



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113748209 A

(43) 申请公布日 2021.12.03

(21) 申请号 202080031771.0

(22) 申请日 2020.02.27

(30) 优先权数据

62/811,511 2019.02.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.10.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/020175 2020.02.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/176776 EN 2020.09.03

(71) 申请人 斯托克制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 伊莎贝尔·阿兹纳雷兹

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 武晶晶

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2018.01)

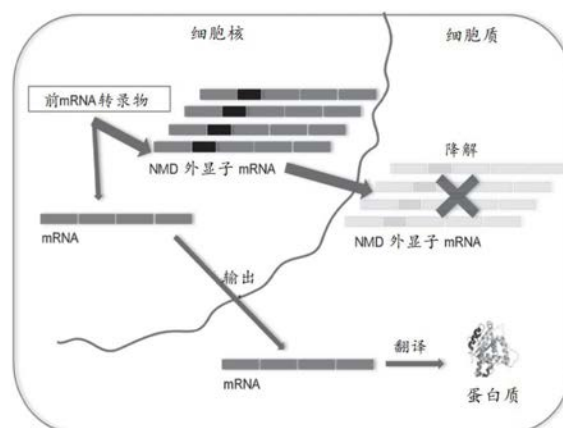
权利要求书3页 说明书69页 附图8页

(54) 发明名称

用于治疗病况和疾病的反义寡聚体

(57) 摘要

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



1. 一种调节细胞中SCN1A蛋白的表达的方法,该细胞具有含有无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子mRNA)并且编码SCN1A蛋白的mRNA,该方法包括使治疗剂与所述细胞接触,由此所述治疗剂调节从所述编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA剪接所述NMD外显子,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节所述细胞中SCN1A蛋白的表达,其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合,并且其中所述靶向部分处于:

NMD诱导外显子(NIE)的5'末端上游约1000个核苷酸至该NIE的5'末端上游约100个核苷酸;或者

该NIE的3'末端下游约100个核苷酸至该NIE的3'末端下游约1000个核苷酸。

2. 一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法,该方法包括:

使所述受试者的细胞与调节从所述细胞中的mRNA剪接无义介导的mRNA衰变诱导外显子(NMD外显子)的治疗剂接触,该mRNA含有所述NMD外显子并且编码SCN1A,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节所述受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达;其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合,并且其中所述靶向部分处于:

NMD诱导外显子(NIE)的5'末端上游约1000个核苷酸至该NIE的5'末端上游约100个核苷酸;或者

该NIE的3'末端下游约100个核苷酸至该NIE的3'末端下游约1000个核苷酸。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述治疗剂干扰参与从所述靶向部分的区域剪接所述NMD外显子的因子的结合。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NIE的5'末端上游至多约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。

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

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NIE的3'末端下游至多约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。

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

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO)。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述ASO包含与SEQ ID NO:12-731中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述治疗剂促进所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中与对照细胞中所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述治疗剂增加所述细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平。

13. 根据权利要求10所述的方法,其中与对照细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

14. 根据权利要求2所述的方法,其中所述疾病或病况是由 $Na_v1.1$ 中的失功能突变诱导的。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述疾病或病况与所述SCN1A基因的单倍性不足相关,并且其中所述受试者具有编码功能性SCN1A的第一等位基因,以及不产生或以降低的水平产生SCN1A的第二等位基因,或编码非功能性SCN1A或部分功能性SCN1A的第二等位基因。

16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述疾病或病况是脑病。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述脑病是癫痫性脑病。

18. 根据权利要求14所述的方法,其中所述疾病或病况是Dravet综合征(DS);婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)-边界(SMEB);发热性惊厥(FS);全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+);早期幼儿癫痫性脑病,13;隐源性全身性癫痫;隐源性局限性癫痫;肌阵挛性无定向癫痫;Lennox-Gastaut综合征;West综合征;特发性痉挛;早期肌阵挛性脑病;进行性肌阵挛性癫痫;儿童交替性偏瘫;未分类的癫痫性脑病;癫痫猝死(SUDEP);病窦综合征1;自闭症;或婴儿期恶性迁移性部分发作。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中GEFS+是全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型。

20. 根据权利要求18所述的方法,其中所述发热性惊厥是家族性发热性惊厥,3A。

21. 根据权利要求18所述的方法,其中SMEB是不具有广泛棘波的SMEB(SMEB-SW)、不具有肌阵挛性发作的SMEB(SMEB-M)、缺乏多于一种SMEI特征的SMEB(SMEB-O)或顽固性儿童癫

痫伴全身性强直性阵挛性发作 (ICEGTC)。

22. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述ASO由选自SEQ ID NO:72或432的序列组成。

23. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述ASO由选自SEQ ID NO:73或433的序列组成。

24. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述ASO由选自SEQ ID NO:76或436的序列组成。

25. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述ASO由选自SEQ ID NO:181或541的序列组成。

26. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述ASO由选自SEQ ID NO:220或580的序列组成。

27. 一种调节细胞中SCN1A蛋白的表达的方法, 该细胞具有含有无义介导的RNA衰变诱导外显子 (NMD外显子mRNA) 并且编码SCN1A蛋白的mRNA, 该方法包括使治疗剂与所述细胞接触, 由此所述治疗剂调节从所述编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA剪接所述NMD外显子, 从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平, 并调节所述细胞中SCN1A蛋白的表达, 其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合, 并且其中所述靶向部分处于NMD诱导外显子 (NIE) 的5' 末端上游约1000个核苷酸至该NIE的3' 末端下游约1000个核苷酸。

28. 一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法, 该方法包括:

使所述受试者的细胞与调节从所述细胞中的mRNA剪接无义介导的mRNA衰变诱导外显子 (NMD外显子) 的治疗剂接触, 该mRNA含有所述NMD外显子并且编码SCN1A, 从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平, 并调节所述受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达; 其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合, 并且其中所述靶向部分处于NMD诱导外显子 (NIE) 的5' 末端上游约1000个核苷酸至该NIE的3' 末端下游约1000个核苷酸。

29. 一种反义寡聚体 (ASO), 其包含与SEQ ID NO:12-731中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

30. 一种反义寡聚体 (ASO), 其由选自SEQ ID NO:12-731的序列组成。

31. 一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法, 该方法包括:

使所述受试者的细胞与权利要求29或权利要求30的ASO接触。

32. 一种试剂盒, 其包含权利要求29或权利要求30的ASO。

用于治疗病况和疾病的反义寡聚体

交叉引用

[0001] 本申请要求2019年2月27日提交的第62/811,511号美国临时申请的权益,该美国临时申请通过引用整体并入本文。

背景技术

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

发明内容

[0003] 在某些实施方案中,本文公开了一种调节细胞中SCN1A蛋白的表达的方法,该细胞具有含有无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子mRNA)并且编码SCN1A蛋白的mRNA,该方法包括使治疗剂与所述细胞接触,由此所述治疗剂调节从所述编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA剪接所述NMD外显子,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节所述细胞中SCN1A蛋白的表达,其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合,并且其中所述靶向部分处于:NMD诱导外显子(NIE)的5'末端上游约1000个核苷酸至该NIE的5'末端上游约100个核苷酸;或者该NIE的3'末端下游约100个核苷酸至该NIE的3'末端下游约1000个核苷酸。在一些实施方案中,所述治疗剂干扰参与从所述靶向部分的区域剪接所述NMD外显子的因子的结合。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NIE的5'末端上游至多约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NIE的5'末端上游至少约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NIE的3'末端下游至多约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NIE的3'末端下游至少约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡

聚体 (ASO)。在一些实施方案中,所述ASO包含与SEQ ID NO:12-731中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。在一些实施方案中,所述治疗剂促进所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除。在一些实施方案中,与对照细胞中所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂增加所述细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平。在一些实施方案中,与对照细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0004] 在某些实施方案中,本文公开了一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法,该方法包括:使所述受试者的细胞与调节从所述细胞中的mRNA剪接无义介导的mRNA衰变诱导外显子 (NMD外显子) 的治疗剂接触,该mRNA含有所述NMD外显子并且编码SCN1A,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节所述受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达;其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合,并且其中所述靶向部分处于:NMD诱导外显子 (NIE) 的5' 末端上游约1000个核苷酸至该NIE的5' 末端上游约100个核苷酸;或者该NIE的3' 末端下游约100个核苷酸至该NIE的3' 末端下游约1000个核苷酸。在一些实施方案中,所述治疗剂干扰参与从所述靶向部分的区域剪接所述NMD外显子的因子的结合。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NIE的5' 末端上游至多约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NIE的5' 末端上游至少约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NIE的3' 末端下游至多约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述靶向部分处于所述NIE的3' 末端下游至少约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70

个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。在一些实施方案中,所述治疗剂是反义寡聚体(ASO)。在一些实施方案中,所述ASO包含与SEQ ID NO:12-731中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。在一些实施方案中,所述治疗剂促进所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除。在一些实施方案中,与对照细胞中所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述治疗剂增加所述细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平。在一些实施方案中,与对照细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。在一些实施方案中,所述疾病或病况是由Na_v1.1中的失功能突变诱导的。在一些实施方案中,所述疾病或病况与所述SCN1A基因的单倍性不足相关,并且其中所述受试者具有编码功能性SCN1A的第一等位基因,以及不产生或以降低的水平产生SCN1A的第二等位基因,或编码非功能性SCN1A或部分功能性SCN1A的第二等位基因。在一些实施方案中,所述疾病或病况是脑病。在一些实施方案中,该脑病是癫痫性脑病。在一些实施方案中,所述疾病或病况是Dravet综合征(DS);婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)-边界(SMEB);发热性惊厥(FS);全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+);早期幼儿癫痫性脑病,13;隐源性全身性癫痫;隐源性局限性癫痫;肌阵挛性无定向癫痫;Lennox-Gastaut综合征;West综合征;特发性痉挛;早期肌阵挛性脑病;进行性肌阵挛性癫痫;儿童交替性偏瘫;未分类的癫痫性脑病;癫痫猝死(SUDEP);病窦综合征1;自闭症;或婴儿期恶性迁移性部分发作。在一些实施方案中,GEFS+是全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型。在一些实施方案中,所述发热性惊厥是家族性发热性惊厥,3A。在一些实施方案中,SMEB是不具有广泛棘波的SMEB(SMEB-SW)、不具有肌阵挛性发作的SMEB(SMEB-M)、缺乏多于一种SMEI特征的SMEB(SMEB-O)或顽固性儿童癫痫伴全身性强直性阵挛性发作(ICEGTC)。

[0005] 在某些实施方案中,本文公开了一种调节细胞中SCN1A蛋白的表达的方法,该细胞具有含有无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子mRNA)并且编码SCN1A蛋白的mRNA,该方法包括使治疗剂与所述细胞接触,由此所述治疗剂调节从所述编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA剪接所述NMD外显子,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节所述细胞中SCN1A蛋白的表达,其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合,并且其中所述靶向部分处于NMD诱导外显子(NIE)的5'末端上游约1000个核苷酸至该

NIE的3'末端下游约1000个核苷酸。

[0006] 在某些实施方案中,本文公开了一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法,该方法包括:使所述受试者的细胞与调节从所述细胞中的mRNA剪接无义介导的mRNA衰变诱导外显子(NMD外显子)的治疗剂接触,该mRNA含有所述NMD外显子并且编码SCN1A,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节所述受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达;其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合,并且其中所述靶向部分处于NMD诱导外显子(NIE)的5'末端上游约1000个核苷酸至该NIE的3'末端下游约1000个核苷酸。

[0007] 在某些实施方案中,本文公开了一种反义寡聚体(ASO),其包含与SEQ ID NO:12-731中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0008] 在某些实施方案中,本文公开了一种反义寡聚体(ASO),其由选自SEQ ID NO:12-731的序列组成。

[0009] 在某些实施方案中,本文公开了一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法,该方法包括:使所述受试者的细胞接触包含与SEQ ID NO:12-731中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列的ASO;或由选自SEQ ID NO:12-731的序列组成的ASO。

[0010] 在某些实施方案中,本文公开了一种试剂盒,其包含:包含与SEQ ID NO:12-731中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列的ASO;或由选自SEQ ID NO:12-731的序列组成的ASO。

援引并入

[0011] 本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度犹如具体地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请均通过引用而并入。

附图说明

[0012] 本发明的新颖特征在所附权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及附图,将会对本发明的特征和优点获得更好的理解,在这些附图中:

[0013] 图1描绘了含有无义介导的RNA衰变诱导外显子的靶mRNA(NMD外显子mRNA)和治疗剂介导的无义介导的mRNA衰变诱导外显子的排除以增加全长靶蛋白或功能性RNA表达的示意图。图1A显示了分为细胞核和细胞质区室的细胞。在细胞核中,靶基因的前mRNA转录物经历剪接以生成mRNA,并且该mRNA被输出到细胞质并翻译为靶蛋白。对于该靶基因,mRNA的一些部分含有在细胞质中降解的无义介导的mRNA衰变诱导外显子(NMD外显子mRNA),因此导致无靶蛋白产生。图1B显示了分为细胞核和细胞质区室的相同细胞的实例。用诸如反义寡聚体(ASO)等治疗剂处理促进了无义介导的mRNA衰变诱导外显子的排除并导致mRNA的增加,该增加的mRNA继而翻译为更高水平的靶蛋白。图1C是治疗性ASO介导的无义介导的mRNA衰变诱导外显子的排除的示意图,其减少非生产性mRNA并增加生产性mRNA,并且增加了全长靶蛋白从该生产性mRNA的表达。

[0014] 图2描绘了SCN1A基因中示例性无义介导的mRNA衰变(NMD)诱导外显子的鉴定。显示了使用比较基因组学鉴定SCN1A基因中的NMD诱导外显子,在UCSC基因组浏览器中可视

化。上图按比例示出了SCN1A基因的图示。在100个脊椎动物物种中的保守水平作为峰示出。最高的峰对应于外显子(黑框),而对于大多数内含子(带箭头的线)未观察到峰。在内含子20(NM_006920)中鉴定了保守的峰,在中间图中示出。对保守序列的检查鉴定出侧翼为3'和5'剪接位点(带下划线的序列)的64bp的外显子样序列(下图,以灰色突出显示的序列),我们称其为外显子20x。包含该外显子导致移码和在外显子21中引入提前终止密码子,使转录物成为NMD的靶标。

[0015] 图3A描绘了通过环己酰亚胺处理确认NMD诱导外显子。使用来自DMSO处理的(CHX-)或环己酰亚胺处理的(CHX+)Neuro 2A(小鼠神经祖细胞)的细胞质RNA以及外显子21和下游外显子中的引物进行的RT-PCR分析,证实了存在对应于NMD诱导外显子(21x)的条带。通过测序确认了产物的身份。对条带进行光密度测定分析,以计算总SCN1A转录物的外显子21x包含百分比。用环己酰亚胺(CHX+)处理Neuro 2A以抑制NMD导致与细胞质部分中的NMD诱导外显子21x相对应的产物增加了2倍(比较浅灰色条,CHX-,与深灰色条,CHX+)。

[0016] 图3B描绘了通过环己酰亚胺处理确认NMD诱导外显子。使用来自DMSO处理的(CHX-)或环己酰亚胺处理的(CHX+)RenCell VM(人神经祖细胞)的细胞质RNA以及外显子20和外显子23中的引物进行的RT-PCR分析,证实了存在对应于NMD诱导外显子(20x)的条带。通过测序确认了产物的身份。对条带进行光密度测定分析,以计算总SCN1A转录物的外显子20x包含百分比。用环己酰亚胺(CHX+)处理RenCell VM以抑制NMD导致与细胞质部分中的NMD诱导外显子20x相对应的产物增加了2倍(比较浅灰色条,CHX-,与深灰色条,CHX+)。

[0017] 图4描绘了针对靶向外显子20x的3'剪接位点上游的两个指示区域(区域1和区域2)和外显子20x的5'剪接位点下游的两个指示区域(区域3和区域4)的SCN1A外显子20x区域进行的ASO步移的示例性图形表示。将ASO设计为通过一次移位5个核苷酸来覆盖这些区域。

[0018] 图5A描绘了通过RT-PCR评价的选自延伸ASO步移的SCN1A外显子20x区域ASO。代表性PAGE显示了通过以1μM核转染24小时,在RenCell中的模拟处理的、对照ASO处理的(NT)、来自延伸步移的ASO处理的SCN1A的SYBR-safe染色的RT-PCR产物。模拟=无ASO;对照NT=非靶向对照;Posctrl=阳性对照。

[0019] 图5B描绘了根据图5A中的数据绘出外显子20x包含百分比的图示。

[0020] 图5C描绘了使用图5A的样品,相对于RPL32内部对照归一化的,延伸ASO步移的qPCR结果的图示,并绘制了SCN1AmRNA相对于模拟的变化倍数。

具体实施方式

剪接和无义介导的mRNA衰变

[0021] 间插序列或内含子被称为剪接体的大型且高度动态的RNA蛋白质复合物去除,该复合物协调初级转录物、小核RNA(snRNA)和大量蛋白质之间的复杂相互作用。剪接体以有序的方式在每个内含子上专门装配,开始于U1 snRNA对5'剪接位点(5' ss)的识别或U2途径对3'剪接位点(3' ss)的识别,这涉及U2辅助因子(U2AF)与3' ss区域的结合,以促进U2与分支点序列(BPS)的结合。U2AF是一种稳定的异二聚体,由结合聚嘧啶束(PPT)的U2AF2编码的65kD亚单位(U2AF65)和与3' ss处高度保守的AG二核苷酸相互作用并稳定U2AF65结合的U2AF1编码的35kD亚单位(U2AF35)组成。除了BPS/PPT单元和3' ss/5' ss之外,准确的剪接还需要激活或阻抑剪接位点识别的辅助序列或结构,这被称为内含子或外显子剪接增强子或

沉默子。这些元件使得真正的剪接位点可以在高等真核生物基因组中的大量过剩的隐蔽位点或伪位点中得到识别,这些隐蔽位点或伪位点具有相同的序列,但是数目比真正的位点多一个数量级。尽管它们通常具有调节功能,但对其激活或阻抑的确切机制知之甚少。

[0022] 一般可以将是否进行剪接的决定建模为随机过程而不是确定性过程,使得即使是最明确的剪接信号有时也可能不会不正确地剪接。然而,在正常条件下,前mRNA剪接以惊人的高保真度进行。这部分地归因于相邻顺式作用辅助外显子和内含子剪接调节元件(ESR或ISR)的活性。通常,这些功能元件根据其刺激或抑制剪接的能力而分别被分类为外显子或内含子剪接增强子(ESE或ISE)或沉默子(ESS或ISS)。尽管现在有证据表明某些辅助顺式作用元件可能通过影响剪接体装配的动力学如U1 snRNP与5' ss之间复合物的排列来发挥作用,但似乎许多元件很有可能与反式作用RNA结合蛋白(RBP)配合起作用。例如,富含丝氨酸和精氨酸的RBP(SR蛋白)家族是保守的蛋白质家族,它们在定义外显子中具有关键作用。SR蛋白通过将前剪接体的组分募集到相邻剪接位点或通过拮抗附近ESS的作用来促进外显子识别。ESS的阻抑作用可以由核内不均一核糖核蛋白(hnRNP)家族成员介导,并且可以改变核心剪接因子向相邻剪接位点的募集。除了其在剪接调节中的作用外,还提出沉默子元件在伪外显子的阻抑中起作用,伪外显子是数组具有典型外显子间距但没有功能性开放阅读框的诱饵内含子剪接位点。ESE和ESS,与它们的同源反式作用RBP协同,代表了一组剪接控制中的重要组成部分,这些剪接控制指定如何、在何处以及何时从其前体装配mRNA。

[0023] 标记外显子-内含子边界的序列是不同强度的简并信号,这些信号可以在人类基因内高频率地发生。在多外显子基因中,不同的剪接位点对可以以许多不同的组合连接在一起,从而从单个基因创建出一系列多样的转录物。这通常被称为可变前mRNA剪接。尽管通过可变剪接产生的大多数mRNA同种型可以从细胞核输出并翻译为功能性多肽,但是来自单个基因的不同mRNA同种型在其翻译效率上可能有很大差异。在外显子连接复合物上游至少50bp处具有提前终止密码子(PTC)的那些mRNA同种型可能被无义介导的mRNA衰变(NMD)途径靶向以供降解。传统(BPS/PPT/3' ss/5' ss)和辅助剪接基序中的突变可导致异常剪接,如外显子跨越或隐蔽(或伪)外显子包含或剪接位点激活,并显著地助长了人类发病率和死亡率。异常剪接模式和可变剪接模式均可受到外显子和内含子中的天然DNA变异的影响。

[0024] 鉴于外显子-内含子边界可以出现在密码子的三个位置中的任何一个位置,显然只有一部分可变剪接事件可以维持规范的开放阅读框。例如,只有可被3整除的外显子可以被跨越或包含在mRNA中而没有任何阅读框改变。没有兼容相的剪接事件将诱导移码。除非被下游事件逆转,否则移码肯定会导致一个或多个PTC,可能导致随后被NMD降解。NMD是一种翻译偶联机制,其消除含有PTC的mRNA。NMD可以作为存在于所有真核生物中的监督途径起作用。NMD可以通过消除含有提前终止密码子的mRNA转录物来减少基因表达中的错误。在一些情况下,这些异常mRNA的翻译可导致所得蛋白质的有害功能获得或显性失活活性。NMD不仅靶向具有PTC的转录物,而且还靶向从许多内源基因表达的大量mRNA同种型,提示NMD是驱动细胞中稳态RNA水平的微调和粗调的主要调节物。

[0025] NMD诱导外显子(NIE)是作为内含子内的区域的外显子或伪外显子,并且如果包含在成熟RNA转录物中,则可以激活NMD途径。在组成性剪接事件中,通常会剪接出含有NIE的内含子,但内含子或其一部分(例如,NIE)可以在可变或异常剪接事件期间得到保留。含有这样的NIE的成熟mRNA转录物由于诱导NMD途径的移码而可能是非生产性的。在成熟RNA转

录物中包含NIE可以下调基因表达。在本公开中,含有NIE的mRNA转录物可以被称为“含有NIE的mRNA”或“NMD外显子mRNA”。

[0026] 隐蔽(或伪剪接位点)具有与真正的剪接位点相同的剪接识别序列,但不在剪接反应中使用。它们的数目比人类基因组中真正的剪接位点多一个数量级,并且通常被迄今尚未充分了解的分子机制所阻抑。隐蔽的5'剪接位点具有共有的NNN/GUNNNN或NNN/GCNNNN,其中N是任何核苷酸,而/是外显子-内含子边界。隐蔽的3'剪接位点具有共有的NAG/N。它们的激活受到周围核苷酸的正面影响,这些核苷酸使得它们更类似于真正剪接位点的最佳共有序列,分别是MAG/GURAGU和YAG/G,其中M为C或A,R为G或A,而Y为C或U。

[0027] 技术人员可以使用可公开获得的合适的算法,例如在Kralovicova,J.和Vorechovsky,I.(2007)Global control of aberrant splice site activation by auxiliary splicing sequences:evidence for a gradient in exon and intron definition.Nucleic Acids Res.,35,6399-6413(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095810/pdf/gkm680.pdf>)中列出的那些,容易地鉴定剪接位点及其调节序列。

[0028] 隐蔽的剪接位点或剪接调节序列可以与NIE的剪接位点竞争RNA结合蛋白,如U2AF。在一个实施方案中,药剂可以与隐蔽的剪接位点或剪接调节序列结合,以防止RNA结合蛋白的结合,从而有利于NIE剪接位点的利用。

[0029] 在一个实施方案中,隐蔽的剪接位点可以不包含NIE的5'或3'剪接位点。隐蔽的剪接位点可以在NIE 5'剪接位点上游至少10个核苷酸处。隐蔽的剪接位点可以在NIE 5'剪接位点上游至少20个核苷酸处。隐蔽的剪接位点可以在NIE 5'剪接位点上游至少50个核苷酸处。隐蔽的剪接位点可以在NIE 5'剪接位点上游至少100个核苷酸处。隐蔽的剪接位点可以在NIE 5'剪接位点上游至少200个核苷酸处。

[0030] 隐蔽的剪接位点可以在NIE 3'剪接位点下游至少10个核苷酸处。

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

目标转录物

[0031] 在一些实施方案中,本公开的方法利用了从SCN1A基因转录的前mRNA中NIE的存在。可以使用刺激NIE的外显子跨越的治疗剂如ASO来诱导所鉴定的SCN1A NIE前mRNA种类的剪接以产生功能性成熟SCN1A mRNA。外显子跨越的诱导可导致NMD途径的抑制。所产生的成熟SCN1A mRNA可以在不激活NMD途径的情况下正常翻译,从而增加患者细胞中SCN1A蛋白的量,并减轻与SCN1A缺乏相关的病况的症状,如Dravet综合征(DS);全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型;家族性发热性惊厥,3A;自闭症;早期幼儿癫痫性脑病,13;病窦综合征1;阿尔茨海默病;或SUDEP。

[0032] 在多个实施方案中,本公开提供了可以靶向SCN1A mRNA转录物以调节,例如增强或抑制剪接或蛋白质表达水平的治疗剂。该治疗剂可以是小分子、多核苷酸或多肽。在一些实施方案中,该治疗剂是ASO。SCN1A前mRNA上的各个区域或序列可以被治疗剂如ASO所靶向。在一些实施方案中,该ASO靶向含有NIE的SCN1A前mRNA转录物。在一些实施方案中,该ASO靶向SCN1A前mRNA转录物的NIE内的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向SCN1A前mRNA转

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

[0033] 在一些实施方案中,本文所述的治疗剂调节参与NMD外显子mRNA的剪接的因子的结合。

[0034] 在一些实施方案中,本文所述的治疗剂干扰参与NMD外显子mRNA的剪接的因子的结合。

[0035] 在一些实施方案中,本文所述的治疗剂阻止参与NMD外显子mRNA的剪接的因子的结合。

[0036] 在一些实施方案中,治疗剂靶向位于编码SCN1A的NMD外显子mRNA的两个规范外显子区域之间的内含子区域中的靶向部分,并且其中该内含子区域含有NMD外显子。

[0037] 在一些实施方案中,治疗剂靶向与NMD外显子至少部分重叠的靶向部分。

[0038] 在一些实施方案中,治疗剂靶向与NMD外显子上游的内含子至少部分重叠的靶向部分。

[0039] 在一些实施方案中,治疗剂靶向在NMD外显子内的靶向部分。

[0040] 在一些实施方案中,治疗剂靶向包含NMD外显子的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个连续核苷酸的靶向部分。在一些实施方案中,治疗剂靶向包含NMD外显子的至多约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个连续核苷酸的靶向部分。在一些实施方案中,治疗剂靶向包含NMD外显子的约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个连续核苷酸的靶向部分。

[0041] 在一些实施方案中,治疗剂靶向邻近NMD外显子的靶向部分。

[0042] 在一些实施方案中,所述ASO靶向包含NIE的内含子的5' 末端下游约1至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向包含NIE的内含子的5' 末端下游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸、约1450至约1500个核苷酸、约1550至约1600个核苷酸、约1650至约1700个核苷酸、约1750至约1800个核苷酸、约1850至约1900个核苷酸、约1950至约2000个核苷酸、约2000至约3000个核苷酸、约3000至约4000个核苷酸或约4000至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向包含NIE的内含子的5' 末端下游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核

核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸或约950至约1000个核苷酸处的序列。

[0043] 在一些实施方案中,所述ASO靶向包含NIE的内含子的5'末端下游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸、至少约1000个核苷酸、至少约1200个核苷酸、至少约1400个核苷酸、至少约1500个核苷酸、至少约1600个核苷酸、至少约1800个核苷酸、至少约2000个核苷酸、至少约3000个核苷酸、至少约4000个核苷酸或至少约5000个核苷酸处的序列。

[0044] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的5'末端上游(或5')约1至约2000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的5'末端上游(或5')约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸、约1450至约1500个核苷酸、约1550至约1600个核苷酸、约1650至约1700个核苷酸、约1750至约1800个核苷酸、约1850至约1900个核苷酸或约1950至约2000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的5'末端上游(或5')约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸或约950至约1000个核苷酸处的序列。

[0045] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的5'末端上游(或5')至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸、至少约1000个核苷酸、至少约1200个核苷酸、至少约1400个核苷酸、至少约1500个核苷酸、至少约1600个核苷酸、至少约1800个核苷酸或至少约2000个核苷酸处的序列。

[0046] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的5'末端下游约1至约500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE区域的5'末端下游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸或至少约500个核苷酸处的序列。

[0047] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的3'末端上游约1至约500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE区域的3'末端上游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸或至少约500个核苷酸处的序列。

[0048] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的3'末端下游(或3')约1至约2000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游(或3')约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸、约1450至约1500个核苷酸、约1550至约1600个核苷酸、约1650至约1700个核苷酸、约1750至约1800个核苷酸、约1850至约1900个核苷酸或约1950至约2000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游(或3')约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸或约950至约1000个核苷酸处的序列。

[0049] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的3'末端下游(或3')至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸、至少约1000个核苷酸、至少约1200个核苷酸、至少约1400个核苷酸、至少约1500个核苷酸、至少约1600个核苷酸、至少约1800个核苷酸或至少约

2000个核苷酸处的序列。

[0050] 在一些实施方案中,所述ASO靶向包含NIE的内含子的3'末端上游约1至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向包含NIE的内含子的3'末端上游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸、约1450至约1500个核苷酸、约1550至约1600个核苷酸、约1650至约1700个核苷酸、约1750至约1800个核苷酸、约1850至约1900个核苷酸、约1950至约2000个核苷酸、约2000至约3000个核苷酸、约3000至约4000个核苷酸或约4000至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向包含NIE的内含子的3'末端上游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸或约950至约1000个核苷酸处的序列。

[0051] 在一些实施方案中,所述ASO靶向包含NIE的内含子的3'末端上游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸、至少约1000个核苷酸、至少约1200个核苷酸、至少约1400个核苷酸、至少约1500个核苷酸、至少约1600个核苷酸、至少约1800个核苷酸、至少约2000个核苷酸、至少约3000个核苷酸、至少约4000个核苷酸或至少约5000个核苷酸处的序列。

[0052] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的5'末端上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE区域的5'末端上游(或5')约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸或约1450至约1500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO可靶向NIE的5'末端上游超过300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游(或3')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核

核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸或约1450至约1500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游超过300个核苷酸处的序列。

[0053] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的5'末端上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE区域的5'末端上游(或5')至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸或至少约1000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游(或3')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸或至少约1000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游超过300个核苷酸处的序列。

[0054] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的5'末端上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE区域的5'末端上游(或5')至多约10个核苷酸、至多约20个核苷酸、至多约50个核苷酸、至多约80个核苷酸、至多约85个核苷酸、至多约90个核苷酸、至多约95个核苷酸、至多约96个核苷酸、至多约97个核苷酸、至多约98个核苷酸、至多约99个核苷酸、至多约100个核苷酸、至多约101个核苷酸、至多约102个核苷酸、至多约103个核苷酸、至多约104个核苷酸、至多约105个核苷酸、至多约110个核苷酸、至多约120个核苷酸、至多约150个核苷酸、至多约200个核苷酸、至多约300个核苷酸、至多约400个核苷酸、至多约500个核苷酸、至多约600个核苷酸、至多约700个核苷酸、至多约800个核苷酸、至多约900个核苷酸、至多约1000个核苷酸、至多约1100个核苷酸、至多约1200个核苷酸、至多约1300个核苷酸、至多约1400个核苷酸或至多约1500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游(或3')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游至多约10个核苷酸、至多约20个核苷酸、至多约50个核苷酸、至多约80个核苷酸、至多约85个核苷酸、至多约90个核苷酸、至多约95个核苷酸、至多约96个核苷酸、至多约97个核苷酸、至多约98个核苷酸、至多约99个核苷酸、至多约100个核苷酸、至多约101个核苷酸、至多约102个核苷酸、至多约103个核苷酸、至多约104个核苷酸、至多约105个核苷酸、至多约110个核苷酸、至多约120个核苷酸、至多约150个核苷酸、至多约200

个核苷酸、至多约300个核苷酸、至多约400个核苷酸、至多约500个核苷酸、至多约600个核苷酸、至多约700个核苷酸、至多约800个核苷酸、至多约900个核苷酸、或至多约1000个核苷酸、至多约1100个核苷酸、至多约1200个核苷酸、至多约1300个核苷酸、至多约1400个核苷酸或至多约1500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向NIE的3'末端下游超过300个核苷酸处的序列。

[0055] 在一些实施方案中,如本文所述的NIE(外显子23)位于GRCh38/hg38:chr2:166007230与chr2:166007293之间。在一些实施方案中,该NIE的5'末端位于GRCh38/hg38:chr2:166007230处。在一些实施方案中,该NIE的3'末端位于GRCh38/hg38:chr2:166007293处。

[0056] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007230的上游(或5')约1至约2000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007230的上游(或5')约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸、约1450至约1500个核苷酸、约1550至约1600个核苷酸、约1650至约1700个核苷酸、约1750至约1800个核苷酸、约1850至约1900个核苷酸或约1950至约2000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007230的上游(或5')约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸或约950至约1000个核苷酸处的序列。

[0057] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007230的上游(或5')至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸、至少约1000个核苷酸、至少约1200个核苷酸、至少约1400个核苷酸、至少约1500个核苷酸、至少约1600个核苷酸、至少约1800个核苷酸或至少约2000个核苷酸处的序列。

[0058] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007230的下游约1至约500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007230的下游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约

100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸或至少约500个核苷酸处的序列。

[0059] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007293的上游约1至约500个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007293的上游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸或至少约500个核苷酸处的序列。

[0060] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007293的下游(或3')约1至约2000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007293的下游(或3')约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸、约1450至约1500个核苷酸、约1550至约1600个核苷酸、约1650至约1700个核苷酸、约1750至约1800个核苷酸、约1850至约1900个核苷酸或约1950至约2000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007293的下游(或3')约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸或约950至约1000个核苷酸处的序列。

[0061] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007293的下游(或3')至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸、至少约1000个核苷酸、至少约1200个核苷酸、至少约1400个核苷酸、至少约1500个核苷酸、至少约1600个核苷酸、至少约1800个核苷酸或至少约2000个核苷酸处的序列。

[0062] 在一些实施方案中,包含NIE的内含子位于GRCh38/hg38:chr2:166002754与chr2:

166009718之间。在一些实施方案中,包含NIE的内含子的5'末端位于GRCh38/hg38:chr2:166002754处。在一些实施方案中,包含NIE的内含子的3'末端位于GRCh38/hg38:chr2:166009718处。

[0063] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166002754的下游约1至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166002754的下游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸、约1450至约1500个核苷酸、约1550至约1600个核苷酸、约1650至约1700个核苷酸、约1750至约1800个核苷酸、约1850至约1900个核苷酸、约1950至约2000个核苷酸、约2000至约3000个核苷酸、约3000至约4000个核苷酸或约4000至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166002754的下游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸或约950至约1000个核苷酸处的序列。

[0064] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166002754的下游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸、至少约1000个核苷酸、至少约1200个核苷酸、至少约1400个核苷酸、至少约1500个核苷酸、至少约1600个核苷酸、至少约1800个核苷酸、至少约2000个核苷酸、至少约3000个核苷酸、至少约4000个核苷酸或至少约5000个核苷酸处的序列。

[0065] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007229的上游约1至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007229的上游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸、约1450至约1500个核苷酸、约1550至约1600个核苷酸、约1650至约1700个核苷酸、约1750至约1800个核苷酸、约1850至约1900个核苷酸、约

1950至约2000个核苷酸、约2000至约3000个核苷酸、约3000至约4000个核苷酸或约4000至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007229的上游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸或约950至约1000个核苷酸处的序列。

[0066] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007229的上游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸、至少约1000个核苷酸、至少约1200个核苷酸、至少约1400个核苷酸、至少约1500个核苷酸、至少约1600个核苷酸、至少约1800个核苷酸、至少约2000个核苷酸、至少约3000个核苷酸、至少约4000个核苷酸或至少约5000个核苷酸处的序列。

[0067] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007294的下游约1至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007294的下游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸、约1450至约1500个核苷酸、约1550至约1600个核苷酸、约1650至约1700个核苷酸、约1750至约1800个核苷酸、约1850至约1900个核苷酸、约1950至约2000个核苷酸、约2000至约3000个核苷酸、约3000至约4000个核苷酸或约4000至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007294的下游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸或约950至约1000个核苷酸处的序列。

[0068] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166007294的下游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个

核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸、至少约1000个核苷酸、至少约1200个核苷酸、至少约1400个核苷酸、至少约1500个核苷酸、至少约1600个核苷酸、至少约1800个核苷酸、至少约2000个核苷酸、至少约3000个核苷酸、至少约4000个核苷酸或至少约5000个核苷酸处的序列。

[0069] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166009718的上游约1至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166009718的上游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸、约950至约1000个核苷酸、约1050至约1100个核苷酸、约1150至约1200个核苷酸、约1250至约1300个核苷酸、约1350至约1400个核苷酸、约1450至约1500个核苷酸、约1550至约1600个核苷酸、约1650至约1700个核苷酸、约1750至约1800个核苷酸、约1850至约1900个核苷酸、约1950至约2000个核苷酸、约2000至约3000个核苷酸、约3000至约4000个核苷酸或约4000至约5000个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166009718的上游约1至约20个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约100至约150个核苷酸、约150至约200个核苷酸、约200至约250个核苷酸、约250至约300、约250至约300个核苷酸、约350至约400个核苷酸、约450至约500个核苷酸、约550至约600个核苷酸、约650至约700个核苷酸、约750至约800个核苷酸、约850至约900个核苷酸或约950至约1000个核苷酸处的序列。

[0070] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh38/hg38:chr2:166009718的上游至少约1个核苷酸、至少约10个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸、至少约96个核苷酸、至少约97个核苷酸、至少约98个核苷酸、至少约99个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约101个核苷酸、至少约102个核苷酸、至少约103个核苷酸、至少约104个核苷酸、至少约105个核苷酸、至少约110个核苷酸、至少约120个核苷酸、至少约150个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约400个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约600个核苷酸、至少约700个核苷酸、至少约800个核苷酸、至少约900个核苷酸、至少约1000个核苷酸、至少约1200个核苷酸、至少约1400个核苷酸、至少约1500个核苷酸、至少约1600个核苷酸、至少约1800个核苷酸、至少约2000个核苷酸、至少约3000个核苷酸、至少约4000个核苷酸或至少约5000个核苷酸处的序列。

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

[0072] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803的上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点

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

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

[0074] 在一些实施方案中,所述ASO靶向基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803的上游(或5')约4至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,该ASO靶向基因组位点GRCh37/hg19:chr2:166,863,803的上游(或5')至多约10个核苷酸、至多约20个核苷酸、至

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

[0075] 如本文实施例中所述,分析了SCN1A基因(SEQ ID NO.1)的NIE,并观察到内含子20(SEQ ID NO.6,其编码内含子20前mRNA)的一部分(在整个本公开中,该部分被称为外显子23或外显子20x)的包含。在一些实施方案中,本文公开的ASO靶向由SCN1A基因组序列转录的含有NIE的前mRNA(SEQ ID NO.2)。在一些实施方案中,该ASO靶向来自包含内含子20一部分的SCN1A基因组序列的含有NIE的前mRNA转录物。在一些实施方案中,该ASO靶向来自包含外显子23(或外显子20x)(SEQ ID NO.4)的SCN1A基因组序列的含有NIE的前mRNA转录物。在一些实施方案中,该ASO靶向SEQ ID NO.2或9的含有NIE的前mRNA转录物。在一些实施方案中,该ASO靶向包含NIE的SEQ ID NO.2或9的含有NIE的前mRNA转录物。在一些实施方案中,该ASO靶向包含外显子23(或外显子20x)的SEQ ID NO.2的含有NIE的前mRNA转录物(SEQ ID NO.7)。在一些实施方案中,本文公开的ASO靶向SCN1A前mRNA序列(SEQ ID NO.2或9)。在一些实施方案中,该ASO靶向包含NIE的SCN1A前mRNA序列(SEQ ID NO.7或11)。在一些实施方案中,该ASO靶向根据SEQ ID NO:6、7、10或11中的任一个的SCN1A前mRNA序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:12-731中的任一个的序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:12-371中的任一个的序列。在一些实施方案中,该ASO具有根据SEQ ID NO:372-731中的任一个的序列。

[0076] 在一些实施方案中,含有NIE的SCN1A前mRNA转录物由与SEQ ID NO:1或8具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的基因序列所编码。在一些实施方案中,该SCN1A NIE前mRNA转录物包含与SEQ ID NO:2-7和9-11中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0077] 在一些实施方案中,所述含有NIE的SCN1A前mRNA转录物(或NMD外显子mRNA)包含

与SEQ ID NO:2、6、7、9、10和12中的任一个具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,含有NIE的SCN1A前mRNA转录物(或NMD外显子mRNA)由与SEQ ID NO:1和8具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列所编码。在一些实施方案中,该NMD外显子mRNA的靶向部分包含与包含SEQ ID NO:2、6、7、9、10和12的至少8个连续核酸的区域具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0078] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的5'末端上游的序列。例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子23(或外显子20x)或小鼠SCN1A中的外显子21x)5'末端上游序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:12-191或372-551中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。再例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子23(或外显子20x)或小鼠SCN1A中的外显子21x)5'末端上游序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:12-191中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。又例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子23(或外显子20x)或小鼠SCN1A中的外显子21x)5'末端上游序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:372-551中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0079] 在一些实施方案中,所述ASO靶向包含外显子23的含有NIE的SCN1A前mRNA中的外显子23(或外显子20x)。在一些实施方案中,该ASO靶向SCN1A前mRNA的外显子23的5'末端下游(或3')的外显子23序列。在一些实施方案中,该ASO靶向SCN1A前mRNA的外显子20x的3'末端上游(或5')的外显子23序列。

[0080] 在一些实施方案中,所述ASO靶向NIE的3'末端下游的序列。例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子23(或外显子20x)或小鼠SCN1A中的外显子21x)3'末端下游序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:192-371或552-731中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。再例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子23(或外显子20x)或小鼠SCN1A中的外显子21x)3'末端下游序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:192-371中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。又例如,靶向NIE(例如,人SCN1A中的外显子23(或外显子20x)或小鼠SCN1A中的外显子21x)3'末端下游序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:552-731中的任一个具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0081] 在一些实施方案中,所述含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分在内含子1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25中(内含子编号对应于NM_006920处的mRNA序列)。在一些实施方案中,ASO与NIE前mRNA的靶向部分的杂交导致内含子1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25内的至少一个NIE的外显子跨越,随后增加SCN1A蛋白的产生量。在一些实施方案中,ASO与NIE前mRNA的靶向部分的杂交抑制或阻断内含子1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25内的至少一个NIE的外显子跨越,随后降低SCN1A蛋白的产生量。在一些实施方案中,所述含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分在内含子20中。本领域技术人员可基于本文提供的内含子序列或利用参照NM_006920、NM_001202435、NM_001165964或NM_001165963处的mRNA序列所提供的编号来确定任何同种型中的相应内含子编号。本领域技术人员还可基于本文提供的内含子序列或利用参照NM_006920、NM_001202435、NM_

001165964或NM_001165963处的mRNA序列所提供的内含子编号,使用本发明的方法来确定用于靶向的任何SCN1A同种型中侧翼外显子的序列。

[0082] 在一些实施方案中,本公开的方法和组合物用来通过诱导或抑制含有NIE的SCN1A前mRNA的伪外显子的外显子跨越来调节,例如增加或减少SCN1A的表达。在一些实施方案中,该伪外显子是内含子1-25中的任一个内的序列。在一些实施方案中,该伪外显子是内含子2、4、6、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24和25中的任一个内的序列。在一些实施方案中,该伪外显子是内含子15、18和19中的任一个内的序列。在一些实施方案中,该伪外显子可以是任何SCN1A内含子或其一部分。在一些实施方案中,该伪外显子在内含子20内。本文使用的SCN1A内含子编号对应于NM_006920处的mRNA序列。应当理解,内含子编号可以参照不同的SCN1A同种型序列而改变。

SCN1A蛋白

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

[0084] 在一些实施方案中,本文所述的方法用来调节,例如增加或减少功能性SCN1A蛋白的产生量。如本文所用的,术语“功能性”是指消除所治疗病况的任何一种或多种症状所必需的SCN1A蛋白的活性或功能量,该病况例如是Dravet综合征;全身性癫痫伴发热性惊厥+, 2型;家族性发热性惊厥, 3A;自闭症;早期幼儿癫痫性脑病, 13;病窦综合征1;阿尔茨海默病;或SUDEP。在一些实施方案中,所述方法用来增加部分功能性SCN1A蛋白的产生量。如本文所用的,术语“部分功能性”是指SCN1A蛋白的活性或功能的任何量低于消除或预防疾病或病况的任何一种或多种症状所需的活性或功能的量。在一些实施方案中,部分功能性蛋白质或RNA将具有比完全功能性蛋白质或RNA低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的活性。

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

[0086] 在相关的实施方案中,所述方法是一种利用ASO增加蛋白质或功能性RNA的表达的方法。在一些实施方案中,ASO用来在SCN1A蛋白的量或功能方面增加具有编码SCN1A蛋白的含有NIE的前mRNA的受试者细胞中SCN1A蛋白的表达,其中该受试者具有缺陷,例如,Dravet

综合征 (DS) (也称为SMEI) ; 婴儿严重肌阵挛性癫痫 (SMEI) - 边界 (SMEB) ; 发热性惊厥 (FS) ; 全身性癫痫伴发热性惊厥+ (GEFS+) ; 早期幼儿癫痫性脑病, 13; 隐源性全身性癫痫; 隐源性局限性癫痫; 肌阵挛性无定向癫痫; Lennox-Gastaut综合征; West综合征; 特发性痉挛; 早期肌阵挛性脑病; 进行性肌阵挛性癫痫; 儿童交替性偏瘫; 未分类的癫痫性脑病; 癫痫猝死 (SUDEP) ; 病窦综合征1; 早期幼儿SCN1A脑病; 早期幼儿癫痫性脑病 (EIEE) ; 或自闭症。在一些实施方案中, ASO用来在SCN8A蛋白的量或功能方面增加受试者细胞中SCN1A蛋白的表达, 其中该受试者具有缺陷, 例如, 早期幼儿癫痫性脑病, 13。在一些实施方案中, ASO用来在SCN5A蛋白的量或功能方面增加受试者细胞中SCN1A蛋白的表达, 其中该受试者具有缺陷, 例如, 病窦综合征1。

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

[0088] 在一些实施方案中, 受试者具有:

(a) 第一突变等位基因, 由其

(i) 产生所述SCN1A蛋白的水平与由野生型等位基因产生相比降低,

(ii) 产生与等价的野生型蛋白质相比功能降低的形式的所述SCN1A蛋白, 或者

(iii) 不产生所述SCN1A蛋白或功能性RNA; 以及

(b) 第二突变等位基因, 由其

(i) 产生所述SCN1A蛋白的水平与由野生型等位基因产生相比降低,

(ii) 产生与等价的野生型蛋白质相比功能降低的形式的所述SCN1A蛋白, 或者

(iii) 不产生所述SCN1A蛋白, 并且

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

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

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

等位基因中具有SCN1A全基因缺失。

[0091] 在一些实施方案中,所述方法是一种降低具有编码SCN1A蛋白的含有NIE的前mRNA的受试者细胞表达SCN1A蛋白的方法,并且其中该受试者在 $\text{Na}_v1.1$ 中具有获功能突变。在这样的实施方案中,该受试者具有以升高的量产生SCN1A蛋白的等位基因,或编码诱导细胞中 $\text{Na}_v1.1$ 活性增加的突变SCN1A的等位基因。在一些实施方案中, $\text{Na}_v1.1$ 活性增加的特征在于由突变 $\text{Na}_v1.1$ 通道介导的延长或接近持久的钠电流、快速失活的减慢、稳态失活的正位移、重复刺激过程中较高的通道利用度、非灭活的去极化诱导的持久钠电流增加、延迟进入失活、从快速失活中的恢复加速和/或通过较低温度下孵育或相互作用蛋白质的共表达对折叠缺陷的挽救。在这些实施方案中的任何实施方案中,所述反义寡聚体与从第二等位基因转录的含有NIE的前mRNA的靶向部分结合,从而抑制或阻断伪外显子从该前mRNA的外显子跨越,并引起编码功能性SCN1A蛋白的成熟mRNA的水平降低,以及受试者细胞中SCN1A蛋白的表达降低。

[0092] 在相关的实施方案中,所述方法是一种利用ASO降低蛋白质或功能性RNA的表达的方法。在一些实施方案中,ASO用来降低具有编码SCN1A蛋白的含有NIE的前mRNA的受试者细胞中SCN1A蛋白的表达。在一些实施方案中,该受试者在 $\text{Na}_v1.1$ 中具有获功能突变,例如偏头痛。在一些实施方案中,ASO用来降低受试者细胞中SCN1A蛋白的表达,该受试者在 $\text{Na}_v1.1$ 中具有获功能突变,例如偏头痛、家族性偏瘫,3。

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

[0094] 在一些实施方案中,使用本公开的方法治疗的受试者从一个等位基因表达突变SCN1A蛋白,其中该突变SCN1A蛋白由一个等位基因中的移码突变、无义突变、错义突变或部分基因缺失所引起,并且其中该突变SCN1A蛋白引起 $\text{Na}_v1.1$ 活性水平升高。在一些实施方案中,使用本公开的方法治疗的受试者由于移码突变、无义突变、错义突变或部分基因缺失,从一个等位基因表达升高量的SCN1A蛋白。

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

[0096] 在一些实施方案中,本文所述的方法和组合物可用来治疗DS。在其他实施方案中,本文所述的方法和组合物可用来治疗婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)。在其他实施方案中,本文所述的方法和组合物可用来治疗边界Dravet综合征;全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型;家族性发热性惊厥,3A;家族性偏瘫性偏头痛,3;自闭症;早期幼儿癫痫性脑病,13;病窦综合征1;阿尔茨海默病或SUDEP。本文所述的方法和组合物还可用来治疗边界SMEI。另外,本

文所述的方法和组合物可用来治疗全身性癫痫伴发热性惊厥+ (GEFS+)。GEFS+可与癫痫相关离子通道亚单位如SCN1B或GABRG2中的突变相关。本文所述的方法和组合物还可用来治疗钠通道病。钠通道病可与SCN1A中的突变相关。钠通道病还可与SCN1A的亚单位如 β 亚单位SCN1B相关。在一些情况下,与SCN1A突变相关的其他疾病也可以用本公开来治疗。与SCN1A突变相关的有关SCN1A疾病包括但不限于非典型性先天性肌强直、高钾性周期性麻痹和先天性副肌强直。

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

外显子包含

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

[0099] 在一些实施方案中,所包括的伪外显子是从细胞中编码靶蛋白的基因转录的含有NIE的前mRNA群体中最丰富的伪外显子。在一些实施方案中,所包括的伪外显子是从细胞中编码靶蛋白的基因转录的含有NIE的前mRNA群体中最丰富的伪外显子,其中该含有NIE的前mRNA群体包含两个或更多个所包括的伪外显子。在一些实施方案中,靶向编码靶蛋白的含有NIE的前mRNA群体中最丰富的伪外显子的反义寡聚体诱导该群体中一个或两个或更多个伪外显子的外显子跨越,包括该反义寡聚体所靶向或结合的伪外显子。在实施方案中,所靶向的区域在伪外显子中,该伪外显子是编码SCN1A蛋白的含有NIE的前mRNA中最丰富的伪外显子。

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

[0101] 在一些实施方案中,所包括的伪外显子是基于确定至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%或至少约50%包含而被鉴定为所包括的伪外显子的外显子。在实施方案中,所包括的伪外显子是基于确定约5%至约100%、约5%至约95%、约5%至约90%、约5%至约85%、约5%至约80%、约5%至约75%、约5%至约70%、约5%至约65%、约5%至约60%、约5%至约55%、约5%至约50%、约5%至约45%、约5%至约40%、约5%至约35%、约5%至约30%、约5%至约25%、约5%至约20%、约5%至约15%、约10%至约100%、约10%至约95%、约10%至约90%、约10%至约85%、约10%至约80%、约10%至约75%、约10%至约70%、约10%至约65%、约10%至约60%、约10%至约55%、约10%至约50%、约10%至约45%、约10%至约40%、约10%至约35%、约10%至约30%、约10%至约25%、约10%至约20%、约15%至约100%、约15%至约95%、约15%至约90%、约15%至约85%、约15%至约80%、约15%至约75%、约15%至约70%、约15%至约65%、约15%至约60%、约15%至约55%、约15%至约

50%、约15%至约45%、约15%至约40%、约15%至约35%、约15%至约30%、约15%至约25%、约20%至约100%、约20%至约95%、约20%至约90%、约20%至约85%、约20%至约80%、约20%至约75%、约20%至约70%、约20%至约65%、约20%至约60%、约20%至约55%、约20%至约50%、约20%至约45%、约20%至约40%、约20%至约35%、约20%至约30%、约25%至约100%、约25%至约95%、约25%至约90%、约25%至约85%、约25%至约80%、约25%至约75%、约25%至约70%、约25%至约65%、约25%至约60%、约25%至约55%、约25%至约50%、约25%至约45%、约25%至约40%或约25%至约35%包含而被鉴定为所包括的伪外显子的外显子。ENCODE数据(例如由Tilgner等人,2012,“Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs,”Genome Research 22(9):1616-25描述的)可用来帮助鉴定外显子包含。

[0102] 在一些实施方案中,使细胞接触与SCN1A前mRNA转录物的靶向部分互补的ASO,与在不存在该ASO/不存在处理的情况下由细胞产生的蛋白质的量相比,导致所产生的SCN1A蛋白的量增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、80%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或1000%。在一些实施方案中,与对照化合物产生的靶蛋白的量相比,该反义寡聚体所接触的细胞产生的SCN1A蛋白的总量增加约1.1倍至约10倍、约1.5倍至约10倍、约2倍至约10倍、约3倍至约10倍、约4倍至约10倍、约1.1倍至约5倍、约1.1倍至约6倍、约1.1倍至约7倍、约1.1倍至约8倍、约1.1倍至约9倍、约2倍至约5倍、约2倍至约6倍、约2倍至约7倍、约2倍至约8倍、约2倍至约9倍、约3倍至约6倍、约3倍至约7倍、约3倍至约8倍、约3倍至约9倍、约4倍至约7倍、约4倍至约8倍、约4倍至约9倍,至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。对照化合物可以是,例如,不与前mRNA的靶向部分互补的寡核苷酸。

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

[0104] 在一些实施方案中,使细胞接触与SCN1A前mRNA转录物的靶向部分互补的ASO,导致编码SCN1A的mRNA(包括编码靶蛋白的成熟mRNA)的量增加。在一些实施方案中,与在不存在该ASO/不存在处理的情况下由细胞所产生的蛋白质的量相比,编码SCN1A蛋白的mRNA或编码SCN1A蛋白的成熟mRNA的量增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、80%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或1000%。在一些实施方案中,与未处理的细胞例如未处理的细胞或用对照化合物处理的细胞中产生的成熟RNA的量相比,在

反义寡聚体所接触的细胞中产生的编码SCN1A蛋白的mRNA或编码SCN1A蛋白的成熟mRNA的总量增加约1.1倍至约10倍、约1.5倍至约10倍、约2倍至约10倍、约3倍至约10倍、约4倍至约10倍、约1.1倍至约5倍、约1.1倍至约6倍、约1.1倍至约7倍、约1.1倍至约8倍、约1.1倍至约9倍、约2倍至约5倍、约2倍至约6倍、约2倍至约7倍、约2倍至约8倍、约2倍至约9倍、约3倍至约6倍、约3倍至约7倍、约3倍至约8倍、约3倍至约9倍、约4倍至约7倍、约4倍至约8倍、约4倍至约9倍,至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。对照化合物可以是,例如,不与含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分互补的寡核苷酸。

[0105] 在一些实施方案中,使细胞接触与SCN1A前mRNA转录物的靶向部分互补的ASO,导致编码SCN1A的mRNA(包括编码靶蛋白的成熟mRNA)的量降低。在一些实施方案中,与在不存在该ASO/不存在处理的情况下由细胞所产生的蛋白质的量相比,编码SCN1A蛋白的mRNA或编码SCN1A蛋白的成熟mRNA的量降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、80%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或1000%。在一些实施方案中,与未处理的细胞例如未处理的细胞或用对照化合物处理的细胞中产生的成熟RNA的量相比,在反义寡聚体所接触的细胞中产生的编码SCN1A蛋白的mRNA或编码SCN1A蛋白的成熟mRNA的总量降低约1.1倍至约10倍、约1.5倍至约10倍、约2倍至约10倍、约3倍至约10倍、约4倍至约10倍、约1.1倍至约5倍、约1.1倍至约6倍、约1.1倍至约7倍、约1.1倍至约8倍、约1.1倍至约9倍、约2倍至约5倍、约2倍至约6倍、约2倍至约7倍、约2倍至约8倍、约2倍至约9倍、约3倍至约6倍、约3倍至约7倍、约3倍至约8倍、约3倍至约9倍、约4倍至约7倍、约4倍至约8倍、约4倍至约9倍,至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。对照化合物可以是,例如,不与含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分互补的寡核苷酸。

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

000个核苷酸。在一些实施方案中,该NIE的长度可以比1,000个核苷酸长。

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

治疗剂

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

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

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

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

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

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

通受试者或治疗前的受试者至少多100%的活性SCN1A蛋白。该增加可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少多200%的活性SCN1A蛋白。该增加可以是相对于普通受试者或治疗前的受试者至少多500%的活性SCN1A蛋白。

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

该多核酸聚合物的长度可以是约13个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约12个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约11个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约50个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约45个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约40个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约35个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约30个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约25个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约10个至约20个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约15个至约25个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约15个至约30个核苷酸。该多核酸聚合物的长度可以是约12个至约30个核苷酸。

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

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

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

[0118] 所述多核酸聚合物可以具有与选自SEQ ID NO:12-731的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%序列同一性的序列。该多核酸聚合物可以具有与选自SEQ ID NO:12-731的序列具有100%序列同一性的序列。在一些情况下,该多核酸聚合物可以具有与选自SEQ ID NO:12-371的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%序列同一性的序列。在一些情况下,该多核酸聚合物可以具有与选自SEQ ID NO:12-371的序列具有100%序列同一性的

序列。在一些情况下,该多核酸聚合物可以具有与选自SEQ ID NO:372-731的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%序列同一性的序列。在一些情况下,该多核酸聚合物可以具有与选自SEQ ID NO:372-731的序列具有100%序列同一性的序列。

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

反义寡聚体

[0120] 本文提供了一种包含反义寡聚体的组合物,该反义寡聚体通过与含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分结合而诱导外显子跨越。如本文所用的,术语“ASO”和“反义寡聚体”可互换使用,并且指包含核碱基的寡聚体如多核苷酸,该寡聚体通过Watson-Crick碱基配对或摆动碱基配对(G-U)与靶核酸(例如,含有NIE的SCN1A前mRNA)序列杂交。ASO可具有互补于靶序列的确切序列或近似的互补性(例如,足以结合靶序列并加强剪接位点处的剪接的互补性)。将ASO设计为使得它们与靶核酸(例如,前mRNA转录物的靶向部分)结合(杂交)并在生理条件下保持杂交。通常,如果它们与预期(靶向)核酸序列之外的位点杂交,则它们与有限数目的非靶核酸的序列(除靶核酸之外的一些位点)杂交。ASO的设计可以考虑存在前mRNA转录物的靶向部分的核酸序列,或基因组或细胞前mRNA或转录组中其他位置上足够类似的核酸序列,使得ASO将结合其他位点并引起“脱靶”效应的可能性受到限制。本领域已知的,例如在作为W0 2015/035091公开的名称为“Reducing Nonsense-Mediated mRNA Decay”的PCT申请PCT/US2014/054151(其通过引用并入本文)中的任何反义寡聚体可用来实施本文所述的方法。

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

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

检索工具) 和本领域已知的PowerBLAST程序(Altschul等人,J.Mol.Biol.,1990,215,403-410;Zhang和Madden,Genome Res.,1997,7,649-656) 来确定ASO与靶核酸的区域的互补性百分比。

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

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

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

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

[0127] 在实施方案中,在ASO骨架的每个磷核苷酸间键处的立体化学是随机的。在实施方案中,在ASO骨架的每个磷核苷酸间键处的立体化学是受控的并且不是随机的。例如,公开号为2014/0194610的美国专利申请,“Methods for the Synthesis of Functionalized Nucleic Acids”(其通过引用并入本文)描述了用于独立选择核酸寡聚体中每个磷原子处手性(chirality)的偏性(handedness)的方法。在实施方案中,在本发明方法中使用的ASO

(包括但不限于本文表5和表6中所示的任何ASO) 包括具有非随机的磷核苷酸间键的ASO。在实施方案中,在本发明方法中使用的组合物包含纯的非对映异构ASO。在实施方案中,在本发明方法中使用的组合物包含非对映异构体纯度为至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、约100%、约90%至约100%、约91%至约100%、约92%至约100%、约93%至约100%、约94%至约100%、约95%至约100%、约96%至约100%、约97%至约100%、约98%至约100%或约99%至约100%的ASO。

[0128] 在实施方案中,所述ASO在其磷核苷酸间键处具有Rp和Sp构型的非随机混合物。例如,已经提出,在反义寡核苷酸中需要Rp和Sp的混合物以实现良好活性与核酸酶稳定性之间的平衡(Wan等人,2014,“Synthesis,biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages,”Nucleic Acids Research 42(22):13456-13468,其通过引用并入本文)。在实施方案中,在本发明的方法中使用的ASO(包括但不限于本文SEQ ID NO:12-731中所示的任何ASO) 包含约5%-100%Rp、至少约5%Rp、至少约10%Rp、至少约15%Rp、至少约20%Rp、至少约25%Rp、至少约30%Rp、至少约35%Rp、至少约40%Rp、至少约45%Rp、至少约50%Rp、至少约55%Rp、至少约60%Rp、至少约65%Rp、至少约70%Rp、至少约75%Rp、至少约80%Rp、至少约85%Rp、至少约90%Rp或至少约95%Rp(其余为Sp),或约100%Rp。在实施方案中,在本发明的方法中使用的ASO(包括但不限于本文SEQ ID NO:12-731中所示的任何ASO) 包含约10%至约100%Rp、约15%至约100%Rp、约20%至约100%Rp、约25%至约100%Rp、约30%至约100%Rp、约35%至约100%Rp、约40%至约100%Rp、约45%至约100%Rp、约50%至约100%Rp、约55%至约100%Rp、约60%至约100%Rp、约65%至约100%Rp、约70%至约100%Rp、约75%至约100%Rp、约80%至约100%Rp、约85%至约100%Rp、约90%至约100%Rp或约95%至约100%Rp、约20%至约80%Rp、约25%至约75%Rp、约30%至约70%Rp、约40%至约60%Rp或约45%至约55%Rp,其余为Sp。

[0129] 在实施方案中,在本发明的方法中使用的ASO(包括但不限于本文SEQ ID NO:12-731中所示的任何ASO) 包含约5%-100%Sp、至少约5%Sp、至少约10%Sp、至少约15%Sp、至少约20%Sp、至少约25%Sp、至少约30%Sp、至少约35%Sp、至少约40%Sp、至少约45%Sp、至少约50%Sp、至少约55%Sp、至少约60%Sp、至少约65%Sp、至少约70%Sp、至少约75%Sp、至少约80%Sp、至少约85%Sp、至少约90%Sp或至少约95%Sp(其余为Rp),或约100%Sp。在实施方案中,在本发明的方法中使用的ASO(包括但不限于本文SEQ ID NO:12-731中所示的任何ASO) 包含约10%至约100%Sp、约15%至约100%Sp、约20%至约100%Sp、约25%至约100%Sp、约30%至约100%Sp、约35%至约100%Sp、约40%至约100%Sp、约45%至约100%Sp、约50%至约100%Sp、约55%至约100%Sp、约60%至约100%Sp、约65%至约100%Sp、约70%至约100%Sp、约75%至约100%Sp、约80%至约100%Sp、约85%至约100%Sp、约90%至约100%Sp或约95%至约100%Sp、约20%至约80%Sp、约25%至约75%Sp、约30%至约70%Sp、约40%至约60%Sp或约45%至约55%Sp,其余为Rp。

[0130] 本文所述的任何ASO可含有包含如天然存在的核苷酸中存在的核糖或脱氧核糖的糖部分,或含有包括吗啉环在内的经修饰的糖部分或糖类似物。经修饰的糖部分的非限制性实例包括2'取代,如2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2' MOE)、2'-O-氨基乙基、2'

F;N3' ->P5' 氨基磷酸酯、2' 二甲基氨基氧基乙氧基、2' 二甲基氨基乙氧基乙氧基、2' -胍、2' -O-胍乙基、氨基甲酸酯修饰的糖和双环修饰的糖。在一些实施方案中,该糖部分修饰选自2' -O-Me、2' F和2' MOE。在一些实施方案中,该糖部分修饰是额外的桥键,如在锁定核酸(LNA)中。在一些实施方案中,该糖类似物含有吗啉环,如二氨基磷酸酯吗啉代(PMO)。在一些实施方案中,该糖部分包含呋喃核糖基或2' 呋喃脱氧核糖基修饰。在一些实施方案中,该糖部分包含2' 4' -约束的2' O-甲基氧基乙基(cMOE)修饰。在一些实施方案中,该糖部分包含cEt 2' ,4' 约束的2' O-乙基BNA修饰。在一些实施方案中,该糖部分包含三环DNA(tcDNA)修饰。在一些实施方案中,该糖部分包含乙烯核酸(ENA)修饰。在一些实施方案中,该糖部分包含MCE修饰。修饰是本领域已知的并且描述在文献中,例如,Jarver等人,2014,“A Chemical View of Oligonucleotides for Exon Skipping and Related Drug Applications,”*Nucleic Acid Therapeutics* 24(1):37-47,其为了本文中的目的通过引用并入本文。

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

[0132] 在一些实施方案中,所述ASO包含一个或多个骨架修饰。在一些实施方案中,该ASO包含一个或多个糖部分修饰。在一些实施方案中,该ASO包含一个或多个骨架修饰和一个或多个糖部分修饰。在一些实施方案中,该ASO包含2' MOE修饰和硫代磷酸酯骨架。在一些实施方案中,该ASO包含二氨基磷酸酯吗啉代(PMO)。在一些实施方案中,该ASO包含肽核酸(PNA)。本文所述的任何ASO或ASO的任何组分(例如,核碱基、糖部分、骨架)均可被修饰,以便获得ASO的所需性质或活性,或减少ASO的不希望的性质或活性。例如,ASO或任何ASO的一种或多种组分可被修饰为增强对前mRNA转录物上的靶序列的结合亲和力;减少与任何非靶序列的结合;减少被细胞核酸酶(即,RNA酶H)的降解;改善ASO向细胞中和/或向细胞的细胞核中的吸收;改变ASO的药代动力学或药效学;以及/或者调节ASO的半衰期。

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

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

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

与该参考点直接相邻且在其下游的核苷酸被表示为“正一”，例如，“+1”。

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

[0137] 在一些实施方案中，所述ASO互补于(且结合)含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分，该靶向部分在含有NIE的SCN1A前mRNA中所包括的外显子的5'剪接位点(或3'末端)的上游(在5'方向)(例如，相对于5'剪接位点的以负数表示的方向)。在一些实施方案中，该ASO互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分，该靶向部分在相对于所包括的外显子的5'剪接位点(或3'末端)的约-4至约-270区域内。在一些实施方案中，该ASO可互补于含有SCN1A NIE的前mRNA的靶向部分，该靶向部分在相对于所包括的外显子的5'剪接位点(或3'末端)的-1至-264核苷酸之间的区域内。在一些方面，该ASO互补于在相对于所包括的外显子的5'剪接位点(或3'末端)的约-1至约-270、约-1至约-260、约-1至约-250、约-1至约-240、约-1至约-230、约-1至约-220、约-1至约-210、约-1至约-200、约-1至约-190、约-1至约-180、约-1至约-170、约-1至约-160、约-1至约-150、约-1至约-140、约-1至约-130、约-1至约-120、约-1至约-110、约-1至约-100、约-1至约-90、约-1至约-80、约-1至约-70、约-1至约-60、约-1至约-50、约-1至约-40、约-1至约-30或约-1至约-20区域内的靶向部分。在一些方面，该ASO互补于在相对于所包括的外显子的5'剪接位点(或3'末端)的约-1至约-50、约-50至约-100、约-100至约-150、约-150至约-200或约-200至约-250区域内的靶向部分。

[0138] 在一些实施方案中，所述ASO互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分，该靶向部分在含有NIE的SCN1A前mRNA中所包括的外显子的3'剪接位点(或5'末端)的上游(在5'方向)(例如，以负数表示的方向)。在一些实施方案中，该ASO互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分，该靶向部分在相对于所包括的外显子的3'剪接位点(或5'末端)的约-1至约-500区域内。在一些实施方案中，该ASO互补于含有NIE的SCN1A前mRNA的靶向部分，该靶向部分在相对于所包括的外显子的3'剪接位点的-1至-496区域内。在一些方面，该ASO互补于在相

对于所包括的外显子的3'剪接位点的约-1至约-500、约-1至约-490、约-1至约-480、约-1至约-470、约-1至约-460、约-1至约-450、约-1至约-440、约-1至约-430、约-1至约-420、约-1至约-410、约-1至约-400、约-1至约-390、约+1至约+380、约-1至约-370、约-1至约-360、约-1至约-350、约-1至约-340、约-1至约-330、约-1至约-320、约-1至约-310、约-1至约-300、约-1至约-290、约-1至约-280、约-1至约-270、约-1至约-260、约-1至约-250、约-1至约-240、约-1至约-230、约-1至约-220、约-1至约-210、约-1至约-200、约-1至约-190、约-1至约-180、约-1至约-170、约-1至约-160、约-1至约-150、约-1至约-140、约-1至约-130、约-1至约-120、约-1至约-110、约-1至约-100、约-1至约-90、约-1至约-80、约-1至约-70、约-1至约-60、约-1至约-50、约-1至约-40或约-1至约-30区域内的靶向部分。在一些方面,该ASO互补于在相对于所包括的外显子的3'剪接位点的约-1至约-100、约-100至约-200、约-200至约-300、约-300至约-400或约-400至约-500区域内的靶向部分。

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

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

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

个核苷酸。在一些实施方案中,该ASO的长度为25个核苷酸。

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

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

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

药物组合物

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

[0146] 药学上可接受的盐适用于与人和低等动物的组织相接触而没有不当的毒性、刺激、变态反应等,并且对应合理的受益/风险比。参见,例如,S.M.Berge等人,J.Pharmaceutical Sciences,66:1-19(1977),其为了此目的通过引用并入本文。所述盐可以在化合物的最终分离和纯化期间原位制备,或通过使游离碱官能与合适的有机酸反应而单独制备。药学上可接受的、无毒的酸加成盐的实例是氨基与诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸等无机酸或与诸如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸等有机酸所形成的盐,或通过利用其他记录的方法如离子交换形成的盐。其他药学上可接受的盐包括己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘

酸盐、果胶酸盐 (pectinate)、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁盐等。适当时,另外的药学上可接受的盐包括利用诸如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低级烷基磺酸根和芳基磺酸根等抗衡离子与铵、季铵和胺阳离子形成的无毒盐。

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

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

[0149] 在实施方案中,所述药物制剂包含多种反义寡核苷酸。在实施方案中,该反义寡核苷酸与另一种药物或治疗剂联合施用。

联合疗法

[0150] 在一些实施方案中,本公开中公开的ASO可以与一种或多种附加治疗剂联合使用。在一些实施方案中,所述一种或多种附加治疗剂可包含小分子。例如,所述一种或多种附加治疗剂可包含W02016128343A1、W02017053982A1、W02016196386A1、W0201428459A1、W0201524876A2、W02013119916A2和W02014209841A2中描述的小分子,这些申请通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,所述一种或多种附加治疗剂包含可用来纠正内含子保留的ASO。在一些实施方案中,所述一种或多种其他治疗剂选自表4中列出的ASO。

受试者的治疗

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

[0152] 在一些实施方案中,将本文提供的组合物施用于个体作为治疗疾病或病症的方法。在一些实施方案中,该个体患有遗传病,如本文所述的任何疾病。在一些实施方案中,该个体处于患有疾病如本文所述的任何疾病的风险中。在一些实施方案中,该个体患上由蛋白质的量不足或蛋白质的活性不足引起的疾病或病症的风险增加。如果个体患上由蛋白质

的量不足或蛋白质的活性不足引起的疾病或病症的“风险增加”，则该方法包括预防性或防范性处理。例如，个体可能由于该疾病的家族史而导致患上这样的疾病或病症的风险增加。通常，患上这样的疾病或病症的风险增加的个体受益于预防性处理（例如，通过预防或延迟该疾病或病症的发作或进展）。在实施方案中，在子宫内对胎儿进行治疗，例如通过直接或间接地（例如，通过母体）将ASO组合物施用于胎儿。

[0153] 用于施用本发明的ASO的合适的途径可根据ASO需要递送至的细胞类型而不同。多种组织和器官受Dravet综合征；全身性癫痫伴发热性惊厥+，2型；家族性发热性惊厥，3A；家族性偏瘫性偏头痛，3；自闭症；早期幼儿癫痫性脑病，13；病窦综合征1；阿尔茨海默病或SUDEP的影响，大脑是受影响最严重的组织。本发明的ASO可经肠胃外，例如通过鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射、玻璃体内注射或静脉内注射施用于患者。

[0154] 在一些实施方案中，所述疾病或病况由Na_v1.1（由SCN1A基因编码的蛋白质）中的突变诱发。在一些情况下，该突变是Na_v1.1中的失功能突变。在一些情况下，该Na_v1.1中的失功能突变包括一种或多种相对于野生型Na_v1.1的功能降低或损害Na_v1.1功能（例如，降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多）的突变。在一些情况下，该Na_v1.1中的失功能突变包括导致疾病表型的一种或多种突变。示例性的失功能突变包括但不限于R859C、T875M、V1353L、I1656M、R1657C、A1685V、M1841T和R1916G。

[0155] 在其他情况下，所述突变是Na_v1.1中的获功能突变。在这样的情况下，该获功能突变包括一种或多种相对于野生型Nav1.1的功能延长Nav1.1的活化（例如，延长10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多）的突变。在这样的情况下，该Nav1.1中的获功能突变包括导致疾病表型的一种或多种突变。示例性的获功能突变包括但不限于D188V、W1204R、R1648H和D1866Y。

[0156] 在一些实施方案中，所述疾病或病况是脑病。在一些情况下，该脑病是由Na_v1.1中的失功能突变诱导的。

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

[0158] 在一些情况下，GEFS+是全身性癫痫伴发热性惊厥+，2型。

[0159] 在一些情况下，所述发热性惊厥是家族性发热性惊厥，3A。

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

阵挛性发作 (ICEGTC)。

[0161] 在一些实施方案中,由 $\text{Na}_v1.1$ 中的失功能突变诱导的疾病或病况包括但不限于Dravet综合征 (DS) (也称为SMEI);婴儿严重肌阵挛性癫痫 (SMEI) - 边界 (SMEB);发热性惊厥 (FS);全身性癫痫伴发热性惊厥+ (GEFS+);早期幼儿癫痫性脑病,13;隐源性全身性癫痫;隐源性局限性癫痫;肌阵挛性无定向癫痫;Lennox-Gastaut综合征;West综合征;特发性痉挛;早期肌阵挛性脑病;进行性肌阵挛性癫痫;儿童交替性偏瘫;未分类的癫痫性脑病;癫痫猝死 (SUDEP);病窦综合征1;早期幼儿SCN1A脑病;早期幼儿癫痫性脑病 (EIEE);自闭症;或婴儿期恶性迁移性部分发作。

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

[0163] 在一些情况下,所述偏头痛是家族性偏瘫性偏头痛,3。

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

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

病(EIEE);或婴儿期恶性迁移性部分发作。

[0166] 在一些情况下,所述疾病或病况是Dravet综合征(DS)。

[0167] Dravet综合征(DS),也称为婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI),是在生命的第一年出现的癫痫性脑病。Dravet综合征是逐渐被认识到的癫痫性脑病,通过在大约70-80%的患者中发现钠通道基因突变来支持临床诊断。离子通道基因的突变在一系列癫痫综合征的发病机理中起主要作用,导致一些癫痫被认为是离子通道病。电压门控钠通道(VGSC)在神经元兴奋性中起关键作用;因此,在编码VGSC亚单位的基因中鉴定出与DS相关的许多突变并不意外。该疾病由例如Mulley等人,2005和在OMIM#607208(Online Mendelian Inheritance in Man, Johns Hopkins University, 1966-2015)中的疾病说明进行了描述,以上两篇文献均通过引用并入本文。

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

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

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

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

[0172] 在一些情况下,所述疾病或病况是SMEB。

[0173] 在一些情况下,所述疾病或病况是GEFS+。

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

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

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

[0177] 在一些情况下,所述疾病或病况是阿尔茨海默病。

[0178] 在一些实施方案中,所述疾病或病况是SCN2A脑病。

[0179] 在一些实施方案中,所述疾病或病况是SCN8A脑病。

[0180] 在一些实施方案中,所述疾病或病况是SCN5A心律失常。

[0181] 在实施方案中,所述反义寡核苷酸通过本领域已知的任何方法与能够促进该反义寡核苷酸跨越血脑屏障渗透的一种或多种药剂一起施用。例如,美国专利6,632,427,“Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons”中描述了通过将腺病毒载体施用于肌肉组织中的运动神经元来递送药剂,其通过引用并入本文。例如,美国专利6,756,523,“Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain”中描述了将载体直接递送至脑,例如,纹状体、丘脑、海马体或黑质,其通过引用并入本文。

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

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

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

鉴定诱导外显子跨越的其他ASO的方法

[0185] 本公开的范围还包括用于鉴定或确定诱导含有NIE的SCN1A前mRNA的外显子跨越的ASO的方法。例如,一种方法可以包括鉴定或确定诱导含有NIE的SCN1A前mRNA的伪外显子跨越的ASO。可筛选与前mRNA的靶区域内的不同核苷酸特异性杂交的ASO,以鉴定或确定改善靶内含子的剪接速率和/或程度的ASO。在一些实施方案中,该ASO可以阻断或干扰剪接阻抑物/沉默子的结合位点。可利用本领域已知的任何方法来鉴定(确定)当与外显子的靶区域杂交时导致所需效果(例如,伪外显子跨越、蛋白质或功能性RNA产生)的ASO。这些方法

还可用于鉴定通过与位于所包括的外显子侧翼的内含子中或非包括的外显子中的靶向区域结合而诱导所包括的外显子的外显子跨越的ASO。以下提供了可以使用的方法的实例。

[0186] 被称为ASO“步移”的一轮筛选可采用被设计为与前mRNA的靶区域杂交的ASO来进行。例如,ASO步移中所用的ASO可从所包括的外显子的3'剪接位点上游约100个核苷酸(例如,位于目标/所包括的外显子上游的外显子序列的一部分)至该目标/所包括的外显子的3'剪接位点下游约100个核苷酸,和/或从所包括的外显子的5'剪接位点上游约100个核苷酸至该目标/所包括的外显子的5'剪接位点下游约100个核苷酸(例如,位于该目标/所包括的外显子下游的外显子序列的一部分),以每5个核苷酸进行平铺。例如,长度为15个核苷酸的第一ASO可被设计为与相对于目标/所包括的外显子的3'剪接位点的+6至+20核苷酸特异性杂交。第二ASO可被设计为与相对于目标/所包括的外显子的3'剪接位点的+11至+25核苷酸特异性杂交。将ASO设计为跨越前mRNA的靶区域。在实施方案中,ASO可更紧密地平铺,例如,每1、2、3或4个核苷酸。此外,ASO可从5'剪接位点下游的100个核苷酸至3'剪接位点上游的100个核苷酸进行平铺。在一些实施方案中,ASO可从5'剪接位点上游的约1,160个核苷酸至3'剪接位点下游的约500个核苷酸进行平铺。在一些实施方案中,ASO可从3'剪接位点上游的约500个核苷酸至3'剪接位点下游的约1,920个核苷酸进行平铺。

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

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

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

[0190] 如以上对于ASO步移所述,通过将一个或多个ASO或对照ASO(具有杂乱序列——预期不与靶区域杂交的序列——的ASO)例如通过转染递送至表达目标前mRNA的疾病相关细胞系中进行ASO微步移。如本文所述(参见,例如,实施例4),可通过本领域已知的任何方法,例如通过使用跨越NIE的引物的逆转录酶(RT)-PCR,来评估每个ASO的剪接诱导效果。与在对照ASO处理的细胞中相比,在ASO处理的细胞中使用跨越NIE的引物所产生的更长RT-PCR产物的减少或不存在,表明外显子跨越(或含有NIE的靶内含子的剪接)已经得到增强。在一些实施方案中,可利用本文所述的ASO来改善外显子跨越效率(或剪接含有NIE的内含子的剪接效率)、已剪接的与未剪接的前mRNA之比、剪接速率或剪接程度。还可以评估由目

标前mRNA编码的蛋白质或功能性RNA的量,以确定每个ASO是否均获得了所需效果(例如,增强的功能性蛋白质产生)。可以使用本领域已知用于评估和/或量化蛋白质产生量的任何方法,如Western印迹法、流式细胞术、免疫荧光显微术和ELISA。

[0191] 当与前mRNA的区域杂交时导致外显子跨越(或含有NIE的内含子的剪接增强)和蛋白质产生量增加的ASO,可利用动物模型,例如已敲入全长人类基因的转基因小鼠模型,或在疾病的人源化小鼠模型中进行体内测试。合适的ASO施用途径可根据需要递送ASO的疾病和/或细胞类型而不同。例如,可通过鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射、玻璃体注射或静脉内注射来施用ASO。施用后,可以评估模型动物的细胞、组织和/或器官,以通过例如由本领域已知和本文所述的方法评价剪接(效率、速率、程度)和蛋白质产生量来确定ASO治疗的效果。该动物模型还可以是疾病或疾病严重程度的任何表型或行为指示。

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

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

具体实施方案

[0194] 实施方案1.一种调节细胞中SCN1A蛋白的表达的方法,该细胞具有含有无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子mRNA)并且编码SCN1A蛋白的mRNA,该方法包括使治疗剂与所述细胞接触,由此所述治疗剂调节从所述编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA剪接所述NMD外显子,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节所述细胞中SCN1A蛋白的表达,其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合,并且其中所述靶向部分处于:NMD诱导外显子(NIE)的5'末端上游约1000个核苷酸至该NIE的5'末端上游约100个核苷酸;或者该NIE的3'末端下游约100个核苷酸至该NIE的3'末端下游约1000个核苷酸。

[0195] 实施方案2.一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法,该方法包括:使所述受试者的细胞与调节从所述细胞中的mRNA剪接无义介导的mRNA衰变诱导外显子(NMD外显子)的治疗剂接触,该mRNA含有所述NMD外显子并且编码SCN1A,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节所述受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达;其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合,并且其中所述靶向部分处于:NMD诱导外显子(NIE)的5'末端上游约1000个核苷酸至该NIE的5'末端上游约100个核苷酸;或者该NIE的3'末端下游约100个核苷酸至该NIE的3'末端下游约1000个核苷酸。

[0196] 实施方案3.根据实施方案1或2所述的方法,其中所述治疗剂干扰参与从所述靶向部分的区域剪接所述NMD外显子的因子的结合。

[0197] 实施方案4.根据实施方案1或2所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NIE的5'末端上游至多约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。

[0198] 实施方案5.根据实施方案1或2所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NIE的5'

末端上游至少约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。

[0199] 实施方案6.根据实施方案1或2所述的方法,其中所述靶向部分处于所述NIE的3'末端下游至多约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸。

[0200] 实施方案7.根据实施方案1或2所述的方法,所述靶向部分处于所述NIE的3'末端下游至少约800个核苷酸、约700个核苷酸、约600个核苷酸、约500个核苷酸、约400个核苷酸、约300个核苷酸、约200个核苷酸、约100个核苷酸、约80个核苷酸、约70个核苷酸、约60个核苷酸、约50个核苷酸、约40个核苷酸、约30个核苷酸、约20个核苷酸、约10个核苷酸、约5个核苷酸、约4个核苷酸、约2个核苷酸、约1个核苷酸。

[0201] 实施方案8.根据实施方案1-7中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是反义寡聚体(ASO)。

[0202] 实施方案9.根据实施方案8所述的方法,其中所述ASO包含与SEQ ID NO:12-731中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0203] 实施方案10.根据实施方案1-9中任一项所述的方法,其中所述治疗剂促进所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除。

[0204] 实施方案11.根据实施方案10所述的方法,其中与对照细胞中所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述NMD外显子从所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA中的排除增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0205] 实施方案12.根据实施方案10所述的方法,其中所述治疗剂增加所述细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平。

[0206] 实施方案13.根据实施方案10所述的方法,其中与对照细胞中所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的总量相比,在与所述治疗剂接触的细胞中,所述经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的量增加约1.1至约10倍、约1.5至约10倍、约2至约10倍、约3至约10倍、约4至约10倍、约1.1至约5倍、约1.1至约6倍、约1.1至约7倍、约1.1至约8倍、约1.1至约9倍、约2至约5倍、约2至约6倍、约2至约7倍、约2至约8倍、约2至约9倍、约3至约6倍、约3至约7倍、约3至约8倍、约3至约9倍、约4至约7倍、约4至约8倍、约4至约9倍、至少约1.1倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约5倍或至少约10倍。

[0207] 实施方案14.根据实施方案2所述的方法,其中所述疾病或病况是由Nav1.1中的失功能突变诱导的。

[0208] 实施方案15.根据实施方案14所述的方法,其中所述疾病或病况与所述SCN1A基因

的单倍性不足相关,并且其中所述受试者具有编码功能性SCN1A的第一等位基因,以及不产生或以降低的水平产生SCN1A的第二等位基因,或编码非功能性SCN1A或部分功能性SCN1A的第二等位基因。

[0209] 实施方案16.根据实施方案14所述的方法,其中所述疾病或病况是脑病。

[0210] 实施方案17.根据实施方案16所述的方法,其中所述脑病是癫痫性脑病。

[0211] 实施方案18.根据实施方案14所述的方法,其中所述疾病或病况是Dravet综合征(DS);婴儿严重肌阵挛性癫痫(SMEI)-边界(SMEB);发热性惊厥(FS);全身性癫痫伴发热性惊厥+(GEFS+);早期幼儿癫痫性脑病,13;隐源性全身性癫痫;隐源性局限性癫痫;肌阵挛性无定向癫痫;Lennox-Gastaut综合征;West综合征;特发性痉挛;早期肌阵挛性脑病;进行性肌阵挛性癫痫;儿童交替性偏瘫;未分类的癫痫性脑病;癫痫猝死(SUDEP);病窦综合征1;自闭症;或婴儿期恶性迁移性部分发作。

[0212] 实施方案19.根据实施方案18所述的方法,其中GEFS+是全身性癫痫伴发热性惊厥+,2型。

[0213] 实施方案20.根据实施方案18所述的方法,其中所述发热性惊厥是家族性发热性惊厥,3A。

[0214] 实施方案21.根据实施方案18所述的方法,其中SMEB是不具有广泛棘波的SMEB(SMEB-SW)、不具有肌阵挛性发作的SMEB(SMEB-M)、缺乏多于一种SMEI特征的SMEB(SMEB-O)或顽固性儿童癫痫伴全身性强直性阵挛性发作(ICEGTC)。

[0215] 实施方案22.根据实施方案1或2所述的方法,其中所述ASO由选自SEQ ID NO:72或432的序列组成。

[0216] 实施方案23.根据实施方案1或2所述的方法,其中所述ASO由选自SEQ ID NO:73或433的序列组成。

[0217] 实施方案24.根据实施方案1或2所述的方法,其中所述ASO由选自SEQ ID NO:76或436的序列组成。

[0218] 实施方案25.根据实施方案1或2所述的方法,其中所述ASO由选自SEQ ID NO:181或541的序列组成。

[0219] 实施方案26.根据实施方案1或2所述的方法,其中所述ASO由选自SEQ ID NO:220或580的序列组成。

[0220] 实施方案27.一种调节细胞中SCN1A蛋白的表达的方法,该细胞具有含有无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子mRNA)并且编码SCN1A蛋白的mRNA,该方法包括使治疗剂与所述细胞接触,由此所述治疗剂调节从所述编码SCN1A蛋白的NMD外显子mRNA剪接所述NMD外显子,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节所述细胞中SCN1A蛋白的表达,其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合,并且其中所述靶向部分处于NMD诱导外显子(NIE)的5'末端上游约1000个核苷酸至该NIE的3'末端下游约1000个核苷酸。

[0221] 实施方案28.一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法,该方法包括:使所述受试者的细胞与调节从所述细胞中的mRNA剪接无义介导的mRNA衰变诱导外显子(NMD外显子)的治疗剂接触,该mRNA含有所述NMD外显子并且编码SCN1A,从而调节经加工的编码SCN1A蛋白的mRNA的水平,并调节所述受试

者的细胞中SCN1A蛋白的表达;其中所述治疗剂与所述编码SCN1A的NMD外显子mRNA的靶向部分结合,并且其中所述靶向部分处于NMD诱导外显子(NIE)的5'末端上游约1000个核苷酸至该NIE的3'末端下游约1000个核苷酸。

[0222] 实施方案29.一种反义寡聚体(ASO),其包含与SEQ ID NO:12-731中的任一个至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%相同的序列。

[0223] 实施方案30.一种反义寡聚体(ASO),其由选自SEQ ID NO:12-731的序列组成。

[0224] 实施方案31.一种通过调节有需要的受试者的细胞中SCN1A蛋白的表达来治疗该受试者的疾病或病况的方法,该方法包括:使所述受试者的细胞与实施方案29或实施方案30的ASO接触。

[0225] 实施方案32.一种试剂盒,其包含实施方案29或实施方案30的ASO。

[0226] 虽然本文已经显示并描述了本发明的优选实施方案,但是对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员现将想到许多变化、改变和替换。应当理解,在实施本发明的过程中可以采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本发明的范围,由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

实施例

[0227] 本发明将通过以下实施例更具体地加以说明。然而,应当理解,本发明不以任何方式由这些实施例来限制。

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

[0228] 使用下一代测序进行全转录组鸟枪法测序,以显示由SCN1A基因产生的转录物的快照,从而鉴定NIE包含事件。为此,从HCN(人皮质神经元)的细胞核和细胞质部分中分离出多聚A+RNA,并使用Illumina的TruSeq Stranded mRNA文库制备试剂盒来构建cDNA文库。对该文库进行对-端测序,从而产生定位到人类基因组的100个核苷酸的读取(2009年2月,GRCh37/hg19装配体)。SCN1A的测序结果在图2中示出。简言之,图2显示了利用UCSC基因组浏览器(由UCSC基因组信息学小组(生物分子科学与工程中心(Center for Biomolecular Science&Engineering),University of California,Santa Cruz,1156High Street,Santa Cruz,CA 95064)运行并由例如Rosenbloom等人,2015,“The UCSC Genome Browser database:2015update,”Nucleic Acids Research 43,Database Issue,doi:10.1093/nar/gku1177描述)可视化的定位读取,并且可通过峰信号推断读取的覆盖范围和数目。峰高指示由特定区域中读取的密度给出的表达水平。上图按比例示出了SCN1A基因的图示。在100个脊椎动物物种中的保守水平作为峰示出。最高的峰对应于外显子(黑框),而对于大多数内含子(带箭头的线)未观察到峰。在内含子20(NM_006920)中鉴定了保守的峰,在中间图中示出。对保守序列的检查鉴定出侧翼为3'和5'剪接位点(带下划线的序列)的64bp的外显子样序列(下图,以灰色突出显示的序列)。包含该外显子导致移码和在外显子21中引入提前终止密码子,使转录物成为NMD的靶标。

[0229] 示例性SCN1A基因、前mRNA、外显子和内含子序列总结于表1中。各个外显子或内含子的序列总结于表2中。

表1.靶SCN1A基因和前mRNA序列的列表。

物种	SEQ ID NO.	序列类型
人	SEQ ID NO. 1	SCN1A 基因(NC_000002.12)
	SEQ ID NO. 2	SCN1A 前 mRNA (例如, 编码 SCN1A mRNA NM_006920.5)
	SEQ ID NO. 3	内含子 22 基因 (GRCh38/hg38 装配体) (坐标: chr2 166002754 166007229)
	SEQ ID NO. 4	外显子 23 (外显子 20x)基因
		(GRCh38/hg38 装配体) (坐标: chr2 166007230 166007293)
	SEQ ID NO. 5	内含子 23 基因 (GRCh38/hg38 装配体) (坐标: chr2 166007294 166009718)
	SEQ ID NO. 6	IVS 22+IVS 23 前 mRNA (内含子 22 和 23 的前 mRNA 序列)
	SEQ ID NO. 7	外显子 23 (外显子 20x)前 mRNA
小鼠	SEQ ID NO. 8	SCN1A 基因(NC_000068.7)
	SEQ ID NO. 9	SCN1A 前 mRNA (例如, 编码 SCN1A mRNA NM_001313997.1)
	SEQ ID NO. 10	内含子 21 前 mRNA
	SEQ ID NO. 11	外显子 21x 前 mRNA

表2. SCN1A前mRNA转录物中的靶外显子或内含子的序列

SEQ ID NO.	序列类型	序列
3	内含子 22 基因	gtaagaaaaatgaaagaacctgaagtattgtatatagccaaaaataaactaaattaaatttagaaaaagga aaatctatgcatgcaaaagggaatggcaaatcttgcaaaattgctactttattgtttatctgttgcatatttactt ctagggtgatatgcaagagaaataggcctctctgaaatgatataatcatttatctgtgtgcttatttaaatg actttatttccaatccatcttgggagtttccttacaatctatatacaaaaaaagctgatgcattattaaagta ctatgtgtaatgatataatggtaatctaaagtaaattctatatacaggtaacttattcttgtgatgatatactgtact taacgagtttctgaaaataatgtgaatcacacatgtgcctaagtatgagtgttaagaaaaaatgaaagg agttgttaaaacttttctgtataatgccaaagttgcattattgaaatataattcaagattagatgggttagatatt aagtgttgactgaatttataaaactagtaataactaaagattacatacaaatccacatcattttataaca ataaagtaaacacttataatgaacagaaaatataatttgactcattactataggttaattatacattaacctt aacttgcacatctattggcagagtcacacaaaatgttatttatcctttcaaagatgcaataatcattttccatc atgcataacagattagaaattttgccattattgacttatttccatgcctttttacggcatgaagcattagttaa tagatataatataaaaaattagttctgcttttttaaaaaaaatattatcaaaaacaaacactgaattgtgt gattccaatagaaaaacactgctctttcaacctcctaagggtgtagttactttatggaaactaagctgtattgta gacttccatttgcactttgtagattgtttatagccttatgttctcttcaagctctattataaatgtcactttgtaa gaacgtaggacttgtcttgattccctaacatataatgaaaactttgtcctcattatcgacaactcagaacaat ataatacaagtagtctctttatttctcacagagagcctcaaatttcacaaaaatgtaacagaaattatctc tgggggtgataagaattaagtctgtttccaattaaatgtcactttgtttgttcagactggcagtttcagttctg gagaaaaaaatgtcatttgtgtacattctacttgaaaacatgttgccctgaatcaaaataatatttttatatgg ctgtgaaatctgaacaatgctaaacatttgaaaatattataaaccttttacatttgaccatttgaagtttatta aattcattggcaagtgtcagataattccatacattacacttcatttctataaaaaagctgatcttatcggtata ctttaattttctcagaaataaccatactataattattaatcaataatgccttttatataaaagagggttagttttg aaacttggagtttagacataaaatccttataaatgctgatagtgatataactaatagtttaaatggtcagattt atgaatatggctctatttctcataatgacaacatacacacagcactaaaatgactaatcttcaatacgtgtt

		tggcattgtagagtcacaaataacgttataattgattctatttttatacttctagtggttgatattttttgtaaa aatataatcatgaatgatgggtgaggttgatataagaatgatgattatgattgggaagtgaagattgaacat gctcagaaactctcatttaattcttggcctagcagcataaaatcacaatagctgctgcaaaagcgttaactca ggcactcattttttttgtgtctgttatttttcaagcatgtgctttatgcaacattactgaataaagcatgtt gtacagtgttgataagaagttagaaagtaacaaataaattatcatcaggtgacattgtgttttgcatgttt atgcacatttctggctgacagcttttaacatttattgtatttcaaattccagtcacaaattttcaactgtaaaa ttaaactgagtgaaattgatgtcgtgaatatctagggtaaaaataaattgtgtttaaattgtatttttaattcct aacctaggaaatcttaataaccttcttttcaaaagaactcaagtcctaatggatagggaacagacggaga gcatcatgaacaaaaagtaacacaaatgttctgtcatatcagatttctaactaataacaaactatatttct atttgtatag
4	外显子 23 (外显子 20x) 基因	GATAATCTTGCTCCAACCTTGGATGGGGTGGAGCGCTGGTTCCT CCCTGAGCCCTTTATTATGG
5	内含子 23 基因	gtactgtattacccttttctaccttataatcctgactgtgacttatgtgtagtgggtgagggagggttg ggaagggtactattattgaccacagtagggaaaaatcattattacatcctaaccctcttttcaattgtctt aaatttcatttgaaaaaaaaaaacctttatgaattaccctctgtggatttaacccaatggttgatattt attaagttcattgaatatgatttagttatgtgtatatggagtatccatcttggggagattactggattggtga ggcggggggaccctgggtgtagaattgattatgtgaaaaacaatttaactgttgaattctatgatactgttg aggcatacagccctgtgttttagtactgtgtctgggtcctgaaaattaccagtttagattaccatcagttgat tattgatgtatgagcagatactagggtgcaatatttcagggttcataagactggattgattgtgaccactc tcatttttattgtgtaagttcatatggggttatttcaaaatgttaacaaggcaaaaatattaaagaaatggt gaataagcacatgtgaattgtgttaacaaaaagttgaataaaaaatccacttattgaattatgcaga atagaatacatacctagaataaaaaacacacgttcatcatgagtattagaataaatttaaggcataaact cacttctagaataagtaactcccaactaacttctagggttttaaacataacacagtgaaaacatacataa acataactctacattttatttattttaaagtttaagtgattatacaagaagaagagttatttcgagagaca gaaaaagtcagaatttttggatcaccaatataatcatagcttcaaaaaaactgtcttaataaaacccac aacataatttttttagattttaagaagattctatttcttcttatacttaaaaaatggatgattcctactttgcc actttatttttattcacatagattttctttatttctattagaagaagcactgaattcatgaattgtgtgattgaa gttcaaaagtaatttaattcagataaaaagacatttctgcatgtatgaaaatttctaattgtgaatttgcatattaat tatcaatccttcattagtgtagactatttttaaaaatgcaggtaatgaaccagaaaatagaattgggtgtgcta gagtagagaacttttttgattgttttgaaaaaaagcttctgagaagaacaacacttagtacagtat taattcattaagatagctccttctcagacatttcttcatgtagcctgaaagttaattgaaattgttcttcc aatttattcagactaattctgctacttcttccccataagaaccaattactgcagcttattgagactgaaa aaagtttaatacacctccttcttctgtaaccaaggaatggcttggaactcttgggaaaagacaatctttcta tgatcttcatgtctaatatatacatataaatatgactatagctttgtataataactccccaaactgtgcc agatgttttctaagataaagttattttatgttcacaaaaaaataaaacttttcttggccaaatgtatgccaa ctttgcaaatcatatcctgaagtgactgtcgcagagtacatgcttgcgtcataaattccatagagttcgtt aactctaaatcaatcccagtttcaaaagtaaacctctcaaacatattacctaagcacaacttctccctgtgc tcagttccttaattattctcatccatattcagaaataacatttaaaaattatgctttgatcaataaatactaatc aaacttggcttcaataacccattcttttgcacacattatttattcctataataagctctctggtatgttcta tattcaagacactcaaggccctgggaagattcacgaacatattgttgcattctaaatttttagaaaatcttaca tctgtcaggattacactgaactctagtacagagtaatatgggtaccagataaagtgaggagcaactctccac gtagactggaaacagcactaaatgctatttataggctacttctgaacttaactgttttaacctatttttctca tatgccaaatgagaacgcaactgaattatctgtacagttctgttcagtagaattctgattcttgattca aaggggaaaacattccttatttttgagggttaactgggggacaaaagtgagctccatgaagaagtg ctattgaaactaaagccttaagaggggagagatttcaagaaggagctattagacaagggaattcaatgt aaatggcatctcaatcacctgcaattatattagcacacgggtattatatttaattgaagtggcatgaagtata gatgaccagggaagttaaaactggaatatagattgtggagtgtgtaatacaaggttaagaaaaat ttgttagttaccagagagccaataataactttcaagtgaggactggggaagattaattcatctacatagat taaatgaaggagagaggttaggagacagatgacagtgcaagtatgaataacagagggcagttctaggt ggtgactgtgagaatggaaaagaggtggcaagctgagaacgtttcaagaaaaaatgtgagacagg taatgtgaaaaaaaatcgagaataggtagataatcagtggttctgctcactctaaattgggtgttgaa ggcaaaatagctattttaattgactctgtgtatcacactagaacagcattgtaactctgatagtggaca aaatattcagaaaaaggggaatagtaactgtattcaatttcaaatctcaatctgaagaaatctaattc tattcatccatttaaaataaattatataacgagaatttatgaagtcattgtattaatgcagacagtcagatga gataaggcaaatgtgcagctgtcagcttgtagtgcacatgccacatatttggcttgcctggataactc

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

实施例2:通过环己酰亚胺处理确认NIE

[0230] 使用来自DMSO处理的(CHX-)或环己酰亚胺处理的(CHX+)小鼠Neuro 2A细胞(图3A)和RenCell VM(人类神经祖细胞)(图3B)的细胞质RNA以及外显子20和外显子23中的引物进行的RT-PCR分析,证实了存在对应于NMD诱导外显子(20x)的条带。通过测序确认了产物的身份。对条带进行光密度测定分析,以计算总SCN1A转录物的外显子20x包含百分比。用环己酰亚胺(CHX+)处理RenCell VM以抑制NMD导致与细胞质部分中的NMD诱导外显子20x相对应的产物增加了2倍(比较浅灰色条,CHX-,与深灰色条,CHX+)。

实施例3:SCN1A外显子23 (外显子20x) 区域ASO步移

[0231] 将ASO设计为通过一次移位5个核苷酸来覆盖SCN1A外显子23(外显子20x)基因的5'末端上游约1000至约100个核苷酸的区域。还将ASO设计为通过一次移位5个核苷酸来覆盖SCN1A外显子23(外显子20x)基因的3'末端下游约1000至约100个核苷酸的第二区域。靶向SCN1A的ASO的列表总结在表3中。ASO的序列总结在表4中。

表3. 靶向SCN1A的ASO的列表

基因 SEQ ID NO.	前 mRNA SEQ ID NO.	ASO SEQ ID NO.	NIE
SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2	SEQ ID NO: 12-731	外显子 23 (外显子 20x)

表4. 靶向人SCN1A的ASO的序列

序列名称	Chr2 起点	Chr2 终点	SEQ ID NO:	ASO 序列	SEQ ID NO:	ASO 序列
SCN1A-IV S22-986	16686 4788	16686 4806	12	ATGAATTTAAT AAACTTT	372	AUGAAUUUAAU AAACUUU
SCN1A-IV S22-981	16686 4783	16686 4801	13	GACCAATGAAT TTAATAA	373	GACCAAUGAAU UUAUAUA
SCN1A-IV S22-976	16686 4778	16686 4796	14	CACTTGACCAA TGAATTT	374	CACUUGACCAA UGAAUUU
SCN1A-IV S22-971	16686 4773	16686 4791	15	CTGAGCACTTG ACCAATG	375	CUGAGCACUUG ACCAAUG
SCN1A-IV S22-966	16686 4768	16686 4786	16	AATATCTGAGC ACTTGAC	376	AAUAUCUGAGC ACUUGAC
SCN1A-IV S22-961	16686 4763	16686 4781	17	ATGGAAATATC TGAGCAC	377	AUGGAAAUAUC UGAGCAC
SCN1A-IV S22-956	16686 4758	16686 4776	18	AATGTATGGAA ATATCTG	378	AAUGUAUGGAA AUAUCUG
SCN1A-IV S22-951	16686 4753	16686 4771	19	AGTGTAATGTA TGAAAT	379	AGUGUAAUGUA UGGAAAU
SCN1A-IV S22-946	16686 4748	16686 4766	20	AATGAAGTGTA ATGTATG	380	AAUGAAGUGUA AUGUAUG
SCN1A-IV S22-941	16686 4743	16686 4761	21	ATAGAAATGAA GTGTAAT	381	AUAGAAAUGAA GUGUAAU
SCN1A-IV S22-936	16686 4738	16686 4756	22	TTTTTATAGAA ATGAAGT	382	UUUUUAUAGAA AUGAAGU
SCN1A-IV S22-931	16686 4733	16686 4751	23	CAGCTTTTTTAT AGAAAT	383	CAGCUUUUUUA UAGAAAU
SCN1A-IV S22-926	16686 4728	16686 4746	24	AAGATCAGCTT TTTTATA	384	AAGAUCAGCUU UUUUAUA
SCN1A-IV S22-921	16686 4723	16686 4741	25	CCGATAAGATC AGCTTTT	385	CCGAUAAGAUC AGCUUUU
SCN1A-IV	16686	16686	26	GTATACCGATA	386	GUAUACCGAUA

S22-916	4718	4736		AGATCAG		AGAUCAG
SCN1A-IV S22-911	16686 4713	16686 4731	27	TAAAAGTATAC CGATAAG	387	UAAAAGUAUAC CGAUAAAG
SCN1A-IV S22-906	16686 4708	16686 4726	28	AAAATTAAAAG TATACCG	388	AAAAUUAAAAG UAUACCG
SCN1A-IV S22-901	16686 4703	16686 4721	29	CTGAGAAAATT AAAAGTA	389	CUGAGAAA AUU AAAAGUA
SCN1A-IV S22-896	16686 4698	16686 4716	30	TATTTCTGAGA AAATTAA	390	UAUUUCUGAGA AAAUUAA
SCN1A-IV S22-891	16686 4693	16686 4711	31	ATGGTTATTTCT GAGAAA	391	AUGGUU AUUUC UGAGAAA
SCN1A-IV S22-886	16686 4688	16686 4706	32	TAGATATGGTT ATTTCTG	392	UAGUAUUGGUU AUUUCUG
SCN1A-IV S22-881	16686 4683	16686 4701	33	AATTATAGATA TGGTTAT	393	AAUUAUAGAU UGGUU AU
SCN1A-IV S22-876	16686 4678	16686 4696	34	TTAATAATTAT AGATATG	394	UUAAUAAUUAU AGAU AUG
SCN1A-IV S22-871	16686 4673	16686 4691	35	ATTGATTAATA ATTATAG	395	AUUGAUUAAUA AUUAUAG
SCN1A-IV S22-866	16686 4668	16686 4686	36	GCATTATTGAT TAATAAT	396	GCAUUAUUGAU UAAUAAU
SCN1A-IV S22-861	16686 4663	16686 4681	37	AAAAGGCATTA TTGATTA	397	AAAAGGCAUUA UUGAUUA
SCN1A-IV S22-856	16686 4658	16686 4676	38	AATATAAAAGG CATTATT	398	AAUAUAAAAGG CAUUAU
SCN1A-IV S22-851	16686 4653	16686 4671	39	CTTTTAATATA AAAGGCA	399	CUUUUAAUUA AAAGGCA
SCN1A-IV S22-846	16686 4648	16686 4666	40	AACCTCTTTTA ATATAAA	400	AACCUCUUUUA AUUAUAA
SCN1A-IV S22-841	16686 4643	16686 4661	41	AAACTAACCTC TTTTAAT	401	AAACUAACCUC UUUUAU
SCN1A-IV S22-836	16686 4638	16686 4656	42	TTCAAAA ACTA ACCTCTT	402	UUCAAAAACUA ACCUCU
SCN1A-IV S22-831	16686 4633	16686 4651	43	CAAGTTTCAAA AACTAAC	403	CAAGUUUCAA AACUAAC
SCN1A-IV S22-826	16686 4628	16686 4646	44	AACTCCAAGTT TCAAAAA	404	AACUCCAAGUU UCAAAAA
SCN1A-IV S22-821	16686 4623	16686 4641	45	TCTAAA ACTCC AAGTTTC	405	UCUAAAACUCC AAGUUUC
SCN1A-IV S22-816	16686 4618	16686 4636	46	TTATGTCTAAA ACTCCAA	406	UUAUGUCUAAA ACUCCAA
SCN1A-IV S22-811	16686 4613	16686 4631	47	GGATTTTATGT CTAAAAC	407	GGAUUUUAUGU CUAAAAC
SCN1A-IV S22-806	16686 4608	16686 4626	48	TATAAGGATTT TATGTCT	408	UAUAAGGAUUU UAUGUCU
SCN1A-IV S22-801	16686 4603	16686 4621	49	GCATTTATAAG GATTTTA	409	GCAUUUAUAAG GAUUUUA
SCN1A-IV S22-796	16686 4598	16686 4616	50	TATCAGCATTT ATAAGGA	410	UAUCAGCAUUU AUAAGGA
SCN1A-IV	16686	16686	51	ATCACTATCAG	411	AUCACUAUCAG

S22-791	4593	4611		CATTTAT		CAUUUAU
SCN1A-IV S22-786	16686 4588	16686 4606	52	GTTATATCACT ATCAGCA	412	GUUAUAUCACU AUCAGCA
SCN1A-IV S22-781	16686 4583	16686 4601	53	TATTAGTTATAT CACTAT	413	UAUUAGUUUAU UCACUAU
SCN1A-IV S22-776	16686 4578	16686 4596	54	TAAACTATTAG TTATATC	414	UAAACUAUUAG UUAUAUC
SCN1A-IV S22-771	16686 4573	16686 4591	55	CCATTTAAACT ATTAGTT	415	CCAUUUAAACU AUUAGUU
SCN1A-IV S22-766	16686 4568	16686 4586	56	TCTGACCATT AACTAT	416	UCUGACCAUUU AAACUAU
SCN1A-IV S22-761	16686 4563	16686 4581	57	ATAAATCTGAC CATTTAA	417	AUAAAUCUGAC CAUUUAA
SCN1A-IV S22-756	16686 4558	16686 4576	58	TATTCATAAAT CTGACCA	418	UAUUCAUAAA CUGACCA
SCN1A-IV S22-751	16686 4553	16686 4571	59	AGCCATATTCA TAAATCT	419	AGCCAUUAUCA UAAAUCU
SCN1A-IV S22-746	16686 4548	16686 4566	60	AATAGAGCCAT ATTCATA	420	AAUAGAGCCAU AUUCAUA
SCN1A-IV S22-741	16686 4543	16686 4561	61	TGAGGAATAGA GCCATAT	421	UGAGGAAUAGA GCCAUAU
SCN1A-IV S22-736	16686 4538	16686 4556	62	CATTATGAGGA ATAGAGC	422	CAUUAUGAGGA AUAGAGC
SCN1A-IV S22-731	16686 4533	16686 4551	63	GTTGTCATTAT GAGGAAT	423	GUUGUCAUUUAU GAGGAAU
SCN1A-IV S22-726	16686 4528	16686 4546	64	TGTATGTTGTC ATTATGA	424	UGUAUGUUGUC AUUAUGA
SCN1A-IV S22-721	16686 4523	16686 4541	65	CTGTGTGTATG TTGTCAT	425	CUGUGUGUAUG UUGUCAU
SCN1A-IV S22-716	16686 4518	16686 4536	66	TAGTGCTGTGT GTATGTT	426	UAGUGCUGUGU GUAUGUU
SCN1A-IV S22-711	16686 4513	16686 4531	67	CATTTTAGTGCT GTGTGT	427	CAUUUUAGUGC UGUGUGU
SCN1A-IV S22-706	16686 4508	16686 4526	68	TTAGTCATTTTA GTGCTG	428	UUAGUCAUUUU AGUGCUG
SCN1A-IV S22-701	16686 4503	16686 4521	69	AGAGATTAGTC ATTTTAG	429	AGAGAUUAGUC AUUUUAG
SCN1A-IV S22-696	16686 4498	16686 4516	70	ATTGAAGAGAT TAGTCAT	430	AUUGAAGAGAU UAGUCAU
SCN1A-IV S22-691	16686 4493	16686 4511	71	CACGTATTGAA GAGATTA	431	CACGUAUUGAA GAGAUUA
SCN1A-IV S22-686	16686 4488	16686 4506	72	CCAAACACGTA TTGAAGA	432	CCAAACACGUA UUGAAGA
SCN1A-IV S22-681	16686 4483	16686 4501	73	CAATGCCAAAC ACGTATT	433	CAAUGCCAAAC ACGUAUU
SCN1A-IV S22-676	16686 4478	16686 4496	74	CTCTACAATGC CAAACAC	434	CUCUACAAUGC CAAACAC
SCN1A-IV S22-671	16686 4473	16686 4491	75	TTTGACTCTAC AATGCCA	435	UUUGACUCUAC AAUGCCA
SCN1A-IV	16686	16686	76	GTTATTTTGACT	436	GUUAUUUUGAC

S22-666	4468	4486		CTACAA		UCUACAA
SCN1A-IV S22-661	16686 4463	16686 4481	77	ATAACGTTATT TTGACTC	437	AUAACGUAAU UUGACUC
SCN1A-IV S22-656	16686 4458	16686 4476	78	CAATTATAACG TTATTTT	438	CAAUUAUAACG UUAUUUU
SCN1A-IV S22-651	16686 4453	16686 4471	79	AGAATCAATTA TAACGTT	439	AGAAUCAAUUA UAACGUU
SCN1A-IV S22-646	16686 4448	16686 4466	80	AAAATAGAATC AATTATA	440	AAAAUAGAAUC AAUUAUA
SCN1A-IV S22-641	16686 4443	16686 4461	81	TATAAAAAATA GAATCAA	441	UAUAAAAAAUA GAAUCAA
SCN1A-IV S22-636	16686 4438	16686 4456	82	AGAAGTATAAA AAATAGA	442	AGAAGUAUAAA AAAUAGA
SCN1A-IV S22-631	16686 4433	16686 4451	83	ACACTAGAAGT ATAAAAA	443	ACACUAGAAGU AUAAAAA
SCN1A-IV S22-626	16686 4428	16686 4446	84	TCCAAACACTA GAAGTAT	444	UCCAAACACUA GAAGUAU
SCN1A-IV S22-621	16686 4423	16686 4441	85	AAATATCCAAA CACTAGA	445	AAAUAUCCAAA CACUAGA
SCN1A-IV S22-616	16686 4418	16686 4436	86	AAATAAAATAT CCAAACA	446	AAAUAAAAUAU CCAAACA
SCN1A-IV S22-611	16686 4413	16686 4431	87	TTACAAAATAA AATATCC	447	UUACAAAAUAA AAUAUCC
SCN1A-IV S22-606	16686 4408	16686 4426	88	TATTTTACAA AATAAAA	448	UAUUUUUACAA AAUAAAA
SCN1A-IV S22-601	16686 4403	16686 4421	89	GATTATATTTT ACAAAA	449	GAUUAUUAUUU UACAAAA
SCN1A-IV S22-596	16686 4398	16686 4416	90	TTCATGATTAT ATTTTAA	450	UUCAUGAUUAU AUUUUUA
SCN1A-IV S22-591	16686 4393	16686 4411	91	CATCATTTCATG ATTATAT	451	CAUCAUUAUG AUUAUAU
SCN1A-IV S22-586	16686 4388	16686 4406	92	CTCACCATCAT TCATGAT	452	CUCACCAUCAU UCAUGAU
SCN1A-IV S22-581	16686 4383	16686 4401	93	CCAACCTCACC ATCATTC	453	CCAACCUCACC AUCAUUC
SCN1A-IV S22-576	16686 4378	16686 4396	94	TATATCCAACC TCACCAT	454	UAUAUCCAACC UCACCAU
SCN1A-IV S22-571	16686 4373	16686 4391	95	ATTCTTATATCC AACCTC	455	AUUCUUAUAUC CAACCUC
SCN1A-IV S22-566	16686 4368	16686 4386	96	TCATCATTCTTA TATCCA	456	UCAUCAUUCUU AUAUCCA
SCN1A-IV S22-561	16686 4363	16686 4381	97	CATAATCATCA TTCTTAT	457	CAUAAUCAUCA UUCUUAU
SCN1A-IV S22-556	16686 4358	16686 4376	98	CCAATCATAAT CATCATT	458	CCAUCAUAAU CAUCAUU
SCN1A-IV S22-551	16686 4353	16686 4371	99	ACTTCCAATC ATAATCA	459	ACUCCCCAUC AUAUCA
SCN1A-IV S22-546	16686 4348	16686 4366	100	ATCTCACTTCCC AATCAT	460	AUCUCACUCC CAAUCAU
SCN1A-IV	16686	16686	101	TTCAAATCTCA	461	UUCAAAUCUCA

S22-541	4343	4361		CTTCCCA		CUUCCCA
SCN1A-IV S22-536	16686 4338	16686 4356	102	GCATGTTCAAA TCTCACT	462	GCAUGUUCAAA UCUCACU
SCN1A-IV S22-531	16686 4333	16686 4351	103	TCTGAGCATGT TCAAATC	463	UCUGAGCAUGU UCAAAUC
SCN1A-IV S22-526	16686 4328	16686 4346	104	GAGTTTCTGAG CATGTTC	464	GAGUUUCUGAG CAUGUUC
SCN1A-IV S22-521	16686 4323	16686 4341	105	AATGAGAGTTT CTGAGCA	465	AAUGAGAGUUU CUGAGCA
SCN1A-IV S22-516	16686 4318	16686 4336	106	AATTAATGAG AGTTTCT	466	AAUAAAUGAG AGUUUCU
SCN1A-IV S22-511	16686 4313	16686 4331	107	CAAAGAATTAA ATGAGAG	467	CAAAGAAUAAA AUGAGAG
SCN1A-IV S22-506	16686 4308	16686 4326	108	TAGGGCAAAGA ATTAAAT	468	UAGGGCAAAGA AUUAAAU
SCN1A-IV S22-501	16686 4303	16686 4321	109	GCTGCTAGGGC AAAGAAT	469	GCUGCUAGGGC AAAGAAU
SCN1A-IV S22-496	16686 4298	16686 4316	110	TTTATGCTGCTA GGGCAA	470	UUUAUGCUGCU AGGGCAA
SCN1A-IV S22-491	16686 4293	16686 4311	111	GTGATTTTATG CTGCTAG	471	GUGAUUUUAUG CUGCUAG
SCN1A-IV S22-486	16686 4288	16686 4306	112	CTATTGTGATTT TATGCT	472	CUAUUGUGAUU UUAUGCU
SCN1A-IV S22-481	16686 4283	16686 4301	113	CGCAGCTATTG TGATTTT	473	CGCAGCUAUUG UGAUUUU
SCN1A-IV S22-476	16686 4278	16686 4296	114	TTTGACGCAGC TATTGTG	474	UUUGACGCAGC UAUUGUG
SCN1A-IV S22-471	16686 4273	16686 4291	115	TACGCTTTGAC GCAGCTA	475	UACGCUUUGAC GCAGCUA
SCN1A-IV S22-466	16686 4268	16686 4286	116	TGAGTTACGCT TTGACGC	476	UGAGUUACGCU UUGACGC
SCN1A-IV S22-461	16686 4263	16686 4281	117	GTGCCTGAGTT ACGCTTT	477	GUGCCUGAGUU ACGCUUU
SCN1A-IV S22-456	16686 4258	16686 4276	118	AATGAGTGCCT GAGTTAC	478	AAUGAGUGCCU GAGUUAC
SCN1A-IV S22-451	16686 4253	16686 4271	119	AATAAAATGAG TGCCTGA	479	AAUAAAUGAG UGCCUGA
SCN1A-IV S22-446	16686 4248	16686 4266	120	ACAAAAATAAA ATGAGTG	480	ACAAAAUAAA AUGAGUG
SCN1A-IV S22-441	16686 4243	16686 4261	121	GAACAACAAAA ATAAAAT	481	GAACAACAAAA AUAAAAU
SCN1A-IV S22-436	16686 4238	16686 4256	122	TAACAGAACAA CAAAAAT	482	UAACAGAACAA CAAAAAU
SCN1A-IV S22-431	16686 4233	16686 4251	123	AAAAATAACAG AACAACA	483	AAAAUAACAG AACAACA
SCN1A-IV S22-426	16686 4228	16686 4246	124	TTTGAAAAAAT AACAGAA	484	UUUGAAAAAAU AACAGAA
SCN1A-IV S22-421	16686 4223	16686 4241	125	CATGCTTTGAA AAAATAA	485	CAUGCUUUGAA AAAAUAA
SCN1A-IV	16686	16686	126	AAGCACATGCT	486	AAGCACAUGCU

S22-416	4218	4236		TTGAAAA		UUGAAAA
SCN1A-IV S22-411	16686 4213	16686 4231	127	CATAAAAGCAC ATGCTTT	487	CAUAAAAGCAC AUGCUUU
SCN1A-IV S22-406	16686 4208	16686 4226	128	TGTTGCATAAA AGCACAT	488	UGUUGCAUAAA AGCACAU
SCN1A-IV S22-401	16686 4203	16686 4221	129	AGTAATGTTGC ATAAAAG	489	AGUAAUGUUGC AUAAAAG
SCN1A-IV S22-396	16686 4198	16686 4216	130	TATTCAGTAAT GTTGCAT	490	UAUUCAGUAAU GUUGCAU
SCN1A-IV S22-391	16686 4193	16686 4211	131	TGCTTTATTCAG TAATGT	491	UGCUUUAAUUA GUAAUGU
SCN1A-IV S22-386	16686 4188	16686 4206	132	CAACATGCTTT ATTCAGT	492	CAACAUGCUUU AUUCAGU
SCN1A-IV S22-381	16686 4183	16686 4201	133	CTGTACAACAT GCTTTAT	493	CUGUACAACAU GCUUUUAU
SCN1A-IV S22-376	16686 4178	16686 4196	134	AAGCACTGTAC AACATGC	494	AAGCACUGUAC AACAUGC
SCN1A-IV S22-371	16686 4173	16686 4191	135	TTATCAAGCAC TGTACAA	495	UUAUCAAGCAC UGUACAA
SCN1A-IV S22-366	16686 4168	16686 4186	136	ACTTCTTATCA AGCACTG	496	ACUUCUUAUCA AGCACUG
SCN1A-IV S22-361	16686 4163	16686 4181	137	TTCTAACTTCTT ATCAAG	497	UUCUAACUUCU UAUCAAG
SCN1A-IV S22-356	16686 4158	16686 4176	138	TTACTTTCTAAC TTCTTA	498	UUACUUUCUAA CUUCUUA
SCN1A-IV S22-351	16686 4153	16686 4171	139	ATTTGTTACTTT CTAACT	499	AUUUGUUACUU UCUAACU
SCN1A-IV S22-346	16686 4148	16686 4166	140	AATTTATTTGTT ACTTTC	500	AAUUUAUUUGU UACUUUC
SCN1A-IV S22-341	16686 4143	16686 4161	141	ATGATAATTTA TTTGTTA	501	AUGAUAAUUUA UUUGUUA
SCN1A-IV S22-336	16686 4138	16686 4156	142	ACGTGATGATA ATTTATT	502	ACGUGAUGAUA AUUUAAU
SCN1A-IV S22-331	16686 4133	16686 4151	143	GTGCAACGTGA TGATAAT	503	GUGCAACGUGA UGAUAAU
SCN1A-IV S22-326	16686 4128	16686 4146	144	ACAAAGTGCAA CGTGATG	504	ACAAAGUGCAA CGUGAUG
SCN1A-IV S22-321	16686 4123	16686 4141	145	AAAACACAAAG TGCAACG	505	AAAACACAAAG UGCAACG
SCN1A-IV S22-316	16686 4118	16686 4136	146	CATGCAAAACA CAAAGTG	506	CAUGCAAAACA CAAAGUG
SCN1A-IV S22-311	16686 4113	16686 4131	147	TAAAACATGCA AAACACA	507	UAAAACAUGCA AAACACA
SCN1A-IV S22-306	16686 4108	16686 4126	148	GTGCATAAAAC ATGCAAA	508	GUGCAUAAAC AUGCAAA
SCN1A-IV S22-301	16686 4103	16686 4121	149	GAAATGTGCAT AAAACAT	509	GAAAUGUGCAU AAAACAU
SCN1A-IV S22-296	16686 4098	16686 4116	150	AGCCAGAAATG TGCATAA	510	AGCCAGAAAUG UGCAUAA
SCN1A-IV	16686	16686	151	CTGTCAGCCAG	511	CUGUCAGCCAG

S22-291	4093	4111		AAATGTG		AAAUGUG
SCN1A-IV S22-286	16686 4088	16686 4106	152	AAAAGCTGTCA GCCAGAA	512	AAAAGCUGUCA GCCAGAA
SCN1A-IV S22-281	16686 4083	16686 4101	153	TGTTTAAAAGC TGTCAGC	513	UGUUUAAAAGC UGUCAGC
SCN1A-IV S22-276	16686 4078	16686 4096	154	ATAAATGTTTA AAAGCTG	514	AUAAAUGUUUA AAAGCUG
SCN1A-IV S22-271	16686 4073	16686 4091	155	ATACAATAAAT GTTTAAA	515	AUACAAUAAA GUUAAA
SCN1A-IV S22-266	16686 4068	16686 4086	156	TTGAAATACAA TAAATGT	516	UUGAAAUACAA UAAAUGU
SCN1A-IV S22-261	16686 4063	16686 4081	157	GAAATTTGAAA TACAATA	517	GAAAUUUGAAA UACAAUA
SCN1A-IV S22-256	16686 4058	16686 4076	158	GACTGGAAATT TGAAATA	518	GACUGGAAA UGAAAUA
SCN1A-IV S22-251	16686 4053	16686 4071	159	ATTTGGACTGG AAATTTG	519	AUUUGGACUGG AAAUUUG
SCN1A-IV S22-246	16686 4048	16686 4066	160	GAAAAATTG ACTGGAA	520	GAAAAAUUUGG ACUGGAA
SCN1A-IV S22-241	16686 4043	16686 4061	161	AAGTTGAAAA TTTGAC	521	AAGUUGAAAA UUUGGAC
SCN1A-IV S22-236	16686 4038	16686 4056	162	TTTACAAGTTG AAAAATT	522	UUUACAAGUUG AAAAAUU
SCN1A-IV S22-231	16686 4033	16686 4051	163	TTAATTTTACA AGTTGAA	523	UUAAUUUUACA AGUUGAA
SCN1A-IV S22-226	16686 4028	16686 4046	164	TCAGTTTAATTT TACAAG	524	UCAGUUUAAU UUACAAG
SCN1A-IV S22-221	16686 4023	16686 4041	165	TTCACTCAGTTT AATTTT	525	UUCACUCAGUU UAAUUUU
SCN1A-IV S22-216	16686 4018	16686 4036	166	ATCAATTCCT CAGTTTA	526	AUCAAUUCACU CAGUUUA
SCN1A-IV S22-211	16686 4013	16686 4031	167	ACGACATCAAT TCACTCA	527	ACGACAUCAAU UCACUCA
SCN1A-IV S22-206	16686 4008	16686 4026	168	TATTCACGACA TCAATTC	528	UAUUCACGACA UCAAUUC
SCN1A-IV S22-201	16686 4003	16686 4021	169	CTAGATATTCA CGACATC	529	CUAGAUUUUCA CGACAUC
SCN1A-IV S22-196	16686 3998	16686 4016	170	TTACCCTAGAT ATTCACG	530	UUACCCUAGAU AUUCACG
SCN1A-IV S22-191	16686 3993	16686 4011	171	TTATTTTACCCT AGATAT	531	UUUUUUUACCC UAGAUAU
SCN1A-IV S22-186	16686 3988	16686 4006	172	AAATTTTATTTT ACCCTA	532	AAUUUUUAAUU UACCCUA
SCN1A-IV S22-181	16686 3983	16686 4001	173	AACACAAATTT TATTTTA	533	AACACAAUUUU UAUUUUA
SCN1A-IV S22-176	16686 3978	16686 3996	174	ATTTAAACACA AATTTTA	534	AUUUAAACACA AAUUUUA
SCN1A-IV S22-171	16686 3973	16686 3991	175	TACAAATTTAA ACACAAA	535	UACAAAUUUA ACACAAA
SCN1A-IV	16686	16686	176	AAAAATACAAA	536	AAAAAUACAAA

S22-166	3968	3986		TTTAAAC		UUUAAAC
SCN1A-IV S22-161	16686 3963	16686 3981	177	AAATTAAAAAT ACAAATT	537	AAAUUAAAAAU ACAAAUU
SCN1A-IV S22-156	16686 3958	16686 3976	178	TTAGGAAATTA AAAATAC	538	UUAGGAAAUUA AAAAUAC
SCN1A-IV S22-151	16686 3953	16686 3971	179	CTAGGTTAGGA AATTAAG	539	CUAGGUUAGGA AAUUAAG
SCN1A-IV S22-146	16686 3948	16686 3966	180	ATTCCTAGGTT AGGAAA	540	AUUUCCUAGGU UAGGAAA
SCN1A-IV S22-141	16686 3943	16686 3961	181	TTAAGATTCCT AGGTTA	541	UUAAGAUUCC UAGGUUA
SCN1A-IV S22-136	16686 3938	16686 3956	182	GGTATTTAAGA TTTCCTA	542	GGUAUUUAAGA UUUCCUA
SCN1A-IV S22-131	16686 3933	16686 3951	183	AAGAAGGTATT TAAGATT	543	AAGAAGGUAAU UAAGAUA
SCN1A-IV S22-126	16686 3928	16686 3946	184	TGAAAAAGAAG GTATTTA	544	UGAAAAAGAAG GUAUUUA
SCN1A-IV S22-121	16686 3923	16686 3941	185	TCTTTTGAAAA AGAAGGT	545	UCUUUUGAAAA AGAAGGU
SCN1A-IV S22-116	16686 3918	16686 3936	186	TGAGTCTTTTG AAAAAG	546	UGAGUUCUUUU GAAAAAG
SCN1A-IV S22-111	16686 3913	16686 3931	187	AGACTTGAGTT CTTTTGA	547	AGACUUGAGUU CUUUUGA
SCN1A-IV S22-106	16686 3908	16686 3926	188	CATTAAGACTT GAGTTCT	548	CAUUAAGACUU GAGUUCU
SCN1A-IV S22-101	16686 3903	16686 3921	189	CTATCCATTAA GACTTGA	549	CUAUCCAUAUA GACUUGA
SCN1A-IV S22-096	16686 3898	16686 3916	190	TTTCCCTATCCA TTAAGA	550	UUUCCCUAUCC AUUAAGA
SCN1A-IV S22-091	16686 3893	16686 3911	191	GTCTGTTTCCCT ATCCAT	551	GUCUGUUUCCC UAUCCAU
SCN1A-IV S23+091	16686 3631	16686 3649	192	TTTCCCTACTGT GGTGCA	552	UUUCCCUACUG UGGUGCA
SCN1A-IV S23+096	16686 3626	16686 3644	193	TGTATTTTCCCT ACTGTG	553	UGUAUUUUCCC UACUGUG
SCN1A-IV S23+101	16686 3621	16686 3639	194	AATAATGTATT TTCCCTA	554	AAUAAUGUAUU UUCCCUA
SCN1A-IV S23+106	16686 3616	16686 3634	195	ATGTAAATAAT GTATTTT	555	AUGUAAAUAUU GUAUUUU
SCN1A-IV S23+111	16686 3611	16686 3629	196	TTAGGATGTAA ATAATGT	556	UUAGGAUGUAA AUAUUGU
SCN1A-IV S23+116	16686 3606	16686 3624	197	AGGGATTAGGA TGTAAT	557	AGGGAUUAGGA UGUAAAU
SCN1A-IV S23+121	16686 3601	16686 3619	198	AAAGAGGGAAT TAGGATG	558	AAAGAGGGAAU UAGGAUG
SCN1A-IV S23+126	16686 3596	16686 3614	199	ATTGAAAAGAA GGGATTA	559	AUUGAAAAGAA GGGAUUA
SCN1A-IV S23+131	16686 3591	16686 3609	200	AGACAATTGAA AAGAGGG	560	AGACAAUUGAA AAGAGGG
SCN1A-IV	16686	16686	201	ATTTAAGACAA	561	AUUUAAGACAA

S23+136	3586	3604		TTGAAAA		UUGAAAA
SCN1A-IV S23+141	16686 3581	16686 3599	202	ATGAAATTTAA GACAATT	562	AUGAAAUUAA GACAAU
SCN1A-IV S23+146	16686 3576	16686 3594	203	TTCAAATGAAA TTTAAGA	563	UUCAAAUGAAA UUUAAGA
SCN1A-IV S23+151	16686 3571	16686 3589	204	TTTTTTTCAAAT GAAATT	564	UUUUUUUCAA UGAAAU
SCN1A-IV S23+156	16686 3566	16686 3584	205	TTTTTTTTTTTT CAAATG	565	UUUUUUUUUU UCAAAUG
SCN1A-IV S23+161	16686 3561	16686 3579	206	AAGGTTTTTTTT TTTTTC	566	AAGGUUUUUU UUUUUC
SCN1A-IV S23+166	16686 3556	16686 3574	207	TCATAAAGGTT TTTTTTT	567	UCAUAAAGGU UUUUUU
SCN1A-IV S23+171	16686 3551	16686 3569	208	TAAATTCATAA AGGTTTT	568	UAAAUUCAUAA AGGUUUU
SCN1A-IV S23+176	16686 3546	16686 3564	209	GAGGGTAAATT CATAAAG	569	GAGGGUAAAU CAUAAAG
SCN1A-IV S23+181	16686 3541	16686 3559	210	CCACAGAGGGT AAATTCA	570	CCACAGAGGGU AAAUUCA
SCN1A-IV S23+186	16686 3536	16686 3554	211	AAAATCCACAG AGGGTAA	571	AAAAUCCACAG AGGGUAA
SCN1A-IV S23+191	16686 3531	16686 3549	212	GGGTAAAATC CACAGAG	572	GGGUUAAAUC CACAGAG
SCN1A-IV S23+196	16686 3526	16686 3544	213	CATTGGGATTA AAATCCA	573	CAUUGGGAUUA AAAUCCA
SCN1A-IV S23+201	16686 3521	16686 3539	214	TCAACCATTAG GGTTAAA	574	UCAACCAUAG GGUAAA
SCN1A-IV S23+206	16686 3516	16686 3534	215	AGATATCAACC ATTGGGA	575	AGAUAUCAACC AUUGGGA
SCN1A-IV S23+211	16686 3511	16686 3529	216	AATAAAGATAT CAACCAT	576	AAUAAAGAUAU CAACCAU
SCN1A-IV S23+216	16686 3506	16686 3524	217	AACTTAATAAA GATATCA	577	AACUAAUAAA GAUAUCA
SCN1A-IV S23+221	16686 3501	16686 3519	218	AATGAAACTTA ATAAAGA	578	AAUGAAACUUA AUAAAGA
SCN1A-IV S23+226	16686 3496	16686 3514	219	TATTCAATGAA ACTTAAT	579	UAUUCAAUGAA ACUUAU
SCN1A-IV S23+231	16686 3491	16686 3509	220	AATCATATTCA ATGAAAC	580	AAUCAUAUUA AUGAAAC
SCN1A-IV S23+236	16686 3486	16686 3504	221	AACTAAATCAT ATTCAAT	581	AACUAAAUCAU AUUCAU
SCN1A-IV S23+241	16686 3481	16686 3499	222	CACATAACTAA ATCATAT	582	CACAUAACUAA AUCAUUAU
SCN1A-IV S23+246	16686 3476	16686 3494	223	ATATACACATA ACTAAAT	583	AUAUACACAU ACUAAAU
SCN1A-IV S23+251	16686 3471	16686 3489	224	ACTCCATATAC ACATAAC	584	ACUCCAUAUAC ACAUAAAC
SCN1A-IV S23+256	16686 3466	16686 3484	225	GGATAACTCCA TATACAC	585	GGAUAAACUCCA UAUACAC
SCN1A-IV	16686	16686	226	AAGATGGATAA	586	AAGAUGGAUAA

S23+261	3461	3479		CTCCATA		CUCCAUA
SCN1A-IV S23+266	16686 3456	16686 3474	227	CCCCAAAGATG GATAACT	587	CCCCAAAGAUG GAUAACU
SCN1A-IV S23+271	16686 3451	16686 3469	228	AATCTCCCCAA AGATGGA	588	AAUCUCCCCAA AGAUGGA
SCN1A-IV S23+276	16686 3446	16686 3464	229	CCAGTAATCTC CCCAAAG	589	CCAGUAAUCUC CCCAAAG
SCN1A-IV S23+281	16686 3441	16686 3459	230	CCAATCCAGTA ATCTCCC	590	CCAAUCCAGUA AUCUCCC
SCN1A-IV S23+286	16686 3436	16686 3454	231	CCTCACCAATC CAGTAAT	591	CCUCACCAAUC CAGUAAU
SCN1A-IV S23+291	16686 3431	16686 3449	232	CCCGCCCTCAC CAATCCA	592	CCCGCCCUCAC CAAUCCA
SCN1A-IV S23+296	16686 3426	16686 3444	233	GGTCCCCCGCC CTCACCA	593	GGUCCCCCGCC CUCACCA
SCN1A-IV S23+301	16686 3421	16686 3439	234	ACCAGGGTCCC CCGCCCT	594	ACCAGGGUCCC CCGCCCU
SCN1A-IV S23+306	16686 3416	16686 3434	235	TCTACACCAGG GTCCCCC	595	UCUACACCAGG GUCCCCC
SCN1A-IV S23+311	16686 3411	16686 3429	236	ATCATTCTACA CCAGGGT	596	AUCAUUCUACA CCAGGGU
SCN1A-IV S23+316	16686 3406	16686 3424	237	ACATAATCATT CTACACC	597	ACAUAAUCAUU CUACACC
SCN1A-IV S23+321	16686 3401	16686 3419	238	TTTTACATAAT CATTCT	598	UUUUCACAUAA UCAUUCU
SCN1A-IV S23+326	16686 3396	16686 3414	239	TTGTTTTTTCAC ATAATC	599	UUGUUUUUUA CAUAAUC
SCN1A-IV S23+331	16686 3391	16686 3409	240	TTAAATTGTTTT TTCACA	600	UUAAAUUGUUU UUUCACA
SCN1A-IV S23+336	16686 3386	16686 3404	241	ACAAGTTAAAT TGTTTTT	601	ACAAGUUAAAU UGUUUUU
SCN1A-IV S23+341	16686 3381	16686 3399	242	GCTTAACAAGT TAAATTG	602	GCUUAACAAGU UAAAUUG
SCN1A-IV S23+346	16686 3376	16686 3394	243	CATGAGCTTAA CAAGTTA	603	CAUGAGCUUAA CAAGUUA
SCN1A-IV S23+351	16686 3371	16686 3389	244	AGTATCATGAG CTTAACA	604	AGUAUCAUGAG CUUAACA
SCN1A-IV S23+356	16686 3366	16686 3384	245	CAAACAGTATC ATGAGCT	605	CAAACAGUAUC AUGAGCU
SCN1A-IV S23+361	16686 3361	16686 3379	246	TGCCTCAAACA GTATCAT	606	UGCCUCAAAACA GUAUCAU
SCN1A-IV S23+366	16686 3356	16686 3374	247	CTGTATGCCTC AAACAGT	607	CUGUAUGCCUC AAACAGU
SCN1A-IV S23+371	16686 3351	16686 3369	248	AGGGACTGTAT GCCTCAA	608	AGGGACUGUAU GCCUCAA
SCN1A-IV S23+376	16686 3346	16686 3364	249	ACAGCAGGGAC TGTATGC	609	ACAGCAGGGAC UGUAUGC
SCN1A-IV S23+381	16686 3341	16686 3359	250	ACTAAACAGCA AGGGCTG	610	ACUAAACAGCA AGGGCUG
SCN1A-IV	16686	16686	251	AATGTACTAAA	611	AAUGUACUAAA

S23+386	3336	3354		CAGCAGG		CAGCAGG
SCN1A-IV S23+391	16686 3331	16686 3349	252	AGACCAATGTA CTAAACA	612	AGACCAAUGUA CUAAACA
SCN1A-IV S23+396	16686 3326	16686 3344	253	GACCCAGACCA ATGTACT	613	GACCCAGACCA AUGUACU
SCN1A-IV S23+401	16686 3321	16686 3339	254	TTCAGGACCCA GACCAAT	614	UUCAGGACCCA GACCAAU
SCN1A-IV S23+406	16686 3316	16686 3334	255	TAATTTTCAGG ACCCAGA	615	UAAUUUUCAGG ACCCAGA
SCN1A-IV S23+411	16686 3311	16686 3329	256	ACTGGTAATTT TCAGGAC	616	ACUGGUAAUUU UCAGGAC
SCN1A-IV S23+416	16686 3306	16686 3324	257	ATCTAACTGGT AATTTTC	617	AUCUAACUGGU AAUUUUC
SCN1A-IV S23+421	16686 3301	16686 3319	258	ATGGTATCTAA CTGGTAA	618	AUGGUAUCUAA CUGGUAA
SCN1A-IV S23+426	16686 3296	16686 3314	259	AACTGATGGTA TCTAACT	619	AACUGAUGGUA UCUAACU
SCN1A-IV S23+431	16686 3291	16686 3309	260	TAATCAACTGA TGGTATC	620	UAAUCAACUGA UGGUUAC
SCN1A-IV S23+436	16686 3286	16686 3304	261	ATCAATAATCA ACTGATG	621	AUCAAUAAUCA ACUGAUG
SCN1A-IV S23+441	16686 3281	16686 3299	262	TACATATCAAT AATCAAC	622	UACAUAUCAAU AAUCAAC
SCN1A-IV S23+446	16686 3276	16686 3294	263	GCTCATACATA TCAATAA	623	GCUCAUACAU UCAAUAA
SCN1A-IV S23+451	16686 3271	16686 3289	264	TATCTGCTCAT ACATATC	624	UAUCUGCUCAU ACAUUAC
SCN1A-IV S23+456	16686 3266	16686 3284	265	CCTAGTATCTG CTCATAC	625	CCUAGUAUCUG CUCAUAC
SCN1A-IV S23+461	16686 3261	16686 3279	266	TGCACCCTAGT ATCTGCT	626	UGCACCCUAGU AUCUGCU
SCN1A-IV S23+466	16686 3256	16686 3274	267	AATATTGCACC CTAGTAT	627	AAUAUUGCACC CUAGUAU
SCN1A-IV S23+471	16686 3251	16686 3269	268	CCTGAAATATT GCACCCT	628	CCUGAAAUAUU GCACCCU
SCN1A-IV S23+476	16686 3246	16686 3264	269	TGAAACCTGAA ATATTGC	629	UGAAACCUGAA AUUUGC
SCN1A-IV S23+481	16686 3241	16686 3259	270	TCTTATGAAAC CTGAAAT	630	UCUUAUGAAAC CUGAAAU
SCN1A-IV S23+486	16686 3236	16686 3254	271	ACCAGTCTTAT GAAACCT	631	ACCAGUCUUAU GAAACCU
SCN1A-IV S23+491	16686 3231	16686 3249	272	TCAATACCAGT CTTATGA	632	UCAAUACCAGU CUUAUGA
SCN1A-IV S23+496	16686 3226	16686 3244	273	CACAATCAATA CCAGTCT	633	CACAAUCAUA CCAGUCU
SCN1A-IV S23+501	16686 3221	16686 3239	274	GTGGTCACAAT CAATACC	634	GUGGUCACAAU CAAUACC
SCN1A-IV S23+506	16686 3216	16686 3234	275	TGAGAGTGGTC ACAATCA	635	UGAGAGUGGUC ACAAUCA
SCN1A-IV	16686	16686	276	AAAAATGAGAG	636	AAAAAUGAGAG

S23+511	3211	3229		TGGTCAC		UGGUCAC
SCN1A-IV S23+516	16686 3206	16686 3224	277	CAATAAAAAAT GAGAGTG	637	CAAUAAAAAAU GAGAGUG
SCN1A-IV S23+521	16686 3201	16686 3219	278	TTACACAATAA AAAATGA	638	UUACACAAUAA AAAAUGA
SCN1A-IV S23+526	16686 3196	16686 3214	279	TGAACTTACAC AATAAAA	639	UGAACUUACAC AAUAAAA
SCN1A-IV S23+531	16686 3191	16686 3209	280	CCATATGAACT TACACAA	640	CCAUAUGAACU UACACAA
SCN1A-IV S23+536	16686 3186	16686 3204	281	TAACCCCATAT GAACTTA	641	UAACCCCAUUA GAACUUA
SCN1A-IV S23+541	16686 3181	16686 3199	282	GAAAATAACCC CATATGA	642	GAAAAUAACCC CAUAUGA
SCN1A-IV S23+546	16686 3176	16686 3194	283	ATTTTGAAAAT AACCCCA	643	AUUUUGAAAAU AACCCCA
SCN1A-IV S23+551	16686 3171	16686 3189	284	TTAACATTTTG AAAATAA	644	UUAACAUUUUG AAAAUAA
SCN1A-IV S23+556	16686 3166	16686 3184	285	CCTTGTTAACA TTTTGAA	645	CCUUGUUAACA UUUUGAA
SCN1A-IV S23+561	16686 3161	16686 3179	286	TTTTGCCTTGTT AACATT	646	UUUUGCCUUGU UAACAUAU
SCN1A-IV S23+566	16686 3156	16686 3174	287	TATATTTTTGCC TTGTTA	647	UAUAUUUUUUGC CUUGUUA
SCN1A-IV S23+571	16686 3151	16686 3169	288	CTTAATATATTT TTGCCT	648	CUUAAUAUAUU UUUGCCU
SCN1A-IV S23+576	16686 3146	16686 3164	289	TATTTCTTAATA TATTTT	649	UAUUUCUUAUU AUUUUUU
SCN1A-IV S23+581	16686 3141	16686 3159	290	TCAACTATTTCT TAATAT	650	UCAACUAUUUC UUAAUAU
SCN1A-IV S23+586	16686 3136	16686 3154	291	CTTATTCAACT ATTTCTT	651	CUUAUUCACU AUUUCUU
SCN1A-IV S23+591	16686 3131	16686 3149	292	ATGTGCTTATTC AACTAT	652	AUGUGCUUAUU CAACUAU
SCN1A-IV S23+596	16686 3126	16686 3144	293	TTCACATGTGC TTATTCA	653	UUCACAUGUGC UUUUUCA
SCN1A-IV S23+601	16686 3121	16686 3139	294	CACAATTCACA TGTGCTT	654	CACAAUUCACA UGUGCUU
SCN1A-IV S23+606	16686 3116	16686 3134	295	TACAACACAAT TCACATG	655	UACAACACAAU UCACAUG
SCN1A-IV S23+611	16686 3111	16686 3129	296	TTGTTTACAAC ACAATTC	656	UUGUUUACAAC ACAAUUC
SCN1A-IV S23+616	16686 3106	16686 3124	297	ACTTTTTGTTTA CAACAC	657	ACUUUUUGUUU ACAACAC
SCN1A-IV S23+621	16686 3101	16686 3119	298	TTCTAACTTTTT GTTTAC	658	UUCUAACUUUU UGUUUAC
SCN1A-IV S23+626	16686 3096	16686 3114	299	TTTTATTCTAAC TTTTTG	659	UUUUAUUCUAA CUUUUUG
SCN1A-IV S23+631	16686 3091	16686 3109	300	GATTTTTTTATT CTAACT	660	GAUUUUUUUAU UCUAACU
SCN1A-IV	16686	16686	301	AAGTGGATTTT	661	AAGUGGAUUUU

S23+636	3086	3104		TTTATTC		UUUAUUC
SCN1A-IV S23+641	16686 3081	16686 3099	302	CAAATAAGTGG ATTTTTT	662	CAAUAAGUGG AUUUUUU
SCN1A-IV S23+646	16686 3076	16686 3094	303	TAATTCAAATA AGTGGAT	663	UAAUUCAAAUA AGUGGAU
SCN1A-IV S23+651	16686 3071	16686 3089	304	CTGCATAATTC AAATAAG	664	CUGCAUAAUUC AAAUAAAG
SCN1A-IV S23+656	16686 3066	16686 3084	305	CTATTCTGCAT AATTCOA	665	CUAUUCUGCAU AAUUCOA
SCN1A-IV S23+661	16686 3061	16686 3079	306	GTATTCTATTCT GCATAA	666	GUAUUCUAUUC UGCAUAA
SCN1A-IV S23+666	16686 3056	16686 3074	307	GGTATGTATTC TATTCTG	667	GGUAUGUAUUC UAUUCUG
SCN1A-IV S23+671	16686 3051	16686 3069	308	TTCTAGGTATG TATTCTA	668	UUCUAGGUAUG UAUUCUA
SCN1A-IV S23+676	16686 3046	16686 3064	309	TTTATTTCTAGG TATGTA	669	UUUAUUUCUAG GUAUGUA
SCN1A-IV S23+681	16686 3041	16686 3059	310	TTTGTTTTATTT CTAGGT	670	UUUGUUUUAAU UCUAGGU
SCN1A-IV S23+686	16686 3036	16686 3054	311	ACGTTTTTGTTT TATTC	671	ACGUUUUUGUU UUAUUUC
SCN1A-IV S23+691	16686 3031	16686 3049	312	ATAAGACGTTT TTGTTTT	672	AUAAGACGUUU UUGUUUU
SCN1A-IV S23+696	16686 3026	16686 3044	313	TCATGATAAGA CGTTTTT	673	UCAUGAUAAGA CGUUUUU
SCN1A-IV S23+701	16686 3021	16686 3039	314	AATACTCATGA TAAGACG	674	AAUACUCAUGA UAAGACG
SCN1A-IV S23+706	16686 3016	16686 3034	315	ATCTTAATACT CATGATA	675	AUCUAAUACU CAUGAUA
SCN1A-IV S23+711	16686 3011	16686 3029	316	ATTTTATCTTAA TACTCA	676	AUUUUAUCUUA AUACUCA
SCN1A-IV S23+716	16686 3006	16686 3024	317	CTTAAATTTTAT CTTAAT	677	CUUAAAUUUUA UCUUAU
SCN1A-IV S23+721	16686 3001	16686 3019	318	TATGCCTTAAA TTTTATC	678	UAUGCCUUAUA UUUUAUC
SCN1A-IV S23+726	16686 2996	16686 3014	319	GAGTTTATGCC TTAAATT	679	GAGUUUAUGCC UUAAAUA
SCN1A-IV S23+731	16686 2991	16686 3009	320	GAAGTGAGTTT ATGCCTT	680	GAAGUGAGUUU AUGCCUU
SCN1A-IV S23+736	16686 2986	16686 3004	321	TCTAAGAAGTG AGTTTAT	681	UCUAAGAAGUG AGUUUAU
SCN1A-IV S23+741	16686 2981	16686 2999	322	CTTATTCTAAG AAGTGAG	682	CUUAUUCUAAG AAGUGAG
SCN1A-IV S23+746	16686 2976	16686 2994	323	AGTTACTTATTC TAAGAA	683	AGUUACUUAUU CUAAGAA
SCN1A-IV S23+751	16686 2971	16686 2989	324	TTGGGAGTTAC TTATTCT	684	UUGGGAGUUAC UUAUUCU
SCN1A-IV S23+756	16686 2966	16686 2984	325	GTTAGTTGGGA GTTACTT	685	GUUAGUUGGGA GUUACUU
SCN1A-IV	16686	16686	326	AGAAAGTTAGT	686	AGAAAGUUAGU

S23+761	2961	2979		TGGGAGT		UGGGAGU
SCN1A-IV S23+766	16686 2956	16686 2974	327	ATCCTAGAAAG TTAGTTG	687	AUCCUAGAAAG UUAGUUG
SCN1A-IV S23+771	16686 2951	16686 2969	328	TAAAAATCCTA GAAAGTT	688	UUAAAAUCCUA GAAAGUU
SCN1A-IV S23+776	16686 2946	16686 2964	329	ATGTTTTAAAA TCCTAGA	689	AUGUUUUAAAA UCCUAGA
SCN1A-IV S23+781	16686 2941	16686 2959	330	GTGTTATGTTTT AAAATC	690	GUGUUAUGUUU UAAAAUC
SCN1A-IV S23+786	16686 2936	16686 2954	331	TCACTGTGTTAT GTTTTA	691	UCACUGUGUUA UGUUUUA
SCN1A-IV S23+791	16686 2931	16686 2949	332	TGTTTTCACTGT GTTATG	692	UGUUUUCACUG UGUUAUG
SCN1A-IV S23+796	16686 2926	16686 2944	333	ATGTATGTTTTC ACTGTG	693	AUGUAUGUUUU CACUGUG
SCN1A-IV S23+801	16686 2921	16686 2939	334	TGTTTATGTATG TTTTCA	694	UGUUUAUGUUA GUUUUCA
SCN1A-IV S23+806	16686 2916	16686 2934	335	AGTTATGTTTAT GTATGT	695	AGUUAUGUUUA UGUAUGU
SCN1A-IV S23+811	16686 2911	16686 2929	336	TGTAGAGTTAT GTTTATG	696	UGUAGAGUUUA GUUUAUG
SCN1A-IV S23+816	16686 2906	16686 2924	337	TAAAATGTAGA GTTATGT	697	UAAAAUGUAGA GUUAUGU
SCN1A-IV S23+821	16686 2901	16686 2919	338	ATAAATAAAAT GTAGAGT	698	AUAAAUAAAAU GUAGAGU
SCN1A-IV S23+826	16686 2896	16686 2914	339	TAAGAATAAAT AAAATGT	699	UAAGAAUAAAU AAAUGU
SCN1A-IV S23+831	16686 2891	16686 2909	340	AACTTTAAGAA TAAATAA	700	AACUUUAAGAA UAAAUA
SCN1A-IV S23+836	16686 2886	16686 2904	341	ACTTAACTTT AAGAATA	701	ACUUAACUUU AAGAAUA
SCN1A-IV S23+841	16686 2881	16686 2899	342	AATACACTTAA ACTTTAA	702	AAUACACUUA ACUUUA
SCN1A-IV S23+846	16686 2876	16686 2894	343	TGTATAATACA CTTAAAC	703	UGUAUAAUACA CUUAAAC
SCN1A-IV S23+851	16686 2871	16686 2889	344	CTTCTTGATAA TACACT	704	CUUCUUGUAUA AUACACU
SCN1A-IV S23+856	16686 2866	16686 2884	345	CTCTTCTTCTG TATAAT	705	CUCUUCUUCUU GUAUAAU
SCN1A-IV S23+861	16686 2861	16686 2879	346	ATAAACTCTTC TTCTTGT	706	AUAAACUCUUC UUCUUGU
SCN1A-IV S23+866	16686 2856	16686 2874	347	CGAATATAAAC TCTTCTT	707	CGAAUAUAAAC UCUUCUU
SCN1A-IV S23+871	16686 2851	16686 2869	348	TCTCTCGAATA TAAACTC	708	UCUCUCGAAUA UAAACUC
SCN1A-IV S23+876	16686 2846	16686 2864	349	TTCTGTCTCTCG AATATA	709	UUCUGUCUCUC GAAUAUA
SCN1A-IV S23+881	16686 2841	16686 2859	350	ACTTTTCTGTC TCTCGA	710	ACUUUUUCUGU CUCUCGA
SCN1A-IV	16686	16686	351	TTCTGACTTTTT	711	UUCUGACUUUU

S23+886	2836	2854		CTGTCT		UCUGUCU
SCN1A-IV S23+891	16686 2831	16686 2849	352	AAAAATTCTGA CTTTTTC	712	AAAAAUUCUGA CUUUUUC
SCN1A-IV S23+896	16686 2826	16686 2844	353	CAAACAAAAAT TCTGACT	713	CAAACAAAAAU UCUGACU
SCN1A-IV S23+901	16686 2821	16686 2839	354	TGATCCAAACA AAAATTC	714	UGAUCCAAACA AAAAUUC
SCN1A-IV S23+906	16686 2816	16686 2834	355	ATTGGTGATCC AAACAAA	715	AUUGGUGAUCC AAACAAA
SCN1A-IV S23+911	16686 2811	16686 2829	356	GATATATTGGT GATCCAA	716	GAUAUAUUGGU GAUCCAA
SCN1A-IV S23+916	16686 2806	16686 2824	357	GCTATGATATA TTGGTGA	717	GCUAUGAUUAU UUGGUGA
SCN1A-IV S23+921	16686 2801	16686 2819	358	TGTAAGCTATG ATATATT	718	UGUAAGCUAUG AUAUAU
SCN1A-IV S23+926	16686 2796	16686 2814	359	TTTTTTGTAAGC TATGAT	719	UUUUUUGUAAG CUAUGAU
SCN1A-IV S23+931	16686 2791	16686 2809	360	ACAGTTTTTTTG TAAGCT	720	ACAGUUUUUUU GUAAGCU
SCN1A-IV S23+936	16686 2786	16686 2804	361	TTAAGACAGTT TTTTTGT	721	UUAAGACAGUU UUUUUGU
SCN1A-IV S23+941	16686 2781	16686 2799	362	TTTAATTAAGA CAGTTTT	722	UUUAAUUAAGA CAGUUUU
SCN1A-IV S23+946	16686 2776	16686 2794	363	TGGGTTTTAATT AAGACA	723	UGGGUUUUAAU UAAGACA
SCN1A-IV S23+951	16686 2771	16686 2789	364	TGTTGTGGGTTT TAATTA	724	UGUUGUGGGUU UUAAUUA
SCN1A-IV S23+956	16686 2766	16686 2784	365	AATTATGTTGT GGGTTTT	725	AAUUAUGUUGU GGGUUUU
SCN1A-IV S23+961	16686 2761	16686 2779	366	AAAAAAATTAT GTTGTGG	726	AAAAAAAUUAU GUUGUGG
SCN1A-IV S23+966	16686 2756	16686 2774	367	AATCTAAAAAA ATTATGT	727	AAUCUAAAAAA AUUAUGU
SCN1A-IV S23+971	16686 2751	16686 2769	368	TAAAAAATCTA AAAAAAT	728	UUAAAAAUCUA AAAAAAU
SCN1A-IV S23+976	16686 2746	16686 2764	369	CTTCTTAAAA ATCTAAA	729	CUUUCUAAAA AUCUAAA
SCN1A-IV S23+981	16686 2741	16686 2759	370	AGAATCTTTCTT AAAAAT	730	AGAAUCUUUCU UAAAAAU
SCN1A-IV S23+986	16686 2736	16686 2754	371	ATAATAGAATC TTTCTTA	731	AUAAUAGAAUC UUUCUUA

实施例4:通过RT-PCR评价的SCN1A外显子23 (外显子20x) 区域延伸ASO步移

[0232] ASO步移序列可以通过例如RT-PCR来评价。在图5A中,代表性的PAGE显示了如本文实施例3中以及图3的说明中所述的在RenCe11中以1 μ M的浓度通过核转染的模拟处理的、对照ASO处理的或靶向外显子20x区域的SCN1A的SYBR-safe染色的RT-PCR产物。对两种产物进行定量,一种包含外显子20x,一种不包含外显子20x,并且将外显子20x包含百分比以条形图绘出(图5B)。Taqman q PCR产物也相对于RPL32内部对照进行归一化,并且相对于模拟的变化倍数以条形图绘出(图5C)。

[0233] 虽然本文已经显示并描述了本发明的优选实施方案,但是对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员现将想到许多变化、改变和替换。应当理解,在实施本发明的过程中可以采用本文所述的

本发明实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本发明的范围,由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

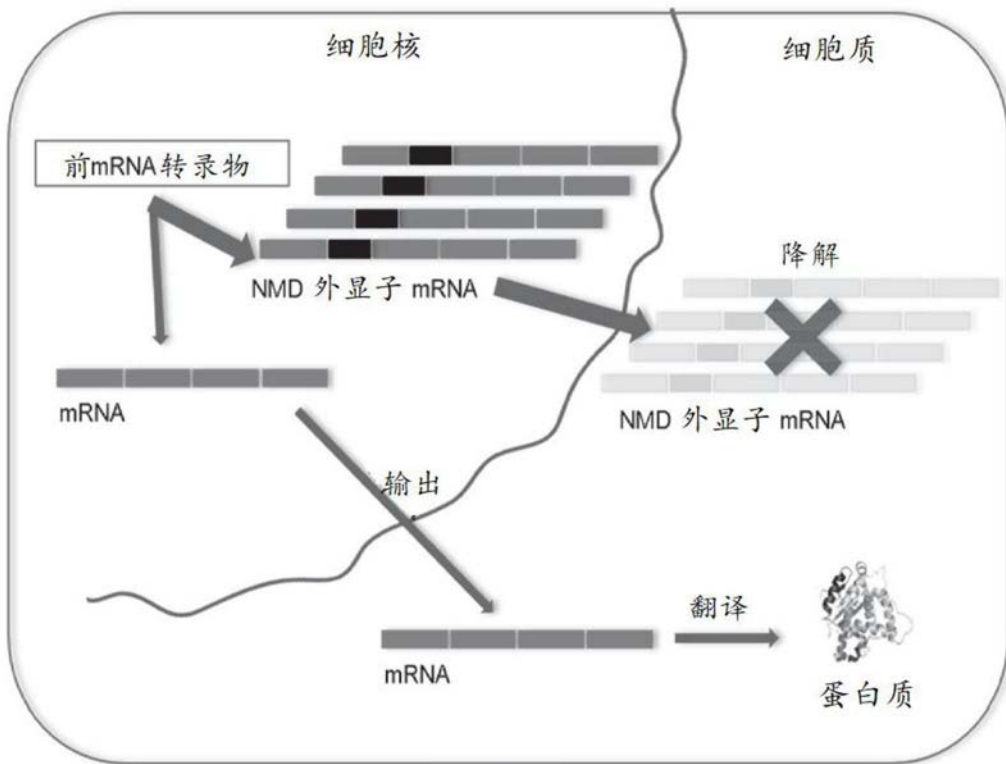


图1A

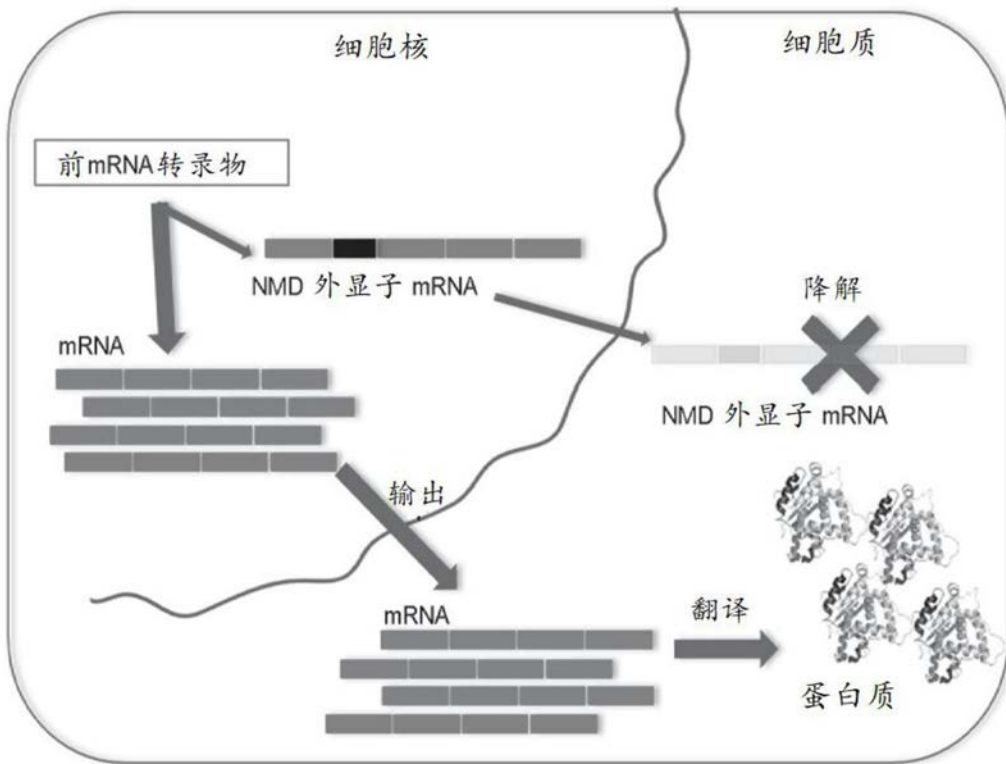


图1B

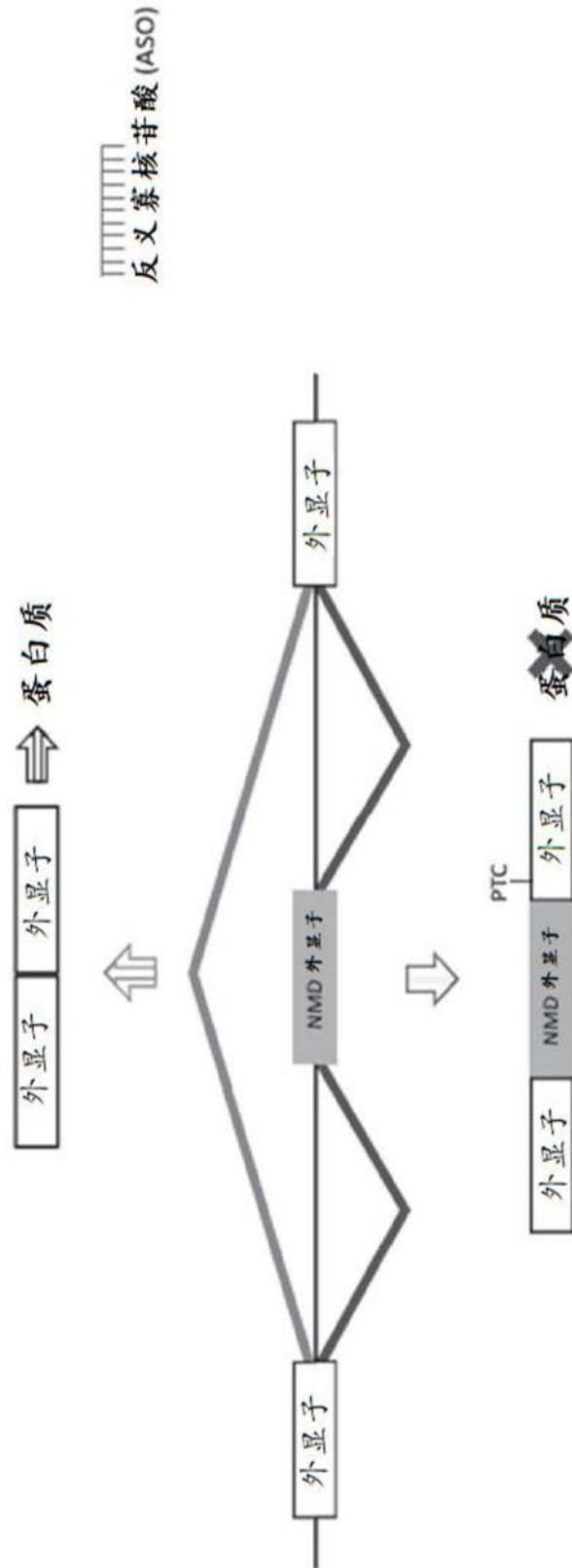


图1C

小鼠 - Neuro 2A

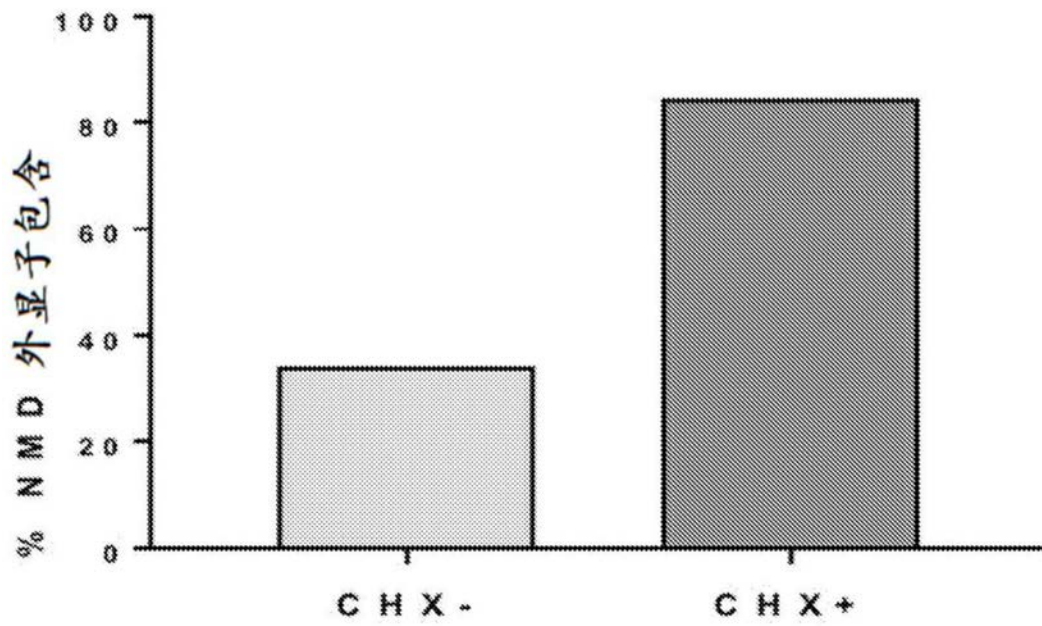


图3A

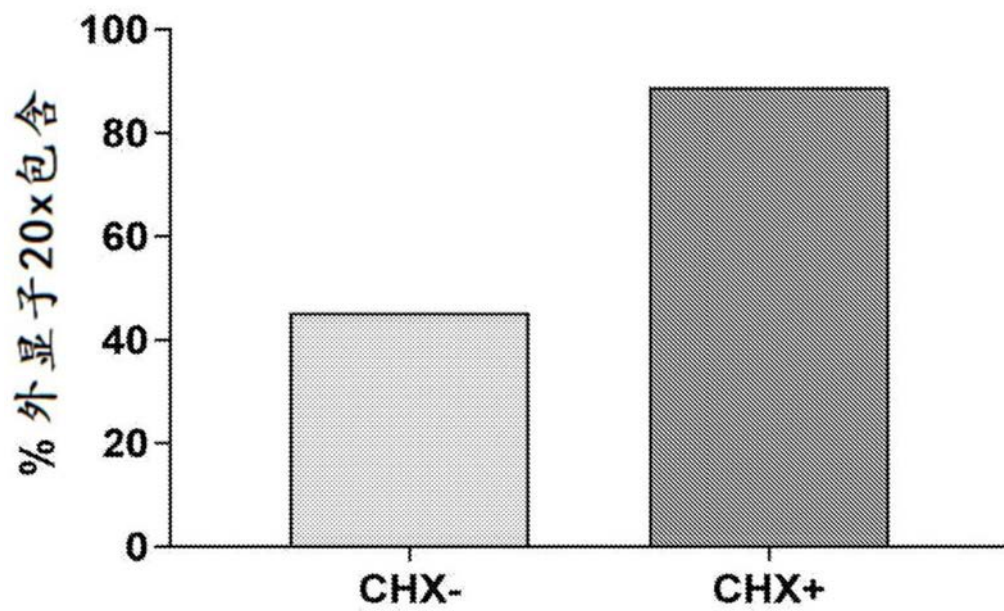
RenCell 中的 SCN1A NMD 外显子
细胞质 RNA

图3B

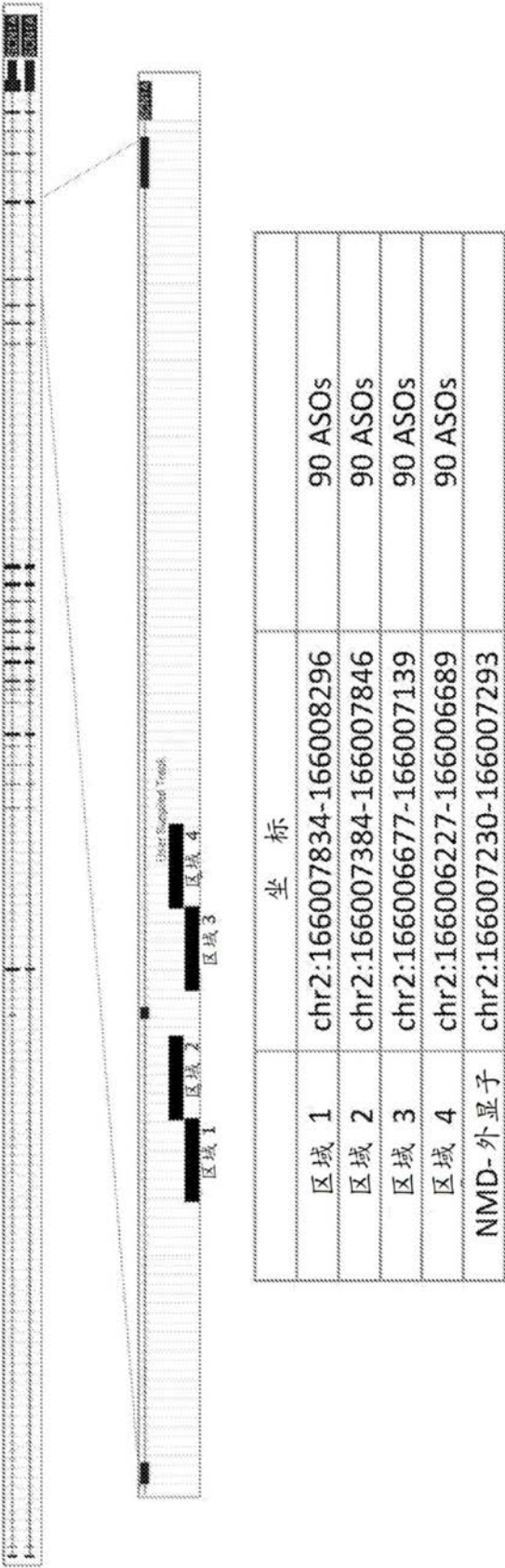


图4

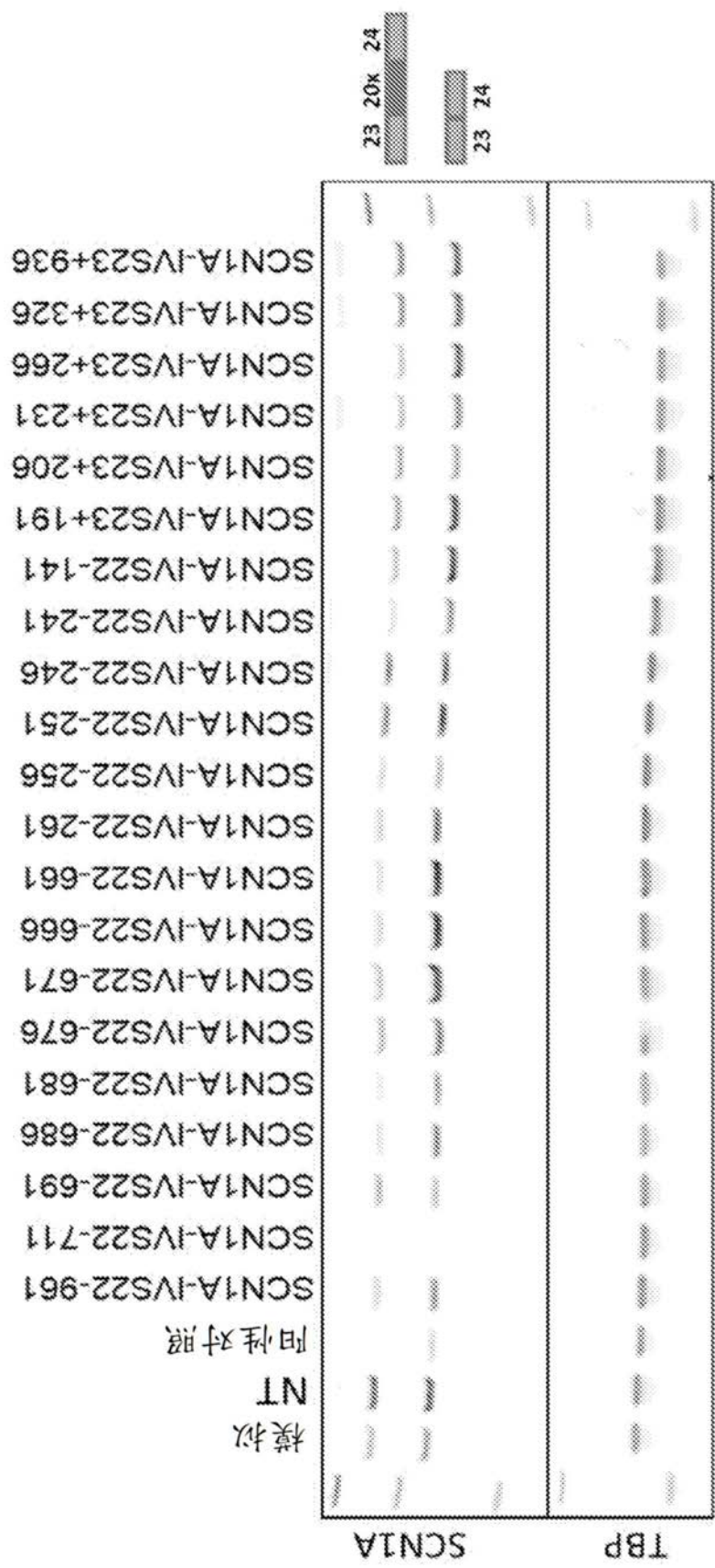


图5A

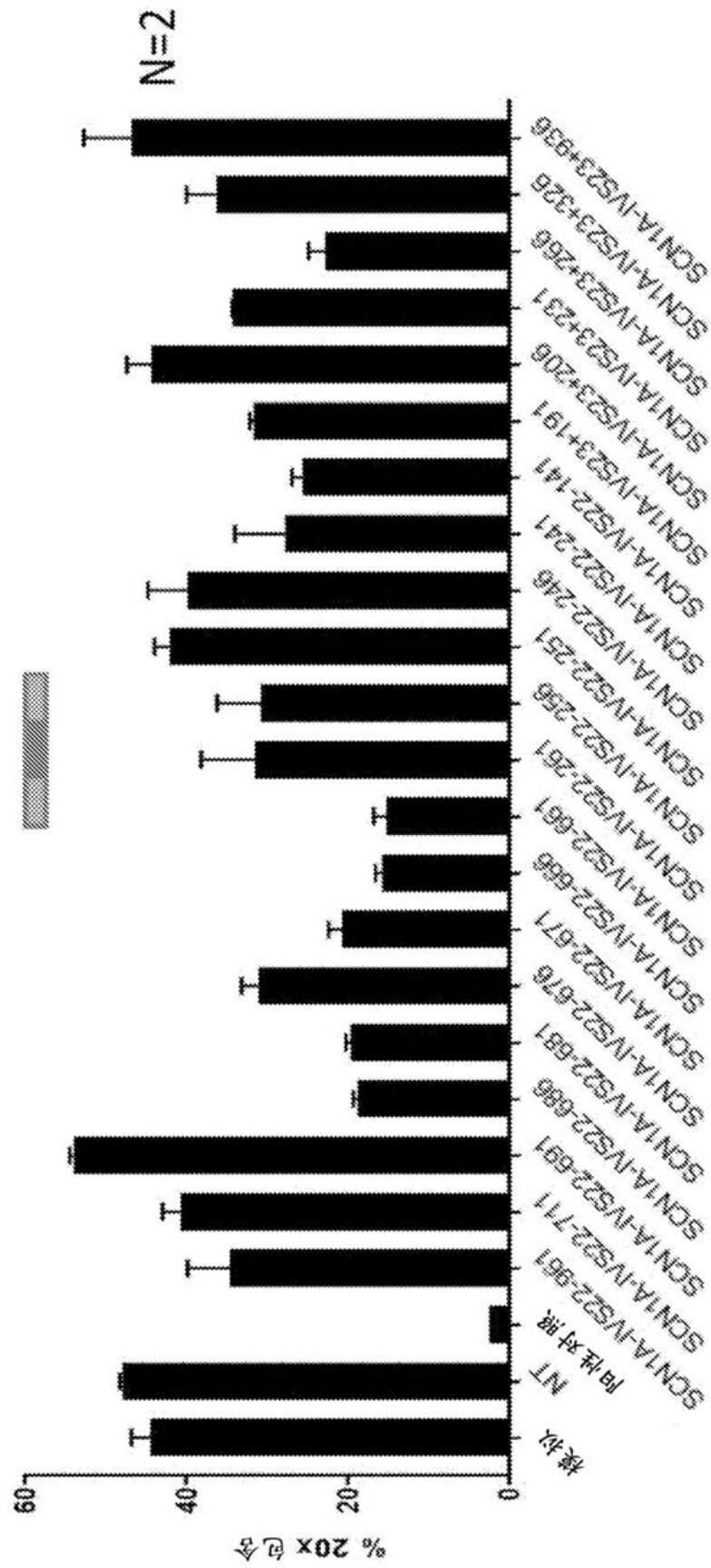


图5B

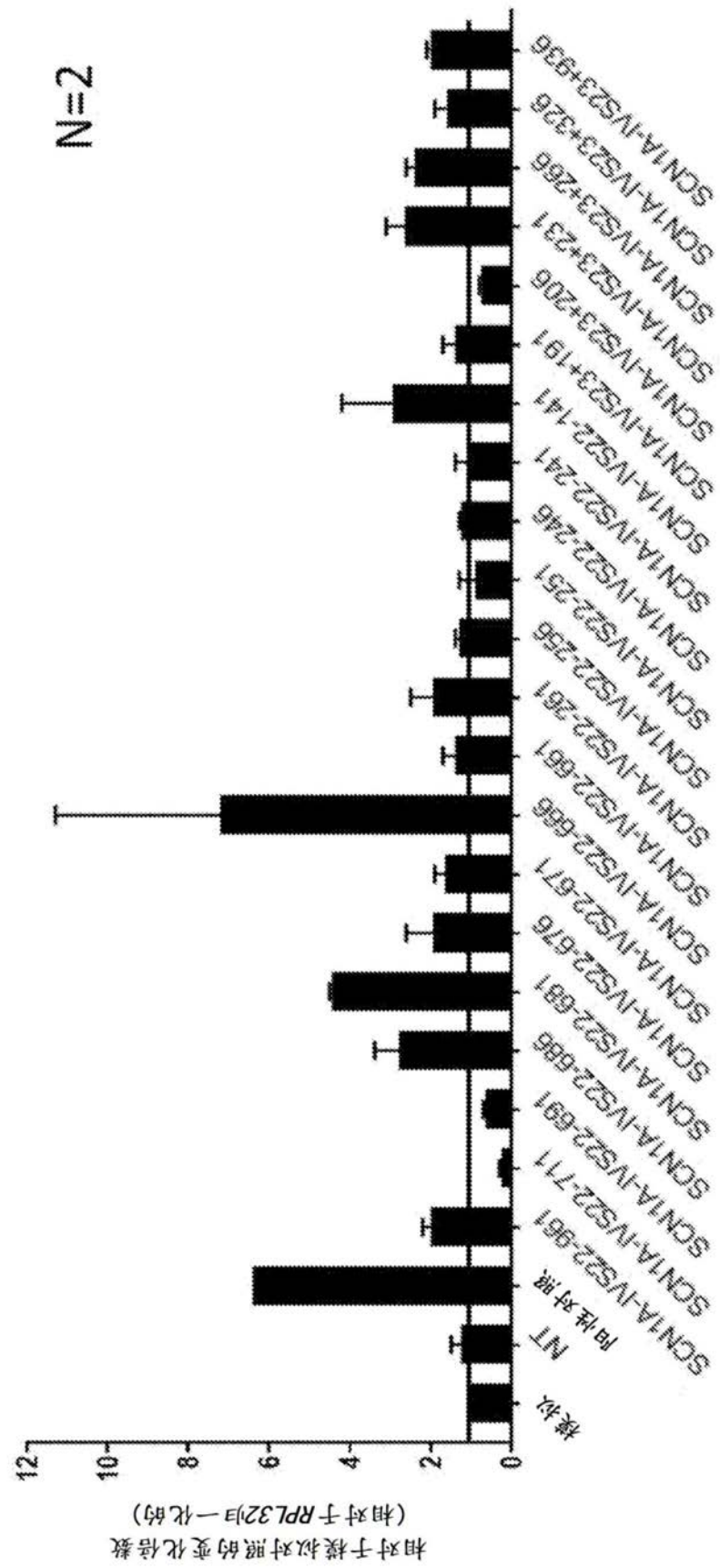


图5C