



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107567498 B

(45) 授权公告日 2021.09.21

---

(21) 申请号 201680015142.2 W·博伊默 V·布林克斯  
(22) 申请日 2016.03.11 (74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322  
(65) 同一申请的已公布的文献号 代理人 龙淳  
申请公布号 CN 107567498 A  
(43) 申请公布日 2018.01.09 (51) Int.Cl.  
(30) 优先权数据 C12N 15/113 (2010.01)  
1504124.7 2015.03.11 GB (56) 对比文件  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 CN 102676529 A, 2012.09.19  
2017.09.11 CN 103501793 A, 2014.01.08  
(86) PCT国际申请的申请数据 WO 2013053819 A1, 2013.04.18  
PCT/EP2016/055360 2016.03.11 Ningning Dang等. Mutation analysis and  
characterization of COL7A1 mutations in  
(87) PCT国际申请的公布数据 dystrophic epidermolysis bullosa.  
WO2016/142538 EN 2016.09.15 《Experimental Dermatology》. 2008, 第17卷 (第  
7期),  
(73) 专利权人 翼治疗有限公司 审查员 王瑶  
地址 美国加利福尼亚州  
(72) 发明人 E·M·海斯马 M·波特曼 权利要求书1页 说明书22页  
序列表13页 附图10页

---

(54) 发明名称

用于大疱性表皮松解症治疗的与COL7A1外显子73配对的寡核苷酸

(57) 摘要

本发明涉及能够防止或减少外显子73包含到人COL7A mRNA中的反义寡核苷酸,其以多种方式进行表征:(a)寡核苷酸的序列包含至多两个CpG序列;(b)寡核苷酸的长度不多于24个核苷酸;(c)寡核苷酸能够与外显子73中的(SRp40/SC35结合/ESE)元件退火。这些寡核苷酸可有用地为具有修饰的核苷间键(例如硫代磷酸酯键)的寡核糖核苷酸。

1. 一种反义寡核糖核苷酸, 当通过从哺乳动物细胞中的前体mRNA剪切产生人COL7A1 mRNA时, 所述反义寡核糖核苷酸能够防止或减少外显子73包含到所述人COL7A1 mRNA中, 其特征在于所述寡核糖核苷酸选自SEQ ID NO: 5、6、7、8、24、25、26、27、28、29、35、39、40、41、42和43的AON。

2. 根据权利要求1所述的反义寡核糖核苷酸, 其特征在于, 所述寡核糖核苷酸具有不多于一个CpG序列。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的反义寡核糖核苷酸, 其特征在于, 所述寡核糖核苷酸的核苷间键是化学修饰的。

4. 根据权利要求3所述的反义寡核糖核苷酸, 其中所述核苷间键修饰为硫代磷酸酯键。

5. 根据权利要求1-2中任一项所述的反义寡核糖核苷酸, 其特征在于, 所述寡核糖核苷酸的糖部分为低级2'-O-烷基取代的糖部分。

6. 根据权利要求5所述的反义寡核糖核苷酸, 其中所述2'-O-烷基取代的糖部分为2'-O-甲基取代的糖部分。

7. 根据权利要求1-2中任一项所述的反义寡核糖核苷酸, 其特征在于, 所述寡核糖核苷酸的长度选自16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个和24个核苷酸。

## 用于大疱性表皮松解症治疗的与COL7A1外显子73配对的寡核苷酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年3月11日提交的英国专利申请1504124.7的优先权,在此出于所有目的将其全部内容并入本文以供参考。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及适用于治疗人类疾病的寡核苷酸。更具体地,本发明涉及适用于治疗营养不良型大疱性表皮松解症的反义寡核苷酸。

### 背景技术

[0004] 大疱性表皮松解症(EB)是一组可遗传的皮肤疾病,其特征在于皮肤和黏膜的慢性脆性和起疱。根据亚型,EB的症状范围非常广,从最小的皮肤脆性到具有全身并发症的非常严重的症状。全球约35万患者受影响。在某些形式的EB中,还可以涉及指甲、头发和牙齿。EB的主要类型包括单纯型EB(EBS)、交界型EB(JEB)、营养不良型EB(DEB)和金德乐综合征(KS)。

[0005] DEB影响约25%的EB患者,可显性或隐性遗传,并涉及VII型胶原蛋白(COL7A1,联机孟德尔人类遗传数据库(omim)120120)缺陷。COL7A1编码胶原蛋白VII的 $\alpha$ -1链。胶原蛋白VII用作真皮上部到致密板(基底膜的部分)的锚原纤维。在翻译后修饰之后,三个相同的 $\alpha$ -1链借助它们的胶原三螺旋结构域折叠在一起。随后,形成反向平行二聚体,其排列以形成锚原纤维。胶原蛋白VII由角质形成细胞和真皮成纤维细胞在皮肤中合成。DEB疾病严重程度与在基底膜区域的VII型胶原蛋白表达量大体相关。

[0006] 显性营养不良型EB(DDEB)的特点包括可局限于手、脚、肘和膝盖或可以是全身性的起疱。常见的发现包括瘢痕、粟粒疹、黏膜受累、和异常或缺失指甲。隐性营养不良型EB(RDEB)通常比DDEB更具全身性且更严重。除了DDEB的发现之外,RDEB的其他常见表现包括营养失调、贫血、骨质疏松、食管狭窄、生长迟缓、蹼化或引起连指手套状并指(并指(趾)畸形(pseudosyndactyly))的手指和脚趾的融合、形成肌肉挛缩、牙齿畸形、小口畸形和眼睛瘢痕化。在该组中,鳞状细胞癌的风险以及来自转移性鳞状细胞癌的死亡大大增加。

[0007] 在基因COL7A1内已知有多于400种不同的突变。最普遍受影响的外显子中的一个(18%的患者)是具有约40种已知突变的外显子73,该突变大多数通常是错义突变或导致提前终止密码子(PTC)和甘氨酸取代的突变。

[0008] 目前不存在对DEB的治疗,只能进行缓和疗护。严重形式的RDEB对社会医疗保健预算造成高昂的费用:每名患者每年的敷料和药物的平均费用约为20万欧元。

[0009] 法国国家健康与医学研究院(Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)(INSERM)的W02013/053819公开了靶向外显子73、导致整个外显子从mRNA跳跃的两种反义寡核苷酸。缺乏外显子73的mRNA被翻译成功能性多肽,该功能性多肽虽然比wt蛋白质短,但其表现与野生型胶原蛋白VIIa非常相似。公开的一种寡核苷酸长度

为25个核苷酸,显示出69%的跳跃效率,而另一种寡核苷酸长度为30个核苷酸,显示出93%的跳跃效率。

### 发明内容

[0010] 尽管W02013/053819中更长的外显子跳跃AON似乎显示出令人满意的外显子跳跃效率,但是从开发这种用于人类治疗用途的分子的角度来看,其长度和一些其他特点使其不太优选。此外,似乎这种寡核苷酸产生既不代表野生型也不代表不含外显子73的mRNA的中间条带。尽管不知道这些条带是否具有临床相关性,但是从监管和安全性的角度来看,产生副产物不太优选。因此,仍然需要另外的改进的治疗DEB的疗法。

[0011] 因此,本发明提供一种反义寡核苷酸,当通过从哺乳动物细胞中的前体mRNA剪切产生人COL7A1 mRNA时,该反义寡核苷酸能够防止或减少外显子73包含到人COL7A1 mRNA中;其特征在于(a)寡核苷酸的序列包含至多两个CpG序列和/或(b)寡核苷酸的长度不多于24个核苷酸。有利地,寡核苷酸具有(a)和(b)两种特性。

[0012] 本发明还提供一种反义寡核苷酸,当通过从哺乳动物细胞中的前体mRNA剪切产生人COL7A1 mRNA时,该反义寡核苷酸能够防止或减少外显子73包含到人COL7A1 mRNA中,其特征在该寡核苷酸能够与由序列5' -UUUCCUGG-3' (SEQ ID NO:4)表征的外显子73中的(SRp40/SC35结合/ESE)元件退火。该寡核苷酸能够具有如上所述的特性(a)和/或(b)。

[0013] 本发明的寡核苷酸可有用地是具有修饰的核苷间键(例如硫代磷酸酯键)的寡核糖核苷酸。它们也可具有修饰的糖,例如用2'-O-甲基取代的糖部分。以下讨论寡核苷酸的这些和其他细节。

### 附图说明

[0014] 图1示出人COL7A1外显子73(SEQ ID NO:1;大写),其5'和3'侧接内含子边界(SEQ ID NO:2和3;小写)。

[0015] 图2示出外显子73中SR蛋白结合位点的位置和AON的位置。

[0016] 图3示出在原代人成纤维(HPF)细胞上外显子跳跃的芯片上实验室(lab-on-a-chip)结果。全长mRNA给出~350bp的条带,而不包含外显子73的mRNA为~150bp。

[0017] 图4示出使用离体猪的皮肤模型递送以PBS配制的mh-AON1的组织学结果。4A至4B示出在未受损伤的皮肤上保持25μg的mh-AON 24小时的结果,4C至4F示出在其中去除整个表皮的水疱状皮肤上保持25μg的mh-AON1的结果。C至D:温育24小时。E至F:温育48小时。将mh-AON1染色(红色)。比例尺为100μm。

[0018] 图5示出使用与图4相同的离体猪的皮肤模型、递送配制在三种不同水凝胶中的mh-AON1的组织学结果。5A至5B示出用盐水对照治疗的猪的皮肤的结果,(A)具有未受损伤的表皮,(B)表皮去除。5C至5D示出用以Flaminal™混合的50μg mh-AON1-cy5治疗的猪的皮肤,(C)具有未受损伤的表皮,(D)表皮去除。5E至5F示出用以卡波姆水凝胶混合的50μg mh-AON1-cy5治疗的猪的皮肤的结果,(E)具有未受损伤的表皮,(F)表皮去除。5G至5H示出用以羟丙甲纤维素水凝胶混合的50μg mh-AON1-cy5治疗的猪的皮肤的结果,(G)未受损伤的皮肤,(H)表皮去除。比例尺指示100μm。将mh-AON1染色(红色)。

[0019] 图6示出用mh-AON1或作为对照寡核苷酸的加扰变体(SCRM)治疗后,COL7A1 mRNA

的剪切产物的芯片上实验室的结果。两种不同的细胞类型 (HeLa和HPF) 均用100nM寡核苷酸测试24小时 (左四列) 或40小时 (右4列)。用mh-AON1或对照寡核苷酸 (包含和不包含外显子73) 治疗后,形成不同的COL7A1 mRNA产物。分析不同的mRNA产物的长度;350片段代表野生型、全长mRNA,150核苷酸片段代表调控的mRNA产物。

[0020] 图7示出ddPCR试验的引物设计。对于PCR,设计两种不同的引物组合:仅野生型产物 (顶部) 或 $\Delta$ 外显子73产物 (底部)。上排:用于野生型的引物对;下排:用于跳跃的外显子73的引物对。

[0021] 图8示出在携带未改变的COL7A1序列的HPF细胞中COL7A1 mRNA转录本 (包含外显子73和不包含外显子73) 的绝对量化 (总拷贝数百分比; y轴)。用50nM、100nM和200nM (x轴) 的mh-AON1进行剂量效应。结果在用寡核苷酸转染后24小时 (左) 或40小时 (右) 示出。黑色条表示全长产物,而灰色条表示转录本 $\Delta$ 73。

[0022] 图9示出人PBMC中mh-AON1的免疫原性和免疫毒性评估结果。(a) 描绘与经盐水治疗的人PBMC相比,用mh-AON1 (10nM、100nM或1 $\mu$ M) 或阳性对照Poly (I:C) (1 $\mu$ g/ml)、CpG (10 $\mu$ g/ml)、LPS (100ng/ml) 和R848 (1 $\mu$ M) 刺激人PBMC 24h后,培养物上清液中细胞因子浓度的显著性水平的热度图。每个方块示出每个测量的细胞因子的每种治疗条件 (五个人供体的几何平均值,其中每个进行一式三份测量) 所达到的显著性水平。(b) 与经盐水治疗的PBMC相比,用mh-AON1或阳性对照刺激PBMC 24小时后,培养物上清液中IFN- $\alpha$ 2浓度的倍数变化。条 (以不同的灰色调) 描绘了每个人供体的一式三份测量的具有SEM的平均值。在1处的虚线描绘了经盐水治疗的PBMC的相对细胞因子浓度。使用Friedman检验与Dunn的事后检验确定 (a) 和 (b) 中的P值。(c) 与经盐水治疗的PBMC相比,在暴露于mh-AON1或阳性对照24h后,表示为试卤灵 (Resorufin) 荧光倍数变化的活PBMC的相对数量。使用CellTiter-Blue试剂盒进行活细胞评估。对于所有个体的生物性重复,通过相对于对应的一式三份盐水对照的几何平均值归一化测量的RFU来计算倍数变化。每个单独的供体的结果示出为相对于其对应的盐水对照 (虚线) 的平均值所归一化的一式三份倍数变化的平均值 $\pm$ SEM。进行重复测量单因素方差分析与Dunnnett检验,用于多次校正 (相比于盐水)。( \*P<0.05, \*\*P $\leq$ 0.01, \*\*\*\*P<0.001)。

[0023] 图10示出人Ramos-Blue细胞中mh-AON1和AON73.24.5的免疫原性和免疫毒性评估结果。(a) 在与mh-AON1或AON73.24.5 (在若干浓度下) 和TLR激动剂Poly (I:C) (1 $\mu$ g/ml)、CpG (10 $\mu$ g/ml)、LPS (100ng/ml) 和R848 (1 $\mu$ M) 温育24h后,Ramos-Blue细胞中的NF-kB/AP-1活化。(b) 与经盐水治疗的Ramos-Blue细胞相比,在暴露于mh-AON1、AON73.45.5或阳性对照24小时后,表示为试卤灵荧光的倍数变化的活Ramos-Blue细胞的相对数量。使用CellTiter-Blue试剂盒进行活细胞评估。对于所有个体的生物性重复,通过相对于对应的一式三份盐水对照的几何平均值归一化测量的O.D (在a中) 或RFU (在b中) 来计算倍数变化。每个结果示出为相对于其对应的盐水对照 (虚线) 的平均值所归一化的一式三份倍数变化的平均值 $\pm$ SEM。对倍数变化值进行重复测量单因素方差分析与Dunnnett检验,用于多次校正 (相比于盐水)。(\*\*\*\*P<.0001)。

## 具体实施方式

[0024] 令人惊奇的是,本发明人已经发现,反义寡核苷酸可经设计满足对于AON的要求,

以将其开发成治疗人类疾病、特别是营养不良型大疱性表皮松解症 (DEB) 的疗法。

[0025] 尽管在W02013/053819中公开的AON73.3在减少外显子73包含到COL7A1 mRNA中的方面似乎是令人满意的,但是该寡核苷酸具有不必要的30nt长度,这从可制造性、CMC和商品成本角度来看是不太优选的。此外,INSERM寡核苷酸含有多个CpG重复序列,这从免疫原性的角度来看是不太优选的。已知CpG(尤其是其重复序列)与TLR9受体相互作用,从而在经治疗的个体中引起免疫应答,该免疫应答可损害效用和/或对用寡核苷酸治疗的组织造成损害。

[0026] 本发明的优选AON的长度小于25个、优选地小于24个核苷酸,其能够高效地防止或至少减少外显子73包含到COL7A1 mRNA中,并且与现有技术相比,其具有更少(并且优选地没有)可能妨碍功能性的结构或序列。

[0027] 作为使用本发明的AON治疗的结果,缺少整个外显子73的缩短的mRNA将会翻译成较短但功能性的COL VII蛋白质。

[0028] 如在HeLa细胞中所测量的,本发明的AON优选地含有不多于两个(优选地仅一个、或甚至没有)CpG序列和/或长度在16个与24个核苷酸之间,同时实现大于60%(例如大于70%、理想地大于75%或80%、优选地大于85%、并且还更优选地大于90%)的外显子跳跃效率。

[0029] 在本发明的不同方面,已经设计出能够与8聚体基序退火的AON,迄今为止,并不认为该8聚体基序在选择侧接外显子73的5' 剪切受体位点中是重要的。假定该8聚体基序是先前忽略的外显子剪切增强子(ESE),可对其进行靶向以防止或至少减少外显子73包含到COL7A1 mRNA中。本发明人使用微步行(microwalk)技术,使用能够与整个基序或部分基序退火的AON,设计逐渐截短以缩短与该基序的重叠直至外显子跳跃完全丧失的不同AON,来确定该新识别的推定ESE的位置。通过这样做,本发明人鉴定出外显子73(参见图1)的5' 区域中的5' -UUUCCUGG-3' 基序(SEQ ID NO:4),该基序形成AON的优异新靶标以实现防止或至少减少外显子73包含到COL7A1 mRNA中。

[0030] 在本发明的另一个实施方式中,公开了能够有效地防止或至少减少外显子73包含到小鼠和人的COL7A1 mRNA中的AON。该AON(m-h AON1)与小鼠和人的前体mRNA靶标完全互补。该AON具有如下优点:它可用于在小鼠中使用与最终将开发用于人的治疗用途的分子完全相同的分子,进行设想研究的证明和毒理学研究。

[0031] 根据本发明的AON似乎都不产生中间条带;在用根据本发明的AON治疗的细胞中似乎仅产生对应于wt mRNA的条带或对应于完整外显子73较少的mRNA的条带。

[0032] 根据本发明的AON的另一个优选的特性是它们不含有G-四联体或多个G(3个或更多个连续的鸟苷),从而避免与复合体形成和/或溶解度相关联的问题。

[0033] 表1示出对于每个AON的HeLa细胞中外显子73的跳跃效率、根据本发明的优选AON(AON1至AON25和m-hAON1)的核苷酸序列和SEQ ID NO、在微步行中用于鉴定新ESE-基序的AON(AON26至AON30)的核苷酸序列和SEQ ID NO、以及发现结合该ESE-基序的没有不期望的结构(比如G-四联体)同时仍然显示令人满意的外显子跳跃效率的截短型式的AON(AON24.1至AON24.5)的核苷酸序列和SEQ ID NO。在实施例1中给出关于AON的进一步的细节、它们在其它细胞中的效力以及与现有技术的AON的比较。

[0034] 表1:使mRNA中不包含外显子73的效率。用100nm AON治疗HPF和HeLa细胞24小时。

	HeLa	AON 序列 5' - 3'	SEQ ID NO
	86%	UCUCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	5
AON1	86%	UCUCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	5
AON2	85%	AGCCCGCGUUCUCCAGGAAAGCCGA	6
AON3	92%	GUCGCCCUUCAGCCCGCGUUCUCCA	7
AON4	83%	ACGGUCGCCCUCAGCCCGCGUU	8
AON5	3%	CCCCUGAGGGCCAGGGUCUCCACGG	9
AON6	0%	CAGACCAGGUGGCCCCUGAGGGCCA	10
AON7	0%	CCAAGGGCCAGACCAGGUGGCCCC	11
AON8	0%	CCAGACCAGGUGGCCCCUGAGGGCC	12
AON9	0%	UCUCCCCAAGGGCCAGACCAGG	13
AON10	0%	GGAAGGCCCGGGGGGCCCUUC	14
AON11	6%	CCGGCAAGGCCGGAAGGCCCGGGG	15
AON12	0%	AGGCUUUCAGGCUCCCCGGCAAG	16
AON13	2%	CGGGAAUACCAGGCUUUCAGGCU	17
AON14	25%	UGCCUGGGAGCCCGGGAAUACCA	18
AON15	8%	CCCACACCCCAGCCUGCCUGGG	19
AON16	0%	CCUCUCCCACACCCCAGCCCU	20
AON17	9%	UCUCUCCUGGCCUUCUGCCUCU	21
[0035] AON18	13%	CACCCUCUCUCCUGGCCUUCU	22
AON19	7%	CCAGCCUCACCCUCUCUCCUGG	23
AON20	100%	CUCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	24
AON21	89%	UCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	25
AON22	85%	CCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	26
AON23	83%	CUCCAGGAAAUCCGAUGGGGCCcu	27
AON24	93%	UCCAGGAAAGCCGAUGGGGCCcug	28
AON24.1	73%	UCCAGGAAAGCCGAUGGG	39
AON24.2	88%	UCCAGGAAAGCCGAUGG	40
AON24.3	79%	UCCAGGAAAGCCGAUG	41
AON24.4	86%	CUCCAGGAAAGCCGAUGG	42
AON24.5	89%	UCUCCAGGAAAGCCGAUG	43
AON25	92%	CCAGGAAAGCCGAUGGGGCCcugc	29
AON26	49%	AGGAAAGCCGAUGGGGCCcugcag	30
AON27	37%	GAAAGCCGAUGGGGCCcugcagga	31
AON28	47%	AAGCCGAUGGGGCCcugcaggagu	32
AON29	0%	GCCGAUGGGGCCcugcaggagugg	33
AON30	7%	GAUGGGGCCcugcaggaguggaa	34
mh-AON 1	91%	CGUUCUCCAGGAAAGCCGAUG	35

[0036] 根据一个实施方式,提供一种反义寡核苷酸,当通过从哺乳动物细胞中的前体 mRNA 剪切产生 COL7A1 mRNA 时,该反义寡核苷酸能够防止或减少外显子 73 包含到哺乳动物 (优选人类) COL7A1 mRNA 中,其特征在于,该寡核苷酸的序列具有特性 (a) 和/或 (b) 中的至少一种: (a) 其包含至多两个 CpG 序列;和/或 (b) 其长度不多于 24 个核苷酸。对于特性 (a),寡核苷酸优选地包含不多于一个 CpG 序列,并且可以仅包含一个。

[0037] 根据另一个实施方式,提供一种反义寡核苷酸,当通过从哺乳动物细胞中的前体

mRNA剪切产生COL7A1 mRNA时,该反义寡核苷酸能够防止或减少外显子73包含到哺乳动物(优选人类)COL7A1 mRNA中,其特征在于该寡核苷酸能够与外显子73(图1)的5'上游部分的序列基序5'-UUUCUGG-3'(SEQ ID NO:4)退火。在不希望受到理论束缚的情况下,假定该基序代表SRp40/SC35结合的外显子剪切增强子(ESE)元件。优选地,根据该实施方式的AON的特征在于,该寡核苷酸的序列具有上述特性(a)和/或(b)中的一种或两种。为了具有最佳效果,寡核苷酸应该与整个8聚体基序退火;如果对于任何具体情况,外显子跳跃效率低于60%是可接受的,那么与8聚体基序的6个或7个大部分的5'核苷酸的退火是可接受的。

[0038] 根据本发明的另一个优选的AON是那些AON,其中特征(a)的特征在于该寡核苷酸包含不多于一个CpG,并且/或者特征(b)的特征在于该寡核苷酸的长度不多于24个核苷酸,优选地在12个与24个核苷酸之间,更优选地在16个与24个核苷酸之间,比如16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个核苷酸,还更优选地少于23个核苷酸,还更优选地在16个与23个核苷酸之间,比如16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个核苷酸。根据本发明的最优选实施方式,寡核苷酸的特征在于它们具有两个特性(a)和(b),其中特性(a)为至多两个CpG序列,优选地不多于一个,比如一个CpG,特性(b)为长度不多于24个核苷酸,优选地在12个与24个核苷酸之间,更优选地在16个与24个核苷酸之间,比如16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个核苷酸,还更优选地少于23个核苷酸,还更优选地在16个与23个核苷酸之间,比如16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个核苷酸。

[0039] 根据本发明的AON的任意的另一个特征是它们的序列没有3个或更多个连续的鸟苷段。

[0040] 本发明的特定优选的AON具有如上表1所公开的核苷酸序列AON1、AON2、AON3、AON4、AON20、AON21、AON22、AON23、AON24、AON24.1、AON24.2、AON24.3、AON.24.4、AON.24.5、AON25和mh-AON1。更优选地对于这些寡核苷酸,所有的核糖部分都是2'-O-甲基化的,并且基本上所有的核苷间键都是硫代磷酸酯键。

[0041] 在本发明的所有实施方式中,术语“防止或至少减少外显子包含”和“外显子跳跃”是同义的。关于COL7A1,“防止或至少减少外显子包含”或“外显子跳跃”应解释为使COL7A1 mRNA中不包含外显子73(SEQ ID NO:1或其等位基因形式)(参见图1)。术语外显子跳跃在本文中定义为在细胞内诱导不含有具体外显子的成熟mRNA,该具体外显子在没有外显子跳跃的情况下将存在于成熟mRNA中。外显子跳跃通过向表达所述成熟mRNA的前体mRNA的细胞提供一种分子来实现,该分子能够干扰序列、例如允许剪切的生物化学过程所需的剪切供体或剪切受体序列,或该分子能够干扰用于识别作为待包含到成熟mRNA中的外显子的核苷酸段所需的外显子包含信号;这样的分子在本文中称为外显子跳跃分子。

[0042] 术语前体mRNA是指通过转录从细胞中的DNA模板合成的未加工或部分加工的前体mRNA。

[0043] 术语“反义寡核苷酸”应理解是指与前体mRNA分子、hnRNA(异质性核RNA)或mRNA分子中靶核苷酸序列互补,使得其能够与其对应的靶序列退火的核苷酸序列。

[0044] 本文所用的术语“互补”包括“完全互补”和“基本上互补”,这意味着寡核苷酸和其对应的靶序列之间的互补度通常将大于80%、优选地大于85%、还更优选地大于90%、最优选地大于95%。例如,对于长度为20个核苷酸的寡核苷酸,其序列与其靶序列之间具有一个错配,互补度为95%。

[0045] 反义序列的互补度优选地使得包含反义序列的分子可以在生理条件下与RNA分子中的靶核苷酸序列退火,从而促进外显子跳跃。对于本领域技术人员熟知的是,某些错配比其他错配较容许,因为某些错配比其他错配对AON和靶序列之间结合强度(如以解链温度或 $T_m$ 表示)的影响较小。某些非互补的碱基对可以形成所谓的“摆动”,该摆动破坏整体结合至比真正的错配更小的程度。AON的长度在结合强度方面也起作用,一般来说较长的AON比较短的AON具有更高的解链温度,并且寡核苷酸的G/C含量也是确定结合强度的因素,对于任何给定长度,G/C含量越高,则解链温度越高。如本发明所考虑的,核碱基或糖-磷酸骨架的某些化学修饰也可影响结合强度,使得在设计根据本发明的寡核苷酸时互补度仅是考虑的一个因素。

[0046] 寡核苷酸中一个CpG或多个(两个或更多个)CpG的存在通常与所述寡核苷酸增加的免疫原性相关联(Dorn和Kippenberger,2008)。该增加的免疫原性是不期望的,因为它可以诱导待治疗的组织、即皮肤(真皮和/或表皮)的损伤。

[0047] 本发明允许设计具有可接受的RNA结合动力学和/或热力学特性的寡核苷酸。RNA结合动力学和/或热力学特性至少部分地由寡核苷酸解链温度( $T_m$ ;对于使用基本 $T_m$ 和最近相邻模型的单链RNA,用寡核苷酸特性计算器计算([www.unc.edu/~cail/bioutil/oligo/index.html](http://www.unc.edu/~cail/bioutil/oligo/index.html)))和/或AON-靶外显子复合物的自由能(使用RNA结构型式4.5)确定。如果 $T_m$ 太高,则预期寡核苷酸的特异性较低。可接受的 $T_m$ 和自由能取决于寡核苷酸的序列、骨架(磷酸二酯,硫代磷酸酯、磷酰胺酯、肽-核酸等)的化学性质、糖部分(核糖、脱氧核糖、取代的核糖、分子内桥)的性质和核碱基的化学修饰。因此, $T_m$ 的范围可变化很大。

[0048] 根据本发明的一个方面,根据本发明,通过使外显子73的5'区域与AON微步行提供新AON。因此,已经鉴定了新的8核苷酸基序(推定的ESE),其形成合适靶标以设计根据本发明的AON。

[0049] 本发明人选择的寡核苷酸的长度在16个与24个核苷酸之间,但是不同的长度也是可以的。优选具有足够长的长度以允许与靶RNA的稳定相互作用和对靶序列的特异性,但是不超过必需的长度,因为更长的寡核苷酸制造成本更高,并且从分析的角度来看其更加复杂。通过制备一系列重叠寡核苷酸(如在实施例中所例示,在体外试验中测试其外显子跳跃的效力)可以探查外显子73的5'区域的有效的外显子跳跃分子。然后基于可制造性、免疫原性和本文提供的其他可用性标准进一步选择建立令人满意的外显子跳跃效力的AON。

[0050] 相反的策略也是可以的。根据该策略,首先基于可制造性、免疫原性和本发明提供的其他可用性标准设计寡核苷酸,然后测试外显子跳跃效率。所述寡核苷酸的功能性活性优选为诱导外显子73(SEQ ID NO:1)在一定程度上跳跃和/或至少减少含外显子73的mRNA的产生,从而增加短于野生型但具功能性的胶原蛋白的产生。

[0051] 在给定的PCR循环次数之后,对于任何给定的引物组,假如循环的次数使得扩增仍处于指数期,可以通过确定扩增的野生型条带的浓度除以扩增的缩短(不含外显子73)的条带的浓度乘以100%计算外显子跳跃百分比或效率。可使用生物分析仪DNA1000设备进行量化。

[0052] 如通过RT-PCR分析所测量,根据本发明的优选的AON是与未治疗的细胞相比,在经AON治疗的细胞中显示出大于70%、更优选地大于80%、还更优选地大于90%的跳跃百分比的那些。

[0053] 优选地,根据本发明的包含与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列互补的序列的AON使得互补部分为至少80%、更优选地至少90%、还更优选地至少95%、最优选地100%与靶序列互补。因此,不完全需要互补区域中的所有碱基能够与相对链中的碱基配对。例如,当设计寡核苷酸时,可能需要包含例如与互补链上的碱基并非碱基配对的残基。如果在细胞的环境下,核苷酸段能够充分地、与互补部分杂交,则在某种程度上可以允许错配。在该上下文中,“充分地”意味着根据本发明的AON能够诱导外显子73的外显子跳跃。所靶向外显子的跳跃可以方便地由RT-PCR评估。互补区域优选地设计成使得当它们组合时,它们对前体mRNA中的外显子是特异性的。这种特异性可以由各种长度的互补区域产生,因为这取决于系统中其他(前体)mRNA分子中的实际序列。寡核苷酸也将能够与一个或多个其他前体mRNA分子杂交的风险随着寡核苷酸大小的增加而减小,而长度不应当太长以致产生可制造性、纯化和/或分析问题。

[0054] 显然在互补区域中包含错配但是保留与前体mRNA中靶向区域杂交和/或结合的能力的寡核苷酸可用于本发明。然而,优选至少互补部分不包含此类错配,因为这些通常比在一个或多个互补区域中具有此类错配的寡核苷酸具有更高的效率和更高的特异性。据认为,较高的杂交强度(即增加与相对链的相互作用数目)对增加干扰系统的剪切机制的过程的效率是有利的。优选地,互补度为90%至100%。通常,这在20个核苷酸的寡核苷酸中允许1个或2个错配。

[0055] 本发明的外显子跳跃分子优选地是与SEQ ID NO:1互补的(反义)寡核苷酸。

[0056] 优选地,寡核苷酸互补部分的长度与寡核苷酸的长度相同,这意味着不存在不与靶RNA形成碱基对的寡核苷酸的5'或3'末端。因此,本发明的寡核苷酸的优选长度为24个核苷酸或更少,例如12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个或24个核苷酸。

[0057] 已经用长度在16个与24个核苷酸之间的AON获得了特别好的结果。

[0058] 根据本发明的外显子跳跃分子可含有多个DNA残基中的一个(因此RNA“u”残基将是作为DNA对应物的“t”残基)、或一个或多个RNA残基、和/或一个或多个核苷酸类似物或等同物,如下文将进一步详细描述。SEQ ID NO:5-35和SEQ ID NO:39-43是RNA序列,是RNA序列,但本发明还涵盖这些序列的DNA形式中的每一个,以及这些序列的DNA/RNA杂交体。

[0059] 本发明的外显子跳跃分子优选包含经修饰以提高核酸酶抗性、和/或以增加反义寡核苷酸对靶序列的亲和力的一个或多个残基。因此,在优选的实施方式中,反义核苷酸序列包含至少一个核苷酸类似物或等同物,其中核苷酸类似物或等同物定义为具有修饰的碱基、和/或修饰的骨架、和/或非天然的核苷间键、或这些修饰的组的残基。

[0060] 在优选的实施方式中,核苷酸类似物或等同物包含修饰的骨架。此类骨架的实例由吗啉代骨架、氨基甲酸酯骨架、硅氧烷骨架、硫化物、亚砷和砷骨架、甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架、亚甲基甲酰乙酰基骨架、核糖乙酰基骨架、含烯烃骨架、氨基磺酸酯、磺酸酯和磺酰胺骨架、亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架和酰胺骨架提供。磷酰二胺吗啉代寡聚物是以前作为反义试剂研究的经修饰的骨架寡核苷酸。吗啉代寡核苷酸具有不带电的骨架,其中DNA的脱氧核糖由六元环代替,并且磷酸二酯键由磷酰二胺键代替。吗啉代寡核苷酸对酶降解具有抗性,并且似乎通过阻止翻译或干扰前体mRNA剪切而不是通过激活核糖核酸酶H(RNase H)起反义试剂作用。通过物理破坏细胞膜的方法已经将吗啉代寡核苷酸成功地递

送至组织培养细胞,并且比较这些方法中的若干方法的一项研究发现,刮擦负载(scrape loading)是最有效的递送方法;然而,因为吗啉代骨架不带电,所以阳离子脂质不是细胞中吗啉代寡核苷酸摄取的有效介质。

[0061] 根据本发明的一个实施方式,骨架中的残基之间的键不包括磷原子,例如由短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键形成的键。

[0062] 根据该实施方式,优选的核苷酸类似物或等同物包含具有修饰的聚酰胺骨架的肽核酸(PNA)(Nielsen等人(1991)《科学(Science)》254,1497-1500)。基于PNA的分子在碱基对识别方面是DNA分子的真实模拟物。PNA的骨架由通过肽键连接的N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元构成,其中核碱基通过亚甲基羰基键连接到骨架。替代骨架包含一碳延伸的吡咯烷PNA单体(Govindaraju和Kumar(2005)《化学通讯(Chem. Commun)》,495-497)。由于PNA分子的骨架不含有带电的磷酸酯基团,所以通常PNA-RNA杂交体分别比RNA-RNA或RNA-DNA杂交体更稳定(Egholm等人(1993)《自然(Nature)》365,566-568)。

[0063] 根据本发明的另一个实施方式,骨架包含吗啉代核苷酸类似物或等同物,其中核糖或脱氧核糖由6-元吗啉代环代替。最优的核苷酸类似物或等同物包含磷酰二胺吗啉代寡聚物(PMO),其中核糖或脱氧核糖由6-元吗啉代环代替,并且相邻吗啉环之间的阴离子磷酰二酯键由非离子磷酰二胺键代替。

[0064] 在又一个实施方式中,本发明的核苷酸类似物或等同物包含磷酰二酯键中的非桥接氧中的一个的取代。该修饰略微使碱基配对不稳定,但增加了对核酸酶降解的明显抗性。优选的核苷酸类似物或等同物包含硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、H-膦酸酯、甲基和其他烷基膦酸酯(包括3'-亚烷基膦酸酯、5'-亚烷基膦酸酯和手性膦酸酯)、次膦酸酯、磷酰胺酯(包括3'-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯)、硫代磷酰胺酯、硫代烷基膦酸酯、硫代烷基磷酸三酯、硒代磷酸酯或碲代磷酸酯。

[0065] 本发明的另一个优选的核苷酸类似物或等同物包含一个或多个糖部分,该一个或多个糖部分在2'、3'和/或5'位置单取代或二取代,例如-OH;-F;可以由一个或多个杂原子中断的取代或未取代的直链或支链低级(C1-C10)烷基、烯基、炔基、烷芳基、烯丙基或芳烷基;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;O-、S-或N-烯丙基;O-烷基-O-烷基、-甲氧基、-氨基丙氧基;甲氧基乙氧基;-二甲基氨基乙氧基;和-二甲基氨基乙氧基乙氧基。糖部分可为五环糖或其衍生物、或脱氧五环糖或其衍生物,优选核糖或其衍生物、或脱氧核糖或其衍生物。优选的衍生化糖部分包括锁核酸(LNA),其中2'-碳原子连接到糖环的3'或4'碳原子上,从而形成双环糖部分。优选的LNA包括2'-O,4'-C-亚乙基桥接的核酸(Morita等人,2001.《核酸研究补充No.1(Nucleic Acid Res Supplement No.1)》:241-242)。这些取代使得核苷酸类似物或等同物具有核糖核酸酶H和核酸酶抗性并增加对靶RNA的亲合力。

[0066] 本领域技术人员应当理解,不必要对反义寡核苷酸中的所有核苷间键都进行修饰。例如,一些核苷间键可以是未修饰的,而其它核苷间键是修饰的。本发明涵盖所有包含骨架的AON,该骨架由沿着AON的长度均匀或不均匀分布的(修饰的)核苷间键中的一种形式、(修饰的)核苷间键中的多种形式构成。另外,骨架修饰的任何方式(均匀、不均匀、单一形式或多种形式及其全部组合)可以与任何形式或下文提及的糖或核苷修饰或类似物的任

何形式组合。

[0067] 用于根据本发明的AON的尤其优选的骨架是均匀(全部)硫代磷酸酯(PS)骨架。

[0068] 在另一个实施方式中,本发明的核苷酸类似物或等同物包含一个或多个碱基修饰或取代。修饰的碱基包括合成和天然的碱基,例如在本领域中已知或将知的肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤以及嘧啶和嘌呤碱基的其他-氮杂、脱氮、-羟基、-卤代、-硫代、硫醇、-烷基、-烯基、-炔基、硫代烷基衍生物。

[0069] 本领域技术人员应当理解,不必要对反义寡核苷酸中的所有位置都均匀地修饰。另外,上述类似物或等同物中的多于一种可以包含在单个反义寡核苷酸中或甚至在反义寡核苷酸内的单个位置处。在某些实施方式中,本发明的反义寡核苷酸具有至少两种不同类型的类似物或等同物。

[0070] 根据另一个实施方式,根据本发明的AON包括2' -O(优选低级)烷基硫代磷酸酯反义寡核苷酸,例如2' -O-甲基修饰的核糖(RNA)、2' -O-甲氧基乙基修饰的核糖、2' -O-乙基修饰的核糖、2' -O-丙基修饰的核糖和/或这些修饰物的取代衍生物,例如卤代衍生物。

[0071] 根据本发明的有效和优选的反义寡核苷酸形式包含具有硫代磷酸酯骨架的2' -O-甲基修饰的核糖部分,优选其中基本上所有的核糖部分均是2' -O-甲基,并且基本上所有的核苷间键均是硫代磷酸酯键。

[0072] 技术人员还将理解,可组合不同的反义寡核苷酸以有效地跳跃COL7A1基因的外显子73。两种反义寡核苷酸的组合可以用于本发明的方法中,比如靶向外显子73(图1)的相同或不同区域的两种反义寡核苷酸、三种不同的反义寡核苷酸、四种不同的反义寡核苷酸或五种不同的反义寡核苷酸,只要至少一个AON是根据本发明的一个AON。

[0073] 反义寡核苷酸可连接到增强细胞(优选皮肤细胞)中反义寡核苷酸摄取的部分。这样的部分的实例为胆固醇、碳水化合物、维生素、生物素、脂质、磷脂、细胞穿透肽(包括但不限于触角足、TAT、转运子)和带正电荷的氨基酸(比如寡聚精氨酸、聚精氨酸、寡聚赖氨酸或聚赖氨酸)、比如由抗体、抗体的Fab片段提供的抗原结合结构域或单链抗原结合结构域(比如骆驼单结构域抗原结合结构域)。

[0074] 根据本发明的外显子跳跃分子可以是裸露(裸(gymnotic))反义寡核苷酸或呈偶联物的形式或从载体表达(载体化的AON)。可以使用本领域已知的合适方式施用外显子跳跃分子。当外显子跳跃分子是载体化的AON时,例如可以将其以表达载体的形式提供给个体或所述个体的细胞、组织或器官,其中表达载体编码包含所述寡核苷酸的转录本。表达载体优选地经由比如病毒载体的基因递送工具引入细胞、组织、器官或个体。在优选的实施方式中,提供基于病毒的表达载体,其包含驱动如本文所鉴定的外显子跳跃分子的表达或转录的表达盒或转录盒。因此,本发明提供病毒载体,当置于有助于外显子跳跃分子表达的条件下时,该病毒载体表达根据本发明的外显子跳跃分子。可向细胞提供能够干扰对包含外显子73是必要的或至少有助于包含外显子73的序列的外显子跳跃分子,使得这样的干扰例如通过由腺病毒类或腺相关病毒类的载体提供的质粒衍生的反义寡核苷酸表达或病毒表达,防止或至少减少外显子73包含到COL7A1 mRNA中。表达可以由聚合酶III启动子(例如U1、U6或U7RNA启动子)驱动。优选的递送工具是病毒载体比如腺相关病毒载体(AAV)、或逆转录病毒载体比如慢病毒载体等。此外,质粒、人造染色体、可用于哺乳动物(优选人类)细胞基因组中靶向同源重组和整合的质粒可以适当地应用于递送本文所述的寡核苷酸。本发明优选

的是那些其中转录由Po1 III启动子驱动、和/或其中转录本为与U1或U7转录本融合的形式载体，它们对于递送小的转录本产生良好的结果。设计合适的转录本在技术人员的技术范围内。优选的是Po1 III驱动的转录本。优选地，以与U1或U7转录本的融合转录本的形式。可以如本领域中（例如参见Gorman L等人，1998或Suter D等人，1999）所述产生此类融合体。

[0075] 一种优选的反义寡核苷酸表达系统是腺病毒相关病毒 (AAV) 类载体。已经开发了单链和双链AAV类载体，其可用于延长反义核苷酸序列的表达，用于高效跳跃COL7A1外显子73。

[0076] 例如，优选的AAV类载体包含由聚合酶III启动子 (Po1 III) 驱动的表达盒。例如，优选的Po1 III启动子是U1、U6或U7RNA启动子。

[0077] 因此，本发明还提供一种病毒类载体，其包含用于表达本发明的反义寡核苷酸的Po1 III启动子驱动的表达盒，该反义寡核苷酸用于诱导COL7A1外显子73的跳跃。

[0078] 根据本发明的AAV载体是重组AAV载体，并且是指包含AAV基因组的部分的AAV载体，该AAV基因组包含根据本发明的编码的外显子跳跃分子，将该外显子跳跃分子在如本文其他地方所描述的衍生自AAV血清型的衣壳蛋白的蛋白质壳中衣壳化。AAV基因组的部分可含有衍生自腺相关病毒血清型（例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV8、AAV9等）的反向末端重复序列 (ITR)。由衣壳蛋白组成的蛋白质壳可衍生自AAV血清型，例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV8、AAV9等。蛋白质壳也可以命名为衣壳蛋白壳。AAV载体可具有缺失的一个或优选缺失的全部野生型AAV基因，但仍可包含功能性ITR核酸序列。功能性ITR序列对于AAV病毒粒子的复制、释放 (rescue) 和包装是必需的。ITR序列可以是野生型序列，或者可与野生型序列具有至少80%、85%、90%、95或100%的序列同一性，或者可以通过例如核苷酸的插入、突变、缺失或取代来改变，只要它们保持功能性。在该上下文中，功能性是指指导基因组包装到衣壳中、然后允许在待感染的宿主细胞或靶细胞中表达的能力。在本发明的上下文中，衣壳蛋白壳可以是与AAV载体基因组ITR不同的血清型。因此，根据本发明的AAV载体可以由一种衣壳蛋白壳（即二十面体衣壳）组成，该衣壳蛋白壳包含一种AAV血清型（例如AAV血清型2）的衣壳蛋白 (VP1、VP2和/或VP3)，而在该AAV5载体中含有的ITR序列可以是上述AAV血清型中的任何一种，包括AAV2载体。因此，“AAV2载体”包含AAV血清型2的衣壳蛋白壳，同时例如“AAV5载体”包含AAV血清型5的衣壳蛋白壳，由此任一个可将根据本发明的任何AAV载体基因组ITR衣壳化。

[0079] 优选地，根据本发明的重组AAV载体包含AAV血清型2、5、8或AAV血清型9的衣壳蛋白壳，其中存在于所述AAV载体中的AAV基因组或ITR衍生自AAV血清型2、5、8或AAV血清型9；此类AAV载体分别称为AAV2/2、AAV2/5、AAV2/8、AAV2/9、AAV5/2、AAV5/5、AAV5/8、AAV5/9、AAV8/2、AAV8/5、AAV8/8、AAV8/9、AAV9/2、AAV9/5、AAV9/8或AAV9/9载体。

[0080] 更优选地，根据本发明的重组AAV载体具有对真皮和表皮细胞的趋向性，并且包含AAV血清型5或8的衣壳蛋白壳。存在于所述载体中的AAV基因组或ITR可以衍生自相同或不同的血清型，比如AAV血清型2；这样的载体称为AAV2/5或AAV2/8载体。具有血清型5衣壳的AAV具有对真皮和表皮细胞（比如基部和上基部角质形成细胞以及真皮成纤维细胞）的趋向性。与具有血清型2衣壳的AAV相比，具有血清型5衣壳的AAV载体显示出更高的转导效率 (Keswani等人,《创伤修复和再生 (Wound Repair Regen.)》2012;20(4):592-600)。类似地，

具有血清型8的衣壳的AAV示出对真皮成纤维细胞和(主要)上基部角质形成细胞的趋向性。此外,AAV2/8在转导哺乳动物、优选人类真皮和表皮细胞方面比AAV2/5更有效。然而,转导效率似乎取决于伤口愈合期间施用的时间,在较晚时间点,AAV2/2示出比AAV2/5和AAV2/8更高的转导效率(Keswani等,同上)。

[0081] 因此,AAV2/2,AAV<sub>x</sub>/5和AAV<sub>x</sub>/8是递送根据本发明的AON的优选AAV,并且可以考虑施用时间和待靶向的细胞类型来确定它们的选择。在临床前或临床研究中,本领域技术人员可以容易地制定这些细节。

[0082] 将由所选择的核酸序列表示的、编码根据本发明的外显子跳跃分子的核酸分子优选地插入如上所述的AAV基因组或ITR序列之间,例如包含可操作地连接到编码序列和3'终止序列的表达调控元件的表达构建体。

[0083] “AAV辅助功能”通常是指在转载(in trans)中供应给AAV载体的AAV复制和包装所需的对应的AAV功能。AAV辅助功能补充AAV载体中缺失的AAV功能,但它们缺少AAV ITR(由AAV载体基因组提供)。AAV辅助功能包括AAV的两个主要ORF,即rep编码区域和cap编码区域,或其功能基本相同的序列。Rep和Cap区域是本领域公知的,例如参见Chiorini等人(1999,《病毒学杂志(J.of Virology)》,Vol 73(2):1309-1319)或US 5,139,941,其并入本文以供参考。可以在可为质粒的AAV辅助构建体上供应AAV辅助功能。在引入本文所述的存在于AAV载体中的AAV基因组之前或同时,例如可通过转化、转染或转导将辅助构建体引入宿主细胞。因此,可选择本发明的AAV辅助构建体,使得它们产生期望的血清型组合,一方面用于AAV载体的衣壳蛋白壳,并且另一方面用于存在于所述AAV载体中的AAV基因组复制和包装。

[0084] “AAV辅助病毒”提供AAV复制和包装所需的附加功能。合适的AAV辅助病毒包括腺病毒、单纯疱疹病毒(例如1型和2型HSV)和痘苗病毒。辅助病毒提供的附加功能也可经由载体引入宿主细胞,如并入本文以供参考的US 6,531,456中所述。

[0085] 优选地,根据本发明的重组AAV载体中存在的AAV基因组不包含编码病毒蛋白质的任何核苷酸序列,例如AAV的rep(复制)或cap(衣壳)基因。AAV基因组还可包含标志物或报告基因,例如编码抗生素抗性基因的基因、编码荧光蛋白的基因(例如gfp)或本领域已知的编码化学上、酶学上或以其他方式可检测和/或可选择的产物的基因(例如lacZ、aph等)。

[0086] 根据本发明的优选的AAV载体是AAV载体,优选是AAV2/5、AAV2/8、AAV2/9或AAV2/2载体,其表达包含反义寡核苷酸的根据本发明的外显子跳跃分子,其中所述反义寡核苷酸包含选自如上表1所公开的以下序列或其组成:AON1、AON2、AON3、AON4、AON20、AON21、AON22、AON23、AON24、AON24.1、AON24.2、AON24.3、AON.24.4、AON.24.5、AON25和mh-AON1。

[0087] 考虑到迄今为止已经取得的进展,预期向个体或所述个体的细胞、组织、器官提供根据本发明的外显子跳跃分子的手段的改进。当然可以并入此类未来的改进以使用本发明的方法来实现提及的对mRNA重组的效果。根据本发明的外显子跳跃分子可按原样递送给个体、所述个体的细胞、组织或器官。当施用根据本发明的外显子跳跃分子时,优选将分子溶解在与递送方法相容的溶液中。

[0088] 体内的大多数细胞容易吸收裸AON,并且通常将根据本发明的AON溶解在等渗(盐水)溶液中将足以到达靶细胞,比如皮肤(真皮和表皮)细胞。替代地,可以使用药理学上可接受的赋形剂、添加剂,稳定剂、溶剂、着色剂等来配制本发明的裸AON。另外或替代地,可以用

下文提及的任何转染辅助剂配制裸AON。

[0089] 通过在比如等渗(盐水)溶液的水溶液中提供质粒,可向皮肤(真皮和表皮)细胞提供用于反义寡核苷酸表达的质粒。替代地,可通过使用已知的转染试剂转染提供质粒。

[0090] 对于静脉内、皮下、肌内、鞘内和/或真皮内施用,优选的溶液是等渗(盐水)溶液。在本发明中特别优选的是赋形剂或转染试剂的使用,该赋形剂或转染试剂将有助于将本文定义的每种成分递送至细胞和/或细胞中,优选皮肤(真皮和表皮)细胞。优选的是能够形成复合物、纳米颗粒、胶束、囊泡和/或脂质体的赋形剂或转染试剂,其将本文所述的每种组分复合或捕获在囊泡或脂质体中递送通过细胞膜。许多这些赋形剂是本领域已知的。合适的赋形剂或转染试剂包括能够自组装成可将本文所定义的每种成分递送至细胞(优选皮肤(真皮或表皮)细胞)的颗粒的聚乙烯亚胺(PEI; ExGen500 (MBI Fermentas)、LipofectAMINE™2000 (Invitrogen) 或其衍生物、或类似的阳离子聚合物(包括聚丙烯亚胺或聚乙烯亚胺共聚物(PEC)和衍生物)、合成两亲物(SAINT-18)、lipofectin™、DOTAP和/或病毒衣壳蛋白。已经表明这样的赋形剂有效地将比如反义核酸的寡核苷酸递送到多种培养的细胞,包括皮肤(真皮和表皮)细胞。就总体细胞存活而言,它们的高转染潜能与可接受的低至中等的毒性相结合。结构修饰的简便性可用于允许进一步修饰和分析其进一步(体内)核酸转移特点和毒性。

[0091] Lipofectin代表脂质体转染试剂的实例。它由两种脂质组分组成,即阳离子脂质N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基铵氯化物(DOTMA) (cp. DOTAP, 其为甲基硫酸盐)和中性脂质二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)。中性组分介导细胞内释放。另一组递送系统是聚合物纳米颗粒。

[0092] 作为DNA转染试剂而公知的比如二乙基氨基乙基氨基乙基(DEAE)-葡聚糖的聚阳离子可与丁基氰基丙烯酸酯(PBCA)和己基氰基丙烯酸酯(PHCA)组合以配制阳离子纳米颗粒,该阳离子纳米颗粒可递送本文所述的每种成分(优选寡核苷酸)跨细胞膜进入细胞。

[0093] 除了这些常见的纳米颗粒材料,阳离子肽鱼精蛋白提供了用胶体制配寡核苷酸的替代方法。该胶体纳米颗粒系统可形成所谓的鱼精蛋白类纳米粒子(protoic),其可通过简单的自组装工艺制备以包装和介导寡核苷酸的细胞内释放。本领域技术人员可以选择和采用任何上述或其它可商购替代赋形剂和递送系统,以包装和递送用于本发明的外显子跳跃分子,以将其用于预防、治疗或延缓与COL7A1基因中突变的外显子73相关联的疾病或病症。

[0094] 另外,根据本发明的外显子跳跃分子可共价地或非共价地连接到经特异性设计的靶向配体以促进摄取到细胞(尤其是皮肤(真皮)细胞)、细胞质和/或其核中。此类配体可包括(i)识别促进细胞摄取的细胞、组织或器官特异性元件的化合物(包括但不限于肽(样)结构),和/或(ii)能够促进细胞摄取和/或由囊泡(例如核内体或溶酶体)的寡核苷酸的细胞内释放的化学化合物。

[0095] 因此,在优选的实施方式中,将根据本发明的外显子跳跃分子配制成组合物或药物或组合物,该组合物或药物被提供有至少一种赋形剂、和/或一种用于递送的靶向配体、和/或一种将其递送至细胞和/或增强其细胞内递送的递送装置。

[0096] 优选的递送是通过表面的施用。如所附实施例中所概述,这可以通过使用药学上可接受的水凝胶,比如已经用于患者护理中的水凝胶Flaminal hydro™, (2)羟丙甲纤维素

水凝胶或(3)卡波姆水凝胶。可以用于表面地递送本发明的寡核苷酸的表面的剂型是：

[0097] 乳膏：其配制成油包水或水包油乳剂；后者在化妆上和审美上更可接受。实例为索肤散(Softisan)类乳膏或聚西托醇乳膏。

[0098] 凝胶：溶液或悬浮液，其含有均匀分布在整個液相中的胶凝剂。实例为水凝胶，包括但不限于羟丙甲纤维素、卡波姆和藻酸盐。

[0099] 软膏剂：这些通常含有<20%的水和>50%的碳氢化合物、作为载体的蜡或多元醇。它们具有的皮肤感觉比乳膏更油腻。

[0100] 糊剂：这些含有高百分比的硬度一致的细分散固体。

[0101] 悬浮液：其是含有分散在液体载体中的固体颗粒的液体制剂。一些可以标注为洗剂。

[0102] 洗剂：这些是流动的有些粘性(乳剂)剂型，其具有悬浮液、低粘度凝胶和溶液的许多共同特点。

[0103] 泡沫剂：其是当分散时具有蓬松一致性的乳剂。

[0104] 喷剂：其是由喷嘴产生的细小的液滴。

[0105] 溶液：其是通常为水性但可以含有比如醇的其它溶剂的液体产品。

[0106] 应当理解，如果组合物包含附加的成分比如本文所述的辅料化合物，则组合物的每种成分可以配制成单一组合或组合物或制剂。根据其特性，技术人员将知道哪种类型的剂型对于如本文所述的每种成分最适当。根据一个实施方式，本发明提供组合物或制剂，其为包含根据本发明的外显子跳跃分子和本文所述的另外的辅料化合物的成套部分的形式。

[0107] 如果需要，可通过添加药学上可接受的载体，将根据本发明的外显子跳跃分子或表达根据本发明的外显子跳跃分子的载体(优选病毒载体)并入药物活性混合物中。

[0108] 因此，本发明还提供包含根据本发明的外显子跳跃分子(比如裸AON)或根据本发明的病毒载体和药学上可接受的赋形剂的组合物、优选药物组合物。此类组合物可以包含根据本发明的单一外显子跳跃分子，但也可以包含根据本发明的多种不同的外显子跳跃分子。此类药物组合物可以包含任何药学上可接受的赋形剂，包括载体、填充剂、防腐剂、佐剂、增溶剂和/或稀释剂。此类药学上可接受的载体、填充剂、防腐剂、佐剂、增溶剂和/或稀释剂可以例如在雷明顿(Remington)，2000中找到。所述组合物的每种特征已经较早在本文中定义。

[0109] 如果使用根据本发明的多种不同的外显子跳跃分子，则本文所定义的程度或剂量可以是指使用的所有寡核苷酸的总浓度或剂量，或者使用或添加的每种外显子跳跃分子的浓度或剂量。因此，在一个实施方式中，提供一种组合物，其中使用的根据本发明的外显子跳跃分子的单量或总量以在0.0001-100mg/kg，优选地0.001-50mg/kg，还更优选地在0.01-20mg/kg之间的范围的范围的量给药。

[0110] 根据本发明的优选的外显子跳跃分子是用于治疗DEB，或更普遍地，治疗个体的与突变的COL7A1外显子73相关的疾病或病症。在本发明的所有实施方式中，术语“治疗”应理解为包括疾病或病症的预防和/或延缓。可使用根据本发明的外显子跳跃分子治疗的个体可以已经被诊断为患有DEB或与COL7A1外显子73相关的疾病或病症。替代地，可使用根据本发明的外显子跳跃分子治疗的个体可以尚未被诊断，但考虑到他或她的遗传背景，该个体可以是在未来具有增加的DEB或与COL7A1外显子73相关的疾病或病症发生风险的个体。优

选的个体是人类。在优选的实施方式中，与突变的COL7A1外显子73相关的疾病或病症是DEB。

[0111] 本发明还提供根据本发明的外显子跳跃分子(比如AON)、或根据本发明的编码AON的载体(比如病毒载体)、或根据本发明的包含AON或编码AON的载体的组合物,其用作例如用于治疗DEB或更普遍的个体的与突变的COL7A1外显子73相关的疾病或病症(如上所述)的药物。

[0112] 本发明还提供根据本发明的外显子跳跃分子(比如AON)、或根据本发明的编码AON的载体(比如病毒载体)、或根据本发明的包含AON或编码AON的载体的组合物用于制造药物的用途,该药物用于治疗DEB或更普遍的个体的与突变的COL7A1外显子73相关的疾病或病症(如上所述)。

[0113] 本发明还提供用于对在其基因组中携带引起疾病或病症(包括DEB)的COL7A1基因的外显子73中的突变的哺乳动物(优选人类)进行治疗的方法,该方法包括向哺乳动物(人类)施用本发明的AON、(病毒)载体或药物组合物。这些患者可患有DEB或相关病症,或有发生DEB或相关病症的风险。相关病症、疾病或状况还涵盖例如皮肤癌(鳞状细胞癌)或其他癌症,其可以作为由COL7A1基因外显子73的突变引起的或与之相关联的个体皮肤或其它器官中的胶原蛋白VII缺乏或异常的结果而出现。

[0114] 本发明的另一个实施方式是根据本发明的AON、编码AON的病毒载体和包含AON的药物组合物,其用作药物以对在其基因组中携带COL7A1基因的外显子73的突变的哺乳动物(优选人类)进行治疗。

[0115] 可以通过由吞咽、注射、吸入、输注、喷雾的口服、眼内、肺内、鼻内、肌内、皮下、皮内、直肠施用来向患者全身地、局部地、表面地施用呈(水)溶液、悬浮液、(水包油)乳剂、软膏剂、锭剂、丸剂形式的根据本发明的外显子跳跃分子。

[0116] 根据施用途径和患者的需要,给药可以每天、每周、每月、每季度、每年一次。

[0117] 由于疾病的早期发病,所以患有由COL7A1基因的突变的外显子73引起的或与之相关联的疾病、病症或病况(包括DEB),或处于形成该疾病、病症或病况(包括DEB)风险的患者,可以在症状的发病之前或之后,在子宫内、直接在出生后、从1、2、3、6月龄、从1岁、从3岁、从5岁治疗,以缓解、减缓发展、停止或逆转疾病的症状等。

[0118] 在根据本发明的用途或方法中的治疗是至少一周、至少一个月、至少若干月、至少一年、至少2、3、4、5、6年或长期地、甚至在患者整个生命期间。根据本发明使用的如本文所述的每种外显子跳跃分子或外显子跳跃寡核苷酸或其等同物可以适用于直接施用于已经受感染或处于形成与突变的COL7A1外显子73相关的病症、疾病或病况的风险的个体的体内细胞、组织和/或器官,并且可以直接在体内、离体或体外施用。本发明的寡核苷酸、组合物、化合物或辅料化合物的施用频率可以取决于若干参数,比如患者的年龄、外显子跳跃分子的性质(例如,裸AON或载体化的AON,比如AAV或慢病毒载体表达的AON)、所述分子的剂量、剂型等。

[0119] 优选地,根据本发明的外显子跳跃分子(优选寡核苷酸)的剂量范围是基于存在严格的方案要求的临床试验(体内使用)中的增加剂量研究来设计的。可以以0.0001mg/kg至100mg/kg,优选地0.01mg/kg至20mg/kg的剂量范围使用如本文所述的寡核苷酸。剂量和治疗方案可以变化很大,这取决于许多因素,包括但不限于施用途径(例如全身地与表面地)、

寡核苷酸是作为裸AON还是作为载体化的AON施用、给药方案、患者的年龄和体重等。

[0120] 在优选的实施方式中,根据本发明作为用于分子的递送工具的如本文较早描述的病毒载体(优选AAV载体)以每次注射 $1 \times 10^9$ 至 $1 \times 10^{17}$ 个病毒颗粒、更优选每次注射 $1 \times 10^{10}$ 至 $1 \times 10^{14}$ 、并且最优选 $1 \times 10^{10}$ 至 $1 \times 10^{12}$ 个病毒颗粒的范围的剂量施用。

[0121] 对于本发明所属领域的技术人员将显而易见的是,治疗细节将根据并取决于比如以下因素来建立:寡核苷酸的序列和化学性质、施用途径、剂型、剂量、给药方案、形式(病毒载体或裸寡核苷酸)、患者的年龄和体重、疾病阶段等,这可能需要进一步的非临床和临床研究。

[0122] 本发明还提供用于防止或至少减少COL7A1外显子73包含到细胞中的方法,该方法包括使细胞(优选皮肤细胞(真皮成纤维细胞))与根据本发明的外显子跳跃分子比如裸AON或编码根据本发明的AON的(病毒)载体或根据本发明的组合物接触。优选地,该方面的特征是本文中较早定义的那些。

[0123] 除非另有说明,否则本文所述的每个实施方式可与本文所述的另一个实施方式组合。

[0124] 当COL7A1基因在哺乳动物(优选人类)细胞中表达时,外显子跳跃分子比如根据本发明的AON或编码这样的AON的(病毒)载体防止或至少减少突变的COL7A1外显子73包含的能力,以及在生理条件下在影响5'剪切受体选择的区域中与哺乳动物(人类)COL7A1前体mRNA结合、并且从而减少突变的外显子73包含到COL7A1 mRNA中的能力,能够使用本文实验部分中公开的试验方便地进行评估。具体地,可将外显子跳跃分子与含有COL7A1基因的外显子73(不一定是突变的)的细胞一起温育,以例如通过RT-PCR评估其减少细胞形成包含外显子73的mRNA的能力(其能够使用生物分析仪设备进行量化),如本文实验部分和实施例中所所述。

[0125] 如在本文的实验部分和实施例中可观察到的,在RNA水平,添加根据本发明的靶向COL7A1基因的外显子73的各种AON确实产生缺少外显子73的mRNA,导致产生较短但具功能性的胶原VII蛋白质。

[0126] 在成纤维细胞(其可衍生自皮肤的真皮部分)中大量表达胶原蛋白VII。因此,预期将AON添加到来自DEB患者的培养的成纤维细胞中将导致在蛋白质印迹上可检测到的缩短但具功能性的胶原VII蛋白质的量增加,并且因此将证明基于AON的疗法将不仅重定向COL7A1 mRNA的剪切,而且也将导致恢复胶原蛋白VII功能性。

[0127] 术语“腺嘌呤”、“鸟嘌呤”、“胞嘧啶”、“胸腺嘧啶”、“尿嘧啶”和次黄嘌呤(肌苷中的核碱基)是指核碱基本身。

[0128] 术语腺苷、鸟苷、胞苷、胸苷、尿苷和肌苷是指与(脱氧)核糖连接的核碱基。

[0129] 术语“核苷”是指与(脱氧)核糖连接的核碱基。

[0130] 在本文及其权利要求中,动词“包括(comprise)”及其变体在其非限制性意义上用于意指包括该词后面的项目,但不排除未特定提及的项目。此外,除非上下文明确要求存在一个且唯一的要素,否则由不定冠词“一”或“一个”对要素的引用不排除存在多于一个要素的可能性。因此,不定冠词“一”或“一个”通常意指“至少一个”。

[0131] 词“包括(include)”及其所有时态和变体应被看作“包括但不限于”。

[0132] 词“外显子跳跃分子”旨在包括裸AON和能够在相容细胞中表达AON的载体化(包括

病毒载体)的AON。

[0133] 当词“约”或“大约”与数值相关联地使用(例如约10)时,优选地意指该值可以是给定值(10)加上或减去该值的5%。

[0134] 如本文提供的序列信息不应被如此狭义地解释为需要包含错误鉴定的碱基。本领域技术人员能够鉴定此类错误鉴定的碱基,并且知晓如何改正此类错误。在序列错误的情况下,应以通过含有编码多肽的核酸序列的SEQ ID NO:1中存在的基因的表达可获得的多肽的序列为准。

[0135] 实施例

[0136] 实施例1:外显子73的mRNA分析

[0137] 为了检测COL7A1 mRNA中外显子73的mRNA的存在,使用HeLa细胞和人原代成纤维细胞(HPF)的提取的mRNA。在(a)补充有10%胎牛血清(FBS)的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium) (DMEM) (对于HeLa细胞)或(b)补充有20%FBS和1%丙酮酸钠的DMEM AQE(对于HPF细胞)中进行细胞培养。所有细胞在37°C 5%CO<sub>2</sub>下生长。

[0138] 为了确定所述AON的外显子跳跃效率,将细胞以60,000个细胞/孔(HeLa)接种到12孔板或以150,000个细胞/孔(HPF)接种到6孔板中。在允许细胞生长的24小时后,用100nm AON-maxPei复合物转染细胞。用ReliaPrep<sup>TM</sup> RNA细胞微量制备系统(普洛麦格(Promega))进行RNA分离,随后使用Thermo Scientific Verso试剂盒制备cDNA。用位于外显子71-72边界的FW引物(5'-GCTGGCATCAAGGCATCT-3';SEQ ID NO:51)和位于外显子74内的RV引物(5'-TCCTTTCTCT CCCCGTTCTC-3';SEQ ID NO:52)进行外显子73的PCR。使用DNA1000芯片,用生物分析仪可视化PCR产物,并且使用软件Expert2100用于产品长度分析。

[0139] 表2中示出跳跃效率,并且图3示出芯片上实验室结果。根据本发明的指定为AON1至AON4、AON20至AON25(包括AON24.1至AON24.5)和m-h AON1的AON具有最佳效率,其中具有外显子73的mRNA的>70%被去除。有效的AON靶向于前体mRNA的5'末端。

[0140] 表2:HPF细胞和HeLa细胞中的mRNA不包含外显子73的效率

	HPF	HeLa	AON 序列 5' - 3'	SEQ ID NO	注释
ESE73.3	82%	96%	UCUCCACGGUCGCCCCUUCAGCCCGCUUCU	37	
ESE73.7	80%	73%	UCUCCACGGUCGCCCCUUCAGCCCGC	38	
AON1	67%	86%	UCUCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	5	
AON2	69%	85%	AGCCCGCUUCUCCAGGAAAGCCGA	6	
AON3	67%	92%	GUCGCCCCUUCAGCCCGCUUCUCCA	7	
AON4	91%	83%	ACGGUCGCCCCUUCAGCCCGCUU	8	
AON5	10%	3%	CCCCUGAGGGCCAGGGUCUCCACGG	9	
AON6	2%	0%	CAGACCAGGUGGCCCCUGAGGGCCA	10	
AON7	4%	0%	CCAAGGGCCAGACCAGGUGGCCCC	11	
AON8	0%	0%	CCAGACCAGGUGGCCCCUGAGGGCC	12	
AON9	0%	0%	UCUCCCCAAGGGCCAGACCAGG	13	
AON10	0%	0%	GGAAGGCCCGGGGGGCCCUUCUC	14	
AON11	6%	6%	CCGGCAAGGCCGGAAGGCCCGGGG	15	
AON12	0%	0%	AGGCUUUCAGGCUCCCCGGCAAG	16	
AON13	0%	2%	CGGGAUACCAGGCUUUCAGGCU	17	
AON14	17%	25%	UGCCUGGGAGCCCGGGAUACCA	18	
AON15	8%	8%	CCCACACCCCAGCCUGCCUGGG	19	
AON16	8%	0%	CCUCUCCCACACCCCAGCCCU	20	
[0141] AON17	9%	9%	UCUCUCCUGGCCUUCUGCCUCU	21	
AON18	11%	13%	CACCCUCUCUCCUGGCCUUCU	22	
AON19	0%	7%	CCAGCCUCACCCUCUCUCCUGG	23	
AON20	74%	100%	CUCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	24	AON1-1N在3"处
AON21	58%	89%	UCCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	25	AON1-2N在3"处
AON22	64%	85%	CCAGGAAAGCCGAUGGGGCC	26	AON1-3N在3"处
AON23	64%	83%	CUCCAGGAAAUCCGAUGGGGCCcu	27	AON1-N 在 3'+ 1 在 5'
AON24	72%	93%	UCCAGGAAAGCCGAUGGGGCCcug	28	AON1-2N 在 3'+2 在 5'
AON24.1	32%	73%	UCCAGGAAAGCCGAUGGG	39	
AON24.2	50%	88%	UCCAGGAAAGCCGAUGG	40	
AON24.3	49%	79%	UCCAGGAAAGCCGAUG	41	
AON24.4	53%	86%	CUCCAGGAAAGCCGAUGG	42	
AON24.5	66%	89%	UCUCCAGGAAAGCCGAUG	43	
AON25	54%	92%	CCAGGAAAGCCGAUGGGGCCcugc	29	AON1-3N 在 3'+3 在 5'
AON26	22%	49%	AGGAAAGCCGAUGGGGCCcugcag	30	2N 朝向5' 偏移
AON27	40%	37%	GAAAGCCGAUGGGGCCcugcagga	31	4N 朝向5' 偏移
AON28	20%	47%	AAGCCGAUGGGGCCcugcaggagu	32	6N 朝向5' 偏移
AON29	5%	0%	GCCGAUGGGGCCcugcaggagugg	33	8N 朝向5' 偏移
AON30	6%	7%	GAUGGGGCCcugcaggaguggaa	34	11N 朝向5' 偏移
AON31	0%	0%	UCCAGGAAAG	44	
m-hAON 1	76%	91%	CGUUCUCCAGGAAAGCCGAUG	35	
m-hAON 2	0%	16%	CCUGAGGGCCAGGGUCUCCACG	36	

[0142] 通过在3'末端处去除不同数量的核苷酸来截短表现出令人满意的外显子跳跃效率的AON中的两种,以便避免出现不期望的G-四联体。在表3中示出这些AON。

[0143] 表3:AON24和AON31的截短型式

名称	AON 序列	SEQ ID NO	RNA 结合序列	SEQ ID NO	长度
AON 24.1	UCCAGGAAAGCCGAUGGG	39	CCCAUCGGCUUUCUGGA	45	18
[0144] 24.2	UCCAGGAAAGCCGAUGG	40	CCAUCGGCUUUCUGGA	46	17
24.3	UCCAGGAAAGCCGAUG	41	CAUCGGCUUUCUGGA	47	16
24.4	CUCCAGGAAAGCCGAUGG	42	CCAUCGGCUUUCUGGAG	48	18
24.5	UCUCCAGGAAAGCCGAUG	43	CAUCGGCUUUCUGGAGA	49	18
AON 31	UCCAGGAAAG	44	CUUUCUGGA	50	10

[0145] 这些AON有效地减少外显子73包含到COL7A1 mRNA中(参见表1),同时没有从可制造性、纯化和分析角度上来看较不期望的任何序列,或由于复合而导致功能整体丧失的机会。

[0146] 不含外显子73的胶原蛋白VII的功能性能够使用文献中描述的若干体外方法处理:

[0147] 1. 使用蛋白质印迹法的 $\alpha 1$ -胶原蛋白链的大小和正确组装的蛋白质分析(Titeux等人2010)。值得注意的是,由于跳跃的外显子的大小较小并且野生型蛋白质的大小很大,可能得不到蛋白质大小方面的明显差异。

[0148] 2. 通过非还原条件下使用蛋白质印迹法的胶原蛋白VII同型三聚体的热稳定性分析。野生型胶原蛋白VII由三个 $\alpha 1$ -胶原蛋白链构成,并且 $T_m$ 为41°C (Mecklenbeck等人,2002)。

[0149] 3. 使用胶体金或划痕试验的细胞迁移分析。比较表达野生型胶原蛋白VII与截短的不含外显子73的蛋白质的成纤维细胞和/或角质形成细胞的运动性(Chen等人2002)。

[0150] 4. 可评估对各种细胞外基质组分的细胞粘附性,例如对胶原蛋白IV、层粘连蛋白-332、层粘连蛋白-1或纤连蛋白的细胞粘附性(Chen等人2002)。

[0151] 本发明人假定在防止或至少减少外显子73包含到哺乳动物(优选人类)COL7A1 mRNA中的方面表现出最佳效果的AON将在如可容易地使用现有技术的上述方法评估的胶原蛋白VII功能性方面提供令人满意的结果。此外,包含不多于两个(优选地不多于一个,比如一个)CpG的AON在体内免疫原性方面将表现令人满意。因此,本发明最优的AON是用于开发成治疗剂的候选物,适合于对患有与COL7A1基因的外显子73突变相关联的营养不良型大疱性表皮松解症类型的人、或处于患有该营养不良型大疱性表皮松解症类型的风险的人进行治疗。

[0152] 实施例2:使用离体猪的皮肤模型的mh-AON1的表面递送

[0153] 目前DEB患者的伤口处理主要集中在伤口护理、瘙痒和疼痛的处理以及鳞状细胞癌的早期诊断。伤口护理包括通过(氯化物)浴、使用作为消毒剂的氯己定和其它抗微生物乳膏的手段来清洁和消毒伤口。另外,使用水凝胶使伤口吸入水分和润湿以减轻疼痛和瘙痒。最后,伤口护理涉及用不同类型的敷料/硅酮泡沫包扎以保护和减少对皮肤的摩擦,防止污染,防止材料粘附,从伤口吸收液体,以防止水疱大小增大,刺穿并排干水疱以从内部减小压力。

[0154] mh-AON1的表面递送提供了几个优点,首先由于局部递送,将存在到靶细胞、角质形成细胞和成纤维细胞的直接递送。其次由于局部施用,全身性吸收将只是微小的,产生较小的全身性毒性(Wraight&White Pharmacol Ther 2001Apr;90(1):89-104)。最后,已经表明,在表面施用寡核苷酸之后,真皮和表皮中的局部浓度能够高达全身性施用之后的150倍

(对于真皮)以及4000倍(对于表皮)(Metha等人,《皮肤病学研究杂志(J Invest Dermatol.)》2000Nov;115(5):805-12)。

[0155] 为了研究mh-AON1的表面递送,建立了内部离体猪的皮肤模型。猪的皮肤被认为与人皮肤非常相似,具有相同的表皮厚度和角质层的屏障特性。对于递送研究,接收猪的离体皮肤,将其切割成0.8mm至1.4mm之间的厚度,并在空气-液体界面处培养,其中顶端部位暴露于空气。在DEB患者的伤口中,表皮与真皮完全分离,因此通过机械地完全去除表皮来模拟这些伤口。为了评估mh-AON1到完整或水疱状离体猪的皮肤中的皮肤渗透性,在PBS或在作为DEB标准伤口护理的部分的水凝胶中配制寡核苷酸。在暴露于mh-AON1之后,将皮肤片固定在4%福尔马林中,处理并包埋在石蜡中,以使用苏木精作为形态学的复染剂来进行组织学评估。由于寡核苷酸与Cy5标记物偶联,所以可通过荧光显微镜可视化mh-AON1的位点。

[0156] 在PBS中配制的mh-AON1

[0157] 将完整的和水疱状的离体猪的皮肤片与在PBS中配制的25 $\mu$ g的mh-AON1一起温育24小时,其后对它们进行处理以进行分析。结果表明,添加到完整猪的皮肤片上的mh-AON1将不渗透角质层(图4a至图4b)。然而,当将mh-AON1配制物在水疱状猪皮肤上温育时,观察到寡核苷酸已渗透到真皮中(图4c至图4f)。

[0158] 在水凝胶中配制的mh-AON1

[0159] 对于在患者伤口上的应用,将mh-AON1并入软膏剂或凝胶中是有益的。由于DEB患者使用水凝胶作为其伤口护理的部分,例如以使伤口润湿,并从而减轻疼痛和瘙痒,所以测试了mh-AON1是否也可并入水凝胶中。为此,使用三种不同的水凝胶:(1) flaminol<sup>TM</sup>,其是已经用于患者护理的水凝胶,内部配制的(2)羟丙甲纤维素水凝胶和(3)卡波姆水凝胶。所有水凝胶已经经常在临床环境中使用。制备含有和不含有寡核苷酸的水凝胶配制物,并在皮肤片上涂布,对于每个皮肤片,将25 $\mu$ g mh-AON1配制到50mg的凝胶中,得到最终浓度为0.5mg/ml的寡核苷酸。

[0160] 观察到在flaminol<sup>TM</sup>、羟丙甲纤维素或卡波姆水凝胶中配制的mh-AON1永远不渗透离体猪的皮肤片的完整角质层(图5a、5c、5e、5g)。然而,所有三种水凝胶都可将寡核苷酸递送到去除表皮的水疱状的猪的皮肤的真皮中(图5b、5d、5f、5h)。对水凝胶的优化正在进行中,并且最终配制物的选择将基于真皮渗透深度、局部耐受性、mh-AON1组合物的pH、mh-AON1水凝胶配制物的稳定性和mh-AON1从水凝胶的释放。

[0161] 结论

[0162] DEB患者极大地受苦于他们的由于水疱、伤口和溃疡导致的脆弱皮肤。此外,他们需要持续的伤口护理。因此,经由表面递送途径评估mh-AON1。通过去除表皮(包括角质层)产生水疱状皮肤来模拟DEB患者皮肤。已经证明,在PBS或水凝胶中配制的mh-AON1能够渗透水疱状皮肤并到达真皮。这些结果证实了对患者的皮肤伤口的表面施用是将mh-AON1递送到皮肤中的靶细胞的可行方法。此外,这些研究结果证实了类似于EB护理标准的配制物似乎适合于递送mh-AON1。

[0163] 实施例3:在mRNA水平的效力测试

[0164] 使用两种不同的细胞类型来评估mh-AON1的效力:(1) HeLa和(2) 来自健康个体的皮肤衍生的人原代成纤维细胞(HPF)。两种细胞类型都表达COL7A1 mRNA并产生胶原蛋白VII型蛋白质。如本文公开的mh-AON1已经设计使COL7A1 mRNA不包含外显子73,并因此使转

录本不包含突变。由于mh-AON1靶向剪切过程,所以效力的最直接的可测量结果是在添加和不添加mh-AON1的情况下,对COL7A1转录本(野生型和 $\Delta$ 73)的图谱化和量化。

[0165] 通过聚合酶链反应(PCR)对COL7A1 mRNA水平的图谱化和量化

[0166] PCR是实现特定DNA(cDNA)序列的对数扩增的简单的技术。侧接外显子73的COL7A1序列特异性引物用于进行PCR反应。之后,使用芯片上实验室技术对形成的产物进行可视化,该技术允许区分不同片段长度的产物和基于得率的量化分析。

[0167] 对于外显子73跳跃实验,使用聚乙烯亚胺(Poly I:C)作为转染载体,用浓度为100nM的mh-AON1转染HPF细胞和HeLa细胞。转染后24小时或40小时,收集细胞,分离全部mRNA,合成cDNA,并使用COL7A1特异性引物(一个在外显子69中,并且一个在外显子74中)进行PCR。作为阴性对照,采用mh-AON1寡核苷酸的加扰(SCRM)型式。

[0168] 结果表明,如通过PCR确定的,与经SCRM治疗的细胞相比,用mh-AON1治疗导致COL7A1 mRNA中有效去除外显子73(图6)。此外,未经治疗的细胞中野生型mRNA的水平与经治疗的细胞中总COL7A1 mRNA的水平相当。由于PCR/生物分析仪方法是信息性的而不是绝对量化的,因此在这些初步研究结果之后,使用提供高度准确和绝对量化的核酸片段的微滴数字PCR测定。

[0169] 用微滴数字PCR对COL7A1 mRNA转录本进行图谱化和量化

[0170] 通过将PCR样品分配成数千个微滴,微滴数字PCR(ddPCR)提供高度准确和绝对量化的核酸。以每个微滴含有一个或不含有COL7A1 cDNA分子的这样的方式调整COL7A1 mRNA/cDNA PCR输入。为了允许检测模板,将对野生型或 $\Delta$ 73 COL7A1特异性的探针添加到PCR混合物中。在图7中描绘这些探针的位置。探针中的一种对于野生型产物是特异性的,而另一种探针仅对于 $\Delta$ 73 COL7A1产物是特异性的。该探针在与模板结合后被水解并变得发光,因此在进行PCR扩增后,能够计数含有靶序列的荧光微滴。使用阳性和阴性微滴的数量的泊松统计分析,能够计算样品中绝对量化的野生型或 $\Delta$ 73 COL7A1 mRNA分子。

[0171] 用50nM、100nM或200nM mh-AON1转染HeLa细胞,以建立mh-AON1的剂量反应曲线。转染后24h的结果表明,用mh-AON1治疗产生COL7A1野生型转录本和 $\Delta$ 外显子73转录本。这些结果证实了用PCR观测到的观察结果。50nM的剂量在24h之后已经几乎达到最大效果。对于50nM和200nM的转染,在40h后,观察到 $\Delta$ 外显子73转录本的百分比略有增加(图8)。

[0172] 实施例4:体外免疫原性测试

[0173] 寡核苷酸具有引起脊椎动物先天免疫系统的模式识别受体(PRR)的激活的潜能。研究最多的PRR受体家族是toll样受体(TLR)。TLR是一类在先天免疫系统中起关键作用的蛋白质。它们是单一的、跨膜的非催化性受体,其通常在识别来自微生物的结构保守分子的巨噬细胞和树突状细胞中表达。由不同类型的核酸激活的TLR是位于核内体上的那些:TLR3(识别双链RNA);TLR7/8(识别双链和单链RNA);和TLR9(识别CpG-DNA)。

[0174] 在通过PRR识别这些组分时,触发特定的‘抗微生物’免疫应答。TLR激活导致激活的B细胞的核因子 $\kappa$ 轻链增强子(NF- $\kappa$ B)、干扰素调节因子3(IRF-3)和激活蛋白1(AP-1)的激活。AP-1、IRF-3和NF- $\kappa$ B的激活导致炎症细胞因子、I型干扰素和其它先天免疫应答介质的产生。这些过程不仅触发即时的宿主防御应答,比如炎症,而且还引发和协调抗原特异性的获得性免疫应答。

[0175] 体外暴露于mh-AON1的原代人外周血单核细胞(PBMC)用于评估(全身性)药品特异

性免疫应答和免疫毒性。使用PBMC的体外测定是使用(炎症)细胞因子的产生作为全身性免疫应答的替代标志的已建立的临床前试验。PBMC测定使得能够预测作为研究化合物的免疫原性和变应原性潜能的因素的耐受性,并且可使得能够估计这些化合物的安全剂量范围。

[0176] 对于mh-AON1的研究,使用从健康血库供体的血沉棕黄层获得的内部分离的PBMC。在用浓度在10nM至1 $\mu$ M范围的mh-AON1刺激24h后,评估培养物上清液中关键的促炎细胞因子的产生。另外,将具有可由NF- $\kappa$ B和/或AP-1诱导的分泌型胚胎碱性磷酸酶报告子构建体的染色体整合的Ramos-Blue (Invivogen, 人B细胞) 报告子细胞系用于评估通过mh-AON1和AON73.24.5的一般PPR介导的免疫激活。Ramos-Blue细胞表达相关的TLR集合,包括:TLR3、TLR-7/8和TLR-9。在用浓度在10nM至1 $\mu$ M范围的mh-AON1或AON73.25.4刺激24h后,测量NF- $\kappa$ B和/或AP-1的激活。此外,通过测量培养物上清液中发荧光的试卤灵,分析用mh-AON1治疗后的PBMC和Ramos-Blue的活力,以评估mh-AON1的潜在细胞毒性作用。活细胞将无荧光的刃天青转化为发荧光的试卤灵。

#### [0177] 人PBMC的结果

[0178] 用阳性对照LPS (TLR4激动剂) 和R848 (TLR7/8激动剂) 刺激人PBMC,导致培养物上清液中所有测量的细胞因子(IL-3除外)的浓度显著增加。此外,尽管是在较小的程度上,但是CpG DNA (TLR9激动剂) 或Poly (I:C) (TLR3激动剂) 的刺激诱导了类似的细胞因子模式。图9a示出热度图,该热度图描绘了与经盐水治疗的人PBMC相比,在用mh-AON1或阳性对照刺激后,培养物上清液中细胞因子浓度的显著水平。重要地,用浓度在10nM至1 $\mu$ M范围的mh-AON1刺激人PBMC不导致培养物上清液中任何测量的细胞因子的浓度增加,除了在最低浓度mh-AON1处的IFN- $\alpha$ 2(图9a)。然而,由于用mh-AON1刺激后上清液中IFN- $\alpha$ 2浓度的增加不是剂量相关的,所以这被认为是实验性异常值或技术误差(图9b)。最后,在用mh-AON1治疗后的24h没有细胞毒性的迹象(图9c)。相比之下,在用R848或10nM和100nM mh-AON1治疗后所观察到的活力略有增加,表明增加的细胞存活率、增强的细胞代谢或甚至增加的增殖/分化。

#### [0179] Ramos-Blue细胞的结果

[0180] 在人Ramos Blue细胞系中进行的免疫原性测定的结果表明,在用浓度在10nM至1 $\mu$ M范围的mh-AON1或AON73.24.5治疗24h后,NF- $\kappa$ B和/或AP-1未激活(图10a)。相比之下,阳性对照Poly (I:C) (1 $\mu$ g/ml)、CpG (10 $\mu$ g/ml) 和R848 (1 $\mu$ M) 确实诱导NF- $\kappa$ B和/或AP-1的激活。LPS不具有效应,因为TLR4在Ramos-Blue上不表达。此外,在用MH-AON1治疗24h后没有细胞毒性的迹象(图10b),证实了在人PBMC中获得的结果。

[0181] 应当理解,以上仅通过示例的方式描述本发明,并且在保持在本发明的范围和和精神内的同时可以进行修改。

## 序列表

<110> ProQR 治疗上市公司 II (PROQR THERAPEUTICS II B.V.)

<120> 用于大疱性表皮松解症治疗的与 COL7A1 外显子 73 配对的寡核苷酸

<130> P065922W0

<140> PCT/EP2016/\_\_\_\_\_

<141> 2016-03-11

<150> GB-1504124.7

<151> 2015-03-11

<160> 52

<170> SeqWin2010, 版本 1.0

<210> 1

<211> 201

<212> DNA

<213> 人类

[0001]

<400> 1

```

ggccccatcg gctttcctgg agaacgcggg ctgaaggcg accgtggaga ccctggcct 60
caggggccac ctggtctggc ctttggggag aggggcccc cgggccttc cggccttgcc 120
ggggagcctg gaaagcctgg tattcccggg ctcccaggca gggetggggg tgtgggagag 180
gcaggaaggc caggagagag g 201

```

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类

<400> 2

```

agcattctct cttccactcc tgcag 25

```

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> 人类

	<400> 3		
	gtgaggctgg gggctggcca ggaga		25
	<210> 4		
	<211> 8		
	<212> RNA		
	<213> 人类		
	<400> 4		
	uuuccugg		8
	<210> 5		
	<211> 24		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
	<400> 5		
	ucuccaggaa agccgauggg gcc		24
[0002]	<210> 6		
	<211> 25		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
	<400> 6		
	agcccgcguu cuccagaaa gccga		25
	<210> 7		
	<211> 25		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义寡核苷酸		
	<400> 7		
	gucgcccuc agcccgcguu cucca		25

	<210>	8	
	<211>	23	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	8	
		acggucgccc uucagcccgc guu	23
	<210>	9	
	<211>	25	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	9	
		ccccugaggg ccagggucuc cacgg	25
[0003]	<210>	10	
	<211>	25	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	10	
		cagaccaggu ggccccugag ggcca	25
	<210>	11	
	<211>	24	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	11	
		ccaaggcca gaccaggugg cccc	24

	<210>	12	
	<211>	25	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	12	
		ccagaccagg uggccccuga gggcc	25
	<210>	13	
	<211>	22	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	13	
		ucucccaag ggccagacca gg	22
[0004]	<210>	14	
	<211>	24	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	14	
		ggaaggcccg ggggggcccc ucuc	24
	<210>	15	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	15	
		ccggcaaggc cggaaggccc gggg	24

	<210>	16	
	<211>	24	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	16	
		aggcuuucca ggcucgcccg caag	24
	<210>	17	
	<211>	24	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	17	
		cgggaauacc agguuucca ggcu	24
[0005]	<210>	18	
	<211>	23	
	<212>	RNA	
	<213>	反义寡核苷酸	
	<400>	18	
		ugccugggag cccgggaaua cca	23
	<210>	19	
	<211>	24	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	19	
		cccacacccc cagcccugcc uggg	24
	<210>	20	
	<211>	22	

	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	20	
		ccucuccac acccccagcc cu	22
	<210>	21	
	<211>	23	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	21	
		ucucuccugg ccuuccugcc ucu	23
[0006]	<210>	22	
	<211>	22	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	22	
		caccucucu ccugccuuc cu	22
	<210>	23	
	<211>	22	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	23	
		ccagccuac ccucucuccu gg	22
	<210>	24	
	<211>	23	

	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	24	
		cuccaggaaa gccgaugggg ccc	23
	<210>	25	
	<211>	22	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	25	
		uccaggaaag ccgauggggc cc	22
[0007]	<210>	26	
	<211>	21	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	26	
		ccaggaaagc cgauggggcc c	21
	<210>	27	
	<211>	24	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	27	
		cuccaggaaa uccgaugggg ccu	24
	<210>	28	
	<211>	24	

	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	28	
		uccaggaaag ccgauggggc ccug	24
	<210>	29	
	<211>	24	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	29	
		ccaggaaagc cgauggggcc cugc	24
[0008]	<210>	30	
	<211>	24	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	30	
		aggaaagccg auggggcccu gcag	24
	<210>	31	
	<211>	24	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	31	
		gaaagccgau ggggcccugc agga	24
	<210>	32	
	<211>	24	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 32	
	aagccgaugg ggcccugcag gagu	24
	<210> 33	
	<211> 24	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 33	
	gccgaugggg cccugcagga gugg	24
[0009]	<210> 34	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 34	
	gauggggccc ugcaggagug gaa	23
	<210> 35	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 35	
	cguucuccag gaaagccgau g	21
	<210> 36	
	<211> 22	

	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	36	
		ccugagggcc agggucucca cg	22
	<210>	37	
	<211>	30	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	37	
		ucuccacggu cgcccuucag cccgcuucu	30
[0010]	<210>	38	
	<211>	25	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	38	
		ucuccacggu cgcccuucag cccgc	25
	<210>	39	
	<211>	18	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	39	
		uccaggaaag ccgauggg	18
	<210>	40	
	<211>	17	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 40	
	uccaggaaag ccgaugg	17
	<210> 41	
	<211> 16	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 41	
	uccaggaaag ccgaug	16
[0011]	<210> 42	
	<211> 18	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 42	
	cuccaggaaa gccgaugg	18
	<210> 43	
	<211> 18	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 43	
	ucuccaggaa agccgaug	18
	<210> 44	
	<211> 10	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 44	
	uccaggaag	10
	<210> 45	
	<211> 18	
	<212> RNA	
	<213> RNA 结合序列	
	<400> 45	
	cccaucggcu uuccugga	18
	<210> 46	
	<211> 17	
	<212> RNA	
	<213> RNA 结合序列	
[0012]	<400> 46	
	ccaucggcuu uccugga	17
	<210> 47	
	<211> 16	
	<212> RNA	
	<213> RNA 结合序列	
	<400> 47	
	caucggcuuu ccugga	16
	<210> 48	
	<211> 18	
	<212> RNA	
	<213> RNA 结合序列	
	<400> 48	
	ccaucggcuu uccuggag	18
	<210> 49	
	<211> 18	
	<212> DNA	

	<213> RNA 结合序列	
	<400> 49	
	caucggcuuu ccuggaga	18
	<210> 50	
	<211> 10	
	<212> RNA	
	<213> RNA 结合序列	
	<400> 50	
	cuuuccugga	10
	<210> 51	
	<211> 18	
[0013]	<212> DNA	
	<213> 引物	
	<400> 51	
	gctggcatca aggcatct	18
	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 52	
	tcctttctct cccggttctc	20

人外显子73 (201b)

5' ...agcattctcttccactcctgcagGCCCCATCGGCTTTCCTGGAGAACGGGGCTGAAGGGCGACCGTGG  
AGACCCTGGCCCTCAGGGCCACCTGGTCTGGCCCTTGGGGAGAGGGCCCCCCCCGGCCCTTCCGGCC  
TTGCCGGGAGCCTGGAAGCCTGGTATTCCCGGCTCCAGGCAGGGCTGGGGTGTGGAGAGGC  
AGGAAGCCAGGAGAGGgtgaggctgggggctggccaggaga...3'

图1

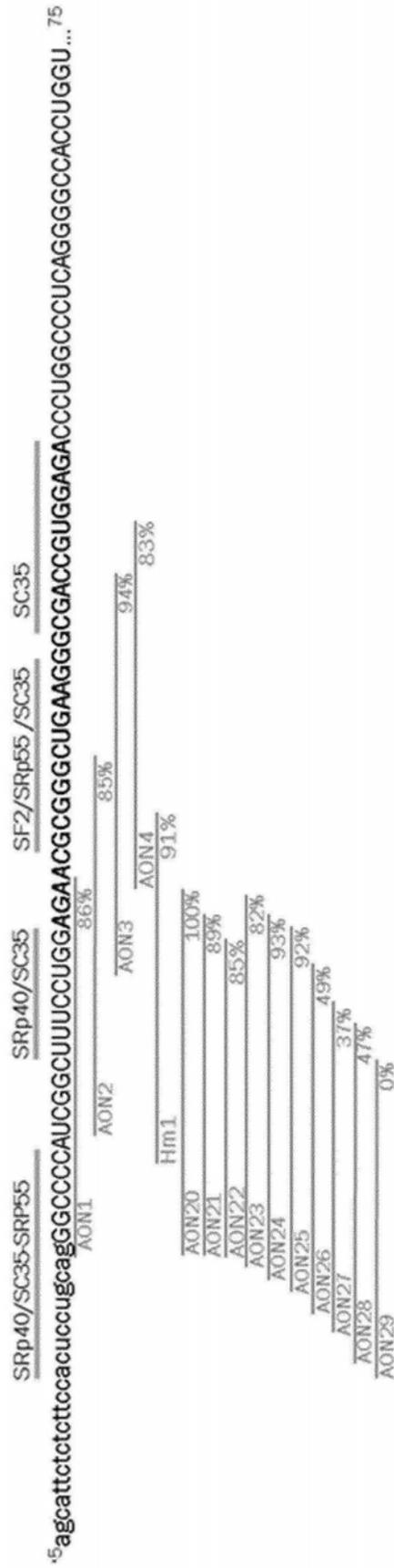


图2

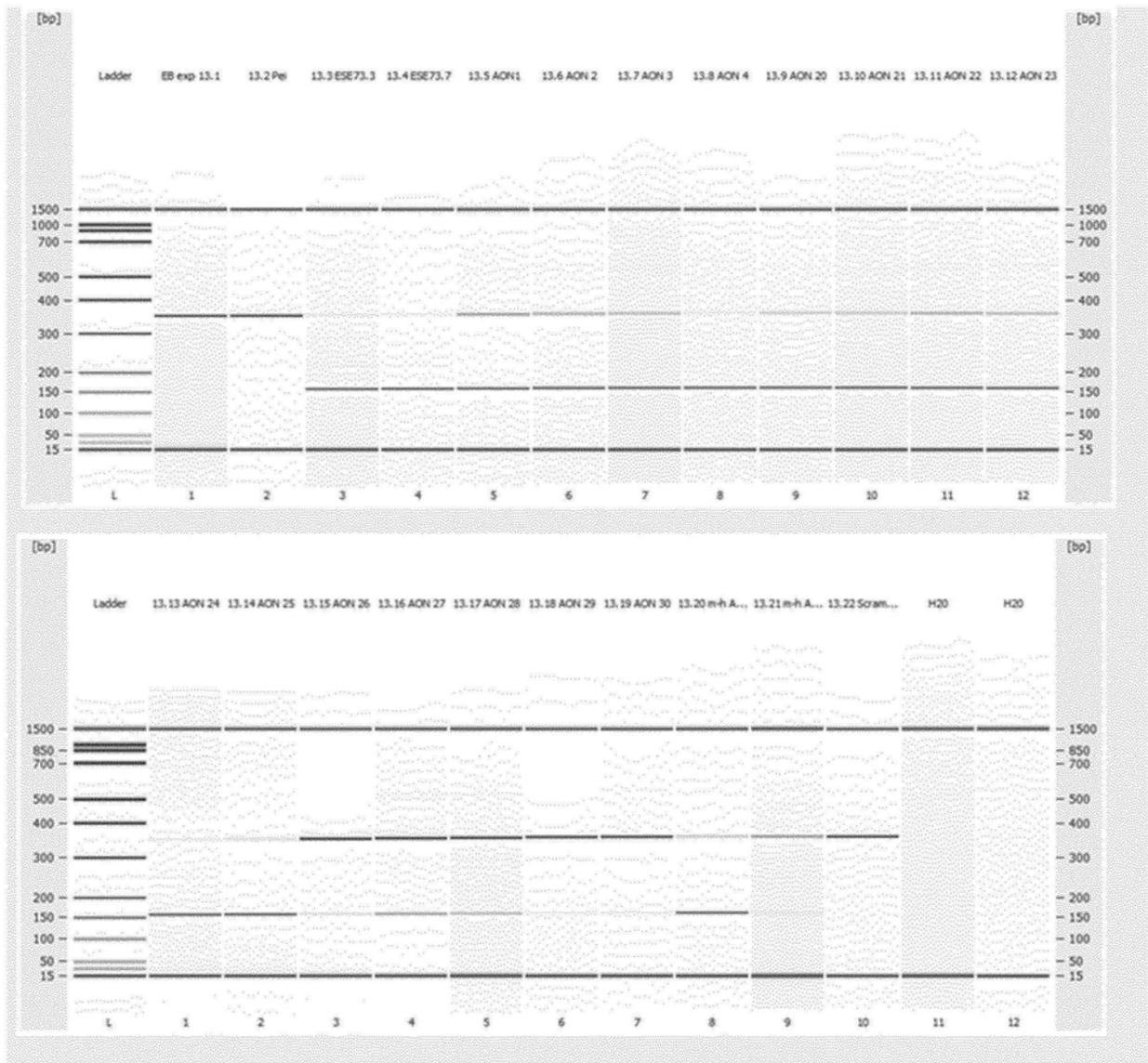


图3

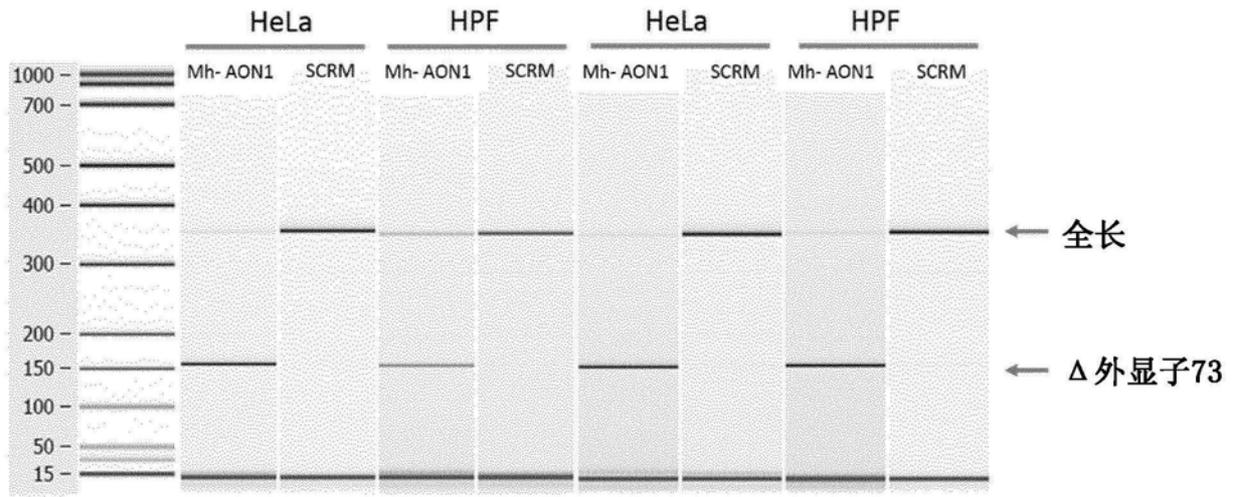


图6

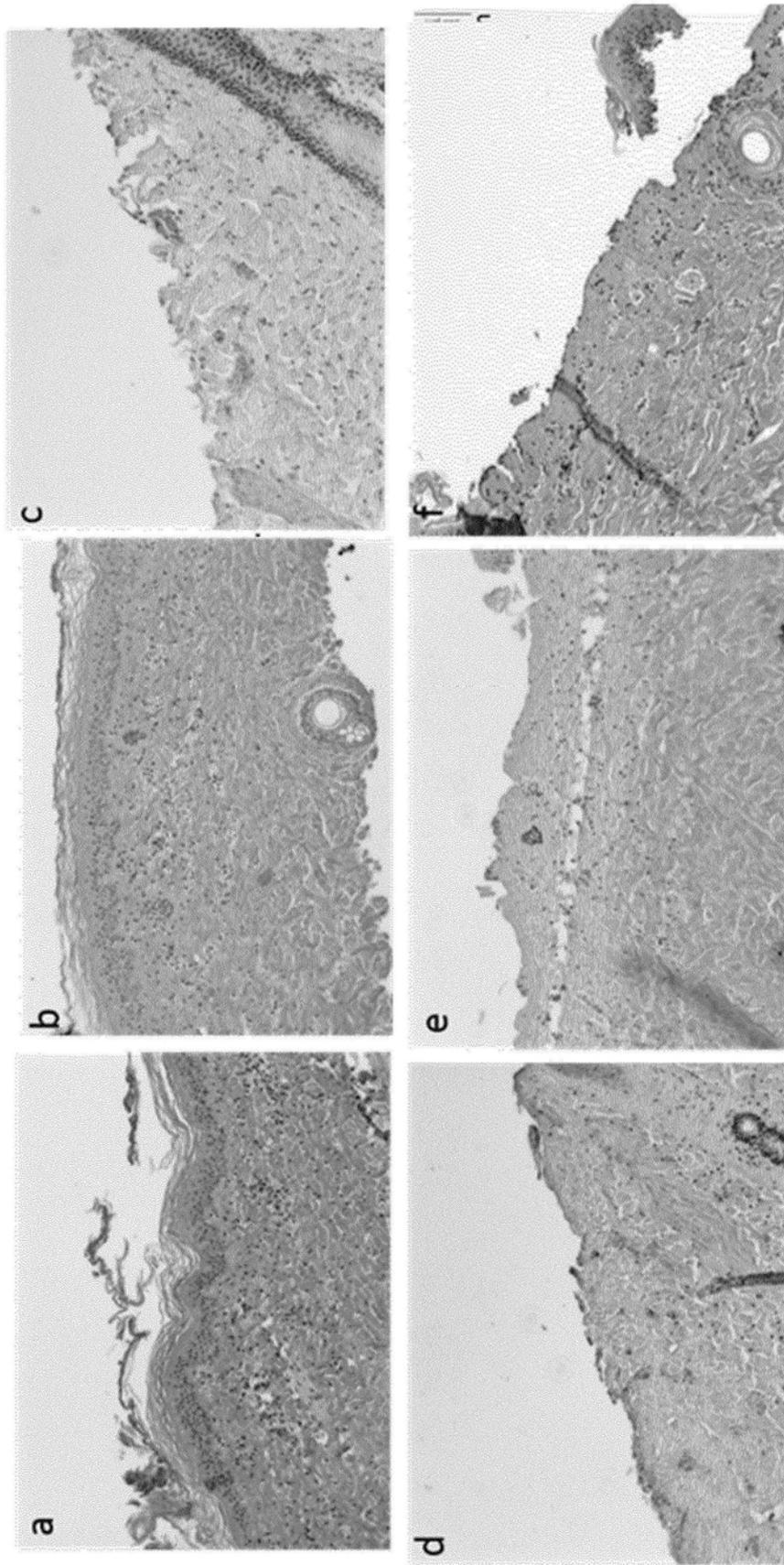


图4

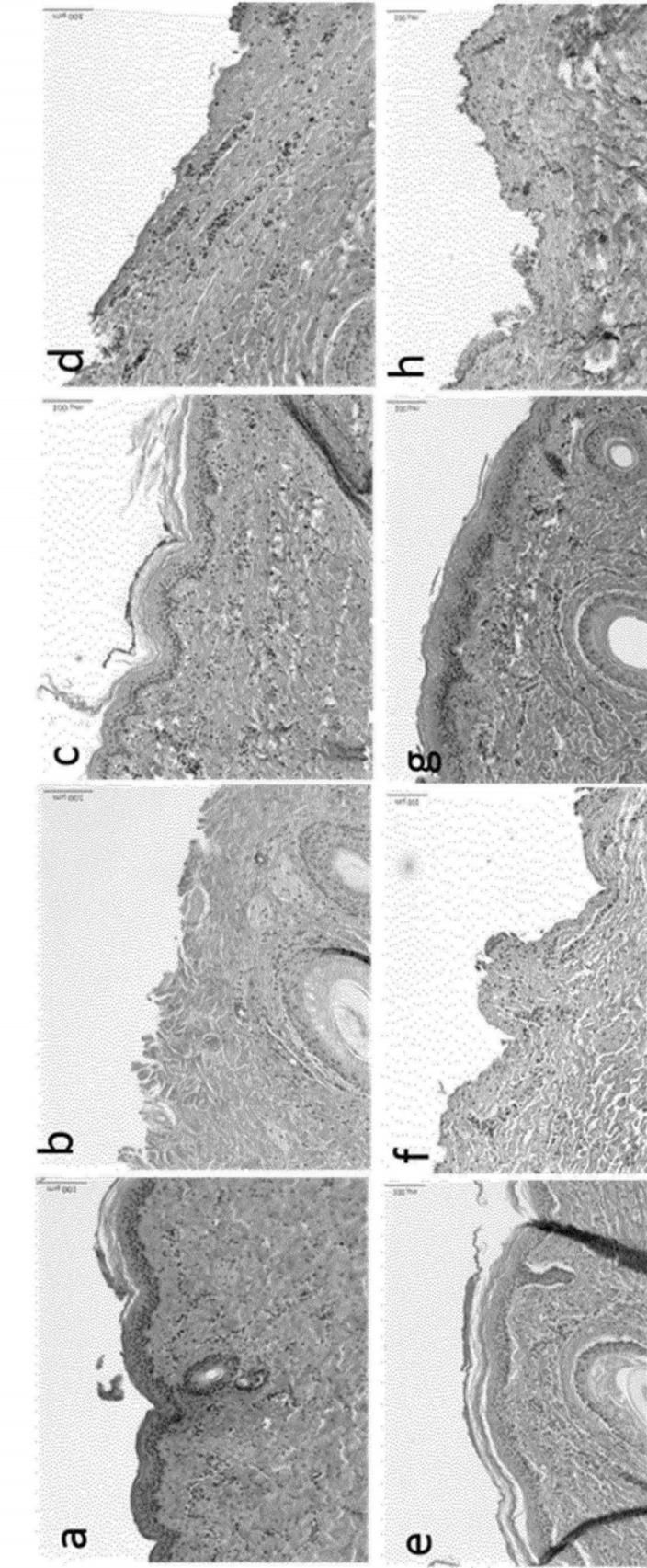


图5

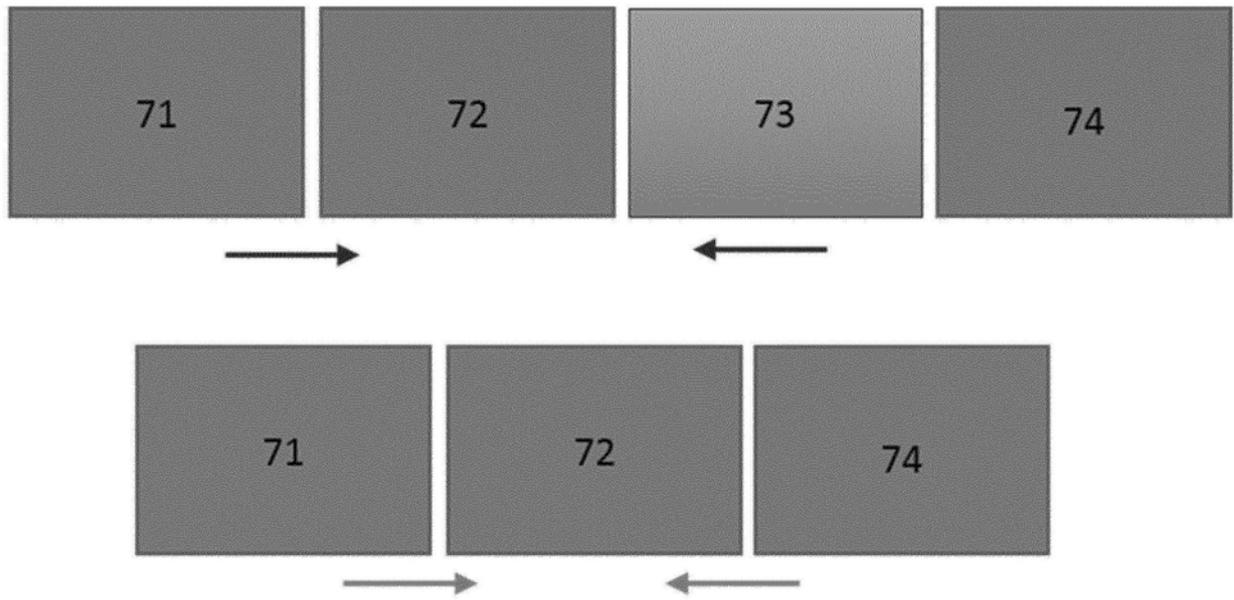


图7

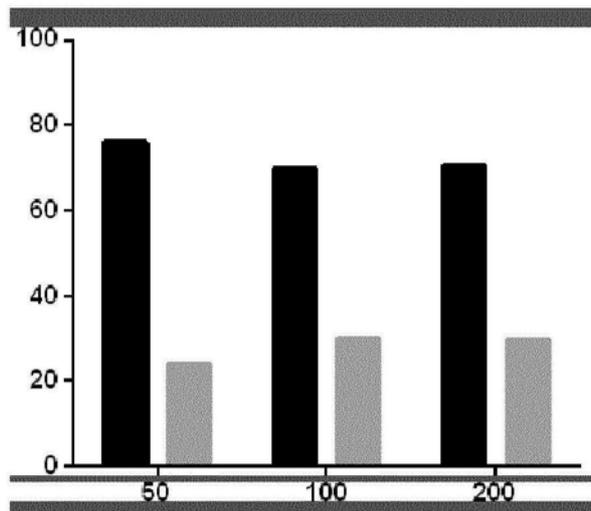


图8A

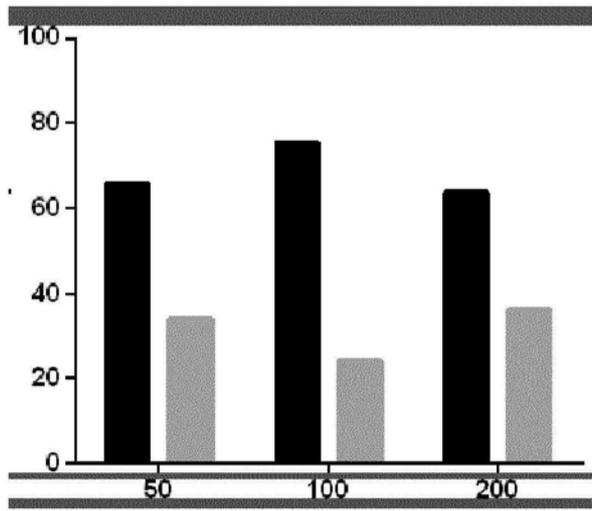
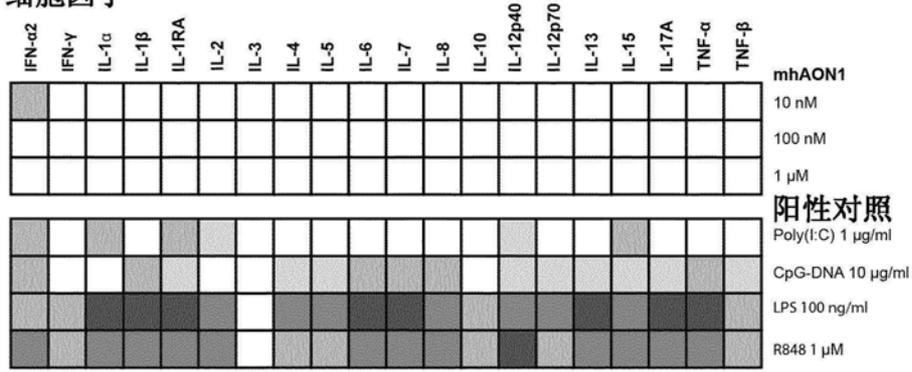
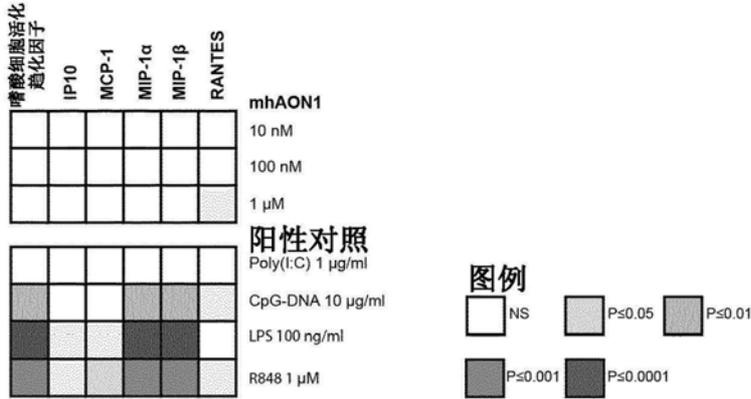


图8B

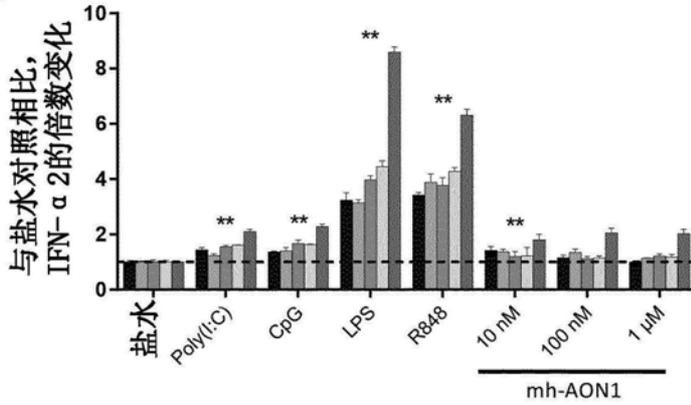
**a 细胞因子**



**趋化因子**



**b**



**c**

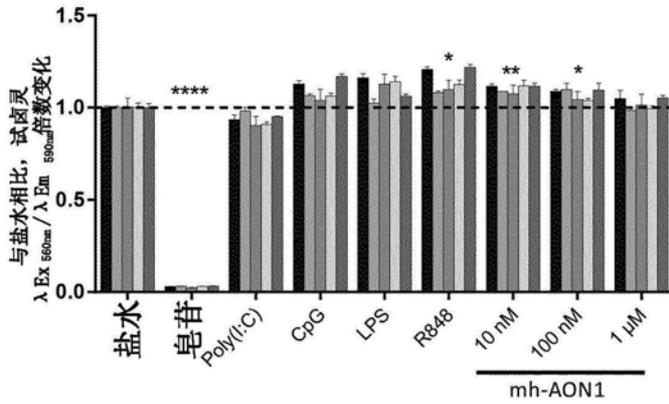


图9

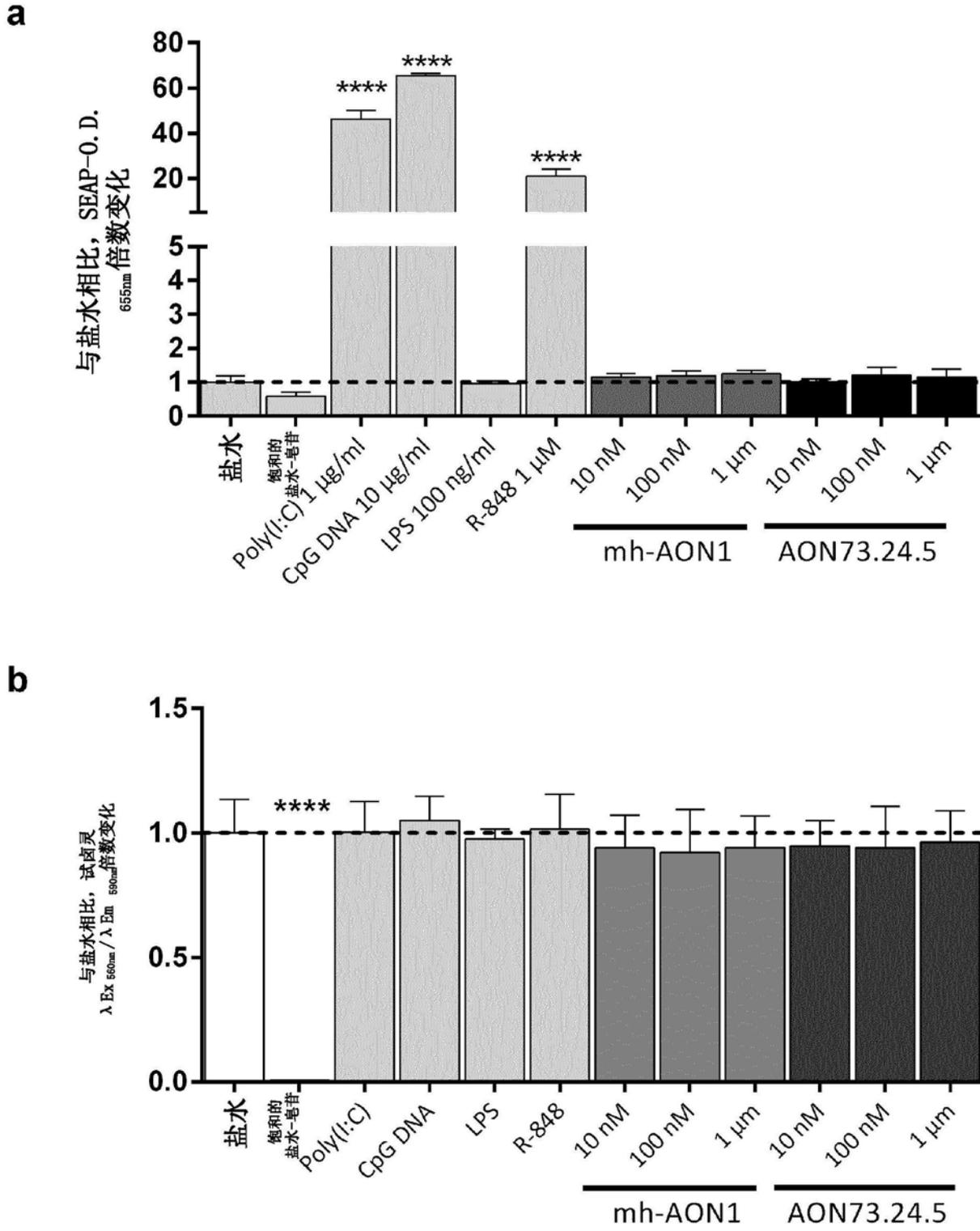


图10