



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117980479 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 03

(21) 申请号 202280057124.6

(22) 申请日 2022.06.21

(30) 优先权数据

63/212,981 2021.06.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/034344 2022.06.21

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/271699 EN 2022.12.29

(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

安娜·科里奥内罗·赛斯

雅各布·艾伯特·卡赫

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 徐爱文 武晶晶

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

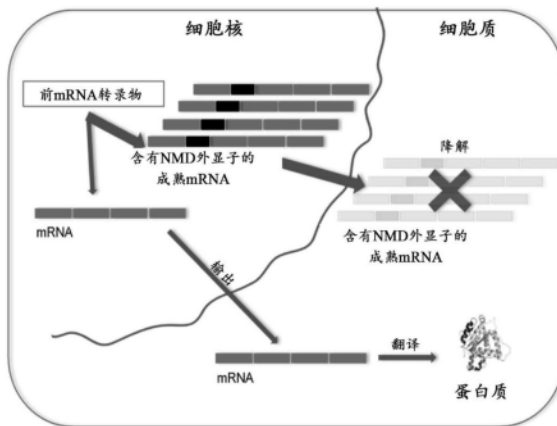
权利要求书6页 说明书55页 附图25页

## (54) 发明名称

用于治疗基于无义介导的RNA衰变的病状和疾病的反义寡聚体

## (57) 摘要

基因中的选择性剪接事件可能导致非生产性mRNA转录物,其进而可能导致异常的或降低的蛋白质表达,并且可以靶向基因中的所述选择性剪接事件的治疗剂可以调节患者中功能性蛋白质的表达水平,并且/或者抑制异常的蛋白质表达。此类治疗剂可以用于治疗由所述蛋白质的缺乏引起的病状或疾病。



1. 一种调节具有前mRNA的细胞中靶蛋白的表达的方法,所述前mRNA自靶基因转录并且包含无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子),所述方法包括使药剂或编码所述药剂的载体与所述细胞接触,由此所述药剂调节所述NMD外显子从所述前mRNA的剪接,从而调节从所述前mRNA加工的经加工mRNA的水平,并且调节所述细胞中所述靶蛋白的表达,并且其中所述靶基因是PHIP基因。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述药剂:

(a) 结合所述前mRNA的靶向部分;

(b) 调节参与所述NMD外显子的剪接的因子的结合;或

(c) (a) 和 (b) 的组合。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述药剂干扰参与所述NMD外显子的剪接的因子与所述靶向部分的区域的结合。

4. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分在所述NMD外显子的近侧。

5. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的5'端上游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

6. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的5'端上游的至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

7. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的3'端下游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

8. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的3'端下游的至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

9. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点GRCh38/hg38:chr6 79004373上游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

10. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点GRCh38/hg38:chr6 79004373上游的约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

11. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点 GRCh38/hg38:chr6 79004436下游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

12. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点 GRCh38/hg38:chr6 79004436下游的约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

13. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分位于所述前mRNA的两个规范外显子区域之间的内含子区域中,并且其中所述内含子区域含有所述NMD外显子。

14. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分与所述NMD外显子至少部分重叠。

15. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分与在所述NMD外显子上游或下游的内含子至少部分重叠。

16. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分包含5' NMD外显子-内含子接合点或3' NMD外显子-内含子接合点。

17. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分在所述NMD外显子内。

18. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分包含所述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。

19. 如权利要求1所述的方法,其中所述NMD外显子(a)在与SEQ ID NO:2具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的内含子序列内并且/或者(b)包含与SEQ ID NO:3具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的序列。

20. 如权利要求1所述的方法,其中所述NMD外显子包含SEQ ID NO:3的序列。

21. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分在无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436内。

22. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分在无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436的上游或下游。

23. 如权利要求2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分包含无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436的外显子-内含子接合点。

24. 如权利要求1所述的方法,其中从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是全长PHIP蛋白或野生型PHIP蛋白。

25. 如权利要求1所述的方法,其中从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是功能性PHIP蛋白。

26. 如权利要求1所述的方法,其中与野生型PHIP蛋白相比,从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是至少部分功能性的。

27. 如权利要求1所述的方法,其中与全长野生型PHIP蛋白相比,从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是至少部分功能性的。

28. 如权利要求1所述的方法,其中从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是缺乏由无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436编码的氨基酸序列的PHIP蛋白。

29. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法促进所述NMD外显子从所述前mRNA中的排除。

30. 如权利要求29所述的方法,其中与在不存在所述药剂相比,在与所述药剂接触的所述细胞中所述NMD外显子从所述前mRNA中的排除增加到约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。

31. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法导致所述细胞中所述经加工mRNA的水平增加。

32. 如权利要求31所述的方法,其中与在不存在所述药剂相比,在与所述药剂接触的所述细胞中所述经加工mRNA的水平增加到约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。

33. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法导致所述细胞中所述靶蛋白的表达的增加。

34. 如权利要求33所述的方法,其中与在不存在所述药剂相比,在与所述药剂接触的所述细胞中从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白的水平增加到约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。

35. 如权利要求1所述的方法,其中所述药剂包括与选自SEQ ID NO:4-180的序列具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的反义寡聚体。

36. 如权利要求1所述的方法,其中所述药剂还包括基因编辑分子。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述基因编辑分子包括CRISPR-Cas9。

38. 如权利要求1所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含含有硫代磷酸酯键联或二氨基磷酸酯键联的骨架修饰。

39. 如权利要求1所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含二氨基磷酸酯吗啉代、锁核酸、肽核酸、2'-O-甲基部分、2'-氟部分、2'-NMA部分或2'-O-甲氧基乙基部分。

40. 如权利要求1所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含至少一个经修饰的糖部分。

41. 如权利要求40所述的方法,其中每个糖部分是经修饰的糖部分。

42. 如权利要求1所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体由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个核碱基或12至15个核碱基组成。

43. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法包括使编码所述药剂的载体与所述细胞接触,其中所述载体是病毒载体。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述病毒载体包括腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、慢病毒载体、单纯疱疹病毒(HSV)病毒载体或逆转录病毒载体。

45. 如权利要求43所述的方法,其中所述病毒载体包括腺相关病毒(AAV)载体。

46. 如权利要求1所述的方法,其中所述药剂包括经修饰的snRNA。

47. 如权利要求46所述的方法,其中所述经修饰的人snRNA是经修饰的U1 snRNA。

48. 如权利要求46所述的方法,其中所述经修饰的人snRNA是经修饰的U7 snRNA。

49. 如权利要求46所述的方法,其中所述经修饰的人snRNA的单链核苷酸序列的一部分包含结合所述前mRNA的所述靶向部分的序列。

50. 如权利要求46所述的方法,其中所述方法包括使编码所述经修饰的snRNA的载体与所述细胞接触。

51. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括评估所述靶蛋白的mRNA水平或表达水平。

52. 如权利要求1所述的方法,其中所述药剂是治疗剂。

53. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求52所述的治疗剂或编码如权利要求52所述的治疗剂的载体和药学上可接受的赋形剂。

54. 一种药物组合物,所述药物组合物包含治疗剂或编码治疗剂的载体和药学上可接受的赋形剂,其中所述治疗剂包括与选自SEQ ID NO:4-180的序列具有至少80%序列同一性的反义寡聚体。

55. 如权利要求54所述的药物组合物,其中所述治疗剂包括与选自SEQ ID NO:55-180的序列具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的反义寡聚体。

56. 如权利要求53所述的药物组合物,其中将所述药物组合物配制用于脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、鞘内注射、皮下注射、口服施用、滑膜注射、玻璃体内施用、视网膜下注射、局部应用、植入或静脉内注射。

57. 如权利要求53所述的药物组合物,其中将所述药物组合物配制用于鞘内注射或脑脊髓内注射。

58. 如权利要求53所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含第二治疗剂。

59. 如权利要求58所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂包括小分子。
60. 如权利要求58所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂包括反义寡聚体。
61. 如权利要求58所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂纠正内含子保留。
62. 一种组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:4-180的序列具有至少80%序列同一性的反义寡聚体,其中所述反义寡聚体包含骨架修饰、糖部分修饰或其组合。
63. 一种组合物,所述组合物包含编码包括反义寡聚体的多核苷酸的病毒载体,其中所述反义寡聚体由选自SEQ ID NO:4-180的序列组成。
64. 如权利要求63所述的组合物,其中所述多核苷酸还包括经修饰的snRNA。
65. 如权利要求64所述的组合物,其中所述经修饰的人snRNA是经修饰的U1 snRNA。
66. 如权利要求64所述的组合物,其中所述经修饰的人snRNA是经修饰的U7 snRNA。
67. 如权利要求62或63所述的组合物,其中所述反义寡聚体与选自SEQ ID NO:55-180的序列具有至少80%、至少90%或100%序列同一性。
68. 一种在有需要的对象中通过调节所述对象的细胞中靶蛋白的表达来治疗疾病或病状或者降低发展所述疾病或病状的可能性的方法,所述方法包括使如权利要求53至61中任一项所述的药物组合物与所述对象的细胞接触。
69. 如权利要求68所述的方法,其中所述疾病或病状与PHIP基因中的功能丧失突变相关联。
70. 如权利要求68或69所述的方法,其中所述疾病或病状与所述PHIP基因的单倍不足相关联,并且其中所述对象具有编码功能性PHIP蛋白的第一等位基因,以及不产生或以降低的水平产生所述PHIP蛋白的第二等位基因,或编码非功能性PHIP蛋白或部分功能性PHIP蛋白的第二等位基因。
71. 如权利要求68所述的方法,其中所述疾病或病状包括智力障碍疾病或病状。
72. 如权利要求68所述的方法,其中所述疾病或病状包括钟-詹森综合征(CHUJANS)(一种常染色体显性病症)、智力障碍、言语迟缓、焦虑、自闭症谱系病症(ASD)、注意力缺陷多动病症(ADHD)、攻击性、面部畸形、咖啡牛奶斑、由PHIP单倍不足引起的超重综合征、发育迟缓、肥胖或畸形。
73. 如权利要求68所述的方法,其中所述疾病或病状包括钟-詹森综合征。
74. 如权利要求68所述的方法,其中所述疾病或病状包括智力障碍。
75. 如权利要求68所述的方法,其中所述疾病或病状与PHIP基因的常染色体隐性突变相关联,其中所述对象具有第一等位基因,由其:
- (i) 不产生PHIP蛋白或者以与野生型等位基因相比降低的水平产生PHIP蛋白;或
  - (ii) 产生的所述PHIP蛋白与野生型等位基因相比是非功能性或部分功能性的;以及第二等位基因,由其:
  - (iii) 以与野生型等位基因相比降低的水平产生所述PHIP蛋白,并且产生的所述PHIP蛋白与野生型等位基因相比是至少部分功能性的;或者
  - (iv) 产生的所述PHIP蛋白与野生型等位基因相比是部分功能性的。
76. 如权利要求68所述的方法,其中所述对象是人。
77. 如权利要求68所述的方法,其中所述对象是非人动物。
78. 如权利要求68所述的方法,其中所述对象是胎儿、胚胎或儿童。

79. 如权利要求68所述的方法,其中所述细胞是离体的。

80. 如权利要求68所述的方法,其中将所述药物组合物通过脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、鞘内注射、皮下注射、口服施用、滑膜注射、玻璃体内施用、视网膜下注射、局部应用、植入或静脉内注射施用。

81. 如权利要求68所述的方法,其中将所述药物组合物通过鞘内注射或脑脊髓内注射施用。

82. 如权利要求68所述的方法,其中所述方法治疗所述疾病或病状。

83. 一种组合物,所述组合物包含药剂或编码所述药剂的载体,所述药剂或所述载体调节无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子)从自靶基因转录并且包含所述NMD外显子的前mRNA的剪接,从而调节从所述前mRNA加工的经加工mRNA的水平,并且调节具有所述前mRNA的细胞中靶蛋白的表达,并且其中所述靶基因是PHIP基因。

84. 一种组合物,所述组合物包含药剂或编码所述药剂的载体,所述药剂或所述载体调节无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子)从自靶基因转录并且包含所述NMD外显子的前mRNA的剪接,从而通过调节从所述前mRNA加工的经加工mRNA的水平,并且调节有需要的对象的细胞中靶蛋白的表达来治疗所述对象中的疾病或病状,并且其中所述靶基因是PHIP基因。

85. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求83或84所述的组合物;和药学上可接受的赋形剂和/或递送媒介物。

86. 如先前权利要求中任一项所述的方法或组合物或药物组合物,其中所述靶蛋白是普列克底物蛋白同源结构域相互作用蛋白(PHIP)。

## 用于治疗基于无义介导的RNA衰变的病状和疾病的反义寡聚体

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年6月21日提交的美国临时专利申请号63/212,981的权益,将所述临时专利申请通过引用全文并入本文。

### 背景技术

[0003] 基因中的选择性剪接事件可能导致非生产性mRNA转录物,其进而可能导致异常的或降低的蛋白质表达,并且可以靶向基因中的所述选择性剪接事件的治疗剂可以调节患者中功能性蛋白质的表达水平,并且/或者抑制异常的蛋白质表达。此类治疗剂可以用于治疗由该蛋白质缺乏引起的病状或疾病。

[0004] PHIP相关病症(也称为钟-詹森(Chung Jansen)综合征(CHUJANS))的特征在于从婴儿期开始明显的全面发育迟缓、智力发育受损或学习困难、行为异常、畸形特征和肥胖。表型的严重程度和另外特征是可变的。CHUJANS是一种由普列克底物蛋白(pleckstrin)同源结构域相互作用蛋白(PHIP)基因的变化引起的罕见病状。此基因在与脑和神经系统发育有关联的几个过程中起着重要作用。PHIP基因还参与调控神经组织中的胰岛素。迄今为止,尚不知道PHIP相关病症会引起糖尿病,然而患有所述病症的人的作为糖尿病的危险因素的超重的风险增加。最常见的体征和症状包括轻度至重度的学习问题、行为问题和超重倾向。PHIP相关病症是一种常染色体显性病状。许多患有PHIP相关病症的人具有轻度至重度的智力障碍。没有智力障碍的患有所述病症的人通常具有言语问题、儿童早期全面发育迟缓和在学习问题。目前,尚无批准用于PHIP相关病症患者的疾病改善治疗法并且需要此类治疗法。

### 发明内容

[0005] 本文提供了一种调节具有前mRNA的细胞中靶蛋白的表达的方法,所述前mRNA自靶基因转录并且包含无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子),所述方法包括使药剂或编码所述药剂的载体与所述细胞接触,由此所述药剂调节所述NMD外显子从所述前mRNA的剪接,从而调节从所述前mRNA加工的经加工mRNA的水平,并且调节所述细胞中所述靶蛋白的表达,并且其中所述靶基因是PHIP基因。

[0006] 在一些方面,所述药剂:(a)与所述前mRNA的靶向部分结合;(b)调节参与所述NMD外显子的剪接的因子的结合;或(a)和(b)的组合。

[0007] 在一些方面,所述药剂干扰参与所述NMD外显子的剪接的因子与所述靶向部分的区域的结合。

[0008] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分在所述NMD外显子的近侧。

[0009] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的5'端上游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0010] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的5'端上游的至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0011] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的3'端下游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0012] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的3'端下游的至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0013] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点GRCh38/hg38:chr6 79004373上游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0014] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点GRCh38/hg38:chr6 79004373上游的约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0015] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点GRCh38/hg38:chr6 79004436下游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0016] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点GRCh38/hg38:chr6 79004436下游的约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0017] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分位于所述前mRNA的两个规范外显子区域之间的内含子区域中,并且其中所述内含子区域含有所述NMD外显子。

[0018] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分与所述NMD外显子至少部分重叠。

[0019] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分与在所述NMD外显子上游或下游的内含子至少部分重叠。

[0020] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分包含5' NMD外显子-内含子接合点或3' NMD外显子-内含子接合点。

[0021] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分在所述NMD外显子内。

[0022] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分包含所述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。

[0023] 在一些方面,所述NMD外显子(a)在与SEQ ID NO:2具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的内含子序列内并且/或者(b)包含与SEQ ID NO:3具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的序列。

[0024] 在一些方面,所述NMD外显子包含SEQ ID NO:3的序列。

[0025] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分在无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436内。

[0026] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分在无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436的上游或下游。

[0027] 在一些方面,所述前mRNA的所述靶向部分包含无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436的外显子-内含子接合点。

[0028] 在一些方面,从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是全长PHIP蛋白或野生型PHIP蛋白。

[0029] 在一些方面,从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是功能性PHIP蛋白。

[0030] 在一些方面,与野生型PHIP蛋白相比,从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是至少部分功能性的。

[0031] 在一些方面,与全长野生型PHIP蛋白相比,从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是至少部分功能性的。

[0032] 在一些方面,从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是缺乏由无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436编码的氨基酸序列的PHIP蛋白。

[0033] 在一些方面,所述方法促进所述NMD外显子从所述前mRNA中的排除。

[0034] 在一些方面,与在不存在所述药剂相比,在与所述药剂接触的所述细胞中所述NMD外显子从所述前mRNA中的排除增加到约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。

[0035] 在一些方面,所述方法导致所述细胞中所述经加工mRNA的水平增加。

[0036] 在一些方面,与在不存在所述药剂相比,在与所述药剂接触的细胞中所述经加工mRNA的水平增加到约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。

[0037] 在一些方面,所述方法导致所述细胞中所述靶蛋白的表达的增加。

[0038] 在一些方面,与在不存在所述药剂相比,在与所述药剂接触的细胞中从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白的水平增加到约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。

[0039] 在一些方面,所述药剂包括与选自SEQ ID NO:4-180的序列具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的反义寡聚体。

[0040] 在一些方面,所述药剂还包括基因编辑分子。

[0041] 在一些方面,所述基因编辑分子包括CRISPR-Cas9。

[0042] 在一些方面,所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含含有硫代磷酸酯键联或二氨基磷酸酯键联的骨架修饰。

[0043] 在一些方面,所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含二氨基磷酸酯吗啉代、锁核酸、肽核酸、2'-O-甲基部分、2'-氟部分、2'-NMA部分或2'-O-甲氧基乙基部分。

[0044] 在一些方面,所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含至少一个经修饰的糖部分。

[0045] 在一些方面,每个糖部分是经修饰的糖部分。

[0046] 在一些方面,所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体由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个核碱基或12至15个核碱基组成。

[0047] 在一些方面,所述方法包括使编码所述药剂的载体与所述细胞接触,其中所述载体是病毒载体。

[0048] 在一些方面,所述病毒载体包括腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、慢病毒载体、单纯疱疹病毒(HSV)病毒载体或逆转录病毒载体。

[0049] 在一些方面,所述病毒载体包括腺相关病毒(AAV)载体。

[0050] 在一些方面,所述药剂包括经修饰的snRNA。

[0051] 在一些方面,所述经修饰的人snRNA是经修饰的U1 snRNA。

[0052] 在一些方面,所述经修饰的人snRNA是经修饰的U7 snRNA。

[0053] 在一些方面,所述经修饰的人snRNA的单链核苷酸序列的一部分包含结合所述前mRNA的所述靶向部分的序列。

[0054] 在一些方面,所述方法包括使编码所述经修饰的snRNA的载体与所述细胞接触。

[0055] 在一些方面,所述方法还包括评估所述靶蛋白的mRNA水平或表达水平。

[0056] 在一些方面,所述药剂是治疗剂。

[0057] 本文还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文所述的治疗剂或编码本

文所述的治疗剂的载体和药学上可接受的赋形剂。

[0058] 本文还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含治疗剂或编码治疗剂的载体和药学上可接受的赋形剂,其中所述治疗剂包括与选自SEQ ID NO:4-180的序列具有至少80%序列同一性的反义寡聚体。

[0059] 在一些方面,所述治疗剂包括与选自SEQ ID NO:55-180的序列具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的反义寡聚体。

[0060] 在一些方面,将所述药物组合物配制用于脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、鞘内注射、皮下注射、口服施用、滑膜注射、玻璃体内施用、视网膜下注射、局部应用、植入或静脉内注射。

[0061] 在一些方面,将所述药物组合物配制用于鞘内注射或脑脊髓内注射。

[0062] 在一些方面,所述药物组合物还包含第二治疗剂。

[0063] 在一些方面,所述第二治疗剂包括小分子。

[0064] 在一些方面,所述第二治疗剂包括反义寡聚体。

[0065] 在一些方面,所述第二治疗剂纠正内含子保留。

[0066] 本文还提供了一种组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:4-180的序列具有至少80%序列同一性的反义寡聚体,其中所述反义寡聚体包含骨架修饰、糖部分修饰或其组合。

[0067] 本文还提供了一种组合物,所述组合物包含编码包括反义寡聚体的多核苷酸的病毒载体,其中所述反义寡聚体由选自SEQ ID NO:4-180的序列组成。

[0068] 在一些方面,所述多核苷酸还包括经修饰的snRNA。

[0069] 在一些方面,经修饰的人snRNA是经修饰的U1 snRNA。

[0070] 在一些方面,所述经修饰的人snRNA是经修饰的U7 snRNA。

[0071] 在一些方面,所述反义寡聚体与选自SEQ ID NO:55-180的序列具有至少80%、至少90%或100%序列同一性。

[0072] 本文还提供了一种在有需要的对象中通过调节所述对象的细胞中靶蛋白的表达来治疗疾病或病状或者降低发展所述疾病或病状的可能性的方法,所述方法包括使本文所述的药物组合物与所述对象的细胞接触。

[0073] 在一些方面,所述疾病或病状与PHIP基因中的功能丧失突变相关联。

[0074] 在一些方面,所述疾病或病状与所述PHIP基因的单倍不足相关联,并且其中所述对象具有编码功能性PHIP蛋白的第一等位基因,以及不产生或以降低的水平产生所述PHIP蛋白的第二等位基因,或编码非功能性PHIP蛋白或部分功能性PHIP蛋白的第二等位基因。

[0075] 在一些方面,所述疾病或病状包括智力障碍疾病或病状。

[0076] 在一些方面,所述疾病或病状包括钟-詹森综合征(CHUJANS)(一种常染色体显性病)、智力障碍、言语迟缓、焦虑、自闭症谱系病症(ASD)、注意力缺陷多动病症(ADHD)、攻击性、面部畸形、咖啡牛奶斑(café au lait spots)、由PHIP单倍不足引起的超重综合征、发育迟缓、肥胖或畸形。

[0077] 在一些方面,所述疾病或病状包括钟-詹森综合征。

[0078] 在一些方面,所述疾病或病状包括智力障碍。

[0079] 在一些方面,所述疾病或病状与PHIP基因的常染色体隐性突变相关联,其中所述

对象具有第一等位基因,由其:(i)不产生PHIP蛋白或者以与野生型等位基因相比降低的水平产生PHIP蛋白;或(ii)产生的所述PHIP蛋白与野生型等位基因相比是非功能性或部分功能性的;以及第二等位基因,由其:(iii)以与野生型等位基因相比降低的水平产生所述PHIP蛋白,并且产生的所述PHIP蛋白与野生型等位基因相比是至少部分功能性的;或者(iv)产生的所述PHIP蛋白与野生型等位基因相比是部分功能性的。

[0080] 在一些方面,所述对象是人。

[0081] 在一些方面,所述对象是非人动物。

[0082] 在一些方面,所述对象是胎儿、胚胎或儿童。

[0083] 在一些方面,所述细胞是离体的。

[0084] 在一些方面,将所述药物组合物通过脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、鞘内注射、皮下注射、口服施用、滑膜注射、玻璃体内施用、视网膜下注射、局部应用、植入或静脉内注射施用。

[0085] 在一些方面,将所述药物组合物通过鞘内注射或脑脊髓内注射施用。

[0086] 在一些方面,所述方法治疗所述疾病或病状。

[0087] 本文还提供了一种组合物,所述组合物包含药剂或编码所述药剂的载体,所述药剂或所述载体调节无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子)从自靶基因转录并且包含所述NMD外显子的前mRNA的剪接,从而调节从所述前mRNA加工的经加工mRNA的水平,并且调节具有所述前mRNA的细胞中靶蛋白的表达,并且其中所述靶基因是PHIP基因。

[0088] 本文还提供了一种组合物,所述组合物包含药剂或编码所述药剂的载体,所述药剂或所述载体调节无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子)从自靶基因转录并且包含所述NMD外显子的前mRNA的剪接,从而通过调节从所述前mRNA加工的经加工mRNA的水平,并且调节有需要的对象的细胞中靶蛋白的表达来治疗所述对象中的疾病或病状,并且其中所述靶基因是PHIP基因。

[0089] 本文还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文所述的组合物;和药学上可接受的赋形剂和/或递送媒介物。

[0090] 在一些方面,所述靶蛋白是普列克底物蛋白同源结构域相互作用蛋白(PHIP)。

[0091] 援引并入

[0092] 本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请都通过引用并入本文,其程度如同明确且单独地指示每个单独的出版物、专利或专利申请都通过引用并入一般。

## 附图说明

[0093] 本公开的新颖特征在所附权利要求书中特别地阐述。将通过参考阐述了利用本公开的原理的说明性实施方案的以下具体实施方式和附图获得对本公开的特征和优点的更好的理解,在所述附图中:

[0094] 图1A-1B描绘了含有无义介导的mRNA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示出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,并且此mRNA被输出到细胞质并翻译为靶蛋白。对于此靶基因,mRNA的一些级分含有在细胞质中降解的无义介导的mRNA衰变诱导外显子(含NMD外显子的

成熟mRNA),因此导致无靶蛋白产生。图1B示出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)的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生产性mRNA的增加,增加的生产性mRNA进而翻译为更高水平的靶蛋白。

[0095] 图2示出了在PHIP基因中鉴定的导致由无义介导的衰变(NMD)降解的非生产性mRNA转录物的新颖NMD外显子包含事件(外显子X)的示例性示意图。

[0096] 图3描绘了PHIP基因(外显子是长方形并且内含子是具有箭头的线)中含有由阴影区域和在顶部的黑色条描绘的NMD诱导外显子包含事件(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)的区域的UCSC基因组浏览器快照。RNA测序从用环己酰亚胺(CHX)或DMSO对照处理的人神经祖细胞(ReN)和人星形胶质细胞追踪。

[0097] 图4A描绘了在HEK293、SK-N-AS和ReN VM细胞系中经由嘌呤霉素或环己酰亚胺处理对NMD诱导外显子的确认。使用来自水处理(H)、DMSO处理(D)、嘌呤霉素处理(P)或环己酰亚胺处理(C)的细胞的总RNA进行的RT-PCR分析确认了对应于PHIP基因的NMD诱导外显子15x(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)的条带的存在。

[0098] 图4B描绘了在U87细胞系和星形胶质细胞中经由嘌呤霉素或环己酰亚胺处理对NMD诱导外显子的确认。使用来自水处理(H)、DMSO处理(D)、嘌呤霉素处理(P)或环己酰亚胺处理(C)的细胞的总RNA进行的RT-PCR分析确认了对应于PHIP基因的NMD诱导外显子15x(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)的条带的存在。

[0099] 图4C描绘了在小鼠胚胎成纤维细胞中经由嘌呤霉素或环己酰亚胺处理对NMD诱导外显子的确认。使用来自水处理(H)、DMSO处理(D)、嘌呤霉素处理(P)或环己酰亚胺处理(C)的细胞的总RNA进行的RT-PCR分析确认了对应于PHIP基因的NMD诱导外显子15x(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)的条带的存在。

[0100] 图5描绘了非人灵长类动物中NMD外显子事件(15X)的保守。

[0101] 图6描绘了PHIP外显子15x(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)区域周围的示例性ASO步移。示出了针对PHIP外显子15x(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)区域周围靶向3'剪接位点上游、跨3'剪接位点、外显子15x、跨5'剪接位点和5'剪接位点下游的序列进行的ASO步移的图示。将ASO设计为通过一次移位5个核苷酸或者在外显子的起始或末端与跨剪接位点区域的相邻ASO之间移位3个核苷酸来覆盖这些区域。

[0102] 图7描绘了在存在环己酰亚胺的情况下在用3 $\mu$ M所指示ASO核转染的ReN VM细胞中通过Taqman RT-qPCR(针对生产性mRNA倍数变化)和RT-PCR(针对非生产性mRNA倍数变化)评价的PHIP外显子15x(GRCh38/hg38:chr6 79004373 79004436)区域ASO步移。绘制了凝胶图像和相对于对照基因的PHIP生产性mRNA产物的倍数变化的图。

[0103] 图8描绘了在不存在环己酰亚胺的情况下在用3 $\mu$ M所指示ASO核转染的ReN细胞中通过Taqman RT-qPCR评价的PHIP外显子15x(GRCh38/hg38:chr6 79004373 79004436)区域ASO步移。绘制了凝胶图像和PHIP非生产性mRNA产物百分比、相对于对照基因的规范PHIP mRNA的倍数变化和总PHIP mRNA的倍数变化的图。

[0104] 图9描绘了在存在环己酰亚胺的情况下在用120nM所指示ASO转染的HEK293细胞中通过Taqman RT-qPCR评价的PHIP外显子15x(GRCh38/hg38:chr6 79004373 79004436)区域ASO步移。绘制了凝胶图像和相对于对照基因的PHIP生产性mRNA产物的倍数变化的图。

[0105] 图10A-10D描绘了在不存在环己酰亚胺的情况下在用120nM所指示ASO转染的

HEK293细胞中通过Taqman RT-qPCR评价的PHIP外显子15x (GRCh38/hg38:chr6 79004373 79004436) 区域ASO步移。绘制了凝胶图像 (图10A-10C) 和PHIP非生产性mRNA产物百分比、相对于对照基因的规范PHIP mRNA的倍数变化和总PHIP mRNA的倍数变化的图 (图10D)。

[0106] 图11描绘了PHIP外显子15x (GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436) 区域周围的示例性ASO微步移。

[0107] 图12描绘了在存在环己酰亚胺的情况下在用3 $\mu$ M所指示ASO核转染的ReN细胞中通过Taqman RT-qPCR评价的PHIP外显子15x (GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436) 区域ASO微步移。绘制了凝胶图像和相对于对照基因的PHIP生产性mRNA产物的倍数变化的图。

[0108] 图13描绘了在存在环己酰亚胺的情况下在用120nM所指示ASO转染的HEK293细胞中通过Taqman RT-qPCR评价的PHIP外显子15x (GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436) 区域ASO微步移。绘制了凝胶图像和相对于对照基因的PHIP生产性mRNA产物的倍数变化的图。

[0109] 图14A示出了展示出通过不同浓度下的示例性ASO调节外显子15x从PHIP前mRNA的剪接的凝胶图像。图14B是汇总对响应于用不同浓度下的示例性ASO处理的规范PHIP mRNA的量的倍数变化和非生产性PHIP mRNA的量的变化的定量的条形图。

[0110] 图15A和15B展示出示例性ASO (IVS14X:-3、IVS14X-Ex15XX:7、Ex15X:19和Ex15X:23) 引起PHIP蛋白水平的增加。图15A示出了在不同处理条件下PHIP蛋白的蛋白质印迹图像,并且图15B是汇总对响应于不同处理的PHIP蛋白水平的变化的定量的条形图。

[0111] 图16A-16D展示出经由核转染用示例性ASO处理导致具有外显子15x的非生产性PHIP转录物的量的降低 (图16B) 并且导致没有外显子15x的PHIP转录物的量的增加,如通过使用跨越外显子15和外显子16 (规范的;图16C) 以及外显子35和外显子36 (GE;图16D) 的探针的Taqman qPCR所示的。图16A示出了在不同处理条件下RT-PCR扩增子的凝胶图像。

[0112] 图17A-17D展示出经由自由摄取用示例性ASO处理导致具有外显子15x的非生产性PHIP转录物的量的降低 (图17B) 并且导致没有外显子15x的PHIP转录物的量的增加,如通过使用跨越外显子15和外显子16 (规范的;图17C) 以及外显子35和外显子36 (GE;图17D) 的探针的Taqman qPCR所示的。图17A示出了在不同处理条件下RT-PCR扩增子的凝胶图像。

## 具体实施方式

[0113] (普列克底物蛋白同源相互作用蛋白) PHIP基因中的选择性剪接事件可能导致非生产性mRNA转录物,其进而可能导致异常的或降低的蛋白质表达,并且可以靶向PHIP基因中的选择性剪接事件的治疗剂可以调节钟-詹森综合征 (CHUJANS) 患者中功能性蛋白质的表达水平,并且/或者抑制异常的蛋白质表达。此类治疗剂可以用于治疗由PHIP蛋白缺乏引起的病状。

[0114] 可以导致非生产性mRNA转录物的选择性剪接事件之一是在mRNA转录物中包含可以诱导无义介导的mRNA衰变的额外外显子。本公开提供了用于调节PHIP的选择性剪接以增加编码蛋白质的成熟mRNA以及因此翻译的功能性PHIP蛋白的产生的组合物和方法。这些组合物和方法包括反义寡聚体 (ASO),其可以引起外显子跳跃 (例如,伪外显子跳跃),并促进PHIP前mRNA的组成性剪接。在各种实施方案中,可以使用本公开的方法增加功能性PHIP蛋白以治疗由PHIP蛋白缺乏引起的病状。

**[0115] mRNA剪接**

**[0116]** RNA序列中的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,所述RNA-蛋白质复合物协调初级转录物、小核RNA (snRNA) 与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组装,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,所述识别涉及U2辅助因子(U2AF)与3' ss区域的结合以有利于U2与分支点序列(BPS)的结合。U2AF是一种稳定的异二聚体,其由结合聚嘧啶束(PPT)的U2AF2编码的65-kD亚基(U2AF65)和与3' ss处高度保守的AG二核苷酸相互作用并稳定化U2AF65结合的U2AF1编码的35-kD亚基(U2AF35)构成。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,所述辅助序列或结构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,所述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控功能,但对其激活或阻抑的确切机制知之甚少。

**[0117]** 典型地可能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。典型地,这些功能性元件基于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一些辅助顺式作用元件可能通过影响剪接体组装的动力学诸如U1 snRNP与5' ss之间复合物的排列来起作用,但似乎许多元件很有可能与反式作用RNA结合蛋白(RBP)配合发挥功能。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,所述蛋白质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至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。除了其在剪接调控中的作用外,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,所述剪接控制指定如何、在何处以及何时从其前体组装mRNA。

**[0118]** 选择性剪接是在基因表达期间的调控过程,所述调控过程可以导致从自单一基因转录的单一初级mRNA转录物加工的成熟mRNA转录物的多种同种型,以及从多种成熟mRNA同种型的至少一些翻译的所得多种蛋白质。在此过程中,可以将基因的特定外显子包含在从此基因产生的最终的经加工mRNA内或从其中排除。因此,从选择性剪接的mRNA翻译的蛋白质将在其氨基酸序列上并且在一些情况下在其生物学功能上含有差异。

**[0119]** 标记外显子-内含子边界的序列是不同强度的简并信号,所述简并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,从而从单一基因创建出一系列多样的转录物。这常常被称为选择性前mRNA剪接。尽管通过选择性剪接产生的大多数mRNA同种型可以从细胞核输出并翻译为功能性多肽,但是来自单一基因的不同mRNA同种型在其翻译效率上可能有很大变化。在外显子接合点复合物上游至少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以导致异常剪接,诸如外显子跳跃或隐蔽(或伪)外显子包含或剪接位点激活,并且显著地助长了人类发病率和死亡率。异常剪接模式和选择性剪接模式两者可以受到外显子和内含子中的天然DNA变体的影响。

[0120] 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处,显然只有选择性剪接事件的一个子集可以维持规范的开放阅读框。例如,只有被3整除的外显子可以被跳跃或包含在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,从而可能导致随后被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发挥功能。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的翻译可能导致所得蛋白质的有害功能获得或显性阴性活性。NMD不仅靶向具有PTC的转录物,而且还靶向从许多内源性基因表达的大量mRNA同种型,这表明NMD是驱动细胞中稳态RNA水平的微调和粗调两者的主要调控物。

[0121] NMD诱导外显子(“NIE”或“NMD外显子”)是作为内含子内的区域并且如果包含在成熟RNA转录物中则可以激活NMD途径的外显子或伪外显子。在组成性剪接事件中,通常剪接出含有NMD外显子的内含子,但内含子或其一部分(例如,NMD外显子)可以在选择性或异常剪接事件期间得到保留。含有这种NMD外显子的成熟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NMD外显子可以下调基因表达。在本公开中,含有NMD外显子的mRNA转录物可以被称为“含有NIE的mRNA”或“NMD外显子mRNA”。

[0122] 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,并且/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,所述周围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是C或A,R是G或A,并且Y是C或U。

[0123] 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中列出的那些,容易地鉴定剪接位点及其调控序列。

[0124] 隐蔽的剪接位点或剪接调控序列可以与NMD外显子的剪接位点竞争RNA结合蛋白,诸如U2AF。在一些实施方案中,药剂可以结合隐蔽的剪接位点或剪接调控序列,以防止RNA结合蛋白的结合,从而有利于RNA结合蛋白与NMD外显子剪接位点的结合。

[0125] 在一些实施方案中,隐蔽的剪接位点可以不包含NMD外显子的5'或3'剪接位点。在一些实施方案中,隐蔽的剪接位点可是在NMD外显子5'剪接位点上游的至少10个核苷酸、至少20个核苷酸、至少50个核苷酸、至少100个核苷酸或至少200个核苷酸。在一些实施方案中,隐蔽的剪接位点可是在NMD外显子3'剪接位点下游的至少10个核苷酸、至少20个核苷酸、至少50个核苷酸、至少100个核苷酸、至少200个核苷酸。

[0126] 靶转录物

[0127] 在一些实施方案中,本公开的方法和组合物利用了从PHIP基因转录的前mRNA中NMD外显子的存在。可以使用刺激NMD外显子的外显子跳跃的药剂诸如ASO来诱导所鉴定的PHIP NMD外显子前mRNA物种的剪接产生功能性成熟PHIP mRNA。外显子跳跃的诱导可以导致对NMD途径的抑制。所得的成熟PHIP mRNA可以在不激活NMD途径的情况下正常翻译,从而增加患者的细胞中PHIP蛋白的量并且减轻与PHIP缺乏相关联的病状或疾病的症状,所述病状或疾病诸如钟-詹森综合征(CHUJANS)(一种常染色体显性病)、智力障碍、言语迟缓、焦虑、自闭症谱系病症(ASD)、注意力缺陷多动病症(ADHD)、攻击性、面部畸形、咖啡牛奶斑、由PHIP单倍不足引起的超重综合征、发育迟缓、肥胖或畸形。

[0128] 在一些实施方案中,可以使用本文公开的方法或组合物治疗或改善的疾病或病状不与治疗剂所靶向的靶蛋白(基因)直接相关。在一些实施方案中,本文提供的治疗剂可以靶向不与疾病或病状直接相关的蛋白质(基因),但是对靶蛋白(基因)表达的调节可以治疗或改善所述疾病或病状。

[0129] 在各种实施方案中,本公开提供了可以靶向PHIP前mRNA转录物以调节剪接或蛋白质表达水平的治疗剂。治疗剂可以是小分子、多核苷酸或多肽。在一些实施方案中,治疗剂是ASO。PHIP前mRNA上的各个区域或序列可以被治疗剂诸如ASO所靶向。在一些实施方案中,ASO靶向含有NMD外显子的PHIP前mRNA转录物。在一些实施方案中,ASO靶向PHIP前mRNA转录物的NMD外显子内的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP前mRNA转录物的NMD外显子(3' ss)的5'端上游(或5')的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP前mRNA转录物的NMD外显子(5' ss)的3'端下游(或3')的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP前mRNA转录物的NMD外显子的5'端侧翼的内含子内的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP前mRNA转录物的NMD外显子的3'端侧翼的内含子内的序列。在一些实施方案中,ASO靶向包含PHIP前mRNA转录物的NMD外显子-内含子边界的序列。NMD外显子-内含子边界可以是指内含子序列与NMD外显子区域的接合点。内含子序列可以在NMD外显子的5'端或NMD外显子3'端的侧翼。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP前mRNA转录物的外显子内的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP前mRNA转录物的内含子内的序列。在一些实施方案中,ASO靶向包含PHIP前mRNA转录物的内含子的一部分和外显子的一部分的序列。

[0130] 在一些实施方案中,ASO靶向在NMD外显子的5'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,ASO靶向在NMD外显子区域的5'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个核苷酸或约250至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,ASO可以靶向在NMD外显子的5'端的上游超过300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在NMD外显子的3'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,ASO靶向在NMD外显子区域的3'端的下游约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个核苷酸或约250至约300个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在NMD外显子的3'端的下游超过300个核苷酸处的序列。

[0131] 在一些实施方案中,含有NMD外显子的PHIP前mRNA转录物由与SEQ ID NO.1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编码。在一些实施方案中,PHIP NMD外显子前mRNA转录物包含与SEQ ID NO:3具有至少约80%、

85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0132] 在一些实施方案中,含有NMD外显子的PHIP前mRNA转录物(或NMD外显子mRNA)包含与SEQ ID NO:3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NMD外显子的PHIP前mRNA转录物(或NMD外显子mRNA)由与SEQ ID NO:3具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列编码。在一些实施方案中,NMD外显子mRNA的靶向部分包含与包含SEQ ID NO:3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。

[0133] 在一些实施方案中,ASO靶向包含NIE外显子15(外显子15x)的含有NMD外显子的PHIP前mRNA的包含NIE外显子15的含有NMD外显子的PHIP前mRNA的外显子15x。在一些实施方案中,ASO靶向PHIP的外显子(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)。

[0134] 在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP的外显子15x、PHIP的外显子15x的5'端上游(或5')的约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP的GRCh38/hg38:chr6 79004373的上游(或5')的约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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个核苷酸处的序列。

[0135] 在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP的外显子15x的5'端上游(或5')的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP的GRCh38/hg38:chr679004373的上游(或5')的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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个核苷酸处的序列。

[0136] 在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP的外显子15x的3'端下游(或3')的约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP的GRCh38/hg38:chr6 79004436的下游(或3')的约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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个核苷酸处的序列。

[0137] 在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP的外显子15x的3'端下游(或3')的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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个核苷酸处的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP的GRCh38/hg38:chr679004436的下游(或3')的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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个核苷酸处的序列。

[0138] 在一些实施方案中,ASO具有与根据SEQ ID NO:3的NMD外显子mRNA的靶向部分互补的序列。

[0139] 在一些实施方案中,ASO靶向在NMD外显子的5'端上游的序列。例如,靶向在NMD外显子的5'端上游的序列(例如,PHIP的外显子(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436))的ASO可以包含与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。

[0140] 在一些实施方案中,ASO靶向含有外显子-内含子边界(或接合点)的序列。例如,靶向含有外显子-内含子边界的序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:3的至少8个连续核酸至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%互补的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在NMD外显子的3'端下游的序列。例如,靶向在NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x)的3'端的下游的序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:3的至少8个连续核酸具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。例如,靶向在NMD外显子(例如,PHIP的外显子(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436))的3'端的下游的序列的ASO可以包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:3的至少8个连续核酸具有至少80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在NMD外显子内的序列。

[0141] 在一些实施方案中,ASO靶向包含外显子15的含有NMD外显子的PHIP前mRNA的外显子15x、包含NIE外显子16的含有NMD外显子的PHIP前mRNA的NIE外显子15x。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP前mRNA的外显子15x的5'端下游(或3')的序列。在一些实施方案中,ASO靶向在PHIP前mRNA的外显子15x的3'端上游(或5')的序列。

[0142] 在一些实施方案中,含有NMD外显子的PHIP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、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38或39中。在一些实施方案中,ASO与NMD外显子前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、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38或39内的至少一个NMD外显子的外显子跳跃,并且随后增加PHIP蛋白产生。在一些实施方案中,含有NMD外显子的PHIP前mRNA的靶向部分在PHIP的内含子15中。在一些实施方案中,含有NMD外显子的PHIP前mRNA的靶向部分是PHIP的内含子(GRCh38/hg38:chr6 79003858至79015082)。

[0143] 在一些实施方案中,将本公开的方法和组合物用于通过诱导含有NMD外显子的PHIP前mRNA的伪外显子的外显子跳跃来增加PHIP的表达。在一些实施方案中,伪外显子是内含子1-39中任一个内的序列。在一些实施方案中,伪外显子是1、2、3、4、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、31、32、33、34、35、36、37、38或39中任一个内的序列。在一些实施方案中,伪外显子可以是PHIP内含子或其一部分。在一些实施方案中,伪外显子在PHIP的内含子15内。在一些实施方案中,伪外显子在PHIP的内含子(GRCh38/hg38:chr679003858 79015082)内。

[0144] 在一些实施方案中,PHIP前mRNA转录物由与SEQ ID NO.1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编码。在一些实施方案

中,PHIP前mRNA转录物包含与SEQ ID NO:3具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0145] 在一些实施方案中,PHIP前mRNA转录物(或NMD外显子mRNA)包含与SEQ ID NO:3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,PHIP前mRNA转录物(或NMD外显子mRNA)由与SEQ ID NO:3具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列编码。在一些实施方案中,PHIP前mRNA的靶向部分包含与包含SEQ ID NO:3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。

[0146] 在一些实施方案中,ASO靶向PHIP前mRNA的外显子15。在一些实施方案中,ASO靶向PHIP前mRNA的外显子(GRCh38/hg38:chr6 79015081 79015216)。在一些实施方案中,ASO靶向PHIP前mRNA的外显子16,ASO靶向PHIP前mRNA的外显子(GRCh38/hg38:chr6 79003729 79003858)。

[0147] 在一些实施方案中,ASO具有与根据SEQ ID NO:3的NMD外显子mRNA的靶向部分互补的序列。

[0148] 蛋白质表达

[0149] 在一些实施方案中,将本文所述的方法用于增加功能性PHIP蛋白或RNA的产生。如本文所用,术语“功能性”是指消除所治疗病状或疾病(例如,钟-詹森综合征)的任何一种或多种症状所需的PHIP蛋白或RNA的活性或功能的量。在一些实施方案中,将所述方法用于增加部分功能性PHIP蛋白或RNA的产生。如本文所用,术语“部分功能性”是指低于消除或预防疾病或病状的任何一种或多种症状所需的活性或功能的量的PHIP蛋白或RNA的活性或功能的任何量。在一些实施方案中,部分功能性蛋白质或RNA将相对于完全功能性蛋白质或RNA具有低至少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。

[0150] 在一些实施方案中,所述方法是一种增加由具有PHIP前mRNA的对象的细胞对PHIP蛋白的表达的方法,其中对象患有由PHIP蛋白的活性的量缺乏引起的疾病或病状(例如,钟-詹森综合征),并且其中PHIP蛋白的量缺乏由PHIP蛋白的单倍不足引起。在这种实施方案中,对象具有编码功能性PHIP蛋白的第一等位基因和不产生所述PHIP蛋白的第二等位基因。在另一个这种实施方案中,对象具有编码功能性PHIP蛋白的第一等位基因和编码非功能性PHIP蛋白的第二等位基因。在另一个这种实施方案中,对象具有编码功能性PHIP蛋白的第一等位基因和编码部分功能性PHIP蛋白的第二等位基因。在这些实施方案中的任一个中,反义寡聚体结合自第二等位基因转录的PHIP前mRNA的靶向部分,从而诱导伪外显子从前mRNA的外显子跳跃,并且引起编码功能性PHIP蛋白的成熟mRNA的水平增加,以及对象的细胞中PHIP蛋白的表达增加。

[0151] 在一些实施方案中,所述方法是一种增加由具有PHIP前mRNA的对象的细胞对PHIP蛋白的表达的方法,其中对象患有由PHIP蛋白的活性的量缺乏引起的疾病或病状,并且其中PHIP蛋白的量缺乏由常染色体隐性遗传引起。

[0152] 在一些实施方案中,所述方法是一种增加由具有PHIP前mRNA的对象的细胞对PHIP蛋白的表达的方法,其中对象患有由PHIP蛋白的活性的量缺乏引起的疾病或病状(例如,钟-詹森综合征),并且其中PHIP蛋白的量缺乏由常染色体显性遗传引起。

[0153] 在相关的实施方案中,所述方法是一种使用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可以用于增加具有PHIP前mRNA的对象的细胞中PHIP蛋白的表达,其中对象具有PHIP蛋白的量或功能的缺乏,例如钟-詹森综合征。

[0154] 在一些实施方案中,编码引起疾病或病状的蛋白质的前mRNA转录物被本文所述的药剂例如寡核苷酸所靶向。在一些情况下,含有NMD外显子的前mRNA转录物被本文所述的药剂例如寡核苷酸所靶向。在一些实施方案中,编码不引起疾病的蛋白质的含有NMD外显子的前mRNA转录物被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以通过靶向编码第二蛋白质的前mRNA,从而增加第二蛋白质的产生来改善。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(其引起疾病或病状)的突变或缺乏。

[0155] 在一些实施方案中,对象具有:(a) 第一突变等位基因,由其(i) 以与由野生型等位基因的产生相比降低的水平产生PHIP蛋白,(ii) 以与等价的野生型蛋白质相比具有降低功能的形式产生PHIP蛋白,或者(iii) 不产生PHIP蛋白或功能性RNA;以及(b) 第二突变等位基因,由其(i) 以与由野生型等位基因的产生相比降低的水平产生PHIP蛋白,(ii) 以与等价的野生型蛋白质相比具有降低功能的形式产生PHIP蛋白,或者(iii) 不产生PHIP蛋白,并且其中含有NMD外显子的前mRNA自第一等位基因和/或第二等位基因转录。在这些实施方案中,ASO结合自第一等位基因或第二等位基因转录的含有NMD外显子的前mRNA的靶向部分,从而诱导伪外显子从含有NMD外显子的前mRNA的外显子跳跃,并且引起编码PHIP蛋白的mRNA的水平增加以及对象的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NMD外显子的前mRNA的外显子跳跃导致表达水平增加的靶蛋白或功能性RNA可以是呈与等价的野生型蛋白质相比具有降低功能的形式(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)。

[0156] 在一些实施方案中,当与在对照细胞(例如,未用反义寡聚体处理的细胞或用不结合PHIP前mRNA的靶向部分的反义寡聚体处理的细胞)中产生的编码PHIP蛋白的mRNA的量相比时,编码PHIP蛋白的mRNA的水平增加1.1至10倍。

[0157] 在一些实施方案中,使用本公开的方法治疗的对象从一个等位基因表达部分功能性PHIP蛋白,其中部分功能性PHIP蛋白可能由移码突变、无义突变、错义突变或部分基因缺失引起。在一些实施方案中,使用本公开的方法治疗的对象从一个等位基因表达非功能性PHIP蛋白,其中非功能性PHIP蛋白可能由一个等位基因中的移码突变、无义突变、错义突变、部分基因缺失引起。在一些实施方案中,使用本公开的方法治疗的对象在一个等位基因中具有PHIP全基因缺失。

[0158] 外显子包含

[0159] 如本文所用,“含有NMD外显子的前mRNA”是含有至少一个伪外显子的前mRNA转录物。选择性或异常剪接可以导致在成熟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,用于描述完全加工的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NMD外显子的成熟mRNA有时可以导致异常的蛋白质表达。

[0160] 在一些实施方案中,所包含伪外显子是自细胞中编码靶蛋白的基因转录的含有NMD外显子的前mRNA群体中最丰富的伪外显子。在一些实施方案中,所包含伪外显子是自细胞中编码靶蛋白的基因转录的含有NMD外显子的前mRNA群体中最丰富的伪外显子,其中含

有NMD外显子的前mRNA群体包含两个或更多个所包含伪外显子。在一些实施方案中,靶向至编码靶蛋白的含有NMD外显子的前mRNA群体中最丰富的伪外显子的反义寡聚体诱导群体中一个或两个或更多个伪外显子(包括反义寡聚体所靶向或结合的伪外显子)的外显子跳跃。在一些实施方案中,靶向区域在作为编码PHIP蛋白的含有NMD外显子的前mRNA中最丰富的伪外显子的伪外显子中。

[0161] 外显子包含的程度可以被表示为外显子包含百分比,例如其中包含给定伪外显子的转录物的百分比。简而言之,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。

[0162] 在一些实施方案中,所包含伪外显子是基于至少约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%包含的确定而被鉴定为所包含伪外显子的外显子。在实施方案中,所包含伪外显子是基于约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%包含的确定而被鉴定为所包含伪外显子的外显子。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)可以用于帮助鉴定外显子包含。

[0163] 在一些实施方案中,使细胞与互补于PHIP前mRNA转录物的靶向部分的ASO接触与不存在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PHIP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,与由对照化合物产生的靶蛋白的量相比,由反义寡聚体所接触的细胞产生的PHIP蛋白的总量增加约20%至约300%、约50%至约300%、约100%至约300%、约150%至约300%、约20%至约50%、约20%至约100%、约20%至约150%、约20%至约200%、约20%至约250%、约50%至约100%、约50%至约

150%、约50%至约200%、约50%至约250%、约100%至约150%、约100%至约200%、约100%至约250%、约150%至约200%、约150%至约250%、约200%至约250%、至少约10%、至少约20%、至少约50%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%。在一些实施方案中,与由对照化合物产生的靶蛋白的量相比,由反义寡聚体所接触的细胞产生的PHIP蛋白的总量增加到约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。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。

[0164] 在一些实施方案中,使细胞与互补于PHIP前mRNA转录物的靶向部分的ASO接触导致编码PHIP的mRNA(包括编码靶蛋白的成熟mRNA)的量的增加。在一些实施方案中,与不存在ASO/不存在处理的情况下由细胞产生的蛋白质的量相比,编码PHIP蛋白的mRNA或编码PHIP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,与在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PHIP蛋白的mRNA或编码PHIP蛋白的成熟mRNA的总量增加约20%至约300%、约50%至约300%、约100%至约300%、约150%至约300%、约20%至约50%、约20%至约100%、约20%至约150%、约20%至约200%、约20%至约250%、约50%至约100%、约50%至约150%、约50%至约200%、约50%至约250%、约100%至约150%、约100%至约200%、约100%至约250%、约150%至约200%、约150%至约250%、约200%至约250%、至少约10%、至少约20%、至少约50%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%。在一些实施方案中,与在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PHIP蛋白的mRNA或编码PHIP蛋白的成熟mRNA的总量增加到约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。对照化合物可以是例如不与含有NMD外显子的PHIP前mRNA的靶向部分互补的寡核苷酸。

[0165] NMD外显子可以具有任何长度。在一些实施方案中,NMD外显子包含内含子的完全序列,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,NMD外显子可以是内含子的一部分。在一些实施方案中,NMD外显子可以是包含5' ss序列的内含子的5'端部分。在一些实施方案中,NMD外显子可以是包含3' ss序列的内含子的3'端部分。在一些实施方案中,NMD外显子可以是不包含5' ss序列的内含子内的一部分。在一些实施方案中,NMD外显子可以是不包含3' ss序列的内含子内的一部分。在一些实施方案中,NMD外显子可以是不包含5' ss或者3' ss序列的内含子内的一部分。在一些实施方案中,NMD外显子可以具有5个核苷酸至10个核苷酸的长度、10个核苷酸至15个核苷酸的长度、15个核苷酸至20个核苷酸的长

度、20个核苷酸至25个核苷酸的长度、25个核苷酸至30个核苷酸的长度、30个核苷酸至35个核苷酸的长度、35个核苷酸至40个核苷酸的长度、40个核苷酸至45个核苷酸的长度、45个核苷酸至50个核苷酸的长度、50个核苷酸至55个核苷酸的长度、55个核苷酸至60个核苷酸的长度、60个核苷酸至65个核苷酸的长度、65个核苷酸至70个核苷酸的长度、70个核苷酸至75个核苷酸的长度、75个核苷酸至80个核苷酸的长度、80个核苷酸至85个核苷酸的长度、85个核苷酸至90个核苷酸的长度、90个核苷酸至95个核苷酸的长度或95个核苷酸至100个核苷酸的长度。在一些实施方案中,NMD外显子可以是至少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个核苷酸的长度、至少90个核苷酸或至少100个核苷酸的长度。在一些实施方案中,NMD外显子可以是100至200个核苷酸的长度、200至300个核苷酸的长度、300至400个核苷酸的长度、400至500个核苷酸的长度、500至600个核苷酸的长度、600至700个核苷酸的长度、700至800个核苷酸的长度、800至900个核苷酸的长度、900至1,000个核苷酸的长度。在一些实施方案中,NMD外显子的长度可以长于1,000个核苷酸。

[0166] 伪外显子的包含可以导致移码以及在成熟mRNA转录物中引入提前终止密码子(PIC),从而使转录物成为NMD的靶标。含有NMD外显子的成熟mRNA转录物可以是不导致蛋白质表达的非生产性mRNA转录物。PIC可以存在于NMD外显子下游的任何位置中。在一些实施方案中,PIC可以存在于NMD外显子下游的任何外显子中。在一些实施方案中,PIC可以存在于NMD外显子内。例如,在由PHIP基因编码的mRNA转录物中包含PHIP的外显子15x可以诱导mRNA转录物中的PIC。例如,在由PHIP编码的mRNA转录物中包含PHIP的外显子(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)。

[0167] 治疗剂

[0168] 在本公开的各种实施方案中,提供包含治疗剂的组合物和方法以调节PHIP的蛋白质表达水平。在一些实施方案中,本文提供了用于调节PHIP前mRNA的选择性剪接的组合物和方法。在一些实施方案中,本文提供了用于在PHIP前mRNA的剪接中诱导外显子跳跃,例如在PHIP前mRNA的剪接期间诱导伪外显子的跳跃的组合物和方法。在其他实施方案中,治疗剂可以用于诱导外显子的包含,以便降低蛋白质表达水平。

[0169] 本文公开的治疗剂可以是NIE阻抑剂。治疗剂可以包括多核酸聚合物。

[0170] 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PHIP蛋白缺乏相关联的病状或疾病的方法,所述方法包括向对象施用NIE阻抑剂以增加功能性PHIP蛋白的水平,其中所述药剂结合前mRNA转录物的区域以降低成熟转录物中的NMD外显子包含。例如,本文提供了一种治疗或预防与功能性PHIP蛋白缺乏相关联的病状的方法,所述方法包括向对象施用NIE阻抑剂以增加功能性PHIP蛋白的水平,其中所述药剂结合前mRNA转录物的含有NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x)的内含子的区域或相同内含子中的NMD外显子激活调控序列。例如,本文提供了一种治疗或预防与功能性PHIP蛋白缺乏相关联的病状的方法,所述方法包括向对象施用NIE阻抑剂以增加功能性PHIP蛋白的水平,其中所述药剂结合前mRNA转录物的含有NMD外显子(例如,PHIP的外显子(GRCh38/hg38:chr679004373至79004436))的内含子的区域或相同内含子中的NMD外显子激活调控序列。

[0171] 当提及减少成熟mRNA中的NMD外显子包含时,所述减少可以是完全的,例如100%,或者可以是部分的。所述减少可以是临床上有意义的。所述减少/纠正可以是相对于未经治

疗的对象中的NMD外显子包含水平,或者相对于相似对象的群体中的NMD外显子包含量。所述减少/纠正可以是相对于普通对象或治疗前的对象低至少10%的NMD外显子包含。所述减少可以是相对于普通对象或治疗前的对象低至少20%的NMD外显子包含。所述减少可以是相对于普通对象或治疗前的对象低至少40%的NMD外显子包含。所述减少可以是相对于普通对象或治疗前的对象低至少50%的NMD外显子包含。所述减少可以是相对于普通对象或治疗前的对象低至少60%的NMD外显子包含。所述减少可以是相对于普通对象或治疗前的对象低至少80%的NMD外显子包含。所述减少可以是相对于普通对象或治疗前的对象低至少90%的NMD外显子包含。

[0172] 当提及增加活性PHIP蛋白水平时,所述增加可以是临床上有意义的。所述增加可以是相对于未经治疗的对象中的活性PHIP蛋白水平,或者相对于相似对象的群体中的活性PHIP蛋白量。所述增加可以是相对于普通对象或治疗前的对象多至少10%的活性PHIP蛋白。所述增加可以是相对于普通对象或治疗前的对象多至少20%的活性PHIP蛋白。所述增加可以是相对于普通对象或治疗前的对象多至少40%的活性PHIP蛋白。所述增加可以是相对于普通对象或治疗前的对象多至少50%的活性PHIP蛋白。所述增加可以是相对于普通对象或治疗前的对象多至少80%的活性PHIP蛋白。所述增加可以是相对于普通对象或治疗前的对象多至少100%的活性PHIP蛋白。所述增加可以是相对于普通对象或治疗前的对象多至少200%的活性PHIP蛋白。所述增加可以是相对于普通对象或治疗前的对象多至少500%的活性PHIP蛋白。

[0173] 在其中NIE抑制剂包括多核酸聚合物的实施方案中,多核酸聚合物可以具有约50个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约45个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约40个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约35个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约30个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约24个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约25个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约20个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约19个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约18个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约17个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约16个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约15个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约14个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约13个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约12个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约11个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约10个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约10与约50之间个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约10与约45之间个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约10与约40之间个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约10与约35之间个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约10与约30之间个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约10与约25之间个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约10与约20之间个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约15与约25之间个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约15与约30之间个核苷酸的长度。多核酸聚合物可以具有约12与约30之间个核苷酸的长度。

[0174] 多核酸聚合物的序列可以与mRNA转录物(例如部分经加工mRNA转录物)的靶序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%互补。多核酸聚合物的序列可以与前mRNA转录物的靶序列100%互补。

[0175] 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。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。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。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。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。

[0176] 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,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。杂交可以在高严格性杂交条件下。

[0177] 多核酸聚合物包含与选自SEQ ID NO:2-5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。多核酸聚合物可以包含与SEQ ID NO:3具有100%序列同一性的序列。

[0178] 当提及多核酸聚合物序列时,技术人员将理解,在所述序列中可以容许一个或多个取代,任选地两个取代,以使得其保持与靶序列杂交的能力;或者在取代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,所述序列可以具有99%的同一性并且仍然发挥功能。在其他实施方案中,根据本公开,所述序列可以具有98%的同一性并且仍然发挥功能。在另一个实施方案中,根据本公开,所述序列可以具有95%的同一性并且仍然发挥功能。在另一个实施方案中,根据本公开,所述序列可以具有90%的同一性并且仍然发挥功能。

[0179] 反义寡聚体

[0180] 本文提供了一种包含反义寡聚体的组合物,所述反义寡聚体通过结合PHIP前mRNA,例如含有NMD外显子的PHIP前mRNA的靶向部分而诱导外显子跳跃。如本文所用,术语“ASO”和“反义寡聚体”可互换使用,并且是指包含核碱基的寡聚体诸如多核苷酸,所述寡聚体通过Watson-Crick碱基配对或摆动碱基配对(G-U)与靶核酸(例如,PHIP前mRNA,例如含有NMD外显子的PHIP前mRNA)序列杂交。ASO可以具有与靶序列互补的确切序列或近似的互补性(例如,足以结合靶序列并增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。典型地,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相似的核酸序列,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WO 2015/035091公布的名称为“Reducing Nonsense-Mediated mRNA Decay”的PCT申请号PCT/US2014/054151(将其通过引用并入本文)中)任何反义寡聚体可以用于实践本文所述的方法。

[0181] 在一些实施方案中,ASO与靶核酸或PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的前mRNA)的靶向部分“特异性杂交”或对其具有“特异性”。典型地,这种杂交的发生伴随着基本大于37°C、优选地至少50°C并且典型地在60°C至大约90°C之间的 $T_m$ 。这种杂交优选地对应于严格杂交条件。在给定的离子强度和pH下, $T_m$ 是50%的靶序列与互补寡核苷酸杂交时的温度。

[0182] 当杂交在两个单链多核苷酸之间以反平行构型发生时,寡聚体诸如寡核苷酸彼此“互补”。如果杂交可以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(一种多核苷酸与另一种多核苷酸互补的程度)是

按照相反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)而可定量的。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可以包含与其所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,ASO中寡聚体化合物的20个核碱基中有18个核碱基与靶区域互补且因此将特异性杂交将表示90%互补性。在此实例中,其余非互补核碱基可以聚集在一起或散布有互补核碱基,而不必彼此连续或与互补核碱基连续。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。

[0183] ASO不需要与靶序列中的所有核碱基杂交,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杂交事件(例如,可以形成环结构或发夹结构)。在某些实施方案中,ASO与靶前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。

[0184] 本文所述的ASO包含与在PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的前mRNA)的靶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任何其他包含能够与靶mRNA上的互补核碱基杂交的核碱基但不含糖部分诸如肽核酸(PNA)的寡聚体分子。ASO可以包含天然存在的核苷酸、核苷酸类似物、经修饰的核苷酸或前述项中两种或三种的任何组合。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“经修饰的核苷酸”包括具有经修饰的或取代的糖基团和/或具有经修饰的骨架的核苷酸。在一些实施方案中,ASO的所有核苷酸是经修饰的核苷酸。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号8,258,109B2、美国专利号5,656,612、美国专利公开号2012/0190728以及Dias和Stein,Mol.Cancer Ther.2002,347-355(将其通过引用全文并入本文)中。

[0185] 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,诸如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶,或足够类似于未修饰的核碱基,使得能够与靶前mRNA上存在的核碱基氢键键合的任何合成或经修饰的核碱基。经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。

[0186] 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“寡聚体键联”可以互换使用,并且是指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'磷酸二酯键联。本文所述的ASO的骨架结构或寡聚体键联可以包括(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、硫代缩苯胺磷酸酯(phosphoroanilothioate)、缩苯胺磷酸酯(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,第87-108页(F.Eckstein编辑,Oxford University Press,Oxford England(1991));Stec等人,美国专利号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联。在一些实施方案中,骨架修饰是氨基磷酸酯键联。

[0187] 在一些实施方案中,在ASO骨架的每个磷核苷酸间键联处的立体化学是随机的。在一些实施方案中,在ASO骨架的每个磷核苷酸间键联处的立体化学是受控的并且不是随机的。例如,美国专利申请公开号2014/0194610,“Methods for the Synthesis of Functionalized Nucleic Acids,”(将其通过引用并入)描述了用于独立选择核酸寡聚体中每个磷原子处手性的偏性(handedness)的方法。在一些实施方案中,在本公开的方法中使用的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联的ASO。在一些实施方案中,在本公开的方法中使用的组合物包含纯的非对映异构ASO。在一些实施方案中,在本公开的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。

[0188] 在一些实施方案中,ASO在其磷核苷酸间键联处具有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,将其通过引用并入本文)。在一些实施方案中,在本公开的方法中使用的ASO(包括但不限于本文在SEQ ID NO:3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。在一些实施方案中,在本公开的方法中使用的ASO(包括但不限于本文所示的任何ASO)包含与包含SEQ ID NO:3中任一个的至少8个连续核酸的区域具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列,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。

[0189] 在一些实施方案中,在本公开的方法中使用的ASO(包括但不限于本文所示的任何ASO)包含与包含SEQ ID NO:3的至少8个连续核酸的区域具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列,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,在本公开的方法中使用的ASO(包括但不限于本文所示的任何ASO)包含与包含SEQ ID NO:3的至少8个连续核酸的区域具有至少约80%、85%、90%、95%、97%或100%序列同一性的序列,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。

[0190] 本文所述的任何ASO可以含有如天然存在的核苷酸中存在的包含核糖或脱氧核糖的糖部分,或含有包括吗啉环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,诸如2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2' MOE)、2'-O-氨基乙基、2' F; 2'-NMA部分; 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-乙基胍、氨基甲酸酯修饰的糖和双环修饰的糖。如本文所用,“2'-NMA”可以意指替代核糖基糖部分的2'-OH基团的-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>3</sub>基团。“2'-NMA糖部分”或“2'-NMA部分”是具有替代核糖基糖部分的2'-OH基团的2'-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>3</sub>基团的糖部分。除非另外指明,否则2'-NMA糖部分呈β-D构型。“NMA”可以意指O-N-甲基乙酰胺。在一些实施方案中,糖部分修饰选自2'-O-Me、2' F、2'-NMA和2' MOE。在一些实施方案中,糖部分修饰是额外的桥键,诸如在锁核酸(LNA)中。在一些实施方案中,糖类似物含有吗啉环,诸如二氨基磷酸酯吗啉代(PMO)。在一些实施方案中,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,糖部分包含2' 4'限制性2'-O-甲基氧基乙基(cMOE)修饰。在一些实施方案中,糖部分包含cEt 2', 4'限制性2'-O乙基BNA修饰。在一些实施方案中,糖部分包含三环DNA(tcDNA)修饰。在一些实施方案中,糖部分包含乙烯核酸(ENA)修饰。在一些实施方案中,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,例如由Jarver等人, 2014, “A Chemical View of Oligonucleotides for Exon Skipping and Related Drug Applications,” *Nucleic Acid Therapeutics* 24(1):37-47(出于本文中此目的将其通过引用并入)描述。

[0191] 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的骨架的每个键联包含硫代磷酸酯键联,或者每个核糖糖部分包含2'-O-甲基修饰。存在于ASO的每个单体组分上的此类修饰被称为“均一修饰”。在一些实例中,可能需要不同修饰的组合,例如,ASO可以包含二氨基磷酸酯键联和含有吗啉环(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”。

[0192] 在一些实施方案中,ASO包含一个或多个骨架修饰。在一些实施方案中,ASO包含一个或多个糖部分修饰。在一些实施方案中,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,ASO包含2' MOE修饰和硫代磷酸酯骨架。在一些实施方案中,ASO包含二氨基磷酸酯吗啉代(PMO)。在一些实施方案中,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)均可以被修饰,以便实现ASO的所需特性或活性,或减少ASO的不希望的特性或活性。例如,ASO或任何ASO的一种或多种组分可以

被修饰以增强对前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摄取;改变ASO的药代动力学或药效动力学;和/或调节ASO的半衰期。

[0193] 在一些实施方案中,ASO由2'-O-(2-甲氧基乙基)(MOE)硫代磷酸酯修饰的核苷酸构成。由此类核苷酸构成的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。

[0194] 合成ASO的方法是本领域技术人员已知的。可替代地或另外地,ASO可以从商业来源获得。

[0195] 除非另外指明,否则单链核酸(例如,前mRNA转录物、寡核苷酸、ASO等)序列的左手端是5'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是3'端或方向。一般来讲,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”。一般来讲,mRNA的5'方向或端是启动或起始密码子所处的位置,而3'端或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标示,而在参考点下游的核苷酸可以用正数标示。例如,参考点(例如,mRNA中的外显子-外显子接合点)可以被标示为“零”位点,并且与参考点直接相邻且在其上游的核苷酸被标示为“负一”,例如“-1”,而与参考点直接相邻且在其下游的核苷酸被标示为“正一”,例如“+1”。

[0196] 在一些实施方案中,ASO互补于(且结合)PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的PHIP前mRNA)的靶向部分,所述靶向部分在PHIP前mRNA中所包含外显子的5'剪接位点(或NMD外显子的3'端)的下游(在3'方向)(例如,相对于5'剪接位点的以正数标示的方向)。在一些实施方案中,ASO互补于PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的PHIP前mRNA)的靶向部分,所述靶向部分在相对于所包含外显子的5'剪接位点(或3'端)的约+1至约+500区域内。在一些实施方案中,ASO可以互补于PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的PHIP前mRNA)的靶向部分,所述靶向部分在相对于所包含外显子的5'剪接位点(或3'端)的+6与+40,000个核苷酸之间的区域内。在一些方面,ASO互补于在相对于所包含外显子的5'剪接位点(或3'端)的约+1至约+40,000、约+1至约+30,000、约+1至约+20,000、约+1至约+15,000、约+1至约+10,000、约+1至约+5,000、约+1至约+4,000、约+1至约+3,000、约+1至约+2,000、约+1至约+1,000、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,ASO互补于在相对于所包含外显子的5'剪接位点(或3'端)的约+1至约+100、约+100至约+200、约+200至约+300、约+300至约+400、约+

400至约+500区域内的靶向部分。

[0197] 在一些实施方案中,ASO互补于(且结合)PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的PHIP前mRNA)的靶向部分,所述靶向部分在PHIP前mRNA(含有NMD外显子的PHIP前mRNA)中所包含外显子的5'剪接位点(或3'端)的上游(在5'方向)(例如,相对于5'剪接位点的以负数标示的方向)。在一些实施方案中,ASO互补于PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的PHIP前mRNA)的靶向部分,所述靶向部分在相对于所包含外显子的5'剪接位点(或3'端)的约-4至约-270区域内。在一些实施方案中,ASO可以互补于PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的PHIP前mRNA)的靶向部分,所述靶向部分在相对于所包含外显子的5'剪接位点(或3'端)的-1与-40,000个核苷酸之间的区域内。在一些方面,ASO互补于在相对于所包含外显子的5'剪接位点(或3'端)的约-1至约-40,000、约-1至约-30,000、约-1至约-20,000、约-1至约-15,000、约-1至约-10,000、约-1至约-5,000、约-1至约-4,000、约-1至约-3,000、约-1至约-2,000、约-1至约-1,000、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。

[0198] 在一些实施方案中,ASO互补于PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的PHIP前mRNA)的靶向区域,所述靶向区域在PHIP前mRNA中所包含外显子的3'剪接位点(或5'端)的上游(在5'方向)(例如,以负数标示的方向)。在一些实施方案中,ASO互补于PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的PHIP前mRNA)的靶向部分,所述靶向部分在相对于所包含外显子的3'剪接位点(或5'端)的约-1至约-500区域内。在一些实施方案中,ASO互补于PHIP前mRNA的靶向部分,所述靶向部分在相对于所包含外显子的3'剪接位点的约-1至约-40,000区域内。在一些方面,ASO互补于在相对于所包含外显子的3'剪接位点的约-1至约-40,000、约-1至约-30,000、约-1至约-20,000、约-1至约-15,000、约-1至约-10,000、约-1至约-5,000、约-1至约-4,000、约-1至约-3,000、约-1至约-2,000、约-1至约-1,000、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,ASO互补于在相对于所包含外显子的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、约-400至约-500区域内的靶

向部分。

[0199] 在一些实施方案中,ASO互补于PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的PHIP前mRNA)的靶向区域,所述靶向区域在PHIP前mRNA(含有NMD外显子的PHIP前mRNA)中所包含外显子的3'剪接位点(5'端)的下游(在3'方向)(例如,以正数标示的方向)。在一些实施方案中,ASO互补于PHIP前mRNA的靶向部分,所述靶向部分在相对于所包含外显子的3'剪接位点的约+1至约+40,000区域内。在一些方面,ASO互补于在相对于所包含外显子的3'剪接位点的约+1至约+40,000、约+1至约+30,000、约+1至约+20,000、约+1至约+15,000、约+1至约+10,000、约+1至约+5,000、约+1至约+4,000、约+1至约+3,000、约+1至约+2,000、约+1至约+1,000、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或约+1至约+10区域内的靶向部分。

[0200] 在一些实施方案中,PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的PHIP前mRNA)的靶向部分在相对于所包含外显子的5'剪接位点(3'端)的+100至相对于所包含外显子的3'剪接位点(5'端)的-100的区域内。在一些实施方案中,含有NMD外显子的PHIP前mRNA的靶向部分在NMD外显子内。在一些实施方案中,含有NMD外显子的PHIP前mRNA的靶部分包含伪外显子和内含子边界。

[0201] ASO可以具有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,ASO由8至50个核碱基组成。例如,ASO可以具有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个核碱基的长度。在一些实施方案中,ASO由超过50个核碱基组成。在一些实施方案中,ASO具有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个核碱基的长度。在一些实施方案中,ASO具有18个核苷酸的长度。在一些实施方案中,ASO具有15个核苷酸的长度。

在一些实施方案中,ASO具有25个核苷酸的长度。

[0202] 在一些实施方案中,使用具有不同化学但与前mRNA(例如,含有NMD外显子的前mRNA)的相同靶向部分互补的两种或更多种ASO。在一些实施方案中,使用与前mRNA(例如,含有NMD外显子的前mRNA)的不同靶向部分互补的两种或更多种ASO。

[0203] 在一些实施方案中,本公开的反义寡核苷酸经化学连接至一个或多个部分或缀合物,例如增强寡核苷酸的活性或细胞摄取的靶向性部分或其他缀合物。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,反义寡核苷酸与某部分缀合,所述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,例如可以使用接头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。接头可以包括二价或三价支链接头。在实施方案中,缀合物附接至反义寡核苷酸的3'端。制备寡核苷酸缀合物的方法描述于例如美国专利号8,450,467,“Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides”(将其通过引用并入本文)中。

[0204] 在一些实施方案中,被ASO所靶向的核酸是在细胞诸如真核细胞中表达的PHIP前mRNA(例如,含有NMD外显子的前mRNA)。在一些实施方案中,术语“细胞”可以是指细胞群体。在一些实施方案中,细胞在对象中。在一些实施方案中,细胞从对象中分离。在一些实施方案中,细胞是离体的。在一些实施方案中,细胞是病状或疾病相关细胞或细胞系。在一些实施方案中,细胞是体外的(例如,在细胞培养物中)。

[0205] 药物组合物

[0206] 包含所述组合物的药剂(例如,反义寡核苷酸)且用于在任何所述方法中使用的药物组合物或配制品可以根据制药工业中熟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,用于治疗对象的药物组合物或配制品包含有效量的如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配制品可以还包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0207] 药学上可接受的盐适用于与人和低等动物的组织接触而没有不当的毒性、刺激、过敏性应答等,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),出于此目的将其通过引用并入本文。所述盐可以在化合物的最终分离和纯化期间原位制备,或通过使游离碱形式与合适的有机酸反应而单独制备。药学上可接受的无毒酸加成盐的实例是氨基与无机酸(诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸以及高氯酸)或与有机酸(诸如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸)形成的盐,或通过使用其他记录的方法(诸如离子交换法)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、乙烷磺酸盐、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、氢碘化物、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、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、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等。另外的药学上可接受的盐包括在适当时使用抗衡离子诸如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低级烷基磺酸根以及芳基磺酸根形成的无毒的铵、季铵和胺阳离子。

[0208] 在一些实施方案中,将组合物配制为许多可能剂型中的任一种,所述可能剂型诸如但不限于片剂、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。水性悬浮液可以还含有增加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。悬浮液还可以含有稳定剂。在实施方案中,本公开的药物配制品或组合物包括但不限于溶液、乳液、微乳液、泡沫或含脂质体的配制品(例如,阳离子型或非阳离子型脂质体)。

[0209] 本文所述的药物组合物或配制品可以包含适当的且本领域技术人员熟知的或公开文献中描述的一种或多种渗透增强剂、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诸如聚乙二醇(PEG)部分来衍生化。在一些实施方案中,在药物配制品或组合物中包含表面活性剂。在药物产品、配制品和乳液中使用表面活性剂是本领域熟知的。在实施方案中,本公开采用渗透增强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/或增强亲脂性药物的渗透性。在一些实施方案中,渗透增强剂是表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂或非螯合非表面活性剂。

[0210] 在一些实施方案中,药物配制品包含多种反义寡核苷酸。在实施方案中,反义寡核苷酸与另一种药物或治疗剂组合施用。

[0211] 组合疗法

[0212] 在一些实施方案中,本公开中公开的ASO可以与一种或多种另外的治疗剂组合使用。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂可以包括小分子。例如,所述一种或多种另外的治疗剂可以包括以下专利中所述的小分子:W02016128343A1、W02017053982A1、W02016196386A1、W0201428459A1、W0201524876A2、W02013119916A2和W02014209841A2,将所述专利通过引用全文并入本文。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂包括可用于纠正内含子保留的ASO。

[0213] 对象的治疗

[0214] 可以将本文提供的任何组合物施用至个体。“个体”可以与“对象”或“患者”互换使用。个体可以是哺乳动物,例如人或动物,诸如非人灵长类动物、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,个体是人。在实施方案中,个体是胎儿、胚胎或儿童。在其他实施方案中,个体可以是另一种真核生物体,诸如植物。在一些实施方案中,将本文提供的组合物施用至离体细胞。

[0215] 在一些实施方案中,将本文提供的组合物施用至个体以作为治疗疾病或病症的方法。在一些实施方案中,个体患有遗传病,诸如本文所述的任何疾病。在一些实施方案中,个体患有疾病诸如本文所述的任何疾病的风险。在一些实施方案中,个体患有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。如果个体患有由蛋白质的量不

足或蛋白质的活性不足引起的疾病或病症的“风险增加”，则所述方法包括预防性或防范性治疗。例如，个体可能由于疾病的家族史而患有这种疾病或病症的风险增加。典型地，患有这种疾病或病症的风险增加的个体受益于防范性治疗（例如，通过预防或延迟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，经由母体）将ASO组合物施用至胎儿。

[0216] 在一些情况下，主题药物组合物和方法适用于治疗与PHIP缺乏相关联的病状或疾病。在一些情况下，主题药物组合物和方法适用于治疗钟-詹森综合征(CHUJANS)（一种常染色体显性病症）、智力障碍、言语迟缓、焦虑、自闭症谱系病症(ASD)、注意力缺陷多动病症(ADHD)、攻击性、面部畸形、咖啡牛奶斑、由PHIP单倍不足引起的超重综合征、发育迟缓、肥胖或畸形。

[0217] 在一些实施方案中，治疗剂包括寡核苷酸。在一些情况下，治疗剂包括表达结合编码靶肽序列的前mRNA的靶向区域的寡核苷酸的载体，例如病毒载体。本文提供的方法可以修改为使编码药剂（例如，寡核苷酸）的载体与细胞接触，使得药剂结合细胞中的前mRNA并且调节前mRNA的加工。在一些情况下，病毒载体包括腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、慢病毒载体、单纯疱疹病毒(HSV)病毒载体、逆转录病毒载体或任何适用的表达载体。在一些情况下，治疗剂包括基因编辑工具，其被配置为修饰编码靶肽序列的基因，使得编码无效翻译区的基因区域缺失。在一些情况下，基因编码工具包括载体（例如，病毒载体）以用于基于CRISPR-Cas9、TALEN、锌指或其他适用的技术的基因编辑。

[0218] 用于施用本公开的ASO的合适的途径可以根据ASO需要递送至的细胞类型而改变。本公开的ASO可以经肠胃外，例如通过玻璃体内、鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射或静脉内注射施用至患者。

[0219] 在实施方案中，通过本领域已知的任何方法将反义寡核苷酸与能够促进主题反义寡核苷酸跨血脑屏障渗透的一种或多种药剂一起施用。例如，美国专利号6,632,427，“Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons”（将其通过引用并入本文）中描述了通过将腺病毒载体施用至肌肉组织中的运动神经元来递送药剂。例如美国专利号6,756,523，“Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain”（将其通过引用并入本文）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。

[0220] 在一些实施方案中，反义寡核苷酸与提供所需药物或药效动力学特性的药剂连接或缀合。在实施方案中，将反义寡核苷酸偶联至本领域已知促进跨越血脑屏障的渗透或转运的物质（例如，针对转铁蛋白受体的抗体）。在实施方案中，反义寡核苷酸与病毒载体连接，例如以使反义化合物更有效或增加跨血脑屏障的转运。在实施方案中，通过输注糖来帮助渗透性血脑屏障破坏，所述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。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号9,193,969，

“Compositions and methods for selective delivery of oligonucleotide molecules to specific neuron types”;美国专利号4,866,042,“Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier”;美国专利号6,294,520,“Material for passage through the blood-brain barrier”和美国专利号6,936,589,“Parenteral delivery systems”中,将每一篇所述专利通过引用并入本文。

[0221] 在一些情况下,治疗剂包括经修饰的snRNA,诸如经修饰的人snRNA。在一些情况下,治疗剂包括编码经修饰的snRNA的载体,诸如病毒载体。在一些实施方案中,经修饰的snRNA是经修饰的U1snRNA(参见例如Alanis等人,Human Molecular Genetics,2012,第21卷,第11期2389-2398)。在一些实施方案中,经修饰的snRNA是经修饰的U7 snRNA(参见例如Gadgil等人,J Gene Med.2021;23:e3321)。在一些实施方案中,经修饰的snRNA已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与含有NMD外显子的PHIP前mRNA杂交。在一些实施方案中,经修饰的snRNA已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列包含本文公开的ASO的一种或两种或更多种序列。在一些实施方案中,经修饰的snRNA已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与含有NMD外显子的PHIP前mRNA的具有突变的序列杂交。在一些实施方案中,经修饰的snRNA已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列包含与含有NMD外显子的PHIP前mRNA的两个或更多个靶区域杂交的两种或更多种序列。例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与含有NMD外显子的PHIP前mRNA的至少8个连续核酸杂交。在一些实施方案中,经修饰的snRNA已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与本文公开的含有NMD外显子的PHIP前mRNA的任何靶区域杂交。在一些实施方案中,经修饰的snRNA已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列包含与含有NMD外显子的PHIP前mRNA的两个或更多个靶区域杂交的两种或更多种序列。例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与前mRNA转录物的含有NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x(例如,PHIP的外显子(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)))的内含子的一种或两种或更多种序列或者与相同内含子中的NMD外显子激活调控序列杂交。例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与NMD外显子内或在NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x(例如,PHIP的外显子(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)))上游或下游的区域杂交。在一些实施方案中,经修饰的snRNA具有5'区域,所述区域已被修饰为包含与含有NMD外显子的PHIP前mRNA杂交的单链核苷酸序列。

[0222] 例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与这样的区域杂交,所述区域与NMD外显子和在NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x(例如,PHIP的外显子(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)))上游的内含子重叠。例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与这样的区域杂交,所述区域与NMD外显子和在NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x(例如,PHIP的外显子(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)))下游的内含子重叠。

[0223] 例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与在NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x(例如,PHIP的外显子(GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436)))下游的内含子序列互补。例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与在NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x(例如,

PHIP的外显子 (GRCh38/hg38:chr679004373至79004436)) 上游或下游的内含子序列的3' 剪接位点互补。例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与在NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x(例如,PHIP的外显子 (GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436))) 下游的内含子序列的5' 剪接位点互补。

[0224] 例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与在NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x(例如,PHIP的外显子 (GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436))) 上游的内含子序列互补。例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与在NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x(例如,PHIP的外显子 (GRCh38/hg38:chr679004373至79004436))) 上游的内含子序列的剪接位点互补。例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与在NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x(例如,PHIP的外显子 (GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436))) 上游的内含子序列的3' 剪接位点互补。例如,经修饰的snRNA可以已被修饰为包含单链核苷酸序列,所述单链核苷酸序列与在NMD外显子(例如,PHIP的外显子15x(例如,PHIP的外显子 (GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436))) 上游的内含子序列的5' 剪接位点互补。

[0225] 在一些实施方案中,使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对象的病状改善。

[0226] 鉴定诱导外显子跳跃的另外ASO的方法

[0227] 本公开的范围还包括用于鉴定或确定诱导含有NMD外显子的PHIP前mRNA的外显子跳跃的ASO的方法。例如,一种方法可以包括鉴定或确定诱导含有NMD外显子的PHIP前mRNA的伪外显子跳跃的ASO。可以筛选与前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,ASO可以阻断或干扰剪接阻抑物/沉默子的结合位点。可以使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应(例如,伪外显子跳跃、蛋白质或功能性RNA产生)的ASO。这些方法还可以用于鉴定通过结合在所包含外显子侧翼的内含子中或非包含外显子中的靶向区域而诱导所包含外显子的外显子跳跃的ASO。以下提供了可以使用的方法的实例。

[0228] 被称为ASO“步移”的一轮筛选可以使用已被设计为与前mRNA的靶区域杂交的ASO来进行。例如,ASO步移中所用的ASO可以从所包含外显子的3' 剪接位点上游大约100个核苷酸(例如,位于靶/所包含外显子上游的外显子序列的一部分)至靶/所包含外显子的3' 剪接位点下游的大约100个核苷酸和/或从所包含外显子的5' 剪接位点上游的大约100个核苷酸至靶/所包含外显子的5' 剪接位点下游的大约100个核苷酸(例如,位于靶/所包含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可以被设计为与相对于靶/所包含外显子的3' 剪接位点的+6至+20核苷酸特异性杂交。第二ASO可以被设计为与相对于靶/所包含外显子的3' 剪接位点的+11至+25核苷酸特异性杂交。将ASO设计为如此跨越前mRNA的靶区域。在实施方案中,ASO可以更紧密地平铺,例如每1、2、3或4个核苷酸。此外,ASO可以从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可以从3' 剪接位点上游的约1,160个核苷酸至5' 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可以从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。

[0229] 例如通过转染将一种或多种ASO或对照ASO(具有杂乱序列,即预期不与靶区域杂交的序列的ASO)递送至表达靶前mRNA(例如,本文所述的含有NMD外显子的前mRNA)的疾病相关细胞系中。如实施例2中所述,可以通过本领域已知的任何方法,例如通过使用跨越剪接合点的引物的逆转录酶(RT)-PCR,评估每种ASO的外显子跳跃效应。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有所包含外显子(例如,包括NMD外显子的侧翼外显子)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NMD外显子的剪接已得到增强。在一些实施方案中,可以使用本文所述的ASO来改善外显子跳跃效率(或剪接含有NMD外显子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。还可以评估由靶前mRNA编码的蛋白质或功能性RNA的量,以确定每种ASO是否实现所需效应(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/或定量蛋白质产生的任何方法,诸如蛋白质印迹、流式细胞术、免疫荧光显微术和ELISA。

[0230] 被称为ASO“微步移”的第二轮筛选可以使用已被设计为与前mRNA的靶区域杂交的ASO来进行。在ASO微步移中使用的ASO以每1个核苷酸进行平铺,以进一步精修当与ASO杂交时导致外显子跳跃(或增强的NMD外显子剪接)的前mRNA的核苷酸序列。

[0231] 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,典型地18-25nt,更详细地探究由促进靶内含子剪接的ASO所限定的区域。

[0232] 如以上对于ASO步移所述,通过将一种或多种ASO或对照ASO(具有杂乱序列,即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靶前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2),可以通过本领域已知的任何方法,例如通过使用跨越NMD外显子的引物的逆转录酶(RT)-PCR,评估每种ASO的剪接诱导效应。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NMD外显子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跳跃(或含有NMD外显子的靶内含子的剪接)已经得到增强。在一些实施方案中,可以使用本文所述的ASO来改善外显子跳跃效率(或剪接含有NMD外显子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。还可以评估由靶前mRNA编码的蛋白质或功能性RNA的量,以确定每种ASO是否实现所需效应(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/或定量蛋白质产生的任何方法,诸如蛋白质印迹、流式细胞术、免疫荧光显微术和ELISA。

[0233] 可以使用动物模型,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对当与前mRNA的区域杂交时导致外显子跳跃(或含有NMD外显子的内含子的剪接增强)和蛋白质产生增加的ASO进行体内测试。合适的ASO施用途径可以根据需要递送ASO的疾病和/或细胞类型而改变。ASO可以例如通过玻璃体内、鞘内注射、脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、皮下注射或静脉内注射施用。在施用后,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(例如,效率、速率、程度)和蛋白质产生来确定ASO治疗的效应。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。

[0234] 在本公开的范围内还包括在存在下NMD抑制剂例如环己酰亚胺的情况下鉴定或验证NMD诱导外显子的方法。实施例3中提供了示例性方法。

[0235] 具体实施方案实施方案1.一种调节具有前mRNA的细胞中靶蛋白的表达的方法,所

述前mRNA自靶基因转录并且包含无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子),所述方法包括使药剂或编码所述药剂的载体与所述细胞接触,由此所述药剂调节所述NMD外显子从所述前mRNA的剪接,从而调节从所述前mRNA加工的经加工mRNA的水平,并且调节所述细胞中所述靶蛋白的表达,并且其中所述靶基因是PHIP基因。

[0236] 实施方案2.如实施方案1所述的方法,其中所述药剂:

[0237] a.结合所述前mRNA的靶向部分;

[0238] b.调节参与所述NMD外显子的剪接的因子的结合;或

[0239] c.(a)和(b)的组合。

[0240] 实施方案3.如实施方案2所述的方法,其中所述药剂干扰参与所述NMD外显子的剪接的因子与所述靶向部分的区域的结合。

[0241] 实施方案4.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分在所述NMD外显子的近侧。

[0242] 实施方案5.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的5'端上游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0243] 实施方案6.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的5'端上游的至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0244] 实施方案7.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的3'端下游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0245] 实施方案8.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在所述NMD外显子的3'端下游的至少约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0246] 实施方案9.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点GRCh38/hg38:chr6 79004373上游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0247] 实施方案10.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点GRCh38/hg38:chr6 79004373上游的约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0248] 实施方案11.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点GRCh38/hg38:chr6 79004436下游的至多约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0249] 实施方案12.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分是在基因组位点GRCh38/hg38:chr6 79004436下游的约1500个核苷酸、约1000个核苷酸、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。

[0250] 实施方案13.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分位于所述前mRNA的两个规范外显子区域之间的内含子区域中,并且其中所述内含子区域含有所述NMD外显子。

[0251] 实施方案14.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分与所述NMD外显子至少部分重叠。

[0252] 实施方案15.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分与在所述NMD外显子上游或下游的内含子至少部分重叠。实施方案16.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分包含5' NMD外显子-内含子接合点或3' NMD外显子-内含子接合点。

[0253] 实施方案17.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分在所述NMD外显子内。

[0254] 实施方案18.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分包含所述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。

[0255] 实施方案19.如实施方案1至18中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子(a)在与SEQ ID NO:2具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的内含子序列内并且/或者(b)包含与SEQ ID NO:3具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的序列。

[0256] 实施方案20.如实施方案1至18中任一项所述的方法,其中所述NMD外显子包含SEQ ID NO:3的序列。

[0257] 实施方案21.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分在无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr679004373至79004436内。

[0258] 实施方案22.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分在无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr679004373至79004436的上游或下游。

[0259] 实施方案23.如实施方案2所述的方法,其中所述前mRNA的所述靶向部分包含无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr679004373至79004436的外显子-内含子接合点。

[0260] 实施方案24.如实施方案1至23中任一项所述的方法,其中从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是全长PHIP蛋白或野生型PHIP蛋白。

[0261] 实施方案25.如实施方案1至23中任一项所述的方法,其中从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是功能性PHIP蛋白。

[0262] 实施方案26.如实施方案1至23中任一项所述的方法,其中与野生型PHIP蛋白相比,从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是至少部分功能性的。

[0263] 实施方案27.如实施方案1至23中任一项所述的方法,其中与全长野生型PHIP蛋白相比,从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是至少部分功能性的。

[0264] 实施方案28.如实施方案1至23或25至27中任一项所述的方法,其中从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白是缺乏由无义介导的RNA衰变诱导外显子GRCh38/hg38:chr6 79004373至79004436编码的氨基酸序列的PHIP蛋白。

[0265] 实施方案29.如实施方案1至28中任一项所述的方法,其中所述方法促进所述NMD外显子从所述前mRNA中的排除。

[0266] 实施方案30.如实施方案29所述的方法,其中与在不存在所述药剂相比,在与所述药剂接触的所述细胞中所述NMD外显子从所述前mRNA中的排除增加到约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。

[0267] 实施方案31.如实施方案1至30中任一项所述的方法,其中所述方法导致所述细胞中所述经加工mRNA的水平增加。

[0268] 实施方案32.如实施方案31所述的方法,其中与在不存在所述药剂相比,在与所述药剂接触的所述细胞中所述经加工mRNA的水平增加到约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。

[0269] 实施方案33.如实施方案1至32中任一项所述的方法,其中所述方法导致所述细胞中所述靶蛋白的表达的增加。

[0270] 实施方案34.如实施方案33所述的方法,其中与在不存在所述药剂相比,在与所述药剂接触的所述细胞中从所述经加工mRNA表达的所述靶蛋白的水平增加到约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。

[0271] 实施方案35.如实施方案1至34中任一项所述的方法,其中所述药剂包括与选自

SEQ ID NO:4-180的序列具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的反义寡聚体。

[0272] 实施方案36.如实施方案1至34中任一项所述的方法,其中所述药剂还包括基因编辑分子。

[0273] 实施方案37.如实施方案36所述的方法,其中所述基因编辑分子包括CRISPR-Cas9。

[0274] 实施方案38.如实施方案1至37中任一项所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含含有硫代磷酸酯键联或二氨基磷酸酯键联的骨架修饰。

[0275] 实施方案39.如实施方案1至38中任一项所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含二氨基磷酸酯吗啉代、锁核酸、肽核酸、2'-O-甲基部分、2'-氟部分、2'-NMA部分或2'-O-甲氧基乙基部分。

[0276] 实施方案40.如实施方案1至39中任一项所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体包含至少一个经修饰的糖部分。

[0277] 实施方案41.如实施方案40所述的方法,其中每个糖部分是经修饰的糖部分。

[0278] 实施方案42.如实施方案1至41中任一项所述的方法,其中所述药剂是反义寡聚体(ASO),并且其中所述反义寡聚体由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个核碱基或12至15个核碱基组成。

[0279] 实施方案43.如实施方案1所述的方法,其中所述方法包括使编码所述药剂的载体与所述细胞接触,其中所述载体是病毒载体。

[0280] 实施方案44.如实施方案43所述的方法,其中所述病毒载体包括腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、慢病毒载体、单纯疱疹病毒(HSV)病毒载体或逆转录病毒载体。

[0281] 实施方案45.如实施方案43所述的方法,其中所述病毒载体包括腺相关病毒(AAV)载体。

[0282] 实施方案46.如实施方案1所述的方法,其中所述药剂包括经修饰的snRNA。

[0283] 实施方案47.如实施方案46所述的方法,其中所述经修饰的人snRNA是经修饰的U1 snRNA。

[0284] 实施方案48.如实施方案46所述的方法,其中所述经修饰的人snRNA是经修饰的U7 snRNA。

[0285] 实施方案49.如实施方案46所述的方法,其中所述经修饰的人snRNA的单链核苷酸序列的一部分包含结合所述前mRNA的所述靶向部分的序列。

[0286] 实施方案50.如实施方案46至49中任一项所述的方法,其中所述方法包括使编码所述经修饰的snRNA的载体与所述细胞接触。

[0287] 实施方案51.如实施方案1至50中任一项所述的方法,其中所述方法还包括评估所

述靶蛋白的mRNA水平或表达水平。

[0288] 实施方案52.如实施方案1至51中任一项所述的方法,其中所述药剂是治疗剂。

[0289] 实施方案53.一种药物组合物,所述药物组合物包含如实施方案52所述的治疗剂或编码如实施方案52所述的治疗剂的载体和药学上可接受的赋形剂。

[0290] 实施方案54.一种药物组合物,所述药物组合物包含治疗剂或编码治疗剂的载体和药学上可接受的赋形剂,其中所述治疗剂包括与选自SEQ ID NO:4-180的序列具有至少80%序列同一性的反义寡聚体。

[0291] 实施方案55.如实施方案54所述的药物组合物,其中所述治疗剂包括与选自SEQ ID NO:55-180的序列具有至少80%、至少90%或100%序列同一性的反义寡聚体。

[0292] 实施方案56.如实施方案53至55中任一项所述的药物组合物,其中将所述药物组合物配制用于脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、鞘内注射、皮下注射、口服施用、滑膜注射、玻璃体内施用、视网膜下注射、局部应用、植入或静脉内注射。

[0293] 实施方案57.如实施方案53至55中任一项所述的药物组合物,其中将所述药物组合物配制用于鞘内注射或脑脊髓内注射。

[0294] 实施方案58.如实施方案53至57中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含第二治疗剂。

[0295] 实施方案59.如实施方案58所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂包括小分子。

[0296] 实施方案60.如实施方案58所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂包括反义寡聚体。

[0297] 实施方案61.如实施方案58所述的药物组合物,其中所述第二治疗剂纠正内含子保留。

[0298] 实施方案62.一种组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:4-180的序列具有至少80%序列同一性的反义寡聚体,其中所述反义寡聚体包含骨架修饰、糖部分修饰或其组合。

[0299] 实施方案63.一种组合物,所述组合物包含编码包括反义寡聚体的多核苷酸的病毒载体,其中所述反义寡聚体由选自SEQ ID NO:4-180的序列组成。

[0300] 实施方案64.如实施方案63所述的组合物,其中所述多核苷酸还包括经修饰的snRNA。

[0301] 实施方案65.如实施方案64所述的组合物,其中经修饰的人snRNA是经修饰的U1 snRNA。

[0302] 实施方案66.如实施方案64所述的组合物,其中所述经修饰的人snRNA是经修饰的U7 snRNA。

[0303] 实施方案67.如实施方案62或63所述的组合物,其中所述反义寡聚体与选自SEQ ID NO:55-180的序列具有至少80%、至少90%或100%序列同一性。

[0304] 实施方案68.一种在有需要的对象中通过调节所述对象的细胞中靶蛋白的表达来治疗疾病或病状或者降低发展所述疾病或病状的可能性的方法,所述方法包括使如实施方案53至61中任一项所述的药物组合物与所述对象的细胞接触。

[0305] 实施方案69.如实施方案68所述的方法,其中所述疾病或病状与PHIP基因中的功能丧失突变相关联。

[0306] 实施方案70.如实施方案68或69所述的方法,其中所述疾病或病状与所述PHIP基因的单倍不足相关联,并且其中所述对象具有编码功能性PHIP蛋白的第一等位基因,以及不产生或以降低的水平产生所述PHIP蛋白的第二等位基因,或编码非功能性PHIP蛋白或部分功能性PHIP蛋白的第二等位基因。

[0307] 实施方案71.如实施方案68至70中任一项所述的方法,其中所述疾病或病状包括智力障碍疾病或病状。

[0308] 实施方案72.如实施方案68至70中任一项所述的方法,其中所述疾病或病状包括钟-詹森综合征(CHUJANS)(一种常染色体显性病症)、智力障碍、言语迟缓、焦虑、自闭症谱系病症(ASD)、注意力缺陷多动病症(ADHD)、攻击性、面部畸形、咖啡牛奶斑、由PHIP单倍不足引起的超重综合征、发育迟缓、肥胖或畸形。

[0309] 实施方案73.如实施方案68至70中任一项所述的方法,其中所述疾病或病状包括钟-詹森综合征。

[0310] 实施方案74.如实施方案68至70中任一项所述的方法,其中所述疾病或病状包括智力障碍。

[0311] 实施方案75.如实施方案68或69所述的方法,其中所述疾病或病状与PHIP基因的常染色体隐性突变相关联,其中所述对象具有第一等位基因,由其:

[0312] (i) 不产生PHIP蛋白或者以与野生型等位基因相比降低的水平产生PHIP蛋白;或

[0313] (ii) 产生的所述PHIP蛋白与野生型等位基因相比是非功能性或部分功能性的;以及

[0314] 实施方案76.第二等位基因,由其:

[0315] 实施方案77.(iii) 以与野生型等位基因相比降低的水平产生所述PHIP蛋白,并且产生的所述PHIP蛋白与野生型等位基因相比是至少部分功能性的;或者

[0316] 实施方案78.(iv) 产生的所述PHIP蛋白与野生型等位基因相比是部分功能性的。

[0317] 实施方案79.如实施方案68至76中任一项所述的方法,其中所述对象是人。

[0318] 实施方案80.如实施方案68至76中任一项所述的方法,其中所述对象是非人动物。

[0319] 实施方案81.如实施方案68至76中任一项所述的方法,其中所述对象是胎儿、胚胎或儿童。

[0320] 实施方案82.如实施方案68至76中任一项所述的方法,其中所述细胞是离体的。

[0321] 实施方案83.如实施方案68至76中任一项所述的方法,其中将所述药物组合物通过脑室内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、鞘内注射、皮下注射、口服施用、滑膜注射、玻璃体内施用、视网膜下注射、局部应用、植入或静脉内注射施用。

[0322] 实施方案84.如实施方案68至76中任一项所述的方法,其中将所述药物组合物通过鞘内注射或脑脊髓内注射施用。

[0323] 实施方案85.如实施方案68至76中任一项所述的方法,其中所述方法治疗所述疾病或病状。

[0324] 实施方案86.一种组合物,所述组合物包含药剂或编码所述药剂的载体,所述药剂或所述载体调节无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子)从靶基因转录并且包含所述NMD外显子的前mRNA的剪接,从而调节从所述前mRNA加工的经加工mRNA的水平,并且调节具有所述前mRNA的细胞中靶蛋白的表达,并且其中所述靶基因是PHIP基因。

[0325] 实施方案87.一种组合物,所述组合物包含药剂或编码所述药剂的载体,所述药剂或所述载体调节无义介导的RNA衰变诱导外显子(NMD外显子)从自靶基因转录并且包含所述NMD外显子的前mRNA的剪接,从而通过调节从所述前mRNA加工的经加工mRNA的水平,并且调节有需要的对象的细胞中靶蛋白的表达来治疗所述对象中的疾病或病状,并且其中所述靶基因是PHIP基因。

[0326] 实施方案88.一种药物组合物,所述药物组合物包含如实施方案84或85所述的组合物;和药学上可接受的赋形剂和/或递送媒介物。

[0327] 实施方案89.如先前实施方案中任一项所述的方法或组合物或药物组合物,其中所述靶蛋白是普列克底物蛋白同源结构域相互作用蛋白(PHIP)。

[0328] 实施例

[0329] 本公开将通过以下实施例更具体地加以说明。然而,应理解,本公开不以任何方式受这些实施例的限制。

[0330] 实施例1:使用测序通过RNAseq鉴定转录物中的NMD诱导外显子包含事件。

[0331] 使用RNA测序进行全转录物组鸟枪法测序以揭示由本文所述基因产生的转录物的快照,从而鉴定NMD外显子包含事件。为此,从用环己酰亚胺(CHX)或DMSO对照处理的人神经祖细胞(ReN)和人星形胶质细胞的细胞核和细胞质级分中分离出多聚A+RNA,并且使用Illumina的TruSeq Stranded mRNA文库制备试剂盒来构建cDNA文库。对文库进行双端(pair-end)测序,从而产生映射至人类基因组(2017年12月,GRCh38/hg38组装体)的100核苷酸读取。图3描绘了对PHIP基因中示例性无义介导的mRNA衰变(NMD)诱导外显子的鉴定。

[0332] 示例性基因和内含子序列汇总于表1中(SEQ ID NO指示由基因ID号表示的对应核苷酸序列)。示例性内含子的序列汇总于表2中。PHIP蛋白序列提供于表3中。表4、5和6列出本公开的PHIP反义寡聚体的序列。

[0333] 表1. 示例性靶基因序列的列表。

基因符号	基因ID号	SEQ ID NO.	疾病	OMIM	遗传学	转录物
PHIP	55023	1	钟-磨森综合征; 智力障碍	612870	单倍不足	ENST00000275034

[0335] 表2. 前mRNA转录物中示例性靶内含子/NMD外显子的序列。

基因	SEQ ID NO.	内含子
<p><i>PHIP</i> 内含子 15 序列</p>	<p>2</p>	<p>gtaattatcattctcttcatTTTTatacctactaaagatttgggagcttttgacaaag                      gtactctgcatgtcacaaaggaaatccatttaaaaattggttcattatttgacttt                      aaattcccatcaataaagaatgatttatccacactttattgacatgctgaattta                      aaagaaaattaattgtgcatattacagtgcctgtacattgtgataactgatacag                      tttatcagtttagcagtgaaacttggaaatcacaaagtgaagatacaaat                      agagaagaaaaaacttggaaaacatgtgaagaaattataataaatactc                      gtattatgtacttgttfaatagctctctagcacaatagaatttactcaagtacact                      gattttaaataaggccaagaatcaagcattcttgcctttaaataatggtag                      tatataaataattgagttatactctctctcacttttgttcttagatgtaacat                      aattggccaagtattgaattacaatgtttaaataatcacatacaactaccgag                      cagtgttctattactgtatgaagatgaaggctctcctcaactactgcagttgtg                      tagtcatatTTTTaaatgtctacttctgtatattagagataccttcaacaaagaa                      caaaagaaaaaacagttccactattcagcatgttaaatttttaaaaaacca                      attatagaatcttagtaatgaaccataaaacaatacaattagtacctgtggtc                      agaattatttgcCAAATAAATtattcacaaaacagttgtgaaacatggtttgtg                      aaaaaattacacgaatgtgatgctatgcttgattgataatcagagtaaagtatt                      tctatgtcgtgagtaagcagatataatagcagatTTTTtagtgagggaataact                      ttagctatcttaaggctgtgccctagaatacattaggtaagaaataaggttgta                      aaaccctctatttctagaaaacagtgtaattatttgggtgtgacttgttagtgat                      ggatggatttcttgtgattgtattgagatTTTTaaaaagccacctgaaatat                      gctagtAAAAAATtattctgctttctatccttgtgttctgatttgcctcttttgg                      atatctgttgaataaggaaattagtcatttctcaatctgtctttatagcttaaaaa                      aataatatgtgagctatataataactagtggttcatttagtagtttgtattccaa                      aggacattattatattggttagagtgttggagggaacttttcccataattga                      ataccgcttaactttcagttatataaagggaatttcccttatcaggaagtgtg                      gtcacactaatattctacctttcagtagataacaaaaactgcagcacctgag                      agttaagtgttgccttagaccattaaaaatagtaatgtaaccaggagtaga                      agtcagccataatataatgtatattttaaaaatagctgagggattggttacatta                      ctgccttaaaaattgttattgttaataagagtgtagatgaggatattttctgg                      ttcttttatggataagagataggaaaactctaagagcagaagaacaata</p>

[0336]

[0337]

	<p>catgtaataagttgaattggatagtattcatagaattgcagacagtgagcaaaa  cataaaccataaaagctaaaaaacagaaagtgagccaccctcatctcattaa  aataaagatactaccttaatTTTTgtatgatgTTaatggTTccaaaaatgctccc  acatattttacctcctttgggtctcatgaaaaccttgaagatgatcaagatagat  ttattattcttggcttaggaatggagaaactgtacattacagagataaagtgct  ttgccccaatftactgagftcacacagctattatgcgggacttggagcataaa  cccatgactctggtgtactcaaatctgtcatggtggcTTTTgagcttttgc  atgttactgcatagctaaactTTaacaatactcagttagtgatatgctatgaaga  aatgTTTTcataatggtaataaatctgagTggatctttgacatctfactcttaact  tgattTTTTctgtctgtctttatgagttatctaattgccctaactcttttgccttc  actctttgtcttttcatgtctgttttattatgggcaaatggaagataaagcatc  cagcattgctattaagaaaataaagagaaacaatfcgagggaggccctgcgt  tctcactgcttgcatacatgaatgtgagtttggctataattatagctattggctc  tctgtagctaatcaataagTTTTcagttactaaaataccacgatacttgattgcat  acaaatTaatccctaatgTtaagttgtagtagtaatacacaagttcagtttagttaa  atatttttgagccatgtgaagggtctagtcataatagtgctttgctctattag  aggatgaagaattctggTggaactcctttttgactagaaatggTgaagttta  tgtgaagtattttaagattaaataatftcatgtgactgtfaaaactgaagttat  aaaacagataagTaaactcaccattccacctacagctagaaaataaggaatgt  agactatacctttagaataacagtttagtacaatftctaaactggttttctc  aagtatattttagaataactttaatattctcctgcttttgaataataaTgaatttc  cattggaaatttataccttgcaaaagataatggaaatcatgtaacataaattta  gtattttgtattcatcagcattttactgcatttttTgttaattggaaatgTaaatt  ctttttTgaaatttagaaatagccaaaaatcctgttatgtTaaaaagcctttcaa  gtgaaaaggTgaactttcaaatgcctgttgatacatagtaattacattttaataa  ttttaaatataagattataaaacatTaatattTaatattgcactgatagtcacatt  gtaataagTattctaatTTTTctgtatcaagccatgactatactttTaaaaattc  ttgtgctttattttgggaccatctaaattgtcagcaaatTaaagagttgagattg  ggaaattgagataaagctatttagttctttatgtTaaataattacttcatctgaa  atcttataaatggattctcaactttcaagtagtattctccagagaaactgagggg  ttattttcttgttttactgctaactttctcctaataagaggatctcaatgataaaa  gcagttggggagTgggtgctgggtttgttttgttactataagaagtatatgac  acgtgagatgatgtttTaaaagaggctaacaatagggcataaaatggaataga  cagtatatgtagcttTactccccctacccttctgttTctcatctTaaactaaa  actttTaaaagcactattgggaaagcctttgtggtctttttgtgtgttttct  ttttaaagtgaacaggagaagaacaaagagaattttgtagaaaatattatga  gacaactttattctTaaaaacaacaaactacattctaggccttcagTactttat  ttctttacgaatcaactgaacagTcctTacataactTgagTattcagaggaaatg  tagtatatatTggatattTactgaagcaagtagTtatataagaatattccaaa  ctataatagTgggtataacttagtaagcccacattgtTggcatTggcaggag  gtaaacatcagaatagctttgtttgatgagagTgtTctaaactctaaaggctct  atactccattTaatgctaaaaggcagataaataatTcccagaaatagctTgaa  aatgtgtgcaactctcaggactgaagctgagggccttctgtgaaagaggtcg  ccaggTtagaagTtaattataacctTaaatgtTcctaataataaattgtttatggT</p>
--	--

[0338]

	<p>ctttattccccatfaaattagcaccggacagctaagtttaactacgagttaac  taaataaatatfaaattfaattgaaaagatagagactttcacatftcttagtacta  ggccatttgaatattaaatagtaataagagatgcttggagttgaattttagtac  cccatgttttagtagcttctcatgttctggcggtttgcfttattctctactct  ttctttctctatagccctagctgtgtctctatctctcttccatattcttctctgt  cattactcaaagctgtagttgttgcctcctgtctggtttcatttfaatcaaagag  tatagtatgtcttfaatagaaagcagtttactgaatttgattttgcfttactttgt  gtttcatgggtaaatccaaataagttttatftgatfaaagtttcttattttataa  ttgttctctaaccttctttacttaagagattttttaaataaaaggtccagt  gtccactaatccagaacaatataattctccttgcaacgttccaaacgagcagag  gctgccaatctaccaccagaattttgtacatgcatacttctctgatgttaaca  tgttctcagtgtagcttactttagtttagataatttagctgtatgtatcagg  aaagggagaaagagaagctcaaaataggtagcagctcatattgtgtatctctt  attaatcaggagaagagctctctctcttctcttcttcttcttctccctcaccac  cctcccttctccctccctccctctctccctcttctctctctctctctctctct  atctaaagataatgtcctatattatactctctgtttaaaggactctctgat  gcttccagtctatgttcagcttcttgggtaaggaagtacttccggcttcttacc  atacctttagtaattacttccaggttfaagatctttagattatctctcttct  atataatatttggtacaaaagcatgttaactgttgccatgaatgtgagttg  tctctccagcttctcacactgcattatattggttaaatfactttatgtagtaattct  ttgacatagtcctgacttgctatcacaagggtattgagattgatagtataatg  agaaggtatataaaattatacagaatttaacatgcagatgaaaacattttaa  aaatatttgagtggttcttcttgggttaagcacaataatgaggaccacaagggga  gaataagacgtggtctttagtcagcctacagtaagttggggagacaaaata  tacaataataccftaagggataaatattgataaataatccaacagtagcatg  acaaatgagaaaagacagttgctgtatcttaagatgtagagatcattgtcagg  gtggacgattggagacgtttgttggaggagaaggaattgaaactatgccttga  aagataaataggaatcgagtcagtaagaaagagaatgaatttataacaaga  ggaacattataaaaagctaaagtgtcaagacatgttcatagaaatttagatatt  ggaagcttgattgcagtagatttggaaataatgacgaaaaacaaattgagat  gaactgtcagtgacttcaaatgatctcataggcataaatacctatgaacctgt  gggggctttagtaaatattttataggatggtcgagaagctaaagaaaaata  gtttggttccagtagtacaatttcaggtatgaaattgaataagtgtgaggaca  actactttaaattagtcataaaatattatagggtagttggtaggaaatttga  gaaaaaatacataaatgacttgggtgtttgtgactatattaggatttgggctata  ggatgacagggaggaaagatttaataaatgggtttagagattgtaagccg  ggtgaccttgagaacaatggtttatttagtggaataatgaaagacataagggga  gaactgacttcttattcagttcatttgaataatgtttatgcgttgaactacctat  gtggaatggccagctggcacttggagatagactacttagaggggctagga  gtaaaaagaagaaagtgtgaagtgttcttatagtatatagttacttctcgtg  gagacaggagaaggaagtgcagaaggcttagaagtaaaacttgggaaatac  tcatatatttagcagaatggaaaaggggtcacaatccttaagaggggtgtca  aggaagacacaccatgctaataatgcaaaaagaccacaaaagaaataagcct  caaggaaggcctaataatagattgctctccccagagaatacataataggg</p>
--	---

[0339]

	<p>tacaaaatgatgftaaattgaagatatattttggtaatat tttcttttgat gaaa  atctagagctgatttttcagaatcactttatataataat ttttttctattttatgtaat  aatctgatctactgattttatcaagtcaggccagcagtttctttttatgttggc  ataagtaagaatttcaagattaaaacagccatgcaataactttttaaagta  atggataacacctgaactgtggaattggatttttttttttagacggagctt  gctctgtcaccaggctggagtgcagtggcacaatctcagctcactgcaacct  ccgctcctggcacaatctcatctcactgcaacctccgctcccgggttcagg  tgatttctgcctgcctcagcctcccaagtagctgggactacatgcgagcgc  accacaccagctaat tttgtgttttagtagagacagggcttcaccatgttga  ccaggatccaacacttat tcaaatatacatctgagctttttgtatctagt t ac  atat tttccctaggttggcaagctctaatctaaaagtttttaatacataaggaa  ggacttcttaagggttattcttagcataaattccattatcacctctttcattctg  gtatatgagtcatttcataagatttttagggattttaaaagttgcatacataa  tttaaaatttggagtttcttaggtaagatgcttcttctaatgaacgggtgtgct  taaaaaaaaaaaaaaaaaaagaacaagacatactgacctgctaafg  aattgaaataactctagaagaggatggttctgcctaagatagccatattttta  acctcctactttgtgtaagggtttctagaagcatatactctcatattcactctct  gtatattctcatgattgatataatgagatcctgaatttagatgcatctgctttt  aatatactctcatctccagattgtccagtttttcaacataaccttcagaacctca  gatggtaggattttagaactggattctagtgcatttatctccatcatccacag  agattagggtatttacctatactgatggagagatgtcttgggtcttcgacctca  ttcctctgtctaatactcatcttctgcttcaggaaaattatgtagttgtgtatag  tacctccctcaaaaaagggtatagtagtcttctcctaatgagtcctcatcagagc  tcttagctcataagttttgtatcatttaatttctttaaagtttagtataaatctctaaa  tgccataacaagttatactactcatttattggtagtat ttagaattcttagtcag  tatgagaatttcaataaaggagctcatattttaaacaatctgatcctcccatct  cctccttttaaaaataaaacaaaatacaataattgctgaatatactttat tttcttt  tactcctctattcttttgaagtttcacagttactggtaaaactgtctcatagatt  atctcagctaaaccttattgatattaatgtctatgagctttatgtggctttatttct  atataccaagaagatgcataacaagcatacttgattttatagaggaatagttc  atctaaaatgcacttat tttgataattctcattacttattagttcactctattctaa  tttttactacaactgcagtaagtgctagctagcataagctatagtagtattaa  at tttatgttgacacatttcttgatacgcagtgcat ttaattttatgtaggcttat  ataccttcat tggtagagagggtatttctttcgttttgaagataaaccttac  tgcttctagtagatgtgaatattcaaatagtgcttcatttaaaatttggctttga  gaattcttactcataaatactttgacctgttfaaaaagataaaatctttctttg  attggcttacttaatcgtaccatacatttfaaaaccagtaggctatttttagttaat  atagagaaagtaaaatatttctgtttatatacatcaactgttggaaacctgg  ctggaaaacctagctgcagttatagatatgggtgtttattgtctgaggatctat  taataaatagagagttggcttttaattgatgaagtagaggcacctttctact  ggttcatgagtaagcagattctttaatgectctttagtaacaaaatggttaat  ccaaataatactctttctttttctgatatgattgaaatatacttctatttctccata  taaaagtcactttggagttaaacagatgccttataccaagaaaatfaatactgtc  ttgccatattcacaatgaaatggttatataggacacacaggcatcttaaatag</p>
--	--

[0340]

		attgctatTTTTcttTgctcttTtagagcttTataagctTcaactTgccccagatta tttcagagatctactaactTgaaatTgggaacattTgataaataatagggtcaa gggTtgatcagtcctactTgccccgaaccctcaccctcaaaaagaaaaaat gTtTgtTaaacaacacatgaaggataccatgcttaggaacattTatcagattc cttTgaaattgctaaattggactactTcaagtTccactTactTcaaatTgtaat cTtagactTgtaattatactTctggaacattTattagagtagattTataaagtTg TgctTTTTgtTctctctctTggctTctTgTgaaattTgagTgaactTgagTaaaaa aatcattTaaacaacacatggctaaaggcagTtcaatcccctaattTtagTttTg atataaaagtctattTtagaggtTgactTgtTcatTggTgctattTataacagT catTgaactTTTTTTattTgcctaggaaaacactTgaaaaataagactTgaatc ctgaattTgactTatagctctTcattTtTggcaaatTgctagctgTatggctctg gtgccctTatggTaatctggagaaatagTtatTctTctTgTttTgaatTgtTta aagtagactTggaatcagTtacctTctTctcctactTtatcatctccaactTctc acactcgagataTaatcctgTtTcactTatgattcattTcctTctTtTctaagTttTg TgtatattaaacatTtagataattTcctagTttTatctaataTggTtacattTTTTaaa agTtattctTctTtctattattTgtaacctcaaaagagcattTaaTaaagcactgT gcacacattTctTctTtagcaagccaaaggaaaaagctagctTctTttTgag gcagTccattTgtgTattTgattaactTcttaggTaaagctctTctTtatagaa atattTctTctTtTaccaaaatTgaaacctTcctTgagaaatcagTtattctTct gaattTtaactTctgattTggTgaactTgacatccatcctTatgccacattTta actaaagaaagaaagtTactacctTctctTccaagcatTcctTgggattTta taataaagctcaattTgtTctagatcagTggataccggaacagaaaggagTta tTctTacctgataatTgtTgtgTgtccgattTctgTaatccagaaatccaacag cattTgtTgaaatcatcctTagtTgtattTgtTtagggagTcaactccctattTtag TgtTctgaaattcagTccctagatTgctTtagatagggtagaaTttTacctct TcagaacactgctaaagaagTtTcaactTggaacatagTctgaagaagcactg agagcaaaaatTcagagTggTgattTggccacctctgTtTgattgacagGTT GCAGGGAGGAAACCCATTCGTTCTGGATTAATG GAACTGGAAAACAGAAAACAATTATCAGgTaaaaa aaacctTtctTaaacctTgaaattcaccattTaaaagacgagTcagactacca gggaaTtattTaccaaaaataataaaatctagTgcatTtTgagcaatgatctctg gctactactTccaagaattTaccaaaaaatccgtacagTtTgctacatTgacgctT TgcagaaagggcattTgaacggagatagatggagTgTaaacataattTat gtgtTaaatctgagTtTaaacatgaagcagaattctatgggtgggggagTg gtattctTtattTctgaaTgtgtTggctgtggatagaactTattTtTcaag gctattTaatctggcactTtTcatgaatattcataaatTtattTactgtacaatgctTg tTtTactTaatctTcactTcatttaggatgTatgctTtTatctTaaaattTatTgtaataat agTgaccaattctTtTcattTtaattggtagTtTctTactgTtggTtaataatTtTca g
PHIP NMD 外 显子序列	3	GTTGCAGGGAGGAAACCCATTCGTTCTGGATTA ATGGAACCTGGAAAACAGAAAACAATTATCAG

[0341] 表3.PHIP蛋白序列

[0342]

基因	SEQ ID NO.	蛋白质序列
<i>PHIP</i>	162	MSCERKGLSELRSELYFLIARFLEDGPCQQAQVL IREVAEKELLPRRTDWTGKEHPRTYQNLVKYYRH LAPDHLQICHRLGPLEQEIPQSVPGVQTLLGAG RQSLLRNTKSKHVWVWKGSAALHCGRPPESPV NYGSPPSIADTLFSRKLNGKYRLERLVPTAVYQH MKMHKRILGHLSSVYCVTFDRTGRRIFTGSDDCL VKIWATDDGRLLATLRGHAAEISDMAVNYENTM IAAGSCDKMIRVWCLRTCAPLAVLQGHASITSL QFSPLCSGSKRYLSSTGADGTICFWLWDAGTLKIN PRPAKFTERPRPGVQMICSSFSAGGMFLATGSTDH IIRVYFFGSGQPEKISELEFHTDKVDSIQFSNTSNRF VSGSRDGTARIWQFKRREWKSILLDMATRPAGQN LQGIEDKITKMKVTMVAWDRHDNTVITAVNNMT LKVWNSYTGQLIHVLMGHEDEVFVLEPHFPDPRV LFSAGHDGNVIVWDLARGVKIRSYFNMIEGQGHG AVFDCKCSPDGQHFACTDSHGHLIFGFGSSSKY DKIADQMFFHSDYRPLIRDANNFVLDEQTQQAPH LMPPPFLVDVDGNPHPSRYQRLVPGRENCREEQLI PQMGVTSSGLNQVLSQQANQEISPLDSMIQRLQQ EQDLRRSGEAVISNTSRLSRGSISSTSEVHSPPNVG LRRSGQIEGVRQMHSNAPRSEIATERDLVAWSRR VVVPELSAGVASRQEEWRTAKGEEEEIKTYRSEEK RKHLTVPKENKIPTVSKNHAHEHFLDLGESKKKQ TNQHNYRTRSALEETPRPSEEIENGSSSSDEGEVV AVSGGTSEEEERAWHSDGSSSDYSSDYSDWTAD AGINLQPPKKVPKNKTKKAESSSDEEEESEKQKQ KQIKKEKKKVNEEKDGPISPKKKKPKERKQKRLA VGELTENGLTLEEWLPSTWITDTIPRRCPFVPMG DEVYYFRQGHEAYVEMARKNKIYSINPKKQPWH KMELREQELMKIVGIKYEVLPTLCLLAFVLDL DTGKLTGGSFTMKYHDMPDVIDFLVLRQQFDDA KYRRWNIGDRFRSVIDDAWWFGTIESQEPLQLEY PDSLFCYVNCWDNGDTEKMSPWDMELIPNNAV FPEELGTSVPLTDGECRSLIYKPLDGEWGTNPRDE ECERIVAGINQLMTLDIASAFVAPVDLQAYPMYC TVVAYPTDLSTIKQRLENRFYRRVSSLMWEVRYI EHNTRTFNEPGSPIVKSASFVTDLLLHFIDQTCY NIPLYNSMKKKVLSDSEDEEKDADVPGTSTRKR KDHQPRRRLRNRAQSYDIQAWKKQCEELNLIFQ CEDSEPFQVLDLLEYPDYRDIIDTPMDFATVRET

[0343]	<p>LEAGNYESPMELCKDVRLIFSNSKAYTPSKRSRIY  SMSLRLSAFFEEHISSVLSYKSAALRFHKRNTITKR  RKKRNRSSSVSSAASSPERKKRILKPQLKSESSTS  AFSTPTRSIPPRHNAAQINGKTESSSVVTRSNRV  VVDPVVTEQPSTSSAAKTFITKANASAI PGKTILEN  SVKHSKALNTLSSPGQSSFSHGTRNNSAKENMEK  EKPVKRKMKSSVLPKASTLSKSSAVIEQGDCCKNN  ALVPGTIQVNGHGGQPSKLVKRGPGRPKPKVEVNT  NSGEIHKRGRKPKKLQYAKPEDLEQNNVHPIR  DEVLPSSTCNFLSETNNVKEDLLQKKNRGGKPK  RKMKTQKLDADLLVPASVKVLRNSNRKKIDDPID  EEEEFEELKGSEPHMRTRNQGRRTAFYNEDDSEE  EQRQLLFEDTSLTFGTSSRGRVRKLTEKAKANLIG  W</p>
--------	---

[0344] 实施例2:经由环己酰亚胺/嘌呤霉素/DMSO处理对NMD外显子的确认。

[0345] 使用来自以下的总RNA和PHIP基因的中外显子15和16中的引物进行的RT-PCR分析来确认对应于NMD诱导外显子的条带的存在:水(H)、DMSO处理(D)或嘌呤霉素(P)或环己酰亚胺处理(C)的人胚肾细胞(HEK293)、人神经母细胞瘤(SK-N-AS)和人神经祖细胞(ReN)。对条带进行光密度测定分析,以计算总转录物的NMD外显子包含百分比。用环己酰亚胺或嘌呤霉素处理细胞以抑制NMD可以导致对应于NMD诱导外显子的产物增多。图4A描绘了在HEK、SK-N-AS和ReN VM细胞中分别使用DMSO、环己酰亚胺或嘌呤霉素处理对PHIP基因转录物中的示例性NMD外显子的确认。用环己酰亚胺(C)、嘌呤霉素(P)或DMSO(D)类似地处理U87细胞和星形胶质细胞。使用PHIP基因的外显子15和16中的引物来确认对应于NMD诱导外显子的条带的存在。针对U87细胞和星形胶质细胞的结果示出于图4B中。

[0346] 在用水(H<sub>2</sub>O)、DMSO、环己酰亚胺(CHX)和嘌呤霉素处理的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)中发现类似结果。示出了四种不同的扩增循环(26、29、32和35个)。发现NMD外显子15x包含在MEF细胞中是保守的,如图4C中所示。

[0347] 实施例3:PHIP NMD事件在非人灵长类动物中保守。

[0348] 从食蟹猴(长尾猕猴(*Macaca fascicularis*))的所指示脑区域提取RNA。生成cDNA并通过使用外显子15中的正向引物和外显子16中的反向引物的PCR扩增所感兴趣的产物。两种不同的扩增循环(28和31个)示出于图5中。

[0349] 实施例4:NMD外显子区域ASO步移。

[0350] 使用2'-MOE ASO、PS骨架,针对NMD外显子区域靶向紧接3'剪接位点上游、跨3'剪接位点、NMD外显子、跨5'剪接位点和5'剪接位点下游的序列进行ASO步移。将ASO设计为通过一次移位5个核苷酸来覆盖这些区域,但最后的3'剪接位点ASO和第一外显子ASO以及最后的外显子ASO和第一5'剪接位点ASO(它们间隔3个核苷酸)除外。图6描绘了对于示例性PHIP NMD外显子区域的ASO步移。

[0351] ASO的标记可以根据以下解释:IVS14X=规范内含子(规范内含子15)的内含子序列部分,其在紧接NMD外显子之前的规范外显子(规范外显子15)之后。Ex15X=NMD外显子(在规范内含子15内)。IVS15X=规范内含子(规范内含子15)的内含子序列部分,其紧接NMD外显子之后且在紧接NMD外显子之后的规范外显子(规范外显子16)之前。对于ASO步移,参见以上命名。需注意,跨越IVS14X和Ex15X或者跨越Ex15X和IVS15X的ASO标记为“XX”。完全

在Ex15X内的ASO不标记为“XX”。

[0352] 实施例5:通过RT-PCR评价的NMD外显子区域ASO步移。

[0353] 通过RT-PCR和TaqMan qPCR评价ASO步移序列。将HEK293细胞使用Lipofectamine RNAiMax转染,或者将ReN细胞用对照ASO(“模拟”或“-”)或用如下表4中所示的靶向PHIP NMD外显子区域的2'-MOE ASO核转染。将对应于PHIP非生产性mRNA(RT-PCR)和生产性mRNA(TaqMan)的产物定量并针对内部对照归一化,并且绘制相对于对照的倍数变化。图7描绘了在ReN细胞中经由RT-PCR和TaqMan qPCR对沿着示例性NMD外显子区域的各种示例性ASO步移的评价。在3小时环己酰亚胺处理之后,在用3uM示例性ASO处理后24小时,通过使用跨越外显子15和外显子16的探针的Taqman qPCR和使用外显子15和外显子16中的引物的RT-PCR对细胞进行对PHIP mRNA的量的测量。

[0354] 表4:示例性ASO

SEQ ID NO:	Chr	开始	结束	ASO 名称	序列
4	chr6	79004521	79004539	IVS14X:-86	CTTTAGCAGTGTTCTGAA
5	chr6	79004516	79004534	IVS14X:-81	AACTTCTTTAGCAGTGTT
6	chr6	79004511	79004529	IVS14X:-76	TTGAAAACCTTCTTTAGCA
7	chr6	79004506	79004524	IVS14X:-71	TCCAGTTGAAAACCTTCTT
8	chr6	79004501	79004519	IVS14X:-66	TATGTTCCAGTTGAAAC
9	chr6	79004496	79004514	IVS14X:-61	CAGACTATGTTCCAGTTG
10	chr6	79004491	79004509	IVS14X:-56	TTCTTCAGACTATGTTCC
11	chr6	79004486	79004504	IVS14X:-51	AGTGCTTCTTCAGACTAT
12	chr6	79004481	79004499	IVS14X:-46	CTCTCAGTGCTTCTTCAG
13	chr6	79004476	79004494	IVS14X:-41	TTTTGCTCTCAGTGCTTC
14	chr6	79004471	79004489	IVS14X:-36	GAATTTTTTGCTCTCAGT
15	chr6	79004466	79004484	IVS14X:-31	ACTCTGAATTTTTTGCTC
16	chr6	79004461	79004479	IVS14X:-26	TCACCACTCTGAATTTTT
17	chr6	79004456	79004474	IVS14X:-21	GCCAATCACCCTCTGAA
18	chr6	79004451	79004469	IVS14X:-16	AGGTGGCCAATCACCCT
19	chr6	79004446	79004464	IVS14X:-11	AACAGAGGTGGCCAATCA
20	chr6	79004441	79004459	IVS14X:-6	AATCAAACAGAGGTGGCC
21	chr6	79004436	79004454	IVS14X:-1	CTGTCAATCAAACAGAGG
22	chr6	79004431	79004449	IVS14X-Ex15XX:5	GCAACCTGTCAATCAAAC
23	chr6	79004426	79004444	IVS14X-Ex15XX:10	TCCCTGCAACCTGTCAAT
24	chr6	79004421	79004439	IVS14X-Ex15XX:15	TTTCCTCCCTGCAACCTG
25	chr6	79004418	79004436	Ex15X:1	GGGTTTCCTCCCTGCAAC
26	chr6	79004413	79004431	Ex15X:6	CGAATGGGTTTCCTCCCT
27	chr6	79004408	79004426	Ex15X:11	CAGAACGAATGGGTTTCC
28	chr6	79004403	79004421	Ex15X:16	TAATCCAGAACGAATGGG
29	chr6	79004398	79004416	Ex15X:21	TCCATTAATCCAGAACGA
30	chr6	79004393	79004411	Ex15X:31	GTTTTCCAGTTCCATTAA
31	chr6	79004388	79004406	Ex15X:-11	TTTTCTGTTTTCCAGTTC
32	chr6	79004382	79004400	Ex15X:-6	AATTGTTTTCTGTTTTCC

[0355]

[0356]

33	chr6	79004377	79004395	Ex15X:-1	CTGATAATTGTTTTCTGT
34	chr6	79004372	79004390	Ex15XX- IVS15X:-15	TACCTGATAATTGTTTTC
35	chr6	79004369	79004387	Ex15XX- IVS15X:-10	TTTTTTACCTGATAATTG
36	chr6	79004364	79004382	Ex15XX- IVS15X:-5	AGGTTTTTTTTTACCTGAT
37	chr6	79004359	79004377	IVS15X:1	AGAAAAGGTTTTTTTAC
38	chr6	79004354	79004372	IVS15X:6	GTTAAAGAAAAGGTTTTT
39	chr6	79004349	79004367	IVS15X:11	CAAAGGTTAAAGAAAAG G
40	chr6	79004344	79004362	IVS15X:16	AATTTCAAAGGTTAAAGA
41	chr6	79004339	79004357	IVS15X:21	TGGTGAATTTCAAAGGTT
42	chr6	79004334	79004352	IVS15X:26	TTAAATGGTGAATTTCAA
43	chr6	79004329	79004347	IVS15X:31	GTCTTTTAAATGGTGAAT
44	chr6	79004324	79004342	IVS15X:36	GACTCGTCTTTTAAATGG
45	chr6	79004319	79004337	IVS15X:41	AGTCTGACTCGTCTTTTA
46	chr6	79004314	79004332	IVS15X:46	CTGGTAGTCTGACTCGTC
47	chr6	79004309	79004327	IVS15X:51	ATTCCCTGGTAGTCTGAC
48	chr6	79004304	79004322	IVS15X:56	AATAAATTCCTGGTAGT
49	chr6	79004299	79004317	IVS15X:61	TTGGTAATAAATTCCTG
50	chr6	79004294	79004312	IVS15X:66	TATTTTTGGTAATAAATT
51	chr6	79004289	79004307	IVS15X:71	TTTATTATTTTTGGTAAT
52	chr6	79004284	79004302	IVS15X:76	TAGATTTTATTATTTTTG
53	chr6	79004279	79004297	IVS15X:81	GACACTAGATTTTATTAT
54	chr6	79004274	79004292	IVS15X:86	CAAATGACACTAGATTTT

[0357] 图8描绘了对PHIP mRNA的量的测量。在不存在环己酰亚胺处理的情况下,在用3uM的数种示例性ASO处理后24小时,通过使用跨越外显子15和外显子16(规范)以及外显子35和外显子36(GE)的探针的Taqman qPCR对ReN细胞进行分析。各种ASO增加规范和总(GE)PHIP mRNA的产生并且降低所产生的非生产性mRNA的量。

[0358] 图9描绘了在HEK293细胞中经由RT-PCR和TaqMan qPCR对沿着示例性NMD外显子区域的各种示例性ASO步移的评价。在3小时环己酰亚胺处理之后,在用120nM示例性ASO处理后24小时,通过使用跨越外显子15和外显子16的探针的Taqman qPCR并通过用外显子15和外显子16中的引物的RT-PCR对细胞进行对PHIP mRNA的量的测量。

[0359] 图10A-10D描绘了经由RT-PCR和TaqMan qPCR对沿着示例性NMD外显子区域15x的数种示例性ASO的评价。在不存在环己酰亚胺的情况下,在用80nM示例性ASO治疗后24小时对细胞进行对PHIP mRNA的量的测量。如图中所示,各种ASO增加规范PHIP mRNA和总PHIP mRNA的产生,并且降低所产生的非生产性mRNA的量。

[0360] 实施例6:通过RT-PCR和RT-qPCR评价的NMD外显子区域ASO微步移。

[0361] 图11描绘了对于示例性PHIP NMD外显子区域的ASO微步移。通过RT-PCR评价ASO微步移序列(跨外显子15x)。将细胞用对照ASO(SMN)或用如下表5中所述的靶向PHIP NMD外显子区域的2'-MOE ASO核转染。将对应于NMD外显子包含和全长的产物定量,并且绘制NMD外显子包含百分比。图12描绘了在ReN细胞中对沿着示例性NMD外显子区域的各种示例性ASO步移的评价。在3小时环己酰亚胺处理之后,在用3uM示例性ASO转染后24小时,通过使用跨越外显子15和外显子16的探针的Taqman qPCR对ReN细胞进行对PHIP mRNA的量的测量(图

12)。

[0362] 表5: 示例性ASO序列

[0363]

SEQ ID NO:	Chr	开始	结束	ASO 名称	序列
55	chr6	79004441	79004459	IVS14X:-6	AATCAAACAGAGGTGGCC
56	chr6	79004440	79004458	IVS14X:-5	CAATCAAACAGAGGTGGC
57	chr6	79004439	79004457	IVS14X:-4	TCAATCAAACAGAGGTGG
58	chr6	79004438	79004456	IVS14X:-3	GTCAATCAAACAGAGGTG
59	chr6	79004437	79004455	IVS14X:-2	TGTCAATCAAACAGAGGT
60	chr6	79004436	79004454	IVS14X:-1	CTGTCAATCAAACAGAGG
61	chr6	79004435	79004453	IVS14X-Ex15XX:1	CCTGTCAATCAAACAGAG
62	chr6	79004434	79004452	IVS14X-Ex15XX:2	ACCTGTCAATCAAACAGA
63	chr6	79004433	79004451	IVS14X-Ex15XX:3	AACCTGTCAATCAAACAG

[0364]

64	chr6	79004432	79004450	IVS14X- Ex15XX:4	CAACCTGTCAATCAAACA
65	chr6	79004431	79004449	IVS14X- Ex15XX:5	GCAACCTGTCAATCAAAC
66	chr6	79004430	79004448	IVS14X- Ex15XX:6	TGCAACCTGTCAATCAAAA
67	chr6	79004429	79004447	IVS14X- Ex15XX:7	CTGCAACCTGTCAATCAA
68	chr6	79004428	79004446	IVS14X- Ex15XX:8	CCTGCAACCTGTCAATCA
69	chr6	79004427	79004445	IVS14X- Ex15XX:9	CCCTGCAACCTGTCAATC
70	chr6	79004426	79004444	IVS14X- Ex15XX:1 0	TCCCTGCAACCTGTCAAT
71	chr6	79004425	79004443	IVS14X- Ex15XX:1 1	CTCCCTGCAACCTGTCAA
72	chr6	79004424	79004442	IVS14X- Ex15XX:1 2	CCTCCCTGCAACCTGTCA
73	chr6	79004423	79004441	IVS14X- Ex15XX:1 3	TCCTCCCTGCAACCTGTC
74	chr6	79004422	79004440	IVS14X- Ex15XX:1 4	TTCCTCCCTGCAACCTGT
75	chr6	79004421	79004439	IVS14X- Ex15XX:1 5	TTTCCTCCCTGCAACCTG
76	chr6	79004420	79004438	IVS14X- Ex15XX:1 6	GTTTCCTCCCTGCAACCT
77	chr6	79004419	79004437	IVS14X- Ex15XX:1 7	GGTTTCCTCCCTGCAACC
78	chr6	79004418	79004436	Ex15X:1	GGGTTTCCTCCCTGCAAC
79	chr6	79004417	79004435	Ex15X:2	TGGGTTTCCTCCCTGCAA
80	chr6	79004416	79004434	Ex15X:3	ATGGGTTTCCTCCCTGCA
81	chr6	79004415	79004433	Ex15X:5	GAATGGGTTTCCTCCCTG
82	chr6	79004414	79004432	Ex15X:6	CGAATGGGTTTCCTCCCT
83	chr6	79004413	79004431	Ex15X:7	ACGAATGGGTTTCCTCCC
84	chr6	79004412	79004430	Ex15X:8	AACGAATGGGTTTCCTCC

[0365]	85	chr6	79004411	79004429	Ex15X:9	GAACGAATGGGTTTCCTC
	86	chr6	79004410	79004428	Ex15X:10	AGAACGAATGGGTTTCCT
	87	chr6	79004409	79004427	Ex15X:11	CAGAACGAATGGGTTTC
	88	chr6	79004408	79004426	Ex15X:12	CCAGAACGAATGGGTTTC
	89	chr6	79004407	79004425	Ex15X:13	TCCAGAACGAATGGGTTT
	90	chr6	79004406	79004424	Ex15X:14	ATCCAGAACGAATGGGTT
	91	chr6	79004405	79004423	Ex15X:15	AATCCAGAACGAATGGGT
	92	chr6	79004404	79004422	Ex15X:16	TAATCCAGAACGAATGGG
	93	chr6	79004403	79004421	Ex15X:17	TTAATCCAGAACGAATGG
	94	chr6	79004402	79004420	Ex15X:18	ATTAATCCAGAACGAATG
	95	chr6	79004401	79004419	Ex15X:19	CATTAATCCAGAACGAAT
	96	chr6	79004400	79004418	Ex15X:20	CCATTAATCCAGAACGAA
	97	chr6	79004399	79004417	Ex15X:21	TCCATTAATCCAGAACGA
	98	chr6	79004398	79004416	Ex15X:22	TTCCATTAATCCAGAACG
	99	chr6	79004397	79004415	Ex15X:23	GTTCCATTAATCCAGAAC
	100	chr6	79004396	79004414	Ex15X:24	AGTTCATTAATCCAGAA
	101	chr6	79004395	79004413	Ex15X:25	CAGTTCATTAATCCAGA
	102	chr6	79004394	79004412	Ex15X:26	CCAGTTCATTAATCCAG
	103	chr6	79004393	79004411	Ex15X:27	TCCAGTTCATTAATCCA
	104	chr6	79004392	79004410	Ex15X:28	TTCCAGTTCATTAATCC
	105	chr6	79004391	79004409	Ex15X:29	TTTCCAGTTCATTAATC
	106	chr6	79004390	79004408	Ex15X:30	TTTTCCAGTTCATTAAT
	107	chr6	79004389	79004407	Ex15X:31	GTTTTCCAGTTCATTAA

[0366] 图13描绘了在HEK293细胞中对沿着示例性NMD外显子区域的各种示例性ASO步移的评价。在用环己酰亚胺3小时处理之后,在用120nM示例性ASO转染后24小时,通过使用跨越外显子15和外显子16的探针的Taqman qPCR并通过使用外显子15和外显子16中的引物的RT-PCR对HEK293细胞进行对PHIP mRNA的量的测量(图10)。

[0367] 下表6提供了另外的示例性PHIP NMD外显子区域ASO微步移序列(跨外显子15x)。

[0368] 表6: 示例性ASO序列

SEQ ID NO:	Chr	开始	结束	名称	ASO 序列
108	chr6	79004441	79004459	IVS14X:-6	AATCAAACAGAGGTGGCC
109	chr6	79004440	79004458	IVS14X:-5	CAATCAAACAGAGGTGGC
110	chr6	79004439	79004457	IVS14X:-4	TCAATCAAACAGAGGTGG

[0370]

111	chr6	79004438	79004456	IVS14X:-3	GTCAATCAAACAGAGGTG
112	chr6	79004437	79004455	IVS14X:-2	TGTCAATCAAACAGAGGT
113	chr6	79004436	79004454	IVS14X:-1	CTGTCAATCAAACAGAGG
114	chr6	79004435	79004453	IVS14X- Ex15XX:1	CCTGTCAATCAAACAGAG
115	chr6	79004434	79004452	IVS14X- Ex15XX:2	ACCTGTCAATCAAACAGA
116	chr6	79004433	79004451	IVS14X- Ex15XX:3	AACCTGTCAATCAAACAG
117	chr6	79004432	79004450	IVS14X- Ex15XX:4	CAACCTGTCAATCAAACA
118	chr6	79004431	79004449	IVS14X- Ex15XX:5	GCAACCTGTCAATCAAAC
119	chr6	79004430	79004448	IVS14X- Ex15XX:6	TGCAACCTGTCAATCAAA
120	chr6	79004429	79004447	IVS14X- Ex15XX:7	CTGCAACCTGTCAATCAA
121	chr6	79004428	79004446	IVS14X- Ex15XX:8	CCTGCAACCTGTCAATCA
122	chr6	79004427	79004445	IVS14X- Ex15XX:9	CCCTGCAACCTGTCAATC
123	chr6	79004426	79004444	IVS14X- Ex15XX:1 0	TCCCTGCAACCTGTCAAT
124	chr6	79004425	79004443	IVS14X- Ex15XX:1 1	CTCCCTGCAACCTGTCAA
125	chr6	79004424	79004442	IVS14X- Ex15XX:1 2	CCTCCCTGCAACCTGTCA
126	chr6	79004423	79004441	IVS14X- Ex15XX:1 3	TCCTCCCTGCAACCTGTC
127	chr6	79004422	79004440	IVS14X- Ex15XX:1 4	TTCCTCCCTGCAACCTGT
128	chr6	79004421	79004439	IVS14X- Ex15XX:1 5	TTTCCTCCCTGCAACCTG
129	chr6	79004420	79004438	IVS14X- Ex15XX:1 6	GTTTCCTCCCTGCAACCT
130	chr6	79004419	79004437	IVS14X-	GGTTTCCTCCCTGCAACC

				Ex15XX:1 7	
131	chr6	79004418	79004436	Ex15X:1	GGGTTTCCTCCCTGCAAC
132	chr6	79004417	79004435	Ex15X:2	TGGGTTTCCTCCCTGCAA
133	chr6	79004416	79004434	Ex15X:3	ATGGGTTTCCTCCCTGCA
134	chr6	79004415	79004433	Ex15X:4	AATGGGTTTCCTCCCTGC
135	chr6	79004414	79004432	Ex15X:5	GAATGGGTTTCCTCCCTG
136	chr6	79004413	79004431	Ex15X:6	CGAATGGGTTTCCTCCCT
137	chr6	79004412	79004430	Ex15X:7	ACGAATGGGTTTCCTCCC
138	chr6	79004411	79004429	Ex15X:8	AACGAATGGGTTTCCTCC
139	chr6	79004410	79004428	Ex15X:9	GAACGAATGGGTTTCCTC
140	chr6	79004409	79004427	Ex15X:10	AGAACGAATGGGTTTCCT
141	chr6	79004408	79004426	Ex15X:11	CAGAACGAATGGGTTTC
142	chr6	79004407	79004425	Ex15X:12	CCAGAACGAATGGGTTTC
143	chr6	79004406	79004424	Ex15X:13	TCCAGAACGAATGGGTTT
144	chr6	79004405	79004423	Ex15X:14	ATCCAGAACGAATGGGTT
[0371] 145	chr6	79004404	79004422	Ex15X:15	AATCCAGAACGAATGGGT
146	chr6	79004403	79004421	Ex15X:16	TAATCCAGAACGAATGGG
147	chr6	79004402	79004420	Ex15X:17	TTAATCCAGAACGAATGG
148	chr6	79004401	79004419	Ex15X:18	ATTAATCCAGAACGAATG
149	chr6	79004400	79004418	Ex15X:19	CATTAATCCAGAACGAAT
150	chr6	79004399	79004417	Ex15X:20	CCATTAATCCAGAACGAA
151	chr6	79004398	79004416	Ex15X:21	TCCATTAATCCAGAACGA
152	chr6	79004397	79004415	Ex15X:22	TTCCATTAATCCAGAACG
153	chr6	79004396	79004414	Ex15X:23	GTTCCATTAATCCAGAAC
154	chr6	79004395	79004413	Ex15X:24	AGTTCCATTAATCCAGAA
155	chr6	79004394	79004412	Ex15X:25	CAGTTCCATTAATCCAGA
156	chr6	79004393	79004411	Ex15X:26	CCAGTTCCATTAATCCAG
157	chr6	79004392	79004410	Ex15X:27	TCCAGTTCCATTAATCCA
158	chr6	79004391	79004409	Ex15X:28	TTCCAGTTCCATTAATCC
159	chr6	79004390	79004408	Ex15X:29	TTTCCAGTTCCATTAATC
160	chr6	79004389	79004407	Ex15X:30	TTTTCCAGTTCCATTAAT
161	chr6	79004388	79004406	Ex15X:31	GTTTTCCAGTTCCATTAA

[0372] 实施例7: 剂量响应评价。

[0373] 进行实验以根据本公开的一些实施方案检查多种示例性ASO的剂量响应关系。

[0374] 在一个实验中, 将ReN VM细胞用不同浓度的ASO核转染, 并且然后在存在环己酰亚胺的情况下培养24小时, 然后收集用于检查细胞中NMD外显子 (15x) 的剪接的RT-PCR分析。如图14A和14B中所描绘, 将细胞用对照ASO (“模拟”)、靶向SMN mRNA的ASO (“SMN”) 或示例性ASO诸如“IVS14X:-3” (SEQ ID NO:58)、“IVS14X-Ex15XX:7” (SEQ ID NO:67)、“Ex15X:19” (SEQ ID NO:95) 或“Ex15X:23” (SEQ ID NO:99) 各自以0.33 $\mu$ M、1 $\mu$ M或3 $\mu$ M处理。24小时以后, 收集细胞用于RT-PCR分析。将靶向外显子15和外显子16的引物用于RT-PCR反应, 并且将扩增结果可视化, 如图14A中所示, 其中下方条带来自没有外显子15x的mRNA转录物 (“规范PHIP mRNA”), 并且上方条带来自具有外显子15x的mRNA转录物 (“非生产性PHIP mRNA”)。对响应于不同处理的规范PHIP mRNA的量的变化和非生产性PHIP mRNA的量的变化的定量汇总于图14B中 (通过其在“模拟”条件下的相应量归一化)。对于所有测试的示例性PHIP ASO, 它们施加的浓度越高, 观察到越多规范PHIP转录物和越少非生产性PHIP转录物。

[0375] 在另一个实验中,将ReN VM细胞用 $3\mu\text{M}$ 下的各种ASO核转染,并且培养72小时,然后收集用于检查细胞中的PHIP蛋白水平的JESS测定。图15A示出了两种平行测定的蛋白质印迹图像,并且图15B示出了展示所有测试的示例性ASO (IVS14X:-3、IVS14X-Ex15XX:7、Ex15X:19和Ex15X:23) 与模拟条件相比引起PHIP蛋白水平的增加,而SMN对照并非如此的绘图。

[0376] 实施例8:通过示例性ASO对剪接的调节。

[0377] 此实施例示出了展示出根据本公开的一些实施方案通过示例性ASO对从PHIP前mRNA剪接NMD外显子15x的调节的另外实验。

[0378] 表7. 示例性ASO序列

SEQ ID NO:	ASO ID	长度	ASO 序列
58	IVS14X:-3	18	GTCAATCAAACAGAGGTG
[0379] 162	化合物 1	17	TCAATCAAACAGAGGTG
162	化合物 2	17	GTCAATCAAACAGAGGT
163	化合物 3	16	CAATCAAACAGAGGTG
164	化合物 4	16	GTCAATCAAACAGAGG
165	化合物 5	16	TCAATCAAACAGAGGT

SEQ ID NO:	ASO ID	长度	ASO 序列
67	IVS14X-Ex15XX:7	18	CTGCAACCTGTCAATCAA
166	化合物 6	17	TGCAACCTGTCAATCAA
167	化合物 7	17	CTGCAACCTGTCAATCA
168	化合物 8	16	GCAACCTGTCAATCAA
169	化合物 9	16	CTGCAACCTGTCAATC
170	化合物 10	16	TGCAACCTGTCAATCA
[0380] 95	Ex15X:19	18	CATTAATCCAGAACGAAT
171	化合物 11	17	ATTAATCCAGAACGAAT
172	化合物 12	17	CATTAATCCAGAACGAA
173	化合物 13	16	TTAATCCAGAACGAAT
174	化合物 14	16	CATTAATCCAGAACGA
175	化合物 15	16	ATTAATCCAGAACGAA
99	Ex15X:23	18	GTTCCATTAATCCAGAAC
176	化合物 16	17	TTCCATTAATCCAGAAC
177	化合物 17	17	GTTCCATTAATCCAGAA
178	化合物 18	16	TCCATTAATCCAGAAC
179	化合物 19	16	GTTCCATTAATCCAGA
180	化合物 20	16	TTCCATTAATCCAGAA

[0381] 在一个实验中,将ReN VM细胞用 $3\mu\text{M}$ 下的ASO核转染,并且在不存在环己酰亚胺的情况下培养24小时,然后收集用于RT-PCR分析。具体地,将细胞用表7中列出的示例性ASO之一、或对照ASO (“模拟”) 或SMN ASO核转染(全部以 $3\mu\text{M}$ )。24小时以后,收集细胞用于RT-PCR (图16A-16B) 或RT-qPCR (图16C-16D)。如图16B-16D中所示,示例性ASO处理导致具有外显子15x的非生产性PHIP转录物的量的降低 (图16B) 并且导致没有外显子15x的PHIP转录物的量

的增加,如通过使用跨越外显子15和外显子16(规范的;图16C)以及外显子35和外显子36(GE;图16D)的探针的Taqman qPCR所示的。

[0382] 在另一个实验中,将ASO以60 $\mu$ M添加至ReN VM细胞的培养基中进行自由摄取,并且然后在3D条件下且在不存在环己酰亚胺的情况下将细胞培养3天,然后收集用于RT-PCR分析。具体地,将细胞用表7中列出的示例性ASO之一、或对照ASO(“模拟”)或SMN ASO处理(全部以3 $\mu$ M)。24小时以后,收集细胞用于RT-PCR(图17A)或RT-qPCR(图17B-17D)。如图17B-17D中所示,示例性ASO处理导致具有外显子15x的非生产性PHIP转录物的量的降低(图17B)并且导致没有外显子15x的PHIP转录物的量的增加,如通过使用跨越外显子15和外显子16(规范的;图17C)以及外显子35和外显子36(GE;图17D)的探针的Taqman qPCR所示的。

[0383] 虽然本文已经示出并描述了本公开的优选实施方案,但对于本领域技术人员明显的是,此类实施方案仅以实例的方式提供。在不脱离本公开的情况下,本领域技术人员将会想到许多变化、改变和替换。应理解,在实践本公开时可以采用本公开的实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本公开的范围,并且由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同方案。

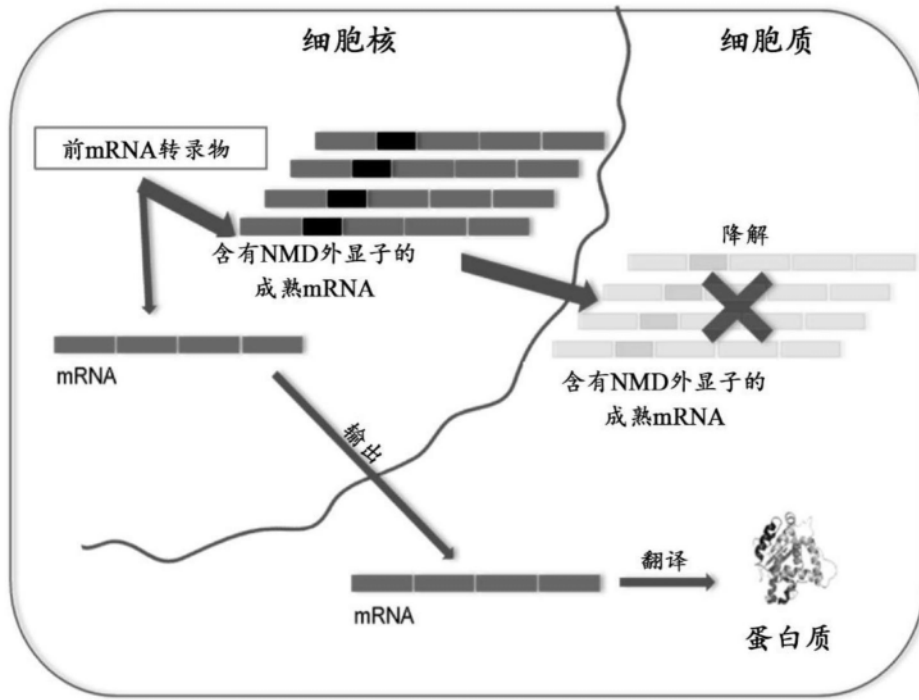


图1A

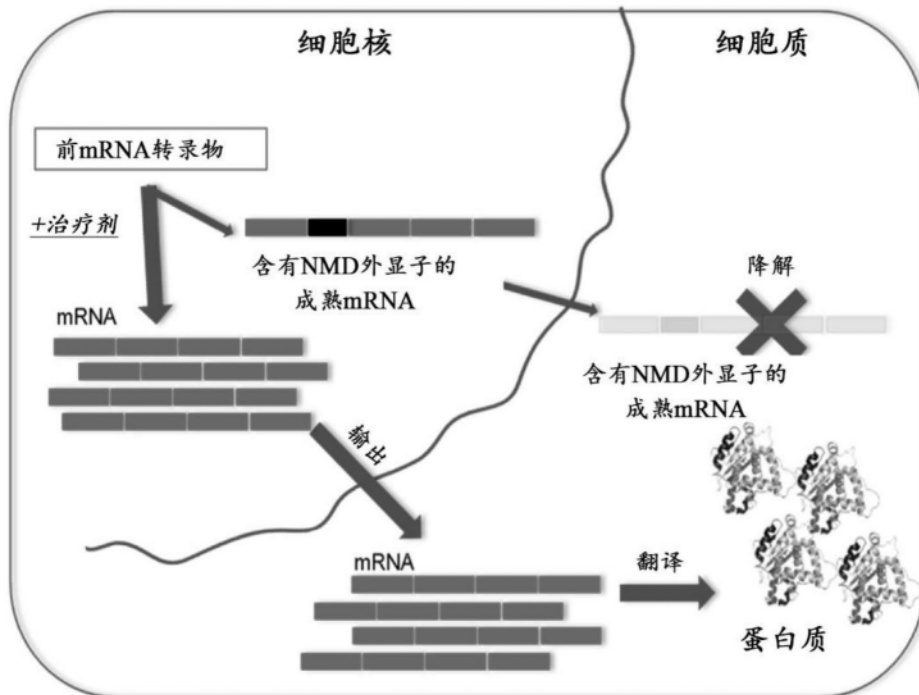


图1B

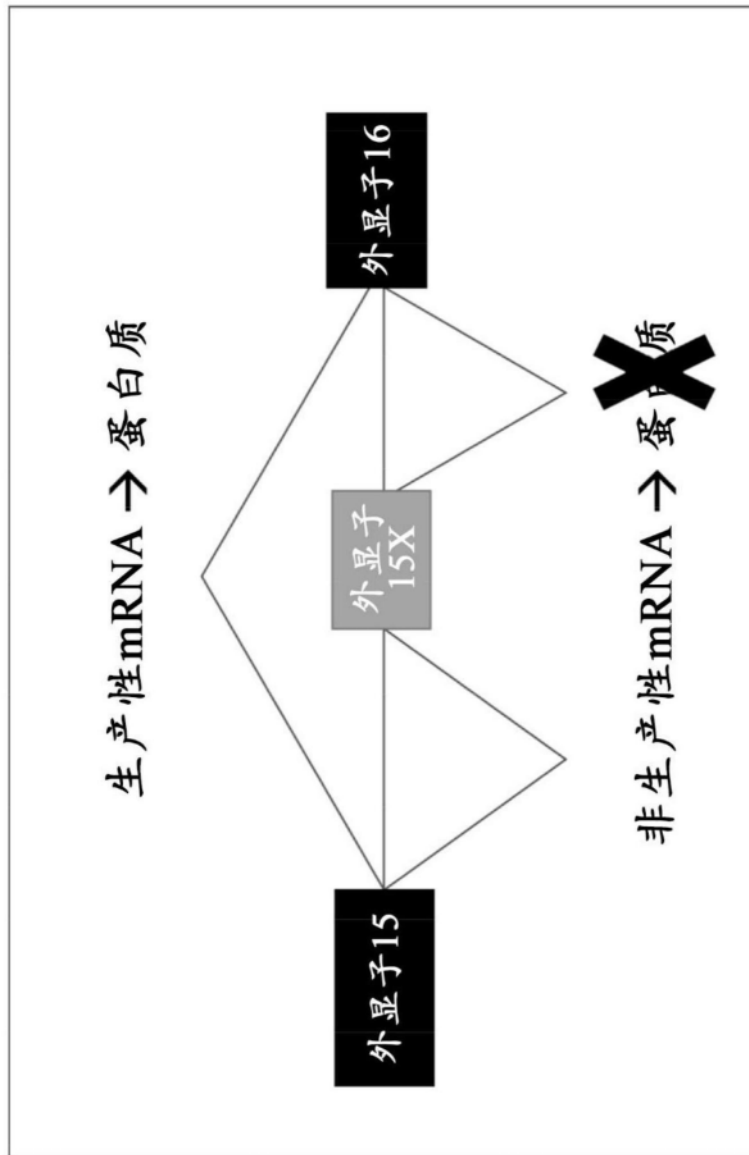


图2

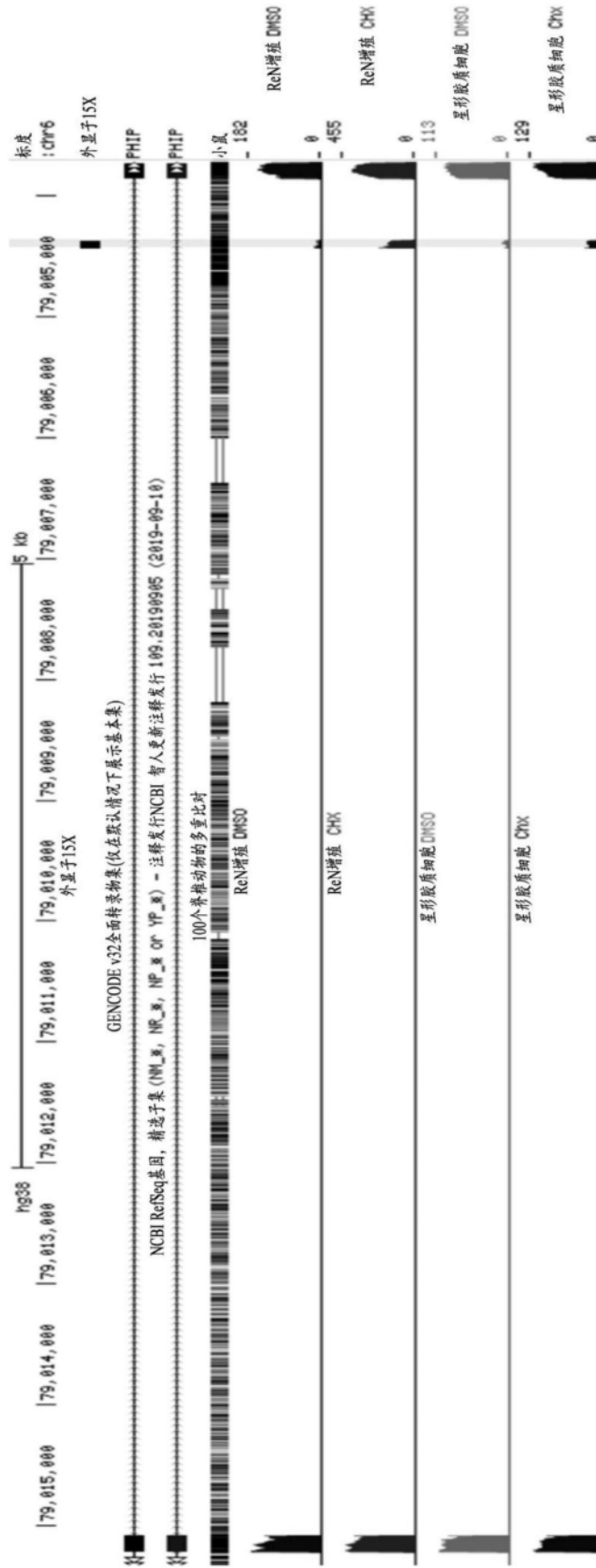


图3

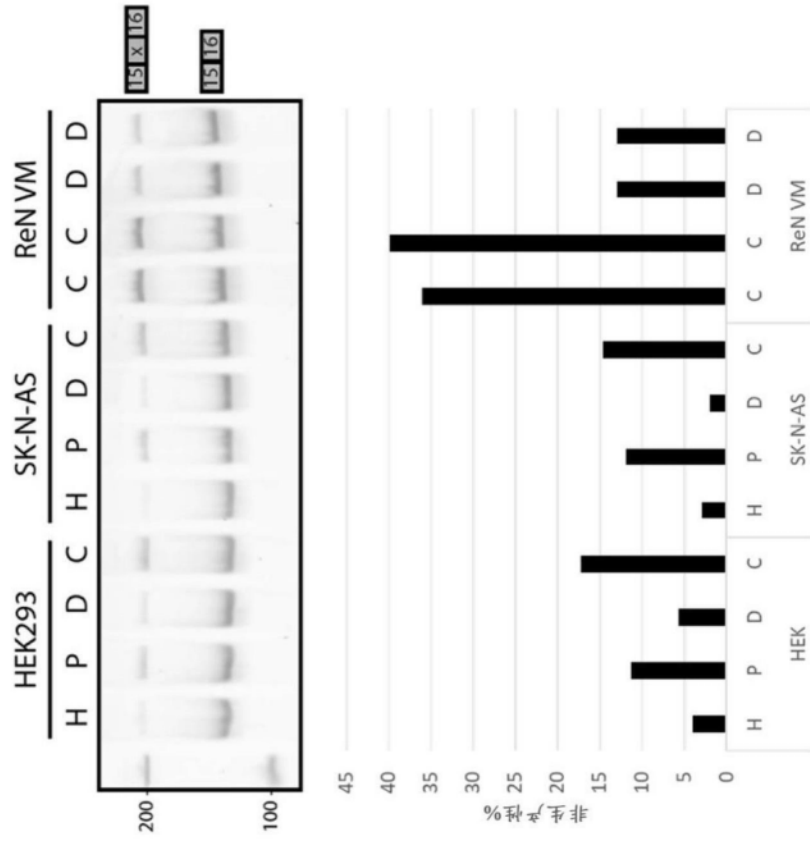


图4A

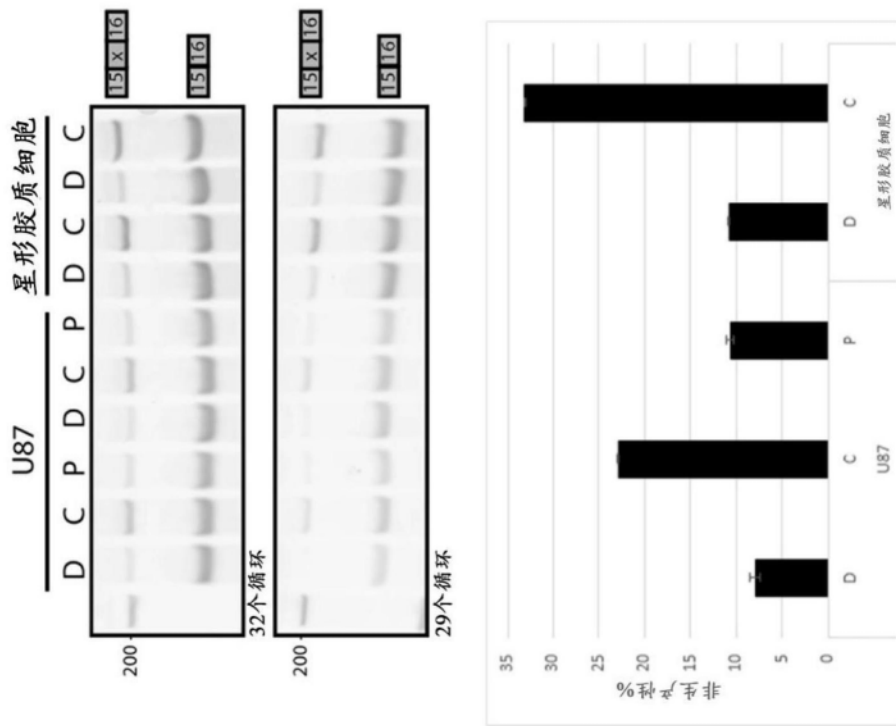


图4B

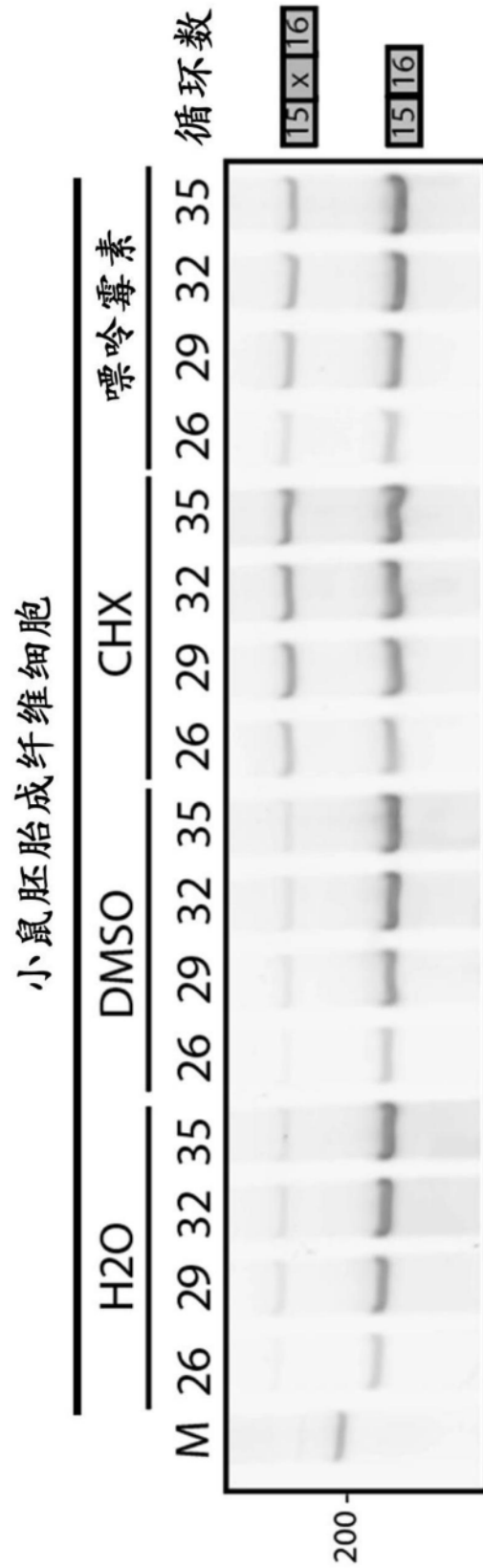


图4C

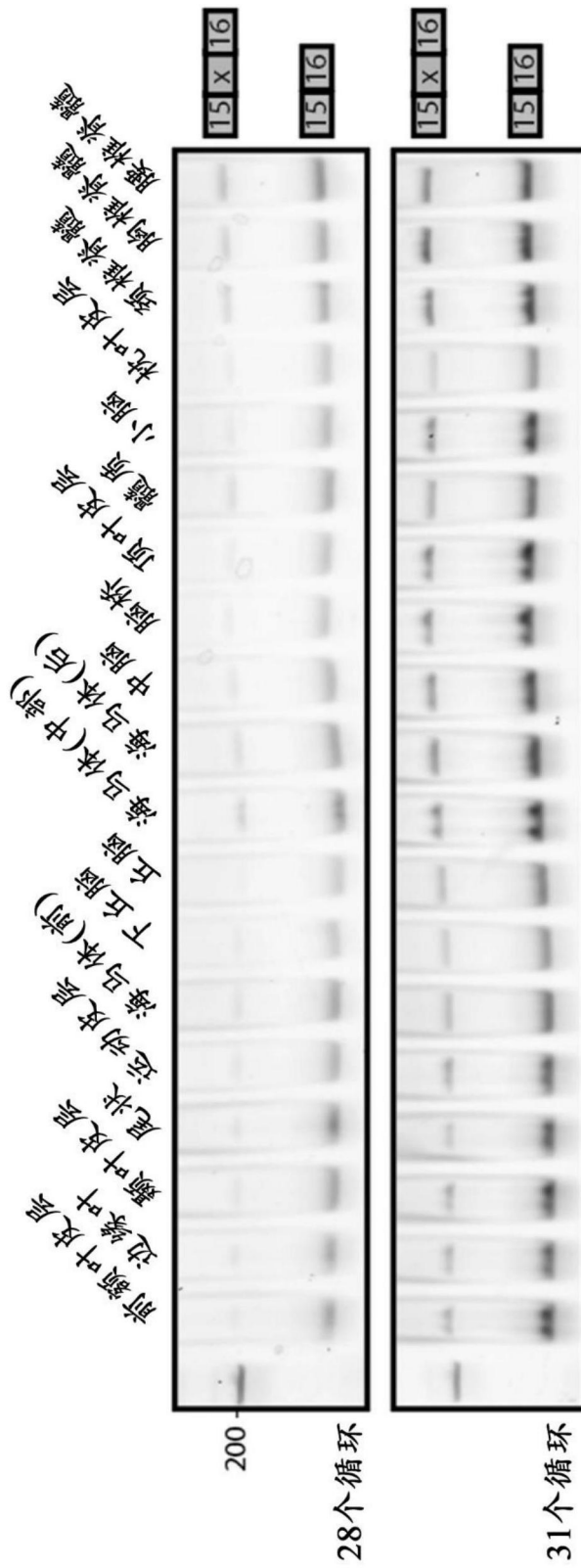


图5

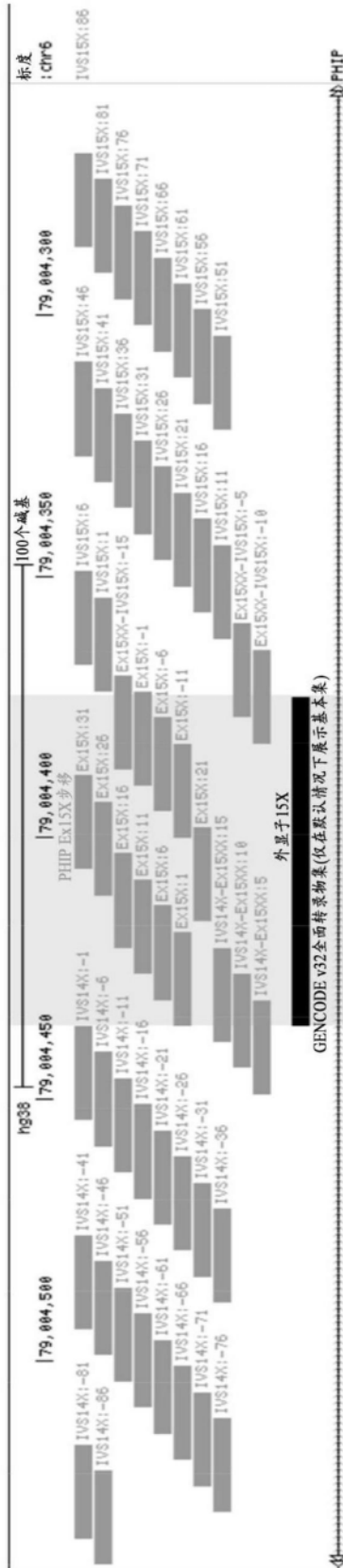


图6





图8

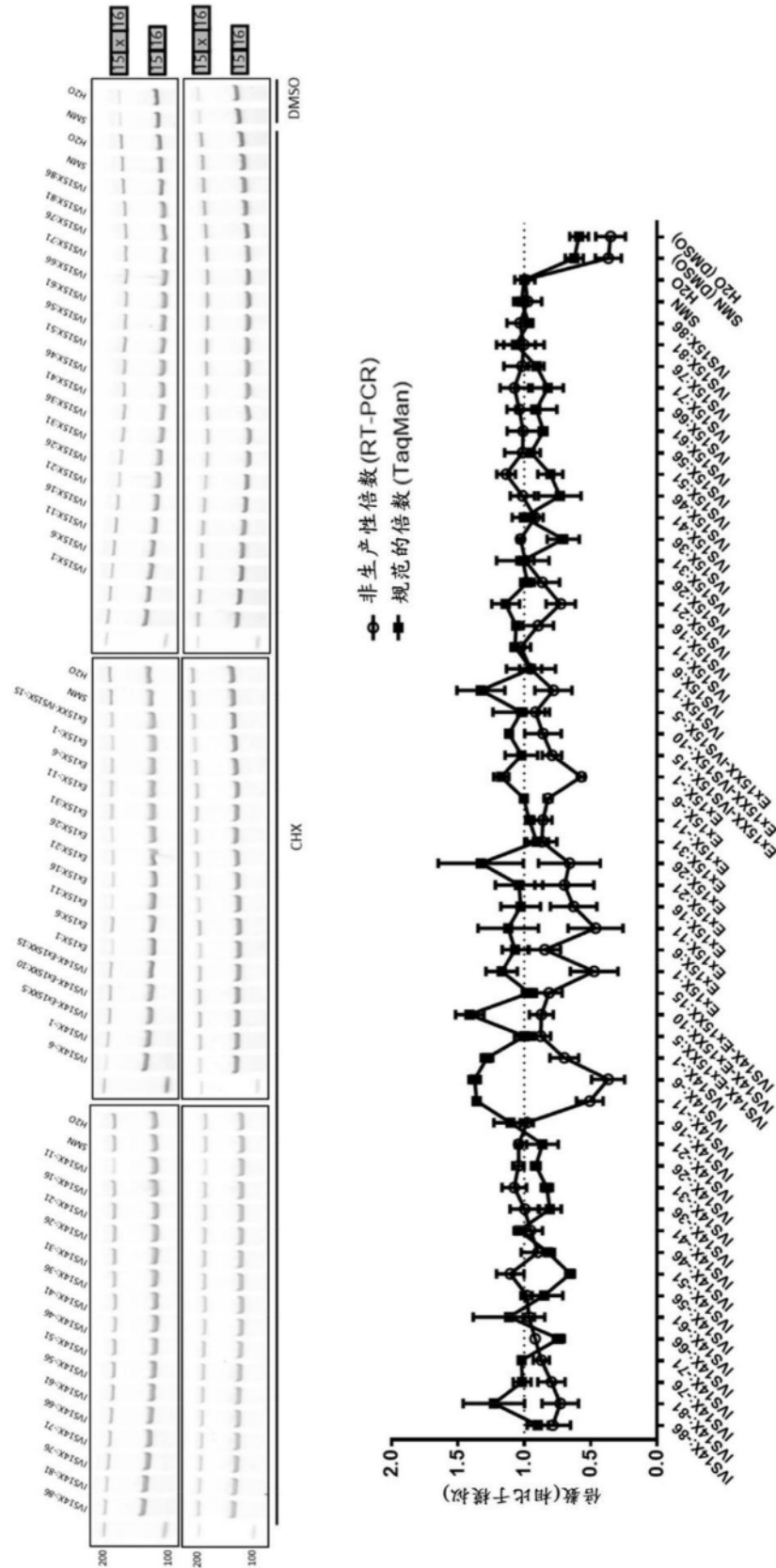


图9

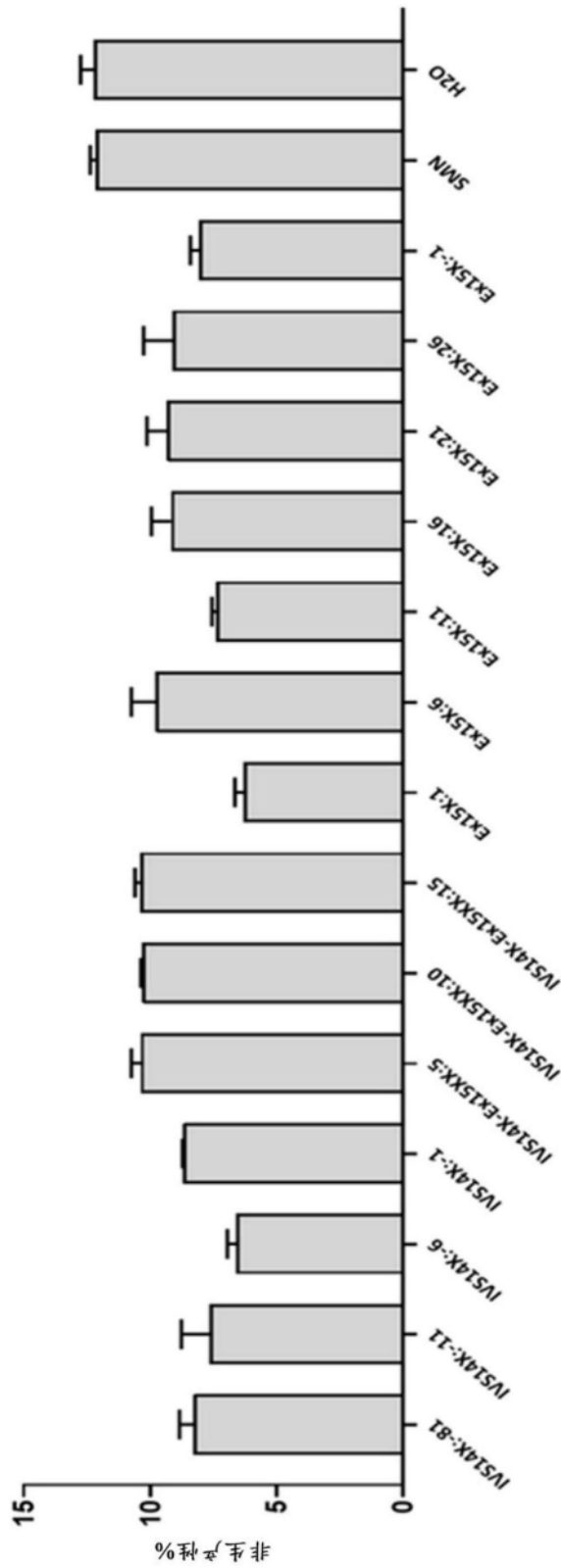


图10A

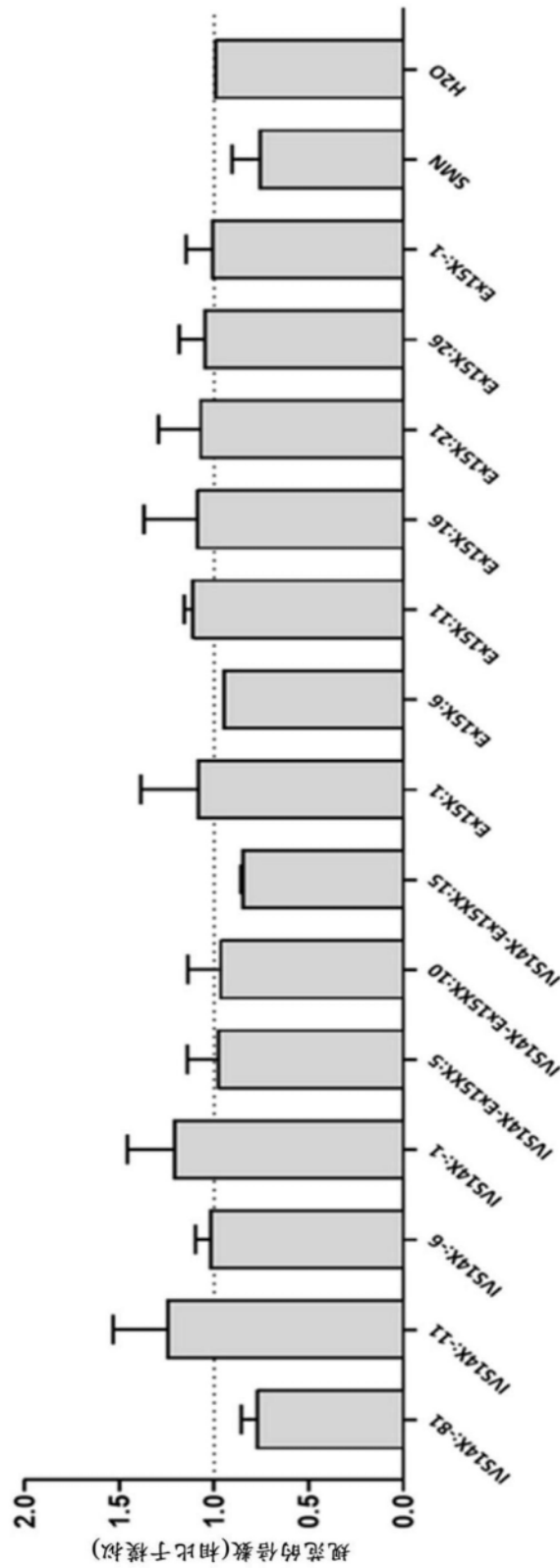


图10B

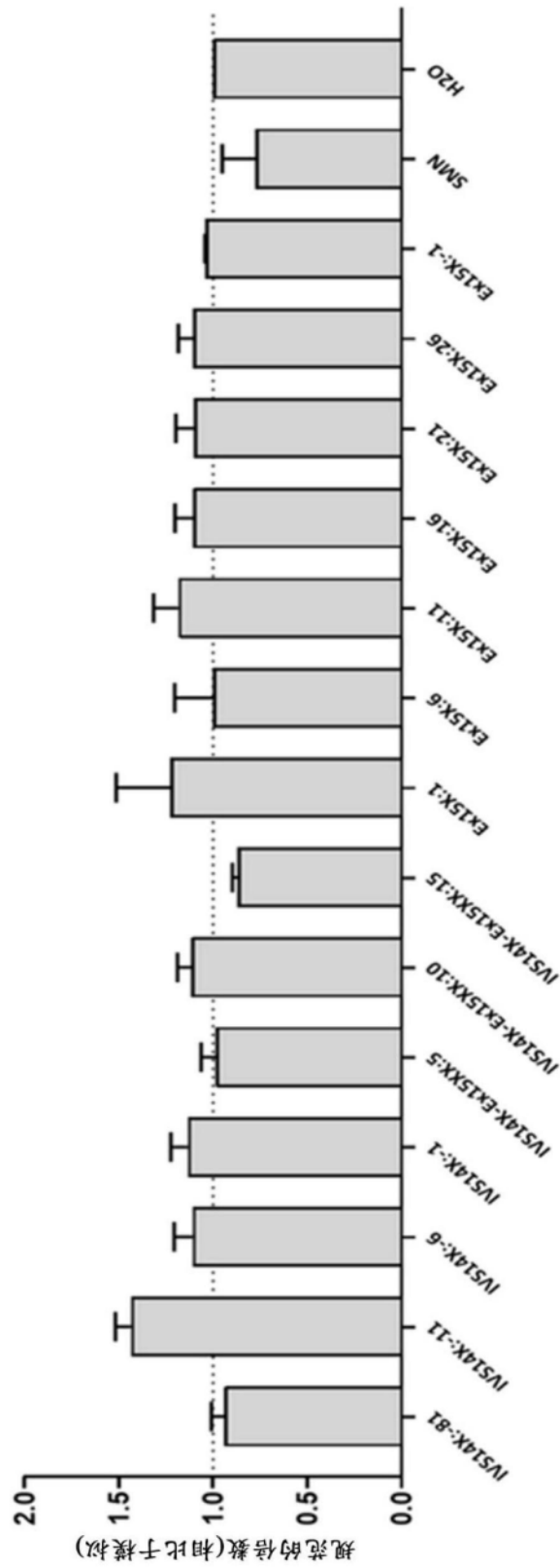


图10C

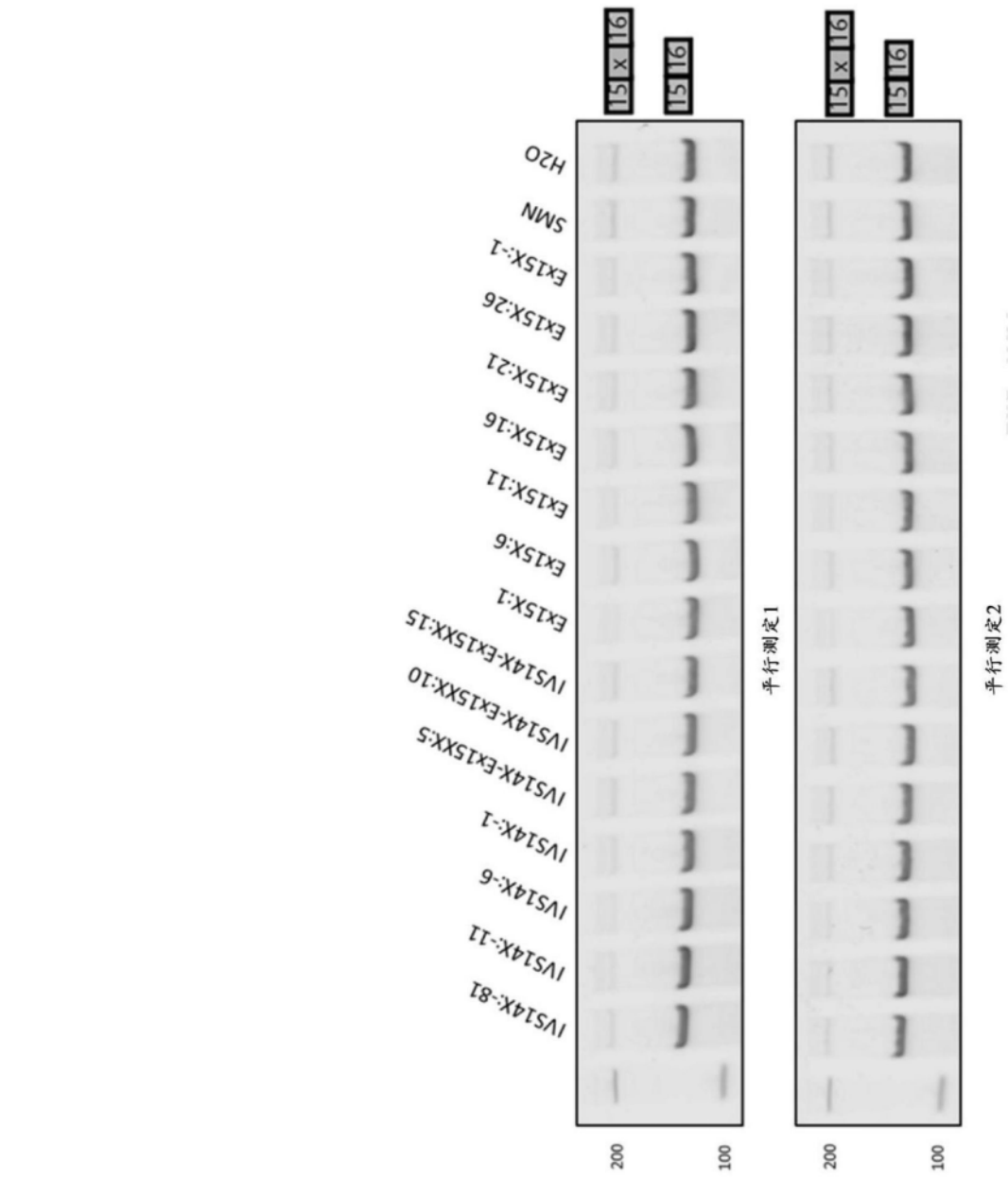


图10D

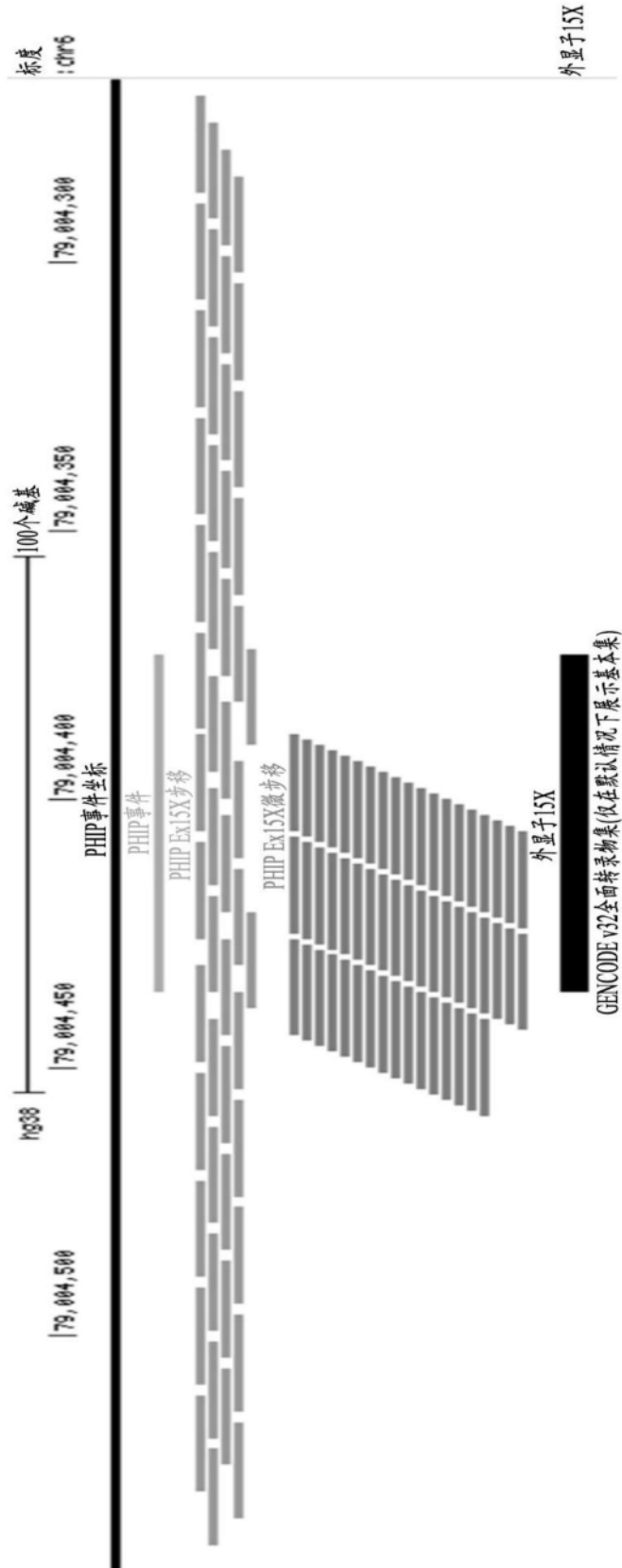


图11

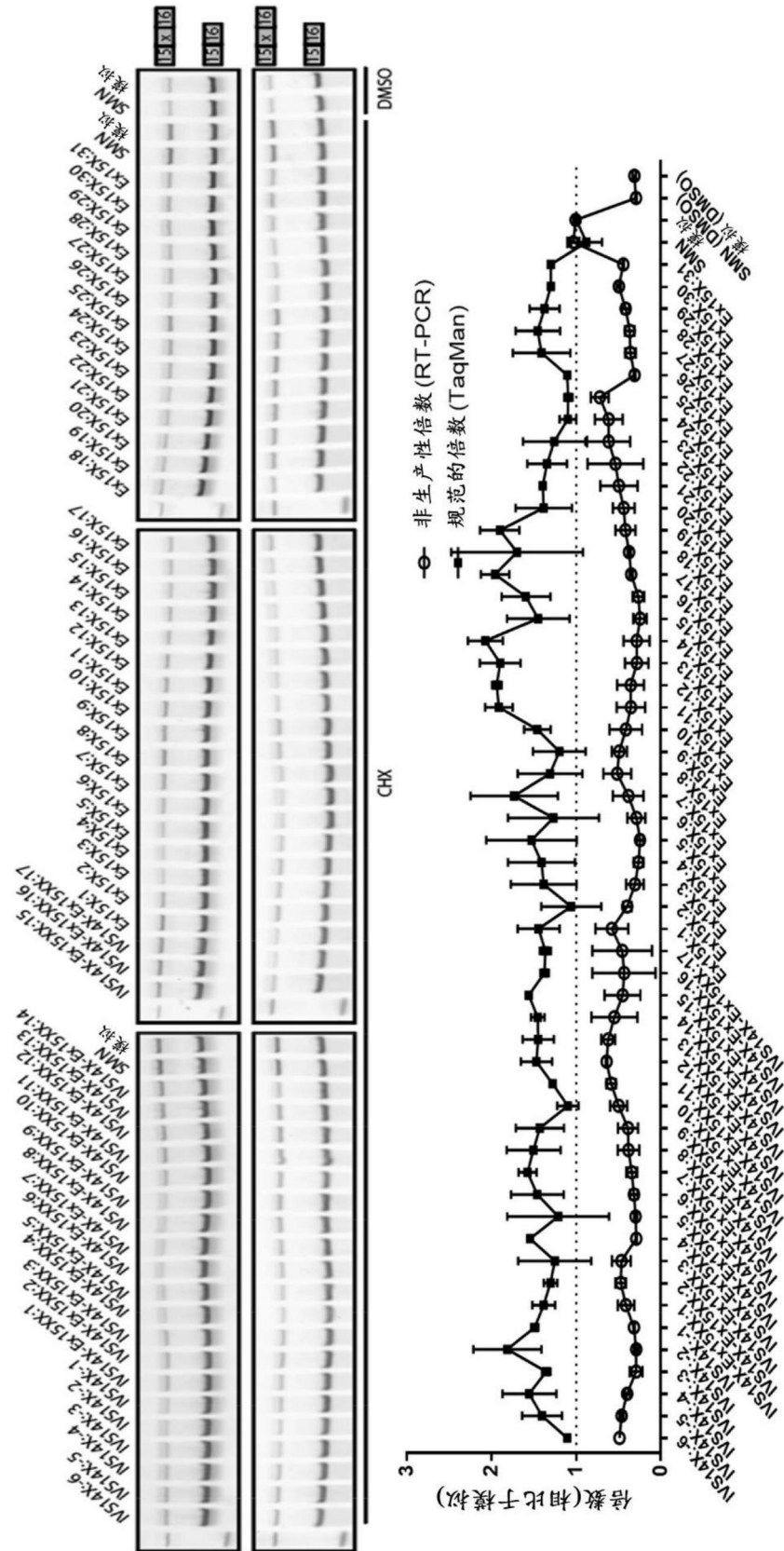


图12

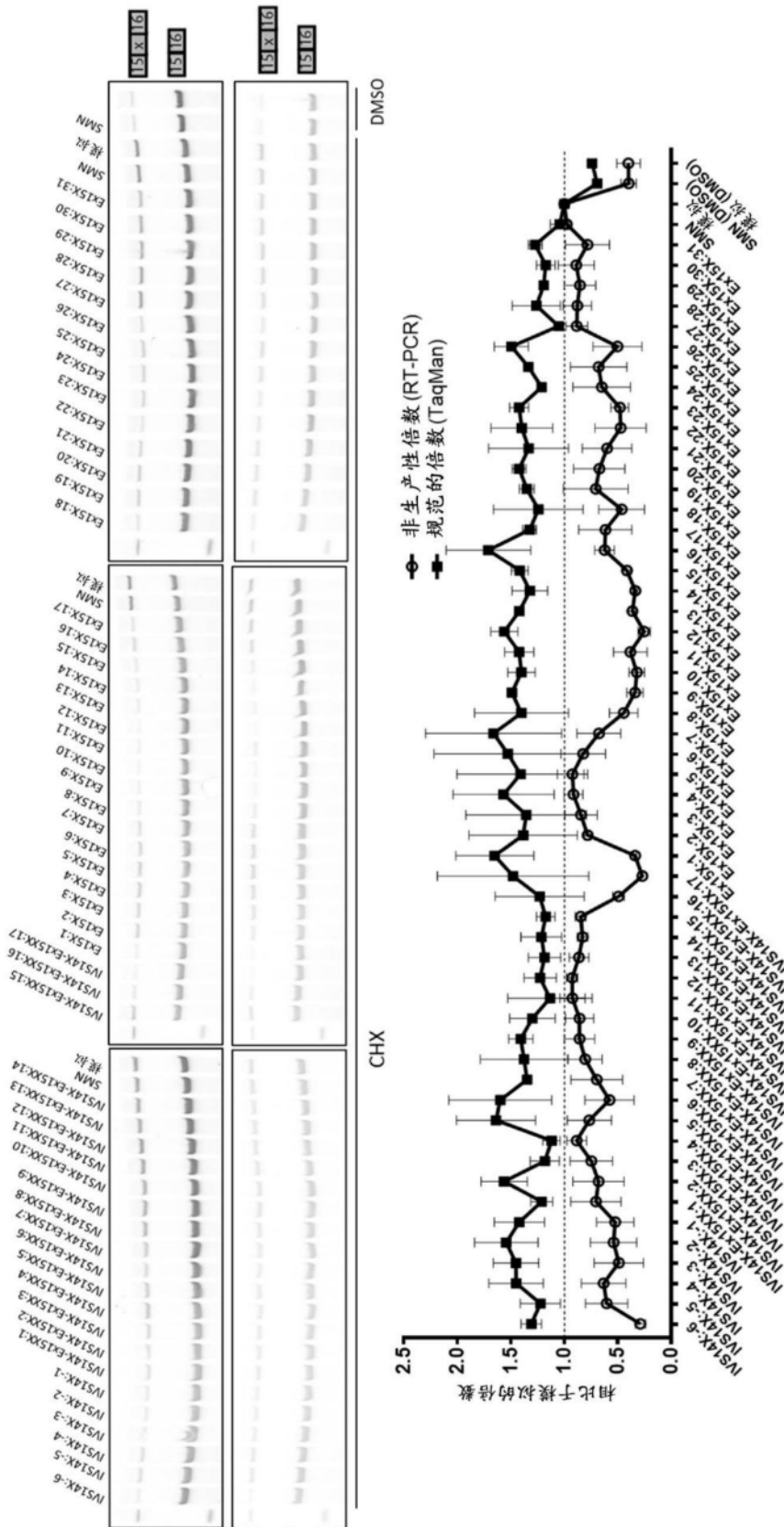


图13

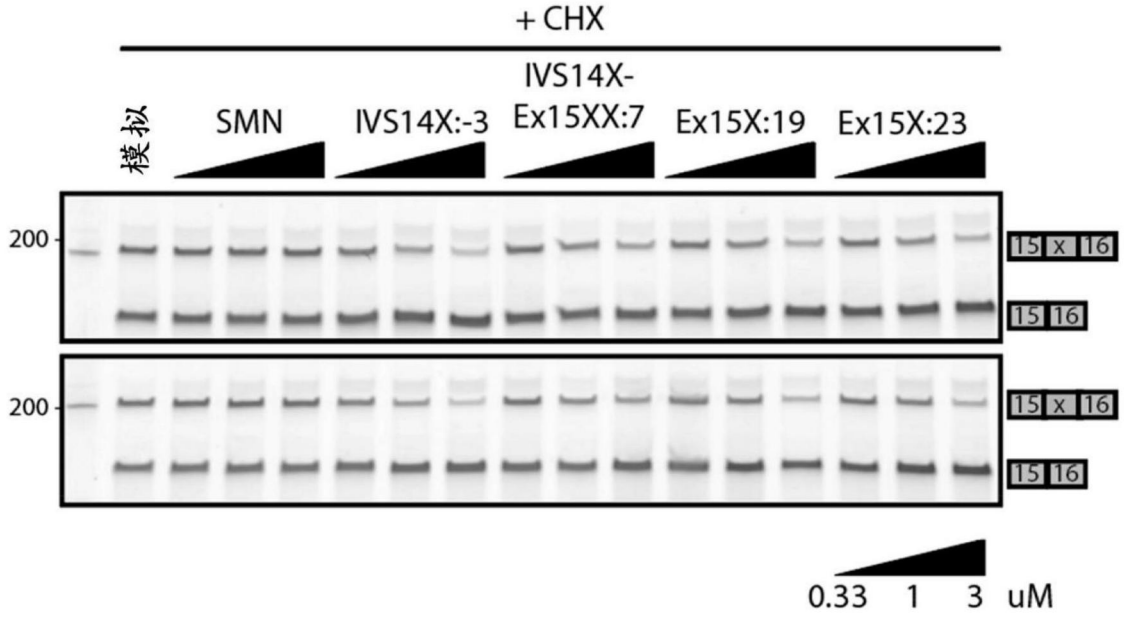


图14A

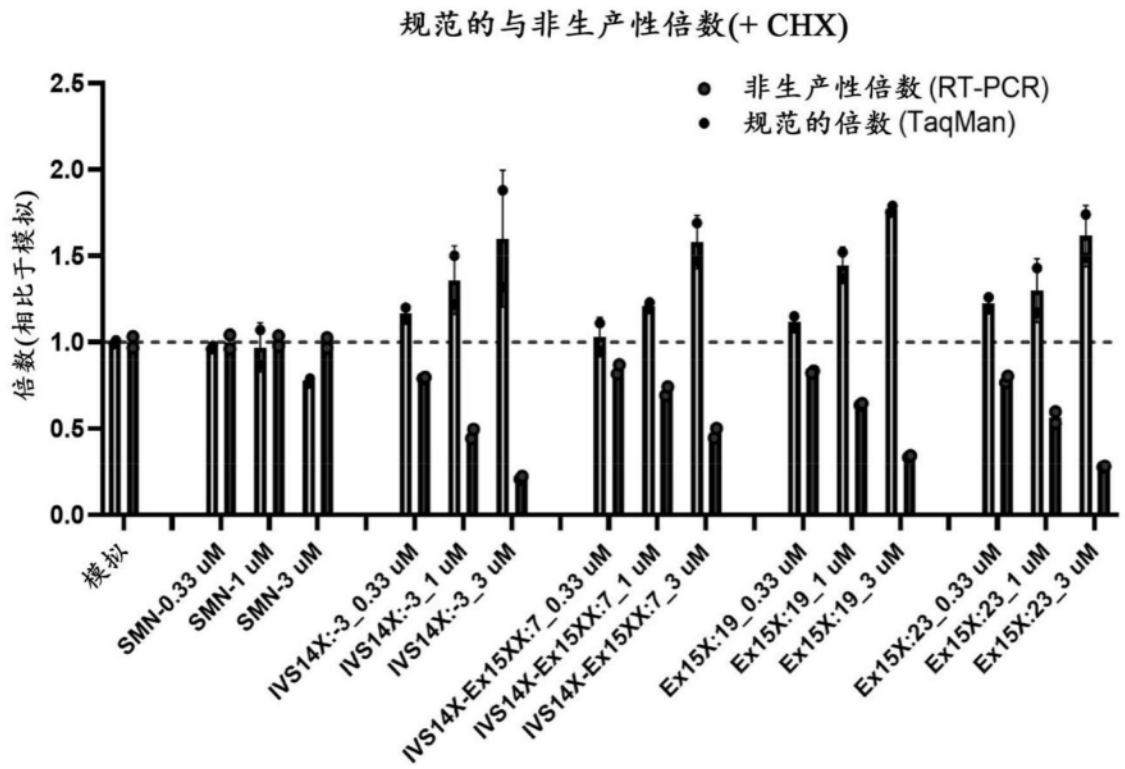


图14B

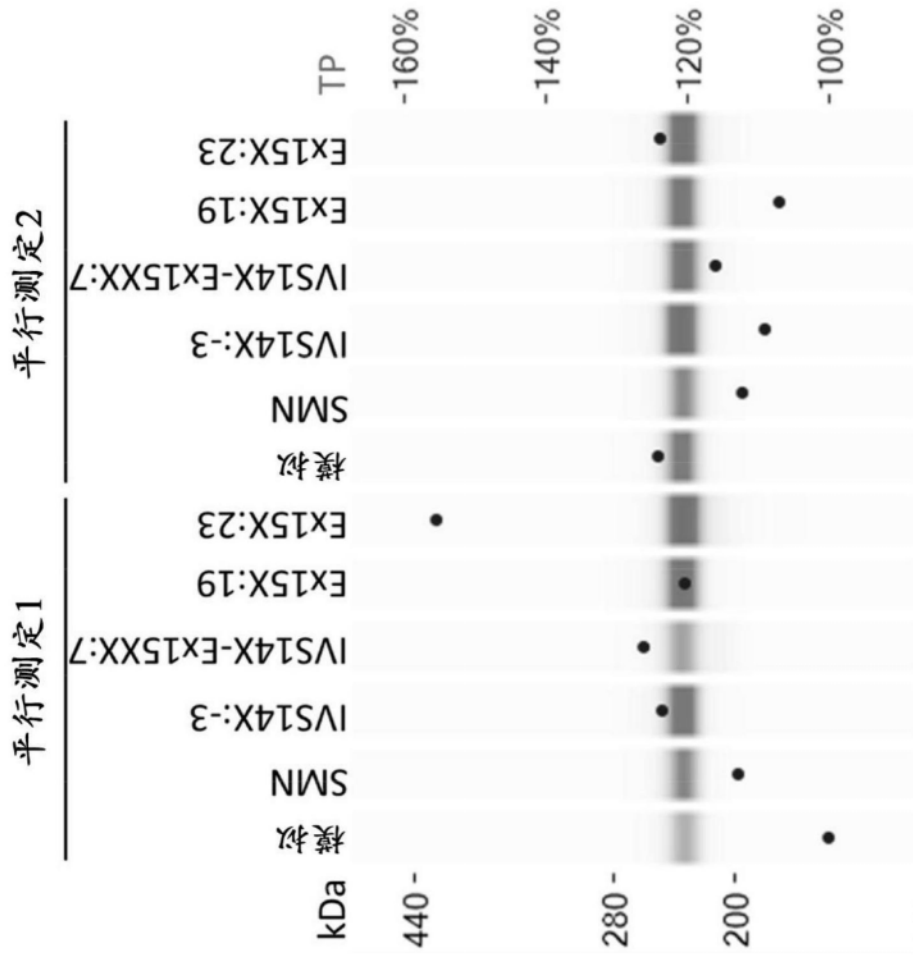


图15A

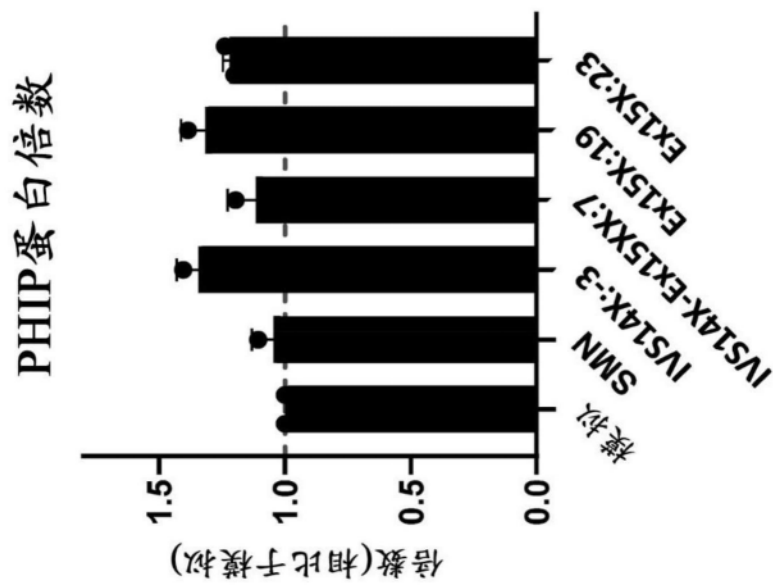


图15B

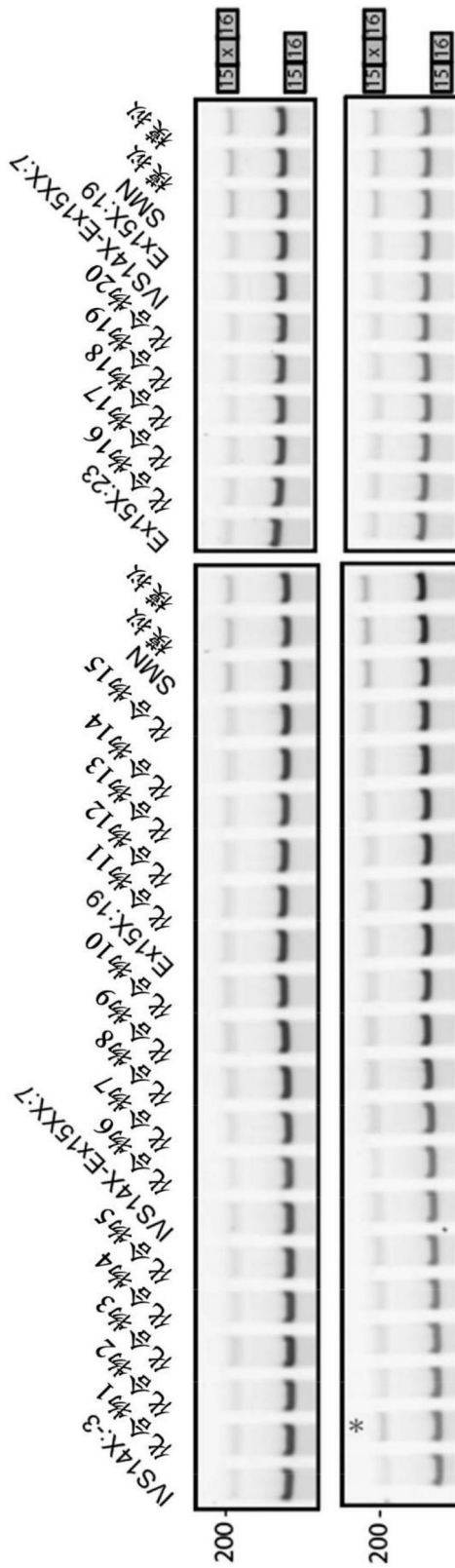


图16A

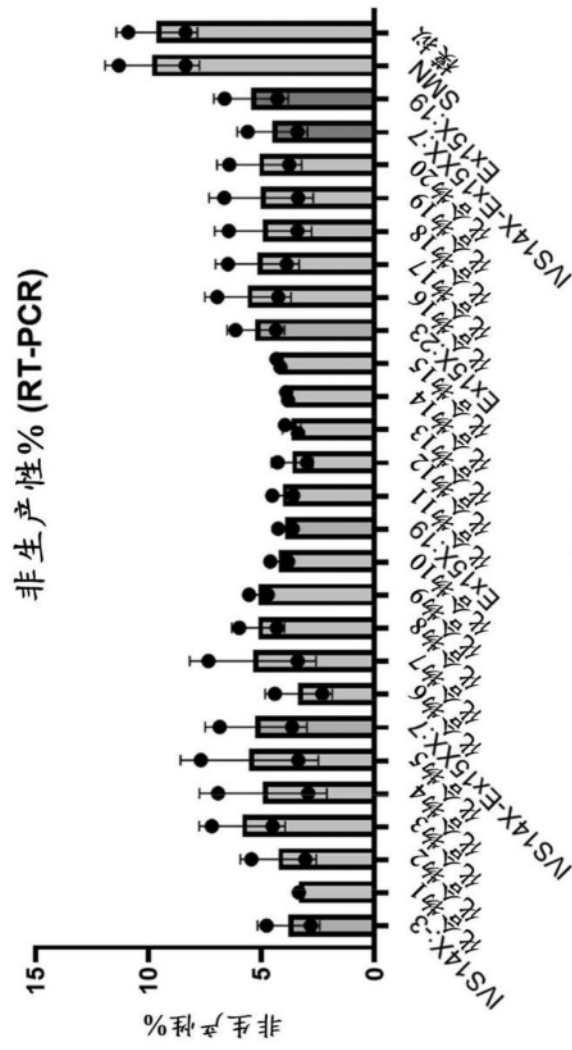


图16B

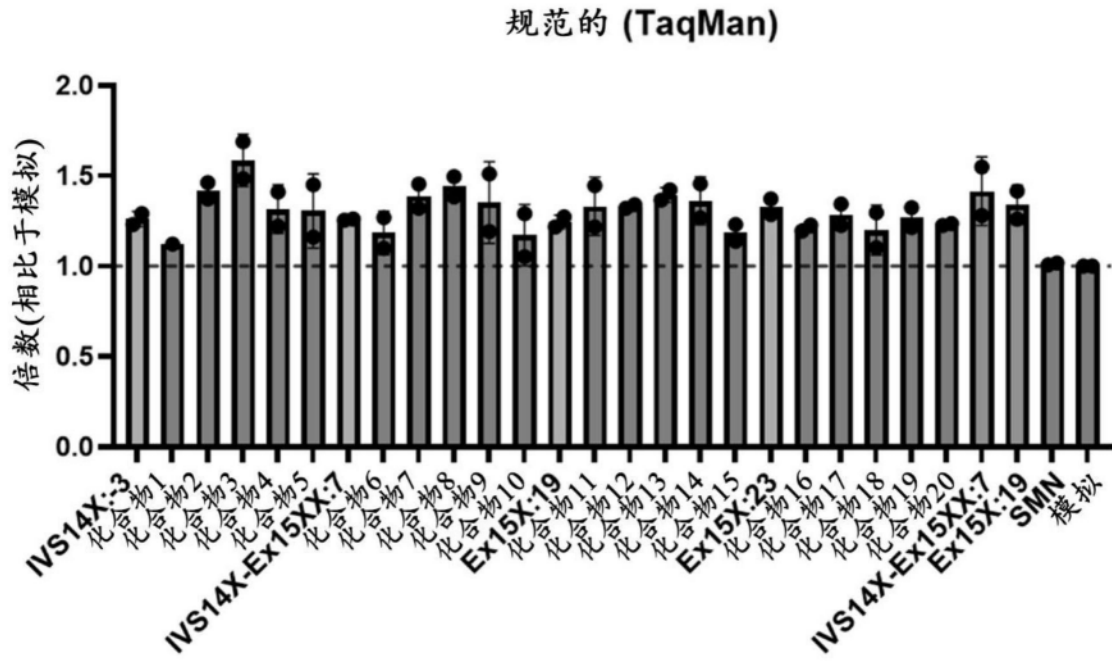


图16C

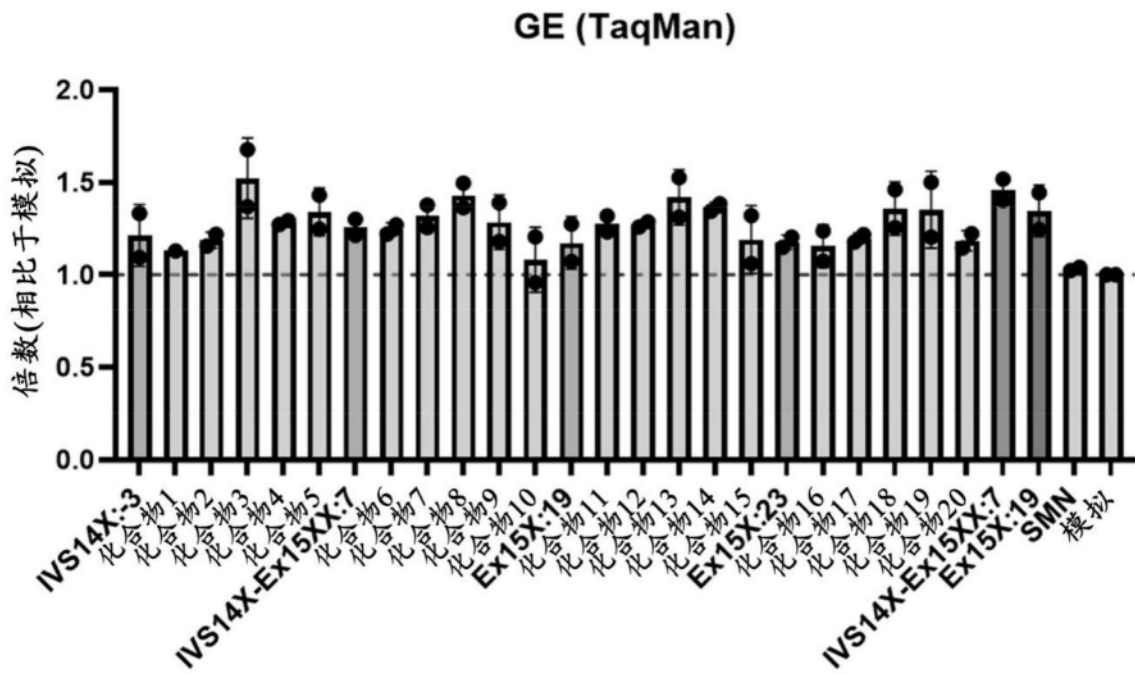


图16D



图17A

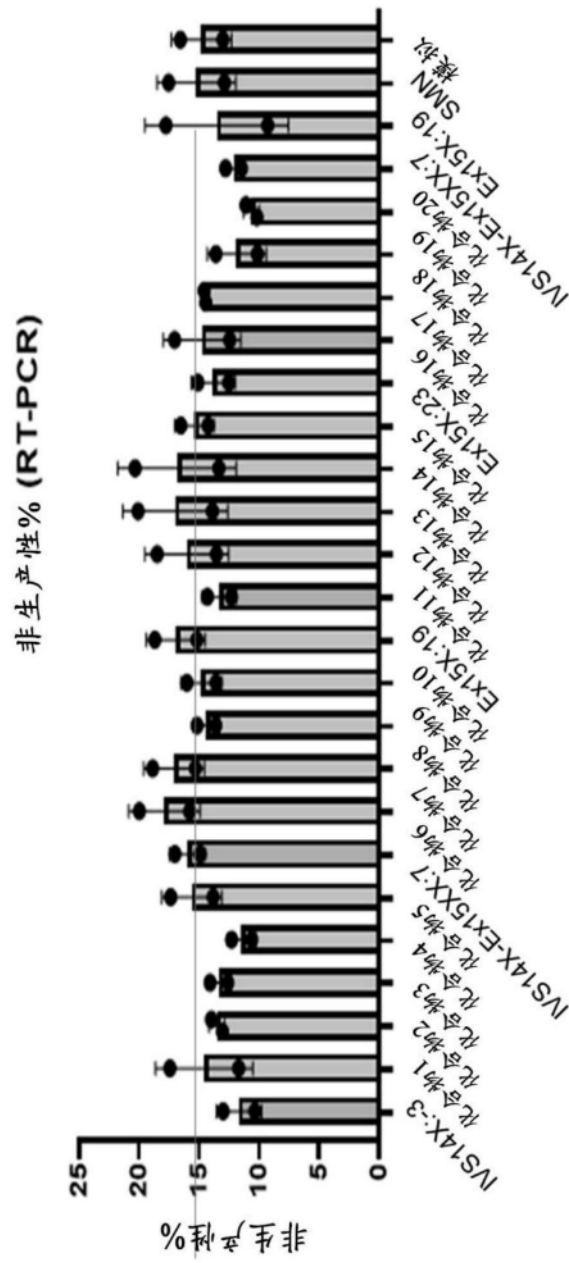


图17B

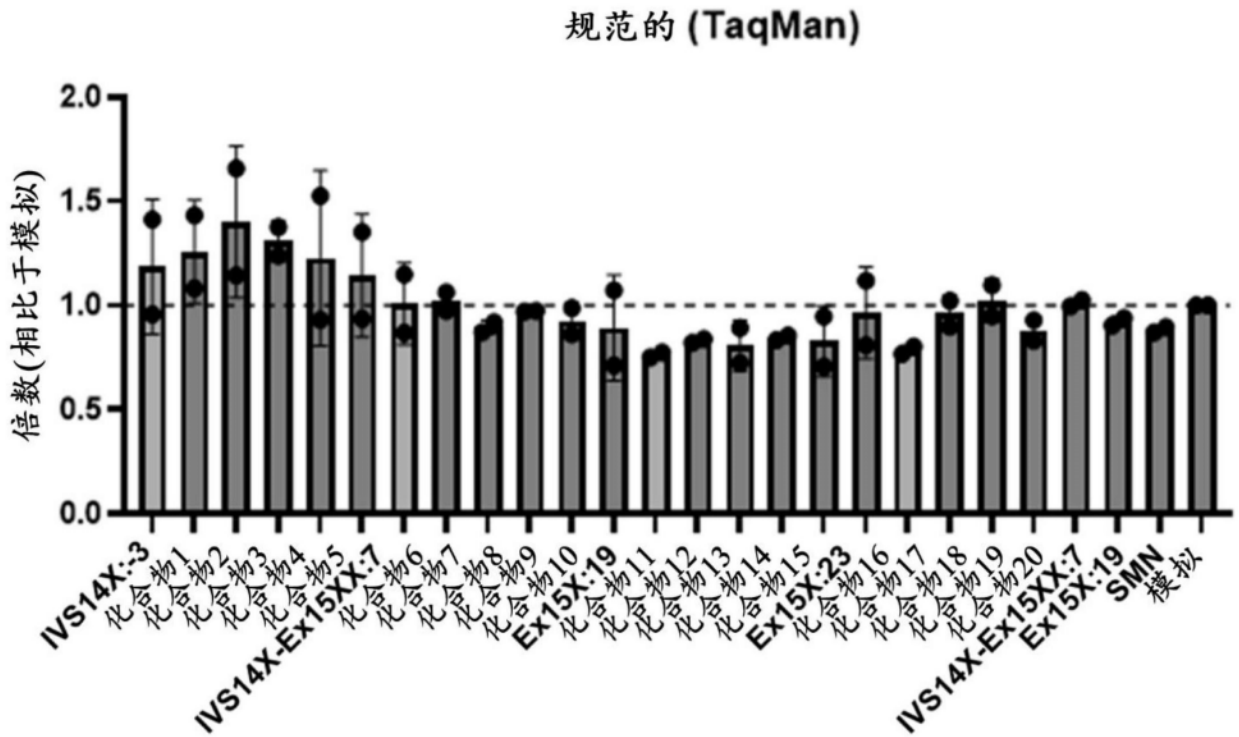


图17C

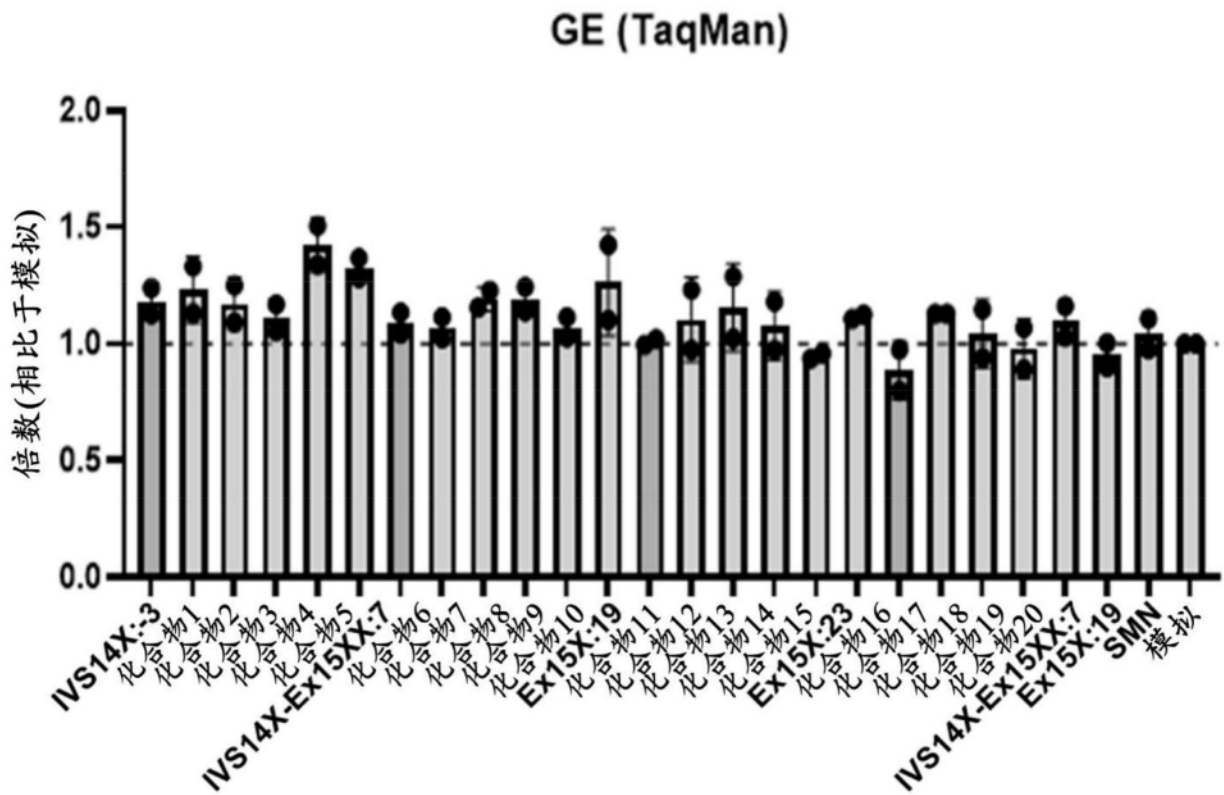


图17D