(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113453694 A
(43)申请公布日 2021.09.28

(21)申请号 202080015037.5

(22)申请日 2020.01.22

(30)优先权数据
62/795,357 2019.01.22 US
62/822,472 2019.03.22 US
62/900,019 2019.09.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/014510 2020.01.22

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/154342 EN 2020.07.30

(71)申请人 科罗生物公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 A·W·弗雷 S·罗比内特 N·伯明翰 M·R·普塔

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.
A61K 31/7125(2006.01)
C12N 15/10(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)

权利要求书6页 说明书74页

(54)发明名称

RNA编辑的寡核苷酸及其用途

(57)摘要

本公开涉及治疗例如在有需要的受试者中的病症的有用的组合物和方法，对于所述病症，在mRNA中腺苷的脱氨基作用产生治疗结果。

CN 113453694 A

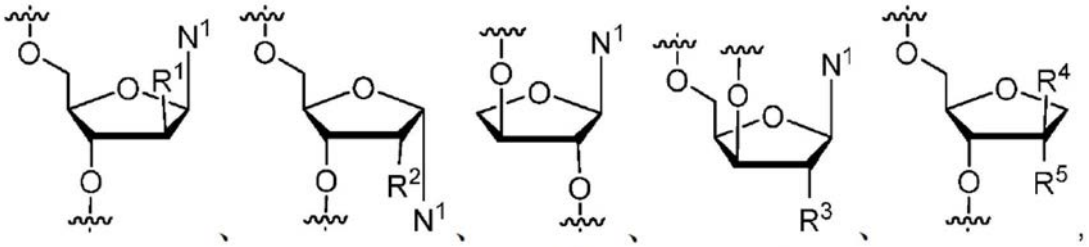
1.一种包含以下结构的寡核苷酸：

$[A_m]-X^1-X^2-X^3-[B_n]$

其中A与B各自为核苷酸；

m与n各自独立地为1至50的整数；

X^1、X^2和X^3各自独立地为核苷酸，其中X^1、X^2或X^3中的至少一个具有式I-V中任一种的结构：



式I　　式II　　式III　　式IV　　式V

其中N^1为氢或核碱基；

R^1为羟基、卤素或C_1-C_6烷氧基；

R^2为氢、羟基、卤素或C_1-C_6烷氧基；

R^3为氢、羟基、卤素或C_1-C_6烷氧基；

R^4为氢、羟基、卤素或C_1-C_6烷氧基；并且

R^5为氢、羟基、卤素或C_1-C_6烷氧基。

2.如权利要求1所述的寡核苷酸，其中R^4为氢且R^5不为氢或羟基，R^5为氢且R^4不为氢，或R^5为羟基且R^4不为氢。

3.如权利要求1或权利要求2所述的寡核苷酸，其中至少80％$[A_m]$和/或$[B_n]$的核苷酸包括核碱基、糖和核苷间键。

4.如权利要求1至3中任一项所述的寡核苷酸，其中R^1为羟基、卤素或OCH_3。

5.如权利要求1至4中任一项所述的寡核苷酸，其中R^2为氢。

6.如权利要求1至5中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2或X^3中的至少一个具有式I、式II或式V的结构；并且X^1、X^2或X^3都不具有式IV或式III的结构。

7.如权利要求1至6中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2或X^3中的至少一个具有式I或式II的结构；并且X^1、X^2或X^3都不具有式III、式IV或式V的结构。

8.如权利要求1至7中任一项所述的寡核苷酸，其中所述卤素为氟。

9.如权利要求1至8中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3中的至少一个具有式I的结构，其中R^1为氟且N^1为核碱基。

10.如权利要求9所述的寡核苷酸，其中X^1具有式I的结构，其中R^1为氟且N^1为核碱基。

11.如权利要求9或10所述的寡核苷酸，其中X^2具有式I的结构，其中R^1为氟且N^1为核碱基。

12.如权利要求9至11中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3具有式I的结构，其中R^1为氟且N^1为核碱基。

13.如权利要求1至8中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3中的至少一个具有式I的结构，其中R^1为羟基且N^1为核碱基。

14.如权利要求13所述的寡核苷酸，其中X^1具有式I的结构，其中R^1为羟基且N^1为核碱基。

15.如权利要求13或14所述的寡核苷酸，其中X^2具有式I的结构，其中R^1为羟基且N^1为核碱基。

16.如权利要求13至15中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3具有式I的结构，其中R^1为羟基且N^1为核碱基。

17.如权利要求1至8中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3中的至少一个具有式I的结构，其中R^1为甲氧基且N^1为核碱基。

18.如权利要求17所述的寡核苷酸，其中X^1具有式I的结构，其中R^1为甲氧基且N^1为核碱基；且X^2与X^3各自为核糖核苷酸。

19.如权利要求17或18所述的寡核苷酸，其中X^2具有式I的结构，其中R^1为甲氧基且N^1为核碱基。

20.如权利要求17至19中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3具有式I的结构，其中R^1为甲氧基且N^1为核碱基。

21.如权利要求1至8中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3中的至少一个具有式II的结构，其中R^2为氢且N^1为核碱基。

22.如权利要求21所述的寡核苷酸，其中X^2具有式II的结构，其中R^2为氢且N^1为核碱基。

23.如权利要求1至6中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1与X^2中的至少一个具有式V的结构。

24.如权利要求23所述的寡核苷酸，其中X^2具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为氢。

25.如权利要求23所述的寡核苷酸，其中X^2具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为羟基。

26.如权利要求23所述的寡核苷酸，其中X^1具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为氢。

27.如权利要求23所述的寡核苷酸，其中X^1具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为羟基。

28.如权利要求23所述的寡核苷酸，其中X^2具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为甲氧基。

29.如权利要求1至28中任一项所述的寡核苷酸，其中当X^1具有式I至V中任一种的结构时，X^2与X^3各自独立地为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^2具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^3各自独立地为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^3具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^2各自独立地为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^1与X^2各自具有式I至V中任一种的结构时，X^3为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^1与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^2为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；并且当X^2与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^1为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、

阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸。

30.如权利要求29所述的寡核苷酸，其中当X^1具有式I至V中任一种的结构时，X^2与X^3各自独立地为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^2具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^3各自独立地为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^3具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^2各自独立地为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^1与X^2各自具有式I至V中任一种的结构时，X^3为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^1与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^2为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸；并且当X^2与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^1为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸。

31.如权利要求30所述的寡核苷酸，其中当X^1具有式I至V中任一种的结构时，X^2与X^3各自为核糖核苷酸；当X^2具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^3各自为核糖核苷酸；当X^3具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^2各自为核糖核苷酸；当X^1与X^2各自具有式I至V中任一种的结构时，X^3为核糖核苷酸；当X^1与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^2为核糖核苷酸；并且当X^2与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^1为核糖核苷酸。

32.如权利要求1至21和23至31中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3都不具有式II的结构，其中N^1为核碱基。

33.如权利要求32所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3都不具有式II的结构，其中N^1为胞嘧啶核碱基。

34.如权利要求1至25和28至33中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1包含尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基。

35.如权利要求34所述的寡核苷酸，其中X^1包含尿嘧啶核碱基。

36.如权利要求1至25和28至33中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1包含次黄嘌呤核碱基。

37.如权利要求1至25和28至33中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1包含胞嘧啶核碱基。

38.如权利要求1至37中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3包含鸟嘌呤核碱基。

39.如权利要求1至37中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3包含次黄嘌呤核碱基。

40.如权利要求1至37中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3包含腺嘌呤核碱基。

41.如权利要求1至23、27、28和29至40中任一项所述的寡核苷酸，其中X^2包含胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基。

42.如权利要求41所述的寡核苷酸，其中X^2包含胞嘧啶核碱基。

43.如权利要求1至5中任一项所述的寡核苷酸，其中X^2具有式I-V中任一种的结构。

44.如权利要求1至43中任一项所述的寡核苷酸，其中X^2不为2'-O-甲基-核苷酸。

45.如权利要求44所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3不为2'-O-甲基-核苷酸。

46.如权利要求1至45中任一项所述的寡核苷酸，其中$[A_m]$包含至少一个核酸酶抗性核苷酸。

47.如权利要求1至46中任一项所述的寡核苷酸，其中$[A_m]$包含至少一个2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、至少一个2'-氨基-核苷酸、至少一个阿拉伯糖核酸-核苷酸、至少一个双环-核苷酸、至少一个2'-F-核苷酸、至少一个2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一个约束型乙基

(cEt)-核苷酸、至少一个LNA-核苷酸和/或至少一个DNA-核苷酸。

48.如权利要求47所述的寡核苷酸,其中[A_m]包含至少一个2'-O-甲基-核苷酸、至少一个2'-F-核苷酸、至少一个2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一个cEt-核苷酸、至少一个LNA-核苷酸和/或至少一个DNA-核苷酸。

49.如权利要求1至48中任一项所述的寡核苷酸,其中[A_m]包含至少五个末端2'-O-甲基-核苷酸。

50.如权利要求1至49中任一项所述的寡核苷酸,其中[A_m]包含至少一个硫代磷酸酯键。

51.如权利要求1至50中任一项所述的寡核苷酸,其中[A_m]包含至少四个末端硫代磷酸酯键。

52.如权利要求50或权利要求51所述的寡核苷酸,其中至少一个硫代磷酸酯键为立体纯的。

53.如权利要求1至52中任一项所述的寡核苷酸,其中[B_n]包含至少一个核酸酶抗性核苷酸。

54.如权利要求1至53中任一项所述的寡核苷酸,其中[B_n]包含至少一个2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、至少一个2'-氨基-核苷酸、至少一个阿拉伯糖核酸-核苷酸、至少一个双环-核苷酸、至少一个2'-F-核苷酸、至少一个2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一个cEt-核苷酸、至少一个LNA-核苷酸和/或至少一个DNA-核苷酸。

55.如权利要求54所述的寡核苷酸,其中[B_n]包含至少一个2'-O-甲基-核苷酸、至少一个2'-F-核苷酸、至少一个2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一个cEt-核苷酸、至少一个LNA-核苷酸和/或至少一个DNA-核苷酸。

56.如权利要求1至55中任一项所述的寡核苷酸,其中[B_n]包含至少五个末端2'-O-甲基-核苷酸。

57.如权利要求1至56中任一项所述的寡核苷酸,其中[B_n]包含至少一个硫代磷酸酯键。

58.如权利要求1至57中任一项所述的寡核苷酸,其中[B_n]包含至少四个末端硫代磷酸酯键。

59.如权利要求57或权利要求58所述的寡核苷酸,其中至少一个硫代磷酸酯键为立体纯的。

60.如权利要求1至56中任一项所述的寡核苷酸,其中至少20%[A_m]与[B_n]组合的核苷酸为2'-O-甲基-核苷酸。

61.如权利要求1至60中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸还包含5'-帽结构。

62.如权利要求1至61中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含至少一个替代性核碱基。

63.如权利要求1至62中任一项所述的寡核苷酸,其中所述5'-末端核苷酸为2'-氨基-核苷酸。

64.如权利要求1至63中任一项所述的寡核苷酸,其中组合的A与B由18至80个核苷酸组成。

65.如权利要求1至64中任一项所述的寡核苷酸,其中m为5至40。

66.如权利要求1至65中任一项所述的寡核苷酸,其中n为5至40。

67.如权利要求1所述的寡核苷酸,其中m与n各自独立地为5至40的整数;X^1、X^2和X^3中的

至少一个具有式I的结构，其中R^1为氟、羟基或甲氧基且N^1为核碱基，或具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为氢；不具有式I或式V的结构的X^1、X^2和X^3各自为核糖核苷酸；[A_m]与[B_n]各自包含至少五个末端2'-O-甲基-核苷酸和至少四个末端硫代磷酸酯键；并且至少20％[A_m]与[B_n]组合的核苷酸为2'-O-甲基-核苷酸。

68.如权利要求1至67中任一项所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸还包含一个或多个作用于RNA的腺苷脱氨酶(ADAR)招募结构域。

69.一种缀合物，其包含缀合至靶部分的如权利要求1至68中任一项所述的寡核苷酸。

70.如权利要求69所述的缀合物，其中所述靶部分为脂质、固醇、碳水化合物和/或肽。

71.一种复合物，其包含：

如权利要求1至68中任一项所述的寡核苷酸或如权利要求69或70所述的缀合物；和

mRNA，

其中所述寡核苷酸或缀合物与mRNA彼此杂交并且所述复合物包含在所述mRNA的腺苷处的第一错配。

72.如权利要求71所述的复合物，其中所述复合物包括距所述第一错配的5'处有四个核苷酸的第二错配。

73.如权利要求71或72所述的复合物，其中所述复合物包括1、2、3、4、5、6、7或8个错配。

74.如权利要求71至73中任一项所述的复合物，其中所述mRNA包含可经脱氨基以产生治疗结果的腺苷。

75.如权利要求71至73中任一项所述的复合物，其中所述mRNA与相应的天然mRNA相比包含鸟苷至腺苷突变。

76.如权利要求75所述的复合物，其中所述鸟苷至腺苷突变为错义或无义突变。

77.如权利要求71至76中任一项所述的复合物，其中所述第一错配在所述mRNA的起始密码子中的腺苷处。

78.如权利要求71至76中任一项所述的复合物，其中所述第一错配在所述mRNA的终止密码子中的腺苷处。

79.如权利要求78所述的复合物，其中所述终止密码子为提前终止密码子。

80.一种产生如权利要求71至79中任一项所述的复合物的方法，所述方法包括使细胞与如权利要求1至68中任一项所述的寡核苷酸或如权利要求69或70所述的缀合物接触。

81.一种使mRNA中的腺苷脱氨基的方法，所述方法包括使细胞与如权利要求1至68中任一项所述的寡核苷酸或如权利要求69或70所述的缀合物接触。

82.一种治疗有需要的受试者中的病症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的如权利要求1至68中任一项所述的寡核苷酸或如权利要求69或70所述的缀合物。

83.如权利要求82所述的方法，其中所述病症为囊性纤维化、白化症、α-1-抗胰蛋白酶缺乏症、阿尔茨海默病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、哮喘、11-地中海贫血、卡达西综合征、夏-马-图三氏病、慢性阻塞性肺病、远端脊肌萎缩症、杜兴氏/贝克尔肌肉营养不良、营养不良性大疱性表皮松解症、大疱性表皮松解症、法布里病、第五因子莱登相关病症、家族性腺瘤、息肉病、半乳糖血症、高歇氏病、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症、血友病、遗传性血色病、亨特氏综合征、亨廷顿氏舞蹈病、贺勒氏综合征、炎性肠病、遗传多重凝集综合征、莱伯氏先天性黑蒙症、莱施-奈恩综合征、林奇综合征、马凡综合征、粘多糖病、肌肉营养不良、I型和

II型强直性肌营养不良、神经纤维瘤病、A型、B型和C型尼-皮二氏病、NY-ESO-1相关癌症、帕金森氏病、Peutz-Jeghers二氏综合征、苯丙酮尿症、庞贝氏病、原发性纤毛病、凝血酶原突变相关病症、肺动脉高血压、色素性视网膜炎、山多夫氏病、严重复合型免疫缺乏综合征、镰状细胞性贫血、脊髓性肌萎缩、斯特格氏病、泰-萨二氏病、乌谢尔综合征、X连锁免疫缺陷、斯特奇-韦伯综合征、雷特氏综合征或癌症。

RNA编辑的寡核苷酸及其用途

背景技术

[0001] 作用于RNA的腺苷脱氨酶(ADAR)为结合至双链RNA(dsRNA)并通过脱氨基作用将腺苷转化成肌苷的酶。在RNA中,肌苷的转译和复制功能与鸟苷类似。因此,在mRNA中腺苷向肌苷的转化可能造成密码子改变,从而可以导致编码的蛋白质及其功能的改变。存在三种已知的在人中表达的ADAR蛋白:ADAR1、ADAR2和ADAR3。ADAR1和ADAR2在全身表达,而ADAR3仅在脑中表达。ADAR1和ADAR2具有催化活性,而ADAR3被认为是无活性的。

[0002] 已经显示合成单链寡核苷酸能够利用ADAR蛋白,通过使靶RNA中的特定腺苷脱氨基来编辑靶RNA。寡核苷酸与靶RNA互补,例外之处在于至少一个与腺苷相反的错配有待脱氨基。然而,先前公开的方法未曾显示具有允许其用作疗法的所需选择性和/或稳定性。因此,需要新型寡核苷酸,其能够利用ADAR蛋白以治疗有效的方式选择性编辑靶RNA。

发明内容

[0003] 本发明涉及例如在有需要的受试者中对靶mRNA中的腺苷(例如,可以脱氨基以产生治疗结果的腺苷)脱氨基的有用的组合物和方法。

[0004] 作用于RNA的腺苷脱氨酶(ADAR)为编辑酶,其识别双链RNA(dsRNA)的某些结构基序并将腺苷编辑成肌苷,造成氨基酸密码子的重编码,由此可以导致对编码的蛋白质及其功能的改变。在编辑位点周围的核碱基(尤其是紧挨编辑位点的5'处的核碱基和紧挨编辑位点的3'处的核碱基,它们连同编辑位点一起称为三联体)在腺苷的脱氨基中起重要作用。对于相对于编辑位点在5'位处的U及在3'位处的G的偏好由酵母RNA的分析所揭示,所述酵母RNA有效地由过度表达的人ADAR2和ADAR1编辑。参见Wang等人(2018)Biochemistry,57:1640-1651;Eifler等人(2013)Biochemistry,52:7857-7869以及Eggington等人(2011)Nat.Commun.,319:1-9。将ADAR招募至所选转录物的特定位点并对腺苷进行脱氨基,而不考虑邻近的碱基,这对疾病的治疗留下很大希望。基于dsRNA/ADAR复合物的编辑位点的结构和模型研究,已经鉴别出可以并入导向寡核苷酸中的若干结构特点,其特性能够增强ADAR的招募并提高靶RNA的编辑效率。显示出具有以下化学修饰的新颖寡核苷酸:诸如阿拉伯糖苷(Ara)、2'-脱氧-2'-氟-阿拉伯糖苷(FANA)、2'-O-甲基-阿拉伯糖苷(Ara-OMe)、α-脱氧胞苷(α-dN)、DNA-无碱基、RNA-无碱基和2'-O-甲基-无碱基,所述新颖寡核苷酸能够在靶RNA中招募ADAR蛋白并对具有不同周围碱基组成的腺苷脱氨基。另外,结构-活性关系(SAR)研究揭示除三联体修饰之外在导向寡核苷酸中一些而非所有核苷的核糖的2'-O-甲基(2'-OMe)修饰也与有效的ADAR接合和编辑相容。

[0005] 本发明的示例性实施方案在下文列举的段落中描述。

[0006] E1.一种包括以下结构的寡核苷酸:

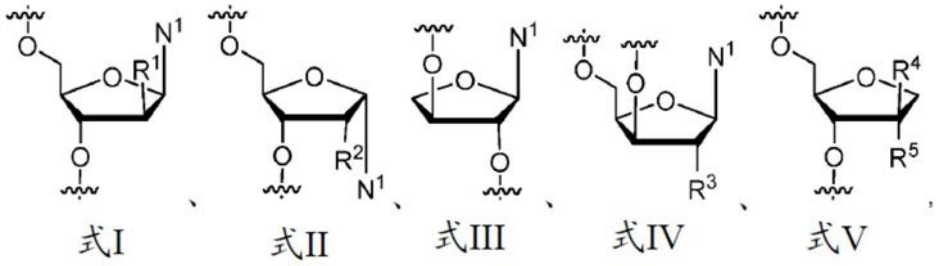
[0007] $[A_m]$-X^1-X^2-X^3-$[B_n]$

[0008] 其中A与B各自为核苷酸;

[0009] m与n各自独立地为1至50的整数;

[0010] X^1、X^2和X^3各自独立地为核苷酸,其中X^1、X^2或X^3中的至少一个具有式I-V中任一种

的结构：

[0011] 

[0012] 其中N^1为氢或核碱基；

[0013] R^1为羟基、卤素或C_1-C_6烷氧基；

[0014] R^2为氢、羟基、卤素或C_1-C_6烷氧基；

[0015] R^3为氢、羟基、卤素或C_1-C_6烷氧基；

[0016] R^4为氢、羟基、卤素或C_1-C_6烷氧基；并且

[0017] R^5为氢、羟基、卤素或C_1-C_6烷氧基。

[0018] E2.如E1所述的寡核苷酸，其中R^4为氢且R^5不为氢或羟基，R^5为氢且R^4不为氢，或者R^5为羟基且R^4不为氢。

[0019] E3.如E1或E2所述的寡核苷酸，其中至少80％(例如，至少85％、至少90％、至少95％、至少99％或100％)[A_m]和/或[B_n]的核苷酸包括核碱基、糖和核苷间键。

[0020] E4.如E1至E3中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基；X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包

括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；或X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基。

[0021] E5.如E1至E4中任一项所述的寡核苷酸，其中R^1为羟基、卤素或OCH_3。

[0022] E6.如E1至E5中任一项所述的寡核苷酸，其中R^2为氢。

[0023] E7.如E1至E6中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2或X^3中的至少一个具有式I、式II或式V的结构；且X^1、X^2或X^3都不具有式III或式IV的结构。

[0024] E8.如E1至E7中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2或X^3中的至少一个具有式I或式II的结构；且X^1、X^2或X^3都不具有式III、式IV或式V的结构。

[0025] E9.如E1至E8中任一项所述的寡核苷酸，其中所述卤素为氟。

[0026] E10.如E1至E9中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3中的至少一个具有式I的结构，其中R^1为氟且N^1为核碱基。

[0027] E11.如E10所述的寡核苷酸，其中X^1具有式I的结构，其中R^1为氟且N^1为核碱基。

[0028] E12.如E10或E11所述的寡核苷酸，其中X^2具有式I的结构，其中R^1为氟且N^1为核碱基。

[0029] E13.如E10至E12中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3具有式I的结构，其中R^1为氟且N^1为核碱基。

[0030] E14.如E1至E9中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3中的至少一个具有式I的结构，其中R^1为羟基且N^1为核碱基。

[0031] E15.如E14所述的寡核苷酸，其中X^1具有式I的结构，其中R^1为羟基且N^1为核碱基。

[0032] E16.如E14或E15所述的寡核苷酸，其中X^2具有式I的结构，其中R^1为羟基且N^1为核碱基。

[0033] E17.如E14至E16中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3具有式I的结构，其中R^1为羟基且N^1为核碱基。

[0034] E18.如E1至E9中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3中的至少一个具有式I的结构，其中R^1为甲氧基且N^1为核碱基。

[0035] E19.如E18所述的寡核苷酸，其中X^1具有式I的结构，其中R^1为甲氧基且N^1为核碱基。

[0036] E20.如E18或E19所述的寡核苷酸，其中X^2具有式I的结构，其中R^1为甲氧基且N^1为核碱基。

[0037] E21.如E18至E20中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3具有式I的结构，其中R^1为甲氧基且N^1为核碱基。

[0038] E22.如E1至E9中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3中的至少一个具有式II的结构，其中R^2为氢且N^1为核碱基或R^2为氢且N^1为氢。

[0039] E23.如E22所述的寡核苷酸，其中X^2具有式II的结构，其中R^2为氢且N^1为核碱基或R^2为氢且N^1为氢。

[0040] E24.如E1至E8中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1与X^2中的至少一个具有式V的结构。

[0041] E25.如E24所述的寡核苷酸，其中X^2具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为氢。

[0042] E26.如E24所述的寡核苷酸，其中X^2具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为羟基。

[0043] E27.如E24所述的寡核苷酸，其中X^1具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为氢。

[0044] E28.如E24所述的寡核苷酸，其中X^1具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为羟基。

[0045] E29.如E24所述的寡核苷酸，其中X^2具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为甲氧基。

[0046] E30.如E1至E29中任一项所述的寡核苷酸，其中当X^1具有式I至V中任一种的结构时，X^2与X^3各自独立地为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^2具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^3各自独立地为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^3具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^2各自独立地为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^1与X^2各自具有式I至V中任一种的结构时，X^3为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^1与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^2为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；并且当X^2与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^1为核糖核苷酸、2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-氨基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、双环-核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、约束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸。

[0047] E31.如E30所述的寡核苷酸，其中当X^1具有式I至V中任一种的结构时，X^2与X^3各自独立地为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^2具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^3各自独立地为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^3具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^2各自独立地为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^1与X^2各自具有式I至V中任一种的结构时，X^3为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸；当X^1与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^2为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸；并且当X^2与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^1为核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或DNA-核苷酸。

[0048] E32.如E31所述的寡核苷酸，其中当X^1具有式I至V中任一种的结构时，X^2与X^3各自为核糖核苷酸；当X^2具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^3各自为核糖核苷酸；当X^3具有式I至V中任一种的结构时，X^1与X^2各自为核糖核苷酸；当X^1与X^2各自具有式I至V中任一种的结构时，X^3为核糖核苷酸；当X^1与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^2为核糖核苷酸；并且当X^2与X^3各自具有式I至V中任一种的结构时，X^1为核糖核苷酸。

[0049] E33.如E1至E22和E24至E32中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3都不具有式II的结构，其中N^1为核碱基。

[0050] E34.如E33所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3都不具有式II的结构，其中N^1为胞嘧啶

核碱基。

[0051] E35.如E1至E26和E29至E34中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基。

[0052] E36.如E35所述的寡核苷酸，其中X^1包括尿嘧啶核碱基。

[0053] E37.如E1至E26和E29至E34中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1包括次黄嘌呤核碱基。

[0054] E38.如E1至E26和E29至E34中任一项所述的寡核苷酸，其中X^1包括胞嘧啶核碱基。

[0055] E39.如E1至E38中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3包括鸟嘌呤核碱基。

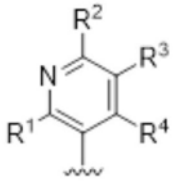
[0056] E40.如E1至E38中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3包括次黄嘌呤核碱基。

[0057] E41.如E1至E38中任一项所述的寡核苷酸，其中X^3包括腺嘌呤核碱基。

[0058] E42.如E1至E24、E27、E28和E30至E41中任一项所述的寡核苷酸，其中X^2包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基。

[0059] E43.如E42所述的寡核苷酸，其中X^2包括胞嘧啶核碱基。

[0060] E44.如E1至E24、E27、E28和E30至E41中任一项所述的寡核苷酸，其中X^2包括具有以下结构的核碱基：

[0061] 

[0062] 其中R^1为氢、三氟甲基、任选取代的氨基、羟基或任选取代的C_1-C_6烷氧基；

[0063] R^2为氢、任选取代的氨基或任选取代的C_1-C_6烷基；并且

[0064] R^3和R^4独立地为氢、卤素或任选取代的C_1-C_6烷基，

[0065] 或其盐。

[0066] E45.如E1至E6中任一项所述的寡核苷酸，其中X^2具有式I-V中任一种的结构。

[0067] E46.如E1至E45中任一项所述的寡核苷酸，其中X^2不为2'-O-甲基-核苷酸。

[0068] E47.如E46所述的寡核苷酸，其中X^1、X^2和X^3不为2'-O-甲基-核苷酸。

[0069] E48.如E1至E47中任一项所述的寡核苷酸，其中[A_m]包括至少一个核酸酶抗性核苷酸。

[0070] E49.如E1至E48中任一项所述的寡核苷酸，其中[A_m]包括至少一个2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、至少一个2'-氨基-核苷酸、至少一个阿拉伯糖核酸-核苷酸、至少一个双环-核苷酸、至少一个2'-F-核苷酸、至少一个2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一个约束型乙基(cEt)-核苷酸、至少一个LNA-核苷酸和/或至少一个DNA-核苷酸。

[0071] E50.如E49所述的寡核苷酸，其中[A_m]包括至少一个2'-O-甲基-核苷酸、至少一个2'-F-核苷酸、至少一个2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一个cEt-核苷酸、至少一个LNA-核苷酸和/或至少一个DNA-核苷酸。

[0072] E51.如E1至E50中任一项所述的寡核苷酸，其中[A_m]包括至少五个末端2'-O-甲基-核苷酸。

[0073] E52.如E1至E51中任一项所述的寡核苷酸，其中[A_m]包括至少一个硫代磷酸酯键。

[0074] E53.如E1至E52中任一项所述的寡核苷酸，其中[A_m]包括至少四个末端硫代磷酸

酯键。

[0075] E54.如E52或E53所述的寡核苷酸,其中至少一个硫代磷酸酯键为立体纯的。

[0076] E55.如E1至E54中任一项所述的寡核苷酸,其中[B_n]包括至少一个核酸酶抗性核苷酸。

[0077] E56.如E1至E55中任一项所述的寡核苷酸,其中[B_n]包括至少一个2'-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、至少一个2'-氨基-核苷酸、至少一个阿拉伯糖核酸-核苷酸、至少一个双环-核苷酸、至少一个2'-F-核苷酸、至少一个2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一个cEt-核苷酸、至少一个LNA-核苷酸和/或至少一个DNA-核苷酸。

[0078] E57.如E56所述的寡核苷酸,其中[B_n]包括至少一个2'-O-甲基-核苷酸、至少一个2'-F-核苷酸、至少一个2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一个cEt-核苷酸、至少一个LNA-核苷酸和/或至少一个DNA-核苷酸。

[0079] E58.如E1至E57中任一项所述的寡核苷酸,其中[B_n]包括至少五个末端2'-O-甲基-核苷酸。

[0080] E59.如E1至E58中任一项所述的寡核苷酸,其中[B_n]包括至少一个硫代磷酸酯键。

[0081] E60.如E1至E59中任一项所述的寡核苷酸,其中[B_n]包括至少四个末端硫代磷酸酯键。

[0082] E61.如E59或E60所述的寡核苷酸,其中至少一个硫代磷酸酯键为立体纯的。

[0083] E62.如E1至E61中任一项所述的寡核苷酸,其中至少20%(例如,至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%)[A_m]与[B_n]组合的核苷酸为2'-O-甲基-核苷酸。

[0084] E63.如E1至E62中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸还包括5'-帽结构。

[0085] E64.如E63所述的寡核苷酸,其中所述5'-帽结构为2,2,7-三甲基鸟苷帽。

[0086] E65.如E1至E64中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括至少一个替代性核碱基。

[0087] E66.如E65所述的寡核苷酸,其中所述替代性核碱基为5-甲基胞嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5-甲氧基胞嘧啶、N^4-甲基胞嘧啶、N^3-甲基胞嘧啶、N^4-乙基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、5-氨基胞嘧啶、5-乙炔基胞嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、吡咯并胞嘧啶、5-氨基甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、萘啶、5-甲氧基尿嘧啶、假尿嘧啶、二氢尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、4-硫代胸腺嘧啶、5,6-二氢胸腺嘧啶、5-卤基尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-氨基甲基尿嘧啶、5-羟甲基尿嘧啶、次黄嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、8-氮杂-7-脱氮鸟嘌呤、7-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、噻吩并鸟嘌呤、N^1-甲基鸟嘌呤、N^2-甲基鸟嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、8-甲氧基鸟嘌呤、8-烯丙氧基鸟嘌呤、7-氨基甲基-7-脱氮鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、咪唑并吡啶并嘧啶、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮腺嘌呤、8-氮杂-7-脱氮腺嘌呤、8-氮杂-7-脱氮腺嘌呤、N^1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、N^6-甲基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-甲基腺嘌呤或8-叠氮基腺嘌呤。

[0088] E67.如E65所述的寡核苷酸,其中所述替代性核碱基为2-氨基-嘌呤、2,6-二氨基-嘌呤、3-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-甲基-腺嘌呤、8-叠氮基-腺嘌呤、8-甲基-腺嘌呤、5-羟甲基-胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、吡咯并胞嘧啶、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟嘌呤、7-脱氮-鸟嘌呤、7-甲基-鸟嘌呤、8-氮杂-7-脱氮-鸟嘌呤、噻吩并鸟嘌呤、次黄嘌呤、4-硫代-尿嘧啶、

5-甲氧基尿嘧啶、二氢尿嘧啶或假尿嘧啶。

[0089] E68.如E65所述的寡核苷酸，其中所述替代性核碱基为5-甲基-胞嘧啶或2-氨基-嘌呤。

[0090] E69.如E1至E68中任一项所述的寡核苷酸，其中所述5'-末端核苷酸为2'-氨基-核苷酸。

[0091] E70.如E1至E69中任一项所述的寡核苷酸，其中组合的A与B由18至80个核苷酸(例如27至71、36至62、45至53或47至51个核苷酸)组成。

[0092] E71.如E1至E70中任一项所述的寡核苷酸，其中m为5至40(例如，8至36、12至32、16至28、20至24或30至40)。

[0093] E72.如E1至E71中任一项所述的寡核苷酸，其中n为5至40(例如，7至17、8至36、12至32、16至28或20至24)。

[0094] E73.如E1所述的寡核苷酸，其中m与n各自独立地为5至40的整数；X^1、X^2和X^3中的至少一个具有式I的结构，其中R^1为氟、羟基或甲氧基，N^1为核碱基或具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为氢；不具有式I或式V的结构的X^1、X^2和X^3各自为核糖核苷酸；$[A_m]$与$[B_n]$各自包括至少五个末端2'-O-甲基-核苷酸和至少四个末端硫代磷酸酯键；并且至少20％$[A_m]$与$[B_n]$组合的核苷酸为2'-O-甲基-核苷酸。

[0095] E74.如E73所述的寡核苷酸，其中X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基；X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基

胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；或X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基。

[0096] E75.如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸还包括一个或多个作用于RNA的腺苷脱氨酶(ADAR)招募结构域。

[0097] E76.如E75所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包括一个ADAR招募结构域。

[0098] E77.如E76所述的寡核苷酸，其中所述ADAR招募结构域在所述寡核苷酸的5'端处。

[0099] E78.如E77所述的寡核苷酸，其中所述ADAR招募结构域在所述寡核苷酸的3'端处。

[0100] E79.如E78所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包括第一ADAR招募结构域和第二ADAR招募结构域。

[0101] E80.如E79所述的寡核苷酸，其中所述第一ADAR招募结构域在所述寡核苷酸的5'端处，其中所述第二ADAR招募结构域在所述寡核苷酸的3'端处。

[0102] E81.如E75至E80中任一项所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包括式VI的结构：

[0103] $C\text{-}L_1\text{-}D\text{-}L_2\text{-}[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$

[0104] 式VI，

[0105] 其中：

[0106] $[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$为如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸；

[0107] C为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸；

[0108] L_1为环区；并且

[0109] D为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸；

[0110] L_2为任选的接头；

[0111] 其中所述寡核苷酸包括通过长度为10-50个连接核苷的C和D形成的双链体结构，其中所述双链体结构包括介于C的核苷酸与D的核苷酸之间的至少一个错配，并且其中C或D包括至少一个替代性核碱基。

[0112] E82.如E81所述的寡核苷酸，其中C与D包括至少一个替代性核碱基。

[0113] E83.如E81或E82所述的寡核苷酸，其中L_1包括连接核苷。

[0114] E84.如E83所述的寡核苷酸，其中L_1由连接核苷组成。

[0115] E85.如E81至E84中任一项所述的寡核苷酸，其中L_1包括至少一个替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0116] E86.如E81至E85中任一项所述的寡核苷酸，其中C或D包括至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0117] E87.如E81至E85中任一项所述的寡核苷酸，其中C和D各自独立地包括至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0118] E88.如E81至E85中任一项所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包括式VII的结构：

[0119] $C\text{-}L_1\text{-}D\text{-}L_2\text{-}[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$

[0120] 式VII，

[0121] 其中：

[0122] $[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$为如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸；

[0123] C为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸；

[0124] L_1为不由连接核苷组成的环区;并且

[0125] D为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸;

[0126] L_2为任选的接头,

[0127] 其中所述寡核苷酸包括通过长度为10-50个连接核苷的C和D形成的双链体结构,并且其中所述双链体结构包括介于C核苷酸与D核苷酸之间的至少一个错配。

[0128] E89.如E83所述的寡核苷酸,其中L_1具有式VIII的结构:

[0129] $F^1-(G^1)_j-(H^1)_k-(G^2)_m-(I)-(G^3)_n-(H^2)_p-(G^4)_q-F^2$

[0130] 式VIII,

[0131] 其中F^1为介于环区与C之间的键;F^2为介于D与$[A_m]$之间或介于D与任选的接头之间的键;G^1、G^2、G^3和G^4各自独立地选自任选取代的C_1-C_2烷基、任选取代的C1-C3杂烷基、O、S和NR^N;R^N为氢、任选取代的C_{1-4}烷基、任选取代的C_{2-4}烯基、任选取代的C_{2-4}炔基、任选取代的C_{2-6}杂环基、任选取代的C_{6-12}芳基或任选取代的C_{1-7}杂烷基;C^1和C^2各自独立地选自羰基、硫羰基、磺酰基或磷酰基;j、k、m、n、p和q各自独立地为0或1;并且I为任选取代的C_{1-10}烷基、任选取代的C_{2-10}烯基、任选取代的C_{2-10}炔基、任选取代的C_{2-6}杂环基、任选取代的C_{6-12}芳基、任选取代的C_2-C_{10}聚乙二醇或任选取代的C_{1-10}杂烷基或连接$F^1-(G^1)_j-(H^1)_k-(G^2)_m-(I)-(G^3)_n-(H^2)_p-(G^4)_q-F^2$的化学键。

[0132] E90.如E88或E89所述的寡核苷酸,其中L_1包括含碳水化合物的连接部分。

[0133] E91.如E88至E90中任一项所述的寡核苷酸,其中C或D各自包括至少一个替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0134] E92.如E88至E90中任一项所述的寡核苷酸,其中C与D各自包括至少一个替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0135] E93.如E75至E80中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式IX的结构:

[0136] $C-L_1-D-L_2-[A_m]-X^1-X^2-X^3-[B_n]$

[0137] 式IX,

[0138] 其中:

[0139] $[A_m]-X^1-X^2-X^3-[B_n]$为如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸;

[0140] C为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸;

[0141] L_1为包括至少一个替代性核碱基或至少一个替代性核苷间键的环区;并且

[0142] D为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸;

[0143] L_2为任选的接头,

[0144] 其中所述寡核苷酸包括通过长度为10-50个连接核苷的C和D形成的双链体结构,并且其中所述双链体结构包括介于C核苷酸与D核苷酸之间的至少一个错配。

[0145] E94.如E93所述的寡核苷酸,其中L_1包括至少一个替代性核碱基和至少一个替代性核苷间键。

[0146] E95.如E75至E80中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式X的结构:

[0147] $C-L_1-D-L_2-[A_m]-X^1-X^2-X^3-[B_n]$

[0148] 式X,

[0149] 其中:

[0150] $[A_m]-X^1-X^2-X^3-[B_n]$为如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸;

[0151] C为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸；

[0152] L_1为包括至少一个替代性糖部分的环区，其中所述替代性糖部分选自由以下组成的组：2'-O-C_1-C_6烷基-糖部分、2'-氨基-糖部分、2'-氟-糖部分、2'-O-MOE糖部分、阿拉伯糖核酸(ANA)糖部分、脱氧核糖糖部分和双环核酸；

[0153] D为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸；并且

[0154] L_2为任选的接头，

[0155] 其中所述寡核苷酸包括通过长度为10-50个连接核苷的C和D形成的双链体结构，并且其中所述双链体结构包括介于C核苷酸与D核苷酸之间的至少一个错配。

[0156] E96.如E95所述的寡核苷酸，其中所述双环糖部分选自氧基-LNA糖部分、硫代-LNA糖部分、氨基-LNA糖部分、cEt糖部分和乙烯桥连(ENA)糖部分和LNA糖部分。

[0157] E97.如E95或E96所述的寡核苷酸，其中所述ANA糖部分为2'-氟-ANA糖部分。

[0158] E98.如E95至E97中任一项所述的寡核苷酸，其中C或D包括至少一个替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0159] E99.如E95至E97中任一项所述的寡核苷酸，其中C与D各自包括至少一个替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0160] E100.如E81至E99中任一项所述的寡核苷酸，其中C与D的至少5个连续核碱基互补。

[0161] E101.如E81至E99中任一项所述的寡核苷酸，其中至少80％(例如至少85％、至少90％、至少95％)的C的核碱基与D的核碱基互补。

[0162] E102.如E81至E101中任一项所述的寡核苷酸，其中C包括与SEQ ID NO.1、4、7、10、13、16、19、22、25、28、31和34中任一个所列的核碱基序列具有至少80％序列同一性的核碱基序列。

[0163] E103.如E81至E102中任一项所述的寡核苷酸，其中D包括与SEQ ID NO.2、5、8、11、14、17、20、23、26、29、32和35中任一个所列的核碱基序列具有至少80％序列同一性的核碱基序列。

[0164] E104.如E81至E103中任一项所述的寡核苷酸，其中C-L_1-D包括与SEQ ID NO.3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33和36中任一个所列的核碱基序列具有至少80％序列同一性的核碱基序列。

[0165] E105.如E81至E87、E93、E94、E98和E99中任一项所述的寡核苷酸，其中所述至少一个替代性核碱基选自由以下组成的组：5-甲基胞嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5-甲氧基胞嘧啶、N4-甲基胞嘧啶、N3-甲基胞嘧啶、N4-乙基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、5-氨基胞嘧啶、5-乙炔基胞嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、吡咯并胞嘧啶、5-氨基甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、萘啶、5-甲氧基尿嘧啶、假尿嘧啶、二氢尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、4-硫代胸腺嘧啶、5,6-二氢胸腺嘧啶、5-卤基尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-氨基甲基尿嘧啶、5-羟甲基尿嘧啶、次黄嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、8-氮杂-7-脱氮鸟嘌呤、7-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、噻吩并鸟嘌呤、N1-甲基鸟嘌呤、N2-甲基鸟嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、8-甲氧基鸟嘌呤、8-烯丙氧基鸟嘌呤、7-氨基甲基-7-脱氮鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、咪唑并吡啶并嘧啶、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮腺嘌呤、8-氮杂-7-脱氮腺嘌呤、8-氮杂-7-脱氮腺嘌呤、N1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-甲基腺嘌呤或8-叠氮基

腺嘌呤。

[0166] E106.如E81至E87、E93、E94、E98和E99中任一项所述的寡核苷酸，其中所述至少一个替代性核碱基选自由以下组成的组：2-氨基-嘌呤、2,6-二氨基-嘌呤、3-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-甲基-腺嘌呤、8-叠氮基-腺嘌呤、8-甲基-腺嘌呤、5-羟甲基-胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、吡咯并胞嘧啶、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟嘌呤、7-脱氮-鸟嘌呤、7-甲基-鸟嘌呤、8-氮杂-7-脱氮-鸟嘌呤、噻吩并鸟嘌呤、次黄嘌呤、4-硫代-尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、二氢尿嘧啶或假尿嘧啶。

[0167] E107.如E85至E87、E91至E94、E98和E99中任一项所述的寡核苷酸，其中所述至少一个替代性核苷间键选自由下列各键组成的组：硫代磷酸酯核苷间键、2'-烷氧基核苷间键和磷酸烷基酯核苷间键。

[0168] E108.如E107所述的寡核苷酸，其中所述至少一个替代性核苷间键为至少一个硫代磷酸酯核苷间键。

[0169] E109.如E85至E87、E91、E92和E95至E99中任一项所述的寡核苷酸，其中所述至少一个替代性糖部分选自由以下组成的组：2'-O-烷基-糖部分、2'-O-甲基-糖部分、2'-氨基-糖部分、2'-氟-糖部分、2'-O-MOE糖部分、ANA糖部分、脱氧核糖糖部分和双环核酸。

[0170] E110.如E109所述的寡核苷酸，其中所述双环糖部分选自氧基-LNA糖部分、硫代-LNA糖部分、氨基-LNA糖部分、cEt糖部分和乙烯桥连(ENA)糖部分和LNA糖部分。

[0171] E111.如E109所述的寡核苷酸，其中所述ANA糖部分为2'-氟-ANA糖部分。

[0172] E112.如E109所述的寡核苷酸，其中所述至少一个替代性糖部分为2'-O-甲基-糖部分、2'-氟-糖部分或2'-O-MOE糖部分。

[0173] E113.如E81至E112中任一项所述的寡核苷酸，其中所述至少一个错配为成对的A至C错配、成对的G至G错配或成对的C至A错配。

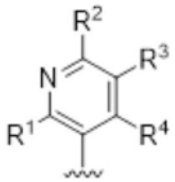
[0174] E114.如E113所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包括介于C的核苷酸与D的核苷酸之间的至少两个错配。

[0175] E115.如E114所述的寡核苷酸，其中所述至少两个错配由至少三个连接核苷分隔。

[0176] E116.如E114所述的寡核苷酸，其中所述至少两个错配由三个连接核苷分隔。

[0177] E117.如E81至E116中任一项所述的寡核苷酸，其中所述至少一个错配包括具有替代性核碱基的核苷。

[0178] E118.如E127所述的寡核苷酸，其中所述替代性核碱基具有以下结构：

[0179] 

[0180] 其中R^1为氢、三氟甲基、任选取代的氨基、羟基或任选取代的C_1-C_6烷氧基；

[0181] R^2为氢、任选取代的氨基或任选取代的C_1-C_6烷基；并且

[0182] R^3和R^4独立地为氢、卤素或任选取代的C_1-C_6烷基，

[0183] 或其盐。

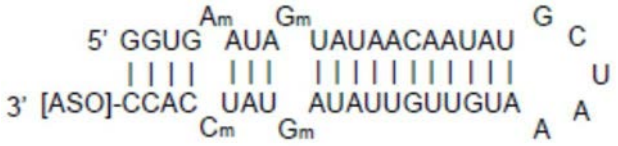
[0184] E119.如E81至E118中任一项所述的寡核苷酸，其中C-L_1-D为ADAR招募结构域。

[0185] E120.如E75至E80和E119中任一项所述的寡核苷酸，其中所述一个或多个ADAR招

募结构域为谷氨酸促离子型受体AMPA型亚单位2(GluR2)ADAR招募结构域。

[0186] E121.如E120所述的寡核苷酸,其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.37的核苷酸序列。

[0187] E122.如E121所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式XI的结构:

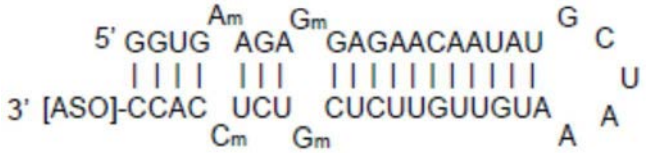
[0188] 

式 XI,

[0189] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸,其中m表示错配的核苷酸。

[0190] E123.如E120所述的寡核苷酸,其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.38的核苷酸序列。

[0191] E124.如E123所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式XII的结构:

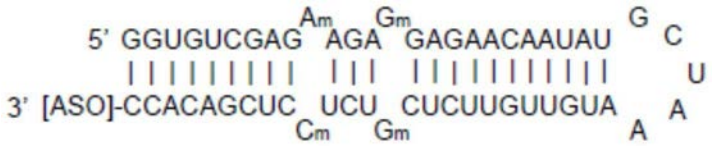
[0192] 

式 XII,

[0193] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸,其中m表示错配的核苷酸。

[0194] E125.如E120所述的寡核苷酸,其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.39的核苷酸序列。

[0195] E126.如E125所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式XIII的结构:

[0196] 

式 XIII,

[0197] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸,其中m表示错配的核苷酸。

[0198] E127.如E120所述的寡核苷酸,其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.40的核苷酸序列。

[0199] E128.如E75至E80或E119至E127中任一项所述的寡核苷酸,其中所述一个或多个ADAR招募结构域包括至少一个核酸酶抗性核苷酸。

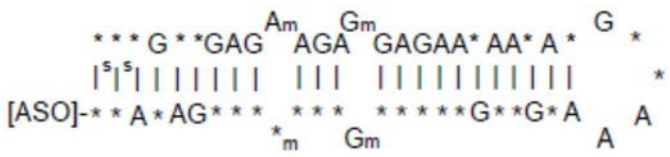
[0200] E129.如E128所述的寡核苷酸,其中所述核酸酶抗性核苷酸为2'-O-甲基-核苷酸。

[0201] E130.如E75至E80或E119至E127中任一项所述的寡核苷酸,其中所述一个或多个ADAR招募结构域包括至少一个替代性核苷间键。

[0202] E131.如E130所述的寡核苷酸,其中所述替代性核苷间键为硫代磷酸酯核苷间键。

[0203] E132.如E127至E131中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式XIV的结

构：

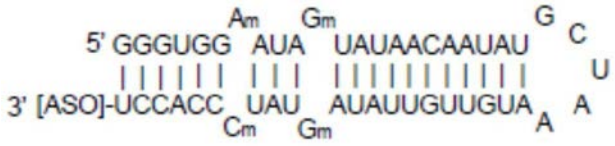
[0204] 

式 XIV，

[0205] 其中[ASO]包括如E1至E81中任一项所述的寡核苷酸，其中*为2'-O-甲基核苷酸，其中s为硫代磷酸酯核苷间键，其中m表示错配的核苷酸。

[0206] E133.如E120所述的寡核苷酸，其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.41的核苷酸序列。

[0207] E134.如E133所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包括式XV的结构：

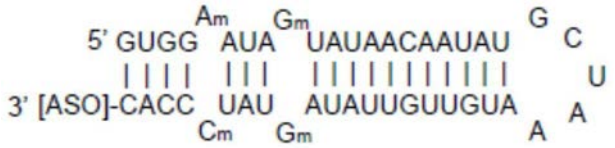
[0208] 

式 XV，

[0209] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸，其中m表示错配的核苷酸。

[0210] E135.如E120所述的寡核苷酸，其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.42的核苷酸序列。

[0211] E136.如E135所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包括式XVI的结构：

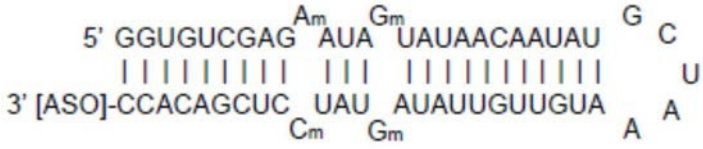
[0212] 

[0213] 式 XVI，

[0214] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸，其中m表示错配的核苷酸。

[0215] E137.如E120所述的寡核苷酸，其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.43的核苷酸序列。

[0216] E138.如E137所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包括式XVII的结构：

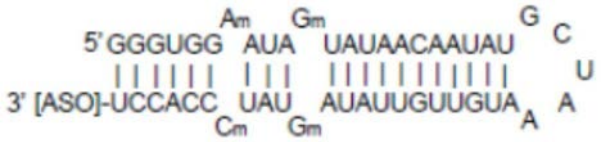
[0217] 

式 XVII，

[0218] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸，其中m表示错配的核苷酸。

[0219] E139.如E120所述的寡核苷酸，其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.44的核苷酸序列。

[0220] E140.如E139所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式XVIII的结构:

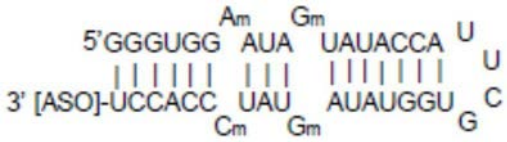
[0221] 

式 XVIII,

[0222] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸,其中m表示错配的核苷酸。

[0223] E141.如E120所述的寡核苷酸,其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.45的核苷酸序列。

[0224] E142.如E148所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式XIX的结构:

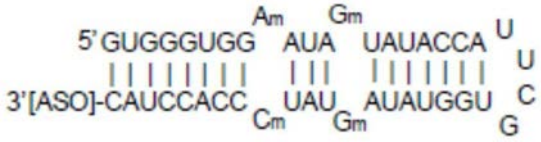
[0225] 

式 XIX,

[0226] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸,其中m表示错配的核苷酸。

[0227] E143.如E120所述的寡核苷酸,其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.46的核苷酸序列。

[0228] E144.如E143所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式XX的结构:

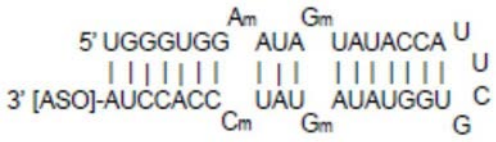
[0229] 

式 XX,

[0230] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸,其中m表示错配的核苷酸。

[0231] E145.如E120所述的寡核苷酸,其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.47的核苷酸序列。

[0232] E146.如E145所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式XXI的结构:

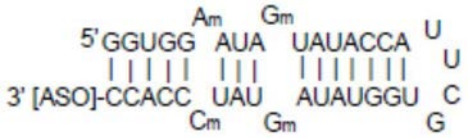
[0233] 

式 XXI,

[0234] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸,其中m表示错配的核苷酸。

[0235] E147.如E120所述的寡核苷酸,其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.48的核苷酸序列。

[0236] E148.如E153所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式XXII的结构:

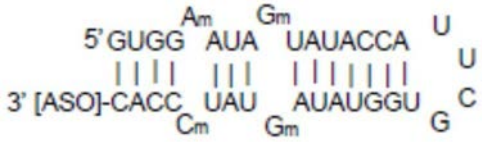
[0237] 

式 XXII,

[0238] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸,其中m表示错配的核苷酸。

[0239] E149.如E120所述的寡核苷酸,其中所述GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.49的核苷酸序列。

[0240] E150.如E149所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括式XXIII的结构:

[0241] 

式 XXIII,

[0242] 其中[ASO]包括如E1至E74中任一项所述的寡核苷酸,其中m表示错配的核苷酸。

[0243] E151.如E75至E80中任一项所述的寡核苷酸,其中所述一个或多个ADAR招募结构域为Z-DNA ADAR招募结构域。

[0244] E152.如E75至E80中任一项所述的寡核苷酸,其中所述一个或多个ADAR招募结构域为MS2 ADAR招募结构域。

[0245] E153.如E152所述的寡核苷酸,其中所述MS2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.50的核苷酸序列。

[0246] E154.一种缀合物,其包括缀合至靶部分的如E1至E153中任一项所述的寡核苷酸。

[0247] E155.如E154所述的缀合物,其中所述靶部分为脂质、固醇、碳水化合物和/或肽。

[0248] E156.如E155所述的缀合物,其中所述寡核苷酸缀合至固醇。

[0249] E157.如E156所述的缀合物,其中所述固醇为胆固醇。

[0250] E158.如E155至E157中任一项所述的缀合物,其中所述寡核苷酸缀合至碳水化合物。

[0251] E159.如E158所述的缀合物,其中所述碳水化合物为N-乙酰半乳糖胺。

[0252] E160.如E155至E159中任一项所述的缀合物,其中如E1至E137中任一项所述的寡核苷酸缀合至肽。

[0253] E161.如E160所述的缀合物,其中所述肽为细胞穿透肽。

[0254] E162.如E156至E161中任一项所述的缀合物,其中所述寡核苷酸缀合至脂质。

[0255] E163.如E162所述的缀合物,其中所述脂质为石胆酸、二十二碳六烯酸或二十二酸。

[0256] E164.一种复合物,其包括:

[0257] 如E1至E153中任一项所述的寡核苷酸或如E154至E163中任一项所述的缀合物;和

[0258] mRNA,

[0259] 其中所述寡核苷酸或缀合物与mRNA彼此杂交并且所述复合物包括在所述mRNA的

腺苷处的第一错配。

[0260] E165.如E164所述的复合物,其中所述复合物包括距所述第一错配的5'处有四个核苷酸的第二错配。

[0261] E166.如E164或E165所述的复合物,其中所述复合物包括1、2、3、4、5、6、7或8个错配。

[0262] E167.如E164至E166中任一项所述的复合物,其中所述mRNA包括可被脱氨基以产生治疗结果的腺苷。

[0263] E168.如E164至E166中任一项所述的复合物,其中所述mRNA与相应的天然mRNA相比包括鸟苷至腺苷突变。

[0264] E169.如E168所述的复合物,其中所述鸟苷至腺苷突变为错义或无义突变。

[0265] E170.如E164至E169中任一项所述的复合物,其中所述第一错配在mRNA的起始密码子中的腺苷处。

[0266] E171.如E164至E169中任一项所述的复合物,其中所述第一错配在mRNA的终止密码子中的腺苷处。

[0267] E172.如E171所述的复合物,其中所述终止密码子为提前终止密码子。

[0268] E173.一种产生如E164至E172中任一项所述的复合物的方法,所述方法包括使细胞与如E1至E153中任一项所述的寡核苷酸或如E154至E163中任一项所述的缀合物接触。

[0269] E174.一种在mRNA中使腺苷脱氨基的方法,所述方法包括使细胞与如E1至E153中任一项所述的寡核苷酸或如E154至E163中任一项所述的缀合物接触。

[0270] E175.一种治疗有需要的受试者中的病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如E1至E153中任一项所述的寡核苷酸或如E154至E163中任一项所述的缀合物。

[0271] E176.如E175所述的方法,其中所述病症为囊性纤维化、白化症、α-1-抗胰蛋白酶缺乏症、阿尔茨海默病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、哮喘、11-地中海贫血、卡达西综合征(Cadasil syndrome)、夏-马-图三氏病(Charcot-Marie-Tooth disease)、慢性阻塞性肺病、远端脊肌萎缩症、杜兴氏/贝克尔肌肉营养不良(Duchenne/Becker muscular, dystrophy)、营养不良性大疱性表皮松解症、大疱性表皮松解症、法布里病(Fabry disease)、第五因子莱登(Factor V Leiden)相关病症、家族性腺瘤、息肉病、半乳糖血症、高歇氏病(Gaucher's disease)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症、血友病、遗传性血色病、亨特氏综合征(Hunter syndrome)、亨廷顿氏舞蹈病(Huntington's disease)、贺勒氏综合征(Hurler syndrome)、炎性肠病、遗传多重凝集综合征、莱伯氏先天性黑蒙症(Leber congenital amaurosis)、莱施-奈恩综合征(Lesch-Nyhan syndrome)、林奇综合征(Lynch syndrome)、马凡综合征(Marfan syndrome)、粘多糖病、肌肉营养不良、I型和II型强直性肌营养不良、神经纤维瘤病、A型、B型和C型尼-皮二氏病(Niemann-Pick disease)、NY-ESO-1相关癌症、帕金森氏病、Peutz-Jeghers二氏综合征、苯丙酮尿症、庞贝氏病(Pompe's disease)、原发性纤毛病、凝血酶原突变相关病症(例如,凝血酶原G20210A突变)、肺动脉高血压、色素性视网膜炎、山多夫氏病(Sandhoff disease)、严重复合型免疫缺乏综合征、镰状细胞性贫血、脊髓性肌萎缩、斯特格氏病(Stargardt's Disease)、泰-萨二氏病(Tay-Sachs disease)、乌谢尔综合征(Usher syndrome)、X连锁免疫缺陷、斯特奇-韦伯综合征(Sturge-Weber syndrome)、雷特氏综合征(Rett syndrome)或癌症。

[0272] E177.如E174至E176中任一项所述的方法,其中所述方法还包括向所述细胞或所述受试者施用ADAR融合蛋白。

[0273] E178.如E177所述的方法,其中使用包括编码ADAR融合蛋白的多核苷酸的表达载体构建体向所述细胞或所述受试者施用所述ADAR融合蛋白。

[0274] E179.如E177或E178所述的方法,其中所述ADAR融合蛋白包括融合至MS2噬菌体外壳蛋白的ADAR的脱氨酶结构域。

[0275] E180.如E179所述的方法,其中ADAR的脱氨酶结构域为ADAR1的脱氨酶结构域。

[0276] E181.如E179所述的方法,其中ADAR的脱氨酶结构域为ADAR2的脱氨酶结构域。

[0277] E182.如E175至E181中任一项所述的方法,其中施用包括肠胃外施用、鞘内施用或颅内施用。

[0278] 化学术语

[0279] 本文所用的术语用于描述特定实施方案,而不旨在限制。

[0280] 对于以下化学定义中的任一个,原子符号后面的数字表示特定化学部分中存在的元素的原子总数。如应理解,其他原子诸如H原子或如本文所述的取代基可在需要时存在以满足原子的原子价。例如,未取代的C_2烷基具有式-CH_2CH_3。当与本文所定义的基团一起使用时,对碳原子数目的提及包括在缩醛和缩酮基团中的二价碳,但不包括在酰基、酯基、碳酸酯基或氨基甲酸酯基中的羰基碳。对杂芳基中的氧、氮或硫原子数目的提及仅包括形成杂环的一部分的那些原子。

[0281] 当特定取代基可在同一结构中出现多次时,可自所述取代基的可能定义列表中独立地选择所述取代基的每个实例。

[0282] 如本文所用,术语“烷基”是指具有1至20个碳原子(例如,1至16个碳原子、1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至3个碳原子)的支链或直链单价饱和脂族烃基。

[0283] 亚烷基为二价烷基。如本文所用,术语“烯基”单独或与其他基团组合时是指具有碳-碳双键且具有2至20个碳原子(例如,2至16个碳原子、2至10个碳原子、2至6个碳原子或2个碳原子)的直链或支链烃残基。

[0284] 如本文所用,术语“卤素”意指氟(氟基)、氯(氯基)、溴(溴基)或碘(碘基)基团。

[0285] 如本文所用,术语“杂烷基”是指其中一个或多个组成碳原子已被氮、氧或硫置换的如本文所定义的烷基。在一些实施方案中,杂烷基可进一步被1、2、3或4个如本文针对烷基所述的取代基取代。杂烷基的实例为“烷氧基”,其如本文所用是指烷基-O-(例如甲氧基和乙氧基)。亚杂烷基为二价杂烷基。如本文所用,术语“杂烯基”是指其中一个或多个组成碳原子已被氮、氧或硫置换的如本文所定义的烯基。在一些实施方案中,杂烯基可进一步被1、2、3或4个如本文针对烯基所述的取代基取代。杂烯基的实例为“烯氧基”,其如本文所用是指烯基-O-。亚杂烯基为二价杂烯基。如本文所用,术语“杂炔基”是指其中一个或多个组成碳原子已被氮、氧或硫置换的如本文所定义的炔基。在一些实施方案中,杂炔基可进一步被1、2、3或4个如本文针对炔基所述的取代基取代。杂炔基的实例为“炔氧基”,其如本文所用是指炔基-O-。亚杂炔基为二价杂炔基。

[0286] 如本文所用,术语“羟基”表示-OH基团。

[0287] 烷基、杂烷基可为取代或未取代的。当取代时,除非另作说明,否则通常将存在1至4个取代基。取代基包括例如:烷基(例如未取代的和取代的,其中所述取代基包括本文所述

的任何基团，例如芳基、卤基、羟基)、芳基(例如取代的和未取代的苯基)、碳环基(例如取代的和未取代的环烷基)、卤基(例如氟基)、羟基、杂烷基(例如取代的和未取代的甲氧基、乙氧基或硫代烷氧基)、杂芳基、杂环基、氨基(例如NH_2或单烷基氨基或二烷基氨基)、叠氮基、氰基、硝基或硫醇。芳基、碳环基(例如环烷基)、杂芳基和杂环基还可被烷基(未取代的和取代的)取代(诸如芳基烷基(例如，取代的和未取代的苄基))。

[0288] 本发明的化合物可具有一个或多个不对称碳原子且可以如下形式存在：光学纯的对映异构体、对映异构体的混合物，诸如外消旋体、光学纯的非对映异构体、非对映异构体的混合物、非对映异构外消旋体或非对映异构外消旋体的混合物。光学活性形式可例如通过拆分外消旋体、通过不对称合成或不对称色谱法(用手性吸附剂或洗脱液的色谱法)而获得。也即是说，某些所公开的化合物可以各种立体异构形式存在。立体异构体是仅在其空间排列上不同的化合物。对映异构体为一对立体异构体，它们的镜像不能重叠，最常见的原因在于它们含有不对称取代的碳原子作为手性中心。“对映异构体”意指一对互为镜像且不能重叠的分子中的一种。非对映异构体为与镜像不相关的立体异构体，最常见的原因在于它们含有两个或更多个不对称取代的碳原子并且代表一个或多个手性碳原子周围的取代基构型。例如，化合物的对映异构体可使用一种或多种众所周知的技术和方法诸如手性色谱法和基于其的分离方法，通过自外消旋体中分离对映异构体来制备。用于自外消旋混合物中分离本文所述的化合物的对映异构体的适当技术和/或方法可易于由本领域技术人员确定。“外消旋体”或“外消旋混合物”意指含有两种对映异构体的化合物，其中这类混合物没有光学活性；即，它们不会围绕偏振光的平面旋转。“几何异构体”意指与碳-碳双键、环烷基环或桥连双环体系的关系在取代基原子的取向上不同的异构体。在碳-碳双键的每侧上的原子(除H以外)可呈E构型(取代基在碳-碳双键的25相对侧上)或Z构型(取代基在同一侧上取向)。“R”、“S”、“S*”、“R*”、“E”、“Z”、“顺式”和“反式”表示相对于核心分子的构型。某些所公开的化合物可以阻转异构形式存在。阻转异构体由围绕单键的旋转受阻而形成的立体异构体，其中立体应变对旋转的屏障高至足以允许分离构象异构体。本发明化合物可通过异构体特异性合成或自异构混合物的拆分而制备成单个异构体。常规拆分技术包括使用光学活性酸(接着分步结晶和使游离碱再生)形成异构对的每种异构体的游离碱的盐；使用光学活性胺(接着分步结晶和使游离碱再生)形成异构对的每种异构体的酸式盐；使用光学纯的酸、胺或醇(接着色谱分离和移除手性助剂)形成异构对的每种异构体的酯或酰胺35；或使用各种众所周知的色谱法拆分起始材料或最终产物的异构混合物。当所公开的化合物的立体化学由结构命名或描绘时，所命名或描绘的立体异构体相对于其他立体异构体为至少60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、99重量%或99.9重量%。当单个对映异构体由结构命名或描绘时，所命名或描绘的对映异构体为至少60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、99重量%或99.9重量%光学纯的。当单个非对映异构体由结构命名或描绘时，所命名或描绘的非对映异构体为至少60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、99重量%或99.9重量%纯的。光学纯度百分比为对映异构体的重量在对映异构体的重量加上其光学异构体重量中的比率。以重量计的非对映异构体纯度为一种非对映异构体的重量在所有非对映异构体重量中的比率。当所公开的化合物的立体化学由结构命名或描绘时，所命名或描绘的立体异构体相对于其他立体异构体为至少60摩尔分数%、70摩尔分数%、80摩尔分数%、90摩尔分数%、99摩尔分数%或99.9摩尔分数%纯的。当单个对映异构体由结构命名或描绘

时，所命名或描绘的对映异构体为至少60摩尔分数％、70摩尔分数％、80摩尔分数％、90摩尔分数％、99摩尔分数％或99.9摩尔分数％纯的。当单个非对映异构体由结构命名或描绘时，所命名或描绘的非对映异构体为至少60摩尔分数％、70摩尔分数％、80摩尔分数％、90摩尔分数％、99摩尔分数％或99.9摩尔分数％纯的。以摩尔分数计的纯度百分比为对映异构体的摩尔数在对映异构体的摩尔数加上其光学异构体摩尔数中的比率。类似地，以摩尔分数计的纯度百分比为非对映异构体的摩尔数在非对映异构体的摩尔数加上其异构体摩尔数中的比率。当所公开的化合物由结构命名或描绘而没有表示立体化学并且所述化合物具有至少一个手性中心时，应理解，所述名称或结构涵盖不含相应光学异构体的化合物的对映异构体、化合物的外消旋混合物、或一种对映异构体相对于其相应的光学异构体富集的混合物。当所公开的化合物由结构命名或描绘而没有指示立体化学并且具有两个或更多个手性中心时，应理解，所述名称或结构涵盖不含其他非对映异构体的非对映异构体，不含其他非对映异构体对的许多非对映异构体、非对映异构体的混合物、非对映异构体对的混合物、其中一种非对映异构体相对于其他非对映异构体富集的非对映异构体的混合物、或其中一种或多种非对映异构体相对于其他非对映异构体富集的非对映异构体的混合物。本发明包括所有这些形式。

[0289] 除非另外定义，否则本文所用的全部技术和科学术语都具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。本文所述的方法和材料用于本公开中；还可使用本领域中已知的其他合适的方法和材料。材料、方法和实施例仅为说明性而不旨在限制。所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和本文提及的其他参考文献都以引用的方式全部并入。当发生冲突时，以本说明书(包括定义)为准。

[0290] 定义

[0291] 为了方便起见，在说明书、实施例和所附权利要求书中使用的一些术语和短语的含义在下文中提供。除非另有说明，或自上下文隐含，否则以下术语或短语包括下文提供的含义。提供所述定义以便于描述特定实施方案，而不旨在限制要求保护的技术，因为技术的范畴仅受权利要求书的限制。除非另外定义，否则本文所用的全部技术和科学术语都具有本技术所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。如果本领域中术语的使用与本文所提供的定义有明显差异，则以说明书内提供的定义为准。

[0292] 在本申请中，除非上下文中另外明晰，否则(i)术语“一个/种”可理解为意指“至少一个/种”；(ii)术语“或”可理解为意指“和/或”；以及(iii)术语“包括”和“包含”可理解为涵盖详细列举的组分或步骤，不管这些组分或步骤是单独提出还是与一个或多个额外组分或步骤一起提出。

[0293] 如本文所用，术语“约”和“大致”是指在超过或低于所述值的10％内的值。例如，术语“约5nM”表示4.5nM至5.5nM的范围。

[0294] 术语“至少”在一个数字或一系列数字之前应理解为包括与术语“至少”相邻的数字，以及逻辑上可包括的所有后续数字或整数，如上下文中所明晰。例如，核酸分子中的核苷酸数目必须为整数。例如，“21-核苷酸核酸分子的至少18个核苷酸”意指具有指示特性的18、19、20或21个核苷酸。当至少出现在一系列数字或范围之前时，应理解，“至少”可修饰所述系列或范围中的每个数字。

[0295] 如本文所用，“不超过”或“小于”应理解为与所述短语相邻的值和合理的下限值或

整数(如上下文中合理的)至零。例如,具有“不超过5个未修饰的核苷酸”的寡核苷酸具有5、4、3、2、1或0个未修饰的核苷酸。当“不超过”出现在一系列数字或范围之前时,应理解,“不超过”可修饰所述系列或范围中的每个数字。

[0296] 如本文所用,术语“施用”是指向受试者或系统施用组合物(例如,如本文所述的化合物或包括如本文所述的化合物的制剂)。向动物受试者(例如向人)的施用可通过任何适当途径诸如本文所述的一种途径来进行。

[0297] 如本文所用,“组合疗法”或“组合施用”意指向受试者施用两种(或更多种)不同剂或治疗作为用于特定疾病或病状的明确治疗方案的一部分。治疗方案规定每种剂的剂量和施用周期,以便使单独的剂对受试者的效果重叠。在一些实施方案中,两种或更多种剂的递送为同时或并行的且所述剂可被共配制。在一些实施方案中,两种或更多种剂不被共配制且以连续方式作为处方方案的一部分施用。在一些实施方案中,组合施用两种或更多种剂或治疗使得症状或与病症相关的其他参数的减少大于单独递送一种剂或治疗或不使用另一种剂或治疗时所观察到的。两种治疗的效果可为部分相加的、完全相加的或大于相加的(例如协同的)。每种治疗剂的连续或实质上同时施用可通过包括但不限于以下的任何适当途径实现:口服途径、静脉内途径、肌内途径和通过黏膜组织的直接吸收。治疗剂可通过相同途径或通过不同途径施用。例如,组合的第一治疗剂可通过静脉内注射施用,而组合的第二治疗剂可口服施用。

[0298] “G”、“C”、“A”、“T”和“U”各自通常代表分别含有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸苷和尿嘧啶作为碱基的天然存在的核苷酸。然而,应理解,术语“核苷酸”还可指的是如下进一步详述的替代性核苷酸或替代置换部分。熟练技术人员充分知晓鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤和尿嘧啶可被其他部分置换,而没有实质上改变寡核苷酸的碱基配对特性,所述寡核苷酸包括载有这类置换部分的核苷酸。例如,但不限于,包括次黄嘌呤作为其碱基的核苷酸可与含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸碱基配对。因此,含有尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可在本发明的寡核苷酸的核苷酸序列中被含有例如次黄嘌呤的核苷酸置换。在另一个实施例中,在寡核苷酸中任何地方的腺嘌呤和胞嘧啶都可分别被鸟嘌呤和尿嘧啶置换以形成与靶mRNA的G-U摆动碱基配对。含有这类置换部分的序列适用于本发明的组合物和方法。

[0299] 术语“核碱基”和“碱基”包括存在于在核酸杂交中形成氢键的核苷和核苷酸中的嘌呤(例如腺嘌呤和鸟嘌呤)和嘧啶(例如尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶)。在本发明的上下文中,术语核碱基还涵盖替代性核碱基,其可不同于天然存在的核碱基但在核酸杂交期间具有功能性。在此情形下,“核碱基”是指天然存在的核碱基,诸如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸苷、尿嘧啶、黄嘌呤和次黄嘌呤;以及替代性核碱基。这类变体例如描述于Hirao等人(2012)Accounts of Chemical Research第45卷,第2055页和Bergstrom(2009)Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry增刊37 1.4.1中。

[0300] 在一些实施方案中,核碱基部分通过使嘌呤或嘧啶变为修饰的嘌呤或嘧啶诸如取代的嘌呤或取代的嘧啶,诸如选自以下的“替代性核碱基”而被修饰:异胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-噻唑并-胞嘧啶、5-丙炔基-胞嘧啶、5-丙炔基-尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-噻唑并-尿嘧啶、2-硫代-尿嘧啶、假尿嘧啶、1-甲基假尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2’-硫代-胸腺嘧啶、次黄嘌呤、二氨基嘌呤、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤和2-氯-6-氨基嘌呤。

[0301] 核碱基部分可由每个相应核碱基的字母代码来表示，例如A、T、G、C或U，其中每个字母可任选包括等效功能的替代性核碱基。在一些实施方案中，例如，对于gapmer，可使用5-甲基胞嘧啶LNA核苷。

[0302] “糖”或“糖部分”包括具有呋喃糖环的天然存在的糖。糖还包括“替代性糖”，定义为能够置换核苷的呋喃糖环的结构。在某些实施方案中，替代性糖为非呋喃糖(或4’-取代的呋喃糖)环或环系或开放系统。这类结构包括相对于天然呋喃糖环的简单变化，诸如六元环，或可为更复杂的，就像在肽核酸中使用的非环系一样。替代性糖还可包括糖替代品，其中呋喃糖环已被另一环系诸如吗啉代或己糖醇环系置换。可用于具有基序的寡核苷酸的制备的糖部分包括但不限于β-D-核糖、β-D-2’-脱氧核糖、取代的糖(诸如2’、5’和双取代的糖)、4’-S-糖(诸如4’-S-核糖、4’-S-2’-脱氧核糖和4’-S-2’-取代的核糖)、双环替代性糖(诸如2’-O—CH_2-4’或2’-O—$(CH_2)_2$-4’桥连的核糖来源的双环糖)以及糖替代品(诸如当核糖环已被吗啉代或己糖醇环系置换时)。在每个位置处使用的杂环碱基和核苷间键的类型是可变的且并非确定基序的因素。在具有替代性糖部分的大部分核苷中，通常维持杂环核碱基以允许杂交。

[0303] 如本文所用，“核苷酸”是指包括核苷和核苷间键的寡核苷酸或多核苷酸的单体单元。核苷间键可包括或不包括磷酸酯键。类似地，“连接核苷”可由或不由磷酸酯键连接。许多“替代性核苷间键”是本领域已知的，包括但不限于硫代磷酸酯和硼磷酸酯键。替代性核苷包括双环核苷(BNA)(例如，锁定核苷(LNA)和约束型乙基(cEt)核苷)、肽核苷(PNA)、磷酸三酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯和天然核苷的磷酸酯主链的其他变体，包括本文所述的那些。

[0304] 如本文所用，“替代性核苷酸”是指具有替代性核苷或替代性糖和核苷间键(可包括替代性核苷键)的核苷酸。

[0305] 术语“核苷”是指具有核碱基和糖部分的寡核苷酸或多核苷酸的单体单元。核苷可包括天然存在的核苷以及替代性核苷，诸如本文所述的那些。核苷的核碱基可为天然存在的核碱基或替代性核碱基。类似地，核苷的糖部分可为天然存在的糖或替代性糖。

[0306] 术语“替代性核苷”是指具有替代性糖或替代性核碱基(诸如本文所述的那些)的核苷。

[0307] 如本文所用，术语“核酸酶抗性核苷酸”是指限制寡核苷酸的核酸酶降解的核苷酸。核酸酶抗性核苷酸通常通过成为核酸酶的不良底物来提高寡核苷酸的稳定性。核酸酶抗性核苷酸是本领域已知的，例如2’-O-甲基-核苷酸和2’-氟-核苷酸。

[0308] 如本文所用，术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”定义为通常由熟练技术人员所理解的包括两个或更多个共价连接的核苷的分子。这类共价结合的核苷还可称为核酸分子或低聚物。寡核苷酸通常在实验室中通过固相化学合成接着纯化来制得。当提及寡核苷酸的序列时，还提及共价连接的核苷酸或核苷的核碱基部分的序列或顺序或其修饰。本发明的寡核苷酸可为人工的，并且在化学上合成，并且通常被纯化或分离。寡核苷酸还旨在包括：(i)具有一个或多个呋喃糖部分的化合物，所述呋喃糖部分被呋喃糖衍生物或任何环状或非环状结构置换，其可用作与碱基部分的共价连接点，(ii)具有一个或多个磷酸二酯键的化合物，所述磷酸二酯键被修饰，就像氨基磷酸酯或硫代磷酸酯键一样，或被合适的连接部分完全置换，就像甲缩醛或核酸缩醛键一样，和/或(iii)具有一个或多个连接的呋喃糖-磷酸二酯

键部分的化合物，所述连接的呋喃糖-磷酸二酯键部分被任何环状或非环状结构置换，其可用作与碱基部分的共价连接点。本发明的寡核苷酸可包括一个或多个替代性核苷或核苷酸(例如，包括本文所述的那些)。还应该理解，寡核苷酸包括缺少糖部分或核碱基但仍能与靶序列配对或杂交的组合物。

[0309] “寡核苷酸”是指短多核苷酸(例如，具有100个或更少的连接核苷)。

[0310] 寡核苷酸可具有任意长度，所述长度允许所需靶RNA的腺苷通过ADAR介导的途径脱氨基，并且可在约10-50个碱基对长度的范围内，例如约15-50个碱基对长度或约18-50个碱基对长度，例如，约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个碱基对长度，诸如约15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23或21-22个碱基对长度。还预期以上列举的范围和长度的中间范围和长度是本发明的一部分。

[0311] 如本文所用，术语“gapmer”是指包括RNA酶H招募寡核苷酸的区域(gap)的寡核苷酸，所述区域在5’和3’处侧接有包括一个或多个增强亲和力的替代性核苷的区域(侧翼或侧面)。在本文中描述各种gapmer设计。头聚体(Headmer)和尾聚体(tailmer)为能够招募RNA酶H的寡核苷酸，其中丢失一个侧翼，即，寡核苷酸仅有一个末端包括增强亲和力的替代性核苷。对于头聚体，丢失3’侧翼(即，5’侧翼包括增强亲和力的替代性核苷)，并且对于尾聚体，丢失5’侧翼(即，3’侧翼包括增强亲和力的替代性核苷)。“混合侧翼gapmer”是指其中侧翼区包括至少一个替代性核苷的gapmer，所述替代性核苷是诸如至少一个DNA核苷或至少一个2’取代的替代性核苷，例如2’-O-烷基-RNA、2’-O-甲基-RNA、2’-烷氧基-RNA、2’-O-甲氧基乙基-RNA(2’-O-MOE)、2’-氨基-DNA、2’-氟-RNA、2’-F-ANA核苷或双环核苷(例如，锁定核苷或cEt核苷)。在一些实施方案中，所述混合侧翼gapmer具有一个包括替代性核苷(例如5’或3’)的侧翼和另一个包括2’取代的替代性核苷的侧翼(分别为3’或5’)。

[0312] 术语“接头”或“连接基团”为介于两个原子之间的连接，其将一个目标化学基团或区段经由一个或多个共价键连接至另一个目标化学基团或区段。缀合物部分可直接或通过连接部分(例如接头或拴系)连接至寡核苷酸。接头用来将第三区域(例如缀合物部分)共价地连接至寡核苷酸(例如，区域A或C的末端)。在本发明的一些实施方案中，本发明的缀合物或寡核苷酸缀合物可任选包括位于寡核苷酸与缀合物部分之间的接头区域。在一些实施方案中，介于缀合物与寡核苷酸之间的接头是生物可裂解的。含有生物可裂解的接头的磷酸二酯更详细地描述于WO 2014/076195(以引用的方式并入本文)中。

[0313] 如本文所用，术语“ADAR招募结构域”是指可共价连接至本发明的寡核苷酸并形成茎-环结构的核苷酸序列，所述茎-环结构充当ADAR酶的招募和结合区。包括这类ADAR招募结构域的寡核苷酸可称为“axiomer AON”或“自成环AON”。ADAR招募结构域部分可用于招募存在于细胞中的内源性ADAR酶。这类ADAR招募结构域不需要缀合的实体或修饰的重组ADAR酶的存在。或者，ADAR招募部分可用于招募重组ADAR融合蛋白，所述重组ADAR融合蛋白已经由包括编码ADAR融合蛋白的多核苷酸的表达载体构建体递送至细胞或受试者。这类ADAR融

合蛋白可包括融合至另一种蛋白质(例如MS2噬菌体外壳蛋白)的ADAR1或ADAR2酶的脱氨酶结构域。ADAR招募结构域可为基于天然底物的核苷酸序列(例如,GluR2受体前mRNA;诸如GluR2 ADAR招募结构域)、Z-DNA结构或已知招募另一种蛋白质的结构域,所述另一种蛋白质为ADAR融合蛋白的一部分,例如,已知由ADAR的dsRNA结合区域识别的MS2 ADAR招募结构域。ADAR招募结构域的茎-环结构可为由两个单独的核酸链形成的分子间茎-环结构或在单一核酸链内形成的分子内茎环结构。

[0314] 如本文所用,术语"Z-DNA"是指DNA双螺旋或RNA茎环结构的左旋构象。这类DNA或dsRNA螺旋以Z形图案向左(与此相对为右,就像更常见的B-DNA形式)缠绕。Z-DNA为已知的高亲和力ADAR结合底物且已显示结合至人ADAR1酶。

[0315] 如本文所用且除非另外指出,否则术语"互补"当用于描述与第二核苷酸或核苷序列有关的第一核苷酸或核苷序列时是指包括第一核苷酸或核苷序列的寡核苷酸或多核苷酸在一定条件下与包括第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并形成双链体结构的能力,如熟练技术人员所理解的。这类条件可例如为严格条件,其中严格条件可包括:400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA,50℃或70℃,持续12-16小时,接着洗涤(参见,例如"Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Sambrook等人(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press)。还可施加其他条件,诸如有机体内可能遇到的生理相关条件。熟练技术人员将能够根据杂交核苷酸或核苷的最终应用来确定最适于两个序列的互补性测试的条件集。

[0316] 如本文所用,"互补"序列还可包括或完全由非沃森-克里克碱基对和/或由非天然和替代性核苷酸形成的碱基对形成,只要满足上述关于它们杂交能力的要求。这类非沃森-克里克碱基对包括但不限于G:U摆动或Hoogstein碱基配对。介于如本文所述的寡核苷酸与靶序列之间的互补序列包括含有第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与含有第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一个或两个核苷酸序列的全长上的碱基配对。这类序列在本文中可称为相对于彼此"完全互补"。然而,当第一序列在本文中称为相对于第二序列"实质上互补"时,两个序列可完全互补,或者它们在针对高达30个碱基对的双链体杂交后可形成一个或多个,但通常不超过5、4、3或2个错配碱基对,同时保留在与它们的最终应用(例如,腺苷的脱氨基)最相关的条件下杂交的能力。"实质上互补"还可指与目标mRNA(例如,具有靶腺苷的mRNA)的连续部分实质上互补的多核苷酸。例如,如果序列与目标mRNA的非中断部分实质上互补,则多核苷酸与目标mRNA的至少一部分互补。

[0317] 如本文所用,术语"互补区域"是指寡核苷酸上与基因、初级转录物、序列(例如,靶序列;例如具有靶腺苷的靶序列)或加工的mRNA的全部或一部分实质上互补以便干扰内源性基因的表达的区域。当互补区域与靶序列不完全互补时,错配可在所述分子的内部或末端区域中。通常,最耐受的错配在末端区域中,例如在寡核苷酸的5'-末端和/或3'-末端的5、4、3或2个核苷酸内。

[0318] 短语"细胞与寡核苷酸接触"包括诸如本文所用的寡核苷酸通过任何可能的手段与细胞接触。细胞与寡核苷酸接触包括使细胞与寡核苷酸体外接触或使细胞与寡核苷酸体内接触。接触可直接或间接进行。因此,例如,个体可通过进行所述方法将寡核苷酸置于与细胞的物理接触中,或替代地,可将寡核苷酸剂置于将允许或使得其随后与细胞接触的情形下。

[0319] 体外接触细胞可例如通过将细胞与寡核苷酸一起孵育来完成。体内接触细胞可例如通过将寡核苷酸注射至细胞所位于的组织中或所述组织附近或通过将寡核苷酸剂注射至另一区域(例如血流或皮下空间)中以便所述剂随后将到达有待接触的细胞所位于的组织来完成。例如,寡核苷酸可含有和/或偶合至配体,例如GalNAc3,所述配体将寡核苷酸引导至目标部位,例如肝脏。体外与体内接触方法的组合也是可能的。例如,细胞还可在体外与寡核苷酸接触且随后移植至受试者中。

[0320] 在一个实施方案中,使细胞与寡核苷酸接触包括通过促进或实现所述细胞中的摄取或吸收将寡核苷酸"引入"或"递送"至所述细胞中。寡核苷酸的吸收或摄取可通过独立的扩散或主动细胞过程,或通过辅助剂或装置进行。寡核苷酸向细胞中的引入可在体外和/或体内进行。例如,对于体内引入,可将寡核苷酸注射至组织部位中或全身施用。向细胞中的体外引入包括本领域中已知的方法,诸如电穿孔和脂质转染。其他方法在下文中描述和/或是本领域已知的。

[0321] 如本文所用,"脂质纳米颗粒"或"LNP"为包括脂质层的囊泡,所述脂质层封装药物活性分子,诸如核酸分子,例如寡核苷酸。LNP是指稳定的核酸-脂质颗粒。LNP通常含有阳离子脂质、可电离脂质、非阳离子脂质和防止颗粒聚集的脂质(例如,PEG-脂质缀合物)。LNP描述于例如美国专利第6,858,225号;第6,815,432号;第8,158,601号;和第8,058,069号中,其整个内容据此以引用的方式并入本文中。

[0322] 如本文所用,术语"脂质体"是指由在至少一个双层(例如,一个双层或多个双层)中排列的两亲性脂质构成的囊泡。脂质体包括具有由亲油性材料形成的膜和水性内部的单层和多层囊泡。水性部分含有寡核苷酸组合物。亲油性材料将水性内部与水性外部分隔开,所述水性外部通常不包括寡核苷酸组合物,但在一些实施例中,可能包括。脂质体还包括"空间上稳定的"脂质体,所述术语如本文所用是指包括一种或多种专化脂质的脂质体,所述一种或多种专化脂质当并入脂质体中时造成循环寿命相对于缺少这类专化脂质的脂质体有所延长。

[0323] "胶束"在本文中定义为特定类型的分子组装,其中两亲性分子以球状结构排列以使得分子的疏水性部分都向内导向,留下亲水性部分与周围水相接触。如果环境为疏水性的,则存在相反的排列。

[0324] "互补"多核苷酸为能够根据标准沃森-克里克互补规则进行碱基配对的那些多核苷酸。具体而言,嘌呤将与嘧啶碱基配对以形成以下组合:在DNA的情况下,鸟嘌呤与胞嘧啶配对(G:C)和腺嘌呤与胸腺嘧啶配对(A:T),或在RNA的情况下,腺嘌呤与尿嘧啶配对(A:U)。应理解,两个多核苷酸可彼此杂交,即使它们没有彼此完全互补,其限制条件为各自具有至少一个实质上与另一者互补的区域。

[0325] 如本文所用,术语(例如在细胞或受试者中)产生本文所述的治疗效果的剂的"有效量"、"治疗有效量"和"足量"是指当向包括人的受试者施用时足以实现有益或所需结果(包括临床结果)的量,且因而,"有效量"或其同义词视其所应用的情形而定。例如,在治疗病症的情形下,其为与在未施用时获得的反应相比足以达成治疗反应的剂的量。给定剂的量将视以下各种因素而变化:诸如给定剂、药物制剂、施用途径、疾病或病症类型、所治疗的受试者或宿主的身份(例如年龄、性别和/或体重)等,但仍可由本领域技术人员常规地确定。再者,如本文所用,剂的"治疗有效量"为与对照相比在受试者中产生有益或所需结果的

量。如本文中所定义，剂的治疗有效量可易于由本领域普通技术人员通过本领域中已知的常规方法来确定。可对给药方案进行调整以提供最佳治疗反应。

[0326] 如本文所用，“预防有效量”旨在包括当向患有病症或易患病症的受试者施用时足以预防或缓解疾病或疾病的一种或多种症状的寡核苷酸的量。缓解疾病包括使疾病过程放缓或降低之后发展的疾病的严重程度。“预防有效量”可视以下因素而变化：寡核苷酸、如何施用剂、疾病的风险程度、以及病史、年龄、体重、家族史、基因组成、先前或伴随治疗(如果有的话)的类型和有待治疗的患者的其他个体特征。

[0327] “治疗有效量”或“预防有效量”还包括在适用于任何治疗的合理的利益/风险比下产生一些所需局部或全身作用的寡核苷酸的量(以单剂量或多剂量施用)。用于本发明方法中的寡核苷酸可以足以产生适用于这类治疗的合理的利益/风险比的量施用。

[0328] 预防有效量还可指例如当向包括人的受试者施用时足以将本文所述的一种或多种病症的发作与预测发作相比推迟至少120天(例如至少6个月、至少12个月、至少2年、至少3年、至少4年、至少5年、至少10年或更久)的量。

[0329] “测定蛋白质的水平”意指通过本领域中已知的方法对蛋白质或编码所述蛋白质的mRNA的直接或间接检测。“直接测定”意指进行过程(例如，对样品进行测定或测试或“分析样品”，如本文中对所述术语所定义)以获得物理实体或值。“间接测定”是指自另一方或来源(例如，直接获取物理实体或值的第三方实验室)接收物理实体或值。测量蛋白质水平的方法通常包括但不限于西方墨点、免疫墨点、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫沉淀、免疫荧光、表面等离子体共振、化学发光、荧光极化、磷光、免疫组织化学分析、基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱法、液相色谱(LC)-质谱法、微型细胞计数法、显微术、荧光激活细胞分选(FACS)、和流式细胞术、以及基于蛋白质的特性的测定，所述特性包括但不限于酶活性或与其他蛋白质伴侣的相互作用。测量mRNA水平的方法是本领域已知的。

[0330] 相对于参考多核苷酸或多肽序列的“序列同一性百分比(%)”定义为在比对序列和引入缺口(必要时)以获得最大序列同一性百分比后的候选序列的核酸或氨基酸与参考多核苷酸或多肽序列的核酸或氨基酸相同的百分比。为了测定核酸或氨基酸序列同一性百分比而进行的比对可例如使用公开可得的计算机软件诸如BLAST、BLAST-2或Megalign软件以在本领域技术人员的能力范围内的多种方式达成。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数，包括在所比较的序列全长上实现最大比对所需的任何算法。例如，可使用序列比较计算机程序BLAST生成序列同一性百分比值。作为说明，给定核酸或氨基酸序列A与或针对给定核酸或氨基酸序列B(其可替代地表达为给定核酸或氨基酸序列A，其与或针对给定核酸或氨基酸序列B具有某一序列同一性百分比)的序列同一性百分比计算如下：

[0331] (分数X/Y)×100

[0332] 其中X为在比对A与B的程序中通过序列比对程序(例如BLAST)评为相同匹配的核苷酸或氨基酸的数目，并且其中Y为B中的核酸的总数。应当理解，当核酸或氨基酸序列A的长度不等于核酸或氨基酸序列B的长度时，A与B的序列同一性百分比将不等于B与A的序列同一性百分比。

[0333] “水平”意指与参考相比蛋白质或编码所述蛋白质的mRNA的水平或活性。参考可为如本文所定义的任何有用的参考。蛋白质的“降低水平”或“提高水平”意指与参考相比蛋白

质水平的降低或提高(例如,与参考相比,降低或提高了约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约100%、约150%、约200%、约300%、约400%、约500%或更多;降低或提高大于约10%、约15%、约20%、约50%、约75%、约100%或约200%;降低或提高了小于约0.01倍、约0.02倍、约0.1倍、约0.3倍、约0.5倍、约0.8倍或更小;或提高了大于约1.2倍、约1.4倍、约1.5倍、约1.8倍、约2.0倍、约3.0倍、约3.5倍、约4.5倍、约5.0倍、约10倍、约15倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约100倍、约1000倍或更多)。蛋白质的水平可以质量/体积(例如,g/dL、mg/mL、μg/mL、ng/mL)或相对于样品中的总蛋白质或mRNA的百分比表示。

[0334] 如本文所用,术语"药物组合物"表示含有与药学上可接受的赋形剂配制的本文所述的化合物的组合物,并且优选地在政府管理机构的批准下制造或销售作为用于治疗哺乳动物的疾病的治疗方案的一部分。药物组合物可配制以例如用于以单位剂型(例如片剂、胶囊、囊片、囊形片或糖浆)经口施用;用于局部施用(例如,作为霜剂、凝胶剂、洗剂或软膏);用于静脉内施用(例如,作为不含微粒栓子的无菌溶液和在适于静脉内使用的溶剂系统中);用于鞘内注射;用于脑室内注射;用于器官实质内注射;或在任何其他药学上可接受的制剂中。

[0335] 如本文所用,"药学上可接受的赋形剂"是指除本文所述的化合物以外的任何成分(例如,能够悬浮或溶解活性化合物的媒介物)并且在患者中具有实质上无毒和非炎性的特性。赋形剂可包括例如:抗粘剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣剂、压缩助剂、崩解剂、染料(色素)、软化剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或包衣剂、调味剂、香料、助滑剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮剂或分散剂、甜味剂和水合水。示例性赋形剂包括但不限于:丁基化羟基甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(二元)、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交联聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、蛋氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预胶凝淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、棕榈酸视黄酯、虫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、淀粉羟基乙酸钠、山梨醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C和木糖醇。

[0336] 如本文所用,术语"药学上可接受的盐"意指本文所述的化合物中的任一种化合物的任何药学上可接受的盐。例如,本文所述的化合物中任一种的药学上可接受的盐包括以下盐:在合理医学判断范畴内,适于与人和动物组织接触而没有不当毒性、刺激、过敏反应,并且与合理的利益/风险比相称。药学上可接受的盐是本领域熟知的。例如,药学上可接受的盐描述于Berge等人,J.Pharmaceutical Sciences 66:1-19,1977以及Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,(P.H.Stahl和C.G.Wermuth编),Wiley-VCH,2008中。盐可在本文所述的化合物的最终分离和纯化期间就地制备或通过使游离碱基团与合适的有机酸反应而单独制备。

[0337] 本文所述的化合物可具有可电离基团以便能够制备成药学上可接受的盐。这些盐可为涉及无机酸或有机酸的酸加成盐,或所述盐在酸性形式的本文所述的化合物的情况下可由无机碱或有机碱制备。常常,将化合物制备成或用作药学上可接受的盐,所述药学上可接受的盐制备成药学上可接受的酸或碱的加成产物。合适的药学上可接受的酸和碱以及用

于制备适当盐的方法是本领域熟知的。盐可由药学上可接受的无毒酸和碱制备，包括无机和有机酸和碱。代表性酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐和戊酸盐。代表性碱或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙和镁，以及无毒铵、季铵和胺阳离子，包括但不限于铵、四甲铵、四乙铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺和乙胺。

[0338] “参考”意指用于比较蛋白质或mRNA水平或活性的任何有用的参考。参考可为用于比较目的的任何样品、标准、标准曲线或水平。参考可为正常参考样品或参考标准或水平。“参考样品”可为例如对照，例如预定阴性对照值，诸如取自同一受试者的“正常对照”或先前样品；来自正常健康受试者诸如正常细胞或正常组织的样品；来自未患病的受试者的样品(例如细胞或组织)；来自被诊断为患有疾病但尚未用本文所述的化合物治疗的受试者的样品；来自已由本文所述的化合物治疗的受试者的样品；或在已知标准浓度下的纯化的蛋白质(例如，本文所述的任一者)的样品。“参考标准或水平”意指来源于参考样品的值或数字。“正常对照值”为指示非疾病状态的预定值，例如，预期出现在健康对照受试者中的值。通常，正常对照值表示为范围(“介于X与Y之间”)、高阈值(“不高于X”)或低阈值(“不低于X”)。具有在针对特定生物标记的正常对照值内的测量值的受试者通常被称为“在针对所述生物标记的正常限值内”。正常参考标准或水平可为来源于以下受试者的值或数字：未患疾病或病症的正常受试者；已用本文所述的化合物治疗的受试者。在优选的实施方案中，参考样品、标准或水平与样品受试者样品在至少一种下列标准上相匹配：年龄、体重、性别、疾病阶段和总体健康情况。纯化的蛋白质(例如本文所述的任一种)在正常参考范围内的水平的标准曲线还可用作参考。

[0339] 如本文所用，术语“受试者”是指例如出于实验、诊断、预防和/或治疗目的而可施用根据本发明的组合物的任何有机体。典型的受试者包括任何动物(例如哺乳动物，诸如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人)。受试者可寻求或需要治疗、要求治疗、正接受治疗、以后将接受治疗或因特定疾病或病状而在训练有素的专业人员的护理下的人或动物。

[0340] 如本文所用，术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”或“治疗(treating)”意指治疗性治疗和预防性或预防措施，其中目标在于预防或减缓(缓解)不希望有的生理病状、病症或疾病，或在于获得有益或所需临床结果。有益或所需临床结果包括但不限于症状的减轻；病状、病症或疾病的程度的减弱；病状、病症或疾病的状态稳定(即不恶化)；病状、病症或疾病的发作的推迟或进展减缓；病状、病症或疾病状态的改善或缓解(不管是部分还是全部)，不管是可检测还是不可检测；至少一个可测量的身体参数的改善(不一定可由患者辨别)；或者病状、病症或疾病的好转或改善。治疗包括引发临床上显著的反应而不产生过度的副作用。治疗还包括与未接受治疗所预期的存活期相比，延长存活期。

[0341] 如本文所用，术语“变体”与“衍生物”可互换地使用且是指本文所述的化合物、肽、蛋白质或其他物质的天然存在的、合成和半合成类似物。本文所述的化合物、肽、蛋白质或

其他物质的变体或衍生物可保留或改善原始材料的生物活性。

[0342] 本发明的一个或多个实施方案的细节在以下具体实施方式中阐述。本发明的其他特征、目标和优势将由具体实施方式和权利要求书中显而易见。

具体实施方式

[0343] 本发明者已发现修饰的寡核苷酸可用于使mRNA中的靶腺苷脱氨基。因此，本发明描述了例如在有需要的受试者中对mRNA上的靶腺苷(例如，可脱氨基以产生治疗结果的腺苷)脱氨基的有用的组合物和方法。

[0344] Ⅰ.病症

[0345] 本发明还提供本发明的寡核苷酸，其用于在如本文所述的哺乳动物(优选人细胞)的靶RNA序列中制造变化的方法中。类似地，本发明提供本发明的寡核苷酸构建体在制造供在如本文所述的哺乳动物(优选人细胞)的靶RNA序列中制造变化用的药剂中的用途。

[0346] 本发明还涉及一种使存在于细胞的靶RNA序列中的至少一个具体靶腺苷脱氨基的方法，所述方法包括以下步骤：向所述细胞提供本文所述的寡核苷酸；允许所述细胞摄取所述寡核苷酸；允许所述寡核苷酸退火成所述靶RNA序列；允许包括见于野生型酶中的天然dsRNA结合结构域的哺乳动物ADAR酶将靶RNA序列中的所述靶腺苷脱氨基成肌苷；以及任选鉴别所述肌苷在所述RNA序列中的存在。

[0347] 因此，本发明还涉及寡核苷酸和方法，其中彼此相邻的两个腺苷通过RNA编辑酶诸如ADAR共同脱氨基。在这种特定情况下，UAA终止密码子转化为编码UII Trp的密码子。由靶密码子内的靶腺苷的脱氨基作用产生的修饰的其他实例在以下表1和表2中提供。

[0348] 表1

[0349]

靶密码子	由靶密码子编码的氨基酸	修饰的密码子	由修饰的密码子编码的氨基酸
AAA	Lys	IAA	Glu
		AIA	Arg
		IIA	Gly
		AII	Arg
		IAI	Glu
		III	Gly
AAC	Asn	IAC	Asp
		AIC	Ser
		IIC	Gly
AAG	Lys	IAG	Glu
		AIG	Arg
		IIG	Gly
AAU	Arg	IAU	Asp
		AIU	Ser
		IIU	Gly
ACA	Thr	ICA	Ala
		ICI	Ala
ACC	Thr	ICC	Ala
ACG	Thr	ICG	Ala
ACU	Thr	ICU	Ala
AGA	Arg	IGA	Gly
		IGI	Gly
AGC	Ser	IGC	Gly
AGG	Arg	IGG	Gly
AGU	Ser	IGU	Gly
AUA	Ile	IUA	Asp
		AUI	Met
		IUI	Val
AUC	Ile	IUC	Val
AUG	Met	IUG	Val
AUU	Ile	IUU	Val
CAA	Gln	CIA	Arg
		CII	Arg
CAC	His	CIC	Arg
CAG	Gln	CIG	Arg
CAU	His	CIU	Arg

[0350]

靶密码子	由靶密码子编码的氨基酸	修饰的密码子	由修饰的密码子编码的氨基酸
GAA	Glu	GIA	Gly
		GII	Gly
GAC	Asp	GIC	Gly
GAG	Glu	GIG	Gly
GAU	Asp	GIU	Gly
UAA	Stop	UII	Trp
UGA	Stop	UGI	Trp
UAC	Tyr	UIC	Cys
UAG	Stop	UIG	Trp
UAU	Tyr	UIU	Cys

[0351] 表2.靶密码子碱基组成和所得的修饰的密码子

[0352]

靶密码子	修饰的密码子
AAA	AIA
AAC	AIC
AAG	AIG
AAU	AIU
CAA	CIA
CAC	CIC
CAG	CIG
CAU	CIU
GAA	GIA
GAC	GIC
GAG	GIG
GAU	GIU
UAA	UIA
UAC	UIC
UAG	UIG
UAU	UIU

[0353] 因为腺苷脱氨基成肌苷可产生在靶位置处不再具有突变A的蛋白质，所以对脱氨基成为肌苷的鉴别可为功能读出，例如，评估功能蛋白是否存在或甚至评估由存在腺苷所引起的疾病为(部分)逆转的。对于本文提及的每种疾病的功能评估通常将根据熟练技术人员已知的方法。当靶腺苷的存在造成异常剪接时，所述读出可为评估异常剪接是否仍在进行、或未进行、或减少。另一方面，当靶腺苷的脱氨基作用想要引入剪接位点时，则类似方法可用于检查所需类型的剪接是否实际上正在进行。鉴别靶腺苷的脱氨基后肌苷的存在的极合适的方法当然为RT-PCR和测序，使用本领域技术人员所熟知的方法进行。

[0354] 一般而言，使用根据本发明的寡核苷酸构建体可逆转的任何靶RNA中的突变为G至A突变，并且可相应地设计寡核苷酸构建体。可使用根据本发明的寡核苷酸构建体靶向的突变还包括C至A、在招募腺苷脱氨酶的情况下U至A(T至A，在DNA层面上)。虽然在后一情形下的RNA编辑不一定会将突变恢复为野生型，但编辑的核苷酸可比原始突变更加改善。例如，

引起框内终止密码子的突变-在转译后产生截短蛋白质-可变成编码氨基酸的密码子，所述氨基酸并非在所述位置处的原始氨基酸，而是产生具有至少一些官能性(至少比截短蛋白质更多的官能性)的(全长)蛋白质。

[0355] 本发明尤其适合治疗遗传性疾病，诸如囊性纤维化、白化症、α-1-抗胰蛋白酶(A1AT)缺乏症、阿尔茨海默病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、哮喘、11-地中海贫血、卡达西综合征、夏-马-图三氏病、慢性阻塞性肺病(COPD)、远端脊肌萎缩症(DSMA)、杜兴氏/贝克尔肌肉营养不良、营养不良性大疱性表皮松解症、大疱性表皮松解症、法布里病、第五因子莱登相关病症、家族性腺瘤、息肉病、半乳糖血症、高歇氏病、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症、血友病、遗传性血色病、亨特氏综合征、亨廷顿氏舞蹈病、贺勒氏综合征、炎性肠病(IBD)、遗传多重凝集综合征、莱伯氏先天性黑蒙症、莱施-奈恩综合征、林奇综合征、马凡综合征、粘多糖病、肌肉营养不良、I型和II型强直性肌营养不良、神经纤维瘤病、A型、B型和C型尼-皮二氏病、NY-ESO-1相关癌症、帕金森氏病、Peutz-Jeghers二氏综合征、苯丙酮尿症、庞贝氏病、原发性纤毛病、凝血酶原突变相关病症(例如，凝血酶原G20210A突变)、肺动脉高血压、色素性视网膜炎、山多夫氏病、严重复合型免疫缺乏综合征(SCID)、镰状细胞性贫血、脊髓性肌萎缩、斯特格氏病、泰-萨二氏病、乌谢尔综合征、X连锁免疫缺陷、斯特奇-韦伯综合征、雷特氏综合征和各种形式的癌症(例如，BRCA1和2连锁的乳腺癌和卵巢癌)。

[0356] 本发明的寡核苷酸可对腺苷突变脱氨基，造成蛋白质活性提高。

[0357] 在某些实施方案中，对已经诊断在基因中具有突变但尚未具有疾病症状的受试者(例如婴儿，诸如1月龄至12月龄的受试者或2岁以下的受试者)进行治疗。在其他实施方案中，对具有至少一种症状的个体进行治疗。

[0358] 治疗可在自婴儿期开始至成人期的任何年龄的受试者中进行。受试者可在例如出生时、6个月、或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15或18岁时开始治疗。

[0359] 在某些实施方案中，寡核苷酸在体外和/或体内使蛋白质活性有所提高(例如，提高了100％、150％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％或更多，或提高了大于1.2倍、1.4倍、1.5倍、1.8倍、2.0倍、3.0倍、3.5倍、4.5倍、5.0倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、1000倍或更多)。

[0360] 在一些实施方案中，寡核苷酸在脑中使蛋白质活性有所提高(例如，提高了100％、150％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％或更多，或提高了大于1.2倍、1.4倍、1.5倍、1.8倍、2.0倍、3.0倍、3.5倍、4.5倍、5.0倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、1000倍或更多)。

[0361] II.寡核苷酸剂

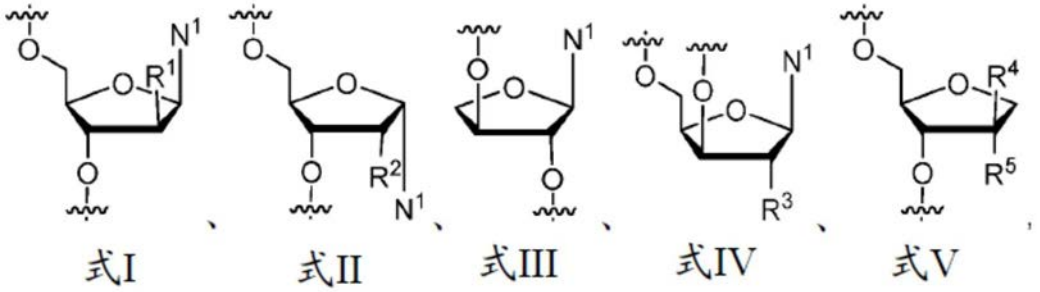
[0362] 本发明的寡核苷酸与靶mRNA互补，例外之处在于至少一个错配能够招募ADAR酶以使靶mRNA上的所选腺苷脱氨基。在一些实施方案中，使仅一个腺苷脱氨基。在一些实施方案中，使1、2或3个腺苷脱氨基。寡核苷酸包括与靶腺苷相反的错配，例如在X^2处。本发明的寡核苷酸还可包括修饰(例如替代性核苷酸)以提高稳定性和/或提高脱氨基效率。

[0363] A.替代性寡核苷酸

[0364] 在一个实施方案中，本发明的寡核苷酸的一个或多个核苷酸是天然产生的，并且不包括例如在本领域中已知和本文所述的化学修饰和/或缀合。在另一个实施方案中，本发明的寡核苷酸的一个或多个核苷酸在化学上修饰以增强稳定性或其他有益的特征(例如，

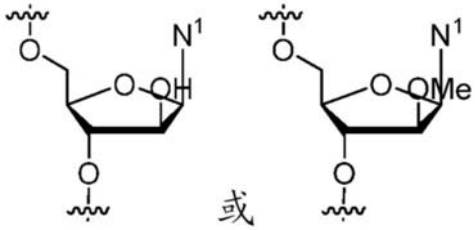
替代性核苷酸)。在不受理论约束的情况下,据信某些修饰能够提高核酸酶抗性和/或血清稳定性或降低免疫原性。例如,本发明的多核苷酸可含有天然地存在于DNA或RNA中的核苷酸(例如,腺嘌呤、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷或肌苷)或可含有在核苷酸的一种或多种组分(例如,核碱基、糖或磷酸接头部分)上具有一种或多种化学修饰的核苷酸。本发明的寡核苷酸可通过天然存在的磷酸二酯键彼此连接,或可经修饰以通过以下各键共价连接:硫代磷酸酯、3'-亚甲基膦酸酯、5'-亚甲基膦酸酯、3'-亚磷酰胺、2'-5'磷酸二酯、胍盐、S-甲基硫脲或肽键。

[0365] 在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸的一个或多个核苷酸具有式I-V中任一种的结构:

[0366] 

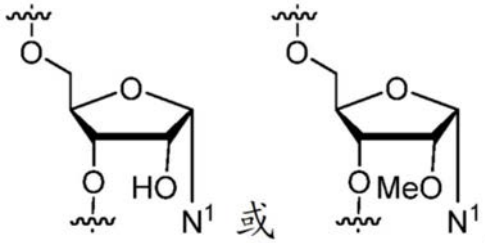
式I 式II 式III 式IV 式V

[0367] 在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸的一个或多个核苷酸具有式I中任一种的结构,例如具有以下结构:

[0368] 

或 。

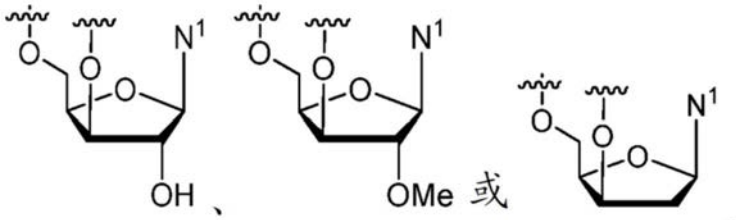
[0369] 在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸的一个或多个核苷酸具有式II中任一种的结构,例如具有以下结构:

[0370] 

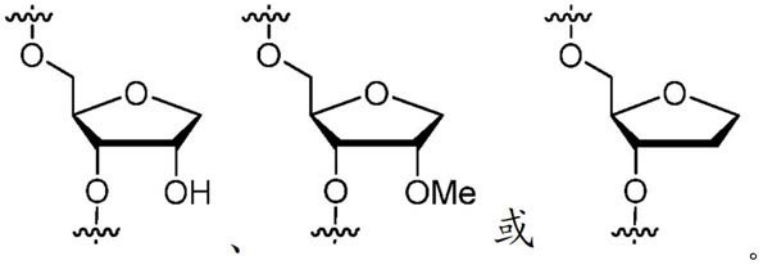
或 。

[0371] 在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸的一个或多个核苷酸具有式III中任一种的结构。

[0372] 在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸的一个或多个核苷酸具有式IV中任一种的结构,例如具有以下结构:

[0373] 

[0374] 在一些实施方案中，本发明的寡核苷酸的一个或多个核苷酸具有式V中任一种的结构，例如具有以下结构：

[0375] 

[0376] 在本发明的某些实施方案中，本发明的寡核苷酸的实质上所有核苷酸为替代性核苷酸。在本发明的其他实施方案中，本发明的寡核苷酸的所有核苷酸都是替代性核苷酸。其中“实质上所有核苷酸为替代性核苷酸”的本发明的寡核苷酸很大程度上而非全部经修饰并且可包括不超过5、4、3、2或1个天然存在的核苷酸。在本发明的又一些实施方案中，本发明的寡核苷酸可包括不超过5、4、3、2或1个替代性核苷酸。

[0377] 在一些实施方案中，本发明的寡核苷酸包括以下结构：

[0378] $[A_m]$-X^1-X^2-X^3-$[B_n]$

[0379] 其中A与B各自为核苷酸；m与n各自独立地为5至40的整数；X^1、X^2和X^3中的至少一个具有式I的结构，其中R^1为氟、羟基或甲氧基且N^1为核碱基或具有式V的结构，其中R^4为氢且R^5为氢；不具有式I的结构的X^1、X^2和X^3各自为核糖核苷酸；$[A_m]$与$[B_n]$各自包括至少五个末端2’-O-甲基-核苷酸；至少四个末端硫代磷酸酯键，并且至少20％$[A_m]$与$[B_n]$组合的核苷酸为2’-O-甲基-核苷酸。在一些实施方案中，X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；X^1包括腺嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；X^1包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶

或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；X^1包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基；X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括腺嘌呤核碱基；X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括鸟嘌呤或次黄嘌呤核碱基；X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基；或X^1包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基，X^2包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核碱基或不包括核碱基，并且X^3包括胞嘧啶或5-甲基胞嘧啶核碱基。

[0380] 本发明的示例性寡核苷酸示于下表3中。在表3中，A、C、G和U为核糖核苷；mA、mC、mG和mU为2'-O-甲基核糖核苷；fC表示2'-脱氧-2'-氟阿糖胞苷；fA表示2'-脱氧-2'-氟阿糖腺苷；aC表示阿糖胞苷；aA表示阿糖腺苷；amC表示2'-O-甲基-阿糖胞苷；amA表示2'-O-甲基-阿糖腺苷；αC表示α-2'-脱氧胞苷；dS表示2'-脱氧核糖(无碱基DNA)；rS表示核糖(无碱基RNA)；mS表示2'-O-甲基-核糖(无碱基2'-OMe-RNA)；并且星号指示硫代磷酸酯键(其余键为磷酸二酯键)。

[0381] 表3.本发明的示例性寡核苷酸

[0382]

5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCCAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 51
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGfCCAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 52
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCfCAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 53

[0383]

5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCCfAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 54
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCfCfAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 55
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGfCfCAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 56
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGfCfCfAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 57
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGaCCAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 58
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCaCAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 59
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCCaAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 60
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGaCaCaAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 61
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGamCCAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 62
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCamCAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 63
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCCamAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 64
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCcCAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 65
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCdSAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 66
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCrSAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 67
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCGCmSAGCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 68
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGCCAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 69
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGfCCAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 70
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGCfCAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 71
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGCCfAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 72
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGCfCfAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 73
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGfCfCAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 74
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGfCfCfAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 75
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGaCCAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 76
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGCaCAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 77
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmG AAUmAmCUGCmCmGCCaAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 78
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGaCaCaAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 79
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGamCCAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 80
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGCamCAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 81
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGCCamAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 82
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGCcCAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 83
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmGCdSAmGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 84

[0384] 在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸包括茎-环结构,所述茎-环结构用作ADAR酶的招募结构域(例如,ADAR招募结构域)。这类寡核苷酸可称为“axiomer AON”或“自成环AON”。所述招募部分用于将细胞中存在的天然ADAR酶招募至通过靶序列与靶部分杂交而形成的dsRNA中。所述招募部分可为茎-环结构,其模拟天然底物(例如,谷氨酸促离子型受体AMPA型亚单位2(GluR2)受体;诸如GluR2ADAR招募结构域)或已知由ADAR酶的dsRNA结合区

识别的Z-DNA结构(例如,Z-DNA ADAR招募结构域)。由于GluR2与Z-DNA ADAR招募结构域为ADAR的高亲和力结合伴侣,所以不需要缀合的实体或存在修饰的重组ADAR酶。茎-环结构可为由两个单独的核酸链形成的分子间茎-环结构或在单一核酸链内形成的分子内茎环结构。招募部分的茎-环结构可为以下文献中描述的茎环结构:WO 2016/097212;US 2018/0208924;Merkle等人Nature Biotechnology,37:133-8(2019);Katrekar等人Nature Methods,16(3):239-42(2019);Fukuda等人Scientific Reports,7:41478(2017),其ADAR招募部分的茎-环结构以引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,寡核苷酸包括一个或多个ADAR招募结构域(例如,1或2个ADAR招募结构域)。

[0385] 在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸包括具有式VI、VII、IX或X中任一种的结构的那些寡核苷酸。在一个实施方案中,本发明的寡核苷酸包括具有式XXIV的结构的ADAR招募结构域的那些寡核苷酸:

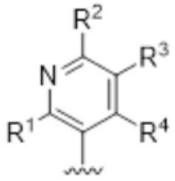
[0386] C-L_1-D,

[0387] 式XXIV,

[0388] 其中C为长度约10-50个连接核苷(例如,长度约10、15、20、25、30、35、40、45、46、47、48、49或50个连接核苷)的单链寡核苷酸,L_1为环区,并且D为长度约10-50个连接核苷(例如,长度约10、15、20、25、30、35、40、45、46、47、48、49或50个连接核苷)的单链寡核苷酸。

[0389] 在一些实施方案中,C包括与D互补的区域以使得两条链在合适条件下杂交并形成双链体。通常,双链体结构的长度介于5与50个连接核苷之间,例如长度介于以下之间:5-49、5-45、5-40、5-35、5-30、5-25、5-20、5-15、5-10、5-6、8-50、8-45、8-40、8-35、8-30、8-25、8-20、8-15、8-10、15-50、15-45、15-40、15-35、15-30、15-25、15-20、15-16、20-50、20-45、20-40、20-35、20-30、20-25、25-50、25-45、25-40、25-35或25-30个连接核苷。还涵盖以上列举的范围和长度的中间范围和长度作为本发明的一部分。在一些实施方案中,C与D的至少5个连续核碱基(例如,5、10、15、20、25、30个或更多个连续核碱基)互补,并且寡核苷酸形成长度介于10-50个连接核苷之间(例如,长度为至少10、15、20、25、30、35、40、45、46、47、48、49或50个连接核苷)的双链体结构。

[0390] 在一些实施方案中,双链体结构包括介于C的核苷酸与D的核苷酸之间的至少一个错配(例如,至少1、2、3、4或5个错配)。在一些实施方案中,所述错配为成对的A至C错配。在一些实施方案中,A至C错配的A核苷在C链上且A至C错配的C核苷在D链上。在一些实施方案中,A至C错配的A核苷在D链上且A至C错配的C核苷在C链上。在其他实施方案中,所述错配为成对的G至G错配。在仍另一些实施方案中,所述错配为成对的C至A错配。在一些实施方案中,C至A错配的C核苷在C链上且C至A错配的A核苷在D链上。在一些实施方案中,C至A错配的C核苷在D链上且C至A错配的A核苷在C链上。在一些实施方案中,所述错配为成对的I至I错配。在一些实施方案中,所述错配为成对的I至G错配。在一些实施方案中,I至G错配的I核苷在C链上且I至G错配的G核苷在D链上。在一些实施方案中,I至G错配的I核苷在D链上且I至G错配的G核苷在C链上。在一些实施方案中,所述错配为成对的G至I错配。在一些实施方案中,G至I错配的G核苷在C链上且G至I错配的I核苷在D链上。在一些实施方案中,G至I错配的G核苷在D链上且G至I错配的I核苷在C链上。在一些实施方案中,所述错配包括具有替代性核碱基的核苷。在一些实施方案中,所述替代性核碱基具有以下结构:

[0391] 

[0392] 其中R^1为氢、三氟甲基、任选取代的氨基、羟基或任选取代的C_1-C_6烷氧基；

[0393] R^2为氢、任选取代的氨基或任选取代的C_1-C_6烷基；并且

[0394] R^3和R^4独立地为氢、卤素或任选取代的C_1-C_6烷基，或其盐。在一些实施方案中，R^1为氢键供给基团(例如羟基、氨基)。在一些实施方案中，R^1为氢键接受基团(例如烷氧基)。

[0395] 在一些实施方案中，双链体结构包括两个错配。在一些实施方案中，错配之间相隔至少三个连接核苷。例如，当错配“由3个核苷酸分隔”时，寡核苷酸包括结构M_1-N_1-N_2-N_3-M_2，其中M_1为第一错配，N_1、N_2和N_3为成对的核碱基，并且M_2为第二错配。在一些实施方案中，M_1为成对的A至C错配且M_2为成对的G至G错配。

[0396] 在一些实施方案中，环区L_1包括连接核苷。在一些实施方案中，L_1包括至少一个替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0397] 在其他实施方案中，环区具有式VIII的结构：

[0398] F^1-$(G^1)_j$-$(H^1)_k$-$(G^2)_m$-(I)-$(G^3)_n$-$(H^2)_p$-$(G^4)_q$-F^2

[0399] 式VIII，

[0400] 其中F^1为介于环区与C之间的键；F^2为介于D与核苷酸之间或介于D与任选的接头之间的键；G^1、G^2、G^3和G^4各自独立地选自任选取代的C1-C2烷基、任选取代的C1-C3杂烷基、O、S和NR^N；R^N为氢、任选取代的C_{1-4}烷基、任选取代的C_{2-4}烯基、任选取代的C_{2-4}炔基、任选取代的C_{2-6}杂环基、任选取代的C_{6-12}芳基或任选取代的C_{1-7}杂烷基；C^1和C^2各自独立地选自羰基、硫羰基、磺酰基或磷酰基；j、k、m、n、p和q各自独立地为0或1；并且I为任选取代的C_{1-10}烷基、任选取代的C_{2-10}烯基、任选取代的C_{2-10}炔基、任选取代的C_{2-6}杂环基、任选取代的C_{6-12}芳基、任选取代的C_2-C_{10}聚乙二醇或任选取代的C_{1-10}杂烷基或连接F^1-$(G^1)_j$-$(H^1)_k$-$(G^2)_m$-(I)-$(G^3)_n$-$(H^2)_p$-$(G^4)_q$-F^2的化学键。在一些实施方案中，接头为任选的。

[0401] 在一些实施方案中，环区，L_1包括含碳水化合物的连接部分。

[0402] 在一个实施方案中，本发明的寡核苷酸的一个或多个核苷酸是天然产生的，并且不包括例如在本领域中已知和本文所述的化学修饰和/或缀合。在另一个实施方案中，本发明的寡核苷酸的一个或多个核苷酸在化学上经修饰以增强稳定性或其他有益的特征(例如，替代性核苷酸)。在不受理论约束的情况下，据信某些修饰能够提高核酸酶抗性和/或血清稳定性或降低免疫原性。例如，本发明的多核苷酸可含有天然地存在于DNA或RNA中的核苷酸(例如，腺嘌呤、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷或肌苷)或可含有在核苷酸的一种或多种组分(例如，核碱基、糖或磷酸接头部分)上具有一种或多种化学修饰的核苷酸。本发明的寡核苷酸可通过天然存在的磷酸二酯键彼此连接，或可经修饰以通过以下各键共价连接：硫代磷酸酯、3’-亚甲基膦酸酯、5’-亚甲基膦酸酯、3’-亚磷酰胺、2’-5’磷酸二酯、胍盐、S-甲基硫脲或肽键。

[0403] 在一些实施方案中，C包括至少一个替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。在其他实施方案中，D包括至少一个替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。在一些实施方案中，C与D各自都包括至少一个

替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0404] 在本发明的某些实施方案中，本发明的寡核苷酸的实质上所有核苷酸为替代性核苷酸。在本发明的其他实施方案中，本发明的寡核苷酸的所有核苷酸都是替代性核苷酸。其中“实质上所有核苷酸为替代性核苷酸”的本发明的寡核苷酸很大程度上而非全部经修饰并且可包括不超过5、4、3、2或1个天然存在的核苷酸。在本发明的又一些实施方案中，本发明的寡核苷酸可包括不超过5、4、3、2或1个替代性核苷酸。

[0405] 在一个实施方案中，本发明的寡核苷酸包括具有式XXIV的结构的ADAR招募结构域，其中C为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸，L_1为环区，并且D为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸。在一些实施方案中，C与D的至少5个连续核碱基互补，并且寡核苷酸包括由长度介于10-50个连接核苷之间的C与D形成的双链体结构。在一些实施方案中，双链体结构包括至少一个错配。在一些实施方案中，C或D包括至少一个替代性核碱基。在一些实施方案中，C与D各自包括至少一个替代性核碱基。在一些实施方案中，C和/或D独立地还包括至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。在一些实施方案中，L_1包括连接核苷酸。在其他实施方案中，L_1由连接核苷组成。在一些实施方案中，L_1包括至少一个替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0406] 在另一个实施方案中，本发明的寡核苷酸包括具有式XXIV的结构的ADAR招募结构域，其中C为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸，L_1为不由连接核苷组成的环区且D为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸。在一些实施方案中，C与D的至少5个连续核碱基互补，并且寡核苷酸包括由长度介于10-50个连接核苷之间的C与D形成的双链体结构。在一些实施方案中，双链体结构包括至少一个错配。在一些实施方案中，L_1具有式VIII的结构，如本文所述。在一些实施方案中，L_1包括含碳水化物的连接部分。在一些实施方案中，C和/或D独立地包括至少一个替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0407] 在另一个实施方案中，本发明的寡核苷酸包括具有式XXIV的结构的ADAR招募结构域，其中C为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸，L_1为包括至少一个替代性核碱基或至少一个替代性核苷间键的环区，并且D为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸。在一些实施方案中，C与D的至少5个连续核碱基互补，并且寡核苷酸包括由长度介于10-50个连接核苷之间的C与D形成的双链体结构。在一些实施方案中，双链体结构包括至少一个错配。在一些实施方案中，L_1包括至少一个替代性核碱基和至少一个替代性核苷间键。

[0408] 在另一个实施方案中，本发明的寡核苷酸包括具有式XXIV的结构的ADAR招募结构域，其中C为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸，L_1为环区，包括至少一个不为2'-O-甲基糖部分的替代性糖部分(例如，所述替代性糖部分选自由下列各部分组成的组：2'-O-C_1-C_6烷基-糖部分、2'-氨基-糖部分、2'-氟-糖部分、2'-O-MOE糖部分、LNA糖部分、阿拉伯糖核酸(ANA)糖部分、2'-氟-ANA糖部分、脱氧核糖糖部分和双环核酸)，并且D为具有10-50个连接核苷长度的单链寡核苷酸。在一些实施方案中，C与D的至少5个连续核碱基互补，并且寡核苷酸包括由长度介于10-50个连接核苷之间的C与D形成的双链体结构。在一些实施方案中，双链体结构包括至少一个错配。在一些实施方案中，C和/或D独立地包括至少一个替代性核碱基、至少一个替代性核苷间键和/或至少一个替代性糖部分。

[0409] 在一些实施方案中，C包括与SEQ ID NO.1、4、7、10、13、16、19、22、25、28、31和34中

任一个所列的核碱基序列具有至少50%序列同一性(例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性)的核碱基序列,并且D包括与C的核碱基序列互补的核碱基序列,其中所述序列包括至少一个如本文所述的错配。在其他实施方案中,D包括与SEQ ID NO.2、5、8、11、14、17、20、23、26、29、32和35中任一个所列的核碱基序列具有至少50%序列同一性(例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性)的核碱基序列,并且C包括与C的核碱基序列互补的核碱基序列,其中所述序列包括至少一个如本文所述的错配。在一些实施方案中,C-L_1-D包括与SEQ ID NO.3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33和36中任一个所列的核碱基序列具有至少50%序列同一性(例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性)的核碱基序列,其中所述序列包括至少一个如本文所述的错配。

[0410] SEQ ID NO.1-36的核碱基序列在下文中提供:

[0411] 表4

[0412]

GGUGAAUAGUAUAACAAUAU	SEQ ID NO. 1
AUGUUGUUAUAGUAUCCACC	SEQ ID NO. 2
GGUGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCACC	SEQ ID NO. 3
GGUGAAGAGGAGAACAAUAU	SEQ ID NO. 4
AUGUUGUUCUCGUCUCCACC	SEQ ID NO. 5
GGUGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCACC	SEQ ID NO. 6
GGUGUCGAGAAGAGGAGAACAAUAU	SEQ ID NO. 7
AUGUUGUUCUCGUCUCCUCGACACC	SEQ ID NO. 8
GGUGUCGAGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCUCGACACC	SEQ ID NO. 9
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAU	SEQ ID NO. 10
AUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 11
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 12
GUGGAAUAGUAUAACAAUAU	SEQ ID NO. 13
AUGUUGUUAUAGUAUCCCAC	SEQ ID NO. 14
GUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCAC	SEQ ID NO. 15
GGUGUCGAGAAUAGUAUAACAAUAU	SEQ ID NO. 16
AUGUUGUUAUAGUAUCCUCGACACC	SEQ ID NO. 17
GGUGUCGAGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCUCGACACC	SEQ ID NO. 18
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAU	SEQ ID NO. 19
AUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 20
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 21
GGGUGGAAUAGUAUACCA	SEQ ID NO. 22
UGGUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 23
GGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 24
GUGGGUGGAAUAGUAUACCA	SEQ ID NO. 25

[0413]

UGGUAUAGUAUCCCACCUAC	SEQ ID NO. 26
GUGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUAC	SEQ ID NO. 27
UGGGUGGAAUAGUAUACCA	SEQ ID NO. 28
UGGUAUAGUAUCCCACCUA	SEQ ID NO. 29
UGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUA	SEQ ID NO. 30
GGUGGAAUAGUAUACCA	SEQ ID NO. 31
UGGUAUAGUAUCCCACC	SEQ ID NO. 32
GGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACC	SEQ ID NO. 33
GUGGAAUAGUAUACCA	SEQ ID NO. 34
UGGUAUAGUAUCCCAC	SEQ ID NO. 35
GUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCAC	SEQ ID NO. 36

[0414] 应理解,虽然SEQ ID NO.1-36中的序列被描述为未修饰和/或未缀合的序列,但本发明的寡核苷酸的RNA可包括SEQ ID NO.1-36中所列的序列中的任一个,其为替代性核苷和/或如下详述进行缀合。

[0415] 在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸还可包括5'帽结构。在一些实施方案中,所述5'帽结构为2,2,7-三甲基鸟苷帽。

[0416] 本发明的寡核苷酸可通过本领域中已知的标准方法合成,如下文中进一步论述,例如通过使用自动化DNA合成仪,诸如可由例如Biosearch,Applied Biosystems,Inc市售。

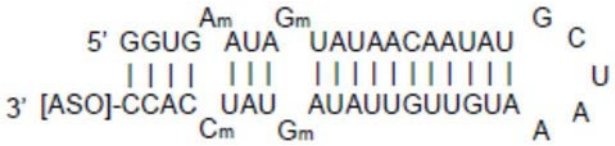
[0417] 寡核苷酸化合物可使用溶液相或固相有机合成或这两者来制备。有机合成提供以下优点:可易于制备包括非天然或替代性核苷酸的寡核苷酸。本发明的单链寡核苷酸可使用溶液相或固相有机合成或这两者来制备。

[0418] 进一步预期,对于本文中所鉴别的任何序列,进一步的优化可通过系统地添加或移除连接核苷以生成较长或较短序列来达成。仍进一步,这类优化序列可通过例如引入如本文所述或如本领域中已知的替代性核苷、替代性糖部分和/或替代性核苷间键来调整,包括如本领域中已知和/或本文所论述的替代性核苷、替代性糖部分和/或替代性核苷间键,以便进一步优化分子(例如,提高血清稳定性或循环半衰期、提高热稳定性、增强跨膜递送、靶向特定位置或细胞类型和/或增强与RNA编辑酶(例如ADAR)的相互作用)。

[0419] 在一些实施方案中,寡核苷酸包括一个ADAR招募结构域。在一些实施方案中,ADAR招募结构域在寡核苷酸的5'端处。在一些实施方案中,ADAR招募结构域在寡核苷酸的3'端处。在一些实施方案中,寡核苷酸包括第一ADAR招募结构域和第二ADAR招募结构域。在一些实施方案中,第一ADAR招募结构域为在寡核苷酸的5'端处,其中第二ADAR招募结构域在寡核苷酸的3'端处。在一些实施方案中,所述一个或多个ADAR招募结构域为GluR2 ADAR招募结构域。在一些实施方案中,GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.37的核苷酸序列,如下在5'至3'方向上所示:

[0420] GGUGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCACC(SEQ ID NO.37)

[0421] 在一些实施方案中,寡核苷酸包括式XI的结构,如下所示:

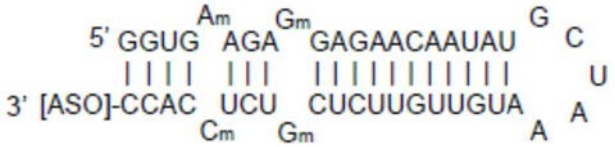
[0422] 

式 XI，

[0423] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种，其中m表示错配的核苷酸。在一些实施方案中，GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.38的核苷酸序列，如下在5'至3'方向上所示：

[0424] GGUGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCACC(SEQ ID NO.38)

[0425] 在一些实施方案中，寡核苷酸包括式XII的结构，如下所示：

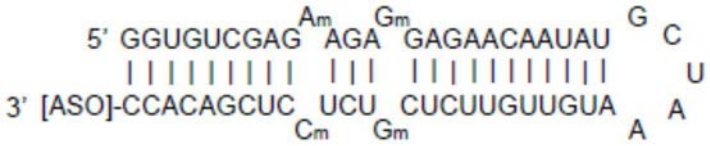
[0426] 

[0427] 式 XII，

[0428] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种，其中m表示错配的核苷酸。在一些实施方案中，GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.39的核苷酸序列，如下在5'至3'方向上所示：

[0429] GGUGUCGAGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCUCGACACC(SEQ ID NO.39)

[0430] 在一些实施方案中，寡核苷酸包括式XIII的结构，如下所示：

[0431] 

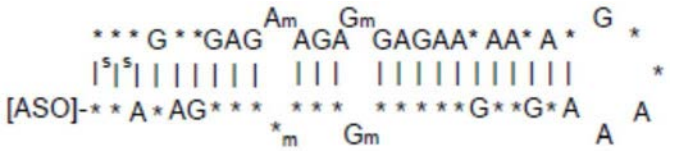
式 XIII，

[0432] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种，其中m表示错配的核苷酸。

[0433] 在一些实施方案中，GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.40的核苷酸序列，如下在5'至3'方向上所示：

[0434] *s*s*G**GAGAAGAGGAGAA*AA*A*G**AAA*G**G*****G*******GA*A**(SEQ ID NO.40)

[0435] 其中*为2'-O-甲基核苷酸且s为介于两个连接核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷间键。在一些实施方案中，寡核苷酸包括式XIV的结构，如下所示：

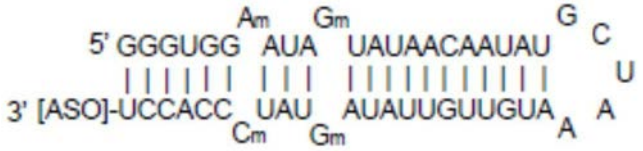
[0436] 

式 XIV，

[0437] 其中[ASO]包括如权利要求1至38中任一项或如权利要求45至49中任一项所述的寡核苷酸，其中*为2'-O-甲基核苷酸，其中s为硫代磷酸酯核苷间键，其中m表示错配的核苷酸。在一些实施方案中，ADAR招募结构域还包括至少一个核酸酶抗性核苷酸(例如，2'-O-甲基核苷酸)。在一些实施方案中，ADAR招募结构域包括至少一个替代性核苷间键(例如，硫代磷酸酯核苷间键)。在一些实施方案中，GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.41的核苷酸序列，如下在5'至3'方向上所示：

[0438] GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUA GUAUCCCACCU(SEQ ID NO.41)

[0439] 在一些实施方案中，寡核苷酸包括式XV的结构，如下所示：

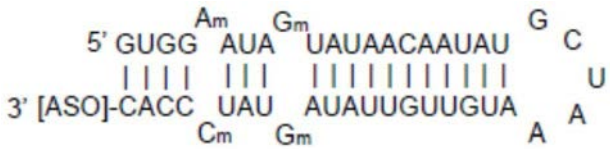
[0440]


式 XV，

[0441] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种，其中m表示错配的核苷酸。在一些实施方案中，GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.42的核苷酸序列，如下在5'至3'方向上所示：

[0442] GUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCAC(SEQ ID NO.42)

[0443] 在一些实施方案中，寡核苷酸包括式XVI的结构，如下所示：

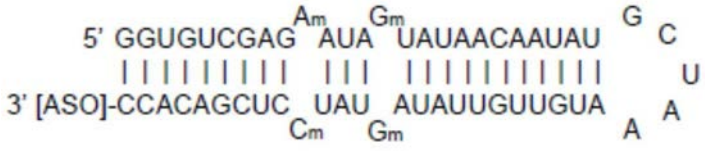
[0444]


式 XVI，

[0445] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种，其中m表示错配的核苷酸。在一些实施方案中，GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.43的核苷酸序列，如下在5'至3'方向上所示：

[0446] GGUGUCGAGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCUCGACACC(SEQ ID NO.43)

[0447] 在一些实施方案中，寡核苷酸包括式XVII的结构，如下所示：

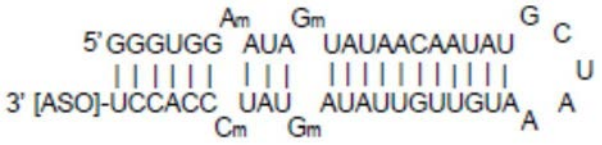
[0448]


式 XVII，

[0449] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种，其中m表示错配的核苷酸。在一些实施方案中，GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.44的核苷酸序列，如下在5'至3'方向上所示：

[0450] GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU(SEQ ID NO.44)

[0451] 在一些实施方案中，寡核苷酸包括式XVIII的结构，如下所示：

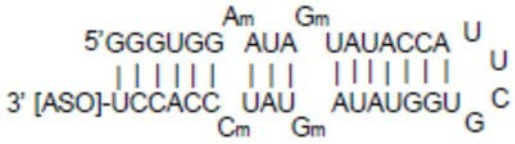
[0452] 

式 XVIII，

[0453] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种，其中m表示错配的核苷酸。在一些实施方案中，GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.45的核苷酸序列，如下在5'至3'方向上所示：

[0454] GGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCU(SEQ ID NO.45)

[0455] 在一些实施方案中，寡核苷酸包括式XIX的结构，如下所示：

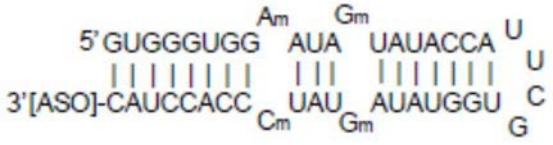
[0456] 

式 XIX，

[0457] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种，其中m表示错配的核苷酸。在一些实施方案中，GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.46的核苷酸序列，如下在5'至3'方向上所示：

[0458] GUGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUAC(SEQ ID NO.46)

[0459] 在一些实施方案中，寡核苷酸包括式XX的结构，如下所示：

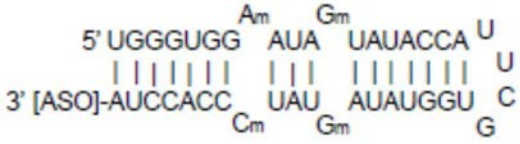
[0460] 

式 XX，

[0461] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种，其中m表示错配的核苷酸。在一些实施方案中，GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.47的核苷酸序列，如下在5'至3'方向上所示：

[0462] UGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUA(SEQ ID NO.47)

[0463] 在一些实施方案中，寡核苷酸包括式XXI的结构，如下所示：

[0464] 

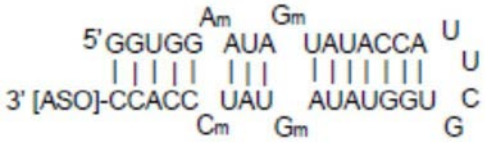
式 XXI，

[0465] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种，其中m表示错配的核苷酸。在一些

实施方案中,GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.48的核苷酸序列,如下在5'至3'方向上所示:

[0466] GGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACC(SEQ ID NO.48)

[0467] 在一些实施方案中,寡核苷酸包括式XXII的结构,如下所示:

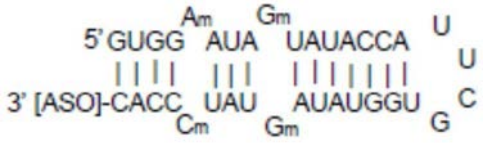
[0468] 

式 XXII,

[0469] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种,其中m表示错配的核苷酸。在一些实施方案中,GluR2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.49的核苷酸序列,如下在5'至3'方向上所示:

[0470] GUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCAC(SEQ ID NO.49)

[0471] 在一些实施方案中,寡核苷酸包括式XXIII的结构,如下所示:

[0472] 

式 XXIII,

[0473] 其中[ASO]包括本发明的寡核苷酸中的任一种,其中m表示错配的核苷酸。

[0474] 在一些实施方案中,ADAR招募结构域为Z-DNA ADAR招募结构域。在一些实施方案中,ADAR招募结构域为MS2 ADAR招募结构域。在一些实施方案中,MS2噬菌体茎-环结构可用作ADAR招募结构域(例如和MS2 ADAR招募结构域)。已知MS2茎-环结合MS2噬菌体外壳蛋白,所述外壳蛋白当融合至ADAR的脱氨酶结构域(例如ADAR融合蛋白)时可用于靶特异性脱氨基作用。在一些实施方案中,MS2 ADAR招募结构域具有SEQ ID NO.50的核苷酸序列,如下在5'至3'方向上所示:

[0475] ACATGAGGATCACCCATGT(SEQ ID NO.50)

[0476] 在一些实施方案中,使用包括编码ADAR融合蛋白的多核苷酸的表达载体构建体向细胞或受试者施用ADAR融合蛋白。在一些实施方案中,ADAR融合蛋白包括融合至MS2噬菌体外壳蛋白的ADAR的脱氨酶结构域。在一些实施方案中,ADAR的脱氨酶结构域为ADAR1的脱氨酶结构域。在一些实施方案中,ADAR的脱氨酶结构域为ADAR2的脱氨酶结构域。ADAR融合蛋白可为Katrekar等人Nature Methods,16(3):239-42(2019)中所述的融合蛋白,所述ADAR融合蛋白以引用的方式并入本文中

[0477] 本发明中所述的核酸可通过本领域中充分确定的方法来合成和/或修饰,诸如以下文献中所述的那些方法:"Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage,S.L.等人(编),John Wiley&Sons,Inc.,New York,N.Y.,USA,所述文献据此以引用的方式并入本文中。替代性核苷酸和核苷包括具有以下修饰的那些:包括例如末端修饰,例如5'-端修饰(磷酸化、缀合、反向键)或3'-端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向键等);碱基修

饰，例如用稳定化碱基、去稳定化碱基或与伴侣的扩增库碱基配对的碱基的置换、移除碱基(无碱基核苷酸)、或缀合碱基；糖修饰(例如，在2'-位置或4'-位置处)或糖的替换；和/或主链修饰，包括磷酸二酯键的修饰或替换。核碱基还可为异核苷，其中将核碱基自糖部分的C1位置移至不同位置处(例如，C2、C3、C4或C5)。可用于本文所述的实施方案中的寡核苷酸化合物的具体实例包括但不限于含有修饰的主链或不含天然核苷间键的替代性核苷。具有修饰的主链的核苷酸和核苷尤其包括在主链中不具有磷原子的那些。出于本说明书的目的且如本领域中有时参考的，在其核苷间主链中不具有磷原子的替代性RNA还可视为寡核苷。在一些实施方案中，寡核苷酸将在其核苷间主链中具有磷原子。

[0478] 替代性核苷间键包括例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、膦酸甲酯和其他膦酸烷酯包括3'-亚烷基膦酸酯和手性膦酸酯、次膦酸酯、氨基磷酸酯包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基膦酸酯、硫代烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'键的硼磷酸酯、其2'-5'-连接类似物、以及具有反向极性的那些，其中相邻的核苷单元对是3'-5'连接至5'-3'或2'-5'连接至5'-2'。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。

[0479] 教导以上含磷键的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利第3,687,808号；第4,469,863号；第4,476,301号；第5,023,243号；第5,177,195号；第5,188,897号；第5,264,423号；第5,276,019号；第5,278,302号；第5,286,717号；第5,321,131号；第5,399,676号；第5,405,939号；第5,453,496号；第5,455,233号；第5,466,677号；第5,476,925号；第5,519,126号；第5,536,821号；第5,541,316号；第5,550,111号；第5,563,253号；第5,571,799号；第5,587,361号；第5,625,050号；第6,028,188号；第6,124,445号；第6,160,109号；第6,169,170号；第6,172,209号；第6,239,265号；第6,277,603号；第6,326,199号；第6,346,614号；第6,444,423号；第6,531,590号；第6,534,639号；第6,608,035号；第6,683,167号；第6,858,715号；第6,867,294号；第6,878,805号；第7,015,315号；第7,041,816号；第7,273,933号；第7,321,029号；和美国专利RE39464，其各自的全部内容据此以引用的方式并入本文中。

[0480] 其中不含磷原子的替代性核苷间键具有由短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键形成的主链。它们包括具有以下的那些：吗啉代键(部分由核苷的糖部分形成)；硅氧烷主链；硫化物、亚砜和砜主链；甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基主链；亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基主链；含有烯烃的主链；氨基磺酸酯主链；亚甲基亚氨基和亚甲基肼基主链；磺酸酯和磺酰胺主链；酰胺主链；以及具有混合的N、O、S和CH_2组成部分的其他物质。

[0481] 教导上述寡核苷的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利第5,034,506号；第5,166,315号；第5,185,444号；第5,214,134号；第5,216,141号；第5,235,033号；第5,64,562号；第5,264,564号；第5,405,938号；第5,434,257号；第5,466,677号；第5,470,967号；第5,489,677号；第5,541,307号；第5,561,225号；第5,596,086号；第5,602,240号；第5,608,046号；第5,610,289号；第5,618,704号；第5,623,070号；第5,663,312号；第5,633,360号；第5,677,437号；和第5,677,439号，其各自的全部内容据此以引用的方式并入本文中。

[0482] 在其他实施方案中，合适的寡核苷酸包括其中核苷酸单元的糖和核苷间键(即主链)都被置换的那些。保留碱基单元以便与适当的核酸靶化合物杂交。一种这类寡聚化合物

被称为肽核酸(PNA),其为已显示具有极佳杂交特性的模拟物。在PNA化合物中,核苷的糖被含有酰胺的主链(特定地,氨基乙基甘氨酸主链)置换。保留核碱基并且直接或间接地结合至主链的酰胺部分的氮杂氮原子上。教导PNA化合物的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利第5,539,082号;第5,714,331号;和第5,719,262号,其各自的全部内容据此以引用的方式并入本文中。适用于本发明的寡核苷酸中的额外PNA化合物描述于例如Nielsen等人,Science,1991,254,1497-1500中。

[0483] 本发明中描述的一些实施方案包括具有硫代磷酸酯主链的寡核苷酸和具有杂原子主链的寡核苷酸,并且特定为以上引用的美国专利第5,489,677号的-CH_2-NH-CH_2-、-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-[称为亚甲基(甲亚氨基)或MMI主链]、-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-、-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-和-N(CH_3)-CH_2-CH_2-[其中天然磷酸二酯主链表示为-O-P-O-CH_2-],以及以上引用的美国专利第5,602,240号的酰胺主链。在一些实施方案中,本文中描述的寡核苷酸具有以上引用的美国专利第5,034,506号的吗啉代主链结构。在其他实施方案中,本文所述的寡核苷酸包括二氨基磷酸酯吗啉代低聚物(PMO),其中脱氧核糖部分被吗啉环置换,并且带电磷酸二酯亚单位间键被不带电的二氨基磷酸酯键置换,如Summerton等人,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.1997,7:63-70中所述。

[0484] 替代性核苷和核苷酸还可含有一个或多个取代的糖部分。寡核苷酸(例如,本文所述的寡核苷酸)可包括在2'-位置处的以下的一种:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可被C_1至C_{10}烷基或C_2至C_{10}烯基和炔基取代或未取代。示例性合适的修饰包括-O[(CH_2)$_n$O]$_m$$CH_3$、-O($CH_2$)$_n$$OCH_3$、-O($CH_2$)$_n$-$NH_2$、-O($CH_2$)$_n$$CH_3$、-O($CH_2$)$_n$-$ONH_2$和-O($CH_2$)$_n$-ON[($CH_2$)$_n$$CH_3$]$_2$,其中n和m为1至约10。在其他实施方案中,寡核苷酸包括在2'位置处的以下的一种:C_1至C_{10}低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的硅基、RNA裂解基团、报告基团、嵌入子、用于改善寡核苷酸的药代动力学特性的基团、或用于改善寡核苷酸的药效学特性的基团、和其他具有类似特性的取代基。在一些实施方案中,所述修饰包括2'-甲氧乙氧基(2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-O-MOE)(Martin等人,Helv.Chin.Acta,1995,78:486-504),即烷氧基-烷氧基。2'-O-MOE核苷向寡核苷酸赋予若干有益特性,包括但不限于与未修饰的寡核苷酸相比增强的核酸酶抗性、改善的药代动力学特性、减少的非特异性蛋白质结合、降低的毒性、减弱的免疫刺激特性和增强的靶亲和力。

[0485] 另一种示例性替代物含有2'-二甲氨基氧基乙氧基,即-O(CH_2)$_2$ON(CH_3)$_2$基团,也称为2'-DMAOE,如下文的实施例中所述;和2'-二甲氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称为2'-O-二甲氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O-(CH_2)$_2$-O-(CH_2)$_2$-N(CH_3)$_2$。其他示例性替代物包括:5'-Me-2'-F核苷酸、5'-Me-2'-OMe核苷酸、5'-Me-2'-脱氧核苷酸(在此三个家族中R异构体和S异构体两者);2'-烷氧基烷基;和2'-NMA(N-甲基乙酰胺)。

[0486] 其他替代物包括2'-甲氧基(2'-OCH_3)、2'-氨基丙氧基(2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)和2'-氟(2'-F)。相似修饰还可在寡核苷酸的核苷和核苷酸上的其他位置处进行,特别是在3'末端核苷酸或2'-5'连接寡核苷酸上的糖的3'位置或5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物诸如环丁基部分以代替呋喃戊糖基糖。教导这类修饰的糖结构的制备的代表性

美国专利包括但不限于美国专利第4,981,957号;第5,118,800号;第5,319,080号;第5,359,044号;第5,393,878号;第5,446,137号;第5,466,786号;第5,514,785号;第5,519,134号;第5,567,811号;第5,576,427号;第5,591,722号;第5,597,909号;第5,610,300号;第5,627,053号;第5,639,873号;第5,646,265号;第5,658,873号;第5,670,633号;和第5,700,920号,其中一些与本申请共同拥有。先前专利各自的全部内容据此以引用的方式并入本文中。

[0487] 本发明的寡核苷酸还可包括核碱基(本领域中常简称为"碱基")替代物(例如修饰或取代)。未修饰或天然核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G);以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。替代性核碱基包括其他合成和天然核碱基,诸如5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-甲酰基胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶、吡咯并胞嘧啶、双脱氧胞嘧啶、尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、5-羟基脱氧尿嘧啶、二氢尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、假尿嘧啶、1-甲基-假尿嘧啶、脱氧尿嘧啶、5-羟基丁基-2'-脱氧尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、7-脱氮-黄嘌呤、噻吩并鸟嘌呤、8-氮杂-7-脱氮鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、6-氨基甲基-7-脱氮鸟嘌呤、8-氨基鸟嘌呤、2,2,7-三甲基鸟嘌呤、8-甲基腺嘌呤、8-叠氮基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮腺嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、8-氨基-腺嘌呤、胸腺嘧啶、双脱氧胸腺嘧啶、5-硝基吲哚、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤基尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、4-硫尿嘧啶、8-卤基、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤基特别是5-溴基、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、以及3-脱氮鸟嘌呤。其他核碱基包括美国专利第3,687,808号中所公开的那些;在Modified Nucleosides in Biochemistry,Biotechnology and Medicine,Herdewijn,P.编Wiley-VCH,2008中所公开的那些;在The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,第858-859页,Kroschwitz,J.L编John Wiley&Sons,1990中所公开的那些;由Englisch等人,(1991)Angewandte Chemie,International Edition,30:613所公开的那些;以及由Sanghvi,Y S.,第15章,Antisense Research and Applications,第289-302页,Crooke,S.T.和Lebleu,B.编,CRC Press,1993所公开的那些。这些核碱基中的某些尤其可用于提高本发明中所述的寡聚化合物的结合亲和力。它们包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶、以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已显示使核酸双链体稳定性提高了0.6-1.2℃(Sanghvi,Y.S.、Crooke,S.T.和Lebleu,B.编,Antisense Research and Applications,CRC Press,Boca Raton,1993,第276-278页)并且为示例性碱基取代,甚至更特别地当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0488] 教导某些上述替代性核碱基的制备以及其他替代性核碱基的代表性美国专利包括但不限于上述美国专利第3,687,808号;第4,845,205号;第5,130,30号;第5,134,066号;第5,175,273号;第5,367,066号;第5,432,272号;第5,457,187号;第5,459,255号;第5,484,908号;第5,502,177号;第5,525,711号;第5,552,540号;第5,587,469号;第5,594,121号;第5,596,091号;第5,614,617号;第5,681,941号;第5,750,692号;第6,015,886号;第6,147,200号;第6,166,197号;第6,222,025号;第6,235,887号;第6,380,368号;第6,528,640

号;第6,639,062号;第6,617,438号;第7,045,610号;第7,427,672号;和第7,495,088号,其各自的全部内容据此以引用的方式并入本文中。

[0489] 在其他实施方案中,核苷酸中的糖部分可为核糖分子,任选具有2'-O-甲基、2'-O-MOE、2'-F、2'-氨基、2'-O-丙基、2'-氨基丙基或2'-OH修饰。

[0490] 本发明的寡核苷酸可包括一个或多个双环糖部分。"双环糖"为通过桥连两个原子而修饰的呋喃糖环。"双环核苷"("BNA")为具有糖部分的核苷,所述糖部分包括连接糖环的两个碳原子的桥,由此形成双环环系。在某些实施方案中,所述桥将糖环的4'-碳与2'-碳相连。因此,在一些实施方案中,本发明的剂可包括一个或多个锁定核苷。锁定核苷为具有修饰的核糖部分的核苷,其中核糖部分包括将2'碳与4'碳相连的额外桥。也即是说,锁定核苷为包括双环糖部分的核苷,所述双环糖部分包括4'-CH_2-O-2'桥。所述结构将核糖有效地"锁定"为3'-内结构构象。已显示向寡核苷酸中添加锁定核苷提高寡核苷酸在血清中的稳定性并且减小脱靶效应(Grunweller,A.等人,(2003)Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193)。用于本发明的多核苷酸中的双环核苷的实例包括但不限于包括介于4'核糖基环原子与2'核糖基环原子之间的桥的核苷。在某些实施方案中,本发明的多核苷酸剂包括一个或多个双环核苷,所述双环核苷包括4'至2'桥。这类4'至2'桥连的双环核苷的实例包括但不限于:4'-(CH_2)-O-2'(LNA);4'-(CH_2)-S-2';4'-(CH_2)$_2$-O-2'(ENA);4'-CH(CH_3)-O-2'(也称为"约束型乙基"或"cEt")和4'-CH(CH_2OCH_3)-O-2'(及其类似物;参见,例如美国专利第7,399,845号);4'-C(CH_3)(CH_3)-O-2'(及其类似物;参见,例如美国专利第8,278,283号);4'-CH_2-N(OCH_3)-2'(及其类似物;参见,例如美国专利第8,278,425号);4'-CH_2-O-N(CH_3)$_2$-2'(参见,例如美国专利公布第2004/0171570号);4'-CH_2-N(R)-O-2',其中R为H、C_1-C_{12}烷基或保护基团(参见,例如美国专利第7,427,672号);4'-CH_2-C(H)(CH_3)-2'(参见,例如Chattopadhyaya等人,J.Org.Chem.,2009,74,118-134);以及4'-CH_2-C(=CH_2)-2'(及其类似物;参见,例如美国专利第8,278,426号)。先前专利各自的全部内容据此以引用的方式并入本文中。

[0491] 教导锁定核酸核苷酸的制备的额外代表性美国专利和美国专利公布包括但不限于以下:美国专利第6,268,490号;第6,525,191号;第6,670,461号;第6,770,748号;第6,794,499号;第6,998,484号;第7,053,207号;第7,034,133号;第7,084,125号;第7,399,845号;第7,427,672号;第7,569,686号;第7,741,457号;第8,022,193号;第8,030,467号;第8,278,425号;第8,278,426号;第8,278,283号;US 2008/0039618;和US 2009/0012281,其各自的全部内容据此以引用的方式并入本文中。

[0492] 可制备任何上述双环核苷,其具有一个或多个立体化学糖构型,包括例如α-L-呋喃核糖和β-D-呋喃核糖(参见WO 99/14226)。

[0493] 本发明的寡核苷酸还可经修饰以包括一个或多个约束型乙基核苷酸。如本文所用,"约束型乙基核苷酸"或"cEt"为包括含有4'-CH(CH3)-O-2'桥的双环糖部分的锁定核酸。在一个实施方案中,约束型乙基核苷酸呈S构象,在本文中称为"S-cEt"。

[0494] 本发明的寡核苷酸还可包括一个或多个"构象上受限的"核苷酸("CRN")。CRN为核苷酸类似物,其具有连接核糖的C2'碳与C4'碳或核糖的C3碳与--C5'碳的接头。CRN将核糖环锁定成稳定构象并且提高与mRNA的杂交亲和力。接头具有足够的长度以将氧放置于对稳定性和亲和力而言最佳的位置,造成较少的核糖环折叠。

[0495] 教导某些上述CRN的制备的代表性公布包括但不限于美国专利公布第2013/0190383号;和PCT公布WO 2013/036868,其各自的全部内容据此以引用的方式并入本文中。

[0496] 在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸包括一种或多种单体,所述一种或多种单体为UNA(未锁定的核酸)核苷酸。UNA为未锁定的无环核酸,其中糖的任何键已经移除,形成未锁定的"糖"残基。在一个实施例中,UNA还涵盖介于C1'-C4'之间的键(即,介于C1'碳与C4'碳之间的共价碳-氧-碳键)已经移除的单体。在另一个实施例中,糖的C2'-C3'键(即,介于C2'碳与C3'碳之间的共价碳-碳键)已经移除(参见,Nuc.Acids Symp.Series,52,133-134(2008)和Fluiter等人,Mol.Biosyst.,2009,10,1039,据此以引用的方式并入)。

[0497] 教导UNA的制备的代表性美国公布包括但不限于美国专利第8,314,227号;和美国专利公布第2013/0096289号;第2013/0011922号;和第2011/0313020号,其各自的全部内容据此以引用的方式并入本文中。

[0498] 核糖分子还可用环丙烷环修饰以产生三环脱氧核酸(三环DNA)。核糖部分可取代为另一种糖,诸如1,5,-脱水己糖醇、苏糖以产生苏糖核苷(TNA)、或阿拉伯糖以产生阿拉伯糖核苷。核糖分子还可经非糖物诸如环己烯置换以产生环己烯核苷或经乙二醇置换以产生乙二醇核苷。

[0499] 核糖分子还可经非糖物诸如环己烯置换以产生环己烯核酸(CeNA)或经乙二醇置换以产生乙二醇核酸(GNA)。对核苷酸分子的末端的潜在稳定修饰可包括N-(乙酰氨基己酰基)-4-羟基脯氨醇(Hyp-C6-NHAc)、N-(己酰基-4-羟基脯氨醇(Hyp-C6)、N-(乙酰基-4-羟基脯氨醇(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-脱氧胸苷(ether)、N-(氨基己酰基)-4-羟基脯氨醇(Hyp-C6-氨基)、2-二十二烷基-尿苷-3"-磷酸、倒置碱基dT(idT)及其他。所述修饰的公开可见于PCT公布第WO 2011/005861号中。

[0500] 本发明的寡核苷酸的其他替代性化合物包括5'磷酸或5'磷酸模拟物,例如,寡核苷酸的5'-末端磷酸或磷酸模拟物。合适的磷酸模拟物公开在例如美国专利公布第2012/0157511号中,其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0501] 本发明的示例性寡核苷酸包括糖修饰的核苷且还可包括DNA或RNA核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸包括糖修饰的核苷和DNA核苷。替代性核苷向本发明的寡核苷酸中的并入可增强寡核苷酸对靶核酸的亲和力。在那种情况下,替代性核苷可被称为增强亲和力的替代性核苷酸。

[0502] 在一些实施方案中,寡核苷酸包括至少1个替代性核苷,诸如至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15或至少16个替代性核苷。在其他实施方案中,寡核苷酸包括1至10个替代性核苷,诸如2至9个替代性核苷,诸如3至8个替代性核苷,诸如4至7个替代性核苷,诸如6或7个替代性核苷。在一个实施方案中,本发明的寡核苷酸可包括替代物,其独立地选自此三种类型的替代物(替代性糖部分、替代性核碱基和替代性核苷间键)或其组合。寡核苷酸优选包括一个或多个包括替代性糖部分的核苷,例如2'糖替代性核苷。在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸包括一个或多个2'糖替代性核苷,所述核苷独立地选自由以下组成的组:2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、ANA、2'-氟-ANA和BNA(例如LNA)核苷。在一些实施方案中,所述一个或多个替代性核苷为BNA。

[0503] 在一些实施方案中,所述替代性核苷中至少1个为BNA(例如LNA),诸如至少2个,诸

如至少3、至少4、至少5、至少6、至少7或至少8个替代性核苷为BNA。在仍又一个实施方案中，所有替代性核苷都是BNA。

[0504] 在又一个实施方案中，寡核苷酸包括至少一个替代性核苷间键。在一些实施方案中，连续核苷酸序列内的核苷间键为硫代磷酸酯或硼磷酸酯核苷间键。在一些实施方案中，寡核苷酸的连续序列中的所有核苷酸间键都是硫代磷酸酯键。在一些实施方案中，硫代磷酸酯键为立体化学纯的硫代磷酸酯键。在一些实施方案中，硫代磷酸酯键为Sp硫代磷酸酯键。在其他实施方案中，硫代磷酸酯键为Rp硫代磷酸酯键。

[0505] 在一些实施方案中，本发明的寡核苷酸包括至少一个替代性核苷，其为2'-O-MOE-RNA，诸如2、3、4、5、6、7、8、9或10个2'-O-MOE-RNA核苷单元。在一些实施方案中，2'-O-MOE-RNA核苷单元由硫代磷酸酯键相连。在一些实施方案中，所述替代性核苷中至少一个为2'-氟DNA，诸如2、3、4、5、6、7、8、9或10个2'-氟-DNA核苷单元。在一些实施方案中，本发明的寡核苷酸包括至少一个BNA单元和至少一个2'取代的替代性核苷。在本发明的一些实施方案中，寡核苷酸包括2'糖修饰的核苷和DNA单元两者。在一些实施方案中，本发明的寡核苷酸或其连续核苷酸区域为gapmer寡核苷酸。

[0506] B.缀合至配体的寡核苷酸

[0507] 本发明的寡核苷酸可在化学上连接至一个或多个配体、部分或缀合物，这些物质增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。这类部分包括但不限于：脂质部分，诸如胆固醇部分(Letsinger等人，(1989)Proc.Natl.Acid.Sci.USA,86:6553-6556)、胆酸(Manoharan等人，(1994)Biorg.Med.Chem.Let.,4:1053-1060)、硫醚，例如beryl-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人，(1992)Ann.N.Y.Acad.Sci.,660:306-309;Manoharan等人，(1993)Biorg.Med.Chem.Let.,3:2765-2770)、巯基胆固醇(Oberhauser等人，(1992)Nucl.Acids Res.,20:533-538)、脂肪链，例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人，(1991)EMBO J,10:1111-1118;Kabanov等人，(1990)FEBS Lett.,259:327-330;Svinarchuk等人，(1993)Biochimie,75:49-54)、磷脂，例如二-十六烷基-外消旋-甘油或1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油基-3-膦酸酯三乙铵(Manoharan等人，(1995)Tetrahedron Lett.,36:3651-3654;Shea等人，(1990)Nucl.Acids Res.,18:3777-3783)、多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人，(1995)Nucleosides&Nucleotides,14:969-973)、或金刚烷乙酸(Manoharan等人，(1995)Tetrahedron Lett.,36:3651-3654)、棕榈基部分(Mishra等人，(1995)Biochim.Biophys.Acta,1264:229-237)、或十八胺或己基氨基-羰氧基胆固醇部分(Crooke等人，(1996)J.Pharmacol.Exp.Ther.,277:923-937)。

[0508] 在一个实施方案中，配体改变其所并入的寡核苷酸剂的分布、靶向性或寿命。在一些实施方案中，配体例如与不存在这类配体的种类相比为以下各物或部位提供增强的亲和力：选定的靶，例如分子、细胞或细胞类型；区室，例如，细胞或器官区室、组织、器官或身体区域。

[0509] 配体可包括天然存在的物质，诸如蛋白质(例如，人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白)；碳水化合物(例如，葡聚糖、支链淀粉、几丁质、壳聚糖、菊粉、环糊精、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺或透明质酸)；或脂质。配体还可为重组或合成分子，诸如合成聚合物，例如合成多氨基酸。多氨基酸的实例包括聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯醚-马来酸酐共聚

物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨基甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪。多胺的实例包括:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、多胺、伪肽-多胺、拟肽物多胺、树状体多胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子可电离的脂质、阳离子卟啉、多胺的季盐或α螺旋肽。

[0510] 配体还可包括靶向基团,例如细胞或组织靶向剂,例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质,例如,结合至指定的细胞类型诸如肾细胞的抗体。靶向基团可为促甲状腺激素、促黑激素、凝集素、糖蛋白、表面活性剂蛋白A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化多氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双膦酸酯、多谷氨酸、多天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸、维生素B12、维生素A、生物素、或RGD肽或RGD肽模拟物。

[0511] 配体的其他实例包括染料、嵌入剂(例如吖啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、得克萨卟啉(texaphyrin)、Sapphyrin)、多环芳香烃(例如吩嗪、二氢吩嗪)、人工核酸内切酶(例如EDTA)、亲油性分子例如,胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噁嗪)和肽缀合物(例如触角肽、Tat肽)、烷化剂、磷酸酯、氨基、巯基、PEG(例如PEG-40K)、MPEG、$[MPEG]_2$、多氨基、烷基、取代的烷基、放射性标记的标记、酶、半抗原(例如生物素)、转运/吸收促进剂(例如阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶(例如咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吖啶-咪唑缀合物、四氮杂大环的Eu3+复合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0512] 配体可为蛋白质,例如,糖蛋白或肽,例如,对共配体具有特异性亲和力的分子;或抗体,例如结合至指定细胞类型诸如肝细胞的抗体。配体还可包括激素和激素受体。它们还可包括非肽物质,诸如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。

[0513] 配体可为能够例如通过破坏细胞的细胞骨架(例如通过破坏细胞的微管、微丝和/或中间丝)来增加寡核苷酸剂在细胞中的摄取的物质,例如药物。所述药物可为例如紫杉醇、长春新碱、长春花碱、细胞松弛素、诺考达唑、促微丝聚合剂(japlakinolide)、红海海绵素(latrunculin)A、鬼笔环肽、海洋苔藓素(swinholide)A、茚满诺星(indanocine)或myoservin。

[0514] 在一些实施方案中,连接至如本文所述的寡核苷酸上的配体充当药代动力学调节剂(PK调节剂)。PK调节剂包括亲脂体、胆汁酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素等。示例性PK调节剂包括但不限于胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰基甘油酯、磷脂、神经鞘脂质、萘普生、布洛芬(ibuprofen)、维生素E、生物素等。还已知包括许多硫代磷酸酯键的寡核苷酸结合至血清蛋白,因此,在主链中包括多个硫代磷酸酯键的短寡核苷酸,例如约5个碱基、10个碱基、15个碱基或20个碱基的寡核苷酸,在本发明中也适合作为配体(例如PK调节配体)。另外,结合血清组分(例如血清蛋白)的适体也适合用作本文所述的实施方案中的PK调节配体。

[0515] 本发明的配体缀合的寡核苷酸可通过利用载有侧悬反应性官能团的寡核苷酸来合成,所述寡核苷酸是诸如衍生自将连接分子连接至寡核苷酸(如下所述)上的寡核苷酸。所述反应性寡核苷酸可直接与以下配体反应:市售的配体、经合成的载有多种保护基中的

任一种的配体、或其上连接有连接部分的配体。

[0516] 本发明的缀合物中使用的寡核苷酸可便利和常规地通过熟知的固相合成技术制得。用于这类合成的设备由包括例如Applied Biosystems(Foster City,Calif.)的若干供应商出售。可另外或替代地采用本领域中已知的用于这类合成的任何其他手段。还已知使用类似技术来制备其他寡核苷酸,诸如硫代磷酸酯和烷化衍生物。

[0517] 在本发明的配体缀合的寡核苷酸(诸如本发明的载有配体分子的序列特异性连接核苷)中,寡核苷酸和寡核苷可利用以下各物在合适的DNA合成仪上组装:标准核苷酸或核苷前体、或已载有连接部分的核苷酸或核苷缀合物前体、已载有配体分子的配体-核苷酸或核苷-缀合物前体、或载有非核苷配体的建构单元。

[0518] 当使用已载有连接部分的核苷酸-缀合物前体时,通常完成序列特异性连接核苷的合成,并且配体分子接着与连接部分反应以形成配体缀合的寡核苷酸。在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸或连接核苷除市售和常规用于寡核苷酸合成中的标准亚磷酰胺和非标准亚磷酰胺之外还使用衍生自配体-核苷缀合物的亚磷酰胺通过自动合成仪来合成。

[0519] i.脂质缀合物

[0520] 在一个实施方案中,配体或缀合物为脂质或基于脂质的分子。这类脂质或基于脂质的分子优选结合血清蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)。HSA结合配体允许缀合物分布于靶组织,例如,身体的非肾靶组织。例如,靶组织可为肝脏,包括肝脏的实质细胞。可结合HSA的其他分子还可用作配体。例如,可使用萘普生或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可(a)提高对缀合物的降解的抗性;(b)提高向靶细胞或细胞膜中的靶向或转运;和/或(c)可用于调节与血清蛋白(例如HSA)的结合。

[0521] 基于脂质的配体可用于抑制,例如控制缀合物与靶组织的结合。例如,更强地结合至HSA的脂质或基于脂质的配体将不太可能靶向肾,并且因此不太可能自体内清除。不太强地结合至HSA的脂质或基于脂质的配体可用于将缀合物靶向肾。

[0522] 在另一方面中,配体为部分,例如维生素,其由靶细胞(例如增殖细胞)摄取。示例性维生素包括维生素A、E和K。

[0523] ii.细胞渗透剂

[0524] 在另一方面中,配体为细胞渗透剂,优选为螺旋细胞渗透剂。所述剂优选为两亲性的。示例性剂为肽,诸如tat或触角蛋白。如果所述剂为肽,则其可修饰,包括肽基模拟物、反演体、非肽或伪肽键,以及D-氨基氨基酸的使用。螺旋剂优选为α-螺旋剂,其优选具有亲油相和疏油相。

[0525] 配体可为肽或肽模拟物。肽模拟物(在本文中也称为寡肽模拟物)为能够折叠成类似于天然肽的确定的三维结构的分子。肽和肽模拟物连接于寡核苷酸剂可诸如通过增加细胞识别和吸收影响寡核苷酸的药代动力学分布。肽或肽模拟物部分可为约5-50个氨基酸长,例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[0526] 肽或肽模拟物可为例如细胞渗透肽、阳离子肽、两亲性肽或疏水性肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可为树状体肽、约束型肽或交联肽。在另一替代方案中,肽部分可包括疏水性膜易位序列(MTS)。示例性含疏水性MTS的肽为具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:87)的RFGF。RFGF类似物(例如,含疏水性MTS的氨基酸序列AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:88)还可为靶向部分。肽部分可为“递送”肽,其可能携带大的极性

分子跨过细胞膜,所述极性分子包括肽、寡核苷酸和蛋白质。例如,已发现来自HIV Tat蛋白(GRKKRRQRRRPPQ;SEQ ID NO:89)和果蝇触角蛋白(RQIKIWFQNRRMKWKK;SEQ ID NO:90)的序列能够用作递送肽。肽或肽模拟物可由DNA的随机序列编码,诸如由噬菌体展示文库或一珠一化(OBOC)组合文库所鉴别的肽(Lam等人,Nature,354:82-84,1991)。通过为了细胞靶向而并入的单体单元拴系至寡核苷酸剂的肽或肽模拟物的实例为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分的长度可在约5个氨基酸至约40个氨基酸范围内。肽部分可具有结构修饰,以便提高稳定性或直接构象特性。可利用如下所述的任何结构修饰。

[0527] 用于本发明的组合物和方法中的RGD肽可为线性或环状,并且可经修饰,例如糖基化或甲基化,以促进靶向具体组织。含RGD的肽和肽模拟物可包括D-氨基酸以及合成RGD模拟物。除RGD之外,还可使用靶向整联蛋白配体的其他部分。所述配体的一些缀合物靶向PECAM-1或VEGF。

[0528] 细胞渗透肽能够渗透细胞,例如,微生物细胞诸如细菌或真菌细胞,或哺乳动物细胞诸如人细胞。微生物细胞渗透肽可为例如α-螺旋线性肽(例如,LL-37或Ceropin P1)、含二硫键的肽(例如,α-防御素、β-防御素或牛抗菌肽(bactenecin))、或仅含一个或两个主要氨基酸的肽(例如,PR-39或吲哚菌素(indolicidin))。细胞渗透肽还可包括核定位信号(NLS)。例如,细胞渗透肽可为二分两亲性肽,诸如MPG,其来源于HIV-1gp41与SV40大T抗原的NLS的融合肽结构域(Simeoni等人,Nucl.Acids Res.31:2717-2724,2003)。

[0529] iii.碳水化合物缀合物

[0530] 在本发明的组合物和方法的一些实施方案中,寡核苷酸还包括碳水化合物。碳水化合物缀合的寡核苷酸有利于核酸的体内递送,以及适合体内治疗使用的组合物,如本文所述。如本文所用,“碳水化合物”是指一种化合物,它由一个或多个具有至少6个碳原子的单糖单元(其可为线性、分支或环状)构成的碳水化合物本身,其中氧、氮或硫原子键结至各碳原子;或一种化合物,它具有碳水化合物部分作为其一部分,所述碳水化合物部分由一个或多个各自具有至少6个碳原子的单糖单元(其可为线性、分支或环状)构成,其中氧、氮或硫原子键结至各碳原子。代表性碳水化合物包括糖(单糖、二糖、三糖和含有约4、5、6、7、8或9个单糖单元的寡糖)和多糖,诸如淀粉、糖原、纤维素和多糖胶。具体的单糖包括C5和更高级(例如C5、C6、C7或C8)糖;二糖和三糖,包括具有两个或三个单糖单元(例如C5、C6、C7或C8)的糖。

[0531] 在一个实施方案中,用于本发明的组合物和方法中的碳水化合物缀合物为单糖。

[0532] 在一些实施方案中,碳水化合物缀合物还包括一种或多种如上所述的额外配体,诸如但不限于PK调节剂和/或细胞渗透肽。

[0533] 适用于本发明中的额外的碳水化合物缀合物(和接头)包括描述于PCT公布第WO 2014/179620号和第WO 2014/179627号中的那些,其各自的全部内容以引用的方式并入本文中。

[0534] iv.接头

[0535] 在一些实施方案中,本文所述的缀合物或配体可用各种接头连接于寡核苷酸,所述接头是可裂解或不可裂解的。

[0536] 接头通常包括直接键或原子,诸如氧或硫;单元诸如NR^8、C(O)、C(O)NH、SO、SO_2、SO_2NH;或原子链,诸如但不限于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、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、杂环烷基、杂环烯基、杂环炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷基芳基烷基、烷基芳基烯基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基烯基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、炔基杂芳基烷基、炔基杂芳基烯基、炔基杂芳基炔基、炔基杂环烷基、炔基杂环烯基、炔基杂环炔基、烯基杂环烷基、烯基杂环烯基、烯基杂环炔基、炔基杂环烷基、炔基杂环烯基、炔基杂环炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基杂芳基、烯基杂芳基、炔基杂芳基，其一个或多个亚甲基可由O、S、S(O)、SO_2、N(R^8)、C(O)、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环中断或封端；其中R^8为氢、酰基、脂族或取代的脂族。在一个实施方案中，接头介于约1-24个原子、2-24、3-24、4-24、5-24、6-24、6-18、7-18、8-18个原子、7-17、8-17、6-16、7-17或8-16个原子之间。

[0537] 可裂解的连接基团在细胞外是足够稳定的，但在进入靶细胞后，便裂解以释放接头结合在一起的两个部分。在一个优选的实施方案中，可裂解的连接基团在靶细胞中或在第一参考条件(其可例如经选出以模拟或代表胞内条件)下比在受试者的血液中或在第二参考条件(其可例如经选择以模拟或代表见于血液或血清中的条件)下裂解快至少约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或更多、或至少约100倍。

[0538] 可裂解的连接基团易受裂解剂的影响，例如pH值、氧化还原电位或降解分子的存在。一般而言，裂解剂在细胞内比在血清或血液中更普遍或在更高水平或活性下发现。这类降解剂的实例包括：氧化还原剂，其对于特定底物有选择性或不具有底物特异性，包括例如氧化酶或还原酶或还原剂，诸如硫醇，存在于细胞中，其可通过还原降解氧化还原可裂解的连接基团；酯酶；胞内体或剂，其可产生酸性环境，例如产生5或更低的pH值的那些；酶，其可通过充当一般酸来水解或降解酸可裂解的连接基团；肽酶(其可为底物特异性的)和磷酸酶。

[0539] 可裂解的键联基团(诸如二硫键)易受pH值的影响。人血清的pH值为7.4，而平均胞内pH值稍低，在约7.1-7.3范围内。胞内体具有更酸性的pH值，在5.5-6.0范围内，并且溶酶体具有甚至更酸性的pH值，在约5.0下。一些接头将具有可裂解的连接基团，所述连接基团在优选pH值下裂解，由此将来自配体的阳离子脂质释放至细胞内部或释放至细胞的所需区室中。

[0540] 接头可包括可由特定酶裂解的可裂解的连接基团。并入接头中的可裂解的连接基团的类型可视有待靶向的细胞而定。例如，靶向肝脏的配体可通过包括酯基的接头连接至阳离子脂质。肝细胞富含酯酶，并且因此，接头在肝细胞中比在不富含酯酶的细胞类型中更有效地裂解。富含酯酶的其他细胞类型包括肺细胞、肾皮质细胞和睾丸细胞。

[0541] 当靶向富含肽酶的细胞类型(诸如肝细胞和滑膜细胞)时，可使用含有肽键的接头。

[0542] 一般而言，通过测试降解剂(或条件)裂解候选连接基团的能力，可评价候选可裂解的连接基团的适用性。还需要测试候选可裂解的连接基团抵抗在血液中或与其他非靶组织接触时的裂解的能力。因此，可确定第一条件与第二条件之间对裂解的相对易感性，其中所述第一条件经选出以表示在靶细胞中的裂解且所述第二条件经选出以表示在其他组织或生物流体(例如血液或血清)中的裂解。评价可在无细胞系统、细胞、细胞培养物、器官或

组织培养物、或整个动物中进行。可能有用的是在无细胞或培养条件下进行初步评价，并通过对整个动物的进一步评价加以确认。在优选的实施方案中，有用的候选化合物在细胞(或在体外条件下，其经选出以模拟胞内条件)中比在血液或血清(或在体外条件下，其经选出以模拟胞外条件)中裂解快至少约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。

[0543] a.氧化还原可裂解的连接基团

[0544] 在一个实施方案中，可裂解的连接基团为在还原或氧化后裂解的氧化还原可裂解的连接基团。还原性可裂解的连接基团的一个实例为二硫化物连接基团(--S--S--)。为了确定候选可裂解的连接基团是否为合适的“还原性可裂解的连接基团”或例如是否适于与特定寡核苷酸部分和特定靶向剂一起使用，可查看本文所述的方法。例如，候选物可通过使用本领域中已知的试剂与二硫苏糖醇(DTT)或其他还原剂一起孵育来评价，所述试剂模拟在细胞(例如靶细胞)中所观察到的裂解速率。还可在经选出以模拟血液或血清条件的条件下评价所述候选物。在一个实施方案中，候选化合物在血液中裂解至多约10％。在其他实施方案中，有用的候选化合物在细胞(或在体外条件下，其经选出以模拟胞内条件)中比在血液(或在体外条件下，其经选出以模拟胞外条件)中降解快至少约2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90或约100倍。候选化合物的裂解率可使用标准酶动力学测定在经选出以模拟胞内培养基且与经选出以模拟胞外培养基的条件相比的条件下测定。

[0545] b.基于磷酸酯的可裂解的连接基团

[0546] 在另一个实施方案中，可裂解的接头包括基于磷酸酯的可裂解的连接基团。基于磷酸酯的可裂解的连接基团由降解或水解磷酸酯基团的剂来裂解。在细胞中裂解磷酸酯基团的剂的一个实例为细胞中的酶，诸如磷酸酶。基于磷酸酯的连接基团的实例为-O-P(O)(OR^k)-O-、-O-P(S)(OR^k)-O-、-O-P(S)(SR^k)-O-、-S-P(O)(OR^k)-O-、-O-P(O)(OR^k)-S-、-S-P(O)(OR^k)-S-、-O-P(S)(OR^k)-S-、-S-P(S)(OR^k)-O-、-O-P(O)(R^k)-O-、-O-P(S)(R^k)-O-、-S-P(O)(R^k)-O-、-S-P(S)(R^k)-O-、-S-P(O)(R^k)-S-、-O-P(S)(R^k)-S-。可使用类似于如上所述的方法评价这些候选物。

[0547] c.酸可裂解的连接基团

[0548] 在另一个实施方案中，可裂解的接头包括酸可裂解的连接基团。酸可裂解的连接基团为在酸性条件下裂解的连接基团。在优选的实施方案中，酸可裂解的连接基团在pH值约6.5或更低(例如，约6.0、5.75、5.5、5.25、5.0或更低)的酸性环境中或通过剂诸如可充当一般酸的酶来裂解。在细胞中，具体的低pH细胞器诸如胞内体和溶酶体可为酸可裂解的连接基团提供裂解环境。酸可裂解的连接基团的实例包括但不限于腙、酯和氨基酸的酯。酸可裂解的基团可具有通式-C＝NN--、C(O)O或--OC(O)。优选实施方案为当连接于酯(烷氧基)的氧的碳为芳基、取代的烷基或叔烷基诸如二甲基戊基或叔丁基时。可使用类似于如上所述的方法评价这些候选物。

[0549] d.基于酯的连接基团

[0550] 在另一个实施方案中，可裂解的接头包括基于酯的可裂解的连接基团。基于酯的可裂解的连接基团在细胞中由酶诸如酯酶和酰胺酶裂解。基于酯的可裂解的连接基团的实例包括但不限于亚烷基、亚烯基和亚炔基的酯。酯可裂解的连接基团具有通式--C(O)O--或--OC(O)--。可使用类似于如上所述的方法评价这些候选物。

[0551] e.基于肽的裂解基团

[0552] 在又一个实施方案中，可裂解的接头包括基于肽的可裂解的连接基团。基于肽的可裂解的连接基团在细胞中由酶诸如肽酶和蛋白酶裂解。基于肽的可裂解的连接基团为在氨基酸之间形成的肽键以产生寡肽(例如二肽、三肽等)和多肽。基于肽的可裂解的基团不包括酰氨基(--C(O)NH--)。酰氨基可在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键为在氨基酸之间形成的一种特殊类型的酰胺键以产生肽和蛋白质。基于肽的裂解基团通常限于氨基酸之间形成的肽键(即酰胺键)，以产生肽和蛋白质且不包括整个酰胺官能团。基于肽的可裂解的连接基团具有通式--NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)--，其中RA和RB为两个相邻氨基酸的R基团。可使用类似于如上所述的方法评价这些候选物。

[0553] 在一个实施方案中，本发明的寡核苷酸通过接头缀合至碳水化合物。接头包括二价和三价支链接头基团。本发明的组合物通过接头的示例性寡核苷酸碳水化合物缀合物和方法包括但不限于PCT公布第WO 2018/195165号的式24-35中所述的那些。

[0554] 教导寡核苷酸缀合物的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利第4,828,979号；第4,948,882号；第5,218,105号；第5,525,465号；第5,541,313号；第5,545,730号；第5,552,538号；第5,578,717,5,580,731号；第5,591,584号；第5,109,124号；第5,118,802号；第5,138,045号；第5,414,077号；第5,486,603号；第5,512,439号；第5,578,718号；第5,608,046号；第4,587,044号；第4,605,735号；第4,667,025号；第4,762,779号；第4,789,737号；第4,824,941号；第4,835,263号；第4,876,335号；第4,904,582号；第4,958,013号；第5,082,830号；第5,112,963号；第5,214,136号；第5,082,830号；第5,112,963号；第5,214,136号；第5,245,022号；第5,254,469号；第5,258,506号；第5,262,536号；第5,272,250号；第5,292,873号；第5,317,098号；第5,371,241号；第5,391,723号；第5,416,203号；第5,451,463号；第5,510,475号；第5,512,667号；第5,514,785号；第5,565,552号；第5,567,810号；第5,574,142号；第5,585,481号；第5,587,371号；第5,595,726号；第5,597,696号；第5,599,923号；第5,599,928号和第5,688,941号；第6,294,664号；第6,320,017号；第6,576,752号；第6,783,931号；第6,900,297号；第7,037,646号；第8,106,022号，其各自的全部内容据此以引用的方式并入本文中。

[0555] 在某些情况下，寡核苷酸的核苷酸可由非配体基团修饰。许多非配体分子已缀合至寡核苷酸，以便增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取，并且用于进行这类缀合的工序可获自科学文献中。这类非配体部分包括脂质部分，诸如胆固醇(Kubo,T.等人，Biochem.Biophys.Res.Comm,2007,365(1):54-61；Letsinger等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86:6553)、胆酸(Manoharan等人，Bioorg.Med.Chem.Lett.,1994,4:1053)、硫醚例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人，Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660:306；Manoharan等人，Bioorg.Med.Chem.Let.,1993,3:2765)、硫代胆固醇(Oberhauser等人，Nucl.Acids Res.,1992,20:533)、脂肪链例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人，EMBO J.,1991,10:111；Kabanov等人，FEBS Lett.,1990,259:327；Svinarchuk等人，Biochimie,1993,75:49)、磷脂例如二-十六烷基-外消旋-甘油或1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油基-3-H-膦酸酯三乙铵(Manoharan等人，Tetrahedron Lett.,1995,36:3651；Shea等人，Nucl.Acids Res.,1990,18:3777)、多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人，Nucleosides&Nucleotides,1995,14:969)、或金刚烷乙酸(Manoharan等人，Tetrahedron Lett.,1995,36:3651)、棕榈基部分(Mishra等人，

Biochim.Biophys.Acta,1995,1264:229)、或十八胺或己基氨基-羰基-羟胆固醇部分(Crooke等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277:923)。上文已列举教导这类寡核苷酸缀合物的制备的代表性美国专利。典型缀合方案涉及合成在序列的一个或多个位置处载有氨基接头的寡核苷酸。氨基接着与使用适当偶合试剂或活化试剂缀合的分子反应。缀合反应可用仍结合至固体支撑体的寡核苷酸进行或在寡核苷酸裂解之后在溶液相中进行。通过HPLC纯化寡核苷酸缀合物通常得到纯缀合物。

[0556] III.药物用途

[0557] 本发明的寡核苷酸可用于治疗可通过腺苷的脱氨基来治疗的任何病症。例如,任何病症由鸟苷向腺苷突变、提前终止密码子的引入或不希望有的蛋白质的表达引起。在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸当向受试者施用时可导致鸟苷向腺苷突变的校正。在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸可导致提前终止密码子的关闭,以便表达所需蛋白质。在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸可导致不希望有的蛋白质的表达的抑制。

[0558] 使用根据本发明的寡核苷酸编辑的特定目标靶腺苷为如下那些:其为定义关键功能或特征的氨基酸残基的密码子的一部分,所述功能或特征是诸如催化位点、其他蛋白质的结合位点、由底物进行的结合、定位结构域、共转译或转译后修饰诸如糖基化、羟基化、豆蔻酰化和由蛋白酶进行的蛋白质裂解(以便使蛋白质成熟和/或作为胞内途径的一部分)。

[0559] 许多遗传性疾病由G至A突变引起,并且它们是有待由本发明的寡核苷酸治疗的可能的疾病,因为在突变的靶腺苷处的腺苷脱氨基作用能将突变逆转为野生型。然而,逆转为野生型并非总是获得有益效果所必需的。如果野生型核苷酸并非G,则在靶中A至G的修饰也可为有益的。在某些情形下,这可经预测为所述情况,在其他情形下,则可能需要一些测试。在某些情形下,在靶RNA中A至G(当野生型不为G时)的修饰可为沉默的(未转译成不同氨基酸),或相反为非结果的(例如,氨基酸取代,但其构成不破坏蛋白质结构和功能的保守取代),或者氨基酸为对变化具有一定稳健性的功能结构域的一部分。如果根据本发明的编辑所造成的A至G的转变在非编码RNA或RNA的非编码部分中,则结果也可为无关紧要的或没有原始突变严重。本领域的普通技术人员应理解本发明的适用性极广泛且甚至不限于预防或治疗疾病。本发明还可用于修饰转录物以研究其效果,即使,或特定地当这类修饰诱导疾病状态时,例如在细胞或非人动物模型中。

[0560] 可用根据本发明的寡核苷酸预防和/或治疗的遗传性疾病的实例为其中靶RNA中的一个或多个腺苷的修饰将造成(潜在)有益变化的任何疾病。

[0561] 本发明不限于纠正突变,因为通过应用根据本发明的寡核苷酸使野生型序列变为突变序列相反可为有用的。修饰野生型腺苷可能有利的一个实例为例如通过修饰腺苷造成外显子的跳跃,所述腺苷碰巧为剪接所述外显子所需的分支位点。另一个实例为,腺苷定义或为蛋白质结合的识别序列的一部分或参与限定RNA的稳定性的二级结构。如上所述,因此,本发明可用于提供用于疾病的研究工具,引入新突变,所述新突变与现有突变相比危害较小。

[0562] 使用本文所公开的寡核苷酸进行的腺苷的脱氨基包括腺苷脱氨基的任何水平,例如在靶序列内至少1个脱氨基的腺苷(例如,在靶序列中至少1、2、3或更多个脱氨基的腺苷)。

[0563] 腺苷脱氨基作用可由与对照水平相比靶序列内腺苷的绝对或相对水平的降低来

评估。对照水平可为在本领域中利用的任何类型的对照水平，例如，预给予的基线水平，或由未经治疗或用对照(诸如，例如仅缓冲剂的对照或无活性剂的对照)治疗的类似受试者、细胞或样品确定的水平。

[0564] 因为ADAR的酶活性将腺苷转化为肌苷，所以腺苷的脱氨基作用可替代地由与对照水平相比靶序列内肌苷的绝对或相对水平的提高来评估。类似地，对照水平可为本领域利用的任何类型的对照水平，例如，预给予的基线水平，或由未经治疗或用对照(诸如，例如仅缓冲剂的对照或无活性剂的对照)治疗的类似受试者、细胞或样品确定的水平。

[0565] 可使用本领域中已知用于确定多核苷酸序列的核苷酸组成的任何方法来评估靶序列内腺苷和/或肌苷的水平。例如，靶序列内腺苷或肌苷的相对或绝对水平可使用包括但不限于以下的核酸序列技术来评估：Sanger测序方法、Next Generation Sequencing(NGS；例如焦磷酸测序、通过可逆性终止子化学的测序、通过连接的测序和即时测序)，诸如在市售平台(例如Illumina、Qiagen、Pacific Biosciences、Thermo Fisher、Roche和Oxford Nanopore Technologies)上提供的那些。可在来自Applied Biosystems、Roche、Stratagene、Cepheid、Eppendorf或Bio-Rad Laboratories的市售平台上使用即时聚合酶链反应(也称为qPCR)进行NGS的靶序列的克隆扩增。另外或替代地，可在市售平台上使用乳液PCR方法诸如Bio-Rad Laboratories的Droplet Digital PCR进行靶序列的扩增。

[0566] 在某些实施方案中，代替标记可用于检测靶序列内腺苷的脱氨基作用。例如，用本公开的寡核苷酸对患有涉及G至A突变的遗传性病症的受试者的有效治疗(如通过可接受的诊断和监测标准所证明)可理解为表明了临床上相关的腺苷脱氨基作用。在某些实施方案中，所述方法包括临床上相关的腺苷脱氨基作用，例如，如由在用本公开的寡核苷酸治疗受试者之后的临床上相关结果所证明。

[0567] 目标基因中的腺苷脱氨基作用可通过以下来表示：与实质上同第一细胞或细胞组相同但没有接受治疗的第二细胞或细胞组(对照细胞未用寡核苷酸治疗或未用靶向目标基因的寡核苷酸来治疗)相比，由第一细胞或细胞组(这类细胞可存在于例如来源于受试者的样品中)所表达的mRNA水平的提高或降低，其中目标基因已转录且所述细胞已经治疗(例如，通过使所述细胞与本公开的寡核苷酸接触，或通过向其中存在细胞的受试者施用本发明的寡核苷酸)，以使得目标基因的表达有所增加或减少。目标基因的mRNA水平的提高或降低程度可根据以下来表示：

[0568] $$\frac{(\text{对照细胞中的mRNA})-(\text{治疗的细胞中的mRNA})}{(\text{对照细胞中的mRNA})}\times 100\%$$

[0569] 在其他实施方案中，基因水平的变化可依据参数的减小来评估，所述参数与目标基因的表达在功能上相关联，例如，目标基因的蛋白质表达或蛋白质下游的信号传导。目标基因水平的变化可在表达目标基因(来自表达构建体的内源性或异源性基因)的任何细胞中且通过本领域中已知的任何测定来测定。

[0570] 目标基因的表达水平的变化可由以下来表示：由目标基因(所述基因由细胞或细胞组表达)产生的蛋白质的水平的提高或降低(例如，在来源于受试者的样品中表达的蛋白质水平)。如上关于mRNA抑制的评估所说明，在治疗的细胞或细胞组中蛋白质表达水平的变化可类似地表示为在对照细胞或细胞组中蛋白质水平的百分比。

[0571] 可用于评估3个目标基因的表达中的变化的对照细胞或细胞组包括尚未与本公开

的寡核苷酸接触的细胞或细胞组。例如，对照细胞或细胞组可来源于在用寡核苷酸治疗受试者之前的单个受试者(例如人或动物受试者)。

[0572] 由细胞或细胞组表达的目标基因的mRNA水平可使用本领域中已知用于评估mRNA表达的任何方法来测定。在一个实施方案中，通过检测转录的多核苷酸或其部分(例如目标基因的mRNA)来测定样品中目标基因的表达水平。RNA可使用包括以下的RNA提取技术自细胞中提取：例如使用酸酚/异硫氰酸胍提取(RNAzol B;Biogenesis)、RNEASY™ RNA制剂试剂盒(Qiagen)或PAXgene(PreAnalytix,Switzerland)。利用核糖核酸杂交的典型测定格式包括核连缀转录测定、RT-PCR、RNA酶保护测定、北方墨点、原位杂交和微阵列分析。可使用PCT公布WO2012/177906中所述的方法检测目标基因的循环mRNA，所述专利的全部内容据此以引用的方式并入本文中。在一些实施方案中，使用核酸探针测定目标基因的表达水平。如本文所用，术语“探针”是指能够选择性地结合至具体序列(例如mRNA或多肽)的任何分子。探针可由本领域技术人员合成或来源于适当的生物制剂。探针可具体设计为标记的。可用作探针的分子的实例包括但不限于RNA、DNA、蛋白质、抗体和有机分子。

[0573] 分离的mRNA可用于包括但不限于以下的杂交或扩增测定中：南方或北方分析、聚合酶链反应(PCR)分析和探针阵列。用于测定mRNA水平的一种方法涉及使分离的mRNA与可杂交至目标基因的mRNA的核酸分子(探针)接触。在一个实施方案中，例如通过使分离的mRNA在琼脂糖凝胶上跑胶并将mRNA自凝胶转移至膜(诸如硝酸纤维)上，将mRNA固定在固体表面上并与探针接触。在一个替代性实施方案中，将探针固定在固体表面上并使mRNA与探针在例如AFFYMETRIX基因晶片阵列中接触。熟练技术人员可易于采纳用于测定目标基因的mRNA水平的已知mRNA检测方法。

[0574] 用于测定样品中的目标基因的表达水平的一种替代性方法涉及例如样品中mRNA的核酸扩增和/或逆转录酶过程(以制备cDNA)，例如通过RT-PCR(在Mullis,1987,美国专利第4,683,202号中列出的实验实施方案)、连接酶链反应(Barany(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189-193)、自我持续序列复制(Guatelli等人(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878)、转录扩增系统(Kwoh等人(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-1177)、Q-Beta复制酶(Lizardi等人(1988)Bio/Technology 6:1197)、滚环式复制(Lizardi等人，美国专利第5,854,033号)或任何其他核酸扩增方法，接着使用本领域技术人员所熟知的技术检测扩增分子。如果核酸分子以极低数量存在，则这些检测方案尤其可用于检测所述分子。在本发明的特定方面中，目标基因的表达水平通过定量荧光RT-PCR(即TAQMAN™系统)或DUAL-GLO®荧光素酶测定来测定。

[0575] 目标基因的mRNA的表达水平可使用膜墨点(诸如在杂交分析诸如北方、南方、斑点等分析中使用)或微孔、样品管、凝胶、珠粒或纤维(或任何固体支撑体，包括结合的核酸)来监测。参见美国专利第5,770,722号；第5,874,219号；第5,744,305号；第5,677,195号；和第5,445,934号，其以引用的方式并入本文中。基因表达水平的测定还可包括使用溶液中的核酸探针。

[0576] 在一些实施方案中，使用分支DNA(bDNA)测定或即时PCR(qPCR)来评估mRNA表达的水平。在本文提出的实施例中描述并例示所述PCR方法的用途。这类方法还可用于检测目标基因的核酸。

[0577] 通过表达目标基因产生的蛋白质的水平可使用本领域中已知用于测量蛋白质水

平的任何方法来测定。这类方法包括例如:电泳、毛细管电泳、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、超扩散色谱法、流体或凝胶沉淀素反应、吸收光谱法、比色测定、分光光度测定、流式细胞术、免疫扩散(单向或双向)、免疫电泳、西方墨点、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定、电化学发光测定等。这类测定还可用于检测蛋白质,指示由目标基因产生的蛋白质的存在或复制。另外,上述测定可用于报告目标mRNA序列的变化,其造成蛋白质功能的恢复或变化,由此提供治疗效果和对受试者的益处、治疗受试者的病症和/或减轻受试者的病症的症状。

[0578] 在本发明方法的一些实施方案中,向受试者施用本公开的寡核苷酸以便将所述寡核苷酸递送至所述受试者内的特定部位。目标基因的表达的变化可使用在来源于受试者内具体部位的样品中由目标基因产生的mRNA或蛋白质的水平或水平变化的测量来评估。

[0579] 在其他实施方案中,施用有效量的寡核苷酸且持续一段时间以造成以下一项(或多项,例如两项或更多项、三项或更多项、四项或更多项):(a)在目标基因的靶序列内腺苷数目的减少,(b)病症发作的延迟,(c)受试者生存期的延长,(d)受试者无进展生存期的延长,(e)蛋白质功能的恢复或变化,和(f)症状的减轻。

[0580] 治疗与G至A突变有关的病症还可导致与未治疗的群相比治疗的受试者群的死亡率的降低。例如,死亡率降低了大于2%(例如大于5%、10%或25%)。治疗的受试者群的死亡率的降低可通过任何可再现的手段测量,例如,通过在开始用本文所述的化合物或本文所述的化合物的药学上可接受的盐治疗之后计算针对群的每单位时间的疾病相关的死亡的平均数目。群的死亡率的降低还可例如通过在完成第一轮用本文所述的化合物或本文所述的化合物的药学上可接受的盐治疗之后计算针对群的每单位时间的疾病相关的死亡的平均数目来测量。

[0581] A.寡核苷酸的递送

[0582] 向细胞,例如受试者诸如人受试者(例如,有需要的受试者,诸如患有病症的受试者)内的细胞递送本发明的寡核苷酸可以许多不同方式达成。例如,递送可通过使细胞与本发明的寡核苷酸在体外或体内接触来进行。体内递送还可通过向受试者施用包括寡核苷酸的组合物直接进行。或者,体内递送可通过施用编码并指导寡核苷酸的表达的一个或多个载体来间接进行。体外与体内接触细胞的方法的组合也是可能的。接触细胞可为直接或间接的,如上所论述。此外,接触细胞可通过靶向配体(包括本文所述或本领域中已知的任何配体)来实现。在一些实施方案中,靶向配体为碳水化合物部分,例如$GalNAc_3$配体,或将寡核苷酸导向目标位点的任何其他配体。细胞可包括中枢神经系统的那些细胞或肌细胞。这些替代物在下文中进一步论述。

[0583] 细胞与寡核苷酸的接触可在体外或体内完成。此可适于与本发明的寡核苷酸一起使用(参见,例如Akhtar S.和Julian R L.,(1992)Trends Cell.Biol.2(5):139-144以及WO94/02595,其以引用的方式全部并入本文中)。对于体内递送,递送寡核苷酸分子所考虑的因素包括例如所递送分子的生物稳定性、非特异性作用的预防以及所递送分子在靶组织中的积聚。寡核苷酸的非特异性作用可通过局部施用最小化,例如通过直接注射或植入组织中或局部施用所述制剂。向治疗部位的局部施用使剂的局部浓度最大化,限制剂对于全身组织的暴露(否则全身组织将受到所述剂的损害或全身组织会降解所述剂),以及允许有待施用的寡核苷酸分子的较低总剂量。

[0584] 对于全身施用寡核苷酸以治疗疾病，所述寡核苷酸可包括替代性核碱基、替代性糖部分和/或替代性核苷间键，或替代地使用药物递送系统进行递送；两种方法都能阻止核酸内切酶和核酸外切酶在体内对寡核苷酸的快速降解。寡核苷酸或药物载剂的修饰还可允许寡核苷酸组合物靶向靶组织并且避免不希望有的脱靶效应。寡核苷酸分子可通过化学缀合至亲油性基团诸如胆固醇来修饰以增强细胞摄取并防止降解。在一个替代性实施方案中，寡核苷酸可使用以下药物递送系统递送：诸如纳米颗粒、脂质纳米颗粒、polyplex纳米颗粒、lipoplex纳米颗粒、树状体、聚合物、脂质体或阳离子递送系统。带正电的阳离子递送系统促进寡核苷酸分子(带负电)的结合并且还增强在带负电的细胞膜处的相互作用，以允许细胞对寡核苷酸的有效摄取。阳离子脂质、树状体或聚合物可结合至寡核苷酸，或经诱导以形成包住寡核苷酸的囊泡或胶束。囊泡或胶束的形成进一步防止寡核苷酸在全身施用时的降解。一般而言，本领域中已知的递送核酸的任何方法都可适于递送本发明的寡核苷酸。用于制备和施用阳离子寡核苷酸复合物的方法完全在本领域技术人员的能力范围内(参见，例如Sorensen,DR.等人(2003)J.Mol.Biol 327:761-766;Verma,U N.等人，(2003)Clin.Cancer Res.9:1291-1300;Arnold,A S等人，(2007)J.Hypertens.25:197-205，其以引用的方式全部并入本文中)。可用于全身递送寡核苷酸的药物递送系统的一些非限制性实例包括DOTAP(Sorensen,DR.等人(2003)，上述;Verma,U N.等人，(2003)，上述)；Oligofectamine，“固体核酸脂质颗粒”(Zimmermann,T S.等人，(2006)Nature 441:111-114)；心磷脂(Chien,P Y.等人，(2005)Cancer Gene Ther.12:321-328;Pal,A.等人，(2005)Int J.Oncol.26:1087-1091)；聚乙烯亚胺(Bonnet M E.等人，(2008)Pharm.Res.8月16日线上发表;Aigner,A.(2006)J.Biomed.Biotechnol.71659)；Arg-Gly-Asp(RGD)肽(Liu,S.(2006)Mol.Pharm.3:472-487)；和聚酰胺-胺(Tomalia,D A.等人，(2007)Biochem.Soc.Trans.35:61-67;Yoo,H.等人，(1999)Pharm.Res.16:1799-1804)。在一些实施方案中，寡核苷酸与环糊精形成复合物以用于全身施用。施用方法和寡核苷酸与环糊精的药物组合物可见于美国专利第7,427,605号中，所述专利以引用的方式全部并入本文中。在一些实施方案中，本发明的寡核苷酸通过polyplex或lipoplex纳米颗粒递送。施用方法和寡核苷酸与polyplex纳米颗粒和lipoplex纳米颗粒的药物组合物可见于美国专利申请第2017/0121454号；第2016/0369269号；第2016/0279256号；第2016/0251478号；第2016/0230189号；第2015/0335764号；第2015/0307554号；第2015/0174549号；第2014/0342003号；第2014/0135376号；和第2013/0317086号中，所述专利以引用的方式全部并入本文中。

[0585] i.膜分子组装递送方法

[0586] 本发明的寡核苷酸还可使用多种膜分子组装递送方法递送，包括本领域中已知的聚合、生物可降解的微粒或微胶囊递送装置。例如，胶体分散系统可用于靶向递送本文所述的寡核苷酸剂。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球体、珠粒和基于脂质的系统，包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。脂质体为可用作体外和体内递送媒介物的人工膜囊泡。已显示尺寸在0.2-4.0μm范围内的大单层囊泡(LUV)可封装相当大百分比的含有大分子的水性缓冲液。脂质体适可用于将活性成分转移并递送至作用位点。因为脂质体膜在结构上类似于生物膜，所以当将脂质体施加于组织时，脂质体双层与细胞膜的双层融合。随着脂质体与细胞融合的进展，包括寡核苷酸的内部水性内容物递送至细胞中，其中寡核苷酸可特异性地结合至靶RNA并且可介导RNA酶H介导的基因沉默。在一些情况下，脂质体

还特异性地靶向,以例如将寡核苷酸导向特定的细胞类型。脂质体的组合物通常为磷脂的组合,通常与类固醇尤其是胆固醇的组合。还可使用其他磷脂或其他脂质。脂质体的物理特征视pH值、离子强度和二价阳离子的存在而定。

[0587] 含有寡核苷酸的脂质体可通过多种方法来制备。在一个实施例中,将脂质体的脂质组分溶于清洁剂中以便由脂质组分形成胶束。例如,脂质组分可为两亲性阳离子脂质或脂质缀合物。清洁剂可具有高临界胶束浓度并且可为非离子的。示例性清洁剂包括胆酸盐、CHAPS、辛基葡萄糖苷、脱氧胆酸盐和月桂酰基肌氨酸。接着将寡核苷酸制剂添加至包括脂质组分的胶束中。脂质上的阳离子基团与寡核苷酸相互作用并且缩合在寡核苷酸周围以形成脂质体。缩合之后,例如通过渗析移除清洁剂以产生寡核苷酸的脂质体制剂。

[0588] 必要时,在缩合反应期间,可例如通过受控添加来添加有助于缩合的载剂化合物。例如,载剂化合物可为除核酸以外的聚合物(例如精胺或亚精胺)。还可调节pH值以促进缩合。

[0589] 用于产生稳定的多核苷酸递送媒介物(其中并入有多核苷酸/阳离子脂质复合物作为递送媒介物的结构组分)的方法进一步描述于例如WO 96/37194中,所述专利的全部内容以引用的方式并入本文中。脂质体形成还可包括以下文献中所述的示例性方法的一个或多个方面:Feigner,P.L.等人,(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 8:7413-7417;美国专利第4,897,355号;美国专利第5,171,678号;Bangham等人,(1965)M.Mol.Biol.23:238;Olson等人,(1979)Biochim.Biophys.Acta 557:9;Szoka等人,(1978)Proc.Natl.Acad.Sci.75:4194;Mayhew等人,(1984)Biochim.Biophys.Acta 775:169;Kim等人,(1983)Biochim.Biophys.Acta 728:339;以及Fukunaga等人,(1984)Endocrinol.115:757。用于制备用作递送媒介物的具有适当尺寸的脂质聚集体的常用技术包括超声处理和冻融加挤压(参见,例如Mayer等人,(1986)Biochim.Biophys.Acta 858:161。当需要始终较小(50nm至200nm)且相对较均匀的聚集体时,可使用微流体化(Mayhew等人,(1984)Biochim.Biophys.Acta 775:169。这些方法容易适于将寡核苷酸制剂包装至脂质体中。

[0590] 脂质体可分为两大类。阳离子脂质体为带正电的脂质体,其与带负电的核酸分子相互作用以形成稳定的复合物。带正电的核酸/脂质体复合物结合至带负电的细胞表面并于胞内体中内化。由于胞内体内的酸性pH值,脂质体破裂,将其内容物释放至细胞胞质中(Wang等人(1987)Biochem.Biophys.Res.Commun.,147:980-985)。

[0591] pH敏感性或带负电的脂质体截留核酸,而非与其形成的复合物。由于核酸与脂质都带相似电荷,所以存在排斥而非复合物形成。尽管如此,一些核酸仍截留在这些脂质体内的水性环境中。pH敏感性脂质体已用于将编码胸苷激酶基因的核酸递送至培养中的细胞单层。在靶细胞中检测到外源基因的表达(Zhou等人(1992)Journal of Controlled Release,19:269-274)。

[0592] 一种主要类型的脂质体组合物包括除天然来源的磷脂酰胆碱以外的磷脂。中性脂质体组合物例如可由二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)形成。阴离子脂质体组合物一般由二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油形成,而阴离子膜融合脂质体主要由二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)形成。另一种类型的脂质体组合物由磷脂酰胆碱(PC)诸如例如大豆PC和卵PC形成。另一种类型由磷脂和/或磷脂酰胆碱和/或胆固醇的混合物形成。

[0593] 将脂质体体外和体内引入细胞中的其他方法的实例包括美国专利第5,283,185号;美国专利第5,171,678号;WO 94/00569;WO 93/24640;WO 91/16024;Feigner,(1994)J.Biol.Chem.269:2550;Nabel,(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.90:11307;Nabel,(1992)Human Gene Ther.3:649;Gershon,(1993)Biochem.32:7143;以及Strauss,(1992)EMBO J.11:417。

[0594] 还已检查非离子脂质体系统以确定其在向皮肤递送药物中的效用,尤其是包括非离子表面活性剂和胆固醇的系统。包括NOVASOME™ I(甘油二月桂酸酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)和NOVASOME™ II(甘油二硬脂酸酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)的非离子脂质体制剂用于将环孢菌素-A递送至小鼠皮肤的真皮中。结果表明,这类非离子脂质体系统有效促进环孢菌素A向皮肤的不同层中的沉积(Hu等人,(1994)S.T.P.Pharma.Sci.,4(6):466)。

[0595] 脂质体还可为空间上稳定的脂质体,包括一种或多种专化脂质,其造成与缺乏这类专化脂质的脂质体相比循环寿命的增加。空间上稳定的脂质体的实例为如下那些:其中脂质体的形成囊泡的脂质部分的一部分(A)包括一种或多种糖脂,诸如单唾液酸神经节苷脂G_{M1},或(B)以一种或多种亲水性聚合物诸如聚乙二醇(PEG)部分衍生而来。虽然不希望受任何特定理论束缚,但在本领域中据信,至少对于含有神经节苷脂、鞘磷脂或PEG衍生的脂质的空间上稳定的脂质体而言,这些空间上稳定的脂质体的循环半衰期的增加由于网状内皮系统(RES)的细胞的摄取的减少(Allen等人,(1987)FEBS Letters,223:42;Wu等人,(1993)Cancer Research,53:3765)。

[0596] 包括一种或多种糖脂的各种脂质体是本领域已知的。Papahadjopoulos等人(Ann.N.Y.Acad.Sci.,(1987),507:64)报告单唾液酸神经节苷脂G^{M1}、半乳糖脑苷脂硫酸酯和磷脂酰肌醇改善脂质体的血液半衰期的能力。这些研究结果由Gabizon等人(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,(1988),85:6949)阐述。Allen等人的美国专利第4,837,028号和WO 88/04924公开包括(1)鞘磷脂和(2)神经节苷脂G_{M1}或半乳糖脑苷脂硫酸酯的脂质体。美国专利第5,543,152号(Webb等人)公开包括鞘磷脂的脂质体。包括1,2-sn-二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱的脂质体公开在WO 97/13499(Lim等人)中。

[0597] 在一个实施方案中,使用阳离子脂质体。阳离子脂质体具有能够融合至细胞膜的优点。非阳离子脂质体虽然不能有效地与质膜融合,但在体内由巨噬细胞摄取并且可用于将寡核苷酸递送至巨噬细胞。

[0598] 脂质体的其他优点包括:由天然磷脂获得的脂质体为生物相容性和生物可降解的;脂质体可并入有广泛的水溶性和脂溶性药物;脂质体可保护在其内区室中封装的寡核苷酸以免代谢和降解(Rosoff,在“Pharmaceutical Dosage Forms,”Lieberman,Rieger and Banker(编),1988,第1卷,第245页中)。在脂质体制剂的制备中的重要因素为脂质表面电荷、囊泡尺寸和脂质体的水体积。

[0599] 带正电的合成阳离子脂质N-[1-(2,3-二油烯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)可用于形成小脂质体,所述小脂质体自发地与核酸相互作用以形成脂质-核酸复合物,所述复合物能够与组织培养细胞的细胞膜的带负电的脂质融合,从而实现寡核苷酸的递送(关于DOTMA和其与DNA一起的用途的描述,参见,例如Feigner,P.L.等人,(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 8:7413-7417和美国专利第4,897,355号)。

[0600] DOTMA类似物1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基氨)丙烷(DOTAP)可与磷脂组合用于形成DNA-复合囊泡。LIPOFECTIN™ Bethesda Research Laboratories,Gaithersburg,Md.)为一种用于向活组织培养细胞递送高阴离子核酸的有效剂,所述活组织培养细胞包括带正电的DOTMA脂质体,其自发地与带负电的多核苷酸相互作用以形成复合物。当使用足够多的带正电的脂质体时,生成的复合物上的净电荷也是正的。以此方式制备的带正电的复合物自发地附着于带负电的细胞表面,与质膜融合,并且有效地将功能性核酸递送至例如组织培养细胞中。另一种市售的阳离子脂质1,2-双(油酰氧基)-3,3-(三甲基氨)丙烷("DOTAP")(Boehringer Mannheim,Indianapolis,Ind.)不同于DOTMA之处在于油酰基部分由酯键而非醚键连接。

[0601] 其他报告的阳离子脂质化合物包括已缀合至多种部分的那些,所述部分包括例如已缀合至两种类型脂质中的一种的羧基精胺,并且包括化合物诸如5-羧基精氨基甘氨酸二八油酰基酰胺("DOGS")(TRANSFECTAM™,Promega,Madison,Wis.)和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺5-羧基精氨基-酰胺("DPPES")(参见,例如美国专利第5,171,678号)。

[0602] 另一种阳离子脂质缀合物包括用胆固醇对脂质的衍生化("DC-Chol"),其已经配制成与DOPE组合的脂质体(参见Gao,X.和Huang,L.,(1991)Biochim.Biophys.Res.Commun.179:280)。已报告通过将聚赖氨酸缀合至DOPE制得的脂聚赖氨酸在血清存在下有效进行转染(Zhou,X.等人,(1991)Biochim.Biophys.Acta 1065:8)。对于某些细胞系,含有缀合的阳离子脂质的这些脂质体据称比含有DOTMA的组合物展示更低的毒性且提供更有效的转染。其他市售的阳离子脂质产物包括DMRIE和DMRIE-HP(Vical,La Jolla,Calif.)以及Lipofectamine(DOSPA)(Life Technology,Inc.,Gaithersburg,Md.)。适于递送寡核苷酸的其他阳离子脂质描述于WO 98/39359和WO 96/37194中。

[0603] 脂质体制剂尤其适合于局部施用,脂质体与其他制剂相比提供若干优点。这类优点包括与所施用药物的高全身吸收有关的副作用的减少、所施用药物在所需靶处的积聚增加以及向皮肤施用寡核苷酸的能力。在一些实施方式中,脂质体用于将寡核苷酸递送至表皮细胞并且还增强寡核苷酸向真皮组织(例如向皮肤)中的渗透。例如,可局部施用脂质体。已经记载配制成脂质体的药物向皮肤的局部递送(参见,例如Weiner等人,(1992)Journal of Drug Targeting,第2,405-410卷和du Plessis等人,(1992)Antiviral Research,18:259-265;Mannino,R.J.和Fould-Fogerite,S.,(1998)Biotechniques 6:682-690;Itani,T.等人,(1987)Gene 56:267-276;Nicolau,C.等人(1987)Meth.Enzymol.149:157-176;Straubinger,R.M.和Papahadjopoulos,D.(1983)Meth.Enzymol.101:512-527;Wang,C.Y.和Huang,L.,(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7851-7855)。

[0604] 还已检查非离子脂质体系统以确定其在向皮肤递送药物中的效用,尤其是包括非离子表面活性剂和胆固醇的系统。包括Novasome I(甘油二月桂酸酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)和Novasome II(甘油二硬脂酸酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)的非离子脂质体制剂用于将药物递送至小鼠皮肤的真皮中。具有寡核苷酸的这类制剂可用于治疗皮肤病症。

[0605] 脂质体的靶向还可能基于例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性并且是本领域已知的。在脂质体靶向递送系统的情况下,脂质基团可并入脂质体的脂质双层中以便

维持靶向配体与脂质体双层的稳定缔合。各种连接基团可用于将脂质链接合到靶向配体上。额外的方法是本领域已知的并且描述于例如美国专利申请公布第20060058255号中，其连接基团以引用的方式并入本文中。

[0606] 包括寡核苷酸的脂质体可被制成高度可变形的。这种变形性使得脂质体能够穿透小于脂质体的平均半径的孔隙。例如，传递体(transfersome)为又一类型的脂质体，并且为高度可变形的脂质聚集体，其为药物递送媒介物的有吸引力的候选物。传递体可被描述为脂肪小滴，其是高度可变形的，使得它们容易穿透小于所述小滴的孔隙。传递体可将表面边缘活化剂(通常表面活性剂)添加至标准脂质体组合物中而制得。包括寡核苷酸的传递体可例如通过感染皮下地递送，以便将寡核苷酸递送至皮肤中的角质细胞。为了跨过完整的哺乳动物皮肤，脂质囊泡必须在合适的经皮梯度的影响下穿过一系列细小孔隙，其中每个孔隙具有小于50nm的直径。另外，由于脂质特性，这些传递体可为自动优化的(适合于孔隙的形状，例如在皮肤中)、自修复的并且常常可到达其靶而不破碎且经常为自动装载的。传递体已用于递送血清白蛋白至皮肤。已显示血清白蛋白的传递体介导的递送与含有血清白蛋白的溶液的皮下注射一样有效。

[0607] 适合于本发明的其他制剂描述于2008年1月2日提交的美国临时申请系列第61/018,616号;2008年1月2日提交的第61/018,611号;2008年3月26日提交的第61/039,748号;2008年4月22日提交的第61/047,087号和2008年5月8日提交的第61/051,528号中。2007年10月3日提交的PCT申请第PCT/US2007/080331号还描述适合于本发明的制剂。

[0608] 表面活性剂在制剂诸如乳液(包括微乳液)和脂质体中获得广泛应用。对许多不同类型的表面活性剂(天然和合成两者)的特性进行分类和分等级的最常见方式是通过使用亲水/亲油平衡(HLB)。亲水基(也称为“头部”)的性质提供用于对制剂中使用的不同表面活性剂进行分类的最有用的手段(Rieger，在Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,1988,第285页中)。

[0609] 如果表面活性剂分子未经离子化，则将其归类为非离子表面活性剂。非离子表面活性剂在药物和化妆产品中获得广泛应用并且可用于大范围的pH值。一般而言，其HLB值在2至约18范围内，视其结构而定。非离子表面活性剂包括非离子酯，诸如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、失水山梨糖醇酯、蔗糖酯和乙氧基化酯。非离子烷醇酰胺和醚诸如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇和乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物还包括在这类中。聚氧乙烯表面活性剂为非离子表面活性剂类中最受欢迎的成员。

[0610] 如果表面活性剂分子在溶解或分散于水中时携带负电荷，则将所述表面活性剂归类为阴离子的。阴离子表面活性剂包括羧酸盐诸如肥皂、酰基乳酸盐、氨基酸的丙烯酰胺、硫酸酯诸如烷基硫酸酯和乙氧基化烷基硫酸酯、磺酸酯诸如烷基苯磺酸酯、酰基羟乙基磺酸酯、酰基牛磺酸酯和磺基丁二酸酯、以及磷酸酯。阴离子表面活性剂类中最重要的成员为烷基硫酸酯和肥皂。

[0611] 如果表面活性剂分子在溶解或分散于水中时携带正电荷，则将所述表面活性剂归类为阳离子的。阳离子表面活性剂包括季铵盐和乙氧化胺。季铵盐为这类中最常用的成员。

[0612] 如果表面活性剂分子具有携带正电荷或负电荷的能力，则将表面活性剂归类为两性的。两性表面活性剂包括丙烯酸衍生物、取代的烷基酰胺、N-烷基甜菜碱和磷脂。

[0613] 表面活性剂在药物产品、制剂和乳液中的用途已有综述(Rieger，在

Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,1988,第285页中)。

[0614] 用于本发明的方法中的寡核苷酸还可以胶束制剂形式提供。胶束为特定类型的分子组装,其中两亲性分子以球状结构排列以使得分子的疏水性部分都向内导向,留下亲水性部分与周围水相接触。如果环境为疏水性的,则存在相反的排列。

[0615] ii.基于脂质纳米颗粒的递送方法

[0616] 本发明的寡核苷酸可完全封装于脂质制剂例如脂质纳米颗粒(LNP)或其他核酸-脂质颗粒中。LNP极其适合全身应用,因为它们在静脉内(i.v.)注射之后展示出延长的循环寿命并且在远端部位(例如,与施用部位在物理上分离的部位)处聚集。LNP包括"pSPLP",其包括封装的缩合剂-核酸复合物,如PCT公布第WO 00/03683号中所列。本发明的颗粒通常具有以下平均直径:约50nm至约150nm、更通常约60nm至约130nm、更通常约70nm至约110nm、最通常约70nm至约90nm,并且为实质上无毒的。另外,核酸当存在于本发明的核酸-脂质颗粒中时在水溶液中对核酸酶的降解有抗性。核酸-脂质颗粒及其制备方法公开在例如美国专利第5,976,567号;第5,981,501号;第6,534,484号;第6,586,410号;第6,815,432号;美国公布第2010/0324120号和PCT公布第WO 96/40964号中。

[0617] 在一个实施方案中,脂质与药物的比率(质量/质量比)(例如,脂质与寡核苷酸的比率)将在以下范围内:约1:1至约50:1、约1:1至约25:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1、或约6:1至约9:1。还涵盖以上列举的范围的中间范围作为本发明的一部分。

[0618] 阳离子脂质的非限制性实例包括N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂酰基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N--(I-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N--(I-(2,3-二油烯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油烯氧基)丙胺(DODMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二次亚麻基氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亚麻基氨基甲酰基氧基-3-二甲氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚麻氧基-3-(二甲氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚麻氧基-3-吗啉基丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚麻基硫基-3-二甲氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚麻基氧基-3-二甲氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚麻基氧基-3-三甲氨基丙烷氯盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲氨基丙烷氯盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚麻基氧基-3-(N-甲基哌嗪并)丙烷(DLin-MPZ)、或3-(N,N-二亚麻基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚麻基氧代基-3-(2-N,N-二甲氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二次亚麻基氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLinDMA)、2,2-二亚麻基-4-二甲氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基四氢--3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-胺(ALN100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-庚三乌头酸-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲氨基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基乙基氮烷二基二(十二烷)-2-醇(Tech G1)或其混合物。阳离子脂质可包括颗粒中存在的总脂质的例如约20摩尔%至约50摩尔%或约40摩尔%。

[0619] 可电离/非阳离子脂质可为阴离子脂质或中性脂质,包括但不限于二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰

基油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰基-乙醇胺(DSPE)、16-O-单甲基PE、16-O-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、胆固醇或其混合物。非阳离子脂质可为颗粒中存在的总脂质的例如约5摩尔%至约90摩尔%、约10摩尔%或约58摩尔%(如果包括胆固醇的话)。

[0620] 抑制颗粒聚集的缀合的脂质可为例如聚乙二醇(PEG)-脂质,包括但不限于PEG-二酰基甘油(DAG)、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)或其混合物。PEG-DAA缀合物可为例如PEG-二月桂氧基丙基(Ci_2)、PEG-二肉豆蔻氧基丙基(Ci_4)、PEG-二棕榈氧基丙基(Ci_6)或PEG-二硬脂氧基丙基(C]$_8$)。防止颗粒聚集的缀合脂质可为例如颗粒中存在的总脂质的0摩尔%至约20摩尔%或约2摩尔%。

[0621] 在一些实施方案中,核酸-脂质颗粒还包括胆固醇,其为例如颗粒中存在的总脂质的约10摩尔%至约60摩尔%或约50摩尔%。

[0622] B.组合疗法

[0623] 本发明的方法可单独或与额外治疗剂组合(例如,治疗相同病症或与此相关的症状的其他剂)或与针对所述病症的其他类型的疗法组合使用。在组合治疗中,一种或多种治疗化合物的剂量与单独施用时的标准剂量相比可减少。例如,剂量可凭经验由药物组合和排列确定或者可通过等辐射分析来推断(例如Black等人,Neurology 65:S3-S6(2005))。在此情况下,化合物在组合时的剂量应提供治疗作用。

[0624] 在一些实施方案中,第二治疗剂为化疗剂(例如,细胞毒性剂或可用于治疗病症的其他化合物)。

[0625] 第二剂可为治疗剂,其为非药物治疗。例如,第二治疗剂为物理疗法。

[0626] 在本文所述的组合实施方案的任一个中,第一治疗剂与第二治疗剂同时或依次地以任一顺序施用。第一治疗剂可在第二治疗剂之前或之后立即、长达1小时、长达2小时、长达3小时、长达4小时、长达5小时、长达6小时、长达7小时、长达8小时、长达9小时、长达10小时、长达11小时、长达12小时、长达13小时、14小时、长达16小时、长达17小时、长达18小时、长达19小时、长达20小时、长达21小时、长达22小时、长达23小时、长达24小时或长达1-7天、1-14天、1-21天或1-30天施用。

[0627] IV.药物组合物

[0628] 本文所述的寡核苷酸优选经配制成药物组合物以便以适于体内施用的生物相容性形式向人受试者施用。

[0629] 本文所述的化合物可以游离碱形式、盐形式、溶剂合物形式和作为前药使用。所有形式都在本文所述的方法内。根据本发明的方法,可向患者以视所选施用途径而定的多种形式施用所述化合物或其盐、溶剂合物或前药,如本领域技术人员所理解。本文所述的化合物可例如通过以下途径施用:口服、肠胃外、鞘内、脑室内、器官实质内、颊内、舌下、鼻、直肠、贴剂、泵、肿瘤内或经皮施用,并且相应地配制药物组合物。肠胃外施用包括静脉内、腹膜内、皮下、肌内、经上皮、鼻、肺内、鞘内、脑室内、器官实质内、直肠和局部施用模式。肠胃外施用可在所选时间段内连续输注。

[0630] 本文所述的化合物可例如用惰性稀释剂或用可吸收可食用的载剂口服施用,或者

可将其包封在硬壳或软壳明胶胶囊中，或者可将其压制成片剂，或者可将其与膳食食物直接合并。对于口服治疗施用而言，本文所述的化合物可合并有赋形剂，并且以可摄取的片剂、颊含片、口含锭、胶囊、酏剂、混悬剂、糖浆和糯米纸囊剂形式使用。本文所述的化合物还可肠胃外施用。本文所述的化合物的溶液可在水中适当地与表面活性剂诸如羟丙基纤维素混合来制备。还可在甘油、液体聚乙二醇、DMSO及其混合物中在有或没有乙醇的情况下和在油中制备分散体。在普通的储存和使用条件下，这些制剂可含有防腐剂以防止微生物的生长。用于选择和制备合适的制剂的常规工序和成分描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences(2012,第22版)和The United States Pharmacopeia:The National Formulary(USP 41NF 36)(于2018年出版)中。适于可注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体和无菌粉剂以用于无菌可注射溶液或分散体的临时制备。在所有情况下，所述形式必须为无菌的且必须为流体，以致于可易于通过注射器施用。用于鼻施用的组合物可易于配制成气雾剂、滴剂、凝胶剂和粉剂。气雾剂制剂通常包括活性物质在生理上可接受的水性或非水性溶剂中的溶液或微细混悬液且通常以单剂量或多剂量以无菌形式存在于密封容器中，所述密封容器可采用药筒形式或经再补充以便与喷雾装置一起使用。或者，密封容器可为整体式分配装置，诸如单剂量鼻吸入器，或装有计量阀的气雾剂分配器，供使用之后弃置。当剂型包括气雾剂分配器时，其将含有推进剂，所述推进剂可为压缩气体，诸如压缩空气；或有机推进剂，诸如氟氯烃。气雾剂剂型还可采用泵-喷雾器形式。适于颊内或舌下施用的组合物包括片剂、口含锭和软锭剂，其中活性成分用载剂诸如糖、阿拉伯胶、黄蓍胶、明胶和甘油来配制。供直肠施用的组合物宜呈含有常规栓剂基质诸如可可脂的栓剂形式。本文所述的化合物可在肿瘤内施用，例如作为肿瘤内注射。肿瘤内注射是直接注射至肿瘤血管系统中且特别预期用于离散、实体、可及的肿瘤。局部、区域或全身施用也可为适当的。本文所述的化合物可通过向相距例如约1cm的肿瘤一次或多次注射施用而有利地与之接触。在外科手术的情况下，本发明可在术前使用，例如以使不宜手术的肿瘤能够被切除。适当时还可例如通过将导管植入肿瘤或肿瘤血管系统中来进行连续施用。

[0631] 本文所述的化合物可单独或与如本文所示的药学上可接受的载剂组合向动物例如人施用，其比率由以下因素决定：化合物的溶解性和化学性质、所选施用途径以及标准药学实践。

[0632] V.剂量

[0633] 本文所述的组合物(例如，包括寡核苷酸的组合物)的剂量可视以下许多因素而变化：诸如化合物的药效学特性；施用模式；接受者的年龄、健康情况和体重；症状的性质和程度；治疗频率和并行治疗的类型(如果有的话)；以及化合物在有待治疗的动物中的清除率。本领域技术人员可基于上述因素确定适当的剂量。本文所述的组合物最初可以根据需要视临床反应来调节的合适的剂量施用。在一些实施方案中，组合物(例如，包括寡核苷酸的组合物)的剂量为预防或治疗有效量。

[0634] VI.试剂盒

[0635] 本发明还描述试剂盒，其包括(a)包括寡核苷酸剂的药物组合物，其造成本文所述的细胞或受试者的mRNA中的腺苷脱氨基，和(b)具有用于执行本文所述的任何方法的说明书的包装插页。在一些实施方案中，所述试剂盒包括(a)包括寡核苷酸剂的药物组合物，其造成本文所述的细胞或受试者的mRNA中的腺苷脱氨基，(b)额外的治疗剂，和(c)具有用于

执行本文所述的任何方法的说明书的包装插页。

[0636] 实施例

[0637] 一般方法

[0638] 所有导向寡核苷酸都使用标准β-氰基乙基亚磷酰胺化学品和通用的固体支撑体诸如可控孔度玻璃(CPG)在自动化RNA/DNA合成仪上以化学方式合成。阿拉伯糖苷、2'-脱氧-2'-氟-阿拉伯糖苷(FANA)、2'-O-甲基-阿拉伯糖苷、α-2'-脱氧胞苷、DNA-无碱基、RNA-无碱基和2'-O-甲基-无碱基的亚磷酰胺购自ChemGenes Corp.(Wilmington,MA)。RNA、2'-O-甲基-RNA和DNA单体(即A、C、G、U和T)的其他5'-O-DMT-3'-亚磷酰胺购自商业来源。所有寡核苷酸都由BioSpring GmbH(Frankfurt,Germany)以200nmol规模合成。合成之后,将寡核苷酸自固体支撑体上裂解下来,脱保护,并通过使用标准方案的HPLC系统进行纯化。将寡核苷酸脱盐、透析并冻干。如通过分析型逆相HPLC所测定,每种冻干的寡聚物的纯度≥95%。通过ESI-MS确定寡核苷酸的序列完整性。

[0639] 使用BamHI和XbaI限制位点(Quintara Bio,Berkeley,CA)将人ADAR2序列(NM_001112.4)在CMV启动子控制下克隆至pcDNA3.1质体中并且对正确的插入物进行序列验证。所述质体将在此后表示为ADAR2/pcDNA3.1。对于编辑实验,每10cm平皿使用25μL Lipofectamine 3000和24μL P3000(Life Technologies)和将2μg ADAR2/pcDNA3.1质体转染至5x10^6个HEK293T细胞(ATCC)中。4小时之后,向培养基中补充新鲜的温热培养基(DMEM High Glucose;Life Technologies)。转染之后12-16小时,用导向寡核苷酸转染经转染的HEK293T细胞以使得各孔中的最终浓度为100nM。所有转染均根据制造商说明书以96孔格式用Lipofectamine 3000(0.4μL/孔)进行。第二次转染之后12-16小时,用冰冷的PBS洗涤细胞一次并且使用适合于KingFisher Flex Purification(Life Technologies)的Dyna Beads mRNA Direct Kit(Life Technologies)根据制造商说明书进行总mRNA分离。洗脱之前,用TURBO DNA酶(Life Technologies)处理样品。使用SuperScript IV Vilo,根据制造商说明书(Life Technologies)将所生成的分离的mRNA用于cDNA合成。将1μl cDNA用作PCR(Platinum II Hot-Start PCR Master Mix;Life Technologies)的模板,使用基因特异性引物以生成用于Sanger测序(表5)的扩增子。通过Quintara Biosciences(Berkeley,CA)进行Sanger测序。通过测量腺苷和鸟苷的峰高并将鸟苷峰高除以腺苷与鸟苷组合的总峰高测量值来量化腺苷至鸟苷的编辑产率。

[0640] 表5.用于RT-PCR的引物

[0641]

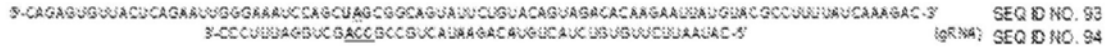
名称	序列(5'至3')	SEQ ID NO.
RAB7A 位点 1 正向	ACAGTATCCATTTATTATGTAATGCTTCTTAG	91

[0642]

RAB7A 位点 1 反向	TGAAAGGAGCGCCTTCTAGAAC	92

[0643] 实施例1:靶向人RAB7A 3'-UTR靶(UAG)的具有新颖核苷酸修饰的导向寡核苷酸的设计

[0644] 靶向人RAB7A(3'-UTR)的导向寡核苷酸:

[0645] 

[0646] 以下表6中显示靶向具有UAG三联体的人RAB7A的示例性修饰的导向寡核苷酸。在表6中，A、C、G和U为核糖核苷；加下划线且粗体的是中央三联体；mA、mC、mG和mU为2'-O-甲基核糖核苷；fC表示2'-脱氧'-2'-氟-阿糖胞苷(式I:R^1＝氟且N^1＝胞嘧啶)；fA表示2'-脱氧-2'-氟-阿糖腺苷(式I:R^1＝氟且N^1＝腺嘌呤)；aC表示阿糖胞苷(式I:R^1＝羟基且N^1＝胞嘧啶)；aA表示阿糖腺苷(式I:R^1＝羟基且N^1＝腺嘌呤)；amC表示2'-O-甲基-阿糖胞苷(式I:R^1＝甲氧基且N^1＝胞嘧啶)；amA表示2'-O-甲基-阿糖腺苷(式I:R^1＝甲氧基且N^1＝腺嘌呤)；αC表示α-2'-脱氧胞苷(式II:R^2＝氢且N^1＝胞嘧啶)；dS表示2'-脱氧核糖(无碱基DNA；式V:R^4＝氢且R^5＝氢)；rS表示核糖(无碱基RNA；式V:R^4＝氢且R^5＝羟基)；mS表示2'-O-甲基-核糖(无碱基2'-OMe-RNA；式V:R^4＝氢且R^5＝甲氧基)；并且星号指示硫代磷酸酯键(其余键为磷酸二酯键)。

[0647] 表6.靶向人RAB7A 3'-UTR靶(UAG)的导向寡核苷酸

[0648]

SEQ ID NO.	具有 20% 2'-O-甲基修饰的序列(5'至 3')	编辑 (%)	SD
51	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUG UACAGAAUACUGCCG**CCA**GCUGGAUmU*mU* mC*mC*mC-3'	22.35	7.42
52	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUG UACAGAAUACUGCCG**fCCA**GCUGGAUmU*mU *mC*mC*mC-3'	17.34	1.00
53	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUG	14.06	2.35

[0649]

	UACAGAAUACUGCCG**CfCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'		
54	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CCfA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	16.87	2.00
55	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CfCfA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	12.84	1.87
56	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**fCfCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	16.10	2.72
57	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**fCfCfA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	13.97	1.64
58	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**aCCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	17.08	3.85
59	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CaCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	19.33	2.32
60	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CCaA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	14.57	2.46
61	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**aCaCaA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	10.55	2.09
62	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**amCCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	22.71	3.27
63	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CamCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	19.24	3.38
64	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CCamA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	20.28	3.87
65	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CαCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	2.66	0.84
66	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CdSA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	13.50	1.91

[0650]

67	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUG UACAGAAUACUGCCG**CrSA**GCUGGAUmU*mU *mC*mC*mC-3'	5.81	1.12
68	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUG UACAGAAUACUGCCG**CmSA**GCUGGAUmU*m U*mC*mC*mC-3'	3.85	0.98
	具有 50% 2'-O-甲基修饰的序列(5'至 3')		
69	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCU ACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**CCA**mGmCUGmGmAUmU* mU*mC*mC*mC-3'	17.17	5.26
70	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCU ACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**fCCA**mGmCUGmGmAUmU *mU*mC*mC*mC-3'	17.41	2.86
71	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCU ACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**CfCA**mGmCUGmGmAUmU *mU*mC*mC*mC-3'	12.27	1.79
72	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCU ACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**CCfA**mGmCUGmGmAUmU *mU*mC*mC*mC-3'	13.83	3.18
73	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCU ACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**CfCfA**mGmCUGmGmAUm U*mU*mC*mC*mC-3'	13.24	6.58
74	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCU ACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**fCfCA**mGmCUGmGmAUm U*mU*mC*mC*mC-3'	17.08	4.78
75	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCU ACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**fCfCfA**mGmCUGmGmAUm U*mU*mC*mC*mC-3'	13.93	3.60
76	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCU ACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**aCCA**mGmCUGmGmAUmU *mU*mC*mC*mC-3'	16.04	3.61
77	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCU ACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**CaCA**mGmCUGmGmAUmU *mU*mC*mC*mC-3'	18.89	1.27

[0651]

78	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**CCaA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	16.30	3.40
79	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**aCaCaA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	11.30	3.38
80	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**amCCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	18.10	9.56
81	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**CamCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	14.30	1.81
82	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**CCamA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	17.36	5.27
83	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**CαCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	4.42	3.03
84	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**CdSA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	4.64	2.04
85	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**CrSA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	5.57	1.30
86	5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**CmSA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	4.07	0.80

[0652] 其他实施方案

[0653] 在本说明书中提及的所有公布、专利和专利申请以引用的方式全部并入本文中，其程度就如同每个单独的公布、专利或专利申请具体且单独地指明以引用的方式全部并入一般。当发现本申请中的术语与在以引用的方式并入本文中的文献中的定义不同时，以本文中提供的定义作为所述术语的定义。

[0654] 虽然本发明已结合其具体实施方案来描述，但应理解，本发明也能进行进一步的修改且本申请旨在包括本发明的任何改动、用途或改进，这是按照本发明的一般原理并且包括落在本发明所属领域的已知或常规实践内且可适用于以上所列基本特征且在权利要

求书的范畴内的本公开的这类偏离。