



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113412330 A

(43) 申请公布日 2021.09.17

(21) 申请号 201980081396.8

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2019.12.11

代理人 罗文锋 初明明

(30) 优先权数据

62/779028 2018.12.13 US

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.06.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/065581 2019.12.11

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/123574 EN 2020.06.18

(71) 申请人 萨勒普塔医疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 F·J·施内尔 蔡宝忠 A·德赛

R·K·贝斯特威克

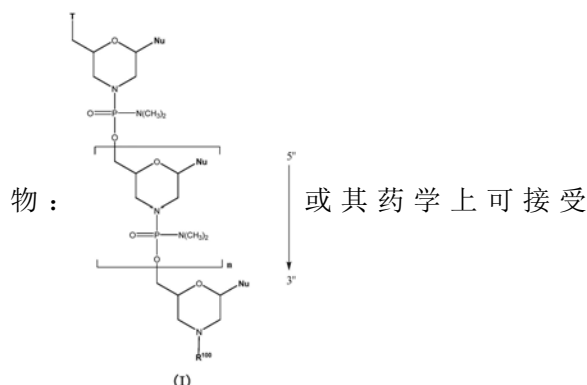
权利要求书7页 说明书81页
序列表15页

(54) 发明名称

用于肌营养不良的外显子跳跃寡聚物缀合物

(57) 摘要

描述了与人类肌营养不良蛋白基因中的选定的靶点互补以诱导外显子50跳跃的反义寡聚物。在各个方面,描述了根据式(I)的反义寡聚



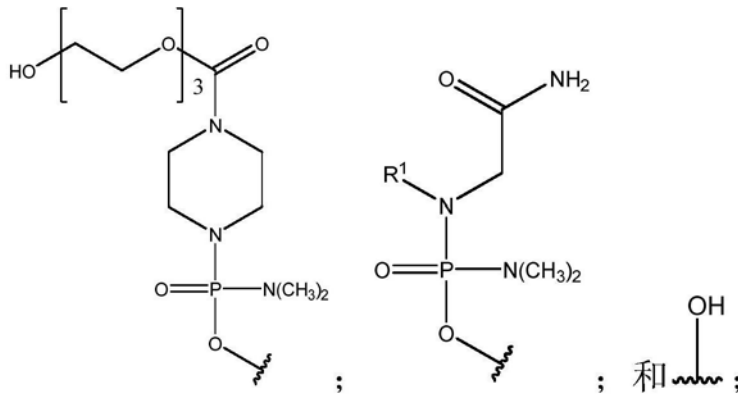
的盐,其中T、Nu、n和R¹⁰⁰在本文中定义。

1. 一种反义寡聚物或其药学上可接受的盐,其能够结合选定的靶标以诱导人类肌营养不良蛋白基因中的外显子跳跃,其中所述反义寡聚物包含与指定为退火位点的肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子50靶区互补的碱基序列,其中所述碱基序列和退火位点选自:

退火位点	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO:1
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO:3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO:5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO:7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO:8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:9

其中SEQ ID NO:1-9中的每一个的T为胸腺嘧啶或尿嘧啶。

2. 如权利要求1所述的反义寡聚物,或其药学上可接受的盐,其中所述反义寡聚物含有附接至所述反义寡聚物的5'端的T部分,其中所述T部分选自:



并且其中所述反义寡聚物任选地连接至细胞穿透肽;

并且其中所述反义寡聚物诱导所述人类肌营养不良蛋白基因中的外显子跳跃。

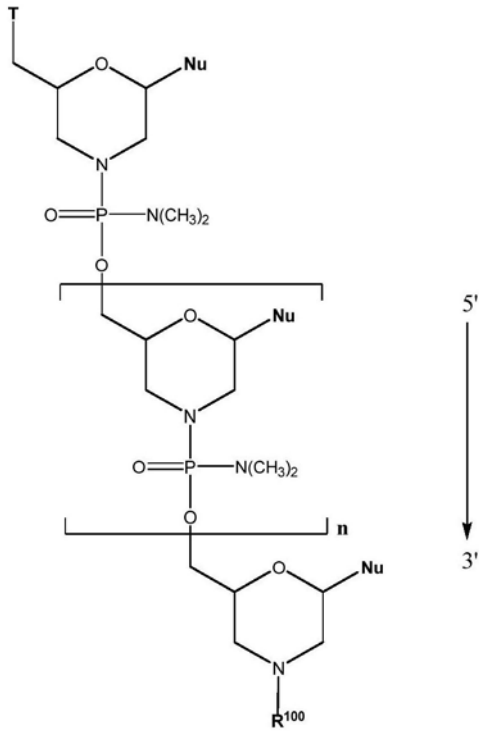
3. 如权利要求1至2中任一项所述的反义寡聚物,其中细胞穿透肽附接至所述反义寡聚物的3'端。

4. 如权利要求3所述的反义寡聚物,其中所述细胞穿透肽是富含精氨酸的肽。

5. 如权利要求4所述的反义寡聚物,其中所述富含精氨酸的肽选自由以下组成的组:-
 $(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO:15)、 $R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO:16)、 $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO:17)、 $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO:18)、 $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO:19)、 $-GLY-R_5-R^a$ (SEQ ID NO:20)、 $-R_5-R^a$ (SEQ ID NO:21)、 $-GLY-R_6-R^a$ (SEQ ID NO:11)和 $-R_6-R^a$ (SEQ ID NO:10),其中 R^a 选自H、酰基、苯甲酰基和硬脂酰基,并且其中R是精氨酸,X是6-氨基己酸,B是β-丙氨酸,F是苯丙氨酸并且GLY(或G)是甘氨酸。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的反义寡聚物,其中所述反义寡聚物的核碱基连接至吗啉代环结构。

7. 一种根据式(I)的反义寡聚物:

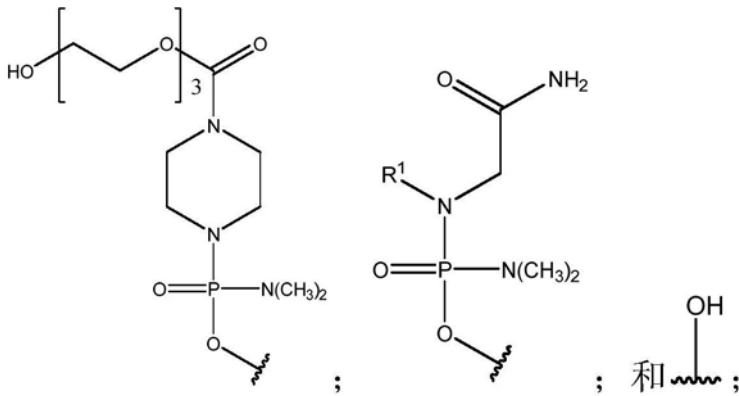


(I)

或其药学上可接受的盐,其中:

每个Nu是核碱基,其合在一起形成靶向序列;

T是选自以下的部分:



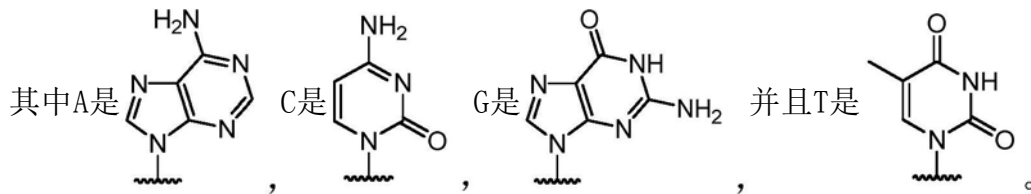
并且T部分的远端-OH或-NH₂任选

地连接至细胞穿透肽;

R¹⁰⁰ 是氢或细胞穿透肽;

每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:

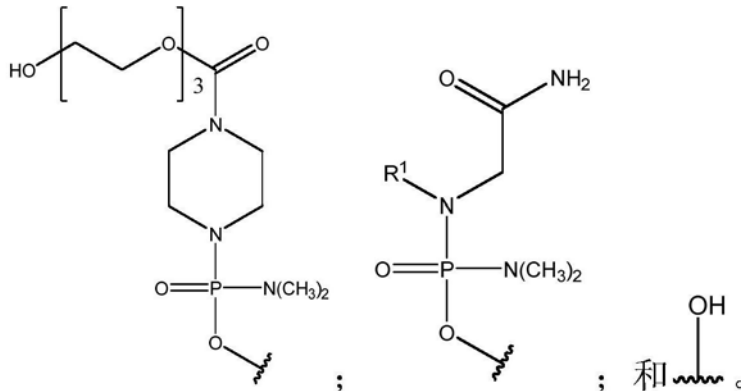
退火位点	靶向序列[5'至 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



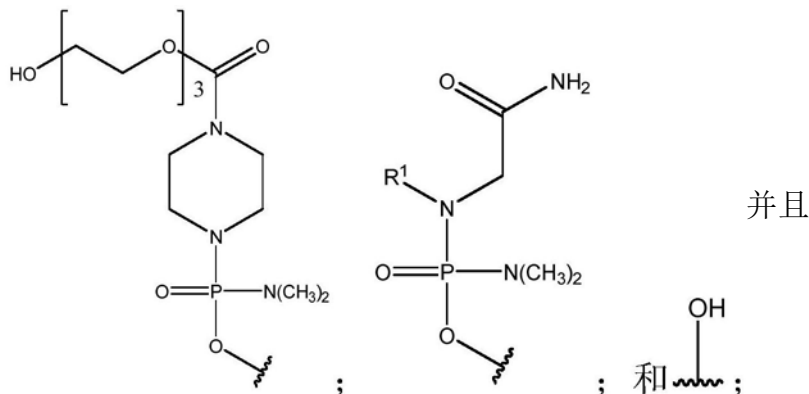
8. 如权利要求7所述的反义寡聚物, 其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO:3。

9. 如权利要求7或8所述的反义寡聚物, 其中所述反义寡聚物含有一个细胞穿透肽。

10. 如权利要求7至9中任一项所述的反义寡聚物, 其中T是选自以下的部分:

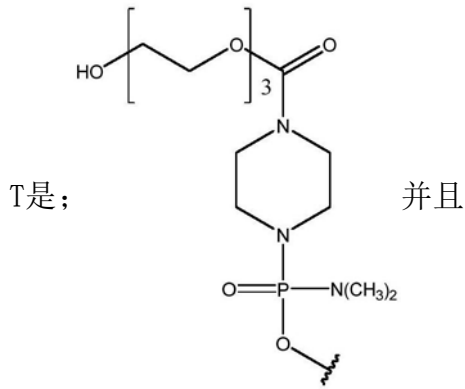


11. 如权利要求7至10中任一项所述的反义寡聚物, 其中T是选自以下的部分:



R¹⁰⁰ 是细胞穿透肽。

12. 如权利要求11所述的反义寡聚物, 其中:



R^{100} 是细胞穿透肽。

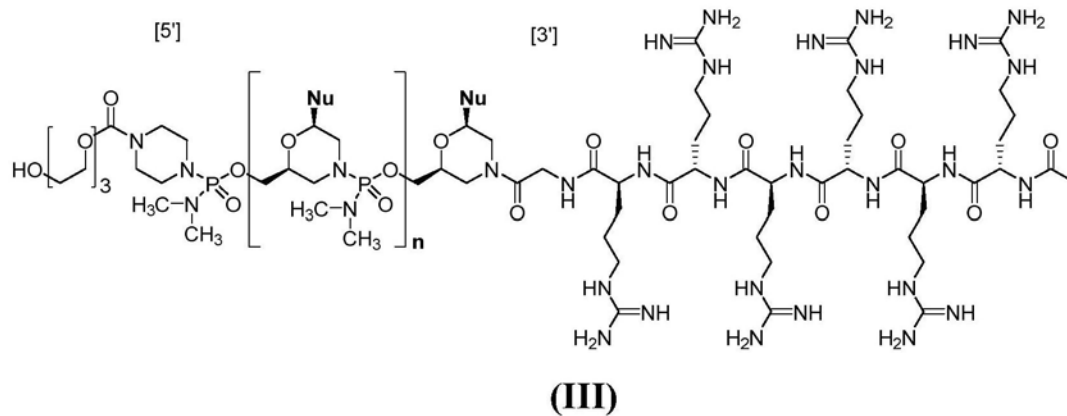
13. 如权利要求7至12中任一项所述的反义寡聚物,其中所述细胞穿透肽是富含精氨酸的肽。

14. 如权利要求13所述的反义寡聚物,其中所述富含精氨酸的肽选自由以下组成的组:- $(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO:15)、 $R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO:16)、 $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO:17)、 $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO:18)、 $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO:19)、 $-GLY-R_5-R^a$ (SEQ ID NO:20)、 $-R_5-R^a$ (SEQ ID NO:21)、 $-GLY-R_6-R^a$ (SEQ ID NO:11)和 $-R_6-R^a$ (SEQ ID NO:10),其中 R^a 选自H、酰基、苯甲酰基和硬脂酰基,并且其中R是精氨酸,X是6-氨基己酸,B是 β -丙氨酸,F是苯丙氨酸并且GLY(或G)是甘氨酸。

15. 如权利要求7至14中任一项所述的反义寡聚物,其中所述反义寡聚物呈游离碱形式。

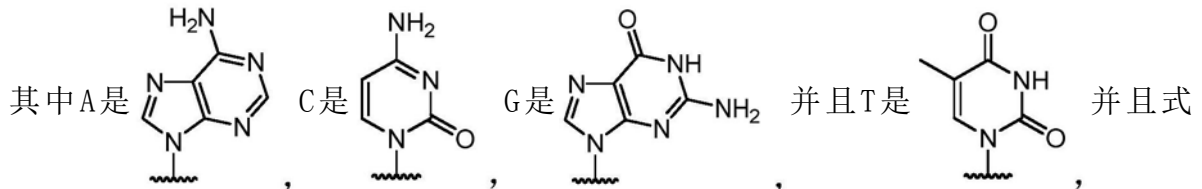
16. 如权利要求7至14中任一项所述的反义寡聚物,其中所述反义寡聚物是其药学上可接受的盐。

17. 一种根据式(III)的反义寡聚物:



或其药学上可接受的盐,其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:

退火位点	靶向序列[5'至 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



(III)的远端-OH连接至细胞穿透肽。

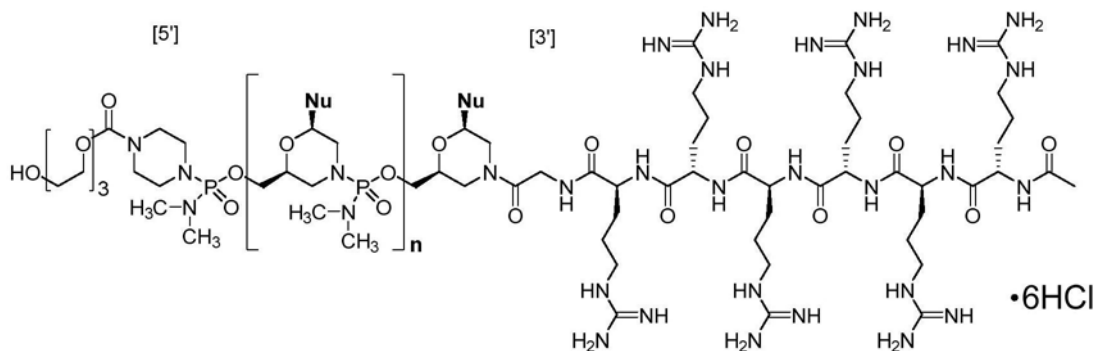
18. 如权利要求17所述的反义寡聚物,其中式(III)的每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO:3。

19. 如权利要求17至18中任一项所述的反义寡聚物,其中所述反义寡聚物呈游离碱形式。

20. 如权利要求17至18中任一项所述的反义寡聚物,其中所述反义寡聚物是其药学上可接受的盐。

21. 如权利要求20所述的反义寡聚物,其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO:3。

22. 一种根据式(IV)的反义寡聚物:



(IV)

其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:

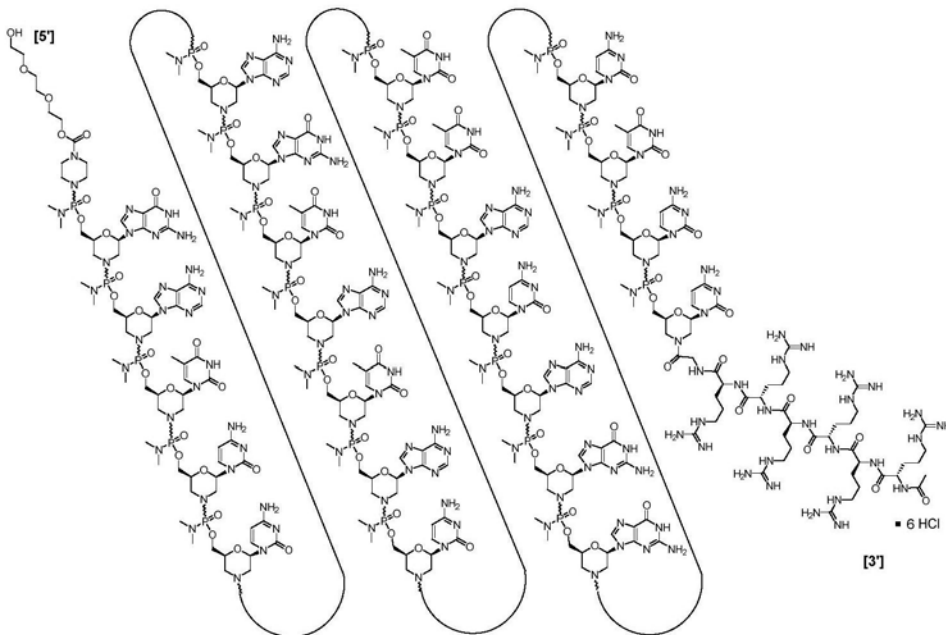
退火位点	靶向序列[5'至 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



(IV) 的远端-OH连接至细胞穿透肽。

23. 如权利要求22所述的反义寡聚物,其中式(IV)的每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO:3。

24. 如权利要求22所述的反义寡聚物,其中所述反义寡聚物是根据式(IVa)的结构



(IVa)。

25. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至24中任一项所述的反义寡聚物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载剂。

26. 一种用于治疗受试者的杜氏肌营养不良 (DMD) 的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求1至24中任一项所述的反义寡聚物或如权利要求25所述的药物组合物。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述受试者具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变。

28. 一种恢复mRNA阅读框以诱导受试者中的肌营养不良蛋白产生的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求1至24中任一项所述的反义寡聚物或如权利要求25所述的药物组合物。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述受试者具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变。

用于肌营养不良的外显子跳跃寡聚物缀合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2018年12月13日提交的美国临时申请第62/779,028号的优先权。上述申请的全部教导内容以全文引用的方式并入。

[0003] 通过EFS-WEB以电子方式提交的序列表的引用

[0004] 与此同时提交的电子提交序列表的内容(名称:8171_50_W000_SL.txt;大小:10,080字节;创建日期:2019年11月6日)以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0005] 本公开涉及适用于人类肌营养不良蛋白基因中外显子50跳跃的新型反义寡聚物和其药物组合物。本公开还提供了使用新型反义寡聚物诱导外显子50跳跃的方法,在具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变的受试者中产生肌营养不良蛋白的方法,以及治疗具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变的受试者的方法。

背景技术

[0006] 杜氏肌营养不良(DMD)是由蛋白质肌营养不良蛋白的表达的缺陷引起的。编码所述蛋白的基因含有79个分布在超过200万个DNA核苷酸上的外显子。任何改变外显子阅读框、或引入终止密码子、或特征在于去除整个框外一个或多个外显子或一个或多个外显子重复的外显子突变都可能破坏功能性肌营养不良蛋白的产生,从而导致DMD。

[0007] 已发现一种不太严重的肌营养不良形式,即贝克尔肌营养不良(BMD),其中突变(通常是一个或多个外显子的缺失)导致沿整个肌营养不良蛋白转录物的正确阅读框,从而使mRNA翻译成蛋白质的过程不会过早终止。如果在处理突变的肌营养不良蛋白前体mRNA时,上游和下游外显子的接合保持了基因的正确阅读框,其结果是编码蛋白质的mRNA具有短的内部缺失,但保留了一些活性,从而产生了贝克尔表型。

[0008] 需要适合于外显子50跳跃的反义寡聚物和相应的药物组合物,所述药物组合物对产生肌营养不良蛋白和治疗DMD的治疗方法是有益的。

发明内容

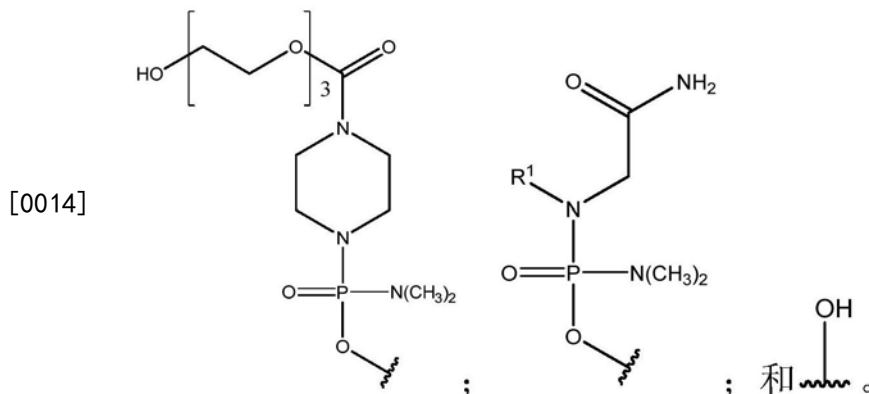
[0009] 反义寡聚物或其药学上可接受的盐能够结合选定的靶标以诱导人类肌营养不良蛋白基因中的外显子跳跃,其中所述反义寡聚物包含与指定为退火位点的肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子50靶区互补的碱基序列,其中所述碱基序列和退火位点选自:

退火位点	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
[0010] H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

[0011] 其中T是胸腺嘧啶或尿嘧啶。在一个方面,每个T是胸腺嘧啶。

[0012] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9。在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO:3的核碱基。

[0013] 在一个方面,反义寡聚物含有衔接至反义寡聚物的5'端的T部分,其中T部分选自:



[0015] 在某些实施方案中,反义寡聚物与一种或多种细胞穿透肽(本文称为“CPP”)缀合。在某些实施方案中,一个或多个CPP衔接至反义寡聚物的末端。在某些实施方案中,至少一个CPP衔接至反义寡聚物的5'末端。在某些实施方案中,至少一个CPP衔接至反义寡聚物的3'末端。在某些实施方案中,第一CPP衔接至反义寡聚物的5'末端,并且第二CPP衔接至反义寡聚物的3'末端。

[0016] 在一些实施方案中, CPP是富含精氨酸的肽。术语“富含精氨酸”是指具有至少2个,优选地2、3、4、5、6、7或8个精氨酸残基的CPP,每个精氨酸残基任选地被一个或多个不带电的疏水性残基分开,并且任选地含有约6至14个氨基酸残基。如下文所解释, CPP优选地在其羧基末端处通过也可以是一个或多个氨基酸的接头连接至反义寡核苷酸的3'和/或5'端,并且优选还在其氨基末端处被取代基R^a封端,其中R^a选自H、酰基、乙酰基、苯甲酰基或硬脂酰基。在一些实施方案中, R^a是乙酰基。

[0017] 如下表中所示,本文使用的CPP的非限制性实例包括- (RXR)₄-R^a (SEQ ID NO:15)、-R- (FFR)₃-R^a (SEQ ID NO:16)、-B-X- (RXR)₄-R^a (SEQ ID NO:17)、-B-X-R- (FFR)₃-R^a (SEQ ID NO:18)、-GLY-R- (FFR)₃-R^a (SEQ ID NO:19)、-GLY-R₅-R^a (SEQ ID NO:20)、-R₅-R^a (SEQ ID NO:21)、-GLY-R₆-R^a (SEQ ID NO:11)和-R₆-R^a (SEQ ID NO:10),其中R^a选自H、酰基、乙酰基、苯甲酰基和硬脂酰基,并且其中R是精氨酸,X是6-氨基己酸,B是β-丙氨酸,F是苯丙氨酸,并且GLY(或G)是甘氨酸。CPP“R₅(SEQ ID NO:21)”意在表示五(5)个精氨酸残基通过酰胺键连接在一起的肽(而不是单个取代基,例如,R⁵(SEQ ID NO:21))。CPP“R₆(SEQ ID NO:10)”意在表示六(6)个精氨酸残基通过酰胺键连接在一起的肽(而不是单个取代基,例如,R⁶(SEQ ID NO:10))。在一些实施方案中,R^a是乙酰基。

[0018] 表1中提供了示例性CPP (SEQ ID NO:10、11和15-21)。

名称	序列	SEQ ID NO:
R ₆ G	RRRRRRG	11
R ₆	RRRRRR	10
(RXR) ₄	RXRRXRRXRRXR	15
(RFF) ₃ R	RFFRFFRFFR	16
(RXR) ₄ XB	RXRRXRRXRRXRXB	17
(RFF) ₃ RXB	RFFRFFRFFRXB	18
(RFF) ₃ RG	RFFRFFRFFRG	19
R ₅ G	RRRRRG	20
R ₅	RRRRR	21

R 是精氨酸; X 是 6-氨基己酸; B 是 β-丙氨酸; F 是苯丙氨酸; G 是甘氨酸

[0020] CPP、其合成和与寡聚物缀合的方法进一步描述于美国申请公开号US 2012/0289457和国际专利申请公开号WO 2004/097017、WO 2009/005793和WO 2012/150960,其公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0021] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸包含取代基“Z”,其定义为CPP和接头的组合。接头将CPP在其羧基末端处桥接至寡核苷酸的3'端和/或5'端。在各种实施方案中,反义寡核苷酸可仅包含连接至寡聚物的3'端的一个CPP。在其他实施方案中,反义寡核苷酸可仅包含连接至寡聚物的5'端的一个CPP。

[0022] Z内的接头可包含例如1、2、3、4或5个氨基酸。

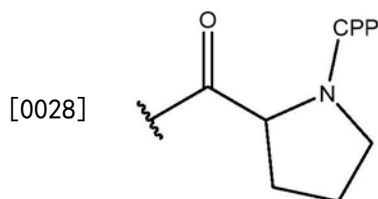
[0023] 在特定实施方案中,Z选自:

[0024] -C(O)(CH₂)₅NH-CPP;

[0025] -C(O)(CH₂)₂NH-CPP;

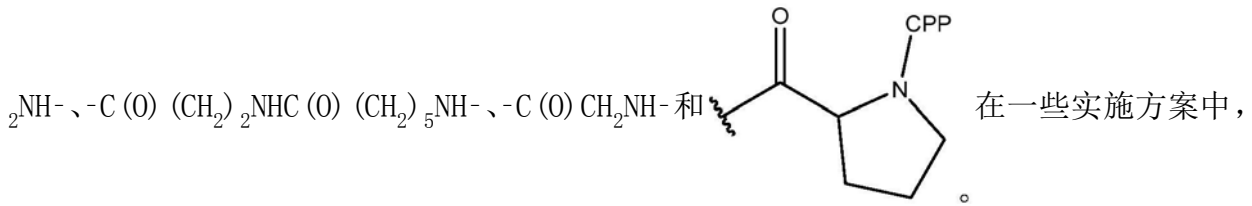
[0026] -C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP;

[0027] -C(O)CH₂NH-CPP; 和式:



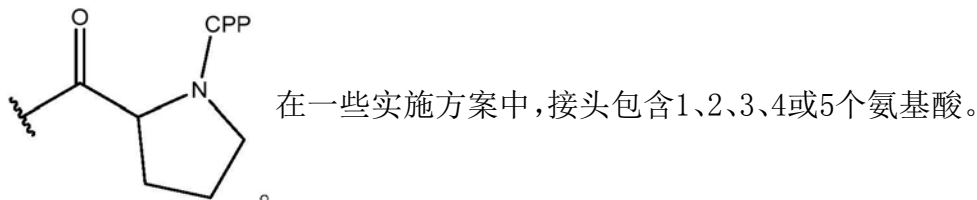
[0029] 其中CPP通过在CPP羧基末端处的酰胺键附接至接头部分。

[0030] 在各种实施方案中, CPP是如本文所描述并且在表1中所见的富含精氨酸的肽。在各种实施方案中, 富含精氨酸的CPP是 $-R_5-R^a$ (即五个精氨酸残基; SEQ ID NO:21), 其中 R^a 选自H、酰基、乙酰基、苯甲酰基和硬脂酰基。在某些实施方案中, R^a 是乙酰基。在各种实施方案中, CPP是SEQ ID NO:21, 并且接头选自由以下组成的组: $-C(O)(CH_2)_5NH-$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$ 、 $-C(O)CH_2NH-$ 和



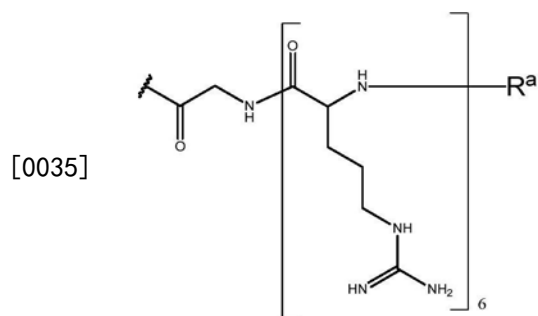
[0031] 在一些实施方案中, CPP是SEQ ID NO:21并且接头是Gly。在一些实施方案中, CPP是SEQ ID NO:20。

[0032] 在某些实施方案中, 富含精氨酸的CPP是 $-R_6-R^a$ (即, 六个精氨酸残基; SEQ ID NO:10), 其中 R^a 选自H、酰基、乙酰基、苯甲酰基和硬脂酰基。在某些实施方案中, R^a 是乙酰基。在各种实施方案中, CPP选自SEQ ID NO:10、15或16, 并且接头选自由以下组成的组: $-C(O)(CH_2)_5NH-$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$ 、 $-C(O)CH_2NH-$ 和



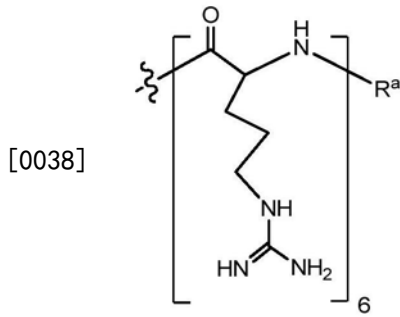
[0033] 在一些实施方案中, CPP是SEQ ID NO:10并且接头是Gly。在一些实施方案中, CPP是SEQ ID NO:11。

[0034] 在某些实施方案中, Z是在寡聚物的5'和/或3'端共价键结至本公开的反义寡聚物的 $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ (" R_6 "公开为SEQ ID NO:10), 其中 R^a 是H、酰基、乙酰基、苯甲酰基或硬脂酰基, 以封端 R_6 (SEQ ID NO:10)的氨基末端。在某些实施方案中, R^a 是乙酰基。在这些非限制性实例中, CPP是 $-R_6-R^a$ (SEQ ID NO:10), 并且接头是 $-C(O)CH_2NH-$ (即GLY)。Z= $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ (" R_6 "公开为SEQ ID NO:10)的特定实例也由以下结构例示:



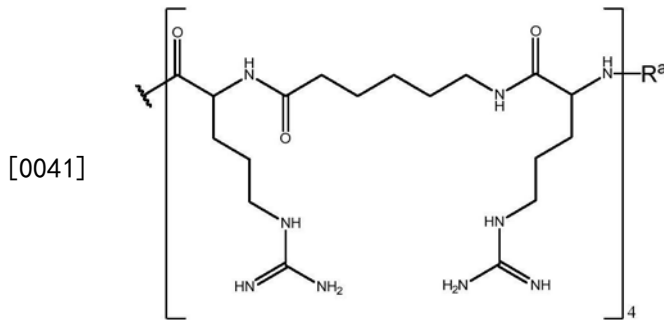
[0036] 其中 R^a 选自H、酰基、乙酰基、苯甲酰基和硬脂酰基。在一些实施方案中, R^a 是乙酰基。

[0037] 在各种实施方案中, CPP是 $-R_6-R^a$ (SEQ ID NO:10), 也例示为下式:

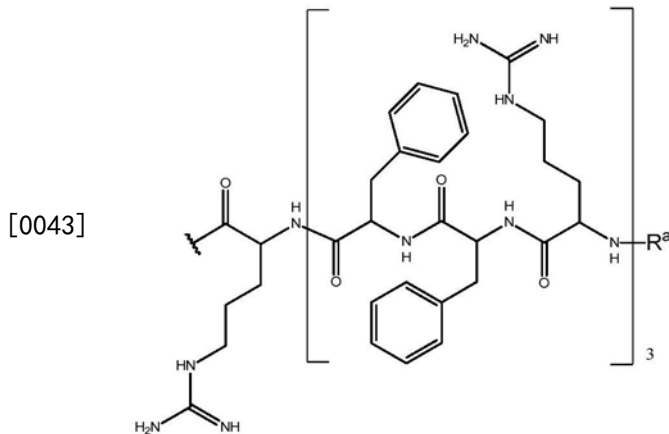


[0039] 其中R^a选自H、酰基、乙酰基、苯甲酰基和硬脂酰基。在某些实施方案中, CPP是SEQ ID NO:11。在一些实施方案中, R^a是乙酰基。

[0040] 在一些实施方案中, CPP是-(RXR)₄-R^a (SEQ ID NO:15), 也例示为下式:



[0042] 在各种实施方案中, CPP是-R-(FFR)₃-R^a (SEQ ID NO:16), 也例示为下式:



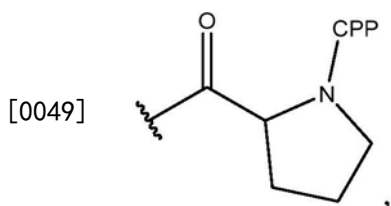
[0044] 在各种实施方案中, Z选自:

[0045] -C(O)(CH₂)₅NH-CPP;

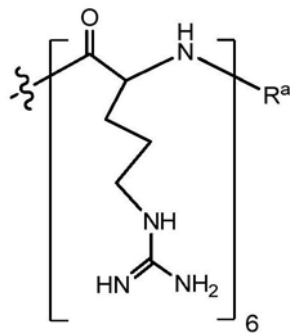
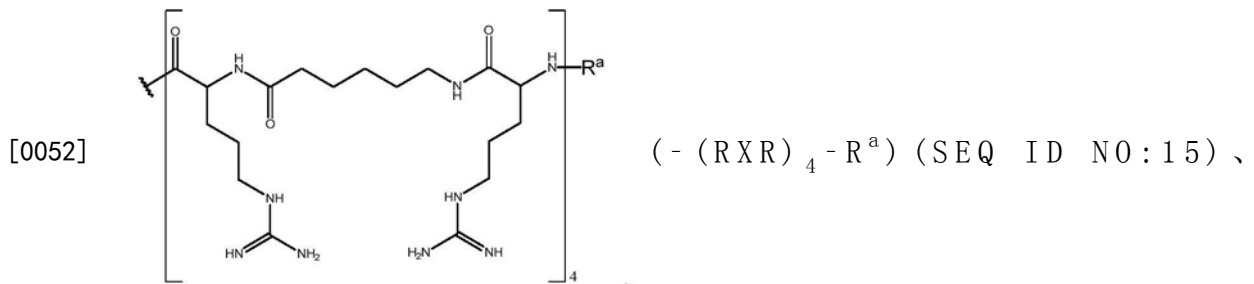
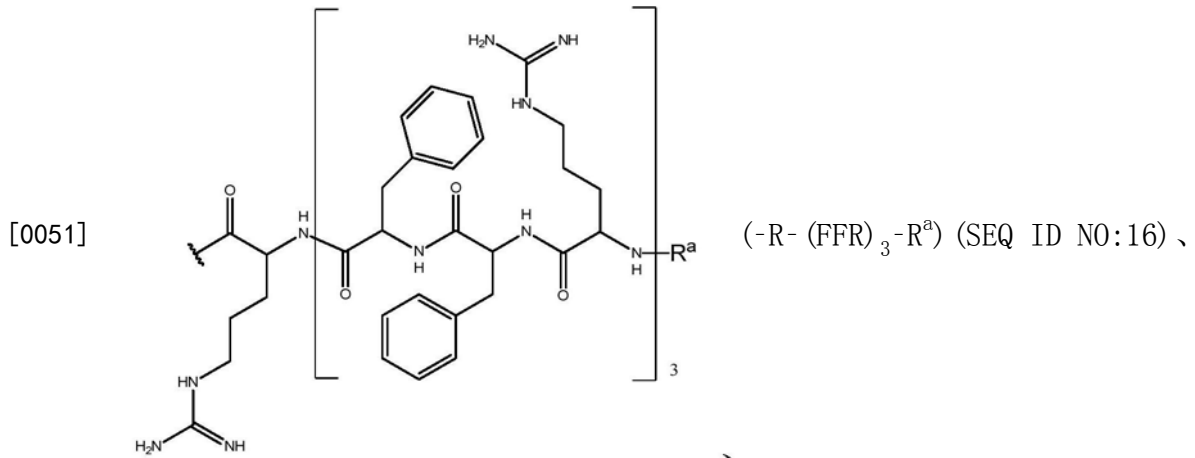
[0046] -C(O)(CH₂)₂NH-CPP;

[0047] -C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP;

[0048] -C(O)CH₂NH-CPP, 和式:



[0050] 其中CPP通过在CPP羧基末端处的酰胺键附接至接头部分, 并且其中CPP选自:



和 $(-R_6-R^a)$ (SEQ ID NO:10)。在一些实施方案中, R^a 是乙酰基。

[0053] 在一些实施方案中, 每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

[0054] 在一些方面, 经修饰的反义寡聚物的核碱基连接至吗啉代环结构, 其中吗啉代环结构通过含磷的亚基间键接合, 所述亚基间键将一个环结构的吗啉代氮接合至相邻环结构的5'外环碳。

[0055] 在一些方面, 反义寡聚物的碱基连接至肽核酸(PNA), 其中磷酸-糖多核苷酸主链被与核碱基连接的柔性伪肽聚合物替换。

[0056] 在一些方面, 反义寡聚物的碱基中的至少一个连接至锁核酸(LNA), 其中锁核酸结构是经化学修饰的核苷酸类似物, 其中核糖部分具有连接2'氧和4'碳的额外桥键。

[0057] 在一些方面, 反义寡聚物的碱基中的至少一个连接至桥接核酸(BNA), 其中通过向呋喃糖骨架引入额外的桥接结构来限制或锁定糖构象。在一些方面, 反义寡聚物的碱基中的至少一个连接至2'-O,4'-C-乙烯桥接核酸(ENA)。

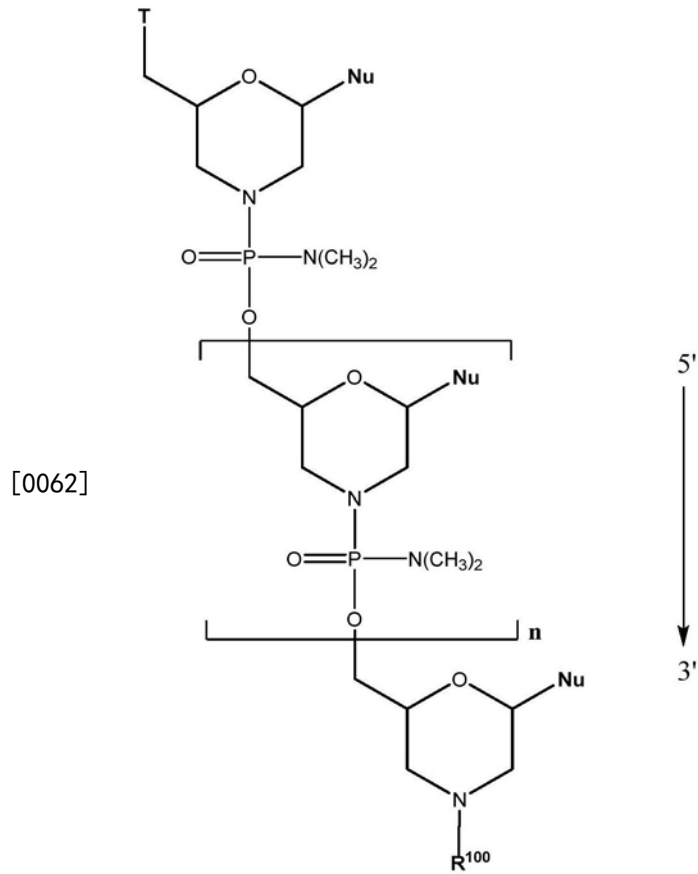
[0058] 在一些方面, 经修饰的反义寡聚物可含有解锁核酸(UNA)亚基。UNA和UNA寡聚物是RNA的类似物, 其中亚基的C2'-C3'键已被裂解。

[0059] 在一些方面, 经修饰的反义寡聚物含有一个或多个硫代磷酸酯(或S-寡核苷酸), 其中一个非桥接氧被硫替换。在一些方面, 经修饰的反义寡聚物含有一个或多个2'-O-甲基、

2'-O-MOE、MCE和2'-F,其中核糖的2'-OH分别被甲基、甲氧基乙基、2-(N-甲基氨甲酰基)乙基或氟基取代。

[0060] 在一些方面,经修饰的反义寡聚物是三环DNA(tc-DNA),其是一种受约束的DNA类似物,其中每个核苷酸通过引入环丙烷环进行修饰,以限制主链的构象灵活性,并且优化扭转角 γ 的主链几何结构。

[0061] 在各个方面,本公开提供了根据式(I)的反义寡聚物:

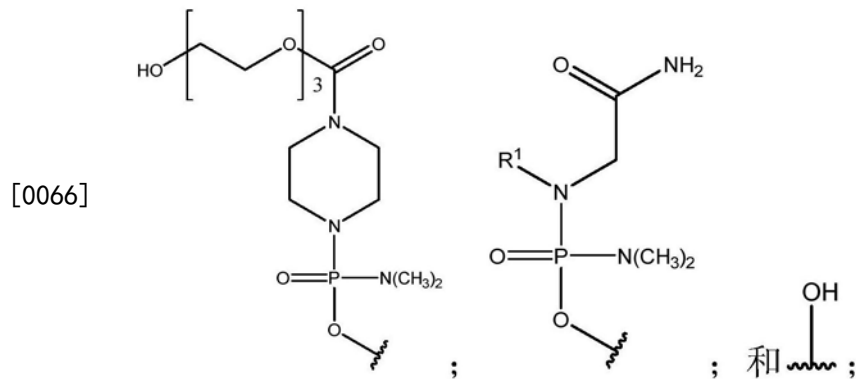


(I)

[0063] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0064] 每个Nu是核碱基,其合在一起形成靶向序列;

[0065] T是选自以下的部分:



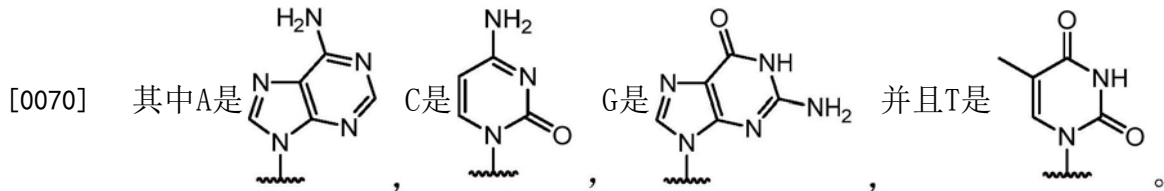
并且T部分的远端-OH或-NH₂

任选地连接至细胞穿透肽。

[0067] R¹⁰⁰是氢或细胞穿透肽；

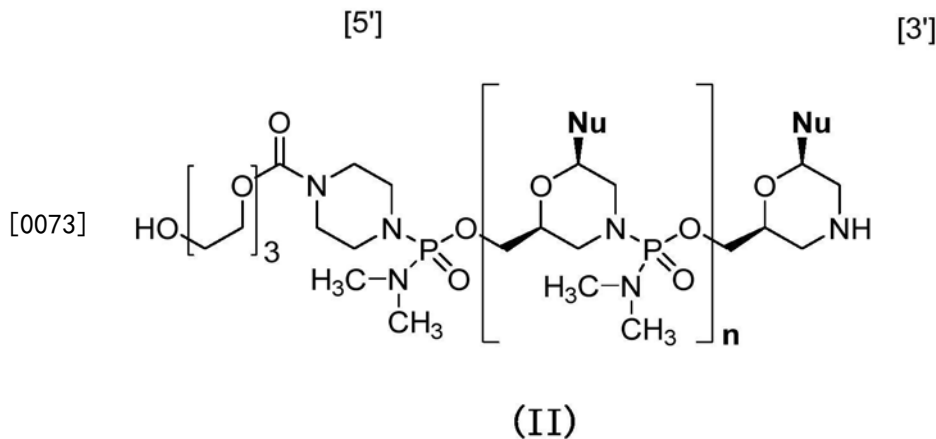
[0068] 每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基：

退火位点	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
[0069] H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



[0071] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9。在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

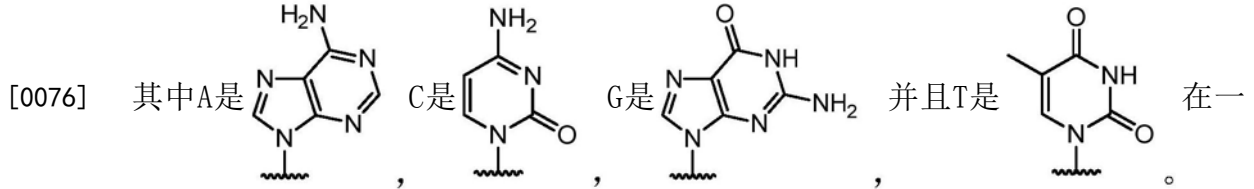
[0072] 在另一方面,本公开提供了式(II)的反义寡聚物:



[0074] 或其药学上可接受的盐,其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:

退火位点	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO:1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO:3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:4

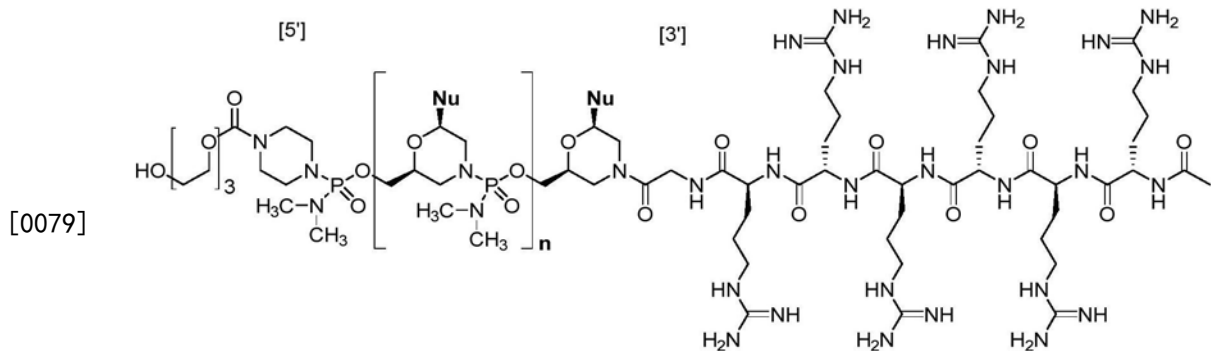
H50A (-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO:5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:6
H50A (-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO:7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO:8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:9



些实施方案中,式(II)的远端-OH连接至细胞穿透肽。

[0077] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9。在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

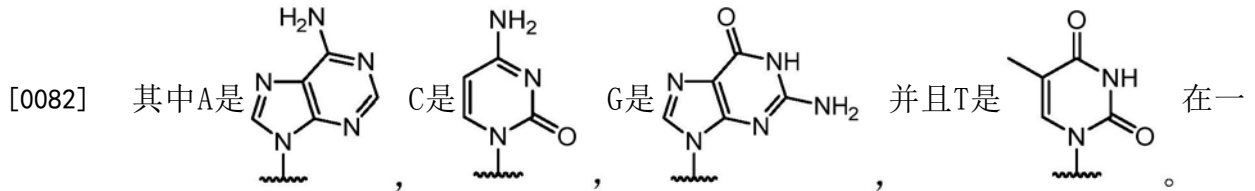
[0078] 在另一方面,本公开提供了式(III)的反义寡聚物:



(III)

[0080] 或其药学上可接受的盐,其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:

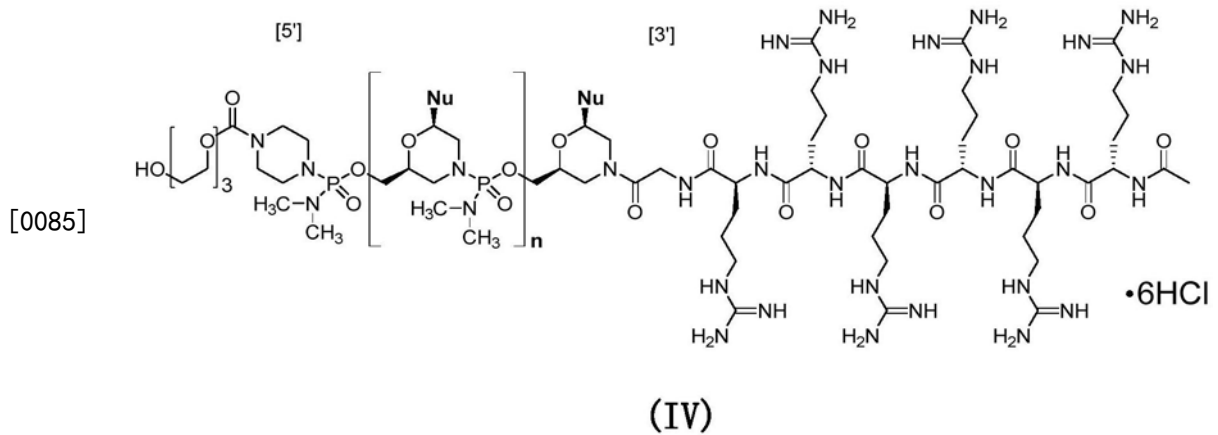
退火位点	靶向序列[5'至 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
[0081] H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



些实施方案中,式(III)的远端-OH连接至细胞穿透肽。

[0083] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

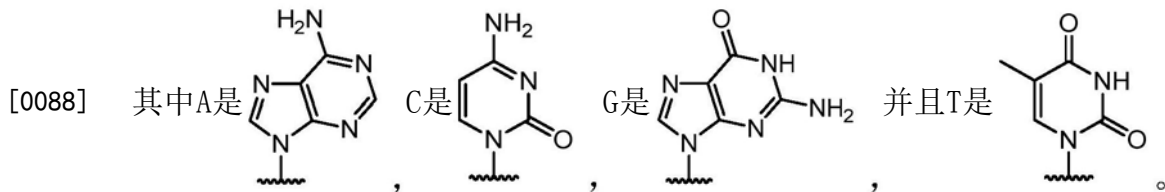
[0084] 在另一方面,本公开提供了式(IV)的反义寡聚物:



[0086] 其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:

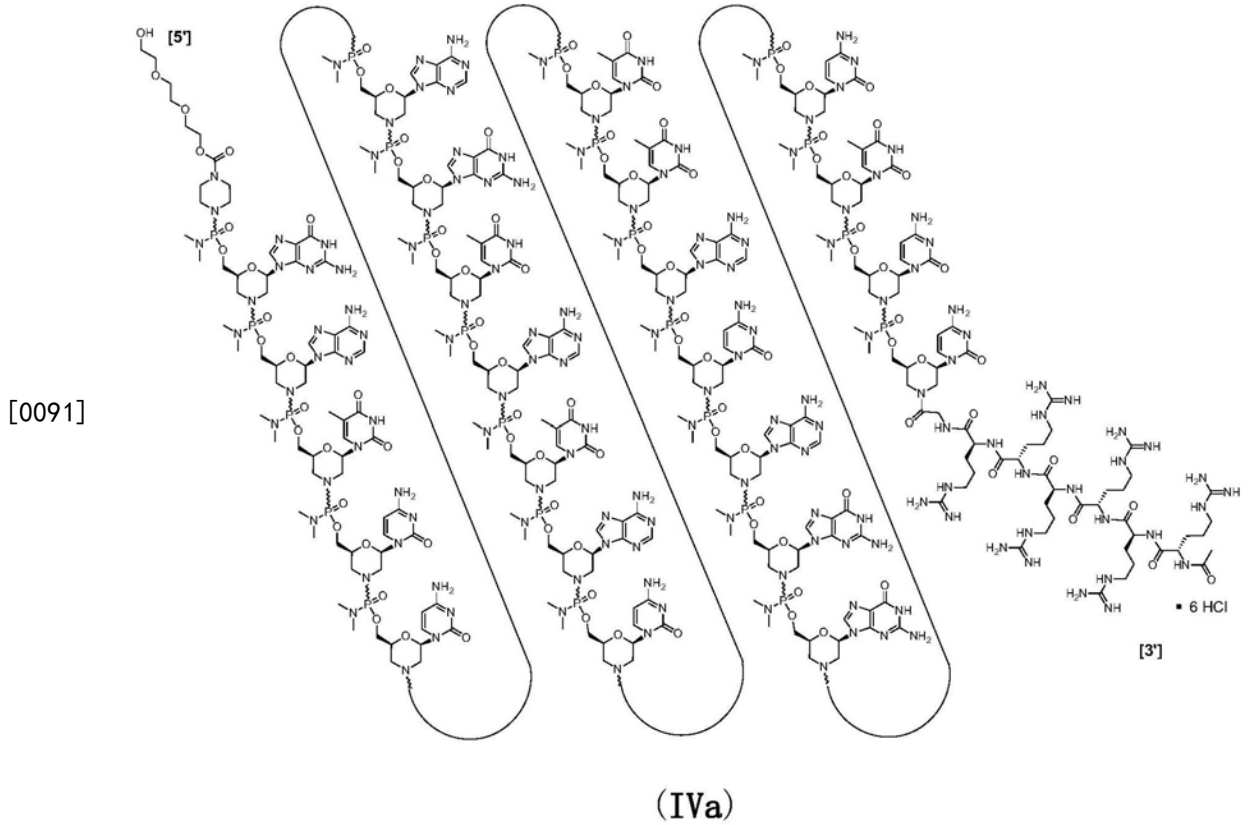
[0087]

退火位点	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO:1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO:3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO:5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO:7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO:8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:9

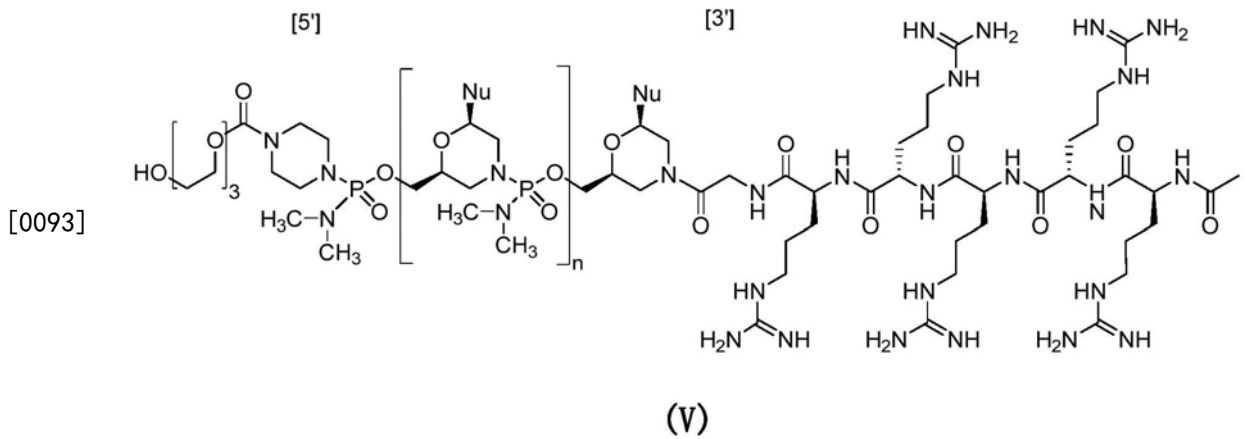


[0089] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

[0090] 在式(IV)的一个实施方案中,反义寡聚物是根据式(IVa)。



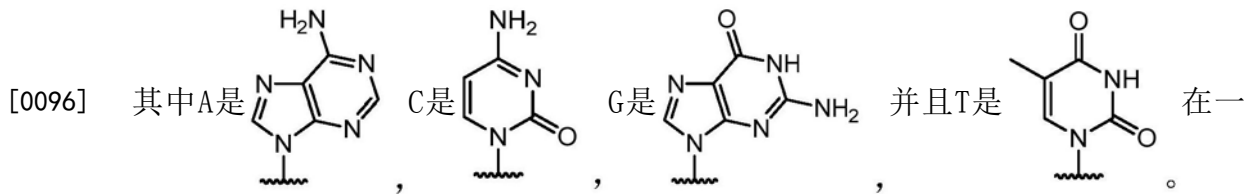
[0092] 在另一方面,本公开提供了式(V)的反义寡聚物:



[0094] 其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:

[0095]

熄火位点	靶向序列[5'至 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9



些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

[0097] 在另一方面,本公开提供了一种用于治疗有需要的受试者的杜氏肌营养不良(DMD)的方法,其中所述受试者具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变,所述方法包含向所述受试者施用本公开的反义寡聚物。本公开还解决了本公开的反义寡聚物用于制造供治疗有需要的受试者的杜氏肌营养不良(DMD)用的药物的用途,其中所述受试者具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变。

[0098] 在另一方面,本公开提供了一种在具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变的受试者中恢复mRNA阅读框以诱导肌营养不良蛋白产生的方法,所述方法包含向所述受试者施用本公开的反义寡聚物。在另一方面,本公开提供了一种在具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变的受试者中在mRNA加工期间从肌营养不良蛋白前体mRNA中排除外显子50的方法,所述方法包含向所述受试者施用本公开的反义寡聚物。在另一方面,本公开提供了一种在具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变的受试者中结合肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子50、内含子49和/或内含子50的方法,所述方法包含向所述受试者施用本公开的反义寡聚物。

[0099] 在另一方面,本公开提供了用于疗法中的本文公开的反义寡聚物。在某些实施方案中,本公开提供了用于治疗杜氏肌营养不良的本公开的反义寡聚物。在某些实施方案中,本公开提供了用于制造用于疗法中的药物的本公开的反义寡聚物。在某些实施方案中,本公开提供了用于制造用于治疗杜氏肌营养不良的药物的本公开的反义寡聚物。

[0100] 在另一方面,本公开还提供了用于治疗有需要的受试者的杜氏肌营养不良(DMD)的试剂盒,其中所述受试者具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变,所述试剂盒包含至少包装在合适的容器中的本公开的反义寡聚物和其使用说明书。

具体实施方式

[0101] 本公开的实施方案大体上涉及改进的反义寡聚物和其使用方法,其专门设计用于诱导人类肌营养不良蛋白基因的外显子跳跃。肌营养不良蛋白在肌肉功能中起着至关重要的作用,并且各种与肌肉相关的疾病以这种基因的突变形式为特征。因此,在某些实施方案中,本文所描述的改进的反义寡聚物诱导人类肌营养不良蛋白基因的突变形式(例如在杜氏肌营养不良(DMD)和贝克尔肌营养不良(BMD)中发现的突变的肌营养不良蛋白基因)中的外显子跳跃。

[0102] 由于突变引起的异常mRNA剪接事件,这些突变的人类肌营养不良蛋白基因表达有缺陷的肌营养不良蛋白或根本不表达可测量的肌营养不良蛋白,这种情况导致各种形式的肌营养不良。为了补救这种情况,本公开的反义寡聚物与突变的人类肌营养不良基因的预处理mRNA的选定区域杂交,诱导以其他方式异常剪接的肌营养不良蛋白mRNA中的外显子跳跃和差异剪接,并且从而使肌肉细胞产生编码功能性肌营养不良蛋白的mRNA转录物。在某些实施方案中,所产生的肌营养不良蛋白不一定是肌营养不良蛋白的“野生型”形式,而是

肌营养不良蛋白的一种截短但具有功能的形式。

[0103] 通过增加肌肉细胞中功能性肌营养不良蛋白的水平,这些和相关的实施方案可用于预防和治疗肌营养不良,特别是那些以由于异常的mRNA剪接而表达缺陷的肌营养不良蛋白为特征的形式肌营养不良,例如DMD和BMD。本文所描述的特定反义寡聚物与其他寡聚物相比,进一步提供了改进的肌营养不良蛋白-外显子特异性靶向,因此与治疗相关形式的肌营养不良的替代方法相比,具有明显且实用的优势。

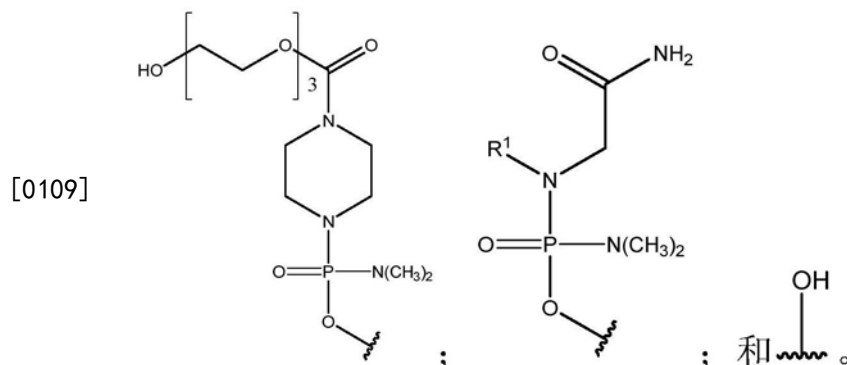
[0104] 因此,本公开涉及反义寡聚物或其药学上可接受的盐,其能够结合选定的靶标以诱导人类肌营养不良蛋白基因中的外显子跳跃,其中所述反义寡聚物包含与指定为退火位点的肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子50靶区互补的碱基序列,其中所述碱基序列和退火位点选自:

退火位点	靶向序列[5'至 3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
[0105] H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

[0106] 其中T是胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0107] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9。在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO:3的核碱基。

[0108] 在一个方面,反义寡聚物含有附接至反义寡聚物的5'端的T部分,其中T部分选自:



[0110] 在某些实施方案中,反义寡聚物与一种或多种细胞穿透肽(本文称为“CPP”)缀合。在某些实施方案中,一个或多个CPP附接至反义寡聚物的末端。在某些实施方案中,至少一个CPP附接至反义寡聚物的5'末端。在某些实施方案中,至少一个CPP附接至反义寡聚物的3'末端。在某些实施方案中,第一CPP附接至反义寡聚物的5'末端,并且第二CPP附接至反义寡聚物的3'末端。

[0111] 在一些实施方案中, CPP是富含精氨酸的肽。术语“富含精氨酸”是指具有至少2个, 优选地2、3、4、5、6、7或8个精氨酸残基的CPP, 每个精氨酸残基任选地被一个或多个不带电的疏水性残基分开, 并且任选地含有约6至14个氨基酸残基。如下文所解释, CPP优选地在其羧基末端处通过也可以是一个或多个氨基酸的接头连接至反义寡核苷酸的3'和/或5'端, 并且优选还在其氨基末端处被取代基 R^a 封端, 其中 R^a 选自H、酰基、乙酰基、苯甲酰基或硬脂酰基。在一些实施方案中, R^a 是乙酰基。

[0112] 如下表所示, 本文使用的CPP的非限制性实例包括 $-(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO:15)、 $R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO:16)、 $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO:17)、 $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO:18)、 $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (SEQ ID NO:19)、 $-GLY-R_5-R^a$ (SEQ ID NO:20)、 $-R_5-R^a$ (SEQ ID NO:21)、 $-GLY-R_6-R^a$ (SEQ ID NO:11)和 $-R_6-R^a$ (SEQ ID NO:10), 其中 R^a 选自H、酰基、苯甲酰基和硬脂酰基, 并且其中R是精氨酸, X是6-氨基己酸, B是 β -丙氨酸, F是苯丙氨酸, 并且GLY(或G)是甘氨酸。CPP“ R_5 (SEQ ID NO:21)”意在表示五(5)个精氨酸残基通过酰胺键连接在一起的肽(而不是单个取代基, 例如, R^5 (SEQ ID NO:21))。CPP“ R_6 (SEQ ID NO:10)”意在表示六(6)个精氨酸残基通过酰胺键连接在一起的肽(而不是单个取代基, 例如 R^6 (SEQ ID NO:10))。在一些实施方案中, R^a 是乙酰基。

[0113] 表1中提供了示例性CPP (SEQ ID NO:10、11和15-21)。

表 1: 示例性细胞穿透肽		
名称	序列	SEQ ID NO:
R_6G	RRRRRRG	11
R_6	RRRRRR	10
$(RXR)_4$	RXRRXRRXRRXR	15
$(RFF)_3R$	RFFRFFRFFR	16
$(RXR)_4XB$	RXRRXRRXRRXRXB	17
$(RFF)_3RXB$	RFFRFFRFFRXB	18
$(RFF)_3RG$	RFFRFFRFFRG	19
R_5G	RRRRRG	20
R_5	RRRRR	21
R 是精氨酸; X 是 6-氨基己酸; B 是 β -丙氨酸; F 是苯丙氨酸; G 是甘氨酸		

[0114] [0115] CPP、其合成和与寡聚物缀合的方法进一步描述于美国申请公开号US 2012/0289457和国际专利申请公开号WO 2004/097017、WO 2009/005793和WO 2012/150960, 其公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0116] 在一些实施方案中, 反义寡核苷酸包含取代基“Z”, 其定义为CPP和接头的组合。接头将CPP在其羧基末端处桥接至寡核苷酸的3'端和/或5'端。在各种实施方案中, 反义寡核苷酸可仅包含连接至寡聚物的3'端的一个CPP。在其他实施方案中, 反义寡核苷酸可仅包含连接至寡聚物的5'端的一个CPP。

[0117] Z内的接头可包含例如1、2、3、4或5个氨基酸。

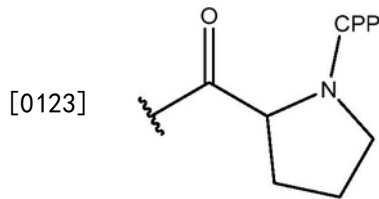
[0118] 在特定实施方案中, Z选自:

[0119] $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$;

[0120] $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$;

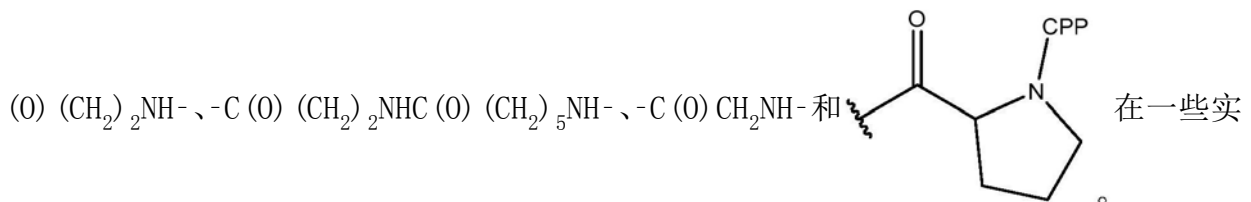
[0121] $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$;

[0122] $-C(O)CH_2NH-CPP$, 和式:



[0124] 其中CPP通过在CPP羧基末端处的酰胺键附接至接头部分。

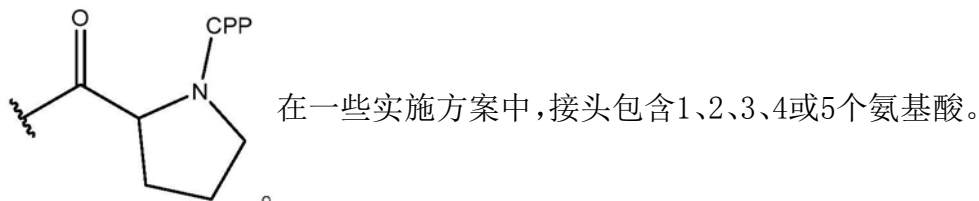
[0125] 在各种实施方案中, CPP是如本文所描述并且在表1中所见的富含精氨酸的肽。在某些实施方案中, 富含精氨酸的CPP是 $-R_5-R^a$ (即, 五个精氨酸残基; SEQ ID NO:21), 其中 R^a 选自H、酰基、乙酰基、苯甲酰基和硬脂酰基。在某些实施方案中, R^a 是乙酰基。在各种实施方案中, CPP选自SEQ ID NO:15、16或21, 并且接头选自由以下组成的组: $-C(O)(CH_2)_5NH-$ 、 $-C$



施方案中, 接头包含1、2、3、4或5个氨基酸。

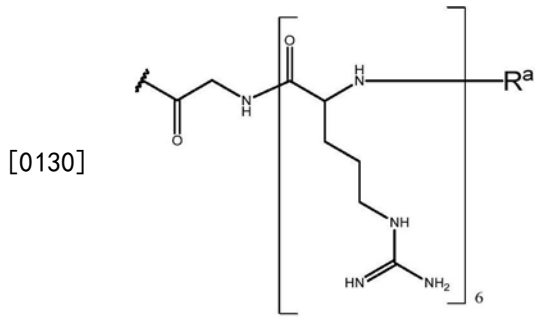
[0126] 在一些实施方案中, CPP是SEQ ID NO:21并且接头是Gly。在一些实施方案中, CPP是SEQ ID NO:20。

[0127] 在某些实施方案中, 富含精氨酸的CPP是 $-R_6-R^a$ (即, 六个精氨酸残基; SEQ ID NO:10), 其中 R^a 选自H、酰基、乙酰基、苯甲酰基和硬脂酰基。在某些实施方案中, R^a 是乙酰基。在各种实施方案中, CPP选自SEQ ID NO:10、15或16, 并且接头选自由以下组成的组: $-C(O)(CH_2)_5NH-$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$ 、 $-C(O)CH_2NH-$ 和



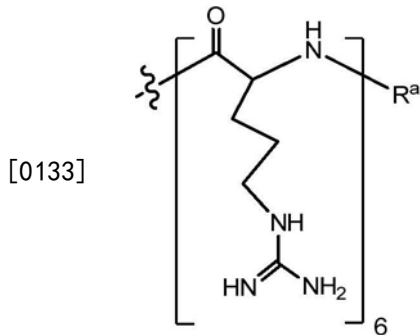
[0128] 在一些实施方案中, CPP是SEQ ID NO:10并且接头是Gly。在一些实施方案中, CPP是SEQ ID NO:11。

[0129] 在某些实施方案中, Z是在寡聚物的5'和/或3'端共价键结至本公开的反义寡聚物的 $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ (“ R_6 ”公开为SEQ ID NO:10), 其中 R^a 是H、酰基、乙酰基、苯甲酰基或硬脂酰基, 以封端 R_6 (SEQ ID NO:10)的氨基末端。在某些实施方案中, R^a 是乙酰基。在这些非限制性实例中, CPP是 $-R_6-R^a$ (SEQ ID NO:10), 并且接头是 $-C(O)CH_2NH-$ (即GLY)。Z= $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ (“ R_6 ”公开为SEQ ID NO:10)的特定实例也由以下结构例示:



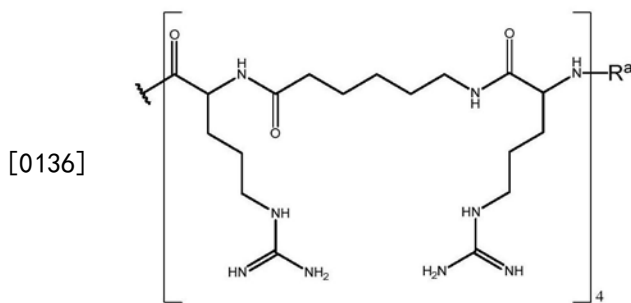
[0131] 其中R^a选自H、酰基、乙酰基、苯甲酰基和硬脂酰基。

[0132] 在各种实施方案中, CPP是 -R₆-R^a (SEQ ID NO:10), 也例示为下式:

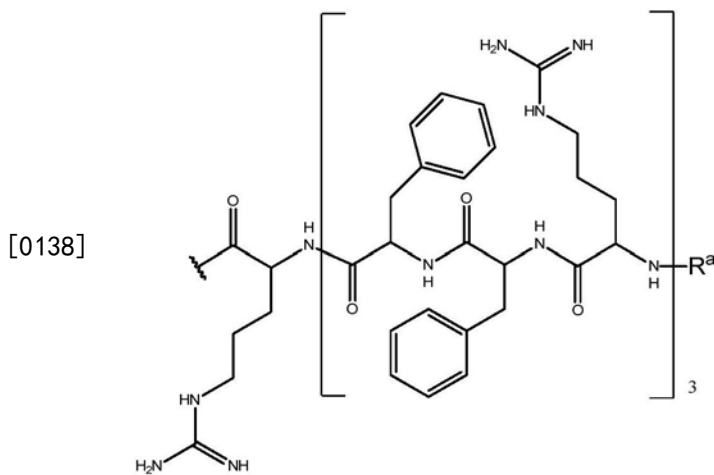


[0134] 其中R^a选自H、酰基、乙酰基、苯甲酰基和硬脂酰基。在某些实施方案中, CPP是SEQ ID NO:11。在一些实施方案中, R^a是乙酰基。

[0135] 在一些实施方案中, CPP是 - (RXR)₄-R^a (SEQ ID NO:15), 也例示为下式:

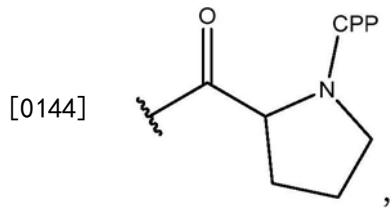


[0137] 在各种实施方案中, CPP是 -R- (FFR)₃-R^a (SEQ ID NO:16), 也例示为下式:

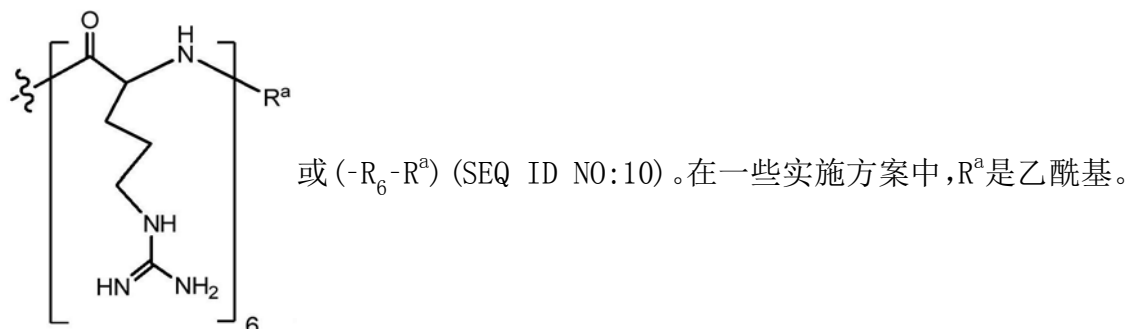
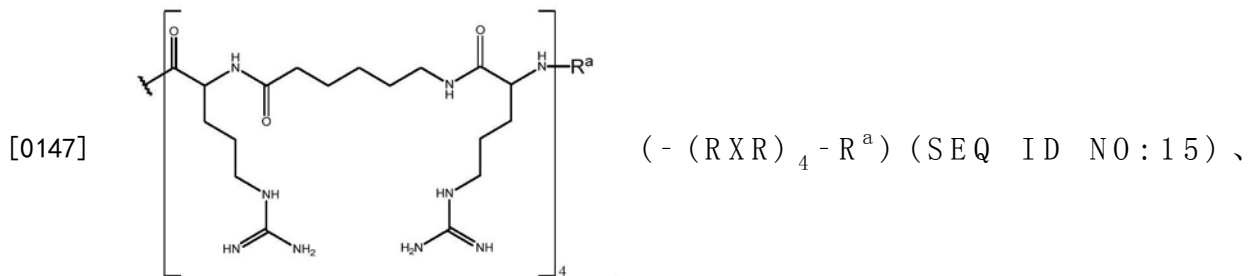
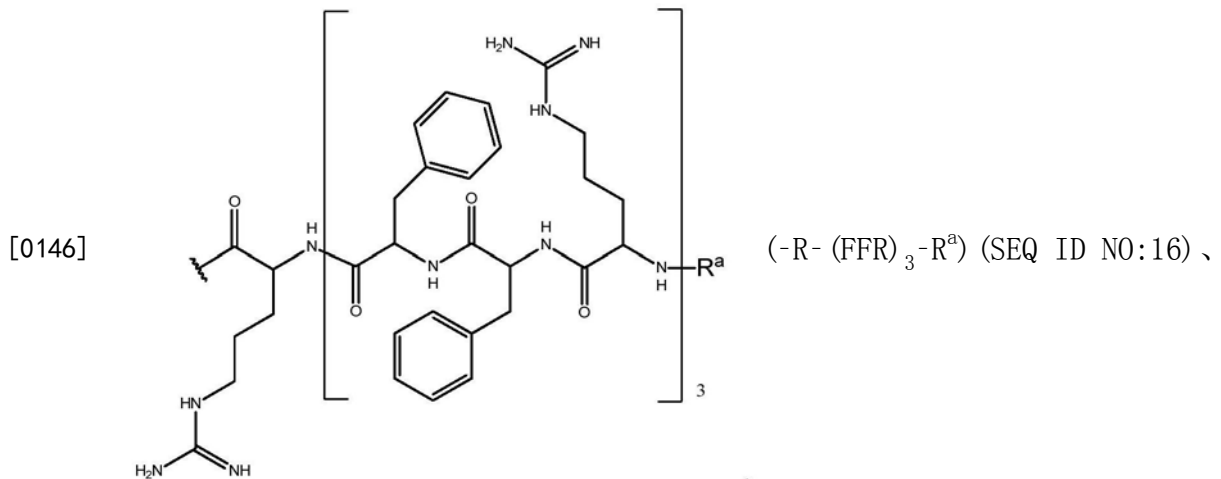


[0139] 在各种实施方案中, Z选自:

- [0140] -C(O)(CH₂)₅NH-CPP;
- [0141] -C(O)(CH₂)₂NH-CPP;
- [0142] -C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP;
- [0143] -C(O)CH₂NH-CPP; 和式:



[0145] 其中CPP通过在CPP羧基末端处的酰胺键附接至接头部分,并且其中CPP选自:



- [0148] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。
- [0149] 在一些方面,经修饰的反义寡聚物的核碱基连接至吗啉代环结构,其中吗啉代环结构通过含磷的亚基间键接合,所述亚基间键将一个环结构的吗啉代氮接合至相邻环结构的5'外环碳。在这一方面,SEQ ID NO:1-9中的每一个的T优选地为胸腺嘧啶。
- [0150] 在一些方面,反义寡聚物的碱基连接至肽核酸(PNA),其中磷酸-糖多核苷酸主链

被与核碱基连接的柔性伪肽聚合物替换。

[0151] 在一些方面,反义寡聚物的碱基中的至少一个连接至锁核酸(LNA),其中锁核酸结构是经化学修饰的核苷酸类似物,其中核糖部分具有连接2'氧和4'碳的额外桥键。在这一方面,连接至SEQ ID NO:1-9中每一个的LNA的每种核碱基包含5-甲基。

[0152] 在一些方面,反义寡聚物的碱基中的至少一个连接至桥接核酸(BNA),其中通过向呋喃糖骨架引入额外的桥接结构来限制或锁定糖构象。在一些方面,反义寡聚物的碱基中的至少一个连接至2'-O,4'-C-乙烯桥接核酸(ENA)。在这一方面,连接至SEQ ID NO:1-9中每一个的BNA或ENA的每种核碱基包含5-甲基。

[0153] 在一些方面,当主链的化学允许时,SEQ ID NO:1-9中的每个胸腺嘧啶是尿嘧啶。

[0154] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。尽管在本公开的实践或测试中可以使用与本文描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料,但描述了优选的方法和材料。为了本公开的目的,以下术语定义如下。

[0155] I. 定义

[0156] 除非另有说明,否则本文所用的术语“烷基”是指饱和的直链或支链烃。在某些实施方案中,烷基是伯烃、仲烃或叔烃。在某些实施方案中,烷基包括一至十个碳原子,即C₁至C₁₀烷基。在某些实施方案中,烷基包括一至六个碳原子,即C₁至C₆烷基。所述术语包括取代和未取代的烷基,包括卤代烷基。在某些实施方案中,烷基是氟化烷基。可以对烷基进行取代的部分的非限制性实例选自以下组成的组:卤素(氟、氯、溴或碘)、羟基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、烷氧基、芳氧基、硝基、氰基、磺酸、硫酸酯基、膦酸、磷酸酯或膦酸酯,这些部分未受保护或必要时受保护,如所属领域技术人员所熟知,例如,如Greene等人, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 第二版, 1991中所教示,特此以引用的方式并入。在某些实施方案中,烷基选自以下组成的组:甲基、CF₃、CCl₃、CFC1₂、CF₂Cl、乙基、CH₂CF₃、CF₂CF₃、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、己基、异己基、3-甲基戊基、2,2-二甲基丁基和2,3-二甲基丁基。

[0157] 如本文关于受试者或患者所用的“适合于外显子50跳跃”旨在包括在肌营养不良蛋白基因中具有一个或多个突变的受试者和患者,所述突变不存在肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子50的跳跃,引起阅读框移码,从而破坏了前体mRNA的翻译,导致受试者或患者无法产生功能性或半功能性肌营养不良蛋白。确定患者是否在肌营养不良蛋白基因中具有适合于外显子跳跃的突变完全在所属领域技术人员的能力范围内(Aartsma-Rus等人(2009) *Hum Mutat.* 30:293-299;Gurvich等人, *Hum Mutat.* 2009;30(4) 633-640和Fletcher等人(2010) *Molecular Therapy* 18(6) 1218-1223.)。

[0158] 如本文所用,术语“寡聚物”是指通过亚基间键连接的亚基序列。在某些情况下,术语“寡聚物”用于指“反义寡聚物”。对于“反义寡聚物”,每个亚基由以下组成:(i)核糖或其衍生物;和(ii)与其结合的核碱基,使得碱基配对部分的顺序通过Watson-Crick碱基配对形成与核酸(通常是RNA)中的靶序列互补的碱基序列,以在靶序列内形成核酸:寡聚物异源双链体,条件是亚基、亚基间键或两者都不是天然存在的。在某些实施方案中,反义寡聚物是二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(PMO)。在其他实施方案中,反义寡聚物是2'-O-甲基硫代磷酸酯。在其他实施方案中,本公开的反义寡聚物是肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)或桥接核酸

(BNA),例如2'-0,4'-C-乙烯桥接核酸(ENA)。本文中描述了额外的示例性实施方案。

[0159] 术语“互补”和“互补性”是指通过Watson-Crick碱基配对规则彼此相关的两种或更多种寡聚物(即,每个包含核碱基序列)。举例来说,核碱基序列“T-G-A(5' 3')”与核碱基序列“A-C-T(3' 5')”互补。互补性可以是“部分的”,其中根据碱基配对规则,给定核碱基序列的不到全部核碱基与另一核碱基序列匹配。举例来说,在一些实施方案中,给定核碱基序列与其他核碱基序列之间的互补性可以是约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。或者,给定核碱基序列和其他核碱基序列之间可能存在“完全”或“完美”(100%)互补性,以继续实例。核碱基序列之间的互补程度对序列之间杂交的效率和强度有显著影响。

[0160] 术语“有效量”和“治疗有效量”在本文中可互换使用,并指作为单剂量或作为一系列剂量的一部分施用于哺乳动物受试者的治疗性化合物(例如反义寡聚物)的量,其可有效地产生期望的治疗效果。对于反义寡聚物,这种效果通常是通过抑制所选靶序列的翻译或天然剪接加工,或产生临床上有意义量的肌营养不良蛋白(统计显著性)而带来的。

[0161] 在一些实施方案中,有效量是约1mg/kg至约200mg/kg的包括反义寡聚物的组合物,以治疗受试者一段时间。在一些实施方案中,有效量是约1mg/kg至约200mg/kg的包括反义寡聚物的组合物,以增加受试者的肌营养不良蛋白阳性纤维的数量。在某些实施方案中,有效量是约1mg/kg至约200mg/kg的包括反义寡聚物的组合物,以例如在6分钟步行测试(6MWT)中稳定、维持或改善患者相对于健康同伴的步行距离。

[0162] “增强(enhance/enhancing)”或“增加(increase/increasing)”或“刺激(stimulate/stimulating)”一般是指与由没有反义寡聚物或对照化合物引起的反应相比,一种或多种反义寡聚物或前述中的任一种的药物组合物在细胞或受试者中产生或引起更大的生理反应(即下游效应)的能力。更大的生理反应可包括增加肌营养不良蛋白的功能形式的表达,或增加肌肉组织中肌营养不良蛋白相关的生物活性,以及根据所属领域的理解和本文的描述显而易见的其他反应。

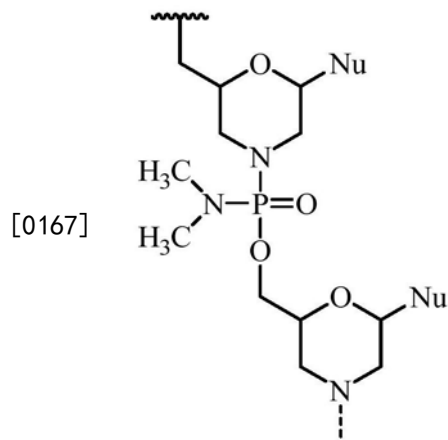
[0163] 如本文所用,术语“功能”和“功能性”等是指生物、酶或治疗功能。

[0164] “功能性”肌营养不良蛋白一般是指具有足够生物活性的肌营养不良蛋白,以减少肌肉组织的进行性降解,这原本是肌营养不良的特征,通常与存在于某些患有DMD或BMD的受试者中的改变的或“缺陷”形式的肌营养不良蛋白相比。作为一个实例,体外肌肉培养物中的肌营养不良蛋白相关活性可以根据肌管大小、肌原纤维组织(或无组织)、收缩活性和乙酰胆碱受体的自发聚集来测量(参见例如Brown等人,Journal of Cell Science.112:209-216,1999)。动物模型也是研究疾病发病机理的宝贵资源,并提供了测试肌营养不良蛋白相关活性的手段。两个最广泛使用的DMD研究动物模型是mdx小鼠和金毛猎犬肌营养不良(GRMD)狗,其都是肌营养不良蛋白阴性的(参见例如Collins&Morgan,Int J Exp Pathol 84:165-172,2003)。这些和其他动物模型可用于测量各种肌营养不良蛋白的功能活性。包括肌营养不良蛋白的截短形式,例如在施用本公开的某些外显子跳跃反义寡聚物之后产生的那些形式。

[0165] 术语“错配”或“不匹配”是指寡聚物核碱基序列中的一个或多个核碱基(无论是连续的还是分开的)根据碱基配对规则与靶前体mRNA不匹配。虽然通常需要完美的互补性,但一些实施方案可以包括一个或多个但优选为6、5、4、3、2或1个相对于靶前体mRNA的错配。在寡聚物内任何位置的变异都包括在内。在某些实施方案中,本公开的反义寡聚物包括内部

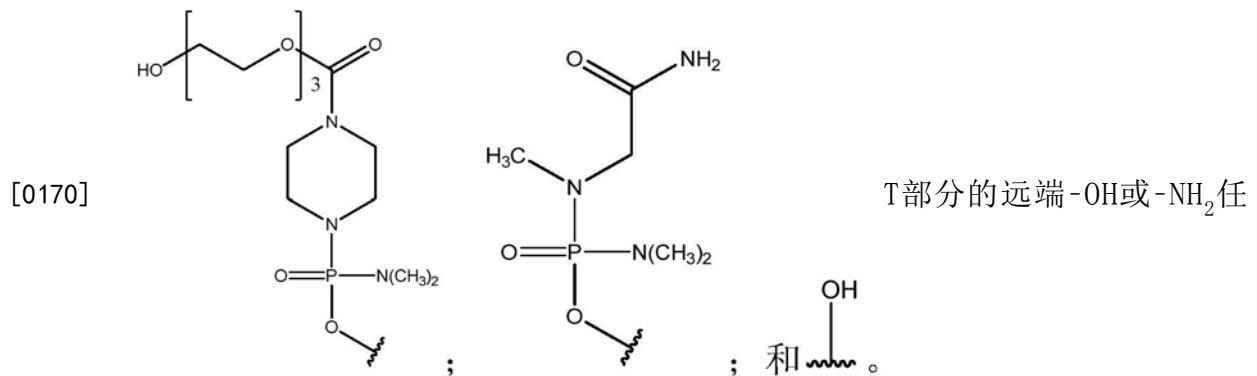
末端变化附近的核碱基序列的变化,并且如果存在,通常在5'和/或3'末端的约6、5、4、3、2或1个亚基内。在某些实施方案中,可去除一个、两个或三个核碱基并且仍提供靶上结合。

[0166] 术语“吗啉代”、“吗啉代寡聚物”和“PMO”是指具有以下通用结构的磷酰二胺吗啉代寡聚物:



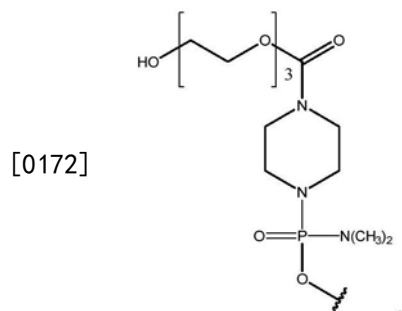
[0168] 并且如Summerton, J.等人, *Antisense&Nucleic Acid Drug Development*, 7:187-195 (1997)的图2中所描述。本文所描述的吗啉代包括前述通用结构的所有立体异构体和互变异构体。吗啉代寡聚物的合成、结构和结合特征详述于美国专利号:5,698,685、5,217,866、5,142,047、5,034,506、5,166,315、5,521,063、5,506,337、8,076,476和8,299,206;所有这些专利都以引用的方式并入本文中。

[0169] 在某些实施方案中,吗啉代在寡聚物的5'或3'端与“尾部”部分缀合以增加其稳定性和/或溶解性。示例性尾部包括:

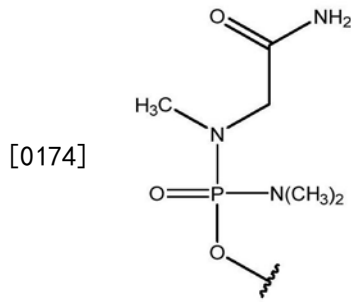


选地连接至细胞穿透肽。

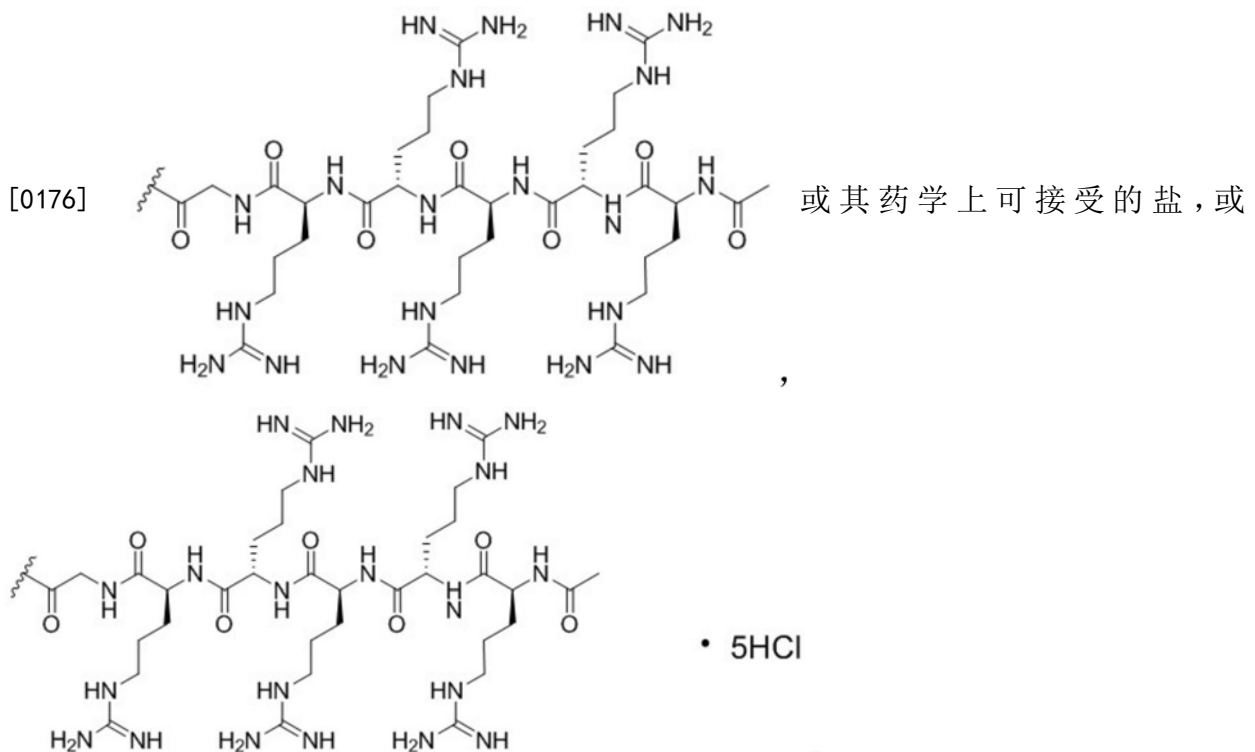
[0171] 在上文示例性尾部部分中,“TEG”或“EG3”是指以下尾部部分:



[0173] 在上文示例性尾部部分中,“GT”是指以下尾部部分:

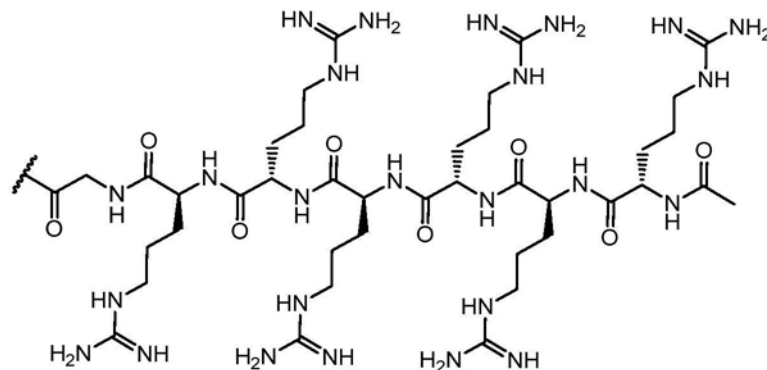


[0175] 如本文所用,术语“-G-R₅ (SEQ ID NO:20)”和“-G-R₅-Ac (SEQ ID NO:20)”可互换使用,并且指与本公开的反义寡聚物缀合的肽部分。在各种实施方案中,“G”代表通过酰胺键与“R₅ (SEQ ID NO:21)”缀合的甘氨酸残基,并且每个“R”代表通过酰胺键缀合在一起的精氨酸残基,使得“R₅ (SEQ ID NO:21)”表示通过酰胺键缀合在一起的五(5)个精氨酸残基。精氨酸残基可具有任何立体构型,例如,精氨酸残基可以是L-精氨酸残基、D-精氨酸残基,或D-精氨酸残基和L-精氨酸残基的混合物。在某些实施方案中,“-G-R₅ (SEQ ID NO:20)”或“-G-R₅-Ac (SEQ ID NO:20)”连接至“尾部”部分的远端-OH或NH₂。在某些实施方案中,“-G-R₅ (SEQ ID NO:20)”或“-G-R₅-Ac (SEQ ID NO:20)”与本公开的PMO反义寡聚物的3'最末端吗啉代亚基的氮原子缀合。在一些实施方案中,“-G-R₅ (SEQ ID NO:20)”或“-G-R₅-Ac (SEQ ID NO:20)”与本公开的反义寡聚物的3'端缀合,并且具有下式:



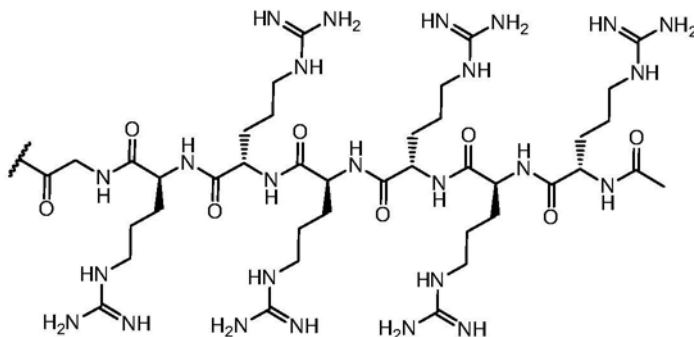
[0177] 如本文所用,术语“-G-R₆ (SEQ ID NO:11)”和“-G-R₆-Ac (SEQ ID NO:11)”和“R₆G (SEQ ID NO:11)”可互换使用,并且指与本公开的反义寡聚物缀合的肽部分。在各种实施方案中,“G”代表通过酰胺键与“R₆ (SEQ ID NO:10)”缀合的甘氨酸残基,并且每个“R”代表通过酰胺键缀合在一起的精氨酸残基,使得“R₆ (SEQ ID NO:10)”表示通过酰胺键缀合在一起的六(6)个精氨酸残基。精氨酸残基可具有任何立体构型,例如,精氨酸残基可以是L-精氨酸残基、D-精氨酸残基,或D-精氨酸残基和L-精氨酸残基的混合物。在某些实施方案中,“-

G-R₆ (SEQ ID NO:11)”或“-G-R₆-Ac (SEQ ID NO:11)”连接至“尾部”部分的远端-OH或-NH₂。在某些实施方案中，“-G-R₆ (SEQ ID NO:11)”或“-G-R₆-Ac (SEQ ID NO:11)”与本公开的PMO反义寡聚物的3'最末端吗啉代亚基的氮原子缀合。在一些实施方案中，“-G-R₆ (SEQ ID NO:11)”或“-G-R₆-Ac (SEQ ID NO:11)”与本公开的反义寡聚物的3'端缀合，并且具有下式：



[0178]

, 或



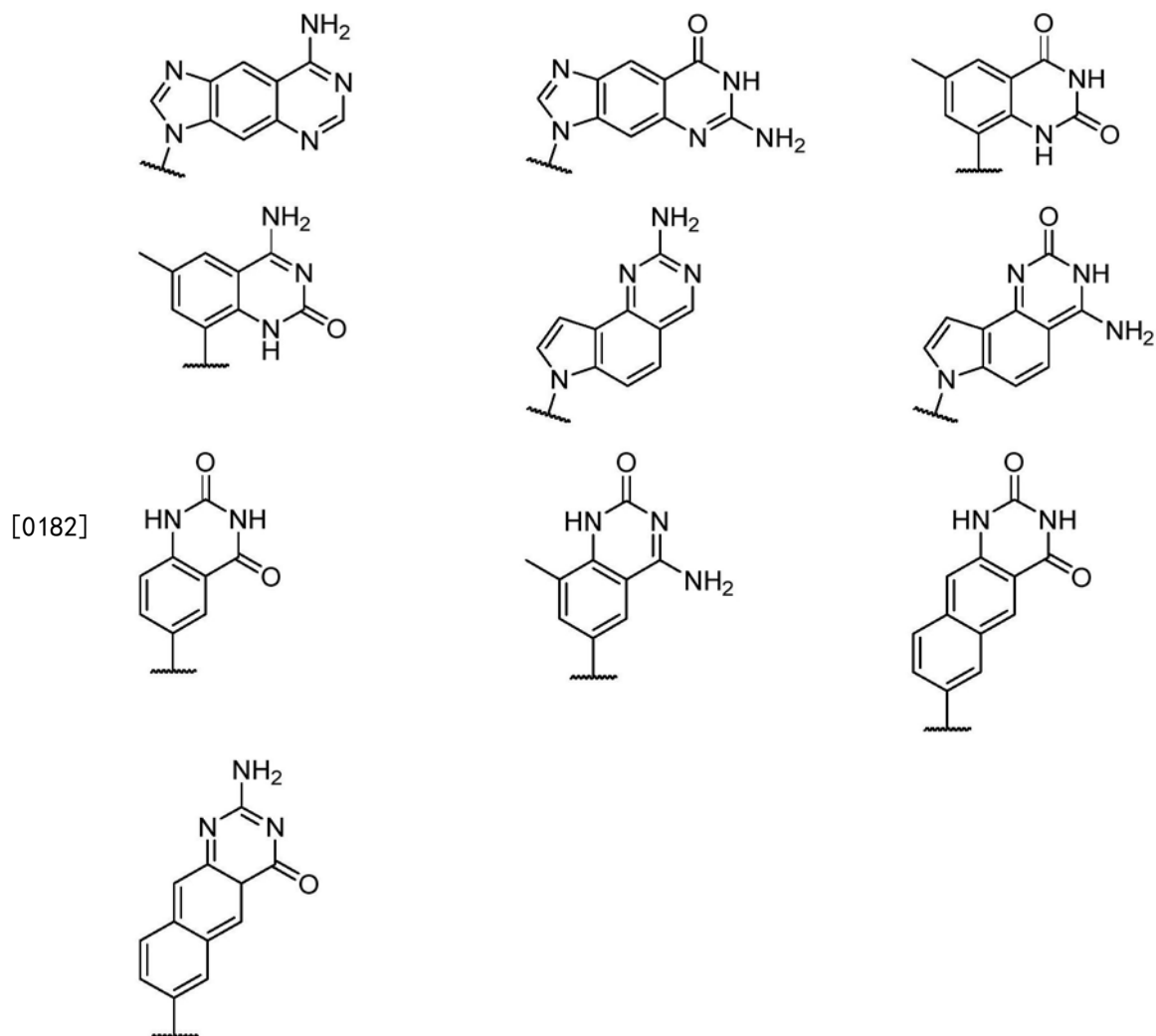
.6HCl

[0179] 术语“核碱基” (Nu)、“碱基配对部分”或“碱基”可互换使用,指天然存在的或“天然”DNA或RNA (例如,尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤) 中发现的嘌呤或嘧啶碱基,以及这些天然存在的嘌呤和嘧啶的类似物。这些类似物可赋予寡聚物改进的特性,例如结合亲和力。示例性的类似物包括次黄嘌呤 (肌苷的基础成分); 2,6-二氨基嘌呤; 5-甲基胞嘧啶; C5-丙炔基修饰的嘧啶; 10-(9-(氨基乙氧基) 苯噁嗪基) (G-钳) 等。

[0180] 碱基配对部分的其他实例包括但不限于尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和次黄嘌呤 (肌苷) (其各自的氨基由酰基保护基团保护)、2-氟尿嘧啶、2-氟胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、氮杂胞嘧啶、嘧啶类似物,例如假异胞嘧啶和假尿嘧啶以及其他修饰的核碱基,例如8-取代的嘌呤、黄嘌呤或次黄嘌呤 (后两者为天然降解产物)。还考虑了以下所公开的修饰的核碱基: Chiu和Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048; Limbach等人 Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196和Revankar和Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, 第7卷, 313; 其内容以引用的方式并入本文中。

[0181] 碱基配对部分的其他实例包括但不限于其中已添加一个或多个苯环的大小扩大的核碱基。核酸碱基替代物描述于: the Glen Research catalog (www.glenresearch.com); Krueger AT等人, Acc.Chem.Res., 2007, 40, 141-150; Kool, ET, Acc.Chem.Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A.等人, Nat.Rev.Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E.等人, Curr.Opin.Chem.Biol., 2003, 7, 723-733和Hirao, I., Curr.Opin.Chem.Biol., 2006, 10, 622-627; 其内容以引用的方式并入本文中, 预期可用于

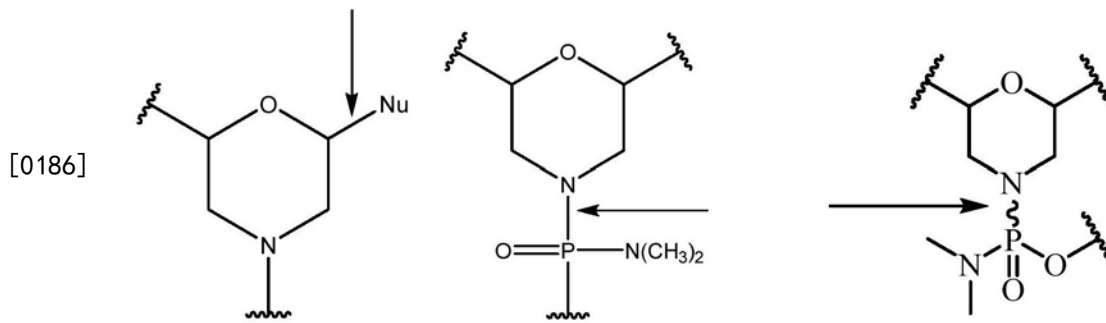
本文所描述的反义寡聚物中。大小扩大的核碱基的实例包括以下所示的核碱基和其互变异构形式。



[0183] 本文所用的短语“肠胃外施用 (parenteral administration/administered parenterally)”是指除肠内和局部施用以外的施用方式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、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、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0184] 如本文所用,在结构式中使用的一组括号表示括号之间的结构特征是重复的。在一些实施方案中,使用的括号可以是“[”和“]”,在某些实施方案中,用于表示重复的结构特征的括号可以是“(”和“)”。在一些实施方案中,括号之间的结构特征的重复迭代次数为括号外指示的次数,例如2、3、4、5、6、7等。在各种实施方案中,括号之间的结构特征的重复迭代次数由括号外指示的变量(例如“Z”)指示。

[0185] 如本文所用,在结构式内绘制到手性碳或磷原子的直键或波状键表示手性碳或磷的立体化学是未定义的,旨在包括手性中心的所有形式和/或其混合物。下面描绘了这类图示的实例。



[0187] 短语“药学上可接受的”是指物质或组合物必须在化学和/或毒理学上与包含配制品的其他成分和/或用其治疗的受试者兼容。

[0188] 本文所用的短语“药学上可接受的载剂”是指无毒的、惰性的固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、囊封材料或任何类型的配制助剂。可以充当药学上可接受的载剂的材料的一些实例是：糖类，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素和其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙纤维素；粉末状黄耆；麦芽；明胶；滑石；赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡；油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；二醇，例如丙二醇；酯，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；海藻酸；无热原质水；等渗盐水；林格氏溶液 (Ringer's solution)；乙醇；磷酸盐缓冲溶液；无毒兼容润滑剂，例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁；着色剂；脱模剂；涂布剂；甜味剂；调味剂；芳香剂；防腐剂和抗氧化剂；根据配方师的判断。

[0189] 关于肌营养不良蛋白合成或生产的术语“恢复”一般是指用本文所描述的反义寡聚物治疗后，肌营养不良的患者产生肌营养不良蛋白，包括截短形式的肌营养不良蛋白。治疗后患者中肌营养不良蛋白阳性纤维的百分比可通过肌肉活检使用已知技术确定。举例来说，可从合适的肌肉，例如患者的肱二头肌中取肌肉活检。

[0190] 阳性肌营养不良蛋白纤维的百分比分析可在治疗前和/或治疗后或在整个治疗过程中的时间点进行。在一些实施方案中，治疗后活检取自治疗前活检的对侧肌肉。治疗前和治疗后的肌营养不良蛋白表达分析可以使用任何合适的肌营养不良蛋白检测法进行。在一些实施方案中，使用作为肌营养不良蛋白的标志物的抗体，例如单克隆或多克隆抗体，对来自肌肉活检的组织切片进行免疫组织化学检测。举例来说，可以使用MANDYS106抗体，其是肌营养不良蛋白的高度敏感标志物。可以使用任何合适的二级抗体。

[0191] 在一些实施方案中，肌营养不良蛋白阳性纤维的百分比通过将阳性纤维的数量除以计数的总纤维来计算。正常的肌肉样品具有100%的肌营养不良蛋白阳性纤维。因此，肌营养不良蛋白阳性纤维的百分比可以表示为正常的百分比。为了控制治疗前肌肉以及回复性纤维中痕量肌营养不良蛋白的存在，在计数治疗后肌肉中的肌营养不良蛋白阳性纤维时，可以使用患者治疗前肌肉的切片设置基线。这可以用作计数所述患者治疗后肌肉的切片中的肌营养不良蛋白阳性纤维的阈值。在其他实施方案中，抗体染色的组织切片也可以用于使用Bioquant图像分析软件 (Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN) 进行肌营养不良蛋白定量。总肌营养不良蛋白荧光信号强度可报告为正常的百分比。此外，使用单克隆或多克隆抗肌营养不良蛋白抗体的蛋白质印迹分析可用于确定肌营养不良蛋白阳性纤维的百分比。例如，可以使用来自Leica Biosystems的抗肌营养不良蛋白抗体NCL-Dys1。还可以通过确定肌聚糖复合物 (β , γ) 和/或神经元NOS的组分的表达来分析肌营

养不良蛋白阳性纤维的百分比。

[0192] 在一些实施方案中,用本公开的反义寡聚物进行的治疗减缓或减少了DMD患者的进行性呼吸肌功能障碍和/或衰竭,这在没有治疗的情况下是可以预期的。在一些实施方案中,用本公开的反义寡聚物进行的治疗可以减少或消除对通气辅助的需要,而这种需要在没有治疗的情况下是可以预期的。在一些实施方案中,用于跟踪疾病过程的呼吸功能测量以及潜在治疗干预的评估包括最大吸气压力(MIP)、最大呼气压力(MEP)和用力肺活量(FVC)。MIP和MEP分别测量一个人在吸气和呼气期间可能产生的压力水平,并且是呼吸肌力量的敏感测量。MIP是对膈膜肌无力的量度。

[0193] 在一些实施方案中,MEP可能与其他肺功能测试(包括MIP和FVC)变化之前下降。在某些实施方案中,MEP可以是呼吸功能障碍的早期指标。在某些实施方案中,FVC可用于测量最大吸气后强制呼气期间排出的空气总量。在患有DMD的患者中,FVC与身体生长同时增加,直到十几岁初期。然而,随着生长减缓或因疾病进展而受阻,以及肌肉无力的进展,肺活量进入下降阶段,并在10至12岁后以平均每年约8至8.5%的速度下降。在某些实施方案中,MIP百分比预测(MIP根据体重调整)、MEP百分比预测(MEP根据年龄调整)和FVC百分比预测(FVC根据年龄和身高调整)是支持性分析。

[0194] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”包括表现出症状或有表现出症状风险的任何动物,所述症状可以用本公开的反义寡聚物进行治疗,例如患有或有风险患有DMD或BMD或与这些病况相关的任何症状(例如,肌纤维丧失)的受试者(或患者)。合适的受试者(或患者)包括实验室动物(例如小鼠、大鼠、兔子或豚鼠)、农场动物和家畜或宠物(例如猫或狗)。包括非人类的灵长类动物和优选人类患者(或受试者)。还包括在具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变的受试者(或患者)中产生肌营养不良蛋白的方法。

[0195] 本文所用的短语“全身施用(systemic administration/administered systemically)”和“外周施用(peripheral administration/administered peripherally)”是指除直接进入中枢神经系统以外的化合物、药物或其他材料的施用,使得其进入患者的系统,从而经历代谢和其他类似过程,例如皮下施用。

[0196] 短语“靶向序列”或“碱基序列”是指与靶前体mRNA中的核苷酸序列互补的寡聚物的核碱基序列。在本公开的一些实施方案中,靶前体mRNA中的核苷酸序列是指定为H50D(+04-18)、H50D(+07-18)、H50D(+07-16)、H50D(+07-17)、H50A(-19+07)、H50D(+07-15)、H50A(-02+23)、H50D(+06-18)或H50D(+07-20)的肌营养不良蛋白前体mRNA中的外显子50、内含子49和/或内含子50退火位点。在一个实施方案中,由本文所描述的反义寡聚物靶向的退火位点是H50D(+07-16)。

[0197] 对受试者(例如,哺乳动物,如人类)或细胞的“治疗”是试图改变受试者或细胞的自然进程而使用的任何类型的干预。治疗包括但不限于施用寡聚物或其药物组合物,并且可以预防性地或在病理事件开始后或与病原体接触后进行。治疗包括对与肌营养不良蛋白相关的疾病或病况的症状或病理的任何理想效果,如在某些形式的肌营养不良中,并且可以包括例如在所治疗的疾病或病况的一个或多个可测量的标志物中的最小变化或改善。还包括“预防性”治疗,其可以针对降低正在治疗的疾病或病况的进展速率,延迟所述疾病或病况的发作,或降低其发作的严重程度。“治疗”或“预防”不一定表示完全根除、治愈或预防疾病或病况或其相关症状。

[0198] 在一些实施方案中,用本公开的反义寡聚物进行的治疗增加新型肌营养不良蛋白产生,延缓疾病进展,减缓或减少行走能力的丧失,减少肌肉炎症,减少肌肉损伤,改善肌肉功能,减少肺功能的丧失,和/或增强肌肉再生,这在没有治疗的情况下是可以预期的。在一些实施方案中,治疗维持、延缓或减缓疾病进展。在一些实施方案中,治疗维持行走能力或减少行走能力的丧失。在一些实施方案中,治疗维持肺功能或减少肺功能的丧失。在一些实施方案中,治疗维持或增加患者的稳定步行距离,如通过6分钟步行测试(6MWT)所测量。在一些实施方案中,治疗维持或减少步行/跑步10米的时间(即,10米步行/跑步测试)。在一些实施方案中,治疗维持或减少从仰卧位站立的时间(即,站立时间测试)。在一些实施方案中,治疗维持或减少爬四层标准楼梯的时间(即,四层楼梯爬升测试)。在一些实施方案中,治疗维持或减少患者的肌肉炎症,如通过例如MRI(例如,腿部肌肉的MRI)所测量。在一些实施方案中,MRI测量T2和/或脂肪分数以识别肌肉退化。MRI可以识别由炎症、水肿、肌肉损伤和脂肪浸润引起的肌肉结构和组成的变化。

[0199] 在一些实施方案中,用本公开的反义寡聚物进行的治疗增加新型肌营养不良蛋白的产生并且减缓或减少行走能力的丧失,这在没有治疗的情况下是可以预期的。举例来说,治疗可以稳定、维持、改善或增加受试者的行走能力(例如,步行的稳定)。在一些实施方案中,治疗维持或增加患者的稳定步行距离,如通过例如McDonald等人描述的6分钟步行测试(6MWT)所测量(Muscle Nerve,2010;42:966-74,以引用的方式并入本文中)。6分钟步行距离(6MWD)的变化可以表示为绝对值、百分比变化或%预测值的变化。可以通过计算%预测值来确定6MWT中相对于健康同伴的典型表现的DMD患者的表现。举例来说,对于男性,预测的6MWD%可以使用以下公式计算: $196.72 + (39.81 \times \text{年龄}) - (1.36 \times \text{年龄}^2) + (132.28 \times \text{身高(米)})$ 。对于女性,预测的6MWD%可以使用以下公式计算: $188.61 + (51.50 \times \text{年龄}) - (1.86 \times \text{年龄}^2) + (86.10 \times \text{身高(米)})$ (Henricson等人PLoS Curr.,2012,第2版,以引用的方式并入本文中)。

[0200] 患有DMD的患者的肌肉功能丧失可能发生在儿童期正常生长发育的背景下。事实上,尽管进行性肌肉损伤,但患有DMD的较年幼的儿童在大约1年的过程中可能会在6MWT期间显示出步行距离的增加。在一些实施方案中,将来自DMD患者的6MWD与典型发育的对照受试者和来自年龄和性别匹配的受试者的现有正常数据进行比较。在一些实施方案中,可以使用基于年龄和身高的方程拟合到正常数据中来说明正常的生长和发育。这样的方程可用于将6MWD转换为患有DMD的受试者的预测百分比(预测%)值。在某些实施方案中,对预测的6MWD%数据的分析代表了一种解释正常生长和发育的方法,并且可以显示在早期年龄(例如,小于或等于7岁)的功能获得代表DMD患者的稳定而不是改善能力(Henricson等人PLoS Curr.,2012,第2版,以引用的方式并入本文中)。

[0201] 提出并公开了一种反义分子命名系统,以区分不同的反义分子(参见Mann等人,(2002) J Gen Med 4,644-654)。当测试几种稍有不同的反义分子时,这种命名法变得特别贴切,这些反义分子都针对同一靶区,如下所示:

[0202] H#A/D(x:y)。

[0203] 第一个字母表示物种(例如,H:人类,M:鼠类,C:犬类)。“#”表示目标肌营养不良蛋白外显子编号。“A/D”分别表示外显子起始和末端的受体或供体剪接位点。(x y)表示退火坐标,其中“-”或“+”分别表示内含子或外显子的序列。举例来说,A(-6+18)将表示目标外显

子之前的内含子的最后6个碱基和目标外显子的前18个碱基。最近的剪接位点将是受体,所以这些坐标将以“A”开头。描述供体剪接位点的退火坐标可以是D(+2-18),其中最后2个外显子碱基和前18个内显子碱基对应于反义分子的退火位点。完全外显子的退火坐标将用A(+65+85)表示,即从所述外显子开始的第65和85个核苷酸之间的位点。

[0204] II. 反义寡聚物

[0205] A. 设计用于诱导外显子50跳跃的反义寡聚物

[0206] 在某些实施方案中,本公开的反义寡聚物与肌营养不良蛋白基因的外显子50、内含子49和/或内含子50靶区互补,并且诱导外显子50跳跃。确切来说,本公开涉及与指定为退火位点的肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子50、内含子49或内含子50靶区互补的反义寡聚物。在一些实施方案中,退火位点选自H50D(+04-18)、H50D(+07-18)、H50D(+07-16)、H50D(+07-17)、H50A(-19+07)、H50D(+07-15)、H50A(-02+23)、H50D(+06-18)或H50D(+07-20)。在一些实施方案中,退火位点是H50D(+07-16)。

[0207] 本公开的反义寡聚物靶向肌营养不良蛋白前体mRNA并诱导外显子50的跳跃,因此其从成熟的剪接的mRNA转录物中被排除或跳过。通过跳跃外显子50,将被破坏的阅读框恢复为框内突变。虽然DMD由各种遗传亚型构成,但本公开的反义寡聚物被特别设计为跳跃肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子50。适合于跳跃外显子50的DMD突变包含DMD患者的一个亚组(4%)。

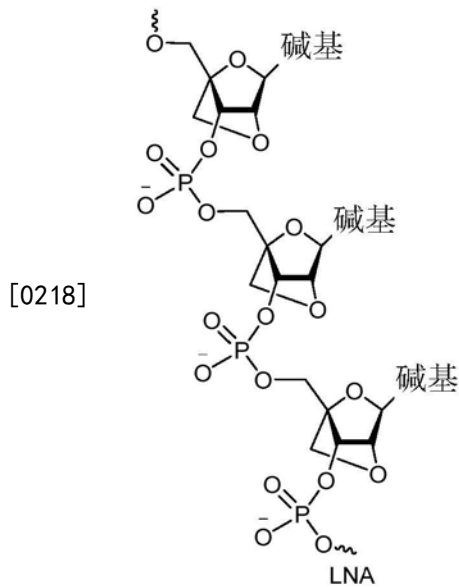
[0208] 诱导外显子50跳跃的反义寡聚物的核碱基序列被设计为与肌营养不良蛋白前体mRNA的外显子50、内含子49或内含子50内的特定靶序列互补。在一些实施方案中,反义寡聚物是PMO,其中PMO的每个吗啉代环与核碱基相连,包括例如DNA中发现的核碱基(腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和胸腺嘧啶)。

[0209] B. 寡聚物化学特征

[0210] 本公开的反义寡聚物可以采用多种反义寡聚物化学物质。寡聚物化学物质的实例包括但不限于吗啉代寡聚物、硫代磷酸酯修饰的寡聚物、2'-O-甲基修饰的寡聚物、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、硫代磷酸酯寡聚物、2'-O-MOE修饰的寡聚物、2'-氟修饰的寡聚物、2',4'-C-乙烯桥接核酸(ENA)、三环DNA、三环DNA硫代磷酸酯亚基、2'-O-[2-(N-甲基氨甲酰基)乙基]修饰的寡聚物,包括上述任何一种的组合。硫代磷酸酯和2'-O-Me修饰的化学物质可以组合生成2'-O-Me-硫代磷酸酯主链。参见例如PCT公开号WO/2013/112053和WO/2009/008725,其均以全文引用的方式并入本文中。如所利用的化学物质所允许,SEQ ID NO:1-9中的任一个中的每个T可以是尿嘧啶。如所利用的化学物质所允许,SEQ ID NO:1-9中的任一个的相关核碱基可包含5-甲基。下文进一步描述了本公开的寡聚物化学物质的示例性实施方案。

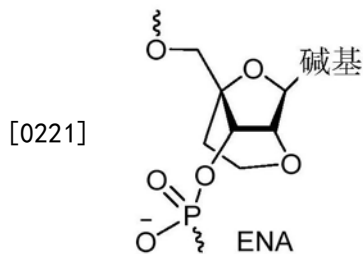
[0211] 1. 肽核酸(PNA)

[0212] 肽核酸(PNA)是DNA的类似物,其中主链在结构上与脱氧核糖主链同形,由N-(2-氨基乙基)甘氨酸单元组成,嘧啶或嘌呤碱基与其附接。含有天然嘧啶和嘌呤碱基的PNA遵循Watson-Crick碱基配对规则与互补寡聚物杂交,并在碱基对识别方面模拟DNA。PNA的主链是由肽键而不是磷酸二酯键形成的,这使得其非常适合于反义应用(参见下面的结构)。主链不带电,导致PNA/DNA或PNA/RNA双螺旋体表现出大于正常的热稳定性。PNA不被核酸酶或蛋白酶识别。下面描绘了PNA的非限制性实例。



[0219] 本公开的反义寡聚物可以掺入一个或多个LNA;在某些情况下,反义寡聚物可以完全由LNA构成。合成个别LNA核苷亚基并将其掺入寡聚物中的方法描述于例如美国专利号:7,572,582;7,569,575;7,084,125;7,060,809;7,053,207;7,034,133;6,794,499;和6,670,461中;其中的每一个均以全文引用的方式并入。典型的亚基间连接基团包括磷酸二酯和硫代磷酸酯部分;或者,可以采用不含磷的连接基团。其他实施方案包括含有LNA的反义寡聚物,其中每个LNA亚基被DNA亚基分开。某些反义寡聚物由交替的LNA和DNA亚基构成,其中亚基间连接基团是硫代磷酸酯。

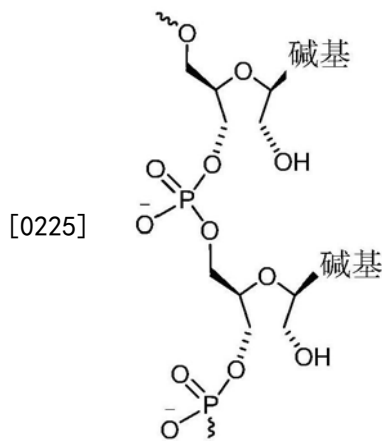
[0220] 2',4'-C-乙烯桥接核酸(ENA)是BNA类的另一成员。下面描绘非限制性实例。



[0222] ENA寡聚物和其制备描述于Obika等人,Tetrahedron Lett(1997)38(50):8735,其以全文引用的方式并入本文中。本公开的反义寡聚物可以掺入一个或多个ENA亚基。

[0223] 3. 解锁核酸(UNA)

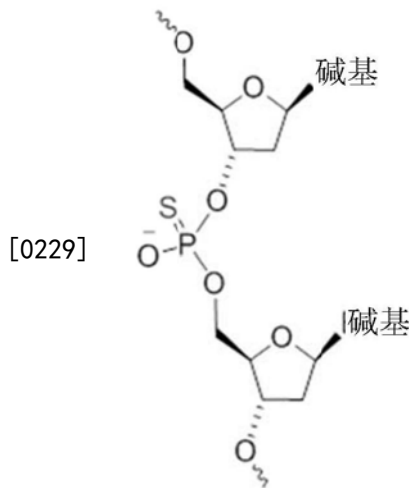
[0224] 反义寡聚物也可含有解锁核酸(UNA)亚基。UNA和UNA寡聚物是RNA的类似物,其中亚基的C2'-C3'键已被裂解。虽然LNA是构象受限的(相对于DNA和RNA),但UNA是非常灵活的。UNA公开于例如WO2016/070166中。下面描绘了UNA的非限制性实例。



[0226] 典型的亚基间连接基团包括磷酸二酯和硫代磷酸酯部分；或者，可以采用不含磷的连接基团。

[0227] 4. 硫代磷酸酯

[0228] “硫代磷酸酯”（或S-寡核苷酸）是正常DNA的变体，其中一个非桥接氧被硫替换。下面描绘了硫代磷酸酯的非限制性实例。

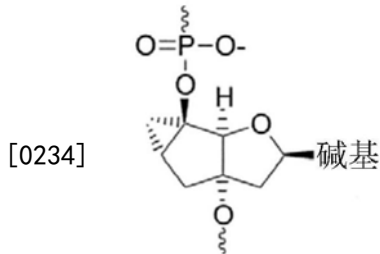


[0230] 核苷酸间键的硫化减少了核酸内切酶和核酸外切酶的作用，包括5'至3'和3'至5' DNA POL 1核酸外切酶、核酸酶S1和P1、RNA酶、血清核酸酶和蛇毒磷酸二酯酶。硫代磷酸酯通过两种主要途径制备：通过元素硫在二硫化碳中的溶液对磷酸氢盐的作用，或通过用二硫化四乙基秋兰姆 (TETD) 或3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮1,1-二氧化物 (BDTD) 使亚磷酸三酯硫化的方法（参见例如，Iyer等人，J.Org.Chem.55,4693-4699,1990，其以全文引用的方式并入本文中）。后一种方法避免了元素硫在大多数有机溶剂中的不溶性和二硫化碳的毒性问题。TETD法和BDTD法也能产生纯度较高的硫代磷酸酯。

[0231] 5. 三环DNA和三环硫代磷酸酯亚基

[0232] 三环DNA (tc-DNA) 是一类受约束的DNA类似物，其中每个核苷酸通过引入环丙烷环进行修饰，以限制主链的构象灵活性，并优化扭转角 γ 的主链几何结构。含同型碱基腺嘌呤和胸腺嘧啶的tc-DNA与互补RNA形成异常稳定的A-T碱基对。三环DNA和其合成描述于国际专利申请公开号WO 2010/115993中，其以全文引用的方式并入本文中。本公开的反义寡聚物可以掺入一个或多个三环DNA亚基；在某些情况下，反义寡聚物可以完全由三环DNA亚基构成。

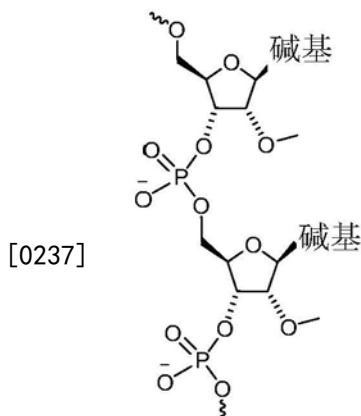
[0233] 三环硫代磷酸酯亚基是具有硫代磷酸酯亚基间键的三环DNA亚基。三环硫代磷酸酯亚基和其合成描述于国际专利申请公开号W02013/053928中,其以全文引用的方式并入本文中。本公开的反义寡聚物可以掺入一个或多个三环DNA亚基;在某些情况下,反义寡聚物可以完全由三环DNA亚基构成。下面描绘了三环DNA/三环硫代磷酸酯亚基的非限制性实例。



三环 DNA

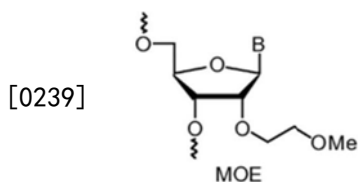
[0235] 6. 2'-O-甲基、2'-O-MOE和2'-F寡聚物

[0236] “2'-O-Me寡聚物”分子在核糖分子的2'-OH残基处携带甲基。2'-O-Me-RNA表现出与DNA相同(或相似)的行为,但防止核酸酶降解。2'-O-Me-RNA也可以与硫代磷酸酯寡聚物(PTO)组合以进一步稳定。2'-O-Me寡聚物(磷酸二酯或硫代磷酸酯)可以根据所属领域的常规技术合成(参见例如,Yoo等人,Nucleic Acids Res.32:2008-16,2004,其以全文引用的方式并入本文中)。下面描绘了2'-O-Me寡聚物的非限制性实例。



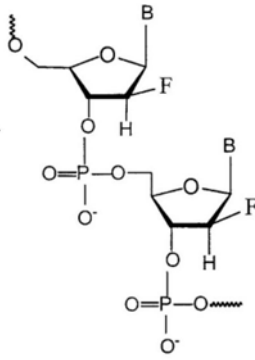
2'-O-Me

[0238] 2'-O-甲氧基乙基寡聚物(2'-O-MOE)在核糖分子之2'-OH残基处携带甲氧基乙基,且论述于Martin等人,Helv.Chim.Acta,78,486-504,1995中,其以全文引用的方式并入本文中。下面描绘了2'-O-MOE亚基的非限制性实例。



[0240] 2'-氟(2'-F)寡聚物在2'位置处具有氟基代替2'-OH。下面描绘了2'-F寡聚物的非限制性实例。

[0241]

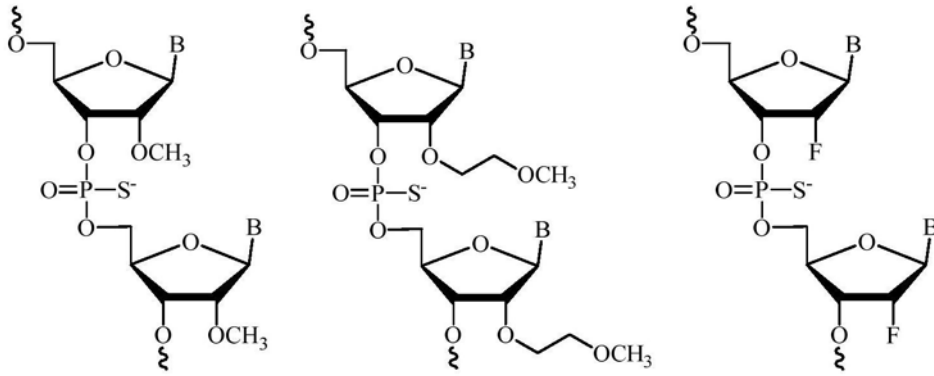


2'-F

[0242] 2'-氟寡聚物进一步描述于W0 2004/043977中,其以全文引用的方式并入本文中。

[0243] 2'-O-甲基、2'-O-MOE和2'-F寡聚物还可包含一个或多个硫代磷酸酯(PS)键,如下所示。

[0244]



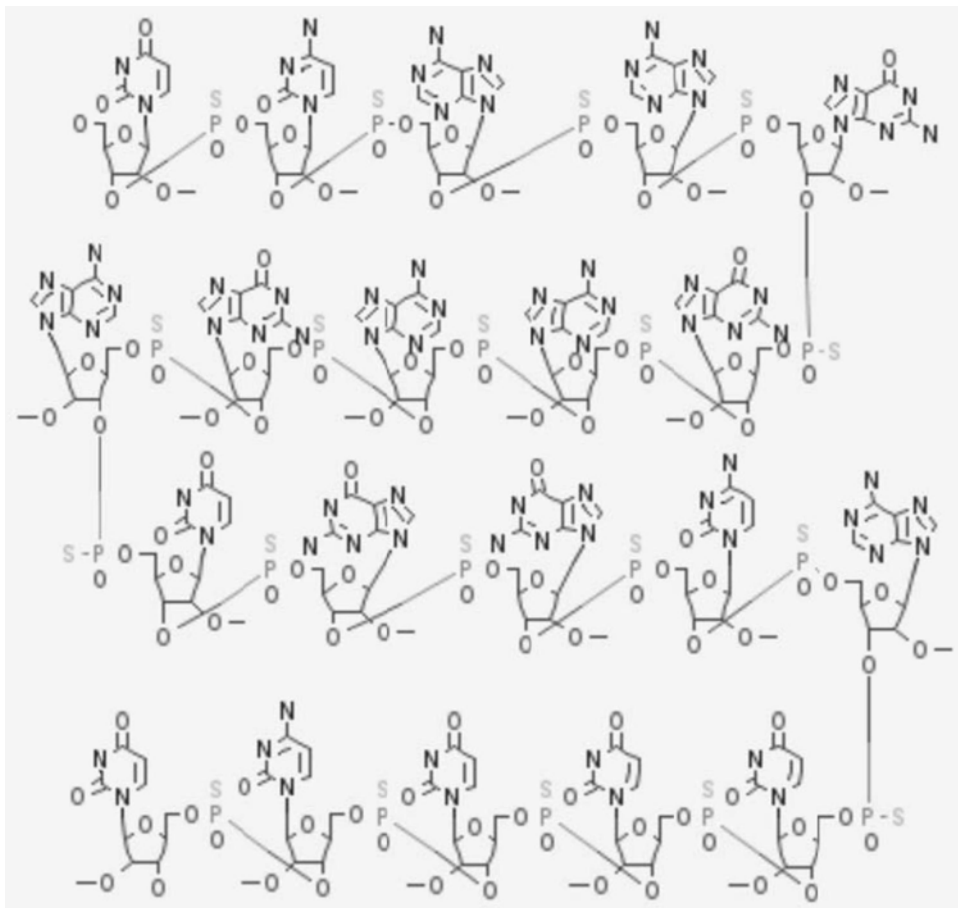
2'-O-甲基 PS

2'-O-MOE PS

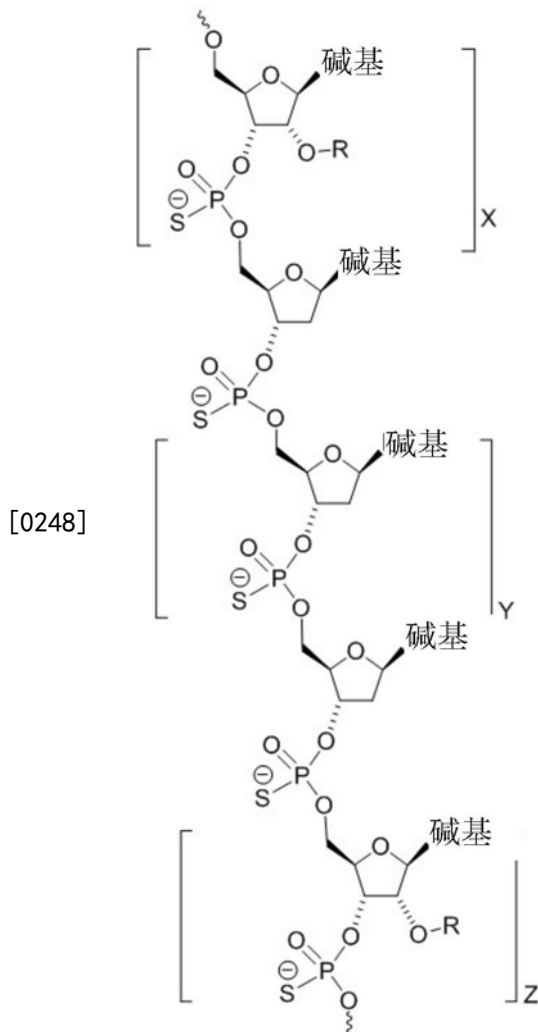
2'-F PS

[0245] 此外,2'-O-甲基、2'-O-MOE和2'-F寡聚物可以在整个寡聚物中包含PS亚基间键,例如,如下面描绘的2'-O-甲基PS寡聚物敦沙普森(drisapersen)。

[0246]



[0247] 或者, 2'-O-甲基、2'-O-MOE和/或2'-F寡聚物可以在寡聚物的末端包含PS键, 如下所示。



[0249] 其中：

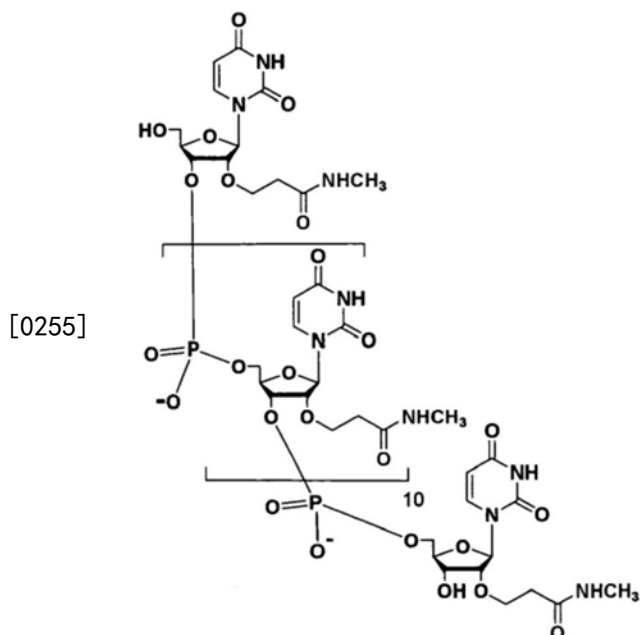
[0250] R是 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ (甲氧基乙基或MOE)；以及

[0251] X、Y和Z分别表示在指定的5'-侧翼、中央间隙和3'-侧翼区域中的每个区域内包含的核苷酸数量。

[0252] 本公开的反义寡聚物可以掺入一个或多个2'-O-甲基、2'-O-MOE和2'-F亚基,并且可以利用本文所描述的任何亚基间键。在某些情况下,本公开的反义寡聚物可以完全由2'-O-甲基、2'-O-MOE或2'-F亚基构成。本公开的反义寡聚物的一个实施方案完全由2'-O-甲基亚基构成。

[0253] 7. 2'-O-[2-(N-甲基氨甲酰基)乙基]寡聚物(MCE)

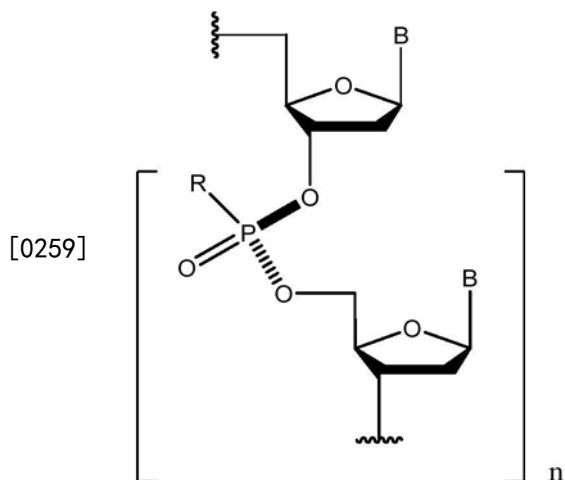
[0254] MCE是可用于本公开的反义寡聚物的2'-O修饰的核糖核苷的另一个实例。此处,2'-OH被衍生为2-(N-甲基氨甲酰基)乙基部分,以增加核酸酶抗性。下面描绘了MCE寡聚物的非限制性实例。



[0256] MCE和其合成描述于Yamada等人, *J. Org. Chem.* (2011) 76 (9) :3042-53, 其以全文引用的方式并入本文中。本公开的反义寡聚物可以掺入一个或多个MCE亚基。

[0257] 8. 立体特异性寡聚物

[0258] 立体特异性寡聚物是指通过合成方法固定每个含磷键的立体化学从而产生基本上立体纯的寡聚物的那些寡聚物。下面描绘了立体特异性寡聚物的非限制性实例。



[0260] 在以上实例中,寡聚物的每个磷具有相同的立体构型。额外的实例包括本文所描述的寡聚物。举例来说,LNA、ENA、三环DNA、MCE、2'-O-甲基、2'-O-MOE、2'-F和吗啉代基寡聚物可以用立体特异性的含磷核苷间键,例如硫代磷酸酯、磷酸二酯、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯或其他含磷核苷间键来制备。立体特异性寡聚物、用于制备这类寡聚物的制备方法、手性控制合成、手性设计和手性助剂详述于例如W02017192664、W02017192679、W02017062862、W02017015575、W02017015555、W02015107425、W02015108048、W02015108046、W02015108047、W02012039448、W02010064146、W02011034072、W02014010250、W02014012081、W020130127858和W02011005761中,其中的每一个都以全文引用的方式并入本文中。

[0261] 立体特异性寡聚物可以具有呈 R_p 或 S_p 构型的含磷核苷间键。键的立体构形受控的

手性含磷键被称为“立体纯”，而键的立体构形不受控制的手性含磷键被称为“立体无规”。在某些实施方案中，本公开的寡聚物包含多个立体纯和立体无规键，使得所得寡聚物在寡聚物的预指定位置具有立体纯亚基。在国际专利申请公开号WO 2017/062862 A2的图7A和7B中提供了立体纯亚基的位置的实例。在一个实施方案中，寡聚物中的所有手性含磷键都是立体无规的。在一个实施方案中，寡聚物中的所有手性含磷键都是立体纯的。

[0262] 在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物中的所有 n 个手性含磷键都是立体无规的。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物中的所有 n 个手性含磷键都是立体纯的。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物中的 n 个含磷键中的至少10% (至最接近的整数) 是立体纯的。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物中的 n 个含磷键中的至少20% (至最接近的整数) 是立体纯的。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物中的 n 个含磷键中的至少30% (至最接近的整数) 是立体纯的。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物中的 n 个含磷键中的至少40% (至最接近的整数) 是立体纯的。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物中的 n 个含磷键中的至少50% (至最接近的整数) 是立体纯的。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物中的 n 个含磷键中的至少60% (至最接近的整数) 是立体纯的。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物中的 n 个含磷键中的至少70% (至最接近的整数) 是立体纯的。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物中的 n 个含磷键中的至少80% (至最接近的整数) 是立体纯的。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物中的 n 个含磷键中的至少90% (至最接近的整数) 是立体纯的。

[0263] 在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物含有至少2个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物含有至少3个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物含有至少4个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物含有至少5个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物含有至少6个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物含有至少7个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物含有至少8个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物含有至少9个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物含有至少10个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中，寡聚物含有至少11个相

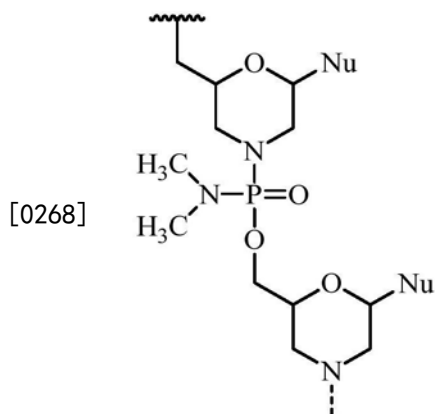
同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中,寡聚物含有至少12个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中,寡聚物含有至少13个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中,寡聚物含有至少14个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中,寡聚物含有至少15个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中,寡聚物含有至少16个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中,寡聚物含有至少17个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中,寡聚物含有至少18个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中,寡聚物含有至少19个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中,寡聚物含有至少20个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键。

[0264] 在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中,寡聚物含有至少2个相同立体取向(即 S_p 或 R_p)的连续的立体纯含磷键和至少2个其他立体取向的连续的立体纯含磷键。举例来说,寡聚物可含有至少2个 S_p 取向的连续的立体纯含磷键和至少2个 R_p 取向的连续的立体纯含磷键。

[0265] 在具有 n 个手性含磷键(其中 n 是1或更大的整数)的寡聚物的一个实施方案中,寡聚物以交替模式含有至少2个相同立体取向的连续的立体纯含磷键。举例来说,寡聚物可以按顺序含有以下:2个或更多个 R_p 、2个或更多个 S_p 和2个或更多个 R_p 等。

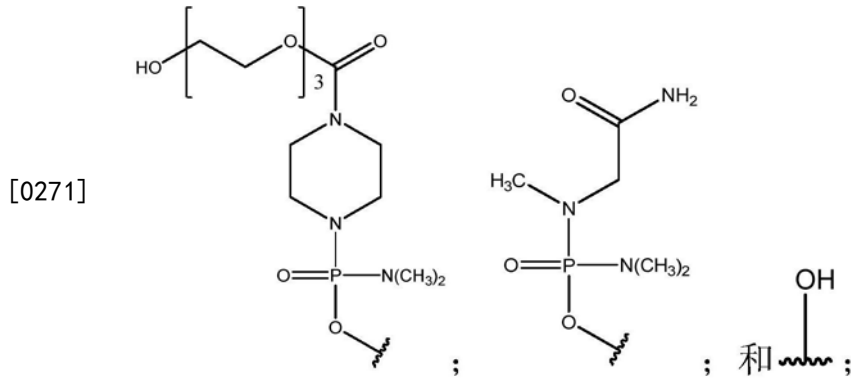
[0266] 9. 吗啉代寡聚物

[0267] 本公开的示例性实施方案涉及具有以下通用结构的二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物:



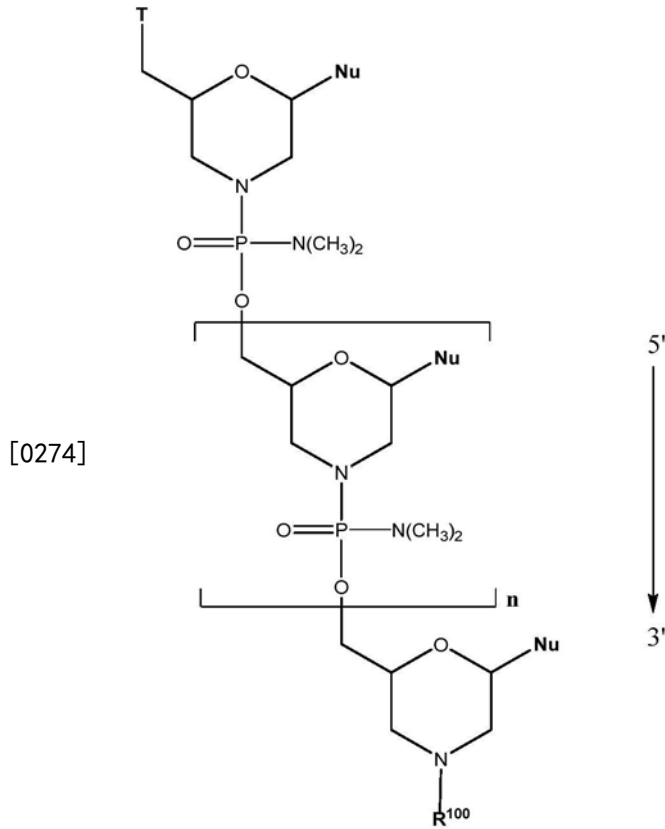
[0269] 并且如Summerton, J.等人, *Antisense&Nucleic Acid Drug Development*, 7:187-195 (1997)的图2中所描述。本文所描述的吗啉代旨在涵盖前述通用结构的所有立体异构体和互变异构体。吗啉代寡聚物的合成、结构和结合特征详述于美国专利号:5,698,685;5,217,866;5,142,047;5,034,506;5,166,315;5,521,063;5,506,337;8,076,476;和8,299,206,所有这些专利都以引用的方式并入本文中。

[0270] 在某些实施方案中,吗啉代在寡聚物的5'或3'端与“尾部”部分缀合以增加其稳定性和/或溶解性。示例性尾部包括:



[0272] 并且“尾部”部分的远端-OH或-NH₂任选地连接到细胞穿透肽。

[0273] 在各个方面,本公开提供了根据式(I)的反义寡聚物:

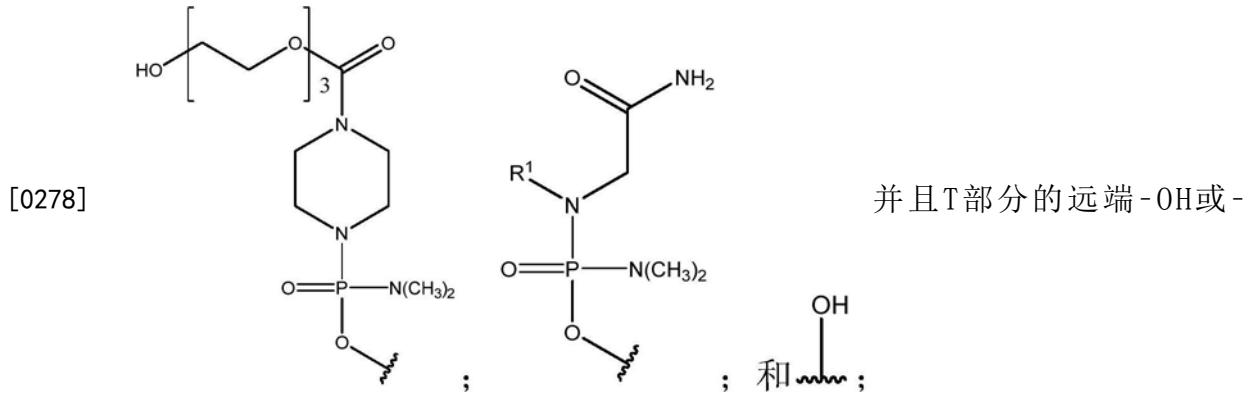


(I)

[0275] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0276] 每个Nu是核碱基,其合在一起形成靶向序列;

[0277] T是选自以下的部分:



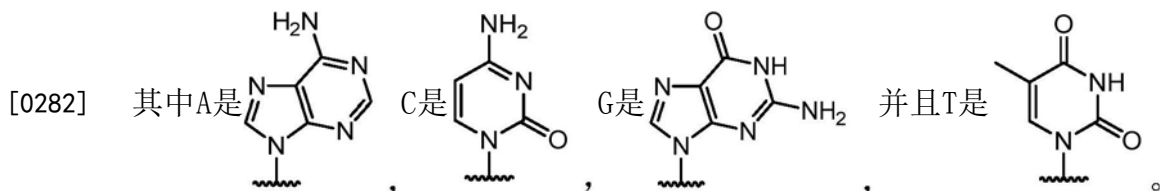
NH₂任选地连接至细胞穿透肽；

[0279] R¹⁰⁰是氢或细胞穿透肽；

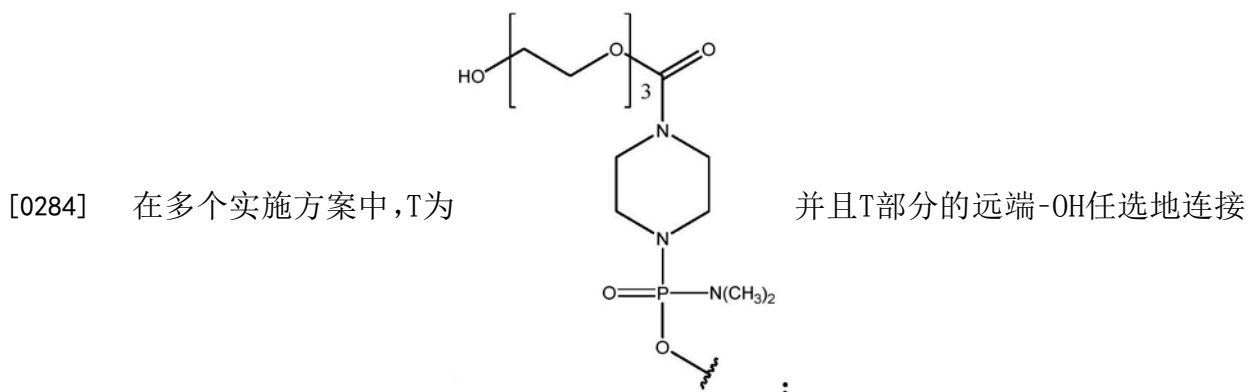
[0280] 每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基：

[0281]

退火位点	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO:1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO:3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO:5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO:7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO:8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:9



[0283] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种:SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8或SEQ ID NO.9。在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

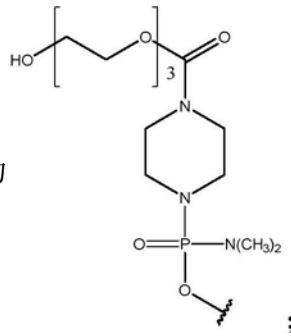


至细胞穿透肽。

[0285] 在各种实施方案中, R^{100} 是氢。在各种其他实施方案中, R^{100} 是细胞穿透肽。在各种实施方案中, R^{100} 是 $-R^5$ (SEQ ID NO:21)。在各种实施方案中, R^{100} 是 $-G-R^5$ (SEQ ID NO:20)。在各种实施方案中, R^{100} 是 $-R^6$ (SEQ ID NO:10)。在各种实施方案中, R^{100} 是 $-G-R^6$ (SEQ ID NO:11)。

[0286] 在一些实施方案中, 式 (I) 的反义寡聚物呈游离碱形式。在一些实施方案中, 式 (I) 的反义寡聚物是其药学上可接受的盐。在一些实施方案中, 式 (I) 的反义寡聚物是其 HCl (盐酸) 盐。在某些实施方案中, HCl 盐是 1HCl、2HCl、3HCl、4HCl、5HCl 或 6HCl 盐。在某些实施方案中, HCl 盐是 6HCl 盐。

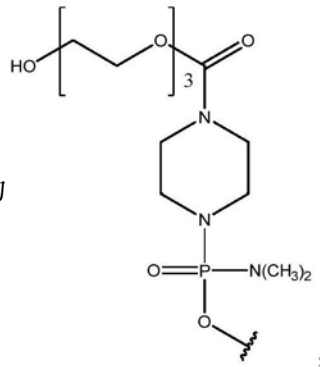
[0287] 在各种实施方案中, T 为



并且 T 部分的远端 -OH 任选地连接至

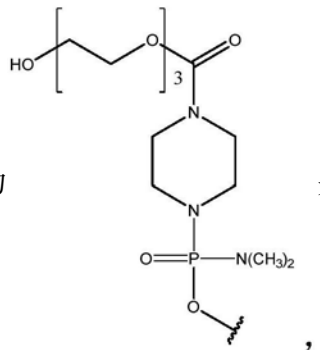
细胞穿透肽, 并且 R^{100} 为细胞穿透肽。

[0288] 在各种实施方案中, T 为



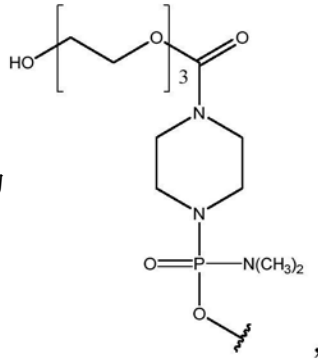
并且 R^{100} 是细胞穿透肽。

[0289] 在各种实施方案中, T 为



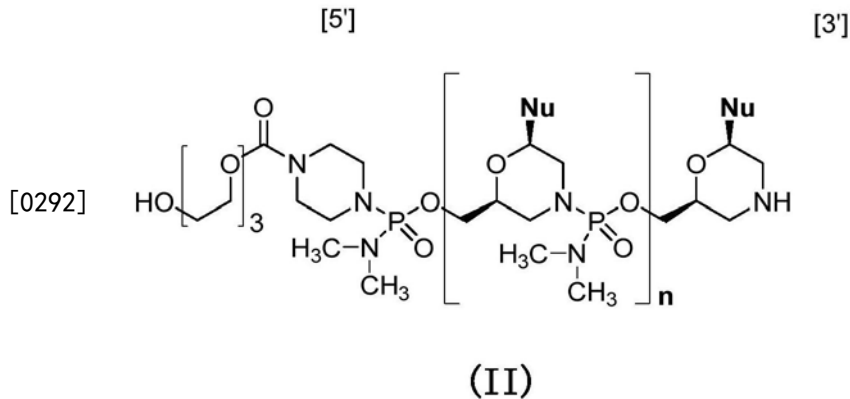
并且 R^{100} 是 $-G-R^5$ (SEQ ID NO:20)。

[0290] 在各种实施方案中, T为



并且R¹⁰⁰是-G-R⁶(SEQ ID NO:11)。

[0291] 在一些实施方案中, 本公开的反义寡聚物是根据式 (II):



[0293] 或其药学上可接受的盐, 其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:

退火位点	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO:1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO:3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO:5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO:7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO:8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:9

[0295] 其中A是 , C是 , G是 , 并且T是 在一

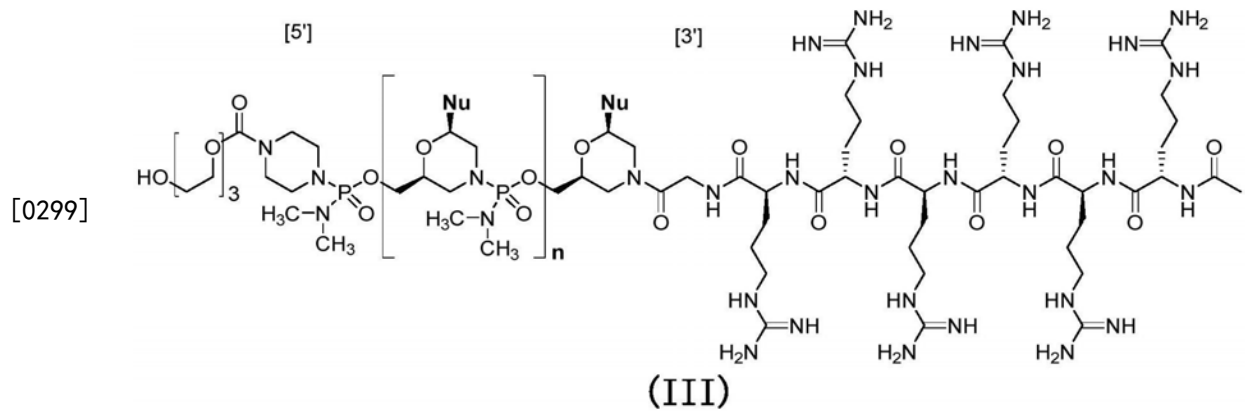
些实施方案中, 式 (II) 的远端-OH连接至细胞穿透肽。

[0296] 在一些实施方案中, 每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种: SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8或SEQ ID NO.9。在一些实施方案中, 每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

[0297] 在一些实施方案中, 式 (II) 的反义寡聚物呈游离碱形式。在一些实施方案中, 式

(II)的反义寡聚物是其医药学上可接受之盐形式。在一些实施方案中,式(II)的反义寡聚物是其HCl(盐酸)盐。在某些实施方案中,HCl盐是1HCl、2HCl、3HCl、4HCl、5HCl或6HCl盐。在某些实施方案中,HCl盐是6HCl盐。

[0298] 在一些实施方案中,本公开的反义寡聚物是根据式(III):



[0300] 或其药学上可接受的盐,其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:

[0301]

退火位点	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO:1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO:3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO:5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO:7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO:8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:9



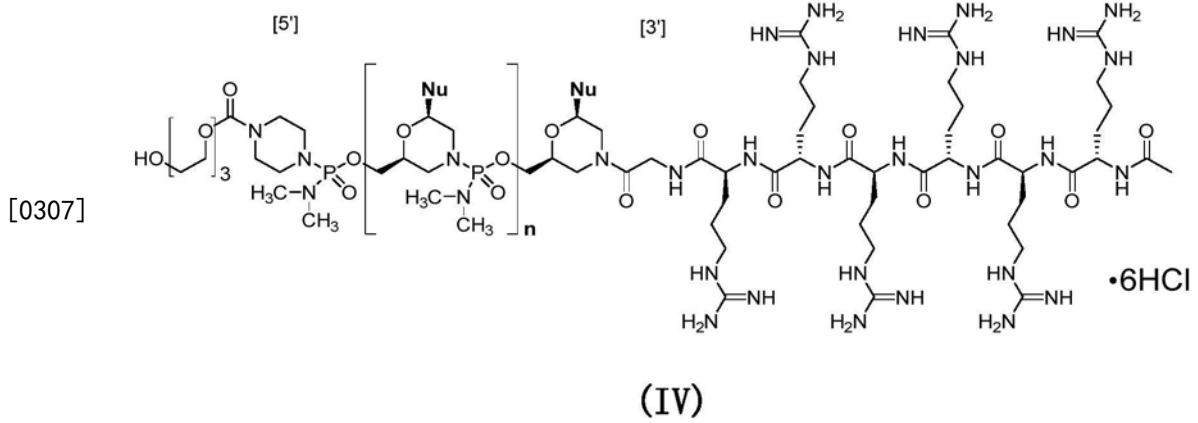
些实施方案中,式(III)的远端-OH连接至细胞穿透肽。

[0303] 在一些实施方案中,式(III)的远端-OH任选地连接至细胞穿透肽。

[0304] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种:SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8或SEQ ID NO.9。在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

[0305] 在一些实施方案中,式(III)的反义寡聚物呈游离碱形式。在一些实施方案中,式(III)的反义寡聚物是其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,式(III)的反义寡聚物是其HCl(盐酸)盐。在某些实施方案中,HCl盐是6HCl盐。

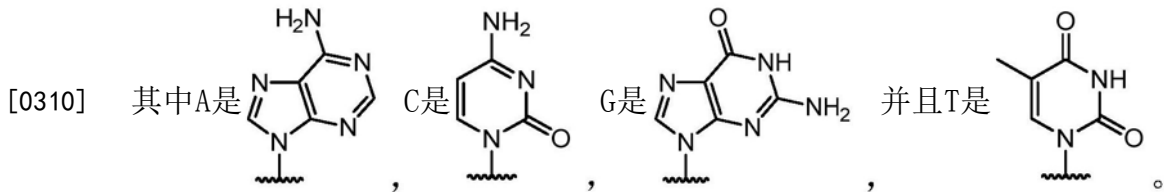
[0306] 在一些实施方案中,本公开的反义寡聚物是根据式(IV):



[0308] 其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基：

[0309]

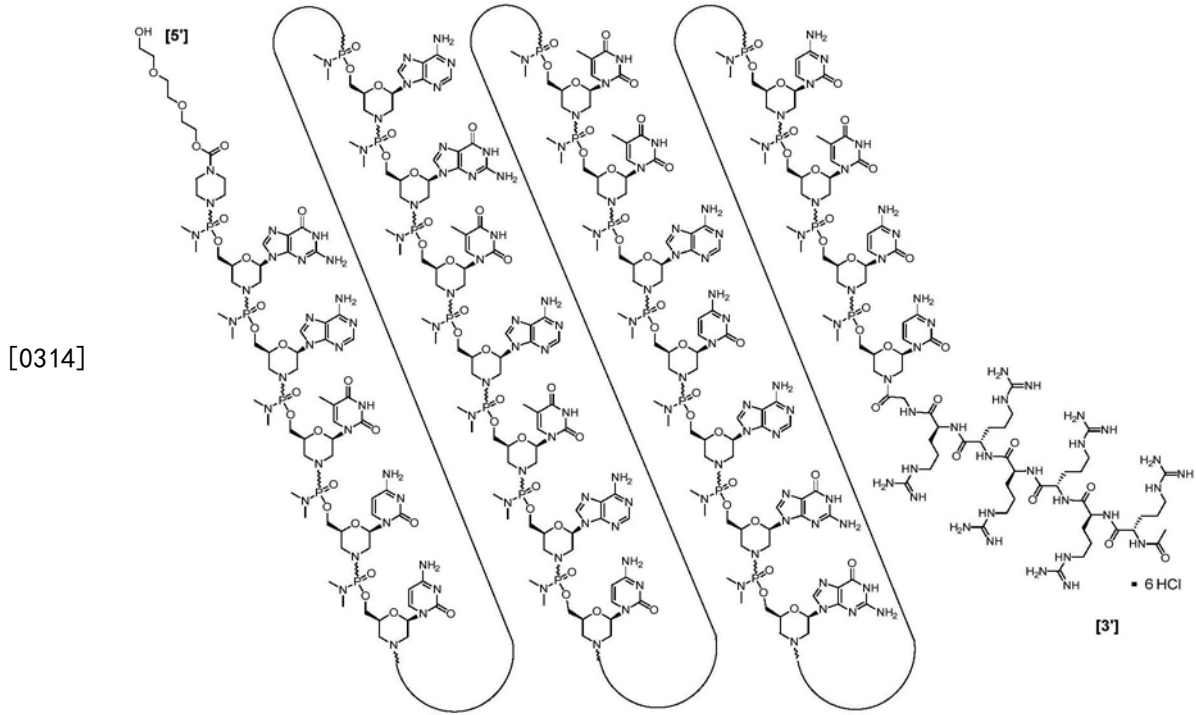
退火位点	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO:1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO:3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO:5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO:7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO:8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:9



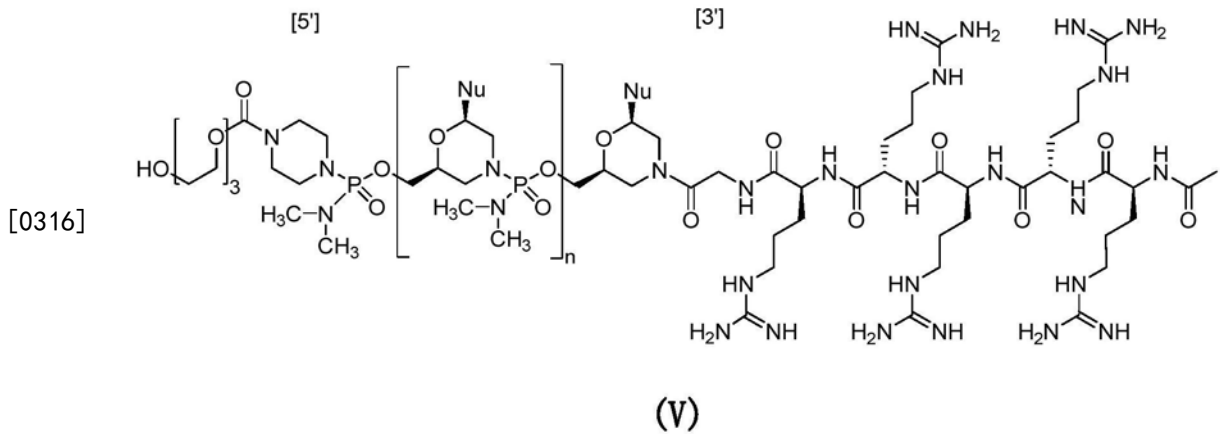
[0311] 在一些实施方案中,式(IV)的远端-OH任选地连接至细胞穿透肽。

[0312] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种:SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8或SEQ ID NO.9。在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

[0313] 在一些实施方案中,包括例如式(IV)的一些实施方案,反义寡聚物是根据式(IVa)：



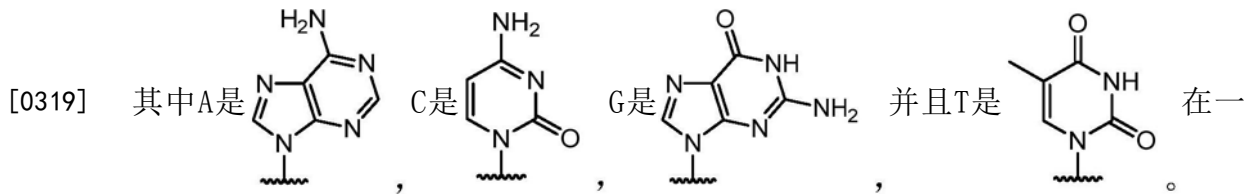
[0315] 在一些实施方案中,本公开的反义寡聚物是根据式(V):



[0317] 或其药学上可接受的盐,其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:

[0318]

退火位点	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO:1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO:3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO:5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO:6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO:7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO:8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO:9



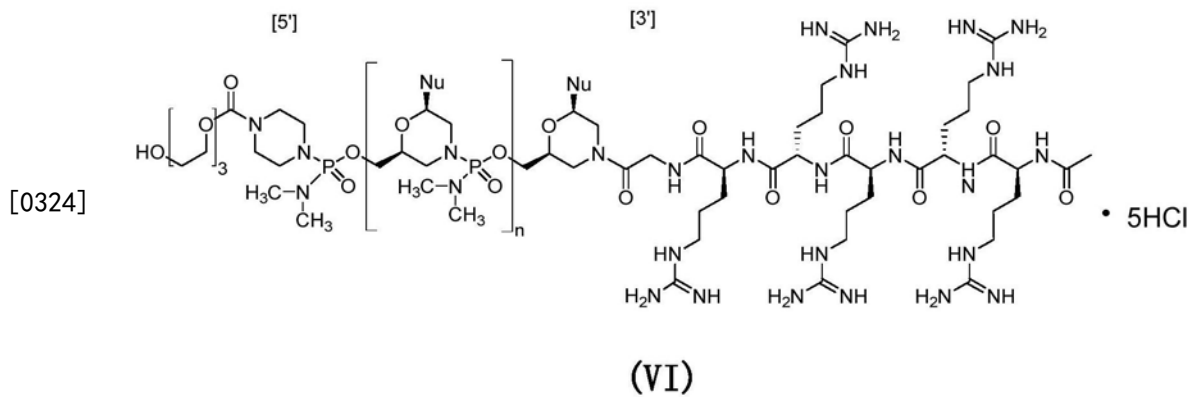
些实施方案中,式(IV)的远端-OH连接至细胞穿透肽。

[0320] 在一些实施方案中,式(V)的远端-OH任选地连接至细胞穿透肽。

[0321] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种:SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8或SEQ ID NO.9。在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

[0322] 在一些实施方案中,式(V)的反义寡聚物呈游离碱形式。在一些实施方案中,式(V)的反义寡聚物是其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,式(V)的反义寡聚物是其HCl(盐酸)盐。在某些实施方案中,HCl盐是5HCl盐。

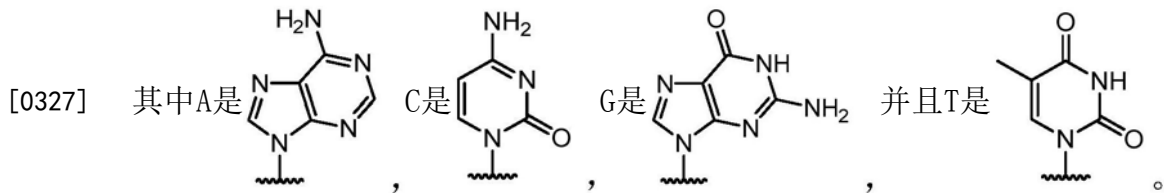
[0323] 在一些实施方案中,本公开的反义寡聚物是根据式(VI):



[0325] 其中每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种的核碱基:

退火位点	靶向序列[5'至3']	SEQ ID NO:
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

[0326]



[0328] 在一些实施方案中,式(VI)的远端-OH任选地连接至细胞穿透肽。

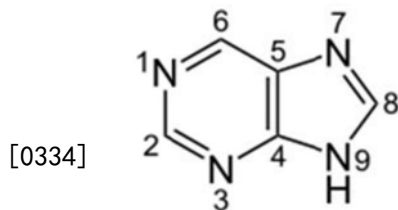
[0329] 在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于以下中的一种:SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8或SEQ ID NO.9。在一些实施方案中,每个Nu从1至n和5'至3'对应于SEQ ID NO.3。

[0330] 10. 核碱基修饰和取代

[0331] 在某些实施方案中,本公开的反义寡聚物由RNA核碱基和DNA核碱基(在本领域中通常简称为“碱基”)构成。RNA碱基通常称为腺嘌呤(A)、尿嘧啶(U)、胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)。DNA碱基通常称为腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)。在各种实施方案中,本公开的反义寡聚物由胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、腺嘌呤(A)、5-甲基胞嘧啶(5mC)、尿嘧啶(U)和次黄嘌呤(I)构成。

[0332] 在某些实施方案中,寡聚物中的一个或多个RNA碱基或DNA碱基可以被RNA碱基或DNA碱基以外的碱基修饰或取代。含有修饰的或取代的碱基的寡聚物包括一个或多个在核酸中最常见的嘌呤或嘧啶碱基被较不常见或非天然的碱基取代的寡聚物。

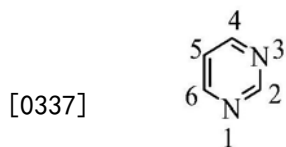
[0333] 嘌呤碱基包含与咪唑环稠合的嘧啶环,如以下通式所描述。



嘌呤

[0335] 腺嘌呤和鸟嘌呤是核酸中最常见的两种嘌呤核碱基。其他天然存在的嘌呤包括但不限于N⁶-甲基腺嘌呤、N²-甲基鸟嘌呤、次黄嘌呤和7-甲基鸟嘌呤。

[0336] 嘧啶碱基包含如下通式所描述的六元嘧啶环。



嘧啶核心

[0338] 胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶是在核酸中最常见的嘧啶碱基。其他天然存在的嘧啶包括但不限于5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、假尿嘧啶和4-硫尿嘧啶。在一个实施方案中,本文所描述的寡聚物含有胸腺嘧啶碱基代替尿嘧啶。

[0339] 其他合适的碱基包括但不限于:2,6-二氨基嘌呤、乳清酸、胍丁胺胞苷、赖胞苷、2-硫代嘧啶(例如2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶)、G-钳和其衍生物、5-取代的嘧啶(例如5-卤尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-氨基甲基尿嘧啶、5-羟甲基尿嘧啶、5-氨基

甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、Super T)、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、7-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、8-氮杂-7-脱氮鸟嘌呤、8-氮杂-7-脱氮腺嘌呤、8-氮杂-7-脱氮-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；以及简并或通用碱基，如2,6-二氟甲苯，或不存在碱基，如无碱基位点(例如1-脱氧核糖、1,2-二脱氧核糖、1-脱氧-2-0-甲基核糖；或吡咯烷衍生物，其中环氧已被氮置换(氮杂核糖))。Super A、Super G和Super T的衍生物的实例可见于美国专利6,683,173(Epoch Biosciences)，其以引用的方式全部并入本文中。cPent-G、cPent-AP和Pr-AP被证明在掺入siRNA中时降低免疫刺激作用(Peacock H.等人J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200)。假尿嘧啶是尿嘧啶的天然存在的异构化形式，具有C-糖苷而不是尿苷中的常规N-糖苷。与含尿苷的mPvNA相比，含假尿苷的合成mRNA可能具有改进的安全概况(WO2009127230，以引用的方式全部并入本文中)。

[0340] 某些核碱基对于增加本公开的反义寡聚物的结合亲和力特别有用。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。5-甲基胞嘧啶取代已被证明可使核酸双螺旋体稳定性提高0.6-1.2 °C，并且是目前优选的碱基取代，尤其是与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时，更是如此。额外的示例性修饰核碱基包括其中核碱基的至少一个氢原子被氟取代的那些核碱基。

[0341] 11. 反义寡聚物的药学上可接受的盐

[0342] 本文所描述的反义寡聚物的某些实施方案可含有碱性官能团，例如氨基或烷基氨基，因此，能够与药学上可接受的酸形成药学上可接受的盐。在这方面，术语“药学上可接受的盐”是指本公开的反义寡聚物的相对无毒的无机和有机酸加成盐。这些盐可以在施用媒介物或剂型制造过程中原位制备，或通过本公开的纯化的反义寡聚物以其游离碱形式与合适的有机或无机酸分别反应，并在随后的纯化过程中分离出这样形成的盐。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、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、萘二甲酸盐、甲磺酸盐、葡萄糖庚酸盐、乳糖醛酸盐和月桂基磺酸盐等。(参见例如，Berge等人(1977)“Pharmaceutical Salts”，J. Pharm. Sci. 66:1-19)。

[0343] 主题反义寡聚物的药学上可接受的盐包括反义寡聚物的常规无毒盐或季铵盐，例如来自无毒有机或无机酸的盐。举例来说，这种常规的无毒盐包括衍生自无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等的盐；以及由有机酸如乙酸、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、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、对氨基苯磺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸、羟乙磺酸等制备的盐。

[0344] 在某些实施方案中，本公开的反义寡聚物可以含有一个或多个酸性官能团，因此能够与药学上可接受的碱形成药学上可接受的盐。在这些情况下，术语“药学上可接受的盐”是指本公开的反义寡聚物的相对无毒的无机和有机碱加成盐。这些盐同样可以在施用媒介物或剂型制造过程中原位制备，或通过纯化的反义寡聚物以其游离酸形式与合适的碱，例如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，与氨，或与药学上可接受的有机伯胺、仲胺或叔胺分别反应。代表性的碱金属或碱土金属盐包括锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和铝盐等。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等人,见上文)。

[0345] III. 配制品和施用模式

[0346] 在某些实施方案中,本公开提供了适合于如本文所描述的反义寡聚物的治疗性递送的配制品或药物组合物。因此,在某些实施方案中,本公开提供了药学上可接受的组合物,其包含与一种或多种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描述的反义寡聚物。虽然本公开的反义寡聚物有可能单独施用,但优选以药物配制品(组合物)施用反义寡聚物。在一个实施方案中,配制品的反义寡聚物是根据式(III)或其药学上可接受的盐。

[0347] 可以适用于本公开的反义寡聚物的核酸分子的递送方法描述于例如以下中: Akhtar等人,1992,Trends Cell Bio.,2:139;Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics,编者Akhtar,1995,CRC Press和Sullivan等人,PCT WO 94/02595。这些和其他方案可用于几乎任何核酸分子的递送,包括本公开的反义寡聚物。

[0348] 本公开的药物组合物可专门配制成为以固体或液体形式施用,包括适应于下列情况的药物组合物:(1)口服施用,例如顿服药(水溶液或非水溶液或悬浮剂)、片剂(针对颊内、舌下或全身吸收)、大丸剂、散剂、颗粒剂、糊剂,施加至舌头;(2)肠胃外施用,例如,通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射,例如,作为无菌溶液或悬浮液,或持续释放配制品;(3)局部施加,例如,作为乳膏、软膏或控释贴剂或喷雾剂施加至皮肤;(4)阴道内或直肠内,例如,作为子宫托、乳膏或泡沫;(5)舌下;(6)经眼;(7)透皮;或(8)经鼻。

[0349] 可以充当药学上可接受的载剂的材料的一些实例包括但不限于:(1)糖类,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)纤维素和其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;(4)粉状黄蓍;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;(9)油,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、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;(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)无热原质水;(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/或聚酸酐;以及(22)药物配制品中采用的其他无毒兼容物质。

[0350] 适合与本公开的反义寡聚物一起配制的药剂的其他非限制性实例包括:PEG缀合的核酸;磷脂缀合的核酸;含有亲脂性部分的核酸;硫代磷酸酯;P-糖蛋白抑制剂(例如Pluronic P85),其可增强药物进入各种组织;可生物降解的聚合物,例如聚(D,L-丙交酯-共乙交酯)微球,用于植入后的持续释放递送(Emerich,D F等人,1999,Cell Transplant,8,47-58)Alkermes,Inc.Cambridge,Mass.;以及负载的纳米颗粒,例如由聚氰基丙烯酸丁酯制成的纳米颗粒,其可通过血脑屏障递送药物,并且可以改变神经元的摄取机制(Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,23,941-949,1999)。

[0351] 本公开的特征还在于使用包括含聚(乙二醇) (“PEG”)脂质的表面改性脂质体的组合物(PEG改性的、支链和非支链的或其组合,或长循环脂质体或隐形脂质体)。本公开的反义寡聚物缀合物也可以包含各种分子量的共价连接的PEG分子。这些配制品提供了一种增加药物在靶组织中的积累的方法。这类药物载体能抵抗单核吞噬系统(MPS或RES)的调理作用和消除作用,从而使囊封的药物有更长的血液循环时间和增强的组织暴露(Lasic等人Chem.Rev.1995,95,2601-2627;Ishiwata等人,Chem.Pharm.Bull.1995,43,1005-1011)。这

样的脂质体已被证明在肿瘤中选择性地积累,推测是通过在新生血管化的靶组织中的外渗和捕获(Lasic等人,Science 1995,267,1275-1276;Oku等人,1995,Biochim.Biophys.Acta,1238,86-90)。长循环脂质体增强了DNA和RNA的药代动力学和药效学,特别是与已知在MPS的组织中积累的传统阳离子脂质体相比(Liu等人,J.Biol.Chem.1995,42,24864-24870;Choi等人,International PCT Publication No.WO 96/10391;Ansell等人,国际PCT公开号W0 96/10390;Holland等人,国际PCT公开号W0 96/10392)。与阳离子脂质体相比,长循环脂质体也可能在更大程度上保护药物不被核酸酶降解,这是基于其能够避免在肝脏和脾脏等代谢侵袭性MPS组织中的积累。

[0352] 在另一实施方案中,本公开包括如美国专利号:6,692,911;7,163,695;和7,070,807中所描述的制备用于递送的反义寡聚物药物组合物。在这方面,在一个实施方案中,本公开提供了在包含赖氨酸和组氨酸(HK)的共聚物的组合物中的本公开的反义寡聚物(如美国专利号:7,163,695;7,070,807;和6,692,911中所描述),其可以单独或与PEG(例如,支链或非支链PEG或两者的混合物)组合,与PEG和靶向部分组合,或上述任何一种与交联剂组合。在某些实施方案中,本公开提供了包含葡糖酸修饰的聚组氨酸或葡糖酸化聚组氨酸/转铁蛋白-聚赖氨酸的药物组合物中的反义寡聚物。本领域技术人员还将认识到,在组合物内可以取代具有与His和Lys相似性质的氨基酸。

[0353] 润湿剂、乳化剂和润滑剂(例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁)、着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于组合物中。

[0354] 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酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;以及(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。

[0355] 本公开的配制品包括适合于口服、鼻腔、局部(包括颊内和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外施用的那些配制品。配制品可以方便地以单位剂型存在,并且可以通过药学领域中众所周知的任何方法制备。可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据所治疗的受试者和特定的施用方式而变化。可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量一般将是产生治疗效果的活性成分的量。一般此量将在活性成分的约0.1%至约99%的范围内,优选为约5%至约70%,最优选为约10%至约30%。

[0356] 在某些实施方案中,本公开的配制品包含选自环糊精、纤维素、脂质体、胶束形成剂(例如,胆汁酸)和聚合物载体(例如,聚酯和聚酸酐)的赋形剂;以及本公开的反义寡聚物。在一个实施方案中,配制品的反义寡聚物是根据式(IV)。在一个实施方案中,配制品的反义寡聚物是根据式(IVa)。在某些实施方案中,前述制剂使本公开的反义寡聚物口服生物可利用。

[0357] 制备这些配制品或药物组合物的方法包括使本公开的反义寡聚物与载体和任选的一种或多种辅助成分缔合的步骤。通常,通过使本公开的反义寡聚物与液体载体或细分的固体载体或两者均匀且紧密地缔合,然后,如果需要,将产物成型来制备配制品。

[0358] 适于口服施用的本公开的配制品可以呈胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、含片(使用调味基础,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍)、散剂、颗粒剂的形式,或作为水性或非水性液体中的溶液或悬浮液,或作为水包油或油包水液体乳液,或作为酞剂或糖浆,或作为锭剂(使用惰

性基质,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口剂等,每个含有预定量的本公开的反义寡聚物作为活性成分。本公开的反义寡聚物也可作为大丸剂、舐剂或糊剂施用。

[0359] 在口服施用的本公开的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣药丸、散剂、颗粒剂、小丸剂)中,活性成分可以与一种或多种药学上可接受的载剂,例如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或以下任何一种混合:(1)填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和/或硅酸;(2)粘合剂,如例如羧甲基纤维素、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)溶液缓释剂,例如石蜡;(6)吸收促进剂,例如季铵化合物和表面活性剂,例如泊洛沙姆和月桂醇硫酸钠;(7)润湿剂,例如例如鲸蜡醇、单硬脂酸甘油酯和非离子表面活性剂;(8)吸收剂,例如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂醇硫酸钠、硬脂酸锌、硬脂酸钠、硬脂酸和其混合物;(10)着色剂;和(11)控释剂,例如交联聚维酮或乙基纤维素。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可包含缓冲剂。类似类型的固体药物组合物也可使用乳糖或奶糖等赋形剂以及高分子量聚乙二醇等作为软壳和硬壳明胶胶囊的填充剂。

[0360] 片剂可以通过压缩或模制来制备,任选地含有一种或多种辅助成分。压缩片剂可以使用粘合剂(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,羟基乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂来制备。模制片剂可以通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉状化合物的混合物来制备。

[0361] 本公开的药物组合物的片剂和其他固体剂型(例如糖衣药丸、胶囊、丸剂和颗粒剂)可以任选地用包衣和外壳(例如肠溶包衣和其他药物配制领域中众所周知的包衣)刻痕或制备。其也可以使用例如不同比例的羟丙基甲基纤维素以提供所需的释放曲线、其他聚合物基质、脂质体和/或微球配制成使其中的活性成分缓慢或受控释放。其可以配制用于快速释放,例如冻干。其可以通过例如通过细菌截留过滤器过滤,或通过掺入无菌固体药物组合物形式的灭菌剂来灭菌,所述灭菌剂可以在使用前立即溶解在无菌水或一些其他无菌可注射介质中。这些药物组合物还可以任选地含有遮光剂,并且其成分可以是其仅或优选地在胃肠道的某一部分释放活性成分,任选地,以延迟的方式释放。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。如果合适,活性成分也可以与一种或多种上述赋形剂一起呈微囊封形式。

[0362] 用于口服施用本公开的反义寡聚物的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮剂、糖浆和酞剂。除活性成分外,液体剂型可含有本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇脂肪酸酯和其混合物。

[0363] 除惰性稀释剂外,口服药物组合物还可以包括佐剂,例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0364] 除活性化合物外,悬浮液可以含有悬浮剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧化乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍和其混合物。

[0365] 用于直肠或阴道施用的配制品可以作为栓剂提供,其可以通过将一种或多种本公开的化合物与一种或多种合适的无刺激性赋形剂或载体混合来制备,所述赋形剂或载体包

含例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸酯,其在室温下是固体,但在体温下是液体,因此会在直肠或阴道腔内融化并释放出活性化合物。

[0366] 本文提供的用于局部或透皮施用的寡聚物的配制品或剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、霜剂、乳液、凝胶、溶液、贴片和吸入剂。活性寡聚物缀合物可以在无菌条件下与药学上可接受的载剂混合,并与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。除本公开的活性化合物外,软膏剂、糊剂、霜剂和凝胶可以含有赋形剂,例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅氧烷、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌,或其混合物。

[0367] 除本公开的反义寡聚物外,散剂和喷雾剂可以含有赋形剂,例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。喷雾剂可另外含有常规推进剂,例如氟氟烃和挥发性未取代的烃,例如丁烷和丙烷。

[0368] 透皮贴剂具有额外的优点,即提供本公开的反义寡聚物向身体的受控递送。这种剂型可以通过将寡聚物溶解或分散在适当的介质中来制备。吸收增强剂也可用于增加药剂穿过皮肤的通量。这种通量的速率可以通过提供速率控制膜或将药剂分散在聚合物基质或凝胶中,以及本领域已知的其他方法来控制。

[0369] 适用于肠胃外施用的药物组合物可以包含一种或多种本公开的寡聚物缀合物与一种或多种药学上可接受的无菌等渗的水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳剂,或可在临使用之前重构成无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末的组合,其可以含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使配制品与预期接受者的血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。可以在本公开的药物组合物中采用的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和其合适的混合物、植物油如橄榄油和可注射的有机酯,例如油酸乙酯。举例来说,通过使用包衣材料(例如卵磷脂),通过在分散体的情况下保持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。在一个实施方案中,药物组合物的反义寡聚物是根据式(IV)。在一个实施方案中,药物组合物的反义寡聚物是根据式(IVa)。

[0370] 这些药物组合物还可以含有佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等),可以确保防止微生物对主题寡聚物缀合物的作用。还可能需要在组合物中包含等渗剂,例如糖、氯化钠等。此外,可以通过包含延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。

[0371] 在某些情况下,为了延长药物的作用,希望减慢皮下或肌肉内注射药物的吸收。这可以通过使用具有较差水溶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他方法来实现。然后,药物的吸收率取决于其溶解率,而溶解率又取决于晶体大小和晶形。或者,通过将药物溶解或悬浮在油性媒剂中来实现胃肠外施用的药物形式的延迟吸收。

[0372] 可注射储库形式可通过在可生物降解的聚合物(例如聚丙交酯-聚乙交酯)中形成主题寡聚物缀合物的微胶囊矩阵而制成。根据寡聚物与聚合物的比例,以及所采用的特定聚合物的性质,可以控制寡聚物的释放速率。其他可生物降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。还可以通过将药物夹带在与身体组织兼容的脂质体或微乳剂中来制备可注射储库配制品。

[0373] 当本公开的反义寡聚物作为药物施用于人类和动物时,其可以本身给药,或可以

作为药物组合物给药,例如含有0.1至99% (更优选10至30%) 的反义寡聚物以及药学上可接受的载剂。

[0374] 本公开的配制品或制剂可以口服、胃肠外、局部或直肠给药。其通常以适合每种施用途径的形式给药。举例来说,其以片剂或胶囊形式施用,通过注射、吸入、眼药水、软膏、栓剂或输液施用;通过乳液或软膏局部施用;或通过栓剂直肠施用。

[0375] 无论所选择的施用途径如何,本公开的反义寡聚物(可以合适的水合形式使用)和/或本公开的药物组合物可以通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。本公开的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以改变,以获得有效地实现特定患者、组合物和施用方式所需的治疗反应的活性成分的量,而不会对患者产生不可接受的毒性。

[0376] 所选择的剂量水平将取决于多种因素,包括所采用的本公开的特定反义寡聚物或其酯、盐或酰胺的活性;施途径;施用时间;所采用的特定寡聚物的排泄或代谢率;吸收的速率和程度;治疗的持续时间;与所采用的特定寡聚物组合使用的其他药物、化合物和/或材料;所治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康状况和先前的病史;以及医学技术中众所周知的类似因素。

[0377] 本领域中具有普通技术的医师或兽医可以易于确定并开处所需药物组合物的有效量。举例来说,医师或兽医可以低于为达成所需治疗作用所需水平的药物组合物中采用的本公开的反义寡聚物的剂量开始,并且逐渐增加剂量直至达成所需作用。一般来说,本公开的反义寡聚物的合适的日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的反义寡聚物的量。此类有效剂量将一般取决于本文所描述的因素。一般来说,当用于指示的效果时,本公开的反义寡聚物对患者的口服、静脉内、脑室内和皮下剂量将范围介于每天每公斤体重约0.0001至约100mg。

[0378] 在一些实施方案中,本公开的反义寡聚物一般以约1至约200mg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,静脉内施用剂量为约0.5mg至约200mg/kg。

[0379] 在一些实施方案中,式(I)的反义寡聚物以通常约1至约200mg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,式(I)的反义寡聚物的静脉内施用剂量为约0.5mg至约200mg/kg。在一些实施方案中,式(II)的反义寡聚物以通常约1至约200mg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,式(II)的反义寡聚物的静脉内施用剂量为约0.5mg至约200mg/kg。在一些实施方案中,式(III)的反义寡聚物以通常约1至约200mg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,式(III)的反义寡聚物的静脉内施用剂量为约0.5mg至约200mg/kg。在一些实施方案中,式(IV)的反义寡聚物以通常约1至约200mg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,式(IV)的反义寡聚物的静脉内施用剂量为约0.5mg至约200mg/kg。在一些实施方案中,式(IVa)的反义寡聚物以通常约1至约200mg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,式(IVa)的反义寡聚物的静脉内施用剂量为约0.5mg至约200mg/kg。在一些实施方案中,式(V)的反义寡聚物以通常约1至约200mg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,式(V)的反义寡聚物的静脉内施用剂量为约0.5mg至约200mg/kg。在一些实施方案中,式(VI)的反义寡聚物以通常约1至约200mg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,式(VI)的反义寡聚物的静脉内施用剂量为约0.5mg至约200mg/kg。

[0380] 如本领域中将理解的,每周、每两周、每三周或每月施用可在本文所讨论的一次或多次施用或子剂量中。

[0381] 本文所描述的核酸分子和反义寡聚物可以通过本领域技术人员已知的各种方法施用于细胞,包括但不限于如本文所描述和本领域中已知的囊封在脂质体中、通过离子电渗疗法或通过掺入其他媒介物中,例如水凝胶、环糊精、可生物降解的纳米胶囊和生物粘附微球。在某些实施方案中,可利用微乳化技术来提高亲脂性(水不溶性)药剂的生物利用率。实例包括曲美汀(Trimetrine) (Dordunoo, S.K.等人, Drug Development and Industrial Pharmacy, 17 (12), 1685-1713, 1991) 和REV 5901 (Sheen, P.C.等人, J Pharm Sci 80 (7), 712-714, 1991)。除其他好处外,微乳化通过优先引导吸收到淋巴系统而不是循环系统,从而绕过肝脏,并防止化合物在肝胆循环中被破坏来提高生物利用率。

[0382] 在本公开的一个方面,配制品含有由本文提供的寡聚物和至少一种两亲载体形成的胶束,其中胶束的平均直径小于约100nm。更优选的实施方案提供了平均直径小于约50nm的胶束,甚至更优选的实施方案提供了平均直径小于约30nm或甚至小于约20nm的胶束。

[0383] 虽然所有合适的两亲载体都可以考虑,但目前优选的载体一般是那些具有一般公认安全(GRAS)状态的载体,并且当溶液与复杂的水相(例如在人类胃肠道中发现的水相)接触时,既能溶解本公开的反义寡聚物,又能在后期使其微乳化。通常,满足这些要求的两亲成分的HLB(亲水与亲脂平衡)值为2-20,并且其结构含有C-6至C-20范围内的直链脂肪族基团。实例是聚乙二醇化的脂肪甘油酯和聚乙二醇。

[0384] 两亲载体的实例包括饱和与单不饱和的聚乙二醇脂肪酸甘油酯,例如从完全或部分氢化的各种植物油中得到的那些。这类油可有利地由三脂肪酸、二脂肪酸和单脂肪酸甘油酯以及相应脂肪酸的二聚和单聚(乙二醇)酯组成,特别优选的脂肪酸组成包括癸酸4-10%、癩酸3-9%、月桂酸40-50%、肉豆蔻酸14-24%、棕榈酸4-14%和硬脂酸5-15%。另一类有用的两亲载体包括部分酯化的脱水山梨糖醇和/或山梨糖醇,以及饱和或单不饱和脂肪酸(SPAN系列)或相应的乙氧基化类似物(TWEEN系列)。

[0385] 市售的两亲载体可能特别有用,包括Gelucire系列、Labrafil、Labrasol或Lauroglycol(均由Gattefosse Corporation, Saint Priest, France生产和分销)、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、聚山梨醇酯80等(由美国及全球多家公司生产和分销)。

[0386] 在某些实施方案中,可以通过使用脂质体、纳米胶囊、微颗粒、微球、脂质颗粒、囊泡等进行递送,以将本公开的药物组合物引入合适的宿主细胞中。特别是,本公开的药物组合物可以配制成囊封在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球、纳米颗粒等中递送。这种递送载体的配制和使用可以使用已知的和常规的技术来进行。

[0387] 适合在本公开中使用的亲水聚合物是那些容易溶于水,可以共价连接到形成囊泡的脂质上,并且在体内可以耐受而没有毒性作用(即,是生物兼容性的)的聚合物。合适的聚合物包括聚(乙二醇)(PEG)、聚乳酸(也称为聚丙交酯)、聚乙二醇酸(也称为聚乙交酯)、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物和聚乙烯醇。在某些实施方案中,聚合物的重均分子量为约100或120道尔顿至约5,000或10,000道尔顿,或约300道尔顿至约5,000道尔顿。在其他实施方案中,聚合物是重均分子量为约100至约5,000道尔顿,或重均分子量为约300至约5,000道尔顿的聚(乙二醇)。在某些实施方案中,聚合物是重均分子量为约750道尔顿的聚(乙二醇),例如PEG(750)。聚合物也可以由其中的单体数目来定义;本公开的一个优选实施方案利用至少约三个单体的聚合物,这种由三个单体组成的PEG聚合物的分子量为约132道尔顿。

[0388] 可能适合在本公开中使用的其他亲水聚合物包括聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺和衍生纤维素，例如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0389] 在某些实施方案中，本公开的配制品包含选自以下组成的组的生物兼容性聚合物：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、聚氨基甲酸酯和其共聚物、纤维素、聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酸酐、聚(正)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(丙交酯-共-己内酯)、多糖、蛋白质、聚透明质酸、聚氰基丙烯酸酯和其掺合物、混合物或共聚物。

[0390] 环糊精是环状寡糖，由6、7或8个葡萄糖单元组成，分别用希腊字母 α 、 β 或 γ 表示。葡萄糖单元通过 α -1,4-糖苷键连接。由于糖单元的椅子构型，所有的仲羟基(在C-2、C-3处)都位于环的一侧，而C-6处的所有伯羟基都位于另一侧。因此，外表面是亲水的，使环糊精具有水溶性。相反，环糊精的空腔是疏水的，因为其是由原子C-3和C-5的氢和醚类氧所衬的。这些基质允许与各种相对疏水的化合物进行络合，包括例如类固醇化合物，如17 α -雌二醇(参见例如，van Uden等人Plant Cell Tiss.Org.Cult.38:1-3-113(1994))。络合是通过范德华相互作用(Van der Waals interactions)和氢键形成而发生。关于环糊精化学的一般综述，参见，Wenz, Agnew.Chem.Int.编Engl., 33:803-822(1994)。

[0391] 环糊精衍生物的物理化学特性在很大程度上取决于取代的种类和程度。举例来说，其在水中的溶解度从不溶(例如，三乙酰- β -环糊精)到147%可溶(w/v)(G-2- β -环糊精)。另外，其可溶于许多有机溶剂。环糊精的特性使得能够通过增加或减少其溶解度来控制各种配制组分的溶解度。

[0392] 已经描述了许多环糊精和其制备方法。举例来说，Parmeter(I)等人(美国专利号3,453,259)和Gramera等人(美国专利号3,459,731)描述了电中性环糊精。其他衍生物包括具有阳离子特性的环糊精[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)和具有阴离子特性的环糊精[Parmeter(III)，美国专利号3,426,011]。在具有阴离子特性的环糊精衍生物中，羧酸、亚磷酸、次磷酸、磷酸、磷酸、硫代磷酸、硫代亚磺酸和磺酸已被附接至母体环糊精[参见，Parmeter(III)，美国专利号3,453,257]。此外，磺基烷基醚环糊精衍生物已由Stella等人描述(美国专利号5,134,127)。

[0393] 脂质体由至少一个脂质双层膜组成，所述脂质双层膜包围水性内部隔室。脂质体可按膜的类型和大小来表征。小单层囊泡(SUV)具有单层膜，通常直径在0.02和0.05 μm 之间；大单层囊泡(LUVS)通常大于0.05 μm 。寡层大囊泡和多层囊泡具有多个通常同心的膜层，通常大于0.1 μm 。具有多个非同心膜的脂质体，即在一个较大囊泡内含有几个较小囊泡，称为多囊囊泡。

[0394] 本公开的一个方面涉及包括含本公开的反义寡聚物的脂质体的配制品，其中脂质体膜被配制为提供具有增加的载量的脂质体。或者或另外，本公开的反义寡聚物可以包含在脂质体的脂质体双层内，或吸附到脂质体的脂质体双层上。本公开的反义寡聚物可以与脂质表面活性剂聚集，并携带在脂质体的内部空间内；在这些情况下，脂质体膜被配制成抵抗活性剂-表面活性剂聚集的破坏作用。

[0395] 根据本公开的一个实施方案，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囊封的内部空间，并从脂质双层的外

部延伸到周围环境中。

[0396] 本公开的脂质体中包含的活性剂呈溶解形式。根据本公开的脂质体的内部空间内可夹带表面活性剂和活性剂(例如含有感兴趣的活性剂的乳液或胶束)的聚集物。表面活性剂的作用是分散和溶解活性剂,并且可以选自任何合适的脂肪族、环脂肪族或芳香族表面活性剂,包括但不限于不同链长(例如,约C14至约C20)的生物兼容性溶血磷脂酰胆碱(LPG)。聚合物衍生的脂质如PEG-脂质也可用于胶束的形成,因为其将起到抑制胶束/膜融合的作用,并且由于将聚合物添加到表面活性剂分子中可降低表面活性剂的CMC并有助于胶束的形成。优选的是CMC在微摩尔范围内的表面活性剂;可以利用更高的CMC表面活性剂来制备夹带在本公开的脂质体内的胶束。

[0397] 根据本公开的脂质体可以通过本领域已知的各种技术中的任何一种来制备。参见例如美国专利号4,235,871;公开的PCT申请W096/14057;New RRC,Liposomes:A practical approach,IRL Press,Oxford(1990),第33-104页和Lasic DD,Liposomes from physics to applications,Elsevier Science Publishers BV,Amsterdam,1993。举例来说,本公开的脂质体可以通过将用亲水聚合物衍生的脂质扩散到预成型的脂质体中来制备,例如将预成型的脂质体暴露在由脂质接枝聚合物构成的胶束中,脂质浓度对应于脂质体中所需的衍生脂质的最终摩尔百分比。含有亲水聚合物的脂质体也可以通过均质化、脂质场水合或挤出技术形成,如本领域中已知的。

[0398] 在另一个示例性配制程序中,活性剂首先通过超声分散在易于溶解疏水分子的溶血磷脂酰胆碱或其他低CMC表面活性剂(包括聚合物接枝脂质)中。然后将所得的活性剂胶束悬浮液用于再水化干燥的脂质样品,所述样品含有合适摩尔百分比的聚合物接枝脂质或胆固醇。然后使用本领域已知的挤出技术将脂质和活性剂悬浮液形成脂质体,并通过标准柱分离将所得脂质体与未囊封的溶液分离。

[0399] 在本公开的一个方面,脂质体被制备成在选定的尺寸范围内具有基本均匀的尺寸。一种有效的施胶方法涉及将脂质体的水性悬浮液挤出通过一系列具有选定的均匀孔径的聚碳酸酯膜;膜的孔径将与通过所述膜挤出产生的脂质体的最大尺寸大致对应。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,可以利用如DharmaFECT®和Lipofectamine®等试剂将多核苷酸或蛋白质引入细胞中。

[0400] 本公开的配制品的释放特征取决于囊封材料、囊封药物的浓度和释放调节剂的存在。举例来说,释放可以被操纵为pH依赖性的,例如,使用pH敏感涂层,所述涂层仅在低pH值下释放,如在胃中,或在较高pH值下释放,如在肠道中。可以使用肠溶包衣来防止释放发生,直到通过胃之后。囊封在不同材料中的氰胺的多种包衣或混合物可用于在胃中获得初始释放,随后在肠道中释放。还可以通过包含盐类或成孔剂来操纵释放,这些盐类或成孔剂可以增加水的吸收或药物从胶囊中扩散释放。改变药物溶解度的赋形剂也可用于控制释放速率。也可以掺入增强基质降解或从基质释放的药剂。其可以添加到药物中,作为单独的相(即,作为颗粒)添加,或者可以根据化合物共溶于聚合物相中。在大多数情况下,量应在0.1%与30%(w/w聚合物)之间。降解促进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;有机碱,例如硫酸鱼精蛋白、精胺、胆碱、乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺;以及表面活性

剂,例如Tween®和Pluronic®。能增加基质微观结构的成孔剂(即,水溶性化合物,例如无机盐和糖)作为颗粒添加。其范围通常在1%与30%(w/w聚合物)之间。

[0401] 还可以通过改变颗粒在肠道内的停留时间来操纵吸收。这可以通过例如用粘膜粘合剂聚合物包覆颗粒,或选择粘膜粘合剂聚合物作为囊封材料来实现。实例包括大多数具有游离羧基的聚合物,例如壳聚糖、纤维素,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和修饰的丙烯酸酯基(例如氰基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯)的聚合物)。

[0402] 反义寡聚物可配制成包含在外科或医疗装置或植入物内,或适应于由外科或医疗装置或植入物释放。在某些方面,可以用反义寡聚物包覆或以其他方式处理植入物。举例来说,水凝胶或其他聚合物,例如生物兼容性和/或可生物降解的聚合物,可用于包覆具有本公开的药物组合物的植入物(即,所述组合物可通过使用水凝胶或其他聚合物适应于与医疗装置一起使用)。用于包覆具有药剂的医疗装置的聚合物和共聚物是本领域中众所周知的。植入物的实例包括但不限于支架、药物洗脱支架、缝合线、假体、血管导管、透析导管、血管移植物、假体心脏瓣膜、心脏起搏器、植入式心脏复律除颤器、静脉注射针、用于骨固定和形成的装置,例如针、螺钉、板和其他装置,以及用于伤口愈合的人工组织基质。

[0403] 除了本文提供的方法外,根据本公开使用的反义寡聚物可以与其他药物类似地配制成以任何方便的方式用于人类或兽药的施用。反义寡聚物和其相应的配制品可单独或与其他治疗策略组合施用,用于治疗肌营养不良,例如成肌细胞移植、干细胞疗法、氨基糖苷类抗生素的施用、蛋白酶体抑制剂和上调疗法(例如,上调肌营养相关蛋白,肌营养不良蛋白的一种常染色体旁系同源物)。

[0404] 在一些实施方案中,额外的治疗剂可以在施用本公开的反义寡聚物之前、同时或之后施用。举例来说,反义寡聚物可与类固醇和/或抗生素组合施用。在某些实施方案中,将反义寡聚物施用给正在接受背景类固醇理论(例如,间歇或慢性/连续背景类固醇疗法)的患者。举例来说,在一些实施方案中,在施用反义寡聚物之前,患者已经用皮质类固醇治疗,并继续接受类固醇疗法。在一些实施方案中,类固醇是糖皮质激素或强的松。

[0405] 所描述的施用途径仅旨在作为一种指导,因为熟练的从业人员将能够很容易地确定最佳的施用途径和任何特定动物和病况的剂量。已经尝试了多种在体外和体内将功能性新遗传物质引入细胞的方法(Friedmann(1989) *Science*, 244:1275-1280)。这些方法包括将待表达的基因整合到修饰的逆转录病毒中(Friedmann(1989) 见上文;Rosenberg(1991) *Cancer Research* 51(18), 增刊:5074S-5079S);整合到非逆转录病毒载体中(例如,腺相关病毒载体)(Rosenfeld等人(1992) *Cell*, 68:143-155;Rosenfeld等人(1991) *Science*, 252:431-434);或通过脂质体递送与异源启动子-增强子元件相连的转基因(Friedmann(1989), 见上文;Brigham等人(1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298:278-281;Nabel等人(1990) *Science*, 249:1285-1288;Hazinski等人(1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*, 4:206-209以及Wang和Huang(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7851-7855);与配体特异性、基于阳离子的转运系统偶合(Wu和Wu(1988) *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624)或使用裸DNA、表达载体(Nabel等人(1990), 见上文;Wolff等人(1990) *Science*, 247:1465-1468)。将转基因直接注射到组织中仅产生局部表达(Rosenfeld(1992) 见上文;Rosenfeld等人(1991) 见上文;Brigham等人(1989) 见上文;Nabel(1990) 见上文和Hazinski等人(1991) 见上文)。Brigham等人的小组(*Am. J. Med. Sci.* (1989) 298:278-281和*Clinical Research* (1991) 39(摘要))报

道了在静脉内或气管内施用DNA脂质体复合物后,仅对小鼠的肺进行体内转染。人类基因治疗程序的评论文章的一个实例是:Anderson, Science (1992) 256:808-813。

[0406] 在另一个实施方案中,本公开的药物组合物可以另外包含如Han等人, Nat. Comms. 7, 10981 (2016) 中所提供的碳水化合物,其全部内容以引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,本公开的药物组合物可包含5%的己糖碳水化合物。举例来说,本公开的药物组合物可包含5%的葡萄糖、5%的果糖或5%的甘露糖。在某些实施方案中,本公开的药物组合物可包含2.5%的葡萄糖和2.5%的果糖。在一些实施方案中,本公开的药物组合物可以包含选自以下的碳水化合物:以5体积%的量存在的阿拉伯糖、以5体积%的量存在的葡萄糖、以5体积%的量存在的山梨糖醇、以5体积%的量存在的半乳糖、以5体积%的量存在的果糖、以5体积%的量存在的木糖醇、以5体积%的量存在的甘露糖、各自以2.5体积%的量存在的葡萄糖和果糖的组合,以及以5.7体积%的量存在的葡萄糖、以2.86体积%的量存在的果糖和以1.4体积%的量存在的木糖醇的组合。

[0407] IV. 使用方法

[0408] 使用外显子跳跃来恢复肌营养不良蛋白阅读框

[0409] 治疗由肌营养不良蛋白基因的框外突变引起的DMD的潜在治疗方法是由称为BMD的肌营养不良蛋白的较轻形式提出的,这种较轻形式是由框内突变引起的。将框外突变转化为框内突变的能力将假设保留mRNA阅读框,并产生内部缩短但有功能的肌营养不良蛋白。本公开的反义寡聚物被设计来实现这一目的。

[0410] 式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(VI)的反义寡聚物与靶向的前体mRNA序列的杂交干扰前体mRNA剪接复合物的形成,并从成熟mRNA中删除外显子50。本公开的反义寡聚物的结构和构象允许与互补序列进行序列特异性碱基配对。

[0411] 含有全部79个外显子的正常肌营养不良蛋白mRNA将产生正常的肌营养不良蛋白。每个外显子的形状描绘了外显子之间的密码子是如何分割的;值得注意的是,一个密码子由三个核苷酸组成。矩形的外显子以完整的密码子开始和结束。箭头形的外显子以完整的密码子开始,但以分裂的密码子结束,仅包含密码子的核苷酸第1号。这个密码子的第2号和第3号核苷酸被包含在随后的外显子中,所述外显子将以人字形开始。

[0412] 分析与人类肌营养不良蛋白前体mRNA外显子50、内含子49和/或内含子50的靶区互补并诱导外显子50跳跃的反义寡聚物的效果的临床结果包括肌营养不良蛋白阳性纤维百分比(PDPF)、六分钟步行测试(6MWT)、丧失行走能力(LOA)、北极星移动评价(NSAA)、肺功能测试(PFT)、无外力支持下起立(从仰卧位)的能力、从头肌营养素产生和其他功能测量。

[0413] 在一些实施方案中,本公开提供了在具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变的受试者中产生肌营养不良蛋白的方法,所述方法包含向所述受试者施用如本文所描述的反义寡聚物或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,本公开提供了在患有杜氏肌营养不良(DMD)的受试者中恢复mRNA阅读框以诱导肌营养不良蛋白产生的方法,所述受试者具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变。蛋白质的产生可以通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质印迹分析或免疫组织化学(IHC)来测量。

[0414] 在一些实施方案中,本公开提供了治疗有需要的受试者的DMD的方法,其中所述受试者具有适合于外显子50跳跃的肌营养不良蛋白基因的突变,所述方法包含向所述受试者施用如本文所描述的反义寡聚物或其药学上可接受的盐。在各种实施方案中,对受试者的

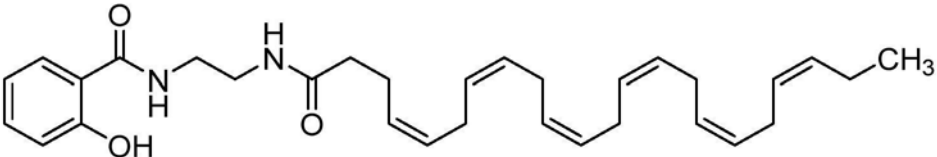
治疗是通过延迟疾病进展来测量的。在一些实施方案中,对受试者的治疗是通过维持受试者的行走能力或减少受试者的行走能力丧失来测量的。在一些实施方案中,使用6分钟步行测试(6MWT)来测量行走能力。在某些实施方案中,使用北极星移动评价(NSAA)来测量行走能力。

[0415] 在各种实施方案中,本公开提供了用于维持患有DMD的受试者的肺功能或减少肺功能丧失的方法,其中所述受试者具有适合于外显子50跳跃的DMD基因突变,所述方法包含向所述受试者施用如本文所描述的反义寡聚物或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,肺功能以最大呼气压力(MEP)测量。在某些实施方案中,肺功能以最大吸气压力(MIP)测量。在一些实施方案中,肺功能以用力肺活量(FVC)测量。

[0416] 在另一个实施方案中,本公开的药物组合物可以在本公开的方法中与碳水化合物以同一配制品或单独的配制品共同施用,如Han等人,Nat. Comms. 7, 10981 (2016)中所提供,其全部内容以引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,本公开的药物组合物可以与5%的己糖碳水化合物共同施用。举例来说,本公开的药物组合物可以与5%的葡萄糖、5%的果糖或5%的甘露糖共同施用。在某些实施方案中,本公开的药物组合物可以与2.5%的葡萄糖和2.5%的果糖共同施用。在一些实施方案中,本公开的药物组合物可以与选自以下的碳水化合物共同施用:以5体积%的量存在的阿拉伯糖、以5体积%的量存在的葡萄糖、以5体积%的量存在的山梨糖醇、以5体积%的量存在的半乳糖、以5体积%的量存在的果糖、以5体积%的量存在的木糖醇、以5体积%的量存在的甘露糖、各自以2.5体积%的量存在的葡萄糖和果糖的组合,以及以5.7体积%的量存在的葡萄糖、以2.86体积%的量存在的果糖和以1.4体积%的量存在的木糖醇的组合。

[0417] 在各种实施方案中,本公开的反义寡聚物与治疗有效量的非甾体抗炎化合物共同施用。在一些实施方案中,非甾体抗炎化合物是NF- κ B抑制剂。举例来说,在一些实施方案中,NF- κ B抑制剂可以是CAT-1004或其药学上可接受的盐。在各种实施方案中,NF- κ B抑制剂可以是水杨酸盐和DHA的缀合物。在一些实施方案中,NF- κ B抑制剂是CAT-1041或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,NF- κ B抑制剂是水杨酸盐和EPA的缀合物。在各种实施方案

中,NF- κ B抑制剂是



或其药学上可接受的盐。

其药学上可接受的盐。

[0418] 在一些实施方案中,非甾体抗炎化合物是TGF- β 抑制剂。举例来说,在某些实施方案中,TGF- β 抑制剂是HT-100。

[0419] 在某些实施方案中,描述了如本文所描述的反义寡聚物,其用于疗法中。在某些实施方案中,描述了如本文所描述的反义寡聚物,其用于治疗杜氏肌营养不良。在某些实施方案中,描述了如本文所描述的反义寡聚物,其用于制造用于疗法中的药物。在某些实施方案中,描述了如本文所描述的反义寡聚物,其用于制造用于治疗杜氏肌营养不良的药物。

[0420] V. 试剂盒

[0421] 本公开还提供了用于治疗患有遗传病的患者的试剂盒,所述试剂盒包含至少一种反义分子(例如,包含SEQ ID NO:1-9中的任一个示出的碱基序列的反义寡聚物),包装在合

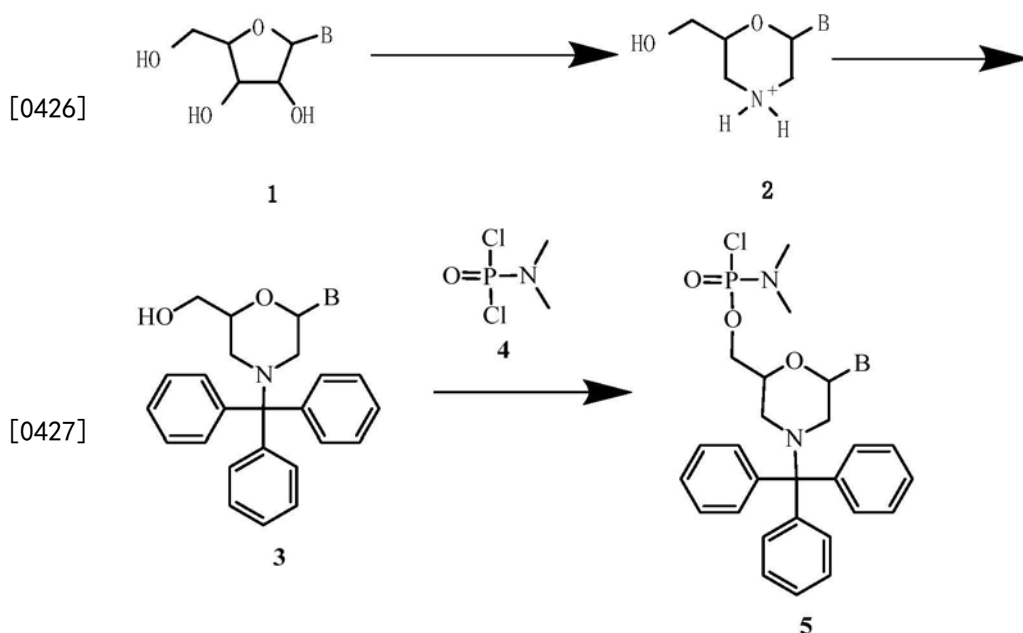
适的容器中,并附有使用说明。试剂盒还可以含有外围试剂,例如缓冲剂、稳定剂等。本领域的普通技术人员应理解,上述方法的应用在鉴定适用于治疗许多其他疾病的反义分子方面具有广泛的应用。在一个实施方案中,试剂盒包含根据式(I)-(VI)中的任一个的反义寡聚物。

[0422] 实施例

[0423] 尽管出于清楚理解的目的已经通过图示和实例的方式对前述公开进行了一些详细的描述,但是根据本公开的教导内容,对于本领域的普通技术人员将显而易见的是,可以进行某些改变和修改。以下实施例仅作为说明而非限制的方式提供。本领域的技术人员将容易识别出多种可以被改变或修改以产生基本类似结果的非关键参数。

[0424] 材料和方法

[0425] 吗啉代亚基的制备



[0428] 方案1:PMO亚基的一般合成路线

[0429] 参照方案1,其中B代表碱基配对部分,可以如图所示由相应的核糖核苷(1)制备吗啉代亚基。吗啉代亚基(2)可以任选地通过与合适的保护基前体(例如三苯甲基氯)反应而受到保护。3'保护基通常在固态寡聚物合成过程中被去除,如下文更详细地描述。碱基配对部分可以适当地保护用于固相寡聚物合成。合适的保护基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,以及用于次黄嘌呤(肌苷)的新戊酰氧基甲基。新戊酰氧基甲基可以引入到次黄嘌呤杂环碱基的N1位上。虽然可以采用未保护的次黄嘌呤亚基,但当碱基被保护时,活化反应的产率要高得多。其他合适的保护基包括美国专利号8,076,476中公开的那些,所述专利以全文引用的方式并入本文中。

[0430] 3与活化的磷化合物4的反应产生具有所需连接部分5的吗啉代亚基。

[0431] 结构4的化合物可以使用本领域技术人员已知的许多方法来制备。然后如上所描述与吗啉代部分偶合。

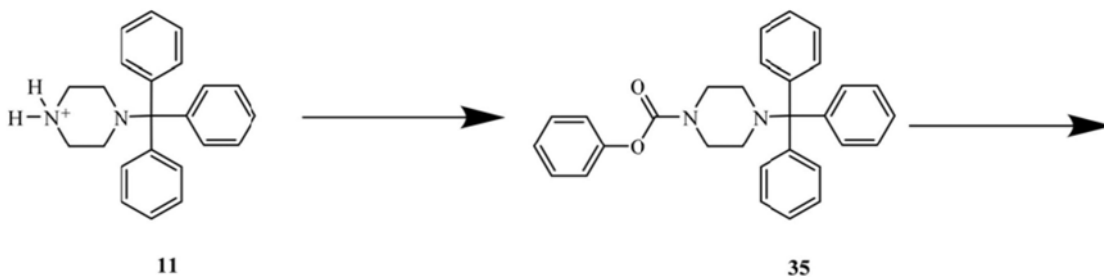
[0432] 结构5的化合物可用于固相寡聚物合成中,以制备包含亚基间键的寡聚物。这样的方法在本领域中是众所周知的。简而言之,结构5的化合物可以在5'端进行修饰以含有连接

到固体支撑物的连接基团。一旦被支撑,就去除5在3'-端的保护基(例如,三苯甲基),并使游离胺与结构5的第二化合物的活化磷部分反应。重复此顺序,直到获得所需序列寡聚物。如果需要3'修饰,末端3'端的保护基可以被去除或留在上面。可以使用许多方法将寡聚物从固体支撑物上去除,或者例如用碱处理以裂解与固体支撑物的连接。

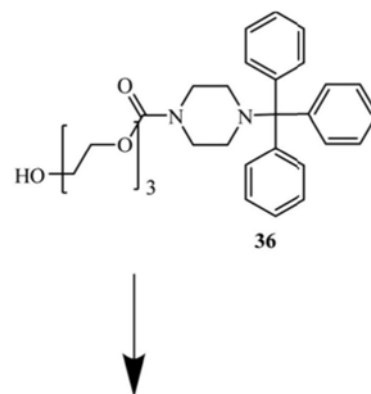
[0433] 在实施例中更详细地描述了本公开的一般吗啉代寡聚物和特定吗啉代寡聚物的制备。

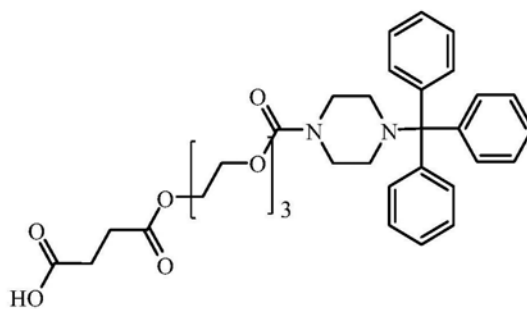
[0434] 吗啉代寡聚物的制备

[0435] 根据方案2,使用以下方案进行本公开的化合物的制备。



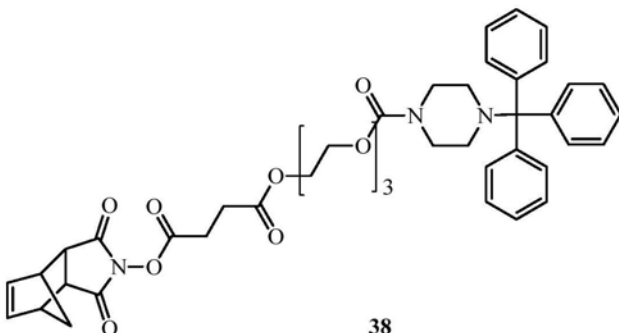
[0436]





37

[0437]



38

[0438] 方案2:活性尾酸的制备

[0439] 氨基甲酸三苯甲基哌嗪苯基酯35的制备:向冷却的化合物11在二氯甲烷(6mL/g 11)中的悬浮液中添加碳酸钾(3.2eq)在水(4mL/g碳酸钾)中的溶液。向这种两相混合物中缓慢添加氯甲酸苯酯(1.03eq)在二氯甲烷(2g/g氯甲酸苯酯)中的溶液。将反应混合物升温至20℃。在反应完成(1-2小时)后,分离各层。将有机层用水洗涤,并且经无水碳酸钾干燥。通过从乙腈中结晶分离出产物35。

[0440] 氨基甲酸酯醇36的制备:将氢化钠(1.2eq)悬浮于1-甲基-2-吡咯烷酮(32mL/g氢化钠)中。可向这种悬浮液中添加三乙二醇(10.0eq)和化合物35(1.0eq)。将所得浆液加热至95℃。在反应完成(1-2小时)后,将混合物冷却至20℃。向这种混合物中添加30%二氯甲烷/甲基叔丁基醚(v:v)和水。将含有产物的有机层依次用NaOH水溶液、琥珀酸水溶液和饱和氯化钠水溶液洗涤。通过从二氯甲烷/甲基叔丁基醚/庚烷中结晶分离出产物36。

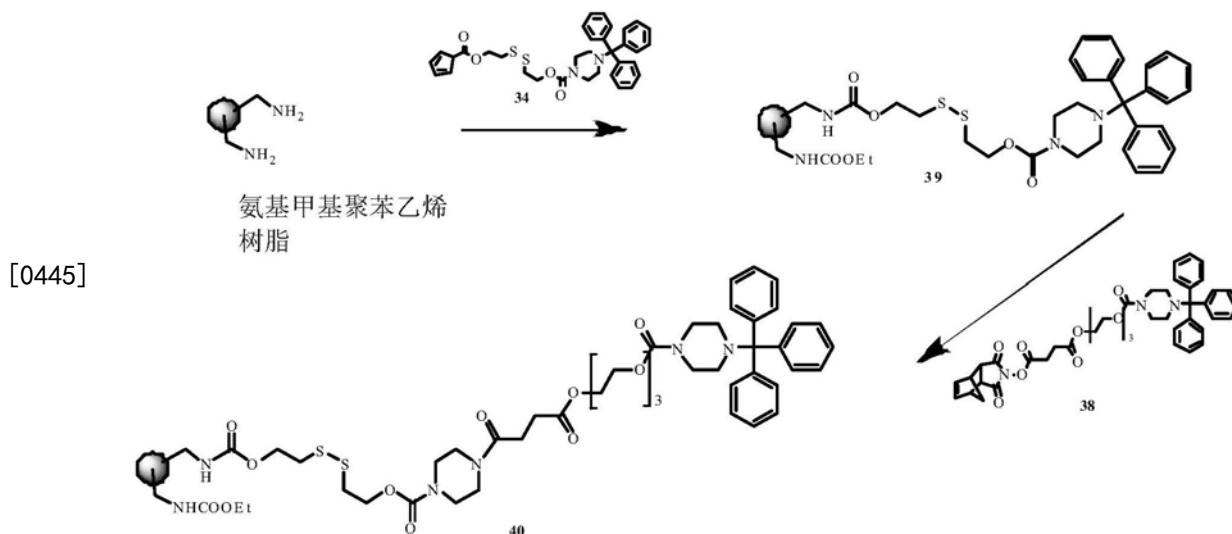
[0441] 尾酸37制备:向化合物36在四氢呋喃(7mL/g 36)中的溶液中添加琥珀酸酐(2.0eq)和DMAP(0.5eq)。将混合物加热至50℃。在反应完成(5小时)后,将混合物冷却至20℃,并用NaHCO₃水溶液调节至pH 8.5。添加甲基叔丁基醚,并将产物萃取到水层中。添加二氯甲烷,并将水层混合物用柠檬酸水溶液调节至pH 3。将含有产物的有机层用pH=3的柠檬酸盐缓冲液和饱和氯化钠水溶液的混合物洗涤。这种37的二氯甲烷溶液无需分离即可用于制备化合物38。

[0442] 38的制备:将N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二羧酸酰亚胺(HONB)(1.02eq)、4-二甲基氨基吡啶(DMAP)(0.34eq),并且随后1-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(EDC)(1.1eq)添加至化合物37的溶液中。将混合物加热至55℃。在反应完成(4-5小时)后,将混合物冷却至20℃,并依次用1:1 0.2M柠檬酸/盐水和盐水洗涤。将二氯甲烷溶液进行溶剂交换成丙酮,然后交换成N,N-二甲基甲酰胺,并且通过从丙酮/N,N-二甲基甲酰胺中沉淀到饱和氯化钠水溶液中来分离产物。将粗产物在水中重新浆化数次以去除残留的N,N-二甲

基甲酰胺和盐类。

[0443] PMO合成方法A:使用二硫化物锚固剂

[0444] 通过在固相合成过程中掺入亚基的程序,在二甲基咪唑啉酮(DMI)中将活化的“尾部”引入到锚固负载的树脂上。



[0446] 方案3:用于合成吗啉代寡聚物的固体支撑物的制备

[0447] 所述程序可以在带有粗孔(40-60 μm)的玻璃料、顶置式搅拌器和三通特氟龙旋塞的硅烷化、带夹套的肽容器(ChemGlass, NJ, USA)中进行的,以使 N_2 冒泡向上通过玻璃料或抽真空。

[0448] 以下程序中的树脂处理/洗涤步骤由两个基本操作组成:树脂流化或搅拌床反应器和溶剂/溶液萃取。对于树脂流化,将旋塞定位成允许 N_2 向上流经玻璃料,并且将指定的树脂处理/洗涤液添加到反应器中,使其渗透并完全润湿树脂。然后开始混合,并且将树脂浆液混合指定的时间。对于溶剂/溶液萃取,停止混合和 N_2 流,并且启动真空泵,然后将旋塞定位成允许排空树脂处理/洗涤液至废料。除非另有说明,否则所有树脂处理/洗涤液体积均为15mL/g。

[0449] 在硅烷化的带夹套的肽容器中,向氨基甲基聚苯乙烯树脂(100-200目;基于氮取代的 $\sim 1.0\text{mmol/g}$ 负载;75g,1eq, Polymer Labs, UK, 部件号1464-X799)中添加1-甲基-2-吡咯烷酮(NMP;20mL/g树脂)并在混合下使树脂溶胀1-2小时。排空溶胀溶剂后,用二氯甲烷(2x1-2min)、含5%二异丙基乙胺的25%异丙醇/二氯甲烷(2x3-4min)和二氯甲烷(2x1-2min)洗涤树脂。在排空最后的洗涤液后,用二硫化物锚固剂34在1-甲基-2-吡咯烷酮中的溶液(0.17M;15mL/g树脂, $\sim 2.5\text{eq}$)处理树脂,并且将树脂/试剂混合物在45 $^\circ\text{C}$ 下加热60小时。反应完成后,停止加热,抽空锚固剂溶液,并且用1-甲基-2-吡咯烷酮(4x3-4min)和二氯甲烷(6x1-2min)洗涤树脂。将树脂用10%(v/v)二碳酸二乙酯(DEDIC)在二氯甲烷中的溶液(16mL/g;2x5-6min)处理,然后用二氯甲烷(6x1-2min)洗涤。将树脂39在 N_2 流下干燥1-3小时,然后在真空下干燥至恒重($\pm 2\%$)。

[0450] 氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂的负载量的测定:树脂的负载量(潜在可用反应位点的数量)是通过光谱法测定每克树脂中三苯甲基(triphenylmethyl/trityl)的数量来确定。

[0451] 将已知重量的干燥树脂 ($25 \pm 3\text{mg}$) 转移到硅烷化的25mL容量瓶中,并且添加~5mL的2% (v/v) 三氟乙酸的二氯甲烷溶液。通过轻轻旋转将内容物混合,然后使其静置30分钟。用额外的2% (v/v) 三氟乙酸的二氯甲烷溶液使体积达到25mL,并且将内容物彻底混合。使用容积式移液管将等分的含三苯甲基的溶液 (500 μL) 转移到10mL容量瓶中,并且用甲磺酸使体积达到10mL。

[0452] 通过431.7nm处的UV吸光度测量最终溶液中的三苯甲基阳离子含量,并且使用适当的体积、稀释度、消光系数 ($\epsilon: 41\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 和树脂重量以每克树脂中的三苯甲基 ($\mu\text{mol/g}$) 计算树脂负载量。一式三份进行测定,并计算平均负载量。

[0453] 这个实施例中的树脂负载程序将为树脂提供约500 $\mu\text{mol/g}$ 的负载量。如果在室温下进行二硫化物锚固剂掺入步骤24小时,则可获得300-400 $\mu\text{mol/g}$ 的负载量。

[0454] 尾部负载:使用与制备氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂相同的设置和体积,可将尾部引入于固体支撑物上。首先将负载有锚固剂的树脂在酸性条件下脱保护,并且在偶合之前中和所得材料。对于偶合步骤,使用38 (0.2M) 在含有4-乙基吗啉 (NEM, 0.4M) 的DMI中的溶液代替二硫化物锚固剂溶液的1-甲基-2-吡咯烷酮。在45 $^{\circ}\text{C}$ 下2小时后,将树脂39用含5%二异丙基乙胺的25%异丙醇/二氯甲烷洗涤两次,并且用DCM洗涤一次。向树脂中添加苯甲酸酐 (0.4M) 和NEM (0.4M) 的溶液。25分钟后,将反应器夹套冷却至室温,将树脂用含5%二异丙基乙胺的25%异丙醇/二氯甲烷洗涤两次,并且用DCM洗涤八次。过滤树脂40并在高真空下干燥。将树脂40的负载量定义为在尾部负载中使用的原始氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂39的负载量。

[0455] 固相合成:在定制的BioAutomation 128AVB (Plano, TX) 上,在4mL BioComma聚丙烯反应柱 (部件号CT003-BC) 中制备吗啉代寡聚物。当柱子位于合成仪上时,将带有水流通道的铝块放在柱子周围。AVB128交替地添加试剂/洗涤液,保持指定的时间,并且使用真空抽空柱子。

[0456] 对于长度至多约25个亚基的寡聚物,优选负载量接近500 $\mu\text{mol/g}$ 的树脂的氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂。对于较大的寡聚物,优选负载量为300-400 $\mu\text{mol/g}$ 的树脂的氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂。如果需要具有5'-尾部的分子,则以相同的负载准则选择已负载尾部的树脂。

[0457] 制备以下试剂溶液:

[0458] 脱三苯甲基溶液:含1% 4氰基吡啶和三氟乙酸 (w/w) 的4:1二氯甲烷/三氟乙醇溶液;

[0459] 中和溶液:含3%二异丙基乙胺的5:1二氯甲烷/异丙醇溶液;以及偶合溶液:含0.18M (或对于生长长度超过20个亚基的寡聚物为0.24M) 具有所需碱基和连接类型的活化的吗啉代亚基和0.4M N-乙基吗啉的1,3-二甲基咪唑啉酮 (DMI) 溶液。

[0460] 二氯甲烷 (DCM) 用作过渡洗涤液,分离不同的试剂溶液洗涤液。

[0461] 在合成仪上,在块设置为42 $^{\circ}\text{C}$ 的情况下,向每个含有30mg氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂 (或尾部树脂) 的柱子中添加2mL 1-甲基-2-吡咯烷酮,并且使其在室温下静置30分钟。用2mL二氯甲烷洗涤2次后,可采用以下合成循环:

	步骤	体积	递送	保持时间
	脱三苯甲基	1.5 mL	歧管	15 秒
	脱三苯甲基	1.5 mL	歧管	15 秒
	脱三苯甲基	1.5 mL	歧管	15 秒
	脱三苯甲基	1.5 mL	歧管	15 秒
	脱三苯甲基	1.5 mL	歧管	15 秒
	脱三苯甲基	1.5 mL	歧管	15 秒
	DCM	1.5 mL	歧管	30 秒
[0462]	中和	1.5 mL	歧管	30 秒
	中和	1.5 mL	歧管	30 秒
	中和	1.5 mL	歧管	30 秒
	中和	1.5 mL	歧管	30 秒
	中和	1.5 mL	歧管	30 秒
	中和	1.5 mL	歧管	30 秒
	DCM	1.5 mL	歧管	30 秒
	偶合	350-500uL 注射器		40 分钟
	DCM	1.5 mL	歧管	30 秒
	中和	1.5 mL	歧管	30 秒
	中和	1.5 mL	歧管	30 秒
[0463]	DCM	1.5 mL	歧管	30 秒
	DCM	1.5 mL	歧管	30 秒
	DCM	1.5 mL	歧管	30 秒

[0464] 将各个寡聚物的序列编程到合成仪中,使每个柱子以适当的顺序接收适当的偶合溶液(A、C、G、T或I)。当柱子中的寡聚物完成了其最后亚基的掺入时,将柱子从块中移出,并且使用含有4-甲氧基三苯基甲基氯(0.32M在DMI中)和0.89M 4-乙基吗啉的偶合溶液手动进行最终循环。

[0465] 从树脂上裂解并去除碱基和主链保护基:甲氧基三苯甲基化后,将树脂用2mL 1-甲基-2-吡咯烷酮洗涤8次。添加一毫升由0.1M 1,4-二硫苏糖醇(DTT)和0.73M三乙胺在1-甲基-2-吡咯烷酮中组成的裂解溶液,将柱子封盖,并且使其在室温下静置30分钟。之后,将溶液排入12mL惠顿(Wheaton)小瓶中。将极大收缩的树脂用300 μ L裂解溶液洗涤两次。向溶液中添加4.0mL浓氨水(储存在-20 $^{\circ}$ C下),将小瓶盖紧(用特氟龙内衬的螺旋盖),旋转混合物以混合溶液。将小瓶置于45 $^{\circ}$ C烘箱中16-24小时,以实现碱基和主链保护基的裂解。

[0466] 粗产物纯化:从烘箱中取出小瓶中的氨水溶液,并使其冷却至室温。将溶液用20mL

的0.28%氨水稀释,并且通过含有Macroprep HQ树脂(BioRad)的2.5x10 cm色谱柱。用盐梯度(A:0.28%氨水与B:1M氯化钠在0.28%氨水中;60分钟内0-100%B)洗脱甲氧基三苯甲基保护的寡聚物。将合并的洗脱分汇集,并且根据所需产物进一步处理。

[0467] 吗啉代寡聚物的脱甲氧基三苯甲基:将Macroprep纯化得到的汇集洗脱分用1M H_3PO_4 处理,以将pH降至2.5。初步混合后,样品在室温下静置4分钟,此时用2.8%氨水/水将其中和至pH 10-11。产物通过固相萃取(SPE)纯化。

[0468] SPE柱填充和调节:将Amberchrome CG-300M(Dow Chemicals(Rohm and Haas); Midland,MI) (3mL) 填充至20mL烧结柱(BioRad Econo-Pac色谱柱(732-1011))中,并用3mL以下试剂冲洗树脂:0.28% NH_4OH /80%乙腈;0.5M NaOH/20%乙醇;水;50mM H_3PO_4 /80%乙腈;水;0.5NaOH/20%乙醇;水;0.28% NH_4OH 。

[0469] SPE纯化:将来自脱甲氧基三苯甲基的溶液装载到色谱柱上,并用8mL 0.28%氨水冲洗树脂三次。可将惠顿小瓶(12mL)置于色谱柱下,用2mL含45%乙腈的0.28%氨水洗涤两次,洗脱出产物。

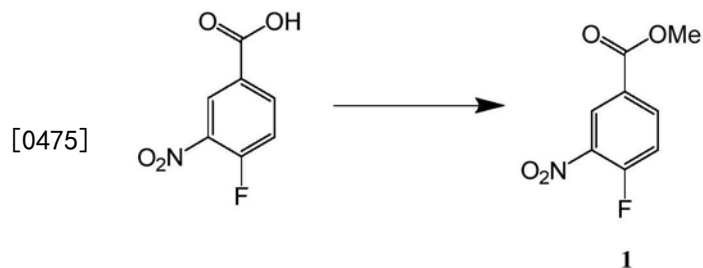
[0470] 产物分离:将溶液在干冰中冷冻,并将小瓶置于冷冻干燥器中至少两天,以产生蓬松的白色粉末。将样品溶解在水中,使用注射器通过0.22微米过滤器(Pall Life Sciences,Acrodisc 25mm注射器过滤器,带有0.2微米的HT Tuffryn膜)过滤,并且在UV分光光度计上测量光密度(OD),以确定存在的寡聚物的OD单位,以及分配样品进行分析。然后将溶液放回惠顿小瓶中进行冻干。

[0471] 通过MALDI分析吗啉代寡聚物:MALDI-TOF质谱法可用于确定纯化中洗脱分的组成,以及为寡聚物的身份(分子量)提供证据。在用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)的溶液作为基质进行稀释后运行样品。

[0472] PMO合成方法B:硝基羧基苯基丙基(NCP2)锚固剂的使用

[0473] NCP2锚固剂合成:

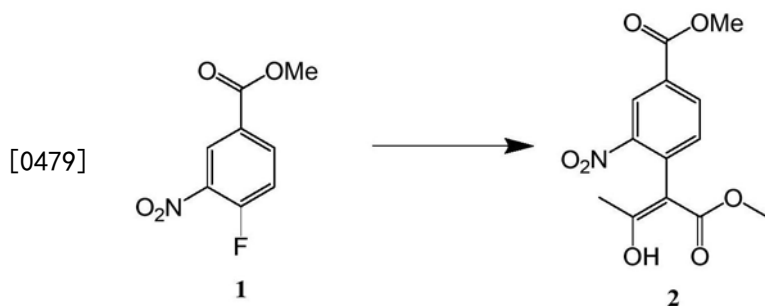
[0474] 1.4-氟-3-硝基苯甲酸甲酯(1)的制备



[0476] 可以将12.7kg 4-氟-3-硝基苯甲酸、40kg甲醇和2.82kg浓硫酸添加至100L烧瓶中。将混合物在回流(65°C)下搅拌36小时。将反应混合物冷却至0°C。晶体可在约38°C下形成。混合物在0°C下保持4小时,然后在氮气下过滤。洗涤100L烧瓶,并用已冷却至0°C的10kg甲醇洗涤滤饼。将固体滤饼在漏斗上干燥1小时,转移到托盘,并且在室温下在真空烘箱中干燥至恒重。

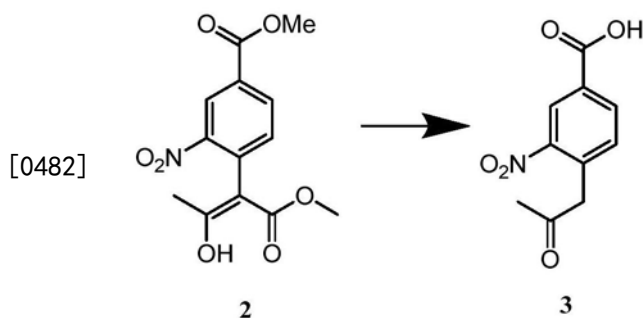
[0477] 2.3-硝基-4-(2-氧代丙基)苯甲酸的制备

[0478] A. (Z)-4-(3-羟基-1-甲氧基-1-氧代丁-2-烯-2-基)-3-硝基苯甲酸甲酯(2)



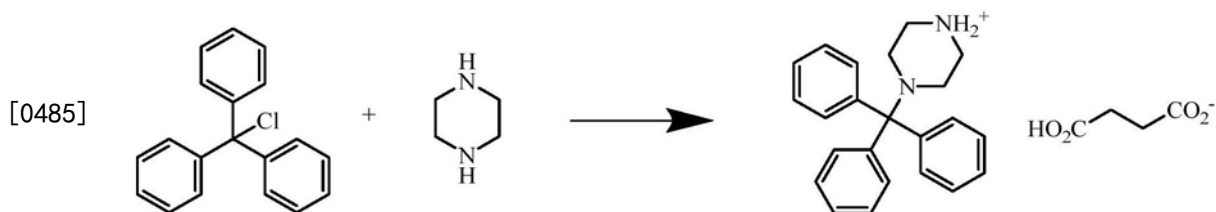
[0480] 可以将来自先前步骤的3.98kg 4-氟-3-硝基苯甲酸甲酯(1)、9.8kg DMF和2.81kg 乙酰乙酸甲酯添加至100L烧瓶中。将混合物搅拌并冷却至0℃。历时约4小时添加3.66kg DBU,同时将温度维持在5℃或以下。将混合物再搅拌1小时。添加8.15kg柠檬酸在37.5kg纯水中的溶液,同时将反应温度维持在15℃或以下。添加后,将反应混合物再搅拌30分钟,然后在氮气下过滤。将湿滤饼连同14.8kg纯水一起返回到100L烧瓶中。将浆液搅拌10分钟,然后过滤。将湿滤饼再次返回到100L烧瓶中,用14.8kg纯水制浆10分钟,然后过滤得到粗制的(Z)-4-(3-羟基-1-甲氧基-1-氧代丁-2-烯-2-基)-3-硝基苯甲酸甲酯。

[0481] B.3-硝基-4-(2-氧代丙基)苯甲酸



[0483] 将粗制的(Z)-4-(3-羟基-1-甲氧基-1-氧代丁-2-烯-2-基)-3-硝基苯甲酸甲酯在氮气下装入100L反应烧瓶中。添加14.2kg 1,4-二噁烷,然后搅拌。历时2小时添加16.655kg 浓HCl和13.33kg纯水的溶液(6M HCl),同时将反应混合物的温度维持在15℃以下。当添加完成时,将反应混合物在回流(80℃)下加热24小时,冷却至室温,并且在氮气下过滤。将固体滤饼用14.8kg纯水湿磨,过滤,再用14.8kg纯水湿磨并过滤。将固体与39.9kg DCM一起返回到100L烧瓶中,并在搅拌下回流1小时。添加1.5kg纯水以溶解剩余的固体。将底部有机层分到预热的72L烧瓶中,然后返回到清洁干燥的100L烧瓶中。将溶液冷却至0℃,保持1小时,然后过滤。固体滤饼用9.8kg DCM和5kg庚烷的溶液各洗涤两次,然后在漏斗上干燥。将固体转移到托盘并干燥至恒重1.855kg的3-硝基-4-(2-氧代丙基)苯甲酸。

[0484] 3.N-三苯甲基哌嗪琥珀酸盐(NTP)的制备



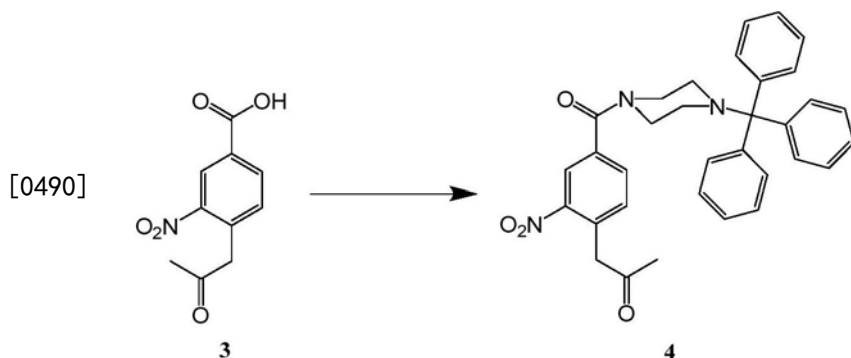
[0486] 可在氮气下将1.805kg三苯甲基氯和8.3kg甲苯(TPC溶液)装入72L带夹套的烧瓶中。搅拌混合物,直至固体溶解。在氮气下,将5.61kg哌嗪、19.9kg甲苯和3.72kg甲醇添加至

100L带夹套的反应烧瓶中。将混合物搅拌并冷却至0℃。历时4小时缓慢地逐份添加TPC溶液,同时将反应温度维持在10℃或以下。将混合物在10℃下搅拌1.5小时,然后使其升温至14℃。可以将32.6kg的纯水装入72L烧瓶中,然后转移到100L烧瓶中,同时将内部批料温度维持在20±5℃。使各层分开,并将底部水层分离并储存。将有机层每次用32kg纯水萃取三次,将水层分离并与储存的水溶液合并。

[0487] 将剩余的有机层冷却至18℃,并将847g琥珀酸在10.87kg纯水中的溶液逐份缓慢地添加到有机层中。将混合物在20±5℃下搅拌1.75小时。将混合物过滤,并将固体用2kg TBME和2kg丙酮洗涤,然后在漏斗上干燥。每次用5.7kg丙酮将滤饼湿磨两次,并在两次研磨之间进行过滤并用1kg丙酮洗涤。将固体在漏斗上干燥,然后转移到托盘上,并在室温下在真空烘箱中干燥至恒重。

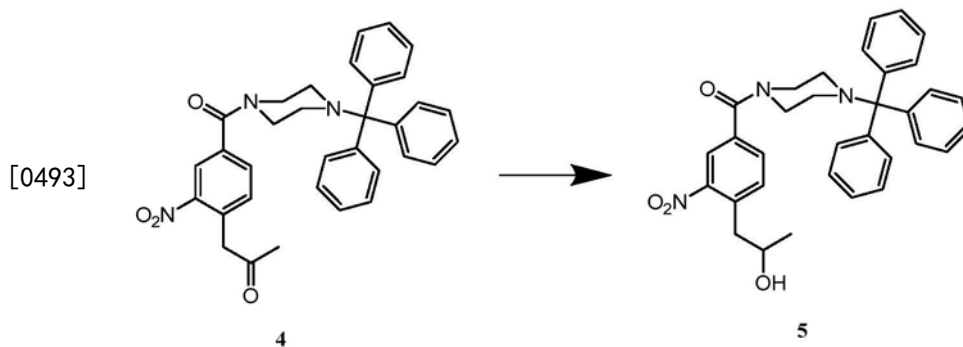
[0488] 4. (4-(2-羟丙基)-3-硝基苯基)(4-三苯甲基哌嗪-1-基)甲酮的制备

[0489] A. 1-(2-硝基-4(4-三苯甲基哌嗪-1-羰基)苯基)丙-2-酮的制备



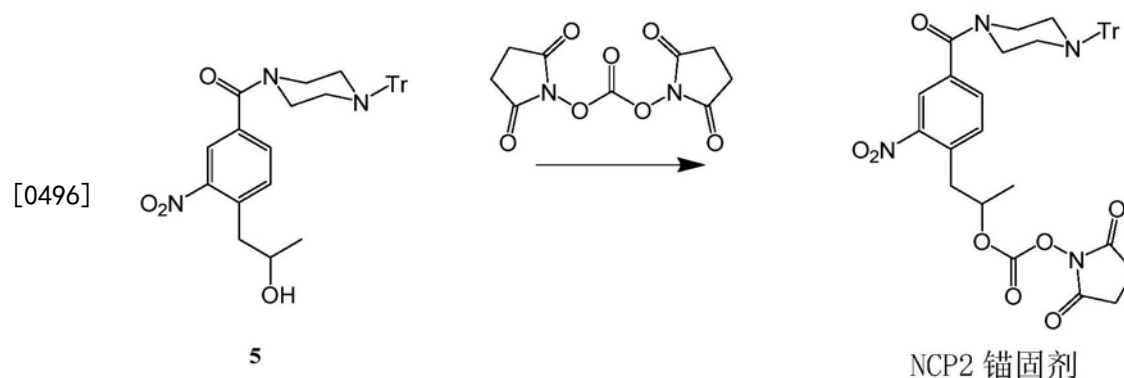
[0491] 可在氮气下将2kg 3-硝基-4-(2-氧代丙基)苯甲酸(3)、18.3kg DCM和1.845kg N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)装入100L带夹套的烧瓶中。搅拌溶液直至形成均匀的混合物。在室温下历时30分钟添加3.048kg NTP,并搅拌8小时。将5.44kg的纯水添加到反应混合物中并搅拌30分钟。使各层分离,并将含有产物的底部有机层沥干并储存。水层用5.65kg的DCM萃取两次。合并的有机层用1.08kg氯化钠在4.08kg纯水中的溶液洗涤。有机层经1.068kg的硫酸钠干燥并过滤。用1.3kg的DCM洗涤硫酸钠。将合并的有机层用252g硅胶制成浆液,并通过含有252g硅胶床的过滤漏斗过滤。用2kg的DCM洗涤硅胶床。将合并的有机层在旋转蒸发器上蒸发,然后将4.8kg的THF添加至残余物中,并在旋转蒸发器上蒸发,直到在THF中达到2.5体积的粗制1-(2-硝基-4(4-三苯甲基哌嗪-1-羰基)苯基)丙-2-酮。

[0492] B. (4-(2-羟丙基)-3-硝基苯基)(4-三苯甲基哌嗪-1-基)甲酮(5)的制备



[0494] 可在氮气下将3600g来自先前步骤的4和9800g THF装入100L带夹套的烧瓶中。将搅拌后的溶液冷却至 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 。溶液用11525g乙醇稀释,并且在 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 下历时约2小时添加194g硼氢化钠。将反应混合物在 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 下再搅拌2小时。通过缓慢添加约1.1kg氯化铵在约3kg水中的溶液淬灭反应,以保持温度 $\leq 10^{\circ}\text{C}$ 。将反应混合物再搅拌30分钟,过滤以去除无机物,重新装入100L带夹套的烧瓶中,并且用23kg DCM萃取。分离有机层,将水层每次用4.7kg DCM再萃取两次。合并的有机层用800g氯化钠在3kg水中的溶液洗涤,然后经2.7kg硫酸钠干燥。过滤悬浮液,并且用2kg DCM洗涤滤饼。将合并的滤液浓缩至2.0体积,用360g乙酸乙酯稀释,并且蒸发。将粗产物装载到在氮气下用DCM填充的4kg二氧化硅的硅胶柱上,并且用含2.3kg乙酸乙酯的7.2kg DCM洗脱。蒸发合并的洗脱分,并且将残余物溶解在11.7kg甲苯中。过滤甲苯溶液,并且将滤饼每次用2kg甲苯洗涤两次。将滤饼干燥至恒重。

[0495] 5. 碳酸2,5-二氧化吡咯烷-1-基(1-(2-硝基-4-(4-三苯甲基哌嗪-1-羰基)苯基)丙-2-基)酯(NCP2锚固剂)的制备



[0497] 可在氮气下将4.3kg化合物5(通过 ^1H NMR基于残余甲苯调整重量;此后的所有试剂都相应地按比例调整)和12.7kg吡啶装入100L带夹套的烧瓶中。向其中添加3.160kg DSC(78.91重量%,通过 ^1H NMR),同时将内部温度维持在 $\leq 35^{\circ}\text{C}$ 。将反应混合物在环境室温下老化约22小时,然后过滤。用200g吡啶洗涤滤饼。分两批,每批包含1/2的滤液体积,将滤液洗涤液缓慢装入100L带夹套的烧瓶中,所述烧瓶中含有11kg柠檬酸和50kg水的溶液,并搅拌30分钟以使固体沉淀。用过滤漏斗收集固体,每次洗涤用4.3kg水洗涤两次,并在真空下在过滤漏斗上干燥。

[0498] 将合并的固体装入100L带夹套的烧瓶中,并且溶解在28kg DCM中,用900g碳酸钾在4.3kg水中的溶液洗涤。在1小时之后,使各层分离并去除水层。将有机层用10kg水洗涤,分离并经3.5kg硫酸钠干燥。过滤DCM,蒸发,并且在真空下干燥,得到6.16kg NCP2锚固剂。

[0499] 负载NCP2锚固剂的树脂的合成

[0500] 可将约52L NMP和2300g氨基甲基聚苯乙烯树脂装入具有特氟龙旋塞的75L固相合成反应器中。将树脂在NMP中搅拌以溶胀约2小时,然后沥干。将树脂每次洗涤用4L DCM洗涤两次,然后每次洗涤用39L中和溶液洗涤两次,然后每次洗涤用39L DCM洗涤两次。将NCP2锚固剂溶液缓慢添加到搅拌的树脂溶液中,在室温下搅拌24小时,并且沥干。将树脂每次洗涤用39L NMP洗涤四次,并且每次洗涤用39L DCM洗涤六次。将树脂用1/2二碳酸二乙酯(DEDIC)封端溶液处理并搅拌30分钟,沥干,再用第2份DEDIC封端溶液处理并搅拌30分钟,沥干。将树脂每次洗涤用39L DCM洗涤六次,然后在烘箱中干燥至恒重3573.71g的负载锚固剂的树脂。

[0501] 使用NCP2锚固剂制备吗啉代寡聚物

[0502] PMO粗原料药的50L固相合成

[0503] 1. 材料

[0504] 表2:起始材料

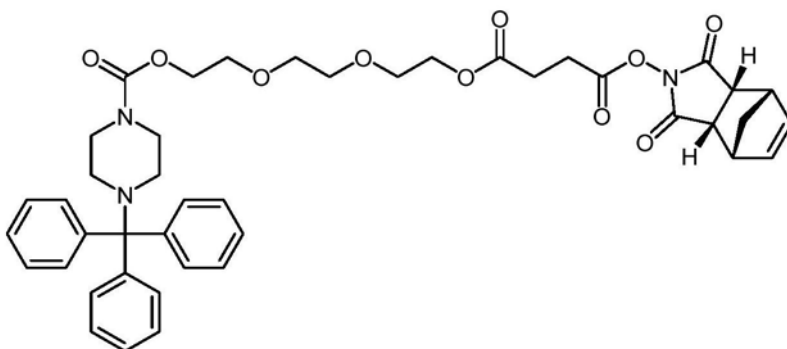
材料名称	化学名称	CAS 编号	化学式	分子量
活化的 A 亚基	磷酸氨基氯酸, <i>N,N</i> -二甲基-, [6-[6-(苯甲酰基氨基)-9H-嘌呤-9-基]-4-(三苯甲基)-2-吗啉基]甲酯	1155373-30-0	C ₃₈ H ₃₇ ClN ₇ O ₄ P	722.2
活化的 C 亚基	磷酸氨基氯酸, <i>N,N</i> -二甲基-, [6-[4-(苯甲酰基氨基)-2-氧代-1(2H)-嘧啶基]-4-(三苯甲基)-2-吗啉基]甲酯	1155373-31-1	C ₃₇ H ₃₇ ClN ₅ O ₅ P	698.2
[0505] 活化的 DPG 亚基	丙酸, 2,2-二甲基-, 4-[[[9-[6-[[[氯(二甲基氨基)氧磷基]氧基]甲基]-4-(三苯甲基)-2-吗啉基]-2-[(2-苯乙酰基)氨基]-9H-嘌呤-6-基]氧基]甲基]苯酯	1155309-89-9	C ₅₁ H ₅₃ ClN ₇ O ₇ P	942.2
活化的 T 亚基	磷酸胺基氯酸, <i>N,N</i> -甲基-, [6-(3,4-二氢-5-甲基-2,4-二氧代-1(2H)-嘧啶基)]-4-(三苯甲基)-2-吗啉基]甲酯	1155373-34-4	C ₃₁ H ₃₄ ClN ₄ O ₅ P	609.1
活化的 EG3 尾部	丁二酸, 1-[3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-六氢-1,3-二氧代-4,7-亚甲基-2H-异吡啶-2-基] 4-[2-[2-[2-[[[4-(三苯甲基)-1-	1380600-06-5	C ₄₃ H ₄₇ N ₃ O ₁₀	765.9

[0506]	哌嗪基]羰基]氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]酯			
--------	------------------------	--	--	--

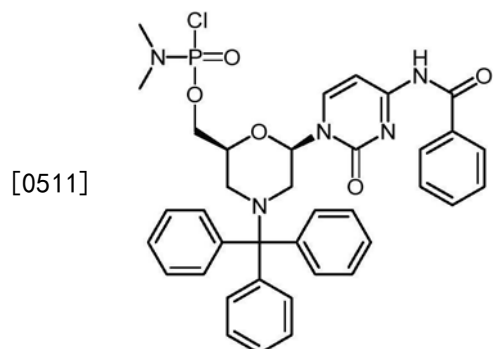
[0507] 起始材料的化学结构:

[0508] A. 活化的EG3尾部

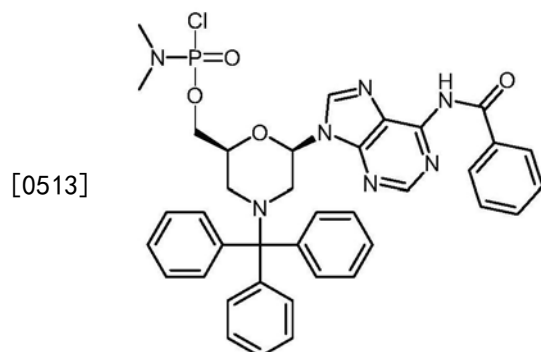
[0509]



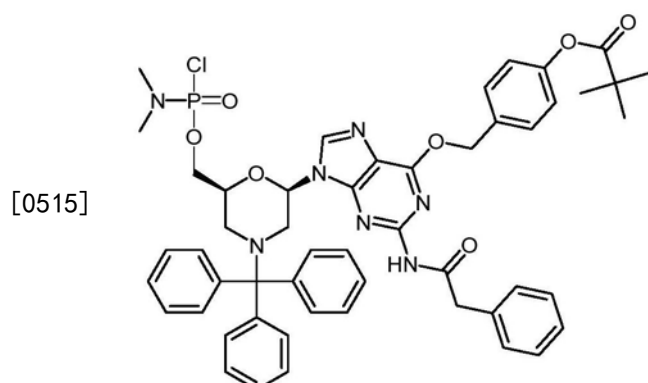
[0510] B. 活化的C亚基(关于制备,参见美国专利号8,067,571)



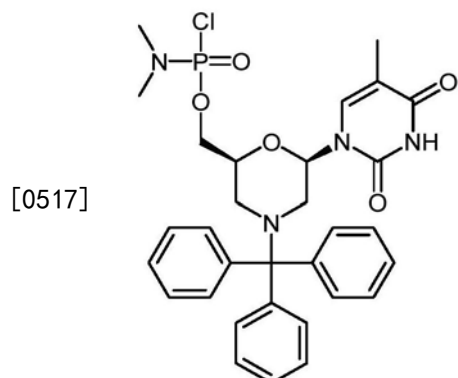
[0512] C. 活化的A亚基 (关于制备, 参见美国专利号8,067,571)



[0514] D. 活化的DPG亚基 (关于制备, 参见WO 2009/064471)

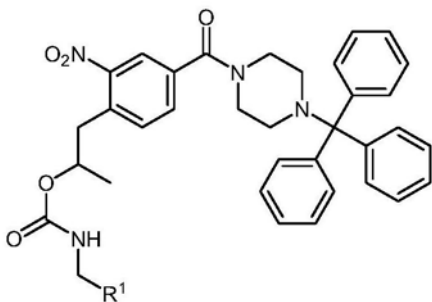


[0516] E. 活化的T亚基 (关于制备, 参见WO 2013/082551)



[0518] F. 负载锚固剂的树脂

[0519]

[0520] 其中R¹是支撑介质。

[0521] 表3:用于PMO粗原料药的固相寡聚物合成的溶液的描述

[0522]

溶液名称	溶液组成
NCP2 锚固剂溶液	37.5 L NMP 和 1292 g NCP2 锚固剂
DEDC 封端溶液	4.16 L 二碳酸二乙酯 (DEDC)、3.64 L NEM 和 33.8 L DCM
CYTFA 溶液	2.02 kg 4-氰基吡啶、158 L DCM、1.42 L TFA、39 L TFE, 和

[0523]

	2 L 纯水
中和溶液	35.3 L IPA、7.5 L DIPEA 和 106.5 L DCM
裂解溶液	1,530.04 g DTT, 6.96 L NMP 和 2.98 L DBU

[0524] 2. PMO粗原料药的合成

[0525] A. 树脂溶胀

[0526] 可将750g负载锚固剂的树脂和10.5L NMP的等分试样装入50L硅烷化反应器中并搅拌3小时。排干NMP,并且将负载锚固剂的树脂每次用5.5L DCM洗涤两次,每次用5.5L 30% TFE/DCM洗涤两次。

[0527] B. 循环0:EG3尾部偶合

[0528] 将负载锚固剂的树脂每次用5.5L 30% TFE/DCM洗涤三次并沥干,用5.5L CYTFA溶液洗涤15分钟并沥干,再用5.5L CYTFA溶液洗涤15分钟不沥干,可向其中装入122mL 1:1NEM/DCM,将悬浮液搅拌2分钟并沥干。将树脂用5.5L中和溶液洗涤两次,持续5分钟并沥干,然后每次用5.5L DCM洗涤两次并沥干。可将706.2g活化的EG3尾部和234mL NEM在3L DMI中的溶液装入树脂,在室温下搅拌3小时并沥干。将树脂每次用5.5L中和溶液洗涤两次,每次洗涤5分钟,然后用5.5L DCM洗涤一次并沥干。可装入374.8g苯甲酸酐和195mL NEM在2680mL NMP中的溶液,搅拌15分钟并沥干。将树脂与5.5L中和溶液一起搅拌5分钟,然后用5.5L DCM洗涤一次并每次用5.5L 30% TFE/DCM洗涤两次。将树脂悬浮在5.5L 30% TFE/DCM中并保持14小时。

[0529] C. 亚基偶合循环1-n

[0530] 表4-一般基础亚基偶合

循环编号: 亚基 (SU)	偶合前处理				偶合循环		偶合后处理	
	1	2	3	4			1	2
[0531]	30% TFE/DCM 洗涤	CYTFA 溶液 ¹	中和溶 液	DCM 洗涤	数量 SU (g) NEM (L) DMI (L)	RT 偶合 时间 (小 时)	DCM 洗涤	30% TFE/DCM 洗涤
	1:C 5.5L	a) 5.5L b) 5.5L, 122mL	3x5.5L	5.5L	536.7g; 195 mL NEM; 3.2L DMI	5	5.5L	2x5.5L

[0532] ¹mL指示1:1NEM/DCM的量

[0533] i. 偶合前处理

[0534] 在每个偶合循环之前,将树脂:1) 用30% TFE/DCM洗涤;2) a) 用CYTFA溶液处理15分钟并沥干,b) 用CYTFA溶液处理15分钟,向其中添加1:1NEM/DCM,搅拌并沥干;3) 与中和溶液一起搅拌三次;4) 用DCM洗涤两次。

[0535] ii. 偶合后处理

[0536] 在排出每种亚基溶液后,将树脂:1) 用DCM洗涤;和2) 用30% TFE/DCM洗涤两次。如果在下一偶合循环之前将树脂保持一段时间,则不排出第二次TFE/DCM洗涤液,并且将树脂保留在所述TFE/DCM洗涤溶液中。

[0537] iii. 活化的亚基偶合循环

[0538] 每个偶合循环如表2中针对每个含碱基的亚基的初始C(胞嘧啶)单体偶合的一般描述来进行。

[0539] iv. 最终IPA洗涤

[0540] 进行最后的偶合步骤后,将树脂每次用19.5L IPA洗涤8次,并且在室温下真空干燥约63.5小时,干重为5,579.8g。

[0541] C. 裂解

[0542] 将上述树脂结合的PMO粗原料药分为两批,每批按以下方式处理。一批2,789.9g的树脂:1) 与10L NMP一起搅拌2小时,然后将NMP排出;2) 每次用10L 30% TFE/DCM洗涤三次;3) 用10L CYTFA溶液处理15分钟;4) 用10L CYTFA溶液处理15分钟,然后向其中添加130mL 1:1NEM/DCM,搅拌2分钟并排出。将树脂每次用10L中和溶液处理三次,用10L DCM洗涤六次,每次用10L NMP洗涤八次。用1530.4g DTT和2980DBU在6.96L NMP中的裂解溶液处理树脂2小时,以使PMO粗原料药从树脂中分离出来。将裂解溶液排出并保留在另一个容器中。反应器和树脂用4.97L NMP洗涤,将NMP洗涤液与裂解溶液合并。

[0543] D. 脱保护

[0544] 将合并的裂解溶液和NMP洗涤液转移到压力容器中,向其中添加39.8L在冰箱中预

先冷却至-10℃至-25℃的NH₄OH (NH₃ • H₂O)。将压力容器密封并加热到45℃持续16小时,然后冷却到25℃。将所述含有PMO粗原料药的脱保护溶液用纯水以3:1稀释,并用2M磷酸将pH调节至3.0,然后用NH₄OH调节至pH 8.03。

[0545] E. PMO粗原料药的纯化

[0546] 将上述D部分的含有PMO粗原料药的脱保护溶液上样到ToyoPearl Super-Q 650S阴离子交换树脂 (Tosoh Bioscience) 的色谱柱上,并且以0-35%B的梯度在17柱体积上洗脱(缓冲液A:10mM氢氧化钠;缓冲液B:1M氯化钠在10mM氢氧化钠中),并且将可接受纯度的洗脱分(C18和SCX HPLC)汇集到纯化的药物产品溶液中。

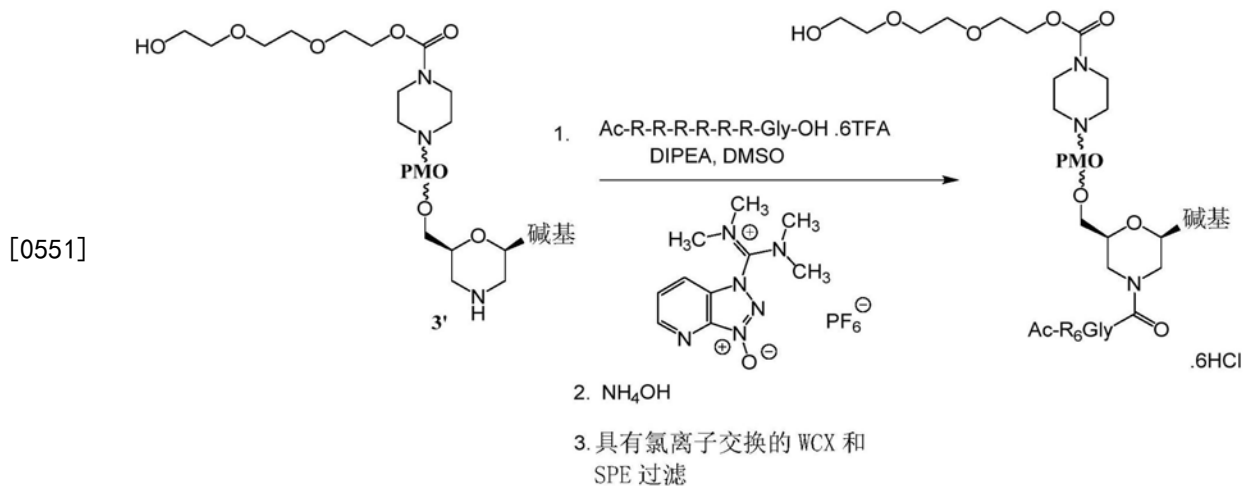
[0547] 将纯化的原料药溶液脱盐并冻干,得到纯化的PMO原料药。

[0548] 表5. 缩写

[0549]

缩写	名称
CYTFA	4-氰基吡啶三氟乙酸
CPP	细胞穿透肽
DBU	1,8-二氮杂双环十一-7-烯
DCM	二氯甲烷
DEDC	二碳酸二乙酯
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
DMI	1,3-二甲基-2-咪唑啉酮
DMSO	二甲基亚砷
DTT	DL-二硫苏糖醇
HPLC	高效液相色谱法
IPA	异丙醇
MW	分子量
NEM	N-乙基吗啉
NMP	N-甲基-2-吡咯烷酮
SAX	强阴离子交换
SCX	强阳离子交换
SPE	固相萃取
RT	室温
TFA	2,2,2-三氟乙酸
TFE	222-三氟乙醇

[0550] CPP缀合 (“R6G1y” 公开为SEQ ID NO:11)



[0552] 分析程序:可使用芥子酸(SA)基质在Bruker AutoflexTM Speed上记录基质辅助的激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)。在配备3000二极管阵列检测器和ProPacTM SCX-20色谱柱(250x4mm)的Thermo Dionex UltiMate 3000系统上进行SCX-HPLC,流速为1.0mL/min(pH=2;30℃柱温)。流动相可为A(25%乙腈在含有24mM H_3PO_4 的水中)和B(25%乙腈在含有1M KCl和24mM H_3PO_4 的水中)。可采用梯度洗脱:0min,35%B;2min,35%B;22min,80%B;25min,80%B;25.1min,35%B;30min,35%B。

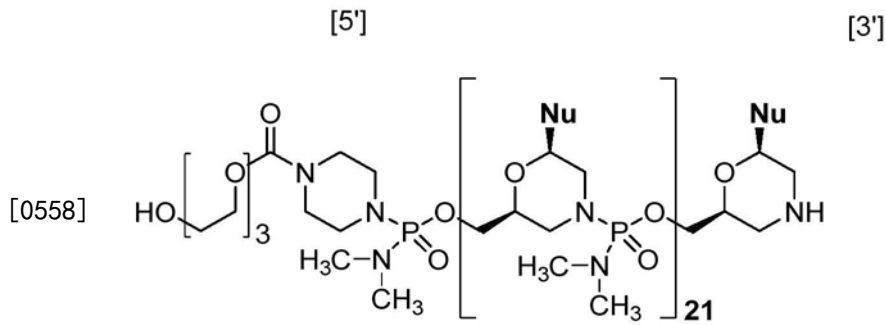
[0553] 将Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH(SEQ ID NO:11)六氟乙酸盐(614.7mg,0.354mmol)和1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU,134.4mg,0.354mmol)和二甲基亚砜(DMSO,20mL)添加至PMO(通过冻干新鲜干燥两天)的混合物中。将混合物在室温下搅拌3分钟,然后添加N,N-二异丙基乙胺(DIPEA,68.5mg,0.530mmol)。5分钟后,浑浊的混合物变成澄清溶液。可通过SCX-HPLC监测反应。2小时后,添加20mL的10%氢氧化铵溶液(2.8% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。将混合物在室温下再搅拌2小时。通过添加400mL水来终止反应。将三氟乙醇(2.0mL)添加至溶液中。

[0554] 将溶液分为两部分,每部分可用WCX柱(每柱10g树脂)纯化。首先用20%乙腈水溶液(v/v)洗涤每个WCX柱,以去除PMO起始材料。当MALDI-TOF质谱分析显示不存在PMO信号时,可停止洗涤(每柱225mL)。然后用水洗涤每一柱(每柱100mL)。所需产物可用2.0M胍HCl洗脱(每柱140mL)。将纯化的溶液汇集在一起,然后分成两部分,每部分用SPE柱(每柱10克树脂)脱盐。

[0555] 可首先用1.0M NaCl水溶液(每柱100mL)洗涤SPE柱,以生成六盐酸盐形式。然后将每个SPE柱用水洗涤(每柱200mL)。可使用50%乙腈水溶液(v/v,每柱150mL)洗脱最终脱盐产物。可在减压下通过排空去除乙腈。可冻干所得水溶液,以获得六盐酸盐形式的所需产物。

[0556] 实施例1:PMO

[0557] 使用上述PMO合成方法,PMO#1、PMO#2和PMO#3如下合成:

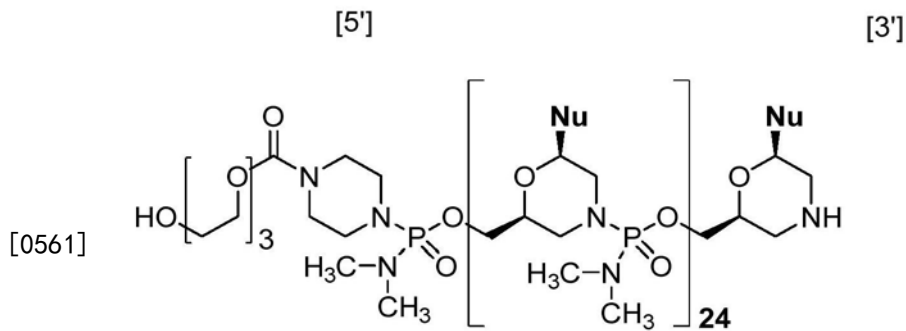


PMO#1

[0559] 其中每个Nu从1至22和5'至3'是H50D(+04-18) (SEQ ID NO:1):

[0560]

位置 编号 5'至 3'	Nu	位置 编号 5' 至 3'	Nu	位置 编号 5'至 3'	Nu	位置 编号 5'至 3'	Nu	位置 编号 5' 至 3'	Nu
1	G	6	C	11	A	16	T	21	G
2	G	7	C	12	T	17	A	22	C
3	G	8	A	13	A	18	C		
4	A	9	G	14	C	19	A		
5	T	10	T	15	T	20	G		

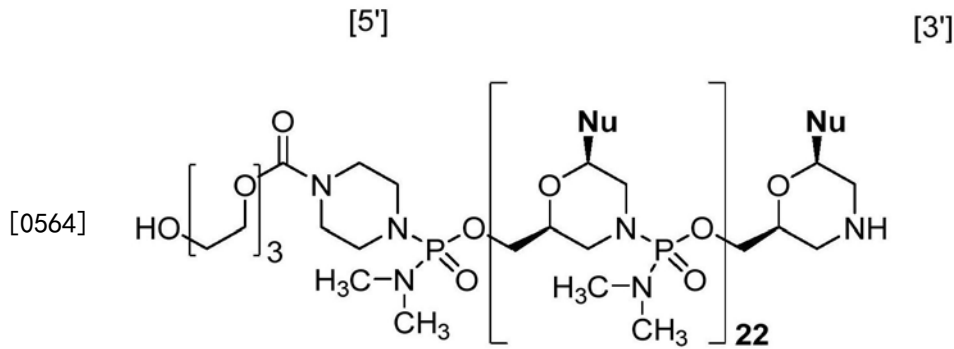


PMO#2

[0562] 其中每个Nu从1至25和5'至3'是H50D(+07-18) (SEQ ID NO:2):

[0563]

位置 编号 5'至 3'	Nu	位置 编号 5' 至 3'	Nu	位置 编号 5'至 3'	Nu	位置 编号 5'至 3'	Nu	位置 编号 5' 至 3'	Nu
1	G	6	C	11	A	16	T	21	G
2	G	7	C	12	T	17	A	22	C
3	G	8	A	13	A	18	C	23	T
4	A	9	G	14	C	19	A	24	C
5	T	10	T	15	T	20	G	25	C



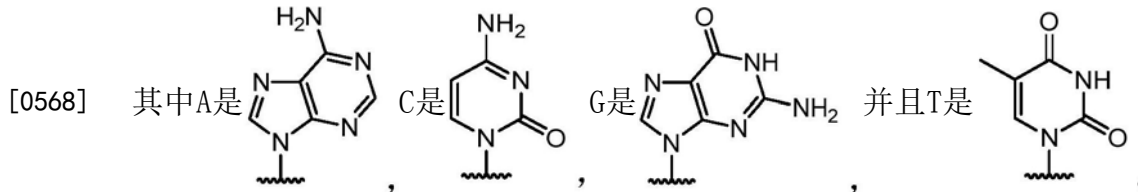
PMO#3

[0565] 其中每个Nu从1至23和5'至3'是H50D(+07-16) (SEQ ID NO:

[0566] 3) :

[0567]

位置编号 5'至 3'	Nu	位置编号 5'至 3'	Nu	位置编号 5'至 3'	Nu	位置编号 5'至 3'	Nu	位置编号 5'至 3'	Nu
1	G	6	A	11	A	16	C	21	T
2	A	7	G	12	C	17	A	22	C
3	T	8	T	13	T	18	G	23	C
4	C	9	A	14	T	19	G		
5	C	10	T	15	A	20	C		



[0569] PMO#1 (SEQ ID NO:1) 产生溶解度特征太有限而不能允许药物产品配制的产品, 而 PMO#2 (SEQ ID NO:2) 产生不能以足够产率和纯度制造的产品。

[0570] 与PMO#1和PMO#2的合成相反, PMO#3的合成(其仅与5'端PMO#2相差2个碱基)没有提供溶解度或纯化问题, 从而允许随后由PMO#3合成PPMO#3(下文实施例2)。

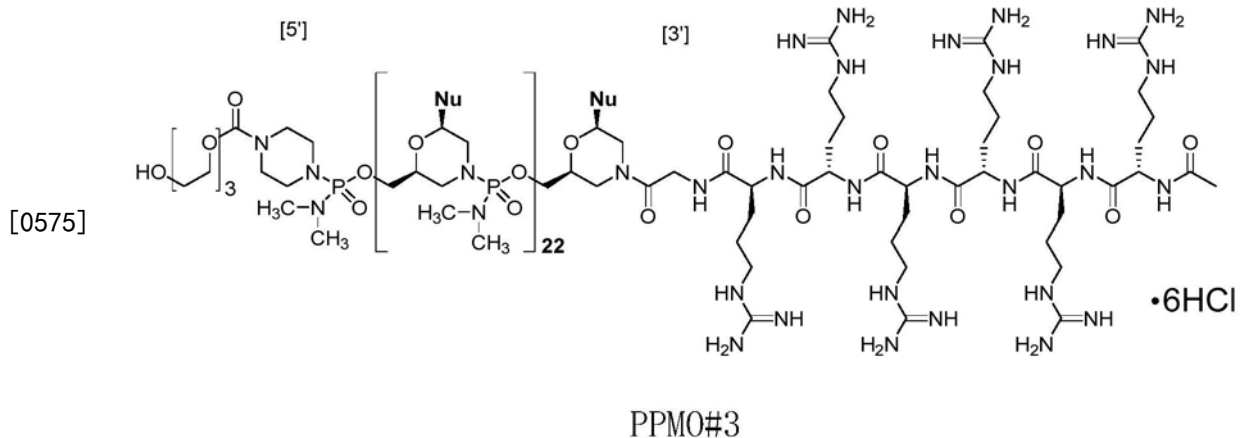
[0571]

靶向序列 (5'-3')	SEQ ID NO:	PMO 制造问题:
GGGATCCAGTATACTTACAGGC	1	溶解度: 粗 PMO 在储存后沉淀出来, 显示出有限的溶解度和溶液稳定性, 使得随后的 PPMO 合成不可行并用作药物产品候选物。
GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	2	纯化: 粗 PMO 无法纯化至随后的 PPMO 合成所需的适当纯度水平, 并且用作药物产品候选物。
GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	无 (91% 纯度; 溶解于水中)

[0572] 使用类似过程来合成PMO#4、PMO#5、PMO#6、PMO#7、PMO#8和PMO#9。

[0573] 实施例2:PPMO#3

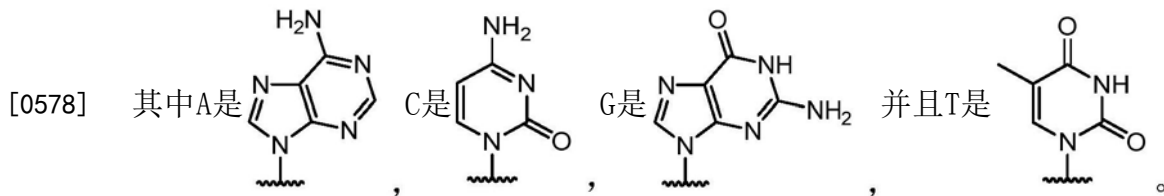
[0574] 使用上述方案,由PMO#3 (SEQ ID NO:3) 合成PPMO#3:



[0576] 其中每个Nu从1至23并且5'至3'是SEQ ID NO:3:

[0577]

位置 编号 5'至 3'	Nu	位置 编号 5' 至 3'	Nu	位置 编号 5'至 3'	Nu	位置 编号 5'至 3'	Nu	位置 编号 5'至 3'	Nu
1	G	6	A	11	A	16	C	21	T
2	A	7	G	12	C	17	A	22	C
3	T	8	T	13	T	18	G	23	C
4	C	9	A	14	T	19	G		
5	C	10	T	15	A	20	C		



[0579] 实施例3:体外外显子50跳跃

[0580] 针对在健康人类成肌细胞中的DMD外显子50跳跃评估了如下表所描述的两种靶向人类肌营养不良蛋白(DMD)外显子50的化合物PMO#3和PPMO#3,其都含有相同的序列。

[0581] PMO#3和PPMO#3的序列:

[0582]

名称	靶向序列 (TS)	SEQ ID NO.	5'	3'
PMO#3	GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	EG3	H
PPMO#3	GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	EG3	-G-R ₆ (SEQ ID NO: 11)

[0583] 具体来说,在通过在低血清培养基(SKM-D, Zen-Bio, Inc.)中培育来开始分化之前,将健康的人类成肌细胞(从Zen-Bio, Inc.购买的通道5-6, SKB-F-SL)培养成在SKM-M培养基中达到80-90%汇合。在分化后五天,将成熟肌管与各种浓度的上述化合物一起培育(即,40μm、20μm、10μm、5μm、2.5μm和1.25μm)。培育九十六个小时后,将肌管用PBS洗涤并且

在补充有1%β-巯基乙醇的RNeasy Micro试剂盒(目录号74004, Qiagen)中通过RLT缓冲液裂解。除了使用20μL不含RNase的水洗脱RNA之外,按照制造商的建议分离总RNA。

[0584] 为了通过两种化合物确定DMD外显子50跳跃,进行一步式终点RT-PCR。通过使用100ng总RNA、基因特异性引物和具有Platinum Taq DNA聚合酶的SuperScript III单步RT-PCR系统(目录号12574-026, Invitrogen)实行cDNA合成和PCR扩增。基因特异性引物被设计成靶向人类DMD外显子49和52(前向引物:CCA GCC ACT CAG CCA GTG AAG (SEQ ID NO:12); 反向引物:CGA TCC GTA ATG ATT GTT CTA GCC (SEQ ID NO:13))。通过BioRad CFX96实时热循环仪使用表6中所示的程序进行cDNA合成和PCR扩增。通过按照制造商的说明书,将22μL PCR产物加载至由DNA 1K试剂(目录号760517和CLS760673, Perkin Elmer)制备的LabChip GX系统的DNA扩展范围LabChip上,来评定跳过和未跳过PCR产物的表达。将DMD外显子50跳跃的百分比计算为外显子50跳过条带的摩尔浓度(nmol/l)与跳过和未跳过条带的摩尔浓度之和的百分比。。

[0585] 使用双尾、无配对的学生t检验(Student's t-test)(同方差)来评定2组在各剂量下的平均值是否有统计学差异。P值<0.05被认为具有统计学意义。

[0586] 表6. 用于扩增具有或不具有外显子50跳跃的DMD扩增子的热循环仪程序。

步骤	温度	时间
1. 逆转录	55°C	30 分钟
2. 逆转录酶失活	94°C	2 分钟
3. 变性	94°C	45 秒
[0587] 4. 退火	59°C	45 秒
5. 延伸	68°C	1 分钟
6. 重复步骤 3-4	45 个循环	
7. 最终延伸	68°C	10 分钟
8. 储存	4°C	∞

[0588] 显示与PMO#3相比, PPMO#3显著增加DMD外显子50跳跃的结果呈现在下表中(作为PPMO#3与PMO#3的跳跃比率)。

[0589] 表7. 人类成肌细胞中PMO#3和PPMO#3的DMD外显子50跳跃的百分比。

化合物/ 剂量 (μm)	相对外显子跳跃					
	1.25	2.5	5	10	20	40
[0590] PMO#3	1	1	1	1	1	1
PPMO#3	2.6	3.2	3.0	2.4	2.1	1.9

[0591] 以上表7中的数据示,与所有浓度的PMO#3相比,当细胞用PPMO#3处理时,成肌细胞中的外显子50跳跃结果更高。这种显著的改善很可能在体内比较试验中进一步证明,例如实施例4的非人类灵长类动物(NHP)研究,其中用PPMO#3或PMO#3处理NHP,并且在各种相关的肌肉组织中测量外显子50跳跃(细节参见实施例4)。

[0592] 实施例4:NHP中的外显子50跳跃

[0593] 为了进一步证明PPMO反义寡聚物外显子跳跃的功效,利用了非人类灵长类动物。具体地说,向具有完整肌肉组织的食蟹猕猴静脉内注射PPMO#3(实施例2)、PMO#3(实施例1)

或生理盐水。

[0594] 在整个研究过程中动物进行观察,包括临床观察(例如,评估皮肤和毛皮、呼吸作用)和体重测量。至少在测试开始前,以及在第一次剂量和最后一次剂量(如适用)后24小时,采集血液和尿液样本。

[0595] 在每次计划的尸检,或在极端情况下安乐死,收集膈膜、十二指肠、食道和主动脉的平滑肌、四头肌、三角肌、二头肌和心脏的切片并速冻。如上所描述,使用RT-PCR确定外显子50跳跃的百分比。

[0596] 实施例5:体外使用PMO的外显子50跳跃

[0597] 制备一系列PMO (SEQ ID NO 1-7;PMO#1-#7) 并测试外显子50跳跃效率。简言之,使用标准技术培养人类原代成肌细胞。将冻干的PMO重悬浮于无核酸酶的水中;验证摩尔浓度,并且使用NanoDrop2000分光光度计(Thermo Scientific)测量PMO溶液。根据制造商的说明书和P3试剂盒(Lonza),使用核穿孔将PMO的剂量范围递送至成肌细胞(例如,0.625、1.25、2.5、5、10和20 μm),并且允许在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂培养箱中培育过夜,然后进行RNA提取。使用来自GE Healthcare的RNAspin 96孔RNA分离试剂盒从PMO处理的细胞中提取RNA,并且使用标准技术用扩增人类DMD外显子49-52的引物进行RT-PCR。使用Caliper LabChip生物分析仪测量跳跃,并且通过以下方程式计算外显子跳跃%(即,外显子跳过的产物相对于全长PCR产物的条带强度):[外显子50跳过的产物/(外显子50跳过和外显子50未跳过的产物之和)*100]且基于在每种浓度下诱导的跳跃百分比来计算EC₅₀。如表8中所示,被设计成靶向外显子50的剪接受体或剪接供体区的本公开PMO寡聚物提供了使用PMO#1、PMO#2和PMO#3的外显子50的跳跃,从而提供了最高水平的外显子50跳跃活性(EC₅₀<1.0 μm)。

[0598] 表8.

SEQ ID NO:	化合物	活性 (EC ₅₀ ⁽¹⁾)
1	PMO#1 (+04-18)	****
2	PMO#2 (+07-18)	****
3	PMO#3 (+07-16)	****
4	PMO#4 (+07-17)	**
5	PMO#5 (-19+07)	**
6	PMO#6 (+07-15)	*
7	PMO#7 (-02+23)	*

[0600] (1) ****=EC₅₀<1.0 μm ; **=EC₅₀ 1.0至3.0 μm ; *=EC₅₀ 3.0 μm 或更大。

[0601] 应理解,前述详细描述和所附实例仅仅是说明性的,并且不应被视为对本发明的范围的限制,本发明的范围仅由所附权利要求书及其等同物限定。

[0602] 对所公开的实施方案的各种改变和修改对于本领域技术人员将是显而易见的。可在不脱离本发明的精神或范围的情况下进行此类改变和修饰,包括但不限于与化学结构、取代基、衍生物、中间体、合成、组合物、配制品或使用有关的那些。

[0603] 序列表

[0604]

描述	PMO 标识符	PPMO 标识符	序列 (5'至 3' 或 N 末端至 C 末端)	S E Q I D N O
H50D(+04-18)	PMO#1	PPMO#1	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	1
H50D(+07-18)	PMO#2	PPMO#2	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	2
H50D(+07-16)	PMO#3	PPMO#3	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	3
H50D(+07-17)	PMO#4	PPMO#4	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	4
H50A(-19+07)	PMO#5	PPMO#5	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	5

[0605]

H50D(+07-15)	PMO#6	PPMO#6	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	6
H50A(-02+23)	PMO#7	PPMO#7	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	7
H50D(+06-18)	PMO#8	PPMO#8	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	8
H50D(+07-20)	PMO#9	PPMO#9	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	9
R ₆			RRRRRR	1 0
R ₆ G			RRRRRRG	1 1
人类外显子 49 结 合正向引物			CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG	1 2
小鼠外显子 52 结 合反向引物			CGATCCGTAATGATTGTTCTAGC C	1 3
PMO-G	PMO-G	PPMO-G	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGT TC	1 4
(RXR) ₄			RXRRXRRXRRXR	1 5
(RFF) ₃ R			RFFRFFRFFR	1 6
(RXR) ₄ XB			RXRRXRRXRRXRB	1 7
(RFF) ₃ RXB			RFFRFFRFFRXB	1 8
(RFF) ₃ RG			RFFRFFRFFRG	1 9
R ₅ G			RRRRRG	2 0
R ₅			RRRRR	2 1
内含子 49-外显子 50-内含子 50	atctcaaagtgttaatcgaataagtaatgtgtatgctttctgtaaagAGGAAGT TAGAAGATCTGAGCTCTGAGTGGAAGGCGGTAAACC GTTTACTTCAAGAGCTGAGGGCAA GCAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTATTGG AGCCTg taagtatactggatccattctcttggctctagctattgtcaaaag		2 2	

[0606] *取决于用于连接核碱基的化学物质,T可以是胸腺嘧啶或尿嘧啶。

序列表

<110>萨勒普塔医疗公司 (SAREPTA THERAPEUTICS, INC.)

<120>用于肌营养不良的外显子跳跃寡聚物缀合物

<130> 8171.50.W000

<140>

<141>

<150> 62/779,028

<151> 2018-12-13

<160> 22

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213>人工序列

[0001]

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的寡核苷酸

<220>

<223>

合并 DNA/RNA 分子的描述：合成的寡核苷酸

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (5).. (5)

<223> t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (10).. (10)

<223> t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

	<222> (12).. (12)	
	<223> t 或 u	
	<220>	
	<221>修饰_碱基	
	<222> (15).. (16)	
	<223>t 或 u	
	<400> 1	
	ggganccagn anacnnacag gc	22
	<210> 2	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213>人工序列	
	<220>	
	<223>	
	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
[0002]	<220>	
	<223>	
	合并 DNA/RNA 分子的描述: 合成的寡核苷酸	
	<220>	
	<221>修饰_碱基	
	<222> (5).. (5)	
	<223>t 或 u	
	<220>	
	<221>修饰_碱基	
	<222> (10).. (10)	
	<223>t 或 u	
	<220>	
	<221>修饰_碱基	
	<222> (12).. (12)	
	<223>t 或 u	
	<220>	
	<221>修饰_碱基	
	<222> (15).. (16)	

<223> t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (23).. (23)

<223>t 或 u

<400> 2

gggancagn anacnacag gcncc

25

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的寡核苷酸

<220>

<223>

[0003]

合并 DNA/RNA 分子的描述：合成的寡核苷酸

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (3).. (3)

<223> t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (8).. (8)

<223> t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (10).. (10)

<223> t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (13).. (14)

<223> t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (21).. (21)

<223> t 或 u

<400> 3

ganccagnan acnnacaggc ncc

23

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的寡核苷酸

<220>

<223>

合并 DNA/RNA 分子的描述：合成的寡核苷酸

[0004]

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (4).. (4)

<223>t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (9).. (9)

<223> t 或 u

<220>

<221> 修饰_碱基

<222> (11).. (11)

<223> t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (14).. (15)

<223> t 或 u

<220>
 <221>修饰_碱基
 <222> (22)..(22)
 <223>t 或 u

 <400> 4
 ggancacagna nacnacagg cncc 24

<210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223>
 人工序列的描述：合成的寡核苷酸

<220>
 <223>
 合并 DNA/RNA 分子的描述：合成的寡核苷酸

[0005]

<220>
 <221>修饰_碱基
 <222> (3)..(4)
 <223> t 或 u

<220>
 <221>修饰_碱基
 <222> (7)..(7)
 <223> t 或 u

<220>
 <221>修饰_碱基
 <222> (9)..(11)
 <223> t 或 u

<220>
 <221>修饰_碱基
 <222> (24)..(24)
 <223> t 或 u

<400> 5

acnncncnn naacagaaaa gcanac

26

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的寡核苷酸

<220>

<223>

合并 DNA/RNA 分子的描述：合成的寡核苷酸

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (2).. (2)

<223> t 或 u

[0006]

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (7).. (7)

<223> t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (9).. (9)

<223> t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (12).. (13)

<223> t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (20).. (20)

<223> t 或 u

<400> 6

anccagnana cnnacaggcn cc

22

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223>
 人工序列的描述：合成的寡核苷酸

<220>
 <223>
 合并 DNA/RNA 分子的描述：合成的寡核苷酸

<220>
 <221>修饰_碱基
 <222> (5).. (5)
 <223>t 或 u

[0007]

<220>
 <221>修饰_碱基
 <222> (10).. (10)
 <223> t 或 u

<220>
 <221>修饰_碱基
 <222> (12).. (13)
 <223> t 或 u

<220>
 <221> 修饰_碱基
 <222> (15).. (15)
 <223> t 或 u

<220>
 <221>修饰_碱基
 <222> (19).. (20)
 <223>t 或 u

<220>
 <221>修饰_碱基
 <222> (23).. (23)

	<223> t 或 u	
	<220>	
	<221>修饰_碱基	
	<222> (25)..(25)	
	<223>t 或 u	
	<400> 7	
	gagcncagan cnnacnncn ccncn	25
	<210> 8	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213>人工序列	
	<220>	
	<223>	
	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
	<220>	
[0008]	<223>	
	合并 DNA/RNA 分子的描述: 合成的寡核苷酸	
	<220>	
	<221>修饰_碱基	
	<222> (5)..(5)	
	<223> t 或 u	
	<220>	
	<221>修饰_碱基	
	<222> (10)..(10)	
	<223> t 或 u	
	<220>	
	<221>修饰_碱基	
	<222> (12)..(12)	
	<223> t 或 u	
	<220>	
	<221>修饰_碱基	
	<222> (15)..(16)	
	<223> t 或 u	

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (23).. (23)

<223> t 或 u

<400> 8

ggganccagn anacnnacag gcnc

24

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的寡核苷酸

<220>

<223>合并 DNA/RNA 分子的描述：合成的寡核苷酸

[0009]

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (2).. (2)

<223>t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (7).. (7)

<223>t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (12).. (12)

<223>t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基

<222> (14).. (14)

<223>t 或 u

<220>

<221>修饰_碱基
 <222> (17)..(18)
 <223> t 或 u

<220>
 <221>修饰_碱基
 <222> (25)..(25)
 <223> t 或 u

<400> 9
 angggancca gnanacnnac aggcnc

27

<210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223>
 人工序列的描述: 合成的肽

[0010]

<400> 10
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223>
 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 11
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly
 1 5

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的寡核苷酸

<400> 12

ccagccactc agccagtgaa g

21

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的寡核苷酸

<400> 13

cgatccgtaa tgattgttct agcc

24

[0011]

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的寡核苷酸

<400> 14

gttgcctccg gttctgaagg tgttc

25

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> 6-氨基己酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> 6-氨基己酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> 6-氨基己酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> 6-氨基己酸

[0012] <400> 15
 Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
 1 5 10

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 16
 Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg
 1 5 10

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223> 6-氨基己酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223> 6-氨基己酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8).. (8)

<223> 6-氨基己酸

[0013]

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11).. (11)

<223> 6-氨基己酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13).. (13)

<223>6-氨基己酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14).. (14)

<223> β-丙氨酸

<400> 17

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Ala

1

5

10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> 6-氨基己酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> β -丙氨酸

<400> 18

Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Xaa Ala

1 5 10

[0014]

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的肽

<400> 19

Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Phe Phe Arg Gly

1 5 10

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

人工序列的描述：合成的肽

<400> 20
 Arg Arg Arg Arg Arg Gly
 1 5

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223>
 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 21
 Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

[0015]

<210> 22
 <211> 209
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223>
 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 22
 atcttcaaag tgtaaatcga ataagtaatg tgtatgcttt tctgttaaag aggaagttag 60
 aagatctgag ctctgagtgg aaggcggtaa accgtttact tcaagagctg agggcaaagc 120
 agcctgacct agctcctgga ctgaccacta ttggagcctg taagtatact ggatcccatt 180
 ctctttggct ctagctatatt gttcaaaag 209