



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118284434 A

(43) 申请公布日 2024.07.02

(21) 申请号 202280066123.8

(22) 申请日 2022.08.30

(30) 优先权数据

63/239,671 2021.09.01 US

63/244,915 2021.09.16 US

63/290,960 2021.12.17 US

63/298,565 2022.01.11 US

63/268,577 2022.02.25 US

63/337,574 2022.05.02 US

63/354,454 2022.06.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/075693 2022.08.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/034818 EN 2023.03.09

(71) 申请人 恩特拉达治疗学股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 李翔 钱自清

马赫布贝·海拉瓦迪 周明

马斯韦塔·吉尔根拉特

内尔萨·埃斯特雷拉

苏雷什·佩德迪加里

阿努什里·帕塔克

纳塔拉詹·塞瑟拉曼 连文龙

刘楠君

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

专利代理师 张珊珊 韩晓帆

(51) Int.Cl.

A61K 47/64 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书10页 说明书129页 附图34页

按照条约第19条修改的权利要求书9页

(54) 发明名称

用于跳跃杜兴氏肌营养不良中的外显子45的组合物和方法

(57) 摘要

本文在多个实施方案中描述了包含 (a) 细胞穿透肽 (CPP) 序列; 和 (b) 反义化合物的组合物, 其中所述反义化合物靶向DMD基因的外显子45。

1. 一种化合物,所述化合物包含:

(a) 环肽;和

(b) 与前mRNA序列中的DMD基因的靶序列互补的反义化合物(AC),其中靶序列包含外显子45的5'侧接内含子的至少一部分、外显子45的至少一部分、外显子45的3'侧接内含子的至少一部分或它们的组合。

2. 如权利要求1所述的化合物,其中所述AC包含至少一种修饰的核苷酸或核酸,所述修饰的核苷酸或核酸选自硫代磷酸酯(PS)核苷酸、二氨基磷酸酯吗啉代核苷酸(PMO)、锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、包含2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的主链的核苷酸、2'-O-甲氧基-乙基(2'-MOE)核苷酸、2',4'约束乙基(cEt)核苷酸和2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿糖核酸(2'F-ANA)。

3. 如权利要求1所述的化合物,其中所述AC包含表6A-6P或表7A-7O或表8A-8C中示出的核酸序列、或其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列。

4. 如权利要求1所述的化合物,其中所述环肽与以下缀合:

(a) 所述AC的3'端;

(b) 所述AC的5'端;或

(c) 所述AC的主链。

5. 如权利要求4-6中任一项所述的化合物,其包含将所述环肽缀合至所述AC的接头,其中所述接头与以下共价结合:

(a) 所述AC的5'端;

(b) 所述AC的3'端;或

(c) 所述AC的主链。

6. 如权利要求5所述的化合物,其中所述接头共价结合到所述环肽上的氨基酸残基的侧链。

7. 如权利要求5或6所述的化合物,其中所述接头包含:

(i) 一个或多个D或L氨基酸残基,其每一者任选地被取代;

(ii) 任选取代的亚烷基;

(iii) 任选取代的亚烯基;

(iv) 任选取代的亚炔基;

(v) 任选取代的碳环基;

(vi) 任选取代的杂环基;

(vii) 一个或多个 $-(R^1-J-R^2)z^m$ -亚基,其中 R^1 和 R^2 中的每一者在每种情况下独立地选自亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基和杂环基,每个J独立地是C、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S和O,其中 R^3 独立地选自H、烷基、烯基、炔基、碳环基和杂环基,其每一者任选地被取代,并且 z^m 是1至50的整数;

(viii) $-(R^1-J)z^m$ -或 $-(J-R^1)z^m$ -,其中 R^1 中的每一者在每种情况下独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基或杂环基,每个J独立地是C、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S或O,其中 R^3 是H、烷基、烯基、炔基、碳环基或杂环基,其每一者任选地被取代,并且 z^m 是1至50的整数;或(ix) 它们的组合。

8. 如权利要求7所述的化合物,其中所述接头包含:

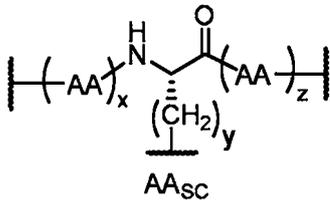
- (i) 赖氨酸、甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸、6-氨基戊酸或它们的组合;
- (ii) 一个或多个 $-(R^1-J-R^2)_z-$ 亚基,
- (iii) $-(R^1-J)_z-$ 或 $-(J-R^1)_z-$, 或者
- (iv) 它们的组合。

9. 如权利要求8或9所述的化合物,其中每个 R^1 和 R^2 独立地是亚烷基,每个 J 是 0,每个 x 独立地是 1 至 20 的整数,并且每个 z 独立地是 1 至 20 的整数。

10. 如权利要求5所述的化合物,其中所述接头包含:

- (i) $-(OCH_2CH_2)_z-$ 亚基,其中 z 是 2 至 20 的整数;
- (ii) 一个或多个氨基酸残基,其包括选自甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸、6-氨基戊酸和它们的组合的残基;或
- (iii) (i) 和 (ii) 的组合。

11. 如权利要求5-10中任一项所述的化合物,其中所述接头具有以下结构:



其中:

每个 AA 独立地为甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸或 6-氨基戊酸;

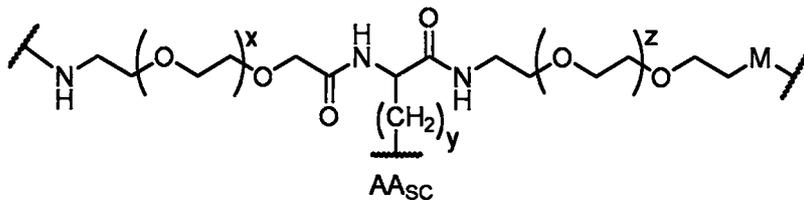
AA_{sc} 是氨基酸侧链;

x 是 1 至 10 的整数;

y 是 1 至 5 的整数;并且

z 是 1 至 10 的整数。

12. 如权利要求5-10中任一项所述的化合物,其中所述接头具有以下结构:



其中:

x 是 2 至 20 的整数;

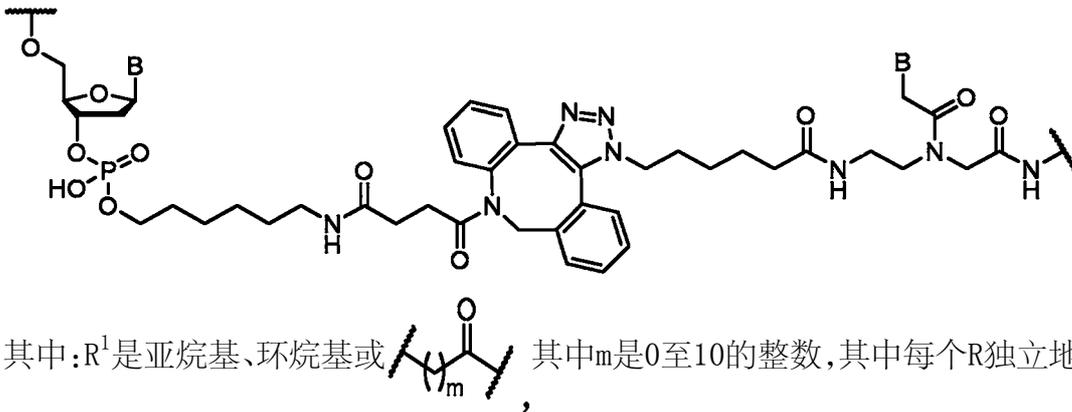
y 是 1 至 5 的整数;

z 是 2 至 20 的整数;

M 是结合部分;并且

AA_{sc} 是所述环肽的氨基酸残基。

13. 如权利要求12所述的化合物,其中 M 选自:



烯基、炔基、碳环基或杂环基，并且其中每个B独立地选自核碱基。

14. 如权利要求12所述的化合物，其中M是-C(O)。

15. 如权利要求11-14中任一项所述的化合物，其中z是11。

16. 如权利要求11-15中任一项所述的化合物，其中x是1。

17. 如前述权利要求中任一项所述的化合物，所述化合物包含与所述环肽或接头缀合的环外肽(EP)。

18. 如权利要求5-17中任一项所述的化合物，所述化合物包含与所述接头的氨基基团缀合的环外肽(EP)。

19. 如权利要求17或18所述的化合物，其中所述EP包含2至10个氨基酸残基。

20. 如权利要求17-19中任一项所述的化合物，其中所述EP包含4至8个氨基酸残基。

21. 如权利要求17-20中任一项所述的化合物，其中所述EP包含含有侧链的1或2个氨基酸，所述侧链包含胍基或其质子化形式。

22. 如权利要求17-21中任一项所述的化合物，其中所述EP包含1、2、3或4个赖氨酸残基。

23. 如权利要求22所述的化合物，其中每个赖氨酸残基的侧链上的所述氨基基团被三氟乙酰基(-COCF₃)基团、烯丙氧基羰基(Alloc)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基(Dde)或(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基-3)-甲基丁基(ivDde)基团取代。

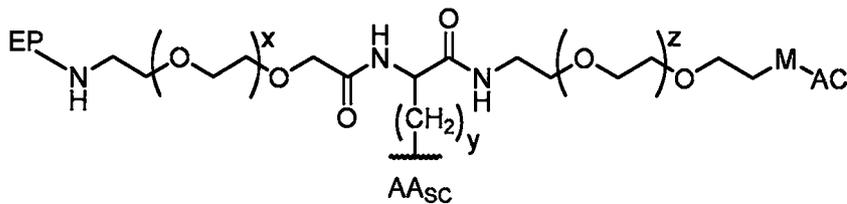
24. 如权利要求17-23中任一项所述的化合物，其中所述EP包含具有疏水侧链的至少2个氨基酸残基。

25. 如权利要求24所述的化合物，其中所述具有疏水侧链的氨基酸残基选自缬氨酸、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和甲硫氨酸。

26. 如权利要求17-25中任一项所述的化合物，其中所述环外肽包含以下序列中的一者：PKKKRKV；KR；RR；KKK；KGK；KBK；KBR；KRK；KRR；RKK；RRR；KKKK；KKRK；KRKK；KRRK；RKKR；RRRR；KGKK；KKGK；KKKKK；KKKRK；KBKBK；KKKRKV；PGKKRKV；PKGKRKV；PKKGRKV；PKKKGKV；PKKKRGV；或PKKKRKG。

27. 如权利要求17-25中任一项所述的化合物，其中所述环外肽具有以下结构：Ac-PKKKRKV-。

28. 如前述权利要求中任一项所述的化合物，所述化合物包含以下结构：



其中：

x是2至20的整数；

y是1至5的整数；

z是2至20的整数；

EP是环外肽；

M是结合部分；

AC是与包含前mRNA序列中的DMD基因的外显子45的靶序列互补的反义化合物；并且

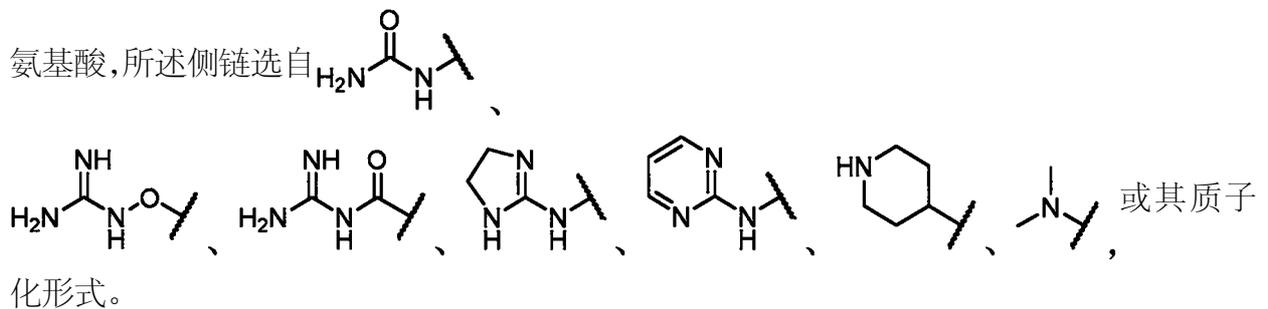
AA_{sc}是所述环肽的氨基酸残基。

29. 如权利要求1-28中任一项所述的化合物，其中所述环肽包含所述环肽中的4至20个氨基酸残基，其中至少两个氨基酸残基包含胍基或其质子化形式，并且至少两个氨基酸残基独立地包含疏水侧链。

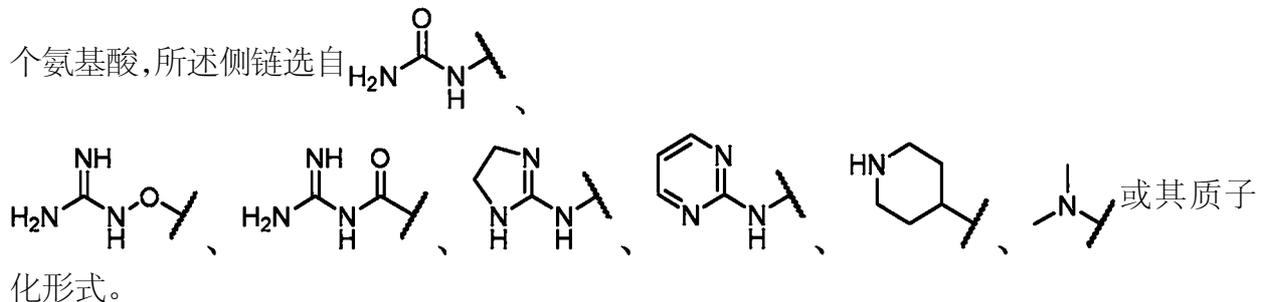
30. 如权利要求1-29中任一项所述的化合物，其中所述环肽包含含有胍基或其质子化形式的2、3或4个酸残基。

31. 如权利要求29或30所述的化合物，其中所述环肽包含含有疏水侧链的2、3或4个氨基酸残基。

32. 如权利要求29-31中任一项所述的化合物，其中所述环肽包含含有侧链的至少一个氨基酸，所述侧链选自



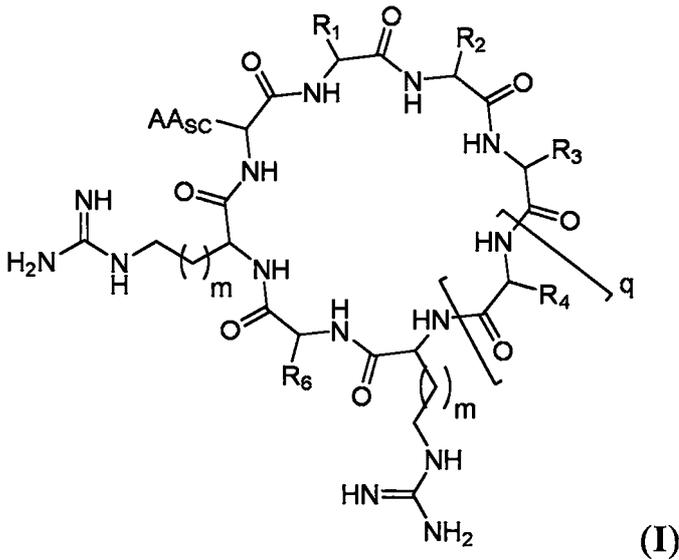
33. 如权利要求29-32中任一项所述的化合物，其中所述环肽包含含有侧链的1、2、3或4个氨基酸，所述侧链选自



34. 如权利要求29-33中任一项所述的化合物，其中所述环肽包含至少一个甘氨酸残基。

35. 如权利要求29-34中任一项所述的化合物，其中所述环肽包含1、2、3或4个甘氨酸残基。

36. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中所述环肽具有式(I)的结构:



或其质子化形式,

其中:

R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

AA_{sc} 是氨基酸侧链;

q 是1、2、3或4;并且

每个 m 独立地是整数0、1、2或3。

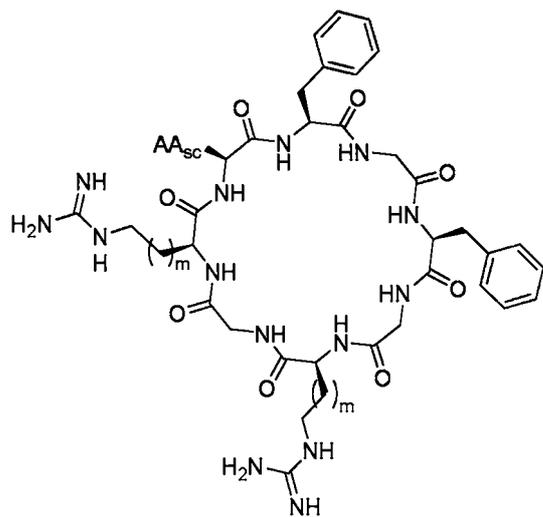
37. 如权利要求36所述的化合物,其中 R_4 是H或包含含有芳族基团的侧链的氨基酸残基。

38. 如权利要求36或37所述的化合物,其中所述包含含有芳族基团的侧链的氨基酸是苯丙氨酸。

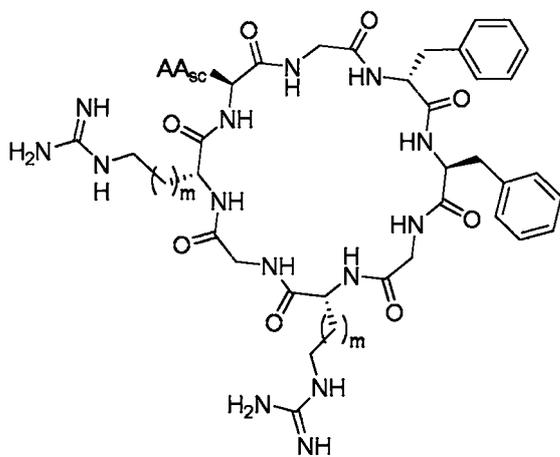
39. 如权利要求36-38中任一项所述的化合物,其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的两者包含苯丙氨酸。

40. 如权利要求36-39中任一项所述的化合物,其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的两者是H。

41. 如权利要求36-40中任一项所述的化合物,其中所述环肽具有式(I-1)或(I-2)的结构:



(I-1)、



(I-2)、

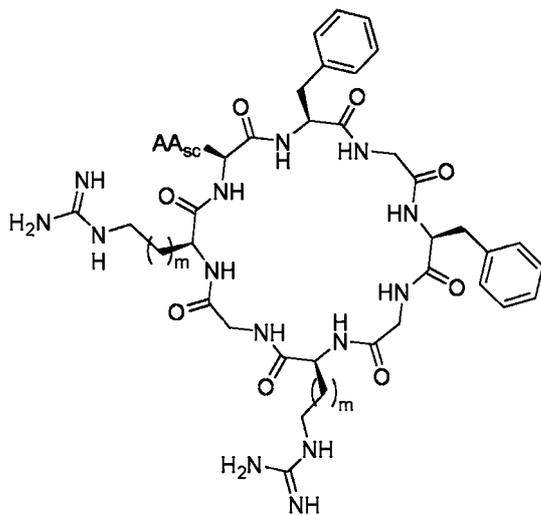
或其质子化形式，

其中：

AA_{sc} 是氨基酸侧链；并且

每个 m 独立地是0至3的整数。

42. 如权利要求36-41中任一项所述的化合物，其中所述环肽具有式(V-1)的结构：



(I-1)

或其质子化形式，

其中：

AA_{SC}是氨基酸侧链；并且

每个m独立地是0至3的整数。

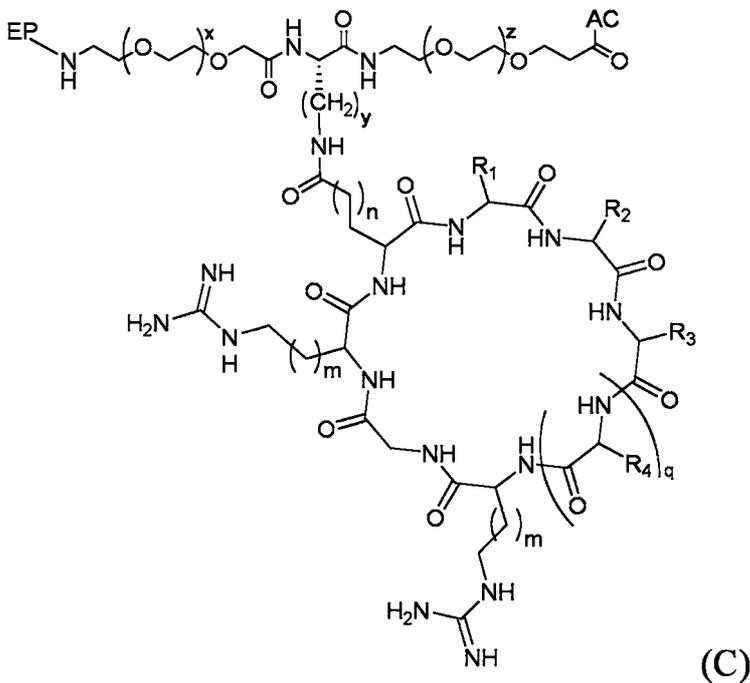
43. 如权利要求36-42中任一项所述的化合物，其中AA_{SC}包含天冬酰胺残基、天冬氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、高谷氨酸残基或高谷氨酰胺残基的侧链。

44. 如权利要求36-42中任一项所述的化合物，其中AA_{SC}包含谷氨酰胺残基的侧链。

45. 如权利要求1-44中任一项所述的化合物，其中所述AC包含表6A-6P或表7A-70或表8A-8C中的任一者中示出的序列、或其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列。

46. 如权利要求1-45中任一项所述的化合物，其中所述环肽包含FGFGRGR。

47. 如权利要求1-45中任一项所述的化合物，所述化合物包含式(C)的结构：



或其质子化形式，

其中：

R₁、R₂和R₃可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基；

R₄和R₆独立地是H或氨基酸侧链；

EP是如本文定义的环外肽；

每个m独立地是0-3的整数；

n是0-2的整数；

x' 是2-20的整数；

y是1-5的整数；

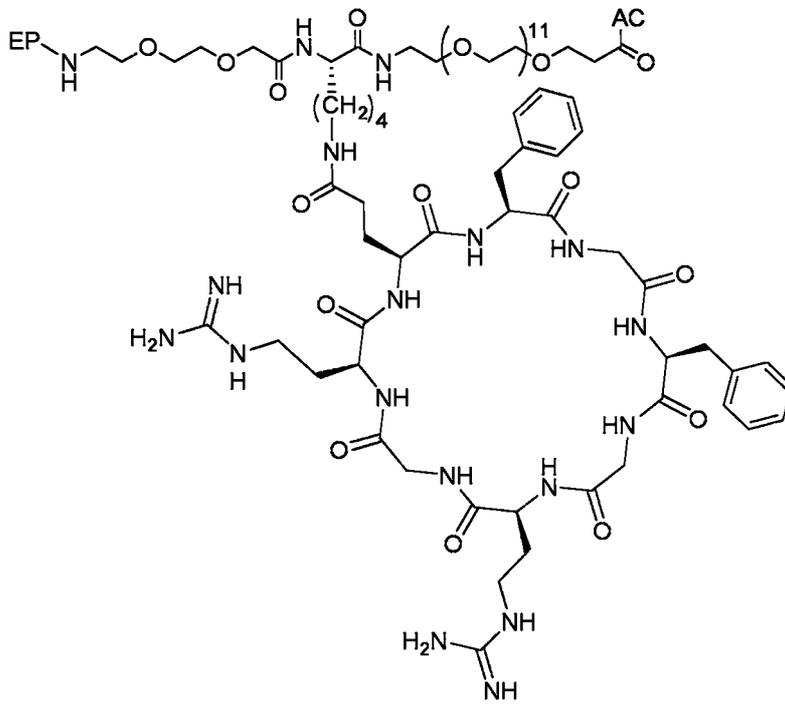
q是1-4的整数；

z' 是2-20的整数；

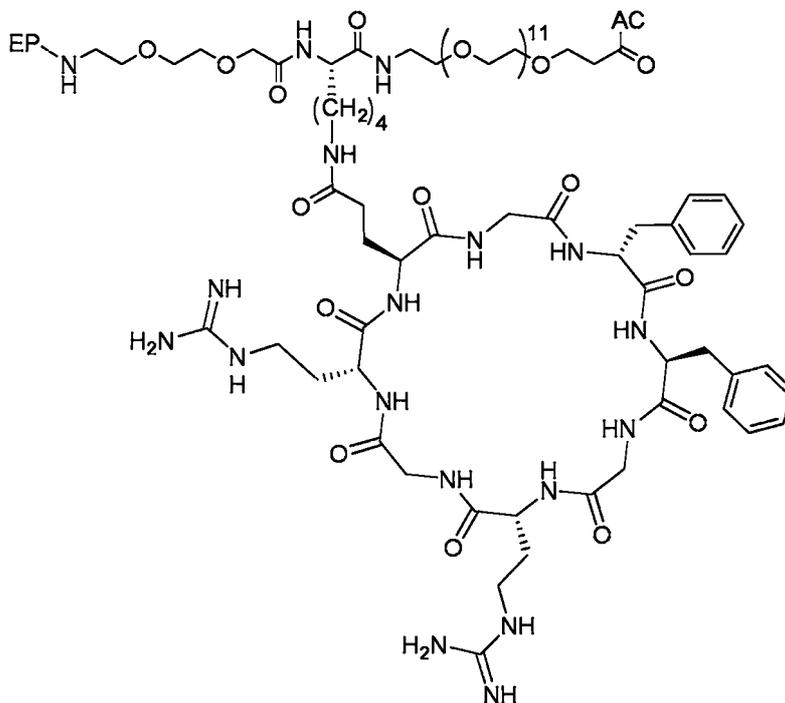
其中所述AC是来自表6A-6P或表7A-70或表8A-8C中的任一者的寡核苷酸、或其反向互

补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列。

48. 如权利要求1-47中任一项所述的化合物,所述化合物具有式(C-1)或式(C-2)的结构:



(C-1)、



(C-2)、

或其质子化形式;

其中所述AC选自表6A-6P或表7A-7O或表8A-8C中的任一者中示出的寡核苷酸、或其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列。

49. 如权利要求1-48中任一项所述的化合物,其中所述AC与外显子45的5'侧接内含子

的一部分和外显子45的一部分互补。

50. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-49中任一项所述的化合物。

51. 一种细胞,其包含如权利要求1-49中任一项所述的化合物。

52. 一种治疗DMD的方法,所述方法包括向有需要的患者施用如权利要求1-49中任一项所述的化合物或药物组合物。

用于跳跃杜兴氏肌营养不良中的外显子45的组合物和方法

[0001] 本申请要求于2021年9月16日提交的美国临时申请序列号63/244,915、于2022年5月2日提交的美国临时申请序列号63/337,574、于2022年6月22日提交的美国临时申请序列号63/354,454、于2021年9月1日提交的美国临时申请序列号63/239,671、于2021年12月17日提交的美国临时申请序列号63/290,960、于2022年1月11日提交的美国临时申请序列号63/298,565和于2022年2月25日提交的美国临时申请序列号63/268,577的优先权权益,所述美国临时申请的内容全文特别以引用方式并入本文。

背景技术

[0002] 杜兴氏肌营养不良 (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) 是一种遗传障碍,其特征在于由于蛋白质抗肌萎缩蛋白的改变导致进行性肌肉退化和无力。DMD中的遗传修饰,编码抗肌萎缩蛋白的基因会导致DMD。这些遗传修饰使DMD的阅读框移位导致非功能性截短的DMD蛋白。治疗DMD患者的一种方法需要向患者递送恢复DMD的阅读框的化合物。反义化合物可通过跳跃与DMD的阅读框移位相关的内部外显子来恢复DMD的阅读框,所述移位导致非功能性截短的DMD蛋白。外显子跳跃产生抗肌萎缩蛋白,所述蛋白保留了疾病状态下丧失的功能。

[0003] DMD是由几个外显子中的一个或多个的突变引起的。例如,8.1%的DMD患者具有DMD外显子45的突变。Aartsma-Rus.Human Mutation,第30卷,No.3,293-299(2009)。反义寡核苷酸卡西莫森(casimersen)已被批准用于外显子45跳跃,但此药物疗效较低,可能是由于治疗剂的细胞内递送较低。

[0004] 进入细胞内区室的能力有限是反义寡核苷酸治疗剂诸如卡西莫森的一个重要问题。已经尝试改善反义化合物的细胞内递送,例如使用载剂系统诸如聚合物、阳离子脂质体或者通过构建体的化学修饰,例如通过胆固醇分子的共价附接。然而,细胞内递送效率仍然很低,并且仍然需要改进的递送系统以增加这些反义化合物的效力。

[0005] 对于将反义化合物递送至细胞内区室以治疗DMD的有效组合物的需求尚未得到满足。

发明内容

[0006] 本文描述了用于递送核酸的组合物。在实施方案中,核酸是反义化合物(AC)。在实施方案中,反义化合物靶向患有杜兴氏肌营养不良(DMD)的受试者中的外显子45。

[0007] 在实施方案中,提供了一种化合物,其包含:

[0008] (a) 环肽(本文也称为细胞穿透肽或“CPP”);和

[0009] (b) 与前mRNA序列中的DMD基因的靶序列互补的反义化合物(AC),其中靶序列包含外显子45的5'侧接内含子的至少一部分、外显子45的至少一部分、外显子45的3'侧接内含子的至少一部分或它们的组合。

[0010] 在实施方案中,AC包含选自硫代磷酸酯(PS)核苷酸、二氨基磷酸酯吗啉代(phosphorodiamidate morpholino,PMO)核苷酸、锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、包含2'-O-甲

基(2'-OMe)修饰的主链的核苷酸、2'-O-甲氧基-乙基(2'-MOE)核苷酸、2',4'约束乙基(cEt)核苷酸和2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿糖核酸(2'F-ANA)的至少一种修饰的核苷酸或核酸。在实施方案中,AC包含至少一个PMO(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个PMO,包括其中的所有范围)。在实施方案中,AC中的每个核苷酸均为PMO。

[0011] 在实施方案中,AC包含以下序列:5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA-3'。在实施方案中,AC包含以下序列:5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT-3'。

[0012] 在实施方案中,环肽是FGFGRGRQ。在实施方案中,环肽是GfFGrGrQ。在实施方案中,环肽是FfΦGRGRQ。

[0013] 在实施方案中,EEV是:Ac-PKKKRKV-AEEA-Lys-(环[FGFGRGRQ])-PEG12-OH。

[0014] 在实施方案中,本公开提供了包含本文所述的化合物的药物组合物。

[0015] 在实施方案中,本公开提供了包含本文所述的化合物的细胞。

[0016] 在实施方案中,本公开提供了一种治疗DMD的方法,所述方法包括向有需要的患者施用本文所述的化合物。

附图说明

[0017] 图1A和图1B示出了用于将反义化合物(AC)与细胞穿透肽(CPP)连接的缀合化学。

[0018] 图2A至图2B示出了用于连接细胞穿透肽(CPP)(如  所示)与反义化合物(AC)的缀合化学,其中CPP包括PEG4接头并且示出了不具有含有聚乙二醇(PEG2或miniPEG)部分的接头的AC(图2A)和具有含有聚乙二醇(PEG2或miniPEG)部分的接头的AC(图2B)。图中的“R”代表棕榈酰基。

[0019] 图3示出了使用代表性CPP进行内体逃逸载体(EEV)设计的实例。应当理解,CPP可包括本文公开的CPP中的任一种。

[0020] 图4示出了表8中选择的AC在5μM和10μM下的外显子45跳跃效率。

[0021] 图5A至图5D示出了施用(静脉内)EEV-PMO-MDX23-1后1周在三头肌(图5A)、胫骨前肌(图5B)、膈肌(图5C)和心脏(图5D)中的外显子跳跃评估,如通过两步RT-PCR所评估。

[0022] 图6A至图6D示出了静脉内施用80mpk EEV-PMO-MDX23-1后三头肌(图6A)、胫骨前肌(图6B)、膈肌(图6C)和心脏(图6D)的作用持续时间(1周、2周、4周和8周)。

[0023] 图7描绘了静脉内给药40mpk EEV-PMO-MDX23-1(4个周剂量)后的结果。

[0024] 图8示出了D2.mdx线挂数据(wire hang data)。治疗12周后,用EEV-PMO-MDX23-180mpk Q2W治疗的动物的线挂时间与WT动物在统计上无法区分。DBA WT媒介物(盐水);D2.mdx媒介物(盐水);D2.mdx EEV-PMO-MDX23-1;D2.mdx EEV-PMO-MDX23-2;D2.mdx PMO-MDX23(5'-GGCCAAACCTCGCTTACCTGAAAT-3')

[0025] 图9A至图9B示出了给药前(图9A)和给药后4周(图9B)D2MDX小鼠的肌酸激酶活性。

[0026] 图10A至图10B示出了给药后8周(图10A)和12周(图10B)D2MDX小鼠血清的肌酸激酶活性。

[0027] 图11A至图11B,给药前(图11A)和给药后12周(图11B)用EEV-PMO-MDX23-3治疗的

D2MDX的握力。

[0028] 图12A至图12D示出了注射有40、60或80mpk的阳性对照的hDMD小鼠的膈肌(图12A)、心脏(图12B)、二头肌(图12C)和胫骨前肌(图12D)中的外显子跳跃效率。

[0029] 图13A至图13C示出了如通过1-STEP RT-PCR检测的胫骨前肌(图13A)、膈肌(图13B)和心脏(图13C)中的外显子跳跃。

[0030] 图14A至图14C示出了注射60mpk的阳性对照(EEV-PMO-DMD45-1)或与EEV-2缀合的候选PMO后1周,hDMD小鼠的胫骨前肌(图14A)、膈肌(图14B)和心脏(图14C)中的外显子跳跃。

[0031] 图15A至图15B示出了用30 μ M与EEV-2缀合的卡西莫森(EEV-PMO-DMD45-1)或10种EEV-PMO化合物之一处理的DMD Δ 46-48 iPSC来源的成肌细胞中DMD45跳跃的评估。

[0032] 图15C至图15E示出了用三种EEV-PMO化合物处理的人心脏细胞中DMD45跳跃的评估。

[0033] 图16示出了EEV PMO EEV-PMO-DMD45-2、EEV-PMO-DMD45-3、EEV-PMO-DMD45-4、EEV-PMO-DMD45-5的CTG1 α 细胞活力测定结果。归一化为蜂毒肽阳性对照。

[0034] 图17示出了EEV PMO EEV-PMO-DMD45-6、EEV-PMO-DMD45-7、EEV-PMO-DMD45-8、EEV-PMO-DMD45-9的CTG1 α 细胞活力测定。归一化为蜂毒肽阳性对照。

[0035] 图18示出了EEV PMO EEV-PMO-DMD45-10、EEV-PMO-DMD45-11和阳性对照的CTG1 α 细胞活力测定结果。归一化为蜂毒肽阳性对照。

[0036] 图19示出了EEV-PMO-DMD-45-5的结构。

[0037] 图20示出了EEV-PMO-DMD-45-7的结构。

[0038] 图21A至图21D示出了示例性EEV-PMO的合成方案。

[0039] 图22A至图22C示出了通过LC-MS/MS确定的PMO与EEV-PMO与EEV-NLS-PMO在THP细胞中的定位:全细胞摄取(图22A);亚细胞定位(图22B);和核摄取(图22C)。

具体实施方式

[0040] 化合物

[0041] 本文在各个实施方案中公开了用于治疗杜兴氏肌营养不良(DMD)的化合物。在实施方案中,DMD是由外显子45中的突变引起的。在实施方案中,化合物被设计成递送与前mRNA序列中的DMD基因的靶序列互补的反义化合物(AC),其中靶序列包含外显子45的5'侧接内含子的至少一部分、外显子45的至少一部分、外显子45的3'侧接内含子的至少一部分或它们的组合。在实施方案中,将化合物细胞内递送至有需要的受试者。在实施方案中,化合物递送与包含DMD基因的外显子45的内含子-外显子连接点的靶序列互补的AC。在实施方案中,化合物递送与包含DMD基因的外显子45上游(或5')的内含子核苷酸序列的靶序列互补的AC。

[0042] 在实施方案中,化合物改变与AC结合的靶前mRNA的剪接模式,导致再剪接靶蛋白的形成。在一个实施方案中,再剪接靶蛋白与在不存在AC的情况下通过剪接靶前mRNA产生的靶蛋白相比具有增加的功能。在实施方案中,与通过剪接产生的靶蛋白的功能相比,再剪接靶蛋白使靶蛋白的功能提高约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约

90%、约95%、约99%、约100%、约150%、约200%、约250%、约300%、约350%、约400%、约450%、约500%或更多,包括其间的所有值和范围。在实施方案中,再剪接靶蛋白将功能恢复至野生型靶蛋白功能的约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%,包括其间的所有值和范围。

[0043] 在实施方案中,本文公开的化合物包含AC部分和环肽部分(也称为细胞穿透肽(CPP)部分),其促进AC的细胞内递送。在实施方案中,化合物能够穿过细胞膜并体内结合到靶前mRNA。在实施方案中,化合物包含:a)至少一个环肽;和b)至少一种AC,其中环肽直接或间接偶联到AC。在实施方案中,化合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个AC部分。在实施方案中,化合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个环肽。在实施方案中,化合物包含一个AC部分。在实施方案中,化合物包含两个AC部分。如本文所用,“偶联”可指环肽与AC之间的共价或非共价缔合,包括环肽与AC的融合以及环肽与AC的化学缀合。将环肽非共价附接到AC的方法的非限制性实例是通过链霉亲和素/生物素相互作用,例如通过将生物素缀合到环肽并且将链霉亲和素与AC融合。在所得化合物中, CPP经由生物素与链霉亲和素之间的非共价缔合来与AC偶联。

[0044] 在实施方案中,环肽直接或间接缀合至AC,从而形成环肽-AC缀合物。AC与CPP的缀合可发生在这些部分上的任何适当的位点处。例如,AC的5'或3'端可与CPP中的氨基酸的C-末端、N-末端或侧链缀合。

[0045] 在实施方案中,AC与环肽共价连接。如本文所用,共价键联是指其中CPP部分共价连接至AC部分的5'和/或3'端的构建体。此类缀合物可替代地被描述为具有细胞穿透部分和寡核苷酸部分。共价键联的方法是本领域熟知的。根据本公开的某些实施方案,共价连接的AC-环肽缀合物包括通过接头彼此缔合的AC组分和环肽组分。

[0046] 在实施方案中,AC可通过AC的5'或3'端上的部分化学缀合到环肽。在又其他实施方案中,AC可通过环肽上氨基酸的侧链缀合到环肽。环肽上能够形成共价键或可如此修饰的任何氨基酸侧链可用于将AC连接到环肽。环肽上的氨基酸可以是天然或非天然氨基酸。在实施方案中,环肽上用于缀合AC的氨基酸是天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、鸟氨酸、2,3-二氨基丙酸或它们的类似物,其中侧链被与AC或接头的键取代。在实施方案中,氨基酸是赖氨酸或其类似物。在实施方案中,氨基酸是谷氨酸或其类似物。在实施方案中,氨基酸是天冬氨酸或其类似物。

[0047] 内体逃逸载体(EEV)

[0048] 本文提供了内体逃逸载体(EEV),其可用于转运AC穿过细胞膜,例如,将AC递送至细胞的胞质或细胞核。EEV可包含细胞穿透肽(CPP),例如,与环外肽(EP)缀合的环状细胞穿透肽(cCPP)。EP可互换地称为调节肽(MP)。EP可包含核定位信号(NLS)的序列。EP可与AC偶联。EP可与cCPP偶联。EP可与AC和cCPP偶联。EP、AC、cCPP或它们的组合之间的偶联可以是非共价的或共价的。EP可通过肽键附接到cCPP的N-末端。EP可通过肽键附接到cCPP的C-末端。EP可通过cCPP中氨基酸的侧链附接到cCPP。EP可通过赖氨酸的侧链附接到cCPP,赖氨酸可与cCPP中的谷氨酰胺的侧链缀合。EP可与AC的5'或3'端缀合。EP可与接头偶联。环外肽可与接头的氨基基团缀合。EP可经由EP和cCPP的C-末端通过cCPP和/或EP上的侧链与接头偶联。例如,EP可包含末端赖氨酸,其然后可通过酰胺键与含有谷氨酰胺的cCPP偶联。当EP含有末

端赖氨酸并且赖氨酸的侧链可用于附接cCPP时,C-末端或N-末端可附接到AC上的接头。

[0049] 环外肽

[0050] 环外肽(EP)可包含2至10个氨基酸残基,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基,包括其间的所有范围和值。EP可包含6至9个氨基酸残基。EP可包含4至8个氨基酸残基。

[0051] 环外肽中的每个氨基酸可以是天然的或非天然的氨基酸。术语“非天然氨基酸”是指一种有机化合物,它是天然氨基酸的同源物,因为它具有与天然氨基酸类似的结构,从而模拟天然氨基酸的结构和反应性。非天然氨基酸可以是修饰的氨基酸和/或氨基酸类似物,其不是20种常见天然存在的氨基酸中的一种,也不是稀有天然氨基酸硒代半胱氨酸或吡咯赖氨酸。非天然氨基酸也可以是天然氨基酸的D-异构体。合适的氨基酸的实例包括但不限于丙氨酸、别亮氨酸(allosoleucine)、精氨酸、瓜氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、萘基丙氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、焦谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸、它们的衍生物或它们的组合。这些和其他氨基酸连同它们在本文中使用的缩写列于表1中。例如,氨基酸可以是A、G、P、K、R、V、F、H、Nal或瓜氨酸。

[0052] EP可包含至少一个带正电荷的氨基酸残基,例如至少一个赖氨酸残基和/或至少一个包含含有胍基或其质子化形式的侧链的胺酸残基。EP可包含1或2个氨基酸残基,其包含含有胍基或其质子化形式的侧链。包含含有胍基的侧链的氨基酸残基可以是精氨酸残基。质子化形式在整个公开内容中可意指其盐。

[0053] EP可包含至少两个、至少三个或至少四个或更多个赖氨酸残基。EP可包含2、3或4个赖氨酸残基。每个赖氨酸残基的侧链上的氨基基团可被保护基团取代,所述保护基团包括例如三氟乙酰基(-COCF₃)、烯丙氧基羰基(Alloc)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基(Dde)或(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基-3)-甲基丁基(ivDde)基团。每个赖氨酸残基的侧链上的氨基基团可被三氟乙酰基(-COCF₃)取代。可包含保护基团以实现酰胺缀合。可在EP与cCPP缀合后去除保护基团。

[0054] EP可包含至少2个具有疏水侧链的氨基酸残基。具有疏水侧链的氨基酸残基可选自缬氨酸、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和甲硫氨酸。具有疏水侧链的氨基酸残基可以是缬氨酸或脯氨酸。

[0055] EP可包含至少一个带正电荷的氨基酸残基,例如至少一个赖氨酸残基和/或至少一个精氨酸残基。EP可包含至少两个、至少三个或至少四个或更多个赖氨酸残基和/或精氨酸残基。

[0056] EP可包含KK、KR、RR、HH、HK、HR、RH、KKK、KGK、KBK、KBR、KRK、KRR、RKK、RRR、KKH、KHK、HKK、HRR、HRH、HHR、HBH、HHH、HHHH、KHKK、KKHK、KKKH、KHKH、HKHK、KKKK、KKRK、KRKK、KRRK、RKKR、RRRR、KGKK、KKGK、HBHBH、HBKBH、RRRRR、KKKKK、KKKRK、RKKKK、KRKKK、KKRKK、KKKKR、KBKKB、RKKKKG、KRKKKG、KKRKKG、KKKKRG、RKKKKB、KRKKKB、KKRKKB、KKKKRB、KKKRKV、RRRRRR、HHHHHH、RHRHRH、HRHRHR、KRKRKR、RKRKRK、RBRBRB、KBKKBK、PKKKRKV、PGKKRKV、PKGKRKV、PKKGRKV、PKKKGKV、PKKKRGV或PKKKRKG,其中B是β-丙氨酸。EP中的氨基酸可具有D或L立体化学。

[0057] EP可包含KK、KR、RR、KKK、KGK、KBK、KBR、KRK、KRR、RKK、RRR、KKKK、KKRK、KRKK、KRRK、RKKR、RRRR、KGKK、KKGK、KKKKK、KKKRK、KBKKB、KKKRKV、PKKKRKV、PGKKRKV、PKGKRKV、PKKGRKV、

PKKKGKV、PKKKRGV或PKKKRKG。EP可包含PKKKRKV、RR、RRR、RHR、RBR、RBRBR、RBHBR或HBRBH，其中B是β-丙氨酸。EP中的氨基酸可具有D或L立体化学。

[0058] EP可由KK、KR、RR、KKK、KGK、KBK、KBR、KRK、KRR、RKK、RRR、KKKK、KKRK、KRKK、KRRK、RKKR、RRRR、KGKK、KKGK、KKKK、KKRK、KBKBK、KKRKV、PKKKRKV、PGKKRKV、PKGKRKV、PKKGRKV、PKKKGV、PKKKRGV或PKKKRKG组成。EP可由PKKKRKV、RR、RRR、RHR、RBR、RBRBR、RBHBR或HBRBH组成，其中B是β-丙氨酸。EP中的氨基酸可具有D或L立体化学。

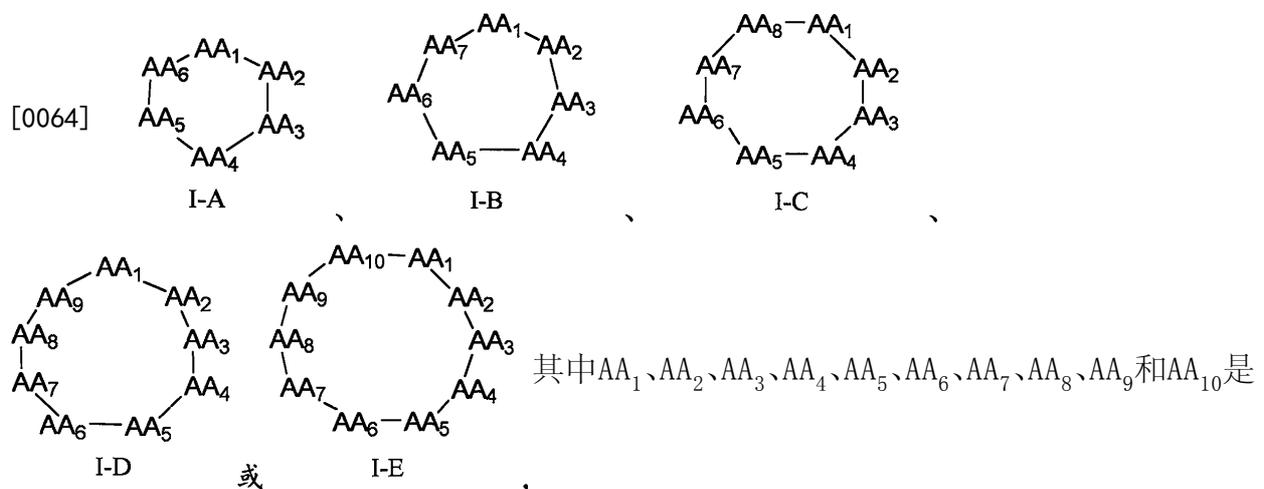
[0059] EP可包含本领域中鉴定为核定位序列(NLS)的氨基酸序列。EP可由本领域中鉴定为核定位序列(NLS)的氨基酸序列组成。EP可包含含有氨基酸序列PKKKRKV的NLS。EP可由包含氨基酸序列PKKKRKV的NLS组成。EP可包含含有选自NLSKRPAAIKAGQAKKKK、PAAKRVKLD、RQRRNELKRSF、RMRKFKNGKDTAELRRRRVEVSVELR、KAKKDEQILKRRNV、VSRKRPRP、PPKKARED、PQPKKKPL、SALIKKKKKMAP、DRLRR、PKQKKRK、RKLKKKIKKL、REKKKFLKRR、KRKGDEVDGVDEVAKKSKK和RKCLQAGMNLEARKTKK的氨基酸序列的NLS。EP可由包含选自NLSKRPAAIKAGQAKKKK、PAAKRVKLD、RQRRNELKRSF、RMRKFKNGKDTAELRRRRVEVSVELR、KAKKDEQILKRRNV、VSRKRPRP、PPKKARED、PQPKKKPL、SALIKKKKKMAP、DRLRR、PKQKKRK、RKLKKKIKKL、REKKKFLKRR、KRKGDEVDGVDEVAKKSKK和RKCLQAGMNLEARKTKK的氨基酸序列的NLS组成

[0060] 所有环外序列还可含有N-末端乙酰基基团。因此，例如，EP可具有以下结构：Ac-PKKKRKV。

[0061] 细胞穿透肽(CPP)

[0062] 细胞穿透肽(CPP)可包含6至20个氨基酸残基。细胞穿透肽可以是环状细胞穿透肽(cCPP)。cCPP能够穿透细胞膜。环外肽(EP)可与cCPP缀合，并且所得构建体可称为内体逃逸载体(EEV)。cCPP可引导AC穿透细胞膜。cCPP可将AC递送至细胞的胞质。cCPP可将AC递送至靶(例如，前mRNA)所在的细胞位置。为了将cCPP与AC缀合，可替换cCPP上的至少一个键或孤对电子。

[0063] cCPP中氨基酸残基的总数在6至20个氨基酸残基的范围内，例如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸残基，包括其间的所有范围和子范围。cCPP可包含6至13个氨基酸残基。本文公开的cCPP可包含6至10个氨基酸。以举例的方式，包含6-10个氨基酸残基的cCPP可具有根据式I-A至I-E中任一种的结构：



氨基酸残基。

[0065] cCPP可包含6至8个氨基酸。cCPP可包含8个氨基酸。

[0066] cCPP中的每个氨基酸可以是天然的或非天然的氨基酸。术语“非天然氨基酸”是指一种有机化合物,它是天然氨基酸的同源物,因为它具有与天然氨基酸类似的结构,从而模拟天然氨基酸的结构和反应性。非天然氨基酸可以是修饰的氨基酸和/或氨基酸类似物,其不是20种常见天然存在的氨基酸中的一种,也不是稀有天然氨基酸硒代半胱氨酸或吡咯赖氨酸。非天然氨基酸也可以是天然氨基酸的D-异构体。合适的氨基酸的实例包括但不限于丙氨酸、别亮氨酸、精氨酸、瓜氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、萘基丙氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、焦谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸、它们的衍生物或它们的组合。这些和其他氨基酸连同它们在本文中使用的缩写列于表1中。

[0067] 表1.氨基酸缩写

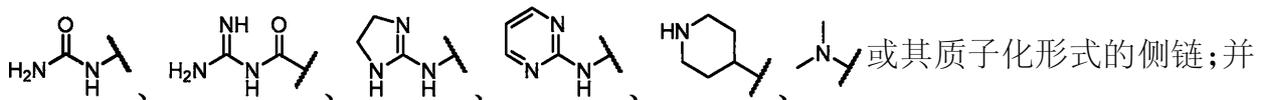
[0068]

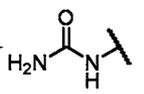
氨基酸	缩写*L-氨基酸	缩写*D-氨基酸
丙氨酸	Ala (A)	ala (a)
别异亮氨酸	Aile	Aile
精氨酸	Arg (R)	arg (r)
天冬酰胺	Asn (N)	asn (n)
天冬氨酸	Asp (D)	asp (d)
半胱氨酸	Cys (C)	cys (c)
瓜氨酸	Cit	Cit
环己基丙氨酸	Cha	cha
2,3-二氨基丙酸	Dap	dap
4-氟苯丙氨酸	Fpa (Σ)	pfa
谷氨酸	Glu (E)	glu (e)
谷氨酰胺	Gln (Q)	gln (q)
甘氨酸	Gly (G)	gly (g)
组氨酸	His (H)	his (h)
高脯氨酸 (又名哌可酸)	Pip (Θ)	pip (θ)
异亮氨酸	Ile (I)	ile (i)
亮氨酸	Leu (L)	leu (l)
赖氨酸	Lys (K)	lys (k)
甲硫氨酸	Met (M)	met (m)
3- (2-萘基) -丙氨酸	Na1 (Φ)	nal (ϕ)
3- (1-萘基) -丙氨酸	1-Nal	1-nal
正亮氨酸	Nle (Ω)	nle
苯丙氨酸	Phe (F)	phe (f)
苯基甘氨酸	Phg (Ψ)	phg
4- (膦酰基二氟甲基) 苯丙氨酸	F ₂ Pmp (Λ)	f ₂ pmp

脯氨酸	Pro (P)	pro (p)
肌氨酸	Sar (Ξ)	sar
硒代半胱氨酸	Sec (U)	sec (u)
丝氨酸	Ser (S)	ser (s)
苏氨酸	Thr (T)	thr (y)
酪氨酸	Tyr (Y)	tyr (y)
色氨酸	Trp (W)	trp (w)
缬氨酸	Val (V)	val (v)
叔丁基-丙氨酸	Tle	tle
青霉素	Pen	Pen
高精氨酸	HomoArg	homoarg
烟酰基-赖氨酸	Lys (NIC)	lys (NIC)
三氟乙酰基-赖氨酸	Lys (TFA)	lys (TFA)
甲基-亮氨酸	MeLeu	meLeu
3-(3-苯并噁吩基)-丙氨酸	Bta	bta

[0069] *单字母缩写: 当在本文中以大写字母示出时, 其表示L-氨基酸形式, 当在本文中以小写字母示出时, 其表示D-氨基酸形式。

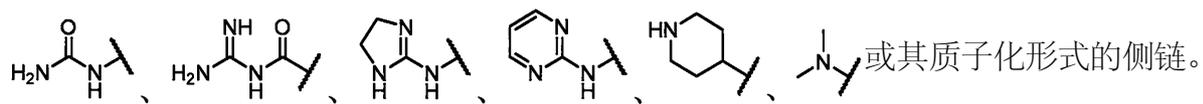
[0070] cCPP可包含4至20个氨基酸, 其中: (i) 至少一个氨基酸具有包含胍基或其质子化形式的侧链; (ii) 至少一个氨基酸不具有侧链或具有包含

 或其质子化形式的侧链; 并且 (iii) 至少两个氨基酸独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链。

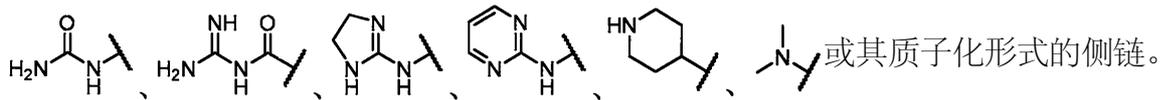
[0071] 至少两个氨基酸可不具有侧链或具有包含  或其质子化形式的侧链。如本文所用, 当不存在侧链时, 氨基酸在连接胺和羧酸的碳原子上具有两个氢原子 (例如, -CH₂-)。

[0072] 不具有侧链的氨基酸可以是甘氨酸或β-丙氨酸。

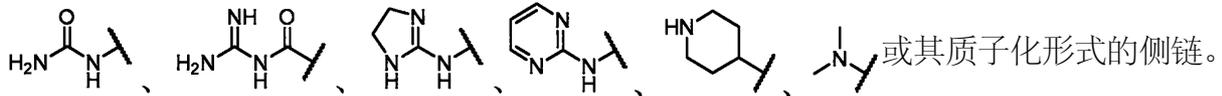
[0073] cCPP可包含形成cCPP的6至20个氨基酸残基, 其中: (i) 至少一个氨基酸可以是甘氨酸、β-丙氨酸或4-氨基丁酸残基; (ii) 至少一个氨基酸可具有包含芳基或杂芳基基团的侧链; 并且 (iii) 至少一个氨基酸具有包含胍基、

 或其质子化形式的侧链。

[0074] cCPP可包含形成cCPP的6至20个氨基酸残基, 其中: (i) 至少两个氨基酸可独立地是甘氨酸、β-丙氨酸或4-氨基丁酸残基; (ii) 至少一个氨基酸可具有包含芳基或杂芳基基团的侧链; 并且 (iii) 至少一个氨基酸具有包含胍基、



[0075] cCPP可包含形成cCPP的6至20个氨基酸残基,其中:(i)至少三个氨基酸可独立地是甘氨酸、 β -丙氨酸或4-氨基丁酸残基;(ii)至少一个氨基酸可具有包含芳族或杂芳族基团的侧链;并且(iii)至少一个氨基酸可具有包含胍基、



[0076] 甘氨酸和相关的氨基酸残基

[0077] cCPP可包含(i)1、2、3、4、5或6个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)2个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)3个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)4个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)5个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)6个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)3、4或5个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)3或4个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。

[0078] cCPP可包含(i)1、2、3、4、5或6个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)2个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)3个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)4个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)5个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)6个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)3、4或5个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)3或4个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)2或3个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)1或2个甘氨酸残基。

[0079] cCPP可包含(i)3、4、5或6个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)3个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)4个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)5个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)6个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)3、4或5个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含(i)3或4个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。

[0080] cCPP可包含至少三个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)3、4、5或6个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)3个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)4个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)5个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)6个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)3、4或5个甘氨酸残基。cCPP可包含(i)3或4个甘氨酸残基

[0081] 在实施方案中,cCPP中的甘氨酸、 β -丙氨酸或4-氨基丁酸残基都不是邻接的。两个或三个甘氨酸、 β -丙氨酸或4-氨基丁酸残基可以是邻接的。两个甘氨酸、 β -丙氨酸或4-氨基丁酸残基可以是邻接的。

[0082] 在实施方案中,cCPP中没有一个甘氨酸残基是邻接的。cCPP中的每个甘氨酸残基可被不能是甘氨酸的氨基酸残基分开。两个或三个甘氨酸残基可以是邻接的。两个甘氨酸残基可以是邻接的。

[0083] 具有芳族或杂芳族基团的氨基酸侧链

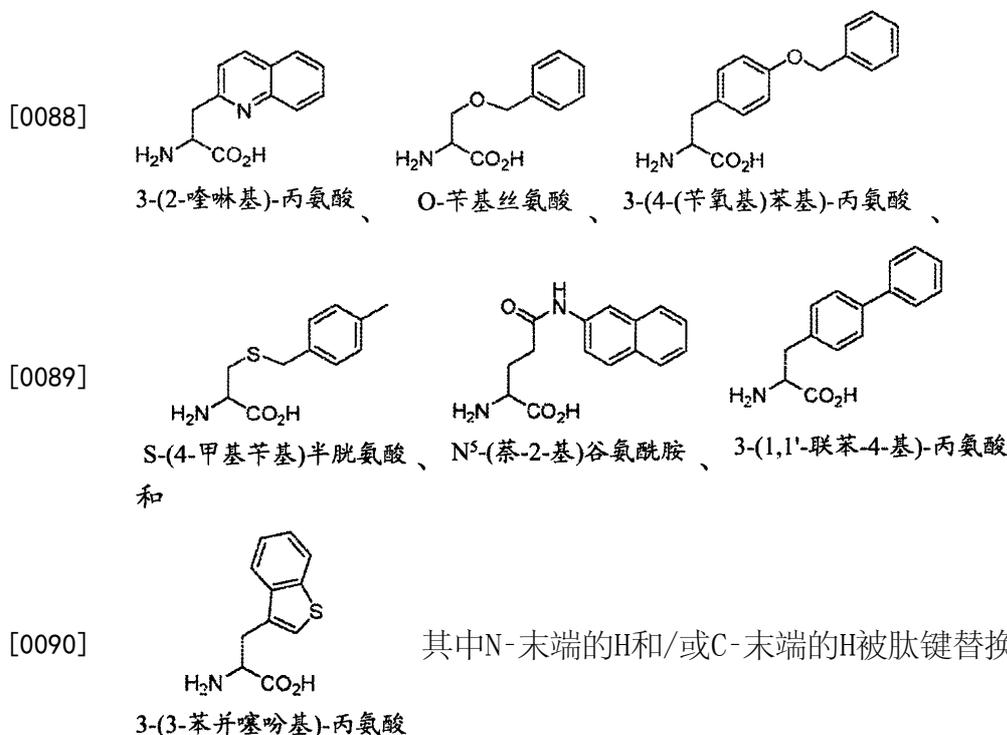
[0084] cCPP可包含(ii)2、3、4、5或6个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP

可包含(ii)3个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)4个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)5个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)6个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2、3或4个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2或3个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。

[0085] cCPP可包含(ii)2、3、4、5或6个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)3个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)4个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)5个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)6个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2、3或4个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2或3个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。

[0086] 芳族基团可以是6至14元芳基。芳基可以是苯基、萘基或蒽基,它们各自任选地被取代。芳基可以是苯基或萘基,它们各自任选地被取代。杂芳族基团可以是具有1、2或3个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基或异喹啉基。

[0087] 具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是双(高萘基丙氨酸)、高萘基丙氨酸、萘基丙氨酸、苯基甘氨酸、双(高苯丙氨酸)、高苯丙氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、3-(3-苯并噻吩基)-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-丙氨酸、O-苄基丝氨酸、3-(4-(苄氧基)苯基)-丙氨酸、S-(4-甲基苄基)半胱氨酸、N-(萘-2-基)谷氨酰胺、3-(1,1'-联苯-4-基)-丙氨酸、3-(3-苯并噻吩基)-丙氨酸或酪氨酸,它们各自任选地被一个或多个取代基取代。具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸可各自独立地选自:



[0091] 具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是苯丙氨酸、萘基

丙氨酸、苯基甘氨酸、高苯丙氨酸、高萘基丙氨酸、双(高苯丙氨酸)、双-(高萘基丙氨酸)、色氨酸或酪氨酸的残基,它们各自任选地被一个或多个取代基取代。具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是酪氨酸、苯丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、色氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、4-苯基苯丙氨酸、3,4-二氟苯丙氨酸、4-三氟甲基苯丙氨酸、2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸、高苯丙氨酸、 β -高苯丙氨酸、4-叔丁基-苯丙氨酸、4-吡啶基丙氨酸、3-吡啶基丙氨酸、4-甲基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、3-(9-蒎基)-丙氨酸的残基。具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是苯丙氨酸、萘基丙氨酸、苯基甘氨酸、高苯丙氨酸或高萘基丙氨酸的残基,它们各自任选地被一个或多个取代基取代。具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是苯丙氨酸、萘基丙氨酸、高苯丙氨酸、高萘基丙氨酸、双(高萘基丙氨酸)或双(高萘基丙氨酸)的残基,它们各自任选地被一个或多个取代基取代。具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是苯丙氨酸或萘基丙氨酸的残基,它们各自任选地被一个或多个取代基取代。至少一个具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可以是苯丙氨酸的残基。至少两个具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可以是苯丙氨酸的残基。每个具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可以是苯丙氨酸的残基。

[0092] 在实施方案中,具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸没有一个是邻接的。两个具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸可以是邻接的。两个邻接的氨基酸可具有相反的立体化学。两个邻接的氨基酸可具有相同的立体化学。三个具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸可以是邻接的。三个邻接的氨基酸可具有相同的立体化学。三个邻接的氨基酸可具有交替的立体化学。

[0093] 包含芳族或杂芳族基团的氨基酸残基可以是L-氨基酸。包含芳族或杂芳族基团的氨基酸残基可以是D-氨基酸。包含芳族或杂芳族基团的氨基酸残基可以是D-氨基酸和L-氨基酸的混合物。

[0094] 任选的取代基可以是任何不显著降低(例如超过50%)cCPP的胞质递送效率的原子或基团,例如与不具有所述取代基的其他相同序列相比。任选的取代基可以是疏水取代基或亲水取代基。任选的取代基可以是疏水取代基。取代基可增加疏水氨基酸的溶剂可及表面积(如本文所定义)。取代基可以是卤素、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、酰基、烷基氨基甲酰基、烷基羧酰胺基(alkylcarboxamidyl)、烷氧羰基、烷硫基或芳硫基。取代基可以是卤素。

[0095] 尽管不希望受理论束缚,但据信相对于具有较低疏水性值的氨基酸,有具有较高疏水性值的芳族或杂芳族基团的氨基酸(即具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸)可改善cCPP的胞质递送效率。每个疏水氨基酸可独立地具有大于甘氨酸的疏水性值。每个疏水氨基酸可独立地是疏水性值大于丙氨酸的疏水氨基酸。每个疏水氨基酸可独立地具有大于或等于苯丙氨酸的疏水性值。疏水性可使用本领域已知的疏水性标度来测量。表2列出了由Eisenberg和Weiss(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1984;81(1):140-144)、Engleman等人(Ann.Rev.of Biophys.Biophys.Chem.1986;1986(15):321-53)、Kyte和Doolittle(J.Mol.Biol.1982;157(1):105-132)、Hoop和Woods(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1981;78(6):3824-3828)以及Janin(Nature.1979;277(5696):491-492)报道的各种氨基酸的疏水性值,其各自的全部内容以引用方式并入本文。疏水性可使用Engleman等人报道的疏水

性标度来测量。

[0096] 表2. 氨基酸疏水性

氨基酸	组	Eisenberg 和 Weiss	Engleman 等人	Kyrie 和 Doolittle	Hoop 和 Woods	Janin
Ile	非极性	0.73	3.1	4.5	-1.8	0.7
Phe	非极性	0.61	3.7	2.8	-2.5	0.5
Val	非极性	0.54	2.6	4.2	-1.5	0.6
Leu	非极性	0.53	2.8	3.8	-1.8	0.5
Trp	非极性	0.37	1.9	-0.9	-3.4	0.3
Met	非极性	0.26	3.4	1.9	-1.3	0.4
Ala	非极性	0.25	1.6	1.8	-0.5	0.3
Gly	非极性	0.16	1.0	-0.4	0.0	0.3
Cys	不带电荷/极性	0.04	2.0	2.5	-1.0	0.9
Tyr	不带电荷/极性	0.02	-0.7	-1.3	-2.3	-0.4
Pro	非极性	-0.07	-0.2	-1.6	0.0	-0.3
Thr	不带电荷/极性	-0.18	1.2	-0.7	-0.4	-0.2
Ser	不带电荷/极性	-0.26	0.6	-0.8	0.3	-0.1
His	带电荷	-0.40	-3.0	-3.2	-0.5	-0.1
Glu	带电荷	-0.62	-8.2	-3.5	3.0	-0.7
Asn	不带电荷/极性	-0.64	-4.8	-3.5	0.2	-0.5
Gln	不带电荷/极性	-0.69	-4.1	-3.5	0.2	-0.7
Asp	带电荷	-0.72	-9.2	-3.5	3.0	-0.6
Lys	带电荷	-1.10	-8.8	-3.9	3.0	-1.8
Arg	带电荷	-1.80	-12.3	-4.5	3.0	-1.4

[0097]

[0098] 可选择芳族或杂芳族基团的大小以改善cCPP的胞质递送效率。尽管不希望受理论束缚,但据信与具有较小疏水氨基酸的其他相同序列相比,氨基酸侧链上的较大芳族或杂芳族基团可改善胞质递送效率。疏水氨基酸的大小可根据疏水氨基酸的分子量、疏水氨基酸的位阻效应、侧链的溶剂可及表面积(SASA)或它们的组合来测量。疏水氨基酸的大小可根据疏水氨基酸的分子量来测量,并且较大的疏水氨基酸具有分子量为至少约90g/mol、或至少约130g/mol、或至少约141g/mol的侧链。氨基酸的大小可根据疏水侧链的SASA来测量。疏水氨基酸可具有SASA大于或等于丙氨酸、或大于或等于甘氨酸的侧链。较大的疏水氨基酸可具有SASA大于丙氨酸或大于甘氨酸的侧链。疏水氨基酸可具有SASA大于或等于约哌啶-2-羧酸、大于或等于约色氨酸、大于或等于约苯丙氨酸、或大于或等于约萘基丙氨酸的芳族或杂芳族基团。第一疏水氨基酸(AA_{H1})可具有SASA为至少约200 Å²、至少约210 Å²、至少约220 Å²、至少约240 Å²、至少约250 Å²、至少约260 Å²、至少约270 Å²、至少约280 Å²、至少约290 Å²、至少约300 Å²、至少约310 Å²、至少约320 Å²或至少约330 Å²的侧链。第二疏水氨基酸(AA_{H2})可具有SASA为至少约200 Å²、至少约210 Å²、至少约220 Å²、至少约240 Å²、至少约250 Å²、至少约260 Å²、至少约270 Å²、至少约280 Å²、至少约290 Å²、至少约300 Å²、至少约310 Å²、至少约320 Å²或至少约330 Å²的侧链。AA_{H1}和AA_{H2}的侧链可具有至少约350 Å²、至少约360 Å²、至少约370 Å²、至少约380 Å²、至少约390 Å²、至少约400 Å²、至少约410 Å²、至少约420 Å²、至少约430 Å²、至少约440 Å²、至少约450 Å²、至少约460 Å²、至少约470 Å²、至少约480 Å²、至少约490 Å²、大于约500 Å²、至少约510 Å²、至少约520 Å²、至少约530 Å²、至少约540 Å²、至少约550 Å²、至少约560 Å²、至少约570 Å²、至少约580 Å²、至少约590 Å²、至少约600 Å²、至少约610 Å²、至少约620 Å²、至少约630 Å²、至少约640 Å²、大于约650 Å²、至少约660 Å²、至少约670 Å²、至少约680 Å²、至少约690 Å²或至少约700 Å²的组合SASA。AA_{H2}可以是疏水氨基酸残

基,其侧链的SASA小于或等于AA_{Hi}的疏水侧链的SASA。以举例的方式而非限制,与具有Phe-Arg基序的其他方面相同的cCPP相比,具有Nal-Arg基序的cCPP可表现出改善的胞质递送效率;与具有Nal-Phe-Arg基序的其他方面相同的cCPP相比,具有Phe-Nal-Arg基序的cCPP可表现出改善的胞质递送效率;并且与具有nal-Phe-Arg基序的其他方面相同的cCPP相比,phe-Nal-Arg基序可表现出改善的胞质递送效率。

[0099] 如本文所用,“疏水表面积”或“SASA”是指氨基酸侧链的溶剂可及的表面积(报告为平方埃;Å²)。SASA可使用由Shrake&Rupley(J Mol Biol.79(2):351-71)开发的‘滚球’算法来计算,其全文以引用方式并入本文用于所有目的。这种算法使用特定半径的溶剂“球体”来探测分子表面。球体的典型值是1.4 Å,其近似于水分子的半径。

[0100] 某些侧链的SASA值示于下表3中。本文所述的SASA值基于下表3中列出的理论值,如Tien等人(PLOS ONE 8(11):e80635.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080635)所报道的,其全文以引用方式并入本文用于所有目的。

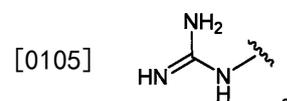
[0101] 表3.氨基酸SASA值

[0102]

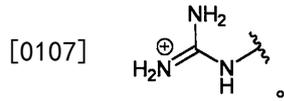
残基	理论值	经验值	Miller等人(1987)	Rose等人(1985)
丙氨酸	129.0	121.0	113.0	118.1
精氨酸	274.0	265.0	241.0	256.0
天冬酰胺	195.0	187.0	158.0	165.5
天冬氨酸	193.0	187.0	151.0	158.7
半胱氨酸	167.0	148.0	140.0	146.1
谷氨酸	223.0	214.0	183.0	186.2
谷氨酰胺	225.0	214.0	189.0	193.2
甘氨酸	104.0	97.0	85.0	88.1
组氨酸	224.0	216.0	194.0	202.5
异亮氨酸	197.0	195.0	182.0	181.0
亮氨酸	201.0	191.0	180.0	193.1
赖氨酸	236.0	230.0	211.0	225.8
甲硫氨酸	224.0	203.0	204.0	203.4
苯丙氨酸	240.0	228.0	218.0	222.8
脯氨酸	159.0	154.0	143.0	146.8
丝氨酸	155.0	143.0	122.0	129.8
苏氨酸	172.0	163.0	146.0	152.5
色氨酸	285.0	264.0	259.0	266.3
酪氨酸	263.0	255.0	229.0	236.8
缬氨酸	174.0	165.0	160.0	164.5

[0103] 具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基

[0104] 如本文所用,胍是指以下结构:



[0106] 如本文所用,质子化形式的胍是指以下结构:

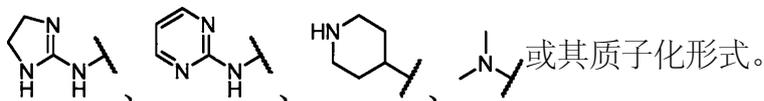


[0108] 胍置换基团是指氨基酸侧链上的官能团,其在生理pH或高于生理pH时将带正电荷,或者可再现胍鎓(guanidinium)基团的氢键给予和接受活性。

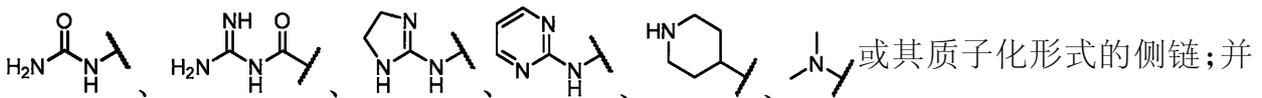
[0109] 胍置换基团促进细胞渗透和治疗剂的递送,同时降低与胍基或其质子化形式相关的毒性。cCPP可包含至少一个具有包含胍或胍鎓置换基团的侧链的氨基酸。cCPP可包含至少两个具有包含胍或胍鎓置换基团的侧链的氨基酸。cCPP可包含至少三个具有包含胍或胍鎓置换基团的侧链的氨基酸

[0110] 胍或胍鎓基团可以是胍或胍鎓的电子等排体。胍或胍鎓置换基团的碱性可低于胍。

[0111] 如本文所用,胍置换基团是指 、、

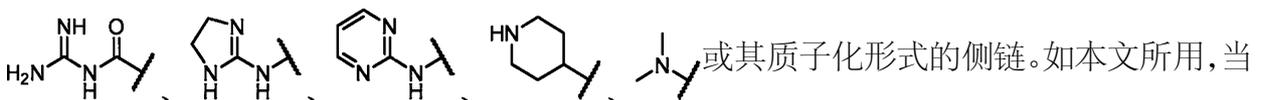


[0112] 本公开涉及包含4至20个氨基酸残基的cCPP,其中:(i)至少一个氨基酸具有包含胍基或其质子化形式的侧链;(ii)至少一个氨基酸残基不具有侧链或具有包含



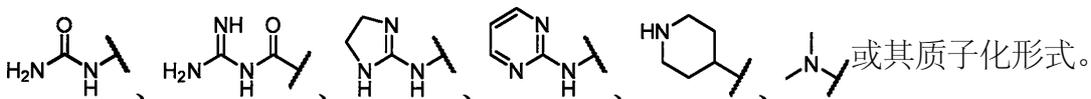
(iii)至少两个氨基酸残基独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链。

[0113] 至少两个氨基酸残基可不具有侧链或具有包含 、

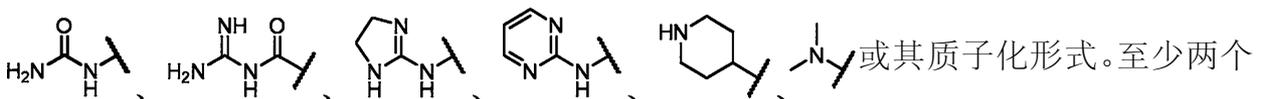


不存在侧链时,氨基酸残基在连接胺和羧酸的碳原子上具有两个氢原子(例如,-CH₂-)。

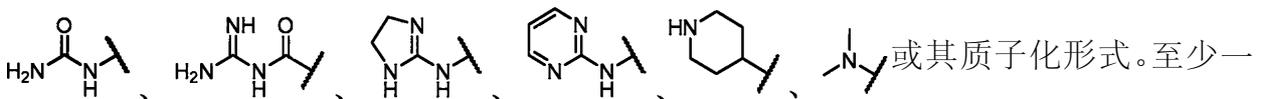
[0114] cCPP可包含至少一个具有包含以下部分之一的侧链的氨基酸:



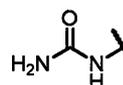
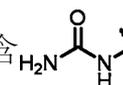
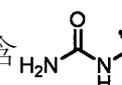
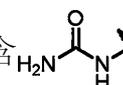
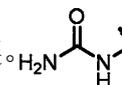
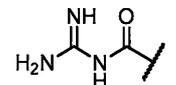
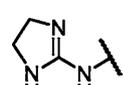
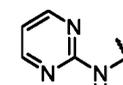
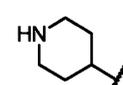
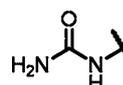
[0115] cCPP可包含至少两个氨基酸,每个氨基酸独立地具有以下部分之一:



氨基酸可具有包含选自以下的相同部分的侧链:



氨基酸可具有包含 或其质子化形式的侧链。至少两个氨基酸可具有包含

或其质子化形式的侧链。一个、两个、三个或四个氨基酸可具有包含或其质子化形式的侧链。一个氨基酸可具有包含或其质子化形式的侧链。两个氨基酸可具有包含或其质子化形式的侧链。、、、、或其质子化形式可附接到氨基酸侧链的末端。可附接到氨基酸侧链的末端。

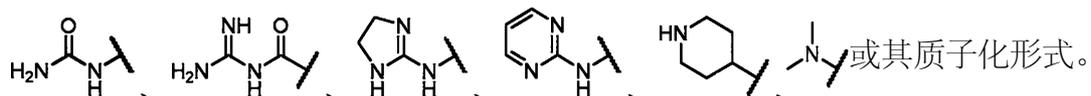
[0116] cCPP可包含 (iii) 2、3、4、5或6个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 2个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 3个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 4个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 5个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 6个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 2、3、4或5个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 2、3或4个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 2或3个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 至少一个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 两个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 三个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。

[0117] 氨基酸残基可独立地具有包含不邻接的胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链。两个氨基酸残基可独立地具有包含可以是邻接的胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链。三个氨基酸残基可独立地具有包含可以是邻接的胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链。四个氨基酸残基可独立地具有包含可以是邻接的胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链。邻接的氨基酸残基可具有相同的立体化学。邻接的氨基酸可具有交替的立体化学。

[0118] 独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基可以是L-氨基酸。独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基可以是D-氨基酸。独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基可以是L-氨基酸或D-氨基酸的混合物。

[0119] 每个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸残基可独立地是精氨酸、高精氨酸、2-氨基-3-丙酸、2-氨基-4-胍基丁酸或其质子化形式的残基。每个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸残基可独立地是精氨酸残基或其质子化形式的残基。

[0120] 每个具有包含胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸可独立地是



[0121] 不受理论的束缚,假设胍置换基团相对于精氨酸具有降低的碱度,并且在一些情况下在生理pH下不带电荷(例如, $-N(H)C(O)$),并且能够维持与质膜上的磷脂的双齿氢键相互作用,这被认为促进有效的膜结合和随后的内化。正电荷的去除也被认为降低了cCPP的毒性。

[0122] 本领域技术人员将理解,上述非天然芳族疏水氨基酸的N-末端/或C-末端在掺入本文公开的肽中后形成酰胺键。

[0123] cCPP可包含具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的第一氨基酸和具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的第二氨基酸,其中第一甘氨酸的N-末端与具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的第一氨基酸形成肽键,并且第一甘氨酸的C-末端与具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的第二氨基酸形成肽键。尽管按照惯例,术语“第一氨基酸”通常是指肽序列的N-末端氨基酸,但如本文所用,“第一氨基酸”用于将所指氨基酸与cCPP中的另一氨基酸(例如,“第二氨基酸”)区分开,使得术语“第一氨基酸”可以是或可指位于肽序列的N-末端的氨基酸。

[0124] cCPP可包含:第二甘氨酸的N-末端与具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸形成肽键,并且第二甘氨酸的C-末端与具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸形成肽键。

[0125] cCPP可包含具有包含胍基或其质子化形式的侧链的第一氨基酸,和具有包含胍基或其质子化形式的侧链的第二氨基酸,其中第三甘氨酸的N-末端与具有包含胍基或其质子化形式的侧链的第一氨基酸形成肽键,并且第三甘氨酸的C-末端与具有包含胍基或其质子化形式的侧链的第二氨基酸形成肽键。

[0126] cCPP可包含天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或高谷氨酰胺的残基。cCPP可包含天冬酰胺的残基。cCPP可包含谷氨酰胺的残基。

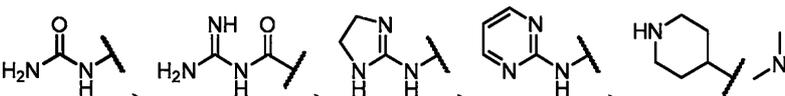
[0127] cCPP可包含酪氨酸、苯丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、色氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、4-苯基苯丙氨酸、3,4-二氟苯丙氨酸、4-三氟甲基苯丙氨酸、2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸、高苯丙氨酸、 β -高苯丙氨酸、4-叔丁基-苯丙氨酸、4-吡啶基丙氨酸、3-吡啶基丙氨酸、4-甲基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、3-(9-蒎基)-丙氨酸的残基。

[0128] 尽管不希望受理论束缚,但据信cCPP中氨基酸的手性可影响胞质摄取效率。cCPP可包含至少一个D氨基酸。cCPP可包含一至十五个D氨基酸。cCPP可包含一至十个D氨基酸。cCPP可包含1、2、3或4个D氨基酸。cCPP可包含具有交替的D和L手性的2、3、4、5、6、7或8个邻接的氨基酸。cCPP可包含具有相同手性的三个邻接的氨基酸。cCPP可包含具有相同手性的两个邻接的氨基酸。至少两个氨基酸可具有相反的手性。具有相反手性的至少两个氨基酸可彼此相邻。至少三个氨基酸可相对于彼此具有交替的立体化学。相对于彼此具有交替手性的至少三个氨基酸可彼此相邻。至少四个氨基酸相对于彼此具有交替的立体化学。相对于彼此具有交替手性的至少四个氨基酸可彼此相邻。至少两个氨基酸可具有相同的手性。具有相同手性的至少两个氨基酸可彼此相邻。至少两个氨基酸具有相同的手性并且至少两个氨基酸具有相反的手性。具有相反手性的至少两个氨基酸可与具有相同手性的至少两个氨基酸相邻。因此,cCPP中的相邻氨基酸可具有以下序列中的任一种:D-L;L-D;D-L-L-D;L-D-D-L;L-D-L-L-D;D-L-D-D-L;D-L-L-D-L;或L-D-D-L-D。形成cCPP的氨基酸残基都可以是

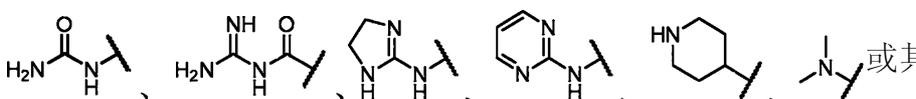
L-氨基酸。形成cCPP的氨基酸残基都可以是D-氨基酸。

[0129] 至少两个氨基酸可具有不同的手性。具有不同手性的至少两个氨基酸可彼此相邻。至少三个氨基酸可相对于相邻氨基酸具有不同的手性。至少四个氨基酸可相对于相邻氨基酸具有不同的手性。至少两个氨基酸具有相同的手性并且至少两个氨基酸具有不同的手性。形成cCPP的一个或多个氨基酸残基可以是非手性的。cCPP可包含3、4或5个氨基酸的基序,其中具有相同手性的两个氨基酸可被非手性氨基酸分开。cCPP可包含以下序列:D-X-D;D-X-D-X;D-X-D-X-D;L-X-L;L-X-L-X;或L-X-L-X-L,其中X是非手性氨基酸。非手性氨基酸可以是甘氨酸。

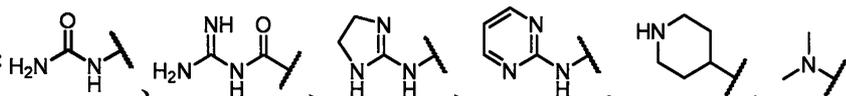
[0130] 具有包含以下的侧链的氨基酸:

[0131]  或其质子化形式,可

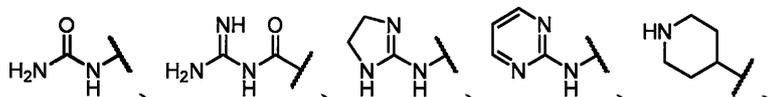
与具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸相邻。具有包含以下的侧链的氨基酸:

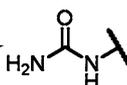
 或其质子化形式,可与至少

一个具有包含胍或其质子化形式的侧链的氨基酸相邻。具有包含胍或其质子化形式的侧链的氨基酸可与具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸相邻。两个具有包含以下的侧链

的氨基酸: 或其质子化形式,

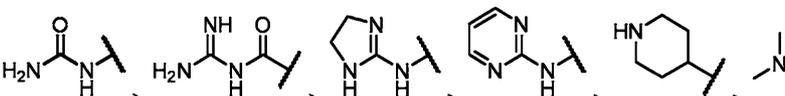
可彼此相邻。两个具有包含胍或其质子化形式的侧链的氨基酸彼此相邻。cCPP可包含至少两个具有可包含芳族或杂芳族基团的侧链的邻接氨基酸,和至少两个具有包含以下的侧链

的不相邻氨基酸: 或其质子

化形式。cCPP可包含至少两个具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的邻接氨基酸和至少两个具有包含  或其质子化形式的侧链的不相邻氨基酸。相邻氨基酸可具有相同的手

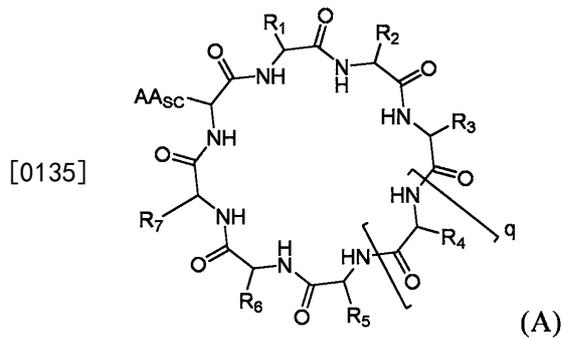
性。相邻氨基酸可具有相反的手性。氨基酸的其他组合可具有D和L氨基酸的任何排列,例如,在前述段落中描述的任何序列。

[0132] 至少两个具有包含以下的侧链的氨基酸:

[0133]  或其质子化形式,与

至少两个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸交替。

[0134] cCPP可包含式(A)的结构:



[0136] 或其质子化形式,

[0137] 其中:

[0138] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0139] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0140] R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 独立地是H或氨基酸侧链;

[0141] R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 中的至少一者是3-胍基-2-氨基丙酸、4-胍基-2-氨基丁酸、精氨酸、高精氨酸、N-甲基精氨酸、N,N-二甲基精氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、赖氨酸、N-甲基赖氨酸、N,N-二甲基赖氨酸、N-乙基赖氨酸、N,N,N-三甲基赖氨酸、4-胍基苯丙氨酸、瓜氨酸、N,N-二甲基赖氨酸、 β -高精氨酸、3-(1-哌啶基)丙氨酸的侧链;

[0142] AA_{sc} 是氨基酸侧链;并且

[0143] q 是1、2、3或4。

[0144] 在实施方案中, R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 中的至少一者独立地是氨基酸的不带电荷的非芳族侧链。在实施方案中, R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 中的至少一者独立地是H或瓜氨酸的侧链。

[0145] 在实施方案中,提供了包含具有6至12个氨基酸的环肽的化合物,其中环肽的至少两个氨基酸是带电荷的氨基酸,环肽的至少两个氨基酸是芳族疏水氨基酸,并且环肽的至少两个氨基酸是不带电荷的非芳族氨基酸。在实施方案中,环肽的至少两个带电荷的氨基酸是精氨酸。在实施方案中,环肽的至少两个芳族疏水氨基酸是苯丙氨酸、萘丙氨酸(3-萘-2-基-丙氨酸)或它们的组合。在实施方案中,环肽的至少两个不带电荷的非芳族氨基酸是瓜氨酸、甘氨酸或它们的组合。在实施方案中,化合物是具有6至12个氨基酸的环肽,其中环肽的两个氨基酸是精氨酸,至少两个氨基酸是选自苯丙氨酸、萘丙氨酸和它们的组合的芳族疏水氨基酸,并且至少两个氨基酸是选自瓜氨酸、甘氨酸及它们的组合的不带电荷的非芳族氨基酸。

[0146] 在实施方案中,式(A)的环肽不是具有以下序列的环肽:

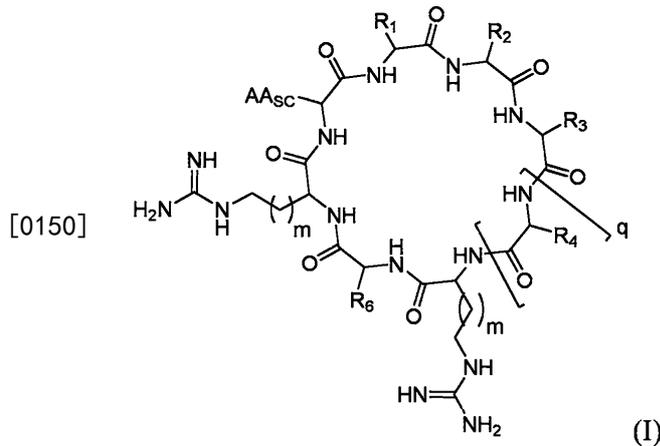
CPP 序列		
F Φ RRRQ	RRFR Φ RQ	F Φ RRRRQK
F Φ RRRC	FRRRR Φ Q	F Φ RRRRQC
F Φ RRRU	rRFR Φ RQ	f Φ RrRrRQ
RRR Φ FQ	RR Φ FRRQ	F Φ RRRRRQ
RRRR Φ F	CRRRRFWQ	RRRR Φ FD Ω C
F Φ RRRR	Ff Φ RrRrQ	F Φ RRR
F Φ rRrRq	FF Φ RRRRQ	FWRRR
F Φ rRrRQ	RFRFR Φ RQ	RRR Φ F
F Φ RRRRQ	URRRRFWQ	RRRWF
f Φ RrRrQ	CRRRRFWQ	

[0147]

[0148] 其中F是L-苯丙氨酸,f是D-苯丙氨酸, Φ 是L-3-(2-萘基)-丙氨酸, Φ 是D-3-(2-萘

基)-丙氨酸,R是L-精氨酸,r是D-精氨酸,Q是L-谷氨酰胺,q是D-谷氨酰胺,C是L-半胱氨酸,U是L-硒代半胱氨酸,W是L-色氨酸,K是L-赖氨酸,D是L-天冬氨酸,并且 Ω 是L-正亮氨酸。

[0149] cCPP可包含式(I)的结构:



[0151] 或其质子化形式,

[0152] 其中:

[0153] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

[0154] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0155] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

[0156] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

[0157] q是1、2、3或4;并且

[0158] 每个m独立地是整数0、1、2或3。

[0159] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H、-亚烷基-芳基或-亚烷基-杂芳基。 R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H、- C_{1-3} 亚烷基-芳基或- C_{1-3} 亚烷基-杂芳基。 R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或-亚烷基-芳基。 R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或- C_{1-3} 亚烷基-芳基。 C_{1-3} 亚烷基可以是亚甲基。芳基可以是6至14元芳基。杂芳基可以是具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。芳基可选自苯基、萘基或蒽基。芳基可以是苯基或萘基。芳基可以是苯基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基和异喹啉基。 R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H、- C_{1-3} 亚烷基-Ph或- C_{1-3} 亚烷基-萘基。 R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H、- CH_2 Ph或- CH_2 萘基。 R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或- CH_2 Ph。

[0160] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是酪氨酸、苯丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、色氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、4-苯基苯丙氨酸、3,4-二氟苯丙氨酸、4-三氟甲基苯丙氨酸、2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸、高苯丙氨酸、 β -高苯丙氨酸、4-叔丁基-苯丙氨酸、4-吡啶基丙氨酸、3-吡啶基丙氨酸、4-甲基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、3-(9-蒽基)-丙氨酸的侧链。

[0161] R_1 可以是酪氨酸的侧链。 R_1 可以是苯丙氨酸的侧链。 R_1 可以是1-萘基丙氨酸的侧链。 R_1 可以是2-萘基丙氨酸的侧链。 R_1 可以是色氨酸的侧链。 R_1 可以是3-苯并噻吩基丙氨酸的侧链。 R_1 可以是4-苯基苯丙氨酸的侧链。 R_1 可以是3,4-二氟苯丙氨酸的侧链。 R_1 可以是4-三氟甲基苯丙氨酸的侧链。 R_1 可以是2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸的侧链。 R_1 可以是高苯丙氨酸的侧链。 R_1 可以是 β -高苯丙氨酸的侧链。 R_1 可以是4-叔丁基-苯丙氨酸的侧链。 R_1 可以是4-吡啶基丙氨酸的侧链。 R_1 可以是3-吡啶基丙氨酸的侧链。 R_1 可以是4-甲基苯丙氨酸的侧链。 R_1

可以是4-氟苯丙氨酸的侧链。 R_1 可以是4-氯苯丙氨酸的侧链。 R_1 可以是3-(9-蒎基)-丙氨酸的侧链。

[0162] R_2 可以是酪氨酸的侧链。 R_2 可以是苯丙氨酸的侧链。 R_2 可以是1-萘基丙氨酸的侧链。 R_1 可以是2-萘基丙氨酸的侧链。 R_2 可以是色氨酸的侧链。 R_2 可以是3-苯并噁吩基丙氨酸的侧链。 R_2 可以是4-苯基苯丙氨酸的侧链。 R_2 可以是3,4-二氟苯丙氨酸的侧链。 R_2 可以是4-三氟甲基苯丙氨酸的侧链。 R_2 可以是2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸的侧链。 R_2 可以是高苯丙氨酸的侧链。 R_2 可以是 β -高苯丙氨酸的侧链。 R_2 可以是4-叔丁基-苯丙氨酸的侧链。 R_2 可以是4-吡啶基丙氨酸的侧链。 R_2 可以是3-吡啶基丙氨酸的侧链。 R_2 可以是4-甲基苯丙氨酸的侧链。 R_2 可以是4-氟苯丙氨酸的侧链。 R_2 可以是4-氯苯丙氨酸的侧链。 R_2 可以是3-(9-蒎基)-丙氨酸的侧链。

[0163] R_3 可以是酪氨酸的侧链。 R_3 可以是苯丙氨酸的侧链。 R_3 可以是1-萘基丙氨酸的侧链。 R_3 可以是2-萘基丙氨酸的侧链。 R_3 可以是色氨酸的侧链。 R_3 可以是3-苯并噁吩基丙氨酸的侧链。 R_3 可以是4-苯基苯丙氨酸的侧链。 R_3 可以是3,4-二氟苯丙氨酸的侧链。 R_3 可以是4-三氟甲基苯丙氨酸的侧链。 R_3 可以是2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸的侧链。 R_3 可以是高苯丙氨酸的侧链。 R_3 可以是 β -高苯丙氨酸的侧链。 R_3 可以是4-叔丁基-苯丙氨酸的侧链。 R_3 可以是4-吡啶基丙氨酸的侧链。 R_3 可以是3-吡啶基丙氨酸的侧链。 R_3 可以是4-甲基苯丙氨酸的侧链。 R_3 可以是4-氟苯丙氨酸的侧链。 R_3 可以是4-氯苯丙氨酸的侧链。 R_3 可以是3-(9-蒎基)-丙氨酸的侧链。

[0164] R_4 可以是H、-亚烷基-芳基、-亚烷基-杂芳基。 R_4 可以是H、- C_{1-3} 亚烷基-芳基或- C_{1-3} 亚烷基-杂芳基。 R_4 可以是H或-亚烷基-芳基。 R_4 可以是H或- C_{1-3} 亚烷基-芳基。 C_{1-3} 亚烷基可以是亚甲基。芳基可以是6至14元芳基。杂芳基可以是具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。芳基可选自苯基、萘基或蒎基。芳基可以是苯基或萘基。芳基可以是苯基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基和异喹啉基。 R_4 可以是H、- C_{1-3} 亚烷基-Ph或- C_{1-3} 亚烷基-萘基。 R_4 可以是H或表1或表3中氨基酸的侧链。 R_4 可以是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。 R_4 可以是H、- CH_2 Ph或- CH_2 萘基。 R_4 可以是H或- CH_2 Ph。

[0165] R_5 可以是H、-亚烷基-芳基、-亚烷基-杂芳基。 R_5 可以是H、- C_{1-3} 亚烷基-芳基或- C_{1-3} 亚烷基-杂芳基。 R_5 可以是H或-亚烷基-芳基。 R_5 可以是H或- C_{1-3} 亚烷基-芳基。 C_{1-3} 亚烷基可以是亚甲基。芳基可以是6至14元芳基。杂芳基可以是具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。芳基可选自苯基、萘基或蒎基。芳基可以是苯基或萘基。芳基可以是苯基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基和异喹啉基。 R_5 可以是H、- C_{1-3} 亚烷基-Ph或- C_{1-3} 亚烷基-萘基。 R_5 可以是H或表1或表3中氨基酸的侧链。 R_4 可以是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。 R_5 可以是H、- CH_2 Ph或- CH_2 萘基。 R_4 可以是H或- CH_2 Ph。

[0166] R_6 可以是H、-亚烷基-芳基、-亚烷基-杂芳基。 R_6 可以是H、- C_{1-3} 亚烷基-芳基或- C_{1-3} 亚烷基-杂芳基。 R_6 可以是H或-亚烷基-芳基。 R_6 可以是H或- C_{1-3} 亚烷基-芳基。 C_{1-3} 亚烷基可以是亚甲基。芳基可以是6至14元芳基。杂芳基可以是具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。芳基可选自苯基、萘基或蒎基。芳基可以是苯基或萘基。芳基可以是苯基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基和异喹啉基。 R_6 可以是H、- C_{1-3} 亚烷基-Ph或- C_{1-3} 亚烷基-萘基。 R_6 可以是H或表1或表3中氨基酸的侧链。 R_6 可以是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。 R_6 可以是H、- CH_2 Ph或- CH_2 萘基。 R_6 可以是H或- CH_2 Ph。

[0167] R_7 可以是H、-亚烷基-芳基、-亚烷基-杂芳基。 R_7 可以是H、- C_{1-3} 亚烷基-芳基或- C_{1-3} 亚烷基-杂芳基。 R_7 可以是H或-亚烷基-芳基。 R_7 可以是H或- C_{1-3} 亚烷基-芳基。 C_{1-3} 亚烷基可以是亚甲基。芳基可以是6至14元芳基。杂芳基可以是具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。芳基可选自苯基、萘基或蒽基。芳基可以是苯基或萘基。芳基可以是苯基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基和异喹啉基。 R_7 可以是H、- C_{1-3} 亚烷基-Ph或- C_{1-3} 亚烷基-萘基。 R_7 可以是H或表1或表3中氨基酸的侧链。 R_7 可以是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。 R_7 可以是H、- CH_2 Ph或- CH_2 萘基。 R_7 可以是H或- CH_2 Ph。

[0168] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的一者、两者或三者可以是- CH_2 Ph。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的一者可以是- CH_2 Ph。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的两者可以是- CH_2 Ph。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的三者可以是- CH_2 Ph。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是- CH_2 Ph。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中不超过四者可以是- CH_2 Ph。

[0169] R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的一者、两者或三者是- CH_2 Ph。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的一者是- CH_2 Ph。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的两者是- CH_2 Ph。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的三者是- CH_2 Ph。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的至少一者是- CH_2 Ph。

[0170] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的一者、两者或三者可以是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的一者可以是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的两者可以是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的三者可以是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中不超过三者可以是- CH_2 Ph。

[0171] R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的一者、两者或三者是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的一者是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的两者是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的三者是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的至少一者是H。

[0172] R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是3-胍基-2-氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是4-胍基-2-氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N-甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N,N-二甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是2,3-二氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是2,4-二氨基丁酸、赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N-甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N,N-二甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N-乙基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N,N,N-三甲基赖氨酸、4-胍基苯丙氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是瓜氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N,N-二甲基赖氨酸、 β -高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是3-(1-哌啶基)丙氨酸的侧链。

[0173] R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是3-胍基-2-氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是4-胍基-2-氨基丁酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N-甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N,N-二甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是2,3-二氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是2,4-二氨基丁酸、赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N-甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N,N-二甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N-乙基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N,N,N-三甲基赖氨酸、4-胍基苯丙氨酸

的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是瓜氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N,N-二甲基赖氨酸、 β -高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是3-(1-哌啶基)丙氨酸的侧链。

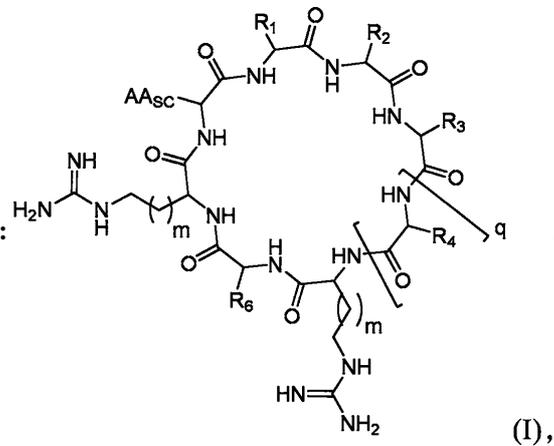
[0174] R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是3-胍基-2-氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是4-胍基-2-氨基丁酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N-甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N,N-二甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是2,3-二氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是2,4-二氨基丁酸、赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N-甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N,N-二甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N-乙基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N,N,N-三甲基赖氨酸、4-胍基苯丙氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是瓜氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N,N-二甲基赖氨酸、 β -高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是3-(1-哌啶基)丙氨酸的侧链。

[0175] AA_{SC} 可以是天冬酰胺、谷氨酰胺或高谷氨酰胺残基的侧链。 AA_{SC} 可以是谷氨酰胺残基的侧链。cCPP还可包含与 AA_{SC} (例如,天冬酰胺、谷氨酰胺或高谷氨酰胺的残基)缀合的接头。因此,cCPP还可包含与天冬酰胺、谷氨酰胺或高谷氨酰胺残基缀合的接头。cCPP还可包含与谷氨酰胺残基缀合的接头。

[0176] q 可以是1、2或3。 q 可以是1或2。 q 可以是1。 q 可以是2。 q 可以是3。 q 可以是4。

[0177] m 可以是1-3。 m 可以是1或2。 m 可以是0, m 可以是1。 m 可以是2。 m 可以是3。

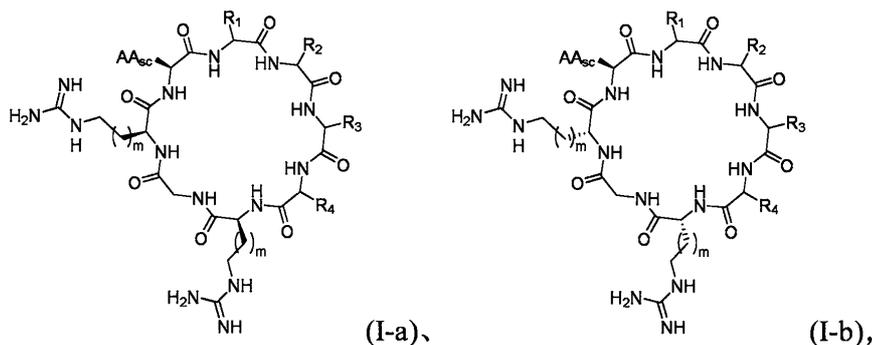
[0178] 式(A)的cCPP可包含式(I)的结构: 或其质



子化形式,其中 AA_{SC} 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_7 、 m 和 q 如本文所定义。

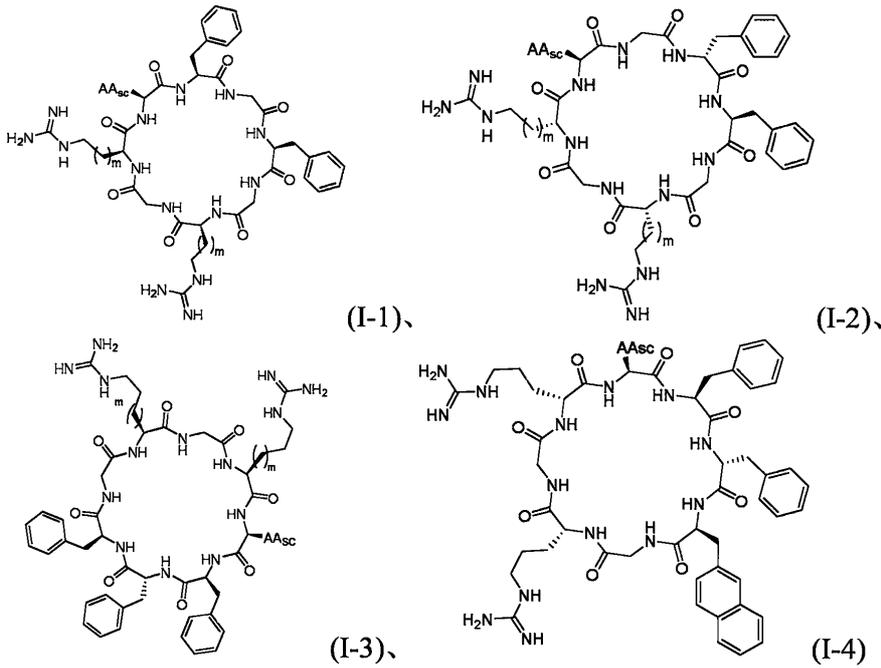
[0179] 式(A)的cCPP可包含式(I-a)或式(I-b)的结构:

[0180]



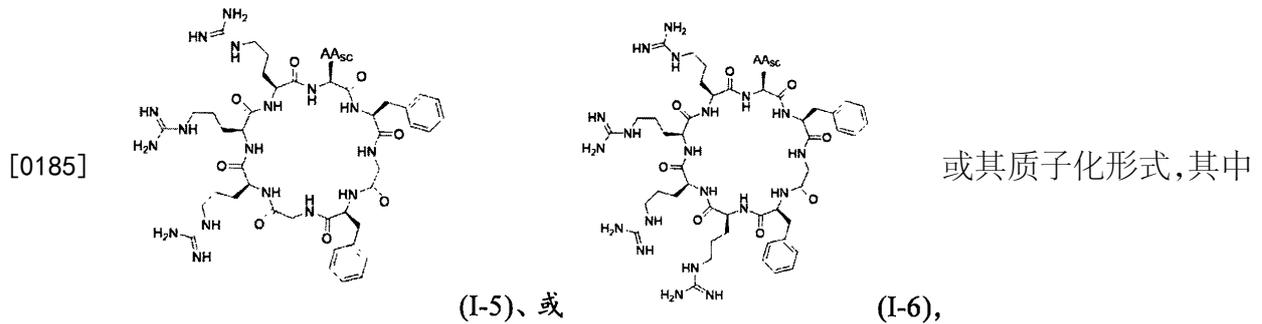
[0181] 或其质子化形式,其中AA_{sc}、R₁、R₂、R₃、R₄和m如本文所定义。

[0182] 式(A)的cCPP可包含式(I-1)、(I-2)、(I-3)或(I-4)的结构:



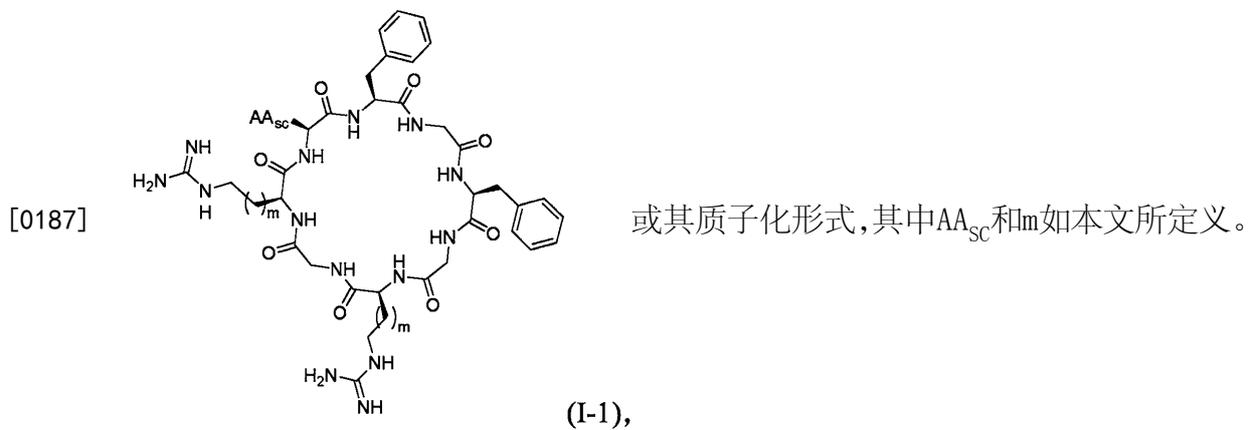
[0183] 或其质子化形式,其中AA_{sc}和m如本文所定义。

[0184] 式(A)的cCPP可包含式(I-5)或(I-6)的结构:

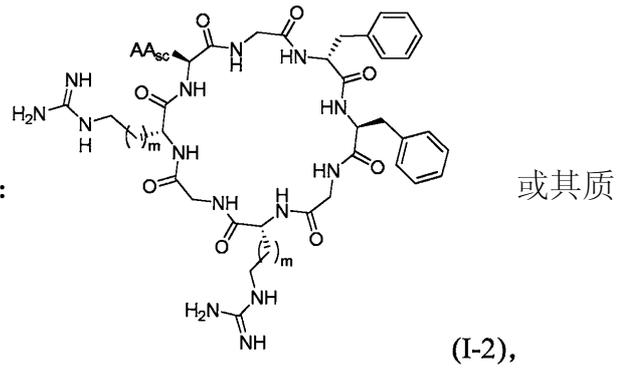


AA_{sc}如本文所定义。

[0186] 式(A)的cCPP可包含式(I-1)的结构:

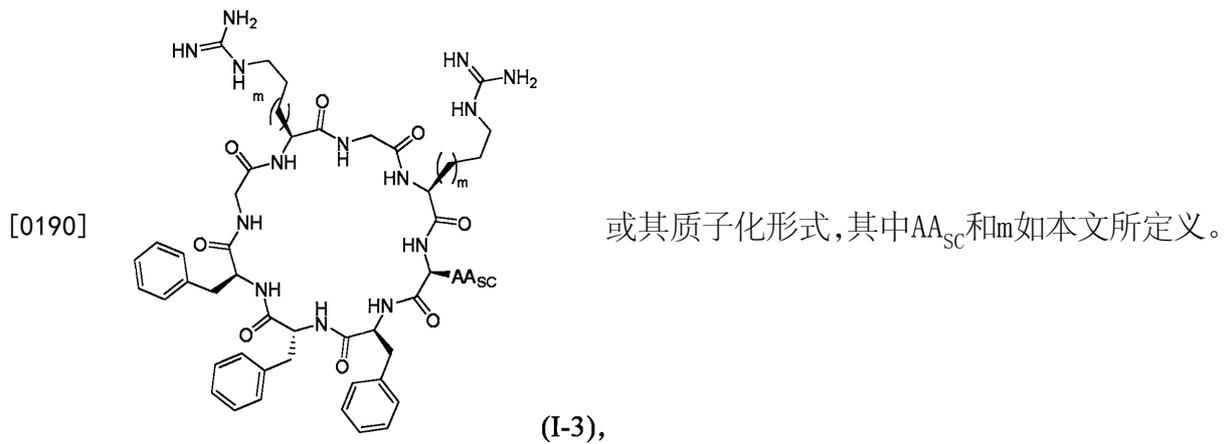


[0188] 式(A)的cCPP可包含式(I-2)的结构:

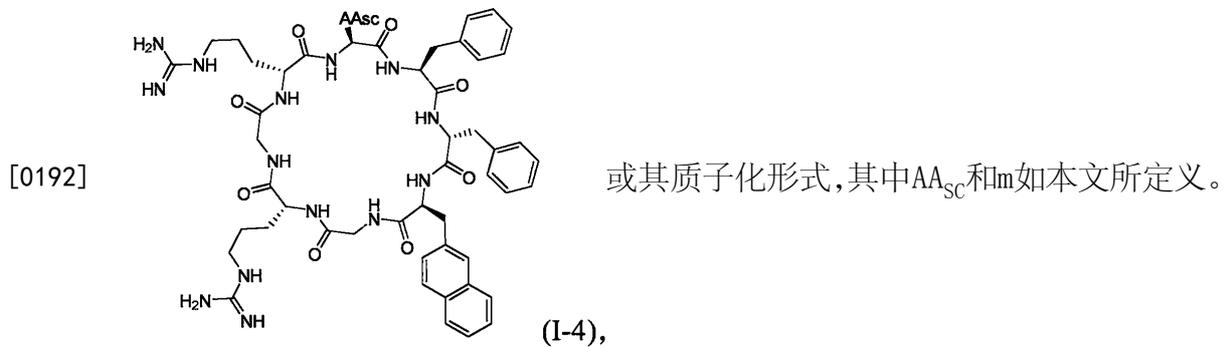


子化形式,其中AA_{sc}和m如本文所定义。

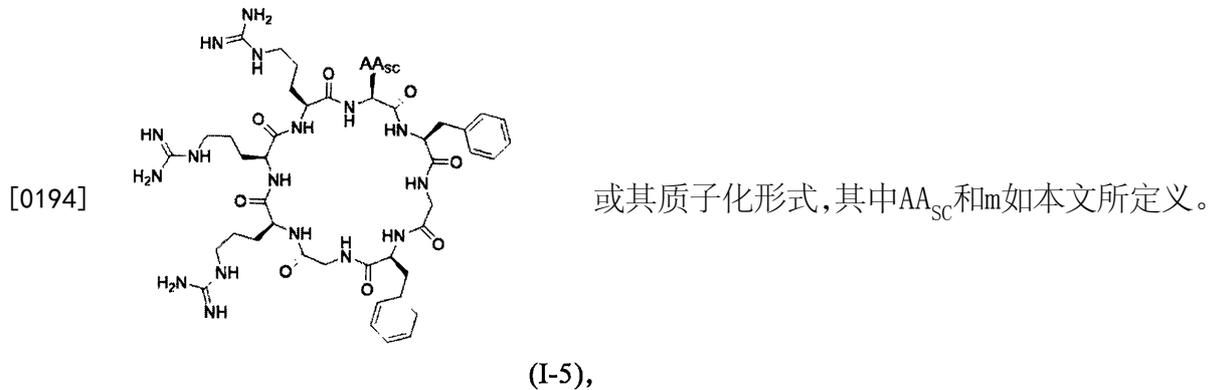
[0189] 式(A)的cCPP可包含式(I-3)的结构:



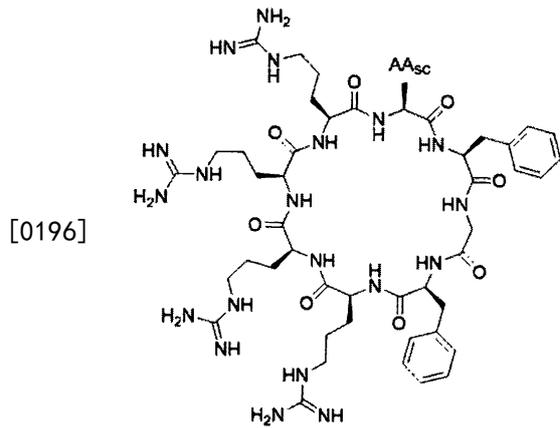
[0191] 式(A)的cCPP可包含式(I-4)的结构:



[0193] 式(A)的cCPP可包含式(I-5)的结构:



[0195] 式(A)的cCPP可包含式(I-6)的结构:



或其质子化形式,其中AA_{sc}和m如本文所定

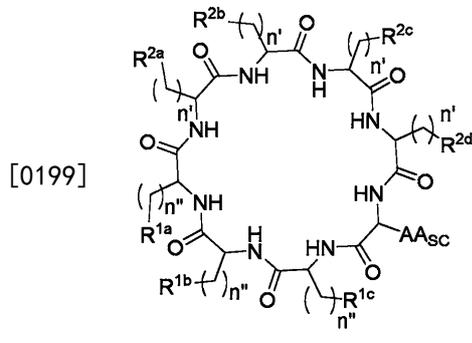
(I-6),

义。

[0197] cCPP可包含以下序列之一:FGFGRGR;GfFGrGr;FfΦGRGR;FfFGRGR;或FfΦGrGr。

cCPP可具有以下序列之一:FGFGRGRQ;GfFGrGrQ;FfΦGRGRQ;FfFGRGRQ;或FfΦGrGrQ。

[0198] 本公开还涉及具有式(II)的结构cCPP:



[0200] 其中:

[0201] AA_{sc}是氨基酸侧链;

[0202] R^{1a}、R^{1b}和R^{1c}各自独立地是6至14元芳基或6至14元杂芳基;

[0203] R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}和R^{2d}独立地是氨基酸侧链;

[0204] R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}和R^{2d}中的至少一者是 、

、、、或其质子化形式;

[0205] R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}和R^{2d}中的至少一者是胍或其质子化形式;

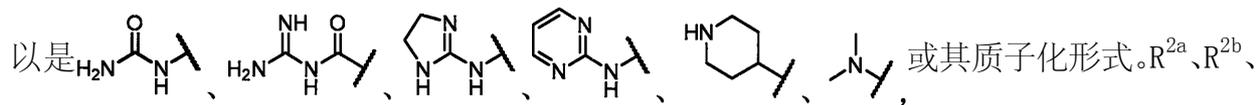
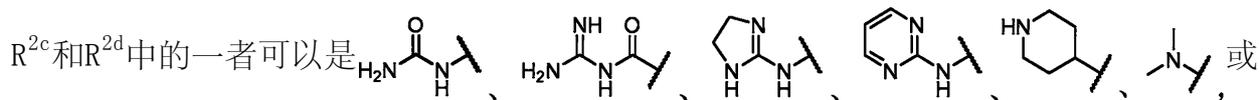
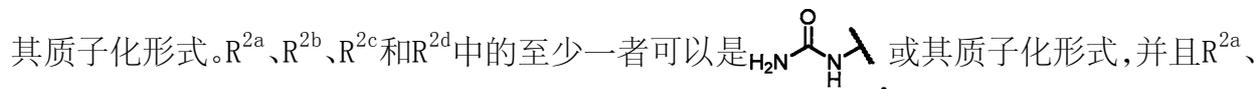
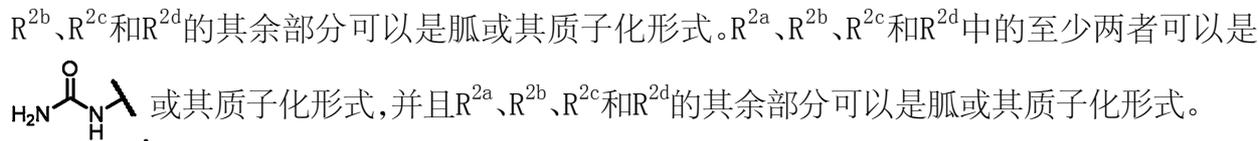
[0206] 每个n^{''}独立地是整数0、1、2、3、4或5;

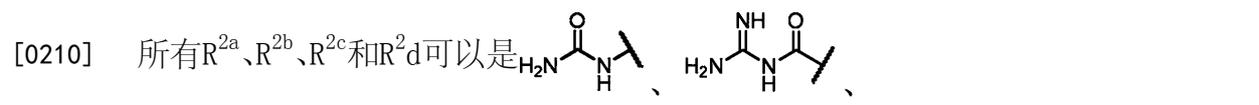
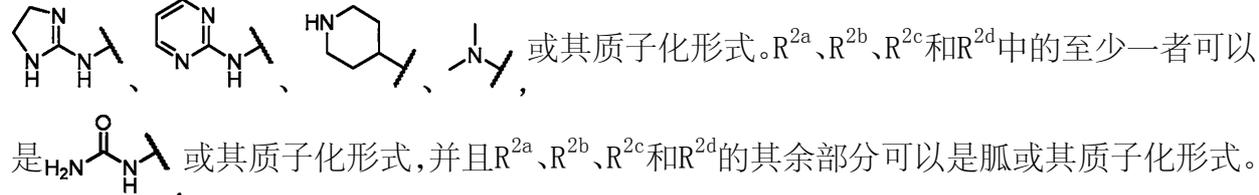
[0207] 每个n[']独立地是0、1、2或3的整数;并且

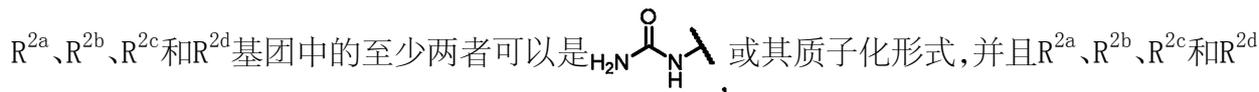
[0208] 如果n[']是0,则R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}或R^{2d}不存在。

[0209] R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}和R^{2d}中的至少两者可以是 、

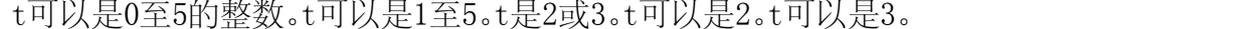
、、、或其质子化形式。R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}和R^{2d}中的两者或三者可

以是  或其质子化形式。 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的一者可以是  或其质子化形式。 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的至少一者可以是  或其质子化形式,并且 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 的其余部分可以是胍或其质子化形式。 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的至少两者可以是  或其质子化形式,并且 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 的其余部分可以是胍或其质子化形式。

[0210] 所有 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 可以是  或其质子化形式。 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的至少一者可以是  或其质子化形式,并且 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 的其余部分可以是胍或其质子化形式。

R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 基团中的至少两者可以是  或其质子化形式,并且 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 的其余部分可以是胍或其质子化形式。

[0211] R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的每一者可独立地是2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、以下酸的侧链:鸟氨酸、赖氨酸、甲基赖氨酸、二甲基赖氨酸、三甲基赖氨酸、高赖氨酸、丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、组氨酸、1-甲基组氨酸、2-氨基丁酸、天冬氨酸、谷氨酸或高谷氨酸。

[0212] AA_{SC} 可以是  其中t可以是0至5的整数。 AA_{SC} 可以是  其中t可以是0至5的整数。t可以是1至5。t是2或3。t可以是2。t可以是3。

[0213] 本文所述的AC可偶联到 AA_{SC} 。在实施方案中,接头(L)将AC偶联到 AA_{SC} 。在实施方案中,接头(L)共价结合到AC的主链。

[0214] AA_{SC} 可以是天冬酰胺、谷氨酰胺或高谷氨酰胺残基的侧链。 AA_{SC} 可以是谷氨酰胺残基的侧链。环肽可包含与 AA_{SC} (例如,天冬酰胺、谷氨酰胺或高谷氨酰胺的残基)缀合的接头。

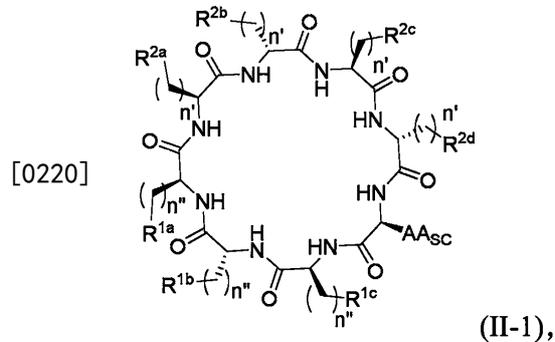
[0215] R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 可各自独立地是6至14元芳基。 R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 可各自独立地是有一个或多个选自N、O或S的杂原子的6至14元杂芳基。 R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 可各自独立地选自苯基、萘基、蒽基、吡啶基、喹啉基或异喹啉基。 R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 可各自独立地选自苯基、萘基或蒽基。 R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 可各自独立地是苯基或萘基。 R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 可以是各自独立选择的吡啶基、喹啉基或异喹啉基。

[0216] 每个 n' 可独立地是1或2。每个 n' 可以是1。每个 n' 可以是2。至少一个 n' 可以是0。至少一个 n' 可以是1。至少一个 n' 可以是2。至少一个 n' 可以是3。至少一个 n' 可以是4。至少一个 n' 可以是5。

[0217] 每个n”可独立地是1至3的整数。每个n”可独立地是2或3。每个n”可以是2。每个n”可以是3。至少一个n”可以是0。至少一个n”可以是1。至少一个n”可以是2。至少一个n”可以是3。

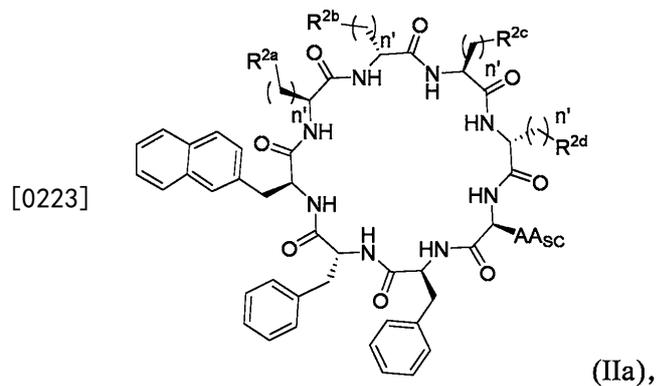
[0218] 每个n”可独立地是1或2,并且每个n’可独立地是2或3。每个n”可以是1并且每个n’可独立地是2或3。每个n”可以是1并且每个n’可以是2。每个n”是1并且每个n’是3。

[0219] 式(II)的cCPP可具有式(II-1)的结构:



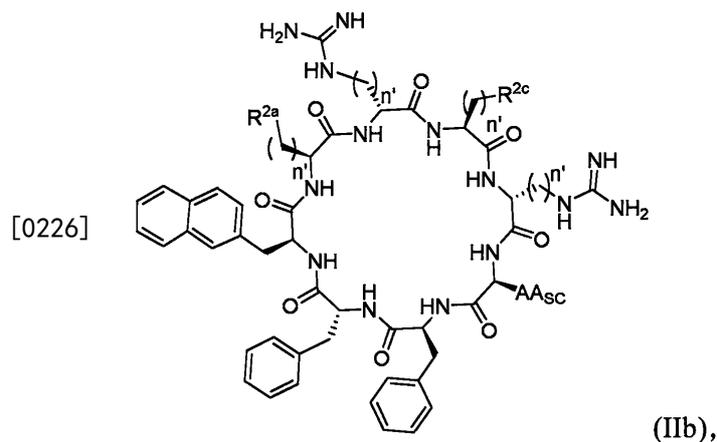
[0221] 其中R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}、R^{2d}、AA_{sc}、n’和n”如本文所定义。

[0222] 式(II)的cCPP可具有式(IIa)的结构:



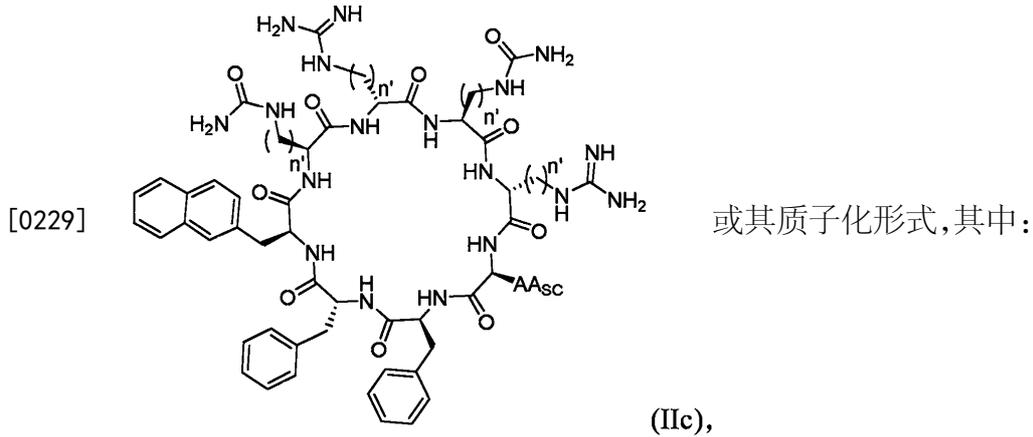
[0224] 其中R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}、R^{2d}、AA_{sc}和n’如本文所定义。

[0225] 式(II)的cCPP可具有式(IIb)的结构:



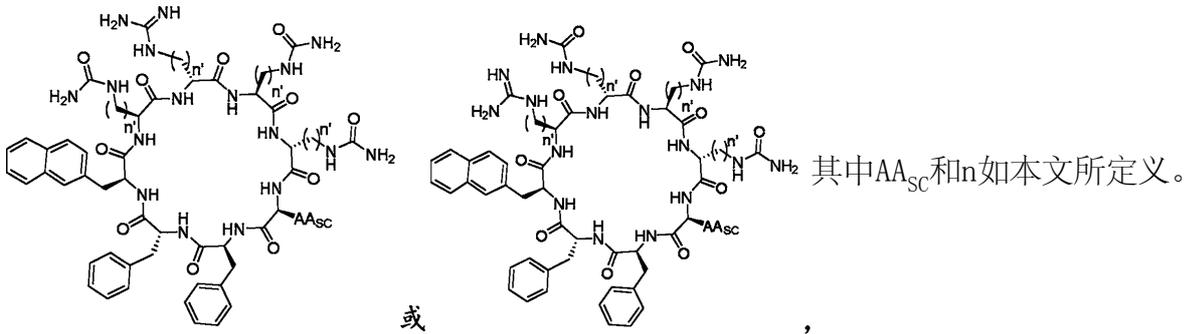
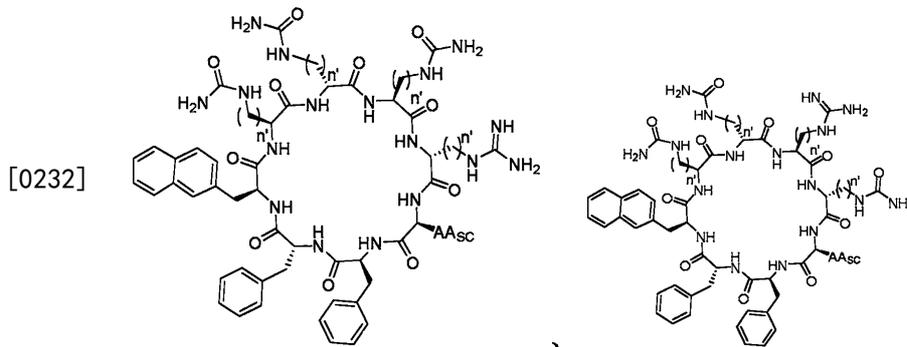
[0227] 其中R^{2a}、R^{2b}、AA_{sc}和n’如本文所定义。

[0228] cCPP可具有式(IIb)的结构:

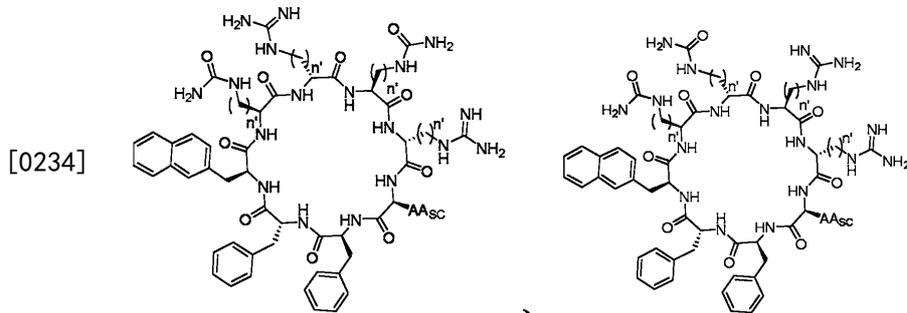


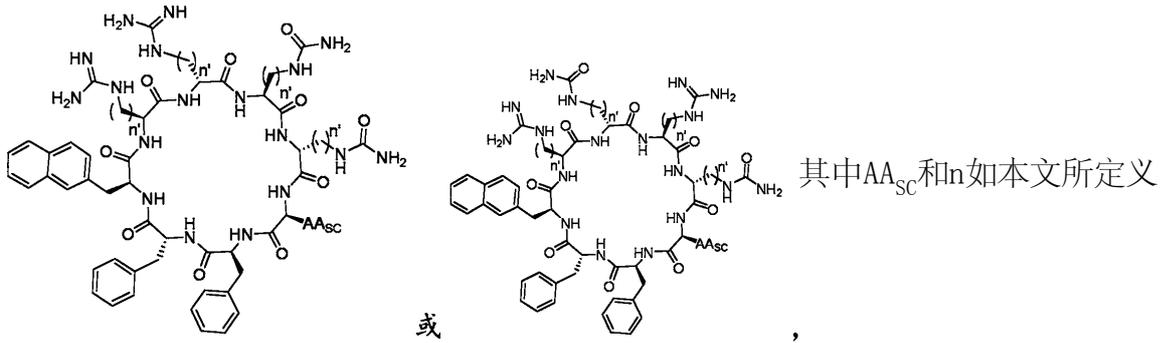
[0230] AA_{Sc}和n' 如本文所定义。

[0231] 式 (IIa) 的cCPP具有以下结构之一:

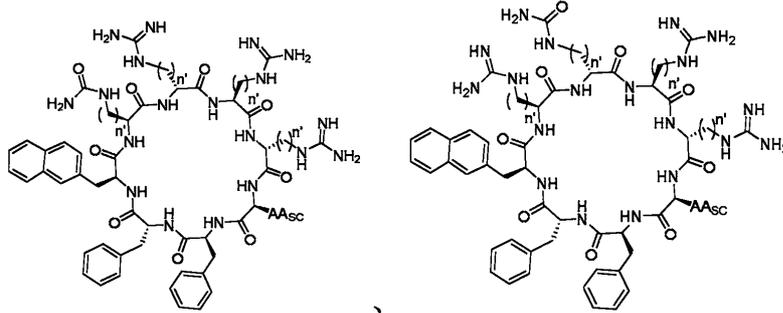


[0233] 式 (IIa) 的cCPP具有以下结构之一:

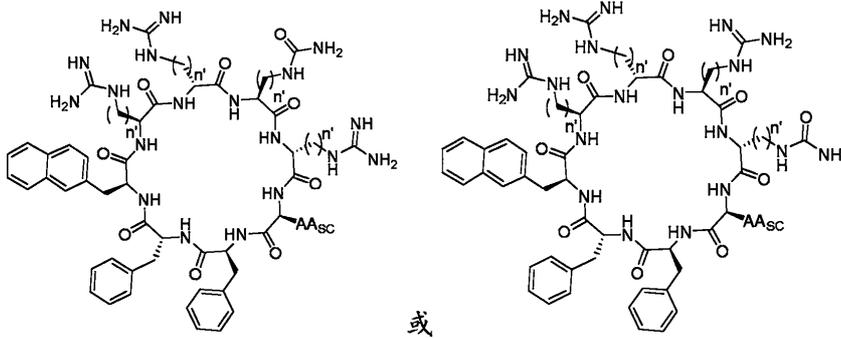




[0235] 式(IIa)的cCPP具有以下结构之一:

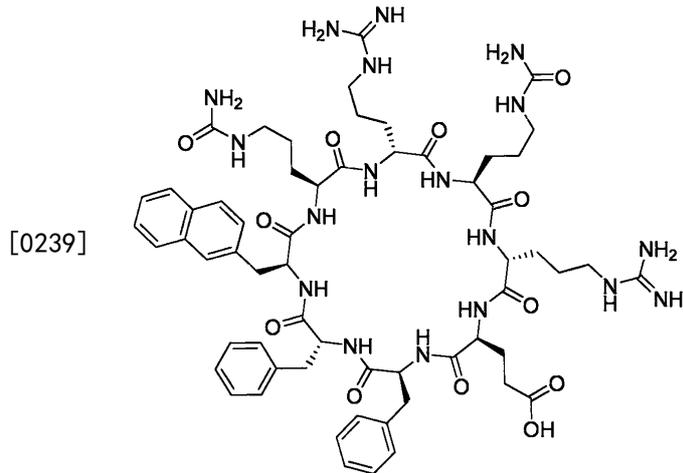


[0236]



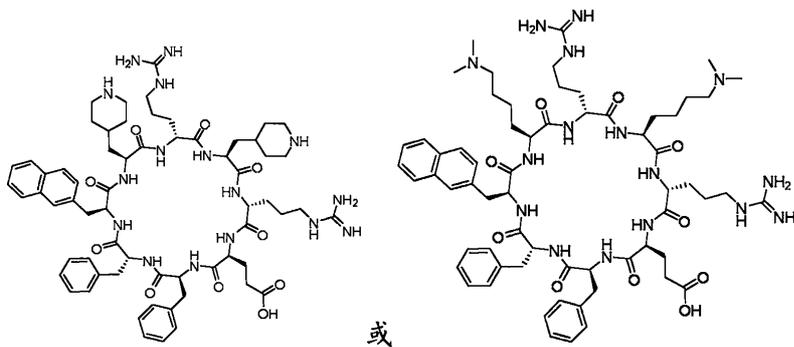
[0237] 其中AA_{Sc}和n如本文所定义。

[0238] 式(II)的cCPP可具有以下结构:

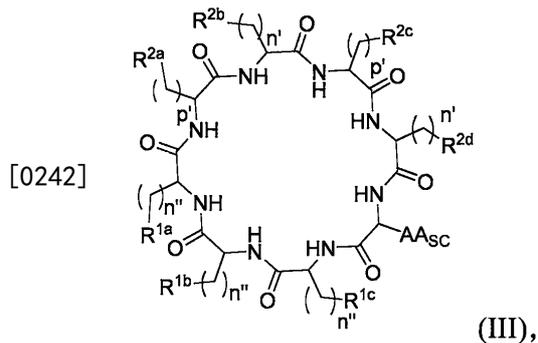


[0239]

[0240] 式(II)的cCPP可具有以下结构:



[0241] cCPP可具有式(III)的结构:



[0243] 其中:

[0244] AA_{SC}是氨基酸侧链;

[0245] R^{1a}、R^{1b}和R^{1c}各自独立地是6至14元芳基或6至14元杂芳基;

[0246] R^{2a}和R^{2c}各自独立地是H、、、、

或其质子化形式;

[0247] R^{2b}和R^{2d}各自独立地是胍或其质子化形式;

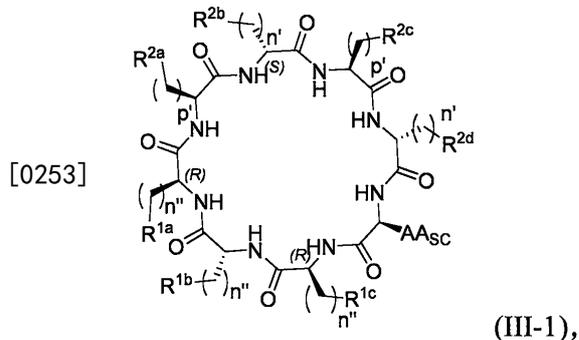
[0248] 每个n''独立地是1至3的整数;

[0249] 每个n'独立地是1至5的整数;并且

[0250] 每个p'独立地是0至5的整数。

[0251] 本文所述的AC可偶联到AA_{SC}。接头可将AC偶联到AA_{SC}。接头可共价结合到AC的主链、AC的5'端或AC的3'端。

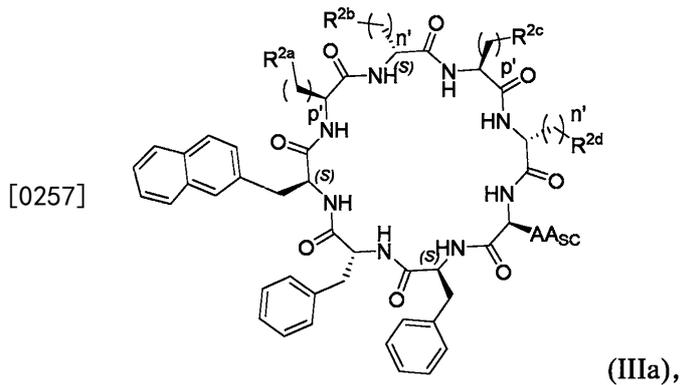
[0252] 式(III)的cCPP可具有式(III-1)的结构:



[0254] 其中:

[0255] AA_{sc} 、 R^{1a} 、 R^{1c} 、 R^{2a} 、 R^{2c} 、 R^{2b} 、 R^{2d} 、 n' 、 n'' 和 p' 如本文所定义。

[0256] 式(III)的cCPP可具有式(IIIa)的结构:



[0258] 其中:

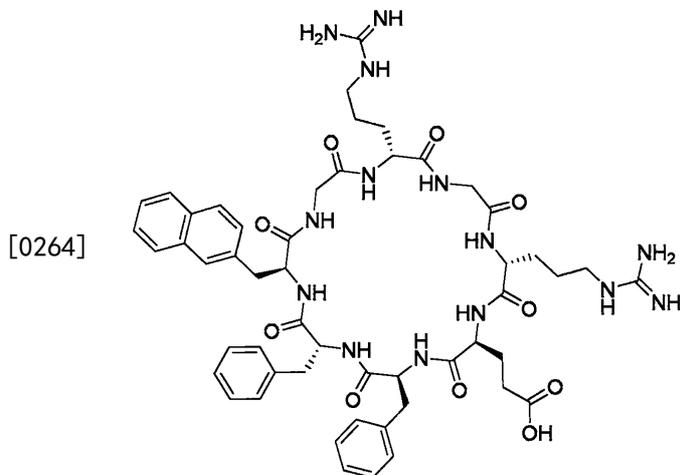
[0259] AA_{sc} 、 R^{2a} 、 R^{2c} 、 R^{2b} 、 R^{2d} 、 n' 、 n'' 和 p' 如本文所定义。

[0260] 在式(III)、(III-1)和(IIIa)中, R^a 和 R^c 可以是H。 R^a 和 R^c 可以是H并且 R^b 和 R^d 可各自独立地是胍或其质子化形式。 R^a 可以是H。 R^b 可以是H。 p' 可以是0。 R^a 和 R^c 可以是H并且每个 p' 可以是0。

[0261] 在式(III)、(III-1)和(IIIa)中, R^a 和 R^c 可以是H, R^b 和 R^d 可各自独立地是胍或其质子化形式, n'' 可以是2或3,并且每个 p' 可以是0。

[0262] p' 可以是0。 p' 可以是1。 p' 可以是2。 p' 可以是3。 p' 可以是4。 p' 可以是5。

[0263] cCPP可具有以下结构:



[0265] 式(A)的cCPP可选自:

[0266]

CPP序列
(Ff Φ RrRrQ)
(Ff Φ Cit-r-Cit-rQ)
(Ff Φ GrGrQ)
(FfFGRRQ)
(FGFRGRQ)
(GfFGRRQ)
(FGFRRRQ)

(FGFRRRRQ)

[0267] 式(A)的cCPP可选自:

[0268]

CPP序列
FΦRRRRQ
fΦRrRrQ
FfΦRrRrQ
FfΦCit-r-Cit-rQ
FfΦGrGrQ
FfΦRGRGQ
FfFGRGRQ
FGFGRGRQ
GfFGrGrQ
FGFRRRRQ
FGFRRRRQ

[0269] 在实施方案中,cCPP选自:

[0270]

CPP序列	CPP序列	CPP序列
FΦRRRQ	RRFRΦRQ	FΦRRRRQK
FΦRRRC	FRRRRΦQ	FΦRRRRQC
FΦRRRU	rRFRΦRQ	fΦRrRrRQ
RRRΦFQ	RRΦFRRQ	FΦRRRRRQ
RRRRΦF	CRRRRFWQ	RRRRΦFDΩC
FΦRRRR	FfΦRrRrQ	FΦRRR
FφrRrRq	FFΦRRRRQ	FWRRR
FφrRrRQ	RFRFRΦRQ	RRRΦF
FΦRRRRQ	URRRRFWQ	RRRWF
fΦRrRrQ	CRRRRFWQ	

[0271] Φ=L-萘基丙氨酸;φ=D-萘基丙氨酸;Ω=L-正亮氨酸

[0272] 在实施方案中,cCPP并不选自:

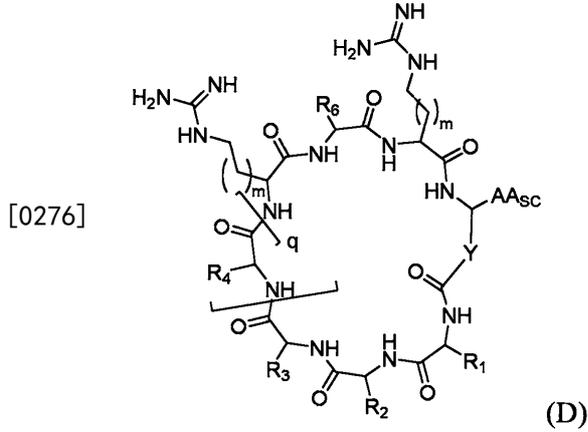
[0273]

CPP序列	CPP序列	CPP序列
FΦRRRQ	RRFRΦRQ	FΦRRRRQK
FΦRRRC	FRRRRΦQ	FΦRRRRQC
FΦRRRU	rRFRΦRQ	fΦRrRrRQ
RRRΦFQ	RRΦFRRQ	FΦRRRRRQ
RRRRΦF	CRRRRFWQ	RRRRΦFDΩC
FΦRRRR	FfΦRrRrQ	FΦRRR
FφrRrRq	FFΦRRRRQ	FWRRR
FφrRrRQ	RFRFRΦRQ	RRRΦF
FΦRRRRQ	URRRRFWQ	RRRWF

$f \Phi RrRrQ$	CRRRRFWQ
----------------	----------

[0274] $\Phi = L$ -萘基丙氨酸; $\Phi = D$ -萘基丙氨酸; $\Omega = L$ -正亮氨酸

[0275] cCPP可包含式 (D) 的结构:



[0277] 或其质子化形式,

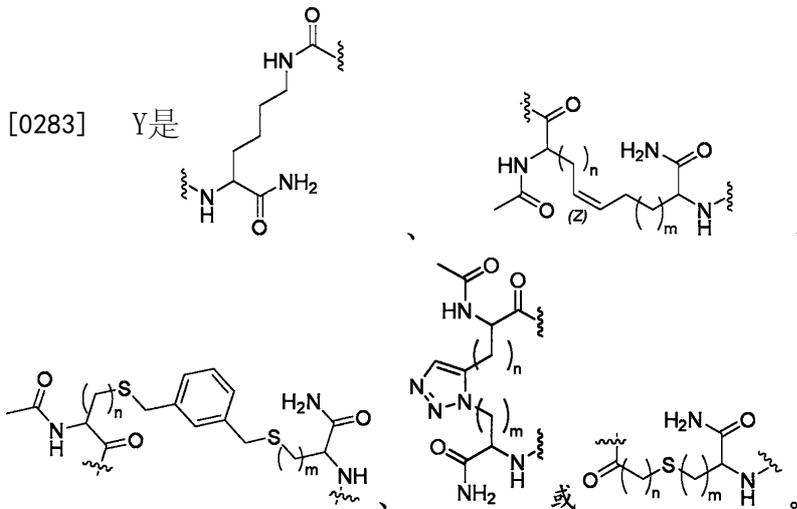
[0278] 其中:

[0279] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

[0280] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0281] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

[0282] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

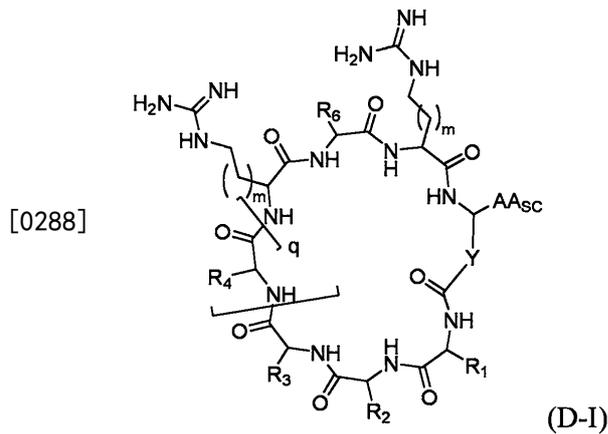


[0284] q是1、2、3或4;

[0285] 每个m独立地是整数0、1、2或3,并且

[0286] 每个n独立地是整数0、1、2或3。

[0287] 式 (D) 的cCPP可具有式 (D-I) 的结构:



[0289] 或其质子化形式,

[0290] 其中:

[0291] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

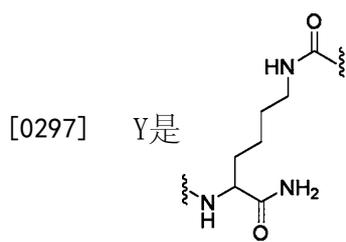
[0292] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0293] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

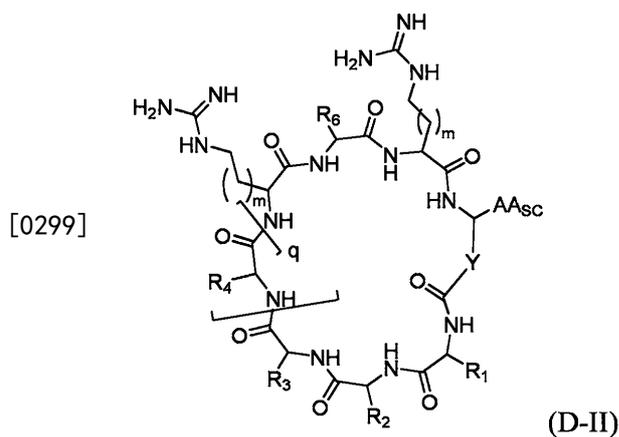
[0294] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

[0295] q 是1、2、3或4;

[0296] 每个 m 独立地是整数0、1、2或3,并且



[0298] 式(D)的cCPP可具有式(D-II)的结构:



[0300] 或其质子化形式,

[0301] 其中:

[0302] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

[0303] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

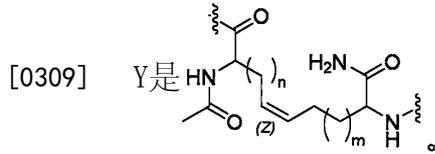
[0304] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

[0305] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

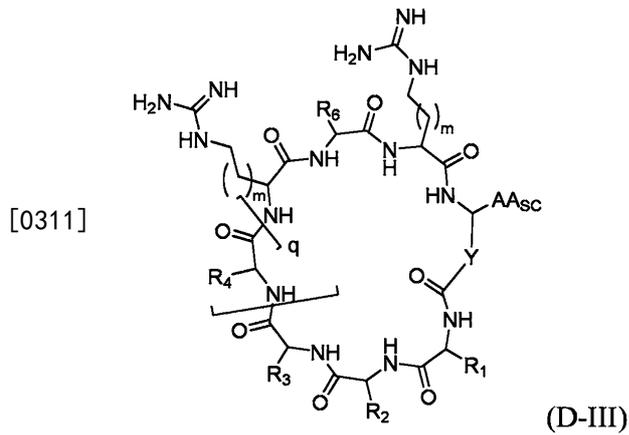
[0306] q是1、2、3或4；

[0307] 每个m独立地是整数0、1、2或3，

[0308] 每个n独立地是整数0、1、2或3，并且



[0310] 式(D)的cCPP可具有式(D-III)的结构：



[0312] 或其质子化形式，

[0313] 其中：

[0314] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基；

[0315] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链；

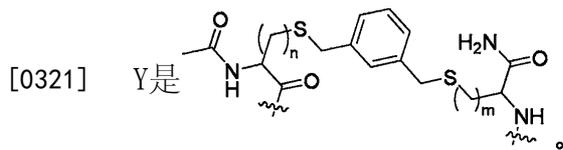
[0316] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链；

[0317] AA_{Sc} 是氨基酸侧链；

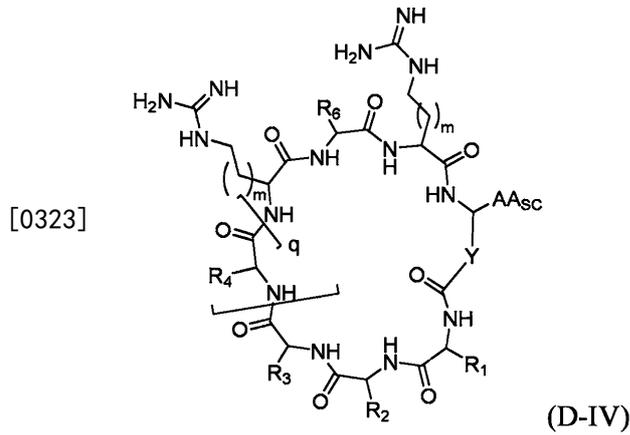
[0318] q是1、2、3或4；

[0319] 每个m独立地是整数0、1、2或3，

[0320] 每个n独立地是整数0、1、2或3，并且



[0322] 式(D)的cCPP可具有式(D-IV)的结构：



[0324] 或其质子化形式,

[0325] 其中:

[0326] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

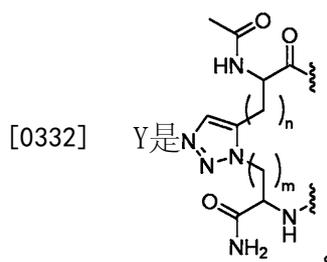
[0327] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0328] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

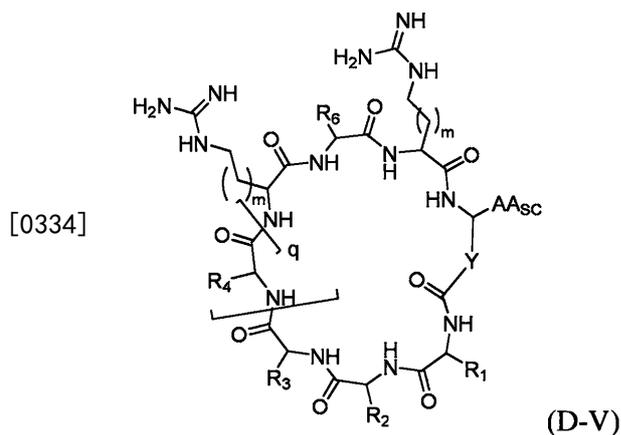
[0329] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

[0330] q 是1、2、3或4;

[0331] 每个 m 独立地是整数0、1、2或3,并且



[0333] 式(D)的cCPP可具有式(D-V)的结构:



[0335] 或其质子化形式,

[0336] 其中:

[0337] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

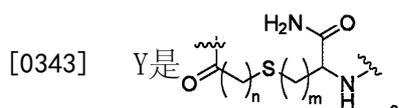
[0338] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0339] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

[0340] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

[0341] q是1、2、3或4；

[0342] 每个m独立地是整数0、1、2或3，并且



[0344] AA_{SC}可与接头缀合。

[0345] 接头

[0346] 本公开的cCPP可与接头缀合。接头可将AC连接到cCPP。接头可附接到cCPP的氨基酸的侧链，并且AC可附接在接头上的合适位置处。

[0347] 接头可以是任何合适的部分，其可将cCPP与一个或多个附加部分（例如环外肽（EP）和/或AC）缀合。在与cCPP和一个或多个附加部分缀合之前，接头具有两个或更多个官能团，它们各自能够独立地与cCPP和一个或多个附加部分形成共价键。接头可共价结合到AC的5'端或AC的3'端。接头可共价结合到AC的5'端。接头可共价结合到AC的3'端。接头可以是本文所述的cCPP与AC缀合的任何合适的部分。

[0348] 接头可包括烃接头。

[0349] 接头可包含切割位点。切割位点可以是二硫化物或胰天蛋白酶切割位点（例如，Val-Cit-PABC）。

[0350] 接头可包含：(i) 一个或多个D或L氨基酸，它们各自任选地被取代；(ii) 任选取代的亚烷基；(iii) 任选取代的亚烯基；(iv) 任选取代的亚炔基；(v) 任选取代的碳环基；(vi) 任选取代的杂环基；(vii) 一个或多个 $-(R^1-J-R^2)z''$ -亚基，其中 R^1 和 R^2 在每种情况下各自独立地选自亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基和杂环基，每个J独立地是C、NR³、-NR³C(O)-、S和O，其中R³独立地选自H、烷基、烯基、炔基、碳环基和杂环基，它们各自任选地被取代，并且z''是1至50的整数；(viii) $-(R^1-J)z''$ -或 $-(J-R^1)z''$ -，其中 R^1 在每种情况下各自独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基或杂环基，每个J独立地是C、NR³、-NR³C(O)-、S或O，其中R³是H、烷基、烯基、炔基、碳环基或杂环基，它们各自任选地被取代，并且z''是1至50的整数；或(ix) 接头可包含(i)至(x)中的一者或多者。

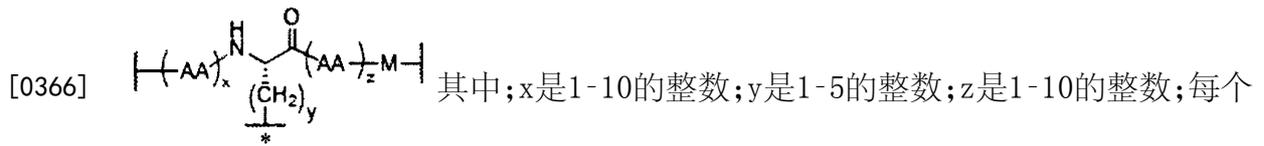
[0351] 接头可包含一个或多个D或L氨基酸和/或 $-(R^1-J-R^2)z''$ -，其中 R^1 和 R^2 在每种情况下各自独立地是亚烷基，每个J独立地是C、NR³、-NR³C(O)-、S和O，其中R⁴独立地选自H和烷基，并且z''是1至50的整数；或它们的组合。

[0352] 接头可包含 $-(OCH_2CH_2)_z'$ -（例如，作为间隔区），其中z'是1至23的整数，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23。“ $-(OCH_2CH_2)_z'$ ”也可称为聚乙二醇（PEG）。

[0353] 接头可包含一个或多个氨基酸。接头可包含肽。接头可包含 $-(OCH_2CH_2)_z'$ -和肽，其中z'是1至23的整数。肽可包含2至10个氨基酸。接头还可包含能够通过点击化学反应的官能团（FG）。FG可以是叠氮化物或炔，并且当AC与接头缀合时形成三唑。

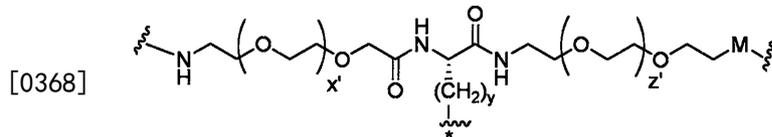
[0354] 接头可包含(i) β丙氨酸残基和赖氨酸残基；(ii) $-(J-R^1)z''$ ；或(iii) 它们的组合。每个R¹可独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基或杂环基，每个J独立地是C、NR³、-NR³C(O)-、S或O，其中R³是H、烷基、烯基、炔基、碳环基或杂环基，它们各自任选地被取代，并且z''可以是1至50的整数。每个R¹可以是亚烷基并且每个J可以是O。

[0355] 接头可包含(i) β-丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸、6-氨基己酸



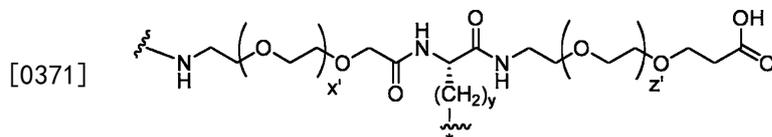
AA独立地是氨基酸残基;*是与AA_{SC}的附接点,并且AA_{SC}是cCPP的氨基酸残基的侧链;并且M是本文所定义的结合基团。

[0367] 接头可具有以下结构:



[0369] 其中;x'是1-23的整数;y是1-5的整数;z'是1-23的整数;*是与AA_{SC}的附接点,并且AA_{SC}是cCPP的氨基酸残基的侧链;并且M是本文所定义的结合基团。

[0370] 接头可具有以下结构:



[0372] 其中;x'是1-23的整数;y是1-5的整数;并且z'是1-23的整数;*是与AA_{SC}的附接点,并且AA_{SC}是cCPP的氨基酸残基的侧链。

[0373] x可以是1-10的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,包括其间的所有范围和子范围。

[0374] x'可以是1-23的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23,包括其间的所有范围和子范围。x'可以是5-15的整数。x'可以是9-13的整数。x'可以是1-5的整数。x'可以是1。

[0375] y可以是1-5的整数,例如1、2、3、4或5,包括其间的所有范围和子范围。y可以是2-5的整数。y可以是3-5的整数。y可以是3或4。y可以是4或5。y可以是3。y可以是4。y可以是5。

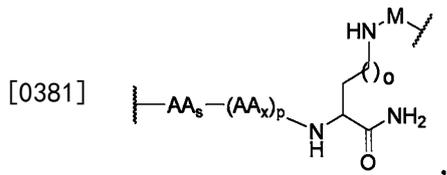
[0376] z可以是1-10的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,包括其间的所有范围和子范围。

[0377] z'可以是1-23的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23,包括其间的所有范围和子范围。z'可以是5-15的整数。z'可以是9-13的整数。z'可以是11。

[0378] 如上所讨论,接头或M(其中M是接头的一部分)可共价结合到AC(AC上的任何合适的位置)。接头或M(其中M是接头的一部分)可共价结合到AC的3'端或AC的5'端。接头或M(其中M是接头的一部分)可共价结合到AC的主链。

[0379] 接头可结合到cCPP上的天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺或赖氨酸的侧链,或者谷氨酰胺或天冬酰胺的修饰侧链(例如,具有氨基基团的还原侧链)。接头可结合到cCPP上的赖氨酸的侧链。

[0380] 接头可具有以下结构:



[0382] 其中

[0383] M是将L与AC缀合的基团；

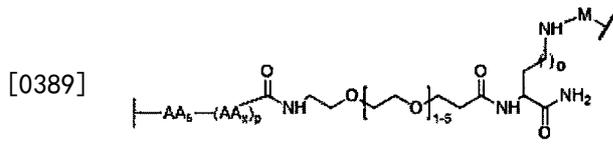
[0384] AA_s是cCPP上的氨基酸的侧链或末端；

[0385] 每个AA_x独立地是氨基酸残基；

[0386] o是0至10的整数；并且

[0387] p是0至5的整数。

[0388] 接头可具有以下结构：



[0390] 其中

[0391] M是将L与AC缀合的基团；

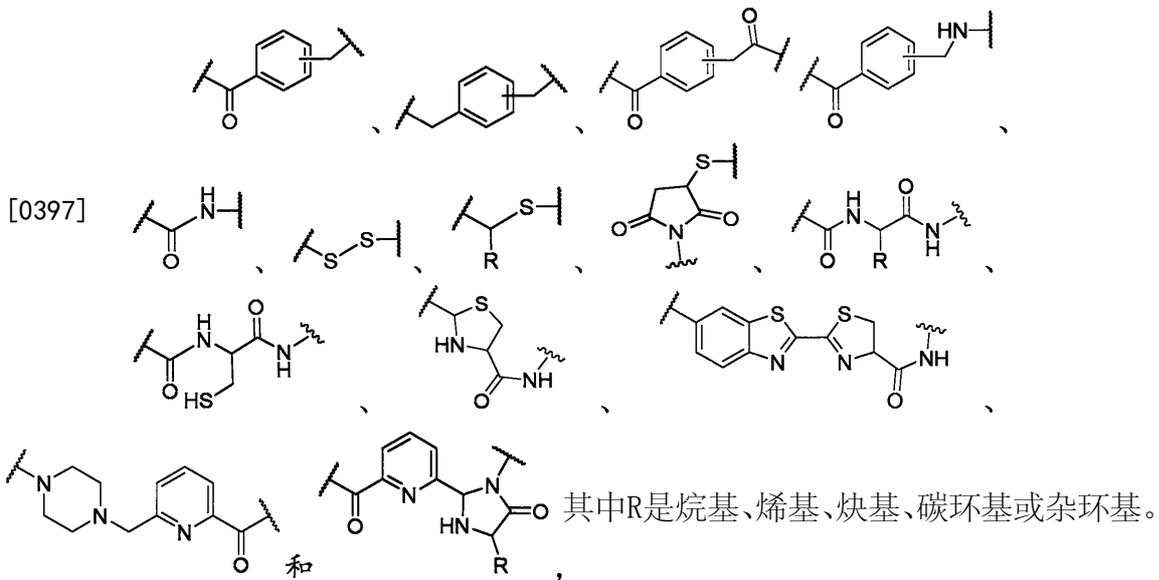
[0392] AA_s是cCPP上的氨基酸的侧链或末端；

[0393] 每个AA_x独立地是氨基酸残基；

[0394] o是0至10的整数；并且

[0395] p是0至5的整数。

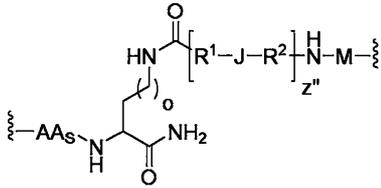
[0396] M可包括亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基或杂环基，它们各自任选地被取代。M可选自：



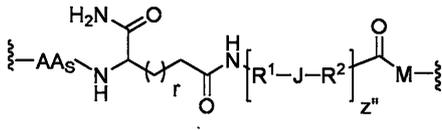
[0398] M可选自：

[0407] p可以是0至5,例如0、1、2、3、4或5。p可以是0。p可以是1。p可以是2。p可以是3。p可以是4。p可以是5。

[0408] 接头可具有以下结构:



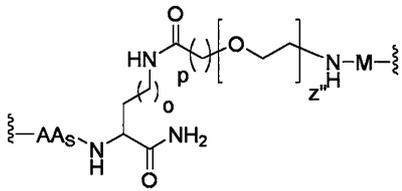
或



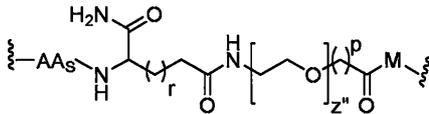
[0410] 其中M、AA_s、每个-(R¹-J-R²)z''-、o和z''如本文所定义;r可以是0或1。

[0411] r可以是0。r可以是1。

[0412] 接头可具有以下结构:



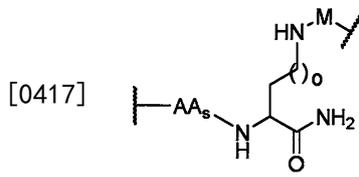
或



[0414] 其中M、AA_s、o、p、q、r和z''各自可如本文所定义。

[0415] z''可以是1至50的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50,包括其间的所有范围和值。z''可以是5-20的整数。z''可以是10-15的整数。

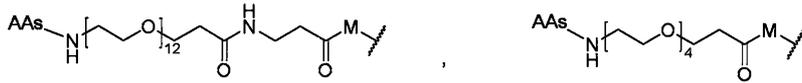
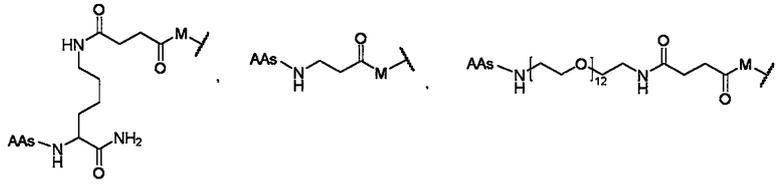
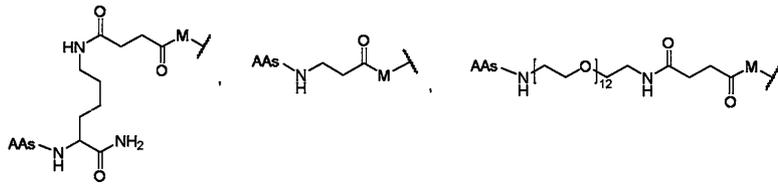
[0416] 接头可具有以下结构:



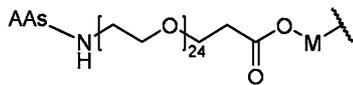
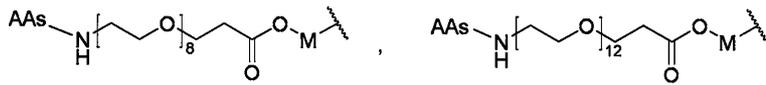
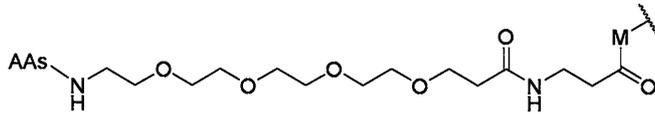
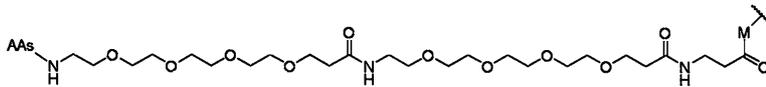
[0418] 其中:

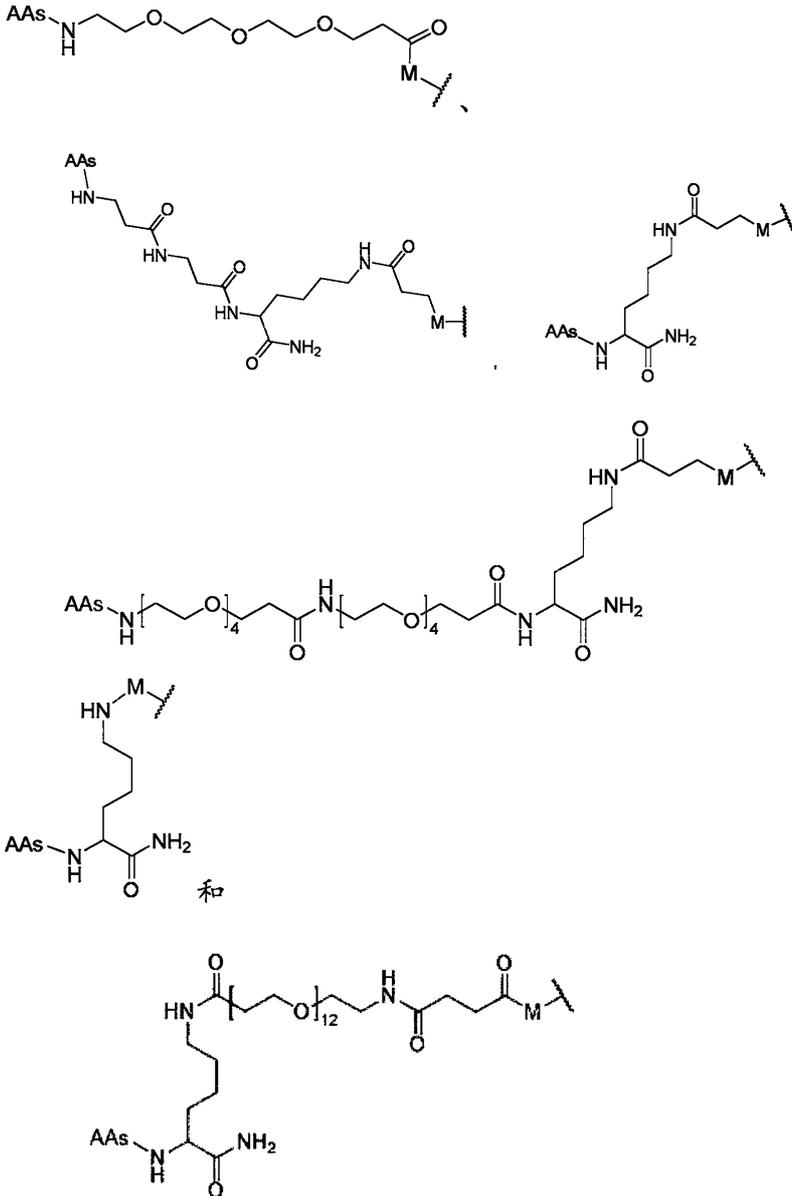
[0419] M、AA_s和o如本文所定义。

[0420] 合适接头的其他非限制性实例包括:



[0421]



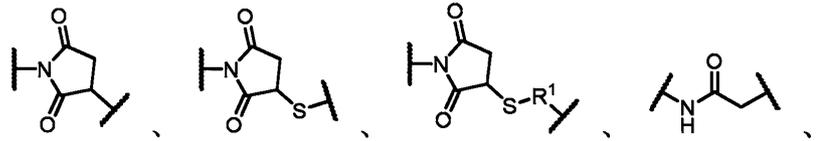


[0423] 其中M和AA_s如本文所定义。

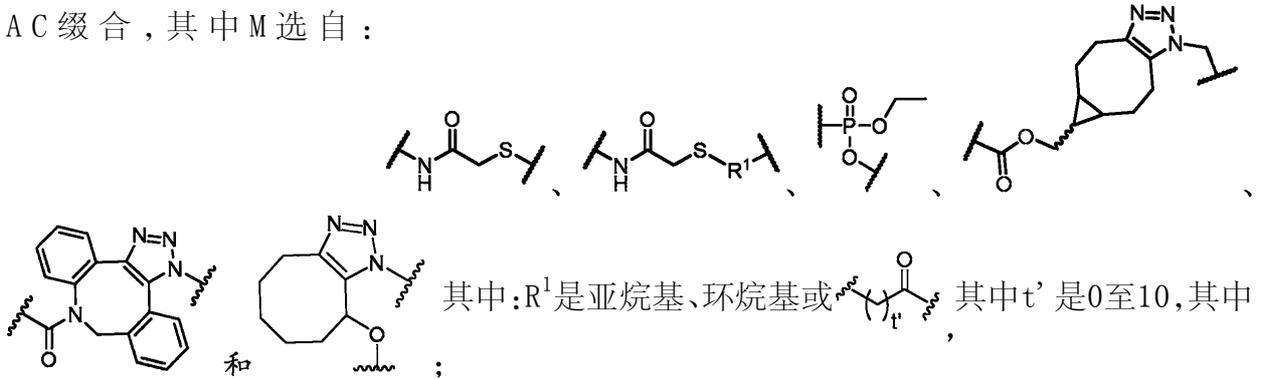
[0424] 本文提供了包含cCPP和与前mRNA序列中的靶标互补的AC的化合物,所述化合物还

包含L,其中接头通过结合基团(M)与AC缀合,其中M是

[0425] 本文提供了包含cCPP和反义化合物(AC)例如反义寡核苷酸的化合物,所述反义化合物与前mRNA序列中的靶标互补,其中所述化合物还包含L,其中接头通过结合基团(M)与



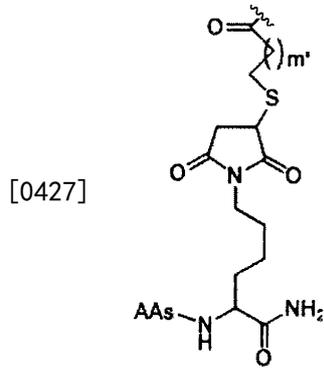
A C 缀合，其中 M 选自：



其中：R¹是亚烷基、环烷基或 $(CH_2)_{t'}$ ，其中 t' 是 0 至 10，其中

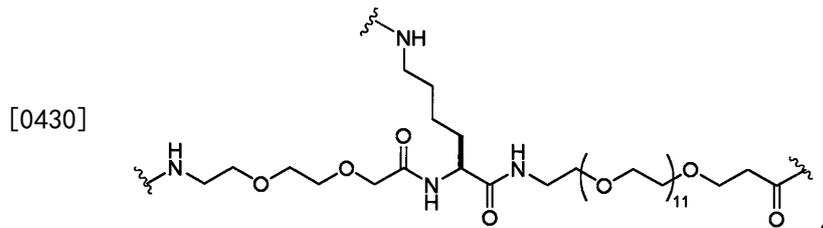
每个 R 独立地是烷基、烯基、炔基、碳环基或杂环基，其中 R¹是 $(CH_2)_{t'}$ 并且 t' 是 2。

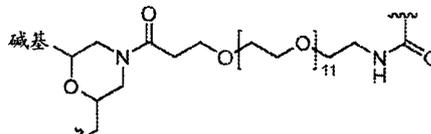
[0426] 接头可具有以下结构：



[0428] 其中 AA_s 如本文所定义，并且 m' 是 0-10。

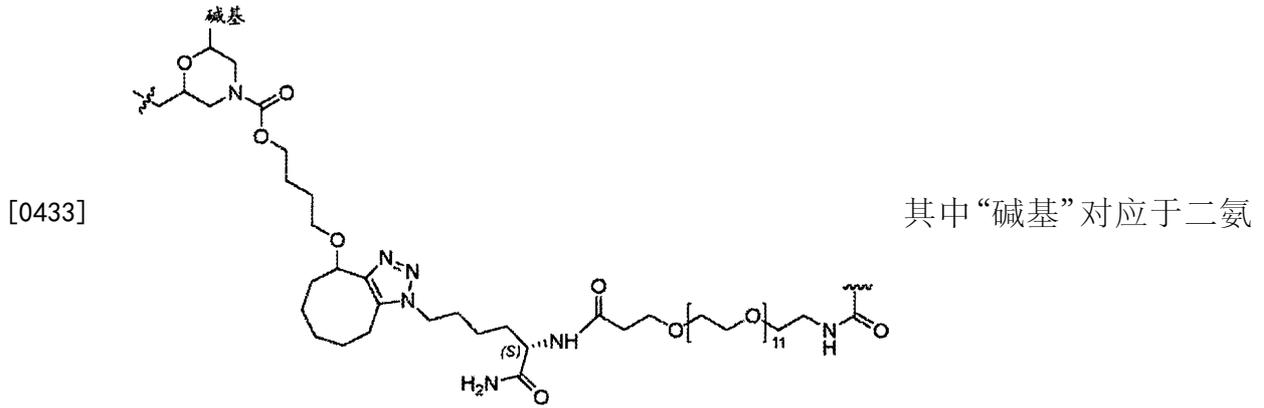
[0429] 接头可具有下式：



[0431] 接头可具有下式：

 其中“碱基”对应于二氨基磷酸

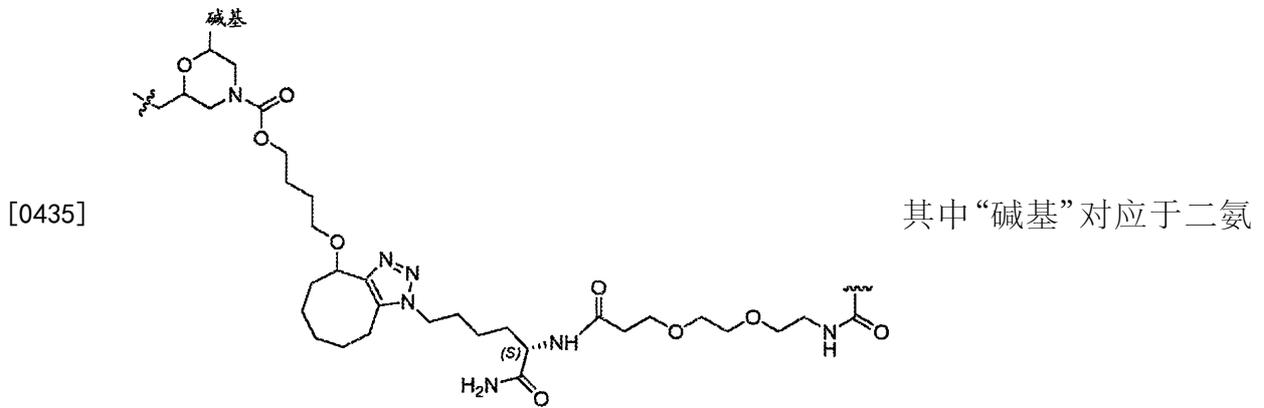
酯吗啉代寡聚物的 3' 端的核碱基。

[0432] 接头可具有下式：

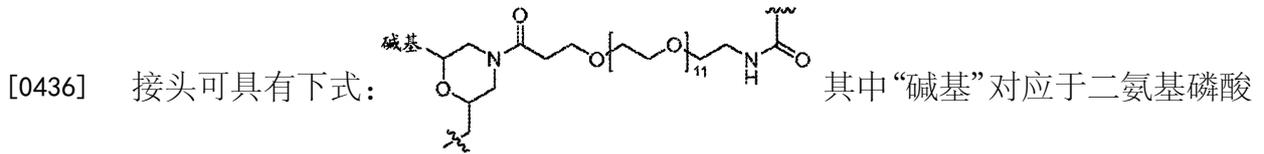


基磷酸酯吗啉代寡聚物的3'端的核碱基。

[0434] 接头可具有下式：

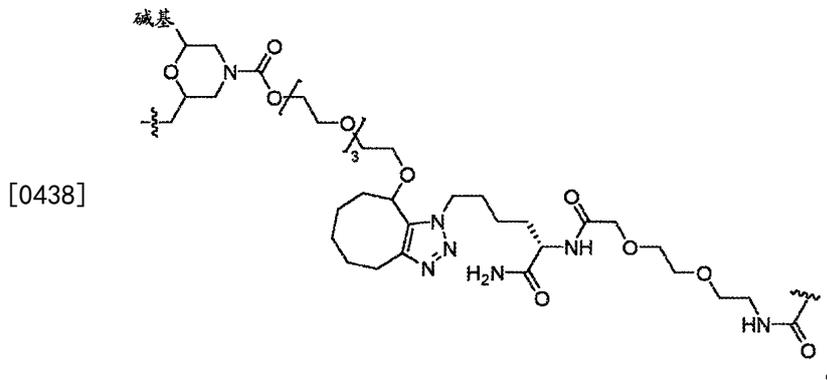


基磷酸酯吗啉代寡聚物的3'端的核碱基。



酯吗啉代寡聚物的3'端的核碱基。

[0437] 接头可具有下式：



[0439] 接头可在AC上的任何合适的位置共价结合。接头可共价结合到AC的3'端或AC的5'端。接头可共价结合到AC的主链。

[0440] 接头可结合到cCPP上的天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺或赖氨酸的侧链，或者谷氨酰胺或天冬酰胺的修饰侧链(例如，具有氨基基团的还原侧链)。接头可结合到

cCPP上的赖氨酸的侧链。

[0441] cCPP-接头缀合物

[0442] cCPP可与本文所定义的接头缀合。接头可与如本文所定义的cCPP的AA_{SC}缀合。

[0443] 接头可包含-(OCH₂CH₂)_z'-亚基(例如作为间隔区),其中z'是1至23的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23。“-(OCH₂CH₂)_z'”也称为PEG。cCPP-接头缀合物可具有选自表4的结构:

[0444] 表4:cCPP-接头缀合物

[0445]	环(FfΦ-4gp-r-4gp-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
	环(FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
	环(FfΦ-Pia-r-Pia-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
	环(FfΦ-Dml-r-Dml-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
	环(FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)-PEG ₁₂ -OH
	环(fΦR-Cit-R-Cit-Q)-PEG ₁₂ -OH

[0446] 接头可包含-(OCH₂CH₂)_z'-亚基和肽亚基,其中z'是1至23的整数。肽亚基可包含2至10个氨基酸。cCPP-接头缀合物可具有选自表5的结构:

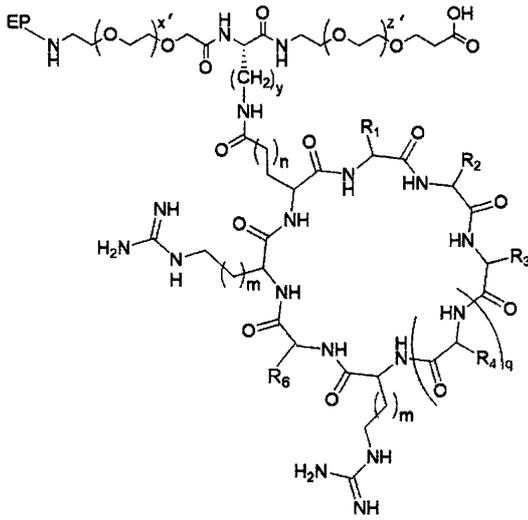
[0447] 表5:内体逃逸载体(cCPP-接头缀合物)

[0448]	Ac-PKKKRKV-Lys(环[FfΦ-R-r-Cit-rQ])-PEG ₁₂ -K(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-Lys(环[FfΦ-Cit-r-R-rQ])-PEG ₁₂ -K(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-K(环(FfΦR-cit-R-cit-Q))-PEG ₁₂ -K(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-B-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG2-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG4-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-pkkrkv-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-rrv-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG12-OH
	Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-r-Q])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKK-Cit-KV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-r-Q])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-r-Q])-PEG12-K(N ₃)-NH ₂

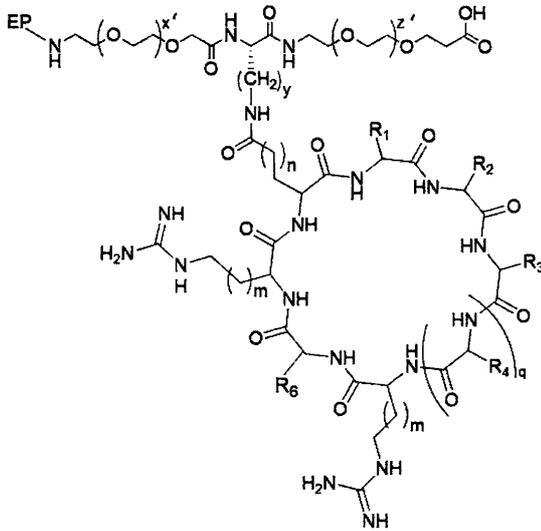
[0449] cCPP-接头缀合物可以是Ac-PKKKRKV(环[FfΦGrGrQ])-PEG12-K(N₃)-NH₂。

[0450] 提供了包含环状细胞穿透肽(cCPP)、接头和环外肽(EP)的EEV。EEV可包含式(B)的结构:

[0451]



[0452]



或其质子化形式,

(B),

[0453] 其中:

[0454] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或氨基酸的芳族或杂芳族侧链;[0455] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

[0456] EP是如本文定义的环外肽;

[0457] 每个m独立地是0-3的整数;

[0458] n是0-2的整数;

[0459] x' 是1-20的整数;

[0460] y是1-5的整数;

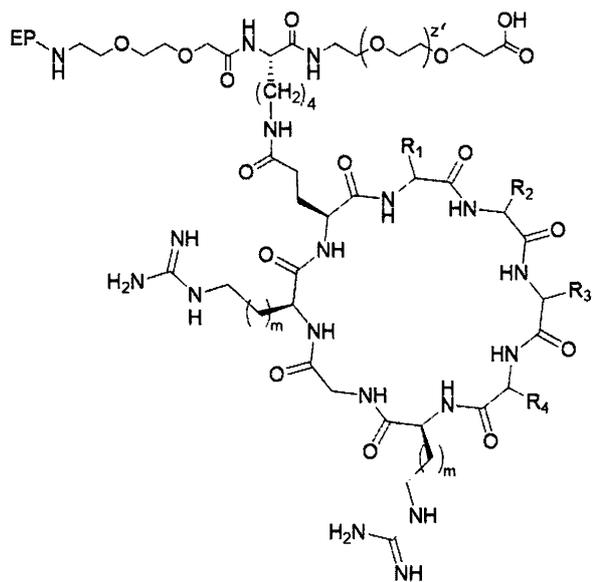
[0461] q是1-4;并且

[0462] z' 是1-23的整数。[0463] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、EP、m、q、y、 x' 、 z' 如本文所述。

[0464] n可以是0.n可以是1.n可以是2。

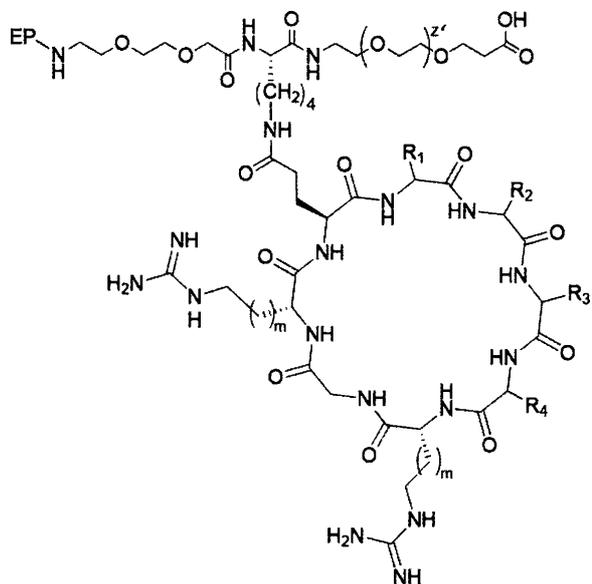
[0465] EEV可包含式(B-a)或(B-b)的结构:

[0466]



(B-a),

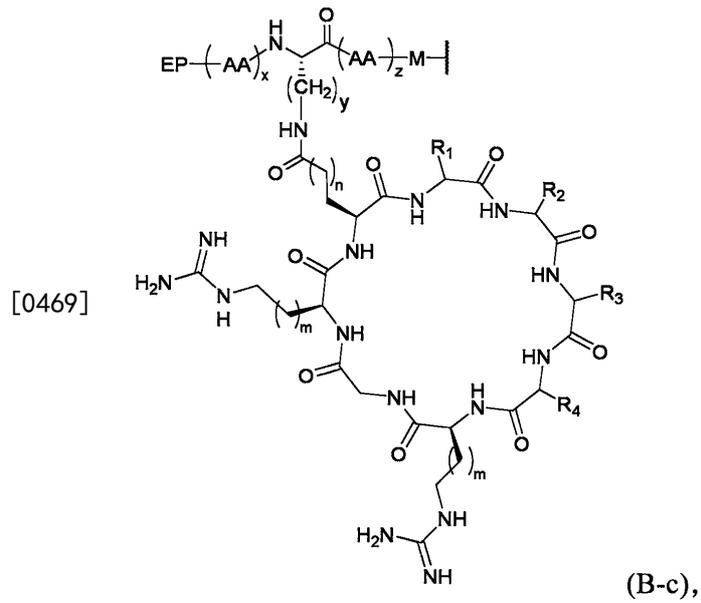
[0467]

或其质子化形式,其中EP、R¹、R²、

(B-b),

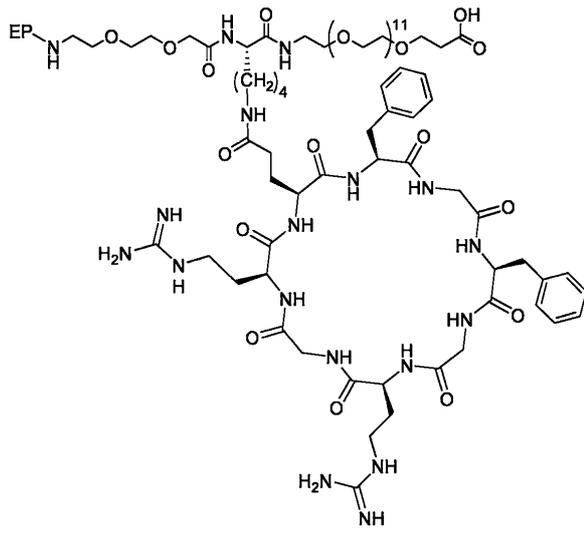
R³、R⁴、m和z' 如上文在式 (B) 中所定义。

[0468] EEV可包含式 (B-c) 的结构:



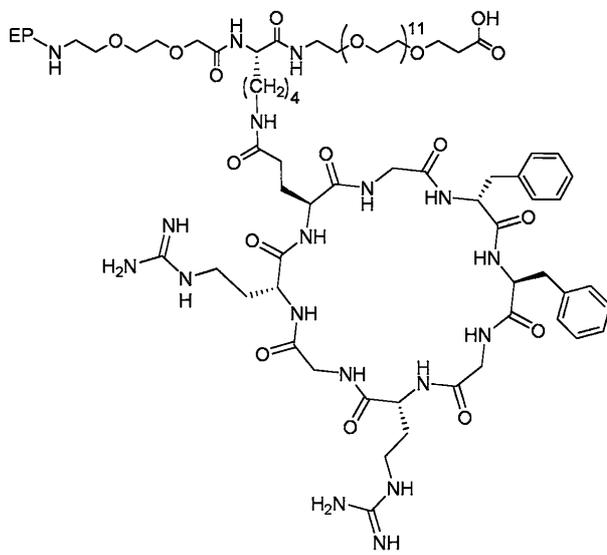
[0470] 或其质子化形式,其中EP、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和m如上文在式(B)中所定义;AA是如本文所定义的氨基酸;M如本文所定义;n是0-2的整数;x是1-10的整数;y是1-5的整数;并且z是1-10的整数。

[0471] EEV可具有式(B-1)、(B-2)、(B-3)或(B-4)的结构:

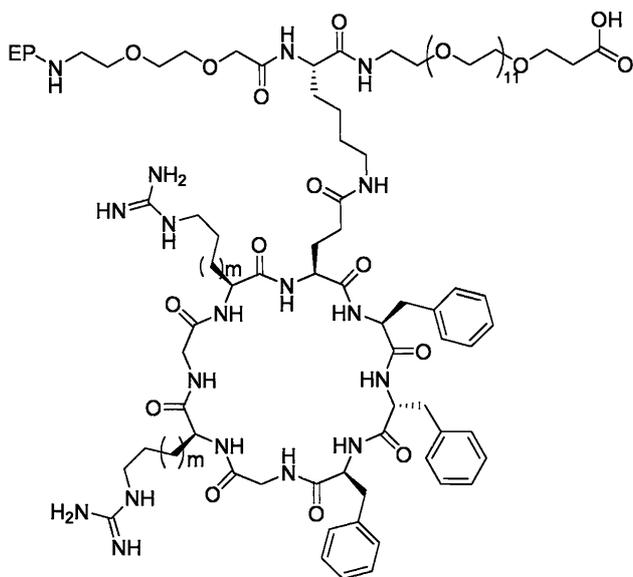


(B-1),

[0472]

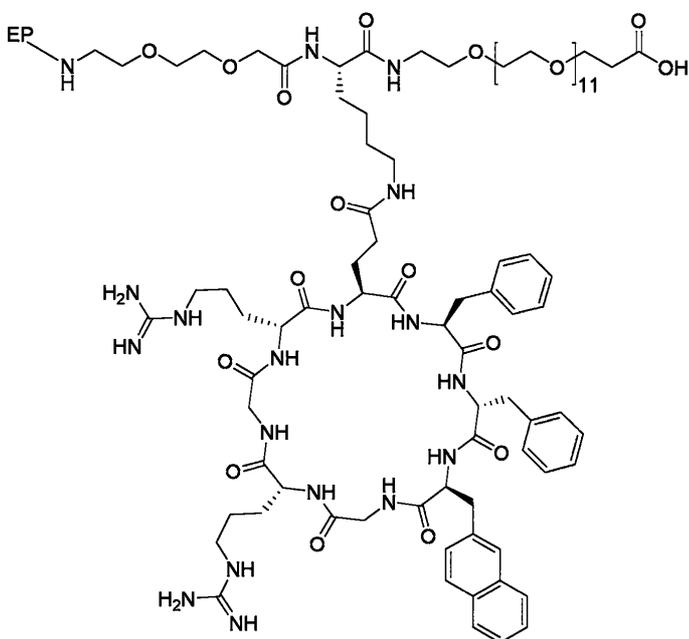


(B-2),



(B-3),

[0473]



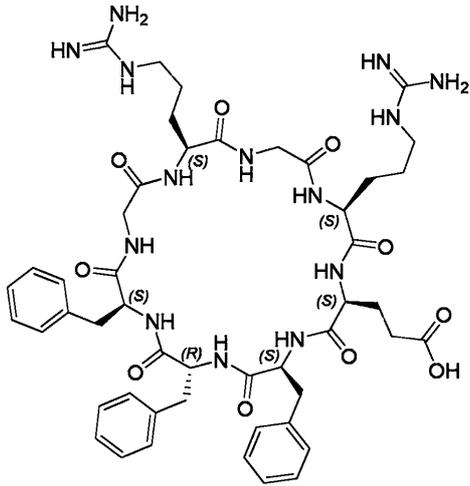
(B-4)

[0474] 或其质子化形式,其中EP如上文在式(B)中所定义。

[0475] EEV可包含式(B)并且可具有以下结构:Ac-PKKKRKV-AEEA-K(环[FGFGRGRQ]) - PEG₁₂-OH或Ac-PKKKRKV-AEEA-K(环[GfFGrGrQ]) - PEG₁₂-OH。

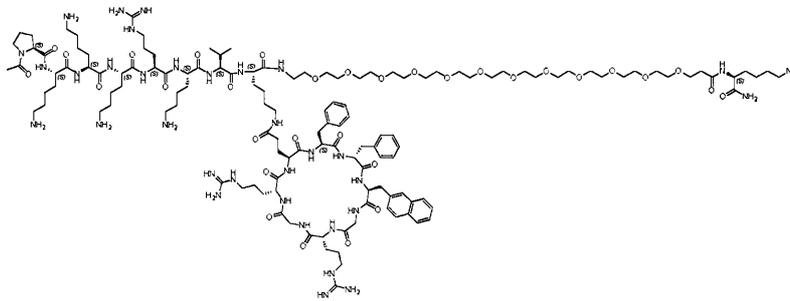
[0476] EEV可包含下式的cCPP:

[0477]

[0478] EEV可包含下式:Ac-PKKKRKV-niniPEG2-Lys(环(FfFGRGRQ))-miniPEG2-K(N₃)。

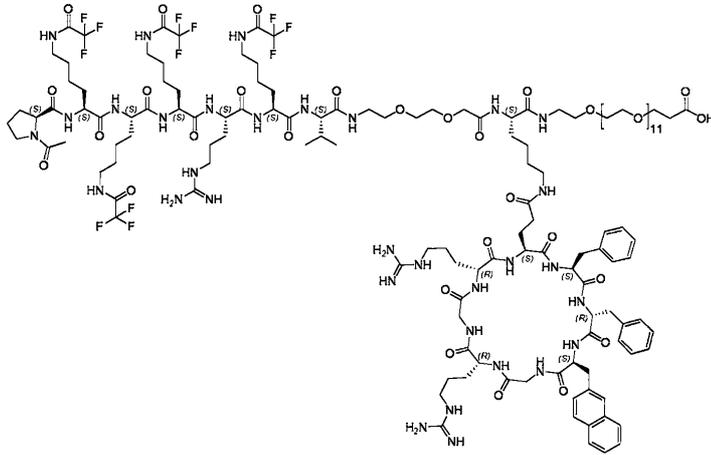
[0479] EEV可以是:

[0480]

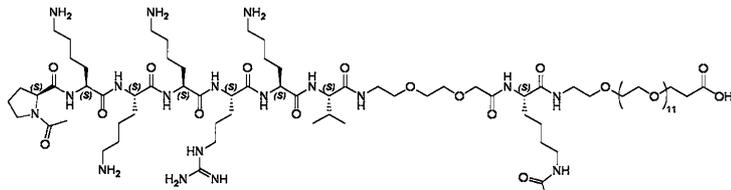
[0481] EEV可以是:Ac-PKKKRKV-K(环(Ff-Nal-GrGrQ))-PEG₁₂-K(N₃)-NH_s。

[0482] EEV可以是

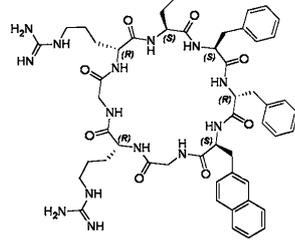
[0483]

[0484] EEV可以是Ac-P-K(Tfa)-K(Tfa)-K(Tfa)-R-K(Tfa)-V-AEEA-K(环(Ff-Nal-GrGrQ))-PEG₁₂-OH或Ac-P-K(Tfa)-K(Tfa)-K(Tfa)-R-K(Tfa)-V-AEEA-K(环(FGFGRGRQ))-PEG₁₂-OH。

[0485] EEV可以是

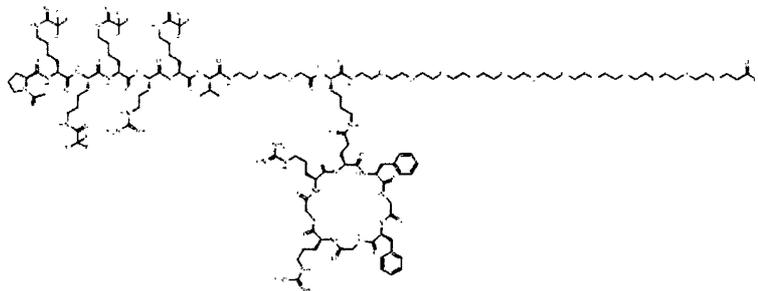


[0486]



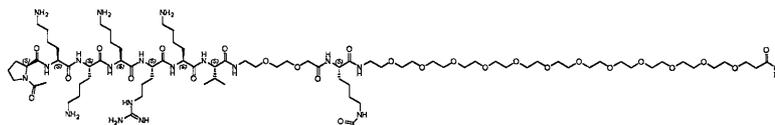
[0487] EEV可以是Ac-PKKKRKV-miniPEG-K (环(Ff-Nal-GrGrQ) -PEG12-OH)。

[0488] EEV可以是

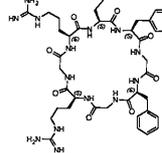


[0489]

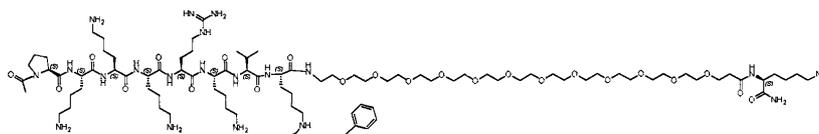
[0490] EEV可以是



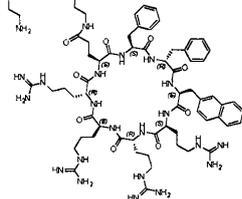
[0491]



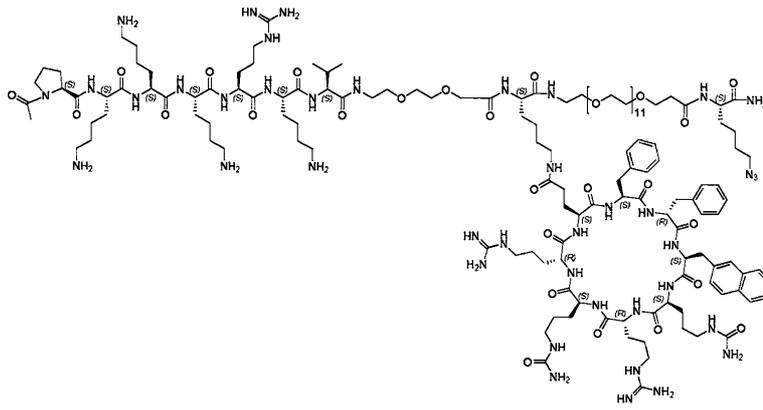
[0492] EEV可以是



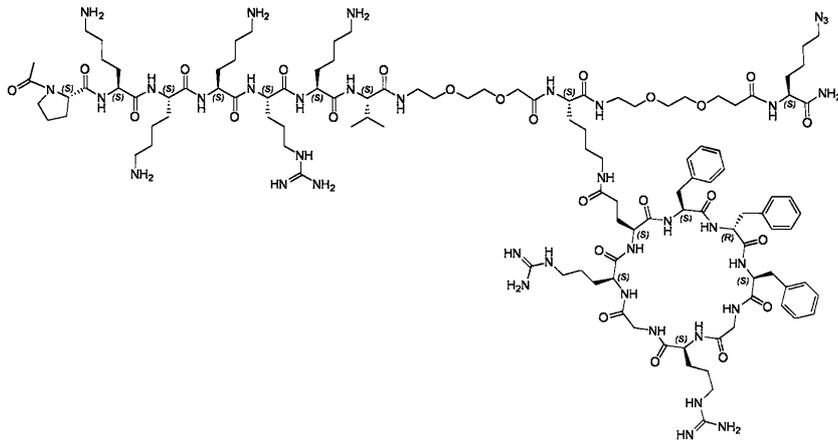
[0493]



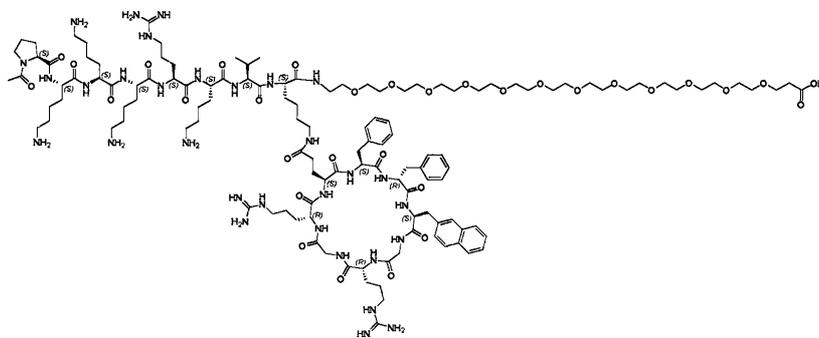
[0494] EEV可以是



[0496] EEV可以是

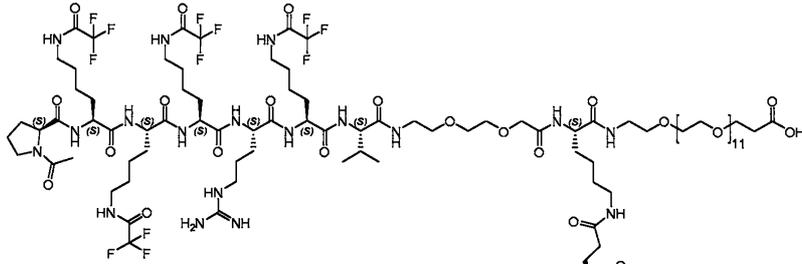


[0498] EEV可以是

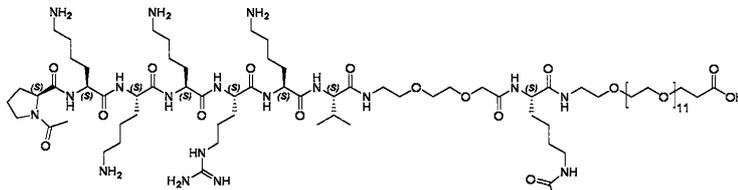


[0500] EEV可以是:

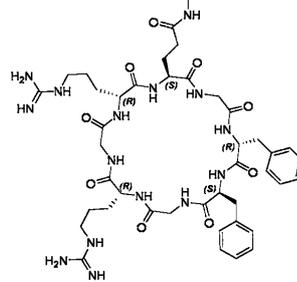
[0501]



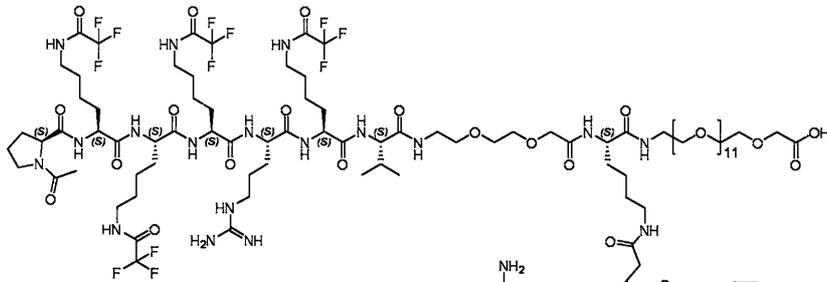
[0502] EEV可以是



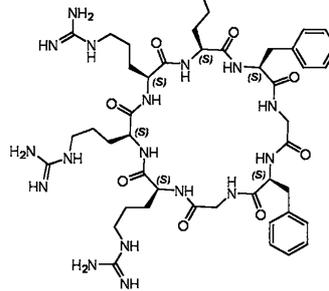
[0503]



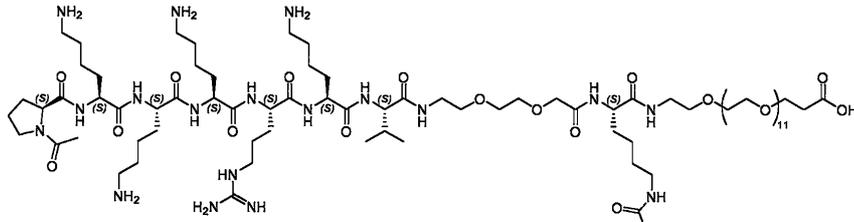
[0504] EEV可以是



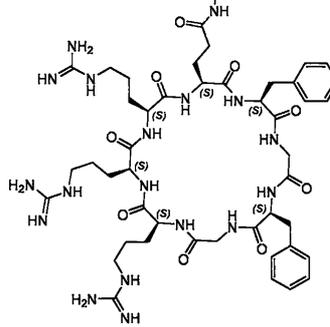
[0505]



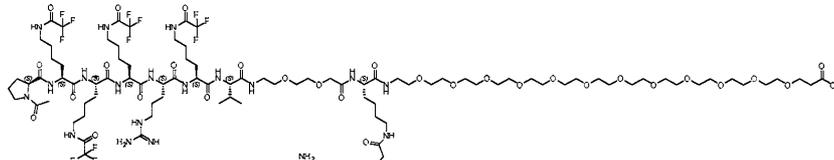
[0506] EEV可以是



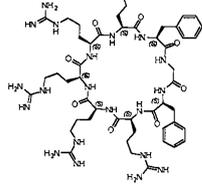
[0507]



[0508] EEV可以是



[0509]



[0510] EEV可选自

[0511] Ac-rr-miniPEG2-Dap[环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ)]-PEG12-OH

[0512] Ac-frr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG12-OH

[0513] Ac-rfr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG12-OH

[0514] Ac-rbfbr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG12-OH

[0515] Ac-rrr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG12-OH

[0516] Ac-rbr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG12-OH

[0517] Ac-rbrbr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG12-OH

[0518] Ac-hh-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG12-OH

[0519] Ac-hbh-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG12-OH

[0520] Ac-hbhbh-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG12-OH

[0521] Ac-rbhbh-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG12-OH

[0522] Ac-hbrbh-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG12-OH

[0523] Ac-rr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0524] Ac-frr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0525] Ac-rfr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0526] Ac-rbfbr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0527] Ac-rrr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0528] Ac-rbr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0529] Ac-rbrbr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

- [0530] Ac-hh-Dap (环 (Ff Φ -Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH
- [0531] Ac-hbh-Dap (环 (Ff Φ -Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH
- [0532] Ac-hhbhb-Dap (环 (Ff Φ -Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH
- [0533] Ac-rhbhb-Dap (环 (Ff Φ -Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH
- [0534] Ac-hbrbh-Dap (环 (Ff Φ -Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH
- [0535] Ac-KKKK-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0536] Ac-KGKK-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0537] Ac-KKKG-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0538] Ac-KKK-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0539] Ac-KK-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0540] Ac-KGK-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0541] Ac-KBK-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0542] Ac-KBKBK-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0543] Ac-KR-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0544] Ac-KBR-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0545] Ac-PKKKRKV-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0546] Ac-PKKKRKV-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0547] Ac-PGKKRKV-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0548] Ac-PKGKRKV-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0549] Ac-PKKGRKV-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0550] Ac-PKKKGKV-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0551] Ac-PKKKRGV-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0552] Ac-PKKKRKG-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0553] Ac-KKKRK-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂
- [0554] Ac-KKRK-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂和
- [0555] Ac-KRK-miniPEG2-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG2-K(N₃) -NH₂。
- [0556] EEV可以选自：
- [0557] Ac-PKKKRKV-Lys (环 [Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-K(N₃) -NH₂
- [0558] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [Ff Φ GrGrQ]) -miniPEG₂-K(N₃) -NH₂
- [0559] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [FGFGRGRQ]) -miniPEG₂-K(N₃) -NH₂
- [0560] Ac-KR-PEG₂-K (环 [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K(N₃) -NH₂
- [0561] Ac-PKKKGKV-PEG₂-K (环 [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K(N₃) -NH₂
- [0562] Ac-PKKKRKG-PEG₂-K (环 [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K(N₃) -NH₂
- [0563] Ac-KKKRK-PEG₂-K (环 [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K(N₃) -NH₂
- [0564] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [FF Φ GRGRQ]) -miniPEG₂-K(N₃) -NH₂
- [0565] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [β hFf Φ GrGrQ]) -miniPEG₂-K(N₃) -NH₂和
- [0566] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [Ff Φ SrSrQ]) -miniPEG₂-K(N₃) -NH₂。
- [0567] EEV可以选自：
- [0568] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 (GfFGrGrQ)) -PEG₁₂-OH

- [0569] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(环[FGFKRKRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0570] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(环[FGFRGRGQ]) -PEG₁₂-OH
- [0571] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(环[FGFRGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0572] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(环[FGFRrRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0573] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(环[FGFRRRQ]) -PEG₁₂-OH和
- [0574] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH。
- [0575] EEV可以选自：
- [0576] Ac-K-K-K-R-K-G-miniPEG₂-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0577] Ac-K-K-K-R-K-miniPEG₂-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0578] Ac-K-K-R-K-K-PEG₄-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0579] Ac-K-R-K-K-K-PEG₄-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0580] Ac-K-K-K-K-R-PEG₄-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0581] Ac-R-K-K-K-K-PEG₄-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₁₂-OH和
- [0582] Ac-K-K-K-R-K-PEG₄-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₁₂-OH。
- [0583] EEV可以选自：
- [0584] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₂-K(N₃)-NH₂
- [0585] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0586] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ]) -PEG₂-K(N₃)-NH₂和
- [0587] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH。
- [0588] 货物可以是AC并且EEV可选自：
- [0589] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0590] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0591] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FfFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0592] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0593] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0594] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0595] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0596] Ac-rr-PEG₂-K(环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0597] Ac-rr-PEG₂-K(环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0598] Ac-rr-PEG₂-K(环[FfF-GRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0599] Ac-rr-PEG₂-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0600] Ac-rr-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0601] Ac-rr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0602] Ac-rr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0603] Ac-rrr-PEG₂-K(环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0604] Ac-rrr-PEG₂-K(环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0605] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FfFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0606] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FGFRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0607] Ac-rrr-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH

- [0608] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0609] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0610] Ac-rhr-PEG₂-K(环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0611] Ac-rhr-PEG₂-K(环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0612] Ac-rhr-PEG₂-K(环[FfFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0613] Ac-rhr-PEG₂-K(环[FGFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0614] Ac-rhr-PEG₂-K(环[GfFGGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0615] Ac-rhr-PEG₂-K(环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0616] Ac-rhr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0617] Ac-rbr-PEG₂-K(环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0618] Ac-rbr-PEG₂-K(环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0619] Ac-rbr-PEG₂-K(环[FfFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0620] Ac-rbr-PEG₂-K(环[FGFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0621] Ac-rbr-PEG₂-K(环[GfFGGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0622] Ac-rbr-PEG₂-K(环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0623] Ac-rbr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0624] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0625] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0626] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[FfFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0627] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[FGFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0628] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[GfFGGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0629] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0630] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0631] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0632] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0633] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[FfFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0634] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[FGFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0635] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[GfFGGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0636] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0637] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0638] Ac-hbrbh-PEG₂-K(环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0639] Ac-hbrbh-PEG₂-K(环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0640] Ac-hbrbh-PEG₂-K(环[FfFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0641] Ac-hbrbh-PEG₂-K(环[FGFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0642] Ac-hbrbh-PEG₂-K(环[GfFGGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0643] Ac-hbrbh-PEG₂-K(环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH和
- [0644] Ac-hbrbh-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH,
- [0645] 其中b是β-丙氨酸,并且环外序列可以是D或L立体化学。
- [0646] 在实施方案中,与包含单独AC的化合物相比,包含环肽和AC的化合物具有改善的

胞质摄取效率。胞质摄取效率可通过将包含环肽和AC的化合物的胞质递送效率与单独AC的胞质递送效率进行比较来测量。

[0647] 反义化合物

[0648] 在各种实施方案中,本文公开的化合物包含与反义化合物(AC)缀合的CPP(例如,环肽)。在实施方案中,AC包含针对靶多核苷酸的反义寡核苷酸。术语“反义寡核苷酸”或简称“反义”意在包括与靶向多核苷酸序列互补的寡核苷酸。反义寡核苷酸是与所选序列(例如靶基因mRNA)互补的DNA或RNA单链。

[0649] 反义寡核苷酸可调节蛋白质转录、翻译和表达的一个或多个方面。在实施方案中,反义寡核苷酸针对靶前mRNA内的靶序列,来调节前mRNA剪接的一个或多个方面。如本文所用,剪接的调节是指改变前mRNA转录物的处理,使得剪接的mRNA分子由于外显子跳跃或外显子包含、一个或多个外显子的缺失或者剪接的mRNA中通常不存在的序列(例如内含子序列)的缺失或添加而含有不同的外显子的组合。在实施方案中,反义寡核苷酸与前mRNA分子中的靶序列杂交恢复了对突变的前mRNA序列的天然剪接。在实施方案中,反义寡核苷酸杂交导致靶前mRNA的选择性剪接。在实施方案中,反义寡核苷酸杂交导致一个或多个外显子的外显子包含或外显子跳跃。在实施方案中,跳跃的外显子序列包含移码突变、无义突变或错义突变。在实施方案中,跳跃的外显子序列包含核酸缺失、取代或插入。在实施方案中,跳跃的外显子本身不包含序列突变,但邻近的外显子包含导致移码突变或无义突变的突变。在实施方案中,反义寡核苷酸与靶前mRNA内的靶序列杂交防止成熟mRNA分子中包含外显子序列。在实施方案中,反义寡核苷酸与靶前mRNA内的靶序列杂交导致野生型靶蛋白异构体的优先表达。在实施方案中,反义寡核苷酸与靶前mRNA内的靶序列杂交导致包含野生型靶蛋白的活性片段的再剪接靶蛋白的表达。

[0650] 反义机制经由反义寡核苷酸化合物与靶核酸的杂交来发挥作用。在实施方案中,反义寡核苷酸与其靶序列的杂交抑制靶蛋白的表达。在实施方案中,反义寡核苷酸与其靶序列的杂交抑制一种或多种野生型靶蛋白异构体的表达。在实施方案中,反义寡核苷酸与其靶序列的杂交上调靶蛋白的表达。在实施方案中,反义寡核苷酸与其靶序列的杂交增加一种或多种野生型靶蛋白异构体的表达。

[0651] 在实施方案中,反义化合物可通过与互补mRNA结合来抑制基因表达。与靶mRNA的结合可通过阻止互补mRNA链的翻译(通过立体阻断参与翻译的RNA结合蛋白)或通过导致靶mRNA的降解而导致基因表达的抑制。反义DNA可用于靶向特异性互补(编码或非编码)RNA。如果发生结合,所述DNA/RNA杂交体可被RNA酶H降解。在实施方案中,反义寡核苷酸含有约10至约50个核苷酸或约15至约30个核苷酸。在实施方案中,反义寡核苷酸可能不与靶核苷酸序列完全互补。

[0652] 反义寡核苷酸已被证明是蛋白质合成的有效的靶向抑制剂,并且因此可用于通过靶向基因特异性抑制蛋白质合成。反义寡核苷酸抑制蛋白质合成的功效已被充分确定。例如,通过针对其对应的mRNA序列的反义寡核苷酸抑制聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase)和毒蕈碱2型乙酰胆碱受体的合成(美国专利5,739,119和美国专利5,759,829)。此外,已用核蛋白细胞周期蛋白、多重耐药基因(MDG1)、ICAM-1、E-选择素、STK-1、纹状体GABAA受体和人EGF证明了反义抑制的实例(Jaskulski等人,Science.1988年6月10日;240(4858):1544-6;Vasanthakumar和Ahmed,Cancer Commun.1989;1(4):225-32;

Peris等人,Brain Res Mol Brain Res.1998年6月15日;57(2):310-20;美国专利5,801,154;美国专利5,789,573;美国专利5,718,709和美国专利5,610,288)。此外,反义构建体也已被描述抑制并且可用于治疗各种异常的细胞增殖,例如癌症(美国专利5,747,470;美国专利5,591,317和美国专利5,783,683)。

[0653] 产生反义寡核苷酸的方法是本领域已知的,并且可以容易地适用于产生靶向任何多核苷酸序列的反义寡核苷酸。对给定靶序列具有特异性的反义寡核苷酸序列的选择是基于对所选靶序列的分析和二级结构、 T_m 、结合能和相对稳定性的确定。反义寡核苷酸可基于它们相对不能形成将减少或抑制与宿主细胞中的靶mRNA的特异性结合的二聚体、发夹或其他二级结构来选择。mRNA的靶区可包括处于或接近AUG翻译起始密码子的那些区和与mRNA的5'区基本上互补的那些序列。这些二级结构分析和靶位点选择考虑可例如使用第4版的OLIGO引物分析软件(Molecular Biology Insights)和/或BLASTN 2.0.5算法软件来进行(Altschul等人,Nucleic Acids Res.1997,25(17):3389-402)。

[0654] 根据本公开,反义化合物(AC)改变靶基因的剪接、翻译或表达的一个或多个方面,例如通过改变真核靶前mRNA的剪接。根据本公开的AC包含与靶前mRNA序列内(例如,在包括外显子的至少一部分、内含子的至少一部分或两者的序列处)发现的序列互补的核酸序列。使用这些AC提供了一种直接的遗传方法,所述方法能够调节特定致病基因的剪接。反义技术背后的原理是与靶核酸杂交的反义化合物通过多种反义机制中的一种调节基因表达活动诸如剪接或翻译。AC的序列特异性使得所述技术作为选择性地调节参与多种疾病中的任一种的发病机制的前mRNA的剪接的治疗方法而极具吸引力。反义技术是用于改变一种或多种特定基因产物的表达的有效手段并且可因此证明在许多治疗、诊断和研究应用中是有用的。

[0655] 本文所述的化合物可含有一个或多个不对称中心,并且因此产生对映异构体、非对映异构体和其他立体异构构型,这些构型可根据绝对立体化学定义为(R)或(S)、 α 或 β 、或者(D)或(L)。本文提供的反义化合物包括所有这些可能的异构体,以及它们的外消旋和光学纯形式。

[0656] 反义化合物杂交位点

[0657] 反义机制依赖于反义化合物与靶核酸的杂交。在实施方案中,本公开提供了与靶核酸互补的反义化合物。在实施方案中,靶核酸序列存在于前mRNA分子中。在实施方案中,靶核酸序列存在于前mRNA分子的外显子中。在实施方案中,靶核酸序列存在于前mRNA分子的内含子中。

[0658] 前mRNA分子在细胞核中产生,并在转运到细胞质进行翻译之前或期间进行处理。前mRNA的处理包括在转录物的3'端添加5'甲基化帽和大约200-250个碱基的聚(A)尾。mRNA处理的下一步是前mRNA的剪接,这发生在90-95%的哺乳动物mRNA的成熟过程中。内含子(或介入序列)是初级转录物(或编码它的DNA)的区,不包括在成熟mRNA的编码序列中。外显子是初级转录物的区,当成熟mRNA到达细胞质时,它们仍保留在其中。外显子剪接在一起形成成熟的mRNA序列。剪接连接点也称为剪接位点,其中连接点的5'侧通常称为“5'剪接位点”或“剪接供体位点”,而3'侧称为“3'剪接位点”或“剪接受体位点”。在剪接中,上游外显子的3'端与下游外显子的5'端接合。因此,未剪接的RNA(前mRNA)在内含子的5'端具有外显子/内含子连接点,并且在内含子的3'端具有内含子/外显子连接点。内含子被去除后,外显

子在成熟mRNA中有时被称为外显子/外显子连接点处或边界处是邻接的。隐蔽剪接位点是不经常使用但在常用剪接位点被阻塞或不可用时可使用的那些剪接位点。选择性剪接,定义为外显子的不同组合剪接在一起,通常会导致单个基因产生多个mRNA转录物。

[0659] 在实施方案中,AC与剪接位点中的序列杂交。在实施方案中,AC与包含剪接位点的一部分的序列杂交。在实施方案中,AC与包含部分或全部剪接位点的序列杂交。在实施方案中,AC与包含部分或全部剪接供体位点的序列杂交。在实施方案中,AC与包含部分或全部剪接受体位点的序列杂交。在实施方案中,AC与包含部分或全部隐蔽剪接位点的序列杂交。在实施方案中,AC与包含外显子/内含子连接点的序列杂交。

[0660] 前mRNA剪接涉及两个连续的生化反应。两种反应都涉及RNA核苷酸之间的剪接体酯交换反应。在第一个反应中,内含子内特定分支点核苷酸(在剪接体组装期间定义)的2' -OH在5' 剪接位点处对内含子的第一个核苷酸进行亲核攻击,从而形成套索中间体(lariat intermediate)。在第二个反应中,释放的5' 外显子的3' -OH对3' 剪接位点处的内含子的最后一个核苷酸进行亲核攻击,从而接合外显子并释放内含子套索。前mRNA剪接由内含子沉默序列(ISS)和末端茎环(TSL)序列调节。如本文所用,术语“内含子沉默序列(ISS)”和“末端茎环(TSL)”分别指内含子和外显子内的序列元件,所述序列元件通过前mRNA内的反式作用蛋白因子的结合来控制选择性剪接,从而导致剪接位点的不同使用。典型地,内含子沉默序列在8至16个核苷酸之间,并且比外显子-内含子连接点处的剪接位点保守性更低。末端茎环序列典型地在12至24个核苷酸之间,并且由于12-24个核苷酸序列内的互补性并因此结合而形成二级环结构。

[0661] 在实施方案中,AC与包含部分或全部内含子沉默序列的序列杂交。在实施方案中,AC与包含部分或全部末端茎环的序列杂交。

[0662] 至多50%的由点突变引起的人遗传病是由异常剪接引起的。这类点突变可破坏当前剪接位点或创建新的剪接位点,从而导致mRNA转录物包含不同的外显子组合或外显子缺失。点突变还可能导致隐蔽剪接位点的激活或破坏顺式调节元件(即剪接增强子或沉默子)。

[0663] 在实施方案中,AC与包含由靶基因中的突变产生的部分或全部异常剪接位点的序列杂交。在实施方案中,AC与包含部分或全部调节元件的序列杂交。还提供了靶向顺式调节元件的反义化合物。在实施方案中,调节元件在外显子中。在实施方案中,调节元件在内含子中。

[0664] 在实施方案中,AC可与翻译起始密码子区、5' 帽区、内含子/外显子连接点、编码序列、翻译终止密码子区或者5' -非翻译区或3' -非翻译区中的序列特异性杂交。在实施方案中,AC可与部分或全部前mRNA剪接位点、外显子-外显子连接点或内含子-外显子连接点杂交。在实施方案中,AC可与由于重排或缺失而导致的异常融合连接点杂交。在实施方案中,AC可与选择性剪接的mRNA中的特定外显子杂交。

[0665] 在实施方案中,AC与长度在5至50个核苷酸之间的序列杂交,所述长度也可称为AC的长度。在实施方案中,AC的长度在5至50个核苷酸之间,例如长度在5至10、10至15、15至20、20至25、25至30、30至35、35至40、40至45之间或45至50个核苷酸之间。在实施方案中,AC的长度是约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个核苷酸。在

实施方案中,AC的长度是至少约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19或约20,并且至多约21、约22、约23、约24或约25,并且至多约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39或约40,并且至多约41、约42、约43、约44、约45、约46、约47、约48、约49或约50个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约10个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约15个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约16个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约17个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约18个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约19个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约20个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约21个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约22个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约23个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约24个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约25个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约26个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约27个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约28个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约29个核苷酸。在一些实施方案中,AC的长度是约30个核苷酸。

[0666] 在实施方案中,AC可与靶核酸序列小于100%互补。如本文所用,术语“互补百分比”是指与寡聚化合物或核酸的对应核碱基具有核碱基互补性的AC的核碱基数量除以AC的总长度(核碱基数量)。本领域技术人员认识到,在不消除反义化合物活性的情况下,包含错配是可能的。在实施方案中,AC可含有至多约20%的核苷酸,其破坏AC与靶核酸的碱基配对。在实施方案中,AC含有不超过约15%、不超过约10%、不超过5%的错配或无错配。在实施方案中,AC含有不超过1、2、3、4或5个错配。在实施方案中,AC与靶核酸至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。寡核苷酸的互补性百分比是通过将互补核碱基的数量除以寡核苷酸的核碱基总数来计算。寡核苷酸区的互补性百分比是通过将所述区中互补核碱基的数量除以核碱基区的总数来计算。

[0667] 在实施方案中,与未修饰的化合物相比,掺入核苷酸亲和力修饰允许更大数量的错配。类似地,某些寡核苷酸序列可比其他寡核苷酸序列更耐受错配。本领域普通技术人员能够确定寡核苷酸之间或寡核苷酸与靶核酸之间的适当数量的错配,诸如通过确定解链温度(T_m)。 T_m 或 AT_m 可通过本领域普通技术人员熟悉的技术来计算。例如,Freier等人(Nucleic Acids Research, 1997, 25, 22:4429-4443)描述的技术允许本领域普通技术人员评价核苷酸修饰提高RNA:DNA双链体解链温度的能力。

[0668] 反义机制

[0669] 根据本公开的AC可调节蛋白质转录、翻译和表达的一个或多个方面。在实施方案中,与靶前mRNA内的靶序列杂交的AC调节前mRNA剪接的一个或多个方面。如本文所用,剪接的调节是指改变前mRNA转录物的处理,使得剪接的mRNA分子由于外显子跳跃或外显子包含、一个或多个外显子的缺失或者剪接的mRNA中通常不存在的序列(例如内含子序列)的缺失或添加而含有不同的外显子的组合。在实施方案中,与前mRNA分子内的靶序列的AC杂交恢复了对突变的前mRNA序列的天然剪接。在实施方案中,AC杂交导致靶前mRNA的选择性剪接。在实施方案中,AC杂交导致一个或多个外显子的外显子包含或外显子跳跃。在实施方案中,跳跃的外显子序列包含移码突变、无义突变或错义突变。在实施方案中,跳跃的外显子序列包含核酸缺失、取代或插入。在实施方案中,跳跃的外显子本身不包含序列突变,但邻近的外显子包含导致移码突变或无义突变的突变。在实施方案中,不包含序列突变的外显

子的缺失恢复了成熟mRNA的阅读框。在实施方案中,AC与靶前mRNA内的靶序列杂交导致野生型靶蛋白异构体的优先表达。在实施方案中,AC与靶前mRNA内的靶序列杂交导致包含野生型靶蛋白的活性片段的再剪接靶蛋白的表达。

[0670] 反义机制经由反义化合物与靶核酸的杂交来发挥作用。在实施方案中,AC与其靶序列杂交抑制靶蛋白的表达。在实施方案中,AC与其靶序列杂交抑制一种或多种野生型靶蛋白异构体的表达。在实施方案中,AC与其靶序列杂交上调靶蛋白的表达。在实施方案中,AC与其靶序列杂交增加一种或多种野生型靶蛋白异构体的表达。

[0671] 本公开的AC的功效可通过评价由其施用所影响的反义活性来评估。如本文所用,术语“反义活性”是指可归因于反义化合物与其靶核酸杂交的任何可检测和/或可测量的活性。此种检测和/或测量可以是直接或间接的。在实施方案中,反义活性是通过检测和/或测量靶蛋白的量来评估。在实施方案中,反义活性是通过检测和/或测量再剪接靶蛋白的量来评估。在实施方案中,反义活性是通过检测和/或测量靶核酸和/或切割的靶核酸和/或选择性剪接的靶核酸的量来评估。

[0672] 反义化合物设计

[0673] 根据本公开的AC的设计将取决于所靶向的序列。将AC靶向特定的靶核酸分子可以是多步骤过程。所述过程通常从靶核酸的鉴定开始,所述靶核酸的表达将被调节。如本文所用,术语“靶核酸”和“编码靶基因的核酸”涵盖编码所选择的靶基因的DNA、从此种DNA转录的RNA(包括前mRNA和mRNA)以及从此种RNA衍生的eDNA。例如,靶核酸可以是表达与特定病症或疾病病况相关的细胞基因(或由所述基因转录的mRNA),或感染原的核酸分子。

[0674] 本领域技术人员将能够设计、合成和筛选不同核碱基序列的反义化合物,以鉴定产生反义活性的序列。例如,可设计改变靶前mRNA的剪接或抑制靶蛋白的表达的反义化合物。用于设计、合成和筛选针对预选靶核酸的反义活性的反义化合物的方法可见于例如由Stanley T.Crooke编辑的“Antisense Drug Technology,Principles,Strategies,and Applications”,CRC Press,Boca Raton,Florida,其全文以引用方式并入以用于任何目的。

[0675] 在实施方案中,反义化合物包含修饰的核苷、修饰的核苷间键联和/或缀合基团。

[0676] 在实施方案中,反义化合物是“三环-DNA(tc-DNA)”,其是指一类受约束的DNA类似物,其中每个核苷酸通过引入环丙烷环而被修饰以限制主链的构象柔性并且优化扭转角 γ 的主链几何形状。含同碱基腺嘌呤和胸腺嘧啶的tc-DNA与互补的RNA形成非常稳定的A-T碱基对。

[0677] 核苷

[0678] 在实施方案中,提供了包含连接核苷的反义化合物。在实施方案中,一些或所有的核苷是修饰的核苷。在实施方案中,一个或多个核苷包含修饰的核碱基。在实施方案中,一个或多个核苷包含修饰的糖。化学修饰的核苷通常用于掺入反义化合物中以增强一种或多种特性,诸如核酸酶抗性、药代动力学或对靶RNA的亲合力。

[0679] 通常,核碱基是含有能够与另一核酸的碱基氢键合的一个或多个原子或原子团的任何基团。除了“未修饰的”或“天然的”核碱基诸如嘌呤核碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)以及嘧啶核碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)外,本领域技术人员已知的许多修饰的核碱基或核碱基模拟物也适用于本文所述的化合物。术语修饰的核碱基和核碱基模拟物可重

叠,但通常修饰的核碱基是指在结构上与亲本核碱基类似的核碱基,例如像7-脱氮嘌呤、5-甲基胞嘧啶或G-钳,而核碱基模拟物将包括更复杂的结构,例如像三环吩噻嗪核碱基模拟物。用于制备上述修饰的核碱基的方法是本领域技术人员熟知的。

[0680] 在实施方案中,本文提供的AC包含一个或多个具有修饰的糖部分的核苷。在实施方案中,天然核苷的呋喃糖基糖环可以多种方式被修饰,包括但不限于添加取代基、桥接两个非偕环原子以形成双环核酸(BNA)以及用原子或基团诸如-S-、-N(R)-C(R₁)(R₂)取代4'-位的环氧。修饰的糖部分是众所周知的,并且可用于改变(典型地是增加)反义化合物对其靶标的亲和力和/或增加核酸酶抗性。修饰的糖的代表性列表包括但不限于非双环取代的糖,尤其是具有2'-F、2'-OCH₃或2'-O(CH₂)₂-OCH₃取代基的非双环2'-取代的糖;和4'-硫代修饰的糖。糖也可用糖模拟基团等替换,例如,呋喃糖环可用吗啉环替换。用于制备修饰的糖的方法是本领域技术人员熟知的。一些教导制备此类修饰的糖的代表性专利和出版物包括但不限于美国专利:4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;5,792,747;5,700,920;和6,600,032;以及WO 2005/121371。

[0681] 在实施方案中,核苷包含双环修饰的糖(BNA),包括LNA(4'-(CH₂)-O-2'桥)、2'-硫代-LNA(4'-(CH₂)-S-2'桥)、2'-氨基-LNA(4'-(CH₂)-NR-2'桥)、ENA(4'-(CH₂)₂-O-2'桥)、4'-(CH₂)₃-2'桥接的BNA、4'-(CH₂CH(CH₃))-2'桥接的BNATMcEt(4'-(CH(CH₃))-O-2'桥)和cMOE BNA(4'-(CH(CH₂OCH₃))-O-2'桥)。在专利文献以及科学文献中已制备并公开了某些此类BNA(参见例如Srivastava等人J. Am. Chem. Soc. 2007, ACS Advanced online publication, 10.1021/ja071106y, Albaek等人J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740, Fluiter等人Chembiochem 2005, 6, 1104-1109, Singh等人, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin等人, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; WO 94/14226; WO 2005/021570; Singh等人, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039, WO 2007/090071; 公开BNA的已发布美国专利和已公布申请的实例包括例如美国专利号7,053,207; 6,268,490; 6,770,748; 6,794,499; 7,034,133; 和6,525,191; 以及美国授权前公开号2004-0171570; 2004-0219565; 2004-0014959; 2003-0207841; 2004-0143114; 和20030082807。

[0682] 本文还提供了“锁核酸”(LNA),其中核糖基糖环的2'-羟基连接到糖环的4'碳原子,从而形成2'-C,4'-C-氧亚甲基键联以形成双环糖部分(综述于Elayadi等人, Curr. Opin. Invers. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch等人, Chem. Biol., 2001, 81-7; 和Orum等人, Curr. Opin. Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; 还参见美国专利:6,268,490和6,670,461)。所述键联可以是桥接2'氧原子和4'碳原子的亚甲基(-CH₂-)基团,为此术语LNA用于双环部分;在所述位置上为亚乙基的情况下,使用术语ENATM(Singh等人, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; ENATM: Morita等人, Bioorganic Medicinal Chemistry, 2003, 11, 2211-2226)。LNA和其他双环糖类似物显示出与互补DNA和RNA的非常高的双链体热稳定性(T_m=+3至+10°C)、对3'-核酸外切降解的稳定性和良好的溶解性。含有LNA的有效并且无毒的反义寡核苷酸已有描述(Wahlestedt等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638)。

[0683] 也已研究的LNA异构体是 α -L-LNA,其已显示对3'-外切核酸酶具有改善的稳定性。将 α -L-LNA掺入显示有效反义活性的反义间隔体和嵌合体中(Frieden等人,Nucleic Acids Research,2003,21,6365-6372)。

[0684] LNA单体腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶的合成和制备以及它们的寡聚化和核酸识别特性已有描述(Koshkin等人,Tetrahedron,1998,54,3607-3630)。LNA及其制备也描述于WO 98/39352和WO 99/14226中。

[0685] 还制备了LNA的类似物,硫代磷酸-LNA和2'-硫代-LNA(Kumar等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1998,8,2219-2222)。含有寡脱氧核糖核苷酸双链体作为核酸聚合酶底物的锁核苷类似物的制备也已有描述(Wengel等人,WO 99/14226)。一种新的构象受限的高亲和力寡核苷酸类似物2'-氨基-LNA的合成已在本领域中描述(Singh等人,J.Org.Chem.,1998,63,10035-10039)。另外,已制备了2'-氨基-LNA和2'-甲基氨基-LNA,并且先前已报道了它们与互补RNA和DNA链的双链体的热稳定性。

[0686] 核苷间键联

[0687] 本文描述了核苷间连接基团,其将核苷或另外修饰的单体单元连接在一起,从而形成反义化合物。核苷间连接基团的两个主要类别是通过磷原子的存在或不存在来定义。代表性含磷核苷间键联包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、氨基磷酸酯(包括二氨基磷酸酯)和硫代磷酸酯。代表性不含磷的核苷间连接基团包括但不限于亚甲基甲基亚氨基(-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-)、硫代二酯(-O-C(O)-S-)、硫代氨基甲酸酯(-O-C(O)(NH)-S-) ;硅氧烷(-O-Si(H)₂-O-) ;和N,N'-二甲胂(-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃-)。具有非磷核苷间连接基团的反义化合物称为寡核苷。与天然磷酸二酯键联相比,修饰的核苷间键联可用于改变(典型地是增加)反义化合物的核酸酶抗性。具有手性原子的核苷间键联可被制备成外消旋的、手性的或作为混合物。代表性手性核苷间键联包括但不限于烷基磷酸酯和硫代磷酸酯。含磷和不含磷的键联的制备方法是本领域技术人员熟知的。

[0688] 在实施方案中,磷酸基团可连接到糖的2'、3'或5'羟基部分。在形成寡核苷酸中,磷酸基团共价连接彼此相邻的核苷以形成线性聚合化合物。在寡核苷酸内,磷酸基团通常被称为形成寡核苷酸的核苷间主链。RNA和DNA的正常键联或主链是3'至5'磷酸二酯键联。

[0689] 缀合基团

[0690] 在实施方案中,通过一个或多个缀合基团的共价附接来修饰AC。通常,缀合基团修饰所附接AC的一种或多种特性,包括但不限于药效学、药代动力学、结合、吸收、细胞分布、细胞摄取、电荷和清除。缀合基团在化学领域中是常规使用的,并且直接地或经由任意的连接部分或连接基团连接到亲本化合物,诸如AC。缀合基团包括但不限于嵌入剂、报道分子、聚胺、聚酰胺、聚乙二醇、硫醚、聚醚、胆固醇、硫胆固醇、胆酸部分、叶酸、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、菲啶、葱醌、金刚烷、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。在实施方案中,缀合基团是聚乙二醇(PEG),并且PEG与AC或环肽缀合。

[0691] 缀合基团包括脂质部分,诸如胆固醇部分(Letsinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86,6553);胆酸(Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1994,4,1053);硫醚,例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660,306;Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Let.,1993,3,2765);硫胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.,1992,20,533);脂族链,例如十二烷

二醇或十一烷基残基 (Saison-Behmoaras等人,EMBO J.,1991,10,111;Kabanov等人,FEBS Lett.,1990,259,327;Svinarchuk等人,Biochimie,1993,75,49);磷脂,例如二-十六烷基外消旋甘油或三乙基铵-1,2-二-0-十六烷基外消旋甘油-3-H-磷酸酯 (Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36,3651;Shea等人,Nucl.Acids Res.,1990,18,3777);聚胺或聚乙二醇链 (Manoharan等人,Nucleosides&Nucleotides,1995,14,969);金刚烷乙酸 (Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36,3651);棕榈基部分 (Mishra等人,Biochim.Biophys.Acta,1995,1264,229);或十八胺或己基氨基-羰基-氧胆固醇部分 (Crooke等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277,923)。

[0692] 连接基团或双官能连接部分诸如本领域已知的那些可包括在本文提供的化合物中。连接基团可用于将化学官能团、缀合基团、报道基团和其他基团附接到亲本化合物(例如像AC)的选择性位点。在实施方案中,双官能连接部分包含具有两个官能团的烃基部分。在实施方案中,选择官能团中的一者与感兴趣的亲本分子或化合物结合,并且选择另一者与基本上任何选择的基团诸如化学官能团或缀合基团结合。可使用本文所述的任何接头。在实施方案中,接头包含重复单元诸如乙二醇或氨基酸单元的链结构或寡聚物。在双官能连接部分中使用的官能团的实例包括但不限于用于与亲核基团反应的亲电体和用于与亲电基团反应的亲核体。在实施方案中,双官能连接部分可包括氨基、羟基、羧酸、硫醇、不饱和度(例如双键或三键)等。双官能连接部分的一些非限制性实例包括8-氨基-3,6-二氧杂辛酸(ADO)、琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)和6-氨基己酸(AHEX或AHA)。其他连接基团包括但不限于取代的C₁-C₁₀烷基、取代或未取代的C₂-C₁₀烯基或取代或未取代的C₂-C₁₀炔基,其中取代基基团的非限制性列表包括羟基、氨基、烷氧基、羧基、苄基、苯基、硝基、硫醇、硫代烷氧基、卤素、烷基、芳基、烯基和炔基。

[0693] 在实施方案中,AC可连接到10精氨酸-丝氨酸二肽重复序列。与10精氨酸-丝氨酸二肽重复序列连接的用于人工募集剪接增强因子的AC已在体外应用,以诱导包含突变的BRCA1和SMN2外显子,否则这些外显子将被跳跃。参见Cartegni和Kraimer 2003,通过引用并入本文。

[0694] 在实施方案中,AC的长度可以是5至50个核苷酸(例如,5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50,包括其中的所有值和范围)。在实施方案中,AC的长度可以是5-10个核苷酸。在实施方案中,AC的长度可以是10-15个核苷酸。在实施方案中,AC的长度可以是15-20个核苷酸。在实施方案中,AC的长度可以是20-25个核苷酸。在实施方案中,AC的长度可以是25-30个核苷酸。在实施方案中,AC的长度可以是30-35个核苷酸。在实施方案中,AC的长度可以是35-40个核苷酸。在实施方案中,AC的长度可以是40-45个核苷酸。在实施方案中,AC的长度可以是45-50个核苷酸。

[0695] 在实施方案中,AC与编码抗肌萎缩蛋白的人DMD基因的核酸序列杂交。在实施方案中,AC结合DMD的外显子45。在实施方案中,结合到DMD的外显子45的AC的长度为约18至约30个核酸,例如长度为约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29或约30个核酸。

[0696] 在实施方案中,反义化合物与DMD外显子45的内含子内的核酸序列杂交。在实施方案中,反义化合物与DMD外显子45内的核酸序列杂交。在实施方案中,反义化合物与跨越DMD

外显子45的内含子-外显子或外显子-内含子连接点的核酸序列杂交。

[0697] Mann等人,(2002)“Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy,”J Gen Med.4:644-654提出的反义命名法系统可用于描述反义化合物可与其杂交的基因序列的靶区域。根据此命名法系统,负号(“-”)表示内含子序列,而正号(“+”)表示外显子序列。字母“A”表示反义化合物与外显子开头的受体剪接位点结合,而字母“D”表示反义化合物与外显子末端的供体剪接位点结合。例如,A(-5+15)代表与靶外显子(例如,外显子45)之前的内含子的最后5个碱基和靶外显子的前15个碱基杂交的反义寡核苷酸。类似地,D(+15-5)代表与靶外显子(例如,外显子45)的最后5个外显子碱基和靶外显子之后的前15个内含子碱基杂交的反义寡核苷酸,所述位置对应于反义分子的退火位点。与完全在外显子内的核酸序列杂交的反义寡核苷酸可以由A(+5+25)表示,例如,反义寡核苷酸与从外显子起始处的第5个核苷酸开始的核酸序列杂交,并且与同一外显子起始处的第25个核苷酸开始的核酸序列杂交。除非另有说明,否则不存在“+”或“-”符号通常意指反义寡核苷酸与靶核酸的外显子内的核酸序列结合。小写的核苷酸用于指示内含子序列,而大写的核苷酸用于指示外显子序列。

[0698] 在实施方案中,DMD的外显子45的核酸序列如下面的SEQ ID NO:1所示(从5'到3',包括侧接上游(5')和下游(3')内含子):

taaaa agaca tgggg cttca ttttt gtttt gcctt tttgg tatct tacag
GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAGC GGCAA ACTGT TGTCA GAACA TTGAA
TGCAA CTGGG GAAGA AATAA TTCAG CAATC CTCAA AAACA GATGC CAGTA
TTCTA CAGGA AAAAT TGGGA AGCCT GAATC TGCGG TGGCA GGAGG TCTGC
AAACA GCTGT CAGAC AGAAA AAAGA *Ggtag ggcga cagat ctaat aggaa*
tgaan acatt tttag agact tttta (SEQ ID NO: 1)

[0700] 上游(5')内含子序列(残基-50至-1)和下游(3')内含子序列(残基-1至-44)以小写和斜体显示;外显子序列(残基+1至+176)以大写粗体和下划线显示。在实施方案中,抗肌萎缩蛋白外显子45的人杜兴氏肌营养不良(DMD)基因的核酸序列包含176个核苷酸。

[0701] 在实施方案中,结合到DMD的外显子45的AC选自表6A-6P、表7A-70或表8A-8C中所示的核酸序列中的任一种、其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列。

[0702] 在实施方案中,AC包含与SEQ ID NO:1的连续核苷酸互补的15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸(例如,AC是15-mer、16-mer、17-mer、18-mer、19-mer、20-mer、21-mer、22-mer、23-mer、24-mer、25-mer、26-mer、27-mer、28-mer、29-mer或30-mer),其中AC的第一核苷酸在SEQ ID NO:1的位置+1、+2、+3、+4、+5、+6、+7、+8、+9、+10、+11、+12、+13、+14、+15、+16、+17、+18、+19、+20、+21、+22、+23、+24、+25、+26、+27、+28、+29、+30、+31、+32、+33、+34、+35、+36、+37、+38、+39、+40、+41、+42、+43、+44、+45、+46、+47、+48、+49、+50、+51、+52、+53、+54、+55、+56、+57、+58、+59、+60、+61、+62、+63、+64、+65、+66、+67、+68、+69、+70、+71、+72、+73、+74、+75、+76、+77、+78、+79、+80、+81、+82、+83、+84、+85、+86、+87、+88、+89、+90、+91、+92、+93、+94、+95、+96、+97、+98、+99、+100、+101、+102、+103、+104、+105、+106、+107、+108、+109、+110、+111、+112、+113、+114、+115、+116、+117、+118、+119、+120、+121、+122、+123、+124、+125、+126、+127、+128、+129、+130、+131、+132、+133、+134、+135、+136、+137、+138、+139、+140、+141、+142、+143、+144、+145、+146、+147、+148、+149、+150、+151、+152、+153、+154、+155、+156、+157、+158、+159、+160、+161、+162、+163、w+

164、+165、+1616、+167、+168、+169、+170、+171、+172、+173、+174、+175或+176处与DMD的外显子45的核苷酸杂交。在实施方案中,AC包含与外显子45之后的3'内含子序列的连续核苷酸互补的核苷酸(3'内含子序列未示出)。如本文所用,“第一核苷酸”是指AC的5'核苷酸。

[0703] 在实施方案中,AC结合选自由表6A-6P、表7A-70或表8A-8C中所示序列组成的核酸序列的DMD外显子45的序列。在实施方案中,结合DMD的外显子45的AC选自表6A-6P、表7A-70和表8A-8C内的核酸序列中的任一种或其反向互补序列。在实施方案中,结合到DMD的外显子45的AC选自表6A-6P、表7A-70和表8A-8C中所示的核酸序列中的任一种、其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列。在实施方案中,结合到DMD的外显子45的AC包含一种或多种修饰的核酸、一种或多种修饰的核苷酸键联或它们的组合。在实施方案中,结合到外显子45的AC包含一个或多个吗啉环、一个或多个二氨基磷酸酯键联或它们的组合。在实施方案中,结合到DMD的外显子45的AC是具有选自表6A-6P内的核酸序列中的任一种的序列、其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列的反义二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(PMO)。

[0704] 表6A. 与DMD的外显子45结合的15-mer AC

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCAT
	GATGGCATTGGGCAG
	GATGGCATTGGGCAG
	CAGATGCCAGTATTC
	CAAAAACCTCCTAACG
	AGGAAAAATTGGGAA
[0705]	ACATCTTATGACCGT
	TCTGCGGTGGCAGGA
	TAAGTCCGAAGGGTT
	GCGGTGGCAGGAGGT
	GTCTAAGTCCGAAGG
	GTCTAAGTCCGAAGGG
	GTGGCAGGAGGTCTG
	GGCGTCTAAGTCCGA

核酸序列(5' - 3')	
	CAGACTGTCGACAAA
	AGAAAAAAGACAGAC
	TCCTAACGACTTAAT
	AACTGGGGAAGAAAT
	CGTAGACAAAAACTC
	ATAATTCAGCAATCC
	AGGACATCTTATGAC
	TCAAAAACAGATGCC
	AAAAAGGACATCTTA
	AAACAGATGCCAGTA
	TAAAAAGGACATCTT
[0706]	AACAGATGCCAGTAT
	GGAGGACGGTGGCGT
	GGGAAGCCTGAATCT
	AAGACAGACTGTCGA
	GGAGGTCTGCAAACA
	AAAGACAGACTGTCG
	GAGGTCTGCAAACAG
	AAAAAAGACAGACTG
	GTCTGCAAACAGCTG
	AGAAAAAAGACAGAC
	CTGCAAACAGCTGTC
	TGCAAACAGCTGTCA
	AAACAGCTGTCAGAC
	TGTCAGACAGAAAAA

[0707] 表6B. 与DMD的外显子45结合的16-merAC

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCATT
	GATGGCATTGGGCAGC
	GATGGCATTGGGCAGC
	CAGATGCCAGTATTCT
	CAAAAACCTCCTAACGA
	AGGAAAAATTGGGAAG
	ACATCTTATGACCGTA
[0708]	TCTGCGGTGGCAGGAG
	TAAGTCCGAAGGGTTA
	GCGGTGGCAGGAGGTC
	GTCTAAGTCCGAAGGG
	GTGGCAGGAGGTCTGC
	GGCGTCTAAGTCCGAA
	CAGACTGTCGACAAAC
	AGAAAAAAGACAGACT
	CTCCTAACGACTTAAT
	CAACTGGGGAAGAAAT

核酸序列(5' - 3')	
	CCGTAGACAAAACTC
	AATAATTCAGCAATCC
	AAGGACATCTTATGAC
	CTCAAAAACAGATGCC
	TAAAAAGGACATCTTA
	AAAACAGATGCCAGTA
	TTAAAAAGGACATCTT
	AAACAGATGCCAGTAT
[0709]	TGGAGGACGGTGGCGT
	TGGGAAGCCTGAATCT
	AAAGACAGACTGTCGA
	AGGAGGTCTGCAAACA
	AAAAGACAGACTGTCG
	GGAGGTCTGCAAACAG
	GAAAAAAGACAGACTG
	GGTCTGCAAACAGCTG
	TCTGCAAACAGCTGTC
	CTGCAAACAGCTGTCA
	CAAACAGCTGTCAGAC
	CTGTCAGACAGAAAAA

[0710] 表6C. 与DMD的外显子45结合的17-merAC

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCATTG
	GATGGCATTGGGCAGCG
	GATGGCATTGGGCAGCG
	CAGATGCCAGTATTCTA
	CAAAAACCTCCTAACGAC
	AGGAAAAATTGGGAAGC
	ACATCTTATGACCGTAG
	TCTGCGGTGGCAGGAGG
	TAAGTCCGAAGGGTTAA
[0711]	GCGGTGGCAGGAGGTCT
	GTCTAAGTCCGAAGGGT
	GTGGCAGGAGGTCTGCA
	GGCGTCTAAGTCCGAAG
	CAGACTGTCGACAAACG
	AGAAAAAAGACAGACTG
	ACTCCTAACGACTTAAT
	GCAACTGGGGAAGAAAT
	ACCGTAGACAAAACTC
	AAATAATTCAGCAATCC
	AAAGGACATCTTATGAC
	CCTCAAAAACAGATGCC
	TTAAAAAGGACATCTTA

核酸序列(5' - 3')	
	AAAAACAGATGCCAGTA
	GTAAAAAAGGACATCTT
	AAAACAGATGCCAGTAT
	CTGGAGGACGGTGGCGT
	TTGGGAAGCCTGAATCT
	AAAAGACAGACTGTCTGA
[0712]	CAGGAGGTCTGCAAACA
	AAAAAGACAGACTGTCTG
	AGGAGGTCTGCAAACAG
	AGAAAAAAGACAGACTG
	AGGTCTGCAAACAGCTG
	GTCTGCAAACAGCTGTC
	TCTGCAAACAGCTGTCA
	GCAAACAGCTGTCAGAC
	GCTGTCAGACAGAAAAA

[0713] 表6D. 与DMD的外显子45结合的18-mer AC

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCATTGG
	GATGGCATTGGGCAGCGG
	GATGGCATTGGGCAGCGG
	CAGATGCCAGTATTCTAC
	CAAAAACCTCCTAACGACT
	AGGAAAAATTGGGAAGCC
	ACATCTTATGACCGTAGA
	TCTGCGGTGGCAGGAGGT
	TAAGTCCGAAGGGTTAAA
	GCGGTGGCAGGAGGTCTG
	GTCTAAGTCCGAAGGGTT
	GTGGCAGGAGGTCTGCAA
[0714]	GGCGTCTAAGTCCGAAGG
	CAGACTGTGACAAAACGT
	AGAAAAAAGACAGACTGT
	AACTCCTAACGACTTAAT
	TGCAACTGGGGAAGAAAT
	GACCGTAGACAAAACCTC
	GAAATAATTCAGCAATCC
	AAAAGGACATCTTATGAC
	TCCTCAAAAACAGATGCC
	GTAAAAAAGGACATCTTA
	CAAAAACAGATGCCAGTA
	GGTAAAAAGGACATCTT
	AAAAACAGATGCCAGTAT
	TCTGGAGGACGGTGGCGT
	ATTGGGAAGCCTGAATCT

核酸序列(5' - 3')	
	AAAAAGACAGACTGTCTGA
	GCAGGAGGTCTGCAAACA
	AAAAAAGACAGACTGTCTG
[0715]	CAGGAGGTCTGCAAACAG
	GAGGTCTGCAAACAGCTG
	GGTCTGCAAACAGCTGTC
	GTCTGCAAACAGCTGTCA
	TGCAAACAGCTGTCAGAC
	AGCTGTCAGACAGAAAAA

[0716] 表6E. 与DMD的外显子45结合的19-mer AC

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCATTGGG
	GATGGCATTGGGCAGCGGC
	GATGGCATTGGGCAGCGGC
	CAGATGCCAGTATTCTACA
	CAAAAACCTCCTAACGACTT
	AGGAAAAATTGGGAAGCCT
	ACATCTTATGACCGTAGAC
	TCTGCGGTGGCAGGAGGTC
	TAAGTCCGAAGGGTAAAA
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGC
	GTCTAAGTCCGAAGGGTAA
	GTGGCAGGAGGTCTGCAA
	GGCGTCTAAGTCCGAAGGG
	CAGACTGTCGACAAACGTC
	AGAAAAAAGACAGACTGTC
[0717]	AAACTCCTAACGACTTAAT
	ATGCAACTGGGAAGAAAT
	TGACCGTAGACAAAAACTC
	AGAAATAATTCAGCAATCC
	AAAAAGGACATCTTATGAC
	ATCCTCAAAAACAGATGCC
	GGTAAAAAGGACATCTTA
	TCAAAAACAGATGCCAGTA
	GGGTAAAAAGGACATCTT
	CAAAAACAGATGCCAGTAT
	GTCTGGAGGACGGTGGCGT
	AATTGGGAAGCCTGAATCT
	AAAAAAGACAGACTGTCGA
	GGCAGGAGGTCTGCAAACA
	GAAAAAAGACAGACTGTCG
	GCAGGAGGTCTGCAAACAG
	GGAGGTCTGCAAACAGCTG
	AGGTCTGCAAACAGCTGTC

核酸序列(5' - 3')	
[0718]	GGTCTGCAAACAGCTGTCA
	CTGCAAACAGCTGTCAGAC
	CAGCTGTCAGACAGAAAA

[0719] 表6F. 与DMD的外显子45结合的20-mer AC

核酸序列(5' - 3')	
[0720]	ACTCCAGGATGGCATTGGGC
	GATGGCATTGGGCAGCGGCA
	GATGGCATTGGGCAGCGGCA
	CAGATGCCAGTATTCTACAG
	CAAAAACCTCCTAACGACTTA
	AGGAAAAATTGGGAAGCCTG
	ACATCTTATGACCGTAGACA
	TCTGCGGTGGCAGGAGGTCT
	TAAGTCCGAAGGGTAAAAA
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCA
	GTCTAAGTCCGAAGGGTAA

GTGGCAGGAGGTCTGCAAAC
GGCGTCTAAGTCCGAAGGGT
CAGACTGTCGACAAACGTCT
AGAAAAAGACAGACTGTCG
AAAACCTAACGACTTAAT
AATGCAACTGGGAAGAAAT
ATGACCGTAGACAAAACTC
AAGAAATAATTCAGCAATCC
TAAAAAGGACATCTTATGAC
AATCCTCAAAAACAGATGCC
GGGTAAAAAGGACATCTTA
CTCAAAAACAGATGCCAGTA
AGGGTAAAAAGGACATCTT
TCAAAAACAGATGCCAGTAT
CGTCTGGAGGACGGTGGCGT
AAATTGGGAAGCCTGAATCT
GAAAAAGACAGACTGTCTGA
TGGCAGGAGGTCTGCAAACA
AGAAAAAGACAGACTGTCG
GGCAGGAGGTCTGCAAACAG
AGGAGGTCTGCAAACAGCTG
GAGGTCTGCAAACAGCTGTC
AGGTCTGCAAACAGCTGTCA
TCTGCAAACAGCTGTCAGAC
ACAGCTGTCAGACAGAAAAA

[0721] 表6G. 与DMD的外显子45结合的21-mer AC

[0722]

核酸序列 (5' -3')
ACTCCAGGATGGCATTGGGCA
GATGGCATTGGGCAGCGGCAA
GATGGCATTGGGCAGCGGCAA
CAGATGCCAGTATTCTACAGG
CAAAAACCTAACGACTTAA
AGGAAAAATTGGGAAGCCTGA
ACATCTTATGACCGTAGACAA
TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTG
TAAGTCCGAAGGGTAAAAAG
GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAA
GTCTAAGTCCGAAGGGTAAAA
GTGGCAGGAGGTCTGCAAACA

GGCGTCTAAGTCCGAAGGGTT
CAGACTGTGACAAAACGTCTG
AGAAAAAAGACAGACTGTGCGA
AAAAACTCCTAACGACTTAAT
GAATGCAACTGGGGAAGAAAT
TATGACCGTAGACAAAAACTC
GAAGAAATAATTCAGCAATCC
TTAAAAAGGACATCTTATGAC
CAATCCTCAAAAACAGATGCC
AGGGTTAAAAAGGACATCTTA
CCTCAAAAACAGATGCCAGTA
AAGGGTTAAAAAGGACATCTT
CTCAAAAACAGATGCCAGTAT
ACGTCTGGAGGACGGTGGCGT
AAAATTGGGAAGCCTGAATCT
AGAAAAAAGACAGACTGTGCGA
GTGGCAGGAGGTCTGCAAACA
TGGCAGGAGGTCTGCAAACAG
CAGGAGGTCTGCAAACAGCTG
GGAGGTCTGCAAACAGCTGTC
GAGGTCTGCAAACAGCTGTCA
GTCTGCAAACAGCTGTCAGAC
AACAGCTGTCAGACAGAAAAA

[0723] 表6H. 与DMD的外显子45结合的22-mer AC

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCATTGGGCAG
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAA
[0724]	GATGGCATTGGGCAGCGGCAA
	CAGATGCCAGTATTCTACAGGA
	CAAAAACCTAACGACTTAAT
	AGGAAAAATTGGGAAGCCTGAA
	ACATCTTATGACCGTAGACAAA

[0725]

核酸序列(5' - 3')	
TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGC	
TAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGG	
GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAA	
GTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAA	
GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG	
GGCGTCTAAGTCCGAAGGGTTA	
CAGACTGTCGACAAACGTCTGG	
AGAAAAAAGACAGACTGTCGAC	
CAAAAACCTCTAACGACTTAAT	
TGAATGCAACTGGGAAGAAAT	
TTATGACCGTAGACAAAACTC	
GGAAGAAATAATTCAGCAATCC	
GTTAAAAAGGACATCTTATGAC	
GCAATCCTCAAAAACAGATGCC	
AAGGGTTAAAAAGGACATCTTA	
TCCTCAAAAACAGATGCCAGTA	
GAAGGGTTAAAAAGGACATCTT	
CCTCAAAAACAGATGCCAGTAT	
AACGTCTGGAGGACGGTGGCGT	
AAAAATTGGGAAGCCTGAATCT	
GGTGGCAGGAGGTCTGCAAACA	
GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG	
GCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG	
AGGAGGTCTGCAAACAGCTGTC	
GGAGGTCTGCAAACAGCTGTCA	
GGTCTGCAAACAGCTGTCAGAC	
AAACAGCTGTCAGACAGAAAA	

[0726]

表6I. 与DMD的外显子45结合的23-mer AC

[0727]

核酸序列(5' - 3')	
ACTCCAGGATGGCATTGGGCAGC	
GATGGCATTGGGCAGCGCAAAC	
GATGGCATTGGGCAGCGCAAAC	
CAGATGCCAGTATTCTACAGGAA	
CAAAAACCTCTAACGACTTAATA	
AGGAAAAATTGGGAAGCCTGAAT	
ACATCTTATGACCGTAGACAAAA	
TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCA	
TAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGA	
GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAAC	
GTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAA	
GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGC	
GGCGTCTAAGTCCGAAGGGTTAA	
CAGACTGTCGACAAACGTCTGGA	
AGAAAAAAGACAGACTGTCGACA	

核酸序列(5' - 3')	
	ACAAAACTCCTAACGACTTAAT
	TTGAATGCAACTGGGAAGAAAT
	CTTATGACCGTAGACAAAACTC
	GGGAAGAAATAATTCAGCAATCC
	GGTAAAAAGGACATCTTATGAC
	AGCAATCCTCAAAAACAGATGCC
	GAAGGGTAAAAAGGACATCTTA
	ATCCTCAAAAACAGATGCCAGTA
[0728]	CGAAGGGTAAAAAGGACATCTT
	TCCTCAAAAACAGATGCCAGTAT
	AAACGTCTGGAGGACGGTGGCGT
	GAAAAATTGGGAAGCCTGAATCT
	CGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACA
	GGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG
	GGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG
	CAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTC
	AGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCA
	AGGTCTGCAAACAGCTGTCAGAC
	CAAACAGCTGTCAGACAGAAAA

[0729] 表6J. 与DMD的外显子45结合的24-mer AC

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCG
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAAC
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAAC
	CAGATGCCAGTATTCTACAGGAAA
	CAAAAACTCCTAACGACTTAATAA
	AGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATC
	ACATCTTATGACCGTAGACAAAA
	TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAA
	TAAGTCCGAAGGGTAAAAAGGAC
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACA
[0730]	GTCTAAGTCCGAAGGGTAAAAAG
	GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCT
	GGCGTCTAAGTCCGAAGGGTAAA
	CAGACTGTCGACAAACGTCTGGAG
	AGAAAAAAGACAGACTGTCGACAA
	GACAAAAACTCCTAACGACTTAAT
	ATTGAATGCAACTGGGAAGAAAT
	TCTTATGACCGTAGACAAAACTC
	GGGAAGAAATAATTCAGCAATCC
	GGGTAAAAAGGACATCTTATGAC
	CAGCAATCCTCAAAAACAGATGCC
	CGAAGGGTAAAAAGGACATCTTA
	AATCCTCAAAAACAGATGCCAGTA

核酸序列(5' - 3')	
	CCGAAGGGTAAAAAGGACATCTT
	ATCCTCAAAAACAGATGCCAGTAT
	CAAACGTCTGGAGGACGGTGGCGT
	GGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCT
[0731]	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACA
	CGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG
	TGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG
	GCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTC
	CAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCA
	GAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGAC
	GCAAACAGCTGTCAGACAGAAAA

[0732] 表6K. 与DMD的外显子45结合的25-mer AC

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGG
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTG
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTG
	CAGATGCCAGTATTCTACAGGAAAA
	CAAAAACCTCCTAACGACTTAATAAA
	AGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCT
	ACATCTTATGACCGTAGACAAAAAC
	TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAA
	TAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACA
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG
	GTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGG
	GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG
	GGCGTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAA
	CAGACTGTCGACAAACGTCTGGAGG
	AGAAAAAAGACAGACTGTCGACAAA
[0733]	AGACAAAAACTCCTAACGACTTAAT
	CATTGAATGCAACTGGGGAAGAAAT
	ATCTTATGACCGTAGACAAAAACTC
	TGGGGAAGAAATAATTCAGCAATCC
	AGGGTTAAAAAGGACATCTTATGAC
	TCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCC
	CCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTTA
	CAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTA
	TCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTT
	AATCCTCAAAAACAGATGCCAGTAT
	ACAAACGTCTGGAGGACGGTGGCGT
	AGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCT
	TGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACA
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG
	GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG
	GGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTC

[0734]

	GCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCA
	GGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGAC
	TGCAAACAGCTGTCAGACAGAAAAA

[0735] 表6L. 与DMD的外显子45结合的26-mer AC

[0736]

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGGC
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGT
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGT
	CAGATGCCAGTATTCTACAGGAAAAA
	CAAAAACCTCCTAACGACTTAATAAAG
	AGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCTG
	ACATCTTATGACCGTAGACAAAAACT
	TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAAC
	TAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACAT
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGC
	GTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGA
	GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGT

GGCGTCTAAGTCCGAAGGGTAAAAA
CAGACTGTCGACAAACGTCTGGAGGA
AGAAAAAGACAGACTGTCGACAAAC
TAGACAAAACTCCTAACGACTTAAT
ACATTGAATGCAACTGGGGAAGAAAT
CATCTTATGACCGTAGACAAAACTC
CTGGGGAAGAAATAATTCAGCAATCC
AAGGGTAAAAAGGACATCTTATGAC
TTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCC
TCCGAAGGGTAAAAAGGACATCTTA
GCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTA
GTCCGAAGGGTAAAAAGGACATCTT
CAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTAT
GACAAACGTCTGGAGGACGGTGGCGT
CAGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCT
CTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACA
TGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG
GGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG
TGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTC
GGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCA
AGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGAC
CTGCAAACAGCTGTCAGACAGAAAAA

[0737] 表6M. 与DMD的外显子45结合的27-mer AC

	核酸序列(5' - 3')
[0738]	ACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGGCA
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACGTGT

核酸序列(5' - 3')	
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGTT
	CAGATGCCAGTATTCTACAGGAAAAAT
	CAAAAACCTCCTAACGACTTAATAAAGA
	AGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCTGC
	ACATCTTATGACCGTAGACAAAAACTC
	TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACA
	TAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATC
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCT
	GTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGAC
	GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTC
	GGCGTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAAAG
	CAGACTGTCGACAAACGTCTGGAGGAC
	AGAAAAAAGACAGACTGTGACAAACG
	GTAGACAAAAACTCCTAACGACTTAAT
[0739]	AACATTGAATGCAACTGGGGAAGAAAT
	ACATCTTATGACCGTAGACAAAAACTC
	ACTGGGGAAGAAATAATTCAGCAATCC
	GAAGGGTTAAAAAGGACATCTTATGAC
	ATTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCC
	GTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTTA
	AGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTA
	AGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTT
	GCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTAT
	CGACAAACGTCTGGAGGACGGTGGCGT
	ACAGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCT
	TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACA
	CTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG
	CGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG
	GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTC
	TGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCA
	CAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGAC
	TCTGCAAACAGCTGTCAGACAGAAAAA

[0740] 表6N. 与DMD的外显子45结合的28-mer AC

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGGCAA
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGTTG
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGTTG
	CAGATGCCAGTATTCTACAGGAAAAAT
[0741]	CAAAAACCTCCTAACGACTTAATAAAGAA
	AGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCTGCG
	ACATCTTATGACCGTAGACAAAAACTCC
	TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG
	TAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCT
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG

核酸序列(5' - 3')	
	GTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACA
	GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCA
	GCGGTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGG
	CAGACTGTCGACAAACGTCTGGAGGACG
	AGAAAAAGACAGACTGTCGACAAACGT
	CGTAGACAAAACTCCTAACGACTTAAT
	GAACATTGAATGCAACTGGGGAAGAAAT
	GACATCTTATGACCGTAGACAAAACTC
	AACTGGGGAAGAAATAATTCAGCAATCC
	CGAAGGGTTAAAAAGGACATCTTATGAC
[0742]	AATTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCC
	AGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTTA
	CAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTA
	AAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTT
	AGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTAT
	TCGACAAACGTCTGGAGGACGGTGGCGT
	TACAGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCT
	ATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACA
	TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG
	GGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTC
	GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCA
	GCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGAC
	GTCTGCAAACAGCTGTCAGACAGAAAAA

[0743] 表60. 与DMD的外显子45结合的29-mer AC

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGGCAAA
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGTTGT
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGTTGT
	CAGATGCCAGTATTCTACAGGAAAAATTG
	CAAAAACCTCCTAACGACTTAATAAGAAG
	AGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCTGCGG
	ACATCTTATGACCGTAGACAAAACTCCT
	TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGC
[0744]	TAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTT
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGT
	GTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACAT
	GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAG
	GCGGTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGA
	CAGACTGTCGACAAACGTCTGGAGGACGG
	AGAAAAAGACAGACTGTCGACAAACGTC
	CCGTAGACAAAACTCCTAACGACTTAAT
	AGAACATTGAATGCAACTGGGGAAGAAAT
	GGACATCTTATGACCGTAGACAAAACTC

核酸序列(5' - 3')	
	CAACTGGGGAAGAAATAATTCAGCAATCC
	CCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTTATGAC
	TAATTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCC
	AAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTTA
	TCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTA
	TAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTT
	CAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTAT
[0745]	GTCGACAAACGTCTGGAGGACGGTGGCGT
	CTACAGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCT
	AATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACA
	ATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG
	TGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG
	CGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTC
	GGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCA
	GGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGAC
	GGTCTGCAAACAGCTGTCAGACAGAAAAA

[0746] 表6P.与DMD的外显子45结合的30-mer AC

核酸序列(5' - 3')	
	ACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGGCAAAC
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGTTGTC
	GATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGTTGTC
	CAGATGCCAGTATTCTACAGGAAAAATTGG
	CAAAAACCTCCTAACGACTTAATAAAGAAGG
	AGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCTGCGGT
	ACATCTTATGACCGTAGACAAAAACTCCTA
	TCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCT
	TAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTTA
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTC
	GTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATC
[0747]	GTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGA
	GGCGTCTAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGAC
	CAGACTGTCGACAAACGTCTGGAGGACGGT
	AGAAAAAAGACAGACTGTCGACAAACGTCT
	ACCGTAGACAAAAACTCCTAACGACTTAAT
	CAGAACATTGAATGCAACTGGGGAAGAAAT
	AGGACATCTTATGACCGTAGACAAAAACTC
	GCAACTGGGGAAGAAATAATTCAGCAATCC
	TCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTTATGAC
	ATAATTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCC
	TAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTTA
	TTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTA
	CTAAGTCCGAAGGGTTAAAAAGGACATCTT
	TCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTAT
	TGTCGACAAACGTCTGGAGGACGGTGGCGT

核酸序列(5' - 3')	
	TCTACAGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCT
	GAATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACA
	AATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAG
[0748]	CTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG
	GCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTC
	CGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCA
	TGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGAC
	AGGTCTGCAAACAGCTGTCAGACAGAAAAA

[0749] 在实施方案中,AC与跨越DMD外显子45的内含子-外显子或外显子-内含子连接点的核酸序列杂交。在实施方案中,AC与包含外显子45之前的上游(5')内含子的至少1个核苷

酸(即,在位置-1开始)的靶核酸序列互补。在实施方案中,AC与靶核酸序列互补,所述靶核酸序列包含外显子45之前的上游(5')内含子的至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19以及至多20个连续核苷酸(即,在位置-20、-19、-18、-17、-16、-15、-14、-13、-12、-11、-10、-9、-8、-7、-6、-5、-4、-3、-2或-1开始)。在实施方案中,AC与至少包含外显子45的5'端的第一个核苷酸(即,位置+1)的靶核酸序列互补。在实施方案中,AC与包含外显子45的至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24以及至多25个连续核苷酸的靶核酸序列互补,从外显子45的5'端的第一个核苷酸开始(即,从位置+1开始)。

[0750] 在实施方案中,AC与跨越包含SEQ ID NO:1的位置-20至+25的DMD的外显子45的内含子-外显子连接点的核酸序列杂交。包含位置-20至+25的DMD外显子45的内含子-外显子连接点由SEQ ID NO:2表示:*gcctt ttgg tatct taca* **GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAGC** (SEQ ID NO:2)。

[0751] SEQ ID NO:2的上游(5')内含子序列以斜体显示(残基-20至-1)并且SEQ ID NO:2的外显子序列以粗体和下划线显示(残基+1至+25)。

[0752] 在实施方案中,AC包含与SEQ ID NO:2的连续核苷酸互补的15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸(例如,AC是15-mer、16-mer、17-mer、18-mer、19-mer、20-mer、21-mer、22-mer、23-mer、24-mer、25-mer、26-mer、27-mer、28-mer、29-mer或30-mer),其中AC的第一个核苷酸在SEQ ID NO:2的位置-20、-19、-18、-17、-16、-15、-14、-13、-12、-11、-10、-9、-8、-7、-6、-5、-4、-3、-2、-1、+1、+2、+3、+4、+5、+6、+7、+8、+9、+10、+11、+12、+13、+14、+15、+16、+17、+18、+19、+20、+21、+22、+23、+24或+25处与DMD的外显子45的核苷酸或外显子45的5'侧接内含子杂交。

[0753] 在实施方案中,结合到DMD的外显子45的AC选自表7A-70中所示的核酸序列中的任一种。在实施方案中,结合到DMD的外显子45的AC包含一种或多种修饰的核酸、一种或多种修饰的核苷酸键联或它们的组合。在实施方案中,结合到外显子45的AC包含一个或多个吗啉环、一个或多个二氨基磷酸酯键联或它们的组合。在实施方案中,结合到DMD的外显子45的AC是具有选自表7A-70内的核酸序列中的任一种的序列、其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列的反义二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(PMO)。

[0754] 表7A.从位置-15开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer AC

20-mer 至 30-mer, 从-15 开始:	
[0755]	TTTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC
	TTTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGG
	TTTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATG
	TTTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG AT
	TTTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG A

[0756]	TTTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG
	TTTGG TATCT TACAG GAACT CCAG
	TTTGG TATCT TACAG GAACT CCA
	TTTGG TATCT TACAG GAACT CC
	TTTGG TATCT TACAG GAACT C
	TTTGG TATCT TACAG GAACT

[0757] 表7B.从位置-14开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

[0758]	20-mer 至 30-mer, 从-14 开始:
	TTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC A
	TTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC
	TTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGG
	TTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATG
	TTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG AT
	TTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG A
	TTGG TATCT TACAG GAACT CCAGG
	TTGG TATCT TACAG GAACT CCAG
	TTGG TATCT TACAG GAACT CCA
	TTGG TATCT TACAG GAACT CC
	TTGG TATCT TACAG GAACT C

[0759] 表7C.从位置-13开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

[0760]	20-mer 至 30-mer, 从-13 开始:
	TGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC AT
	TGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC A
	TGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC
	TGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGG
	TGG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATG
	TGG TATCT TACAG GAACT CCAGG AT
	TGG TATCT TACAG GAACT CCAGG A
	TGG TATCT TACAG GAACT CCAGG
	TGG TATCT TACAG GAACT CCAG
	TGG TATCT TACAG GAACT CCA
	TGG TATCT TACAG GAACT CC

[0761] 表7D.从位置-12开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

[0762]	20-mer 至 30-mer, 从-12 开始
	GG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATT

[0763]	GG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC AT
	GG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC A
	GG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC
	GG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGG
	GG TATCT TACAG GAACT CCAGG ATG
	GG TATCT TACAG GAACT CCAGG AT
	GG TATCT TACAG GAACT CCAGG A
	GG TATCT TACAG GAACT CCAGG
	GG TATCT TACAG GAACT CCAG
	GG TATCT TACAG GAACT CCA

[0764] 表7E.从位置-11开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

[0765]	25-mer至30-mer,从-11开始:
--------	-----------------------

G TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTG
G TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATT
G TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC AT
G TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC A
G TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC
G TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGG
G TATCT TACAG GAACT CCAGG ATG
G TATCT TACAG GAACT CCAGG AT
G TATCT TACAG GAACT CCAGG A
G TATCT TACAG GAACT CCAGG
G TATCT TACAG GAACT CCAG

[0766] 表7F. 从位置-10开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

[0767]

20-mer至30-mer, 从-10开始:
TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG
TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTG
TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATT
TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC AT
TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC A
TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC
TATCT TACAG GAACT CCAGG ATGG
TATCT TACAG GAACT CCAGG ATG
TATCT TACAG GAACT CCAGG AT
TATCT TACAG GAACT CCAGG A
TATCT TACAG GAACT CCAGG

[0768] 表7G. 从位置-9开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

[0769]

20-mer至30-mer, 从-9开始:
ATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG G
ATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG
ATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTG
ATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATT
ATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC AT
ATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC A
ATCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC
ATCT TACAG GAACT CCAGG ATGG
ATCT TACAG GAACT CCAGG ATG
ATCT TACAG GAACT CCAGG AT
ATCT TACAG GAACT CCAGG A

[0770] 表7H.从位-置-8开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

[0771]

20-mer至30-mer,从-8开始:
TCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GC
TCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG G
TCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG
TCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTG
TCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATT
TCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC AT
TCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC A
TCT TACAG GAACT CCAGG ATGGC
TCT TACAG GAACT CCAGG ATGG
TCT TACAG GAACT CCAGG ATG
TCT TACAG GAACT CCAGG AT

[0772] 表7I.从位置-7开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

[0773]

20-mer至30-mer,从-7开始:
CT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCA
CT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GC
CT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG G
CT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG
CT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTG
CT TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATT
CT TACAG GAACT CCAGG ATGGC AT
CT TACAG GAACT CCAGG ATGGC A
CT TACAG GAACT CCAGG ATGGC
CT TACAG GAACT CCAGG ATGG

[0774]

CT TACAG GAACT CCAGG ATG

[0775] 表7J.从位置-6开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

[0776]

20-mer至30-mer,从-6开始:
T TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCA
T TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCA
T TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GC
T TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG G
T TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG
T TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTG
T TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATT
T TACAG GAACT CCAGG ATGGC AT
T TACAG GAACT CCAGG ATGGC A
T TACAG GAACT CCAGG ATGGC
T TACAG GAACT CCAGG ATGG

[0777] 表7K.从位置-5开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

[0778]	20-mer至30-mer,从-5开始:
	TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAGC
	TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAG
	TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCA
	TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GC
	TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG G
	TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG
	TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTG
	TACAG GAACT CCAGG ATGGC ATT
	TACAG GAACT CCAGG ATGGC AT
	TACAG GAACT CCAGG ATGGC A
	TACAG GAACT CCAGG ATGGC

[0779] 表7L.从位置-4开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

	20-mer至29-mer,从-4开始:
	ACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAGC
	ACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAG
[0780]	ACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCA
	ACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GC
	ACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG G
	ACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG
	ACAG GAACT CCAGG ATGGC ATTG
[0781]	ACAG GAACT CCAGG ATGGC ATT
	ACAG GAACT CCAGG ATGGC AT
	ACAG GAACT CCAGG ATGGC A

[0782] 表7M.从位置-3开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer
AC

[0783]	20-mer至28-mer,从-3开始:
	CAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAGC
	CAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAG
	CAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCA
	CAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GC
	CAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG G
	CAG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG
	CAG GAACT CCAGG ATGGC ATTG
	CAG GAACT CCAGG ATGGC ATT
	CAG GAACT CCAGG ATGGC ATT
	CAG GAACT CCAGG ATGGC AT

[0784] 表7N.从位置-2开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer

AC

[0785]	20-mer至27-mer,从-2开始:
	AG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAGC
	AG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAG
	AG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCA
	AG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GC
	AG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG G
	AG GAACT CCAGG ATGGC ATTGG
	AG GAACT CCAGG ATGGC ATTG
	AG GAACT CCAGG ATGGC ATT

[0786] 表70.从位置-1开始与外显子45的内含子-外显子连接点结合的20-mer至30-mer

AC

[0787]	20-mer至26-mer,从-1开始:
	G GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAGC
	G GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCAG
	G GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GCA
	G GAACT CCAGG ATGGC ATTGG GC
	G GAACT CCAGG ATGGC ATTGG G
	G GAACT CCAGG ATGGC ATTGG
	G GAACT CCAGG ATGGC ATTG

[0788] 在实施方案中,结合到DMD的外显子45的AC选自表8A-8C中所示的核酸序列中的任一种。在实施方案中,结合到DMD的外显子45的AC包含一种或多种修饰的核酸、一种或多种修饰的核苷酸键联或它们的组合。在实施方案中,结合到外显子45的AC包含一个或多个吗啉环、一个或多个二氨基磷酸酯键联或它们的组合。在实施方案中,结合到DMD的外显子45的AC是具有选自表8A-8C内的核酸序列中的任一种的序列、其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列的反义二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(PMO)。

[0789] 表8A.外显子45跳跃的另外的AC

[0790]

序列
5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3'
5'-TCCTGGAGTTCCTGTAAGATA-3'
5'-ATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3'
5'-CATCCTGGAGTTCCTGTAAGA-3'
5'-CCATCCTGGAGTTCCTGTAAG-3'
5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGT-3'
5'-AATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3'
5'-GCTGCCCAATGCCATCCTGGA-3'
5'-CGCTGCCCAATGCCATCCTGG-3'
5'-CCGCTGCCCAATGCCATCCTG-3'
5'-GCCGC TGCC CAAT GCCA TCCT-3'
5'-TTTGC CGCT GCCC AATG CCAT-3'
5'-GTTTG CCGC TGCC CAAT GCCA-3'
5'-AGTTT GCCG CTGC CCAA TGCC-3'
5'-CAGTT TGCC GCTG CCAA ATGC-3'
5'-ACAGTTTGCCGCTGCCCAATG-3'
5'-AACAGTTTGCCGCTGCCCAAT-3'
5'-CAACAGTTTGCCGCTGCCCAA-3'
5'-GACAACAGTTTGCCGCTGCCC-3'
5'-TGACAACAGTTTGCCGCTGCC-3'
5'-CTGACAACAGTTTGCCGCTGC-3'
5'-TCTGACAACAGTTTGCCGCTG-3'
5'-TTCTGACAACAGTTTGCCGCT-3'
5'-GTTCTGACAACAGTTTGCCGC-3'

[0791]

序列
5'-ATGTTCTGACAACAGTTTGCC-3'
5'-AATGTTCTGACAACAGTTTGC-3'
5'-CAATGTTCTGACAACAGTTTG-3'
5'-TCAATGTTCTGACAACAGTTT-3'
5'-TTCAATGTTCTGACAACAGTT-3'
5'-ATTCAATGTTCTGACAACAGT-3'
5'-ATCCTGGAGTTCCTGTAAGATA-3'
5'-CATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3'
5'-CCATCCTGGAGTTCCTGTAAGA-3'
5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA-3'
5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTC-3'
5'-GCCCAATGCCATCCTGGAGTTC-3'
5'-TGCCCAATGCCATCCTGGAGTT-3'
5'-CTGCCCAATGCCATCCTGGAGT-3'
5'-GCTGCCCAATGCCATCCTGGAG-3'
5'-CGCTGCCCAATGCCATCCTGGA-3'
5'-GTTTGCCGCTGCCCAATGCCAT-3'
5'-AGTTTGCCGCTGCCCAATGCCA-3'
5'-CAGTTTGCCGCTGCCCAATGCC-3'
5'-ACAGTTTGCCGCTGCCCAATGC-3'
5'-AACAGTTTGCCGCTGCCCAATG-3'
5'-CAACAGTTTGCCGCTGCCCAAT-3'
5'-GACAACAGTTTGCCGCTGCCCA-3'
5'-TCTGACAACAGTTTGCCGCTGC-3'
5'-TTCTGACAACAGTTTGCCGCTG-3'
5'-GTTCTGACAACAGTTTGCCGCT-3'
5'-ATGTTCTGACAACAGTTTGCCG-3'
5'-TCAATGTTCTGACAACAGTTTG-3'
5'-TTCAATGTTCTGACAACAGTTT-3'
5'-ATTCAATGTTCTGACAACAGTT-3'
5'-CATCCTGGAGTTCCTGTAAGATA-3'
5'-GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGA-3'
5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3'
5'-AATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA-3'
5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT-3'
5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT-3'
5'-GCCCAATGCCATCCTGGAGTTC-3'
5'-CTGCCCAATGCCATCCTGGAGTT-3'
5'-GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGT-3'
5'-TTGCCGCTGCCCAATGCCATCCT-3'
5'-AGTTTGCCGCTGCCCAATGCCAT-3'

[0792]

序列
5'-CAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCA-3'
5'-ACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCC-3'
5'-AACAGTTTGCCGCTGCCCAATGC-3'
5'-CAACAGTTTGCCGCTGCCCAATG-3'
5'-GACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA-3'
5'-TGACAACAGTTTGCCGCTGCCCA-3'
5'-CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCC-3'
5'-TCTGACAACAGTTTGCCGCTGCC-3'
5'-TTCTGACAACAGTTTGCCGCTGC-3'
5'-GTTCTGACAACAGTTTGCCGCTG-3'
5'-ATGTTCTGACAACAGTTTGCCGC-3'
5'-AATGTTCTGACAACAGTTTGCCG-3'
5'-CAATGTTCTGACAACAGTTTGCC-3'
5'-TCAATGTTCTGACAACAGTTTGC-3'
5'-TTCAATGTTCTGACAACAGTTTG-3'
5'-ATTCAATGTTCTGACAACAGTTT-3'
5'-CATTCAATGTTCTGACAACAGTT-3'
5'-GCATTCAATGTTCTGACAACAGT-3'
5'-CCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATA-3'
5'-GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3'
5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG-3'
5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA-3'
5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3'
5'-GCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT-3'
5'-TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTC-3'
5'-GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTT-3'
5'-CGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGT-3'
5'-CCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAG-3'
5'-GCCGCTGCCCAATGCCATCCTGGA-3'
5'-CAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCAT-3'
5'-AACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCC-3'
5'-CAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGC-3'
5'-GACAACAGTTTGCCGCTGCCCAAT-3'
5'-TGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA-3'
5'-CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCA-3'
5'-TCTGACAACAGTTTGCCGCTGCCC-3'
5'-TTCTGACAACAGTTTGCCGCTGCC-3'
5'-GTTCTGACAACAGTTTGCCGCTGC-3'
5'-ATGTTCTGACAACAGTTTGCCGCT-3'
5'-AATGTTCTGACAACAGTTTGCCGC-3'
5'-CAATGTTCTGACAACAGTTTGCCG-3'

	序列
	5'-TCAATGTTCTGACAACAGTTTGCC-3'
	5'-TTCAATGTTCTGACAACAGTTTGC-3'
	5'-ATTCAATGTTCTGACAACAGTTTG-3'
	5'-CATTCAATGTTCTGACAACAGTTT-3'
	5'-GCATTCAATGTTCTGACAACAGTT-3'
	5'-TGCATTCAATGTTCTGACAACAGT-3'
	5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGA-3'
	5'-AATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG-3'
[0793]	5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3'
	5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT-3'
	5'-TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT-3'
	5'-CTTCCCCAGTTGCATTCAATGTTCT-3'
	5'-TCTTCCCCAGTTGCATTCAATGTTTC-3'
	5'-TTCTTCCCCAGTTGCATTCAATGTT-3'
	5'-AGGATTGCTGAATTATTTCTTCCCC-3'
	5'-TGAGGATTGCTGAATTATTTCTTCC-3'
	5'-AGAATACTGGCATCTGTTTTTGAGG-3'
	5'-TCCTGTAGAATACTGGCATCTGTTT-3'
	5'-TTCCTGTAGAATACTGGCATCTGTT-3'

[0794] 表8B. 外显子45跳跃的另外的AC

[0795]	序列
	5' - AATGCCATCCTGGAGTTCCTG - 3'
	5' - ATGCCATCCTGGAGTTCCTGT - 3'
	5' - CCCAATGCCATCCTGGAGTTC - 3'
	5' - ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA - 3'
	5' - GCCCAATGCCATCCTGGAGTTC - 3'
	5' - CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT - 3'
	5' - CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG - 3'
	5' - TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT - 3'
	5' - CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT - 3'
	5' - CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT - 3'

[0796] 表8C. 外显子45跳跃的另外的AC

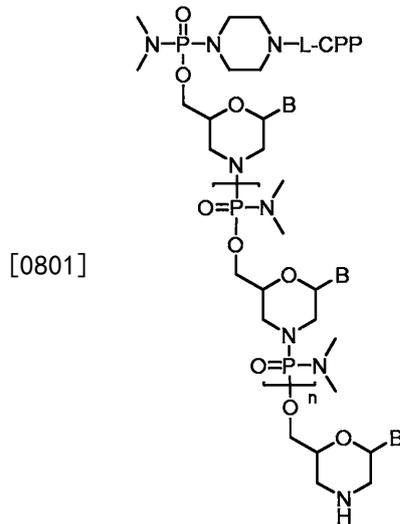
	序列
[0797]	5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGT-3'
	5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA-3'
	5'-GCCCAATGCCATCCTGGAGTTC-3'

	序列
[0798]	5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT-3'
	5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3'

[0799] 在实施方案中,表6A-6P或表7A-70或表8A-8C中AC中的任一种、其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列,包含选自以下的至少一种修饰的核苷酸或核酸:硫代磷酸酯(PS)核苷酸、二氨基磷酸酯吗啉代(PMO)核苷酸、锁核

酸(LNA)、肽核酸(PNA)、包含2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的主链的核苷酸、2'-O-甲氧基-乙基(2'-MOE)核苷酸、2',4'约束乙基(cEt)核苷酸和2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿糖核酸(2'F-ANA)。在实施方案中,AC与靶序列的杂交降低或防止外显子45的剪接。在实施方案中,AC包含至少一种二氨基磷酸酯吗啉代(PMO)核苷酸。在实施方案中,AC中的每个核苷酸是二氨基磷酸酯吗啉代(PMO)核苷酸。

[0800] 在实施方案中,化合物具有以下结构:



[0802] 其中:

[0803] CPP是细胞穿透肽;

[0804] L是接头;

[0805] B各自独立地是与靶序列中的碱基互补的核碱基;和

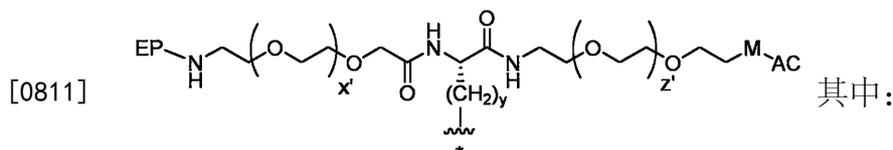
[0806] n是1至50的整数。

[0807] 在实施方案中,B和n的和对应于表6A-6P或表7A-70或表8A-8C中所示的序列、其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列。

[0808] 与AC缀合的环状细胞穿透肽(cCPP)

[0809] 环状细胞穿透肽(cCPP)可与AC缀合。

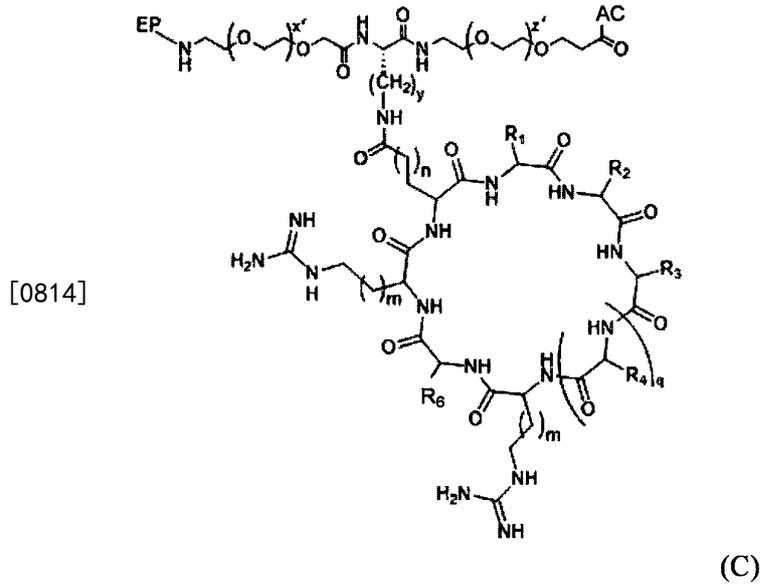
[0810] AC可通过接头与cCPP缀合。AC可以包含治疗部分。治疗部分可以包括寡核苷酸、肽或小分子。寡核苷酸可以包括反义寡核苷酸。AC可在末端羰基处与接头缀合以提供以下结构:



[0812] EP是环外肽,并且M、AA_{SC}、AC、x'、y和z' 如上文所定义,*是与AA_{SC}的附接点。x'可以是1。y可以是4。z'可以是11。-(OCH₂CH-)_{x'}-和/或-(OCH₂CH-)_{z'}-可独立地被一个或多个氨基酸替换,包括例如甘氨酸、β-丙氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸、6-氨基己酸或它们的组合。

[0813] 内体逃逸载体(EEV)可包含环状细胞穿透肽(cCPP)、环外肽(EP)和接头,并且可与

AC缀合以形成包含式(C)的结构的EEV-缀合物:



[0815] 或其质子化形式,

[0816] 其中:

[0817] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

[0818] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

[0819] EP是如本文定义的环外肽;

[0820] AC如本文所定义;

[0821] 每个m独立地是0-3的整数;

[0822] n是0-2的整数;

[0823] x' 是2-20的整数;

[0824] y是1-5的整数;

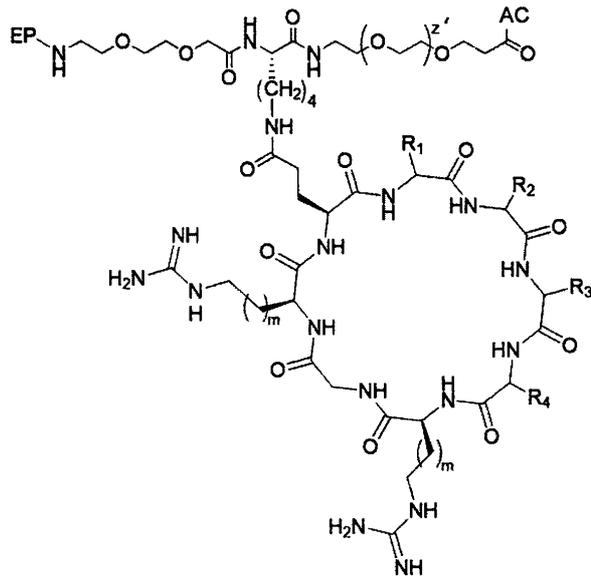
[0825] q是1-4的整数;并且

[0826] z' 是2-20的整数。

[0827] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、EP、AC、m、n、 x' 、y、q和 z' 如本文所定义。

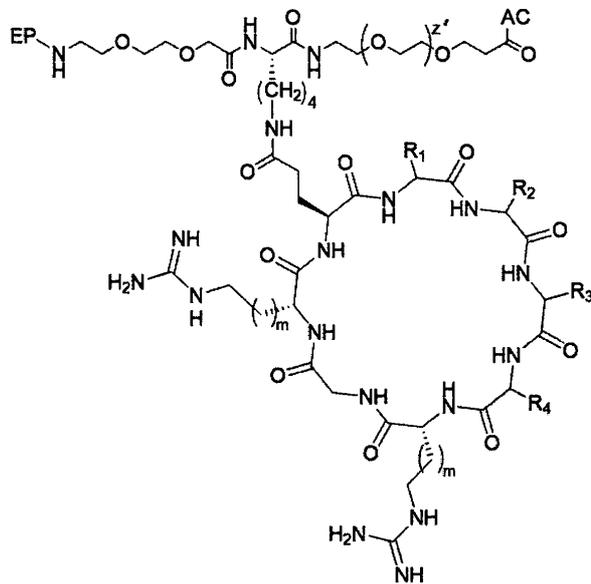
[0828] EEV可与AC缀合,并且EEV-缀合物可包含式(C-a)或(C-b)的结构:

[0829]



(C-a),

[0830]

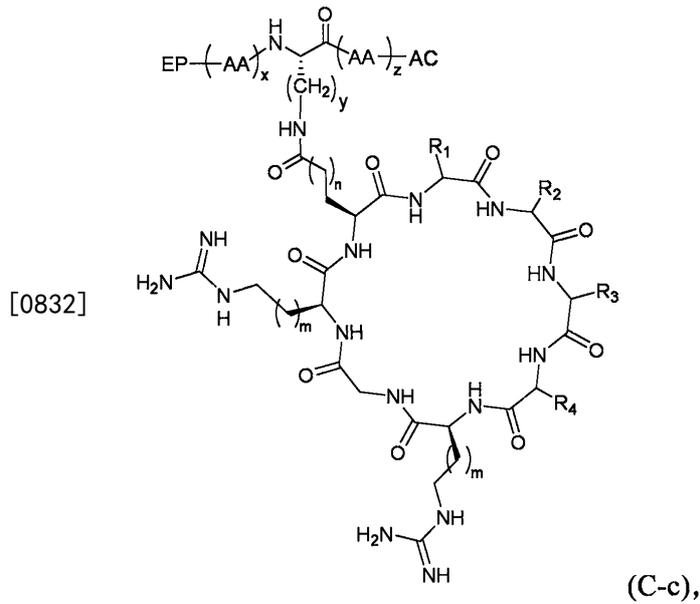


(C-b),

或其质子化形式,其中EP、m和z

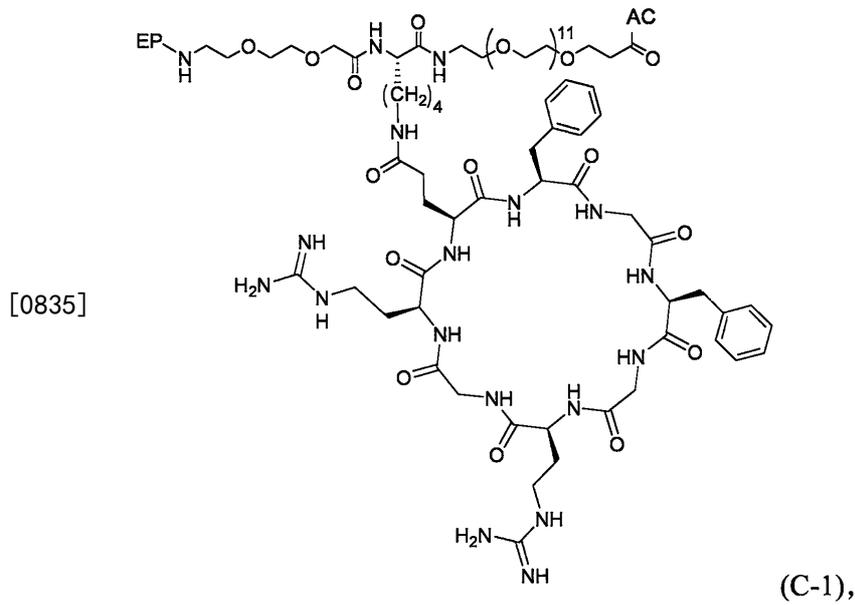
如上文在式(C)中所定义。

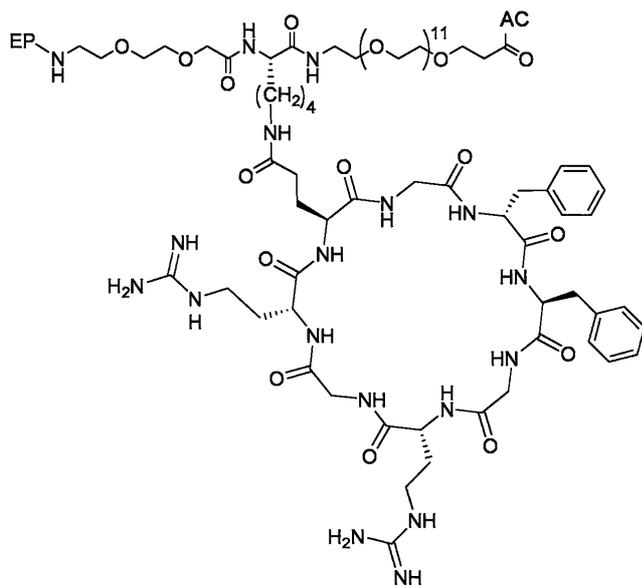
[0831] EEV可与AC缀合,并且EEV-缀合物可包含式(C-c)的结构:



[0833] 或其质子化形式,其中EP、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和m如上文在式(III)中所定义;AA可以是如本文所定义的氨基酸;n可以是0-2的整数;x可以是1-10的整数;y可以是1-5的整数;并且z可以是1-10的整数。

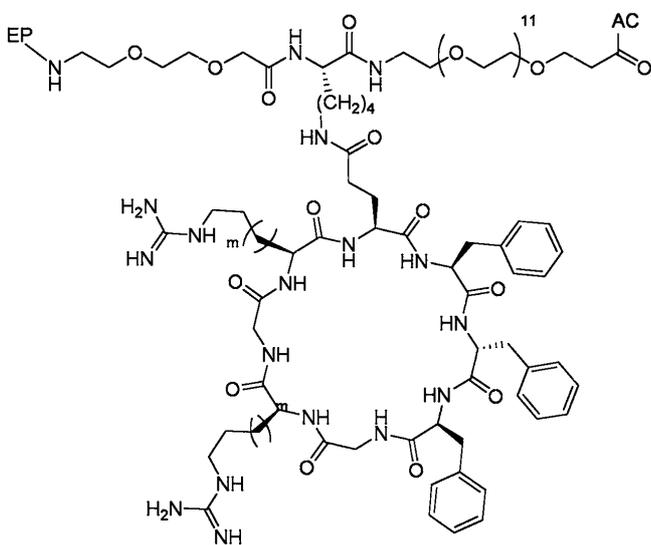
[0834] EEV可与AC缀合,并且EEV-寡核苷酸缀合物可包含式(C-1)、(C-2)、(C-3)或(C-4)的结构:



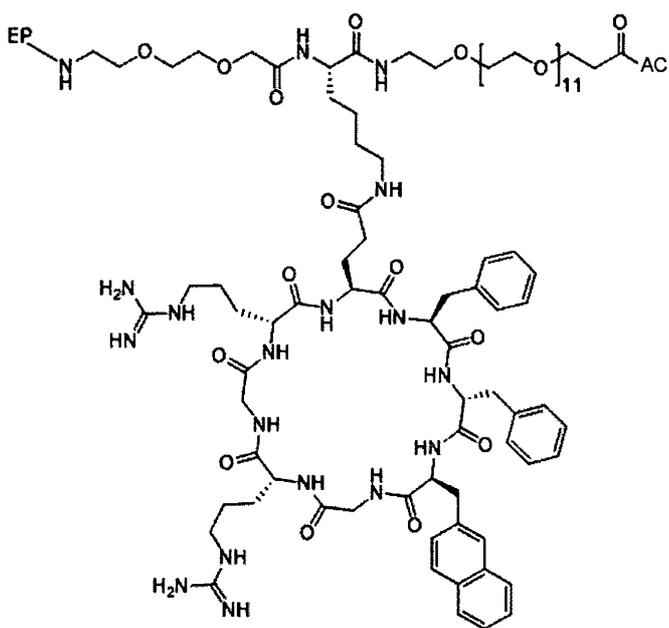


[0836]

(C-2),



(C-3),



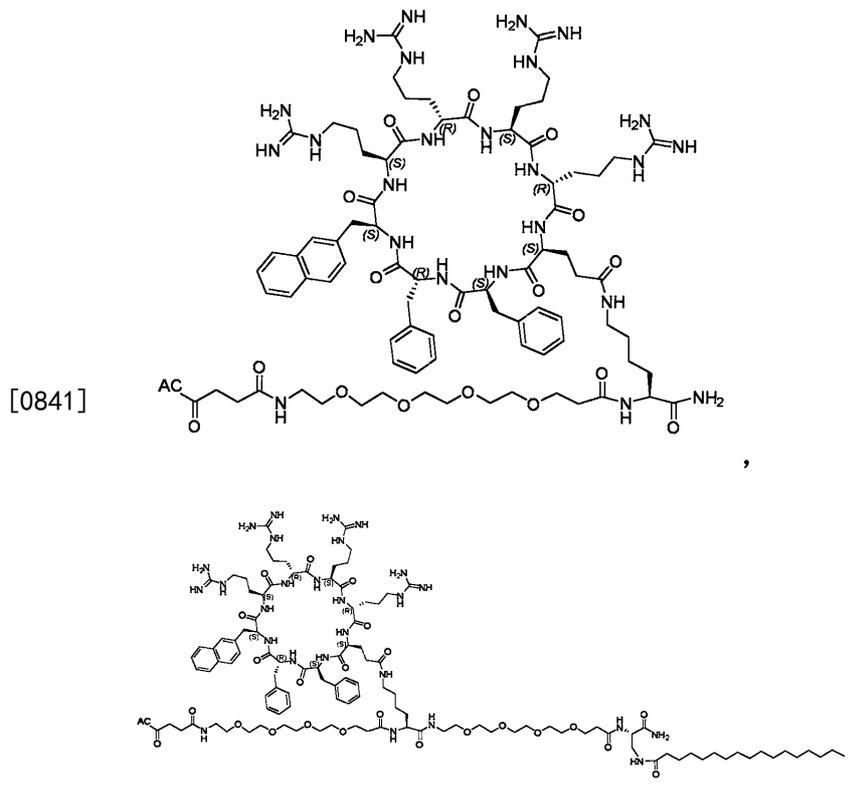
[0837]

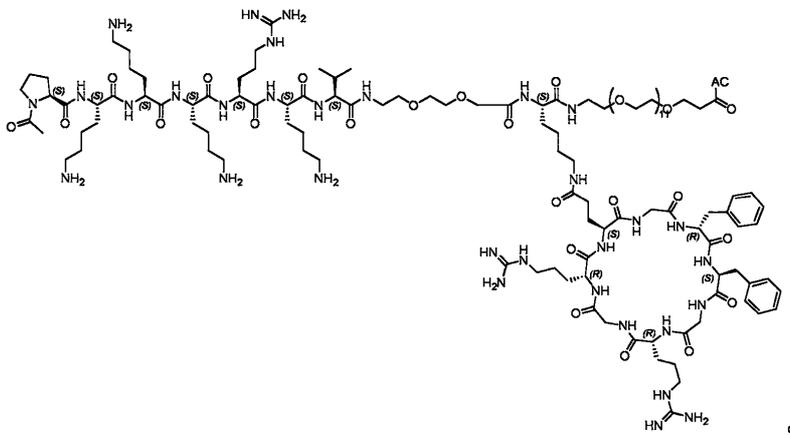
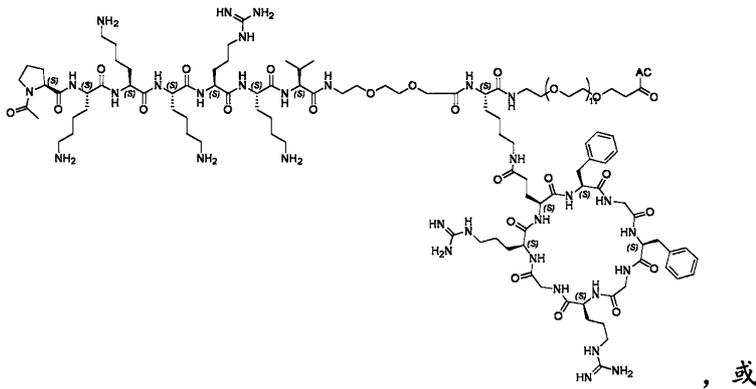
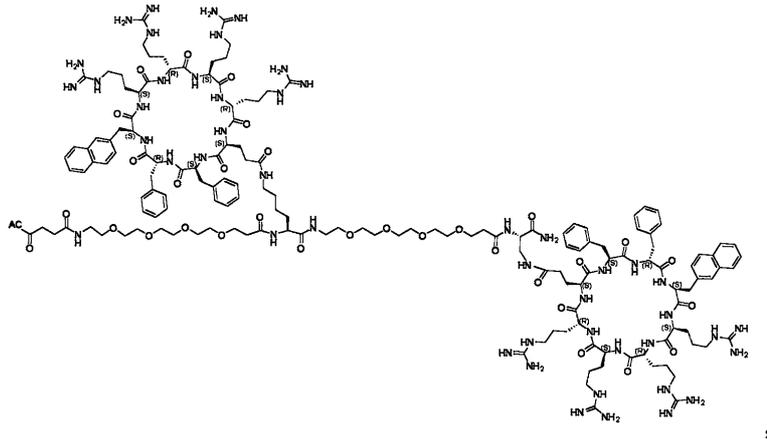
(C-4)。

[0838] 在上式中,EP是环外肽并且AC可具有15-30个核酸的序列,其与包含前mRNA序列中的DMD基因的外显子44的至少一部分的靶序列互补。在实施方案中,AC可选自表6A-6P、表7A-7O和表8A-8C中所示的寡核苷酸、其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列。

[0839] 在实施方案中,本文所述的化合物形成多聚体。在实施方案中,多聚化经由非共价相互作用发生,例如通过疏水相互作用、离子相互作用、氢键或偶极-偶极相互作用。在实施方案中,化合物形成二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体或九聚体。在实施方案中,化合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个环肽。在实施方案中,化合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个AC。在实施方案中,化合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个EP。在实施方案中,化合物包含1至10个环肽和1至10个AC。在实施方案中,化合物包含1至10个环肽、1至10个AC或1至10个EP。

[0840] 在实施方案中,本公开的化合物包含以下结构中的任一种。以下化合物仅是说明性的,并且以下结构中的任一种中的环肽、接头和AC中的任一种可被本文所述的环肽、接头或AC中的任一种替换。





[0843] 胞质递送效率

[0844] 对环状细胞穿透肽(cCPP)的修饰可提高胞质递送效率。通过将具有修饰的序列的cCPP的胞质递送效率与对照序列进行比较,可测量改善的胞质摄取效率。对照序列不包括修饰的序列中的特定置换氨基酸残基(包括但不限于精氨酸、苯丙氨酸和/或甘氨酸),但在其他方面是相同的。

[0845] 在实施方案中,与包含单独AC的化合物相比,包含环肽和AC的化合物具有改善的胞质摄取效率。胞质摄取效率可通过将包含环肽和AC的化合物的胞质递送效率与单独AC的胞质递送效率进行比较来测量。

[0846] 如本文所用,胞质递送效率是指cCPP穿过细胞膜并进入细胞的胞质的能力。cCPP的胞质递送效率不一定依赖于受体或细胞类型。胞质递送效率可指绝对胞质递送效率或相对胞质递送效率。

[0847] 绝对胞质递送效率是生长培养基中cCPP (或cCPP-AC缀合物) 的胞质浓度与cCPP (或cCPP-AC缀合物) 的浓度的比率。相对胞质递送效率是指与对照cCPP在胞质中的浓度相比cCPP在胞质中的浓度。定量可通过荧光标记cCPP (例如, 用FITC染料) 并使用本领域熟知的技术测量荧光强度来实现。

[0848] 通过比较 (i) 被某种细胞类型 (例如, HeLa细胞) 内化的本发明cCPP的量与 (ii) 被相同细胞类型内化的对照cCPP的量来确定相对胞质递送效率。为了测量相对胞质递送效率, 可将所述细胞类型在cCPP的存在下孵育指定的时间段 (例如, 30分钟、1小时、2小时等), 之后使用本领域已知的方法例如荧光显微术定量被细胞内化的cCPP的量。单独地, 将相同浓度的对照cCPP在所述细胞类型的存在下孵育相同的时间段, 并且对被细胞内化的对照cCPP的量进行定量。

[0849] 相对胞质递送效率可通过测量具有修饰的序列的cCPP对胞内靶标的 IC_{50} 并将具有修饰的序列的cCPP对对照序列的 IC_{50} (如本文所述) 进行比较来确定。

[0850] 与环 (Ff Φ RrRrQ) 相比, cCPP的相对胞质递送效率可在约50%至约450%的范围内, 例如约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约110%、约120%、约130%、约140%、约150%、约160%、约170%、约180%、约190%、约200%、约210%、约220%、约230%、约240%、约250%、约260%、约270%、约280%、约290%、约300%、约310%、约320%、约330%、约340%、约350%、约360%、约370%、约380%、约390%、约400%、约410%、约420%、约430%、约440%、约450%、约460%、约470%、约480%、约490%、约500%、约510%、约520%、约530%、约540%、约550%、约560%、约570%、约580%或约590%, 包括其间的所有值和子范围。与包含环 (Ff Φ RrRrQ) 的环肽相比, cCPP的相对胞质递送效率可提高大于约600%。

[0851] 绝对胞质递送效力为约40%至约100%, 例如约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%, 包括其间的所有值和子范围。

[0852] 与在其他方面相同的序列相比, 本公开的cCPP可将胞质递送效率提高约1.1倍至约30倍, 例如, 约1.2、约1.3、约1.4、约1.5、约1.6、约1.7、约1.8、约1.9、约2.0、约2.5、约3.0、约3.5、约4.0、约4.5、约5.0、约5.5、约6.0、约6.5、约7.0、约7.5、约8.0、约8.5、约9.0、约10、约10.5、约11.0、约11.5、约12.0、约12.5、约13.0、约13.5、约14.0、约14.5、约15.0、约15.5、约16.0、约16.5、约17.0、约17.5、约18.0、约18.5、约19.0、约19.5、约20、约20.5、约21.0、约21.5、约22.0、约22.5、约23.0、约23.5、约24.0、约24.5、约25.0、约25.5、约26.0、约26.5、约27.0、约27.5、约28.0、约28.5、约29.0或约29.5倍, 包括其间的所有值和子范围。

[0853] 再剪接靶蛋白

[0854] “靶蛋白”是由靶基因的转录和翻译产生的氨基酸序列。如本文所用, “再剪接靶蛋白”是指由于AC与从靶基因转录的靶前mRNA结合而编码的蛋白质。“野生型靶蛋白”是指由野生型靶基因编码的靶前mRNA的正确剪接产生的天然存在的、正确翻译的蛋白质异构体。本发明化合物和方法可产生与野生型靶蛋白相比含有一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入的再剪接靶蛋白。在实施方案中, 再剪接靶蛋白保留一些野生型靶蛋白活性。在实施方案中, 通过施用本发明化合物产生的再剪接靶蛋白与野生型靶蛋白同源。在实施方案中, 再剪接靶蛋白具有与野生型靶蛋白至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少

约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%并且至多100%同一的氨基酸序列。在实施方案中,再剪接靶蛋白与野生型靶蛋白基本上相同。在实施方案中,再剪接靶蛋白的氨基酸序列与野生型靶蛋白的氨基酸序列至少50%同一。在实施方案中,再剪接靶蛋白的氨基酸序列与野生型靶蛋白的氨基酸序列至少75%同一。在实施方案中,再剪接靶蛋白的氨基酸序列与野生型靶蛋白的氨基酸序列至少90%同一。在实施方案中,再剪接靶蛋白是野生型靶蛋白的缩短形式。

[0855] 在实施方案中,再剪接靶蛋白可挽救与靶基因的转录和翻译相关的疾病的一种或多种表型或症状。在实施方案中,再剪接靶蛋白可挽救与靶蛋白的表达相关的疾病的一种或多种表型或症状。在实施方案中,再剪接靶蛋白是野生型靶蛋白的活性片段。在实施方案中,再剪接靶蛋白以与野生型靶蛋白基本相似的方式起作用。在实施方案中,再剪接靶蛋白使得细胞与表达野生型靶蛋白的相似细胞基本上相似地起作用。在实施方案中,再剪接靶蛋白并不治愈与靶基因或靶蛋白相关的疾病,但改善疾病的一种或多种症状。在实施方案中,再剪接靶蛋白导致靶蛋白功能提高至少约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%,并且至多约100%。

[0856] 在实施方案中,再剪接靶蛋白可具有比野生型靶蛋白的大小减少约1个或更多个氨基酸的氨基酸序列,例如减少约5、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约55、约60、约65、约70、约75、约80、约90、约95、约100、约105、约110、约115、约120、约125、约130、约135、约140、约145、约150、约155、约160、约165、约170、约175或约180个或更多个氨基酸。

[0857] 在实施方案中,再剪接靶蛋白可具有相对于靶蛋白改进的一种或多种特性。在实施方案中,再剪接靶蛋白可具有相对于野生型靶蛋白改进的一种或多种特性。在实施方案中,可通过促进靶前mRNA的不同剪接来增强酶活性或稳定性。在实施方案中,再剪接靶蛋白可具有与野生型靶蛋白异构体同一或基本上相似的序列,与另一种野生型靶蛋白异构体相比具有改进的特性。

[0858] 在实施方案中,靶蛋白的一种或多种特性在再剪接靶蛋白中不存在(消除)或减少。在实施方案中,野生型靶蛋白的一种或多种特性在再剪接靶蛋白中不存在(消除)或减少。可减少或消除的特性的非限制性实例包括免疫原性、血管生成性、血栓形成性、聚集性和配体结合活性。

[0859] 在实施方案中,与野生型靶蛋白相比,再剪接靶蛋白含有一个或多个氨基酸取代。在实施方案中,取代可以是保守取代或非保守取代。保守氨基酸取代的实例包括用一种氨基酸取代以下组中的一者中的另一种氨基酸:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)和小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)。在实施方案中,结构上相似的氨基酸被取代以反转残基的电荷(例如,谷氨酰胺取代谷氨酸,或反之亦然,天冬氨酸取代天冬酰胺,或反之亦然)。在实施方案中,酪氨酸取代苯丙氨酸,或反之亦然。氨基酸取代的其他非限制性实例例如由

H.Neurath和R.L.Hill,1979在The Proteins,Academic Press,New York中描述。常见取代是Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu和Asp/Gly。

[0860] 在实施方案中,与野生型靶蛋白相比,再剪接靶蛋白可在一个或多个(例如,几个)位置处包含取代、缺失和/或插入。在实施方案中,再剪接靶蛋白氨基酸序列中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数量不超过200个、不超过150个、不超过100个、不超过50个、不超过40个、不超过30个、不超过20个或不超过10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个。

[0861] 治疗方法

[0862] 在实施方案中,以约0.1mg/kg至约1000mg/kg,例如,约0.1mg/kg、约0.2mg/kg、约0.3mg/kg、约0.4mg/kg、约0.5mg/kg、约0.6mg/kg、约0.7mg/kg、约0.8mg/kg、约0.9mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg、约11mg/kg、约12mg/kg、约13mg/kg、约14mg/kg、约15mg/kg、约16mg/kg、约17mg/kg、约18mg/kg、约19mg/kg、约20mg/kg、约21mg/kg、约22mg/kg、约23mg/kg、约24mg/kg、约25mg/kg、约26mg/kg、约27mg/kg、约28mg/kg、约29mg/kg、约30mg/kg、约31mg/kg、约32mg/kg、约33mg/kg、约34mg/kg、约35mg/kg、约36mg/kg、约37mg/kg、约38mg/kg、约39mg/kg、约40mg/kg、约41mg/kg、约42mg/kg、约43mg/kg、约44mg/kg、约45mg/kg、约46mg/kg、约47mg/kg、约48mg/kg、约49mg/kg、约50mg/kg、约51mg/kg、约52mg/kg、约53mg/kg、约54mg/kg、约55mg/kg、约56mg/kg、约57mg/kg、约58mg/kg、约59mg/kg、约60mg/kg、约61mg/kg、约62mg/kg、约63mg/kg、约64mg/kg、约65mg/kg、约66mg/kg、约67mg/kg、约68mg/kg、约69mg/kg、约70mg/kg、约71mg/kg、约72mg/kg、约73mg/kg、约74mg/kg、约75mg/kg、约76mg/kg、约77mg/kg、约78mg/kg、约79mg/kg、约80mg/kg、约81mg/kg、约82mg/kg、约83mg/kg、约84mg/kg、约85mg/kg、约86mg/kg、约87mg/kg、约88mg/kg、约89mg/kg、约90mg/kg、约91mg/kg、约92mg/kg、约93mg/kg、约94mg/kg、约95mg/kg、约96mg/kg、约97mg/kg、约98mg/kg、约99mg/kg、约100mg/kg、约110mg/kg、约120mg/kg、约130mg/kg、约140mg/kg、约150mg/kg、约160mg/kg、约170mg/kg、约180mg/kg、约190mg/kg、约200mg/kg、约210mg/kg、约220mg/kg、约230mg/kg、约240mg/kg、约250mg/kg、约260mg/kg、约270mg/kg、约280mg/kg、约290mg/kg、约300mg/kg、约310mg/kg、约320mg/kg、约330mg/kg、约340mg/kg、约350mg/kg、约360mg/kg、约370mg/kg、约380mg/kg、约390mg/kg、约400mg/kg、约410mg/kg、约420mg/kg、约430mg/kg、约440mg/kg、约450mg/kg、约460mg/kg、约470mg/kg、约480mg/kg、约490mg/kg、约500mg/kg、约510mg/kg、约520mg/kg、约530mg/kg、约540mg/kg、约550mg/kg、约560mg/kg、约570mg/kg、约580mg/kg、约590mg/kg、约600mg/kg、约610mg/kg、约620mg/kg、约630mg/kg、约640mg/kg、约650mg/kg、约660mg/kg、约670mg/kg、约680mg/kg、约690mg/kg、约700mg/kg、约710mg/kg、约720mg/kg、约730mg/kg、约740mg/kg、约750mg/kg、约760mg/kg、约770mg/kg、约780mg/kg、约790mg/kg、约800mg/kg、约810mg/kg、约820mg/kg、约830mg/kg、约840mg/kg、约850mg/kg、约860mg/kg、约870mg/kg、约880mg/kg、约890mg/kg、约900mg/kg、约910mg/kg、约920mg/kg、约930mg/kg、约940mg/kg、约950mg/kg、约960mg/kg、约970mg/kg、约980mg/kg、约990mg/kg或约1000mg/kg(包括其中和之间的所有值和范围)的剂量向诊断患有杜兴氏肌营养不良(DMD)的患者施用本公开的AC。

[0863] 本公开提供了一种治疗有需要的受试者的杜兴氏肌营养不良(DMD)的方法,所述

方法包括施用本文所公开的化合物。在一些实施方案中,靶基因是DMD。在实施方案中,靶序列包括DMD的外显子44的至少一部分、DMD的3'内含子侧接外显子44的至少一部分、DMD的5'内含子侧接外显子44的至少一部分或它们的组合。

[0864] 在各种实施方案中,治疗是指受试者中一种或多种症状的部分或完全缓和、改善、缓解、抑制、发作延迟、严重程度和/或发生率降低。

[0865] 在实施方案中,提供了一种用于改变有需要的受试者中靶基因的表达的方法,所述方法包括施用本文所公开的化合物。在实施方案中,治疗导致靶蛋白的表达降低。在实施方案中,治疗导致再剪接靶蛋白的表达。在实施方案中,治疗导致野生型靶蛋白异构体的优先表达。

[0866] 在实施方案中,与治疗前受试者中或患有类似疾病的无治疗的一个或多个对照个体中的靶蛋白的平均水平相比,根据本公开的治疗导致受试者中靶蛋白的表达减少超过约5%,例如约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%和约100%。在实施方案中,与治疗前受试者中或患有类似疾病的无治疗的一个或多个对照个体中的靶蛋白的平均水平相比,根据本公开的治疗导致受试者中再剪接靶蛋白的表达增加超过约5%,例如约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%和约100%。在实施方案中,与治疗前受试者中或患有类似疾病的无治疗的一个或多个对照个体中的靶蛋白的平均水平相比,根据本公开的治疗导致受试者中野生型靶蛋白异构体的表达增加或减少超过约5%,例如约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%和约100%。

[0867] 如本文所用,术语“改进”、“增加”、“降低”、“减少”等指示相对于对照的值。在实施方案中,合适的对照是基线测量结果,诸如在起始本文所述的治疗之前在同个体中的测量结果,或在不存在本文所述的治疗的情况下对照个体(或多个对照个体)中的测量结果。“对照个体”是罹患相同疾病的个体,其年龄和/或性别与所治疗的个体大致相同(以确保所治疗个体和对照个体的疾病阶段具有可比性)。

[0868] 所治疗的个体(也称为“患者”或“受试者”)是患有疾病或具有形成疾病的潜力的个体(胎儿、婴儿、儿童、青少年或成年人)。个体可能患有由异常基因表达或异常基因剪接介导的疾病。在各种实施方案中,患有疾病的个体可具有野生型靶蛋白表达或活性水平,所述野生型靶蛋白表达或活性水平为未患有所述疾病的个体中正常蛋白表达或活性水平的约1%至99%。在实施方案中,所述范围包括但不限于正常胸苷磷酸化酶表达或活性水平的约80-99%、约65-80%、约50-65%、约30-50%、约25-30%、约20-25%、约15-20%、约10-15%、约5-10%或约1-5%。在实施方案中,个体可具有比正常野生型靶蛋白表达或活性水平高约1%至约500%的靶蛋白表达或活性水平。在实施方案中,所述范围包括但不限于约1-10%、约10-50%、约50-100%、约100-200%、约200-300%、约300-400%、约400-500%或约500-1000%更高的靶蛋白表达或活性水平。

[0869] 在实施方案中,个体是最近被诊断患有所述疾病的个体。典型地,早期治疗(诊断后尽快开始治疗)对于最大限度地减少疾病的影响并最大限度地提高治疗益处非常重要。

[0870] 在实施方案中,在DMD动物模型中评价本公开的化合物和AC对DMD的功效。动物模

型是用于研究疾病发病机制的宝贵资源,并提供了测试抗肌萎缩蛋白相关活性的手段。在实施方案中,使用mdx小鼠和肌营养不良金毛猎犬(GRMD)犬(两者都是抗肌萎缩蛋白阴性的)(参见例如Collins&Morgan,Int J Exp Pathol 84:165-172,2003)来评价本公开的化合物。在实施方案中,利用C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J(B110/mdx)或D2.B10-Dmdmdx/J(D2/mdx)小鼠模型来评价本公开的化合物。在实施方案中,使用携带人DMD基因并且缺乏小鼠Dmd基因的转基因小鼠(无hDMD/Dmd小鼠)来评价本公开的化合物。这种小鼠可通过雄性hDMD小鼠(可从Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME获得)与雌性无DMD小鼠杂交产生。以下参考文献中的每一者描述了这些模型并全文以引用方式并入本文:J Neuromuscul Dis.2018;5(4):407-417.;Proc Natl Acad Sci U S A.1984;81(4):1189-92.;Am J Pathol.2010;176(5):2414-24.;J Clin Invest.2009;119(12):3703-12;国际公开号W02019014772。这些和其他动物模型可用于测量各种抗肌萎缩蛋白的功能活性。

[0871] 在实施方案中,使用体外模型来评价本公开的组合物功效。在实施方案中,体外模型是永生化肌细胞模型。所述模型在以下文章中进行了描述,所述文章的全文以引用方式并入本文:Nguyen等人J Pers Med.2017年12月;7(4):13。

[0872] 制备方法

[0873] 本文所述的化合物可以有有机合成领域技术人员已知的多种方式或本领域技术人员所理解的其变化形式制备。本文所述的化合物可由容易获得的起始材料制备。最佳反应条件可随所用的特定反应物或溶剂而变化,但此类条件可由本领域技术人员确定。

[0874] 本文所述化合物的变化形式包括如针对每种化合物所述的各种成分的添加、减去或移动。类似地,当分子中存在一个或多个手性中心时,分子的手性可改变。另外,化合物合成可涉及各种化学基团的保护和脱保护。保护和脱保护的使用以及适当的保护基团的选择可由本领域技术人员确定。保护基团的化学性质可见于例如Wuts和Greene,Protective Groups in Organic Synthesis,第4版,Wiley&Sons,2006,其全文以引用方式并入本文。

[0875] 用于制备所公开的化合物和组合物的起始材料和试剂可购自商业供应商诸如Aldrich Chemical Co.,(Milwaukee,WI)、Acros Organics(Morris Plains,NJ)、Fisher Scientific(Pittsburgh,PA)、Sigma(St.Louis,MO)、Pfizer(New York,NY)、GlaxoSmithKline(Raleigh,NC)、Merck(Whitehouse Station,NJ)、Johnson&Johnson(New Brunswick,NJ)、Aventis(Bridgewater,NJ)、AstraZeneca(Wilmington,DE)、Novartis(Basel,Switzerland)、Wyeth(Madison,NJ)、Bristol-Myers-Squibb(New York,NY)、Roche(Basel,Switzerland)、Lilly(Indianapolis,IN)、Abbott(Abbott Park,IL)、Schering Plough(Kenilworth,NJ)或Boehringer Ingelheim(Ingelheim,Germany),或者通过本领域技术人员已知的方法按照参考文献中所阐述的程序制备,所述参考文献诸如Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis,第1-17卷(John Wiley and Sons,1991);Rodd's Chemistry of Carbon Compounds,第1-5卷和补充版(Elsevier Science Publishers,1989);Organic Reactions,第1-40卷(John Wiley and Sons,1991);March's Advanced Organic Chemistry,(John Wiley and Sons,第4版);以及Larock's Comprehensive Organic Transformations(VCH Publishers Inc.,1989)。其他材料,诸如本文所公开的药物载剂可从商业来源获得。

[0876] 产生本文所述化合物的反应可在溶剂中进行,所述溶剂可由有机合成领域的技术

人员选择。在进行反应的条件(即,温度和压力)下,溶剂可基本上不与起始材料(反应物)、中间体或产物反应。反应可在一种溶剂或多于一种溶剂的混合物中进行。产物或中间体形成可根据本领域已知的任何合适的方法进行监测。例如,产物形成可通过光谱手段诸如核磁共振光谱法(例如, ^1H 或 ^{13}C)、红外光谱法、分光光度测定法(例如,UV-可见光)或质谱法,或通过色谱法诸如高效液相色谱法(HPLC)或薄层色谱法来监测。

[0877] 所公开的化合物可通过固相肽合成来制备,其中氨基酸 α -N-末端被酸或碱保护基团保护。此类保护基团应具有对肽键联形成条件稳定的特性,同时可容易地去除而不破坏生长的肽链或使其中所含的任何手性中心外消旋化。合适的保护基团是9-苄基甲氧羰基(Fmoc)、叔丁氧羰基(Boc)、苄氧羰基(Cbz)、联苯异丙氧羰基、叔戊氧羰基、异冰片基氧羰基、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基苄氧羰基、邻硝基苄基亚磺酰基、2-氰基-叔丁氧羰基等。9-苄基甲氧羰基(Fmoc)保护基团对于所公开化合物的合成是特别优选的。对于侧链氨基基团如赖氨酸和精氨酸,其他优选的侧链保护基团是2,2,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰基(pmc)、硝基、对甲苯磺酰基、4-甲氧基苯-磺酰基、Cbz、Boc和金刚烷氧羰基;对于酪氨酸是苄基、邻溴苄氧基-羰基、2,6-二氯苄基、异丙基、叔丁基(t-Bu)、环己基、环戊基和乙酰基(Ac);对于丝氨酸是叔丁基、苄基和四氢吡喃基;对于组氨酸是三苯甲基、苄基、Cbz、对甲苯磺酰基和2,4-二硝基苄基;对于色氨酸是甲酰基;对于天冬氨酸和谷氨酸是苄基和叔丁基,并且对于半胱氨酸是三苯基甲基(三苯甲基)。在固相肽合成方法中,将 α -C-末端氨基酸附接到合适的固体支持物或树脂上。可用于上述合成的合适固体支持物是对逐步缩合-脱保护反应的试剂和反应条件呈惰性以及不溶于所用介质的那些材料。用于合成 α -C-末端羧基肽的固体支持物是可购自Applied Biosystems(Foster City, Calif.)的4-羟甲基苯氧基甲基-共聚(苯乙烯-1%二乙烯基苯)或4-(2',4'-二甲氧基苄基-Fmoc-氨基甲基)苯氧基乙酰胺基乙基树脂。 α -C-末端氨基酸通过N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)或0-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐(HBTU),在有或没有4-二甲氨基吡啶(DMAP)、1-羟基苯并三唑(HOBT)、苯并三唑-1-基氧基-三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐(BOP)或双(2-氧代-3-噁唑烷基)氯化磷(BOPCl)的情况下,在10°C至50°C之间的温度下在溶剂诸如二氯甲烷或DMF中介导偶联约1至约24小时而偶联到树脂上。当固体支持物是4-(2',4'-二甲氧基苄基-Fmoc-氨基甲基)苯氧基-乙酰氨基乙基树脂时,在如上所述与 α -C-末端氨基酸偶联之前,用仲胺(优选地哌啶)切割Fmoc基团。一种用于与脱保护的4-(2',4'-二甲氧基苄基-Fmoc-氨基甲基)苯氧基-乙酰氨基乙基树脂偶联的方法是在DMF中的0-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐(HBTU,1当量)和1-羟基苯并三唑(HOBT,1当量)。可在自动多肽合成仪中进行连续的受保护氨基酸的偶联。在一个实例中,用Fmoc保护生长的肽链的氨基酸中的 α -N-末端。从生长的肽的 α -N-末端侧去除Fmoc保护基团是通过用仲胺(优选地哌啶)处理完成的。然后以约3倍摩尔过量引入每个受保护的氨基酸,并且优选地在DMF中进行偶联。偶联剂可以是0-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐(HBTU,1当量)和1-羟基苯并三唑(HOBT,1当量)。在固相合成结束时,将多肽从树脂上去除并脱保护,连续地或在单一操作中进行。通过用包含茴香硫醚、水、乙二硫醇和三氟乙酸的切割试剂处理树脂结合的多肽,可在单一操作中完成多肽的去除和脱保护。在多肽的 α -C-末端是烷基酰胺的情况下,通过用烷基胺氨解来切割树脂。另选地,可通过酯交换(例如,用甲醇)、接着氨解或通过直接转酰胺基来去除肽。受保护的肽可在此时纯化或直接用于下一

步骤。侧链保护基团的去除可使用上述切割混合物来完成。完全脱保护的肽可通过使用任何或所有以下类型的一系列色谱步骤来纯化：在弱碱性树脂(乙酸盐形式)上的离子交换；在未衍生的聚苯乙烯-二乙烯基苯(例如,Amberlite XAD)上的疏水吸附色谱法；硅胶吸附色谱法；羧甲基纤维素上的离子交换色谱法；分配色谱法(例如,在Sephadex G-25、LH-20上或逆流分布)；高效液相色谱法(HPLC),特别是在辛基-二氧化硅或十八烷基甲硅烷基-二氧化硅键合相柱填料上的反相HPLC。

[0878] 上述聚合物,诸如PEG基团,可在用于使蛋白质与活化的聚合物分子反应的任何合适的条件下附接到AC。可使用本领域已知的任何方法,包括经由酰化、还原烷基化、迈克尔加成、硫醇烷基化或通过PEG部分上的反应性基团(例如醛、氨基、酯、硫醇、 α -卤代乙酰基、马来酰亚胺基或胍基)与AC上的反应性基团(例如醛、氨基、酯、硫醇、 α -卤代乙酰基、马来酰亚胺基或胍基)的其他化学选择性缀合/连接方法。可用于将水溶性聚合物连接到一种或多种蛋白质的活化基团包括但不限于砜、马来酰亚胺、巯基、硫醇、三氟甲磺酸酯、三氟乙磺酸酯(tresylate)、氮杂环丙烷(azidirine)、环氧乙烷、5-吡啶基和 α -卤代酰基(例如, α -碘乙酸、 α -溴乙酸、 α -氯乙酸)。如果通过还原烷基化附接到AC,则所选聚合物应具有单一反应性醛,以便控制聚合度。参见例如Kinstler等人,Adv. Drug. Delivery Rev. 54:477-485 (2002); Roberts等人,Adv. Drug Delivery Rev. 54:459-476 (2002); 和Zalipsky等人, Adv. Drug Delivery Rev. 16:157-182 (1995)。

[0879] 为了将AC直接共价连接到CPP, CPP的适当氨基酸残基可与有机衍生剂反应,所述有机衍生剂能够与氨基酸的选定侧链或N-末端或C-末端反应。肽或缀合物部分上的反应性基团包括例如醛、氨基、酯、硫醇、 α -卤代乙酰基、马来酰亚胺基或胍基。衍生剂包括例如马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐或本领域已知的其他剂。

[0880] 合成寡聚反义化合物的方法是本领域已知的。本公开不限于合成AC的方法。在实施方案中,本文提供了具有可用于形成核苷间键联(包括例如磷酸二酯和硫代磷酸酯核苷间键联)的反应性磷基团的化合物。前体或反义化合物的制备和/或纯化方法并不限制本文提供的组合物或方法。用于DNA、RNA和反义化合物的合成和纯化的方法是本领域技术人员熟知的。

[0881] 修饰和未修饰的核苷的寡聚化可根据关于DNA (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Agrawal编(1993), Humana Press) 和/或RNA (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait等人, Applications of Chemically synthesized RNA in RNA:Protein Interactions, Smith编(1998), 1-36. Gallo等人, Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713) 的文献程序常规进行。

[0882] 本文提供的反义化合物可通过熟知的固相合成技术方便并且常规地制备。用于此类合成的设备由包括例如Applied Biosystems (Foster City, CA) 的几家供应商出售。可另外或替代地使用本领域已知的用于此类合成的任何其他方法。使用类似技术来制备寡核苷酸(诸如硫代磷酸酯和烷基化衍生物)为人所熟知。本发明不受反义化合物合成方法的限制。

[0883] 寡核苷酸纯化和分析的方法是本领域技术人员已知的。分析方法包括毛细管电泳(CE)和电喷雾质谱法。此类合成和分析方法可在多孔板中进行。本发明的方法不限于寡聚

物纯化方法。

[0884] 施用方法

[0885] 所公开的化合物和含有它们的组合物的体内应用可通过本领域技术人员目前或预期已知的任何合适的方法和技术来实现。例如,所公开的化合物可被配制成生理学上或药学上可接受的形式,并通过本领域已知的任何合适的途径施用,包括例如口服和肠胃外施途径。如本文所用,术语肠胃外包括皮下、皮内、静脉内、肌内、腹膜内、胸骨内和鞘内施用,诸如通过注射。所公开的化合物或组合物的施用可以是单次施用,或以连续或不同的间隔施用,如本领域技术人员可容易地确定的。

[0886] 本文公开的化合物和包含它们的组合物也可利用脂质体技术、缓释胶囊、可植入泵和可生物降解容器来施用。这些递送方法可有利地在延长的时间段内提供均匀的剂量。化合物还可以其盐衍生物形式或结晶形式施用。

[0887] 本文公开的化合物可根据用于制备药学上可接受的组合物的已知方法配制。在本领域技术人员熟知且容易获得的许多来源中详细描述了制剂。例如,Remington's Pharmaceutical Science, E.W.Martin (1995) 描述了可与所公开的方法结合使用的制剂。通常,本文公开的化合物可被配制成使得有效量的化合物与合适的载剂组合,以便促进化合物的有效施用。所用的组合物还可以呈各种形式。这些形式包括例如固体、半固体和液体剂型,诸如片剂、丸剂、粉剂、液体溶液或悬浮液、栓剂、可注射和可输注溶液以及喷雾剂。优选的形式取决于预期的施用方式和治疗应用。组合物还优选地包含本领域技术人员已知的常规药学上可接受的载剂和稀释剂。与化合物一起使用的载剂或稀释剂的实例包括乙醇、二甲亚砜、甘油、氧化铝、淀粉、盐水和等效载剂和稀释剂。为了提供用于期望的治疗性治疗的此类剂量的施用,基于包含载剂或稀释剂的总组合物的重量,本文所公开的组合物可有利地包含总共约0.1重量%至100重量%之间的主题化合物中的一种或多种。

[0888] 适于施用的制剂包括例如无菌注射水溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;以及水性和非水性无菌悬浮液,其可包含悬浮剂和增稠剂。制剂可存在于单位剂量或多剂量容器例如密封的安瓿和小瓶中,并且可储存在冷冻干燥(冻干)条件下,在使用前仅需要无菌液体载剂(例如注射用水)的条件。临时注射溶液和悬浮液可由无菌粉末、颗粒、片剂等制备。应当理解,除了以上特别提及的成分外,本文所公开的组合物还可包含本领域中关于所讨论的制剂类型的其他常规剂。

[0889] 本文所公开的化合物和包含它们的组合物可通过与细胞直接接触或经由载剂手段递送至细胞。用于将化合物和组合物递送至细胞的载剂手段是本领域已知的,并且包括例如将组合物包封在脂质体部分中。用于将本文所公开的化合物和组合物递送至细胞的另一手段包括将化合物附接到靶向递送至靶细胞的蛋白质或核酸。美国专利号6,960,648以及美国申请公开号20030032594和20020120100公开了可与另一种组合物偶联并允许所述组合物跨生物膜易位的氨基酸序列。美国申请公开号20020035243也描述了用于跨细胞膜转运生物部分以用于细胞内递送的组合物。也可将化合物掺入聚合物中,所述聚合物的实例包括用于颅内肿瘤的聚(D-L丙交酯-共-乙交酯)聚合物;摩尔比为20:80的聚[双(对羧基苯氧基)丙烷:癸二酸](如GLIADEL中所用);软骨素;甲壳质;和壳聚糖。

[0890] 本文所公开的化合物和组合物,包括其药学上可接受的盐或前药,可通过输注或注射静脉内、肌内或腹膜内施用。活性剂或其盐的溶液可在水中制备,任选地与无毒表面活

性剂混合。分散体也可在甘油、液体聚乙二醇、三醋精以及它们的混合物中以及在油中制备。在普通的储存和使用条件下,这些制剂可含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0891] 适于注射或输注的药物剂型可包括包含活性成分的无菌水溶液或分散体或无菌粉末,其适于临时制备任选地包封在脂质体中的无菌可注射或可输注溶液或分散体。最终剂型在制造和储存条件下应当是无菌的、流体的和稳定的。液体载剂或媒介物可以是溶剂或液体分散介质,包括例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、植物油、无毒甘油酯以及它们的合适混合物。适当的流动性可例如通过形成脂质体、在分散体的情况下通过维持所需的粒度或通过使用表面活性剂来维持。任选地,可通过各种其他抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,将优选包含等渗剂,例如糖、缓冲剂或氯化钠。通过包含延迟吸收的剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可实现可注射组合物的延长吸收。

[0892] 通过将所需量的本文所公开的化合物和/或剂与上文列举的各种其他成分掺入适当溶剂中,根据需要,随后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分加上存在于先前无菌过滤的溶液中的任何附加的期望成分的粉末。

[0893] 本文所公开的化合物和剂以及药物组合物的有用剂量可通过比较它们在动物模型中的体外活性和体内活性来确定。将小鼠和其他动物中的有效剂量外推至人的方法是本领域已知的。

[0894] 组合物施用的剂量范围是大到足以产生影响症状或病症的期望效果的剂量范围。剂量不应大到引起不良副作用,诸如不希望的交叉反应、过敏反应等。通常,剂量将随患者的年龄、状况、性别和疾病程度而变化,并且可由本领域技术人员确定。在任何禁忌症的情况下,剂量可由个别医师调整。剂量可变化,并且可每天一次或多次剂量施用,持续一天或几天。

[0895] 还公开了包含本文所公开的化合物与药学上可接受的载剂的组合的药物组合物。包含一定量化合物的适于口服、局部或肠胃外施用的药物组合物构成优选的方面。施用于患者(特别是人)的剂量应当足以在合理的时间范围内在患者中实现治疗反应,而没有致死毒性,并且优选地引起不超过可接受水平的副作用或发病率。本领域技术人员将认识到,剂量将取决于多种因素,包括受试者的状况(健康)、受试者的体重、同时治疗的种类(如果有的话)、治疗频率、治疗比率以及病理状况的严重程度和阶段。

[0896] 还公开了在一个或多个容器中包含本文所公开的化合物的试剂盒。所公开的试剂盒可任选地包括药学上可接受的载剂和/或稀释剂。在一个实施方案中,试剂盒包括如本文所述的一种或多种其他组分、助剂或佐剂。在另一个实施方案中,试剂盒包括一种或多种抗癌剂,诸如本文所述的那些剂。在一个实施方案中,试剂盒包括描述如何施用试剂盒的化合物或组合物的说明书或包装材料。试剂盒的容器可以是任何合适的材料,例如玻璃、塑料、金属等,并且可以是任何合适的大小、形状或配置。在一个实施方案中,本文所公开的化合物和/或剂作为固体(诸如片剂、丸剂或粉末形式)提供在试剂盒中。在另一个实施方案中,本文所公开的化合物和/或剂作为液体或溶液提供在试剂盒中。在一个实施方案中,试剂盒包括含有液体或溶液形式的本文所公开的化合物和/或剂的安瓿或注射器。

[0897] 已描述了本发明的多个实施方案。然而,应当理解,在不背离本发明的精神和范围

的情况下,可进行各种修改。因此,其他实施方案也在以下权利要求的范围内。

[0898] 某些定义

[0899] 如在说明书和所附权利要求书中所使用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括多个指示物,除非上下文另外明确指出。因此,例如,提及“一种组合物”包括两种或更多种此类组合物的混合物,提及“一种剂”包括两种或更多种此类剂的混合物,提及“所述组分”包括两种或更多种此类组分的混合物等。

[0900] 术语“约”当紧接在数值之前时意指范围(例如,所述值的加或减10%)。例如,“约50”可意指45至55,“约25,000”可意指22,500至27,500等,除非本公开的上下文另外指出,或者与此类解释不一致。例如,在诸如“约49、约50、约55、...”的数值列表中,“约50”意指延伸至小于前后值之间一半间隔的范围,例如,大于49.5至小于52.5。此外,短语“小于约”值或“大于约”值应当根据本文提供的术语“约”的定义来理解。类似地,术语“约”当在一系列数值或数值范围(例如,“约10、20、30”或“约10-30”)之前时分别指所述系列中的所有值或所述范围的端点。

[0901] 术语“miniPEG”、“PEG2”和“AEEA”在本文中可互换使用,是指2-[2-[2-氨基乙氧基]乙氧基]乙酸。

[0902] 如本文所用,术语“环状细胞穿透肽”或“cCPP”是指促进将AC递送至细胞中的肽。

[0903] 如本文所用,术语“内体逃逸载体”(EEV)是指通过化学键联(即,共价键或非共价相互作用)与接头和/或环外肽(EP)缀合的cCPP。EEV可以是式(B)的EEV。

[0904] 如本文所用,术语“EEV-缀合物”是指通过化学键联(即,共价键或非共价相互作用)与AC缀合的本文所定义的内体逃逸载体。AC可通过EEV递送至细胞中。EEV-缀合物可以是式(C)的EEV-缀合物。

[0905] 如本文所用,术语“环外肽”(EP)和“调节肽”(MP)可互换使用,是指通过肽键连接的两个或更多个氨基酸残基,其可与本文所公开的环状细胞穿透肽(cCPP)缀合。当与本文所公开的环肽缀合时,EP可改变化合物的组织分布和/或保留。典型地,EP包含至少一个带正电荷的氨基酸残基,例如至少一个赖氨酸残基和/或至少一个精氨酸残基。本文描述了EP的非限制性实例。EP可以是在本领域中被鉴定为“核定位序列”(NLS)的肽。核定位序列的非限制性实例包括SV40病毒大T抗原的核定位序列,其最小功能单元是七个氨基酸序列PKKKRKV、具有序列NLSKRPAAIKKAGQAKKKK的双分型核质蛋白NLS、具有氨基酸序列PAAKRVKLD或RQRRNELKRSF的c-myc核定位序列、来自输入蛋白- α 的IBB域的序列RMRKFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV、肌瘤T蛋白的序列VSRKRPRP和PPKKARED、人p53的序列PQPKKKPL、小鼠c-abl IV的序列SALIKKKKMAP、流感病毒NS1的序列DRLRR和PKQKKRK、肝炎病毒 δ 抗原的序列RKLKKKIKKL和小鼠Mx1蛋白的序列REKKKFLKRR、人聚(ADP-核糖)聚合酶的序列KRKGDEVDGVDEVAKKKSCKK和类固醇激素受体(人)糖皮质激素的序列RKCLQAGMNLEARKTKK。国际公开号2001/038547描述了NLS的附加实例并且全文以引用方式并入本文。

[0906] 如本文所用,“接头”或“L”是指将一个或多个部分(例如,环外肽(EP)和AC)与环状细胞穿透肽(cCPP)共价键合的部分。接头可包含天然或非天然氨基酸或多肽。接头可以是含有两个或更多个适于将cCPP结合AC从而形成本文所公开的化合物的适当官能团的合成化合物。接头可包含聚乙二醇(PEG)部分。接头可包含一个或多个氨基酸。cCPP可经由接头

与AC共价结合。

[0907] 如本文所用,术语“寡核苷酸”是指包含多个连接的核苷酸或核苷的寡聚化合物。寡核苷酸的一个或多个核苷酸可被修饰。寡核苷酸可包括核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)。寡核苷酸可由天然和/或修饰的核碱基、糖和共价核苷间键联构成,并且可进一步包括非核酸缀合物。

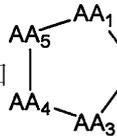
[0908] 术语“肽”、“蛋白质”和“多肽”可互换使用,是指包含通过一个氨基酸的羧基基团与另一个氨基酸的 α 氨基基团连接的两个或更多个氨基酸的天然或合成分子。两个或更多个氨基酸残基可通过一个氨基酸的羧基基团与 α 氨基基团连接。多肽的两个或更多个氨基酸可通过肽键接合。多肽可包括肽主链修饰,其中两个或更多个氨基酸通过除肽键以外的键共价附接。多肽可包括一种或多种非天然氨基酸、氨基酸类似物或能够整合到多肽中的其他合成分子。术语多肽包括天然存在的和人工存在的氨基酸。术语多肽包括例如包含约2至约100个氨基酸残基的肽以及包含超过约100个氨基酸残基或超过约1000个氨基酸残基的蛋白质,包括但不限于治疗性蛋白质,诸如抗体、酶、受体、可溶性蛋白质等。

[0909] 术语“治疗性多肽”指具有治疗、预防或其他生物活性的多肽。治疗性多肽可以任何合适的方式产生。例如,治疗性多肽可从天然存在的环境中分离或纯化,可化学合成,可重组产生,或它们的组合。

[0910] 术语“小分子”是指具有药理学活性且分子量小于约2000道尔顿、或小于约1000道尔顿、或小于约500道尔顿的有机化合物。小分子治疗剂典型地通过化学合成来制造。

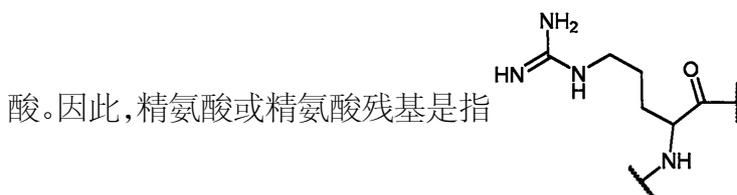
[0911] 如本文所用,术语“邻接”是指通过共价键连接的两个氨基酸。例如,在代表性环状

细胞穿透肽(cCPP)诸如

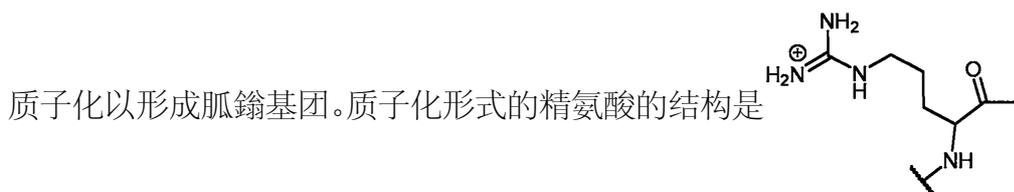


了邻接氨基酸对。

[0912] 如本文所用,化学物质的残基是指存在于特定产物中的化学物质的衍生物。为了形成产物,所述物质的至少一个原子被与另一部分的键替换,使得产物含有所述化学物质的衍生物或残基。例如,本文所述的环状细胞穿透肽(cCPP)具有通过形成一个或多个肽键而掺入其中的氨基酸(例如,精氨酸)。掺入cCPP中的氨基酸可称为残基,或简单地称为氨基



[0913] 术语“其质子化形式”是指氨基酸的质子化形式。例如,精氨酸侧链上的胍基可被



[0914] 如本文所用,术语“手性”是指具有多于一种在原子的三维空间排列上不同的立体异构体的分子,其中一种立体异构体是另一种立体异构体的不可重叠的镜像。除了甘氨酸

外,氨基酸具有与羧基基团相邻的手性碳原子。术语“对映体”是指手性的立体异构体。手性分子可以是具有“D”和“L”对映体的氨基酸残基。没有手性中心的分子,诸如甘氨酸,可被称为“非手性的”。

[0915] 如本文所用,术语“疏水的”是指不溶于水或在水中溶解度极小的部分。通常,中性部分和/或非极性部分,或者主要是中性和/或非极性的部分是疏水的。疏水性可通过本文以下公开的方法之一来测量。

[0916] 如本文所用,“芳族”是指具有 $4n+2$ 个 π 电子的不饱和环分子,其中 n 是任何整数。术语“非芳族”是指不属于芳族定义的任何不饱和环分子。

[0917] “烷基”、“烷基链”或“烷基基团”是指具有一至四十个碳原子并且通过单键与分子的其余部分附接的完全饱和的直链或支链烃链基团。包括包含1至40的任何数量的碳原子的烷基。包含至多40个碳原子的烷基是 C_1-C_{40} 烷基,包含至多10个碳原子的烷基是 C_1-C_{10} 烷基,包含至多6个碳原子的烷基是 C_1-C_6 烷基,并且包含至多5个碳原子的烷基是 C_1-C_5 烷基。 C_1-C_5 烷基包括 C_5 烷基、 C_4 烷基、 C_3 烷基、 C_2 烷基和 C_1 烷基(即,甲基)。 C_1-C_6 烷基包括上文对于 C_1-C_5 烷基所述的所有部分,但还包括 C_6 烷基。 C_1-C_{10} 烷基包括上文对于 C_1-C_5 烷基和 C_1-C_6 烷基所述的所有部分,但还包括 C_7 、 C_8 、 C_9 和 C_{10} 烷基。类似地, C_1-C_{12} 烷基包括所有前述部分,但还包括 C_{11} 和 C_{12} 烷基。 C_1-C_{12} 烷基的非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、仲丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、叔戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一烷基和正十二烷基。除非在说明书中另有具体说明,否则烷基基团可任选地被取代。

[0918] “亚烷基”、“亚烷基链”或“亚烷基基团”是指具有一至四十个碳原子的完全饱和的直链或支链二价烃链基团。 C_2-C_{40} 亚烷基的非限制性实例包括亚乙基、亚丙基、正亚丁基、亚乙烯基、亚丙烯基、正亚丁烯基、亚丙炔基、正亚丁炔基等。除非在说明书中另有具体说明,否则亚烷基链可任选地被取代。

[0919] “烯基”、“烯基链”或“烯基基团”是指具有二至四十个碳原子并具有一个或多个碳-碳双键的直链或支链烃链基团。每个烯基基团通过单键与分子的其余部分附接。包括包含2至40的任何数量的碳原子的烯基基团。包含至多40个碳原子的烯基是 C_2-C_{40} 烯基,包含至多10个碳原子的烯基是 C_2-C_{10} 烯基,包含至多6个碳原子的烯基是 C_2-C_6 烯基,并且包含至多5个碳原子的烯基是 C_2-C_5 烯基。 C_2-C_5 烯基包括 C_5 烯基、 C_4 烯基、 C_3 烯基和 C_2 烯基。 C_2-C_6 烯基包括上文关于 C_2-C_5 烯基所述的所有部分,但还包括 C_6 烯基。 C_2-C_{10} 烯基包括上文对于 C_2-C_5 烯基和 C_2-C_6 烯基所述的所有部分,但还包括 C_7 、 C_8 、 C_9 和 C_{10} 烯基。类似地, C_2-C_{12} 烯基包括所有前述部分,但还包括 C_{11} 和 C_{12} 烯基。 C_2-C_{12} 烯基的非限制性实例包括乙烯基(ethenyl/vinyl)、1-丙烯基、2-丙烯基(烯丙基)、异丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基、5-己烯基、1-庚烯基、2-庚烯基、3-庚烯基、4-庚烯基、5-庚烯基、6-庚烯基、1-辛烯基、2-辛烯基、3-辛烯基、4-辛烯基、5-辛烯基、6-辛烯基、7-辛烯基、1-壬烯基、2-壬烯基、3-壬烯基、4-壬烯基、5-壬烯基、6-壬烯基、7-壬烯基、8-壬烯基、1-癸烯基、2-癸烯基、3-癸烯基、4-癸烯基、5-癸烯基、6-癸烯基、7-癸烯基、8-癸烯基、9-癸烯基、1-十一烯基、2-十一烯基、3-十一烯基、4-十一烯基、5-十一烯基、6-十一烯基、7-十一烯基、8-十一烯基、9-十一烯基、10-十一烯基、1-十二烯基、2-十二烯基、3-十二烯基、4-十二烯基、5-十二烯基、6-十二烯基、7-十二烯基、8-十二烯基、9-十二烯基、10-十二烯基和11-十二烯基。除非在说明书中另

团(即,烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、酰基、烷基氨基甲酰基、烷基羧酰胺基、烷氧羰基、烷硫基或芳硫基),所述非氢原子诸如但不限于:卤素原子,诸如F、Cl、Br和I;诸如羟基基团、烷氧基基团和酯基团的基团中的氧原子;诸如硫醇基团、硫代烷基基团、砒基团、磺酰基基团和亚砒基团的基团中的硫原子;诸如胺、酰胺、烷基胺、二烷基胺、芳基胺、烷基芳基胺、二芳基胺、N-氧化物、酰亚胺和烯胺的基团中的氮原子;诸如三烷基甲硅烷基基团、二烷基芳基甲硅烷基基团、烷基二芳基甲硅烷基基团和三芳基甲硅烷基基团的基团中的硅原子;以及各种其他基团中的其他杂原子。“取代的”还意指其中一个或多个原子被与杂原子(诸如氧代、羰基、羧基和酯基团中的氧;以及诸如亚胺、肟、脞和脞的基团中的氮)的高阶键(例如双键或三键)替换的任何上述基团。例如,“取代的”包括其中一个或多个原子被 $-NR_gR_h$ 、 $-NR_gC(=O)R_h$ 、 $-NR_gC(=O)NR_gR_h$ 、 $-NR_gC(=O)OR_h$ 、 $-NR_gSO_2R_h$ 、 $-OC(=O)NR_gR_h$ 、 $-OR_g$ 、 $-SR_g$ 、 $-SOR_g$ 、 $-SO_2R_g$ 、 $-OSO_2R_g$ 、 $-SO_2OR_g$ 、 $=NSO_2R_g$ 和 $-SO_2NR_gR_h$ 替换的任何上述基团。“取代的”还意指其中一个或多个氢原子被 $-C(=O)R_g$ 、 $-C(=O)OR_g$ 、 $-C(=O)NR_gR_h$ 、 $-CH_2SO_2R_g$ 、 $-CH_2SO_2NR_gR_h$ 替换的任何上述基团。在上文中, R_g 和 R_h 相同或不同,并且独立地是氢、烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷基氨基、硫代烷基、芳基、芳烷基、环烷基、环烯基、环炔基、环烷基烷基、卤代烷基、卤代烯基、卤代炔基、杂环基、N-杂环基、杂环基烷基、杂芳基、N-杂芳基和/或杂芳基烷基。“取代的”还意指其中一个或多个原子被氨基、氰基、羟基、亚氨基、硝基、氧代、硫代、卤代、烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷基氨基、硫代烷基、芳基、芳烷基、环烷基、环烯基、环炔基、环烷基烷基、卤代烷基、卤代烯基、卤代炔基、杂环基、N-杂环基、杂环基烷基、杂芳基、N-杂芳基和/或杂芳基烷基替换的任何上述基团。“取代的”还可意指侧链上的一个或多个原子被烷基、烯基、炔基、酰基、烷基羧酰胺基、烷氧羰基、碳环基、杂环基、芳基或杂芳基替换的氨基酸。另外,前述取代基中的每一者还可任选地被上述取代基中的一者或多者取代。

[0928] 如本文所用,“受试者”意指个体。因此,“受试者”可包括驯养动物(例如,猫、狗等)、家畜(例如,牛、马、猪、绵羊、山羊等)、实验动物(例如,小鼠、兔、大鼠、豚鼠等)和鸟。“受试者”还可包括哺乳动物,诸如灵长类动物或人。因此,受试者可以是人或兽医患者。术语“患者”是指在临床医生(例如,医师)的治疗下的受试者。

[0929] 术语“抑制”是指活性、反应、疾患、疾病或其他生物参数的减少。这可包括但不限于活性、反应、疾患或疾病的完全消除。这还可包括,例如,与天然或对照水平相比,活性、反应、疾患或疾病减少10%。因此,减少可以是与天然或对照水平相比10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或其间的任何减少量的减少。

[0930] “减少(reduce)”或所述词的其他形式,诸如“减少(reducing/reduction)”,意指事件或特征(例如,肿瘤生长)的降低。应当理解,这典型地与一些标准或预期值有关,换句话说讲,它是相对的,但并不总是需要参考标准或相对值。例如,“减少肿瘤生长”意指相对于标准或对照(例如,未治疗的肿瘤)减少肿瘤的生长速率。

[0931] 术语“治疗”是指旨在治愈、改善、稳定或预防疾病、病理状况或病症而对患者进行的医学管理。所述术语包括积极治疗,即专门针对改善疾病、病理状况或病症的治疗,并且还包

补充另一种旨在改善相关疾病、病理状况或病症的特定疗法的治疗。

[0932] 术语“治疗有效”是指所用组合物的量足以改善疾病或病症的一种或多种病因或症状。此类改善仅需要减少或改变,而不必消除。

[0933] 术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适用于与人和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的与合理的效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0934] 术语“载剂”意指化合物、组合物、物质或结构,当与化合物或组合物组合时,其有助于或促进化合物或组合物的制备、储存、施用、递送、有效性、选择性或用于其预期用途或目的的任何其他特征。例如,可选择载剂以使活性成分的任何降解最小化并使受试者中的任何不良副作用最小化。

[0935] 如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”是指无菌水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液,以及用于在临近使用前复溶成无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。合适的水性和非水性载剂、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、羧甲基纤维素及其合适的混合物、植物油(诸如橄榄油)和可注射有机酯诸如油酸乙酯。适当的流动性可例如通过使用包衣材料诸如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来维持。这些组合物还可含有佐剂,诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂诸如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等来确保防止微生物的作用。还可期望包括等渗剂,诸如糖、氯化钠等。可注射制剂可例如通过经细菌截留过滤器过滤或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,所述无菌固体组合物可在临近使用前溶解或分散在无菌水或其他无菌可注射介质中。合适的惰性载剂可包括糖诸如乳糖。

[0936] 如本文所用,术语“序列同一性”是指两个多肽序列之间的氨基酸相同并且在相同的相对位置中的百分比。因此,与另一个多肽序列相比,一个多肽序列具有一定百分比的序列同一性。对于序列比较,典型地将一个序列用作参考序列,将其与测试序列进行比较。本领域普通技术人员将理解,如果两个序列在对应位置含有同一的残基,则通常认为它们是“基本上同一的”。在实施方案中,两个氨基酸序列之间的序列同一性使用在EMBOSS包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice等人,2000,Trends Genet.16:276-277)的Needle程序中实现的Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)(截至提交之日存在的版本)来确定。所用参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EBL0SUM62(BL0SUM62的EMBOSS版本)替换矩阵。标记为“最长同一性”的Needle输出(使用-nobrief选项获得)用作同一性百分比,并且计算如下:(同一的残基×100)/(比对长度-比对中的空位总数)

[0937] 在实施方案中,序列同一性可使用Smith-Waterman算法以截至提交之日存在的版本来确定。

[0938] 如本文所用,“序列同源性”是指两个多肽序列之间的氨基酸同源并且在相同的相对位置中的百分比。因此,与另一个多肽序列相比,一个多肽序列具有一定百分比的序列同源性。如本领域普通技术人员将理解,如果两个序列在对应位置含有同源残基,则通常认为它们是“基本上同源的”。同源残基可以是同一的残基。或者,同源残基可以是具有适当相似的结构和/或功能特征的不同一残基。例如,如本领域普通技术人员所熟知的,某些氨基酸

典型地被分类为“疏水性”或“亲水性”氨基酸,和/或被分类为具有“极性”或“非极性”侧链,并且一个氨基酸取代另一个相同类型的氨基酸通常可被认为是“同源”取代。

[0939] 如本领域熟知的,可使用多种算法中的任一种来比较氨基酸序列,所述算法包括可在商业计算机程序中获得的那些算法,诸如截至提交之日存在的BLASTP、空位BLAST和PSI-BLAST。在以下中描述了示例性的此类程序:Altschul等人,Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215 (3): 403-410, 1990; Altschul等人, *Methods in Enzymology*; Altschul等人, “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis等人, *Bioinformatics A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; 和 Misener 等人, (编), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 第132卷)*, Humana Press, 1999。除了鉴定同源序列之外,上述程序典型地还提供同源程度的指示。

[0940] 如本文所用,术语“反义化合物”和“AC”可互换使用,是指与同其(AC)杂交的靶核酸分子至少部分互补的聚合核酸结构(也可称为寡核苷酸或多核苷酸)。AC可以是短(在实施方案中,小于50个碱基对)多核苷酸或包含与靶前mRNA链中的靶序列互补的序列的多核苷酸同源物。AC可由天然核酸、合成核酸、核酸同源物或它们的任何组合形成。在实施方案中,AC包含寡核苷酸。在实施方案中,AC包含反义寡核苷酸。在实施方案中,AC包含缀合基团。AC的非限制性实例包括但不限于引物、探针、反义寡核苷酸、外部引导序列(EGS)寡核苷酸、可变剪接子、siRNA、寡核苷酸、寡核苷酸类似物、寡核苷酸模拟物以及这些的嵌合组合。因此,这些化合物可以单链、双链、环状、支链或发夹的形式引入,并且可含有结构元件,诸如内部或末端凸起或环。寡聚双链化合物可以是杂交形成双链化合物的两条链,或者是具有足够的自身互补性以允许杂交并形成完全或部分双链化合物的单链。在实施方案中,AC调节(增加、减少或改变)靶核酸的表达。可对聚合核酸结构进行各种修饰,诸如二氨基磷酸酯吗啉代(PMO)。因此,如本文所用的AC涵盖本文所述的任何修饰,诸如PMO。

[0941] 如本文所用,术语“前mRNA”和“初级转录物”是指DNA转录后直接新合成的真核mRNA分子。前mRNA必须用5'帽进行盖帽,用3'聚A尾修饰,并剪接以产生成熟的mRNA序列。

[0942] 如本文所使用,术语“靶向”或“靶向于”是指反义化合物(AC)与靶核酸分子或靶核酸分子区的缔合。在实施方案中,AC能够在生理条件下与靶核酸杂交。在实施方案中,AC靶向靶核酸内的特定部分或位点,例如,具有至少一种可识别的结构、功能或特征的靶核酸的一部分,诸如特定外显子或内含子,或外显子和/或内含子内的选定核碱基或基序。在实施方案中,AC靶向包含与疾病或病症相关的基因的内含子-外显子连接点的区域。在实施方案中,AC靶向抗肌萎缩蛋白基因的外显子45。在实施方案中,AC靶向包含抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的内含子-外显子连接点的区域。在实施方案中,AC靶向包含抗肌萎缩蛋白基因的外显子45上游(或5')的内含子核苷酸序列的区域。在实施方案中,AC靶向包含抗肌萎缩蛋白基因的外显子45上游(或5')的内含子核苷酸序列的区域。

[0943] 如本文所用,术语“靶核酸”和“靶序列”是指包含与反义化合物结合或杂交的核酸序列的核酸分子。靶核酸包括但不限于RNA(包括但不限于前mRNA和mRNA或其部分)、源自此种RNA的cDNA以及非翻译RNA,诸如miRNA。例如,在实施方案中,靶核酸可以是表达与特定病症或疾病病况相关的细胞基因(或由此种基因转录的mRNA),或感染原的核酸分子。在实施

方案中,靶核酸是靶RNA。在实施方案中,靶核酸是靶mRNA。在实施方案中,靶核酸是靶前mRNA。在实施方案中,靶核酸包含抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的核苷酸序列。在实施方案中,靶核酸包含含有抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的内含子-外显子连接点的核苷酸序列。在实施方案中,靶核酸包含抗肌萎缩蛋白基因的外显子45上游(或5')的内含子核苷酸序列的区域。

[0944] 如本文所用,术语“mRNA”是指编码蛋白质并且包括前mRNA和成熟mRNA的RNA分子。“前mRNA”是指DNA转录后直接新合成的真核mRNA分子。在实施方案中,前mRNA用5'帽进行盖帽,用3'聚A尾修饰,且/或剪接以产生成熟的mRNA序列。在实施方案中,前mRNA包含一个或多个内含子。在实施方案中,前mRNA经历称为剪接的过程以去除内含子并且接合外显子。在实施方案中,前mRNA包含聚腺苷酸化位点。

[0945] 如本文所用,术语“剪接”和“处理”是指转录后前mRNA的修饰,其中内含子被去除并且外显子被接合。剪接发生在由五个小核核糖核蛋白(snRNP)构成的大RNA-蛋白质复合物(称为剪接体)催化的一系列反应中。在内含子内,剪接需要3'剪接位点、5'剪接位点和分支位点。snRNP的RNA组分与内含子相互作用,并且可能参与催化

[0946] 如本文所用,术语“外显子”是指前mRNA的一部分,其在剪接后典型地包含在成熟mRNA中。

[0947] 如本文所用,术语“内含子”是指前mRNA的一部分,其在剪接后典型地不包含在成熟mRNA中。

[0948] 如本文所用,术语“侧接”是指紧邻所缔合外显子上游(5')或下游(3')的内含子。例如,外显子44的5'侧接内含子是指紧邻外显子44上游(即,直接偶联到外显子44的5'端)的内含子。例如,外显子44的3'侧接内含子是指紧邻外显子44下游(即,直接偶联到外显子44的5'端)的内含子。

[0949] “靶前mRNA”是包含与AC杂交的靶序列的前mRNA。

[0950] “靶mRNA”是由靶前mRNA序列剪接产生的mRNA序列。在实施方案中,靶mRNA不编码功能性蛋白质。在实施方案中,靶mRNA保留一个或多个内含子序列。

[0951] 如本文所用,术语“基因”是指具有涵盖与基因产物的表达相关的5'启动子区,以及任何内含子和外显子区,以及与基因产物的表达相关的3'非翻译区(“UTR”)的核酸序列的核酸分子。

[0952] 本公开的“靶基因”是指编码靶前mRNA的基因。

[0953] “靶蛋白”是指由靶mRNA编码的氨基酸序列。在实施方案中,靶蛋白可以不是功能性蛋白质。

[0954] “野生型靶蛋白”是指由野生型、正常或未突变形式的靶基因产生的天然的功能性蛋白质异构体。野生型靶蛋白还指由已正确剪接的靶前mRNA产生的蛋白质。

[0955] 如本文所用,术语“转录物”是指从DNA转录的RNA分子,并且包括但不限于mRNA、成熟mRNA、前mRNA和部分处理的RNA。

[0956] 如本文所用,“再剪接靶蛋白”是指由与AC杂交的靶前mRNA剪接而产生的mRNA编码的蛋白质。再剪接靶蛋白可与野生型靶蛋白同一,可与野生型靶蛋白同源,可以是野生型靶蛋白的功能变体,或者可以是野生型靶蛋白的活性片段。

[0957] 如本文所用,“功能片段”或“活性片段”是指真核野生型靶蛋白的一部分,其表现

出活性,诸如全长野生型靶蛋白的一种或多种活性,或具有另一种活性。在实施方案中,共享野生型靶蛋白的至少一种生物活性的再剪接靶蛋白被认为是野生型靶蛋白的活性片段。活性可以是全长野生型靶蛋白活性的任何百分比(即,或多或少),包括但不限于与野生型目标蛋白相比的活性的约1%,活性的约2%、约3%、约4%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、约100%、约200%、约300%、约400%、约500%或更多(包括这些值之间的所有值和范围)。因此,在实施方案中,活性片段可保留野生型靶蛋白的一种或多种生物活性的至少一部分。在实施方案中,活性片段可增强野生型靶蛋白的一种或多种生物活性。

[0958] 如本文所用,术语“核苷”意指包含核碱基和糖的糖基胺。核苷包括但不限于天然核苷、无碱基核苷、修饰的核苷和具有模拟碱基和/或糖基团的核苷。“天然核苷”或“未修饰的核苷”是包含天然核碱基和天然糖的核苷。天然核苷包括RNA核苷和DNA核苷。

[0959] 如本文所用,术语“天然糖”是指未对其在RNA(2'-OH)或DNA(2'-H)中的天然存在形式进行修饰的核苷的糖。

[0960] 如本文所用,术语“核苷酸”是指具有与糖共价连接的磷酸基团的核苷。核苷酸可用多种取代基中的任一种进行修饰。

[0961] 如本文所用,术语“核碱基”是指核苷或核苷酸的碱基部分。核碱基可包含能够与另一核酸的碱基氢键合的任何原子或原子团。天然核碱基是未对其在RNA或DNA中天然存在形式进行修饰的核碱基。

[0962] 如本文所用,术语“杂环碱基部分”是指包含杂环的核碱基。

[0963] 如本文所用,“寡核苷”是指其中核苷间键联不含磷原子的寡核苷酸。

[0964] 如本文所用,术语“寡核苷酸”是指包含多个连接的核苷酸或核苷的寡聚化合物。在某些实施方案中,寡核苷酸的一个或多个核苷酸被修饰。在实施方案中,寡核苷酸包含核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)。在实施方案中,寡核苷酸由天然和/或修饰的核碱基、糖和共价核苷间键联构成,并且还可包括非核酸缀合物。

[0965] 如本文所用,“核苷间键联”是指相邻核苷之间的共价键联。

[0966] 如本文所用,“天然的核苷间键联”是指3'至5'磷酸二酯键联。

[0967] 如本文所用,术语“修饰的核苷间键联”是指除了天然存在的核苷间键联之外的核苷或核苷酸之间的任何键联。

[0968] 如本文所用,术语“嵌合反义化合物”或“嵌合AC”是指具有至少一个糖、核碱基和/或核苷间键联的反义化合物,与同一寡聚化合物内的其他糖、核碱基和核苷间键联相比,所述糖、核碱基和/或核苷间键联被区别地修饰。其余的糖、核碱基和核苷间键联可独立地修饰或未修饰。一般来说,嵌合寡聚化合物将具有修饰的核苷,这些核苷可位于分离的位置或在将限定特定基序的区中组合在一起。修饰和/或模拟基团的任何组合可包含如本文所述的嵌合寡聚化合物。

[0969] 如本文所用,术语“混合主链反义寡核苷酸”是指其中反义寡核苷酸的至少一个核苷间键联不同于反义寡核苷酸的至少一个其他核苷酸间键联的反义寡核苷酸。

[0970] 如本文所用,术语“核碱基互补性”是指能够与另一核碱基进行碱基配对的核碱基。例如,在DNA中,腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)互补。例如,在RNA中,腺嘌呤(A)与尿嘧啶(U)互补。在实施方案中,互补核碱基是指反义化合物中能够与其靶核酸的核碱基进行碱基配

对的核碱基。例如,如果反义化合物的某个位置处的核碱基能够与靶核酸的某个位置处的核碱基氢键合,那么寡核苷酸与靶核酸之间的氢键合的位置被认为在所述核碱基对处是互补的。

[0971] 如本文所用,术语“非互补核碱基”是指一对彼此不形成氢键或以其他方式支持杂交的核碱基。

[0972] 如本文所用,术语“互补”是指寡聚化合物通过核碱基互补性与另一种寡聚化合物或核酸杂交的能力。在实施方案中,当每个分子中足够数量的对应位置被可彼此键合以允许反义化合物与靶标之间的稳定缔合的核碱基占据时,反义化合物和其靶标彼此互补。本领域技术人员认识到,在不消除寡聚化合物保持缔合的能力的情况下包含错配是可能的。因此,本文描述了反义化合物,其可包含至多约20%错配的核苷酸(即,与靶标的对应核苷酸不核碱基互补)。优选地,反义化合物含有不超过约15%、更优选不超过约10%、最优选不超过5%错配或没有错配。其余核苷酸是核碱基互补的或不会破坏杂交(例如,通用碱基)。本领域普通技术人员将认识到,本文提供的化合物与靶核酸至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%核碱基互补。

[0973] 如本文所使用,“杂交”意指互补寡聚化合物(例如,反义化合物和其靶核酸)的配对。虽然不限于具体机制,但配对的最常见机制涉及氢键合,所述氢键合可为互补核苷或核苷酸碱基(核碱基)之间的沃森-克里克、霍斯汀或反向霍斯汀氢键合。例如,天然碱基腺嘌呤是与天然核碱基胸苷和尿嘧啶互补的核碱基,其通过形成氢键来配对。天然碱基鸟嘌呤是与天然碱基胞嘧啶和5-甲基胞嘧啶互补的核碱基。杂交可在不同情形下发生。

[0974] 如本文所用,术语“特异性杂交”是指寡聚化合物与一个核酸位点杂交比它与另一个核酸位点杂交具有更大亲和力的能力。在实施方案中,反义寡核苷酸与多于一个靶位点特异性杂交。在实施方案中,寡聚化合物在严格杂交条件下与其靶标特异性杂交。

[0975] 术语“调节(modulate/modulating/modulation)”是指与调节前的表达、功能或活性水平相比时对表达、功能或活性的扰动。调节可包括表达、功能或活性的增加(刺激或诱导)或减少(抑制或降低)。在实施方案中,调节可包括扰动前mRNA处理期间的剪接位点选择。

[0976] 术语“抑制(inhibit/inhibiting/inhibition)”是指活性、表达、功能或其他生物学参数的降低,并且可包括但不要求活性、表达、功能或其他生物学参数的完全消除。抑制可包括,例如,与对照相比,活性、反应、疾患或疾病至少约10%减少。在实施方案中,基因或蛋白质的表达、活性或功能降低了统计学上显著的量。

[0977] 如本文所用,术语“表达”是指将基因的编码信息转化为细胞中存在和操作的结构的所有功能和步骤。此类结构包括但不限于转录和翻译的产物。

[0978] 如本文所用,术语“2'-修饰的”或“2'-取代的”意指在2'位包含除H或OH之外的取代基的糖。2'-修饰的单体包括但不限于BNA和具有2'-取代基的单体(例如,核苷和核苷酸),所述取代基诸如烯丙基、氨基、叠氨基、硫代、0-烯丙基、0-C₁-C₁₀烷基、-OCF₃、0-(CH₂)₂-0-CH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、0-(CH₂)₂-0-N(R_m)(R_n)或0-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n),其中每个R_m和R_n独立地是H或取代或未取代的C₁-C₁₀烷基。

[0979] 如本文所用,术语“MOE”是指2'-O-甲氧基乙基取代基。

[0980] 如本文所用,术语“高亲和力修饰的核苷酸”是指具有至少一个修饰的核碱基、核

苷间键联或糖部分的核苷酸,使得所述修饰增加包含修饰的核苷酸的反义化合物与靶核酸的亲合力。高亲和力修饰包括但不限于BNA、LNA和2'-MOE。

[0981] 如本文所用,术语“模拟物”是指取代AC中糖、核碱基和/或核苷间键联的基团。一般来说,使用模拟物替代糖或糖-核苷间键联组合,并且维持核碱基以便与所选靶标杂交。糖模拟物的代表性实例包括但不限于环己烯基或吗啉代。糖-核苷间键联组合的模拟物的代表性实例包括但不限于通过不带电荷的非手性键联来连接的肽核酸(PNA)和吗啉代基团。在一些情况下,使用模拟物替代核碱基。代表性核碱基模拟物是本领域熟知的,并且包括但不限于三环吩噻嗪类似物和通用碱基(Berger等人,Nuc Acid Res.2000,28:2911-14,以引用方式并入本文)。糖、核苷和核碱基模拟物的合成方法是本领域技术人员熟知的。

[0982] 如本文所用,术语“双环核苷”或“BNA”是指其中核苷的呋喃糖部分包括连接呋喃糖环上的两个原子的桥,从而形成双环体系的核苷。BNA包括但不限于 α -L-LNA、 β -D-LNA、ENA、氧氨基BNA(2'-O-N(CH₃)-CH₂-4')和氨氧基BNA(2'-N(CH₃)-O-CH₂-4')。

[0983] 如本文所用,术语“4'至2'双环核苷”是指其中连接呋喃糖环的两个原子的桥桥接呋喃糖环的4'碳原子和2'碳原子,从而形成双环体系的BNA。

[0984] 如本文所用,“锁核酸”或“LNA”是指修饰的核苷酸,使得核糖基糖环的2'-羟基基团经由亚甲基基团连接到糖环的4'碳原子,从而形成2'-C,4'-C-氧基亚甲基键联。LNA包括但不限于 α -L-LNA和 β -D-LNA。

[0985] 如本文所用,术语“帽结构”或“末端帽部分”是指已并入AC任一端的化学修饰。

[0986] 如本文所用,术语“剂量单位”是指提供药剂的形式。在实施方案中,剂量单位是包含冻干反义寡核苷酸的小瓶。在实施方案中,剂量单位是包含复溶反义寡核苷酸的小瓶。

[0987] 已描述了本发明的多个实施方案。然而,应当理解,在不背离本发明的精神和范围的情况下,可进行各种修改。其他实施方案在以下权利要求书的范围内。

[0988] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都指示本发明所属领域技术人员的技术水平。所有出版物、专利和专利申请都以引用方式并入本文,引用的程度就如同已特定地和个别地指示将各个别出版物或专利申请以引用方式并入一般。

[0989] 实施例

[0990] 实施例1.寡核苷酸与细胞穿透肽的缀合。

[0991] AC与CPP的缀合。如图1A中所示,5'硫代磷酸酯末端具有(NH₂-(CH₂)₅-CH₂-)接头的AC寡核苷酸经由肽上的羧酸酯或N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS酯)官能团与本文公开的CPP缀合。如图1B中所示,AC寡核苷酸经由酰胺键形成(左)或点击化学与细胞穿透肽(CPP)缀合。接头/CPP安装在寡核苷酸的5'端或3'端上。

[0992] 具有PEG间隔区的寡核苷酸-肽缀合物的合成。如图2A和图2B中所示,合成了寡核苷酸-肽缀合物,其不具有(图2A)和具有(图2B)插入寡核苷酸部分与肽之间的PEG(聚乙二醇)接头。图中的“R”代表棕榈酰基。

[0993] 示例性反义化合物与表6A-6P和表7A-7O和表8A-8C中发现的序列结合或由其组成。示例性CPP和EEV可在本公开全文中找到。

[0994] 实施例2.使用与寡核苷酸缀合的细胞穿透肽在体外模型中剪接校正DMD的外显子45。

[0995] 目的.本研究采用体外模型来研究以下物质对抗肌萎缩蛋白表达的作用:单独的

表6A-6P、表7A-70或表8A-8C的反义化合物、其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列,或者表6A-6P、表7A-70或表8A-8C的AC、其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列与细胞穿透肽的缀合物。表6A-6P、表7A-70或表8A-8C的AC、或其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列恢复了DMD基因的阅读框。

[0996] 本研究采用体外模型来研究以下物质对抗肌萎缩蛋白表达的作用:单独的结合或包含表6A-6P或表7A-70或表8A-8C的序列或其反向互补序列的反义化合物,或者结合或包含表6A-6P或表7A-70或表8A-8C的序列或其反向互补序列的AC与细胞穿透肽的缀合物。与表6A-6P或表7A-70或表8A-8C的序列或其反向互补序列结合或由其组成的AC恢复DMD基因的阅读框。

[0997] 体外模型:本研究采用原代DMD肌细胞和不含DMD的肌细胞。本研究还采用了DMD的永生肌细胞模型。使用人端粒酶逆转录酶(hTert)和细胞周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)表达载体转导源自DMD患者的肌细胞,以产生具有增强增殖能力的肌肉干细胞系。以下出版物中描述了这些模型:Thorley等人Skelet Muscle.2016;6:43。本研究还采用了源自横纹肌肉瘤患者的CRL-2061™肌细胞系。

[0998] 研究设计:将包含表6A-6P或表7A-70或表8A-8C的AC或其反向互补序列和环肽的化合物施用至永生肌细胞、原代DMD肌细胞或肌细胞系(例如,CRL-2061™)。从细胞中提取总RNA,并且通过RT-PCR和蛋白质印迹进行分析,以可视化剪接校正的效率并检测抗肌萎缩蛋白产物。评价了外显子45校正产物的百分比。

[0999] 实施例3.使用与寡核苷酸缀合的细胞穿透肽在动物模型中剪接校正DMD的外显子45

[1000] 目的.本研究采用小鼠模型来研究包含表6A-6P或表7A-70或表8A-8C的反义化合物或其反向互补序列的组合物(单独或与细胞穿透肽缀合)对抗肌萎缩蛋白表达的作用。与表6A-6P或表7A-70或表8A-8C的AC或其反向互补序列恢复DMD基因的阅读框。

[1001] 小鼠模型:本研究采用了Veltrop等人PLoS One.2018;13(2):e0193289中描述的del52hDMD/mdx小鼠。此文件通过引用整体并入本文。del52hDMD/mdx小鼠同时携带鼠和人DMD基因。所述模型在外显子23中包含终止突变,以防止鼠抗肌萎缩蛋白的表达。所述模型含有外显子52的缺失,以防止人抗肌萎缩蛋白的表达。本研究还采用了mdx52小鼠。mdx52小鼠缺乏鼠抗肌萎缩蛋白的外显子52。此小鼠模型在以下文件中进行了描述,所述文件通过引用并入本文:Aoki等人(2012).PNAS USA.109(34):1376-13768和Araki等人Biochem Biophys Res Commun.1997年9月18日;238(2):492-7。还使用人源化DMD(hDMD)小鼠。hDMD小鼠含有完整的人抗肌萎缩蛋白基因。此模型在美国专利号9,078,911中进行了描述,所述专利通过引用整体并入本文。

[1002] 本研究采用CD1小鼠来评价本文所述化合物的安全性和耐受性。所述化合物的测试浓度范围为1mg/kg小鼠体重-1g/kg小鼠体重。

[1003] 本研究采用非人灵长类动物(NHP)来评价本文所述化合物的功效和安全性。

[1004] 研究设计.将包含表6A-6P或表7A-7O或表8A-8C的AC或其反向互补序列和CPP的组合应用于上述小鼠模型以评价化合物和AC跳跃外显子45从而治疗DMD的能力。经由肌肉(IM)或静脉内(IV)注射将化合物和AC以下剂量施用于小鼠:1mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg和30mg/kg。

[1005] 从组织样品中提取总RNA,并且通过RT-PCR和蛋白质印迹进行分析,以可视化剪接校正的效率并检测抗肌萎缩蛋白产物。评价了外显子45校正产物的百分比。

[1006] 化合物合成和纯化:根据以下程序合成化合物。使TFA-赖氨酸保护的cCPP与表8A-8C的AC反应,随后脱保护以提供cCPP-AC缀合物。简而言之,通过使cCPP与HATU(2.0当量)和DIPEA(2.0当量)在DMSO(10mM,1.8mL)中反应来将其预激活。在室温下10min后,将预激活的溶液与AC在DMSO中的溶液(10mM,1.8mL)组合并充分混合。将反应在室温下孵育2小时。通过LCMS(Q-TOF)监测反应,使用BEH C18柱(130Å,1.7μm,2.1mm×50mm),缓冲液A:水(0.1%FA),缓冲液B:乙腈(0.1%FA),流速:0.4mL/min,从2%缓冲液B开始并在3.4min内逐渐增加至98%。完成后,通过用0.2M KCl(水溶液)pH 12(36mL)稀释反应混合物来引发TFA保护的赖氨酸的原位脱保护。使用上述分析方法,通过LCMS(Q-TOF)监测反应。将粗混合物直接上样到C18反相柱(Oligo clarity柱,150mm×21.2mm)上。然后使用含0.1%FA和乙腈的水作为溶剂并以20mL/min的流速,在60min内使用5%-20%的梯度纯化粗产物。合并含有所需产物的级分,并使用0.5M NaOH将溶液的pH值调节至7。将溶液冷冻并冻干,得到白色粉末。通过在1M NaCl水溶液中复溶cCPP-AC缀合物并通过3-kD MW-截止amicon管重复洗涤(以3500rpm离心20-40min),用氯化物交换甲酸盐。所述过程用1M NaCl进行三次,并用盐水(0.9%NaCl,无菌,无内毒素)进行三次。评估最终滤液的电导率以确认适当的盐浓度。将溶液进一步用盐水稀释至期望的制剂浓度,并在生物安全柜中无菌过滤。过滤后重新测量每种制剂的浓度。

[1007] 获得EEV-PMO-DMD45-5(参见,表10A),并且通过液相色谱-质谱四极杆飞行时间质谱(QTOF-LCMS)评估每种制剂的纯度和身份。EEV-PMO-DMD45-5通过RP-FA确定为99%纯,并且通过CEX确定为73.3%纯。 $C_{378}H_{609}N_{152}O_{124}P_{21}$ 的MW计算值为9917.42。通过QTOF-LCMS鉴定的MW为9917.29。进一步测定制剂的内毒素量、残留游离肽、FA含量和pH值。

[1008] 获得EEV-PMO-DMD45-7(参见,表10A),并且通过QTOF-LCMS评估每种制剂的纯度和身份。EEV-PMO-DMD45-7通过RP-FA确定为99%纯,并且通过CEX确定为79.7%纯。 $C_{387}H_{626}N_{156}O_{127}P_{22}$ 的MW计算值为10177.65。通过QTOF-LCMS鉴定的MW为10177.60。

[1009] 实施例4.靶向外显子45的AC的体外筛选

[1010] 目的.本研究的目的是评价靶向外显子45的AC。

[1011] 细胞培养和处理:本研究采用人横纹肌肉瘤细胞(RMS细胞,ATCC CRL-2061)。在37℃和5%CO₂条件下,将RMS细胞在T75烧瓶中的RPMI1640(ATCC)培养基中培养,添加10%FBS(VWR)和1x青霉素-链霉素(VWR)。将每孔 1×10^5 个RMS细胞接种到24孔板的RPMI1640全培养基中过夜。第二天,用1mL新鲜培养基替换培养基。将表8中的5μM或10μM AC添加到细胞培养物中并且旋转混合。随后,将6μL Endo-Porter(Gene-tools)添加到每孔细胞培养物(1mL培养基)中,并且立即旋转混合。在孵育24小时后,用PBS(VWR)洗涤细胞两次,然后将350μL RLT裂解缓冲液(QIAGEN)添加到每个孔中。将细胞在室温下静置5分钟以进行细胞裂解,并且用移液器吹打(pipetted)几次以彻底混合。将裂解物收集在样品管RB(QIAGEN)中。

[1012] RNA提取:使用QIAcube按照制造商的方案提取RNA。使用NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific)测定总RNA的浓度。

[1013] 巢式PCR:使用200ng提取的总RNA和QIAGEN OneStep RT-PCR试剂盒执行巢式PCR以进行初级扩增。按照制造商的方案,使用DMD特异性引物制备50 μ L反应溶液。

[1014] 正向引物:5'-CAATGCTCCTGACCTCTGTGC-3'

[1015] 反向引物:5'-GCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGG-3')。

[1016] 所用RT-PCR程序如下:

[1017] 反转录50 $^{\circ}$ C,30min。

[1018] 初始PCR激活95 $^{\circ}$ C,15min。

[1019] 20个循环:变性95 $^{\circ}$ C,1min;退火55 $^{\circ}$ C,1min;延伸72 $^{\circ}$ C,1min。

[1020] 最终延伸72 $^{\circ}$ C,5min。

[1021] 4 $^{\circ}$ C过夜。

[1022] 二次扩增PCR反应是按照制造商的方案使用OneTaq $^{\circledR}$ Hot Start 2X Master Mix准备的。

[1023] 正向引物:5'-GTCTACAACAAAGCTCAGGTCG-3',

[1024] 反向引物:5'-GCAATGTTATCTGCTTCCTCCAACC-3')。

[1025] 所用RT-PCR程序如下:

[1026] 95 $^{\circ}$ C,1min。

[1027] 25个循环:变性95 $^{\circ}$ C,30s;退火55 $^{\circ}$ C,1min;延伸72 $^{\circ}$ C,1min。

[1028] 最终延伸72 $^{\circ}$ C,5min。

[1029] 4 $^{\circ}$ C过夜。

[1030] 外显子跳跃效率的凝胶电泳分析:通过2%E-gel (Invitrogen $^{\text{TM}}$)分析4 μ L上述PCR产物,并且使用E-Gel $^{\text{TM}}$ Power Snap电泳系统(Thermo Fisher Scientific)进行成像。分析了跳跃条带和全长条带的强度。使用ImageJ测量具有外显子45跳跃的条带的多核苷酸水平“A”和没有外显子45跳跃的条带的多核苷酸水平“B”。基于“A”和“B”的这些测量值,通过以下等式确定跳跃效率:跳跃效率(%) = A/(A+B) \times 100。

[1031] 结果:图4示出了表9A的AC的外显子45跳跃效率。

[1032] 表9A. 跳跃外显子45的AC序列

寡核苷酸 ID	序列
卡西莫森	5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3'
D45-21mer-n4	5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGT-3'
D45-21mer-n3	5'-AATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3'
D45-21mer-4	5'-GCTGCCCAATGCCATCCTGGA-3'
D45-21mer-5	5'-CGCTGCCCAATGCCATCCTGG-3'
D45-21mer-6	5'-CCGCTGCCCAATGCCATCCTG-3'
D45-21mer-7	5'-GCCGCTGCCCAATGCCATCCT-3'
D45-22mer-n5	5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA-3'
D45-22mer-n1	5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTC-3'
D45-22mer-0	5'-GCCCAATGCCATCCTGGAGTTC-3'
D45-22mer-4	5'-CGCTGCCCAATGCCATCCTGGA-3'
D45-22mer-10	5'-GTTTGCCGCTGCCCAATGCCAT-3'
D45-23mer-n8	5'-GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGA-3'
D45-23mer-n6	5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA-3'
D45-23mer-n5	5'-AATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA-3'
D45-23mer-n4	5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT-3'
D45-23mer-n2	5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT-3'
D45-23mer-n1	5'-GCCCAATGCCATCCTGGAGTTC-3'
D45-24mer-n9	5'-GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT-3'
D45-24mer-n7	5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAG-3'
D45-24mer-n5	5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA-3'
D45-24mer-n3	5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3'
D45-24mer-n2	5'-GCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT-3'
D45-24mer-n1	5'-TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTC-3'
D45-24mer-3	5'-CCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAG-3'
D45-25mer-n4	5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT-3'
D45-25mer-n2	5'-TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT-3'

[1035] 表9B的AC在跳跃外显子45方面比批准的外显子45反义寡核苷酸卡西莫森更有效。

[1036] 表9B. 跳跃外显子45的AC序列

寡核苷酸 ID	序列	5 μ M AC 下的外显子跳跃效率(%)	10 μ M AC 下的外显子跳跃效率(%)
D45-23mer-n2	5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT-3'	46.4	58.2
D45-21mer-6	5'-CCGCTGCCCAATGCCATCC TG-3'	45.9	59.5
D45-22mer-n1	5'-CCCAATGCCATCCTGGAGT TCC-3'	45.1	62.3
D45-24mer-n3	5'-CCCAATGCCATCCTGGAGT TCCTG-3'	44.2	52.3
D45-25mer-n2	5'-TGCCCAATGCCATCCTGGA GTTCCT-3'	44.0	48.8
[1037] D45-21mer-n4	5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTG T-3'	42.6	52.0
D45-21mer-n3	5'-AATGCCATCCTGGAGTTCCT G-3'	41.8	52.7
D45-23mer-n1	5'-GCCCAATGCCATCCTGGAG TTCC-3'	39.6	54.4
D45-25mer-n4	5'-CCCAATGCCATCCTGGAGT TCCTGT-3'	37.6	42.6
D45-24mer-3	5'-CCGCTGCCCAATGCCATCC TGGAG-3'	37.2	40.8
D45-22mer-n5	5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTG TA-3'	36.8	50.9
D45-23mer-n4	5'-CAATGCCATCCTGGAGTTC CTGT-3'	35.3	45.3

[1038] 实施例5:施用EEV-PMO-MDX23-1后对D2MDX小鼠的持续效果和重复剂量效应

[1039] 方法:D2/MDX小鼠静脉给药20、40或80mpk的小鼠PMO-EEV (EEV-PMO-MDX23-1:EEV = Ac-PKKKRKV-miniPEG-K(环(GfFGrGrQ))-PEG₁₂-OH; PMO = 5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3') 替代物,在D2/MDX小鼠模型中诱导外显子23跳跃。在1、2、4和8周时收获组织以测试单剂量持续时间效应和单剂量范围发现。向D2/MDX小鼠每周给药40mpk,持续4周,并在最终剂量后1周处死小鼠以测试重复剂量效应。

[1040] 结果:注射后1周,在20、40或80mpk的单剂量后,在所有4个组织中观察到外显子跳跃(图5)。外显子跳跃在注射后2周达到峰值,并且在骨骼肌(三头肌和胫骨前肌)中维持至少8周(图6)。在4周和8周后,在横膈膜和心脏(图6)中观察到外显子跳跃下降。以40mpk每周给药4次后,在所有4个组织中观察到外显子跳跃(图7)(最后一次给药后1周收集组织)。

[1041] 实施例6:D2DMX中的功能测定

[1042] 方法:每2周对6组雄性D2/MDX和DBA/2J(野生型)小鼠(每组n=8)进行静脉内给药,总共6剂,包括:WT媒介物(盐水)、D2.mdx媒介物(盐水);仅PMO (PMO-MDX23:5'-GGCCAAACCTCGGCT TACCTGAAAT-3')或靶向外显子23的两种EEV-PMO构建体之一:(EEV-PMO-MDX23-1:EEV = Ac-PKKKRKV-miniPEG-K(环(GfFGrGrQ))-PEG₁₂-OH; PMO = 5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3';和EEV-PMO-MDX23-2 (EEV = Ac-PKKKRKV-Lys (Ff Φ -GrGrQ)-PEG12-K(N3)-NH₂; PMO = 5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'-C4COT)。C4COT = 环辛-2-炔-1-0-(CH₂)₄-0-C(0)。剂量已在上面列出。使用已知方法每4周测定一次肌酸激酶水平、握力和线挂时间,共测定4次。

[1043] 结果:EEV-PMO-MDX23-1 80mpk Q2W治疗在首次注射后2周后比其他组产生了更长的悬挂时间,并且继续显示出统计学上显著的改善,与媒介物D2.mdx组相比,在首次注射后4周和8周,均有所增加(图8)。治疗12周后,用EEV-PMO-MDX23-1 80mpk Q2W治疗的动物的线挂时间与WT动物在统计上无法区分(图8)。与媒介物D2.mdx组相比,使用负载剂量的EEV-PMO-MDX23-1 40mpk Q2W和EEV-PMO-MDX23-2 15mpk Q2W治疗从第一次治疗后8周开始显示出显著更高的线挂时间,一直稳定到治疗12周,此时表型改善的迹象首次变得明显(图8)。单独PMO治疗似乎遵循与媒介物D2.mdx组和媒介物对照组相同的趋势,在2周时较低,但它们与已发表的4、8和12周数据一致,表明测试正在正确执行(图8)。

[1044] 在4个时间点测定血清CK:给药前,以及4、8和12周时。EEV-PMO治疗的组显示出血清CK的显著降低,接近野生型。仅PMO治疗的组在治疗后的所有时间点均未表现出显著下降(图9A-9B和图10A-10B)。

[1045] 在给药前(图11A)和12周时(图11B)测量握力。对于PMO-EEV治疗的小鼠,观察到握力的剂量依赖性增加。媒介物和PMO治疗的小鼠没有显示出显著的改善。

[1046] 实施例7:hDMD和外显子45跳跃

[1047] 方法:将卡西莫森,一种商业外显子45跳跃PMO(5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3'),与EEV(Ac-PKKKRKV-AEEA-Lys-(环[FGFGRGRQ])-PEG12-OH;EEV-PMO-DMD45-1)缀合并且用作测试体内系统(hDMD)的阳性对照。

[1048] 向8-9周龄的hDMD小鼠静脉内注射40、60或80mpk的EEV-PMO-DMD45-1阳性对照。在1周后,收获组织并且通过PCR(Labchip定量)测定外显子跳跃。

[1049] 结果:观察到肌肉组织中的剂量依赖性外显子45跳跃:横膈膜(图12A);心脏(图12B);二头肌(图12C);胫骨前肌(图12D)。

[1050] 实施例8:库筛选

[1051] 方法:向8-9周龄的hDMD小鼠静脉内注射60mpk的与EEV缀合的阳性对照(EEV缀合的卡西莫森;EEV-PMO-DMD45-1)或与EEV缀合的候选PMO。每个的PMO序列如表10A所示。EEV具有序列Ac-PKKKRKV-AEEA-Lys-(环[FGFGRGRQ])-PEG12-OH。

[1052] 1周后,收获组织并且通过PCR测定Tia、TA、横膈膜和心脏的外显子跳跃。

[1053] 结果:每个外显子45EEV-PMO在60mpk时的外显子45跳跃大于阳性对照(EEV-PMO-DMD45-1)(图13)。在30mpk下测试了外显子45跳跃,以进一步区分候选外显子45EEV-PMO的功效。候选EEV-PMO-DMD45-10、EEV-PMO-DMD45-11和EEV-PMO-DMD45-3在TA和横膈膜组织中表现出比其他EEV-PMO更低的功效(图14)。低外显子跳跃异常值在所有组织中都是一致的,并且都是雌性。

[1054] 实施例9:患者来源的细胞数据

[1055] 方法:用EEV-PMO-DMD45-1(阳性对照)和10种EEV-PMO化合物(参见,表10A)以30 μ M处理具有易于外显子45跳跃的突变的DMD Δ 46-48 iPSC来源的成肌细胞24小时,然后是7天的分化。通过RT-PCR测定外显子跳跃。通过蛋白质印迹测定抗肌萎缩蛋白表达。

[1056] 结果:与阳性对照相比,所有10种EEV-PMO均表现出优异的外显子跳跃和抗肌萎缩蛋白表达(图15A-B)。

[1057] 将DMD Δ 46-48 iPSC来源的心肌细胞用30 μ M阳性对照(EEV-PMO-DMD45-1)、EEV-PMO-DMD45-5或EEV-PMO-DMD45-7处理24小时,并且在72小时后进行分析。对于所有三种构

建体都观察到稳健的外显子45跳跃和抗肌萎缩蛋白产生(图15C-D)。

[1058] 将DMDA46-48 iPSC来源的心肌细胞用20、10、5或1 μ M阳性对照(EEV-PMO-DMD45-1)、EEV-PMO-DMD45-5或EEV-PMO-DMD45-7处理24小时,并且在72小时后进行分析。对于所有三种构建体都观察到稳健的外显子45跳跃(图15E)。

[1059] 表10A:EEV-PMO

EEV*-PMO	PMO 序列
EEV-PMO-DMD45-2	AATGCCATCCTGGAGTTCCTG
EEV-PMO-DMD45-3	ATGCCATCCTGGAGTTCCTGT
EEV-PMO-DMD45-4	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCC
EEV-PMO-DMD45-5	ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA
EEV-PMO-DMD45-6	GCCCAATGCCATCCTGGAGTTCC
[1060] EEV-PMO-DMD45-7	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT
EEV-PMO-DMD45-8	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG
EEV-PMO-DMD45-9	TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT
EEV-PMO-DMD45-10	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT
EEV-PMO-DMD45-11	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT
EEV-PMO-DMD45-1 (阳性对照)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG (卡西莫森)

[1061] *EEV序列=Ac-PKKKRKV-AEEA-Lys-(环[FGFGRGRQ])-PEG12-OH。

[1062] 实施例10:人原代肾近端管状上皮细胞(Renal Proximal Tubular Epithelial Cell, RPTEC)的细胞活力

[1063] 方法:筛选10种外显子45PMO-EEV(参见下表10B)的RPTEC(肾近端管状上皮细胞)的活力。10种PMO-EEV的EEV具有序列Ac-PKKKPKV-AEEA-Lys-(环[FGFGRGRQ])-PEG12-OH。针对每种构建体测试的PMO序列和浓度范围显示在表10B中。

[1064] 使用两个阳性对照:(1)阳性对照(EEV-PMO-对照:EEV=Ac-PKKKRKV-miniPEG2-Lys(环(Ff Φ GrGrQ))-AEEA-K(N₃);PMO=5'-TGAAAACGCCCATTTCTCAACAG-3'-PEG4COT(PEG4COT=环辛-2-炔-1-0-(PEG4)-0-C(0)));和(2)蜂毒肽(以16.6 μ M使用)。PBS用作媒介物(阴性对照)。

[1065] 将EEV-PMO重悬于盐水中(1:2连续稀释)以获得表10B中所示的浓度范围。将数据归一化为蜂毒肽对照。

[1066] 结果:EEV-PMO-DMD45-2仅在两个最高浓度下表现出一些毒性。EEV-PMO-DMD45-3、EEV-PMO-DMD45-4和EEV-PMO-DMD45-5在测试浓度下基本上没有毒性,但在测试的最高浓度下显示出活力下降趋势(图16)。EEV-PMO-DMD45-6、EEV-PMO-DMD45-7、EEV-PMO-DMD45-8和EEV-PMO-DMD45-9在测试浓度下基本上没有毒性(图17)。EEV-PMO-DMD45-10在测试的最高两个浓度下显示出毒性;EEV-PMO-DMD45-11在测试浓度下并无明显毒性;EEV-PMO-对照用作毒性的阳性对照(图18)。

[1067]

表 10B: EEV-PMO

EEV*-PMO	PMO 序列	物料浓度 (Stock concentration)	测试浓度范围
EEV-PMO-DMD45-2	AA TGCCATCCTGGAGTTCCTG	7mM	623uM-4.9uM
EEV-PMO-DMD45-3	ATGCCATCCTGGAGTTCCTGT	7.3mM	612uM-4.8uM
EEV-PMO-DMD45-4	CCCAATGCCATCCTGGAGTTC	6.4mM	532uM-4.2uM
EEV-PMO-DMD45-5	ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA	6mM	502uM-3.9uM
EEV-PMO-DMD45-6	GCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	7.3mM	605uM-4.7uM
EEV-PMO-DMD45-7	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT	6.1mM	508uM-4uM
EEV-PMO-DMD45-8	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	4.8mM	602uM-4.7uM
EEV-PMO-DMD45-9	TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT	4.9mM	610uM-4.8uM
EEV-PMO-DMD45-10	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT	3.2mM	402uM-3.1uM
EEV-PMO-DMD45-11	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT	5.6mM	705uM-5.5uM
EEV-PMO-DMD45-1 (阳性对照)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG (卡西莫森)	1.8mM	46uM-3.6uM

*EEV 序列 = Ac-PKKRKRKV-AEEA-Lys-(环[FGFGRGRQ])-PEG12-OH。

实施例 11: 定位

[1068] 确定了单独的PMO (PMO)、与EEV缀合的PMO (EEV-PMO) 以及与EEV和核定位信号缀合的PMO (EEV-NLS-PMO) 的亚细胞定位。

[1069]

PMO:	5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAA T-3'
EEV-PMO:	环(FfΦRrRrQ)-PEG ₁₂ -NH-CH ₂ -CH ₂ -C(O)- ^{3'} TAAAGTCCA TTCGGCTCCAAACCG ^{5'}
EEV-NLS-PMO	Ac-PKKRKRKV-Lys[环(FfΦRrRrQ)]-PEG ₁₂ -Lys(叠氮化物-环辛-2-炔-1-O-(CH ₂) ₄ -O-C(O))- ^{3'} TAA AGT CCA TTC GGC TCC AAA CCG G ^{5'}

[1070] 简而言之,使THP-1单核细胞与3μM的PMO、EEV-PMO或EEV-NLS-PMO接触并孵育24小时,并且通过LC-MS进行检查。

[1071] 图22A示出了PMO与EEV-PMO与EEV-NLS-PMO的全细胞摄取。与单独的PMO相比,EEV-PMO和EEV-NLS-PMO均显示出细胞摄取的显著增加。

[1072] • EEV-PMO与PMO:约3倍

[1073] • EEV-NLS-PMO与PMO:约58倍

[1074] • EEV-NLS-PMO与EEV-PMO:约19倍

[1075] 图22B示出了使用LC-MS/MS测定的THP细胞中PMO与EEV-PMO与EEV-NLS-PMO的亚细胞定位。如图22B中所示,与单独PMO相比,EEV-PMO表现出改进的细胞通透性。NLS的添加进一步提高了细胞通透性。图22C示出了三种构建体的核摄取。

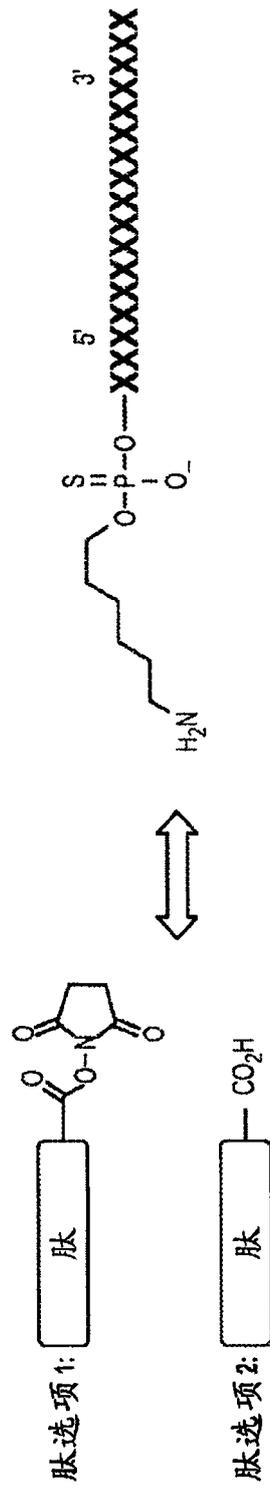


图1A

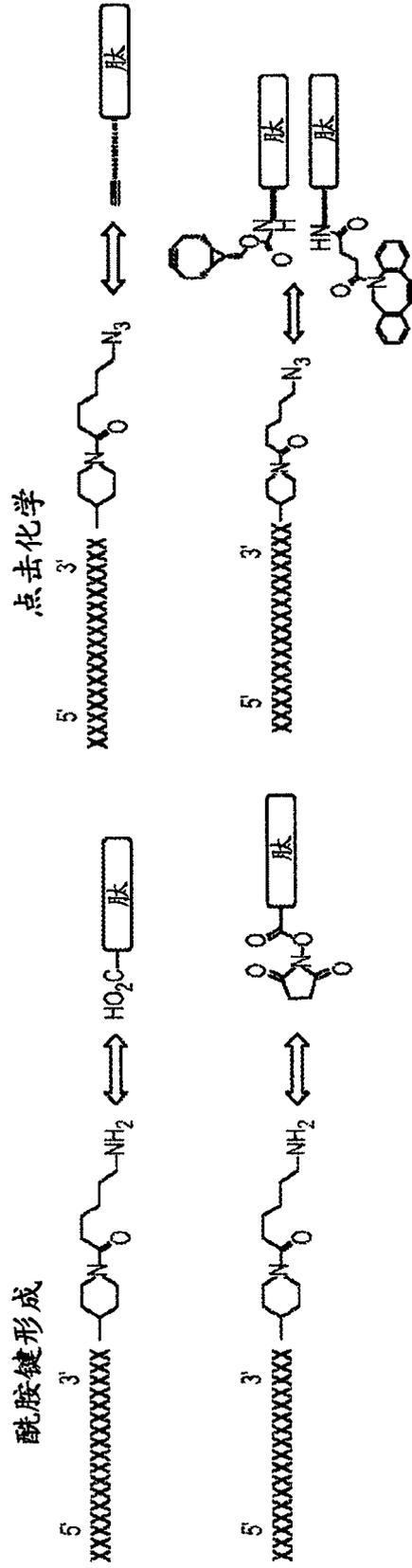


图1B

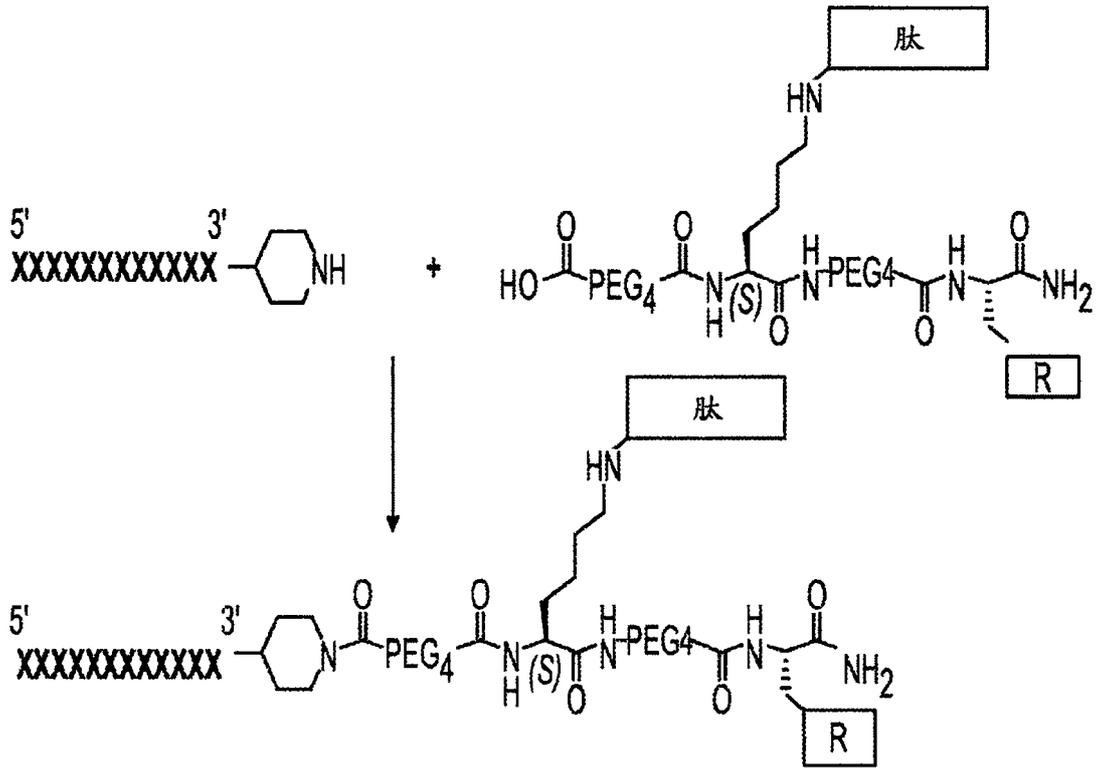


图2A

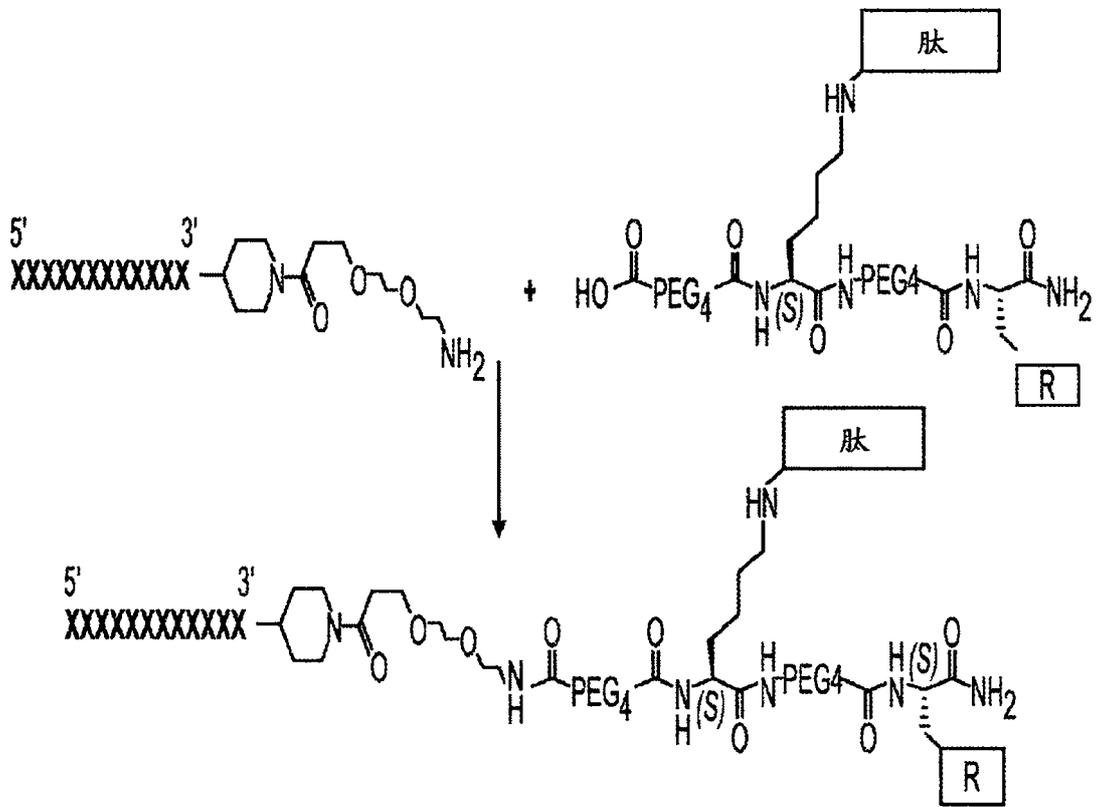


图2B

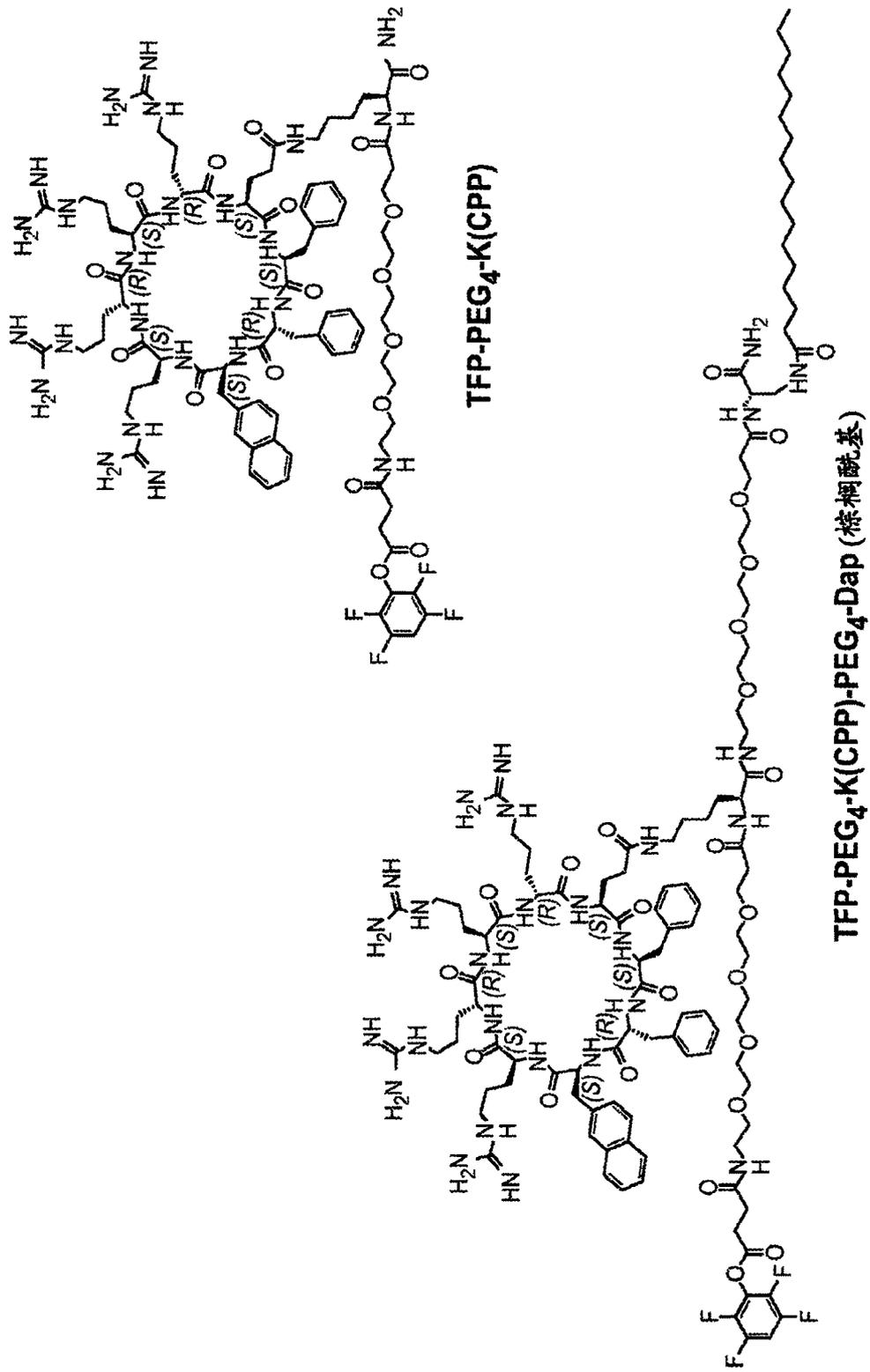
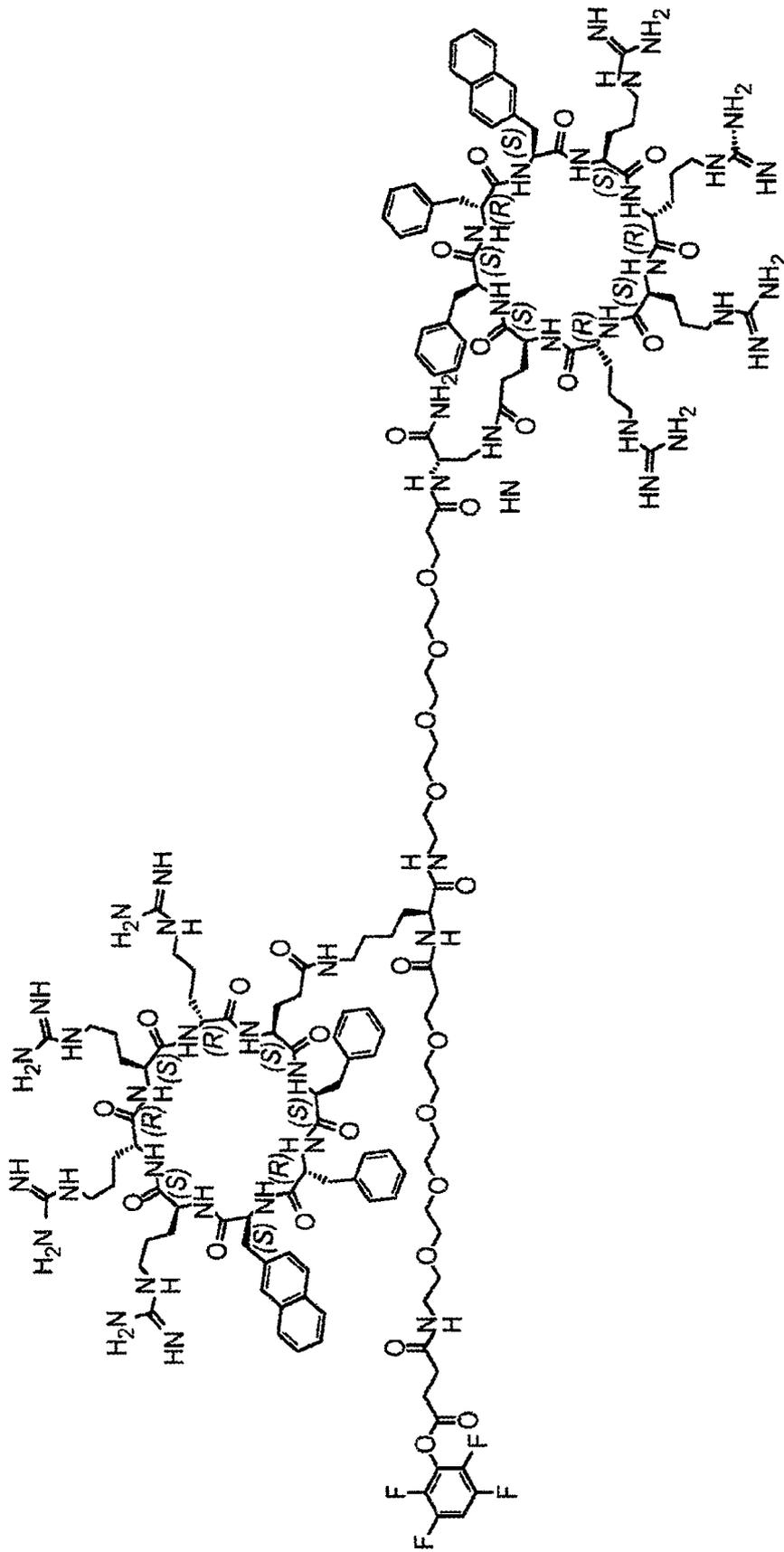


图3



TFP-PEG₄-K(CPP)-PEG₄-Dap(CPP)

图3(续)

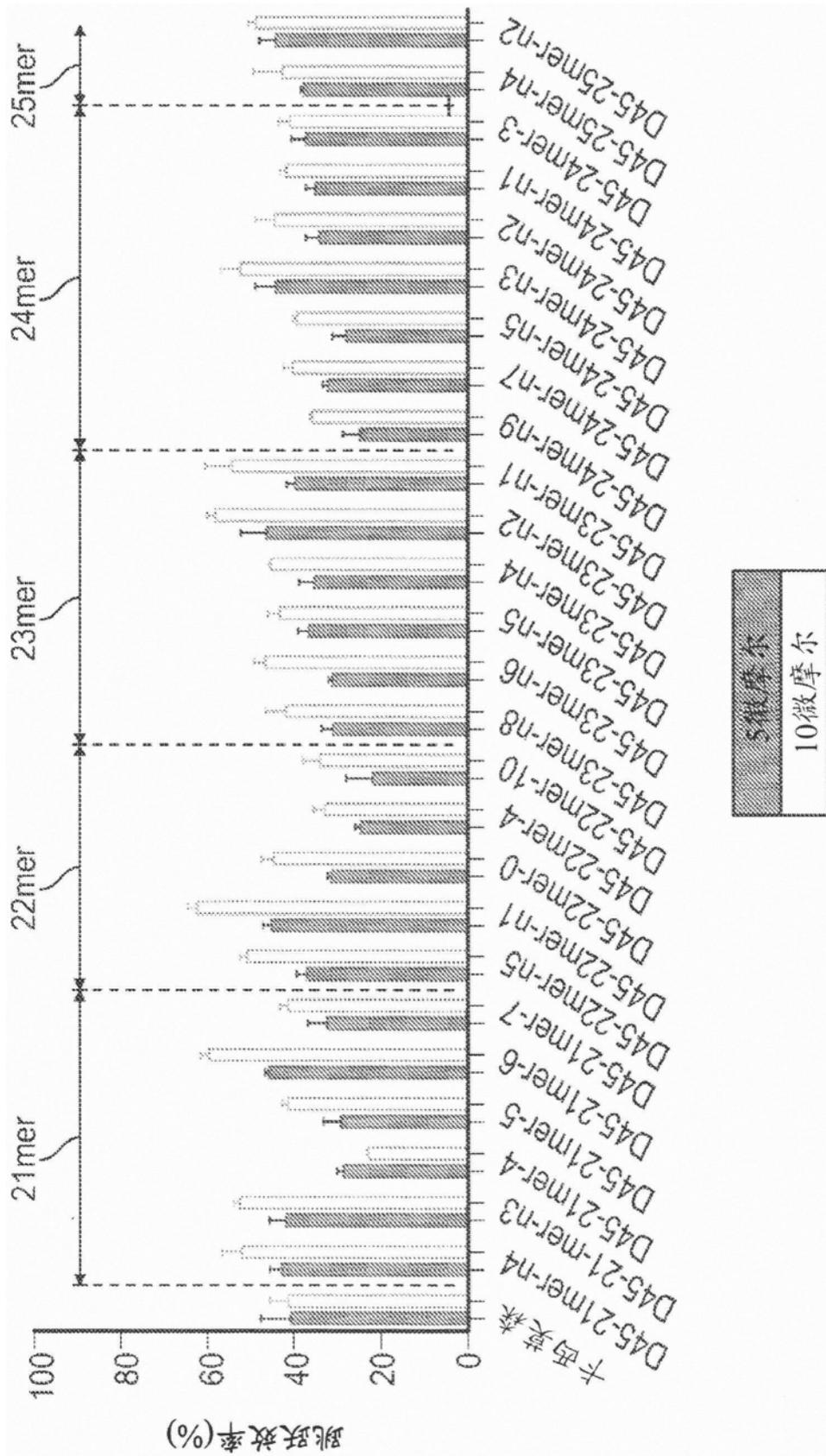


图4

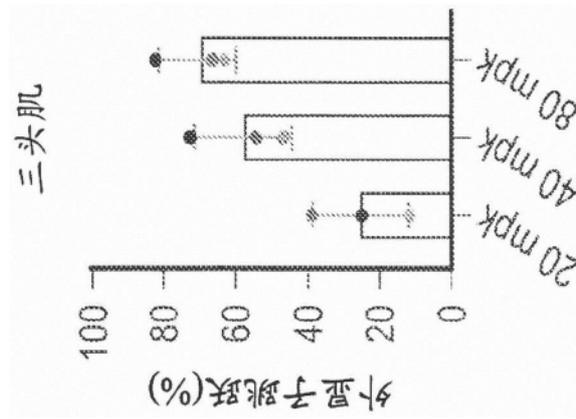


图5A

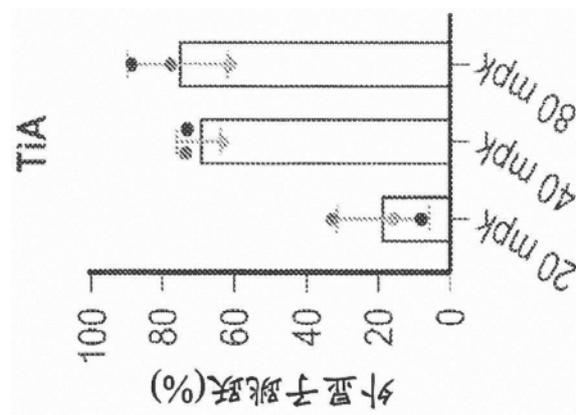


图5B

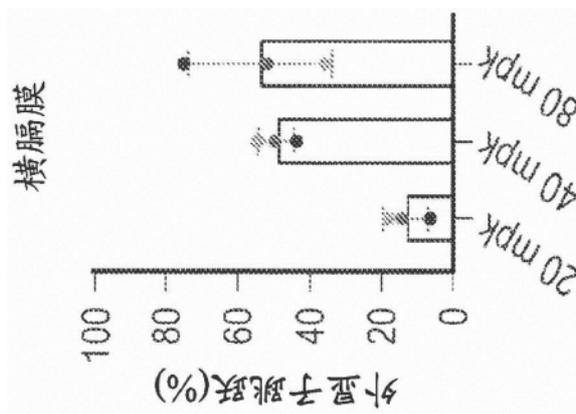


图5C

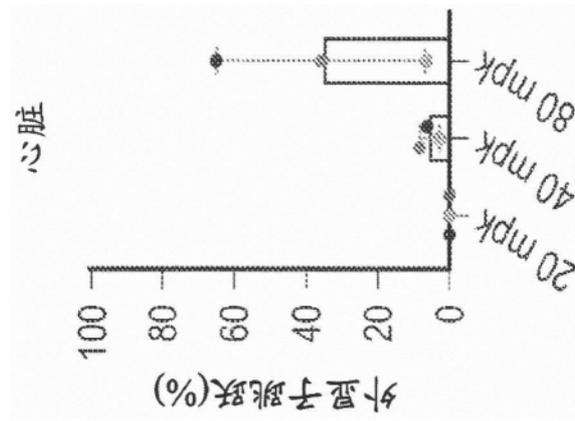


图5D

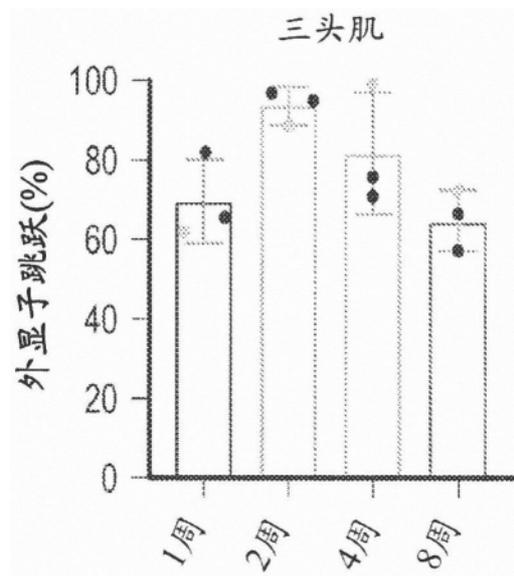


图6A

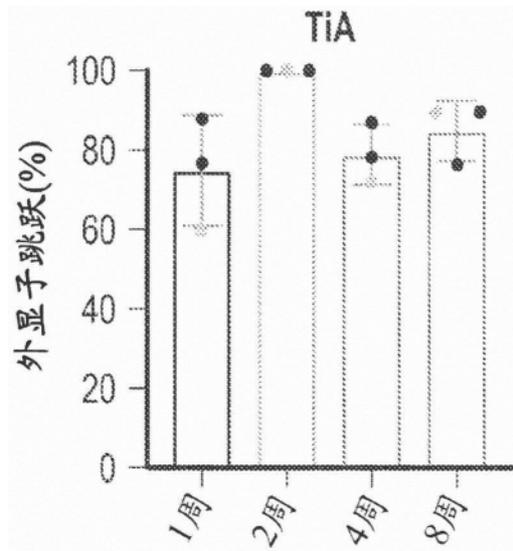


图6B

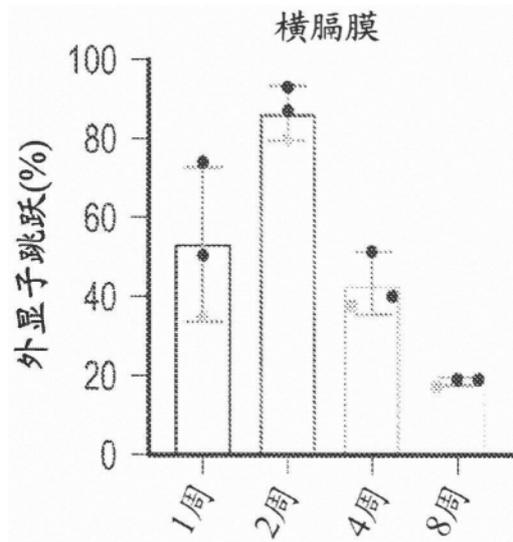


图6C

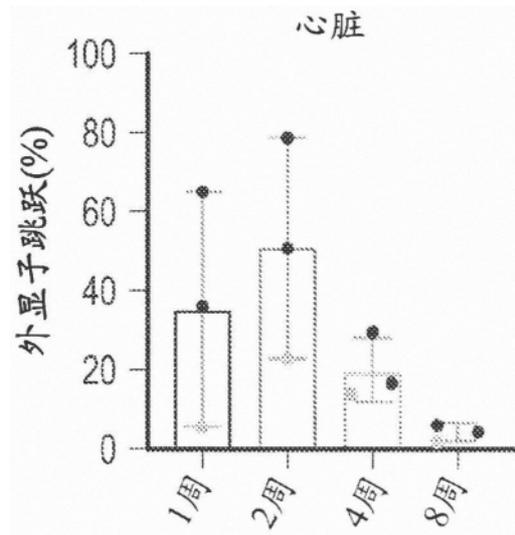


图6D

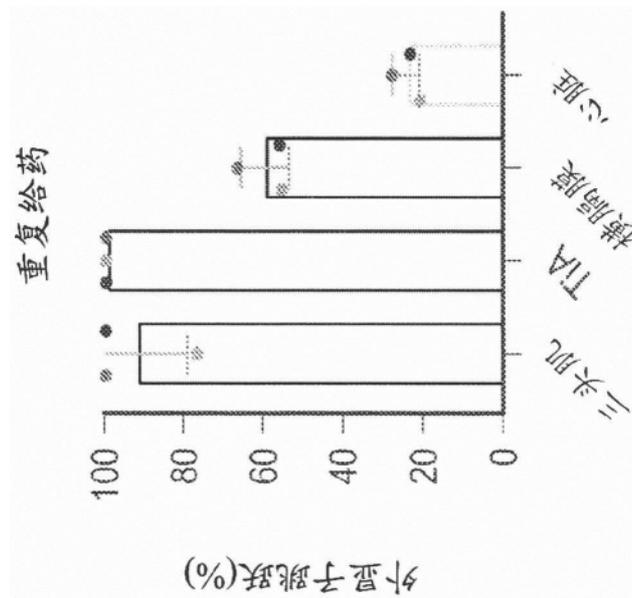


图7

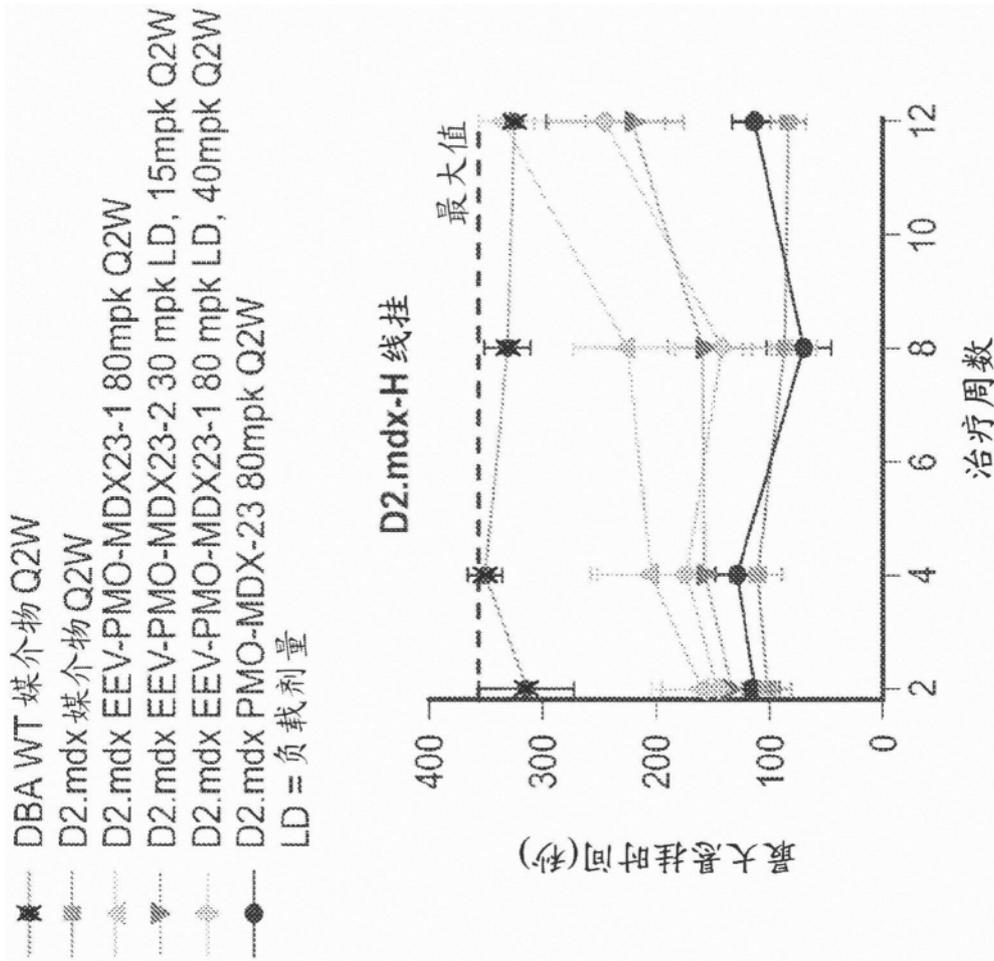


图8

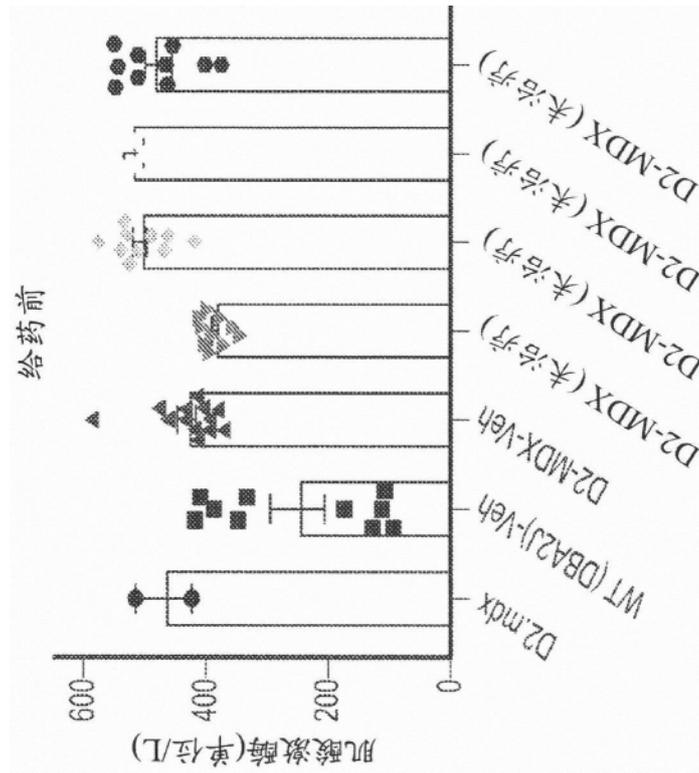


图9A

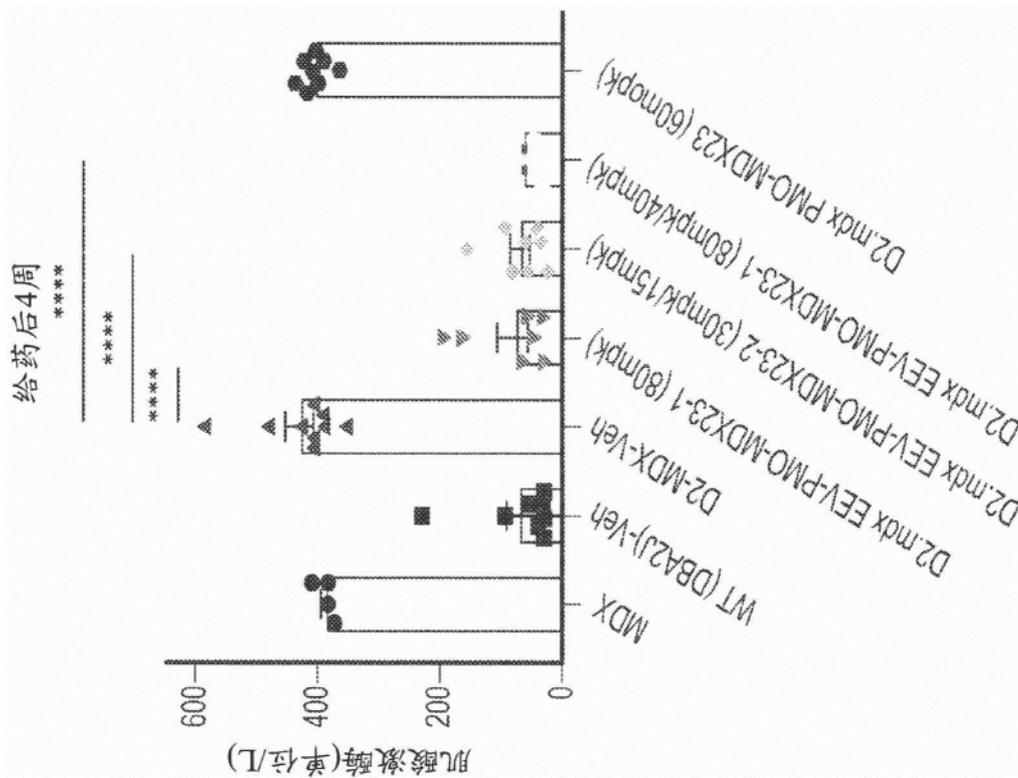


图9B

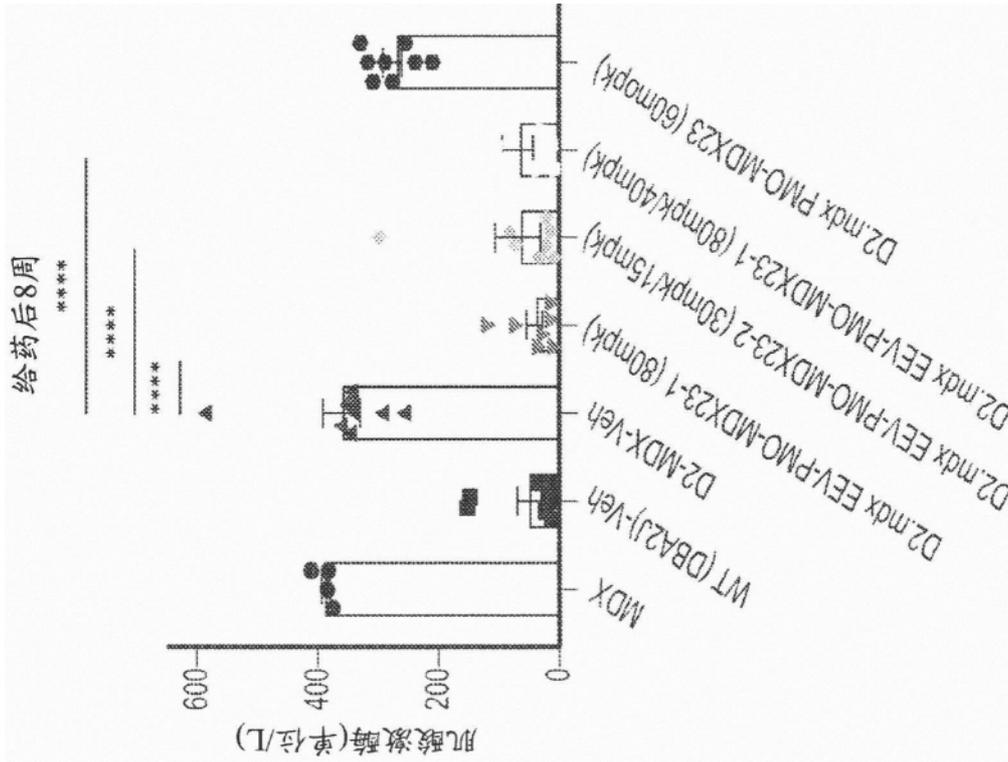


图10A

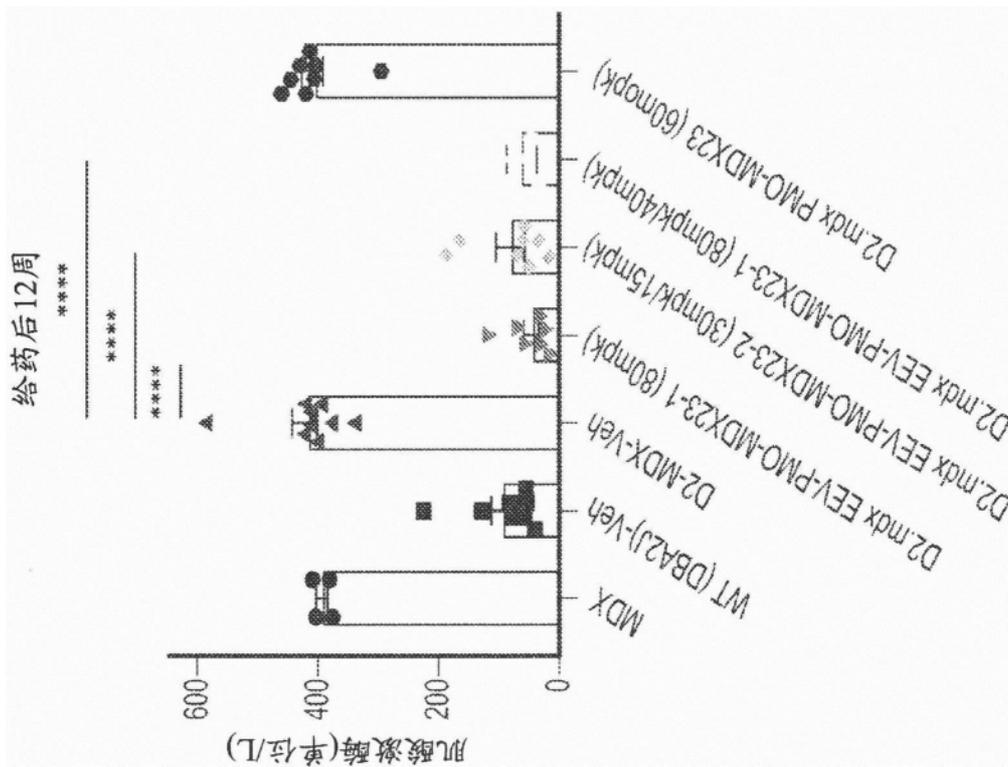


图10B

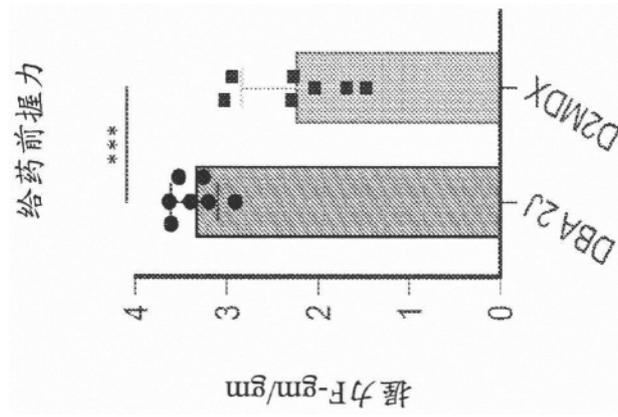


图11A

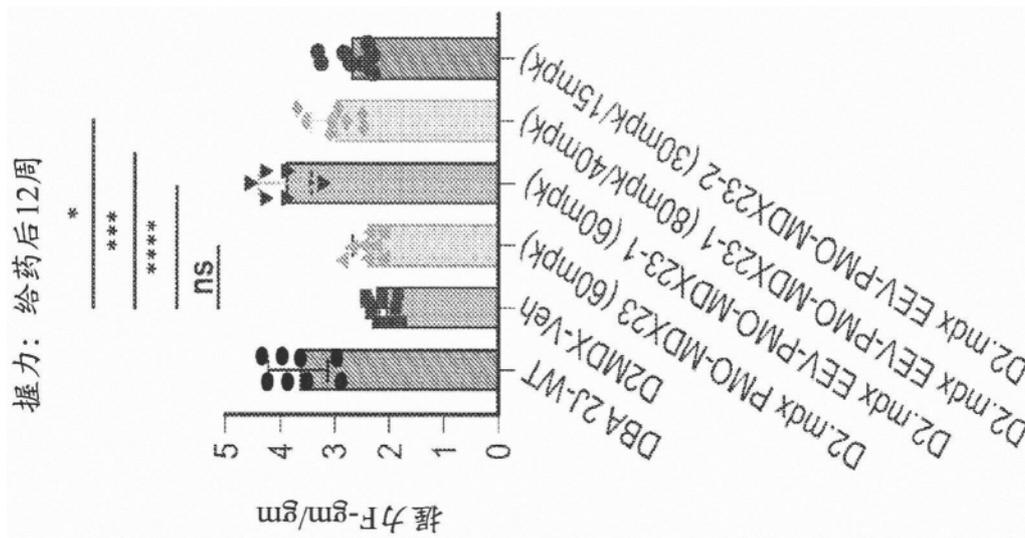


图11B

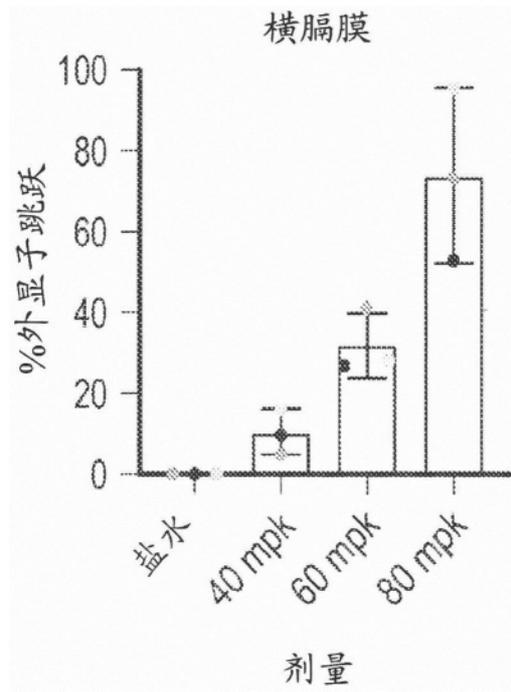


图12A

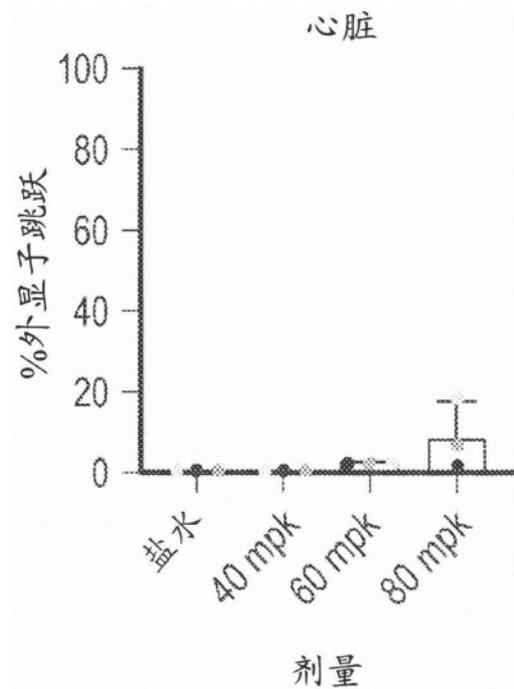


图12B

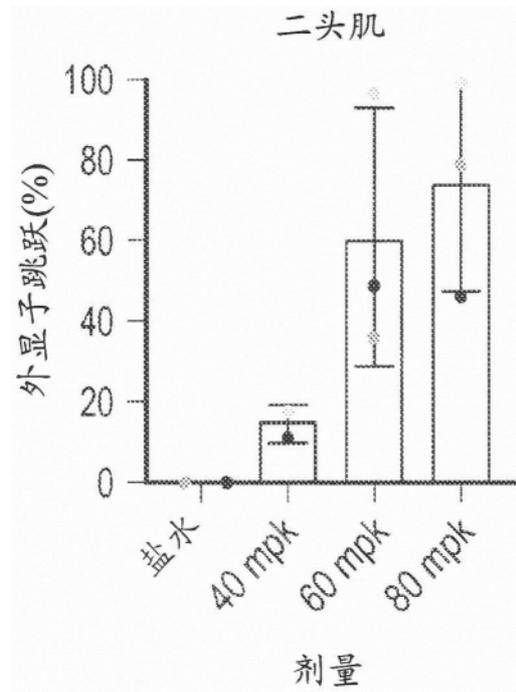


图12C

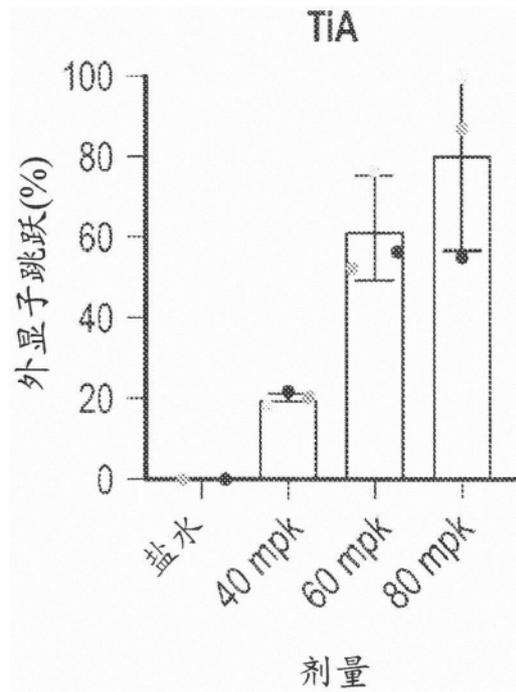
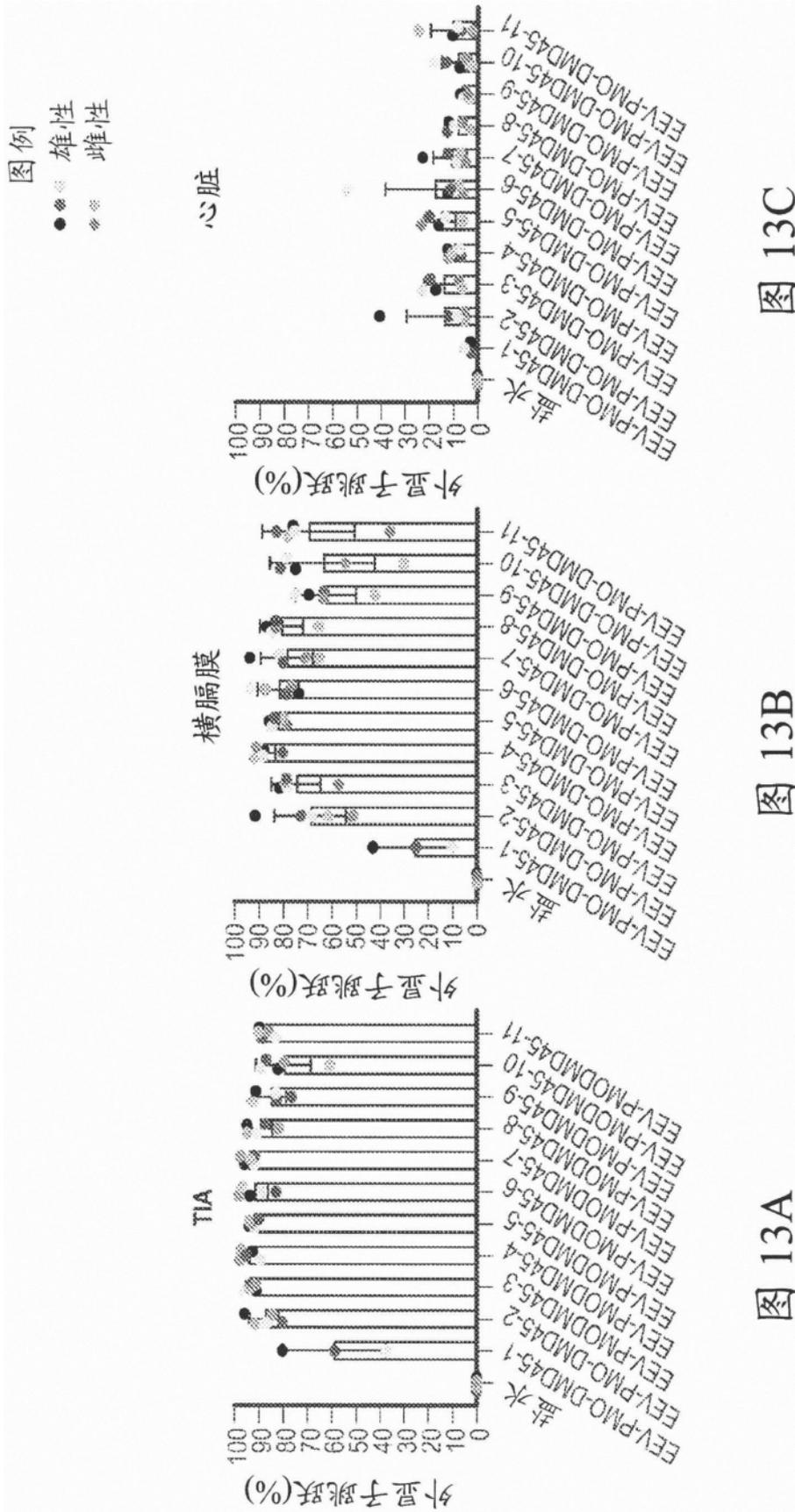


图12D



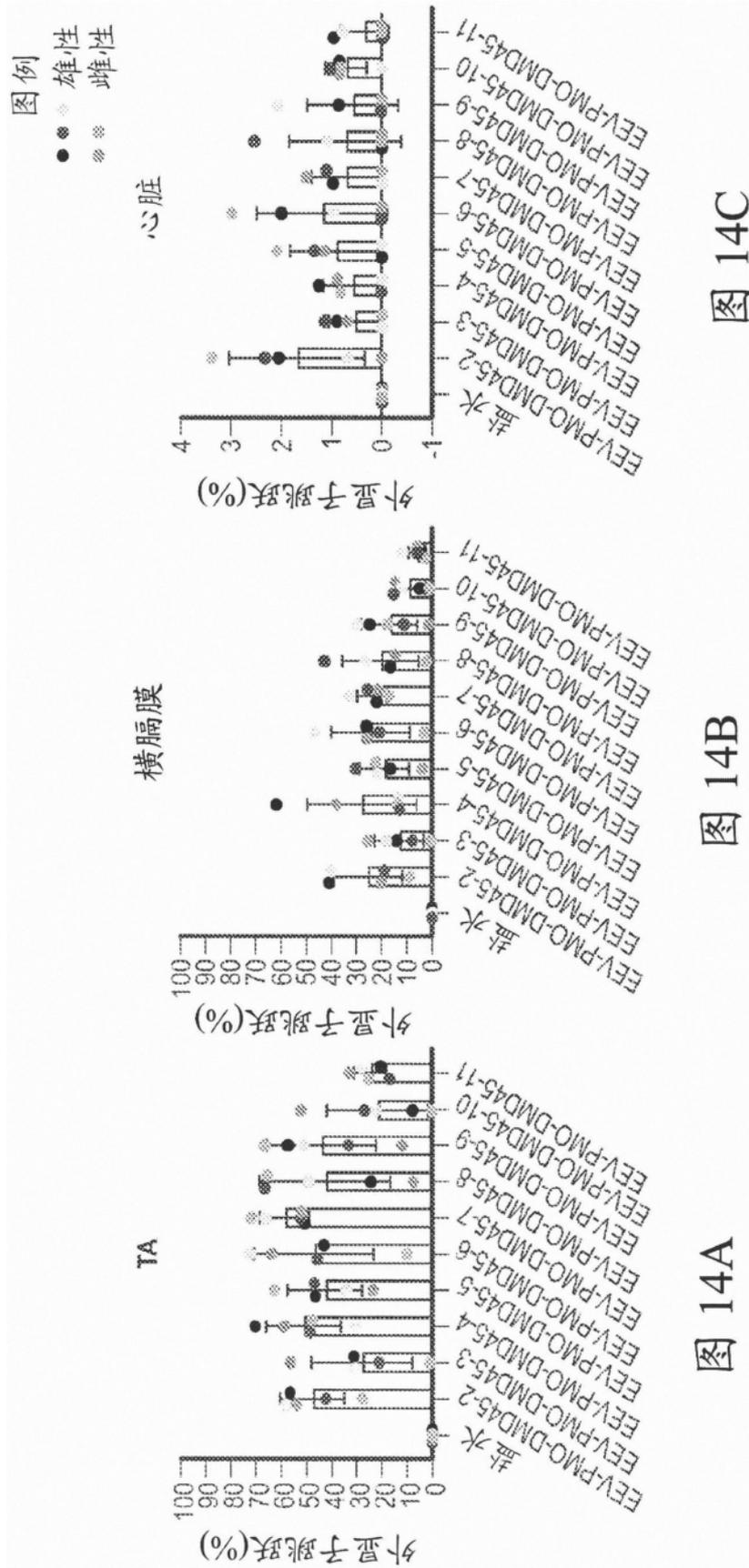


图 14C

图 14B

图 14A

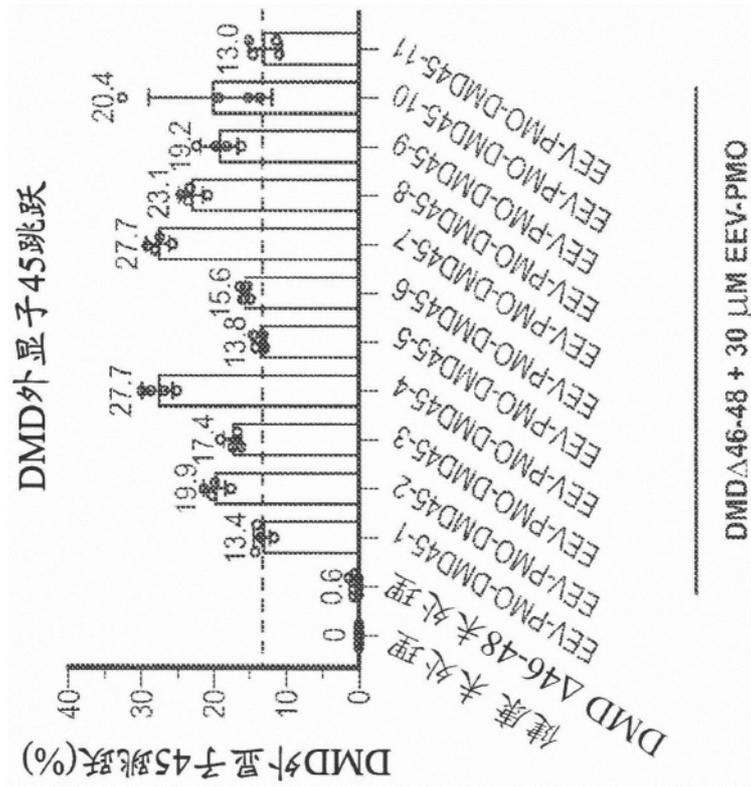


图15A

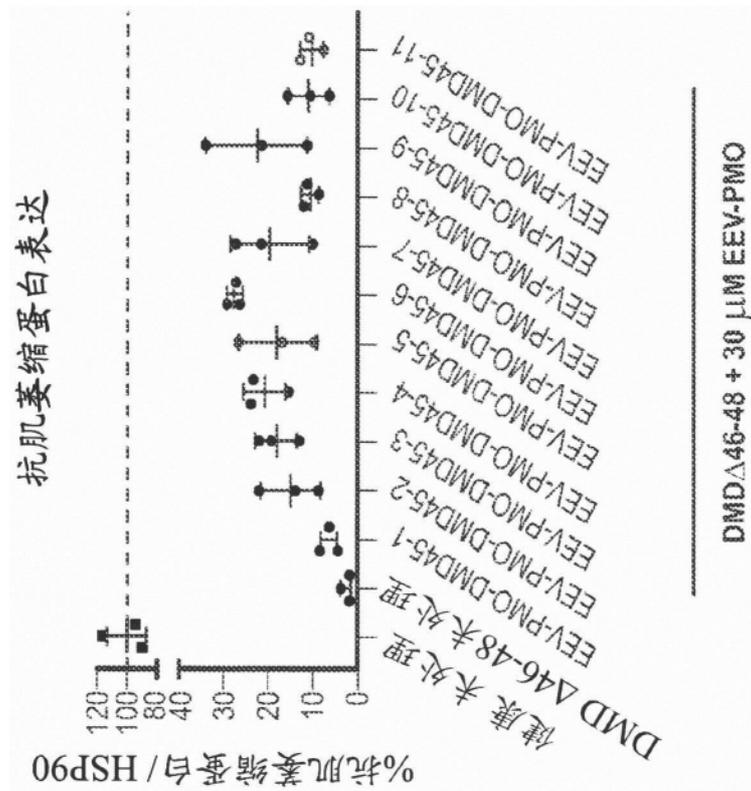
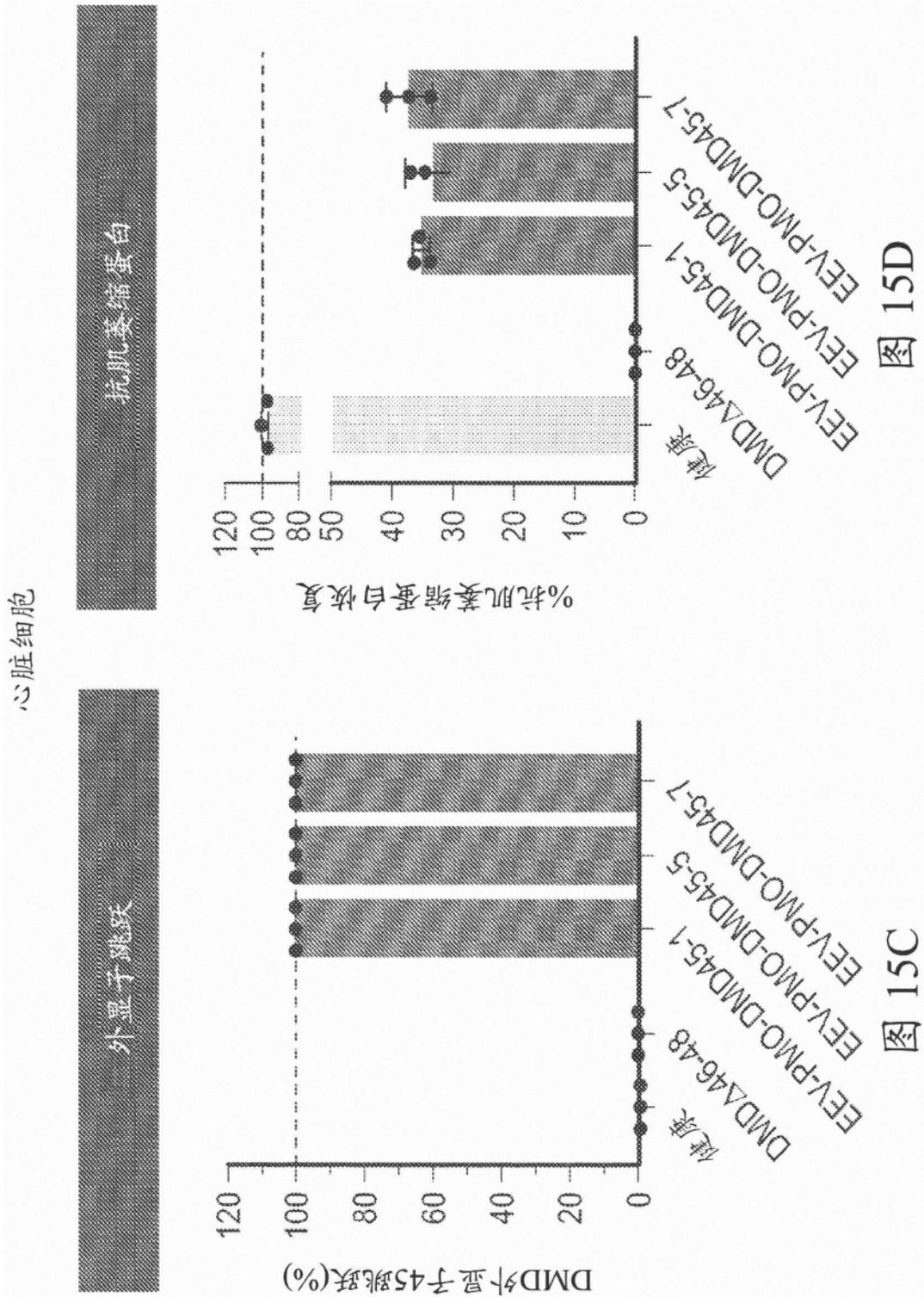


图15B



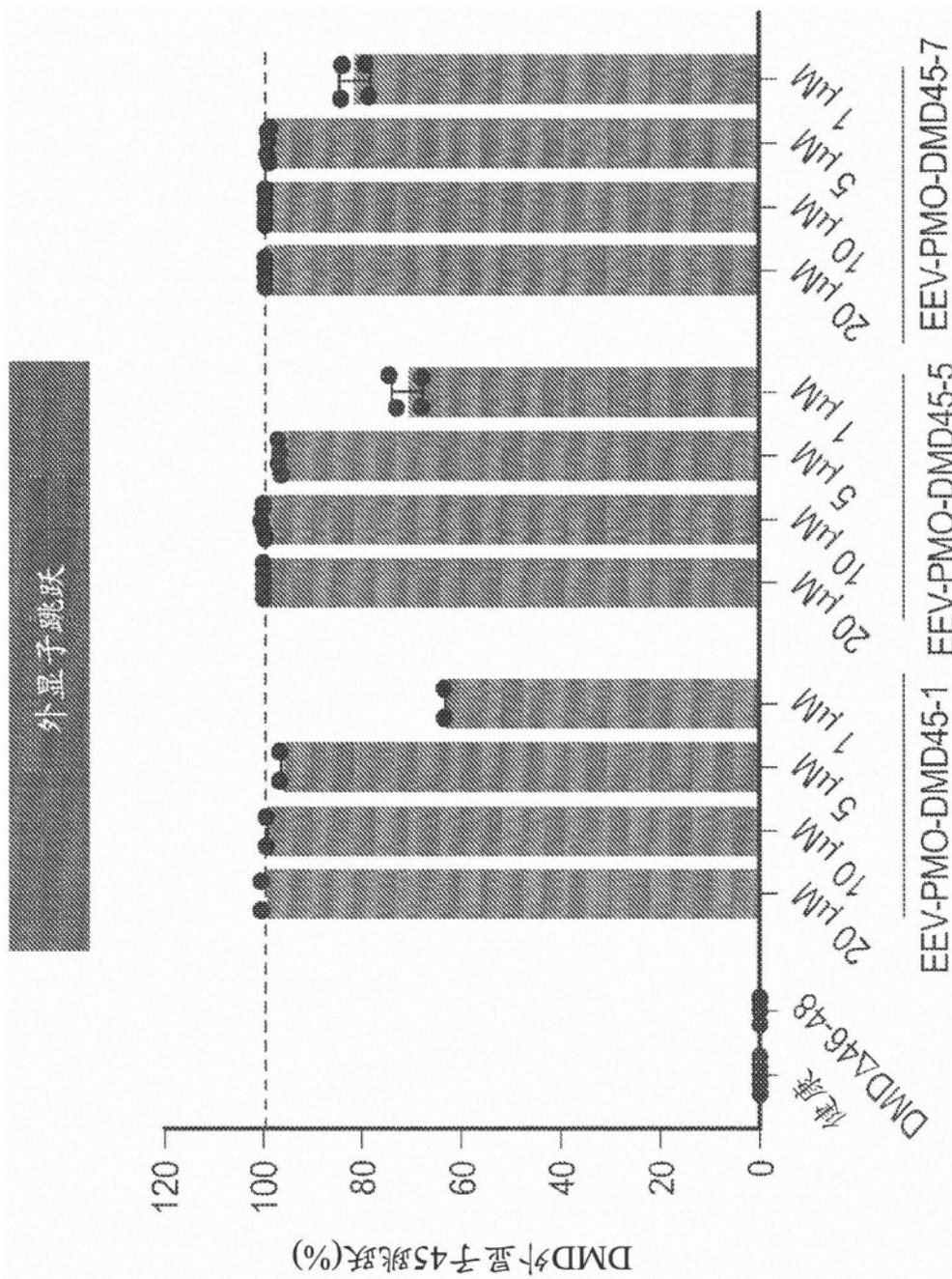


图15E

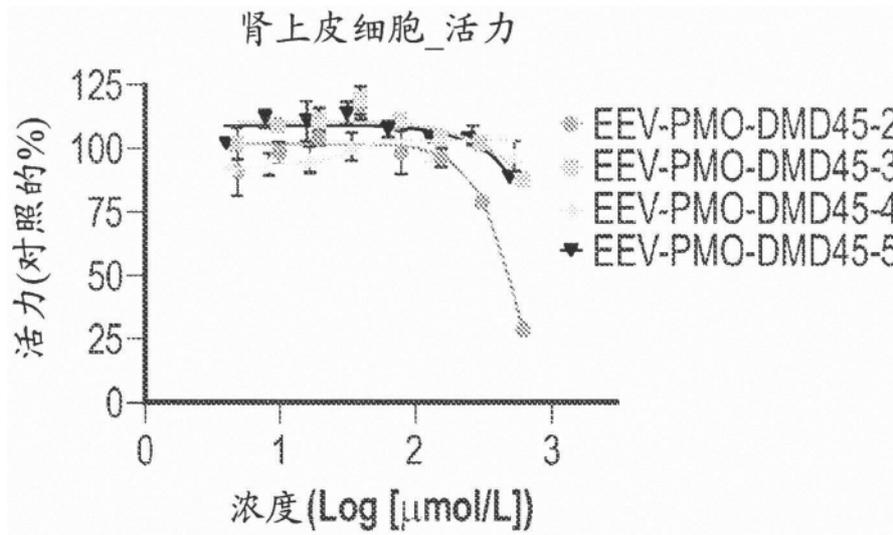


图16

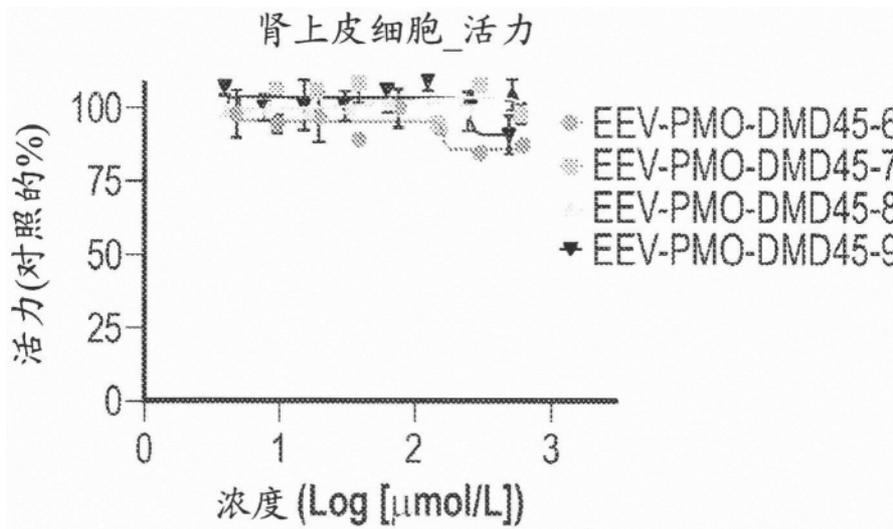


图17

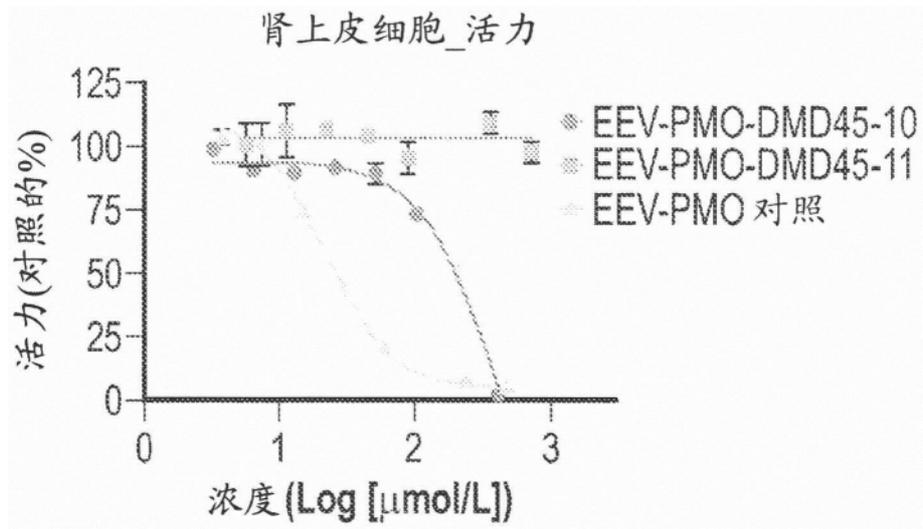


图18

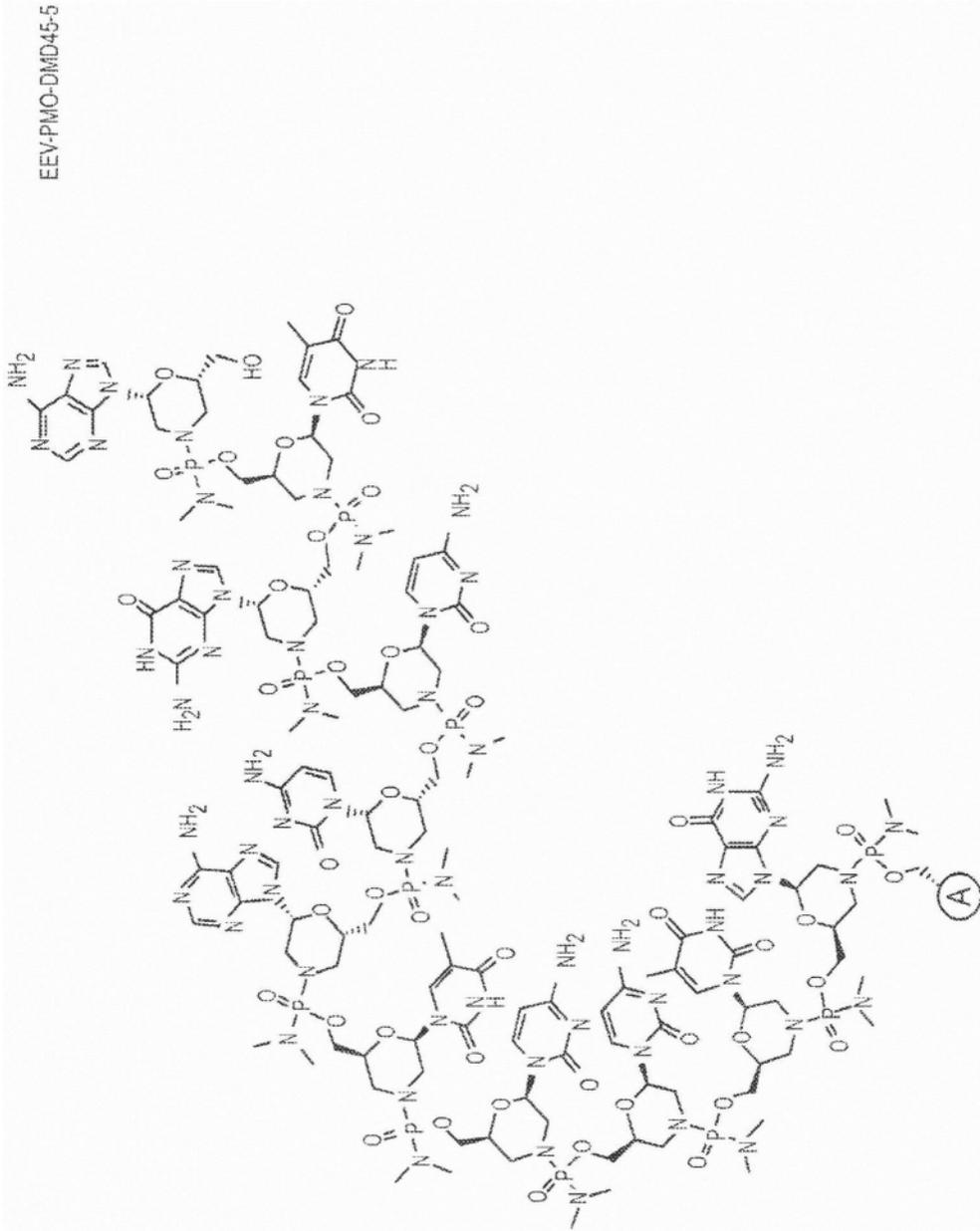


图19

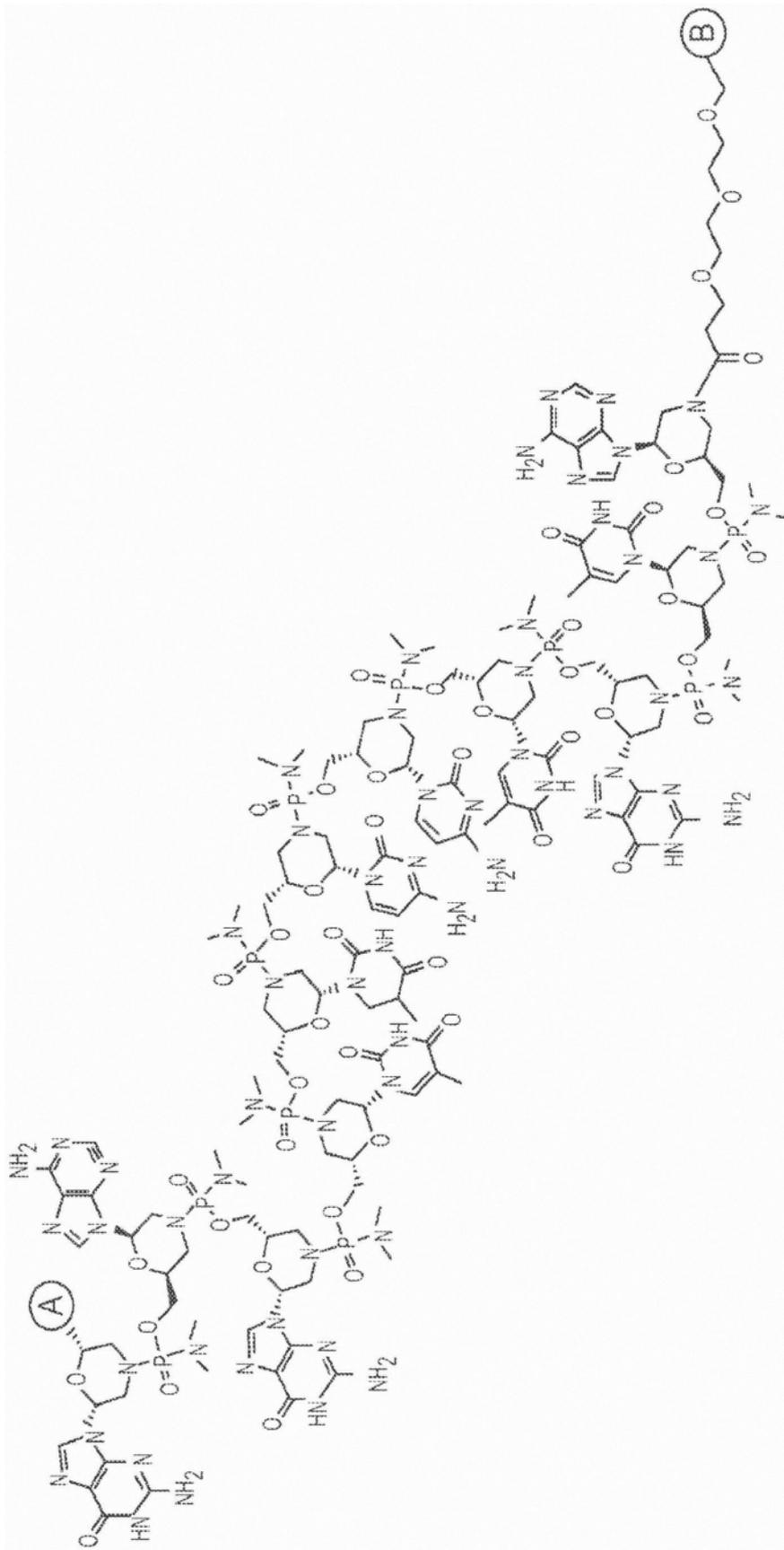


图19(续)

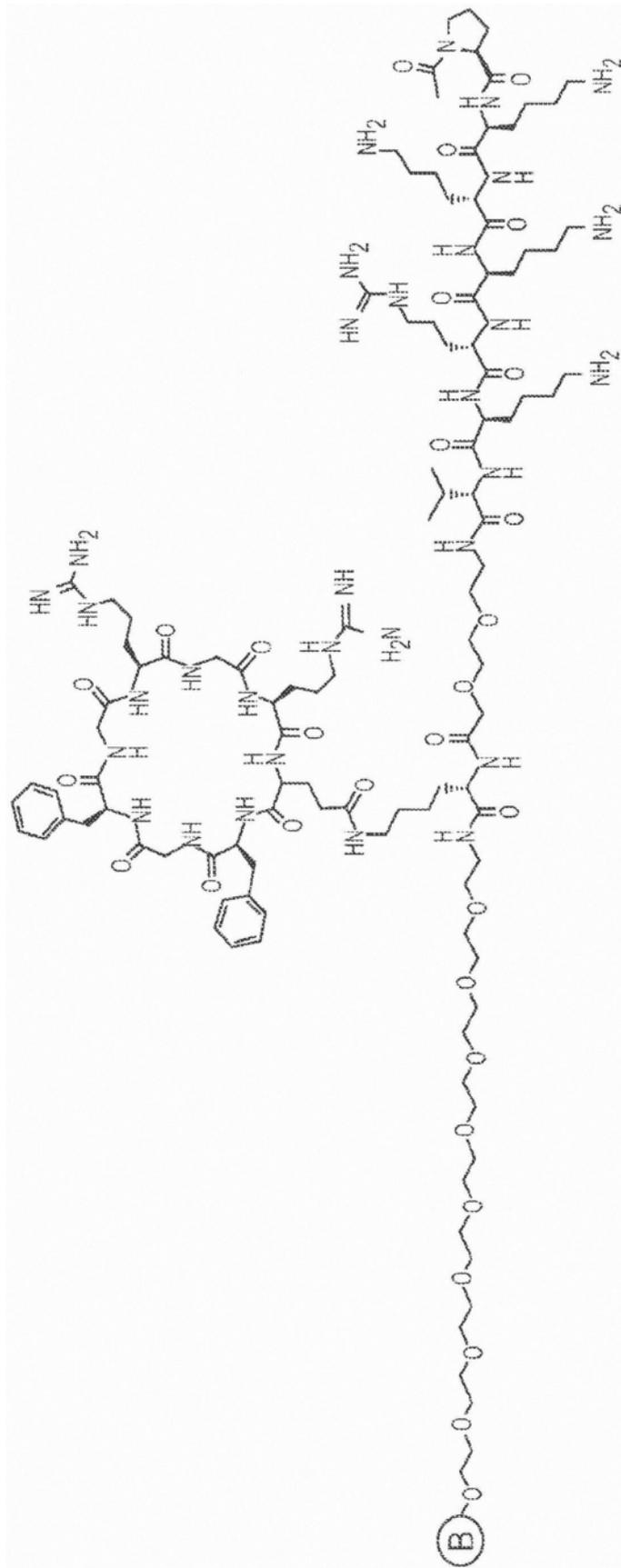


图19(续)

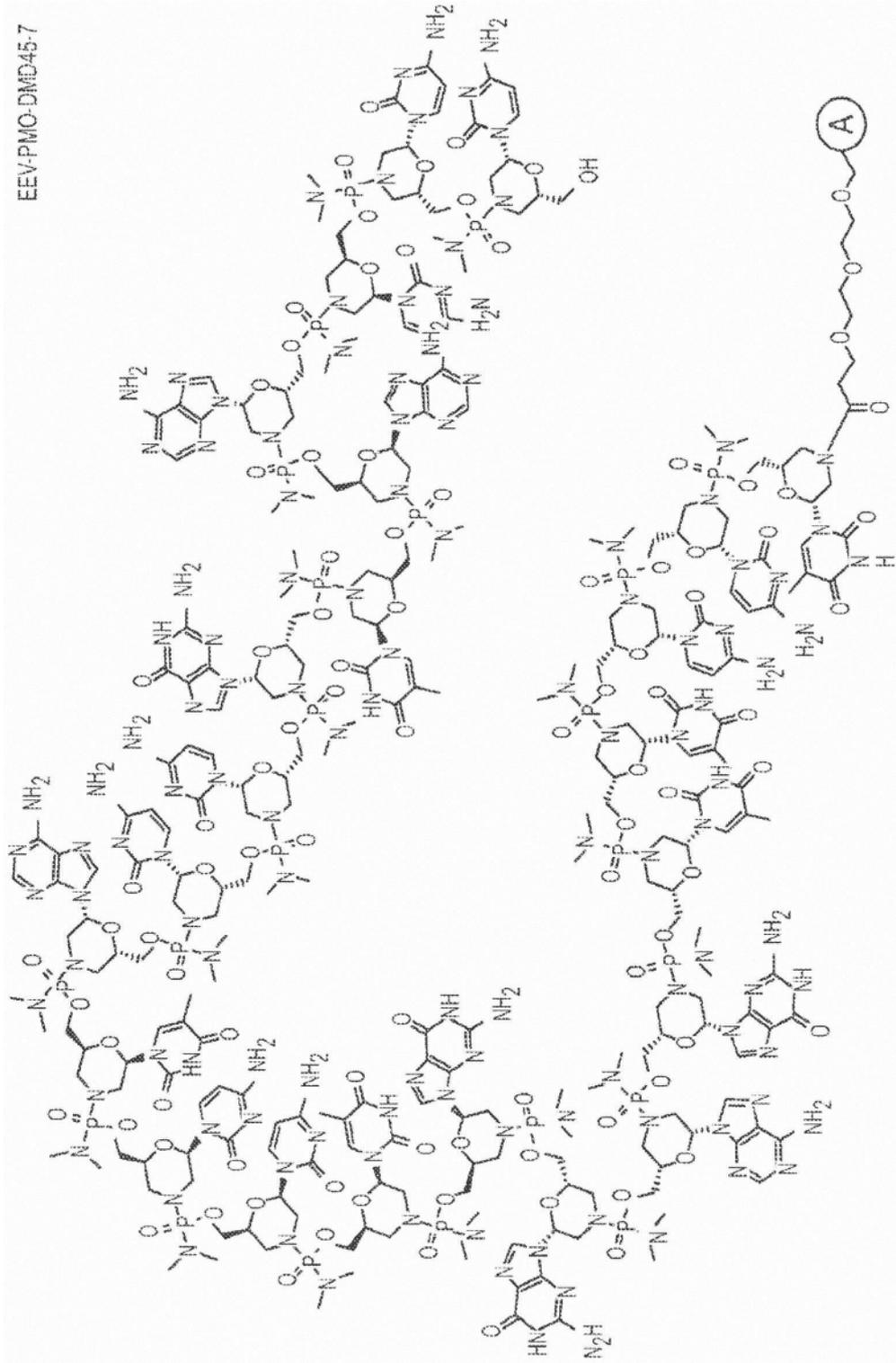


图20

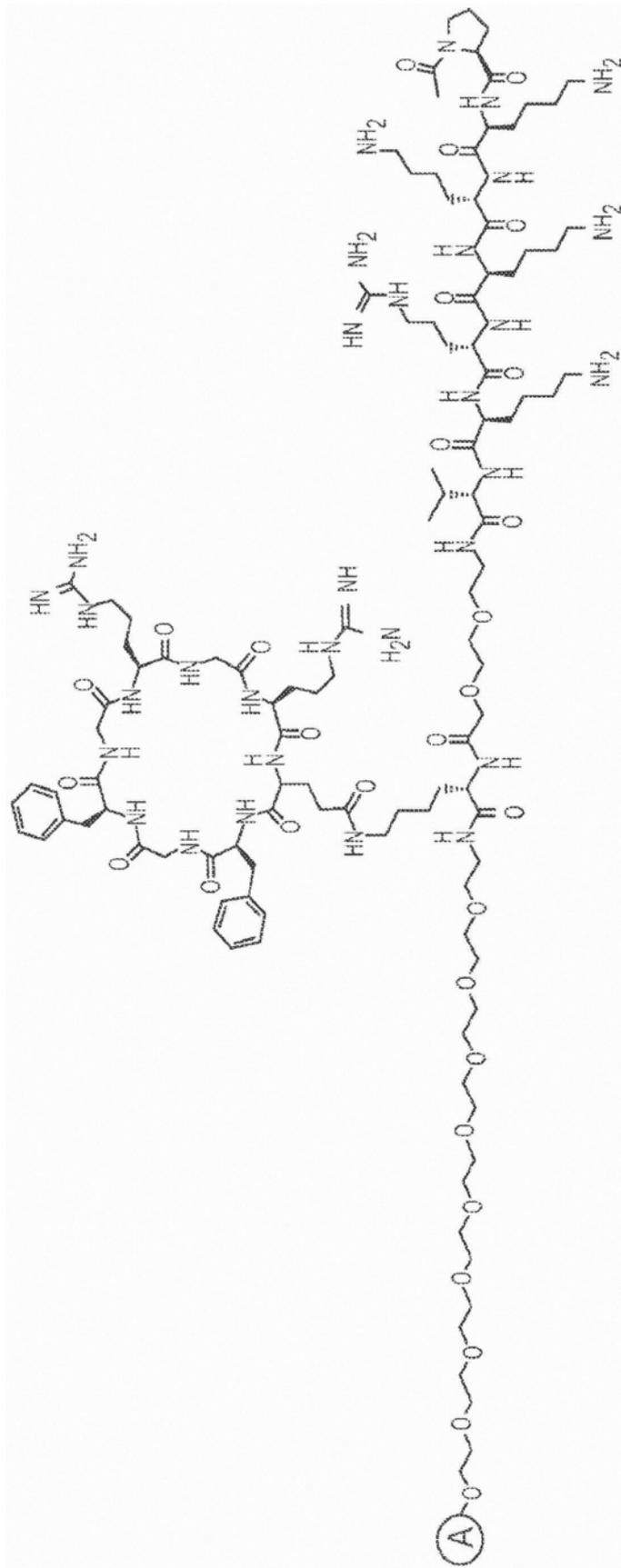


图20(续)

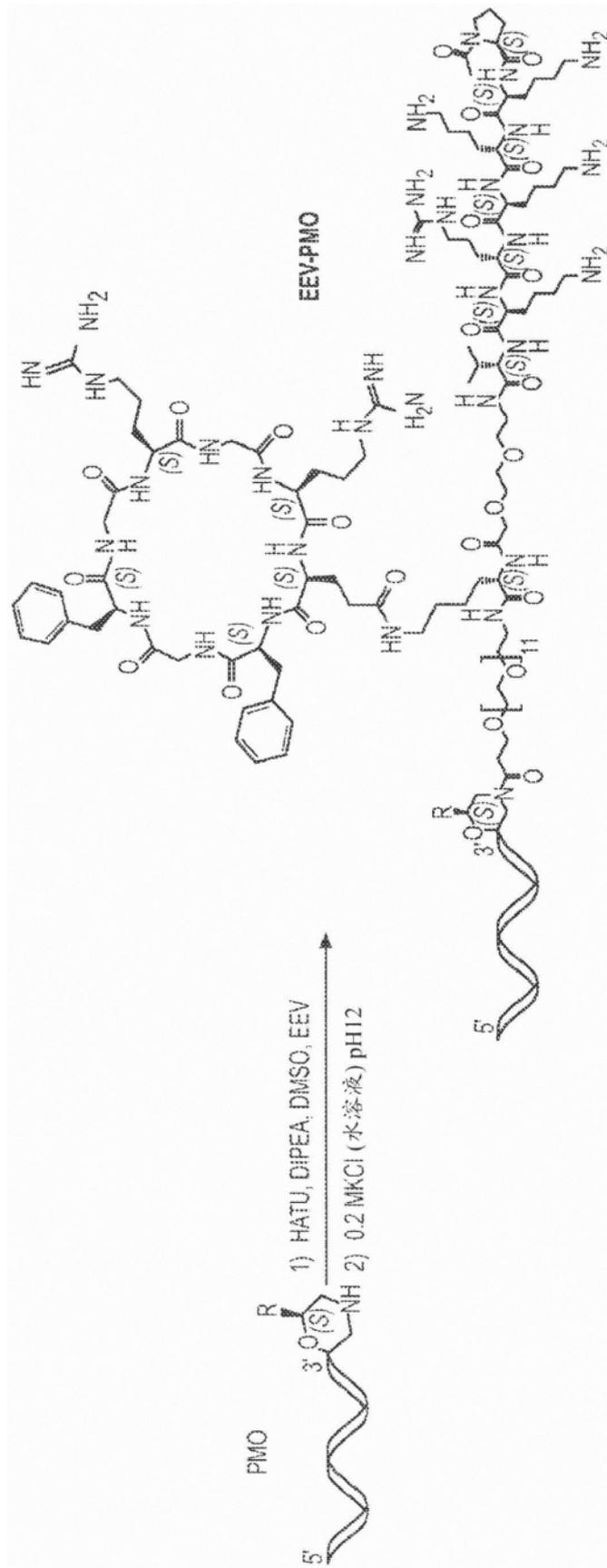


图21A

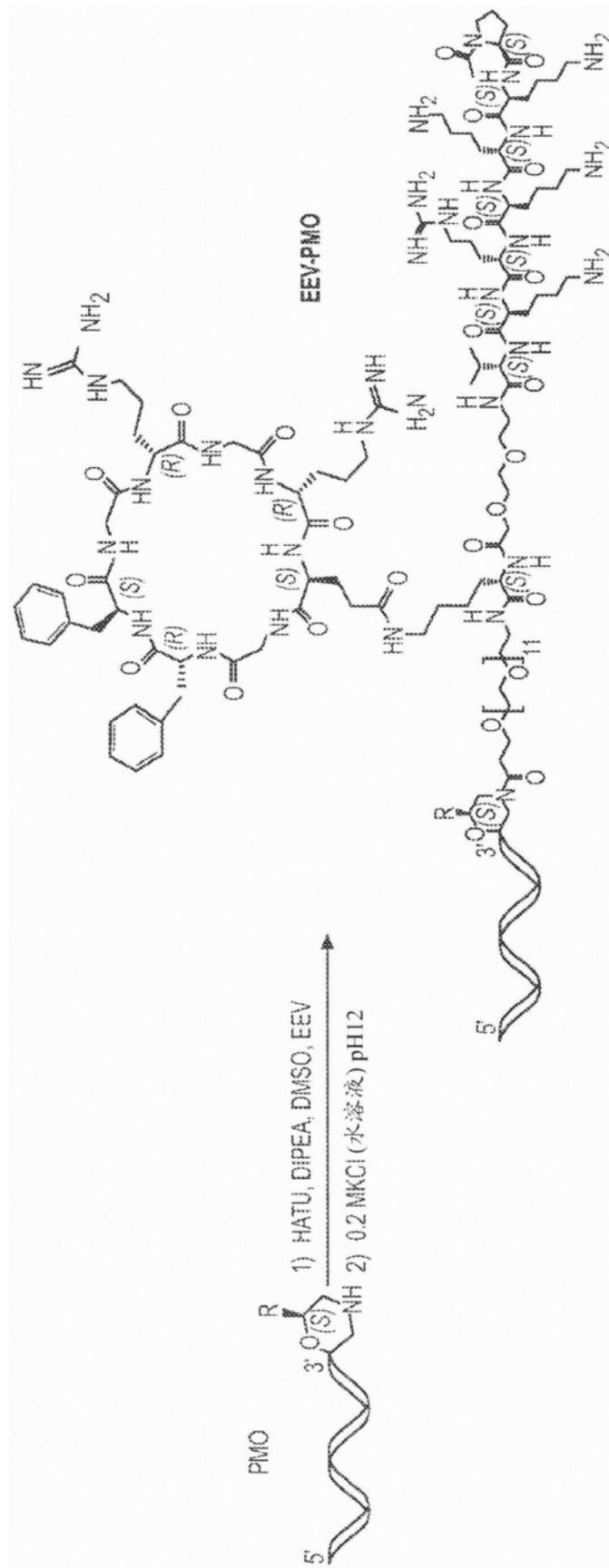


图21B

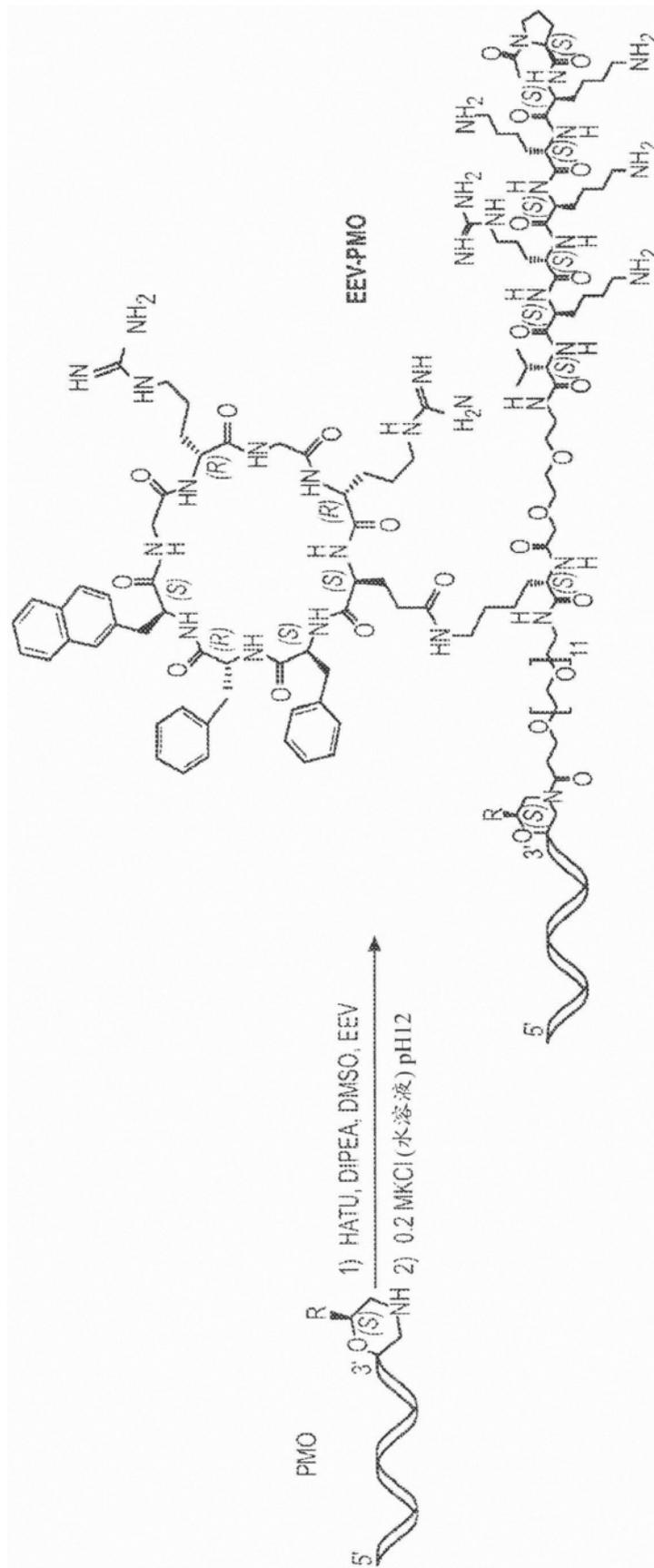


图21C

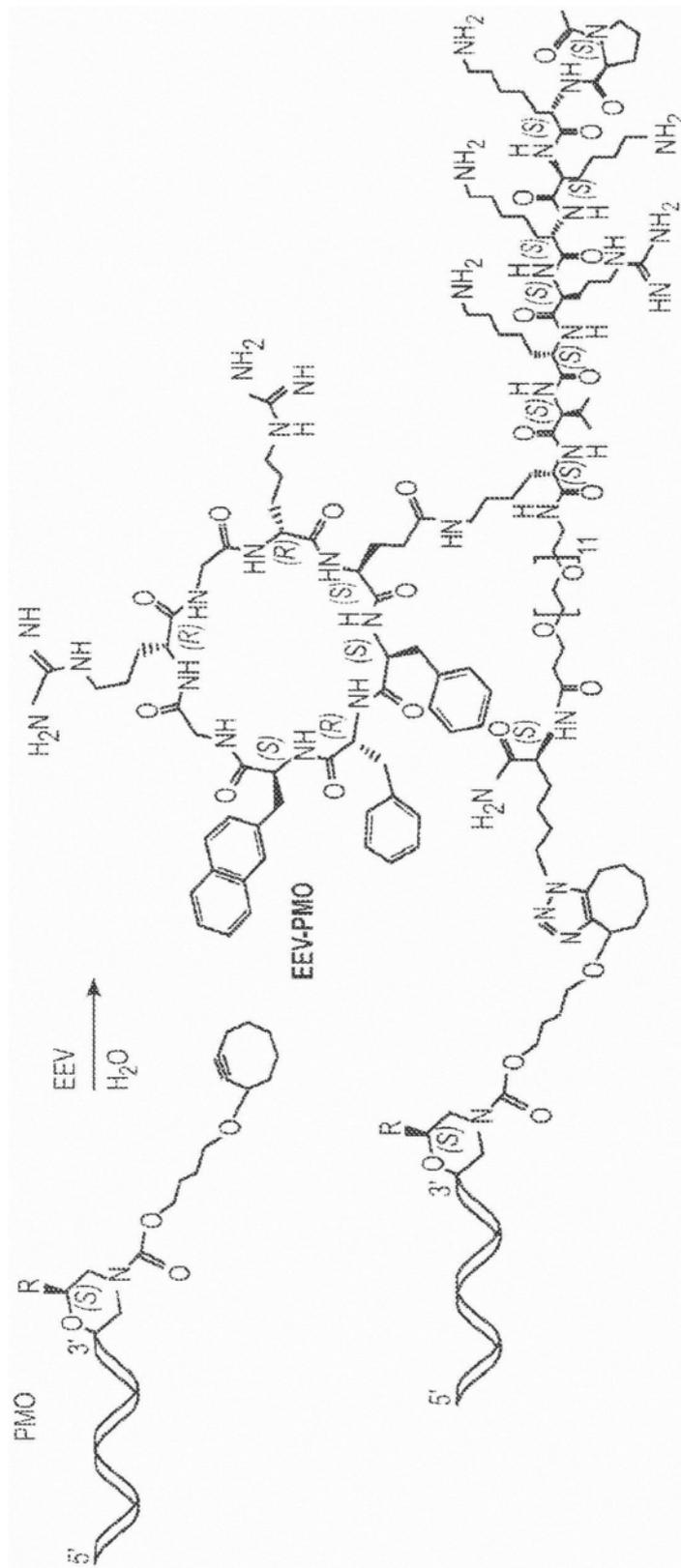


图21D

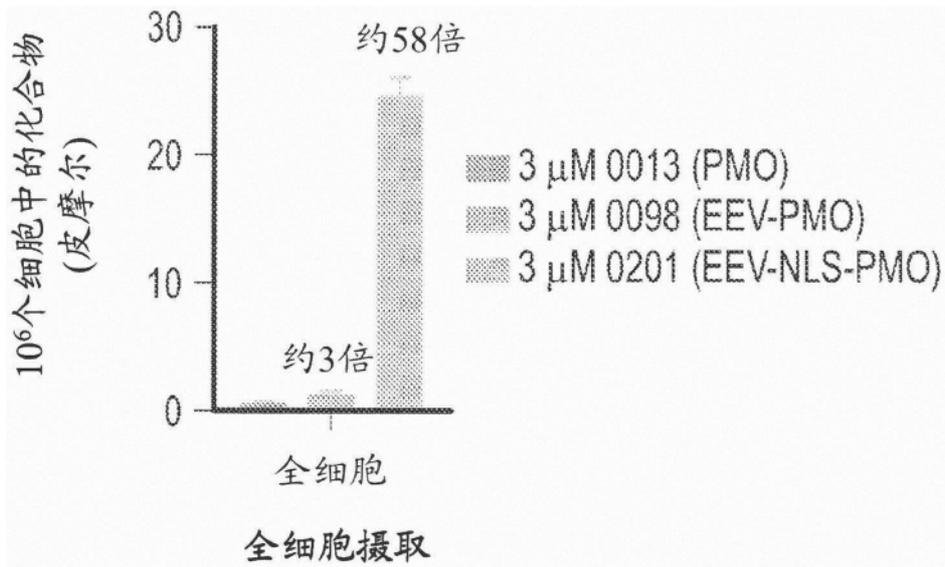


图22A

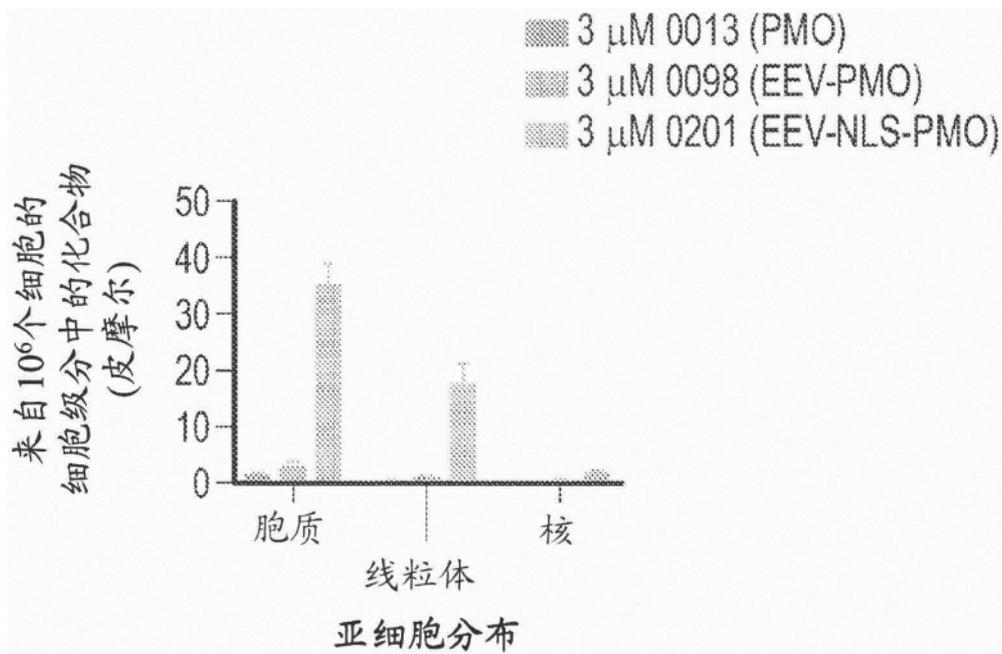


图22B

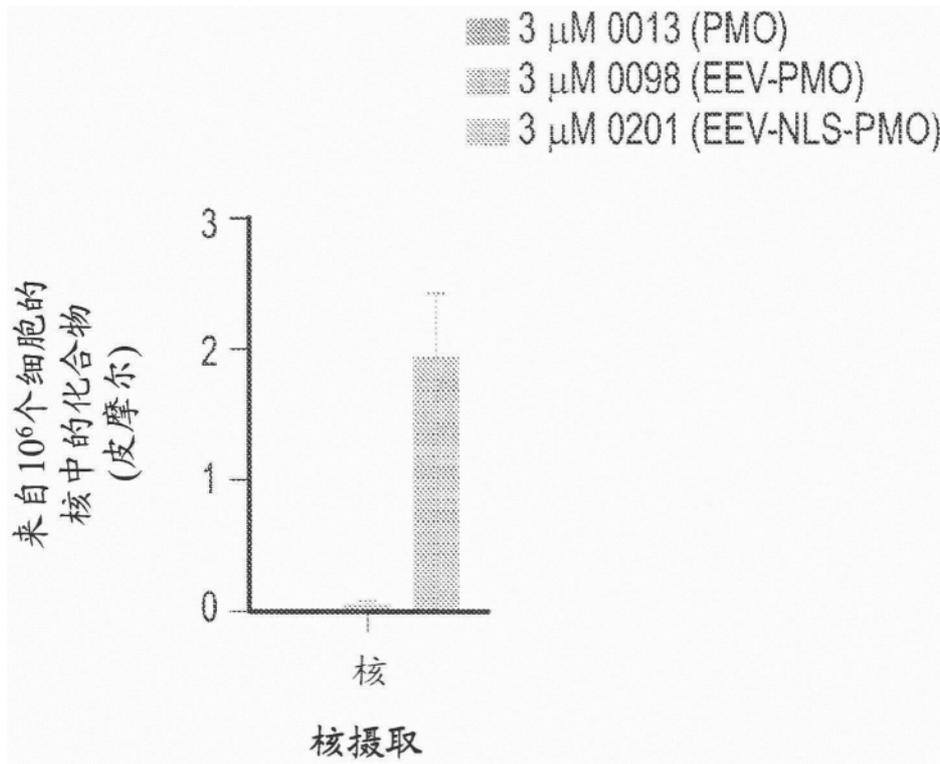
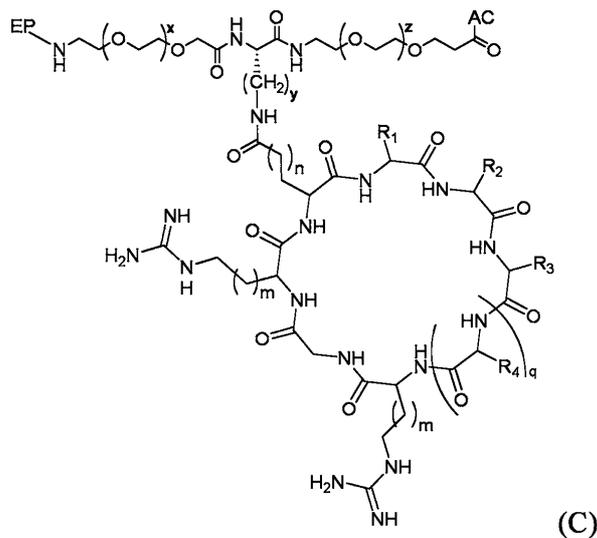


图22C

1. 一种化合物,其包含含有环状细胞穿透肽(cCPP)、环外肽(EP)和接头的内体逃逸载体(EEV),所述内体逃逸载体与AC缀合以形成式(C)的EEV-缀合物:



或其质子化形式,

其中:

(a) 在环状细胞穿透肽(cCPP)中:

R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的两者包含苯丙氨酸;

每个m独立地是0-3的整数;

n是0-2的整数;

x' 是2-20的整数;

y是1-5的整数;

q是1-4的整数;

z' 是2-20的整数;

(b) EP是包含4至8个氨基酸残基的环外肽,所述氨基酸残基包含1或2个包含含有胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸残基以及2、3或4个赖氨酸残基;并且

(c) AC是来自表6A-6P或表7A-7O或表8A-8C中的任一者的寡核苷酸、或其反向互补序列或与其具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列同一性的序列。

2. 如权利要求1所述的化合物,其中q是1。

3. 如权利要求1或2所述的化合物,其中所述EP具有以下结构:Ac-PKKKRKV。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的化合物,其中所述环状细胞穿透肽包含FGFGRGRQ。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的化合物,其中与所述AC缀合以形成所述式(C)的化合物的所述EEV包含:Ac-PKKKRKV-AEEA-Lys-(环[FGFGRGRQ])-PEG₁₂-OH。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中所述AC包含以下序列:5'-ATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA-3'。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中所述AC包含以下序列:5'-

ATGCCATCCTGGAGTTCCTGT-3'。

8.如权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中所述AC包含以下序列:5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT-3'。

9.如权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中所述AC包含以下序列:5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3'。

10.如权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中所述AC包含以下序列:5'-CCCAATGCCATCCTGGAGTTCC-3'。

11.如权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中所述AC包含以下序列:5'-GCCCAATGCCATCCTGGAGTTCC-3'。

12.如权利要求1-5中任一项所述的化合物,其中所述AC包含以下序列:5'-TGCCCAATGCCATCCTGGAGTTCCT-3'。

13.如权利要求1所述的化合物,其中所述AC包含至少一种修饰的核苷酸或核酸,所述修饰的核苷酸或核酸选自硫代磷酸酯(PS)核苷酸、二氨基磷酸酯吗啉代核苷酸(PMO)、锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、包含2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的主链的核苷酸、2'-O-甲氧基-乙基(2'-MOE)核苷酸、2',4'约束乙基(cEt)核苷酸和2'-脱氧-2'-氟-β-D-阿糖核酸(2'F-ANA)。

14.如权利要求1所述的化合物,其中所述环肽与以下缀合:

- (a)所述AC的3'端;
- (b)所述AC的5'端;或
- (c)所述AC的主链。

15.如权利要求14所述的化合物,其包含将所述环肽缀合至所述AC的接头,其中所述接头与以下共价结合:

- (a)所述AC的5'端;
- (b)所述AC的3'端;或
- (c)所述AC的主链。

16.如权利要求15所述的化合物,其中所述接头共价结合到所述环肽上的氨基酸残基的侧链。

17.如权利要求14或15所述的化合物,其中所述接头包含:

- (i)一个或多个D或L氨基酸残基,其每一者任选地被取代;
- (ii)任选取代的亚烷基;
- (iii)任选取代的亚烯基;
- (iv)任选取代的亚炔基;
- (v)任选取代的碳环基;
- (vi)任选取代的杂环基;

(vii)一个或多个 $-(R^1-J-R^2)z''$ -亚基,其中 R^1 和 R^2 中的每一者在每种情况下独立地选自亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基和杂环基,每个J独立地是C、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S和O,其中 R^3 独立地选自H、烷基、烯基、炔基、碳环基和杂环基,其每一者任选地被取代,并且 z'' 是1至50的整数;

(viii) $-(R^1-J)z''$ -或 $-(J-R^1)z''$ -,其中 R^1 中的每一者在每种情况下独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基或杂环基,每个J独立地是C、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S或O,其中 R^3 是H、烷基、烯

基、炔基、碳环基或杂环基,其每一者任选地被取代,并且z”是1至50的整数;或(ix)它们的组合。

18. 如权利要求17所述的化合物,其中所述接头包含:

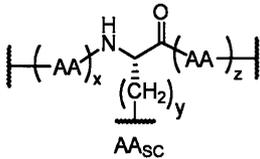
- (i) 赖氨酸、甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸、6-氨基戊酸或它们的组合;
- (ii) 一个或多个 $-(R^1-J-R^2)_z-$ 亚基,
- (iii) $-(R^1-J)_z-$ 或 $-(J-R^1)_z-$,或者
- (iv) 它们的组合。

19. 如权利要求17或18所述的化合物,其中每个 R^1 和 R^2 独立地是亚烷基,每个J是0,每个x独立地是1至20的整数,并且每个z独立地是1至20的整数。

20. 如权利要求15所述的化合物,其中所述接头包含:

- (i) $-(OCH_2CH_2)_z-$ 亚基,其中z是2至20的整数;
- (ii) 一个或多个氨基酸残基,其包括选自甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸、6-氨基戊酸和它们的组合的残基;或
- (iii) (i) 和(ii) 的组合。

21. 如权利要求15-20中任一项所述的化合物,其中所述接头具有以下结构:



其中:

每个AA独立地为甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸或6-氨基戊酸;

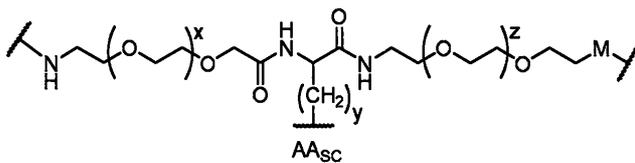
AA_{sc} 是氨基酸侧链;

x是1至10的整数;

y是1至5的整数;并且

z是1至10的整数。

22. 如权利要求15-20中任一项所述的化合物,其中所述接头具有以下结构:



其中:

x是2至20的整数;

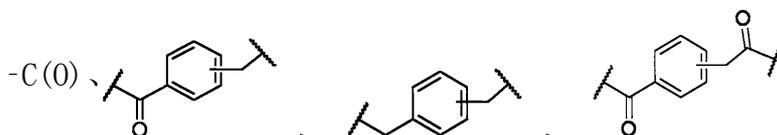
y是1至5的整数;

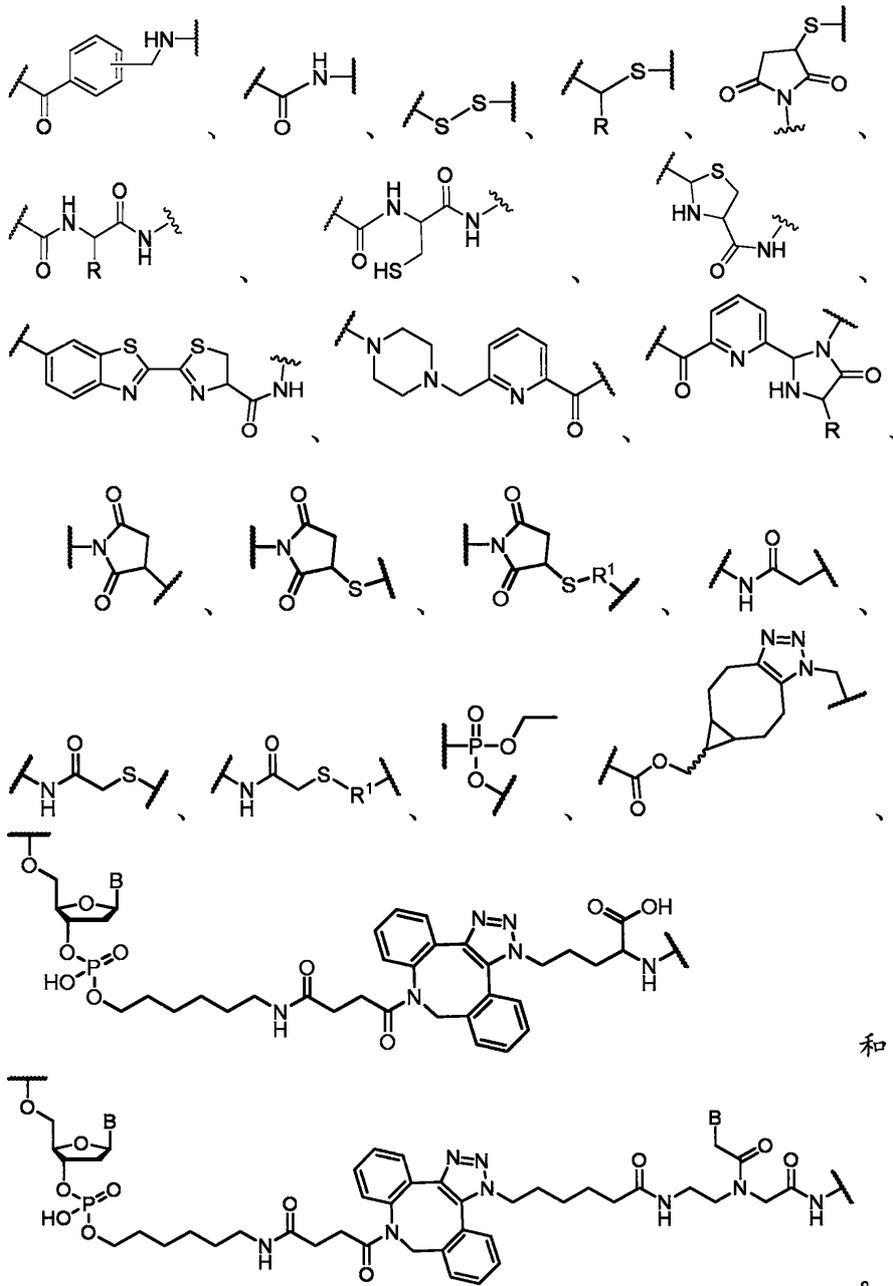
z是2至20的整数;

M是结合部分;并且

AA_{sc} 是所述环肽的氨基酸残基。

23. 如权利要求22所述的化合物,其中M选自:





其中： R^1 是亚烷基、环烷基或 $\text{-(CH}_2\text{)}_m\text{-}$ ，其中m是0至10的整数，其中每个R独立地是烷基、烯基、炔基、碳环基或杂环基，并且其中每个B独立地选自核碱基。

24. 如权利要求22所述的化合物，其中M是-C(O)。

25. 如权利要求21-24中任一项所述的化合物，其中z是11。

26. 如权利要求21-25中任一项所述的化合物，其中x是1。

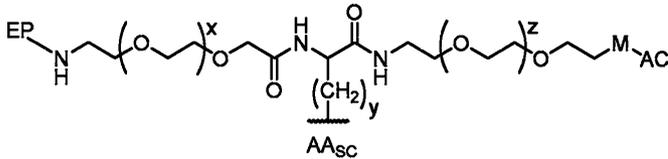
27. 如权利要求1所述的化合物，其中每个赖氨酸残基的侧链上的氨基基团被三氟乙酰基(-COCF₃)基团、烯丙氧基羰基(Alloc)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧化亚环己基)乙基(Dde)或(4,4-二甲基-2,6-二氧化环己-1-亚基-3)-甲基丁基(ivDde)基团取代。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的化合物，其中所述EP包含具有疏水侧链的至少2个氨基酸残基。

29. 如权利要求28所述的化合物,其中所述具有疏水侧链的氨基酸残基选自缬氨酸、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和甲硫氨酸。

30. 如权利要求1-29中任一项所述的化合物,其中所述环外肽包含以下序列中的一者: PKKKRKV; KR; RR; KKK; KGK; KBK; KBR; KRK; KRR; RKK; RRR; KKKK; KKRK; KRKK; KRRK; RKKR; RRRR; KGKK; KKGK; KKKKK; KKKRK; KBKBK; KKKRKV; PGKKRKV; PKGKRKV; PKKGRKV; PKKKGKV; PKKKRGV; 或 PKKKRKG。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的化合物,所述化合物包含以下结构:



其中:

x是2至20的整数;

y是1至5的整数;

z是2至20的整数;

EP是环外肽;

M是结合部分;

AC是与包含前mRNA序列中的DMD基因的外显子45的靶序列互补的反义化合物;并且

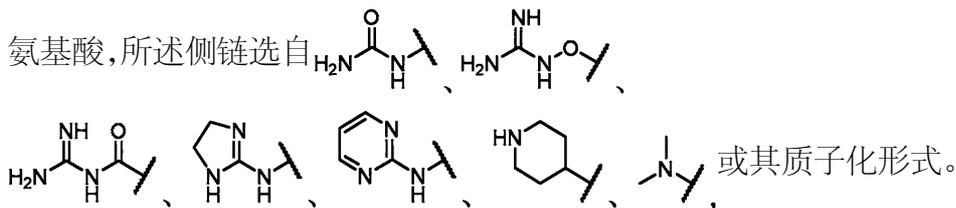
AA_{Sc}是所述环肽的氨基酸残基。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的化合物,其中所述环肽包含所述环肽中的4至20个氨基酸残基,其中至少两个氨基酸残基包含胍基或其质子化形式,并且至少两个氨基酸残基独立地包含疏水侧链。

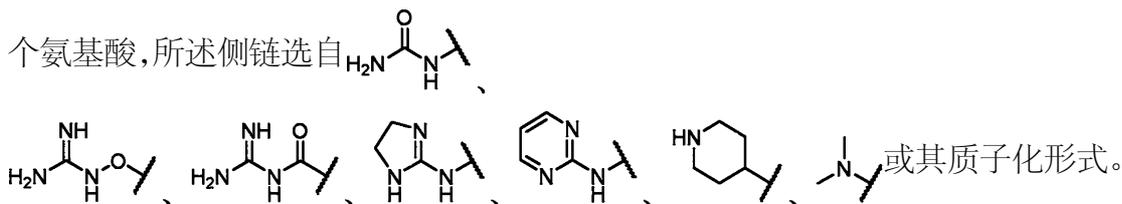
33. 如权利要求1-32中任一项所述的化合物,其中所述环肽包含含有胍基或其质子化形式的2、3或4个酸残基。

34. 如权利要求32或33所述的化合物,其中所述环肽包含含有疏水侧链的2、3或4个氨基酸残基。

35. 如权利要求32-34中任一项所述的化合物,其中所述环肽包含含有侧链的至少一个氨基酸,所述侧链选自



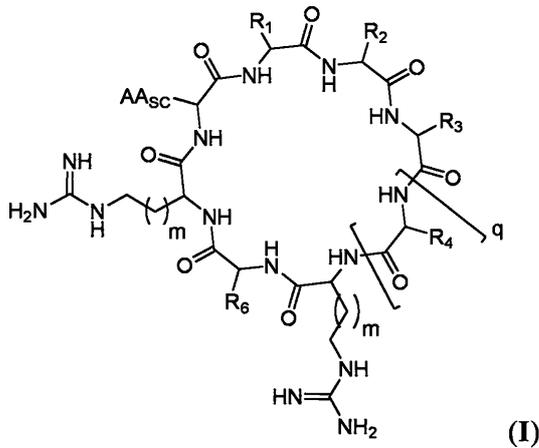
36. 如权利要求32-35中任一项所述的化合物,其中所述环肽包含含有侧链的1、2、3或4个氨基酸,所述侧链选自



37. 如权利要求32-36中任一项所述的化合物,其中所述环肽包含至少一个甘氨酸残基。

38. 如权利要求32-37中任一项所述的化合物,其中所述环肽包含1、2、3或4个甘氨酸残基。

39. 如权利要求1-38中任一项所述的化合物,其中所述环肽具有式(I)的结构:



或其质子化形式,

其中:

R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

AA_{sc} 是氨基酸侧链;

q 是1、2、3或4;并且

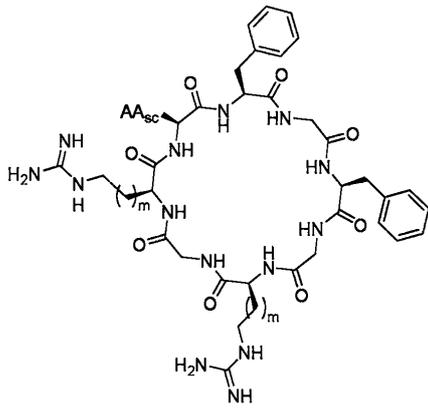
每个 m 独立地是整数0、1、2或3。

40. 如权利要求39所述的化合物,其中 R_4 是H或包含含有芳族基团的侧链的氨基酸残基。

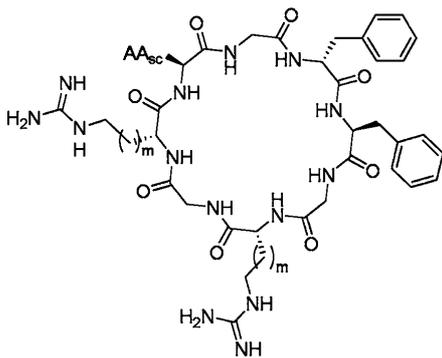
41. 如权利要求39或40所述的化合物,其中所述包含含有芳族基团的侧链的氨基酸是苯丙氨酸。

42. 如权利要求39-41中任一项所述的化合物,其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的两者是H。

43. 如权利要求39-43中任一项所述的化合物,其中所述环肽具有式(I-1)或(I-2)的结构:



(I-1)、



(I-2)、

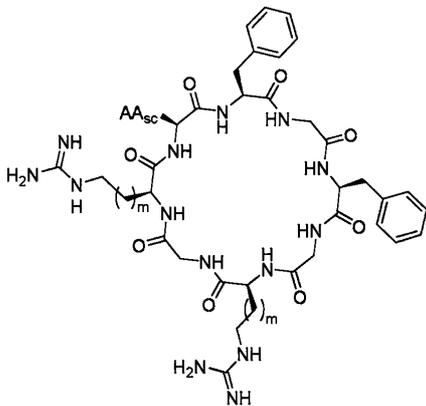
或其质子化形式，

其中：

AA_{sc} 是氨基酸侧链；并且

每个 m 独立地是0至3的整数。

44. 如权利要求39-43中任一项所述的化合物，其中所述环肽具有式(V-1)的结构：



(I-1)

或其质子化形式，

其中：

AA_{sc} 是氨基酸侧链；并且

每个 m 独立地是0至3的整数。

45. 如权利要求39-44中任一项所述的化合物，其中 AA_{sc} 包含天冬酰胺残基、天冬氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、高谷氨酸残基或高谷氨酰胺残基的侧链。

46. 如权利要求39-45中任一项所述的化合物，其中 AA_{sc} 包含谷氨酰胺残基的侧链。

所述的化合物或如权利要求50所述的药物组合物。