(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102665731 A
(43)申请公布日 2012.09.12

(21)申请号 201080036807.0
(22)申请日 2010.06.17
(30)优先权数据
61/218,031 2009.06.17 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2012.02.17
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2010/039077 2010.06.17
(87)PCT申请的公布数据
WO2010/148249 EN 2010.12.23
(71)申请人 ISIS 制药公司
地址 美国加利福尼亚州
申请人 冷泉港实验室
(72)发明人 C·F·班尼特 G·洪 F·里戈
A·R·克莱纳 Y·华
M·A·帕西尼 L·史哈布丁
S·H·程 K·W·克令格
(74)专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有限公司 11111
代理人 杨颖 张一军
(51)Int.Cl.
A61K 31/7088(2006.01)

权利要求书 5 页 说明书 41 页
序列表 4 页 附图 10 页

(54)发明名称

用于在对象中调节 SMN2 剪接的组合物和方法

(57)摘要

本发明公开了用于调节对象中的 SMN2mRNA 剪接的化合物、组合物和方法。还提供了所公开的化合物和组合物用于生产药物的用途，所述药物用于治疗疾病和病症，包括脊髓性肌萎缩症。

CN 102665731 A

1. 一种方法，包括向对象给药包含反义寡核苷酸的反义化合物，该反义寡核苷酸互补于人 SMN2mRNA 前体的编码核酸的内含子 7，其中所述反义化合物给药至脑脊液。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述给药是至鞘内空隙。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述给药是至脑内的脑脊液。

4. 根据权利要求 1-3 任意一项所述的方法，其中所述给药包含推注注射。

5. 根据权利要求 1-3 任意一项所述的方法，其中所述给药包含利用递送泵输注。

6. 根据权利要求 1-5 任意一项所述的方法，其中所述反义化合物给药的剂量为 0.01 至 10 毫克反义化合物每千克对象体重。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述给药剂量为 0.01 至 10 毫克反义化合物每千克对象体重。

8. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述给药剂量为 0.01 至 5 毫克反义化合物每千克对象体重。

9. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述给药剂量为 0.05 至 1 毫克反义化合物每千克对象体重。

10. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述给药剂量为 0.01 至 0.5 毫克反义化合物每千克对象体重。

11. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述给药剂量为 0.05 至 0.5 毫克反义化合物每千克对象体重。

12. 根据权利要求 6-11 任意一项所述的方法，其中每日给药所述剂量。

13. 根据权利要求 6-11 任意一项所述的方法，其中每周给药所述剂量。

14. 根据权利要求 6-11 任意一项所述的方法，其中连续给药所述反义化合物，且其中所述剂量是每日给药的剂量。

15. 根据权利要求 1-13 任意一项所述的方法，包括在诱导期给药至少一个诱导剂量，且在维持期给药至少一个维持剂量。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述诱导剂量为 0.05 至 5.0 毫克反义化合物每千克对象体重。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的方法，其中所述维持剂量为 0.01 至 1.0 毫克反义化合物每千克对象体重。

18. 根据权利要求 15-17 任意一项所述的方法，其中所述诱导期的持续时间为至少 1 周。

19. 根据权利要求 15-18 任意一项所述的方法，其中所述维持期的持续时间为至少 1 周。

20. 根据权利要求 15-19 任意一项所述的方法，其中各诱导剂量和各维持剂量均包含单次注射。

21. 根据权利要求 15-19 任意一项所述的方法，其中各诱导剂量和各维持剂量均独立地包含两次或更多注射。

22. 根据权利要求 1-21 任意一项所述的方法，其中在至少 1 周的治疗期内，给药所述反义化合物至少 2 次。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述治疗期为至少一个月。

24. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述治疗期为至少 2 个月。

25. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述治疗期为至少 4 个月。

26. 根据权利要求 15-25 任意一项所述的方法，其中通过一次或更多推注注射给药所述诱导剂量，和通过输注泵给药所述维持剂量。

27. 根据权利要求 1-26 任意一项所述的方法，包括评估反义化合物的所述耐受性和 / 或有效性。

28. 根据权利要求 1-27 任意一项所述的方法，其中当出现所述反义化合物给药不耐受的指征时，降低反义化合物的给药剂量或频率。

29. 根据权利要求 1-28 任意一项所述的方法，其中当出现所述反义化合物给药有效的指征时，维持或降低反义化合物的给药剂量或频率。

30. 根据权利要求 1-29 任意一项所述的方法，其中当出现所述反义化合物给药无效的指征时，增加反义化合物的剂量。

31. 根据权利要求 1-30 任意一项所述的方法，其中当出现所述反义化合物给药有效的指征时，降低反义化合物的给药频率。

32. 根据权利要求 1-31 任意一项所述的方法，其中当出现所述反义化合物给药无效的指征时，增加反义化合物的给药频率。

33. 根据上述权利要求任意一项所述的方法，包括将所述反义化合物与至少一种其他疗法联合给药。

34. 根据权利要求 33 所述的方法，其中将所述反义化合物与至少一种其他疗法同时联合给药。

35. 根据权利要求 34 所述的方法，其中在至少一种其他治疗给药前，给药所述反义化合物。

36. 根据权利要求 34 所述的方法，其中在至少一种其他治疗给药后，给药所述反义化合物。

37. 根据权利要求 33-36 任意一项所述的方法，其中所述至少一种其他治疗包括，给药丙戊酸、利鲁唑、羟基脲和丁酸盐中的一种或更多种。

38. 根据权利要求 33-37 任意一项所述的方法，其中所述至少一种其他治疗包括给药曲古霉素 -A。

39. 根据权利要求 33-38 任意一项所述的方法，其中所述至少一种其他治疗包括给药干细胞。

40. 根据权利要求 33-39 任意一项所述的方法，其中所述至少一种其他治疗为基因治疗。

41. 根据上述权利要求任意一项所述的方法，其中所述反义化合物的给药浓度为约 0.01mg/ml、约 0.05mg/ml、约 0.1mg/ml、约 0.5mg/ml、约 1mg/ml、约 5mg/ml、约 10mg/ml、约 50mg/ml、或约 100mg/ml。

42. 根据权利要求 1-41 任意一项所述的方法，其中在对象的运动神经元中，SMN2mRNA 对外显子 7 的包含增加。

43. 根据权利要求 1-42 任意一项所述的方法，其中在对象的运动神经元中，SMN2 多肽对外显子 7 的氨基酸的包含增加。

44. 一种在对象的运动神经元中增加 SMN2mRNA 对外显子 7 的包含的方法，包括向对象给药含有反义寡核苷酸的反义化合物，所述反义寡核苷酸互补于人 SMN2 编码核酸的内含子 7，进而在对象的运动神经元中增加 SMN2mRNA 对外显子 7 的包含。

45. 一种在对象的运动神经元中增加 SMN2 多肽对外显子 7 氨基酸的包含的方法，包括向对象给药含有反义寡核苷酸的反义化合物，所述反义寡核苷酸互补于人 SMN2 编码核酸的内含子 7，进而在对象的运动神经元中增加 SMN2 多肽对外显子 7 氨基酸的包含。

46. 根据权利要求 1-45 任意一项所述的方法，其中所述对象患有 SMA。

47. 根据权利要求 1-45 任意一项所述的方法，其中所述对象患有 I 型 SMA。

48. 根据权利要求 1-45 任意一项所述的方法，其中所述对象患有 II 型 SMA。

49. 根据权利要求 1-45 任意一项所述的方法，其中所述对象患有 III 型 SMA。

50. 根据权利要求 1-49 任意一项所述的方法，其中在子宫内进行第一次给药。

51. 根据权利要求 50 所述的方法，其中在血脑屏障完全形成前进行所述第一次给药。

52. 根据权利要求 1-49 任意一项所述的方法，其中在对象出生 1 周内进行第一次给药。

53. 根据权利要求 1-49 任意一项所述的方法，其中在对象出生 1 个月内进行第一次给药。

54. 根据权利要求 1-49 任意一项所述的方法，其中在对象出生 3 个月内进行第一次给药。

55. 根据权利要求 1-49 任意一项所述的方法，其中在对象出生 6 个月内进行第一次给药。

56. 根据权利要求 1-49 任意一项所述的方法，其中在对象 1 至 2 岁时进行第一次给药。

57. 根据权利要求 1-49 任意一项所述的方法，其中在对象 1 至 15 岁时进行第一次给药。

58. 根据权利要求 1-49 任意一项所述的方法，其中在对象 15 岁以上时进行第一次给药。

59. 根据权利要求 1-58 任意一项所述的方法，其中所述对象是哺乳动物。

60. 根据权利要求 59 所述的方法，其中所述对象是人。

61. 根据权利要求 1-60 任意一项所述的方法，包括识别患有 SMA 的对象。

62. 根据权利要求 61 所述的方法，其中通过测定对象一块或更多块肌肉的电活性来识别所述对象。

63. 根据权利要求 61 所述的方法，其中通过遗传检测以确定对象的 SMN1 基因中是否具有突变来识别所述对象。

64. 根据权利要求 61 所述的方法，其中通过肌肉组织活检来识别所述对象。

65. 根据权利要求 42 所述的方法，其中所述反义化合物的给药使得含有外显子 7 的 SMN2mRNA 的量增加至少 10％。

66. 根据权利要求 65 所述的方法，其中含有外显子 7 的 SMN2mRNA 的量增加至少 20％。

67. 根据权利要求 65 所述的方法，其中含有外显子 7 的 SMN2mRNA 的量增加至少 50％。

68. 根据权利要求 65 所述的方法，其中含有外显子 7 的 SMN2mRNA 的量增加至少 70％。

69. 根据权利要求 43 所述的方法，其中所述反义化合物的给药使得含有外显子 7 氨基酸的 SMN2 多肽的量增加至少 10％。

70. 根据权利要求 69 所述的方法，其中含有外显子 7 氨基酸的 SMN2 多肽的量增加至少 20％。

71. 根据权利要求 69 所述的方法，其中含有外显子 7 氨基酸的 SMN2 多肽的量增加至少 50％。

72. 根据权利要求 69 所述的方法，其中含有外显子 7 氨基酸的 SMN2 多肽的量增加至少 70％。

73. 根据权利要求 1-72 任意一项所述的方法，其中所述反义化合物的给药能在所述对象中减轻 SMA 的至少一种症状。

74. 根据权利要求 73 所述的方法，其中所述反义化合物的给药使得在所述对象中的运动功能改善。

75. 根据权利要求 73 所述的方法，其中所述反义化合物的给药使得在所述对象中运动功能丧失被推迟或减少。

76. 根据权利要求 73 所述的方法，其中所述反义化合物的给药使得呼吸功能改善。

77. 根据权利要求 73 所述的方法，其中所述反义化合物的给药使得生存期改善。

78. 根据权利要求 1-77 任意一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸的至少一个核苷包含修饰的糖配基。

79. 根据权利要求 78 所述的方法，其中所述至少一个修饰的糖配基包含 2’- 甲氧乙基糖配基。

80. 根据权利要求 1-79 任意一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸的各核苷基本上均包含修饰的糖配基。

81. 根据权利要求 80 所述的方法，其中所述包含修饰糖配基的核苷均包含相同的糖修饰。

82. 根据权利要求 81 所述的方法，其中各修饰的糖配基均包含 2’- 甲氧乙基糖配基。

83. 根据权利要求 1-79 任意一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸的各核苷均包含修饰的糖配基。

84. 根据权利要求 83 所述的方法，其中所述核苷均包含相同的糖修饰。

85. 根据权利要求 84 所述的方法，其中各修饰的糖配基均包含 2’- 甲氧乙基糖配基。

86. 根据权利要求 1-85 任意一项所述的方法，其中至少一个核苷间连接是硫代磷酸酯核苷间连接。

87. 根据权利要求 86 所述的方法，其中各核苷间连接均为硫代磷酸酯核苷间连接。

88. 根据权利要求 1-87 任意一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸由 10 至 25 个连接的核苷组成。

89. 根据权利要求 1-87 任意一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸由 12 至 22 个连接的核苷组成。

90. 根据权利要求 1-87 任意一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸由 15 至 20 个连接的核苷组成。

91. 根据权利要求 1-87 任意一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸由 18 个连接的核苷组成。

92. 根据权利要求 1-91 任意一项所述的方法，其中所述反义寡核苷酸与人 SMN2 的编码

核酸具有至少 90％的互补性。

93. 根据权利要求 92 所述的方法，其中所述反义寡核苷酸与人 SMN2 的编码核酸具有完全的互补性。

94. 根据权利要求 1-93 任意一项所述的方法，其中所述寡核苷酸具有核碱基序列，所述核碱基序列包含 SEQ ID NO :1 的核碱基序列中的至少 10 个连续核碱基。

95. 根据权利要求 94 所述的方法，其中所述寡核苷酸具有核碱基序列，所述核碱基序列包含 SEQ ID NO :1 的核碱基序列中至少 15 个连续核碱基。

96. 根据权利要求 94 所述的方法，其中所述寡核苷酸具有核碱基序列，所述核碱基序列包含 SEQ ID NO :1 的核碱基序列。

97. 根据权利要求 94 所述的方法，其中所述寡核苷酸具有核碱基序列，所述核碱基序列由 SEQ ID NO :1 的核碱基序列组成。

98. 根据权利要求 1-97 任意一项所述的方法，其中所述反义化合物包含缀合基团或末端基团。

99. 根据权利要求 1-97 任意一项所述的方法，其中所述反义化合物由反义寡核苷酸组成。

100. 根据权利要求 1-99 任意一项所述的方法，其中所述反义化合物还可以全身给药。

101. 根据权利要求 100 所述的方法，其中所述全身给药是通过静脉或腹腔注射。

102. 根据权利要求 100 或 101 所述的方法，其中所述全身给药和给药至中枢神经系统同时进行。

103. 根据权利要求 100 或 101 所述的方法，其中所述全身给药和给药至中枢神经系统在不同时间进行。

104. 一种包含反义寡核苷酸的反义化合物，所述反义寡核苷酸互补于人 SMN2 编码核酸的内含子 7，所述反义化合物用于权利要求 1-103 任意一项所述的方法。

105. 根据权利要求 104 所述的反义化合物，所述反义化合物用于治疗与运动神经元存活基因 1(SMN1) 有关的疾病或状态。

106. 一种包含反义寡核苷酸的反义化合物用于生产药物的用途，所述反义寡核苷酸互补于人 SMN2 编码核酸的内含子 7，所述药物用于前述任意权利要求所述的方法。

107. 根据权利要求 106 所述的用途，其中该药物用于治疗与运动神经元存活基因 1(SMN1) 有关的疾病或状态。

用于在对象中调节 SMN2 剪接的组合物和方法

[0001] 序列表

[0002] 本申请连同电子形式的序列表一起提交。提交的序列表是命名为 20100617_CORE0086WOSEQ.txt 的文件，该文件于 2010 年 6 月 17 日创建，5Kb 大小。序列表的电子形式中的信息通过引用全文并入本申请。

背景技术

[0003] 新合成的真核 mRNA 分子，称为初级转录物或 mRNA 前体，在翻译前被加工。mRNA 前体的加工包括添加 5’甲基化帽和在转录物的 3’末端加上约 200-250 个碱基的 poly(A) 尾。从 mRNA 前体到 mRNA 的加工经常还包括 mRNA 前体的剪接，其发生在 90-95％哺乳动物 mRNA 的成熟过程中。内含子（或插入序列）是 mRNA 前体中的某些区域，其不包含在成熟 mRNA 的编码序列中。外显子是初级转录物的某些区域，其仍保留在成熟 mRNA 中。外显子被剪接在一起，以形成成熟的 mRNA 序列。剪接结点也被称作剪接点，其中结点的 5′ 端通常称作“5′ 剪接位点”或“剪接供体位点”，而 3′ 端则称作“3′ 剪接位点”或“剪接受体位点”。在剪接过程中，上游外显子的 3’末端与下游外显子的 5’末端连接。这样，未剪接的 mRNA 前体在内含子的 5’末端具有一个外显子 / 内含子结点，且在内含子的 3’末端具有一个内含子 / 外显子结点。将内含子除去后，在成熟 mRNA 的有时被称作外显子 / 外显子结点或边界的地方，外显子是连续的。隐蔽剪接位点在通常情况下很少使用，但当通常的剪接位点被阻断或无法利用时可以使用。可变剪接被定义为将不同组合的外显子剪接在一起，通常可以从单个基因得到多种 mRNA 转录物。

[0004] 点突变可导致 mRNA 前体加工异常，高达 50％的人类遗传病是由这样的点突变导致的。此类点突变可以破坏目前使用的剪接位点，或者可以创造出新的剪接位点，导致产生的 mRNA 转录物包含不同组合的外显子或出现外显子缺失。点突变还能导致隐蔽剪接位点的激活或破坏调控顺式元件（即剪接增强子或沉默子）(Cartegni et al., Nat. Rev. Genet., 2002, 3, 285-298 ; Drawczak et al., Hum. Genet., 1992, 90, 41-54)。将反义寡核苷酸已被用于靶向作用于那些在某些遗传病中导致异常剪接的突变，以重新剪接并获得所需的剪接产物 (Kole, Acta Biochimica Polonica, 1997, 44, 231-238)。

[0005] 反义化合物还可用于改变天然存在的可变剪接变体的比率，如 Bcl-x mRNA 前体的长型或短型（美国专利 6,172,216 ; 美国专利 6,214,986 ; Taylor et al., Nat. Biotechnol. 1999, 17, 1097-1100)，或用于强行跳过包含提前终止的密码子的特定外显子 (Wilton et al., Neuromuscul. Disord., 1999, 9, 330-338)。美国专利 5,627,274 和 WO 94/26887 公开了组合物和方法，其使用不激活 RNAse H 的反义寡核苷酸，来对抗包含突变的 mRNA 前体分子的异常剪接。

[0006] 近端型脊髓性肌萎缩症 (SMA) 是一种遗传性的、神经退行性病变，其特征为脊髓运动神经元的丧失。SMA 是一种发病较早的常染色体隐性遗传病，是目前导致婴儿死亡的首要原因。SMA 在不同患者中的严重性不同，因此将其分成三类。I 型 SMA 是最严重的形式，患者在出生时或出生后 6 个月内发病，一般在 2 岁以内死亡。患有 I 型 SMA 的儿童无法坐

下或行走。II 型 SMA 是中间形式，患者能够坐下，但不能站立或行走。患者患有 III 型 SMA 的，即该疾病的慢性形式，一般在出生后 18 个月后发展成 SMA(Lefebvre et al.，Hum.Mol.Genet.，1998，7，1531-1536)。

[0007] 导致 SMA 的分子机制是运动神经元存活基因 1(SMN1) 的两个拷贝均缺失，SMN1 也称为 SMN 端粒，这种蛋白是一种多蛋白复合物的一部分，该多蛋白复合物被认为参与小核糖核酸蛋白 snRNP 生物合成和循环。在染色体 5q13 的复制区存在一个基本相同的基因 SMN2，也称为 SMN 着丝粒，其调节疾病的严重程度。正常 SMN1 基因的表达仅导致运动神经元存活基因 (SMN) 蛋白的表达。尽管 SMN1 和 SMN2 都能够编码相同的蛋白，但 SMN2 在其外显子 7 的 +6 位含有翻译沉默突变，会导致在 SMN2 转录物中外显子 7 的包含不足。这样，SMN2 主要形成为被截短的版本，缺乏外显子 7，其不稳定且无活性 (Cartegni and Krainer，Nat.Genet.，2002，30，377-384)。SMN2 基因表达产生约 10-20％的 SMN 蛋白和 80-90％不稳定 / 非功能性的 SMNΔ7 蛋白。SMN 蛋白在剪接体装配过程中的作用已被验证，且其还可以介导 mRNA 在神经元的轴突和神经末梢间的转运。

[0008] 反义技术可有效调节一种或多种特定基因产物，包括可变剪接产物的表达，且其在多种治疗、诊断和研究应用上具有独特的作用。反义技术的原理为，反义化合物可与靶核酸杂交，通过多种反义机制之一调节基因表达的活性，例如转录、剪接或翻译。反义化合物的序列特异性使其成为一种极具吸引力的工具，用于靶点验证和基因功能化，以及作为治疗手段用于选择性调节疾病相关基因的表达。

[0009] 本领域已知某些与 SMN2 互补的反义化合物，参见例如，WO 2007/002390；US61/168,885；Hua et al.，American J.of Human Genetics(April 2008)82，1-15；Singh et al.，RNA Bio.6：3，1-10(2009)。与本领域已知的此类化合物和方法相比，本文所公开的某些反义化合物和方法具有所需的特性。已有专利描述了被设计用于调节 SMN2 剪接的嵌合肽核酸分子 (WO 02/38738；Cartegni and Krainer，Nat.Struct.Biol.，2003，10，120-125)。

[0010] 发明概述

[0011] 在某些实施方式中，本发明提供了方法，其包括向对象给药包含反义寡核苷酸的反义化合物，该反义化合物互补于人 SMN2 mRNA 前体的编码核酸的内含子 7，其中反义化合物给药至脑脊液 (CSF) 中。在某些实施方式中，所述给药是至鞘内空隙。在某些实施方式中，所述给药是至脑内的脑脊液。在某些实施方式中，所述给药包含推注注射。在某些实施方式中，所述给药包含利用递送泵输注。

[0012] 在某些实施方式中，所述反义化合物的给药剂量为 0.01 至 10 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，剂量为 0.01 至 10 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，剂量为 0.01 至 5 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，剂量为 0.05 至 1 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，剂量为 0.01 至 0.5 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，剂量为 0.05 至 0.5 毫克反义化合物每千克对象体重。

[0013] 在某些实施方式中，每日给药所述剂量。在某些实施方式中，每周给药所述剂量。在某些实施方式中，连续给药反义化合物，且所述剂量是每日给药的剂量。在某些实施方式中，该方法包含在诱导期给药至少一个诱导剂量以及在维持期给药至少一个维持剂量。在

某些实施方式中，诱导剂量为 0.05 至 5.0 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，维持剂量为 0.01 至 1.0 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，诱导期的持续时间为至少 1 周。在某些实施方式中，维持期的持续时间为至少 1 周。在某些实施方式中，各个诱导剂量和各个维持剂量均包含单次注射。在某些实施方式中，各个诱导剂量和各个维持剂量均独立地包含两次或更多注射。在某些实施方式中，在至少 1 周的治疗期内，给药反义化合物至少两次。在某些实施方式中，治疗期为至少一个月。在某些实施方式中，治疗期为至少 2 个月。在某些实施方式中，治疗期为至少 4 个月。在某些实施方式中，通过一次或更多推注注射给药诱导剂量，以及通过输液泵给药维持剂量。

[0014] 在某些实施方式中，该方法包含评估反义化合物的耐受性和 / 或有效性。在某些实施方式中，当出现反义化合物给药不耐受的指征时，降低反义化合物的给药剂量或给药频率。在某些实施方式中，当出现反义化合物给药有效的指征后，维持或降低反义化合物的给药剂量或给药频率。在某些实施方式中，当出现反义化合物给药无效的指征后，增加反义化合物的给药剂量。在某些实施方式中，当出现反义化合物给药有效的指征后，降低反义化合物的给药频率。在某些实施方式中，当出现反义化合物给药无效的指征后，增加反义化合物的给药频率。

[0015] 在某些实施方式中，该方法包括将反义化合物与至少一种其他疗法联合给药。在某些实施方式中，反义化合物与至少一种其他疗法同时联合给药。在某些实施方式中，在至少一种其他疗法给药前，给药反义化合物。在某些实施方式中，在至少一种其他疗法给药之后，给药反义化合物。在某些实施方式中，所述至少一种其他疗法包括，给药丙戊酸、利鲁唑、羟基脲和丁酸盐中的一种或更多种。在某些实施方式中，所述至少一种其他疗法包括给药曲古霉素 -A。在某些实施方式中，至少一种其他疗法包括给药干细胞。在某些实施方式中，至少一种其他疗法为基因治疗。在某些实施方式中，基因治疗给药至 CSF 以及反义化合物给药至全身。在某些实施方式中，基因治疗给药至 CSF，以及反义化合物给药至全身和 CSF。在某些实施方式中，本发明提供了治疗方案，其中初始时给药反义化合物至 CSF 和全身，随后给药基因治疗至 CSF，并将反义化合物给药至全身。在某些此类实施方式中，在初始治疗时对象为婴儿。在某些此类实施方式中，对象为 2 岁以下。在某些实施方式中，在对象的年龄足以接受基因治疗以前，将反义化合物给药至对象的中枢神经系统。在某些此类实施方式中，反义化合物自始自终全身给药。

[0016] 在某些实施方式中，反义化合物的给药浓度为约 0.01mg/ml、约 0.05mg/ml、约 0.1mg/ml、约 0.5mg/ml、约 1mg/ml、约 5mg/ml、约 10mg/ml、约 50mg/ml 或约 100mg/ml。

[0017] 在某些实施方式中，在对象的运动神经元中，SMN2mRNA 对外显子 7 的包含增加。在某些实施方式中，在对象的运动神经元中，SMN2 多肽对外显子 7 氨基酸的包含增加。

[0018] 在某些实施方式中，本发明提供在对象的运动神经元中增加 SMN2mRNA 对外显子 7 的包含的方法，包括向对象给药含有反义寡核苷酸的反义化合物，所述反义寡核苷酸互补于人 SMN2 编码核酸的内含子 7，进而在对象的运动神经元中增加 SMN2mRNA 对外显子 7 的包含。

[0019] 在某些实施方式中，本发明提供在对象的运动神经元中增加 SMN2 多肽对外显子 7 氨基酸的包含的方法，包括向对象给药含有反义寡核苷酸的反义化合物，所述反义寡核苷酸互补于人 SMN2 编码核酸的内含子 7，进而在对象的运动神经元中增加 SMN2 多肽对外显子

7 氨基酸的包含。

[0020] 在某些实施方式中，对象患有 SMA。在某些实施方式中，对象患有 I 型 SMA。在某些实施方式中，对象患有 II 型 SMA。在某些实施方式中，对象患有 III 型 SMA。

[0021] 在某些实施方式中，在子宫内进行第一次给药。在某些实施方式中，在血脑屏障完全形成前进行所述第一次给药。在某些实施方式中，在对象出生 1 周内进行第一次给药。在某些实施方式中，在对象出生 1 个月内进行第一次给药。在某些实施方式中，在对象出生 3 个月内进行第一次给药。在某些实施方式中，在对象出生 6 个月内进行第一次给药。在某些实施方式中，在对象 1 至 2 岁时进行第一次给药。在某些实施方式中，在对象 1 至 15 岁时进行第一次给药。在某些实施方式中，在对象 15 岁以上时进行第一次给药。

[0022] 在某些实施方式中，对象为哺乳动物。在某些实施方式中，对象为人。

[0023] 在某些实施方式中，该方法包括识别患有 SMA 的对象。在某些实施方式中，通过测定对象一块或更多块肌肉的电活性来识别所述对象。在某些实施方式中，通过遗传检测以确定对象的 SMN1 基因中是否具有突变来识别所述对象。在某些实施方式中，通过肌肉组织活检来识别所述对象。

[0024] 在某些实施方式中，所述反义化合物的给药使得含有外显子 7 的 SMN2mRNA 的量增加至少 10％。在某些实施方式中，含有外显子 7 的 SMN2mRNA 的量增加至少 20％。在某些实施方式中，含有外显子 7 的 SMN2mRNA 的量增加至少 50％。在某些实施方式中，含有外显子 7 的 SMN2mRNA 的量增加至少 70％。

[0025] 在某些实施方式中，所述反义化合物的给药使得含有外显子 7 氨基酸的 SMN2 多肽的量增加至少 10％。在某些实施方式中，含有外显子 7 氨基酸的 SMN2 多肽的量增加至少 20％。在某些实施方式中，含有外显子 7 氨基酸的 SMN2 多肽的量增加至少 50％。在某些实施方式中，含有外显子 7 氨基酸的 SMN2 多肽的量增加至少 70％。

[0026] 在某些实施方式中，所述反义化合物的给药能在所述对象中减轻 SMA 的至少一种症状。在某些实施方式中，所述反义化合物的给药使得在所述对象中的运动功能改善。在某些实施方式中，所述反义化合物的给药使得在所述对象的运动功能丧失被推迟或减少。在某些实施方式中，所述反义化合物的给药使得呼吸功能改善。在某些实施方式中，所述反义化合物的给药使得生存率改善。

[0027] 在某些实施方式中，反义寡核苷酸的至少一个核苷包含修饰的糖配基。在某些实施方式中，至少一种修饰的糖配基包含 2’- 甲氧乙基糖配基。在某些实施方式中，反义寡核苷酸的各核苷基本上均包含修饰的糖配基。在某些实施方式中，包含修饰糖配基的核苷均包含相同的糖修饰。在某些实施方式中，其中各修饰的糖配基均包含 2’- 甲氧乙基糖配基。在某些实施方式中，反义寡核苷酸的各核苷均包含修饰的糖配基。在某些实施方式中，核苷均包含相同的糖配基。在某些实施方式中，各修饰的糖配基均包含 2’- 甲氧乙基糖配基。在某些实施方式中，至少一个核苷间连接为硫代磷酸酯核苷间连接。在某些实施方式中，各核苷间连接均为硫代磷酸酯核苷间连接。

[0028] 在某些实施方式中，反义寡核苷酸由 10 至 25 个连接的核苷组成。在某些实施方式中，反义寡核苷酸由 12 至 22 个连接的核苷组成。在某些实施方式中，反义寡核苷酸由 15 至 20 个连接的核苷组成。在某些实施方式中，反义寡核苷酸由 18 个连接的核苷组成。

[0029] 在某些实施方式中，反义寡核苷酸与人 SMN2 的编码核酸具有至少 90％的互补性。

在某些实施方式中，反义寡核苷酸与人 SMN2 的编码核酸完全互补。在某些实施方式中，寡核苷酸具有核碱基序列，所述核碱基序列包含 SEQ ID NO :1 的核碱基序列中至少 10 个连续核碱基。在某些实施方式中，寡核苷酸具有核碱基序列，所述核碱基序列包含 SEQ ID NO :1 的核碱基序列中至少 15 个连续核碱基。在某些实施方式中，寡核苷酸具有核碱基序列，所述核碱基序列包含 SEQ ID NO :1 的核碱基序列。在某些实施方式中，寡核苷酸具有核碱基序列，所述核碱基序列由 SEQ ID NO :1 的核碱基序列组成。

[0030] 在某些实施方式中，反义化合物包含缀合基团或末端基团。

[0031] 在某些实施方式中，反义化合物由反义寡核苷酸组成。

[0032] 在某些实施方式中，反义化合物也可以全身给药。在某些实施方式中，全身给药是通过静脉或腹腔注射。在某些实施方式中，全身给药和给药至中枢神经系统同时进行。在某些实施方式中，全身给药和给药至中枢神经系统在不同时间进行。

[0033] 在某些实施方式中，本发明提供了将反义化合物全身给药，可以单独进行，或者与递送至 CSF 联合进行。在某些实施方式中，将药物组合物全身给药。在某些实施方式中，将药物组合物皮下给药。在某些实施方式中，将药物组合物静脉给药。在某些实施方式中，将药物组合物肌内注射给药。

[0034] 在某些实施方式中，将药物组合物直接给药至 CSF（例如，IT 和 / 或 ICV 注射和 / 或输注）并且全身给药。

[0035] 在某些实施方式中，本发明提供了方法，包括向对象给药至少一剂量的反义化合物，所述对象具有与 SMA 相关的至少一种症状，所述反义化合物包含由 15 至 20 个连接的核苷组成的寡核苷酸，并且具有核碱基序列，所述核碱基序列的全长与 SEQ ID NO. 7 的核碱基序列具有 100％互补性，且其中各核苷均为 2’-MOE 修饰的核苷；且其中至少一剂量在 0.1mg/kg 至 5mg/kg 之间且给药至 CSF。在某些此类实施方式中，所述剂量在 0.5mg/kg 至 2mg/kg 之间。在某些实施方式中，至少一剂量通过推注注射给药。在某些此类实施方式中，所述剂量通过鞘内推注注射给药。在某些实施方式中，至少再给药一次。在某些此类实施方式中，在第一次给药至少 2 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，在第一次给药至少 4 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，在第一次给药至少 8 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，在第一次给药至少 12 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，在第一次给药至少 16 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，在第一次给药至少 20 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，在第一次给药时，对象在 2 岁以下。在某些实施方式中，对象在 2 至 15 岁之间。在某些实施方式中，对象在 15 至 30 岁之间。在某些实施方式中，对象为 30 岁以上。在某些实施方式中，与 SMA 相关的至少一种症状减轻，其进展减慢。在某些实施方式中，寡核苷酸为 ISIS396443。

[0036] 在某些实施方式中，本发明提供了方法，包括向对象给药至少一剂量的反义化合物，所述对象具有与 SMA 相关的至少一种症状，所述反义化合物包含由 15 至 20 个连接的核苷组成的寡核苷酸，并且具有核碱基序列，所述核碱基序列的全长与 SEQ ID NO. 7 的核碱基序列具有 100％互补性，且其中各核苷均为 2’-MOE 修饰的核苷；且其中至少一剂量为全身给药。在某些此类实施方式中，所述至少一剂量通过推注注射给药。在某些此类实施方式中，所述剂量通过皮下推注注射给药。在某些实施方式中，给药剂量为 0.5mg/kg 至 50mg/kg 之间。在某些实施方式中，给药剂量为 1mg/kg 至 10mg/kg 之间。在某些实施方式中，给药

剂量为 1mg/kg 至 5mg/kg 之间。在某些实施方式中，给药剂量为 0.5mg/kg 至 1mg/kg 之间。在某些实施方式中，至少再给药一次。在某些此类实施方式中，在第一次给药至少 2 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，在第一次给药至少 4 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，在第一次给药至少 8 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，在第一次给药至少 12 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，在第一次给药至少 16 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，在第一次给药至少 20 周后，进行第二次给药。在某些实施方式中，第一次给药时对象在 2 岁以下。在某些实施方式中，对象在 2 至 15 岁之间。在某些实施方式中，对象在 15 至 30 岁之间。在某些实施方式中，对象为 30 岁以上。在某些实施方式中，与 SMA 相关的至少一种症状减轻，其进展减慢。在某些实施方式中，寡核苷酸为 ISIS396443。

[0037] 在某些实施方式中，本发明提供了方法，包括将至少一剂量的反义化合物向对象给药至 CSF 以及至少一剂量全身给药，所述对象具有与 SMA 相关的至少一种症状，所述反义化合物包含由 15 至 20 个连接的核苷组成的寡核苷酸，并且具有核碱基序列，所述核碱基序列的全长与 SEQ ID NO.7 的核碱基序列具有 100％互补性，且其中各核苷均为 2’-MOE 修饰的核苷。在某些此类实施方式中，CSF 给药的剂量为 0.1mg/kg 至 5mg/kg 之间。在某些实施方式中，全身给药的剂量为 0.5mg/kg 至 50mg/kg 之间。在某些实施方式中，至少一次 CSF 给药通过推注注射给药。在某些此类实施方式中，至少一次 CSF 给药通过鞘内推注注射给药。在某些实施方式中，至少一次全身给药通过推注注射给药。在某些此类实施方式中，至少一次全身给药通过皮下注射给药。在某些实施方式中，CSF 给药和全身给药同时进行。在某些实施方式中，CSF 给药和全身给药在不同的时间进行。在某些实施方式中，第一次给药时对象在 2 岁以下。在某些实施方式中，对象在 2 至 15 岁之间。在某些实施方式中，对象在 15 至 30 岁之间。在某些实施方式中，对象为 30 岁以上。在某些实施方式中，与 SMA 相关的至少一种症状减轻，其进展减慢。在某些实施方式中，寡核苷酸为 ISIS396443。

[0038] 在某些实施方式中，本发明提供了方法，包括向对象给药至少一全身给药剂量的反义化合物，所述对象具有与 SMA 相关的至少一种症状，所述反义化合物包含由 15 至 20 个连接的核苷组成的寡核苷酸，并且具有核碱基序列，所述核碱基序列的全长与 SEQ ID NO.7 的核碱基序列具有 100％互补性，且其中各核苷均为 2’-MOE 修饰的核苷；以及至少一剂量的基因治疗剂。在某些实施方式中，全身给药剂量为 0.5mg/kg 至 50mg/kg 之间。在某些实施方式中，至少一次全身给药通过推注注射给药。在某些此类实施方式中，至少一次全身给药通过皮下注射给药。在某些实施方式中，全身给药和基因治疗剂给药在同时进行。在某些实施方式中，全身给药和基因治疗剂给药在不同的时间进行。在某些实施方式中，基因治疗剂给药至 CSF。在某些此类实施方式中，基因治疗剂通过鞘内注射和 / 或输注给药。在某些此类实施方式中，基因治疗剂通过脑室内注射和 / 或输注给药。在某些实施方式中，第一次给药时对象在 2 岁以下。在某些实施方式中，对象在 2 至 15 岁之间。在某些实施方式中，对象在 15 至 30 岁之间。在某些实施方式中，对象为 30 岁以上。在某些实施方式中，与 SMA 相关的至少一种症状减轻，其进展减慢。在某些实施方式中，寡核苷酸为 ISIS396443。

[0039] 在某些实施方式中，本发明提供方法，包括选择具有至少一种与 SMA 相关的症状的对象，并按照上文所述的任意方法给药反义化合物。在某些此类实施方式中，在给药后评估 SMA 的至少一种症状。在某些此类实施方式中，SMA 的至少一种症状被改善。在某些此

类实施方式中，与未给药反义化合物的对象相比，SMA 的至少一种症状未出现进展或进展更为缓慢。

[0040] 在某些此类实施方式中，本发明提供包含反义寡核苷酸的反义化合物，所述反义寡核苷酸互补于人 SMN2 编码核酸的内含子 7，所述反义化合物用于上文所述的任意方法。在某些实施方式中，本发明提供一种此类化合物，用于治疗与存活运动神经元 1(SMN1) 相关的疾病或病症。

[0041] 在某些实施方式中，本发明提供包含反义寡核苷酸的反义化合物用于在药物生产中的用途，所述反义寡核苷酸互补于人 SMN2 编码核酸的内含子 7，所述药物用于上文所述的任意方法。在某些实施方式中，该药物用于治疗与存活运动神经元 1(SMN1) 相关的疾病或病症。

[0042] 附图的简要说明

[0043] 图 1 显示了实施例 4 所述研究中作用持续时间的结果，其中评估了在 7 天治疗结束后 0、2、4、6 和 8 周时 (x- 轴)SMN2 中外显子 7 的百分率 (y- 轴)。第“0”周样品收集自治疗结束后 1 天。CON 表示生理盐水治疗组小鼠。在 0 至 6 个月的不同时间点接受生理盐水治疗的对照小鼠之间的百分率不存在差异。

[0044] 图 2 显示了实施例 4 所述研究中作用持续时间的结果，其中评估了在 7 天治疗结束后 0、0.5、1、2、5 和 6 个月时 SMN2 中外显子 7 的百分率。第“0”周样品收集自治疗结束后 1 天。CON 表示生理盐水治疗组小鼠。在 0 至 6 个月的不同时间点接受生理盐水治疗的对照小鼠之间的百分率不存在差异。

[0045] 图 3 显示了实施例 6 所述实验的结果，检测 ISIS396443 胚胎给药对台湾品系 SMA 小鼠尾长的影响。图 3A 为首次实验和图 3B 为重复实验，对不同浓度的反义化合物进行检测，其中还包括正常小鼠的数据作为对照。

[0046] 图 4 显示了实施例 7 所述 Western 印迹的结果。Y 轴为包含外显子 7 的不同样品的 SMN 百分率。

[0047] 图 5 和 6 显示了实施例 7 所述实验的结果。向 SMA 小鼠 (台湾品系) 给药反义化合物或对照寡核苷酸后对其进行的若干项评估。

[0048] 图 7 显示了实施例 7 所述实验的生存曲线。

[0049] 图 8 显示了如实施例 7 所述，用反义化合物或对照寡核苷酸处理后，对脊髓不同部分运动神经元数量进行评估的结果。

[0050] 图 9 显示了如实施例 7 所述，经反义处理的动物中，对全长 SMN RNA(包括外显子 7) 进行评估的结果。

[0051] 图 10 显示了实施例 7 所述实验的生存曲线，其中动物为 (1) 未治疗 ;(2) 在出生时 (第 P0 天) 给药单剂量反义化合物 ;或 (3) 在 P0 时第一次给药和在第 21 天 (P21) 时第二次给药。

[0052] 图 11 显示了实施例 7 所述实验的生存曲线，对接受第二次给药的动物与仅接受第一次给药的动物进行比较。

[0053] 图 12 显示了实施例 9 所述实验的结果，对猴鞘内输注给药反义化合物，并评估 96 小时后不同组织中化合物的浓度。

[0054] 图 13 显示了实施例 12 所述实验的生存曲线，向患有严重 SMA 的小鼠皮下注射给

药不同剂量的反义化合物。

[0055] 发明详述

[0056] 应当理解，前述一般性说明和下文的详细说明仅为示例和解释性的，并非限制本发明所要求的权利。除非另外特别指明，本发明中单数的使用包括复数。如本发明中使用的，除非另有指明，使用的“或”是指“和 / 或”。另外，术语“包括”以及诸如“包含”和“含有”的使用为非限制性的。另外，除非另外特别指明，诸如“元件”或“组分”等术语涵盖包括一个单元的元件和组分以及包括超过一个亚单元的元件和组分。

[0057] 本发明使用的章节标题仅为了组织性目的，不应解释为限制所描述的主题。本申请中引用的所有文件或部分文件，包括但不限于专利、专利申请、论文、书籍以及专题论文等，在此明确地通过参考全文并入，用于任何目的。

[0058] I. 定义

[0059] 除非提供特殊定义，本发明所使用的术语与分析化学、合成有机化学以及医用化学和药物化学相关的术语及程序和技术均为本领域熟知和通用。标准的技术可用于化学合成和化学分析。某些此类的技术和程序可以在下列文献中找到，例如“Carbohydrate Modifications in Antisense Research”Edited by Sangvi and Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994；“Remington ′ s Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18th edition, 1990；和“Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications”Edited by Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Florida；以及 Sambrook et al.,“Molecular Cloning, A laboratory Manual,”2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989，其出于任何目的通过引用全文并入。在允许的情况下，本文通篇公开内容中所引用的所有专利、申请、公开的申请和其他出版物以及其他数据均通过引用全文并入本文。

[0060] 除非另有说明，下列术语具有以下含义：

[0061] “核苷”指包含杂环碱基配基和糖配基的化合物。核苷包括，但不限于，天然存在的核苷、修饰核苷，以及具有模拟碱基和 / 或糖基的核苷。核苷可以被任意种类的取代基所修饰。

[0062] “糖配基”指天然或修饰的糖或糖替代物。

[0063] “天然的糖”指 DNA(2’-H) 或 RNA(2’-OH) 的呋喃核糖配基。

[0064] “修饰的糖”指呋喃核糖配基，其包含天然糖取代基以外的至少一个取代基。

[0065] “糖替代物”指除呋喃核糖以外、能够替代核苷中的糖的结构。糖替代物的例子包括，但不限于，开环系统、6 元环、氧被取代的糖，例如氧被硫或氮取代。例如，糖替代物包括，但不限于吗啉基取代和含 4’- 硫的糖。

[0066] “核碱基”指核苷的杂环碱基部分。核碱基可以是天然存在的也可以是被修饰的。在某些实施方式中，核碱基可以包含能够与另一个核酸的核碱基形成氢键的任意原子或基团。

[0067] “核苷酸”指包含磷酸酯连接基团的核苷。在本申请中，核苷包括核苷酸。

[0068] “修饰的核苷”指一种核苷，与天然存在的 RNA 或 DNA 核苷相比，其含有至少一种修饰。此类修饰可以位于糖配基中和 / 或位于核碱基中。

[0069] “双环核苷”或“BNA”指一种核苷，其中所述核苷的糖配基包含一种桥，连接糖环中

的两个碳原子，以形成双环糖配基。

[0070] “4’-2’双环核苷”指包含呋喃环的双环核苷，所述呋喃环含有一种桥，连接呋喃环上的两个碳原子，将糖环的 2’位碳原子和 4’位碳原子连接。

[0071] “2’- 修饰”或“2’- 取代”指包含糖的核苷，所述糖在 2’位含有除 H 或 OH 以外的取代基。

[0072] “2’-OMe”或“2’-OCH_3”或“2’-O- 甲基”均指包含糖的核苷，所述糖在糖环的 2’位具有 -OCH_3 基团。

[0073] “MOE”或“2’-MOE”或“2’-$OCH_2CH_2OCH_3$”或“2’-O- 甲氧乙基”均指包含糖的核苷，所述糖在糖环的 2’位具有 -$OCH_2CH_2OCH_3$ 基团。

[0074] “寡核苷酸”指包含多个连接的核苷的化合物。在某些实施方式中，多个核苷中的一个或更多个被修饰。在某些实施方式中，寡核苷酸包含一个或更多个核糖核苷酸 (RNA) 和 / 或脱氧核糖核苷酸 (DNA)。

[0075] “寡核苷”指核苷间连接均不含磷原子的寡核苷酸。在本申请中，寡核苷酸包括寡核苷。

[0076] “修饰的寡核苷酸”指一种寡核苷酸，其包含至少一个修饰的核苷和 / 或至少一个修饰的核苷间连接。

[0077] “核苷间连接”指寡核苷酸的相邻核苷之间的共价连接。

[0078] “天然存在的核苷间连接”指 3′ 至 5′ 的磷酸二酯键。

[0079] “修饰的核苷间连接”指除天然存在的核苷间连接以外的任意核苷间连接。

[0080] “寡聚化合物”指包含寡核苷酸的化合物。在某些实施方式中，寡聚化合物由寡核苷酸组成。在某些实施方式中，寡聚化合物进一步包含一个或多个缀合和 / 或末端基团。

[0081] “反义化合物”指一种寡聚化合物，其至少有一部分是至少部分互补于其所杂交的靶核酸，其中此类杂交产生至少一种反义活性。

[0082] “反义寡核苷酸”指一种反义化合物，其中所述寡聚化合物由寡核苷酸组成。

[0083] “反义活性”指因反义化合物与其靶核酸杂交所获得的任何可检测和 / 或可测定的效应。在某些实施方式中，这样的反义活性是核酸或蛋白的量增加或减少。在某些实施方式中，这样的反义活性是核酸或蛋白的剪接变体比率的改变。在某些实施方式中，这样的反义活性是细胞和 / 或对象的表型改变。

[0084] 反义活性的“检测”或“测定”可以是直接的或间接的。例如，在某些实施方式中，通过检测和 / 或测定靶核酸或蛋白的量，或靶核酸或蛋白的剪接变体的相对量对反义活性进行评估。在某些实施方式中，通过观察细胞或动物的表型改变情况对反义活性进行检测。术语“检测”和“测定”与任何活性、应答或效应相关时，是指为检测或测定进行了实验。此类检测和 / 或测定可以包括零值。因此，即使为检测或测定而进行的试验得到的结果为无活性（零活性），然而检测或测定活性的步骤已经进行。

[0085] “靶核酸”指任意核酸分子，其表达、量或活性能够被反义化合物所调节。

[0086] “靶 mRNA”指预先选定的编码某蛋白的 RNA 分子。

[0087] “靶 mRNA 前体”指预先选定的未被完全加工成 mRNA 的 RNA 转录物。值得注意的是，mRNA 前体包括一个或多个内含子。

[0088] “靶蛋白”指由靶核酸编码的蛋白。

[0089] “调节”指对功能或活性的干扰。在某些实施方式中，调节指增加基因表达。在某些实施方式中，调节指降低基因表达。

[0090] “表达”指任意功能和步骤，通过这样的功能和步骤将基因编码的信息转化成细胞内存在或操控的结构。

[0091] “核碱基序列”指连续核碱基从 5’至 3’方向的顺序，其与任意糖、连接和 / 或核碱基修饰无关。

[0092] “连续核碱基”指在核酸中彼此直接相邻的核碱基。

[0093] “核碱基的互补性”指两个核碱基通过氢键形成非共价配对的能力。

[0094] “互补的”是指第一核酸在严格的杂交条件下能够与第二核酸杂交。例如，如果在严格的杂交条件下，反义化合物能够与靶核酸杂交，则反义化合物与其靶核酸是互补的。

[0095] “完全互补的”是指第一核酸的各个核碱基均能够与第二核酸中各个相应连续位点的核碱基配对。

[0096] 反义化合物的“互补性百分率”是指，反义化合物中与靶核酸的等长部分互补的核碱基的百分率。互补性百分率的计算方法为，将反义寡核苷酸中与靶核酸相应连续位点的核碱基互补的核碱基的数目除以反义化合物的总长。

[0097] “同一性百分率”是指第一核酸中与第二核酸相应位点具有相同核碱基的核碱基数目除以第一核酸中的核碱基总数。

[0098] “杂交”指通过核碱基互补性进行的互补核酸的退火。

[0099] “错配”指第一核酸的核碱基无法与第二核酸相应位点的核碱基进行配对。

[0100] “同一的核碱基序列”指具有相同的核碱基序列，其与核苷的任何化学修饰无关。

[0101] “不同修饰”或“不同的修饰”指核苷或核苷间连接之间具有不同的核苷修饰或核苷间连接，包括无修饰。因此，例如，MOE 核苷和未修饰的 DNA 核苷之间为“不同的修饰”，虽然 DNA 核苷是未修饰的。同样的，DNA 与 RNA 之间为“不同的修饰”，即使它们均为天然存在的未修饰核苷。除包含不同的核碱基以外其他都相同的核苷不属于不同的修饰，除非另有说明。例如，包含 2’-OMe 修饰糖和腺嘌呤核碱基的核苷与包含 2’-OMe 修饰糖和胸腺嘧啶碱基的核苷之间不属于不同的修饰。

[0102] “相同修饰”指相互之间相同的核苷和核苷间连接（包括未修饰的核苷和核苷间连接）。因此，例如，两个未修饰的 DNA 核苷具有“相同修饰”，即使 DNA 核苷是未修饰的。

[0103] “修饰类型”或核苷的“类型”是指核苷的修饰，包括修饰的和未修饰的核苷。相应地，除另有说明外，“具有第一修饰类型的核苷”可以是未修饰核苷。

[0104] 寡核苷酸的“分离区域”是指寡核苷酸的一部分，其中该区域内的核苷和核苷间连接均包含相同的修饰；并且与其相邻的任意部分的核苷和 / 或核苷间连接包含至少一种不同的修饰。

[0105] “基序”指寡核苷酸中修饰和 / 或未修饰核碱基、糖和 / 或核苷间连接的样式。

[0106] “完全修饰的寡核苷酸”指各核碱基、各糖、和 / 或各核苷间连接均被修饰。

[0107] “均一修饰的寡核苷酸”指在修饰的寡核苷酸中各核碱基、各糖、和 / 或各核苷间连接均具有相同修饰。

[0108] “交替的基序”指寡核苷酸或其一部分，具有至少四个修饰核苷的分离区域，其样式为 $(AB)_nA_m$，其中 A 表示具有第一种修饰类型的核苷区域；B 表示具有不同修饰类型的核苷

区域；n 为 2-15；且 m 为 0 或 1。因此，在某些实施方式中，交替的基序包括 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 或更多的交替区域。在某些实施方式中，各 A 区域和各 B 区域均独立地包含 1-4 个核苷。

[0109] “对象”指入选进行处理或治疗的人或非人动物。

[0110] “需求对象”指经鉴定需要治疗或处理的对象。在某些此类实施方式中，对象具有一种或多种指征，表明患有 SMA 或正处于 SMA 发展过程中。

[0111] “给药”指向对象提供药物或组合物，包括，但不限于，由专业医师给药和自我给药。

[0112] “肠道外给药”指通过注射或输注给药。肠道外给药包括，但不限于，皮下给药、静脉给药或肌内给药。

[0113] “全身给药”指对除目标活性部位以外的区域给药。全身给药的例子为皮下给药和静脉给药，以及腹腔给药。

[0114] “皮下给药”指在皮肤之下给药。

[0115] “静脉给药”指给药至静脉。

[0116] “脑脊液”或“CSF”指充满脑和脊髓内空间的液体。

[0117] “给药至脑脊液”指将物质直接递送至 CSF 的任意给药方法。

[0118] “脑室内”或“ICV”指给药至大脑的脑室系统 (ventricular)。

[0119] “鞘内”或“IT”指给药至蛛网膜下腔的 CSF，蛛网膜覆盖于脑和脊髓之上。通过脊髓的鞘进入蛛网膜下腔进行 IT 注射，将药物试剂注射入脊髓周围的鞘。

[0120] “诱导期”指一段给药期，在此期间开始给药，并且活性药物在靶组织中达到稳态浓度。例如，诱导期是指反义寡核苷酸在肝脏中达到稳态浓度前的给药期。

[0121] “维持期”指药物在靶组织中达到稳态浓度以后的给药期。

[0122] “持续时间”指活性或事件持续的时间。例如，诱导期的持续时间是指采用诱导剂量给药的时间。

[0123] “维持剂量”是指在维持期内进行单次给药的剂量。在本申请中，“诱导剂量”指在诱导期内进行单次给药的剂量。

[0124] “联合给药”指向对象给药两种或更多种药物。两种或更多种药物可以在一个药物组合物中，或可以在不同的药物组合物中。所述两种或多种药物的每一种可以通过相同或不同的途径给药。联合给药包括平行或顺序给药。

[0125] “处理”指疾病的治疗方法。在某些实施方式中，处理包括，但不限于手术处理、化学处理、和物理干预，如辅助呼吸、插导管、以及出于增强体质目的的物理处理。

[0126] “治疗”指使用一种或多种特定的程序，用于治愈或改善疾病。在某些实施方式中，特定的程序为给药一种或多种药物。

[0127] “改善”指减轻疾病或状态的至少一种指征的严重性。在某些实施方式中，改善包括延迟或减缓疾病或状态的一种或更多种指征的进程。指征的严重性可以通过本领域技术人员公认的主观或客观检测方法确定。

[0128] “阻止发病”指阻止处于疾病或状态的发生风险中的对象发展出疾病或状态。在某些实施方式中，处于疾病或状态风险中的对象接受的治疗与已经患有疾病或状态的对象接受的治疗类似。

[0129] “延迟发病”指延迟处于疾病或状态的发生风险中的对象发展出疾病或状态。

[0130] “减慢进展”指与疾病或状态相关的至少一种症状的严重性的恶化速度减慢。

[0131] “外显子 7 氨基酸”指与 SMN RNA 的外显子 7 对应的 SMN 蛋白部分。在剪接过程中外显子 7 未被排除时，SMN RNA 表达的 SMN 蛋白中存在有外显子 7 氨基酸。

[0132] “SMN 蛋白”指正常全长的运动神经元存活蛋白。SMN 可以由 SMN1 基因或 SMN2 基因表达，前提是成熟 mRNA 中存在外显子 7，且 SMN 蛋白中存在外显子 7 氨基酸。

[0133] “剂量”指在单次给药中或在一段特定时间内提供的药物的特定量。在某些实施方式中，可以通过两次或更多推注注射、片剂或注射给药剂量。例如，在某些实施方式中，在希望皮下或鞘内或 ICV 给药时，希望的剂量所需要的体积难以通过单次注射来调节。在此类实施方式中，可以使用两次或更多注射以达到希望的剂量。在连续输注装置中，可以将剂量表示为在单位时间内递送的药物的量。

[0134] “剂量单位”指提供药物的形式。在某些实施方式中，剂量单位为含有冻干寡核苷酸的小管。在某些实施方式中，剂量单位指含有复溶寡核苷酸的小管。

[0135] “治疗有效量”指向动物提供治疗效果的药物的量。

[0136] “药物组合物”指适合给药于个体的包含药物的物质混合物。例如，药物组合物可以包含修饰寡核苷酸和无菌水溶液。

[0137] “可接受的安全性”指副作用的样式在临床可以接受的限度内。

[0138] “副作用”指治疗导致的除所需效应以外的生理应答。

[0139] 1. 某些修饰的寡核苷酸

[0140] 在某些实施方式中，本发明提供了包括包含反义寡核苷酸的方法和组合物，与由天然存在的寡聚体形成的寡核苷酸相比，如 DNA 或 RNA，所述反义寡核苷酸具有一种或多种修饰。此类修饰的反义寡核苷酸可以具有一种或多种优选的性质。某些此类修饰改变反义寡核苷酸的反义活性，例如增加反义寡核苷酸与其靶核酸的亲和性、增强其对一种或多种核酸酶的抗性、和 / 或改变寡核苷酸的药代动力学或组织分布性质。在某些实施方式中，此类修饰的反义寡核苷酸包含一种或多种修饰的核苷和 / 或一种或多种修饰的核苷连接和 / 或一种或多种缀合基团。

[0141] a. 某些修饰的核苷

[0142] 在某些实施方式中，反义寡核苷酸包含一种或多种修饰的核苷。此类修饰的核苷可以包括修饰的糖和 / 或修饰的核碱基。在某些实施方式中，在寡核苷酸中掺入此类修饰核苷可以使得修饰的寡核苷酸对靶核酸具有更高的亲和性和 / 或更强的稳定性，包括但不限于，对核酸酶降解具有更高的抗性、和 / 或具有改进的毒性和 / 或摄取特性。

[0143] i. 某些核碱基

[0144] 核苷中天然存在的碱基部分为杂环碱基，一般为嘌呤和嘧啶。除“未修饰”的或“天然”的核碱基如嘌呤核碱基腺嘌呤 (A) 和鸟嘌呤 (G)，以及嘧啶核碱基胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C) 和尿嘧啶 (U) 以外，在本发明所述的化合物中还可以掺入本领域技术人员公知的多种修饰的核碱基或核碱基模拟物。在某些实施方式中，修饰的核碱基为结构与母体核碱基非常类似的核碱基，例如 7- 脱氮杂嘌呤、5- 甲基胞嘧啶、或 G- 夹钳。在某些实施方式中，核碱基模拟物包括更加复杂的结构，例如三环吩噁嗪核碱基模拟物。上文所述的修饰核碱基的制备方法为本领域技术人员所熟知。

[0145] ii. 某些修饰的糖和糖替代物

[0146] 本发明的反义寡核苷酸可以任选地含有一种或更多种核苷，其与天然糖相比，其中的糖配基被修饰。包含此类糖修饰核苷的寡核苷酸可以具有增强的核酸酶稳定性、具有增强的结合亲和性或某些其他有益的生物学性质。此类修饰包括但不限于，添加其他取代基团、将非成对环原子桥接以形成双环核酸 (BNA)、将核糖环中的氧原子用 S、N(R) 或 $C(R_1)(R)_2$(R = H、C_1-C_{12} 烷基或保护基团）以及这些组合取代，例如 2′ -F-5′ - 甲基取代核苷（其他公开的 5′，2′ - 双取代核苷参见公开于 8/21/08 的 PCT 国际申请 WO 2008/101157)，或者将核糖环中的氧原子用 S 取代并进一步在 2′ - 位进行取代（参见公开的美国专利申请 US2005-0130923，公开日 2005 年 6 月 16 日)，或者在 BNA 的 5′ - 取代（参见 PCT 国际申请 WO2007/134181，公开日 11/22/07，其中 LNA 被例如 5′ - 甲基或 5′ - 乙烯基基团取代)。

[0147] 具有修饰糖配基的核苷的例子包括但不限于包含 5′ - 乙烯基、5′ - 甲基 (R 或 S)、4′ -S、2′ -F、2′ -OCH_3 和 2′ -$O(CH_2)_2OCH_3$ 取代基团的核苷。2’位的取代基还可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、O- 烯丙基、O-C_1-C_{10} 烷基、OCF_3、$O(CH_2)_2SCH_3$、$O(CH_2)_2$-O-N(R_m)(R_n)、和 O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)，其中各 R_m 和 R_n 独立地为 H 或取代或非取代的 C_1-C_{10} 烷基。

[0148] 双环核酸 (BNA) 的例子包括但不限于在 4′ 和 2′ 核糖环原子之间具有桥接的核苷。在某些实施方式中，本发明所述的反义化合物包括一种或多种 BNA 核苷，其中桥接包括下式之一：4′ -β-D-(CH_2)-O-2′ (β-D-LNA)；4′ -(CH_2)-S-2′；4’-α-L-(CH_2)-O-2’(α-L-LNA)；4’-$(CH_2)_2$-O-2’(ENA)；4’-$C(CH_3)_2$-O-2’(参见 PCT/US2008/068922)；4’-$CH(CH_3)$-O-2’ 和 4’-C-H(CH_2OCH_3)-O-2’(参见美国专利 7,399,845，2008 年 7 月 15 日授权)；4’-CH_2-N(OCH_3)-2’(参见 PCT/US2008/064591)；4’-CH_2-O-N(CH_3)-2’(参见公开的美国专利申请 US2004-0171570，2004 年 9 月 2 日公开)；4’-CH_2-N(R)-O-2’(参见美国专利 7,427,672，2008 年 9 月 23 日授权)；4’-CH_2-C(CH_3)-2’ 和 4’-CH_2-C(=CH_2)-2’(参见 PCT/US2008/066154)；以及其中 R 独立地为 H、C_1-C_{12} 烷基、或保护基团。

[0149] 在某些实施方式中，本发明提供了包含修饰糖配基的修饰核苷，其中所述修饰糖配基不是双环糖配基。某些此类修饰的核苷是已知的。在某些实施方式中，核苷的糖环可以在任意位置被修饰。可以在本发明中使用的糖修饰的例子包括，但不限于，含有选自下述糖取代基团的化合物：OH、F、O- 烷基、S- 烷基、N- 烷基或 O- 烷基 -O- 烷基，其中的烷基、烯基和炔基可以是取代或非取代的 C_1 至 C_{10} 烷基或 C_2 至 C_{10} 烯基和炔基。在某些此类实施方式中，此类取代基在糖的 2’ 位。

[0150] 在某些实施方式中，修饰核苷在糖的 2’ 位具有取代基。在某些实施方式中，这样的取代基选自：卤素（包括，但不限于 F)、烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、O- 烯丙基、O-C_1-C_{10} 烷基、-OCF_3、O-$(CH_2)_2$-O-CH_3、2′ -$O(CH_2)_2SCH_3$、O-$(CH_2)_2$-O-N(R_m)(R_n)、或 O-CH2-C(=O)-N(R_m)(R_n)，其中各 R_m 和 R_n 独立地为 H 或取代或非取代的 C_1-C_{10} 烷基。

[0151] 在某些实施方式中，适用于本发明的修饰核苷为：2- 甲氧乙氧基、2’-O- 甲基 (2’-O-CH_3)、2’ - 氟代 (2’-F)。

[0152] 在某些实施方式中，修饰核苷在 2′ - 位具有的取代基选自：O[$(CH_2)_nO$]$_m$$CH_3$、

$O(CH_2)_nNH_2$、$O(CH_2)_nCH_3$、$O(CH_2)_nONH_2$、$OCH_2C(=O)N(H)CH_3$、和$O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$，其中n和m为1至约10。其他2′-糖取代基团包括：C_1至C_{10}烷基、取代烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、杂环烷基、杂环烷芳基、氨烷基氨基、聚烷氨基、取代甲硅烷基、RNA剪切基团、报告基团、插入剂、用于改善药代动力学性质的基团或用于改善寡聚化合物药效学性质的基团、以及具有类似性质的其他取代基。

[0153] 在某些实施方式中，修饰核苷包含2'-MOE侧链(Baker et al.，J.Biol.Chem.，1997,272,11944-12000)。已有报道，此类2′-MOE取代比未修饰的核苷和其他修饰核苷，如2'-O-甲基、O-丙基、和O-氨基丙基具有更好的结合亲和性。具有2′-MOE取代的寡核苷酸还可以作为基因表达的反义抑制剂，其特性有望在体内使用(Martin，P.，Helv.Chim.Acta,1995,78,486-504；Altmann et al.，Chimia,1996,50,168-176；Altmann et al.，Biochem.Soc.Trans.,1996,24,630-637；以及Altmann et al.，Nucleosides Nucleotides,1997,16,917-926)。

[0154] 在某些实施方式中，2′-糖取代基团可以位于阿拉伯糖(上)位或核糖(下)位。在某些此类实施方式中，2′-阿拉伯糖修饰为2′-F阿拉伯糖(FANA)。类似的修饰还可以位于糖的其他位置，特别是在3′末端核苷或2′-5′连接的寡核苷酸的糖的3′位，以及在5′末端核苷酸的5′位。

[0155] 在某些实施方式中，适用于本发明的核苷具有糖替代物如环丁基，以替代呋喃核糖基糖。教导制备此类修饰糖结构的美国专利的例子包括，但不限于，美国专利4,981,957；5,118,800；5,319,080；5,359,044；5,393,878；5,446,137；5,466,786；5,514,785；5,519,134；5,567,811；5,576,427；5,591,722；5,597,909；5,610,300；5,627,053；5,639,873；5,646,265；5,658,873；5,670,633；5,792,747；和5,700,920，每一篇都通过引用全文参考并入。

[0156] 在某些实施方式中，本发明提供在糖的2'-位具有修饰的核苷。在某些实施方式中，本发明提供在糖的5'-位具有修饰的核苷。在某些实施方式中，本发明提供了在糖的2'-位和5'-位都具有修饰的核苷。在某些实施方式中，修饰的核苷可以用于掺入寡核苷酸。在某些实施方式中，修饰的核苷掺入到位于寡核苷酸5'-末端的寡核苷。

[0157] b. 某些核苷间连接

[0158] 本发明的反义寡核苷酸可以任选地含有一种或更多种修饰的核苷间连接。根据存在或不存在磷原子，将连接基团定义为两个主要的分类。具有代表性的含磷连接包括，但不限于，磷酸二酯(P=O)、磷酸三酯、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯、和硫代磷酸酯(P=S)。具有代表性的不含磷的连接基团包括，但不限于，亚甲基甲基亚胺基(-CH2-N(CH3)-O-CH2-)、硫代二酯(-O-C(O)-S-)、硫羰氨基甲酸酯(-O-C(O)(NH)-S-)；硅氧烷(-O-Si(H)2-O-)；以及N,N′-二甲肼(-CH2-N(CH3)-N(CH3)-)。将具有非磷连接基团的寡核苷酸称为寡核苷。与天然磷酸二酯键相比，修饰的连接可以改变，通常为增加，寡核苷酸对核酸酶的抗性。在某些实施方式中，具有手性原子的连接可以被制备为外消旋混合物，或制备为单独的对映异构体。具有代表性的手性连接包括，但不限于，烷基膦酸酯和硫代磷酸酯。含磷和非含磷连接的制备方法为本领域技术人员所熟知。

[0159] 本文所述的反义寡核苷酸含有一个或更多个不对称的中心，因此产生了对映异构

体、非对映异构体和依据绝对立体化学可以被定义为 (R) 或 (S) 的其他立体异构构型，如糖端基异构体，或可以被定义为 (D) 或 (L) 的其他立体异构构型，如氨基酸等。本文的反义化合物中可包括所有此类可能的异构体，及其外消旋体以及光学纯形式。

[0160] 在某些实施方式中，反义寡核苷酸具有至少一个修饰的核苷间连接。在某些实施方式中，反义寡核苷酸具有至少两个修饰的核苷间连接。在某些实施方式中，反义寡核苷酸具有至少 3 个修饰的核苷间连接。在某些实施方式中，反义寡核苷酸具有至少 10 个修饰的核苷间连接。在某些实施方式中，反义寡核苷酸的各核苷间连接均为修饰的核苷间连接。在某些实施方式中，此类修饰的核苷间连接为硫代磷酸酯连接。

[0161] c. 长度

[0162] 在某些实施方式中，本发明提供的反义寡核苷酸具有任意多种范围的长度。在某些实施方式中，本发明提供的反义化合物或反义寡核苷酸包含 X-Y 连接的核苷或者由 X-Y 连接的核苷组成，其中 X 和 Y 均独立地选自 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、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、和 50 ；其中 X ＜ Y。例如，在某些实施方式中，本发明提供的反义化合物或反义寡核苷酸包含下述核苷或由下述核苷组成 ：8-9、8-10、8-11、8-12、8-13、8-14、8-15、8-16、8-17、8-18、8-19、8-20、8-21、8-22、8-23、8-24、8-25、8-26、8-27、8-28、8-29、8-30、9-10、9-11、9-12、9-13、9-14、9-15、9-16、9-17、9-18、9-19、9-20、9-21、9-22、9-23、9-24、9-25、9-26、9-27、9-28、9-29、9-30、10-11、10-12、10-13、10-14、10-15、10-16、10-17、10-18、10-19、10-20、10-21、10-22、10-23、10-24、10-25、10-26、10-27、10-28、10-29、10-30、11-12、11-13、11-14、11-15、11-16、11-17、11-18、11-19、11-20、11-21、11-22、11-23、11-24、11-25、11-26、11-27、11-28、11-29、11-30、12-13、12-14、12-15、12-16、12-17、12-18、12-19、12-20、12-21、12-22、12-23、12-24、12-25、12-26、12-27、12-28、12-29、12-30、13-14、13-15、13-16、13-17、13-18、13-19、13-20、13-21、13-22、13-23、13-24、13-25、13-26、13-27、13-28、13-29、13-30、14-15、14-16、14-17、14-18、14-19、14-20、14-21、14-22、14-23、14-24、14-25、14-26、14-27、14-28、14-29、14-30、15-16、15-17、15-18、15-19、15-20、15-21、15-22、15-23、15-24、15-25、15-26、15-27、15-28、15-29、15-30、16-17、16-18、16-19、16-20、16-21、16-22、16-23、16-24、16-25、16-26、16-27、16-28、16-29、16-30、17-18、17-19、17-20、17-21、17-22、17-23、17-24、17-25、17-26、17-27、17-28、17-29、17-30、18-19、18-20、18-21、18-22、18-23、18-24、18-25、18-26、18-27、18-28、18-29、18-30、19-20、19-21、19-22、19-23、19-24、19-25、19-26、19-29、19-28、19-29、19-30、20-21、20-22、20-23、20-24、20-25、20-26、20-27、20-28、20-29、20-30、21-22、21-23、21-24、21-25、21-26、21-27、21-28、21-29、21-30、22-23、22-24、22-25、22-26、22-27、22-28、22-29、22-30、23-24、23-25、23-26、23-27、23-28、23-29、23-30、24-25、24-26、24-27、24-28、24-29、24-30、25-26、25-27、25-28、25-29、25-30、26-27、26-28、26-29、26-30、27-28、27-29、27-30、28-29、28-30、或 29-30 个连接的核苷。

[0163] 在某些实施方式中，本发明的反义化合物或反义寡核苷酸的长度为 15 个核苷。在某些实施方式中，本发明的反义化合物或反义寡核苷酸的长度为 16 个核苷。在某些实施方式中，本发明的反义化合物或反义寡核苷酸的长度为 17 个核苷。在某些实施方式中，本发明的反义化合物或反义寡核苷酸的长度为 18 个核苷。在某些实施方式中，本发明的反义化

合物或反义寡核苷酸的长度为 19 个核苷。在某些实施方式中，本发明的反义化合物或反义寡核苷酸的长度为 20 个核苷。

[0164] d. 某些寡核苷酸基序

[0165] 在某些实施方式中，反义寡核苷酸具有的化学修饰的亚基沿着其长度以特定方向排列。在某些实施方式中，本发明的反义寡核苷酸是完全修饰的。在某些实施方式中，本发明的反义化合物是均一修饰的。在某些实施方式中，本发明的反义化合物是均一修饰的且各核苷包含 2'-MOE 糖配基。在某些实施方式中，本发明的反义寡核苷酸是均一修饰的且各核苷包含 2'-OMe 糖配基。在某些实施方式中，本发明的反义寡核苷酸是均一修饰的且各核苷包含吗啉取代糖配基。

[0166] 在某些实施方式中，本发明的寡核苷酸包含交替的基序。在某些此类实施方式中，交替的修饰类型选自 2'-MOE、2'-F、双环糖修饰核苷、和 DNA（未修饰的 2'- 脱氧）。在某些此类实施方式中，各交替的区域包含单一核苷。

[0167] 在某些实施方式中，本发明的寡核苷酸包含一个或更多个第一类型核苷区和一个或更多个第二类型核苷区。

[0168] 在某些实施方式中，在交替的基序中，一个或多个交替的区域包括某类型的多于一个的核苷。例如，本发明的寡聚化合物可以包含下述核苷基序中任一种的一个或更多个区域：

[0169] Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_1；

[0170] Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_2；

[0171] Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1 Nu_2；

[0172] Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_2；

[0173] Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1；

[0174] Nu_1 Nu_1 Nu_2 学习 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2；

[0175] Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1；

[0176] Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1；

[0177] Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1；或

[0178] Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_1 Nu_2 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_2 Nu_1 Nu_1；

[0179] 其中 Nu_1 为第一类型的核苷且 Nu_2 为第二类型的核苷。在某些实施方式中，Nu_1 和 Nu_2 中的一个为 2'-MOE 核苷且 Nu_1 和 Nu_2 中的另一个选自：2'-OMe 修饰的核苷、BNA 和未修饰的 DNA 或 RNA 核苷。

[0180] 2. 寡聚化合物

[0181] 在某些实施方式中，本发明提供寡聚化合物。在某些实施方式中，寡聚化合物仅包含寡核苷酸。在某些实施方式中，寡聚化合物包含寡核苷酸和一种或更多种缀合和 / 或末端基团。在上文所讨论的具有任意化学基序的寡核苷酸中可以插入此类缀合和 / 或末端基团。因此，例如，包含具有交替核苷区域的寡核苷酸的寡聚化合物可以包含末端基团。

[0182] a. 某些缀合基团

[0183] 在某些实施方式中，通过连接一个或更多个缀合基团对本发明的寡核苷酸进行修饰。一般而言，缀合基团可修饰与之连接的寡聚化合物的一种或多种性质，包括但不限于，药效学、药代动力学、稳定性、结合、吸收、细胞分布、细胞摄取、电荷和清除率。缀合基

团在化学领域被常规使用，且与母体化合物直接连接，或通过任选的缀合连接配基或缀合连接基团相连接，母体化合物例如寡聚化合物，如寡核苷酸。缀合基团包括但不限于，插入剂、报告分子、聚胺、聚酰胺、聚乙二醇、硫醚、聚醚、胆固醇、硫代胆固醇、胆酸配基、叶酸酯、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、菲啶、蒽醌、金刚烷胺、吖啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。某些缀合基团此前已被描述，例如：胆固醇配基 (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556)、胆酸 (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060)、硫醚，例如，己基 -S- 三硫醇 (Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309 ; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770)、硫代胆固醇 (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538)、脂肪链，例如，十二烷基二醇或十一烷基残基 (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118 ; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330 ; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54)、磷脂，例如，双十六烷基 -rac- 甘油或三乙基 - 铵 1, 2- 双 -O- 十六烷基 -rac- 甘油 -3-H- 膦酸酯 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654 ; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)、聚胺或聚乙二醇链 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973)、金刚烷胺乙酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654)、棕榈酰配基 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)、或十八胺或己基氨基 - 羰基 - 羟胆固醇配基 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937)。

[0184] 在某些实施方式中，缀合基团包含活性药物，例如，阿司匹林、华法林、保泰松、布洛芬、舒洛芬、芬布芬、酮洛芬、(S)-(+)- 吡喃洛芬、卡洛芬、丹肌氨酸、2, 3, 5- 三碘苯甲酸、氟芬那酸、亚叶酸、苯并噻二嗪、氯噻嗪、二氮杂卓、吲哚美辛、巴比妥酸盐、头孢菌素、磺胺类药物、抗糖尿病药、抗菌剂或抗生素。寡核苷酸 - 药物缀合物及其制备方法参见美国专利申请 09/334, 130。

[0185] 教导寡核苷酸缀合物制备方法的具有代表性的美国专利包括，但不限于，美国专利：4, 828, 979 ; 4, 948, 882 ; 5, 218, 105 ; 5, 525, 465 ; 5, 541, 313 ; 5, 545, 730 ; 5, 552, 538 ; 5, 578, 717, 5, 580, 731 ; 5, 580, 731 ; 5, 591, 584 ; 5, 109, 124 ; 5, 118, 802 ; 5, 138, 045 ; 5, 414, 077 ; 5, 486, 603 ; 5, 512, 439 ; 5, 578, 718 ; 5, 608, 046 ; 4, 587, 044 ; 4, 605, 735 ; 4, 667, 025 ; 4, 762, 779 ; 4, 789, 737 ; 4, 824, 941 ; 4, 835, 263 ; 4, 876, 335 ; 4, 904, 582 ; 4, 958, 013 ; 5, 082, 830 ; 5, 112, 963 ; 5, 214, 136 ; 5, 082, 830 ; 5, 112, 963 ; 5, 214, 136 ; 5, 245, 022 ; 5, 254, 469 ; 5, 258, 506 ; 5, 262, 536 ; 5, 272, 250 ; 5, 292, 873 ; 5, 317, 098 ; 5, 371, 241, 5, 391, 723 ; 5, 416, 203, 5, 451, 463 ; 5, 510, 475 ; 5, 512, 667 ; 5, 514, 785 ; 5, 565, 552 ; 5, 567, 810 ; 5, 574, 142 ; 5, 585, 481 ; 5, 587, 371 ; 5, 595, 726 ; 5, 597, 696 ; 5, 599, 923 ; 5, 599, 928 和 5, 688, 941。

[0186] 缀合基团可以连接于寡核苷酸的任一个或两个末端（末端缀合基团）和 / 或任意内部位点。

[0187] b. 末端基团

[0188] 在某些实施方式中，寡聚化合物的一个或两个末端包含末端基团。在某些实施方式中，末端基团可以包含上文所述的任意缀合基团。在某些实施方式中，末端基团可以包含附加的核苷和 / 或反向无碱基核苷。在某些实施方式中，末端基团为稳定基团。

[0189] 在某些实施方式中，寡聚化合物包含一种或更多种末端稳定基团，其能够增强诸如核酸酶稳定性等特性。稳定基团包括帽结构。本文使用的术语“帽结构”或“末端帽配基”是指可以连接到寡聚化合物的一个或两个末端的化学修饰。某些此类末端修饰可以保护具有末端核酸配基的寡聚化合物不受外切核酸酶的降解，且可以帮助其在细胞内的递送和 / 或定位。帽可以存在于 5′ - 末端 (5′ - 帽) 或 3′ - 末端 (3′ - 帽) 或可以存在于两个末端 (更详细的内容参见 Wincott et al.，国际 PCT 公开号 WO 97/26270 ;Beaucage and Tyer，1993，Tetrahedron 49，1925 ;美国专利申请公开号 US 2005/0020525 ;以及 WO 03/004602)。

[0190] 在某些实施方式中，将一个或更多个附加的核苷加入寡聚化合物的寡核苷酸的一个或两个末端。此类附加的末端核苷在本文中称为末端基团核苷。在双链化合物中，此类末端基团核苷是末端 (3’和 / 或 5’) 突出。在双链反义化合物中，此类末端基团核苷可以与靶核酸互补或不互补。在某些实施方式中，末端基团为非核苷末端基团。此类非末端基团可以为除核苷以外的任意末端基团。

[0191] c. 寡聚化合物基序

[0192] 在某些实施方式中，本发明的寡聚化合物包含基序 :

[0193] $T_1-(Nu_1)_{n1}-(Nu_2)_{n2}-(Nu_1)_{n3}-(Nu_2)_{n4}-(Nu_1)_{n5}-T_2$，其中 :

[0194] Nu_1，为第一类型的核苷 ;

[0195] Nu_2，为第二类型的核苷 ;

[0196] 每一个 n1 和 n5 均独立地为 0 至 3 ;

[0197] n2 与 n4 之和在 10 至 25 之间 ;

[0198] n3 为 0 至 5 ;以及

[0199] 每一个 T_1 和 T_2 均独立地为 H、羟基保护基团，任选地连接的缀合基团或加帽基团。

[0200] 在此类实施方式中，n2 和 n4 之和为 13 或 14 ;n1 为 2 ;n3 为 2 或 3 ;以及 n5 为 2。在某些此类实施方式中，本发明的寡聚化合物包含选自表 A 的基序。

[0201]

表 A				
n1	n2	n3	n4	n5
2	16	0	0	2
2	2	3	11	2
2	5	3	8	2
2	8	3	5	2
2	11	3	2	2
2	9	3	4	2
2	10	3	3	2
2	3	3	10	2
2	4	3	9	2
2	6	3	7	2
2	7	3	6	2
2	8	6	2	2
2	2	2	12	2
2	3	2	11	2
2	4	2	10	2
2	5	2	9	2
2	6	2	8	2
2	7	2	7	2
2	8	2	6	2

[0202]

2	9	2	5	2
2	10	2	4	2
2	11	2	3	2
2	12	2	2	2

[0203] 表 A 旨在说明，而并非是对本发明进行限制。表 A 描述的寡聚化合物均包含 20 个核苷。通过对 n1-n5 中的一个或多个选择不同数量的核苷，可以很容易地设计包含或多或少核苷的寡聚化合物。在某些实施方式中，Nu_1 和 Nu_2 均选自如下：2'-MOE、2'-OMe、DNA、和双环核苷。

[0204] 3. 反义的

[0205] 在某些实施方式中，本发明的寡聚化合物为反义化合物。相应地，在此类实施方式中，寡聚化合物与靶核酸杂交，导致产生反义活性。

[0206] a. 杂交

[0207] 在某些实施方式中，本发明提供与靶核酸特异性杂交的反义化合物，在特异性结合所需的条件下，即进行体内检测或治疗时的生理条件，以及进行体外检测时的检测条件，其互补性程度足以避免反义化合物与非靶核酸序列发生非特异性结合。

[0208] 因此，“严格杂交条件”或“严格条件”指反义化合物与靶序列杂交，而与其他序列杂交最少时的条件。严格条件具有序列依赖性，且在不同条件下有所不同，反义寡核苷酸与靶序列杂交的“严格条件”取决于反义寡核苷酸的性质和成分，以及用来对其进行研究的实验方法。

[0209] 本领域公知，与未修饰化合物相比，掺入核苷酸亲和性修饰可以允许更多数量的错配。类似地，某些核碱基序列与其他核碱基序列相比可以耐受更多的错配。本领域普通技术人员能够确定寡核苷酸之间、或反义寡核苷酸与靶核酸之间适宜数量的错配，如通过确定熔点 (Tm) 来确定。Tm 或 ΔTm 的计算方法是本领域技术人员所熟知的。例如，Freier et al.(Nucleic Acids Research，1997，25，22 ：4429-4443) 描述的技术教导本领域技术人员评估核苷酸的修饰对 RNA:DNA 双螺旋熔点的提升能力。

[0210] b. mRNA 前体的加工

[0211] 在某些实施方式中，本文提供的反义化合物与 mRNA 前体互补。在某些实施方式中，此类反义化合物改变 mRNA 前体的剪接。在某些此类实施方式中，与靶 mRNA 前体对应的成熟 mRNA 的一种变体与该成熟 mRNA 的另一种变体的比率被改变。在某些此类实施方式中，由靶 mRNA 前体表达的蛋白的一种变体与该蛋白的另一种变体的比率被改变。某些可以用于改变 mRNA 前体剪接的寡聚化合物和核碱基序列的例子可以见于 US 6,210,892 ；US5,627,274 ；US 5,665,593 ；5,916,808 ；US 5,976,879 ；US2006/0172962 ；US2007/002390 ；US2005/0074801 ；US2007/0105807 ；US2005/0054836 ；WO 2007/090073 ；WO2007/047913，Hua et al.，PLoS Biol 5(4) ：e73 ；Vickers et al.，J. Immunol. 2006 Mar 15 ；176(6) ：3652-61 ；以及 Hua et al.，American J. ofHuman Genetics(2008 年 4 月)82，1-15，以上的每一篇都通过全文参考并入，用于任何目的。在某些实施方式中，根据本发明的基序对改变剪接的反义序列进行修饰。

[0212] 反义技术是用于调节一种或多种特定基因产物表达的有效方法，且其在多种治疗、诊断和研究应用上具有独特的作用。通过反义作用机制，包括基于靶点占据的反义机制，本文提供的反义化合物可用于调节基因的表达。在一方面，本文提供的反义化合物调节靶基因的剪接。此类调节包括促进或抑制外显子的包含。本文进一步提供了一些反义化合物，其靶向作用于 mRNA 前体分子中存在的顺式剪接调节元件，包括外显子剪接增强子、外显子剪接沉默子、内含子剪接增强子和内含子剪接沉默子。顺式剪接调节元件的破坏被认为可以改变剪接位点的选择，其可以导致剪接产物组成的改变。

[0213] 真核 mRNA 前体的加工是一个复杂的过程，其需要多种信号和蛋白因子，以实现适宜的 mRNA 剪接。剪接体对外显子的定义不仅仅需要定义内含子 - 外显子边界的标准剪接信号。一种此类附加信号是顺式作用调节增强子和沉默子序列。经鉴定，外显子剪接增强子 (ESE)、外显子剪接沉默子 (ESS)、内含子剪接增强子 (ISE) 和内含子剪接沉默子 (ISS) 可以抑制或增强剪接供体位点或剪接受体位点的使用，取决于其位点和作用模式 (Yeo et al. 2004，Proc. Natl. Acad. Sci. 美国 A. 101(44) ：15700-15705)。特定蛋白 (反式因子) 与这些调节序列的结合支配剪接过程，促进或抑制特定剪接位点的使用，从而调节剪接产物的比率 (Scamborova et al. 2004，Mol. Cell. Biol. 24(5) ：1855-1869 ；Hovhannisyan and Carstens，2005，Mol. Cell. Biol. 25(1) ：250-263 ；Minovitsky et al. 2005，Nucleic Acids Res. 33(2) ：714-724)。

[0214] 4. 药物组合物

[0215] 在某些实施方式中，本发明提供包含一种或多种反义化合物的药物组合物。在某些实施方式中，此类药物组合物包含无菌盐水溶液和一种或多种反义化合物。在某些实施方式中，此类药物组合物由无菌盐水溶液和一种或多种反义化合物组成。

[0216] 在某些实施方式中，可以将反义化合物与药学上可接受的活性和 / 或惰性物质混合，用于制备药物组合物或制剂。用于药物组合物制剂的组合物和方法取决于多种标准，包括但不限于，给药途径、疾病程度或给药剂量。

[0217] 在某些实施方式中，可以通过将此类寡聚化合物与适宜的药学上可接受的稀释剂或载体进行组合，从而将反义化合物用于药物组合物中。药学上可接受的稀释剂包括磷酸盐缓冲液 (PBS)。PBS 是一种稀释剂，适用于经肠道外递送的组合物。相应地，在某些实施方式中，在本文所述的方法中使用的药物组合物包含反义化合物和药学上可接受的稀释剂。在某些实施方式中，药学上可接受的稀释剂为 PBS。

[0218] 含有反义化合物的药物组合物包含任意药学上可接受盐、酯、或此类酯的盐。在某些实施方式中，含有反义化合物的药物组合物包含一种或多种寡核苷酸，当所述寡核苷酸给药于动物，包括人时，可以（直接地或间接地）提供生物学活性代谢产物或其残留物。相应地，例如，本发明还提供反义化合物的药学上可接受的盐，前药、此类前药的药学上可接受的盐，以及其他生物等效物。适宜的药学上可接受的盐包括，但不限于，钠盐和钾盐。

[0219] 前药可以在寡聚化合物的一个或两个末端添加有其他核苷，其在体内可以被内源性的核酸酶所剪切，以形成具有活性的反义寡聚化合物。

[0220] 在多种方法中，已将基于脂质的载体用于核酸治疗。例如，在一种方法中，将核酸加入到由阳离子脂质和中性脂质混合形成的脂质体或脂复合体中。在另外一种方法中，在不存在中性脂质的情况下，DNA 与单一或多聚阳离子脂质形成复合物。

[0221] 某些制备方法参见 Akinc et al.，Nature Biotechnology 26，561-569(2008 年 5 月 1 日)，其全文通过引用参考并入。

[0222] 5. 向对象给药

[0223] 在某些实施方式中，向对象给药包含一种或多种反义化合物的药物组合物。在某些实施方式中，此类药物组合物通过注射给药。在某些实施方式中，此类药物组合物通过输注给药。

[0224] 在某些实施方式中，通过注射或输注将药物组合物给药至 CSF。在某些此类实施方式中，将药物组合物直接注射或输注至脊柱。在某些实施方式中，通过注射或输注将药物组合物给药至脑。在某些实施方式中，通过鞘内注射或输注给药药物组合物，而不是给药至脊髓组织本身。不受理论的限制，在某些实施方式中，反义化合物释放进入 CSF 周围，并且可以渗透进入脊髓实质。鞘内递送的另外一个优点是，鞘内途径模拟了在人体内已常规使用的腰椎穿刺给药（即，脊椎穿刺）。

[0225] 在某些实施方式中，药物组合物通过脑室内 (ICV) 注射或输注给药。当向脑室内或脑室递送含有一种或多种反义化合物的药物组合物时，可以在任意一个或多个脑室内进行，其中充满了脑脊液 (CSF)。CSF 是一种充满了脑室的透明液体，其存在于蛛网膜下腔的空隙，以及在脑和脊髓的周围。CSF 由脉络膜丛产生，并通过渗出或组织液交换方式从脑转移至脑室。脉络膜丛是位于脑室外侧底部和第三和第四脑室顶部的结构夹层。某些研究表明，这些结构每天能够产生 400-600cc 液体，其与每日四次填充中枢神经系统的量一致。在成年人中，经计算该液体的体积为 125 至 150ml(4-5oz)。CSF 持续形成、循环和吸收。某些研究表明，每日可以产生约 430 至 450ml（约 2 杯）CSF。某些计算估计，在成人中的产生量约为 0.35ml 每分钟，在婴儿中约为 0.15 每分钟。大多数的 CSF 由脑室外侧的脉络膜丛产

生。其通过 Monro 孔流入第三脑室，加入第三脑室中产生的产物，并通过 Sylvius 导水管继续进入第四脑室。在第四脑室中产生更多的 CSF，随后这种液体通过 Magendie 和 Luschka 孔进入蛛网膜下腔。随后其在整个脑内循环，下至脊髓，上至大脑半球。CSF 通过蛛网膜绒毛和颅内血管窦排入血液。

[0226] 在某些实施方式中，此类药物组合物通过全身给药。在某些实施方式中，药物组合物通过皮下给药。在某些实施方式中，药物组合物通过静脉给药。在某些实施方式中，药物组合物通过肌内注射给药。

[0227] 在某些实施方式中，药物组合物直接给药至 CSF（例如，IT 和 / 或 ICV 注射和 / 或输注）以及全身。

[0228] 在某些实施方式中，通过全身给药的反义化合物进入神经元。在某些实施方式中，全身给药反义化合物可以穿透血脑屏障，特别是在血脑屏障没有完全形成的年轻对象中（例如，在子宫内的对象和 / 或新生对象）。在某些实施方式中，通过全身给药的反义化合物的一定量可以被神经细胞摄取，甚至在血脑屏障已经完全形成的对象中。例如，反义化合物可以进入位于神经肌接头处或其附近的神经元中（逆行摄取）。在某些实施方式中，此类逆行摄取导致在神经元中发挥反义活性，包括但不限于，运动神经元，并且通过在神经元中发挥反义活性而提供治疗效果。

[0229] 在某些实施方式中，全身给药通过在神经元以外的细胞和 / 或组织中发挥反义活性而提供治疗效果。虽然有证据表明正常神经元功能需要神经元中有功能性 SMN，但在其他细胞和组织中功能性 SMN 减少所带来的结果尚未明确定性。在某些实施方式中，在非神经元细胞中发挥反义活性使得 SMN 功能在这些非神经元细胞中得以恢复，其可以带来治疗效果。

[0230] 在某些实施方式中，非神经元细胞的 SMN 功能改善能够改善神经元细胞的功能，而不管神经元中的 SMN 功能是否改善。例如，在某些实施方式中，全身给药本发明的药物组合物可以使其在肌肉细胞中发挥反义活性。在肌肉细胞中的此类反义活性可以对与该肌肉细胞相关的运动神经元或对神经元整体带来效果。在此类实施方式中，恢复了 SMN 功能的肌肉细胞可以提供某种因子，其能够改善神经元的存活和 / 或功能。在某些实施方式中，此类反义活性不依赖于神经元内反义化合物发挥反义活性所带来的益处。在某些实施方式中，全身给药本发明的药物组合物将在其他非神经元细胞中发挥反义活性，包括与神经元无直接关联的细胞。在非神经元细胞中的此类反义活性可以改善神经元的功能。例如，在非神经元细胞（例如，肝细胞）中的反义活性可以使细胞产生能够改善神经元功能的因子。注意：由于“反义活性”包括直接和间接活性，因此即使反义化合物未进入神经系统，其对神经元功能的效果也称为“反义活性”。

[0231] 在某些实施方式中，药物组合物的全身给药所带来的治疗效果不依赖于其在神经元内的直接或间接反义活性。通常，出现 SMA 后，神经元功能减弱，结果将产生明显的症状。其他细胞中的 SMN 活性减弱可能产生其他症状。由于神经元功能减弱导致的症状相对严重，可能掩盖某些此类症状。在某些实施方式中，全身给药使得非神经元细胞中的 SMN 功能恢复或改善。在某些此类实施方式中，此类恢复或改善的非神经元细胞的 SMN 功能可以带来治疗效果。例如，在某些例子中，患有 SMA 的对象生长缓慢。此类生长缓慢可能不是神经元细胞功能减弱的结果。事实上，生长缓慢可能与其他器官中的细胞功能损伤有关，如垂

体，和 / 或可能是整个机体细胞 SMN 缺陷的结果。在此类实施方式中，全身给药的结果可以改善垂体细胞和 / 或其他细胞的 SMN 活性，进而改善生长情况。在某些例子中，给药至 CSF 使足量神经元的功能得以恢复，以延长对象的生命，但是由于对象的生命延长了，一种或多种此前未知的症状突然出现，因为对象通常在这些症状出现以前已经死亡。某些此类突然出现的症状可能是致命的。在某些实施方式中，通过全身给药治疗突然出现的症状。在不考虑作用机制的情况下，在某些实施方式中，SMA 的多种症状均可以通过全身给药治疗，这些症状包括但不限于，此前被与神经元功能损伤相关的更加严重的症状所掩盖的症状。

[0232] 在某些实施方式中，全身给药本发明的药物组合物使得肌肉细胞中的 SMN 活性增加。在某些实施方式中，肌肉细胞中此类 SMN 活性的改善可以提供治疗效果。已有报道表明，仅有在肌肉中改善 SMN 活性还不足以提供治疗效果（例如，Gravrilina，et al.，Hum Mol Genet 200817(8)：1063-1075）。在某些实施方式中，本发明提供能够在肌肉中改善 SMN 功能并提供治疗效果的方法。在某些例子中，在其他细胞中（单独或与肌肉细胞一起）的 SMN 功能的改善产生了该治疗效果。在某些实施方式中，仅改善肌肉中的 SMN 功能就可以提供治疗效果。

[0233] 在某些实施方式中，全身给药使得存活情况改善。

[0234] 6. 脊髓性肌萎缩症 (SMA)

[0235] SMA 是一种以脊髓运动神经元退化为特征的遗传病。SMA 的病因为 SMN1 基因的两个功能性拷贝纯合性缺失。但是，SMN2 基因具有编码与 SMN1 相同蛋白的能力，这样就可以克服 SMA 患者的遗传缺陷。在 SMN2 外显子 7 的 +6 位含有一个翻译沉默突变 (C → T)，其导致 SMN2 转录物中的外显子 7 不能被有效包含。因此，SMN2 的主要形式缺乏外显子 7，其不稳定且没有活性。因此，能够调节 SMN2 剪接以使得含有外显子 7 的 SMN2 转录物百分率增加的治疗化合物，将可以用于治疗 SMA。

[0236] 在某些实施方式中，本发明提供与编码 SMN2 的 mRNA 前体互补的反义化合物。在某些此类实施方式中，反义化合物改变 SMN2 的剪接。某些用于改变 SMN2 剪接的序列和区域可以参见 PCT/US06/024469，其全文通过引用参考并入，用于任何目的。在某些实施方式中，具有本文所述任意基序的寡聚化合物具有与 SMN2 的内含子 7 互补的核碱基序列。在非限制性的下表中列出了某些此类核碱基序列的例子。

[0237]

序列	长度	SEQ ID
TGCTGGCAGACTTAC	15	3
CATAATGCTGGCAGA	15	4
TCATAATGCTGGCAG	15	5
TTCATAATGCTGGCA	15	6
TTTCATAATGCTGGC	15	2

[0238]

ATTCACTTTCATAATGCTGG	20	7
TCACTTTCATAATGCTGG	18	1
CTTTCATAATGCTGG	15	8
TCATAATGCTGG	12	9
ACTTTCATAATGCTG	15	10
TTCATAATGCTG	12	11
CACTTTCATAATGCT	15	12
TTTCATAATGCT	12	13
TCACTTTCATAATGC	15	14
CTTTCATAATGC	12	15
TTCACTTTCATAATG	15	16
ACTTTCATAATG	12	17
ATTCACTTTCATAAT	15	18
CACTTT CATAAT	12	19
GATTCACTTTCATAA	15	20
TCACTTTCATAA	12	21
TTCACTTTCATA	12	22
ATTCACTTTCAT	12	23
AGTAAGATTCACTTT	15	24

[0239] 本发明的反义化合物可以用于调节对象如人中 SMN2 的表达。在某些实施方式中，对象患有脊髓性肌萎缩症。在某些此类对象中，SMN1 基因缺失或不足以产生足量的功能性 SMN 蛋白。在某些实施方式中，本发明的反义化合物可以有效调节 SMN2 的剪接，使得在 SMN2mRNA 中，并且最终在包含外显子 7 对应的氨基酸的 SMN2 蛋白中，外显子 7 的包含增加。此类替代 SMN2 蛋白与野生型 SMN 蛋白类似。能够有效调节 SMN2mRNA 的表达或其所表达的蛋白产物的本发明反义化合物，被认为是活性反义化合物。

[0240] 对 SMN2 表达的调节可以在体液中检测，体液可以含有或不含细胞，或在动物的组织、器官中检测。本领域技术人员已知获取供分析用的样本的方法，样本例如体液（例如，

唾液、血清、CSF)、组织(例如,活检)、或器官,以及制备供分析用样本的方法。RNA 和蛋白水平分析采用的方法已在上文中进行了讨论,且其均为本领域技术人员所熟知。通过本领域公知的常规临床方法,从用本发明一种或多种化合物接触的动物收集上文所述的液体、组织或器官,检测其中与靶基因表达相关的生物标记物,进而评估治疗效果。

[0241] 还包括了用有效量的本发明所述一种或更多种反义化合物或组合物接触体液、器官或组织的方法。体液、器官或组织可以与一种或更多种本发明的化合物接触,使得体液、器官或组织的细胞中 SMN2 的表达被调节。可以利用本领域的常规方法,监测反义化合物或组合物对靶核酸或其产物的调节作用,从而确定有效量。

[0242] 本发明还提供了如本文所述的反义化合物,以用于如本文所述的任意方法。例如,本发明提供了包含与编码人 SMN2 的核酸互补的反义化合物,用于治疗与运动神经元存活蛋白 (SMN) 相关的疾病或状态,如脊髓性肌萎缩症 (SMA)。作为进一步的例子,本发明提供了包含反义寡核苷酸的反义化合物,所述反义寡核苷酸与编码人 SMN2 的核酸互补,通过将反义化合物直接给药至中枢神经系统 (CNS) 或 CSF,用于治疗与运动神经元存活蛋白 (SMN) 相关的疾病或状态。

[0243] 本发明还提供了如本文所述的反义化合物用于生产药物的用途,所述药物用于如本文所述任意方法。例如,本发明提供了包含反义寡核苷酸的反义化合物用于生产药物的用途,所述反义寡核苷酸互补于编码人 SMN2 的核酸,所述药物用于治疗与运动神经元存活蛋白 (SMN) 相关疾病或状态,如脊髓性肌萎缩症 (SMA)。作为进一步的例子,本发明提供了包含反义寡核苷酸的反义化合物用于生产药物的用途,所述反义寡核苷酸互补于编码人 SMN2 的核酸,通过将所述药物直接给药至中枢神经系统 (CNS) 或 CSF,所述药物用于治疗与运动神经元存活蛋白 (SMN) 相关疾病或状态。

[0244] 在某些实施方式中,具有本文所述任意基序的寡聚化合物具有与 SMN2 的外显子 7 互补的核碱基序列。

[0245] 在某些实施方式中,具有本文所述任意基序的寡聚化合物具有与 SMN2 的内含子 6 互补的核碱基序列。

[0246] 在某些实施方式中,反义化合物包含反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸具有核碱基序列,所述核碱基序列包含以下序列 :TCACTTTCATAATGCTGG(SEQ ID NO :1) 中的至少 10 个核碱基。在某些实施方式中,反义寡核苷酸具有包括此序列中至少 11 个核碱基的核碱基序列。在某些实施方式中,反义寡核苷酸具有包括此序列中至少 12 个核碱基的核碱基序列。在某些实施方式中,反义寡核苷酸具有包括此序列中至少 13 个核碱基的核碱基序列。在某些实施方式中,反义寡核苷酸具有包括此序列中至少 14 个核碱基的核碱基序列。在某些实施方式中,反义寡核苷酸具有包括此序列中至少 15 个核碱基的核碱基序列。在某些实施方式中,反义寡核苷酸具有包括此序列中至少 16 个核碱基的核碱基序列。在某些实施方式中,反义寡核苷酸具有包括此序列中至少 17 个核碱基的核碱基序列。在某些实施方式中,反义寡核苷酸具有包括此序列的核碱基的核碱基序列。在某些实施方式中,反义寡核苷酸具有由此序列的核碱基组成的核碱基序列。在某些实施方式中,反义寡核苷酸由 10-18 个连接的核苷组成,且具有的核碱基序列与序列 :TCACTTTCATAATGCTGG(SEQ ID NO :1) 的等长部分具有 100%同一性。

[0247] 7. 某些对象

[0248] 在某些实施方式中，对象具有一个或多个 SMA 指征。在某些实施方式中，对象的一块或多块肌肉的电活性下降。在某些实施方式中，对象具有突变的 SMN1 基因。在某些实施方式中，对象的 SMN1 基因缺失或无法产生功能性的 SMN 蛋白。在某些实施方式中，通过遗传检测诊断对象。在某些实施方式中，通过肌肉组织活检识别对象。在某些实施方式中，对象不能坐直。在某些实施方式中，对象不能站立或行走。在某些实施方式中，对象的呼吸和 / 或进食需要帮助。在某些实施方式中，通过肌肉电生理检测和 / 或肌肉组织活检识别对象。

[0249] 在某些实施方式中，对象患有 I 型 SMA。在某些实施方式中，对象患有 II 型 SMA。在某些实施方式中，对象患有 III 型 SMA。在某些实施方式中，诊断在子宫中的对象患有 SMA。在某些实施方式中，诊断出生一周内的对象患有 SMA。在某些实施方式中，诊断出生一个月内的对象患有 SMA。在某些实施方式中，诊断年龄为 3 个月的对象患有 SMA。在某些实施方式中，诊断年龄为 6 个月的对象患有 SMA。在某些实施方式中，诊断年龄为 1 岁的对象患有 SMA。在某些实施方式中，诊断年龄为 1 至 2 岁的对象患有 SMA。在某些实施方式中，诊断年龄为 1 至 15 岁的对象患有 SMA。在某些实施方式中，诊断年龄为 15 岁以上的对象患有 SMA。

[0250] 在某些实施方式中，本发明的药物组合物的第一次给药在子宫内。在某些此类实施方式中，第一次给药于血脑屏障发育完全以前。在某些实施方式中，第一次给药为向处于子宫内的对象全身给药。在某些实施方式中，第一次给药为血脑屏障形成后向子宫内给药。在某些实施方式中，第一次给药为向 CSF 给药。

[0251] 在某些实施方式中，当对象的年龄小于一周时完成本发明药物组合物的第一次给药。在某些实施方式中，当对象的年龄小于一个月时完成本发明药物组合物的第一次给药。在某些实施方式中，当对象的年龄小于 3 个月时完成本发明药物组合物的第一次给药。在某些实施方式中，当对象的年龄小于 6 个月时完成本发明药物组合物的第一次给药。在某些实施方式中，当对象的年龄小于一岁时完成本发明药物组合物的第一次给药。在某些实施方式中，当对象的年龄小于 2 岁时完成本发明药物组合物的第一次给药。在某些实施方式中，当对象的年龄小于 15 岁时完成本发明药物组合物的第一次给药。在某些实施方式中，当对象的年龄大于 15 岁时完成本发明药物组合物的第一次给药。

[0252] 8. 某些剂量

[0253] 在某些实施方式中，本发明提供给药剂量和频率。在某些实施方式中，药物组合物通过推注给药。在某些此类实施方式中，推注给药的剂量为 0.01 至 25 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些此类实施方式中，推注给药的剂量为 0.01 至 10 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些此类实施方式中，所述剂量为 0.05 至 5 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些此类实施方式中，所述剂量为 0.1 至 2 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些此类实施方式中，所述剂量为 0.5 至 1 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，此类剂量每月给药两次。在某些实施方式中，此类剂量每月给药一次。在某些实施方式中，此类剂量每 2 个月给药一次。在某些实施方式中，此类剂量每 6 个月给药一次。在某些实施方式中，此类剂量通过推注给药至 CSF。在某些实施方式中，此类剂量通过鞘内推注给药。在某些实施方式中，此类剂量通过全身推注注射（例如，皮下、肌内或静脉注射）。在某些实施方式中，对象接受向 CSF 的推注注射和全身推注注射。在此类实施方式中，各次

CSF 推注和全身推注的剂量可以相同或不同。在某些实施方式中，CSF 和全身给药的频率不同。在某些实施方式中，本发明提供的给药方案包含至少一次鞘内推注注射和至少一次皮下推注注射。

[0254] 在某些实施方式中，通过连续输注给药药物组合物。此类连续输注可以通过输液泵完成，其将药物组合物递送至 CSF。在某些实施方式中，此类输液泵递送药物组合物至 IT 或 ICV。在某些实施方式中，给药剂量为每日 0.05 至 25 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，给药剂量为每日 0.1 至 10 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，给药剂量为每日 0.5 至 10 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，给药剂量为每日 0.5 至 5 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，给药剂量为每日 1 至 5 毫克反义化合物每千克对象体重。在某些实施方式中，本发明提供的给药方案包含输注至 CNS 和至少一次全身推注注射。在某些实施方式中，本发明提供的给药方案包括输注至 CNS 和至少一次皮下推注注射。在某些实施方式中，对剂量进行调整，无论是推注还是输注，使得反义化合物的浓度达到或维持在 0.1 至 100 毫克每克 CNS 组织。在某些实施方式中，对剂量进行调整，无论是推注还是输注，使得反义化合物的浓度达到或维持在 1 至 10 毫克每克 CNS 组织。在某些实施方式中，对剂量进行调整，无论是推注还是输注，使得反义化合物的浓度达到或维持在 0.1 至 1 毫克每克 CNS 组织。

[0255] 在某些实施方式中，向对象的给药分为诱导期和维持期。在某些此类实施方式中，在诱导期的给药剂量高于在维持期的给药剂量。在某些实施方式中，在诱导期的给药剂量低于在维持期的给药剂量。在某些实施方式中，诱导期通过推注注射完成，维持期通过连续输注完成。

[0256] 在某些实施方式中，本发明提供反义化合物的全身给药，以单用的方式进行或与递送至 CSF 联用。在某些实施方式中，全身给药的剂量为 0.1mg/kg 至 200mg/kg。在某些实施方式中，全身给药的剂量为 0.1mg/kg 至 100mg/kg。在某些实施方式中，全身给药的剂量为 0.5mg/kg 至 100mg/kg。在某些实施方式中，全身给药的剂量为 1mg/kg 至 100mg/kg。在某些实施方式中，全身给药的剂量为 1mg/kg 至 50mg/kg。在某些实施方式中，全身给药的剂量为 1mg/kg 至 25mg/kg。在某些实施方式中，全身给药的剂量为 0.1mg/kg 至 25mg/kg。在某些实施方式中，全身给药的剂量为 0.1mg/kg 至 10mg/kg。在某些实施方式中，全身给药的剂量为 1mg/kg 至 10mg/kg。在某些实施方式中，全身给药的剂量为 1mg/kg 至 5mg/kg。在某些实施方式中包含全身和 CSF 递送，独立地确定这两种途径的剂量。

[0257] a. 计算适宜的人用剂量

[0258] 在某些实施方式中，所述对象是人。在某些实施方式中，通过动物实验的数据，例如本文所描述的那些，计算或估计人用剂量。在某些实施方式中，通过猴和 / 或小鼠实验的数据，例如本文所描述的那些，计算或估计人用剂量。在某些实施方式中，通过小鼠实验的数据，例如本文所描述的那些，计算或估计人用剂量。在某些实施方式中，可以采用小鼠药代动力学数据，结合脑重和 / 或脑脊液 (CSF) 更新速度，计算适宜的人用剂量。例如，小鼠脑重约 0.4g，其约占体重的 2%。对人而言，平均脑重为 1.5kg，其约占体重的 2.5%。在某些实施方式中，给药至 CSF 使得部分化合物通过脑组织的摄取和随后的代谢而被消除。利用人与小鼠脑重量的比率作为换算因子，可以计算通过脑组织的消除和清除估计值。此外，可以使用 CSF 更新速度，估计化合物从 CSF 中消除到血液中的情况。小鼠 CSF 的更新速度

为每日约 10-12 次（以 0.325μl/min 的速度产生 0.04mL）。人 CSF 的更新速度为每日约 4 次（以 350-400μl/min 的速度产生 100-160mL）。可以依据脑重量的消除换算，和 / 或 CSF 的更新换算，确定清除率以及给药剂量。外推得到的人 CSF 清除率可以用于估算近似于小鼠给药剂量的人用等同剂量。这样，依据脑重量和 CSF 更新速度，可以估计出考虑了组织代谢差异的人用剂量。用于计算和估算的此类方法是本领域技术人员所熟知的。

[0259] 作为非限制性的例子，在某些实施方式中，可以由期望的小鼠剂量估算出人用等同剂量，通过将 mg/kg 的小鼠剂量乘以约 0.25 至约 1.25 的因子，该因子取决于特定化合物的已确定的清除率和消除值。因此，例如，在某些实施方式中，与 20g 小鼠的 0.01mg 给药剂量相等同的人用剂量范围为，对 70kg 人的约 8.75mg 至约 43.75mg 的总剂量。同样地，在某些实施方式中，与 4g 新生小鼠的 0.01mg 给药剂量相等同的人用剂量范围为，对 3kg 新生儿的约 1.9mg 至约 9.4mg 的总剂量。这些例子仅用于说明本领域技术人员是如何确定适宜的人用剂量的，其并非旨在限制本发明。

[0260] 在某些实施方式中，通过动物实验的数据，如本文所描述的那些，来计算或估算全身递送（不论是单用或是与 CSF 递送联用）的人用剂量。通常，用于全身给药的适宜的人用剂量（以 mg/kg 计）为动物用有效剂量的 0.1 至 10 倍。因此，仅作为举例，对 2g 新生小鼠皮下给药 50μg，其剂量为 25mg/kg。预计在人体内的相应剂量为 2.5mg/kg 至 250mg/kg。对于 3 千克重的婴儿而言，相应的剂量为 7.5mg 至 750mg。对于 25kg 重的儿童而言，相应剂量为 62.5mg 至 6250mg。

[0261] 9. 治疗方案

[0262] 在某些实施方式中，对上述给药剂量、给药频率、给药途径、诱导期和维持期、以及第一次给药时间进行组合，以提供对患有 SMA 对象的给药方案。可以对此类给药方案进行选择和调整，以改善 SMA 的一种或多种症状和 / 或减轻或避免药物组合物的给药所导致的毒性或副作用。在某些实施方式中，对象在子宫内或为新生儿。在此类实施方式中，药物组合物的给药，特别是通过连续输注给药，存在特定挑战。因此，在某些实施方式中，当对象在子宫内或年龄非常小时，本发明通过推注给药的方式提供药物组合物的给药，此后当对象年龄更大且安放植入的输液泵更为现实时，通过这种泵连续输注给药。进一步地，在某些实施方式中，当对象长大后，增加绝对剂量，以获得相同或相近的剂量 :体重比率。下表旨在举例说明治疗方案，而并非意在限制本领域技术人员容易想到的可能存在的治疗组合。

[0263]

给药期	第一次	第二次	第三次	第四次	第五次
方案 1					
对象年龄	在子宫内，形成血脑屏障前	在子宫内，形成血脑屏障后	> 1 周	6 个月	1.5 岁
给药量	50 μg	50 μg	100 μg	10 μg/天	50 μg/天
频率	单次给药	单次给药	每月一次	连续	连续
给药途径	全身注射	IT 注射	IT 注射	IT 输注	IT 输注
持续时间	N/A	N/A	6 个月	1 年	正在进行中
方案 2					
对象年龄	在子宫内，形成血脑屏障后	> 1 周	6 个月	1.5 年	N/A
给药量	50 μg	100 μg	5 mg/天	10 mg/天	N/A
频率	单次给药	每月一次	连续	连续	N/A
给药途径	ICV 注射	ICV 注射	ICV 输注	ICV 输注	N/A
持续时间	N/A	6 个月	1 年	持续	N/A
方案 3					
对象年龄	> 1 周	6 个月	1.5 年	2.5 年*	
给药量	100 μg	500 μg/天	20 mg/天	20 mg/天	100 mg
频率	每月 2 次	连续	连续	连续	每月 2 次
给药途径	ICV 注射	ICV 输注	ICV 输注	ICV 输注	IP
持续时间	6 个月	1 年	1 年	持续	持续

[0264] *注释：方案 3 的第 4 次给药期为连续 CSF 输注与周期性全身给药联用的例子。这些治疗方案旨在举例，并非意在限制本发明。

[0265] 在某些实施方式中，给药方案包含全身给药，单用或与给药至 CSF 联用（例如方案 3，见上文）。下表对此类方案进一步举例。

[0266]

全身给药			CSF 给药		
剂量	途径	频率	剂量	途径	频率
1-5 mg/kg	皮下	每周一次	5-10 mg/kg	IT 推注	每月一次
1-5 mg/kg	皮下	每月一次	1-5 mg/kg	ICV 推注	2 个月
10-50 mg/kg	皮下	每月一次	0.5-1 mg/kg	IT 推注	6 个月
0.5-25 mg/kg	皮下	每月一次	10 mg/kg/天	IT 输注	每 6 个月连续给药 7 天
0.1-10 mg/kg	皮下	每月一次	无		
无			0.5-1 mg/kg	IT 推注	6 个月

[0267] 这些治疗方案旨在举例，并非意在限制本发明。根据本申请的内容，并基于多种因素，如状态的严重程度以及对象的总体健康状况和年龄等，本领域技术人员能够选择给药剂量和递送方式的适宜组合。

[0268] 10. 联合给药

[0269] 在某些实施方式中，本发明的药物组合物与至少一种用于治疗 SMA 和 / 或用于治疗一种或多种与 SMA 相关症状的其他药物组合物联合给药。在某些实施方式中，此类其他药物组合物选自曲古霉素 -A 丙戊酸、利鲁唑、羟基脲以及丁酸盐或丁酸盐衍生物。在某些实施方式中，本发明的药物组合物与曲古霉素 -A 联合给药。在某些实施方式中，本发明的药物组合物与喹唑啉衍生物联合给药，例如在 Thurmond, et al., J. Med Chem. 2008, 51, 449-469 中所描述。在某些实施方式中，本发明的药物组合物与至少一种其他药物组合物在相同时间联合给药。在某些实施方式中，本发明的药物组合物与至少一种其他药物组合物在不同时间联合给药。

[0270] 在某些实施方式中，本发明的药物组合物与基因治疗剂联合给药。在某些此类实施方式中，基因治疗剂给药至 CSF，且本发明的药物组合物全身给药。在某些此类实施方式中，基因治疗剂给药至 CSF，且本发明的药物组合物给药至 CSF 和全身给药。在某些实施方式中，本发明的药物组合物和基因治疗剂在相同时间联合给药。在某些实施方式中，本发明的药物组合物和基因治疗剂在不同的时间联合给药。已报道了用于 SMA 治疗的某些基因治疗方法 (例如，Coady et al., PLoS ONE 20083(10) :e3468 ;Passini et al., J Clin Invest 2010 Apr 1, 120(4) :1253-64)。

[0271] 在某些实施方式中，本发明的药物组合物与至少一种用于 SMA 的其他疗法联合给药。在某些实施方式中，此类用于 SMA 的其他疗法为手术。在某些实施方式中，此类其他疗法为物理治疗，包括但不限于，对呼吸所必须的肌肉进行力量增强的锻炼，如咳嗽治疗。在某些实施方式中，其他治疗为物理介入，如饲喂管或呼吸辅助设备。

[0272] 在某些实施方式中，本发明的药物组合物与一种或多种药物组合物联合给药，所述药物组合物能够降低本发明药物组合物的不希望的副作用。

[0273] 11. 表型效应

[0274] 在某些实施方式中，给药至少一种本发明的药物组合物使得对象的表型改变。在某些实施方式中，此类表型改变包括，但不限于 :包含外显子 7 的 SMN mRNA 的绝对量增加 ;包含外显子 7 的 SMN mRNA 与缺乏外显子 7 的 SMN mRNA 的比率升高 ;包含外显子 7 的 SMN 蛋白的绝对量增加 ;包含外显子 7 的 SMN 蛋白与缺乏外显子 7 的 SMN 蛋白的比率升高 ;肌肉力量改善，至少一块肌肉的电活性改善 ;呼吸改善 ;体重增加 ;以及存活。在某些实施方式中，在对象运动神经元检测到至少一种表型改变。在某些实施方式中，给药至少一种本发明的药物组合物使得对象能够端坐、站立和 / 或行走。在某些实施方式中，给药至少一种本发明药物组合物使得对象在没有帮助的情况下能够进食、饮水和 / 或呼吸。在某些实施方式中，通过对肌肉进行电生理评估评价治疗效果。在某些实施方式中，给药本发明的药物组合物改善 SMA 的至少一种症状且具有较少或没有炎症作用。在某些此类实施方式中，通过治疗后未出现 Aif1 水平的显著增加，来确定未出现炎症作用。

[0275] 在某些实施方式中，给药至少一种本发明药物组合物能延迟 SMA 的至少一种症状的出现。在某些实施方式中，给药至少一种本发明药物组合物能延缓 SMA 的至少一种症状的进展。在某些实施方式中，给药至少一种本发明药物组合物能降低 SMA 至少一种症状的严重程度。

[0276] 在某些实施方式中，给药至少一种本发明药物组合物使得产生不期望出现的副作

用。在某些实施方式中，识别出治疗方案，使得症状获得所需的改善，且避免不期望出现的副作用。

[0277] 12. 剂量单位

[0278] 在某些实施方式中，将本发明的药物组合物制成用于给药的剂量单位。某些此类剂量单位的浓度选自 0.01mg 至 100mg。在某些此类实施方式中，本发明的药物组合物所包含的反义化合物的剂量选自 0.01mg、0.1mg、0.5mg、1mg、5mg、10mg、20mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、和 200mg。在某些实施方式中，药物组合物所包含的寡核苷酸的剂量选自 0.1mg、0.5mg、1mg、5mg、10mg、25mg、和 50mg。

[0279] 13. 试剂盒

[0280] 在某些实施方式中，本发明提供的试剂盒包含至少一种药物组合物。在某些实施方式中，此类试剂盒进一步包含一种递送工具，例如注射器或输液泵。

[0281] 非限制性公开和通过引用并入

[0282] 尽管已经根据一些实施方式专门描述了本发明所述的一些化合物、组合物以及方法，下列实施例仅用以描述本发明所述化合物且非旨在对其限制。本申请中所引用的各参考文献、GenBank 登录号等等均通过引用整体并入。

[0283] 尽管在本文件所附的序列表中按照要求将各序列标注为“RNA”或“DNA”，但实际上，可以采用任意组合的化学修饰对这些序列进行修饰。本领域技术人员容易理解，用如“RNA”或“DNA”这样的命名来描述修饰的寡核苷酸，在某些例子中是专断的。例如，包含含有 2’-OH 糖配基和胸腺嘧啶碱基的核苷的寡核苷酸可以被称为具有修饰糖基的 DNA（将天然 DNA 的 2’-H 修饰为 2’-OH）或具有修饰碱基的 RNA（将天然 RNA 的尿嘧啶修饰为胸腺嘧啶（甲基尿嘧啶））。

[0284] 因此，本申请提供的核酸序列，包括但不限于序列表中列出的序列，意在包括含有天然或修饰 RNA 和 / 或 DNA 的任意组合的核酸，包括但不限于具有修饰核碱基的此类核酸。作为进一步举例且非限制，具有核碱基序列“ATCGATCG”的寡聚化合物包括具有此类核碱基序列的任意寡聚化合物，无论其是修饰或未修饰，包括但不限于，包含 RNA 碱基的此类化合物，例如具有序列“AUCGAUCG”的，以及具有某些 DNA 碱基和某些 RNA 碱基的，如“AUCGATCG”，以及具有其他修饰碱基的寡聚化合物，如“AT^{me}CGAUCG”，其中 ^{me}C 表示 5- 位包含甲基的胞嘧啶碱基。

[0285] 实施例 1- 靶向作用于 SMN2 的反义化合物

[0286] 采用此前报道的标准技术合成下述寡核苷酸。

[0287]

参考编号 #	序列	长度	化学	SEQ ID
ISIS396443	TCACTTTCATAATGCTGG	18	全长 2’-MOE ;全长 PS	1
ISIS396449	TTTCATAATGCTGGC	15	全长 2’-MOE ;全长 PS	2

[0288] PS = 硫代磷酸酯核苷间连接

[0289] 实施例 2-Smn-/-SMN 转基因小鼠

[0290] 在适宜的动物模型中可以对上文所述的反义化合物的治疗作用和安全性进行检

测。例如，与人类疾病的表现极其接近的动物模型包括特定疾病的自发发生率较高或被诱导成发生率较高的动物品系。

[0291] 特别地，SMA 的动物模型是已知的。如上文所阐述的，SMA 是常染色体退行性神经肌肉病变，其分子机制为运动神经元存活基因 1(SMN1) 的纯合性缺失。在人体内发现了与 SMN1 基因基本相同的拷贝，称为 SMN2，其能够调节疾病的严重程度。与人类不同，小鼠具有一个与 SMN1 等同的单基因 (Smm)。该基因的纯合性缺失对胚胎是致命的，且导致大量细胞死亡，提示 Smn 基因产物对细胞的存活和功能是必要的。在缺乏 SMN 的小鼠中引入 2 个拷贝的 SMN2，可以挽救其对胚胎的致命性，得到具有 SMA 表型的小鼠 (Monani et al.，Hum.Mol.Genet.(2000)9 :333-339)。高拷贝数的 SMN2 可以挽救小鼠，因为运动神经元中产生了充足的 SMN 蛋白。还可以参见 Hsieh-Li，et al.，Nat.Genet.(2000)24 :66-70，其报道了表达人 SMN2 的转基因小鼠品系的生产。特别地，在 Smn-/- 的背景下引入了 SMN2 的转基因小鼠在脊髓和骨骼肌中显示出的病理学改变与 SMA 患者接近。这些小鼠病理变化的严重程度与含有外显子 7 编码区域的 SMN 蛋白的量相关。缺乏一个 Smn 拷贝的杂合小鼠称为 Smn-/+，其是 SMA 严重程度较低型，III 型的模型。

[0292] SMA 表型的严重程度与小鼠中的人 SMN2 拷贝数相关。“台湾”品系具有人 SMN2 的 4 个拷贝，这种小鼠具有中度至重度 SMA 表型，与 I 型或 II 型接近。

[0293] Δ-7 小鼠 ($Smn^{-/-}$，$hSMN2^{+/+}$，$SMN\Delta7^{+/+}$) 也缺乏小鼠 Smn 且表达人 SMN2。Δ-7 小鼠具有更为严重的表型，其在出生后较短时间内死亡，一般约为出生后 15-20 天。

[0294] 实施例 3- 在 Smn-/-SMN2(台湾品系) 中用反义化合物在体内进行全身给药

[0295] 对台湾小鼠通过腹腔注射，给药生理盐水，或 35mg/kg ISIS396443，或错配反义寡核苷酸对照，每日一次，连续 5 天，并在 2 天后即第 7 天处死小鼠。收集肝脏和肾脏，通过标准技术分离 RNA。通过 RT-PCR 观察含有或不含外显子 7 的 SMN2。与给药生理盐水和错配对照的动物相比，给药 ISIS396443 使得来自肾脏和肝脏的 SMN2 中，对外显子 7 的包含大量增加。

[0296] 实施例 4- 在 Smn-/-SMN2(台湾品系) 中用反义化合物在体内进行脑室内 (ICV) 给药

[0297] 对台湾小鼠通过 ICV 注射，给药生理盐水或 150μg ISIS396443，每日一次，连续 7 天。在第 8 天处死小鼠，从脑和脊髓中提取 RNA。RT-PCR 分析显示，给药 ISIS396443 的动物的脑和脊髓样品中，SMN2 对外显子 7 的包含大量增加。这些结果提示，使用靶向作用于 SMN 的反义寡核苷酸进行 ICV 给药，可以挽救 SMA 状态，因为对外显子 7 的排除与 SMA 的表型相关。

[0298] 剂量 - 应答

[0299] 对台湾小鼠通过 ICV 注射生理盐水或 10、50、100 或 150μg 的 ISIS396443(每个治疗组 5 只小鼠)，每日一次，连续 7 天，并在第 8 天将动物处死。分离 RNA，使用 RT-PCR 进行分析。10μg 治疗组显示出中等程度的对外显子 7 的包含。50μg、100μg 和 150μg 组均显示出大量的对外显子 7 的包含。

[0300] 应答持续时间

[0301] 为确定效应持续时间，对 24 只小鼠通过 ICV 注射 50μg 的 ISIS396443，每日一次，连续 7 天。在末次给药时 (0 时刻) 处死四只小鼠，在末次给药后 1 周、2 周、4 周和 8 周分

别处死四只小鼠。通过 RT-PCR 检测显示，所有治疗小鼠均显示大量的对外显子 7 的包含，在第 8 周时的效果与其他组之间不存在差异，如图 1 所示：

[0302] 这些结果提示，通过 ICV，每天给药 50μg 的 ISIS396443，连续 7 天，能够在治疗后至少 8 周有效。

[0303] 重复实验以检测更长的时间点。对 III 型小鼠通过 ICV 输注，以 50μg/ 天给药 ISIS396443，连续 7 天。在为期 7 天的输注期结束后的 0、0.5、1、2、4、和 6 个月处死小鼠。从脊髓中收集 RNA，采用 northern 印迹进行分析。如下图所示，ISIS396443 输注的效应可以在输注后持续 6 个月，如图 2 所示。针对这种长效作用存在若干种可能的解释。其可能反映出 ISIS396443 的稳定性、修正后的 SMN 蛋白的稳定性和 / 或给药剂量足够高，使得化合物即使通过代谢而减少，其剩余剂量仍持续提供效果。因此，这些数据可以支持采用更低的给药剂量和给药频率。

[0304] 实施例 5- 通过连续脑室内 (ICV) 输注进行反义化合物给药

[0305] 采用微型渗透泵 (Azlet 渗透泵，Cupertino，CA，USA)，在带有人 SMN2 转基因的成年 III 型 Smn+/- 或 Smn-/-SMA 小鼠（台湾品系）中，将 ISIS396443 通过右侧脑室递送至脑脊液 (CSF) 中。剂量依赖性研究揭示，在脑室内 (ICV) 输注 ISIS396443 可以使脊髓中 SMN2 对外显子 7 的包含增至～ 90％，而经生理盐水治疗的小鼠为～ 10％。Western 印迹和免疫组化分析显示，脊髓运动神经元中人转基因 SMN 蛋白的水平表现出稳健的增加。这些结果提示，通过 CNS 输注给药反义寡核苷酸 ISIS396443，可以挽救 SMA 状态，因为对外显子 7 的排除与 SMA 的表型相关。

[0306] 实施例 6- 胚胎给药

[0307] 在妊娠第 15 天 (E15)，对胚胎台湾小鼠通过单次 ICV 注射 20μg 或 10μg 的 ISIS396443。在出生后第 7 天 (P7) 处死动物。从腰椎脊髓中分离 RNA，使用 RT-PCR 进行分析。单次胚胎给药 ISIS396443，得到大量的对外显子 7 的包含。这些结果提示，在子宫内使用反义寡核苷酸 ISIS396443 治疗，可以挽救 SMA 状态，因为对外显子 7 的排除与 SMA 的表型相关。

[0308] 重复上述实验并在第 11 周处死动物。未治疗的台湾小鼠出现坏死的尾部，其随时间的推移而变短。单次胚胎注射给药 20μg 的 ISIS396443，可以明显推迟尾部降解的发生，如图 3A 所示。这些结果提示，采用靶向作用于 SMN 的反义寡核苷酸进行胚胎治疗，能够推迟 SMA 发病。

[0309] 这些结果在另外一项研究中得到确证，其采用相同条件，但检测时采用的剂量为 20μg 和 10μg 的 ISIS396443，且该研究包括正常小鼠作为对照。实验结果见图 3B。

[0310] 实施例 7- 在 Δ-7 小鼠模型中进行的体内给药

[0311] 将杂合子 ($SMN^{+/-}$、$hSMN2^{+/+}$、$SMN\Delta7^{+/+}$) 繁育配子进行交配，并于出生当日 (P0) 对新生幼仔给药 ISIS396443(18-mer，SEQ ID NO.1)、ISIS396449(15-mer，SEQ ID NO.2)、ISIS387954(20-mer，SEQ ID NO.7) 或乱序对照 ASO(ISIS439273；18-mer)。通过双侧注射，向小鼠大脑外侧的脑室给药总共 8μg 的剂量（每个外侧脑室 4μg)。全部注射均使用已描述过的极细拉制玻璃微量吸管针进行 (Passini et al，J.Virol.(2001)75：12382-12392)。注射后，通过剪去幼仔的足趾和鉴定其基因型 (Le et al.，Hum.Mol.Genet.(2005)14：845-857)，以识别 SMA($SMN^{-/-}$、$hSMN2^{+/+}$、$SMN\Delta7^{+/+}$)、杂合子和野生型 ($SMN^{+/+}$、$hSMN2^{+/+}$、

SMN Δ $7^{+/+}$) 小鼠。将整窝淘汰至剩余 7 只幼仔，以控制存活窝的规模。某些窝未进行注射，以作为未治疗的对照组。

[0312] 在 SMA 小鼠中，在注射后 14 天检测到脊髓中广泛分布有 18-mer，包括脊髓的胸段、腰段和颈段。此外，采用 ChAT 进行的共定位研究确证了，在脊髓中 ISIS396443 靶向作用的大量细胞为运动神经元。在未经治疗的对照小鼠中未检测到该信号。

[0313] 在第 14 天进行 Western 印迹分析的结果显示，在脑和脊髓中 SMN 的量为野生型水平的 40-60％，而未经治疗的 SMA 对照为 10％。在给药乱序 ASO 的对照小鼠中，未检测到高于背景值的信号。Western 印迹的结果参见图 4。

[0314] 与未经治疗的 SMA 小鼠或给药乱序 ASO 的 SMA 小鼠相比，给药 SMA ASO 的 SMA 小鼠还表现出体重、移动功能（翻正反射和抓握力）和协调性（后肢张开）的显著增加，不管 ASO 的长度如何。与未经治疗的 SMA 小鼠相比，给药乱序 ASO 的 SMA 小鼠的体重、移动功能（翻正反射和抓握力）和协调性未出现显著增加。结果参见图 5 和图 6。

[0315] 重要的是，给药 ASO 的 SMA 小鼠，不管 ASO 的长度如何，其平均生存期显著增加，如图 7 所示。与未经治疗的 SMA 对照 (16.0 天）相比，自出生时起的生存期为 31.5(15-mer)、27.0(18-mer) 和 28.0(20-mer) 天。而与之相反的是，对 SMA 小鼠给药 18-mer 的乱序对照后，不能改善其生存期。这些结果表明，采用靶向作用于 SMN 的反义寡核苷酸进行治疗，可以延长患有 SMA 对象的寿命。

[0316] 如图 8 所示，SMA ASO 还可以增加脊髓中运动神经元细胞的计数。

[0317] 采用 RT-PCR 对 SMN RNA 进行检测。与未经治疗的 SMA 小鼠相比，给药 SMA ASO 的动物中 SMN RNA 水平增加。图 9 显示了给药 20-mer ASO 的小鼠与未经治疗 SMA 小鼠的比较结果。

[0318] 为确定给药第二个剂量是否能够进一步延长生存期，在第 21 天时以额外的 20 μ g 剂量重复上述实验。结果见图 10。上面的图显示第 0 天时第一个 8 μ g 剂量的作用。在 P21 天时，对一半的治疗小鼠进行第二次治疗。

[0319] 图 11 显示了第二次治疗的作用与仅接受第一次治疗小鼠的比较结果。该结果显示，使用反义寡核苷酸进行第二次 ICV 治疗能够进一步延长存活期。

[0320] 实施例 8- 在 SMAIII 型小鼠中的活性

[0321] 在 SMA 小鼠模型中，对两种反义化合物和一种对照化合物进行检测。化合物如下表所述。

[0322] 在台湾品系 SMA 小鼠中检测的化合物

[0323]

ISIS#	序列	描述	SEQ ID
396443	TCACTTTCATAATGCTGG	均一为 2'-MOE、全长 PS；18-mer；与人 SMN2 的内含子 7 互补	1
449220	ATTCACTTTCATAATGCTGG	均一为 2-OMe；全长 PS；20-mer；与人 SMN2 的内含子 7 互补	3
439272	TTAGTTTAATCACGCTCG	均一 2 为'-MOE；全长 PS；18-mer；对照序列	4

[0324] 台湾品系的 SMA III 型小鼠来自杰克逊实验室 (Bar Harbor, Maine)。这些小鼠缺乏小鼠 SMN，并且是人 SMN2 的纯合子 (mSMN-/- ;hSMN2+/+)。对这些小鼠的描述参见 Hsieh-Li HM, et al., Nature Genet. 24, 66-702000。

[0325] 每天对小鼠给药 3、10、30、或 100 μg 的 ISIS396443 或 ISIS449220，或每天给药 30 或 100 μg 对照化合物 ISIS439272，溶于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中。对照小鼠仅给药 PBS(剂量为 0)。全部治疗药物均采用 Azlet 1007D 渗透泵进行脑室内 (ICV) 输注给药。各剂量均设置 5 只动物，但是，ISIS449220 的最高剂量组中有两只小鼠在研究完成前死亡。在第 9 天处死动物 (末次给药后两天)，收集各只动物的脑和脊髓腰段。对各样品进行实时 PCR 检测，以确定包含外显子 7((+) 外显子 7) 的人 SMN2 的量，和缺乏外显子 7((-) 外显子 7) 的人 SMN2 的量。同时还通过实时 PCR 检测，确定同种异体移植物炎症因子 (AIF1) 和甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (GADPH) 的表达水平。

[0326] 利用 GADPH 水平对 (+) 外显子 7 和 (-) 外显子 7 的表达水平进行归一化处理。随后用这些归一化的表达水平除以给药 PBS 的对照小鼠经 GADPH 归一化的水平。在下表 17 中报告了得到的对照值的倍数。数据表示为各组中全部五只小鼠的对照值倍数的平均值，但 ISIS449220 最高剂量组除外，其表示 3 只存活小鼠的值。

[0327] ISIS396443 给药导致外显子 7 的包含显著增加。在 10 μg/ 天剂量下，ISIS396443 使得在脑内保留了外显子 7 的 SMN2 几乎是未经治疗的对照的 2 倍 (1.8 倍)，在脊髓腰段为高于 2 倍。

[0328] 在 SMA 小鼠中反义化合物改变剪接的能力

[0329]

化合物	剂量 (μg/天)	脑		腰髓	
		(+) 外显子 7	(-) 外显子 7	(+) 外显子 7	(-) 外显子 7
396443 (2'-MOE)	0	1.0	1.0	1.0	1.0
	3	1.3	1.0	1.4	1.0
	10	1.8	0.7	2.1	0.6
	30	2.4	0.6	3.4	0.3
	100	3.0	0.3	3.8	0.1
449220 (2'-OMe)	0	1.0	1.0	1.0	1.0
	3	0.9	1.1	1.0	1.1
	10	1.0	1.1	1.0	1.2
	30	1.0	1.2	1.1	1.2
	100*	1.0	1.0	1.2	1.1
439272 对照	0	1.0	1.0	1.0	1.0
	30	1.0	1.1	0.9	1.1
	100	1.0	1.0	1.0	1.0

[0330] * 该剂量下的数据仅来自 3 只小鼠

[0331] 将同种异体移植物炎症因子 (AIF1) 的表达量作为炎症指标进行检测。将所有样品以 (GADPH) 归一化后，用各治疗组的 AIF1 比率除以 PBS 对照的值。即使在最高剂量水平，ISIS396443 也未使 AIF1 增加。ISIS449220 使脑和腰段脊髓的 AIF1 增加。表 18 中的

数据表示各组全部五只小鼠的对照值倍数的平均值，但 ISIS449220 最高剂量组除外，其表示 3 只存活小鼠的值。

[0332] 在 SMA 小鼠中反义化合物的毒性

[0333]

化合物	剂量（μg/天）	AIF-1/GAPDH	
		脑	腰段
396443（2'-MOE）	0	1.0	1.0
	3	10	1.0
	10	1.1	1.2
	30	1.0	1.0
	100	0.9	1.0
449220（2'-OMe）	0	1.0	1.0
	3	1.0	1.0
	10	1.0	1.8
	30	1.2	2.9
	100*	1.8	3.3
439272 对照	0	0.9	0.9
	30	0.9	1.0
	100	0.9	1.2

[0334] * 该剂量下的数据仅来自 3 只小鼠

[0335] 实施例 9- 对猴给药

[0336] 使用短尾猴评估 ISIS395443 在不同剂量和给药途径下的分布。对 2 只猴给药 ISIS395443。通过 ICV 输注对一只猴给药 3mg 的剂量，通过 IT 输注对另外一只猴给药 3mg 的剂量。两次输注的递送时间均为 24 小时。在输注期结束 96 小时后，处死猴并收集其组织。检测脊髓颈段、胸段和腰段样品中 ISIS396443 的浓度。结果汇总于下表。

[0337]

动物#	剂量	给药途径	组织	ISIS396443 的浓度（μg/g）
1	24 小时给药 3 mg	ICV 输注	颈段	21.5
			胸段	9.4
			腰段	23.9
2	24 小时给药	IT 输注	颈段	12.5

[0338]

	3 mg		胸段	22.6
			腰段	42.6

[0339] 由于短尾猴约为 3kg，因此该给药剂量约为 1mg/kg。

[0340] 为进一步评估 ISIS39644 的分布，将二十六只猴如下表所示分为六组。

[0341]

分组	剂量	给药途径	化合物的浓度（mg/ml）	输注持续时间	处死日期	猴数量
1	0	ICV	0	14 天	第 19 天	2M/2F
2	3 mg	ICV	0.09	14 天	第 19 天	2M/2F
3	3 mg	IT	1.25	1 天	第 6 天	3M/2F
4	3 mg	IT	0.42	3 天	第 8 天	2M/2F
5	3 mg	IT	0.18	7 天	第 12 天	3M/2F
6	3 mg	IT	0.09	14 天	第 19 天	2M/2F

[0342] 各组的输注速率均为 100 μ L/ 小时。所有猴均接受溶于生理盐水的总剂量为 3mg 的 ISIS39644，但第 1 组除外，其仅使用生理盐水。输注结束后 5 天处死猴并收集组织。

[0343] 采用标准技术评估猴组织样本中 ISIS39644 的浓度。结果汇总于图 12 的图表中。还采用组织学方法对样本进行评估。组织学检测并未显示出治疗存在任何不良反应，且确证了 ISIS396443 的存在。没有证据显示 Purkinje 细胞减少。

[0344] 与慢速输注相比，快速输注似乎具有更多的 ISIS396443。这些结果提示，在某些实施方式中可以优选更快的输注速率或推注注射。由于推注给药与输注相比具有某些实际的优点，因此在某些实施方式中优选通过该方法给药至 CSF。在某些实施方式中，给药至 CSF 的优选方法为通过推注 IT 注射。

[0345] 实施例 10- 严重 SMA 小鼠模型的产生和 ICV 治疗

[0346] 已产生出具有严重 SMA 表型（sSMA 小鼠）的小鼠。纯合性 sSMA 小鼠携带 2 个拷贝的人 SMN2 且无小鼠 SMN。其平均寿命约为 10 天。此外，SMA 小鼠更小，且具有更短的尾部。杂合子携带小鼠 SMN 且发育正常。

[0347] 为研究在这些 sSMA 小鼠中反义化合物的效应，在 P1 天通过 ICV 注射给药 20 μ g 的 ISIS396443。治疗使得平均生存期由 9.9 天（给药生理盐水的对照）增至 16.7 天。RT-PCR 分析结果显示，在治疗组小鼠的组织中，全长 SMN RNA 的量增加。

[0348] 实施例 11-ISIS 396443 全身给药

[0349] 将 sSMA 小鼠和健康杂合对照小鼠按照如下方式分组，以研究通过推注 ICV 注射和 / 或推注皮下注射 (SC) 时，ISIS396443 的效应 ：

[0350] 第 1 组 -ICV+SC

[0351] 在 P1 或 P2（出生后第 1 天或第 2 天）进行一次 20 μ g 的 ICV 注射 ；在 P0 和 P3 之间递送两次 50 μ g/g 的皮下注射。

[0352] 第 2 组 -SC+SC

[0353] 在 P0 和 P3 之间递送两次 50 μ g/g 的 SC 注射 ；在 P5 和 P6 之间递送一次 50 μ g/g 的皮下注射 ；在 P9 和 P10 之间递送一次 50 μ g/g 的皮下注射。

[0354] 第 3 组 -SC

[0355] 在 P0 和 P3 之间递送两次 50 μ g/g 的 SC 注射。

[0356] 第 4 组 -SMA 生理盐水对照

[0357] 在 P1 或 P2 进行一次生理盐水的 ICV 注射 ；在 P0 和 P3 之间递送两次生理盐水皮下注射。

[0358] 第 5 组 - 杂合子对照

[0359] 在 P1 或 P2 进行一次 20μg 的 ICV 注射；在杂合小鼠的 P0 和 P3 之间递送两次 50μg/g 的皮下注射。

[0360] 各组均包含 14 至 22 只小鼠。各组中各只小鼠的存活期（以天计）参见下表。在撰写本专利申请时，本研究中的很多小鼠仍然存活。因此，以“>”表示的值是指已经存活了这些天数且仍存活的小鼠。

[0361]

小鼠	第 1 组 ICV+SC	第 2 组 SC+SC	第 3 组 SC	第 4 组 生理盐水	第 5 组 Het

[0362]

1	> 141	> 130	> 103	8	> 146
2	> 141	127	94	8	> 146
3	22	> 114	61	8	> 146
4	> 140	73	> 103	8	> 146
5	117	27	> 103	8	> 145
6	> 124	27	> 103	8	> 145
7	> 111	18	34	8	> 145
8	> 111	> 102	26	8	> 145
9	> 111	>98	31	8	> 145
10	> 111	> 98	69	9	> 144
11	29	> 102	69	9	> 144
12	> 110	> 102	67	9	> 144
13	> 110	> 102	> 91	9	> 144
14	> 110	> 102	> 90	9	> 143
15	> 110	ND	> 90	9	> 143
16	> 108	ND	> 90	9	> 143
17	> 108	ND	> 90	10	> 129
18	> 109	ND	86	10	> 129
19	18	ND	> 75	10	> 129
20	ND	ND	69	10	ND
21	ND	ND	18	11	ND
22	ND	ND	> 71	12	ND
23	ND	ND	ND	12	ND
24	ND	ND	ND	13	ND
25	ND	ND	ND	13	ND
26	ND	ND	ND	14	ND

[0363] 实施例 12-SC 给药的剂量应答

[0364] 通过下述给药组，评估 sSMA 小鼠在接受不同剂量皮下给药 ISIS396443 时的存活期。

[0365] 第 1 组 -SC400（剂量范围为 80mg/kg 至 180mg/kg）

[0366] 在 P0 至 P3 之间通过两次 SC 注射向每只小鼠递送总剂量 400μg，第一个剂量是在 P0 或 P1 时的 150μg（体积为 3μl），第二个剂量是在 P2 或 P3 时递送的 250μg（体积为

5μl)。

[0367] 第2组-SC200(剂量范围为40mg/kg至90mg/kg)

[0368] 在P0至P3之间通过两次SC注射向每只小鼠递送200μg的总剂量,第一个剂量在P0-P1时的75μg(体积为1.5μl),第二个剂量是在P2或P3时递送的125μg(体积为2.5μl)。

[0369] 第3组-SC100(剂量范围为20mg/kg至45mg/kg)

[0370] 在P0至P3之间通过两次SC注射向每只小鼠递送100μg的总剂量,第一个剂量是在P0或P1时的40μg(体积为2μl),第二个剂量是在P2或P3时递送的60μg(体积为3μl)。

[0371] 第4组-SMA生理盐水(阴性对照)

[0372] 在P0和P3之间通过两次SC注射生理盐水,第一个剂量是在P0或P1(体积为5μl),第二个剂量在P2或P3时递送(体积为5μl)。

[0373] 第5组-杂合子对照(阳性对照)

[0374] 未接受任何治疗的小鼠。

[0375] 各组均包含14至26只小鼠。各组中各只小鼠的存活期(以天计)参见下表。在撰写本专利申请时,本研究中的很多小鼠仍然存活。因此,以“>”表示的值是指已经存活了这些天数且仍存活的小鼠。

[0376]

小鼠	第1组 SC400	第2组 SC200	第3组 SC100	第4组 生理盐水	第5组 Het
1	> 82	>93	11	8	> 87
2	> 82	>91	11	8	> 87
3	> 82	>91	11	9	> 87
4	> 82	> 91	11	9	> 87
5	> 82	14	11	9	> 87
6	> 82	25	12	9	> 87
7	> 82	92	18	9	> 86
8	> 82	>93	19	9	> 86
9	> 82	>93	22	9	> 86
10	> 82	> 90	69	9	> 86
11	> 82	> 90	> 77	9	> 86
12	> 80	> 91	> 77	10	> 86
13	> 80	> 91	> 77	10	> 86
14	25	> 90	> 77	10	> 86

[0377]

15	ND	> 90	> 75	10	> 85
16	ND	> 90	> 74	11	> 85
17	ND	86	> 74	11	> 85
18	ND	> 90	> 74	12	ND
19	ND	> 52	> 74	12	ND
20	ND	ND	> 74	13	ND
21	ND	ND	> 74	13	ND
22	ND	ND	>71	13	ND
23	ND	ND	>49	13	ND
24	ND	ND	>49	14	ND
25	ND	ND	>49	15	ND
26	ND	ND	23	ND	ND

[0378] 实施例 13-ICV 输注对比 ICV 推注

[0379] 比较了对脑室内推注注射（ICV 推注）给药与连续脑室内输注（ICV 输注）给药。对 III 型 SMA 转基因小鼠给药 ISIS387954。对 ICV 输注小鼠给药，总剂量为 0(PBS 对照)、87.5 μg、175 μg、350 μg、或 700 μg，输注 7 天，并于 2 天后处死动物。通过单次 ICV 注射，对 ICV 推注小鼠给药相同的总剂量，0(PBS 对照)、87.5 μg、175 μg、350 μg、或 700 μg，并于 9 天后处死动物。各组均有 5 只小鼠。收集腰段脊髓的 RNA，并采用实时 PCR 进行分析。使用生理盐水对照对内含子 7 的包含进行归一化处理。结果汇总于下表。

[0380]

分组	剂量	与 PBS 相比，内含子 7 的包含的增加倍数
1	PBS（对照）	1.0
2	87.5 μg， ICV 输注 7 天	2.1
3	175 μg， ICV 输注 7 天	2.4
4	350 μg，ICV 输注 7 天	3.2
5	700 μg，ICV 输注 7 天	3.6
6	PBS（对照）	1.0
7	87.5 μg，ICV 推注	3.1

[0381]

8	175 μg， ICV 推注	3.7
9	350 μg，ICV 推注	3.8
10	700 μg，ICV 推注	3.8

[0382] 在此项实验中，与 ICV 输注 7 天进行的递送相比，通过 ICV 推注递送相同的剂量可获得更高的活性。

[0383] 还通过实时 PCR 检测，确定同种异体移植物炎症因子 (AIF1) 的表达水平，以便对炎症进行评估。经治疗小鼠的样本与对照小鼠的样本相比，均不存在显著差异。

[0384] 实施例 14-ICV 推注的剂量应答

[0385] 在附加剂量下对脑室内推注给药进行检测。通过单次推注 ICV 注射，对转基因小鼠给药 0、10.9μg、21.9μg、43.4μg、87.5μg、或 175μg 的 ISIS387954，并在 9 天后处死小鼠，如实施例 13 所述。收集脑和腰段脊髓样本。制备 RNA 并采用 RT-PCR，分析内含子 7 的包含的变化和 AIF1 的变化。与对照相比，没有样本显示出 AIF1 改变。内含子 7 的包含的结果汇总于下表。ED50 在 22μg 左右。

[0386]

分组	剂量	与 PBS 相比，内含子 7 的包含的增加倍数	
		脑	腰段脊髓
1	PBS（对照）	1.0	1.0
2	ICV 推注 10.9 μg	2.4	2.2
3	ICV 推注 21.9 μg	2.8	2.7
4	ICV 推注 43.4 μg	3.2	3.4
5	ICV 推注 87.5 μg	3.5	3.4
6	ICV 推注 175 μg	4.4	3.7

[0001]

20100617_CORE0086WOSEQ.txt

序列表

<110> ISIS制药公司
健赞公司
冷泉港实验室
C. Frank Bennett
Gene Hung
Frank Rigo
Adrian R. Krainer
Yimin Hua
Marco Passini
Lamya Shihabuddin
Seng H. Cheng
Katherine W. Klinger

<120> 用于在对象中调节SMN2剪接的组合物和方法

<130> CORE0086WO

<150> 61/218,031
<151> 2009-06-17

<160> 24

<170> 供Windows使用的FastSEQ 4.0版

<210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 1
tcactttcat aatgctgg 18

<210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 2
tttcataatg ctggc 15

<210> 3
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 3
tgctggcaga cttac 15

<210> 4
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 4
cataatgctg gcaga 15

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

[0002]

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 5
tcataatgct ggcag 15

<210> 6
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 6
ttcataatgc tggca 15

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 7
attcactttc ataatgctgg 20

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 8
ctttcataat gctgg 15

<210> 9
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 9
tcataatgct gg 12

<210> 10
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 10
actttcataa tgctg 15

<210> 11
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 11
ttcataatgc tg 12

<210> 12
<211> 15

[0003]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 12
cactttcata atgct 15

<210> 13
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 13
tttcataatg ct 12

<210> 14
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 14
tcactttcat aatgc 15

<210> 15
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 15
ctttcataat gc 12

<210> 16
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 16
ttcactttca taatg 15

<210> 17
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 17
actttcataa tg 12

<210> 18
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 18
attcactttc ataat 15

[0004]

<210> 19
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 19
cactttcata at 12

<210> 20
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 20
gattcacttt cataa 15

<210> 21
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 21
tcactttcat aa 12

<210> 22
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 22
ttcactttca ta 12

<210> 23
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 23
attcactttc at 12

<210> 24
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 24
agtaagattc actttt 15

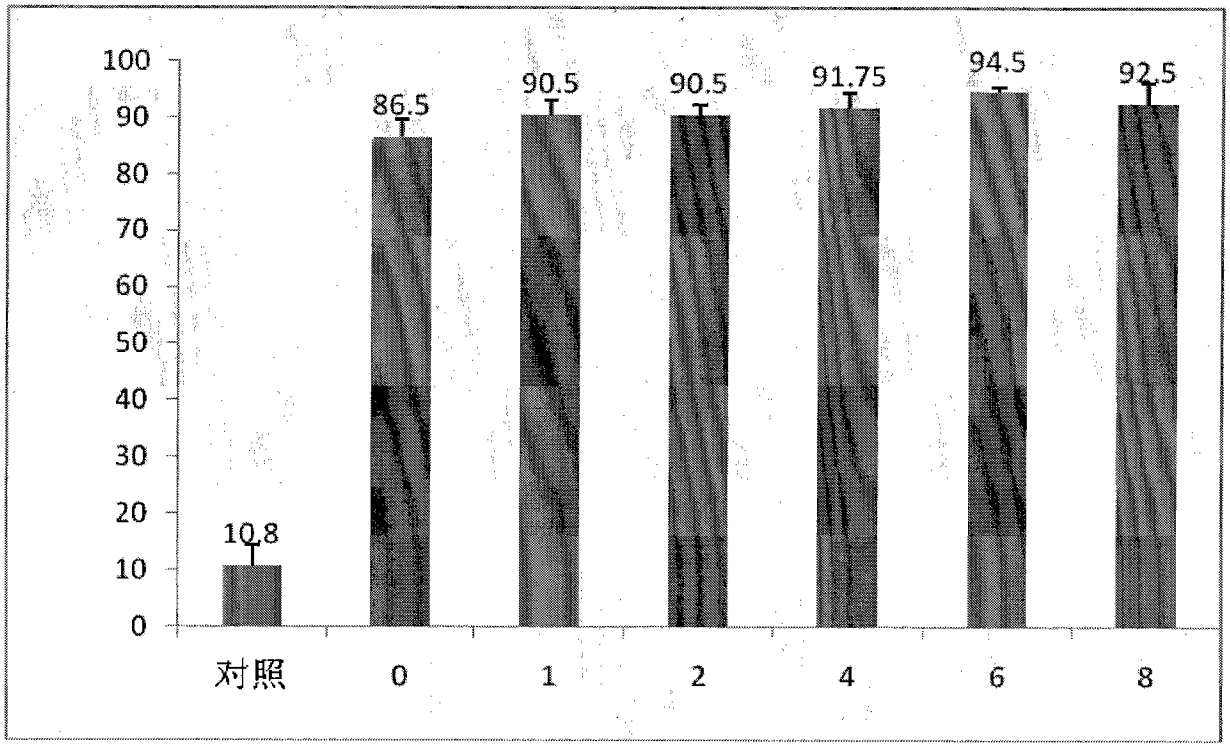

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10.8
86.5
90.5
90.5
91.75
94.5
92.5
对照
0
1
2
4
6
8

图 1

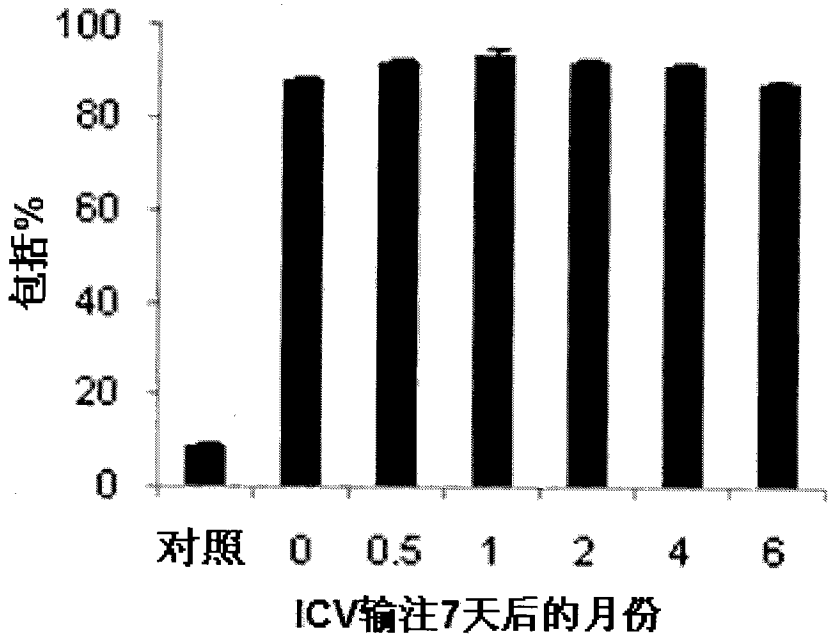
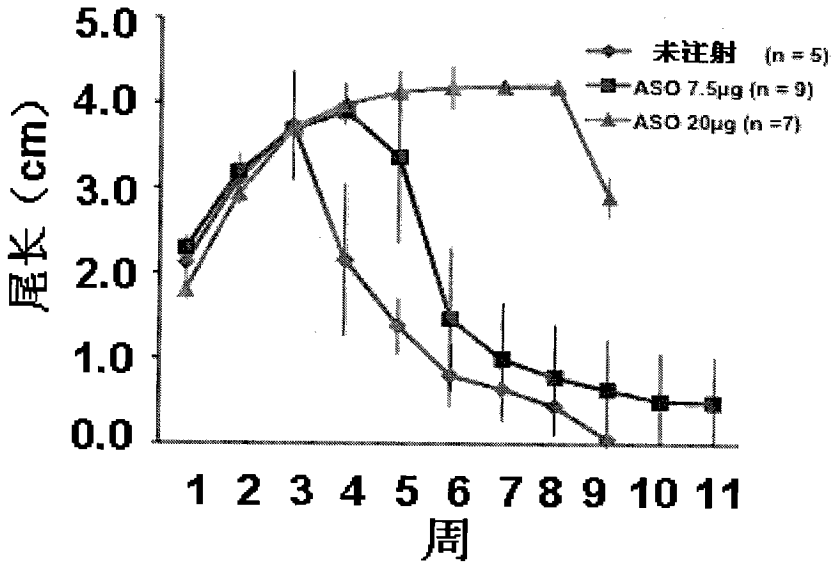

100
80
60
40
20
0
包括%
对照
0
0.5
1
2
4
6
ICV输注7天后的月份

图 2

A


5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
尾长（cm）
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
周
未注射 (n = 5)
ASO 7.5μg (n = 9)
ASO 20μg (n =7)

B

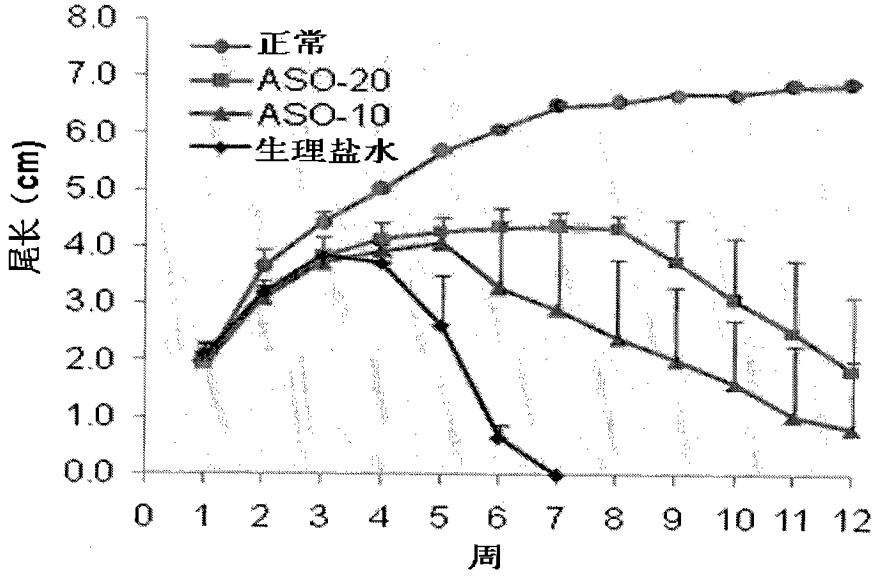

8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
尾长 (cm)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
周
正常
ASO-20
ASO-10
生理盐水

图 3

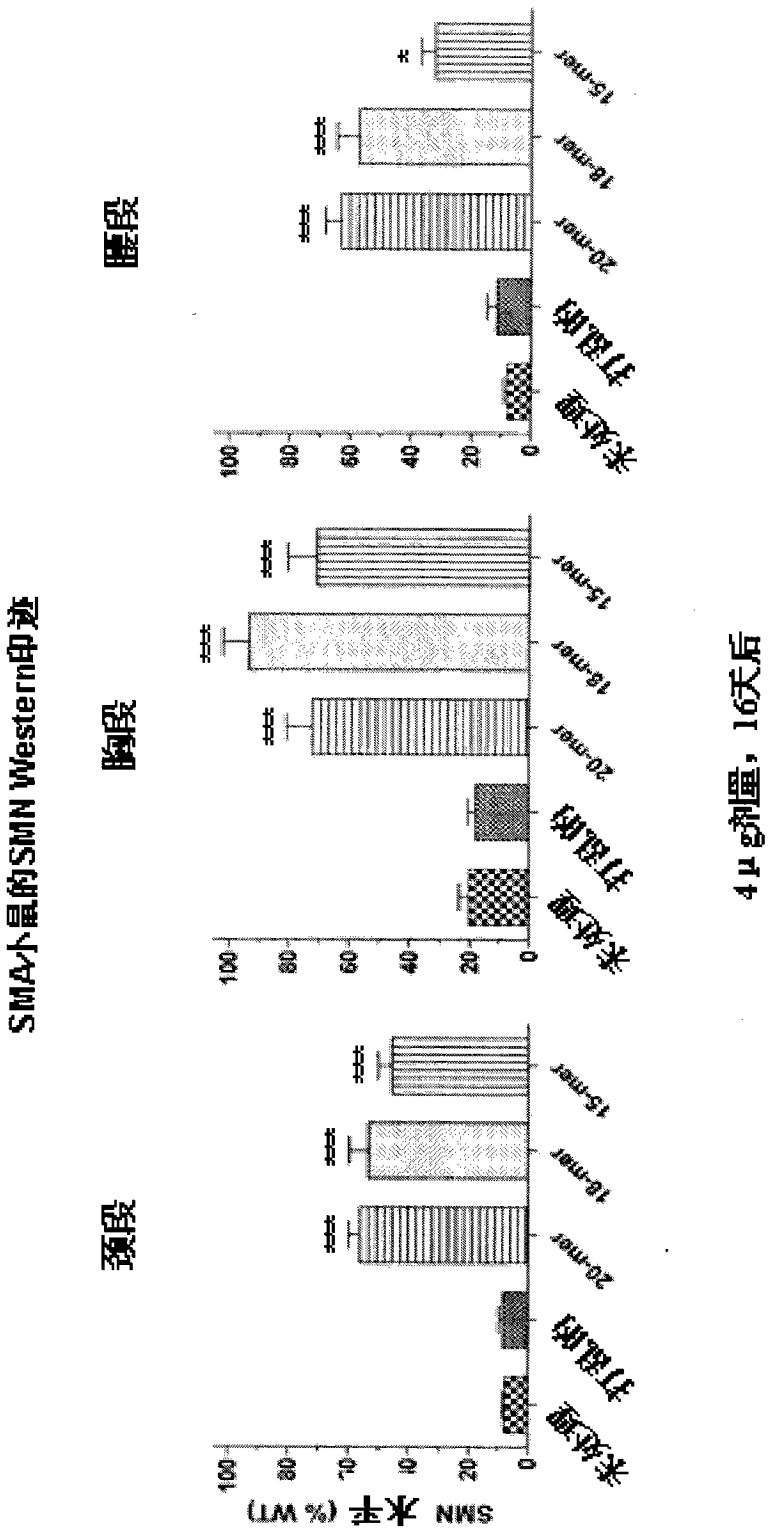

SMA小鼠的SMN Western印迹
颈段
胸段
腰段
SMN 水平 (% WT)
未处理
打孔的
20-mer
18-mer
15-mer
4 μg剂量，16天后

图 4

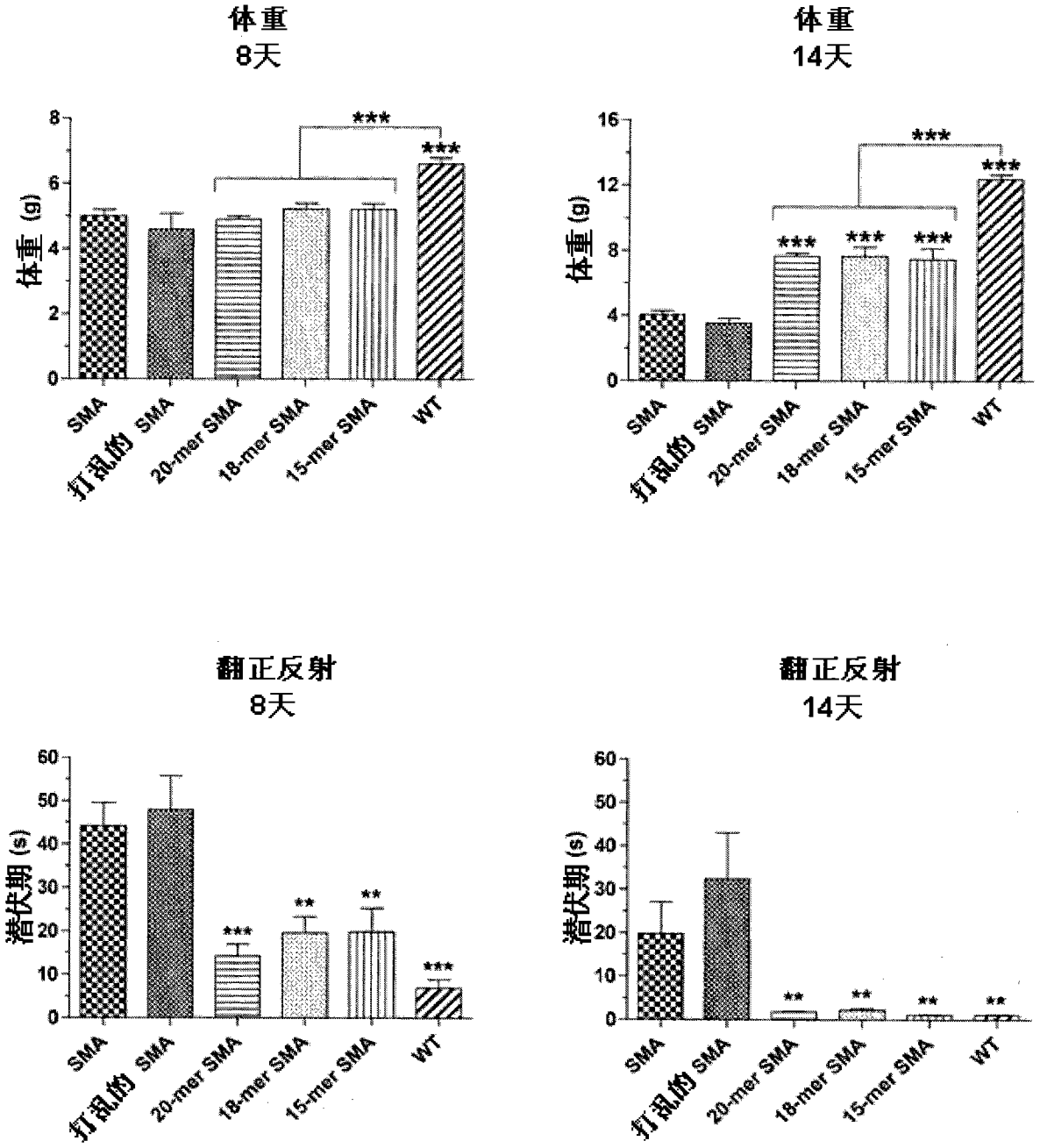

体重
8天
体重 (g)
***
***
SMA
打乱的 SMA
20-mer SMA
18-mer SMA
15-mer SMA
WT
体重
14天
体重 (g)
***
***
***
***
***
翻正反射
8天
潜伏期 (s)
***
**
**
***
翻正反射
14天
潜伏期 (s)
**
**
**
**

图 5

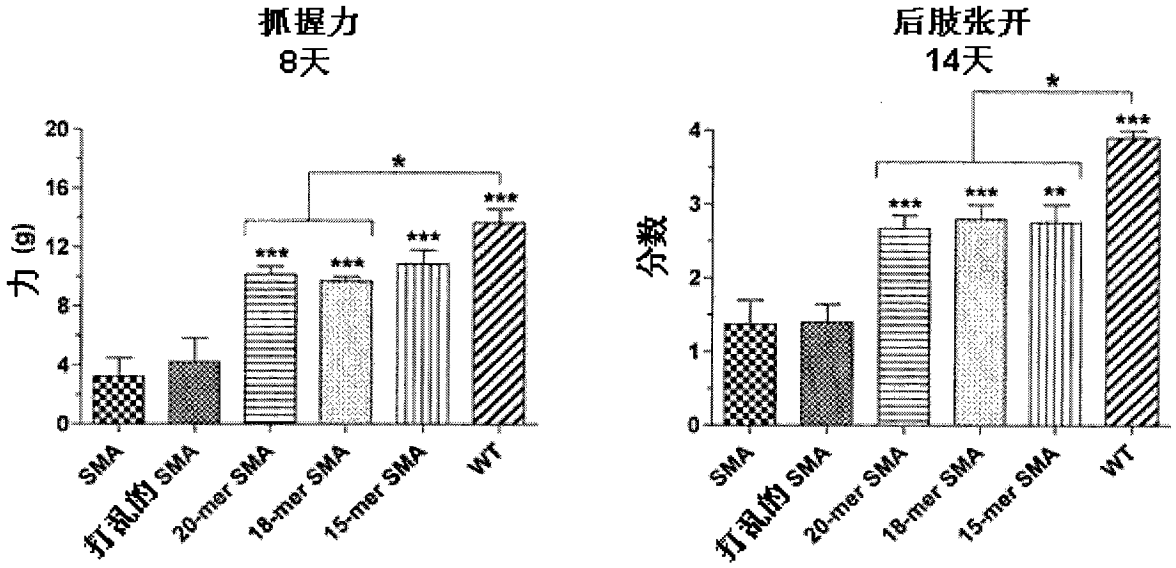

抓握力
8天
力 (g)
20
16
12
8
4
0
*
***
***
***
***
SMA
打乱的 SMA
20-mer SMA
18-mer SMA
15-mer SMA
WT
后肢张开
14天
分数
4
3
2
1
0
*
***
***
***
**
***
SMA
打乱的 SMA
20-mer SMA
18-mer SMA
15-mer SMA
WT

图 6

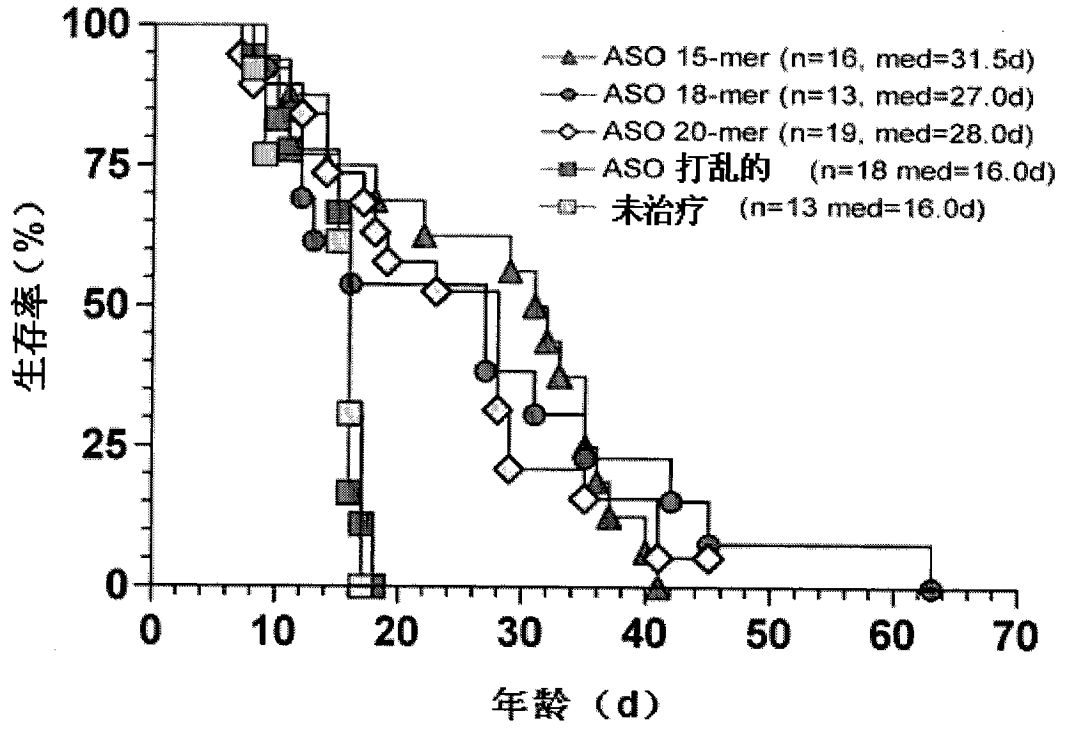

100
75
50
25
0
生存率（%）
0
10
20
30
40
50
60
70
年龄（d）
ASO 15-mer (n=16, med=31.5d)
ASO 18-mer (n=13, med=27.0d)
ASO 20-mer (n=19, med=28.0d)
ASO 打乱的 (n=18 med=16.0d)
未治疗 (n=13 med=16.0d)

图 7

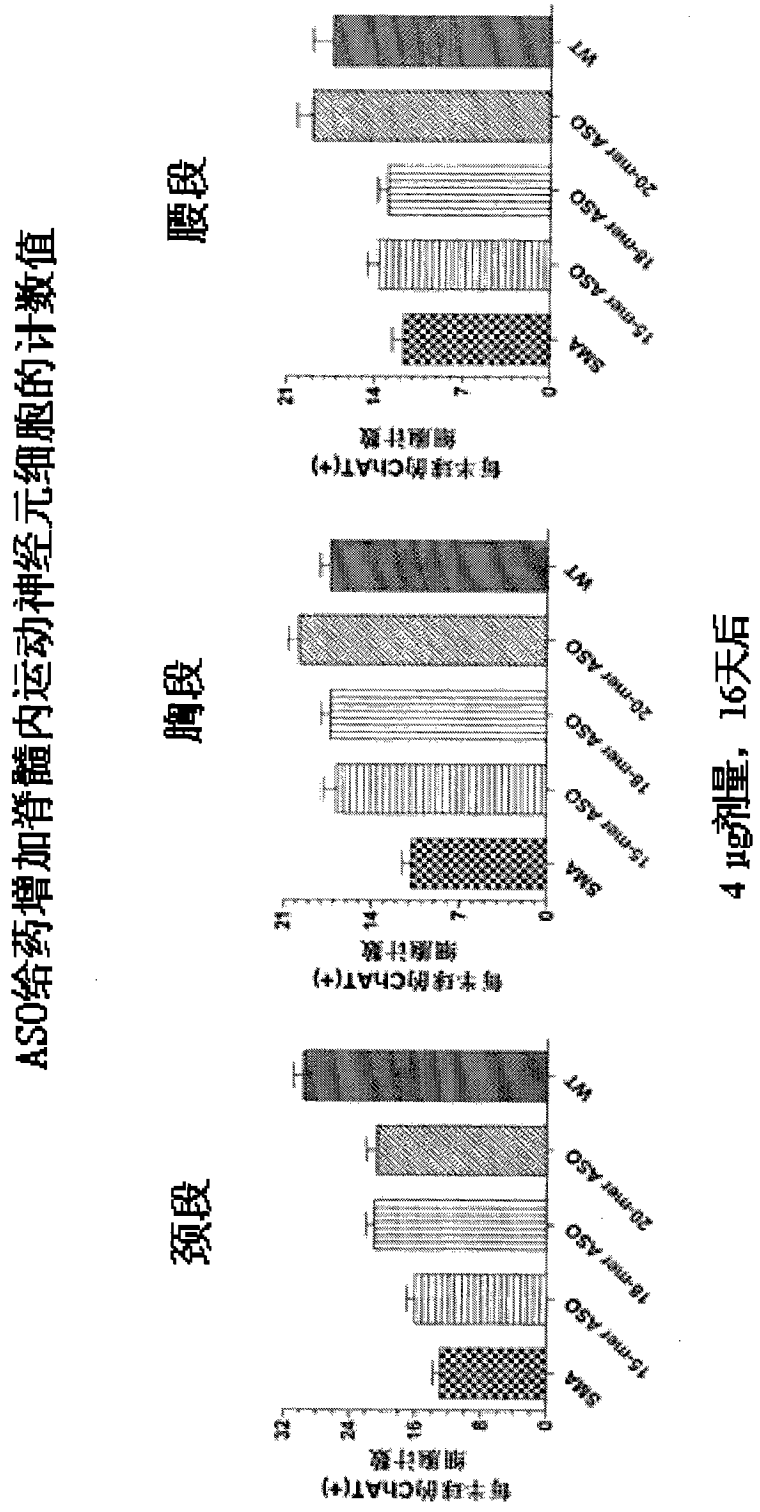

ASO给药增加脊髓内运动神经元细胞的计数值
腰段
胸段
颈段
每半球的ChAT(+)细胞计数
SMA
15-mer ASO
18-mer ASO
20-mer ASO
WT
4 μg剂量，16天后

图 8

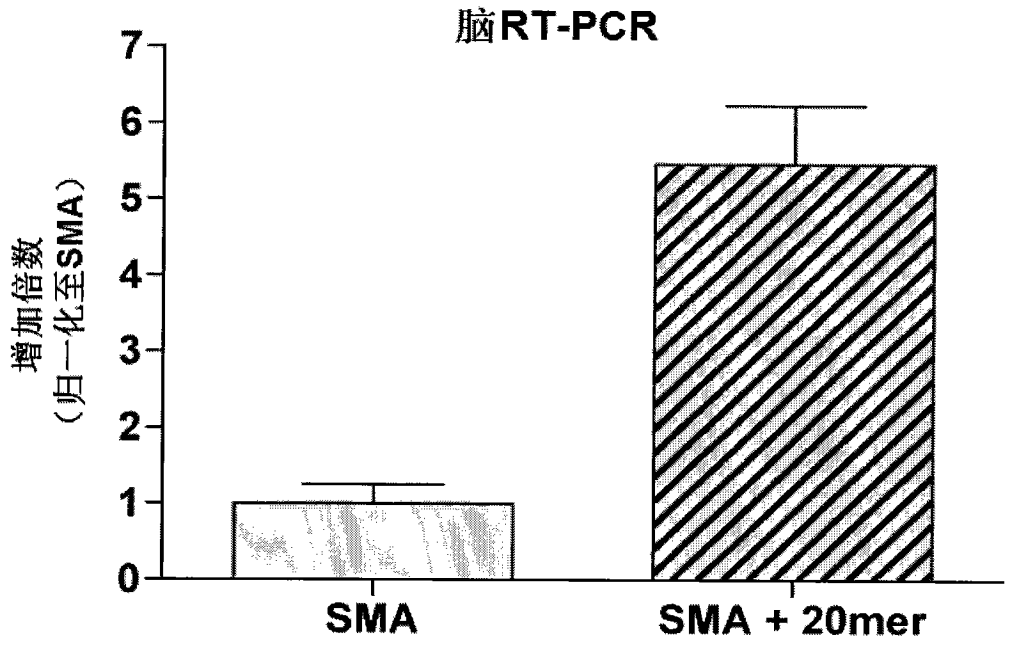

脑RT-PCR
增加倍数
（归一化至SMA）
7
6
5
4
3
2
1
0
SMA
SMA + 20mer

图 9

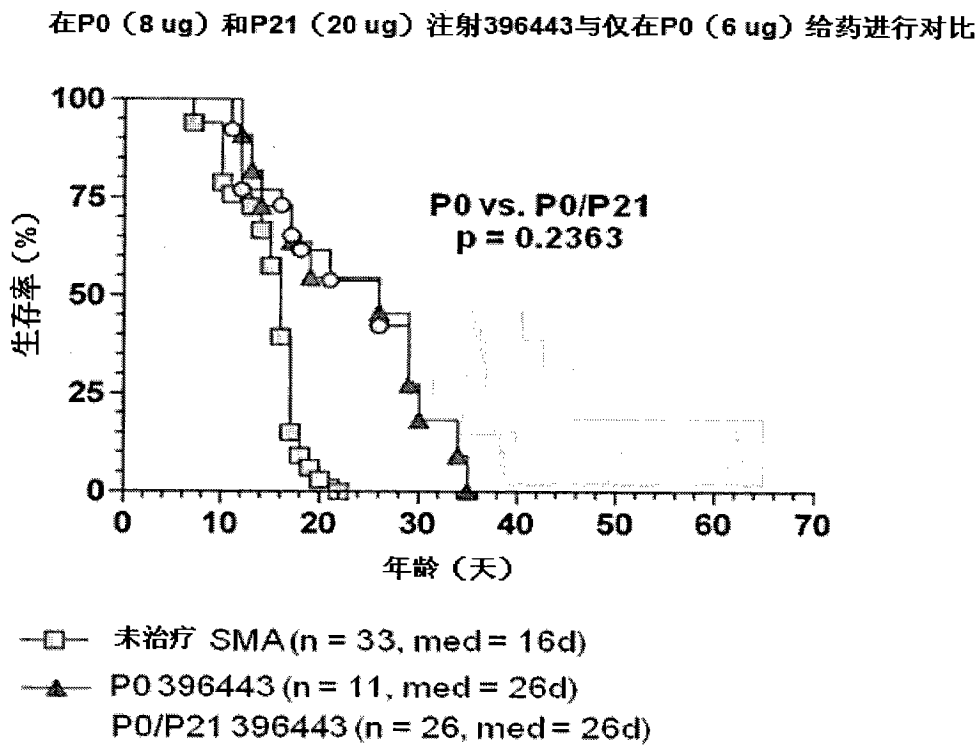

在P0（8 ug）和P21（20 ug）注射396443与仅在P0（6 ug）给药进行对比
100
75
50
25
0
生存率（%）
P0 vs. P0/P21
p = 0.2363
0
10
20
30
40
50
60
70
年龄（天）
未治疗 SMA (n = 33, med = 16d)
P0 396443 (n = 11, med = 26d)
P0/P21 396443 (n = 26, med = 26d)

图 10

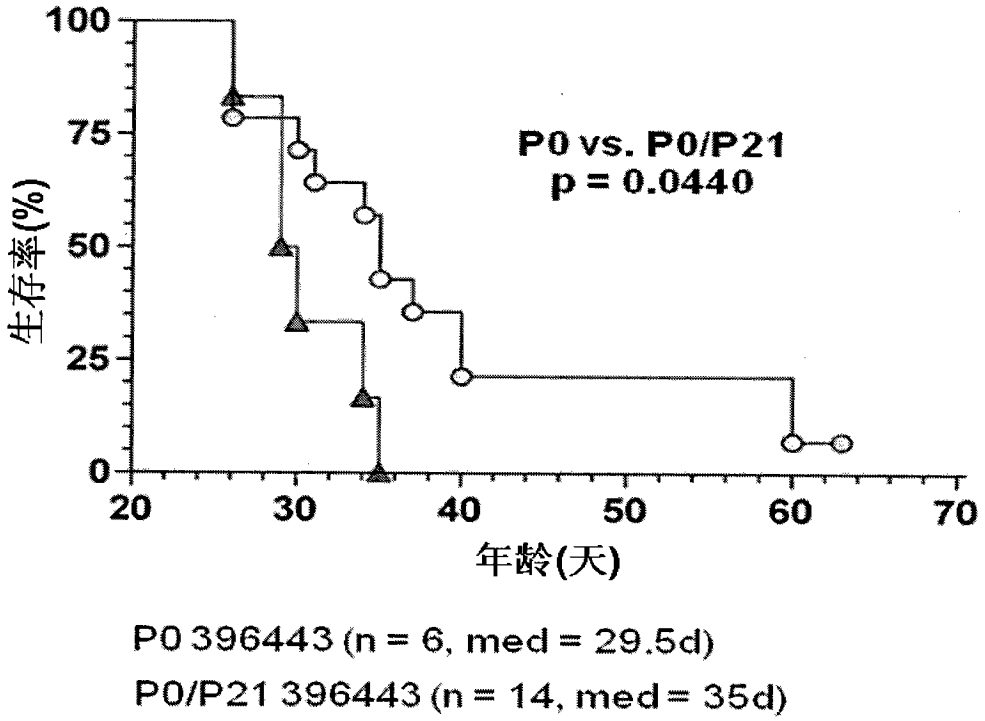

100
75
50
25
0
生存率(%)
20
30
40
50
60
70
年龄(天)
P0 vs. P0/P21
p = 0.0440
P0 396443 (n = 6, med = 29.5d)
P0/P21 396443 (n = 14, med = 35d)

图 11

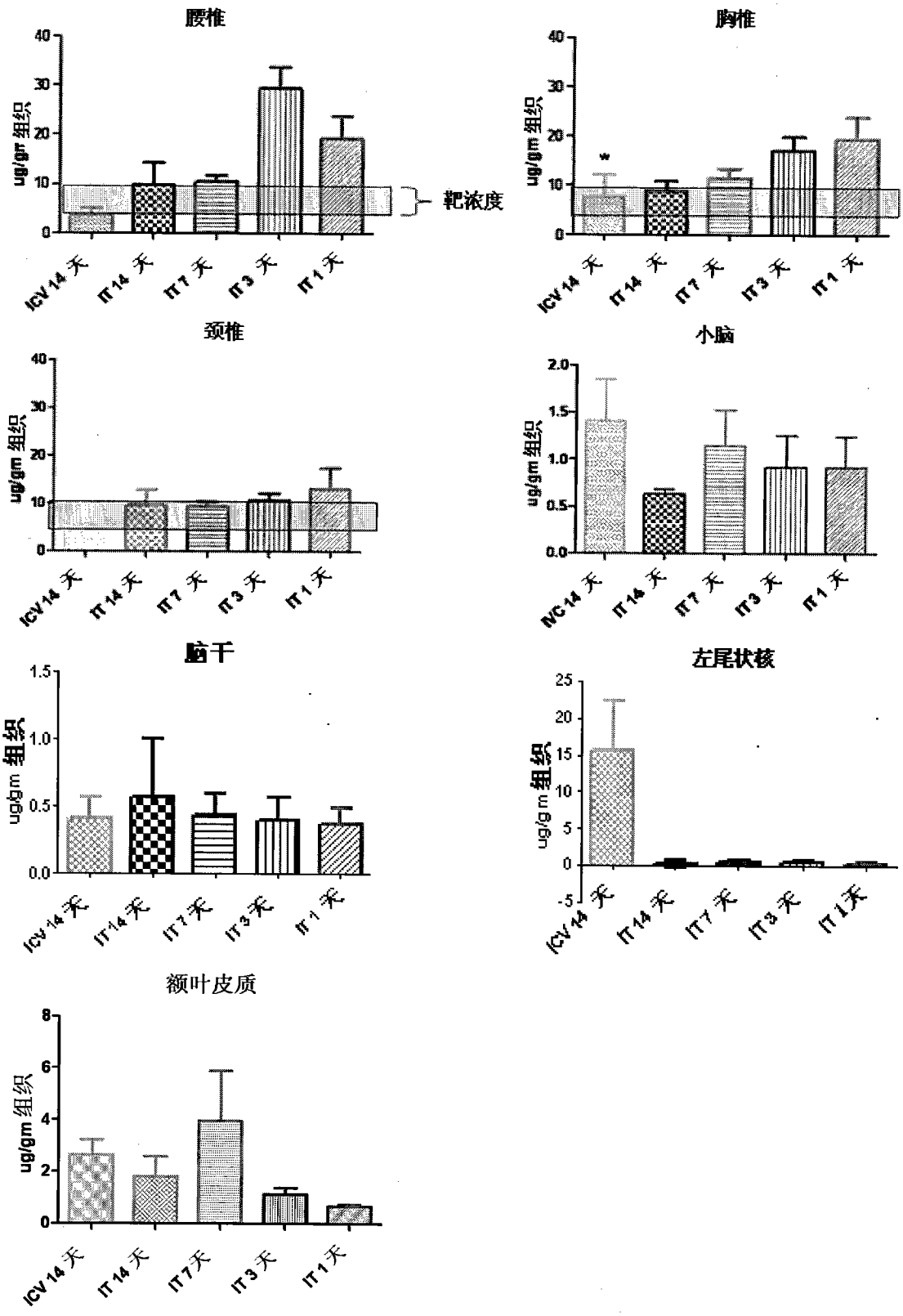

腰椎
ug/gm 组织
靶浓度
ICV 14 天
IT 14 天
IT 7 天
IT 3 天
IT 1 天
胸椎
ug/gm 组织
*
ICV 14 天
IT 14 天
IT 7 天
IT 3 天
IT 1 天
颈椎
ug/gm 组织
ICV 14 天
IT 14 天
IT 7 天
IT 3 天
IT 1 天
小脑
ug/gm 组织
NC 14 天
IT 14 天
IT 7 天
IT 3 天
IT 1 天
脑干
ug/gm 组织
ICV 14 天
IT 14 天
IT 7 天
IT 3 天
IT 1 天
左尾状核
ug/gm 组织
ICV 14 天
IT 14 天
IT 7 天
IT 3 天
IT 1 天
额叶皮质
ug/gm 组织
ICV 14 天
IT 14 天
IT 7 天
IT 3 天
IT 1 天

图 12

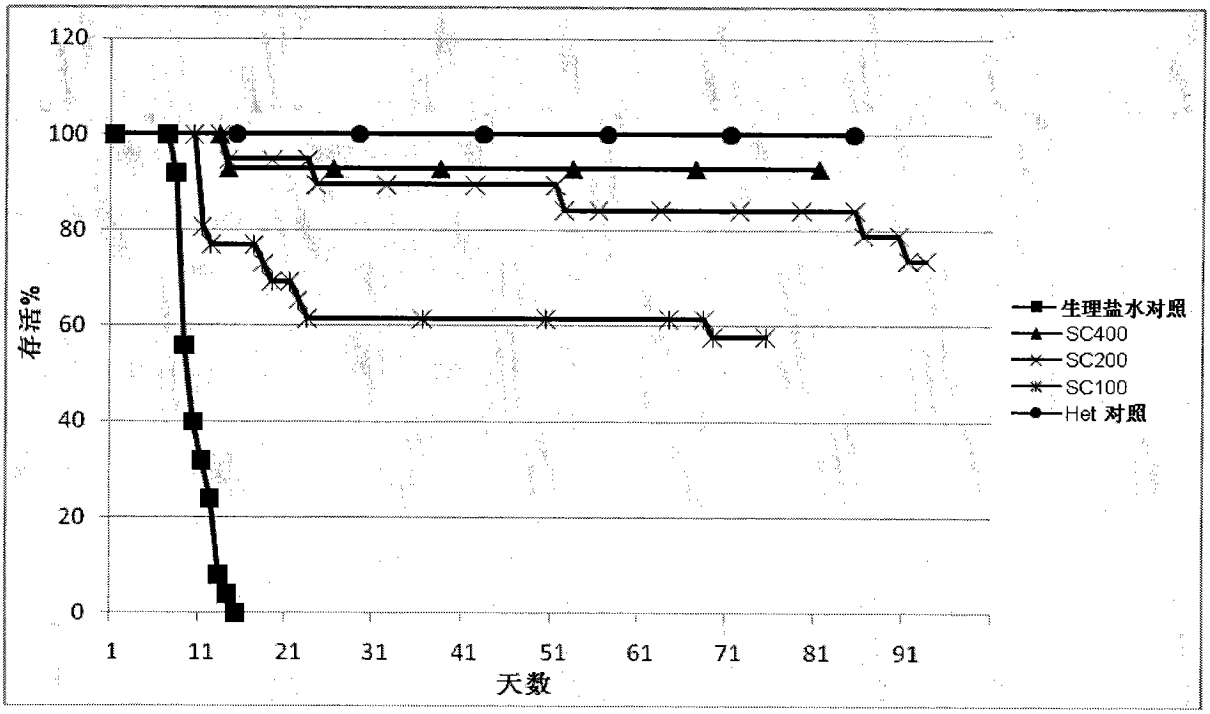

120
100
80
60
40
20
0
存活%
1
11
21
31
41
51
61
71
81
91
天数
生理盐水对照
SC400
SC200
SC100
Het 对照

图 13