

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780020127.8

[51] Int. Cl.

A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/41 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/4162 (2006.01)
A61K 31/46 (2006.01)

[43] 公开日 2009年8月12日

[11] 公开号 CN 101505739A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 5/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

[22] 申请日 2007.3.29

[21] 申请号 200780020127.8

[30] 优先权

[32] 2006.3.30 [33] US [31] 60/787,333

[32] 2006.6.12 [33] US [31] 60/813,085

[86] 国际申请 PCT/US2007/008268 2007.3.29

[87] 国际公布 WO2007/117438 英 2007.10.18

[85] 进入国家阶段日期 2008.12.1

[71] 申请人 PTC 医疗公司

地址 美国新泽西

[72] 发明人 尼尔·G·阿姆斯泰德 陈光明

萨米特·海拉华特 黄承佑
加里·M·卡普 蓝登·米勒
穆英春 任宏宇 杰姆士·J·高杉
埃伦·M·韦尔奇
理查德·G·王尔德 保罗·肯尼迪

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 陶贻丰 郑霞

权利要求书 15 页 说明书 306 页 附图 3 页

[54] 发明名称

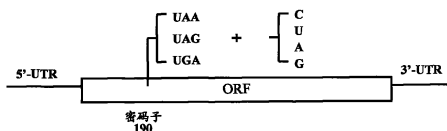
由具有无义突变的 DNA 生产功能蛋白的方法
以及相关疾病的治疗

[57] 摘要

本发明涉及由包含无义突变的核酸序列编码的功能蛋白。本发明还涉及包含无义突变的核酸序列编码的功能蛋白的生产方法，以及该蛋白在预防、控制和/或治疗与基因无义突变相关的疾病中的用途。

由荧光素酶报告构建体获得的信使 RNA

终止密码子: +1 位置核苷酸



缩写: A=腺苷, C=胞苷, G=鸟苷, U=尿苷, RNA

=核糖核酸, ORF=开放阅读框架, UTR=未翻译区域

译区域

1. 生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法，该方法包括向有此需要的人个体口服施用有效量的无义密码子抑制剂，其中该无义密码子抑制剂的有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg，其被分为三个剂量，第一和第二剂量分别为总施用量的 25%，且第三剂量为总施用量的 50%。

2. 生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法，该方法包括向有此需要的人个体口服施用有效量的无义密码子抑制剂，其中该无义密码子抑制剂的有效量足以生成 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至 500 $\mu\text{g/ml}$ 该试剂的血浆浓度至少 2 小时。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂的有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg。

4. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂的有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg，其被分为三个剂量，第一和第二剂量分别为总施用量的 25%，且第三剂量为总施用量的 50%。

5. 如权利要求 2、3 或 4 所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂经口服施用至人个体。

6. 生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法，该方法包括向有此需要的人个体口服施用有效量的无义密码子抑制剂，其中该无义密码子抑制剂的有效量对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性。

7. 如权利要求6所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂经口服施用于人个体。

8. 如权利要求6或7所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂的有效量介于每天0.1 mg/kg和500 mg/kg，其被分为三个剂量，第一和第二剂量分别为总施用量的25%，且第三剂量为总施用量的50%。

9. 如权利要求6或7所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂的有效量足以生成0.1 µg/ml至500 µg/ml该试剂的血浆浓度至少2小时。

10. 如权利要求1、2或6所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂的有效量不会引起人个体的听力损失和/或肾衰竭。

11. 如权利要求1、2或6所述的方法，其中所述人个体根据对所述无义密码子抑制剂发生响应的可能性进行筛选。

12. 如权利要求6所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂的有效量等于在包含以下步骤的报告基因测定中抑制无义密码子的量：

(a) 将所述试剂与具有包含报告基因的核酸序列的细胞相接触，其中该报告基因包含提前终止密码子；和

(b) 检测由该报告基因编码的功能通读蛋白的表达和/或活性。

13. 治疗、控制和/或预防与基因无义突变相关的疾病的方法，该方法包括向有此需要的人个体口服施用有效量的无义密码子抑制剂，其中该试剂的有效量是足以生成有效量的由该包含无义突变的基因编码的功能通读蛋白的量。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述功能通读蛋白的有效量是预防所述疾病或其症状发作、发展和/或恶化所必需的蛋白量。

15. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述功能通读蛋白的有效量是减少所述疾病或其症状的延续时间和/或严重性所必需的蛋白量。

16. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述功能通读蛋白的有效量是在所述疾病的动物模型中生成的在该动物模型中具有治疗和/或预防益处的量。

17. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述功能通读蛋白的有效量等于包含所述疾病相关基因的细胞所生成的量。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其中所述细胞所生成的功能通读蛋白的量为包含编码相应野生型蛋白的基因的不同物种和类型的细胞所生成的量的约 1%、约 5%、约 10%、约 15% 或约 25%。

19. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂的有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg，其被分为三个剂量，第一和第二剂量分别为总施用量的 25%，且第三剂量为总施用量的 50%。

20. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂的有效量可生成 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至 500 $\mu\text{g/ml}$ 该试剂的血浆浓度至少 2 小时。

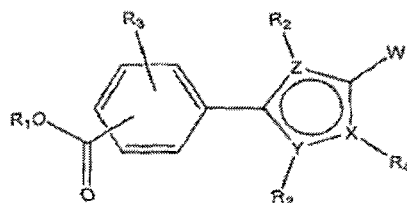
21. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂不会引起人个体的听力损失和/或肾衰竭。

22. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性。

23. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述人个体根据对无义密码子抑制剂发生响应的可能性进行筛选。

24. 如权利要求 1、2、6 或 13 所述的方法，其中所述无义密码子抑制剂为 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐。

25. 生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法，该方法包括向有此需要的人个体施用有效量的下式的化合物：



或其药学上可接受的盐，其中：

X、Y和Z独立地选自N、S、O和C，其中X、Y或Z中至少一个为杂原子；

R₁为氢、C₁-C₆烷基、或Na⁺、或Mg²⁺；

R₂独立地为缺失；氢；-CH=N-OH基团；氰基基团；C₁-C₆烷基，其任选地被羟基基团取代；或羰基基团，其任选地被氢、羟基或C₁-C₄烷氧基取代；

R₃独立地为缺失、卤素、羟基、C₁-C₆烷基、C₁-C₄烷氧基或硝基基团；

R₄独立地为缺失，氢，C₁-C₆烷基，或与W一起时，R₄可以是键，且W与R₄和W所连接的杂环形成一个十一至十三元杂三环的环状结构；

W选自：

(a) C₂-C₆炔基，其任选地被苯基取代；

(b) C₁-C₈直链或支链烷基，其任选地被一个或多个独立地选自如下的基团取代：C₁-C₆烷基；卤素；-C(=O)-NH-苯基，其中苯基任选地被一个或多个独立选择的卤素或C₁-C₄烷基基团取代；五至六元杂环；C₆-C₈芳基，其任选地被一个或多个独立地选自羟基、卤素、C₁-C₄烷基、C₁-C₄卤烷基、C₁-C₄烷氧基或任选地被一个或多个C₁-C₄烷基取代的氨基的基团取代；芳

氧基，其任选地被一个或多个独立地选自如下的基团取代：羟基、卤素、 C_1-C_4 烷基基团、 C_1-C_4 卤烷基基团、 C_1-C_4 烷氧基基团或任选地被一个或多个 C_1-C_4 烷基基团取代的氨基基团；

(c) C_2 至 C_8 烯基；

(d) C_3-C_8 环烷基，任选地被 C_1-C_6 烷基取代；

(e) C_6-C_8 芳基，其任选地被一个或多个独立选择的如下的基团取代：羟基；卤素； C_1-C_4 直链或支链烷基，其任选地被一个或多个独立选择的卤素或羟基基团取代； C_1-C_4 烷氧基，其任选地被一个或多个独立选择的卤素或苯基基团取代； C_3-C_8 环烷基，其任选地被一个或多个独立选择的 C_1-C_4 烷基基团取代； C_6-C_8 芳基，其任选地被一个或多个独立选择的 C_1-C_4 烷基基团取代；芳氧基，其任选地被一个或多个独立选择的如下的基团取代：羟基、卤素、 C_1-C_4 烷基基团、 C_1-C_4 卤烷基基团、 C_1-C_4 烷氧基基团、或被一个或多个独立选择的 C_1-C_4 烷基基团任选地取代的氨基基团；五至六元杂环，其任选地被一个或多个独立选择的如下的基团取代： C_1-C_4 烷基、氧代、或任选地被一个或多个独立选择的如下的基团取代的 C_6-C_8 芳基：羟基、卤素、 C_1-C_4 烷基基团、 C_1-C_4 卤烷基基团、 C_1-C_4 烷氧基基团、或被一个或多个独立选择的 C_1-C_4 烷基基团任选地取代的氨基基团；萘基基团，其任选地被氨基或氨烷基或烷氧基基团取代； $-C(O)-NR_xR_y$ 基团； $-C(O)-R_x$ 基团；异吲哚-1,3-二酮基团；硝基基团；氰基基团； $-SO_3H$ 基团；烷硫基基团；烷基磺酰基团； $-NR_x-C(O)-R_z$ 基团； $-NR_xR_y$ 基团； $-NR_x-SO_2-R_z$ 基团； $-NR_x-C(O)-NR_xR_y$ 基团； $-NR_x-C(O)O-R_z$ 基团；

(f) $C_{10}-C_{14}$ 芳基基团，其任选地被一个或多个独立地选自卤素、氨基基团或氨烷基基团、或烷氧基基团的基团取代；

(g) $-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_x\text{R}_y$ 基团;

(h) 五或六元杂环, 其任选地被一个或多个独立选择的如下的基团取代: 氧代基团; 卤素; $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基基团; $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷氧基基团; $\text{C}_1\text{-C}_4$ 卤烷基基团; $\text{C}_1\text{-C}_4$ 卤烷氧基基团; 芳氧基基团; $-\text{NR}_x\text{R}_y$ 基团; 烷硫基基团; $-\text{C}(\text{O})-\text{R}_x$ 基团; 或 C_6 至 C_8 芳基基团, 其任选地被一个或多个独立选择的卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基基团、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷氧基基团取代;

(i) 具有二至三个环状结构的杂环基团, 其任选地被一个或多个独立选择的卤素、氧代基团、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基基团、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 卤烷基基团、或 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷氧基基团取代;

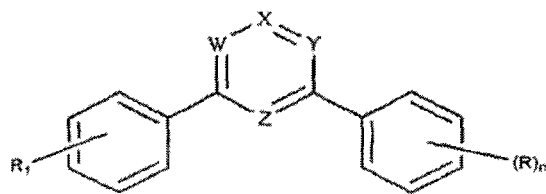
(j) 或 W 与 R_4 , 包括当 R_4 是一个键时, 与 R_4 和 W 所连接的杂环一起形成一个十一至十三元杂-三环的环状结构;

其中 R_x 为氢、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基基团, 或 R_x 和 R_y 以及它们所连接的原子一起形成四至七元碳环或杂环;

R_y 为氢、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基基团; 任选地被一个或多个独立地选择的 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基基团取代的芳基基团, 或 R_x 和 R_y 与它们所连接的原子一起形成四至七元碳环或杂环; 和

R_z 为 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基, 其任选地被芳基或卤素取代; 或芳基, 其任选地被卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基取代。

26. 生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法, 该方法包括向有此需要的人个体施用有效量的下式的化合物:



或其药学上可接受的盐，其中：

W、X、Y 和 Z 独立地选自 N 或 C-R_a，其中 R_a 为氢或 C₁-C₄ 烷基基团，其中 W、X、Y 和 Z 中至少一个为 N；

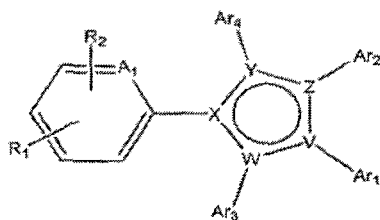
n 为 0、1、2 或 3；

R₁ 为氰基基团；氨基甲酰，其任选地被一个或两个 C₁-C₄ 烷基基团取代；或羰基基团，其任选地被羟基、C₁-C₄ 烷基、或 C₁-C₄ 烷氧基基团取代；

R 为羟基基团；卤素；C₁-C₄ 烷基，其任选地被一个或多个独立选择的卤素或羟基基团取代；C₁-C₄ 烷氧基，其任选地被一个或多个独立选择的卤素或苯基基团取代；C₄-C₈ 环烷基，其任选地被一个或多个独立选择的 C₁-C₄ 烷基基团取代；-R_b 基团；-O-R_b 基团；五至六元杂环，其任选地被一个或多个独立选择的 C₁-C₄ 烷基、氧代、或-R_b 基团取代；具有两个环状结构的九至十元杂环；羰基基团，其任选地被羟基、C₁-C₄ 烷基、或 C₁-C₄ 烷氧基基团取代；氨基甲酰基，其任选地被一个或两个 C₁-C₄ 烷基基团取代；硝基基团；氰基基团；任选地被羟基、C₁-C₄ 烷基、或-R_b 基团取代的硫代；磺酰基，其任选地被羟基、C₁-C₄ 烷基、或-R_b 基团取代；氨基，其任选地被一个或两个独立选择的 C₁-C₄ 烷基、磺酰基或羰基基团取代，其中所述氨基磺酰基任选地被羟基、C₁-C₄ 烷基、或-R_b 基团取代，且其中所述氨基羰基基团任选地被 C₁-C₄ 烷基、C₁-C₄ 卤烷基、苯甲酰氧基或被-R_b 基团任选地取代的氨基基团取代；或者两个 R 基团与它们所连接的苯环一起形成苯并[1,3]二氧杂或 2,3-二氢-苯并[1,4]二噁唑基基团，其中-R_b 为 C₆-C₈ 芳基，任选地

被一个或多个如下基团取代：羟基、卤素、C₁-C₄烷基基团、C₁-C₄卤烷基基团、C₁-C₄烷氧基基团、或任选地被一个或多个 C₁-C₄烷基基团取代的氨基基团。

27. 生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法，该方法包括向有此需要的人个体施用有效量的下式的化合物：



或其药学上可接受的盐，其中：

A₁ 为 C、CH 或 N；

V 和 X 独立地选自 N 或 C；

W 选自 N、C 或 CH；

其中 V、W 或 X 中至少一个为 N，且其中当 W 为 N 时，V 或 X 中至少一个也是 N；

Y 和 Z 独立地选自 N、C、C-R_c、C=O、C=S，其中 R_c 为 H、CH₃ 或 NH₂；前提是，当 Y 或 Z 之一为 C=O 或 C=S 时，另一个可选自 NH、S 或 O；

R₁ 为羧基、氰基或羰基基团，任选地被 C₁-C₄烷氧基基团取代；

R₂ 缺失或为硝基；

Ar₁ 为 C₁ 至 C₄烷基，任选地被 R 基团取代；C₆ 至 C₁₀芳基，其任选地被一个、两个或三个独立选择的 R 基团取代；五至十元杂环，其任选地被一个、两个、三个独立选择的 R 基团取代；或与 Ar₂ 和 Ar₁ 和 Ar₂ 所连接的

杂环一起形成选自 Ar_{1-2} 的环状结构；或与 Ar_3 和 Ar_1 和 Ar_3 所连接的杂环一起形成选自 Ar_{1-3} 的环状结构；

Ar_2 缺失或与 Ar_1 和 Ar_1 和 Ar_2 所连接的杂环一起形成选自 Ar_{1-2} 的环状结构；

Ar_3 缺失或与 Ar_1 和 Ar_1 和 Ar_3 所连接的杂环一起形成选自 Ar_{1-3} 的环状结构；

Ar_4 缺失，或为 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、或 C_1 - C_4 硫烷基，其中的任何一个与 A_1 一起形成四至七元碳环或杂环；

R 为氢； $-R_a$ 基团；或两个 R 基团，其中 R 还可包括氧基团，与它们所连接的苯基或杂环一起形成选自 RR 的环状结构；

其中：

Ar_{1-2} 和 Ar_{1-3} 选自十一至十四元杂-三环环状结构，其任选地被一个或多个卤素、 C_1 - C_4 烷基基团、 C_1 - C_4 卤烷基基团、任选地被卤素或 C_1 - C_4 烷氧基基团取代的 C_1 - C_4 烷氧基基团、 C_1 - C_4 卤烷氧基基团、或任选地被羰基基团(被 C_1 - C_4 烷基基团取代)取代的氨基基团取代；

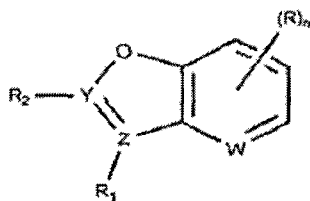
RR 为九至十元双环环状结构，其任选地被一个或多个卤素、 C_1 - C_4 烷基基团、 C_1 - C_4 卤烷基基团、 C_1 - C_4 烷氧基基团、氧代基团或 C_1 - C_4 卤烷氧基基团取代；

R_a 选自：羟基基团；卤素； C_1 - C_4 烷基，其任选地被一个或多个独立选择的卤素或羟基基团取代； C_1 - C_4 烷氧基，其任选地被一个或多个独立选择的卤素或苯基基团取代； C_4 - C_8 环烷基，其任选地被一个或多个独立选择的 C_1 - C_4 烷基基团取代； $-R_b$ 基团； $-O-R_b$ 基团；四至六元杂环，其任选地被一个或多个独立选择的 C_1 - C_4 烷基基团、氧代或 $-R_b$ 基团取代；具有两个环状

结构的九至十元杂环；羰基，其任选地被羟基、C₁-C₄烷基或C₁-C₄烷氧基基团取代；氨基甲酰，其任选地被一个或两个C₁-C₄烷基基团取代；硝基基团；氰基基团；任选地被羟基、C₁-C₄烷基基团或-R_b基团取代的硫代；磺酰基，其任选地被羟基、C₁-C₄烷基基团或-R_b基团取代；或氨基，其任选地被一个或两个独立选择的C₁-C₄烷基、磺酰基或羰基基团取代，其中的所述氨基磺酰基基团任选地被羟基、C₁-C₄烷基或-R_b基团取代，且其中的所述氨基羰基被C₁-C₄烷基、C₁-C₄卤烷基、苯甲酰氧基或任选地被-R_b基团取代的氨基基团取代；和

其中-R_b为C₆-C₈芳基，其任选地被一个或多个如下基团取代：羟基、卤素、C₁-C₄烷基基团、C₁-C₄卤烷基基团、C₁-C₄烷氧基基团、或任选地被一个或多个C₁-C₄烷基基团取代的氨基基团。

28. 生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法，该方法包括向有此需要的人个体施用有效量的下式的化合物：



或其药学上可接受的盐，其中：

Y和Z独立地选自N或C；

W为N或CH；

n为0、1、2或3；

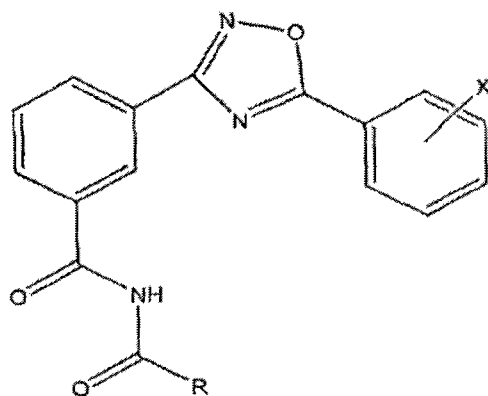
R₁为氢，被羰基基团任选地取代的C₆至C₈芳基，或当Z为N时R₁缺失；

R_2 为氢; C_6 至 C_8 芳基, 其任选地被一个、两个或三个独立选择的 R_a 基团取代; 四至七元杂环, 其任选地被一个或多个独立选择的 C_1 - C_6 烷基基团取代, 或三至七元杂环; 或当 Y 为 N 时 R_2 缺失;

R 独立地选自卤素; 羧基基团; C_1 - C_6 烷基基团, 其任选地被四至七元杂环、 C_6 - C_8 芳氧基基团或氨基基团取代, 其中该四至七元杂环、 C_6 - C_8 芳氧基基团或氨基基团任选地被一个或两个独立选择的 C_1 - C_6 烷基或 C_6 - C_8 芳基基团取代, 其中该 C_6 - C_8 芳基基团任选地和独立地被一个或多个 C_1 - C_6 烷基基团取代; C_1 - C_6 烷氧基; C_6 - C_8 芳氧基; C_6 - C_8 芳基, 其任选地被一个或多个独立选择的卤素、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 卤烷基、氧代、 C_1 - C_4 烷氧基或 C_1 - C_4 卤烷氧基基团取代; 氨基基团, 其任选地被一个或两个独立选择的 C_6 - C_8 芳基或 C_1 - C_6 烷基基团(其任选地被羟基、 C_6 - C_8 芳基或具有两个环状结构的九至十元环取代)取代; 羧基基团, 其被五至六元杂环基团取代; 四至七元杂环基团, 其任选地被一个或多个 C_1 - C_4 烷基或氧代基团取代; 具有两个环状结构的九至十元杂环; 或双 R 基团, 其中 R 还可包括氧代基团, 与它们所连接的杂-双环一起形成具有三个环状结构的十二至十三元杂环; 和

其中 R_a 为卤素; C_1 - C_6 烷基; C_1 - C_6 烷氧基, 其任选地被一个或多个独立选择的卤素基团取代; C_6 - C_8 芳基; 四至七元杂环, 其任选地被一个或多个独立选择的氧代基团取代; 羧基, 其任选地被羟基或 C_1 - C_6 烷氧基基团取代; 氨基甲酰基; 氨基, 其任选地被独立选择的 C_1 - C_6 烷基基团取代, 其中该 C_1 - C_6 烷基基团任选地被一个或多个独立选择的卤素或羟基基团取代; 或两个 R_a 基团, 其中 R_a 还可包括氧代基团, 与它们所连接的 C_6 至 C_8 芳基基团一起形成具有两个环状结构的九至十元杂环, 其中该具有两个环状结构的九至十元杂环任选地被一个或多个独立选择的卤素取代。

29. 生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法，其包括向有此需要的人患者施用有效量的下式的化合物：



或其药学上可接受的盐，其中：

X 为卤素；

R 为 C₁-C₈ 烷基基团；C₁-C₄ 卤烷基基团；-OR₁ 基团；或氨基基团，其任选地被一个或两个独立选择的 R₂ 基团取代；

R₁ 为 C₁-C₈ 烷基基团，其任选地被一个或多个独立选择的 R_a 基团取代；-R_b 基团；吡咯烷基，其任选地被一个或多个独立选择的 C₁-C₄ 烷基或氧代基团取代；哌啶基，其任选地被一个或多个独立选择的 C₁-C₄ 烷基基团，苯甲基基团，或羧基基团(其任选地被一个或多个 C₁-C₄ 烷基或 C₁-C₄ 烷氧基基团取代)取代；四氢呋喃基团；四氢吡喃基团；四氢萘基基团；或茚满基基团；

R₂ 为氢，C₁-C₆ 烷基基团；C₁-C₄ 卤烷基基团；C₁-C₄ 烷氧基基团；-R_b 基团；嘧啶基基团；吡啶基基团；任选地被-R_b 基团取代的磺酰基基团；或两个 R₂ 与它们结合的氨基一起形成任选地被苯基取代的吗啶基基团、吡咯烷基基团、异吲哚基基团、或哌嗪基基团；

其中 R_a 为卤素； C_1 - C_4 烷氧基基团；氨基甲酰基，其任选地被一个或两个独立选择的 C_1 - C_4 烷基或 C_1 - C_4 烷氧基基团取代；磷酰基基团，其任选地被一个或两个独立选择的 C_1 - C_4 烷基或 C_1 - C_4 烷氧基基团取代；吗啉基基团；吡啶基基团；或 $-R_b$ 基团；和

其中 R_b 为 C_6 - C_8 芳基，其任选地被一个或多个独立地选自如下的基团取代：羟基；卤素； C_1 - C_4 烷基基团； C_1 - C_4 卤烷基基团； C_1 - C_4 烷氧基基团；或氨基基团，其任选地被一个或多个独立选择的 C_1 - C_4 烷基基团取代。

30. 如权利要求 25、26、27、28 或 29 所述的方法，其中所述化合物口服施用至人个体。

31. 如权利要求 25、26、27、28 或 29 所述的方法，其中所述化合物的有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg。

32. 如权利要求 25、26、27、28 或 29 所述的方法，其中所述化合物的有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg，其被分为三个剂量，第一和第二剂量分别为总施用量的 25%，且第三剂量为总施用量的 50%。

33. 如权利要求 25、26、27、28 或 29 所述的方法，其中所述化合物的有效量足以生成 0.1 μ g/ml 至 500 μ g/ml 该试剂的血浆浓度至少 2 小时。

34. 如权利要求 25、26、27、28 或 29 所述的方法，其中所述化合物的有效量不会引起人个体的听力损失和/或肾衰竭。

35. 如权利要求 25、26、27、28 或 29 所述的方法，其中所述人个体根据对该化合物发生响应的可能性进行筛选。

36. 如权利要求 25、26、27、28 或 29 所述的方法，其中所述化合物的有效量等于在包含以下步骤的报告基因测定中抑制无义密码子的量：

(a) 将所述试剂与具有包含报告基因的核酸序列的细胞相接触，其中该报告基因包含提前终止密码子；和

(b) 检测由该报告基因编码的功能通读蛋白的表达和/或活性。

37. 如权利要求 25、26、27、28 或 29 所述的方法，其中所述化合物对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性。

38. 预防、治疗和/或控制与无义突变相关的疾病的方法，该方法包括在有此需要的人个体中通过如权利要求 25、26、27、28 或 29 所述的方法生成有效量的功能通读蛋白。

由具有无义突变的 DNA 生产功能蛋白的方法以及相关疾病的治疗

本申请主张于 2006 年 3 月 30 日提交的美国临时申请序列号 60/787,333 以及于 2006 年 6 月 12 日提交的美国临时申请序列号 60/813,085 的权益，其披露的内容在此全文引用作为参考。

1. 技术领域

本发明涉及由包含无义突变的核酸序列编码的功能蛋白。本发明还涉及包含无义突变的核酸序列编码的功能蛋白的生产方法，以及该蛋白在预防、控制和/或治疗与基因无义突变相关的疾病中的用途。

2. 背景技术

基因在细胞中的表达依赖于相继的转录和翻译过程。这些过程一起从蛋白相应基因的核苷酸序列生成该蛋白。

转录涉及通过 RNA 聚合酶从 DNA 合成 RNA。转录起始于基因的启动子区域，并继续直至诱发终止，例如在新生 RNA 中形成茎环结构或结合 *rho* 基因产物。

然后在核糖体上在 tRNA、tRNA 合成酶和各种其它蛋白和 RNA 类型的辅助下通过翻译过程从 mRNA 生成蛋白。翻译包含起始、延伸和终止三个阶段。翻译可通过形成起始复合物而启动，该起始复合物由蛋白因子、

mRNA、tRNA、辅助因子和识别在 mRNA 上指导翻译机制开始翻译该 mRNA 的信号的核糖体亚基组成。

一旦形成了所述起始复合物,多肽链通过核糖体以及 tRNA 和 tRNA 合成酶的肽基转移酶活性反复添加氨基酸而得以生长。在核糖体的 A 位点中存在的三个终止密码子(UAA、UAG、UGA)中的一个向多肽链释放因子(RF)发出结合和识别该终止信号的信号。从而,位于核糖体 P 位点的 tRNA 的 3'核苷酸和新生多肽链之间的酯键被水解。该完成的多肽链被释放,而所述核糖体亚基循环进入另一轮翻译。

其中碱基数量有变化的 DNA 序列突变被分类为插入或删除突变(移码突变),其可导致基因组的严重破坏。将一种碱基转变为另一种碱基的 DNA 突变被称为错义突变,其被细分为转换型(一种嘌呤转变为另一种嘌呤,或一种嘧啶转变为另一种嘧啶)和颠换型(嘌呤转变为嘧啶,或嘧啶转变为嘌呤)。

插入、删除、转换和颠换突变均可导致无义突变或链终止突变,其中碱基突变如移码突变或框内突变将氨基酸密码子转为称为三个终止密码子中的一个。因为提前的翻译终止,这些提前终止密码子可以在细胞中生成异常蛋白。基因的无义突变可导致一系列疾病,例如癌症、溶酶体沉积性疾病、肌肉萎缩症、囊性纤维化和血友病等。

在具有无义突变的细菌和真核菌株中,由于 tRNA 分子之一发生突变而使该突变的 tRNA 能识别无义密码子,由于翻译过程中涉及蛋白的突变,由于核糖体中(核糖体 RNA 或核糖体蛋白)突变,或通过加入可改变翻译过程的化合物,可导致无义突变的抑制。其结果是氨基酸在无义突变的位点处被整合进所述多肽链,且翻译在所述无义密码子处并不提前终止。该插入

的氨基酸并不必需地与野生型蛋白中的原始氨基酸一致；然而，许多氨基酸替换并不对蛋白结构或功能产生明显的影响。因此，通过无义突变抑制生成的蛋白可能具有与野生型蛋白类似的活性。这一情况提供了通过抑制无义突变，避免翻译的提前终止来治疗与无义突变相关的疾病的机会。

在本领域仍然存在通过施用化合物并在体内生成其数量足以治疗、控制和/或预防与人个体中基因的无义突变相关的疾病的非野生型蛋白以在人个体中治疗、控制和/或预防与基因的无义突变相关的疾病的方法的需求，该化合物介导无义密码子的错读以在人体中抑制提前翻译终止。

3. 发明概述

本发明部分地是基于发现了无义密码子抑制剂，其可被全身性地施用至个体(包括人)以抑制从包含无义突变的基因转录的 RNA 中的无义密码子，从而允许通读该无义密码子并在该无义密码子的位置插入氨基酸。在某些实施方式中，该插入的氨基酸不同于在野生型蛋白的相应位置处存在的氨基酸以生成功能通读蛋白。通过抑制从包含无义突变的基因转录的 RNA 中的无义密码子生成的功能通读蛋白可用于治疗、预防和/或控制与该基因无义突变有关的疾病。

通过用无义密码子抑制剂抑制从包含无义突变的基因转录的 RNA 中的无义密码子在个体(包括人)中生成功能通读蛋白比用于预防、治疗和/或控制与基因无义突变相关的疾病的其它疗法中具有许多益处。例如，与基因治疗不同，使用无义密码子抑制剂生成功能通读蛋白不涉及向个体中导入外源遗传物质。因此，可以消除在染色体 DNA 中的错误位置插入外源遗传性物质的风险，消除被导入个体的外源遗传物质编码的蛋白过量表达的风

险,和消除将用于向个体中导入外源遗传性材料的载体(例如病毒)传递至其它个体的风险。

本发明提供了在有此需要的个体(优选人)中生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法,该方法包括向个体施用有效量的无义密码子抑制剂。具体地,本发明提供了用于预防、控制和/或治疗与基因无义突变相关的疾病的方法,该方法包括向有此需要的个体(优选人)施用有效量的无义密码子抑制剂,其中有效量的该试剂足以生产有效量的由所述包含无义突变的基因编码的功能通读蛋白。可被本发明所述的方法治疗、控制和/或预防的与基因无义突变相关的疾病的非限制性范例包括:淀粉样变性、LINCL、血友病、阿尔茨海默病、动脉粥样硬化、巨大症、侏儒症、甲状腺功能减退症、甲状腺功能亢进症、囊性纤维化、老化、肥胖、帕金森病、尼曼-匹克病、家族性高胆固醇血症、视网膜色素变性、肌肉萎缩症(如杜兴肌营养不良)、脊髓性肌萎缩和马凡综合症。

一方面,本发明提供了可被口服施用至个体(优选人)以预防、治疗和/或控制与基因无义突变相关的疾病的无义密码子抑制剂。该口服施用的无义密码子抑制剂在生成有效量的功能通读蛋白的剂量下不具有或具有极少的(如有)的不良副作用。在一个特定的实施方式中,该无义密码子抑制剂在生成有效量的功能通读蛋白的剂量下向个体(优选人)口服施用时不导致肾衰竭和/或听力损失。因此,该无义密码子抑制剂可被长期全身性地(例如,口服)施用而无毒性,例如肾衰竭和听力损失。

口服施用无义密码子抑制剂可使个体摄取他/她的处方剂量的无义密码子抑制剂,而无需医疗人员来施用该试剂。由于减少了通过医疗人员施用该试剂的成本,因而就减少了与预防、治疗和/或控制与基因无义突变相关

疾病有关的医疗成本。口服施用无义密码子抑制剂还改善了个体的生活质量，因为该个体无需受限于和/或不方便地约见医疗人员来接受他的/她的无义密码子抑制剂剂量。此外，口服施用无义密码子抑制剂允许向所有疾病影响的器官位点传递全身性治疗。

另一方面，本发明提供了对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性的无义密码子抑制剂。与具有抗菌活性的无义密码子抑制剂不同，使用对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性的无义密码子抑制剂不会导致对具有抗生素活性的药物形成细菌耐受性。此外，使用对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性的无义密码子抑制剂不太可能像许多长期施用抗生素那样诱发与正常微生物菌丛的病理性过度生长相关的并发症。

因此，本发明提供了由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白，该蛋白通过包括施用在个体中耐受良好且对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不具有明显抗菌活性的无义密码子抑制剂等方法生成。

4. 附图说明

图 1. 来自荧光素酶报告构建体的 mRNA 的示意图。

图 2A-2E. 来自 mRNA 构建体中荧光素酶-CD40 报告基因的 mRNA。

图 3. 小鼠 β -微管蛋白 mRNA 的示意图。

5. 发明详述

本发明部分地是基于发现无义密码子抑制剂，其可被全身性地施用于个体(包括人)以抑制从包含无义突变的基因转录的 RNA 中的无义突变，从

而允许通读该无义突变并在该无义密码子的位置处插入氨基酸。在某些实施方式中，该插入的氨基酸不同于在野生型蛋白的相应位置处存在的氨基酸残基以生成功能非野生型蛋白。通过抑制从包含无义突变的基因转录的RNA中的无义密码子生成的功能通读蛋白可用于治疗、预防和/或控制与该基因无义突变有关的疾病。

本发明提供了在有此需要的个体(优选人)中生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法，该方法包括向个体施用有效量的无义密码子抑制剂。依据本发明，该功能通读蛋白具有全长野生型蛋白的一个或多个功能。在特定的实施方式中，由本发明的方法生成的功能通读蛋白为功能非野生型蛋白。在另一实施方式中，该功能非野生型蛋白为全长蛋白。在其它实施方式中，该功能非野生型蛋白不是全长蛋白。该功能通读蛋白的生成可通过体外测定和/或在动物模型中进行评价。例如，可采用报告测定来检测功能通读蛋白是否被生成。可替代地，可采用动物模型(例如 *mdx* 鼠)检测功能通读蛋白是否被生成。

在某些实施方式中，如本发明所述施用至个体的无义密码子抑制剂的有效量等于在包含如下步骤的报告基因测定中抑制无义密码子的量：(a)将所述试剂与具有包含报告基因的核酸序列的细胞相接触，其中该报告基因包含提前终止密码子；和(b)检测由该报告基因编码的功能通读蛋白的表达和/或活性。在其它实施方式中，无义密码子抑制剂的有效量等于在包含如下步骤的报告基因测定中抑制无义密码子的量：(a)将所述试剂与细胞裂解产物和带有报告基因的核酸序列相接触，其中该报告基因包含提前终止密码子；和(b)检测由该报告基因编码的功能通读蛋白的表达和/或活性。有关该类测定的详细描述参见5.4节。

在一方面,本发明提供了在有此需要的个体(优选人)中生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法,该方法包括向该个体口服施用有效量的无义密码子抑制剂。在某些实施方式中,该口服施用的无义密码子抑制剂的有有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg。在一些实施方式中,该口服施用的无义密码子抑制剂的有有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg, 并作为单个剂量、两个剂量、三个剂量、四个剂量或更多个剂量施用。在具体的实施方式中,该口服施用的无义密码子抑制剂的有有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg, 其被分为三个剂量,第一和第二剂量分别为总施用量的 25%,第三剂量为总施用量的 50%。在其它实施方式中,该向人口服施用的无义密码子抑制剂的有有效量小于每天 35 mg/kg。在具体的实施方式中,该向人口服施用的无义密码子抑制剂的有有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 30 mg/kg。

在另一方面,本发明提供了在有此需要的个体(优选人)中生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法,该方法包括向个体施用有效量的无义密码子抑制剂,其中该试剂的有有效量足以生成 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 至 500 $\mu\text{g/ml}$ 的该试剂的血浆浓度 2 小时、2.5 小时、3 小时或更多时间。在某些实施方式中,该试剂的有有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg。在具体的实施方式中,该试剂的有有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg, 被分为三个剂量,第一和第二剂量分别为总施用量的 25%,第三剂量为总施用量的 50%。在某些实施方式中,该无义密码子抑制剂被口服施用至该个体。

在另一方面,本发明提供了在有此需要的个体(优选人)中生成有效量的由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法,该方法包括向该

个体施用有效量的无义密码子抑制剂，其中该无义密码子抑制剂的有效量对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性。在一些实施方式中，该无义密码子抑制剂被口服施用。在某些实施方式中，该无义密码子抑制剂的有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg。在具体的实施方式中，该无义密码子抑制剂的有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg，被分为三个剂量，第一和第二剂量分别为总施用量的 25%，第三剂量为总施用量的 50%。在某些其它实施方式中，该试剂的有效量足以生成 0.1 µg/ml 至 500 µg/ml 的该试剂的血浆浓度 2 小时、2.5 小时、3 小时或更多时间。

通过向个体施用无义密码子抑制剂生成由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白可用于治疗、控制和/或预防与基因无义突变相关的疾病。可通过生成由包含无义突变的基因编码的功能通读蛋白治疗、控制和/或预防的疾病非限制性范例包括：淀粉样变性、LINCL、血友病、阿尔茨海默病、动脉粥样硬化、巨大症、侏儒症、甲状腺功能减退症、甲状腺功能亢进症、囊性纤维化、老化、肥胖、帕金森病、尼曼-匹克病、家族性高胆固醇血症、视网膜色素变性、肌肉萎缩症(如杜兴肌营养不良)、脊髓性肌萎缩和马凡综合症。

在某些实施方式中，通过生成由包含无义突变的基因编码的功能通读蛋白治疗、控制和/或预防的所述疾病不是肠胃疾病。在其它实施方式中，通过生成由包含无义突变的基因编码的功能通读蛋白治疗、控制和/或预防的该疾病不是皮肤性疾病。在一些实施方式中，通过生成由包含无义突变的基因编码的功能通读蛋白治疗、控制和/或预防的该疾病不是如下一种或多种或所有疾病：基底细胞癌综合症(例如，PTCH 基因)、偶发性基底细胞

癌(例如, PTCH 基因)、黑色素瘤(例如, CDKN2a 基因)、交界型大疱性表皮松解症(例如, LAMB3、LAMC2、LAMA3 基因)、泛发性萎缩性良性大疱性表皮松解症(例如, COL17A1 基因)、营养不良性表皮松解(例如, COL7A1 基因)、良性天疱疮疾病(如 ATP2C1 基因)、Darier 氏症(例如, ATP2A2 基因)、板层状鱼鳞病(例如, TGM1 基因)、X-连锁鱼鳞病(例如, STS 基因)、着色性干皮病(例如, XPA、XPC、XPG 基因)、布卢姆综合征(例如, BLM 基因)、纹状掌跖角化病(例如, DSP、DSG1 基因)、Cockayne 综合症(例如, ERCC6 基因)、眼皮肤白化病(例如, TYR、TYRP1 基因)、Hermansky-Pudlack 综合症(例如, HPS1、HPS4 基因)、共济失调毛细血管扩张症(例如, ATM 基因)、Griscelli 综合症(例如, RAB27A、MYO5A 基因)、和外胚层发育不良/皮肤脆性(例如, PKP1 基因)。在一些实施方式中, 该种通过生成由包含无义突变的基因编码的功能通读蛋白治疗、控制和/或预防的疾病不是如下一一种或多种或所有疾病: 偶发性食道癌(p53 基因)和偶发性结肠癌(APC、p53 基因)、Barrett 食道(p53 基因)、遗传性癌综合症如腺瘤性结肠息肉病(APC 基因)、遗传性非息肉性结肠癌(MLH1、MSH2 基因)、Peutz-Jeghers 综合症(STK 11 基因)、以及 Cowden 综合症(PTEN 基因)。

本发明提供了用于预防、控制和/或治疗与基因无义突变相关的疾病的方法, 该方法包括向有此需要的个体(优选人)施用有效量的无义密码子抑制剂, 其中该试剂的有效量足以生成有效量的由该包含无义突变的基因编码的功能通读蛋白。在某些的实施方式中, 该功能通读蛋白的有效量为预防疾病或其症状发作、发展和/或进展所必需的蛋白的量。在其它实施方式中, 该功能通读蛋白的有效量为减少疾病或其症状的延续时间和/或严重性所必需的蛋白的量。在某些实施方式中, 该功能通读蛋白的有效量等于在目标

疾病的动物模型中所生成的量。在其它实施方式中，该功能通读蛋白的有效量为在所述疾病的动物模型中生成的具有治疗和/或预防效益的蛋白的量。

在某些实施方式中，所述功能通读蛋白的有效量等于在包含如下步骤的报告基因测定中生成的量：(a)将无义密码子抑制剂与具有包含报告基因的核酸序列的细胞相接触，其中该报告基因包含提前终止密码子；和(b)检测由该报告基因编码的功能通读蛋白的生成量。在其它实施方式中，该功能通读蛋白的有效量等于在包含如下步骤的报告基因测定中生成的量：(a)将无义密码子抑制剂与细胞裂解产物和包含该报告基因的核酸序列相接触，其中该报告基因包含提前终止密码子；和(b)检测由该报告基因编码的功能通读蛋白的生成量。功能通读蛋白的量可采用，例如，免疫测定检测功能通读蛋白的表达水平，或通过检测功能通读蛋白的活性得到检测。

在某些实施方式中，所述功能通读蛋白的有效量为具有与所述疾病相关基因(即，包含与该疾病相关的无义突变的基因)的细胞所生成的量。在一些实施方式中，由该细胞生成的量为由包含编码相应野生型蛋白的正常基因(即，不包含该无义突变的基因)的相同物种和类型的细胞所生成量的约0.1%、约1%、约2%、约5%、约7%、或约10%(在其它实施方式中，约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约75%或约90%，且在其它实施方式中，0.1-25%、0.1-50%、10-50%、10-90%、0.1-98%、5-98%或10-98%)。该功能通读蛋白的量以及野生型蛋白的量可通过本领域技术人员已知的任意方法进行测定，只要测量该两种蛋白的方法一致。在某些实施方式中，该功能通读蛋白的量和野生型蛋白的量通过免疫测定(例如，ELISA)进行测量。在具体的实施方式中，该细胞

经工程改造后含有所述基因。在替代性的实施方式中，该细胞天然地包含该基因。

在某些实施方式中，所述功能通读蛋白的有效量为来自与包含无义突变的基因相关的疾病的患者的细胞生成的量。在一些实施方式中，由该患者细胞生成的量为来自不患有该疾病的相同物种和类型的个体的细胞(该细胞包含编码相应野生型蛋白的基因)所生成量的约1%、约2%、约5%、约7%或约10%(在其它实施方式中，约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约75%、约90%，且在其它实施方式中，0.1-25%、0.1-50%、0.1-90%、10-90%、5-25%、5-90%、10-98%、0.1-98%或5-98%)。该功能通读蛋白的量以及野生型蛋白的量可通过本领域技术人员已知的任意方法进行测定，只要测量该两种蛋白的方法一致。在某些实施方式中，该功能通读蛋白的量和野生型蛋白的量通过免疫测定(例如，ELISA)进行测量。在具体的实施方式中，该患者细胞来自于正接受或将要接受无义密码子抑制剂的患者。

本发明提供了预防、控制和/或治疗与基因无义突变相关的疾病的方法，该方法包括向有此需要的个体(优选人)口服施用有效量的无义密码子抑制剂，其中该无义密码子抑制剂的有效量足以生成有效量的由该包含无义突变的基因编码的功能通读蛋白。在某些实施方式中，该试剂的有效量介于每天0.1 mg/kg和500 mg/kg。在具体的实施方式中，该无义密码子抑制剂的有效量介于每天0.1 mg/kg和500 mg/kg，分为三个剂量，第一和第二剂量分别为总施用量的25%，第三剂量为总施用量的50%。在其它实施方式中，该试剂的有效量为可生成0.1 μg/ml、2 μg/ml或更多(在一些实施方式中，5 μg/ml、10 μg/ml、15 μg/ml、20 μg/ml、25 μg/ml、30 μg/ml、35 μg/ml、

40 µg/ml、45 µg/ml、50 µg/ml、75 µg/ml、100 µg/ml、125 µg/ml、150 µg/ml、175 µg/ml、200 µg/ml、225 µg/ml、250 µg/ml、275 µg/ml、300 µg/ml、325 µg/ml、375 µg/ml、400 µg/ml、425 µg/ml、450 µg/ml、475 µg/ml 或 500 µg/ml)的该试剂的血浆浓度至少 2 小时、至少 2.5 小时、至少 3 小时或更多时间。在某些实施方式中，该无义密码子抑制剂对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性。

本发明提供了用于预防、控制和/或治疗与基因无义突变相关的疾病的方法，该方法包括向有此需要的个体(优选人)施用有效量的无义密码子抑制剂，其中该试剂的有效量足以生成 0.1 µg/ml 至 500 µg/ml 的该试剂的血浆浓度 2 小时、2.5 小时、3 小时或更长时间。在某些实施方式中，该试剂的有效量介于每天 0.1 mg/kg 至 500 mg/kg。在具体的实施方式中，该试剂的有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg，分为三个剂量，第一和第二剂量分别为总施用量的 25%，第三剂量为总施用量的 50%。在某些其它实施方式中，该试剂对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不具有明显的抗菌活性。

本发明提供了用于治疗、控制和/或预防与基因无义突变相关的疾病的方法，该方法包括向有此需要的个体(优选人)施用有效量的对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性的无义密码子抑制剂。在某些实施方式中，该试剂的有效量介于每天 0.1 mg/kg 至 500 mg/kg。在具体的实施方式中，该试剂的有效量介于每天 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg，分为三个剂量，第一和第二剂量分别为总施用量的 25%，第三剂量为总施用量的 50%。

由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的生成可用于：(i)不能表达足量的相应野生型蛋白的个体，和/或(ii)不能从特定功能通读蛋白的表达受益的个体。在一方面，本发明提供了在有此需要的个体(优选人)中生成由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白的方法，该方法包括向该个体施用有效量的无义密码子抑制剂，其中该个体已构建成包含所述核酸序列。在具体的实施方式中，该功能通读蛋白对应于在个体中具有有益效果的野生型蛋白。在某些实施方式中，施用该试剂的该个体生成不足量的对应该功能通读蛋白的野生型蛋白。在具体的实施方式中，施用该试剂的该个体患有与对应该功能通读蛋白的野生型蛋白生成不足相关的疾病。在本发明的某些实施方式中，待接受无义密码子抑制剂的该个体在接受该试剂前经过筛选。在具体的实施方式中，该个体经筛选以确定该试剂是否能生成功能通读蛋白。在另一实施方式中，该个体经筛选以确定该有效量的该试剂是否施用至该个体。下文 5.6 节提供了筛选个体的方法。

本发明包括使用无义密码子抑制剂以从包含突变的核酸序列生成功能通读蛋白，其中该突变导致从该核酸序列转录的 RNA 中的终止密码子不同于编码相应野生型蛋白的 RNA 中发现的终止密码子。具体地，本发明提供了与包含突变(其导致从该核酸序列转录的 RNA 中的终止密码子不同于编码相应野生型蛋白的 RNA 中发现的终止密码子)的基因相关的疾病的预防、控制和/或治疗的方法，该方法包括向有此需要的个体(优选人)施用有效量的无义密码子抑制剂。在某些实施方式中，该无义密码子抑制剂的有效量是足以生成有效量的由该基因编码的功能通读蛋白的量。在一些实施方式中，该无义密码子抑制剂的有效量介于每天 0.1 mg/kg 至 500 mg/kg。在一

些其它实施方式中，该无义密码子抑制剂的有效量为导致介于 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至 500 $\mu\text{g/ml}$ 的血浆浓度的试剂量。

在某些实施方式中，本发明所采用所述无义密码子抑制剂不是氨基糖苷。氨基糖苷的非限制性范例包括庆大霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、奈替米星、新霉素、新霉素 B、负霉素(negamycin)、巴龙霉素(paromycin)、西索米星、G-418 及其衍生物和类似物。在具体的实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂不是以下一种、两种、三种或多种：庆大霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、奈替米星、新霉素、新霉素 B、负霉素(negamycin)、巴龙霉素(paromycin)、西索米星、G-418 和/或其衍生物和类似物。在其它实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂不是保留了促进提前终止密码子通读活性的氯霉素及其衍生物或类似物。在其它实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂不是恶唑烷酮。恶唑烷酮的非限制性范例为利奈唑酮、依哌唑胺及其类似物或衍生物。在某些实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂在基于细胞的测定、动物模型测定或是此处描述的或本领域已知的针对无义密码子抑制的其它测定中比同等剂量的氨基糖苷、恶唑烷酮和/或氯霉素生成更多的(在一些实施方式中，5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或更多，在其它实施方式中，5-95%、10%-95%、25%-95%或 10%-65%以上)功能通读蛋白。

在某些实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂不是具式 I、式 II、式 III 或式 IV 的化合物。在具体的实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂不是表 1、表 2、表 3 或表 4 的化合物。在其它实施方式

中，该无义密码子抑制剂不是具式 V、式 VI、式 VII、式 VIII 或式 IX 的化合物。在具体的实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂不是表 5、表 6、表 7、表 8 或表 9 的化合物。

在某些实施方式中，本发明所采用的所述无义密码子抑制剂对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性。在具体的实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂为 5.2 节中描述的化合物。在某些实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂是具式 I、式 II、式 III 或式 IV 的化合物。在具体的实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂是表 1、表 2、表 3 或表 4 的化合物。在其它实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂是具式 V、式 VI、式 VII、式 VIII 或式 XI 的化合物。在具体的实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂是表 5、表 6、表 7、表 8 或表 9 的化合物。

在某些实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂与 28S rRNA 相互作用。在具体的实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂结合 28S rRNA 的特定区域。在其它实施方式中，本发明所采用的该无义密码子抑制剂不与 18S rRNA 相互作用。

本发明提供了由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白，该蛋白由本发明所述的方法生成。在某些实施方式中，该功能通读蛋白发现位于细胞中相应野生型蛋白的相同位置。在一些实施方式中，该功能通读蛋白为功能非野生型蛋白。在具体实施方式中，该功能非野生型蛋白与相应野生型蛋白的区别仅在于在非野生型蛋白中由该提前终止密码子编码的位置处插入的氨基酸残基。在其它实施方式中，该功能非野生型蛋白与相应野生型蛋白的区别在于：(i)在非野生型蛋白中由提前终止密码子编码的位

置处插入的氨基酸残基；和(ii)在非野生型蛋白中提前终止密码子编码的氨基酸残基以外的氨基酸残基。在其它实施方式中，该非野生型蛋白为全长蛋白(即，与相应的野生型蛋白具有相同的长度)。由本发明的方法生成的功能通读蛋白的氨基酸序列可通过对包含目标核酸序列(即，包含该目标无义突变的核酸序列)的细胞生成的蛋白进行测序来测定。在某些实施方式中，该细胞天然地包含该核酸序列。在具体的实施方式中，该细胞为来自于正接受或将要接受无义密码子抑制剂的患者的细胞。在其它实施方式中，该细胞被工程改造以包含该核酸序列。

因此，本发明所公开了示例性的、结构多样的无义密码子抑制剂；制备该试剂的参考方法；测定该试剂的无义密码子抑制剂活性的方法；施用于无义密码子抑制剂的施用途径和剂型，包括优选的给药方案和药物代谢动力学模式；与无义突变相关的疾病，包括对无义突变和此处所引的疾病之间的关系的关系的公开；适于所公开的治疗、控制和预防方法的患者群体，包括患者筛选的方法；以及用于确定无义密码子抑制剂的效力的治疗终点。

5.1 定义

此处所用的术语“提前翻译终止”指将对应氨基酸的密码子改变为终止密码子的突变所产生的结果。

此处所用的术语“无义介导的 mRNA 降解”指介导包含提前翻译终止密码子的 mRNA 降解的任意机制。

此处所用的术语“提前终止密码子”和“无义密码子”指在氨基酸相对应的密码子应该出现时出现终止密码子。

此处所用的术语“无义突变”指将编码氨基酸的密码子改变为终止密码子的突变。

此处所用的术语“无义密码子抑制”指对提前翻译和/或无义介导的 mRNA 降解的抑制或阻抑。在一个实施方式中，对提前翻译和/或无义介导的 mRNA 降解的抑制或阻抑存在于体内。在另一实施方式中，对提前翻译和/或无义介导的 mRNA 降解的抑制或阻抑存在于体外。

此处所用的短语“对提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的调节”指通过改变无义密码子抑制的水平调节基因表达。例如，如果需要提高由具有提前终止密码子的基因编码的功能通读蛋白的生成，即允许通读该疾病基因的提前终止密码子从而可以翻译该 RNA，则提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的调节需要上调无义密码子抑制。相反地，如果需要促进具有提前终止密码子的 mRNA 的降解，则提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的调节需要下调无义密码子抑制。

此处所用的术语“个体”和“患者”可相互替换地指动物(例如，牛、马、羊、猪、鸡、火鸡、鹤鹑、猫、狗、小鼠、大鼠、兔、豚鼠等)，优选哺乳动物例如非灵长动物和灵长动物(例如，猴和人)，最优选人。在某些实施方式中，该患者为胚胎、胎儿、婴儿、儿童、青少年或成人。在一个实施方式中，通过预筛选确定该患者具有无义突变。在另一实施方式中，通过预筛选确定该患者具有哪一个无义突变(即，UAA、UGA 或 UAG)。在另一实施方式中，该患者被细菌细胞(例如，铜绿假单胞菌)感染。在另一实施方式中，该患者的细胞被病毒感染。

此处所用的短语“对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性”指无义密码子抑制剂在添加至革兰氏阴性微生物的培

培养基和/或革兰氏阳性微生物的培养基时具有 250 µg/ml 或更大(在特定实施方式中, 300 µg/ml、350 µg/ml、400 µg/ml、450 µg/ml 或 500 µg/ml, 以及在其它实施方式中, 约 250 µg/ml 至约 1000 µg/ml、或 250 µg/ml 至约 500 µg/ml)的最小抑制浓度。在具体实施方式中, 该短语指在添加至大肠杆菌 BAS 849 的培养基(可渗透)、铜绿假单胞菌 27853 的培养基、金黄葡萄球菌 29213 的培养基、上皮葡萄球菌 12228 (CNSA)的培养基、屎肠球菌 49624 的培养基和/或粪肠球菌 29212 的培养基中时 MIC 为 250 µg/ml 或更多(在特定实施方式中, 300 µg/ml、350 µg/ml、400 µg/ml、450 µg/ml 或 500 µg/ml, 以及在其它实施方式中, 约 250 µg/ml 至约 1000 µg/ml、或 250 µg/ml 至约 500 µg/ml)的无义密码子抑制剂。

除非另行指明, 此处所用的术语“牛奶”包括标准化的、完全的、减脂的(2%)、低脂的(1%)、脱脂的、无脂的以及无乳糖的牛奶。术语“牛奶”还包括来自人或驯养动物(例如, 牛、水牛、山羊、绵羊或骆驼)的牛奶和豆奶以及任意基于牛奶或含奶产品。

除非另行指明, 此处所用的术语“取代的”指被一个至四个或更多个取代基取代的基团, 该取代基如卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、羟基、烷氧基、环烷氧基、杂环氧基、氧代、烷酰基、烷基羰基、环烷基、芳基、芳氧基、芳烷基、烷酰氧基、氰基、叠氮基、氨基、烷氨基、芳氨基、芳烷基、环烷氨基、杂环氨基、单和双取代的氨基, 其中在氨基基团上的两个取代基选自烷基、芳基、芳烷基、烷酰氨基、芳酰氨基、芳烷酰氨基、取代的烷酰氨基、取代的芳烷基、取代的芳烷酰氨基、硫代、烷硫基、芳硫基、芳烷硫基、环烷硫基、杂环硫基、烷硫羰基、芳硫羰基、芳烷硫羰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基、亚磺酰氨基(例如, SO_2NH_2)、取

代的亚磺酰氨基、硝基、羧基、氨基甲酰(例如, CONH_2), 取代的氨基甲酰(例如, CONH 烷基、 CONH 芳基、 CONH 芳烷基或是氮上具有两个选自烷基、芳基或芳烷基的取代基的情况)、烷氧基羰基、芳基、取代的芳基、胍基和杂环, 例如吡啶基、咪唑基、呋喃基、噻吩基、噻唑基、吡咯烷基、吡啶基、嘧啶基等。其中, 如上文所述, 该取代基本身可被进一步取代, 该种进一步的取代基选自卤素、烷基、烷氧基、芳基和芳烷基。在某些实施方式中, 术语取代的不是指氰基。

除非另行指明, 此处所用的术语“烷基”指具有 1 至 20 个碳原子、优选 1-10 个碳原子、最优选 1-4 个碳原子的饱和直链或支链非环状烃。代表性的饱和直链烷基包括-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基、-正己基、-正庚基、-正辛基、-正壬基和-正癸基; 而饱和支链烷基包括-异丙基、-仲丁基、-异丁基、-叔丁基、-异戊基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基丁基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基戊基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、2-甲基-4-乙基戊基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2-甲基-4-乙基己基、2,2-二乙基戊基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基、3,3-二乙基己基等。烷基基团可被取代或未被取代。不饱和烷基基团包括烯基基团和炔基基团, 其将在下文讨论。

除非另行指明，此处所用的术语“烯基基团”指具有 2 至 20 个碳原子、优选 2-10 个碳原子、最优选 2-6 个碳原子，并包括至少一个碳碳双键的直链或支链非环状烃。代表性的直链和支链(C₂-C₁₀)烯基包括-乙烯基、-丙烯基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-异丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基、-2,3-二甲基-2-丁烯基、-1-己烯基、-2-己烯基、-3-己烯基、-1-庚烯基、-2-庚烯基、-3-庚烯基、-1-辛烯基、-2-辛烯基、-3-辛烯基、-1-壬烯基、-2-壬烯基、-3-壬烯基、-1-癸烯基、-2-癸烯基、-3-癸烯基等。烯基基团的双键未结合或结合至另一不饱和基团。烯基基团可被取代或未被取代。

除非另行指明，此处所用的术语“炔基基团”指具有 2 至 20 个碳原子、优选 2-10 个碳原子、最优选 2-6 个碳原子，并包括至少一个碳碳三键的直链或支链非环状烃。代表性的直链和支链(C₂-C₁₀)炔基包括包括-乙炔基、-丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基、-3-甲基-1-丁炔基、-4-戊炔基、-1-己炔基、-2-己炔基、-5-己炔基、-1-庚炔基、-2-庚炔基、-6-庚炔基、-1-辛炔基、-2-辛炔基、-7-辛炔基、-1-壬炔、-2-壬炔、-8-壬炔、-1-癸炔、-2-癸炔、-9-癸炔等。炔基基团的三键未结合或结合至另一不饱和基团。炔基基团可被取代或未被取代。

除非另行指明，此处所用的术语“卤素”指氟、氯、溴或碘原子。

除非另行指明，此处所用的术语“卤烷基”指被一个或多个卤素原子取代的烷基基团。

除非另行指明，此处所用的术语“卤烷氧基”指被一个或多个卤素原子取代的烷氧基基团。

除非另行指明，此处所述的术语“烷基磺酰基”指-烷基-SO₃H 或-SO₃-烷基(其中烷基如上文定义)，包括-SO₂-CH₃、-SO₂-CH₂CH₃、-SO₂-(CH₂)₂CH₃、-SO₂-(CH₂)₃CH₃、-SO₂-(CH₂)₄CH₃、-SO₂-(CH₂)₅CH₃等。

除非另行指明，此处所述的术语“羧基”指-COOH。

除非另行指明，此处所述的术语“烷氧基”指-O-(烷基)(其中烷基如上文定义)，包括-OCH₃、-OCH₂CH₃、-O(CH₂)₂CH₃、-O(CH₂)₃CH₃、-O(CH₂)₄CH₃、-O(CH₂)₅CH₃等。

除非另行指明，此处所述的术语“烷氧基羰基”指-C(=O)O-(烷基)(其中烷基如上文定义)，包括-C(=O)O-CH₃、-C(=O)O-CH₂CH₃、-C(=O)O-(CH₂)₂CH₃、-C(=O)O-(CH₂)₃CH₃、-C(=O)O-(CH₂)₄CH₃、-C(=O)O-(CH₂)₅CH₃等。在优选的实施方式中，该酯可生物水解(即，该酯可在体外或体内水解为羧酸)。

除非另行指明，此处所述的术语“烷氧基烷基”指-(亚烷基)-O-(烷基)(其中各“烷基”独立为上文定义的烷基基团)，包括-CH₂OCH₃、-CH₂OCH₂CH₃、-(CH₂)₂OCH₂CH₃、-(CH₂)₂O(CH₂)₂CH₃等。

除非另行指明，此处所用的术语“芳基”指含有5至14个环原子的碳环型芳香环。该碳环芳基基团中的环原子均为碳原子。芳基环结构包括具有一个或多个环结构的化合物(例如单、双或三环化合物以及苯稠合的碳环部分，如5,6,7,8-四氢萘基等)。优选地，该芳基基团为单环状环或双环状环。代表性的芳基基团包括苯基、甲苯基、萘基、萸基、茛基、奥基、菲基和蒽基。碳环芳基基团可被取代或未被取代。

除非另行指明，此处所述的术语“杂芳基”指含5至14个环原子的碳环芳香环，且该环原子包含至少一个、优选1至3个独立地选自氮、氧或硫

的杂原子。杂芳基环结构包括具有一个或多个环结构的化合物，例如，单-、双-、或三环化合物以及稠合杂环部分。代表性的杂芳基为三唑基、四唑基、噁二唑基、吡啶基、呋喃基、苯并呋喃基、苯硫基、苯并硫苯基、苯并异噁唑基、苯并异噻唑基、喹啉基、吡咯基、吲哚基、噁唑基、苯并唑基、咪唑基、苯并咪唑基、噻唑基、苯并噻唑、异噁唑基、吡唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、噌啉基、酞嗪基、喹唑啉基、苯并喹唑啉基、吡啶基、嘧啶基和噁唑基。基团可被取代或未被取代。

除非另行指明，此处所用的术语“芳氧基”指-O-芳基基团，其中芳基如上文定义。芳氧基团可被取代或未被取代。

除非另行指明，此处所用的术语“芳烷基”指-(烷基)-(芳基)(其中烷基和芳基如上文定义)，包括但不限于：-(CH₂)₁苯基、-(CH₂)₂苯基、-(CH₂)₃苯基、-CH(苯基)₂、-CH(苯基)₃、-(CH₂)₁苯甲基、-(CH₂)₁萸基、-(CH₂)₁萹基、-(CH₂)₁茛基、-(CH₂)₁奥基、-(CH₂)₁萘基等。

除非另行指明，此处所用的术语“杂芳烷基”指-(烷基)-(杂芳基)(其中烷基和杂芳基如上文定义)，包括但不限于：-(CH₂)₁吡啶基、-(CH₂)₂吡啶基、-(CH₂)₃吡啶基、-CH(吡啶基)₂、-CH(吡啶基)₃、-(CH₂)₁三唑基、-(CH₂)₁四唑基、-(CH₂)₁噁二唑基、-(CH₂)₁呋喃基、-(CH₂)₁苯并呋喃基、-(CH₂)₁硫苯基、-(CH₂)₁苯并硫苯基等。

除非另行指明，此处所用的术语“芳烷氧基”指-O-(烷基)-(芳基)(其中烷基和芳基如上文定义)，包括但不限于：-O-(CH₂)₂苯基、-(CH₂)₃苯基、-O-CH(苯基)₂、-O-CH(苯基)₃、-O-(CH₂)₁苯甲基、-O-(CH₂)₁萸基、-O-(CH₂)₁萹基、-O-(CH₂)₁茛基、-O-(CH₂)₁奥基、-O-(CH₂)₁萘基等。

除非另行指明,此处所用的术语“环烷基”指包含碳和氢原子且不具有碳碳多键的单环状或多环状饱和的环。环烷基基团可被取代或未被取代。环烷基基团的范例包括但不限于:(C₃-C₇)环烷基基团、包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基以及饱和的环状和双环萜烯。环烷基基团可被取代或未被取代。优选地,该环烷基基团为单环状环或双环状环。

除非另行指明,此处所用的术语“杂环基”指包含碳和氢原子,任选地具有1至4个多重键的单环状或多环状环,且环原子至少包含1个、优选1至3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子。杂环基环结构包括具有一个或多个环结构的化合物,例如单-、双-、或三环化合物。优选地,该杂环基基团为单环状环或双环状环。代表性的杂环包括但不限于:吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、乙内酰脲基、戊内酰胺基、环氧基(oxiranyl)、叔环丁基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢苯硫基、四氢硫吡喃基等。杂环基环可被取代或未被取代。

除非另行指明,此处所用的术语“环烷氧基”指-O-(环烷基),其中环烷基如上文定义。

除非另行指明,此处所用的术语“环烷基烷氧基”指 O-(烷基)-(环烷基)(其中环烷基和烷基如上文定义),包括但不限于:-O-环丙基、-O-环丁基、-O-环戊基、-O-环己基、-O-环庚基等。

除非另行指明,此处所用的术语“氨烷氧基”指-O-(烷基)-NH₂(其中烷基如上文定义),包括但不限于:-O-CH₂-NH₂、-O-(CH₂)₂-NH₂、-O-(CH₂)₃-NH₂、-O-(CH₂)₄-NH₂、-O-(CH₂)₅-NH₂等。

除非另行指明,此处所用的术语“烷氨基”指-NH(烷基)或-N(烷基)(烷基)(其中烷基如上文定义),包括但不限于: NHCH₃、-NHCH₂CH₃、

-NH(CH₂)₂CH₃、-NH(CH₂)₃CH₃、-NH(CH₂)₄CH₃、-NH(CH₂)₅CH₃、-N(CH₃)₂、
-N(CH₂CH₃)₂、-N((CH₂)₂CH₃)₂、-N(CH₃)(CH₂CH₃)等。

除非另行说明，此处所用的术语“芳氨基”指-NH(芳基)(其中芳基如上文定义)，包括但不限于：-NH(苯基)、-NH(苯甲基)、-NH(萸基)、-NH(萸基)、-NH(茛基)、-NH(奥基)、-NH(吡啶基)、-NH(萘基)等。

除非另行说明，此处所用的术语“芳烷基”指-NH-(烷基)-(芳基)(其中烷基和芳基如上文定义)，包括-NH-CH₂-(苯基)、-NH-CH₂-(苯甲基)、-NH-CH₂-(萸基)、-NH-CH₂-(萸基)、-NH-CH₂-(茛基)、-NH-CH₂-(奥基)、-NH-CH₂-(吡啶基)、-NH-CH₂-(萘基)、-NH-(CH₂)₂-(苯基)等。

除非另行指明，此处所用的术语“环烷基”指-NH-(环烷基)(其中环烷基如上文定义)，包括-NH-环丙基、-NH-环丁基、-NH-环戊基、-NH-环己基、-NH-环庚基等。

除非另行指明，此处所述的术语“氨基烷基”指-(烷基)-NH₂(其中烷基如上文定义)，包括-CH₂-NH₂、-(CH₂)₂-NH₂、-(CH₂)₃-NH₂、-(CH₂)₄-NH₂、-(CH₂)₅-NH₂等。

除非另行指明，此处所用的术语“烷基氨基”指-(烷基)-NH(烷基)或-(烷基)-N(烷基)(烷基)(其中各“烷基”独立为上文定义的烷基基团)，包括-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-NHCH₂CH₃、-CH₂-NH(CH₂)₂CH₃、-CH₂-NH(CH₂)₃CH₃、-CH₂-NH(CH₂)₄CH₃、-CH₂-NH(CH₂)₅CH₃、-(CH₂)₂-NH-CH₃、-CH₂-N(CH₃)₂、-CH₂-N(CH₂CH₃)₂、-CH₂-N((CH₂)₂CH₃)₂、-CH₂-N(CH₃)(CH₂CH₃)、-(CH₂)₂-N(CH₃)₂等。

此处所用的术语“具有无义密码子抑制活性的化合物”和“无义密码子抑制剂”指在体外或体内可引起无义密码子通读的化合物，或其药学上可接受的盐、前药、溶剂化物、水合物、多晶型或对映体。

此处所用的“治疗方案”指一个或多个治疗的时机和剂量方案。

此处所用的“预防性方案”指一个或多个治疗的时机和用药方案。

此处所用的“方案”包括用药安排和用药方案。

此处所用的“联合”指使用一种以上疗法。术语“联合”的使用不限制各疗法被施用至患病个体的顺序。第一疗法可在第二疗法被施用至已患或易患疾病的个体之前(例如, 1分钟、5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周前)、同时或之后(例如, 1分钟、5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周后)进行施用。该疗法可以一定的顺序在一定的时间间隔内施用至个体, 从而使本发明的试剂可以与其它疗法共同作用, 以提供较以其它方式施用更好的效果。可与其它密码子抑制剂联合施用的疗法的非限制性范例包括镇痛药、麻醉剂、镇痉剂、支持性疗法以及其它列举于美国药典和/或医生桌上参考手册(Physician's Desk Reference)的疗法。

此处所用的术语“控制”在向个体施用疗法的上下文中指个体从疗法中获得的不导致该疾病的治愈的有益效果。在某些实施方式中, 向个体施用了一种或多种疗法以“控制”疾病, 从而防止该疾病或其症状的进展或恶化。

此处所用的术语“疗法”指任何可用于预防、控制和/或治疗疾病或其症状的方案、方法和/或试剂。在某些实施方式中，该术语“疗法”指可用于预防、控制和/或治疗疾病或其症状的生物疗法、手术和/或支持性疗法。在具体实施方式中，无义密码子抑制剂为一种疗法。

此处所用的术语“预防”在向个体施用疗法的上下文中指通过施用疗法预防个体中疾病或其症状的发作、形成、复发、扩散和/或恶化。

此处所用的术语“治疗”在向个体施用疗法的上下文中指消除或缓解疾病或与该疾病相关的症状。在某些实施方式中，该术语指通过向患有该疾病的个体施用一种或多种疗法而使疾病的扩散或恶化的最小化。在其它实施方式中，该术语指降低疾病或与该疾病相关的症状的严重性和/或延续时间。

此处所用的术语“全长”在功能通读蛋白的上下文中指与相应野生型蛋白相同数量的氨基酸残基组成的功能通读蛋白。

此处所用的术语“非野生型蛋白”指氨基酸序列与相应野生型蛋白不同的蛋白。在某些实施方式中，该非野生型蛋白与相应野生型蛋白的区别仅在于在非野生型蛋白中提前终止密码子编码位置处插入的氨基酸残基。在其它实施方式中，该非野生型蛋白与相应野生型蛋白的区别在于：(i)在非野生型蛋白中提前终止密码子编码位置处插入的氨基酸残基；和(ii)在非野生型蛋白中提前终止密码子编码的氨基酸残基以外的氨基酸残基。

此处所用的术语“野生型”在涉及蛋白时指天然发现的蛋白(通常(但非绝对)为主要蛋白)且被称为标准或参考蛋白。

此处所用的短语“功能通读蛋白”指由基因转录的 RNA(例如，mRNA)中的无义密码子的通读所生成的功能蛋白。在具体的实施方式中，短语“功

能通读蛋白”指由包含无义突变的基因转录的 RNA 中的无义密码子的通读所生成的功能蛋白。在某些实施方式中，该功能通读蛋白与不具有无义突变的基因编码的相应野生型蛋白由相同的氨基酸序列组成。在其它实施方式中，该功能通读蛋白为功能非野生型蛋白。

此处所用的术语“皮肤疾病”指皮肤的疾病，特别指皮肤的表皮或真皮成分的疾病，更特别地指皮肤的表皮成分的疾病。“表皮”包括角质层、透明层、颗粒层、棘层和生发层(基底层、基底细胞层)。在具体的实施方式中，本发明治疗、预防和/或控制的疾病不是皮肤疾病。

此处所用的术语“肠胃疾病”指胃肠(GI)道，包括口腔、咽、食道、胃和十二指肠(例如小肠、大肠(例如结肠))的疾病。在具体的实施方式中，本发明治疗、预防和/或控制的疾病不是肠胃疾病。

此处所用的术语“疾病”和“失调”可以互换使用。

此处所用的短语“与基因无义突变相关的疾病”和“与基因无义突变相关的失调”可互换使用，指由基因无义突变直接或间接导致的疾病，其中该无义突变阻止在感染细胞中生成野生型蛋白。与无义突变相关的疾病包括单个基因中包含一个、两个、三个或更多无义突变的疾病，以及两个、三个或更多(多个)基因中包含一个、两个、三个或更多无义突变的疾病。

此处所用的术语“功能”在功能通读蛋白的上下文中指具有足够的相应野生型蛋白的功能，以在由于编码该蛋白的核酸序列(例如，基因)的突变(例如，无义突变)而导致不生成或不足量生成野生型蛋白的细胞或个体中产生有益效果的蛋白。

此处所用的术语“药学上可接受的盐”指由药学上可接受的无毒的酸或碱(包括无机酸和碱以及有机酸和碱)制备的盐。本发明化合物适用的药学上

可接受的碱加成盐包括但不限于：由铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌制备的金属盐，或由赖氨酸、N,N'-二苄乙烯二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、甲葡胺(N-甲葡糖胺)和普鲁卡因制备的有机盐。适用的无毒酸包括但不限于：无机和有机酸，例如醋酸、褐藻酸、邻氨基苯甲酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙烯磺酸、甲酸、富马酸、糠酸、半乳糖醛酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、谷氨酸、乙醇酸、氢溴酸、盐酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲基磺酸、粘酸、硝酸、扑酸、泛酸、苯乙酸、磷酸、丙酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、磺胺酸、硫酸、酒石酸和对甲苯磺酸。具体的无毒酸包括盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和甲磺酸。具体盐的范例包括盐酸盐和甲磺酸盐。盐的其它范例已为本领域公知。例如，参见，*Remington's Pharmaceutical Sciences*，第18版，Mack Publishing, Easton PA (1990)。

除非另行指明，此处所用的术语“前药”指在生物学条件下(体外或体内)能水解、氧化或以其它方式反应而提供活性化合物(特别是本发明的化合物)的化合物的衍生物。前药的范例包括但不限于：包含如可生物水解酰胺基、可生物水解酯、可生物水解氨基甲酸酯、可生物水解碳酸酯、可生物水解脲、以及可生物水解磷酸酯类似物的可生物水解部分的本发明化合物的衍生物和代谢产物。优选地，具有羧基功能基团的化合物的前药为该羧酸的低级烷基酯。该羧酸酯可通过将该分子上的任意羧酸部分酯化得以方便地形成。前药通常可采用公知方法进行制备，例如在 *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*，第6版(Donald J. Abraham 编，2001, Wiley) 以及 *Design and Application of Prodrugs* (H. Bundgaard 编，1985, Harwood Academic Publishers Gmfh)中描述的方法。

除非另行指明，此处所用的术语“可生物水解酰胺”、“可生物水解酯”、“可生物水解氨基甲酸酯”、“可生物水解碳酸酯”、“可生物水解酰脲”、以及“可生物水解磷酸酯”分别指 1)不干扰该化合物的生物活性但在体内可赋予该化合物摄取、作用期限或作用发生等有利特性；或者 2)无生物活性但在体内可转化为生物活性化合物的化合物的酰胺、酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、酰脲、以及磷酸酯。可生物水解酯的范例包括但不限于：低级烷基酯、烷氧基酰氧基酯、烷基酰胺烷基酯、以及胆碱酯。可生物降解的酰胺的范例包括但不限于：低级烷基酰胺、 α -氨基酸酰胺、烷氧酰基酰胺以及烷氨烷羰基酰胺。可生物水解氨基甲酸酯包括但不限于：低级烷胺、取代乙撑二胺、氨基酸、羟烷胺、杂环和杂芳环胺以及聚醚胺。

除非另行指明，此处所用的术语“光学纯的”或“立体异构纯的”指基本没有该化合物的另一立体异构体的化合物的立体异构体。例如，具有一个手性中心的立体异构纯的化合物就基本上不含有该化合物的相对对映体。具有两个手性中心的立体异构纯的化合物就基本不含有该化合物的其它非对映异构体。典型的立体异构纯化合物包含大于约 80%重量的该化合物的一种立体异构体和少于约 20%重量的该化合物的其它立体异构体，更优选大于约 90%重量的该化合物的一种立体异构体和少于约 10%重量的该化合物的其它立体异构体，更优选大于约 95%重量的该化合物的一种立体异构体和少于约 5%重量的该化合物的其它立体异构体，最优选大于约 97%重量的该化合物的一种立体异构体和少于约 3%重量的该化合物的其它立体异构体。

除非另行指明，此处所用的术语“立体异构纯的”指具有一个手性中心的化合物的立体异构纯的组合物。

此处所用的术语“单位剂型”包括片剂；咀嚼片；囊片；胶囊，如软弹性凝胶胶囊；药囊剂；扁囊剂；锭剂；糖锭；分散剂；粉末；溶液；凝胶；适于向患者进行口服或黏膜施用的液体剂型，包括悬浮剂(例如，水或非水液体悬浮剂)、乳剂(例如，水包油型乳剂、或油包水型乳剂)、溶液和酞剂；以及可以重新配制为可通过口服或肠胃外施用至患者的液体剂型的无菌固体(例如，结晶或非晶质固体)。该单位剂型不一定必须作为单个剂量施用。

此处所用的术语“库”在涉及化合物时指多个化合物。库可以是组合库，例如采用组合化学技术合成的化合物的集合，或是各自占据独特的三维空间的低分子量(小于 1000 道尔顿)的独特化合物的集合。

此处所用的术语“报告基因”指通过其确定提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的调节的基因。在具体的实施方式中，报告基因的表达可简单地测定，并具有在获取细胞或翻译提取物的生物体中通常不能发现的活性。

此处所用的“无义介导的 mRNA 降解”指介导包含提前翻译终止密码子的 mRNA 降解的任意机制。

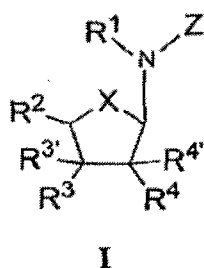
此处所用的术语“预先确定的参考范围”指特定测定的读数的参考范围。在具体的实施方式中，该术语指特定细胞或特定的无细胞萃取物中报告基因的表达和/或报告基因产物的活性的参考范围。在一些实施方式中，各个实验室针对各个特定的测定、各个细胞类型和各个无细胞萃取物建立了其自己的参考范围。在优选的实施方式中，在进行分析的各批化合物中包括至少一个阳性对照和至少一个阴性对照。

应当指出如果在所示结构和对该结构所给的名称之间存在差异，则应当侧重所示的结构。此外，如果一种结构或结构部分的立体化学未通过如

粗线或虚线等线条指出，则该结构或结构部分应解释为包含了其所有的立体异构体。

5.2 具有无义突变抑制活性的示例化合物

在一个实施方式中，所述无义密码子抑制剂为具式 I 的化合物：



或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、包合物、外消旋体或立体异构体，其中：

Z 为取代或未取代的烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的环烷基烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基羰基；

X 为 CH₂、O、S 或 NH；

R¹ 为氢，取代或未取代的烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的环烷基烷基、取代或未取代的杂环烷基；

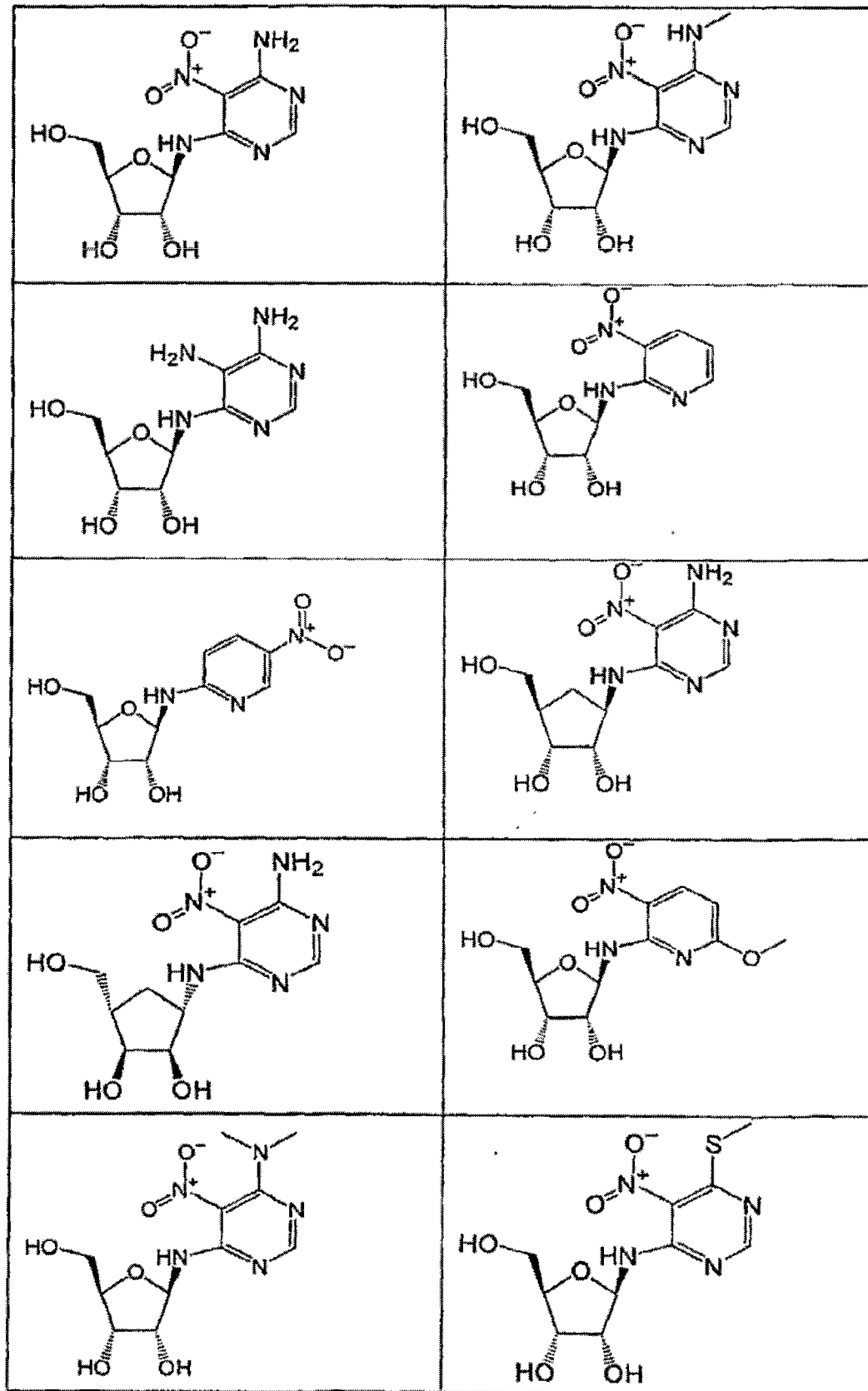
R² 为取代或未取代的烷基、羧基、酰胺基、酰基、烷基羰基、卤素、可生物水解的基团、OP(O)₃²⁻、O[P(O)₃]₂³⁻、O[P(O)₃]₃⁴⁻、N₃、CH₂-NR₆R₇ 或 CH₂-OR⁶；

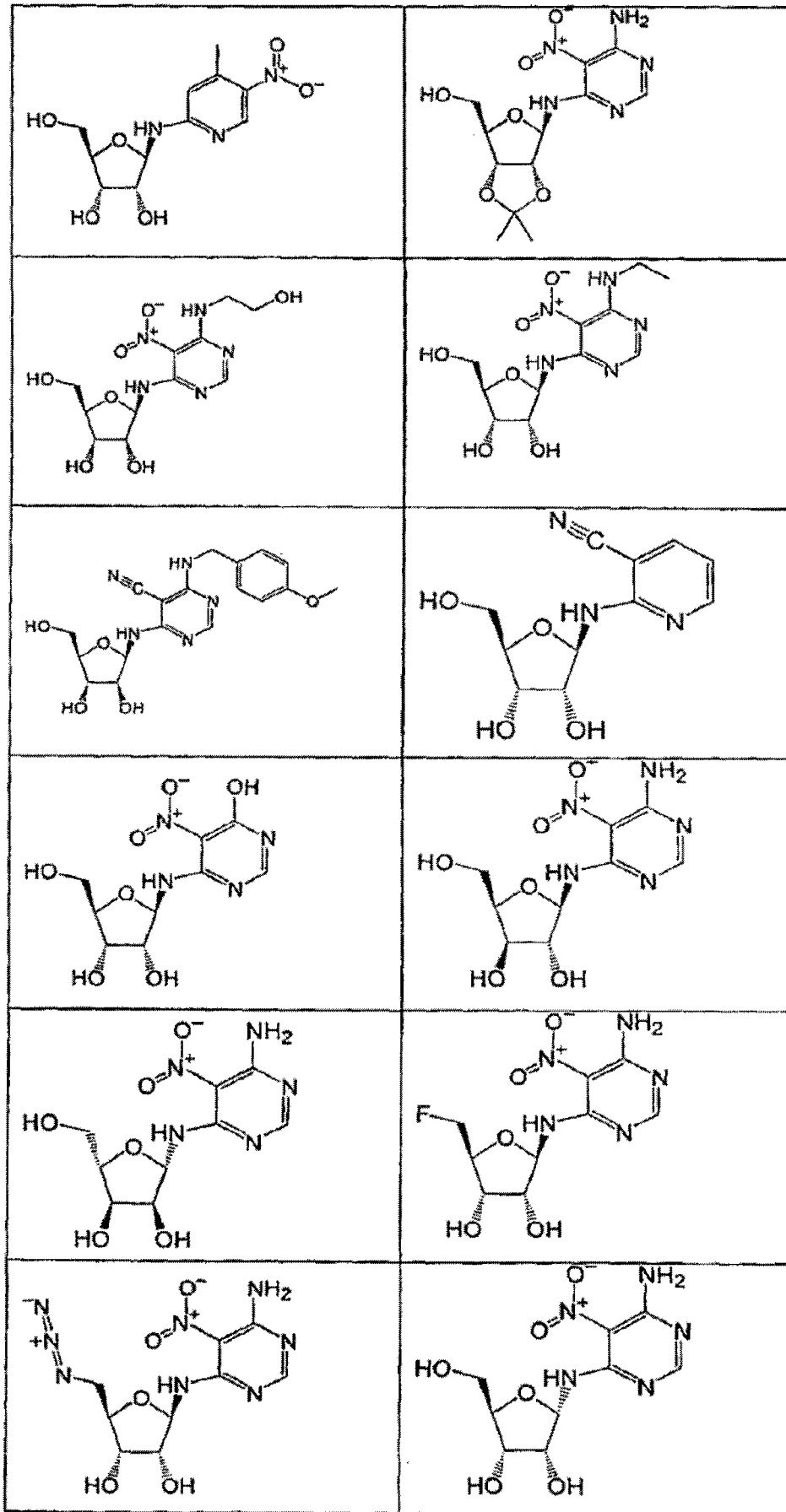
R^3 、 $R^{3'}$ 、 R^4 和 $R^{4'}$ 在各情况下独立为 OR^7 、 OR^8 、氢、卤素、取代或未取代的烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的环烷基烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基羰基、取代或未取代的烷基羰基、可生物水解的基团，或 R^3 和 R^4 一起形成键，或 R^3 和 R^4 与它们结合的原子一起形成取代或未取代的杂环，或 R^3 和 $R^{3'}$ 和/或 R^4 和 $R^{4'}$ 与它们结合的碳一起形成 $C(=O)$ ；且

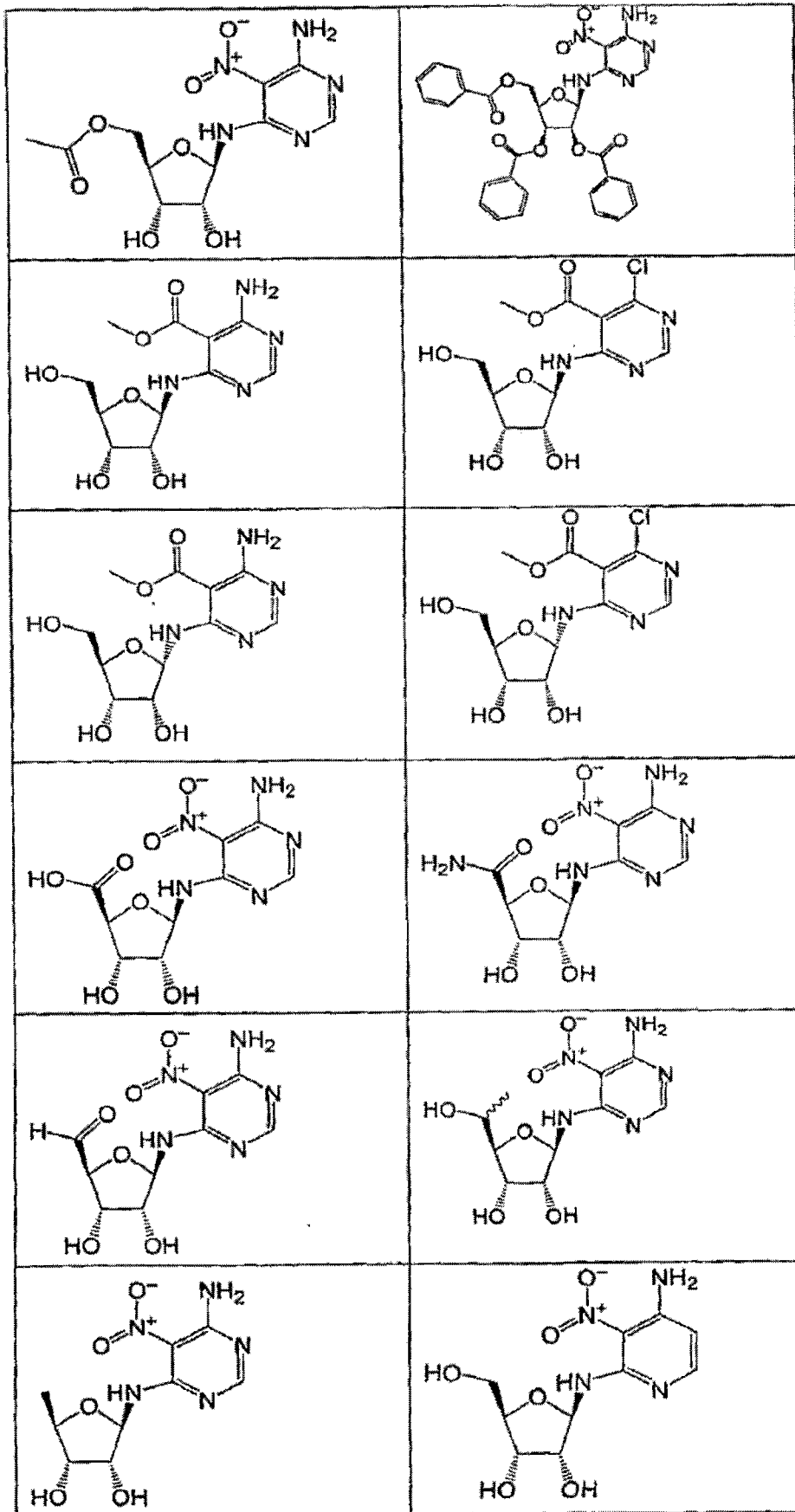
R^6 、 R^7 和 R^8 在各情况下独立为氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的环烷基烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基羰基、取代或未取代的烷基羰基、可生物水解的基团，或 R^3 和 R^4 与它们结合的原子一起形成取代或未取代的杂环。

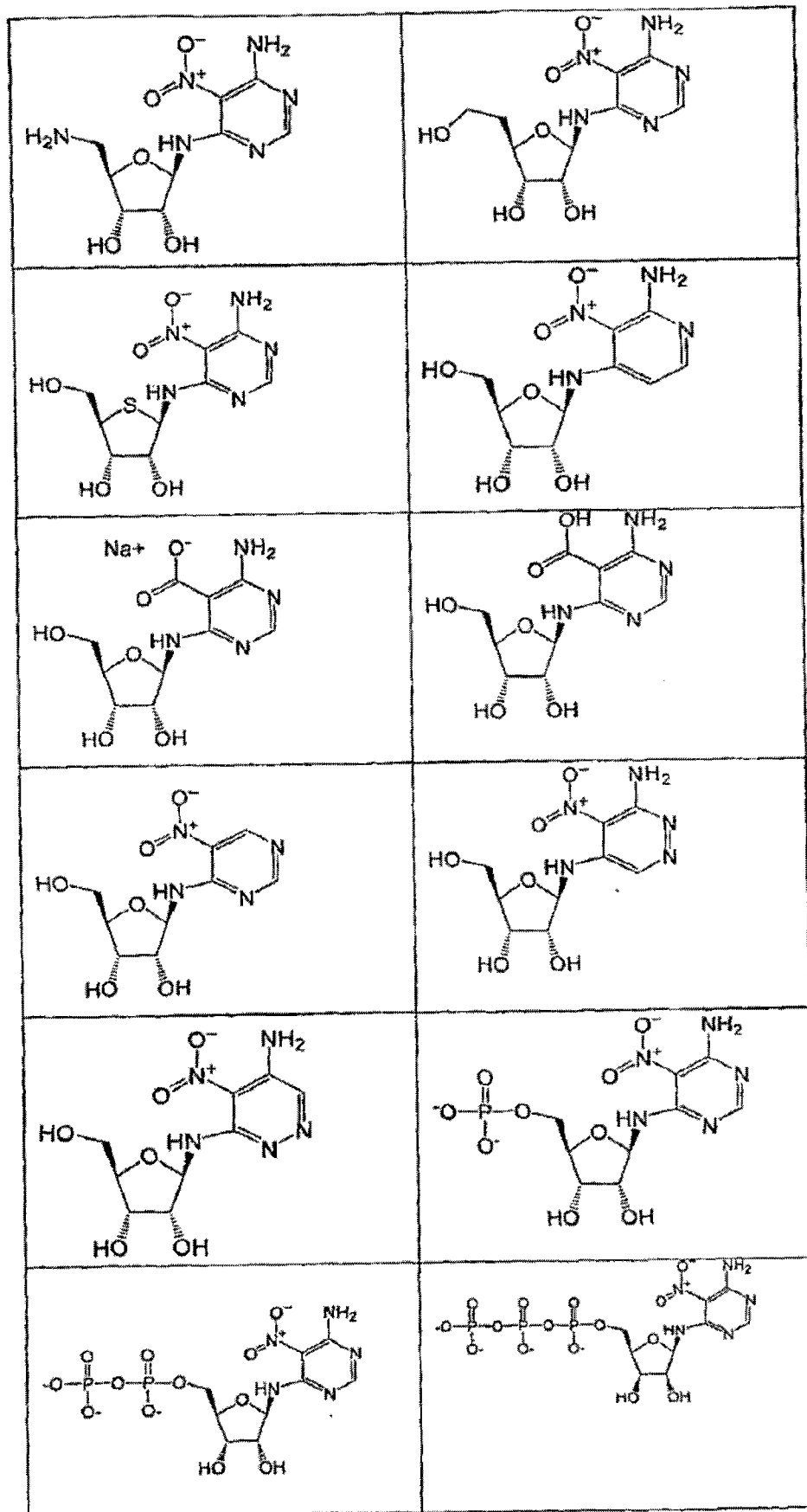
优选的式 I 的化合物列举于下表 1。

表 1





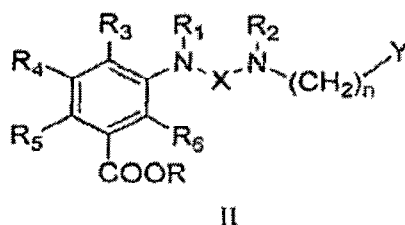




具式 I 的化合物可通过标准的、公知的合成方法获得, 该类方法可参见, 例如, March, J. *Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms and Structure*, 第 4 版, 1992。因此, 可用于制备式 I 的化合物的起始材料和中间体可从商业途径获得, 或可用商业途径购得的材料通过已知的合成方法和试剂制备得到。

制备具式 I 的化合物的具体方法在 2004 年 4 月 8 日公开的 US 2004-0067900 中有公开, 其全文在此引用作为参考。

在另一实施方式中, 所述无义密码子抑制剂为式 II 的化合物:



或其药学上可接受的盐、水合物、包合物、多晶型、前药或立体异构体, 其中:

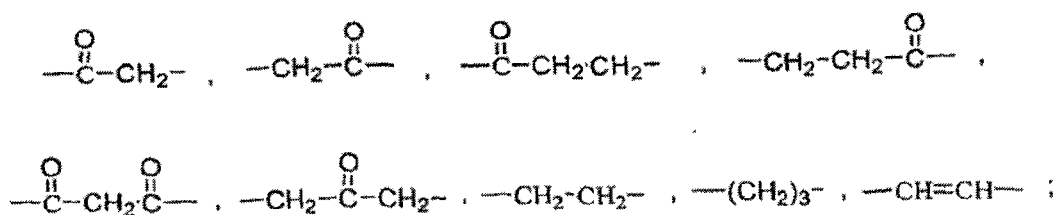
X 为 C(=O)、C(=S)、S、S(=O) 或 S(O)₂;

Y 为取代或未取代的烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环;

R 为氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的环烷基烷基、取代或未取代的杂环烷基;

n 为介于 0-4 的整数;

R_1 和 R_2 各自独立为氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、 $-(CH_2)_m-W$ 、羧烷基、烷基羰基、烷氧基烷基、烷氧基羰基、芳烷基、磺酰基、酰胺，或 R_1 和 R_2 与它们连接的原子一起形成任选地被取代的 5-7 元杂环、任选地被取代的 5-7 元杂芳基环，或 R_1 和 R_2 一起形成：



W 各情况下独立地选自氢、卤素、羟基、烷氧基、羧基、醛、 NH_2 、 $\text{NR}^{14}\text{R}^{14'}$ 、硝基、环烷基、杂芳基、杂芳烷基；

其中(i)各情况下 R^{14} 和 $R^{14'}$ 独立地选自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基或 CF_3 ；或(ii) R^{14} 和 $R^{14'}$ 与它们连接的氮原子一起形成含有 5 至 8 个环原子(其中 1 至 3 个为杂原子)的任选地被取代的杂环状环；

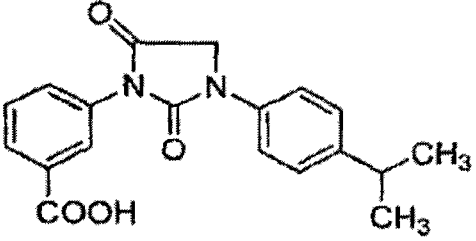
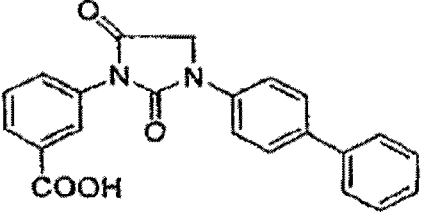
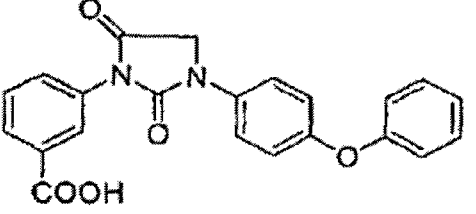
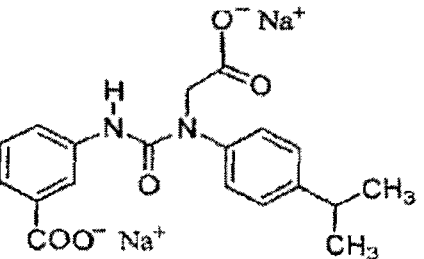
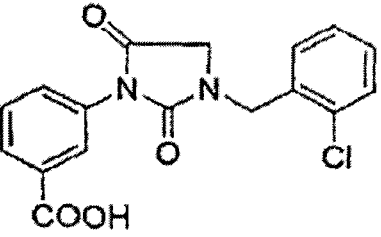
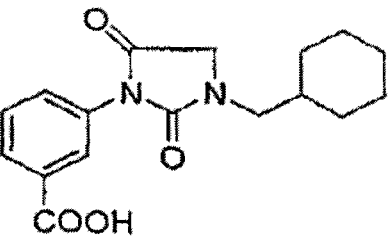
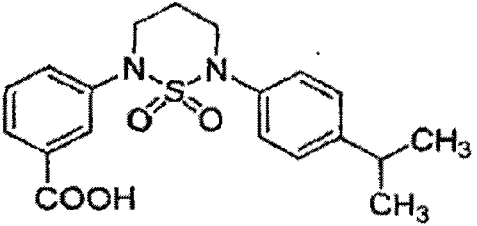
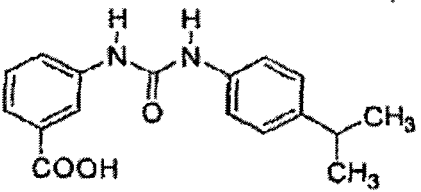
m 为介于 1-4 的整数；

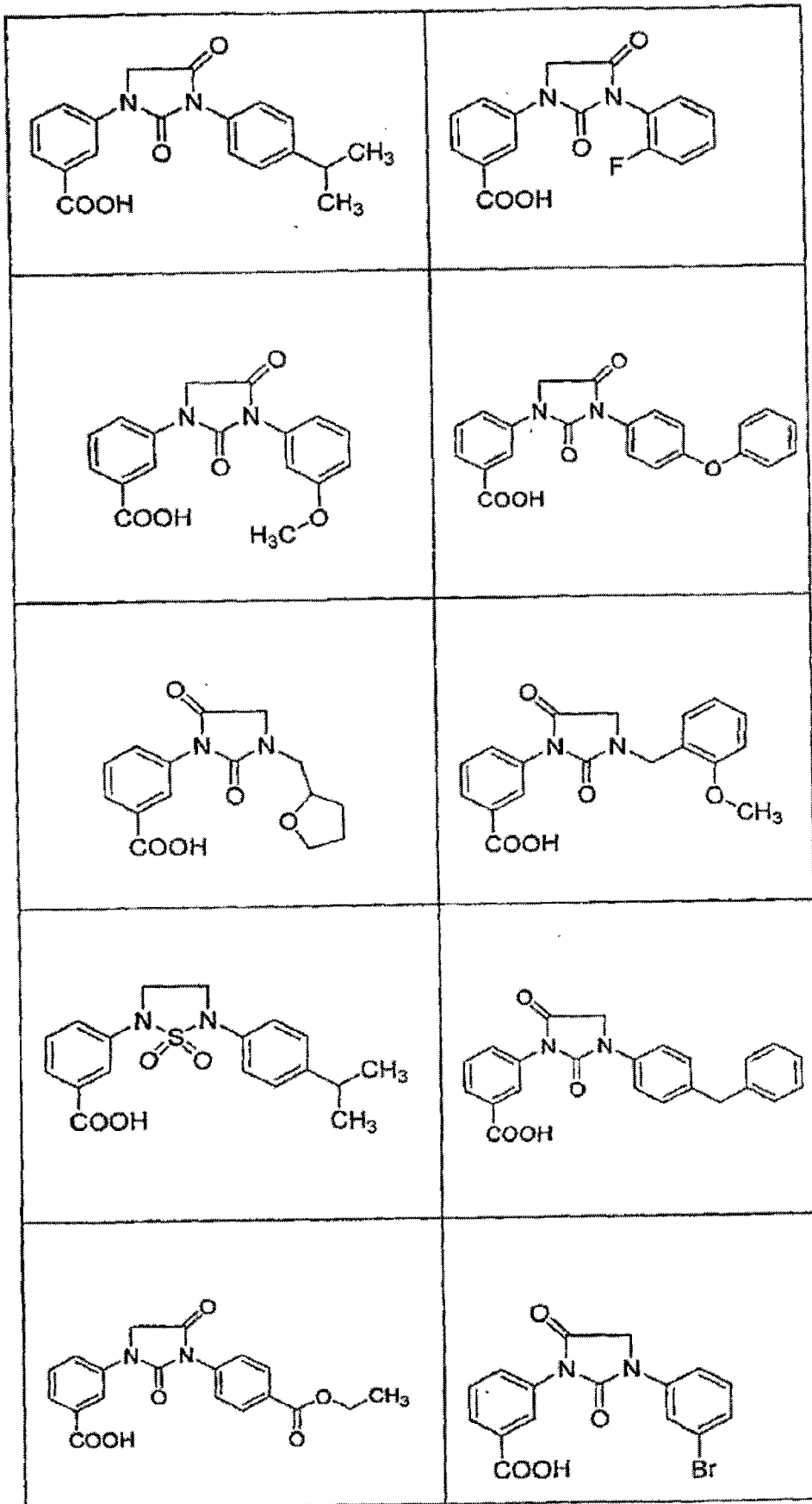
R_3 - R_6 各自独立地选自氢、卤素、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的环烷基烷基、取代或未取代的杂环烷基、烷氨基、氨烷基、烷氧基、芳氧基、杂芳氧基、环烷氧基、杂环烷氧基、酰胺、卤烷基(例如 CF_3)、卤烷氧基(例如 OCF_3 或 OCHF_2)、 OH 、 CN 、 COOH 、 COOR^{15} 、 SO_2R^{15} 、 NO_2 、 NH_2 ，或者 $\text{NR}^{14}\text{R}^{14'}$ 和 R^{15} 选

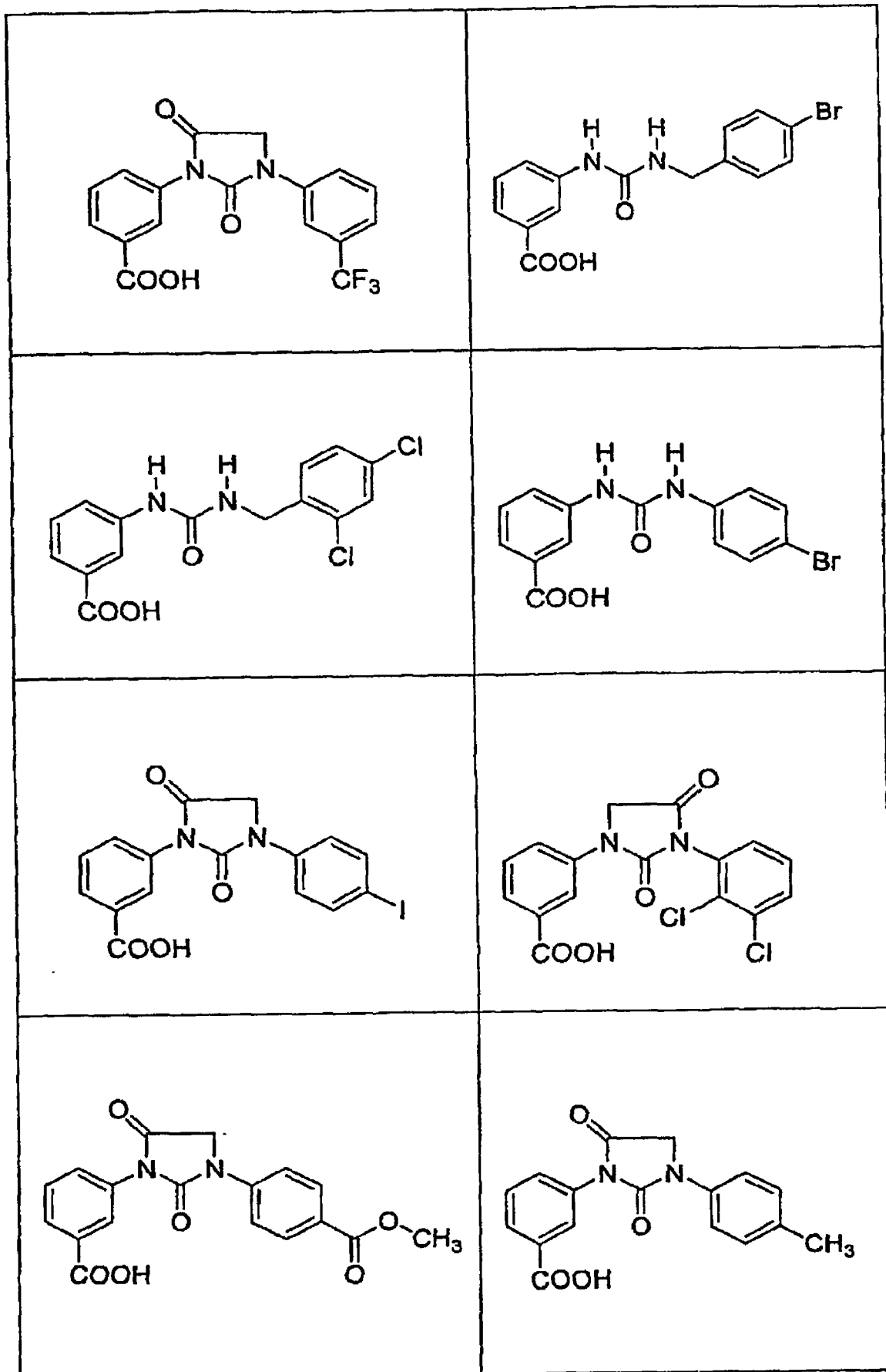
自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基或 CF_3 。

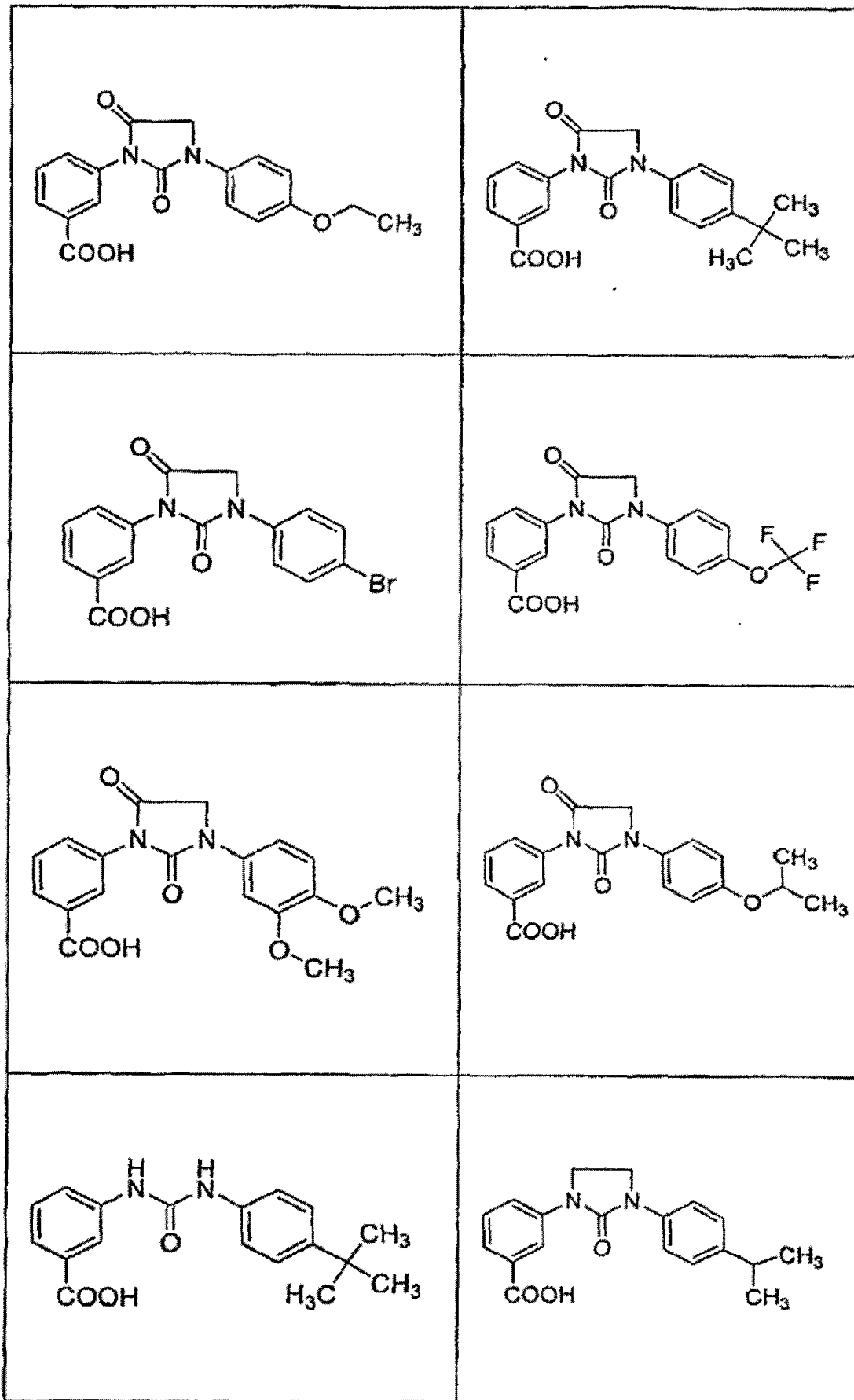
优选的式 II 的化合物列于下表 2。

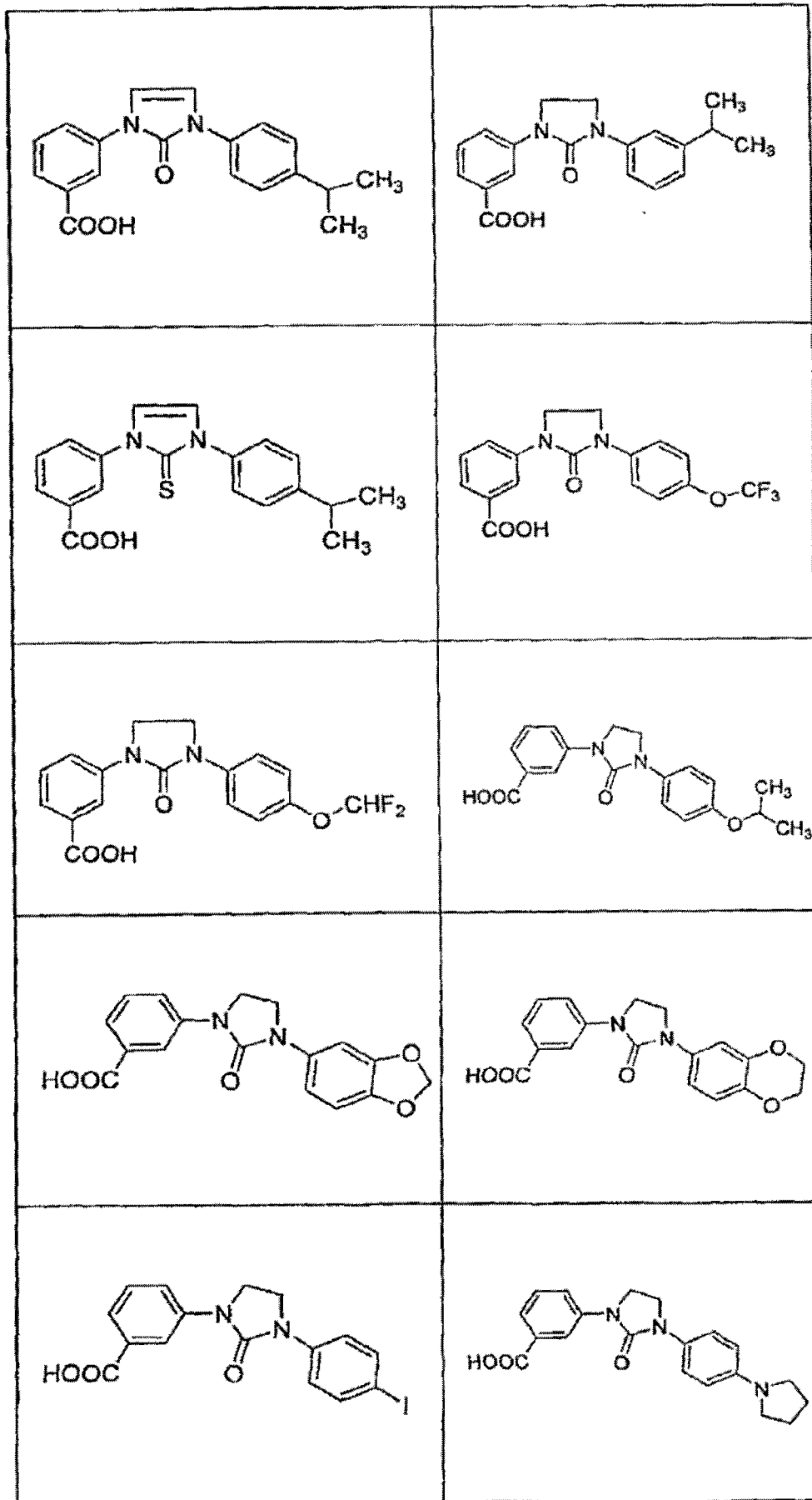
表 2

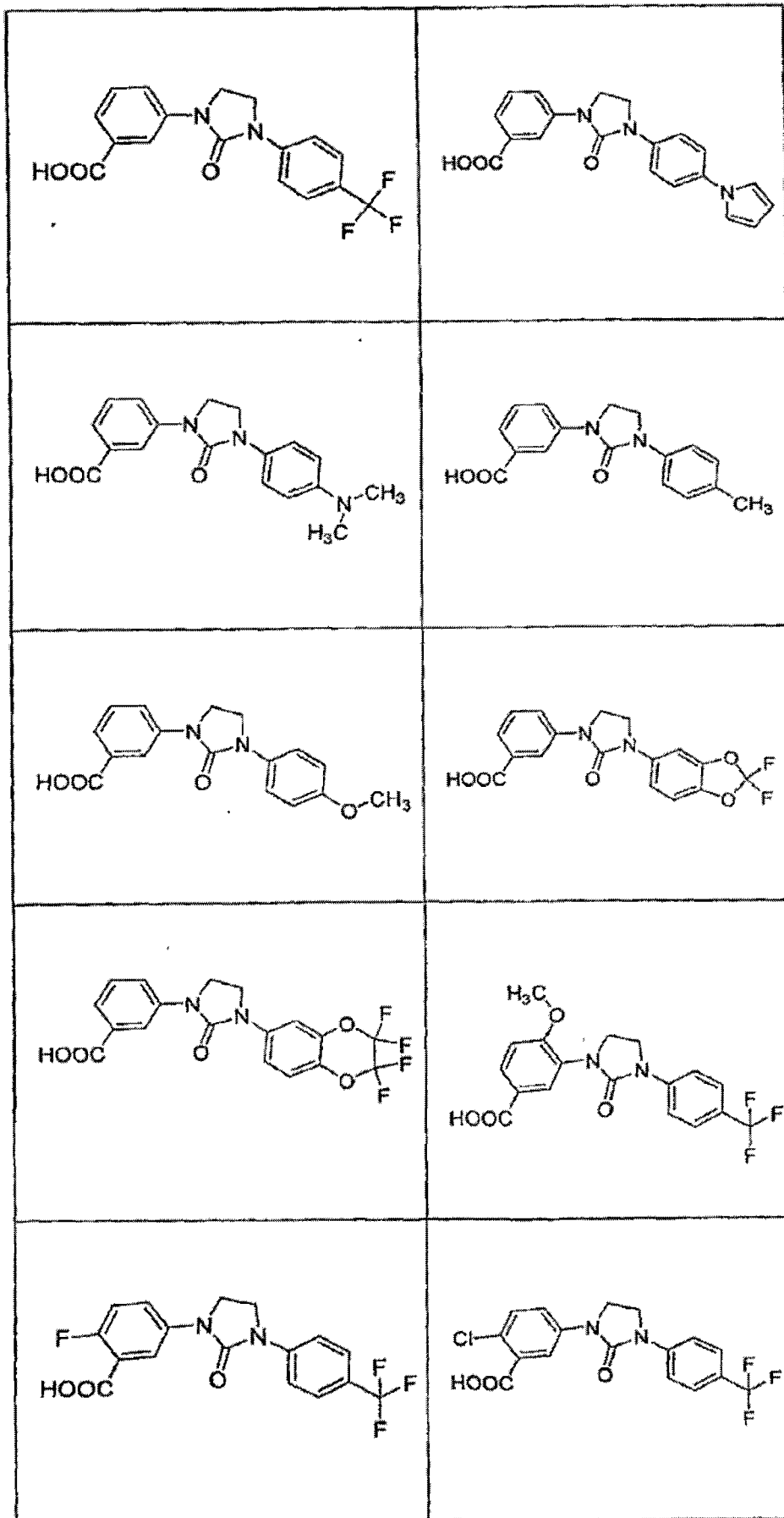
 <chem>CC(C)c1ccc(cc1)N2C(=O)N(c3ccc(cc3)C(=O)O)C2=O</chem>	 <chem>c1ccc(cc1)N2C(=O)N(c3ccc(cc3)C(=O)O)C2=O</chem>
 <chem>c1ccc(cc1)Oc2ccc(cc2)N3C(=O)N(c4ccc(cc4)C(=O)O)C3=O</chem>	 <chem>CC(C)c1ccc(cc1)N2C(=O)N(c3ccc(cc3)C(=O)[O-])[Na+]C2=O</chem>
 <chem>Clc1ccc(cc1)CN2C(=O)N(c3ccc(cc3)C(=O)O)C2=O</chem>	 <chem>C1CCCCC1CN2C(=O)N(c3ccc(cc3)C(=O)O)C2=O</chem>
 <chem>CC(C)c1ccc(cc1)N2CCN(S(=O)(=O)N2)c3ccc(cc3)C(=O)O</chem>	 <chem>CC(C)c1ccc(cc1)N2C(=O)N(c3ccc(cc3)C(=O)O)C2=O</chem>

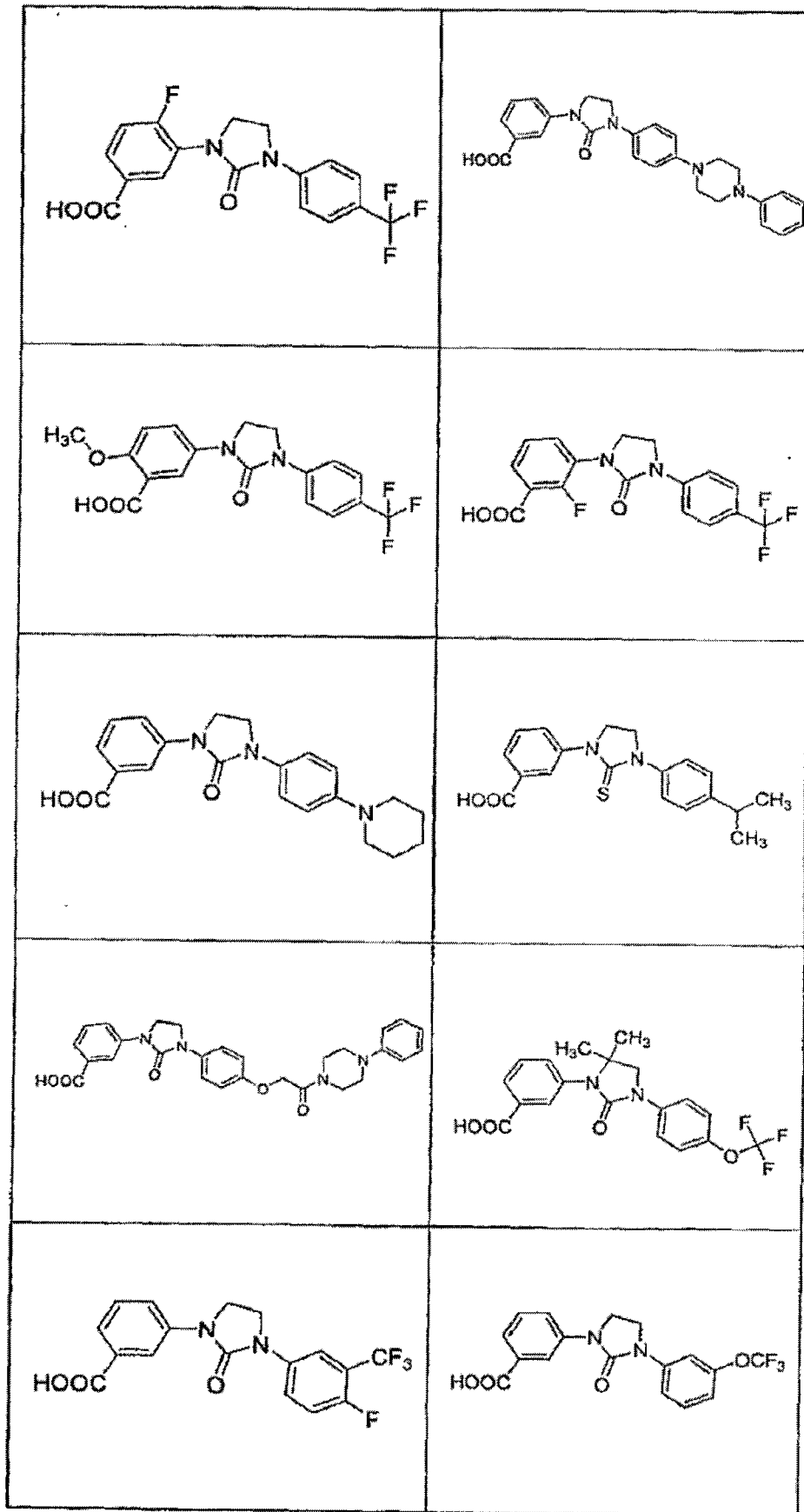


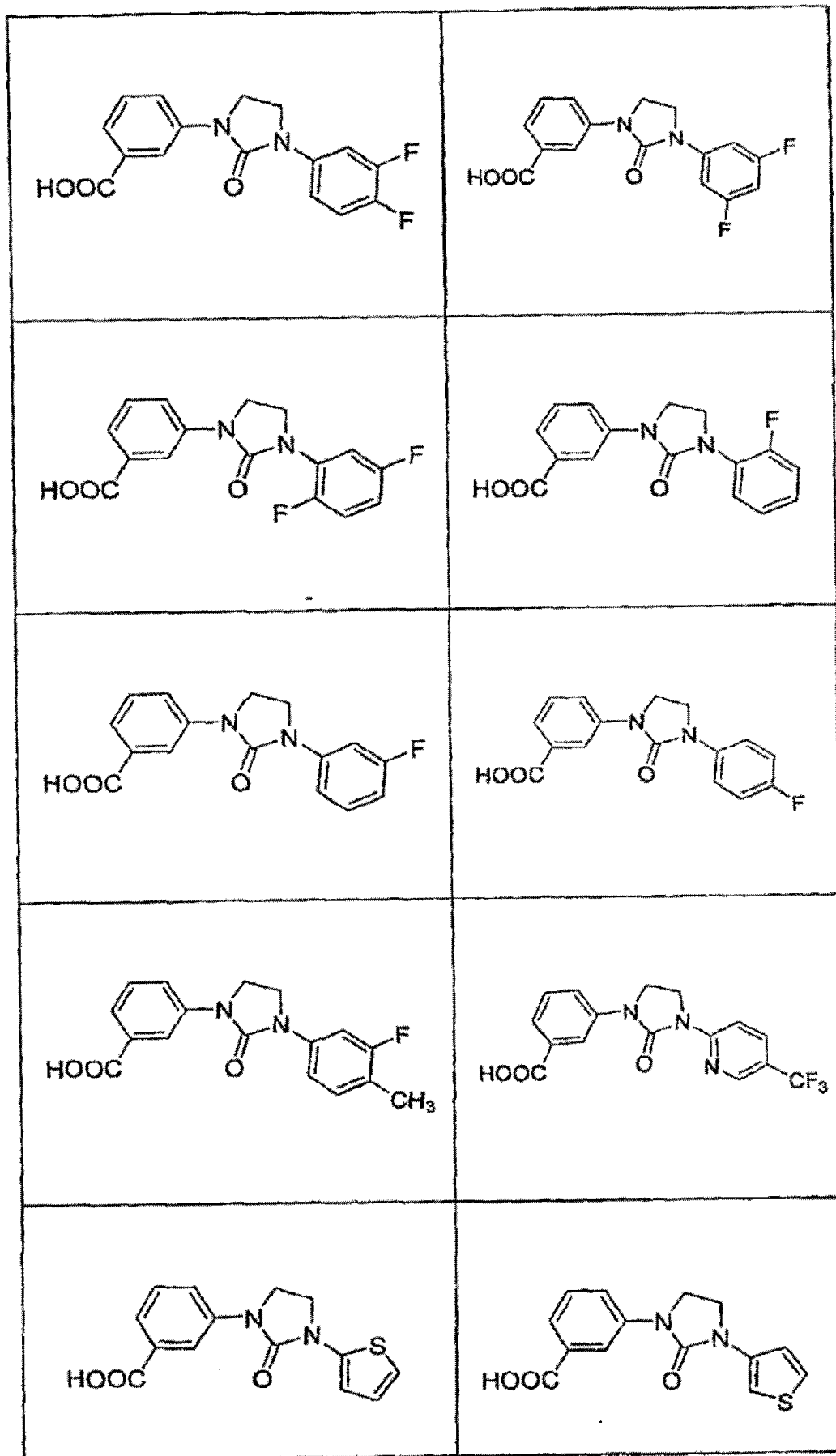


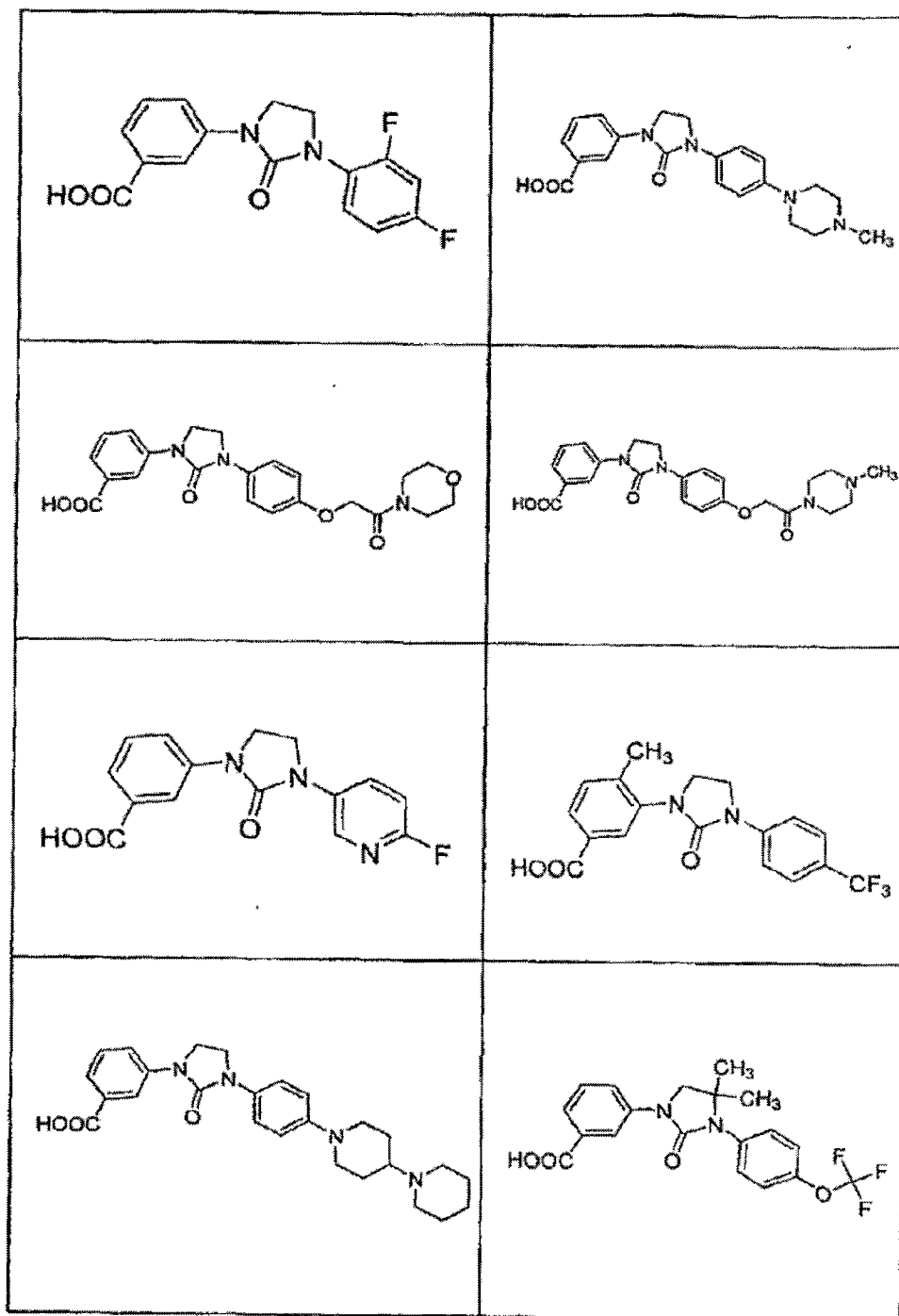








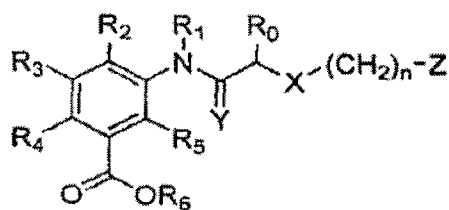




式 II 的化合物可通过标准的、公知的合成方法获得，该类方法可参见，例如，March, J. *Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms and Structure*, 第 4 版, 1992。因此，可用于制备式 II 的化合物的起始材料和中间体可从商业途径购得，或可由商业途径购得的材料采用已知的合成方法和试剂制备得到。

制备具式 II 的化合物的具体方法在 2004 年 1 月 29 日公开的 WO 2004/009558 A2 中有公开，其全文在此引用作为参考。

在另一实施方式中，该无义密码子抑制剂为具式 III 的化合物：



III

或其药学上可接受的盐、水合物、包合物、前药、多晶型、立体异构体，立体异构体包括对映体、非对映体、外消旋体或立体异构体的混合物，其中：

X 为氧、硫、CO、SO 或 S(O)₂；

Y 为氧或硫，

Z 为取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的环烷基；

n 为介于 0 至 4 的整数；

R¹ 为氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基；取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、SO₂R⁷、CF₃、CN、COOH、COR⁷ 或 COOR⁷；

R⁰ 为氢、或与 R¹ 及它们结合的原子一起形成任选地被取代的 5-7 元杂环、或杂芳基环；

R²、R³、R⁴ 和 R⁵ 独立地为氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基；取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、烷氧基、芳氧基、

杂芳氧基、卤素、 CF_3 、 OCF_3 、 OCHF_2 、 CN 、 COOH 、 COOR^7 、 SO_2R^7 、 NO_2 、 NH_2 或 $\text{N}(\text{R}^7)_2$;

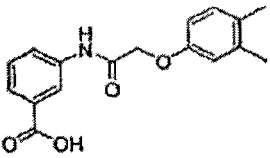
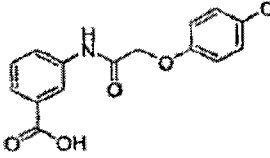
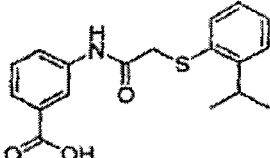
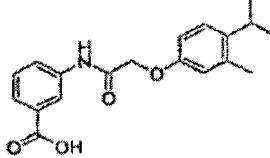
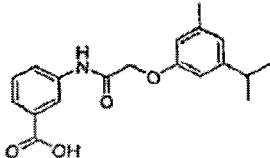
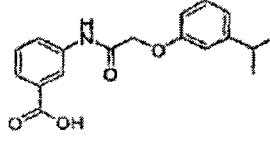
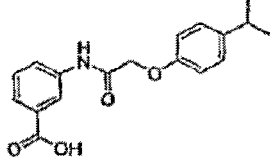
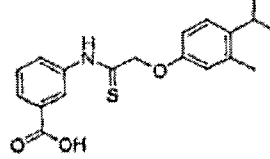
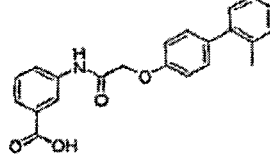
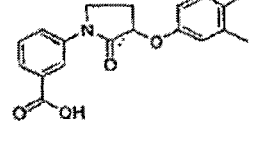
R^6 为氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、或任何可生物水解的基团; 以及

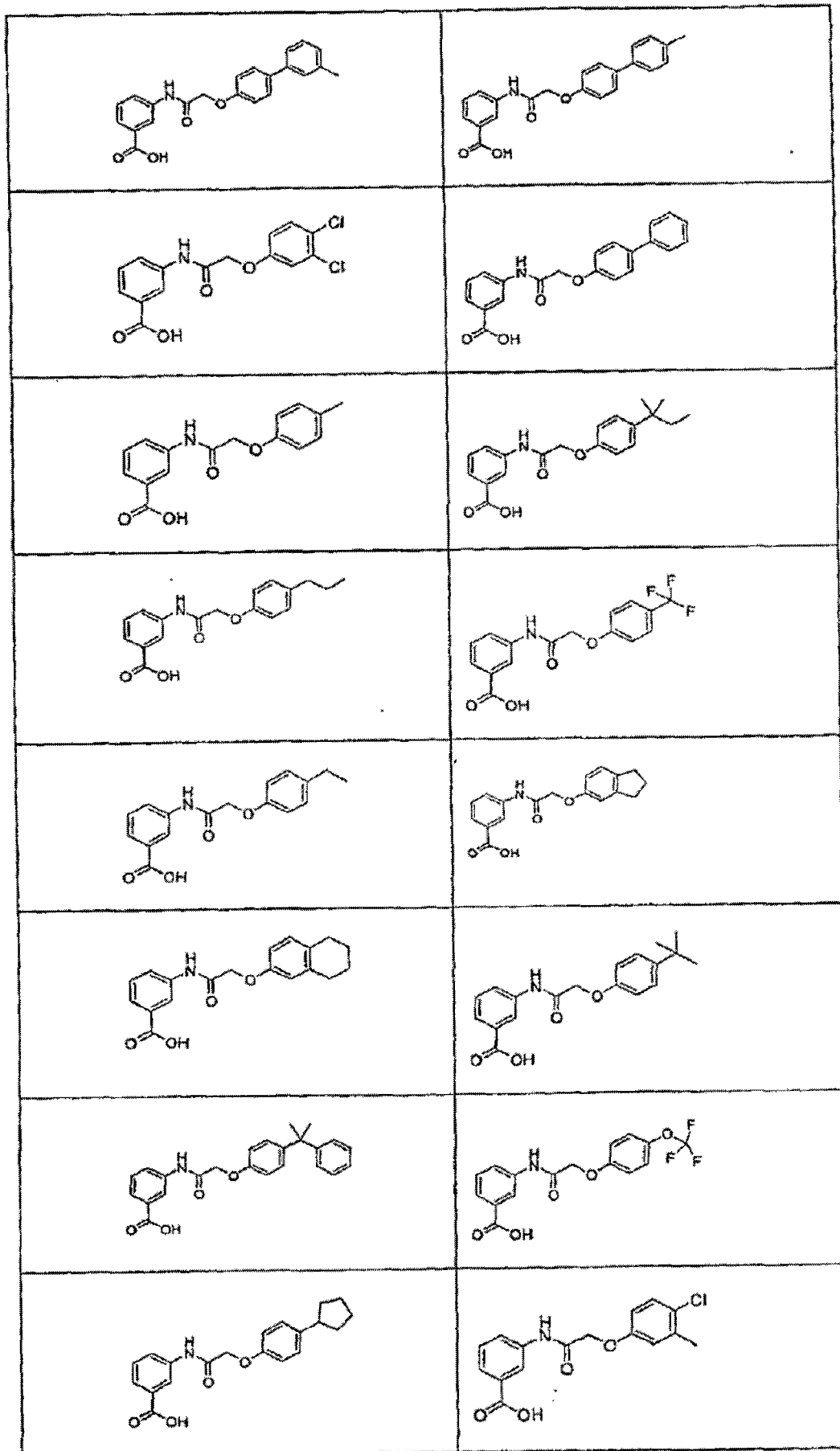
各情况下 R^7 独立为氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基; 取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、烷氧基、芳氧基、杂芳氧基、卤素或 CF_3 ;

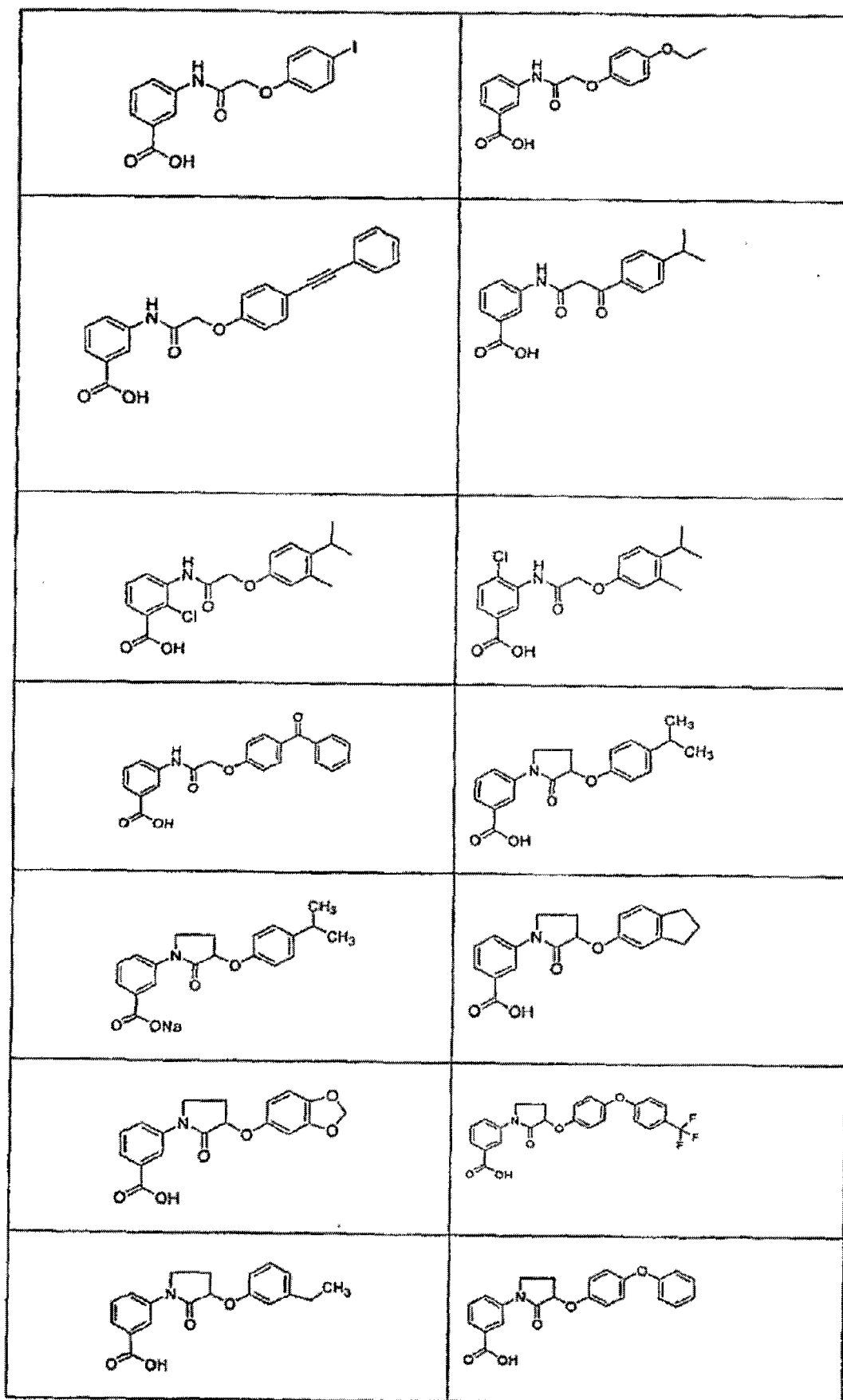
前提是, 当 X 为 O , Y 为 O , n 为 0 且 R^1 为氢时, Z 不是 4-氯苯基、4-甲基苯基、3-氯苯基或 2,4-二氯苯基; 且前提是, 当 X 为 O , Y 为 O , n 为 0, R^1 为氢, 且 Z 为未取代的苯基时, R^2 - R^5 中至少一个不是氢; 且前提是, 当 R^3 为 COOH , R^2 、 R^4 和 R^5 不全为卤素。

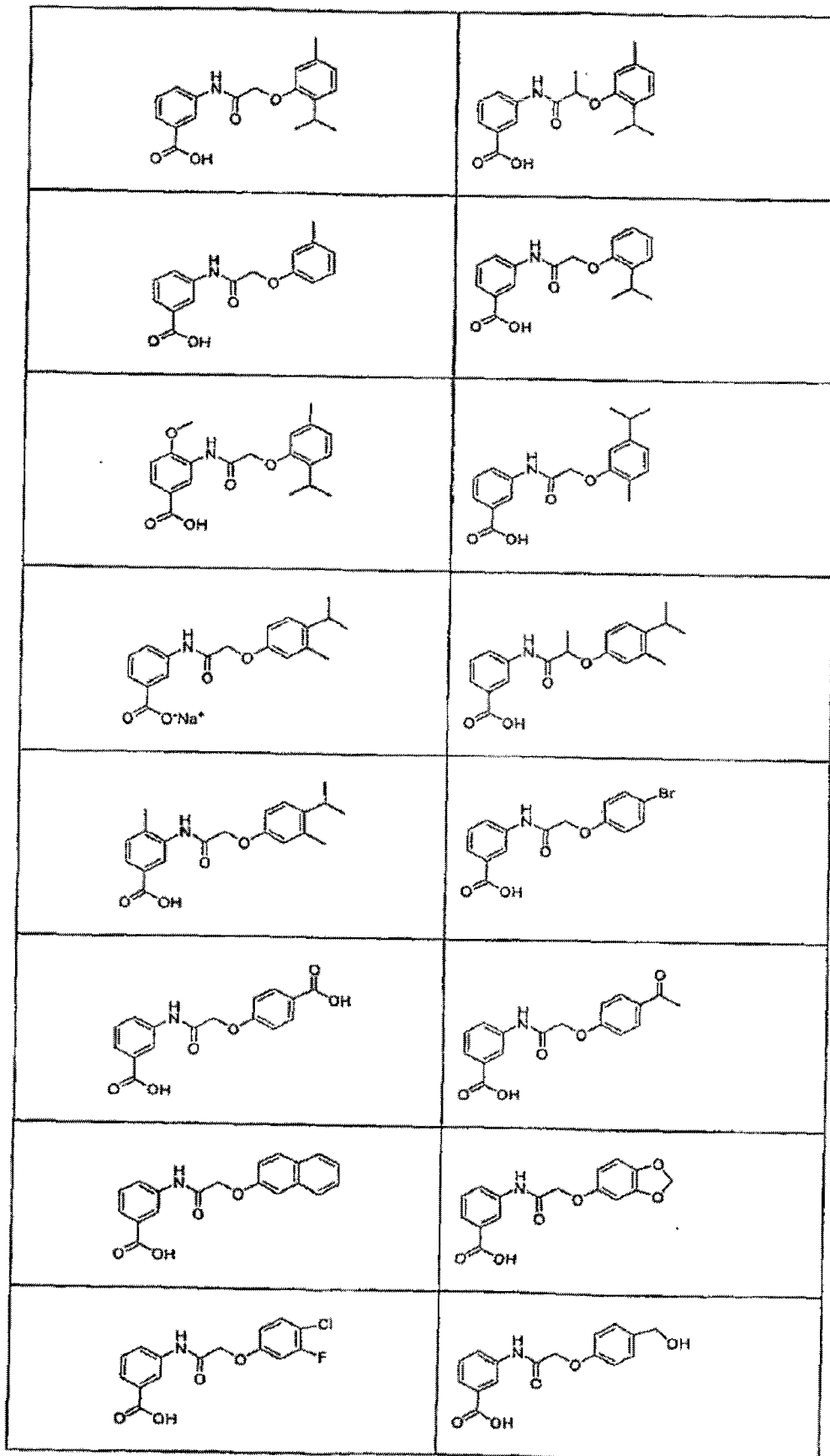
优选的式 III 的化合物列于下表 3。

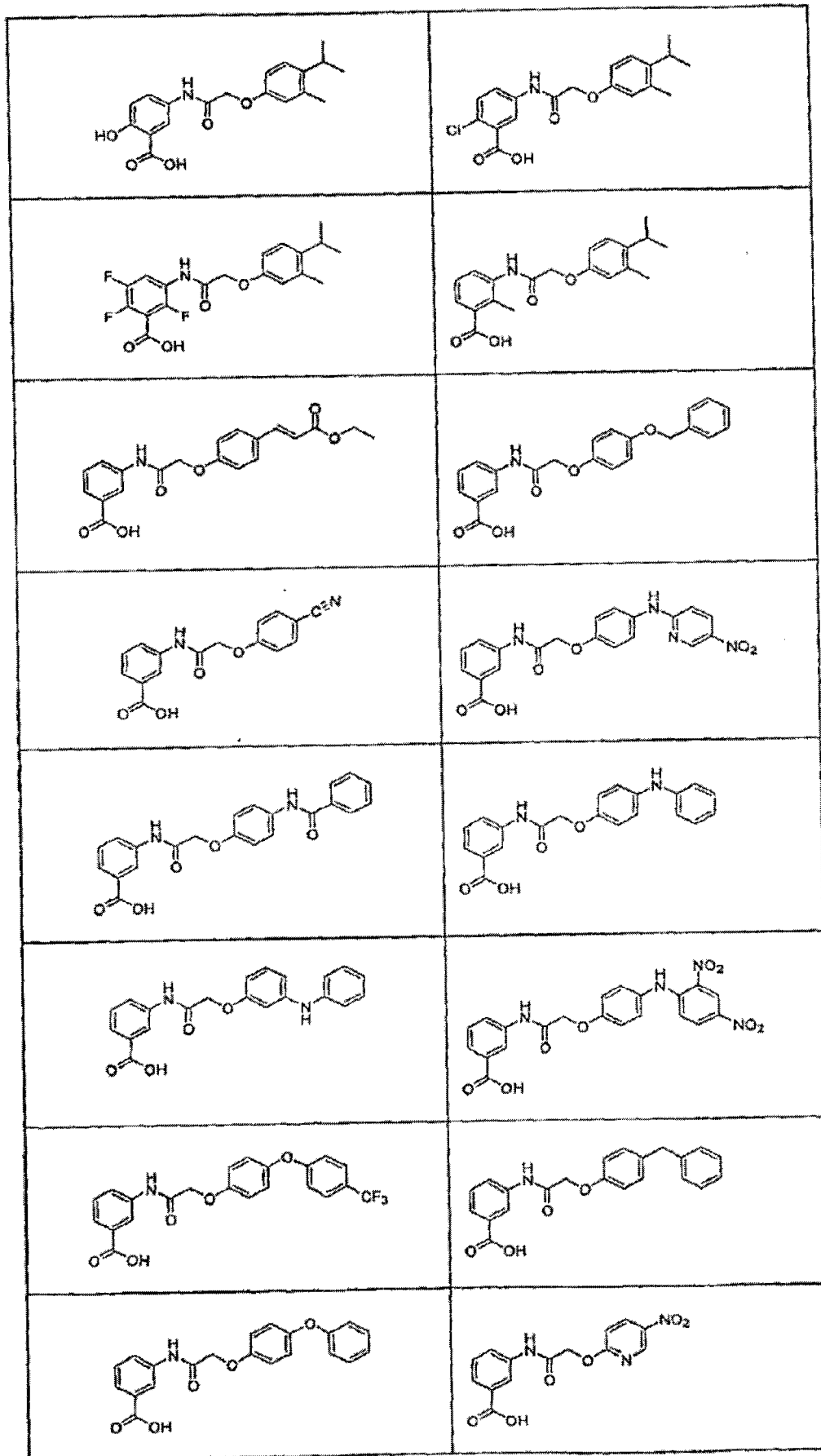
表 3

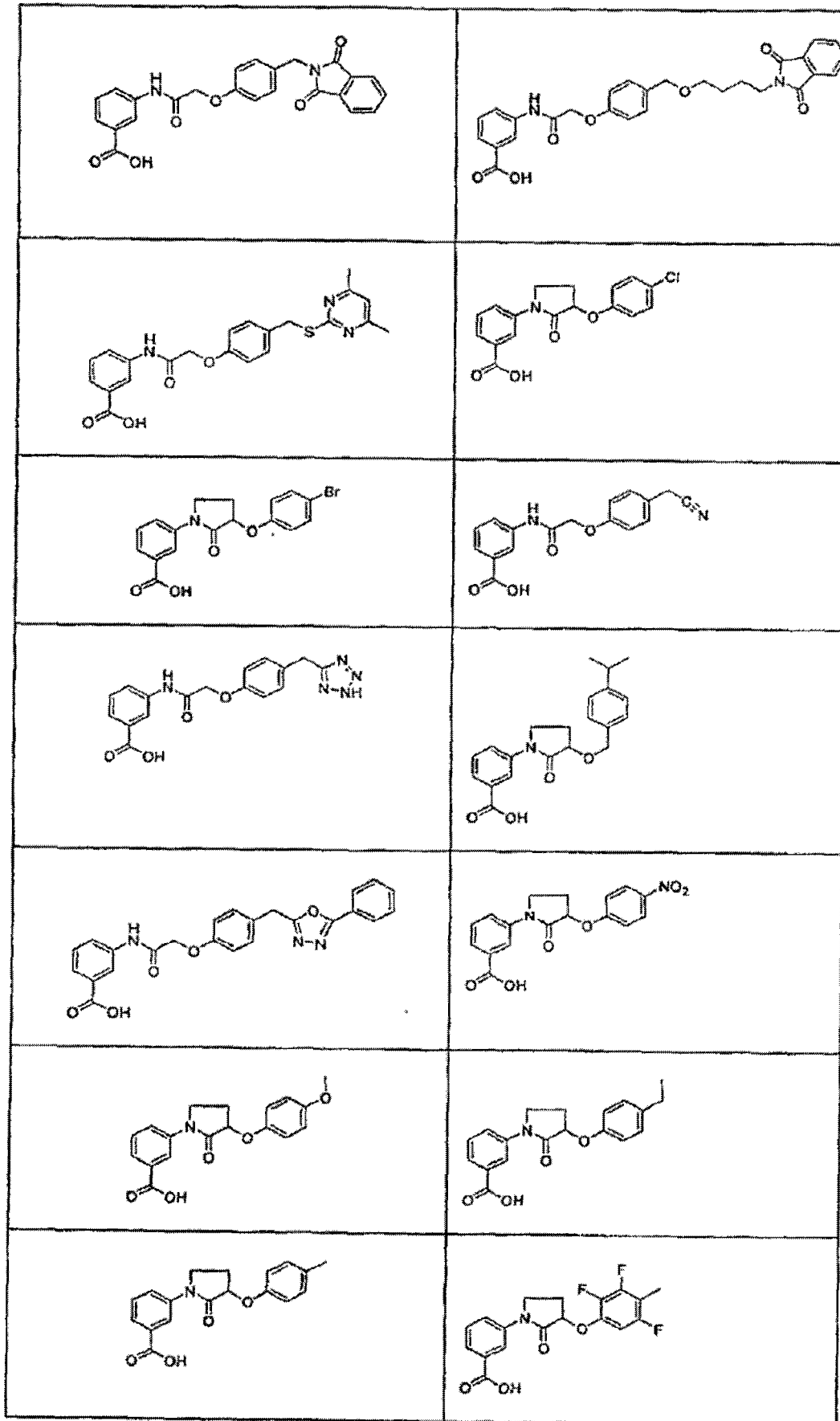
	
	
	
	
	

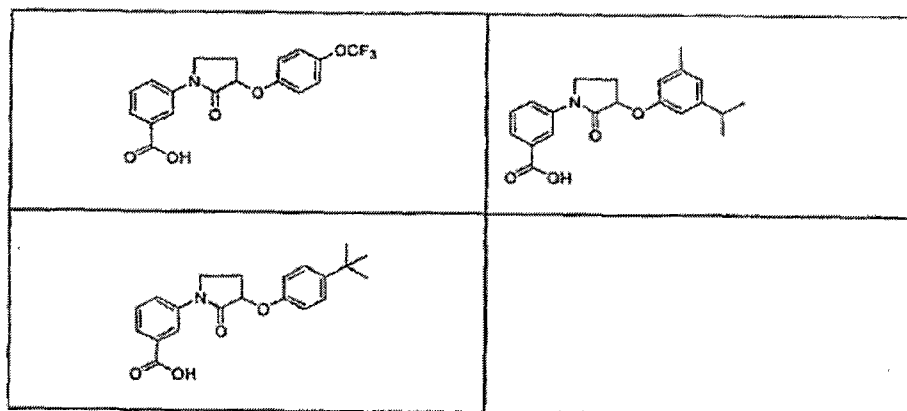








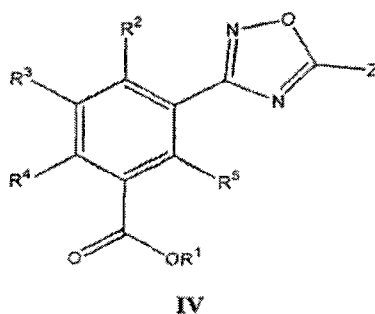




式 III 的化合物可通过标准的、公知的合成方法获得, 该类方法可参见, 例如, March, J. *Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms and Structure*, 第 4 版, 1992。因此, 可用于制备具式 III 的化合物的起始材料和中间体可从商业途径购得, 或可由商业途径购得的材料采用已知的合成方法和试剂制备得到。

制备式 III 的化合物的具体方法在 2004 年 1 月 29 日公开的 WO 2004/009533 A1 中有公开, 其全文在此引用作为参考。

在另一实施方式中, 该无义密码子抑制剂为式 IV 的化合物:



或其药学上可接受的盐、水合物、包合物、前药、多晶型、立体异构体, 立体异构体包括对映体、非对映体、外消旋体或立体异构体的混合物, 其中:

Z 为取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的杂环、取代或未取代的芳烷基；

R^1 为氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、 $-(CH_2CH_2O)_nR^6$ 或任何可生物水解的基团；

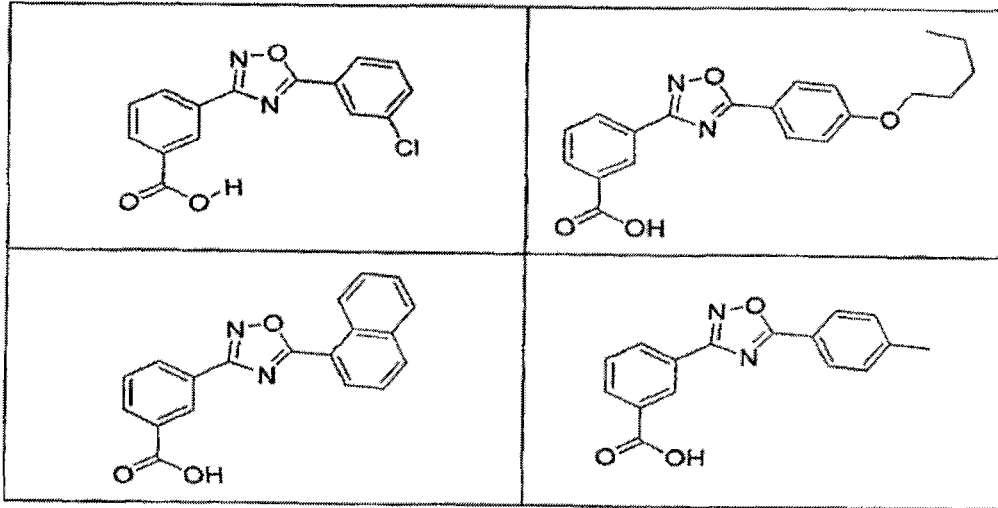
R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 独立为氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基；取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、烷氧基、芳氧基、杂芳氧基、卤素、 CF_3 、 OCF_3 、 $OCHF_2$ 、 CN 、 $COOH$ 、 $COOR^7$ 、 SO_2R^7 、 NO_2 、 NH_2 或 $N(R^7)_2$ ；

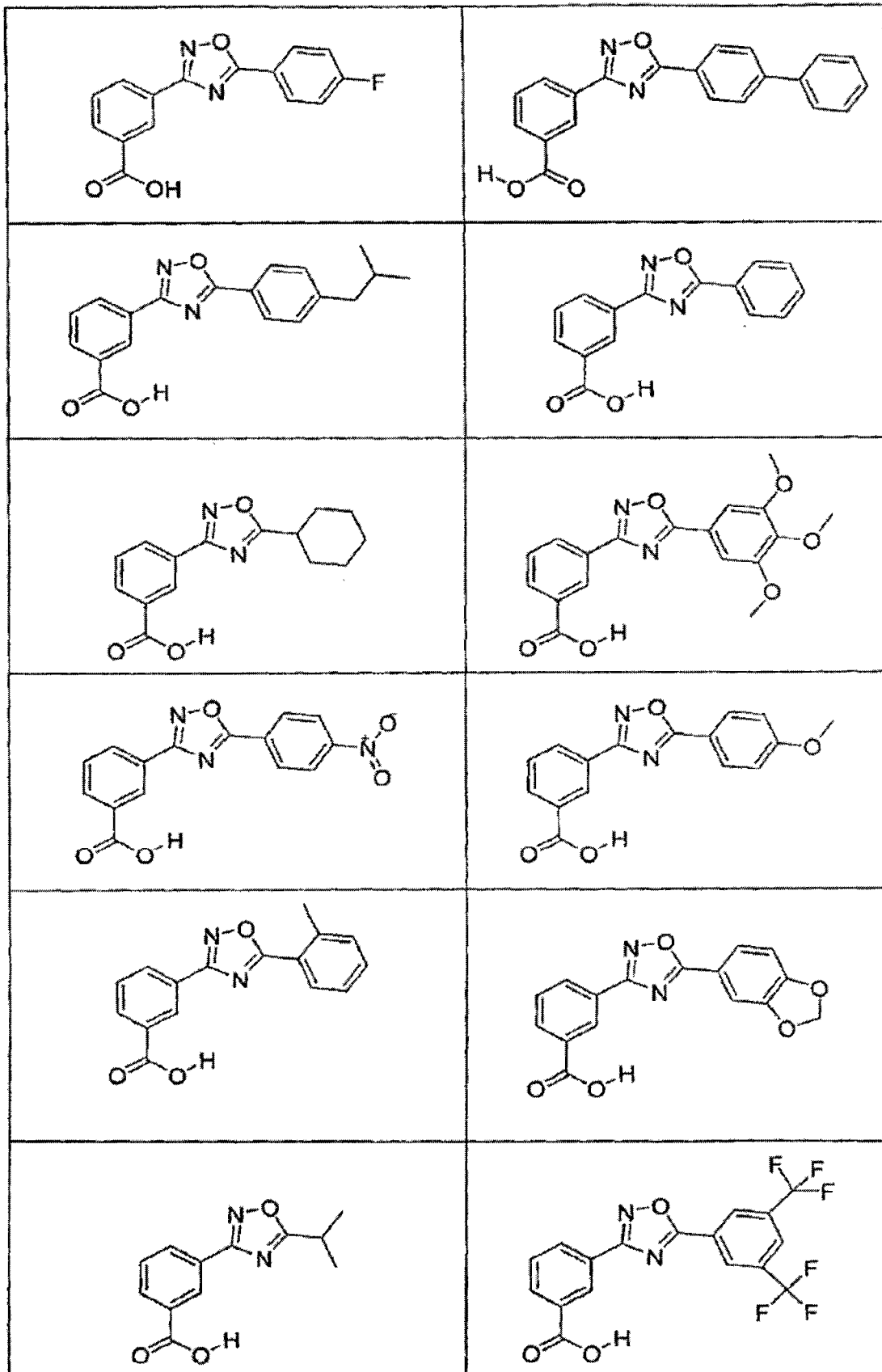
各情况下 R^7 独立为氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基；取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基；烷氧基；芳氧基；杂芳氧基、卤素或 CF_3 ；且

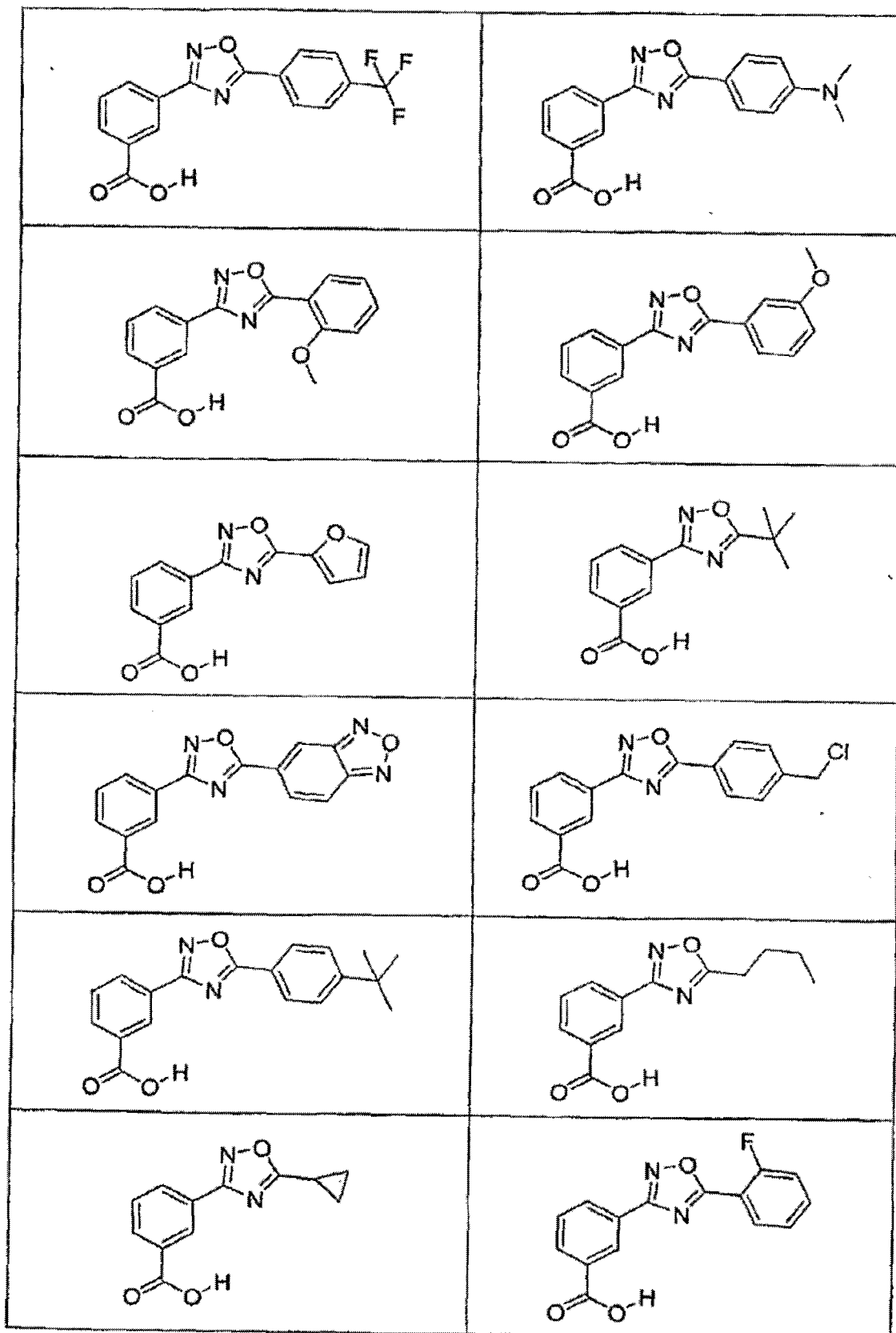
n 为介于 1 至 7 的整数；

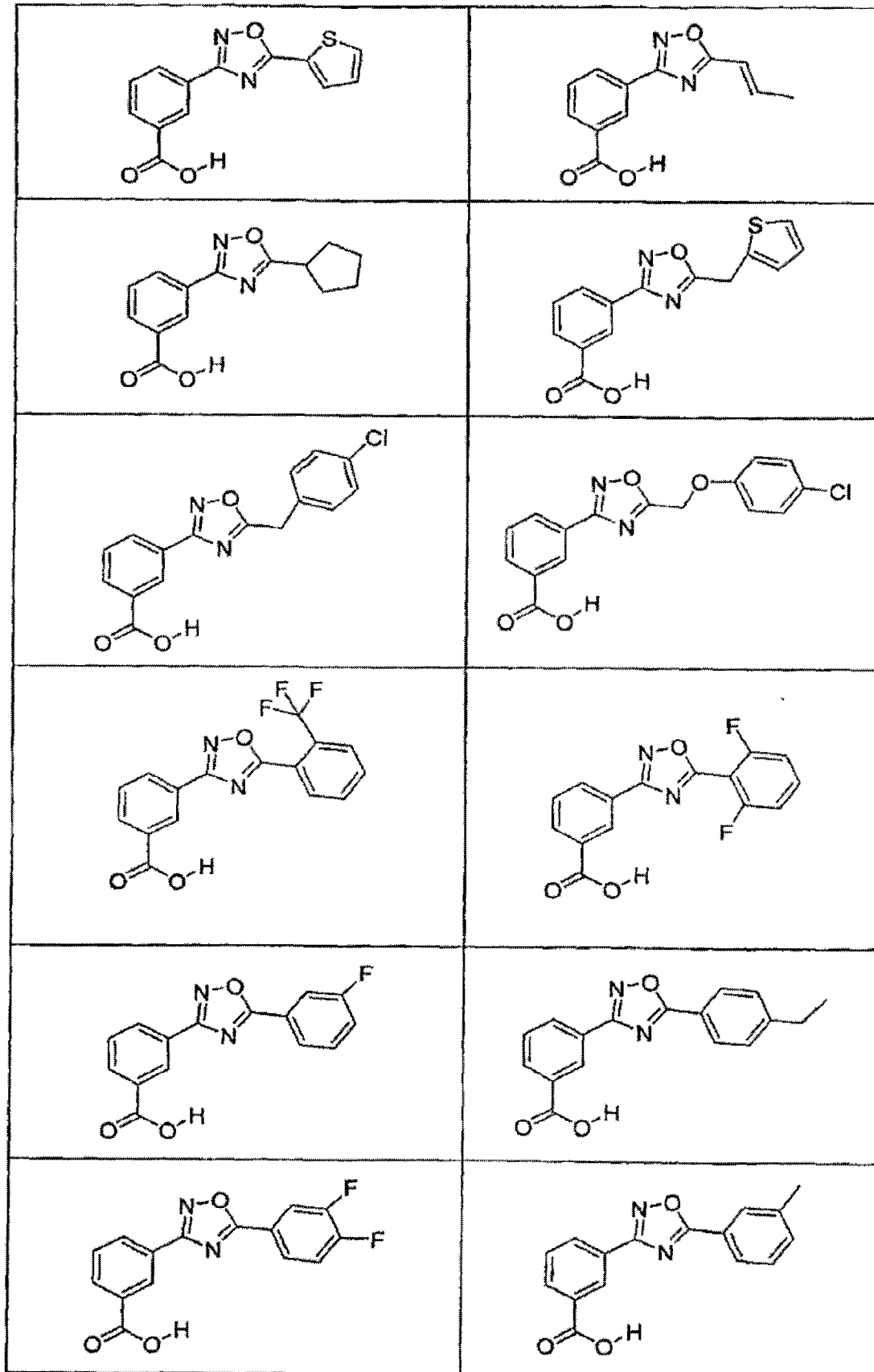
优选的式 IV 的化合物列于下表 4。

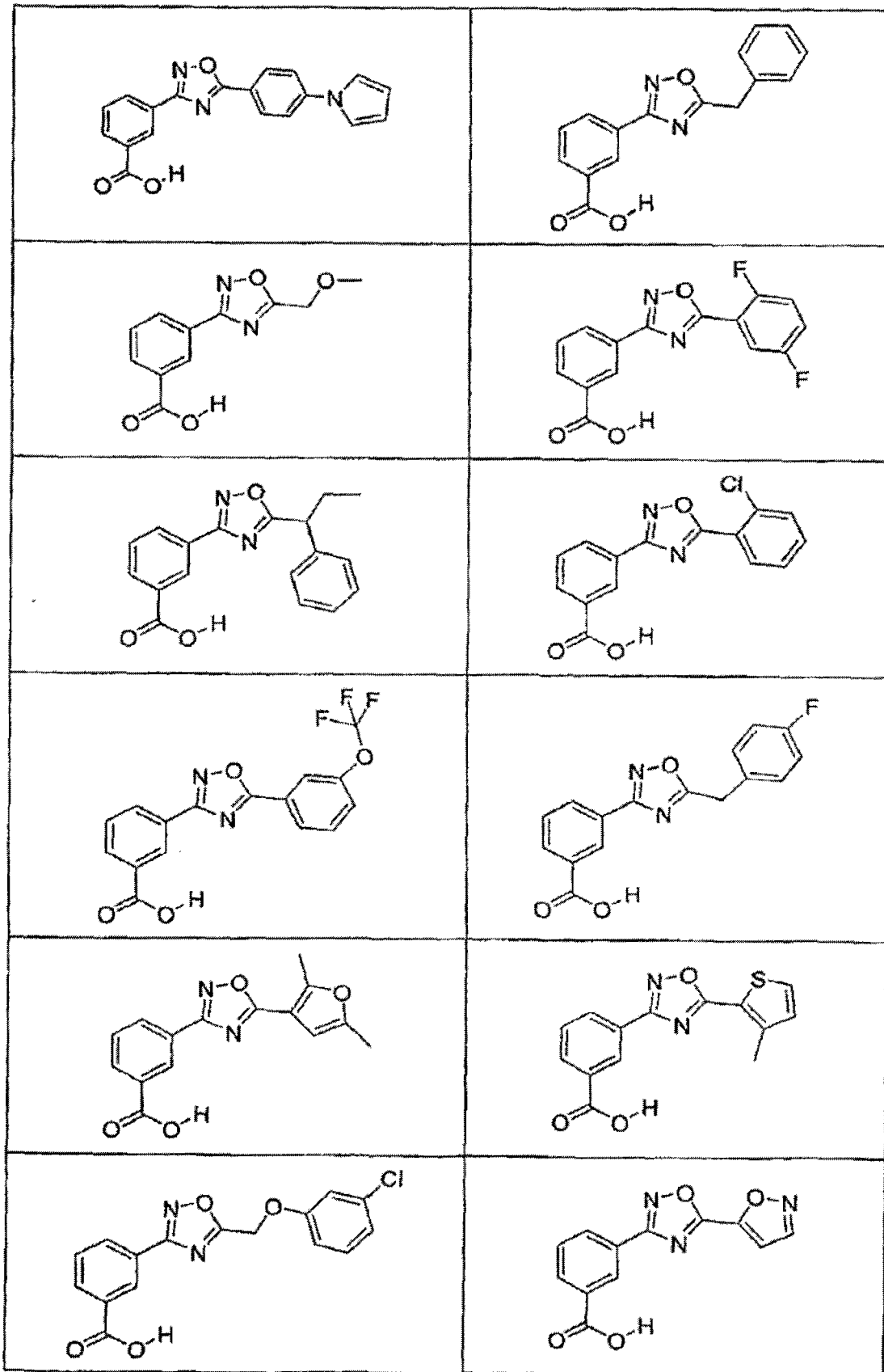
表 4

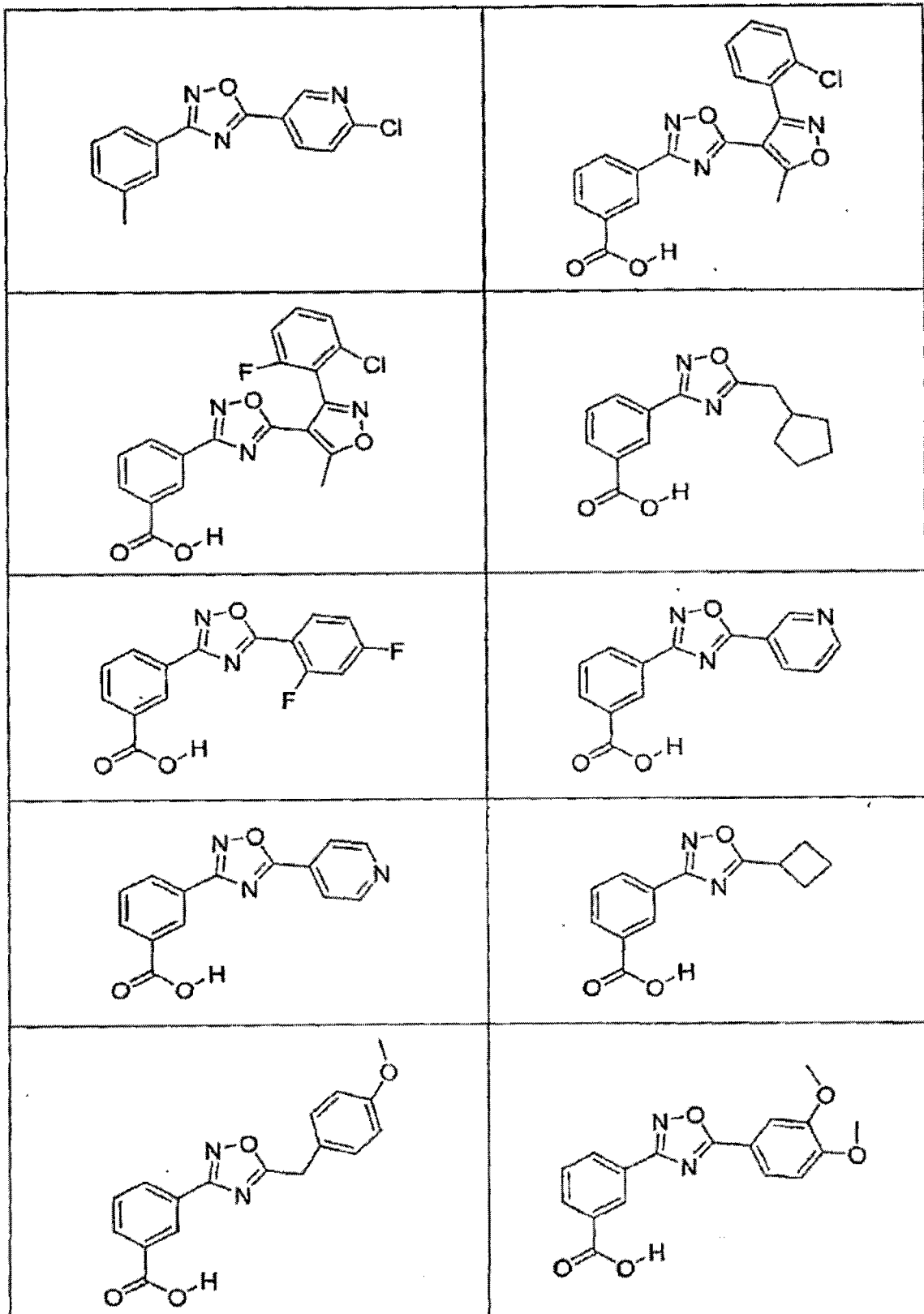


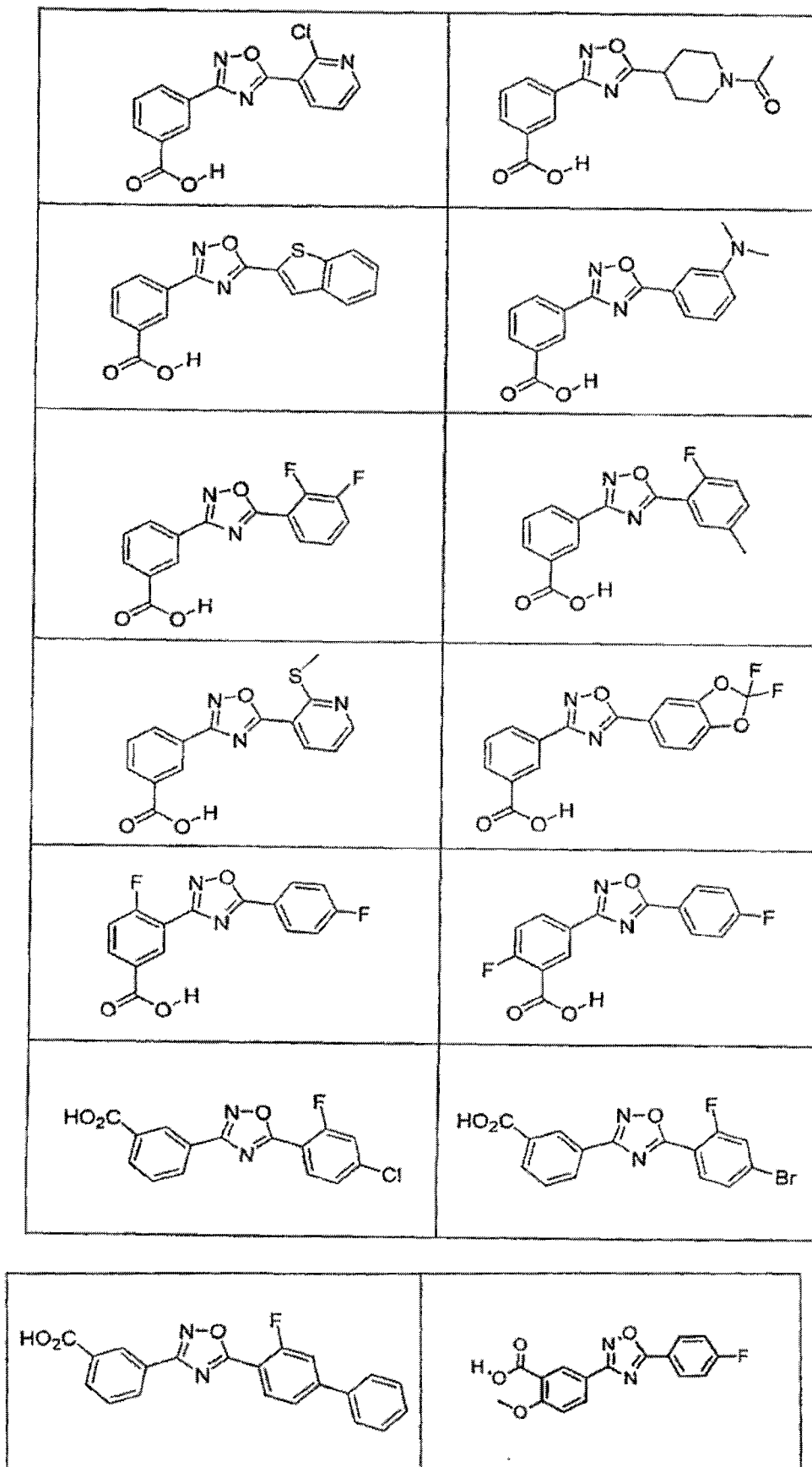


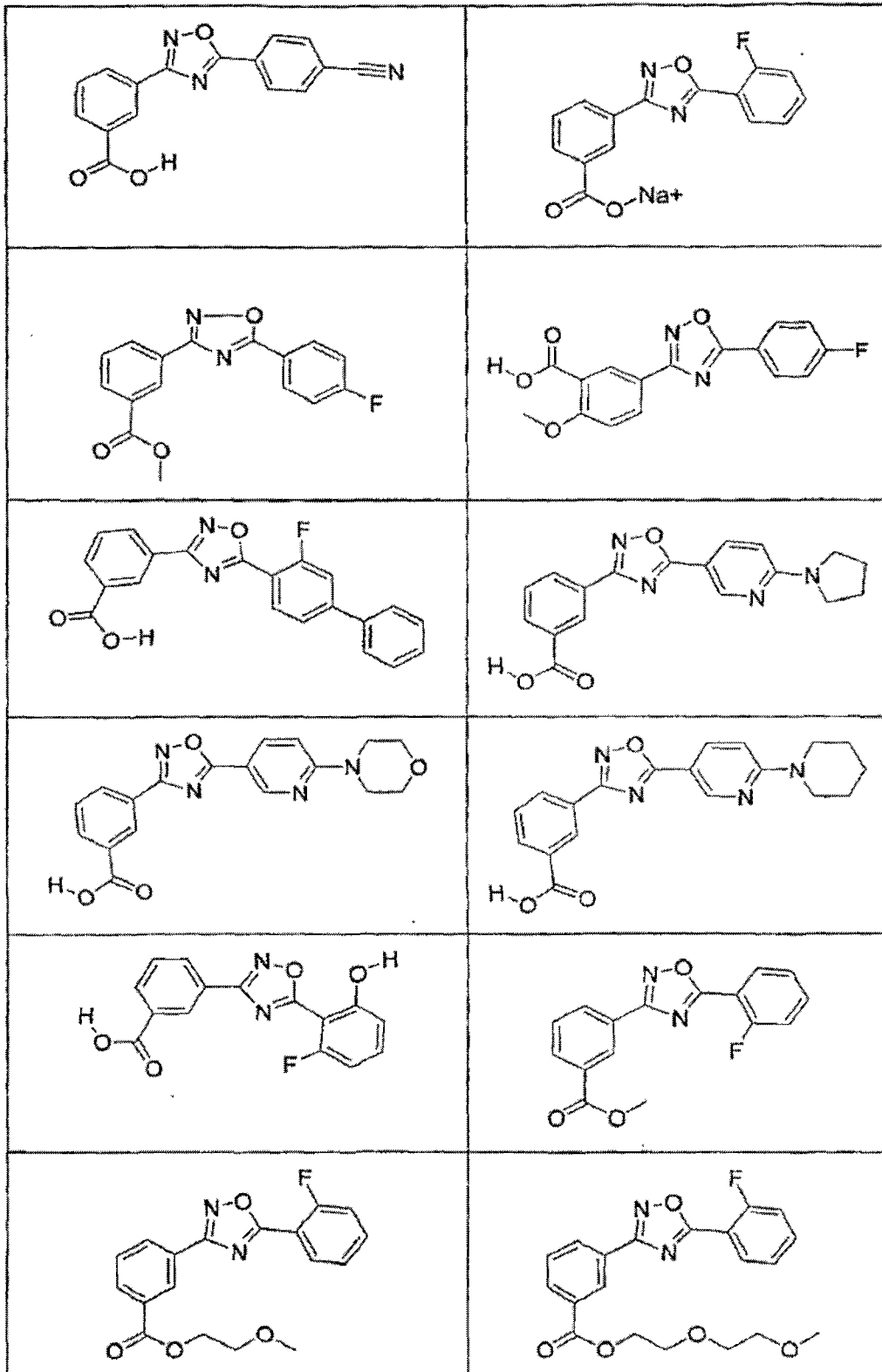


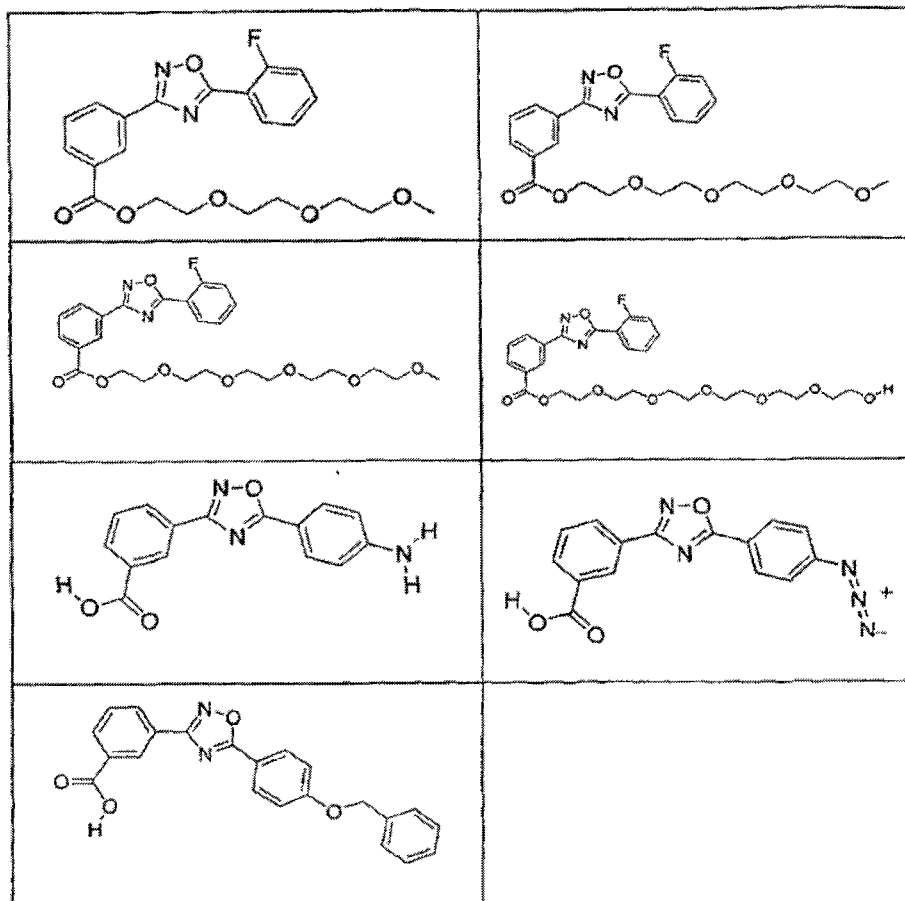








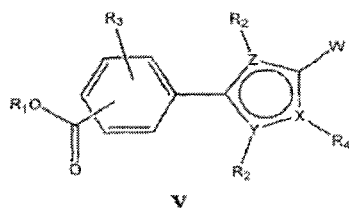




式 IV 的化合物可通过标准的、公知的合成方法获得, 该类方法可参见, 例如, March, J. *Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms and Structure*, 第 4 版, 1992。因此, 可用于制备具式 IV 的化合物的起始材料和中间体可从市场购得, 或可由商业途径购得的材料采用已知的合成方法和试剂制备得到。

制备式 IV 的化合物的具体方法在 2004 年 10 月 14 日公开的 US 2004-0204461 A1 中有公开, 其全文在此引用作为参考。

在另一实施方式中, 该无义密码子抑制剂为式 V 的化合物:



或其药学上可接受的盐、水合物、包合物、前药、多晶型、立体异构体，立体异构体包括对映体、非对映体、外消旋体或立体异构体的混合物，其中：

X、Y 和 Z 独立地选自 N、S、O 和 C，其中 X、Y 或 Z 中至少一个为杂原子；

R₁ 为氢、C₁-C₆ 烷基、或 Na⁺、或 Mg²⁺；

R₂ 独立地为缺失；氢；-CH=N-OH 基团；氰基基团；C₁-C₆ 烷基，其任选地被羟基基团取代；羰基基团，其任选地被氢、羟基或 C₁-C₄ 烷氧基取代；

R₃ 独立地为缺失、卤素、羟基、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₄ 烷氧基或硝基基团；

R₄ 独立地为缺失、氢、C₁-C₆ 烷基，或与 W 一起时，R₄ 可以是键，且 W 与 R₄ 和 W 所连接的杂环形成一个十一至十三元杂三环的环状结构；

W 选自：

(a) C₂-C₆ 炔基，其任选地被苯基取代；

(b) C₁-C₈ 直链或支链烷基，其任选地被一个或多个独立选择的如下的基团取代：C₁-C₆ 烷基；卤素；-C(=O)-NH-苯基，其中苯基任选地被一个或多个独立选择的卤素或 C₁-C₄ 烷基的基团取代；五至六元杂环；C₆-C₈ 芳基，其任选地被一个或多个独立地选自羟基、卤素、C₁-C₄ 烷基、C₁-C₄ 卤烷基、C₁-C₄ 烷氧基或任选地被一个或多个 C₁-C₄ 烷基取代的氨基的基团取代；芳氧基，其任选地被一个或多个独立选择的如下的基团取代：羟基、卤素、C₁-C₄ 烷基基团、C₁-C₄ 卤烷基基团、C₁-C₄ 烷氧基基团或任选地被一个或多个 C₁-C₄ 烷基基团取代的氨基基团；

(c) C₂ 至 C₈ 烯基；

(d) C₃-C₈ 环烷基，任选地被 C₁-C₆ 烷基取代；

(e) C₆-C₈ 芳基, 其任选地被一个或多个独立选择的如下的基团取代: 羟基; 卤素; C₁-C₄ 直链或支链烷基, 其任选地被一个或多个独立选择的卤素或羟基的基团取代; C₁-C₄ 烷氧基, 其任选地被一个或多个独立选择的卤素或苯基的基团取代; C₃-C₈ 环烷基, 其任选地被一个或多个独立选择的 C₁-C₄ 烷基的基团取代; C₆-C₈ 芳基, 其任选地被一个或多个独立选择的 C₁-C₄ 烷基的基团取代; 芳氧基, 其任选地被一个或多个独立选择的如下的基团取代: 羟基、卤素、C₁-C₄ 烷基基团、C₁-C₄ 卤烷基基团、C₁-C₄ 烷氧基基团、或被一个或多个 C₁-C₄ 烷基基团任选地取代的氨基基团; 五至六元杂环, 其任选地被一个或多个独立选择的如下的基团取代: C₁-C₄ 烷基、氧代、或任选地被独立地选自如下的基团取代的 C₆-C₈ 芳基: 羟基、卤素、C₁-C₄ 烷基基团、C₁-C₄ 卤烷基基团、C₁-C₄ 烷氧基基团、或被一个或多个独立选择的 C₁-C₄ 烷基基团任选地取代的氨基基团; 萘基基团, 其任选地被氨基或氨烷基或烷氧基基团取代; -C(O)-NR_xR_y 基团; -C(O)-R_x 基团; 异吲哚-1,3-二酮基团; 硝基基团; 氰基基团; -SO₃H 基团; 烷硫基基团; 烷基磺酰基基团; -NR_x-C(O)-R_z 基团; -NR_xR_y 基团; -NR_x-SO₂-R_z 基团; -NR_x-C(O)-NR_xR_y 基团; -NR_x-C(O)O-R_z 基团;

(f) C₁₀-C₁₄ 芳基基团, 其任选地被一个或多个独立选择卤素、氨基基团或氨烷基基团、或烷氧基基团取代;

(g) -C(O)-NR_xR_y 基团;

(h) 五或六元杂环, 其任选地被一个或多个独立选择的如下的基团取代: 氧代基团; 卤素; C₁-C₄ 烷基基团; C₁-C₄ 烷氧基基团; C₁-C₄ 卤烷基基团; C₁-C₄ 卤烷氧基基团; 芳氧基基团; -NR_xR_y 基团; 烷硫基基团; -C(O)-R_x

基团；或 C_6 至 C_8 芳基基团，其任选地被一个或多个独立选择的卤素、 C_1 - C_4 烷基基团、 C_1 - C_4 烷氧基基团取代；

(i) 具有二至三个环状结构的杂环基团，其任选地被一个或多个独立选择的卤素、氧代基团、 C_1 - C_4 烷基基团、 C_1 - C_4 卤烷基基团、或 C_1 - C_4 烷氧基基团取代；

(j) 或 W 与 R_4 (包括当 R_4 是一个键时)，和 R_4 和 W 所连接的杂环一起形成一个十一至十三元杂-三环的环状结构；

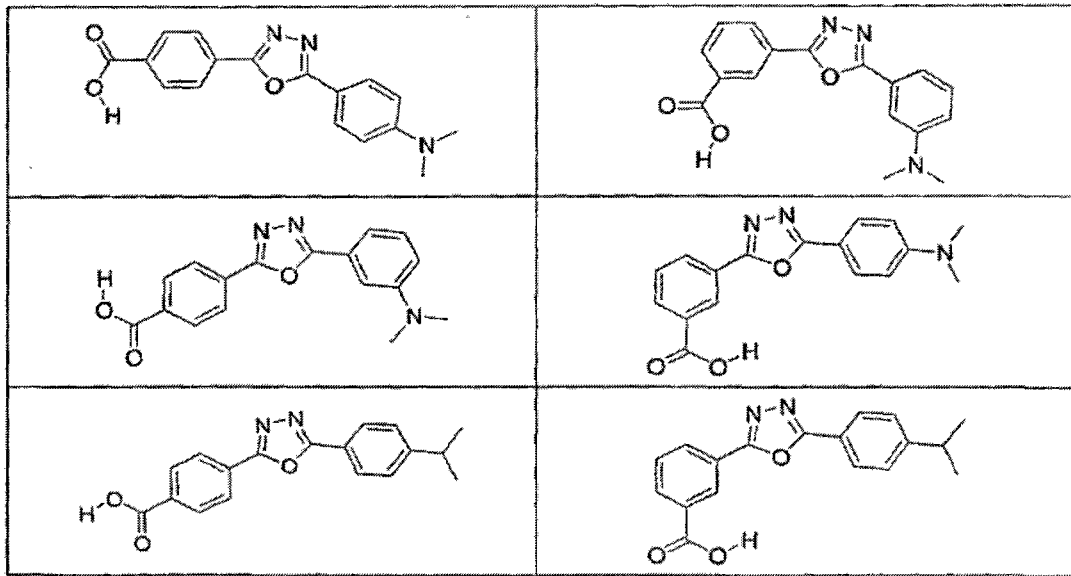
其中 R_x 为氢、 C_1 - C_6 烷基基团，或 R_x 和 R_y 以及它们所连接的原子一起形成四至七元碳环或杂环；

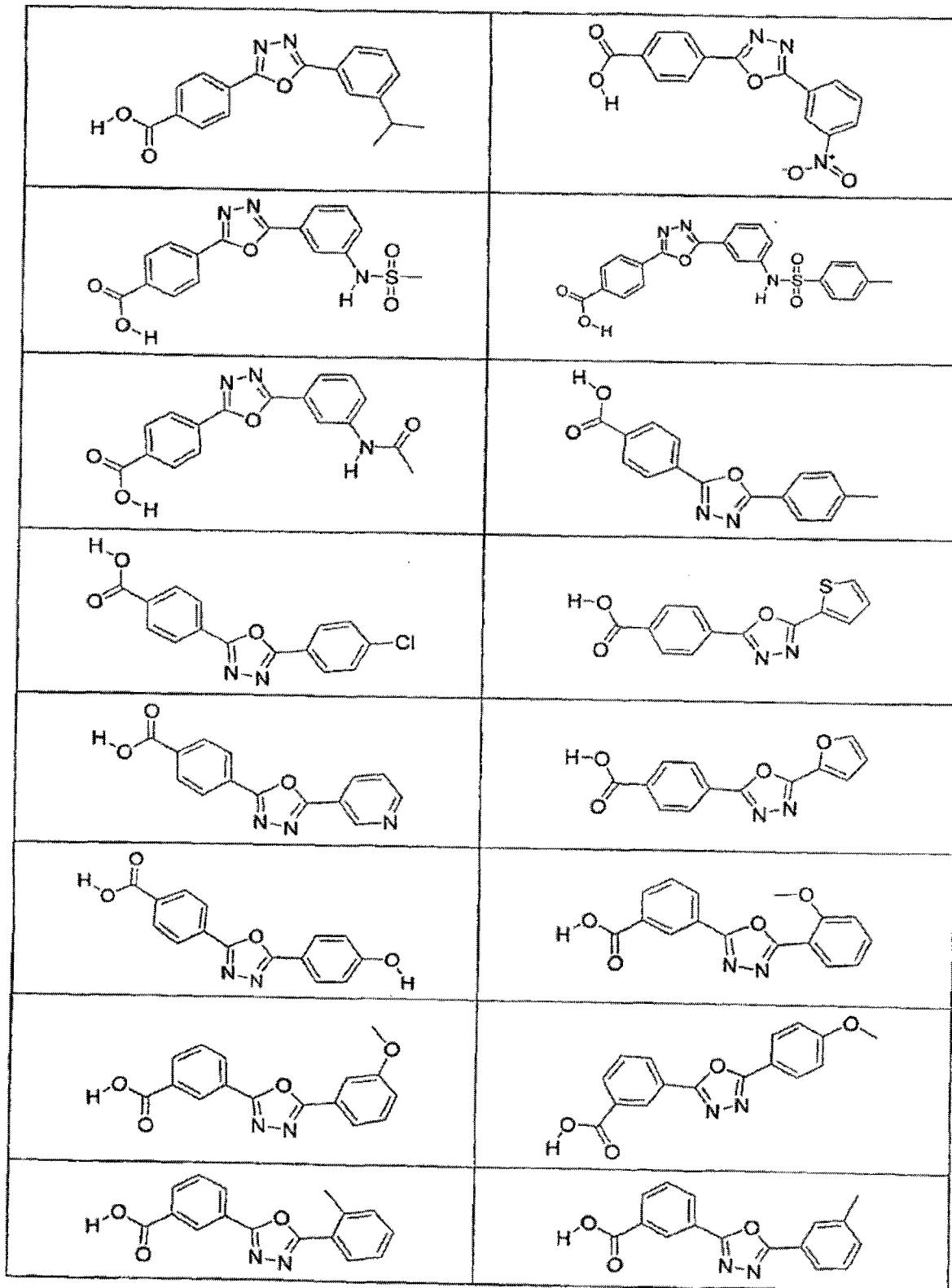
R_y 为氢、 C_1 - C_6 烷基基团；任选地被一个或多个独立地选择的 C_1 - C_4 烷基基团取代的芳基基团，或 R_x 和 R_y 与它们所连接的原子一起形成四至七元碳环或杂环；和

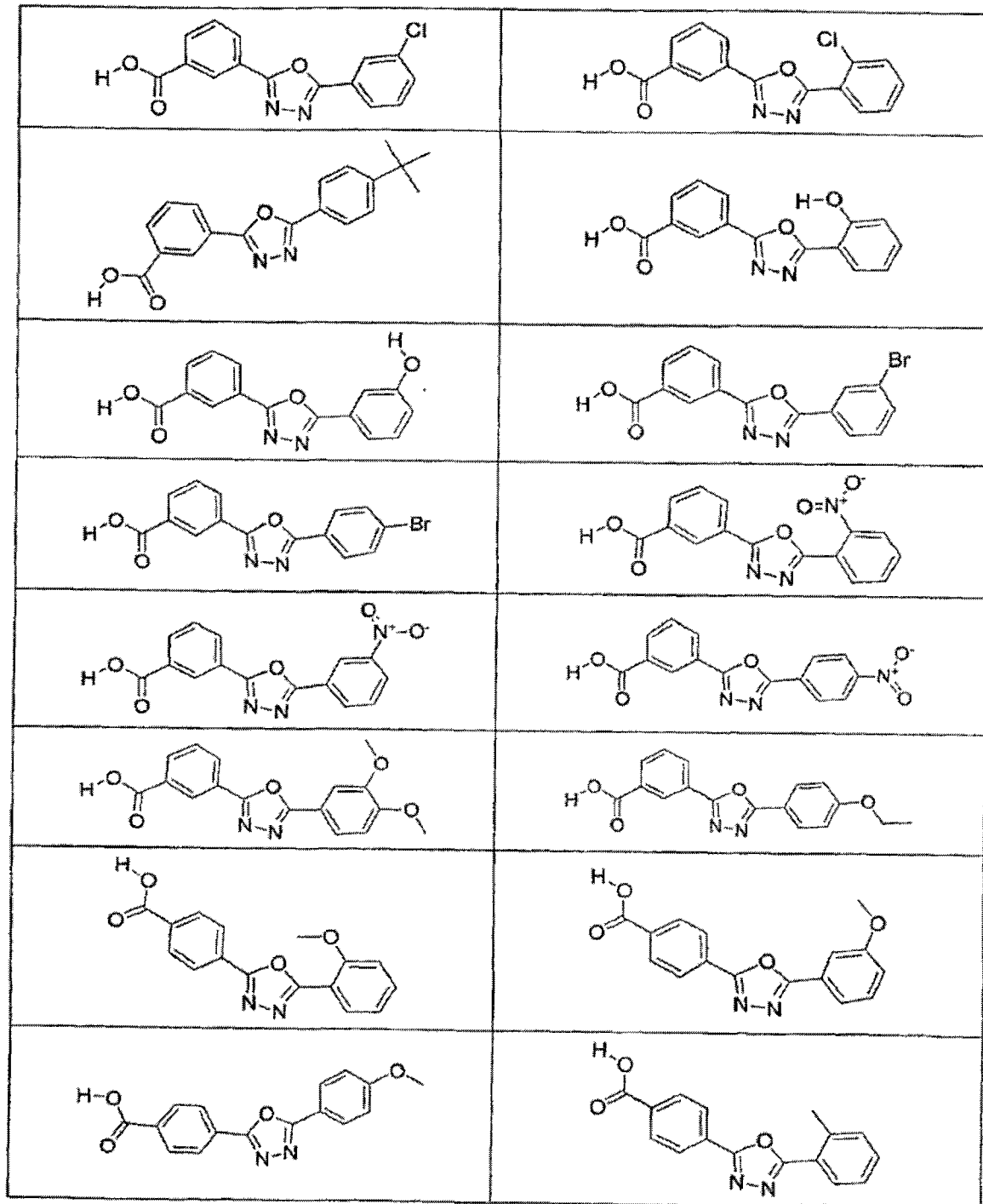
R_z 为 C_1 - C_6 烷基，其任选地被芳基或卤素取代；或芳基，其任选地被卤素、 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_6 烷氧基取代。

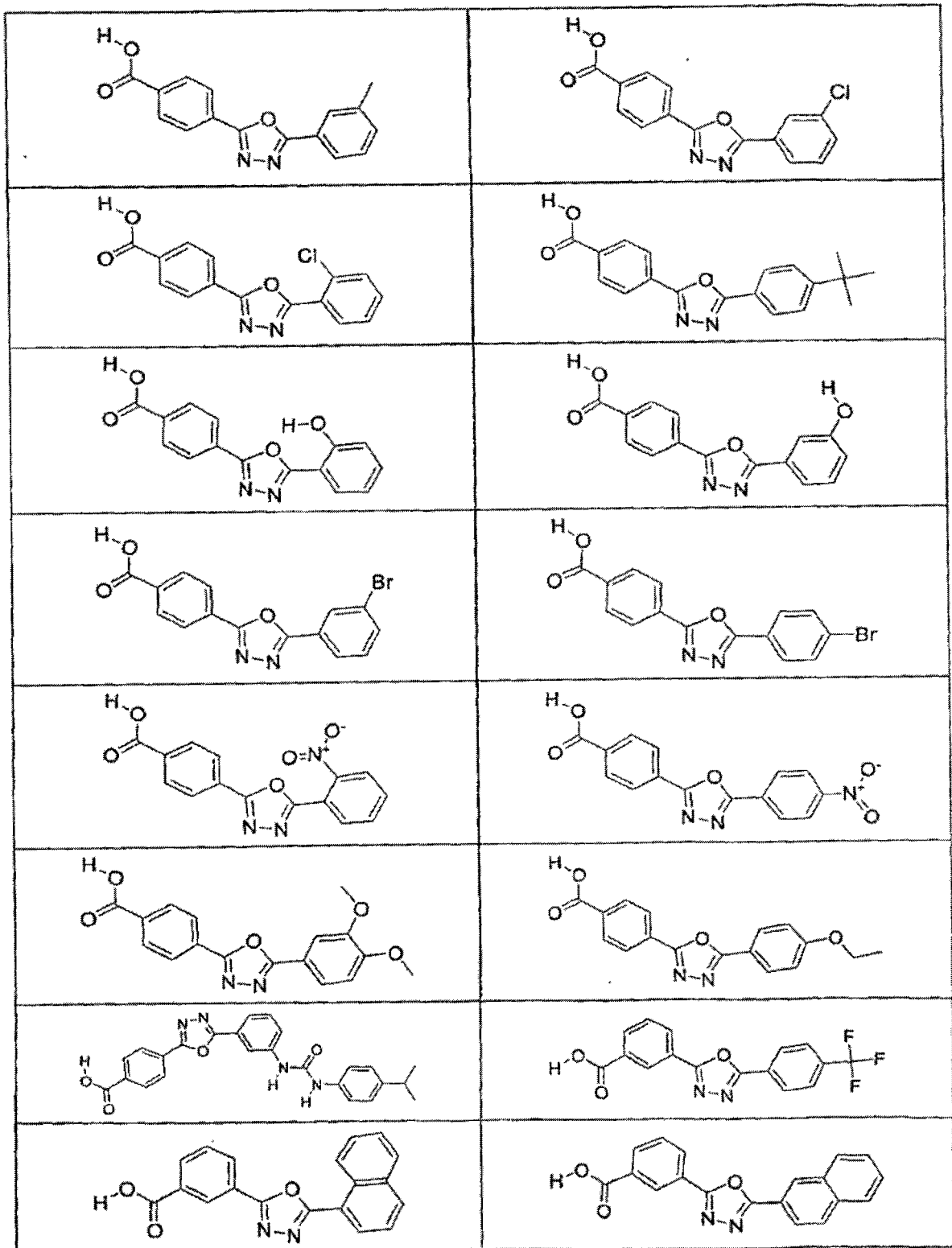
优选的式 V 的化合物列于下表 5。

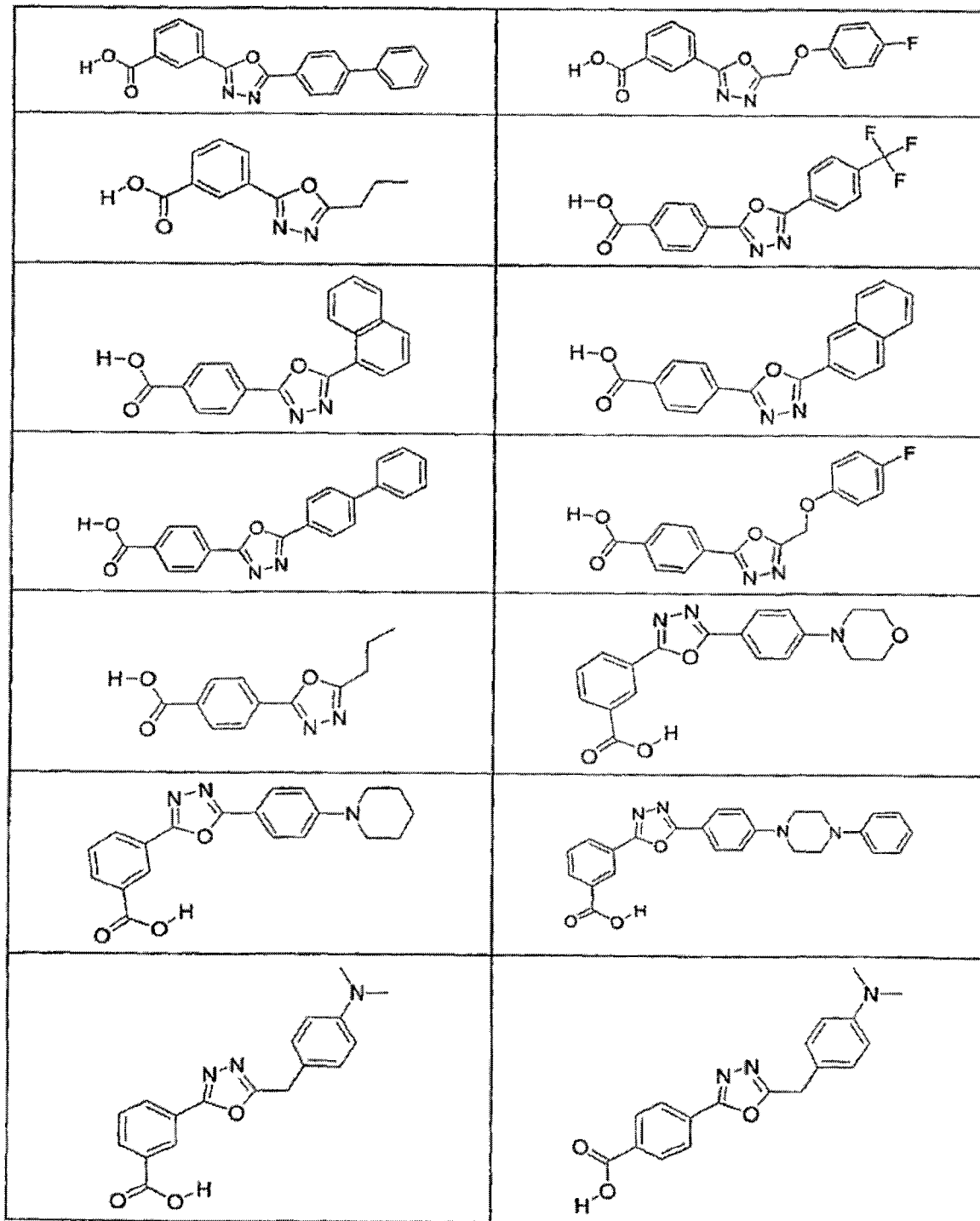
表 5

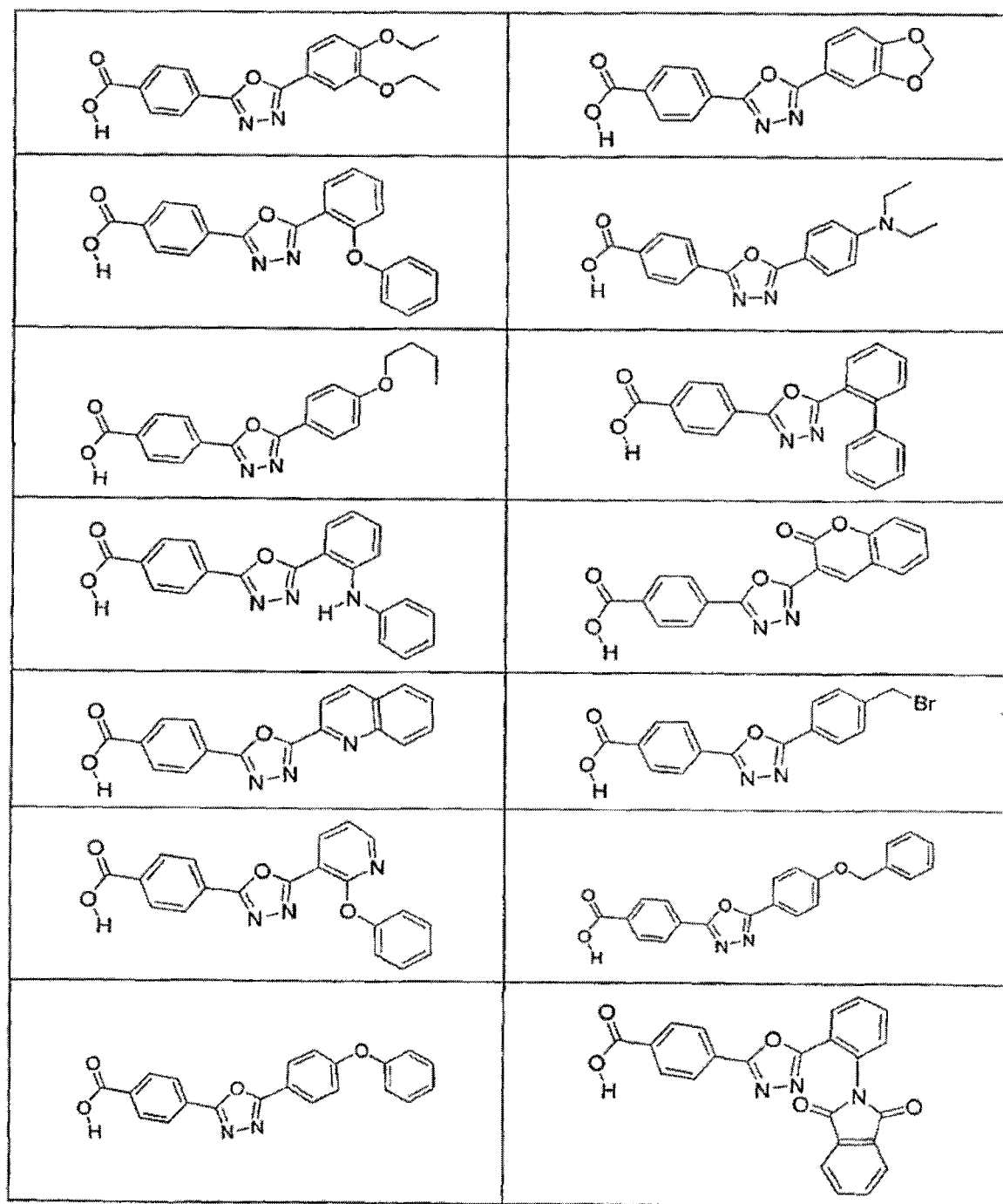


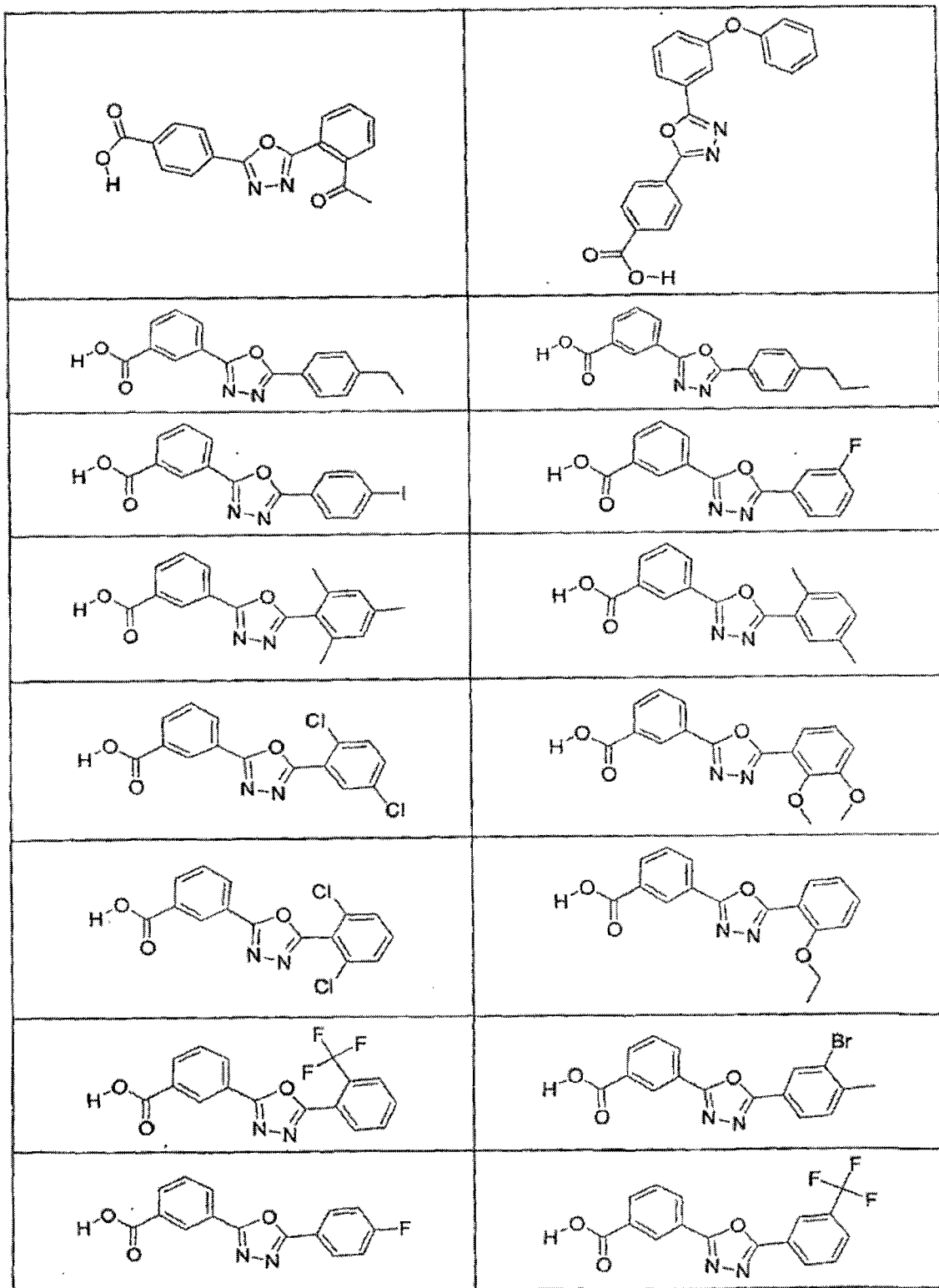


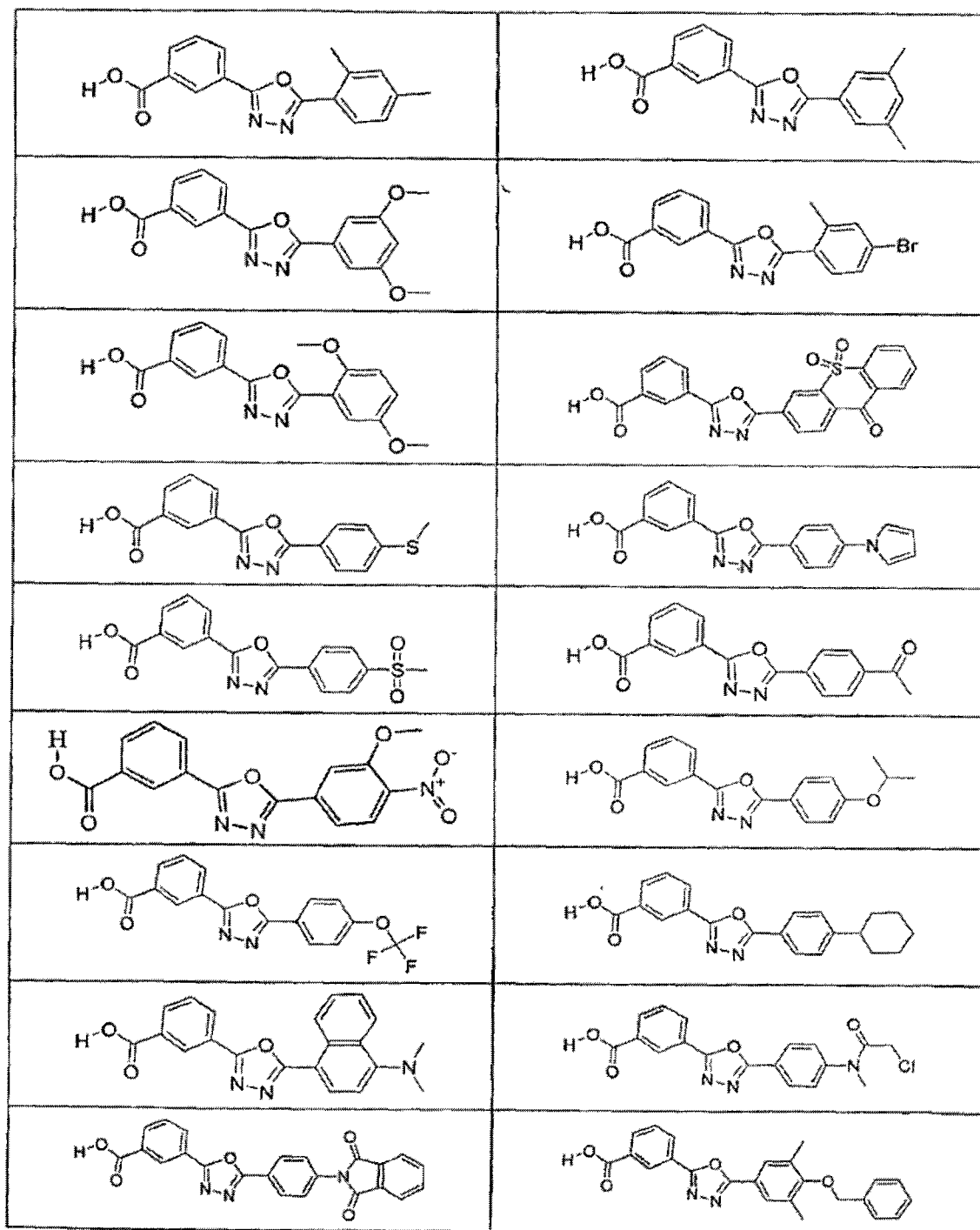


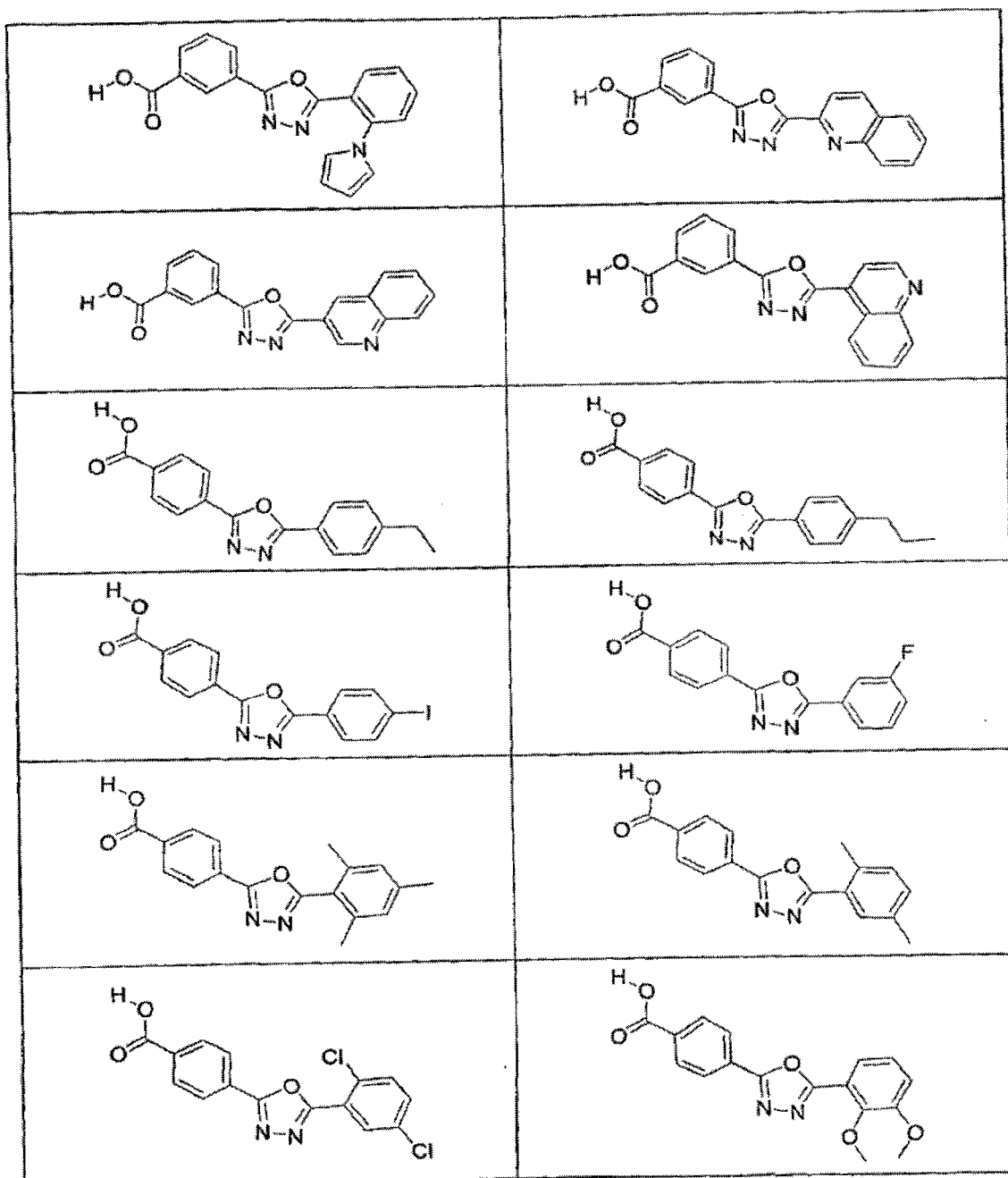


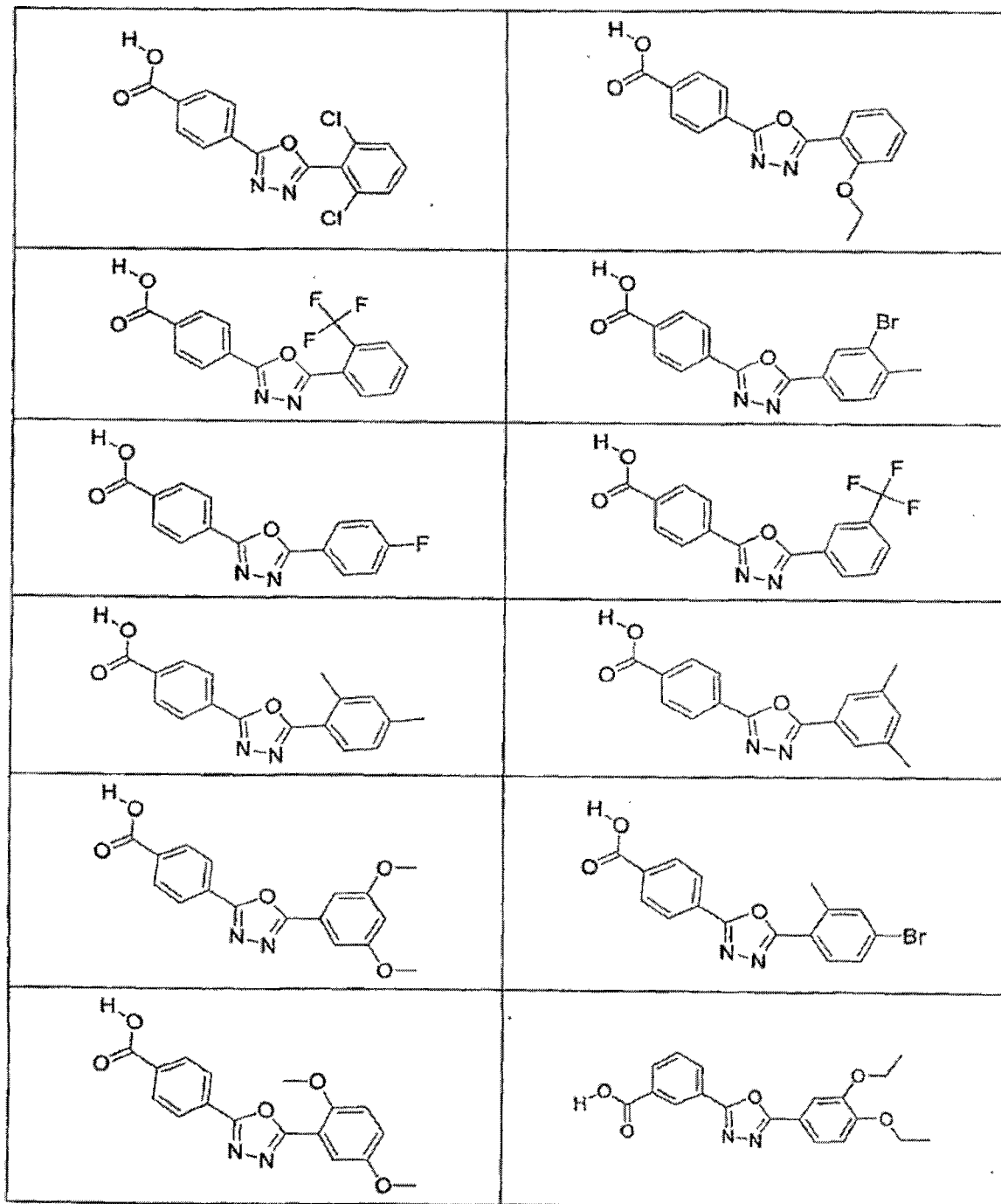


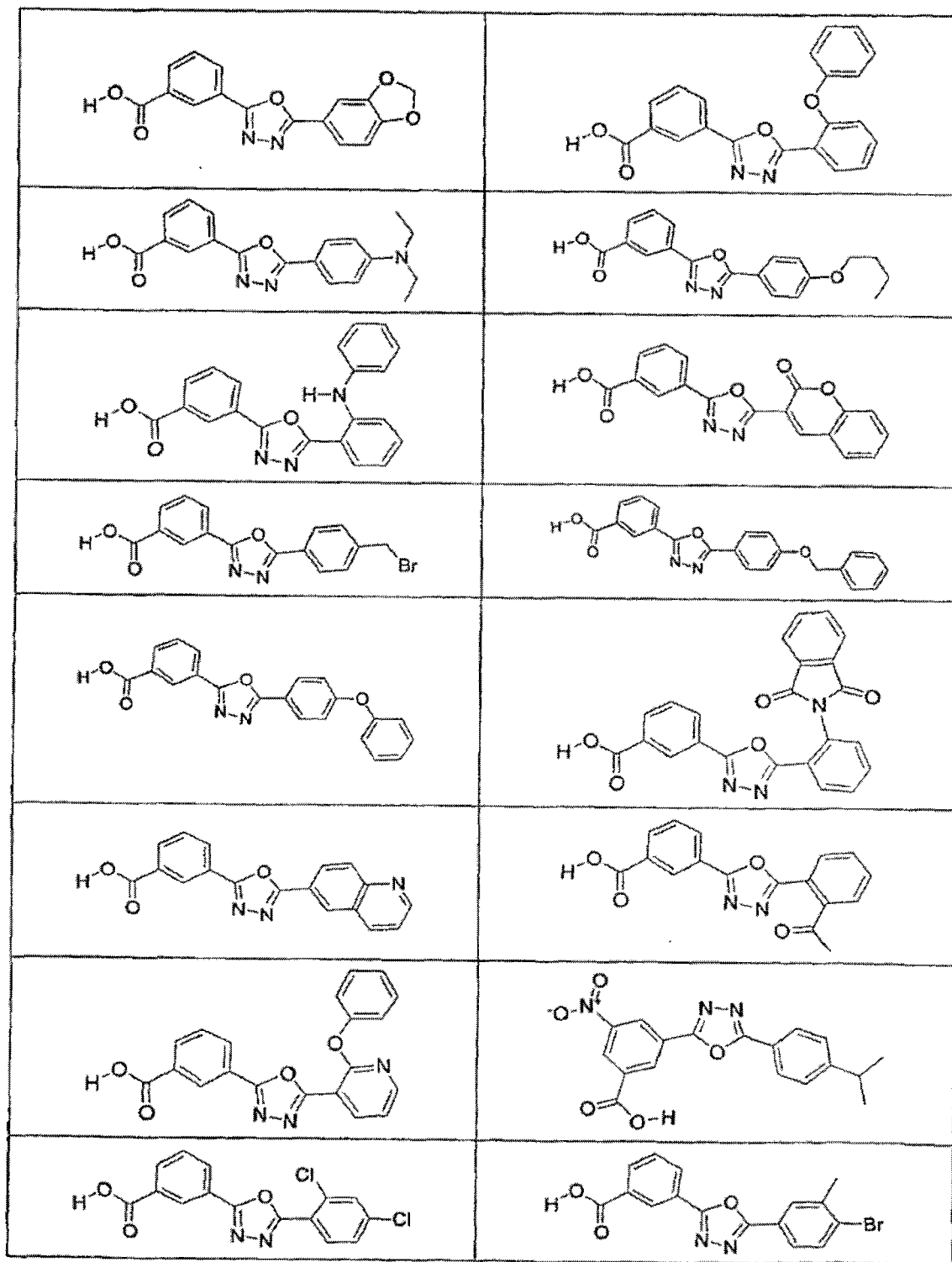


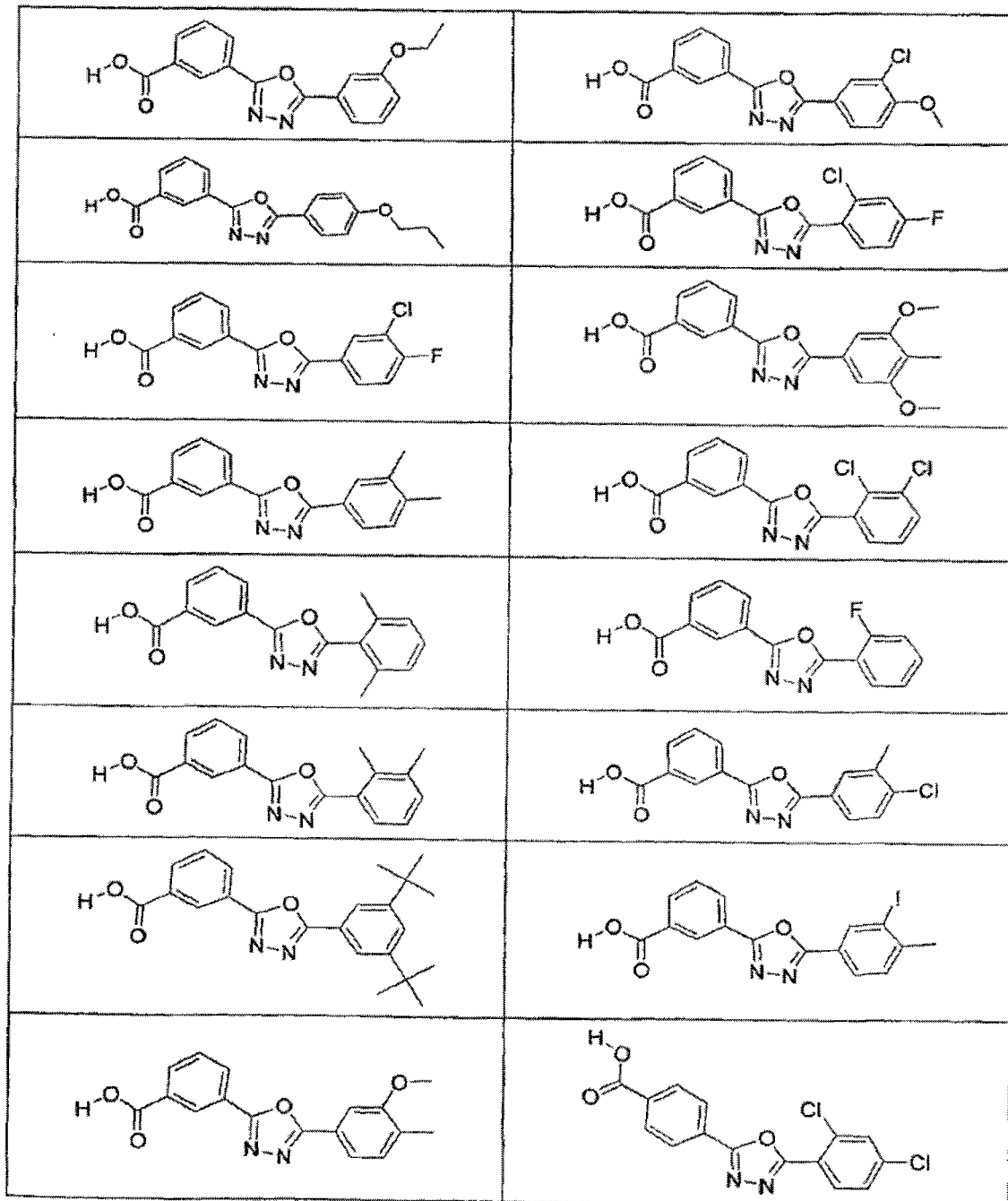


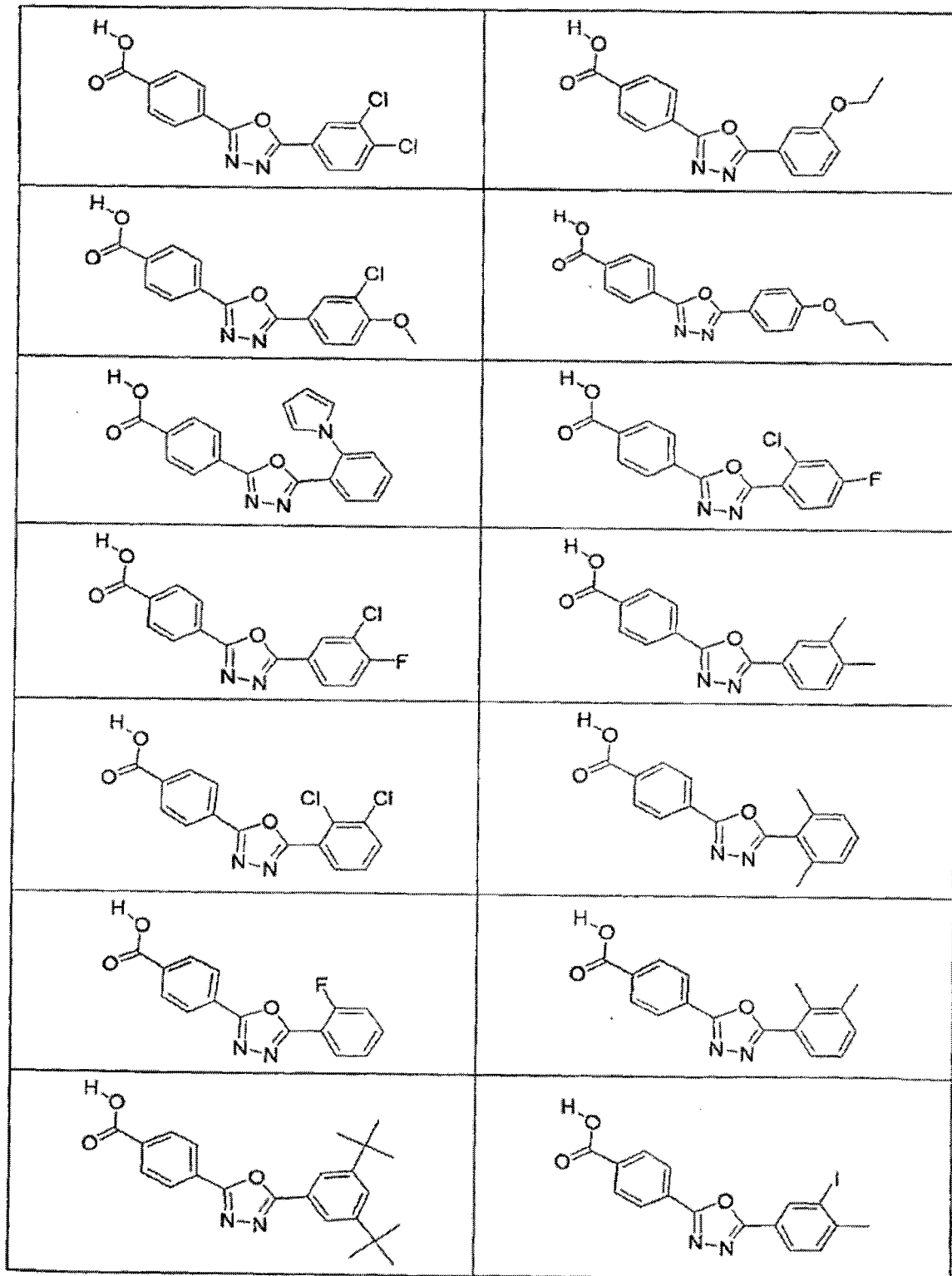


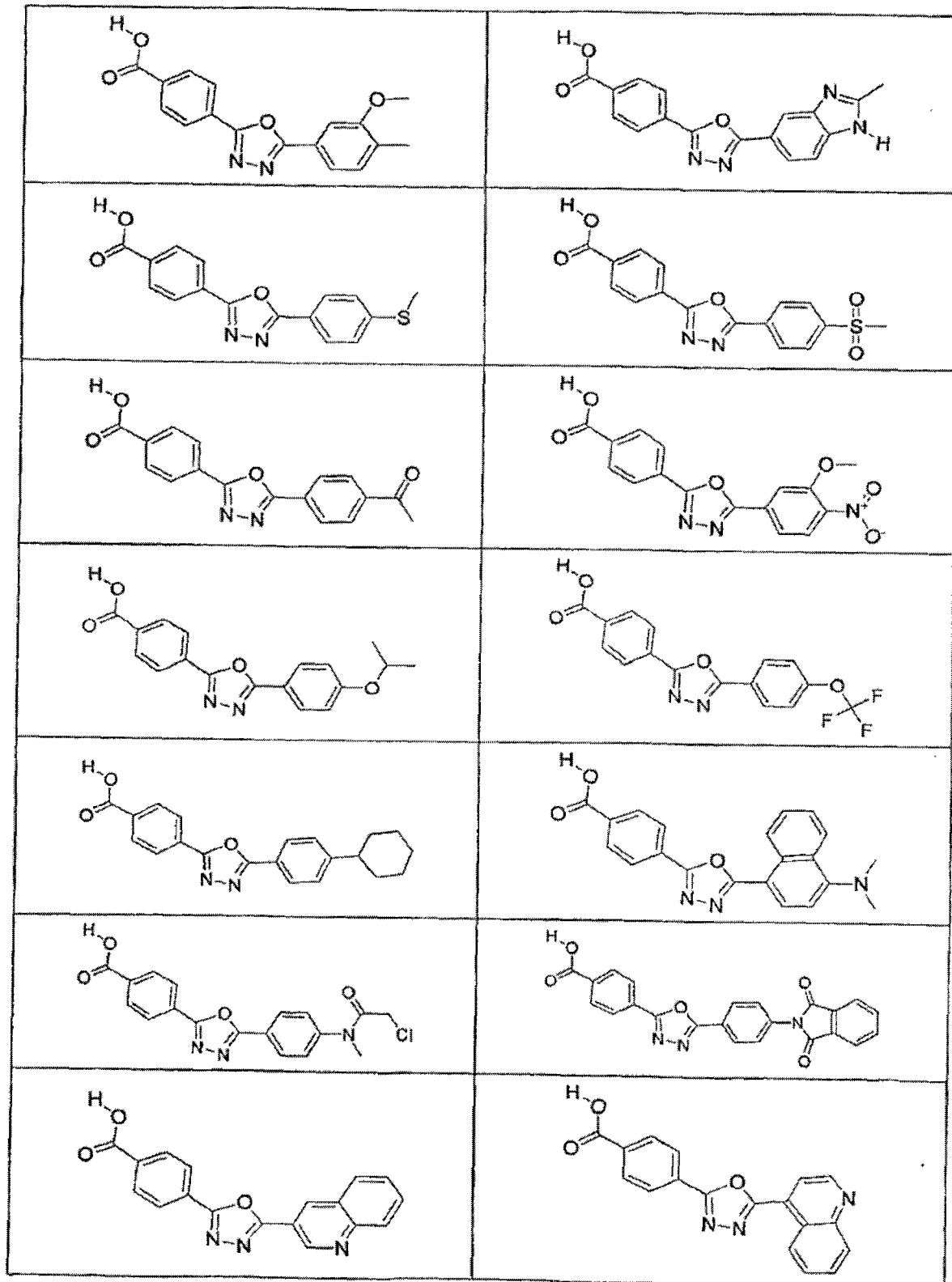


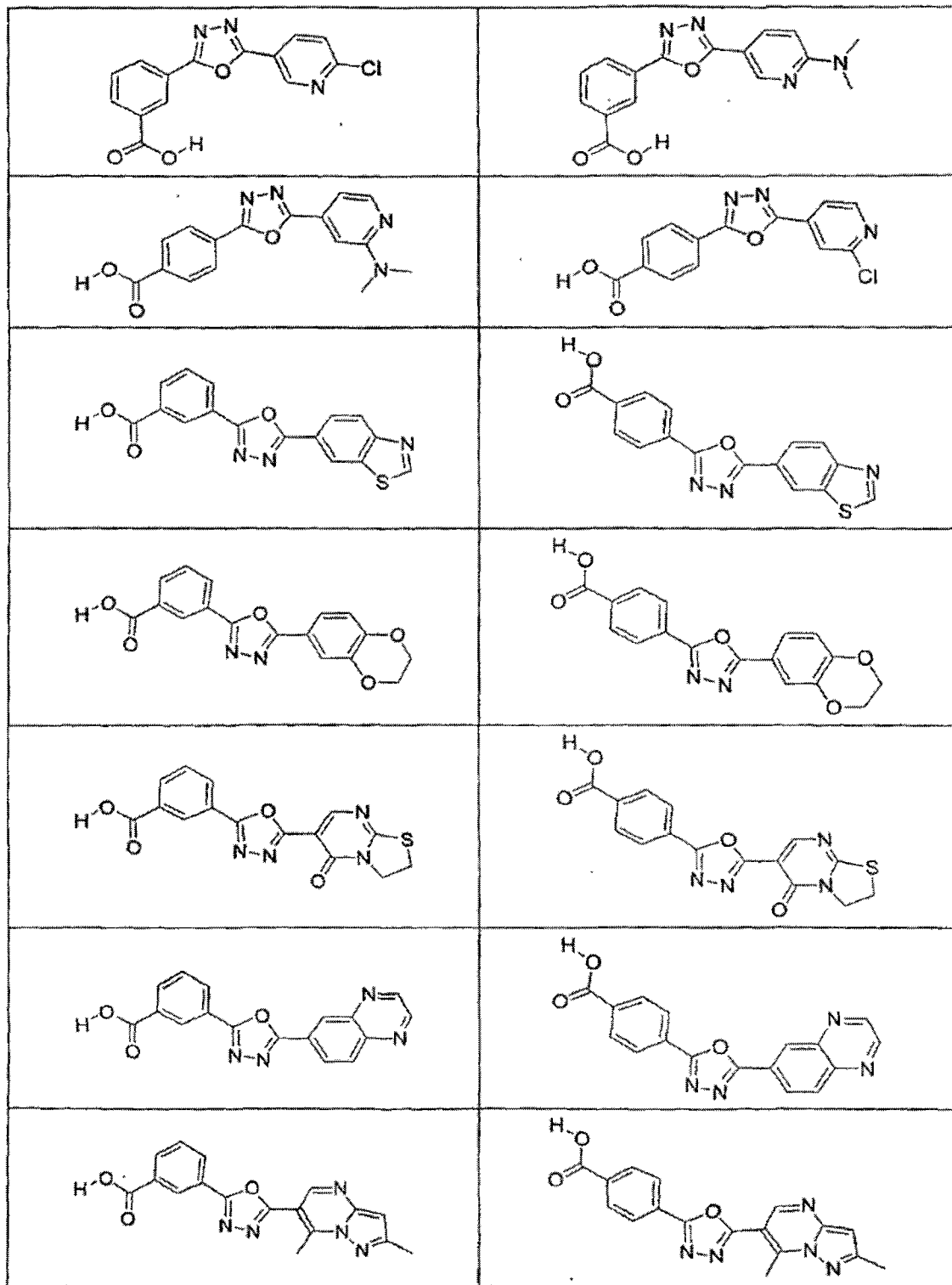


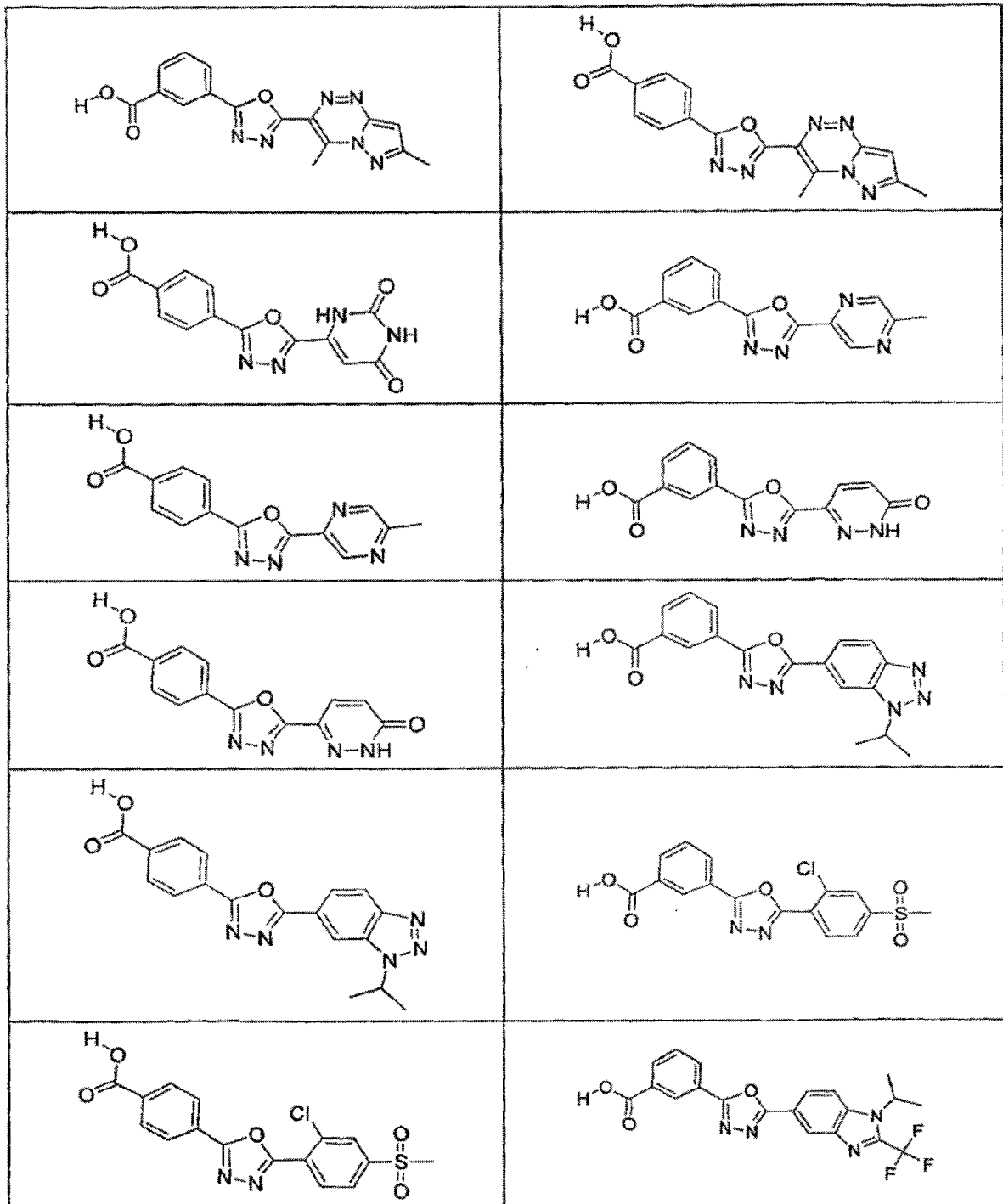


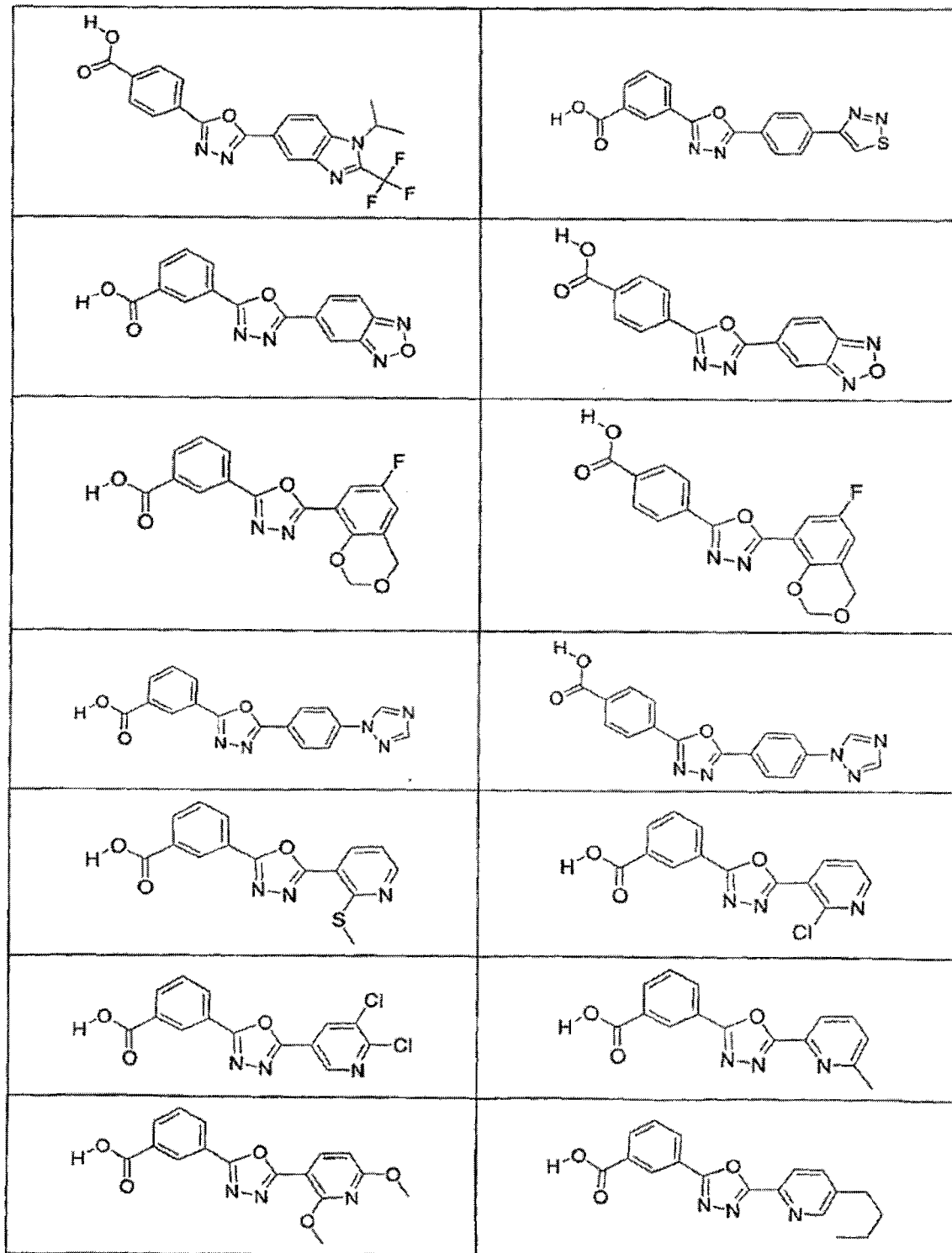


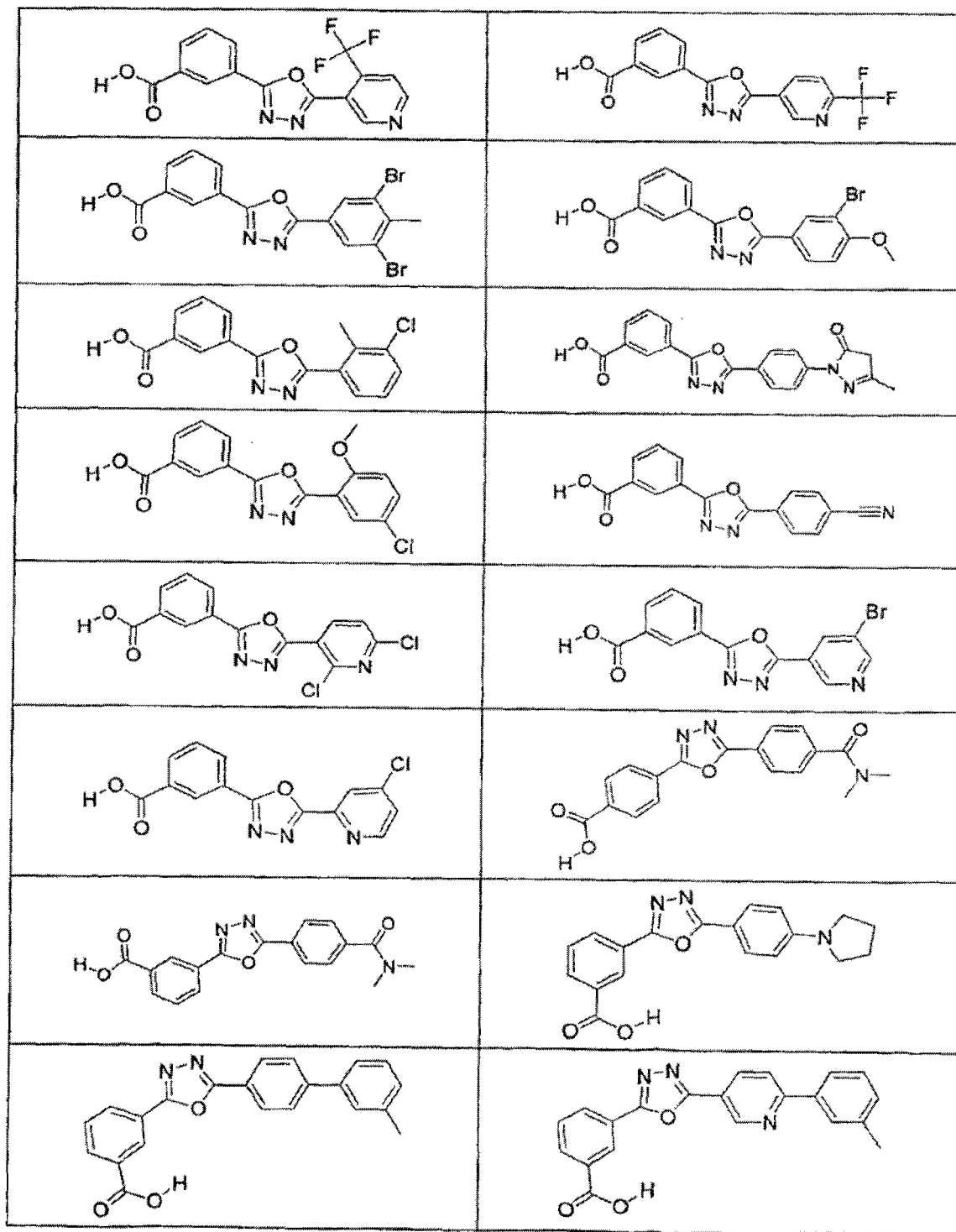


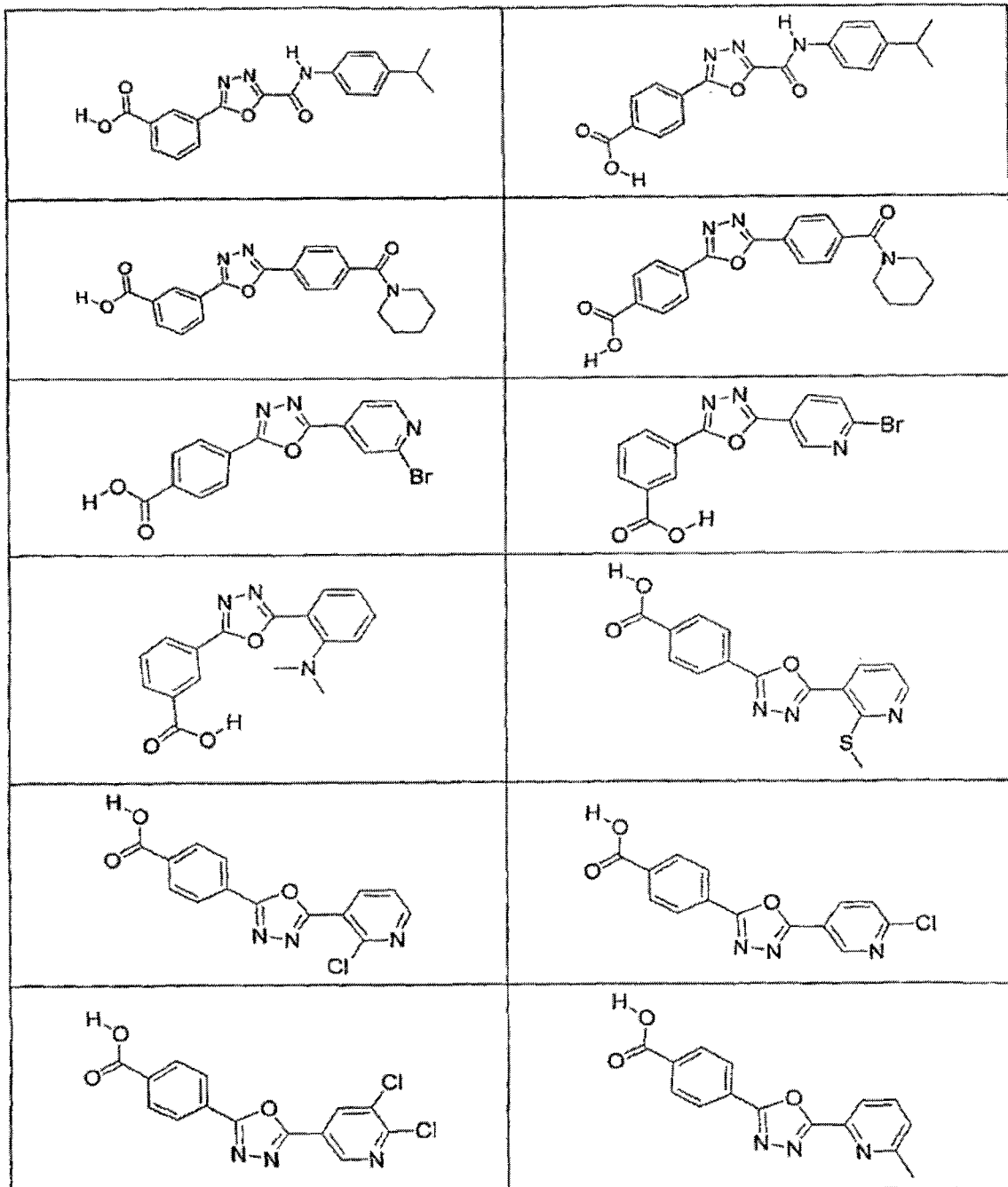


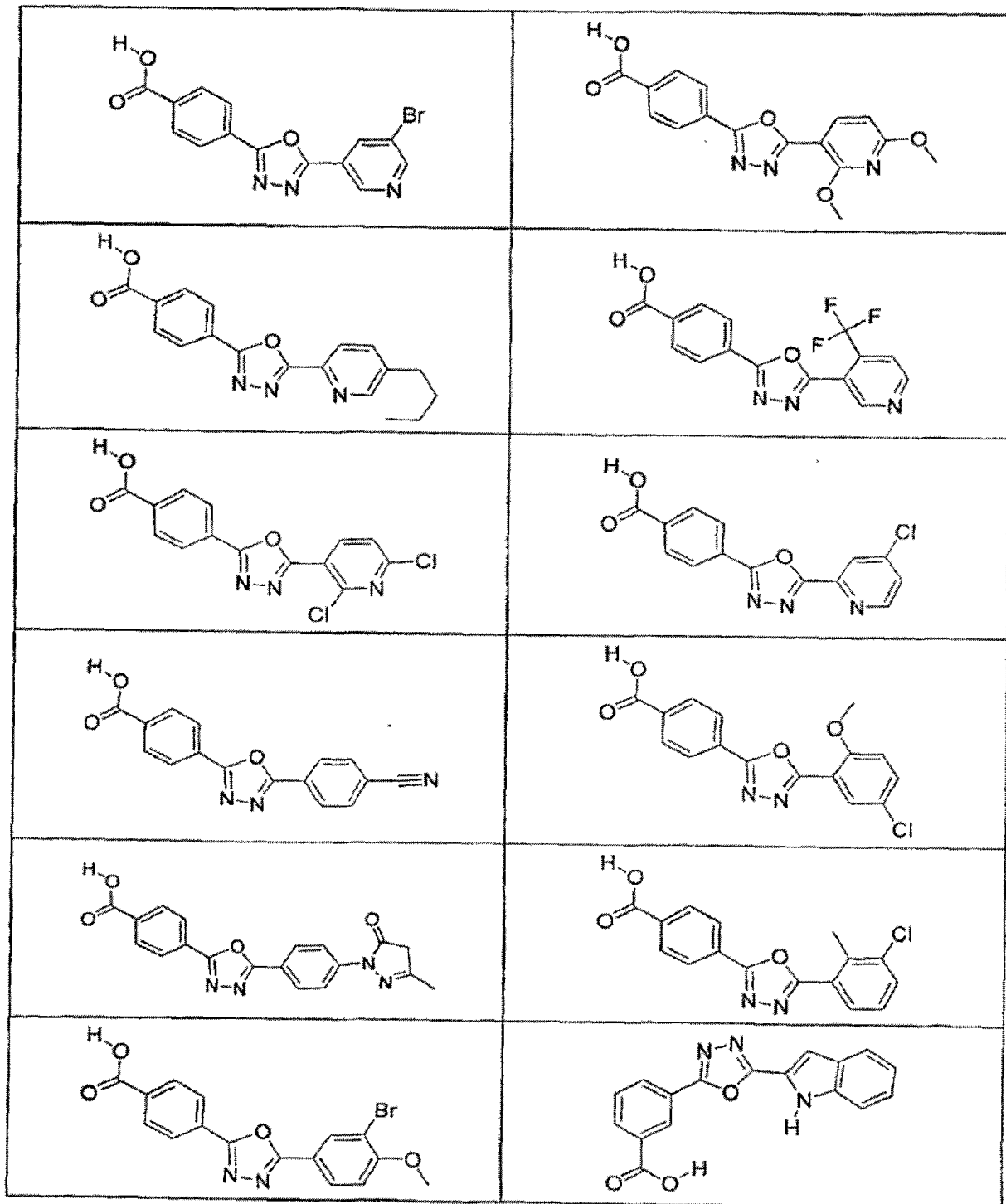


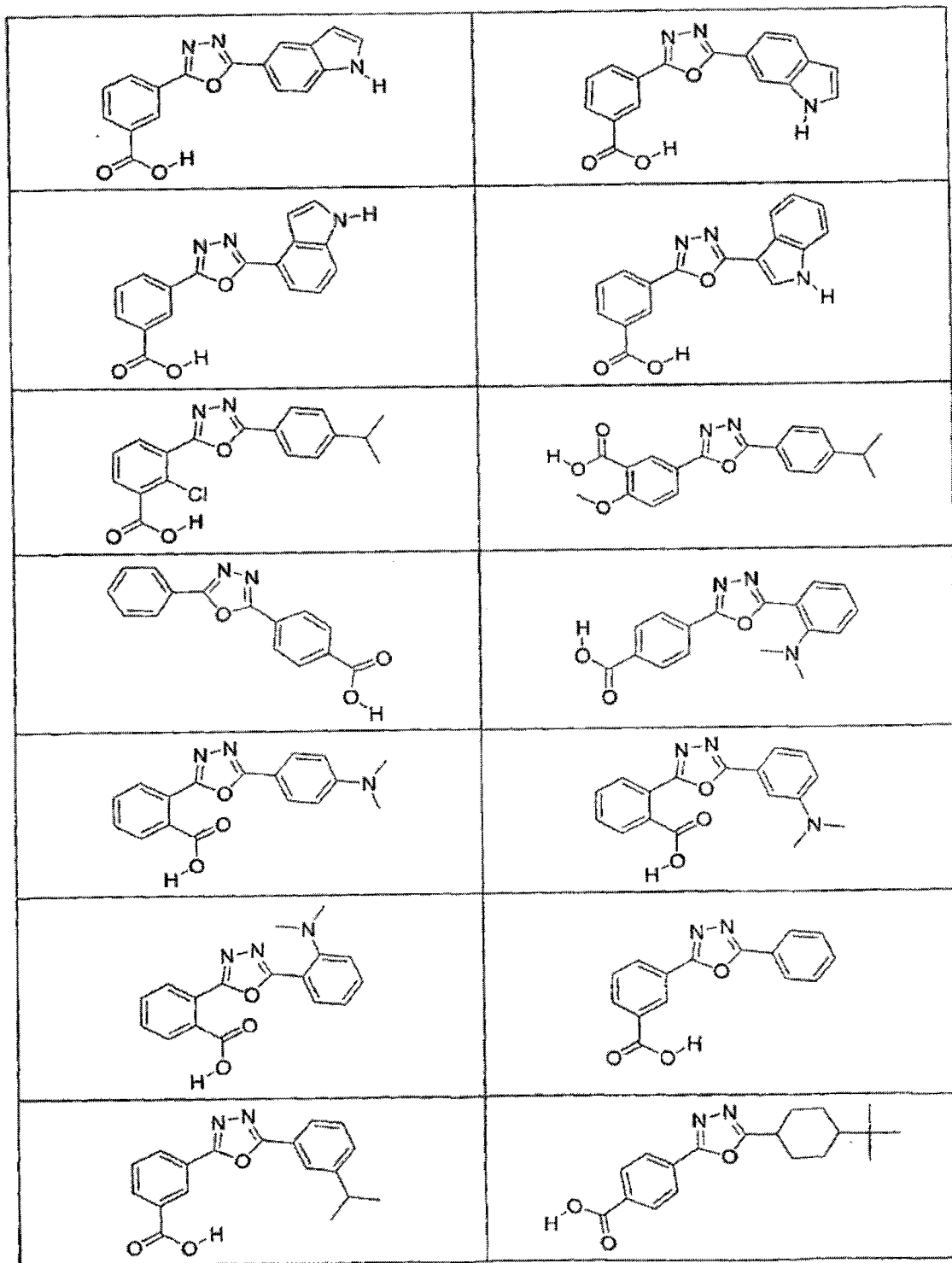


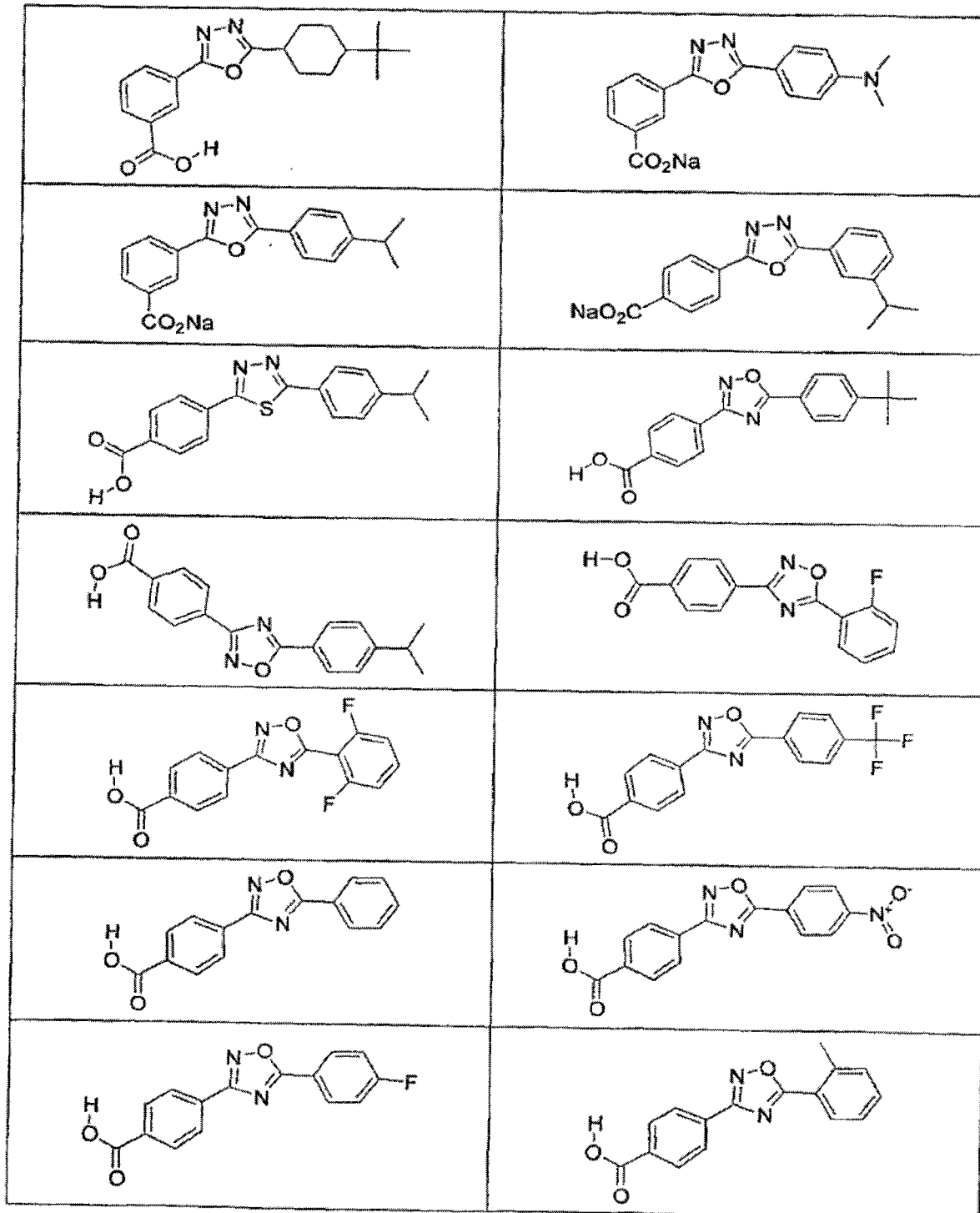


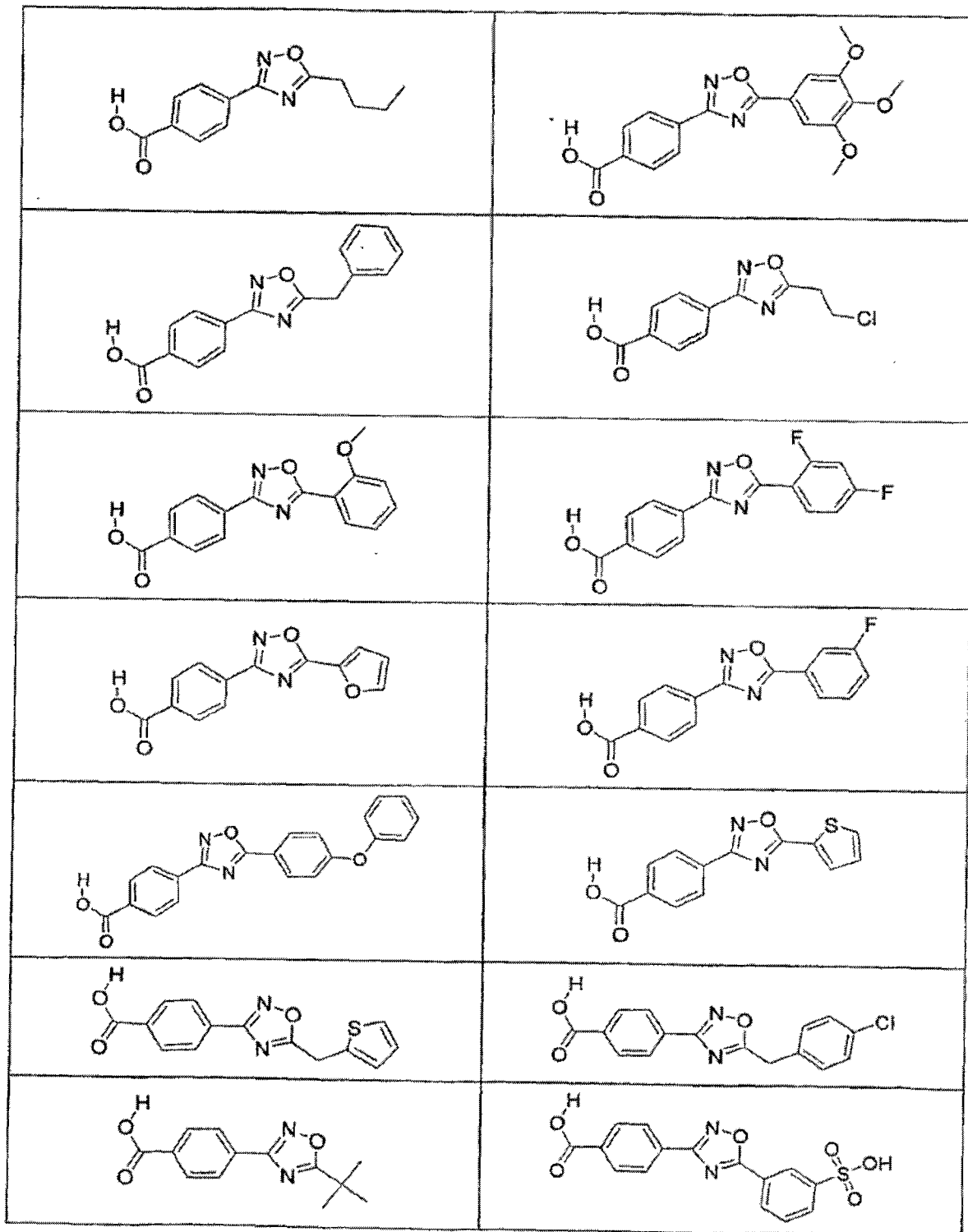


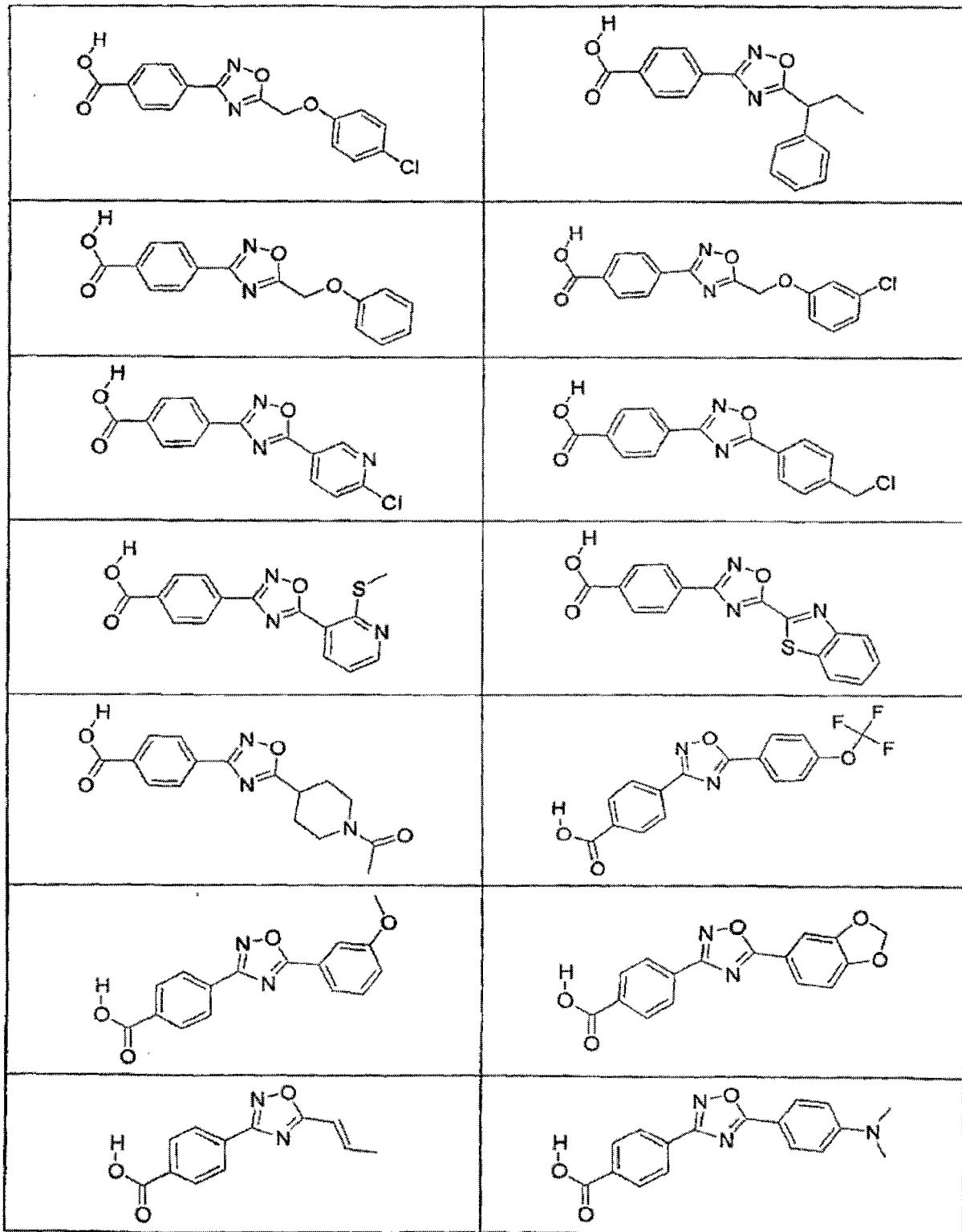


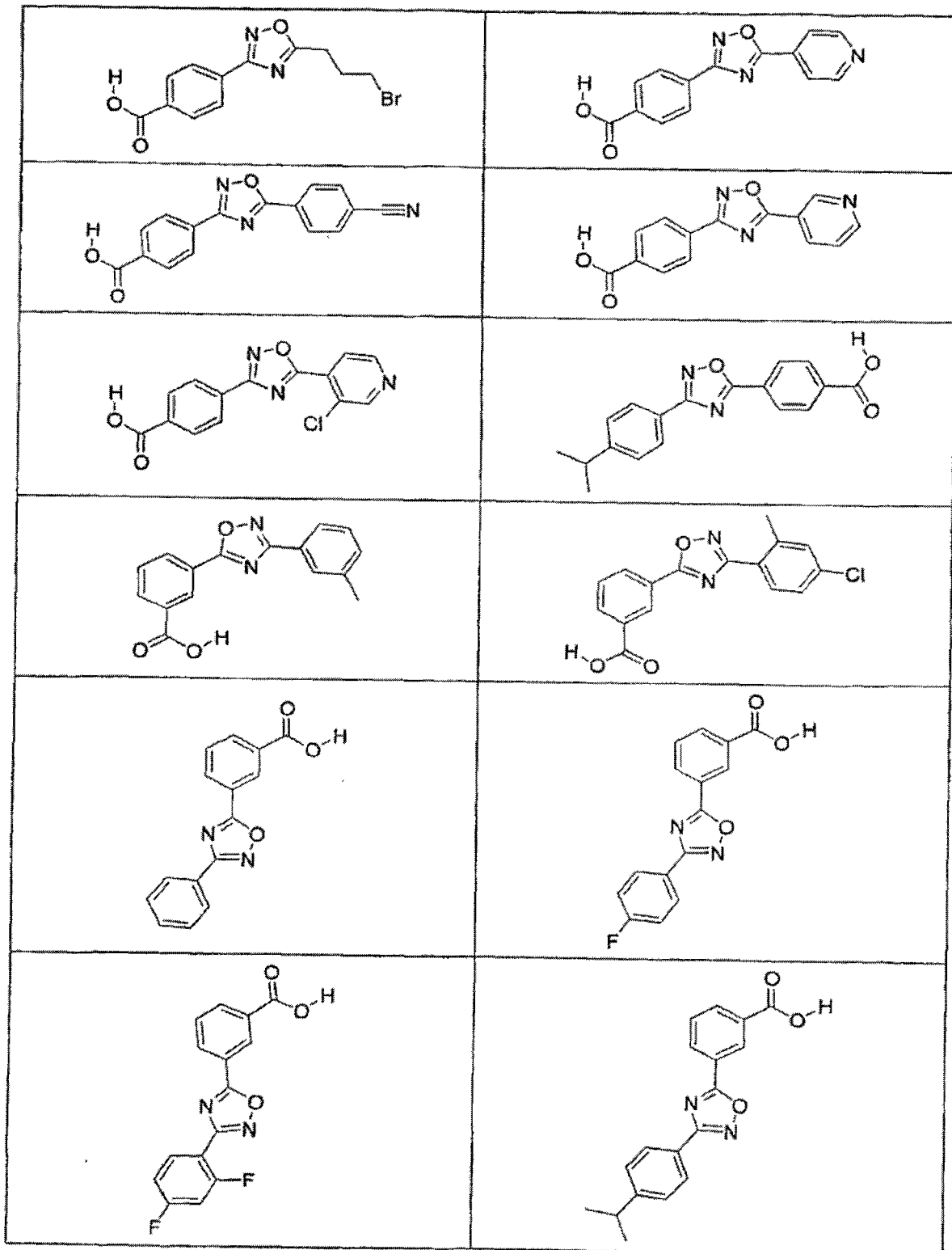


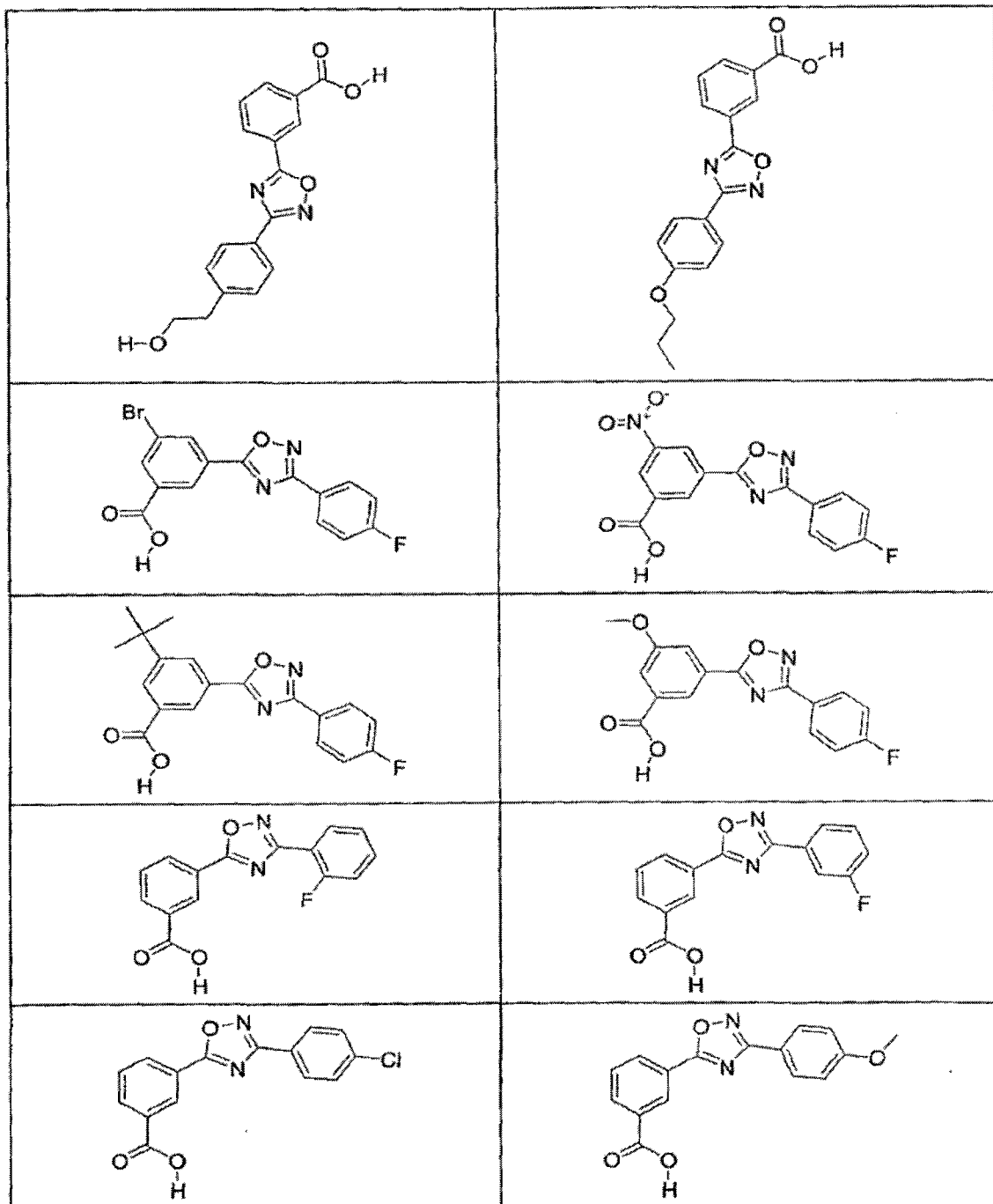


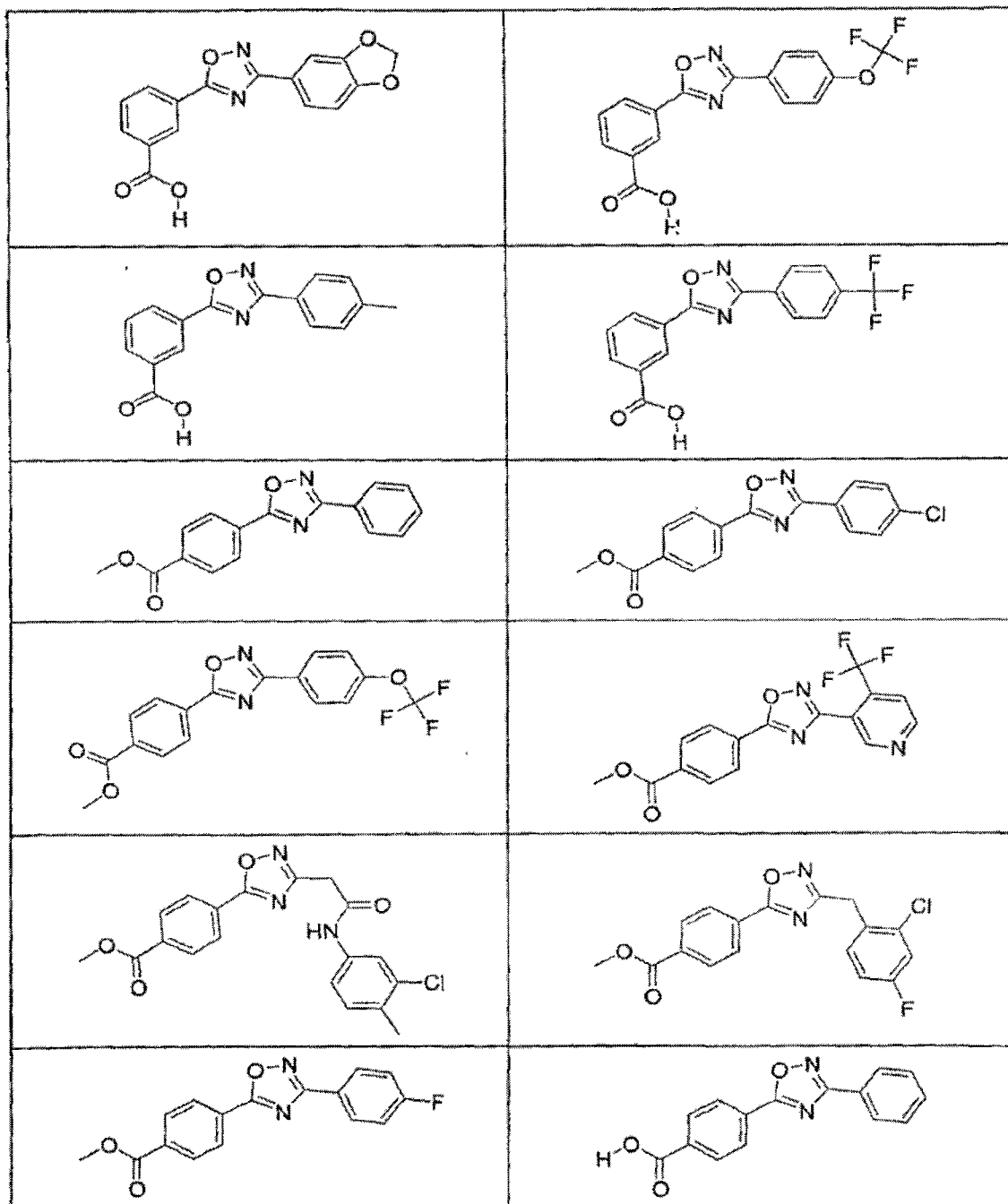


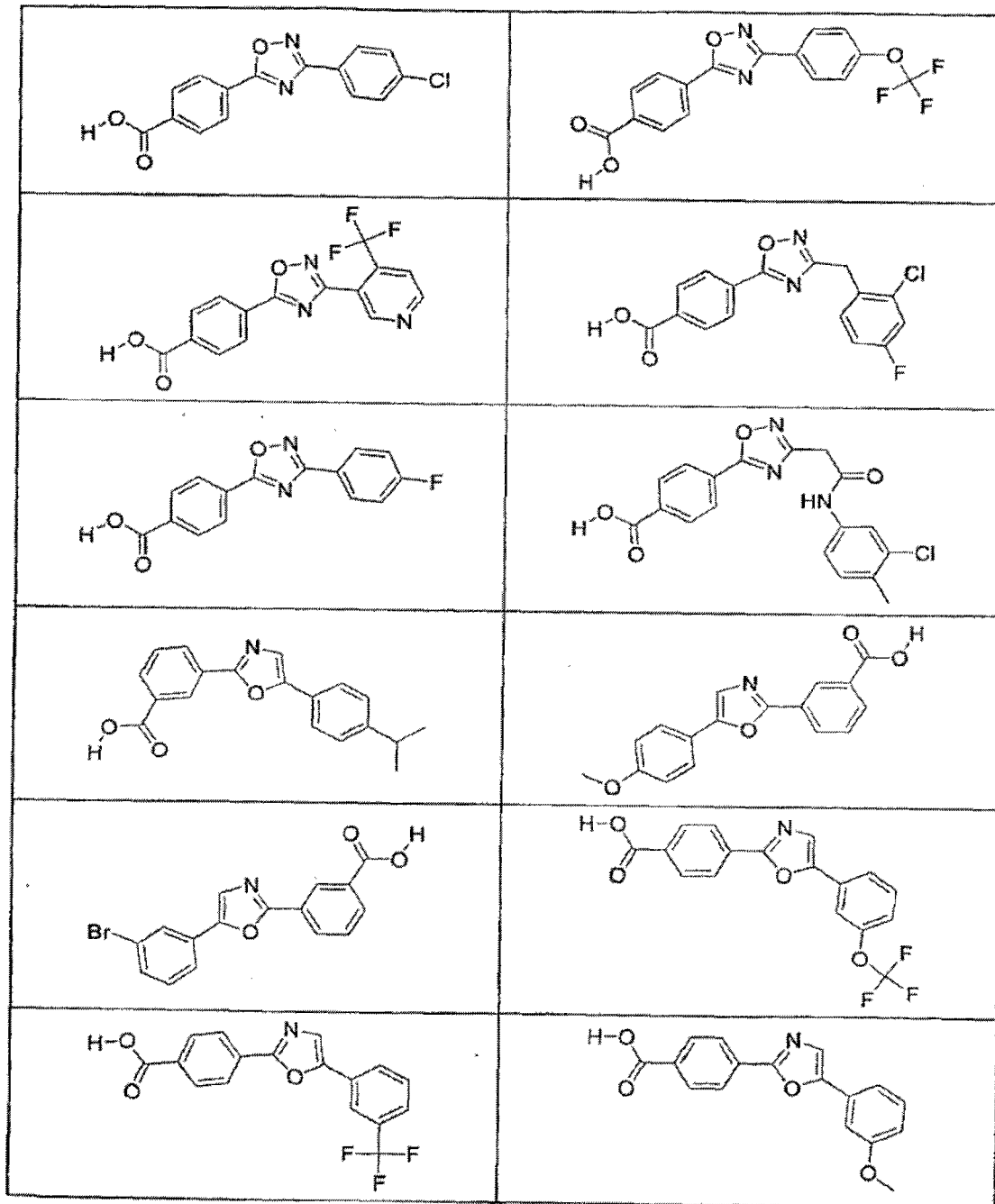


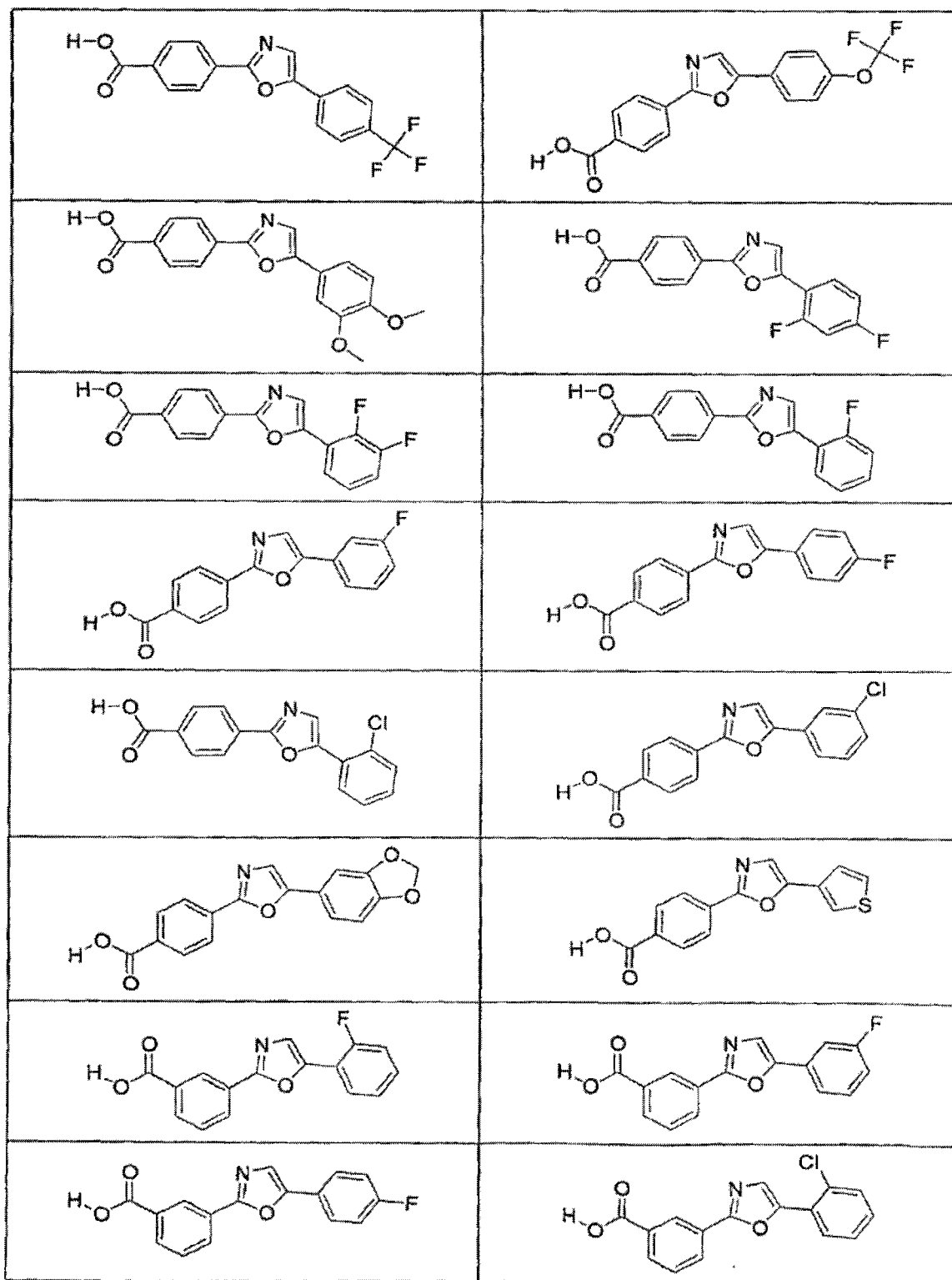


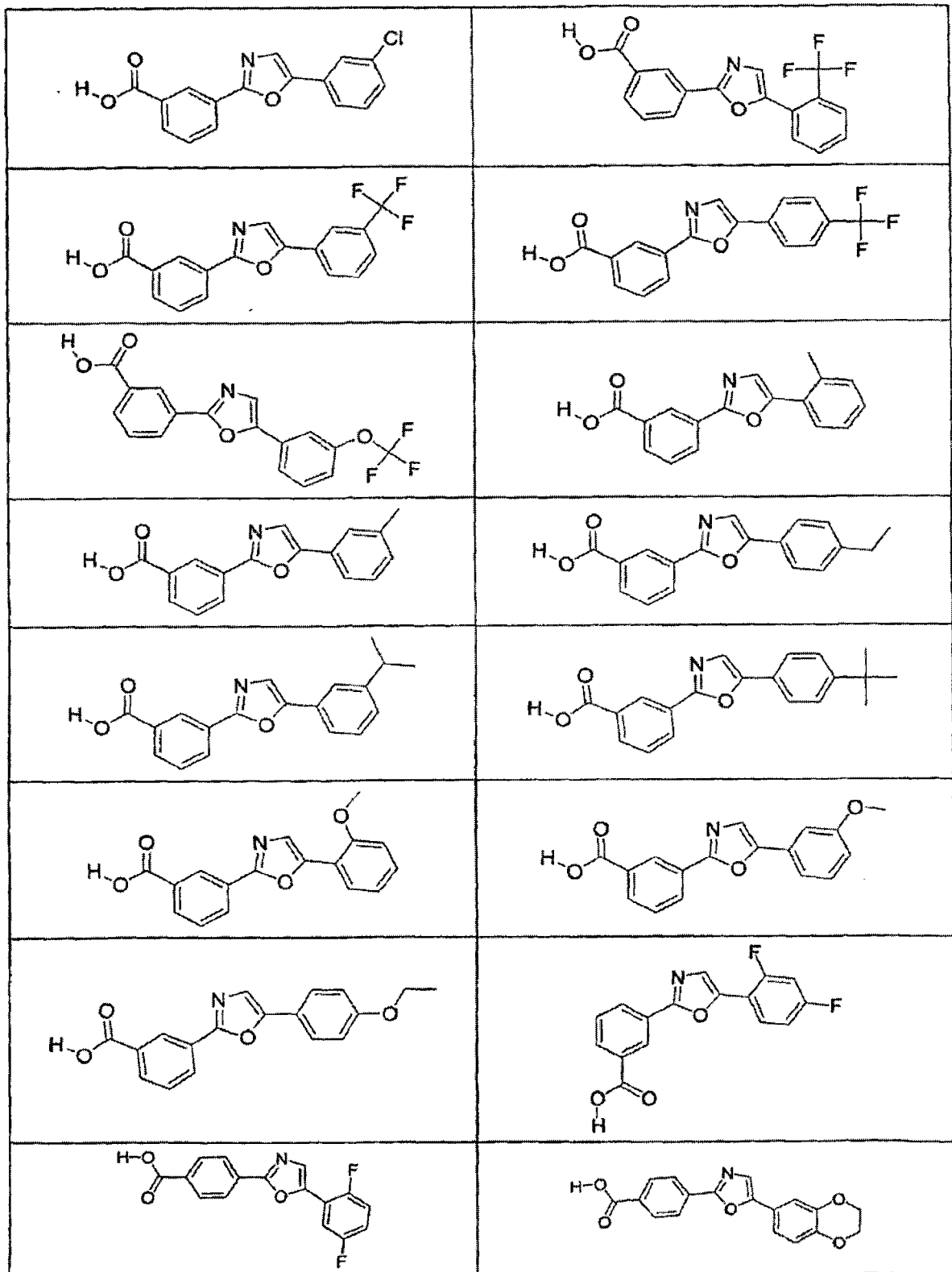


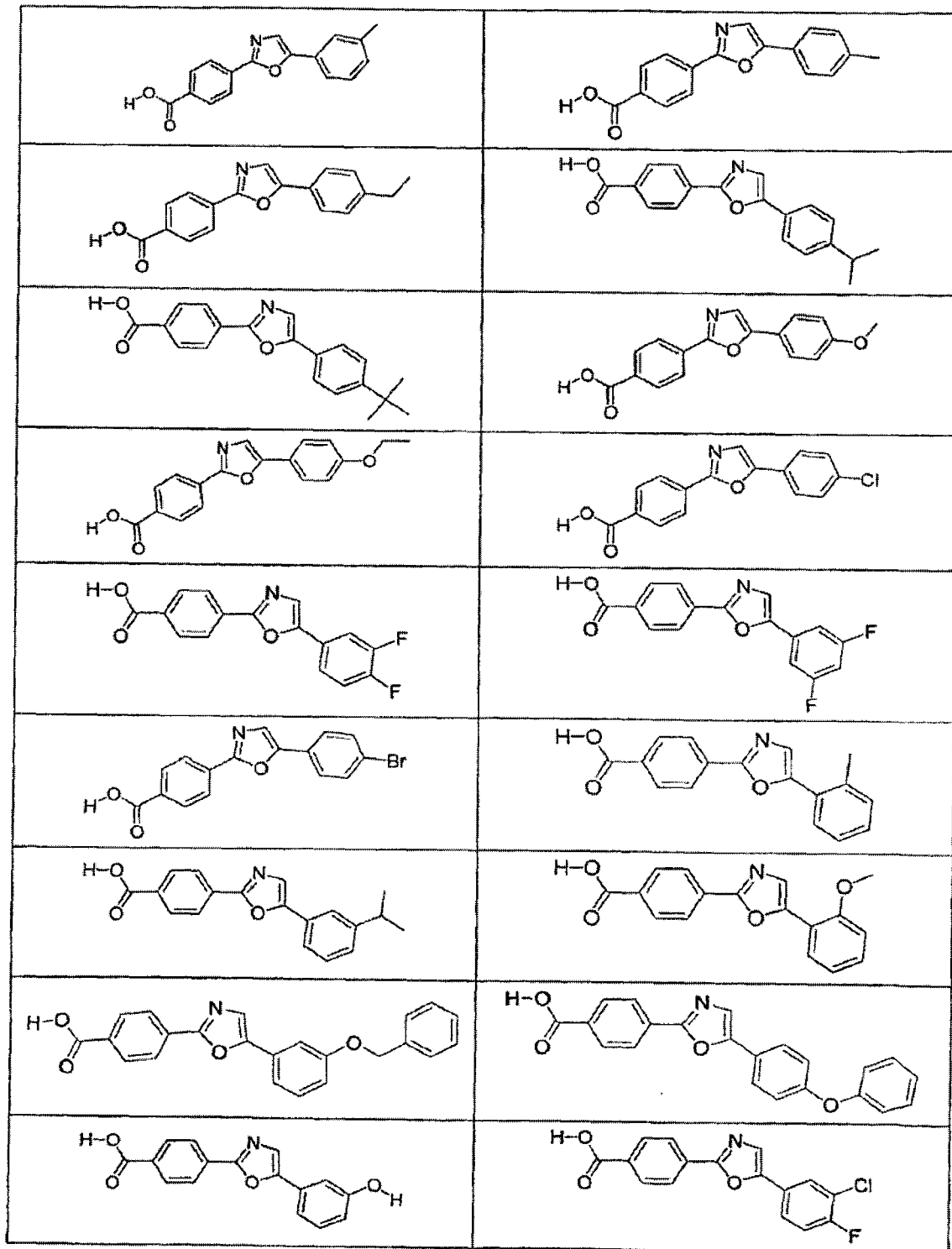


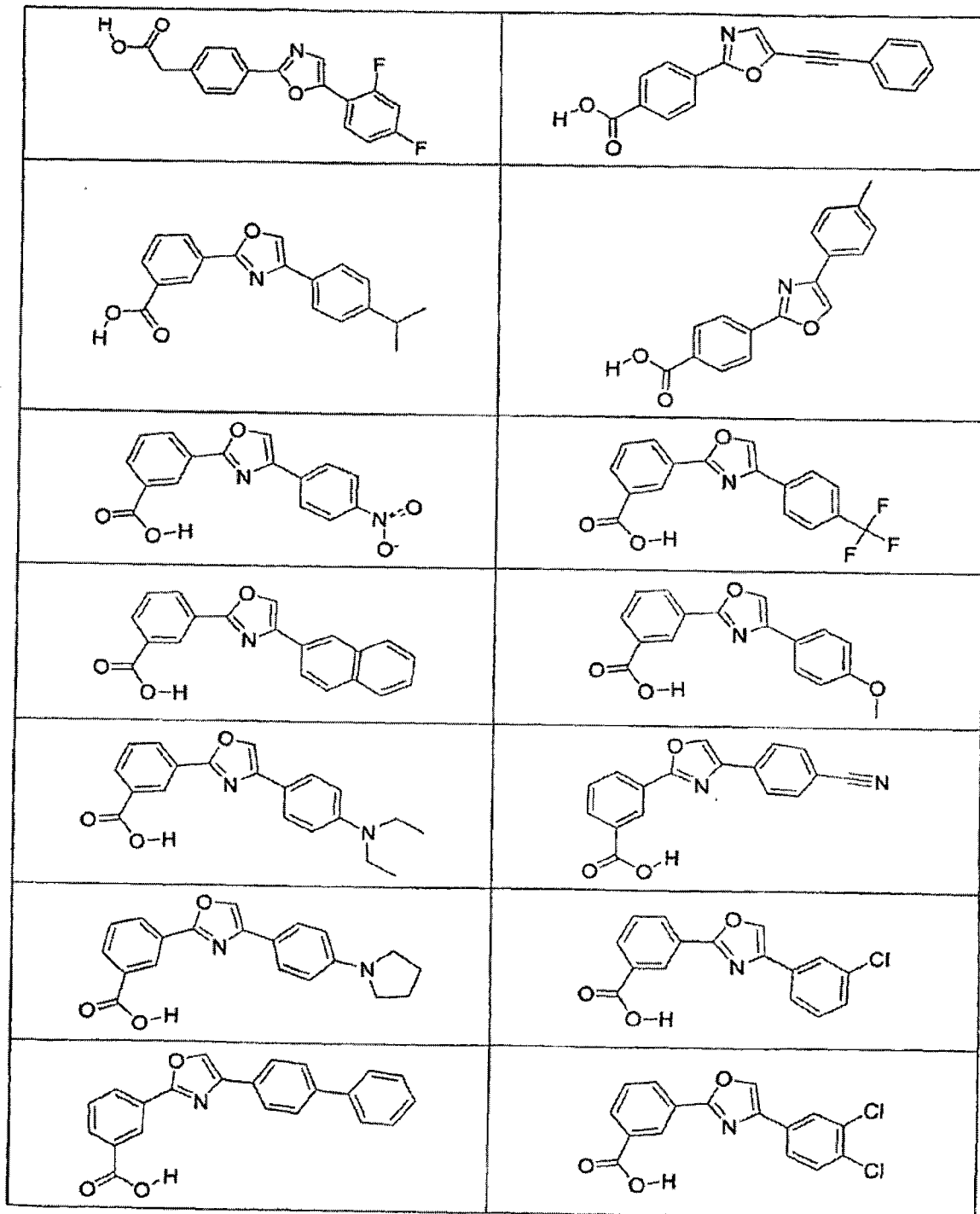


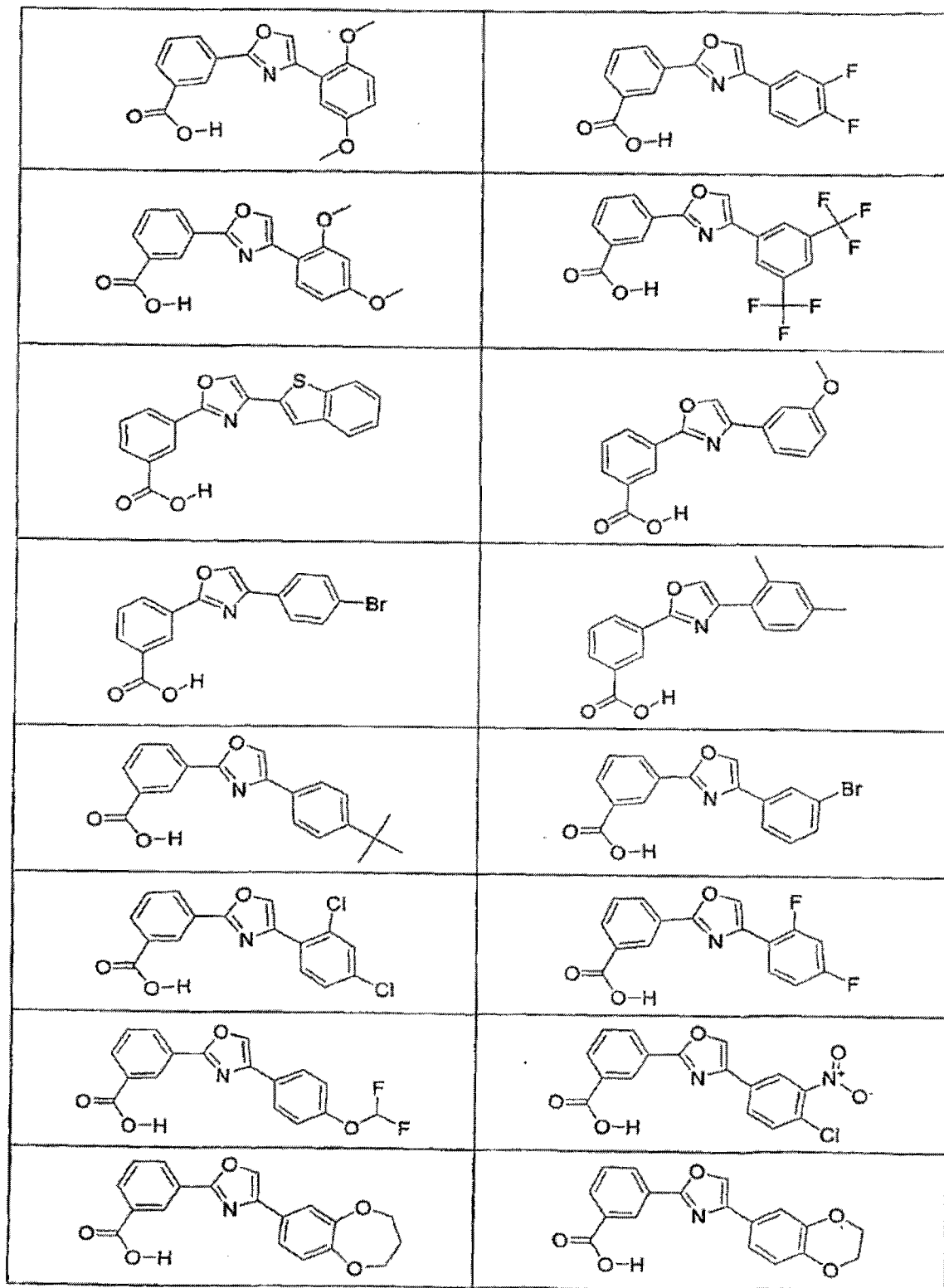


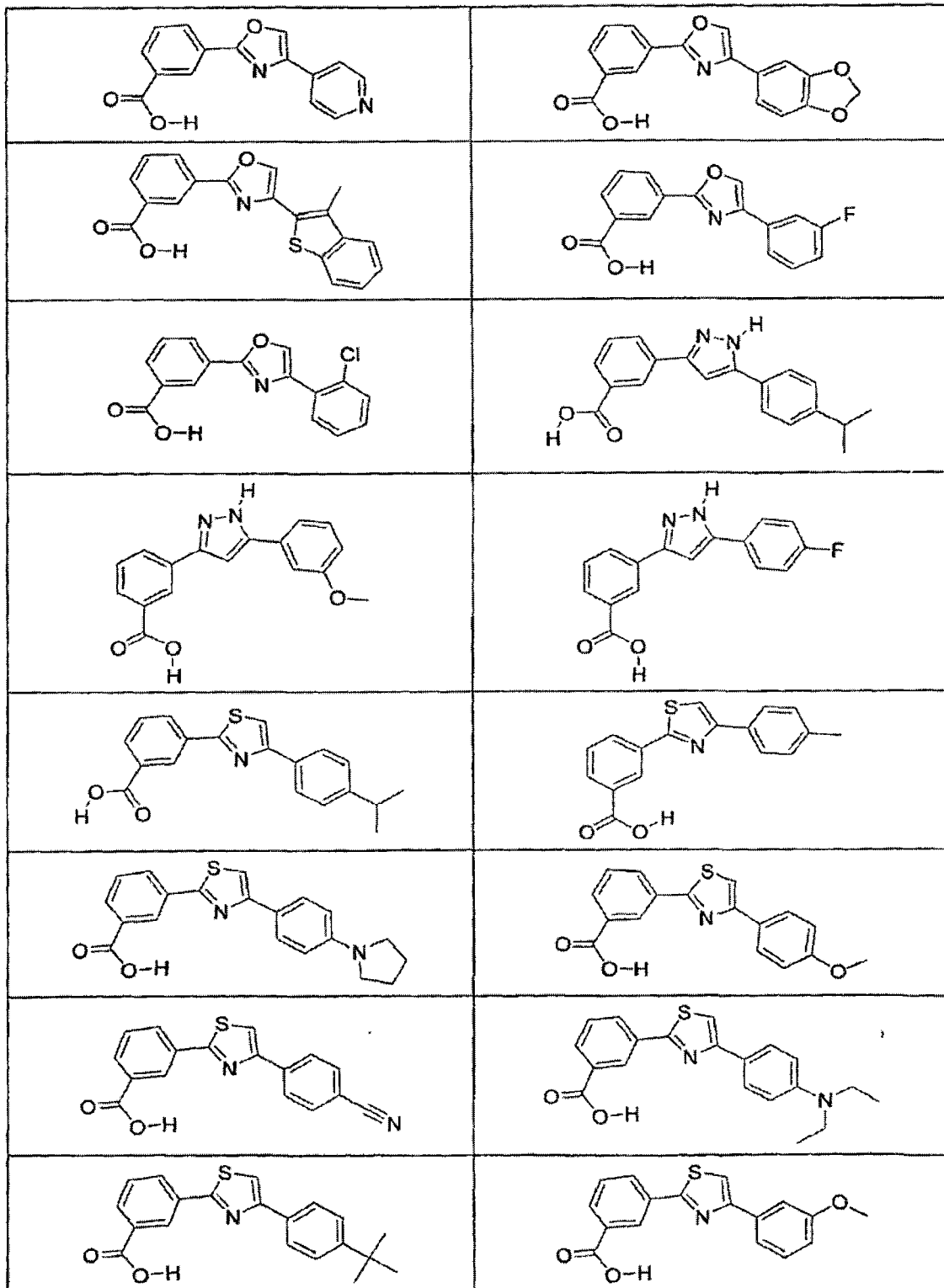


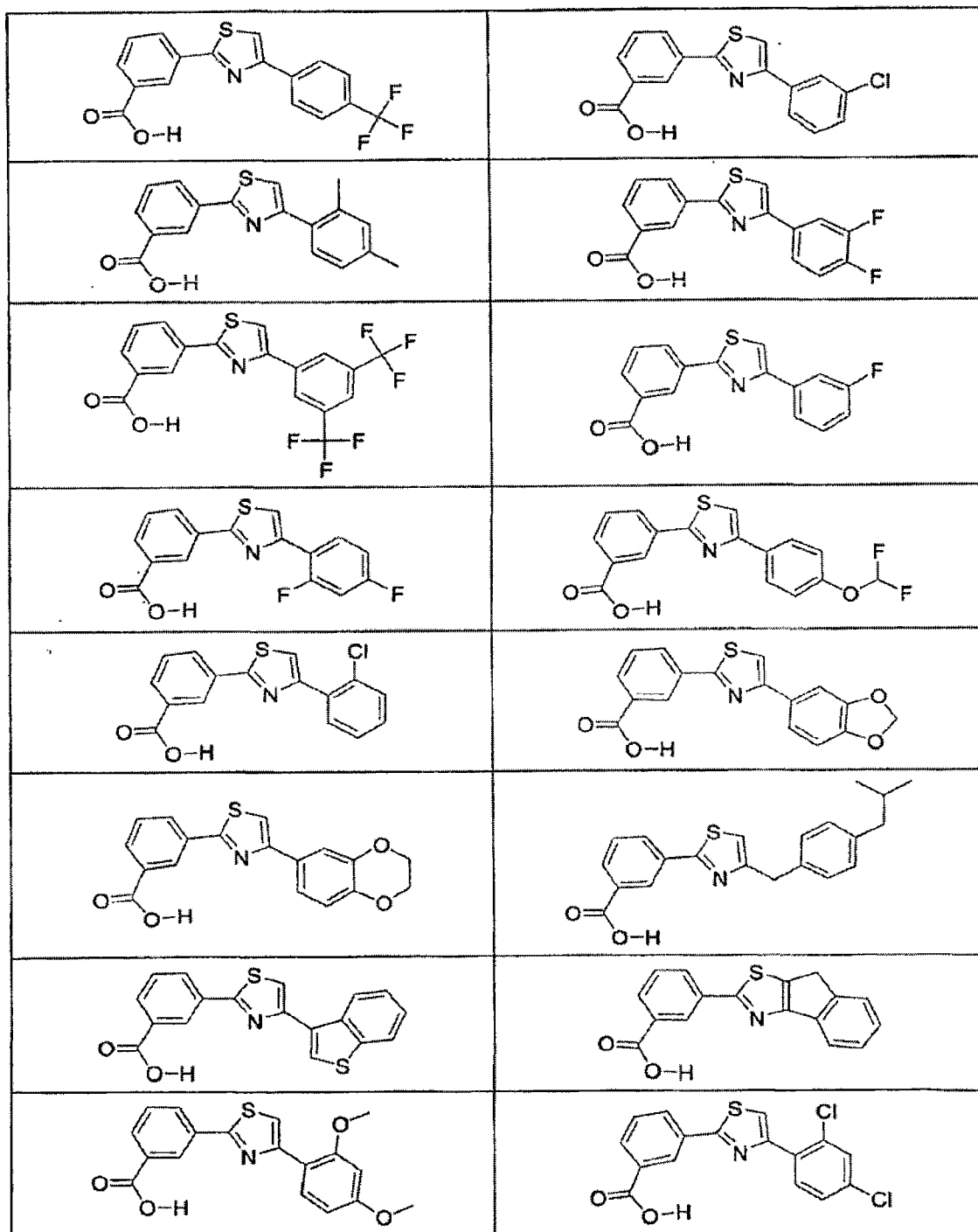


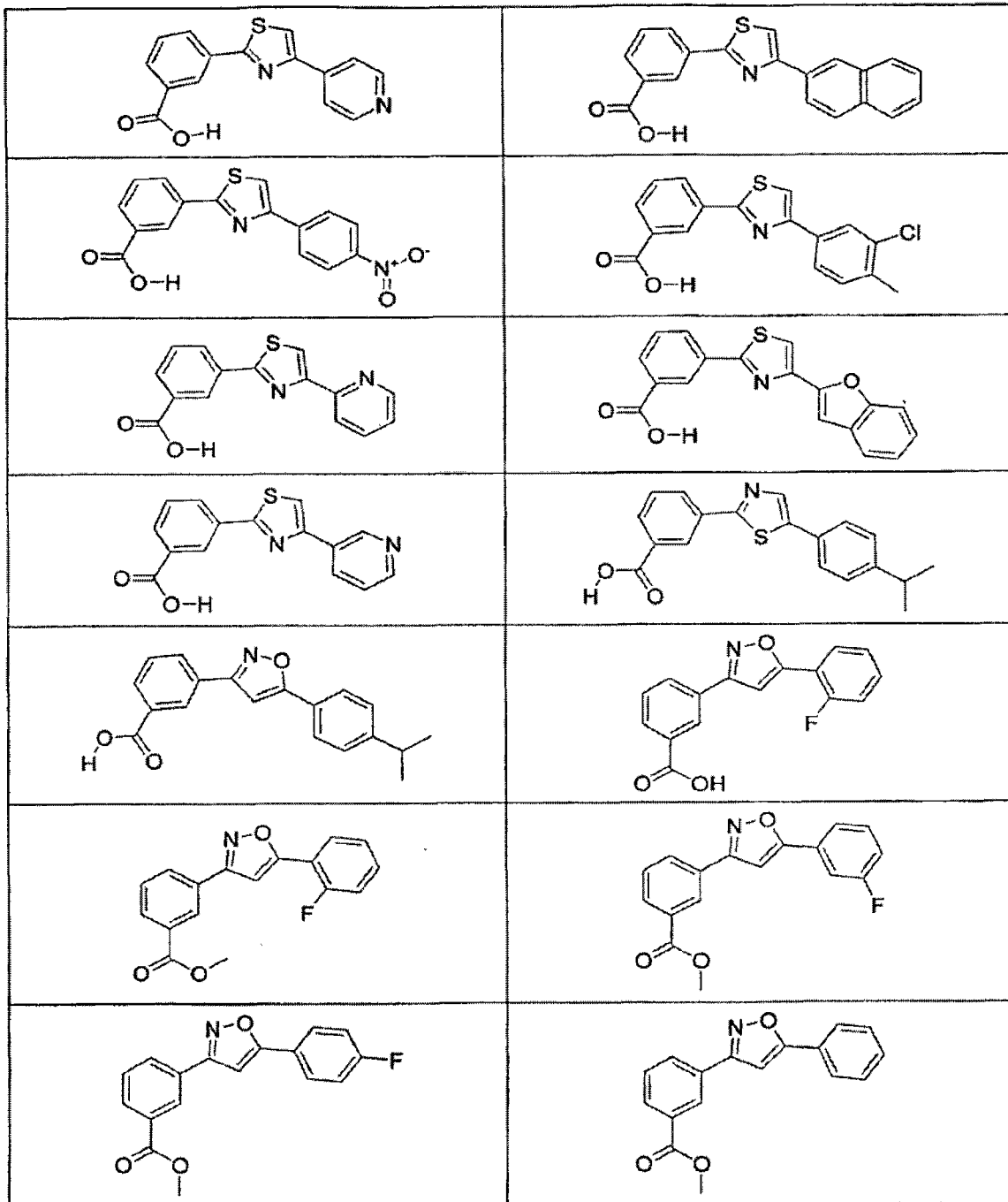


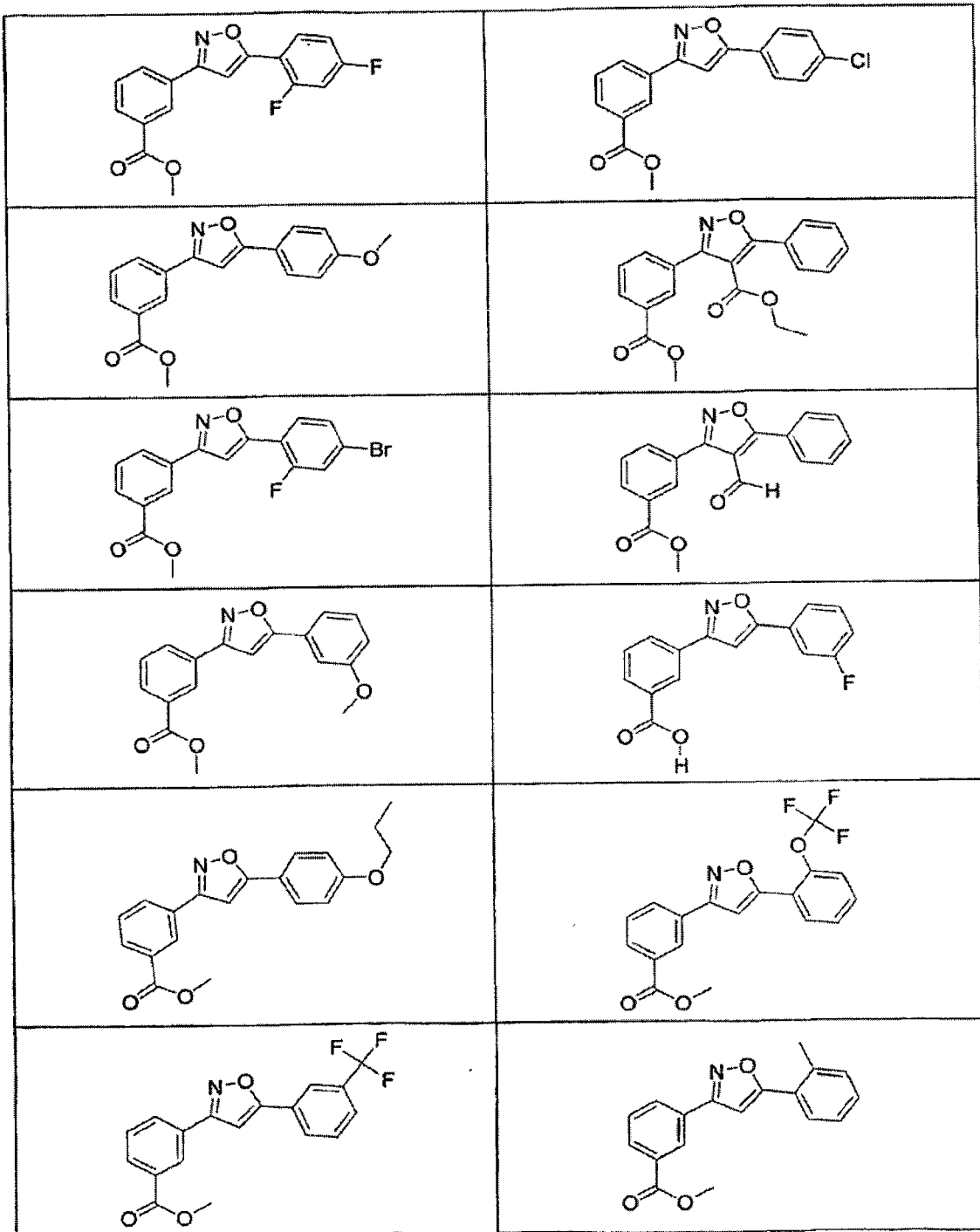


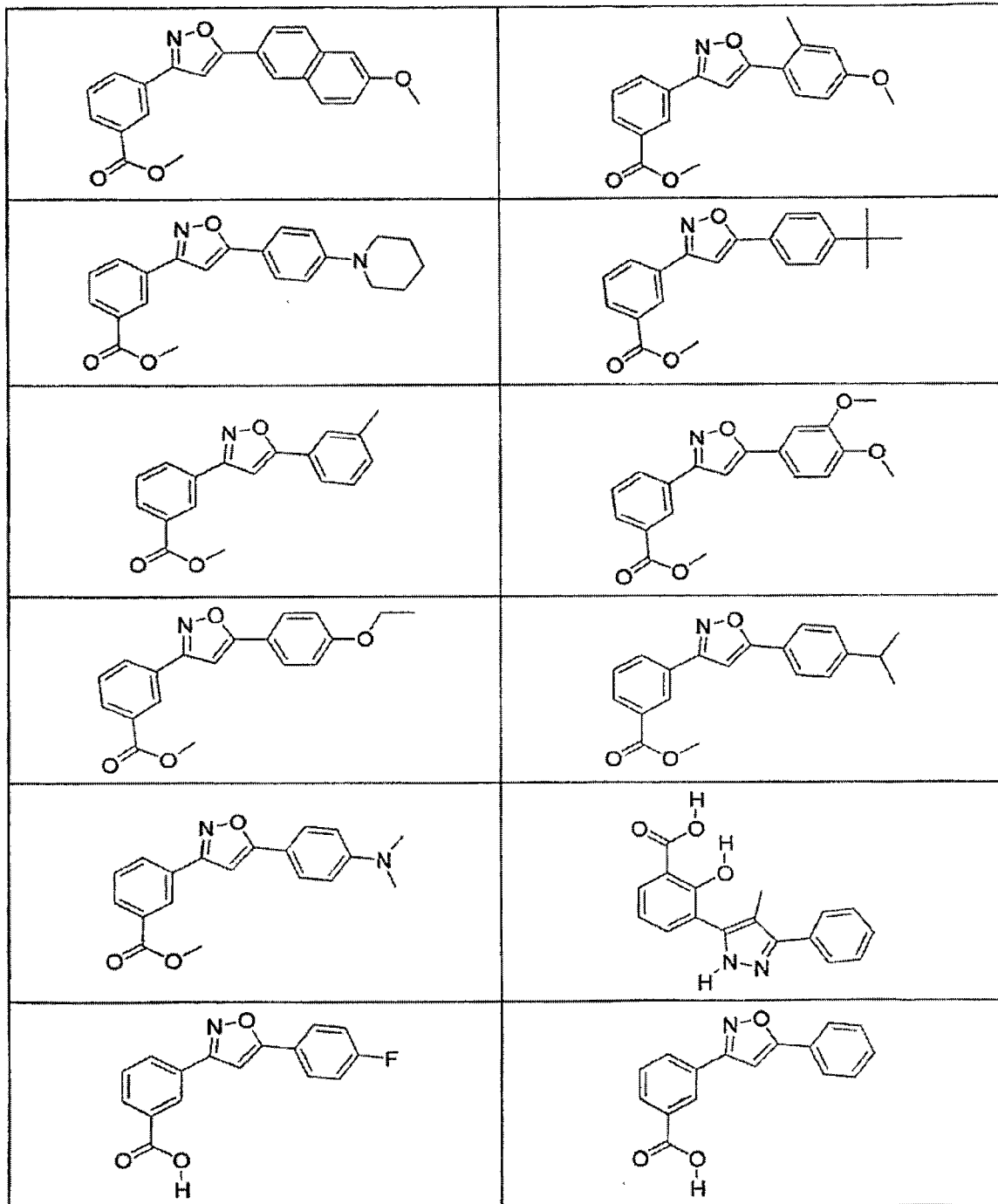


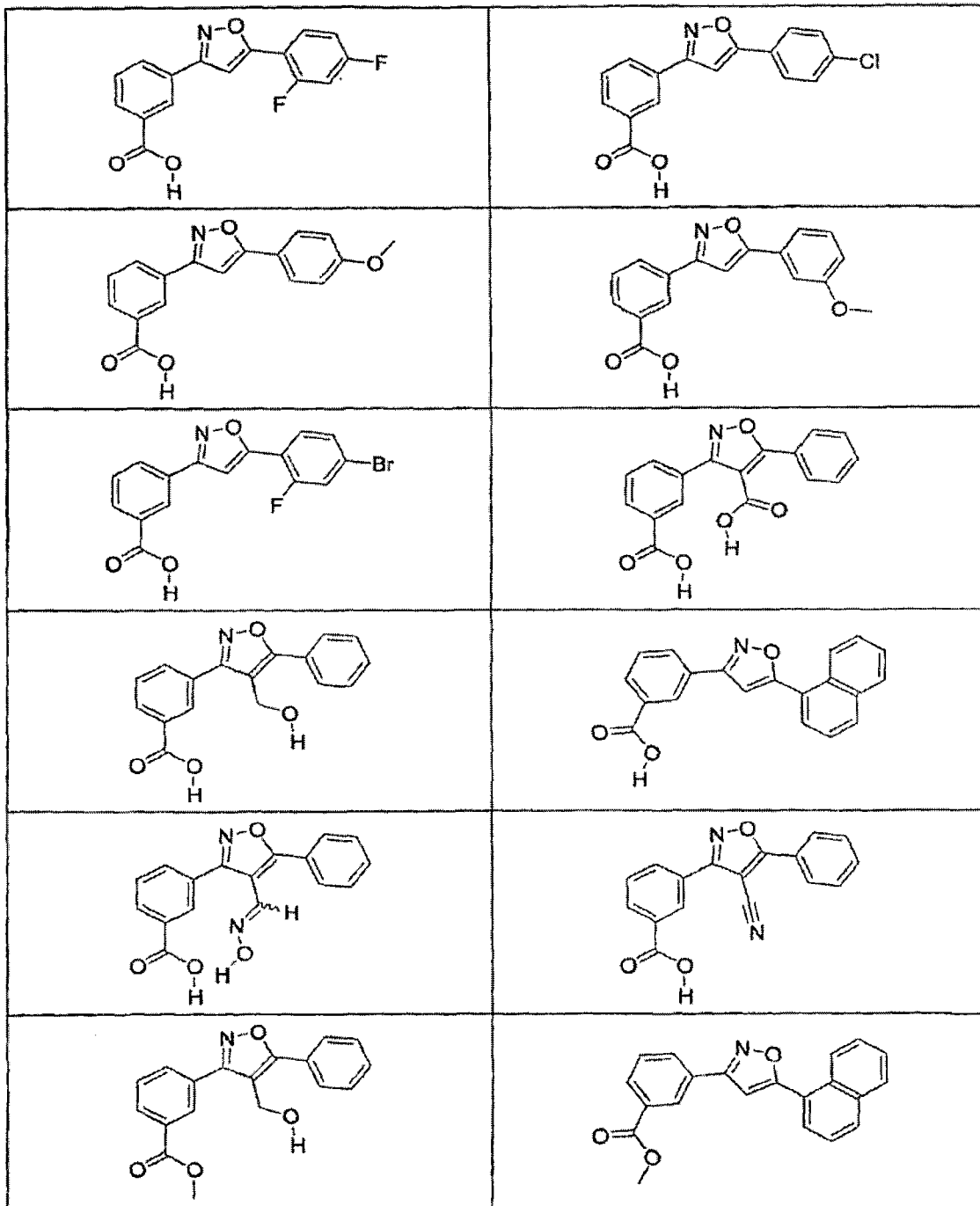


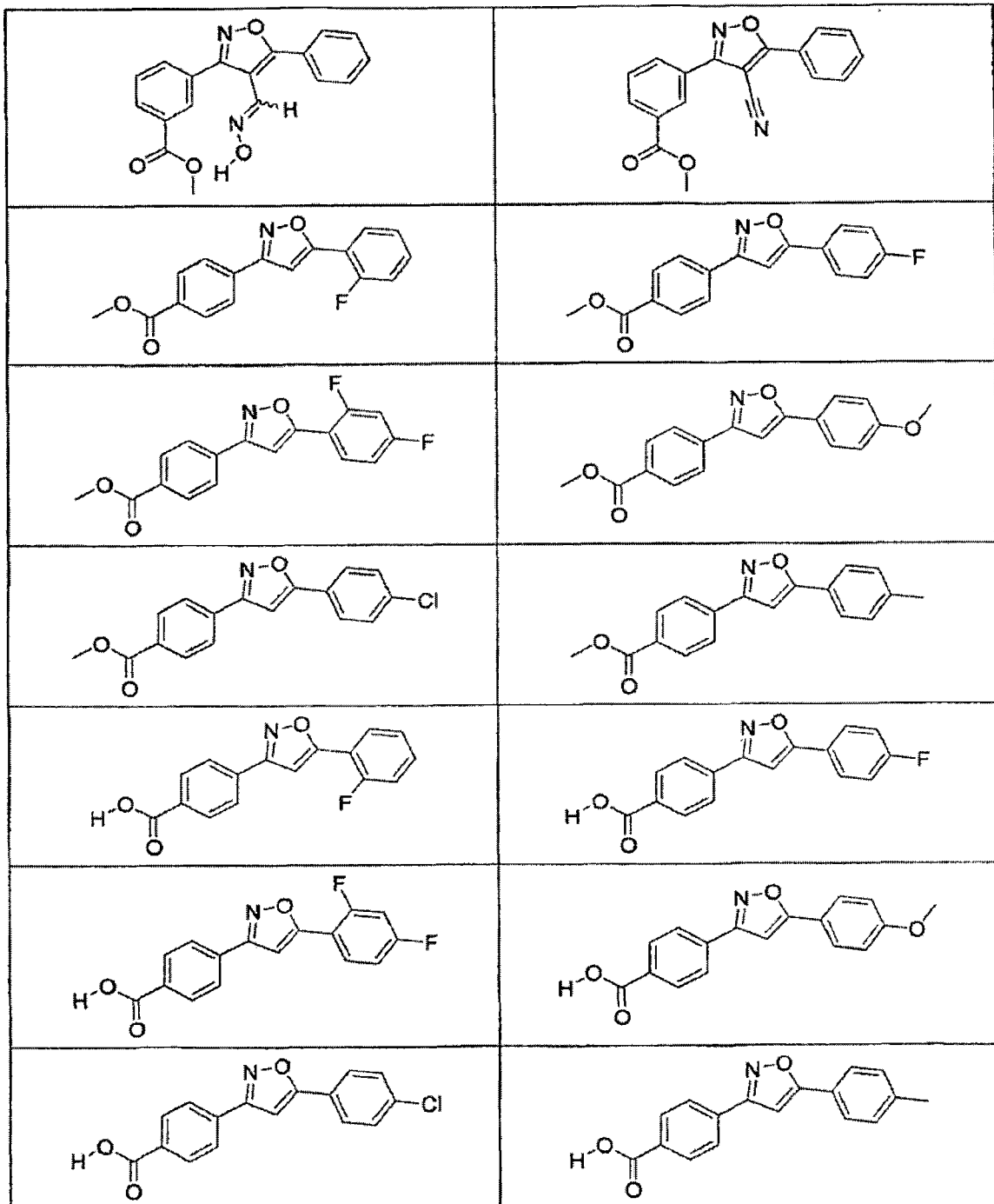


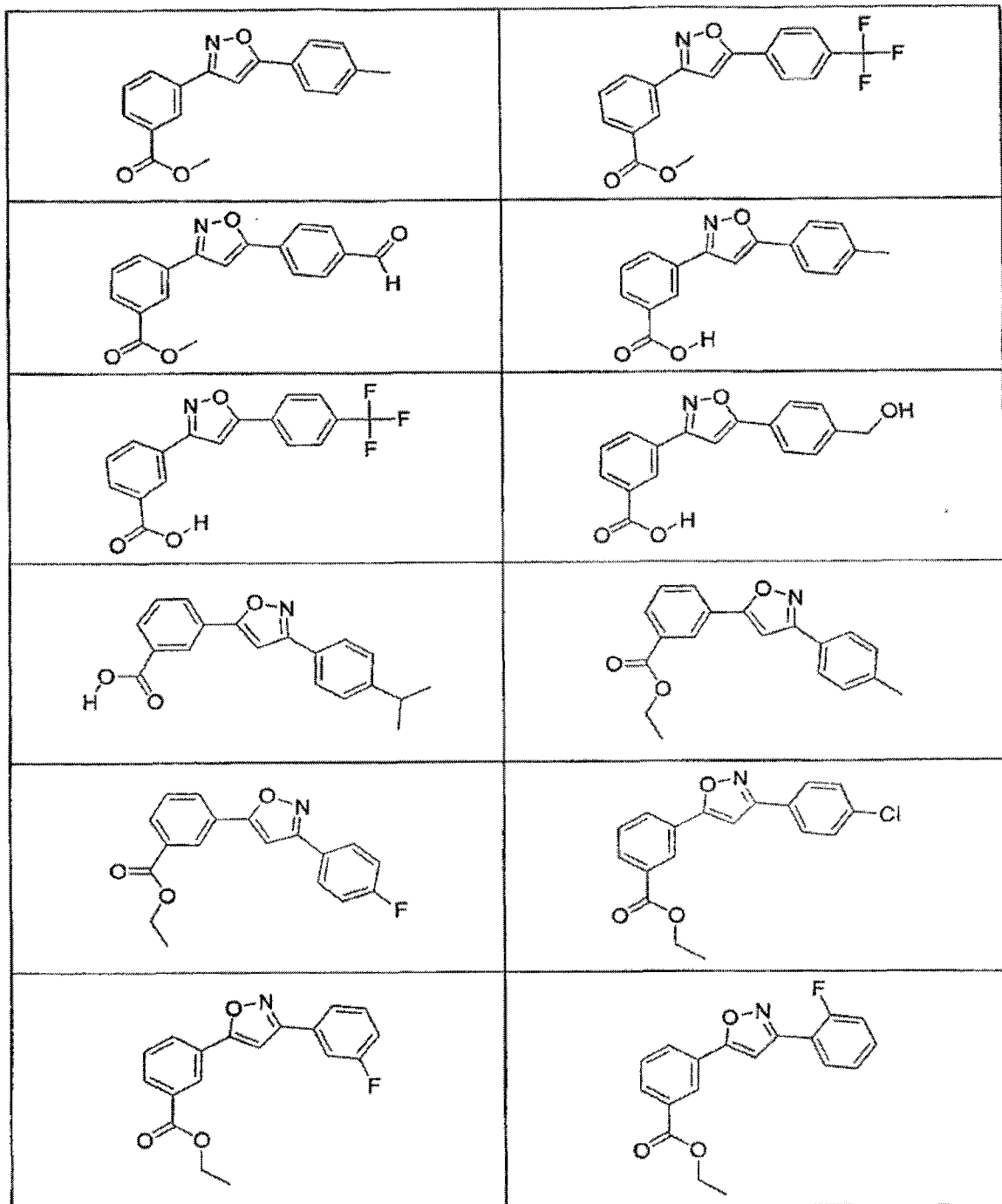


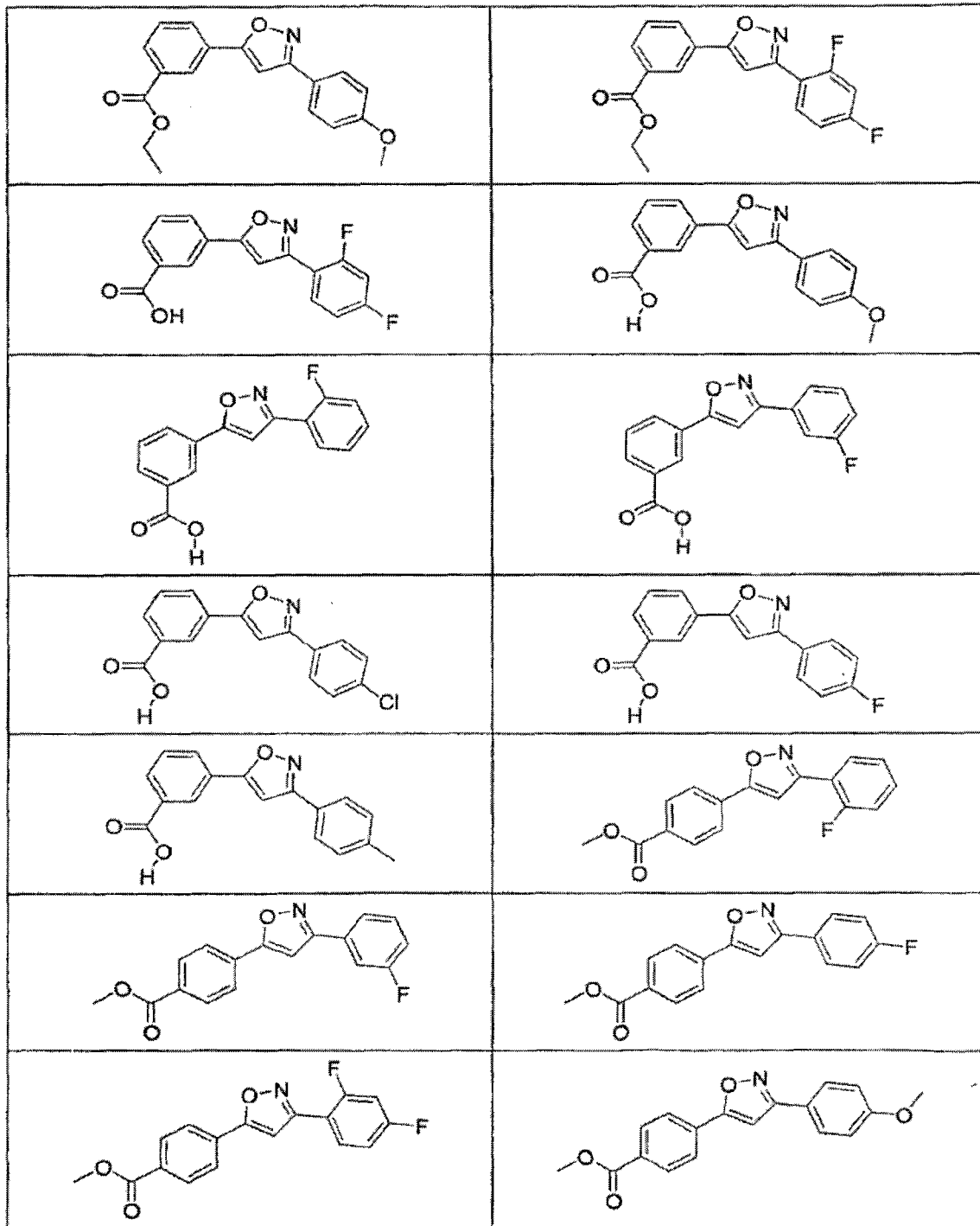


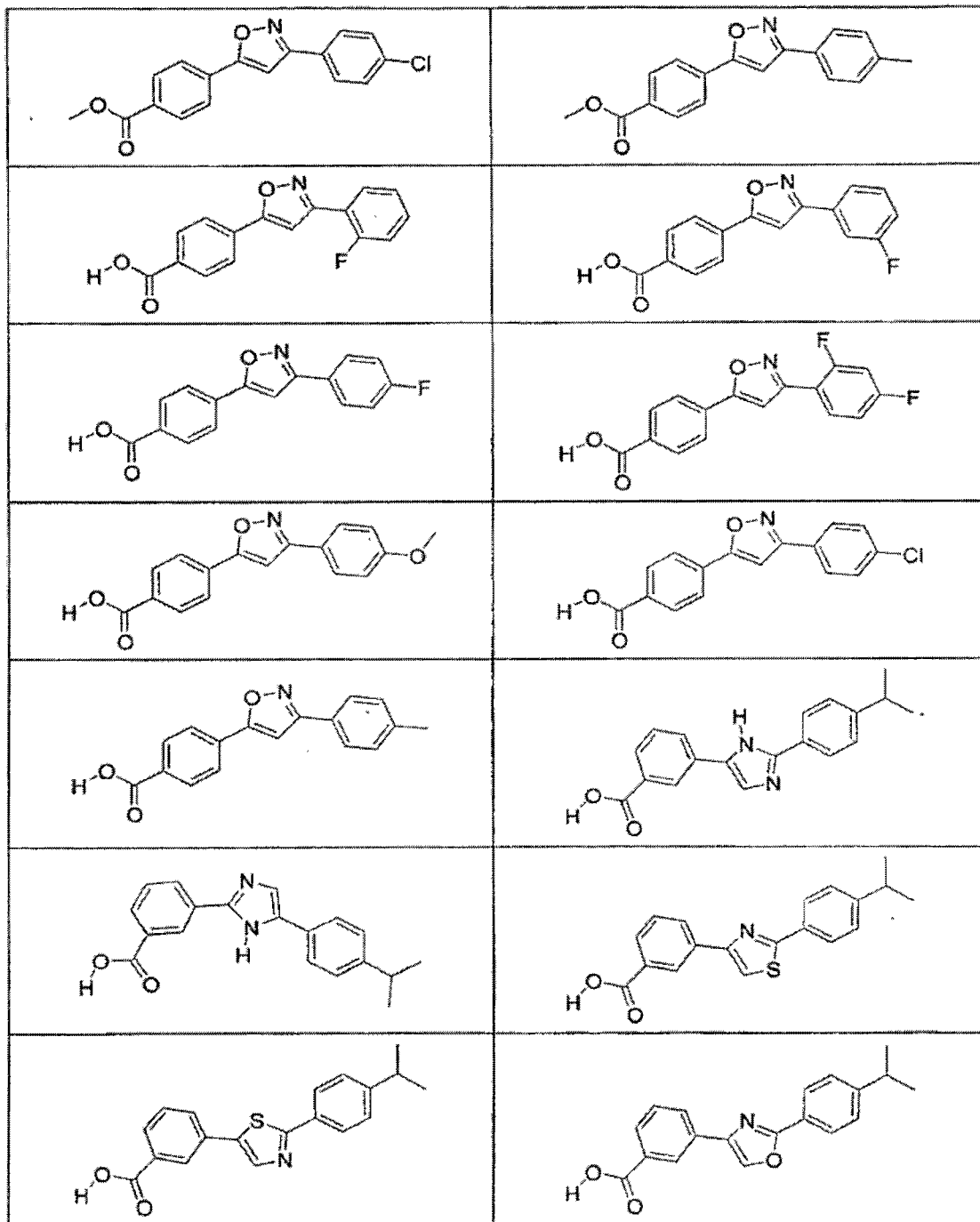


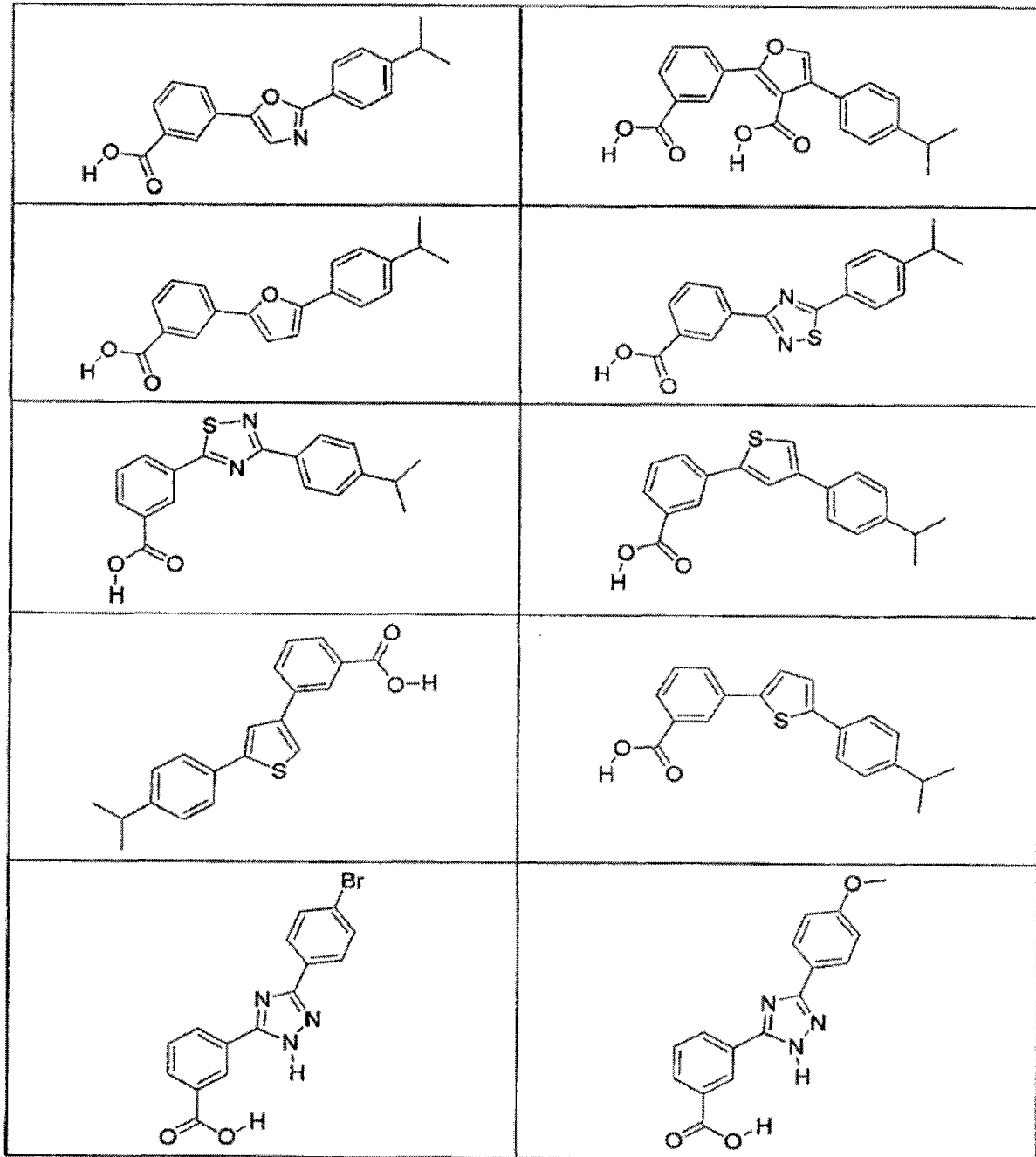


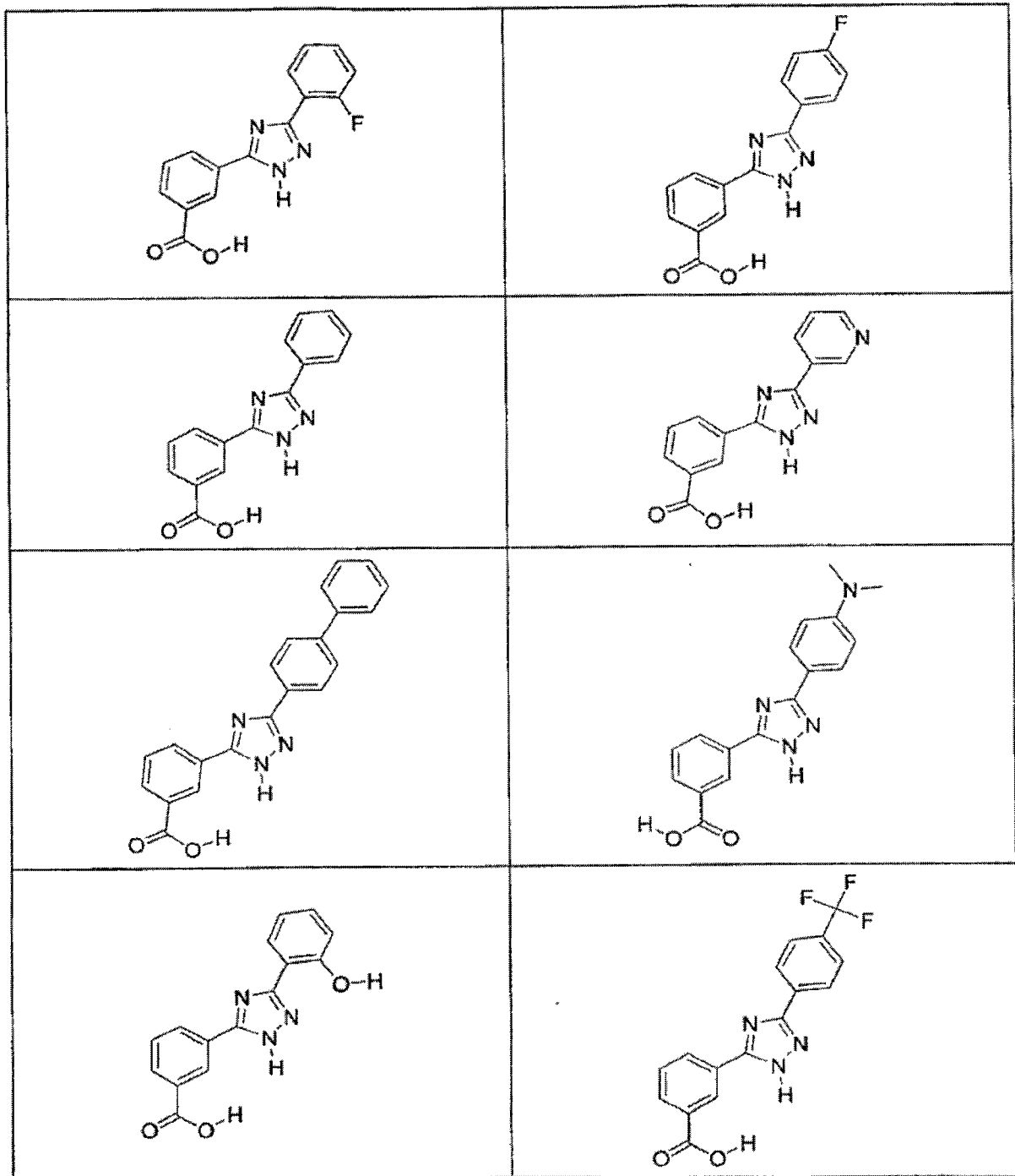


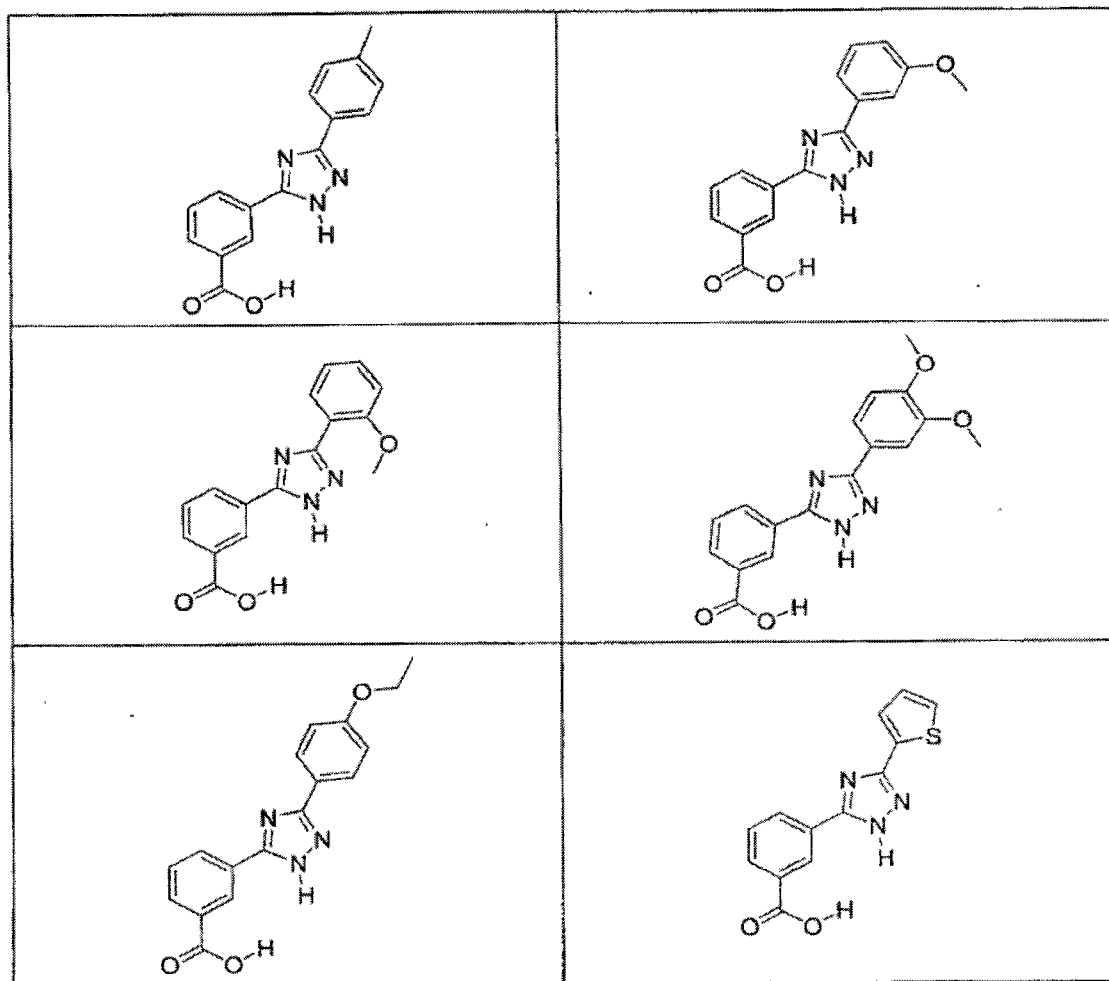








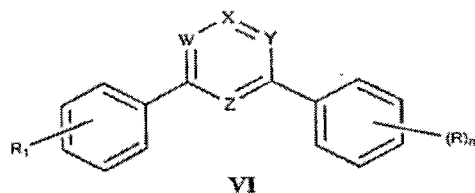




式 V 的化合物可通过标准的、公知的合成方法获得，该类方法可参见，例如，March, J. *Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms and Structure*, 第 4 版，1992。因此，可用于制备具式 V 的化合物的起始材料和中间体可从市场购得，或可由商业途径购得的材料采用已知的合成方法和试剂制备得到。

制备式 V 的化合物的具体方法在 2005 年 10 月 13 日提交的国际申请 PCT/US05/036673 中有公开，其全文在此引用作为参考。

在另一实施方式中，该无义密码子抑制剂为式 VI 的化合物：



或其药学上可接受的盐、水合物、包合物、前药、多晶型、立体异构体，立体异构体包括对映体、非对映体、外消旋体或立体异构体的混合物，其中：

W、X、Y 和 Z 独立地选自 N 或 C-R_a，其中 R_a 为氢或 C₁-C₄ 烷基基团，其中 W、X、Y 和 Z 中至少一个为 N；

n 为 0、1、2 或 3；

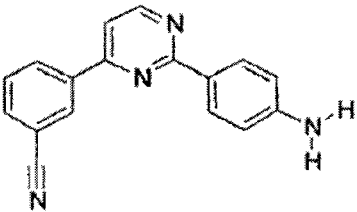
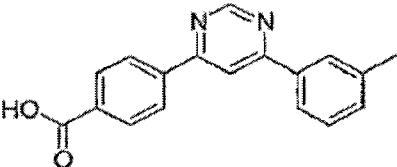
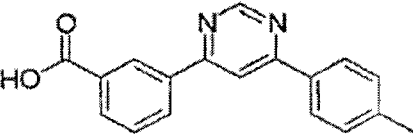
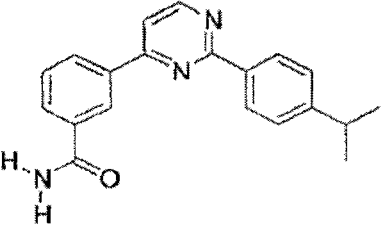
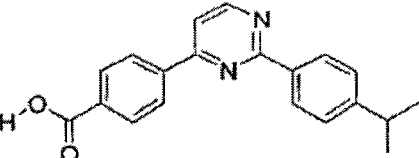
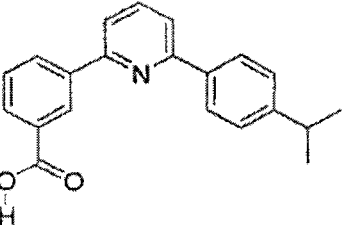
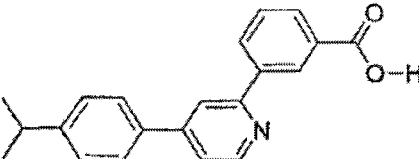
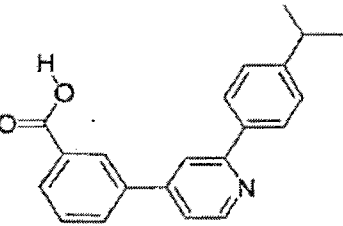
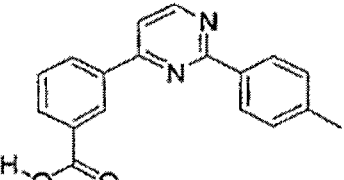
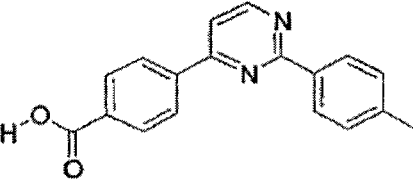
R₁ 为氰基基团；氨基甲酰，其任选地被一个或两个 C₁-C₄ 烷基基团取代；或羰基基团，其被羟基、C₁-C₄ 烷基、或 C₁-C₄ 烷氧基基团取代；

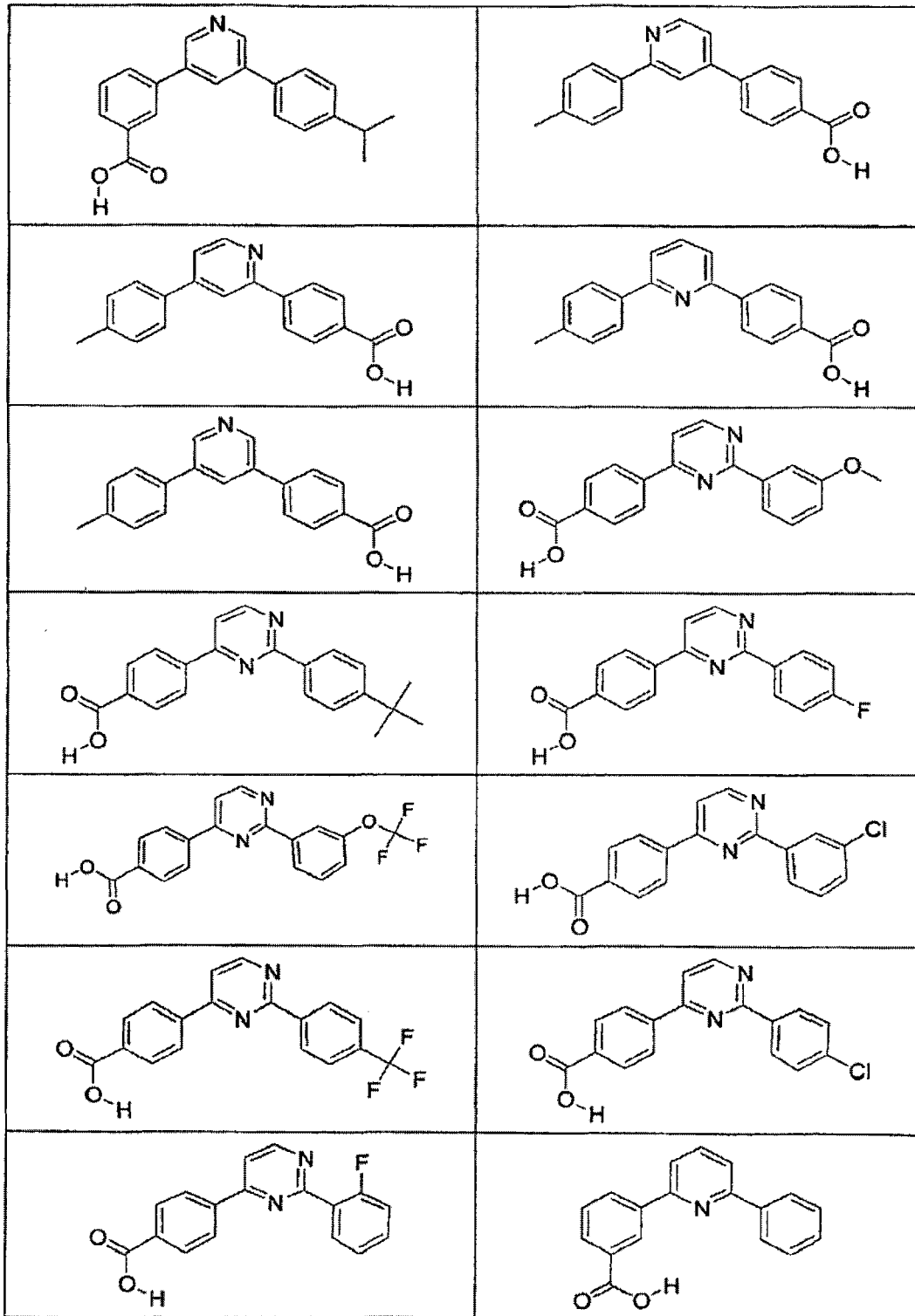
R 为羟基基团；卤素；C₁-C₄ 烷基，其任选地被一个或多个独立选择的卤素或羟基基团取代；C₁-C₄ 烷氧基，其任选地被一个或多个独立选择的卤素或苯基基团取代；C₄-C₈ 环烷基，其任选地被一个或多个独立选择的 C₁-C₄ 烷基基团取代；-R_b 基团；-O-R_b 基团；五至六元杂环，其任选地被一个或多个独立选择的 C₁-C₄ 烷基、氧代、或-R_b 基团取代；具有两个环状结构的九至十元杂环；羰基基团，其被羟基、C₁-C₄ 烷基、或 C₁-C₄ 烷氧基基团取代；氨基甲酰基，其任选地被一个或两个 C₁-C₄ 烷基基团取代；硝基基团；氰基基团；任选地被羟基、C₁-C₄ 烷基、或-R_b 基团取代的硫代；磺酰基，其任选地被羟基、C₁-C₄ 烷基、或-R_b 基团取代；氨基，其任选地被一个或两个独立选择的 C₁-C₄ 烷基、磺酰基或羰基基团取代，其中的所述氨基磺酰基任选地被羟基、C₁-C₄ 烷基、或-R_b 基团取代，且其中的所述氨基羰基基团任选地被 C₁-C₄ 烷基、C₁-C₄ 卤烷基、苯甲酰氧基或被-R_b 基团任选地取代

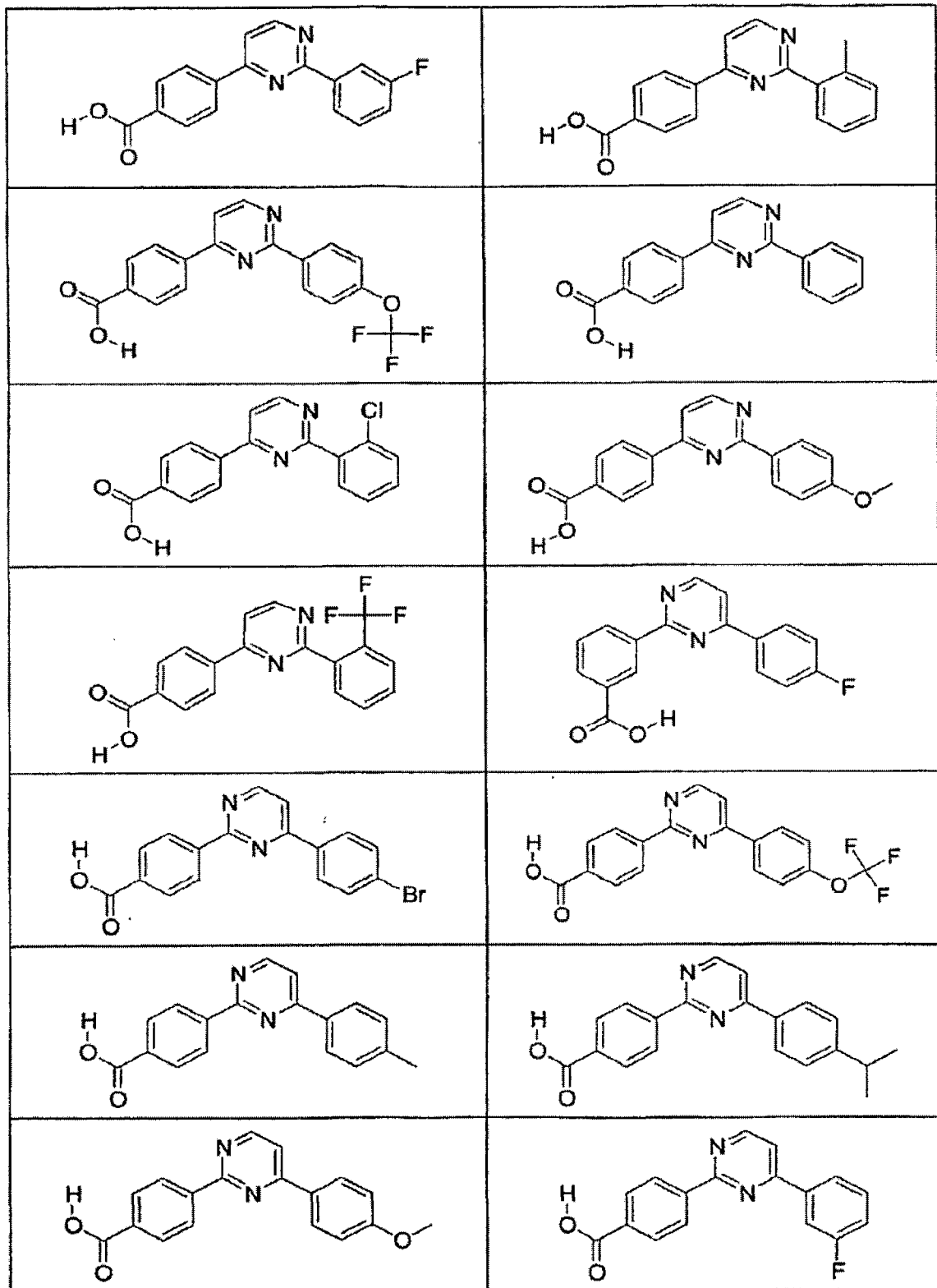
的氨基基团取代；或者两个 R 基团与它们所连接的苯环一起形成苯并[1,3]二氧杂或 2,3-二氢-苯并[1,4]二噁唑基(dioxinyl)基团，其中-R_b为 C₆-C₈芳基，任选地被一个或多个如下基团取代：羟基、卤素、C₁-C₄烷基基团、C₁-C₄卤烷基基团、C₁-C₄烷氧基基团、或任选第一个或多个 C₁-C₄烷基基团取代的氨基基团。

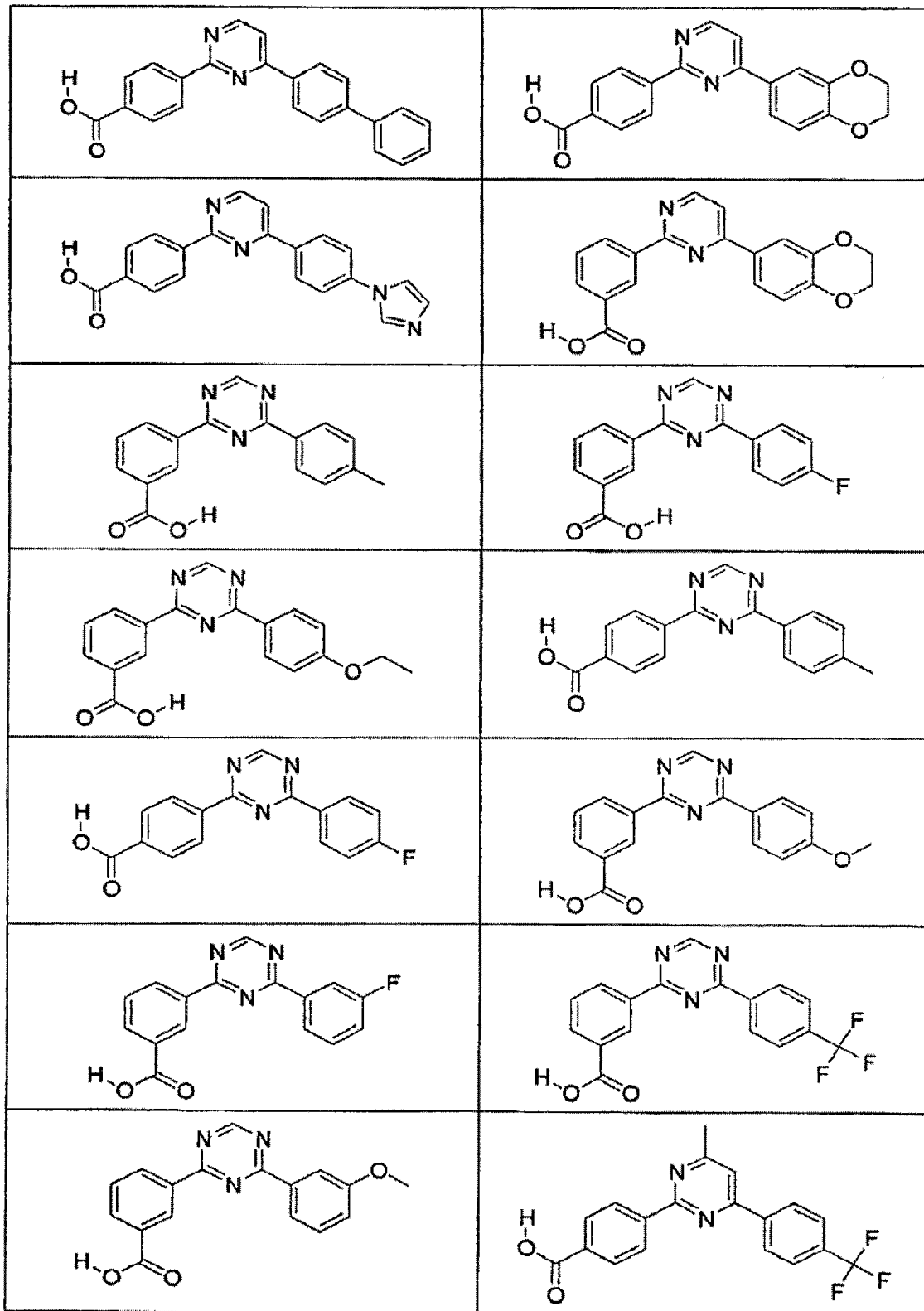
优选的式 VI 的化合物列于下表 6:

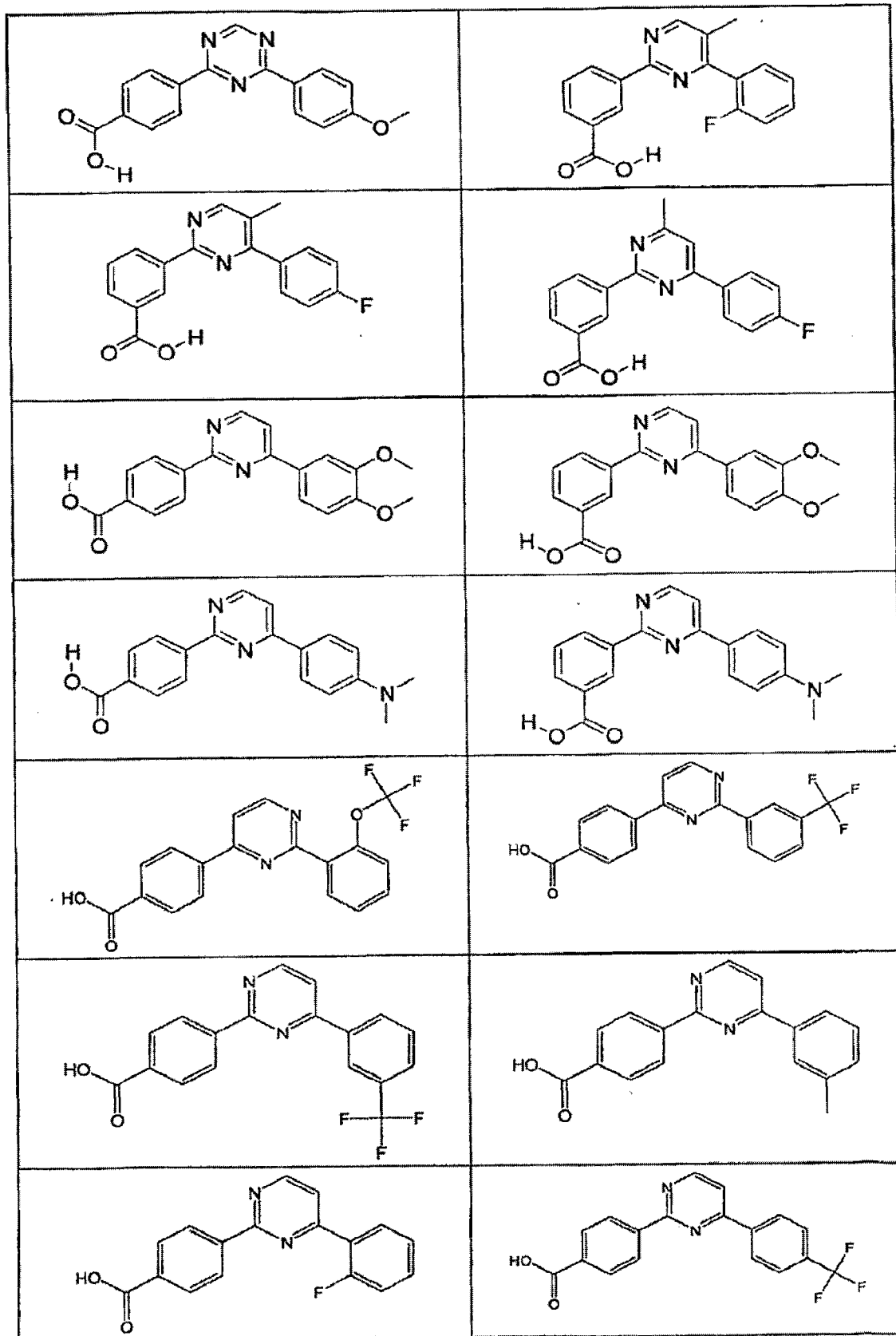
表 6

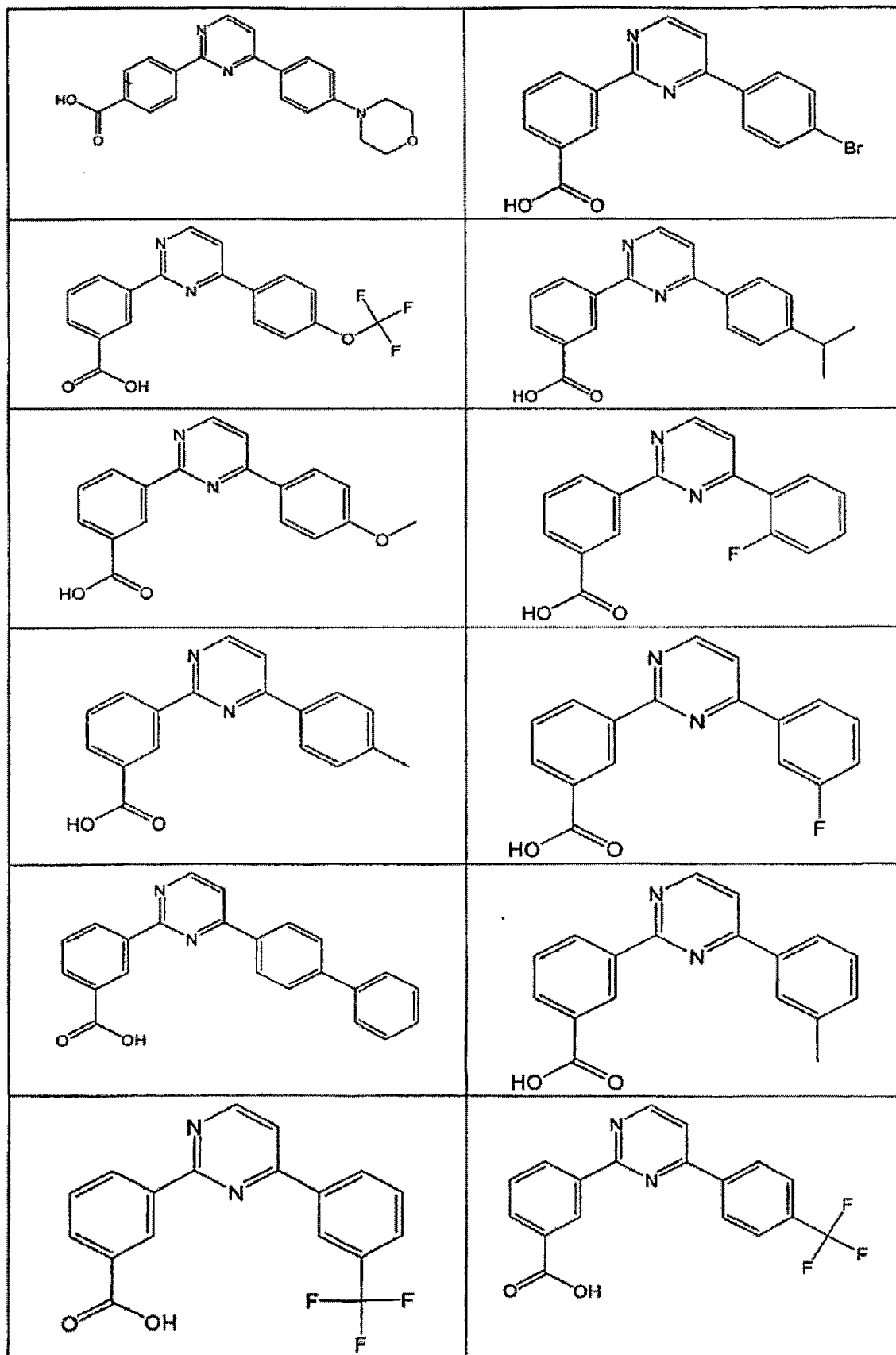
	
	
	
	
	

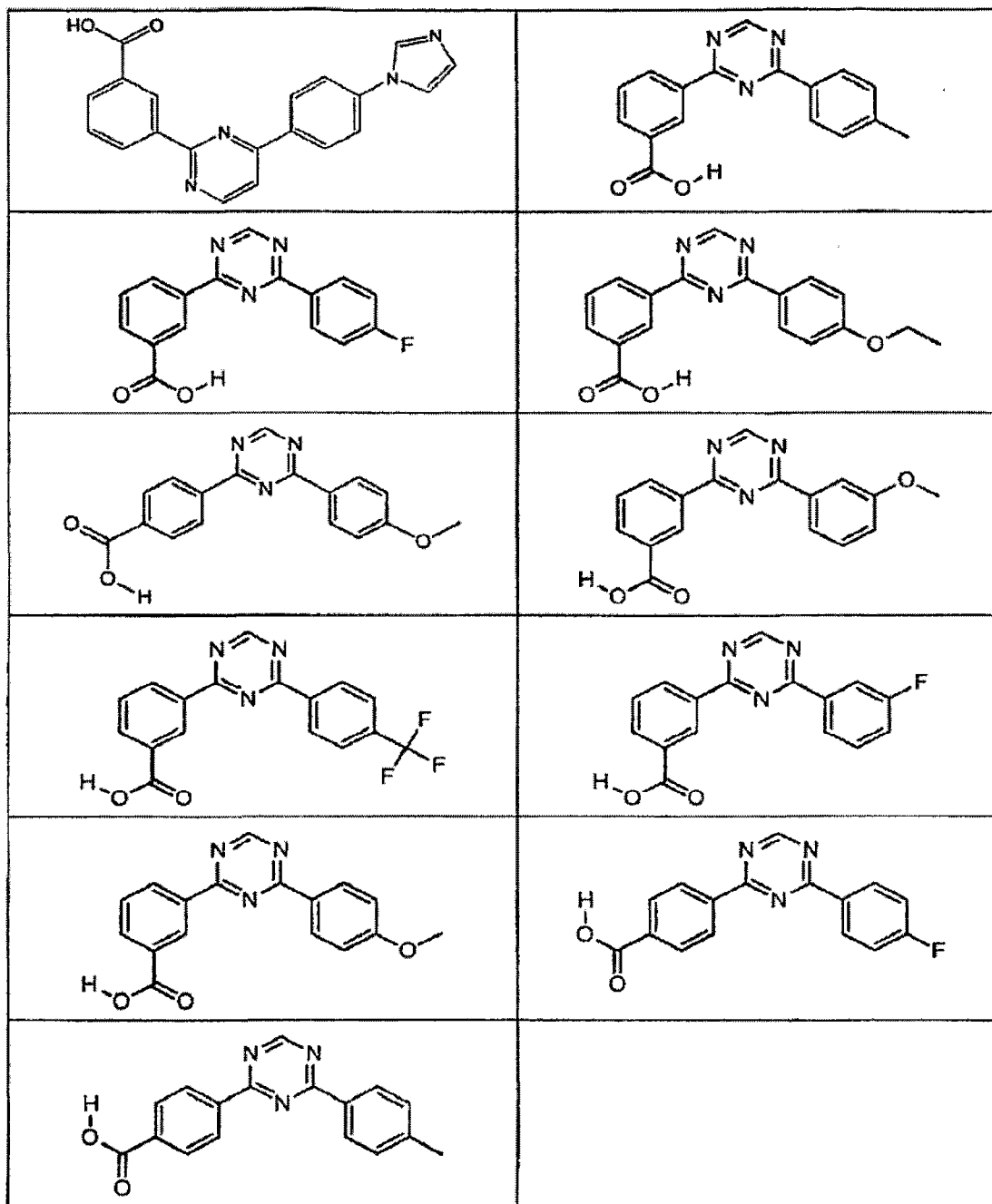








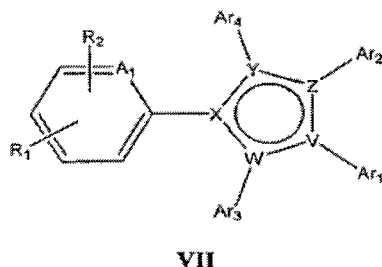




式 VI 的化合物可通过标准的、公知的合成方法获得, 该类方法可参见, 例如, March, J. *Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms and Structure*, 第 4 版, 1992。因此, 可用于制备具式 VI 的化合物的起始材料和中间体可从市场购得, 或可由商业途径购得的材料采用已知的合成方法和试剂制备得到。

制备式 VI 的化合物的具体方法在 2005 年 10 月 13 日提交的国际申请 PCT/US05/036764 中有公开，其全文在此引用作为参考。

在另一实施方式中，该无义密码子抑制剂为式 VII 的化合物：



或其药学上可接受的盐、水合物、包合物、前药、多晶型、立体异构体，立体异构体包括对映体、非对映体、外消旋体或立体异构体的混合物，其中：

A_1 为 C、CH 或 N；

V 和 X 独立地选自 N 或 C；

W 选自 N、C 或 CH；

其中 V、W 或 X 中至少一个为 N，且其中当 W 为 N 时，V 或 X 中至少一个也是 N；

Y 和 Z 独立地选自 N、C、C- R_c 、C=O、C=S，其中 R_c 为 H、 CH_3 或 NH_2 ；前提是，当 Y 或 Z 之一为 C=O 或 C=S 时，另一个可选自 NH、S 或 O；

R_1 为羧基、氰基或羰基基团，任选地被 C_1 - C_4 烷氧基基团取代；

R_2 缺失或为硝基；

Ar_1 为 C_1 至 C_4 烷基，任选地被 R 基团取代； C_6 至 C_{10} 芳基，其任选地被一个、两个或三个独立选择的 R 基团取代；五至十元杂环，其任选地被一个、两个、三个独立选择的 R 基团取代；或与 Ar_2 和 Ar_1 和 Ar_2 所连接的

杂环一起形成选自 Ar_{1-2} 的环状结构；或与 Ar_3 和 Ar_1 和 Ar_3 所连接的杂环一起形成选自 Ar_{1-3} 的环状结构；

Ar_2 缺失或与 Ar_1 和 Ar_1 和 Ar_2 所连接的杂环一起形成选自 Ar_{1-2} 的环状结构；

Ar_3 缺失或与 Ar_1 和 Ar_1 和 Ar_3 所连接的杂环一起形成选自 Ar_{1-3} 的环状结构；

Ar_4 缺失，或为 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、或 C_1 - C_4 硫烷基，其中的任何一个与 A_1 一起形成四至七元碳环或杂环；

R 为氢； $-R_a$ 基团；或两个 R 基团，其中 R 还可包括氧基团，与它们所连接的苯基或杂环一起形成选自 RR 的环状结构；

其中：

Ar_{1-2} 和 Ar_{1-3} 选自十一至十四元杂-三环环状结构，其任选地被一个或多个卤素、 C_1 - C_4 烷基基团、 C_1 - C_4 卤烷基基团、任选地被卤素或 C_1 - C_4 烷氧基基团取代的 C_1 - C_4 烷氧基基团、 C_1 - C_4 卤烷氧基基团、或任选地被羰基基团(被 C_1 - C_4 烷基基团取代)取代的氨基基团取代；

RR 为九至十元双环环状结构，其任选地被一个或多个卤素、 C_1 - C_4 烷基基团、 C_1 - C_4 卤烷基基团、 C_1 - C_4 烷氧基基团、氧代基团或 C_1 - C_4 卤烷氧基基团取代；

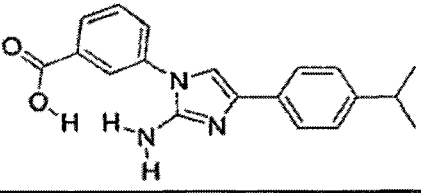
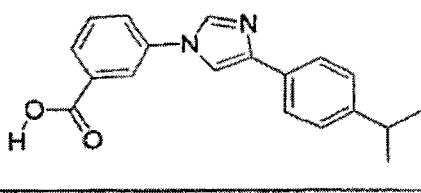
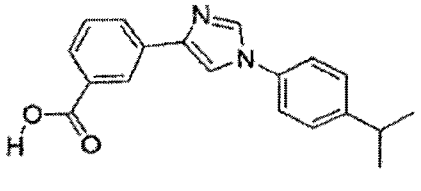
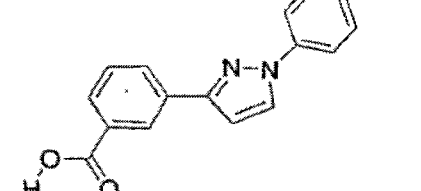
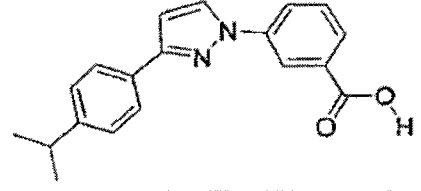
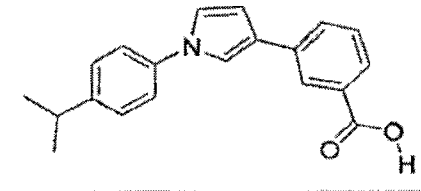
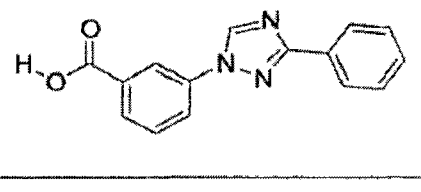
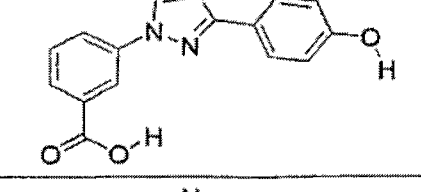
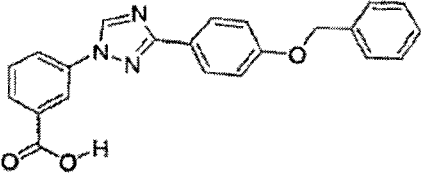
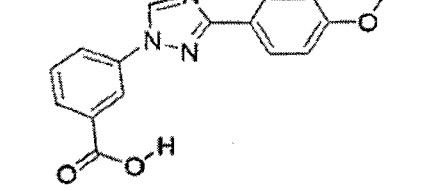
R_a 选自：羟基基团；卤素； C_1 - C_4 烷基，其任选地被一个或多个独立选择的卤素或羟基基团取代； C_1 - C_4 烷氧基，其任选地被一个或多个独立选择的卤素或苯基基团取代； C_4 - C_8 环烷基，其任选地被一个或多个独立选择的 C_1 - C_4 烷基基团取代； $-R_b$ 基团； $-O-R_b$ 基团；四至六元杂环，其任选地被一个或多个独立选择的 C_1 - C_4 烷基基团、氧代或 $-R_b$ 基团取代；具有两个环状

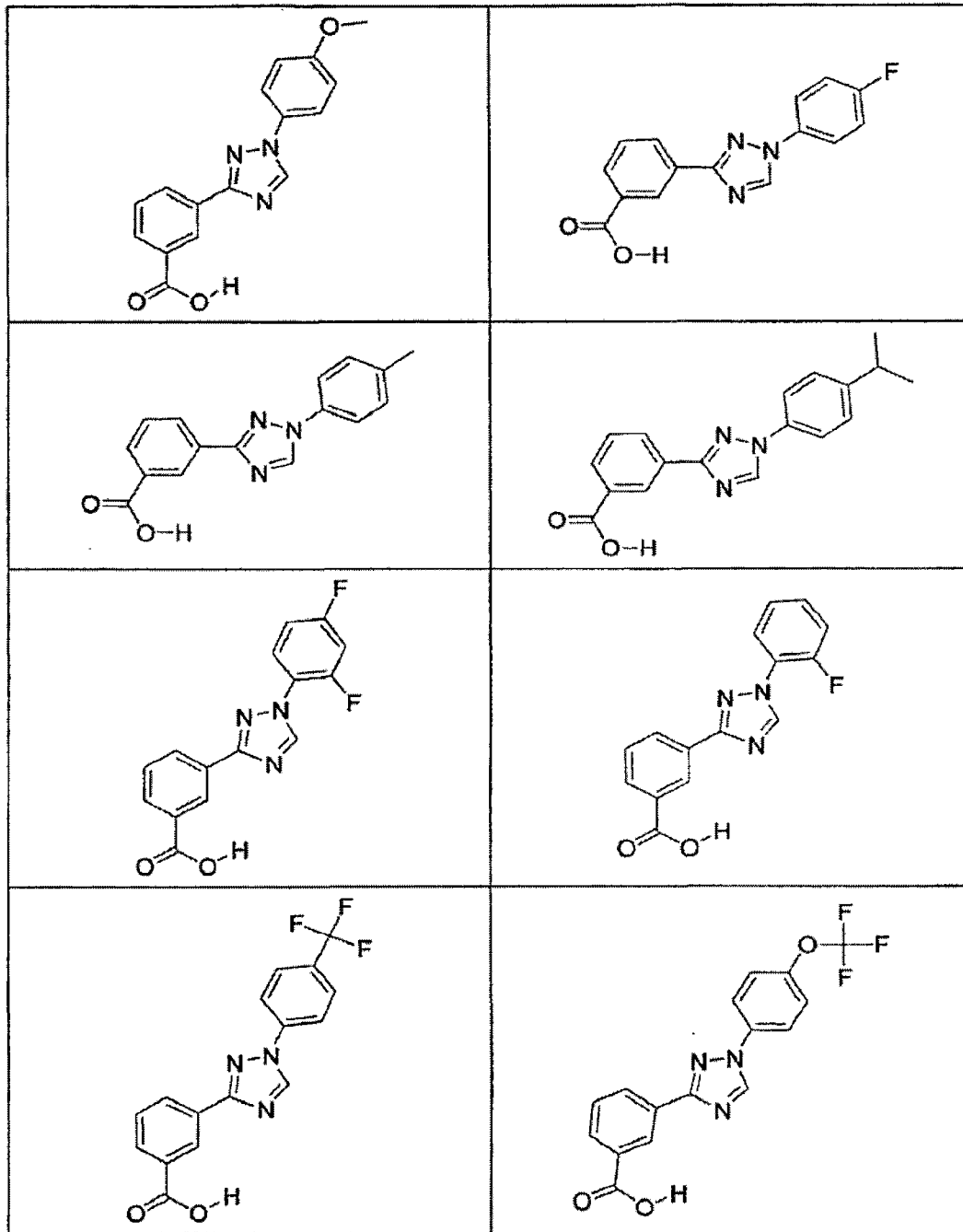
结构的九至十元杂环；羰基，其任选地被羟基、C₁-C₄烷基或C₁-C₄烷氧基基团取代；氨基甲酰，其任选地被一个或两个C₁-C₄烷基基团取代；硝基基团；氰基基团；任选地被羟基、C₁-C₄烷基基团或-R_b基团取代的硫代；磺酰基，其任选地被羟基、C₁-C₄烷基基团或-R_b基团取代；或氨基，其任选地被一个或两个独立选择的C₁-C₄烷基、磺酰基或羰基基团取代，其中的所述氨基磺酰基基团任选地被羟基、C₁-C₄烷基或-R_b基团取代，且其中的所述氨基羰基被C₁-C₄烷基、C₁-C₄卤烷基、苯甲酰氧基或任选地被-R_b基团取代的氨基基团取代；和

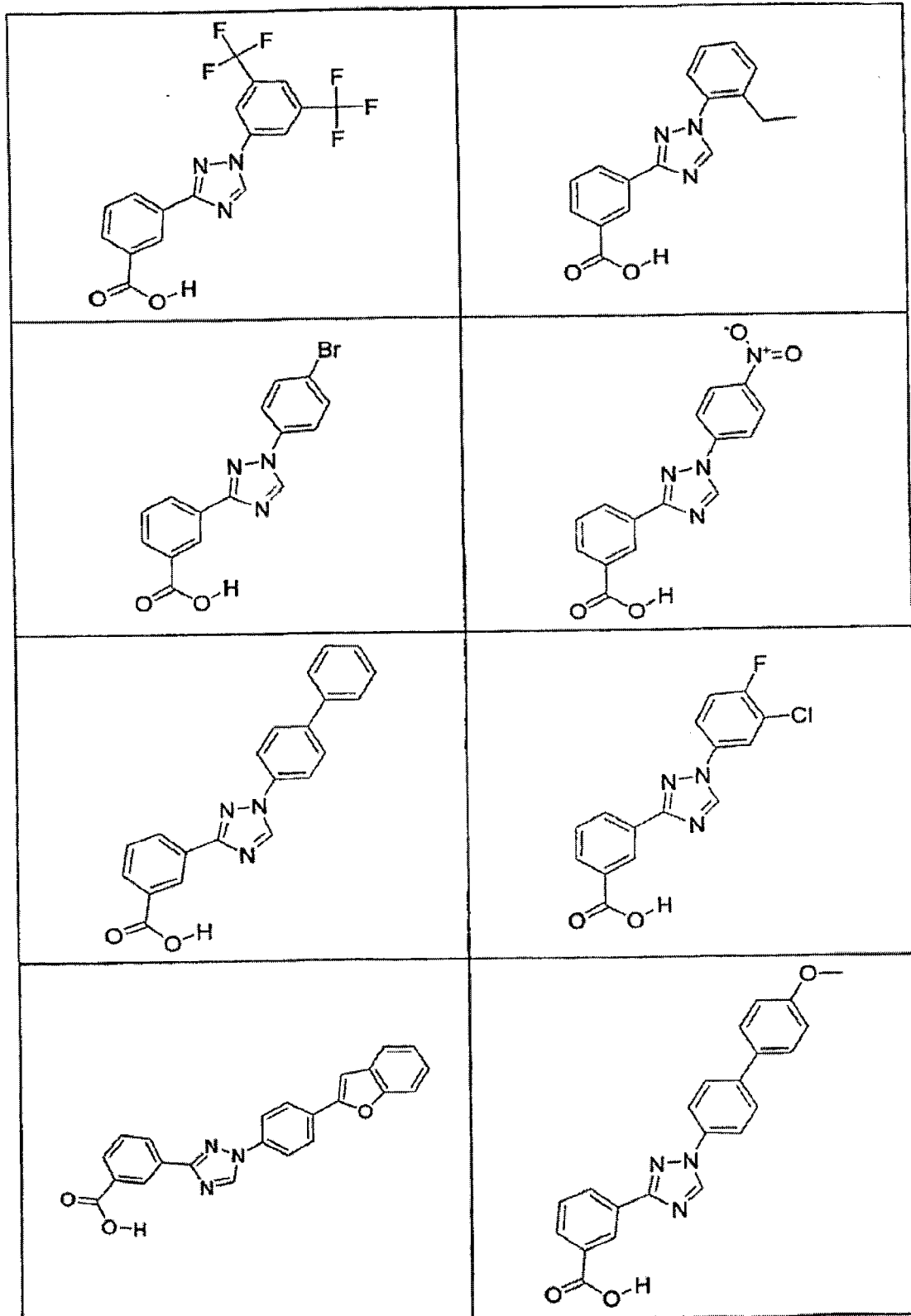
其中-R_b为C₆-C₈芳基，其任选地被一个或多个如下基团取代：羟基、卤素、C₁-C₄烷基基团、C₁-C₄卤烷基基团、C₁-C₄烷氧基基团、或任选地被一个或多个C₁-C₄烷基基团取代的氨基基团。

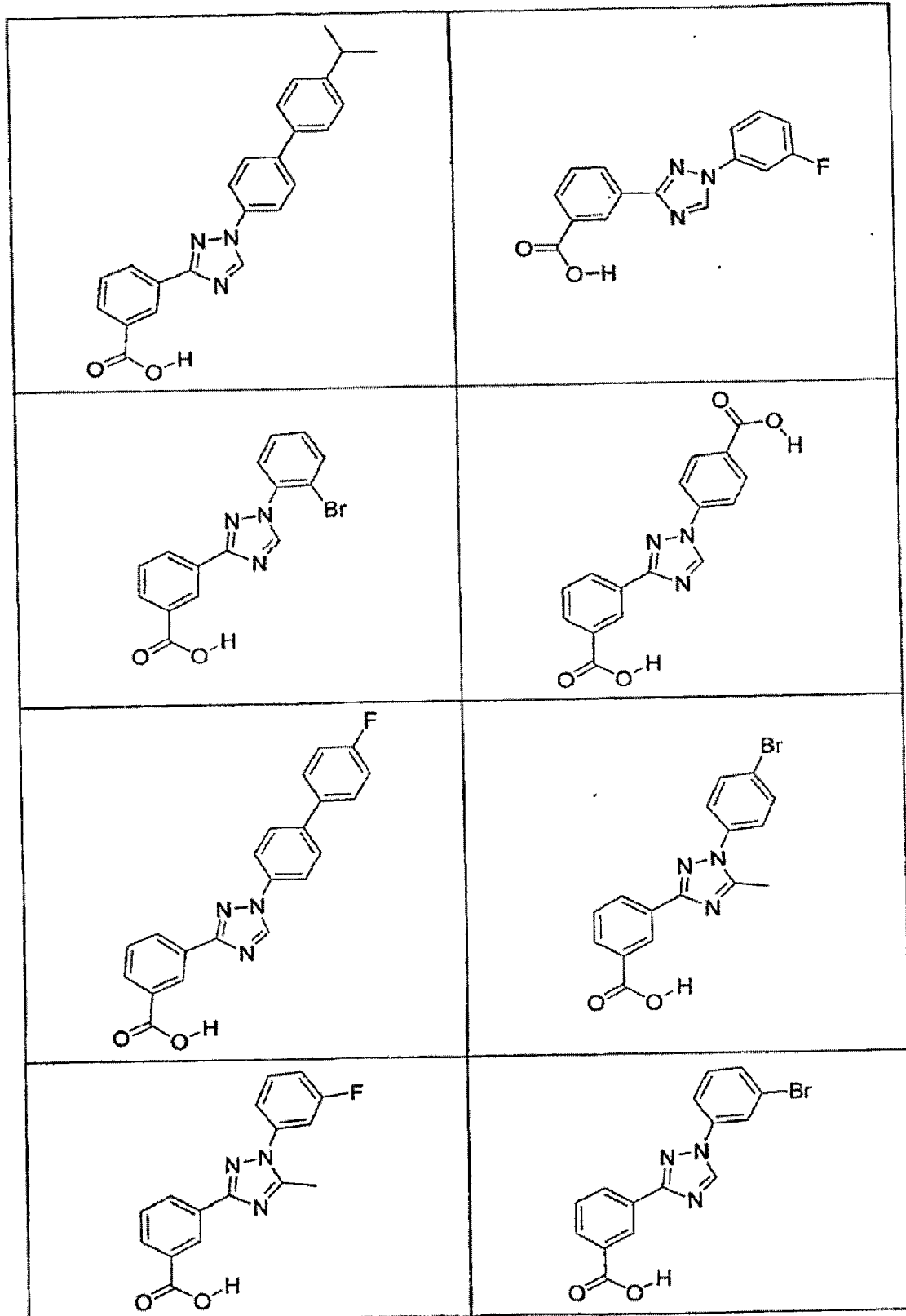
优选的式VII的化合物列于下表7:

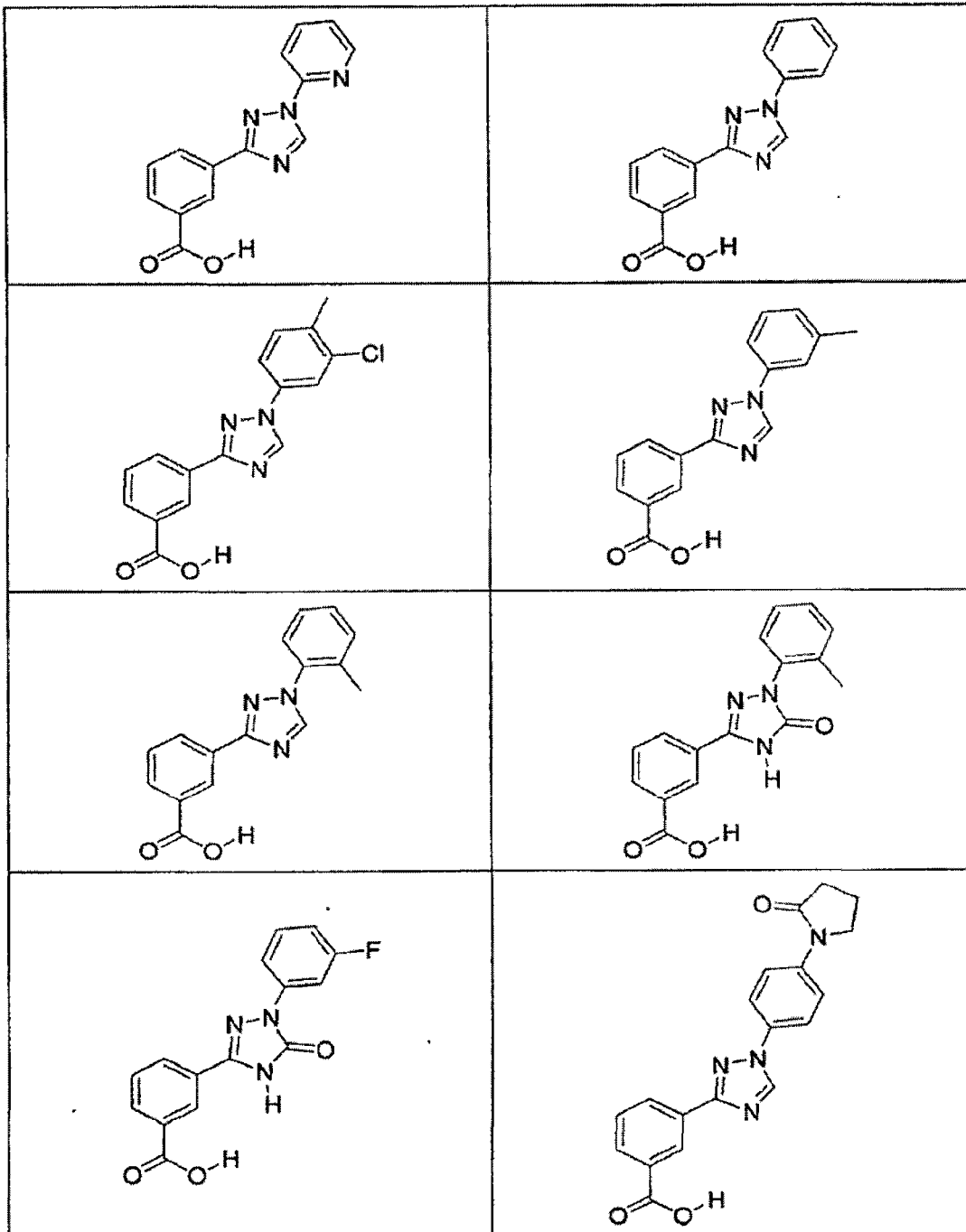
表 7

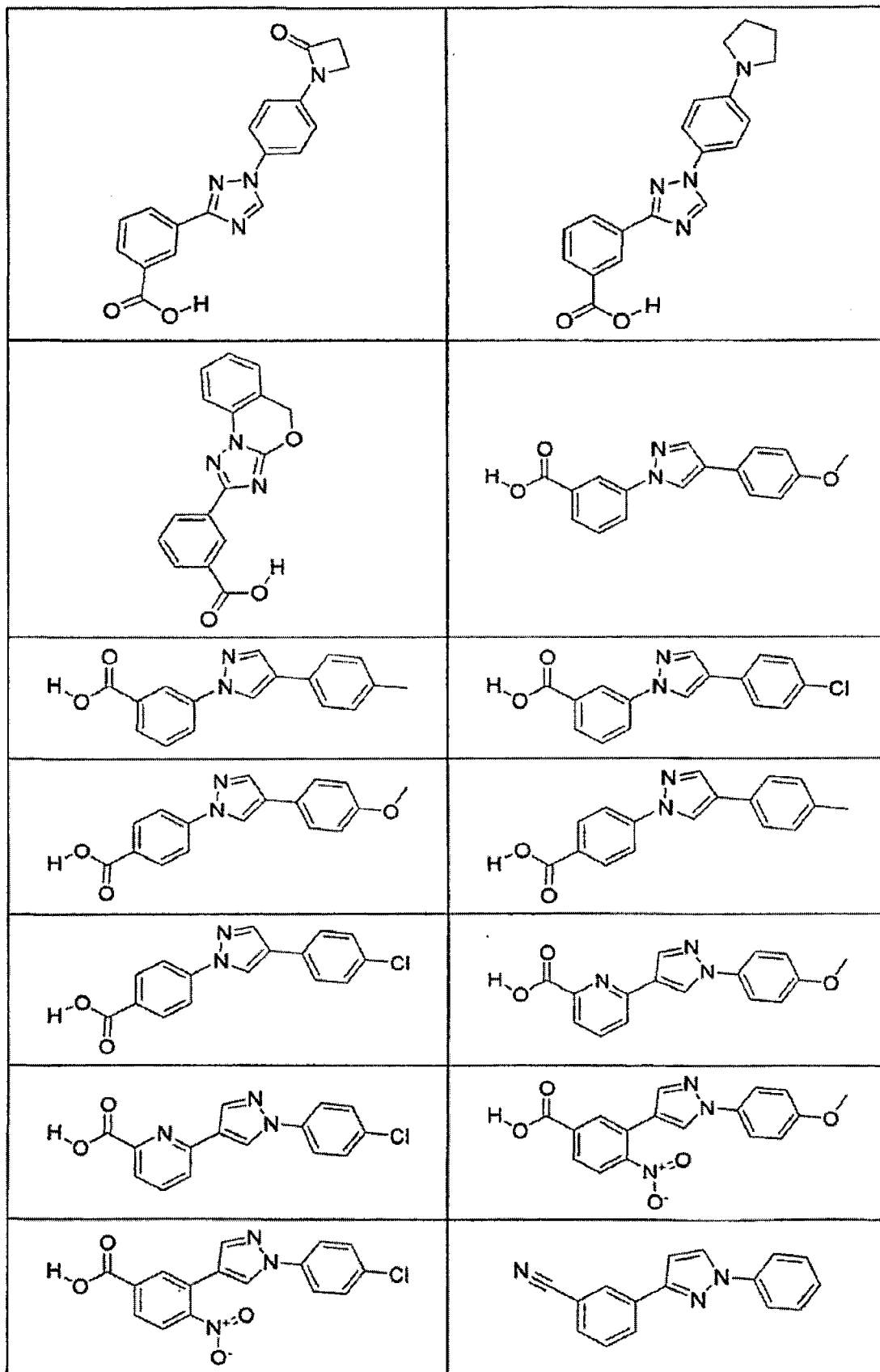
	
	
	
	
	

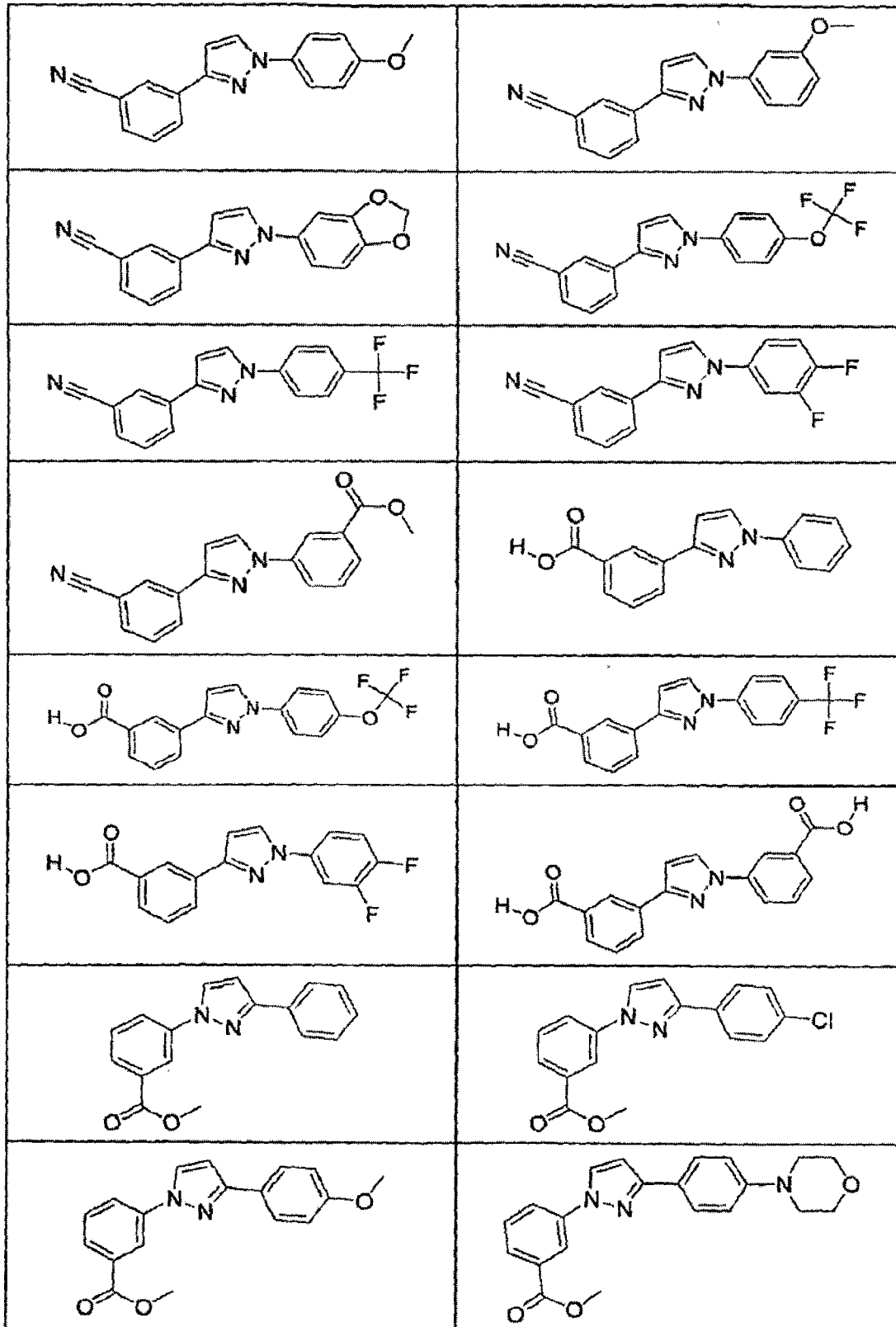


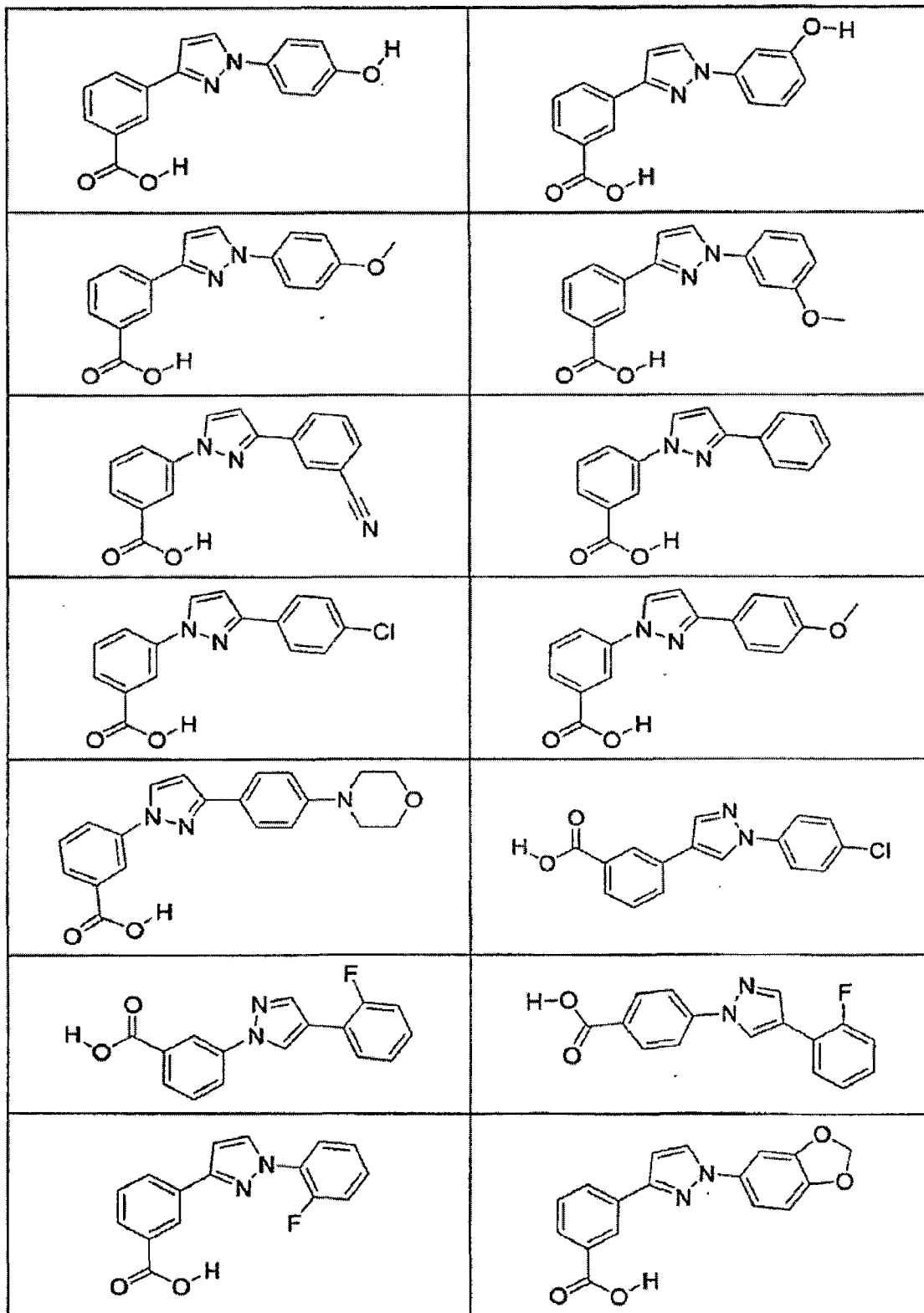


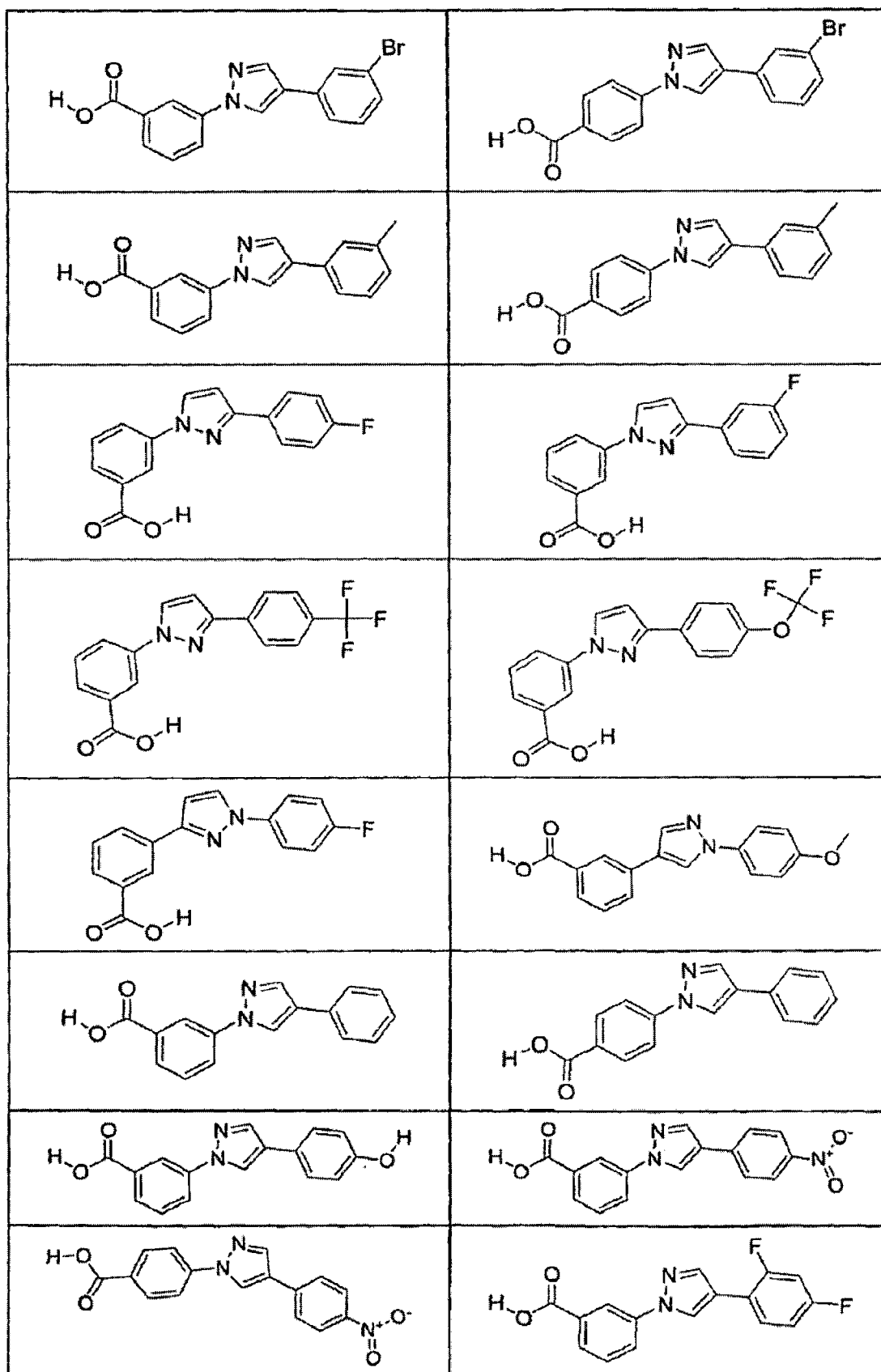


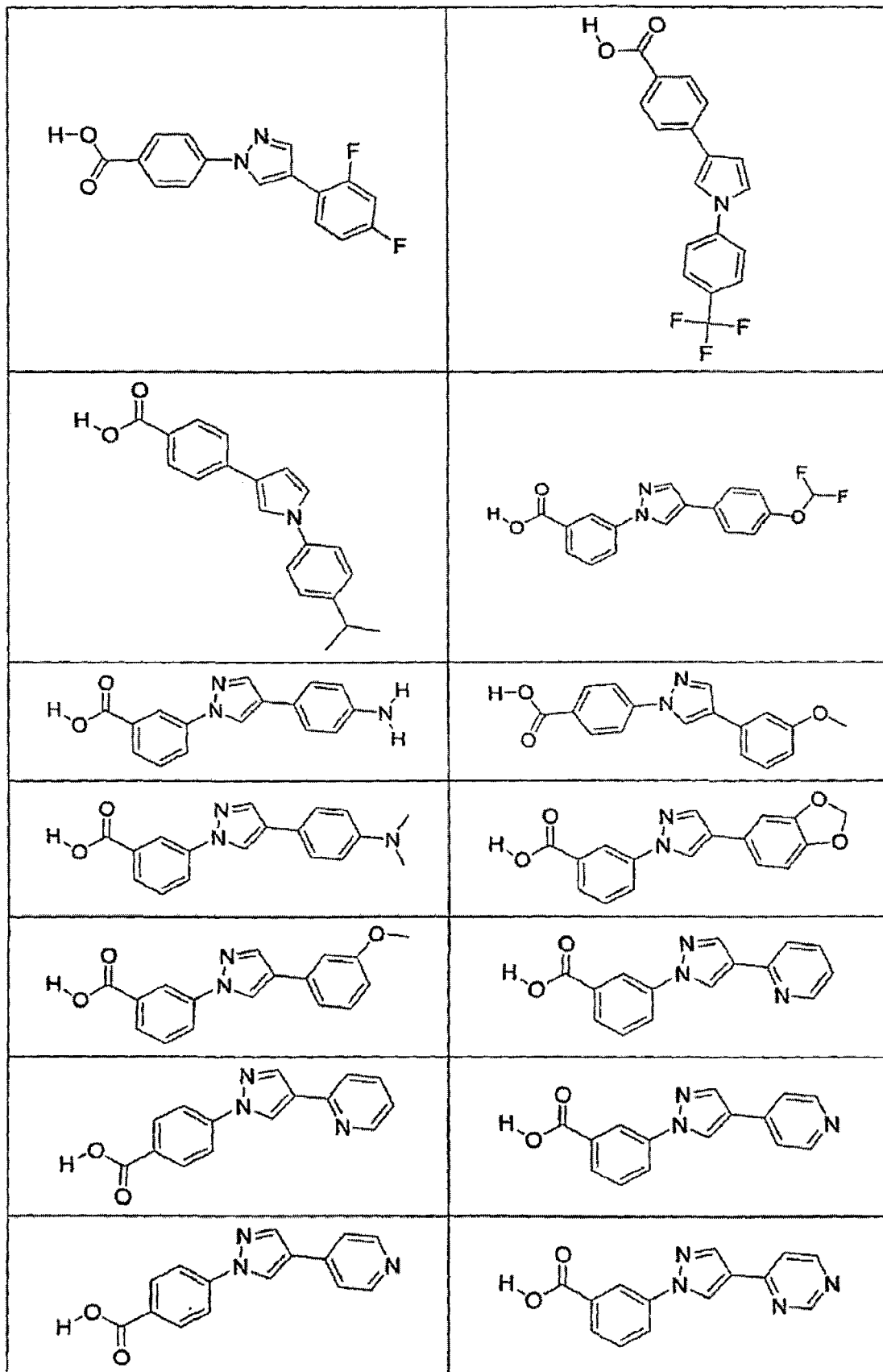


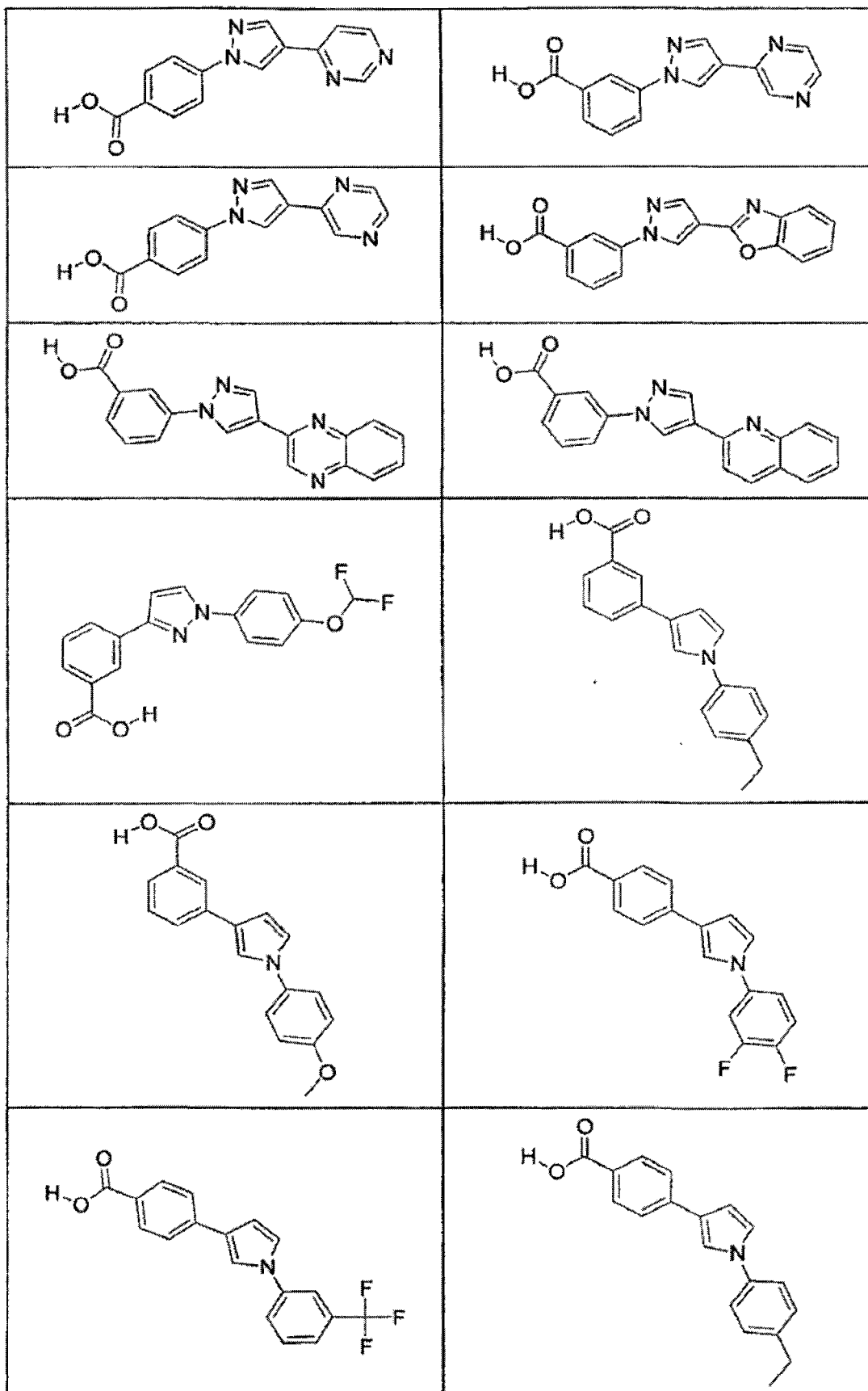


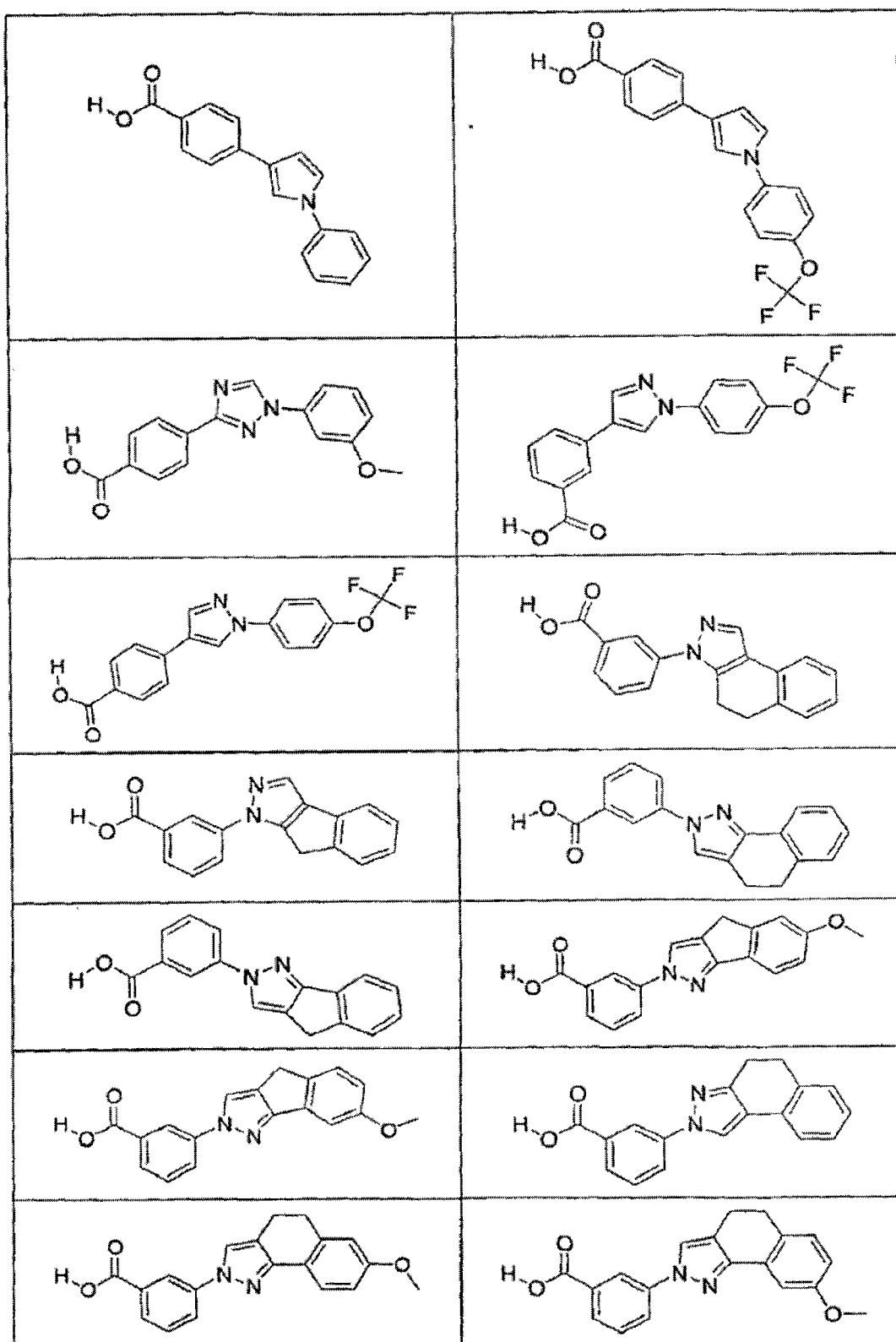


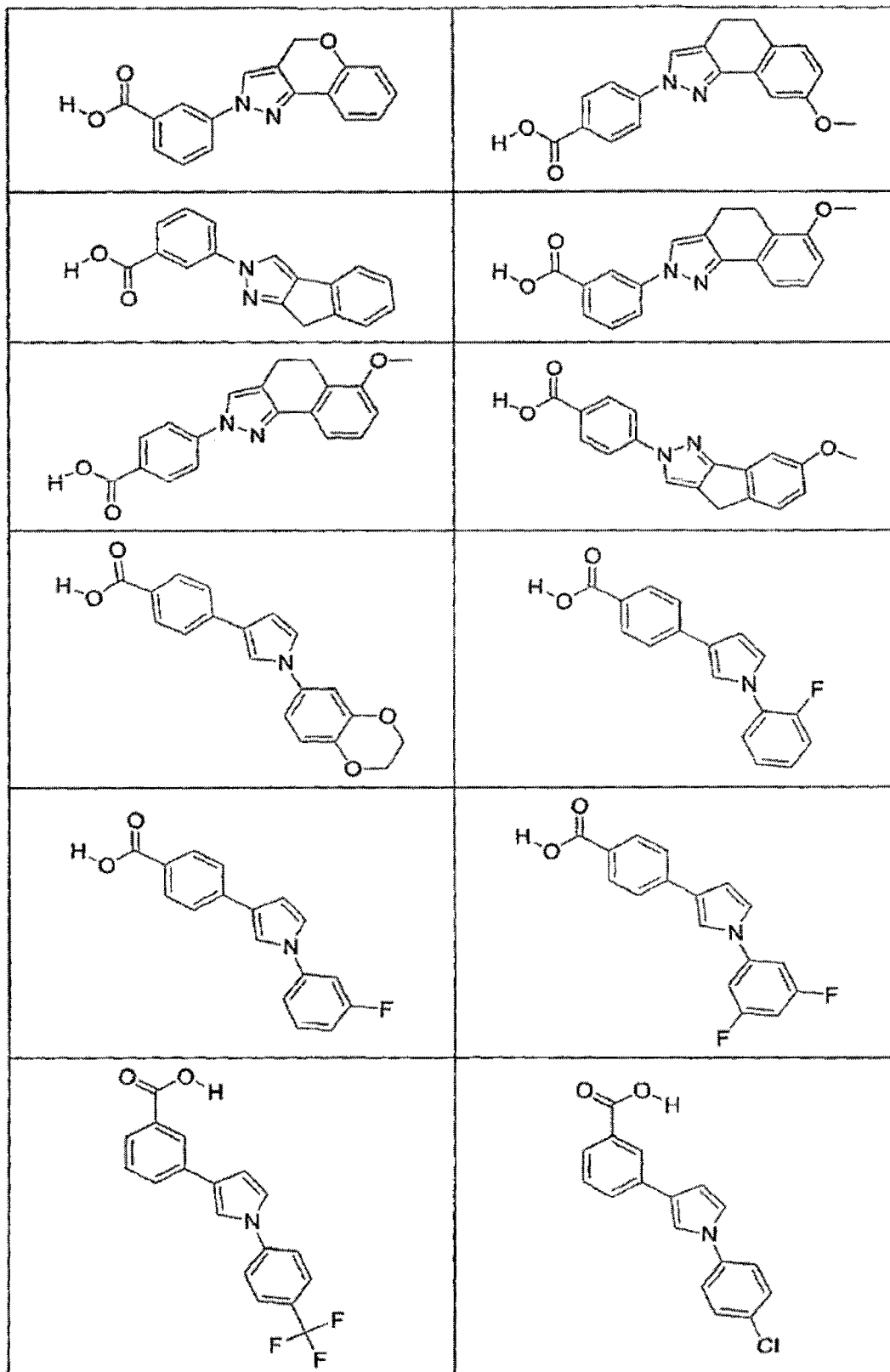


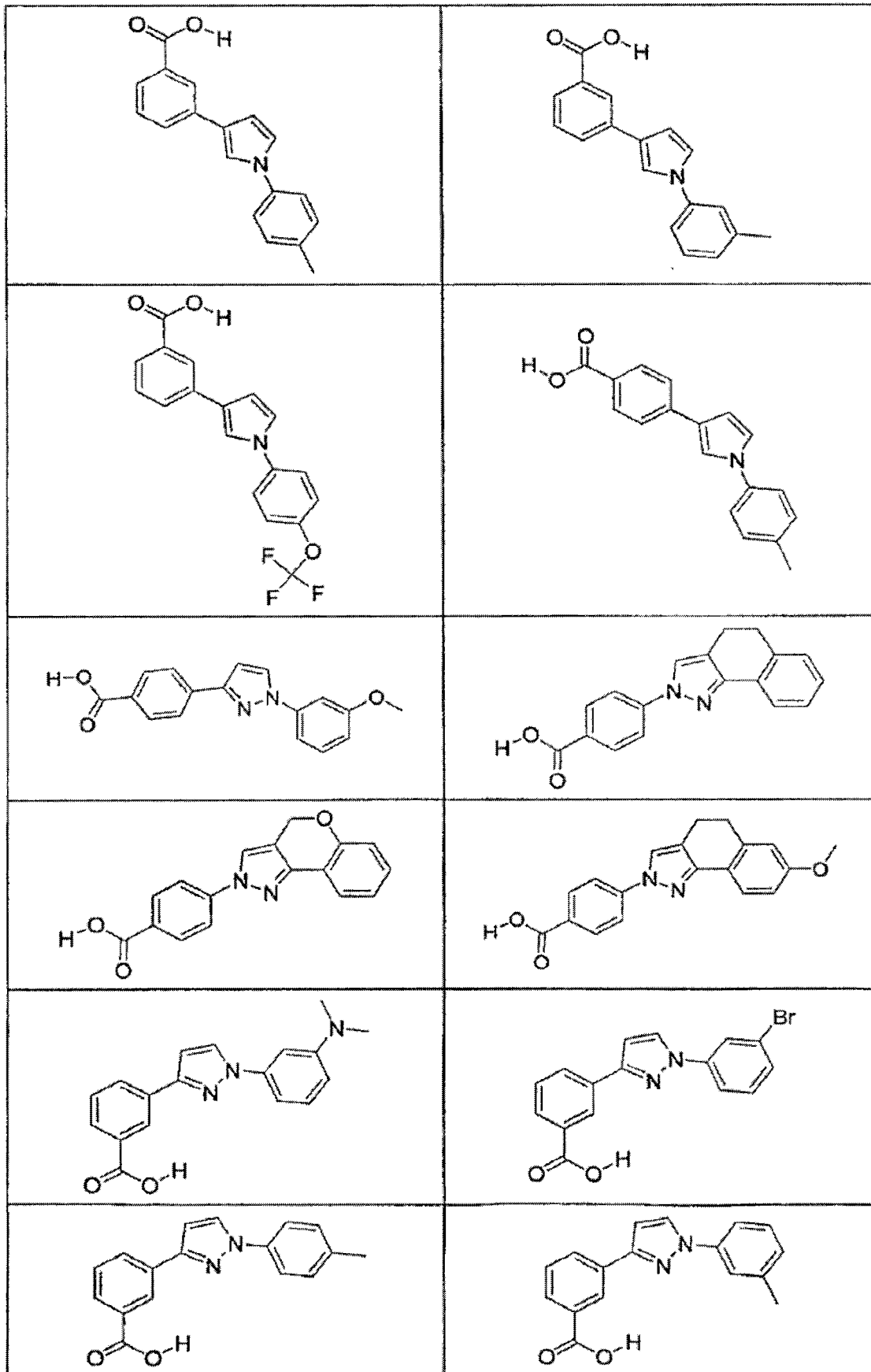


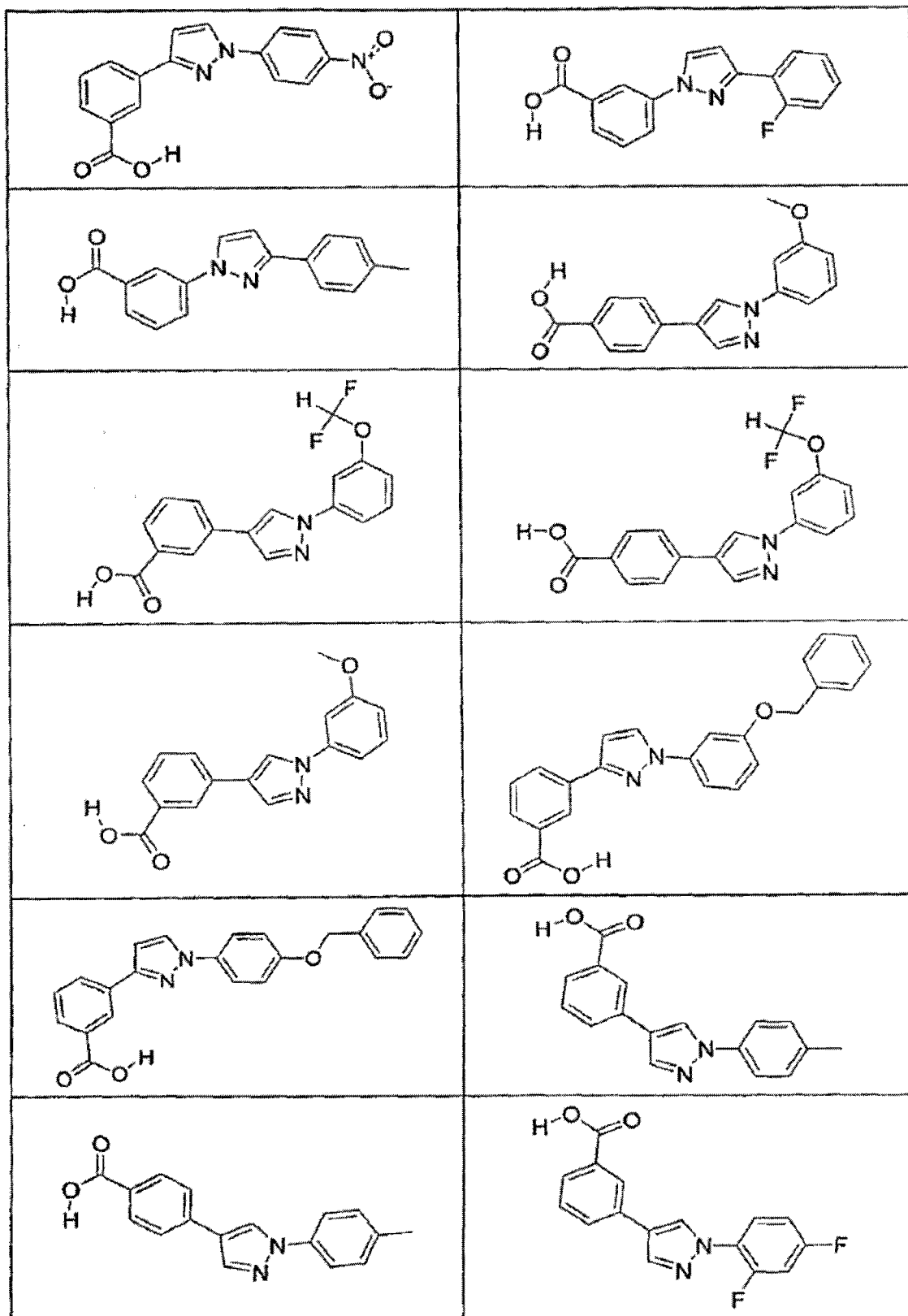


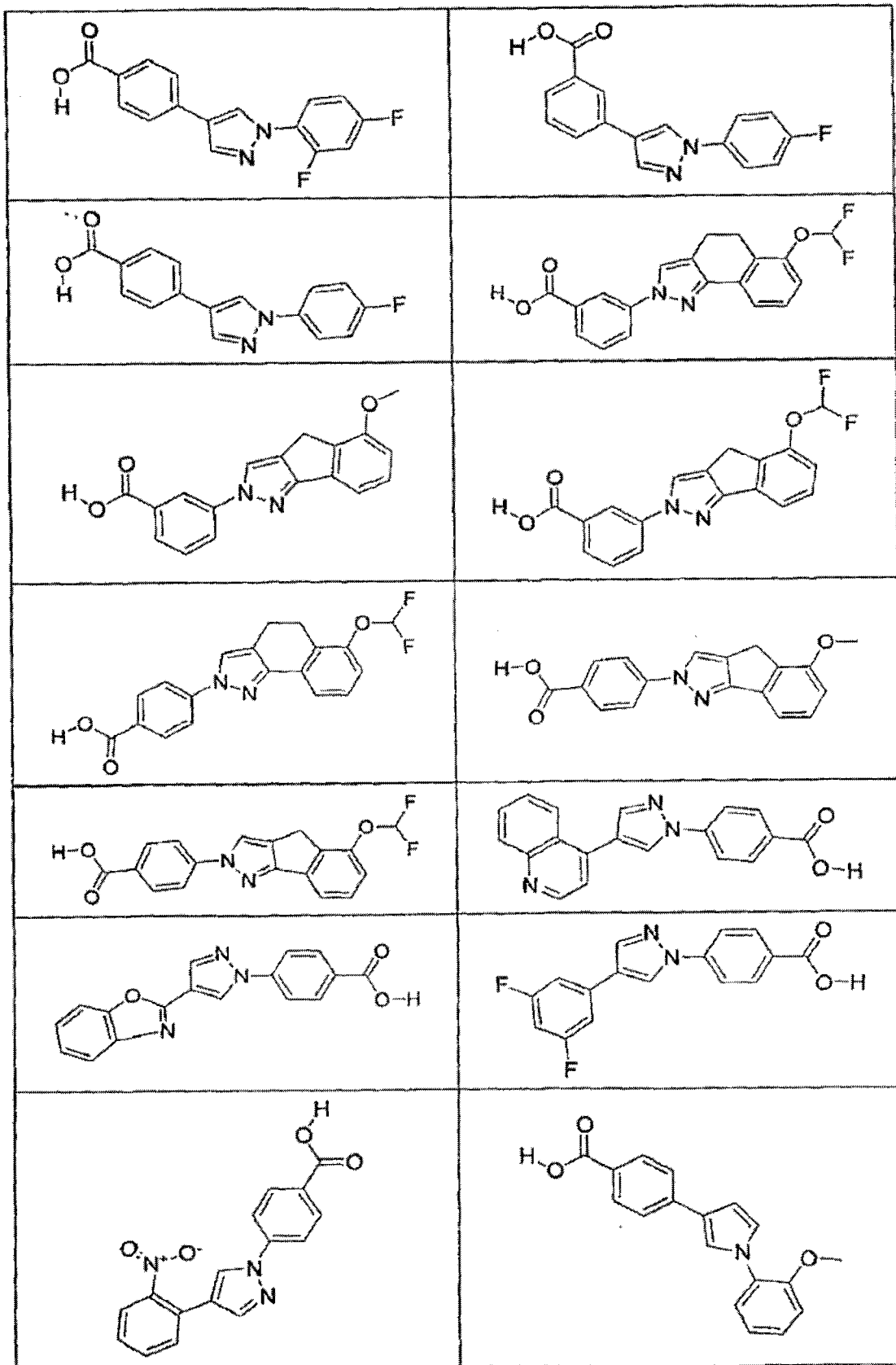


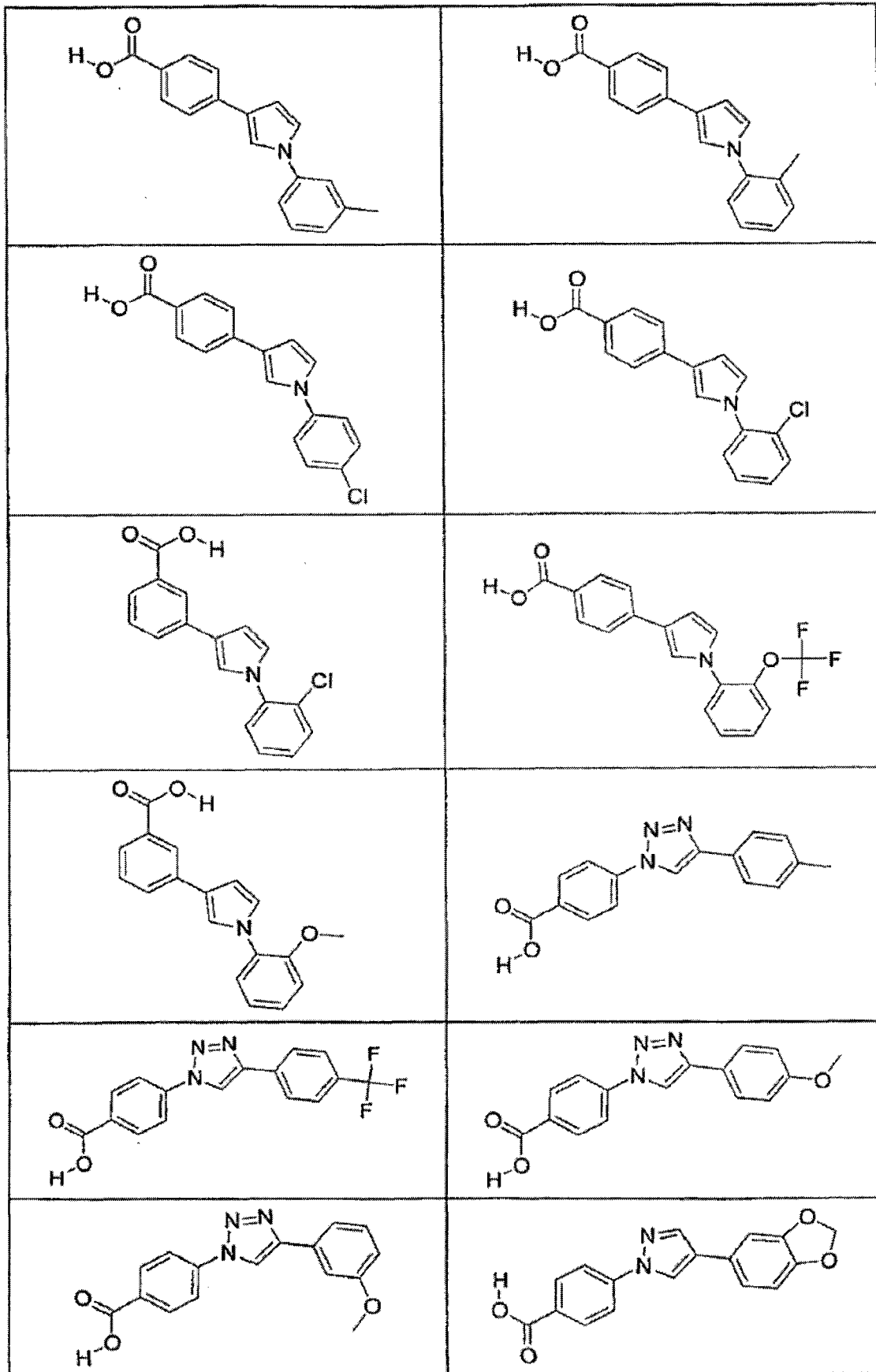


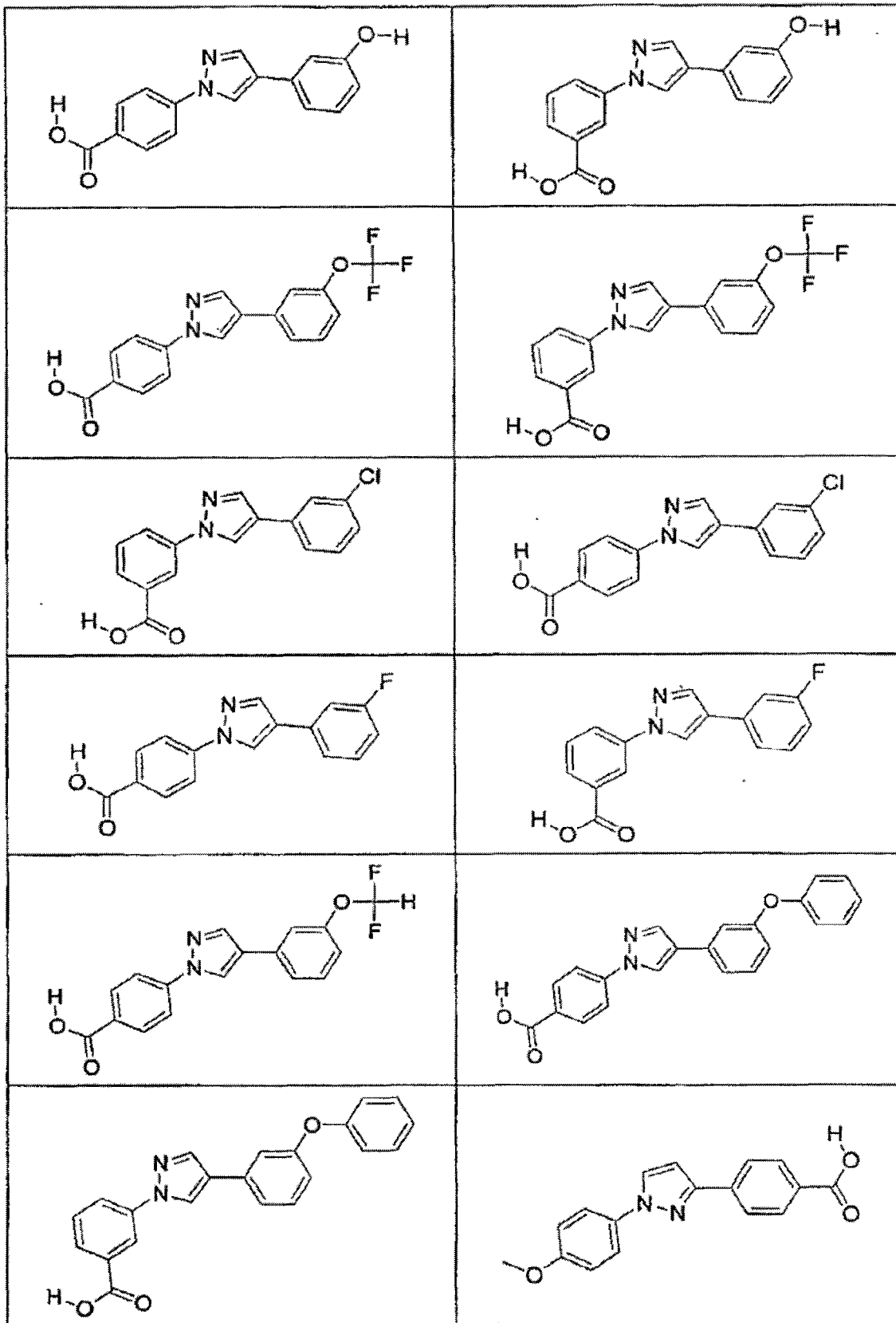


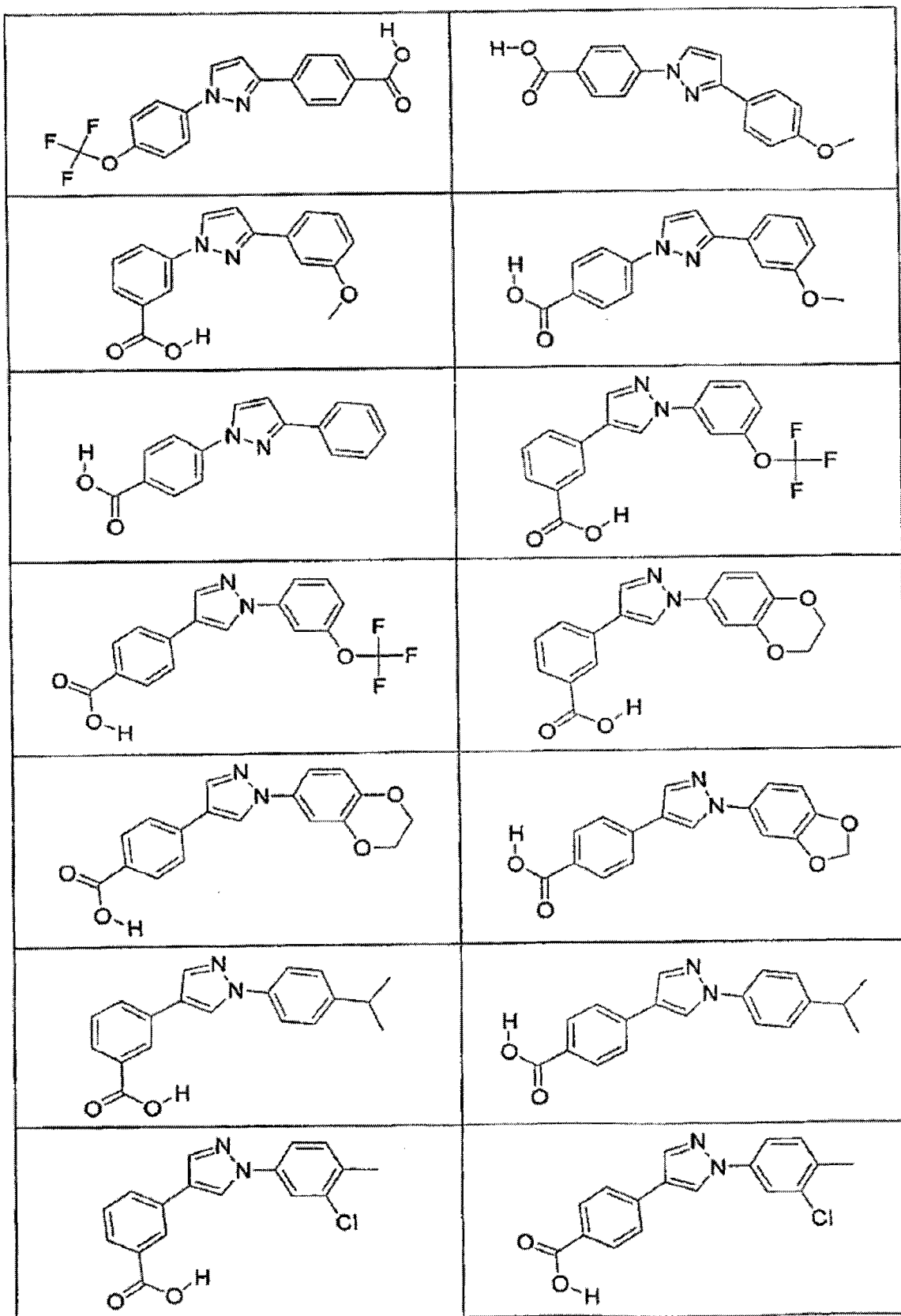


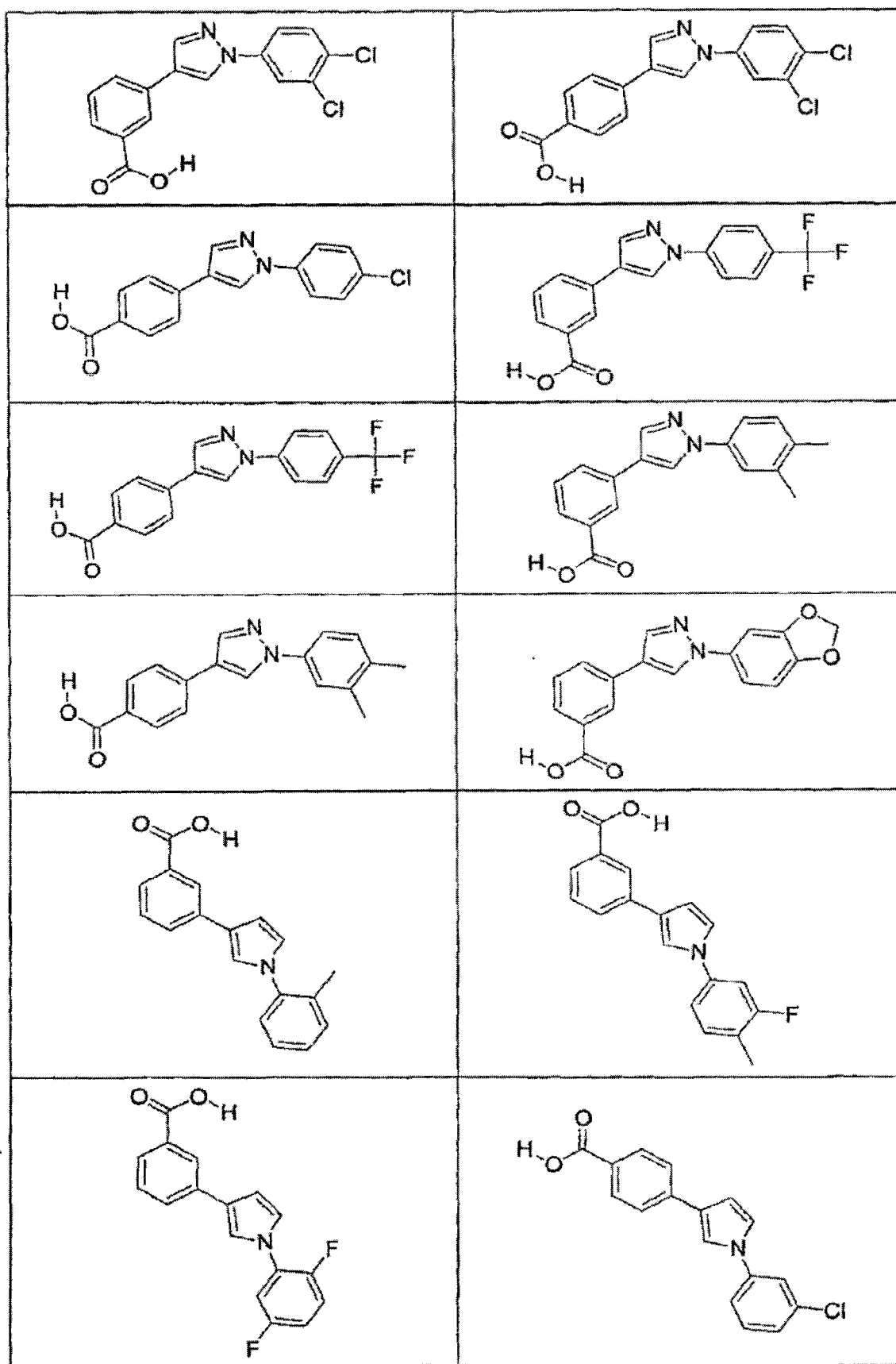


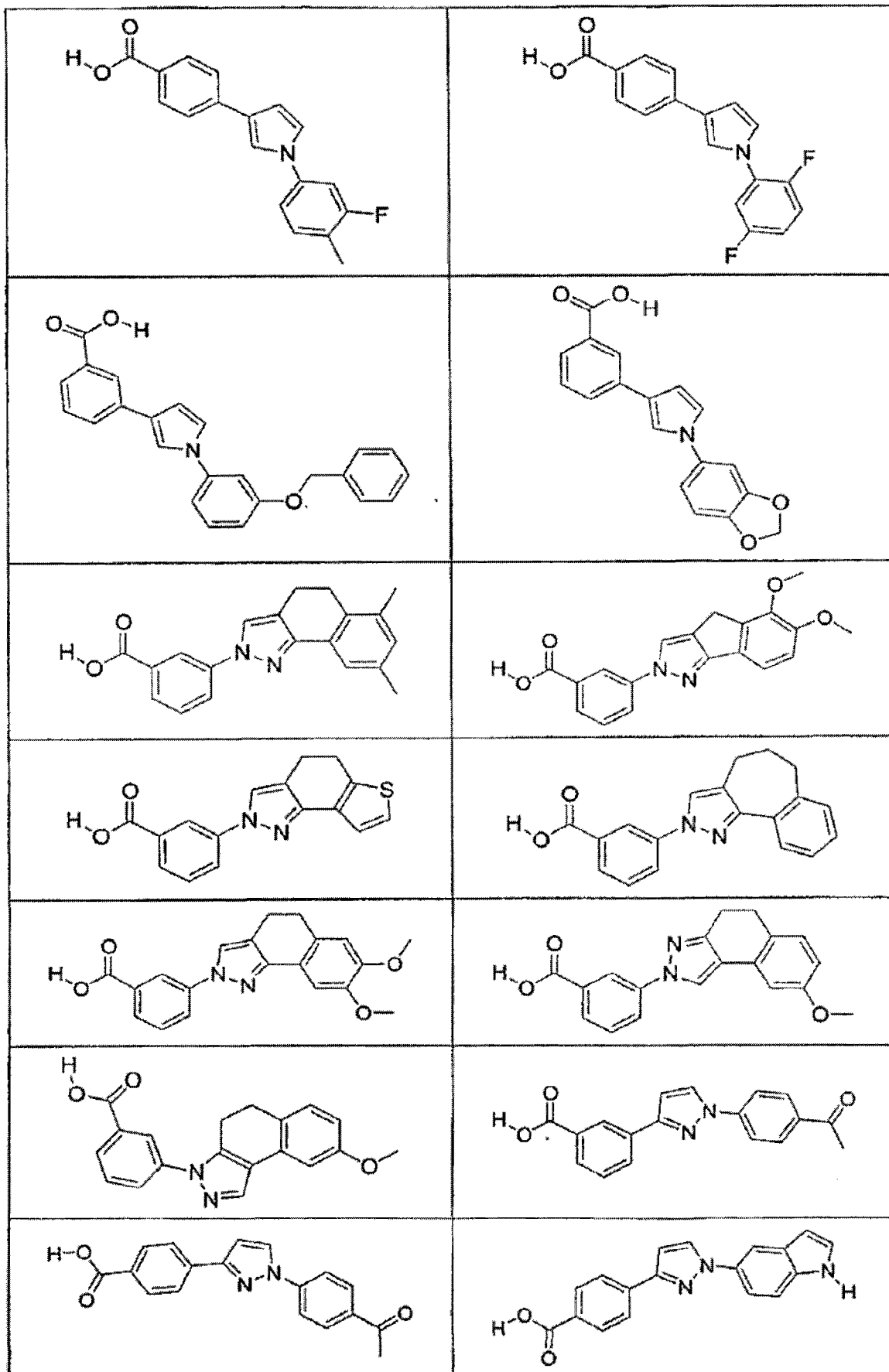


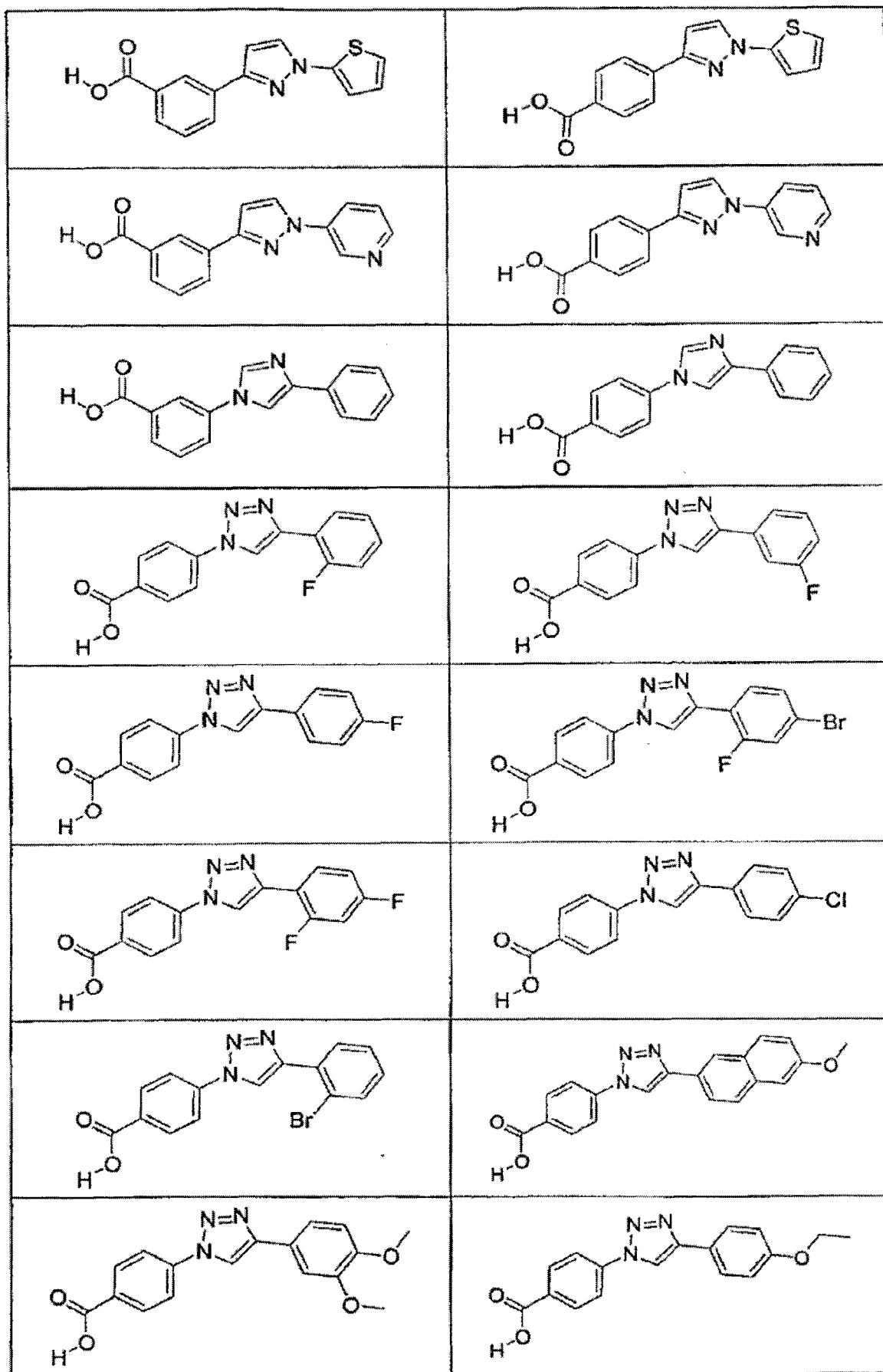


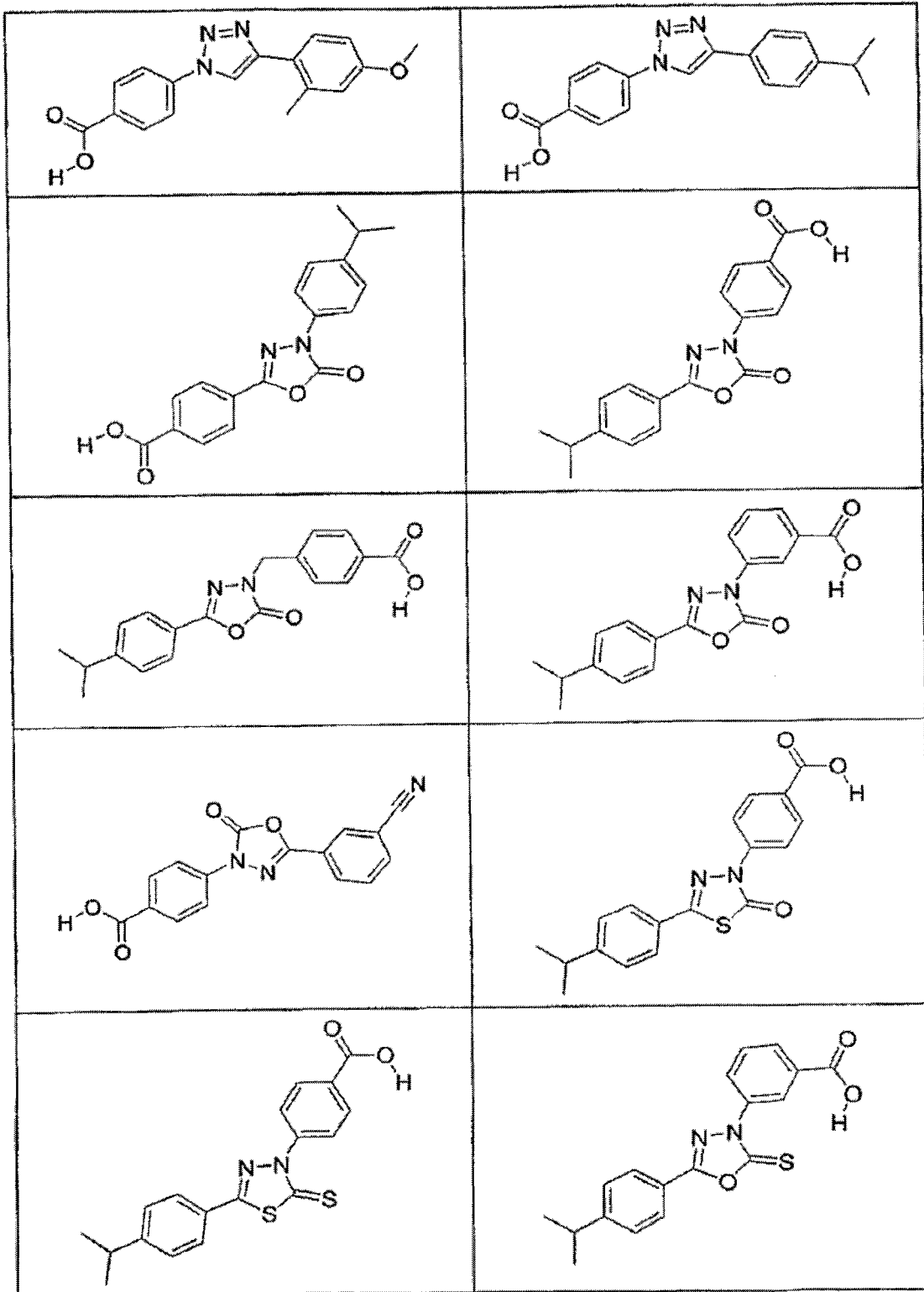


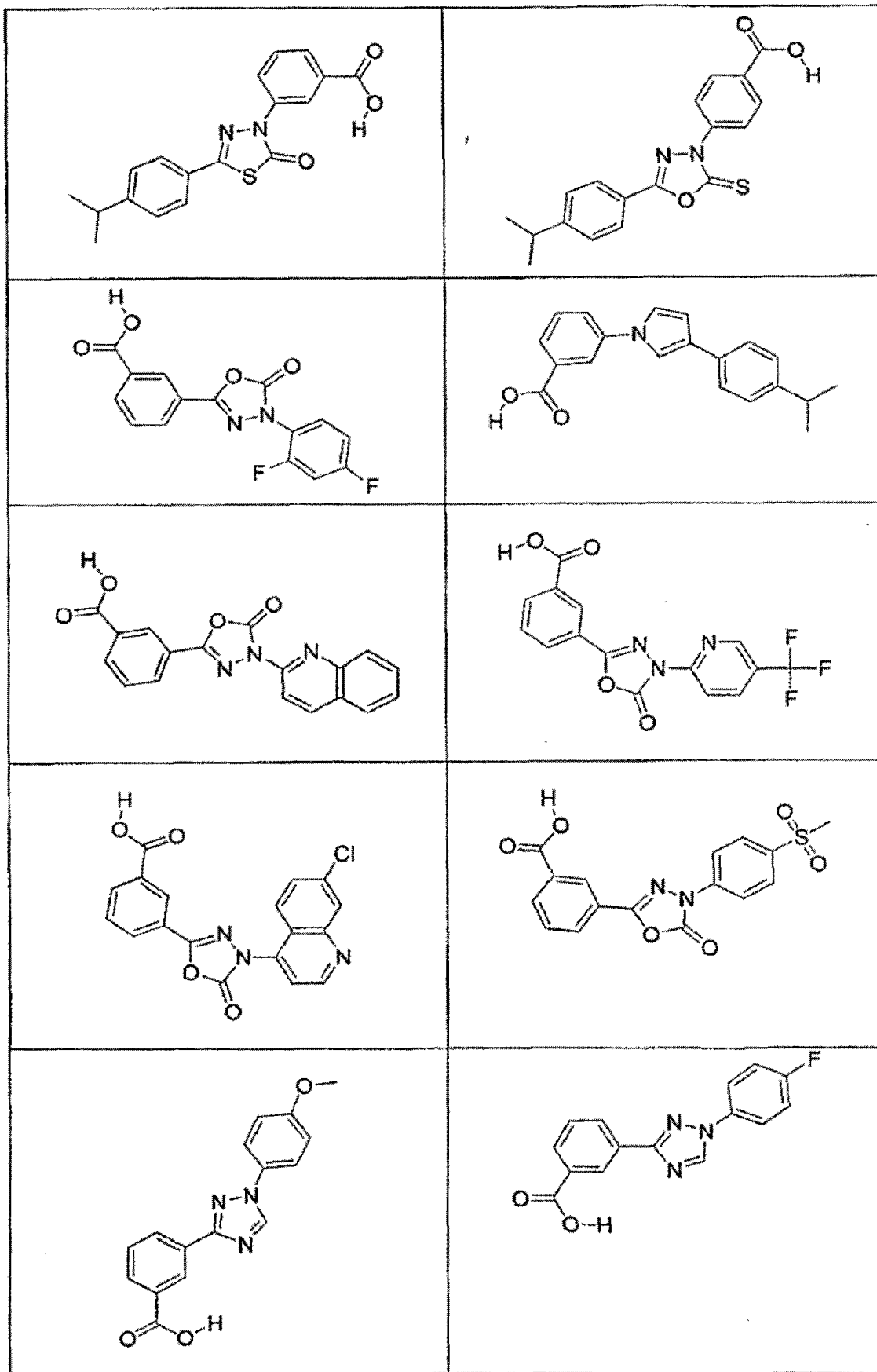


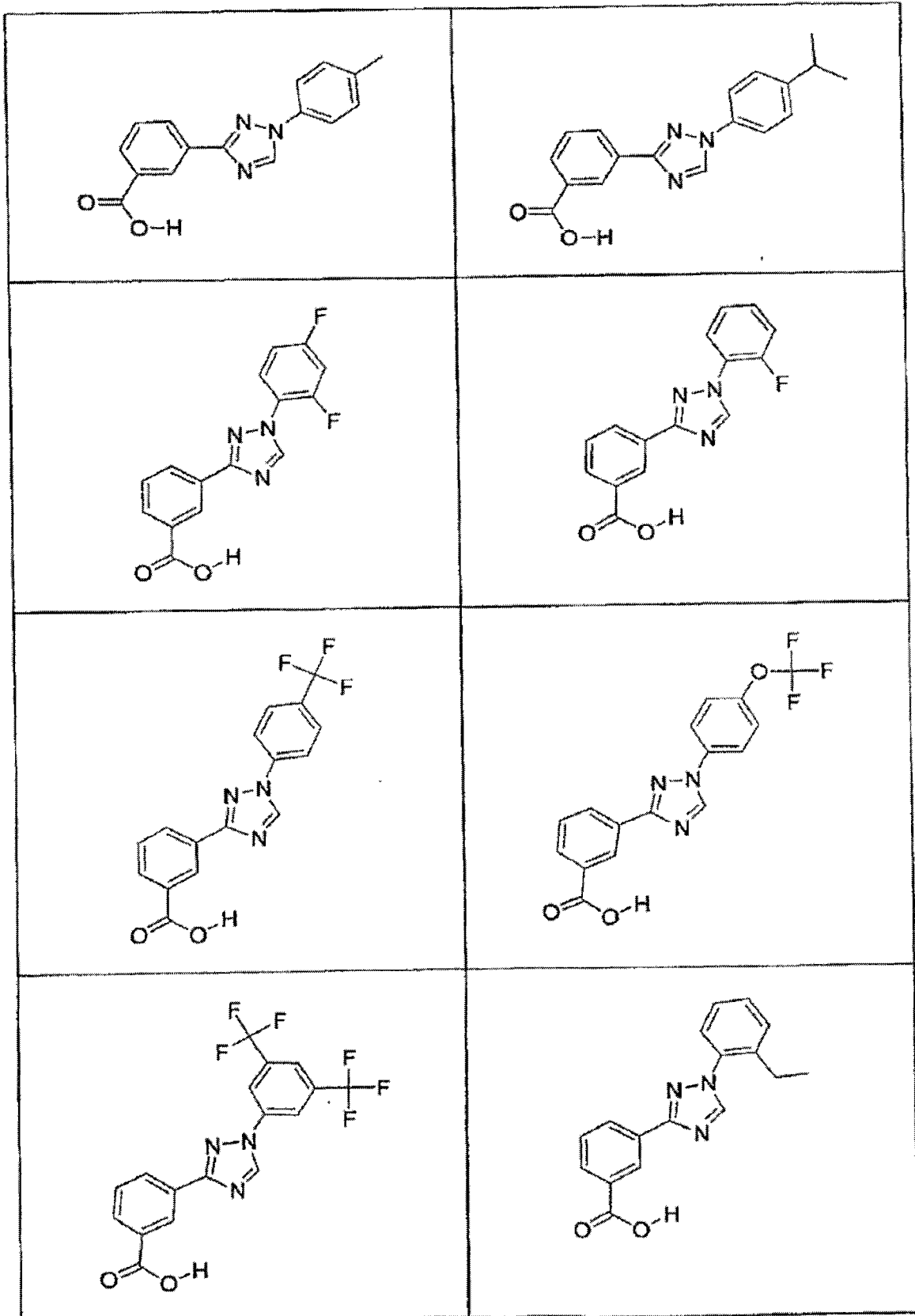


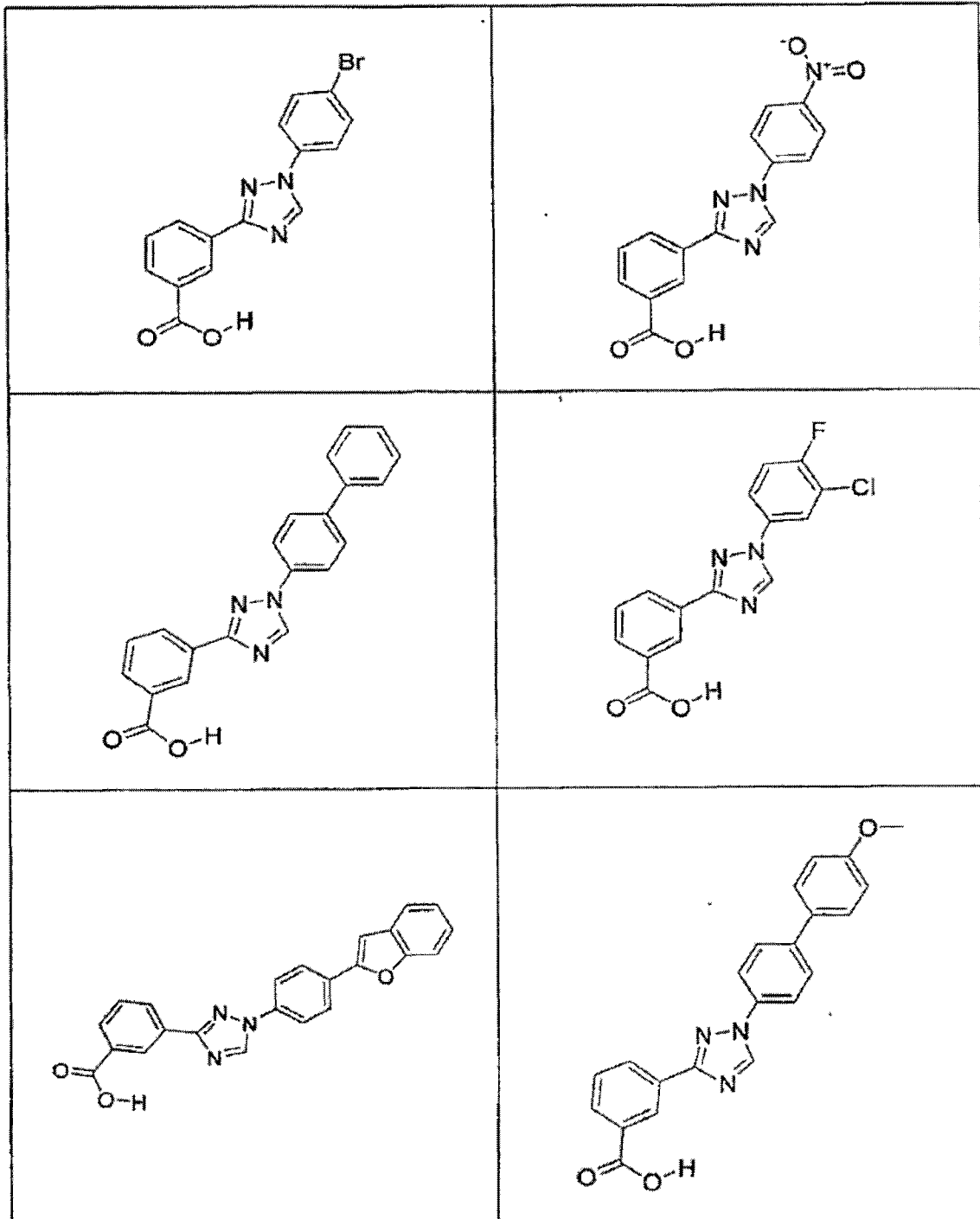


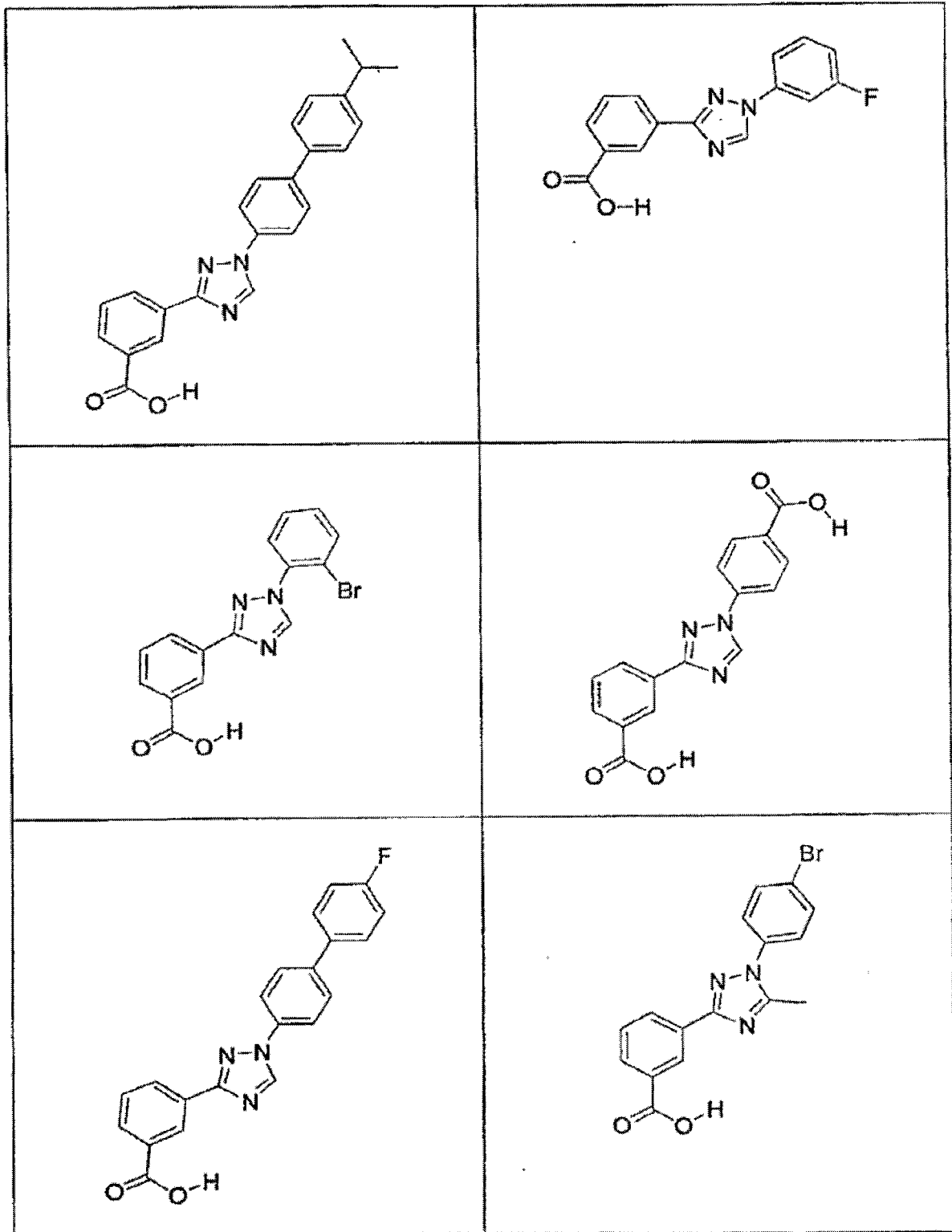


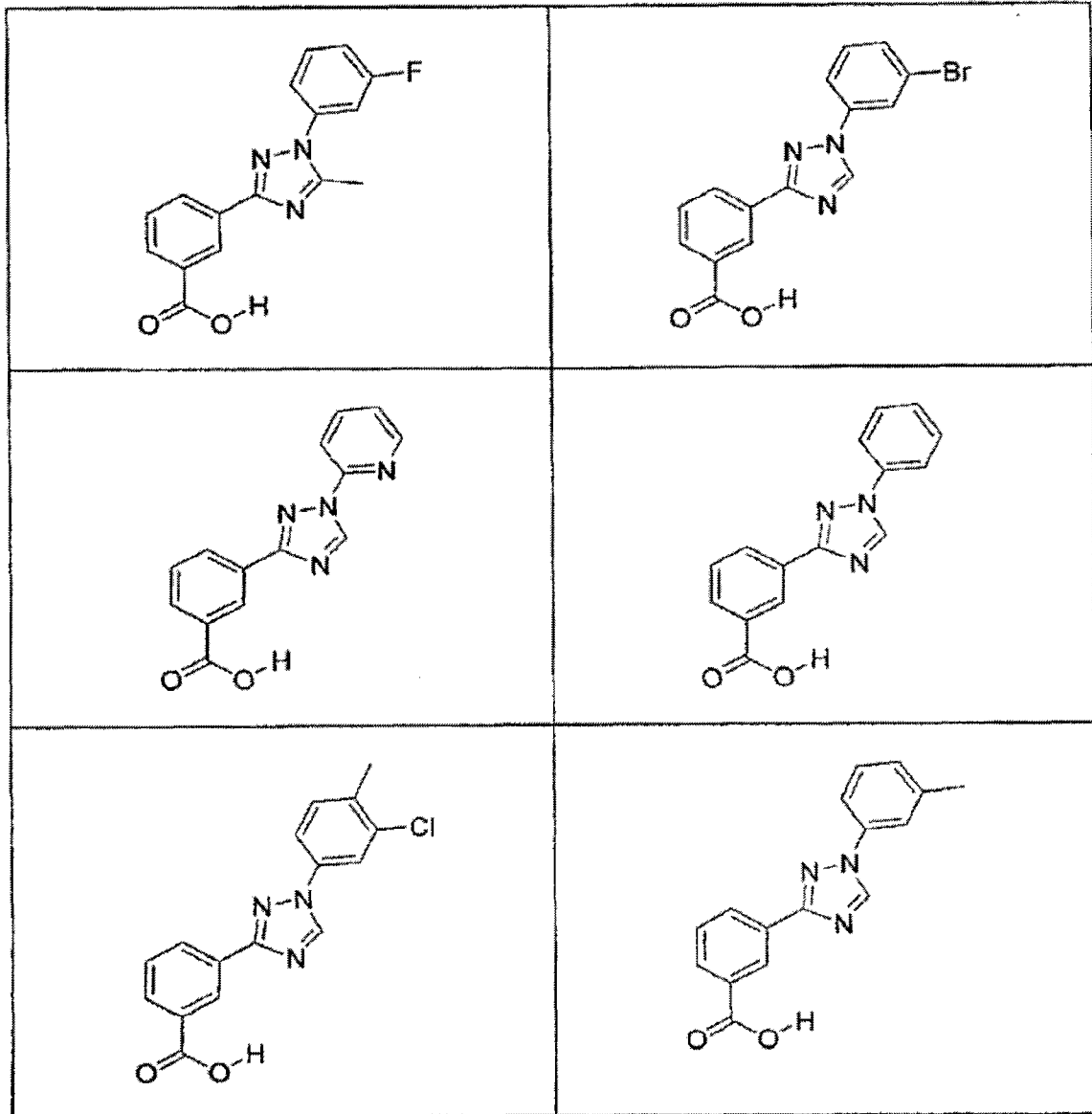


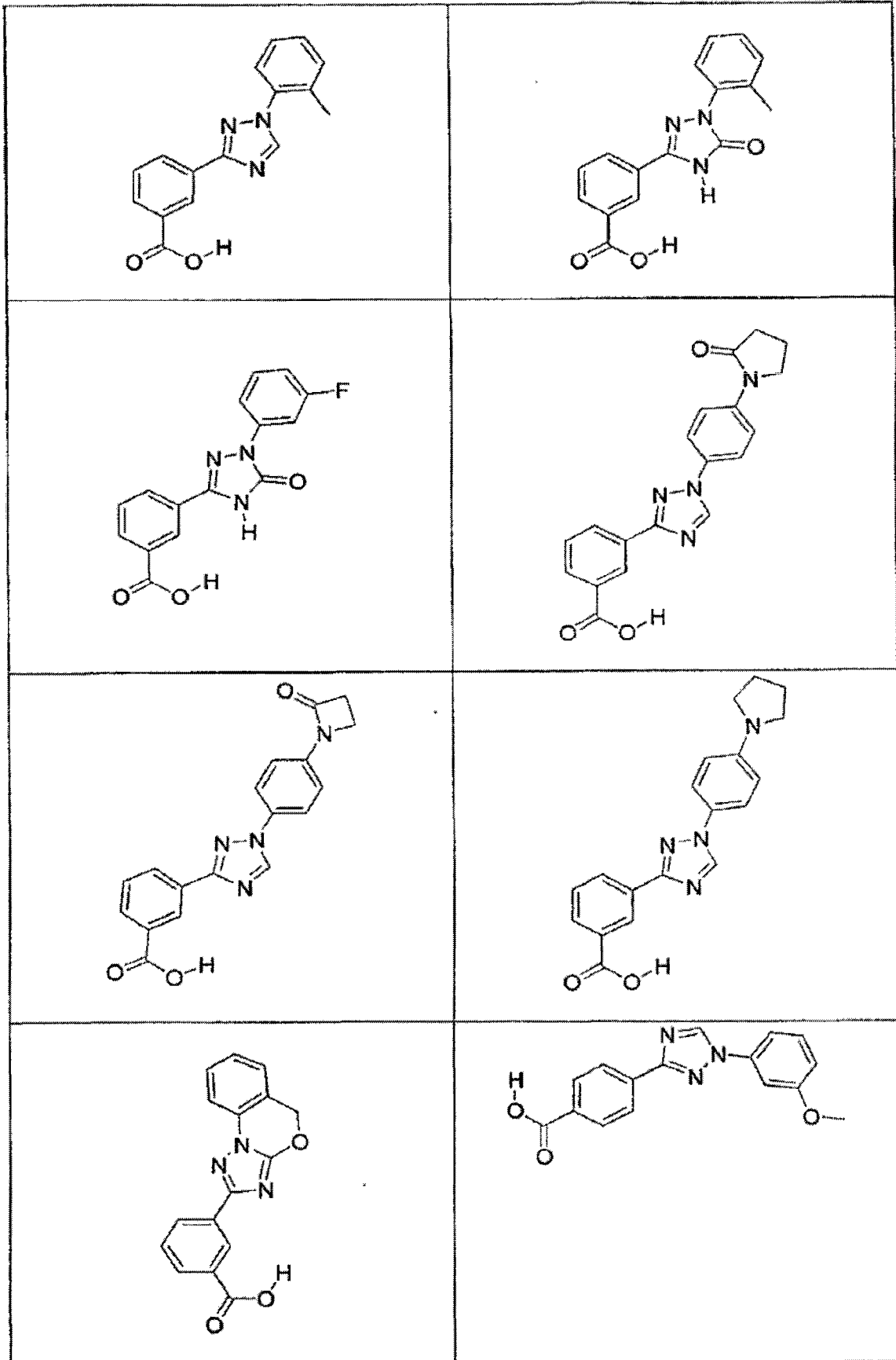


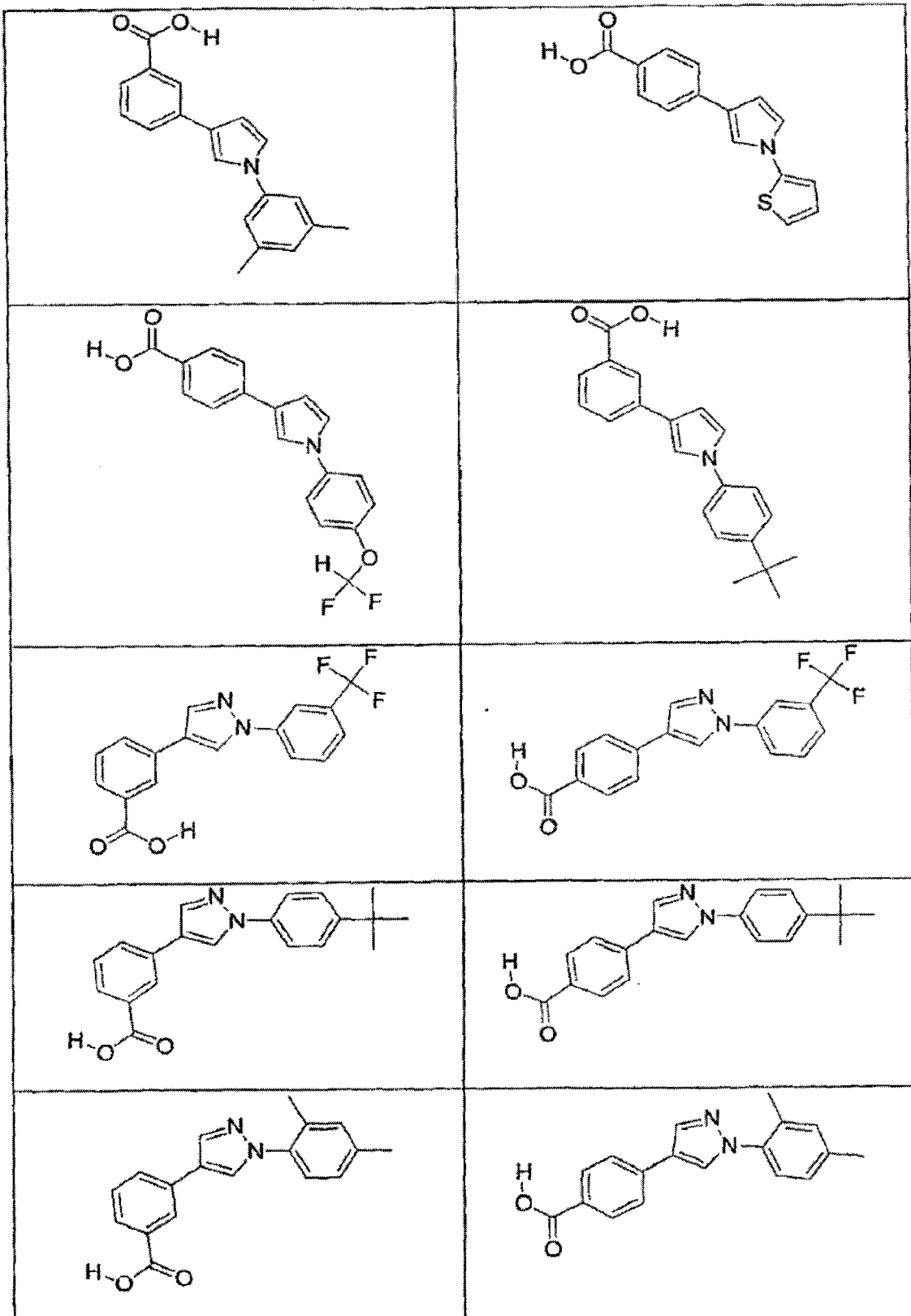


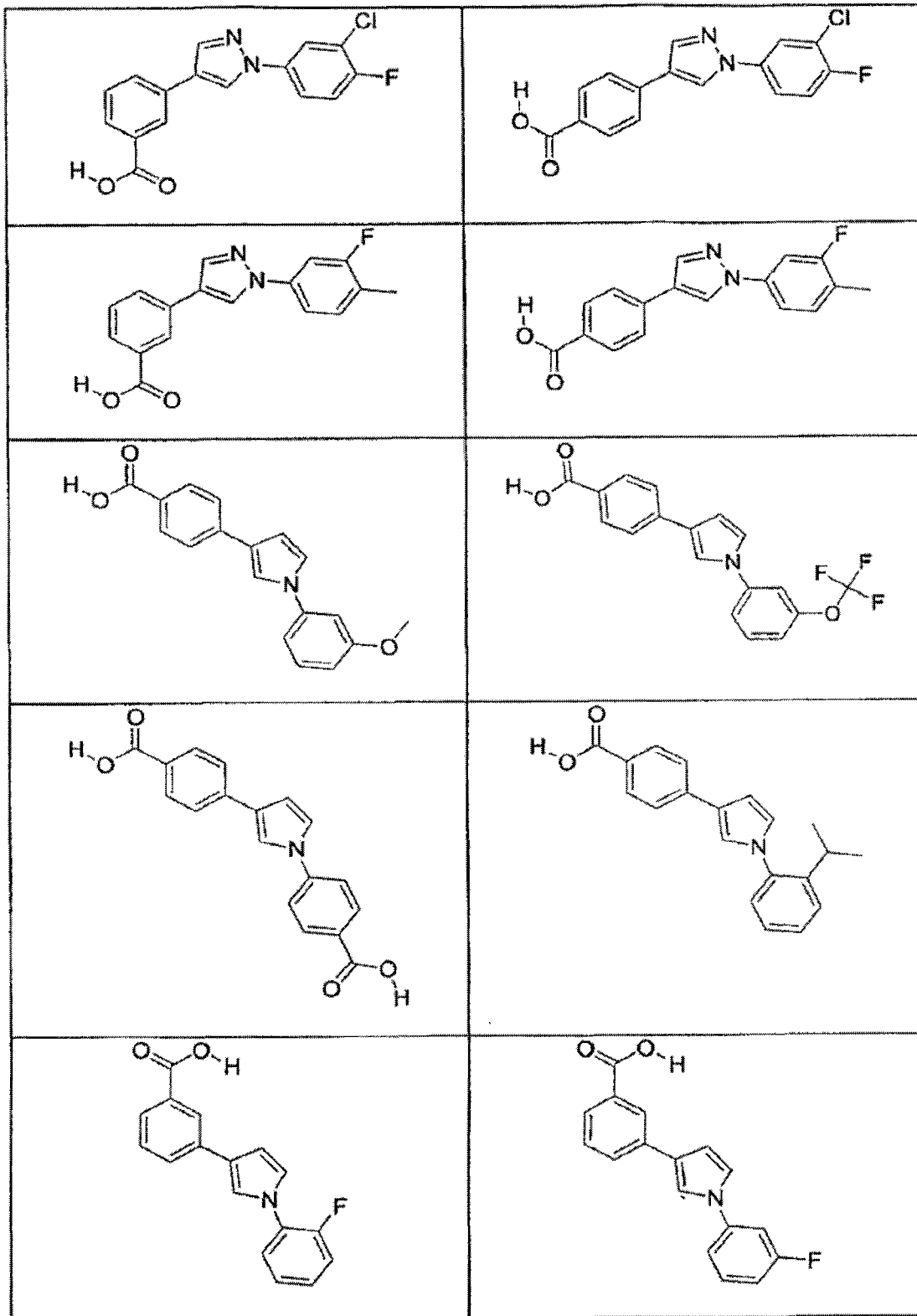


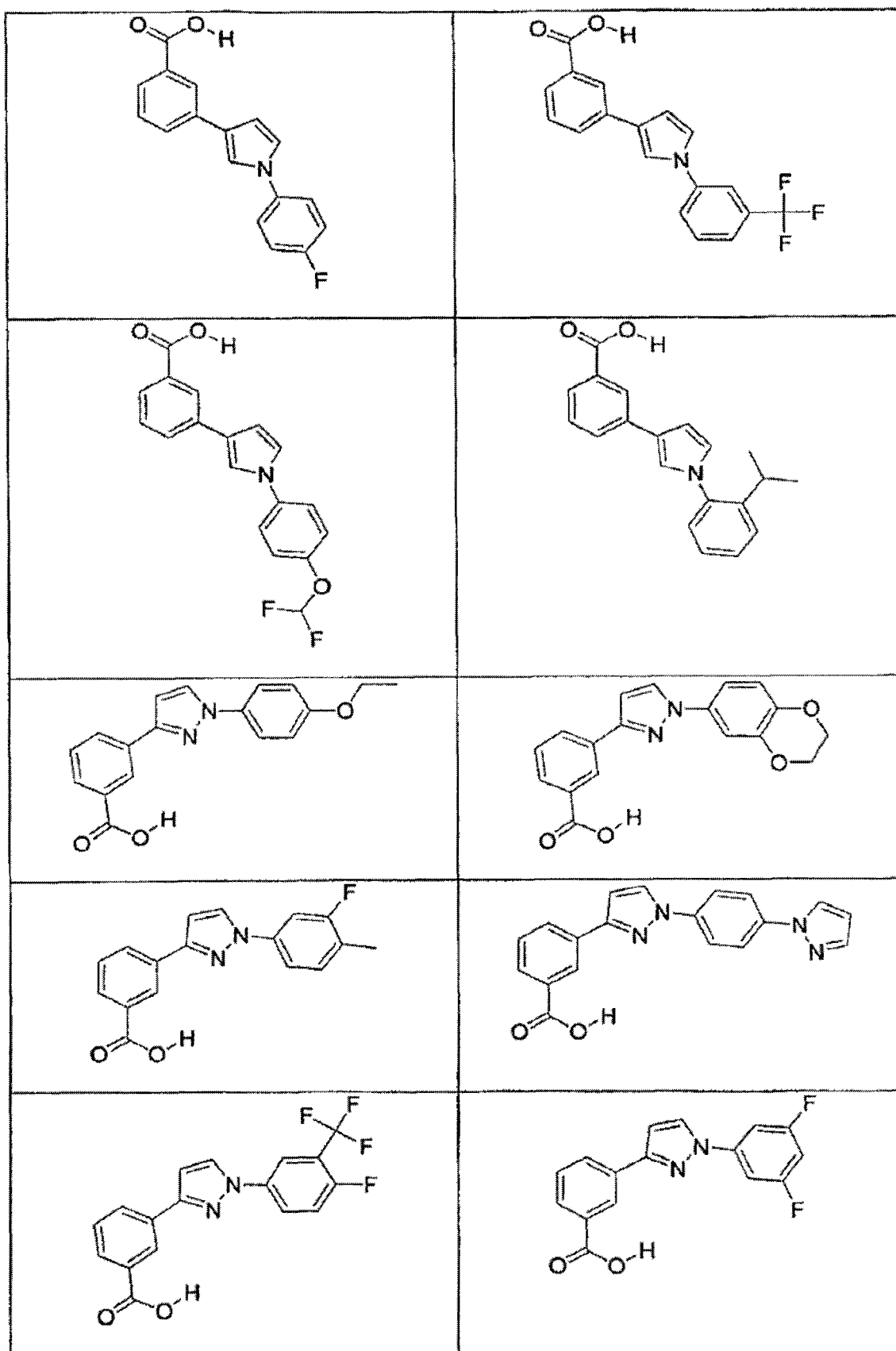


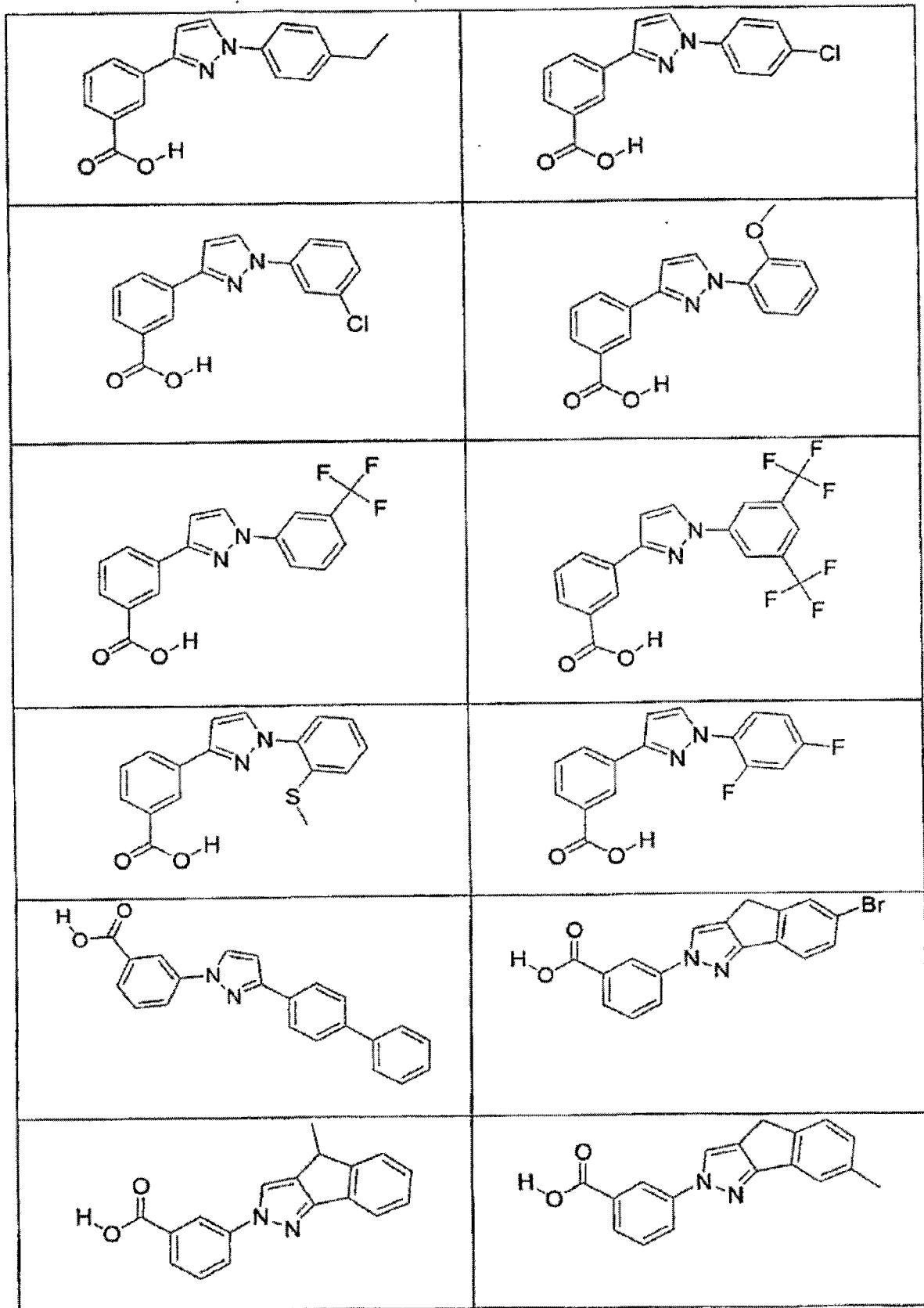


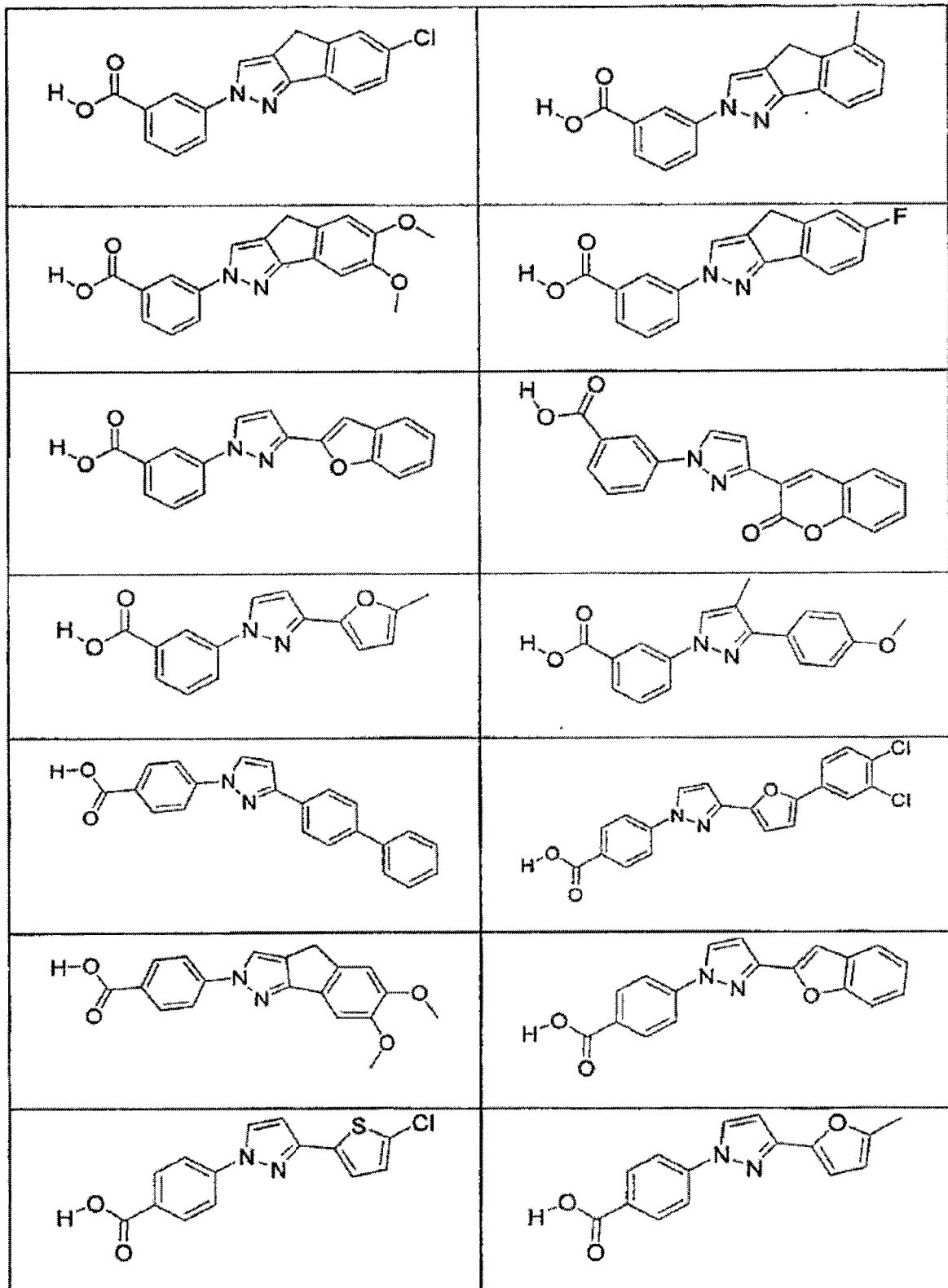


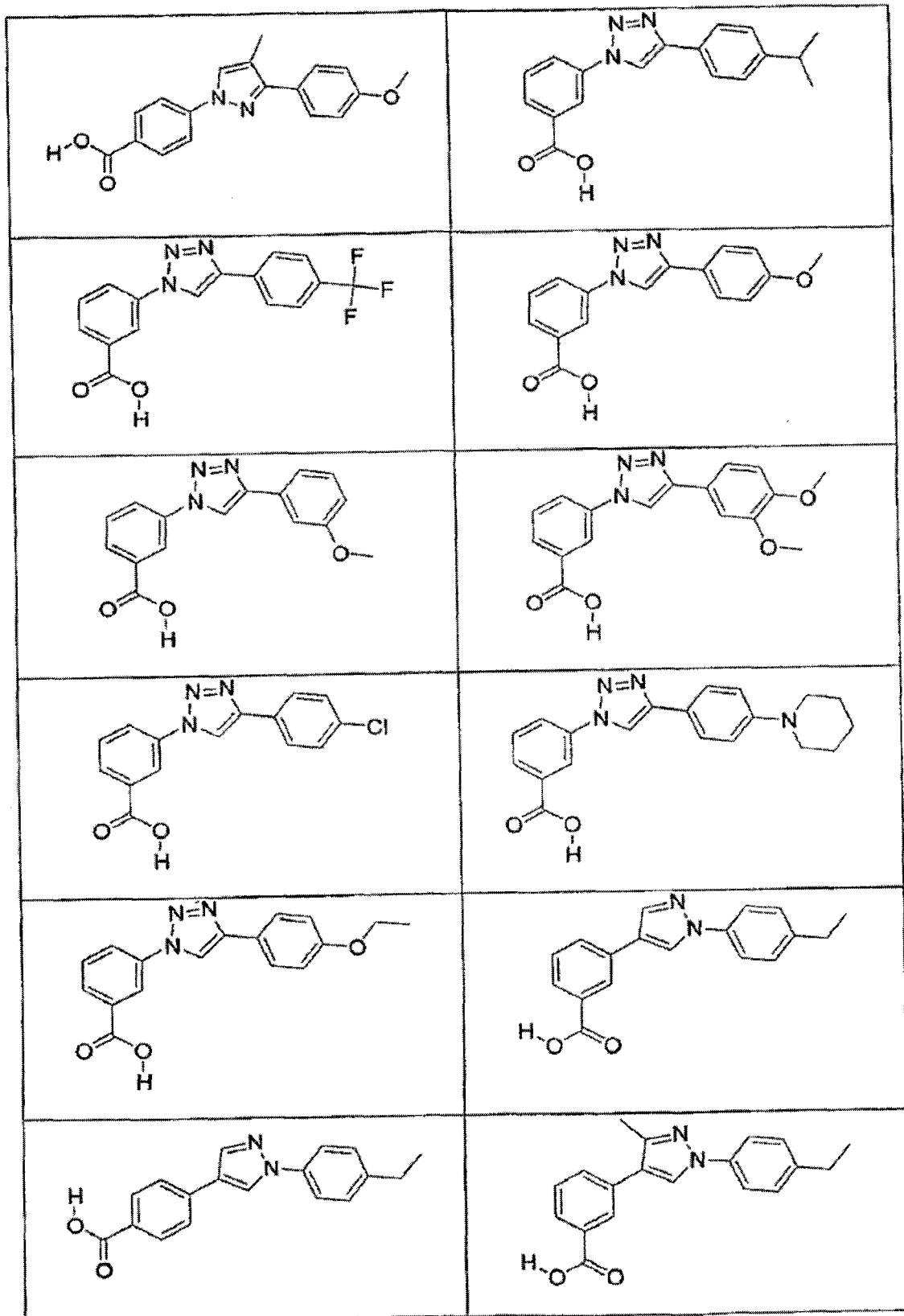


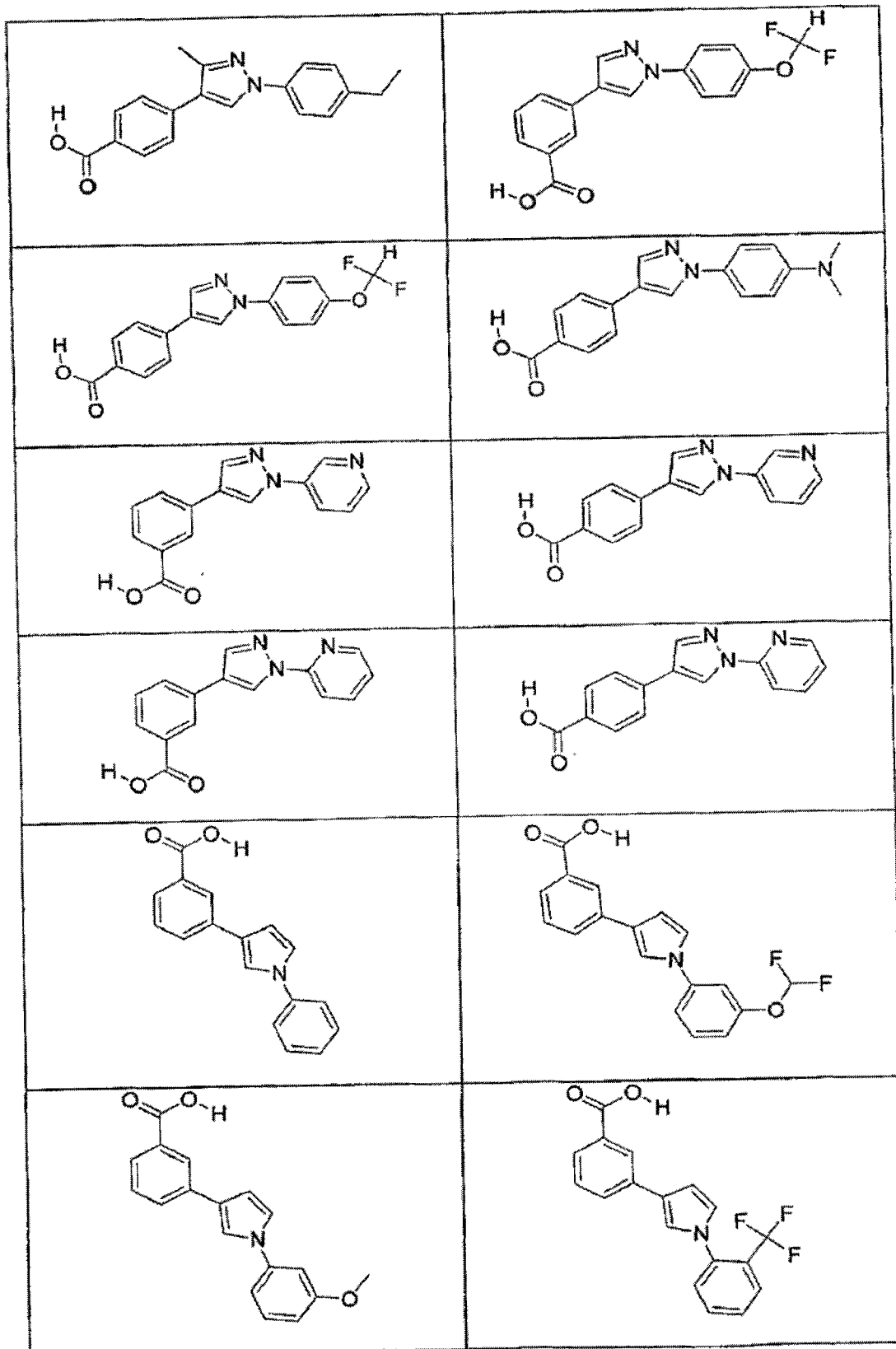


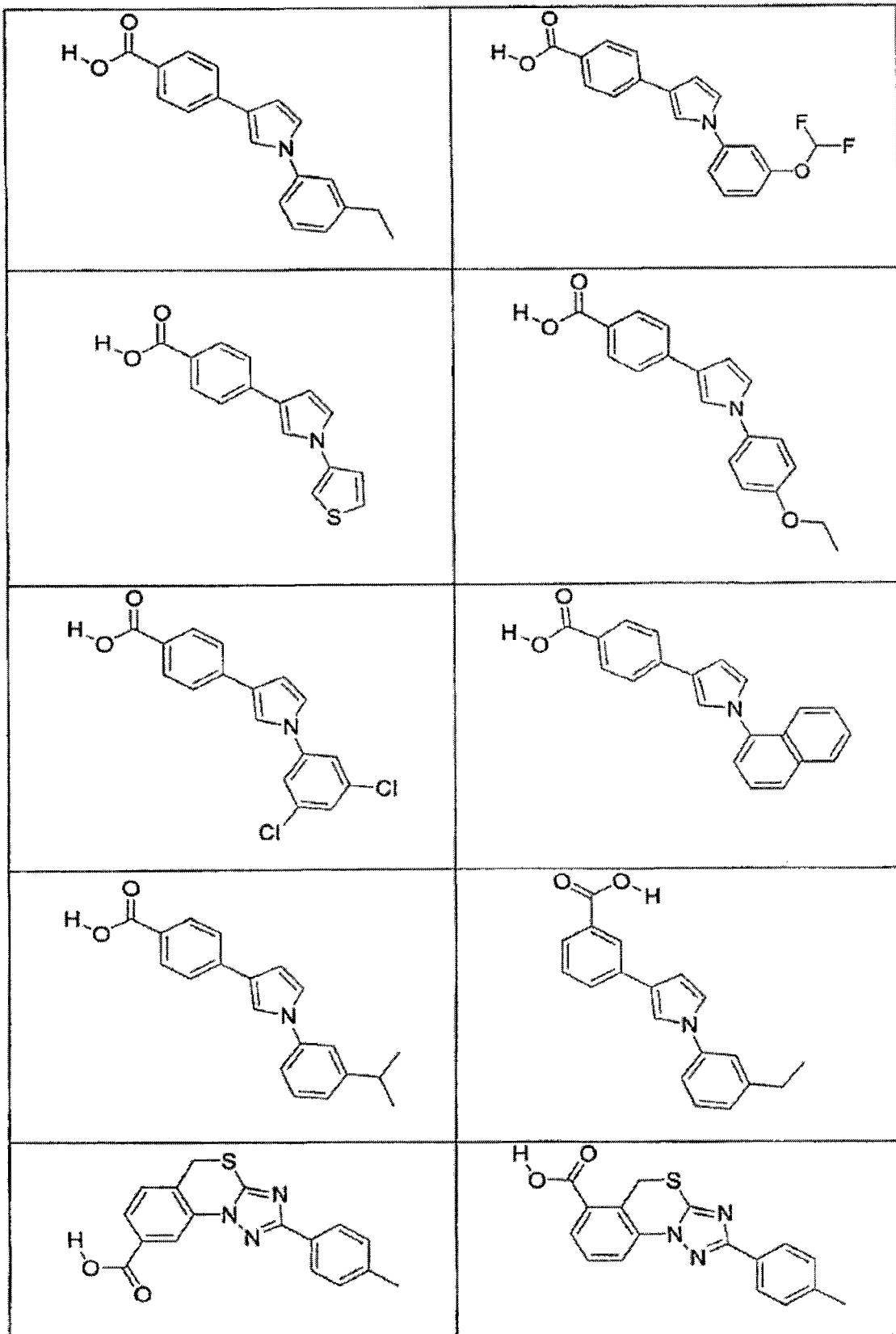


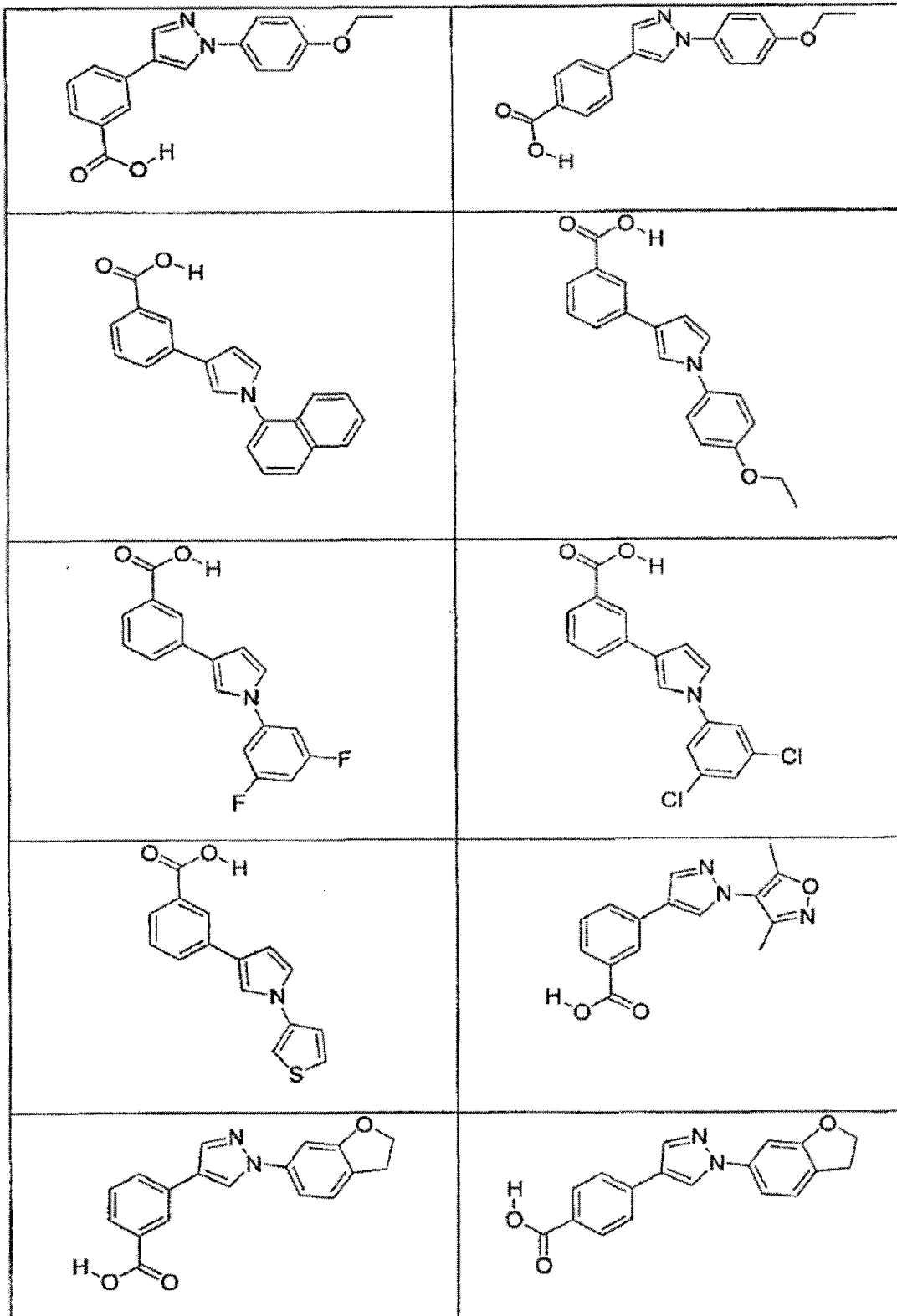


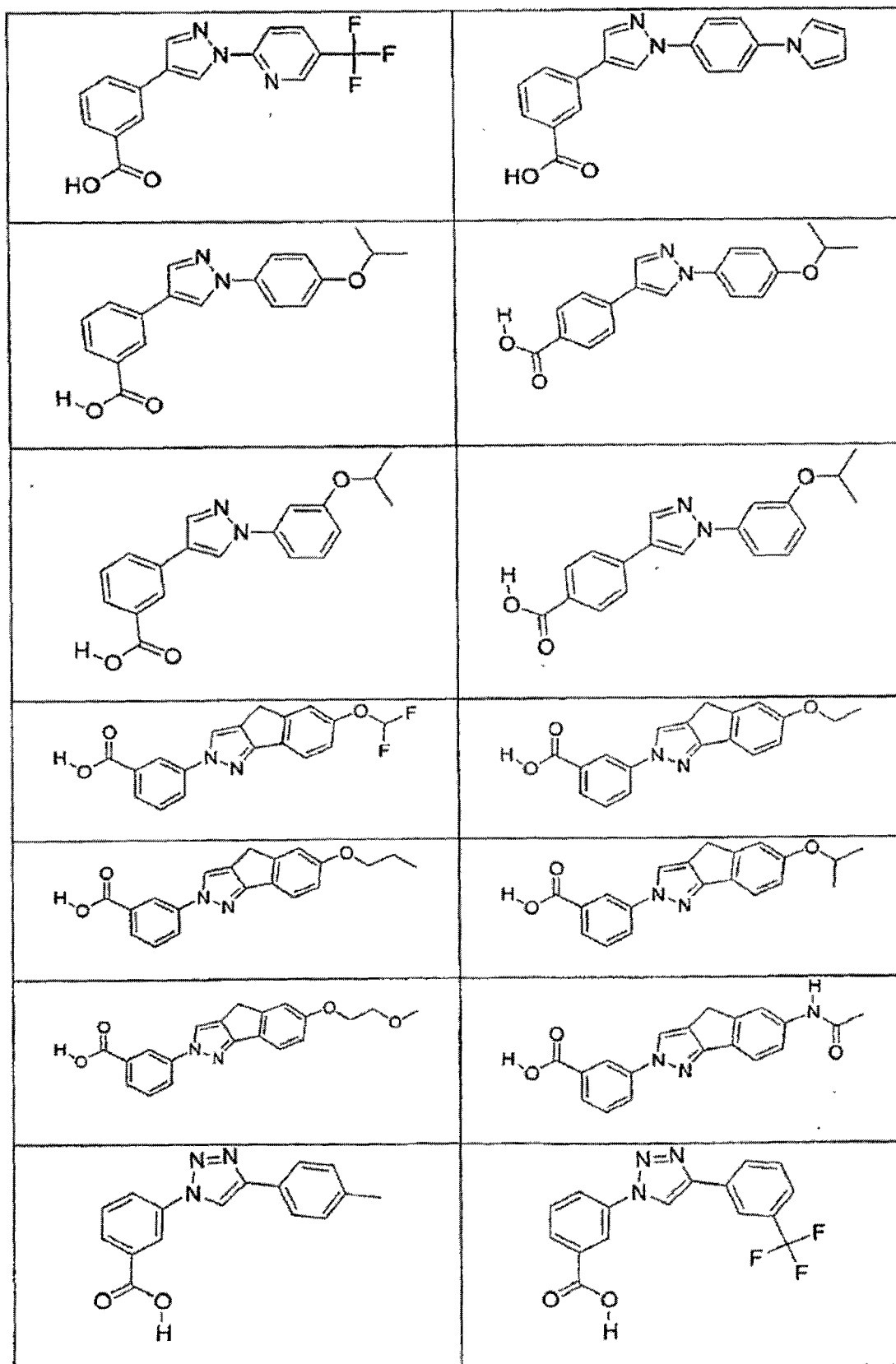


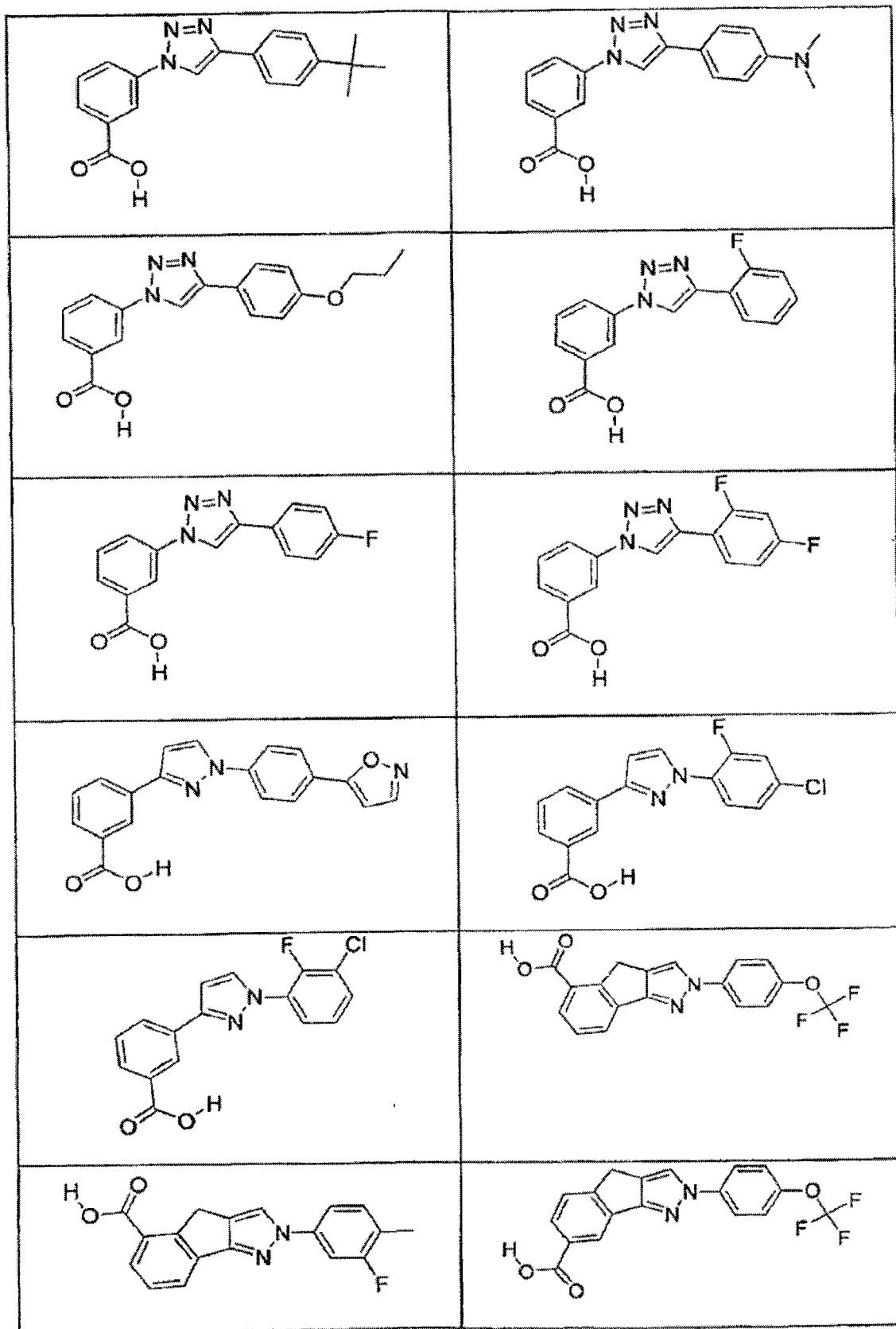


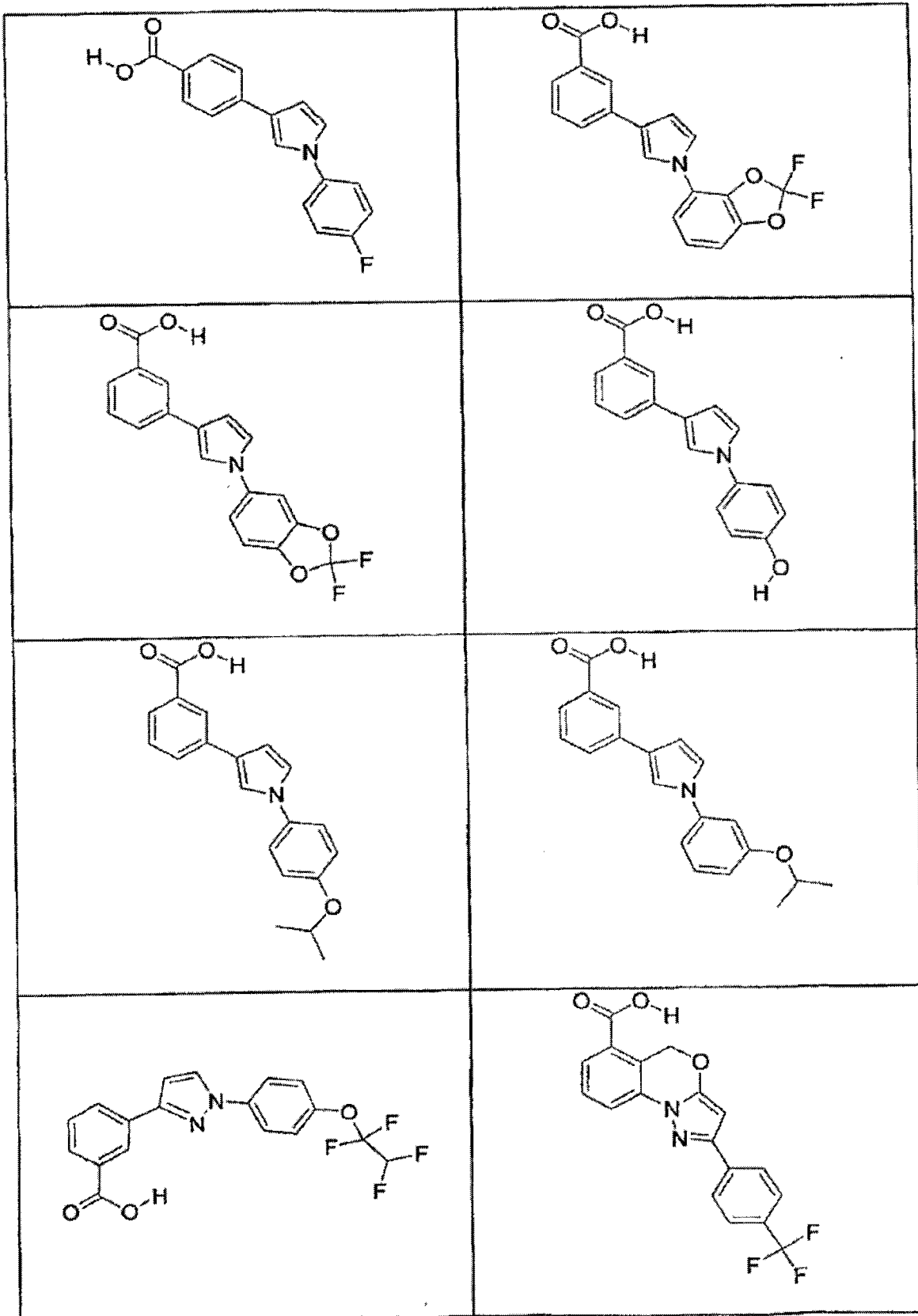


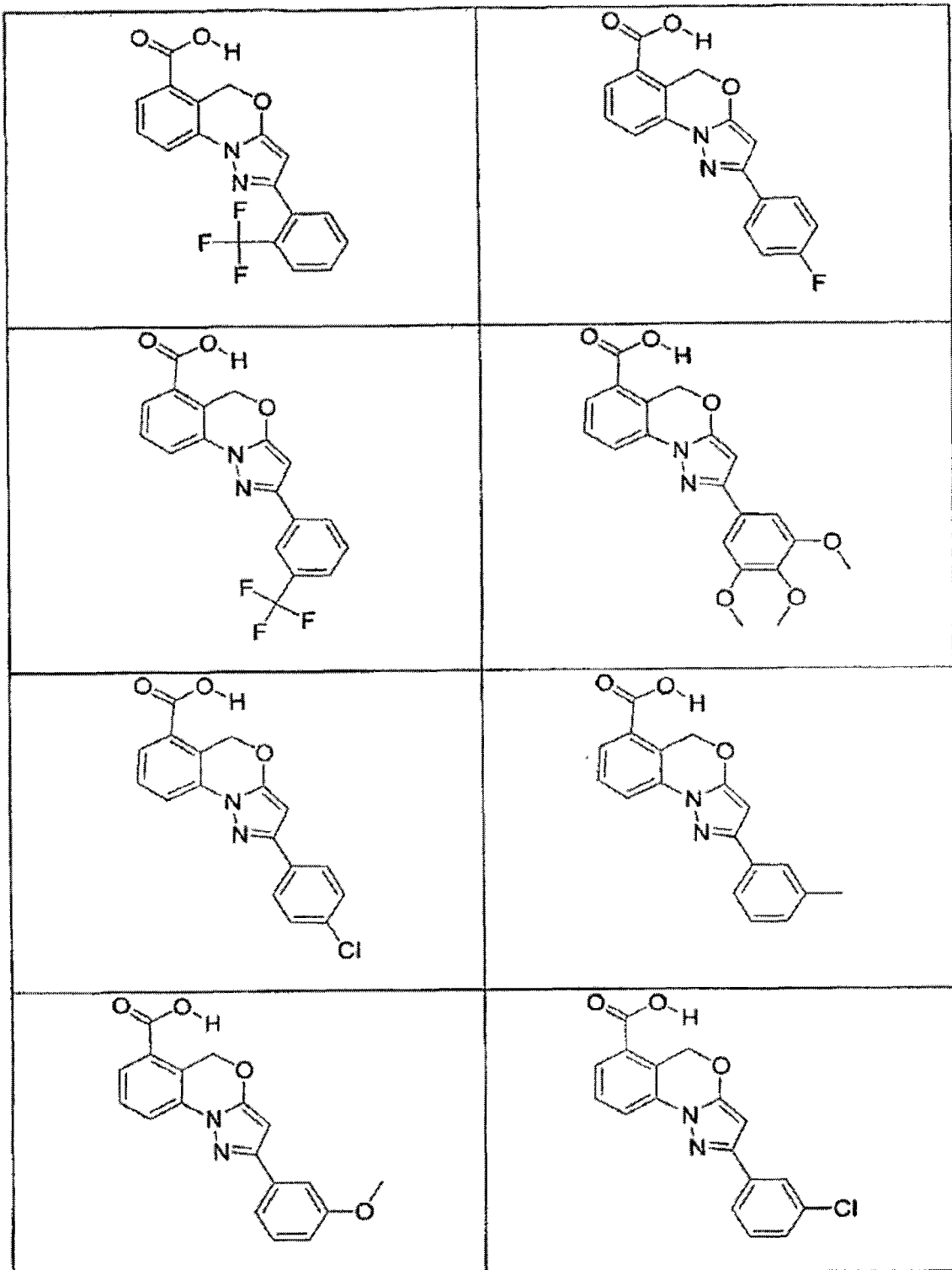


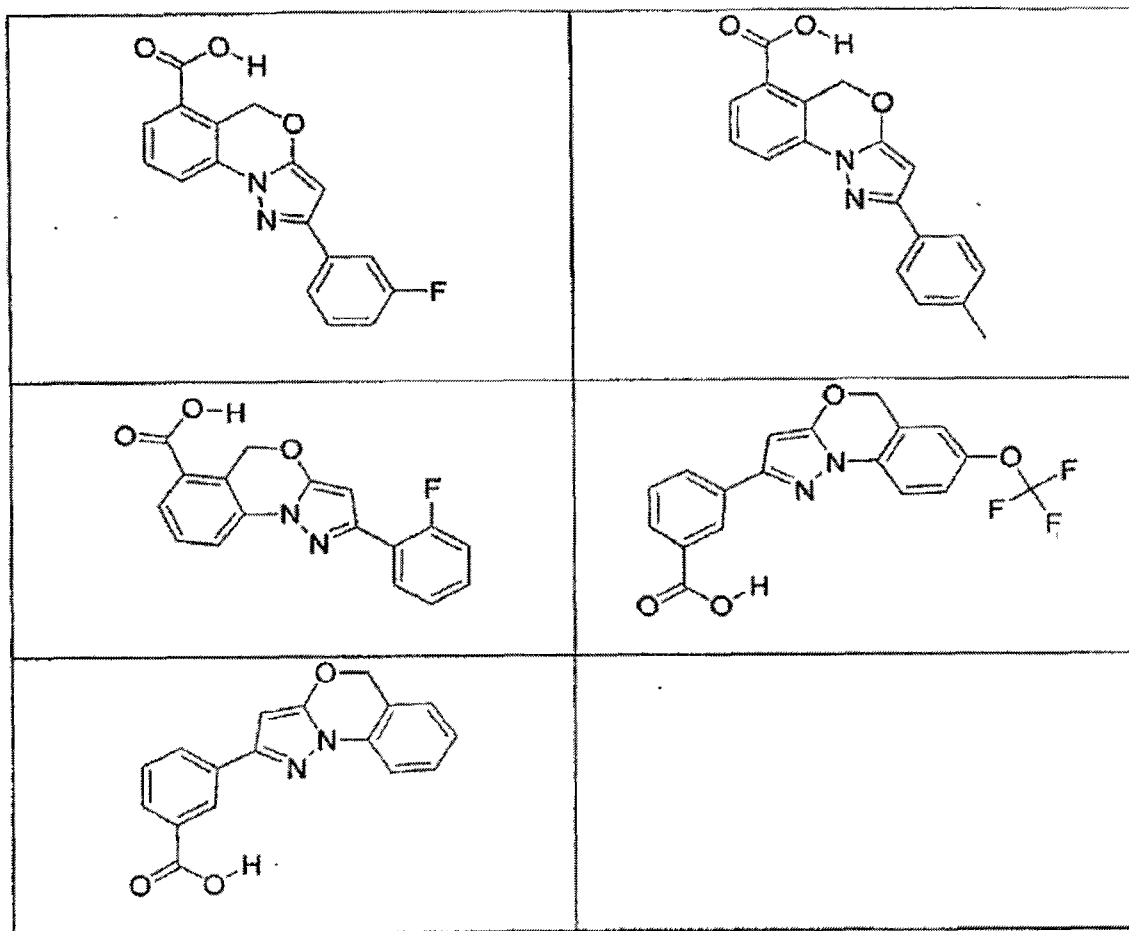








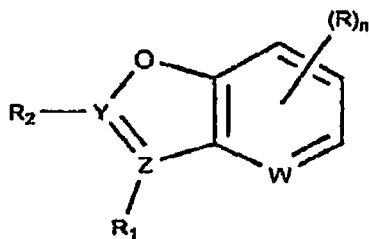




式 VII 的化合物可通过标准的、公知的合成方法获得,该类方法可参见,例如, March, J. *Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms and Structure*, 第 4 版, 1992。因此,可用于制备具式 VII 的化合物的起始材料和中间体可从市场购得,或可由商业途径购得的材料采用已知的合成方法和试剂制备得到。

制备式 VII 的化合物的具体方法在 2005 年 10 月 13 日提交的国际申请 PCT/US05/036761 中有公开,其全文在此引用作为参考。

在另一实施方式中,该无义密码子抑制剂为式 VIII 的化合物:



VIII

或其药学上可接受的盐、水合物、包合物、前药、多晶型、立体异构体，立体异构体包括对映体、非对映体、外消旋体或立体异构体的混合物，其中：

Y 和 Z 独立地选自 N 或 C；

W 为 N 或 CH；

n 为 0、1、2 或 3；

R₁ 为氢，被羧基基团任选地取代的 C₆ 至 C₈ 芳基，或当 Z 为 N 时 R₁ 缺失；

R₂ 为氢；C₆ 至 C₈ 芳基，其任选地被一个、两个或三个独立选择的 R_a 基团取代；四至七元杂环，其任选地被一个或多个独立选择的 C₁-C₆ 烷基基团取代，或三至七元杂环；或当 Y 为 N 时 R₂ 缺失；

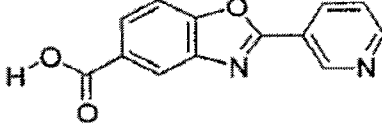
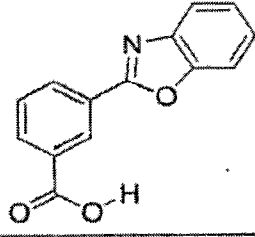
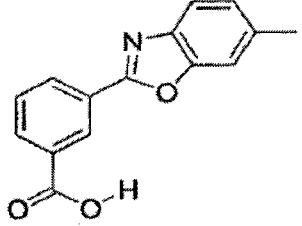
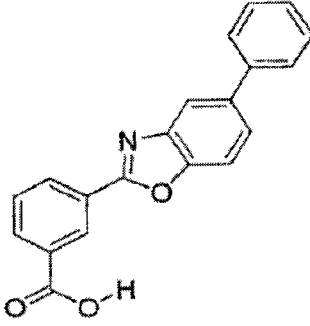
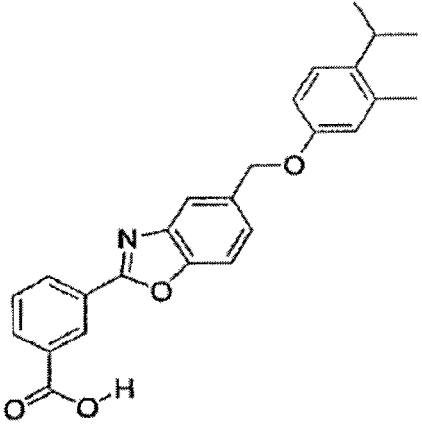
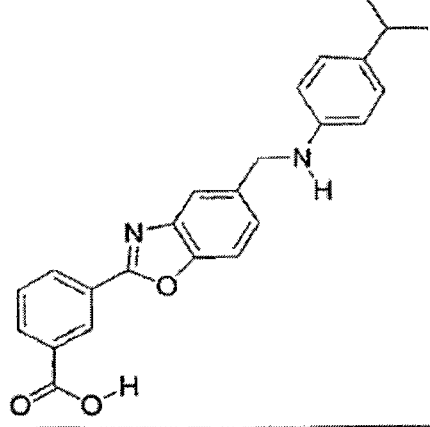
R 独立地选自卤素；羧基基团；C₁-C₆ 烷基基团，其任选地被四至七元杂环、C₆-C₈ 芳氧基基团或氨基基团取代，其中该四至七元杂环、C₆-C₈ 芳氧基基团或氨基基团任选地被一个或两个独立选择的 C₁-C₆ 烷基或 C₆-C₈ 芳基基团取代，其中该 C₆-C₈ 芳基基团任选地和独立地被一个或多个 C₁-C₆ 烷基基团取代；C₁-C₆ 烷氧基；C₆-C₈ 芳氧基；C₆-C₈ 芳基，其任选地被一个或多个独立选择的卤素、C₁-C₄ 烷基、C₁-C₄ 卤烷基、氧代、C₁-C₄ 烷氧基或 C₁-C₄ 卤烷氧基基团取代；氨基基团，其任选地被一个或两个独立选择的

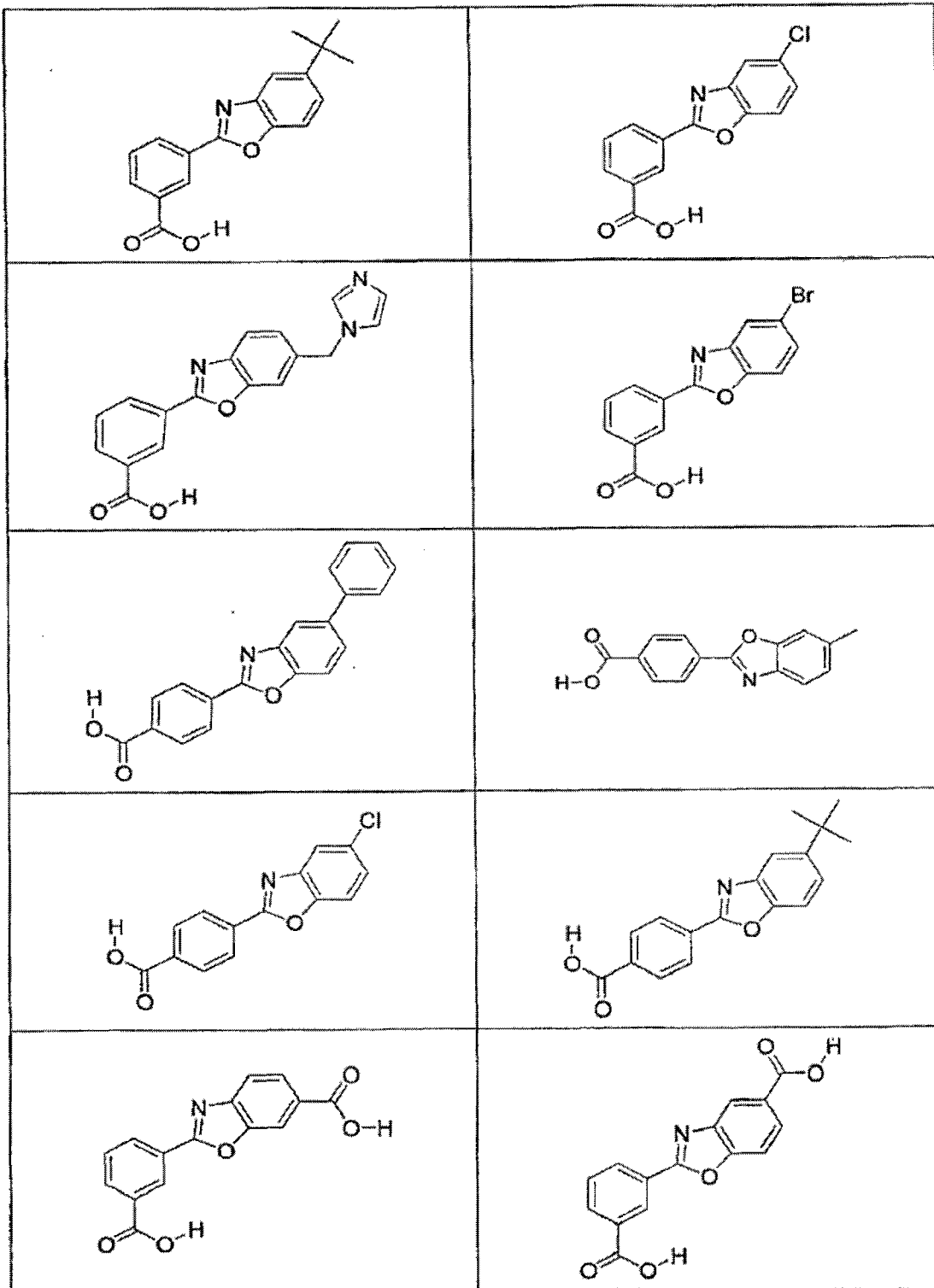
C₆-C₈ 芳基或 C₁-C₆ 烷基基团(其任选地被羟基、C₆-C₈ 芳基或具有两个环状结构的九至十元杂环取代)取代; 羰基基团, 其被五至六元杂环基团取代; 四至七元杂环基团, 其任选地被一个或多个 C₁-C₄ 烷基或氧代基团取代; 具有两个环状结构的九至十元杂环; 或双 R 基团, 其中 R 还可包括氧代基团, 与它们所连接的杂-双环一起形成具有三个环状结构的十二至十三元杂环; 和

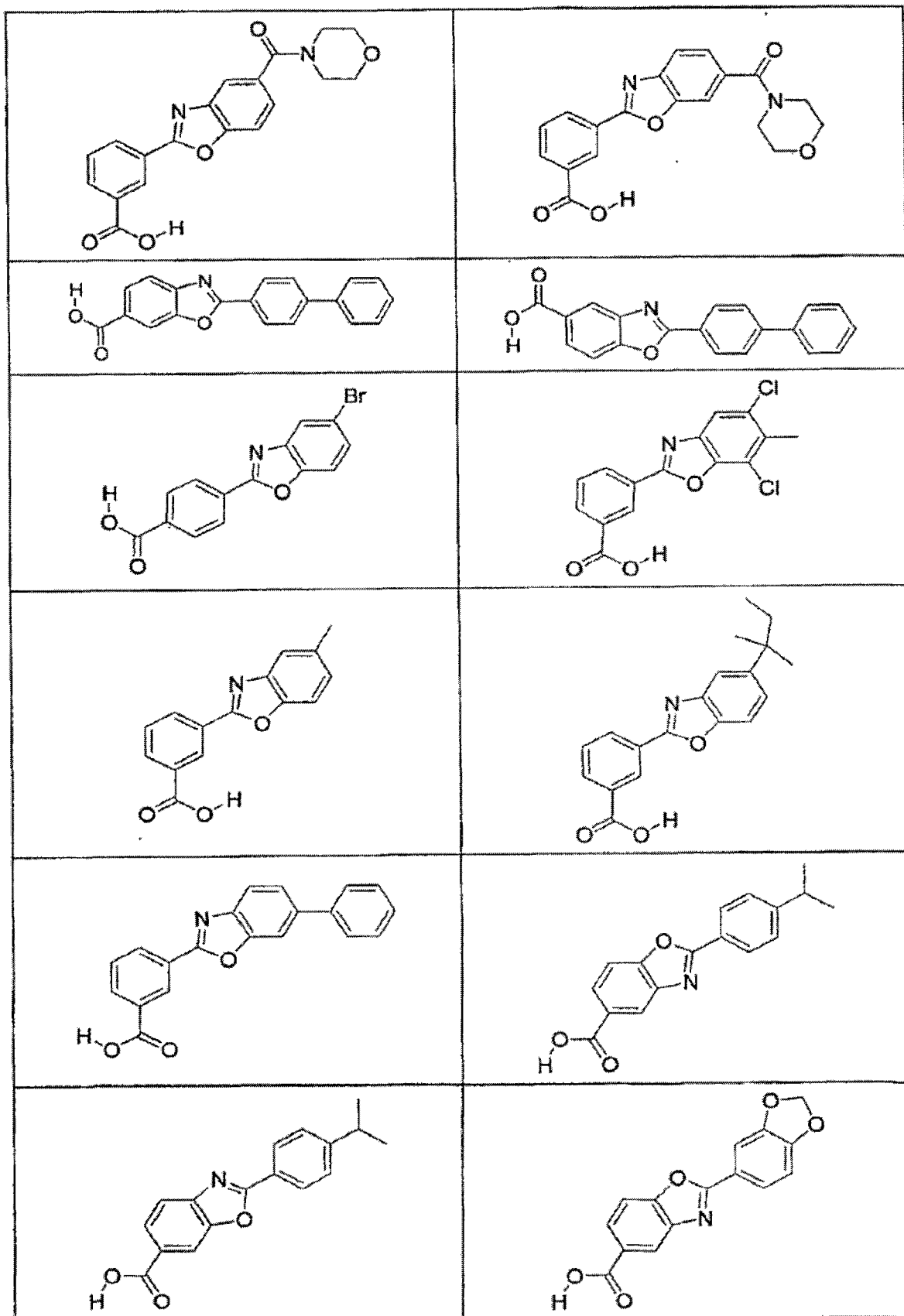
其中 R_a 为卤素; C₁-C₆ 烷基; C₁-C₆ 烷氧基, 其任选地被一个或多个独立选择的卤素基团取代; C₆-C₈ 芳基; 四至七元杂环, 其任选地被一个或多个独立选择的氧代基团取代; 羰基, 其任选地被羟基或 C₁-C₆ 烷氧基基团取代; 氨基甲酰基; 氨基, 其任选地被独立选择的 C₁-C₆ 烷基基团取代, 其中该 C₁-C₆ 烷基基团任选地被一个或多个独立选择的卤素或羟基基团取代; 或两个 R_a 基团, 其中 R_a 还可包括氧代基团, 与它们所连接的 C₆ 至 C₈ 芳基基团一起形成具有两个环状结构的九至十元杂环, 其中该具有两个环状结构的九至十元杂环任选地被一个或多个独立选择的卤素取代。

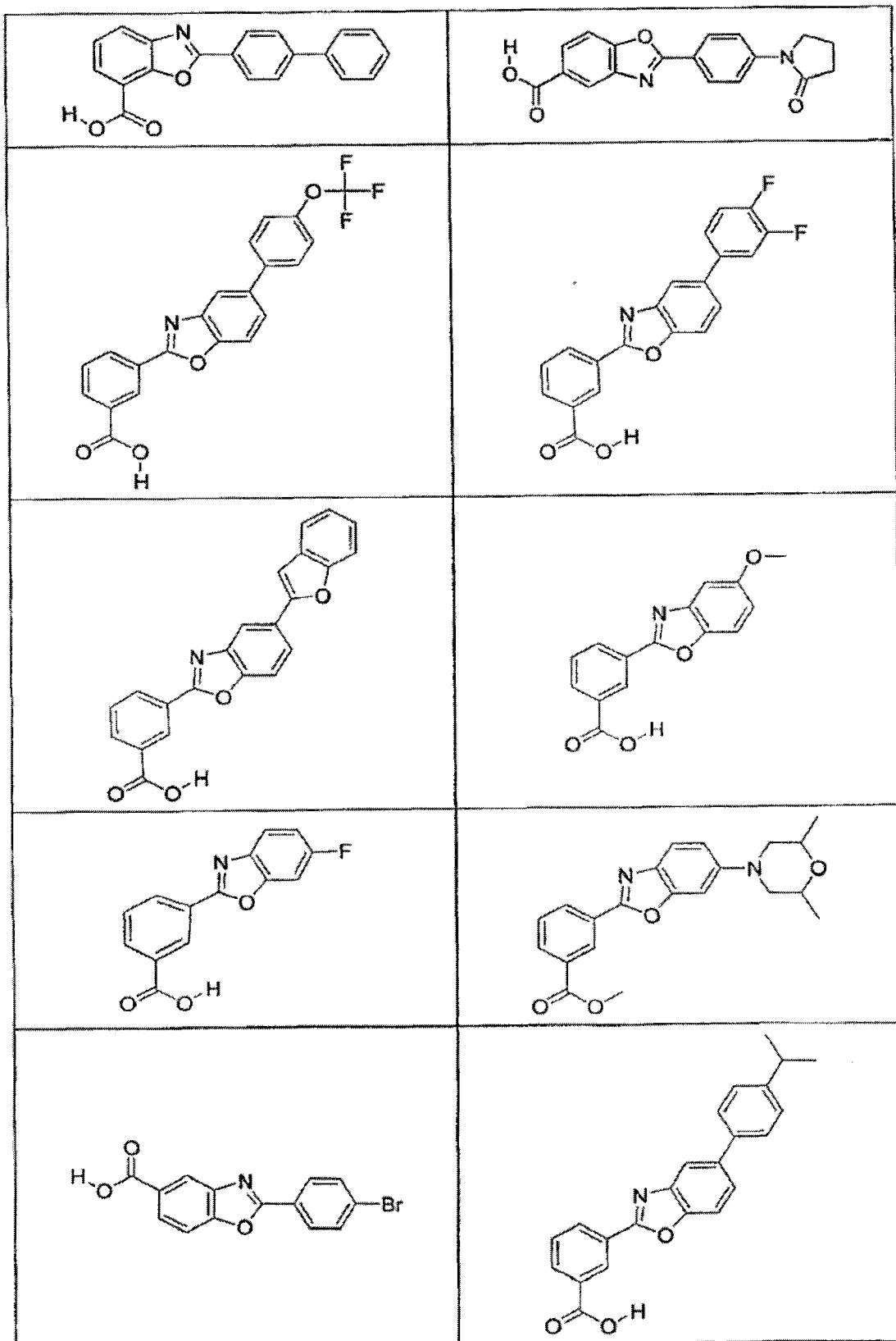
优选的式 VIII 的化合物列于下表 8。

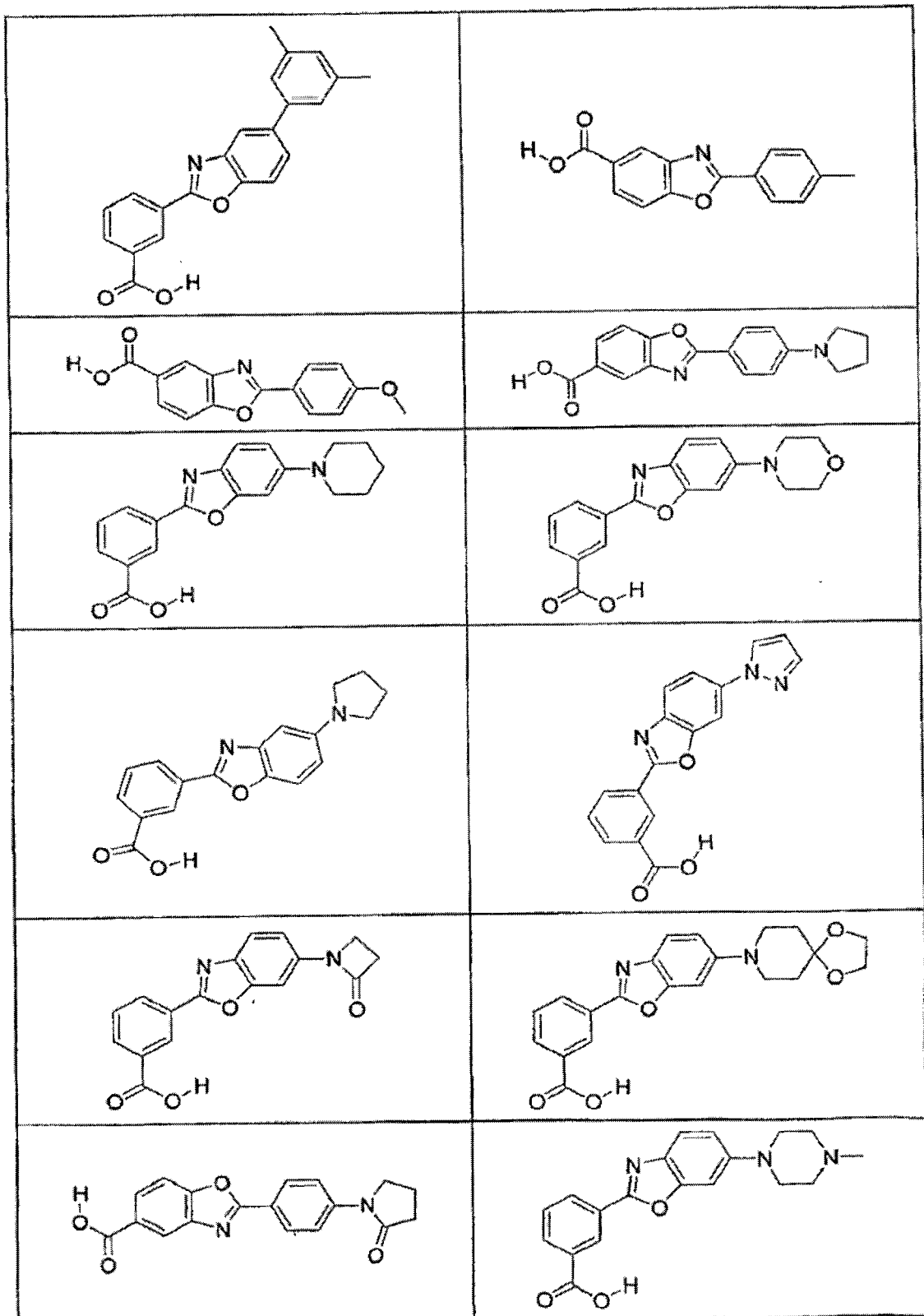
表 8

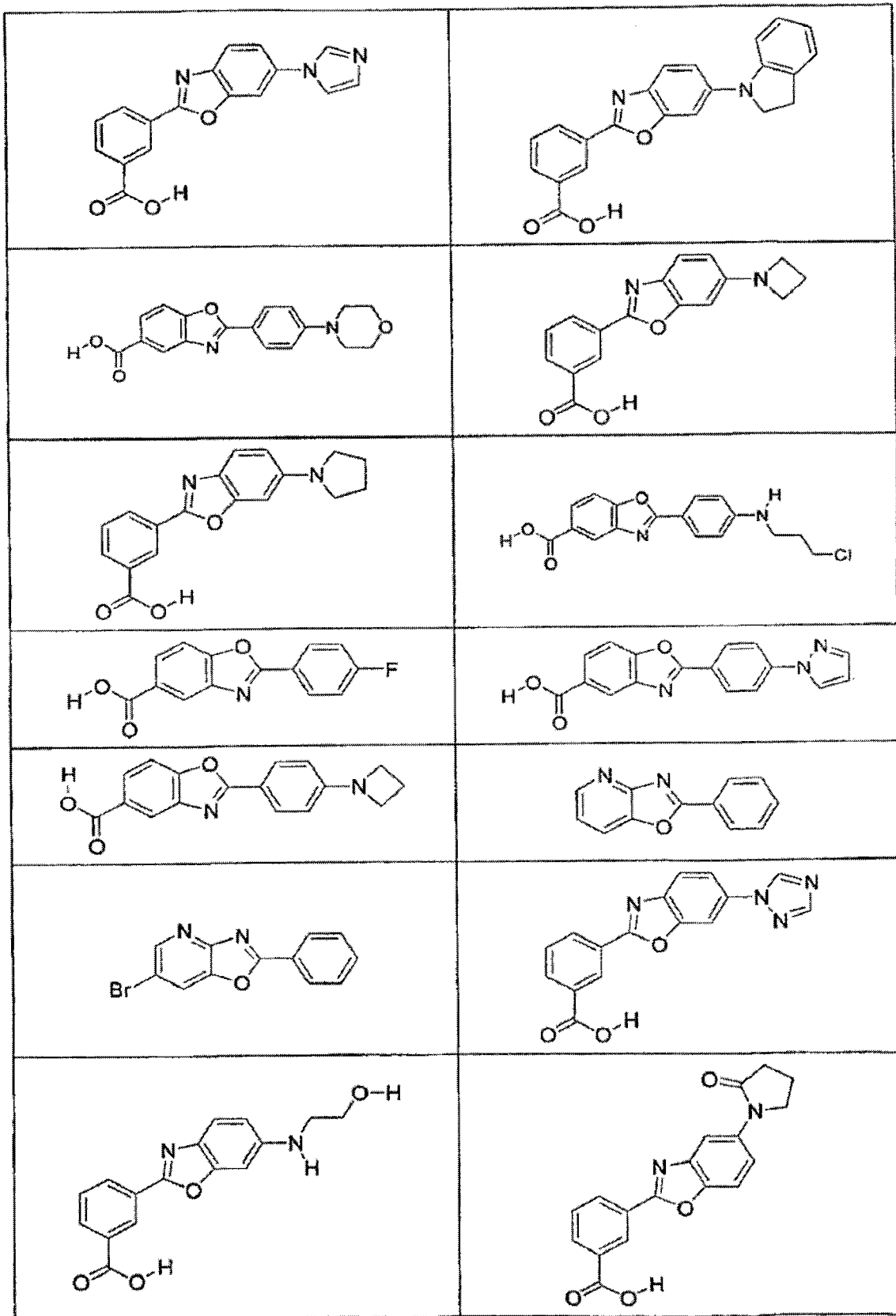
	
	
	

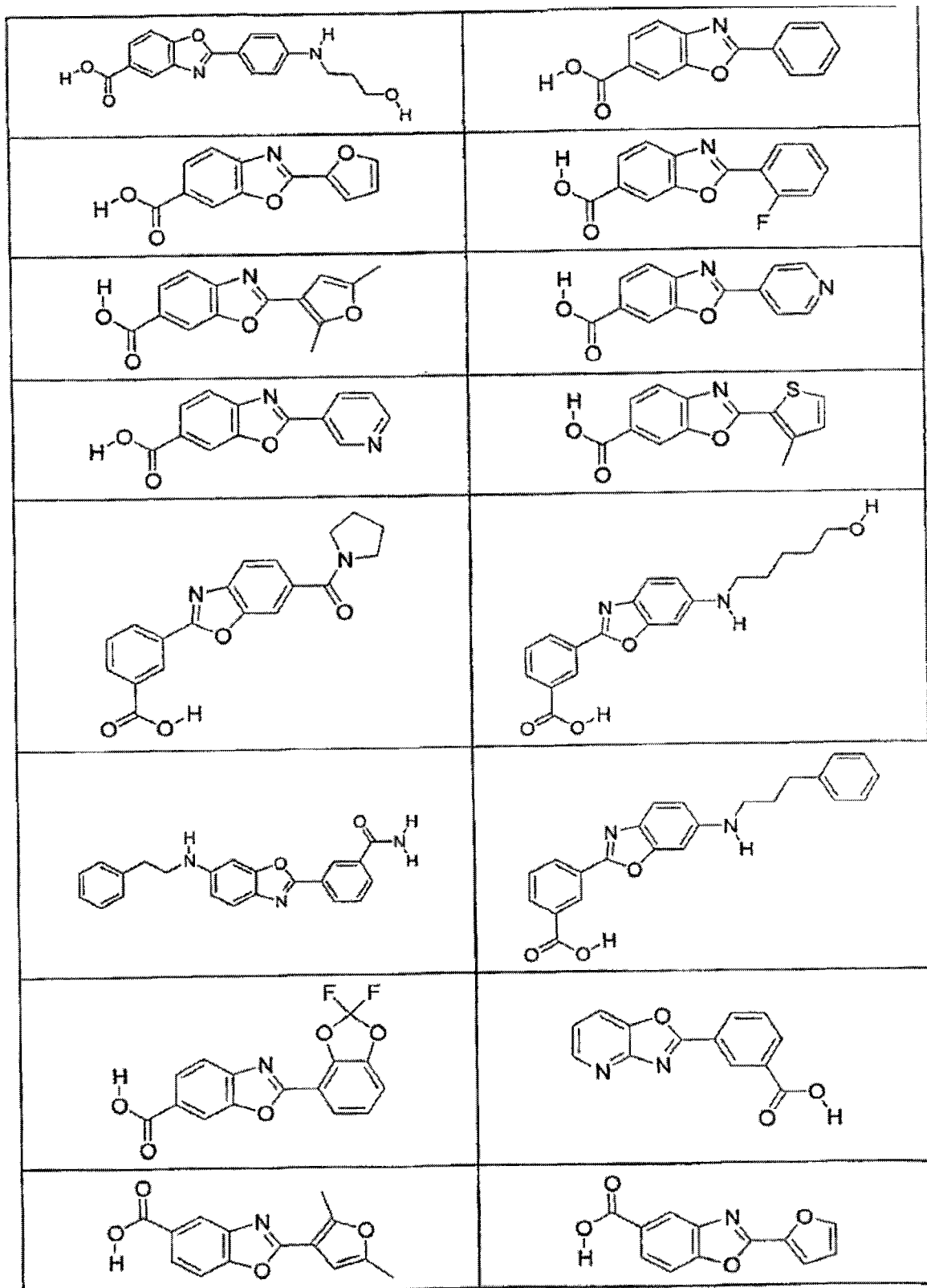


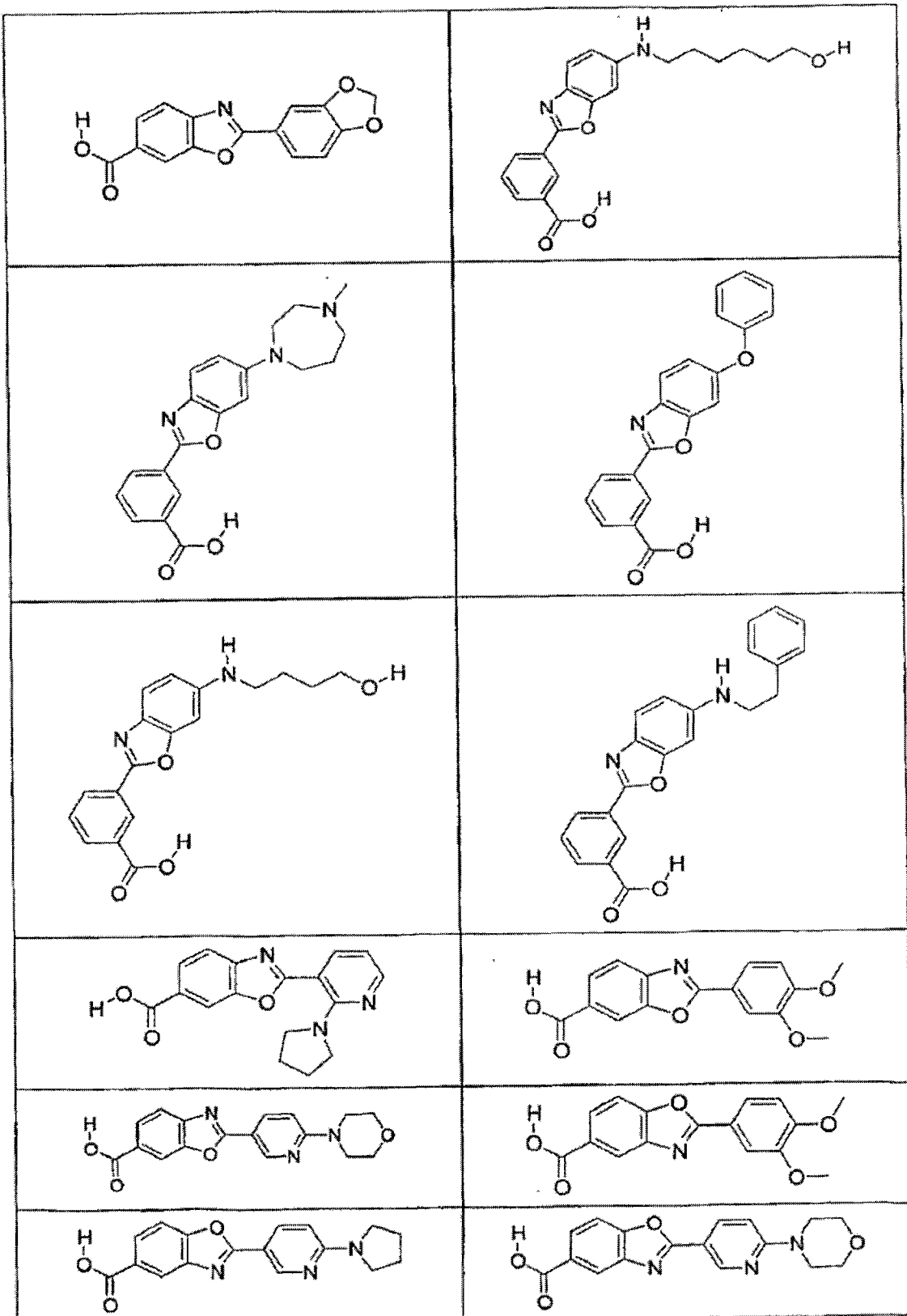


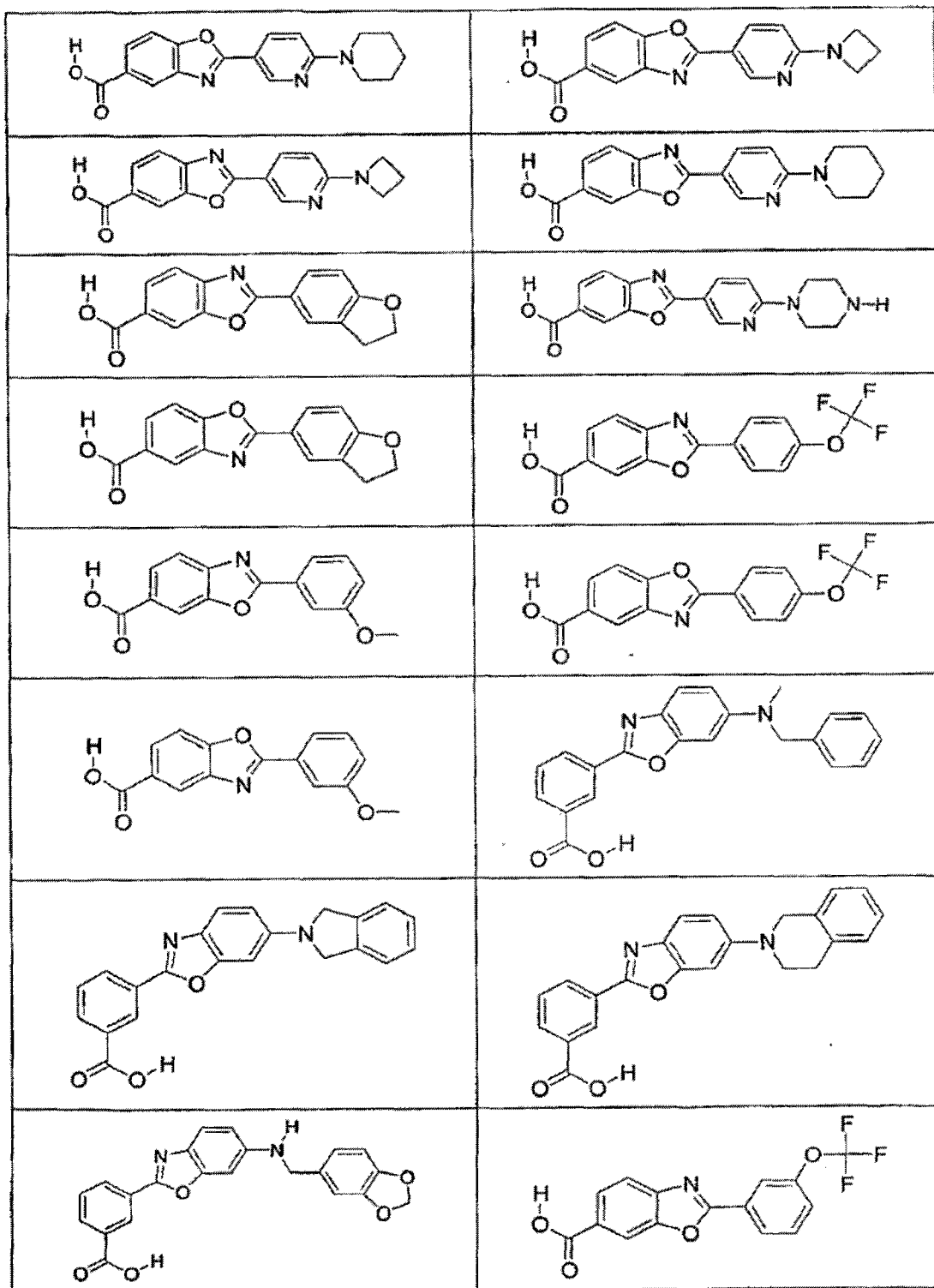


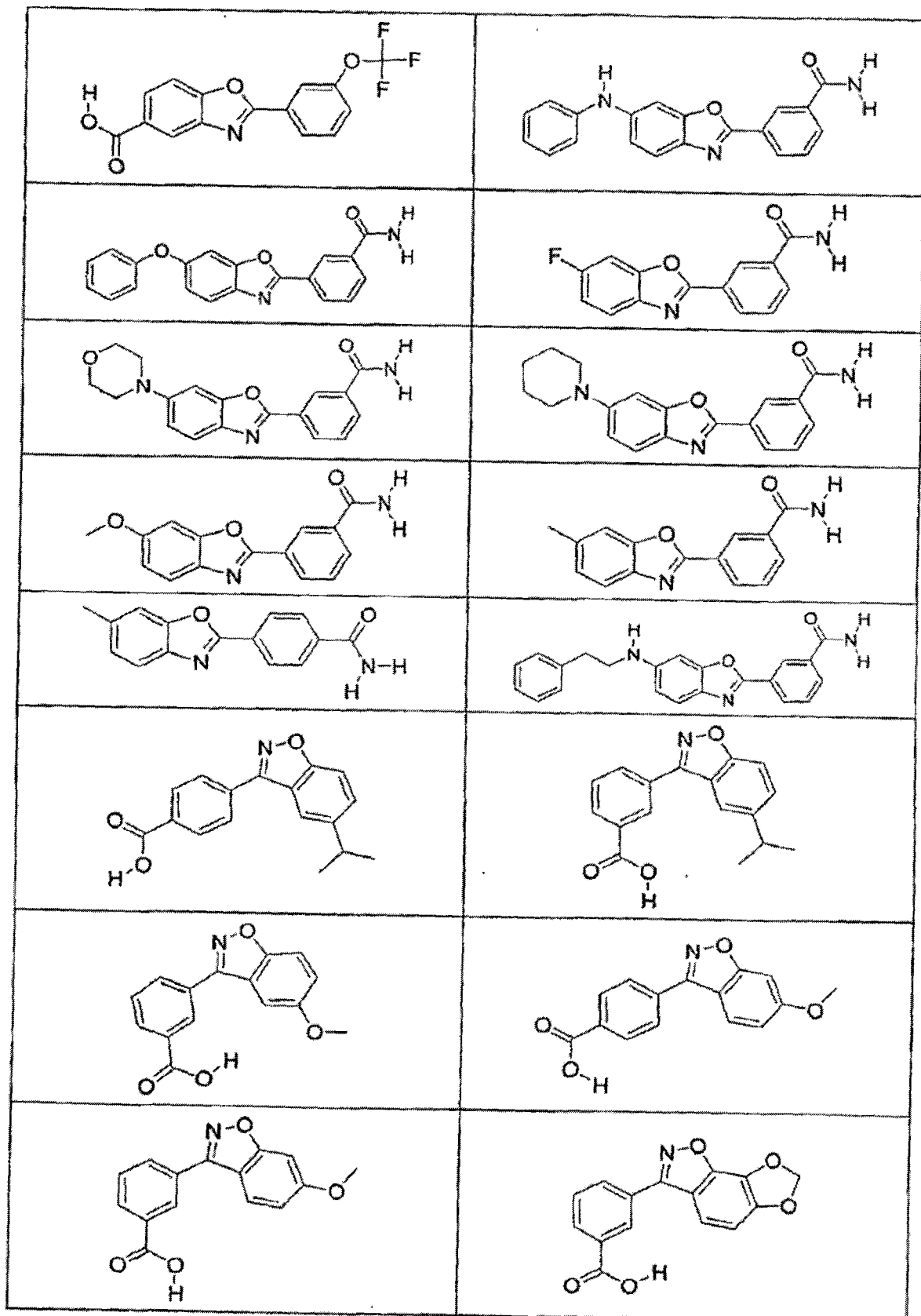


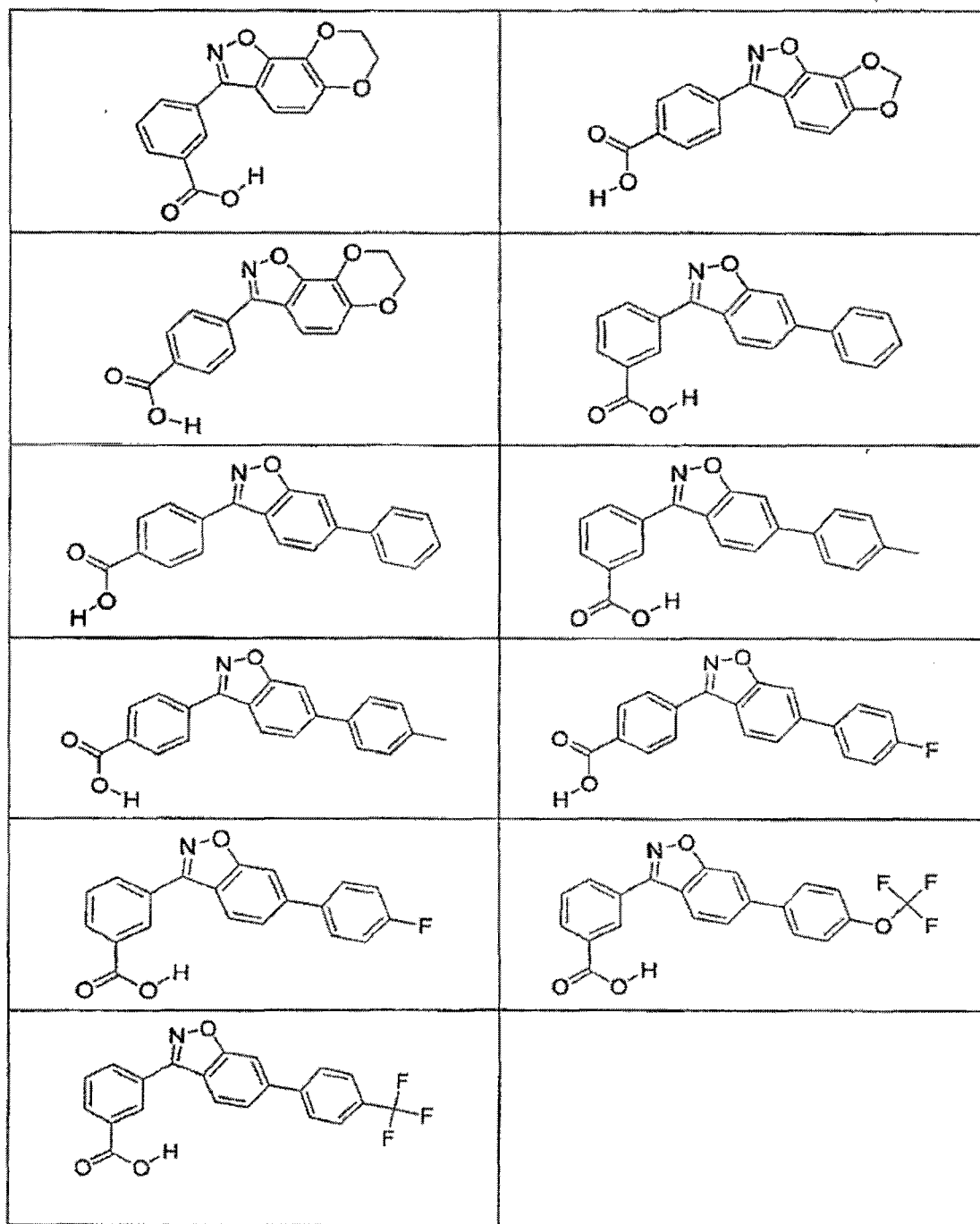








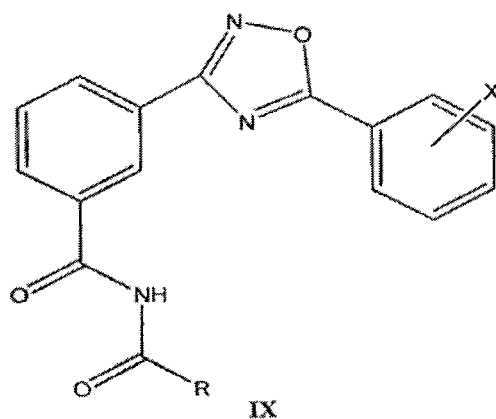




式 VIII 的化合物可通过标准的、公知的合成方法获得，该类方法可参见，例如，March, J. *Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms and Structure*, 第 4 版, 1992。因此，可用于制备具式 VIII 的化合物的起始材料和中间体可从市场购得，或可由商业途径购得的材料采用已知的合成方法和试剂制备得到。

制备式 VIII 的化合物的具体方法在 2005 年 10 月 13 日提交的国际申请 PCT/US05/036762 中有公开，其全文在此引用作为参考。

在另一实施方式中，该无义密码子抑制剂为式 IX 的化合物：



或其药学上可接受的盐、水合物、包合物、前药、多晶型、立体异构体，立体异构体包括对映体、非对映体、外消旋体或立体异构体的混合物，其中：

X 为卤素；

R 为 C₁-C₈ 烷基基团；C₁-C₄ 卤烷基基团；-OR₁ 基团；或氨基基团，其任选地被一个或两个独立选择的 R₂ 基团取代；

R₁ 为 C₁-C₈ 烷基基团，其任选地被一个或多个独立选择的 R_a 基团取代；-R_b 基团；吡咯烷基，其任选地被一个或多个独立选择的 C₁-C₄ 烷基或氧代基团取代；哌啶基，其任选地被一个或多个独立选择的 C₁-C₄ 烷基基团、苯甲基基团或羧基基团(其任选地被一个或多个 C₁-C₄ 烷基或 C₁-C₄ 烷氧基基团取代)取代；四氢呋喃基团；四氢吡喃基团；四氢萘基基团；或茚满基基团；

R₂ 为氢、C₁-C₆ 烷基基团；C₁-C₄ 卤烷基基团；C₁-C₄ 烷氧基基团；-R_b 基团；嘧啶基基团；吡啶基基团；任选地被-R_b 基团取代的磺酰基基团；或

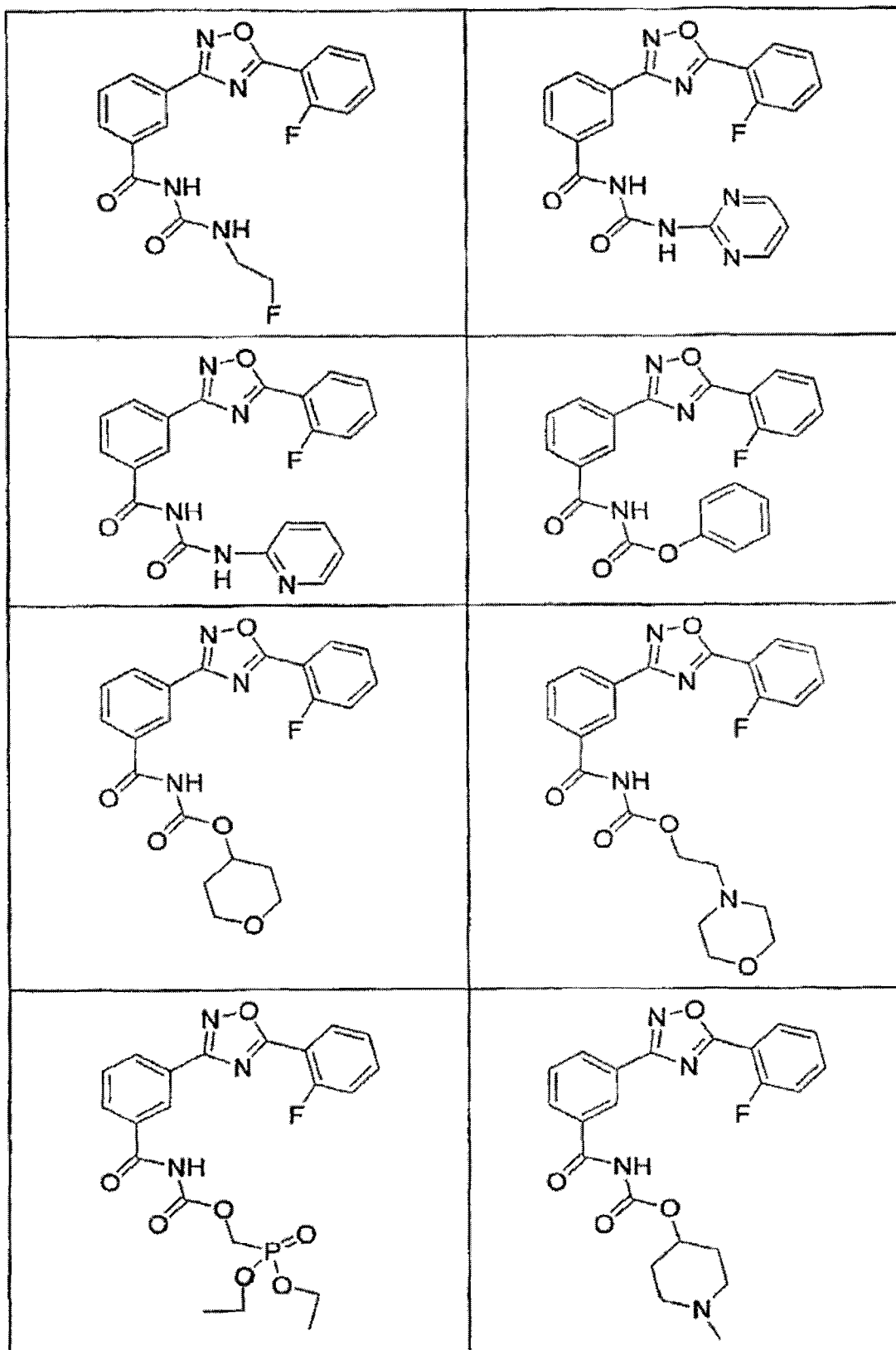
两个 R_2 与它们结合的氨基一起形成任选地被苯基取代的咪唑基基团、吡咯烷基基团、异吡啶基基团、或哌嗪基基团；

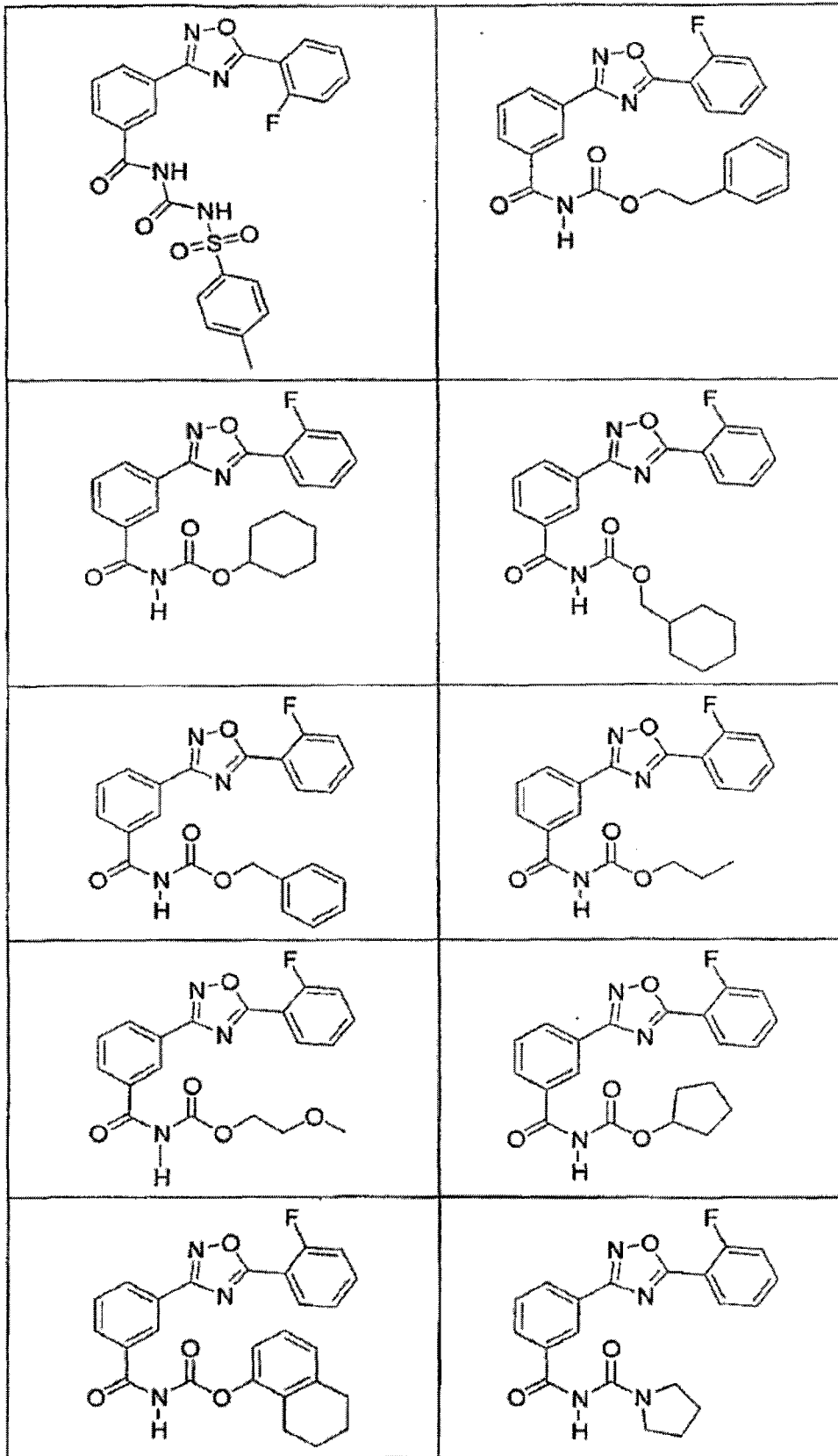
其中 R_a 为卤素； C_1 - C_4 烷氧基基团；氨基甲酰基，其任选地被一个或两个独立选择的 C_1 - C_4 烷基或 C_1 - C_4 烷氧基基团取代；磷酰基基团，其任选地被一个或两个独立选择的 C_1 - C_4 烷基或 C_1 - C_4 烷氧基基团取代；吗啉基基团；吡啶基基团；或 $-R_b$ 基团；和

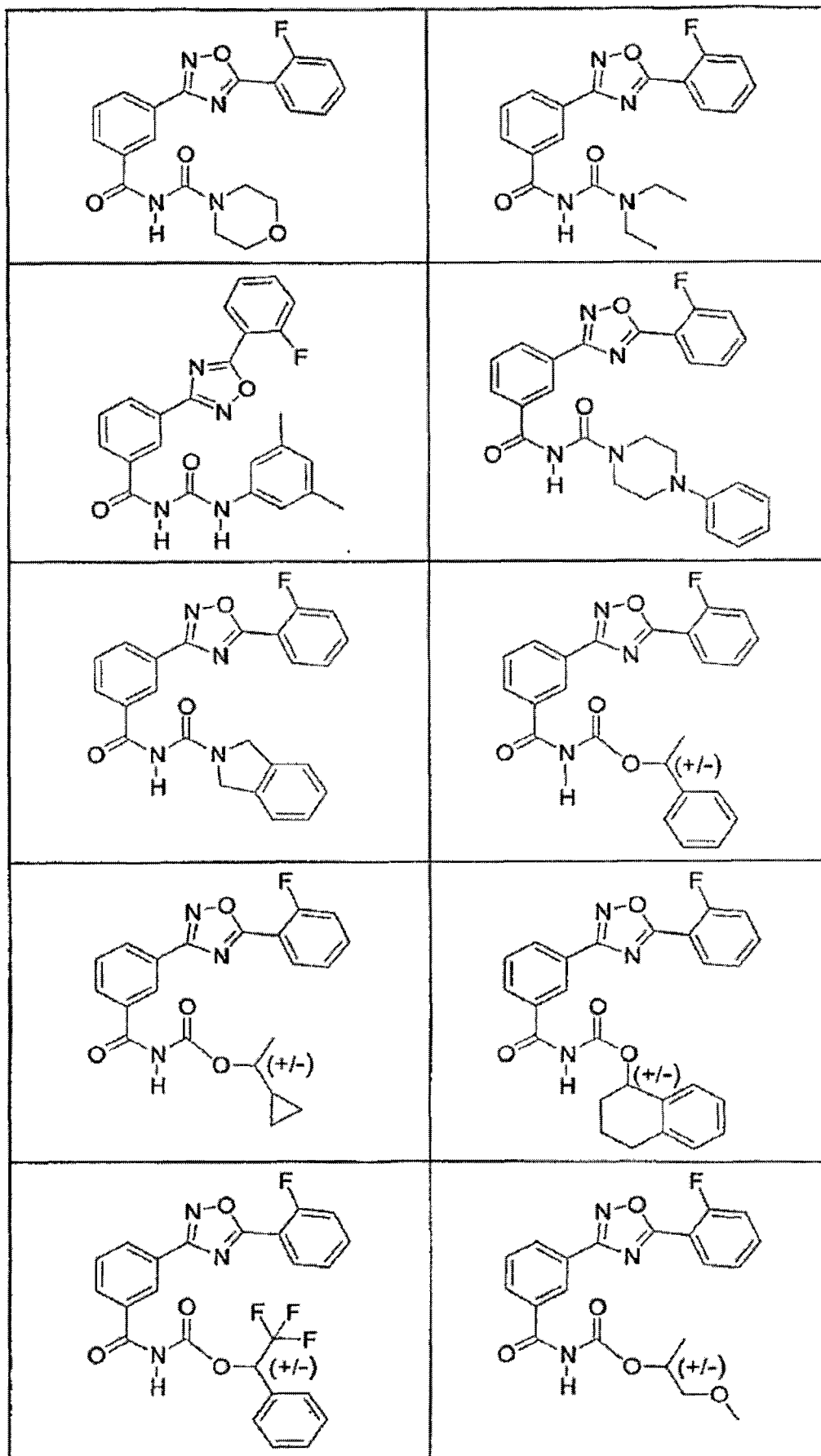
其中 R_b 为 C_6 - C_8 芳基，其任选地被一个或多个独立地选自如下的基团取代：羟基；卤素； C_1 - C_4 烷基基团； C_1 - C_4 卤烷基基团； C_1 - C_4 烷氧基基团；或氨基基团，其任选地被一个或多个独立选择的 C_1 - C_4 烷基基团取代。

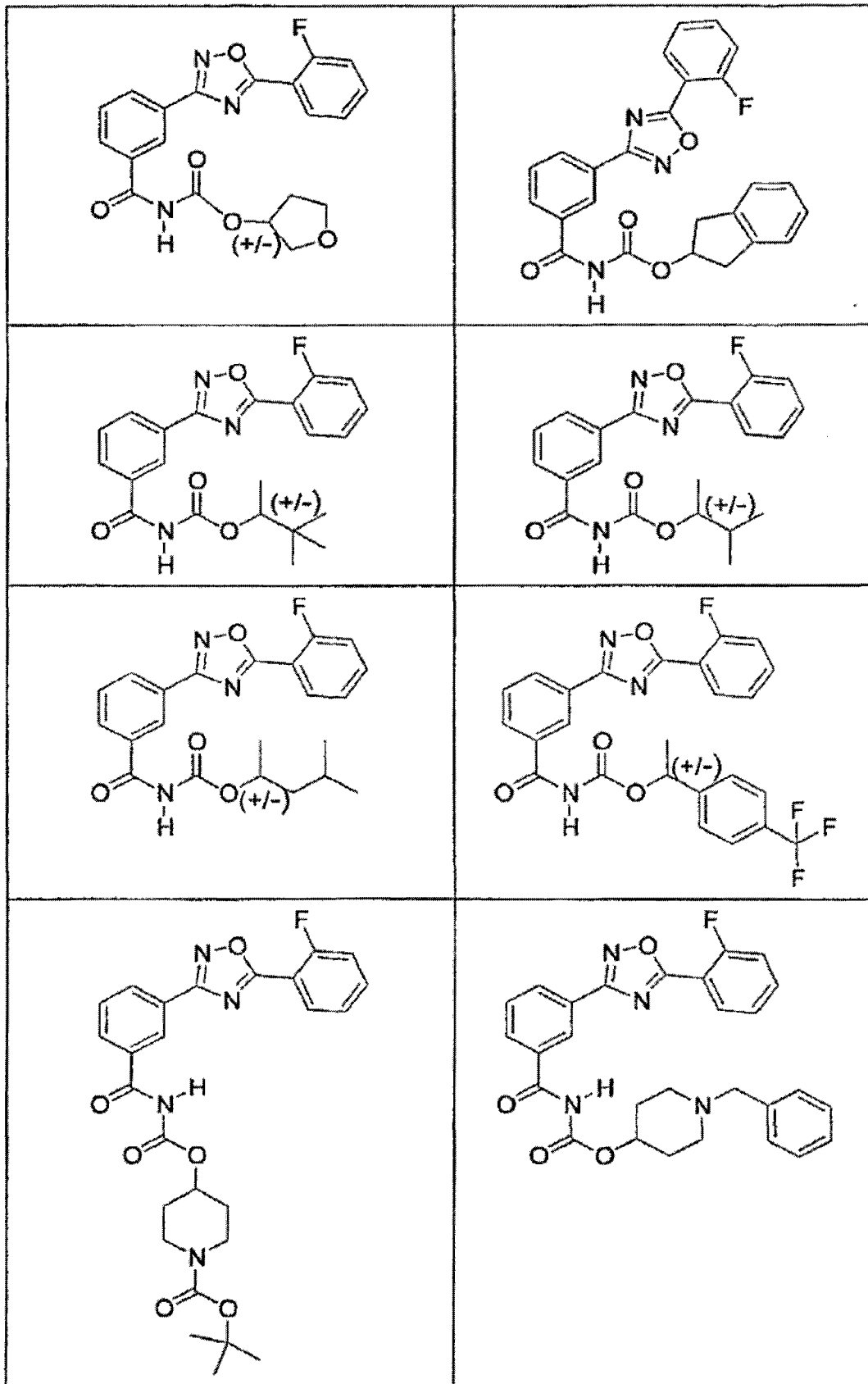
优选的式 IX 的化合物列于下表 9。

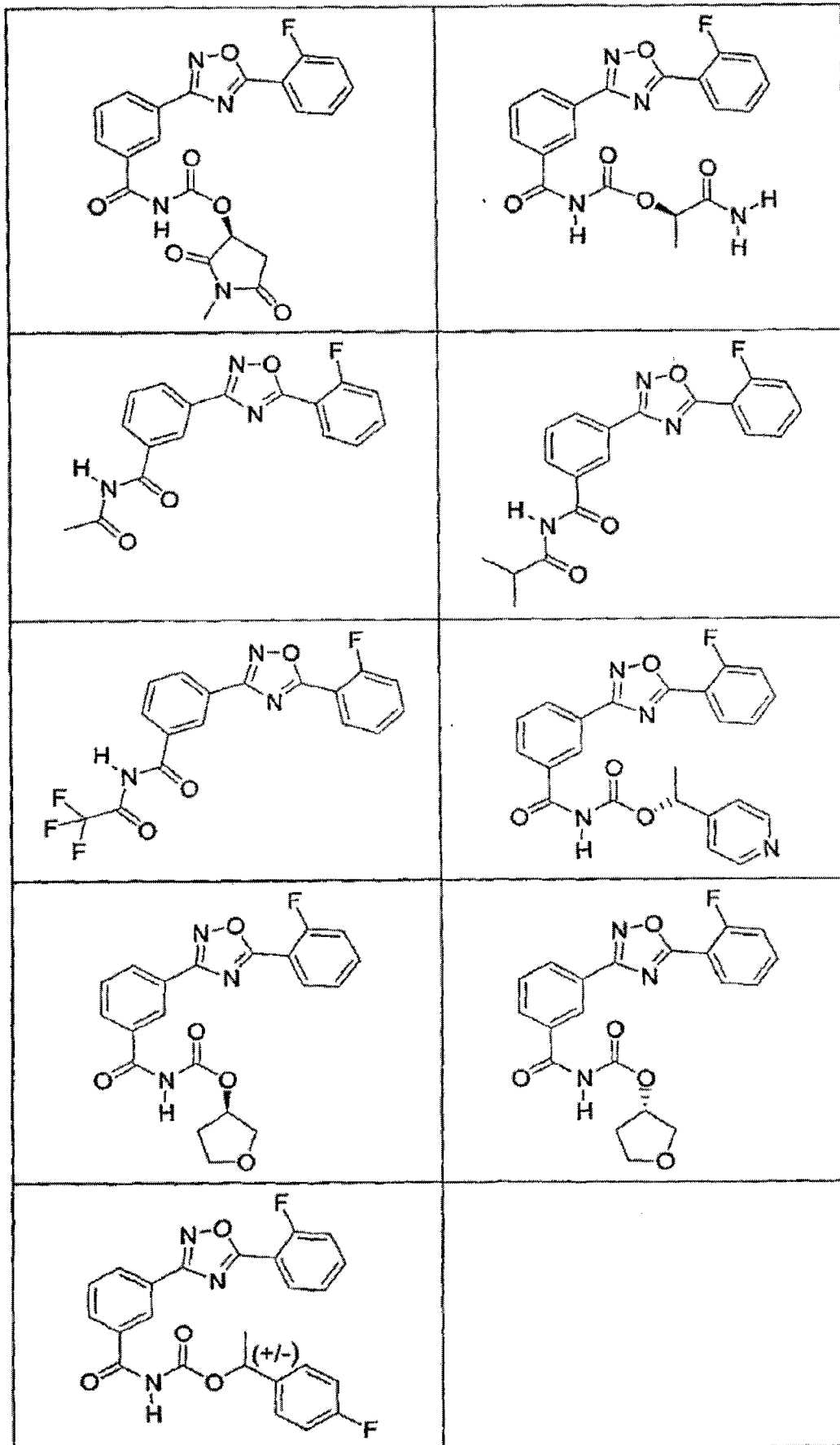
表 9











式 IX 的化合物可通过标准的、公知的合成方法获得, 该类方法可参见, 例如, March, J. *Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms and Structure*, 第 4 版, 1992。因此, 可用于制备具式 X 的化合物的起始材料和中间体可从市场购得, 或可由商业途径购得的材料采用已知的合成方法和试剂制备得到。

制备式 IX 的化合物的具体方法在 2005 年 10 月 13 日提交的国际申请 PCT/US05/037052 中有公开, 其全文在此引用作为参考。

此处所述的化合物的无义密码子抑制活性可通过 5.4 节所述的报告测定法进行检测。在具体的实施方式中, 此处所述的化合物的无义密码子抑制活性可采用基于细胞的荧光素酶报告测定法进行检测, 该测定中包含了被稳定转染至 293T 人胚胎肾细胞的含有 UGA 提前终止密码子的荧光素酶报告构建体。已知一种允许提前终止密码子通读的小分子 3-[3-(4-异丙基-苯基)-2,5-二氧化-咪唑烷-1-基]-苯甲酸可被用作内标。活性的测量基于在细胞中生成给定蛋白所需的化合物的最小浓度(潜能)和该细胞生成蛋白的最大数量(效力)之间的定量关系。

相信在基于细胞的荧光素酶测定中具有较低显著性蛋白合成潜能或效力或两者的化合物仍可用于在本发明的体内方法中。

5.3 示例化合物的合成和制备

此处所述的示例化合物可通过标准的、公知的合成方法获得, 该类方法可参见, 例如, March, J. *Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms and Structure*, 第 4 版, 1992。因此, 可用于制备该示例化合物

的起始材料和中间体可从商业途径购得，或可由商业途径购得的材料采用已知的合成方法和试剂制备得到。

可获得此处所述的示例化合物的具体方法至少在2004年4月8日公开的US 2004/0067900、2004年1月29日公开的WO 2004/009558 A2，2004年1月29日公开的WO 2004/009533 A1、2004年10月14日公开的US 2004-0204461 A1、2005年10月13日提交的国际申请PCT/US2005/036673、2005年10月13日提交的国际申请PCT/US2005/037052、2005年10月13日提交的国际申请PCT/US2005/036764、2005年10月13日提交的国际申请PCT/US2005/036762、2005年10月13日提交的国际申请PCT/US2005/036761中有描述，其全文在此引用作为参考。

5.4 鉴定无义密码子抑制剂的方法

抑制提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的化合物可通过本领域技术人员已知的技术进行鉴定。例如，参见，2005年10月20日公开的题为“Methods for Identifying Small Molecules that Modulate Premature Translation Termination and Nonsense Mediated mRNA Decay(调节提前翻译终止和无义介导的 mRNA 降解的小分子的鉴定方法)”的美国公开2005/0233327；题为“Methods of Assaying for Compounds that Inhibit Premature Translation Termination and Nonsense Mediated RNA Decay(抑制提前翻译终止和无义介导的 RNA 降解的化合物的测定方法)”的美国专利6,458,538；2003年1月9日公开的题为“Methods of Assaying for Compounds that Inhibit Premature Translation Termination and Nonsense Mediated RNA Decay(抑制提前翻译终止和无义介导的 RNA 降解的化合物的测定方法)”的

美国公开 2003/0008317；以及题为“Methods of Assaying for Compounds that Inhibit Premature Translation Termination and Nonsense Mediated RNA Decay(抑制提前翻译终止和无义介导的 RNA 降解的化合物的测定方法)”的国际申请公开 WO 2004/010106，其全文分别在此引用作为参考。具体地，可采用基于细胞的和无细胞的测定法来鉴定抑制提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的化合物。

在一个实施方式中，本发明提供了抑制提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的化合物的鉴定方法，所述方法包括：(a)将化合物或者化合物库的成员与带有包含报告基因的核酸序列的细胞相接触，其中该报告基因包含提前终止密码子；和(b)检测所述报告基因的表达，其中相对于预先测定的参考范围或所述报告基因在不存在所述化合物或存在合适对照(例如，阴性对照)时的表达和/或活性，如果在存在化合物时所述报告基因的表达和/或活性有所提高，则鉴定得到抑制提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的化合物。在另一实施方式中，本发明提供了抑制提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的化合物的鉴定方法，所述方法包括：(a)将化合物或者化合物库的成员与包含报告基因的无细胞萃取物和核酸序列相接触，其中该报告基因包含提前终止密码子；和(b)检测所述报告基因的表达，其中相对于预先测定的参考范围或所述报告基因在不存在所述化合物或存在合适对照(例如，阴性对照)时的表达和/或活性，如果在存在化合物时所述报告基因的表达和/或活性有所提高，则鉴定得到抑制提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的化合物。根据该实施方式，该细胞萃取物可从在约 0°C 至约 10°C 下孵育过的细胞中分离得到，并且/或者是 S10 至 S30 无细胞萃取物。

根据本发明，此处所述的基于报告基因的测定中化合物与细胞或无细胞萃取物和核酸序列的接触步骤优选在包含缓冲液和盐的组合(例如 KCl、NaCl 和/或 $MgCl_2$)的水溶液中进行。在水溶液中使用的各种盐的最佳浓度取决于例如由该核酸序列编码的蛋白、多肽或肽(例如，调节蛋白)以及所用的化合物，并可通过常规实验进行检测。在具体的实施方式中，该水溶液接近或模仿生理条件。在另一具体的实施方式中，该水溶液进一步包含去污剂或表面活性剂。

本发明的测定可采用不同的孵育时间。在基于细胞的系统中，该细胞和化合物或化合物库的成员在检测报告基因的表达和/或活性前共同孵育至少 0.2 小时、0.25 小时、0.5 小时、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、8 小时、10 小时、12 小时、18 小时、至少 1 天、至少 2 天或至少 3 天。在无细胞系统中，该无细胞萃取物和该核酸序列(例如，报告基因)可在添加化合物或化合物库成员前共同孵育。在某些实施方式中，该无细胞萃取物与核酸序列(例如，报告基因)在化合物或化合物库成员添加前至少孵育 0.2 小时、0.25 小时、0.5 小时、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、8 小时、10 小时、12 小时、18 小时或至少 1 天。在其它实施方式中，该无细胞萃取物或该核酸序列(例如，报告基因)在添加该核酸序列(例如，报告基因)或该无细胞萃取物前分别与化合物或化合物库成员共同孵育。在某些实施方式中，化合物或化合物库的成员与核酸序列(例如，报告基因)或无细胞萃取物在添加剩余成分(即，分别为无细胞萃取物或核酸序列(例如，报告基因))前至少孵育 0.2 小时、0.25 小时、0.5 小时、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、8 小时、10 小时、12 小时、18 小时或至少 1 天。一旦反应容器包含该成分(即，化合物或化合物库的成员，

该无细胞萃取物和该核酸序列(例如, 报告基因)), 该反应可进一步孵育至少 0.2 小时、0.25 小时、0.5 小时、1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、8 小时、10 小时、12 小时、18 小时或至少 1 天。

在基于报告基因的测定中可连续检测反应的进展。可替代地, 可在反应的不同时间的时间点监测基于报告基因的测定中的反应进展。

此处所述的基于报告基因的测定可在经遗传工程改造后表达该报告基因的细胞中进行。可替代地, 此处所述的基于报告基因的测定可在天然表达在基因编码区包含无义突变的报告基因的细胞中进行。本领域技术人员公知的任意物种的任意细胞或细胞系均可用于本发明所述的方法。此外, 无细胞萃取物可来自本领域技术人员公知的任意物种的任意细胞或细胞系。细胞和细胞类型的范例包括但不限于: 人细胞、培养的小鼠细胞、培养的大鼠细胞或中国仓鼠卵巢("CHO")细胞。

在此处所述的基于报告基因的测定中采用的该报告基因构建体包含报告基因的编码区以及导致提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的提前终止密码子。优选地, 该提前终止密码子为该报告基因的野生型终止密码子的 N 末端, 且其位置使得对提前终止密码子的抑制方便检测。在具体的实施方式中, 在此处所述的基于报告基因的测定中采用的该报告基因构建体包含报告基因编码区, 该编码区包含来自报告基因开发阅读框架中离起始密码子至少 15 个核苷酸、优选 25 至 50 个核苷酸、50 至 75 个核苷酸、75 至 100 个核苷酸、100 至 300 个核苷酸、100 至 500 个核苷酸、100 至 750 个核苷酸或 100 至 1000 个核苷酸的提前终止密码子。在另一实施方式中, 在此处所述的基于报告基因的测定中采用的报告基因构建体包含报告基因编码区, 该编码区包含来自报告基因开发阅读框架中离野生型终止密码子

至少 15 个核苷酸、优选 25 至 50 个核苷酸、50 至 75 个核苷酸、75 至 100 个核苷酸、100 至 150 个核苷酸、150 至 300 个核苷酸、300 至 500 个核苷酸、500 至 750 个核苷酸或 500 至 1000 个核苷酸的提前终止密码子。在另一实施方式中，在此处所述的基于报告基因的测定中采用的报告基因构建体包含报告基因编码区，该编码区包含 UAG 和/或 UGA 提前终止密码子。在另一实施方式中，在此处所述的基于报告基因的测定中采用的报告基因构建体包含报告基因编码区，该编码区包含在 UGAA、UGAC、UGAG、UGAU、UAGA、UAGC、UAGG、UAGU、UAAA、UAAC、UAAG 或 UAAU 中的提前终止密码子。

本领域技术人员公知的任意报告基因均可用于此处所述的报告基因构建体。报告基因的获得以及该元件的核苷酸序列的测定均可通过本领域技术人员公知的方法进行。报告基因的核苷酸序列可从，例如，文献或 GenBank 等数据库获得。可替代地，编码报告基因的多聚核苷酸可由适当来源的核酸生成。当对报告基因的核苷酸序列进行测定后，可采用本领域公知的操作核苷酸序列的方法(如重组 DNA 技术、定点突变、PCR 等(例如，参见 Sambrook 等人，1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 以及 Ausubel 等人编，1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY 所述的技术，其全文在此引用作为参考))对报告基因的核苷酸序列进行操作，以生成具有不同氨基酸序列(例如形成氨基酸替换、删除、和/或插入)的报告基因。

在具体的实施方式中，报告基因是具有提前终止密码子的任意天然存在的基因。可用于本发明的具有提前终止密码子的基因包括但不限于此处

所述的基因。在替代性的实施方式中，报告基因为自然界中未知的包含提前终止密码子的任意基因。报告基因的范例包括但不限于：编码萤火虫荧光素酶的基因、编码海肾荧光素酶的基因、编码叩头虫荧光素酶的基因、编码绿色荧光蛋白的基因、编码黄色荧光蛋白的基因、编码红色荧光蛋白的基因、编码青色荧光蛋白的基因、编码蓝色荧光蛋白的基因、编码 β -半乳糖苷酶的基因、编码 β -葡萄糖醛酸苷酶的基因、编码 β -内酰胺酶的基因、编码氯霉素乙酰转移酶的基因、以及编码碱性磷酸酶的基因。

此处所述的测定中采用的化合物可以是化合物库的成员。在一个实施方式中，该化合物选自包含类肽；随机的生物低聚物；diversomers，如乙内酰胺、苯并二氮和二肽类等；插烯(vinylogous)多肽；非肽类肽类似物；低聚氨基甲酸酯；肽基磷酸酯；肽核酸库；抗体库；糖库；以及小有机分子库的化合物组合库。在具体的实施方式中，该小有机分子库为苯并二氮类、异戊烯类、噻唑啉酮类、间噻嗪酮类、吡咯烷类、吗啉化合物或二氮杂二酮类的库。

在某些实施方式中，该化合物在池中筛选。鉴定得到阳性池后，对该池的单个化合物进行单独测试。在某些实施方式中，该池的大小为至少2个、至少5个、至少10个、至少25个、至少50个、至少75个、至少100个、至少150个、至少200个、至少250个或至少500个化合物。

本领域已知的用于检测蛋白表达的任何方法均可用于检测根据本发明生成的功能通读蛋白的表达。该种方法的非限制性范例包括免疫测定例如Western印迹，免疫沉淀接连十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，免疫细胞化学，放射性免疫测定，ELISA(酶联免疫吸附分析)，“夹心”免疫测定，免疫沉淀测定，沉淀素反应，凝胶扩散沉淀素反应，免疫

扩散测定,凝集测定,补体-固定测定,免疫放射分析,荧光免疫测定,蛋白 A 免疫测定以及使用特异性针对目标基因编码的多肽的抗体的表位标记。在具体的实施方式中,在免疫测定中采用的抗体对免疫测定中所用的多肽的 C 末端部分具有特异性。这些均为常规测定并在本领域公知(例如,参见 Ausubel 等人编,1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第 1 卷, John Wiley & Sons, Inc., New York, 其全文在此引用作为参考)。下文简述了示范性的免疫测定(但并非进行限制)。

免疫沉淀方案通常包括在添加了蛋白磷酸酯酶和/或蛋白酶抑制剂(例如, EDTA、PMSF、抑肽酶、钒酸钠)的裂解缓冲液如 RIPA 缓冲液(1%NP-40 或 Triton X-100、1%脱氧胆酸盐、0.1% SDS、0.15 M NaCl、pH7.2 的 0.01 M 磷酸钠、1%特血尔(Trasylol))中裂解一定量的细胞,向细胞裂解产物添加识别该抗原的抗体,在 40°C 下培养一定时间(例如,1-4 小时),向细胞裂解产物添加蛋白 A 和/或蛋白 G 琼脂糖珠,在 40°C 下培养一小时或更多时间,以裂解缓冲液洗涤珠子并将珠子重新悬浮于 SDS/样本缓冲液中。抗体免疫沉淀特定抗原的能力可通过,例如,western 印迹分析进行评价。本领域的技术人员应能理解可对该参数进行调整以提高抗体与抗原的结合,并降低背景干扰(例如,以琼脂糖珠预先去除细胞裂解产物)。有关免疫沉淀方案的进一步讨论可参见,例如 Ausubel 等人编,2003, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第 1 卷, John Wiley & Sons, Inc., New York, 第 10 章。

Western 印迹分析通常包括制备蛋白样本,将蛋白样本在聚丙烯酰胺凝胶(例如,根据抗原的分子量选择 8%-20%SDS-PAGE)中进行电泳,将蛋白样本从聚丙烯酰胺凝胶转移到膜如硝化纤维、PVDF 或尼龙上,在封闭液(例如,含有 3%BSA 或脱脂牛奶的 PBS)中封闭膜,以洗涤缓冲液(例如,

PBS-Tween 20)清洗膜,以稀释于封闭缓冲液的一抗(识别该抗原的抗体)封闭膜,在洗涤缓冲液中清洗膜,以稀释于封闭缓冲液的结合至酶底物(例如,辣根过氧化酶、碱性磷酸酶)或放射性底物(例如, ^{32}p 或 ^{125}I)的二抗(可识别该一抗,例如抗人抗体)封闭膜,在洗涤缓冲液中清洗膜,并检测抗原的存在。本领域的技术人员应能理解可对该参数进行调整以提高检测到的信号并降低背景噪音。有关 western 印迹方案的进一步讨论可参见,例如 Ausubel 等人编,2003, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第 1 卷, John Wiley & Sons, Inc., New York, 第 10 章。

ELISA 包括制备抗原,以抗原涂布 96 孔微量滴定板的孔,向孔中添加与可测化合物如酶底物(例如,辣根过氧化酶或碱性磷酸酶)结合的一抗(其识别该抗原)并孵育一段时间,检测抗原的存在。在 ELISA 中该目标抗体并非必须连接至可测化合物;事实上可向孔中添加一种结合了可测化合物的二抗(可识别一抗)。此外,除了用抗原涂布微孔外,也可以使用抗体涂布微孔。在这一情况下,在添加目标抗原后可能要向涂布的微孔中添加结合了可测化合物的二抗。本领域的技术人员应能理解可对该参数进行调整以提高检测到的信号以及其它本领域已知的 ELISA 变量。有关 ELISA 的进一步讨论可参见,例如 Ausubel 等人编,2003, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第 1 卷, John Wiley & Sons, Inc., New York。

检测由包含无义突变的报告基因编码的功能通读蛋白活性的方法将随所用的报告基因而变化。各种报告基因的测定已为本领域技术人员公知。例如,荧光素酶、 β -半乳糖苷酶(" β -gal")、 β -葡萄糖醛酸苷酶("GUS")、 β -内酰胺酶、氯霉素乙酰转移酶("CAT")以及碱性磷酸酶("AP")为可在底物存在下进行分析并可适用于高通量筛选的酶。例如,荧光素酶、 β -半乳糖苷酶

("β-gal")和碱性磷酸酶("AP")的反应产物可通过光成像(例如, 荧光素酶)、分光光度吸收(例如, "β-gal")或荧光(例如, AP)的变化进行测定。光输出、吸收和/或荧光的变化的测定可在高通量筛选中简单地采用。例如, β-gal 活性可通过酶标仪进行检测。绿色荧光蛋白("GFP")活性可通过荧光的变化进行检测。例如, 对于在 488 nm 下发荧光的突变 GFP, 可采用标准的荧光激活细胞分类("FACS")设备根据 GFP 活性分离细胞。

以下描述了基于细胞的报告基因测定的具体实例: 制备报告构建体, 该报告构建体能够基于荧光素酶介导的化学发光对翻译通读的水平进行定量评价。以在氨基酸位置 190 处包含提前终止密码子的北美萤火虫荧光素酶基因稳定转染生长于培养基(例如, 含胎牛血清(FBS)的培养基)中的细胞(例如, HEK 293 细胞)。代替通常存在于所述位点的苏氨酸密码子(腺苷-胞嘧啶-腺苷(ACA)), 通过定点突变导入 3 个可能的无义密码子(UAA、UAG 或 UGA)中的一个以及在无义密码子后的环境(contextually)重要的下游+1 位置处的 4 个可能的核苷酸(C、U、A、G)中的一个。图 1 提供了整合进入这些构建体的多类荧光素酶 mRNA 的示意图。将不同浓度的目标化合物、阳性对照(例如, 庆大霉素)或阴性对照(例如, 仅溶剂(例如, PBS、DMSO 或水))添加到该细胞, 大约四小时后检测生成的发光量。发光可采用 ViewLux CCD 成像仪(Perkin-Elmer, Turku, 芬兰)进行检测。发光数据被归一化为由溶剂单独产生的数据, 相对背景的抑制倍数计算为 $\frac{\text{化合物}_{\text{发光单位}}}{\text{溶剂}_{\text{发光单位}}}$ 。

在对照细胞(仅用溶剂处理)中, 荧光素酶基因的翻译被荧光素酶 mRNA 中存在的提前终止密码子中断, 并生成不能有效催化化学发光反应的截短的、非功能的荧光素酶蛋白。然而, 当能够诱导提前终止密码子的核糖体

通读的化合物存在时，可生成全长荧光素酶蛋白，并能够对相对于对照的相应发光进行量化。

以下描述了无细胞报告基因测定的具体实例：采用 MegaScript 体外 T7-启动子转录试剂盒(Ambion, Austin, TX)制备在位置 190 处具有提前终止密码子(具有+1A)的荧光素酶 mRNA。将该 mRNA 与从细胞(例如, HeLa 细胞)制备的包含核糖体和其它翻译必需细胞因子的细胞质萃取物进行孵育。将不同浓度的目标化合物、阳性对照(例如, 具有无义抑制活性的化合物)或阴性对照(例如, 单独的溶剂(例如, PBS、DMSO 或水))添加入该体外反应, 大约 4 小时后检测生成的发光量。发光可采用 ViewLux CCD 成像仪(Perkin-Elmer, Turku, 芬兰)进行检测。发光数据被归一化为由溶剂单独产生的数据, 相对背景的抑制倍数计算为化合物_{发光单位}/溶剂_{发光单位}。

在对照萃取物(仅用溶剂处理)中, 荧光素酶 mRNA 的翻译被荧光素酶 mRNA 中存在的提前终止密码子中断, 并生成不能有效催化化学发光反应的截短的、非功能的荧光素酶蛋白。然而, 当能够诱导提前终止密码子的核糖体通读的化合物存在时, 可生成全长荧光素酶蛋白, 并能够对相对于对照的相应发光进行量化。如果化合物能够在不含核的细胞质萃取物中诱导全长荧光素酶蛋白的生成, 则表明该化合物的无义通读活性发生在翻译水平而非转录水平。

化合物的无义抑制活性可在个体或动物模型的细胞, 例如来自 *mdx* 小鼠的细胞中进行评价, 该细胞包含含有与人类疾病相关的无义突变的基因。该 *mdx* 小鼠在肌营养不良蛋白基因的外显子 23 中具有无义突变, 其可在肌营养不良 mRNA 中生成提前 UAA (+1A)终止密码子(Sicinski 等人, Science 244: 1578-1580 (1989)), 并导致几乎完全不生成全长蛋白。

以下描述了用来自动物模型的细胞进行的报告基因测定的具体实例，该细胞含有与人类疾病相关的无义突变的基因：原代成肌细胞通过已建立的方法取自 1 天大新生 *mdx* 小鼠(Neville 等人(编), *Methods in Cell Biology*, 第 52 卷, 第 85-116 页, San Diego, Academic Press (1998); 以及 Barton-Davis 等人, *J. Clin. Invest.* 104(4): 375-381 (1999))。吸附至塑料碟后，在添加了目标化合物或阳性对照(即，具有无义密码子抑制活性的化合物)的含血清培养基中使细胞分化成为肌管。每隔一天补充培养基和化合物，并在 12 日通过免疫荧光检测肌营养不良蛋白和肌球蛋白。各自的阴性和阳性对照包含未处理的 *mdx* 和野生型 C57/B16 小鼠原代肌培养物。染色的程度采用 a-、+1、+2、+3 和+4 半定量等级进行评价。具有无义抑制活性的目标化合物将导致生成全长肌营养不良蛋白。

包含了具有与人类疾病相关的无义突变的基因的动物模型系统可用于确认在报告测定中鉴定的化合物的无义密码子抑制剂活性。例如，化合物的无义密码子抑制剂活性可在 *mdx* 或 CFTR 小鼠模型中进行评价。针对人类疾病的其它动物模型系统的范例参见，例如，国际公布 WO 2004/001010，其全文在此引用作为参考。

在具体的实例中：*mdx* 小鼠在 2 至 12 或更多星期的期间内被施用目标化合物、阳性对照(即，具有无义密码子抑制活性的化合物)或阴性对照(例如，单独的运载体)。所有的小鼠以 Peptamen®等张液体要素饮食(Nestlé, 血清 CK 活性通过市售的 NADH-连接的动力学测定进行评价(Diagnostic Chemicals Limited, Oxford, CT))进行喂养。用于血清肌酸酐激酶(CK)检测的血液以不同的时间间隔采集。在治疗的末期，将小鼠处死。采集血液以评价血清 CK 水平。去除胫前(TA)肌和趾长伸(EDL)肌以进行后续分析。将 TA

快速冷冻以进行肌营养不良蛋白整合进入横纹肌的免疫荧光分析。将 EDL 用于功能(包括离心收缩损伤的强度和易感性)测试。

肌营养不良蛋白的一抗为市售的针对对应人肌营养不良蛋白的羧基末端附近序列的合成肽的兔多克隆抗体(Abcam 15277)。该抗体与小鼠肌营养不良蛋白交叉反应。该表位位于 *mdx* 小鼠的肌营养不良蛋白基因的外显子 23 编码的提前终止位点的更下游(更朝向肌营养不良蛋白的羧基末端)。以连接在入射荧光显微镜的数码摄像机捕捉图像,并以图像分析软件进行处理。

采用专门设计的装置在 EDL 肌肉(包括可制备双侧制备物的动物中的各 EDL 肌肉)上进行分离的全肌肉力学研究(Barton-Davis 等人, PNAS USA 95(26): 15603- 15607 (1998))。对 EDL 的比力(每单位横截面积上的力)进行分析。对针对一系列 5 个离心收缩(其牵张为 10%的最佳长度)诱导的机械损伤所提供的保护进行评价;损伤测定为第一和最后离心收缩之间的力的百分比损失。

血清 CK 活性采用市售的 NADH 连接的动力学测定(Diagnostic Chemicals Ltd., Oxford, CT)进行评价。

相对于未处理 *mdx* 小鼠的肌肉,以具有无义密码子抑制活性的化合物处理的 *mdx* 小鼠会显示出肌营养不良蛋白的可见着色。相对于未处理 *mdx* 小鼠或运载体对照处理的 *mdx* 小鼠的平均 EDL 力,以具有无义密码子抑制活性的化合物处理的 *mdx* 小鼠还提高了平均 EDL 比力。以具有无义密码子抑制活性的化合物处理的 *mdx* 小鼠还会保护以免受离心收缩损伤。此外,以具有无义密码子抑制活性的化合物处理的 *mdx* 小鼠相对于未处理 *mdx* 小鼠或运载体对照处理的 *mdx* 小鼠会降低血清 CK。

在另一具体的实例中：为了评价目标化合物对无义密码子抑制的作用，以该化合物、阴性对照或阳性对照处理 *cftr*^{-/-} *FABP-hCFTR-G542X* 小鼠一周或更长时间。阴性对照组包含未处理的 *cftr*^{-/-} *FABP-hCFTR-G542X* 小鼠。阳性对照组包含接受了已知具有无义密码子抑制活性的化合物的 *cftr*^{-/-} *FABP-hCFTR-G542X* 小鼠。在十二指肠切片上进行 CFTR 特异性免疫荧光染色以证实 CFTR 的生成。也可评价目标化合物对 CFTR-介导的经上皮氯电导的功能影响。具有无义密码子抑制活性的化合物将导致定位于十二指肠分粘腺体的上皮顶端区的 CFTR 免疫荧光染色的阳性结果。此外，在添加毛喉素而导致环腺苷酸(cAMP)升高后，具有无义突变抑制活性的化合物还会导致经上皮氯电导的强烈上升。

一旦抑制提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的化合物被鉴定，则该化合物的结构可采用公知的技术或者通过参考预定的规范进行测定。例如，该化合物的结构可通过质谱、NMR、振动光谱或 X 射线晶体学进行测定。

为了评价化合物对此处所述的报告测定的部分作用是否是通过报告基因 mRNA 水平的变化来介导的，采用实时反转录 PCR 测定法(Bustin, J. Mol. Endocrinol. 25(2): 169-193 (2000))。以高浓度的目标化合物处理生长于培养基(例如，含 FBS 的培养基)中的细胞(例如，HEK293 细胞)48 小时。该实验还包括阴性对照细胞(以单独的溶剂处理)和阳性对照细胞(以已显示能使含无义突变的 mRNA 稳定的化合物处理)。从细胞裂解产物萃取总 RNA。采用针对报告基因 mRNA 和 18S 核糖体 RNA(rRNA)的引物进行定量实时 PCR。以 18S rRNA 的测量作为起始原料数量的归一化因子，计算处理细胞相对对照细胞的报告基因 mRNA 的水平。

化学足迹法可用于对目标化合物和 rRNA 相互作用的位点进行定位。在这些实验中, 将由细胞(例如, HeLa 细胞)制备的核糖体与运载体对照或目标化合物共同孵育, 然后与用能改变 rRNA 结构的 2 种化学修饰剂(硫酸二甲酯或凯托沙(kethoxal))进行处理。化学修饰反应后, 分离 rRNA, 并采用末端标记的, 被杂交至人 28S、18S 和 5.8S rRNA 的不同区域的寡核苷酸进行引物延伸分析。在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上分辨引物延伸的产物。rRNA 对硫酸二甲酯或凯托沙的化学修饰的不可及性可显示为凝胶上条带强度的出现、消失或变化; 任意该类事件可认为是该化合物对 rRNA 上特定区域的潜在作用的指示。该凝胶上条带的出现与对化学修饰剂的新导入的不可及性一致(例如, 作为引起 rRNA 中构象变化的化合物相互作用的结果)。相反地, 条带的消失与对化学修饰剂的新导入的不可及性相一致(例如, 由于化合物结合或 rRNA 中碱基配对的改变而对位点产生保护)。

根据其诱导提前终止密码子的特异性核糖体通读的能力和诱导普通终止密码子的非特异性核糖体通读的能力, 在体外评价目标化合物的特异性。例如, 将荧光素酶报告体连接至其它蛋白(例如, CD40 蛋白)。CD40 是由 B-淋巴细胞和其它免疫细胞表达的细胞表面受体; 它的 mRNA 提供合适的 3'-UTR 序列且该蛋白具有通过 Western 印迹检测潜在蛋白延伸的适当大小。

在该测定中, 以编码荧光素酶-CD40 融合蛋白的基因稳定转染生长于培养基(例如, 含胎牛血清(FBS)的培养基)的细胞(例如, HEK 293 细胞)。代替通常存在于荧光霉素的位置 190 处的苏氨酸密码子(ACA), 通过定点突导入 UGA 无义密码子。此外, 将 CD40 蛋白的 3'-UTR 导入到荧光素酶 UAA 终止密码子的下游。对于各个构建体, 在荧光素酶基因的 5'端包含了 6 个

组氨酸(6X-His), 以方便该目标蛋白从细胞裂解产物中纯化。此外, 还包含 Xpress™ 表位标记, 以允许在 Western 印迹分析时分离该目标蛋白。

图 2 显示了由这些构建体转录的 mRNA 的特征以及在各种条件和假定下的预期结果。在未处理的细胞中, 应当仅观察到截短的荧光素酶蛋白(图 2A)。在用具有无义抑制活性、诱导普通终止密码子特异性通读的化合物处理的细胞中, 应当同时生成截短和全长荧光素酶蛋白(图 2B)。然而, 如果化合物具有诱导普通终止密码子的非特异性核糖体通读的能力, 则可预期在位置 190 处插入的提前终止密码子和荧光素酶 ORF 末端的普通终止密码子会发生通读。这将导致荧光素酶蛋白产生 CD30 3'-UTR 编码的 84 个氨基酸的延伸, 且通过 Western 印迹会检测到 9kD 的分子量增加(从 66kD 至 75kD)。如果这种情况发生, 则该构建体的分子量就会增加, 且会生成所有的 3 种蛋白(截短的、荧光素酶以及荧光素酶-CD40)(图 2C)。进一步制备构建体作为标记。阴性对照构建体仅编码该全长荧光素酶 mRNA(图 2D)。该阴性对照构建体仅编码该全长荧光素酶 mRNA(图 2D)。阳性对照构建体编码所述延长的荧光素酶-CD40 mRNA, 并通过在荧光素酶 ORF 的末端构建有义(非终止)突变(CAA)产生(图 2E)。

用目标化合物处理细胞一段时间(例如, 72 小时), 然后制备细胞裂解产物。将细胞裂解产物与设计来捕获所述 6X-His 标记蛋白的磁性镍-带电琼脂糖珠相混合。在蛋白捕获步骤之后, 在 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶上分离该蛋白, 并采用抗 Xpress 抗体进行 Western 印迹分析。

可以使用 2 维凝胶电泳进行有关非特异性终止密码子通读理论问题的更通用但灵敏性和特异性较低的方法(O'Farrell, J. Biol. Chem. 250(10):4007-421 (1975))。可诱导普通终止密码子的核糖体通读的化合物可

能会产生异常延长的蛋白，并由于分子量的增加和/或电荷的改变可能会导致电泳迁移模式随之改变。在该种测定的一个实例中，以目标化合物或运载体处理双份细胞(例如，HDEK 293 细胞)样本一段时间(例如，48 小时)，该细胞在荧光素酶报告体的 190 氨基酸位置处具有 UGA (+1A)终止密码子。在标准的基于细胞的报告测定中检测等分的细胞以确定化合物诱导的荧光素酶核糖体通读的证据。进行 2 维电泳并用 Phoretix 软件进行计算分析。

通过评价化合物在体内对单个富集 mRNA 翻译的作用，可在动物疾病模型中对非特异性终止密码子通读的潜力进行更具体的实验。例如，每天以目标化合物、阳性对照或运载体处理 *max* 小鼠一段时间(例如，28 天)，然后从动物个体中采集肌肉组织。同样对来自未处理的野生型 C57/B10 小鼠的肌肉进行分析。另外，已知 β -微管蛋白(小鼠肌肉中的富含蛋白)的 mRNA 在 ORF 的末端具有 UAA (+1A)终止密码子，且在其 3'-UTR 下游具有第二框内 UAA (+1A)终止密码子。在这 2 个终止密码子之间是 126 个核苷酸的间隔序列，其理论上可编码小鼠 β -微管蛋白的 42 个氨基酸延伸。图 3 提供了 β -微管蛋白 mRNA 的示意图。如果目标化合物能够诱导终止密码子的非特异性核糖体通读，可以预期该 β -微管蛋白的大小将增加 ≥ 42 个氨基酸(~ 5 kD)，且该变化可通过 Western 印迹检测到。

根据其诱导提前终止密码子的特异性核糖体通读的能力和不诱导普通终止密码子的非特异性核糖体通读的能力，可在施用了所述无义密码子抑制剂的个体(具体地是人)的生物样本中评价该无义密码子抑制剂的特异性。例如，可在给药前和给药后的不同时间点(例如，2、4、6、8、12、24、48 和 72 小时)从无义密码子抑制剂处理的个体(例如，人)获取血液样本。从该个体获取的血液样本或来自血液样本的样本(例如，PBMC 和血浆)可在分析

前汇集。例如，来自相同时间点的相同性别的个体的血液样本或血液样本的样本可在分析前汇集。可替代地，来自各个个体的血液样本或该血液样本的样本可单独地分析。

分离外周血单核细胞(PBMC)和血浆，并任选地在使用前进行冷冻和贮存。将 PBMC 和血浆加载至聚丙烯酰胺凝胶，该聚丙烯酰胺凝胶经优化以获得延长的通读蛋白产物之间的最大分离，进行电泳，并转移至硝化纤维素膜(或其它适当的膜，例如尼龙膜)进行免疫印迹。蛋白，例如 C-反应蛋白(CRP)、B₂ 微球蛋白和胱抑素 C 可用于评价普通终止密码子的非特异性通读。野生型和相应的延长的蛋白可用作对照。可采用该被评价蛋白的特异性一抗和包含辣根过氧化物酶结合物的该一抗的特异性二抗进行免疫印迹。

施用该无义密码子抑制剂的个体可包括已知具有包含无义突变的基因的个体，在这种情况下，由该基因编码的功能通读蛋白的生成可用作无义密码子的特异性通读的阳性对照。施用该无义密码子抑制剂的个体还可包括未知是否具有包含无义突变的基因的个体。在这种情况下，来自用无义密码子抑制剂处理的个体的血浆可被添加至以包含提前终止密码子的报告基因(例如，在氨基酸残基 190 处包含 UGA 提前终止密码子的萤火虫荧光素酶报告基因)稳定转染的细胞(例如，HEK 293 细胞)的培养基，或与细胞萃取物和含有提前终止密码子的报告基因共同孵育。测定处理的细胞或处理的细胞萃取物中的提前终止密码子的通读，作为阳性对照。

根据本发明鉴定的化合物的毒性和/或效力可在细胞培养物或试验动物中通过标准的药物程序进行测定，例如测定 LD₅₀(50%群体的致死剂量)和 ED₅₀(50%群体的治疗有效剂量)。用于评价本发明鉴定的化合物的细胞毒性的细胞和细胞系包括但不限于：外周血单核细胞(PBMC)、Caco-2 细胞和

Huh7 细胞。毒性和治疗效果之间的剂量比例是治疗指数，可以 LD50/ED50 来表示。优选具有高治疗指数的本发明的化合物。尽管也可使用显示具有毒副作用的本发明的化合物，但在设计传递系统的时候应当注意将该试剂靶向作用组织的位点以最小化对未感染细胞的潜在损伤，从而减少副作用。

从细胞培养测定和动物试验获得的数据可用于制定本发明的化合物在人体中使用的剂量范围。该试剂的剂量优选处于包含 ED50 且毒性很小或没有毒性的循环浓度的范围内。该剂量可根据采用的剂型和给药途径在该范围内变化。对于本发明的方法中所使用的任何试剂，其治疗有效剂量可通过细胞培养分析进行初始估计。剂量可以在动物模型中制定，以得到包含细胞培养中测得的 IC50(即达到症状最大抑制一半时该化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。这些信息可用于更准确地制定有用的人体剂量。血浆中的水平可通过，例如，高效液相色谱进行测定。

毒性测定的具体实例包括如下：

将运载体或各剂量的所述化合物每日施用至雄性和雌性 Sprague-Dawley 大鼠一段时间(例如，28 天)。多个大鼠/性别/组在一段时间后(例如，28 天)终止，一些其它大鼠/性别/组则在给药期后进行一额外的恢复期(例如，4 周的恢复期)，剩余的大鼠/性别/组用于在给药后的数小时和数天中(例如，在第 1 和 28 天给药后 0.5、1.5、4、8、12 和 24 小时)进行毒理动力学评价。

将运载体或各剂量的所述化合物施用至雄性和雌性 beagle 犬一段时间(例如，28 天)。多个犬/性别/组在给药期后终止。其它犬/性别/组继续进行一恢复期(例如，4 周的恢复期)并进行毒理动力学评价，在给药后的数小时

和数天(例如, 在第 1 和 28 天给药后 1、2、4、8、12、16 和 24 小时)中采集样本。

通过 HPLC 进行剂量分析以确认动物接受了所述预期剂量。每天进行两次笼侧观察, 每周记录具体的临床观察和体重。对治疗期的食物消耗进行记录。在治疗前和治疗期最后一天进行检眼镜检查和心电图(仅针对犬)。在基线处(仅针对犬)和在治疗期的最后一天(所有动物)以及在恢复动物的恢复期评价血液学、凝血、临床化学和尿分析参数。在治疗或恢复期的最后的步骤包括进行总体的尸体解剖检查, 取出器官并称重, 对保藏的组织进行福尔马林固定以供显微镜分析。采用对各个动物种类有效的 HPLC 和串联质谱法进行血浆的化合物浓度分析。采用非房室方法评价药代动力学参数。采用单因素方差分析(ANOVA)分析体重、食物消耗、临床病理学和器官重量, 并以 Dunnett 检验对各剂量与对照进行两两比较。

在优选的实施方式中, 本发明所采用的所述无义密码子抑制剂诱导提前终止密码子的特异性核糖体通读, 但不诱导普通终止密码子的非特异性通读。可通过本领域已知或是此处所述的任意测定来评价目标化合物对提前终止密码子的特异性核糖体通读。

本发明所用的无义密码子抑制剂可与 28S rRNA、18S rRNA 和/或 5.8S rRNA 相互作用。在某些实施方式中, 本发明所采用的该无义密码子抑制剂结合 28S rRNA。在其它实施方式中, 本发明所采用的该无义密码子抑制剂不结合 18S rRNA。在一些实施方式中, 该无义密码子抑制剂通过与另一蛋白的相互作用间接结合至 rRNA。在某些其它实施方式中, 本发明所采用的该无义密码子抑制剂对革兰氏阴性微生物和/或革兰氏阳性微生物不显示出明显的抗菌活性。在优选的实施方式中, 根据本发明所用的该无义密码子

抑制剂在全身(例如,口服)施用至个体(优选人)时具有极少(如有)的不良或不需要的副作用。在具体的实施方式中,该无义密码子抑制剂在口服施用至个体(优选人)时不引起肾衰竭和/或听力问题(例如,听力损失)。

5.5 功能通读蛋白

本发明提供了由包含无义突变的核酸序列编码的功能通读蛋白,该蛋白由此处所述的方法生成。在某些实施方式中,该功能通读蛋白为功能非野生型蛋白。在具体的实施方式中,该功能通读蛋白为全长非野生型蛋白。在其它的实施方式中,该功能通读蛋白与相应的野生型蛋白由相同的氨基酸序列组成。

本发明提供了由包含突变(例如,删除、插入和/或替换)的核酸序列编码的功能通读蛋白,该突变导致由该核酸序列转录的RNA中的终止密码子不同于编码相应野生型蛋白的RNA中的终止密码子。在某些实施方式中,该功能通读蛋白为功能非野生型蛋白。在具体的实施方式中,该功能通读蛋白为全长非野生型蛋白。

在具体的实施方式中,本发明提供了由包含突变(例如,删除、插入和/或替换)的核酸序列编码的功能通读蛋白的生产方法,该突变导致由该核酸序列转录的RNA中的终止密码子不同于普通终止密码子(即,编码相应野生型蛋白的RNA中的终止密码子),该方法包括将包含该核酸序列的细胞与无义抑制剂相接触。可替代地,该方法包括将具有该核酸的无细胞萃取物与无义密码子抑制剂相接触。在另一实施方式中,本发明提供了由包含突变(例如,删除、插入和/或替换)的基因编码的功能通读蛋白的生产方法,该突变导致由该基因转录的RNA中的终止密码子不同于普通终止密码子

(即, 编码相应野生型蛋白的 RNA 中发现的终止密码子), 该方法包括向有此需要的个体(优选人)施用有效量的无义密码子抑制剂。根据这些实施方式, 该无义密码子抑制剂通读该不同的终止密码子至另一终止密码子以生成功能通读蛋白。

在具体实施方式中, 本发明提供了由包含基因编码区无义突变的基因编码的功能通读蛋白的生产方法, 该方法包括将含有该基因的细胞与无义密码子抑制剂相接触。在另一实施方式中, 本发明提供了由包含基因编码区无义突变的基因编码的功能通读蛋白的生产方法, 该方法包括向有此需要的个体(优选人)施用有效量的无义密码子抑制剂。在某些实施方式中, 该个体患有或可能患有或易患与该基因的无义突变相关的疾病。

在某些实施方式中, 根据本发明的方法生成的该功能通读蛋白在细胞中发现于相应野生型蛋白被发现的相同位置。例如, 在某些实施方式中, 该功能通读蛋白和相应的野生型蛋白均发现于细胞表面。在其它实施方式中, 该功能蛋白发现的位置不同于发现相应野生型蛋白的位置。在具体的实施方式中, 根据本发明的方法生成的该功能通读蛋白发现于细胞核, 而相应的野生型蛋白发现于细胞质或细胞表面。在另一实施方式中, 根据本发明的方法生成的该功能通读蛋白发现于细胞质或细胞表面, 而相应的野生型蛋白发现于细胞核。功能通读蛋白在细胞中/上的位置可通过本领域技术人员已知的技术进行检测/确定。在具体的实施方式中, 功能通读蛋白在细胞中/上的位置可通过免疫荧光进行检测/确定。在某些实施方式中, 如下免疫荧光法被用于检测/确定功能通读蛋白在细胞中/上的位置:

1. 在 Coplin 缸中用 PBS 使细胞复水(例如, 约 5 分钟)。
2. 用免疫前小鼠血清封闭细胞一段时间(例如, 20 分钟)。

3. 应用一抗一段时间。
4. 在 PBS 中洗涤玻片 2-5 次, 然后与二抗孵育一段时间。
5. 通过染色(例如, DAPI 染色)鉴定核。
6. 在数字共焦荧光显微镜上对细胞成像, 并以例如 IPLab 光谱软件捕获图像。
7. 将染色分类/评分为(0)缺失、(1)核周、(2)外周和(3)表面。
8. 捕获图像, 例如在配备了步进马达、滤光轮装置(Ludi Electronics Products, Hawthorne, NY)和 83,000 滤光装置(Chroma Technology, Brattleboro, VT)以及 SenSys-cooled 电荷耦合高分辨率相机(Photometrics, Tucson, Az)的 Olympus IX170 倒置式表面荧光显微镜捕获图像。
9. 对图像进行部分去卷积, 例如通过 IPLab 软件(Scanalytics, Fairfax, VA)对图像进行部分去卷积。

在具体的实施方式中, 由本发明的方法生成的该功能通读蛋白为功能 CFTR 通读蛋白。在某些实施方式中, 通过本领域已知的方法(例如, 免疫荧光)检测/确定该功能 CFTR 通读蛋白位于鼻细胞的核周、外周和/或表面。在优选的实施方式中, 通过免疫荧光检测/确定该功能 CFTR 通读蛋白位于鼻细胞的表面。在具体的实施例中, 通过如下免疫荧光法检测/确定位于核周、外周和/或表面的该功能 CFTR 通读蛋白的数量:

1. 在 Coplin 缸中用 PBS 使鼻细胞复水(例如, 约 5 分钟)。
2. 用免疫前小鼠血清封闭细胞一段时间(例如, 20 分钟)。
3. 用一抗, 例如 1:100 的稀释的一抗(例如, 针对全长 CFTR 羧基末端 4 氨基酸的小鼠单克隆抗-CFTR 24-1)应用一段时间(例如, 两小时)。

4. 在 PBS 中洗涤玻片三次，然后与二抗(例如，山羊抗小鼠 IgG, AlexaFluor 596, Molecular Probes, Portland, Oregon)孵育一段时间(例如，一小时)。

5. 通过 DAPI 染色鉴定核。

6. 在数字共焦荧光显微镜上对细胞成像，并用例如 IPLab 光谱软件捕获图像。

7. 将 CFTR 染色分类/评分为(0)缺失、(1)核周、(2)外周和(3)表面。在具体的实施方式中，对来自各玻片随机区域的至少 50 个上皮细胞进行评价和评分。

8. 捕获图像，例如在配备了步进马达、滤光轮装置(Ludi Electronics Products, Hawthorne, NY)和 83,000 滤光装置(Chroma Technology, Brattleboro, VT)以及 SenSys-cooled 电荷耦合高分辨率相机(Photometrics, Tucson, Az)的 Olympus IX170 倒置式表面荧光显微镜捕获图像。

9. 对图像进行部分去卷积，例如通过 IPLab 软件(Scanalytics, Fairfax, VA)对图像进行部分去卷积。

在某些实施方式中，根据本发明的方法生成的该功能通读蛋白与相应野生型蛋白的区别仅在该功能通读蛋白中由所述提前终止密码子编码的位置处插入的氨基酸残基。在其它实施方式中，根据本发明的方法生成的该功能通读蛋白与相应野生型蛋白的区别在于：(i)在该功能通读蛋白中由提前终止密码子编码的位置处插入的氨基酸残基；以及(ii)在该功能通读蛋白中由提前终止密码子编码的氨基酸残基以外的氨基酸残基。

由本发明的方法生成的功能通读蛋白的氨基酸序列可通过对包含目标核酸序列(即，包含该目标无义突变的核酸序列)的细胞生成的蛋白进行测序

来测定。在某些实施方式中，该细胞天然包含该核酸序列。在具体的实施方式中，该细胞为来自于正接受或将要接受无义密码子抑制剂的患者的细胞。在其它实施方式中，该细胞经工程改造后包含该核酸序列。

在某些实施方式中，根据本发明的方法生成的该功能通读蛋白在翻译该蛋白的 RNA 中的无义密码子的对应位置处包含酪氨酸、半胱氨酸或色氨酸。在具体的实施方式中，根据本发明的方法生成的该功能通读蛋白在翻译该蛋白的 RNA 中的 UAA 或 UAG 无义密码子的对应位置包含酪氨酸。在其它实施方式中，根据本发明的方法生成的该功能通读蛋白在翻译该蛋白的 RNA 中的 UAG 无义密码子的对应位置包含半胱氨酸或色氨酸。

下表 10 提供了与基因无义突变相关的疾病的列表。该表提供了与该疾病相关的基因名称，该基因中至少编码区的核酸的 GenBank 编号，由该基因编码的蛋白的 GenBank 编号，与该疾病相关的基因中发现的代表性无义突变，以及有关与该基因无义突变相关的疾病的参考文献。在某些实施方式中，根据本发明的方法生成的该功能通读蛋白在表 10 中所述的氨基酸残基(具有与疾病相关的基因无义突变)的位置之外的位置包含相应野生型蛋白的氨基酸序列。根据该实施方式，在所述位置的氨基酸残基并非在相应野生型蛋白中发现的 1 种氨基酸残基，而是其它 19 种氨基酸残基中的任意一种。因此，例如，对于 3-M 综合症，该功能通读蛋白在位置 1445 处可包含除了精氨酸外的任意其它氨基酸残基。

表 10

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
3-M 综合症	cullin 7 (CUL7)	NM_014780.3	NP_055595	R1445X	Huber 等人, Nat Genet. 2005.10; 37(10):1119-24
Alpers 综合症	POLG	NM_002693	NP_002684	E873X	Chan 等人, DNA Repair (Amst). 2005.12.8; 4(12):1381-9.
致心律失常性右室心肌病	plakophilin-2	NM_001005242	NP_001005242	R413X	Syrris 等人, Circulation. 2006.01.24; 113(3):356-64
共济失调毛细血管扩张	ATM		AAB65827	601G>T (G204X) 6913C>T (Q2305X)	Jiang 等人, J Neurol Sci. 2006.02.15; 241(1-2):1-6 Saviozzi 等人, Hum Mutat. 2003.04; 21(4):450
动脉粥样硬化	原脂蛋白 A-I.			Q84X	Matsunaga 等人, Proc Nati Acad Sci USA. 1991.4.1; 88(7):2793-7
自身炎症综合症	PYPAFI	AF420469	AAL65136	R554X	Jeru 等人, Arthritis Rheumt 2006.02; 54(2):508-14.

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
常染色体隐性非综合征型耳聋 (ARNSHI)	cormexin-26 (GJB2)	AF479776.1	AAL87696	W24X	Alvarez 等人, Am J Med Genet A. 2005.9.1; 137(3):255-8
巴特综合症	BSND	NM_057176	NP_476517	Q32X	Kitanaka 等人, PediatrNephrol. 2006.02; 21(2):190-3
良性遗传性舞蹈病 (BHC)	甲状腺转录因子基因 (TITF1)	BT009773	AAP88775	745C>T (Q249X)	Do Carmo Costa 等人, Neurogenetics. 2005.12; 6(4):209-15
Brugada 综合症	SCN5A	AY038064	AAK74065	W822X R1623X	Keller 等人, Can J Cardiol. 2005.09; 21(11):925-31 Makiyama 等人, J Am Coll Cardiol. 2005.12.6; 46(11):2100-6
Charcot-Marie-Tooth 症 (CMT) 4A 型 (CMT4A)	神经节苷酯诱导分化相关蛋白 1 基因 (GDAP1)	NM_018972.1	NPO61845	c. 581 C>G, S194X	Nelis 等人, Neurology. 2002.12.24; 59(12):1865-72.
Charcot-Marie-Tooth 病	connexin (Cx) 32	NM_000166.2	NP_000157	W132X	Lin 等人, Tohoku J Exp Med. 1999.07; 188(3):239-44.

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
慢性溶血性贫血	AK-1	NM_000476.1	NP_000467	R107X	Bianchi 等人, Br J Haematol., 1999.04; 105(1):75-9.
结肠直肠癌	APC	NM_000038	NP_000029	R283X	
	MSH2		P43246	E422X	Tanyi 等人, World J Gastroenterol. 2006.02.28; 12(8):1192-7.
先天性肾上腺增生	CYP21A2	NM_000500	NP_000491	2557C>T (R445X)	Friaes 等人, Mol Genet Metab Epub Jan 19
先天性纤维蛋白原缺乏症	FGA	AF361104	AAK31372 AAK31373	3108C>T (Q150 X)	Wu 等人, Blood Coagul Fibrinolysis. 2005.04; 16(3):221-6.
伴有鱼鳞样痣和肢体缺陷的先天性半身发育异常 (CHILD) 综合症	NAD(P)H 类固醇脱氢酶样 [NSDHL]	NM_015922	NP_057006	E151X	Hummel 等人, Am J Med Genet A., 2003.10.15; 122(3):246-51.
先天性乳糖酶缺乏	乳糖酶 (LCT)	NM_002299	NP_002290	4170T>A (Y1390X)	Kuokannen 等人, Am J Hum Genet. 2006.02; 78(2):339-44

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
先天性肌营养不良症	层粘蛋白 $\alpha 2$ 基因 (LAMA2)		AAB18388	R2578X W166X; S2553Y; V2587X	Coral-Vazquez 等人, J Hum Genet. 2003;48(2):91-5 Mendell 等人, Hum Mutat. 1998;12(2):135
囊性纤维化	CFTR	NM_000492	NP_000483	Q414X 1609C>T (Q493X)	Dork 等人, Hum Genet. 1994.01; 93(1):67-73.
				3976 (TGG 至 T) W 1282X W1316X	Shoshani 等人, Am J Hum Genet. 1992.01; 50(1):222-8. Hamosh 等人, J Clin Invest. 1991.12; 88(6): 1880-5.
				R553X G542X	Chen 等人, J Hum Genet. 2005; 50(12):674-8 Bienvenu 等人, J Med Genet, 1993.07; 30(7):621-2.
				R1162X	Rolfini 等人, J Clin Invest. 1993.12; 92(6) :2683-7.

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
				Y122X	Bensalem 等人, Mol Cell Proteomics. 2005.10; 4(10):1591-601
				S1455X	Salvatore 等人, Am J Med Genet A. 2005.3.1; 133(2):207-8.
				E822X	Tzetzis 等人, Hum Genet. 2001.12; 109(6):592-601
				E60X, R764X	Strandvik 等人, Genet Test. 2001; 5(3):235-42
				Q1291X	Feldman 等人, Hum Mutat. 2001.04; 17(4):356.
				Y849X	Castaldo 等人, Hum Mutat. 1999.09.19; 14(3):272
				S434X	Mittre 等人, Hum Mutat. 1999.08.19; 14(2):182
				L88X	Macek 等人, Hum Mutat. 1992;1(6):501-2
				R1158X	Roncetto 等人, Genomics. 1992.02; 12(2):417-8
				G6542X	

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
糖尿病	铜蓝蛋白	NM_000096.1	NP_000087	W858X	Takahashi 等人, Hum Mol Genet. 1996.01; 5(1):81-84.
杜兴肌营养不良	肌营养不良蛋白	HUMDYS	AAA53189	L1417X Q3625X	Disset 等人, Hum Mol Genet. 2006.03.15; 15(6):999-1013 Suminaga 等人, Pediatr Res. 2004.11; 56(5):739-43
侏儒症	GH-释放激素受体 (GHRHR)		Q02643	Q492X E72X	Ito 等人, J Neurol. 2003.05; 250(5):581-7 Baumann, Growth Horm IGF Res. 1999.01; 9 Suppl B:24-9; discussion 29-30.
表皮松懈角化过度症	生长激素受体			R43X	Putzolu 等人, J Endocrinol Invest. 1997.05; 20(5):286-8
疣状表皮发育不良	角蛋白 10 (KRT10)	NM_000421	NP_000412	Q434X	Muller 等人, 2006, Hum Mol Genet Epub Feb. 27.
疣状表皮发育不良	EVER2	AY099358	AAM44454	568C>T (R190X)	Sun 等人, Clin Exp Dermatol. 2005.09; 30(5):573-4
发作性共济失调	CACNA1A			1547X	Jen 等人, Neurology. 1999.07.13; 53(1):34-7

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
Fabry 病	α -半乳糖苷酶 A (α -Gal A)	NM_000169	NP_000160	Y86X 和 R342X W162X R220X Y222X E251X R301X	Lee 等人, Clin Genet. 2000.09; 58(3):228-33. Rosenberg 等人, Hum Mutat. 2000.02; 15(2):207-8. Maki 等人, Clin Nephrol. 2004.03; 61(3):185-90. Yang 等人, Clin Genet. 2003.03; 63(3):205-9. Altarescu 等人, Clin Genet. 2001.07; 60(1):46-51. Okumiya 等人, Jpn J Hum Genet. 1996.09; 41(3):313-21.
家族性中央性尿崩症	精氨酸抗利尿激素-神经垂体素 II (AVP-NPII)			Q83X E82X	Bullman 等人, Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2002.05; 110(3): 134-7. J Clin Endocrinol Metab. 1998.03; 83(3):995-7.
家族性圆柱瘤	CYLD	NM_015247	NP_056062	R758X	Oiso 等人, 2004, Br J Dermatol 151:1084-6

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
家族性低 β 脂蛋白血症 (FHBL)	apoB			Y1220X Q1755X	Lancellotti 等人, J Hepatol. 2005.07; 43(1): 188-91. Ohashi 等人, Arterioseler Thromb Vasc Biol. 1998.08; 18(8):1330-4.
家族性高胆固醇血症	PCSK9			Y142X 和 C679X	Cohen 等人, Nat Genet. 2005.02; 37(2): 161-5
家族高发 2 型糖尿病	CD36/脂肪酸移位酶 (FAT)	NM_001001548.1	NP_001001548	L360X	Lepretre 等人, Hum Mutat. 2004.07; 24(1):104.
	低密度脂蛋白 (LDL)受体		AAP36025	W422X E92X 和 C371X E296X K790X	Zakharova 等人, BMC Med Genet. 2005.02..8; 6:6. Salazar 等人, Hum Mutat. 2002.04; 19(4):462-3. Genschel 等人, Hum Mutat. 2001.04; 17(4):354. Maruyama 等人, Arterioseler Thromb Vase Biol. 1995.10; 15(10):1713-8.

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
IIIa 型糖原贮积症 (GSD Lila)	AGL	NM_003227.2		W1327X	Endo 等人, J Hum Genet. 2005; 50(10):538-42
血色沉着病	转铁蛋白受体-2		NP_003218	Y250X	Rivers 等人, Genet Test. 2001 夏; 5(2):131-4.
血友病 A	VIII 因子		AAA52420	W1029X Y1792X W1535X; R2116X; R427X S1395X Q139X, R583X R1941X R1966X, R2116X Q1778X	Hill 等人, Haemophilia. 2005.03; 11(2):133-41 Jayandharan 等人, Haemophilia. 2005.09; 11(5):481-91 James 等人, Blood. 2005.11.01; 106(9):3043-8 David 等人, J Thromb Haemost. 2003.01; 1(1):139-46. Moller-Murlang 等人, Hum Mutat. 1999;13(6):504.

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
血友病 B	IX 因子			R333X, R252X C31118X R116X R338X	James 等人, Blood. 2005.11.01; 106(9):3043-8 Lorenzo 等人, Haemophilia. 2000.05; 6(3): 195-7. Walter 等人, Thromb Haemost. 1994.07; 72(1):74-7. Driscoll 等人, Blood. 1989.08.01; 74(2):737-42.
遗传性酪氨酸血症 I 型	延胡索酰乙酰水 解酶 (FAH)	NM_000137	NP_000128	W262X	Dreumont 等人, Biochem Biophys Res Commun. 2004.11.05; 324(1): 186-92.
高乳糜微粒血症	APOA5	AY358749.1	AAQ89109	Q139X	Marcais 等人, J Clin Invest. 2005.10; 115(10):2862-9.
高甘油三酯 2 型 糖尿病	脂蛋白脂酶 (LPL)		AAH11353	S447X	Yang 等人, Hum Mutat. 2003.04; 21(4):453.
甲状腺机能减退	DUOX2	NM_014080.3	NP_054799	c.2524C>T (R842X)	Vigone 等人, Hum Mutat. 2005.10; 26(4):395.
	甲状腺球蛋白		NP_003226	886CT (R277X)	Rivolta 等人, J Clin Endocrinol Metab. 2005.06; 90(6):3766-70

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
	促甲状腺激素受体 (TSHR)	M31774.1	AAA36783	R609X	Richter-Unruh 等人, Thyroid. 2004.11; 4(11):971-4.
	Prop1	NM_006261.2	NP_006252	Q83X	Voutetakis 等人, Eur J Endocrinol. 2004.03; 150(3):257-64
单纯性头皮稀毛症	Corneodesmosin 基因 (CDSN)	NM_001264	NP_001255	Y239X	Davalos 等人, Br J Dermatol. 2005.12; 153(6):1216-9.
Kindler 综合症	KIND1	AY137240	AAM94174	C468X	Sethuraman 等人, Clin Exp Dermatol. 2005.03; 30(3):286-8
晚发婴儿型神经无蜡样脂褐质沉着病	CLN6	NM_017882.1	NP_060352	c663C>G (Y221X)	Siintola 等人, Clin Genet. 2005.08; 68(2):167-73.
	CLN2		AAQ88866	R208X	Sleat 等人, Eur J Paediatr Neurol. 2001;5 Suppl A:57-62.
				Q509X	Tessa 等人, Hum Mutat. 2000.06; 15(6):577.

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
Leigh 综合症	琥珀酸脱氢酶 (SDHA)	NM_004168	NP_004159	W119X	Horvath 等人, J Neuro Neurosurg Psychiatry. 2006.01; 77(1):74-6.
类脂质蛋白沉积症 (LP), 也称为 Urbach-Wiethe 疾	细胞外基质蛋白 1 (ECM1)		AAB05934	C589T (Q197X)	Lupo 等人, Br J Dermatol. 2005.11; 153(5):1019-22.
McArdle 疾病	磷酸化酶		AAC52081	Y52X	Hadjigeorgiou 等人, 2002, J Neurol Sci 194 :83-6
				R207X	Hadjigeorgiou 等人, Neuromuscul Disord. 2002.11; 12(9):824-7.
				R269X	Bruno 等人, Neuromuscul Disord. 1999.01; 9(1):34-7.
				W361X	Deschauer 等人, 2001, Mol Genet Metab 74 :489-91
				Y573X	Gamez 等人, Muscle Nerve. 2003.09; 28(3):380-2

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
马凡综合症	原纤维蛋白 1 (FBN1)	NM_000138.2	NP_000129	R215X S813X R2220X	Matsukawa 等人, Hum Mutat. 2001;17(1):71-2.
青少年起病的成年型糖尿病 (MODY)	肝细胞核因子-1 β (HNF-1 β)		AAC63388	R276X RI 77X Q176X R179X	Furuta 等人, J Clin Endocrinol Metab. 2002.08; 87(8):3859-63. Montoli 等人, Am J Kidney Dis. 2002.08; 40(2):397-402. Miyamoto 等人, J Hum Genet. 2001; 46(5):260-2.
线粒体鸟氨酸转运体缺陷(或 HHH 综合症)	ORNT1				
III A 型粘多糖病 (溶酶体贮积症)	SGSH	NM_000199	NP_000190	Y40X R233X	Bekri 等人, J Inherit Metab Dis. 2005;28(4):601-2 Muschol 等人, Hum Mutat. 2004.06; 23(6):559-66
肌肉萎缩症					
肌原纤维肌病 (MFM)	filamin c 基因 (FLNC)		Q14315	8130G-->A; W2710X	Vorgerd 等人, Am J Hum Genet. 2005.08; 77(2):297-304

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
神经纤维瘤病	NF1	HUMNF1AB	AAA59924	R1947X R1306X & R2496X	Consoli 等人, J Invest Dermatol. 2005.09; 125(3):463-6. Park 等人, J Med Genet. 1998.10; 35(10):813-20.
Niemann Pick 症	HE1	NM_006432.3	NP_006423	E20X 和 E118X	Millat 等人, Am J Hum Genet. 2001.11; 69(5):1013-21
非眼部 Stickler 综合症	COL11A2			R893X	Vuoristo 等人, Am J Med Genet A. 2004.10.01; 130(2):160-4.
肥胖	黑皮素 4 受体基因 (MC4R)	NM_005912.1	NP_005903	W16X Y35X	Marti 等人, Int J Obes Relat Metab Disord. 2003.03; 27(3):385-8. Larsen 等人, J Clin Endocrinol Metab. 2005.01; 90(1):219-24
P53 相关的癌症	P53	DQ263704	ABB72446	R196X R213X E287X	Mol Genet.
帕金森病	Parkin	AB009973.1	BAA25751	W453X	Abbas 等人, Hum Mol Genet. 1999.04; 8(4):567-74

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
PCWH: 周围性脱髓鞘性多发性神经病, 中央髓鞘形成障碍 脑白质营养不良, 瓦登伯革氏综合症和 Hirschsprung 症	SOX10	NM_006941	NP_008872	S384X	Verheij 等人, 2006, Eur J Paediatr Neurol Epub Feb. 24.
Peutz-Jeghers 综合症 (PJS)	STK11/LKB1 (LKB1)		AAC 15742	Y246X	Herman 等人, Clin Genet. 2004.01; 66(1):58-62.
多囊肾病	PKD1	L33243.1	AAC37576	C4086X Y3818X C3817X	Neophyton 等人, Hum Genet. 1996.10; 98(4):437-42 Peral 等人, Hum Mol Genet. 1996.04; 5(4):539-42. Turco 等人, Hum Mol Genet. 1995.08; 4(8):1331-5.
原发性生长激素不敏感性(Laron 综合症)	生长激素受体			R43X	Rosenbium 等人, J Pediatr Endocrinol Metab. 1995.07.09; 8(3): 159-65.
原发性开角型青光眼 (POAG)	肌纤蛋白	NM_000261.1	NP_000252	Q368X	Allingham 等人, Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998.11; 39(12):2288-95.

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
脯氨酸胺酶缺乏症	肽酶 D (PEPD)	NM_000285	NP_000276	R265X	Wang 等人, Am J Med Genet A. 2006.03.15; 140(6):580-5.
进行性家族性肝内胆汁淤积	MDR3				De Vree 等人, Proc Nati Acad Sci U S A. 1998.01.06; 95(1):282-7.
前列腺癌风险	EphB2 (前列腺癌标记)	AF025304	AAB94602	3055A>T (K1019X)	
前列腺癌	MSR1		AAH63878	c.877C>T (R293X)	Maier 等人, Hum Mutat. 2006.01; 27(1):98-102.
弹性纤维性假黄瘤	ABCC6	NM_001171	NP_001162	R1141X	Schultz 等人, Hum Biol. 2005.06; 77(3):367-84
色素性视网膜炎	视紫质	NM_000539	NP_000530	Q378X Q344X	Cai 等人, 2001 J Mol Med 79:536-46 Yong 等人, 2005, Ann Acad Med Singapore 34:94-99

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
	RP1	NM_006269	NP_006260	R677X Q679X K778X	Berson 等人, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001.09; 42(10):2217-24. Sullivan 等人, Nat Genet. 1999.07; 22(3):255-9. Dietrich 等人, Br J Ophthalmol. 2002.03; 86(3):328-32.
	RP2	AL050307.13	CAB82030	R120X	Vorster 等人, Clin Genet. 2004.01; 65(1):7-10.
重症联合免疫缺陷病 (SCID)	IL-7R α	NM_002185.2	NP_002176	638C-->T (R206X)	Jo 等人, Int J Hematol. 2004.11; 80(4):332-5.
恒牙严重发育不全 (少牙) 和结肠直肠癌	Wnt-信号转导调节剂 AXN2	NM_004655	NP_004646	R656X	Lammi 等人, Am J Hum Genet. 2004.05; 74(5): 1043-50.

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
脊髓性肌萎缩	运动神经元生存基因 (SMN1)	AC004999.1	AAC83178	W102X	Sossi 等人, Eur J Hum Genet. 2001.02; 9(2):113-20.
Tangier 病	SNNM2 ATP-结合盒转运子 1 (ABC1)	AF165281	AAD49849	Q15X R909X	Wirth 等人, Am J Hum Genet. 1999.05; 64(5):1340-56. Zuchner 等人, Brain. 2003.04; 126(Pt 4): 920-7
珠蛋白生成障碍性贫血	β 球蛋白	AF007546	AAB62944	Q127X	Prehu 等人, Hemoglobin. 2005;29(3):229-33
薄基底膜肾病 (TBMD)	COL4A4	NM_000092.3	NP_000083	R1377X	Buzza 等人, Kidney Int. 2003.02; 63(2):447-53.
结节性硬化症 (TSC)	TSC1		CAH72112	Q897X	Yamamoto 等人, Brain Dev. 2002.06; 24(4):227-30.
UDP-半乳糖-4-表异构酶 (GALE) 缺陷型半乳糖血症	UDP-半乳糖-4-表异构酶 (GALE)	DQ233667	ABB04109	W336X	Park 等人, Genet Med. 2005.11-12; 7(9):646-9

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
Ullrich 先天性肌营养不良 (UCMD)	COL6A3			R465X R2342X	Demir 等人, Am J Hum Genet. 2002.06; 70(6):1446-58
Ib 型 Usher 综合症	肌凝蛋白 VIIA	NM_000260.1	NP_000251	C628X	Cuevas 等人, Mol Cell Probes. 1998.12; 12(6):4 17-20.
Von Willibrand's 病	vWF	NM_000552	NP_000543	Q218X, W222X, R365X, R373X, Y610X, W642X, E644X, Q706X, Q1311X, S1338X, Q1346X, Y1542X, R1659X, E1981X, E2129X, R2434X, 以及 Q2544X R2535X Q2470X	Baronciani 等人, Blood Cells Mol Dis. 2003.05-06; 30(3):264-70.

疾病	基因	核酸的 GenBank 编号	蛋白的 GenBank 编号	突变	参考文献
Waardenburg Hirschsprung 综合症	内皮素 B 受体 (EDNRB)	D13168.2	BAA02445	R253X -	Syrris 等人, Am J Med Genet. 1999.11.05; 87(1):69-71.
Wilms 肿瘤	Wt1	AY245105	AA061088	1084C>T (R362X)	
X -连锁性尿崩症	AVRP2	NM_000054	NP_000045	961 GAG>TAG (E242X)	
着色性干皮病 C 组	XPC	NM_004628.3	NP_004619	R579X	Gozukara 等人, J Invest Dermatol. 2001.08; 117(2):197-204.

5.6 患者群体

5.6.1 优选的个体和遗传状况

本发明的方法和组合物可用于预防、治疗和/或控制患有或可能患有或易患(例如, 由于环境和/或遗传因素)与基因无义突变相关的疾病(例如, 本发明所述的疾病)的患者(例如, 胚胎、胎儿、婴儿(新生儿至1岁的人)、儿童(1岁至18岁的人)、成年人(18岁或更大的人)和老年人(65岁及以上的人))。在一个实施方式中, 该患者为儿童或青少年(5至13岁的人)。在另一实施方式中, 该患者为男性。在某些实施方式中, 该患者为男性儿童或青少年(5至13岁的人)。在具体的实施方式中, 该患者为患有肌肉萎缩症(如杜兴肌营养不良)的男性儿童或青少年(5至13岁的人)。在另一实施方式中, 该患者为女性。在具体的实施方式中, 该患者为女性儿童或青少年(5至13岁的人)。

在具体的实施方式中, 本发明的方法和组合物可用于预防、治疗和/或控制患有或可能患有或易患与基因无义突变相关的疾病(例如, 本发明所述的疾病)的胚胎或胎儿。根据该实施方式中, 无义密码子抑制剂被施用至怀孕女性, 并通过胎盘到达该胚胎或胎儿。

上文表10提供了与基因无义突变相关的疾病以及基因无义突变的代表性范例的列表。在某些实施方式中, 该施用了无义密码子抑制剂的患者为具有表10所列疾病的患者, 其具有与该疾病相关的一种或多种代表性基因无义突变。

在某些实施方式中, 根据本发明施用了无义密码子抑制剂的所述患者在最近数天、1周、2周、1个月、3个月、6个月或1年内未接受另一疗法。在具体的实施方式中, 根据本发明施用了无义密码子抑制剂的该患者从未

接受另一疗法。在其它实施方式中，根据本发明施用了无义密码子抑制剂的该患者曾在最近分钟、数小时或数天内接受了另一疗法。

本发明包括联合施用无义密码子抑制剂与另一类型的疗法(例如支持疗法和/或镇痉剂)。对于囊性纤维化，支持疗法的范例包括胰腺酶替代品(例如，脂肪酶)、粘液溶解剂(例如， α 链道酶)、支气管扩张剂、类固醇和抗生素。对于杜兴肌营养不良，支持疗法的范例包括皮质类固醇和抗生素。在具体的实施方式中，该患者未以氨基糖苷、恶唑烷酮和/或氯霉素作为抗生素与无义密码子抑制剂联合施用。根据该实施方式，该无义密码子抑制剂不是氨基糖苷、恶唑烷酮和/或氯霉素。

在某些实施方式中，根据本发明施用了无义密码子抑制剂的患者对于氨基糖苷、恶唑烷酮和/或氯霉素的无义密码子抑制活性来说具有难治性。根据该实施方式，可以确定对该种试剂具有难治性的患者，例如通过将来自患者的细胞与氨基糖苷、恶唑烷酮或氯霉素相接触，并检查与该疾病相关的包含无义突变的基因的活性和/或表达来确定。

本发明的方法和组合物还可用于预防、治疗和/或控制患有或可能患有或易患(例如，由于环境和/或遗传因素)与基因突变相关的疾病的患者(例如，胚胎、胎儿、婴儿(新生儿至1岁的人)、儿童(1岁至18岁的人)、成年人(18岁或更大的人)和老年人(65岁及以上的人))，该基因突变导致由该基因转录的RNA的终止密码子不同于编码相应野生型蛋白的RNA中发现的终止密码子。该种疾病的非限制性范例包括脊髓性肌萎缩和囊性纤维化(例如，囊性纤维化由CFTR基因中的突变3849+10kb C→T引起，由于内含子19被识别为外显子，因而该突变产生84个碱基对的插入，且在翻译时，该84

个碱基对插入生成带有 UAA 无义突变的 28 个氨基酸的肽(Highsmith 等人, New England Journal of Medicine 331(1):974 (1994))。

此外, 本发明的方法和组合物可用于预防、治疗和/或控制患有或可能患有或易患(例如, 由于环境和/或遗传因素)所述疾病的患者(例如, 胚胎、胎儿、婴儿(新生儿至 1 岁的人)、儿童(1 岁至 18 岁的人)、成年人(18 岁或更大的人)和老年人(65 岁及以上的人)), 在该疾病中患者不表达足量的蛋白和/或可受益于特定蛋白的表达。这些患者曾通过基因疗法(有关基因疗法参见 5.11 节)施用了在编码区包含无义突变(在某些实施方式中, 该无义突变在编码区的 5'区(例如, 氨基末端前 50、75、100、125、150、175、200、225、250、300 或 350 个氨基酸))的核酸序列, 且施用无义密码子抑制剂抑制了由该核酸序列转录的 RNA 的无义密码子, 从而可生成由该核酸序列编码的功能通读蛋白。该无义密码子抑制剂的施用使得人们可以调节所生成的功能通读蛋白的数量。换言之, 当无义密码子抑制剂缺失时, 通过例如 ELISA 等免疫测定检测可确定仅生成了少量或没有生成可检测的功能通读蛋白。生成的该种功能通读蛋白对应于患者中未足量表达和/或对该患者有益的野生型蛋白。可从该种疗法受益的患者群体的非限制性范例包括患有如下疾病的患者:

软骨发育不全

马凡综合症

色盲

Moebius 综合症

酸性麦芽糖酶缺乏症

黏多糖(贮积)病 (MPS)

肾上腺脑白质营养不良

甲骯综合症

Aicardi 综合症

肾性尿崩症

α -1 抗胰蛋白酶缺乏

神经纤维瘤病

雄激素不敏感综合症	尼曼-匹克病
Apert 综合症	成骨不全
心律失常性右心室发育不良	卟啉症
共济失调毛细血管扩张	Prader-Willi 综合症
Barth 综合症	早衰
蓝橡皮疱痣综合症	Proteus 综合症
海绵状脑白质营养不良症	视网膜母细胞瘤
癌症	Rett 综合症
猫叫综合症	Rubinstein-Taybi 综合症
囊性纤维化	沙费利波综合症
Dercum's 病	Shwachman 综合症
外胚层发育不良	镰状细胞(贫血)病
范可尼贫血	史密斯-马吉利氏综合症
进行性肌肉骨化症	Stickler 综合症
X 染色体脆弱症	黑蒙性白痴
半乳糖血症	血小板缺乏合并桡骨缺失(TAR)综合症
Gaucher 病	Treacher Collins 综合症
血色沉着病	三体
血友病	结节性脑硬化
亨廷顿舞蹈病	特纳综合症
Hurler 综合症	尿素循环障碍
低磷酸酯酶症	von Hippel-Lindau 病
克兰费尔特综合症	瓦登伯革氏综合症

克腊比氏病

威廉综合症

Langer-Giedion 综合症

威尔森氏病

脑白质营养不良

长QT 综合症

可被本发明包括的方法预防、治疗和/或控制的癌症的具体范例包括但不限于：头、颈、眼、嘴、喉咙、食道、胸部、骨骼、肺、结肠、直肠、胃、前列腺、乳腺、卵巢、肾、肝、胰和脑的癌症。其它癌症包括但不限于以下：白血病，例如但不限于急性白血病，急性淋巴细胞白血病，急性髓细胞白血病如成髓细胞、前髓细胞、髓单核细胞、单核细胞、红白血病和骨髓增生异常综合症，慢性白血病，例如但不限于慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病；真性红细胞增多症；淋巴瘤，例如但不限于霍奇金氏病、非霍奇金氏病；多发性骨髓瘤，例如但不限于阴燃多发性骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、浆细胞性白血病、孤立性浆和髓外浆细胞瘤；Waldenstrom 巨球蛋白血症；意义未明的单克隆丙种球蛋白病；良性单克隆丙种球蛋白病；重链病；骨癌和结缔组织肉瘤，例如但不限于骨组织肉瘤、多发性骨髓瘤骨病、骨肉瘤、软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、帕杰特氏骨病、恶性骨巨细胞瘤、骨纤维肉瘤、脊索瘤、骨膜肉瘤、软组织肉瘤、血管性肉瘤(血管肉瘤)、纤维肉瘤、卡波西肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、神经鞘瘤、横纹肌肉瘤、滑膜肉瘤；脑肿瘤，例如但不限于胶质瘤、星形胶质细胞瘤、脑干胶质瘤、室管膜瘤、少突胶质瘤、非神经胶质肿瘤、听神经瘤、颅咽管瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、成松果体细胞瘤、成松果体母细胞瘤、原发性脑淋巴瘤；乳腺癌，包括但不限于腺癌、小叶(小细胞)癌、导管内癌、乳腺癌髓、粘液性

乳腺癌、乳腺癌管、乳头乳腺癌、帕杰特氏病(包括少年帕杰特氏病)和炎性乳腺癌；肾上腺肿瘤，例如但不限于嗜铬细胞瘤和肾上腺皮质癌；甲状腺癌，例如但不限于乳头或甲状腺滤泡癌、甲状腺髓样癌和未分化甲状腺癌；胰腺癌，例如但不限于胰岛瘤、胃泌素瘤、胰高糖素瘤、血管活性肠肽瘤、生长抑素分泌肿瘤以及良性癌或胰岛细胞瘤；垂体癌，例如但不限于 Cushing 病、泌乳素分泌肿瘤、肢端肥大症和尿崩症；眼癌，例如但不限于黑色素瘤眼虹膜，如黑色素瘤、脉络膜黑色素瘤和睫状机构黑色素瘤及视网膜母细胞瘤；阴道癌，例如鳞状细胞癌、腺癌和黑色素瘤；外阴癌，如鳞状细胞癌、黑色素瘤、腺癌、基底细胞癌、肉瘤和帕杰特氏病；子宫颈癌，例如但不限于鳞状细胞癌和腺癌；子宫癌，例如但不局限于子宫内膜癌和子宫肉瘤；卵巢癌，例如但不限于卵巢上皮癌、交界性肿瘤、生殖细胞肿瘤和间质细胞瘤；食道癌，例如但不限于鳞状上皮癌、腺癌、腺样囊性癌、粘液表皮样癌、腺鳞癌、肉瘤、黑色素瘤、浆细胞瘤、疣状癌和燕麦细胞(小细胞)癌；胃癌，例如但不限于腺癌、蕈伞型(息肉)、溃疡、表浅扩散型、弥散型、恶性淋巴瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和肉瘤；结肠癌；直肠癌；胃癌，如腺癌、鳞状细胞癌、类癌、淋巴瘤、胃基质瘤和神经内分泌肿瘤；肝癌，例如但不限于肝细胞癌和肝母细胞瘤，胆囊癌如腺癌；胆管癌，例如但不限于乳头状、结核状和弥漫性；肺癌，例如非小细胞肺癌、鳞状细胞癌(上皮癌)、腺癌、大细胞癌和小细胞肺癌；睾丸癌，例如但不限于胚胎组织瘤，精原细胞瘤，退化发育，经典型(典型性)，精母细胞瘤，非精原细胞瘤，胚胎癌，畸胎瘤癌，绒毛膜癌(卵黄囊肿瘤)；前列腺癌，例如但不限于腺癌、平滑肌肉瘤以及横纹肌肉瘤；penal 癌；口腔癌，例如但不限于鳞状细胞癌；基底癌；唾液腺癌，例如但不限于腺癌、黏液表皮样

癌和腺腺样囊性癌；咽癌，如但不限于鳞状细胞癌以及疣；皮肤癌，例如包括但不限于基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤、浅表性传播黑色素瘤、结节性黑色素瘤、黑色素瘤雀斑、肢端黑色素瘤；肾癌，例如但不限于肾细胞癌、腺癌、肾上腺样瘤、纤维肉瘤、移行细胞癌(肾盂和/或输尿管)；Wilms 肿瘤；膀胱癌，例如但不局限于移行细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌、癌肉瘤。此外，癌症包括黏液肉瘤、骨源性肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、间皮瘤、滑膜瘤、血管母细胞瘤、上皮癌、囊腺癌、支气管癌、汗腺瘤、皮脂腺癌、乳头状癌和乳头状腺癌(该类疾病的综述可参见 Fishman 等人, 1985, *Medicine*, 第 2 版, J.B. Lippincott Co.; Philadelphia 和 Murphy 等人, 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America)。可以预期本发明的方法和组合物还可以用来预防、治疗和/或控制因为凋亡失常而引起的癌症。该类癌症包括但不限于：滤泡性淋巴瘤，具有 p53 突变的肿瘤，乳腺的激素依赖性肿瘤，前列腺癌和卵巢癌，及癌前病变，如家族性腺瘤性息肉和骨髓增生异常综合症。

5.6.2 患者筛选和细胞系

在一个实施方式中，通过预筛选确定该患者或该患者的亲属具有与遗传疾病相关的基因无义突变(即 UAA、UGA 或 UAG)。

在某些实施方式中，本发明提供了筛选患者以鉴别可能对使用无义密码子抑制剂的疗法有响应的患者的方法。

5.6.2.1 短期治疗挑战

本发明提供了根据所述患者响应无义密码子抑制剂的可能性筛选患有与基因无义突变相关疾病的患者的方法，该方法包括向该患者施用无义密码子抑制剂，然后检测与该需要预防、控制和/或治疗的疾病相关的一种或多种药效学标记。如果该药效学标记的检测显示该患者可能对该无义密码子抑制剂有响应，则可继续施用该试剂。

在具体实施方式中，该筛选方法包括向该患者短期施用无义密码子抑制剂，然后检测与该需要预防、控制和/或治疗的疾病相关的药效学标记，接着可选地长期施用该无义密码子抑制剂。在某些实施方式中，该无义密码子抑制剂的短期施用持续约5天、约10天、约14天、约21天或约28天。在另一实施方式中，该无义密码子抑制剂的长期施用持续约30天、约45天、约80天、约120天、约240天、约1年或直至医生认为治疗应该停止。在具体实施方式中，在该无义密码子抑制剂 TEPD 的短期施用和长期施用，与肺功能评价之间有一段约1天、约3天、约5天、约7天、约10天、约14天、约21天或约28天的无治疗期。在具体的实施方式中，该无义密码子抑制剂口服施用。

任何本领域技术人员知道的与本发明所述疾病相关的药效学标记均可用于本发明的方法(例如，参见，Politano 等人, *Acta Myologica* XXII: 15-21 (2003)，其全文在此引用作为参考)。

与囊性纤维化相关的示范性药效学标记包括但不限于：鼻部跨上皮电位差(例如，参见，Standaert 等人, *Pediatric Pulmonology* 57:385-392 (2004) 和 Du 等人, *J. Mol. Med.* 50:595-604 (2002)，其全文分别在此引用作为参考，以及下文的实施例 13)、从鼻部采集的细胞的 CFTR 蛋白染色和检测(例如，参见, Wilschanski, 等人, *N. Engl. J. Med.* 349: 1433-1441 (2003)，其全文在此

引用作为参考, 以及实施例 14)、汗液氯离子浓度的变化(例如, 参见实施例 16)以及肺功能的变化(例如, 参见实施例 15)。

与杜兴肌营养不良相关的示范性药效学标记包括但不限于: 血清肌酸酐激酶水平(例如, 参见下文实施例 20 中检测血清肌酸酐激酶水平的方法)以及通过染色进行的肌营养不良检测(例如, 参见, Politano, 等人, *Acta Myologica* XXII: 15-21 (2003), 其全文在此引用作为参考, 以及实施例 17)。

与淀粉样变性相关的示范性药效学标记包括但不限于: 淀粉样 β 蛋白的清除, 体重增加, 肾小球滤过率, 室间隔厚度, 淀粉样蛋白的跨组织分配和心脏淀粉样蛋白负荷, 血清中与免疫球蛋白有关的自由轻链(FLC)的 κ/λ 比例, 以及心脏肌钙蛋白 T 和 I(cTnT、cTnI)的缺失。

与血友病相关的示范性药效学标记包括但不限于: 血液凝固活性, 组织因子诱导的纤维蛋白形成和 tPA 介导的纤维蛋白溶解中血块溶解时间的缩短。

与阿尔海默病相关的示范性药效学标记包括但不限于: 改变的淀粉样前体蛋白(APP)亚型的血小板比例; 总体的、认知的(通过心理测验, 例如改良的简易智能状态测验(MMSE)或改良的 Hachinski 缺血指数来检测)、功能和行为的检测, 包括日常活动和行为, 尤其是激动, 减少的脑容积缺损(例如, 使用 MRI 测得)。还可参见 Caban-Holt 等人, *Geriatrics*. 2005.06; Suppl:3-8。

与帕金森病相关的示范性药效学标记包括但不限于: 帕金森病评定量表(UPDRS)的评分、MMSE、Hamilton-17 抑郁、NPI、每日“开”的总时间(TTON)、运动测试、运动障碍评定、患者日记以及(18)F-多巴的摄取。

与动脉粥样硬化症和家族性高胆固醇血症相关的示范性药效学标记包括但不限于：降低的胆固醇水平，如降低的MDA-LDL水平和/或增加的高密度脂蛋白胆固醇；血清脂肪酸状况，血清脂蛋白和血管发炎的标记，降低的血浆同型半胱氨酸浓度，动脉粥样硬化脉管中的斑块形成(通过MRI或血管内超声(IVUS))，通过如电子束计算机断层扫描测得的冠状动脉钙化(CAC)，以及通过如颈动脉内膜中层厚度(IMT)对颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)以及颈动脉的咽球片段检测测得到的减少的动脉阻塞。

与侏儒症和巨大症相关的示范性药效学标记包括但不限于：高度以及生长激素和催乳激素的水平。

与甲状腺功能减退症和甲状腺功能亢进症相关的示范性药效学标记包括但不限于：TT3、TT4和TSH血清水平以及对甲状腺形态及大小的评价、骨骼年龄、生长发育和发育商数(DQ)。

与视网膜色素变性病相关的示范性药效学标记包括但不限于：二十二碳六烯酸(DHA)水平，通过Humphrey视野分析仪根据视野敏感性、30-Hz视网膜电图幅度以及视觉灵敏度测得的眼功能。

与晚发婴儿型神经元蜡样脂褐质沉着病相关的示范性药效学标记包括但不限于：基于LINCL临床评分表的神经学评价和对脑的磁共振成像/磁共振波谱评价。

与脊髓性肌萎缩相关的示范性药效学标记包括但不限于：肌肉力量，运动功能和检查指数(IFM)的总和，呼吸肌麻痹指数(IMR)以及并仰卧位用力肺活量/理论指数(ICV/CT)，通过手持肌力计得到的最大自愿等长收缩以及计算的手臂大分值(加合肘屈曲、手抓力和三点捏力分数)，和腿大分值(加

和膝弯曲、膝伸展、扩展和足伸展分数), 总运动功能测试量, 肺功能检查, 定量肌力测试, 和生活质量。

与共济失调毛细血管扩张症相关的示范性药效学标记包括但不限于: 降低的 α -胎儿蛋白, 改善的免疫功能以及改善的神经功能。

与巴特综合症相关的示范性药效学标记包括但不限于: 提高的血钾水平, 提高的生长和提高的心理功能。

5.6.2.2 培养的组织细胞的体外暴露

本发明提供了针对患者响应无义密码子抑制剂的可能性筛选患有与基因无义突变相关疾病的患者的方法, 该方法包括将来自该患者的细胞样本与该无义密码子抑制剂接触, 并检测该无义密码子抑制剂诱导与该疾病相关的基因的无义突变的通读时功能通读蛋白的表达和/或活性。细胞样本的非限制性范例包括有核血细胞(例如, 外周血淋巴细胞)、皮肤细胞(例如, 真皮纤维原细胞)、神经元细胞、神经胶质细胞以及肌肉细胞。在某些实施方式中, 该细胞样本为受到基因无义突变的存在影响的细胞的样本。所测得的活性将取决于由普通基因编码的野生型蛋白的功能。例如, 参见上文 5.5 节描述的检测。

在某些实施方式中, 本发明提供了针对患者响应无义密码子抑制剂的可能性筛选患有与基因无义突变相关疾病的患者的方法, 该方法包括将来自该患者的细胞样本(例如, 皮肤细胞样本, 例如, 真皮纤维原细胞)在允许该细胞转化为目标组织(例如, 肌肉细胞)的条件下与该无义密码子抑制剂相接触, 并检测所述响应。来自可能响应该无义密码子抑制剂的患者的细胞样本将会产生功能通读蛋白, 因为从该基因转录的 RNA 中的无义密码子受

到抑制。在具体的实施方式中，所用的该细胞为从患者分离的成纤维细胞。该类细胞可通过用包含MyoD基因的载体转染该细胞而分化成为肌肉细胞。

本发明还提供了针对患者响应无义密码子抑制剂的可能性筛选患有与基因无义突变相关疾病的患者的方法，该方法包括对与该疾病相关的基因测序，将包含了具有相同无义突变的基因的细胞样本与所述无义密码子抑制剂相接触，并检测当该无义密码子抑制剂诱导了与该疾病相关的基因转录的RNA中的无义密码子的通读时生成的功能通读蛋白的表达和/或活性。在某些实施方式中，所用的该细胞样本为细胞样本库的一部分，每个细胞样本包含与疾病相关的基因的无义突变。例如，囊性纤维化细胞样本库包含细胞样本，例如，在CTFR基因中具有表10所列举的无义突变的细胞样本。细胞样本可被贮存在-70℃下直至使用，使用时该细胞样本被解冻并在允许该细胞生长的条件下培养。

5.6.2.3 荧光素酶测定中的人造基因构建体

本发明还提供了针对患者响应无义密码子抑制剂的可能性筛选患有与基因无义突变相关疾病的患者的方法，该方法包括对与该疾病相关的基因测序，将所述无义密码子抑制剂与已改造成包含报告基因例如荧光素酶(包含与所述疾病相关的基因的具有所述无义突变的区域)的细胞相接触，并检测当该无义密码子抑制剂诱导了从该基因转录的RNA中的无义密码子的通读时生成的功能通读蛋白的表达和/或活性。在某些实施方式中，该报告基因包含目标基因的具有该无义突变的区域的6个核苷酸(在某些实施方式中，9、12、15、21、24、27、30或33个核苷酸)，其中包括该无义突变。该报告基因已改造成包含目标基因的具有该无义突变的区域，从而保留该

报告基因的开放阅读框，且在无义密码子抑制剂诱导了从该基因转录的RNA中的无义密码子的通读时该报告基因编码的蛋白将会形成功能通读蛋白。上文5.5节提供了报告基因的范例。任意细胞均可通过工程改造为包含所述报告基因。非限制性的范例包括成纤维细胞、淋巴细胞、神经胶质细胞、神经细胞、肌肉细胞和巨噬细胞。可通过标准的分子和细胞生物学方法(包括定点突变)制备该报告基因，并对细胞进行工程改造(包括磷酸钙沉淀、电穿孔和脂质体)以包含该报告基因。

5.6.3 疾病

通过抑制提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解来预防、治疗和/或控制的疾病包括但不限于：遗传疾病、癌症、自身免疫疾病、血液疾病、胶原病、糖尿病、神经退行性疾病、增生性疾病、心血管疾病、肺病、炎症性疾病和中枢神经系统疾病。

在本发明的方法范围内的具体遗传疾病包括但不限于：淀粉样变性、血友病、阿尔海默病、泰伊-萨克斯二氏病、动脉粥样硬化、巨大症、侏儒症、甲状腺功能减退症、甲状腺功能亢进症、衰老、肥胖、帕金森病、尼曼-匹克病、囊肿性纤维化、肌肉萎缩症、心脏病、肾结石、共济失调毛细血管扩张症、家族性高胆固醇血症、视网膜色素变性、溶酶体贮积病、结节性硬化症、杜兴型肌营养不良症、脊髓性肌萎缩症和马凡综合症。实体肿瘤和其它癌症均包括在本发明方法的范围内。

在另一实施方式中，该遗传疾病为自身免疫疾病。在优选的实施方式中，该自身免疫疾病为风湿性关节炎或移植物抗宿主病。

在另一实施方式中，该遗传疾病为血液疾病。在优选的实施方式中，该血液疾病为血友病、Von Willebrand 病、共济失调毛细血管扩张症、b-地中海贫血或肾结石。

在另一实施方式中，该遗传疾病为胶原病。在另一实施方式中，该胶原病为成骨不全或肝硬化。

在另一实施方式中，该遗传疾病为糖尿病。

在另一实施方式中，该遗传疾病为炎性疾病。在优选的实施方式中，该炎性疾病为关节炎。

在另一实施方式中，该遗传疾病为中枢神经系统疾病。在一个实施方式中，该中枢神经系统疾病为神经退行性疾病。在优选的实施方式中，该中枢神经系统疾病为多发性硬化症、肌肉萎缩症、杜兴型肌营养不良症、脊髓性肌萎缩症、阿尔海默病、泰伊-萨克斯二氏病、晚发婴儿型神经元蜡样脂褐质沉着病(LINCL)或帕金森病。

在另一实施方式中，该遗传疾病为癌症。在优选的实施方式中，该癌症为头颈、眼、皮肤、口、咽喉、食道、胸部、骨、肺、结肠、乙状结肠、直肠、胃、前列腺、乳腺、卵巢、肾、肝、胰、脑、肠、心脏或肾上腺的癌症。

在另一优选的实施方式中，该癌症与肿瘤抑制基因有关(例如，参见 Garinis 等人 2002, Hum Gen 111:115-117; Meyers 等人.1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 15587-15591; Kung 等人 2000, Nature Medicine 6(12): 1335-1340)。该肿瘤抑制基因包括但不限于：APC、ATM、BRAC1、BRAC2、MSH1、pTEN、Rb 和 p53。

在特别优选的实施方式中，该肿瘤抑制基因为 p53 基因。已经鉴别出了 p53 基因中的无义突变，其与癌症相关联。在 p53 基因中已鉴定出多个无义突变(例如，参见 Masuda 等人, 2000, Tokai J Exp Clin Med. 25(2):69-77; Oh 等人, 2000, Mol Cells 10(3):275-80; Li 等人, 2000, Lab Invest. 80(4):493-9; Yang 等人, 1999, Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 21(2):114-8; Finkelstein 等人, 1998, Mol Diagn. 3(1):37-41; Kajiyama 等人, 1998, Dis Esophagus. 11(4):279-83; Kawamura 等人, 1999, Leuk Res. 23(2):115-26; Radig 等人, 1998, Hum Pathol. 29(11):1310-6; Schuyer 等人, 1998, Int J Cancer 76(3):299-303; Wang-Gohrke 等人, 1998, Oncol Rep. 5(1):65-8; Fulop 等人, 1998, J Reprod Med. 43(2):119-27; Ninomiya 等人, 1997, J Dermatol Sci. 14(3):173-8; Hsieh 等人, 1996, Cancer Lett. 100(1-2):107-13; Rail 等人, 1996, Pancreas. 12(1):10-7; Fukutomi 等人, 1995, Nippon Rinsho. 53(11):2764-8; Frebourg 等人, 1995, Am J Hum Genet. 56(3):608-15; Dove 等人, 1995, Cancer Surv. 25:335-55; Adamson 等人, 1995, Br J Haematol. 89(1):61-6; Grayson 等人, 1994, Am J Pediatr Hematol Oncol. 16(4):341-7; Lepelley 等人, 1994, Leukemia. 8(8): 1342-9; McIntyre 等人, 1994, J Clin Oncol. 12(5):925-30; Horio 等人, 1994, Oncogene. 9(4):1231-5; Nakamura 等人, 1992, Jpn J Cancer Res. 83(12): 1293-8; Davidoff 等人, 1992, Oncogene. 7(1):127-33; 以及 Ishioka 等人, 1991, Biochem Biophys Res Commun. 177(3):901-6; 其披露的内容在此全文引用作为参考)。与编码提前翻译密码子，包括但不限于上文所引的参考文献中描述的无义突变的 p53 基因相关的任何疾病都可用本发明的方法来治疗、控制和/或预防。

其它可用本发明的方法治疗、控制和/或预防的疾病包括实体肿瘤、肉瘤、癌、纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆道癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、Wilms 肿瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形胶质细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、卡波西肉瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、血液源性肿瘤、急性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞 B-细胞白血病、急性淋巴细胞的 T-细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性红白血病、急性成巨核细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性非淋巴细胞白血病、急性未分化型白血病、慢性粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病或多发性骨髓瘤。例如，参见 *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Eugene Braunwald 等人编，第 491-762 页（第 15 版，2001）。

在一些实施方式中，可以用本发明的方法预防、治疗和/或控制的疾病包括上文表 10 列举的疾病。在某些实施方式中，可以预防、治疗和/或控制的疾病不是肠胃疾病和/或皮肤疾病。在一些实施方式中，可以预防、治疗和/或控制的疾病不是如下疾病的一种或多种：基底细胞癌综合症(例如，PTCH 基因)、偶发性基底细胞癌(例如，PTCH 基因)、黑色素瘤(例如，CDKN2a 基因)、交界型大疱性表皮松解症(例如，LAMB3、LAMC2、LAMA3

基因)、泛发性萎缩性良性大疱性表皮松解症(例如, COL17A1 基因)、营养不良性表皮松解(例如, COL7A1 基因)、良性天疱疮疾病(如 ATP2C1 基因)、Darier 氏症(例如, ATP2A2 基因)、板层状鱼鳞病(例如, TGM1 基因)、X-连锁鱼鳞病(例如, STS 基因)、着色性干皮病(例如, XPA、XPC、XPG 基因)、Bloom 综合征(例如, BLM 基因)、纹状掌跖角化病(例如, DSP、DSG1 基因)、Cockayne 综合症(例如, ERCC6 基因)、眼皮肤白化病(例如, TYR、TYRP1 基因)、Hermansky-Pudlack 综合征(例如, HPS1、HPS4 基因)、共济失调毛细血管扩张症(例如, ATM 基因)、Griscelli 综合症(例如, RAB27A、MYO5A 基因)、以及外胚层发育不良/皮肤脆性(例如, PKP1 基因)。在一些实施方式中, 该疾病不是如下一种或多种疾病: 偶发性食道癌(p53 基因)和偶发性结肠癌(APC、p53 基因)、Barrett's 食道癌(p53 基因)、遗传性癌综合症、如腺瘤性结肠息肉病(APC 基因)、遗传性非息肉性结肠癌(MLH1、MSH2 基因)、Peutz-Jeghers 综合征(STK 11 基因)、以及 Cowden 综合症(PTEN 基因)。

5.7 制剂

本发明的方法中可采用包含有效量的无义密码子抑制剂的药物组合物和单一单位剂型。个体剂型可适用于通过口服、粘膜(包括舌下、口腔、直肠、鼻部、或阴道)或肠胃外(包括皮下、肌肉内、弹丸注射、动脉内或静脉内)施用。优选的药物组合物和单一单位剂型适用于口服施用。在一个实施方式中, 该药物组合物或单一单位剂型包含有效量的一种或多种无义密码子抑制剂, 和用于制备该无义密码子抑制剂的合成路径中的一种或多种杂质。

在一个实施方式中，该药物组合物为固体口服剂型。在一个实施方式中，该药物组合物为液体口服剂型。在某些实施方式中，本发明的方法包括剂量、单位剂型或药物组合物的施用，其中该无义密码子抑制剂是口服生物相容的。口服施用的优势包括便于施用，对给药方案产生更好的患者适应性，临床效力，更少的并发症，住院期更短和节省总成本。

在另一实施方式中，本发明的方法包括施用包含约 35 mg 至约 1400 mg、约 125 mg 至约 1000 mg、约 250 mg 至约 1000 mg、或约 500 mg 至约 1000 mg 无义密码子抑制剂的单位剂型。在一个实施方式中，该单位剂型包含无义密码子抑制剂，和适于在瓶中悬浮于药学上可接受的溶剂(例如，水、牛奶、碳酸饮料、果汁、苹果酱、婴儿食品或婴儿配方)中的一种或多种载体或赋形剂。

在另一实施方式中，本发明的方法包括施用包含 35 mg、50 mg、70 mg、100 mg、125 mg、140 mg、175 mg、200 mg、250 mg、280 mg、350 mg、500 mg、560 mg、700 mg、750 mg、1000 mg 或 1400mg 的无义密码子抑制剂的单位剂型。优选的单位剂型包括约 125 mg、约 250 mg 或约 1000 mg 的无义突变抑制剂。在一个实施方式中，该单位剂型包含无义密码子抑制剂，和适于在瓶中悬浮于药学上可接受的溶剂(例如，水、牛奶、碳酸饮料、果汁、苹果酱、婴儿食品或婴儿配方)中的一种或多种载体或赋形剂。优选的单位剂型为粉末和小袋。

尽管推荐本发明所述的单位剂型贮存于约 2°C 至约 8°C，但该单位剂型可在重新配制前在室温下贮存 48 小时。在一个实施方式中，可通过直接向含有 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物的瓶中添加约 10 mL 的水来对 250 mg 的 3-[5-(2-氟-苯

基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物的单位剂型进行重新配制，从而形成浓度约为 25 mg/mL 的悬浮液。对于 1,000 mg 的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物的单位剂型，直接向含有 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物的瓶中添加约 20 mL 的水，从而形成浓度约为 50 mg/mL 的悬浮液。在加入水后立即盖上瓶子，并用手轻柔震荡至少 30 秒以实现均匀悬浮。尽管该重新配制的悬浮液在摄入前可在最初的塑料瓶中保存达 24 小时，但推荐在重新配制后立即施用该药物。如果在重新配制和给药之间有超过大约 15 分钟的延误，则推荐用手轻柔摇动该瓶至少 30 秒。推荐从瓶中直接施用该悬浮液。进一步推荐用水洗涤该瓶一次，并将该洗涤液摄入以确保没有粉末遗留在该瓶中。

用于向患者口服施用的单一单位剂型包括但不限于：药囊剂；扁囊剂；片剂；咀嚼片；囊片；胶囊，如软弹性凝胶胶囊；锭剂；糖锭；分散剂；粉末；溶液；液体剂型，包括悬浮液(例如，水或非水液体悬浮液)；乳剂(例如，水包油乳剂或油包水乳剂)；以及酞剂。在一个实施方式中，本发明的方法包括施用含有过饱和的其它活性试剂的胶体溶液或溶液。可用于本发明方法的特定剂型的彼此的区分方法对本领域的技术人员而言是显而易见的。例如，参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Publishing, Easton PA (1990)。

本发明的方法进一步包括施用包含无义密码子抑制剂的无水药物组合物和剂型。无水药物组合物和剂型可采用无水或低含水量的成分并在低水分或低湿度条件下制备。

典型的口服剂型可通过充分混合具有无义密码子抑制活性的化合物和根据常规药物配合技术的至少一种载体或赋形剂制备得到。赋形剂可根据需要施用的制剂形式可采取各种形式。例如，适于在口服液体或气雾剂剂型中使用的赋形剂包括但不限于：水、乙二醇、油、醇、调味剂(例如，香草精)、防腐剂以及着色剂。适于在固体口服剂型中使用的赋形剂(例如，粉末、片剂、咀嚼片、药囊剂、胶囊和囊片)的范例包括但不限于：淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、成粒剂、润滑剂、结合剂和崩解剂。

特别优选的单位剂型为包含有效量的无义密码子抑制剂的粉剂，其适于在药学上可接受的溶剂(例如水、牛奶、碳酸饮料、果汁、苹果酱、婴儿食品或婴儿配方)中重新配制并随后口服施用。在具体实施方式中，该粉剂可任选地包含与该无义密码子抑制剂联合的一种或多种载体或赋形剂。在另一实施方式中，该粉剂可在施用或重新配制前贮存于密封容器中。在另一实施方式中，该粉末被胶囊化(例如，包含在凝胶胶囊中)。

用于口服施用的液体制剂的形式可以是例如溶液、糖浆或悬浮液，或是在使用前可用水或其它合适运载体配制的干产品(例如，粉末或颗粒)。该种液体制剂可通过常规方法用药学上可接受的添加剂例如悬浮剂(例如，山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪)；乳化剂(例如，卵磷脂或阿拉伯树胶)；非水运载体(例如，杏仁油、油酯、酒精或分馏的植物油)；以及防腐剂(甲基或丙基-对羟基安息香酸盐或山梨酸)进行制备。该制剂还可酌情包含缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。

可用于固体口服剂型中的赋形剂的范例包括但不限于：结合剂、填充剂、崩解剂和润滑剂。适用于药物组合物和剂型的结合剂包括但不限于：玉米淀粉、马铃薯淀粉或其它淀粉、凝胶、阿拉伯树胶等天然和合成树胶、

藻酸钠、海藻酸、其它藻酸盐、粉状黄芪胶、瓜儿胶、纤维素及其衍生物(例如, 乙基纤维素、醋酸纤维素、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠)、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、预胶化淀粉、羟丙基甲基纤维素(例如, 2208、2906、2910), 粗晶纤维素及其混合物。

优选的赋形剂包括 Litesse® Ultra(精制右旋糖)甘露醇、表面活性剂(聚乙二醇 3350 和 Lutrol ®micro F127(poloxamer 407 粉))、崩解剂(交聚维酮)、硅石粉、Carbopol®、聚丙烯酸和其它赋形剂(羟基乙基纤维素、香草香精、硬脂酸镁(非牛)、以及硅胶)。

适用于本发明所公开的药物组合物和固体剂型的填充剂的范例包括但不限于: 乳糖、滑石、碳酸钙(例如, 颗粒或粉末)、微晶纤维素、粉末状纤维素、葡聚糖、高岭土、甘露醇、硅酸、山梨醇、淀粉、预胶化淀粉及其混合物。本发明药物组合物的结合剂或填充剂通常占该药物组合物或剂型的约 50%至约 99%重量。

适用的微晶纤维素包括但不限于: 商品名为 AVICEL-PH-101、AVICEL-PH-103 AVICEL RC-581、AVICEL-PH-105(可从 FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Sales, Marcus Hook, PA 购得)的材料及其混合物。一种特定的结合剂为商品名为 AVICEL RC-581 的微晶纤维素和羧甲基纤维素钠的混合物。适用的无水或低水分赋形剂或添加剂包括 AVICEL-PH-103™和淀粉 1500 LM。

5.8 剂量和给药方案

不希望受限于理论，本发明的方法部分地包括可最大化地抑制提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的无义密码子抑制剂的特定剂量和给药方案。

本发明的方法包括治疗、预防和控制可通过抑制提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解来治疗、预防和/或控制的疾病或其症状，同时减少或避免不良或不需要的作用(例如，毒性或副作用)。此处所述的剂量和给药方案的优选施用途径为口服(即，摄入溶液、含有超过活性剂饱和浓度的其它活性试剂的胶体溶液或溶液)。在一个实施方式中，此处所述的剂量或给药方案的施用途径为局部(例如，经皮肤)施用。

此处所述的剂量和给药方案由于能够达到或维持具有无义密码子抑制活性的所述化合物的预期血浆浓度而被认为是有用的。不希望受限于理论，认为在例如 24 小时或更长的时间内达到并维持无义突变抑制剂相对恒定的血浆浓度会对患者产生有益的治疗效果。此处所述的剂量和给药方案可用于到达并维持具有无义密码子抑制活性的化合物的该种治疗性血浆浓度。

在一个实施方式中，本发明的方法包括施用无义密码子抑制剂，其中该化合物在 12 小时或 24 小时的期间内向有此需要的患者施用一、二或三次，其中各次施用优选间隔约 4-14 小时。在具体实施方式中，该无义密码子抑制剂在早晨、下午和晚上各施用一次。在另一实施方式中，该无义密码子抑制剂在早晨和晚上各施用一次。在另一实施方式中，该无义密码子抑制剂在早晨施用一次、下午施用一次或晚上施用一次。各次剂量之间的优选间隔包括 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 和 14 小时。

在一个实施方式中，该无义密码子抑制剂的剂量在 24 小时的期间内逐步升高。在具体实施方式中，所施用的所述二剂量高于(例如，两倍于)所述

第一剂量。在另一实施方式中，所施用的该第一和第二剂量保持恒定，而施用的第三剂量升高(例如，两倍)。不希望受限于理论，认为该无义密码子抑制剂的施用存在昼夜变化，其中在晚上施用的剂量所得到的血浆浓度高于在早晨或下午施用剂量所得到的浓度。不希望进一步受限于理论，认为相对于之前的施用剂量倍增晚上施用的剂量会最佳地维持目标血浆浓度，同时会降低对该无义密码子抑制剂的总体暴露。

在某些实施方式中，参照以下公式 $1X$ 、 $1X$ 、 $2X$ 在 24 小时期间内施用三个剂量，其中 X 为具体的起始剂量(例如，4 mg/kg、7mg/kg 或 10 mg/kg)。在另一实施方式中，该无义密码子抑制剂在患者进食(即之前或之后)约 10、15、30、45 或 60 分钟内被施用。在一个实施方式中，有效量的无义密码子抑制剂被散布或混合于食物中。在一个实施方式中，在该无义密码子抑制剂施用前、施用时或施用后摄取的食物为高脂肪和/或高卡路里和/或高蛋白食物。

在一个实施方式中，如果在一个治疗周期中形成的不良事件被认为是剂量限制的，则在该治疗周期的剩余时间内或者直至该不良事件消退，所施用的该第二或第三剂量(例如，晚上的剂量)被减少约 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或完全不施用。

特别优选的给药方案为：以大约 6-、6-和 12-小时的间隔(例如，早餐后的~7:00 AM，午餐后的~1:00 PM 以及晚餐后的~7:00 PM)在就餐后 30 分钟内向患者施用无义密码子抑制剂。

在另一实施方式中，本发明的方法包括以介于 0.1 mg/kg 和 500 mg/kg、1 mg/kg 和 250 mg/kg、1 mg/kg 和 150 mg/kg、1 mg/kg 和 100 mg/kg、1 mg/kg 和 50 mg/kg、1 mg/kg 和 25 mg/kg、1 mg/kg 和 20 mg/kg、1 mg/kg 和 10 mg/kg、

或 2 mg/kg 和 10 mg/kg 之间的剂量单次或分次(例如, 在 24 小时内三次)向有此需要的患者施用无义密码子抑制剂。在某些实施方式中, 以约 2-6 mg/kg、约 5-9 mg/kg、约 6-10 mg/kg、约 8-12 mg/kg、约 12-16 mg/kg 或约 18-22 mg/kg 的剂量施用无义密码子抑制剂。在某些实施方式中, 以约 3 mg/kg、约 4 mg/kg、约 6 mg/kg、约 7 mg/kg、约 8 mg/kg、约 10 mg/kg、约 14 mg/kg、约 20 mg/kg、约 30 mg/kg、约 50 mg/kg、约 100 mg/kg、约 200 mg/kg 或约 300 mg/kg 的剂量施用无义密码子抑制剂。在另一实施方式中, 前述实施方式中所述的无义密码子抑制剂的任意剂量在 24 小时的期间内施用一次、两次或三次。

在另一实施方式中, 本发明的方法包括持续疗法, 其中在特定的时间期限(例如, 5、7、10、14、20、24、28、60 或 120 天或更长时间)内每天向有此需要的患者施用无义密码子抑制剂。在一个实施方式中, 无义密码子抑制剂每 24 小时连续施用一次、两次或三次。在另一实施方式中, 无义密码子抑制剂每天、每周、每月或每年连续施用。在具体的实施方式中, 无义密码子抑制剂每 24 小时以约 4 mg/kg、约 4 mg/kg 和约 8 mg/kg 的剂量连续施用一次、两次或三次, 持续数天、数周、数月或数年。在具体的实施方式中, 无义密码子抑制剂每 24 小时以约 7 mg/kg、约 7 mg/kg 和约 14 mg/kg 的剂量连续施用三次, 持续数天、数周、数月或数年。在具体的实施方式中, 无义密码子抑制剂每 24 小时以约 10 mg/kg、约 10 mg/kg 和约 20 mg/kg 的剂量连续施用三次, 持续数天、数周、数月或数年。在另一实施方式中, 无义密码子抑制剂每 24 小时以约 8 mg/kg 的剂量连续施用两次, 持续数天、数周、数月或数年。

在另一具体的实施方式中，无义密码子抑制剂在第一周期中每24小时以约4 mg/kg、约4 mg/kg和约8 mg/kg的剂量连续施用三次，持续数天、数周、数月或数年，然后在第二周期中每24小时以约8 mg/kg的剂量施用两次，持续数天、数周、数月或数年。在另一具体的实施方式中，无义密码子抑制剂在第一周期中每24小时以约8 mg/kg的剂量施用两次，持续数天、数周、数月或数年，然后在第二周期中每24小时以约4 mg/kg、约4 mg/kg和约8 mg/kg的剂量连续施用三次，持续数天、数周、数月或数年。在这些实施方式中，该第一和第二周期可以分开或伴随一段不施用无义密码子抑制剂的休息期。该休息期可持续数天、数月或数年。

在施用无义密码子抑制剂的各个24小时期间内，优选以大约6-、6和12-小时的间隔(例如，早餐后的~7:00 AM、午餐后的~1:00 PM以及晚餐后的~7:00 PM)施用三次。

一个疗程的治疗期间可持续一周、两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周、九周、十周、十一周、十二周、十三周、十四周、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、一年、两年、三年、四年、五年或更长。在具体的实施方式中，一个疗程的治疗期间可以是该个体的终生。该治疗期间可被持续一天、一周、两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周、九周、十周、十一周、十二周、十三周、十四周、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、一年、两年、三年、四年、五年或更长的休息期所中断。这可由本领域的技术人员(例如，医师)确定。

可以理解向有此需要的患者施用的无义密码子抑制剂的量是根据/或可以根据所涉及患者的实际体重或所涉及患者群体(例如，白人男性、白人女

性、非裔美国男性、非裔美国女性、亚裔男性或亚裔女性，包括胚胎、胎儿、婴儿、儿童、成年人和老年人)的平均体重进行计算。

5.9 血浆浓度

在一个实施方式中，本发明的方法包括在患者体内维持无义密码子抑制剂的血浆浓度 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至 500 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至 400 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至 300 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至 200 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至 100 $\mu\text{g/ml}$ 或 2 $\mu\text{g/ml}$ 至 10 $\mu\text{g/ml}$ 约 1 至 72 小时、2 至 48 小时或 2 至 24 小时，包括向有此需要的患者施用有效量的无义密码子抑制剂。在另一实施方式中，本发明的方法包括维持无义密码子抑制剂的血浆浓度大于约 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、约 1 $\mu\text{g/ml}$ 、约 2 $\mu\text{g/ml}$ 、约 5 $\mu\text{g/ml}$ 、约 10 $\mu\text{g/ml}$ 、约 15 $\mu\text{g/ml}$ 、约 20 $\mu\text{g/ml}$ 、约 25 $\mu\text{g/ml}$ 、约 30 $\mu\text{g/ml}$ 、约 40 $\mu\text{g/ml}$ 、约 50 $\mu\text{g/ml}$ 、约 75 $\mu\text{g/ml}$ 、约 100 $\mu\text{g/ml}$ 、约 125 $\mu\text{g/ml}$ 、约 150 $\mu\text{g/ml}$ 、约 175 $\mu\text{g/ml}$ 、约 200 $\mu\text{g/ml}$ 、约 225 $\mu\text{g/ml}$ 、约 250 $\mu\text{g/ml}$ 、约 275 $\mu\text{g/ml}$ 、约 300 $\mu\text{g/ml}$ 、约 325 $\mu\text{g/ml}$ 、约 350 $\mu\text{g/ml}$ 、约 375 $\mu\text{g/ml}$ 或约 400 $\mu\text{g/ml}$ 至少约 2、4、6、8、12、24、36 或 48 小时，包括向有此需要的患者施用有效量的无义密码子抑制剂。在某些实施方式中，该施用为口服。

在另一实施方式中，本发明的方法包括在患者体内维持无义密码子抑制剂的血浆浓度约 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至约 400 $\mu\text{g/ml}$ 至少约 2、4、6、8、12 或 24 小时，包括向有此需要的患者以相同或递增的剂量(例如，此处所述的 1X、1X、2X)施用有效量的无义密码子抑制剂多达每天三次。在某些实施方式中，该施用为口服。

在某些实施方式中，通过向有此需要的患者每天三次施用该无义密码子抑制剂，将患者的无义密码子抑制剂血浆水平维持在约 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至约 400 $\mu\text{g/ml}$ 以上至少 2、4、6、8、12 或 24 小时。在具体实施方式中，该施用为口服。

在一个实施方式中，本发明的方法包括施用无义密码子抑制剂，从而在施用后约 1 至约 3 小时或约 2 至约 4 小时出现 T_{max} 血浆浓度。

在一个实施方式中，本发明的方法包括施用无义密码子抑制剂，从而使该血浆浓度的平均半衰期 $t_{1/2}$ 为约 2 至约 6 小时或约 3 至约 6 小时。

在某些实施方式中，本发明的方法包括施用无义密码子抑制剂，该施用的量可在体内有效生成相当于正常个体中生成的相应野生型蛋白量的 1% 或更多、2% 或更多、3% 或更多、4% 或更多、5% 或更多、7% 或更多、10% 或更多、12% 或更多、15% 或更多、17% 或更多、20% 或更多、22% 或更多、25% 或更多、27% 或更多、30% 或更多、32% 或更多、35% 或更多、40% 或更多、45% 或更多、50% 或更多、55% 或更多、60% 或更多、65% 或更多、70% 或更多、75% 或更多或是 80% 或更多的该种功能通读蛋白。在一些实施方式中，本发明的方法包括施用无义密码子抑制剂，该施用的量有效生成足够的功能通读蛋白，从而获得正常个体中的野生型蛋白的大约 1%、大约 2%、大约 3%、大约 4%、大约 5%、大约 10%、大约 15%、大约 20%、大约 25%、大约 30%、大约 35%、大约 40%、大约 45%、大约 50%、大约 55%、大约 60% 或更多的活性。

在具体的实施方式中，本发明的方法包括施用无义密码子抑制剂，该施用的量可在体内有效生成相当于正常个体中生成的 CFTR 蛋白量的至少约 1% 或更多、2% 或更多、3% 或更多、4% 或更多、5% 或更多、7% 或更多、

10%或更多、12%或更多、15%或更多、17%或更多、20%或更多、22%或更多、25%或更多、27%或更多、30%或更多、32%或更多、35%或更多、40%或更多、45%或更多、50%或更多、55%或更多、60%或更多、65%或更多、70%或更多、75%或更多或是80%的该种功能通读 CFTR 蛋白。

在另一实施方式中，本发明的方法包括施用无义密码子抑制剂，该施用的量可在体内有效生成相当于正常个体中生成的肌营养不良蛋白蛋白量的1%或更多、2%或更多、3%或更多、4%或更多、5%或更多、7%或更多、10%或更多、12%或更多、15%或更多、17%或更多、20%或更多、22%或更多、25%或更多、27%或更多、30%或更多、32%或更多、35%或更多、40%或更多、45%或更多、50%或更多、55%或更多、60%或更多、65%或更多、70%或更多、75%或更多或是80%的功能通读肌营养不良蛋白。

5.10 治疗终点

任何本领域技术人员知道的本发明所公开的疾病的治疗终点或结果均可用于本发明的方法(例如，参见 Politano, 等人, 2003, *Acta Myologica XXII*:15-21, 其全文在此引用作为参考)。代表性的治疗终点包括但不限于：如本发明所述的，包括实施例中列举的治疗终点。

杜兴型肌营养不良症的代表性终点包括但不限于：在其它情况下不生成肌营养不良蛋白的肌肉内肌营养不良蛋白的生成(例如，骨骼肌细胞的肌膜中肌营养不良蛋白的重新表达)；与相对侧的未处理的肌肉相比，处理的肌肉的肌肉 MRI 参与方式和肌容积；以及肌肉力量和表现，包括个体肘部和膝屈肌和伸肌和手抓力 QMT 评分以及通过医学研究委员会(MRC)肌肉力量评分法测定的徒手肌力测试分值。

定量的肌肉力量可以测定，例如通过儿科定量测量系统(PQMS)测定。主要的力量标记包括由配对屈肌/伸肌组构成的上和下肢的定量肌力法(QMT)分值。

囊性纤维化的代表性终点包括但不限于：通过鼻跨上皮电位差(TEPD)评价的 CFTR 活性；副作用，CFTR 蛋白和 mRNA 的存在，以及肺功能。

淀粉样变性的代表性终点包括但不限于：淀粉样 β 蛋白的清除；体重增加，肾小球滤过率，室间隔厚度，淀粉样蛋白的跨组织分配和心脏淀粉样蛋白负荷，血清中与免疫球蛋白有关的自由轻链(FLCs)的 κ/λ 比例，以及心脏肌钙蛋白 T 和 I(cTnT、cTnI)的缺失。

血友病的代表性终点包括但不限于：血液凝固活性，组织因子诱导的纤维蛋白形成和 tPA 介导的纤维蛋白溶解中血块溶解时间的缩短。

阿尔海默病的代表性终点包括但不限于：改变的淀粉样前体蛋白(APP)亚型的血小板比例；总体的、认知的(通过心理测验，例如改良的简易智能状态测验(MMSE)或改良的 Hachinski 缺血指数测得)、功能和行为的检测，包括日常活动和行为，尤其是激动，减少的脑容积缺损(例如，使用 MRI 测得)。还可参见 Caban-Holt 等人, Geriatrics. 2005.06; Suppl:3-8。

帕金森病的代表性终点包括但不限于：帕金森病评定量表(UPDRS)的评分、MMSE、Hamilton-17 抑郁、NPI、每日“开”的总时间(TTON)、运动测试、运动障碍评定、患者日记以及(18)F-多巴的摄取。

动脉粥样硬化症和家族性高胆固醇血症的代表性终点包括但不限于：降低的胆固醇水平，如降低的 MDA-LDL 水平和/或增加的高密度脂蛋白胆固醇；血清脂肪酸状况，血清脂蛋白和血管发炎的标记，降低的血浆同型半胱氨酸浓度，动脉粥样硬化脉管中的斑块形成(通过 MRI 或血管内超声

(IVUS)), 通过如电子束计算机断层扫描测得的冠状动脉钙化(CAC), 以及通过如颈动脉内膜中层厚度(IMT)对颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)以及颈动脉的咽球片段检测测得的减少的动脉阻塞。

侏儒症和巨大症的代表性终点包括但不限于: 高度以及生长激素和催乳激素的水平。

甲状腺功能减退症和甲状腺功能亢进症的代表性终点包括但不限于: TT3、TT4 和 TSH 血清水平以及对甲状腺形态及大小的评价, 骨骼年龄, 生长发育和发展商数(DQ)。

视网膜色素变性病的代表性终点包括但不限于: 二十二碳六烯酸(DHA)水平, 通过 Humphrey 视野分析仪对视野敏感性、30-Hz 视网膜电图幅度以及视觉灵敏度测得的眼功能。

晚发婴儿型神经元蜡样脂褐质沉着病的代表性终点包括但不限于: 基于 LINCL 临床评分表神经学评价和对脑的磁共振成像/磁共振波谱评价。

脊髓性肌萎缩的代表性终点包括但不限于: 肌肉力量, 运动功能和检查指数(IFM)的总和, 呼吸肌麻痹指数(IMR)以及并仰卧位用力肺活量/理论指数(ICV/CT), 通过手持肌力计得到的最大自愿等长收缩以及计算的手臂大分值(总结肘屈曲、手抓力以及三点捏力分数), 和腿大分值(总结膝弯曲、膝伸展、扩展和足伸展分数), 总运动功能测试量, 肺功能检查, 定量肌力测试, 和生活质量。

共济失调毛细血管扩张症的代表性终点包括但不限于: 降低的 α -胎儿蛋白, 改善的免疫功能以及改善的神经功能。

巴特综合症的代表性终点包括, 但不限于: 提高的血钾水平, 提高的生长和提高的心理功能。

5.11 基因疗法

基因疗法指通过向个体施用表达的或可表达的核酸序列进行的治疗。本领域中现有的任何基因治疗方法均可用于本发明。以下描述了示范性方法。

对于基因疗法的一般综述可参见, Goldspiel 等人, 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu 和 Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); 以及 Morgan 和 Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215。重组 DNA 技术领域中公知的方法描述于 Ausubel 等人(编), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); 以及 Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)。

一方面, 核酸序列是在适当宿主中表达该核酸序列的表达载体的一部分。具体地, 这种核酸序列包括可操作地与蛋白编码区连接的启动子(包括外源启动子), 所述启动子为可诱导型或组成型, 且任选地具有组织特异性。在另一特定的实施方案中, 所使用的核酸序列中所述蛋白编码序列和任意其它目标序列与促进该基因组在目标位点上发生同源重组的区域侧翼连接, 从而提供了该蛋白编码核酸序列的染色体内表达(Roller 和 Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935; Zijlstra 等人, 1989, *Nature* 342:435-438)。

所述核酸序列向个体的传递可以是直接的, 此时该个体直接暴露至该核酸序列或携带该核酸序列的载体; 也可以是间接的, 此时首先在体外以

该核酸转化细胞，然后将细胞移植入该个体。这两种方法分别被称为体内或体外基因疗法。

在具体的实施方式中，所述核酸序列被直接施用至体内，在其中该核酸序列表达或生成编码产物。这可通过本领域已知的许多方法中的任一方法实现，例如，通过将其构建为合适核酸表达载体的一部分，并例如通过如下方法而将其施用至细胞内来实现：例如使用缺陷型或减毒型逆转录病毒或其它病毒载体感染(参见美国专利 4,980,286)，或直接注射裸露 DNA，或通过微粒轰击(例如，基因枪法；Biolistic, Dupont)，或通过具有包含该核酸序列的原位支架的基质(例如，参见欧洲专利 EP 0 741 785 B1 和美国专利 5,962,427)，或以脂质或细胞表面受体或转染剂包覆，在脂质体、微粒或微胶囊中包封，或通过将其与已知进入细胞核的的肽相结合进行施用，将其与会遭受受体介导的内吞作用的配体相结合进行施用(例如，参见 Wu 和 Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432)(其可用于靶向特异性表达该受体的细胞类型)等。在另一实施方式中，可形成核酸-配体复合物，其中该配体包含融合的病毒肽来破坏内涵体，从而使核酸避免溶酶体降解。在另一实施方式中，该核酸序列可通过靶向特异性受体在体内定向，从而进行细胞特异性摄取和表达(例如，参见 PCT 公开 WO 92/06180、WO 92/22635、WO 92/20316、WO 93/14188、WO 93/20221)。可替代地，该核酸序列可被导入胞内，并通过同源重组被整合至该宿主细胞 DNA 中以进行表达(Koller 和 Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935; 以及 Zijlstra 等人, 1989, *Nature* 342:435-438)。

在具体的实施方式中，使用包含编码预防或治疗性试剂的核酸序列的病毒载体。例如，可使用逆转录病毒载体(参见 Miller 等人, 1993, *Meth.*

Enzymol. 217:581-599)。这些逆转录载体包含正确包装病毒基因组并整合进入宿主细胞 DNA 所必需的组件。将在基因疗法中使用的所述核酸序列克隆进一种或多种促进该基因传递进入个体的载体中。有关逆转录病毒载体更具体的信息可参见 Boesen 等人, 1994, *Biotherapy* 6:291-302, 其描述了使用逆转录病毒载体传递 *mdr 1* 基因进入造血干细胞, 从而使该干细胞对化疗更具耐受力。其它阐述逆转录病毒在基因疗法中的用途的参考文献有: Clowes 等人, 1994, *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Klein 等人, 1994, *Blood* 83:1467-1473; Salmons 和 Gunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4:129-141; 以及 Grossman 和 Wilson, 1993, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114。

腺病毒是可用于基因疗法的另一病毒载体。腺病毒是用于向呼吸道上皮细胞传递基因的特别受人关注的载体。腺病毒天然感染呼吸道上皮细胞, 并在此引起轻微的疾病。基于腺病毒的传递系统的其它靶标为肝、中枢神经系统、内皮细胞和肌肉。腺病毒具有能够感染非分裂细胞的优势。Kozarsky 和 Wilson, 1993, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 中提供了基于腺病毒基因疗法的综述。Bout 等人, 1994, *Human Gene Therapy* 5:3-10 显示了腺病毒载体在向恒河猴的呼吸道上皮细胞传递基因中的用途。腺病毒在基因疗法中的用途的其它实例可参见 Rosenfeld 等人, 1991, *Science* 252:431-434; Rosenfeld 等人, 1992, *Cell* 68:143-155; Mastrangeli 等人, 1993, *J. Clin. Invest.* 91:225-234; PCT 公布 WO94/12649; 以及 Wang 等人, 1995, *Gene Therapy* 2:775-783。在优选的实施方式中, 采用腺病毒载体。

腺相关病毒(AAV)也曾被提议用于基因疗法(Walsh 等人, 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 以及美国专利 5,436,146)。

基因疗法的另一方法包括通过诸如电穿孔、脂质体转染、磷酸钙介导的转染或病毒感染等方法将基因转移进入组织培养中的细胞。该种转移方法通常包括将可选择标记转移进入该细胞。然后对该细胞进行选择，以分离那些摄取并表达该转移基因的细胞。这些细胞随后被传递进入个体。

在该实施方式中，该核酸首先被导入细胞，随后体内施用所得的重组细胞。该种导入可通过本领域任何已知的方法进行，包括但不限于转染、电穿孔、显微注射、以带有该核酸序列的病毒或噬菌体感染、细胞融合、染色体介导的基因转移、微细胞介导的基因转移、原生质球融合等。本领域中已知有多种技术可用于将外源基因导入细胞(例如，参见 Loeffler 和 Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen 等人, 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Clin. Pharma. Ther. 29:69-92 (1985))，这些技术均可用于本发明，只要受体细胞必要的发育和生理功能未被破坏。该技术应能将核酸稳定转移至该细胞，从而使该核酸可被细胞表达，并优选可被其细胞子代继承和表达。

所得的重组细胞可通过本领域已知的各种方法传递至个体。重组血细胞(例如，造血干或祖细胞)优选通过静脉内施用。预期使用的细胞的数量取决于目标效果、患者状态等，并可由本领域技术人员确定。

用于基因治疗目的导入核酸的细胞包括任意理想的、现有的细胞类型，且包括但不限于上皮细胞、内皮细胞、角化细胞、成纤维细胞、肌肉细胞、肝细胞；血细胞如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨核细胞、粒细胞；各种干或祖细胞，尤其是造血干或祖细胞，例如由骨髓、脐带血、外周血、胎肝等获得的造血干或祖细胞等。

在优选的实施方式中，用于基因疗法的所述细胞与该个体自体同源。

在重组细胞被用于基因疗法的实施方式中，将编码蛋白的核酸序列导入细胞，从而使它们可以被该细胞或其子代表达，随后将该重组细胞体内施用以获得预防或治疗效果。在具体的实施方式中，使用干或祖细胞。任何能被分离并在体外维持的干和/或祖细胞均可用于本发明的该种实施方式（例如，参见 PCT 公布 WO 94/08598；Stemple 和 Anderson, 1992, Cell 71:973-985；Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229 以及 Pittelkow 和 Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771）。

在具体的实施方式中，用于基因疗法而被导入的核酸包含可操作地与编码区域连接的组成型或组织特异型启动子。

6. 实施例

以下实施例采用了可用于鉴定具有无义突变抑制活性的化合物的方法。

6.1 实施例 1：促进无义突变抑制和/或调节翻译终止的化合物的鉴定和表征

调节提前翻译终止和/或无义介导的 mRNA 降解的化合物可通过许多技术进行鉴定。例如，国际专利申请 WO 01/44516 A2（在此全文引用作为参考）中描述了能调节任意具有提前翻译终止密码子的基因的转录后表达的化合物的筛选方法。在一个实例中，具有提前终止密码子的 mRNA 在体外翻译并用于筛选测试化合物的库。在另一实例中，该具有提前终止密码子的 mRNA 为具有提前终止密码子的报告基因。

人们开发了两种用于高通量筛选的两种测定法，以鉴定促进无义突变抑制的小分子。各测定法中均采用了荧光素酶，因为这是一种功能报告基因测定法(仅当蛋白为功能蛋白时发光)并且极度灵敏(光强度与 nM 范围内的荧光素酶浓度成比例)。第一种测定法为基于细胞的荧光素酶报告测定法，第二种为由兔网状细胞裂解产物和含无义荧光素酶报告 mRNA 组成的生物化学测定法。在基于细胞的测定法中，含 UGA 提前终止密码子的荧光素酶报告构建体被转染进入 293T 人胚胎肾细胞。在生物化学测定法中，含 UGA 提前终止密码子的 mRNA 被用作体外翻译反应(其采用添加了 tRNA、血红蛋白、肌酸酐激酶、氨基酸、KOAc、Mg(OAc)₂ 和磷酸肌酸的兔网状细胞裂解产物)的报告体。mRNA 的翻译在来自病毒的前导序列中启动。合成 mRNA 可采用 T7 启动子和 MegaScript 体外转录试剂盒(Ambion)在体外制备。在生物化学和基于细胞的测定法中，已知允许提前终止密码子通读的小分子 3-[3-(4-异丙基-苯基)-2,5-二氧化-咪唑烷-1-基]-苯甲酸可被用作内标。

6.2 实施例 2: 可提高无义突变抑制并生成功能蛋白的化合物的表征

为测定体内活性，以测试化合物处理具有含有所述无义 UGA 的荧光素酶基因的稳定细胞系。在添加了 1% 青霉素-链霉素(P/S)和 10% 胎牛血清(FBS)的标准细胞培养基中将细胞生长至 70% 汇合，并在处理前一天 1:1 分离。在次日，将细胞胰蛋白酶化并向 96 孔组织培养皿的每个微孔中添加 40,000 个细胞。制备各个化合物的系列稀释物以生成跨越 2 log (30 μM 至 0.3 μM) 的六点剂量响应曲线。各微孔中的 DMSO 溶剂的终浓度恒定为 1%。以 1% DMSO 处理的细胞作为背景标准，以庆大霉素处理的细胞作为阳性对照。

6.3 实施例 3: 无义抑制剂改变化学修饰剂对 28 S rRNA 中特定核苷酸的 可及性。

前述研究已经证明了可降低翻译精确性的庆大霉素和氨基糖苷家族的其它成员结合至 16S rRNA 的 A 位点。通过化学足迹、UV 交联和 NMR 已显示庆大霉素结合在 rRNA 的 A 位点(包含核苷酸 1400-1410 和 1490-1500, 大肠杆菌编号)的核苷酸 1406、1407、1494 和 1496 上(Moazed & Noller, 1987, *Nature* 327(6121):389-394; Woodcock 等人, 1991, *EMBO J.* 10(10):3099-3103; 以及 Schroeder 等人, 2000, *EMBO J.* 19:1-9)。

从 HeLa 细胞制备的核糖体与测试化合物(浓度 100 μM)一起孵育, 然后以化学修饰剂(硫酸二甲酯[DMS]或凯托沙[KE])处理。化学修饰后, 以苯酚-氯仿萃取 rRNA, 乙醇沉淀, 通过杂交至三个 rRNA 不同区域的末端标记寡核苷酸进行引物延伸反应分析, 在 6%聚丙烯酰胺凝胶上进行分辨。用于引物延伸的探针涵盖了整个 18S(7 个寡核苷酸引物)、28S(24 个寡核苷酸引物)和 5S(一个引物)rRNA。这些实验中的对照包括 DMSO(由 DMSO 诱导的 rRNA 可及性变化的对照)、巴龙霉素(18S rRNA 结合的标记)以及茴香霉素(28S rRNA 结合的标记)。

6.4 实施例 4: 基于细胞的疾病模型中的提前终止密码子的通读

为了说明无义抑制化合物对特定的遗传性疾病中改变的 mRNA 的影响, 以测试化合物(20 μM)处理在氨基酸 1282 处(W1282X)具有无义密码子的支气管上皮细胞系, 并用 SPQ 测定法监测 CFTR 功能作为 cAMP-激活的氯离子通道(Yang 等人, 1993, *Hum Mol Genet.* 2(8): 1253-1261 和 Howard

等人, 1996, *Nat Med.* 2(4):467-469)。这些实验证实了这些细胞的 cAMP 处理导致 SPQ 荧光的上升, 这与 CFTR-介导的卤物流出相一致。当细胞未以测试化合物处理时, 或当该细胞未以 cAMP 刺激时, 未观察到荧光的上升。这些结果表明该种含无义的等位基因在以测试化合物处理后表达的全长 CFTR 具有和 cAMP-刺激的阴离子通道具有相同作用, 从而证实了囊性纤维化细胞系在以测试化合物处理时提高了氯离子通道活性。

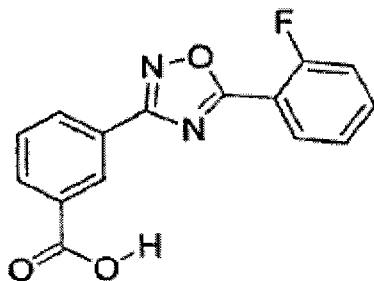
6.5 实施例 5: 含无义的 MDX 小鼠的原代细胞在以无义抑制剂处理后表达全长肌营养不良蛋白

据显示 mdx 小鼠中导致 427 kDa 肌营养不良多肽提前终止的突变是在外显子 23 的位置 3185 处的 C 转变成了 T(Sicinski 等人, 1989, *Science* 244(4912):1578-1580)。参照已有的描述从 1 天大 mdx 小鼠制备小鼠原代骨骼肌培养物(Barton- Davis 等人, 1999, *J Clin Invest.* 104(4):375-381)。在测试化合物(20 μ M)存在下将细胞培养 10 天。每四天更换培养基, 并参照已有描述通过免疫染色检测成肌细胞培养物中肌营养不良蛋白的存在(Barton-Davis 等人, 1999, *J Clin Invest.* 104(4):375-381)。使用未经稀释的针对肌营养不良蛋白 C 末端(F19A12)的一级单克隆抗体, 并将结合了若丹明的抗小鼠 IgG 作为二抗。F19A12 抗体将检测通过无义密码子抑制生成的全长蛋白。在宾夕法尼亚大学通过 Leica DMR 显微镜、数码相机和相关的成像软件观察染色。

6.6 实施例 6: MDX 小鼠中提前终止密码子的通读

根据已有的描述 (Barton-Davis 等人, 1999, *J Clin Invest.* 104(4):375-381), 将测试化合物通过植入麻醉小鼠皮下的 AlZet 渗透泵输入。施用两种测试化合物剂量。以庆大霉素作为阳性对照, 并以仅装有溶剂的泵作为阴性对照。向泵中加入适当的化合物, 使得计算的组织所暴露的剂量为 10 μM 和 20 μM 。庆大霉素的浓度经计算达到约 200 μM 的组织暴露。在初期实验中, 将小鼠处理 14 天, 随后以克他命麻醉动物并放血。然后切下实验动物的胫前(TA)肌, 冷冻, 并用于对结合进入横纹肌肌的营养不良蛋白进行免疫荧光分析。TA 肌肉中肌营养不良蛋白的存在可参照已有描述通过免疫染色进行检测 (Barton-Davis 等人, 1999, *J Clin Invest.* 104(4):375-381)。

6.7 实施例 7: 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸的制备



向 3-氟基苯甲酸(44.14 g, 300 mmol)的 DMF 溶液(0.6 L)添加 K_2CO_3 (62.19 g, 450 mmol), 并在室温下搅拌 30 分钟。在 20 分钟内向该悬浮液添加碘代甲烷(28 mL, 450 mmol), 将反应混合物在室温下继续搅拌 4 小时。将反应混合物注入 1.2 L 冰水, 搅拌 30 分钟, 并滤出沉淀物。将白色滤饼溶解于甲醇(70 mL), 并在冷水中重新沉淀。以 79% 的产率获得白色粉末状的目标产物(38 g, LC/UV 纯度为 99%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.85 (2H), 8.28 (1H), 8.02 (1H), 4.17 (3H)。

向 3-氟基苯甲酸甲酯(50 g, 310 mmol)的乙醇溶液(500 mL)在室温下添加 50%羟胺(41 mL, 620 mmol)水溶液。将反应混合物在 100°C 下搅拌 1 小时, 并减压去除溶剂。将油状残留物溶解于 20/80 乙醇/甲苯(50 mL×2), 然后再次浓缩。获得 98%纯度(LC/UV)的白色粉末状的目标酯(61 g, 定量产率)。¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.76 (1H), 8.24 (1H), 7.82 (2H), 7.51 (1H), 5.92 (2H), 3.82 (3H)。

此时向 3-(N-羟基亚胺甲酰基)-苯甲酸甲酯(60 g, 310 mmol)的无水 THF 溶液(200 mL)中 5°C 下添加二异丙基乙胺(75 mL, 434 mmol), 然后在 20 分钟内向该混合物添加 2-氟苯甲酰氯(48.1 mL, 403 mmol)。将该反应混合物在室温下搅拌 1 小时。滤出沉淀物并减压浓缩滤出液。将残留物溶解于乙酸乙酯(400 mL), 然后用水洗涤(200 mL×2)。减压去除溶剂, 在 60%乙酸乙酯的己烷溶液中将目标产物结晶, 得到白色固体状的目标产物(81 g, 83%产率)。¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.18 (1H), 8.03 (3H), 7.48 (2H), 7.18 (2H), 5.61 (2H), 3.82 (3H)。

使用 Dean-Stark 装置将溶于甲苯(500 mL)的 44 g 的 3-(N-2-氟苯甲酰亚胺甲酰基)-苯甲酸甲酯在 130°C 下回流 4 小时。将反应混合物在 5°C 下搅拌 18 小时。滤出白色沉淀物并浓缩滤出液, 再次在甲苯中结晶。获得 99%纯度(LC/UV)的白色粉固体状的目标噁二唑(38 g, 92%产率)。¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.91 (1H), 8.38 (1H), 8.15 (2H), 7.62 (2H), 7.35 (2H), 3.95 (3H)。

向 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸甲酯(3.3 g, 11 mmol)的 THF 溶液(40 mL)添加 1.5M NaOH 水溶液(10 mL, 14 mmol)。将反应混合物在 100°C 下回流 2 小时。去除有机溶剂, 并用水(50 mL)稀释该水溶液。然后以 HCl 水溶液酸化。滤出白色沉淀物, 以冰水洗涤该白色滤饼, 然后用

冻干机干燥。获得 98% 纯度(LC/UV)的白色粉末状的目标酸(3.0 g, 96% 产率)。熔点 242°C; IR 3000 (芳香的 C-H), 1710 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$) δ 8.31 (1H), 8.18 (2H), 8.08 (1H), 7.88 (2H), 7.51 (2H); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$) δ 172.71, 167.38, 166.48, 161.25, 135.80, 132.24, 131.79, 131.79, 131.08, 130.91, 129.81, 127.76, 125.48, 117.38, 111.70; $^{19}\text{F-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$) δ 109.7。

3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸的药学上可接受的盐可通过本领域技术人员已知的方法进行制备。钠盐可按如下制备。向 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸甲酯 (33 g, 111 mmol) 的 THF 溶液(400 mL)添加 1.5M NaOH 水溶液(100 mL, 144 mmol)。将反应混合物在 100°C 下回流 2 小时。减压去除有机溶剂, 并在 5°C 下搅拌该水溶液 2 小时。滤出白色沉淀物, 浓缩滤出液, 并再次在水中沉淀。以冰水洗涤该白色滤饼, 然后用冻干机干燥。获得 98.6% 纯度(LC/UV)的白色粉末状的目标盐(33 g, 96% 产率)。

6.8 实施例 8: 口服治疗无义突变介导的囊性纤维化

本实施例提供了可用于治疗无义突变介导的囊性纤维化的给药方案。

3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物作为香草风味的粉末提供以用于悬浮。该药物在现行良好生产规范(cGMP)条件下生产。该制剂可包括结合剂和悬浮剂、表面活性剂、以及各种在生产过程中提供辅助的少量赋形剂。该混合物可被包装于 40 mL 塑料(高密度聚乙烯[HDPE])瓶中, 用铝箔封口和白色塑料的、对儿童安全的盖子进行密封。每个瓶中可包含或 125、250 或 1000 mg(总制剂总重量的 25.0%)的药物物质。可替代地, 该混合物可制备成如实施例 12 所述的药囊

剂剂型。赋形剂(及其相对总剂型重量的比例)包括悬浮剂(Litesse® Ultra [精制右旋糖]-25.7%)、可提供味道掩饰的结合剂(甘露醇-25.0%)、表面活性剂(聚乙二醇 3350-12.8%和 Lutrol® micro F 127(poloxamer 407 粉)-3.7%)、崩解剂(交聚维酮-5.0%), 以及每种存在的量少于 2%的其它赋形剂(羟基乙基纤维素、香草香精、硬脂酸镁[非牛]、以及硅胶)。瓶标签上注明药物物质的种类、批次、药物物质的量、以及储藏条件(例如, 室温或 5°C 至 8°C 冷藏)。

所述药物物质的剂量基于每公斤患者体重的药物毫克数。药物物质的剂量可大约与现有瓶子的大小保持一致。该给药方案确保总的实际给药剂量不比理想剂量 <50 mg 或 >250 mg (即始终在 5 mg/kg 的浮动(assigned)剂量水平之内)。例如, 体重 40 kg 的患者以 4 mg/kg 的剂量进行治疗时的计算剂量为 160 mg。该患者应该接受一个 250 mg 瓶(总计 250 mg)或 6.25 mg/kg 的剂量。这一相同患者在晚上以 8 mg/kg 的剂量治疗时, 则计算剂量应该为 320 mg, 其应该接受两个 250 mg 瓶(总计 500 mg)或 12.5 mg/kg 的剂量。这一相同患者在晚上以 10 mg/kg 的剂量治疗时, 则计算剂量为 400 mg, 其应该接受两个 250 mg 瓶(总计 500 mg)或 12.5 mg/kg 的剂量。这一相同患者在晚上以 20 mg/kg 的剂量治疗时, 则计算剂量为 800 mg, 其应该接受一个 1000 mg 瓶(总计 1000 mg)或 25 mg/kg 的剂量。

该药物产品的重新配制和给药均在室温下进行。在重新配制前无需对药物产品进行特定的加温。该药物产品可以用任何药学上可接受的溶剂(例如, 水、牛奶、碳酸饮料、果汁、苹果酱、婴儿食品或婴儿配方)进行重新配制。对于每个 250 mg 瓶, 加入~10 mL 的水或其它药学上可接受的溶剂以在总悬浮液中形成约 25 mg/mL 的浓度。对于每个 1000 mg 瓶, 加入~20 mL 的水或其它药学上可接受的溶剂以在总悬浮液中形成约 50 mg/mL 的浓

度。同样可以制备约 150 mg/mL 的悬浮液。当水或其它药学上可接受的溶剂被加入到干的研究试剂中后，立即盖上瓶子并用手剧烈振荡约 60 秒，以形成均匀的悬浮液。尽管该悬浮液可在摄入前于最初的塑料瓶中保存达 24 小时，但推荐在重新配制后的短时间内摄入该药物。如果在重新配制和给药之间有超过 15 分钟的间隔，则应用手剧烈振荡该瓶约 60 秒。

可持续施用治疗，只要患有或可能患有囊性纤维化的患者需要。表 11 列举了 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物的示例性每日给药方案，其中每天以 6-、6-和 12-小时(例如，-7:00 AM、-1:00 PM 和-7:00 PM)的间隔随食物施用三次。在具体的实施方式中，该患者参照表 11 连续 14 天施用 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物，随后 14 天无治疗，接着给药另外 14 天，随后又一个 14 天无治疗。在另一具体实施方式中，该患者参照表 11 连续 14 天以 4 mg/kg、4 mg/kg 和 8 mg/kg 的三个每日剂量施用 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物，随后 14 天无治疗，随后以 10 mg/kg、10 mg/kg 和 20 mg/kg 的三个每日剂量给药另外 14 天，随后又一个 14 天无治疗。在某些实施方式中，每天采用表 11 所列举的单一每日给药方案。在另一实施方式中，可在不同的天内采用表 11 列举的不同给药方案。

表 11. 给药方案

	1	2	3
方案	TID 随食物给药	TID 随食物给药	TID 随食物给药
安排	连续每日施用	连续每日施用	连续每日施用
时间			剂量
~7:00 AM	4 mg/kg	7 mg/kg	10 mg/kg
~1:00 PM	4 mg/kg	7 mg/kg	10 mg/kg
~7:00 PM	8 mg/kg	14 mg/kg	20 mg/kg

缩写：TID=每日三次

患者优选在就餐后 30 分钟内摄入药物；理想情况下该药物应当以约 6-、6-和 12-小时的间隔(例如，早餐后的~7:00 AM、午餐后的~1:00 PM 以及晚餐后的~7:00 PM)摄入。患者通过如下方式摄入该药物：将所需量的水或其它药学上可接受的溶剂注入每个瓶中，将每个瓶子加盖并振荡约 60 秒，然后摄入每次服药所需量和大小的瓶子中的内含物。重新配制药物的整个剂量应当一次摄入。摄入后，用水或其它药学上可接受的溶剂将给药瓶加至半满，加盖并振荡，然后由患者摄入该瓶中的这种水或其它药学上可接受的溶剂。该洗涤步骤进行一次。在某些实施方式中，该药物作为药囊剂提供。在这些实施方式中，称量或测定该药物的适当量，并在施用前与适当的药学上可接受的溶剂合并。

6.9 实施例 9：口服治疗无义突变介导的杜兴型肌营养不良症

本实施例提供了可用于治疗无义突变介导的杜兴型肌营养不良症的给药方案。

3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物作为香草风味的粉末提供以用于悬浮。该药物在现行良好生产规范(cGMP)条件下生产。该制剂可包括结合剂和悬浮剂、表面活性剂、以及各种在生产过程中提供辅助的少量赋形剂。该混合物可被包装于 40 mL 塑料(高密度聚乙烯[HDPE])瓶中，用铝箔封口和白色塑料的、对儿童安全的盖子进行密封。每个瓶中可包含或 125、250 或 1000 mg(总制剂总重量的 25.0%)的药物物质。可替代地，该混合物可制备成如实施例 12 所述的药囊剂剂型。赋形剂(及其相对总剂型重量的比例)包括悬浮剂(Litesse® Ultra [精

制右旋糖]-25.7%)、可提供味道掩饰的结合剂(甘露醇-25.0%)、表面活性剂(聚乙二醇 3350-12.8%和 Lutrol® micro F 127(poloxamer 407 粉)-3.7%)、崩解剂(交聚维酮-5.0%)，以及每种存在的量少于 2%的其它赋形剂(羟基乙基纤维素、香草香精、硬脂酸镁[非牛]、以及硅胶)。瓶标签上注明药物物质的种类、批次、药物物质的量、以及储藏条件(例如，室温或 5°C 至 8°C 冷藏)。

该药物的剂量基于每公斤患者体重的药物毫克数。应当计算将向患者施用的药物总毫克数相对应的总体积。例如，如果一位 30 kg 的患者需要 4 mg/kg，则待传递的剂量为 $30 \times 4 = 120$ mg。该患者应该使用 250 mg 剂量瓶进行给药。由于在该种 250 mg 剂量瓶中每 mL 的悬浮液包含 $250/10 = 25$ mg 该种药物，因此该患者在每个 4 mg/kg 剂量下应取用 $120/25 = \sim 5$ mL 该悬浮液。同一患者在晚上以 8 mg/kg 剂量治疗时，其计算剂量为 240 mg，并应该接受一个 250 mg 瓶(10 mL 悬浮液)。这些体积的各个剂量的悬浮液应该通过塑料口服给药注射器而从药物瓶中取出。在转移 <10 mL(针对 250 mg 瓶)或 <20 mL(针对 1000 mg 瓶)的部分体积时，应当以适当类型和大小的给药注射器(例如，Baxa, Exacta-Med 校正的无乳胶的塑料口服给药注射器)从实验药物瓶中取出预定量并使用同一注射器给药。在重新配制后的同一 24 小时内，可从悬浮液的相同瓶中取出 >1 剂量；然而，重新配制的药物不应为了使用同一物质向同一患者多次给药的目的而储存超过 24 小时。如果在 1 天内需要摄入的药物总量超过 10 mL(针对 250mg 瓶)或 20 mL(针对 1000mg 瓶)重新配制的药物，则应在每次给药时使用新一瓶药物。

针对 TID 给药方案，可施用如下药物剂量：

TID 给药方案：125 mg 药囊剂中每次服药所

摄入的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸的量

体重范围 (kg)	早餐剂量 (4mg/kg)	午餐剂量 (4mg/kg)	晚餐剂量 (8mg/kg)
25-35	1	1	2
36-44	1	1	3
45-53	2	2	3
54-66	2	2	4
67-78	2	2	5
79-89	3	3	5
90	3	3	6
中间剂量 [范围]	4mg/kg [3-6mg/kg]	4mg/kg [3-6mg/kg]	8mg/kg [7-10mg/kg]

针对 BID 给药方案，可施用如下药物剂量：

BID 给药方案：125 mg 药囊剂中每次服药所

摄入的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸 的量

体重范围 (kg)	早餐剂量 (8mg/kg)	晚餐剂量 (8mg/kg)
25-35	2	2
36-44	3	3
45-53	3	3
54-66	4	4
67-78	5	5
79-89	5	5
90	6	6
中间剂量 [范围]	8mg/kg [7-10mg/kg]	8mg/kg [7-10mg/kg]

该药物产品的重新配制和给药均在室温下进行。在重新配制前无需对药物产品进行特定的加温。该药物产品可以用任何药学上可接受的溶剂(例如，水、牛奶、碳酸饮料、果汁、苹果酱、婴儿食品或婴儿配方)进行重新配制。对于每个 250 mg 瓶，加入~10 mL 的水或其它药学上可接受的溶剂以在总悬浮液中形成约 25 mg/mL 的浓度。对于每个 1000 mg 瓶，加入~20 mL 的水或其它药学上可接受的溶剂以在总悬浮液中形成约 50 mg/mL 的浓度。当水或其它药学上可接受的溶剂被加入到干的研究试剂中后，立即盖上瓶子并用手剧烈振荡约 60 秒，以形成均匀的悬浮液。尽管该悬浮液可在

摄入前于最初的塑料瓶中保存达 24 小时，但推荐在重新配制后的短时间内摄入该药物。如果在重新配制和给药之间有超过 15 分钟的间隔，则应再次用手剧烈振荡该瓶约 60 秒。

可持续施用治疗，只要患有或可能患有有杜兴型肌营养不良症的患者需要。表 12 列举了 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物的示例性每日给药方案，其中每天以 12-小时(例如，-7:00 AM 和-7:00 PM)的间隔随食物施用两次，或以 6-、6-和 12-小时(例如，-7:00 AM、-1:00 PM 和-7:00 PM)的间隔随食物施用三次。在具体实施方式中，该患者连续 14 或 28 天以表 12 所述的给药方案中的一种施用 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在某些实施方式中，每天采用表 12 所述的单一每日给药方案。在其它实施方式中，可在不同的天内采用表 12 所述的不同给药方案。

表 12. 给药方案

方案 安排 时间	1 BID 随食物施用 连续每日施用	2 TID 随食物施用 连续每日施用	3 TID 随食物施用 连续每日施用	4 TID 随食物施用 连续每日施用
		剂量		
~7:00 AM	8 mg/kg	4 mg/kg	7 mg/kg	10 mg/kg
~1:00 PM	0 mg/kg	4 mg/kg	7 mg/kg	10 mg/kg
~7:00 PM	8 mg/kg	8 mg/kg	14 mg/kg	20 mg/kg

缩写：TID=每日三次

患者优选在就餐后 30 分钟内摄入药物；理想情况下该药物应当以约 6-、6-和 12-小时的间隔(例如，早餐后的~7:00 AM、午餐后的~1:00 PM 以及晚餐后的~7:00 PM)摄入。患者通过如下方式摄入该药物：将所需量的水或其它药学上可接受的溶剂注入每个瓶中，将每个瓶子加盖并振荡约 60 秒，使用口服给药注射器从该瓶中取出适当量并直接从该给药注射器中摄入内含

物。对应于所述剂量的重新配制药物的整个计算体积应当一次摄入。在药物摄入后，应以与剂量体积等体积的水或其它药学上可接受的溶剂注入该给药注射器，并由患者摄入。该洗涤步骤应进行一次。在某些实施方式中，该药物作为药囊剂提供。在这些实施方式中，称量或测量该药物适当量，并在施用前与适当的药学上可接受的溶剂合并。

治疗的效力可通过测定足部肌肉趾短伸肌(EDB)活检组织中的肌营养不良蛋白水平相对于基线测量值的变化来确定。

6.10 实施例 10: 制备 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物的无味剂型

3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物可提供为粉末以用于悬浮。该药物在现行良好生产规范(cGMP)条件下生产。该药物可与结合剂和悬浮剂、表面活性剂、以及各种在生产过程中提供辅助的少量赋形剂充分混合。该混合物被包装于 40 mL 塑料(高密度聚乙烯[HDPE])瓶中，该瓶以铝箔封口和白色塑料的、对儿童安全的盖子进行密封。每个瓶子包含约 35 mg、约 70 mg、约 125 mg、约 140 mg、约 175 mg、约 250 mg、约 280 mg、约 350 mg、约 560 mg、约 700 mg、约 1000 mg 或约 1400 mg 的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。赋形剂(及其相对总剂型重量的比例)任选地包括悬浮剂(Litesse® Ultra [精制右旋糖]-25.7%)、可提供味道掩饰的结合剂(甘露醇-25.0%)、表面活性剂(聚乙二醇 3350-12.8%和 Lutrol® micro F 127(poloxamer 407 粉)-3.7%)、崩解剂(交聚维酮-5.0%)，以及每种存在的量少于 2%的其它赋形剂(硅石粉、羟基乙基纤维素、硬脂酸

镁[非牛]、以及硅胶)。瓶标签上注明药物物质的种类、批次、药物物质的量、以及储藏条件(例如, 室温或 5°C 至 8°C 冷藏)。在施用前, 该药物产品可在适当体积的药学上可接受的溶剂(例如, 水、牛奶、碳酸饮料、果汁、苹果酱、婴儿食品或婴儿配方)中重新配制。

6.11 实施例 11: 制备 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物的调味剂型

3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物可提供为香草风味(例如, 通过添加香草萃取物)的粉末以用于悬浮。该药物在现行良好生产规范(cGMP)条件下生产。该药物可与结合剂和悬浮剂、表面活性剂、以及各种在生产过程中提供辅助的少量赋形剂充分混合。该混合物被包装于 40 mL 塑料(高密度聚乙烯[HDPE])瓶中, 该瓶以铝箔封口和白色塑料的、对儿童安全的盖子进行密封。每个瓶子包含约 35 mg、约 70 mg、约 125 mg、约 140 mg、约 175 mg、约 250 mg、约 280 mg、约 350 mg、约 560 mg、约 700 mg、约 1000 mg 或约 1400 mg 的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。赋形剂(及其相对总剂型重量的比例)任选地包括悬浮剂(Litesse® Ultra [精制右旋糖]-25.7%)、可提供味道掩饰的结合剂(甘露醇-25.0%)、表面活性剂(聚乙二醇 3350-12.8%和 Lutrol® micro F 127(poloxamer 407 粉)-3.7%)、崩解剂(交聚维酮-5.0%), 以及每种存在的量少于 2%的其它赋形剂(硅石粉、羧基乙基纤维素、香草香精、硬脂酸镁[非牛]、以及硅胶)。瓶标签上注明药物物质的种类、批次、药物物质的量、以及储藏条件(例如, 室温或 5°C 至 8°C 冷藏)。在施用前, 该药物产品可在适当体积的药学上可接

受的溶剂(例如, 水、牛奶、碳酸饮料、果汁、苹果酱、婴儿食品或婴儿配方)中重新配制。

6.12 实施例 12: 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物的药囊剂剂型

使用囊状物或扁囊包装所述混合物, 该囊状物或扁囊具有可包括纸层、铝箔层和沙林(surlyn)层的多重复合层。每个扁囊可包含约 125 mg、约 250 mg、约 500 mg 或约 1000 mg 的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。赋形剂(及其相对总剂型重量的比例)任选地包括表 13 和表 14 所列其中之一。

表 13. 配方

成分	重量%
3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其 药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物	25.0
Litesse® Ultra	24.75
聚乙二醇	12.8
Lutrol® Micro	3.7
甘露醇	25.0
羟乙基纤维素	1.5
香草香精	0.75
交聚维酮	5.0
硅石粉	0.5
硬脂酸镁	0.5
滑石	0.5

表 14. 配方

成分	重量%
3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸或其 药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物	25.0
Litesse® Ultra	25.65
聚乙二醇	12.8

Lutrol® Micro	3.7
甘露醇	25.0
羟乙基纤维素	1.5
香草香精	0.75
交聚维酮	5.0
硅石粉	0.1
硬脂酸镁	0.5

然后在药囊剂上添加标签以注明药物物质的种类、批次、药物物质的数量、以及储藏条件(例如, 5°C至 8°C冷藏)。在施用前, 可在适当体积的药学上可接受的溶剂(例如, 水、牛奶、碳酸饮料、果汁、苹果酱、婴儿食品或婴儿配方)中重新配制适当量的药物产品。

6.13 实施例 13: 跨上皮电位差(TEPD)测定

跨上皮电位差(TEPD)(也称为鼻部电位差)测定通过评价跨上皮生物电属性可提供分泌上皮细胞中直接的钠和氯运输的灵敏评价(Knowles 等人, 1981, *N. Engl. J. Med.* 305(25): 1489-95; Knowles 等人, 1995, *Hum. Gene Ther* 5:445)。TEPD 使用标准化的技术在每个鼻孔中进行(Standaert 等人, 2004, *Ped Pulm.* 57:385-92)。在该方法中, 采用小塑料导管来评价鼻孔中鼻粘膜细胞的跨外细胞膜电位差。TEPD 值以毫伏或 mV 表示。电负性等于或负于-5.0 mV 的氯电导通常认为在正常范围内。TEPD 评价在下鼻甲的内层鼻上皮细胞上进行, 因为这些细胞比下气道内层的呼吸道上皮细胞更容易接近, 且已经表明具有相同的离子运输特征(Knowles 等人, 1981, *Am. Rev. Respir. Dis.* 124(4):484~90)。TEPD 评价还可在直肠上皮细胞和下呼吸道上皮细胞上进行。由于 CFTR 蛋白在运输氯离子通过细胞膜中具有作用且由于缺失该种蛋白, 因此囊性纤维化患者具有异常的 TEPD 氯电导。作为终点, TEPD 的

优势在于它可以检测到氯运输变化,这是在气道细胞中的 CFTR 存在、功能活性和顶端位置的数量整合。此外,CFTR 活性的直接测量不可能受到 CF 支持性治疗或姑息治疗的影响(可能无需全身施用氨基糖苷抗菌素)。重要的是,有证据表明 TEPD 值与肺功能障碍和放射学异常的程度相关(Ho 等人,1997, *Eur. Respir. J.* 10(9):2018-22; Fajac 等人,1998, *Eur. Respir. J.* 12(6):1295-300; Sermet-Gaudelus 等人,2005, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171(9):1026-1031)。具体地,经证实异丙肾上腺素诱导的 CFTR 氯活性的 TEPD 评价在测定 FEV1 和放射性评分上比基因型具有更好的预测价值(Ho 等人,1997, *Eur Respir J.* 10(9):2018-22)。在基线条件下,TEPD 评价的氯离子通道的活性在患有 CF 的患者中极不可能自发地正常化;在 TEPD 评价氯离子通道活性方面观察的任何改善预期可特别地表示 CFTR 纠正疗法的药理学活性。因此,它已经成为纠正 CFTR 障碍的 1-2 期药理和基因替代研究的主要终点(Peckham 等人,1995, *AJ. Clin Sci (London).* 89 (3): 277-84; Wilschanski 等人,2003, *N. Engl. J. Med.* 349(15): 1433-41)。

6.14 实施例 14: CFTR 免疫荧光

可通过标准化技术从患者的各个鼻孔采集和处理鼻粘膜刮除物,以通过免疫荧光或 CFTR mRNA 定量来进行评价 CFTR 蛋白(Clancy 等人,2001, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163(7): 1683-92; Amaral 等人,2004, *J. Cyst. Fibros.* 3 Suppl 2:17-23)。普通上皮细胞(例如,来自于鼻粘膜刮除物)的免疫荧光染色表面大多数 CFTR 蛋白存在于顶端表面。在无义突变介导的 CF 动物模型中或在患有无义突变介导的 CF 的患者中,没有观察到 CFTR 染色(例如,在对提前终止突变纯合的患者中)或主要在核周区域观察到 CFTR 染色

(例如,在具有阻止正常 CFTR 胞内运输的 $\Delta F508$ 突变的患者中)。在动物模型中和患者中,功能野生型或非野生型 CFTR 蛋白的成功生成与通过免疫荧光检测到的顶端表皮 CFTR 蛋白的再现相关(Clancy 等人, 2001, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163(7):1683-92; Wilschanski 等人, 2003, *N. Engl. J. Med.* 349(75): 1433 -41)。

6.15 实施例 15: 肺功能试验

肺功能试验(包括 FEV1、FVC 和 MEF25-75)以标准肺活量测定法进行检测。肺功能(包括 MEF25-75、FVC、以及特别地 FEV1)评价已被认为是 CF 患者的确定性临床终点(Food and Drug Administration, 第 62 版, Anti-Infective Drugs Advisory Committee. Discussion of NDA for tobramycin solution for inhalation (Tobi®) for the management of cystic fibrosis patients. November, 1997; Tiddens, 2002, *Pediatr. Pulmonol* 34(3): 228-31)。已经表明 FEV1 和其它肺功能试验检测与疾病严重性相关,其根据医疗服务利用情况和 IV 抗生素的使用情况预测疾病发病率,并显示与 CF 有关的死亡风险(Food and Drug Administration,第 62 版, Anti-Infective Drugs Advisory Committee. Discussion of NDA for tobramycin solution for inhalation (Tobi®) for the management of cystic fibrosis patients. November, 1997)。肺功能试验易于实施(即使对于仅 7 岁大的患者),并采用广泛使用的标准设备和技术。可使用既定的与患者年龄、身高和性别有关的规范性方程进行解读。认为 FEV1 的改善定量显示了 CF 中有意义的临床益处,并用作 α 链道酶和吸入得妥布霉素的注册审批的基础(Food and Drug Administration, 第 62 版, Anti-Infective Drugs Advisory Committee. Discussion of NDA for tobramycin

solution for inhalation (Tobi®) for the management of cystic fibrosis patients. November, 1997)。

6.16 实施例 16: 用 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸口服治疗无义突变介导的囊性纤维化的 2 期研究

患者必须满足以下所有条件, 方可有资格被招募进入本研究:

1. 基于确定性异常出汗试验的文件证明诊断患有 CF(通过毛果芸香碱电离子导入法得到汗水氯化物 >60 mEq/升(LeGrys, Sweat testing: Sample collection and quantitative analysis: Approved guidelines—第 2 版, National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000; 第 20 卷: 14));
2. 通过 TEPD 测得异常氯化物分泌(比使用无氯阿米洛利和异丙基肾上腺素测得的氯化物分泌 -5 mV TEPD 评价更正);
3. 在 *cftr* 基因的一个等位基因中存在无义突变;
4. 有文件表明已经进行过 *cftr* 基因测序;
5. 年龄 ≥ 18 岁;
6. 体重 ≥ 40 kg;
7. FEV1 \geq 根据年龄、性别和身高的预测值的 40% (Knudson 标准)(Knudson, 1983, Am. Rev. Respi.r Dis. 127: 725-734);
8. 室内空气下血氧饱和度(通过脉搏血氧测定法测定) $\geq 92\%$;
9. 在研究药物施用和随访期中, 男性和女性患者愿意(如未手术绝育)禁止性交或者采用避孕屏障或医学避孕方法;
10. 怀孕测试为阴性(对于有生育可能的女性);

11. 愿意并有能力遵守定期访问、药品施用计划、研究程序(包括 TEPD 测量、临床实验室试验以及 PK 取样)、以及研究限制;

12. 能够提供书面知情同意书; 以及

13. 亲自签署并注明日期的知情同意的证明文件, 表明患者已被告知该试验的所有相关方面。

出现下列任一条件时不得将患者招募进入本研究:

1. 根据研究者的观点, 以前的或现发生的医学疾病(例如, 伴发病、精神疾病、酒精中毒、药物滥用)、病史、体检发现、ECG 发现或实验室异常可能对患者安全有不利影响、使治疗期或随访期不可能完成或可能影响研究结果的评价;

2. 在研究治疗开始前两周内发生急性疾病, 包括急性上或下呼吸道感染;

3. 在研究治疗开始前2月内有肺病主并发症的病史(包括近期大量咯血或气胸);

4. 胸部 X 光筛选异常, 其表明具有临床意义的非 CF 的活跃性肺病, 或者新的重大异常(如肺不张或胸腔积液), 其可能是临床意义的从属于 CF 的活性肺病的指征;

5. 乙型肝炎表面抗原、丙型肝炎抗体检测或人类免疫缺陷病毒(HIV) 检验阳性;

6. 血色素 <10 g/dL;

7. 血清白蛋白 <2.5 g/dL;

8. 肝功能异常(血清总胆红素 $>$ 正常的上限, 或血清 ALT、AST 或 GGT $>$ 大于正常上限的 2.0 倍);

9. 肾功能异常(血清肌氨酸酐>正常上限的 1.5 倍);
10. 怀孕或哺乳;
11. 固体器官或血液移植史;
12. 在试验治疗开始前 14 天内接触另一研究药物;
13. 正参与任何其它的治疗性临床试验;
14. 正使用噻唑烷二酮过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPAR γ)激动剂, 例如, 罗格列酮(Actos®或同等药物)或吡格列酮(Actos®或同等药物);
15. 在试验治疗开始前 14 天内改变了鼻内药物治疗(包括使用皮质类固醇、色甘酸、异丙托溴铵、苯肾上腺素或羟甲唑啉);
16. 在试验治疗开始前 14 天内改变了全身性或吸入性皮质类固醇治疗;
17. 在试验治疗开始前 14 天内或试验治疗期间使用或需要吸入性庆大霉素或阿米卡星; 或者
18. 在试验治疗开始前 14 天内需要全身性氨基糖甙类抗生素。

3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸以本发明所述的剂型提供。参照下文的 56 日计划向 15 名患者(12 名来自于在以色列进行的 2 期试验, 3 名来自在美国进行的 2 期试验; 七名患者为男性, 8 名为女性; 患者的平均年龄为 22 岁; 且所有的患者具有囊肿性纤维化的多种迹象和症状, 包括一定程度的肺功能障碍)口服施用 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸: 以 4 mg/kg、4 mg/kg 和 8 mg/kg 每天三次(TID)施用 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸 14 天, 然后 14 天无治疗(周期 1, 共 28 天), 然后以 10 mg/kg、10 mg/kg 和 20 mg/kg 每天三次(TID)施用 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸 14 天, 然后 14 天无治疗(周期 2, 共 28 天)。

临床终点可通过以上所述的方法进行评价。在治疗前以及周期 1 和周期 2 的 14 日和 28 日进行 TEPD 检测。在治疗前以及周期 1 和周期 2 的 14 日和 28 日从各名患者的各鼻孔采集鼻粘膜刮除物。在以色列所进行的研究中于治疗前、周期 2 的第 1 日、周期 1 的 13 或 14 日以及周期 2 的 13 日或 14 日进行肺部检测，包括测定 FEV₁、FVC 和 MEF₂₅₋₇₅；在美国进行的研究中于治疗前以及周期 2 的 13 或 14 日检测相同的参数。

*TEPD 氯电导的平均变化。*这是各个研究参与者在治疗期开始至结束的 TEPD 氯电导变化的平均值。例如，假设三名参与者的 TEPD 氯电导的变化分别为 -7.0 mV、-2.0 mV 和 -9.0 mV，则这三个参与者的 TEPD 氯电导的平均变化为 -6.0 mV。

*具有氯电导响应的患者百分比。*这是在使用 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸治疗的末期显示了 TEPD 氯电导响应的患者的百分比。针对本试验的目的，氯电导响应被定义为至少 -5 mV 的 TEPD 氯电导提高。例如，对于基线 TEPD 氯电导值为 +1.0 mV，治疗末期 TEPD 氯电导值为 -6.0 mV 的患者，其 TEPD 氯电导提高了 -7.0 mV，这表示具有氯电导响应。

*TEPD 氯电导值提高至正常范围的患者百分比。*如上文指出，电负性等或负于 -5.0 mV 的氯电导通常认为在正常范围内。这样，基线 TEPD 氯电导值为 +1.0 mV 的患者可被认为具有异常值，因为该值比 -5.0 mV 更具电正性。如果在治疗末期，该患者的 TEPD 氯电导值提高为 -6.0 mV，表示该值被提高至正常范围，因为该提升后的值比 -5.0 mV 更具电负性。

根据患者性别、年龄和身高，研究入口的平均 FEV₁ 为正常值的 66%，而研究入口的平均 FVC 为正常值的 80%。本分析中 15 名患者中的 14 人具有铜绿假单胞菌的气道定殖(囊性纤维化患者的常见细菌感染，能导致严重

肺炎)。15名患者中的14人还患有胰腺功能不全并需要慢性胰酶替代疗法。患者具有较低的体重，研究入口的平均体重为58.3 kg。

表15显示了15名患者的TEPD结果。各个测定的结果分别显示为鼻孔最佳值和两个鼻孔平均值。过去TEPD测验的结果通常显示为鼻孔最佳值。然而，由囊性纤维化治疗剂开发网络最近制定的指南推荐同时显示两种TEPD结果。可明显看到具有不同类型的CFTR基因无义突变的患者中TEPD氯电导提高。

表15

<u>TEPD 结果</u>	<u>较低剂量水平</u>		<u>较高剂量水平</u>	
	<u>结果</u>	<u>p-值</u>	<u>结果</u>	<u>p-值</u>
TEPD 氯电导的平均变化:				
鼻孔最佳值	-9.0 mV	<0.001	-6.4 mV	0.010
两个鼻孔平均值	-6.7 mV	<0.001	-4.4 mV	0.023
TEPD 氯电导提高 \geq -5 mV 的患者数:				
鼻孔最佳值	9/15 (60%)	<0.001	8/15 (53%)	<0.001
两个鼻孔平均值	6/15 (40%)	0.005	7/15 (47%)	<0.001
TEPD 氯电导提高至正常的患者数:				
鼻孔最佳值	8/15 (53%)	0.008	8/15 (53%)	0.008
两个鼻孔平均值	6/15 (40%)	0.032	7/15 (47%)	0.016

较低和较高 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸剂量水平的治疗效果并不是统计学上显著的，这表明没有必要作进一步的剂量提升，且即使较低剂量的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸也能有效提高TEPD氯电导。还观察到有关第二终点的统计上显著的结果和正向趋势。具体地，尽管本试验未检测到第二终点方面的统计上的显著变化，但观察到了从研究入口至高剂量治疗周期末期患者的平均FEV₁、FVC和体重的统计

学上的显著提高。表 16 显示了该结果。对于肺功能的变化，一名患者不包括在内，因为该患者在高剂量治疗周期的末期并未检测肺功能。

表 16

终点	研究入口	较高剂量治疗末期	变化	p-值
肺功能(表示为相对性别、年龄和身高的正常值的百分比):				
平均 FEV ₁	65.8%	69.1%	3.3%	0.015
平均 FVC.....	80.2%	85.1%	4.9%	0.037
体重	58.3 kg	59.0 kg	0.7 kg	0.012

表 17 描述了来自这 15 名患者的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸中期 PK 参数。不同性别的 PK 参数没有明显差异。

表 17

平均药代动力学参数 CF 2 期初步分析				
参数	周期 1(较低剂量) 4、4、8 mg/kg		周期 2(较高剂量) 10、10、20 mg/kg	
	N=15		N=15	
	第 1 天	第 14 天	第 1 天	第 14 天
AUC ₀₋₂₄ , µg 小时/mL	145	124	435	417
C _{max} , µg/mL	16	13	41	36
C _{max} , µg/mL	1.6	1.9	5.0	6.5

此外，尽管未通过生活质量问卷来正式检测患者症状的变化，但试验研究者被要求询问患者囊性纤维化症状的变化。在中期分析包括的 15 名患者中，6 名报告了健康的总体改善，6 名报告了咳嗽的减少，10 名报告了粘液厚度的减少和更容易清除粘液。

随后进行以 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸口服治疗无义突变介导的囊性纤维化的第二个 2 期研究方案。

该治疗以两个28天的周期施用。每个周期包括连续14日每日以3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸进行治疗，然后计划为14日无研究药物给药期。如果需要，周期2的治疗可在周期1的3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸最后剂量后早至10天或晚至28天开始。

群组1中的患者将在周期1内每日三次分别以4 mg/kg、4 mg/kg和8 mg/kg的剂量以6-、6-和12-小时(±30分钟)的间隔施用3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸。理想情况下每个剂量应在就餐后~30分钟(例如，早餐后的~7:00 AM、午餐后的~1:00 PM、晚餐后的~7:00 PM)内施用。在第二个周期内进行计划的给药方案改变，从而使该群组中的每个患者在周期2内以8 mg/kg的剂量每日两次施用3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸。理想情况下每个剂量应在就餐后~30分钟(例如，早餐后的~7:00 AM和晚餐后的~7:00 PM)内施用。

群组2中的患者在周期1内以8 mg/kg的剂量并以12小时(±~30分钟)的间隔每日两次施用3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸。理想情况下每个剂量应在就餐后~30分钟(例如，早餐后的~7:00 AM和晚餐后的~7:00 PM)内施用。在第二个周期内进行计划的给药方案改变，从而使该群组中的每个患者将在周期2内以4 mg/kg、4 mg/kg和8 mg/kg的剂量每日三次施用3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸。理想情况下每个剂量应在就餐后~30分钟(例如，早餐后的~7:00 AM、午餐后的~1:00 PM、晚餐后的~7:00 PM)内施用。

6.17 实施例 17: 用免疫荧光和 WESTERN 印迹检测肌营养不良蛋白、肌聚

糖和肌营养不良蛋白聚糖的表达

在治疗前于局部麻醉和清醒镇静(在某些情况下可能需要全身麻醉)的情况下进行一只脚的 EDB 肌肉和上覆皮肤的活组织检查,并在治疗的最后一天进行另一只脚的活组织检查。该活组织检查方法采用标准技术进行(Stedman, 2000, Human Gene Therapy 11 :777-90)。在该方法中(如有可能)去除整个腹肌。在治疗前采集活检组织时,将肌肉标本分为至少 3 个片段,并将治疗最后一天采集的活检标本至少分为 2 个片段。将活检标本置于用 Ringer 盐溶液润湿的 telfa 纱布海绵上。在立体解剖显微镜下以低倍数观察活检标本,以确定纤维取向。在可能时以锋利的手术刀以横截方式(与纤维取向垂直)横切肌肉,并放置 2 分钟以使痉挛停止。然后在液氮冷却的异戊烷中冷冻该样本,转移至液氮容器,并在液/气界面 1 英寸以上保留 2 分钟,从而在浸入液氮之前缓慢冷却并蒸发异戊烷,并包入预先冷却(于液氮中冷却并储存在干冰上)的标记了研究编号、位点编号、患者编号、日期、患者姓名首字母以及脚的位置(右侧脚或左侧脚)的金属薄片。

所有的样本容器均清晰标明个体身份和采集日期。标记应当以能够防止脱落的方式固定在样本容器上。进行该操作后立即运送样本以供分析/培养/主要检查(central review)。为检测肌营养不良蛋白,可采用 3 种市售的识别该蛋白 C 末端、N 末端和杆状区的抗体。为检查肌聚糖和肌营养不良蛋白聚糖复合物,如有可能采用市售的针对 α -、 β -、 γ -和 δ -肌聚糖以及 β -肌营养不良蛋白聚糖的抗体。该分析中采用了表面荧光显微术。在对正常肌肉标本进行荧光强度的校正后,以 CCD 相机捕获图像。将图像数字储存和留存以供进一步考察,并在研究完成时进行最终的评价。还对组织进行处理以使用相同抗体通过 Western 印迹检测组织中的肌营养不良蛋白、肌聚糖和 β -肌营养不良蛋白聚糖。捕捉显微镜图像并留存以供进一步考察和在研究完

成时进行最终的评价。保留剩余肌肉组织样本以进行 DMD 中涉及的 mRNA 和蛋白的验证试验。免疫染色和 Western 印迹可用于蛋白检测。

肌肉活检通常作为研究过程中诊断和疗效测定的一部分在 DMD 个体上进行。选择 EDB 是因为它是日常活动的非必需肌肉，因此该肌肉的取样不会对该个体产生不利的功能后果。由于很少使用，EDB 肌肉不太可能显示大量的肌肉纤维更换，因此是检测肌营养不良蛋白的合适组织。由于 EDB 肌肉易于辨别，可在局部麻醉状态下解剖，并提供了足够进行所需分析的组织数量，因而 EDB 肌肉的取样还提供了其它的实际优势。免疫荧光和 Western 印迹是在肌肉活检标本上确认全长肌营养不良蛋白的存在或缺失的常规测试。肌营养不良蛋白的缺失被看作是 DMD 的确诊。肌营养不良蛋白的修复并定位到肌肉膜被认为是临床前和临床药效活性的直接测量 (Barton-Davis, 1999, *J. Clin. Invest.* 104(4):375-81; Politano, 2003, *Acta Myol.* 22(1): 15-21)。

6.18 实施例 18: 上肢和下肢肌力法

上下肢肌力法可通过手持式肌力计根据标准方法进行 (Beenakker, 2001, *Neuromuscul. Disord.* 11(5): 441-6; Hyde, 2001, *Neuromuscul. Disord.* 11(2): 165-70)。(根据个体的基线功能状态)推荐评价的肌肉组包括髂外展肌、膝伸肌、肘屈肌和伸肌、以及手抓力。可进行双侧评价，且可从每个肌肉组的每一侧记录三个测量值。这些参数可在治疗前、治疗的第二至最后一天、以及治疗后的随访期内进行监测。在治疗前和治疗期间，该肌力法可在肌肉活检之前进行。

通过手持肌力计进行的肌力法评价是针对可走动和不可走动的个体的肌肉力量的一种灵敏的可重复的检测法(Beenakker, 2001, *Neuromuscul. Disord.* 11(5): 441-6; Hyde, 2001, *Neuromuscul. Disord.* 11(2): 165-70)。患有肌营养不良症的个体的评分信度高(Stuberg, 1988, *Phys. Ther.* 1988 68(6): 911-82; Hyde, 2001, *Neuromuscul. Disord.* 11 (2): 165-70)。与徒手肌力测定相比,肌力法更为灵敏,且对肌肉功能检测的复杂性更低(McDonald, 1995, *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* (5 Suppl):S70-92)。该测试可由评价者(例如,医生或物理治疗师)简单地实施。

6.19 实施例 19: 计时功能试验

计时功能试验包括从仰卧姿势站起所需的时间,行走 10 米所需的时间,以及爬上 4 级标准大小的阶梯所需的时间(Mendell, 1989, *N. Engl. J. Med.* 320(24): 1592- 7; Griggs, 1991, *Arch. Neurol.* 48 (4) :383-8)。这些参数可在治疗前、治疗的第二至最后一天、以及治疗后的随访期内进行监测。在治疗前和治疗期间,该计时功能试验可在肌肉活检之前进行。

这些试验(仰卧姿势站起所需的时间、行走 10 米所需的时间、以及爬上 4 级标准大小的阶梯所需的时间)提供了对可走动个体的功能能力的附加检测。这些试验重现性好、较为常用、易于实施,并能记录对类固醇治疗性介入的响应(Mendell, 1989, *N. Engl. J. Med.* 320(24): 1592-7; Griggs, 1991, *Arch. Neurol.* 48(4);383-8)。

6.20 实施例 20: 血清 CK 水平

血清 CK 活性采用市售的 NADH 连接的动力学测定(Diagnostic Chemicals Ltd., Oxford, CT)进行评价。血清 CK 水平可在治疗前, 治疗期第 1 天(第一剂量前)、第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 27 天, 以及治疗后的第 42 天和第 56 天进行检测。血清 CK 在杜兴型肌营养不良症中上升, 因此它是该疾病的简易可测诊断标记, 并可作为该药物药理活性的潜在生物标记(Mendell 等人, 1989, *New Eng. J. Med.* 320(24): 1592-1597)。

血清 CK 提供了对全身肌肉完整性的检测。在患有 DMD 的个体中该酶在血清中的浓度会上升 50 至 100 倍, 且对其水平的检测可用于进行该疾病的早期诊断(Worton, *The muscular dystrophies*, 在 Scriver CR., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D 编, *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 第 8 版, 第 4 卷, New York: McGraw-Hill, 2001:5493-523 中)。通过血清 CK 水平的检测可以监测该疾病的进展, 并作为肌肉损伤的标记。尽管运动诱导的变化可带来可变性(Politano, 2003, *Acta. Myol.* 22(1):15-21), 但该标记仍具有一定优势, 因为它用广泛使用的可靠的测定法可容易地、反复地和频繁地评价。已有临床研究显示血清 CK 的下降与类固醇治疗中肌肉力量的提升相一致(Reitter, 1995, *Brain Dev.* 17 Suppl:39-43)。

6.21 实施例 21: 真皮纤维原细胞及肌肉细胞培养

在来自患者的肌肉组织和皮肤进行研究, 以确定来自患者的原代肌肉培养中的肌营养不良蛋白生成是否与体内的肌营养不良蛋白生成相对应。这些实验评价来自患者的真皮纤维原细胞在以 Myo-D-生成表达构建体转染后体外分化成为肌肉细胞时(Wang, 2001, *Development* 128: 4623-33)是否响应治疗而显示生成肌营养不良蛋白。皮肤细胞应答与临床活性的相关性

可为选择进行治疗的患者,或是为治疗 DMD 的新试剂筛选提供易获性预测试验。细胞可按如下方式培养。活检物质在运输过程中储存于人扩增培养基(或 PBS)中,如有需要置于冰上以储存更长时间。如果该组织不在 24 小时内制备,则该物质可冷冻于含 10% DMSO 的人扩增培养基并在液氮(或干冰)中储存。在准备组织以建立成肌细胞培养时,以 PBS 洗涤活检材料。向培养皿添加足以使该组织润湿的 PBS。用刀片将活检材料彻底切碎至几乎均匀悬浮的状态。添加每克组织约 2 ml 的胶原酶/分散酶/ CaCl_2 溶液,并继续破碎数分钟(例如,5×5×5 mm 的肌肉活检标本使用 1 ml 的酶溶液)。将该悬浮液转移至无菌管中,并在 37°C 下水浴中孵育,直至该混合物成为稀浆状(例如,约 20 至 30 分钟)。在孵育过程中通过多次上下移液使该悬浮液进一步匀浆化。如有需要,使用注射器上下移液进行附加的重悬浮循环。向该悬浮液添加 8 mL 的人扩增培养基并混合。将混合物在 1200 rpm 下离心 10 分钟。将细胞团重悬浮于 3 ml 人扩增培养基。将细胞接种到胶原涂覆的 6 孔平板的一个微孔上,或者,根据材料的数量,接种到 T25 胶原涂覆的瓶中。在 37°C 和 5% CO_2 下培养细胞 48 小时。去除未吸附细胞,并转移至另一胶原涂覆的微孔中(作为备份)。向第一个微孔添加新鲜的扩增培养基(3 ml)。将第一微孔的细胞培养至汇合,并直至获得两个汇合的 T75 瓶。为进行储存,将细胞从一个 T75 瓶中移入 4 个具有 1 ml 冷冻培养基的低温保存管中冷冻。培养物中的肌原性细胞成分可通过肌间线蛋白染色进行检测。在肌间线蛋白阳性细胞的百分比太低的情况下,需要预接种该培养物。

6.22 实施例 22: 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸口服治疗杜兴型肌营养不良症的 2 期研究

个体必须满足以下所有条件，方可有资格被招募进入本研究：

1. 基于 5 期所表示的临床表型，及血清 CK 提高和肌肉活检标本中肌营养不良蛋白缺失(以肌营养不良蛋白的 C 末端部分的抗体进行的肌纤维膜染色呈阴性)，诊断患有杜兴型肌营养不良症(DMD)；
2. 肌营养不良蛋白基因中存在无义突变；
3. 有文件记载表明进行过肌营养不良蛋白基因测序，或在未进行过该测序时，已将血液样本发送用于验证性肌营养不良蛋白基因测序；
4. 经物理检查或射线成像证明在双足上均有 EDB 肌肉；
5. 能够走动；
6. 男性；
7. 年龄 ≥ 5 岁；
8. 已知性活跃的个体愿意在研究药物施用和随访期中禁止性交或者采用避孕屏障或医疗避孕方法；
9. 愿意并有能力遵守定期访问、药品施用计划、实验室试验、研究限制、以及研究程序(包括肌肉活检、肌力法、以及 PK 取样)；
10. 当年龄 ≥ 18 岁时，能够提供书面知情同意书，或当年龄 ≥ 7 岁时，能够提供书面知情同意(经父母亲/监护人同意)。如果该个体年龄 < 7 岁，可获取父母/法定监护人的同意；以及
11. 亲自签署并注明日期的知情同意的证明文件(年龄 ≥ 7 岁的儿童同样要求同意),该证明文件表明该个体/父母/法定监护人已被告知该试验的所有相关方面。

出现下列任一条件时不得将个体招募进入本研究：

1. 根据研究者的观点, 以前的或现发生的医学疾病(例如, 伴发病、精神疾病、酒精中毒、药物滥用)、病史、体检发现、ECG 发现或实验室异常可能对患者安全有不利影响、使治疗期或随访期不可能完成或可能影响研究结果的评价;

2. 具有充血性心力衰竭的临床症状和表现(美国心脏病学院/美国心脏病协会 C 阶段或 D 阶段)(Hunt, 2001, *J. Am. Coll. Cardiol.* 35:2101-13);

3. 乙型肝炎表面抗原、丙型肝炎抗体检测、或人类免疫缺陷病毒(HIV) 检验阳性;

4. 血色素<10 g/dL;

5. 血清白蛋白<2.5 g/dL;

6. GST 或总胆红素异常(>正常的实验室上限);

7. 肾功能异常(血清肌氨酸酐>正常的实验室上限的 1.5 倍);

8. 固体器官或血液移植史;

9. 正在使用免疫抑制疗法(非皮质类固醇类);

10. 在试验治疗开始前 28 天内接触另一研究药物;

11. 正参与任何其它的治疗性临床试验;

12. 正使用噻唑烷二酮过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPAR γ) 激动剂, 例如, 罗格列酮(Avandia®或同等药物)或吡格列酮(Actos®或同等药物);

13. 在研究治疗开始前 3 个月内改变了全身性皮质类固醇疗法(例如, 治疗的启动; 治疗的中止; 剂量、进度或类固醇类型的改变); 或者

14. 在试验治疗开始前 3 月内用全身性氨基糖甙类抗生素治疗。

3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸以本发明所述的剂型提供。

对每个治疗组施用治疗 28 天。对患者的初始群组每日三次以给定的剂量水

平(例如, 4、4 和 8 mg/kg)的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸治疗 28 天。如果该初始患者对药物耐受, 则第二组患者每日三次接受更高剂量水平(例如, 10、10 和 20 mg/kg)的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸。这样, 每位患者接受了总计 84 剂量的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸。在 28 天治疗的末期, 每位患者将继续进行附加的 28 天无治疗。

在每个剂量水平下, 推荐以 6、6 和 12 小时(\pm ~30 分钟)间隔每天三次施用 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸。理想情况下每个剂量应在就餐后~30 分钟(例如, 早餐后的~7:00 AM、午餐后的~1:00 PM、晚餐后的~7:00 PM)内施用。尽管可以理解在门诊安排中可能出现不同的给药方案, 但推荐该处方方案(包括给药间隔和给药和就餐的关系)紧随 PK 样本采集的日子。临床终点可通过如上方法进行评价。

向六位患者以早餐时 4 mg/kg、午餐时 4 mg/kg 和晚餐时 8 mg/kg 的方案每日三次施用 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸, 其每日总剂量为 16 mg/kg。所有的患者均可走动, 但具有 DMD 的特征表现和症状, 包括一定程度的肌肉功能障碍和提高的 CK 浓度。未报道严重的药物相关不良事件。初步结果提示所有潜在的药物相关不良事件的严重性均较温和。这种不良事件包括腹泻 1 例; 腹部疼痛 1 例; 以及胀气 2 例。目前尚未在患者的身体检查、生命体征测量、或心电图中发现有安全问题。在血清肝酶、胆红素、肌酐或尿素氮方面未观察到临床意义的提高。治疗顺应性良好, 患者接受了>95%的预期的 28 天低剂量水平的全部药物治疗。未有患者由于不良事件而停止治疗。

表 18 描述了来自这 6 名患者的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸中期 PK 参数。在 DMD 2 期研究中的取样期之间的 27 天治疗间隔中既没有药物积累的证据，也没有由代谢诱导的药物水平下降的证据。

表 18

平均药代动力学参数 DMD 2 期的中期分析		
参数	3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸 (4、4、8 mg/kg)	
	N=6	
	第 1 日	第 27 日
AUC ₀₋₂₄ , µg·小时/mL	87	87
C _{max} , µg/mL	10	10
C _{max} , µg/mL	0.5	0.6

参照如下方案进行额外的 2 期研究以评价 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸在患有无义突变介导的 DMD 的患者中的安全性、顺应性、PK、对全长肌营养不良蛋白表达的影响以及临床活性。

分别在早餐、午餐和晚餐后以 4、4、8 mg/kg(低剂量), 10、10、20 mg/kg(中剂量), 和 20、20、40 mg/kg(高剂量)的剂量水平口服施用 28 天的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸。26 位男孩(年龄: 5-13 岁; 终止密码子: 15 UGA、6 UAG、5 UAA; 基线血清 CK: 8,645-49,500 IU; 类固醇使用: 19/26)完成了低(n=6)或中(n=20)剂量水平的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸。所有的不良事件和实验室异常均为轻至中度, 且其频率或严重性没有剂量相关性变化。两种剂量水平下的顺应性均>98%。第 1 和第 28 天的 PK 显示随时间变化血浆暴露稳定; 然而, 在 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸治疗的健康成年志愿者和囊性纤维化患者中的暴露较低。治疗前肌肉活检组织的肌管培养显示, 在 24/24 (100%)可评价的患者中,

肌营养不良蛋白表达用体外 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸治疗表现出剂量依赖性提高。相对于基线，在低和中剂量下的男孩中分别发生 4/6 (67%) (90% CI 27-94%)和 10/20 (50%) (90% CI 30-70%)的体内肌营养不良蛋白表达的治疗后提升。在 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸施用过程中血清 CK 水平明显下降。在 28 天的治疗中，肌肉力量和计时功能的变化较小，不太明显。

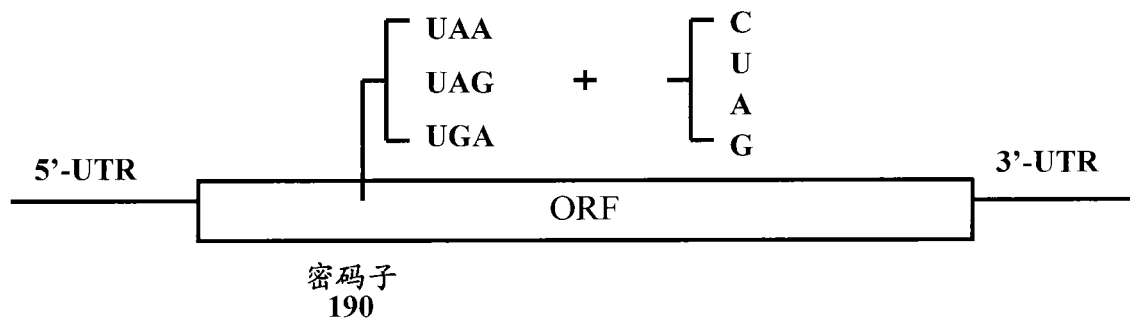
3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸在患有无义突变介导的 DMD 的男孩中安全地诱导了全长肌营养不良蛋白的体外和体内表达，并降低了血清 CK 水平。尽管低和中剂量水平的 3-[5-(2-氟-苯基)-[1,2,4]噁二唑-3-基]-苯甲酸具有活性，但它们未形成与最大临床前活性相关的血浆暴露。对高剂量水平下的另 12 位男孩的评价正在进行。

7. 等同

本领域的技术人员应该认识到或能利用常规实验确定本发明所述的发明的具体实施方式的众多等同方式。这些等同方式应该包含在所附权利要求的范围内。本说明书中所涉及的所有出版物、专利和专利申请均引用作为参考，其引用程度如同每一个单独的出版物、专利和专利申请特定地单独引为参考一样。

由荧光素酶报告构建体获得的信使 RNA

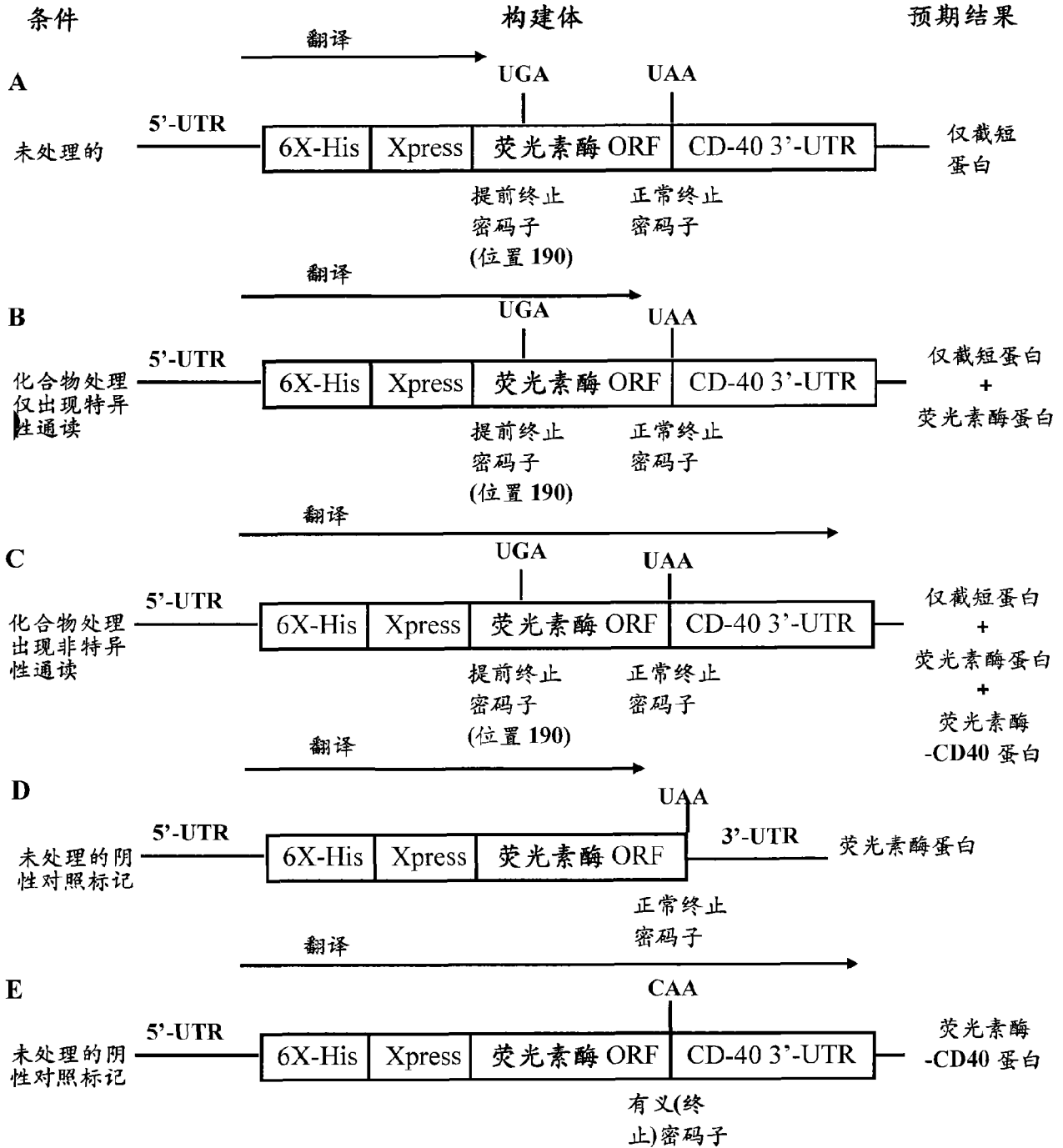
终止密码子: +1 位置核苷酸



缩写: A=腺苷, C=胞苷, G=鸟苷, U=尿苷, RNA
=核糖核酸, ORF=开放阅读框架, UTR=未翻
译区域

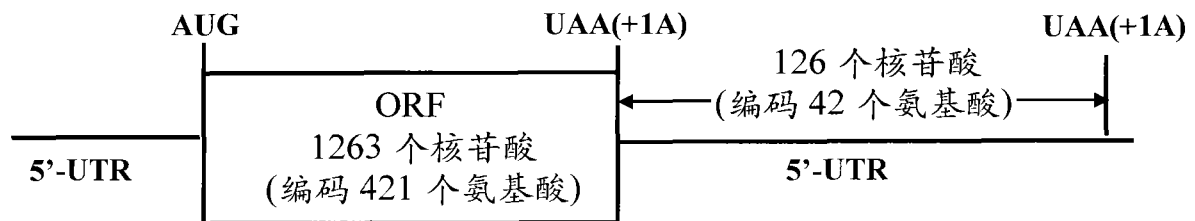
图 1

由荧光素酶-CD40 报告 mRNA 构建体获得的信使 mRNA



缩写: A=腺苷, C=胞苷, G=鸟苷, U=尿苷, ORF=开放阅读框架, UTR=未翻译区域, 6X-His=6个组氨酸氨基酸的密码子, Xpress=Xpress 表位标记的密码子

图 2

小鼠 β -微管蛋白 mRNA

缩写：A=腺苷，G=鸟苷，U=尿苷，mRNA=信使核糖核酸，

ORF=开放阅读框架，UTR=未翻译区域

图 3