



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106414739 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201380073536.X

(22)申请日 2013.12.20

(30)优先权数据

61/739,968 2012.12.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.08.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/077216 2013.12.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/100714 EN 2014.06.26

(71)申请人 萨雷普塔医疗公司

地址 美国华盛顿州博塞尔

(72)发明人 理查德·K·贝斯特威克

黛安·伊丽莎白·弗兰克

(74)专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司 31211

代理人 丁纪铁

(51)Int.Cl.

*G12N 15/113*(2006.01)

*A61K 31/7088*(2006.01)

权利要求书2页 说明书37页

序列表13页 附图4页

(54)发明名称

用于治疗肌营养不良症的改良的外显子跳跃组合物

(57)摘要

本发明描述了反义分子,所述反义分子能在肌营养不良基因中结合所选靶点从而诱导外显子53发生跳跃。

1. 一种分离的长度为20~50个核苷酸的反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸包含至少20个连续核苷酸,所述连续核苷酸与被命名作为退火点H53A(+33+60)的肌营养不良基因的外显子53靶区域互补,其中所述反义寡核苷酸特异性地与肌营养不良基因的外显子53靶区域杂交并诱导外显子53跳跃。

2. 权利要求1所述的反义寡核苷酸,包含SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,其中胸腺嘧啶任选为尿嘧啶。

3. 权利要求1所述的反义寡核苷酸,由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列组成。

4. 权利要求1所述的反义寡核苷酸,其中所述寡核苷酸不活化RNA酶H。

5. 权利要求1所述的寡核苷酸,包含一个非天然的骨架。

6. 权利要求1所述的寡核苷酸,其中寡核苷酸骨架的糖基为非天然基团所取代。

7. 权利要求6所述的寡核苷酸,其中所述非天然基团为吗啉代。

8. 权利要求1所述的寡核苷酸,其中寡核苷酸骨架的核苷酸间键合为非天然核苷酸间键合所取代。

9. 权利要求8所述的寡核苷酸,其中所述非天然核苷酸间键合为修饰的磷酸酯。

10. 权利要求1所述的寡核苷酸,其中寡核苷酸骨架的糖基为非天然基团所取代并且寡核苷酸骨架的核苷酸间键合为非天然核苷酸间键合所取代。

11. 权利要求10所述的寡核苷酸,其中所述非天然基团为吗啉代并且所述非天然核苷酸间键合为修饰的磷酸酯。

12. 权利要求11所述的寡核苷酸,其中所述修饰的磷酸酯为甲基磷酸酯、甲基磷硫酰、磷酰吗啉酯(phosphoromorpholides)、磷酰哌嗪酯(phosphoropiperazides)、或磷酰胺酯。

13. 权利要求1所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸为2'-O-甲基-寡核糖核苷酸。

14. 权利要求1所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸为肽核酸。

15. 权利要求1所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸化学连接了一个或多个基团或偶联物,所述基团或偶联物增强所述反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄入。

16. 权利要求15所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸与富含精氨酸的细胞穿膜肽偶联。

17. 权利要求15所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸化学连接聚乙二醇。

18. 权利要求1所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的至少一个嘧啶碱基包含一种5-取代的嘧啶碱基。

19. 权利要求18所述的寡核苷酸,其中所述嘧啶碱基选自胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。

20. 权利要求18所述的寡核苷酸,其中所述5-取代的嘧啶碱基为5-甲基胞嘧啶。

21. 权利要求1所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的至少一个嘌呤碱基包含一种N-2, N-6取代的嘌呤碱基。

22. 权利要求21所述的寡核苷酸,其中所述N-2, N-6取代的嘌呤碱基为2,6-二氨基嘌呤。

23. 一种表达载体,包含权利要求1所述反义寡核苷酸。

24. 一种药物组合物,包含权利要求1所述反义寡核苷酸、以及包括磷酸缓冲液的盐溶液。

25. 一种治疗杜氏肌营养不良症的方法,包含给予需治疗患者有效量的权利要求24所

述的药物组合物。

26. 根据权利要求1所述反义分子用于制作药物治疗肌营养不良症药物的用途。

27. 根据权利要求1所述反义分子用于以反义分子为基础的治疗。

28. 一种试剂盒, 包含至少一种权利要求1所述的反义分子、合适的载体和使用说明。

## 用于治疗肌营养不良症的改良的外显子跳跃组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2012年12月20日提交的美国临时专利申请系列第61/739,968号的权益。上述参考的临时专利申请的所有内容通过引用整体结合在本申请中。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及适于促进人类肌营养不良蛋白基因中外显子跳跃的新型反义化合物和组合物。利用适合用于本发明方法的反义组合物,本发明也提供了诱导外显子跳跃的方法。

### 发明背景

[0005] 反义技术是一项正在开发之中的技术,其利用一系列的化学物质在多种不同水平上(转录、剪接、稳定、翻译)影响基因表达。该研究大多聚焦于使用反义化合物纠正或补偿各种不同疾病中异常或与疾病有关的基因。反义分子能够特异性地抑制基因表达,因此,关于寡聚核苷酸作为基因表达调节物的许多研究聚焦于抑制靶基因的表达或抑制顺式作用元件的功能。这些反义寡核苷酸典型地作用于RNA,无论是正义链(如mRNA)或反义链如一些病毒RNA靶标。为了获得负调节特定基因的预期效果,通常这些核苷酸既促进靶mRNA的降解、阻断mRNA翻译或阻断顺式作用RNA元件的功能,因此可有效预防靶蛋白的从头合成或病毒RNA的复制。

[0006] 然而,当目标是为了获得天然蛋白的正调节产物、或者为了补偿引起翻译提前终止的突变,如无义突变或移码突变,这类技术就没有作用了。在这些情况下,缺陷基因的转录物将不能被定向降解或受到空间抑制,因此这些化学的反义寡核苷酸将不能促进靶mRNA的降解或阻断翻译。

[0007] 在各种遗传疾病中,突变对基因最后表达的影响可通过剪接加工期间靶外显子跳跃过程进行调节。剪接加工受到复杂的多组分剪接体(multi-component machinery)指导,该剪接体使mRNA前体(Pre-mRNA)中毗邻的外显子-内含子结点紧靠,并将内含子末端的磷酸二酯键断裂,随后在外显子之间进行重排从而剪接在一起。这个复杂而高度精确的过程由mRNA前体中的序列基元调节,序列基元是相对短的半保守RNA片段,其能与剪接反应中有关的各种核剪接因子结合。通过改变方式,剪接体可读取或识别mRNA前体过程中有关的基序,从而可创造出不同的已剪接mRNA分子。现已知大多数人类基因在正常基因表达期间可选择性剪接,尽管涉及的机制还没有明确。Bennett等(美国专利第6210892号)描述了反义调节野生型细胞mRNA过程中,使用反义寡核苷酸类似物不能诱导RNA酶H介导的靶RNA裂解。这一发现能够产生变化的已剪接mRNA,这些已剪接mRNA缺乏特定的外显子用于产生可溶性TNF超家族受体(如Sazani, Kole等,2007),这些TNF超家族受体缺乏外显子编码的跨膜结构域。

[0008] 在正常功能蛋白蛋白因基因突而提前终止的情况下,一种通过反义技术恢复一些功能蛋白的方法表明,在剪接过程中通过干预是有可能,并且如果可从一些基因上特异性地缺失与致病突变有关的外显子,则有时可产生缩短的蛋白产物,而其具有与天然蛋白相

似的生物学性质,或者具有足以改善由外显子相关突变导致的疾病的生物学活性(参见 Sierakowska, Sambade等1996; Wilton, Lloyd等1999; van Deutekom, Bremmer-Bout等2001; Lu, Mann等2003; Aartsma-Rus, Janson等2004)。Kole等(美国专利第5,627,274号、第5,916,808号、第5,976,879号和第5,665,593号)公开了使用并不促进靶mRNA前体降解的修饰的反义寡核苷酸类似物与异常剪接竞争的方法。Bennett等(美国专利第6,210,892号)描述了野生型细胞mRNA加工的反义调节,其中也使用了不会诱导RNA酶H介导的靶RNA裂解的反义寡核苷酸类似物。

[0009] 靶向于外显子跳跃的过程可特别用于长基因,长基因中具有许多外显子和内含子,其中外显子在遗传组成上具有冗余,或者一个蛋白可以具有功能而不需要一个或多个特定的外显子。各种基因中的突变引起了截短,利用基因改造治疗与该截短有关的遗传疾病,与基因改造有关的研究工作主要集中于利用反义寡核苷酸:(1)与剪接加工中涉及的元件部分或完全重叠;或(2)在非常靠近元件的位点结合mRNA前体,以阻断剪接因子的结合和功能,剪接因子通常调节发生在上述元件上的特定剪接反应。

[0010] 杜氏肌营养不良(DMD)是由肌营养不良蛋白表达缺陷所引起的。编码该蛋白的基因含有79个外显子,遍布于超过两百万个核苷酸的DNA中。改变外显子读码框、或引入一个终止密码子、或特征在于去除一整个框外外显子或多个外显子、或一个或多个外显子副本,以上这些外显子突变都可能导致不能产生功能性的肌营养不良蛋白,从而导致DMD。

[0011] 一种病症稍轻的肌营养不良症形式为贝克肌营养不良(Becker muscular dystrophy, BMD),发现其典型地出现了一个或多个外显子缺失的突变,导致正确的读码框沿着整个肌营养不良蛋白转录物,如此使得mRNA翻译为蛋白不能提前终止。假如突变肌营养不良蛋白mRNA前体加工过程中上下游外显子相连接从而维持正确的基因读码框,则结果是mRNA编码具有短的内在缺失的蛋白,从而保留了一些活性,导致了贝克表型。

[0012] 多年来,已知一个或多个外显子缺失并不会改变肌营养不良蛋白的读码框,但会引发BMD表型,而一个导致移码的外显子缺失则将引起DMD(Monaco, Bertelson等,1988)。通常,肌营养不良蛋白突变包括改变读码框的点突变和外显子缺失,由此阻断了正常蛋白的反义从而导致DMD。应当注意,一些BMD和DMD患者的外显子缺失含盖了多个外显子。

[0013] 现已报道了体外和体内中利用反义寡核苷酸调节突变肌营养不良蛋白mRNA前体的剪接(参见Matsuo, Masumura等,1991; Takeshima, Nishio等,1995; Pramono, Takeshima等,1996; Dunckley, Eperon等,1997; Dunckley, Manoharan等,1998; Errington, Mann等,2003)。

[0014] Wilton等(Wilton, Lloyd等,1999)报道了mdx小鼠模型中首个特异性可重复的外显子跳跃实例。通过将反义分子靶向作用于供体剪接位点,培养细胞处理6小时之内肌营养不良蛋白mRNA中诱导了外显子23持续和有效的跳跃。Wilton等也描述了使用更长反义寡核苷酸靶向作用于小鼠肌营养不良蛋白mRNA前体的受体区域。尽管靶向作用于内含子23供体剪接位点的第一条反义寡核苷酸在原代培养的肌细胞中诱导了连续的外显子跳跃,但是发现在表达更高水平肌营养不良蛋白的无限增殖细胞培养物中该化合物的效果要低得多。然而,随着进一步优化靶点和反义寡核苷酸设计,特异性外显子跳跃的效率几乎提高了一个数量级(Mann, Honeyman等2002)。

[0015] 解决以下问题的研究工作最近已开展:在受肌营养不良蛋白缺乏影响的组织中持

续表达肌营养不良蛋白而副作用极轻。在4例患有DMD的患者中,将靶向作用于外显子51 (PRO051)的反义寡核苷酸肌内注射入胫骨前肌,结果发生外显子51特异性跳跃而无任何临床明显的不良反应(Mann,Honeyman等,2002;van Deutekom,Janson等,2007)。将靶向作用于mdx小鼠中外显子23、与细胞穿膜肽偶联的反义磷酸二胺酯吗啉代寡聚物(PPMO)进行全身性给药的研究正在开展中,该研究在骨骼肌和心肌中产生了高效且持续的肌营养不良蛋白产物而检测不到毒性(Jearawiriyapaisarn,Moulton等,2008;Wu,Moulton等,2008;Yin,Moulton等,2008)。

[0016] 治疗DMD的剪接转换寡核苷酸(SSO)的安全与有效性临床试验,基于SSO技术,通过空间阻断剪接体诱导mRNA前体发生可变性剪接(Cirak等,2011;Goemans等,2011;Kinali等,2009;van Deutekom等,2007)。

[0017] 尽管已有成功事例,但仍然需要改善靶向作用于多个肌营养不良蛋白外显子的反义寡核苷酸以及改善用于DMD治疗的肌肉给药组合物和方法。

## 发明概要

[0018] 一方面,本发明提供了能结合人类肌营养不良蛋白mRNA前体中所选靶点诱导外显子跳跃的反义分子。另一方面,本发明提供了组合使用诱导单个或多个外显子跳跃的两个或更多反义寡核苷酸。例如,可通过共同连接两种或更多反义寡核苷酸分子,可获得单个或多个外显子跳跃。

[0019] 另一方面,本发明涉及20~50核苷酸长度的分离的反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸包括至少10、12、15、17、20或更多连续核苷酸,所述连续核苷酸与肌营养不良基因的外显子53靶区域互补,所述外显子53靶区域被命名作为退火点,选自下组:H53A(+33+60)和H53A(+22+46),其中所述反义寡核苷酸特异性地与退火点杂交诱导外显子53跳跃。在一个实施方案中,反义寡核苷酸的长度为25至28个核苷酸。本发明的另一个实施方案涉及20~50长度的分离的反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸包括至少10、12、15、17、20或更多连续核苷酸,所述连续核苷酸与肌营养不良基因的外显子53靶区域互补,所述外显子53靶区域被命名作为选自下组的退火点:H53A(+46+73)、H53A(+46+69)和H53A(+40+61),其中所述反义寡核苷酸特异性地与退火点杂交诱导外显子53跳跃。

[0020] 另一方面,本发明涉及20~50长度的分离的反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸包括至少10、12、15、17、20或更多连续核苷酸,所述连续核苷酸选自SEQ ID NOs:1和7,其中所述寡核苷酸特异性地与肌营养不良蛋白基因的外显子53靶区域杂交并诱导外显子53跳跃。在一个实施方案中,SEQ ID NOs:1和7中的胸腺嘧啶碱基任选为尿嘧啶。

[0021] 本发明的其他实施方案涉及20~50长度的分离的反义寡核苷酸,所述长度包括至少10、12、15、17、20或更多连续核苷酸,所述连续核苷酸选自SEQ ID NOs:6、8和9,其中所述寡核苷酸特异性地与肌营养不良基因的外显子53靶区域杂交并诱导外显子53跳跃。在一个实施方案中,SEQ ID NOs:6、8和9中的胸腺嘧啶碱基任选为尿嘧啶。

[0022] 靶向作用于外显子53的实例性反义序列包括那些如下经鉴定的序列。

[0023] H53A(+33+60):5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG-3'(SEQ ID NO:1)

[0024] H53A(+46+73):5'-ATTTCATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCT-3'(SEQ ID NO:6)

[0025] H53A(+22+46):5'-TGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCCC-3'(SEQ ID NO:7)

[0026] H53A(+46+69):5'-CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCT-3'(SEQ ID NO:8)

[0027] H53A(+40+61):5'-TGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGT-3'(SEQ ID NO:9)

[0028] 在一个实施方案中,所述反义寡聚物特异性地与退火位点H53A(+33+60)杂交,如SEQ ID NO:1,其中胸腺嘧啶任选为尿嘧啶。仍然是另一实施方案,所述反义寡聚物特异性地与退火位点H53A(+22+46)杂交,如SEQ ID NO:7。

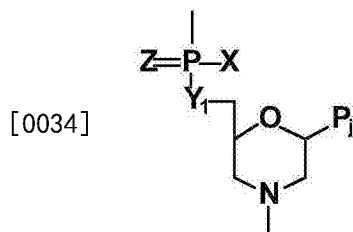
[0029] 在一些实施方案中,本发明的反义寡核苷酸含有一个或多个修饰,以尽量减少或预防为RNA酶H所降解。在一些实施方案中,本发明的反义寡核苷酸不激活RNA酶H。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸包含非天然的骨架。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸骨架的糖基被非天然基团如吗啉代所取代。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸的核苷酸间键合为非天然核苷酸间键合所取代,如修饰的磷酸酯。修饰的磷酸酯实例包括甲基磷酸酯、甲基磷硫酯、磷酰吗啉酯、磷酰哌嗪酯和磷酰胺酯。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸为2'-O-甲基寡核糖核苷酸或肽核酸。

[0030] 在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸含有碱基修饰物或取代物。例如,可选择某些核酸碱基增强本文所述反义寡核苷酸的亲和力。这些碱基包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2,N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。显示5-甲基胞嘧啶可将双链核酸的稳定性提高0.6~1.2℃,并且可以整合入本文所述的反义寡核苷酸。在一个实施方案中,所述寡核苷酸的至少一个嘧啶碱基包含一5-取代的嘧啶碱基,其中所述嘧啶碱基选自胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。在一个实施方案中,5-取代的嘧啶为5-甲基胞嘧啶。在另一个实施方案中,所述寡核苷酸的至少一个嘌呤包含N-2,N-6取代的嘌呤碱基。在一个实施方案中,所述N-2,N-6取代的嘌呤碱基为2,6-二氨基嘌呤。

[0031] 在一个实施方案中,所述寡核苷酸包括一个或多个5-甲基胞嘧啶取代物,单独或与其他修饰组合,如2'-O-甲氧乙基糖基。仍然是另一个实施方案中,所述反义寡核苷酸包括一个或多个2,6-二氨基嘌呤取代物,单独或与另一修饰组合。

[0032] 另一方面,本发明包括如下的反义寡核苷酸:(i)由吗啉代亚基和含磷的亚基间键合组成,所述键合将一个亚基的氮与相邻亚基的5'环外碳相连;(ii)含有10-50个核苷酸碱基;(iii)具有能有效与肌营养不良蛋白mRNA前体中靶序列的至少10或12个连续碱基杂交并诱导外显子跳跃的碱基序列。

[0033] 一方面,所述反义化合物由含磷亚基间键合组成,所述键合将一个亚基的氮与相邻亚基的5'环外碳相连。所述化合物中的吗啉代亚基可通过磷酰二胺酯键连接,结构如下:



[0035] 其中,Y<sub>1</sub>=O,Z=O,P<sub>j</sub>为可通过碱基特异性氢键有效结合多聚核苷酸中碱基的嘌呤或嘧啶碱基对,X为烷基、烷氧基、硫代烷氧基、或烷氨基,例如其中X=NR<sub>2</sub>,其中每一个R各自为氢或甲基。上述不带电荷的亚基间键合可以随生理pH中带正电荷的键合散布,其中带

正电荷的键合的总数在1与至多至亚基间所有键合总数之间。

[0036] 在另一个实例性的实施方案中,所述化合物由美国专利申请第13/118,298号所述的亚基间键合和末端修饰组成,所述美国专利申请通过引用整体结合至本文中。

[0037] 在一些实施方案中,本发明的反义寡聚物并不激活RNA酶H。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸包含非天然的骨架。在一些实施方案中,寡核苷酸骨架的糖基为非天然基团如吗啉代所取代。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸的寡核苷酸骨架的核苷酸间键合为非天然的核苷酸间键合如修饰的磷酸酯所取代。修饰的磷酸酯实例包括甲基膦酸酯、甲基磷硫酰、磷酰吗啉酯、磷酰哌嗪酯和磷酰胺酯。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸为2'-O-甲基-寡核糖核苷酸或肽核酸。

[0038] 在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸化学偶联了一个或多个基团,如聚乙二醇基团,或偶联物如富含精氨酸的细胞穿膜肽(例如SEQ ID NOs:9-25),所述基团或偶联物增强了反义寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄入。在一个实例性的实施方案中,富含精氨酸的细胞穿膜肽在其N-末端或C-末端残基供价偶联至反义化合物的3'或5'端。同样在一个实例性的实施方案中,所述反义化合物由吗啉代亚基和含磷亚基间键合组成,所述键合将一个亚基的嗎啉代氮与相邻亚基的5'环外碳相连。

[0039] 另一方面,本发明提供了整合上述反义寡核苷酸的表达载体,例如SEQ ID NOs:1和7的反义寡核苷酸。在一些实施方案中,表达载体为修饰的反转录病毒或非反转录病毒载体,如腺相关的病毒载体。

[0040] 另一方面,本发明提供了包括上述反义寡核苷酸的药物组合物、包括磷酸缓冲液的盐溶液。

[0041] 另一方面,本发明提供了可选择的或适于预防或治疗遗传疾病的反义分子,包含至少一种以适给予患者给药形式的反义分子。

[0042] 另一方面本发明提供了治疗患有遗传疾病的患者的方法,其中编码特定蛋白的基因中发生突变,并且该突变的影响可通过外显子跳跃消除,包含以下步骤:(a)选择与本文所述相关的反义分子;(b)将该分子给予需要治疗的患者。本发明也公开了本发明纯化和分离的反义寡核苷酸用于制作治疗遗传疾病的药物的应用。

[0043] 另一方面,本发明提供了治疗以杜氏肌营养不良为特征的疾病的方法,包括给予患者本发明有效量适当设计的反义寡核苷酸,该反义寡核苷酸与患者具体遗传疾病相关。此外,通过给予患者有效量的反义寡核苷酸或者给予含有一种或多种上述生物分子的药物组合物,本发明提供了预防性治疗患者的方法以预防或尽量减轻杜氏肌营养不良症。

[0044] 另一方面,本发明也提供了治疗遗传疾病的试剂盒,所述试剂盒包含至少一种本发明的反义寡核苷酸、合适的包装以及使用说明。

[0045] 结合附图阅读以下本发明的说明详述将更深入理解这些和其他目的和特征。

[0046] 附图简述

[0047] 图1A显示了实例性的具有磷酰二胺酯键的吗啉代寡聚物结构。

[0048] 图1B显示了本发明实施方案有关的富含精氨酸肽与反义寡聚物的偶联物。

[0049] 图1C显示了图1B中的偶联物,其中骨架键合含有一个或多个带正电荷的基团。

[0050] 图1D-G显示了实例性吗啉代寡核苷酸的重复性亚基片段,称为D至G

[0051] 图2显示了实例性反义寡聚物与人肌营养不良蛋白外显子53退火诱导外显子53跳

跃的相对位置。

[0052] 图3和4描述了相关的2个独立试验的示意图,显示实例性反义寡聚物在人横纹肌肉瘤细胞中诱导外显子53跳跃的相对活性。使用标明的寡聚物处理分离自横纹肌肉瘤细胞的RNA,进行外显子53特异性的巢式RT-PCR扩增,随后进行凝胶电泳和谱带强度定量。数据标绘为通过PCR评估的外显子跳跃百分比,即外显子跳跃产物相对于全长PCR产物的谱带强度。NG-11-0352、NG-12-0078、AND NG-12-0079(分别为SEQ ID NOs:2-4)为公开的寡聚物。

[0053] 图5所述示意图显示诱导外显子53跳跃的实例性反义寡聚物在原代肌细胞培养物中的相对活性。使用标明的寡聚物处理分离自原代肌细胞的RNA,进行外显子53特异性的巢式RT-PCR扩增,随后进行凝胶电泳和谱带强度定量。数据标绘为通过PCR评估的外显子跳跃百分比,即外显子跳跃产物相对于全长PCR产物的谱带强度。NG-12-0080对应SEQ ID NO:1所示的寡聚物。

[0054] 发明详述

[0055] 本发明的实施方案通常涉及改良的反义化合物及其使用方法,所述反义化合物经特别设计用于诱导人类肌营养不良蛋白基因中的外显子跳跃。肌营养不良蛋白在肌肉功能中发挥重要功能,且各种肌肉相关疾病的特征都在于该基因的突变。因此,在某些实施方案中,本文所述改良的反义化合物诱导人类肌营养不良蛋白基因突变形式中的外显子跳跃,如杜氏肌营养不良症(DMD)和贝克肌营养不良症(BMD)发现的肌营养不良蛋白突变基因。

[0056] 由于突变导致mRNA剪接异常,这些突变的人肌营养不良蛋白基因或表达缺陷型肌营养不良蛋白或表达的肌营养不良蛋白几乎完全检测不到,导致产生了各种形式肌营养不良的疾病。为了治疗这一疾病,将本发明的反义化合物与突变的人肌营养不良蛋白基因中预加工RNA的选定区域杂交,在不同的异常剪接的人肌营养不良蛋白mRNA中诱导外显子跳跃并进行差异化剪接,由此使肌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,得到的肌营养不良蛋白不一定是“野生型”形式的肌营养不良蛋白,而是截短形式的肌营养不良蛋白,但该蛋白仍然具有功能或半功能。

[0057] 通过提高肌细胞中功能性肌营养不良蛋白基因的水平,那些以及相关的实施方案可用于预防和治疗肌营养不良症,尤其是那些DMD和BMD形式的肌营养不良症,它们的特征在于由于mRNA剪接异常而导致表达缺陷的肌营养不良蛋白。本文所述的特定寡聚物还提供了超过其他在用寡聚物的改良的肌营养不良蛋白外显子特异性靶标,因此相较于其他治疗肌营养不良症相关形式的方法,本文提供的治疗方法具有显著且实际的优点。

[0058] 因此,本发明涉及分离的20~50长度的分离的反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸包括至少10、12、15、17、20或更多连续核苷酸,所述连续核苷酸与肌营养不良蛋白基因的外显子53靶区域互补,所述外显子53靶区域被命名作为退火点,其选自下组:H53A(+33+60)和H53A(+22+46)。所述反义寡核苷酸特异性地与退火位点杂交,诱导外显子53跳跃。本发明其他的反义寡核苷酸长度为20~50个核苷酸,并包括至少10、12、15、17、20或更多连续核苷酸,所述连续核苷酸与肌营养不良基因的外显子53靶区域互补,所述外显子53靶区域被命名作为选自下组H53A(+46+73)、H53A(+46+69)和H53A(+40+61)的退火点。

[0059] 本发明其他的反义寡核苷酸长度为20~50个核苷酸,并包括SEQ ID NO s:1或7的至少10、12、15、17、20、22、25或更多核苷酸。其他实施方案涉及长度为20~50核苷酸的反义寡核苷酸,包括SEQ ID NOs:6、8和9的至少10、12、15、17、20、22、25或更多的核苷酸。在一些

实施方案中,SEQ ID NOs:1、6、7、8和9中的胸腺嘧啶任选为尿嘧啶。

[0060] 本发明实例性的反义寡聚物如下所示:

[0061] H53A(+33+60):5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG-3'(SEQ ID NO:1)

[0062] H53A(+46+73):5'-ATTTCATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCT-3'(SEQ ID NO:6)

[0063] H53A(+22+46):5'-TGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCCC-3'(SEQ ID NO:7)

[0064] H53A(+46+69):5'-CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCT-3'(SEQ ID NO:8)

[0065] H53A(+40+61):5'-TGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGT-3'(SEQ ID NO:9)

[0066] 在优选的实施方案中,所述反义寡聚物特异性的与退火位点H53A(+33+60)杂交,如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

[0067] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同含义。尽管任何类似于或等同于本文所述方法和材料都可用于实践或测试本发明,仍然描述了优选的方法和材料。为了本发明的目的,下述术语定义如下。

[0068] I. 定义

[0069] “约”表示数量、水平、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度的变化范围达到参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、维度、尺寸、量、重量或长度的30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1%。

[0070] 术语“互补”和“互补性”是指通过碱基配对原理关联的多聚核苷酸(即核苷酸序列)。例如,序列“T-G-A(5'-3')”与序列“T-C-A(5'-3')”相互补。互补性可以是“部分的”,其中仅有一些核酸碱基按照碱基配对原理匹配。或者,在核苷酸之间可存在“完全”或“全部”的互补。核酸链之间的互补程度对核酸链之间的杂交效率和强度有重要影响。尽管通常希望进行完美互补,但是一些实施方案可包括一个或多个但优选6、5、4、3、2或1个与靶RNA之间的错配。包括寡聚物内部任何位点的变化。在某些实施方案中,接近寡聚物末端的序列中的变化通常优选于内部的变化,假如存在,典型地在5'和/或3'末端的约6、5、4、3、2或1个核苷酸之内。

[0071] 术语“细胞穿膜肽”和“CPP”可替换使用,是指阳离子细胞穿膜肽,也称为转运肽、载体肽或肽转导结构域。本文所示的肽能在给定的细胞培养群中诱导100%细胞进行细胞穿透,并允许大分子在全身给药后在体内多个组织间迁移。优选的CPP实施方案为下文进一步描述的富含精氨酸的肽。

[0072] 术语“反义寡聚物”或“反义化合物”和“反义寡核苷酸”可替换使用,是指通过亚基间键合连接的环状亚基序列,每一亚基都带有碱基配对部分,通过Watson-Crick配对原理允许碱基配对部分与核酸(典型为1条RNA)的靶序列杂交,在靶序列之内形成核酸-寡聚物异源双链体。环状的亚基基于核糖或另一戊糖,或在优选的实施方案中基于吗啉代基团(参见以下吗啉代寡聚物的说明书)。该寡聚物可以具有与靶序列正确的或接近的序列互补性,通常接近寡聚物末端的变化优选于序列中内部的变化。

[0073] 这种反义寡聚物可以设计为阻断或抑制mRNA的翻译、或者抑制天然mRNA前体的剪接加工,可以认为是“定向”或“靶向”作用于与其杂交的靶序列。靶序列典型是一个区域,包括一个mRNA的AUG启动密码子、翻译抑制寡聚物、或预加工mRNA的剪接位点、剪接抑制寡聚物(SSO)。剪接位点的靶序列可包括一个mRNA序列,该mRNA序列在其5'端具有位于正常剪接位点受体下游1至约25个碱基对,而剪接位点受体与预加工mRNA相连。优选的靶序列为预加

工mRNA的任何区域,该序列包括剪接位点、或整体包含在外显子编码序列之内、或横跨剪接受体或供体位点。当以上述方式靶向作用于靶标的核苷酸时,寡聚物通常被称为“靶向作用于”生物相关靶标,例如蛋白、病毒或细菌。

[0074] 术语“吗啉代寡聚物”或“PMO”(磷酸酯或磷酸二胺酯吗啉代寡聚物)是指由吗啉代亚基结构组成的寡核苷酸类似物,其中(i)所述结构通过含磷键合连接,所述含磷键合1-3个原子长,优选2个原子长,优选不带电荷或带正电荷,将一个亚基的吗啉代氮与相邻亚基的5'环外的碳相连;(ii)每一个吗啉环都带有嘌呤或嘧啶碱基对部分,通过碱基特异性氢键与多聚核苷酸中的碱基有效结合。参见,例如,图1A中的结构显示了优选的磷酸二胺酯键类型。该键合可以有所变化,只要它们不干扰结合或活性。例如,与磷相连的氧可被硫取代(硫代磷酸二胺酯)。5'氧可被氨基或氨基取代的低级烷基所取代。与磷相连的悬氮(pendant nitrogen)可以是非取代的、单取代的或低级烷基任选取代的双取代。也参见下述阳离子键合的讨论。嘌呤或嘧啶碱基对典型为腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶或肌苷。吗啉代寡聚物的合成、结构和结合特征详述于美国专利第5,698,685号、第5,217,866号、第5,142,047号、第5,034,506号、第5,166,315号、第5,521,063号、第5,506,337号、第8,076,476号、第8,299,206号和第7,943,762号(阳离子键合),所有以上专利文献通过引用结合到本文中。PCT申请US2011/038459和公开说明书W0/2011/150408详述了修饰的亚基间键合和末端基团,以上文献通过引用整体结合至本文中。

[0075] “氨基酸亚基”或“氨基酸残基”是指 $\alpha$ -氨基酸残基( $-\text{CO}-\text{CHR}-\text{NH}-$ )或 $\beta$ -或其他氨基酸残基(例如 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n\text{CHR}-\text{NH}-$ ),其中R是侧链(其可包括氢)且n为1-6,优选1-4。

[0076] 术语“天然存在的氨基酸”是指天然发现的蛋白中存在的氨基酸。术语“非天然氨基酸”是指那些天然发现的蛋白中不存在的氨基酸,实例包括 $\beta$ -丙氨酸( $\beta$ -Ala)、6-氨基己酸(Ahx)或6-氨基戊酸。

[0077] 术语“天然存在的核酸”是指天然发现的核酸。天然存在的核酸典型为核酸(每一个含有嘌呤或嘧啶核碱基以及戊糖)通过磷酸酯键结合在一起的聚合物。天然存在的核酸分子实例包括RNA和DNA。术语“非天然存在的核酸”是指天然中不存在的核酸。例如,非天然存在的核酸可包括一个或多个非天然的碱基、糖、和/或亚基间键合,如将对应天然发现的核酸分子的糖、碱基和/或键合进行修饰或取代。本文中描述了实例性的修饰。在一些实施方案中,非天然存在的核酸包括多个类型的修饰,例如糖和碱基修饰、糖和键合修饰、碱基和键合修饰、或碱基、糖和键合修饰。在一个优选的实施方案中,本发明的反义寡核苷酸是非天然存在的核酸分子。例如,在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸含有非天然的(如修饰或取代的)碱基。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸含有非天然的(如修饰或取代的)糖。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸含有非天然的(如修饰或取代的)亚基间键合。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸含有多个类型的修饰或取代,如非天然碱基和/或非天然糖、和/或非天然亚基间键合。在其他实施方案中,所述反义寡核苷酸具有天然存在核酸分子的化学组合,即所述反义寡核苷酸并不包括修饰或取代的碱基、糖或亚基间键合。无论化学组合物,本发明的反义寡核苷酸是体外合成的,并不包括生物源性的反义组合物。

[0078] “外显子”是指限定的编码蛋白的核酸片段,或者通过剪接去除预加工(前体)RNA任一部分后以RNA分子的成熟形式为代表的核酸序列。成熟的RNA分子可以是信使RNA(mRNA),或非编码RNA的功能形式如rRNA或tRNA。人肌营养不良蛋白基因具有约79个外显

子。

[0079] “内含子”是指不翻译为蛋白的核酸区(基因内)。内含子是非编码片段,不能转录为前体mRNA(pre-mRNA),随后在形成成熟RNA期间通过剪接去除。

[0080] “有效量”或“治疗有效量”是指以单剂量或系列剂量的一部分给予哺乳动物受试者诸如反义寡聚物的治疗化合物的量,该剂量下可有效产生期望获得的治疗效果。对于一个反义寡聚物,该效果典型地通过抑制所选靶序列的翻译或天然的剪接加工获得。

[0081] “外显子跳跃”通常是指从给定的预加工的RNA中去除整个外显子或其部分,由此将成熟RNA中存在的整个外显子或其部分排除在外的过程,成熟RNA如翻译成蛋白的成熟RNA。因此,以另外方式由跳跃外显子编码的蛋白部分并不存在于蛋白的表达形式中,通常创造了改变的但仍然具有功能的蛋白形式。在某些实施方案中,跳跃的外显子为来源于人肌营养不良蛋白基因的异常外显子,该人肌营养不良蛋白基因可能含有突变或序列中另外引起异常剪接的其他变异。在某些实施方案中,跳跃的外显子为人肌营养不良蛋白基因外显子1-79中任意一个或多个,尽管优选人肌营养不良蛋白基因外显子53。

[0082] “肌营养不良蛋白”是杆状细胞质蛋白,并且是通过细胞膜将肌纤维细胞骨架与周围胞外基质相连的蛋白复合物的重要部分。肌营养不良蛋白含有多个功能结构域。例如,肌营养不良蛋白含有位于约氨基酸14-240处的肌动蛋白和位于约氨基酸253-3040处的中心杆状结构域。这个巨大的中心结构域由约109个氨基酸的24个膜收缩蛋白样三螺旋元件形成,这些元件与 $\alpha$ -辅肌动蛋白和膜收缩蛋白具有同源性。这些重复典型被四个富含脯氨酸的非重复片段所间断,该非重复片段也被称为铰链区。重复15、16被18个氨基酸序列所分离,该氨基酸序列看似为肌营养不良蛋白的溶蛋白性裂解提供了一个主要位点。大部分重复的序列同一性范围在10-25%之间。一个重复含有三个 $\alpha$ -螺旋:1、2或3。 $\alpha$ -螺旋1和3每个都由7个螺旋转角,该螺旋转角可能通过疏水界面作为卷曲螺旋相互作用。 $\alpha$ -螺旋2具有更复杂的结构,由四个和三个分别为甘氨酸或脯氨酸残基隔离的螺旋转角的片段组成。每一个重复都由两个外显子编码,典型在 $\alpha$ -螺旋2的第一部分中氨基酸47和48之间被一个内含子所中断。在重复中的不同位点发现了其他内含子,通常分散在螺旋3中。肌营养不良蛋白也含有位于约氨基酸3080-3360处富含半胱氨酸的结构域,其包括显示与粘菌(盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum*) $\alpha$ -辅肌动蛋白C末端结构域具有同源性的富含半胱氨酸片段(即280个氨基酸中的15个半胱氨酸)。羧基末端结构域处于约氨基酸3361-3685处。

[0083] 在肌膜上肌营养不良蛋白的氨基末端与F-肌动蛋白结合,而羧基末端与肌营养不良蛋白相关蛋白复合物(DAPC)结合。该DAPC包括肌营养不良蛋白聚糖、肌膜聚糖、整联蛋白和小窝蛋白,这些成分中的任一发生突变都将导致常染色体遗传的肌营养不良。当肌营养不良蛋白缺乏则DAPC不稳定,引起膜蛋白水平降低,反过来导致渐进式纤维损伤和膜渗漏。在肌营养不良症的各种形式中,如杜氏肌营养不良症(DMD)和贝克肌营养不良症(BMD),肌细胞产生了改变的和功能缺陷的肌营养不良蛋白类型,或完全不产生肌营养不良蛋白,主要由导致不正确剪接的基因序列突变导致。优势表达缺陷的肌营养不良蛋白、或完全缺乏肌营养不良蛋白或肌营养不良蛋白样蛋白,都将导致肌肉退化快速恶化,如上所述。这一方面,“缺陷的”肌营养不良蛋白的特征可能在于:本领域已知的某些DMD或BMD患者产生的肌营养不良蛋白形式,或者缺乏可检测的肌营养不良蛋白。

[0084] 如本文所用的,术语“功能”和“功能性的”及其类似术语是指生物、酶促或治疗功

能。

[0085] “功能性”肌营养不良蛋白通常是指：典型与某些DMD或BMD患者中存在的改变或“缺陷的”肌营养不良蛋白形式相比，具有足以降低肌肉组织渐进性退化的生物活性的肌营养不良蛋白，而肌肉组织渐进性退化是肌营养不良症另外特征。在某些实施方案中，功能性肌营养不良蛋白具有野生型肌营养不良蛋白约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%（包括之间的所有整数）的体外或体内生物活性，依据本领域常规技术测量。作为一个实例，可依据肌管尺寸、肌原纤维组织化状态（或裂解）、收缩活性和乙酰胆碱受体的自发性成簇聚集测定体外肌细胞中的肌营养不良蛋白相关活性（参见，如Brown等，*Journal of Cell Science*.112:209-216,1999）。动物模型也是研究疾病发病机制的重要资源，提供了测试肌营养不良蛋白相关活性的方法。广泛用于DMD研究的两个动物模型是mdx小鼠和金毛猎犬肌营养不良（GRMD）狗，这两者都是肌营养不良蛋白阴性（参见，如Collins&Morgan,*Int J Exp Pathol* 84:165-172,2003）。这些和其他的动物模型都可用于测定各种肌营养不良蛋白的功能活性。包括截短的肌营养不良蛋白形式，如那些由本发明的某些外显子跳跃反义化合物所产生的形式。

[0086] “分离”表示基本上或大体上不含在其天然状态下通常伴生成分的物质。例如，本文所用的“分离的多聚核苷酸”是指已纯化的或天然状态下去除两侧序列的多聚核苷酸，例如通常从与之相邻序列去除的DNA片段。

[0087] 如本文所用的，“足够长度”是指与靶肌营养不良蛋白mRNA前体中至少8个、更典型8-30个连续核酸碱基互补的反义寡核苷酸。在一些实施方案中，足够长度的反义包括靶肌营养不良蛋白mRNA前体中至少8、9、10、11、12、13、14、15、17、20或更长连续核碱基。在其他实施方案中，足够长度反义包括靶肌营养不良蛋白mRNA前体中至少16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核酸碱基或更长连续核碱基。足够长度的反义寡核苷酸具有至少能与外显子53特异性杂交的最少核酸数量。优选的足够长度寡核苷酸从约10至约50核苷酸长度，包括10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39和40或更多核苷酸。在一个实施方案中，足够长度寡核苷酸从10至约30个核苷酸长度。在另一个实施方案中，足够长度寡核苷酸从15至约25个核苷酸长度。仍然另一个实施方案中，足够长度寡核苷酸从20至30或20至50个核苷酸长度。仍然另一个实施方案中，足够长度寡核苷酸从25至28个核苷酸长度。

[0088] “增强(enhance)”或“增强(enhancing)”、或“增加(increase)”或“增加(increasing)”、或“刺激(stimulate)”或“刺激(stimulating)”通常是指与非反义化合物或对照化合物相比，一个或多个反义化合物或组合物在细胞或受试者中产生或引起更强的生理反应（即下游效果）的能力。除了本领域理解和本文所述的明显反应外，可测量的生理反义可包括在肌肉组织中增强表达肌营养不良蛋白的功能形式、或增强肌营养不良蛋白相关的生理活性。增强的肌肉功能也可测定，包括肌肉功能增强或改善了约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。表达功能性肌营养不良蛋白的肌纤维的百分比也可测定，包括肌纤维的肌营养不良蛋白表达增加约1%、2%、%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。例如，以显

示假如25-30%纤维表达肌营养不良蛋白,则肌肉功能改善约40%(参见例如DelloRusso等,Proc Natl Acad Sci USA 99:12979-12984,2002)。“增加”或“增强”量是典型的“统计学显著”的量,可包括增加由非反义化合物(无药物)或对照化合物产生量的1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50或更多倍(如500、1000倍)(包括1以上的之间的所有整数和小数点,如1.5、1.6、1.7、1.8等)。

[0089] 术语“降低”或“抑制”通常是指一个或多个本发明反义化合物能“降低”相关生理或细胞反应,如本文所述病症和疾病的症状,所述相关生理或细胞反应依据诊断领域常规技术测定。相关生理或细胞反应(体内或体外)对于本领域技术人员而言是显而易见的,可包括减轻肌营养不良症的症状或病状、或减少表达缺陷型肌营养不良蛋白,缺陷形式的肌营养不良蛋白如DMD或BMD患者中表达的变化的肌营养不良蛋白形式。与非反义化合物或对照化合物产生的反应相比,“降低”的反应是统计学显著地,可包括减少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%,包括期间的所有整数。

[0090] 也包括能表达本发明的寡聚物、靶向肌营养不良蛋白序列的载体递送系统,如表达包含本文所述SEQ ID NOs:1和6-9中任意一个或多个的多聚核苷酸序列的载体。“载体”或“核苷酸构建物”是指可以插入或克隆多聚核酸的多聚核苷酸分子,优选例如来源于质粒、噬菌体、酵母或病毒的DNA分子。载体优选含有一个或多个独特的限制性酶切位点,可在限定的宿主细胞中自主复制,包括靶细胞或组织或祖细胞或其组织,或者能与限定宿主细胞的基因组整合,如此再生克隆序列。相应地,载体可以是自主复制载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如线性或闭合质粒、染色体外元件、微型染色体、或人工染色体。载体可以含有任何确保自我复制的手段。可选地,当导入宿主细胞,载体可以整合入基因组,并与整合入的染色体一起复制。

[0091] 个体(如哺乳动物,例如人)或细胞的“治疗”是尝试改变个体或细胞自然进程的任何类型的干预。治疗包括,但不限于,给予药物组合物,可以是预防性应用,或病程开始或与病原体接触后实施。治疗包括任何对在某些肌营养不良症形式中与肌营养不良蛋白相关疾病或病状的症状和病理施加希望的影响,可包括例如尽量小改变或改善所治疗疾病或病状的一个或多个可测量标记物。也包括“预防性”治疗,可以定向降低所治疗疾病或病状的恶化速度,延缓疾病或病状的发作,或者降低发作的严重程度。“治疗”或“预防”不一定表示完全根除、治愈或预防疾病或病状、或其相关的症状。

[0092] 因此,包括了治疗肌营养不良症如DMD和BMD的方法,该方法通过将本发明的一个或多个反义寡聚物(如SEQ ID NOs:1和6-9,及其变体),任选作为药物制剂或药物剂型的部分,给予需要治疗的受试者。也包括通过给予一个或多个反义寡聚物诱导受试者外显子跳跃的方法,其中所述外显子为来源于肌营养不良蛋白基因的外显子53,优选来源于人肌营养不良蛋白基因。本文所用的“受试者”包括任何表现出症状或处于表现症状风险中并可使用本发明反义化合物的动物,如患有DMD或BMD、或有DMD或BMD患病风险、或者具有任何与这些病状(如肌纤维损失)相关症状的受试者。合适的受试者(患者)包括实验动物(如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、耕作动物、家养动物或宠物(如家猫和狗)。非人灵长类动物也包括在内,优选人类患者。

[0093] “烷基”或“亚烷基”都是指含有1-18个碳的饱和直链或支链烃基。实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、n-戊基和n-己基。术语“低级烷基”是指如本文所定义的含有1-8个碳的烷基。

[0094] “烯基”是指含有2-18个碳并包含至少一个碳碳双键的不饱和直链或支链烃基。实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、异丙烯基、丁烯基、异丁烯基、叔丁烯基、n-戊烯基和n-己烯基。术语“低级烯基”是指如本文所定义的含有2-8个碳的烯基。

[0095] “炔基”是指含有2-18个碳并包含至少一个碳碳三键的不饱和直链或支链烃基。实例包括但不限于乙炔基、丙炔基、丁炔基、异丁炔基、叔丁炔基、戊炔基和己炔基。术语“低级炔基”是指如本文所定义的含有2-8个碳的炔基。

[0096] “环烷基”是指单环或多环烷基。实例包括但不限于环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0097] “芳基”是指含有至18个碳、具有一个或多个闭环的环状芳香烃基。实例包括但不限于苯基、苄基、萘基、蒽基、菲基和联苯基。

[0098] “芳烷基”是指式 $R_aR_b$ 的基团，其中 $R_a$ 为如上文所定义的亚烷基， $R_b$ 为如上所定义的芳基，例如苄基、二苯甲基等。

[0099] “硫代烷氧基”是指式 $-SR_c$ 的基团，其中 $R_c$ 为如本文所定义的烷基。术语“低级硫代烷氧基”是指如本文所定义的含有1-8个碳的烷氧基。

[0100] “烷氧基”是指式 $-OR_d$ 的基团，其中 $R_d$ 为如本文所定义的烷基。术语“低级烷氧基”是指如本文所定义的含有1-8个碳的烷氧基。烷氧基实例包括但不限于甲氧基和乙氧基。

[0101] “烷氧基烷基”是指被烷氧基取代的烷基。

[0102] “羰基”是指 $-C(=O)-$ 基团。

[0103] “胍基”是指 $H_2N(C=NH_2)-NH-$ 基团。

[0104] “脒基”是指 $H_2N(C=NH_2)CH-$ 基团。

[0105] “氨基”是指 $-NH_2$ 基团。

[0106] “烷氨基”是指式 $-NHR_d$ 或 $-NR_dR_d$ 的基团，其中每个 $R_d$ 各自独立为本文定义的烷基。术语“低级烷氨基”是指如本文所定义的含有1-8个碳的烷氨基。

[0107] “杂环”是指5-7元单环或7-10元双环、杂环，其是饱和、不饱和或芳香族的，含有1-4个独立选自氮、氧和硫的杂原子，其中氮和硫杂原子可任选氧化，氮杂原子可任选季铵化，包括上述杂环与苯环稠合成的双环。杂环可通过任何杂原子或碳原子连接。杂环包括如下所定义的杂芳基。因此，除了如下所列的杂芳基外，杂环也包括吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、乙内酰脲基、戊内酰胺基、环氧乙基、环氧丁基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢苯硫基、四氢硫代吡喃基、四氢哌嗪基、四氢硫代吡喃基等。

[0108] “杂芳基”是指5-10元、具有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子并含有至少一个碳原子的芳香杂环，包括单环或双环系统。代表性的杂环有吡啶基、呋喃基、苯并呋喃基、苯硫基、苯并苯硫基、喹啉基、吡咯基、吡啶基、恶唑基、苯并恶唑基、咪唑基、苯并咪唑基、噻唑基、苯并噻唑基、异恶唑基、吡唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、噌啉基、酞嗪基和喹啉基。

[0109] 术语“任选取代的烷基”、“任选取代的烯基”、“任选取代的烷氧基”、“任选取代的硫代烷氧基”、“任选取代的烷氨基”、“任选取代的低级烷基”、“任选取代的低级烯基”、“任

选取代的低级烷氧基”、“任选取代的低级硫代烷氧基”、“任选取代的低级烷氨基”和“任选取代的杂环基”是指被取代时至少一个氢原子被取代基取代。至于氧取代( $=O$ )则两个氢原子被取代。这一方面,取代基包括:氘、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基、任选取代的杂环、任选取代的环烷基、氧、卤素、 $CN$ 、 $-OR_x$ 、 $NR_xR_y$ 、 $NR_xC(=O)R_y$ 、 $NR_xSO_2R_y$ 、 $-NR_xC(=O)NR_xR_y$ 、 $C(=O)R_x$ 、 $C(=O)OR_x$ 、 $C(=O)NR_xR_y$ 、 $-SomR_x$ 和 $-SomNR_xR_y$ ,其中 $m$ 为0、1或2, $R_x$ 和 $R_y$ 相同或不同,独立为氢、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基、任选取代的杂环或任选取代的环烷基,每一个所述任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基、任选取代的杂环或任选取代的环烷基可进一步被氧、卤素、 $-CN$ 、 $-OR_x$ 、 $NR_xR_y$ 、 $NR_xC(=O)R_y$ 、 $NR_xSO_2R_y$ 、 $-NR_xC(=O)NR_xR_y$ 、 $C(=O)R_x$ 、 $C(=O)OR_x$ 、 $C(=O)NR_xR_y$ 、 $-SomR_x$ 和 $-SomNR_xR_y$ 中的一个或多个所取代。

[0110] 提出和公开反义分子命名系统是为了区分不同的反义分子(参见Mann等,(2002)J Gen Med 4,644-654)。如下所示,当测试数个区别不大、都作用于同一靶区的反义分子时,该命名法就变得特别适当:

[0111]  $H\#A/D(x:y)$

[0112] 第一个字母代表种(如H:人,M:鼠,C:犬)。“#”代表靶肌营养不良蛋白外显子号。“A/D”分别代表外显子起始端和末端的受体或供体剪接位点。 $(x\ y)$ 代表退火坐标(annealing coordinate),其中“-”或“+”分别代表内含子或外显子序列。例如,A(-6+18)表示靶外显子之前内含子的最后6个碱基以及靶外显子的最初18个碱基。最接近的剪接位点是受体则这些配位物之前使用“A”。所述位于供体剪接位点的退火配位物可以为D(+2-18),其中外显子的最后2个碱基和内含子的最初18个碱基对应反义分子的退火点。A(+65+85)表示整个外显子的退火坐标,退火点为在外显子开始的第65个和第85个核苷酸之间。

#### [0113] II.反义寡核苷酸

[0114] 当反义分子在mRNA前体序列内的外显子中靶向作用于剪接外显子有关的核苷酸序列时,正常外显子剪接作用有可能受到抑制,导致剪接体从成熟的mRNA中绕过整个靶外显子。在许多基因中,通过丢失重要的功能结构域或破坏读码框,缺失整个外显子将导致产生非功能蛋白。然而,在一些蛋白中可能在蛋白内部缺失一个或多个外显子而不破坏读码框来缩短蛋白,但并不严重改变该蛋白的生物学活性。典型地,这类蛋白在其末端具有结构性作用和/或具有功能域。杜氏肌营养不良的病因源于肌营养不良蛋白基因发生突变而妨碍了功能性基因产物的合成,典型地通过破坏读码框。能诱导含有突变的肌营养不良蛋白基因区域的外显子跳跃的反义寡核苷酸,可使肌肉细胞产生成熟的mRNA转录物而编码功能性的肌营养不良蛋白。得到的肌营养不良蛋白并不必然是“野生型”的肌营养不良蛋白,而是截短的但仍然具有功能或半功能的肌营养不良蛋白形式。本发明描述了能结合外显子53中特定肌营养不良蛋白mRNA前体靶点并重新指导基因加工的反义分子。

[0115] 具体而言,本发明涉及分离的20-50个核苷酸长度的反义寡核苷酸,包括至少10、12、15、17、20或更多连续核苷酸,所述连续核苷酸与肌营养不良基因的外显子53靶区域互补,所述外显子53靶区域被命名作为退火点,所述退火点选下组:自H53A(+33+60)、H53A(+22+46)、H53(+46+73)、H53A(+46+69)和H53A(+40+61)。所述反义寡核苷酸特异性地与退火位点杂交,诱导外显子53跳跃。

[0116] 当核酸通过各自之间的氢键作用占据寡核苷酸各个分子中的足量对应点时,反义寡核苷酸和靶RNA之间相互互补,如此在寡核苷酸和靶标之间发生稳定且特异性的结合。因此,使用的术语“特异性杂交”和“互补”表示互补或精确配对的充分程度,如此在寡核苷酸与靶标之间发生稳定且特异性的结合。本领域中可以理解,反义分子序列无需100%与靶序列互补进行特异性杂交。当反义寡核苷酸与靶分子结合,干扰这些靶RNA的正常功能,则这些反义化合物就为特异性可杂交,同时也要有充分的互补性,以避免反义寡核苷酸与非靶序列在希望特异性结合的条件下发生非特异性结合,所述特异性结合条件即在体内试验或治疗的情况、体外试验的情况下的生理条件,以及进行上述体内、体外试验的条件。

[0117] 反义分子的长度可以有所变化,只要该反义分子能选择性结合mRNA前体分子内预作用的部位。这些序列的长度可依据本文所述的选择方法确定。通常,反义分子的长度从约10个核苷酸到约50个核苷酸。然而,应当了解,该范围内的任何核苷酸长度都可用于本方法。反义分子的长度优选在10至30个核苷酸长度。

[0118] 在一个实施方案中,本发明的寡核苷酸长度为20-50个核苷酸长度,包括SEQ ID NOs:1、6-9中任一序列的10、12、15、17、20或更多核苷酸。在一些实施方案中,SEQ ID NOs:1和6-9中的胸腺嘧啶任选为尿嘧啶。

[0119] 在缩短的转录mRNA中外显子缺失不应当导致读码框移位。因此,假如在三个外显子的线性序列中,第一个外显子的末端编码一个密码子中三个核苷酸中两个,下一个外显子缺失,然后线性序列中的第三个外显子必须从能使核苷酸三联体成为完整密码子的单个核苷酸开始。假如第三个外显子不能从单个核苷酸开始,读码框就会发生移位,这将导致产生截短的或无功能的蛋白。

[0120] 应当了解,在结构蛋白中外显子末端的密码子重排可能不总是在密码子的末端中断,因此,可能需要从mRNA前体中缺失多个外显子,以保证mRNA的框内阅读。这种情况下,可能需要通过本发明的方法选择多数反义寡核苷酸,其中每一条反义寡核苷酸都作用于不同区域,以诱导待缺失外显子中的剪接作用。

[0121] 在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸具有的化学组合物为天然存在的核苷酸分子,即所述反义寡核苷酸不包括修饰或取代的碱基、糖或亚基间键合。在一个优选的实施方案中,本发明的反义寡核苷酸是非天然存在的核苷酸。例如,非天然存在的核苷酸可包括一个或多个非天然地碱基、糖和/或亚基间键合,如将对对应发现的天然存在核酸分子的糖、碱基和/或键合进行修饰或取代。实例性的修饰如下所述。在一些实施方案中,非天然存在的核酸包括多个类型的修饰,例如糖和碱基修饰、糖和键合修饰、碱基和键合修饰、或碱基、糖和键合修饰。例如,在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸含有非天然的(如修饰或取代的)碱基。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸含有非天然的(如修饰或取代的)糖。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸含有非天然的(如修饰或取代的)的亚基间键合。在一些实施方案中,所述反义寡核苷酸含有多个类型的修饰或取代,如非天然碱基和/或非天然糖、和/或非天然亚基间键合。

[0122] 为了避免mRNA前体与反义分子形成双链体时被降解,所述反义分子应当尽量少或防止为内源性RNA酶H所裂解。这种性质是高度优选的,因为在胞内环境下或者与含有RNA酶H的粗提物接触时,使用非甲基化寡核苷酸处理RNA将导致mRNA前体-反义寡核苷酸双螺旋体的降解。对反义分子进行任何形式的修饰,以使该反义分子能绕过或不诱导上述这种降

解,都可用于本发明方法。反义分子与RNA形成双链体时反义分子不被胞内RNA酶H所降解的实例为2'-O-甲基衍生物。2'-O-甲基寡核苷酸在细胞环境和动物组织内非常稳定,与它们的核糖或脱氧核糖对应物相比,这种2'-O-甲基寡核苷酸与RNA形成的双链体具有更高的T<sub>m</sub>值。2'羟基核糖位点的甲基化并整合磷硫酰骨架是常规策略,产生的分子与RNA非常相似但对抗核酸酶降解作用的抗性要强得多。

[0123] 依据已知技术(参见美国专利第5,149,797号)可以制备不激活RNA酶H的反义分子。这类反义分子可以是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,简单包含空间阻碍或阻止RNA酶H结合双链分子的任何结构修饰,所述双链分子包含该所述反义寡核苷酸作为双链分子的一员,结构修饰基本上不阻碍或破坏双链体的形成。因为双链体形成中涉及的核苷酸部分实质上不同于RNA酶H所要结合的那一部分,因此得到很多不激活RNA酶H的反义分子。例如,这些反义分子可以是以下这种寡核苷酸,这种寡核苷酸中至少一个或所有核苷酸间内桥连的磷酸酯基为修饰的磷酸酯,例如甲基磷酸酯、甲基磷硫酰、磷酰吗啉酯、磷酰哌嗪酯、磷酰胺酯。例如,每隔一个核苷酸内桥连的磷酸酯残基可按所述进行修饰。在另一个非限制性的实例中,这些反义分子为以下该类分子,这些分子中至少一个或所有的核苷酸含有2'低级烷基(例如C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>、线性或分支、饱和或不饱和的烷基如甲基、乙基、丙基、1-丙烯基、2-丙烯基和异丙基)。例如,每隔一个核苷酸可如上所述进行修饰。

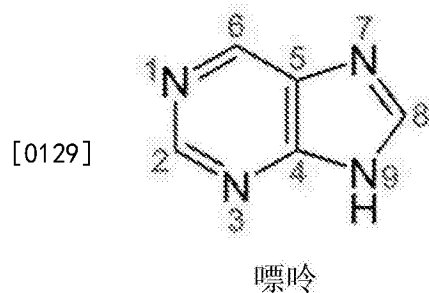
[0124] 用于本发明的反义寡核苷酸的特殊实例包括含有修饰骨架或非天然亚基间键合的反义寡核苷酸。具有修饰骨架的寡核苷酸包括骨架中保留磷原子那些寡核苷酸,以及包括骨架中没有磷原子的寡核苷酸。核苷间骨架中不含磷原子的修饰寡核苷酸也可被认为是修饰的寡核苷酸。

[0125] 在其他反义分子中,使用新的基团取代核苷酸单元的糖和核苷间键合(即骨架)。该碱基单元被保持为仍可与与合适的核苷酸靶化合物进行杂交。一种这样的寡聚化合物——显示具有极佳杂交性质的寡核苷酸类似物——被称之为核酸肽(PNA)。在PNA化合物中,使用含有骨架的酰胺基(具体为氨乙基甘氨酸骨架)取代寡核苷酸的糖骨架。核苷碱基被保留下来,并能直接或间接与骨架酰胺部位的杂氮原子结合。

[0126] 修饰的寡核苷酸也可含有一个或多个取代的糖基。

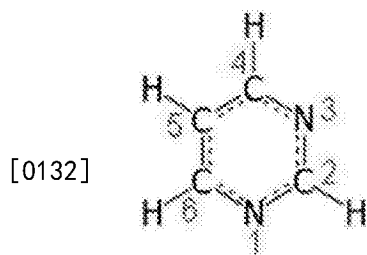
[0127] 寡核苷酸也可包括核苷碱基(本领域通常简单称之为“碱基”)修饰物或取代物。含有修饰或取代碱基的寡核苷酸包括以下这些寡核苷酸,该寡核苷酸中一个或多个核酸中最普遍存在的嘌呤或嘧啶碱基被少见的或非天然的碱基取代。

[0128] 嘌呤碱基包含一个与呋啉环稠合的嘧啶环,如通式所示:



[0130] 腺嘌呤或鸟嘌呤是核酸中最常见的两种核碱基。它们可以被其他天然存在的嘌呤取代,包括但不限于N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤、N<sup>2</sup>-甲基鸟嘌呤、次黄嘌呤和7-甲基鸟嘌呤。

[0131] 嘧啶碱基包含如通式所示的6元嘧啶环：



嘧啶

[0133] 胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶是核酸中最常见的嘧啶碱基。它们可以被其他天然存在的嘧啶取代,包括但不限于5-甲基胞嘧啶、5-羟基甲基胞嘧啶、假尿嘧啶和4-硫代尿嘧啶。在一个实施方案中,本文所述的寡核苷酸含有胸腺嘧啶代替尿嘧啶。

[0134] 其他修饰或取代的碱基包括,但不限于,2,6-二氨基嘌呤、乳清酸、agmatidine、赖西丁、2-硫代嘧啶(如2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶)、G-锁(G-clamp)及其衍生物、5-取代的嘧啶(如5-卤代尿嘧啶、5-炔丙基尿嘧啶、5-炔丙基胞嘧啶、5-氨基甲基尿嘧啶、5-羟基甲基尿嘧啶、5-氨基甲基胞嘧啶、5-羟基甲基胞嘧啶、Super T)、7-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;N<sup>2</sup>-环戊基鸟嘌呤(cPent-G)、N<sup>2</sup>-环戊基-2-氨基嘌呤(cPent-AP)、和N<sup>2</sup>-丙基-2-氨基嘌呤(Pr-AP)、假尿嘧啶或其衍生物;和多义碱基或通用碱基,如2,6-二氟甲基或缺乏碱基如无碱基位点(如1-脱氧核糖、1,2-二脱氧核糖、1-脱氧-2-O-甲基核糖;或环氧被氮所取代的吡咯烷衍生物(氮杂核糖)。可在美国专利第6,683,173号(Epoch生物科学)中找到Super A、Super G和Super T的衍生物实例,上述专利文献通过引用整体结合入本文中。当将cPent-G、cPent-AP和Pr-AP整合入siRNA中,Pent-G、cPent-AP和Pr-AP显示出降低免疫刺激效应(Peacock H. et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200)。假尿嘧啶是天然存在的尿嘧啶的异构化形式,尿苷中是C-糖苷而不是常规的N-糖苷。与含有尿嘧啶的mPvNA相比,合成的含假尿嘧啶的mRNA安全性有所改善(WO 2009127230,通过引用整体结合入本文中)。

[0135] 某些修饰或取代的核苷碱基对于增加本发明寡核苷酸的亲和力特别有用。这些核苷碱基包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶以及N-2,N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙基尿嘧啶、5-炔丙基胞嘧啶。显示5-甲基胞嘧啶取代物将核酸双链体的稳定性增强了0.6-1.2℃,是目前优选的碱基取代物,当与2'-O-甲氧乙基糖修饰物组合时甚至更独特。

[0136] 在一些实施方案中,修饰或取代的核碱基用于方便纯化反义寡核苷酸。例如,在某些实施方案中,反义寡核苷酸可含有三个或更多(如3、4、5、6或更多)连续的鸟嘌呤碱基。在某些反义寡核苷酸中,三个或更多连续鸟嘌呤碱基串可导致寡核苷酸聚集,使纯化变得复杂。在这些反义寡核苷酸中,一个或更多连续鸟嘌呤可由肌苷取代。三个或更多连续鸟嘌呤串中肌苷取代一个或多个鸟嘌呤,可降低反义寡核苷酸聚集,因此便于纯化。

[0137] 在一个实施方案中,另一个反义寡核苷酸修饰包括寡核苷酸化学连接一个或多个基团或偶联物,以增强寡核苷酸的活性、细胞分布和细胞摄入。这些基团包括但不限于脂基(如胆固醇、胆酸)、硫醚如己基-5-三苯甲硫醇、巯基胆固醇、脂肪链如十二烷二醇或十一烷基、磷脂如双十六烷基-RAC-甘油或三乙胺1,2-双-O-十六烷基-RAC-甘油-3H-磷酸酯、聚胺

或聚乙二醇链、或金刚烷乙酸、棕榈基、或十八胺或己氨基-羰基-羟胆固醇基团。

[0138] 将给定化合物中的所有位点进行一致性修饰并非必要,事实上单个化合物中、甚至一个寡核苷酸内的单个核酸上可以掺入多个上述的修饰物。本发明也包括为嵌合化合物的反义寡核苷酸。本发明上下文中的“嵌合”反义化合物或“嵌合体”为反义分子,具体为寡核苷酸,其含有两个或更多的化学性质不同的区,每一区由至少一种单体构成,即寡核苷酸化合物情况下的核苷。这些寡核苷酸典型地含有至少一个如下所述的区,其中对寡核苷酸进行了修饰,只要这种修饰增强靶核苷酸对核酸酶降解的抗性、增加细胞的摄入以及增强另外区的亲合力。

[0139] 用于本发明的反义分子可通过已知的固相合成技术方便地、常规化地制备。多家厂商销售这种合成设备,包括例如应用生物系统(Applied Biosystems)(Foster城,加利福尼亚)。美国专利第4,458,066号中描述了一种在修饰的固体载体上合成寡核苷酸的方法。

[0140] 本领域中任何其他这类合成方法都可另外和变化地应用。利用相似的技术合成寡核苷酸如磷硫酰和烷基化衍生物都是为人所公知的。在一个这样的自动化的实施方案中,二乙基亚磷酰胺被用作为原材料,并可如Beaucage等(1981)Tetrahedron Letters,22:1859-1862中所述合成。

[0141] 本发明的反义分子在体外合成,不包括生物来源的反义成分。本发明的分子也可与其他分子、分子结构或化合物混合物一起混合、包封、偶联,以协助摄入、分配和/或吸收,所述其他分子、分子结构或化合物的混合物如脂质体、靶分子受体,以口服、直肠、局部或其他制剂形式给药。

[0142] A. 吗啉代寡核苷酸

[0143] 本发明实例性的实施方案涉及具有含磷骨架键合的吗啉代寡核苷酸,如图1A-1C所示。优选如图1C所示的的磷酰二胺酯连接的吗啉代寡核苷酸,其依据本发明一方面进行修饰,优选在其10%-50%的骨架键合上含有正电荷基团。具有不带电荷骨架键合的吗啉代寡核苷酸(包括反义寡核苷酸)得到了详述,例如(Summerton和Weller 1997)共同所有的美国专利第5,698,685号、第5,217,866号、第5,142,047号、第5,034,506号、第5,166,315号、第5,185,444号、第5,521,063号、第5,506,337号、第8,076,476号、第8,299,206号和第7,943,762号,以上所有专利文献通过引用整体结合至本文中。

[0144] 基于吗啉代亚基的重要性质包括:1)通过稳定、不带电荷或正电荷骨架键合连接寡聚物形式的能力;2)支持核苷酸碱基(如腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶和肌苷)以便形成的聚合物可与碱基互补的靶核苷酸进行杂交的能力,靶核苷酸包括靶RNA,在相对短的寡核苷酸(如10-15个碱基)中T<sub>m</sub>值高于约45℃;3)将寡核苷酸主动或被动运输入哺乳动物细胞的能力;4)反义寡核苷酸-RNA异源双链体各自对RNA酶和RNA酶H降解具有抗性的能力。

[0145] 要求保护主题的反义寡核苷酸的实例性骨架结构包括图1D-G所示的吗啉代亚基,每一个通过不带电荷或正电荷、含磷亚基键合连接。图1D显示了形成5个原子重复单元骨架的含磷键合,其中吗啉环通过1-原子磷酰胺酯键连接。图1E显示了产生6-原子重复单元骨架的键合。在该结构中,将5'吗啉代碳和磷基连接的原子Y可以是硫、氮、碳,或优选为氧。悬在磷上的X部分可以是氟、烷基或取代的烷基、烷氧基或取代的烷氧基、硫代烷氧基或取代的硫代烷氧基、或非取代的、单取代的或双取代的氮,包括环状结构如吗啉或哌啶。烷基、烷

氧基和硫代烷氧基优选包括1-6个碳原子。Z部分为硫或氧,优选为氧。

[0146] 图1F和1G所示的键合是为7原子单元长度骨架而设计的。在1F结构中,X部分如结构1E中所示,Y部分可以是亚甲基、硫或优选为氧。在结构1G中,X和Y部分都如结构1E中所示。特别优选的吗啉代寡核苷酸包括由图1E所示的吗啉代亚基结构组成的那些吗啉代寡核苷酸,其中 $X = NH_2$ 、 $N(CH_3)_2$ 、或1-哌嗪或其他带电基团, $Y = O$ , $Z = O$ 。

[0147] 依据本发明一个方面,基本不带电的寡核苷酸可被修饰成包括带电键合,如每2-5个不带电键合中多至大约1个带电键合,如每10个不带电键合中约4-5个带电键合。在某些实施方案中,当约25%骨架键合为阳离子时,可观察到反义活性得到最佳改善。在某些实施方案中,带有小数量如10-20%阳离子键合或阳离子键合数量在50-80%之间如约60%时,可以观察到增强。

[0148] 提供了具有任何数量阳离子键合的寡聚物,包括完全阳离子连接的寡聚物。然而,优选寡聚物带部分电荷,例如携带10%-80%。在优选的实施方案中,约10%-60%,优选20%-50%的键合是阳离子的。

[0149] 在一个实施方案中,阳离子键合沿着骨架分布。部分带电寡聚物优选含有至少两个连续的不带电荷键合,即该寡聚物优选沿着整个长度不按严格交替的模式进行。

[0150] 也认为所述寡聚物具有阳离子键合块和不带电键合块,例如,不带电荷的中央块的两侧连接阳离子键合块,或反之亦然。在一个实施方案中,所述寡聚物具有大致等长的5'、3'和中心区,中心区中的阳离子键合比例高于约50%,优选高于约70%。

[0151] 在某些实施方案中,所述反义寡核苷酸可通过逐步固相合成制备,应用了上述引用文献中详述的方法,下文关于合成具有混合或不带电和阳离子骨架键合的寡核苷酸。在某些情况下,可以期望反义化合物中添加另外的化学基团,例如,以便增强药代动力学或便于捕获或检测化合物。这些基团可依据标准合成方法共价连接。例如,添加聚乙二醇或其他亲水性聚合物如具有1-100个单体亚基的亲水性聚合物,可用于增加水溶性。

[0152] 为检测目的,可添加一个报告基团,如荧光素或放射性标记基团。可选地,连接于寡聚物的报告标签可以是能结合标记抗体或抗生蛋白链菌素的配基,例如抗原或生物素。所选用于连接或修饰反义寡核苷酸的基团中,通常当然希望选择具有生物相容性且可能为受试者所耐受而无非希望副作用的化合物类别。

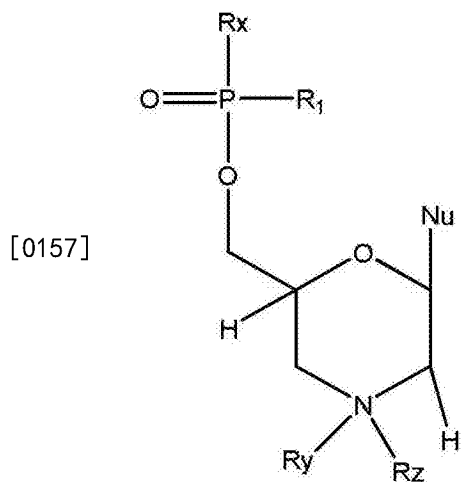
[0153] 用于反义应用的寡核苷酸长度通常从约10至约50个亚基,更优选约10至约30个亚基,典型地15-25个碱基。例如,本发明的寡核苷酸具有19-20个亚基,对于反义寡核苷酸是有用的长度,寡核苷酸可理想具有2-10个、如4-8个阳离子键合,其余为不带电键合。具有14-15个亚基的寡核苷酸可理想具有2-7个、如3、4或5个阳离子键合,其余为不带电键合。在一个优选的实施方案中,寡核苷酸具有25-28个亚基。

[0154] 每一个吗啉环都支持碱基配对部分形成碱基配对对序列,所述序列典型地设计为与细胞或治疗受试者中所选反义靶标杂交。碱基配对部分可以是天然DNA或RNA中发现的嘌呤或嘧啶(如A、G、C、T或U),或其类似物如次黄嘌呤(核苷肌苷的基础部分)或5-甲基胞嘧啶。

[0155] 如上所述,某些实施方案指向的寡核苷酸包含新型的亚基间键合,包括PMO-X寡聚物或那些具有修饰末端的寡聚物。在一些实施方案中,相对未修饰的寡聚物,上述这些寡聚物对DNA或RNA具有更强的亲合力,并且证明相对具有其他亚基间键合的寡聚物,这些寡聚

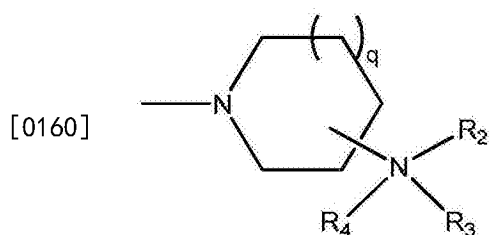
物改善细胞运输、潜力和/或组织分布特性。各种键合类型和寡聚物的结构特征和特性将在下文得到更详细描述。这些和相关寡聚物的合成描述于共同所有的美国专利申请第13/118,298号,其通过引用整体结合至本文中。

[0156] 在某些实施方案中,本发明提供了具有与靶序列互补的寡核苷酸序列,所述靶序列与人类疾病相关,包含的核苷酸序列具有下式:



[0158] 其中Nu为核碱基:

[0159] R<sub>1</sub>具有式



[0161] q为0、1或2;

[0162] R<sub>2</sub>选自氢、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>芳烷基、和甲脒基,且

[0163] R<sub>3</sub>选自氢、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>酰基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>氨酰基、天然或非天然α或β氨基酸的酰基部分、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>芳烷基或C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基,或者

[0164] R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>结合组成5-7元环,其中所述环可使用选自C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、苯基、卤素和C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>芳烷基的取代基任选取代;

[0165] R<sub>4</sub>选自电子对、氢、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基和C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>芳烷基;

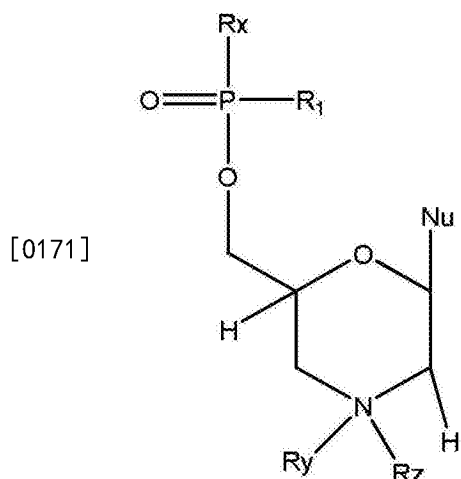
[0166] R<sub>x</sub>选自肌氨酰胺、羟基、核苷酸、细胞穿膜肽部分和哌嗪基；

[0167]  $R_y$ 选自氢、 $C_1$ - $C_6$ 烷基、核苷酸、细胞穿膜肽部分、氨基酸、甲脒基或 $C_1$ - $C_6$ 酰基

[0168] R<sub>z</sub>选自电子对、氢、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基和其C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>酰基药物可接受盐；

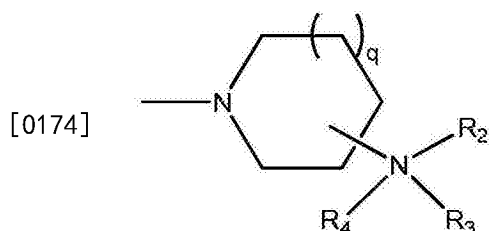
[0169] Nu可选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶和次黄嘌呤。Nu更优选为胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0170] 在优选的实施方案中,本发明提供了具有下式核苷酸序列的寡核苷酸:



[0172] 其中Nu为核碱基；

[0173] R<sub>1</sub>选自R<sub>1</sub>'和R<sub>1</sub>'',其中R<sub>1</sub>'为二甲氨基,R<sub>1</sub>''具有式



[0175] 其中至少一个R<sub>1</sub>为R<sub>1</sub>'；

[0176] q为0、1或2；前提条件是至少一个R<sub>1</sub>为哌啶基；

[0177] R<sub>2</sub>选自氢、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷氧基、和甲脒基,且

[0178] R<sub>3</sub>选自氢、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>酰基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>氨酰基、天然或非天然α或β氨基酸的酰基部分、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>芳烷基和C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基,或者

[0179] R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>结合组成5-7元环,其中所述环可使用选自C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、苯基、卤素和C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>芳烷基的取代基任选取代；

[0180] R<sub>4</sub>选自电子对、氢、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基和C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>芳烷基；

[0181] R<sub>x</sub>选自肌氨酰胺、羟基、核苷酸、细胞穿膜肽部分和哌嗪基；

[0182] R<sub>y</sub>选自氢、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、核苷酸、细胞穿膜肽部分、氨基酸、甲脒基或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>酰基

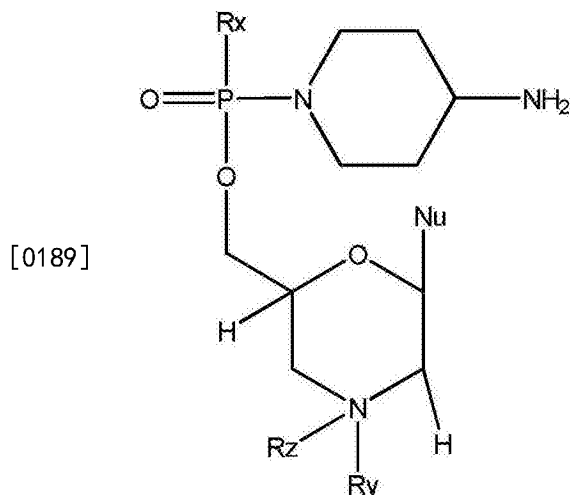
[0183] R<sub>z</sub>选自电子对、氢、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基和其C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>酰基药物可接受盐；

[0184] Nu可选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶和次黄嘌呤。Nu更优选为胸腺嘧啶或尿嘧啶

[0185] 约90-50%的R<sub>1</sub>为二甲氨基(即R<sub>1</sub>')。更优选的是,90-50%的R<sub>1</sub>为二甲氨基。最优选约66%的R<sub>1</sub>为二甲氨基。

[0186] R<sub>1</sub>''可选自下列基团：





[0190] 其中,  $\text{Rx}$ 、 $\text{Ry}$ 、 $\text{Rz}$  和  $\text{Nu}$  如上所述。 $\text{Nu}$  最优选为胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0191] 尽管胸腺嘧啶(T)是优选含有上述化学修饰物的碱基配对部分( $\text{Nu}$ 或 $\text{Pi}$ ),但本领域普通技术人员已知的任何碱基也可用作碱基配对部分。

[0192] B. 肽转运蛋白

[0193] 本发明的反义寡核苷酸可包括偶联CPP的寡核苷酸,优选偶联富含精氨酸的肽转运蛋白,有效增强化合物运输入细胞内。转运蛋白优选连接如图1B和1C中所示的寡核苷酸的末端。该肽能在给定的细胞培养集群中诱导30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%(包括之间的所有整数)细胞进行细胞穿透,经全身给药后允许大分子在体内多个组织间迁移。在一个实施方案中,所述细胞穿膜肽可以是富含精氨酸的肽转运蛋白。在另一个实施方案中,所述细胞穿膜肽可以是Penetratin或者Tat肽。这些肽为本领域普通技术人员所公知并已公开,例如,公开于美国公开号2010-0016215A1,该专利通过引用整体结合至本文中。将肽偶联至反义寡核苷酸的特别优选的方法可在PCT公布说明书W02012/150960中找到,其通过引用整体结合至本文中。肽偶联本发明寡核苷酸的优选实施方案利用甘氨酸作为CPP和反义寡核苷酸之间的连接物。例如,偶联PMO的优选肽由 $\text{R}_6\text{-G-PMO}$ 组成。

[0194] 相对于缺少转运蛋白的寡聚物,显示上述转运蛋白极大提高了偶联寡聚物的细胞摄入。相对未偶联的化合物,偶联化合物摄入优选提高至少10倍,更优选提高20倍。

[0195] 利用富含精氨酸肽转运蛋白(即细胞穿膜肽)在实施本发明时特别有用。某些肽转运蛋白在将反义化合物转运入原代细胞包括肌细胞方面已显示出极高效率(Marshall, Oda等2007; Jearawiriyapaisarn, Moulton等2008; Wu, Moulton等2008)。此外,相对于其他已知的肽转运蛋白如Penetratin和Tat肽,当偶联反义PMO时,证明本文所述的肽转运蛋白提高了改变若干基因转录物剪接作用的能力(Marshall, Oda等2007)。

[0196] 排除连接物的肽转运蛋白的实例如表1所示。

[0197] 表1. 肽转运蛋白实例

[0198]

| 名称(命名)                                       | 序列                            | SEQ ID NO <sup>A</sup> |
|----------------------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| rTAT                                         | RRRQRRKKR                     | 10                     |
| Tat                                          | RKKRRQRRR                     | 11                     |
| R <sub>9</sub> F <sub>2</sub>                | RRRRRRRRRFF                   | 12                     |
| R <sub>5</sub> F <sub>2</sub> R <sub>4</sub> | RRRRRFFRRRR                   | 13                     |
| R <sub>4</sub>                               | RRRR                          | 14                     |
| R <sub>5</sub>                               | RRRRR                         | 15                     |
| R <sub>6</sub>                               | RRRRRR                        | 16                     |
| R <sub>7</sub>                               | RRRRRRR                       | 17                     |
| R <sub>8</sub>                               | RRRRRRRR                      | 18                     |
| R <sub>9</sub>                               | RRRRRRRRR                     | 19                     |
| (RX) <sub>8</sub>                            | RXXRXXRXXRXXRXX               | 20                     |
| (RAhxR) <sub>4</sub> ; (P007)                | RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR          | 21                     |
| (RAhxR) <sub>5</sub> ; (CP04057)             | RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRR<br>AhxR | 22                     |
| (RAhxRRBR) <sub>2</sub> ; (CP06062)          | RAhxRRBRRAhxRRBR              | 23                     |
| (RAR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>            | RARRARRARRARFF                | 24                     |
| (RGR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>            | RGRRGRRGRRGRFF                | 25                     |

[0199] 注意SEQ ID NO代表的序列不包括键合部分(如C、G、P、Ahx、B、AhxB,其中Ahx和B分别是指6-氨基己酸和β-丙氨酸)。

[0200] C. 表达载体

[0201] 在一个实施方案中,本发明包括在细胞中表达上述靶向肌营养不良蛋白序列的表达载体。载体递送系统能表达本发明寡聚的、靶向肌营养不良蛋白的序列。在一个实施方案中,这些载体表达包含至少10个连续核苷酸的多聚核苷酸序列,这10个连续的核苷酸来自SEQ ID NOs:1和6-9中的一个或多个。在另一个实施方案中,这些载体表达包含SEQ ID NOs:1和6-9中一个或多个序列的多聚核苷酸序列。适合基因递送的表达载体为本领域所公知。可对这些表达载体进行修饰以表达本文所述的的靶向肌营养不良蛋白的序列。实例性的表达载体包括来源于例如质粒、噬菌体、酵母或病毒(如腺病毒、腺相关病毒、慢病毒等)的多聚核苷酸,优选DNA分子,其中插入或克隆一段多聚核苷酸。表达载体优选含有一个或多个独特的限制性酶切位点,且能在限定的宿主细胞中自主复制,包括靶细胞或组织或祖细胞或其组织,或者能与限定宿主细胞的基因组整合,如此再生克隆序列。相应地,载体可以是自主复制载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如线性或闭合质粒、染色体外元件、微型染色体、或人工染色体。载体可以含有任何确保自我复制的手段。可选地,当导入宿主细胞,载体可以整合入基因组,并与整合入的染色体(或多个染色体)一起复制。

[0202] 在一个实施方案中,所述表达载体包括组织特异性的启动子,如肌肉特异性的启动子和/或增强子,其促进本文所述靶向肌营养不良蛋白的寡聚序列在感兴趣的具体细胞或组织中的表达(如在肌肉中)。适合在肌肉细胞中表达的启动子序列和表达载体,例如,包括那些美国专利第2011/0212529号中所述的序列和载体,该专利的全部内容通过引用结合至本文中。实例性的肌肉特异性的启动子包括结蛋白启动子、肌肉肌酸激酶(MCK)启动子、Pitx3启动子、骨骼α肌动蛋白启动子或肌钙蛋白I启动子。肌肉特异性的启动子进一步描述

于,例如,Talbot等,Molecular Therapy(2010),18(3):601-608;Wang等,Gene Therapy(2008),15(22):1489-99;和Coulon等,Journal of Biological Chemistry(2007),282(45):33192-33200。

### [0203] III.制剂和给药方式

[0204] 在某些实施方案中,本发明提供了本文所述的适合反义寡核苷酸治疗给药的制剂或组合物。因此,在某些实施方案中,本发明提供了药物可接受的组合物,该组合物中包含治疗有效量的一个或多种本文所述的寡聚物,并与一种或多种药物可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂一起制成制剂。尽管单独给予本发明的寡聚物是有可能的,但优选以药物制剂(组合物)给予所述化合物。

[0205] 递送核苷酸分子的方法描述于,例如Akhtar等,1992,Trends Cell Bio.,2:139;和Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics,ed.Akhtar;Sullivan等,PCT WO 94/02595。实际上这些方法和其他方案可用于递送任何核酸分子,包括本发明分离的寡聚物。

[0206] 如下所述,本发明的药物组合物可特别制成固体或液体形式进行给药,包括适用于一下那些:(1)口服给药,例如兽用顿服药(含水或非水溶液或悬液)、片剂如那些用于应用于舌的含服、舌下或全身吸收的片剂、大丸剂、粉剂、颗粒剂、糊剂;(2)非经肠给药,例如通过皮下注射、肌肉注射、静脉注射或硬膜外注射例如无菌溶液或悬液或持续释放的制剂;(3)局部应用,例如作为应用于皮肤的乳剂、软膏剂、或控释的贴剂或喷雾剂;(4)阴道或直肠给药,例如为阴道栓、乳剂或泡沫;(6)舌下给药;(6)经眼给药;(7)经皮给药;或(8)经鼻给药。

[0207] 本文应用的短语“药物可接受的”是指在那些合理医学评价范围内、适合用于与人类和动物组织接触而物过高毒性、刺激性、过敏反应、或其他问题或并发症、具有合理的效益/风险比的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0208] 本文使用的短语“药物可接受的载体”是指药物可接受的材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制备辅料(如润滑剂、滑石粉、硬脂酸镁、钙或锌、或硬脂酸)、或溶剂封装料,涉及将受试化合物从身体的一个器官或部位携带或转运至身体的另一个器官或部位。每个载体都必须是“可接受的”,意味着与制剂的其他成分相容且对患者无害。

[0209] 一些作为药物可接受载体的材料实例包括,但不限于:(1)糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;(4)西黄蓍胶粉;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,如可可脂和栓蜡;(9)油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇类,如丙二醇;(11)多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯,如油酸乙酯和十二烷酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热源的水;(17)等渗盐水;(18)林格溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;和(22)其他用于药物制剂的无毒相容性物质。

[0210] 适合与本发明反义寡核苷酸配伍制成制剂的其他非限制性实例包括:偶联PEG的核苷酸、偶联磷脂的核苷酸,含有亲脂部分、磷硫酰、可增强药物进入多种组织的P-糖蛋白抑制剂(如Pluronic P85)的核苷酸;生物可降解聚合物,如植入后持续释放输送的聚(DL-

丙交酯-乙交酯)微球(Emerich,D F等,1999,Cell Transplant,8,47-58)Alkermes, Inc.Cambridge,Mass.;以及装载的纳米颗粒,例如由聚丁基氰基丙烯酸酯制成,其可跨血脑屏障递药并可改变神经元摄入机制(Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23,941-949,1999)。

[0211] 本发明的特征还在于包含表面修饰的脂质体的组合物的用途,该脂质体含有聚(乙二醇)脂质(PEG修饰的、分枝或不分枝或其组合物,或长循环脂质体或隐形脂质体)。本发明的寡聚物也可包含共价连接的各种分子量的PEG分子。这些制剂提供了增加靶组织中积累药物的方法。这类药物载体对单核巨噬细胞系统(MPS或RES)介导的调理和消除作用有抗性,因此延长了封装药物的血液循环次数并增强了组织暴露(Lasic等Chem.Rev.1995, 95,2601-2627;Ishiwata等,Chem.Pharm.Bull.1995,43,1005-1011)。这类脂质体已在肿瘤中显示选择性积累,推测通过在新血管形成的靶组织中溢出或捕获(Lasic等,Science 1995,267,1275-1276;Oku等,1995,Biochim.Biophys.Acta,1238,86-90)。特别是与已知在MPS组织中累积的常规阳离子脂质体相比,长循环脂质体增强了DNA和RNA的药代动力学和药效学(Liu等,J.Biol.Chem.1995,42,24864-24870;Choi等,国际PCT公布说明书WO 96/10391;Ansell等,国际PCT公布说明书WO 96/10390;Holland等,国际PCT公布说明书WO96/10392)。与阳离子脂质体相比,长循环脂质体基于能避免在代谢活跃的MPS组织如肝和脾中中累积,因此也可更大程度地保护药物免于核酸酶降解。

[0212] 在另一个实施方案中,本发明包括制备用于美国专利第6,692,911号、第7,163,695号和第7,070,807号中所述的递送的寡聚物组合。在这方面,在一个实施方案中,本发明以组合物提供了本发明的寡聚物,所述组合物包含赖氨酸和组氨酸的共聚物(HK)(如美国专利第7,163,695号、第7,070,807号和第6,692,911号所述),单独或与PEG组合(如分枝或不分枝的PEG或两者的混合物),与PEG和靶向作用部分组合或上任何述与交联剂组合。在某些实施方案中,本发明提供了组合物中的反义寡核苷酸,所述组合物中包含葡萄糖酸修饰的聚组氨酸或糖基化的聚组氨酸/转铁蛋白-聚组氨酸。本领域技术人员也将认识到,组合物内与组氨酸和赖氨酸性质相似的氨基酸可被取代。

[0213] 本文所述的寡聚物的某些实施方案可包含碱性功能基团,如氨基或烷氨基,因此能与药物可接受的酸形成药物可接受的盐。在这方面,术语“药物可接受的盐”是指本发明化合物的相对无毒性、无机或有机酸的加成盐。这些盐可在给药载体中原位制备,或在剂型制造过程中制备,或单独通过将本发明纯化的化合物以游离碱形式与合适的有机或无机酸反应,并在后续纯化中分离所述盐。代表性的盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、二硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月硅酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、延胡索酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖酸盐和十二烷基磺酸盐等等(参见,例如,Berge等(1977)“Pharmaceutical Salts”,J.Pharm.Sci.66:1-19)

[0214] 提供的寡聚物药物可接受的盐包括所述化合物常规无毒性盐或季铵盐,如来源于无毒的有机或无机酸。例如这些常规无毒性盐包括那些衍生于无机酸的盐,所述无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、磺胺酸、磷酸、硝酸等;和从有机酸制备,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、苯基乙酸、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、甲磺酸、甲

磺酸、乙二磺酸、草酸、异硫酸等等。

[0215] 在某些实施方案中,本发明的寡聚物可含有一个或多个酸性功能基团,因而能与药物可接受的碱形成药物可接受的盐。在这些情况中,术语“药物可接受的盐”是指本发明相对无毒的无机和有机碱加成盐。这些盐同样可在给药载体中原位制备,或在剂型制造过程中制备,或单独通过将本发明纯化的化合物以游离酸形式与合适的碱反应来制备,所述合适的碱如药物可接受金属阳离子的氢氧化物,或者与铵或与药物可接受的伯胺、仲胺或叔胺反应制备。代表性的碱或碱土盐包括锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、和铝盐等。代表性的用于制备碱加成盐的有机胺包括乙胺、二乙胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等(参见如Berge等, *supra*)。

[0216] 湿润剂、乳化剂和润滑剂如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁、以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于组合物中。

[0217] 药物可接受的抗氧化剂实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯,丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等;(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0218] 本发明的制剂包括适合口服、鼻、局部(包括含服和舌下)、直肠、阴道和/或非经肠给药的那些制剂。所述制剂可方便地存在于单位剂型中,并可通过任何药学领域公知的方法制备。可与载体材料组合制成单个剂型的活性成分的量根据要治疗宿主、具体给药方式而发生变化。可与载体材料组合制成单个剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的化合物量。通常,在百分率中,该量的范围为约0.1%至约99%的活性成分,优选从约5%至约70%,最优选从约10%至约30%。

[0219] 在某些实施方案中,本发明的制剂包含选自环糊精、纤维素、脂质体、胶束形成剂如胆酸、聚合物载体如聚酯和聚酐的赋形剂;以及包含本发明的寡聚物。在某些实施方案中,上述制剂使本发明的寡聚物具有口服生物可用性。

[0220] 这些制剂或组合物的制备方法包括以下步骤:将本发明的寡聚物与载体任选一个或多个辅料成分组合在一起。通常,通过将本发明的化合物与液体载体或精细固体载体或两者均匀且紧密结合制备,假如需要,可使产物成型。

[0221] 适合口服给药的本发明的制剂可以是以下形式:胶囊、扁胶囊、丸剂、片剂、糖锭剂(使用调味基质,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉剂、颗粒剂、或在水性或非水性液体中的溶液或悬液、或为水包油或油包水的液体乳剂、或为酞剂或糖浆剂、或为锭剂(使用惰性基质,例如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯胶)、和/或为漱口水等,每一种都含有预定量的本发明的化合物作为活性成分。本发明的寡聚物也可作为大丸剂、冲剂或糊剂给药。

[0222] 用于口服给药(胶囊、片剂、丸剂、糖锭剂、粉剂、颗粒剂、锭剂(trouches)等)的本发明的固体剂型中,活性成分可与一种或多种药物可接受的载体如柠檬酸钠或磷酸二钙、和/或任何以下物质混合:(1)填充剂或增量剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、和/或硅酸;(2)粘合剂,如,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)润湿剂,如甘油;(4)崩解剂,如琼脂—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)溶液阻滞剂,如石蜡;(6)吸收促进剂,如季胺化合物和表面活性剂,如泊洛沙姆和十二烷基硫酸钠;(7)湿润剂,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，如高岭土和皂粘土；(9)润滑剂，如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、硬脂酸锌、硬脂酸钠、硬脂酸，或其混合物；(10)着色剂；(11)控释剂，如交聚维酮或乙基纤维素。就胶囊、片剂和丸剂而言，药物组合物也可包含缓冲剂。相似类型的固体组合物也可在软或硬胶囊中用作填充剂，使用如乳糖或奶糖、以及高分子聚乙二醇等作为赋形剂。

[0223] 可通过任选与一种或多种辅料成分压缩或模压制备片剂。制备压缩片剂可使用粘合剂如(明胶或羟丙甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(如淀粉羟乙酸钠或交联的羧甲基纤维素钠)、表面活性或分散剂。模制片可通过在合适的机械中使用惰性液体稀释剂湿润化合物粉末的混合物进行制备。

[0224] 本发明药物组合物的片剂或其他固体剂型，如糖衣片、胶囊、丸剂和颗粒剂，可任选进行压痕，或使用包衣或壳制备，如使用肠溶衣和其他药制剂领域公知的包衣。使用例如提供期望释放性质的不同比例羧丙甲基纤维素钠、其他聚合基质、脂质体和/或微球，也可将制剂制成缓释或控释制剂以便从中缓慢释放或控制释放活性成分。也可制成速释制剂如冷冻干燥。通过例如过截留细菌的滤膜过滤、或以无菌固体组合物形式掺入灭菌剂，可对它们进行灭菌，所述灭菌剂可在使用前立即溶于无菌水，或一些其他无菌注射介质。这些组合物也可任选含有遮光剂，可以是这样的组合物：任选以延迟方式在胃肠道某些位置仅仅或优选释放活性成分。可以应用的包埋组合物的实例包括聚合物和石蜡。活性成分也可以是微囊化形式，假如需要，可以使用一种或多种上述赋形剂微囊化。

[0225] 用于口服给药本发明化合物的液体剂型包括药物可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、悬液剂、糖浆剂和酏剂。除了活性成分，液体剂型可含有本领域常用的惰性稀释剂，例如，如水或其他溶剂、增溶剂或乳化剂，如乙醇、异丙醇、碳酸乙酸、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、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、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯、及其混合物。

[0226] 除了惰性稀释剂，口服组合物也可包含辅料如湿润剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0227] 悬液除活性化合物之外还可含有助悬剂，例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯、山梨醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝(Aluminum Metahydroxide)、皂粘土、琼脂-琼脂、黄蓍胶，及其混合物。

[0228] 用于直肠或阴道给药的制剂可制成栓剂，其可通过将一种或多种本发明的化合物与一种或多种适合的不刺激的赋形剂或载体混合制备，所述赋形剂或载体如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸脂，所述制剂可在室温下固化，但在人体温度下液化，因此，在直肠或阴道内熔化并释放活性化合物。

[0229] 用于局部或经皮肤给予本文所供寡聚物的制剂或剂型，包括粉剂、喷雾剂、软膏、糊剂、乳剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。活性寡聚物可在无菌条件下与药物可接受载体、任何需要的防腐剂、缓冲剂或抛射剂混合。除了本发明的活性化合物之外，软膏剂、糊剂、乳膏剂和凝胶剂还可含有赋形剂，例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、皂粘土、硅酸、滑石和氧化性，以及它们的混合物。

[0230] 除了本发明的寡聚物之外，粉剂和喷雾剂还可含有赋形剂，例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末，或它们的混合物。喷雾剂可另外含有常规的抛射剂，例如

氯氟烃和挥发性未取代烃如丁烷和丙烷。

[0231] 皮肤贴片具有向身体控制递送寡聚物的额外优点。这类剂型可通过将寡聚物溶解或分散于适当介质来制备。吸收增强剂也可用于提高药物跨皮的流动性。除本领域已知的其他方法外,可通过速度控制膜或将药物分散于聚合物基质或凝胶中,控制流动速度。

[0232] 适合非经肠给药的药物组合可包含一种或多种本发明的寡聚物和一种或多种药物可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散液、悬液或乳状液、或可与使用前重新配制成无菌注射溶液或分散液的无菌粉末,无菌注射溶液或分散液可含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂,使溶质与预期受体的血液等渗的溶质、或悬液或增稠剂。可应用于本发明药物组合物的适合的水性或非水载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、以及它们合适的混合物、植物油如橄榄油、和可注射有机酯如油酸乙酯。可维持合适的流动性,例如,可通过使用包衣材料如卵磷脂,通过分散情况下维持所需的颗粒尺寸,以及可通过使用表面活性剂。

[0233] 这些组合物也可含有辅料如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。预防微生物对所供寡聚物的作用可通过包含各种抗细菌和抗真菌剂如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚山梨酸等来确保、也可期望将等渗剂如糖、氯化钠等包括入组合物。此外,通过加入延缓吸收的试剂如硬脂酸铝和明胶,延长可注射药物形式的吸收。

[0234] 一些情况下,为了延长药物效果,希望减缓皮下或肌肉注射的药物吸收。除了本领域的其他方法外,可通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体悬浮液来实现。药物的吸收速率之后取决于其溶解速率,反过来溶解速率取决于晶体粒度和晶型。可选地,可通过将药物溶解或悬浮于油状介质来实现非经常给药剂型的延缓吸收。

[0235] 可通过将所述寡聚物在可降解聚合物如聚乳糖-聚乙二醇中形成微囊化基质制备可注射的仓储剂型(depot forms)。根据寡聚物与聚合物的比例、以及所用具体聚合物的性质,可以控制寡聚物的释放速率。其他生物可降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酐)。可注射仓储制剂也可通过将药物包埋入与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备。

[0236] 当将本发明寡聚物作为药物给予人或动物时,可以只给予寡聚物,或者作为药物组合物给予,药物组合物含有例如与药物可接受载体组合的0.1-99%(更优选10-30%)活性成分。

[0237] 如上所述,本发明的制剂或制品可以以口服、非经肠、局部或直肠给药。典型地以适合各个给药途径的剂型给予。例如,以片剂或胶囊剂给药、或通过注射、输液或吸入方式给予注射剂、吸入剂、洗眼液、软膏、栓剂等,通过洗液或软膏局部给药;通过栓剂直肠给药。

[0238] 本文所用的短语“非经肠给药”或“肠胃外给药”是指除了肠之外的给药方式或局部给药,通常通过注射方式给药,包括但不限于静脉、肌内、动脉、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜、气管、皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、胸骨内注射或输注。

[0239] 本文使用的短语“全身给药”、“全身性给药”、“外周给药”和“外周性给药”是指除直接中枢神经系统给药之外给予化合物、药物或其他物质,如此化合物、药物或其他物质进入患者全身,因此进行代谢和其他类似过程,例如,皮下给药。

[0240] 不管什么所选给药途径,适合水合形式使用的本发明聚合物、和/或本发明药物组合物,可通过本领域技术人员公知的常规方法制备成药物可接受的剂型。本发明组合物中活性成分的实际剂量水平可以有所变化,以便获得对于具体患者、组合物和给药方式而言

有效实现治疗反应的活性成分的量,而无对患者而言不可接受的毒性。

[0241] 所选的剂量水平将取决于多种因素,包括本发明所用具体寡聚物或其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、给药时间、具体所用寡聚物的排泄或代谢速率、吸收速率和吸收程度、治疗持续时间、其他药物、与所用具体寡聚物组合使用的化合物和/或材料、年龄、性别、体重、疾病状况、整体健康和待治疗患者之前的医疗史、以及医疗领域公知的类似因素。

[0242] 具有本领域普通技术的内科医生或兽医可容易决定所需药物组合物的量并对该量开出处方。例如内科医生或兽医开始使用的药物组合物中本发明化合物的剂量水平要低于获得期望疗效所需的剂量水平,并逐级提高剂量直至获得期望的效果。通常,本发明化合物合适的每日剂量为化合物有效产生疗效的最低剂量。这种有效剂量通常取决于上述因素。通常,当用于确定效果时,口服、静脉、脑室内和皮下注射给予患者本发明化合物,每天每公斤体重使用量范围从约0.0001mg至约100mg。

[0243] 如果期望,活性化合物每日有效剂量可以任选单位剂型、一天内的适当周期分别以2、3、4、5、6或更多亚剂量给予。在某些情况下,每天只给药一次。在某些实施方案中,按照需要,每2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天,或者每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12周、每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12月给予一次或多次剂量给药,以维持所需地表达功能性肌营养不良蛋白。

[0244] 可通过那些熟悉本领域的技术人员已知的多种方法将核苷酸分子给予细胞,所述方法包括但不限于,通过电离子透入法或通过与其他载体整合,如水凝胶、环糊精、生物可降解的纳米囊、生物粘附的微球,包埋入脂质体,如本文所述和本领域所知。在某些实施方案中,可利用微乳化技术改善亲脂性(水不溶性)药物制剂的生物利用度。实例包括(Dordunoo, S.K., 等, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(12), 1685-1713, 1991和REV 5901(Sheen, P.C., 等, *J Pharm Sci* 80(7), 712-714, 1991)。除了其他优点外,微乳化提高了生物利用度,其通过优选在淋巴系统而不是循环系统中靶向吸收,因此绕过了肝脏,避免了化合物在肝胆循环中受到破坏。

[0245] 本发明的一个方面,制剂含有本文所供寡聚物与至少一种两性载体形成的胶束,其中胶束的平均直径小于约100nm。更优选的实施方案提供的胶束平均直径小于约50nm,甚至更优选的实施方案提供的胶束平均直径小于约30nm,甚至小于约20nm。

[0246] 考虑了所用合适的两性载体,目前优选的载体通常是那些公认安全的(GRAS)的两性载体,并且能溶解本发明的化合物,并在后续阶段中该溶液与复合水相(如人胃肠道中所发现的)接触时将其微乳化。通常,满足这些要求的两性成分的HLB(亲水亲油平衡值)为2-20,它们的结构含有C-6至C-20的直链脂肪族基团。实例为聚乙二醇化的脂肪酸甘油酯和聚乙二醇。

[0247] 两性载体的实例包括饱和和单取代的聚乙二醇化的脂肪酸甘油酯,如那些来源于完全或部分氢化的多种植物油。这些油可优势性地由三、双或单脂肪酸甘油酯和对应脂肪酸双或单聚乙二醇酯组成,特别优选的脂肪酸组合包括4-10%癩酸、3-9%癩酸、40-50%十二烷酸、14-24%肉豆蔻、4-14%棕榈酸和5-15%硬脂酸。另一类有用的两性载体包括部分酯化的山梨聚糖和/或山梨醇,具有饱和或单取代的脂肪酸(司盘系列)或相应的乙氧基化类似物(吐温系列)。

[0248] 特别有用的是可市售的两性载体,包括Gelucire系列、Labrafil、Labrasol或

Lauroglycol(都由Gattefosse公司Saint Priest,法国,生产和销售)、PEG单油酸酯、PE双油酸酯、PEG单月桂酸酯和双月桂酸酯、卵磷脂、聚山梨醇酯80等(由美国和全球的许多公司生产和销售)。

[0249] 在某些实施方案中,可通过利用脂质体、纳米囊、微粒、微球、脂肪微粒、囊泡等进行递送,将本发明的组合物导入适合的宿主细胞。具体而言,可将本发明的组合物制成包埋入脂肪微粒、脂质体、囊泡、纳米囊、纳米粒等进行递送。使用已知且常规的技术,可以实现制剂以及利用这类递送载体。

[0250] 适合用于本发明的亲水性聚合物为容易水溶,可共价结合于形成囊泡的脂质上,体内可耐受而无毒性(即生物相容)。适合的聚合物包括聚乙二醇(PEG)、聚乳酸(也称为聚交酯)、聚乙醇酸(也称为聚乙醇酸交酯)、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物、聚乙烯醇。在某些实施方案中,聚合物分子量从约100或120道尔顿直至约5000或10000道尔顿,或从约300道尔顿至约5000道尔顿。在其他实施方案中,聚合物为聚乙二醇,分子量从约100至约5000道尔顿,或分子量从约300至约5000道尔顿。在某些实施方案中,聚合物为750道尔顿的聚乙二醇(PEG750)。聚合物也可通过其中的单体数量来定义;本发明优选的实施方案利用的聚合物至少含有约3个单体,这种PEG聚合物由3个单体组成(大约150道尔顿)。

[0251] 适合可用于本发明的其他亲水性聚合包括聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基恶唑啉、聚乙基恶唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺、聚甲基丙烯酸酰胺、聚二甲基丙烯酸酰胺和衍生的纤维素,如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0252] 在某些实施方案中,本发明的制剂包含选自下列生物相容的聚合物:聚酰胺、聚碳酸酯、聚烷撑(polyalkylenes)、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物、聚乙烯聚合物、聚乙醇酸交酯、聚硅氧烷、聚氨基甲酸酯及其共聚物、纤维素、聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酐、聚(原)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(丙交酯-co-己交酯)、多糖、蛋白、聚透明质酸、聚氰基丙烯酸酯、和它们的掺合物、混合物或共聚物。

[0253] 环糊精是环状寡糖,由6、7或8个葡萄糖单元组成,各自由希腊字母命名为 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\gamma$ 。葡萄糖单元通过 $\alpha$ -1,4-糖苷键连接。作为糖单元椅型构象的结果,所有仲羟基(位于C2和C3)都位于环的一侧,而C6上的所有伯羟基位于环的另一侧。结果是,外部面是亲水性的,使得环糊精具有水溶性。相反,环糊精的腔内是疏水性的,因为它们通过C3和C5的氢原子和醚样的氧原子连接。这些基质可以与多种相对疏水的化合物复合,包括如类固醇化合物,如17 $\alpha$ -雌二醇(参见,如van Uden等Plant Cell Tiss.Org.Cult.38:1-3-113(1994))。通过范德华力相互作用和形成氢键实现复合。环糊精化学性质的一般性综述参见Wenz, Agnew.Chem.Int.Ed.Engl.,33:803-822(1994)。

[0254] 环糊精衍生物的理化性质强烈取决于取代基类型和取代程度。例如,它们在水中的溶解度从不溶(如三乙酰- $\beta$ -环糊精)至147%(w/v)(G-2- $\beta$ -环糊精)。另外,它们可溶于许多有机溶剂。通过提高或降低环糊精的溶解度,环糊精的这种性质能控制各种制剂成分的溶解度。

[0255] 许多环糊精和它们的制备方法描述于,例如,Parmeter(I),等(U.S.Pat.No.3,453,259),Gramera,等(美国专利等3,459,731号)描述了电中性的环糊精。其他衍生物包括具有阳离子性质的环糊精(Parmeter(II),美国专利第3,453,259号),不溶性交联环糊精(Solms,美国专利第3,420,788号),具有阴离子性质的环糊精(Parmeter(III),美国专利第

3,426,011号)。在具有阴离子性质的环糊精衍生物中,环糊精母环上添加了羧酸、亚磷酸、三价磷酸、磷酸、磷酸、硫代磷酸、硫代亚磺酸和磺酸(参见上述的Parmeter(III))。此外,Stella等(美国专利第5,134,127号)描述了硫烷基醚环糊精衍生物。

[0256] 脂质体由至少一个脂质双层膜组成,脂质双层膜内部包封有水性隔室。脂质体的特征在于膜的类型和尺寸。小单层脂质体(SUVs)具有单层膜,典型地直径范围在0.02至0.05 $\mu\text{m}$ 之间,大单层脂质体(LUVs)典型地大于0.05 $\mu\text{m}$ 。寡层大脂质体和多层脂质体具有多层、通常同中心的膜层,典型地大于0.1 $\mu\text{m}$ 。具有若干非同中心膜的脂质体即大脂质体中含有若干小脂质体,被称之为多囊脂质体。

[0257] 本发明的一个方面涉及包含含有本发明寡聚物的脂质体的制剂,其中制备了脂质体膜以使得脂质体提高负载能力。可选或另外,本发明的化合物可包含在脂质体的脂质体双层膜中或吸附在其之上。本发明的寡聚物可用脂质表面活性剂聚集,并载入脂质体的内部空间;这些情况下,形成的脂质体膜可抵抗活性成分-表面活性剂聚集的破坏作用。

[0258] 根据本发明的一个实施方案,脂质体的脂质双层含有PEG衍生化的脂质,如此PEG链从脂质双层的内表面延伸至脂质体包封的内部空间,并从脂质双层的外表面延伸至周围环境。

[0259] 包含入本发明脂质体的活性成分为可溶形式。表面活性剂和活性成分的聚集体(如含有相关活性成分的乳化或胶束),可以陷入本发明脂质体的内部空间。表面活性剂的作用为分散和溶解活性成分,可以选自任何合适的脂肪族、环状脂肪族或芳香族表面活性剂,包括但不限于生物相容的各种链长的溶血磷脂酰胆碱(LPGs)(例如,从约C14至约C20)。聚合物衍生的脂质如PEG-脂质也可用于形成胶束,因为它们作用为抑制胶束/膜融合,添加聚合物至表面活性剂分子上降低了表面活性剂的临界胶束浓度CMC,有助于胶束形成。优选的表面活性剂具有微摩尔范围的CMOs。可将具有更高CMC的表面活性剂用于制备包埋入本发明脂质体的胶束。

[0260] 本发明的脂质体可通过本领域已知的任何多种技术制备。参见,如美国专利第4,235,871号,公开的PCT申请W096/14057;New RRC,Liposomes:A practical approach,IRL Press,Oxford(1990),pages 33-104;Lasic DD,Liposomes from physics to applications,Elsevier Science Publishers BV,Amsterdam,1993。例如,本发明的脂质体可通过将亲水性聚合物衍生的脂质扩散至已形成的脂质体中,制备本发明的脂质体,例如将已形成的脂质体暴露于脂质接枝聚合物组成的胶束,脂质浓度对应衍生化脂质的最终摩尔百分比,该百分比为脂质体中所期望。含有亲水聚合物的脂质体也可通过本领域已知的均质、脂质场(lipid-field)水合作用、或挤出技术制备。

[0261] 在另一个实例性的制剂程序中,首先通过超声将活性成分分散于溶血磷脂酰胆碱或其他容易溶解疏水分子的低CMC表面活性剂中(包括枝接脂质的聚合物)。然后将所得的活性成分胶束悬浮液用于再水合干燥的脂质样品,脂质样品中含有合适摩尔百分比的枝接聚合物的脂质或胆固醇。然后使用本领域已知的挤出技术将脂质和活性成分悬浮液制成脂质体,通过标准柱分离将所得的脂质体从未包埋的溶液中分离。

[0262] 本发明的一个方面中,制得的脂质体在选定的尺寸范围内具有基本一致的尺寸。一个有效控制尺寸的方法涉及将水性脂质体悬浮液挤过一系列具有所选统一孔径的聚碳酸酯膜;膜的孔径大小大致与通过挤压过膜产生的脂质体的最大尺寸向对应。参见,如美国

专利第4,737,323号(1988年4月12日)。在某些实施方案中,试剂如DharmaFECT<sup>®</sup>和Lipofectamine<sup>®</sup>可用于介导聚核苷酸或蛋白进入细胞。

[0263] 本发明制剂的释放特性依据包封材料、包封药物的浓度、是否存在释放修饰剂。例如,可以处理成pH依赖性释放,例如,使用使用pH敏感的包衣,如此只在低pH如胃中、或在高pH如在肠中释放。肠溶衣可用于预防药物在胃中发生释放,直至通过胃以后才释放。多层包衣或者包封与不同材料中的氰胺混合物可用于胃中初步释放,随后在肠中再次释放。也可通过包入盐或致孔剂进行释放,盐或致孔剂通过从囊中扩散来增加水的摄入或释放药物。改变药物溶解度的赋形剂可用于控制释放速率。与可掺入增加基质降解或从基质中释放的试剂。依据化合物,它们可以单独状态(即微粒)加入到药物中,或者共溶于聚合物状态。大多数情况下,该量应该介于0.1%至30%之间(w/w聚合物)。降解增强剂包括无机盐如硫酸铵和氯化铵,有机酸如柠檬酸、苯甲酸和抗坏血酸,无机碱如碳酸钠、碳酸钾、碳酸钙、碳酸锌和氢氧化锌,有机碱如硫酸鱼精蛋白、精胺、胆碱、乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺,表面活性剂如吐温<sup>®</sup>和Pluronic<sup>®</sup>。致孔剂增加了基质的微结构(即水溶性化合物,如无机盐或糖),以颗粒形式添加。典型地范围在1%至30%之间(w/w聚合物)。

[0264] 通过改变颗粒在消化道中的滞留时间,也可控制摄入。例如,可通过使用粘膜粘附聚合物对颗粒进行包衣或者选为包封材料控制摄入。实例包括多数具有游离羧基的聚合物,例如壳聚糖、纤维素,特别是聚丙烯酰胺(如本文使用的,聚丙烯酰胺是指包括丙烯酸酯基团和修饰的丙烯酸酯基团如氰基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物)。

[0265] 寡聚物可制成包含于外科或医疗装置或植入物中,或适于通过外科或内科装置或植入物释放。在某些方面,植入物上可涂有寡聚物或另行使用寡聚物处理。例如,水凝胶或其他聚合物,如生物相容和/或生物可降解的聚合物,可用于对具有本发明组合物的植入物进行包衣(即通过使用水凝胶或其他聚合物,组合物适合与医疗装置一起使用)。用于对含药医疗装置进行包衣的聚合物或共聚物为本领域所公知。植入物的实例包括,单不限于,支架、药物洗脱支架、缝合线、假体、血管导管、透析导管、人造血管、人工瓣膜、心脏起搏器、植入型心律转复除颤器、静脉注射针、用于正骨和骨形成的装置,例如钉、螺丝、板和其他装置,用于伤口愈合的人工组织基质。

[0266] 除了本文所提供的方法外,通过与其他药物类比,可将本发明所用的寡聚物制成以任何常规方式用于人类或兽医医学的制剂。在肌营养不良症的治疗中,反义寡聚物和它们对应的制剂可单独给药或与其他治疗策略组合给药,如成肌细胞移植、干细胞治疗、给予氨基糖苷类抗生素、蛋白酶体抑制剂、正调控治疗(如utrophin蛋白的正调控,utrophin为肌营养不良蛋白的常染色体旁系同源物)。

[0267] 所述得给药途径只作为指南,因为有经验的医师能容易确定最佳的给药途径,以及任何具体动物和疾病的给药剂量。介导新的功能性遗传物质进入细胞的多种方法,无论是体内还是体外,都已尝试过(Friedmann(1989)Science,244:1275-1280)。这些方法包括将待表达的基因整合入修饰的反转录病毒中,(Friedmann(1989)supra;Rosenberg(1991)Cancer Research 51(18),suppl.:5074S-5079S);整合入非反转录载体(如腺相关的病毒载体)(Rosenfeld,等(1992)Cell,68:143-155;Rosenfeld,等(1991)Science,252:431-434);或者通过脂质体递送连接异源启动子-增强子元件的转基因(Friedmann(1989),

supra;Brigham,等(1989)Am.J.Med.Sci.,298:278-281;Nabel,等(1990)Science,249:1285-1288;Hazinski,等(1991)Am.J.Resp.Cell Molec.Biol.,4:206-209;和Wang and Huang(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.(USA),84:7851-7855);偶联配体特异性的、基于阳离子的转运系统(Wu and Wu(1988)J.Biol.Chem.,263:14621-14624)或利用裸露DNA、表达载体(Nabel等(1990),supra);Wolff等(1990)Science,247:1465-1468)。直接在组织中注射转基因只产生了局部表达(Rosenfeld(1992)supra);Rosenfeld等(1991)supra;Brigham等(1989)supra;Nabel(1990)supra;和Hazinski等(1991)supra)。Brigham等团队(Am.J.Med.Sci.(1989)298:278-281和Clinical Research(1991)39(摘要))报道了静脉注射或气管内给予DNA脂质体复合物后,只在小鼠肺部发生体内转染。人类基因治疗程序的综述性文章实例为:Anderson,Science(1992)256:808-813。

#### [0268] IV. 试剂盒

[0269] 本发明也提供了治疗患有遗传疾病患者的试剂盒,该试剂盒包含至少一种反义分子(如SEQ ID NOs:1和6-9所示的反义寡聚物)、合适的包装、以及指导其使用的说明书。该试剂盒也可含有如缓冲液、稳定剂等辅助试剂。本领域普通技术人员应当理解上述方法广泛应用于鉴定反义分子,所述反义分子适合用于许多其他疾病的治疗。

#### [0270] V. 实施例

[0271] 虽然上述发明已通过举例和实例方式在某些程度上得到详述,其目的在于清楚理解,但对于本技术领域的普通技术人员而言显而易见的是,依据本发明的教导而做出的某些变化和修改并不使其背离所附权利要求的精神或范围。提供的下述实施例只是为了说明本发明,而不限本本发明。本领域的技术人员将容易认识到各种可能被改变或修改而产生基本相似结果的非关键参数。

#### [0272] 材料和方法

##### [0273] 细胞和组织培养处理条件

[0274] 将人横纹肌肉瘤细胞(ATCC、CCL-136;RD细胞)以 $1.5 \times 10^6$ /培养瓶接种于组织培养处理过的T75培养瓶(Nunc)中,培养瓶中含24mL含有L-谷氨酰胺、10%胎牛血清(HyClone)、和1%青霉素-链霉素抗生素溶液(CelGro)的温热DMEM;24小时后,吸出培养基,用温热的PBS洗涤细胞一次,加入新鲜培养基。37℃培养箱中5.0%CO<sub>2</sub>下使细胞生长至80%汇合,使用胰蛋白酶收集细胞。将冻干的磷酸二胺酯吗啉代寡聚物(PMO)以约2.0mM浓度悬浮于无核酸酶的水中;使用NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Scientific,赛默飞科技)测量PMO溶液以验证摩尔浓度。根据生产商的说明书和SG试剂盒(Lonza,龙沙),使用核操作(nucleoporation)将PMO递送入RD细胞。在各种浓度下(2.5、5、12.5和25微摩尔)测试PMO。核操作后在12孔板中以 $3 \times 10^5$ 细胞/孔将细胞培养24小时,然后进行如下所述的RNA抽提。

[0275] 使用标准技术在骨骼肌细胞生长液(PromoCell)培养人原代肌细胞。按如上所述在各种PMO浓度下对RD细胞进行核操作。然后将细胞一式三份接种于含有PromoCell细胞培养液的12孔板中,培养24小时后如下所述进行RNA抽提。

##### [0276] RNA抽提和PCR扩增

[0277] 使用购自通用医疗的RNAspin 96孔RNA分离试剂盒从PMO处理的细胞(RD细胞或人原代肌细胞)中抽提RNA,并使用标准技术和下述的引物对进行巢式RT-PCR。外引物:正向5'-CTTGGACAGAACTTACCGACTGG-3'(SEQ ID NO:26),反向5'-GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTCG-3'

(SEQ ID NO:27);内引物:正向5'-GCAGGATTTGGAACAGAGGCG-3'(SEQ ID NO:28),反向5'-CATCTACATTTGTCTGCCACTGG-3'(SEQ ID NO:29)。使用Caliper LabChip的生物分析仪测定外显子跳跃,外显子跳跃百分比如图3-5所示(即外显子跳跃产物的谱带密度与全长PCR产物谱带密度的比值)。

[0278] 实施例1

[0279] Exon 53跳跃

[0280] 如下设计和合成了一系列靶向作用于人肌营养不良蛋白外显子3的反义寡聚物:

[0281]

| 名称           | 序列                                | 序列号 |
|--------------|-----------------------------------|-----|
| H53A(+33+60) | GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG      | 1   |
| H53A(+23+47) | CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC         | 2   |
| H53A(+33+62) | CTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG    | 3   |
| H53A(+33+65) | CAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG | 4   |
| H53A(+31+55) | CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA         | 5   |
| H53A(+46+73) | ATTTCACTCAACTGTTGCCTCCGGTTCT      | 6   |
| H53A(+22+46) | TGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCCC         | 7   |
| H53A(+46+69) | CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCT          | 8   |
| H53A(+40+61) | TGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGT            | 9   |

[0282] 通过各种标明的浓度下处理RD细胞,评估了反义寡聚物的外显子跳跃效率。这些实验中,以对应H53A(+23+47)(美国专利第8,232,384号;SEQ ID NO:2)、H53A(+33+62)(美国专利第8,084,601号;SEQ ID NO:3)、和H53A(+33+65)(W02011/057350;SEQ ID NO:4)公开的反义寡聚物作为对照。如图3和4所示(两个独立实验),寡聚物H53A(+33+60)(SEQ ID NO:1)高效诱导了外显子53在RD细胞中的跳跃。H53A(+31+55)(SEQ ID NO:5)和H53A(+22+46)(SEQ ID NO:7)也诱导了外显子53跳跃,但是程度要低于H53A(+33+60)(SEQ ID NO:1)。如图5所示,相对于其他强活性的反义寡核苷酸,H53A(+33+60)(SEQ ID NO:1;命名为NG-12-0080)高效诱导了外显子53在培养的人原代肌细胞中跳跃。

[0283] \*\*\*\*\*

[0284] 本说明书中引用的所有出版物和专利申请都通过引用结合至本文中,如同每一个单独的出版物或专利申请特异性地独立地通过引用结合至本文中。

[0285] 参考文献

[0286] Aartsma-Rus,A.,A.A.Janson,et al.(2004).“Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense.(反义诱导的多外显子跳跃用于治疗杜氏肌营养不良症更有意义)”Am J Hum Genet74(1):83-92.

[0287] Cirak,S.,V.Arechavala-Gomeza,et al.(2011).“Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment:an open-label,phase 2,dose-escalation study.(磷酸二胺酯吗啉代寡聚物全身给药后杜氏肌营养不良患者中外显子跳跃和肌营养不良蛋白恢复:一个公开标签的、二期、剂量上升研究)”Lancet378(9791):595-605.

[0288] Dunckley,M.G.,I.C.Eperon,et al.(1997).“Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides.(通过反义寡核糖核酸调控DMD中的剪接)”Nucleosides&Nucleotides16(7-9):1665-1668.

[0289] Dunckley,M.G.,M.Manoharan,et al.(1998).“Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides.(通过反义寡核糖核酸在培养的mdx肌细胞中修饰肌营养不良蛋白基因的剪接)”Hum Mol Genet7(7):1083-90.

[0290] Errington,S.J.,C.J.Mann,et al.(2003).“Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene.(诱导肌营养不良蛋白基因中外显子跳跃的反义寡核苷酸靶标选择)”J Gene Med5(6):518-27.

[0291] Goemans,N.M.,M.Tulinus,et al.(2011).“Systemic Administration of PR0051 in Duchenne’s Muscular Dystrophy.(杜氏肌营养不良症中PR0051的全身给药)”N Engl JMed.

[0292] Jearawiriyapaisarn,N.,H.M.Moulton,et al.(2008).“Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice.(mdx小鼠肌肉中偶联肽的吗啉代寡聚物诱导持续表达肌营养不良蛋白)”MolTher.

[0293] Kinali,M.,V.Arechavala-Gomez,et al.(2009).“Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658in Duchenne muscular dystrophy:a single-blind,placebo-controlled,dose-escalation,proof-of-concept study.(使用吗啉代寡聚物AVI-4658在杜氏肌营养不良症中局部恢复肌营养不良蛋白的表达)”LancetNeurol8(10):918-28.

[0294] Lu,Q.L.,C.J.Mann,et al.(2003).“Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse.(mdx肌营养不良小鼠中突变外显子跳跃产生功能量的肌营养不良蛋白)”Nat Med9(8):1009-14.

[0295] Mann,C.J.,K.Honeyman,et al.(2002).“Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy.(改良的反义寡核苷酸在肌营养不良mdx小鼠模型中诱导外显子跳跃)”J Gene Med4(6):644-54.

[0296] Marshall,N.B.,S.K.Oda,et al.(2007).“Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing.(富含精氨酸的细胞穿膜肽促进反义寡聚物递送入鼠白细胞并改变MRName前体的剪接)”Journal of Immunological Methods325(1-2):114-126.

[0297] Matsuo,M.,T.Masumura,et al.(1991).“Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe.(杜氏肌营养不良症kobe(神户)的肌营养不良蛋白基因中由于内含子缺失而导致肌营养不良蛋白mRNA前体剪接期间发生外显子跳跃)”J Clin Invest87(6):2127-31.

[0298] Monaco,A.P.,C.J.Bertelson,et al.(1988).“An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD

locus.(DMD部位部分缺失的患者间表型差异的解释)”Genomics2(1):90-5.

[0299] Pramono,Z.A.,Y.Takeshima,et al.(1996).”Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence.(通过转染与外显子识别序列互补的反义寡脱氧核糖核酸,在淋巴样干细胞中诱导肌营养不良蛋白转录物的外显子跳跃)”Biochem Biophys Res Commun226(2):445-9.

[0300] Sazani,P.,R.Kole,et al.(2007).Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease.(用于TNF超家族受体的剪接转换寡聚物及其治疗疾病的应用)PCT W02007058894,University of North Carolina

[0301] Sierakowska,H.,M.J.Sambade,et al.(1996).”Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides.(通过反义寡核苷酸修复哺乳动物细胞中的人地中海贫血β珠蛋白mRNA)”Proc Natl Acad Sci U S A93(23):12840-4.

[0302] Summerton,J.and D.Weller(1997).”Morpholino antisense oligomers: design,preparation,and properties.(吗啉代反义寡聚物:设计、制备和性质)”Antisense Nucleic Acid Drug Dev7(3):187-95.

[0303] Takeshima,Y.,H.Nishio,et al.(1995).”Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe.(通过修饰外显子内的序列体外调控上游内含子的剪接,外显子内序列在肌营养不良症中从肌营养不良蛋白基因中缺失)”J Clin Invest95(2):515-20.

[0304] van Deutekom,J.C.,M.Bremmer-Bout,et al.(2001).”Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells.(反义诱导的外显子跳跃恢复了DMD患者肌细胞中肌营养不良蛋白的表达)”Hum MolGenet10(15):1547-54.

[0305] van Deutekom,J.C.,A.A.Janson,et al.(2007).”Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PR0051.(反义寡核苷酸PR0051局部恢复肌营养不良蛋白)”N Engl J Med357(26):2677-86.

[0306] Wilton,S.D.,A.M.Fall,et al.(2007).”Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript.(反义寡核苷酸诱导的跨人肌营养不良蛋白基因转录物的外显子跳跃)”Mol Ther15(7):1288-96.

[0307] Wilton,S.D.,F.Lloyd,et al.(1999).”Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides.(使用反义寡核苷酸特异性去除mdx肌营养不良蛋白mRNA的无义突变)”Neuromuscul Disord9(5):330-8.

[0308] Wu,B.,H.M.Moulton,et al.(2008).”Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer.(通过修饰的吗啉代寡聚物有效恢复肌营养不良蛋白改善肌营养不

良蛋白缺陷小鼠的心脏功能)"Proc Natl Acad Sci U S A105(39):14814-9.

[0309] Yin,H.,H.M.Moulton,et al.(2008). "Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function.(偶联细胞穿膜肽的反义寡核苷酸恢复全身肌肉和心脏的肌营养不良蛋白的表达和功能)"Hum Mol Genet17(24):3909-18.

[0310] 序列表

[0311]

| 名称                                           | 序列                                    | SEQ<br>ID NO |
|----------------------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| H53A(+33+60)                                 | GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG          | 1            |
| H53A(+23+47)                                 | CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC             | 2            |
| H53A/2(+33+62)                               | G<br>CTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTT    | 3            |
| H53A(+33+65)                                 | CAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTT<br>CTTG | 4            |
| h53A(+31+55)                                 | CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA             | 5            |
| H53A(+46+73)                                 | ATTTCATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCT          | 6            |
| H53A(+22+46)                                 | TGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCCC             | 7            |
| H53A(+46+69)                                 | CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCT              | 8            |
| H53A(+40+61)                                 | TGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGT                | 9            |
| rTAT                                         | RRRQRRKKR                             | 10           |
| Tat                                          | RKKRRQRRR                             | 11           |
| R <sub>9</sub> F <sub>2</sub>                | RRRRRRRRRFF                           | 12           |
| R <sub>5</sub> F <sub>2</sub> R <sub>4</sub> | RRRRRFFRRRR                           | 13           |
| R <sub>4</sub>                               | RRRR                                  | 14           |
| R <sub>5</sub>                               | RRRRR                                 | 15           |
| R <sub>6</sub>                               | RRRRRR                                | 16           |
| R <sub>7</sub>                               | RRRRRRR                               | 17           |
| R <sub>8</sub>                               | RRRRRRRR                              | 18           |
| R <sub>9</sub>                               | RRRRRRRRR                             | 19           |
| (RX) <sub>8</sub>                            | RXXRXRXRXRXRXRX                       | 20           |
| (RAhxR) <sub>4</sub> ; (P007)                | RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR                  | 21           |
| (RAhxR) <sub>5</sub> ; (CP04057)             | RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR             | 22           |
| (RAhxRRBR) <sub>2</sub> ; CP06062            | RAhxRRBRRAhxRRBR                      | 23           |
| (RAR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>            | RARRARRARRARFF                        | 24           |
| (RGR) <sub>4</sub> F <sub>2</sub>            | RGRGRGRGRGRFF                         | 25           |
| 引物                                           | CTTGACAGAACTTACCGACTGG                | 26           |
| 引物                                           | GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTCG               | 27           |
| 引物                                           | GCAGGATTTGGAACAGAGGCG                 | 28           |
| 引物                                           | CATCTACATTTGTCTGCCACTGG               | 29           |

## 序列表

<110> 理查德·K·贝斯特威克  
黛安·伊丽莎白·弗兰克

<120> 用于治疗肌营养不良症的改良的外显子跳跃组合物

<130> AVN-010PC

<150> US 61/739,968

<151> 2012-12-20

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的H53A(+33+60)

<400> 1

gttgccctccg gttctgaagg tgttcttg

28

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的H53A(+23+47)

<400> 2

ctgaagggtg tcttgactt catcc

25

|       |                                      |    |
|-------|--------------------------------------|----|
| <210> | 3                                    |    |
| <211> | 30                                   |    |
| <212> | DNA                                  |    |
| <213> | 人工序列                                 |    |
| <220> |                                      |    |
| <223> | 合成的H53A/2(+33+62)                    |    |
| <400> | 3                                    |    |
|       | ctgttgcctc cggttctgaa ggtgttcttg     | 30 |
| <210> | 4                                    |    |
| <211> | 33                                   |    |
| <212> | DNA                                  |    |
| <213> | 人工序列                                 |    |
| <220> |                                      |    |
| <223> | 合成的H53A(+33+65)                      |    |
| <400> | 4                                    |    |
|       | caactgttgc ctccggttct gaagtggttc ttg | 33 |
| <210> | 5                                    |    |
| <211> | 25                                   |    |
| <212> | DNA                                  |    |
| <213> | 人工序列                                 |    |
| <220> |                                      |    |
| <223> | 合成的h53A(+31+55)                      |    |
| <400> | 5                                    |    |
|       | ctccggttct gaagtggttc ttgta          | 25 |
| <210> | 6                                    |    |

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的H53A(+46+73)

<400> 6

atttcattca actgttgcct ccggttct

28

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的H53A(+22+46)

<400> 7

tgaaggtgtt cttgtacttc atccc

25

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的H53A(+46+69)

<400> 8

cattcaactg ttgcctccgg ttct

24

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的H53A(+40+61)

<400> 9

tggttgccctcc gggttctgaag gt

22

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的rTAT

<400> 10

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的Tat

<400> 11

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的R9F2

<400> 12

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

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的R5F2R4

<400> 13

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

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的R4

<400> 14

Arg Arg Arg Arg  
1

<210> 15  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的R5

<400> 15

Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 16  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的R6

<400> 16

Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 17  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的R7

<400> 17

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

---

1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的R8

<400> 18

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的R9

<400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的(RX)8

<220>

<221> 其他特征

<222> (2)..(2)

<223> Xaa为天然存在的氨基酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (4)..(4)

<223> Xaa为天然存在的氨基酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (6)..(6)

<223> Xaa为天然存在的氨基酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (8)..(8)

<223> Xaa为天然存在的氨基酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (10)..(10)

<223> Xaa为天然存在的氨基酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (12)..(12)

<223> Xaa为天然存在的氨基酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (14)..(14)

<223> Xaa为天然存在的氨基酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (16)..(16)

<223> Xaa为天然存在的氨基酸

<400> 20

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Xaa | Arg | Xaa | Arg | Xaa | Arg | Xaa | Arg | Xaa | Arg | Xaa | Arg | Xaa | Arg | Xaa |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的(RAhxR)<sub>4</sub>; (P007)

<220>

<221> 其他特征

<222> (2)..(2)

<223> Xaa为6-氨基己酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (5)..(5)

<223> Xaa为6-氨基己酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (8)..(8)

<223> Xaa为6-氨基己酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (11)..(11)

<223> Xaa为6-氨基己酸

<400> 21

---

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Xaa | Arg | Arg | Xaa | Arg | Arg | Xaa | Arg | Arg | Xaa | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的(RAhxR)5; (CP04057)

<220>

<221> 其他特征

<222> (2)..(2)

<223> Xaa为6-氨基己酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (5)..(5)

<223> Xaa为6-氨基己酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (8)..(8)

<223> Xaa为6-氨基己酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (11)..(11)

<223> Xaa为6-氨基己酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (14)..(14)

<223> Xaa为6-氨基己酸

<400> 22

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

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的(RAhxRRBR)<sub>2</sub>;CP06062

<220>

<221> 其他特征

<222> (2)..(2)

<223> Xaa为6-氨基己酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (8)..(8)

<223> Xaa为6-氨基己酸

<400> 23

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

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的(RAR)<sub>4</sub>F2

<400> 24

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

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的(RGR)4F2

<400> 25

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

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400> 26

cttggacaga acttaccgac tgg

23

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

---

<400> 27  
gtttcttcca aagcagcctc tcg 23

<210> 28  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<400> 28  
gcaggatttg gaacagaggc g 21

<210> 29  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成引物

<400> 29  
catctacatt tgtctgccac tgg 23



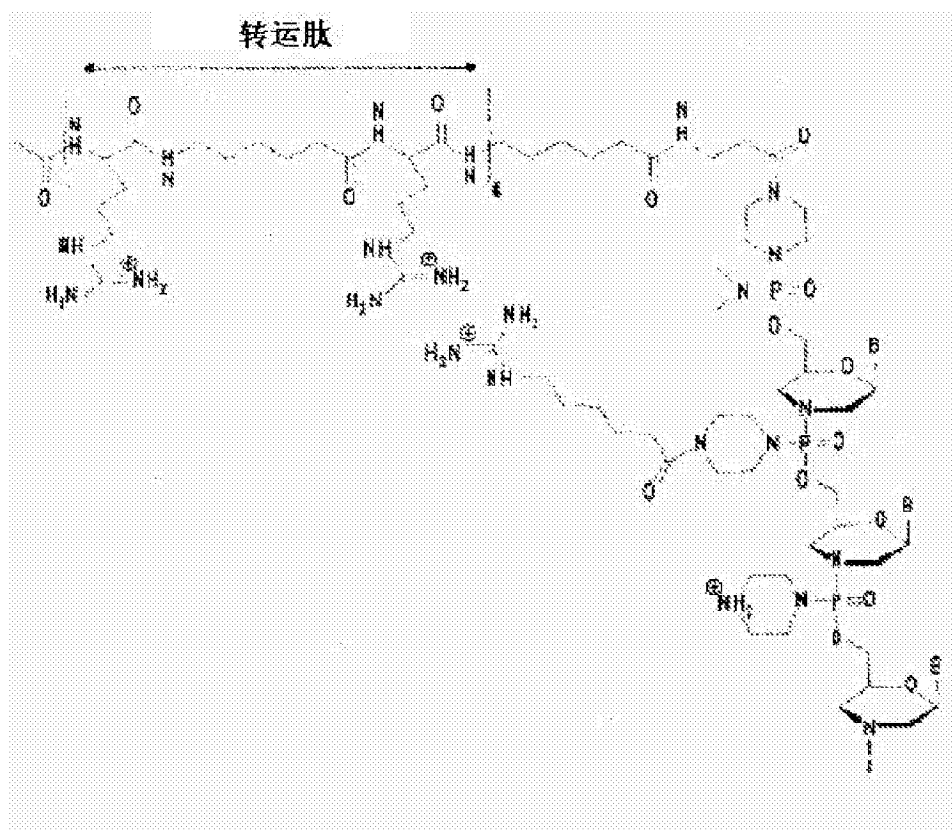


图1C

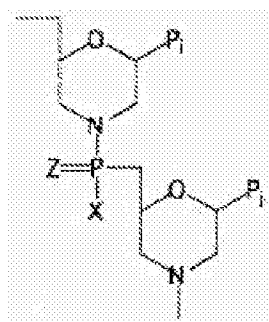


图1D

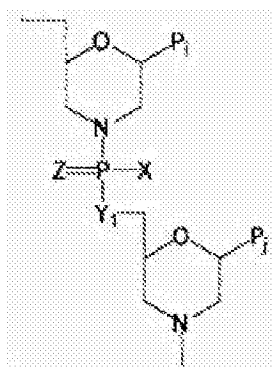


图1E

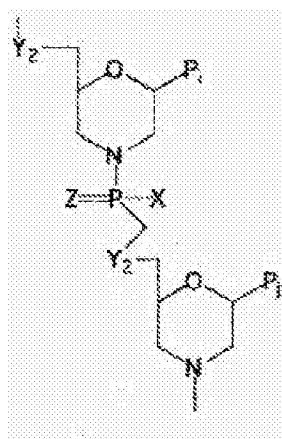


图1F

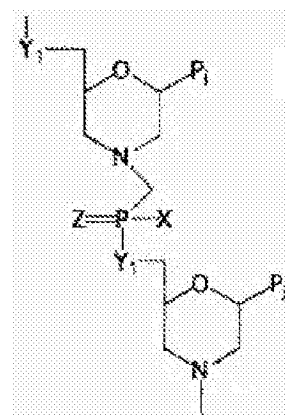


图1G

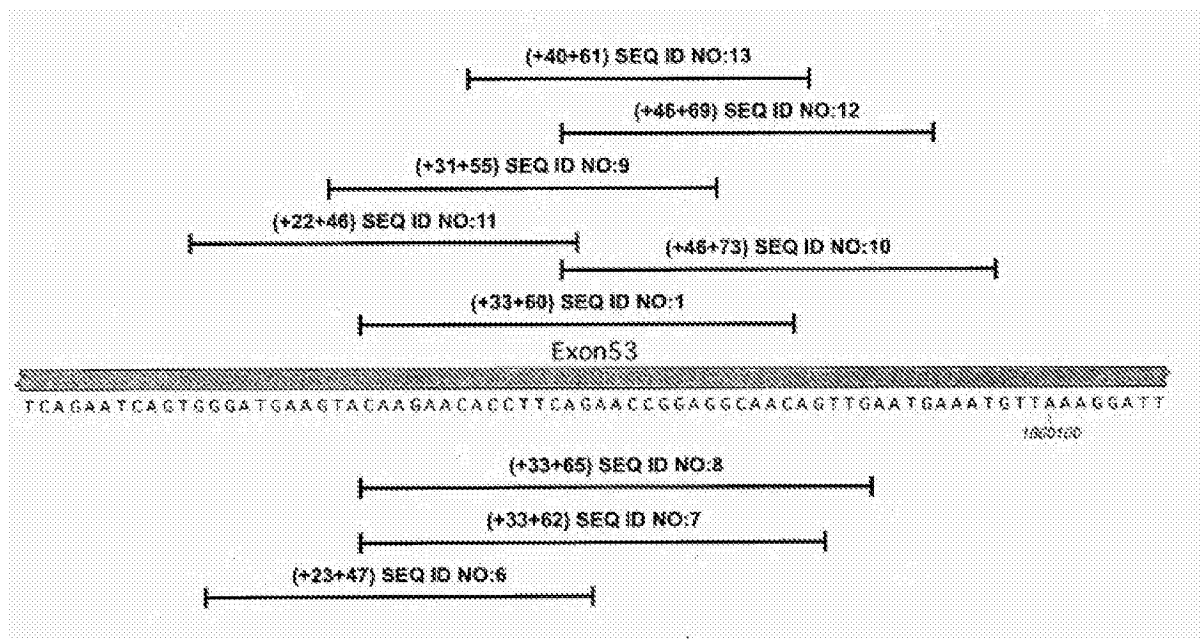


图2

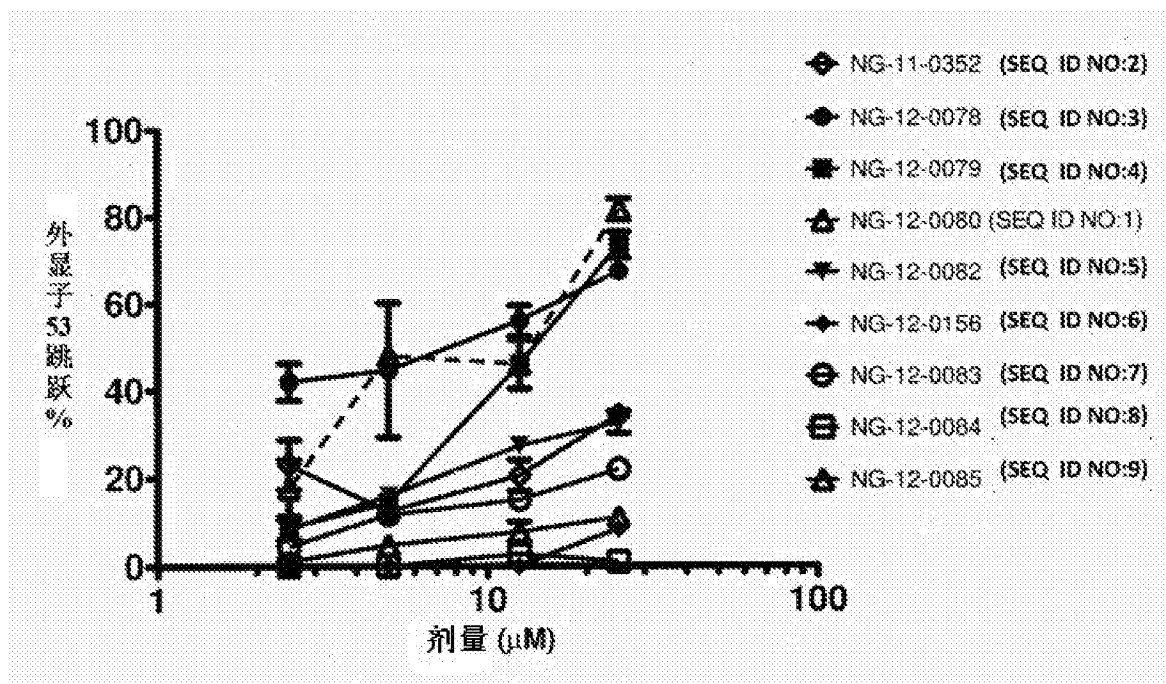


图3

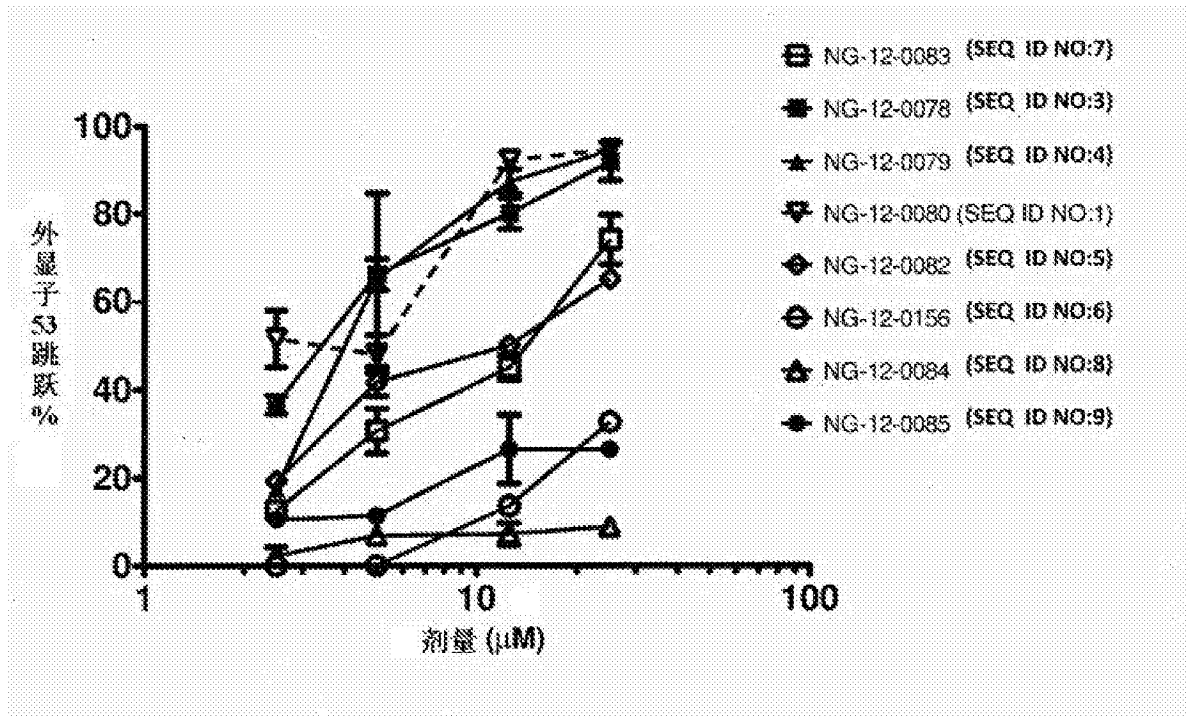


图4

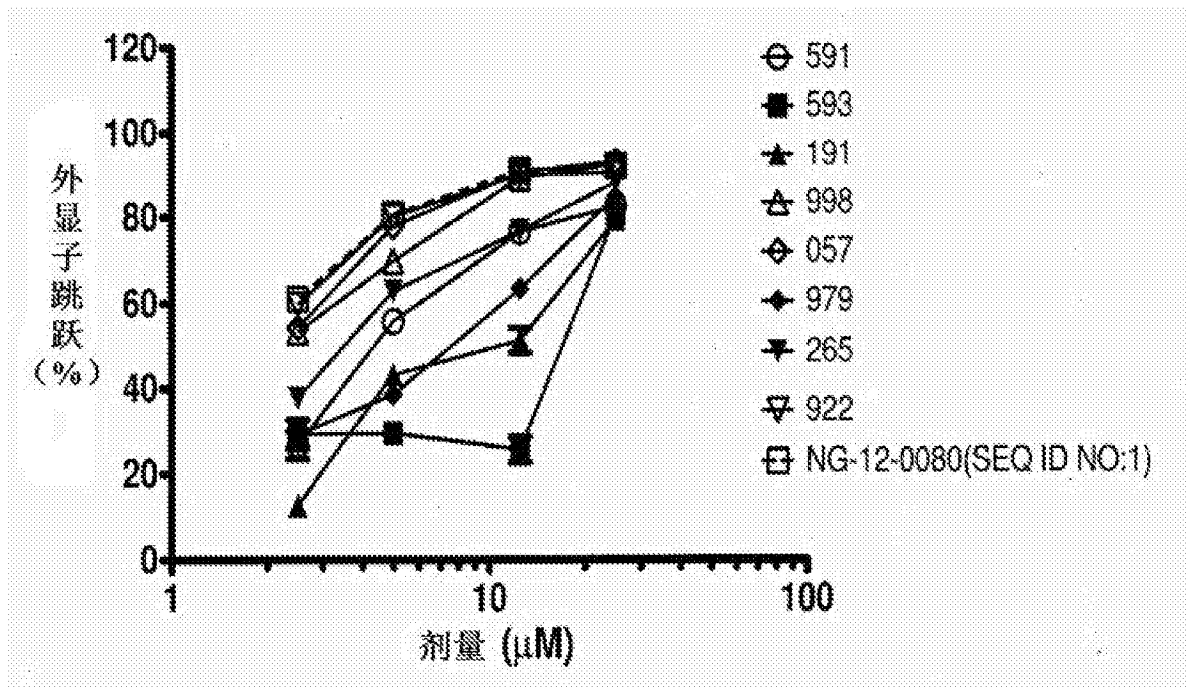


图5