



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117642505 A

(43) 申请公布日 2024.03.01

(21) 申请号 202280039858.1

亨里克·瓦尔德马尔·克利特高德

(22) 申请日 2022.06.03

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

(30) 优先权数据

PA202170290 2021.06.04 DK

专利代理师 李小明

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.01

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/065217 2022.06.03

A61K 31/7125 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/254021 EN 2022.12.08

(71) 申请人 神经微核糖核酸治疗有限公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 马库斯·萨卡里·考皮宁

吕克·佩德森

斯蒂娜·诺曼·汉森

权利要求书2页 说明书27页

序列表34页 附图14页

(54) 发明名称

靶向腺苷激酶的反义寡核苷酸

(57) 摘要

本发明提供了靶向腺苷激酶的反义寡核苷酸。此类反义寡核苷酸可用于治疗一系列神经疾病,例如癫痫。提供了使用本发明的寡核苷酸治疗神经疾病的组合物和方法。

1. 一种与ADK mRNA (SEQ ID NO:1) 互补的反义寡核苷酸, 包含长度为10-30个核苷酸的序列, 其中所述反义寡核苷酸具有至少一个亲和力增强核苷酸类似物, 并且其中所述反义寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键。

2. 根据权利要求1) 所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸对ADK-L具有特异性并且与SEQ ID NO:2、120、121或122-132中的任一个互补。

3. 根据权利要求1) -2) 中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸含有至少5个连续DNA核苷酸的连续链段。

4. 根据权利要求1) -2) 中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸不含有超过4个DNA核苷酸的连续链段, 例如不超过3个连续DNA核苷酸。

5. 根据权利要求1) -4) 中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含长度为14-19个核苷酸的序列。

6. 根据权利要求1) -5) 中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述亲和力增强核苷酸类似物选自LNA、三环DNA、2'-氟、2'-O-甲基、2'甲氧基乙基(2'MOE)、2'环乙基(cET)、UNA、2'氟和构象受限的核苷(CRN)的列表。

7. 根据权利要求1) -6) 中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸包含至少一个LNA。

8. 根据权利要求1) -7) 中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸是SEQ ID NO 3-73中的任一个或者SEQ ID NO 74-100中的任一个或者SEQ ID NO 133-147中的任一个。

9. 根据权利要求1) -8) 中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸是SEQ ID NO:10、11、14、16、18、23、36、41、42、43、64、65、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146或147中的任一个。

10. 根据权利要求9) 所述的反义寡核苷酸, 其中所述反义寡核苷酸是以下SEQ ID NO中的任一个:

(SEQ ID NO 10) 5'CTttatacttATtAGgAAG 3' 或

(SEQ ID NO 16) 5'CTttatactTaTTaggAAG 3' 或

(SEQ ID NO 41) 5'AGctTtTtAAagcaaCAG 3' 或

(SEQ ID NO 42) 5'CTTtgggattTCaGAAA3' 或

(SEQ ID NO 43) 5'CTtgggattTCaGAAA 3' 或

(SEQ ID NO 136) 5'CTttatactTaTTaGgAAG 3' 或

(SEQ ID NO 137) 5'CTttatacttATtaGgAAG 3' 或

(SEQ ID NO 139) 5'CTtgggatTTCaGAAA3',

并且其中大写字母表示LNA, 小写字母是DNA, 大写字母C是LNA 5-甲基胞嘧啶, LNA是 β -D-氧基LNA, 并且所有核苷间键都是硫代磷酸酯键。

11. 根据权利要求1) -10) 中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸连接至递送载体或配制用于靶向递送。

12. 根据权利要求1) -11) 中任一项所述的反义寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸与另一种药物组合使用。

13. 根据权利要求1) -12) 中任一项所述的反义寡核苷酸, 用于作为药物使用。

14. 根据权利要求1)至13)所述的用于使用的反义寡核苷酸或组合物,其中用途是用于治疗依赖于ADK-L表达的CNS或PNS的疾病。

15. 根据权利要求1)至14)中任一项所述的用于使用的反义寡核苷酸或组合物,其中CNS或PNS的疾病是神经障碍。

16. 根据权利要求1)至15)中任一项所述的用于使用的反义寡核苷酸或组合物,其中神经障碍是癫痫。

靶向腺苷激酶的反义寡核苷酸

技术领域

[0001] 本发明提供了靶向腺苷激酶的新的反义寡核苷酸。该化合物可用于治疗神经疾病(神经疾病,neurological diseases)例如癫痫。

背景技术

[0002] 癫痫是一种严重的慢性神经障碍,其特征是反复自发性癫痫发作,影响全球约5000万人。

[0003] 目前可用的抗癫痫药物通常可以控制三分之二患者的癫痫发作,但可能对潜在的病理生理学没有影响。其余三分之一的癫痫患者要么对现有药物产生耐药性,要么遭受目前可用药物的严重副作用。

[0004] 脑部手术、迷走神经刺激、颅内刺激和生酮饮食是避免无法接受药物治疗的患者癫痫发作的替代方案。

[0005] 有症状(获得性)癫痫的发展被认为涉及离子通道和神经递质受体表达的改变、突触重塑、炎症、神经胶质增生和神经元死亡等。然而,针对这些过程的抗癫痫发作干预措施很少在体内表现出足够的功效,而且我们对细胞和分子机制的理解仍然不完整。目前尚无在可能导致癫痫发展的脑损伤之后的预防性治疗(“抗癫痫发作”)。类似地,对于癫痫持续状态(SE)没有特异性神经保护治疗方法,或治疗急性神经损伤可能导致脑损伤或癫痫,例如中风或创伤。

[0006] 因此,对于专门针对癫痫和可能导致脑损伤发展的其它神经损伤的过程并且克服一些上述问题的治疗或预防措施存在高度未满足的需求。

[0007] 腺苷和腺苷激酶

[0008] 腺苷是一种特性已知的内源性抗惊厥剂和大脑癫痫发作终止剂。腺苷影响癫痫发作(发作发生)、癫痫的发展及其进展(癫痫发生)。腺苷代谢的适应不良变化,特别是星形胶质细胞酶腺苷激酶(ADK)表达的增加,在癫痫发生中起着重要作用。(Weltha et al,2019, The role of adenosine in epilepsy,Brain Res Bull 2019September,page 1-22.)

[0009] 哺乳动物细胞中表达两种N末端不同的ADK亚型(同种型,同工型,isoform)。ADK在调节细胞内和间质的嘌呤核苷腺苷浓度方面发挥着核心作用,表现出强大的心脏保护和神经保护活性。癫痫发作或中风后,腺苷激酶的表达在大脑中经历快速协调变化,导致腺苷急剧激增,从而最大限度地减少对大脑的损害。哺乳动物细胞中腺苷激酶的两亚型仅在其N末端有所不同。长亚型(AdK-L)含有额外的20-21个氨基酸,而不是AdK短亚型(AdK-S)的前四个氨基酸。AdK-L中的N末端延伸起到核定位信号的作用。因此,在两种亚型中,AdK-L靶向细胞核,而AdK-S定位于细胞质。(Cui et al,2011,Molecular Characterization of Chinese Hamster Cells Mutants Affected in Adenosine Kinase and Showing Novel Genetic and Biochemical Characteristics,BMC Biochemistry 2011.)

[0010] 腺苷发挥多种心脏保护作用。此外,ADK表达失调以及由此导致的腺苷稳态破坏与多种神经系统和神经精神病理有关。星形胶质细胞ADK是预测和预防癫痫发作的一个有前

景的靶点。在由侧面液体冲击损伤引起的严重创伤性脑损伤(TBI)的大鼠模型中也发现了星形胶质细胞增生和相关的ADK过表达。此外,ADK表达水平关键性决定大脑对中风影响的脆弱性。腺苷及其受体激动剂也可以增强睡眠和睡眠强度,而诸如咖啡因或茶碱等拮抗剂则可以诱导觉醒。

[0011] 根据Boison et al.,ADK过表达与认知障碍之间的联系可能与神经疾病具有病理相关性,其中ADK过表达已被证实(癫痫)或怀疑(阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化症)。精神分裂症的腺苷假说假设腺苷信号功能低下可能导致精神分裂症的病理生理学。在糖尿病中,多种组织中的腺苷稳态被严重改变。

[0012] 此外,腺苷受体信号传导的稳态对于炎症的调节和促炎细胞因子的释放至关重要。腺苷受体信号传导的稳态对于IBD中的慢性炎症反应也具有至关重要的意义。

[0013] 腺苷/ADK调节系统在癌症中的作用可能取决于癌症的类型。发现肝癌细胞中ADK活性降低,表明腺苷增加可能为肝癌提供了选择性优势。(Boison et al.,2013,Adenosine Kinase:Exploitation for Therapeutic Gain,Pharmacol Rev 65:906-943,July 2013.)

[0014] 腺苷受体

[0015] 抑制性腺苷A1受体的激活对于癫痫、慢性疼痛和脑缺血有益,而促进性A2A受体的抑制则具有深远的神经保护作用。(Boison et al,2008,Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases,Curr Opin Pharmacol,2008February.)

[0016] 腺苷是一种神经调节剂,通过最丰富的抑制性腺苷A1受体(A1R)和数量较少但广泛的促进性A2AR发挥作用。人们普遍认为,A1R在神经保护中发挥着关键作用,因为它们减少谷氨酸释放并使神经元超极化。(Rodrigo A.Cunha,2005,Neuroprotection by adenosine in the brain:From A1 receptor activation to A2Areceptor blockade, Purinergic Signalling(2005)1:111-134.)

[0017] 通过抑制腺苷激酶或用鞘内选择性A3AR激动剂激活A3AR来恢复脊髓中的A3AR信号传导,可以预防建立化疗诱发的神经性疼痛(CINP)。(Wahlman et al,2018,Chemotherapy-induced pain is promoted by enhanced spinal adenosine kinase levels via astrocyte-dependent mechanisms,Pain.2018Jun;159(6):1025-1034.)

[0018] 癫痫、神经保护和精神障碍

[0019] 腺苷具有抗惊厥和神经保护作用。(Patodia et al,2020,Adenosine kinase and adenosine receptors A1R and A2AR in temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis and association with risk factors for SUDEP,Epilepsia,page 787-797.)

[0020] 使用腺苷激酶抑制剂的局灶腺苷增强疗法已被证明可以有效减少动物模型和从难治性癫痫患者的各种病因切下的人脑组织中的癫痫发作。除了减少癫痫发作之外,腺苷增强疗法还可以缓解合并症,如睡眠、认知或抑郁。ADK减少的转基因小鼠能够抵抗由急性脑损伤引起的癫痫发生。(Wang et al,2020,Role of Adenosine Kinase Inhibitor in Adenosine Augmentation Therapy for Epilepsy:A Potential Novel Drug for Epilepsy,Current Drug Targets,摘要.)

[0021] 根据Boison et al.2006,腺苷是一种大脑活动的抑制性调节剂,具有神经保护和抗惊厥特性。因此,基于细胞的腺苷递送对于癫痫和中风的新疗法具有广阔的前景。

(Boison et al,2013,Adenosine kinase,epilepsy and stroke:mechanisms and therapies,Trends Pharmacol Sci,摘要.)腺苷激酶在调节成年中与神经精神疾病相关的行为方面也具有促进作用。(Osborne et al,2018,Developmental role of adenosine kinase for the expression of sex-dependent neuropsychiatric behaviour,Neuropharmacology,2018October.) [精神分裂症、自闭症、ADHD]

[0022] Hai-Ying Shen et al 2012的一项研究发现,通过药物抑制腺苷激酶来增强腺苷,可以在小鼠体内发挥抗精神病样活性。此外,转基因小鼠中ADK的过表达与精神分裂症相关的注意力障碍有关。(Hai-Ying Shen et al2012,Adenosine augmentation ameliorates psychotic and cognitive endophenotypes of schizophrenia,J Clin Invest,page 2567-2577.)

[0023] 疼痛

[0024] 根据Otsuguro et al.2015,腺苷激酶抑制剂是控制疼痛的潜在候选物。(Otsuguro et al,.2015,An adenosine kinase inhibitor,ABT-702,inhibits spinal nociceptive transmission by adenosine release via equilibrative nucleoside transporters in rat,neuropharmacology volume 97,摘要.)腺苷激酶的抑制剂可增强组织过度兴奋部位的抑制性神经调节剂腺苷的细胞外浓度,并在疼痛和炎症的动物模型中产生镇痛作用。此外,腺苷激酶抑制剂产生特定的抗痛觉过敏作用。(Jarvis et al,2002,Comparison of the ability of adenosine kinase inhibitors and adenosine receptor agonists to attenuate thermal hyperalgesia and reduce motor performance in rats,Pharmacology Biochemistry and Behavior vol 73,摘要.)

[0025] 腺苷激酶抑制剂已在多种伤害感受动物模型中显示出镇痛活性,并且新的腺苷激酶抑制剂A-134974可有效减轻触觉异常性疼痛。(Zhu et al,2001,A-134974:a novel adenosine kinase inhibitor,relieves tactile allodynia via spinal sites of action in peripheral nerve injured rats,Brain Research vol 905,摘要.)腺苷激酶抑制剂也已被证明可以在动物模型中提供有效的镇痛、抗炎和抗惊厥活性,从而表明它们对于疼痛、炎症、癫痫以及可能与细胞创伤和炎症相关的其它中枢和周围神经疾病具有潜在的治疗用途。(Gomtsyan et al,2004,Non-nucleoside inhibitors of adenosine kinase,Current Pharmaceutical Design,摘要.)

[0026] 根据Bauser et al.2004,腺苷激酶抑制是一种有吸引力的治疗方法,适用于例如神经退行性疾病、癫痫发作、缺血、炎症和疼痛等多种疾病。(Bauser et al,2004,Discovery and optimization of 2-aryl oxazolo-pyrimidines as adenosine kinase inhibitors using liquid phase parallel synthesis,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,摘要.)

[0027] 脑炎

[0028] 拉斯穆森脑炎(Rasmussen encephalitis)是一种罕见的神经障碍(neurological disorder),其特征是大脑皮层和其它结构(最明显的是海马体)的单侧炎症、进行性认知功能减退和耐药性局灶性癫痫。Luan et al.提出,腺苷激酶的过表达是拉斯穆森脑炎的常见病理标志,并且拉斯穆森脑炎中神经元A1R的上调对于预防癫痫发作的扩散至关重要。此外,腺苷作为内源性神经调节剂,具有抗惊厥、抗炎作用,并在癫痫继发性认知受损时恢复

认知功能。腺苷稳态的破坏与癫痫、炎症和认知功能障碍有关。已证明,腺苷受体和主要腺苷-去除酶ADK的改变促进癫痫中腺苷稳态的破坏。(Luan et al,2017,Upregulation of Neuronal Adenosine A1 Receptor in Human Rasmussen Encephalitis,J Neuropathol Exp Neurol vol 76,page 720-731.)

[0029] 血管生成

[0030] 靶向腺苷激酶以升高细胞内腺苷,促进体外内皮增殖和迁移以及离体血管萌芽。此外,内皮特异性腺苷激酶敲除小鼠增加了视网膜血管生成,加速了伤口愈合,并且可以防止后肢缺血性损伤。(Xu et al.,2017,Intracellular adenosine regulates epigenetic programming in endothelial cells to promote angiogenesis,EMBO Molecular Medicine,page 1263-1278.)

[0031] 癌症

[0032] Huang et al 2015的一项研究表明,腺苷激酶参与神经胶质瘤的进展,并且瘤周组织中腺苷激酶水平升高可能与神经胶质瘤的癫痫有关。(Huang et al,2015,Adenosine deaminase and adenosine kinase expression in human glioma and their correlation with glioma-associated epilepsy,Molecular Medicine Reports 12, page 6509-6516.)

[0033] 糖尿病、炎症、心血管障碍、肾脏疾病和肺部疾病

[0034] 根据Pye et al 2014,腺苷通过激活腺苷A2A受体在心血管疾病中提供抗炎作用;然而,由于腺苷激酶的磷酸化,腺苷的生理作用可能受到限制。用于腺苷激酶抑制剂ABY702治疗可降低糖尿病小鼠中的血糖水平,降低糖尿病小鼠中的白蛋白尿以及肾小球损伤标志物、肾病尿和足细胞标志蛋白排泄水平。此外,氧化应激指数也有所降低。(Pye et al, 2014,Adenosine Kinase Inhibition Protects The Kidney Against Streptozotocin-Induced Diabetes Through Anti-inflammatory and Anti-oxidant Mechanisms, Pharmacol Res.)

[0035] A1腺苷受体的激活可通过改善肾血流动力学改变、减少肾小管坏死来预防急性肾损伤,并且其抑制可有助于慢性肾病模式下毒素或药物代谢物的清除。(Pandey et al, 2021,"Adenosine an old player with new possibilities in kidney diseases": Preclinical evidences and clinical perspectives,Life Sciences vol 265,摘要.)

[0036] 在许多治疗领域,腺苷功能的调节已被视为一种治疗选项,例如神经性疼痛、中风、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)和促进睡眠。(Knutsen et al,2007,Therapeutic Areas I:Central Nervous System,Pain,Metabolic Syndrome,Urology,Gastrointestinal and Cardiovascular,Comprehensive Medicinal Chemistry II,2007,<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/adenosine-kinase-inhibitor>,accessed 21-4-2021.)

发明内容

[0037] 对于改善神经疾病(神经系统疾病,neurological diseases)的治疗存在着高度未满足的医疗需求,因为许多疾病不能以充分的方式治疗,或者目前可用的治疗会导致严重的副作用。本发明的化合物是腺苷激酶(ADK)例如ADK-L的有效抑制剂,并因此可用于治

疗神经疾病例如癫痫。

附图说明

[0038] 图1为qPCR引物和探针。

[0039] 图2.1的A) ADK-L间隔体 (gapmer) 和B) 混合体 (mixmer) 反义寡核苷酸从ADK-L敲低的最高到最低水平的排名。水平虚线显示100% (无敲低) 的仅RNAiMAX处理的细胞。A) 黑线代表70%敲低, 并且灰线代表80%敲低。垂直虚线显示选择用于确认的寡核苷酸的截止值, $n, N=1, 1-2$, 平均值 \pm SEM

[0040] 图2.2的A) 初级qPCR测定和B) 次级qPCR测定中所选ADK-L间隔体反义寡核苷酸从最高到最低敲低水平的排名。水平虚线显示100% (无敲低) 的仅RNAiMAX处理的细胞, 并且灰线显示80%敲低。 $n, N=2, 3-4$, 平均值 \pm SEM

[0041] 图3.1剂量-响应研究。水平虚线显示100% (无敲低) 的仅RNAiMAX处理的细胞, 并且黑线显示80%敲低。 $n, N=1-2, 2-4$, 均值 \pm SEM

[0042] 图4.1剂量-响应曲线和IC50值, 3-参数非线性曲线拟合, $n, N=2-3, 4-6$; 描述了所有技术重复。水平虚线代表50%敲低。

[0043] 图5.1为ADK (两种亚型) 的归一化mRNA表达值, $n=3$ 。

[0044] 图5.2用Seq ID 42 (左) 和Seq ID 139 (右) 处理的细胞的差异基因表达分析。火山图显示了Seq ID 42、Seq ID 139和模拟处理细胞之间转录物的不同水平, 将反义寡核苷酸处理组和模拟处理组之间RNA表达的变化与差异表达的显著性相关联。x轴表示表达的相对变化, 而y轴表示显著性。每个点表示特异性RNA。黑点表示不显著的变化, 而灰点表示显著的值。

[0045] 图5.3使用反义寡核苷酸序列进行计算机分析来预测剪接转录组 (细胞质; 第1-4列) 和未剪接转录组 (核, 第5-8列) 内的所有潜在靶位点。这样做是为了1) 靶mRNA与反义寡核苷酸的完美匹配, 或2) 具有1、2、3或4个错配 (INDEL) 的序列。将所得预测的靶与来自RNAseq数据的结果 (表2, 3nM和表3, 20nM) 进行比较, 以了解有多少预测靶mRNA (第1行) 在数据集 (第2行) 中表达, 以及这些之中有多少显著地被差异表达 (第3行), 以及DGE是否构成这些数据集中的上调 (第4和5行) 或下调 (第6和7行)。

[0046] 图5.4为ADK-L到ADK-S第一外显子的特写。IGV基因组浏览器视图显示了ADK-L (A) 和ADK-S (B) 的第一外显子上的读取映射。水平虚线区分了 $n=3$ 的不同治疗组。

具体实施方式

[0047] 在描述本发明的实施例时, 为了清楚起见将采用特定术语。然而, 本发明并不旨在限于如此选择的特定术语, 并且应当理解, 每个特定术语包括以类似方式操作以实现类似目的的所有技术等同物。

[0048] 术语“治疗有效量”或“有效量”或“有效剂量”是指给予需要该药剂的个体所需的治疗效果的治疗剂的量。有效量可以根据待治疗个体的健康和身体状况、待治疗个体的分类群、组合物的制剂、给药方法、个体医学状况的评估和其它相关因素而变化。

[0049] 术语“治疗”是指治疗药物的任何给药, 所述治疗药物在本文中包含部分或完全治愈或减轻给定疾病的一种或多种症状或特征的反义寡核苷酸。

[0050] 本文使用的术语“化合物”是指包含根据本发明的寡核苷酸的化合物。在一些实施方式中,化合物可以包含作为本发明的寡核苷酸的一部分的其它元件(element)。在非限制性示例中,此类其它元件可以是缀合或以其它方式结合至寡核苷酸的递送载体。

[0051] “反义寡核苷酸”意指具有允许与靶核酸的相应区域或区段(节段,segment)杂交的核碱基序列的单链寡核苷酸。在一些情况下,本发明的反义寡核苷酸是“混合体(mixer)”,并且在一些情况下,本发明的反义寡核苷酸是“间隔体(gapmer)”。

[0052] “混合体”是一种反义寡核苷酸,其包含核苷类似物(例如LNA和DNA核苷)的混合物,并且其中反义寡核苷酸不包含具有多个核苷(例如不超过4或5个DNA核苷酸的连续链段)的内部区域。混合体不能募集RNase,例如RNaseH,而是通过与靶RNA结合并从而阻断其正常功能来发挥其作用。

[0053] “间隔体”是一种反义寡核苷酸,其包含核苷的至少6或7个DNA核苷酸的连续链段,其侧翼是包含亲和力增强核苷酸类似物(例如LNA核苷)的核苷酸链段。间隔体能够募集RNase,例如RNaseH,其中包含内部区域的核苷在化学上不同于包含外部翼的一个或多个核苷。

[0054] 例如,Freier&Altmann;Nucl. Acid. Res., 1997, 25, 4429-4443和Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3 (2), 293-213描述了“核苷类似物”,并且W02007031091提供了合适且优选的核苷类似物的示例,它们通过引用并入本文。

[0055] “5-甲基胞嘧啶”是指用附接至5'位置的甲基修饰的胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶是经修饰的核碱基,通常取代反义寡核苷酸中的胞嘧啶。在本发明的寡核苷酸中,胞嘧啶被5-甲基胞嘧啶取代也在本发明的范围内。

[0056] “2'-O-甲氧基乙基”(也称为2'-MOE和2'-O(CH₂)₂-OCH₃)是指在呋喃糖环的2'位置处的O-甲氧基-乙基修饰。

[0057] “2'-MOE核苷”(也称为2'-O-甲氧基乙基核苷)是指包含2'-MOE修饰的糖部分的核苷。

[0058] “锁核酸”或“LNA”通常被称为不可接近的RNA,并且是经修饰的RNA核碱基。LNA核碱基的核糖部分通过连接2'氧和4'碳的额外桥进行修饰。与常规DNA或RNA寡核苷酸相比,LNA寡核苷酸对其互补链的亲和力大大增加。在一些方面,双环核苷类似物是LNA核苷酸,并且因此这些术语可以互换使用,并且在此类实施方式中,两者的特征均在于核糖糖环的C2'和C4'之间存在接头基团(例如桥)。当在本文中使用时,术语“LNA单元”、“LNA单体”、“LNA残基”、“锁核酸单元”、“锁核酸单体”或“锁核酸残基”是指双环核苷类似物。LNA单元尤其描述于W0 99/14226、W0 00/56746、W0 00/56748、W0 01/25248、W0 02/28875、W0 03/006475、W02015071388和W0 03/095467中。

[0059] “β-D-氧基LNA”是优选的LNA变体。

[0060] “双环核酸”或“BNA”或“BNA核苷”意指具有连接核苷糖单元的4'和2'位置之间的两个碳原子的桥从而形成双环糖的核酸单体。此类双环糖的示例包括但不限于A) pt-L-亚甲氧基(4'-CH₂-O-2')LNA、(B) P-D-亚甲氧基(4'-CH₂-O-2')LNA、(C) 亚乙氧基(4'-(CH₂)₂-O-2')LNA、(D) 氨氧基(4'-CH₂-O-N(R)-2')LNA和(E) 氧氨基(4'-CH₂-N(R)-O-2')LNA。

[0061] 如本文所用,LNA化合物包括但不限于在糖的4'和2'位置之间具有至少一个桥的化合物,其中每个桥独立地包含1个或2至4个独立地选自以下的连接基团:-[C(R~)

(R2)], -, -, -C(R~) = C(R2) -, -, -C(R~) = N-, -C(=NREM) -, -, -C(=O) -, -, -C(=S) -, -, -O-, -, -Si(Ri) q-, -, -S(=O) -和-N(R&) -; 其中:x为0、1或2;n为1、2、3或4;每个R&和R2独立地是H、保护基、羟基、C≡C≡烷基、连接2'氧原子和4'碳原子的取代的C≡(-CHz-)基团,其中使用术语亚甲氧基(4'-CH&-O-2')LNA。

[0062] 此外,在该位置具有亚乙基桥连基团的双环糖部分的情况下,使用亚乙氧基(4'-CH&CH&-O-2')LNA。*n*-L-亚甲氧基(4'-CH&-O-2')、亚甲氧基(4'-CH&-O-2')LNA的异构体也涵盖在本文所用的LNA的定义内。

[0063] 在一些实施方式中,核苷单元是选自以下列表的LNA单元: β -D-氧基-LNA、 α -L-氧基-LNA、 β -D-氨基-LNA、 α -L-氨基-LNA、 β -D-硫代-LNA、 α -L-硫代-LNA、5'-甲基-LNA、 β -D-ENA和 α -L-ENA。

[0064] “cEt”或“受限乙基”是指包含连接4'-碳和2'-碳的桥的双环糖部分,其中该桥具有式:4'-CH(CHq)-O-2'。

[0065] “受限乙基核苷”(也称为cEt核苷)是指包含含有4'-CH(CH3)-O-2'桥的双环糖部分的核苷。Pallan et al. Chem Commun (Camb). 2012, August 25; 48 (66): 8195-8197中描述了cEt及一些其性质。

[0066] “三环(tc)-DNA”属于构象受限的DNA类似物的类别,显示出与DNA和RNA的增强结合特性。结构和生产方法可参见Renneberg et al. Nucleic Acids Res. 2002 Jul 1; 30 (13): 2751-2757。

[0067] 如本文所提及的“2'-氟”是在糖环的2'位置处包含氟基团的核苷。Peng et al. J Fluor Chem. 2008 September; 129 (9): 743-766中描述了2'-氟化核苷酸。

[0068] 如本文所提及的“2'-O-甲基”是在糖环的2'位置包含-OCH₃基团的糖的核苷。

[0069] 如本文提及的“构象受限的核苷(CRN)”及其合成方法描述于W02013036868中,其通过引用并入本文。CRN是糖修饰的核苷,其中与LNA类似,化学桥连接核糖的C2'和C4'碳。然而,在CRN中,C2'-C4'桥比LNA分子中的长一个碳。CRN核糖中的化学桥将核糖锁定在固定位置,这进而又限制核碱基和磷酸基团的灵活性。基于RNA或DNA的寡核苷酸内的CRN取代具有增加杂交亲和力和增强对核酸酶降解的抗性的优点。

[0070] “未锁定的核酸(unlocked nucleic acid)”或“UNA”在本文中是指未锁定的核酸,通常其中核糖的C2-C3 C-C键已被去除,形成未锁定的“糖”残基(参见Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039, 通过引用并入本文,和Snead et al. Molecular Therapy—Nucleic Acids (2013) 2, e103)。

[0071] “靶区域”是指一种或多种反义化合物所靶向的靶核酸的一部分。

[0072] 如本文所用的“靶向递送”意指以下递送:其中反义寡核苷酸已经以促进在特定组织或细胞中有效递送的方式配制,或者其中反义寡核苷酸已经以其它方式被例如修饰以包含靶向部分,或以其它方式进行修饰以促进在特定靶细胞中的摄取。

[0073] 本发明的反义寡核苷酸被设计为靶向腺苷激酶(ADK)。

[0074] 如本文使用的术语“腺苷激酶相关的神经疾病”是指其中疾病病理学与腺苷激酶活性的上调相关的疾病,或者其中腺苷激酶活性的下调将有益于疾病治疗的疾病。

[0075] 化合物

[0076] 人类ADK基因编码14种转录物。在这些转录物中,10种是蛋白质编码,并因此是潜

在的核酸靶。设计了许多ASO以靶向ADK pre-mRNA上的5'-区域(SEQ ID NO 2)。具体地,SEQ ID NO 2是ADK pre mRNA上从位置1到位置25349的区域。例如,ASO被构建为靶向SEQ ID NO:2的核苷酸74-75、132-134、782、830、926、5865、7203、15679、24985和25284。

[0077] 表1和表2中描述了ASO的示例性序列。在一些实施方式中,ASO被设计为间隔体或混合体。间隔体将募集RNase H来切割靶RNA,而混合体不会募集RNase H。

[0078] 表1和2含有针对所选序列的ASO设计的非限制性示例。相同的方法可以应用于本文公开的任何其它序列。构建间隔体以含有锁核酸-LNA(大写字母)。例如,间隔体可以在5'端和3'端具有 β -脱氧LNA并且具有硫代磷酸酯主链。但LNA也可以被任何其它核苷酸类似物取代,并且主链可以是另一种类型的主链(例如磷酸二酯键、磷酸三酯键、甲基磷酸酯键、氨基磷酸酯键或其组合)。

[0079] 在表1和2中,在化合物名称中,大写字母表示经修饰的核苷酸,例如LNA核苷酸(β -D-氧基、 α -L-氧基、 β -D-氨基或 β -D-硫代LNA或其它经修饰的核苷酸,例如cEt、cMOE、UNA或ENA),小写字母表示DNA核苷酸。

[0080] 因此,AAaatggccgcGCC(SEQ ID NO:63)代表的序列表示具有5'-A和3'-C的2-9-314聚体修饰的核苷酸-DNA-修饰的核苷酸间隔体,例如2-9-3LNA-DNA-LNA间隔体。一些ASO可以是如本文别处所述的交替侧翼间隔体。在一些实施方式中,具有7个核苷酸间隙的交替侧翼间隔体的选定示例是SEQ ID NO 5、33和71。

[0081] 从其最广泛的意义上说,本发明提供了与腺苷激酶(ADK)RNA(SEQ ID NO:1)互补的反义寡核苷酸,其包含长度为10-30个核苷酸的序列,其中所述反义寡核苷酸包含至少一个亲和力增强核苷酸类似物,并且其中所述反义寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯或类似的核苷间键。在一些实施方式中,本发明的反义寡核苷酸具有硫代磷酸酯核苷间键的替代方案,例如主链(骨架,backbone)可以是另一种类型的主链,例如磷酸二酯键、磷酸三酯键、甲基磷酸酯键、氨基磷酸酯键或其组合。在优选的实施方式中,替代核苷主链适合反义寡核苷酸的医学用途。

[0082] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸与SEQ ID NO:2互补,SEQ ID NO:2是SEQ ID NO:1的5'端(ADK pre mRNA的核苷酸1:25349)并且其对编码ADK的长亚型的mRNA具有特异性。因此,在一些实施方式中,本发明提供选择性靶向编码ADK长亚型的mRNA的反义寡核苷酸。在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸与SEQ ID NO:120或121互补。在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸是与SEQ ID NO:120或121互补并且抑制ADK RNA的剪接的混合体。在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸与SEQ ID NO:122-132中的任一个互补。在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:101-119中的任一个。在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸是混合体,即其不含有超过4个DNA核苷酸的连续链段,例如不超过3个连续DNA核苷酸。在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸是间隔体,其中反义寡核苷酸含有至少五个连续DNA核苷酸的连续链段。用于医学目的的反义寡核苷酸的大小很重要,因此根据本发明的反义寡核苷酸被设计用于此类用途。在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸的长度为10-30个核苷酸,并且在一些实施方式中,反义寡核苷酸的长度为14-19个核苷酸。

[0083] 反义寡核苷酸的反义功效取决于稳定性、对靶RNA的亲和力和其它因素。反义寡核苷酸中亲和力增强核苷类似物(例如LNA)的存在提供了这样的优点。在优选的实施方式中,

本发明的反义寡核苷酸中使用的亲和力增强核苷酸类似物选自LNA、三环DNA、2'-氟、2'-O-甲基、2'甲氧基乙基(2'MOE)、2'环乙基(cET)、UNA、2'氟和构象受限的核苷(CRN)。在一些实施方式中,此类寡核苷酸可包含LNA、DNA与三环DNA、2'-氟、2'-O-甲基、2'甲氧基乙基(2'MOE)、2'环乙基(cET)、UNA、2'氟和构象受限的核苷(CRN)中的一种或多种的组合。

[0084] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸包含至少一个LNA。在一些实施方式中,反义寡核苷酸包含30-55%的LNA。在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸是LNA/DNA寡核苷酸,但进一步包含作为三环DNA、2'-氟、2'-O-甲基、2'甲氧基乙基(2'MOE)、2'环乙基(cET)、UNA、2'氟和构象受限的核苷(CRN)中的任一个的一种或多种核苷。

[0085] 在一些优选的实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸包含LNA,其中所述LNA是 β -D-氧基LNA。

[0086] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸被设计为使得所有核苷间键都是硫代磷酸酯键。在一些实施方式中,本发明提供了一系列有效的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸是SEQ ID NO 3-73中的任一个。在一些实施方式中,本发明提供了一系列有效的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸是SEQ ID NO 74-100中的任一个。在一些实施方式中,本发明提供了一系列有效的反义寡核苷酸,其中该反义寡核苷酸是SEQ ID NO 133-147中的任一个。在一些实施方式中,本发明提供了选自SEQ ID NO:10、11、14、16、18、23、36、41、42、43、64、65、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146或147的反义寡核苷酸。

[0087] 在表1和2中,列出的ASO始终以5'至3'方向描绘。因此,ASO的5'端与表中的pre-mRNA“结束”编号杂交,并且ASO的3'端与表中的pre-mRNA“起始”编号杂交。

[0088] 表1提供了与SEQ ID NO:1)互补的反义寡核苷酸的基序列表。表1进一步呈现了包含基序序列的ASO间隔体设计。

[0089] 表2提供了与SEQ ID NO:1)互补的反义寡核苷酸的基序列表。表2进一步呈现了包含基序序列的ASO混合体设计。

[0090] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸与SEQ ID NO:2内的序列互补,该序列是ADK长形式中独特的序列。

[0091] 在一些实施方式中,LNA混合体被设计为靶向剪接位点附近的ADK pre mRNA,并防止剪接事件。在一些实施方式中,混合体寡核苷酸与SEQ ID NO:120内的序列互补;5' GATGCGAAGA GGGGCGGGA CCAGAGAGTG GATGGCAGAG GTGGGCTGTA GAGCCAAAGT GGGGTGGGAG CGCGAAGATG GCAGCTGCTG AGGAGGAGCC GAAGCCCAA AAGCTGAAGG TGGAGGCGCC GCAAGCGCTG AGGTGAGCGC TGCCGACTT GGGGAGGAGG GTGACGGCGC TGCAAGCAAG CCAGGGCCCA CGTGGGGTTG CACGGCCCCG ACGCTGGGTG GTGTCTCTCA CTGCCAGCTT 3'。

[0092] 在一些实施方式中,本发明的混合体与SEQ ID NO:121内的序列互补;5' GAAGATGGCA GCTGCTGAGG AGGAGCCGAA GCCCAAAAAG CTGAAGGTGG AGGCGCCGCA AGCGCTGAGG TGAG 3'。

[0093] 在一些实施方式中,本发明的反义寡核苷酸与SEQ ID NO:122-132中的任一个互补。

[0094] 表3特异性ASO靶序列。

[0095] 表1列出了SEQ ID NO:1(完整的ADK pre mRNA序列)中靶区域的位置、本发明的各

个反义寡核苷酸的基序 (SEQ ID NO:101-111) 和特定反义寡核苷酸间隔体化合物 (SEQ ID NO:3-73和133-147)。

[0096] 表2列出了SEQ ID NO:1中靶区域的位置、本发明的各个反义寡核苷酸的基序 (SEQ ID NO:112-119) 和特定反义寡核苷酸混合体化合物 (SEQ ID NO:74-100)。

[0097] 表1

[0098] 表1:与SEQ ID NO:1) 互补的间隔体或连续核碱基序列、由它们制成的ASO设计、以及基于基序序列设计的特定ASO化合物的列表。对于SEQ ID NO:3-74和133-147,大写字母是亲和力增强核苷类似物,例如LNA,例如 β -d-氧基LNA,大写字母C是LNA 5'甲基C,并且至少一个核苷间键是非天然键,例如硫代磷酸酯键。

[0099]

起始 SEQ ID 1	结束 SEQ ID 1	SEQ ID NO	基序	SEQ ID NO	化合物
132	146	101	TCACCTCAGCGCTTG	3	TCacctcagcGctTG
132	146	101	TCACCTCAGCGCTTG	4	TCacctcAgegctTG
132	146	101	TCACCTCAGCGCTTG	5	TCaccTcagegctTG
782	798	102	AAAGTTGCAACATCAAT	6	AAagtTGCaacatCAAT
782	798	102	AAAGTTGCAACATCAAT	7	AAAgttGCaacatCAAT
782	798	102	AAAGTTGCAACATCAAT	8	AAaGTTgcaacatCAAT
830	848	103	CTTTATACTTATTAGGAAG	9	CTTtatacTtattagGAAG
830	848	103	CTTTATACTTATTAGGAAG	10	CTttatactAtTAGgAAG
830	848	103	CTTTATACTTATTAGGAAG	11	CTttAtacttattAGgAAG
830	848	103	CTTTATACTTATTAGGAAG	12	CTtTaTacttaTtaGgAAG
830	848	103	CTTTATACTTATTAGGAAG	13	CTTtAtacttAttaGgAAG
830	848	103	CTTTATACTTATTAGGAAG	14	CTTtatacttAtTAGgAAG
830	848	103	CTTTATACTTATTAGGAAG	15	CTtTatacttATTaggAAG
830	848	103	CTTTATACTTATTAGGAAG	16	CTttatactTaTTaggAAG
830	848	103	CTTTATACTTATTAGGAAG	17	CTtTataCTtAttaggAAG
830	848	103	CTTTATACTTATTAGGAAG	18	CTttataCttatTAGgAAG
830	848	103	CTTTATACTTATTAGGAAG	19	CTtTATacttatTAGgAAG
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	20	GTttaaAtCagTtTGAT
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	21	GTttaaTcagTtTGAT
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	22	GTtTtAaatcagTtTGAT
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	23	GTTtTaaatcagTtTGAT
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	24	GTttaaatcAGtTGAT
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	25	GTttaaAtCaGtTGAT
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	26	GTtTaaatCaGtTGAT
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	27	GTTtAaatcaGtTGAT
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	28	GTtTaaatcaGtTGAT
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	29	GTttaaatcaGtTGAT
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	30	GTttaaatcAgtTGAT
5865	5881	105	GCTTTTTAAAGCAACAG	31	GCtTTtTaaagcAaCAG
5865	5881	105	GCTTTTTAAAGCAACAG	32	GCttttAAagCaaCAG
5865	5881	105	GCTTTTTAAAGCAACAG	33	GCttttaaAGcaacAG
5865	5881	105	GCTTTTTAAAGCAACAG	34	GCtTtTaAagcaacAG
5865	5881	105	GCTTTTTAAAGCAACAG	35	GCtttTaAagcaacAG
5865	5881	105	GCTTTTTAAAGCAACAG	36	GCtTtTAAagcaacAG
5865	5881	105	GCTTTTTAAAGCAACAG	37	GCtTtTaaagcaacAG
5865	5882	106	AGCTTTTTAAAGCAACAG	38	AGcttttAaAgcAaCAG
5865	5882	106	AGCTTTTTAAAGCAACAG	39	AGcttttaaAgcAaCAG

[0100]

5865	5882	106	AGCTTTTTAAAGCAACAG	40	AGctTTtaaagcAaCAG
5865	5882	106	AGCTTTTTAAAGCAACAG	41	AGctTtTtAAagcaaCAG
7203	7219	107	CTTTGGGATTTTCAGAAA	42	CTTtgggattTCaGAAA
7203	7219	107	CTTTGGGATTTTCAGAAA	43	CTtgggattTCaGAAA
7203	7219	107	CTTTGGGATTTTCAGAAA	44	CTtgggATtTcaGAAA
7203	7219	107	CTTTGGGATTTTCAGAAA	45	CTtTgGgattCaGAAA
7203	7219	107	CTTTGGGATTTTCAGAAA	46	CTtTgGgattCaGAAA
7203	7219	107	CTTTGGGATTTTCAGAAA	47	CTtTgggatTTcaGAAA
7203	7219	107	CTTTGGGATTTTCAGAAA	48	CTtgggATiTcaGAAA
7203	7219	107	CTTTGGGATTTTCAGAAA	49	CTtgggATTcaGAAA
7203	7219	107	CTTTGGGATTTTCAGAAA	50	CTTtgggaTTcaGAAA
15679	15695	108	CAAAGCTCTTTTCCTTG	51	CAaagctctTTtccTTG
15679	15695	108	CAAAGCTCTTTTCCTTG	52	CAaagctcTtTtccTTG
15679	15695	108	CAAAGCTCTTTTCCTTG	53	CAaAgctcttTtccTTG
15679	15695	108	CAAAGCTCTTTTCCTTG	54	CAAagctcttTtccTTG
15679	15695	108	CAAAGCTCTTTTCCTTG	55	CAaagctcttTtccTTG
15679	15695	108	CAAAGCTCTTTTCCTTG	56	CAaagctcTtttccTTG
24985	25001	109	AACTTCAGAAACACTTA	57	AAcTtCAgaaacaCTTA
24985	25001	109	AACTTCAGAAACACTTA	58	AAcTtCAgaaacaCtTA
24985	25002	110	GAACTTCAGAAACACTTA	59	GAActtcagAaAcaCTTA
24985	25002	110	GAACTTCAGAAACACTTA	60	GAaCtCagaaacaCTTA
24985	25002	110	GAACTTCAGAAACACTTA	61	GAaCtCagaaacAcTTA
24985	25002	110	GAACTTCAGAAACACTTA	62	GAActtcagaAACacTTA
24985	25002	110	GAACTTCAGAAACACTTA	63	GAacttcAGaAaCacTTA
24985	25002	110	GAACTTCAGAAACACTTA	64	GAaCtCagaaaCacTTA
24985	25002	110	GAACTTCAGAAACACTTA	65	GAACtCagaaaCacTTA
24985	25002	110	GAACTTCAGAAACACTTA	66	GAActtCagAaacacTTA
24985	25002	110	GAACTTCAGAAACACTTA	67	GAactCagaaACAcTtTA
25284	25297	111	AAAATGGCCGCGCC	68	AAaatggccgcGCC
25284	25297	111	AAAATGGCCGCGCC	69	AAaatggcCgCgCC
25284	25297	111	AAAATGGCCGCGCC	70	AAaaTggccgCgCC
25284	25297	111	AAAATGGCCGCGCC	71	AAaatggccgCgCC
25284	25297	111	AAAATGGCCGCGCC	72	AAaatggccgCgCC
25284	25297	111	AAAATGGCCGCGCC	73	AAAatggccGcgCC
5865	5882	106	AGCTTTTTAAAGCAACAG	133	AGcttTtAAagcaaCAG
5865	5882	106	AGCTTTTTAAAGCAACAG	134	AGctTtttAAagcaaCAG
5865	5882	106	AGCTTTTTAAAGCAACAG	135	AGctTtTtAAagcaaCAG
5865	5882	106	CTTTATACTTATTAGGAAG	136	CTttatactTaTTaGgAAG
5865	5882	106	CTTTATACTTATTAGGAAG	137	CTttatacttATaGgAAG

[0101]

5865	5882	106	CTTTATACTTATTAGGAAG	138	CTttatacttATtAggAAG
7203	7219	107	CTTTGGGATTCAGAAA	139	CTTtgggatTTCaGAAA
7203	7219	107	CTTTGGGATTCAGAAA	140	CTTtgggattTcaGAAA
7203	7219	107	CTTTGGGATTCAGAAA	141	CTTtgggattTCagAAA
24985	25002	110	GAACCTCAGAAACACTTA	142	GAACttcagaaaCacTTA
24985	25002	110	GAACCTCAGAAACACTTA	143	GAACttcagaaaCactTA
5865	5881	105	GCTTTTTAAAGCAACAG	144	GCtTtTAAagcaaCAG
5865	5881	105	GCTTTTTAAAGCAACAG	145	GCtTtTAAagcaacAG
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	146	GTtTaaatcagTtTGAT
926	943	104	GTTTTAAATCAGTTTGAT	147	GTTtTaaatcagTtGAT

[0102] 表2:与SEQ ID NO:1)互补的混合体或连续核碱基序列、由它们制成的ASO设计、以及基于基序序列设计的特定ASO化合物的列表。对于SEQ ID NO:74-100,大写字母是亲和力增强核苷类似物,例如LNA,例如 β -d-氧基LNA,大写字母C是LNA 5'甲基C,并且至少一个核苷间键是非天然键,例如硫代磷酸酯键。

[0103]

起始 SEQ ID 1	结束 SEQ ID 1	基序 SEQ ID NO:	基序	化合物 SEQ ID NO:	化合物
74	87	112	CAGCTGCCATCTTC	74	CAGctGccaTCTTC
74	87	112	CAGCTGCCATCTTC	75	CAgcTgCcatCtTC
74	87	112	CAGCTGCCATCTTC	76	CAgctGccAtctTC
74	88	113	GCAGCTGCCATCTTC	77	GCagcTgCcaTctTC
74	88	113	GCAGCTGCCATCTTC	78	GCaGctGccaTctTC
74	88	113	GCAGCTGCCATCTTC	79	GCagcTgccAtctTC
75	88	114	GCAGCTGCCATCTT	80	GCAgctGccAtCTT
75	88	114	GCAGCTGCCATCTT	81	GCagcTgccAteTT
75	88	114	GCAGCTGCCATCTT	82	GCaGcTgcCateTT
132	145	115	CACCTCAGCGCTTG	83	CACcTCaGcgcTTG
132	145	115	CACCTCAGCGCTTG	84	CAcctCagCGctTG
132	145	115	CACCTCAGCGCTTG	85	CAcctCagcGctTG
132	146	101	TCACCTCAGCGCTTG	86	TCacCTcAgcGcTTG
132	146	101	TCACCTCAGCGCTTG	87	TCacCtcAgcGcTTG
132	146	101	TCACCTCAGCGCTTG	88	TCaccTcAgcGctTG
132	147	116	CTCACCTCAGCGCTTG	89	CTcAccTcAgcGctTG
132	147	116	CTCACCTCAGCGCTTG	90	CTcaCctCagcGctTG
132	147	116	CTCACCTCAGCGCTTG	91	CTcAcctCagcGctTG
133	146	117	TCACCTCAGCGCTT	92	TCaccTCagcGCTT
133	146	117	TCACCTCAGCGCTT	93	TCAcctCaGcGcTT

[0104]	133	146	117	TCACCTCAGCGCTT	94	TCaccTcAgcGcTT
	133	147	118	CTCACCTCAGCGCTT	95	CTcAcctCagcGcTT
	133	147	118	CTCACCTCAGCGCTT	96	CTcAccTcAgCgcTT
	133	147	118	CTCACCTCAGCGCTT	97	CTcACctcAGgcTT
	134	147	119	CTCACCTCAGCGCT	98	CTcAcCTcagCgCT
	134	147	119	CTCACCTCAGCGCT	99	CTcaCcTeaGcgCT
	134	147	119	CTCACCTCAGCGCT	100	CTcAccTcAgcgCT

[0105] 表3针对表1的AS0的靶序列。

SEQ ID NO:	靶序列
122	CAAGCGCTGAGGTGA
123	ATTGATGTTGCACTTT
124	CTTCCTAATAAGTATAAAG
125	ATCAAAGTATTAAAAC
126	CTGTTGCTTTAAAAAGC
127	CTGTTGCTTTAAAAAGCT
128	TTTCTGAAATCCCAAAG
129	CAAGGAAAAGAGCTTTG
130	TAAGTGTTTCTGAAGTT
131	TAAGTGTTTCTGAAGTTC
132	GGCGCGGCCATTTT

[0107] 在一些实施方式中,本发明的反义寡核苷酸是SEQ ID NO:3-73或74-100或133-147中的任一个,其中寡核苷酸包含至少一个非天然核苷间键,例如硫代磷酸酯键。在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸是SEQ ID NO:3-73或74-100或133-147中的任一个,并且包含至少5个非天然核苷间键,例如至少5个硫代磷酸酯键。在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸是SEQ ID NO:3-73或74-100或133-147中的任一个,并且包含至少7个非天然核苷间键,例如至少8个或至少9个或至少10个或至少15个或所有核苷间键都是非天然的,例如硫代磷酸酯键。在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸是SEQ ID NO:3-73或74-100或133-147中的任一个,并且非天然核苷是LNA。

[0108] 在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸是SEQ ID NO:3-73或74-100或133-147中的任一个,并且非天然核苷是LNA,例如 β -d-氧基LNA并且LNA C是5'甲基C。在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸是SEQ ID NO:3-73或74-100或133-147中的任一个,并且非天然核苷是 β -d-氧基LNA并且LNA C是5'甲基C并且所有核苷间键都是硫代磷酸酯键。

[0109] 在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸选自列表SEQ ID NO:10、11、14、16、18、23、36、41、42、43、64、65、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146或147。在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸选自列表SEQ ID NO:10、11、14、16、18、23、36、41、42、43、64、65、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146或147,其中根据表1和2中的列表,大写字母是LNA,例如 β -d-氧基LNA,LNA C是5'甲基C,并且所有核苷间键都是硫代磷酸酯键。

[0110] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸是以下中的任一个:

[0111] 寡核苷酸是SEQ ID NO中的任一个:

[0112] (SEQ ID NO 10) 5'CTttatacttATtAGgAAG 3'或

[0113] (SEQ ID NO 16) 5'CTttatactTaTTaggAAG 3'或

[0114] (SEQ ID NO 41) 5'AGctTtTtAAagcaaCAG 3'或

[0115] (SEQ ID NO 42) 5'CTTtgggattTCaGAAA 3'或

[0116] (SEQ ID NO 43) 5'CTtgggattTCaGAAA3'或

[0117] (SEQ ID NO 136) 5'CTttatactTaTTaGgAAG 3'或

[0118] (SEQ ID NO 137) 5'CTttatacttATtaGgAAG 3'或

[0119] (SEQ ID NO 139) 5'CTtgggatTTCaGAAA 3'

[0120] 其中大写字母为LNA,如 β -d-氧基LNA,LNA C为5'甲基C,并且所有核苷间键均为硫代磷酸酯键。

[0121] 在一些实施方式中,本发明提供了RNA抑制剂,例如靶向ADK RNA(SEQ ID NO:1)的siRNA。在一些实施方式中,本发明提供了一种选择性靶向编码ADK长亚型(SEQ ID NO:2)的mRNA的siRNA。在一些实施方式中,本发明提供了一种靶向ADK-L mRNA并且包含SEQ ID NO:3-73或74-100或133-147中任一个的siRNA。在一些实施方式中,本发明的siRNA包含SEQ ID NO:101-119中的任一个。在一些实施方式中,本发明的siRNA的靶序列包含对应于SEQ ID NO:122-132中任一个的RNA序列。

[0122] siRNA是本领域众所周知的,并且可以由本领域技术人员容易地设计,如W016/057893(通过引用包含在内)所描述的。

[0123] 组合物和用途

[0124] 本发明的化合物用于组合物中,例如用于本发明的药物组合物中,并且用作药物,以及用于治疗、减轻、改善、预先治疗或预防本文公开的疾病,例如神经障碍,包括癫痫。

[0125] 在一些实施方式中,本发明的化合物包含在组合物中,例如用于治疗疾病的药物组合物,所述疾病是其中腺苷激酶活性的调节有益于预防性、治愈性或疾病修正性(disease modifying)治疗、预防、减轻或改善疾病或疾病参数的疾病。在一些实施方式中,治疗、预防、减轻或改善是治愈性的。在一些实施方式中,治疗、预防、减轻或改善是疾病修正性的。在一些实施方式中,治疗、预防、减轻或改善是预防性的。

[0126] 可以通过化合物和组合物治疗、减轻、改善、预先治疗或预防性治疗的疾病包括作为非限制性示例的中枢神经系统(CNS)或周围神经系统(PNS)的疾病,包括神经障碍、神经退行性障碍、神经发育障碍或精神疾病。

[0127] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用作神经保护剂。

[0128] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防CNS或PNS疾病、神经障碍、神经退行性障碍、神经发育障碍、与细胞创伤和炎症相关的中枢和周围神经疾病、神经元损伤、海马损伤、创伤性脑损伤、记忆障碍、海马硬化、帕金森病、多发性硬化症、急性脊髓损伤、肌萎缩侧索硬化症、共济失调、贝尔麻痹、夏科-玛丽-图斯特病、头痛、霍顿氏头痛、偏头痛、皮克氏病、进行性核上性麻痹、多系统变性、运动神经元病、亨廷顿病、朊病毒病、克雅氏病、皮质基底节变性、原发性进行性失语症或其症状或影响。

[0129] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗癫痫。

[0130] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗癫痫发作。

[0131] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防癫痫和/或癫痫发作,优选治疗耐受性癫痫、获得性、遗传性和/或特发性癫痫,疗法耐受性癫痫综合征、耐药性癫痫、耐药性局灶性癫痫、自发性癫痫发作、疗法耐受性癫痫发作、局灶性癫痫、全身性癫痫或癫痫持续状态。

[0132] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防癫痫、耐药性癫痫、耐药性局灶性癫痫、癫痫发作、自发性癫痫发作、疗法耐受性癫痫发作、局灶性癫痫,优选地其中所述局灶性癫痫集中于额叶、顶叶、枕叶或颞叶,全身性癫痫,优选地其中所述全身性癫痫选自失神、肌阵挛性癫痫发作、强直阵挛性癫痫发作、强直性癫痫发作、失张力性癫痫发作、阵挛性癫痫发作和肌痉挛、癫痫持续状态、急性脑损伤诱发的癫痫发生、常染色体显性遗传性夜间额叶癫痫、缓慢睡眠期间的持续棘波、德拉维特综合征、中风后发生的癫痫、癫痫性脑病、痴笑性癫痫、失神、良性新生儿癫痫发作、Jeavons综合征、青少年肌阵挛性癫痫、Landau-Kleffner综合征、Lennox-Gastaut综合征、内侧颞叶癫痫、肌阵挛性静态癫痫、Ohtahara综合征、Panayiotopoulos综合征、PCDH19综合征、伴有中央颞区棘波的良好儿童癫痫、Sturge-Weber综合征、症状性局灶性癫痫、短暂性癫痫性遗忘症和韦斯特综合征、和/或神经胶质瘤相关性癫痫。

[0133] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防疼痛,优选地其中所述疼痛是慢性疼痛、神经性疼痛、化疗诱导的神经性疼痛、偏头痛、头痛、痛觉过敏、异常性疼痛和/或纤维肌痛。

[0134] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗疼痛。

[0135] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防疼痛、慢性疼痛、神经性疼痛、化疗诱导的神经性疼痛、偏头痛(包括有先兆的偏头痛和无先兆偏头痛)、原发性头痛、紧张性头痛、丛集性头痛、霍顿斯头痛、慢性每日头痛、窦性头痛、创伤后头痛、运动性头痛、持续性偏头痛、睡眠性头痛、痛觉过敏、热痛觉过敏、异常性疼痛、触觉异常性疼痛和/或纤维肌痛。

[0136] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防精神障碍、认知障碍、睡眠障碍、心血管障碍、呼吸障碍、癌症、肾脏病症、炎症或代谢紊乱。

[0137] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防精神障碍、神经精神障碍、焦虑症、抑郁症、双相情感障碍、注意力缺陷多动障碍、注意力缺陷障碍、自闭症、阿斯伯格症、图雷特症、精神分裂症、偏执型精神分裂症、青春型精神分裂症、紧张性精神分裂症、未分化型精神分裂症、残留型精神分裂症、单纯性精神分裂症或未特指的精神分裂症。

[0138] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防认知障碍、认知损伤、痴呆、阿尔茨海默病、血管性痴呆、额颞叶痴呆或路易体痴呆。

[0139] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防睡眠障碍。

[0140] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用作睡眠调节剂。

- [0141] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于睡眠促进。
- [0142] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防心血管障碍、外周动脉疾病、术后心房颤动、心力衰竭、慢性心力衰竭、脑内出血诱导的脑损伤、中风、脑缺血或局部缺血。
- [0143] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防呼吸障碍、哮喘或慢性阻塞性肺病。
- [0144] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防癌症、神经系统中的癌症、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、肝癌或癌症转移。
- [0145] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防肾病症、肾损伤、肾炎症、蛋白尿或肾小球损伤。
- [0146] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防炎症。
- [0147] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防炎性病症、氧化应激、炎症、细胞凋亡、关节炎、骨关节炎、类风湿性关节炎和与这些病情相关的疼痛、脑炎、脑膜炎、人拉斯穆森脑炎、大脑皮层和/或海马体的炎症、进行性认知减退、结肠炎、溃疡性结肠炎或炎症性肠病。
- [0148] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防代谢紊乱,优选糖尿病,更优选1型或2型糖尿病。
- [0149] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物用于治疗、减轻、预先治疗或预防普拉德-威利综合征、安格尔曼综合征、神经纤维瘤病、血管生成相关疾病、促进血管生成、视网膜病症,优选糖尿病性视网膜病变或听力损失。
- [0150] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物通过全身给药、鞘内给药、心室内给药至CNS或静脉内给药来给药。
- [0151] 在一些实施方式中,根据本发明的反义寡核苷酸或组合物与一种或多种用于治疗本发明的任何疾病的其它活性药物成分组合使用。
- [0152] 根据一个实施方式,本发明涉及根据本发明的反义寡核苷酸的用途,其中其它活性药物成分是用于治疗本发明的疾病的成分。
- [0153] 根据一个实施方式,本发明涉及根据本发明的反义寡核苷酸的用途,其中其它药物成分是靶向miR-27b或miR-134或两者的反义寡核苷酸。
- [0154] 根据一个实施方式,本发明涉及一种药物组合物,其包含有效剂量的根据本发明的反义寡核苷酸和药学上可接受的载体。
- [0155] 根据一个实施方式,本发明涉及一种包含有效剂量的根据本发明的反义寡核苷酸的药物组合物,其中所述反义寡核苷酸是唯一的活性药物成分。
- [0156] 在一些实施方式中,抗腺苷激酶化合物可以有利地与用于待通过该抗腺苷激酶组合物治疗的某种疾病的其它疗法一起使用。
- [0157] 因此,本发明的抗腺苷激酶反义寡核苷酸与一种或多种其它疗法组合使用。在一些实施方式中,所述其它疗法是抗miR-27b反义寡核苷酸。在一些实施方式中,所述其它疗法是抗miR-134反义寡核苷酸。在一些实施方式中,所述其它疗法在哺乳动物(例如人类)中诱导Nrf-2/ARE途径。在一些实施方式中,所述抗腺苷激酶反义寡核苷酸组合物与抗miR27b

反义寡核苷酸、抗miR-134反义寡核苷酸和诱导Nrf-2/ARE途径的疗法中的一种或多种组合使用。

[0158] 在一些实施方式中,本发明的靶向腺苷激酶的反义寡核苷酸用于其中它们是唯一活性成分的组合中,并且在一些实施方式中,它们用于包含其它活性药物成分的组合中。

[0159] 本发明提供了包含本发明的抗腺苷激酶反义寡核苷酸化合物的药物组合物,其进一步包含药学上可接受的载体。

[0160] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物包含抗腺苷激酶反义寡核苷酸作为唯一的活性药物成分。在一些实施方式中,本发明的药物组合物中存在一种或多种活性药物成分。

[0161] 剂量

[0162] 表述“有效剂量”表示可以实现期望效果的药物的剂量。在本发明的上下文中,期望的效果是降低腺苷激酶的活性。腺苷激酶活性的降低可以通过测量腺苷激酶的水平来测量,例如当使用导致ADK mRNA或ADK pre mRNA降解的寡核苷酸时。

[0163] 本发明的化合物以有效剂量使用,并且组合物包含有效剂量的本发明化合物。

[0164] 在一些实施方式中,每次给药时所给予的化合物的剂量(例如单位剂量)在0.001mg/kg-25mg/kg的范围内。

[0165] 在一些实施方式中,有效剂量是足以在连续给药剂量之间的时间段内将腺苷激酶或其活性下调至显著水平的剂量,例如对受试者有治疗益处的水平。

[0166] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物可以制备用于给药以提供初始剂量积累阶段,根据疾病病理学,该阶段之后可以是维持剂量方案以在受试者中(例如在受试者的靶组织中)维持化合物浓度,这将有效治疗疾病。剂量的有效性例如可以通过观察指示疾病状态的疾病参数来测量;或者取决于靶组织,可以通过观察各种组织参数来测量,例如腺苷激酶的活性;或者在替代示例中,血浆中可测量的疾病状态相关参数。

[0167] 药物递送

[0168] 各种递送系统是已知的并且可用于给予本发明的治疗剂。给药方法包括但不限于皮下给药、静脉内给药、肠胃外给药、经鼻给药、肺部给药、直肠给药、阴道给药、子宫内给药、尿道内给药、眼部给药、耳部给药、皮肤给药、皮内给药、肌肉内给药、腹膜内给药、硬膜外给药、心室内给药、脑内给药、鞘内给药或口服给药或直接给药到脑或脑脊液中。组合物可以通过任何方便的途径给药,例如通过输注或推注、通过上皮或粘膜皮肤组织(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与或不与其它生物活性剂一起给药。给药可以是全身或局部的。另外,可以通过任何合适的途径将本发明的组合物给药到中枢神经系统中,包括心室内和鞘内给药。心室内注射可以通过心室内导管来促进,例如附接至储器(诸如Ommaya储器)的心室内导管。还可以采用肺部给药,例如通过使用吸入器或喷雾器以及用气雾化剂配制。优选地,将治疗剂递送至CNS或PNS。

[0169] 给药方式包括吸入给药、通过注射器或微型渗透泵直接至肌肉的肌肉内递送、通过注射器或微型渗透泵直接给药至腹膜的腹腔内给药、通过注射器直接给药至皮肤下方的皮下给药、通过注射或使用连接到渗透泵的小导管直接给药至大脑中心室的心室内给药。此外,可以制备植入物(例如小型硅植入物),将其放置在肌肉中或直接放置在脊髓上。可以

需要将本发明的组合物局部给药至需要治疗的区域；这可以例如但不限于通过局部给药、通过注射、通过导管、通过栓剂或通过植入物来实现，所述植入物可以是多孔的、无孔的或凝胶状材料，包括膜，例如硅橡胶(sialastic)膜或纤维。

[0170] 药物组合物

[0171] 本发明还提供药物组合物。此类组合物可包含治疗有效量的治疗剂和药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的”可以定义为经监管机构批准的。监管机构可以是例如欧洲药品管理局、联邦或州政府、或在美国药典或其它普遍认可的用于动物且更具体地用于人类的药典中列出的机构。术语“治疗有效量”可定义为导致临床上显著抑制、改善或逆转病症或疾病的发展或发生的治疗剂的量。术语“载体(carrier)”可以指与治疗剂一起给药的稀释剂、佐剂、赋形剂或运载介质(载体,vehicle)。此类药物载体可以是无菌液体，例如水和油，包括石油、动物、植物或合成来源的那些油，例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内给予药物组合物时，水可以是优选的载体。盐水溶液以及葡萄糖水溶液和甘油溶液也可以用作液体载体，特别是对于可注射溶液而言。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。如果需要，组合物还可含有润湿剂或乳化剂、或pH缓冲剂。这些组合物可以采取溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、缓释制剂等形式。该组合物可以与常规粘合剂和载体(例如甘油三酯)一起配制为栓剂。口服制剂可以包括标准载体，例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。此类组合物可含有治疗有效量的治疗剂，优选纯化形式的治疗剂，以及适量的载体，以提供适合向患者给药的形式。制剂可以适合给药方式。用于静脉内给药的组合物可以是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时，组合物还可包括增溶剂和局部麻醉剂(例如利多卡因)以减轻注射部位的疼痛。这些成分可以单独提供或在单位剂型中混合在一起提供，例如作为干燥的冻干粉末或无水浓缩物，装在密封容器(例如标明活性剂的量的安瓿或小袋)中。当组合物通过输注给药时，可以用含有无菌药物级水或盐水的输注瓶来分配。当组合物通过注射给药时，可以提供注射用无菌水或盐水的安瓿，以便可以在给药之前混合所述成分。

[0172] 实施例

[0173] 实施例1. 例如包含LNA核苷酸的寡核苷酸的合成在文献中是众所周知的。LNA单体和寡核苷酸合成可以使用W02007/11275的实施例1和2中提及的方法进行。

[0174] 可以使用W02007/112754的实施例4中提到的方法来进行LNA寡核苷酸在人类或大鼠血浆中的稳定性评价。可以使用W02007/11275的实施例6中提及的方法进行用LNA-修饰的反义寡核苷酸处理培养的细胞。

[0175] 实施例2. 使用W02007/112754的实施例10中提及的方法进行来自培养的细胞和组织的RNA分离和表达分析。使用(Djebali et al. Nature 489:101-108或Chu et al. Nucleic Acid Ther. 22:271-274或Wang et al. Nature Reviews Genetics 10:57-63)中提到的方法对培养的细胞和组织进行基于RNAseq的转录谱分析。

[0176] 实施例3. 细胞培养

[0177] 贴壁人类乳腺腺癌细胞系MCF7(ECACC编号:86012803)购自ATCC(目录号:HTB-22™)并且保存于装在Nunc™EasYFlask™细胞培养瓶(目录号:159910,Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA,USA)中的Eagle最低必需培养基(目录号:M2279,Sigma Aldrich,

St.Louis,MO,USA)中,该培养基提供有10%胎牛血清(目录号:F4135,Sigma Aldrich,St.Louis,MO,USA)、1%非必需氨基酸(目录号:11140050,Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA,USA)、1%L-谷氨酰胺(目录号:G7513,Sigma Aldrich,St.Louis,MO,USA)和1%青霉素/链霉素(目录号:P4333,Sigma Aldrich,St.Louis,MO,USA)。将细胞在37°C下保存在湿润的5%CO₂培养箱中并每周传代两次。

[0178] 实施例4.反义寡核苷酸化合物文库的初步筛选

[0179] 设计了97个反义寡核苷酸的文库以选择性地靶向腺苷激酶长亚型(ADK-L)的第一外显子,该外显子在腺苷激酶短亚型(ADK-S)中不存在。反义寡核苷酸由IDT(Coralville,Iowa,USA)合成并且在无菌条件下用无核酸酶水(目录号:AM9938,Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA,USA)稀释至500μM的储备浓度。将重悬的寡核苷酸储存在-20°C下。

[0180] 在转染前一天,将MCF7细胞以1.25x10⁵个细胞/孔接种到24孔Nunc™细胞培养处理的多培养皿(目录号:142475,Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA,USA)中。在转染当天,转染前一小时除去细胞培养基,并添加475uL维持培养基。将所有寡核苷酸均在Opti-MEM(目录号:31985-070,Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA,USA)中稀释至最终孔浓度10nM。将Lipofectamine™RNAiMAX(目录号:13778150,Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA,USA)在Opti-MEM中稀释至最终孔浓度1.5uL。将等量的RNAiMAX和反义寡核苷酸溶液混合并温育五分钟,然后将25uL混合物添加到孔中。作为实验对照,使用了乱序对照寡核苷酸和仅RNAiMAX处理的细胞。转染后48小时,使用RNeasy迷你试剂盒(目录号:74106,Qiagen,Hilden,Germany)按照制造商的说明进行RNA提取。使用Superscript IV逆转录酶(目录号:18090010,Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA,USA)按照制造商的说明进行逆转录,包括通过ezDNase™(目录号:11766051,Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA,USA)并使用随机六聚体引物(目录号:S0142,Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA,USA)进行gDNA去除。在QuantStudio 6Flex(Applied Biosystems,Waltham,MA,USA)上使用由Integrated DNA Technologies(Newark,NJ,USA)合成的Taqman测定(表1)和TaqMan™Universal Master Mix II,no UNG(目录号:4440040,Thermo Fischer Scientific,Waltham,MA,USA)按照制造商的说明进行qPCR。所有测定均设计为跨外显子,并通过引物Blast确认特异性,并且使用五倍稀释系列测试引物的效率。将Hprt1用作看家基因。所使用的ADK测定仅检测ADK-L mRNA。

[0181] 表1 qPCR引物和探针

基因	正向引物	反向引物	探针	目录号:
<i>ADK-L</i> <i>1</i>	GCCCAAAAAGC TGAAGGTGG	GCAGAGATGTCAA GCAGAGGA	/56-FAM/CGCCGCAAG/ZE N/CGCTGAGAGAA/3IABkF Q/	定制
[0182] <i>ADK-L</i> <i>2</i>	TGGGCTGTAGA GCCAAAGTG	AGCAGAGATGTCA AGCAGAGG	/56-FAM/GGAGCGCGA/ZE N/AGATGGCAGCT/3IABkF Q/	定制
<i>Hprt1</i>	GCGATGTCAAT AGGACTCCAG	TTGTTGTAGGATA TGCCCTTGA	/56-FAM/AGCCTAAGA/ZE N/TGAGAGTTCAAGTTGA GTTTGG/3IABkFQ/	Hs.PT.58v.4 5621572

[0183] 所有数据均在Microsoft Excel中计算,并在Prism ver.9.1.1(GraphPad,San Diego,CA,USA)中可视化。使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法分析qPCR结果,使用仅用RNAiMAX处理的细胞作为参考。第一次筛选(图2.1)是在 $n=1$ 的情况下进行的,并进行了两次技术重复,并被描述为平均值 \pm SEM。选择前十二个候选物(SEQ ID NO:16、43、42、41、65、10、14、18、23、36、64和11),并且在后续实验中确认了ADK-L mRNA敲低的水平($n,N=2,3-4$, ($n=$ 生物重复, $N=$ 技术重复)),在图2.2中描绘为平均值 \pm SEM。为了进一步验证结果,使用对ADK-L具有特异性的第二qPCR测定法分析所述靠前的反义寡核苷酸。

[0184] 实施例5:通过选择的反义寡核苷酸敲低ADK-L

[0185] 如实施例2中那样进行转染和qPCR(仅ADK-L 1测定),不同之处在于反义寡核苷酸浓度为5、1或0.2nM。重复该实验,给出两个生物重复,每个重复两个技术重复。图3.1显示了剂量-响应研究的结果,基于该结果选择化合物SEQ ID NO:10、16、41、42、43、136、137和139进行IC₅₀值测试。

[0186] 实施例6:培养细胞系中所选ADK-L反义寡核苷酸的IC₅₀值的确定

[0187] 如实施例3中那样进行转染和qPCR,不同之处在于用从90nM至0.004nM的3倍稀释的一系列反义寡核苷酸浓度转染细胞。在Graphpad Prism(版本9.0.2,GraphPad Software)中将通过qPCR确定的ADK-L相对水平相对于log(M)进行绘图。使用3-参数非线性拟合来拟合剂量-响应曲线并且以nM计算IC₅₀值。重复该实验,给出两到三个生物重复,每个重复具有两个技术重复。

[0188] 图4.1显示了ADK-L反义寡核苷酸的剂量-响应曲线和IC₅₀值。

[0189] 实施例7:培养细胞系中的RNA测序

[0190] 按照上述实验进行细胞转染,不同之处在于反义寡核苷酸浓度分别为3和30nM。重复该实验,给出三个生物重复。使用miRNeasy迷你试剂盒(目录号:217004,Qiagen)从细胞沉淀中分离RNA,使用无RNase的DNase集(目录号:79254,Qiagen)去除污染的基因组DNA。使用RNA Nano芯片在Bioanalyzer 2100(目录号:5067-1511,Agilent technologies,Santa Clara,CA,USA)上评估最终的RNA质量。将分离的RNA样品耗尽rRNA并且准备用于使用SMARTer链式总RNA样品制备试剂盒-HI哺乳动物(目录号:38229000,Takara Bio Europa)进行测序。使用RiboGone进行rRNA耗尽,并使用AMPure XP珠粒(目录号:A63881,Beckman Coulter,Brea,CA,USA)纯化剩余的RNA,并且是根据制造商的协议完成文库构建。对最终的文库在Pippin Prep(Sage Science,Inc.Beverly,MA,USA)上进行尺寸选择(150-500bp),使用Qubit和高灵敏度芯片(Agilent)在Bioanalyzer 2100上进行质量控制,并使用KAPA文库定量试剂盒(Kapa Biosystems,Wilmington,MA,USA)进行定量。在Novogene(Cambridge,UK)的Novaseq 6000S4上进行RNA-seq。

[0191] 通过使用Trim Galore(v0.4.1)去除适配子序列并修剪掉Phred评分低于20的低质量碱基,对测序数据进行预处理。使用FastQC和MultiQC¹进行质量控制,以确保高质量的数据。

[0192] 通过使用STAR²将过滤的读取映射到人类基因组(hg19)来进行基因表达的量化。使用软件FeatureCounts来量化映射到使用Gencode V37³的基因注释的每个基因的读取数量。

[0193] 使用R中的DESeq2对基因表达水平进行差异表达分析⁴。使用GGGenome作为参考,

通过计算机分析,找到了每个反义寡核苷酸的预测基因靶标⁵。每个反义寡核苷酸的序列与来自RefSeq的成熟剪接mRNA序列(剪接)和未剪接pre-mRNA序列(剪接前)进行匹配,允许总共最多三个插入、缺失或错配。每个反义寡核苷酸匹配的插入、缺失和错配的总和表示为“距离”(d),代表了预测的靶位点的质量;d=0表示完美匹配,并且d=3表示反义寡核苷酸和(pre-)mRNA之间的结合中存在三个插入、缺失或错配。将预测的mRNA和pre-mRNA反义寡核苷酸靶向与来自RNA-seq的基因表达和差异表达分析进行比较,以估计哪些基因由于反义寡核苷酸脱靶而差异表达。所有绘图均在R中完成。

¹ Philip Ewels and others, ‘MultiQC: Summarize Analysis Results for Multiple Tools and Samples in a Single Report’, *Bioinformatics*, 32.19 (2016), 3047–48 <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>>.

² Alexander Dobin and others, ‘STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner’, *Bioinformatics*, 29.1 (2013), 15–21 <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>>.

³ Yang Liao, Gordon K Smyth, and Wei Shi, ‘FeatureCounts: An Efficient General Purpose Program for Assigning Sequence Reads to Genomic Features’, *Bioinformatics*, 30.7 (2014), 923–30 <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>>.

⁴ Michael I Love, Wolfgang Huber, and Simon Anders, ‘Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2’, *Genome Biology*, 15.12 (2014), 550 <<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>>.

⁵ Tokuyuki Yoshida and others, ‘Evaluation of Off-Target Effects of Gapmer Antisense Oligonucleotides Using Human Cells’, *Genes to Cells*, 24.12 (2019), 827–35 <<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/gtc.12730>>.

[0194] 为了评估反义寡核苷酸处理对ADK表达的影响,对表达水平进行归一化并在样品之间进行比较(图5.1)。

[0195] 图5.1显示了ADK(两种亚型)的归一化mRNA表达值,n=3。

[0196] 为了评估ADK-L特异性反义寡核苷酸对整个转录组的影响,进行了差异基因表达分析,并在火山图中可视化所得数据(图5.2):用Seq ID 42(左)和序列Seq ID 139(右)处理的细胞的差异基因表达分析。火山图显示了Seq ID 42、Seq ID 139和模拟处理细胞之间转录物的不同水平,将反义寡核苷酸处理组和模拟处理组之间RNA表达的变化与差异表达的显著性相关联。x轴表示表达的相对变化,而y轴表示显著性。

[0197] 每个点表示特定的RNA。黑点表示不显著的变化,而灰点表示显著的值。

[0198] 为了检查RNA表达的变化是否可归因于1)通过靶向转录组中的其它序列而产生的直接效应或2)直接效应的下游次级结果,进行了初步的计算机分析,使用反义寡核苷酸序列来预测1)剪接的转录组(细胞质)和2)未剪接的转录组(细胞核)内的所有潜在靶位点。这是针对具有0、1、2或3个插入、缺失或错配(统称为距离(d))的靶位点进行的。仅在反义寡核苷酸与ADK RNA结合时观察到距离0。结果如图5.3所示。

[0199] 为了评价SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:139的ADK-L特异性作用,单独对ADK-L亚型进行进一步分析。ADK-L和-S亚型因转录起始位点而异,这两种亚型使用不同的第一外显子。ADK-L亚型包括上游起始外显子并跳过ADK-S第一外显子。使用这种转录差异来区分两种亚型,通过手动研究ADK-L和ADK-S亚型中的特定第一外显子,显示Seq ID 42和139在3nM而非30nM下发生ADK-L特异性敲低,其中SEQ ID NO:42也影响ADK-S亚型(图5.4)。

[0200] 图5.4显示了ADK-L至ADK-S第一外显子的特写。IGV基因组浏览器视图显示了ADK-L(A)和ADK-S(B)的第一外显子上的读取映射。

[0201] 实施方式

[0202] 1一种与ADK mRNA (SEQ ID NO:1) 互补的反义寡核苷酸,其包含长度为10-30个核苷酸的序列,其中所述反义寡核苷酸具有至少一个亲和力增强核苷酸类似物,并且其中所述反义寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键。

[0203] 2根据实施方式1)的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸对ADK-L具有特异性并且与SEQ ID NO:2、120、121或122-132中的任一个互补。

[0204] 3根据实施方式1)或2)的反义寡核苷酸,其包含根据SEQ ID NO:101-119中的任一个的基序。

[0205] 4根据实施方式1) -3)中任一项的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸含有至少5个、例如至少6个或至少7个连续DNA核苷酸的连续链段。

[0206] 5根据实施方式1) -3)中任一项的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸不含有超过4个DNA核苷酸的连续链段,例如不超过3个连续DNA核苷酸。

[0207] 6根据实施方式1) -5)中任一项的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸包含长度为14-19个核苷酸的序列。

[0208] 7根据实施方式1) -6)中任一项所述的反义寡核苷酸,其中所述亲和力增强核苷酸类似物选自LNA、三环DNA、2'-氟、2'-O-甲基、2'甲氧基乙基(2'MOE)、2'环乙基(cET)、UNA、2'氟和构象受限的核苷(CRN)的列表。

[0209] 8根据实施方式1) -7)中任一项的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸包含至少一个LNA。

[0210] 9根据实施方式1) -8)中任一项的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸包含30-55%的LNA。

[0211] 10根据实施方式9)的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸进一步包含作为三环DNA、2'-氟、2'-O-甲基、2'甲氧基乙基(2'MOE)、2'环乙基(cET)、UNA、2'氟和构象受限的核苷(CRN)中的任一种的一个或多个核苷。

[0212] 11根据实施方式1) -10)中任一项的反义寡核苷酸,其中所述LNA是 β -D-氧基LNA。

[0213] 12根据实施方式1) -11)中任一项的反义寡核苷酸,其中所有核苷间键都是硫代磷酸酯键。

[0214] 13根据实施方式1) -12)中任一项的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸是SEQ ID NO 3-73或SEQ ID NO 133-147中的任一个,例如SEQ ID NO:10、11、14、16、18、23、36、41、42、43、64、65、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146或147中的任一个;例如SEQ ID NO:10、16、41、42、43、136、137或139中的任一个;例如以下中的任一个:

[0215] (SEQ ID NO 10) 5'CTttatacttATtAGgAAG 3'或

[0216] (SEQ ID NO 16) 5'CTttatactTaTTaggAAG 3'或

[0217] (SEQ ID NO 41) 5'AGctTtTtAAagcaaCAG 3'或

[0218] (SEQ ID NO 42) 5'CTTtgggattTCaGAAA 3'或

[0219] (SEQ ID NO 43) 5'CTtgggattTCaGAAA3'或

[0220] (SEQ ID NO 136) 5'CTttatactTaTTaGgAAG 3'或

[0221] (SEQ ID NO 137) 5'CTttatacttATtaGgAAG 3'或

[0222] (SEQ ID NO 139) 5'CTtgggatTTCaGAAA 3'

[0223] 并且其中大写字母表示LNA,小写字母是DNA,大写字母C是LNA 5-甲基胞嘧啶,LNA是 β -D-氧基LNA并且所有核苷间键都是硫代磷酸酯键。

[0224] 14根据实施方式1) - 12) 中任一项的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸是SEQ ID NO 74-100中的任一个。

[0225] 15一种组合物,其包含根据实施方式1) - 14) 中任一项的反义寡核苷酸。

[0226] 16根据实施方式1) - 14) 中任一项的反义寡核苷酸或根据实施方式15) 的组合物,用于作为药物使用。

[0227] 17根据实施方式1) - 14) 中任一项的反义寡核苷酸,或根据实施方式15) 的组合物,其中所述反义寡核苷酸或组合物用于作为药物使用,优选地其中所述药物用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防其中改变ADK活性有益的疾病中使用。

[0228] 18根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,其中所述用途是用于预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、改善、预先治疗或预防CNS或PNS疾病。

[0229] 19根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,其中所述反义寡核苷酸或所述组合物用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防CNS或PNS的疾病中使用,例如精神病、神经障碍、神经退行性障碍或神经发育障碍。

[0230] 20根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于作为神经保护剂使用。

[0231] 21根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防CNS或PNS的疾病、精神病、神经障碍、神经退行性障碍、神经发育障碍、与细胞创伤和炎症相关的中枢和周围神经疾病、神经元损伤、海马损伤、创伤性脑损伤、记忆障碍、海马硬化、帕金森病、多发性硬化症、急性脊髓损伤、肌萎缩侧索硬化症、共济失调、贝尔麻痹、夏科-玛丽-图思病、头痛、霍顿头痛、偏头痛、皮克氏病、进行性核上性麻痹、多系统变性、运动神经元病、亨廷顿病、朊病毒病、克雅氏病、皮质基底节变性、原发性进行性失语症或其症状或影响中使用。

[0232] 22根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗癫痫中使用。

[0233] 23根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正治疗癫痫发作中使用。

[0234] 24根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,其中所述反义寡核苷酸或所述组合物用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防癫痫和/或癫痫发作中使用,优选治疗耐受性癫痫,获得性、遗传性和/或特发性癫痫,疗法耐受性癫痫综合征、耐药性癫痫、耐药性局灶性癫痫、自发性癫痫发作、疗法耐受性癫痫发作、局灶性癫痫、全身性癫痫或癫痫持续状态。

[0235] 25根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防以下中使用:癫痫、耐药性癫痫、耐药性局灶性癫痫、癫痫发作、自发性癫痫发作、疗法耐受性癫痫发作、局灶性癫痫(优选地其中所述局灶性癫痫集中于额叶、顶叶、枕叶或颞叶)、全身性癫痫(优选地其中所述全身性癫痫选自失神、肌阵挛性癫痫发作、强直性-阵挛性癫痫发作、强直性癫痫发作、失张力性癫痫发作、阵挛性癫痫发作和肌痉挛)、癫痫持续状态、急性脑损伤诱发的癫痫发生、常染色体显性遗传

性夜间额叶癫痫、缓慢睡眠期间的持续棘波、德拉维特综合征、中风后发生的癫痫、癫痫性脑病、痴笑性癫痫、失神、良性新生儿惊厥、Jeavons综合征、青少年肌阵挛性癫痫、Landau-Kleffner综合征、Lennox-Gastaut综合征、内侧颞叶癫痫、肌阵挛性静态癫痫、Ohtahara综合征、Panayiotopoulos综合征、PCDH19综合征、伴有中央颞区棘波的良性儿童癫痫、Sturge-Weber综合征、症状性局灶性癫痫、短暂性癫痫性遗忘症和韦斯特综合征和/或神经胶质瘤相关性癫痫。

[0236] 26根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防疼痛中使用,优选地其中所述疼痛是慢性疼痛、神经性疼痛、化疗引起的神经性疼痛、偏头痛、头痛、痛觉过敏、异常性疼痛和/或纤维肌痛。

[0237] 27根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗疼痛中使用。

[0238] 28根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防以下中使用:疼痛、慢性疼痛、神经性疼痛、化疗诱发的神经性疼痛、偏头痛(包括有先兆偏头痛和无先兆偏头痛)、原发性头痛、紧张性头痛、丛集性头痛、霍顿斯头痛、慢性每日头痛、窦性头痛、创伤后头痛、运动性头痛、持续性偏头痛、睡眠性头痛、痛觉过敏、热痛觉过敏、异常性疼痛、触觉异常性疼痛和/或纤维肌痛。

[0239] 29根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防精神障碍、认知障碍、睡眠障碍、心血管障碍、呼吸疾病、癌症、肾病症、炎症或代谢紊乱中使用。

[0240] 30根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防精神障碍、神经精神障碍、焦虑症、抑郁症、双相情感障碍、注意缺陷多动障碍、注意缺陷障碍、自闭症、阿斯伯格症、图雷特症、精神分裂症、偏执型精神分裂症、青春型精神分裂症、紧张性精神分裂症、未分化型精神分裂症、残留型精神分裂症、单纯性精神分裂症或未特指的精神分裂症中使用。

[0241] 31根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防认知障碍、认知损伤、痴呆、阿尔茨海默病、血管性痴呆、额颞叶痴呆或路易体痴呆中使用。

[0242] 32根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防睡眠障碍中使用。

[0243] 33根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于作为睡眠调节剂使用。

[0244] 34根据实施例1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在睡眠促进中使用。

[0245] 35根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防心血管障碍、外周动脉疾病、术后心房颤动、心力衰竭、慢性心力衰竭、脑内出血引起的脑损伤、中风、脑缺血或局部缺血中使用。

[0246] 36根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防呼吸障碍、哮喘或慢性阻塞性肺病中使用。

[0247] 37根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防癌症、神经系统中的癌症、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、肝癌或癌症转移中使用。

[0248] 38根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防肾病症、肾损伤、肾炎症、蛋白尿或肾小球损伤中使用。

[0249] 39根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防炎症中使用。

[0250] 40根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防炎性病症、氧化应激、炎症、细胞凋亡、关节炎、骨关节炎、类风湿性关节炎、以及与这些病情相关的疼痛、脑炎、脑膜炎、人拉斯穆森脑炎、大脑皮层和/或海马炎症、进行性认知衰退、结肠炎、溃疡性结肠炎或炎症性肠病中使用。

[0251] 41根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在治疗、减轻、预先预防性、治愈性或疾病修正治疗或预防代谢紊乱中使用,优选糖尿病,更优选1型或2型糖尿病。

[0252] 42根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在预防性、治愈性或疾病修正性治疗、减轻、预先治疗或预防普拉德-威利斯综合征、安格尔曼综合征、神经纤维瘤病、血管生成相关疾病、促进血管生成、视网膜病症中使用,优选糖尿病视网膜病变或听力损失。

[0253] 43根据前述实施方式中任一项的反义寡核苷酸或组合物,其中所述反义寡核苷酸或组合物通过全身给药、皮下给药、经鼻、鞘内给药、心室内给药至CNS或静脉给药来给药。

[0254] 44根据前述实施方式中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于与用于预防性、治愈性或疾病修正治疗实施方式16) - 42) 的疾病的任一种的一种或多种其它活性药物成分组合使用。

[0255] 45根据实施方式44) 的用途,其中所述其它活性药物成分是制备用于预防性、治愈性或疾病修正治疗实施方式16) - 42) 中任一项的疾病的成分。

[0256] 46根据实施方式44) 或45) 的用途,其中所述其它药物成分是靶向miR-27b或miR-134的反义寡核苷酸。

[0257] 47一种药物组合物,其包含有效剂量的根据前述实施方式中任一项的反义寡核苷酸和药学上可接受的载体。

[0258] 48一种药物组合物,其包含有效剂量的根据前述实施方式中任一项所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸是唯一的活性药物成分。

[0259] 49根据实施方式47) 或48) 的药物组合物,其中所述组合物根据实施方式16) - 46) 中任一项使用。

[0260] 50根据实施方式47) - 49) 中任一项的药物组合物,其中所述组合物用于鞘内给药,或用于脑室内给药。

[0261] 51根据实施方式50) 的药物组合物,其中所述组合物在泵中给药,优选其中所述泵是微型泵,更优选其中所述微型泵是微型渗透泵。

[0262] 52根据实施方式50) - 51) 中任一项的药物组合物,其中所述组合物用于通过心室

内导管促进的心室内给药,优选其中所述导管附接至储器,优选其中所述储器是Ommaya储器。

[0263] 53根据实施方式47) - 52) 中任一项的药物组合物,其中所述组合物以1天、2天、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119或120天中任一个的间隔进行给药。

[0264] 54根据实施方式47) - 52) 中任一项的药物组合物,其中所述组合物以1-200天、10-190天、20-180天、30-170天、40-160天、50-150天、60-140天、70-130天、80-120天、90-110天或优选约100天的间隔进行给药。

[0265] 55根据实施方式1) - 15) 中任一项的反义寡核苷酸或组合物,用于在根据实施方式16) - 42) 中任一项所述的治疗疾病的方法中使用。

[0266] 56一种治疗根据实施方式16) - 42) 中任一项的疾病的方法,通过使用根据实施方式1) - 14) 中任一项所述的反义寡核苷酸或根据实施方式15) 所述的组合物或根据实施方式47) - 54) 中任一项所述的药物组合物。

[0267] 57根据实施方式16) - 46) 中任一项的用途,或根据实施方式56) 的方法,其中所述治疗是预防性、治愈性或疾病修正中的任一种。

[0268] 58一种诊断根据实施方式16) - 42) 中任一项的疾病的方法,其通过使用根据实施方式1) - 14) 中任一项所述的反义寡核苷酸或根据实施方式15) 所述的组合物。

序列表

- <110> 神经微核糖核酸治疗有限公司(Neumirna Therapeutics APS)
 萨卡里·考皮宁(Kauppinen, Sakari)
 吕克·佩德森(Perdersen, Lykke)
 斯蒂娜·诺曼·汉森(Normann Hansen , Stine)
 亨里克·克利特高德(Klitgaard, Henrik)
- <120> 靶向腺苷激酶的反义寡核苷酸
- <130> P243044PC00
- <150> PA 2021 70290
- <151> 2021-06-04
- <160> 147
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 5976
- <212> DNA
- <213> 智人
- <400> 1

```

accagagagt ggatggcaga ggtgggctgt agagccaaag tggggtggga gcgcgaagat      60
ggcagctgct gaggaggagc cgaagcccaa aaagctgaag gtggaggcgc cgcaagcgct      120
gagagaaaat attctctttg gaatgggaaa tcctctgctt gacatctctg ctgtagtgga      180
caaagatttc cttgataagt attctctgaa accaaatgac caaatcttgg ctgaagacaa      240
acacaaggaa ctgtttgatg aacttgtgaa aaaattcaaa gtcgaatatac atgctggtgg      300
ctctaccag aattcaatta aagtggctca gtggatgatt caacagccac acaaagcagc      360
aacatttttt ggatgcattg ggatagataa atttggggag atcctgaaga gaaaagctgc      420
tgaagcccat gtggatgctc attactacga gcagaatgag cagccaacag gaacttgtgc      480
tgcattgcatc actggtgaca acaggtccct catagctaata cttgctgctg ccaattgtta      540
taaaaaggaa aaacatcttg atctggagaa aaactggatg ttggtagaaa aagcaagagt      600
ttgttatata gcaggctttt ttcttacagt ttccccagag tcagtattaa aggtggctca      660
ccatgcttct gaaaacaaca ggattttcac tttgaateta tctgcaccgt ttattagcca      720
gttctacaag gaatcattga tgaaagtat gccttatggt gatatacttt ttggaaatga      780
gacagaagct gccacttttg ctagagagca aggctttgag actaaagaca ttaaagagat      840
agccaaaaaag acacaagccc tgccaaagat gaactcaaag aggcagcgaa tcgtgatctt      900
cacccaaggg agagatgaca ctataatggc tacagaaagt gaagtactg cttttgctgt      960
cttgatcaa gaccagaaag aaattattga taccaatgga gctggagatg catttgttgg      1020
aggttttctg tctcaactgg tctctgacaa gcctctgact gaatgtatcc gtgctggcca      1080
ctatgcagca agcatcataa ttagacggac tggtgcacc tttctgaga agccagactt      1140
cactgatgg aagagctgaa aacacaagcc caggagtgca gacctgccc taattgcttc      1200
ctgagaattc ccatattaat aaagaagaaa attatctgcc attttttct actataataa      1260

```

tgctgaatct	taatttagag	ggtacaagg	tatggtaatg	cttgtagaat	ctttattatc	1320
tcaacaatct	aaaaaatgat	gtttatttcc	atagtttgat	agtgccactt	aaatgccaat	1380
taaacaagaa	tataacattt	caatagaaat	ttttatttca	ttttcaatta	ctttgtaaat	1440
tcgtgtgtat	ttagtacct	gatttgtttt	tttacatttc	tgctttgaat	gcagatgcaa	1500
tttaataata	tagatttttt	aatgaattaa	tcttaacata	gtaatcttta	gctttttata	1560
caaataatatt	taatttagga	gtatatgtgt	gtctatacac	acacatacat	aaatatacca	1620
catatacacc	tgatagtcaa	ataaggtaca	gaaattttat	cttgtaatt	atgccaaata	1680
atctctttta	tgtagactca	aacatgtaat	aaactttgga	taattaaata	atgtgccaaa	1740
tttaagttgt	accacaatat	tcaaatcata	gtcttatgga	actctgtaat	tgacacaaa	1800
caaaaacttg	tcatatagga	atTTTTTct	gtcttttccc	tgtgtacagc	aaactgagga	1860
agaaaatca	ttatttaata	ctgggcctg	aatgacacc	caatttgta	atggaattat	1920
gaagaacagc	aatataatac	actgaagaat	aacttagtat	cagagacca	taaatcactt	1980
ttttaaggat	gaaccagaga	gtggatggca	gaggtggct	gtagagcaa	agtggggtgg	2040
gagcgcgaag	atggcagctg	ctgaggagga	gccgaagccc	aaaagctga	aggtggaggc	2100
gccgaagcg	ctgagagaaa	atattctctt	tggaatggga	aatcctctgc	ttgacatctc	2160
tgctgtagtg	gacaaaagatt	tccttgataa	gtattctctg	aaaccaaatg	accaaactt	2220
ggctgaagac	aaacacaagg	aactgtttga	tgaacttggt	aaaaaattca	aagtcgaata	2280
tcatgctggg	ggctctacc	agaattcaat	taaagtggct	cagtggatga	ttcaacagcc	2340
acacaaagca	gcaacatttt	ttggatgcat	tgggatagat	aaatttggg	agatcctgaa	2400
gagaaaagct	gctgaagccc	atgtggatgc	tcattactac	gagcagaatg	agcagccaac	2460
aggaacttgt	gctgcatgca	tacttggtga	caacaggtcc	ctcatagcta	atcttgctgc	2520
tgccaattgt	tataaaaagg	aaaacatct	tgatctggag	aaaactgga	tgttggtaga	2580
aaaagcaaga	gtttgttata	tagcaggctt	ttttettaca	gtttccccag	agtcagtatt	2640
aaaggtggct	cacatgctt	ctgaaaaca	caggatttcc	actttgaatc	tatctgcacc	2700
gtttattagc	cagtctaca	aggaatcatt	gatgaaagtt	atgccttatg	ttgatatact	2760
ttttggaaat	gagacagaag	ctgccacttt	tgctagagag	caaggctttg	agactaaaga	2820
cattaaagag	atagccaaaa	agacacaagc	cctgccaaag	atgaactcaa	agaggcagcg	2880
aatcgtgatc	ttcacccaag	ggagagatga	cactataatg	gctacagaaa	gtgaagtcac	2940
tgcttttgct	gtcttgatc	aagaccagaa	agaaattatt	gataccaatg	gagctggaga	3000
tgcatttggt	ggaggttttc	tgtctcaact	ggtctctgac	aagcctctga	ctgaatgtat	3060
ccgtgctggc	cactatgcag	caagcatcat	aattagacgg	actggctgca	cctttcctga	3120
gaagccagac	ttccactgat	ggaagagctg	aaaacacaag	cccaggagtg	cagacactgc	3180
cctaattgct	tcctgagaat	tcccatatta	ataaagaaga	aaattatctg	ccatTTTTTc	3240
ctactataat	aatgctgaat	cttaatttag	agggtacaag	ggtatggtaa	tgcttgtaga	3300
atctttatta	tctcaacaat	ctaaaaaatg	atgtttattt	ccatagtttg	atagtgccac	3360
ttaaatgcca	attaaacaag	aatataacat	ttcaatagaa	atTTTTTattt	cattttcaat	3420
tactttgtaa	attcgtgtgt	atttagtaca	ctgatttggt	tttttacatt	tctgctttga	3480
atgcagatgc	aatTTAatat	aatagatttt	ttaatgaatt	aatcttaaca	tagtaacttt	3540
tagcttttta	tacaaaatata	tttaatttag	gagtatatgt	gtgtctatac	acacacatac	3600

ataaatatac	cacatataca	cctgatagtc	aaataaggta	cagaaatfff	atcttgtcaa	3660
ttatgccaaa	taatctcttt	aatgtgcact	caaacatgta	ataaactttg	gataattaa	3720
taatgtgcca	aatttaagtt	gtaccacaat	attcaaatca	tagtcttatg	gaactctgta	3780
attggacaca	aacaaaaact	tgtcatatag	gaatfttttt	ctgtcttttc	cctgtgtaca	3840
gcaaaactgag	gaagaaagat	cattatftaa	tactgggccc	tgaaatgaca	cccaatftgt	3900
taatggaatt	atgaagaaca	gcaatataat	acactgaaga	ataacttagt	atcagagacc	3960
aataaatcac	ftttftaagg	atgaaccaga	gagtggatgg	cagaggtggg	ctgtagagcc	4020
aaagtgggg	gggagcgcga	agatggcagc	tgctgaggag	gagccgaagc	ccaaaaagct	4080
gaaggtggag	gcccgcgaag	cgctgagaga	aaatattctc	tttggaatgg	gaaatctct	4140
gcttgacatc	tctgctgtag	tggacaaaga	tttcttggat	aagtattctc	tgaaaccaa	4200
tgaccaaate	ttggctgaag	acaaacacaa	ggaactgttt	gatgaacttg	tgaaaaaatt	4260
caaagtcgaa	tatcatgetg	gtggctctac	ccagaattca	attaaagtgg	ctcagtggat	4320
gattcaacag	ccacacaaag	cagcaacatt	ttttggatgc	attgggatag	ataaattttg	4380
ggagatcctg	aagagaaaag	ctgctgaagc	ccatgtggat	gctcattact	acgagcagaa	4440
tgagcagcca	acaggaactt	gtgctgcatg	catcactggt	gacaacaggt	ccctcatagc	4500
taatcttgct	gctgccaatt	gttataaaaa	ggaaaaacat	cttgatctgg	agaaaaactg	4560
gatgttggta	gaaaaagcaa	gagtttgta	tatagcaggc	ttttttctta	cagtttcccc	4620
agagtcagta	ttaaaggtgg	ctcaccatgc	ttctgaaaac	aacaggattt	tcactttgaa	4680
tctatctgca	ccgtttatta	gccagttcta	caaggaatca	ttgatgaaag	ttatgcctta	4740
tgttgatata	ctttttggaa	atgagacaga	agctgccact	tttgctagag	agcaaggctt	4800
tgagactaaa	gacattaaag	agatagccaa	aaagacacaa	gcctgccaa	agatgaactc	4860
aaagaggcag	cgaatcgtga	tcttcacca	aggagagat	gacactataa	tggctacaga	4920
aagtgaagtc	actgcttttg	ctgtcttgg	tcaagaccag	aaagaaatta	ttgataccaa	4980
tggagctgga	gatgcatttg	ttggaggttt	tctgtctcaa	ctggctctctg	acaagcctct	5040
gactgaaatg	atccgtgctg	gccactatgc	agcaagcatc	ataattagac	ggactggctg	5100
cacctttcct	gagaagccag	acttccactg	atggaagagc	tgaaaacaca	agcccaggag	5160
tgcagacact	gccctaattg	cttctgaga	attcccatat	taataaagaa	gaaaattatc	5220
tgccattttt	tcctactata	ataatgctga	atcttaattt	agagggtaca	agggtatggt	5280
aatgcttgta	gaatctttat	tatctcaaca	atctaaaaaa	tgatgtttat	ttccatagtt	5340
tgatagtgcc	acttaaatgc	caattaaaca	agaatataac	atttcaatag	aaatftttat	5400
ttcattttca	attactttgt	aaattcgtgt	gtatttagta	cactgatttg	tttttttaca	5460
tttctgcttt	gaatgcagat	gcaatftaat	ataatagatt	ttftaatgaa	ttaatcttaa	5520
catagtaate	tttagctttt	tatacaata	tatttaattt	aggagtatat	gtgtgtctat	5580
acacacacat	acataaaat	accacatata	cactgatag	tcaaataagg	tacagaaatt	5640
ttatcttgte	aattatgcca	aataatctct	ttaatgtgca	ctcaaacatg	taataaactt	5700
tggataatta	aataatgtgc	caaatftaag	ttgtaccaca	atattcaaat	catagtctta	5760
tggaaactctg	taattggaca	caaacaaaa	cttgtcatat	aggaatfttt	ttctgtcttt	5820
tcctgtgta	cagcaaaactg	aggaagaaa	atcattatft	aatactgggc	cctgaaatga	5880
cacccaatft	gttaatggaa	ttatgaagaa	cagcaatata	atacactgaa	gaataactta	5940

gtatcagaga ccaataaatc acttttttaa ggatga	5976
<210> 2	
<211> 250	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 2	
gatgcgaaga gggggcggga ccagagagtg gatggcagag gtgggctgta gagccaaagt	60
gggggtgggag cgcgaagatg gcagctgctg aggaggagcc gaagcccaa aagctgaagg	120
tggaggcgcc gcaagcgtg aggtgagcgc tgccggactt ggggaggagg gtgacggcgc	180
tgcaagcaag ccagggccca cgtggggttg cacggccccg acgctgggtg gtgtctctca	240
ctgccagctt	250
<210> 3	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 3	
tcacctcagc gcttg	15
<210> 4	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 4	
tcacctcagc gcttg	15
<210> 5	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 5	
tcacctcagc gcttg	15
<210> 6	
<211> 17	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 6	
aaagttgcaa catcaat	17
<210> 7	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 7	
aaagttgcaa catcaat	17
<210> 8	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 8	
aaagttgcaa catcaat	17
<210> 9	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 9	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 10	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 11	

<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 11	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 12	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 12	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 13	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 14	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 15	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 15	
ctttatactt attaggaag	19

<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 16	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 17	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 17	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 18	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 18	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 19	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 19	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 20	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 20	

gttttaaadc agtttgat	18
<210> 21	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 21	
gttttaaadc agtttgat	18
<210> 22	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 22	
gttttaaadc agtttgat	18
<210> 23	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 23	
gttttaaadc agtttgat	18
<210> 24	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 24	
gttttaaadc agtttgat	18
<210> 25	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	

<400> 25	
gttttaaadc agtttgat	18
<210> 26	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 26	
gttttaaadc agtttgat	18
<210> 27	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 27	
gttttaaadc agtttgat	18
<210> 28	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 28	
gttttaaadc agtttgat	18
<210> 29	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 29	
gttttaaadc agtttgat	18
<210> 30	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 寡核苷酸	
<400> 30	
gttttaaadc agtttgat	18
<210> 31	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 31	
gctttttaaadc gcaacag	17
<210> 32	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 32	
gctttttaaadc gcaacag	17
<210> 33	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 33	
gctttttaaadc gcaacag	17
<210> 34	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 34	
gctttttaaadc gcaacag	17
<210> 35	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	35	
	gcttttttaa gcaacag	17
<210>	36	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	36	
	gcttttttaa gcaacag	17
<210>	37	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	37	
	gcttttttaa gcaacag	17
<210>	38	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	38	
	agctttttaa agcaacag	18
<210>	39	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	39	
	agctttttaa agcaacag	18
<210>	40	
<211>	18	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 40	
agctttttaa agcaacag	18
<210> 41	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 41	
agctttttaa agcaacag	18
<210> 42	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 42	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 43	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 43	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 44	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 44	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 45	
<211> 17	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 45	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 46	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 46	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 47	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 47	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 48	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 48	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 49	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 49	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 50	

<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 50	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 51	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 51	
caaagctctt ttccttg	17
<210> 52	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 52	
caaagctctt ttccttg	17
<210> 53	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 53	
caaagctctt ttccttg	17
<210> 54	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 54	
caaagctctt ttccttg	17

<210>	55	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	55	
	caaagctctt ttccttg	17
<210>	56	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	56	
	caaagctctt ttccttg	17
<210>	57	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	57	
	aacttcagaa acactta	17
<210>	58	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	58	
	aacttcagaa acactta	17
<210>	59	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	59	

gaacttcaga aacactta	18
<210> 60	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 60	
gaacttcaga aacactta	18
<210> 61	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 61	
gaacttcaga aacactta	18
<210> 62	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 62	
gaacttcaga aacactta	18
<210> 63	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 63	
gaacttcaga aacactta	18
<210> 64	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	

<400> 64	
gaacttcaga aacactta	18
<210> 65	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 65	
gaacttcaga aacactta	18
<210> 66	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 66	
gaacttcaga aacactta	18
<210> 67	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 67	
gaacttcaga aacactta	18
<210> 68	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 68	
aaaatggccg cgcc	14
<210> 69	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 寡核苷酸	
<400> 69	
aaaatggccg cgcc	14
<210> 70	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 70	
aaaatggccg cgcc	14
<210> 71	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 71	
aaaatggccg cgcc	14
<210> 72	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 72	
aaaatggccg cgcc	14
<210> 73	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 73	
aaaatggccg cgcc	14
<210> 74	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	74	
cagctgccat cttc		14
<210>	75	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	75	
cagctgccat cttc		14
<210>	76	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	76	
cagctgccat cttc		14
<210>	77	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	77	
gcagctgccca tcttc		15
<210>	78	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	78	
gcagctgccca tcttc		15
<210>	79	
<211>	15	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 79	
gcagctgccca tcttc	15
<210> 80	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 80	
gcagctgccca tctt	14
<210> 81	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 81	
gcagctgccca tctt	14
<210> 82	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 82	
gcagctgccca tctt	14
<210> 83	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 83	
cacctcagcg cttg	14
<210> 84	
<211> 14	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 84	
cacctcagcg cttg	14
<210> 85	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 85	
cacctcagcg cttg	14
<210> 86	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 86	
tcacctcagc gcttg	15
<210> 87	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 87	
tcacctcagc gcttg	15
<210> 88	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 88	
tcacctcagc gcttg	15
<210> 89	

<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 89	
ctcacctcag cgcttg	16
<210> 90	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 90	
ctcacctcag cgcttg	16
<210> 91	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 91	
ctcacctcag cgcttg	16
<210> 92	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 92	
tcacctcagc gctt	14
<210> 93	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 93	
tcacctcagc gctt	14

<210> 94	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 94	
tcacctcagc gctt	14
<210> 95	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 95	
ctcacctcag cgctt	15
<210> 96	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 96	
ctcacctcag cgctt	15
<210> 97	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 97	
ctcacctcag cgctt	15
<210> 98	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 98	

ctcacctcag cgct	14
<210> 99	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 99	
ctcacctcag cgct	14
<210> 100	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 100	
ctcacctcag cgct	14
<210> 101	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 101	
tcacctcagc gcttg	15
<210> 102	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 102	
tcacctcagc gcttg	15
<210> 103	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	

<400> 103	
aaagttgcaa catcaat	17
<210> 104	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 104	
gttttaaate agtttgat	18
<210> 105	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 105	
gctttttaa gcaacag	17
<210> 106	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 106	
agctttttaa agcaacag	18
<210> 107	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 107	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 108	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 寡核苷酸	
<400> 108	
caaagctctt ttccttg	17
<210> 109	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 109	
aacttcagaa aactta	17
<210> 110	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 110	
gaacttcaga aactta	18
<210> 111	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 111	
aaaatggccg cgcc	14
<210> 112	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 112	
cagctgcat cttc	14
<210> 113	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	113	
gcagctgccca tcttc		15
<210>	114	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	114	
gcagctgccca tctt		14
<210>	115	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	115	
cacctcagcg cttg		14
<210>	116	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	116	
ctcacctcag cgcttg		16
<210>	117	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	117	
tcacctcagc gctt		14
<210>	118	
<211>	15	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 118	
ctcacctcag cgctt	15
<210> 119	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 119	
ctcacctcag cgct	14
<210> 120	
<211> 250	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 120	
gatgcgaaga gggggcggga ccagagagt gatggcagag gtgggctgta gagccaaagt	60
gggggtgggag cgccaagatg gcagctgctg aggaggagcc gaagcccaa aagctgaagg	120
tggaggcgcc gcaagcgctg aggtgagcgc tgccggactt ggggaggagg gtgacggcgc	180
tgcaagcaag ccagggccca cgtgggggtg cacggccccg acgctgggtg gtgtctctca	240
ctgccagctt	250
<210> 121	
<211> 74	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 121	
gaagatggca gctgctgagg aggagccgaa gcccanaaag ctgaaggtgg aggcgcccga	60
agcgctgagg tgag	74
<210> 122	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 寡核苷酸	
<400> 122	
caagcgctga ggtga	15
<210> 123	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 123	
attgatggtg caacttt	17
<210> 124	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 124	
cttcctaata agtataaag	19
<210> 125	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 125	
atcaaactga tttaaac	18
<210> 126	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 126	
ctggtgcttt aaaaagc	17
<210> 127	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	127	
	ctggttgcttt aaaaagct	18
<210>	128	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	128	
	tttctgaaat cccaaag	17
<210>	129	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	129	
	caaggaaaag agctttg	17
<210>	130	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	130	
	taagtgtttc tgaagtt	17
<210>	131	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	131	
	taagtgtttc tgaagttc	18
<210>	132	
<211>	14	
<212>	DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 132	
ggcgcggcca tttt	14
<210> 133	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 133	
agctttttaa agcaacag	18
<210> 134	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 134	
agctttttaa agcaacag	18
<210> 135	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 135	
agctttttaa agcaacag	18
<210> 136	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 136	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 137	
<211> 19	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 137	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 138	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 138	
ctttatactt attaggaag	19
<210> 139	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 139	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 140	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 140	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 141	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 141	
ctttgggatt tcagaaa	17
<210> 142	

<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 142	
gaacttcaga aacactta	18
<210> 143	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 143	
gaacttcaga aacactta	18
<210> 144	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 144	
gctttttaa gcaacag	17
<210> 145	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 145	
gctttttaa gcaacag	17
<210> 146	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 146	
gttttaaadc agtttgat	18

<210> 147

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 147

gttttaaate agtttgat

18

表1 qPCR引物和探针

基因	正向引物	反向引物	探针	目录号
<i>ADK-L 1</i>	GCCCAAAAAGCTG AAGGTGG	GCAGAGATGTCAAGC AGAGGA	/56- FAM/CGCCGCAAG/ZEN/CGC TGAGAGAA/3IABkFQ/	定制的
<i>ADK-L 2</i>	TGGGCTGTAGAGC CAAAGTG	AGCAGAGATGTCAAG CAGAGG	/56- FAM/GGAGCGCGA/ZEN/AG ATGGCAGCT/3IABkFQ/	定制的
<i>Hprt1</i>	GCGATGTCAATAG GACTCCAG	TTGTTGTAGGATATG CCCTTGA	/56- FAM/AGCCTAAGA/ZEN/TGA GAGTTCAAGTTGAGTTTGG/3 IABkFQ/	Hs.PT.58v.4 5621572

图1

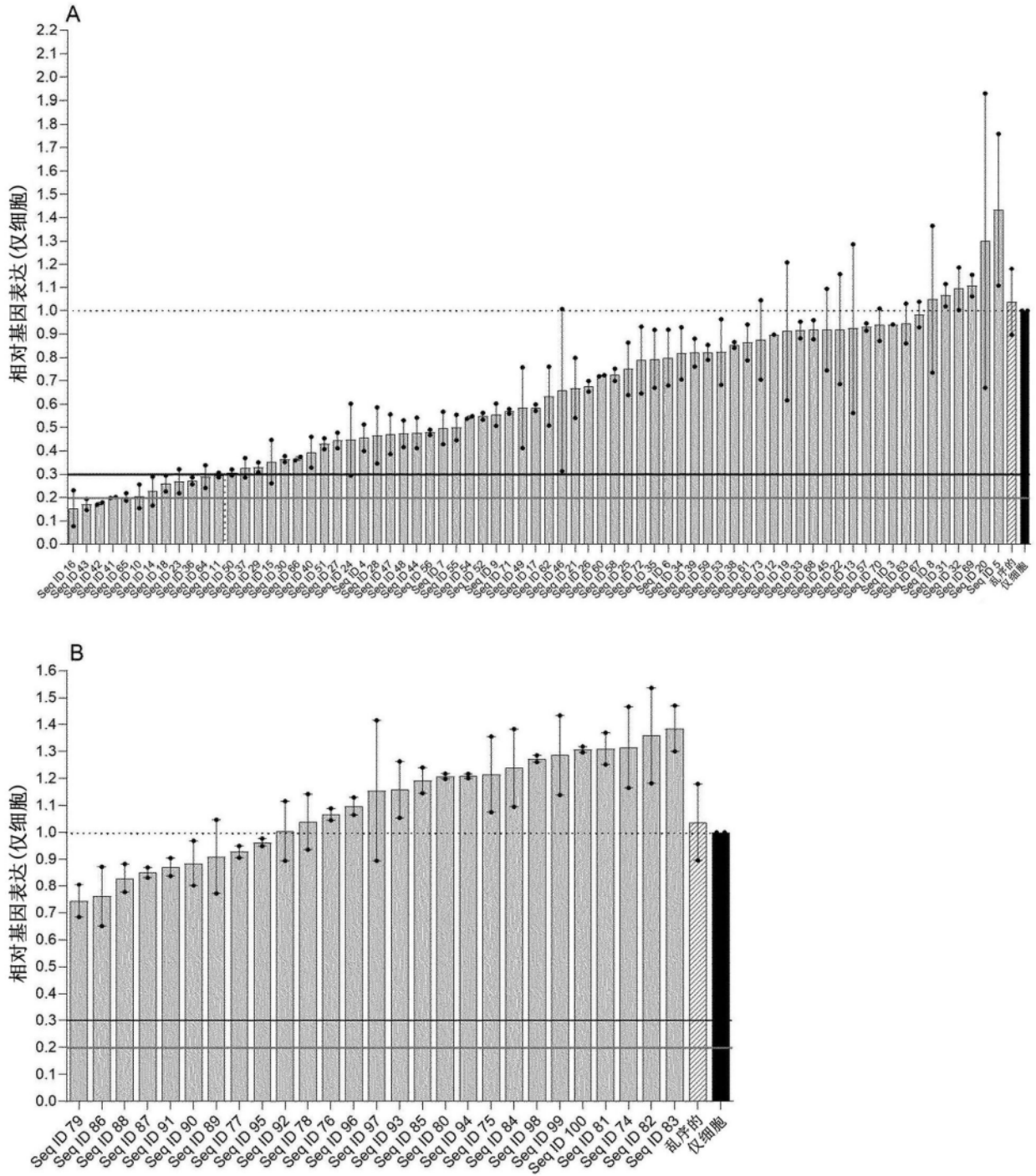


图2.1A和B

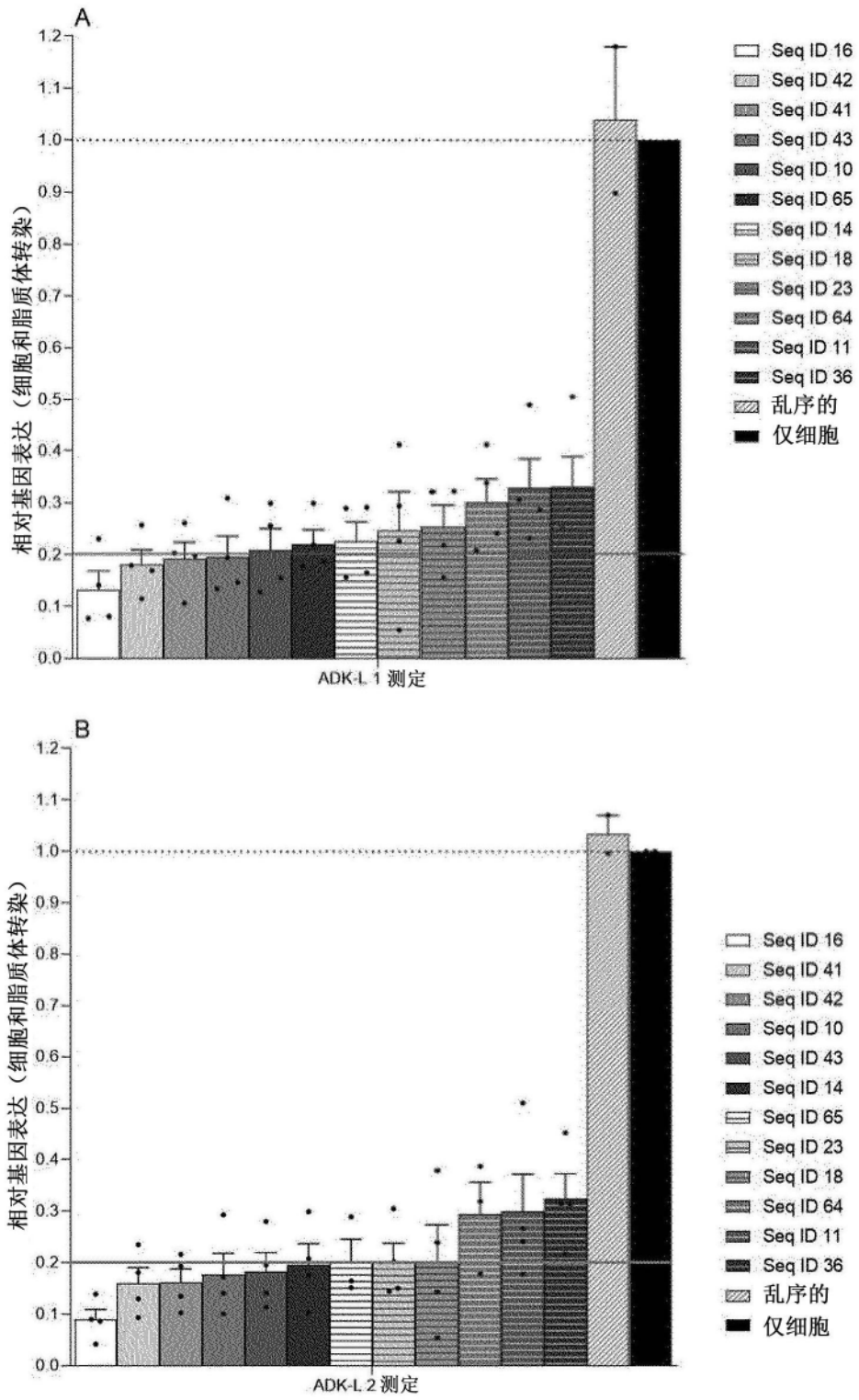


图2.2A和B

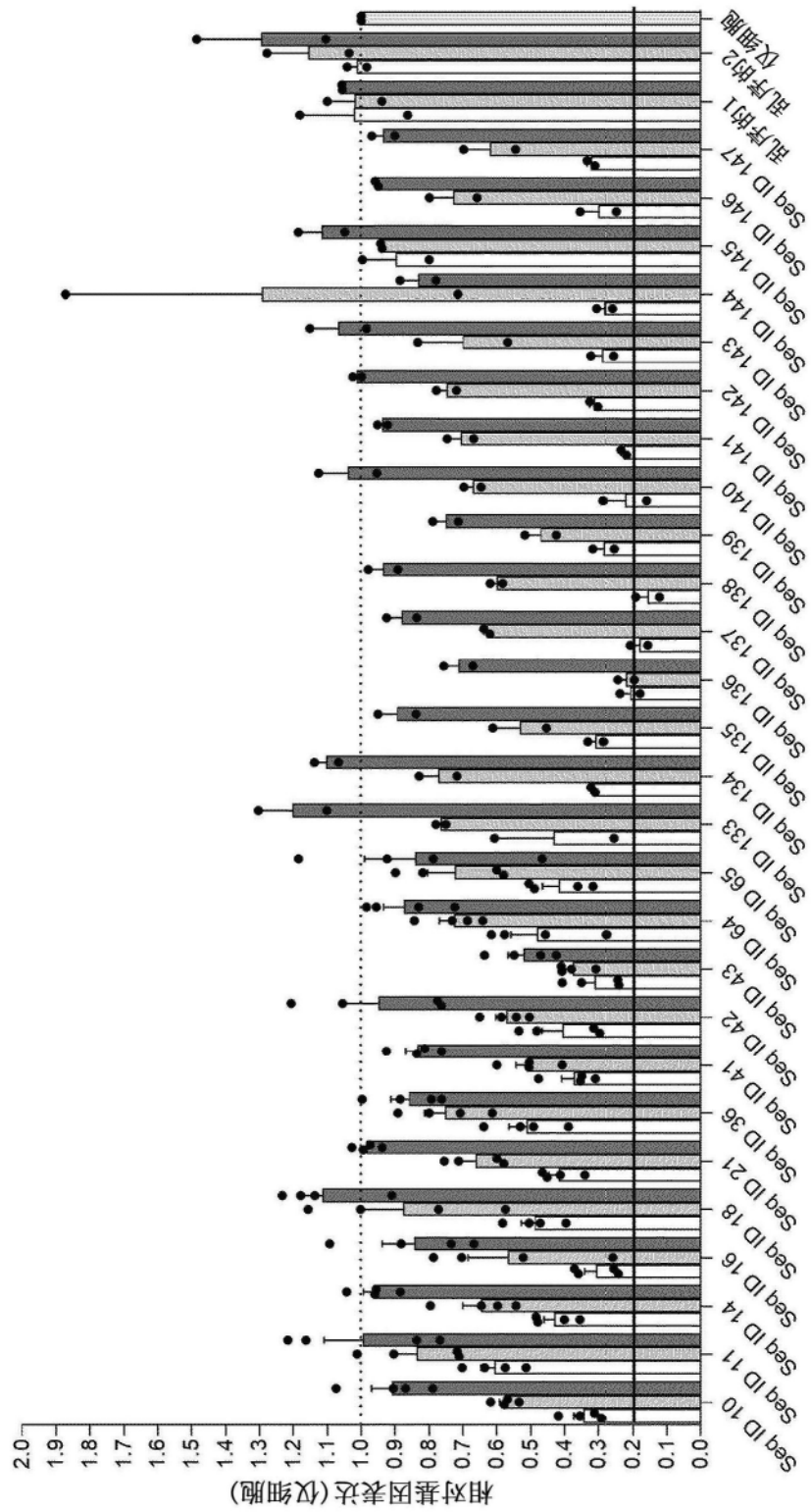


图3.1

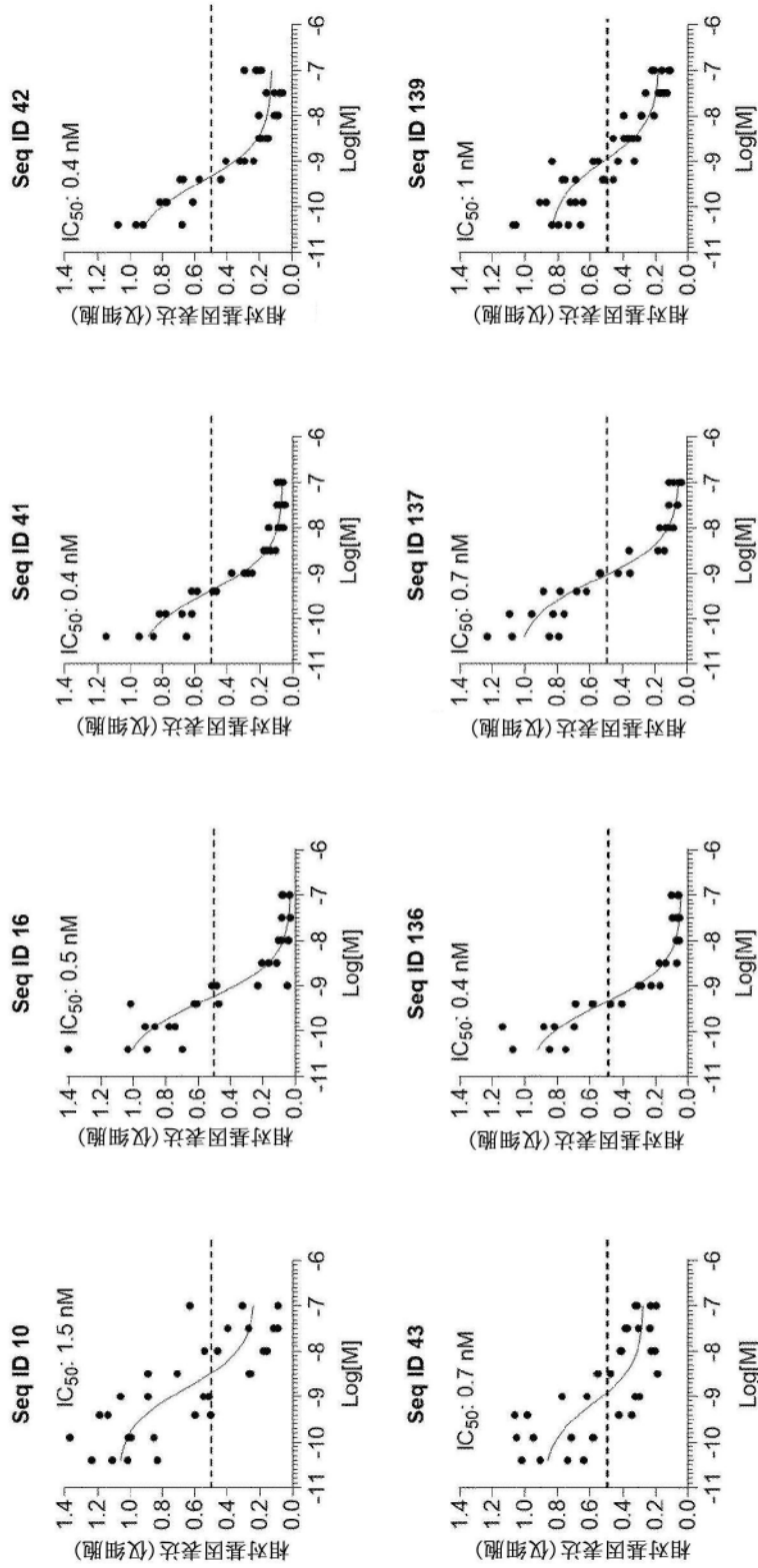


图4.1

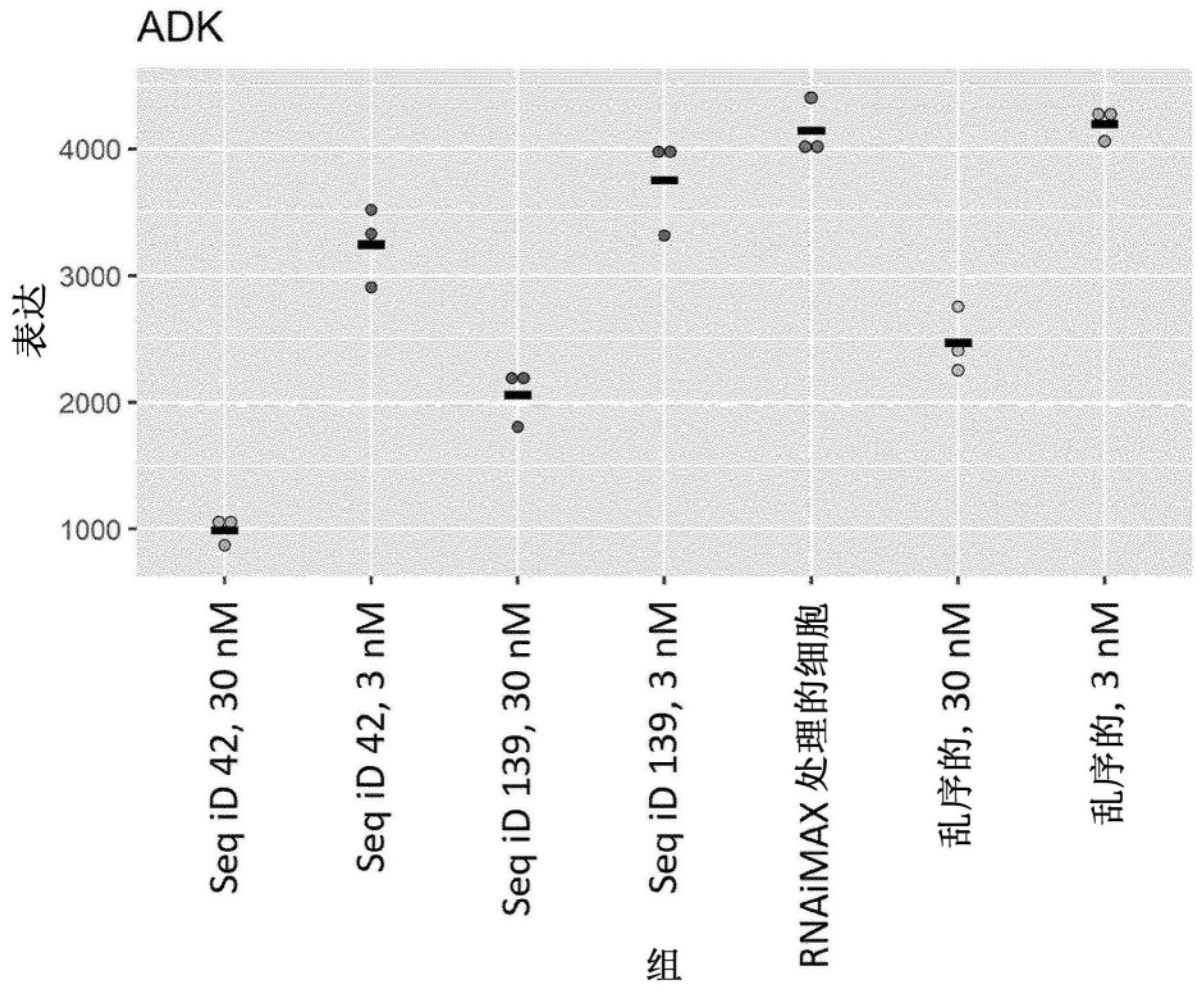


图5.1

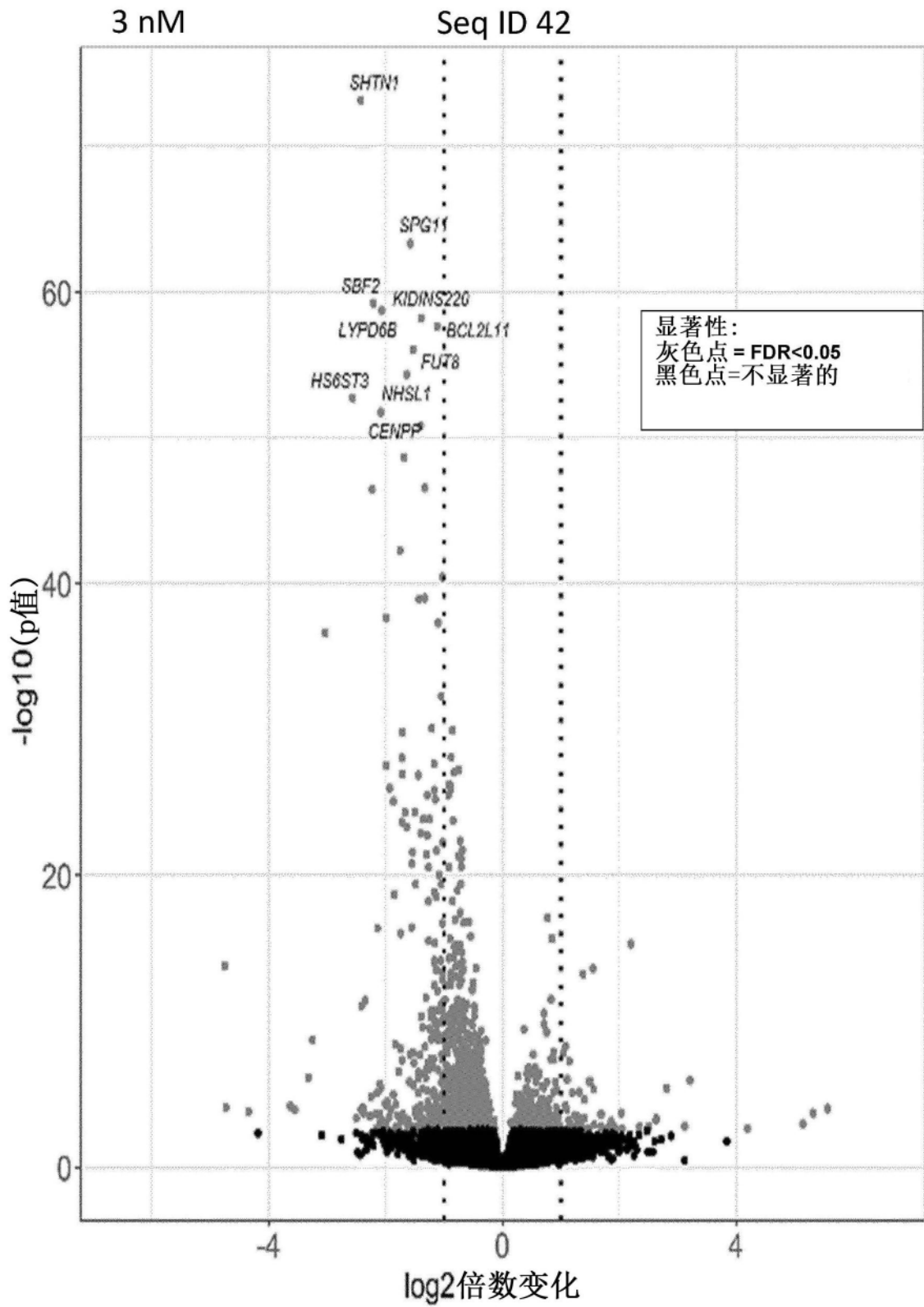


图5.2

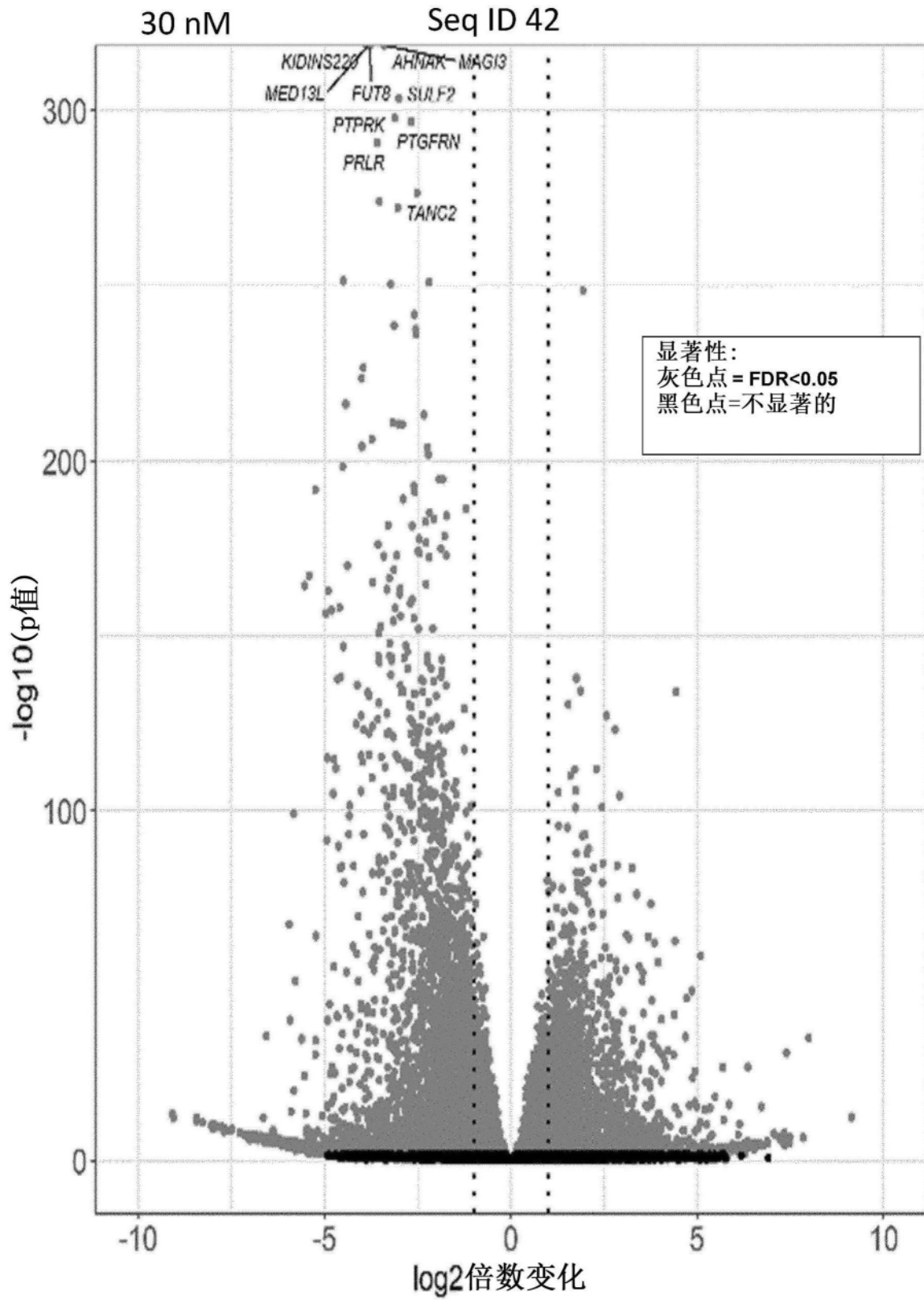


图5.2续

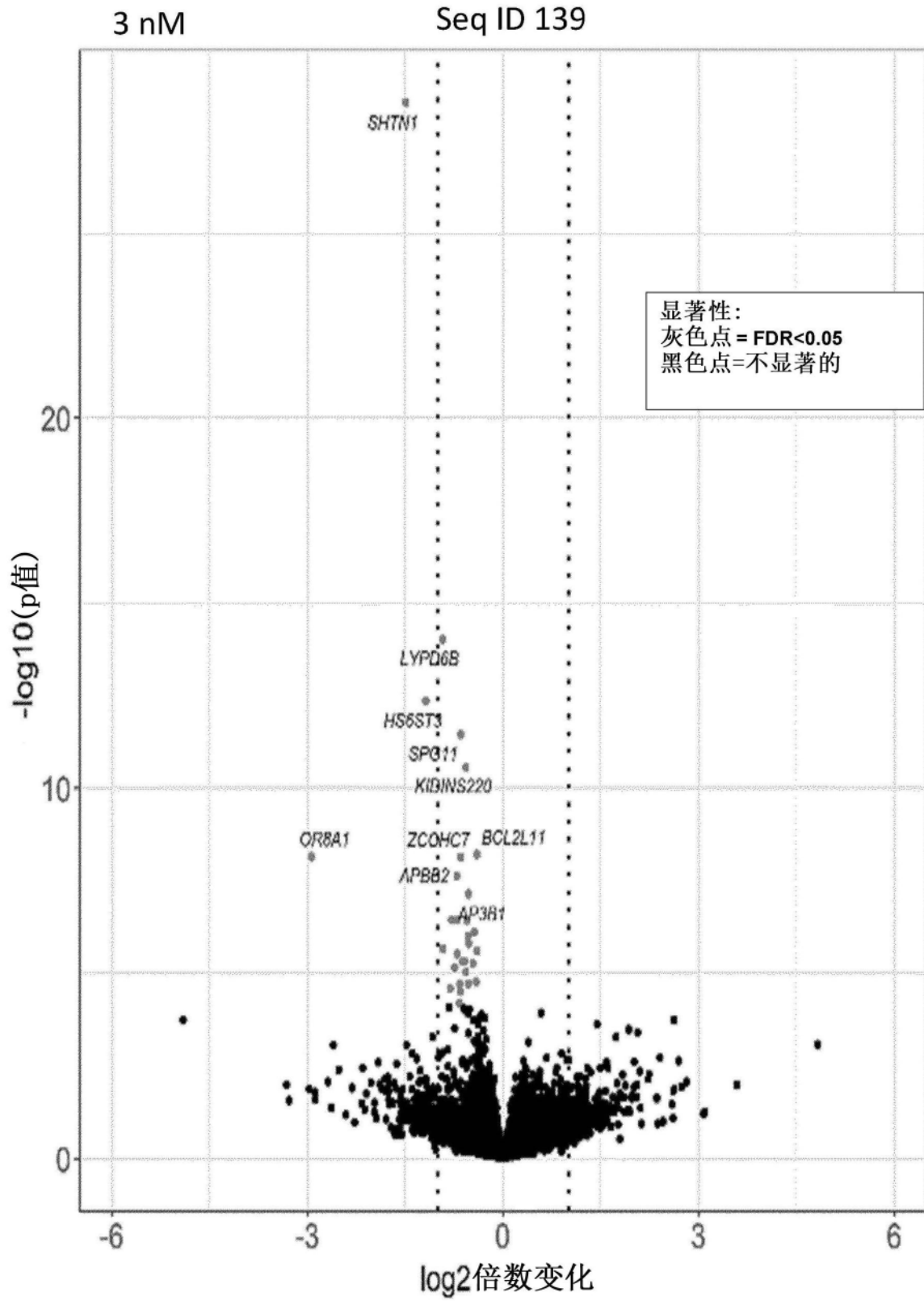


图5.2续

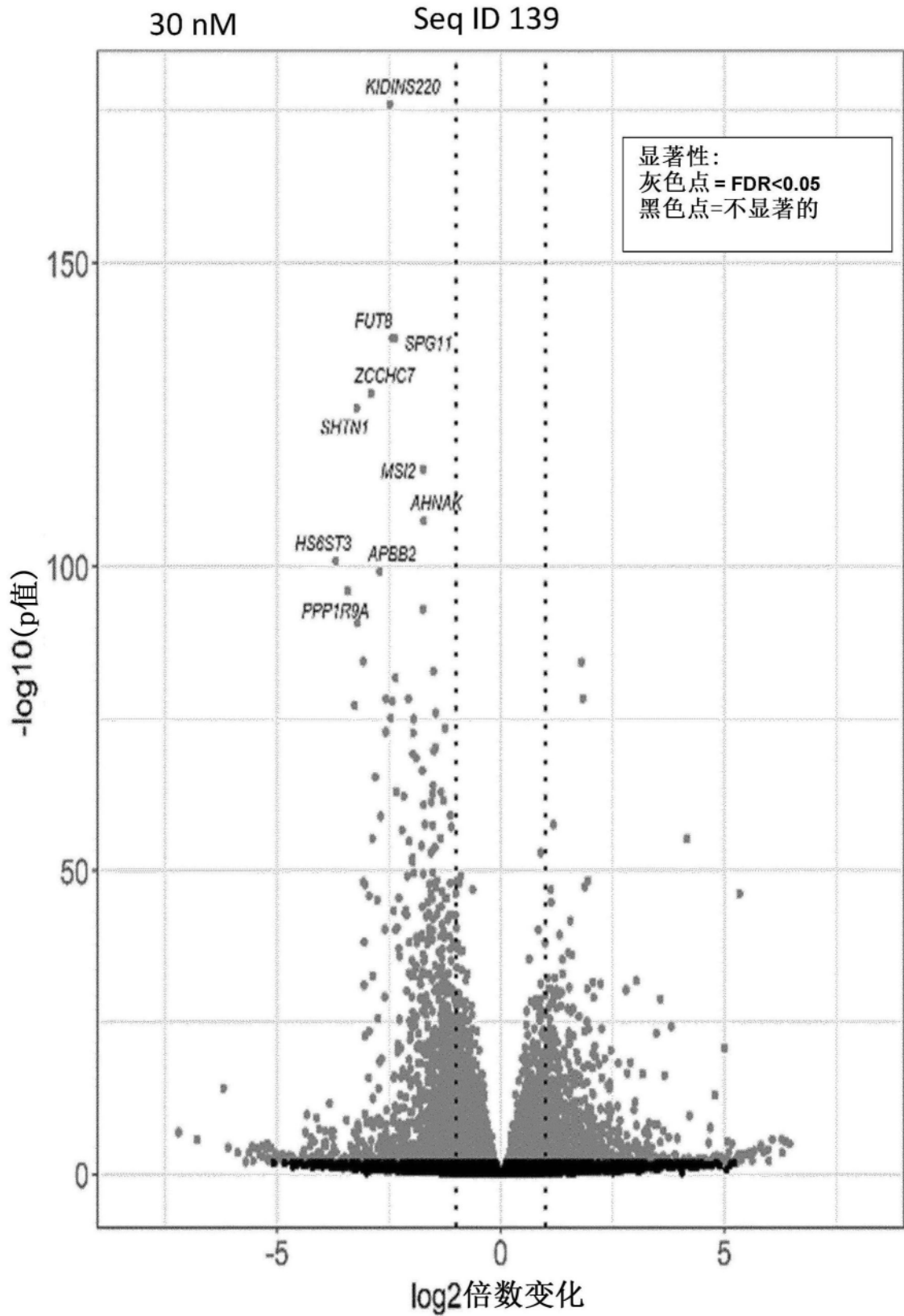


图5.2续

Seq ID NO: 42

3 nM

30 nM

	d0_剪接	d1_剪接	d2_剪接	d3_剪接	d1_剪接前	d2_剪接前	d3_剪接前	d1_剪接前	d2_剪接前	d3_剪接前
预测的靶	0	1	54	745	1	773	5531	28	773	5531
表达的	0	1	42	625	1	590	4408	23	590	4408
显著的	0	1	13	76	0	155	500	16	155	500
up_1log2FC	0	0	0	0	0	0	11	0	0	11
up_0.5log2FC	0	0	0	3	0	3	28	0	3	28
下调_1log2FC	0	1	2	17	0	46	77	5	46	77
下调_0.5log2FC	0	1	7	39	0	116	247	15	116	247

	d0_剪接	d1_剪接	d2_剪接	d3_剪接	d0_剪接前	d1_剪接前	d2_剪接前	d3_剪接前	d1_剪接前	d2_剪接前	d3_剪接前
预测的靶	0	1	54	745	1	28	773	5531	28	773	5531
表达的	0	1	44	616	1	24	585	4365	24	585	4365
显著的	0	1	31	448	1	18	455	3123	18	455	3123
Up_1log2FC	0	0	3	48	0	1	15	283	1	15	283
up_0.5log2FC	0	0	8	94	0	1	36	582	1	36	582
下调_1log2FC	0	1	17	195	1	16	306	1338	16	306	1338
下调_0.5log2FC	0	1	20	266	1	17	378	1948	17	378	1948

图5.3

Seq ID NO: 139

3 nM

30 nM

	d0_剪接	d1_剪接	d2_剪接	d3_剪接	d0_剪接前	d1_剪接前	d2_剪接前	d3_剪接前
预测的靶	0	1	54	745	1	28	773	5531
表达的	0	1	44	626	1	23	599	4408
显著的	0	1	2	5	0	5	9	11
up_1log2FC	0	0	0	0	0	0	0	0
up_0.5log2FC	0	0	0	0	0	0	0	0
下调_1log2FC	0	0	0	0	0	0	1	1
下调_0.5log2FC	0	1	2	3	0	4	7	9

	d0_剪接	d1_剪接	d2_剪接	d3_剪接	d0_剪接前	d1_剪接前	d2_剪接前	d3_剪接前
预测的靶	0	1	54	745	1	28	773	5531
表达的	0	1	45	628	1	24	598	4429
显著的	0	1	23	319	1	17	353	2077
up_1log2FC	0	0	1	14	0	1	6	115
up_0.5log2FC	0	0	3	45	0	1	22	329
下调_1log2FC	0	1	8	71	1	11	155	388
下调_0.5log2FC	0	1	13	152	1	16	256	968

图5.3续

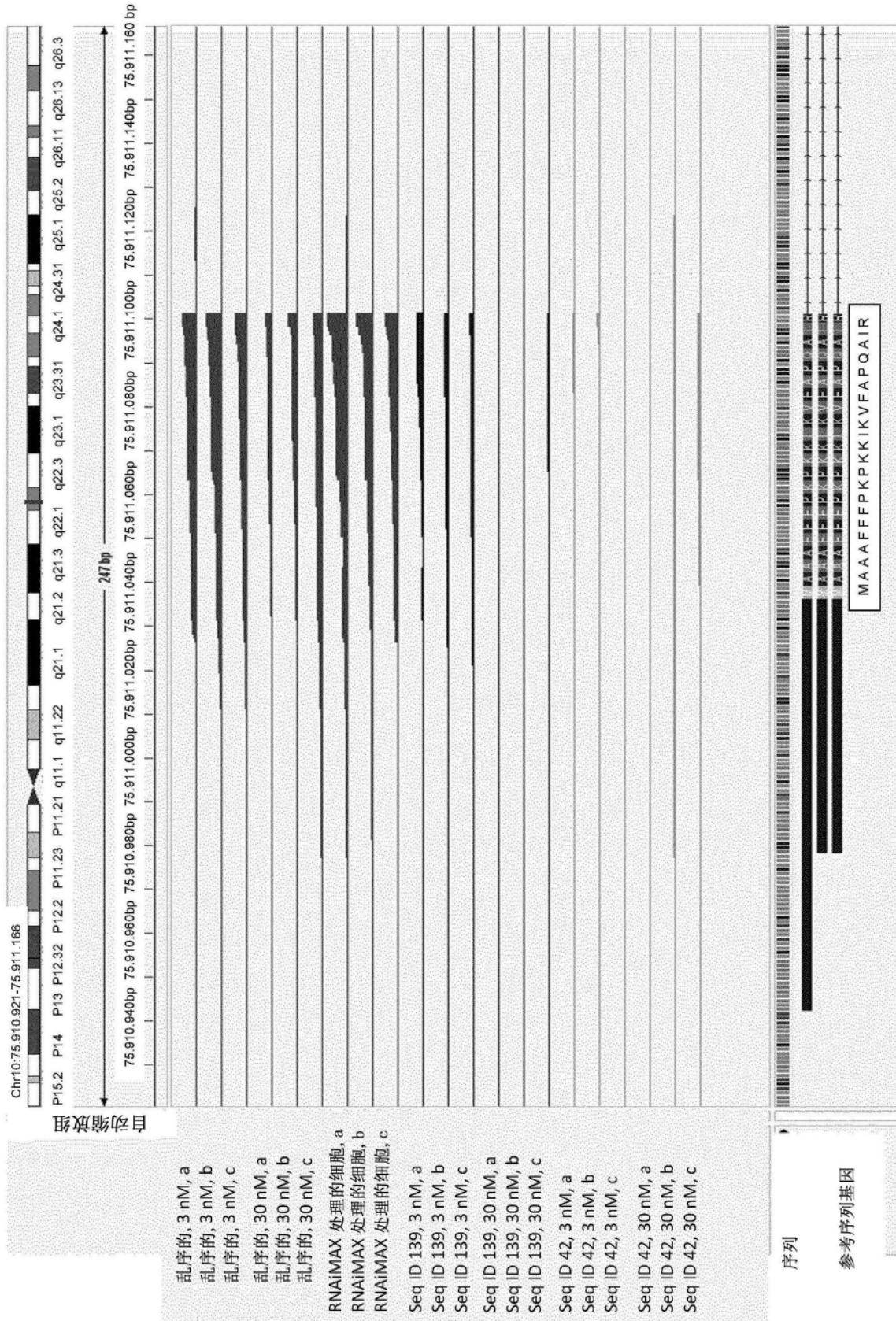


图5.4A

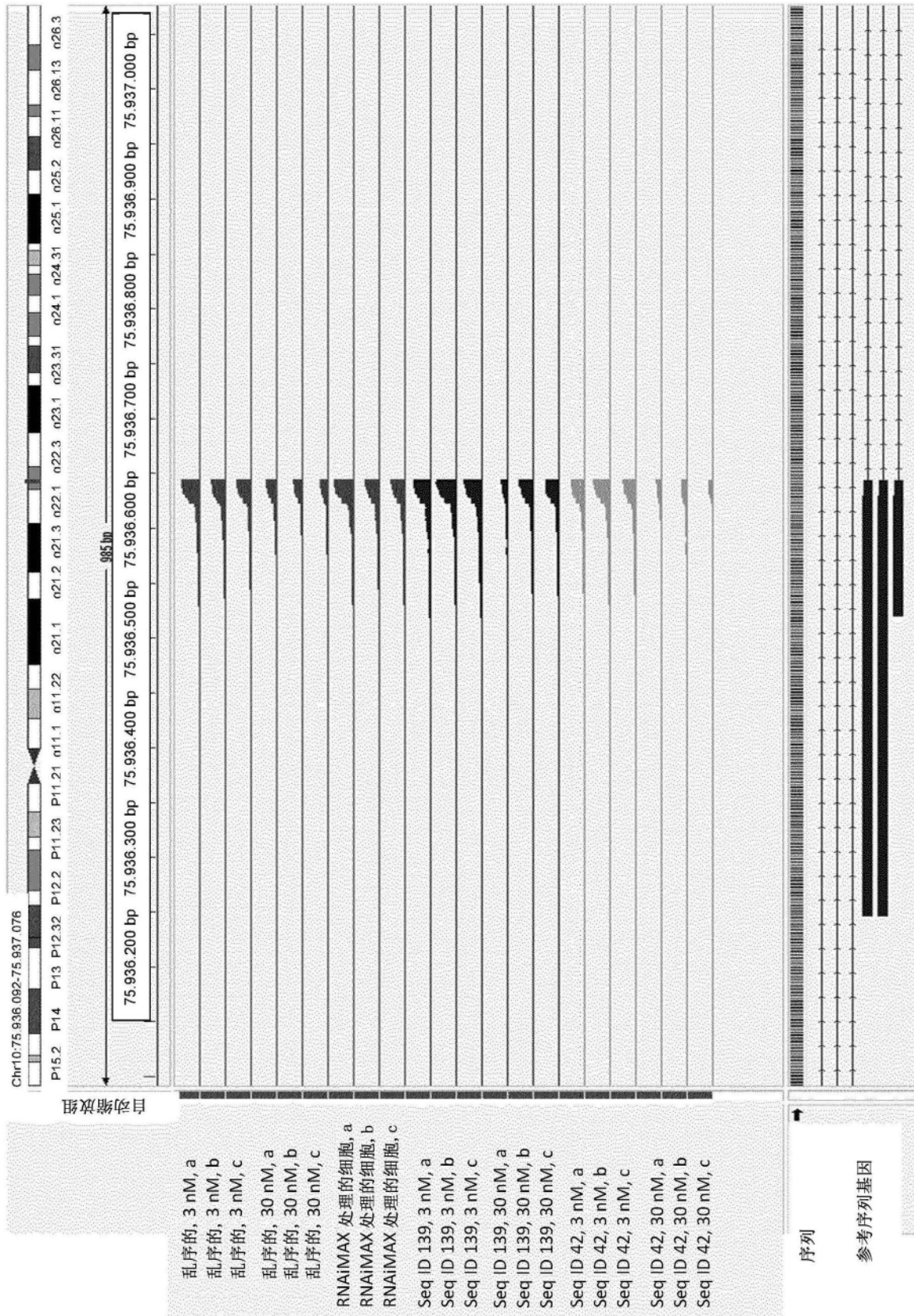


图5.4B