GCTTATGGGAGCACTTACAAGCACG	137
人 DMD 外显子 47.25.010.2	TACAAGCACGGGTCCTCCAGTTTCA	138
人 DMD 外显子 47.25.011	AGTTTATCTTGCTCTTCTGGGCTTA	139
人 DMD 外显子 47.25.012	TCTGCTTGAGCTTATTTTCAAGTTT	140
人 DMD 外显子 47.25.012.2	ATCTTGCTCTTCTGGGCTTATGGGA	141
人 DMD 外显子 47.25.013	CTTTATCCACTGGAGATTTGTCTGC	142
人 DMD 外显子 47.25.013.2	CTTATTTTCAAGTTTATCTTGCTCT	143
人 DMD 外显子 47.25.014	CTAACCTTTATCCACTGGAGATTG	144

[0348]

人 DMD 外显子 47.25.014.2	ATTTGTCTGCTTGAGCTTATTTTCA	145
人 DMD 外显子 47.25.015	AATGTCTAACCTTTATCCACTGGAG	146
人 DMD 外显子 47.25.016	TGGTTAATGTCTAACCTTTATCCAC	147
人 DMD 外显子 47.25.017	AGAGATGGTTAATGTCTAACCTTTA	148
人 DMD 外显子 47.25.018	ACGGAAGAGATGGTTAATGTCTAAC	149
人 DMD 外显子 47.20.001	ACAGACAAATGCAACAACGT	150
人 DMD 外显子 47.20.002	CTGAAACAGACAAATGCAAC	151
人 DMD 外显子 47.20.003	AGTAACTGAAACAGACAAAT	152
人 DMD 外显子 47.20.004	CCACCAGTAACTGAAACAGA	153
人 DMD 外显子 47.20.005	CTCTTCCACCAGTAACTGAA	154
人 DMD 外显子 47.20.006	GGCAACTCTTCCACCAGTAA	155
人 DMD 外显子 47.20.007	CTGGCGCAGGGGCAACTCTT	156
人 DMD 外显子 47.20.008	TTGTTTGAGAATTCCTGGC	157
人 DMD 外显子 47.20.009	TCCAGTTTCATTTAATTGTT	158
人 DMD 外显子 47.20.010	TACAAGCACGGGTCTCCAG	159
人 DMD 外显子 47.20.011	GCTTATGGGAGCACTTACAA	160
人 DMD 外显子 47.20.012	ATCTTGCTCTTCTGGGCTTA	161
人 DMD 外显子 47.20.013	CTTATTTTCAAGTTTATCTT	162
人 DMD 外显子 47.20.014	ATTTGTCTGCTTGAGCTTAT	163
人 DMD 外显子 47.20.015	CTTTATCCACTGGAGATTG	164
人 DMD 外显子 47.20.016	CTAACCTTTATCCACTGGAG	165
人 DMD 外显子 47.20.017	AATGTCTAACCTTTATCCAC	166
人 DMD 外显子 47.20.018	TGGTTAATGTCTAACCTTTA	167
人 DMD 外显子 47.20.019	AGAGATGGTTAATGTCTAAC	168
人 DMD 外显子 47.20.020	ACGGAAGAGATGGTTAATGT	169
人 DMD 外显子 48.25.001	CTGAAAGGAAAATACATTTTAAAAA	170
人 DMD 外显子 48.25.002	CCTGAAAGGAAAATACATTTTAAAAA	171
人 DMD 外显子 48.25.002.2	GAAACCTGAAAGGAAAATACATTTT	172
人 DMD 外显子 48.25.003	GGAAACCTGAAAGGAAAATACATTT	173
人 DMD 外显子 48.25.003.2	CTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATAC	174
人 DMD 外显子 48.25.004	GCTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATA	175
人 DMD 外显子 48.25.004.2	TAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGAA	634
人 DMD 外显子 48.25.005	GTAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGA	176
人 DMD 外显子 48.25.005.2	TCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGAA	177

[0349]

人 DMD 外显子 48.25.006	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGA	178
人 DMD 外显子 48.25.006.2	GTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAAC	179
人 DMD 外显子 48.25.007	TGTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	180
人 DMD 外显子 48.25.007.2	AATTTCTCCTTGTTTCTCAGGTAAA	181
人 DMD 外显子 48.25.008	TTTGAGCTTCAATTTCTCCTTGTTT	182
人 DMD 外显子 48.25.008	TTTTATTTGAGCTTCAATTTCTCCT	183
人 DMD 外显子 48.25.009	AAGCTGCCCCAAGGTCTTTTATTTGA	184
人 DMD 外显子 48.25.010	AGGTCTTCAAGCTTTTTTTTCAAGCT	185
人 DMD 外显子 48.25.010.2	TTCAAGCTTTTTTTTCAAGCTGCCCCA	186
人 DMD 外显子 48.25.011	GATGATTAACTGCTCTTCAAGGTC	187
人 DMD 外显子 48.25.011.2	CTGCTCTTCAAGGTCTTCAAGCTTT	188
人 DMD 外显子 48.25.012	AGGAGATAACCACAGCAGCAGATGA	189
人 DMD 外显子 48.25.012.2	CAGCAGATGATTAACTGCTCTTCA	190
人 DMD 外显子 48.25.013	ATTCCAACCTGATTCTTAATAGGAG	191
人 DMD 外显子 48.25.014	CTTGGTTTGGTTGGTTATAAATTC	192
人 DMD 外显子 48.25.014.2	CAACTGATTCCTAATAGGAGATAAC	193
人 DMD 外显子 48.25.015	CTTAACGTCAAATGGTCCTTCTTGG	194
人 DMD 外显子 48.25.015.2	TTGGTTATAAATTTCCAACCTGATTC	195
人 DMD 外显子 48.25.016	CCTACCTTAACGTCAAATGGTCCTT	196
人 DMD 外显子 48.25.016.2	TCCTTCTTGGTTTGGTTGGTTATAA	197
人 DMD 外显子 48.25.017	AGTTCCTACCTTAACGTCAAATGG	198
人 DMD 外显子 48.25.018	CAAAAAGTTCCCTACCTTAACGTCA	199
人 DMD 外显子 48.25.019	TAAAGCAAAAAGTTCCCTACCTTAA	200
人 DMD 外显子 48.25.020	ATATTTAAAGCAAAAAGTTCCCTAC	201
人 DMD 外显子 48.20.001	AGGAAAATACATTTTAAAAA	202
人 DMD 外显子 48.20.002	AAGGAAAATACATTTTAAAAA	203
人 DMD 外显子 48.20.003	CCTGAAAGGAAAATACATTT	204
人 DMD 外显子 48.20.004	GGAAACCTGAAAGGAAAATA	205
人 DMD 外显子 48.20.005	GCTCTGGAAACCTGAAAGGA	206
人 DMD 外显子 48.20.006	GTAAAGCTCTGGAAACCTGA	207
人 DMD 外显子 48.20.007	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	208
人 DMD 外显子 48.20.008	AATTTCTCCTTGTTTCTCAG	209
人 DMD 外显子 48.20.009	TTTTATTTGAGCTTCAATTT	210
人 DMD 外显子 48.20.010	AAGCTGCCCCAAGGTCTTTTA	211

[0350]

人 DMD 外显子 48.20.011	TTCAAGCTTTTTTTCAAGCT	212
人 DMD 外显子 48.20.012	CTGCTCTTCAAGGTCTTCAA	213
人 DMD 外显子 48.20.013	CAGCAGATGATTTAACTGCT	214
人 DMD 外显子 48.20.014	AGGAGATAACCAACAGCAGCA	215
人 DMD 外显子 48.20.015	CAACTGATTCCTAATAGGAG	216
人 DMD 外显子 48.20.016	TTGGTTATAAATTTCCAACCT	217
人 DMD 外显子 48.20.017	TCCTTCTTGGTTTGGTTGGT	218
人 DMD 外显子 48.20.018	CTTAACGTCAAATGGTCCTT	219
人 DMD 外显子 48.20.019	CCTACCTTAACGTCAAATGG	220
人 DMD 外显子 48.20.020	AGTTCCCTACCTTAACGTCA	221
人 DMD 外显子 48.20.021	CAAAAAGTTCCTACCTTAA	222
人 DMD 外显子 48.20.022	TAAAGCAAAAAGTTCCTAC	223
人 DMD 外显子 48.20.023	ATATTTAAAGCAAAAAGTTC	224
人 DMD 外显子 49.25.001	CTGGGGAAAAGAACCCATATAGTGC	225
人 DMD 外显子 49.25.002	TCCTGGGGAAAAGAACCCATATAGT	226
人 DMD 外显子 49.25.002.2	GTTTCCTGGGGAAAAGAACCCATAT	227
人 DMD 外显子 49.25.003	CAGTTTCCTGGGGAAAAGAACCCAT	228
人 DMD 外显子 49.25.003.2	TTTCAGTTTCCTGGGGAAAAGAACC	229
人 DMD 外显子 49.25.004	TATTTTCAGTTTCCTGGGGAAAAGAA	230
人 DMD 外显子 49.25.004.2	TGCTATTTTCAGTTTCCTGGGGAAAA	231
人 DMD 外显子 49.25.005	ACTGCTATTTTCAGTTTCCTGGGGAA	232
人 DMD 外显子 49.25.005.2	TGAACTGCTATTTTCAGTTTCCTGGG	233
人 DMD 外显子 49.25.006	CTTGAACCTGCTATTTTCAGTTTCCTG	234
人 DMD 外显子 49.25.006.2	TAGCTTGAACTGCTATTTTCAGTTTC	235
人 DMD 外显子 49.25.007	TTTAGCTTGAACTGCTATTTTCAGTT	236
人 DMD 外显子 49.25.008	TTCCACATCCGGTTGTTTAGCTTGA	237
人 DMD 外显子 49.25.009	TGCCCTTTAGACAAAATCTCTTCCA	238
人 DMD 外显子 49.25.009.2	TTTAGACAAAATCTCTTCCACATCC	239
人 DMD 外显子 49.25.010	GTTTTTCCTTGTACAAATGCTGCCC	240
人 DMD 外显子 49.25.010.2	GTACAAATGCTGCCCTTTAGACAAA	241
人 DMD 外显子 49.25.011	CTTCACTGGCTGAGTGGCTGGTTTTT	242
人 DMD 外显子 49.25.011.2	GGCTGGTTTTTTCCTTGTACAAATGC	243
人 DMD 外显子 49.25.012	ATTACCTTCACTGGCTGAGTGGCTG	244
人 DMD 外显子 49.25.013	GCTTCATTACCTTCACTGGCTGAGT	245

[0351]

人 DMD 外显子 49.25.014	AGGTTGCTTCATTACCTTCACTGGC	246
人 DMD 外显子 49.25.015	GCTAGAGGTTGCTTCATTACCTTCA	247
人 DMD 外显子 49.25.016	ATATTGCTAGAGGTTGCTTCATTAC	248
人 DMD 外显子 49.20.001	GAAAAGAACCCATATAGTGC	249
人 DMD 外显子 49.20.002	GGGAAAAGAACCCATATAGT	250
人 DMD 外显子 49.20.003	TCCTGGGGAAAAGAACCCAT	251
人 DMD 外显子 49.20.004	CAGTTTCCTGGGGAAAAGAA	252
人 DMD 外显子 49.20.005	TATTTCAGTTTCCTGGGGAA	253
人 DMD 外显子 49.20.006	ACTGCTATTTCAGTTTCCTG	254
人 DMD 外显子 49.20.007	CTTGAAGTCTATTTCAGTT	255
人 DMD 外显子 49.20.008	TTTAGCTTGAAGTCTATTT	256
人 DMD 外显子 49.20.009	TTCCACATCCGGTTGTTTAG	257
人 DMD 外显子 49.20.010	TTTAGACAAAATCTCTTCCA	258
人 DMD 外显子 49.20.011	GTACAAATGCTGCCCTTAG	259
人 DMD 外显子 49.20.012	GGCTGGTTTTTCCTTGACAA	260
人 DMD 外显子 49.20.013	CTTCACTGGCTGAGTGGCTG	261
人 DMD 外显子 49.20.014	ATTACCTTCACTGGCTGAGT	262
人 DMD 外显子 49.20.015	GCTTCATTACCTTCACTGGC	263
人 DMD 外显子 49.20.016	AGGTTGCTTCATTACCTTCA	264
人 DMD 外显子 49.20.017	GCTAGAGGTTGCTTCATTAC	265
人 DMD 外显子 49.20.018	ATATTGCTAGAGGTTGCTTC	266
人 DMD 外显子 50.25.001	CTTTAACAGAAAAGCATAACATTA	267
人 DMD 外显子 50.25.002	TCCTCTTTAACAGAAAAGCATAAC	268
人 DMD 外显子 50.25.002.2	TTCCTCTTTAACAGAAAAGCATACA	269
人 DMD 外显子 50.25.003	TAAGTTCCTCTTTAACAGAAAAGCA	270
人 DMD 外显子 50.25.003.2	CTAAGTTCCTCTTTAACAGAAAAGC	271
人 DMD 外显子 50.25.004	TCTTCTAAGTTCCTCTTTAACAGAA	272
人 DMD 外显子 50.25.004.2	ATCTTCTAAGTTCCTCTTTAACAGA	273
人 DMD 外显子 50.25.005	TCAGATCTTCTAAGTTCCTCTTTAA	274
人 DMD 外显子 50.25.005.2	CTCAGATCTTCTAAGTTCCTCTTTA	275
人 DMD 外显子 50.25.006	AGAGCTCAGATCTTCTAAGTTCCTC	276
人 DMD 外显子 50.25.006.2	CAGAGCTCAGATCTTCTAAGTTCCT	277
NG-08-0731		
人 DMD 外显子 50.25.007	CACTCAGAGCTCAGATCTTCTACT	278

[0352]

人 DMD 外显子 50.25.007.2	CCTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTC	279
人 DMD 外显子 50.25.008	GTAAACGGTTTACCGCCTTCCACTC	280
人 DMD 外显子 50.25.009	CTTTGCCCTCAGCTCTTGAAGTAAA	281
人 DMD 外显子 50.25.009.2	CCCTCAGCTCTTGAAGTAAACGGTT	282
人 DMD 外显子 50.25.010	CCAGGAGCTAGGTCAGGCTGCTTTG	283
人 DMD 外显子 50.25.010.2	GGTCAGGCTGCTTTGCCCTCAGCTC	284
人 DMD 外显子 50.25.011	AGGCTCCAATAGTGGTCAGTCCAGG	285
人 DMD 外显子 50.25.011.2	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCAGGCTG	286
人 DMD 外显子 50.25.012 AVI-5038	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	287
人 DMD 外显子 50.25.013	GTATACTTACAGGCTCCAATAGTGG	288
人 DMD 外显子 50.25.014	ATCCAGTATACTTACAGGCTCCAAT	289
人 DMD 外显子 50.25.015 NG-08-0741	ATGGGATCCAGTATACTTACAGGCT	290
人 DMD 外显子 50.25.016 NG-08-0742	AGAGAATGGGATCCAGTATACTTAC	291
人 DMD 外显子 50.20.001	ACAGAAAAGCATACACATTA	292
人 DMD 外显子 50.20.002	TTTAACAGAAAAGCATACAC	293
人 DMD 外显子 50.20.003	TCCTCTTTAACAGAAAAGCA	294
人 DMD 外显子 50.20.004	TAACCTCCTCTTTAACAGAA	295
人 DMD 外显子 50.20.005	TCTTCTAACTTCCTCTTTAA	296
人 DMD 外显子 50.20.006	TCAGATCTTCTAACTTCCTC	297
人 DMD 外显子 50.20.007	CCTTCCACTCAGAGCTCAGA	298
人 DMD 外显子 50.20.008	GTAAACGGTTTACCGCCTTC	299
人 DMD 外显子 50.20.009	CCCTCAGCTCTTGAAGTAAA	300
人 DMD 外显子 50.20.010	GGTCAGGCTGCTTTGCCCTC	301
人 DMD 外显子 50.20.011	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCA	302
人 DMD 外显子 50.20.012	AGGCTCCAATAGTGGTCAGT	303
人 DMD 外显子 50.20.013	CTTACAGGCTCCAATAGTGG	304
人 DMD 外显子 50.20.014	GTATACTTACAGGCTCCAAT	305
人 DMD 外显子 50.20.015	ATCCAGTATACTTACAGGCT	306
人 DMD 外显子 50.20.016	ATGGGATCCAGTATACTTAC	307
人 DMD 外显子 50.20.017	AGAGAATGGGATCCAGTATA	308
人 DMD 外显子 51.25.001-44	CTAAAATATTTTGGGTTTTTGCAAAA	309

[0353]

人 DMD 外显子 51.25.002-45	GCTAAAATATTTTGGGTTTTTGCAA	310
人 DMD 外显子 51.25.002.2-46	TAGGAGCTAAAATATTTTGGGTTTT	311
人 DMD 外显子 51.25.003	AGTAGGAGCTAAAATATTTTGGGTT	312
人 DMD 外显子 51.25.003.2	TGAGTAGGAGCTAAAATATTTTGGG	313
人 DMD 外显子 51.25.004	CTGAGTAGGAGCTAAAATATTTTGGG	314
人 DMD 外显子 51.25.004.2	CAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	315
人 DMD 外显子 51.25.005	ACAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	316
人 DMD 外显子 51.25.005.2	GAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCTAAA	317
人 DMD 外显子 51.25.006	CAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCT	318
人 DMD 外显子 51.25.006.2	CACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG	319
人 DMD 外显子 51.25.007	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAG	320
人 DMD 外显子 51.25.007.2	AACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAA	321
人 DMD 外显子 51.25.008	GTTGTGTCACCAGAGTAACAGTCTG	322
人 DMD 外显子 51.25.009	TGGCAGTTTCCTTAGTAACCACAGGT	323
人 DMD 外显子 51.25.010	ATTTCTAGTTTGGAGATGGCAGTTTC	324
人 DMD 外显子 51.25.010.2	GGAAGATGGCATTCTAGTTTGGAG	325
人 DMD 外显子 51.25.011	CATCAAGGAAGATGGCATTCTAGTT	326
人 DMD 外显子 51.25.011.2	GAGCAGGTACCTCCAACATCAAGGAA	327
人 DMD 外显子 51.25.012	ATCTGCCAGAGCAGGTACCTCCAAC	328
人 DMD 外显子 51.25.013	AAGTTCTGTCCAAGCCCGTTGAAAT	329
人 DMD 外显子 51.25.013.2	CGGTTGAAATCTGCCAGAGCAGGTAC	330
人 DMD 外显子 51.25.014	GAGAAAGCCAGTCGGTAAGTTCTGTC	331
人 DMD 外显子 51.25.014.2	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAGCCCGG	332
人 DMD 外显子 51.25.015	ATAACTTGATCAAGCAGAGAAAGCCA	333
人 DMD 外显子 51.25.015.2	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGGTAAGT	334
人 DMD 外显子 51.25.016	CACCCTCTGTGATTTTATAACTTGAT	335
人 DMD 外显子 51.25.017	CAAGGTCACCCACCATCACCTCTGT	336
人 DMD 外显子 51.25.017.2	CATCACCTCTGTGATTTTATAACT	337
人 DMD 外显子 51.25.018	CTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTGA	338
人 DMD 外显子 51.25.019	CCTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTG	339
人 DMD 外显子 51.25.019.2	ATCTCGTTGATATCCTCAAGGTCACC	340
人 DMD 外显子 51.25.020	TCATACCTTCTGCTTGATGATCATCT	341
人 DMD 外显子 51.25.020.2	TCATTTTTTCTCATACCTTCTGCTTG	342
人 DMD 外显子 51.25.021	TTTTCTCATACCTTCTGCTTGATGAT	343

[0354]

人 DMD 外显子 51.25.022	TTTTATCATTTTTTCTCATACCTTCT	344
人 DMD 外显子 51.25.023	CCAAC TTTTATCATTTTTTCTCATAC	345
人 DMD 外显子 51.20.001	ATATTTTGGGTTTTTGCAAA	346
人 DMD 外显子 51.20.002	AAAATATTTTGGGTTTTTG	347
人 DMD 外显子 51.20.003	GAGCTAAAATATTTTGGGTT	348
人 DMD 外显子 51.20.004	AGTAGGAGCTAAAATATTTT	349
人 DMD 外显子 51.20.005	GTCTGAGTAGGAGCTAAAAT	350
人 DMD 外显子 51.20.006	TAACAGTCTGAGTAGGAGCT	351
人 DMD 外显子 51.20.007	CAGAGTAACAGTCTGAGTAG	352
人 DMD 外显子 51.20.008	CACAGGTTGTGTCACCAGAG	353
人 DMD 外显子 51.20.009	AGTTTCCTTAGTAACCACAG	354
人 DMD 外显子 51.20.010	TAGTTTGGAGATGGCAGTTT	355
人 DMD 外显子 51.20.011	GGAAGATGGCATTCTAGTT	356
人 DMD 外显子 51.20.012	TACCTCCAACATCAAGGAAG	357
人 DMD 外显子 51.20.013	ATCTGCCAGAGCAGGTACCT	358
人 DMD 外显子 51.20.014	CCAAGCCCGGTTGAAATCTG	359
人 DMD 外显子 51.20.015	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAG	360
人 DMD 外显子 51.20.016	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGG	361
人 DMD 外显子 51.20.017	TTTATAACTTGATCAAGCA	362
人 DMD 外显子 51.20.018	CATCACCTCTGTGATTTTA	363
人 DMD 外显子 51.20.019	CTCAAGGTCACCCACCATCA	364
人 DMD 外显子 51.20.020	CATCTCGTTGATATCCTCAA	365
人 DMD 外显子 51.20.021	CTTCTGCTTGATGATCATCT	366
人 DMD 外显子 51.20.022	CATACCTTCTGCTTGATGAT	367
人 DMD 外显子 51.20.023	TTTCTCATACCTTCTGCTTG	368
人 DMD 外显子 51.20.024	CATTTTTTCTCATACCTTCT	369
人 DMD 外显子 51.20.025	TTTATCATTTTTTCTCATAC	370
人 DMD 外显子 51.20.026	CAACTTTTATCATTTTTTCT	371
人 DMD 外显子 52.25.001	CTGTAAGAACAAATATCCCTTAGTA	372
人 DMD 外显子 52.25.002	TGCCTGTAAGAACAAATATCCCTTA	373
人 DMD 外显子 52.25.002.2	GTTGCCTGTAAGAACAAATATCCCT	374
人 DMD 外显子 52.25.003	ATTGTTGCCTGTAAGAACAAATATC	375
人 DMD 外显子 52.25.003.2	GCATTGTTGCCTGTAAGAACAAATA	376
人 DMD 外显子 52.25.004	CCTGCATTGTTGCCTGTAAGAACAA	377

[0355]

人 DMD 外显子 52.25.004.2	ATCCTGCATTGTTGCCTGTAAGAAC	378
人 DMD 外显子 52.25.005	CAAATCCTGCATTGTTGCCTGTAAG	379
人 DMD 外显子 52.25.005.2	TCCAAATCCTGCATTGTTGCCTGTA	380
人 DMD 外显子 52.25.006	TGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCCT	381
人 DMD 外显子 52.25.006.2	TCTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGC	382
人 DMD 外显子 52.25.007	AACTGGGGACGCCTCTGTTCCAAAT	383
人 DMD 外显子 52.25.007.2	GCCTCTGTTCCAAATCCTGCATTGT	384
人 DMD 外显子 52.25.008	CAGCGGTAATGAGTTCTTCCAACTG	385
人 DMD 外显子 52.25.008.2	CTTCCAACTGGGGACGCCTCTGTTC	386
人 DMD 外显子 52.25.009	CTTGTTTTTCAAATTTGGGCAGCG	387
人 DMD 外显子 52.25.010	CTAGCCTCTTGATTGCTGGTCTTGT	388
人 DMD 外显子 52.25.010.2	TTTTCAAATTTGGGCAGCGGTAAT	389
人 DMD 外显子 52.25.011	TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGC	390
人 DMD 外显子 52.25.011.2	GATTGCTGGTCTTGTTTTTCAAATT	391
人 DMD 外显子 52.25.012	CTTACTTCGATCCGTAATGATTGTT	392
人 DMD 外显子 52.25.012.2	TTGTTCTAGCCTCTTGATTGCTGGT	393
人 DMD 外显子 52.25.013	AAAAACTTACTTCGATCCGTAATGA	394
人 DMD 外显子 52.25.014	TGTTAAAAAACTTACTTCGATCCGT	395
人 DMD 外显子 52.25.015	ATGCTTGTTAAAAAACTTACTTCGA	396
人 DMD 外显子 52.25.016	GTCCCATGCTTGTTAAAAAACTTAC	397
人 DMD 外显子 52.20.001	AGAACAAATATCCCTTAGTA	398
人 DMD 外显子 52.20.002	GTAAGAACAAATATCCCTTA	399
人 DMD 外显子 52.20.003	TGCCTGTAAGAACAAATATC	400
人 DMD 外显子 52.20.004	ATTGTTGCCTGTAAGAACAA	401
人 DMD 外显子 52.20.005	CCTGCATTGTTGCCTGTAAG	402
人 DMD 外显子 52.20.006	CAAATCCTGCATTGTTGCCT	403
人 DMD 外显子 52.20.007	GCCTCTGTTCCAAATCCTGC	404
人 DMD 外显子 52.20.008	CTTCCAACTGGGGACGCCTC	405
人 DMD 外显子 52.20.009	CAGCGGTAATGAGTTCTTCC	406
人 DMD 外显子 52.20.010	TTTTCAAATTTGGGCAGCG	407
人 DMD 外显子 52.20.011	GATTGCTGGTCTTGTTTTTC	408
人 DMD 外显子 52.20.012	TTGTTCTAGCCTCTTGATTG	409
人 DMD 外显子 52.20.013	TTCGATCCGTAATGATTGTT	410
人 DMD 外显子 52.20.014	CTTACTTCGATCCGTAATGA	411

[0356]

人 DMD 外显子 52.20.015	AAAAACTTACTTCGATCCGT	412
人 DMD 外显子 52.20.016	TGTTAAAAAACTTACTTCGA	413
人 DMD 外显子 52.20.017	ATGCTTGTTAAAAAACTTAC	414
人 DMD 外显子 52.20.018	GTCCCATGCTTGTTAAAAAA	415
人 DMD 外显子 53.25.001	CTAGAATAAAAAGGAAAAATAATAT	416
人 DMD 外显子 53.25.002	AACTAGAATAAAAAGGAAAAATAAT	417
人 DMD 外显子 53.25.002.2	TTCAACTAGAATAAAAAGGAAAAATA	418
人 DMD 外显子 53.25.003	CTTTCAACTAGAATAAAAAGGAAAAA	419
人 DMD 外显子 53.25.003.2	ATTCTTTCAACTAGAATAAAAAGGAA	420
人 DMD 外显子 53.25.004	GAATTCCTTTCAACTAGAATAAAAAGG	421
人 DMD 外显子 53.25.004.2	TCTGAATTCTTTCAACTAGAATAAAA	422
人 DMD 外显子 53.25.005	ATTCTGAATTCTTTCAACTAGAATA	423
人 DMD 外显子 53.25.005.2	CTGATTCTGAATTCTTTCAACTAGA	424
人 DMD 外显子 53.25.006	CACTGATTCTGAATTCTTTCAACTA	425
人 DMD 外显子 53.25.006.2	TCCCACTGATTCTGAATTCTTTCAA	426
人 DMD 外显子 53.25.007	CATCCCACTGATTCTGAATTCTTTC	427
人 DMD 外显子 53.25.008	TACTTCATCCCACTGATTCTGAATT	428
人 DMD 外显子 53.25.008.2	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	429
人 DMD 外显子 53.25.009	CGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACT	430
人 DMD 外显子 53.25.009.2	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGT	431
人 DMD 外显子 53.25.010	TTTCATTCAACTGTTGCCTCCGGTT	432
人 DMD 外显子 53.25.010.2	TAACATTTCAATTCAACTGTTGCCTC	433
人 DMD 外显子 53.25.011	TTGTGTTGAATCCTTTAACATTTCA	434
人 DMD 外显子 53.25.012	TCTTCCTTAGCTTCCAGCCATTGTG	435
人 DMD 外显子 53.25.012.2	CTTAGCTTCCAGCCATTGTGTTGAA	436
人 DMD 外显子 53.25.013	GTCCTAAGACCTGCTCAGCTTCTTC	437
人 DMD 外显子 53.25.013.2	CTGCTCAGCTTCTTCCTTAGCTTCC	438
人 DMD 外显子 53.25.014	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCTGTCCT	439
人 DMD 外显子 53.25.014.2	GGCCTGTCCTAAGACCTGCTCAGCT	440
人 DMD 外显子 53.25.015	TAGGGACCCCTCCTTCCATGACTCAA	441
人 DMD 外显子 53.25.016	TTTGGATTGCATCTACTGTATAGGG	442
人 DMD 外显子 53.25.016.2	ACCTCCTTCCATGACTCAAGCTTG	443
人 DMD 外显子 53.25.017	CTTGGTTTCTGTGATTTCTTTTGG	444
人 DMD 外显子 53.25.017.2	ATCTACTGTATAGGGACCCTCCTTC	445

[0357]

人 DMD 外显子 53.25.018	CTAACCTTGGTTTCTGTGATTTTCT	446
人 DMD 外显子 53.25.018.2	TTTCTTTTGGATTGCATCTACTGTA	447
人 DMD 外显子 53.25.019	TGATACTAACCTTGGTTTCTGTGAT	448
人 DMD 外显子 53.25.020	ATCTTTGATACTAACCTTGGTTTCT	449
人 DMD 外显子 53.25.021	AAGGTATCTTTGATACTAACCTTGG	450
人 DMD 外显子 53.25.022	TTAAAAAGGTATCTTTGATACTAAC	451
人 DMD 外显子 53.20.001	ATAAAAGGAAAAATAAATAT	452
人 DMD 外显子 53.20.002	GAATAAAAGGAAAAATAAAT	453
人 DMD 外显子 53.20.003	AACTAGAATAAAAGGAAAAA	454
人 DMD 外显子 53.20.004	CTTTCAACTAGAATAAAAGG	455
人 DMD 外显子 53.20.005	GAATTCCTTCAACTAGAATA	456
人 DMD 外显子 53.20.006	ATTCTGAATTCTTTCAACTA	457
人 DMD 外显子 53.20.007	TACTTCATCCCACTGATTCT	458
人 DMD 外显子 53.20.008	CTGAAGGTGTTCTTGTA	459
人 DMD 外显子 53.20.009	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAA	460
人 DMD 外显子 53.20.010	TAACATTTCACTCAACTGTT	461
人 DMD 外显子 53.20.011	TTGTGTTGAATCCTTTAACA	462
人 DMD 外显子 53.20.012	CTTAGCTTCCAGCCATTGTG	463
人 DMD 外显子 53.20.013	CTGCTCAGCTTCTTCCTTAG	464
人 DMD 外显子 53.20.014	GGCCTGTCCTAAGACCTGCT	465
人 DMD 外显子 53.20.015	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCT	466
人 DMD 外显子 53.20.016	ACCTCCTTCCATGACTCAA	467
人 DMD 外显子 53.20.017	ATCTACTGTATAGGGACCCT	468
人 DMD 外显子 53.20.018	TTTCTTTTGGATTGCATCTA	469
人 DMD 外显子 53.20.019	CTTGGTTTCTGTGATTTTCT	470
人 DMD 外显子 53.20.020	CTAACCTTGGTTTCTGTGAT	471
人 DMD 外显子 53.20.021	TGATACTAACCTTGGTTTCT	472
人 DMD 外显子 53.20.022	ATCTTTGATACTAACCTTGG	473
人 DMD 外显子 53.20.023	AAGGTATCTTTGATACTAAC	474
人 DMD 外显子 53.20.024	TTAAAAAGGTATCTTTGATA	475
人 DMD 外显子 54.25.001	CTATAGATTTTATGAGAAAGAGA	476
人 DMD 外显子 54.25.002	AACTGCTATAGATTTTATGAGAAA	477
人 DMD 外显子 54.25.003	TGGCCAAGCTGCTATAGATTTTATG	478
人 DMD 外显子 54.25.004	GTCTTTGGCCAAGCTGCTATAGATT	479

[0358]

人 DMD 外显子 54.25.005	CGGAGGTCTTTGGCCAACTGCTATA	480
人 DMD 外显子 54.25.006	ACTGGCGGAGGTCTTTGGCCAACTG	481
人 DMD 外显子 54.25.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAGGTCTT	482
人 DMD 外显子 54.25.008	AGTCATTTGCCACATCTACATTTGT	483
人 DMD 外显子 54.25.008.2	TTTGCCACATCTACATTTGTCTGCC	484
人 DMD 外显子 54.25.009	CCGGAGAAGTTTCAGGGCCAAGTCA	485
人 DMD 外显子 54.25.010	GTATCATCTGCAGAATAATCCCGGA	486
人 DMD 外显子 54.25.010.2	TAATCCCGGAGAAGTTTCAGGGCCA	487
人 DMD 外显子 54.25.011	TTATCATGTGGACTTTTCTGGTATC	488
人 DMD 外显子 54.25.012	AGAGGCATTGATATTCTCTGTTATC	489
人 DMD 外显子 54.25.012.2	ATGTGGACTTTTCTGGTATCATCTG	490
人 DMD 外显子 54.25.013	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	491
人 DMD 外显子 54.25.013.2	ATATTCTCTGTTATCATGTGGACTT	492
人 DMD 外显子 54.25.014	CATACCTTTTATGAATGCTTCTCCA	493
人 DMD 外显子 54.25.014.2	CTCCAAGAGGCATTGATATTCTCTG	494
人 DMD 外显子 54.25.015	TAATTCATACCTTTTATGAATGCTT	495
人 DMD 外显子 54.25.015.2	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	496
人 DMD 外显子 54.25.016	TAATGTAATTCATACCTTTTATGAA	497
人 DMD 外显子 54.25.017	AGAAATAATGTAATTCATACCTTTT	498
人 DMD 外显子 54.25.018	GTTTTAGAAATAATGTAATTCATAC	499
人 DMD 外显子 54.20.001	GATTTTATGAGAAAGAGA	500
人 DMD 外显子 54.20.002	CTATAGATTTTTATGAGAAA	501
人 DMD 外显子 54.20.003	AACTGCTATAGATTTTTATG	502
人 DMD 外显子 54.20.004	TGGCCAACTGCTATAGATTT	503
人 DMD 外显子 54.20.005	GTCTTTGGCCAACTGCTATA	504
人 DMD 外显子 54.20.006	CGGAGGTCTTTGGCCAACTG	505
人 DMD 外显子 54.20.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAG	506
人 DMD 外显子 54.20.008	TTTGCCACATCTACATTTGT	507
人 DMD 外显子 54.20.009	TTCAGGGCCAAGTCATTTGC	508
人 DMD 外显子 54.20.010	TAATCCCGGAGAAGTTTCAG	509
人 DMD 外显子 54.20.011	GTATCATCTGCAGAATAATC	510
人 DMD 外显子 54.20.012	ATGTGGACTTTTCTGGTATC	511
人 DMD 外显子 54.20.013	ATATTCTCTGTTATCATGTG	512
人 DMD 外显子 54.20.014	CTCCAAGAGGCATTGATATT	513

[0359]

人 DMD 外显子 54.20.015	CTTTTATGAATGCTTCTCCA	514
人 DMD 外显子 54.20.016	CATACCTTTTATGAATGCTT	515
人 DMD 外显子 54.20.017	TAATTCATACCTTTTATGAA	516
人 DMD 外显子 54.20.018	TAATGTAATTCATACCTTTT	517
人 DMD 外显子 54.20.019	AGAAATAATGTAATTCATAC	518
人 DMD 外显子 54.20.020	GTTTTAGAAATAATGTAATT	519
人 DMD 外显子 55.25.001	CTGCAAAGGACCAAATGTTTCAGATG	520
人 DMD 外显子 55.25.002	TCACCCTGCAAAGGACCAAATGTTTC	521
人 DMD 外显子 55.25.003	CTCACTCACCTGCAAAGGACCAAA	522
人 DMD 外显子 55.25.004	TCTCGCTCACTCACCTGCAAAGGA	523
人 DMD 外显子 55.25.005	CAGCCTCTCGCTCACTCACCTGCA	524
人 DMD 外显子 55.25.006	CAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC	525
人 DMD 外显子 55.25.007	TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	526
人 DMD 外显子 55.25.007.2	TCTATGAGTTTCTTCCAAAGCAGCC	527
人 DMD 外显子 55.25.008	GTTGCAGTAATCTATGAGTTTCTTC	528
人 DMD 外显子 55.25.008.2	GAAGTGTGTCAGTAATCTATGAGTT	529
人 DMD 外显子 55.25.009	TTCCAGGTCCAGGGGGAAGTGTGTC	530
人 DMD 外显子 55.25.010	GTAAGCCAGGCAAGAACTTTTCCA	531
人 DMD 外显子 55.25.010.2	CCAGGCAAGAACTTTTCCAGGTCC	532
人 DMD 外显子 55.25.011	TGGCAGTTGTTTCAGCTTCTGTAAG	533
人 DMD 外显子 55.25.011.2	TTCAGCTTCTGTAAGCCAGGCAAGA	635
人 DMD 外显子 55.25.012	GGTAGCATCCTGTAGGACATTGGCA	534
人 DMD 外显子 55.25.012.2	GACATTGGCAGTTGTTTCAGCTTCT	535
人 DMD 外显子 55.25.013	TCTAGGAGCCTTTTCTTACGGGTAG	536
人 DMD 外显子 55.25.014	CTTTTACTCCCTTGGAGTCTTCTAG	537
人 DMD 外显子 55.25.014.2	GAGCCTTTTCTTACGGGTAGCATCC	538
人 DMD 外显子 55.25.015	TTGCCATTGTTTCATCAGCTCTTTT	539
人 DMD 外显子 55.25.015.2	CTTGGAGTCTTCTAGGAGCCTTTCC	540
人 DMD 外显子 55.25.016	CTTACTTGCCATTGTTTCATCAGCT	541
人 DMD 外显子 55.25.016.2	CAGCTCTTTTACTCCCTTGGAGTCT	542
人 DMD 外显子 55.25.017	CCTGACTTACTTGCCATTGTTTCAT	543
人 DMD 外显子 55.25.018	AAATGCCTGACTTACTTGCCATTGT	544
人 DMD 外显子 55.25.019	AGCGGAAATGCCTGACTTACTTGCC	545
人 DMD 外显子 55.25.020	GCTAAAGCGGAAATGCCTGACTTAC	546

[0360]

人 DMD 外显子 55.20.001	AAGGACCAAATGTTTCAGATG	547
人 DMD 外显子 55.20.002	CTGCAAAGGACCAAATGTTTC	548
人 DMD 外显子 55.20.003	TCACCCTGCAAAGGACCAAAA	549
人 DMD 外显子 55.20.004	CTCACTCACCTGCAAAGGA	550
人 DMD 外显子 55.20.005	TCTCGCTCACTCACCTGCA	551
人 DMD 外显子 55.20.006	CAGCCTCTCGCTCACTCACC	552
人 DMD 外显子 55.20.007	CAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	553
人 DMD 外显子 55.20.008	TCTATGAGTTTCTTCCAAAG	554
人 DMD 外显子 55.20.009	GAACTGTTGCAGTAATCTAT	555
人 DMD 外显子 55.20.010	TTCCAGGTCCAGGGGGAAGT	556
人 DMD 外显子 55.20.011	CCAGGCAAGAACTTTTCCA	557
人 DMD 外显子 55.20.012	TTCAGCTTCTGTAAGCCAGG	558
人 DMD 外显子 55.20.013	GACATTGGCAGTTGTTTCAG	559
人 DMD 外显子 55.20.014	GGTAGCATCCTGTAGGACAT	560
人 DMD 外显子 55.20.015	GAGCCTTTCTTACGGGTAG	561
人 DMD 外显子 55.20.016	CTTGGAGTCTTCTAGGAGCC	562
人 DMD 外显子 55.20.017	CAGCTCTTTTACTCCCTTGG	563
人 DMD 外显子 55.20.018	TTGCCATTGTTTCATCAGCT	564
人 DMD 外显子 55.20.019	CTTACTTGCCATTGTTTCAT	565
人 DMD 外显子 55.20.020	CCTGACTTACTTGCCATTGT	566
人 DMD 外显子 55.20.021	AAATGCCTGACTTACTTGCC	567
人 DMD 外显子 55.20.022	AGCGGAAATGCCTGACTTAC	568
人 DMD 外显子 55.20.023	GCTAAAGCGGAAATGCCTGA	569
H50A(+02+30)-AVI-5656	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCC	584
H50D(+07-18)-AVI-5915	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	585
H50A(+07+33)	CTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAA	586
H51A(+61+90)-AVI-4657	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAGTTTGG	587
H51A(+66+95)-AVI-4658	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	588
H51A(+111+134)	TTCTGTCCAAGCCCGGTTGAAATC	589
H51A(+175+195)	CACCCACCATCACCTCYGTG	590
H51A(+199+220)	ATCATCTCGTTGATATCCTCAA	591
H51A(+66+90)	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	592
H51A(-01+25)	ACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGC	593
h51AON1	TCAAGGAAGATGGCATTCT	594
h51AON2	CCTCTGTGATTTATAACTTGAT	595

[0361]

H51D(+08-17)	ATCATTTTTTCTCATACCTTCTGCT	596
H51D(+16-07)	CTCATACCTTCTGCTTGATGATC	597
hAON#23	TGGCATTCTAGTTTGG	598
hAON#24	CCAGAGCAGGTACCTCCAACATC	599
H44A(+61+84)	TGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGA	600
H44A(+85+104)	TTTGTGTCTTTCTGAGAAAC	601
h44AON1	CGCCGCCATTTCTCAACAG	602
H44A(-06+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAG	603
H45A(+71+90)	TGTTTTTGAGGATTGCTGAA	604
h45AON1	GCTGAATTATTTCTTCCCC	605
h45AON5	GCCCAATGCCATCCTGG	606
H45A(-06+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	607
H53A(+39+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGT G	608
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	609
h53AON1	CTGTTGCCTCCGGTTCTG	610
H53A(-12+10)	ATTCTTTCAACTAGATAAAAAG	611
huEx45.30.66	GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATACCAAA	612
huEx45.30.71	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATA	613
huEx45.30.79	GCCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT	614
huEx45.30.83	GTTTGCCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGT	615
huEx45.30.88	CAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCATCCT	616
huEx45.30.92	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCA	617
huEx45.30.96	TGTTCTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAAT	618
huEx45.30.99	CAATGTTCTGACAACAGTTTGCCGCTGCCC	619
huEx45.30.103	CATTCAATGTTCTGACAACAGTTTGCCGCT	620
huEx45.30.120	TATTTCTTCCCCAGTTGCATTCAATGTTCT	621
huEx45.30.127	GCTGAATTATTTCTTCCCCAGTTGCATTCA	622
huEx45.30.132	GGATTGCTGAATTATTTCTTCCCCAGTTGC	623
huEx45.30.137	TTTGAGGATTGCTGAATTATTTCTTCCCCA	624
huEx53.30.84	GTACTTCATCCCACTGATTCTGAATTCTTT	625
huEx53.30.88	TCTTGTACTTCATCCCACTGATTCTGAATT	626
huEx53.30.91	TGTTCTTGTACTTCATCCCACTGATTCTGA	627
huEx53.30.103	CGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	628
huEx53.30.106	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTCA	629
huEx53.30.109	TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACT	630
huEx53.30.112	TGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT	631

[0362]

huEx53.30.115	AACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCT	632
huEx53.30.118	TTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGT	633
h50AON1		
h50AON2		
<u>肽转运蛋白(NH₂至COOH)*:</u>		
rTAT	RRRQRRKKRC	570
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFFC	571
(RAhx) ₄ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	572
(RAhxR) ₄ AhxB; (P007)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	573
(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	574
(RAhx) ₆ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	575
(RAhx) ₈ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	576
(RAhxR) ₅ AhxB	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	577
(RAhxRRBR) ₂ AhxB; (CPO6062)	RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	578
MSP	ASSLNIA	579
细胞穿透肽/导向肽/ PMO 偶联物 (NH₂至COOH且5'至3')		
MSP-PMO	ASSLNIA-XB-GGCCAAACCTCGGCTTACCTG AAAT	580 636
CP06062-MSP-PMO	RXRRBRRXRRBR-XB-ASSLNIA-X- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	581 636
MSP-CP06062-PMO	ASSLNIA-X-RXRRBRRXRRBR-B- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	582 636
CP06062-PMO	RXRRBRRXRRBR-XB- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	583 636

[0363] *Ah_x 是氨基己酸而 B 是 β-丙氨酸。

[0001]

序列表

- <110> AVI生物制药公司(AVI BioPharma, Inc.)
彼得·萨扎尼
瑞斯扎德·科勒
- <120> 用于DMD的多外显子跳跃组合物
- <130> 120178.410PC
- <140> PCT
<141> 2009-10-23
- <150> US 61/108,416
<151> 2008-10-24
- <160> 651
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列
- <400> 1
ctgcaggtaa aagcatatgg atcaa 25
- <210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列
- <400> 2
atcgccctgca ggtaaaagca tatgg 25
- <210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列
- <400> 3
gtcaaatcgc ctgcaggtaa aagca 25
- <210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

[0002]

<400> 4 gatctgtcaa atcgccctgca ggtaa	25
<210> 5 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 5 caacagatct gtcaaatcgc ctgca	25
<210> 6 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 6 tttctcaaca gatctgtcaa atcgc	25
<210> 7 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 7 ccatttctca acagatctgt caaat	25
<210> 8 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 8 ataatgaaaa cgccgccatt tctca	25
<210> 9 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 9 aaatatcttt atatcataat gaaaa	25

[0003]

<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 10	
tgttagccac tgattaaata tcttt	25
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 11	
aaactgttca gcttctgtta gccac	25
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 12	
ttgtgtcttt ctgagaaact gttca	25
<210> 13	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 13	
ccaattctca ggaatttgtg tcttt	25
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 14	
gtatttagca tgttcccaat tctca	25
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	

[0004]

〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
〈400〉 15	
cttaagatac catttgtatt tagca	25
〈210〉 16	
〈211〉 25	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
〈400〉 16	
cttaccttaa gataccattt gtatt	25
〈210〉 17	
〈211〉 25	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
〈400〉 17	
aaagacttac cttaagatac cattt	25
〈210〉 18	
〈211〉 25	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
〈400〉 18	
aaatcaaaga cttaccttaa gatac	25
〈210〉 19	
〈211〉 25	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
〈400〉 19	
aaaacaaatc aaagacttac cttaa	25
〈210〉 20	
〈211〉 25	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0005]

<400> 20 tcgaaaaaac aaatcaaaga cttac	25
<210> 21 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 21 ctgtaagata ccaaaaaggc aaaac	25
<210> 22 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 22 cctgtaagat accaaaaagg caaaa	25
<210> 23 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 23 agttcctgta agataccaaa aaggc	25
<210> 24 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 24 gagttcctgt aagataccaa aaagg	25
<210> 25 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 25 cctggagttc ctgtaagata ccaaa	25

[0006]

<210> 26	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 26	
tcctggagtt cctgtaagat accaa	25
<210> 27	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 27	
gccatcctgg agttcctgta agata	25
<210> 28	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 28	
tgccatcctg gagttcctgt aagat	25
<210> 29	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 29	
ccaatgccat cctggagttc ctgta	25
<210> 30	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 30	
cccaatgcca tcctggagtt cctgt	25
<210> 31	
<211> 25	
<212> DNA	

[0007]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 31	
gctgccaat gccatcctgg agttc	25
<210> 32	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 32	
cgctgcccaa tgccatcctg gagtt	25
<210> 33	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 33	
aacagtttgc cgctgcccaa tgcca	25
<210> 34	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 34	
ctgacaacag ttgcccgtg cccaa	25
<210> 35	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 35	
gttgcatcca atgttctgac aacag	25
<210> 36	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0008]

<400> 36 gctgaattat ttcttcccca gttgc	25
<210> 37 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 37 attatttctt cccagttgc attca	25
<210> 38 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 38 ggcatctggtt ttgaggatt gctga	25
<210> 39 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 39 tttgaggatt gctgaattat ttctt	25
<210> 40 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 40 aatttttcct gtagaatact ggcat	25
<210> 41 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 41 atactggcat ctgtttttga ggatt	25

[0009]

<210> 42	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 42	
accgcagatt caggcttccc aattt	25
<210> 43	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 43	
aatttttcct gtagaatact ggcat	25
<210> 44	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 44	
ctgtttgcag acctcctgcc accgc	25
<210> 45	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 45	
agattcaggc ttcccaattt ttcct	25
<210> 46	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 46	
ctcttttttc tgtctgacag ctggt	25
<210> 47	
<211> 25	
<212> DNA	

[0010]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 47	
acctcctgcc accgcagatt caggc	25
<210> 48	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 48	
cctacctctt ttttctgtct gacag	25
<210> 49	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 49	
gacagctgtt tgcagacctc ctgcc	25
<210> 50	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 50	
gtcgcctac ctcttttttc tgtct	25
<210> 51	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 51	
gatctgtcgc cctacctctt ttttc	25
<210> 52	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0011]

<400> 52 tattagatct gtcgccctac ctctt	25
<210> 53 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 53 attcctatta gatctgtcgc cctac	25
<210> 54 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 54 agataccaaa aaggcaaac	20
<210> 55 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 55 aagataccaa aaaggcaaaa	20
<210> 56 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 56 cctgtaagat accaaaaagg	20
<210> 57 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 57 gagttcctgt aagataccaa	20

[0012]

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 58
tcctggagtt cctgtaagat 20

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 59
tgccatcctg gagttcctgt 20

<210> 60
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 60
cccaatgcca tcctggagtt 20

<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 61
cgctgccc aa tgccatcctg 20

<210> 62
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 62
ctgacaacag ttgcccgtg 20

<210> 63
<211> 20
<212> DNA

[0013]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 63	
gttgattca atgttctgac	20
<210> 64	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 64	
attatttctt ccccagttgc	20
<210> 65	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 65	
tttgaggatt gctgaattat	20
<210> 66	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 66	
atactggcat ctgtttttga	20
<210> 67	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 67	
aatttttcct gtagaatact	20
<210> 68	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0014]

<400> 68 agattcaggc ttcccaattt	20
<210> 69 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 69 acctcctgcc accgcagatt	20
<210> 70 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 70 gacagctgtt tgcagacctc	20
<210> 71 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 71 ctcttttttc tgtctgacag	20
<210> 72 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 72 cctacctctt tttctgtct	20
<210> 73 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 73 gtcgccctac ctcttttttc	20

[0015]

<210> 74	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 74	
gatctgtcgc cctacctctt	20
<210> 75	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 75	
tattagatct gtcgccctac	20
<210> 76	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 76	
attcctatta gatctgtcgc	20
<210> 77	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 77	
gggggatttg agaaaataaa attac	25
<210> 78	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 78	
atttgagaaa ataaaattac cttga	25
<210> 79	
<211> 25	
<212> DNA	

[0016]

〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
〈400〉 79 ctagcctgga gaaagaagaa taaaa	25
〈210〉 80	
〈211〉 25	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
〈400〉 80 agaaaataaa attaccttga cttgc	25
〈210〉 81	
〈211〉 25	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
〈400〉 81 ttcttctagc ctggagaaag aagaa	25
〈210〉 82	
〈211〉 25	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
〈400〉 82 ataaaattac ctgacttgc tcaag	25
〈210〉 83	
〈211〉 25	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
〈400〉 83 ttttgttctt ctagcctgga gaaag	25
〈210〉 84	
〈211〉 25	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0017]

<400> 84 attaccttga cttgctcaag ctttt	25
<210> 85 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 85 tattcttttg ttcttctagc ctgga	25
<210> 86 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 86 cttgacttgc tcaagctttt ctttt	25
<210> 87 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 87 caagatattc ttttgttcctt ctagc	25
<210> 88 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 88 cttttagttg ctgctctttt ccagg	25
<210> 89 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 89 ccaggttcaa gtgggatact agcaa	25

[0018]

<210> 90
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 90
atctctttga aattctgaca agata 25

<210> 91
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 91
agcaatgtta tctgcttcct ccaac 25

<210> 92
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 92
aacaaattca tttaaattctc tttaga 25

<210> 93
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 93
ccaaccataa aacaaattca tttaa 25

<210> 94
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 94
ttcttccaac cataaaacaa attca 25

<210> 95
<211> 25
<212> DNA

[0019]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 95	
tttaaattctc ttgaaattc tgaca	25
<210> 96	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 96	
tgacaagata ttcttttggtt cttct	25
<210> 97	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 97	
ttcaagtggtg atactagcaa tgtta	25
<210> 98	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 98	
agatatcttt ttgttcttct agcct	25
<210> 99	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 99	
ctgctctttt ccaggttcaa gtggg	25
<210> 100	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0020]

<400> 100 ttcttttgtt cttctagcct ggaga	25
<210> 101 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 101 cttttctttt agttgctgct ctttt	25
<210> 102 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 102 ttgttcttct agcctggaga aagaa	25
<210> 103 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 103 cttctagcct ggagaaagaa gaata	25
<210> 104 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 104 agcctggaga aagaagaata aaatt	25
<210> 105 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 105 ctggagaaag aagaataaaa ttgtt	25

[0021]

<210> 106	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 106	
gaaagaagaa taaaattgtt	20
<210> 107	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 107	
ggagaaagaa gaataaaatt	20
<210> 108	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 108	
agcctggaga aagaagaata	20
<210> 109	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 109	
cttctagcct ggagaaagaa	20
<210> 110	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 110	
ttgttcttct agcctggaga	20
<210> 111	
<211> 20	
<212> DNA	

[0022]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 111	
ttcttttggt cttctagcct	20
<210> 112	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 112	
tgacaagata ttcttttggt	20
<210> 113	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 113	
atctctttga aattctgaca	20
<210> 114	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 114	
aacaaattca tttaaattctc	20
<210> 115	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 115	
ttctccaac cataaaacaa	20
<210> 116	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0023]

<400> 116 agcaatgtta tctgcttcct	20
<210> 117 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 117 ttcaagtggg atactagcaa	20
<210> 118 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 118 ctgctctttt ccaggttcaa	20
<210> 119 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 119 cttttctttt agttgctgct	20
<210> 120 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 120 cttgacttgc tcaagctttt	20
<210> 121 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 121 attaccttga cttgctcaag	20

[0024]

<210> 122	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 122	
ataaaattac cttgacttgc	20
<210> 123	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 123	
agaaaataaa attaccttga	20
<210> 124	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 124	
atttgagaaa ataaaattac	20
<210> 125	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 125	
gggggatttg agaaaataaa	20
<210> 126	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 126	
ctgaaacaga caaatgcaac aacgt	25
<210> 127	
<211> 25	
<212> DNA	

[0025]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 127	
agtaactgaa acagacaaat gcaac	25
<210> 128	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 128	
ccaccagtaa ctgaaacaga caaat	25
<210> 129	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 129	
ctcttccacc agtaactgaa acaga	25
<210> 130	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 130	
ggcaactctt ccaccagtaa ctgaa	25
<210> 131	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 131	
gcaggggcaa ctcttccacc agtaa	25
<210> 132	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0026]

<400> 132 ctggcgcagg ggcaactctt ccacc	25
<210> 133 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 133 tttaattggtt tgagaattcc ctggc	25
<210> 134 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 134 ttgtttgaga attccctggc gcagg	25
<210> 135 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 135 gcacgggtcc tccagtttca tttaa	25
<210> 136 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 136 tccagtttca tttaattggtt tgaga	25
<210> 137 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 137 gcttatggga gcacttaca gcacg	25

[0027]

<210> 138	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 138	
tacaagcacg ggtcctccag tttca	25
<210> 139	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 139	
agtttatctt gctcttctgg gctta	25
<210> 140	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 140	
tctgcttgag cttatcttca agttt	25
<210> 141	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 141	
atcttgctct tctgggctta tggga	25
<210> 142	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 142	
ctttatccac tggagatttg tctgc	25
<210> 143	
<211> 25	
<212> DNA	

[0028]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 143	
cttattttca agtttatctt gctct	25
<210> 144	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 144	
ctaaccttta tccactggag atttg	25
<210> 145	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 145	
atttgctctgc ttgagcttat ttica	25
<210> 146	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 146	
aatgtctaac ctttatccac tggag	25
<210> 147	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 147	
tggttaatgt ctaaccttta tccac	25
<210> 148	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0029]

<400> 148 agagatgggtt aatgtctaac cttaa	25
<210> 149 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 149 acggaagaga tggtaaatgt ctaac	25
<210> 150 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 150 acagacaaat gcaacaacgt	20
<210> 151 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 151 ctgaaacaga caaatgcaac	20
<210> 152 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 152 agtaactgaa acagacaaat	20
<210> 153 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 153 ccaccagtaa ctgaaacaga	20

[0030]

<210> 154	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 154	
ctcttcacc agtaactgaa	20
<210> 155	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 155	
ggcaactctt ccaccagtaa	20
<210> 156	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 156	
ctggcgcagg ggcaactctt	20
<210> 157	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 157	
ttgtttgaga attccctggc	20
<210> 158	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 158	
tccagtttca tttaattgtt	20
<210> 159	
<211> 20	
<212> DNA	

[0031]

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 159

tacaagcacg ggtcctccag

20

<210> 160

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 160

gcttatggga gcacttaaa

20

<210> 161

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 161

atcttgctct tctgggctta

20

<210> 162

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 162

cttatatttca agtttatctt

20

<210> 163

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 163

atttgtctgc ttgagcttat

20

<210> 164

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

[0032]

<400> 164 ctttatccac tggagatttg	20
<210> 165 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 165 ctaaccttta tccactggag	20
<210> 166 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 166 aatgtctaac ctttatccac	20
<210> 167 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 167 tggttaatgt ctaaccttta	20
<210> 168 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 168 agagatgggtt aatgtctaac	20
<210> 169 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 169 acggaagaga tggttaatgt	20

[0033]

<210> 170
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 170
ctgaaaggaa aatacatttt aaaaa 25

<210> 171
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 171
cctgaaagga aaatacattt taaaa 25

<210> 172
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 172
gaaacctgaa aggaaaatac atttt 25

<210> 173
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 173
ggaaacctga aaggaaaata catTT 25

<210> 174
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 174
ctctggaaac ctgaaaggaa aatac 25

<210> 175
<211> 25
<212> DNA

[0034]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 175	
gctctggaaa cctgaaagga aaata	25
<210> 176	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 176	
gtaaagctct ggaaacctga aagga	25
<210> 177	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 177	
tcaggtaaag ctctggaaac ctgaa	25
<210> 178	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 178	
ctcaggtaaa gctctgaaa cctga	25
<210> 179	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 179	
gtttctcagg taaagctctg gaaac	25
<210> 180	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0035]

<400> 180 tgtttctcag gtaaagctct ggaaa	25
<210> 181 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 181 aatttctcct tgtttctcag gtaaa	25
<210> 182 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 182 tttgagcttc aatttctcct tgttt	25
<210> 183 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 183 ttttatttga gcttcaattt ctcct	25
<210> 184 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 184 aagctgccca aggtctttta ttgga	25
<210> 185 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 185 aggtcttcaa gctttttttc aagct	25

[0036]

<210> 186	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 186	
ttcaagcttt ttttcaagct gccca	25
<210> 187	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 187	
gatgatttaa ctgctcttca aggtc	25
<210> 188	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 188	
ctgctcttca aggtcttcaa gcttt	25
<210> 189	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 189	
aggagataac cacagcagca gatga	25
<210> 190	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 190	
cagcagatga tttaactgct cttca	25
<210> 191	
<211> 25	
<212> DNA	

[0037]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 191	
atttccaact gattcctaata aggag	25
<210> 192	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 192	
cttggtttgg ttggttataa atttc	25
<210> 193	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 193	
caactgattc ctaataggag ataac	25
<210> 194	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 194	
cttaacgtca aatggtcctt cttgg	25
<210> 195	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 195	
ttggttataa atttccaact gattc	25
<210> 196	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0038]

<400> 196 cctaccttaa cgtcaaatgg tcctt	25
<210> 197 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 197 tccttcttgg tttggttgg tataa	25
<210> 198 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 198 agttccctac cttaacgtca aatgg	25
<210> 199 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 199 caaaaagttc cctaccttaa cgtca	25
<210> 200 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 200 taaagcaaaa agttccctac cttaa	25
<210> 201 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 201 atatttaaag caaaaagttc cctac	25

[0039]

<210> 202	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 202	
aggaaaatac attttaaaaa	20
<210> 203	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 203	
aaggaaaata cattttaaaa	20
<210> 204	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 204	
cctgaaagga aaatacattt	20
<210> 205	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 205	
ggaaacctga aaggaaaata	20
<210> 206	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 206	
gctctgaaa cctgaaagga	20
<210> 207	
<211> 20	
<212> DNA	

[0040]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 207	
gtaaagctct ggaaacctga	20
<210> 208	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 208	
ctcaggtaaa gctctggaaa	20
<210> 209	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 209	
aatttctcct tgtttctcag	20
<210> 210	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 210	
ttttatttga gcttcaattt	20
<210> 211	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 211	
aagctgccca aggtctttta	20
<210> 212	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0041]

<400> 212 ttcaagcttt ttttcaagct	20
<210> 213 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 213 ctgctcttca aggtcttcaa	20
<210> 214 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 214 cagcagatga tttaactgct	20
<210> 215 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 215 aggagataac cacagcagca	20
<210> 216 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 216 caactgattc ctaataggag	20
<210> 217 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 217 ttggttataa atttccaact	20

[0042]

<210> 218	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 218	
tccttccttg tttggttggt	20
<210> 219	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 219	
cttaacgtca aatggtcctt	20
<210> 220	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 220	
cctaccttaa cgtcaaatgg	20
<210> 221	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 221	
agttccctac cttaacgtca	20
<210> 222	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 222	
caaaaagttc cctaccttaa	20
<210> 223	
<211> 20	
<212> DNA	

[0043]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 223	
taaagcaaaa agttccctac	20
<210> 224	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 224	
atatttaaag caaaaagttc	20
<210> 225	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 225	
ctggggaaaa gaacccatat agtgc	25
<210> 226	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 226	
tcctggggaa aagaacccat atagt	25
<210> 227	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 227	
gtttcctggg gaaaagaacc catat	25
<210> 228	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0044]

<400> 228 cagtttcctg gggaaaagaa cccat	25
<210> 229 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 229 tttcagtttc ctggggaaaa gaacc	25
<210> 230 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 230 tatttcagtt tcctggggaa aagaa	25
<210> 231 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 231 tgctatttca gtttcctggg gaaaa	25
<210> 232 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 232 actgctattt cagtttcctg gggaa	25
<210> 233 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 233 tgaactgcta tttcagtttc ctggg	25

[0045]

<210> 234	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 234	
cttgaactgc tatttcagtt tcctg	25
<210> 235	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 235	
tagcttgaac tgctatttca gtttc	25
<210> 236	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 236	
tttagcttga actgctattt cagtt	25
<210> 237	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 237	
ttccacatcc ggttgtttag cttga	25
<210> 238	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 238	
tgccctttag acaaaatctc ttcca	25
<210> 239	
<211> 25	
<212> DNA	

[0046]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 239	
tttagacaaa atctcttcca catcc	25
<210> 240	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 240	
gtttttcctt gtacaaatgc tgccc	25
<210> 241	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 241	
gtacaaatgc tgccctttag acaaa	25
<210> 242	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 242	
cttcactggc tgagtggctg gtttt	25
<210> 243	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 243	
ggctggtttt tccttgtaca aatgc	25
<210> 244	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0047]

<400> 244 attaccttca ctggctgagt ggctg	25
<210> 245 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 245 gcttcattac cttcactggc tgagt	25
<210> 246 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 246 aggttgcttc attaccttca ctggc	25
<210> 247 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 247 gctagaggtt gcttcattac cttca	25
<210> 248 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 248 atattgctag aggttgcttc attac	25
<210> 249 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 249 gaaaagaacc catatagtgc	20

[0048]

<210> 250	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 250	
gggaaaagaa cccatatagt	20
<210> 251	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 251	
tcctggggaa aagaacccat	20
<210> 252	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 252	
cagtttcctg gggaaaagaa	20
<210> 253	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 253	
tatttcagtt tcctggggaa	20
<210> 254	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 254	
actgctattt cagtttcctg	20
<210> 255	
<211> 20	
<212> DNA	

[0049]

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 255

cttgaactgc tatttcagtt

20

<210> 256

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 256

ttagcttga actgctattt

20

<210> 257

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 257

ttccacatcc ggttgtttag

20

<210> 258

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 258

ttagacaaa atctcttcca

20

<210> 259

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 259

gtacaaatgc tgcctttag

20

<210> 260

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

[0050]

<400> 260 ggctgggtttt tccttgtaga	20
<210> 261 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 261 cttcactggc tgagtggctg	20
<210> 262 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 262 attaccttca ctggctgagt	20
<210> 263 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 263 gcttcattac cttcactggc	20
<210> 264 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 264 aggttgcttc attaccttca	20
<210> 265 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 265 gctagaggtt gcttcattac	20

[0051]

<210> 266	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 266	
atattgctag aggttgcttc	20
<210> 267	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 267	
ctttaacaga aaagcataca catta	25
<210> 268	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 268	
tcctctttaa cagaaaagca tacac	25
<210> 269	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 269	
ttcctcttta acagaaaagc ataca	25
<210> 270	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 270	
taacttcctc tttaacagaa aagca	25
<210> 271	
<211> 25	
<212> DNA	

[0052]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 271	
ctaacttcct ctttaacaga aaagc	25
<210> 272	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 272	
tcttctaact tcctctttaa cagaa	25
<210> 273	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 273	
atcttctaac ttctcttta acaga	25
<210> 274	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 274	
tcagatcttc taacttcctc tttaa	25
<210> 275	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 275	
ctcagatctt ctaacttcct cttta	25
<210> 276	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0053]

<400> 276 agagctcaga tcttctaact tcctc	25
<210> 277 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 277 cagagctcag atcttctaac ttcct	25
<210> 278 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 278 cactcagagc tcagatcttc tact	24
<210> 279 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 279 ccttccactc agagctcaga tcttc	25
<210> 280 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 280 gtaaacgggt taccgccttc cactc	25
<210> 281 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 281 ctttgccctc agctcttgaa gtaaa	25

[0054]

<210> 282	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 282	
ccctcagctc ttgaagtaaa cggtt	25
<210> 283	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 283	
ccaggagcta ggtcaggctg ctttg	25
<210> 284	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 284	
ggtcaggctg ctttgccctc agctc	25
<210> 285	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 285	
aggctccaat agtggtcagt ccagg	25
<210> 286	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 286	
tcagtccagg agctaggtca ggctg	25
<210> 287	
<211> 25	
<212> DNA	

[0055]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 287	
cttacaggct ccaatagtgg tcagt	25
<210> 288	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 288	
gtatacttac aggtccaat agtgg	25
<210> 289	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 289	
atccagtata cttacaggct ccaat	25
<210> 290	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 290	
atgggatcca gtatacttac aggct	25
<210> 291	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 291	
agagaatggg atccagtata cttac	25
<210> 292	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0056]

<400> 292 acagaaaagc atacacatta	20
<210> 293 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 293 tttaacagaa aagcatacac	20
<210> 294 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 294 tcctctttaa cagaaaagca	20
<210> 295 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 295 taacttcctc tttaacagaa	20
<210> 296 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 296 tcttctaact tcctctttaa	20
<210> 297 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 297 tcagatcttc taacttcctc	20

[0057]

<210> 298	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 298	
ccttcactc agagtcaga	20
<210> 299	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 299	
gtaaacggtt taccgccttc	20
<210> 300	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 300	
ccctcagctc ttgaagtaaa	20
<210> 301	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 301	
ggtcaggctg ctttgcctc	20
<210> 302	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 302	
tcagtcagg agctaggtca	20
<210> 303	
<211> 20	
<212> DNA	

[0058]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 303	
aggctccaat agtggtcagt	20
<210> 304	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 304	
cttacaggct ccaatagtgg	20
<210> 305	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 305	
gtatacttac aggctccaat	20
<210> 306	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 306	
atccagtata cttacaggct	20
<210> 307	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 307	
atgggatcca gtatacttac	20
<210> 308	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0059]

<400> 308 agagaatggg atccagtata	20
<210> 309 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 309 ctaaaatatt ttgggttttt gcaaaa	26
<210> 310 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 310 gctaaaatat tttgggtttt tgcaaa	26
<210> 311 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 311 taggagctaa aatatttttg gttttt	26
<210> 312 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 312 agtaggagct aaaatatttt gggtt	25
<210> 313 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 313 tgagtaggag ctaaaatatt ttggg	25

[0060]

<210> 314	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 314	
ctgagtagga gctaaaatat ttgagg	26
<210> 315	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 315	
cagtctgagt aggagctaaa atatt	25
<210> 316	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 316	
acagtctgag taggagctaa aatatt	26
<210> 317	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 317	
gagtaacagt ctgagtagga gctaaa	26
<210> 318	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 318	
cagagtaaca gtctgagtag gagct	25
<210> 319	
<211> 26	
<212> DNA	

[0061]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 319	
caccagagta acagtctgag taggag	26
<210> 320	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 320	
gtcaccagag taacagtctg agtag	25
<210> 321	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 321	
aaccacaggt tgtgtcacca gagtaa	26
<210> 322	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 322	
gttgtgtcac cagagtaaca gtctg	25
<210> 323	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 323	
tggcagtttc cttagtaacc acaggt	26
<210> 324	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0062]

<400> 324 atttctagtt tggagatggc agtttc	26
<210> 325 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 325 ggaagatggc atttctagtt tggag	25
<210> 326 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 326 catcaaggaa gatggcatTT ctagtt	26
<210> 327 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 327 gagcaggtac ctccaacatc aaggaa	26
<210> 328 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 328 atctgccaga gcaggtacct ccaac	25
<210> 329 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 329 aagttctgtc caagcccggT tgaaat	26

[0063]

<210> 330	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 330	
cggttgaaat ctgccagagc aggtac	26
<210> 331	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 331	
gagaaagcca gtcggttaagt tctgtc	26
<210> 332	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 332	
gtcggtaagt tctgtccaag cccgg	25
<210> 333	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 333	
ataacttgat caagcagaga aagcca	26
<210> 334	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 334	
aagcagagaa agccagtcgg taagt	25
<210> 335	
<211> 26	
<212> DNA	

[0064]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 335	
caccctctgt gattttataa cttgat	26
<210> 336	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 336	
caaggtcacc caccatcacc ctctgt	26
<210> 337	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 337	
catcacccctc tgtgatttta taact	25
<210> 338	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 338	
cttctgcttg atgatcatct cgttga	26
<210> 339	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 339	
ccttctgctt gatgatcatc tcgttg	26
<210> 340	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0065]

<400> 340 atctcgttga tatcctcaag gtcacc	26
<210> 341 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 341 tcataccttc tgcttgatga tcatct	26
<210> 342 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 342 tcattttttc tcataccttc tgcttg	26
<210> 343 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 343 tttttcata cttctgctt gatgat	26
<210> 344 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 344 ttttatcatt ttttcata cttct	26
<210> 345 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 345 ccaacttta tcattttttc tcatac	26

[0066]

<210> 346	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 346	
atattttggg tttttgcaaa	20
<210> 347	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 347	
aaaatatttt gggtttttgc	20
<210> 348	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 348	
gagctaaaat attttgggtt	20
<210> 349	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 349	
agtaggagct aaaatatttt	20
<210> 350	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 350	
gtctgagtag gagctaaaat	20
<210> 351	
<211> 20	
<212> DNA	

[0067]

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 351

taacagtctg agtaggagct

20

<210> 352

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 352

cagagtaaca gtctgagtag

20

<210> 353

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 353

cacaggttgt gtcaccagag

20

<210> 354

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 354

agtttcctta gtaaccacag

20

<210> 355

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 355

tagtttgag atggcagttt

20

<210> 356

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

[0068]

<400> 356 ggaagatggc atttctagtt	20
<210> 357 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 357 tacctccaac atcaaggaag	20
<210> 358 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 358 atctgccaga gcaggtacct	20
<210> 359 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 359 ccaagcccggttgaaatctg	20
<210> 360 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 360 gtcggtaagt tctgtccaag	20
<210> 361 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 361 aagcagagaa agccagtcgg	20

[0069]

<210> 362	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 362	
ttttataact tgatcaagca	20
<210> 363	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 363	
catcacctc tgtgatttta	20
<210> 364	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 364	
ctcaagggtca cccaccatca	20
<210> 365	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 365	
catctcgttg atatcctcaa	20
<210> 366	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 366	
cttctgcttg atgatcatct	20
<210> 367	
<211> 20	
<212> DNA	

[0070]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 367	
cataccttct gcttgatgat	20
<210> 368	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 368	
tttctcatac cttctgcttg	20
<210> 369	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 369	
cattttttct cataccttct	20
<210> 370	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 370	
tttatcattt tttctcatac	20
<210> 371	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 371	
caacttttat catTTTTTct	20
<210> 372	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0071]

<400> 372 ctgtaagaac aaatatccct tagta	25
<210> 373 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 373 tgcctgtaag aacaaatata cctta	25
<210> 374 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 374 gttgctgta agaacaata tccct	25
<210> 375 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 375 attgttgctt gtaagaacaa atata	25
<210> 376 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 376 gcattgttgc ctgtaagaac aaata	25
<210> 377 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 377 cctgcattgt tgcctgtaag aacaa	25

[0072]

<210> 378	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 378	
atcctgcatt gttgcctgta agaac	25
<210> 379	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 379	
caaatcctgc attgttgctt gtaag	25
<210> 380	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 380	
tccaaatcct gcattgttgc ctgta	25
<210> 381	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 381	
tgttccaaat cctgcattgt tgcct	25
<210> 382	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 382	
tctgttccaa atcctgcatt gttgc	25
<210> 383	
<211> 25	
<212> DNA	

[0073]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 383	
aactggggac gcctctgttc caaat	25
<210> 384	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 384	
gcctctgttc caaatcctgc attgt	25
<210> 385	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 385	
cagcggtaat gagttcttcc aactg	25
<210> 386	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 386	
cttccaactg gggacgcctc tgttc	25
<210> 387	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 387	
cttggttttc aaattttggg cagcg	25
<210> 388	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0074]

<400> 388 ctagcctctt gattgctggt cttgt	25
<210> 389 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 389 ttttcaaatt ttgggcagcg gtaat	25
<210> 390 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 390 ttcgatccgt aatgattggt ctagc	25
<210> 391 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 391 gattgctggt cttgtttttc aaatt	25
<210> 392 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 392 cttacttcga tccgtaatga ttggt	25
<210> 393 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 393 ttgttctagc ctcttgattg ctggt	25

[0075]

<210> 394	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 394	
aaaaacttac ttcgatccgt aatga	25
<210> 395	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 395	
tgttaaaaaa cttacttcga tccgt	25
<210> 396	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 396	
atgcttggtta aaaaacttac ttcga	25
<210> 397	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 397	
gtcccatgct tgttaaaaaa cttac	25
<210> 398	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 398	
agaacaaata tcccttagta	20
<210> 399	
<211> 20	
<212> DNA	

[0076]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 399	
gtaagaacaa atatccctta	20
<210> 400	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 400	
tgctgtgaag aacaaatatc	20
<210> 401	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 401	
attgttgctt gtaagaacaa	20
<210> 402	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 402	
cctgcattgt tgctgtgaag	20
<210> 403	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 403	
caaatacctgc attgttgctt	20
<210> 404	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0077]

<400> 404 gcctctgttc caaatcctgc	20
<210> 405 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 405 cttccaactg gggacgcctc	20
<210> 406 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 406 cagcggtaat gattcttcc	20
<210> 407 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 407 ttttcaaatt ttgggcagcg	20
<210> 408 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 408 gattgctggt cttgtttttc	20
<210> 409 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 409 ttgttctagc ctcttgattg	20

[0078]

<210> 410	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 410	
ttcgatccgt aatgattgtt	20
<210> 411	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 411	
cttacttcga tccgtaatga	20
<210> 412	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 412	
aaaaacttac ttcgatccgt	20
<210> 413	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 413	
tgtaaataaa cttacttcga	20
<210> 414	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 414	
atgcttggtta aaaaacttac	20
<210> 415	
<211> 20	
<212> DNA	

[0079]

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 415

gtcccatgct tgttaaaaaa

20

<210> 416

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 416

ctagaataaa aggaaaaata aatat

25

<210> 417

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 417

aactagaata aaaggaaaaa taaat

25

<210> 418

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 418

ttcaactaga ataaaaggaa aaata

25

<210> 419

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 419

ctttcaacta gaataaaagg aaaaa

25

<210> 420

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

[0080]

<400> 420 attctttcaa ctagaataaa aggaa	25
<210> 421 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 421 gaattctttc aactagaata aaagg	25
<210> 422 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 422 tctgaattct ttcaactaga ataaa	25
<210> 423 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 423 attctgaatt ctttcaacta gaata	25
<210> 424 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 424 ctgattctga attctttcaa ctaga	25
<210> 425 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 425 cactgattct gaattctttc aacta	25

[0081]

<210> 426	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 426	
tcccactgat tctgaattct ttcaa	25
<210> 427	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 427	
catcccactg attctgaatt ctttc	25
<210> 428	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 428	
tacttcatcc cactgattct gaatt	25
<210> 429	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 429	
ctgaaggtgt tcttgactt catcc	25
<210> 430	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 430	
cgttctgaa ggtgttcttg tact	24
<210> 431	
<211> 25	
<212> DNA	

[0082]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 431	
ctgttgccctc cggttctgaa ggtgt	25
<210> 432	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 432	
tttcattcaa ctgttgccctc cggtt	25
<210> 433	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 433	
taacatttca ttcaactggt gcctc	25
<210> 434	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 434	
ttgtgttgaa tcctttaaca tttca	25
<210> 435	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 435	
tcttccttag cttccagcca ttgtg	25
<210> 436	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0083]

<400> 436 cttagcttcc agccattgtg ttgaa	25
<210> 437 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 437 gtcctaagac ctgctcagct tcttc	25
<210> 438 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 438 ctgctcagct tcttccttag cttcc	25
<210> 439 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 439 ctcaagcttg gctctggcct gtcct	25
<210> 440 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 440 ggcctgtcct aagacctgct cagct	25
<210> 441 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 441 tagggaccct ccttccatga ctcaa	25

[0084]

<210> 442	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 442	
tttgattgc atctactgta taggg	25
<210> 443	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 443	
accctccttc catgactcaa gcttg	25
<210> 444	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 444	
cttggtttct gtgattttct tttgg	25
<210> 445	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 445	
atctactgta tagggaccct ccttc	25
<210> 446	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 446	
ctaaccttgg tttctgtgat tttct	25
<210> 447	
<211> 25	
<212> DNA	

[0085]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 447	
tttcttttgg attgcatcta ctgta	25
<210> 448	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 448	
tgataactaac cttggtttct gtgat	25
<210> 449	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 449	
atcttttgata ctaaccttgg tttct	25
<210> 450	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 450	
aaggtatctt tgataactaac cttgg	25
<210> 451	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 451	
ttaaaaaggt atctttgata ctaac	25
<210> 452	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0086]

<400> 452 ataaaaggaa aaataaatat	20
<210> 453 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 453 gaataaaagg aaaaataaat	20
<210> 454 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 454 aactagaata aaaggaaaaa	20
<210> 455 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 455 ctttcaacta gaataaaagg	20
<210> 456 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 456 gaattctttc aactagaata	20
<210> 457 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 457 attctgaatt ctttcaacta	20

[0087]

<210> 458	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 458	
tacttcatcc cactgattct	20
<210> 459	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 459	
ctgaagggtgt tcttgact	19
<210> 460	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 460	
ctgttgccctc cggttctgaa	20
<210> 461	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 461	
taacatttca ttcaactgtt	20
<210> 462	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 462	
ttgtgttgaa tcctttaaca	20
<210> 463	
<211> 20	
<212> DNA	

[0088]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 463	
cttagcttcc agccattgtg	20
<210> 464	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 464	
ctgctcagct tcttccttag	20
<210> 465	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 465	
ggcctgtcct aagacctgct	20
<210> 466	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 466	
ctcaagcttg gctctggcct	20
<210> 467	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 467	
accctccttc catgactcaa	20
<210> 468	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0089]

<400> 468 atctactgta tagggaccct <210> 469 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	20
<400> 469 tttcttttgg attgcatcta <210> 470 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	20
<400> 470 cttggtttct gtgattttct <210> 471 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	20
<400> 471 ctaaccttgg tttctgtgat <210> 472 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	20
<400> 472 tgataactaac cttggtttct <210> 473 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	20
<400> 473 atctttgata ctaaccttgg	20

[0090]

<210> 474	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 474	
aaggtatctt tgatactaac	20
<210> 475	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 475	
ttaaaaaggt atctttgata	20
<210> 476	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 476	
ctatagattt ttatgagaaa gaga	24
<210> 477	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 477	
aactgctata gatttttatg agaaa	25
<210> 478	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 478	
tggccaactg ctatagattt ttatg	25
<210> 479	
<211> 25	
<212> DNA	

[0091]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 479	
gtctttggcc aactgctata gattt	25
<210> 480	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 480	
cggaggtctt tggccaactg ctata	25
<210> 481	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 481	
actggcggag gtctttggcc aactg	25
<210> 482	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 482	
tttgtctgcc actggcggag gtctt	25
<210> 483	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 483	
agtcatttgc cacatctaca tttgt	25
<210> 484	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0092]

<400> 484 tttgccacat ctacatttgt ctgcc	25
<210> 485 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 485 ccggagaagt ttcaggcca agtca	25
<210> 486 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 486 gtatcatctg cagaataatc ccgga	25
<210> 487 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 487 taatccgga gaagtttcag ggcca	25
<210> 488 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 488 ttatcatgtg gacttttctg gtatc	25
<210> 489 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 489 agaggcattg atattctctg ttatc	25

[0093]

<210> 490
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 490
atgtggactt ttctggtatc atctg 25

<210> 491
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 491
cttttatgaa tgcttctcca agagg 25

<210> 492
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 492
atattctctg ttatcatgtg gactt 25

<210> 493
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 493
catacctttt atgaatgctt ctcca 25

<210> 494
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 494
ctccaagagg cattgatatt ctctg 25

<210> 495
<211> 25
<212> DNA

[0094]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 495	
taattcatac cttttatgaa tgctt	25
<210> 496	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 496	
cttttatgaa tgcttctcca agagg	25
<210> 497	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 497	
taatgtaatt catacctttt atgaa	25
<210> 498	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 498	
agaaataatg taattcatac ctttt	25
<210> 499	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 499	
gttttagaaa taatgtaatt catac	25
<210> 500	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0095]

<400> 500 gatttttatg agaaagaga	19
<210> 501 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 501 ctatagattt ttatgagaaa	20
<210> 502 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 502 aactgctata gatttttatg	20
<210> 503 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 503 tggccaactg ctatagattt	20
<210> 504 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 504 gtctttggcc aactgctata	20
<210> 505 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 505 cggagggtctt tggccaactg	20

[0096]

<210> 506
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 506
ttgtctgcc actggcggag 20

<210> 507
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 507
ttgccacat ctacatttgt 20

<210> 508
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 508
ttcaggcca agtcatttgc 20

<210> 509
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 509
taatcccga gaagtttcag 20

<210> 510
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 510
gtatcatctg cagaataatc 20

<210> 511
<211> 20
<212> DNA

[0097]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 511	
atgtggactt ttctggtatc	20
<210> 512	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 512	
atattctctg ttatcatgtg	20
<210> 513	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 513	
ctccaagagg cattgatatt	20
<210> 514	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 514	
cttttatgaa tgcttctcca	20
<210> 515	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 515	
catacctttt atgaatgctt	20
<210> 516	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0098]

<400> 516 taattcatac cttttatgaa	20
<210> 517 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 517 taatgtaatt catacctttt	20
<210> 518 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 518 agaaataatg taattcatac	20
<210> 519 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 519 gttttagaaa taatgtaatt	20
<210> 520 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 520 ctgcaaagga ccaaattgttc agatg	25
<210> 521 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 521 tcaccctgca aaggaccaa tggttc	25

[0099]

<210> 522	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 522	
ctcactcacc ctgcaaagga ccaaa	25
<210> 523	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 523	
tctcgctcac tcaccctgca aagga	25
<210> 524	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 524	
cagcctctcg ctcactcacc ctgca	25
<210> 525	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 525	
caaagcagcc tctcgctcac tcacc	25
<210> 526	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 526	
tcttccaaag cagcctctcg ctcac	25
<210> 527	
<211> 25	
<212> DNA	

[0100]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 527	
tctatgagtt tcttccaaag cagcc	25
<210> 528	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 528	
gttgacagtaa tctatgagtt tcttc	25
<210> 529	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 529	
gaactgttgc agtaatctat gagtt	25
<210> 530	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 530	
ttccaggtcc agggggaact gttgc	25
<210> 531	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 531	
gtaagccagg caagaaactt ttcca	25
<210> 532	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0101]

<400> 532 ccaggcaaga aacttttcca ggtcc	25
<210> 533 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 533 tggcagttgt ttcagcttct gtaag	25
<210> 534 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 534 ggtagcatcc tgtaggacat tggca	25
<210> 535 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 535 gacattggca gttgtttcag cttct	25
<210> 536 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 536 tctaggagcc tttccttacg ggtag	25
<210> 537 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 537 cttttactcc cttggagtct tctag	25

[0102]

<210> 538	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 538	
gagcctttcc ttacgggtag catcc	25
<210> 539	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 539	
ttgccattgt ttcacagct ctttt	25
<210> 540	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 540	
cttggagtct tctaggagcc tttcc	25
<210> 541	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 541	
cttacttgcc attgtttcat cagct	25
<210> 542	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 542	
cagctctttt actcccttgg agtct	25
<210> 543	
<211> 25	
<212> DNA	

[0103]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 543	
cctgacttac ttgccattgt ttcac	25
<210> 544	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 544	
aaatgcctga cttacttgcc attgt	25
<210> 545	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 545	
agcggaatg cctgacttac ttgcc	25
<210> 546	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 546	
gctaaagcgg aaatgcctga cttac	25
<210> 547	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 547	
aaggaccaaa tggtcagatg	20
<210> 548	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0104]

<400> 548 ctgcaaagga ccaaattgttc	20
<210> 549 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 549 tcaccctgca aaggaccaaa	20
<210> 550 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 550 ctcactcacc ctgcaaagga	20
<210> 551 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 551 tctcgctcac tcaccctgca	20
<210> 552 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 552 cagcctctcg ctcactcacc	20
<210> 553 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 553 caaagcagcc tctcgctcac	20

[0105]

<210> 554	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 554	
tctatgagtt tcttccaaag	20
<210> 555	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 555	
gaactgttgc agtaatctat	20
<210> 556	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 556	
ttccaggtcc agggggaact	20
<210> 557	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 557	
ccaggcaaga aacttttcca	20
<210> 558	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 558	
ttcagcttct gtaagccagg	20
<210> 559	
<211> 20	
<212> DNA	

[0106]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 559	
gacattggca gttgtttcag	20
<210> 560	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 560	
ggtagcatcc tgtaggacat	20
<210> 561	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 561	
gagcctttcc ttacgggtag	20
<210> 562	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 562	
cttgaggtct tctaggagcc	20
<210> 563	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 563	
cagctctttt actcccttgg	20
<210> 564	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0107]

<400> 564 ttgccattgt ttcacagct	20
<210> 565 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 565 cttacttgcc attgtttcat	20
<210> 566 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 566 cctgacttac ttgccattgt	20
<210> 567 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 567 aaatgcctga cttacttgcc	20
<210> 568 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 568 agcggaaatg cctgacttac	20
<210> 569 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 569 gctaaagcgg aaatgcctga	20

[0108]

<210> 570
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于PMO细胞内送递的肽转运蛋白

<400> 570
Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Cys
1 5 10

<210> 571
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于PMO细胞内送递的肽转运蛋白

<400> 571
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Cys
1 5 10

<210> 572
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于PMO细胞内送递的肽转运蛋白

<220>
<221> MOD_RES
<222> 3, 6, 9, 12
<223> X = 6-氨基己酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> 13
<223> X = β 丙氨酸

<400> 572
Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 573
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于PMO细胞内送递的肽转运蛋白

<220>
<221> MOD_RES

[0109]

<222> 2, 5, 8, 11, 13

<223> X = 6-氨基己酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> 14

<223> X = β 丙氨酸

<400> 573

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 574

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于PMO细胞内送递的肽转运蛋白

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1, 4, 7, 10, 13

<223> X = 6-氨基己酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> 14

<223> X = β 丙氨酸

<400> 574

Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 575

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于PMO细胞内送递的肽转运蛋白

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 4, 6, 8, 10, 12

<223> X = 6-氨基己酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> 13

<223> X = β 丙氨酸

<400> 575

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 576

<211> 17

<212> PRT

[0110]

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于PMO细胞内送递的肽转运蛋白

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16

<223> X = 6-氨基己酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> 17

<223> X = β 丙氨酸

<400> 576

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Xaa

<210> 577

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于PMO细胞内送递的肽转运蛋白

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 5, 8, 11, 14, 16

<223> X = 6-氨基己酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> 17

<223> X = β 丙氨酸

<400> 577

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
Xaa

<210> 578

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于PMO细胞内送递的肽转运蛋白

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1, 8, 13

<223> X = 6-氨基己酸

<220>

[0111]

<221> MOD_RES
<222> 5, 11, 14
<223> X = β 丙氨酸

<400> 578
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 579
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 用于PMO细胞内送递的肽转运蛋白

<400> 579
Ala Ser Ser Leu Asn Ile Ala
1 5

<210> 580
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽/导向肽/PMO偶联物

<220>
<221> MOD_RES
<222> 8
<223> X = 中性氨基酸 C(=O) (CHR)_n NH-, 其中n是2-7而每个R独立地是H或甲基

<220>
<221> MOD_RES
<222> 9
<223> X = β 丙氨酸

<400> 580
Ala Ser Ser Leu Asn Ile Ala Xaa Xaa
1 5

<210> 581
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽/导向肽/PMO偶联物

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 8, 13, 22
<223> X = 中性氨基酸 C(=O) (CHR)_n NH-, 其中n是2-7而每个R独立地是H或甲基

<220>

[0112]

<221> MOD_RES
<222> 5, 11, 14
<223> X = β 丙氨酸

<400> 581
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa Ala Ser
1 5 10 15
Ser Leu Asn Ile Ala Xaa
20

<210> 582
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽/导向肽/PMO偶联物

<220>
<221> MOD_RES
<222> 8, 10, 16
<223> X = 中性氨基酸 C(=O) (CHR)_n NH-, 其中n是2-7而每个R独立地是H或甲基

<220>
<221> MOD_RES
<222> 13, 19, 21
<223> Xaa = β 丙氨酸

<400> 582
Ala Ser Ser Leu Asn Ile Ala Xaa Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa
1 5 10 15
Arg Arg Xaa Arg Xaa
20

<210> 583
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽/导向肽/PMO偶联物

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 8, 13
<223> X = 中性氨基酸 C(=O) (CHR)_n NH-, 其中n是2-7而每个R独立地是H或甲基

<220>
<221> MOD_RES
<222> 5, 11, 14
<223> X = β 丙氨酸

<400> 583
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 584
<211> 29
<212> DNA

[0113]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 584	
ccactcagag ctcagatctt ctaacttcc	29
<210> 585	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 585	
gggatccagt atacttacag gctcc	25
<210> 586	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 586	
cttcactca gagctcagat cttctaa	27
<210> 587	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 587	
acatcaagga agatggcatt tctagtttgg	30
<210> 588	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 588	
ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag	30
<210> 589	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0114]

<400> 589 ttctgtccaa gcccggttga aatc	24
<210> 590 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 590 cacccaccat caccctcygt g	21
<210> 591 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 591 atcatctcgt tgatatcctc aa	22
<210> 592 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 592 acatcaagga agatggcatt tctag	25
<210> 593 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 593 accagagtaa cagtctgagt aggagc	26
<210> 594 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 594 tcaaggaaga tggcatttct	20

[0115]

<210> 595	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 595	
cctctgtgat tttataactt gat	23
<210> 596	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 596	
atcatttttt ctcatacctt ctgct	25
<210> 597	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 597	
ctcatacctt ctgcttgatg atc	23
<210> 598	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 598	
tggcatttct agtttgg	17
<210> 599	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 599	
ccagagcagg tacctccaac atc	23
<210> 600	
<211> 24	
<212> DNA	

[0116]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 600	
tgttcagctt ctgttagcca ctga	24
<210> 601	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 601	
tttgtgtctt tctgagaaac	20
<210> 602	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 602	
cgccgccatt tctcaacag	19
<210> 603	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 603	
atctgtcaaa tcgcctgcag	20
<210> 604	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 604	
tgtttttgag gattgctgaa	20
<210> 605	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0117]

<400> 605 gctgaattat ttcttcccc	19
<210> 606 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 606 gccaatgcc atcctgg	17
<210> 607 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 607 ccaatgcat cctggagttc ctgtaa	26
<210> 608 <211> 31 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 608 cattcaactg ttgcctccgg ttctgaaggt g	31
<210> 609 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 609 ctgaaggtgt tcttgtactt catcc	25
<210> 610 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 610 ctgttgccctc cggttctg	18

[0118]

<210> 611	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 611	
attctttcaa ctagaataaa ag	22
<210> 612	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 612	
gccatcctgg agttcctgta agatacaaaa	30
<210> 613	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 613	
ccaatgccat cctggagtgc ctgtaagata	30
<210> 614	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 614	
gccgctgccc aatgccatcc tggagttcct	30
<210> 615	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 615	
gtttgccgct gcccaatgcc atcctggagt	30
<210> 616	
<211> 30	
<212> DNA	

[0119]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 616 caacagtttg ccgctgcca atgccatcct	30
<210> 617 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 617 ctgacaacag tttgccgtg cccaatgcca	30
<210> 618 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 618 tgttctgaca acagtttgcc gctgcccaat	30
<210> 619 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 619 caatgttctg acaacagttt gccgctgccc	30
<210> 620 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 620 cattcaatgt tctgacaaca gtttgccgt	30
<210> 621 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	

[0120]

<400> 621 tatttcttcc ccagttgcat tcaatgttct	30
<210> 622 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 622 gctgaattat ttcttcccca gttgcattca	30
<210> 623 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 623 ggattgctga attatttctt ccccagttgc	30
<210> 624 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 624 tttgaggatt gctgaattat ttcttcccca	30
<210> 625 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 625 gtacttcac ccaactgattc tgaattcttt	30
<210> 626 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 626 tcttgactt catcccactg attctgaatt	30

[0121]

<210> 627
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 627
tgttcttgta cttcatccca ctgattctga 30

<210> 628
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 628
cggttctgaa ggtgttcttg tacttcatcc 30

<210> 629
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 629
ctccggttct gaaggtgttc ttgtacttca 30

<210> 630
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 630
tgcctccggt tctgaagtg ttcttgtact 30

<210> 631
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列

<400> 631
tgttgccctcc ggttctgaag glgttcttgt 30

<210> 632
<211> 30
<212> DNA

[0122]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 632 aactgttgcc tccggttctg aaggtgttct	30
<210> 633	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 633 ttcaactgtt gcctccggtt ctgaaggtgt	30
<210> 634	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 634 taaagctctg gaaacctgaa aggaa	25
<210> 635	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 靶向预加工的人肌营养不良蛋白剪接位点的反义序列	
<400> 635 ttcagcttct gtaagccagg caaga	25
<210> 636	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反义寡聚体	
<400> 636 ggccaaacct cggcttacct gaaat	25
<210> 637	
<211> 12	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 富含精氨酸的肽转运	

[0123]

<220>
<221> VARIANT
<222> 1, 3, 4, 7, 9, 10
<223> Xaa = K、R或精氨酸类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 8
<223> Xaa =中性氨基酸 C(=O) (CHR)n NH-, 其中n是2-7而每个R独立地是H或甲基

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 5, 6, 11, 12
<223> Xaa = 具有中性芳烷基侧链的 α -氨基酸

<400> 637
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 638
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富含精氨酸的肽转运

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 6, 8, 12
<223> Xaa =中性氨基酸 C(=O) (CHR)n NH-, 其中n是2-7而每个R独立地是H或甲基

<400> 638
Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa
1 5 10

<210> 639
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 富含精氨酸的肽转运

<220>
<221> MOD_RES
<222> 3, 5, 9
<223> Xaa =中性氨基酸 C(=O) (CHR)n NH-, 其中n是2-7而每个R独立地是H或甲基

<400> 639
Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa
1 5

<210> 640
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物

<400> 640

[0124]

ccagagcttt acctgagaaa caag	24
<210> 641	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 641	
ccagccactc agccagtgaa g	21
<210> 642	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 642	
cgatccgtaa tgattgttct agcc	24
<210> 643	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 643	
catttcattc aactgttgcc tccg	24
<210> 644	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 644	
caatgctcct gacctctgtg c	21
<210> 645	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 645	
gtctacaaca aagctcaggt cg	22
<210> 646	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	

[0125]

<400> 646 gcaatgttat ctgcttcctc caacc	25
<210> 647 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 647 gctcttttcc aggttcaagt gg	22
<210> 648 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 648 cttggacaga acttaccgac tgg	23
<210> 649 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 649 gcaggatttg gaacagaggc g	21
<210> 650 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 650 catctacatt tgtctgccac tgg	23
<210> 651 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 651 gtttcttcca aagcagcctc tcg	23

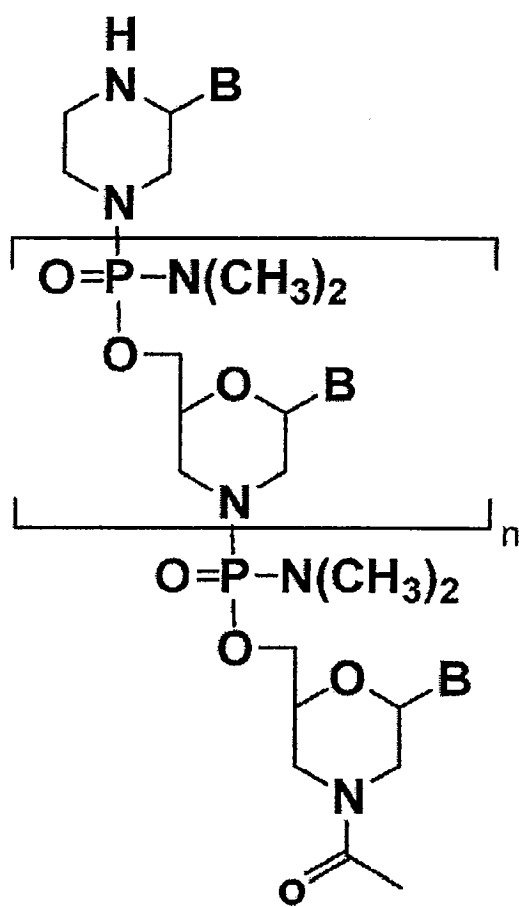


图 1A

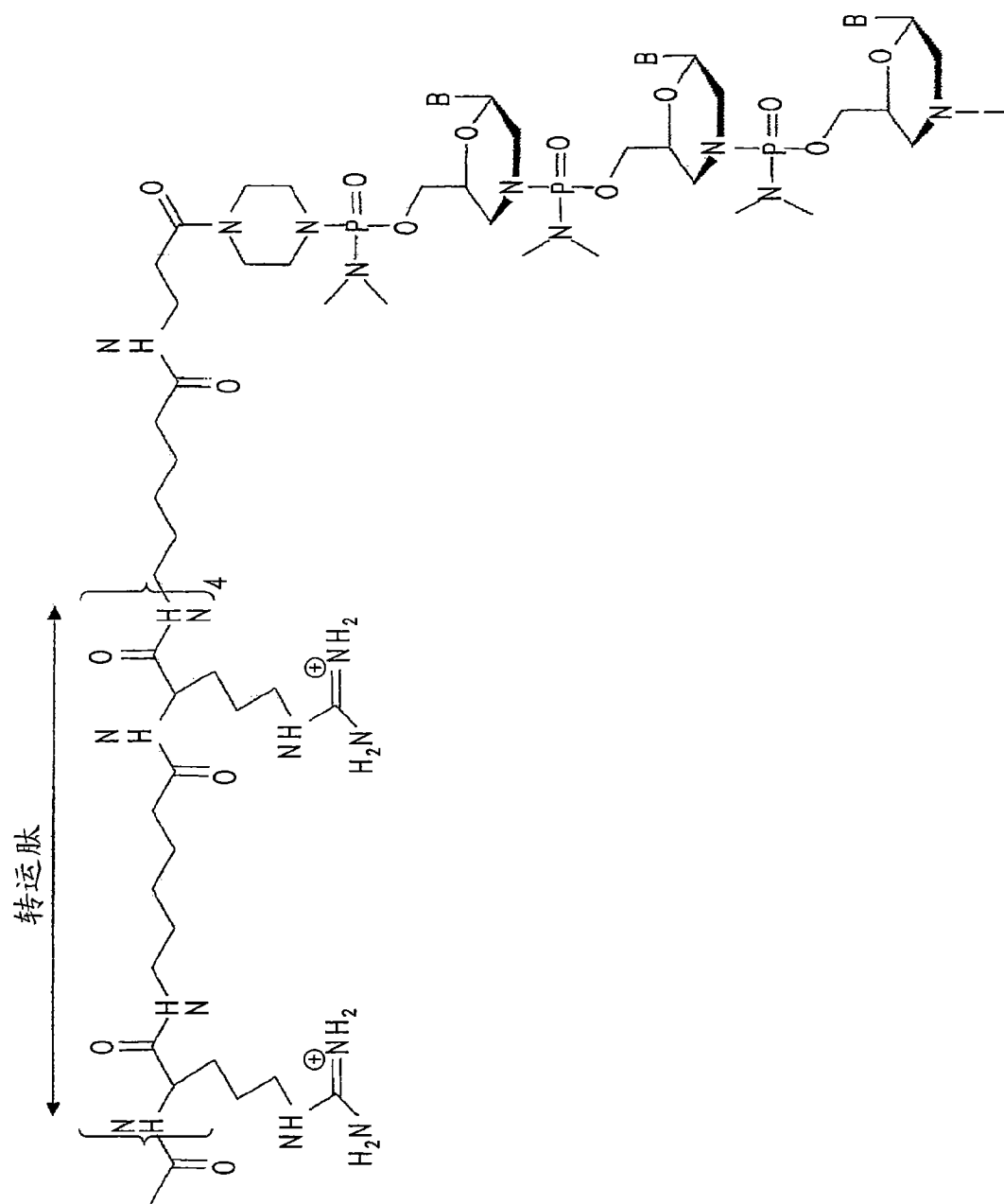


图 1B

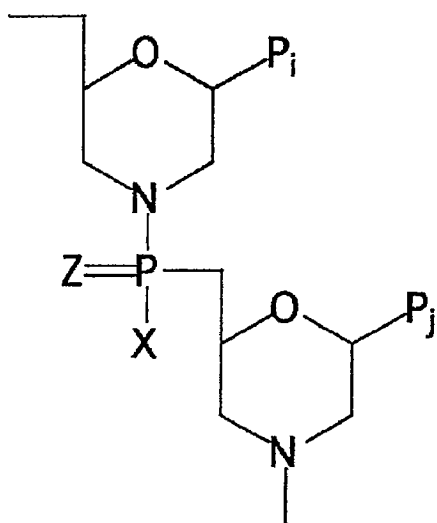


图 1D

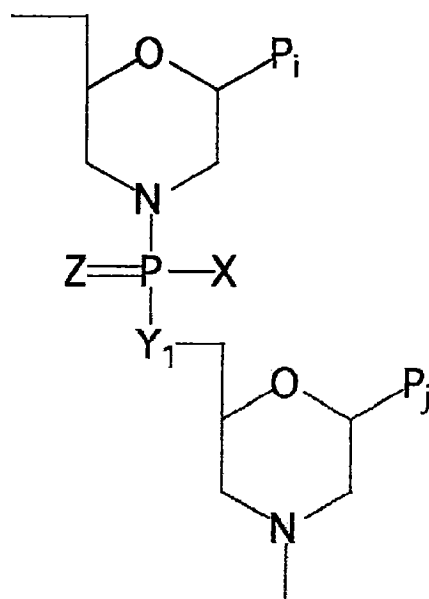


图 1E

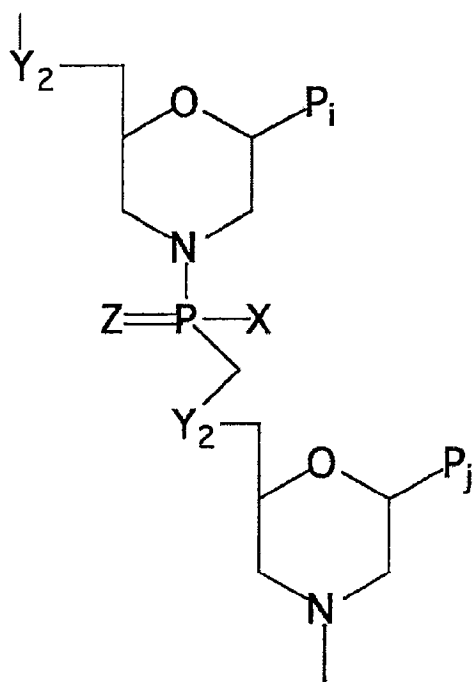


图 1F

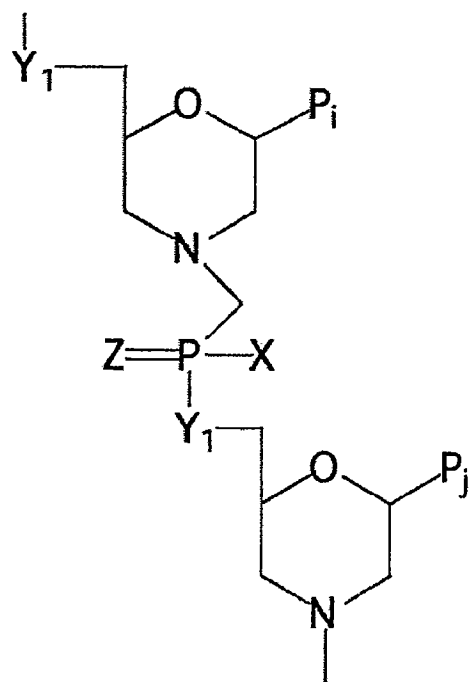
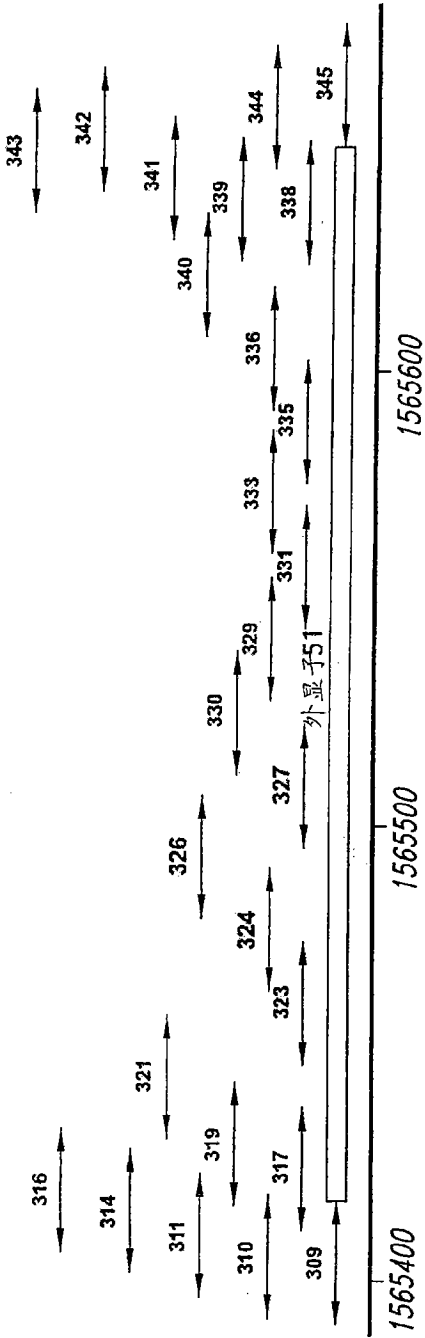


图 1G

肌营养不良蛋白外显子51扫描寡聚体
DMD 基因 1756



所示的寡聚体 SEQ ID NO (序列标识号), SEQ ID NOs: 324、326和327是最有效的

图 2A

外显子 51S.3(RD)
高纯度合成, 3.0uM, RD 细胞

寡聚体	名称; SEQ ID NO	批号 (Lot)
NG-07-1160	AVI-5658; 588	09MY11-R(E4)
NG-09-0053	053; 324	09JNJ12-R(A4)
NG-09-0054	054; 326	09JNJ12-R(B4)
NG-09-0055	055; 327	09JNJ12-R(E4)

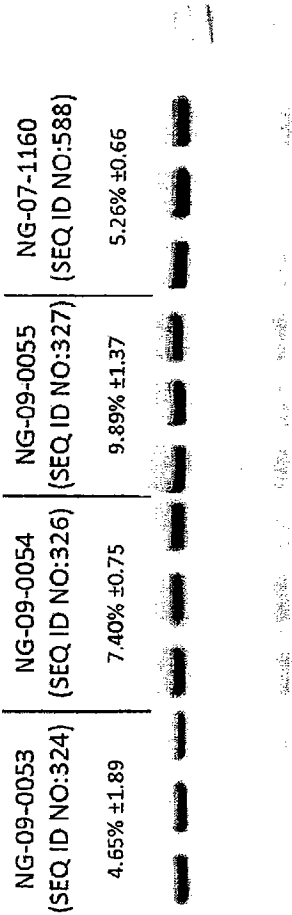


图 2B

51MCS(肌细胞竞争者筛选(competitor screen))
高纯度合成, 3.0uM, 人原代骨骼肌细胞

寡聚体	名称; SEQ ID NO	批号(Lot)
NG-07-1160	AVI-5658; 588	09MY11-R(E4)
NG-09-0053	053; 324	09JNJ12-R(A4)
NG-09-0054	054; 326	09JNJ12-R(B4)
NG-09-0055	055; 327	09JNJ12-R(E4)
NG-08-0835	h51AON1: 594	09JL07-R(A1)

NG-09-0053	NG-09-0054	NG-09-0055	无	NG-07-1160	NG-08-0835
SEQ ID NO:324	SEQ ID NO:326	SEQ ID NO:327	tx	SEQ ID NO:588	SEQ ID NO:594
1.02% ±0.30	1.12% ±0.08	1.30% ±0.40	0%	1.10% ±0.13	0.14% ±0.07

图 2C

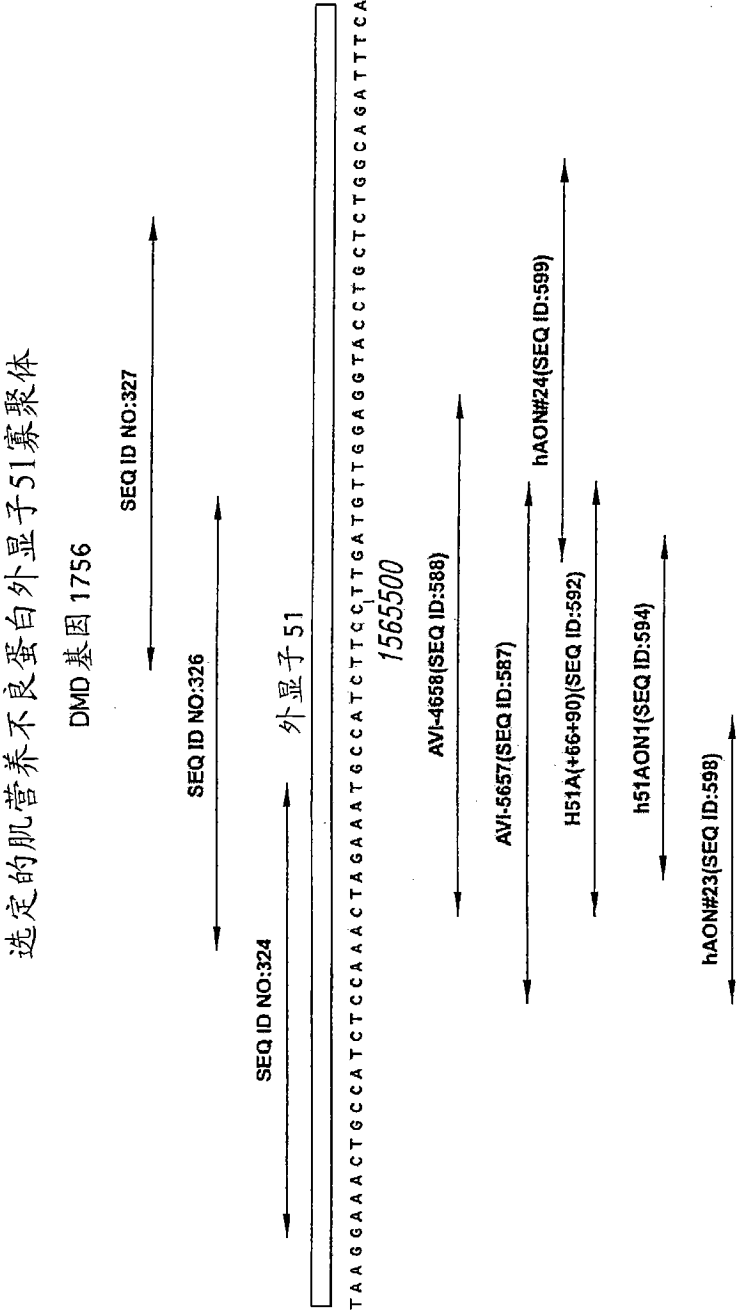


图 2D

肌营养不良蛋白外显子50扫描寡聚体

DMD 基因 1756

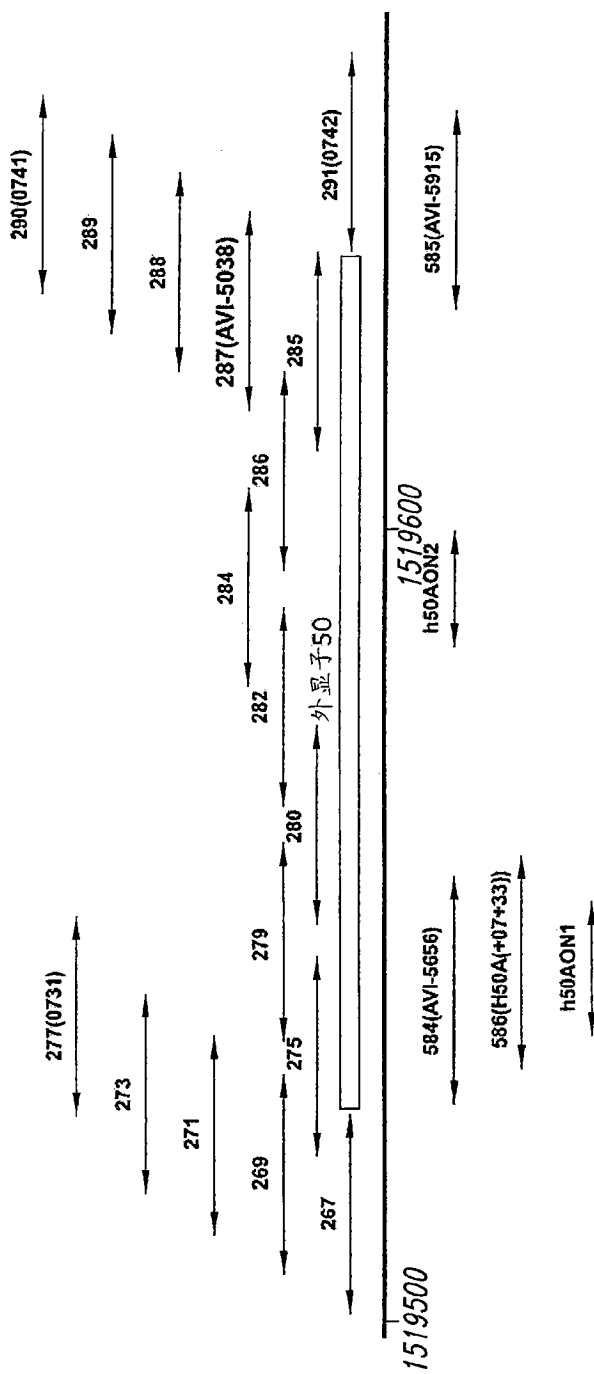
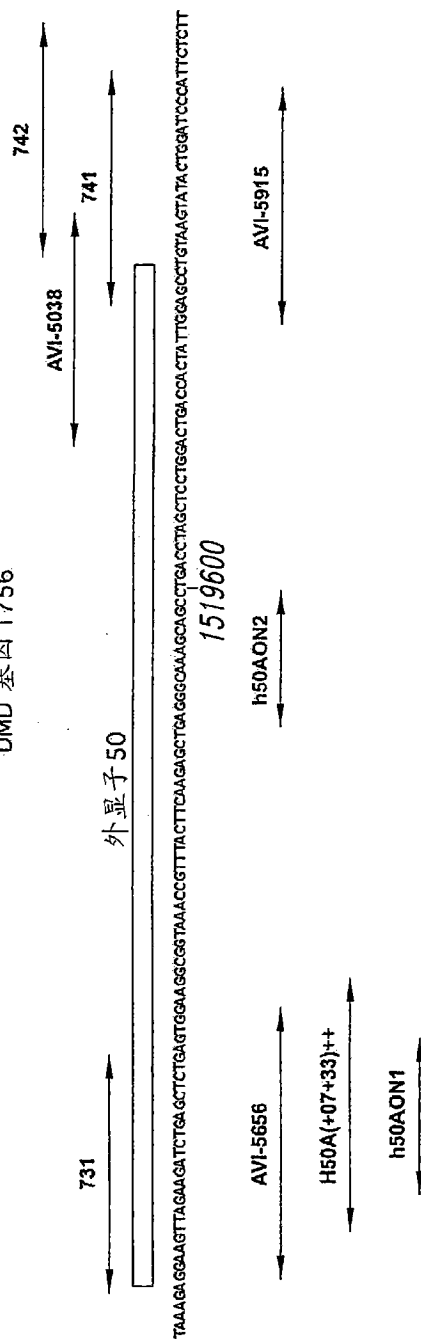


图 3A

选定的肌营养不良蛋白外显子50寡聚体

DMD 基因 1756



化合物	EC ₅₀ (微摩尔)*
AVI-5656 (SEQ ID NO:584)	0.921
AVI-5915 (SEQ ID NO:585)	3.693
NG-08-0731 (SEQ ID NO:277)	1.741
AVI-5038 (SEQ ID NO:287)	0.966
NG-08-0741 (SEQ ID NO:290)	1.836
NG-08-0742 (SEQ ID NO:291)	2.402

*由RD细胞的剂量范围研究所确定
AVI #00453 - 02FEB2009

图 3B

肌营养不良蛋白外显子53扫描寡聚体

DMD 基因 1756

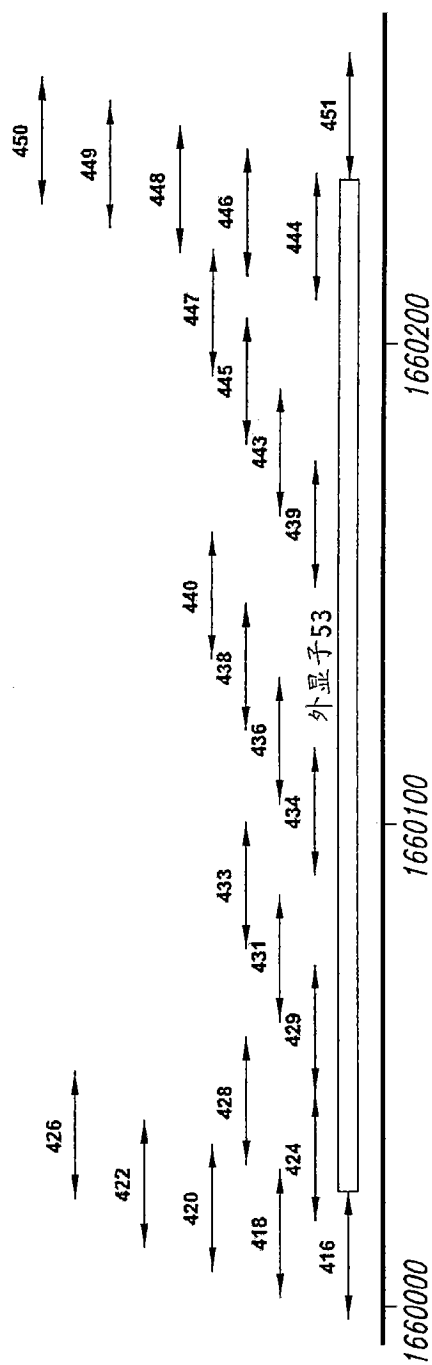


图 4A

选定的肌营养不良蛋白外显子53寡聚体

DMD 基因 1756

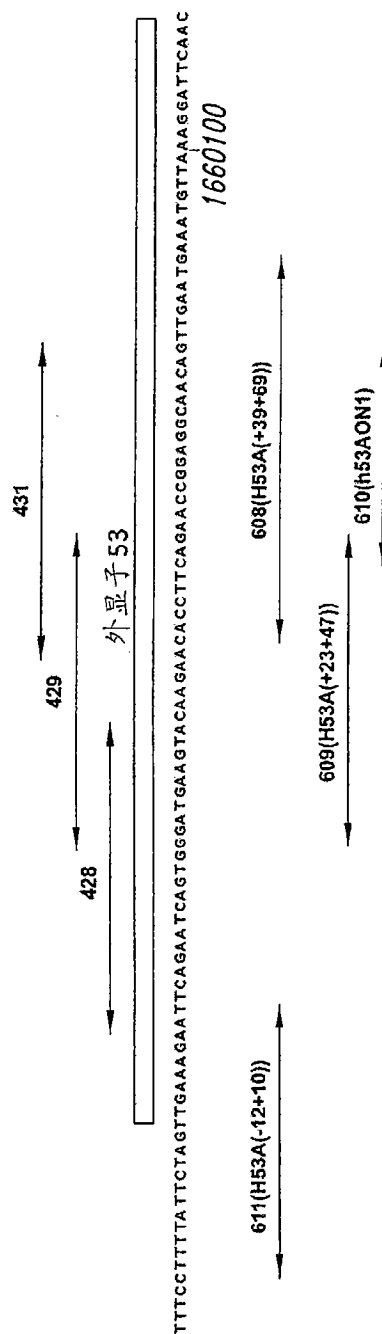


图 4B

外显子53 DR.2
高纯度合成,(1.0,2.0,3.0,5.0,10.0uM)RD细胞

NG-0746 09AU11-R(E5) (SEQ ID NO: 422)



图 4C

外显子53 DR.2
高纯度合成,(1.0,2.0,3.0,5.0,10.0uM)RD细胞

NG-0749 09AU11-R(A7) (SEQ ID NO: 428)



图 4D

外显子53 DR.2
高纯度合成,(1.0,2.0,3.0,5.0,10.0uM)RD细胞
NG-0750 09AU11-R(C7) (SEQ ID NO: 429)

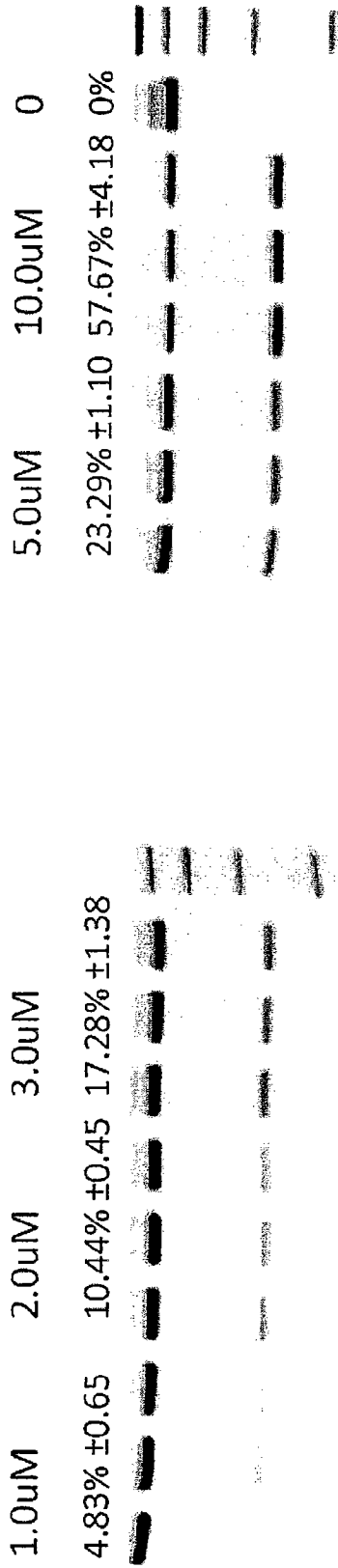


图 4E

外显子53 DR.2
高纯度合成,(1.0,2.0,3.0,5.0,10.0uM)RD细胞
NG-0751 09AU11-J(E7) (SEQ ID NO: 431)

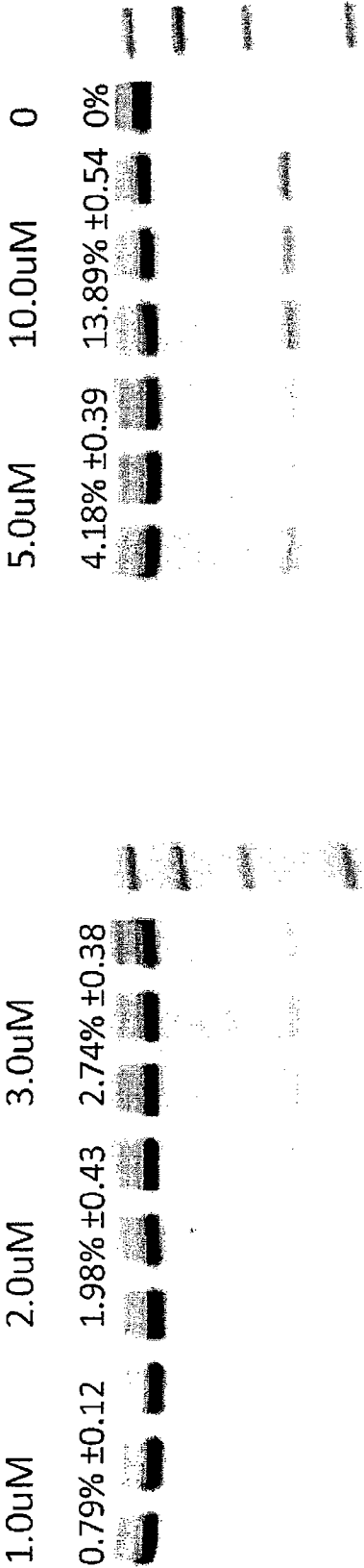


图 4F

外显子53 RD细胞剂量范围总结

跳跃的外显子百分比					
处理 (μM)	746 (SEQ ID NO:422)	749 (SEQ ID NO:428)	750 (SEQ ID NO:429)	751 (SEQ ID NO:431)	
1.0	0.00	1.05	4.83	0.79	
2.0	0.00	1.72	10.44	1.98	
3.0	0.00	2.40	17.28	2.74	
5.0	0.54	2.62	23.29	4.18	
10	3.53	4.63	57.67	13.89	
EC_{50} (μM)	NA	72.2	9.3	25.3	

图 4G

外显子53CS (竞争者筛选)
高纯度合成, 3.0uM, RD细胞

寡聚体		名称;SEQ ID(序列标识符)				批号	
NG-09-0490 NG-08-0750 (W) NG-09-0559 NG-09-0560 NG-08-0750	H53A(+39+69); 608 H53A(+23+47); 609 h53AON1; 610 H53A(-12+10); 611 008; 429					09AU18-J(A1) 09-AU18-J(B1) 09AU18-J(C1) 09AU18-J(D1) 09AU11-R(C7)	
		490	750 (W)	750	559	560	750
		SEQ ID NO:608	SEQ ID NO:609	SEQ ID NO:429	SEQ ID NO:610	SEQ ID NO:611	SEQ ID NO:429
		5.21% ±1.39	20.09% ±1.00	未定量	1.03% ±0.10	1.49% ±0.21	16.49% ±1.35
		0				0	
						0% ±0	

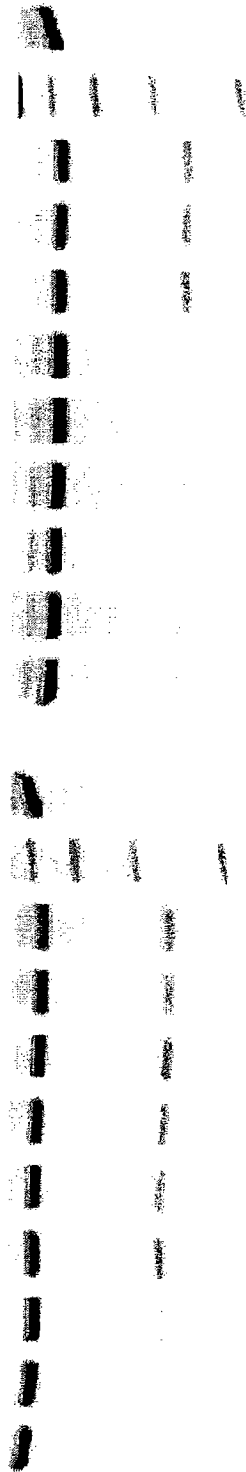


图 4H

外显子53MCS (肌肉细胞竞争者筛选)
高纯度合成, 3.0uM,人原代骨骼肌细胞

寡聚体	名称; SEQ ID	批号
NG-09-0490	H53A(+39+69); 608	09AU18-J(A1)
NG-08-0750 (W)	H53A(+23+47); 609	09-AU18-J(B1)
NG-09-0559	h53AON1; 610	09AU18-J(C1)
NG-09-0560	H53A(-12+10); 611	09AU18-J(D1)
NG-08-0750	008; 429	09AU11-R(C7)

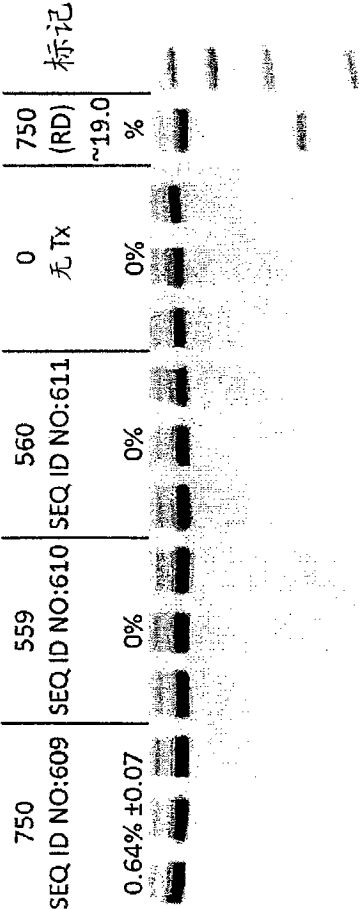


图 4I

肌营养不良蛋白外显子44扫描寡聚体

DMD 基因 1756

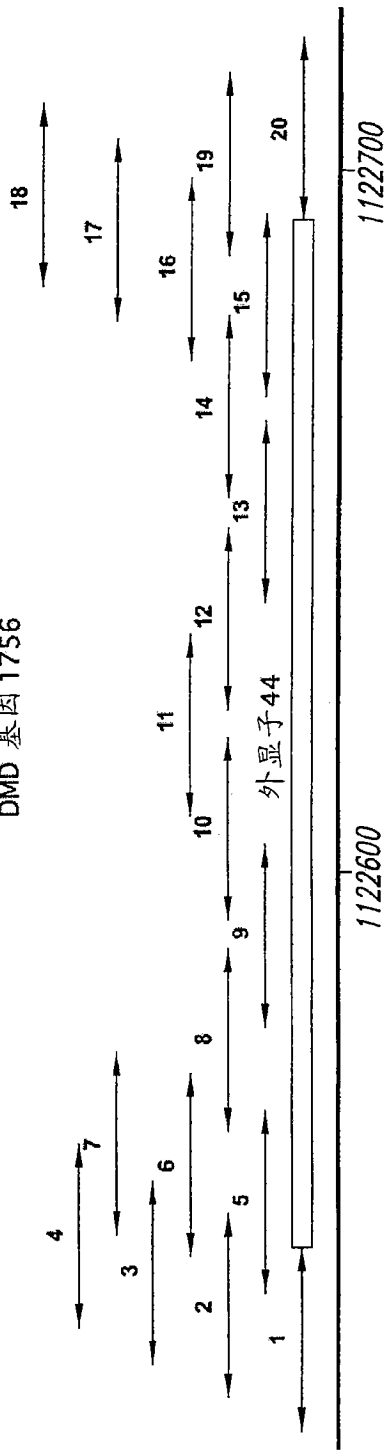


图 5A

选定的肌营养不良蛋白外显子44寡聚体

DMD 基因 1756

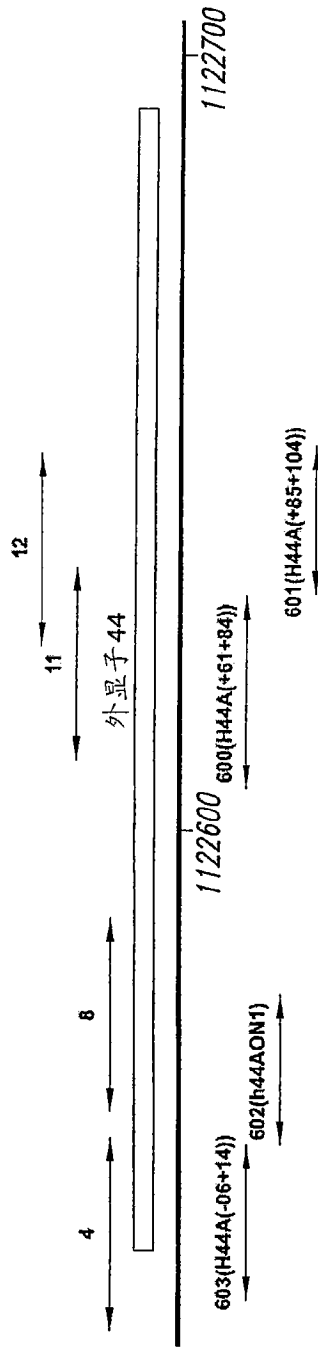


图 5B

外显子44 DR.2 (剂量范围)
高纯度合成, (0.1, 0.3, 1.0, 10uM) RD细胞
NG-08-0792 09AU11-J(A2) (SEQ ID NO: 4)

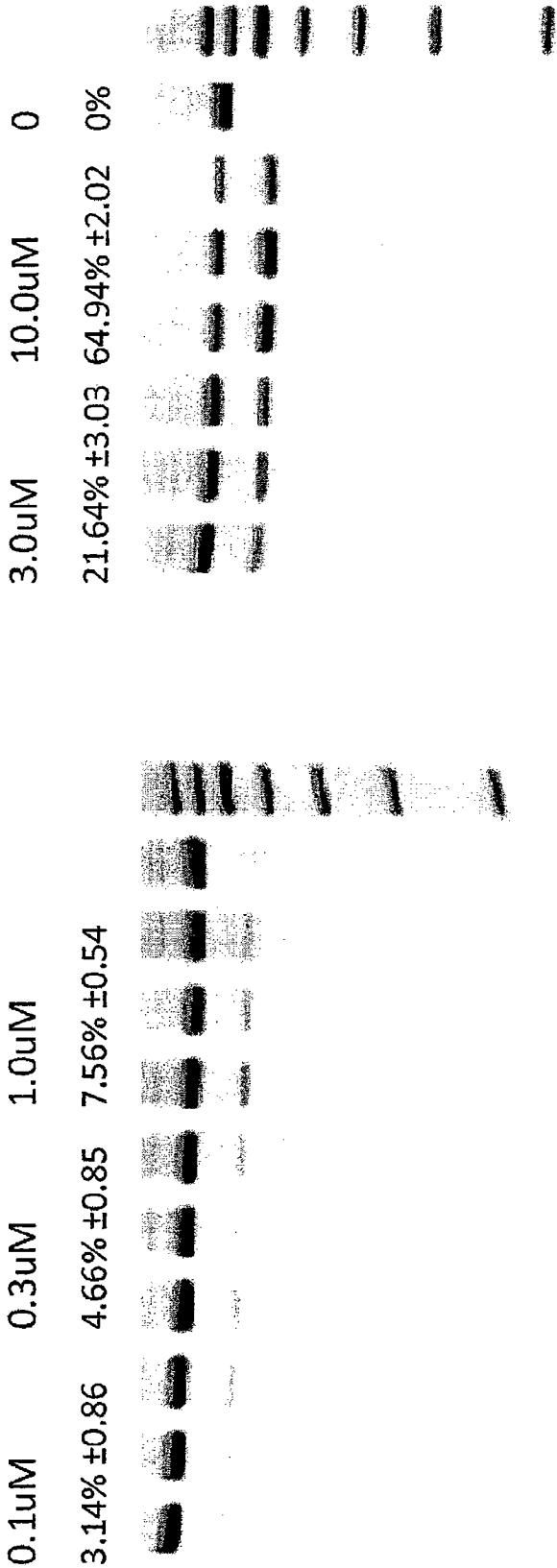


图 5C

外显子44 DR.2
高纯度合成, (0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10uM) RD细胞
NG-08-0796 09AU11-J(B2) (SEQ ID NO: 8)

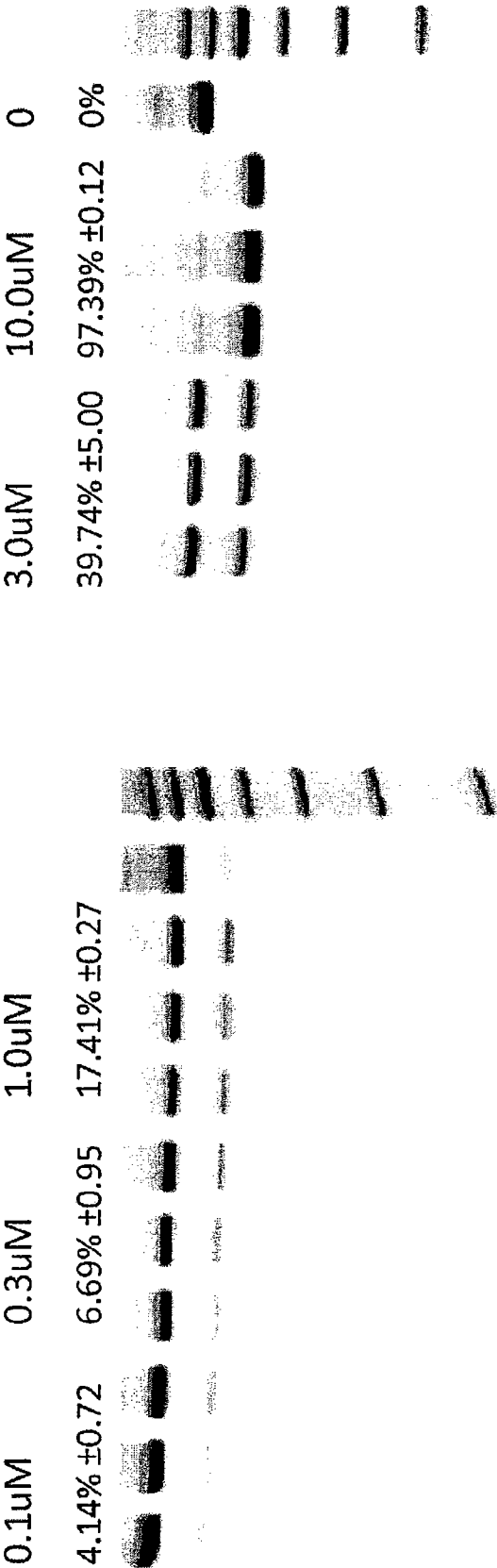


图 5D

外显子44 DR.2
高纯度合成, (0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10uM) RD细胞

NG-08-0799 09AU11-J(C2) (SEQ ID NO: 11)

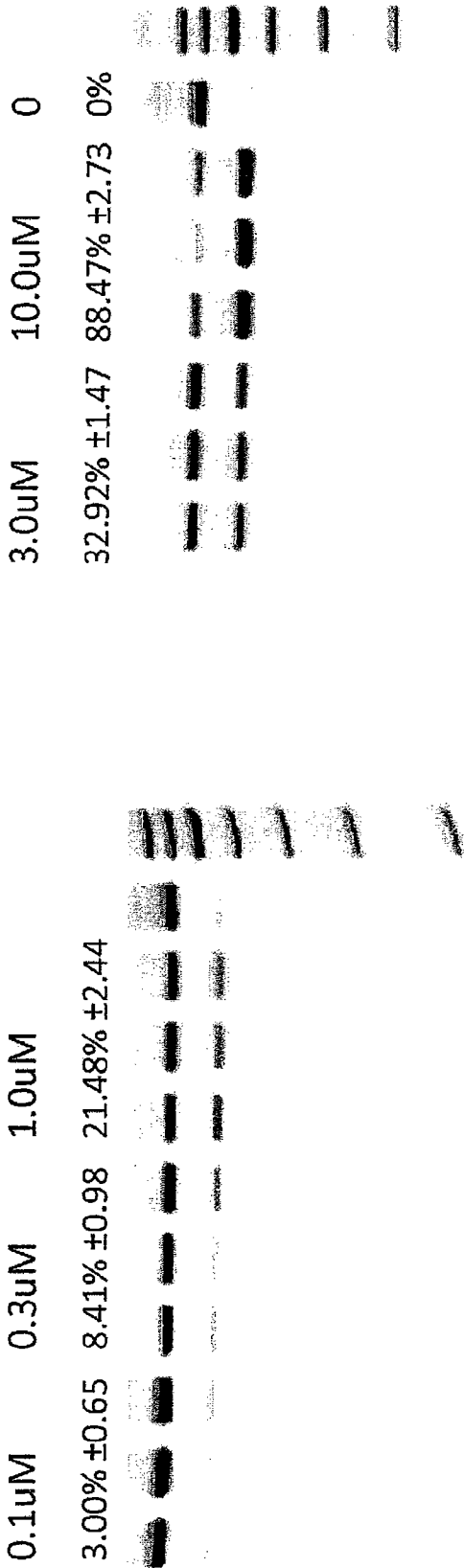


图 5E

外显子44 DR.2
高纯度合成, (0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10uM) RD细胞

NG-08-0800 09AU11-J(D2) (SEQ ID NO: 12)

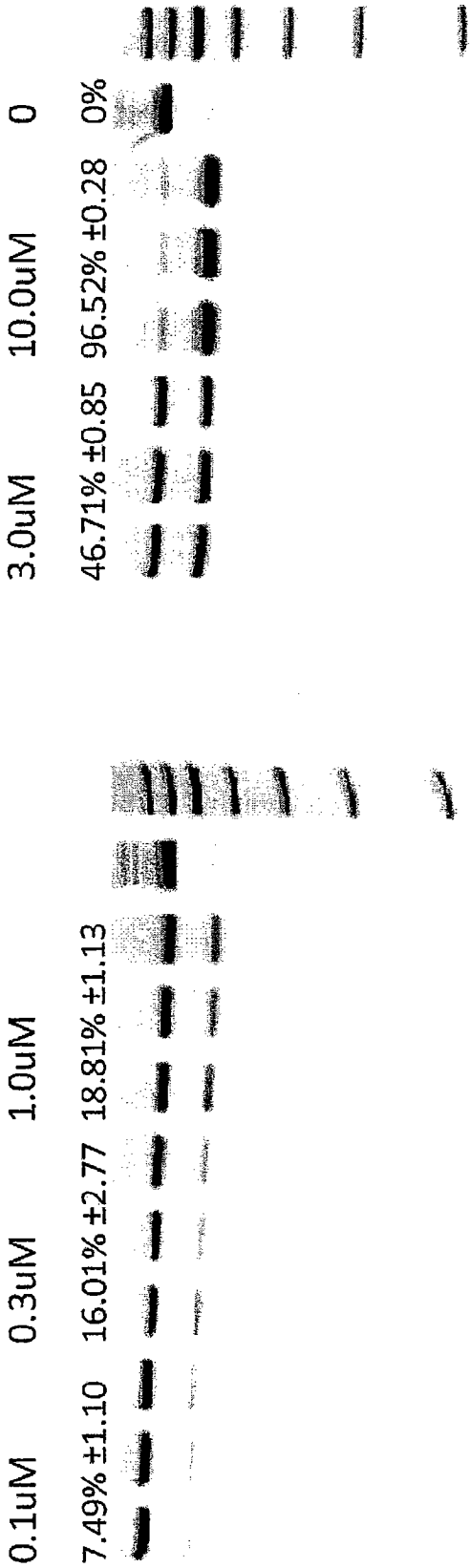


图 5F

外显子44 DR.2
高纯度合成, (0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10uM) RD细胞

NG-0801 09AU11-J(E2) (SEQ ID NO: 13)

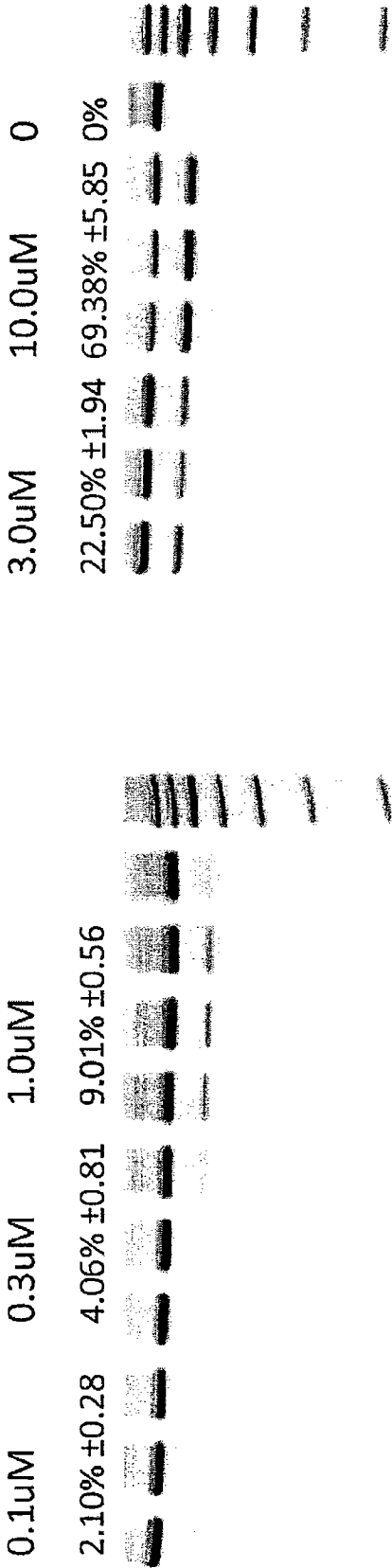


图 5G

外显子44 RD细胞剂量范围总结

跳跃的外显子的百分比						
处理 (uM)	792 (SEQ ID NO:4)	796 (SEQ ID NO:8)	799 (SEQ ID NO:11)	800 (SEQ ID NO:12)	801 (SEQ ID NO:13)	
0.1	3.14	4.14	3.00	7.49	2.10	
0.3	4.66	6.69	8.41	16.01	4.06	
1	7.56	17.41	21.48	18.81	9.01	
3	21.64	39.74	32.92	46.71	22.50	
10	64.94	97.39	88.47	96.52	69.38	
EC ₅₀ (uM)	7.166	3.024	3.594	2.795	6.277	

图 5H

外显子44 CS (竞争者筛选)
高纯度合成, 3.0uM, RD细胞

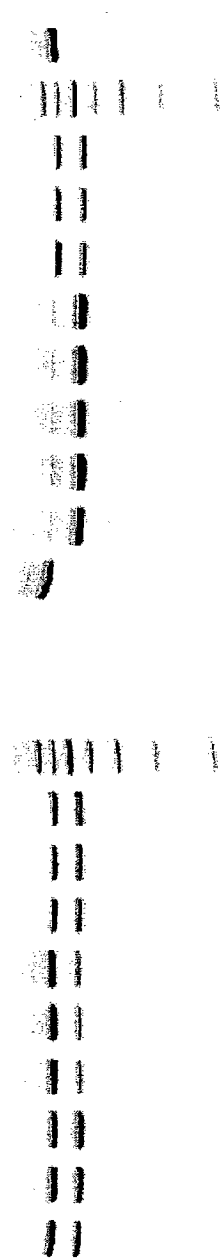
寡聚体		名称; SEQ ID		批号	
NG-09-0561	H44A(+61+84); 600	09AU18-J(E1)			
NG-09-0562	H44A(+85+104); 601	09AU18-J(F1)			
NG-09-0563	h44AON1; 602	09AU18-J(A2)			
NG-09-0564	H44A(-06+14); 603	09AU18-J(B2)			
NG-08-0800	012; 12	09AU11-J(D2)			
561	562	563	564	800	
SEQ ID NO: 800	SEQ ID NO: 800	SEQ ID NO: 602	SEQ ID NO: 603	SEQ ID NO: 12	
600	601	602	NO:603	12	MW 0
44.4% ±4.22	20.4% ±0.84	94.0% ±0.32	97.1% ±0.07	47.5% ±2.05	0%
未定量					
					

图 5I

外显子44 MCS (肌肉细胞竞争者筛选)
高纯度合成, 3.0uM, 人原代骨骼肌细胞

寡聚体	名称; SEQ ID	批号
NG-09-0561	H44A(+61+84); 600	09AU18-J(E1)
NG-09-0562	H44A(+85+104); 601	09AU18-J(F1)
NG-09-0563	h44AON1; 602	09AU18-J(A2)
NG-09-0564	H44A(-06+14); 603	09AU18-J(B2)
NG-08-0800	012; 12	09AU11-J(D2)

在筛选中包括不足的Ng-09-0564

800	561	562	563	800	No tx	800 (RD)
8.86% ±0.57	2.13% ±0.75	0%	6.42% ±0.54	未定量	0%	47.53% ±2.05

图 5J

肌营养不良蛋白外显子45扫描寡聚体

DMD 基因 1756

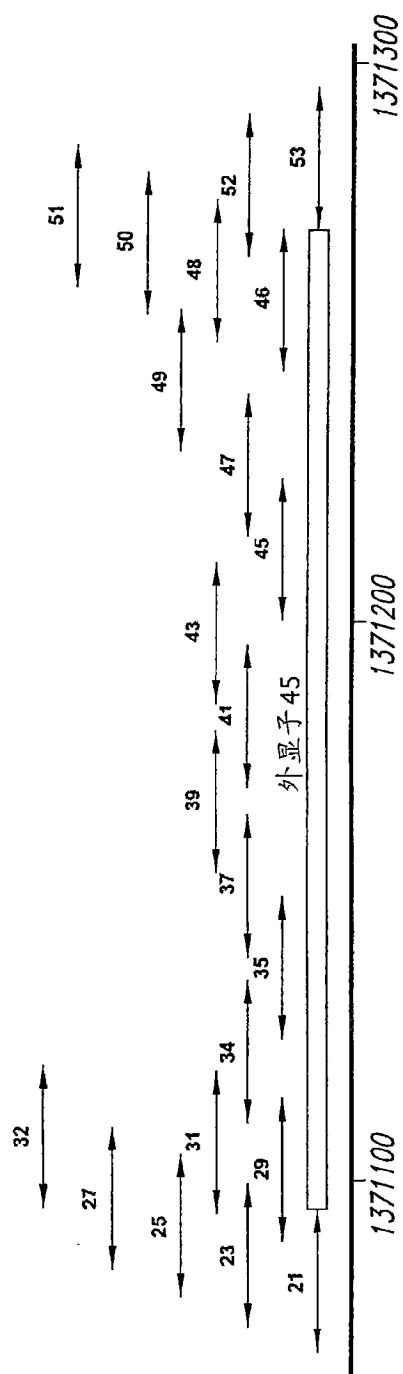


图 6A

选定的肌营养不良蛋白外显子45寡聚体

DMD 基因 1756

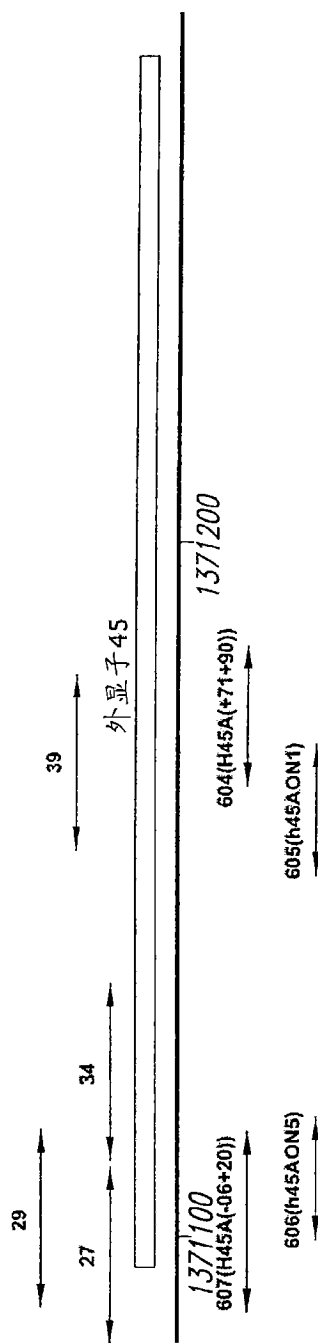


图 6B

外显子45 DR.2
高纯度合成，（1.0，2.0，3.0，5.0，10.0uM）RD细胞
NG-0770 09AU11-J(F2) (SEQ ID NO: 27)

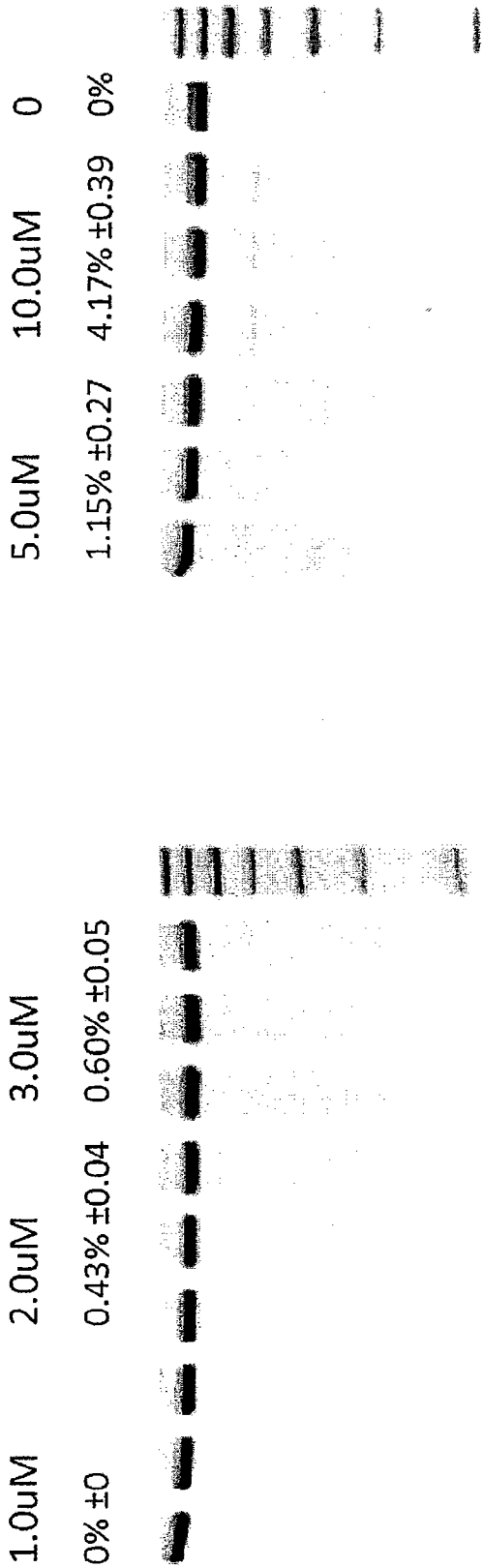


图 6C

外显子45 DR.2
高纯度合成，（1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM）RD细胞
NG-0771 09AU11-J(A4) (SEQ ID NO: 29)

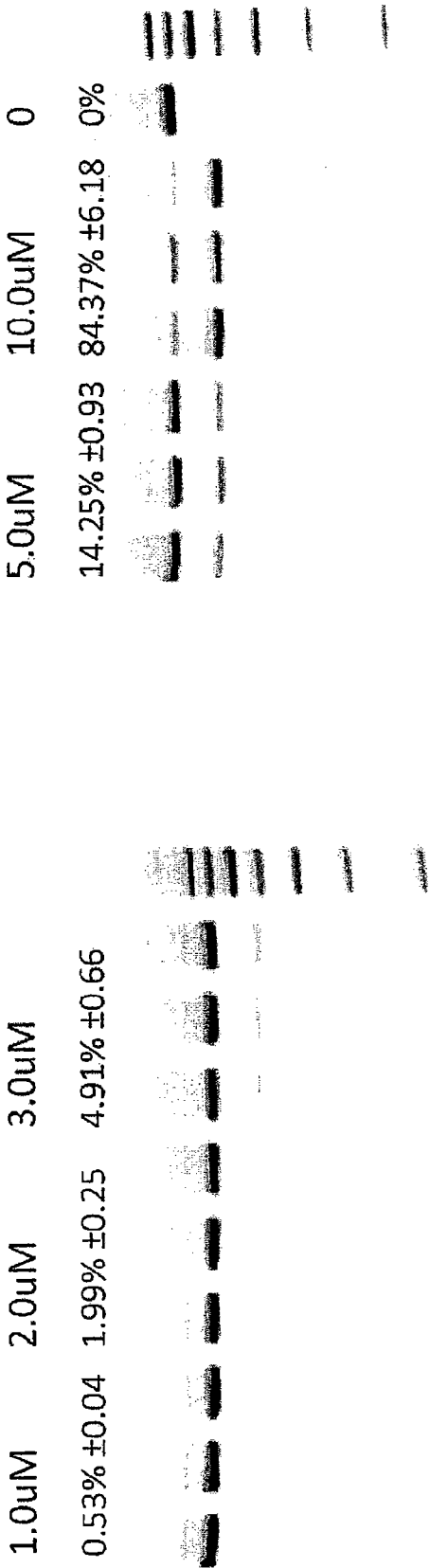


图 6D

外显子45 DR.2
高纯度合成, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD细胞
NG-0774 09AU11-J(B4) (SEQ ID NO: 34)

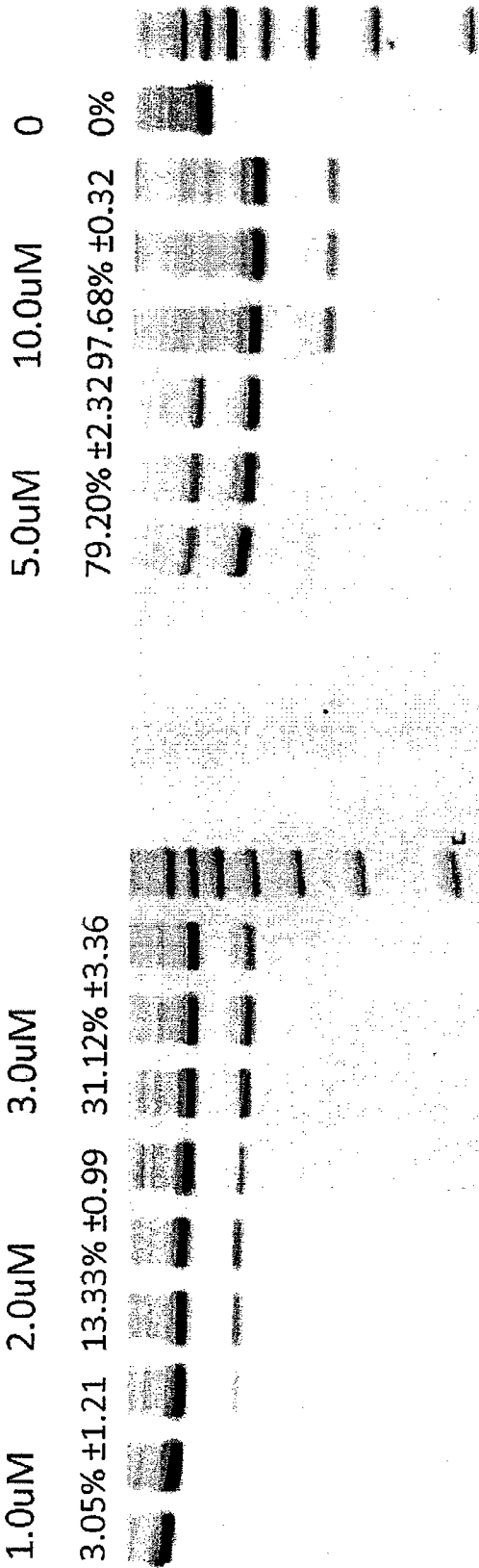


图 6E

外显子45 DR.2
高纯度合成, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD细胞
NG-0777 09AU11-J(C4) (SEQ ID NO: 39)

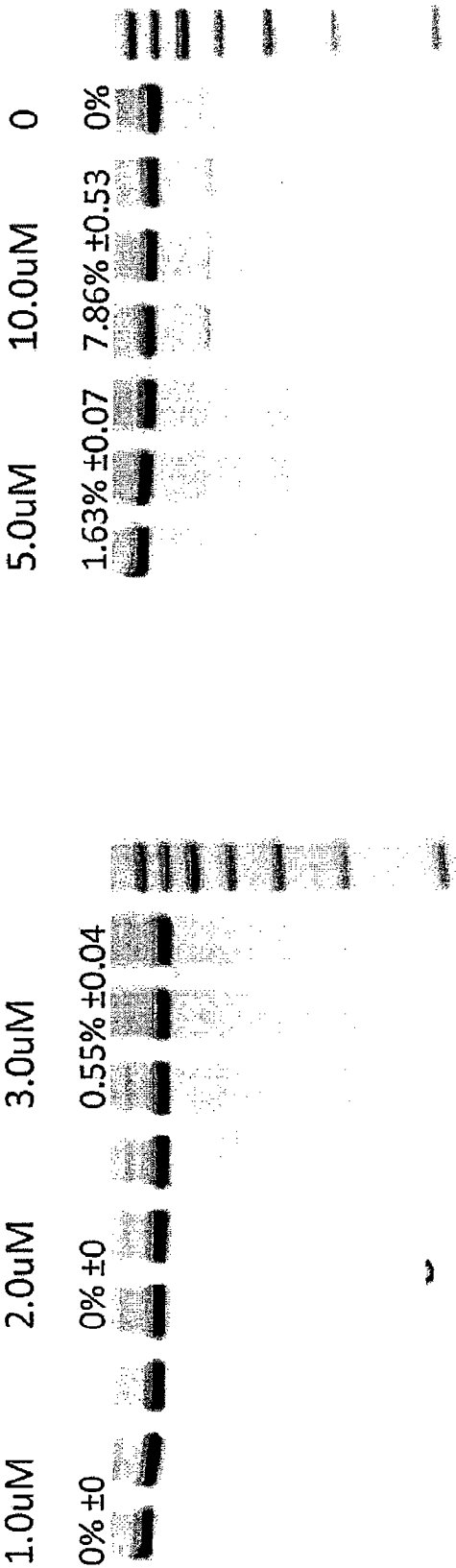


图 6F

外显子45 DR.2
高纯度合成, (1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD细胞
(阴性对照)
NG-0782 09AU11-J(D4) (SEQ ID NO: 49)

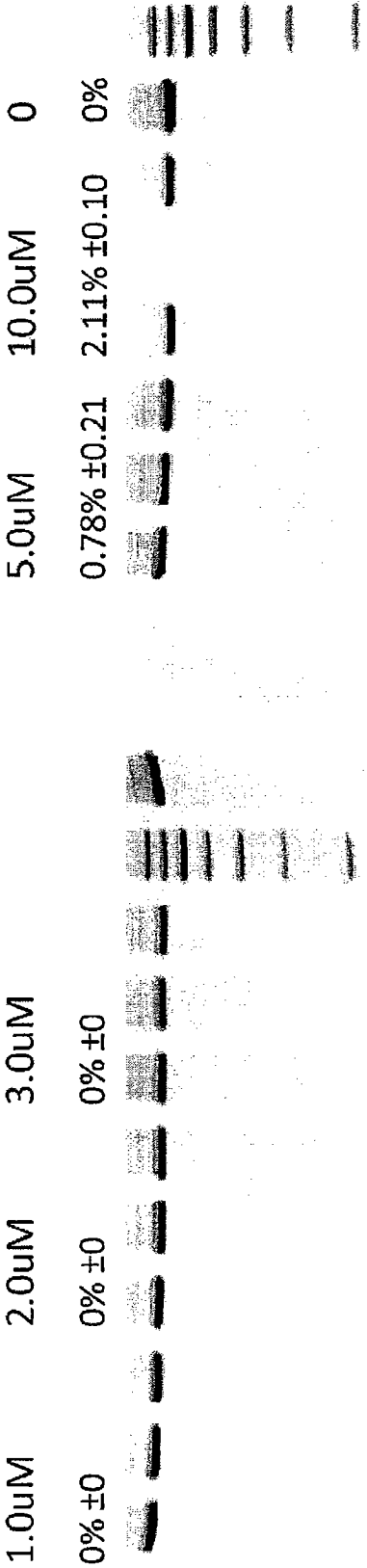


图 6G

外显子45 RD细胞剂量范围总结

跳跃的外显子的百分比						
处理 (μM)	770 (SEQ ID NO:27)	771 (SEQ ID NO:29)	774 (SEQ ID NO:34)	777 (SEQ ID NO:39)	782 (SEQ ID NO:49)	
1.0	0.00	0.53	3.05	0.00	0.00	
2.0	0.43	1.99	13.33	0.00	0.00	
3.0	0.60	4.91	31.12	0.55	0.00	
5.0	1.15	14.25	79.20	1.63	0.78	
10	4.17	84.37	97.68	7.86	2.11	
EC_{50} (μM)	54.37	7.25	3.69	NA	NA	

图 6H

外显子45 CS (竞争者筛选)
高纯度合成, 3.0uM, RD细胞

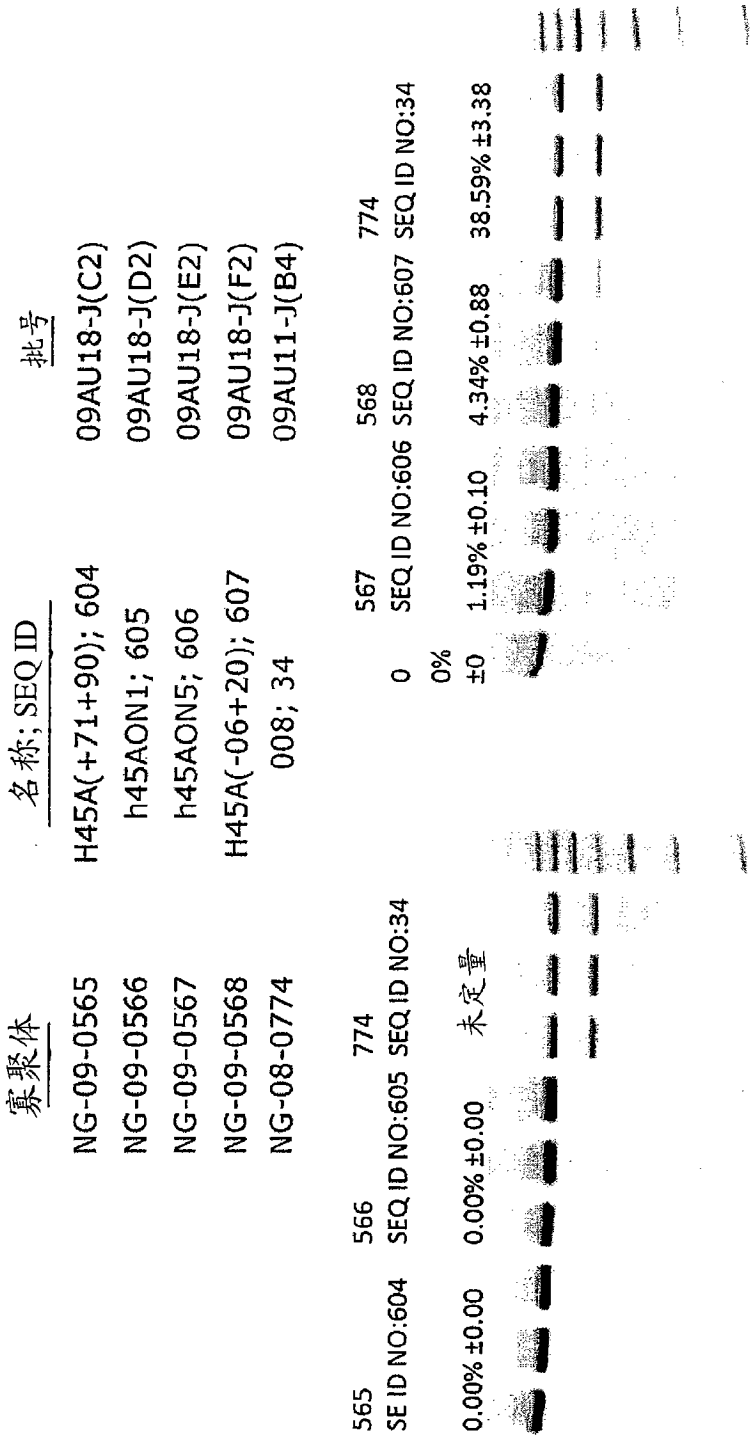


图 6I

外显子45 MCS (肌肉细胞竞争者筛选)
高纯度合成, 3.0uM, 人原代骨骼肌细胞

寡聚体	名称; SEQ ID	批号
NG-09-0565	H45A(+71+90); 604	09AU18-J(C2)
NG-09-0566	h45AON1; 605	09AU18-J(D2)
NG-09-0567	h45AON5; 606	09AU18-J(E2)
NG-09-0568	H45A(-06+20); 607	09AU18-J(F2)
NG-08-0774	008; 34	09AU11-J(B4)

774	565	566	567	568	774 (RD)
SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
34	604	605	606	607	tx
0%	0%	0%	0%	0%	38.59%
					±3.38

图 6J