



(21) 申请号 202080040006.5

(22) 申请日 2020.05.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113891940 A

(43) 申请公布日 2022.01.04

(30) 优先权数据
2019901804 2019.05.27 AU
2019903812 2019.10.10 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2020/050516 2020.05.25

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/237294 EN 2020.12.03

(73) 专利权人 视觉制药私人有限公司
地址 澳大利亚西澳大利亚州

(72) 发明人 S.弗莱彻 I.皮图特 J.格赖诺克
S.D.威尔顿 F.K.陈

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

专利代理师 涂滔 邹宗亮

(51) Int.Cl.
C12N 15/113 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(56) 对比文件

CA 3147970 A1,2021.02.25

CN 113584038 A,2021.11.02

US 2005048531 A1,2005.03.03

WO 2021247540 A1,2021.12.09

Pitou,L.modulation of modifiers of
pre-mRNA splicing:A therapeutic strategy
for amenable inherited diseases”
.phDThesis,Murdoch University.2019,第1-47
页.

Giulia Venturini等.CNOT3 is a
modifier of PRPF31 mutations in retinitis
pigmentosa with incomplete
penetrance.PloS Genetics.2012,第8卷(第11
期),摘要,第2页右栏第5-7段.

Niccolò Bacchi 等.Splicing-correcting
therapeutic approaches for retinal
dystrophies:where endogenous gene
regulation and specificity
matter.Investigative Ophthalmology &
Visual Science.2014,第55卷(第5期),摘要,第
3287页右栏第2段-第3289页左栏第1段.

Strausberg,R.L等.“Homo sapiens CCR4-
NOT transcription complex, subunit 3,
mRNA (cDNA clone MGC:17152IMAGE:4181383),
complete cds”.GenBank Database.2006,
BC016474.1.

审查员 张晓中

权利要求书1页 说明书31页

序列表19页 附图12页

(54) 发明名称

视网膜色素变性的新治疗方法

(57) 摘要

分离的或纯化的反义寡聚体,其用于修饰
CNOT3基因转录本或其部分中的mRNA前体剪接。

1. 分离或纯化的反义寡聚体,其用于修饰CNOT3基因转录本或其部分中的mRNA前体剪接,其中所述反义寡聚体选自由以下组成的列表:SEQ ID NO:4、7-9、11、14-18、26、27、30-35、39、40、44-48、53-57、59、60、64、67、69、70和72-74。

2. 根据权利要求1所述的反义寡聚体,其中所述反义寡聚体的序列选自SEQ ID NO:4、7、9、11、15、16-18、27、30、34、35和64。

3. 根据权利要求1所述的反义寡聚体,其中所述反义寡聚体的序列选自SEQ ID NO:4、7、27、30、34和64。

4. 根据权利要求1所述的反义寡聚体,其包含一个或多个具有选自以下的替代化学或修饰的核苷酸位置:(i) 修饰的主链结构;(ii) 修饰的糖部分;(iii) 对RNase H的抗性;和(iv) 寡聚体模拟化学。

5. 根据权利要求1所述的反义寡聚体,其中所述反义寡聚体进一步包含:(i) 化学缀合部分;或(ii) 细胞穿透肽。

6. 根据权利要求1所述的反义寡聚体,其中所述反义寡聚体是磷酸二胺吗啉代寡聚体。

7. 根据权利要求1所述的反义寡聚体,其中所述核苷酸序列中的任何尿嘧啶(U)被胸腺嘧啶(T)取代。

8. 根据权利要求1所述的反义寡聚体,其中所述反义寡聚体使具有症状性PRPF31突变的受试者中PRPF31蛋白的表达增加1.5至5倍。

9. 药物组合物,其包含:

a) 一种或多种权利要求1至8中任一项所述的反义寡聚体,和

b) 一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂。

10. 一种或多种根据权利要求1至8中任一项所述的反义寡聚体在制备用于治疗或预防视网膜色素变性的药物中的用途。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述药物用于人受试者的治疗。

视网膜色素变性的新治疗方法

技术领域

[0001] 本发明涉及反义寡聚体在用于治疗、预防或改善视网膜色素变性的影响中的用途。

背景技术

[0002] 视网膜色素变性(RP)是由于视网膜中视杆细胞进行性变性而导致严重视力损害的退行性眼病;大多数RP病例是遗传的。这种形式的视网膜营养不良表现出与年龄无关的初始症状;因此,RP的诊断发生在从婴儿早期到成年晚期的任何时期。RP是一种罕见的疾病,大约4000人中就有一人(全世界超过150万人)受到影响。在家族性RP病例中,30%-40%表现为常染色体显性遗传(Hartong et al.2006)。目前尚无治疗RP的方法。

[0003] RP是由50多个基因的突变引起的。PRPF31基因的杂合突变导致常染色体显性视网膜色素变性(adRP)。在某些情况下,这种突变显示出不完全外显性,其中某些携带者发生视网膜变性,而其他携带者根本没有症状。无症状的携带者通过高于平均水平的未突变的PRPF31等位基因的表达而免受疾病的影响。

[0004] PRPF31基因的表达是由Ccr4-Not脱腺苷化酶(deadenylase)复合物控制的。Ccr4-Not是一个九亚基蛋白复合物,是真核细胞翻译和mRNA稳定性的主要调节因子。核心CCR4-Not复合物由酵母中的Ccr4p、Caf1p、五种Not蛋白(CNot1-CNot5)、Caf40p和Caf130p组成。

[0005] 目前正在探索AAV介导的基因置换和CRISPR/Cas9基因编辑作为视网膜疾病的治疗方法。虽然PRPF31的编码序列在AAV载体的容量范围内,但PRPF31不受调控或过度表达的后果尚不清楚。此外,目前尚不清楚眼内病毒介导的基因治疗是否可以再次给药,因为已有报道称眼内病毒载体注射导致血清转换。此外,CRISPR/Cas9基因校正将需要每个家族的PRPF31突变的不同产物。此外,基因置换和基因编辑方法都需要在视网膜下注射病毒载体以实现充分的转染。

[0006] 有必要为视网膜色素变性提供新的治疗或预防措施;或者至少提供方法来补充先前已知的治疗方法。

[0007] 本发明寻求提供一种用于治疗、预防或改善视网膜色素变性影响的改进或替代方法。

[0008] 先前对背景技术的讨论仅旨在帮助理解本发明。该讨论不是承认或承认所提及的任何材料是或属于本申请优先权日时的公知常识的一部分。

[0009] 发明概述

[0010] 广义地,根据本发明的一个方面,提供了分离或纯化的反义寡聚体,其用于修饰CNOT3基因转录本或其部分中的mRNA前体(pre-mRNA)剪接。优选地,提供了分离或纯化的反义寡聚体,其用于诱导CNOT3基因转录本或其部分中的非生产性剪接。

[0011] 例如,在本发明的一个方面,提供了10至50个核苷酸的反义寡聚体,其包含与CNOT3基因转录本或其部分的内含子附近或内含子内的区域互补的靶向序列。在本发明的另一方面,提供了10至50个核苷酸的反义寡聚体,其包含与CNOT3基因转录本或其部分的外

显子附近或外显子内的区域互补的靶向序列。

[0012] 优选地,所述反义寡聚体是磷酸二胺吗啉代寡聚体。优选反义寡聚体具有修饰的主链。

[0013] 优选地,所述反义寡聚体选自表1所示的序列。

[0014] 优选地,所述反义寡聚体选自包含以下序列的列表:SEQ ID NO:1-74,更优选SEQ ID NO:4、7、9、11、14、16-18、27、30、34、35、64和67,甚至更优选SEQ ID NO:4、7、27、30、34和64。

[0015] 所述反义寡聚体优选地用于诱导CNOT3基因转录本的一个或多个外显子或其部分的跳跃。例如,反义寡聚体可诱导外显子3、8、9、12和/或17的跳跃。

[0016] 本发明所述的反义寡聚体可以被选择为能够结合选定的CNOT3靶位点的反义寡聚体,其中所述靶位点是选自剪接供体位点、剪接受体位点或外显子剪接元件的mRNA剪接位点。当靶向供体或受体剪接位点时,靶位点还可以包括一些侧接的内在序列。

[0017] 更具体地,反义寡聚体可选自SEQ ID NO:1-74,更优选SEQ ID NO:4、7、9、11、14、16-18、27、30、34、35、64和67,甚至更优选SEQ ID NO:4、7、27、30、34和64中的任何一种或多种,和/或表1中列出的序列及其组合或混合物。这包括可在严格杂交条件下与这些序列杂交的序列、与其互补的序列、含有修饰碱基、修饰主链和其功能截短或延伸的序列,这些序列在CNOT3基因转录本中具有或调节mRNA前体加工活性。在某些实施方案中,反义寡聚体可与靶序列100%互补,或可以包括错配,例如以包含变体,只要寡核苷酸和靶序列之间形成的异源双链体足够稳定以承受细胞核酸酶的作用和可能在体内发生的其他降解模式。因此,某些寡核苷酸可以具有约或至少约70%的序列互补性,例如,寡核苷酸与靶序列之间的序列互补性为70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0018] 本发明还延伸到两种或多种反义寡聚体的组合,其能够结合选定的靶标以诱导CNOT3基因转录本中的外显子排除,包括包含两种或多种此类反义寡聚体的构建体。该构建体可用于基于反义寡聚体的治疗。

[0019] 根据本发明的另一方面,本发明扩展到本发明的反义寡聚体序列的cDNA或克隆拷贝,以及包含本发明的反义寡聚体序列的载体。本发明还进一步扩展到含有这种序列和/或载体的细胞。

[0020] 还提供了用于操纵CNOT3基因转录本中的剪接的方法,该方法包括以下步骤:

[0021] a) 提供一种或多种如本文所述的反义寡聚体,并允许寡聚体与靶核酸位点结合。

[0022] 还提供了用于治疗、预防或改善患者中与CNOT3表达相关的疾病的影响的药物、预防性或治疗性组合物,所述组合物包含:

[0023] a) 一种或多种如本文所述的反义寡聚体,和

[0024] b) 一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂。

[0025] 组合物可包含约1nM-1000nM的本发明所需的每种反义寡聚体。优选地,组合物可包含约10nM-500nM,最优选在1nM-10nM的本发明的每种反义寡聚体。

[0026] 还提供了治疗、预防或改善与CNOT3表达相关的疾病的影响的方法,其包括以下步骤:

[0027] a) 向患者施用有效量的一种或多种本文所述的反义寡聚体或包含一种或多种本文所述的反义寡聚体的药物组合物。

[0028] 还提供了如本文所述的纯化和分离的反义寡聚体在制备用于治疗、预防或改善与CNOT3表达相关的疾病的影响的药物中的用途。

[0029] 还提供了用于治疗、预防或改善患者中与CNOT3表达相关的疾病的影响的试剂盒,该试剂盒包含包装在合适的容器中的至少一种如本文所述的反义寡聚体及其组合或混合物,以及其使用说明。

[0030] 优选地,患者中与CNOT3表达相关的疾病是视网膜色素变性。与CNOT3表达相关的疾病的受试者可以是哺乳动物,包括人。

[0031] 现在将参考所附的非限制性实施例和附图描述本发明的其他方面。

附图说明

[0032] 本发明的其他特征在以下对其几个非限制性实施例的描述中更全面地描述。包括该描述仅是为了举例说明本发明。不应将其理解为对上文所述的本发明的广泛概述、公开或描述的限制。将参考附图进行描述,其中:

[0033] 图1是CNOT3阅读框的示意图。CNOT3由18个外显子组成并编码具有753个氨基酸的蛋白质。图1(a)框内外显子用矩形表示,而具有中断密码子的连接的外显子用V形边(蓝色,红色)表示。图1(b)示出了CNOT3蛋白,其显示了与上述外显子相对应的功能域和氨基酸位置。NAR:非锚定区域。CS:连接序列。NOT框:负向TATA框。外显子2、3、8、9、11、12、13、14、15和16的排除均会破坏开放阅读框。

[0034] 图2是显示2' 0-甲基硫代磷酸酯A0转染(50、25和12.5nM)后48小时RP11患者成纤维细胞的CNOT3转录产物的凝胶图像。包括靶向未知序列的对照A0(-ve对照A0)进行比较。

[0035] 图3是显示用2' 0-甲基硫代磷酸酯A0转染成纤维细胞48小时后的CNOT3转录产物的凝胶图像,所述A0旨在诱导末端内含子保留,浓度为50和25nM。

[0036] 图4A和4B:图4A是0255系谱:11个成员具有PRPF31突变(c.267delA)。图4B是0080系谱:13名受影响成员(c.1205G>A)。箭头=捐献的真皮成纤维细胞,黑色=目前正在CRE自然史研究中的患者。

[0037] 图5A-H显示了来自CLN3突变患者的重编程为多能性的皮肤成纤维细胞。患者-iPSC (CLN3-/-)表现出典型的iPSC形态并表达多能性标志物,包括OCT4、NANOG、SOX2和SSEA4(A)。通过定量RT-PCR对6个iPSC系的多能基因表达的比较表明,所有系的表达模式相似(B)。患者iPSC表现出三系分化潜能。将患者iPSC (CLN3-iPS-EB)、基因校正对照iPSC (CLN3HDR-iPS-EB)和对照人iPSC (WT-iPS-EB, ThermoFisher)分化为胚状体2周后,用定量RT-PCR筛选外胚层(PAX6、OTX1)、中胚层(SOX17、GATA4、FOX2A)和内胚层(BRACHYURY、FDGFR)系谱标志物及多能性基因(OCT4、NANOG、SOX2)的表达(C)。D-H: iPSC的视网膜分化。视网膜类器官呈视杯状形态,被透明的层状视网膜组织(D)包围,层状视网膜组织包含有组织的顶层的恢复蛋白表达的光感受器(E),以及位于基部的表达Smi32的视网膜神经节细胞(F)。在第170天,视网膜类器官(G)的光感受器外节的电镜表现出与发育中的(E120)人视网膜(H)的外节相似的形态。

[0038] 图6显示了在PS主链上使用2' -O-甲基化学筛选A0诱导的CNOT3外显子跳跃。A0被

设计成靶向CNOT3外显子的剪接增强子基序,以在mRNA前体剪接期间介导靶外显子的排除,从而介导CNOT3的敲低或破坏蛋白质功能。用靶向外显子(如所示)的CNOT3 A0(2' OMe-PS化学)转染真皮成纤维细胞48小时。在2%琼脂糖凝胶上分离RT-PCR产物。

[0039] 图7显示了在PS主链上使用2'-O-甲基化学筛选A0诱导的CNOT3外显子跳跃。A0被设计成靶向CNOT3外显子的剪接增强子基序,以在mRNA前体剪接期间介导靶外显子的排除,从而介导CNOT3的敲低或破坏蛋白质功能。用靶向外显子(如所示)的CNOT3 A0(2' OMe-PS化学)转染真皮成纤维细胞48小时。在2%琼脂糖凝胶上分离RT-PCR产物。

[0040] 图8显示了CNOT3与PRPF31 mRNA表达的负相关。图8(a) RP11、无症状和健康(WT)个体的iPSC衍生的视网膜色素上皮细胞中PRPF31和CNOT3 mRNA表达相对于TATA结合蛋白(TBP)表达归一化的qRT-PCR分析。RP11和无症状受试者来自同一系谱,均为PRPF31 c.1205C>A (Ser402*) 突变杂合。健康的受试者来自不相关的家族。健康对照组CNOT3和PRPF31 mRNA的表达设为1。(n≥2)。图8(b)用靶向外显子4、6、7或10的CNOT3 A0(2' OMe-PS)转染来自RP11患者的真皮成纤维细胞48小时。用qRT-PCR分析PRPF31的转录水平,并相对于TBP的表达进行归一化。用25nM对照A0处理的细胞中的PRPF31表达设为1 (n=1)。图8(c)用靶向外显子3、8、9、16或17的CNOT3 A0(2' OMe-PS化学)转染来自RP11患者的真皮成纤维细胞48小时。用qRT-PCR分析PRPF31转录水平,并相对于TBP的表达进行归一化,结果显示为相对于用25nM假对照A0处理的细胞中的PRPF31表达(对照PRPF31表达设为1 (n=1))。

[0041] 图9显示了合成为磷酸二胺吗啉代寡聚体(PMO)并转染到RP11 iPSC衍生的RPE中的AS06(SEQ ID NO:64, CNOT3_H17A(+83+107),靶向CNOT3外显子17)的效果。(A)在用浓度为5 μM的单独的PMO或细胞穿透肽标记的PMO(PPMO)处理的细胞中的CNOT3外显子17跳跃。(B) CNOT3基因敲低导致的PRPF31上调,由qRT-PCR确定,并相对于TATA结合蛋白(TBP)的表达进行归一化。将未处理对照组的PRPF31表达设为1。

[0042] 图10显示了(A)用或不用AS06(SEQ ID NO:64, CNOT3_H17A(+83+107),靶向CNOT3外显子17)进行反义寡聚体处理的野生型和RP11 RPE中纤毛(红色)和基体(绿色)的免疫染色。(B)表达纤毛的RPE细胞的百分比,从>1,000个细胞计数。(C)利用NIS-Elements成像软件测量纤毛长度。条形图代表了来自约300个纤毛细胞的平均±SEM。比例尺=10 μm。学生t检验。***P<0.001。

[0043] 发明详述

[0044] 本发明的详细说明

[0045] 反义寡核苷酸

[0046] 光感受器对剪接活性普遍降低的易损性增加。剪接因子的突变可能导致多种组织的剪接缺陷,而感光细胞由于对mRNA(如编码视紫红质和其他光转导蛋白的mRNA)的大量生产需求而受到极大影响。该模型假定视网膜产生的mRNA数量大大超过其他组织产生的mRNA水平。

[0047] PRPF31(也称为hPRP31)编码U4/U6RNA复合物的组装和循环所需的基本的mRNA前体剪接因子。一些研究表明,在RP11患者中,总的PRPF31 mRNA数量减少,并且剪接体组装和mRNA前体加工速度延迟。这表明该疾病是通过单倍体不足机制发生的。与其他组织相比,视网膜表达的主要剪接体小核RNA(snRNA)是其他组织的七倍。

[0048] CCR4-Not转录复合物亚基3(CNOT3, CCR4-Not脱腺苷化酶复合物的五种Not蛋白之

一)已被鉴定为通过转录抑制机制决定PRPF31突变外显性、通过直接结合PRPF31的启动子来调节PRPF31的转录的主要修饰基因。野生型PRPF31等位基因的表达水平决定突变的PRPF31等位基因携带者是否有症状。在无症状的携带者中,CNOT3以低水平表达,从而允许产生更多的野生型PRPF31转录本,并防止视网膜变性的表现。

[0049] 人CNOT3是18外显子基因,其编码具有753个氨基酸的蛋白质。外显子2的排除导致从转录本中去除翻译起始密码子。外显子4、5、6、7、10或17的去除可能会破坏CNOT3的功能域。外显子3、8、9和11-16中的任何一个的排除都会破坏开放阅读框。

[0050] 敲低CNOT3基因对胚胎是致命的,因为它通过调节mRNA周转和调节mRNA衰变在各种生理过程中对细胞周期进展至关重要。然而,如果可以在有RP风险或患有RP的受试者的眼部局部降低或消除CNOT3水平,则疾病的进展将随着可能产生的PRPF31蛋白的量的增加而受到影响,这模拟了不完全外显模型,其中无症状的携带者通过高于未修饰基因的平均PRPF31表达而免受疾病的影响。

[0051] 因此,本发明提供反义寡核苷酸,以诱导CNOT3 (PRPF31的负调节物)的非生产性剪接或功能受损的CNOT3蛋白质至更低(但优选不消除)的CNOT3水平,并因此增加正常PRPF31等位基因的转录和翻译。

[0052] 与其他基于反义寡聚体的治疗相比,本发明不通过RNase H的募集诱导增加的RNA降解,其中RNase H优先结合并降解与CNOT3基因的DNA双链体结合的RNA。其也不依赖于反义寡聚体与CNOT3基因组DNA的杂交或反义寡聚体与mRNA的结合来通过干扰复制、转录、易位和翻译等正常功能来调节CNOT3蛋白的产生量。

[0053] 相反,反义寡聚体用于修饰CNOT3基因转录本或其部分中的mRNA前体剪接,并诱导外显子“跳跃”和/或末端内含子保留。该策略优选地降低总蛋白表达或产生缺乏功能域的蛋白,从而导致降低的蛋白功能。

[0054] 根据本发明的第一方面,提供了能够结合CNOT3基因转录本上的选定靶标以修饰CNOT3基因转录本或其部分中的mRNA前体剪接的反义寡聚体。广义地,提供了用于诱导CNOT3基因转录本或其部分中的靶向外显子排除和/或末端内含子保留的分离或纯化的反义寡聚体。

[0055] 在一般群体中,PRPF31的表达高度可变,其水平呈连续分布。表达量从0.53至2.48个任意单位不等,这代表最低表达量和最高表达量之间的5倍变化。百分之三十的PRPF31突变携带者没有症状,这些个体具有野生型等位基因,其表达比那些具有症状性PRPF31突变的表达高几乎2倍。因此,优选地,CNOT3表达的调节允许PRPF31的表达比那些具有症状性PRPF31突变的PRPF31表达高至少两倍。优选地,由于本发明的A0降低了CNOT3的表达,PRPF31的表达比那些具有症状性PRPF31突变的表达高1.5至5倍。例如,PRPF31的表达可能高2-4倍。

[0056] “分离的”是指大体上或基本上不含通常伴随其原生状态的成分的材料。例如,本文所用的“分离的多核苷酸”或“分离的寡核苷酸”可指在自然发生状态下从其两侧的序列中纯化或移出的多核苷酸,例如,从基因组中与该片段相邻的序列中移出的DNA片段。与细胞有关的术语“分离”是指从源受试者(例如,患有多核苷酸重复疾病的受试者)中纯化细胞(例如,成纤维细胞、淋巴细胞)。在mRNA或蛋白质的上下文中,“分离”是指从来源(如细胞)回收mRNA或蛋白质。

[0057] 反义寡聚体可以说是“指向”或“靶向”与其杂交的靶序列。在某些实施方案中,靶序列包括以下区域,该区域包括预处理mRNA的3'或5'剪接位点、分支点或参与剪接调节的其他序列。靶序列可以在外显子内,也可以在内含子内,或者跨越内含子/外显子交界。

[0058] 在某些实施方案中,反义寡聚体与靶RNA(即,剪接位点选择受调节的RNA)具有足够的序列互补性,以有效地阻断靶RNA(例如mRNA前体)的区域。在示例性实施方案中,CNOT3 mRNA前体的这种阻断用于调节剪接,其通过掩蔽天然蛋白的结合位点,否则该结合位点将调节剪接,和/或通过改变靶RNA的结构来调节剪接。在一些实施方案中,靶RNA是靶mRNA前体(例如,CNOT3基因mRNA前体)。

[0059] 具有与靶RNA序列足够的序列互补性以调节靶RNA剪接的反义寡聚体意味着该反义寡聚体具有足以触发天然蛋白质结合位点的掩蔽的序列,否则该天然蛋白质将调节剪接和/或改变靶RNA的三维结构。

[0060] 选择的反义寡聚体可以更短,例如约12个碱基,或更长,例如约50个碱基,并包括少量的错配,只要该序列在与靶序列杂交时充分互补以实现剪接调节,并且任选地与RNA形成 T_m 为45°C或更高的异源双链体。

[0061] 优选地,反义寡聚体选自表1所示的序列。优选地,反义寡聚体选自SEQ ID NO:1-74,更优选SEQ ID NO:4、7、9、11、14、16-18、27、30、34、35、64和67中的序列,甚至更优选SEQ ID NO:4、7、27、30、34和64中的序列。

[0062] 在某些实施方案中,靶序列和反义寡聚体之间的互补程度足以形成稳定的双链体。反义寡聚体与靶RNA序列的互补区可以短至8-11个碱基,但可以是12-15个碱基或更多,例如,10-50个碱基、10-40个碱基、12-30个碱基、12-25个碱基、15-25个碱基、12-20个碱基或15-20个碱基,包括这些范围之间的所有整数。约16-17个碱基的反义寡聚体通常足够长以具有独特的互补序列。在某些实施方案中,如本文所述,可能需要最小长度的互补碱基来达到所需的结合 T_m 。

[0063] 在某些实施方案中,长达50个碱基的寡核苷酸可能是合适的,其中至少最少数量的碱基,例如10-12个碱基与靶序列互补。然而,一般而言,细胞中促进或主动的摄取在寡核苷酸长度小于约30个碱基时是最优化的。对于磷酸二胺吗啉代寡核苷酸(PMO)反义寡聚体,结合稳定性和摄取量的最佳平衡一般发生在18-25个碱基的长度上。包括由约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、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个碱基组成的反义寡聚体(例如,CPPMO、PPMO、PMO、PMO-X、PNA、LNA、2'-OMe)。

[0064] 在某些实施方案中,反义寡聚体可以与靶序列100%互补,或者可以包括错配,例如,以包含变体,只要寡核苷酸和靶序列之间形成的异源双链体足够稳定,以承受细胞核酸酶的作用和可能在体内发生的其他降解模式。因此,某些寡核苷酸可以具有约或至少约70%的序列互补性,例如,寡核苷酸与靶序列之间的序列互补性为70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0065] 错配(如果存在的话)通常导致杂交双链体的末端区域比中间区域更不稳定。根据已知的双链体稳定性原理,允许错配的数量将取决于寡核苷酸的长度、双链体中G:C碱基对的百分比以及双链体中错配的位置。尽管这种反义寡聚体不一定与靶序列100%互补,但它

可以有效地稳定且特异性地与靶序列结合,从而调节靶pre-RNA的剪接。

[0066] 在反义寡聚体和靶序列之间形成的双链体的稳定性取决于结合 T_m 和双链体对细胞的酶切割的敏感性。寡核苷酸相对于互补序列RNA的 T_m 可以通过常规方法测量,例如Hames et al.,*Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, pp.107-108或如Miyada C.G. and Wallace R.B., 1987, *Oligonucleotide Hybridization Techniques*, Methods Enzymol. Vol. 154 pp. 94-107中所述。在某些实施方案中,反义寡聚体相对于互补序列RNA的结合 T_m 可大于体温,优选大于约45°C或50°C。还包括在60-80°C或更高温度范围内的 T_m 。

[0067] 变体的其他实例包括具有约或至少约70%序列同一性或同源性的反义寡聚体,例如在SEQ ID No:1-74,更优选SEQ ID No:4、7、9、11、14、16-18、27、30、34、35、64和67,甚至更优选SEQ ID No:4、7、27、30、34和64或表1中提供的序列的整个长度上,70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性或同源性。

[0068] 更具体地,提供了反义寡聚体,其能够结合选定的靶位点以修饰CNOT3基因转录本或其部分中的mRNA前体剪接。反义寡聚体优选选自表1中提供的序列或SEQ ID NO:1-74,更优选SEQ ID NO:4、7、9、11、14、16-18、27、30、34、35、64和67,甚至更优选SEQ ID NO:4、7、27、30、34和64。

[0069] mRNA前体剪接的修饰优选诱导“跳跃”,或mRNA的一个或多个外显子或内含子的去除和/或末端内含子保留。与亲本全长CNOT3相比,由于内部截短或过早终止,所得蛋白质的长度可能较短,或者由于末端内含子保留,所得蛋白质的长度可能较长。这些CNOT3蛋白可称为未修饰的CNOT3蛋白的亚型。

[0070] 所产生的mRNA的其余外显子可能是在框内,并产生较短的蛋白质,其序列类似于亲本全长蛋白质的序列,除了它在原始3'和5'末端之间的区域具有内部截短。在另一种可能性中,外显子跳跃可诱导移码,导致蛋白质的第一部分与亲本全长蛋白质基本相同,但其中蛋白质的第二部分由于移码而具有不同的序列(例如无义序列)。或者,外显子跳跃可能会由于阅读框的破坏和翻译的过早终止而导致过早终止蛋白的产生。此外,反义寡聚体可产生人工延长的蛋白质,这是由于末端内含子的保留。

[0071] CNOT3的功能域包括卷曲螺旋、接头、NAR(非锚定区)、CS(连接序列)和NOT框。外显子4的排除会除去部分卷曲螺旋结构域,丢失外显子9会破坏开放阅读框,从而导致mRNA降解并且任何编码蛋白都将被截短,而跳跃外显子17会改变NOT框,从而影响复合物的形成,并因此影响CNOT3的功能。

[0072] 一个或多个外显子的去除可进一步导致CNOT3蛋白的错误折叠和蛋白成功通过膜运输的能力降低。

[0073] 优选存在内部截短的蛋白(即缺少由一个或多个外显子编码的氨基酸的蛋白质)。如果CNOT3蛋白被敲除,当机体试图补偿CNOT3蛋白总量的减少时,可能会存在CNOT3转录升高的问题。相反,内部截短蛋白(优选缺乏完整的CNOT3蛋白的一个或多个特征)的存在应足以防止转录升高,但由于功能性CNOT3蛋白总量的减少,仍然提供治疗优势。

[0074] 本发明所述的反义寡聚体诱导的外显子跳跃不需要完全或甚至基本上消除CNOT3蛋白的功能。优选地,外显子跳跃过程导致CNOT3蛋白的功能降低或受损。

[0075] 使用反义寡聚体的本发明的跳跃过程可以跳跃单个外显子,或者可以导致一次跳跃两个或更多外显子。

[0076] 本发明所述的反义寡聚体可以是能够结合选定靶标以诱导CNOT3基因转录本中的外显子排除的两种或多种反义寡聚体的组合。该组合可以是两种或更多种反义寡聚体的混合物,和/或包含两种或更多种连接在一起的反义寡聚体的构建体。

[0077] 表1:用于本研究的反义寡聚体序列列表和A0诱导的CNOT3外显子跳跃的功效评分。+1:>50%外显子跳跃,0:<50%外显子跳跃,-1:无外显子跳跃

[0078]

SEQ ID	JSR#	坐标	序列 5'-3'	2-OMePS
1	4112	CNOT3_H2A(-6+19)	ACUCUCUUGGAGACGG ACGCUGCUA	-1
2	4113	CNOT3_H2A(+28+52)	AUCUUCCCUGCCCUAC AGACGCACU	-1
3	4114	CNOT3_H2D(+55-4)	GUACCUUGGAGUUUG CGCUUGUCCG	-1
4	3697	CNOT3_H3A(+9+33)	CGGACACCUUCUUGAG GCAGCGAUC	1
5	3698	CNOT3_H3A(+39+63)	GCCAAUAUCUUCAAA CUGCUECCAC	0
6	4579	CNOT3_H4A (-8+17)	UUGGCUGCAUUGUGG AGCUGAGGGA	-1
7	4580	CNOT3_H4A (+12+36)	CUUUUCUUUCUGGUUC GCGUUGGCU	1
8	4581	CNOT3_H4A (+38+62)	AUCUCCUUCUUUAGGU CAGCCUCAU	0
9	4582	CNOT3_H4D (+13-12)	CAGCCCCCUCACUUGU AGCUUCUUA	1
10	4583	CNOT3_H5A (-9+16)	UUUGGUCCCUCAGCCG	-1

[0079]

			CUGCAGAUG	
11	4584	CNOT3_H5A (+36+60)	CUGCCUCUUGUCCUUG AUCUCGUUG	1
12	4585	CNOT3_H5A (+53+77)	UUGCGGUUGUCUAUA AGCUGCCUCU	-1
13	4586	CNOT3_H5D (+13-12)	CUGGGCUCCUACCGUC UCAAUGAGC	-1
14	4587	CNOT3_H6A (-5+20)	ACUUUGAACCGUCCA UUUGCUGUA	1
15	4588	CNOT3_H6A (+12+36)	GGUCUCUCGUUCCACA ACUUUGAAC	0
16	4589	CNOT3_H6A (+37+61)	CCUCUUUGCUGUAAGC UUUGGUUUU	1
17	4590	CNOT3_H6A (+89+113)	ACCUCUCCUUCUCCU UCUGGGCAG	1
18	4591	CNOT3_H6D (+15-10)	CCCAACUCACCGUGAG CCACUGGCC	1
19	4592	CNOT3_H7A(-6+19)	UGAGCGUGUCGAUGG UAUUCUAGGG	-1
20	4593	CNOT3_H7A(+16+40)	CAAACUGGUCCACCUG CAUGUUGAG	-1
21	4594	CNOT3_H7A(+62+86)	CCCUUCUUCUUGCGUG UCUGCACUG	-1
22	4595	CNOT3_H7D(+15-10)	CCUCACUCACAUCCUU GUCGCCC UU	-1
23	3699	CNOT3_H8A(-10+15)	CCGCTTCAAGCCCTCG CCCAGGGCC	-1

[0080]

24	3700	CNOT3_H8A(+18+41)	GUGGUAGCGGUGCUU CUCGAUGUG	-1
25	3701	CNOT3_H8A(+34+58)	UGGUCUCUAGCAUGCG CACGUGGUA	-1
26	3702	CNOT3_H8A(+75+99)	GGCGUCAACGAGGAU GGAGUCAUUG	0
27	3703	CNOT3_H8A(+141+165)	CUCCUCGAAGUCGGGG UCCUGGGAU	1
28	3704	CNOT3_H9A(-6+19)	GUGGCGACCAGCGCCU GUGCUGUGG	-1
29	3705	CNOT3_H9A(+29+52)	CUCAUCCUCCAUGUGG CUGUGGCUG	-1
30	3706	CNOT3_H9A(+56+80)	GGGCGUGCUGCUGGAC UGGUUGAAG	1
31	3707	CNOT3_H9A(+98+122)	GGCUGGGCUGGGCGG GAUGGGAGAG	0
32	5485	CNOT3_H9A(+52+76)	GUGCUGCUGGACUGG UUGAAGAUCU	0
33	4596	CNOT3_H10A(-10+15)	AUCUUCAGAGUUUCC UGAGGUAGG	1
34	4597	CNOT3_H10A(+16+40)	CUGUGGAACGUCCCCU CUUCUUAUC	1
35	4598	CNOT3_H10D(+12-13)	UCACACCCACCUGGCU GACUUCACU	1
36	4892	CNOT3_H11A(+49+73)	AGGUGGGCGGCACAGC UGGGGACUG	-1
37	4893	CNOT3_H11A(+56+80)	GAGGGGUAGGUGGGC GGCACAGCUG	-1

[0081]

38	4894	CNOT3_H11A(+74+98)	GCAGCAGGCGGGGGGC CGGAGGGGU	-1
39	4115	CNOT3_H11A(-8+17)	CCGUUUUUGGCUGGA GACUGCGGGU	0
40	4116	CNOT3_H11A(+171+195)	GUGGCUGGGAGCUGG ACUGGCCUUG	1
41	3708	CNOT3_H12A(+1+25)	CUGUCUGCCACAACUG AGCUGUAAAC	NT
42	3709	CNOT3_H12A(+85+109)	GGGUUGUGGGGGCCG GAAGGGGGGC	NT
43	3710	CNOT3_H12D(+19-6)	ACUCACGAGGUGCUGG GAGGUGGGU	NT
44	4117	CNOT3_H13A(-6+19)	UGCCGCACUGGGUUC UUCUGGAG	1
45	4118	CNOT3_H13A(+38+62)	UGUUCCCUGAGCCUGG GGCCACGCC	0
46	4119	CNOT3_H13A(+83+107)	GAGGAUUCACAGGCA GUGGCACCAG	1
47	4120	CNOT3_H14A(-8+17)	CUCAGAGGCUCAGGGG CCUGGGGAG	0
48	4121	CNOT3_H14A(+48+72)	AGGGUCCUCAAUGCCA GAGCUGAUG	0
49	4895	CNOT3_H15A(+147+171)	GCAUGUGGUGCCAGGC GGCCUCUUC	-1
50	4896	CNOT3_H15A(+157+181)	GAGGGGUGAGGCAUG UGGUGCCAGG	-1
51	4897	CNOT3_H15A(+175+199)	CGAAUACGCUCAGAGU CAGAGGGGU	-1

[0082]

52	4122	CNOT3_H15A(-11+14)	GCUCAGGAUGAUGUC UGUGGGGAGG	-1
53	4123	CNOT3_H15A(+5+29)	AGGUGCUGAUGUACU GCUCAGGAUG	1
54	4124	CNOT3_H15A(+42+66)	CCUCUGACAGCUGCAG GGGCGGCUG	0
55	4125	CNOT3_H15A(+78+102)	CCAUGGACAGACACCC AGCGACAGC	1
56	4126	CNOT3_H15A(+108+132)	AGAGCUGCUCUUGGU GAGGGGCAC	1
57	4127	CNOT3_H15A(+162+186)	AGUCAGAGGGGUGAG GCAUGUGGUG	1
58	4128	CNOT3_H16A(-11+14)	GGGGGAGGUACUGCC UGUGAGAGCA	-1
59	4129	CNOT3_H16A(+36+58)	GGUGGCAUCUGGUGG UGGUAGG	1
60	4130	CNOT3_H16A(+109+133)	CUCCAGAUAGUAGAA GAUGAAGAAG	0
61	4365	CNOT3_H17A(+28+52)	GCCAUGACUGCUUCUU UAGGGCCUU	-1
63	4366	CNOT3_H17A(+57+81)	GAACCACAUCAUGUAC UUGGUGUGG	-1
64	4367	CNOT3_H17A(+83+107)	AUGGUCUUGGGCUCCU CGUGCCUCU	1
65	---	CNOT3_H17A(+78+102)	CUUGGGCUCCUCGUGC CUCUGGAAC	NT
66	---	CNOT3_H17A(+88+112)	CAGUGAUGGUCUUGG GCUCCUCGUG	NT

[0083]

67	5486	CNOT3 H17A(+102+126)	CUGCUCAAACUCGUCA GUGAUGGUC	0
68	3886	CNOT3_H18A(-10+15)	GUAGAUGUAGGUGCC CUGGCCGGGG	-1
69	3887	CNOT3_H18A(+16+40)	GCUGGCCCCACUUCUC GUAGUCAA	1
70	3888	CNOT3_H18A(+41+65)	UCAAAGGUGAAGCCU UCCUUCUCC	1
71	3889	CNOT3_H18A(+66+90)	GUCCCGGUCCUCCAGG UAGCGGUAC	-1
72	5551	CNOT3_H9A(+1+25)	GGGGAGGUGGCGACC AGCGCCUGUG	0
73	5555	CNOT3_H17A(+71+95)	UCCUCGUGCCUCUGGA ACCACAUCA	1
74	4368	CNOT3 H17D(+15-10)	GGGCCUCACCUGCUC AAACUCGUC	0

[0084] 还提供了用于操纵CNOT3基因转录本中的剪接的方法,该方法包括以下步骤:

[0085] a) 提供一种或多种如本文所述的反义寡聚体,并允许寡聚体与靶核酸位点结合。

[0086] 根据本发明的另一个方面,提供了CNOT3的剪接操纵靶核酸序列,其包含选自表1或选自SEQ ID NO:1-74,更优选SEQ ID NO:4、7、9、11、14、16-18、27、30、34、35、64和67,更优选SEQ ID NO:4、7、27、30、34和64的核酸序列的DNA等同物,以及与其互补的序列。

[0087] 设计反义寡聚体来完全掩蔽共有剪接位点可能不一定会导致靶向外显子剪接的改变。此外,本发明人已经发现,当设计反义寡聚体时,反义寡聚体本身的大小或长度并不总是主要因素。对于某些靶标,如IGTA4外显子3,短至20个碱基的反义寡聚体能够诱导某些外显子跳跃,在某些情况下,比针对同一外显子的其他较长(如25个碱基)寡聚体更有效。

[0088] 本发明人还发现,似乎不存在可以被反义寡聚体阻断或掩蔽以重定向剪接的任何标准基序。已经发现,必须设计反义寡聚体,并对其个体功效进行经验评估。

[0089] 更具体地,反义寡聚体可选自表1中列出的那些。所述序列优选选自SEQ ID NO:1-74,更优选SEQ ID NO:4、7、9、11、14、16-18、27、30、34、35、64和67,甚至更优选SEQ ID NO:4、7、27、30、34和64,及其组合或混合物中的任何一个或多个。这包括能够在严格杂交条件下与这些序列杂交的序列、与之互补的序列、含有修饰碱基、修饰主链和其功能截短或延伸的序列,这些序列在CNOT3基因转录本中具有或调节mRNA前体加工活性。

[0090] 当每个分子中足够数量的相应位置被可彼此氢键结合的核苷酸占据时,寡核苷酸和DNA、cDNA或RNA就会彼此互补。因此,“特异性杂交”和“互补”是用于表示足够程度的互补或配对,使得在寡核苷酸和DNA、cDNA或RNA靶标之间发生稳定和特异性的结合的术语。本领域中应理解的是,反义寡聚体的序列不需要与其待特异性杂交的靶序列100%互补。当化合物与靶DNA或RNA分子的结合干扰靶DNA或RNA产物的正常功能时,反义寡聚体是特异性杂交

的,并且在需要特异性结合的条件下,即在体内试验或治疗的生理条件下,以及在进行试验的条件下的体外试验的情况下,存在足够程度的互补以避免反义寡聚体与非靶序列的非特异性结合。

[0091] 选择性杂交可以在低、中或高严格条件下进行,但优选在高严格条件下进行。本领域的技术人员将认识到,除了碱基组成、互补链长度和杂交核酸之间的核苷酸碱基错配数之外,杂交的严格性还会受到诸如盐浓度、温度或有机溶剂等条件的影响。严格的温度条件通常包括温度超过30°C,通常超过37°C,优选超过45°C,优选至少50°C,通常60°C-80°C或更高。严格的盐条件通常小于1000mM,通常小于500mM,优选小于200mM。然而,参数的组合比任何单个参数的度量都重要得多。严格杂交条件的实例是65°C和 $0.1 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC} = 0.15\text{M NaCl}$, 0.015M柠檬酸钠, pH 7.0)。因此,本发明所述的反义寡聚体可以包括与表1中提供的序列或SEQ ID NO:1-74,更优选SEQ ID NO:4、7、9、11、14、16-18、27、30、34、35、64和67,甚至更优选SEQ ID NO:4、7、27、30、34和64选择性杂交的寡核苷酸。

[0092] 应该理解,结构蛋白中外显子末端的密码子排列并不总是在密码子末端断裂,因此可能需要从mRNA前体中删除一个以上的外显子以确保mRNA的框内阅读。在这种情况下,可能需要通过本发明的方法选择多个反义寡聚体,其中每个反义寡聚体针对负责诱导包含所需外显子和/或内含子的不同区域。在给定的离子强度和pH值下, T_m 是50%的靶序列与互补多核苷酸杂交的温度。这种杂交可发生在反义寡聚体与靶序列“接近”或“基本”互补的情况下,也可发生在完全互补的情况下。

[0093] 通常,当与反义寡聚体的核苷酸在至少约14个核苷酸的区段上具有至少约55%的同一性,优选至少约65%、更优选至少约75%、最优选至少约90%、95%、98%或99%的同一性时,将发生选择性杂交。如上所述,同源性比较的长度可以是更长的序列,并且在某些实施方案中,通常在至少约九个核苷酸,通常至少约12个核苷酸,更通常至少约20个,通常至少约21、22、23或24个核苷酸,至少约25、26、27或28个核苷酸,至少约29、30、31或32个核苷酸,至少约36个或更多个核苷酸的区段上。

[0094] 因此,本发明所述的反义寡聚体序列优选与本文序列表中所示的序列具有至少75%,更优选至少85%,更优选至少86%、87%、88%、89%或90%的同源性。更优选具有至少91%、92%、93%、94%或95%,更优选至少96%、97%、98%或99%的同源性。通常,反义寡聚体的长度越短,实现选择性杂交所需的同源性越大。因此,在本发明的反义寡聚体由少于约30个核苷酸组成的情况下,与本文序列表中列出的反义寡聚体相比,优选百分比同一性大于75%,优选大于85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。核苷酸同源性比较可以通过序列比较程序进行,例如GCG Wisconsin Bestfit程序或GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395)。以这种方式,可以通过在比对中插入空位来比较与本文引用的长度相似或基本不同的序列,例如,通过GAP使用的比较算法来确定这种空位。

[0095] 本发明所述的反义寡聚体可以具有降低同源性的区域,以及与靶序列完全同源的区域。寡核苷酸没有必要在其整个长度上具有完全的同源性。例如,寡核苷酸可以具有与靶序列相同的至少4或5个碱基的连续区段,优选具有与靶序列相同的至少6或7个碱基的连续区段,更优选具有与靶序列相同的至少8或9个碱基的连续区段。寡核苷酸可以具有与靶序列相同的至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个碱基的区段。

寡核苷酸序列的剩余区段可以间歇性地与靶序列相同;例如,剩余序列可具有相同的碱基,随后是不相同的碱基,然后是相同的碱基。或者(或并且)寡核苷酸序列可以具有几个相同序列的区段(例如3、4、5或6个碱基),其中穿插着不完全同源的区段。这样的序列错配将优选地没有或很少有剪接转换活性损失。

[0096] 术语“调控”或“调节”包括“增加”或“减少”一个或多个可量化参数,任选地以定义和/或统计上显著的量“增加”或“减少”。术语“增加”、“增强”或“提高”或“刺激”或“促进”通常是指一种或多种反义寡聚体或组合物相对于由无反义寡聚体或对照化合物引起的反应在细胞或受试者中产生或引起更大生理反应(即下游效应)的能力。术语“降低”或“减少”通常是指一种或多种反义寡聚体或组合物相对于由无反义寡聚体或对照化合物引起的反应在细胞或受试者中产生或引起降低的生理反应(即下游效应)的能力。

[0097] 相关的生理或细胞反应(体内或体外)对本领域技术人员而言是显而易见的,并且可以包括在有需要的细胞、组织或受试者中,CNOT3-编码mRNA前体中排斥特定外显子的增加、编码CNOT3的mRNA前体的量的减少或功能性CNOT3蛋白表达的减少。“减少”或“降低”的量通常是统计上显著的量,并且可以包括比不存在反义寡聚体(不存在试剂)或使用对照化合物时产生的量少1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50倍或更多倍(例如500、1000倍)(包括在它们之间和1以上的所有整数和小数,例如1.5、1.6、1.7、1.8)的减少。

[0098] 术语“降低”或“抑制”通常可涉及一种或多种反义寡聚体或组合物“减少”相关生理或细胞反应的能力,例如根据诊断领域常规技术测量的本文所述疾病或病症的症状。相关的生理或细胞反应(体内或体外)对本领域技术人员来说是显而易见的,并且可以包括诸如视网膜色素变性等疾病的症状或病理的减轻。

[0099] 与没有反义寡聚体或对照组合物产生的反应相比,反应的“减少”可以是统计学上显著的,并且可以包括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%减少,包括其间的所有整数。

[0100] 反义寡聚体的长度可以改变,只要其能够选择性地结合mRNA前体分子内的预期位置。这些序列的长度可以根据本文描述的选择过程来确定。通常,反义寡聚体的长度从约10个核苷酸,至约50个核苷酸。然而,应理解是,在该范围内的任何长度的核苷酸都可以用于该方法。优选反义寡聚体的长度在10至40、10至35、15至30个核苷酸长度或20至30个核苷酸长度之间,最优选约25至30个核苷酸长度。例如,寡聚体的长度可以是20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0101] 如本文所用,“反义寡聚体”是指核苷酸或核苷酸类似物的线性序列,其允许核酸酶通过Watson-Crick碱基配对与RNA中的靶序列杂交,以在靶序列内形成寡核苷酸:RNA异源双链体。术语“反义寡聚体”、“反义寡核苷酸”、“低聚物(寡聚物)”和“反义化合物”可互换地用于指代寡核苷酸。环亚基可以基于核糖或另一戊糖,或者在某些实施方案中基于吗啉基(参见下文对吗啉代寡核苷酸的描述)。还包括肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)和2'-O-甲基寡核苷酸,以及本领域已知的其他反义试剂。

[0102] 包括非天然存在的反义寡聚体或“寡核苷酸类似物”,包括以下反义寡聚体或寡核苷酸,其具有(i)修饰的主链结构,例如,除了在天然存在的寡核苷酸和多核苷酸中发现的标准磷酸二酯键之外的主链,和/或(ii)修饰的糖部分,例如,吗啉代部分,而不是核糖或脱

氧核糖部分。寡核苷酸类似物支持能够通过Watson-Crick碱基配对与标准多核苷酸碱基进行氢键结合的碱基,其中类似物主链以允许寡核苷酸类似物分子与标准多核苷酸(例如,单链RNA或单链DNA)中的碱基之间以序列特异性方式进行这种氢键结合的方式呈现碱基。优选的类似物是那些具有基本上不带电荷的、含磷的主链的类似物。

[0103] 生产反义寡聚体的一种方法是使2' 羟基核糖位置甲基化,并且硫代磷酸酯主链的并入产生表面上类似RNA但更耐核酸酶降解的分子,但本发明领域的技术人员将知道可用于本发明目的的其他形式的合适主链。

[0104] 为了避免在与反义寡聚体形成双链体期间mRNA前体的降解,本方法中使用的反义寡聚体可适于最小化或防止内源性RNase H的切割。这一特性是高度优选的,因为用非甲基化寡聚体处理RNA(无论是在细胞内还是在含有RNase H的粗提取物中)导致mRNA前体:反义寡聚体双链体的降解。能够绕过或不诱导这种降解的任何形式的修饰反义寡聚体可用于本发明方法。可以通过修饰本发明所述的反义寡聚体以使其包含部分不饱和脂肪烃链和一个或多个极性带电基团,包括羧酸基团、酯基团和醇基团,以实现核酸酶抗性。

[0105] 不激活RNase H的反义寡聚体可以根据已知技术制备(参见,例如美国专利5,149,797)。这种反义寡聚体可以是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸序列,简单地包含在空间上阻碍或阻止RNase H与包含寡聚体作为其一个成员的双链体分子的结合的任何结构修饰,该结构修饰基本上不阻碍或破坏双链体的形成。由于涉及双链体形成的寡聚体的部分与涉及与其结合的RNase H的部分基本不同,因此可获得许多不激活RNase H的反义寡聚体。例如,这样的反义寡聚体可以是其中至少一个或全部核苷酸间桥接磷酸残基是修饰的磷酸酯的寡核苷酸,该磷酸酯例如是磷酸甲酯、硫代磷酸甲酯、磷酰吗啉代酸酯、磷哌嗪化硼磷酸酯(phosphoropiperazidates boranophosphates)、酰胺键和磷酰胺酯。例如,核苷酸间桥接磷酸残基中的每一个其他残基都可以如所述进行修饰。在另一非限制性实例中,这种反义寡聚体是其中至少一个或全部核苷酸含有2' 低级烷基部分的分子(例如,C1-C4,直链或支链,饱和或不饱和烷基,例如甲基、乙基、乙烯基、丙基、1-丙烯基、2-丙烯基和异丙基)。例如,核苷酸中的每一个可按所述进行修饰。

[0106] 当与RNA形成双链体时不被细胞RNase H切割的反义寡聚体的实例是2' -O-甲基衍生物。这种2' -O-甲基-寡核糖核苷酸在细胞环境和动物组织中是稳定的,它们与RNA的双链体比它们的核糖或脱氧核糖对应物具有更高的T_m值。或者,本发明所述的核酸酶抗性反义寡聚体可以具有至少一个最后3' -末端核苷酸氟化。另外,本发明所述的核酸酶抗性反义寡聚体具有连接在最后3'-末端核苷酸碱基中的至少两个之间的硫代磷酸键,优选具有连接在最后4个3' -末端核苷酸碱基之间的硫代磷酸键。

[0107] 增加的剪接转换也可以通过替代寡核苷酸化学实现。例如,反义寡聚体可选自包括以下的列表:磷酰胺酯或磷酰二胺吗啉代寡核苷酸(PMO);PMO-X;PPMO;肽核酸;锁核酸(LNA)及其衍生物,包括 α -L-LNA、2' -氨基LNA、4' -甲基LNA和4' -O-甲基LNA;乙烯桥联核酸(ENA)及其衍生物;硫代磷酸酯寡聚体;三环DNA寡聚体(tcDNA);三环硫代磷酸寡聚体;2' O-甲基修饰的寡聚体(2' -OMe);2' -O-甲氧基乙基(2' -MOE);2' -氟,2' -氟代阿拉伯糖(2' -fluoroarabino FANA);解锁核酸(UNA);己糖醇核酸(HNA);环己烯基核酸(CeNA);2' -氨基(2' -NH₂);2' -O-亚乙基胺或上述任何组合作为混合物或作为gapmer。为了提高递送效率,上述修饰的核苷酸通常与脂肪酸/脂质/胆固醇/氨基酸/碳水化合物/多糖/纳米颗粒

等缀合到糖或核碱基部分。这些缀合的核苷酸衍生物还可用于构建外显子跳跃反义寡聚体。反义寡聚体诱导的人CNOT3基因转录本剪接修饰通常使用寡核苷酸、PNA、2OMe或MOE修饰的硫代磷酸酯主链上的碱基。尽管2OMeA0用于寡聚体设计,但由于作为阳离子脂质复合物递送时其在体外高效吸收,这些化合物容易被核酸酶降解,并不理想用于体内或临床应用。当使用其它化学方法产生本发明的反义寡聚体时,本文提供的序列的尿嘧啶(U)可以被胸腺嘧啶(T)取代。

[0108] 虽然上述反义寡聚体是本发明所述反义寡聚体的优选形式,但本发明包括其它反义寡聚分子,包括但不限于如下所述的寡聚体模拟物。

[0109] 可用于本发明的优选反义寡聚体的具体实例包括含有修饰的主链或非天然核苷间键的寡核苷酸。如本说明书所定义的,具有修饰的主链的寡聚体包括那些在主链中保留磷原子的寡聚体和那些在主链中不具有磷原子的寡聚体。为了本说明书的目的,并且如本领域中有时提到的,在它们的核苷间主链中没有磷原子的修饰的寡聚体也可以被认为是反义寡聚体。

[0110] 在其他优选的寡聚体模拟物中,核苷酸单元的糖和核苷间键(即主链)都被新的基团取代。保留碱基单元以便与适当的核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物,即已经显示具有优异杂交特性的寡聚体模拟物,被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,寡聚体的糖主链被含有酰胺的主链取代,特别是被氨基乙基甘氨酸主链取代。核碱基保留并直接或间接地与主链酰胺部分的氮杂原子结合。

[0111] 另一种优选的化学物质是磷酰二胺吗啉代寡核苷酸(PMO)寡聚化合物,其不被任何已知的核酸酶或蛋白酶降解。这些化合物不带电荷,当与RNA链结合时不激活RNase H活性,并且已经显示在体内施用后可施加持续的剪接调节(Summerton and Weller, Antisense Nucleic Acid Drug Development, 7, 187-197)。

[0112] 修饰的寡聚体还可以含有一个或多个取代的糖部分。寡聚体还可以包括核碱基(在本领域中通常简称为“碱基”)修饰或取代。某些核碱基对于提高本发明所述的寡聚化合物的结合亲和力特别有用。这些包括5-取代嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙基尿嘧啶和5-丙基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代可使核酸双链体稳定性提高0.6-1.2°C,尤其是当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0113] 本发明所述寡聚体的另一种修饰涉及化学连接至寡聚体的一个或多个部分或缀合物,其增强寡聚体的活性、细胞分布或细胞摄取。这些部分包括但不限于脂质部分,例如胆固醇部分、胆酸、硫醚,例如己基-S-三苯甲基硫醇(hexyl-S-tritylthiol)、硫代胆固醇、脂肪链,例如十二烷二醇或十一烷基残基、磷脂,例如二-十六烷基-rac甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-rac甘油-3-H-磷酸酯、多胺或聚乙二醇链,或金刚烷乙酸、棕榈基部分、肉豆蔻基、或十八胺或己氨基-羰基-氧基胆固醇部分。

[0114] 已经将细胞穿透肽添加到磷酰二胺吗啉代寡聚体中,以增强细胞摄取和核定位。如Jearawiriyapaisarn et al. (2008), Mol. Ther. 16 9, 1624-1629所示,不同的肽标签已经显示影响摄取效率和靶组织特异性。

[0115] 在给定的化合物中没有必要对所有位置进行均一的修饰,事实上,在单个化合物中甚至在寡聚体内的单个核苷中可以并入不止一种上述修饰。本发明还包括作为嵌合化合物的反义寡聚体。在本发明的上下文中,“嵌合”反义寡聚体或“嵌合体”是反义寡聚体,特别

是寡聚体,其包含两个或更多化学上不同的区域,每个区域由至少一个单体单元组成,即在寡聚体化合物的情况下由至少一个核苷酸组成。这些寡聚体通常包含至少一个区域,其中寡聚体经修饰以赋予寡聚体或反义寡聚体增加对核酸酶降解的抗性,增加细胞摄取,以及增加对靶核酸结合亲和力的附加区域。

[0116] 反义寡聚体及其变体的活性可根据本领域常规技术进行测定。例如,可以通过用于检测转录核酸或蛋白质的剪接形式和/或表达的多种众所周知的方法中的任何一种来评估所检测的RNA和蛋白质的剪接形式和表达水平。这些方法的非限制性实例包括剪接形式RNA的RT-PCR,然后对PCR产物进行大小分离,核酸杂交方法例如Northern印迹和/或使用核酸阵列;核酸扩增方法;蛋白质检测的免疫学方法;蛋白质纯化方法;和蛋白质功能或活性测定。

[0117] RNA表达水平可以通过从细胞、组织或生物体制备mRNA/cDNA(即转录的多核苷酸),并通过将mRNA/cDNA与作为被测核酸的互补物的参考多核苷酸或其片段杂交来评估。在与互补多核苷酸杂交之前,可以任选地使用各种聚合酶链反应或体外转录方法中的任何一种来扩增cDNA;优选地,它不被放大。还可以使用定量PCR检测一个或多个转录本的表达,以评估转录本的表达水平。

[0118] 本发明提供了反义寡聚体诱导的CNOT3基因转录本的剪接切换、临床相关的寡聚体化学和将CNOT3剪接操纵引导至治疗水平的递送系统。由CNOT3基因转录的全长CNOT3 mRNA以及CNOT3蛋白的数量的显著降低是通过以下方法实现的:

[0119] 1) 利用成纤维细胞系体外精制寡聚体,通过实验评估(i)内含子-增强子靶基序,(ii)反义寡聚体长度和寡聚体混合物的形成,(iii)化学物质的选择,以及(iv)细胞穿透肽(CPP)的添加以增强寡聚体的递送;和

[0120] 2) 详细评价新的方法以产生一个或多个外显子缺失的CNOT3转录本。

[0121] 因此,本文证明了CNOT3 mRNA前体的加工可以用特定的反义寡聚体操纵。通过这种方式,可以获得CNOT3蛋白量的功能性显著减少,从而减少与视网膜色素变性相关的严重病理。

[0122] 根据本发明使用的反义寡聚体可以通过众所周知的固相合成技术方便地制备。用于这种合成的设备由几个供应商出售,例如,包括应用生物系统公司(Foster City, Calif.)。在美国专利第4,458,066号中描述了一种在改性固体载体上合成寡核苷酸的方法。

[0123] 可另外或替代地采用本领域已知的任何其它用于这种合成的方法。众所周知,使用类似的技术来制备寡聚体,如硫代磷酸酯和烷基化衍生物。在一个这样的自动化实施方案中,二乙基-磷酰胺用作起始材料,并且可以如Beaucage, et al., (1981) Tetrahedron Letters, 22:1859-1862所描述的那样合成。

[0124] 本发明所述的反义寡聚体是在体外合成的,并且不包括生物来源的反义组合物或设计用于指导反义寡聚体的体内合成的遗传载体构建体。本发明的分子也可以与其他分子、分子结构或化合物的混合物,例如脂质体、受体靶向分子等混合、包封、缀合或以其他方式结合。

[0125] 反义寡聚体可配制用于口服、局部、胃肠外或其他递送,特别是用于局部眼部递送和可注射眼部递送的制剂。制剂的配制可用于协助在递送或活性位点的摄取、分配和/或吸

收。优选地,本发明所述的反义寡聚体被配制为局部递送到眼睛或通过眼内注射或眼内植入,使得对CNOT3产生的作用在空间上受限并且不是全身性的。

[0126] 治疗方法

[0127] 根据本发明的另一方面,提供了一种或多种如本文所述的反义寡聚体,其用于基于反义寡聚体的疗法中。优选地,该疗法用于与CNOT3表达相关的病症。更优选地,用于与CNOT3表达相关的病症的疗法是用于视网膜色素变性的疗法。

[0128] 更具体地,反义寡聚体可以选自表1,或SEQ ID NO:1-74,更优选SEQ ID NO:4、7、9、11、14、16-18、27、30、34、35、64和67,甚至更优选SEQ ID NO:4、7、27、30、34和64中的任何一种或多种,及其组合或混合物。这包括能够在严格杂交条件下与这些序列杂交的序列、与之互补的序列、含有修饰碱基、修饰主链和其功能截短或延伸的序列,这些序列在CNOT3基因转录本中具有或调节mRNA前体加工活性。

[0129] 本发明还扩展到两种或多种反义寡聚体的组合,这些反义寡聚体能够结合选定的靶标以诱导CNOT3基因转录本中的外显子排除。该组合可以是两种或更多种反义寡聚体的混合物,包含两种或更多种结合在一起用于基于反义寡聚体的治疗的构建体。

[0130] 因此,提供了治疗、预防或改善与CNOT3表达相关的疾病的影响的方法,其包括以下步骤:

[0131] a) 向患者施用有效量的一种或多种反义寡聚体或包含本文所述的一种或多种反义寡聚体的药物组合物。

[0132] 优选地,患者中与CNOT3表达相关的疾病是视网膜色素变性。

[0133] 因此,本发明提供了治疗、预防或改善视网膜色素变性影响的方法,其包括以下步骤:

[0134] a) 向患者施用有效量的一种或多种反义寡聚体或包含本文所述的一种或多种反义寡聚体的药物组合物。

[0135] 优选地,所述疗法用于通过外显子跳跃策略降低功能性CNOT4蛋白的水平。CNOT3水平的降低优选通过修饰CNOT3基因转录本或其部分中的mRNA前体剪接来降低转录本水平从而得以实现。

[0136] CNOT3的减少将优选导致CNOT3相关病症或病理(例如视网膜色素变性)的症状的数量、持续时间或严重程度的减少。

[0137] 如本文所用,对受试者(例如哺乳动物,如人类)或细胞的“治疗”是试图改变个体或细胞的自然进程而使用的任何类型的干预。治疗包括但不限于药物组合物的给药,并且可以预防性地或在病理事件开始或与病原体接触之后进行。还包括“预防性”治疗,其目的是降低所治疗的疾病或病症的进展速度,延迟疾病或病症的发作,或降低其发作的严重程度。“治疗”或“预防”并不一定指完全根除、治愈或预防疾病或病症或相关症状。

[0138] 患有与CNOT3表达相关的疾病的受试者可能是哺乳动物,包括人。

[0139] 本发明所述的反义寡聚体也可与其他疗法结合使用,例如药物疗法。

[0140] 因此,本发明提供了治疗、预防或改善与CNOT3表达相关的疾病或病症的影响的方法,其中本发明所述的反义寡聚体和与治疗、预防或改善与CNOT3表达相关的疾病或病症的影响相关的另一替代疗法顺序或同时给药。优选地,所述疾病或病症是视网膜色素变性。

[0141] 递送

[0142] 本发明所述的反义寡聚体也可用作预防剂或治疗剂,其可用于治疗疾病的目的。因此,在一个实施方案中,本发明提供了与药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂混合的治疗有效量的反义寡聚体,其结合CNOT3mRNA前体中的选定靶标以诱导如本文所述的有效且一致的外显子跳跃。

[0143] 还提供了用于治疗、预防或改善患者中与CNOT3表达相关的疾病的影响的药物、预防性或治疗性组合物,所述组合物包含:

[0144] a) 本文所述的一种或多种反义寡聚体;和

[0145] b) 一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂。

[0146] 优选地,本发明所述的反义寡聚体通过局部眼部途径递送,以避免全身效应。给药途径包括但不限于玻璃体腔内、前房内、结膜下、筋膜囊下、眼球后、近巩膜后或局部(滴剂,洗眼剂,乳剂等)。递送方法包括,例如,通过注射器注射和药物递送装置,如植入的玻璃体递送装置(即,VITRASERT®)。

[0147] 在一个实施方案中,反义寡聚体以20mg/kg的剂量静脉注射。例如,反义寡聚体可以在小鼠中以20mg/kg的剂量静脉注射。

[0148] 优选地,反义寡聚体以0.01-1.5mg/kg体重、0.1-0.1mg/kg体重、0.2-0.8mg/kg体重、0.4-0.7mg/kg体重或更优选0.4-0.6mg/kg体重通过玻璃体内注射施用。反义寡聚体可通过玻璃体内注射施用,例如以约0.05mg/kg体重、0.1mg/kg体重、0.2mg/kg体重、0.3mg/kg体重、0.4mg/kg体重、0.5mg/kg体重、0.6mg/kg体重、0.7mg/kg体重、0.8mg/kg体重、0.9mg/kg体重、1.0mg/kg体重、1.1mg/kg体重、1.2mg/kg体重、1.3mg/kg体重、1.4mg/kg体重、1.5mg/kg体重的剂量。优选地,反义寡聚体以约0.5mg/kg体重通过玻璃体内注射施用。例如,反义寡聚体可以以约0.5mg/kg体重通过玻璃体内注射施用于小鼠。

[0149] 更优选地,反义寡聚体通过玻璃体内注射以0.5-50mg/眼、0.5-40mg/眼、0.5-30mg/眼、2-30mg/眼、2-20mg/眼、0.5-20mg/眼或更优选5-20mg/眼的剂量施用。反义寡聚体可通过玻璃体内注射,以例如约0.5mg/眼、1.0mg/眼、2.0mg/眼、3.0mg/眼、4.0mg/眼、5.0mg/眼、6.0mg/眼、7.0mg/眼、8.0mg/眼、9.0mg/眼、10.0mg/眼、11.0mg/眼、12.0mg/眼、13.0mg/眼、14.0mg/眼、15.0mg/眼、16.0mg/眼、17.0mg/眼、18.0mg/眼、19.0mg/眼、20.0mg/眼、21mg/眼、22mg/眼、23mg/眼、24mg/眼、25mg/眼、30mg/眼、35mg/眼、40mg/眼、45mg/眼,或50mg/眼施用。优选地,反义寡聚体以约5-20mg/眼通过玻璃体内注射施用。

[0150] 反义寡聚体可以在短时间段内以规定的间隔施用,例如每天施用,持续两周或更短时间。然而,在许多情况下,寡聚体在较长的时间段内间歇施用。在施用之后或同时施用抗生素或其他治疗。治疗方案可以根据免疫分析、其他生化测试和接受治疗的受试者生理检查的结果进行调整(剂量、频率、途径等)。

[0151] 剂量可取决于要治疗的疾病状态的严重程度和反应性,治疗过程从几天持续到几个月,或者直至实现治愈或疾病状态的减轻。或者,可以针对疾病进展速率滴定给药。建立基线进展。然后监测初始一次停药后的进展速率,以检查速率是否有降低。优选地,给药后没有进展。优选地,仅在进展速率不变的情况下才需要再给药。成功的治疗优选不会导致疾病进一步发展,甚至视力有所恢复。最佳给药方案可以从患者体内药物积累的测量中计算出来。普通技术人员可以很容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。

[0152] 最佳剂量可取决于单独寡聚体的相对效力,通常可以基于在体外和体内动物模型

中发现有效的EC50来估计。

[0153] 通常,剂量为0.01-1.5mg/kg体重或以0.5-50mg/眼的玻璃体内注射施用,可以每天、每周、每月或每年施用一次或多次,甚至每2-20年施用一次。重复给药率取决于疾病的进展速度。本领域普通技术人员可以基于测量的药物在体液或组织中的停留时间和浓度容易地估计给药的重复率。在成功治疗之后,可能希望患者接受维持治疗以防止疾病状态的复发,其中寡聚体以维持剂量施用,剂量可以是0.01-1.5mg/kg体重或以0.5-50mg/眼的玻璃体内注射施用,可以每天、每周、每月或每年施用一次或多次,甚至每2-20年施用一次。

[0154] 使用本发明所述的反义寡聚体的有效体内治疗方案可以根据给药的持续时间、剂量、频率和途径以及治疗中受试者的病症而变化(即,预防性给药是针对局限性或全身性感染的给药)。因此,这种体内治疗通常需要通过适于所治疗的特定类型疾病的测试进行监测,并相应地调整剂量或治疗方案,以实现最佳的治疗结果。

[0155] 可以例如通过本领域已知的疾病的一般指标来监测治疗。体内施用的本发明的反义寡聚体的效力可由在施用反义寡聚体之前、期间和之后从受试者身上取的生物样品(组织、血液、尿液等)确定。此类样品的测定包括:(1)使用本领域技术人员已知的方法,例如电泳凝胶迁移率测定,监测与靶序列和非靶序列形成异源双链核酸分子的存在或不存在;(2)通过RT-PCR、Northern印迹、ELISA或Western印迹等标准技术,监测突变mRNA相对于参考正常mRNA或蛋白质的量。

[0156] 寡聚体的核内递送是反义寡聚体的主要挑战。不同的细胞穿透肽(CPP)在不同的条件和细胞系中不同程度地定位PMO,发明人已经评估了新的CPP将PMO递送到靶细胞的能力。术语CPP或“增强细胞摄取的肽部分”可互换使用,并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”。如本文所示,所述肽具有在给定细胞培养群体的约或至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的细胞内诱导细胞穿透的能力,并且在全身给药时允许大分子在体内多个组织内易位。CPP在本领域中是公知的,并且例如在美国申请第2010/0016215号中公开,其通过引用整体并入本文。

[0157] 因此,本发明提供了与细胞穿透肽组合用于制备治疗性药物组合物的本发明的反义寡聚体。

[0158] 赋形剂

[0159] 本发明所述的反义寡聚体优选以药学上可接受的组合物递送。组合物可包含约1nM至1000nM的本发明所需的每种反义寡聚体。优选地,组合物可包含约1nM至500nM、10nM至500nM、50nM至750nM、10nM至500nM、1nM至100nM、1nM至50nM、1nM至40nM、1nM至30nM、1nM至20nM,最优选在1nM至10nM之间的本发明的每种反义寡聚体。

[0160] 组合物可包含约1nM、2nM、3nM、4nM、5nM、6nM、7nM、8nM、9nM、10nM、20nM、50nM、75nM、100nM、150nM、200nM、250nM、300nM、350nM、400nM、450nM、500nM、550nM、600nM、650nM、700nM、750nM、800nM、850nM、900nM、950nM或1000nM的本发明所需的每种反义寡聚体。

[0161] 本发明还提供一种或多种反义寡聚体,其适于以适合于递送给患者的形式帮助预防或治疗性治疗、预防或改善疾病的症状,例如与CNOT3表达相关的疾病或病理。

[0162] 短语“药学上可接受的”是指生理上可耐受的分子实体和组合物,当给患者服用时,通常不会产生过敏或类似的不良反应,如胃部不适等。术语“载体”是指与化合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这种药物载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石

油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、豆油、矿物油、芝麻油等。水或盐水溶液以及葡萄糖和甘油水溶液优选用作载体,特别是用于可注射溶液。合适的药物载体描述于 Remington:The Science and Practice of Pharmacy,22nd Ed.,Pharmaceutical Press,PA(2013)。

[0163] 在本发明的更具体形式中,提供了包含治疗有效量的本发明的一种或多种反义寡聚体以及药学上可接受的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体的药物组合物。这类组合物包括各种缓冲液内容物(如Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐)、pH和离子强度的稀释剂和添加剂,如洗涤剂 and 增溶剂(如Tween80、聚山梨酸酯80)、抗氧化剂(如抗坏血酸、焦亚硫酸钠)、防腐剂(如Thimersol、苯甲醇)和填充物质(如乳糖、甘露醇)。所述材料可掺入聚合物如聚乳酸、聚乙醇酸等的颗粒制剂中或掺入脂质体中。也可以使用透明质酸。这些组合物可能影响现有蛋白质和衍生物的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。参见例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,22nd Ed.,Pharmaceutical Press,PA(2013)。组合物可以以液体形式制备,或者可以以干粉形式制备,例如冻干形式。

[0164] 应当理解,根据本发明提供的药物组合物可以通过本领域中已知的任何方法施用。施用的药物组合物通过注射、口服、局部或通过肺或鼻途径施用。例如,反义寡聚体可以通过静脉、动脉、腹腔、肌肉或皮下施用途径递送。适当的途径可以由本领域的技术人员根据治疗中的受试者的情况来确定。优选地,将反义寡聚体局部递送至眼睛或通过眼内注射或眼内植入,使得对CNOT3产生的影响是空间有限的,并且不是全身性的。

[0165] 用于局部施用的制剂包括其中本公开所述的寡聚体与局部递送剂如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的制剂。脂质和脂质体包括中性(如二油酰基磷脂酰(di-oleoylphosphatidyl)DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰(di-stearoylphosphatidyl)胆碱)、阴性(如二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子(如二油酰基四甲基氨基丙基(di-oleoyltetramethylaminopropyl)DOTAP和二油酰基磷脂酰乙醇胺(di-oleoylphosphatidyl)DOTMA)。对于局部施用或其他施用方式,本公开的寡聚体可以封装在脂质体中,或者可以与脂质体形成复合物,特别是与阳离子脂质体形成复合物。或者,寡聚体可以与脂质复合,特别是与阳离子脂质复合。脂肪酸和酯,其药学上可接受的盐,及其用途在美国专利No.6,287,860和/或于1999年5月20日提交的美国专利申请第09/315,298号中进一步描述。

[0166] 在某些实施方案中,本公开所述的反义寡聚体可以通过局部或透皮方法递送(例如,通过将反义寡聚体掺入例如乳剂中,该反义寡聚体任选地包装在脂质体中),包括递送到眼表面。这种局部或经皮和乳剂/脂质体介导的递送方法在本领域中描述了用于递送反义寡聚体,例如美国专利第6,965,025号。优选地,局部递送是递送至眼睛。

[0167] 本文所述的反义寡聚体也可以通过可植入装置递送。这种装置的设计是本领域公知的方法,例如美国专利第6,969,400号中描述的合成植入物设计。优选地,所述植入物能够植入眼内以持续递送反义寡聚体。

[0168] 用于眼部施用(包括眼部注射、眼部局部递送和眼部植入)的组合物和制剂,可包括无菌水溶液,其还可包含缓冲剂、稀释剂和其他合适的添加剂,例如但不限于渗透促进剂、载体化合物和其他药学上可接受的载体或赋形剂。

[0169] 治疗有效的反义寡聚体的递送可以通过以前公开的方法来实现。例如,反义寡聚

体的递送可以通过包含所述反义寡聚体和有效量的嵌段共聚物的混合物的组合物。美国专利申请US20040248833中描述了该方法的一个实例。将反义寡聚体递送至细胞核的其它方法描述于Mann CJ et al. (2001) Proc, Natl. Acad. Science, 98(1) 42-47和Gebiski et al. (2003) Human Molecular Genetics, 12(15):1801-1811中。在US 6,806,084中描述了通过表达载体将核酸分子作为裸DNA或与脂质载体复合物导入细胞的方法。

[0170] 可以使用本领域公认的技术(例如,转染、电穿孔、融合、脂质体、胶体聚合物颗粒和病毒和非病毒载体以及本领域已知的其他方法)将反义寡聚体导入细胞中。所选择的递送方法将至少取决于待处理的细胞和细胞的位置,并且对本领域技术人员来说是显而易见的。例如,定位可以通过在表面上具有特定标记的脂质体以引导脂质体、直接注射到含有靶细胞的组织中、特定受体介导的摄取等来实现。

[0171] 可能希望在胶体分散体系中递送反义寡聚体。胶体分散体系包括大分子复合物、纳米胶囊、微球、微珠和脂质系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体或脂质体制剂。这些胶体分散体系可用于制备治疗药物组合物。

[0172] 脂质体是人工膜囊泡,其在体外和体内均可用作递送载体。这些制剂可以具有净阳离子、阴离子或中性电荷特性,并具有体外、体内和离体递送方法的有用特性。已有研究表明,大的单层囊泡可以包封相当大百分比的含有大分子的水性缓冲液。RNA和DNA可以包封在水性内部并以生物活性形式递送至细胞(Fraley, et al., Trends Biochem. Sci. 6:77, 1981)。

[0173] 为了使脂质体成为有效的基因转移载体,应具备以下特征:(1) 高效地包封感兴趣的反义寡聚体,同时不损害其生物活性;(2) 与非靶细胞相比,优先与靶细胞充分结合;(3) 高效地将囊泡的水性内容物递送至靶细胞胞质;和(4) 准确有效地表达遗传信息(Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988)。脂质体的组成通常是磷脂(特别是高相变温度磷脂)的组合,通常与类固醇(特别是胆固醇)组合。也可以使用其他磷脂或其他脂质。脂质体的物理特性取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,据信其与带负电荷的DNA分子相互作用形成稳定的复合物。pH敏感或带负电荷的脂质体被认为能捕获DNA而不是与之复合。阳离子脂质体和非阳离子脂质体均已用于将DNA递送至细胞。

[0174] 脂质体还包括“空间稳定的”脂质体,如本文所用,该术语是指包含一种或多种特定脂质的脂质体,当将其掺入脂质体中时,相对于缺乏这种特定脂质的脂质体,其导致循环寿命增加。空间稳定的脂质体的实例是脂质体的囊泡形成脂质部分的一部分包含一种或多种糖脂或由一种或多种亲水性聚合物如聚乙二醇(PEG)部分衍生的那些。脂质体及其用途进一步描述于U.S. 6,287,860中。

[0175] 如本领域已知的,反义寡聚体可以使用例如涉及脂质体介导的摄取、脂质缀合物、多聚赖氨酸介导的摄取、纳米颗粒介导的摄取和受体介导的胞吞作用的方法,以及另外的非胞吞递送模式,例如显微注射、透化(例如,链球菌溶血素-O透化、阴离子肽透化)、电穿孔和本领域已知的各种非侵入性非胞吞递送方法(参见Dokka和Rojanasakul, Advanced Drug Delivery Reviews 44, 35-49, 通过引用整体并入本文)。

[0176] 反义寡聚体也可与其它药学上可接受的载体或稀释剂组合以制备药物组合物。合适的载体和稀释剂包括等渗盐水溶液,例如磷酸盐缓冲盐水。该组合物可配制为胃肠外、肌肉内、静脉内、皮下、眼内、口服或经皮给药。

[0177] 所描述的施用途径仅旨在作为指导,因为本领域技术人员将能够容易地确定用于任何特定动物和病症的最佳施用途径和任何剂量。

[0178] 在体外和体内尝试了多种方法将功能性新遗传物质导入细胞(Friedmann(1989) *Science*, 244:1275-1280)。这些方法包括将要表达的基因整合到修饰的逆转录病毒中(Friedmann(1989) *supra*; Rosenberg(1991) *Cancer Research* 51(18), suppl.:5074S-5079S);整合到非逆转录病毒载体中(Rosenfeld, et al. (1992) *Cell*, 68:143-155; Rosenfeld, et al. (1991) *Science*, 252:431-434);或通过脂质体递送与异源启动子-增强子元件连接的转基因(Friedmann(1989), 上文;Brigham, et al. (1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298:278-281; Nabel, et al. (1990) *Science*, 249:1285-1288; Hazinski, et al. (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*, 4:206-209;和Wang and Huang(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7851-7855);与配体特异性的、基于阳离子的转运系统耦合(Wu and Wu(1988) *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624)或裸DNA、表达载体的使用(Nabel et al. (1990), 上文;Wolff et al. (1990) *Science*, 247:1465-1468)。直接将转基因注射到组织中仅产生局部表达(Rosenfeld(1992) 上文);Rosenfeld et al. (1991) 上文;Brigham et al. (1989) 上文;Nabel(1990) 上文;和Hazinski et al. (1991) 上文)。Brigham et al. group (*Am. J. Med. Sci.* (1989) 298:278-281 and *Clinical Research* (1991) 39(摘要))报道了在静脉或气管内施用DNA脂质体复合物后仅对小鼠肺进行体内转染。人类基因治疗程序的综述文章的实例是:Anderson, *Science* (1992) 256:808-813;Barteau et al. (2008), *Curr Gene Ther*; 8(5):313-23;Mueller et al. (2008). *Clin Rev Allergy Immunol*; 35(3):164-78;Li et al. (2006) *Gene Ther.*, 13(18):1313-9;Simoës et al. (2005) *Expert Opin Drug Deliv*; 2(2):237-54。

[0179] 本发明所述的反义寡聚体包括任何药学上可接受的盐、酯或此类酯的盐,或任何其他化合物,当施用于动物(包括人)后,其能够(直接或间接)提供生物活性代谢物或其残留物。因此,作为实例,本公开还涉及本发明化合物的前药和药学上可接受的盐、此类前药的药学上可接受的盐和其他生物等效物。

[0180] 术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的生理学和药学上可接受的盐:即保留母体化合物所需的生物活性且不会对其产生不期望的毒理学作用的盐。对于寡聚体,药学上可接受的盐的优选实例包括但不限于(a)与阳离子如钠、钾、铵、镁、钙、多胺如精胺和亚精胺等形成的盐;(b)与无机酸形成的酸加成盐,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等;(c)与有机酸形成的盐,例如乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、葡萄糖酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、单宁酸、棕榈酸、海藻酸、聚谷氨酸、萘磺酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、聚半乳糖醛酸等;和(d)由元素阴离子如氯、溴和碘形成的盐。本发明所述的药物组合物可以以多种方式施用,这取决于是否需要局部治疗或全身治疗以及待治疗的区域。施用可以通过局部(包括眼部和粘膜,以及直肠给药)、肺部(例如,通过吸入或吹入粉末或气雾剂,包括通过雾化器、气管内、鼻内、表皮和经皮)、口服或肠外途径。肠外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹腔内、眼内或肌肉内注射或输注;或颅内,如鞘内或脑室内施用。具有至少一个2'-O-甲氧乙基修饰的寡聚体被认为特别适用于眼内施用。优选地,反义寡聚体通过眼内途径递送。

[0181] 本发明所述的药物制剂可以方便地以单位剂型呈现,可以根据制药工业中熟知的

常规技术制备。这种技术包括将活性成分与药物载体或赋形剂结合的步骤。通常,通过将活性成分与液体载体或细小的固体载体或两者均匀地紧密结合,然后在必要时对产品进行成型,制备制剂。

[0182] 瑞士型制药用途

[0183] 根据本发明的另一方面,提供了本文所述的一种或多种反义寡聚体在制备用于调节或控制与CNOT3表达相关的疾病的药物中的用途。

[0184] 本发明还提供了如本文所述的纯化和分离的反义寡聚体在制备用于治疗与CNOT3表达相关的疾病的药物中的用途。

[0185] 还提供了如本文所述的纯化和分离的反义寡聚体在制备用于治疗、预防或改善与CNOT3表达相关的疾病的影响的药物中的用途。

[0186] 优选地,CNOT3相关的病理或疾病是视网膜色素变性。

[0187] 根据本发明的另一方面,本发明扩展到本发明所述的反义寡聚体序列的cDNA或克隆拷贝,以及包含本发明所述的反义寡聚体序列的载体。本发明还进一步扩展到含有这种序列和/或载体的细胞。

[0188] 试剂盒

[0189] 还提供了用于治疗、预防或改善患者中与CNOT3表达相关的疾病的影响的试剂盒,该试剂盒包含包装在合适容器中的至少一种如本文所述的反义寡聚体及其组合或混合物,以及其使用说明。

[0190] 在优选的实施方案中,试剂盒将包含至少一种如本文所述或如表1所示的反义寡聚体,或如本文所述的SEQ ID NO:1-74,更优选SEQ ID NO:4、7、9、11、14、16-18、27、30、34、35、64和67,甚至更优选SEQ ID NO:4、7、27、30、34和64的反义寡聚体或反义寡聚体的混合物。试剂盒还可以含有外周试剂,如缓冲剂、稳定剂等。

[0191] 因此,提供了治疗、预防或改善患者中与CNOT3表达相关的疾病或病症的试剂盒,该试剂盒包含包装在合适的容器中的至少一种本文所述的或如表1所示的反义寡聚体及其组合或混合物,以及其使用说明。

[0192] 还提供了用于治疗、预防或改善患者中与CNOT3表达相关的疾病或病症的试剂盒,该试剂盒包含包装在合适的容器中的至少一种反义寡聚体,其选自SEQ ID NO:1-74,更优选SEQ ID NO:4、7、9、11、14、16-18、27、30、34、35、64和67,甚至更优选SEQ ID NO:4、7、27、30、34和64中的任何一种或多种,及其组合或混合物,以及其使用说明。

[0193] 优选地,所述疾病或病症是视网膜色素变性。

[0194] 试剂盒的内容物可以冻干,并且试剂盒可以另外含有用于重构冻干组分的合适溶剂。试剂盒的各个组成部分将被包装在单独的容器中,并与这些容器相关联的是一份通知,其可以是管理药物或生物制品的制造、使用或销售的政府机构所规定形式的通知,该通知反映了制造、使用或销售机构批准人类施用。

[0195] 当试剂盒的组分以一种或多种液体溶液提供时,液体溶液可以是水溶液,例如无菌水溶液。对于体内应用,可以将表达构建体配制成药学上可接受的可注射组合物。在这种情况下,容器装置本身可以是吸入剂、注射器、移液管、滴眼管或其他类似的装置,从这些装置可以将制剂应用于动物的受影响区域,例如肺,注射到动物体内,或者甚至应用于试剂盒的其他组分并与之混合。

[0196] 在一个实施方案中,本发明所述的试剂盒包含组合物,该组合物包含治疗有效量的反义寡聚体,所述反义寡聚体能够结合CNOT3基因转录本上的选定靶标,以修饰CNOT3基因转录本或其部分中的mRNA前体剪接。在另一个实施方案中,制剂是预先测量的、预混合的和/或预包装的。优选地,眼内溶液是无菌的。

[0197] 本发明所述的试剂盒还可以包括设计用于促进使用者依从性的说明书。如本文所使用,说明书指的是任何标签、插入物等,并且可以定位在包装材料的一个或多个表面上,或者说明书可以提供在单独的薄片上,或其任何组合上。例如,在一个实施方案中,本发明所述的试剂盒包括用于管理本发明的制剂的说明书。在一个实施方案中,说明书表明本发明的制剂适用于治疗视网膜色素变性。这样的说明书还可以包括剂量的说明,以及通过局部递送至眼睛或通过眼内注射给药的说明。

[0198] 反义寡聚体和合适的赋形剂可以单独包装,以便从业者或使用者根据需要 will 将组分配制成药学上可接受的组合物。或者,可以将反义寡聚体和合适的赋形剂包装在一起,由此需要医师或使用者进行微量配制。在任何情况下,包装应保持化学、物理和美学完整性的活性成分。

[0199] 通用

[0200] 本领域技术人员将理解,本文所描述的本发明易受除具体描述的那些之外的变化和修改的影响。本发明包括所有这些变化和修改。本发明还包括说明书中单独或共同提及或指出的所有步骤、特征、制剂和化合物,以及任何和所有组合或任何两个或更多步骤或特征。

[0201] 本文中引用的每个文献、参考文献、专利申请或专利都通过引用明确地整体并入本文,这意味着其应由读者阅读并视为本文的一部分。本文中引用的文献、参考文献、专利申请或专利在本文中不重复只是为了简明。

[0202] 用于此处提及的任何产品的任何制造商的说明书、描述、产品规格和产品,或在此处引用的任何文献中的任何产品均以引用方式并入本文,并可用于本发明的实践中。

[0203] 本发明不限于本文所述的任何具体实施方案的范围。这些实施例仅用于举例说明的目的。功能等同的产品、制剂和方法显然在本文所述的本发明的范围内。

[0204] 这里描述的本发明可以包括一个或多个范围的值(例如尺寸、位移和场强等)。值的范围将被理解为包括该范围内的所有值,包括定义该范围的值,以及邻近该范围的值,其导致与紧邻定义该范围边界的值的值相同或基本相同的结果。因此,除非有相反指示,否则本说明书和权利要求书中阐述的数值参数是近似值,其可根据本发明寻求获得的期望特性而变化。因此,“约80%”是指“约80%”以及“80%”。至少,每个数值参数都应该根据有效数字的数目和普通的四舍五入方法来解释。

[0205] 在本说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”一词或诸如“包括(comprises)”或“包含(comprising)”的变型将被理解为暗示包含一个规定的整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组。还注意到,在本公开中,特别是在权利要求和/或段落中,诸如“包括(comprises)”、“包含(comprised)”、“包含(comprising)”等术语可以具有美国专利法中赋予其的含义;例如,它们可以表示“包含(includes)”、“包括(included)”、“包括(including)”等;并且诸如“基本上由…构成(consisting essentially of)”和“基本上由…组成(consists essentially of)”的术语具有美国专利法赋予它们的含义,例

如,它们允许未明确叙述的元素,但排除在现有技术中发现的或影响本发明的基本或新颖特性的元素。

[0206] 本文所用的所选术语的其它定义可在本发明的详细描述中找到并贯穿全文应用。除非另有定义,本文所用的所有其他科学和技术术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。术语“活性剂”可意指一种活性剂,或可涵盖两种或更多种活性剂。

[0207] 包含本说明书中的核苷酸和氨基酸序列信息的序列标识号(“SEQ ID NO:”)收集在说明书的末尾,并使用程序Patentln Version 3.0制备。每个核苷酸或氨基酸序列在序列列表中由数字指示符<210>随后通过序列标识符(例如<210>1、<210>2等)标识。每个核苷酸或氨基酸序列的长度、序列类型和来源生物分别由数字指示字段<211>、<212>和<213>中提供的信息表示。本说明书中提到的核苷酸和氨基酸序列是由数字指示字段<400>中提供的信息定义的,随后是序列标识符(例如<400>1、<400>2等)。

[0208] 提出并公开了反义寡聚体命名系统,以区分不同的反义寡聚体(参见Mann et al., (2002) J Gen Med 4,644-654)。当测试几个略有不同的反义寡聚体时,这种命名变得特别相关,全部针对相同的靶区域,如下所示:

[0209] H#A/D(x:y)

[0210] 第一个字母表示物种(例如,H:人,M:鼠)

[0211] “#”表示靶外显子数

[0212] “A/D”分别表示位于外显子开始和结束的受体或供体剪接位点

[0213] (x,y)表示退火坐标,其中“-”或“+”分别表示内含子或外显子序列。例如,A(-6+18)表示靶外显子前内含子的最后6个碱基和靶外显子前18个碱基。最接近的剪接位点是受体,所以这些坐标前面是“A”。描述供体剪接位点的退火坐标可以是D(+2-18),其中最后2个外显子碱基和前18个内含子碱基对应于反义寡聚体的退火位点。完全外显子退火坐标将由A(+65+85)表示,即从外显子开始的第65个和第85个核苷酸(包括端值)之间的位点。

[0214] 以下实施例用于更全面地描述使用上述发明的方式,以及阐述用于实现本发明的各个方面的最佳模式。应当理解,这些方法绝不用于限制本发明的真实范围,而是出于说明性目的而呈现。

实施例

[0215] 实施例1

[0216] A0介导外显子跳跃以诱导CNOT3的移码

[0217] CNOT3的外显子结构如图1所示。设计剪接转换A0以靶向CNOT3mRNA前体中移码外显子内的增强子位点(图1),以诱导外显子跳跃,从而导致开放阅读框的丢失和CNOT3的敲低。

[0218] 从皮肤活检获取正常人成纤维细胞和RP11患者的成纤维细胞(PRPF31c.1205C>A Ser402*),并在添加有10%FBS的DMEM中培养。按照制造商的说明书,使用Lipofectamine 3000(Life Technologies)将以2' O-甲基硫代磷酸酯寡聚体的形式内部合成的反义序列(表1)作为脂质复合物转染到24孔板中的成纤维细胞中。然后将有效改变靶外显子选择的序列合成为磷酸二胺吗啉代寡聚体(PMO)并通过以下方式转染到纤维细胞中:作为i)未复

合的,ii)与有义ODN条带(ODN leash)退火并用Lipofectamine 3000(如上)递送,或iii)根据制造商的说明书使用P2原代细胞4-D NucleofectorX试剂盒S(Lonza)进行核转染。

[0219] 用MagMax RNA提取系统(Life Technologies)从转染细胞和对照细胞中提取总RNA。首先用半定量RT-PCR评估目的转录本,然后用qRT-PCR进行评估。按照制造商的说明书,使用SuperScript IV逆转录酶试剂盒(Life Technologies)合成cDNA(RNA 300ng)。按照制造商的说明书,用LA Taq DNA聚合酶和GC缓冲液I(TAKARA)进行RT-PCR。

[0220] 在用CNOT3外显子跳跃A0转染细胞后,使用三个不同的引物组来评估CNOT3转录本:

[0221] 1.对于靶向外显子3的A0,与外显子2退火的正向引物与外显子6中的反向引物配对。

[0222] 2.对于靶向外显子8和9的A0,外显子7中的正向引物与外显子11反向引物配对。

[0223] 3.对于靶向外显子16和17的A0,外显子15中的正向引物与外显子18中的反向引物配对。

[0224] 使用qRT-PCR来定量用CNOT3外显子跳跃A0转染后PRPF31的转录水平。穿过PRPF31外显子2和3连接的正向引物与穿过外显子3和4连接的反向引物配对(表2)。将所有CNOT3 A0处理的细胞的结果相对于两种管家基因TBP和GAPDH的表达进行归一化,并与抗ISS-N1和假A0处理的细胞进行比较,以计算PRPF31转录本的倍数变化。

[0225] 表2:CNOT3、PRPF31和管家基因TBP和GAPDH的RT-PCR和qRT-PCR引物。

SEQ ID NO	基因	引物名称	引物序列 5'-3'	浓度	分析
75	CNOT3	外显子 2 正向	GAAGATGGCGGACAAGC GCAA	50 nM	RT-PCR
[0226] 76	CNOT3	外显子 6 反向	CTGGCCAACCTCTTCCTTC TC	50 nM	RT-PCR
77	CNOT3	外显子 7 正向	CTGTCAGTGCAGACACGC AA	50 nM	RT-PCR
78	CNOT3	外显子 11 反向	GGACAGGCTGGAGCCGTT	50 nM	RT-PCR

[0227]

			T		
79	<i>CNOT3</i>	外显子 15 正向	CATCCTGAGCAGTACATC AGC	50 nM	RT-PCR
80	<i>CNOT3</i>	外显子 18 反向	CTCCAGGTAGCGGTACTC AA	50 nM	RT-PCR
81	<i>PRPF31</i>	外显子 2/3 正向	GGGATAGTAAGATGTTTG CTGAG	250 nM	qRT-PCR
82	<i>PRPF31</i>	外显子 3/4 反向	GTCCCATCACTTCTGAAG CTTTGG	250 nM	qRT-PCR
83	<i>TBP</i>	F	TCAGGCGTTCGGTGGATC GAGT	500 nM	qRT-PCR
84	<i>TBP</i>	R	AGTGATGCTGGGCACTGC GGAGAA	500 nM	qRT-PCR
85	<i>GAPDH</i>	F	ACAGTCAGCCGCATCTTC TT	250 nM	qRT-PCR
86	<i>GAPDH</i>	R	AGGGGTCTACATGGCAAC TG	250 nM	qRT-PCR
87	<i>CNOT3</i>	外显子 10 正向	GACGTTCCACAGACAGTG AAG		
88	<i>CNOT3</i>	外显子 8 反向	GTGGTAGCGGTGCTTCTC GATG		
89	<i>CNOT3</i>	3_5'UTR 正向	TATATTCGGGACTCGGGG G		

[0228] 对诱导的(较小的)CNOT3转录产物进行测序,对来自诱导的外显子跳跃的结果的预测表明,A0 3697和3698介导外显子3跳跃,A0 3702介导外显子8的部分和完全跳跃,A0 3703介导剂量依赖性外显子8跳跃(数据未显示)。然后将有效介导CNOT3外显子3、8或9跳跃的A0转染到RP患者成纤维细胞48小时,并用RT-PCR分析CNOT3转录物(图2)。转染后48小时,CNOT3外显子跳跃明显,全长转录产物水平有所下降。通过A0 3697排除了外显子3,通过A0 3702和3703跳过了外显子8,通过A0 3706跳过了外显子9。

[0229] 先前已经表明,磷酸二胺吗啉代(PMO)化学比作为2'-O-甲基PS化学合成的相同序列更有效地介导剪接修饰。因此,用于CNOT3转录物敲低的最有前景的A0序列将被合成为PMO,并以未复合、使用条带(leash)/脂质复合物、或通过核转染(Nucleofector, Lonza)的方式转染到正常成纤维细胞中。靶向CNOT3的A0序列的评估和优化正在进行。

[0230] SH-SY5Y细胞常用作神经元功能和分化的体外模型。它们是肾上腺素能表型,但也表达多巴胺能标志物。将在分化的SH-SY5Y细胞中评估在成纤维细胞中修饰CNOT3转录本的A0下调CNOT3和增加PRPF31表达(转录本和蛋白)的能力。

[0231] 实施例2

[0232] A0介导末端内含子保留以敲低CNOT3

[0233] 设计反义序列以靶向CNOT3末端外显子,以诱导CNOT3末端内含子的保留和CNOT3的敲低。

[0234] 将靶向CNOT3末端外显子的2' 0'-甲基A0转染adRP11患者成纤维细胞48小时。对CNOT3转录本的RT-PCR分析显示A0 3887、3888和3889(表1)以剂量依赖性方式诱导末端内含子保留和全长转录产物水平降低(图3)。

[0235] 实施例3

[0236] 招募和审查具有RP的家族

[0237] 在WA的2个家族(1个白种人和1个土著人)中检测了3代的PRPF31突变(图4)。从7名患者中获得了真皮成纤维细胞,并开始监测这些家族中24名受影响个体中的10名患者的疾病进展。

[0238] 表3:鉴定的RP11引起的突变和具有每个确认突变的相应患者数量(来自澳大利亚遗传性视网膜疾病登记截至2018年的信息)。

[0239]	突变	蛋白质变化	表型	受影响人数(状态)
	PRPF31.1205C>A	Ser402*	显性RP	9(WA)
	PRPF31.267delA	Glu89Aspfs	显性RP	8(WA, Vic)
	PRPF31.527+3A>G	N/A:SPLICE	显性RP	3(NSW)
	PRPF31.319C>G	Leu107Val	显性RP	1(SA)
	PRPF31.527+1G>T	N/A:SPLICE	显性RP	1(WA)
	PRPF31.1289_1290insA	X	显性RP	1(SA)

[0240] 实施例4

[0241] 从RP11患者和对照成纤维细胞产生诱导的多能干细胞并评估由CNOT3敲低导致的基因表达

[0242] 诱导的多能干细胞将从患者和对照成纤维细胞产生。使用NEON®电穿孔系统,用重编程的游离体(ThermoFisher®)转染患者的成纤维细胞。在典型的重编程实验中,在转染后3-4周采集12-15个iPSC样克隆并传代培养,以通过免疫染色和RT-PCR分析来评估多能基因表达(图5A-C)。然后选择三个克隆进行另外的测试,包括通过TaqMan阵列(人干细胞多能性阵列, ThermoFisher)进行基因表达谱分析,以及通过采用QuantiSNP分析(AGRF)的染色体G带分析进行虚拟核型分析。

[0243] 为了证明三系分化潜能,将iPSC作为胚状体培养2-4周,并用RT-PCR检测外胚层、中胚层和内胚层分化标志物的表达,以及多能性标志物的下调(图5C)。使用CIF公布的方案将iPSC分化为视网膜器官(Mellough et al., Efficient stage-specific differentiation of human pluripotent stem cells toward retinal photoreceptor cells. Stem Cells, 2012.30(4):p.673-86.) (图5D-H)。

[0244] 用合成为吗啉代化合物的前导CNOT3靶向A0转染分化的细胞,每次分析一式三份。

[0245] 分析CNOT3、PRPF31和其他剪接因子转录本。通过Western印迹和免疫荧光评估CNOT3、PRPF31和选择的paraspeckle蛋白和剪接因子,以反映剪接机制和途径的完整性。

[0246] 实施例5

[0247] A0的剂量依赖性试验

[0248] A0序列被设计成跳过CNOT3信使RNA的选定外显子,并在与阳离子脂质体复合后以2' O-甲基硫代磷酸酯A0的形式转染至成纤维细胞以获得高效转染。靶外显子的跳跃导致缩短的信使RNA RT-PCR产物,其通过在2%琼脂糖凝胶上对产物进行分离和染色来鉴定(图6和7)。

[0249] 优选序列显示剂量依赖性靶外显子跳跃。然后将前导序列合成为磷酸二胺吗啉代寡聚体(PPMO),以用于通过转染至患者成纤维细胞来进行测试。

[0250] RP11患者的PRPF31水平约为健康人群的50%。在RP11家族成员和健康对照中,通过逆转录定量PCR(qRT-PCR)对CNOT3和PRPF31的信使RNA进行定量。图8a显示,在杂合性PRPF31突变携带者中,较高的CNOT3表达与PRPF31减少和临床结果相关。靶CNOT3外显子的跳跃通过qRT-PCR(图8b,8c)进行评估,并且A0处理后的PRPF31表达相对于用对照A0序列(对照A025nM转染值设置为1)处理的细胞中的表达进行显示,该对照A0序列不靶向健康人基因组的任何区域(无预期效果-阴性对照)。包括来自未处理细胞的数据以供比较。

[0251] RP11患者的PRPF31水平约为健康人群的50%,而无症状的PRPF31突变携带者的水平至少为健康水平的70%或更高。预期PRPF31表达增加1.5倍(如图8b的CNOT3外显子3或10跳跃,和图8c的CNOT3外显子9、16或17跳跃)拯救了RP11视网膜色素上皮细胞中的剪接功能。

[0252] 实施例6

[0253] 反义寡聚体介导的CNOT3外显子跳跃上调RP11患者iPSC衍生的视网膜色素上皮细胞(RPE)中PRPF31的表达并拯救原纤毛长度和数量

[0254] 将AS06(SEQ ID NO:64,CNOT3_H17A(+83+107),靶向CNOT3外显子17)合成为磷酸二胺吗啉代寡聚体(PMO),并使用5uM的AS0通过直接转染而转染至RP11iPSC衍生的RPE。

[0255] 免疫细胞化学用于对采用或未采用翻译寡聚体处理的野生型和RP11RPE的纤毛和基体进行免疫染色。

[0256] 纤毛免疫染色方案

[0257] 将载玻片上的RPE细胞用冰冷的丙酮-甲醇(1:1)固定4分钟,然后风干。在含10%过滤的山羊血清的PBS中封闭细胞30分钟。对于基体染色,将细胞与小鼠抗中心粒周蛋白抗体(1:100)在室温下孵育1小时。用AlexaFluoro488抗小鼠(1:400)检测一抗。对于纤毛染色,将细胞与兔抗ARL13B抗体(1:500)在4°C下孵育过夜。用AlexaFluoro568抗兔(1:400)在室温下检测二抗1小时,用Hoechst复染以检测细胞核(稀释度1:125)。用延长金抗褪色介质将盖玻片固定在载玻片上。

[0258] 共聚焦分析与定量

[0259] 用共聚焦显微镜检查RPE的原纤毛以评估PRPF31的功能。用NIS原件成像软件测量约300个RPE细胞/样品的纤毛长度。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 视觉制药私人有限公司
- [0003] <120> 视网膜色素变性的新治疗方法
- [0004] <130> <http://WRA-110.US>
- [0005] <140> US 17/614495
- [0006] <141> 2021-11-26
- [0007] <150> PCT/AU20/50516
- [0008] <151> 2020-05-25
- [0009] <150> AU 2019901804
- [0010] <151> 2019-05-27
- [0011] <150> AU 2019903812
- [0012] <151> 2019-10-10
- [0013] <160> 89
- [0014] <170> PatentIn 版本 3.5
- [0015] <210> 1
- [0016] <211> 25
- [0017] <212> RNA
- [0018] <213> 人工序列
- [0019] <220>
- [0020] <223> 反义寡核苷酸
- [0021] <400> 1
- [0022] acucucuugg agacggacgc ugcua 25
- [0023] <210> 2
- [0024] <211> 25
- [0025] <212> RNA
- [0026] <213> 人工序列
- [0027] <220>
- [0028] <223> 反义寡核苷酸
- [0029] <400> 2
- [0030] aucuucccug cccuacagac gcacu 25
- [0031] <210> 3
- [0032] <211> 25
- [0033] <212> RNA
- [0034] <213> 人工序列
- [0035] <220>
- [0036] <223> 反义寡核苷酸
- [0037] <400> 3
- [0038] guaccuugga guuugcgcuu guccg 25

[0039]	<210> 4
[0040]	<211> 25
[0041]	<212> RNA
[0042]	<213> 人工序列
[0043]	<220>
[0044]	<223> 反义寡核苷酸
[0045]	<400> 4
[0046]	cggacaccuu cuugaggcag cgauc 25
[0047]	<210> 5
[0048]	<211> 25
[0049]	<212> RNA
[0050]	<213> 人工序列
[0051]	<220>
[0052]	<223> 反义寡核苷酸
[0053]	<400> 5
[0054]	gccaaauauc uucaaacugc uccac 25
[0055]	<210> 6
[0056]	<211> 25
[0057]	<212> RNA
[0058]	<213> 人工序列
[0059]	<220>
[0060]	<223> 反义寡核苷酸
[0061]	<400> 6
[0062]	uuggcugcau uguggagcug aggga 25
[0063]	<210> 7
[0064]	<211> 25
[0065]	<212> RNA
[0066]	<213> 人工序列
[0067]	<220>
[0068]	<223> 反义寡核苷酸
[0069]	<400> 7
[0070]	cuuuucuuuc ugguucgcgu ugguu 25
[0071]	<210> 8
[0072]	<211> 25
[0073]	<212> RNA
[0074]	<213> 人工序列
[0075]	<220>
[0076]	<223> 反义寡核苷酸
[0077]	<400> 8

[0078] aucuccuucu uuaggucagc cucau 25
[0079] <210> 9
[0080] <211> 25
[0081] <212> RNA
[0082] <213> 人工序列
[0083] <220>
[0084] <223> 反义寡核苷酸
[0085] <400> 9
[0086] cagccccuc acuuguagcu ucuua 25
[0087] <210> 10
[0088] <211> 25
[0089] <212> RNA
[0090] <213> 人工序列
[0091] <220>
[0092] <223> 反义寡核苷酸
[0093] <400> 10
[0094] uuuggucccu cagccgcugc agaug 25
[0095] <210> 11
[0096] <211> 25
[0097] <212> RNA
[0098] <213> 人工序列
[0099] <220>
[0100] <223> 反义寡核苷酸
[0101] <400> 11
[0102] cugccucuug uccuugaucu cguug 25
[0103] <210> 12
[0104] <211> 25
[0105] <212> RNA
[0106] <213> 人工序列
[0107] <220>
[0108] <223> 反义寡核苷酸
[0109] <400> 12
[0110] uugcgguugu cuauaagcug ccucu 25
[0111] <210> 13
[0112] <211> 25
[0113] <212> RNA
[0114] <213> 人工序列
[0115] <220>
[0116] <223> 反义寡核苷酸

[0117]	<400> 13
[0118]	cugggcuccu accgucucaa ugagc 25
[0119]	<210> 14
[0120]	<211> 25
[0121]	<212> RNA
[0122]	<213> 人工序列
[0123]	<220>
[0124]	<223> 反义寡核苷酸
[0125]	<400> 14
[0126]	acuuugaacc guuccauuug cugua 25
[0127]	<210> 15
[0128]	<211> 25
[0129]	<212> RNA
[0130]	<213> 人工序列
[0131]	<220>
[0132]	<223> 反义寡核苷酸
[0133]	<400> 15
[0134]	ggucucucgu uccacaacuu ugaac 25
[0135]	<210> 16
[0136]	<211> 25
[0137]	<212> RNA
[0138]	<213> 人工序列
[0139]	<220>
[0140]	<223> 反义寡核苷酸
[0141]	<400> 16
[0142]	ccucuuugcu guaagcuuug guuuu 25
[0143]	<210> 17
[0144]	<211> 25
[0145]	<212> RNA
[0146]	<213> 人工序列
[0147]	<220>
[0148]	<223> 反义寡核苷酸
[0149]	<400> 17
[0150]	accucuuccu ucuccuucug ggcag 25
[0151]	<210> 18
[0152]	<211> 25
[0153]	<212> RNA
[0154]	<213> 人工序列
[0155]	<220>

[0156] <223> 反义寡核苷酸
[0157] <400> 18
[0158] cccaacucac cgugagccac uggcc 25
[0159] <210> 19
[0160] <211> 25
[0161] <212> RNA
[0162] <213> 人工序列
[0163] <220>
[0164] <223> 反义寡核苷酸
[0165] <400> 19
[0166] ugagcguguc gaugguauuc uaggg 25
[0167] <210> 20
[0168] <211> 25
[0169] <212> RNA
[0170] <213> 人工序列
[0171] <220>
[0172] <223> 反义寡核苷酸
[0173] <400> 20
[0174] caaacugguc caccugcaug uugag 25
[0175] <210> 21
[0176] <211> 25
[0177] <212> RNA
[0178] <213> 人工序列
[0179] <220>
[0180] <223> 反义寡核苷酸
[0181] <400> 21
[0182] cccuucuucu ugcgugucug cacug 25
[0183] <210> 22
[0184] <211> 25
[0185] <212> RNA
[0186] <213> 人工序列
[0187] <220>
[0188] <223> 反义寡核苷酸
[0189] <400> 22
[0190] ccucacucac auccuugueg cccuu 25
[0191] <210> 23
[0192] <211> 25
[0193] <212> DNA
[0194] <213> 人工序列

[0195]	<220>
[0196]	<223> 反义寡核苷酸
[0197]	<400> 23
[0198]	ccgcttcaag ccctcgccca gggcc 25
[0199]	<210> 24
[0200]	<211> 24
[0201]	<212> RNA
[0202]	<213> 人工序列
[0203]	<220>
[0204]	<223> 反义寡核苷酸
[0205]	<400> 24
[0206]	gugguagcgg ugcuuucuga ugug 24
[0207]	<210> 25
[0208]	<211> 25
[0209]	<212> RNA
[0210]	<213> 人工序列
[0211]	<220>
[0212]	<223> 反义寡核苷酸
[0213]	<400> 25
[0214]	uggucucuag caugcgcacg uggua 25
[0215]	<210> 26
[0216]	<211> 25
[0217]	<212> RNA
[0218]	<213> 人工序列
[0219]	<220>
[0220]	<223> 反义寡核苷酸
[0221]	<400> 26
[0222]	ggcgucaacg aggauggagu cauug 25
[0223]	<210> 27
[0224]	<211> 25
[0225]	<212> RNA
[0226]	<213> 人工序列
[0227]	<220>
[0228]	<223> 反义寡核苷酸
[0229]	<400> 27
[0230]	cuccucgaag ucgggguccu gggau 25
[0231]	<210> 28
[0232]	<211> 25
[0233]	<212> RNA

- [0234] <213> 人工序列
[0235] <220>
[0236] <223> 反义寡核苷酸
[0237] <400> 28
[0238] guggcgacca gcgccugugc ugugg 25
[0239] <210> 29
[0240] <211> 25
[0241] <212> RNA
[0242] <213> 人工序列
[0243] <220>
[0244] <223> 反义寡核苷酸
[0245] <400> 29
[0246] cucauccucc auguggcugu ggcug 25
[0247] <210> 30
[0248] <211> 25
[0249] <212> RNA
[0250] <213> 人工序列
[0251] <220>
[0252] <223> 反义寡核苷酸
[0253] <400> 30
[0254] gggcgugcug cuggacuggu ugaag 25
[0255] <210> 31
[0256] <211> 25
[0257] <212> RNA
[0258] <213> 人工序列
[0259] <220>
[0260] <223> 反义寡核苷酸
[0261] <400> 31
[0262] ggcugggcug ggcgggaugg gagag 25
[0263] <210> 32
[0264] <211> 25
[0265] <212> RNA
[0266] <213> 人工序列
[0267] <220>
[0268] <223> 反义寡核苷酸
[0269] <400> 32
[0270] gugcugcugg acugguugaa gaucu 25
[0271] <210> 33
[0272] <211> 25

[0273]	<212> RNA
[0274]	<213> 人工序列
[0275]	<220>
[0276]	<223> 反义寡核苷酸
[0277]	<400> 33
[0278]	aucuucagag uuuuccugag guagg 25
[0279]	<210> 34
[0280]	<211> 25
[0281]	<212> RNA
[0282]	<213> 人工序列
[0283]	<220>
[0284]	<223> 反义寡核苷酸
[0285]	<400> 34
[0286]	cuguggaacg uccccucuuc uuau 25
[0287]	<210> 35
[0288]	<211> 25
[0289]	<212> RNA
[0290]	<213> 人工序列
[0291]	<220>
[0292]	<223> 反义寡核苷酸
[0293]	<400> 35
[0294]	ucacaccac cuggcugacu ucacu 25
[0295]	<210> 36
[0296]	<211> 25
[0297]	<212> RNA
[0298]	<213> 人工序列
[0299]	<220>
[0300]	<223> 反义寡核苷酸
[0301]	<400> 36
[0302]	aggugggcgg cacagcuggg gacug 25
[0303]	<210> 37
[0304]	<211> 25
[0305]	<212> RNA
[0306]	<213> 人工序列
[0307]	<220>
[0308]	<223> 反义寡核苷酸
[0309]	<400> 37
[0310]	gagggguagg ugggcggcac agcug 25
[0311]	<210> 38

[0312]	<211> 25
[0313]	<212> RNA
[0314]	<213> 人工序列
[0315]	<220>
[0316]	<223> 反义寡核苷酸
[0317]	<400> 38
[0318]	gcagcaggcg gggggccgga ggggu 25
[0319]	<210> 39
[0320]	<211> 25
[0321]	<212> RNA
[0322]	<213> 人工序列
[0323]	<220>
[0324]	<223> 反义寡核苷酸
[0325]	<400> 39
[0326]	ccguuuuugg cuggagacug cgggu 25
[0327]	<210> 40
[0328]	<211> 25
[0329]	<212> RNA
[0330]	<213> 人工序列
[0331]	<220>
[0332]	<223> 反义寡核苷酸
[0333]	<400> 40
[0334]	guggcuggga gcuggacugg ccuug 25
[0335]	<210> 41
[0336]	<211> 25
[0337]	<212> RNA
[0338]	<213> 人工序列
[0339]	<220>
[0340]	<223> 反义寡核苷酸
[0341]	<400> 41
[0342]	cugucugcca caacugagcu guaac 25
[0343]	<210> 42
[0344]	<211> 25
[0345]	<212> RNA
[0346]	<213> 人工序列
[0347]	<220>
[0348]	<223> 反义寡核苷酸
[0349]	<400> 42
[0350]	ggguuguggg ggccggaagg ggggc 25

[0351]	<210> 43
[0352]	<211> 25
[0353]	<212> RNA
[0354]	<213> 人工序列
[0355]	<220>
[0356]	<223> 反义寡核苷酸
[0357]	<400> 43
[0358]	acucacgagg ugcugggagg ugggu 25
[0359]	<210> 44
[0360]	<211> 25
[0361]	<212> RNA
[0362]	<213> 人工序列
[0363]	<220>
[0364]	<223> 反义寡核苷酸
[0365]	<400> 44
[0366]	ugccgcacug gguuccuucc uggag 25
[0367]	<210> 45
[0368]	<211> 25
[0369]	<212> RNA
[0370]	<213> 人工序列
[0371]	<220>
[0372]	<223> 反义寡核苷酸
[0373]	<400> 45
[0374]	uguucccuga gccuggggcc acgcc 25
[0375]	<210> 46
[0376]	<211> 25
[0377]	<212> RNA
[0378]	<213> 人工序列
[0379]	<220>
[0380]	<223> 反义寡核苷酸
[0381]	<400> 46
[0382]	gaggauucac aggcaguggc accag 25
[0383]	<210> 47
[0384]	<211> 25
[0385]	<212> RNA
[0386]	<213> 人工序列
[0387]	<220>
[0388]	<223> 反义寡核苷酸
[0389]	<400> 47

[0390] cucagaggcu caggggccug gggag 25
[0391] <210> 48
[0392] <211> 25
[0393] <212> RNA
[0394] <213> 人工序列
[0395] <220>
[0396] <223> 反义寡核苷酸
[0397] <400> 48
[0398] aggguccuca augccagagc ugaug 25
[0399] <210> 49
[0400] <211> 25
[0401] <212> RNA
[0402] <213> 人工序列
[0403] <220>
[0404] <223> 反义寡核苷酸
[0405] <400> 49
[0406] gcauguggug ccaggcggcc ucuuc 25
[0407] <210> 50
[0408] <211> 25
[0409] <212> RNA
[0410] <213> 人工序列
[0411] <220>
[0412] <223> 反义寡核苷酸
[0413] <400> 50
[0414] gaggggugag gcauguggug ccagg 25
[0415] <210> 51
[0416] <211> 25
[0417] <212> RNA
[0418] <213> 人工序列
[0419] <220>
[0420] <223> 反义寡核苷酸
[0421] <400> 51
[0422] cgaauacgcu cagagucaga ggggu 25
[0423] <210> 52
[0424] <211> 25
[0425] <212> RNA
[0426] <213> 人工序列
[0427] <220>
[0428] <223> 反义寡核苷酸

[0429]	<400> 52
[0430]	gcucaggaug augucugugg ggagg 25
[0431]	<210> 53
[0432]	<211> 25
[0433]	<212> RNA
[0434]	<213> 人工序列
[0435]	<220>
[0436]	<223> 反义寡核苷酸
[0437]	<400> 53
[0438]	aggugcugau guacugcuca ggaug 25
[0439]	<210> 54
[0440]	<211> 25
[0441]	<212> RNA
[0442]	<213> 人工序列
[0443]	<220>
[0444]	<223> 反义寡核苷酸
[0445]	<400> 54
[0446]	ccucugacag cugcaggggc ggcug 25
[0447]	<210> 55
[0448]	<211> 25
[0449]	<212> RNA
[0450]	<213> 人工序列
[0451]	<220>
[0452]	<223> 反义寡核苷酸
[0453]	<400> 55
[0454]	ccauggacag acaccagcg acagc 25
[0455]	<210> 56
[0456]	<211> 25
[0457]	<212> RNA
[0458]	<213> 人工序列
[0459]	<220>
[0460]	<223> 反义寡核苷酸
[0461]	<400> 56
[0462]	agagcugcuc cuuggugagg ggcac 25
[0463]	<210> 57
[0464]	<211> 25
[0465]	<212> RNA
[0466]	<213> 人工序列
[0467]	<220>

[0468]	<223> 反义寡核苷酸
[0469]	<400> 57
[0470]	agucagaggg gugaggcaug uggug 25
[0471]	<210> 58
[0472]	<211> 25
[0473]	<212> RNA
[0474]	<213> 人工序列
[0475]	<220>
[0476]	<223> 反义寡核苷酸
[0477]	<400> 58
[0478]	gggggaggua cugccuguga gagca 25
[0479]	<210> 59
[0480]	<211> 22
[0481]	<212> RNA
[0482]	<213> 人工序列
[0483]	<220>
[0484]	<223> 反义寡核苷酸
[0485]	<400> 59
[0486]	gguggcaucu ggugguggua gg 22
[0487]	<210> 60
[0488]	<211> 25
[0489]	<212> RNA
[0490]	<213> 人工序列
[0491]	<220>
[0492]	<223> 反义寡核苷酸
[0493]	<400> 60
[0494]	cuccagauag uagaauga agaag 25
[0495]	<210> 61
[0496]	<211> 25
[0497]	<212> RNA
[0498]	<213> 人工序列
[0499]	<220>
[0500]	<223> 反义寡核苷酸
[0501]	<400> 61
[0502]	gccaugacug cuucuuuagg gccuu 25
[0503]	<210> 62
[0504]	<400> 62
[0505]	000
[0506]	<210> 63

[0507]	<211> 25
[0508]	<212> RNA
[0509]	<213> 人工序列
[0510]	<220>
[0511]	<223> 反义寡核苷酸
[0512]	<400> 63
[0513]	gaaccacauc auguacuugg ugugg 25
[0514]	<210> 64
[0515]	<211> 25
[0516]	<212> RNA
[0517]	<213> 人工序列
[0518]	<220>
[0519]	<223> 反义寡核苷酸
[0520]	<400> 64
[0521]	auggucuugg gcuccucgug ccucu 25
[0522]	<210> 65
[0523]	<211> 25
[0524]	<212> RNA
[0525]	<213> 人工序列
[0526]	<220>
[0527]	<223> 反义寡核苷酸
[0528]	<400> 65
[0529]	cuugggcucc ucgugccucu ggaac 25
[0530]	<210> 66
[0531]	<211> 25
[0532]	<212> RNA
[0533]	<213> 人工序列
[0534]	<220>
[0535]	<223> 反义寡核苷酸
[0536]	<400> 66
[0537]	cagugauggu cuugggcucc ucgug 25
[0538]	<210> 67
[0539]	<211> 25
[0540]	<212> RNA
[0541]	<213> 人工序列
[0542]	<220>
[0543]	<223> 反义寡核苷酸
[0544]	<400> 67
[0545]	cugcucaaac ucgucaguga ugguc 25

[0546]	<210> 68
[0547]	<211> 25
[0548]	<212> RNA
[0549]	<213> 人工序列
[0550]	<220>
[0551]	<223> 反义寡核苷酸
[0552]	<400> 68
[0553]	guagauguag gugcccuggc cgggg 25
[0554]	<210> 69
[0555]	<211> 25
[0556]	<212> RNA
[0557]	<213> 人工序列
[0558]	<220>
[0559]	<223> 反义寡核苷酸
[0560]	<400> 69
[0561]	gcuggcccca cuucucguag ucaaa 25
[0562]	<210> 70
[0563]	<211> 25
[0564]	<212> RNA
[0565]	<213> 人工序列
[0566]	<220>
[0567]	<223> 反义寡核苷酸
[0568]	<400> 70
[0569]	ucaaagguga agccuuccuu cuucc 25
[0570]	<210> 71
[0571]	<211> 25
[0572]	<212> RNA
[0573]	<213> 人工序列
[0574]	<220>
[0575]	<223> 反义寡核苷酸
[0576]	<400> 71
[0577]	gucccggucc uccagguagc gguac 25
[0578]	<210> 72
[0579]	<211> 25
[0580]	<212> RNA
[0581]	<213> 人工序列
[0582]	<220>
[0583]	<223> 反义寡核苷酸
[0584]	<400> 72

[0585] ggggaggugg cgaccagcgc cugug 25
[0586] <210> 73
[0587] <211> 25
[0588] <212> RNA
[0589] <213> 人工序列
[0590] <220>
[0591] <223> 反义寡核苷酸
[0592] <400> 73
[0593] uccucgugcc ucuggaacca cauca 25
[0594] <210> 74
[0595] <211> 25
[0596] <212> RNA
[0597] <213> 人工序列
[0598] <220>
[0599] <223> 反义寡核苷酸
[0600] <400> 74
[0601] gggcccucac cugcucaaac ucguc 25
[0602] <210> 75
[0603] <211> 21
[0604] <212> DNA
[0605] <213> 人工序列
[0606] <220>
[0607] <223> 引物
[0608] <400> 75
[0609] gaagatggcg gacaagcgca a 21
[0610] <210> 76
[0611] <211> 21
[0612] <212> DNA
[0613] <213> 人工序列
[0614] <220>
[0615] <223> 引物
[0616] <400> 76
[0617] ctggccaacc tcttccttct c 21
[0618] <210> 77
[0619] <211> 20
[0620] <212> DNA
[0621] <213> 人工序列
[0622] <220>
[0623] <223> 引物

[0624]	<400> 77
[0625]	ctgtcagtgc agacacgcaa 20
[0626]	<210> 78
[0627]	<211> 19
[0628]	<212> DNA
[0629]	<213> 人工序列
[0630]	<220>
[0631]	<223> 引物
[0632]	<400> 78
[0633]	ggacaggctg gagccgttt 19
[0634]	<210> 79
[0635]	<211> 21
[0636]	<212> DNA
[0637]	<213> 人工序列
[0638]	<220>
[0639]	<223> 引物
[0640]	<400> 79
[0641]	catcctgagc agtacatcag c 21
[0642]	<210> 80
[0643]	<211> 20
[0644]	<212> DNA
[0645]	<213> 人工序列
[0646]	<220>
[0647]	<223> 引物
[0648]	<400> 80
[0649]	ctccaggtag cgggtactcaa 20
[0650]	<210> 81
[0651]	<211> 23
[0652]	<212> DNA
[0653]	<213> 人工序列
[0654]	<220>
[0655]	<223> 引物
[0656]	<400> 81
[0657]	gggatagtaa gatgtttgct gag 23
[0658]	<210> 82
[0659]	<211> 24
[0660]	<212> DNA
[0661]	<213> 人工序列
[0662]	<220>

[0663] <223> 引物
[0664] <400> 82
[0665] gtcccatcac ttctgaagct ttgg 24
[0666] <210> 83
[0667] <211> 22
[0668] <212> DNA
[0669] <213> 人工序列
[0670] <220>
[0671] <223> 引物
[0672] <400> 83
[0673] tcaggcgttc ggtggatcga gt 22
[0674] <210> 84
[0675] <211> 24
[0676] <212> DNA
[0677] <213> 人工序列
[0678] <220>
[0679] <223> 引物
[0680] <400> 84
[0681] agtgatgctg ggcactgcgg agaa 24
[0682] <210> 85
[0683] <211> 20
[0684] <212> DNA
[0685] <213> 人工序列
[0686] <220>
[0687] <223> 引物
[0688] <400> 85
[0689] acagtcagcc gcatcttctt 20
[0690] <210> 86
[0691] <211> 20
[0692] <212> DNA
[0693] <213> 人工序列
[0694] <220>
[0695] <223> 引物
[0696] <400> 86
[0697] aggggtctac atggcaactg 20
[0698] <210> 87
[0699] <211> 21
[0700] <212> DNA
[0701] <213> 人工序列

-
- [0702] <220>
[0703] <223> 引物
[0704] <400> 87
[0705] gacgttccac agacagtgaa g 21
[0706] <210> 88
[0707] <211> 22
[0708] <212> DNA
[0709] <213> 人工序列
[0710] <220>
[0711] <223> 引物
[0712] <400> 88
[0713] gtggtagcgg tgcttctcga tg 22
[0714] <210> 89
[0715] <211> 19
[0716] <212> DNA
[0717] <213> 人工序列
[0718] <220>
[0719] <223> 引物
[0720] <400> 89
[0721] tatattcggg actcggggg 19

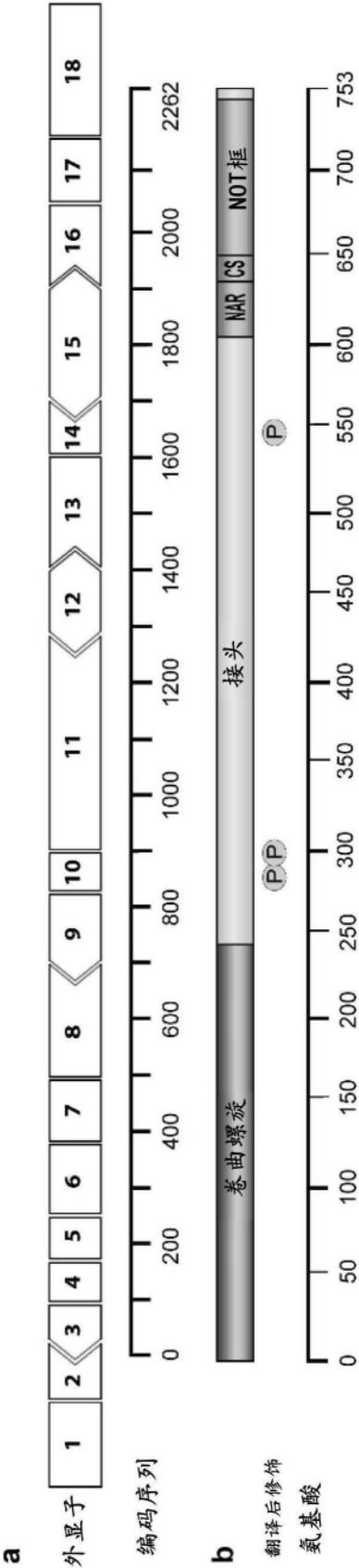


图1

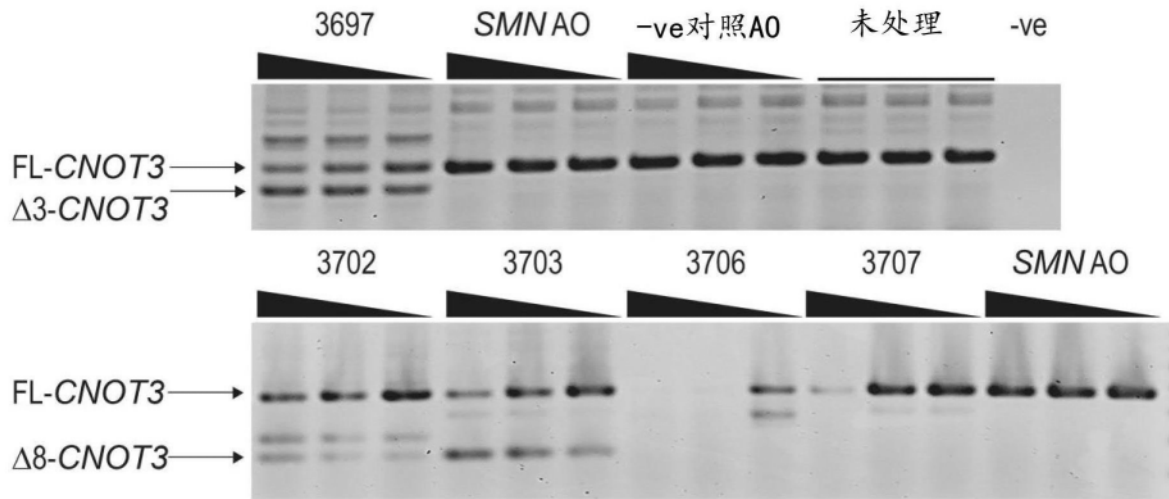


图2A

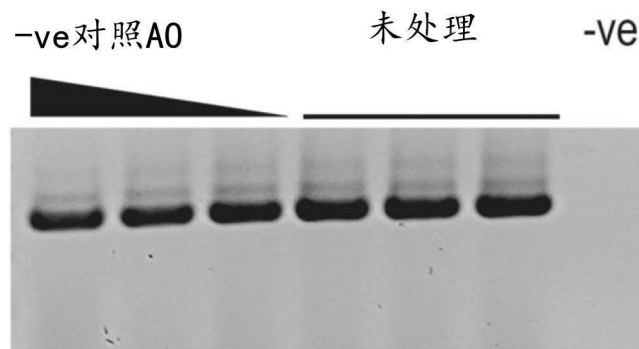


图2B

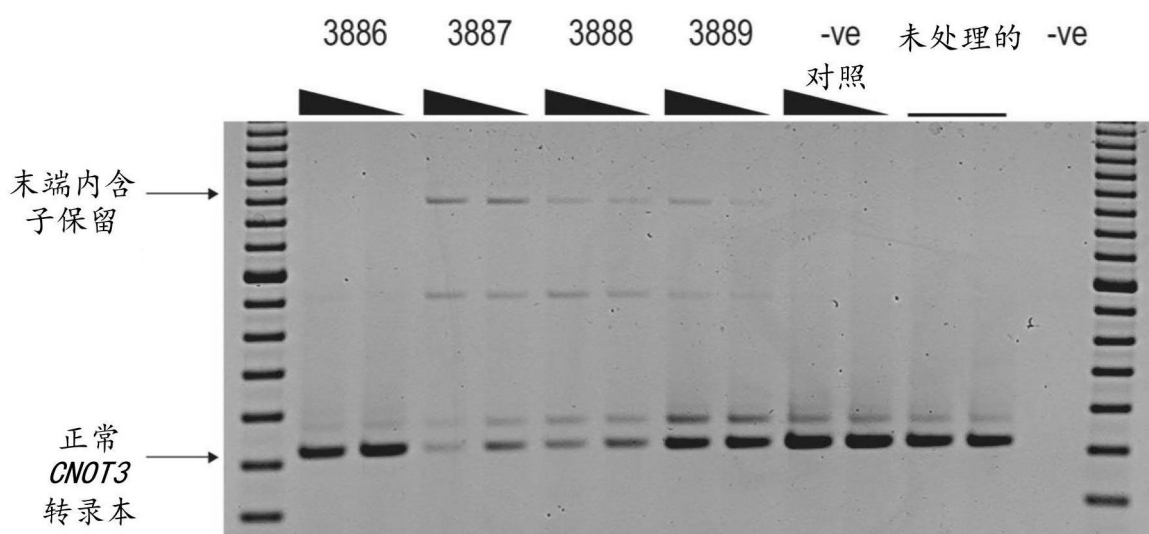


图3

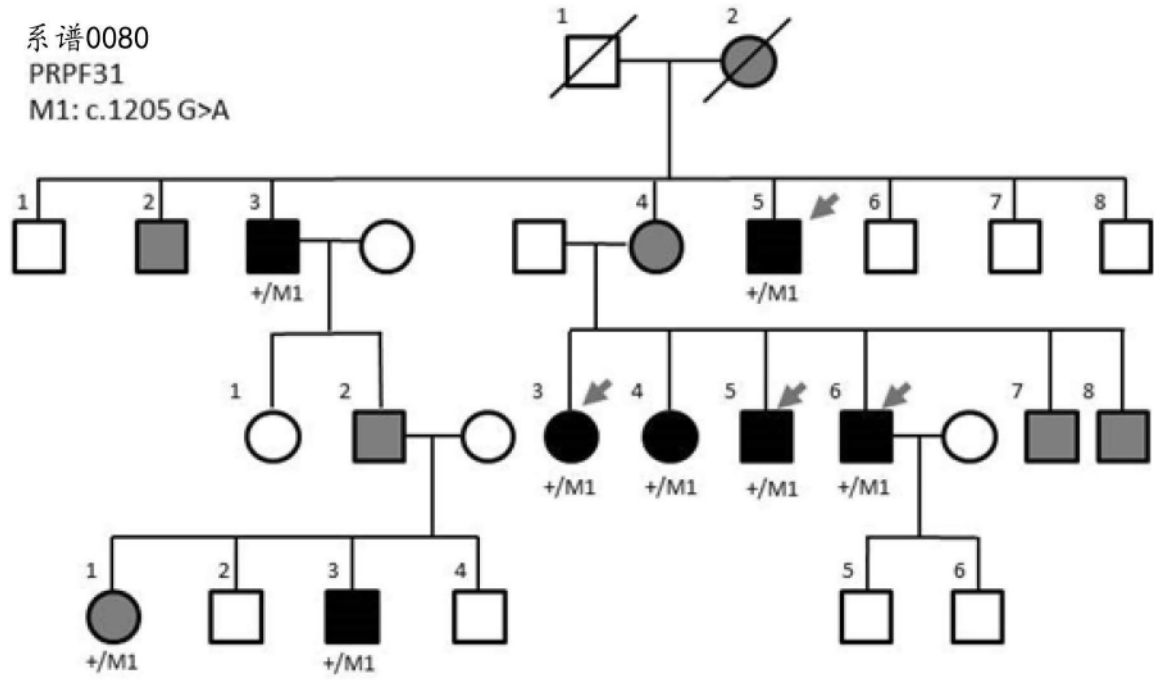


图4A

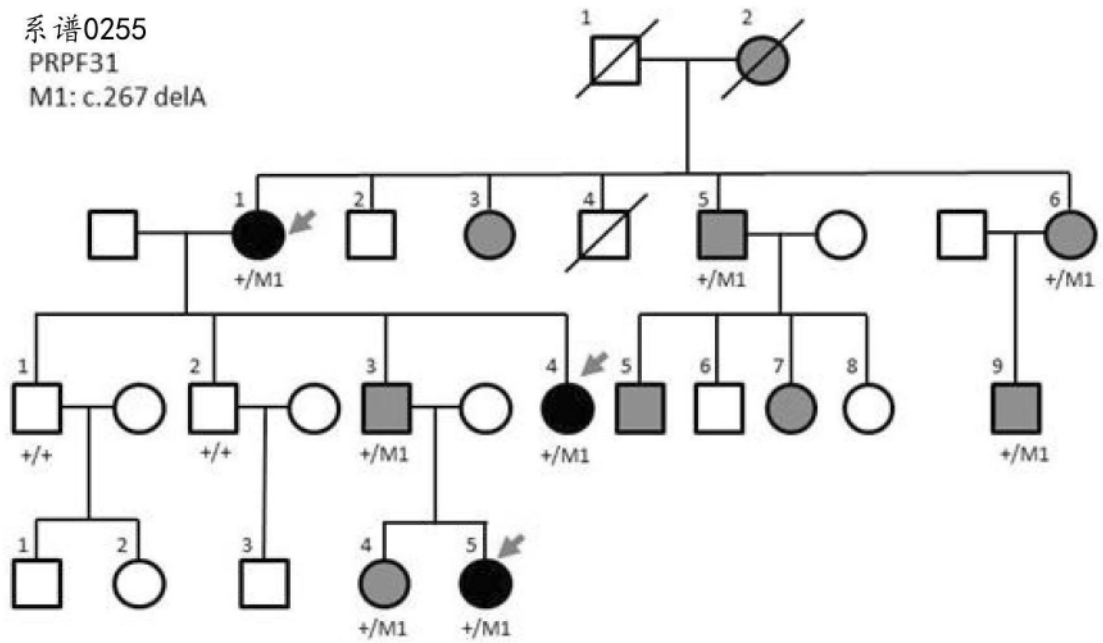


图4B

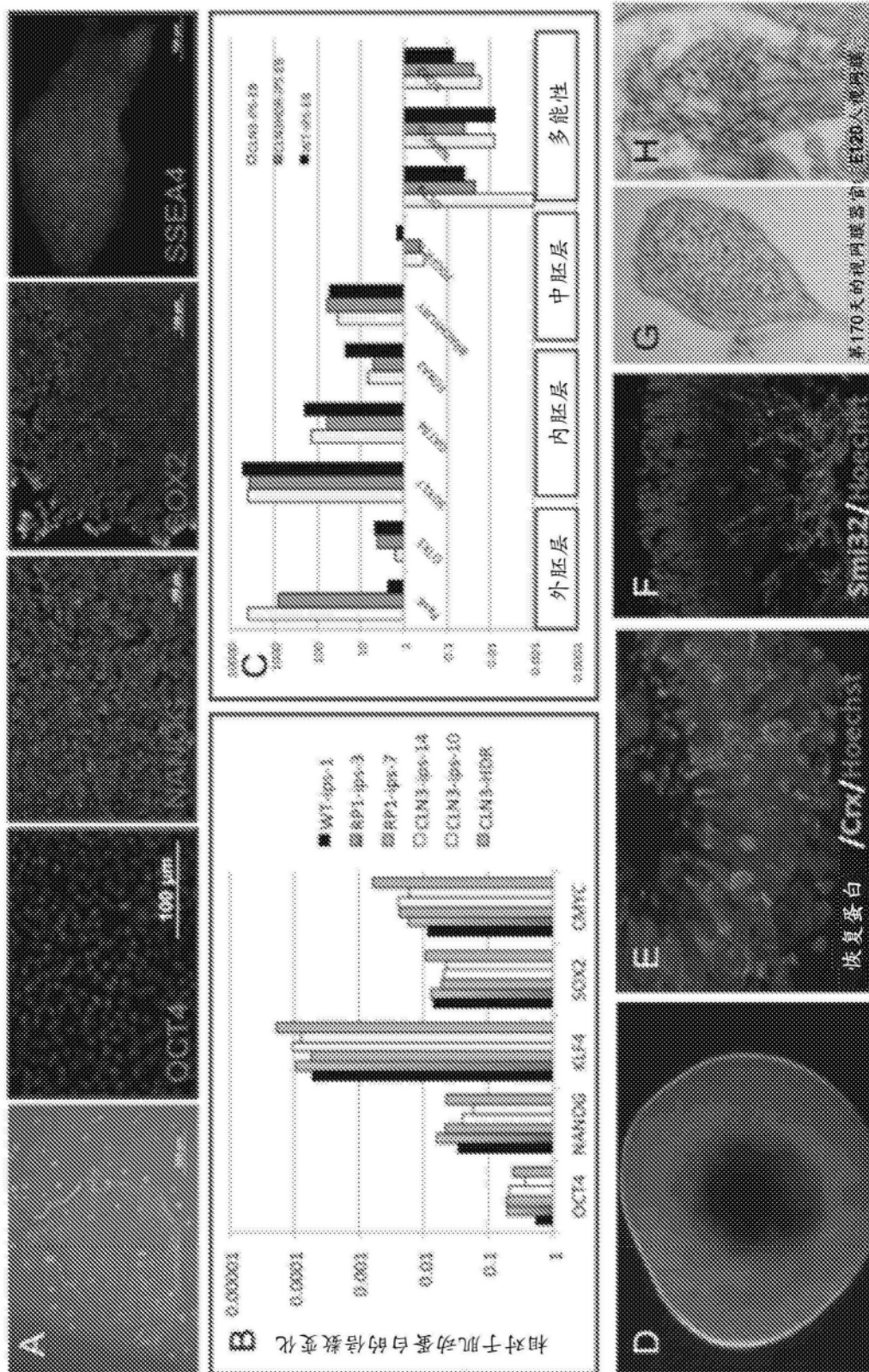


图5

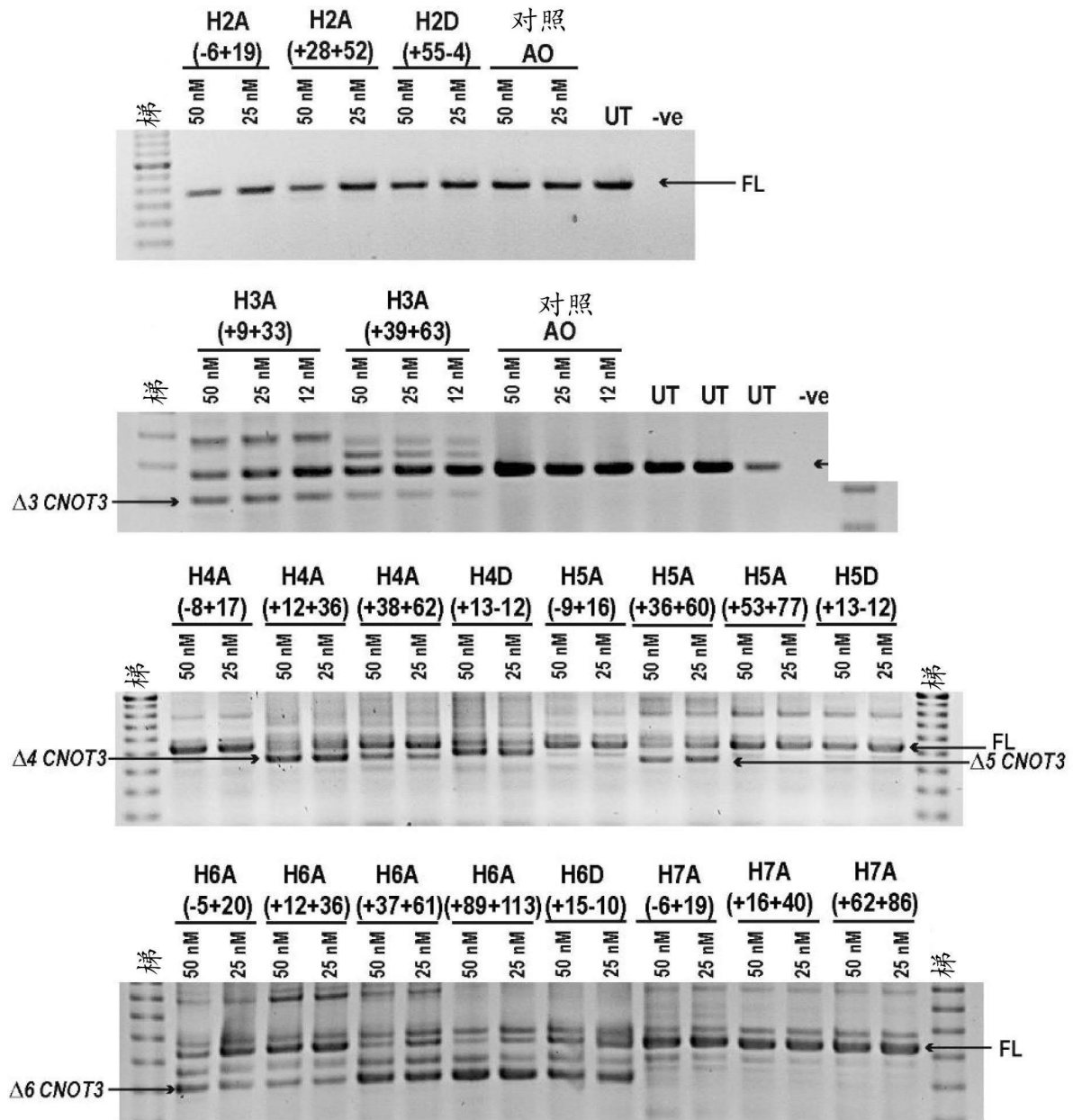


图6A

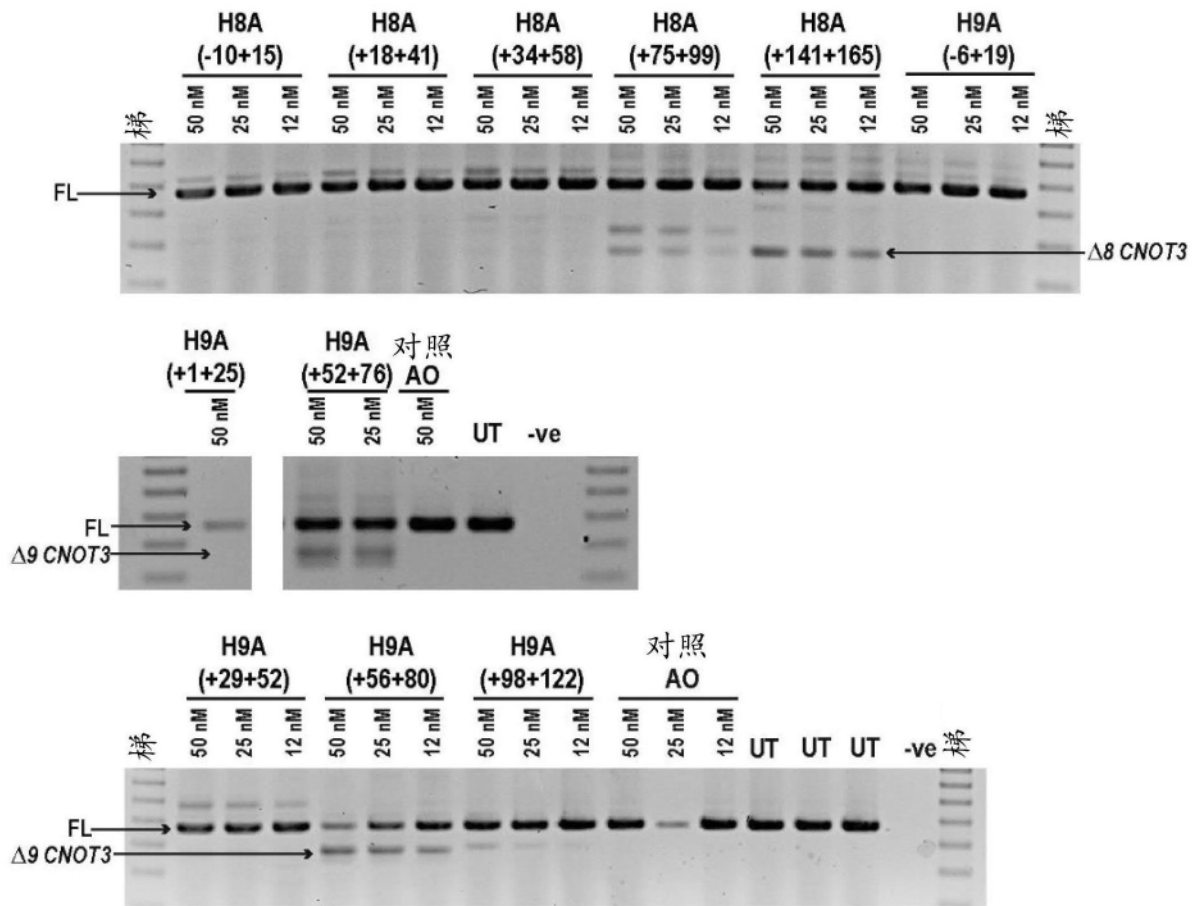


图6B

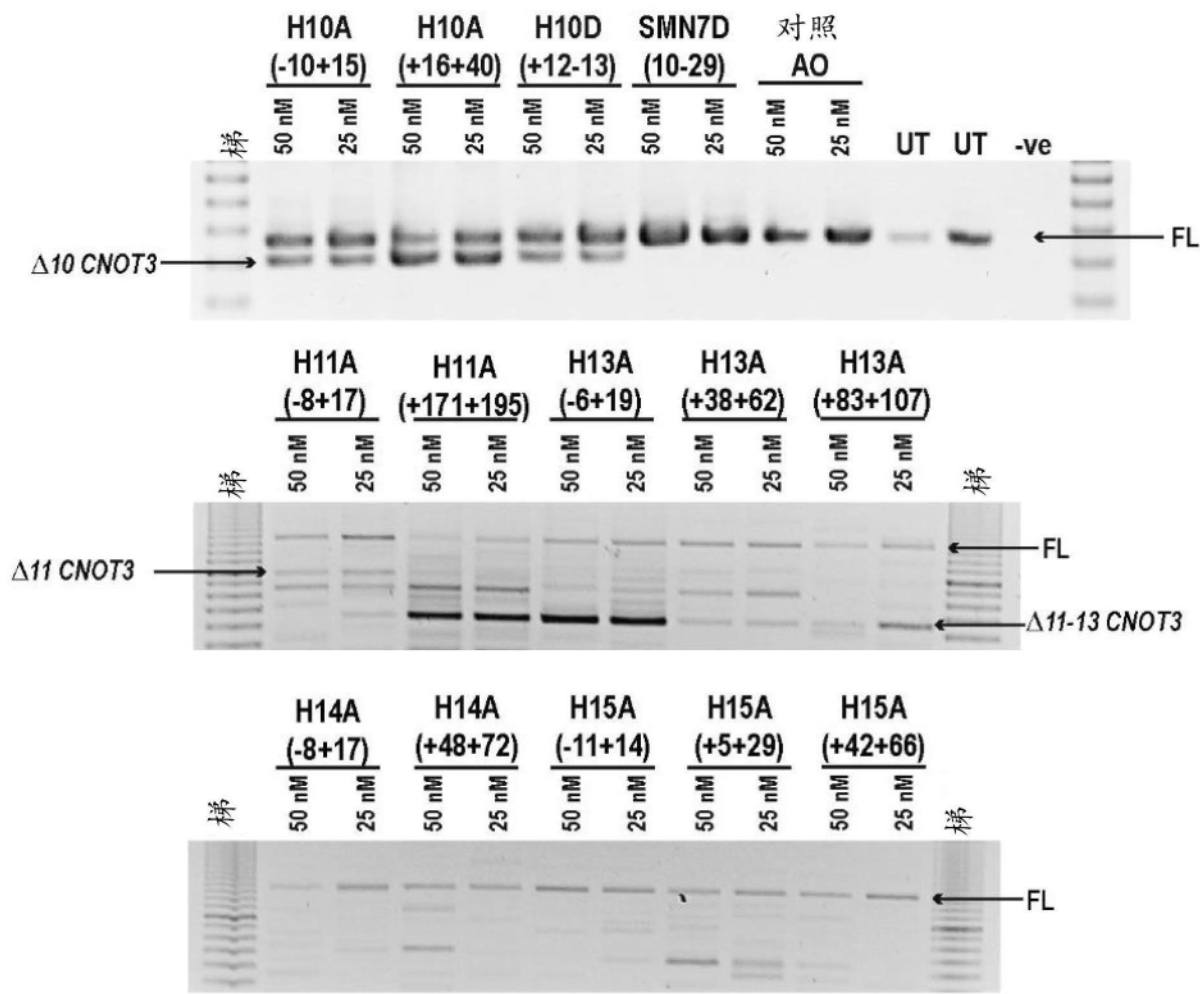


图7A

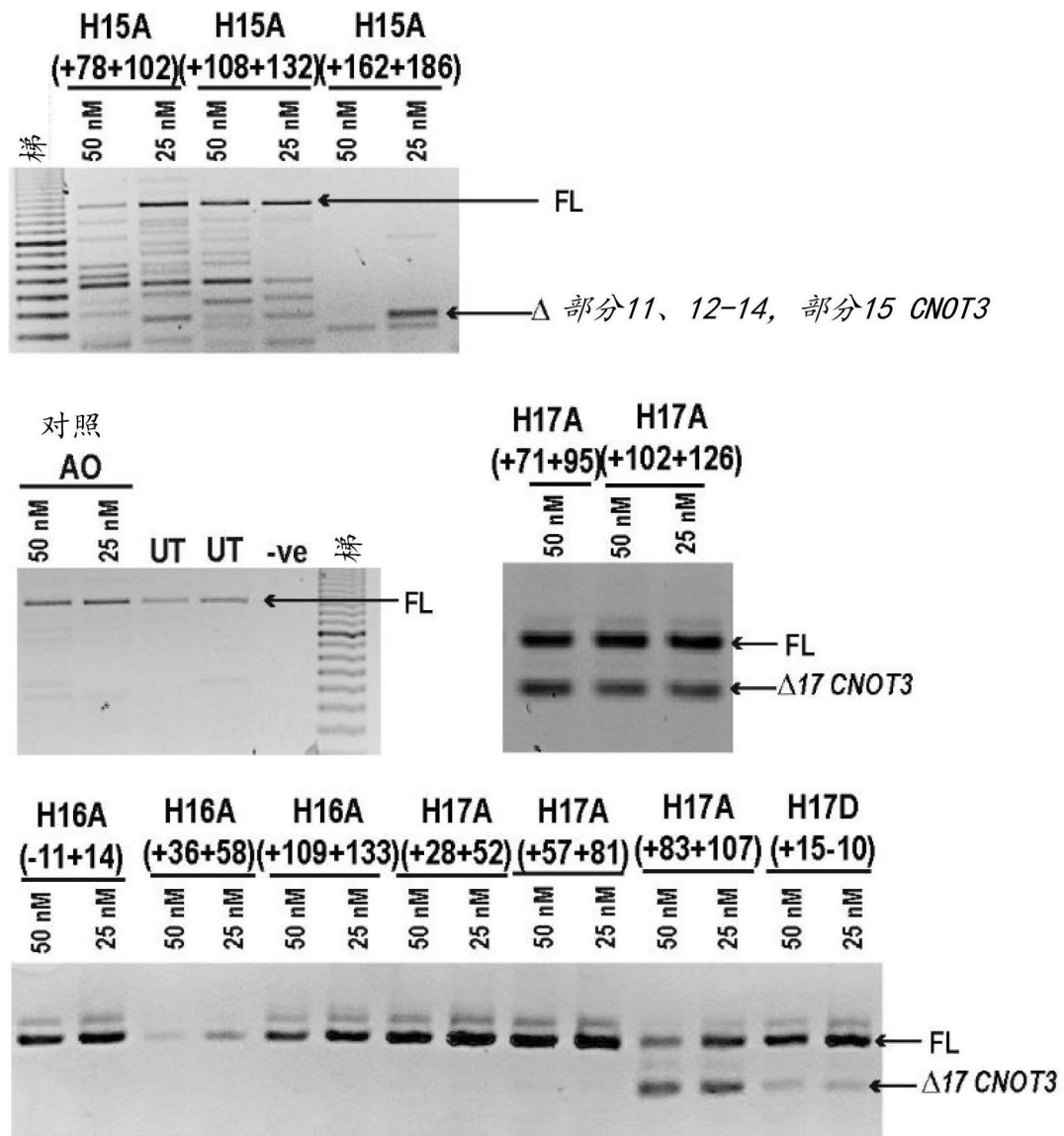


图7B

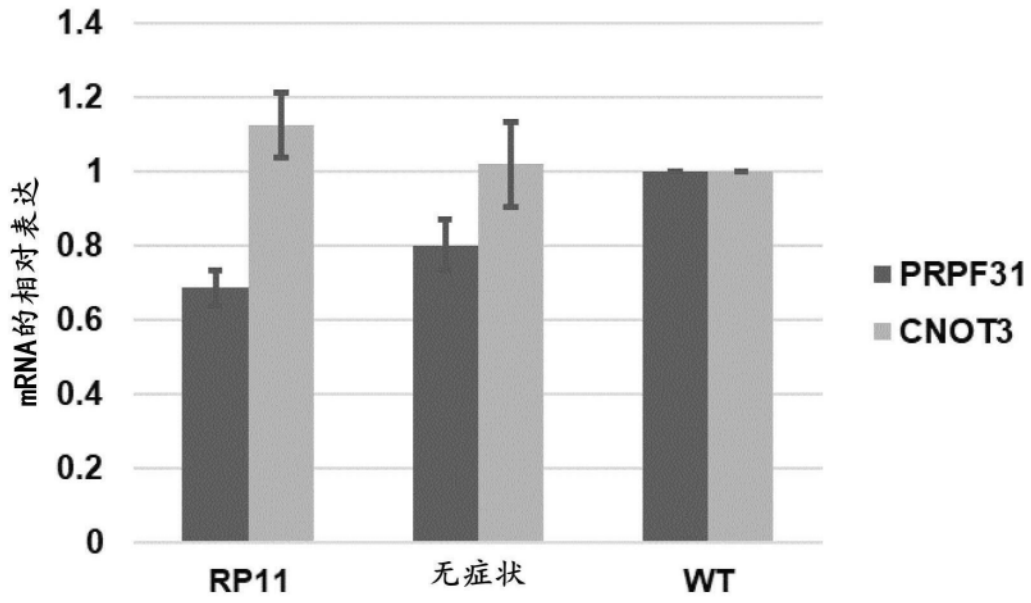


图8a

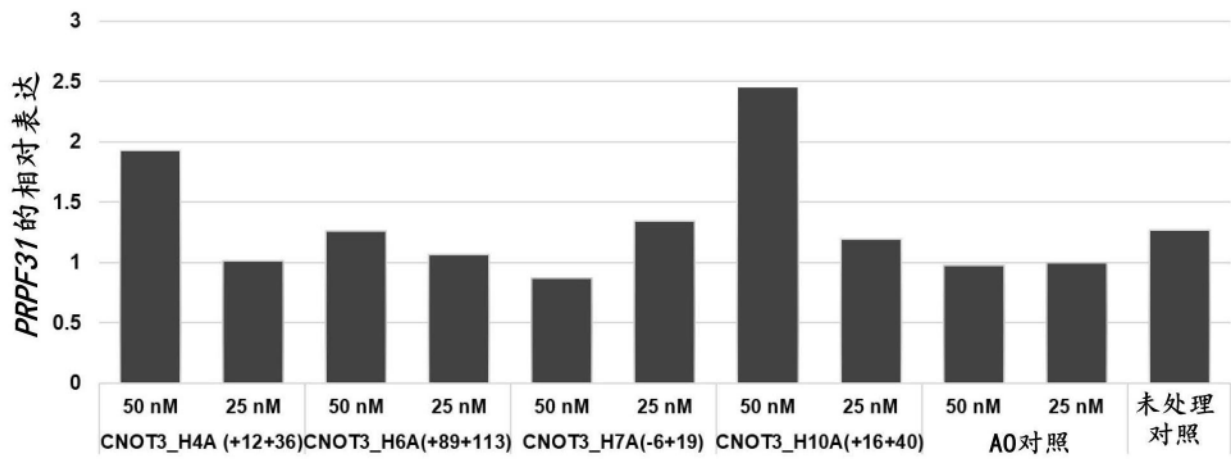


图8b

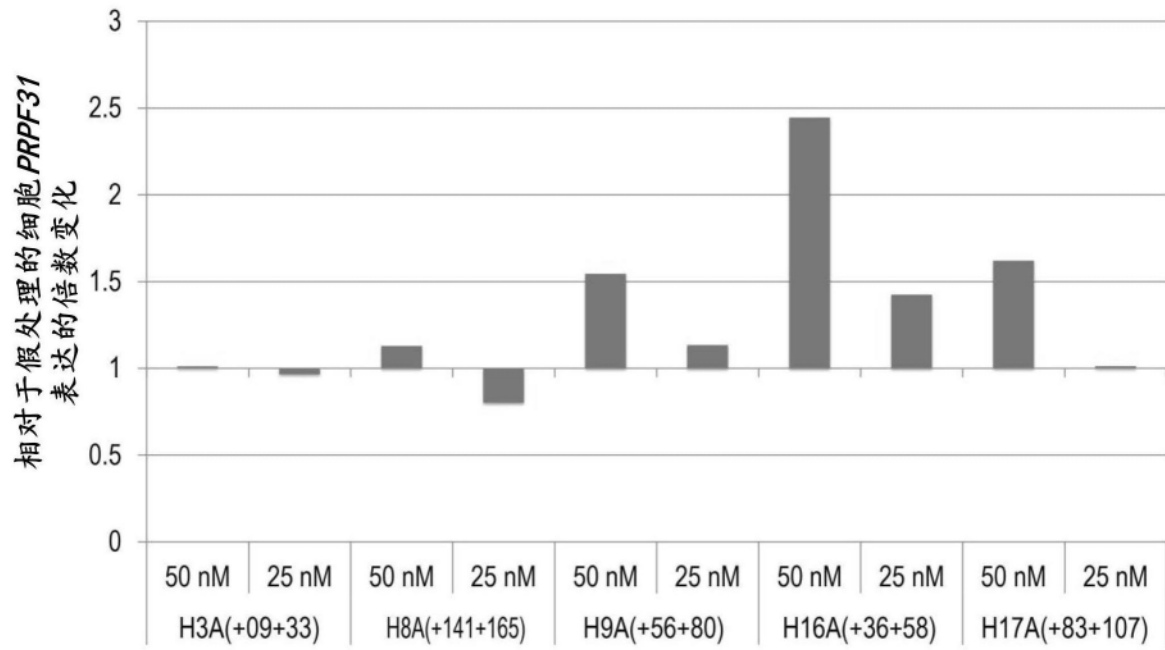


图8c

a

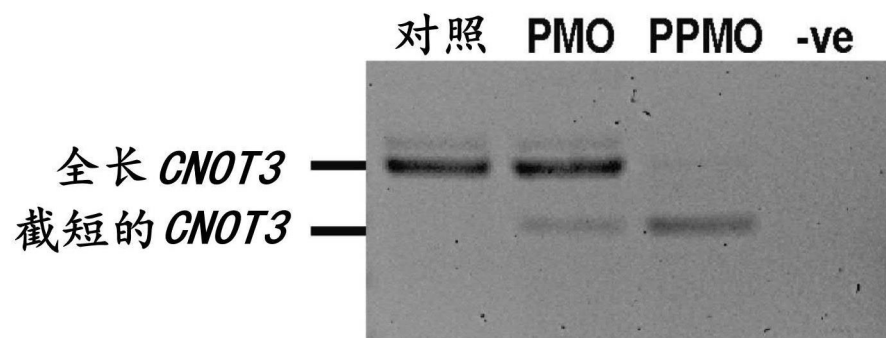


图9A

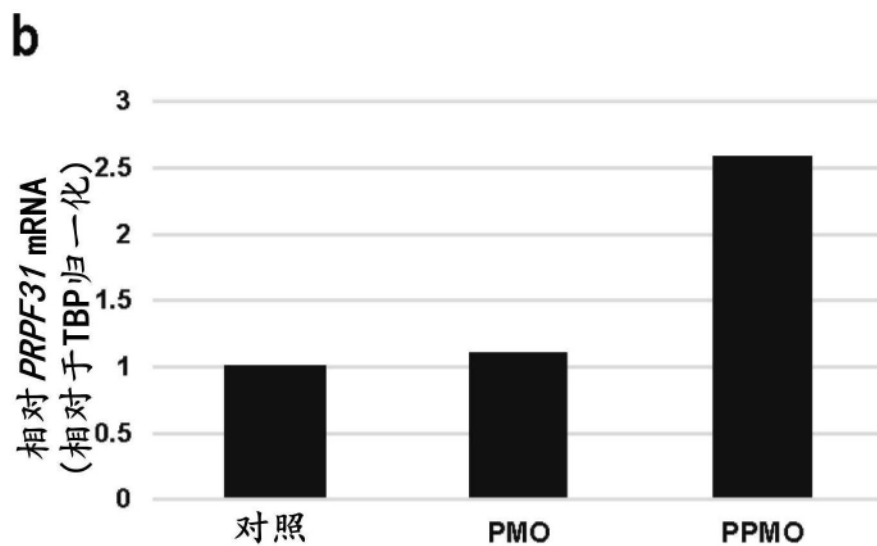


图9B

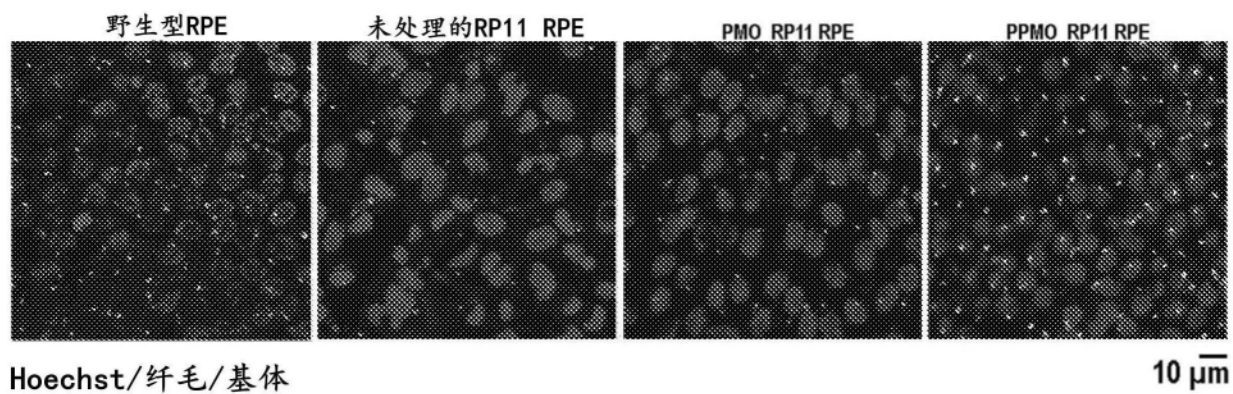


图10A

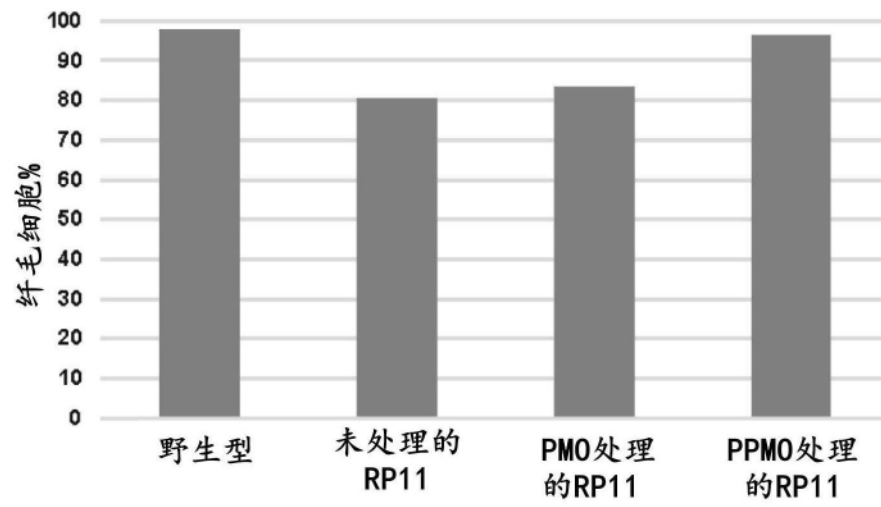
b

图10B

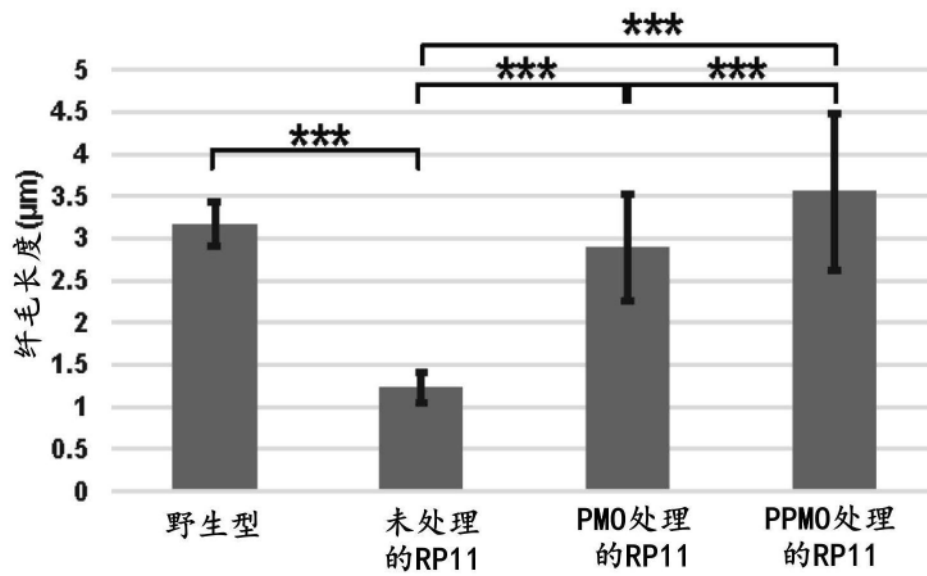
c

图10C