



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105392884 B

(45)授权公告日 2018.11.30

(21)申请号 201480027371.7

(22)申请日 2014.03.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105392884 A

(43)申请公布日 2016.03.09

(30)优先权数据

61/782706 2013.03.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.11.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/029766 2014.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/153240 EN 2014.09.25

(73)专利权人 萨勒普塔医疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 R.K. 贝斯特维克 D.E. 弗兰克

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 初明明 林森

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/113(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61P 21/00(2006.01)

(56)对比文件

W0 2012/029986 A1, 2012.03.08, 权利要求1和6, 第19-21页, 序列57.

W0 2010/048586 A1, 2010.04.29, 第41-47页, 权利要求36, 39, 48, 序列631.

US 2010/168212 A1, 2010.07.01, 权利要求1, 7, 11; 表1, 序列22和23.

FOSTER等. Genetic therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy. 《HUMAN GENE THERAPY》. 2012, 第23卷(第7期), 全文.

VAN等. Assessment of the feasibility of exon skipping for duchenne muscular dystrophy. 《BMC MEDICAL GENETICS》. 2008, 第9卷(第1期), 全文.

审查员 张锦广

权利要求书2页 说明书54页

序列表14页 附图11页

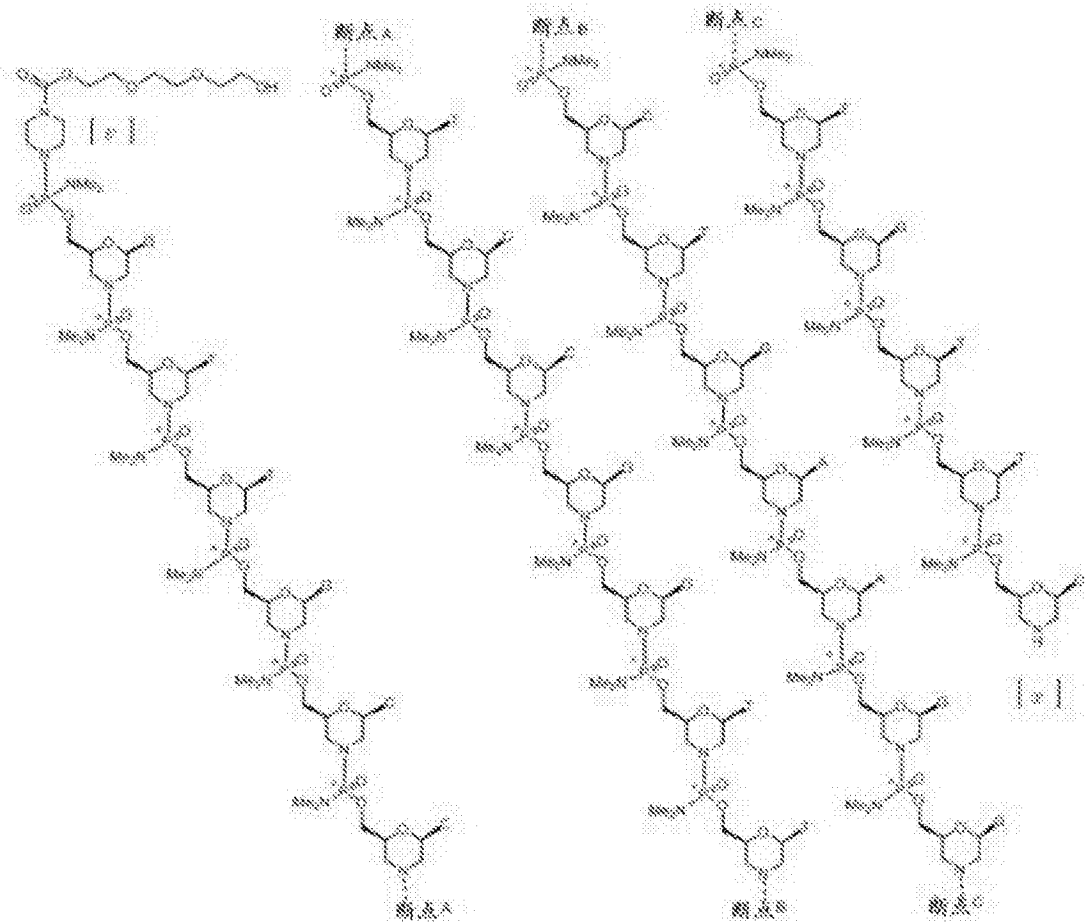
(54)发明名称

用于治疗肌肉萎缩的外显子跳跃组合物

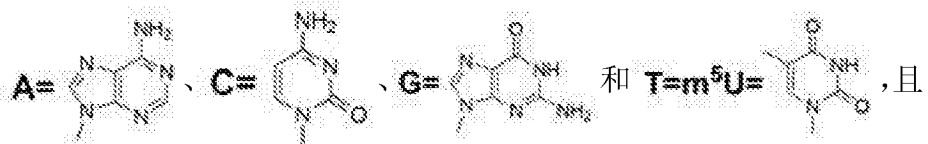
(57)摘要

本发明描述了能够结合在人类抗肌萎缩蛋白基因中的选定的靶标位点以诱发外显子53跳跃的反义分子。

1. 由以下结构组成的反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐：



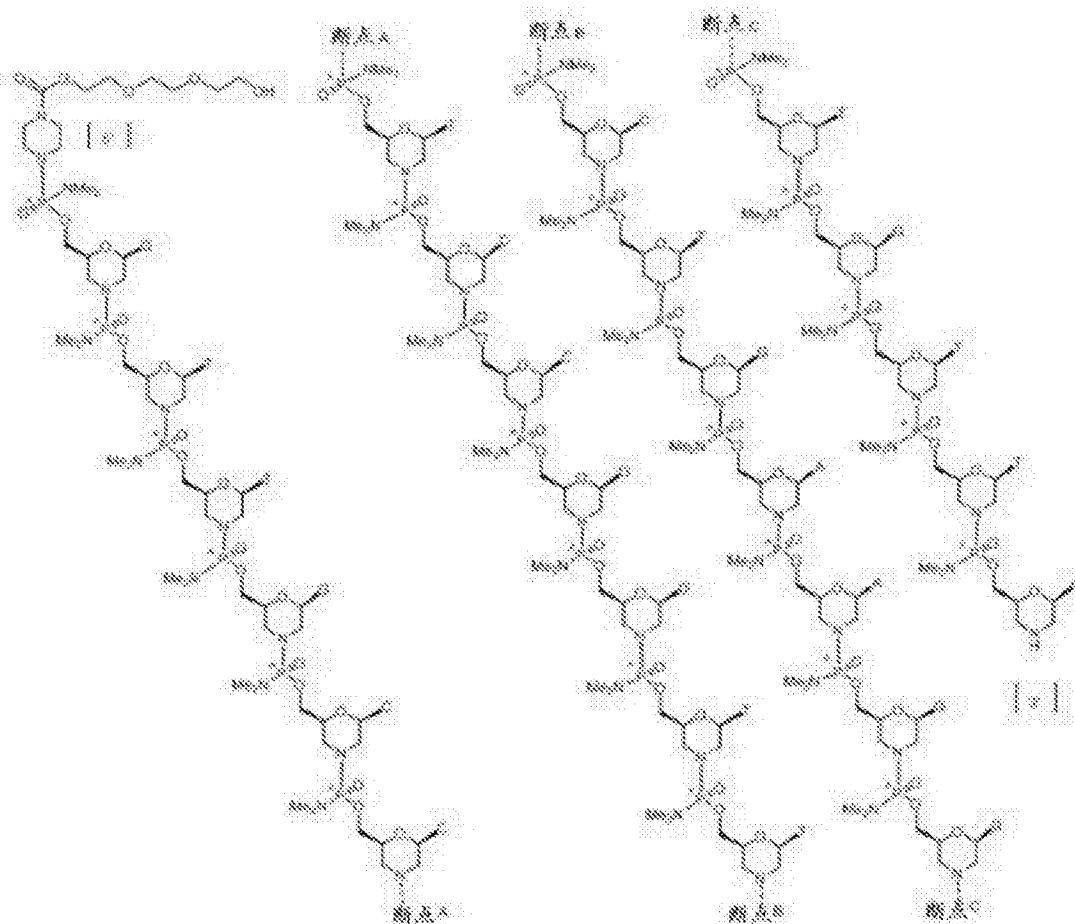
其中



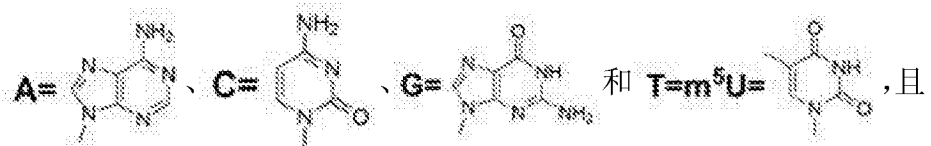
其中[^] = 磷中心的立体化学没有限定。

2. 权利要求1的反义寡核苷酸, 其中胸腺嘧啶碱基是尿嘧啶碱基。

3. 药物组合物, 其包含: (i) 由以下结构组成的反义寡核苷酸或其药学上可接受的盐:



其中



其中[^] = 磷中心的立体化学没有限定；

和 (ii) 药学上可接受的载体。

4. 权利要求3的药物组合物, 其中胸腺嘧啶碱基是尿嘧啶碱基。

5. 权利要求3或4的药物组合物, 其用于治疗杜兴肌营养不良。

用于治疗肌肉萎缩的外显子跳跃组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请要求2013年3月14日提交的美国临时专利申请61/782,706号的权益。上文提到的临时专利申请的全部内容通过引用结合到本文中来。

发明领域

[0003] 本发明涉及适合促进在人类抗肌萎缩蛋白基因中的外显子跳跃的新反义化合物和组合物。还提供了使用适用于本发明方法的新反义组合物诱发外显子跳跃的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 反义技术正使用各种化学发展以实现各种不同的水平的基因表达(转录、剪接、稳定、翻译)。大量研究集中在使用反义化合物来矫正或补偿在广泛的适应症中的异常或疾病相关的基因。反义分子能够特异性地抑制基因表达,并且因为此,考虑寡核苷酸作为基因表达的调整剂的许多研究工作集中在抑制靶向基因的表达或顺式作用元件的功能。反义寡核苷酸通常指向RNA,即有义链(例如,mRNA)或在一些病毒RNA靶标的情况下负链。为了实现特异性基因下调的期望效果,寡核苷酸通常促进靶向mRNA的衰变、阻断mRNA的翻译或阻断顺式作用RNA元件的功能,由此有效地防止靶标蛋白质的从头合成或病毒RNA的复制。

[0006] 然而,在旨在上调天然蛋白质的产生或补偿诱发翻译的过早终止的突变如无义或移码突变的情况下,这样的技术是不可用的。在这些情况下,缺陷型基因转录体将不会经历靶向降解或空间抑制,因此反义寡核苷酸化学将不会促进靶标mRNA衰变或阻断翻译。

[0007] 在多种遗传性疾病中,突变对于基因的最后表达的影响可经由在剪接过程期间靶向外显子跳跃的过程调整。该剪接过程通过复杂的多组分机制引导,所述机制使在前-mRNA中的邻近外显子-内含子接点紧靠着并执行在内含子的末端的磷酸二酯键的裂解,其随后在将一起剪接的外显子之间再形成。该复杂且高度精确的过程由在前-mRNA中的序列基元介导,这些序列基元为相对较短的半保守RNA链段,随后在剪接反应中包括的各种核剪接因子与其结合。通过改变剪接机制读取或识别在前-mRNA加工中包括的基元的方式,可以产生区别性剪接的mRNA分子。现在已经认识到大多数人类基因供选地在正常基因表达期间剪接,不过尚未鉴定出所包括的机理。Bennett等(美国专利6,210,892号)描述使用不诱发靶标RNA的RNase H-介导的裂解的反义寡核苷酸类似物反义调整野生型细胞mRNA加工。该发现能够用于产生缺乏特异性外显子的供选剪接的mRNA(例如,如(sazani, kole等,2007)描述,从而产生缺乏编码跨膜域的外显子的可溶性TNF超家族受体。

[0008] 在正常功能蛋白由于其中的突变而过早地终止的情况下,已经显示经由反义技术修复一些功能蛋白产生的方法可以经由在剪接过程期间的干预进行,并且如果与引起疾病的突变相关的外显子可从一些基因上特异性地缺失,则有时可生成缩短的蛋白质产物,其具有与天然蛋白质类似的生物性质或者具有足以缓解由与该外显子相关的突变引起的疾病的生物活性(参见,例如Sierakowska, Sambade等,1996;Wilton, Lloyd等,1999;van Deutekom, Bremmer-Bout等,2001;Lu, Mann等,2003;Aartsma-Rus, Janson等,2004)。Kole等(美国专利号5,627,274、5,916,808、5,976,879和5,665,593)公开了使用不促进靶

向的前-mRNA的衰变的修饰的反义寡核苷酸类似物抗击异常剪接的方法。Bennett等(美国专利号6,210,892)描述还使用不诱发靶标RNA的RNAse H-介导的裂解的反义寡核苷酸类似物反义调整野生型细胞mRNA加工。

[0009] 靶向外显子跳跃的方法可能特定地可用于长基因中,在这些长基因中,存在许多外显子和内含子,其中在外显子的遗传成分中存在冗余或其中蛋白质能够在没有一种或多种特定外显子的情况下起作用。重新定向基因加工来治疗与由在各种基因中的突变引起的截断相关的遗传性疾病的努力已经集中在使用如下反义寡核苷酸:(1) 与在剪接过程中包括的元件完全或部分地重叠;或(2) 在充分靠近该元件的位置处结合前-mRNA以破坏将通常介导在该元件处发生的特定剪接反应的剪接因子的结合和功能。

[0010] 杜兴肌营养不良(DMD)由在蛋白质抗肌萎缩蛋白的表达中的缺陷引起。编码该蛋白质的基因含有散布在DNA的超过两百万个核苷酸上的79种外显子。改变外显子的阅读框或引入终止密码子或以除去整框的一种或多种外显子或复制一种或多种外显子为特征的任何外显子突变具有破坏功能性抗肌萎缩蛋白的产生的潜力,其引起DMD。

[0011] 已经发现在如下情况下发生不太严重形式的肌肉萎缩:贝克尔肌营养不良(BMD),其中通常是一种或多种外显子缺失的突变沿整个抗肌萎缩蛋白转录体产生正确阅读框,使得mRNA向蛋白质的翻译未过早地终止。如果在突变的抗肌萎缩蛋白前-mRNA的加工中接合上游外显子和下游外显子维持基因的正确阅读框,则产生保持一定活性的具有短内部缺失的编码蛋白质的mRNA,产生贝克尔表型。

[0012] 多年来已知不改变抗肌萎缩蛋白蛋白质的阅读框的一种或多种外显子的缺失将产生BMD表型,而引起框架移位的外显子缺失将产生DMD (Monaco, Bertelson等,1988)。通常,改变阅读框且因此中断恰当的蛋白质翻译的包括点突变和外显子缺失的抗肌萎缩蛋白突变引起DMD。还应该注意到,一些BMD和DMD患者具有覆盖多种外显子的外显子缺失。

[0013] 已经报道了体外和体内用反义寡核糖核苷酸剪接突变体抗肌萎缩蛋白前-mRNA的调整(参见,例如Matsuo, Masumura等,1991;Takeshima, Nishio等,1995;Pramono, Takeshima等,1996;Dunckley, Eperon等,1997;Dunckley, Manoharan等,1998;Errington, Mann等,2003)。

[0014] 在mdx小鼠模型中特异性且可重现的外显子跳跃的第一实例由Wilton等报道(Wilton, Lloyd等,1999)。通过将反义分子定向到供体剪接位点,在6小时的培养细胞处理内在抗肌萎缩蛋白mRNA中诱发一致且有效的外显子23跳跃。Wilton等还描述了用较长的反义寡核苷酸靶向小鼠抗肌萎缩蛋白前-mRNA的受体区。虽然在内含子23供体剪接位点处定向的第一反义寡核苷酸在原代培养成肌细胞中诱发一致的外显子跳跃,但发现该化合物在表达较高水平的抗肌萎缩蛋白的永生细胞培养物中不太有效。然而,在精细的靶向和反义寡核苷酸设计中,特异性外显子去除的效率增加几乎一个数量级(Mann, Honeyman等,2002)。

[0015] 近来研究已经开始克服实现在受抗肌萎缩蛋白缺乏影响的组织中伴随着最低不良作用的持续抗肌萎缩蛋白表达的挑战。将靶向外显子51 (PR0051)的反义寡核苷酸肌肉内注射到四名具有DMD的患者的胫骨前肌肌肉中引起外显子51的特异性跳跃,而没有任何临床上明显的不良作用(Mann, Honeyman等,2002;van Deutekom, Janson等,2007)。考察在mdx小鼠中与靶向外显子23的细胞穿透肽(PPMO)缀合的反义二氨基磷酸吗啉寡聚体的全

身性递送的研究在骨骼和心肌中实现高且持续的抗肌萎缩蛋白蛋白质产生,而没有可检测的毒性(Jearawiriyapaisarn, Moulton等,2008;Wu, Moulton等,2008;Yin, Moulton等,2008)。

[0016] 测试剪接开关寡核苷酸(SSO)治疗DMD的安全性和功效的最新临床试验基于SSO技术以通过空间阻断剪接体诱发前-mRNA的供选剪接(Cirak等,2011;Goemans等,2011;Kinali等,2009;van Deutekom等,2007)。

[0017] 尽管取得了这些成果,但是仍然需要靶向多种抗肌萎缩蛋白外显子的改进的反义寡聚体及用于DMD治疗应用的改进的递送组合物和方法。

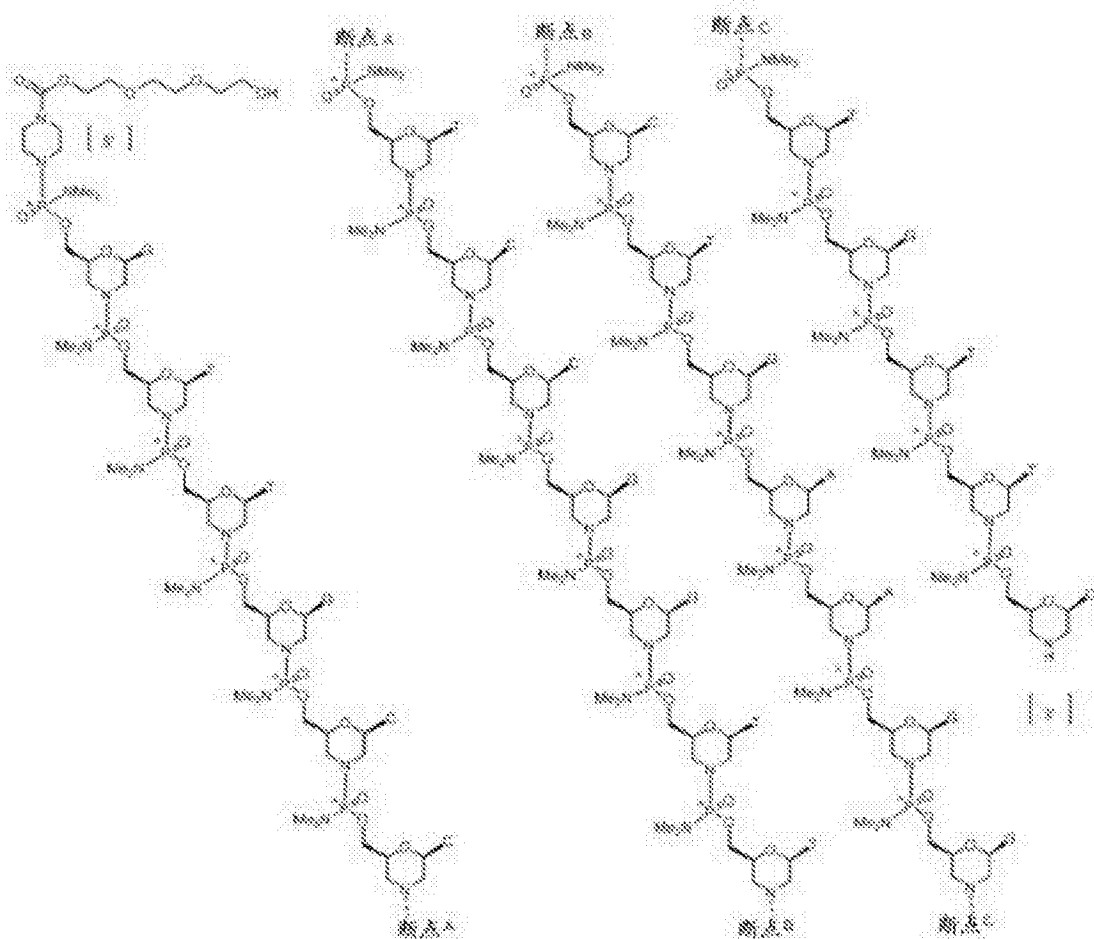
[0018] 发明概述

[0019] 一方面,本发明提供能够结合选定的靶标以诱发在人类抗肌萎缩蛋白基因中的外显子跳跃的长度为20-50个核苷酸的反义寡聚体,其中所述反义寡聚体包含特异性杂交至选自H53A(+36+60)、H53A(+30+57)、H53A(+30+56)、H53A(+30+55)和H53A(+33+57)的外显子53靶标区的碱基序列,其中所述寡聚体的碱基连接到吗啉环结构,且其中所述吗啉环结构通过接合一个环结构的吗啉氮到邻近环结构的5'外环碳的含磷亚基间键接合。在一个实施方案中,所述反义寡聚体包含命名为SEQ ID NO: 1-5的碱基序列。在另一实施方案中,所述反义寡聚体的长度为约20-30个核苷酸或约25-28个核苷酸。在又一实施方案中,所述序列为25个核苷酸且由选自SEQ ID NO: 1-5的序列组成。在一个实施方案中,本发明提供不激活RNase H的反义寡聚体。

[0020] 另一方面,本发明提供反义寡聚体,所述反义寡聚体化学连接增强所述反义寡聚体的活性、细胞分布或细胞摄取的一个或多个部分或缀合物,例如聚乙二醇分子。在其它实施方案中,所述反义寡聚体与例如选自SEQ ID NO: 16-31的序列的富精氨酸肽缀合。

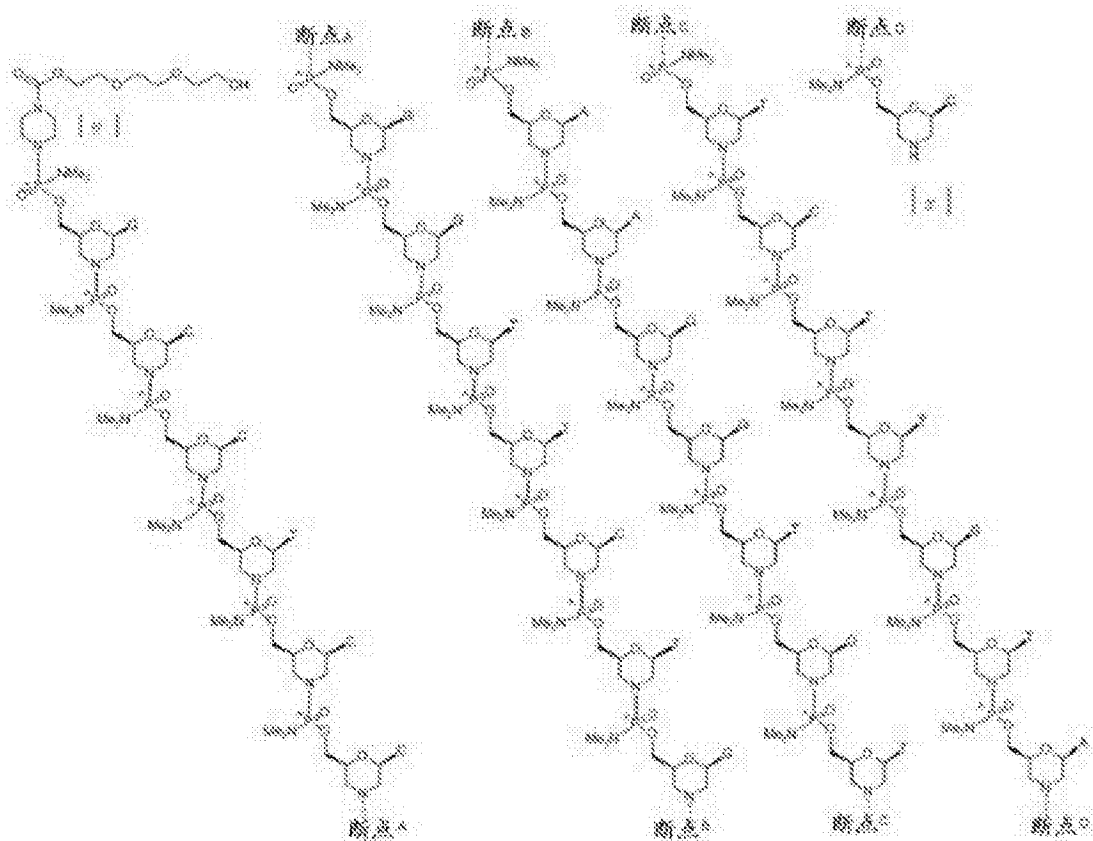
[0021] 又一方面,本发明提供能够结合选定的靶标以诱发在人类抗肌萎缩蛋白基因中的外显子跳跃的长度为20-50个核苷酸的反义寡聚体,其中所述反义寡聚体包含特异性杂交至选自H53A(+36+60)、H53A(+30+57)、H53A(+30+56)、H53A(+30+55)和H53A(+33+57)的外显子53靶标区的碱基序列,其中所述寡聚体的碱基连接到吗啉环结构,且其中所述吗啉环结构通过接合一个环结构的吗啉氮到邻近环结构的5'外环碳的基本不带电的含磷亚基间键接合。在一个实施方案中,所述反义寡聚体的5%-35%的键带正电。在另一实施方案中,所述反义寡聚体的亚基间键不带电且与在生理学pH下带正电的键交替,其中带正电的键的总数在2个和不超过键总数的一半之间。在一些实施方案中,所述反义寡聚体包含吗啉环结构和二氨基磷酸酯亚基间键。在一些实施方案中,所述反义寡聚体用侧位阳离子基团修饰。

[0022] 另一方面,本发明提供反义寡聚体,其中所述寡聚体具有:



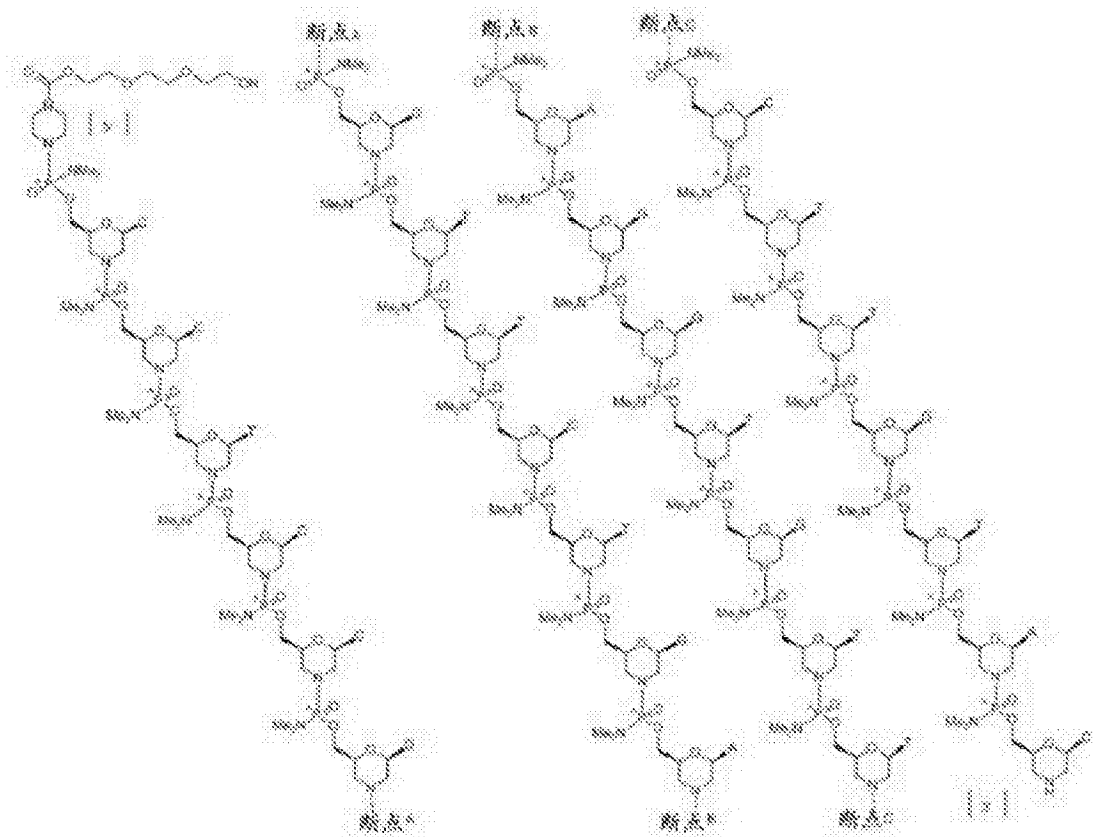
[0023] H53A (+36+60) 、

[0024]



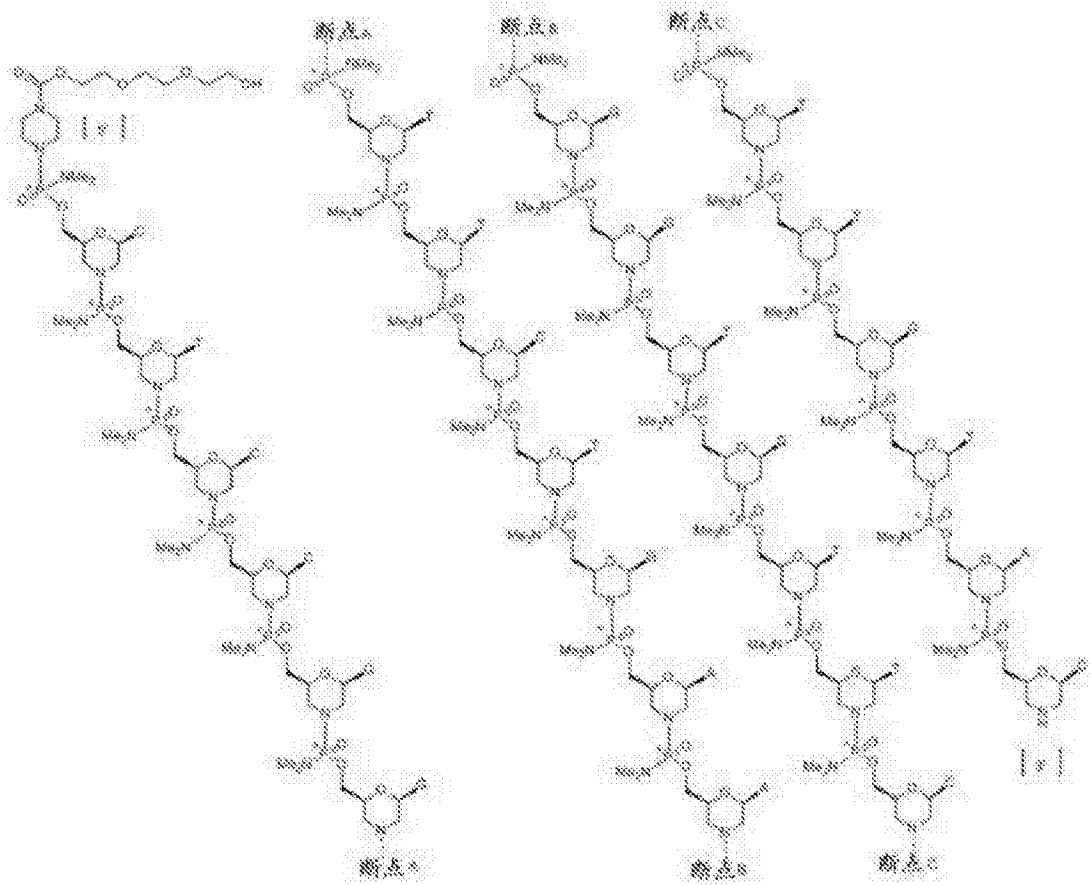
[0025] H53A (+30+57) 、

[0026]



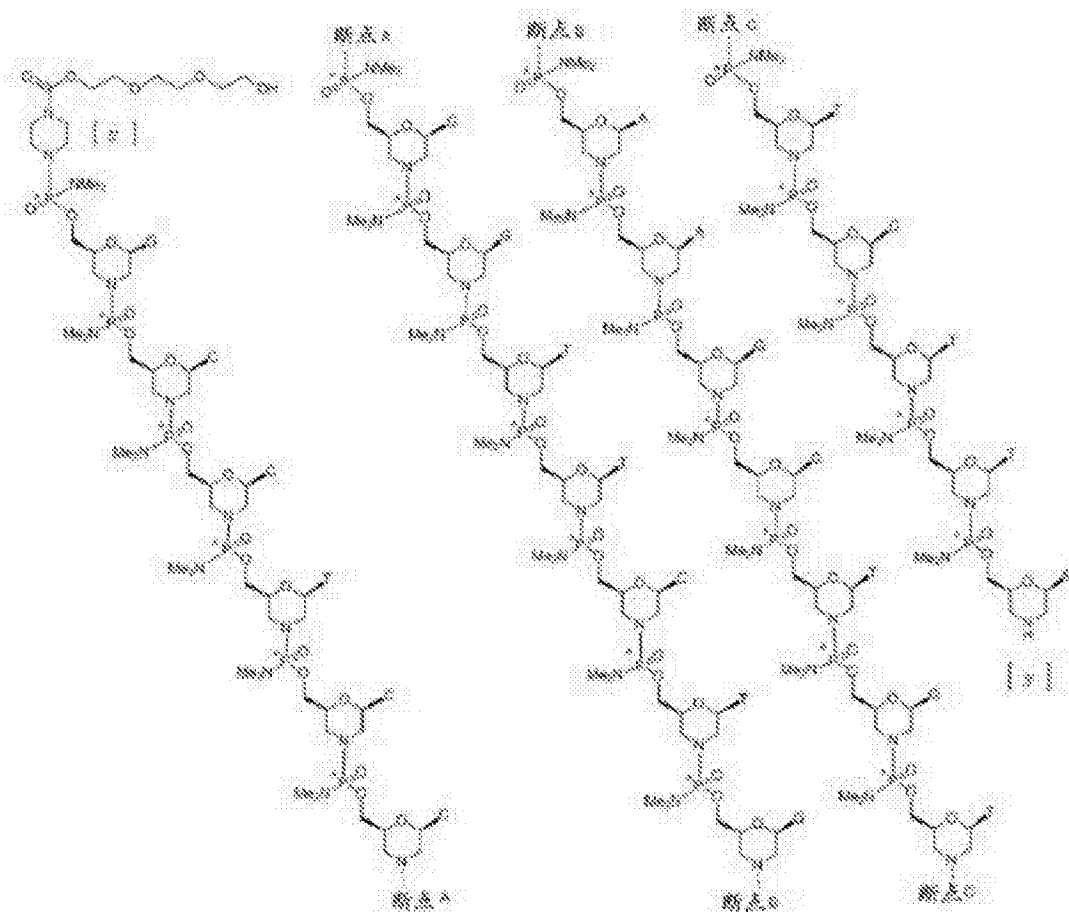
[0027] H53A (+30+56) 、

[0028]



[0029] H53A (+30+55) 和

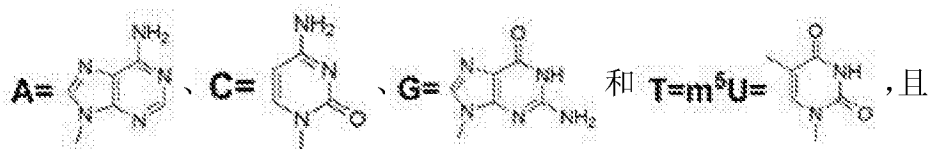
[0030]



[0031] H53A(+33+57),

[0032] 其中:

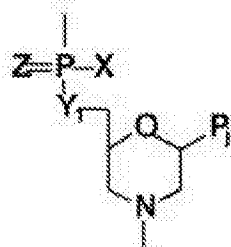
[0033]

[0034] 其中 $\wedge$ = 磷中心的立体化学没有限定。

[0035] 任选可用尿嘧啶碱基取代胸腺嘧啶碱基。

[0036] 一方面,所述反义化合物由接合一个亚基的嘌呤氮到邻近亚基的5'外环碳的含磷亚基间键构成,其中,根据以下结构,所述键为二氨基磷酸酯键:

[0037]



[0038] 其中 $Y_1 = O$, $Z = O$, P_j 为通过碱基特异性氢键结合而有效结合到在多核苷酸中的碱基的嘌呤或嘧啶碱基配对部分,且 X 为烷基、烷氧基、硫代烷氧基或烷基氨基,例如,其中 $X = NR_2$,其中 R 各自独立地为氢或甲基。不带电的上述亚基间键可与在生理学pH下带正电的键交替,其中带正电的键的总数在1个和至多亚基间键的全部总数之间。

[0039] 在另一例示性实施方案中,所述化合物由亚基间键和如在整体结合到本文中的美国申请号:13/118,298中描述的末端修饰构成。

[0040] 根据一个方面,本发明提供能够结合在人类抗肌萎缩蛋白前-mRNA中的选定的靶标以诱发外显子跳跃的反义分子。另一方面,本发明提供一起使用以诱发单一或多重外显子跳跃的两种或更多种反义寡核苷酸。例如,单一或多个外显子的外显子跳跃可通过将两种或更多种反义寡核苷酸分子连接在一起而实现。

[0041] 在另一实施方案中,本发明涉及长度为20-50个核苷酸的分离的反义寡核苷酸,其包括与选自以下的命名为退火位点的抗肌萎缩蛋白基因的外显子53靶标区互补的至少10、12、15、17、20或25个连续核苷酸:H53(+36+60)、H53A(+30+57)、H53A(+30+56)、H53A(+30+55)和H53A(+33+57),其中所述反义寡核苷酸特异性杂交至所述退火位点,诱发外显子53跳跃。在一个实施方案中,所述反义寡核苷酸的长度为20-30个或25-28个核苷酸。

[0042] 另一方面,本发明涉及长度为20-50个核苷酸的分离的反义寡核苷酸,其包括选自SEQ ID NO: 1-5的核苷酸序列的至少10、12、15、17、20或25个连续核苷酸,其中所述寡核苷酸特异性杂交至抗肌萎缩蛋白基因的外显子53靶标区并诱发外显子53跳跃。在一个实施方案中,所述反义寡核苷酸的长度为20-30个或25-28个核苷酸。在另一实施方案中,在SEQ ID NO: 1-5中的胸腺嘧啶碱基任选为尿嘧啶。

[0043] 本发明包括靶向向外显子53的例示性反义序列,例如下文鉴定的那些。

[0044] H53A(+36+60): 5'-GTTGCCTCCGTTCTGAAGGTGTTTC-3' (SEQ ID NO:1)

[0045] H53A(+30+57): 5'-GCCTCCGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC-3' (SEQ ID NO: 2)

[0046] H53A(+30+56): 5'-CCTCCGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC-3' (SEQ ID NO: 3)

[0047] H53A(+30+55): 5'-CTCCGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC-3' (SEQ ID NO: 4)

[0048] H53A(+33+57): 5'-GCCTCCGTTCTGAAGGTGTTCTTG-3' (SEQ ID NO: 5)

[0049] 在一个实施方案中,所述反义寡聚体特异性杂交至退火位点H53A(+30+56),例如SEQ ID NO: 3。在又一实施方案中,所述反义寡聚体特异性杂交至退火位点H53A(+30+57),例如SEQ ID NO: 2。在又一实施方案中,所述反义寡聚体特异性杂交至退火位点H53A(+30+55),例如SEQ ID NO: 4。在又一实施方案中,所述反义寡聚体特异性杂交至退火位点H53A(+33+57),例如SEQ ID NO: 5。在又一实施方案中,所述反义寡聚体特异性杂交至退火位点H53A(+36+60),例如SEQ ID NO: 1。

[0050] 在一些实施方案中,本发明的反义寡核苷酸含有使由RNase H引起的裂解减至最少或防止由RNase H引起的裂解的一种或多种修饰。在一些实施方案中,本发明的反义寡核苷酸不激活RNase H。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸包含非天然的主链。在一些实施方案中,所述寡核苷酸主链的糖部分被例如吗啉的非天然部分置换。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸具有被例如修饰的磷酸酯的非天然核苷酸间键置换的寡核苷酸主链的核苷酸间键。例示性修饰的磷酸酯包括膦酸甲酯、硫代膦酸甲酯、吗啉膦酸酯、哌嗪膦酸酯和氨基膦酸酯。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸为2'-O-甲基-寡核糖核苷酸或肽核苷酸。

[0051] 在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸含有碱基修饰或取代。例如,可选择某些核碱基以增加本文所述的反义寡核苷酸的结合亲和性。这些包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2, N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶

和2,6-二氨基嘌呤。已经显示5-甲基胞嘧啶取代使核酸双链体稳定性增加0.6-1.2°C,且可掺入到本文所述的反义寡核苷酸中。在一个实施方案中,所述寡核苷酸的至少一个嘧啶碱基包含5-取代的嘧啶碱基,其中所述嘧啶碱基选自胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。在一个实施方案中,所述5-取代的嘧啶碱基为5-甲基胞嘧啶。在另一实施方案中,所述寡核苷酸的至少一个嘌呤碱基包含N-2, N-6取代的嘌呤碱基。在一个实施方案中,所述N-2, N-6取代的嘌呤碱基为2,6-二氨基嘌呤。

[0052] 在一个实施方案中,所述反义寡核苷酸包括单独或与例如2'-O-甲氧基乙基糖修饰的另一修饰组合的一个或多个5-甲基胞嘧啶取代。在又一实施方案中,所述反义寡核苷酸包括单独或与另一修饰组合的一个或多个2,6-二氨基嘌呤取代。

[0053] 在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸与例如聚乙二醇部分的一个或多个部分或例如富精氨酸细胞穿透肽(例如,SEQ ID NO: 16-31)的缀合物化学连接,这增强反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。在一个例示性实施方案中,所述富精氨酸多肽在其N-末端或C-末端残基处与所述反义化合物的3'或5'端共价偶联。并且,在一个例示性实施方案中,所述反义化合物由吗啉亚基和接合一个亚基的吗啉氮到邻近亚基的5'外环碳的含磷的亚基间键构成。

[0054] 另一方面,本发明提供掺入上述反义寡核苷酸如SEQ ID NO: 1-5的反义寡核苷酸的表达载体。在一些实施方案中,所述表达载体为修饰的逆转录病毒或非逆转录病毒载体,例如腺伴随病毒载体。

[0055] 另一方面,本发明提供包含上述反义寡核苷酸和包括磷酸盐缓冲液的盐水溶液的医药组合物。

[0056] 另一方面,本发明提供选择和/或用以帮助预防性或治疗性治疗遗传病症的反义分子,其包含至少一种以适合递送到患者的形式的反义分子。

[0057] 另一方面,本发明提供治疗遭受遗传疾病的患者的方法,其中在编码特定蛋白质的基因中存在突变且所述突变的影响可通过外显子跳跃废除,其包括以下步骤:(a) 根据本文所述的方法选择反义分子;和(b) 施用所述分子到需要所述治疗的患者。本发明还提出了本发明的纯化并分离的反义寡核苷酸用于制造用于治疗遗传疾病的药物的用途。

[0058] 另一方面,本发明提供治疗例如杜兴肌营养不良或贝克尔肌营养不良的以肌肉萎缩为特征的病状的方法,其包括向患者施用关于在所述患者中的特定遗传病变的有效量的本发明适当设计的反义寡核苷酸。此外,本发明提供通过向患者施用有效量的反义寡核苷酸或包含这些生物分子中的一种或多种的医药组合物来预防性治疗患者以预防例如杜兴肌营养不良或贝克尔肌营养不良的肌肉萎缩或使所述肌肉萎缩减至最少的方法。

[0059] 另一方面,本发明还提供治疗遗传疾病的试剂盒,所述试剂盒包含包装在合适容器中的至少一种本发明的反义寡核苷酸及其使用说明。

[0060] 在结合附图阅读以下发明详述时,将更全面地理解这些及其它目的和特征。

[0061] 附图简述

[0062] 图1A示出具有二氨基磷酸酯键的例示性吗啉寡聚体结构。

[0063] 图1B示出根据本发明的一个实施方案的富精氨酸肽和反义寡聚体的缀合物。

[0064] 图1C示出如在图1B中的缀合物,其中主链键含有一个或多个带正电的基团。

[0065] 图1D-G示出例示性吗啉寡核苷酸的重复亚基链段,命名为D-G。

[0066] 图2A-2B描绘制备用于固相合成的连接子和用于寡聚体合成的固体载体的反应方案。

[0067] 图3描绘示出例示性反义寡聚体用于诱发在培养的原代成肌细胞中的外显子53跳跃的相对活性的曲线。使从用所指示的寡聚体处理的原代成肌细胞中分离的RNA经受外显子53-特异性巢式RT-PCR扩增,接着经受凝胶电泳和谱带强度量化。数据描绘为如由PCR评价的外显子跳跃%,即,外显子跳跃产物相对于全长PCR产物的谱带强度。

[0068] 图4描绘示出例示性反义寡聚体用于诱发在培养的人类横纹肌肉瘤细胞中的外显子53跳跃的相对活性的曲线。使从用所指示的寡聚体处理的横纹肌肉瘤细胞中分离的RNA经受外显子53-特异性巢式RT-PCR扩增,接着经受凝胶电泳和谱带强度量化。数据描绘为如由PCR评价的外显子跳跃%,即,外显子跳跃产物相对于全长PCR产物的谱带强度。

[0069] 图5A-B描绘示出例示性反义寡聚体用于诱发在培养的原代成肌细胞中的外显子53跳跃的相对活性的曲线。使从用所指示的寡聚体处理的原代成肌细胞中分离的RNA经受外显子53-特异性巢式RT-PCR扩增,接着经受凝胶电泳和谱带强度量化。数据描绘为如由PCR评价的外显子跳跃%,即,外显子跳跃产物相对于全长PCR产物的谱带强度。

[0070] 发明详述

[0071] 本发明的实施方案通常涉及改进的反义化合物及其使用方法,其特别设计用来诱发在人类抗肌萎缩蛋白基因中的外显子跳跃。抗肌萎缩蛋白在肌肉功能中起重要作用,且各种与肌肉有关的疾病以该基因的突变形式为特征。因此,在某些实施方案中,本文所述的改进的反义化合物诱发在突变形式的人类抗肌萎缩蛋白基因如在杜兴肌营养不良(DMD)和贝克尔肌营养不良(BMD)中见到的突变的抗肌萎缩蛋白基因中的外显子跳跃。

[0072] 由于由突变引起的异常mRNA剪接事件,这些突变的人类抗肌萎缩蛋白基因表达缺陷型抗肌萎缩蛋白或根本不表达可测量的抗肌萎缩蛋白,这种状况导致各种形式的肌肉萎缩。为了补救该状况,本发明的反义化合物杂交至突变的人类抗肌萎缩蛋白基因的预加工的RNA的选定区,诱发外显子跳跃和不然会异常地剪接抗肌萎缩蛋白mRNA的差别性剪接,由此允许肌细胞生产编码功能抗肌萎缩蛋白蛋白质的mRNA转录体。在某些实施方案中,产生的抗肌萎缩蛋白蛋白质未必是“野生型”形式的抗肌萎缩蛋白,而是截断的仍具功能性或半功能性的形式的抗肌萎缩蛋白。

[0073] 通过增加在肌细胞中功能抗肌萎缩蛋白蛋白质的水平,这些和有关实施方案可用于预防和治疗肌肉萎缩,特别是以由于异常mRNA剪接而表达缺陷型抗肌萎缩蛋白蛋白质为特征的例如DMD和BMD的那些形式的肌肉萎缩。本文所述的特异性寡聚体还提供相对于所使用的其它寡聚体改进的抗肌萎缩蛋白-外显子-特异性靶向,且由此提供优于治疗有关形式的肌肉萎缩的供选方法的显著且实用的优势。

[0074] 因此,本发明涉及能够结合选定的靶标以诱发在人类抗肌萎缩蛋白基因中的外显子跳跃的长度为20-50个核苷酸的反义寡聚体,其中所述反义寡聚体包含特异性杂交至选自H53A(+36+60)、H53A(+30+57)、H53A(+30+56)、H53A(+30+55)和H53A(+33+57)的外显子53靶标区的碱基序列,其中所述寡聚体的碱基连接吗啉环结构,且其中所述吗啉环结构通过接合一个环结构的吗啉氮到邻近环结构的5'外环碳的含磷亚基间键接合。在一个实施方案中,所述反义寡聚体包含命名为SEQ ID NO: 1-5的碱基序列。在另一实施方案中,所述反义寡聚体的长度为约20-30个核苷酸或约25-28个核苷酸。在又一实施方案中,所述序列为25

个核苷酸且由选自SEQ ID NO: 1-5的序列组成。

[0075] 本发明还涉及长度为20-50个核苷酸且包括与选自以下的命名为退火位点的抗肌萎缩蛋白基因的外显子53靶标区互补的至少10、12、15、17、20或更多个连续核苷酸的反义寡核苷酸:H53(+36+60)、H53A(+30+57)、H53A(+30+56)、H53A(+30+55)和H53A(+33+57)。

[0076] 本发明的其它反义寡核苷酸的长度为20-50个核苷酸且其包括至少10、12、15、17、20或更多个SEQ ID NO: 1-5的连续核苷酸。在一些实施方案中,在SEQ ID NO: 1-5中的胸腺嘧啶碱基任选为尿嘧啶。

[0077] 本发明的例示性反义寡聚体在下文阐述:

[0078] H53A(+36+60): 5'-GTTGCCTCCGTTCTGAAGGTGTTTC-3' (SEQ ID NO: 1)

[0079] H53A(+30+57): 5'-GCCTCCGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC-3' (SEQ ID NO: 2)

[0080] H53A(+30+56): 5'-CCTCCGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC-3' (SEQ ID NO: 3)

[0081] H53A(+30+55): 5'-CTCCGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC-3' (SEQ ID NO: 4)

[0082] H53A(+33+57): 5'-GCCTCCGTTCTGAAGGTGTTCTTG-3' (SEQ ID NO: 5)

[0083] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域一般技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管在实施或测试本发明中可使用与本文所述的那些方法和材料类似或等价的任何方法和材料,但是描述了优选的方法和材料。对于本发明的目的,以下术语如下定义。

[0084] I. 定义

[0085] “约”意指数量、水平、值、数、频率、百分数、尺寸、大小、量、重量或长度相对于参考数量、水平、值、数、频率、百分数、尺寸、大小、量、重量或长度变化差不多30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1%。

[0086] 术语“互补”和“互补性”是指通过碱基配对定律相关的多核苷酸(即,核苷酸的序列)。例如,序列“T-G-A (5'-3')”与序列“T-C-A (5'-3')”互补。互补性可为“部分的”,其中仅一些核酸碱基根据碱基配对定律匹配。或者,在核酸之间可能存在“完全”或“总体”互补性。在核酸链之间的互补程度对在核酸链之间的杂交的效率和强度具有明显影响。尽管常期望完全互补性,但是一些实施方案可包括对于靶标RNA的一处或多处、但优选6、5、4、3、2或1处错配。包括在寡聚体内的任何位置处的变化。在某些实施方案中,在寡聚体端点附近的序列的变化通常优于在内部的变化,并且,如果存在,其通常在5'和/或3'端的约6、5、4、3、2或1个核苷酸内。

[0087] 术语“细胞穿透肽”和“CPP”可互换使用且是指阳离子细胞穿透肽,也称作转运肽、载体肽或肽转导域。如在本文中所示的肽具有在给定细胞培养群体的100%细胞内诱发细胞穿透的能力并允许在全身性施用时在体内多个组织内大分子易位。优选的CPP实施方案为如下文进一步描述的富精氨酸肽。

[0088] 术语“反义寡聚体”和“反义化合物”和“反义寡核苷酸”可互换使用且是指环状亚基的序列,其各自带有通过允许碱基配对部分通过Watson-Crick碱基配对杂交至在核酸(通常RNA)中的靶标序列以在该靶标序列内形成核酸:寡聚体异源双链的亚基间键连接的碱基配对部分。所述环状亚基基于核糖或另一戊糖,或者在一个优选的实施方案中,基于吗啉基团(参见下文吗啉寡聚体的描述)。该寡聚体可与靶标序列具有精确或近似的序列互补性;在寡聚体的端点附近的序列变化通常优于在内部的变化。

[0089] 这类反义寡聚体可设计用来阻断或抑制mRNA的翻译或抑制天然前-mRNA剪接加工,或可称为“定向”或“靶向”与其杂交的靶标序列。该靶标序列通常为包括mRNA的AUG起始密码子、翻译抑制寡聚体或预加工的mRNA的剪接位点、剪接抑制寡聚体(SSO)的区。剪接位点的靶标序列可包括在预加工的mRNA中的正常剪接受体接点下游的具有其5'末端1至约25个碱基对的mRNA序列。优选的靶标序列为包括剪接位点或完全包含在外显子编码序列内或跨越剪接受体或供体位点的预加工的mRNA的任何区。寡聚体在其以上述方式靶向靶标的核酸时更一般地称为“靶向”生物学相关靶标,例如蛋白质、病毒或细菌。

[0090] 术语“吗啉寡聚体”或“PMO”(氨基磷酸酯-或二氨基磷酸酯吗啉寡聚体)是指由吗啉亚基结构构成的寡核苷酸类似物,其中(i)所述结构通过1-3个原子长、优选2个原子长且优选不带电或阳离子的含磷键连接在一起,所述键结合一个亚基的氮到邻近亚基的5'外环碳,和(ii)各吗啉环带有通过碱基特异性氢键结合而有效结合到在多核苷酸中的碱基的嘌呤或嘧啶碱基配对部分。参见,例如在图1A中的结构,示出了优选的二氨基磷酸酯键类型。术语“吗啉环结构”可与术语“吗啉亚基”互换使用。可对该键进行改变,条件是它们不妨碍结合或活性。例如,附接至磷的氧可被硫取代(硫代二氨基磷酸酯)。5'氧可被氨基或低碳烷基取代的氨基取代。连接至磷的侧位氮可未被取代,被(任选取代的)低碳烷基单取代或二取代。嘌呤或嘧啶碱基配对部分通常为腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶或肌苷。吗啉寡聚体的合成、结构和结合特性在美国专利号5,698,685、5,217,866、5,142,047、5,034,506、5,166,315、5,521,063、5,506,337、8,076,476、8,299,206和7,943,762(阳离子键)中详述,其全部都通过引用结合到本文中。修饰的亚基间键和端基在PCT申请US2011/038459和公告WO/2011/150408中详述,其通过引用整体结合到本文中。

[0091] “氨基酸亚基”或“氨基酸残基”可指 α -氨基酸残基(-CO-CHR-NH-)或 β -氨基酸残基或其它氨基酸残基(例如,-CO-(CH₂)_nCHR-NH-),其中R为侧链(其可包括氢)且n为1-6,优选为1-4。

[0092] 术语“天然存在的氨基酸”是指在自然中见到的蛋白质中存在的氨基酸。术语“非天然氨基酸”是指在自然中见到的蛋白质中不存在的那些氨基酸,实例包括 β -丙氨酸(β -Ala)、6-氨基己酸(Ahx)和6-氨基戊酸。

[0093] “外显子”是指编码蛋白质的核酸的限定区段或在预加工的(或前体)RNA的任一部分已经通过剪接除去之后在成熟形式的RNA分子中表达的核酸序列。成熟RNA分子可为信使RNA(mRNA)或功能形式的非编码RNA,例如rRNA或tRNA。人类抗肌萎缩蛋白基因具有约79个外显子。

[0094] “内含子”是指不翻译成蛋白质的核酸区(在基因内)。内含子为转录到前体mRNA(前-mRNA)中且接着在成熟RNA形成期间通过剪接除去的非编码区段。

[0095] “有效量”或“治疗有效量”是指作为单一剂量或作为一系列剂量的一部分施用到哺乳动物受试者的例如反义寡聚体的治疗化合物的量,其有效生成所期望的治疗效果。对于反义寡聚体,该效果通常通过抑制选定靶标序列的翻译或天然剪接加工产生。

[0096] “外显子跳跃”通常是指如下过程,其中整个外显子或其部分自给定预加工的RNA中除去且由此从在例如翻译成蛋白质的成熟mRNA的成熟RNA中存在排除。因此,通过跳跃的外显子另外编码的蛋白质的部分在表达形式的蛋白质中不存在,通常产生改变(尽管仍具功能性)形式的蛋白质。在某些实施方案中,跳跃的外显子为来自人类抗肌萎缩蛋白基因的

异常外显子,其可在其序列中含有另外导致异常剪接的突变或其它改变。在某些实施方案中,跳跃的外显子为抗肌萎缩蛋白基因的外显子1-79中的任一个或多个,不过优选人类抗肌萎缩蛋白基因的外显子53。

[0097] “抗肌萎缩蛋白”为杆状胞浆蛋白且为经由细胞膜连接肌纤维的细胞骨架到周围胞外基质的蛋白质复合物的重要部分。抗肌萎缩蛋白含有多个功能域。例如,抗肌萎缩蛋白含有在约氨基酸14-240处的肌动蛋白结合域和在约氨基酸253-3040处的中心杆状域。该大中心域由24种约109个氨基酸的收缩蛋白样三重螺旋元件形成,其与 α -放线素和收缩蛋白具有同源性。重复序列(repeat)通常由四个也称作绞链区的富脯氨酸的非重复链段中断。重复序列15和16由似乎提供用于抗肌萎缩蛋白的蛋白水解裂解的主要位点的18个氨基酸的序列段间隔。在大多数重复序列之间的序列同一性为10-25%。一个重复序列含有三个 α -螺旋:1、2和3。 α -螺旋1和3各自可能经由疏水界面作为卷曲螺旋相互作用的7个螺旋转角形成。 α -螺旋2具有更复杂的结构且由通过甘氨酸或脯氨酸残基间隔的四个链段和三个螺旋转角形成。各重复序列通过通常由在 α -螺旋2的第一部分中的氨基酸47和48之间的内含子中断的两个外显子编码。另一内含子在重复序列中的不同位置见到,通常散布在螺旋-3上。抗肌萎缩蛋白还含有在约氨基酸3080-3360处的富半胱氨酸域,其包括富半胱氨酸链段(即,在280个氨基酸中有15个半胱氨酸),显示与粘液菌(盘状细胞粘菌(*Dictyostelium discoideum*)) α -放线素的C-末端域的同源性。羧基-末端域在约氨基酸3361-3685处。

[0098] 抗肌萎缩蛋白的氨基-端点结合F-肌动蛋白且羧基-端点在肌纤膜处结合抗肌萎缩蛋白相关的蛋白质复合物(DAPC)。DAPC包括肌营养不良蛋白聚糖(dystroglycans)、肌膜蛋白聚糖(sarcoglycans)、整合素和窖蛋白(caveolin),且在这些组分中的任一种中的突变导致常染色体遗传性肌肉营养不良。在缺乏抗肌萎缩蛋白时,DAPC不稳定,这引起成员蛋白质的水平减小并且又导致渐进性纤维损伤和膜渗漏。在例如杜兴肌营养不良(DMD)和贝克尔肌营养不良(BMD)的各种形式的肌肉萎缩中,肌细胞主要由于在基因序列中导致不恰当剪接的突变而生成改变且功能缺陷形式的抗肌萎缩蛋白,或者根本不生成抗肌萎缩蛋白。缺陷型抗肌萎缩蛋白的主导表达或抗肌萎缩蛋白或抗肌萎缩蛋白样蛋白质的完全缺乏导致肌肉退化迅速发展,如上所述。在这方面,“缺陷型”抗肌萎缩蛋白可通过如本领域中已知的在具有DMD或BMD的某些受试者中生成的抗肌萎缩蛋白的形式或通过可检测的抗肌萎缩蛋白的缺乏来表征。

[0099] 本文使用的术语“功能”和“功能性”等是指生物、酶或治疗功能。

[0100] “功能性”抗肌萎缩蛋白通常是指,通常与在具有DMD或BMD的某些受试者中存在的改变或“缺陷”形式的抗肌萎缩蛋白相比较,具有足以降低另外表征肌肉萎缩的肌肉组织的渐进性退化的生物活性的抗肌萎缩蛋白。在某些实施方案中,如根据在本领域中的常规技术所测量,功能性抗肌萎缩蛋白可具有野生型抗肌萎缩蛋白的体外或体内生物活性的约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%(包括在中间的所有整数)。作为一个实例,在肌肉体外培养物中的抗肌萎缩蛋白有关活性可根据肌管大小、肌原纤维组织(或组织破坏)、收缩活性和乙酰胆碱受体的自发团簇测量(参见,例如,Brown等,Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999)。动物模型也是研究疾病的致病原因的有价值资源且提供测试抗肌萎缩蛋白有关活性的工具。对于DMD研究最广泛使用的动物模型中的两种是mdx小鼠和金毛猎犬肌肉萎缩(GRMD)狗,这两种都是抗肌萎缩蛋白阴性(参见,例如,Collins和

Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003)。可使用这些及其它动物模型来测量各种抗肌萎缩蛋白的功能活性。包括截断形式的抗肌萎缩蛋白,例如由某些本发明的外显子跳跃反义化合物生成的那些形式。

[0101] “分离的”意指本质上或基本上不含在其天然状态下通常伴随的组分材料。例如,本文使用的“分离的多核苷酸”可指已经从在天然存在的状态下侧接的序列中纯化或除去的多核苷酸,例如已经从通常邻近DNA片段的序列中除去的DNA片段。

[0102] 本文使用的“足够长度”是指与在靶标抗肌萎缩蛋白前-mRNA中的至少8个、更通常8-30个邻接核苷碱基互补的反义寡核苷酸。在一些实施方案中,足够长度的反义包括在靶标抗肌萎缩蛋白前-mRNA中的至少8、9、10、11、12、13、14或15个邻接核苷碱基。在其它实施方案中,足够长度的反义包括在靶标抗肌萎缩蛋白前-mRNA中的至少16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个邻接核苷碱基。足够长度的反义寡核苷酸具有能够特异性杂交至外显子53的至少最小数目的核苷酸。优选足够长度的寡核苷酸的长度为约10-约50个核苷酸,包括10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39和40个或更多个核苷酸的寡核苷酸。在一个实施方案中,足够长度的寡核苷酸的长度为10-约30个核苷酸。在另一实施方案中,足够长度的寡核苷酸的长度为15-约25个核苷酸。在又一实施方案中,足够长度的寡核苷酸的长度为20-30、或20-50个核苷酸。在又一实施方案中,足够长度的寡核苷酸的长度为22-28、25-28、24-29或25-30个核苷酸。

[0103] “增强(enhance)”或“增强(enhancing)”或者“增加(increase)”或“增加(increasing)”或者“刺激(stimulate)”或“刺激(stimulating)”通常是指一种或多种反义化合物或组合物在细胞或受试者中生成或导致与由在无反义化合物的情况下或由对照化合物引起的反应相比更大的生理反应(即,下游效果)的能力。可测量的生理反应可包括功能形式的抗肌萎缩蛋白的表达增加或在肌肉组织中抗肌萎缩蛋白有关的生物活性增加以及对于本领域的理解和本文中的描述显而易见的其它反应。还可测量到肌肉功能增加,包括肌肉功能增加或改进约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。还可测量表达功能性抗肌萎缩蛋白的肌肉纤维的百分数,包括抗肌萎缩蛋白表达增加约1%、2%、%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的肌肉纤维。例如,已经显示如果25-30%的纤维表达抗肌萎缩蛋白,则可发生约40%的肌肉功能改进(参见,例如,DelloRusso等,Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002)。“增加”或“增强”的量通常为“统计上显著的”量,且可包括相对于由在没有反义化合物的情况下(缺乏试剂)或由对照化合物生成的量增加1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50倍或更多倍(例如,500、1000倍)(包括在中间且大于1的所有整数和小数点,例如,1.5、1.6、1.7、1.8等)。

[0104] 术语“降低”或“抑制”通常可涉及本发明的一种或多种反义组合物“减小”例如本文所述的疾病或病状的症状的相关生理学或细胞反应的能力,如根据在诊断领域中的常规技术所测量。相关生理学或细胞反应(体内或体外)对于本领域的技术人员将是显而易见的,且可包括降低肌肉萎缩的症状或病变或降低例如在具有DMD或BMD的个体中表达的改变形式的抗肌肉萎缩蛋白的缺陷形式的抗肌萎缩蛋白的表达。反应“减小”与由在没有反义化合物的情况下或由对照组合物生成的反应相比在统计上是显著的,且可包括减小1%、2%、

3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%，包括在中间的所有整数。

[0105] 还包括能够表达本发明的低聚抗肌萎缩蛋白-靶标序列的载体递送体系，例如表达如本文所述的包含SEQ ID NO: 1和9-18中的任一个或多个的多核苷酸序列的载体。“载体”或“核酸构建体”意指多核苷酸分子，优选例如来源于质粒、噬菌体、酵母或病毒的DNA分子，多核苷酸可插入或克隆到其中。载体优选含有一个或多个独特的限制位点，且能够在包括靶标细胞或组织或其祖细胞或组织的限定宿主细胞中自主复制，或可与限定的宿主的基因组整合使得克隆的序列可重现。因此，该载体可为自主复制载体，即，作为外染色体实体存在的载体，其复制不取决于染色体复制，例如线性或封闭环形质粒、外染色体元件、极微染色体或人造染色体。该载体可含有保证自我复制的任何手段。供选地，该载体可为在引入宿主细胞中时整合到基因组中并与已经整合到其中的一个或多个染色体一起复制的载体。

[0106] 个体（例如，哺乳动物，例如人类）或细胞的“治疗”为在改变个体或细胞的天然进程的努力中使用的任何类型的干预。治疗包括但不限于施用医药组合物，且可预防地或在病理学事件开始或与病原剂接触之后进行。治疗包括对如在某些形式的肌肉萎缩中的与抗肌萎缩蛋白相关的疾病或病状的症状或病变的任何期望的效果，且可包括例如对正治疗的疾病或病状的一种或多种可测量标记物的最低程度的改变或改进。还包括“预防性”治疗，其可涉及到降低正治疗的疾病或病状的进展速度、延迟该疾病或病状的发作或降低其发作的严重程度。“治疗”或“预防”未必指示疾病或病状或其相关症状的完全根除、治愈或预防。

[0107] 因此，包括通过施用任选作为医药制剂或剂型的一部分的本发明的一种或多种反义寡聚体（例如，SEQ ID NO: 1-5及其变体）到需要其的受试者来治疗例如DMD和BMD的肌肉萎缩的方法。还包括通过施用一种或多种反义寡聚体诱发受试者的外显子跳跃的方法，其中该外显子为来自抗肌萎缩蛋白基因、优选人类抗肌萎缩蛋白基因的外显子53。本文使用的“受试者”包括表现出症状或处于表现出症状的危险之中的任何动物，其可用本发明的反义化合物治疗，例如具有DMD或BMD或与这些病状相关的症状（例如，肌肉纤维损失）中的任一种或处于具有DMD或BMD或与这些病状相关的症状（例如，肌肉纤维损失）中的任一种的危险之中的受试者。合适的受试者（患者）包括实验室动物（例如，小鼠、大鼠、兔或豚鼠）、农畜和家畜或宠物（例如，猫或狗）。包括非人类灵长类动物且优选人类患者。

[0108] “烷基”或“亚烷基”都指含有1-18个碳的饱和直链或支链烃基。实例包括不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、正戊基和正己基。术语“低碳烷基”是指含有1-8个碳的如本文定义的烷基。

[0109] “烯基”是指包含2-18个碳且含有至少一个碳碳双键的不饱和直链或支链烃基。实例包括而限于乙烯基、丙烯基、异丙烯基、丁烯基、异丁烯基、叔丁烯基、正戊烯基和正己烯基。术语“低碳烯基”是指含有2-8个碳的如本文定义的烯基。

[0110] “炔基”是指含有2-18个碳、包含至少一个碳碳三键的不饱和直链或支链烃基。实例包括而限于乙炔基、丙炔基、异丙炔基、丁炔基、异丁炔基、叔丁炔基、戊炔基和己炔基。术语“低碳炔基”是指含有2-8个碳的如本文定义的炔基。

[0111] “环烷基”是指单或多环烷基。实例包括而限于环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0112] “芳基”是指含有1-8个碳、具有一个或多个闭合环的环状芳族烃部分。实例包括而不仅限于苯基、苄基、萘基、蒽基、菲基和联苯基。

[0113] “芳烷基”是指式 R_aR_b 的基团,其中 R_a 为如上定义的亚烷基链且 R_b 为如上定义的一种或多种芳基,例如苄基、二苯甲基等。

[0114] “硫代烷氧基”是指式 $-SR_c$ 的基团,其中 R_c 为如本文定义的烷基。术语“低碳硫代烷氧基”是指含有1-8个碳的如本文定义的烷氧基。

[0115] “烷氧基”是指式 $-OR_{da}$ 的基团,其中 R_d 为如本文定义的烷基。术语“低碳烷氧基”是指含有1-8个碳的如本文定义的烷氧基。烷氧基的实例包括而不仅限于甲氧基和乙氧基。

[0116] “烷氧基烷基”是指被烷氧基取代的烷基。

[0117] “羰基”是指 $C(=O)$ -基团。

[0118] “胍基”是指 $H_2N(C=NH_2)-NH$ -基团。

[0119] “脒基”是指 $H_2N(C=NH_2)CH$ -基团。

[0120] “氨基”是指 NH_2 基团。

[0121] “烷基氨基”是指式 $-NHR_d$ 或 $-NR_dR_d$ 的基团,其中 R_d 各自独立地为如本文定义的烷基。术语“低碳烷基氨基”是指含有1-8个碳的如本文定义的烷基氨基。

[0122] “杂环”意指5-至7-元单环杂环或7-至10-元双环杂环,其为饱和、不饱和或芳族的,且其含有1-4个各自独立地选自氮、氧和硫的杂原子,且其中氮和硫杂原子可任选被氧化,且氮杂原子可任选季铵化的,包括其中上述杂环中的任一个稠合成苯环的双环。杂环可经由任何杂原子或碳原子附接。杂环包括如下定义的杂芳基。因此,除了以下列出的杂芳基之外,杂环还包括吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、乙内酰脲基、戊内酰胺基、氧杂环丙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢噻吩基、四氢噻吡喃基、四氢嘧啶基、四氢噻吡喃基等。

[0123] “杂芳基”意指5-10个成员且具有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子且含有至少1个碳原子的芳族杂环,包括单环体系和双环体系。代表性杂芳基为吡啶基、呋喃基、苯并呋喃基、噻吩基、苯并噻吩基、喹啉基、吡咯基、吡啶基、咪唑基、苯并咪唑基、咪唑基、苯并咪唑基、噻唑基、苯并噻唑基、异噻唑基、吡唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、噌啉基、酞嗪基和喹啉基。

[0124] 术语“任选被取代的烷基”、“任选被取代的烯基”、“任选被取代的烷氧基”、“任选被取代的硫代烷氧基”、“任选被取代的烷基氨基”、“任选被取代的低碳烷基”、“任选被取代的低碳烯基”、“任选被取代的低碳烷氧基”、“任选被取代的低碳硫代烷氧基”、“任选被取代的低碳烷基氨基”和“任选被取代的杂环基”意指在被取代时至少一个氢原子被取代基置换。在氧取代基($=O$)情况下,两个氢原子被置换。在这方面,取代基包括:氘、任选被取代的烷基、任选被取代的烯基、任选被取代的炔基、任选被取代的芳基、任选被取代的杂环、任选被取代的环烷基、氧、卤素、 $-CN$ 、 $-OR_x$ 、 NR_xR_y 、 $NR_xC(=O)R_y$ 、 $NR_xSO_2R_y$ 、 $-NR_xC(=O)NR_xR_y$ 、 $C(=O)R_x$ 、 $C(=O)OR_x$ 、 $C(=O)NR_xR_y$ 、 $-SO_mR_x$ 和 $-SO_mNR_xR_y$,其中 m 为0、1或2, R_x 和 R_y 相同或不同且独立地为氢、任选被取代的烷基、任选被取代的烯基、任选被取代的炔基、任选被取代的芳基、任选被取代的杂环或任选被取代的环烷基,且所述任选被取代的烷基、任选被取代的烯基、任选被取代的炔基、任选被取代的芳基、任选被取代的杂环和任选被取代的环烷基的每个可被以下基团中的一个或多个进一步取代:氧、卤素、 $-CN$ 、 $-OR_x$ 、 NR_xR_y 、 $NR_xC(=O)R_y$ 、

NRxSO_2Ry 、 $-\text{NRxC}(=\text{O})\text{NRxRy}$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{Rx}$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{ORx}$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{NRxRy}$ 、 $-\text{SOmRx}$ 和 $-\text{SOmNRxRy}$ 。

[0125] 提出了反义分子命名系统并且将其公开以区别不同的反义分子(参见Mann等,(2002) J Gen Med 4, 644-654)。该命名在测试如下所述全部靶向相同靶标区的几种稍微不同的反义分子时特别相关: $\text{H}\# \text{A/D}(x:y)$ 。

[0126] 首字母命名物种(例如,H:人类;M:鼠科;C:犬科)。“#”命名靶标抗肌萎缩蛋白外显子数。“A/D”分别指示在外显子的开始和结尾处的受体和供体剪接位点。 $(x\ y)$ 表示退火坐标,其中“-”或“+”分别指示内含子序列或外显子序列。例如,A $(-6+18)$ 将指示在靶标外显子前面内含子的最后6个碱基和靶标外显子的前18个碱基。最靠近的剪接位点将是受体,因此这些坐标的前面是“A”。描述在供体剪接位点处的退火坐标可为D $(+2-18)$,其中最后2个外显子碱基和前18个内含子碱基对应于反义分子的退火位点。全部外显子退火坐标将由A $(+65+85)$ 表示,其为在自外显子的起始点计第65个核苷酸和第85个核苷酸之间的位点。

[0127] II. 反义寡核苷酸

[0128] 当一种或多种反义分子靶向在前mRNA内的外显子的剪接中包括的核苷酸序列时,可抑制外显子的正常剪接,导致剪接机制绕过来自成熟mRNA的全部靶向外显子。在许多基因中,全部外显子的缺失将经由重要功能域的损失或阅读框的破坏而导致生成无功能的蛋白质。然而,在一些蛋白质中,可以通过缺失来自蛋白质内的一种或多种外显子来缩短蛋白质,而不破坏阅读框并且不严重地改变蛋白质的生物活性。通常,这类蛋白质在其末端具有结构作用和/或具备功能域。杜兴肌营养不良由通常通过破坏阅读框排除功能性抗肌萎缩蛋白基因产物的合成的突变引起。诱发含有该突变的抗肌萎缩蛋白基因的区域的外显子跳跃的反义寡核苷酸可允许肌细胞生成编码功能性抗肌萎缩蛋白的成熟mRNA转录体。产生的抗肌萎缩蛋白未必是“野生”形式的抗肌萎缩蛋白,而更确切地是截断的仍具功能性或半功能性的形式的抗肌萎缩蛋白。本发明描述能够结合在外显子53中的指定抗肌萎缩蛋白前-mRNA靶标且再定向加工该基因的反义分子。

[0129] 具体地讲,本发明涉及长度为20-50个核苷酸的分离的反义寡核苷酸,其包括与选自以下的命名为退火位点的抗肌萎缩蛋白基因的外显子53靶标区互补的至少10、12、15、17、20、25个或更多个连续核苷酸:H53A $(+36+60)$ 、H53A $(+30+57)$ 、H53A $(+30+56)$ 、H53A $(+30+55)$ 和H53A $(+33+57)$ 。反义寡核苷酸特异性杂交至退火位点,诱发外显子53跳跃。

[0130] 反义寡核苷酸和靶标RNA在各分子中的足够数目的相应位置被可彼此氢键结使得在寡核苷酸和靶标之间发生稳定且特异性的结合的核苷酸占据时彼此互补。因此,“可特异性杂交”和“互补”为用以指示足够程度的互补或精确配对以使得在寡核苷酸和靶标之间发生稳定且特异性的结合的术语。在本领域中应理解反义分子的序列不必与其将特异性杂交的靶标序列100%互补。在寡核苷酸与靶标分子结合妨碍靶标RNA的正常功能时,可使反义分子特异性杂交,且存在足够程度的互补性以避免反义寡核苷酸与非靶标序列在期望特异性结合的条件下(即,在体内测定或治疗情况下的生理条件下;和在体外测定情况下的其中进行所述测定的条件下)非特异性结合。

[0131] 反义分子的长度可为变化的,条件是其能够选择性地结合在前mRNA分子内的预定位置。这类序列的长度可根据本文所述的选择程序确定。通常,反义分子的长度将为约10个核苷酸至多达约50个核苷酸。然而,应了解在该方法中可使用在该范围内的任何核苷酸长度。优选反义分子的长度为10-30个核苷酸。

[0132] 在一个实施方案中,本发明的寡核苷酸的长度为20-50个核苷酸且其包括至少10、12、15、17、20或更多个SEQ ID NO: 1-5中的任一个的核苷酸。在一些实施方案中,在SEQ ID NO: 1-5中的胸腺嘧啶碱基任选为尿嘧啶。

[0133] 外显子缺失将不会在缩短的转录mRNA中导致阅读框移位。因此,如果在三个外显子的线性序列中,第一外显子的末端编码在密码子中的三个核苷酸中的两个且紧接着的外显子缺失,则在该线性序列中的第三个外显子必须从能够完成密码子的核苷酸三联体的单一核苷酸开始。如果第三个外显子未用单一核苷酸开始,则将会有将导致产生截断或无功能的大白质的阅读框移位。

[0134] 应了解,在结构蛋白质中外显子的末端的密码子配置并非总是在密码子的末端断开,因此可能必须从前mRNA中缺失至少一个外显子以确保mRNA的框内阅读。在这类情况下,可能必须通过本发明的方法选择多种反义寡核苷酸,其中各自定向到负责在将缺失的外显子中诱发剪接的不同区。

[0135] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸具有天然存在的核酸分子的化学组成,即反义寡核苷酸不包括修饰或取代的碱基、糖或亚基间键。在一个优选的实施方案中,本发明的反义寡核苷酸为非天然存在的核酸分子。例如,非天然存在的核酸可包括一个或多个非天然碱基、糖和/或亚基间键,例如,已经关于在天然存在的核酸分子中所见到的那些修饰或取代的碱基、糖和/或键。例示性修饰描述如下。在一些实施方案中,非天然存在的核酸包括多于一种类型的修饰,例如糖和碱基修饰、糖和键修饰、碱基和键修饰或碱基、糖和键修饰。例如,在一些实施方案中,反义寡核苷酸含有非天然的(例如,修饰或取代的)碱基。在一些实施方案中,反义寡核苷酸含有非天然的(例如,修饰或取代的)糖。在一些实施方案中,反义寡核苷酸含有非天然的(例如,修饰或取代的)亚基间键。在一些实施方案中,反义寡核苷酸含有多于一种类型的修饰或取代,例如非天然碱基和/或非天然糖和/或非天然亚基间键。

[0136] 为了避免在用反义分子形成复体期间前mRNA降解,反义分子可适合使由内源RNase H引起的裂解最少化或防止由内源RNase H引起的裂解。该性质是高度优选的,因为用未甲基化的寡聚核苷酸细胞内或在含有RNase H的粗提取物中处理RNA导致前mRNA:反义寡核苷酸复体降解。在本发明方法中可使用能够绕过这类降解或者不诱发这类降解的任何形式的修饰的反义分子。当与RNA复合时不会被细胞RNase H裂解的反义分子的实例为2'-O-甲基衍生物。2'-O-甲基-寡核糖核苷酸在细胞环境中且在动物组织中非常稳定,且其与RNA的复体具有比其核糖-或脱氧核糖-对应物高的T_m值。使2'羟基核糖位置甲基化和并入硫代磷酸酯主链是生产表面上类似于RNA、但更加抗核酸酶降解的分子的常用策略。

[0137] 不激活RNase H的反义分子可根据已知技术制造(参见,例如,美国专利号5,149,797)。可为脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸序列的这类反义分子仅含有空间阻碍或防止RNase H与含有寡核苷酸作为其一个成员的复体分子结合的任何结构修改,该结构修改不会明显阻碍或破坏复体形成。因为在复体形成中包括的寡核苷酸的部分与在与其结合的RNase H中包括的那些部分明显不同,所以可利用不激活RNase H的许多反义分子。例如,这类反义分子可为如下寡核苷酸,其中核苷酸间桥连磷酸酯残基中的至少一个或全部为修饰的磷酸酯,例如磷酸甲酯、硫代磷酸甲酯、吗啉磷酸酯、哌嗪磷酸酯和氨基磷酸酯。例如,如所述,可修饰核苷酸间桥连磷酸酯残基中的每隔一个。在另一非限制性实例中,这类反义分子为如下分子,其中核苷酸中的至少一个或全部含有2'低碳烷基部分(例如,C₁-C₄直链或支

链的饱和或不饱和的烷基,例如甲基、乙基、乙烯基、丙基、1-丙烯基、2-丙烯基和异丙基)。例如,如所描述,可修饰核苷酸中的每隔一个。

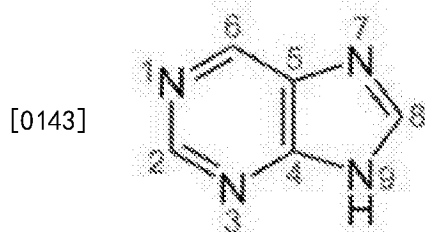
[0138] 可用于本发明的反义寡核苷酸的特定实例包括含有修饰的主链或非天然亚基间键的寡核苷酸。具有修饰的主链的寡核苷酸包括保持磷原子在主链上的那些和在主链上不具有磷原子的那些。在其核苷间主链中不具有磷原子的修饰的寡核苷酸也可被视为寡核苷。

[0139] 在其它反义分子中,核苷酸单元的糖和核苷间键(即,主链)可被新基团置换。维持碱基单元以与适当核酸靶标化合物杂交。一种这样的寡聚化合物被称为肽核酸(PNA),已经显示寡核苷酸模拟物具有优良的杂交性质。在PNA化合物中,寡核苷酸-糖主链被含有酰胺的主链、尤其是氨基乙基甘氨酸主链置换。保留核-碱基并使其与主链的酰胺部分的氮杂氮原子直接或间接地结合。

[0140] 修饰的寡核苷酸还可含有一个或多个被取代的糖部分。

[0141] 寡核苷酸还可包括核碱基(在本领域中常简称为“碱基”)修饰或取代。含有修饰或取代的碱基的寡核苷酸包括其中在核酸中最常见的一个或多个嘌呤或嘧啶碱基被较不常见的或非天然的碱基取代的寡核苷酸。

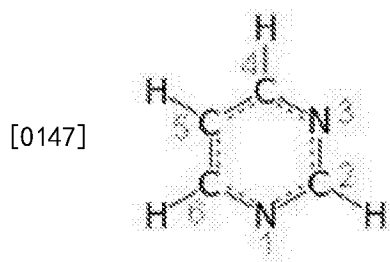
[0142] 嘌呤碱基包含与咪唑环稠合的嘧啶环,如由以下通式描述:



[0144] 嘌呤

[0145] 腺嘌呤和鸟嘌呤为在核酸中最常见到的两种嘌呤核苷碱基。这些可被包括但不限于N⁶-甲基腺嘌呤、N²-甲基鸟嘌呤、次黄嘌呤和7-甲基鸟嘌呤的其它天然存在的嘌呤取代。

[0146] 嘧啶碱基包含如由以下通式描述的六元嘧啶环:



[0148] 嘧啶

[0149] 胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶为在核酸中最常见到的嘧啶碱基。这些可被包括但不限于5-甲基胞嘧啶、5-羟基甲基胞嘧啶、假尿嘧啶和4-硫尿嘧啶的其它天然存在的嘧啶取代。在一个实施方案中,本文所述的寡核苷酸含有胸腺嘧啶碱基,而不是尿嘧啶。

[0150] 其它修饰或取代的碱基包括但不限于2,6-二氨基嘌呤、乳清酸、agmatidine、赖西丁(lysidine)、2-硫代嘧啶(例如,2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶)、螺旋夹(G-clamp)及其衍生物、5-取代的嘧啶(例如,5-卤基尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-氨基甲基尿嘧啶、5-羟基甲基尿嘧啶、5-氨基甲基胞嘧啶、5-羟基甲基胞嘧啶、Super T)、7-去氮鸟嘌呤

呤、7-去氮腺嘌呤、7-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、8-氮杂-7-去氮鸟嘌呤、8-氮杂-7-去氮腺嘌呤、8-氮杂-7-去氮-2,6-二氨基嘌呤、Super G、Super A和N⁴-乙基胞嘧啶或其衍生物；N²-环戊基鸟嘌呤(cPent-G)、N²-环戊基-2-氨基嘌呤(cPent-AP)和N²-丙基-2-氨基嘌呤(Pr-AP)、假尿嘧啶或其衍生物；和简并或通用碱基，如2,6-二氟甲苯，或缺少碱基，如去碱基位点(例如，1-脱氧核糖、1,2-二脱氧核糖、1-脱氧-2-O-甲基核糖；或吡咯烷衍生物，其中环氧被氮置换(氮杂核糖))。Super A、Super G和Super T的衍生物的实例可在美国专利6,683,173(Epoch Biosciences)中见到，其通过引用整体结合到本文中。显示cPent-G、cPent-AP和Pr-AP在并入siRNA中时降低免疫刺激作用(Peacock H.等, J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200)。假尿嘧啶为具有C-糖苷而不是如在尿核苷中的规则N-糖苷的天然存在的异构化型式的尿嘧啶。含有假尿嘧啶核苷的合成mRNA可具有与含有尿核苷的mPvNA相比改进的安全性概况(WO 2009127230,其通过引用整体结合到本文中)。

[0151] 某些修饰或取代的核-碱基可特定地用于增加本发明的反义寡核苷酸的结合亲和性。这些包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2, N-6和O-6取代的嘌呤，包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。已经显示5-甲基胞嘧啶取代使核酸复体稳定性增加0.6-1.2℃且甚至更特定地在与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时，是目前优选的碱基取代。

[0152] 在一些实施方案中，修饰或取代的核-碱基可用于促进反义寡核苷酸的纯化。例如，在某些实施方案中，反义寡核苷酸可含有三个或更多个(例如，3、4、5、6或更多个)连续的鸟嘌呤碱基。在某些反义寡核苷酸中，一连串的三个或更多个连续鸟嘌呤碱基可引起寡核苷酸的聚集，使纯化变复杂。在这类反义寡核苷酸中，连续鸟嘌呤中的一个或多个可被肌苷取代。肌苷取代在一连串的三个或更多个连续鸟嘌呤碱基中的一个或多个鸟嘌呤可降低反义寡核苷酸的聚集，由此促进纯化。

[0153] 在一个实施方案中，反义寡核苷酸的另一修饰包括化学连接寡核苷酸的一个或多个部分或缀合物，其增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。这类部分包括但不限于脂质部分，例如胆固醇部分；胆酸；硫醚，例如，己基-5-三苯甲基硫醇；硫代胆固醇；脂肪链，例如，十二烷二醇或十一烷基残基；磷脂，例如，二-十六烷基-消旋-甘油或三乙胺1,2-二-O-十六烷基-消旋-甘油基-3-H-磷酸酯；多胺或聚乙二醇链；或金刚烷乙酸、棕榈酰基部分；或十八烷基胺或己基氨基-羰基-羟胆固醇部分。

[0154] 未必均匀地修饰在给定化合物中的所有位置，且实际上上述修饰中的多于一个可并入单一化合物中或甚至在寡核苷酸内的单一核苷处并入。本发明还包括作为嵌合化合物的反义寡核苷酸。“嵌合”反义化合物或“嵌合体”在本发明的上下文中为反义分子，特定地为寡核苷酸，其含有两个或多个化学不同区，各自由至少一种单体单元组成，即，在寡核苷酸化合物的情况下，该单体单元为核苷酸。这些寡核苷酸通常含有至少一个区，其中修饰寡核苷酸以赋予对核酸酶降解的增加的抵抗性、增加的细胞摄取；和一个额外区，其用于增加对于靶标核酸的结合亲和性。

[0155] 根据本发明使用的反义分子可通过固相合成的公知技术方便且常规地制造。用于这类合成的设备由包括例如Applied Biosystems (Foster City, Calif.)的几个供应商销售。在修饰的固体载体上合成寡核苷酸的一种方法描述在美国专利号4,458,066中。

[0156] 可额外或供选地采用在本领域中已知的用于这类合成的任何其它手段。众所周知

使用类似技术来制备例如硫代磷酸酯和烷基化衍生物的寡核苷酸。在一种这样的自动化实施方案中,将二乙基-氨基磷酸酯用作原料且可如Beaucage等,(1981) Tetrahedron Letters, 22:1859-1862所述合成。

[0157] 本发明的反义分子可体外合成且不包括生物来源的反义组合物。本发明的分子也可与例如脂质体、受体靶标分子、口服、直肠、局部或其它制剂的其它分子、分子结构或化合物混合物混合、封装、缀合或另外相关以帮助摄取、分布和/或吸收。

[0158] A. 吗啉寡聚体

[0159] 本发明的例示性实施方案涉及在图1A-1C中图示的具有含磷主链键的吗啉寡聚体。一个实施方案例如在图1C中示出的二氨基磷酸酯连接的吗啉寡聚体,其根据本发明的一个方面修饰以在优选10%-50%的主链键处含有带正电的基团。包括反义寡核苷酸的具有不带电主链键的吗啉寡聚体例如在以下文献中详述:(Summerton和Weller 1997)和共有的美国专利号5,698,685、5,217,866、5,142,047、5,034,506、5,166,315、5,185,444、5,521,063、5,506,337、8,076,476、8,299,206和7,943,762,其全部通过引用的方式明确地结合到本文中。具有包括带电键的修饰键的吗啉寡聚体可在美国申请号13/118,298中见到,该申请通过引用整体结合到本文中。

[0160] 吗啉基亚基的重要性质包括:1) 能够以寡聚形式由稳定的不带电或带正电的主链键连接;2) 能够支撑核苷酸碱基(例如,腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶和肌苷)使得所形成的聚合物可与包括靶标RNA的互补碱基靶标核酸杂交,在相对短的寡核苷酸(例如,10-15个碱基)中 T_m 值高于约45°C;3) 寡核苷酸能够主动地或被动地运输到哺乳动物细胞中;和 4) 反义寡核苷酸:RNA异源双链体能够分别耐受RNase和RNase H降解。

[0161] 所要求主题的反义寡核苷酸的例示性主链结构包括在图1D-G中示出的吗啉亚基型,其各自由不带电或带正电的含磷亚基键连接。图1D示出含磷键,其形成5-原子重复单元主链,其中吗啉环由1-原子磷酸胺键连接。图1E示出生成6-原子重复单元主链的键。在该结构中,连接5'吗啉碳到磷基团的原子Y可为硫、氮、碳或优选氧。在磷侧位的X部分可为氟、烷基或取代的烷基、烷氧基或取代的烷氧基、硫代烷氧基或取代的硫代烷氧基、或未被取代的、被单取代或二取代的氮,包括环状结构,例如吗啉或哌啶。烷基、烷氧基和硫代烷氧基优选包括1-6个碳原子。Z部分为硫或氧,且优选为氧。

[0162] 在图1F和1G中示出的键设计成7-原子单元长度的主链。在结构1F中,X部分与在结构1E中一样,且Y部分可为亚甲基、硫或优选为氧。在结构1G中,X部分和Y部分与在结构1E中一样。特定优选的吗啉寡核苷酸包括由在图1E中示出的形式的吗啉亚基结构组成的那些,其中 $X = NH_2$ 、 $N(CH_3)_2$ 或1-哌嗪或其它带电基团、 $Y=O$ 且 $Z=O$ 。

[0163] 基本不带电的寡核苷酸可根据本发明的一方面修饰成包括带电键,例如每2-5个不带电键至多达约1个带电键,例如每10个不带电键约4-5个带电键。在某些实施方案中,反义活性的最佳改进可在约25%的主链键为阳离子型时见到。在某些实施方案中,增强可在小数目如10-20%的阳离子键的情况下见到,或者其中阳离子键的数目在50-80%范围内,例如为约60%。

[0164] 提供具有任何数目的阳离子键的寡聚体,包括完全阳离子连接的寡聚体。然而,优选寡聚体部分地带电,例如10%-80%。在优选的实施方案中,约10%-60%且优选20%-50%的键为阳离子的。

[0165] 在一个实施方案中,阳离子键沿主链散布。部分带电的寡聚体优选含有至少两个连续不带电的键;也就是说,寡聚体优选不具有沿其全部长度严格交替的图案。

[0166] 同时考虑具有阳离子键嵌段和不带电键嵌段的寡聚体;例如不带电键的中心嵌段与阳离子键嵌段侧接,或反过来。在一个实施方案中,寡聚体具有近似相等长度的5'、3'和中心区,且在中心区中阳离子键的百分数大于约50%,优选大于约70%。

[0167] 在某些实施方案中,反义化合物可通过逐步固相合成、采用在上文提到的参考文献中和在下文关于具有混合或不带电和阳离子主链键的寡核苷酸的合成详述的方法来制备。在一些情况下,可能期望将额外的化学部分加成到反义化合物中,例如以增强药物动力学或促进化合物的捕集或检测。这样的部分可根据标准合成方法而共价附接。例如,可使用聚乙二醇部分或其它亲水性聚合物如具有1-100个单体亚基的亲水性聚合物的加成来增加溶解性。

[0168] 为了检测,可附接例如荧光素或放射性标记基团的报道体部分。供选地,附接至寡聚体的报道体标记物可为能够结合标记的抗体或抗生蛋白链菌素的配体,例如抗原或生物素。在附接或修饰反义化合物的部分的选择中,通常理所当然地期望选择生物相容且可能被受试者耐受而没有不期望的副作用的基团的化合物。

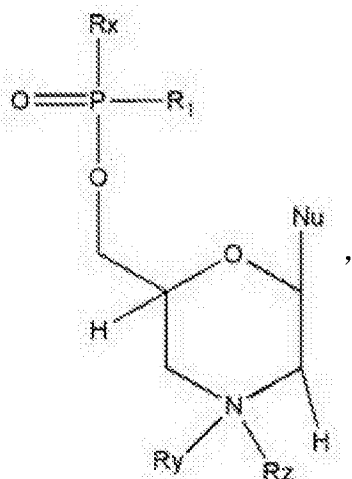
[0169] 在反义应用中使用的寡聚体通常在约10-约50个亚基、更优选约10-30个亚基且通常15-25个碱基的长度范围内。例如,具有19-20亚基(反义化合物的有效长度)的本发明的寡聚体可理想地具有2-10、例如4-8个阳离子键,且其余为不带电的键。具有14-15个亚基的寡聚体可理想地具有2-7、例如,3、4或5个阳离子键且其余为不带电的键。在一个优选的实施方案中,寡聚体具有25-28个亚基。

[0170] 各个吗啉环结构支撑碱基配对部分,形成碱基配对部分的序列,其通常设计成杂交至在细胞或正治疗的受试者中的选定反义靶标。碱基配对部分可为在天然DNA或RNA中见到的嘌呤或嘧啶(例如,A、G、C、T或U)或类似物,例如次黄嘌呤(核苷肌苷的碱基组分)或5-甲基胞嘧啶。

[0171] 如上所述,某些实施方案涉及包含新亚基间键的寡聚体,包括PMO-X寡聚体和具有修饰的端基的那些。在一些实施方案中,这些寡聚体对于DNA和RNA具有比相应未修饰的寡聚体高的亲和性且说明与具有其它亚基间键的寡聚体相比改进的细胞递送、效价和/或组织分布性质。各种键类型和寡聚体的结构特点和性质在以下论述中更详细地描述。这些和有关寡聚体的合成描述在共有的美国申请号13/118,298中,其通过引用的方式整体结合到本文中。

[0172] 在某些实施方案中,本发明提供具有与靶标序列互补的序列的寡核苷酸,所述靶标序列与人类疾病相关,且包含具有下式的核苷酸的序列:

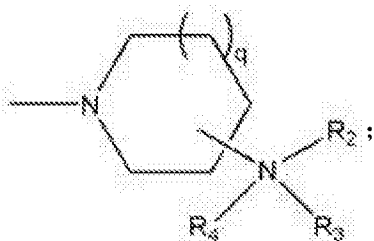
[0173]



[0174] 其中Nu为核碱基；

[0175] R₁具有式：

[0176]



[0177] q为0、1或2；

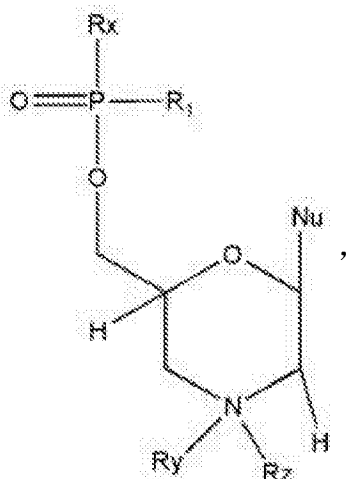
[0178] R₂选自氢、C₁-C₅烷基、C₁-C₅芳烷基和甲脒基，且[0179] R₃选自氢、C₁-C₁₀酰基、C₁-C₁₀氨酰基、天然或非天然α或β氨基酸的酰基部分、C₁-C₁₀芳烷基和C₁-C₁₀烷基，或[0180] R₂和R₃接合以形成5-7元环，其中该环可任选被选自C₁-C₁₀烷基、苯基、卤素和C₁-C₁₀芳烷基的取代基取代；[0181] R₄选自电子对、氢、C₁-C₆烷基和C₁-C₆芳烷基；[0182] R_x选自肌氨酰胺、羟基、核苷酸、细胞穿透肽部分和哌嗪基；[0183] R_y选自氢、C₁-C₆烷基、核苷酸、细胞穿透肽部分、氨基酸、甲脒基和C₁-C₆酰基；且[0184] R_z选自电子对、氢、C₁-C₆烷基和C₁-C₆酰基，

[0185] 其医药学上可接受的盐。

[0186] Nu可选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶和次黄嘌呤。更优选Nu为胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0187] 在优选的实施方案中，本发明提供具有具有下式的核苷酸的序列的寡核苷酸：

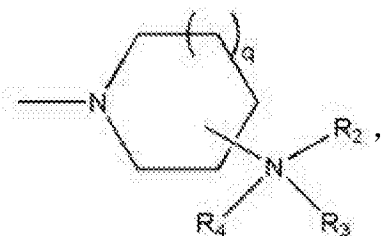
[0188]



[0189] 其中Nu为核碱基；

[0190] R_1 选自 R_1' 和 R_1'' ，其中 R_1' 为二甲基-氨基且 R_1'' 具有式：

[0191]

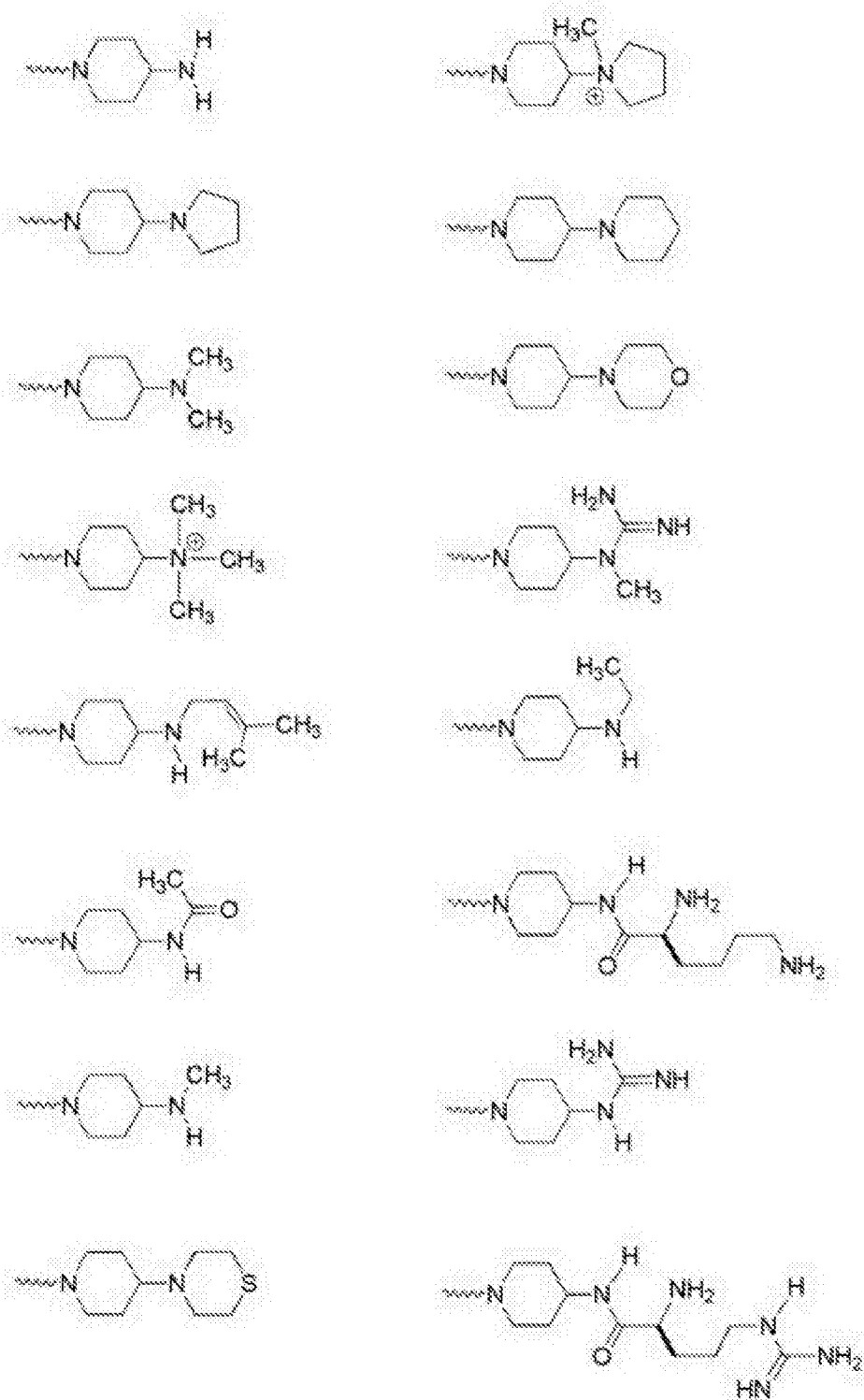
[0192] 其中至少一个 R_1 为 R_1'' ；[0193] q为0、1或2；条件是至少一个 R_1 为哌啶基部分；[0194] R_2 选自氢、 C_1 - C_5 烷基、 C_1 - C_5 芳烷基和甲脒基，且[0195] R_3 选自氢、 C_1 - C_{10} 酰基、 C_1 - C_{10} 氨酰基、天然或非天然 α 或 β 氨基酸的酰基部分、 C_1 - C_{10} 芳烷基和 C_1 - C_{10} 烷基，或[0196] R_2 和 R_3 接合以形成5-7元环，其中该环可任选被选自 C_1 - C_{10} 烷基、苯基、卤素和 C_1 - C_{10} 芳烷基的取代基取代；[0197] R_4 选自电子对、氢、 C_1 - C_6 烷基和芳烷基；[0198] R_x 选自肌氨酰胺、羟基、核苷酸、细胞穿透肽部分和哌嗪基；[0199] R_y 选自氢、 C_1 - C_6 烷基、核苷酸、细胞穿透肽部分、氨基酸、甲脒基和 C_1 - C_6 酰基；且[0200] R_z 选自电子对、氢、 C_1 - C_6 烷基和 C_1 - C_6 酰基，

[0201] 其医药学上可接受的盐。

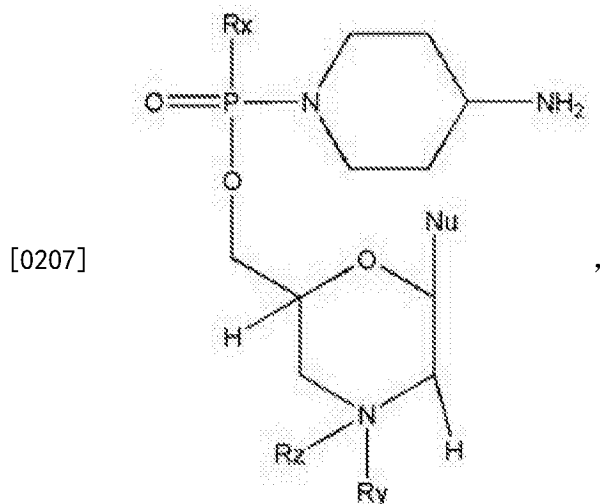
[0202] Nu可选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶和次黄嘌呤。更优选Nu为胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0203] 约90-50%的 R_1 基团为二甲氨基(即， R_1')。更优选90-50%的 R_1 基团为二甲氨基。最优选约66%的 R_1 基团为二甲氨基。[0204] R_1'' 可选自

[0205]



[0206] 优选寡核苷酸的至少一个核苷酸具有式：



[0208] 其中Rx、Ry、Rz和Nu如上所述。最优选Nu为胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0209] 尽管胸腺嘧啶(T)为含有上述化学修饰的优选碱基配对部分(Nu或Pi),但是本领域的技术人员已知的任何碱基亚基都可作为该碱基配对部分使用。

[0210] B. 肽转运蛋白

[0211] 本发明的反义寡核苷酸可包括与CPP、优选富精氨酸肽转运部分缀合的寡核苷酸部分,以有效增强化合物向细胞中的转运。转运部分优选附接至寡聚体的端点,如例如在图1B和1C中所示。这些肽具有诱发在给定细胞培养群体中30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的细胞内的细胞穿透的能力(包括在中间的所有整数),且允许在全身性施用时在体内多个组织内大分子移位。在一个实施方案中,细胞穿透肽可为富精氨酸肽转运蛋白。在另一实施方案中,细胞穿透肽可为Penetratin或Tat肽。这些肽在本领域中公知且例如公开在美国公告号2010-0016215 A1中,其通过引用的方式整体结合到本文中。肽缀合到反义寡核苷酸的特定优选的方法可在PCT公告W02012/150960中见到,其通过引用的方式整体结合到本文中。本发明的肽缀合的寡核苷酸的一个优选的实施方案利用甘氨酸作为CPP和反义寡核苷酸之间的连接子。例如,优选的肽缀合的PMO由R₆-G-PMO组成。

[0212] 已经显示,相对于在缺乏附接的转运部分的情况下摄取寡聚体而言,如上所述的转运部分大大增强附接的寡聚体的细胞进入。相对于未缀合的化合物,摄取优选增强至少10倍且更优选20倍。

[0213] 富精氨酸肽转运蛋白(即,细胞穿透肽)的使用特别适用于实施本发明。已经显示某些肽转运蛋白在递送反义化合物到包括肌细胞的原代细胞方面非常有效(Marshall, Oda等,2007;Jearawiriyapaisarn, Moulton等,2008;Wu, Moulton等,2008)。此外,与例如Penetratin和Tat肽的其它已知肽转运蛋白相比较,在与反义PMO缀合时,本文所述的肽转运蛋白说明增强的改变几种基因转录体的剪接的能力(Marshall, Oda等,2007)。吗啉肽转运蛋白缀合物的优选实施方案描述在W0/2012/150960中,其整体结合到本文中。

[0214] 除连接子之外的例示性肽转运蛋白下表1中给出。

[0215] 表1. 例示性肽转运蛋白

名称(命名)	序列	SEQ ID NO ^A
rTAT	RRRQRRKKR	16
Tat	RKKRRQRRR	17
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFF	18
R ₃ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR	19
R ₄	RRRR	20
R ₅	RRRRR	21
R ₆	RRRRRR	22
R ₇	RRRRRRR	23
R ₈	RRRRRRRR	24
R ₉	RRRRRRRRR	25
(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXRXR	26
(RAhxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	27
(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRR AhxR	28
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	29
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRFF	30
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRGRFF	31

[0216] ^A分配给SEQ ID NO的序列不包括键部分(例如,C、G、P、Ahx、B、AhxB,其中Ahx和B分别是指6-氨基己酸和β-丙氨酸)。

[0217] C. 表达载体

[0218] 在一个实施方案中,本发明包括在细胞中表达本文所述的抗肌萎缩蛋白靶标序列的表达载体。载体递送系统能够表达本发明的寡聚抗肌萎缩蛋白靶标序列。在一个实施方案中,所述载体表达包含SEQ ID NO: 1-5中的一种或多种的至少10个连续核苷酸的多核苷酸序列。在另一实施方案中,所述载体表达包含SEQ ID NO: 1-5中的一种或多种的多核苷酸序列。适合基因递送的表达载体在本领域中已知。可修饰所述表达载体以表达本文所述的抗肌萎缩蛋白靶标序列。例示性表达载体包括源自例如质粒、噬菌体、酵母或病毒(例如,腺病毒、腺伴随病毒、慢病毒等)的多核苷酸分子,优选DNA分子,多核苷酸可插入其中或克隆到其中。载体优选含有一个或多个独特的限制位点且能够在包括靶标细胞或组织或其祖细胞或组织的限定宿主细胞中自主复制,或可与限定的宿主的基因组整合使得克隆的序列可重现。因此,该载体可为自主复制载体,即,作为外染色体实体存在的载体,其复制不取决于染色体复制,例如线性或封闭环质粒、外染色体元件、极微染色体或人造染色体。该载体可含有保证自我复制的任何手段。供选地,该载体可为在引入宿主细胞中时整合到基因组中并与已经整合到其中的一个或多个染色体一起复制的载体。

[0219] 在一个实施方案中,所述表达载体包括组织特异性启动子,例如,肌肉特异性启动子和/或增强子,其促进本文所述的寡聚抗肌萎缩蛋白-靶标序列在所关注的特定细胞或组织中(例如在肌肉中)的表达。适合在肌细胞中表达的启动子序列和表达载体包括例如在US

2011/0212529中描述的那些,其全部内容通过引用结合到本文中。例示性肌肉特异性启动子包括间线蛋白启动子、肌肉肌酸激酶(MCK)启动子、Pitx3启动子、骨骼 α -肌动蛋白启动子或肌钙蛋白I启动子。肌肉特异性启动子的用途在例如以下文献中进一步描述: Talbot等, *Molecular Therapy* (2010), 18(3): 601-608; Wang等, *Gene Therapy* (2008), 15(22): 1489-99; 和 Coulon等, *Journal of Biological Chemistry* (2007), 282(45): 33192-33200。

[0220] III. 制剂和施用模式

[0221] 在某些实施方案中,本发明提供适合治疗性递送如本文所述的反义寡聚体的制剂或组合物。因此,在某些实施方案中,本发明提供包含与一种或多种医药学上可接受的载剂(添加剂)和/或稀释剂一起配制的治疗有效量的一种或多种本文所述的寡聚体的医药学上可接受的组合物。虽然本发明的寡聚体可以单独施用,但是该化合物优选作为医药制剂(组合物)施用。

[0222] 递送核酸分子的方法例如描述在 Akhtar等, 1992, *Trends Cell Bio.*, 2:139; 和反义寡核苷酸治疗剂的递送策略(Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics), Akhtar; Sullivan等编著, PCT WO 94/02595中。这些及其它方案可用以递送包括本发明的分离的寡聚体的几乎任何的核酸分子。

[0223] 如下详述,本发明的医药组合物可具体配制成为以固体或液体形式施用,包括适合以下施用的那些: (1) 口服施用,例如灌服剂(水性或非水性溶液或混悬剂); 片剂,例如,靶向颊、舌下和全身性吸收的那些; 丸剂; 粉剂; 颗粒剂; 施用到舌的糊剂; (2) 肠胃外施用,例如,通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射,作为例如无菌溶液或混悬剂或持续释放的制剂; (3) 局部施用,例如作为霜剂、软膏剂或受控释放的贴剂或施用到皮肤的喷剂; (4) 阴道内或直肠内施用,例如作为子宫托、霜剂或泡沫体; (5) 舌下施用; (6) 眼内施用; (7) 透皮施用; 或 (8) 经鼻施用。

[0224] 词组“医药学上可接受的”在本文中用以指在合理医学判断的范围内适合接触人类和动物的组织使用而不产生过度毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症,具有合理的效益/风险比的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0225] 本文使用的词组“医药学上可接受的载剂”意指医药学上可接受的材料、组合物或媒剂,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、生产助剂(例如,润滑剂、滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌或硬脂酸)或溶剂封装材料,其包括在将本发明的化合物从身体的一个器官或部分运载或运输到身体的另一器官或部分中。每种载剂在与制剂的其它成分相容且对其患者无害的意义上必须为“可接受的”。

[0226] 可充当医药学上可接受载剂的材料的一些实例包括而不限于: (1) 糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖; (2) 淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉; (3) 纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素; (4) 粉状黄蓍胶; (5) 麦芽; (6) 明胶; (7) 滑石粉; (8) 赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡; (9) 油类,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油; (10) 二醇,例如丙二醇; (11) 多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇; (12) 酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯; (13) 琼脂; (14) 缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝; (15) 海藻酸; (16) 无热原水; (17) 等渗盐水; (18) 林格氏溶液; (19) 乙醇; (20) pH缓冲溶液; (21) 聚酯、聚碳酸酯和/或聚醚; 和 (22) 在医药制剂中采用的其它

无毒的相容性物质。

[0227] 适合与本发明的反义寡聚体一起配制的试剂的额外非限制性实例包括PEG缀合的核酸、磷脂缀合的核酸、含有亲油性部分的核酸、硫代磷酸酯、可增强药物进入各种组织的P-糖蛋白抑制剂(例如,Pluronic P85);生物可降解的聚合物,例如在移植之后持续释放递送的共聚(DL-丙交酯-乙交酯)微球(Emerich, D F等,1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.;和装载的纳米粒子,例如由聚氰基丙烯酸丁酯制成的那些,其可递送药物穿过血脑屏障且可改变神经元摄取机制(Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999)。

[0228] 本发明的特点还在于包含含有聚(乙二醇)脂质的表面修饰的脂质体(PEG-修饰的分支和不分支或其组合,或长循环脂质体或隐形脂质体)的组合物的用途。本发明的寡聚体还可包含各种分子量的共价附接的PEG分子。这些制剂提供增加药物在靶标组织中的聚积的方法。这类药物载体耐受由单核吞噬细胞体系(MPS或RES)引起的调理和消除,由此能够实现较久的血液循环时间并增强组织对于封装的药物的暴露(Lasic等Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627;Ishiwata等,Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011)。已经显示所述脂质体在肿瘤中选择性地聚积,据推测是由于在新形成血管的目标组织中外渗和捕集(Lasic等,Science 1995, 267, 1275-1276;Oku等,1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90)。长时间循环的脂质体增强DNA和RNA的药物动力学和药效学,特别是在与已知聚积在MPS的组织中的常规阳离子脂质体相比较(Liu等,J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870;Choi等,国际PCT公告号W0 96/10391;Ansell等,国际PCT公告号W0 96/10390; Holland等,国际PCT公告号W0 96/10392)。根据长时间循环的脂质体避免在例如肝和脾的代谢侵袭性MPS组织中聚积的能力,与阳离子脂质体相比较,长时间循环脂质体还有可能更大程度地保护药物不受核酸酶降解影响。

[0229] 在另一实施方案中,本发明包括准备用于递送的寡聚体组合物,如在美国专利号6,692,911、7,163,695和7,070,807中所述。在这方面,在一个实施方案中,本发明提供在包含单独或与PEG(例如,分支或不分支的PEG或两者的混合物)组合的赖氨酸和组氨酸的共聚物(HK)(如在美国专利号7,163,695、7,070,807和6,692,911中所述)以及PEG和靶标部分或任何上述物质以及交联剂的组合物中的本发明的寡聚体。在某些实施方案中,本发明提供在包含葡萄糖修饰的多组氨酸或糖基化-多组氨酸/转铁蛋白-多赖氨酸的组合物中的反义寡聚体。本领域的技术人员还将认识到具有与His和Lys类似的性质的氨基酸可在所述组合物内取代。

[0230] 本文所述的寡聚体的某些实施方案可含有碱性官能团,例如氨基或烷基氨基,且因此能够与医药学上可接受的酸形成医药学上可接受的盐。术语“医药学上可接受的盐”在这方面是指本发明的化合物的相对无毒的无机和有机酸加成盐。这些盐可在施用媒介或剂型制造过程中原位制备,或者通过使以其游离碱形式的本发明的纯化的化合物与合适的有机或无机酸单独地反应并在随后纯化期间分离这样形成的盐来制备。代表性盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、naphthylate、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖酸盐和月桂基磺酸盐等。(参见,例如,Berge等(1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19)。

[0231] 本发明的寡聚体的医药学上可接受的盐包括得自例如无毒有机或无机酸的所述化合物的常规无毒盐和季铵盐。例如,所述常规无毒盐包括衍生自例如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等无机酸的那些;和由例如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、棕榈酸、马来酸、羟基马来酸、苯基乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、乙二酸、异硫羧酸等有机酸制备的盐。

[0232] 在某些实施方案中,本发明的寡聚体可含有一个或多个酸式官能团,且因此能够与医药学上可接受的碱形成医药学上可接受的盐。在这些情况下,术语“医药学上可接受的盐”是指本发明的化合物的相对无毒的无机和有机碱加成盐。这些盐同样可在施用媒剂或剂型制造过程中原位制备,或者通过使以其游离酸形式的纯化的化合物与例如医药学上可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐的合适碱,与氨,或与医药学上可接受的有机伯胺、仲胺或叔胺单独地反应来制备。代表性碱金属或碱土金属盐包括锂、钠、钾、钙、镁和铝盐等。可用于形成碱加成盐的代表性有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等。(参见,例如,Berge等,上述)。

[0233] 在所述组合物中还可存在润湿剂;乳化剂;和润滑剂,例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁;以及着色剂;释放剂;涂覆剂;甜味、调味和芳香剂;防腐剂;和抗氧化剂。

[0234] 医药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1) 水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2) 油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸盐、丁基羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3) 金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0235] 本发明的制剂包括适合口服、鼻、局部(包括颊和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外施用的那些。所述制剂可以单位剂型方便地存在且可通过制药领域中公知的任何方法制备。可与载体物质组合以生成单剂型的活性成分的量将视所治疗的宿主、特定施用模式而改变。可与载体物质组合以生成单剂型的活性成分的量通常将为产生治疗效果的化合物的量。通常,在100%之中,该量将为约0.1%-约99%的活性成分,优选为约5%-约70%、最优选为约10%-约30%。

[0236] 在某些实施方案中,本发明的制剂包含赋形剂,选自环糊精、纤维素、脂质体;胶束成型剂,例如胆汁酸;和聚合载体,例如聚酯和聚酐;和本发明的寡聚体。在某些实施方案中,上述制剂赋予本发明的寡聚体口服生物利用性。

[0237] 制备这些制剂或组合物的方法包括使本发明的寡聚体与载体和任选一种或多种辅助成分缔合的步骤。通常,所述制剂通过使本发明的化合物与液体载体或细分散的固体载体或两者均匀且紧密地缔合且随后如果需要的话使产物成形来制备。

[0238] 适合口服施用的本发明的制剂可以如下形式:胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基质,通常蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉剂、颗粒剂或作为在水性或非水性液体中的溶液或混悬剂,或作为水包油或油包水液体乳剂,或作为酏剂或糖浆剂,或作为锭剂(使用惰性基质,例如明胶和丙三醇或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口剂等,各自含有预定量的本发明化合物作为活性成分。本发明的寡聚体还可作为丸剂、舐剂或糊剂施用。

[0239] 在用于口服施用的本发明的固体剂型(胶囊剂、片剂、丸剂、糖锭剂、粉剂、颗粒剂、锭剂等)中,活性成分可与例如柠檬酸钠或磷酸二钙的一种或多种医药学上可接受的载体

和/或以下试剂中的任一种混合：(1) 填料或增量剂，例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和/或硅酸；(2) 粘合剂，例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶；(3) 保湿剂，例如甘油；(4) 崩解剂，例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠；(5) 溶解延迟剂，例如石蜡；(6) 吸收加速剂，例如季铵化合物和表面活性剂，例如泊洛沙姆和十二烷基硫酸钠；(7) 润湿剂，例如鲸蜡醇、单硬脂酸甘油酯和非离子表面活性剂；(8) 吸附剂，例如高岭土和膨润土；(9) 润滑剂，例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、硬脂酸锌、硬脂酸钠、硬脂酸及其混合物；(10) 着色剂；和(11) 受控释放剂，例如交聚维酮或乙基纤维素。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下，医药组合物还可包含缓冲剂。类似类型的固体组合物也可用作使用诸如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂的软和硬壳的明胶胶囊中的填料。

[0240] 片剂可通过任选用一或多种辅助成分压缩或成型制造。压缩片剂可使用粘合剂(例如，明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如淀粉羟乙酸钠或交联的羧甲基纤维素钠)、表面活性或分散剂来制备。成型的片剂可通过在合适机器中使用惰性液体稀释剂润湿的粉状化合物的混合物成型来制造。

[0241] 本发明的医药组合物的片剂及其它固体剂型如糖锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂可任选地用例如在医药配制领域中公知的肠溶衣及其它衣料的衣料或壳刻划或制备。它们也可配制成提供使用例如用以提供期望的释放概况的变化比例的羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、脂质体和/或微球使在其中的活性成分缓慢或受控地释放。它们可配制成迅速释放，例如冻干的。它们可通过例如经由保留细菌的过滤器过滤或通过掺入可在使用前立即溶解于灭菌水或其它灭菌可注射介质中的灭菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌。这些组合物还可任选地含有乳浊剂且可为仅或优先在胃肠道的某一部分中、任选地以延迟方式释放活性成分的组合物。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。活性成分还可以微囊封形式，如果合适的话，具有上述赋形剂中的一种或多种。

[0242] 口服施用本发明的化合物的液体剂型包括医药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、混悬剂、糖浆剂和酏剂。除了活性成分以外，液体剂型可含有在本领域中常用的惰性稀释剂，例如，水或其它溶剂；增溶剂；和乳化剂，例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(尤其是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和失水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。

[0243] 除了惰性稀释剂之外，口服组合物还可包含助剂，例如湿润剂、乳化和助悬剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0244] 除了活性化合物之外，混悬剂可含有助悬剂，例如乙氧化异十八醇、聚氧化乙烯山梨糖醇和失水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄耆胶及其混合物。

[0245] 用于直肠或阴道施用的制剂可作为栓剂提供，其可通过混合本发明的一种或多种化合物与一种或多种包含例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸酯的合适无刺激的赋形剂或载剂来制备，所述赋形剂或载剂在室温下为固体，而在体温下为液体且因此将在直肠或阴道腔中熔融并释放活性化合物。

[0246] 用于局部或透皮施用如本文提供的寡聚体的制剂或剂型包括粉剂、喷剂、软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、溶液、贴片和吸入剂。活性寡聚体可在无菌条件下与医药学上可

接受的载剂和与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。除了本发明的活性化合物之外,软膏剂、糊剂、霜剂和凝胶剂可含有赋形剂,例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄耆胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、聚硅氧烷、膨润土、硅酸、滑石粉和氧化锌或其混合物。

[0247] 除了本发明的寡聚体之外,粉剂和喷剂可含有赋形剂,例如乳糖、滑石粉、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末或这些物质的混合物。喷剂可额外地含有常用的推进剂,例如氯氟烃和挥发性未被取代的烃如丁烷和丙烷。

[0248] 透皮贴片具有提供本发明的寡聚体受控地递送到身体的附加优势。所述剂型可通过将寡聚体溶解或分散在恰当的基质中来制造。还可使用吸收增强剂来增加试剂在皮肤中的通量。所述通量率可通过提供速率控制膜或分散试剂在聚合物基质或凝胶中以及本领域已知的其它方法来控制。

[0249] 适合肠胃外施用的医药组合物可包含一种或多种本发明的寡聚体以及一种或多种医药学上可接受的无菌等渗水或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液或者可仅在使用前重构成无菌注射溶液或分散液的无菌粉末,其可含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质或者助悬剂或增稠剂。可用于本发明的医药组合物的合适的水性和非水性载剂的实例包括水;乙醇;多元醇(例如,甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物;植物油,例如橄榄油;和可注射的有机酯,例如油酸乙酯。恰当的流动性可例如通过使用例如卵磷脂的涂覆材料、通过在分散体的情况下维持所需粒度或通过使用表面活性剂来维持。

[0250] 这些组合物还可含有助剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。防止微生物对本发明寡聚体的作用可通过包含例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等的各种抗菌剂和防真菌剂来确保。还期望在所述组合物中包含等渗剂,例如糖、氯化钠等。另外,可注射的医药形式的延长吸收可通过包含例如单硬脂酸铝和明胶的延迟吸收的试剂而达到。

[0251] 在一些情况下,为了延长药物的作用,期望使药物从皮下或肌肉内注射的吸收变慢。这可通过使用具有弱水溶解性的结晶或无定形材料的液体悬浮液以及本领域已知的其它方法来实现。药物的吸收速率则取决于其分解速率,这又可取决于晶体尺寸和晶型。供选地,肠胃外施用药物形式的延迟吸收伴随着药物在油性媒剂中的溶解或悬浮。

[0252] 注射储存形式可通过在例如聚丙交酯-聚乙交酯的生物可降解聚合物中形成本发明的寡聚体的微胶囊基质来制造。根据寡聚体与聚合物的比率和所采用的特定聚合物的性质,可控制寡聚体释放速率。其它生物可降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。储存可注射制剂也可通过在与身体组织相容的脂质体或微乳液中截留药物来制备。

[0253] 当本发明的寡聚体作为医药施用到人类和动物时,它们可作为本身给出或作为含有例如0.1-99% (更优选,10-30%)的活性成分以及医药学上可接受的载剂的医药组合物给出。

[0254] 如上所述,本发明的制剂或制品可经口、肠胃外、局部或直肠给药。它们通常以适合各种施用途径的形式给药。例如,它们以片剂或胶囊剂形式施用,通过注射、吸入剂、洗眼剂、软膏剂、栓剂等,通过注射、输注或吸入施用;以洗剂或软膏剂经局部施用;和以栓剂经直肠施用。

[0255] 本文使用的词组“肠胃外施用(parenteral administration)”和“肠胃外施用(administered parenterally)”意指除肠道和局部施用外通常通过注射施用的施用模式,

且包括而限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、包囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0256] 本文使用的词组“全身性施用(systemic administration)”、“全身地施用(administered systemically)”、“外周施用(peripheral administration)”和“外周地施用(administered peripherally)”意指除直接施用到中枢神经系统外施用化合物、药物或其它材料,使得其进入患者的全身且因此经历新陈代谢和其它类似过程,例如皮下施用。

[0257] 与所选择的施用途径无关,本发明的寡聚体可以合适水合形式使用,和/或本发明的医药组合物可通过本领域的技术人员已知的常规方法配制成医药学上可接受的剂型。可改变在本发明的医药组合物中活性成分的实际剂量水平以得到对于特定患者、组合物和施用模式有效实现期望的治疗反应而对患者没有不可接受的毒性的活性成分的量。

[0258] 选择的剂量水平将取决于多种因素,包括所采用的本发明的特定寡聚体或其酯、盐或酰胺的活性;施用途径;施用时间;所采用的特定寡聚体的排泄或新陈代谢速率;吸收的速率和程度;治疗的持续时间;与所采用的特定寡聚体组合使用的其它药物、化合物和/或材料;所治疗患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康和先前病史;和医学领域中公知的类似因素。

[0259] 具有本领域的普通技术的医师或兽医可容易地确定并规定所需医药组合物的有效量。例如,医师或兽医可以低于实现期望治疗效果所需的水平开始给予在医药组合物中采用的本发明的化合物并逐渐增加用量,直至实现期望的效果。一般而言,本发明的化合物的合适日剂量将为如下化合物量,其为有效产生治疗效果的最低剂量。这样的有效剂量通常将取决于上述因素。通常,当为了所指示的效果而使用时,本发明的化合物对于患者的口服、静脉内、侧脑室和皮下剂量将为约0.0001-约100mg/公斤体重/日。

[0260] 如果期望,则活性化合物的有效日剂量可作为在一天的适当间隔下单独施用的2、3、4、5、6或更多个亚剂量、任选地以单位剂型施用。在某些情形下,给药为每日施用一次。在某些实施方案中,给药根据需要是每2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12月施用一次或多次,以维持功能性抗肌萎缩蛋白的期望表达。

[0261] 核酸分子可通过熟悉本领域的技术人员已知的多种方法施用到细胞,所述方法包括而不局限于封装在脂质体中,通过离子电渗法或合并到例如水凝胶、环糊精、生物可降解的纳米胶囊和生物粘附微球的如本文所述且在本领域中已知的其它媒剂中。在某些实施方案中,微乳化技术可用以改进亲脂性(水不溶性)医药剂的生物利用率。实例包括 Trimetrine (Dordunoo, S. K.等, Drug Development and Industrial Pharmacy, 17 (12), 1685-1713, 1991) 和 REV 5901 (Sheen, P. C.等, J Pharm Sci 80 (7), 712-714, 1991)。在其它益处之中,微乳化通过优先定向吸收到淋巴系统中而不是循环系统中提供增强的生物利用率,其由此绕过肝脏,且防止在肝胆循环中化合物的破坏。

[0262] 本发明的一方面,所述制剂含有由如本文提供的寡聚体和至少一种两亲性载剂形成的胶束,其中所述胶束具有小于约100nm的平均直径。更优选的实施方案提供具有小于约50nm的平均直径的胶束,且甚至更优选的实施方案提供具有小于约30nm或甚至小于约20nm的平均直径的胶束。

[0263] 虽然涵盖所有合适的两亲性载剂,但是本发明优选的载剂通常为具有一般公认安

全 (GRAS) 状态且可使本发明的化合物溶解或在溶液接触复杂水相 (例如, 在人类胃肠道中存在的水相) 时在随后的阶段使其微乳化的那些载剂。通常, 满足这些要求的两亲性成分具有 2-20 的 HLB (亲水亲脂平衡) 值, 且其结构含有在 C-6 至 C-20 范围内的直链脂族基团。实例有聚乙二醇化脂肪酸甘油酯和聚乙二醇。

[0264] 两亲性载剂的实例包括饱和和单不饱和的聚乙二醇化脂肪酸甘油酯, 例如由完全或部分氢化的各种植物油得到的那些。所述油可有利地由对应脂肪酸的三-、二-和单-脂肪酸甘油酯和二-和单-聚乙二醇酯组成, 其中特别优选的脂肪酸组成包括癸酸 4-10、癸酸 3-9、月桂酸 40-50、肉豆蔻酸 14-24、棕榈酸 4-14 和硬脂酸 5-15%。另一有用类别的两亲性载剂包括具有饱和或单不饱和脂肪酸 (SPAN 系列) 或相应乙氧基化类似物 (TWEEN-系列) 部分酯化的失水山梨糖醇和/或山梨糖醇。

[0265] 市售两亲性载剂可特别有用, 包括 Gelucire 系列、Labrafil、Labrasol 或 Lauroglycol (全部由 Gattefosse Corporation, Saint Priest, France 制造并分销)、PEG-单油酸酯、PEG-二油酸酯、PEG-单月桂酸酯和二月桂酸酯、卵磷脂、聚山梨酸酯 80 等 (由美国和全世界的许多公司制造并分销)。

[0266] 在某些实施方案中, 所述递送可通过使用脂质体、纳米胶囊、微颗粒、微球、脂质颗粒、囊等发生, 从而将本发明的组合物引入合适的宿主细胞中。特定地讲, 本发明的组合物可配制成封装在脂质颗粒、脂质体、囊、纳米球、纳米颗粒等中递送。所述递送媒剂的配制和使用可使用已知且常规的技术来进行。

[0267] 适合在本发明中使用的亲水性聚合物为易溶于水、可共价附接到形成起泡的脂质且在体内耐受而没有毒性作用 (即, 生物相容) 的那些。合适的聚合物包括聚乙二醇 (PEG)、聚乳酸 (polylactic) (也称作聚丙交酯)、聚乙醇酸 (也称作聚乙交酯)、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物和聚乙烯醇。在某些实施方案中, 聚合物具有约 100 或 120 道尔顿至多达约 5,000 或 10,000 道尔顿或约 300 道尔顿-约 5,000 道尔顿的分子量。在其它实施方案中, 所述聚合物为具有约 100-约 5,000 道尔顿的分子量或具有约 300-约 5,000 道尔顿的分子量的聚乙二醇。在某些实施方案中, 所述聚合物为 750 道尔顿的聚乙二醇 (PEG (750))。聚合物也可由在其中的单体的数目定义; 本发明的一个优选的实施方案利用至少约三种单体的聚合物, 例如由三种单体组成的 PEG 聚合物 (约 150 道尔顿)。

[0268] 可适合用于本发明中的其它亲水性聚合物包括聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟基丙基甲基丙烯酸酰胺、聚甲基丙烯酸酰胺、聚二甲基丙烯酸酰胺和例如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素的衍生化纤维素。

[0269] 在某些实施方案中, 本发明的制剂包含选自以下的生物相容性聚合物: 聚酰胺、聚碳酸酯、聚亚烷基、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物、聚乙烯聚合物、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨酯及其共聚物、纤维素、聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酐、聚(邻)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、共聚(丙交酯-己内酯)、多糖、蛋白质、聚透明质酸、聚氰基丙烯酸酯及其共混物、混合物或共聚物。

[0270] 环糊精为由 6、7 或 8 个葡萄糖单元组成的环状寡糖, 其各自由希腊字母 α 、 β 或 γ 命名。所述葡萄糖单元由 α -1,4-糖苷键连接。由于糖单元的椅式构象, 所有仲醇羟基 (在 C-2、C-3 处) 都位于环的一侧, 而所有在 C-6 处的伯醇羟基都位于另一侧。因此, 外表面为亲水性的, 使得环糊精具有水溶性。相比之下, 环糊精的空腔为疏水的, 因为它们由原子 C-3 和 C-5

的氢和醚样氧连接。这些基质允许与包括例如类固醇化合物如17 α -雌二醇的多种相对疏水的化合物复合(参见,例如,van Uden等,Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994))。复合通过范德瓦尔相互作用且通过氢键形成发生。对于环糊精化学的一般综述,参见Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994)。

[0271] 环糊精衍生物的理化性质强烈取决于取代的种类和程度。例如,它们在水中的溶解性为不溶(例如,三乙酰基- β -环糊精)到147%溶解(w/v) (G-2- β -环糊精)。另外,它们可溶解于许多有机溶剂中。环糊精的性质使得能够通过增加或减小其溶解性而控制各种制剂组分的溶解性。

[0272] 已经描述了许多环糊精及其制备方法。例如,Parmeter (I)等(美国专利号3,453,259)和Gramera等(美国专利号3,459,731)描述了电中性的环糊精。其它衍生物包括具有阳离子性质的环糊精[Parmeter (II),美国专利号3,453,257];不溶性交联环糊精(Solms,美国专利号3,420,788);和具有阴离子性质的环糊精[Parmeter (III),美国专利号3,426,011]。在具有阴离子性质的环糊精衍生物之中,羧酸、亚磷酸、亚膦酸、膦酸、磷酸、硫代膦酸、硫代亚磺酸和磺酸已经附加到母体环糊精上[参见,Parmeter (III),上述]。此外,磺基烷基醚环糊精衍生物已经由Stella等(美国专利号5,134,127)描述。

[0273] 脂质体由至少一个包围水性内部隔室的脂质双层膜组成。脂质体可以膜类型和尺寸表征。小单层泡(SUV)具有单个膜且直径通常在0.02 μm 和0.05 μm 之间;大单层泡(LUV)通常大于0.05 μm 。多层大泡和多室泡具有多个通常为同心的膜层且通常大于0.1 μm 。具有几个不同心的膜的脂质体(即,几个较小的泡包含在较大的泡内)称为多泡囊泡。

[0274] 本发明的一方面涉及包含含有本发明的寡聚体的脂质体的制剂,其中所述脂质体膜配制成提供具有增加的载运容量的脂质体。供选地或额外地,本发明的化合物可包含在脂质体的脂质双层内或吸附在脂质体的脂质双层上。本发明的寡聚体可与脂质表面活性剂聚集且在脂质体的内部空间中载运;在这样的情况下,脂质体膜配制成耐受活性剂-表面活性剂聚集体的破坏性作用。

[0275] 根据本发明的一个实施方案,脂质体的脂质双层含有用聚乙二醇(PEG)衍生的脂质,使得PEG链从脂质双层的内表面延伸到由脂质体封装的内部空间中并从脂质双层的外部延伸到周围环境中。

[0276] 在本发明的脂质体内包含的活性剂呈溶解形式。表面活性剂和活性剂的聚集体(例如,含有所关注的活性剂的乳液或胶束)可截留在根据本发明的脂质体的内部空间内。表面活性剂用以分散并溶解活性剂,且可选自任何合适的脂族、环脂族或芳族表面活性剂,包括但不限于不同链长(例如,约C14-约C20)的生物相容性溶血磷脂酰胆碱(LPG)。例如PEG-脂质的聚合物衍生的脂质也可用以胶束形成,因为它们将用以抑制胶束/膜融合且将聚合物加到表面活性剂分子中减小表面活性剂的CMC并有助于胶束形成。优选具有在微摩尔范围内的CMC的表面活性剂;较高CMC的表面活性剂可用以制备截留在本发明的脂质体内的胶束。

[0277] 根据本发明的脂质体可通过本领域已知的多种技术中的任一种制备。参见,例如,美国专利号4,235,871;公开的PCT申请WO 96/14057;New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990),第33-104页;Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993。例

如,本发明的脂质体可通过使用亲水性聚合物衍生的脂质扩散到预成型的脂质体中,例如通过将预成型的脂质体暴露于由脂质接枝的聚合物组成的胶束,在对应于作为在脂质体中所期望的衍生化脂质的最终摩尔百分数的脂质浓度下制备。包含亲水性聚合物的脂质体也可通过均质化、脂质领域水合或挤压技术形成,如在本领域中已知。

[0278] 在另一例示性配制程序中,活性剂通过超声处理而首先在容易地溶解疏水分子的溶血磷脂酰胆碱或其它低CMC表面活性剂(包括聚合物接枝的脂质)中分散。活性剂的所得胶束悬浮液随后用于使含有合适摩尔百分数的聚合物接枝的脂质或胆固醇的干燥的脂质样品再水合。脂质和活性剂悬浮液随后使用如本领域已知的挤压技术形成脂质体,且所得脂质体通过标准管柱分离从未封装的溶液中分离。

[0279] 在本发明的一方面,所述脂质体制备成具有在所选择的尺寸范围内的基本均一的尺寸。一种有效的定尺寸方法包括挤压脂质体的水性悬浮液穿过一系列具有所选择的均匀孔径的聚碳酸酯膜;所述膜的孔径将大致对应于通过挤压穿过该膜生成的脂质体的最大尺寸。参见,例如美国专利号4,737,323 (1988年4月12日)。在某些实施方案中,可利用例如DharmaFECT[®]和Lipofectamine[®]的试剂以将多核苷酸或蛋白质引入细胞中。

[0280] 本发明的制剂的释放特性取决于封装材料、封装的药物的浓度和释放改性剂的存在。例如,释放可例如使用仅在如在胃中的低pH下释放或在如在肠管中的较高pH下释放的pH敏感性衣料操控成pH依赖性的。可使用肠溶衣来防止释放发生,直至经过胃。封装在不同材料中的氰胺的多重衣料或混合物可用以在胃中获得初始释放,继之以在肠管中随后释放。释放也可通过包含盐或造孔剂来操控,盐或造孔剂可增加水摄取或使药物从胶囊中扩散而释放药物。还可使用改变药物的溶解性的赋形剂来控制释放速率。还可掺入增强基质的降解或从基质中释放的试剂。可将它们加到药物中,作为分散相(即,作为微粒)加入,或可将其根据化合物而共同溶解于聚合物相中。在大多数情况下,该量应该在0.1%和30%(w/w聚合物)之间。降解增强剂的类型包括无机盐,例如硫酸铵和氯化铵;有机酸,例如柠檬酸、苯甲酸和抗坏血酸;无机碱,例如碳酸钠、碳酸钾、碳酸钙、碳酸锌和氢氧化锌;和有机碱,例如硫酸精蛋白、精胺、胆碱、乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺;和表面活性剂,例如Tween[®]和Pluronic[®]。将微观结构加到基质中的造孔剂(即,水溶性化合物,例如无机盐和糖)作为微粒加入。该范围在1%和30%(w/w聚合物)之间。

[0281] 摄取也可通过改变颗粒在内脏中的驻留时间来操控。这可例如通过用粘膜粘附聚合物包覆颗粒或将其选择为封装材料来实现。实例包括具有游离羧基的大多数聚合物,例如壳聚糖、纤维素,且特别是聚丙烯酸酯(如本文所用,聚丙烯酸酯是指包括丙烯酸酯基团和修饰的丙烯酸酯基团如氰基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物)。

[0282] 寡聚体可配制成包含在外科手术或医疗装置或植入物中或适合通过外科手术或医疗装置或植入物释放。在某些方面,植入物可用寡聚体包覆或以其它方式用寡聚体处理。例如,可使用水凝胶或例如生物相容和/或生物可降解的聚合物的其它聚合物以用本发明的组合物包覆植入物(即,该组合物可适合通过使用水凝胶或其它聚合物而与医疗装置一起使用)。用于用试剂包覆医疗装置的聚合物或共聚物在本领域中公知。植入物的实例包括但不限于支架、药物洗脱支架、缝线、修复体、脉管导管、渗析导管、脉管移植物、修复心瓣膜、心脏起搏器、可植入的心律转变器、除颤器、IV针、用于骨骼固定和形成的装置如销、螺钉、板及其它装置和用于伤口愈合的人造组织基质。

[0283] 除了本文提供的方法之外,根据本发明使用的寡聚体可配制以任何方便的方式施用以便在人类或兽医学中与其它药品类似地使用。反义寡聚体及其对应的制剂可单独或与其它治疗策略组合在肌肉萎缩的治疗如肌母细胞移植、干细胞疗法、施用氨基糖苷类抗生素、蛋白酶体抑制剂和上调疗法(例如,上调utrophin,抗肌萎缩蛋白的正染色体的旁系同源物)中施用。

[0284] 预期所述的施用途径仅供参考,因为熟练的专业人员将能够容易地确定最佳施用途径和任何特定动物和病状的任何用量。已经尝试了将功能性新遗传物质体外和体内地引入细胞中的多种方法(Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280)。这些方法包括整合基因以在修饰的逆转录病毒中表达(Friedmann (1989) 上述;Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18),增刊:5074S-5079S);整合到非逆转录病毒载体(例如,腺伴随病毒载体)中(Rosenfeld等,(1992) Cell, 68:143-155;Rosenfeld等(1991) Science, 252:431-434);或经由脂质体递送与异源启动子-增强子元件连接的转基因(Friedmann (1989), 上述;Brigham等(1989) Am. J. Med. Sci., 298:278-281;Nabel等(1990) Science, 249:1285-1288;Hazinski等(1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209;和Wang和Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855);偶联到配体特异性的阳离子基转运体系(Wu和Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624)或使用裸DNA表达载体(Nabel等(1990), 上述);Wolff等(1990) Science, 247:1465-1468)。直接注射转基因到组织中仅产生局部化表达(Rosenfeld (1992), 上述);Rosenfeld等(1991), 上述;Brigham等(1989), 上述;Nabel (1990), 上述;和Hazinski等(1991) 上述)。Brigham等的小组(Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-28和Clinical Research (1991) 39 (摘要))已经报道在静脉内或气管内施用DNA脂质体复合物之后仅体内转染小鼠的肺。人类基因治疗方法的评论文章的实例为:Anderson, Science (1992) 256:808-813。

[0285] IV. 试剂盒

[0286] 本发明还提供用于治疗具有遗传疾病的患者的试剂盒,所述试剂盒包括包装在合适容器中的至少一种反义分子(例如,以SEQ ID NO:1-5阐述的反义寡聚体)以及其使用说明书。所述试剂盒还可含有例如缓冲剂、稳定剂等周边试剂。本领域的普通技术人员将了解上述方法的应用具有鉴定适合在许多其它疾病的治疗中使用的反义分子的广泛应用。

[0287] V. 实施例

[0288] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过说明和实例的方式相当详细地描述了前述发明,但是在本发明的教导下本领域的普通技术人员将显而易见的是,在不背离随附权利要求的精神或范围的情况下可对本发明进行某些改变和修饰。以下实施例仅以说明而不是限制的方式提供。本领域的技术人员将容易地识别多种非关键性参数,所述参数可能发生改变或修改以产生基本上类似的结果。

[0289] 材料和方法

[0290] 细胞和组织培养物处理条件

[0291] 将人类横纹肌肉瘤细胞(ATCC, CCL-136;RD细胞)以 1.5×10^6 个细胞/烧瓶在处理组织培养物的T75烧瓶(Nunc)中在24mL具有L-谷氨酰胺(HyClone)、10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素抗生素溶液(CelGro)的温DMEM中接种;在24小时之后,吸出培养基,将细胞在温PBS中洗涤一次且加入新鲜的培养基。使细胞在37℃恒温箱中在5.0% CO₂下生长到80%汇合

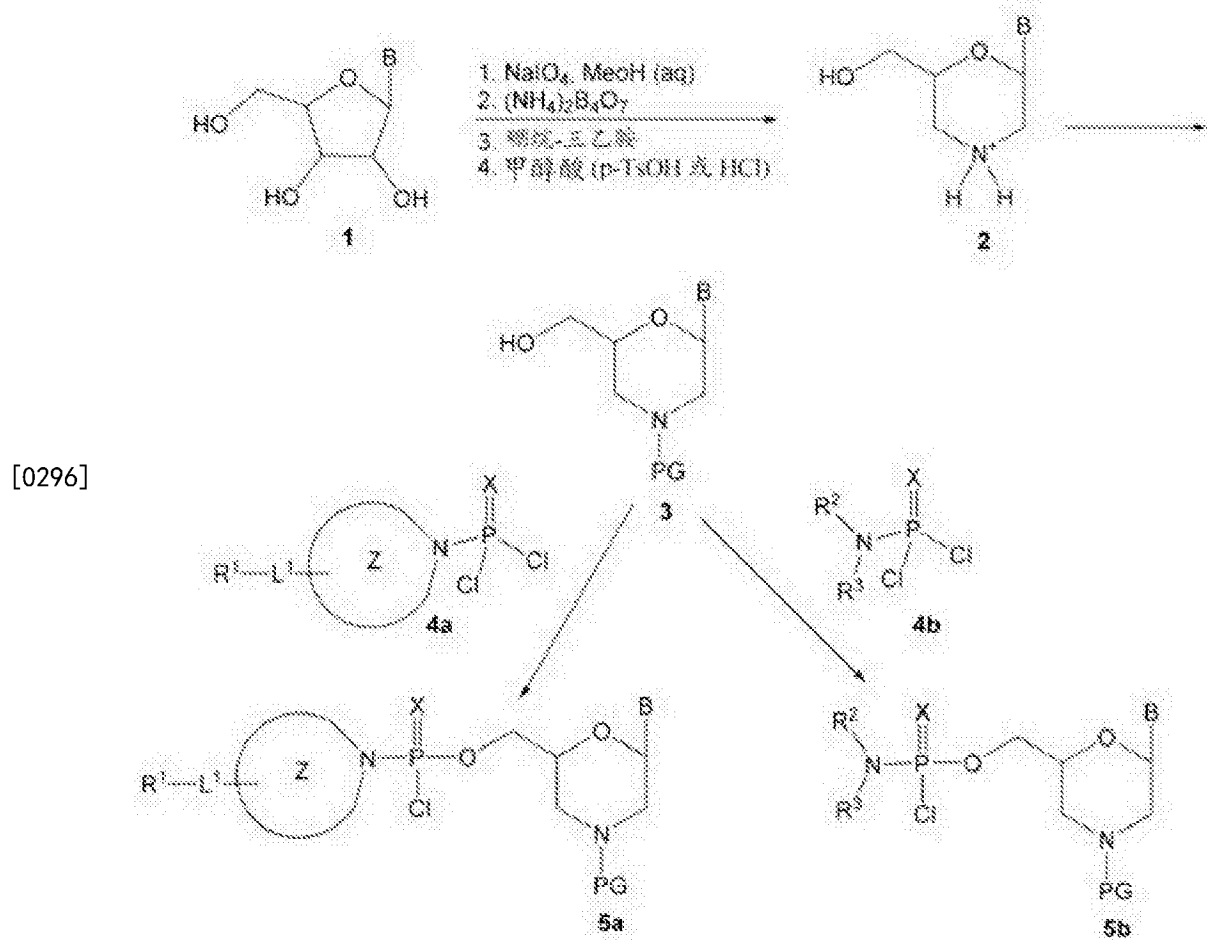
度并使用胰蛋白酶收获。将冻干的二氨基磷酸酯吗啉寡聚体 (PMO) 以约 0.5-2.0mM 再悬浮在无核酸酶的水中; 为了证实摩尔浓度, 使用 NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific) 测量 PMO 溶液。根据生产商说明书和 SG 试剂盒 (Lonza), PMO 使用核穿孔递送到 RD 细胞。PMO 在如所指示的各种浓度 (例如, 2.5、5、10、12.5、20 和 25 微摩尔) 下测试。在核穿孔后将细胞在 12 或 24-孔板上以约 $2-3 \times 10^5$ 个细胞/孔培育 24 小时 ($n = 2$ 或 3) 且随后进行如下所述的 RNA 提取。

[0292] 原代人类肌母细胞在骨骼肌细胞生长培养基 (PromoCell) 中使用标准技术培养。在各种浓度下的 PMO 的核穿孔如上对于 RD 细胞所述进行。随后将细胞在 12-孔板的重复的三个孔中在 PromoCell 生长培养基中铺板并允许培育 24 小时, 之后进行如下所述的 RNA 提取。

[0293] RNA 提取和 PCR 扩增

[0294] RNA 从 PMO 处理过的细胞 (RD 细胞或原代人类肌母细胞) 中使用得自 GE Healthcare 的 RNeasy spin 96 孔 RNA 分离试剂盒提取并使用标准技术及以下引物对进行巢式 RT-PCR。外部引物: 前向 5'-CTTGGACAGAACTTACCGACTGG-3' (SEQ ID NO: 22), 反向 5'-GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTCG-3' (SEQ ID NO: 23); 内部引物: 前向 5'-GCAGGATTTGGAACAGAGGCG-3' (SEQ ID NO: 25), 反向 5'-CATCTACATTTGTCTGCCACTGG-3' (SEQ ID NO: 25)。外显子跳跃通过凝胶电泳或通过使用 Caliper LabChip 生物分析仪测量且外显子跳跃% (即, 外显子跳跃产物相对于全长 PCR 产物的谱带强度) 如在图 3-5 中所示图解。

[0295] 吗啉亚基、PMO 和具有修饰的亚基间键的 PMO 的制备



[0297] 方案1: PMO 和修饰的 PMO 亚基的一般合成途径

[0298] 参考反应方案1,其中B表示碱基配对部分且PG表示保护基团,吗啉亚基可由如所示的对应核糖核苷(1)制备。吗啉亚基(2)可任选地通过与例如三苯甲基氯的合适保护基团前体反应来保护。3'保护基团通常在如下文更详细描述 of 的固态寡聚体合成期间除去。碱基配对部分可被适当地保护以用于固相寡聚体合成。合适的保护基团包括用于腺嘌呤和胞嘧啶的苯甲酰基、用于鸟嘌呤的苯乙酰基和用于次黄嘌呤(I)的特戊酰氧基甲基。特戊酰氧基甲基可引入到次黄嘌呤杂环碱基的N1位置上。尽管可采用未受保护的次黄嘌呤亚基,但是在碱基被保护时,激活反应的产率优异得多。其它合适的保护基团包括在美国专利号8,076,476中公开的那些,其整体通过引用结合到本文中来。

[0299] 3与激活的磷化合物4a或4b的反应产生具有期望的键部分的吗啉亚基(5a或5b)。应该注意到在P-O键形成之后或甚至在亚基已经掺入到寡聚体中之后R¹和/或L¹部分也可安置在杂环Z上。

[0300] 结构4a或4b的化合物可使用包括在实施例中描述的那些的本领域的技术人员已知的许多方法制备。随后如上概述进行与吗啉部分的偶联。

[0301] 结构5a或5b的化合物可用于固相寡聚体合成中,以制备包含亚基间键的寡聚体。所述方法在本领域中公知。简要地讲,结构5a或5b的化合物可在5'末端修饰以含有连接固体载体的连接子。一旦被支撑,5a或5b的保护基团(例如,在3'-末端的三苯甲基)则被除去且使游离胺与结构5的第二化合物的激活的磷部分(或其类似物)反应。该顺序是重复的,直至获得期望长度的寡聚体。在末端3'末端的保护基团可被除去或者如果期望3'修饰,则可保留。寡聚体可使用许多方法或用碱例示性处理以裂解与固体载体连接的键而从固体载体上除去。

[0302] 一般吗啉寡聚体和本发明的特殊吗啉寡聚体的制备在实施例中更详细地描述。

[0303] 实施例1

[0304] 吗啉寡聚体的制备

[0305] 本发明的化合物的制备使用以下方案进行:

[0306] 三苯甲基哌嗪氨基甲酸苯酯35的制备(图2):向化合物11在二氯甲烷(6mL/g 11)中的冷却悬浮液中加入碳酸钾(3.2当量)在水(4mL/g碳酸钾)中的溶液。向该两相混合物中缓慢加入氯甲酸苯酯(1.03当量)在二氯甲烷(2g/g氯甲酸苯酯)中的溶液。将反应混合物温热到20℃。在反应完成(1-2小时)后,分离各层。将有机层用水洗涤并在无水碳酸钾上干燥。产物35通过自乙腈中结晶来分离。

[0307] 氨基甲酸酯醇36的制备:将氢化钠(1.2当量)悬浮在1-甲基-2-吡咯烷酮(32mL/g氢化钠)中。向该悬浮液中加入三乙二醇(10.0当量)和化合物35(1.0当量)。将所得浆液加热到95℃。在反应完成(1-2小时)后,将混合物冷却到20℃。向该混合物中加入30%二氯甲烷/甲基叔丁基醚(v:v)和水。将含有产物的有机层用水性NaOH、水性琥珀酸和饱和水性氯化钠依次洗涤。产物36通过自二氯甲烷/甲基叔丁基醚/庚烷中结晶而分离。

[0308] 尾酸37的制备:向化合物36在四氢呋喃(7mL/g 36)中的溶液中加入琥珀酸酐(2.0当量)和DMAP(0.5当量)。将混合物加热到50℃。在反应完成(5小时)后,将混合物冷却到20℃且用水性NaHCO₃调节到pH 8.5。加入甲基叔丁基醚且将产物提取到水层中。加入二氯甲烷,且将混合物用水性柠檬酸调节到pH 3。将含有产物的有机层用pH = 3柠檬酸盐缓冲剂和饱和水性氯化钠的混合物洗涤。37的该二氯甲烷溶液在没有分离的情况下用于制备化合

物38。

[0309] 38的制备:向化合物37的溶液中加入N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二甲酸酐亚胺(HONB) (1.02当量)、4-二甲基氨基吡啶(DMAP) (0.34当量),且随后加入1-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) (1.1当量)。将混合物加热到55℃。在反应完成(4-5小时)后,将混合物冷却到20℃且用1:1 0.2M柠檬酸/盐水和盐水依次洗涤。二氯甲烷溶液经历与丙酮的溶剂交换且随后经历与N,N-二甲基甲酰胺的溶剂交换,且产物通过从丙酮/N,N-二甲基甲酰胺沉淀到饱和水性氯化钠中来分离。将粗产物在水中再浆化几次以除去残留的N,N-二甲基甲酰胺和盐。

[0310] 将激活的“尾物质”引入到锚载树脂上在二甲基咪唑烷酮(DMI)中通过用于在固相合成期间掺入亚基的程序进行。

[0311] 用于合成吗啉寡聚体的固体载体的制备:该程序在具有粗孔隙(40-60μm)玻璃粉、塔顶搅拌器和三通Teflon活塞以允许N₂鼓泡经过玻璃料的硅烷化夹套肽容器(ChemGlass, NJ, USA)或真空提取中进行。

[0312] 在以下程序中的树脂处理/洗涤步骤由两个基本操作组成:树脂流态化或搅拌器床反应器和溶剂/溶液提取。对于树脂流态化,将活塞定位以允许N₂向上流经玻璃料且将指定的树脂处理/洗涤液加到反应器中并允许其渗透且完全地润湿树脂。随后开始混合并将树脂浆料混合指定的时间。对于溶剂/溶液提取,停止混合和N₂流动且开启真空泵并定位活塞以允许树脂处理/洗涤液作为废料排出。除非另外注明,否则所有树脂处理/洗涤体积都为15mL/g树脂。

[0313] 向在硅烷化的夹套肽容器中的氨基甲基聚苯乙烯树脂(100-200目;基于氮取代,约1.0mmol/g装载量;75g,1当量,Polymer Labs, UK, #1464-X799部分)中加入1-甲基-2-吡咯烷酮(NMP;20mL/g树脂)并允许树脂在混合下溶胀1-2小时。在排出膨胀溶剂之后,将树脂用二氯甲烷(2×1-2分钟)、在25%异丙醇/二氯甲烷中的5%二异丙基乙胺(2×3-4分钟)和二氯甲烷(2×1-2分钟)洗涤。在排出最后洗涤液之后,将树脂用二硫化物锚34在1-甲基-2-吡咯烷酮(0.17M;15mL/g树脂,约2.5当量)中的溶液处理并将树脂/试剂混合物在45℃下加热60小时。在反应完成后,将加热中止并排出锚溶液且将树脂用1-甲基-2-吡咯烷酮(4×3-4分钟)和二氯甲烷(6×1-2分钟)洗涤。将树脂用10% (v/v) 二碳酸二乙酯在二氯甲烷(16mL/g;2×5-6分钟)中的溶液处理且随后用二氯甲烷(6×1-2分钟)洗涤。将树脂39(参见,图4)在N₂流下干燥1-3小时且随后在真空中干燥至恒定重量(±2%)。产率:原始树脂重量的110-150%。

[0314] 氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂的装载量的测定:对于每克树脂中三苯甲基(triphenylmethyl) (三苯甲基(trityl))的数目,树脂的装载量(潜在可利用的反应位点的数目)通过光谱测量测定法来确定。

[0315] 将已知重量的干燥的树脂(25±3mg)转移到硅烷化25mL容量瓶中并加入约5mL在二氯甲烷中的2% (v/v) 三氟乙酸。内含物通过轻微地打旋来混合,且随后允许静置30分钟。用额外的在二氯甲烷中的2% (v/v) 三氟乙酸使体积达到25mL并将内含物彻底混合。使用正排量移液管将等份的含三苯甲基的溶液(500μL)转移到10mL容量瓶中并用甲磺酸使体积达到10mL。

[0316] 在最终溶液中的三苯甲基阳离子含量通过在431.7nm下的UV吸光度测量且树脂装

载量使用适当的体积、稀释度、消光系数(ϵ : $41\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)和树脂重量以三苯甲基基团/克树脂($\mu\text{mol/g}$)计算。测定重复进行三次并计算平均装载量。

[0317] 在该实施例中的树脂装载程序将提供具有约 $500\mu\text{mol/g}$ 的装载量的树脂。如果二硫化物锚掺入步骤在室温下进行24小时,则获得 $300\text{--}400\mu\text{mol/g}$ 的装载量。

[0318] 尾物质装载:使用与氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂制备相同的装备和体积,可将尾物质引入固体载体中。锚载树脂首先在酸性条件下去保护且在偶联之前将所得材料中和。对于偶联步骤,使用38 (0.2M)在含有4-乙基吗啉(NEM, 0.4M)中的溶液代替二硫化物锚溶液。在 45°C 下2小时之后,将树脂39用在25%异丙醇/二氯甲烷中的5%二异丙基乙胺洗涤两次且用DCM洗涤一次。向树脂中加入苯甲酸酐(0.4M)和NEM (0.4M)的溶液。在25分钟之后,将反应器夹套冷却到室温,且将树脂用在25%异丙醇/二氯甲烷中的5%二异丙基乙胺洗涤两次且用DCM洗涤8次。将树脂40过滤并在高真空中干燥。将树脂40的装载量限定到在尾物质装载中使用的原始氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂39的装载量。

[0319] 固相合成:吗啉寡聚体在Gilson AMS-422自动化肽合成器上在2mL Gilson聚丙烯反应柱(#3980270部分)中制备。将具有用于水流动的通道的铝嵌块放置在柱周围,就像它们落在合成器上一样。AMS-422将供选地加入试剂/洗涤溶液,保持指定的时间并使用真空抽空柱。

[0320] 对于长度多达约25个亚基的寡聚体,优选具有接近 $500\mu\text{mol/g}$ 树脂的装载量的氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂。对于较大的寡聚体,优选具有 $300\text{--}400\mu\text{mol/g}$ 的树脂的装载量的氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂。如果期望具有5'-尾的分子,则在相同装载准则下选择已经装载尾物质的树脂。

[0321] 制备以下试剂溶液:

[0322] 脱三苯甲基溶液:在4:1二氯甲烷/乙腈中的10%氰基乙酸(w/v);中和溶液:在3:1二氯甲烷/异丙醇中的5%二异丙基乙胺;偶联溶液:在1,3-二甲基咪唑啉酮中的0.18M (或0.24M,对于具有比20个亚基长的寡聚体)期望碱基和键类型的激活的吗啉亚基和0.4M N-乙基吗啉。将二氯甲烷(DCM)用作暂时洗涤物,分离不同的试剂溶液洗涤液。

[0323] 在合成器上,将嵌块设定到 42°C ,向含有30mg氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂(或尾树脂)的各个柱中加入2mL的1-甲基-2-吡咯烷酮并允许处于室温下30分钟。在用2mL二氯甲烷洗涤两次之后,采用以下合成循环:

步骤	体积	递送	保持时间
脱三苯甲基	1.5mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基	1.5mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基	1.5mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基	1.5mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基	1.5mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基	1.5mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基	1.5mL	歧管	15 秒
DCM	1.5mL	歧管	30 秒
中和	1.5mL	歧管	30 秒
中和	1.5mL	歧管	30 秒
[0324] 中和	1.5mL	歧管	30 秒
中和	1.5mL	歧管	30 秒
中和	1.5mL	歧管	30 秒
中和	1.5mL	歧管	30 秒
DCM	1.5mL	歧管	30 秒
偶联	350-500 μ L	注射器	40 分钟
DCM	1.5mL	歧管	30 秒
中和	1.5mL	歧管	30 秒
中和	1.5mL	歧管	30 秒
DCM	1.5mL	歧管	30 秒
DCM	1.5mL	歧管	30 秒
DCM	1.5mL	歧管	30 秒

[0325] 将单独寡聚体的顺序程序化至合成仪中,从而各个柱以恰当的顺序接收恰当的偶联溶液(A,C,G,T,I)。当在柱中的寡聚体完全掺入其最终亚基时,将柱从嵌块上移下并用由含有0.89M 4-乙基吗啉的4-甲氧基三苯基甲基氯(0.32M,在DMI中)组成的偶联溶液手动地进行最终循环。

[0326] 从树脂中裂解和除去碱基和主链保护基团:在甲氧基三苯甲基之后,将树脂用2mL 1-甲基-2-吡咯烷酮洗涤8次。加入1mL的由在1-甲基-2-吡咯烷酮中的0.1M 1,4-二硫苏糖醇(DTT)和0.73 M三乙胺组成的裂解溶液,将柱盖住并允许置于室温下30分钟。在此之后,将溶液引流到12mL Wheaton小瓶中。将大大收缩的树脂用300 μ L裂解溶液洗涤两次。向溶液中加入4.0mL浓氨水(在-20℃下储存),将小瓶盖紧(用Teflon加衬的螺帽),且将混合物打旋以混合溶液。将小瓶置于45℃烘箱中16-24小时,以实现碱基和主链保护基团的裂解。

[0327] 粗产物纯化:将装小瓶的氨解溶液从烘箱中移出并允许冷却到室温。将溶液用20mL 0.28%氨水稀释并使其穿过含有Macroprep HQ树脂(BioRad)的2.5 $\times$ 10cm柱。使用盐

梯度(A:0.28%氨,与B:在0.28%氨中的1M氯化钠;0-100% B,在60分钟内)以洗脱含有甲氧基三苯甲基的峰。将合并的部分汇合并根据期望的产物进一步加工。

[0328] 吗啉寡聚体的脱甲氧基三苯甲基化:将来自Macroprep纯化的汇合的部分用1M H_3PO_4 处理以将pH降到2.5。在初始混合之后,使样品处于室温下4分钟,此时将其用2.8%氨/水中和到pH 10-11。产物通过固相提取(SPE)纯化。

[0329] SPE柱填充和调节:将Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3mL) 填充到20mL玻璃料柱(BioRad Econo-Pac Chromatography Columns (732-1011))中并将树脂用3mL的以下物质冲洗:0.28% NH_4OH /80%乙腈;0.5M $NaOH$ /20%乙醇;水;50 mM H_3PO_4 /80%乙腈;水;0.5 $NaOH$ /20%乙醇;水;0.28% NH_4OH 。

[0330] SPE纯化:将来自脱甲氧基三苯甲基化的溶液装载到柱上并将树脂用3-6mL 0.28%氨水冲洗三次。将Wheaton小瓶(12mL)放置在柱下且产物通过用2mL在0.28%氨水中的45%乙腈两次洗涤来洗脱。

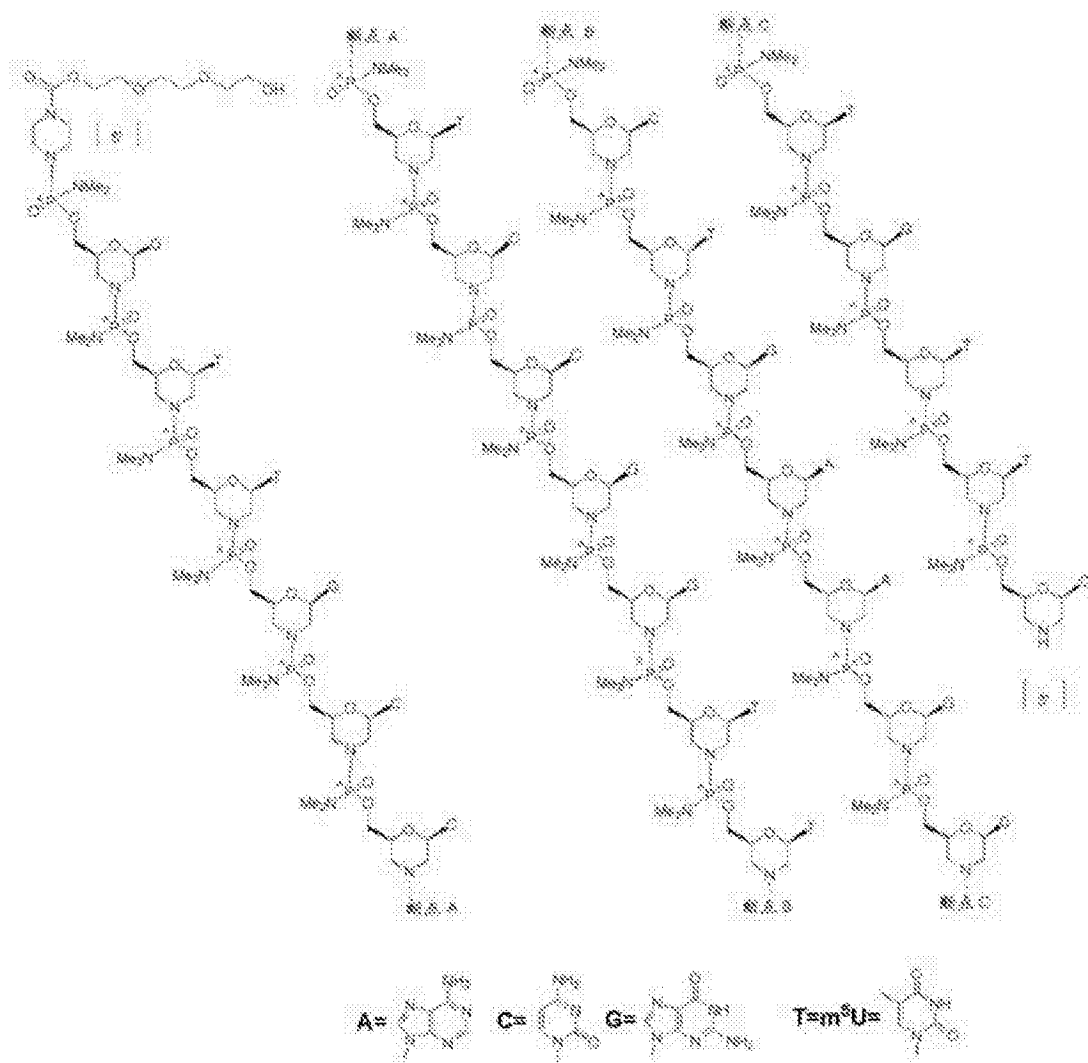
[0331] 产物分离:将溶液在干冰中冷冻且将小瓶置于冰冻干燥器中以生成绒毛状白色粉末。将样品溶解于水中,经0.22微孔过滤器(Pall Life Sciences, Acrodisc 25 mm针筒过滤器,具有0.2微米HT Tuffryn膜)使用注射器过滤,且在UV分光光度计上测量光学密度(OD)以确定存在的寡聚体的OD单位以及分配样品以便分析。随后将溶液放回Wheaton小瓶中以便冻干。

[0332] 通过MALDI分析吗啉寡聚体:使用MALDI-TOF质谱法确定在纯化中各部分的组成以及提供寡聚体的身份(分子量)的证明。将样品用3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸(芥子酸)、3,4,5-三羟基苯乙酮(THAP)或 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)的溶液作为基质稀释后运行。

[0333] 实施例2

[0334] 使用在实施例1中描述的方案,合成以下PMO:H53A (+30+60),SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3')且将其用于实施例中。

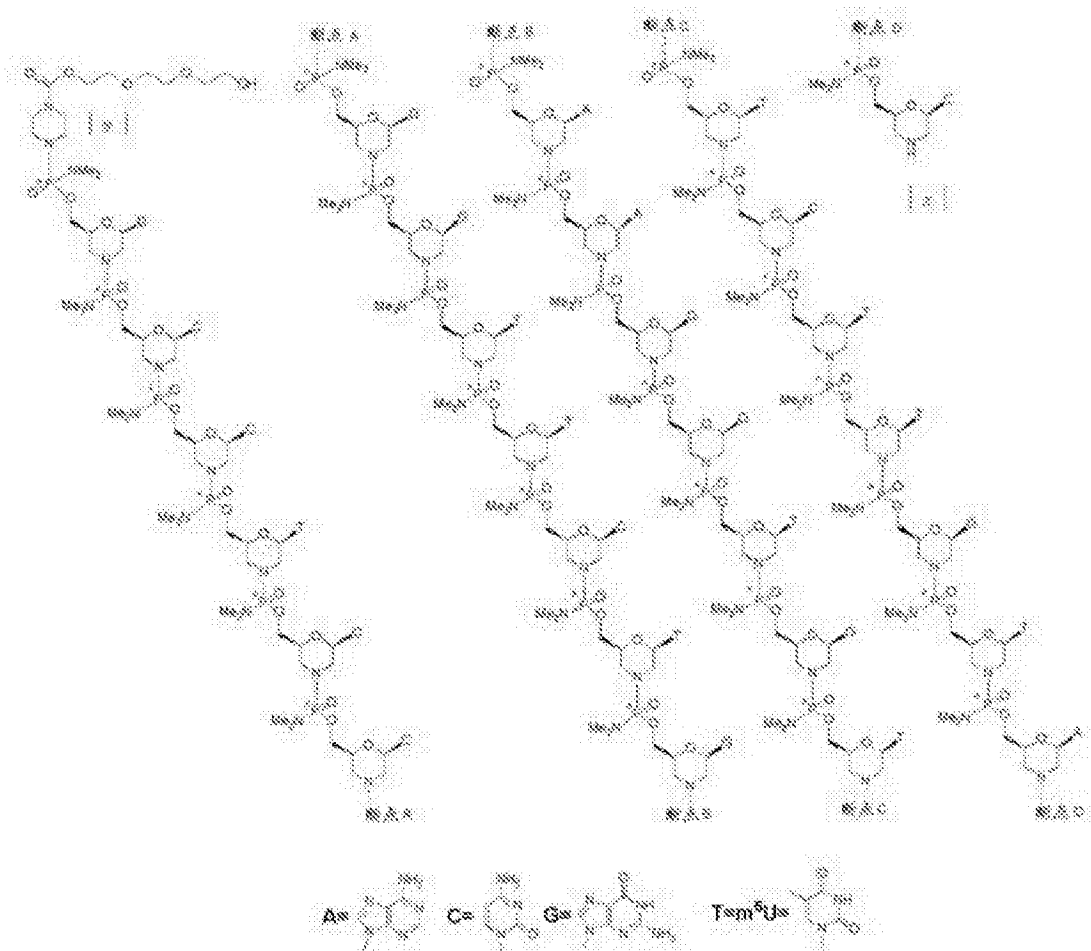
[0335]



[0336] 实施例3

[0337] 使用在实施例1中描述的方案,合成以下PMO:H53A (+30+57),SEQ ID NO: 2 (5'-GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT CTT GTA C-3')且将其用于实施例中。

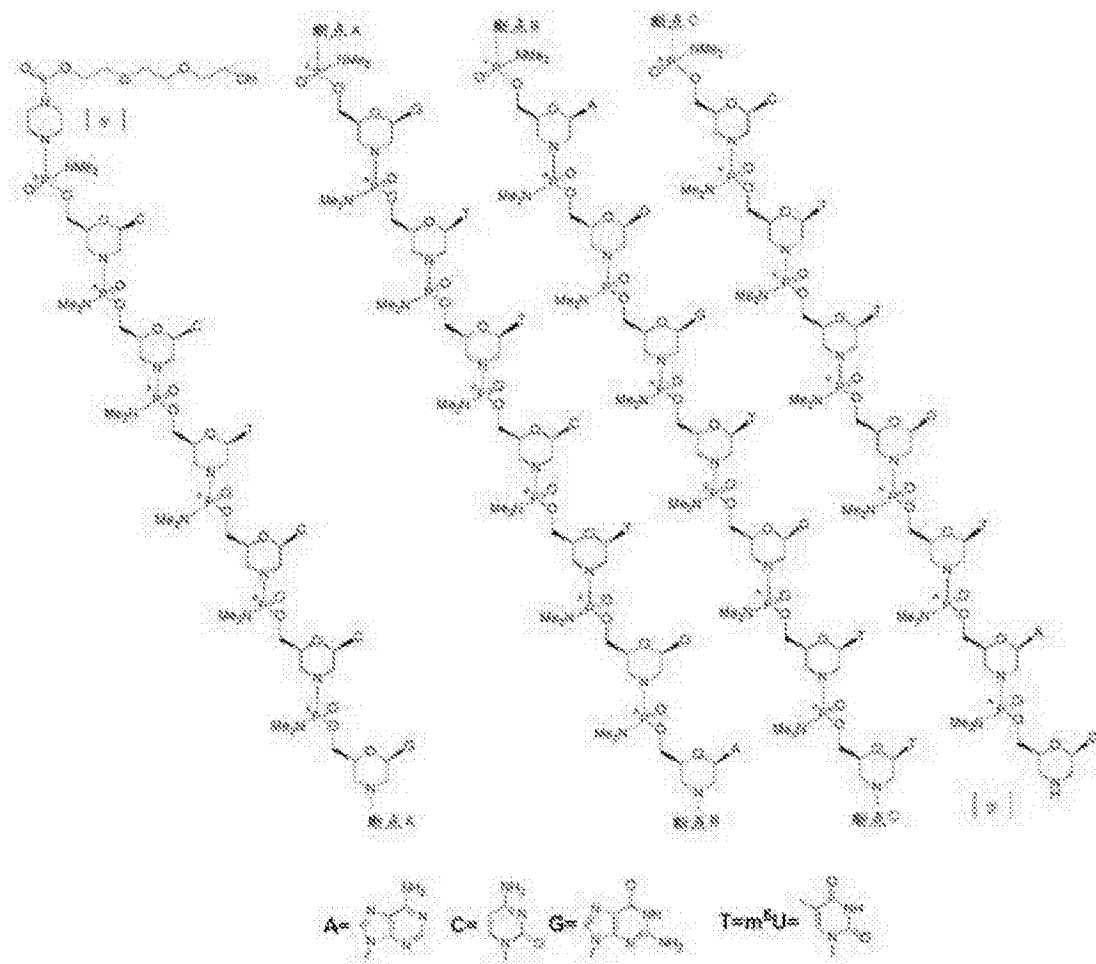
[0338]



实施例4

[0339] 使用在实施例1中描述的方案,合成以下PMO:H53A (+33+56),SEQ ID NO: 3 (5'-CCT CCG GTT CTG AAG GTG TTC TTG TAC-3')且将其用于实施例中。

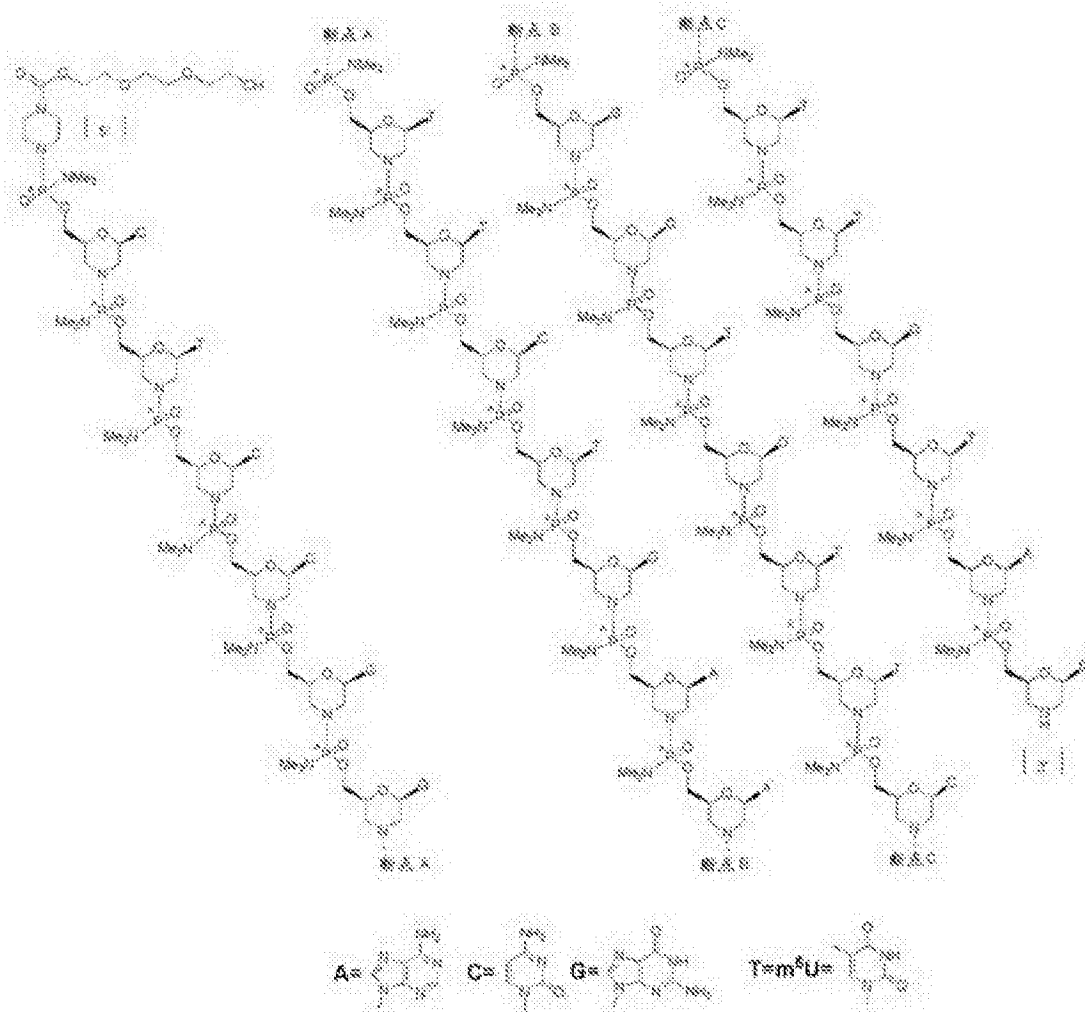
[0340]



实施例5

[0341] 使用在实施例1中描述的方案,合成以下PMO:H53A (+33+55),SEQ ID NO: 4 (5'-CTC CGG TTC TGA AGG TGT TCT TGT AC-3')且将其用于实施例中。

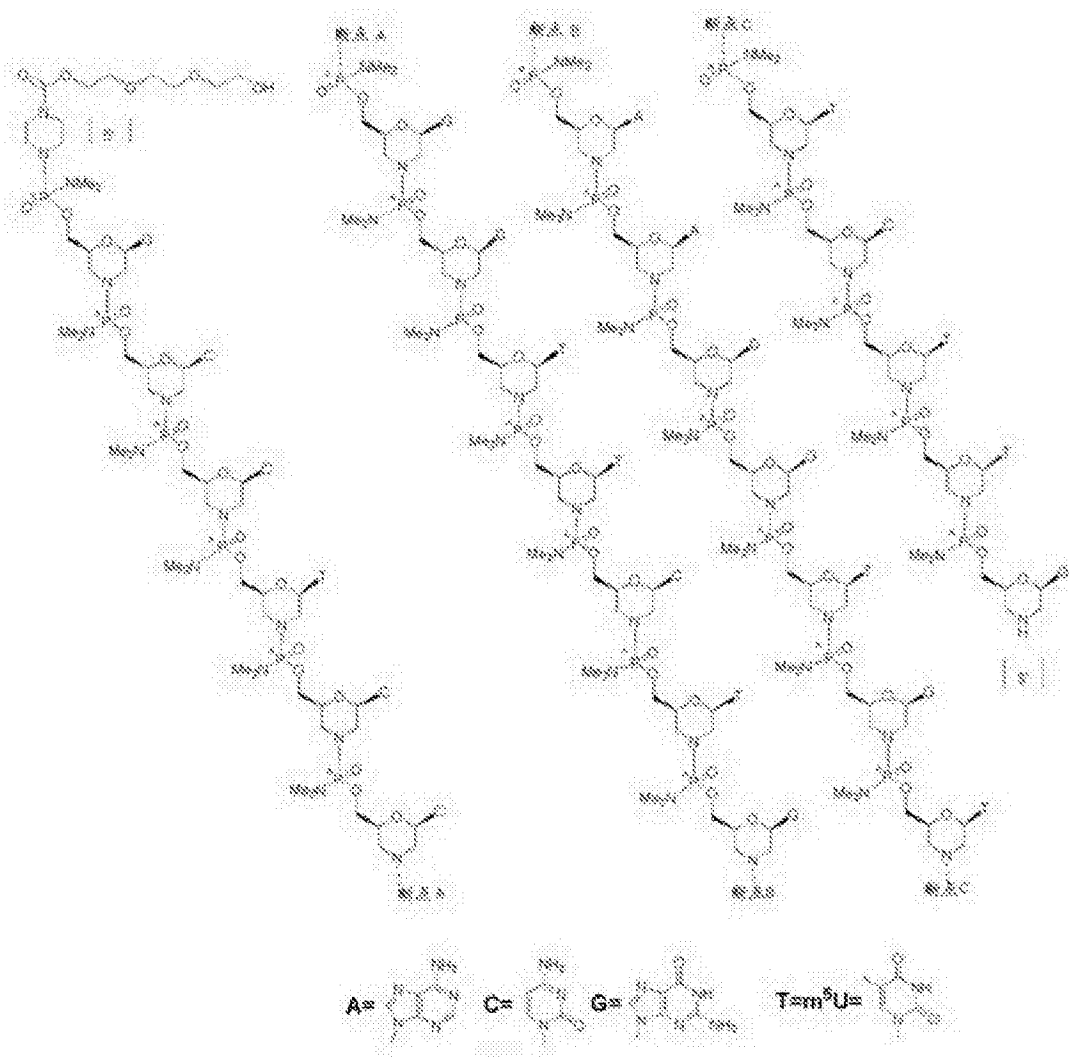
[0342]



[0343] 实施例6

[0344] 使用在实施例1中描述的方案,合成以下PM0:H53A (+33+57),SEQ ID NO: 5 (5'-GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT CTT G-3')且将其用于实施例中。

[0345]



[0346] 实施例7

[0347] 外显子53跳跃

[0348] 如下设计并合成靶向人类抗肌萎缩蛋白外显子53的一系列反义寡聚体：

[0349]

描述	序列	SEQ ID NO
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGGTCTGAAGG TGTTC	1
H53A(+30+57)	GCCTCCGGTCTGAAGGTGT TCTTGTAC	2
H53A(+30+56)	CCTCCGGTCTGAAGGTGTT CTTGTAC	3
H53A(+30+55)	CTCCGGTCTGAAGGTGTTC TTGTAC	4
H53A(+33+57)	GCCTCCGGTCTGAAGGTGT TCTTG	5
H53A(+33+60)	GTTGCCTCCGGTCTGAAGG TGTICTTG	6
H53A(+31+55)	CTCCGGTCTGAAGGTGTTC TTGTA	7
H53A(+22+46)	TGAAGGTGTTCTTGTACTTC ATCCC	8
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTACTT CATCC	9

[0350] 通过在各种指示浓度下处理原代人类肌母细胞来对于外显子跳跃功效评价上述反义寡聚体。在这些实验中,将对应于H53A (+33+60)和H53A (+31+55)的反义寡聚体用作比较寡聚体。如在图3和图4中所示,寡聚体H53A (+36+60) (SEQ ID NO: 1)在诱发在原代人类肌母细胞中的外显子53跳跃方面非常有效。H53A(+31+55) (SEQ ID NO: 7)和H53A(+22+46) (SEQ ID NO: 8)也诱发外显子53跳跃,但程度不如H53A(+33+60) (SEQ ID NO: 6)和H53A(+36+60) (SEQ ID NO: 1)。如在图3中所示,H53A(+33+60)和H53A(+36+60) (分别SEQ ID NO:6和SEQ ID NO: 1)与其它高活性反义寡核苷酸相比较在诱发在培养的肌母细胞中的外显子53跳跃方面非常有效。

[0351] 通过在各种指示浓度下处理RD细胞来对于外显子跳跃功效评价上述额外的反义寡聚体。在这些实验中,将对应于H53A (+33+60) (SEQ ID NO: 6)的反义寡聚体用作比较寡聚体。如在图4中所示,寡聚体H53A (+30+57)、H53A (+30+56)、H53A (+30+55)和H53A (+33+57) (分别地SEQ ID NO: 2-5)在活性方面与寡聚体H53A (+33+60) (SEQ ID NO: 6)相当。

[0352] 在另一实验中,与公开的反义寡核苷酸相比较,测试本发明的反义寡聚体在原代人类肌母细胞中的外显子53跳跃。除了上述的H53A (+23+47) (SEQ ID NO: 9)之外,将来自US 8,232,384的H53A (+39+69)、H53A (+39+62)和H53A (+45+69) (分别地SEQ ID NO: 10、11和12);来自W02004/083446的h53A0N1 (+45+62) (SEQ ID NO: 13);和来自W02012/

029986的PM03 (+32+56)和PM08 (+36+56) (分别地SEQ ID NO: 14和15)与本发明的例示性寡聚体H53A (+36+60) (SEQ ID NO: 1)相比较。如在图5A和5B中所示,说明最低EC50的寡聚体被确定为H53A (+36+60) SEQ ID NO: 1。这通过对结果进行在GraphPad Prism程序中的三参数回归分析以产生如下表中所示的EC50值来证实。

	EC50
SEQIDNO:10 H53A(+39+69)	6.482
SEQIDNO:9 H53A(+23+47)	9.135
SEQIDNO:1 H53A(+36+60)	3.910
SEQIDNO:13 H53A(+45+62)	17.13
SEQIDNO:11 H53A(+39+62)	6.061
SEQIDNO:12 H53A(+45+69)	13.11
SEQIDNO:14 PM03(+32+56)	11.80
SEQIDNO:15 PM08(+36+56)	15.81

[0354] 在本说明书中引用的所有出版物和专利申请都通过引用结合到本文中,如同特别地且单独地指出每一个单个的出版物或专利申请通过引用结合到本文中。

[0355] 参考文献

[0356] Aartsma-Rus, A., A. A. Janson等(2004). "Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense." Am J Hum Genet 74 (1): 83-92.

[0357] Cirak, S., V. Arechavala-Gomeza等(2011). "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study." Lancet 378(9791): 595-605.

[0358] Dunkley, M. G., I. C. Eperon等(1997). "Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides." Nucleosides & Nucleotides 16(7-9): 1665-1668.

[0359] Dunkley, M. G., M. Manoharan等(1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides." Hum Mol Genet 7(7): 1083-90.

[0360] Errington, S. J., C. J. Mann等(2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene." J Gene Med 5 (6): 518-27.

[0361] Goemans, N. M., M. Tulinius等(2011). "Systemic Administration of PR0051 in Duchenne's Muscular Dystrophy." N Engl J Med.

[0362] Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton等(2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." Mol Ther.

[0363] Kinali, M., V. Arechavala-Gomeza等(2009). "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation,

proof-of-concept study." *Lancet Neurol* 8(10): 918-28.

[0364] Lu, Q. L., C. J. Mann等(2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." *Nat Med* 9(8): 1009-14.

[0365] Mann, C. J., K. Honeyman等(2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy." *J Gene Med* 4(6): 644-54.

[0366] Marshall, N. B., S. K. Oda等(2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." *Journal of Immunological Methods* 325(1-2): 114-126.

[0367] Matsuo, M., T. Masumura等(1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe." *J Clin Invest* 87(6): 2127-31.

[0368] Monaco, A. P., C. J. Bertelson等(1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus." *Genomics* 2(1): 90-5.

[0369] Pramono, Z. A., Y. Takeshima等(1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence." *Biochem Biophys Res Commun* 226(2): 445-9.

[0370] Sazani, P., R. Kole等(2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT W02007058894, University of North Carolina.

[0371] Sierakowska, H., M. J. Sambade等(1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23): 12840-4.

[0372] Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 187-95.

[0373] Takeshima, Y., H. Nishio等(1995). "Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe." *J Clin Invest* 95(2): 515-20.

[0374] van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout等(2001). "Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells." *Hum Mol Genet* 10(15): 1547-54.

[0375] van Deutekom, J. C., A. A. Janson等(2007). "Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PR0051." *N Engl J Med* 357(26): 2677-86.

[0376] Wilton, S. D., A. M. Fall等(2007). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript." *Mol Ther* 15(7): 1288-96.

[0377] Wilton, S. D., F. Lloyd等(1999). "Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides." *Neuromuscul Disord* 9(5): 330-8.

[0378] Wu, B., H. M. Moulton等(2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39): 14814-9.

[0379] Yin, H., H. M. Moulton等(2008). "Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function." *Hum Mol Genet* 17(24): 3909-18.

[0380] 序列表

[0381]

描述	序列	SEQ ID NO
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTG	1
H53A(+30+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG TAC	2
H53A(+30+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT AC	3
H53A(+30+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA C	4
H53A(+33+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	5
H53A(+33+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCT TTG	6
H53A(+31+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA	7
H53A(+22+46)	TGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCCC	8
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	9
H53(+39+69)	CATCAACTGTTGCCTCCGGTTCTG AAGGTG	10
H53(+39+62)	CTGTTGCCCTCCGGTTCTGAAGGTG	11
H53(+45+69)	CATCAACTGTTGCCTCCGGTTCTG	12
H53(+45+62)	CTGTTGCCCTCCGGTTCTG	13
PMO3(+32+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT	14
PMO8(+36+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCT	15
rTAT	RRRQRRKKR	16
Tat	RKKRRQRRR	17
R ₀ F ₂	RRRRRRRRRFF	18
R ₃ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR	19
R4	RRRR	20
R5	RRRRR	21
R6	RRRRRR	22
R7	RRRRRRR	23
R8	RRRRRRRR	24
R9	RRRRRRRRR	25
(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXRXR	26
(RAhxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	27

[0382]

(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	28
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	29
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRARFF	30
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRRGRFF	31
引物	CTTGGACAGAACTTACCGACTGG	32
引物	GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTCG	33
引物	GCAGGATTGGAACAGAGGCG	34
引物	CATCTACATTGTCTGCCACTGG	35

序列表

	<110>	SAREPTA THERAPEUTICS, INC.	
	<120>	用于治疗肌肉萎缩的外显子跳跃组合物	
	<130>	AVN-010BPC	
	<140>	PCT/US2014/029766	
	<141>	2014-03-14	
	<150>	US 61/782,706	
	<151>	2013-03-14	
	<160>	35	
	<170>	PatentIn version 3.5	
[0001]	<210>	1	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸 H53A(+36+60)	
	<400>	1	
		gttgccctccg gttctgaagg tgttc	25
	<210>	2	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸 H53A(+30+57)	
	<400>	2	
		gccctccggtt ctgaagggtg tcttgtac	28
	<210>	3	
	<211>	27	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸 H53A(+30+56)	
	<400> 3	
	cctccggttc tgaagtggtt ctgtac	27
	<210> 4	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸 H53A(+30+55)	
	<400> 4	
	ctccggttct gaagtggtc ttgtac	26
[0002]	<210> 5	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸 H53A(+33+57)	
	<400> 5	
	gcctccggtt ctgaaggtgt tcttg	25
	<210> 6	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸 H53A(+33+60)	
	<400> 6	
	gttgcctcgg gtctgaagg tggtcttg	28

	<210> 7 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的寡核苷酸 h53A(+31+55) <400> 7 ctccggttct gaagggttct ttgta	25
	<210> 8 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的寡核苷酸 H53A(+22+46) <400> 8 tgaaggtgtt ettgtacttc atccc	25
[0003]	<210> 9 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的寡核苷酸 H53A(+23+47) <400> 9 ctgaaggtgt tctgtacttt catcc	25
	<210> 10 <211> 31 <212> DNA <213> 人工序列 <220>	

	<223> 合成的寡核苷酸 H53 (+39+69)	
	<400> 10	
	cattcaactg ttgcctccgg ttctgaaggt g	31
	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸 H53 (+39+62)	
	<400> 11	
	ctgttgccctc cggttctgaa ggtg	24
	<210> 12	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0004]	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸 H53 (+45+69)	
	<400> 12	
	cattcaactg ttgcctccgg ttctg	25
	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸 H53 (+45+62)	
	<400> 13	
	ctgttgccctc cggttctg	18
	<210> 14	
	<211> 25	

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸 PM03 (+32+56)

<400> 14

cctccggttc tgaagtggtt cttgt

25

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸 PM08 (+36+56)

<400> 15

cctccggttc tgaagtggtt c

21

[0005]

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽 rTAT

<400> 16

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg

1

5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽 Tat

<400> 17

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽 R9F2

<400> 18

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe
1 5 10

[0006]

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽 R5F2R4

<400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽 R4

<400> 20

Arg Arg Arg Arg

1

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽 R5

<400> 21

Arg Arg Arg Arg Arg

1

5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

[0007]

<220>

<223> 合成的肽 R6

<400> 22

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1

5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽 R7

<400> 23

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1

5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽 R8

<400> 24

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0008] <223> 合成的肽 R9

<400> 25

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽 (RX) 8

<220>

<221> 其它特征

<222> (2).. (2)

<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

	<220>	
	<221>	其它特征
	<222>	(4).. (4)
	<223>	Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	
	<221>	其它特征
	<222>	(6).. (6)
	<223>	Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	
	<221>	其它特征
	<222>	(8).. (8)
	<223>	Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	
	<221>	其它特征
	<222>	(10).. (10)
	<223>	Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
[0009]	<220>	
	<221>	其它特征
	<222>	(12).. (12)
	<223>	Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	
	<221>	其它特征
	<222>	(14).. (14)
	<223>	Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	
	<221>	其它特征
	<222>	(16).. (16)
	<223>	Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸
	<400>	26
	Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa	
	1 5 10 15	
	<210>	27
	<211>	12
	<212>	PRT

- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的肽 (RAhxR) 4; (P007)
- <220>
- <221> 其它特征
- <222> (2).. (2)
- <223> Xaa 是 6-氨基己酸
- <220>
- <221> 其它特征
- <222> (5).. (5)
- <223> Xaa 是 6-氨基己酸
- <220>
- <221> 其它特征
- <222> (8).. (8)
- <223> Xaa 是 6-氨基己酸
- [0010] <220>
- <221> 其它特征
- <222> (11).. (11)
- <223> Xaa 是 6-氨基己酸
- <400> 27
- Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
- 1 5 10
- <210> 28
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的肽 (RAhxR) 5; (CP04057)
- <220>
- <221> 其它特征
- <222> (2).. (2)

<223> Xaa 是 6-氨基己酸

<220>

<221> 其它特征

<222> (5).. (5)

<223> Xaa 是 6-氨基己酸

<220>

<221> 其它特征

<222> (8).. (8)

<223> Xaa 是 6-氨基己酸

<220>

<221> 其它特征

<222> (11).. (11)

<223> Xaa 是 6-氨基己酸

<220>

<221> 其它特征

<222> (14).. (14)

<223> Xaa 是 6-氨基己酸

[0011]

<400> 28

Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg	Arg	Xaa	Arg
1				5				10					15	

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽 (RAhxRRBR)₂; (CP06062)

<220>

<221> 其它特征

<222> (2).. (2)

<223> Xaa 是 6-氨基己酸

<220>

<221> 其它特征

<222> (5).. (5)
<223> Xaa 是 β -丙氨酸

<220>
<221> 其它特征
<222> (8).. (8)
<223> Xaa 是 6-氨基己酸

<220>
<221> 其它特征
<222> (11).. (11)
<223> Xaa 是 β -丙氨酸

<400> 29

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10

[0012]

<210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽(RAR) 4F2

<400> 30

Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Phe Phe
1 5 10

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽(RGR) 4F2

<400> 31

Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Phe Phe

	1	5	10
	<210>	32	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	32	
		cttggacaga acttaccgac tgg	23
	<210>	33	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
[0013]	<223>	合成引物	
	<400>	33	
		gtttcttcca aagcagcctc tcg	23
	<210>	34	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	34	
		gcaggatttg gaacagagge g	21
	<210>	35	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

	<220>		
	<223>	合成引物	
[0014]	<400>	35	
	catctacatt tgtctgccac tgg		23

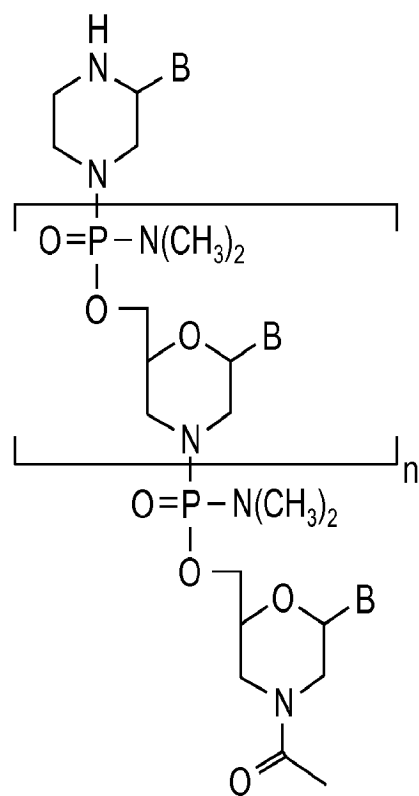


图 1A

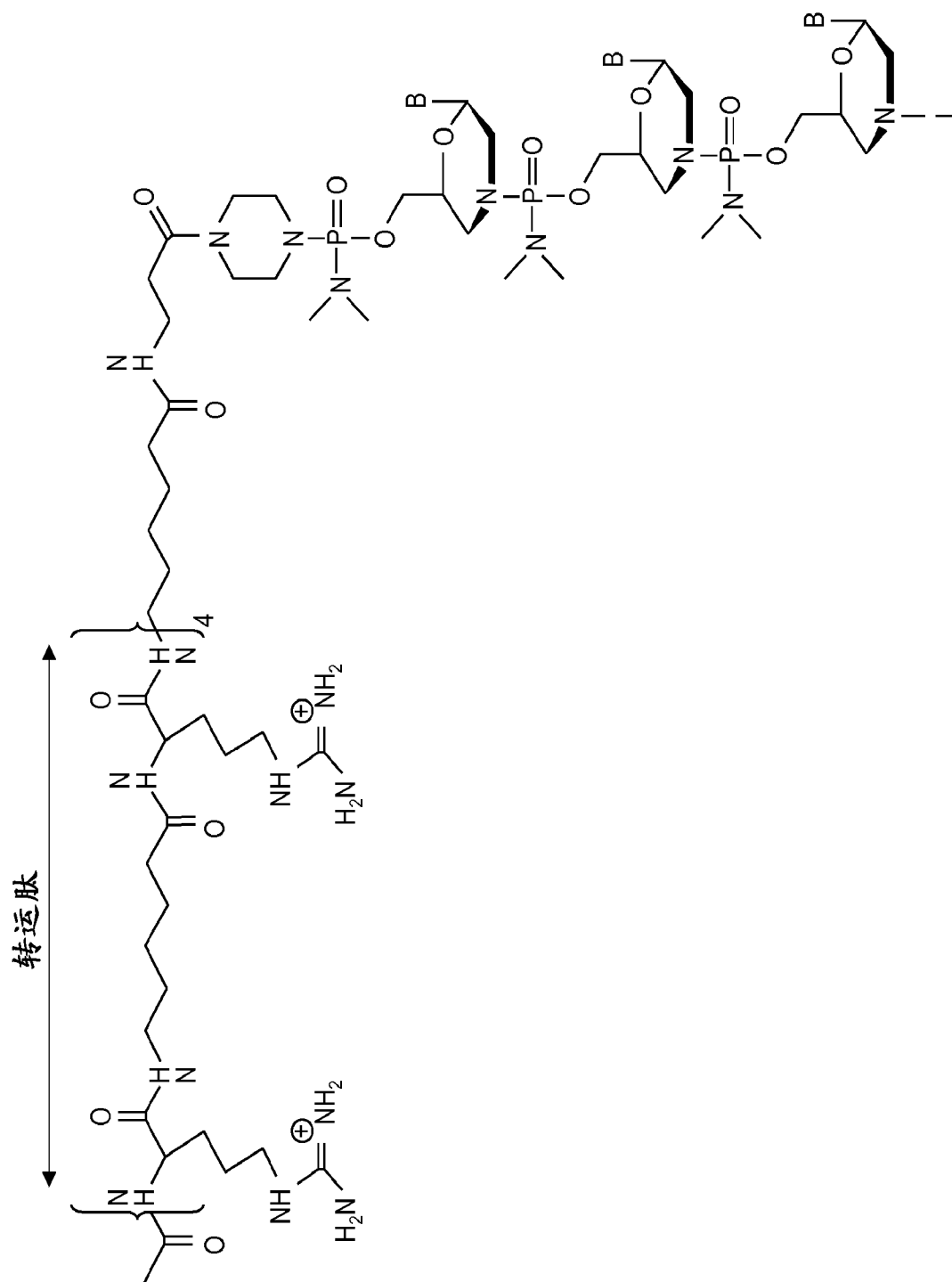


图 1B

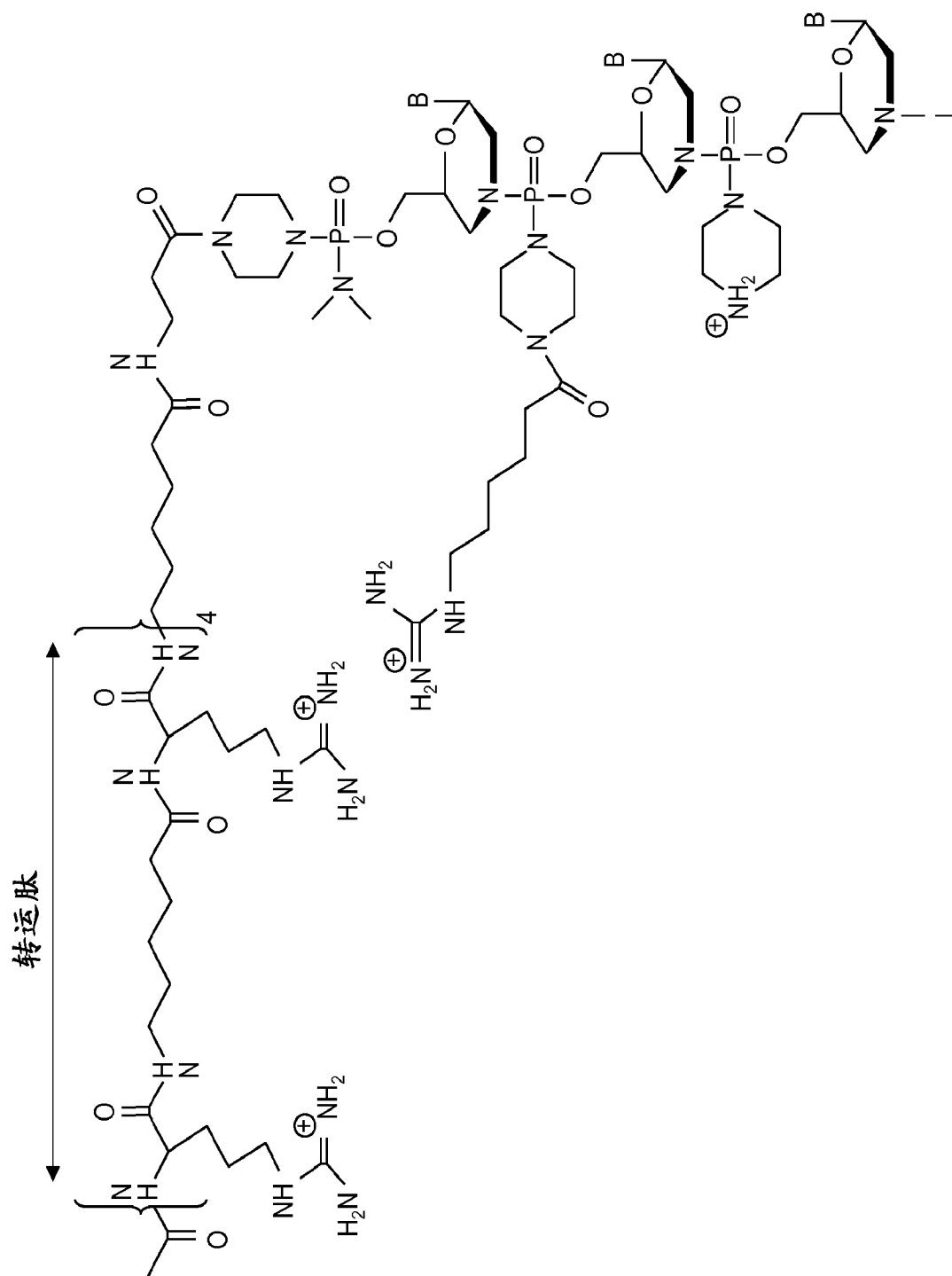


图 1C

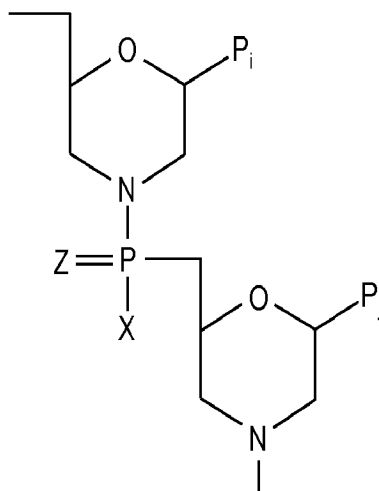


图 1D

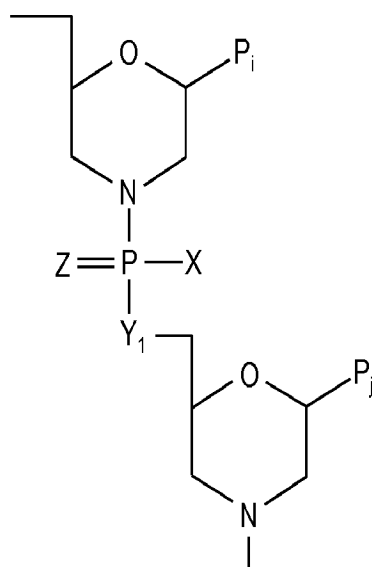


图 1E

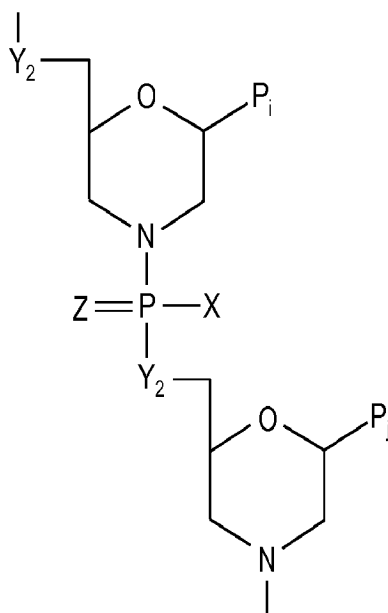


图 1F

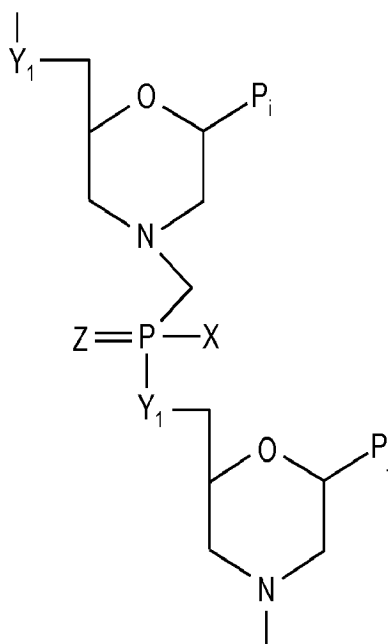


图 1G

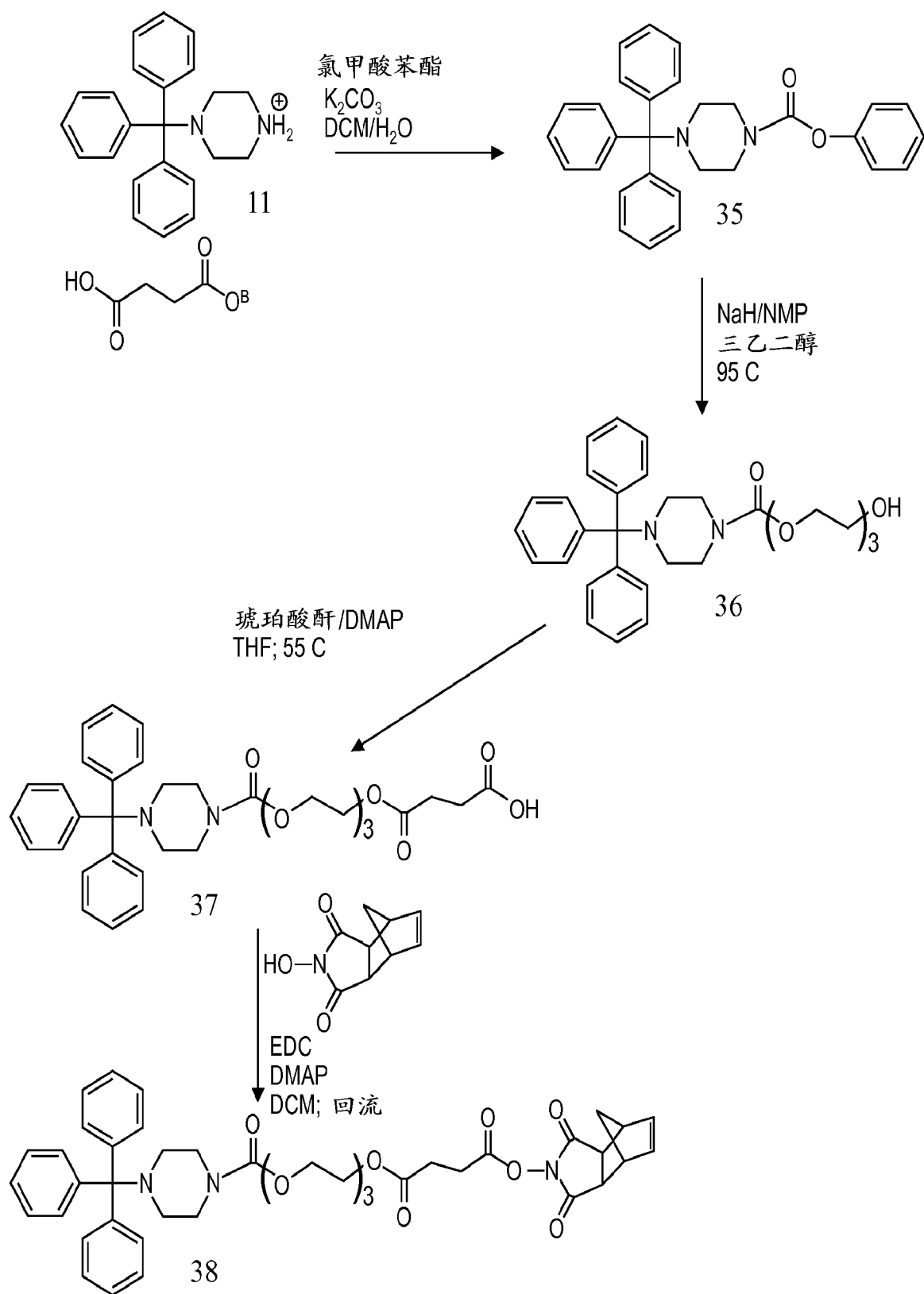


图 2A

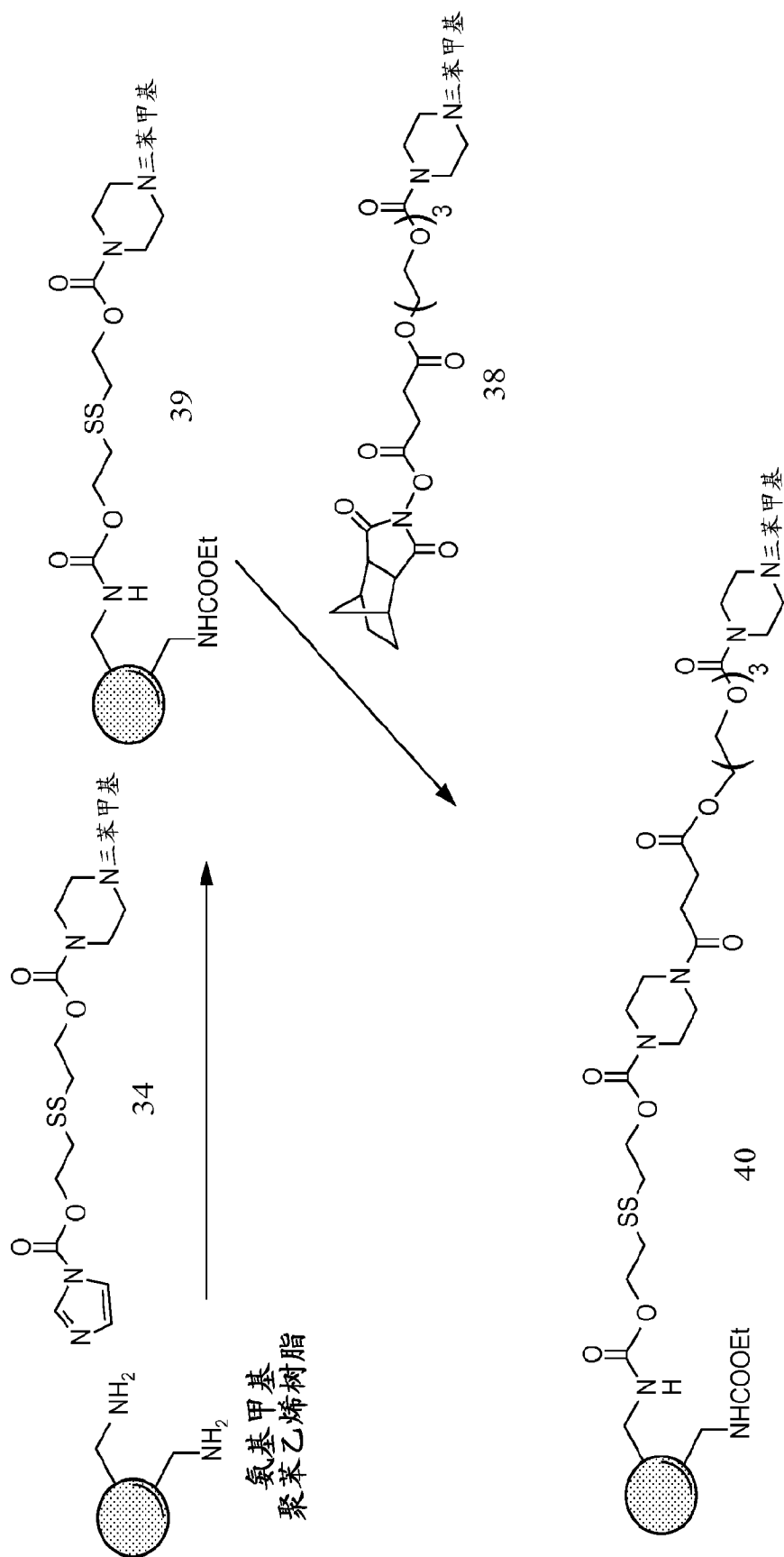


图 2B

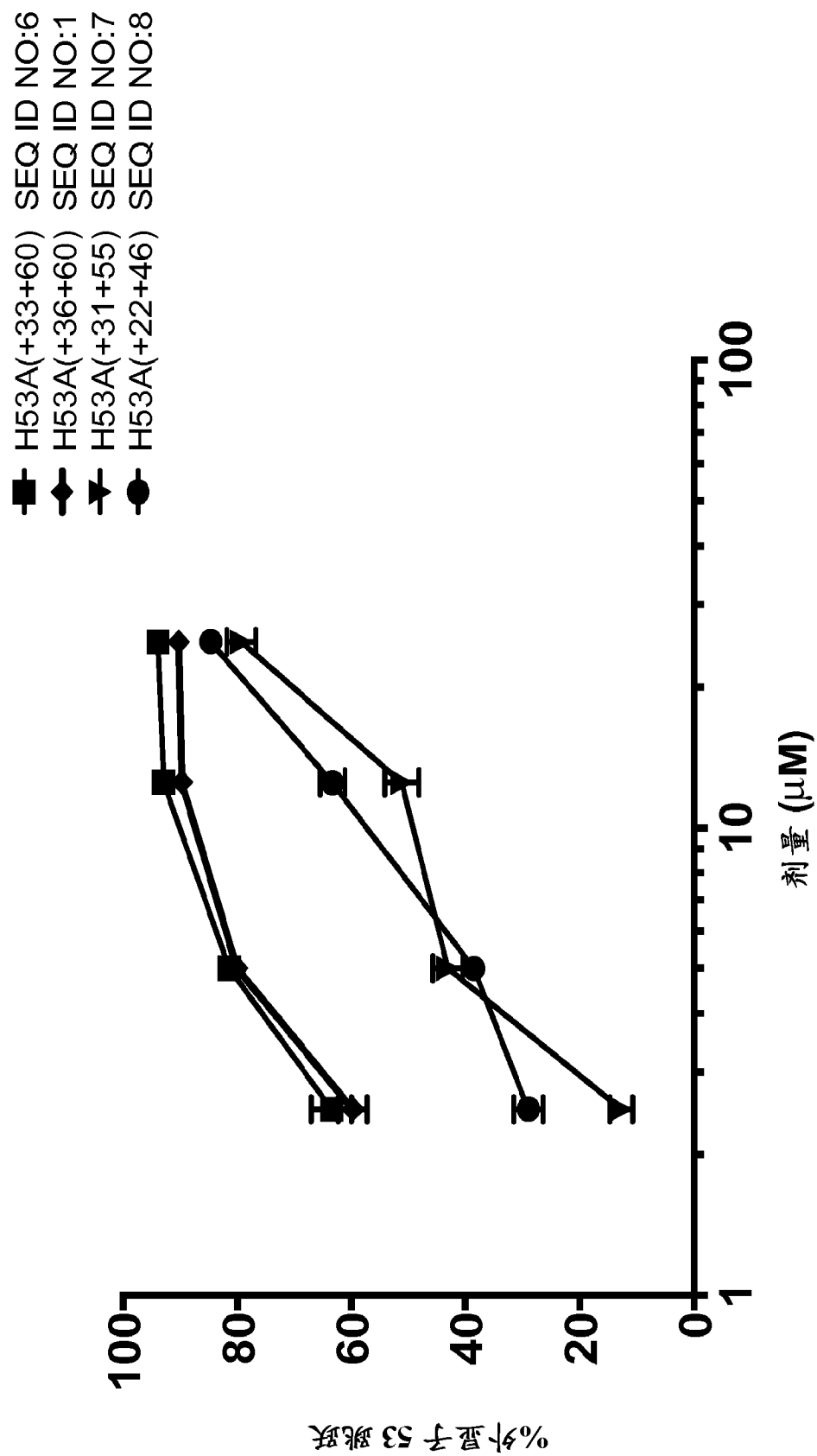


图 3

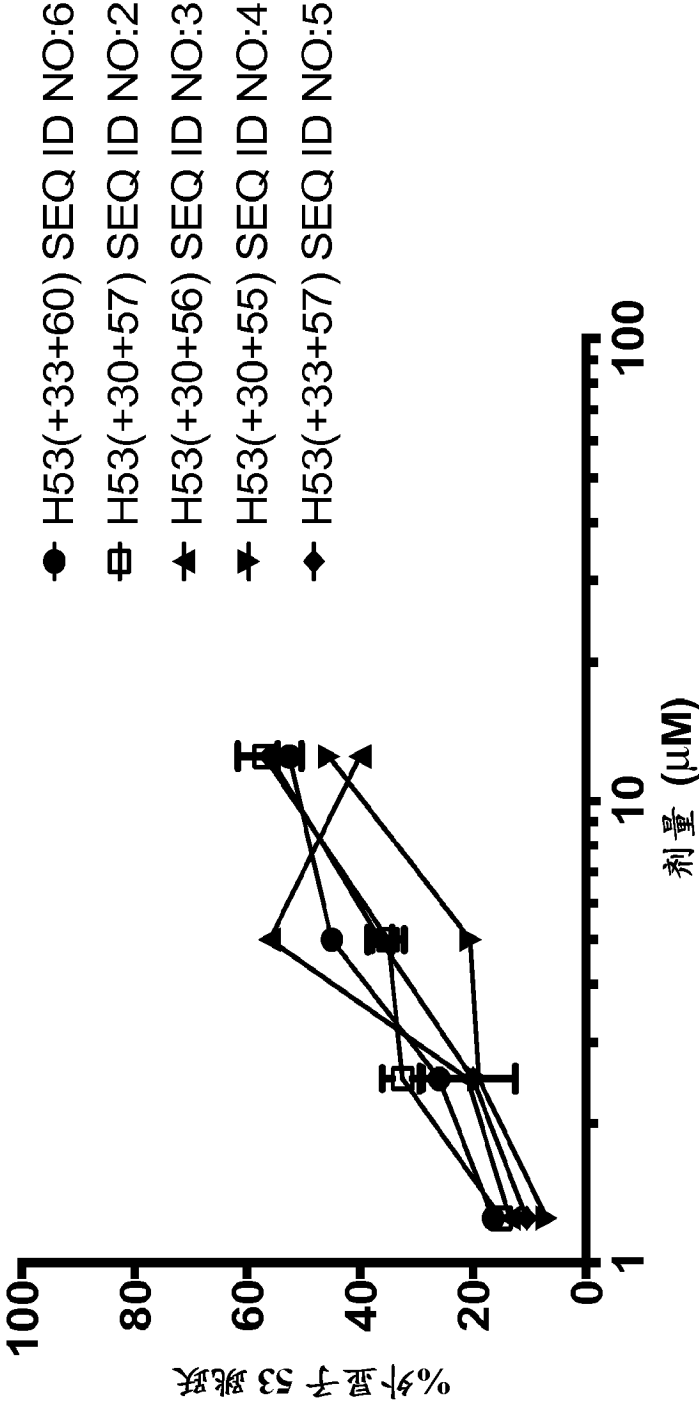


图 4

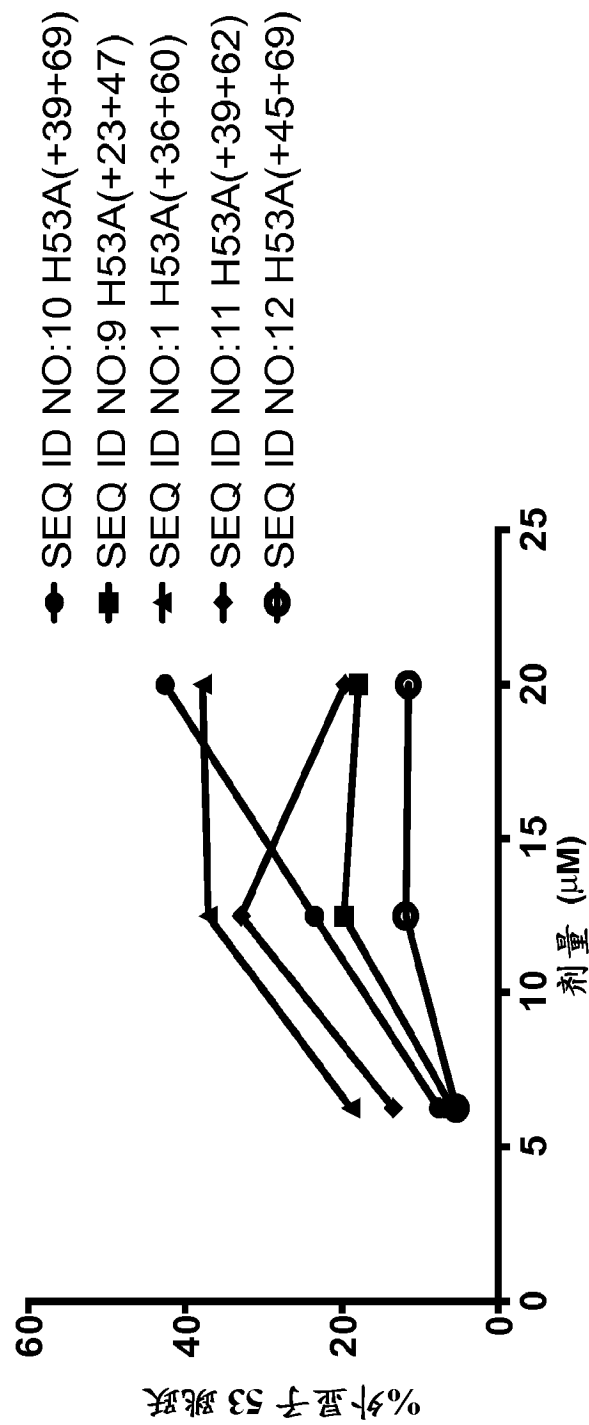


图 5A

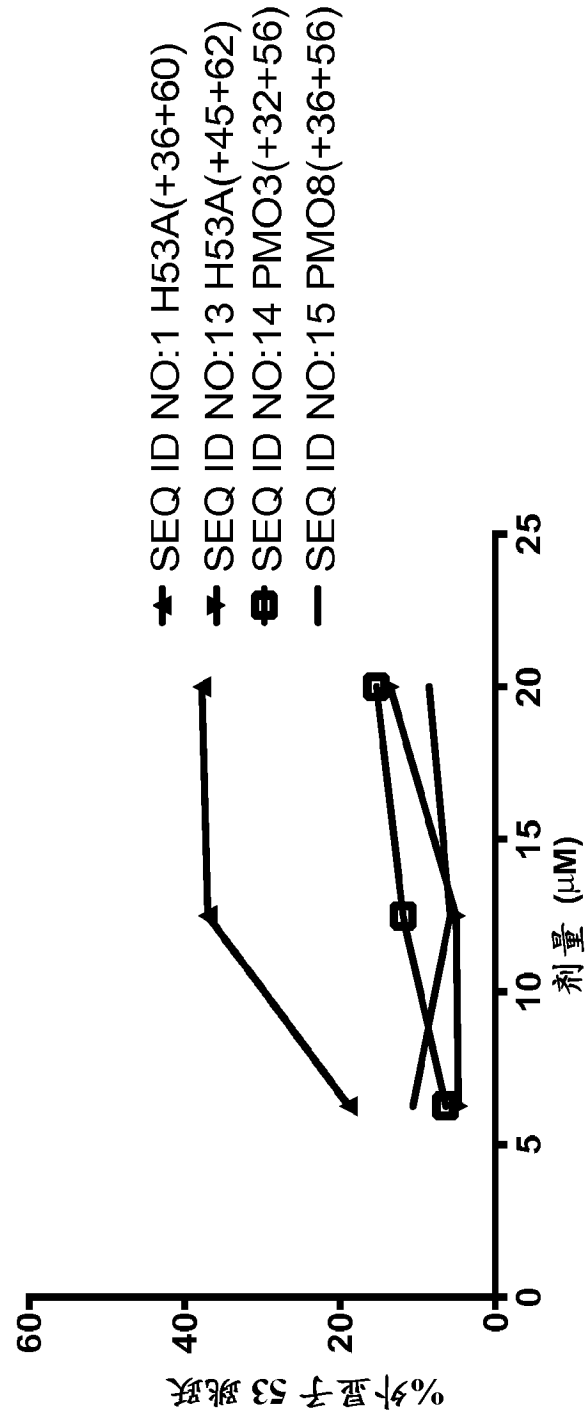


图 5B