



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104254610 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 31

(21) 申请号 201380013752. 5

代理人 罗菊华

(22) 申请日 2013. 03. 12

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12N 15/63(2006. 01)

61/609, 774 2012. 03. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/030553 2013. 03. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/138353 EN 2013. 09. 19

(71) 申请人 桑塔里斯制药公司

地址 丹麦赫斯霍尔姆

(72) 发明人 N·乌斯卡特吉 M·黑特耶恩

J·B·R·海森

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

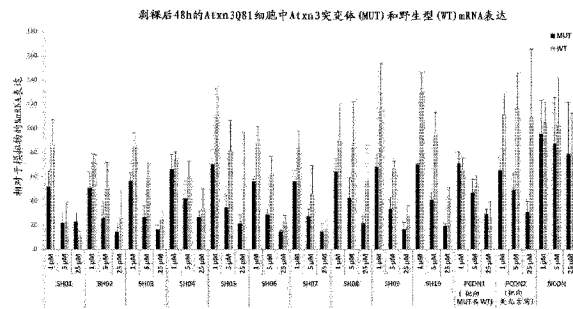
权利要求书7页 说明书49页 附图8页

(54) 发明名称

调节 ATXN3 表达的组合物和方法

(57) 摘要

公开的是寡核苷酸,其靶向及杂交于编码 ATXN3 的核酸分子,导致减少的 ATXN3 的表达。异常 ATXN3 的表达的减小有益于治疗特定医疗病症,诸如脊髓小脑共济失调 3。在特定实施方式中,调节异常 ATXN3 等位基因或转录物的表达,例如,恢复例如, Purkinje 细胞或脊髓神经元的正常功能。本发明的寡核苷酸和使用该寡核苷酸调节异常或伸展的 ATXN3 的表达的方法提供改善存活和关联于,或甚至治愈,异常 ATXN3 等位基因或转录物的表达的病态诸如,例如,3 型脊髓小脑共济失调 (SCA3) 的手段。



1. 寡核苷酸,其与包含 G987C 单核苷酸多态性的 SEQ ID NO:4 的区杂交,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。
2. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中寡核苷酸调节编码伸展的 ATXN3 的核酸的表达。
3. 权利要求 2 的寡核苷酸,其中寡核苷酸选自:SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 和 SEQ ID NO:23。
4. 权利要求 2 的寡核苷酸,其中寡核苷酸与选自下列的寡核苷酸具有至少 80% 同一性:SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12。
5. 权利要求 2 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是 14 个核苷酸长。
6. 权利要求 2 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是至少 15 个核苷酸长。
7. 权利要求 2 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是至少 16 个核苷酸长。
8. 权利要求 2 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是至少 18 个核苷酸长。
9. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中寡核苷酸能与包含 G987C 单核苷酸多态性的 SEQ ID NO:4 的区特异性地杂交。
10. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中调节减少 ATXN3 的表达至少约 50%。
11. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中调节减少 ATXN3 的表达至少约 75%。
12. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中调节减少 ATXN3 的表达至少约 90%。
13. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中寡核苷酸不与编码野生型 ATXN3 的核酸杂交。
14. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中寡核苷酸相对于野生型 ATXN3 的表达而优先调节伸展的 ATXN3 的表达。
15. 权利要求 9 的寡核苷酸,其中寡核苷酸抑制伸展的 ATXN3 的表达。
16. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中所述调节下调 ATXN3 的表达。
17. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中所述调节相对于伸展的 ATXN3 的表达而上调野生型 ATXN3 的表达。
18. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中寡核苷酸不与包含 SEQ ID NO:1 的核酸特异性杂交。
19. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中寡核苷酸不在第 987 位与包含 SEQ ID NO:1 的核酸杂交。
20. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中寡核苷酸与包含 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:6 的核酸杂交。
21. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中寡核苷酸还与相邻于 G987C 单核苷酸多态性的迭代 (CAG)_n 伸展的部分杂交。
22. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中寡核苷酸在包含 G987C 单核苷酸多态性的区与包含 SEQ ID NO:4 的核酸特异性杂交。
23. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中寡核苷酸在第 987 位与包含 SEQ ID NO:4 的核酸特异性杂交。
24. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是反义寡核苷酸。
25. 权利要求 24 的寡核苷酸,其中寡核苷酸选自:SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 和 SEQ ID NO:23。

26. 权利要求 24 的寡核苷酸,其中寡核苷酸包含至少一个选自下列的糖修饰的核苷酸:锁核酸(LNA)单元;2'-O-烷基-RNA 单元,2'-OMe-RNA 单元,2'-氨基-DNA 单元和 2'-氟-DNA 单元。

27. 权利要求 26 的寡核苷酸,其中寡核苷酸包含 2 个或更多 LNA 单体单元。

28. 权利要求 27 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是间隔聚体。

29. 权利要求 27 的寡核苷酸,其中 2 个或更多 LNA 单体单元彼此毗邻。

30. 权利要求 1 的寡核苷酸,其中 ATXN3 的表达的调节恢复神经元功能。

31. 权利要求 1 的寡核苷酸用于治疗与伸展的 ATXN3 的表达关联的病情的用途。

32. 权利要求 1 的寡核苷酸用于治疗脊髓小脑共济失调 3 的用途。

33. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:7,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。

34. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:8,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。

35. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:9,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。

36. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:10,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。

37. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:11,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。

38. 寡核苷酸,其在包含 G987C 单核苷酸多态性的区与包含 SEQ ID NO:4 的核酸杂交,其中寡核苷酸包含一个或更多 LNA 单体单元,且其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。

39. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是 14 个核苷酸长。

40. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是 15 个核苷酸长。

41. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是 16 个核苷酸长。

42. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中调节减少 ATXN3 的表达至少约 50%。

43. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中调节减少 ATXN3 的表达至少约 75%。

44. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中调节减少 ATXN3 的表达至少约 90%。

45. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中 ATXN3 包含突变的形式的 ATXN3。

46. 权利要求 45 的寡核苷酸,其中调节抑制突变的形式的 ATXN3 的表达。

47. 权利要求 46 的寡核苷酸,其中突变的形式的 ATXN3 是伸展的 ATXN3。

48. 权利要求 47 的寡核苷酸,其中寡核苷酸不调节野生型形式的 ATXN3 的表达。

49. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中寡核苷酸在包含 G987C 单核苷酸多态性的区与包含 SEQ ID NO:4 的核酸特异性杂交。

50. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中寡核苷酸与包含 SEQ ID NO:4 的片段的核酸杂交,其中片段包含核苷酸 987。

51. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中寡核苷酸在 G987C 单核苷酸多态性与包含 SEQ ID NO:4 的核酸特异性杂交。

52. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是反义寡核苷酸。

53. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中寡核苷酸包含 2 个或更多 LNA 单体单元。

54. 权利要求 53 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是间隔聚体。

55. 权利要求 53 的寡核苷酸,其中 2 个或更多 LNA 单体单元彼此毗邻。

56. 权利要求 38 的寡核苷酸,其中 ATXN3 的表达的调节恢复神经元功能。

57. 权利要求 38 的寡核苷酸用于治疗与异常 ATXN3 的表达关联的病情的用途。

58. 权利要求 57 的寡核苷酸的用途,其中与异常 ATXN3 的表达关联的病情是脊髓小脑

共济失调 3。

59. 对于治疗脊髓小脑共济失调 3 有用的寡核苷酸,其中寡核苷酸与包含 G987C 单核苷酸多态性的 SEQ ID NO:4 的区杂交,且其中寡核苷酸包含至少一个 LNA 单体单元。

60. 权利要求 59 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是 14 个核苷酸长。

61. 权利要求 59 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是 15 个核苷酸长。

62. 权利要求 59 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是 16 个核苷酸长。

63. 权利要求 59 的寡核苷酸,其中寡核苷酸下调 ATXN3 的表达,且其中 ATXN3 包含病原性聚 - 谷氨酰胺伸展。

64. 权利要求 59 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是反义寡核苷酸。

65. 对于治疗脊髓小脑共济失调 3 有用的寡核苷酸,其中寡核苷酸在包含 G987C 单核苷酸多态性的区与 SEQ ID NO:4 杂交,且其中寡核苷酸包含至少一个 LNA 单体单元。

66. 调节 ATXN3mRNA 的表达的方法,包括下列步骤:使 ATXN3mRNA 与权利要求 1 的寡核苷酸在对于 ATXN3mRNA 与寡核苷酸杂交适当的条件下接触,由此调节 ATXN3mRNA 的表达。

67. 权利要求 66 的方法,其中 ATXN3mRNA 编码病原性聚 - 谷氨酰胺伸展,且其中调节 ATXN3 的表达导致减少的 ATXN3 的表达。

68. 调节 ATXN3 的表达的方法,其中 ATXN3 包括病原性聚 - 谷氨酰胺伸展,其中方法包括使一种或更多编码 ATXN3 的核酸与权利要求 2 的寡核苷酸在对于一种或更多核苷酸与寡核苷酸杂交适当的条件下接触,由此调节 ATXN3 的表达。

69. 权利要求 68 的方法,其中调节 ATXN3 的表达导致减少的 ATXN3 的表达。

70. 治疗与异常 ATXN3 的表达关联的病情的方法,包括选择被诊断患该病情的受试者及给受试者施用权利要求 2 的寡核苷酸。

71. 治疗与异常 ATXN3 的表达关联的病情的方法,包括选择被诊断患该病情的受试者及给受试者施用权利要求 38 的寡核苷酸。

72. 寡核苷酸,其在包含 G987C 单核苷酸多态性的区与包含 SEQ ID NO:4 的核酸特异性杂交,其中寡核苷酸包含至少一个 LNA 单体单元,且其中寡核苷酸不与包含 SEQ ID NO:1 的核酸特异性杂交。

73. 药物组合物,其包含对于治疗脊髓小脑共济失调 3 有用的寡核苷酸,其中寡核苷酸在包含 G987C 单核苷酸多态性的区与包含 SEQ ID NO:4 的核酸杂交,且其中寡核苷酸包含至少一个 LNA 单体单元。

74. 权利要求 73 的药物组合物,其中寡核苷酸是反义寡核苷酸。

75. 权利要求 73 的药物组合物,其中组合物被配制用于脑室内施用。

76. 权利要求 73 的药物组合物,其中组合物被配制用于肠胃外施用。

77. 权利要求 73 的药物组合物,其中寡核苷酸通过在包含 G987C 单核苷酸多态性的区与包含 SEQ ID NO:4 的核酸杂交来调节 ATXN3 的表达。

78. 权利要求 77 的药物组合物,其中寡核苷酸不与包含 SEQ ID NO:1 的核酸杂交。

79. 权利要求 73 的药物组合物,其中寡核苷酸通过与包含 SEQ ID NO:4 的核酸在 G987C 单核苷酸多态性特异性杂交来调节 ATXN3 的表达。

80. 权利要求 79 的药物组合物,其中寡核苷酸不与包含 SEQ ID NO:1 的核酸特异性杂交。

81. 寡核苷酸,其调节 ATXN3 的表达,其中寡核苷酸包含 SEQ ID NO:12,且其中寡核苷酸包含至少一个 LNA 单体单元。

82. 约 14 ~ 20 个核苷酸长的寡核苷酸,其中寡核苷酸包含与包含 G987C 单核苷酸多态性的 SEQ ID NO:4 的区的反向互补体具有至少 80%同源性的核苷酸序列,或其天然存在的变体。

83. 权利要求 82 的寡核苷酸,其中连续的核苷酸序列与 SEQ ID NO:4 的反向互补体包含不多于一个错配,且其中错配不在第 987 位。

84. 权利要求 82 的寡核苷酸,其中核苷酸序列包含一个或更多核苷酸类似物。

85. 权利要求 84 的寡核苷酸,其中一个或更多核苷酸类似物是糖修饰的核苷酸。

86. 权利要求 85 的寡核苷酸,其中糖修饰的核苷酸选自:锁核酸(LNA)单元,2'-O-烷基-RNA 单元,2'-OMe-RNA 单元,2'-氨基-DNA 单元和 2'-氟-DNA 单元。

87. 权利要求 84 的寡核苷酸,其中一个或更多核苷酸类似物是 LNA。

88. 权利要求 82 的寡核苷酸,其中寡核苷酸选自:SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 和 SEQ ID NO:23。

89. 权利要求 82 的寡核苷酸,其中寡核苷酸是间隔聚体。

90. 权利要求 82 的寡核苷酸,其中寡核苷酸抑制表达 ATXN3mRNA 的细胞中 ATXN3mRNA 的表达,其中 ATXN3mRNA 编码病原性聚-谷氨酰胺伸展。

91. 权利要求 90 的寡核苷酸,其中 ATXN3mRNA 包含三-核苷酸重复(CAG)_n,其中“n”大于 52。

92. 权利要求 91 的寡核苷酸,其中“n”等于或大于 81。

93. 缀合物,其包含权利要求 82 的寡核苷酸和共价附接于寡核苷酸的至少一个非-核苷酸部分。

94. 药物组合物,其包含权利要求 82 的寡核苷酸和药学可接受的稀释剂,载体,盐或佐剂。

95. 权利要求 82 的寡核苷酸用于治疗脊髓小脑共济失调 3 的用途。

96. 治疗受脊髓小脑共济失调 3 影响的受试者的方法,所述方法包括给受试者施用权利要求 82 的寡核苷酸的步骤,使得脊髓小脑共济失调 3 的一个或更多目标症状改善。

97. 权利要求 96 的方法,其中目标症状选自:减少的痉挛状态,增加的肌张力及改善的步态。

98. 减少表达异常 ATXN3 的细胞中异常 ATXN3 的表达的方法,所述方法包括使所述细胞与权利要求 82 的寡核苷酸接触的步骤,使得异常 ATXN3 的表达减少。

99. 权利要求 98 的方法,其中 ATXN3 包含病原性聚-谷氨酰胺伸展。

100. 治疗患脊髓小脑共济失调 3 的哺乳动物的方法,所述方法包括给所述哺乳动物施用治疗有效量的靶向 ATXN3 的寡核苷酸,其中寡核苷酸与包含 G987C 单核苷酸多态性的 SEQ ID NO:4 的区杂交,其中寡核苷酸包括一个或更多 LNA 单元,且其中 ATXN3 包含病原性聚-谷氨酰胺伸展。

101. 权利要求 100 的方法,其中寡核苷酸包含选自下列的序列:SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 和 SEQ ID NO:23。

102. 权利要求 100 的方法,其中寡核苷酸肠胃外施用。
103. 权利要求 100 的方法,其中寡核苷酸静脉内施用。
104. 权利要求 100 的方法,其中寡核苷酸由推注施用于靶器官或组织。
105. 权利要求 100 的方法,其中寡核苷酸腹膜内施用。
106. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:19,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。
107. 权利要求 106 的寡核苷酸,其中寡核苷酸与编码 ATXN3 的核酸杂交而形成具有至少约 65°C 的解离 T_m 的双联的结构。
108. 权利要求 106 的寡核苷酸,其中 ATXN3 包含 G987C 突变,且其中调节 ATXN3 的表达包含抑制 ATXN3 的表达。
109. 权利要求 108 的寡核苷酸,其中寡核苷酸以约 0.3 ~ 约 81 μ M 之间的 IC_{50} 浓度抑制 ATXN3 的表达。
110. 权利要求 106 的寡核苷酸,其中寡核苷酸于 37°C,在血浆中稳定至少约 96 小时。
111. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:20,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。
112. 权利要求 111 的寡核苷酸,其中寡核苷酸与编码 ATXN3 的核酸杂交而形成具有至少约 60°C 的解离 T_m 的双联的结构。
113. 权利要求 111 的寡核苷酸,其中 ATXN3 包含 G987C 突变,且其中调节 ATXN3 的表达包含抑制 ATXN3 的表达。
114. 权利要求 113 的寡核苷酸,其中寡核苷酸以约 0.3 ~ 约 81 μ M 之间的 IC_{50} 浓度抑制 ATXN3 的表达。
115. 权利要求 111 的寡核苷酸,其中寡核苷酸于 37°C,在血浆中稳定至少约 96 小时。
116. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:21,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。
117. 权利要求 116 的寡核苷酸,其中寡核苷酸与编码 ATXN3 的核酸杂交而形成具有至少约 65°C 的解离 T_m 的双联的结构。
118. 权利要求 116 的寡核苷酸,其中 ATXN3 包含 G987C 突变,且其中调节 ATXN3 的表达包含抑制 ATXN3 的表达。
119. 权利要求 118 的寡核苷酸,其中寡核苷酸以约 0.3 ~ 约 81 μ M 之间的 IC_{50} 浓度抑制 ATXN3 的表达。
120. 权利要求 116 的寡核苷酸,其中寡核苷酸于 37°C,在血浆中稳定至少约 96 小时。
121. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:22,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。
122. 权利要求 121 的寡核苷酸,其中寡核苷酸与编码 ATXN3 的核酸杂交而形成具有至少约 60°C 的解离 T_m 的双联的结构。
123. 权利要求 121 的寡核苷酸,其中 ATXN3 包含 G987C 突变,且其中调节 ATXN3 的表达包括抑制 ATXN3 的表达。
124. 权利要求 123 的寡核苷酸,其中寡核苷酸以约 0.3 ~ 约 81 μ M 之间的 IC_{50} 浓度抑制 ATXN3 的表达。
125. 权利要求 121 的寡核苷酸,其中寡核苷酸于 37°C,在血浆中稳定至少约 96 小时。
126. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:23,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。
127. 权利要求 126 的寡核苷酸,其中寡核苷酸与编码 ATXN3 的核酸杂交而形成具有至少约 55°C 的解离 T_m 的双联的结构。

128. 权利要求 127 的寡核苷酸,其中 ATXN3 包含 G987C 突变,且其中调节 ATXN3 的表达包含抑制 ATXN3 的表达。

129. 权利要求 128 的寡核苷酸,其中寡核苷酸以约 0.3 ~ 约 81 μ M 之间的 IC_{50} 浓度抑制 ATXN3 的表达。

130. 权利要求 126 的寡核苷酸,其中寡核苷酸于 37°C,在血浆中稳定至少约 96 小时。

131. 寡核苷酸,其与包含 SEQ ID NO:18 的核酸杂交,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。

132. 权利要求 131 的寡核苷酸,其中寡核苷酸包含 SEQ ID NO:12。

133. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:12,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达。

134. 权利要求 133 的寡核苷酸,其中寡核苷酸包含至少一个核苷酸类似物,且其中核苷酸类似物是锁核酸。

135. 寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO:12,其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达,且其中寡核苷酸在一个或更多选自下列的位置包含至少一个核苷酸类似物:

(a) 在第 1 和 3 位的一个或更多的腺嘌呤核苷酸是氧基 -LNA;

(b) 在第 10 位的鸟嘌呤核苷酸是氧基 -LNA;

(c) 在第 9 和 11 位的一个或更多的胞嘧啶核苷酸是氧基 -LNA;以及

(d) 在第 2 位的胸腺嘧啶核苷酸是氧基 -LNA。

136. 权利要求 135 的寡核苷酸,其中在第 1 和 3 位的腺嘌呤核苷酸是 β -D-氧基 -LNA,其中在第 2 位的胸腺嘧啶核苷酸是 β -D-氧基 -LNA,其中在第 9 位的胞嘧啶核苷酸是 C5-甲基胞嘧啶,且其中全部核苷酸间连接基团是硫代磷酸酯核苷酸间连接基团。

137. 权利要求 135 的寡核苷酸,其中在第 1 位的腺嘌呤核苷酸是 β -D-氧基 -LNA,其中在第 9 位的胞嘧啶核苷酸是 C5-甲基胞嘧啶,且其中全部核苷酸间连接基团是硫代磷酸酯核苷酸间连接基团。

138. 权利要求 135 的寡核苷酸,其中在第 9 和 11 位的胞嘧啶核苷酸均是 C5-甲基胞嘧啶,其中在第 11 位的胞嘧啶核苷酸是 β -D-氧基 -LNA,且其中全部核苷酸间连接基团是硫代磷酸酯核苷酸间连接基团。

139. 权利要求 135 的寡核苷酸,其中在第 10 位的鸟嘌呤核苷酸是 β -D-氧基 -LNA,其中在第 11 位的胞嘧啶核苷酸是 β -D-氧基 -LNA,其中在第 9 和 11 位的胞嘧啶核苷酸均是 C5-甲基胞嘧啶,且其中全部核苷酸间连接基团是硫代磷酸酯核苷酸间连接基团。

140. 权利要求 135 的寡核苷酸,其中在第 9 和 11 位的胞嘧啶核苷酸均是 β -D-氧基 -LNA,其中在第 10 位的鸟嘌呤核苷酸是 β -D-氧基 -LNA,其中在第 9 和 11 位的胞嘧啶核苷酸均是 C5-甲基胞嘧啶,且其中全部核苷酸间连接基团是硫代磷酸酯核苷酸间连接基团。

141. 权利要求 135 的寡核苷酸,其中至少一个核苷酸是独立地选自下列的修饰的核碱基:5-甲基胞嘧啶,异胞嘧啶,假异胞嘧啶,5-溴尿嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶,6-二氨基嘌呤,2-二氨基嘌呤,肌苷,二氨基嘌呤和 2-氯-6-二氨基嘌呤胞嘧啶。

142. 权利要求 135 的寡核苷酸,其中氧基 -LNA 是 β -D-氧基 LNA。

143. 权利要求 135 的寡核苷酸,其中至少一个核苷酸间连接基团是硫代磷酸酯核苷酸间连接基团。

144. 权利要求 135 的寡核苷酸,其中全部核苷酸间连接基团是硫代磷酸酯核苷酸间连

接基团。

145. 权利要求 135 的寡核苷酸,其用作药物。

146. 权利要求 135 的寡核苷酸,其用于治疗 3 型脊髓小脑共济失调 (SCA3)。

147. 权利要求 1 的寡核苷酸,其用作药物。

148. 权利要求 1 的寡核苷酸,其用于治疗 3 型脊髓小脑共济失调 (SCA3)。

调节 ATXN3 表达的组合物和方法

【0001】 【相关申请】

【0002】 本申请要求 2012 年 3 月 12 日提交的美国临时申请 No. 61/609, 774 的优先权及权益。以上申请的整个教导通过引用并入本文。

【技术领域】

【0003】 本申请涉及靶向及杂交于核酸编码蛋白共济蛋白-3(ATXN3)的寡核苷酸及相关的药物组合物及使用寡核苷酸调节 ATXN3 的表达以治疗一系列医疗病症,诸如 3 型脊髓小脑共济失调(SCA3)的方法。

【背景技术】

【0004】 3 型脊髓小脑共济失调(SCA3),其也被称为 Machado-Joseph 病,是具有初现和严重性的变化的年龄的常染色体显性,进行性神经退行性病症。SCA3 原本描述于葡萄牙人后裔,及尤其是来自 SCA3 最普遍的亚速尔群岛(例如, Flores 小岛中 SCA3 的发生率是 1/140)(Sudarsky L., 等人, Clin. Neurosci. 1995 ;3:17-22)。SCA3 随后在几个其他国家被鉴定,及现在被认为是最常见的显性地遗传的遗传性共济失调。

【0005】 临床上,患 SCA3 的患者呈现进行性步态和肢共济失调,构音困难和其他症状包括锥体束征,张力失调,眼球运动病症,面舌虚弱,神经病变,进行性感觉损失和帕金森特征的可变的组合。以其更严重的形式,SCA3 特征在于锥体(例如,运动,躯体感觉)和锥体外束(例如,肌张力)神经功能的缺陷。在受影响的家族之内,此形式的共济失调也展示预期效应,其特征在于早先疾病初现和具有各新影响的代的更严重的症状。

【0006】 全部形式的 SCA3 归因于编码病原性聚-谷氨酰胺区的在染色体 14q32.1 上 ATXN3 的编码区中的 (CAG)_n 段或翻译的 ATXN3 蛋白中的段的不稳定和迭代遗传伸展(Kawaguchi Y., 等人, Nature Genet. 1994 ;8 :221 ~ 228)。ATXN3 的编码区中 (CAG)_n 段(及由此编码的病原性聚-谷氨酰胺段)的不稳定和迭代伸展造成蛋白错折叠的增加,其导致核和细胞质包裹体聚集和形成(Paulson HL, 等人, 1997, Neuron 19, 333 ~ 344)。错折叠的蛋白聚集物不仅是 SCA3 和 Machado-Joseph 病的特征,而且也是许多其他神经退行性疾病,包括阿尔茨海默病和帕金森病的常见的特征。

【0007】 对于治疗 SCA3 目前可利用的治疗方法被限制于症状性治疗,或主要基于锻炼及饮食改良的治疗方法。开发对于治疗 SCA3 适合的治疗剂的尝试中所做的努力靶向了 ATXN3 的编码区中的伸展的 (CAG)_n 段。但是,在许多实例中,该治疗无法有效抑制编码病原性聚-谷氨酰胺段的突变的或异常等位基因(相对于功能野生型等位基因)的表达。例如,国际申请 W02008/018795A1 和 W0/2009/099326A1 描述了通过设计互补于异常和野生型等位基因中的重复子序列,但可优先与表征异常等位基因的更可接近的临时开环结构杂交的寡核苷酸来靶向异常等位基因或编码聚-谷氨酰胺伸展的转录物的各种手段。类似地, Hu 等人 (Nat. Biotechnol. 2009 ;27 (5):478-484) 评价了是否寡聚体可部分基于表征各等位基因的结构差异来区别野生型和突变等位基因。SCA3 的等位基因-特异性沉默已

被 Miller 等人在小干扰 RNA- 介导的技术的情景中描述 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003 ; 100(12):7195-7200)。但是, Miller 等人总结出,野生型和突变的等位基因之间的单核苷酸差异可在此情景中不足以赋予等位基因特异性,除非遇到特定病情。

[0008] 由于患 SCA3 的患者无目前可利用的治愈法,需要进一步开发以鉴定调节编码 ATXN3 的核酸的表达及抑制,抑制,预防或减少包括病原性聚-谷氨酰胺伸展的 ATXN3 的表达的新疗法作为治愈手段,或至少改善人中与 SCA3 关联的症状,及存活和病态。特别需要的是能相对于功能野生型等位基因,辨别性地有效靶向编码病原性聚-谷氨酰胺段的突变的或异常等位基因的新反义治疗法。

[0009] 【发明概述】

[0010] 在本文提供的是新寡核苷酸,特别锁核酸(LNA)反义寡核苷酸,及对于治疗与异常,突变的或伸展的 ATXN3 的表达关联的疾病(例如,3型脊髓小脑共济失调或 Machado-Joseph 病)有用的治疗性干预。本文公开的发明涉及这样的发现,使表达突变的或异常 ATXN3 等位基因的细胞或组织与本发明的寡核苷酸接触调节该 ATXN3 的表达,及尤其是调节 ATXN3 的突变的或天然存在的变体(例如,被表征为具有病原性,伸展的聚-谷氨酰胺段的 ATXN3)的表达。在特定实施方式中,调节异常 ATXN3 等位基因或转录物的表达,例如,恢复例如, Purkinje 细胞或脊髓神经元的正常功能。本发明的寡核苷酸和使用该寡核苷酸调节异常或伸展的 ATXN3 的表达的方法提供改善存活和关联于,或甚至治愈,异常 ATXN3 等位基因或转录物的表达的病态诸如,例如,3型脊髓小脑共济失调(SCA3)的手段。在特定实施方式中,本发明的寡核苷酸,当施用于患 SCA3 的受试者时,导致 SCA3 症状的改善或消退(例如,步态和肢共济失调,构音困难,锥体束征,张力失调,眼球运动病症,面舌虚弱,神经病变,进行性感觉损失,昏睡和帕金森特征的改善)。

[0011] 一方面,本文公开的发明涉及与 ATXN3 靶序列(例如,哺乳动物 ATXN3 或由此编码的 mRNA 序列)杂交的约 8~约 50 个核苷酸长的寡核苷酸。在特定方面,该寡核苷酸与具有足够的稳定性(例如,具有足够的杂交强度及持续足够的时间)的 ATXN3 靶序列杂交而抑制或另外调节 ATXN3 基因产物(例如,被表征为具有伸展的病原性聚-谷氨酰胺段的 ATXN3 蛋白)的表达。在本文描述了对于此目的和其他目的特别适合的寡核苷酸。

[0012] 一方面,本发明提供约 8~约 50 个核苷酸长(例如,约 8~30,8~20,12~18,或 14~16 个核苷酸长)的寡核苷酸,其包含与对应于哺乳动物 ATXN3 基因的编码区的反向互补体或编码 ATXN3 的 mRNA 的补体的区具有至少 80%同一性(例如,至少约 85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或 100%同一性)的约 8~约 30 个核苷酸(例如,约 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29 或 30 个核苷酸长)的连续的核苷酸序列(第 1 区)。例如,本发明的寡核苷酸可包含是至少 80%互补于编码 ATXN3 的部分核酸序列(例如,至少 80%互补于编码 ATXN3DNA,前-mRNA 或 mRNA 的部分核酸序列)的连续的核苷酸序列。本文公开的寡核苷酸可包含互补于突变的 ATXN3 基因的区域或由此编码的对应 mRNA 的核酸序列。类似地,本文公开的寡核苷酸可包含这样的序列,其互补于 ATXN3 基因的基因产物(例如,由 ATXN3 基因编码的 mRNA)或其编码突变的多态型或天然存在的变体,诸如编码病原性聚-谷氨酰胺伸展(CAG)_n 的区及例如包含 G987C 单核苷酸多态性,例如由 SEQ ID NO:4 编码的区,或其天然存在的变体(例如,由 NM_004993.5 编码的转录物变体或单核苷酸多态性诸如 SNP ID rs12895357)。尤其是,本文

所述的寡核苷酸可至少 80% 互补（例如，至少约 85%，90%，95%，96%，97%，98%，99% 或更高互补）于编码 ATXN3 基因或 mRNA 的突变的区，诸如编码聚 - 谷氨酰胺伸展突变的区和编码病原性聚 - 谷氨酰胺伸展区的区的立即上游和 / 或下游（例如，自聚 - 谷氨酰胺伸展区的位置约 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 个或更多核苷酸上游和 / 或下游）区的核酸序列。

[0013] 在另一方面，本发明提供包含约 8 ~ 约 20 个核苷酸的寡核苷酸，其中寡核苷酸与编码 ATXN3 的核酸（例如，ATXN3mRNA）的至少 8- 核碱基部分杂交。例如，在本发明的一些实施方式中，寡核苷酸与编码聚 - 谷氨酰胺伸展区的核酸（即，mRNA），或与毗邻于和 / 或相邻于编码聚 - 谷氨酰胺伸展区（例如，位于病原性 (CAG)_n 伸展的一个核苷酸下游或 3' 侧及在本文被称为“G987C” SNP 或突变的 G → C 单核苷酸多态性）的核酸的区杂交。在一些实施方式中，寡核苷酸互补于编码 ATXN3 的核酸分子的单链区，诸如，例如具有部分 SEQ ID NO:4 的序列的核酸分子区或其天然存在的变体（例如，SNP ID rs12895357）。

[0014] 在一些实施方式中，要求保护的寡核苷酸包含互补于编码 ATXN3mRNA 的 DNA 序列或其部分的序列，或替代性地，要求保护的寡核苷酸与由此编码的 RNA 序列（例如，前 -mRNA 或其 mRNA）或其部分杂交。当与靶向的细胞或组织（例如，受本文公开的 SCA3 影响的或患受本文公开的 SCA3 的患者的中枢神经系统的神经元或其他组织）接触时，寡核苷酸可减少 ATXN3 的表达（及尤其是减少突变的或异常 ATXN3 的表达），由此恢复神经元功能。例如，本发明的寡核苷酸可靶向，及在特定实施方式中，杂交于编码突变的或异常 ATXN3 的核酸（例如，mRNA），诸如，例如，包含或由 SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 和 / 或 SEQ ID NO:18 编码的 mRNA，或上述任何一个特定部分或区（例如，编码病原性聚 - 谷氨酰胺伸展的区）和由此调节 ATXN3 的表达，使得表达减少和 / 或抑制至少约 10%，20%，25%，35%，40%，50% 或优选至少 60%，65%，70%，75%，85%，90%，95%，99% 或 100%。

[0015] 在仍另一方面，本发明提供组合物，其包含寡核苷酸诸如本文所述的那些。在一些实施方式中，组合物可包括药物组合物，其包含一种或更多本文所述的寡核苷酸以及一种或更多药学可接受的赋形剂，佐剂或其他分子，以辅助或改善组合物的递送或稳定性。在一些实施方式中，发明提供缀合物，其包含一种或更多本文所述的寡核苷酸及与之附接（例如，共价或非 - 共价附接于所述寡核苷酸）的至少一个非 - 核苷酸或非 - 多核苷酸部分。本文公开的也是寡核苷酸和包含所述寡核苷酸的缀合物和药物组合物，其用作药物，诸如用于治疗与异常 ATXN3 的表达关联的疾病（例如，共济失调该 SCA3 和 Machado-Joseph 病），及通过给哺乳动物受试者，例如，人受试者诸如小儿人受试者（出生之前或之后）或成年人受试者施用本文所述的寡核苷酸、缀合物和 / 或药物组合物来治疗该疾病的方法。

[0016] 在另一方面，发明提供寡核苷酸或其缀合物用于制备治疗 SCA3 的药物的用途。也被本发明涵盖的是本文所述的寡核苷酸（例如，与 SEQ ID NO:4 的区或包含 G987C 单核苷酸多态性的 SNP ID rs12895357 杂交的寡核苷酸）作为药物的用途。类似地，在本文提供的是本文所述的寡核苷酸（例如，与编码或相邻于 ATXN3 聚 - 谷氨酰胺伸展段的 mRNA 杂交的寡核苷酸）用于治疗疾病诸如 SCA3 的用途。本发明也提供治疗与编码突变的或异常 ATXN3 的核酸的表达关联的疾病或病情，诸如 SCA3 或 Machado-Joseph 病的方法，所述方法

包括以下步骤:将有效量的本发明的寡核苷酸、缀合物和/或药物组合物施用于患 SCA3,可能患 SCA3 或另外受 SCA3 影响或患 SCA3 的受试者(例如,诸如患或敏感于 SCA3 的人类小儿或成年患者)。在一些实施方式中,与异常 ATXN3 的表达关联的疾病,病症或病情涉及 ATXN3 的过表达,及尤其是突变的或伸展的 ATXN3(例如,包含 (CAG)_n 段的不稳定和/或迭代遗传病原性伸展的 ATXN3,其中“n”等于或大于 52)的过表达。在一些实施方式中,本文所述的寡核苷酸、缀合物和药物组合物优先调节 ATXN3 突变体,多态型或天然存在的变体,诸如例如包含病原性聚-谷氨酰胺伸展 (CAG)_n 的 ATXN3 突变体,多态型或天然存在的变体(例如,由 SEQ ID NO:4 或 SNP ID rs12895357 编码的)的表达。由本发明的寡核苷酸的该 ATXN3 突变体,多态型或天然存在的变体的表达的优先调节可在性质上相对于野生型 ATXN3 的表达(例如,由 SEQ ID NO:1 编码的)为部分或绝对的。例如,当施用于患(杂合)SCA3 的患者时,本发明的寡核苷酸可靶向编码野生型 ATXN3 等位基因的 mRNA 和编码突变的或伸展的 ATXN3 等位基因的 mRNA,但是该寡核苷酸可调节各靶的表达至改变的程度,使得,例如,相比野生型 ATXN3 等位基因的表达,伸展的 ATXN3 等位基因的表达被调节至更大程度。本发明的寡核苷酸可,例如,靶向及减少突变的 ATXN3 变体或包含 G987C 转变取代的多态型(例如,ATXN3 变体或包含由 SEQ ID NO:4, 5 或 6 编码的序列的多态型)的表达 2, 4, 8, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 200 倍或更多倍;而相同的寡核苷酸分别减少野生型 ATXN3(例如,如由 SEQ ID NO:1 编码的)的表达 1, 2, 4, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100 倍或更多倍。类似地,本发明的寡核苷酸可,例如,靶向及减少包含病原性聚-谷氨酰胺区的突变的 ATXN3 多态型或变体(例如,如由 SEQ ID NO:4 或 SNP ID rs12895357 编码的)的表达约 1%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 35%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 或更多;而相同的寡核苷酸减少野生型 ATXN3(例如,如由 SEQ ID NO:1 编码的)的表达约 1%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 35%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80% 或 90%。本文公开的也是相对于编码有功能的或野生型 ATXN3 的核酸,可辨别地靶向和/或杂交(例如,特异性杂交)于编码突变的或伸展的 ATXN3 的核酸的寡核苷酸。例如,在患 Machado-Joseph 病的患者中,本发明的寡核苷酸可相对于有功能的或野生型 ATXN3 等位基因的表达,靶向及减少突变的或伸展的 ATXN3 等位基因的表达约 1%, 2.5%, 5%, 10%, 20%, 35%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 或更多。或者,本发明的寡核苷酸可增加野生型 ATXN3 基因产物或 mRNA 的表达(例如,在受 SCA3 影响的小儿患者中)而减少和/或抑制突变的 ATXN3 基因产物或 mRNA 的表达。在一些实施方式中,本文公开的寡核苷酸、缀合物和药物组合物减少或另外抑制突变的 ATXN3 的表达(例如,由优先靶向及杂交于患 SCA3 的患者的等位基因中编码 ATXN3 病原性 (CAG)_n 伸展和/或 G987C 单核苷酸多态性的核酸(例如, mRNA)),而不影响或最低限度影响不编码突变的 ATXN3 的表达。

[0017] 在一些实施方式中,本文公开的寡核苷酸杂交(例如,特异性杂交)于 ATXN3 的基因产物(即, mRNA),例如,由包含病原性 (CAG)_n 突变或伸展的突变的 ATXN3 多态型或变体编码的 mRNA 基因产物(例如,如由 SEQ ID NO:4 或 SNP ID rs12895357 编码的)。在其他实施方式中,寡核苷酸与编码突变的或伸展的 ATXN3 多态型或变体的核酸的基因产物(例如, mRNA)杂交,其中编码该 ATXN3 多态型的核苷酸包含病原性 (CAG)_n 突变或区(例如,病原性 (CAG)_n,其中“n”等于 81)。在其他实施方式中,本发明的寡核苷酸可与编码突变的 ATXN3 多态型或变体的核酸(即, mRNA)的基因产物(例如,如由 SEQ ID NO:4 或

SNP ID rs12895357 编码的) 特异性杂交, 而相同的寡核苷酸不与编码野生型 ATXN3 的核酸(即, mRNA) 的基因产物(例如, 如由 SEQ ID NO:1 编码的) 特异性杂交。寡核苷酸与编码伸展的或突变的 ATXN3 多态型的核酸的该优先或辨别杂交可调节伸展的或突变的基因产物的表达, 而野生型 ATXN3 基因产物的表达保守或另外保持未变化。例如, 本发明的寡核苷酸可靶向和优先杂交于由包含 SEQ ID NO:15 ~ 20 的核酸编码的 mRNA(或其片段), 使得由该 mRNA 编码的蛋白的表达被减少和/或抑制至少约 10%, 20%, 25%, 35%, 40%, 50% 或优选至少 60%, 65%, 70%, 75%, 85% 或最优选至少 90%, 95%, 99% 或 100%。

[0018] 在一些实施方式中, 本发明的寡核苷酸与编码人 ATXN3 的核酸(例如, mRNA)(例如, 由登录号 No. NM_004993 编码的 ATXN3mRNA, 包括任何其变体和多态型) 杂交。例如, 本发明的寡核苷酸可靶向及杂交于人 ATXN3mRNA(例如, 如由 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:4 编码的)。也涵盖的是优先与一种或更多靶序列杂交的寡核苷酸, 其中该靶序列包含 ATXN3mRNA(例如, 包含 SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:18 之一或多个的靶序列)。本发明的寡核苷酸可优选与包含病原性 (CAG)_n 突变, 伸展的人 ATXN3mRNA 或其片段(例如, 由登录号 No. NM_004993 编码的 ATXN3mRNA) 杂交, 由此调节靶向的人 ATXN3 的表达。或者, 相同的寡核苷酸可与编码 ATXN3 多态型的核酸特异性杂交, 其编码病原性 (CAG)_n 突变或伸展, 但无法在相同的或近似严格度条件下与编码缺乏或不另外编码该病原性 (CAG)_n 突变或伸展的人物种的野生型的核酸杂交。

[0019] 也提供的是抑制核酸编码突变的, 伸展的或异常 ATXN3 的表达的方法, 及尤其是抑制表达突变的或伸展的 ATXN3 的细胞(例如, Purkinje 细胞或神经元) 中编码突变的, 伸展的或异常 ATXN3 基因的该核酸的基因产物(例如, 编码伸展的 ATXN3 的 mRNA) 的产生(例如, 转录或翻译) 的方法。在一些实施方式中, 所述方法包括给患者施用本发明的寡核苷酸、缀合物或药物组合物, 或另外使细胞或组织与该寡核苷酸, 缀合物或药物组合物接触, 以抑制该患者或细胞中 ATXN3(例如, 包含病原性聚-谷氨酰胺伸展的 ATXN3) 的表达。

[0020] 也公开的是约 8 ~ 50 个单体的寡核苷酸, 其包含约 8 ~ 50 个连续的单体(例如, 核苷酸) 的第 1 区, 其中该第 1 区的序列是至少 80% 同一(例如, 至少 85%, 至少 90%, 至少 95%, 至少 99% 同一) 于一种或更多选择的靶序列(例如, 包含编码突变的或伸展的 ATXN3 的 mRNA 的靶序列)。在一些实施方式中, 选择的靶序列可包含编码哺乳动物 ATXN3(例如, mRNA) 的核酸或其片段的区。还提供的是锁的反义寡核苷酸, 例如, 8 ~ 50, 12 ~ 30 或 12 ~ 20 个核苷酸长。例如, 在一些实施方式中, 寡核苷酸包含一个或更多锁核酸(LNA) 残基或单体单元(例如, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:23)。当本发明的寡核苷酸包含 2 个或更多 LNA 单体单元(例如, 2 或更多 β -D-氧基-LNA 单体单元) 时, 该 LNA 单体单元可彼此毗邻, 或替代性地该 LNA 单体单元可在彼此非-连续的位置。在特定实施方式中, 本文公开的寡核苷酸是间隔聚体。例如, 在本文公开的是反义寡核苷酸, 其包含 SEQ ID NO:12, 其中寡核苷酸调节 ATXN3 的表达, 且其中寡核苷酸在一个或更多选自下列的核苷酸包含至少一个锁核酸: 其中所述寡核苷酸调节 ATXN3 的表达, 且其中所述寡核苷酸在一个或更多选自下列的位置包含至少一个核苷酸类似物: (i) 在第 1 和 3 位的一个或更多的腺嘌呤核苷酸是氧基-LNA; (ii) 在第 10 位的鸟嘌呤核苷酸是氧基-LNA; (iii) 在第 9 和 11 位的一个或更多的胞嘧啶核苷酸是氧基-LNA;

及 (iv) 在第 2 位的胸腺嘧啶核苷酸是氧基 -LNA。

[0021] 任选地, 该锁的反义寡核苷酸可包含一个或更多糖取代, 诸如例如, 2'-O- 甲氧基乙基糖取代。本文提供的也是包含一种或更多本发明的寡核苷酸的缀合物, 其中该寡核苷酸包含至少一个共价附接于本发明的寡核苷酸的非 - 核苷酸或非 - 多核苷酸部分。

[0022] 也提供的是药物组合物, 其包含一种或更多本发明的寡核苷酸或缀合物, 及药学可接受的稀释剂, 载体, 盐, 溶剂或佐剂。也提供的是药物组合物, 其包含一种或更多本发明的寡核苷酸。该药物组合物可例如, 肠胃外通过注射或直接输注到靶作用位点来施用, 或可通过吸入, 腹膜, 局部, 经口或鞘内施用。

[0023] 还提供的是在细胞或组织中下调编码突变的或异常 ATXN3 的等位基因或核酸的表达 (例如, 在 mRNA 水平下调伸展的 ATXN3 的表达), 及尤其是下调 ATXN3 的突变体或天然存在的变体的表达的方法。该方法包括使细胞或组织与有效量的一种或更多本发明的寡核苷酸、缀合物或组合物体外或体内接触。在一些实施方式中, 本发明的寡核苷酸和组合物能下调哺乳动物 (例如, 患 SCA3 或另外受 SCA3 影响的人患者) 中突变的, 伸展的或异常 ATXN3 等位基因的表达, 而不调节或另外最低限度影响正常有功能的或野生型等位基因的表达。

[0024] 也公开的是通过给动物施用治疗或预防性地有效量的一种或更多本文所述的寡核苷酸、缀合物或药物组合物来治疗疑患或敏感于与伸展的或异常 ATXN3 的表达或过表达关联的疾病或病情的动物 (例如, 非 - 人动物或人) 的方法。此外, 在本文提供的是使用寡核苷酸抑制突变的或异常 ATXN3 (例如, ATXN3 的突变的或天然存在的变体) 的表达的方法。

[0025] 也提供的是治疗与异常 ATXN3 的表达关联的病情 (例如, 共济失调诸如 SCA3 和 Machado-Joseph 病) 的方法和恢复细胞 (例如, 神经元) 功能的方法。该方法包括向表达 ATXN 的异常等位基因的受影响的细胞 (例如, 神经元或 Purkinje 细胞) 递送或接触一种或更多本发明的寡核苷酸。要求保护的方法将寡核苷酸导入神经元细胞 (例如, 转染或剥裸递送) 的条件足以减少受影响的细胞中异常 ATXN3 等位基因的表达, 由此恢复正常细胞功能。在一些实施方式中, 该方法优先减少包含 G987C 单核苷酸多态性的伸展的 ATXN3 多态型或天然存在的变体的表达。本发明提供治疗疾病诸如 SCA3 和 Machado-Joseph 病的方法, 所述方法包括给有需求的患者 (例如, 人类受 SCA3 影响的小儿患者) 施用有效量的一种或更多寡核苷酸, 缀合物或其药物组合物。本发明提供抑制 (例如, 通过下调) 细胞或组织中突变的或异常 ATXN3 的表达的方法, 所述方法包括以下步骤: 使细胞或组织与有效量的一种或更多本文公开的寡核苷酸或其缀合物或药物组合物接触, 由此下调突变的或异常 ATXN3 等位基因的表达 (例如, 在 mRNA 水平)。

[0026] 以上讨论的, 及本发明的许多其他特征和伴随优势会通过引用以下本发明的详述结合伴随的实施例而变得更佳明晰。

【附图说明】

[0027] 图 1A 和 1B 例证经历了用互补于包括 G987C 单核苷酸多态性的伸展的 ATXN3 等位基因区的部分的寡核苷酸 (来自 ATXN3mRNA 的病理性 (CAG)_n 伸展的一个核苷酸) 48 小时的剥裸处理的 HEK-293 细胞中的 FLAG- 标记的突变体 (MUT) 报告子构建体和野生型 (WT) 内

源性表达报告子构建体水平。将 HEK-293 细胞用包含与萤火虫萤光素酶转录物融合的具有 G987C SNP 和 81 个 (CAG) 重复子的突变的 ATXN3 转录物的编码区的 pFLAG-ATX3Q81-FL-FF 萤光素酶报告子构建体稳定地转染, 并通过在 $1\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{M}$ 和 $25\ \mu\text{M}$ 的培养基浓度剥裸而将寡核苷酸随后导入转染的细胞。然后在 48 小时之后收获细胞, 并通过使用关联 qPCR 测定 mRNA 表达的百分率。结果表示为模拟物 - 治疗的样品的百分率, 及报道为每寡核苷酸 3 次独立研究的平均。描绘的误差条指示标准偏差。如在图 1A 和 1B 中所示, 20 种寡核苷酸展示具有相对于内源性 WT 报告子的显著的剂量应答的 MUT 报告子构建体的稳健的敲落。

[0028] 图 2A 和 2B 显示 12 种选择的寡核苷酸的剥裸递送后, ATXN3-Q81 转染的 HEK-293 细胞中伸展的 ATXN3 转录物 (MUT) 和内源性 ATXN3 (WT) mRNA 的表达。将结果标准化到内源性 GAPDH 水平及表示为模拟物处理的样品的百分率。将寡核苷酸由剥裸, 使用具有 $0.3\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$, $3\ \mu\text{M}$, $9\ \mu\text{M}$, $27\ \mu\text{M}$ 和 $81\ \mu\text{M}$ 的终浓度的培养基导入细胞。然后在寡核苷酸的剥裸递送之后 48 小时收获细胞, 及提取突变的 ATXN3 转录物 (报告子构建体) 和内源性 ATXN3 转录物的 mRNA 及由 qPCR 分析。结果报道为每寡核苷酸 3 次独立研究的平均值, 和误差条指示标准偏差。如显示于图 2A 和 2B, 评价的全部 12 种寡核苷酸被发现在评价的浓度范围产生 MUT 报告子构建体 (相对于 WT 报告子构建体) 的剂量 - 依赖性敲落。

[0029] 图 3 例证被选择为领先的及被设计为互补于包括位于自 ATXN3mRNA 的病理性 (CAG)_n 伸展一个核苷酸的 G987C 单核苷酸多态性的伸展的 ATXN3 等位基因的区的部分的 5 种寡核苷酸的半最大抑制性浓度 (IC_{50}) 曲线。将 HEK-293 细胞用包含与萤火虫萤光素酶转录物融合的具有 G987C SNP 和 81 个 (CAG) 重复子的突变的 ATXN3 转录物的编码区的 pFLAG-ATX3Q81-FL-FF 萤光素酶报告子构建体稳定地转染, 并通过使用具有 $0.3\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$, $3\ \mu\text{M}$, $9\ \mu\text{M}$, $27\ \mu\text{M}$ 和 $81\ \mu\text{M}$ 的终浓度的培养基剥裸而将寡核苷酸随后导入转染的细胞。然后在寡核苷酸的剥裸递送之后 48 小时收获细胞, 及提取突变的 ATXN3 转录物 (报告子构建体) 和内源性 ATXN3 转录物的 mRNA, 并由 qPCR 分析。标绘的数据点表示 3 次独立实验的平均报告子信号, 和误差条表示标准偏差。灰色曲线 (◆) 表示野生型 (WT) 报告子的拟合的应答曲线, 和黑色曲线 (▲) 表示伸展的或突变体 (MUT) 报告子的拟合的应答曲线。各曲线的对应 IC_{50} 值显示在各图上, 和 5 个选择的领先的寡核苷酸的实际值也报道于表 2。

[0030] 图 4 例证互补于包括位于自 ATXN3mRNA 的病理性 (CAG)_n 伸展一个核苷酸的 G987C 单核苷酸多态性的伸展的 ATXN3 等位基因的区的部分的各 12 种寡核苷酸的稳定性。将各寡核苷酸于 37°C , 在含添加的脑组织的脑脊液中温育 120 小时。在 0, 24, 48, 96 和 120 小时取样品, 及由 SDS-PAGE 分析。各 12 种寡核苷酸的血浆稳定性被发现在预期的范围之内良好, 且尤其是, 全部寡核苷酸被发现具有大于 96 小时的总体半衰期, 和多数寡核苷酸未产生任何可感觉到的降解产物。

[0031] 图 5A 和 5B 显示 16 天体内耐受性研究的结果, 其中将互补于包括及邻接编码 G987C 单核苷酸多态性的核苷酸的区的部分的寡核苷酸在第 0, 3, 7, 10 和 14 天施用于小鼠。在第 16 天处死小鼠及评价。对照施用盐水对照。结果报道为每寡核苷酸 5 次独立研究的平均值, 和误差条指示标准偏差。如显示于图 5A 和 5B, 相对于盐水对照, 5 种选择的寡核苷酸 (SH06, SH10, SH13, SH16 和 SH20, 它们分别对应于 SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22 和 23) 导致肝酶丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 的可忽略的升高。

[0032] 【发明详述】

[0033] 本文所述的寡核苷酸提供能调节 ATXN3 的表达的特定治疗性工具。在一些实施方式中,本文所述的短(例如,通常的少于 50, 40, 30, 20, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 个或更少核苷酸长)单链合成寡核苷酸具有互补于 ATXN3RNA 靶序列(例如,前-mRNA 或 mRNA)的碱基序列,及由氢键合的碱基配对形成杂交体双联体。例如,在本发明的一些实施方式中,寡核苷酸可靶向或互补于编码 ATXN3 的核酸(例如,编码 ATXN3 的 mRNA)或其片段(例如,SEQ ID NO:5 或 6),由此调节 ATXN3 的表达。在其他实施方式中,本发明的寡核苷酸(例如,锁核酸间隔聚体)可通常由切割作用模式或空间阻断加工前-mRNA 或 mRNA 的翻译中涉及的酶来工作。此杂交可被预期预防表达,(即,靶 mRNA 代码翻译为其蛋白产物)由此排除随后蛋白产物的效应。因此,本文所述的寡核苷酸和方法可用于改善或治疗一种或更多与异常 ATXN3 的表达关联的病情(例如,疾病或综合征),例如,共济失调该 3 型脊髓小脑共济失调(SCA3)。

[0034] SCA3(也被称为 Machado-Joseph 病)是具有初现和严重性的可变年龄的常染色体显性,进行性神经退行性病症。SCA3 由编码共济蛋白-3 的核酸中病原性(CAG)_n三核苷酸伸展导致,其导致 ATXN3 蛋白中聚-谷氨酰胺结构域或段的伸展。SCA3 原本描述于葡萄牙人后裔,及尤其是来自 SCA3 和 Machado-Joseph 病是最普遍的亚速尔群岛(例如,在 Flores 小岛,SCA3 的发生率是 1/140)。(Sudarsky L., 等人, Clin. Neurosci. 1995 ;3:17-22)。SCA3 随后在其他几个国家被鉴定,及现在被认为是最常见的显性地遗传的遗传性共济失调。

[0035] 临床,SCA3 和 Machado-Joseph 病呈现进行性步态和肢共济失调,构音困难和其更严重的形式的其他症状的可变的组合,包括锥体束征,张力失调,昏睡,眼球运动病症,面舌虚弱,神经病变,进行性感觉得失和帕金森特征,SCA3 特征在于锥体(例如,运动,躯体感觉),锥体外束(例如,肌张力)和神经功能缺陷。在受影响的家族之内,此形式的共济失调也展示预期效应,其特征在于早先疾病初现和随各新的受影响的代的更严重的症状。

[0036] 如同临床特征,成为基础的 SCA3 中退行性变化以一些程度改变。在中枢神经系统之中,经历神经元损失和反应性星形胶质化的区是选择的端脑,小脑和脑干核,脊髓前角,Clarke 氏柱和背根神经节。(Durr A, 等人, Ann Neurol 1996 ;39 :490-9)。SCA3 的分子发病机制仍是推测性的,由于对 ATXN3 的正常功能知之甚少,但是全部形式的 SCA3 归因于染色体 14q32.1 上 ATXN3 的编码区中(CAG)_n段的不稳定和迭代遗传伸展。(Kawaguchi Y., 等人, Nature Genet. 1994 ;8 :221 ~ 228)。

[0037] ATXN3 是聚泛素-结合蛋白,其生理学功能已连系到泛素-介导的蛋白水解。(Doss-Pepe EW, Mol. Cell. Biol. 2003 ;23:6469 - 6483)。编码 ATXN3 的核酸中伸展的(CAG)_n突变的存在在 ATXN3 蛋白的 C-端区导致长聚-谷氨酰胺链,及其在本文被称为“聚-谷氨酰胺伸展”或“聚-谷氨酰胺段”。(Durr A, 等人, Ann Neurol 1996 ;39 :490-9)。如本文所用,术语“伸展的”指称存在聚-谷氨酰胺伸展(例如,具有(CAG)_n的伸展的等位基因,其中 n 大于 52)。聚-谷氨酰胺伸展增加蛋白错折叠,其导致核和细胞质包裹体的聚集和形成。(Paulson HL, 等人, 1997, Neuron 19, 333 ~ 344)。聚-谷氨酰胺伸展也与 Purkinje 细胞和脊髓神经元中有害泛素化的核聚集物和包裹体的形成关联。错折叠的蛋白聚集物不仅是 SCA3 的特征,而且也是许多其他神经退行性疾病,包括阿尔茨海默病和帕金森病的常见的特征。

[0038] 因为 SCA3 的显性遗传模式,及因为 ATXN3 功能的损失不赋予与聚-谷氨酰胺

伸展相同的疾病表型,伸展的等位基因在受影响的神经元获取显性毒性。(Schmitt 等人, *Biochem Biophys Res Commun* 2007 ;362(3):734-9)。毒性可出现自泛素 / 蛋白酶体机制的饱和,或出现自未折叠或错折叠的蛋白的蓄积,或自缺陷蛋白降解的其他调控缺陷。

[0039] 相比可展示约 55 ~ 84 之间或更伸展的谷氨酰胺重复长度(通常在本文被称为“病原性 (CAG)_n 伸展”或“病原性伸展”(例如, (CAG)_n 其中 n = 约 55 ~ 84 或更多))的患 SCA3 患者,未受 SCA3 影响的个体正常展示 ATXN3 蛋白中约 10 ~ 40 个之间的谷氨酰胺重复长度(例如, (CAG)_n 其中“n”等于约 10-40)。(见, Paulson, HL, *Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3/Machado Joseph disease*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, United Kingdom ; Kawaguchi Y., et al. *Nat. Genet.* 1994 ;8:221-228)。聚 - 谷氨酰胺段的伸展给突变的 ATXN3 蛋白赋予毒性功能获得,这导致神经元核内包裹体的形成。(Schmidt T, 等人, *Brain Pathol.* 1998 ; 8:669-679)。聚 - 谷氨酰胺段的长度与 SCA3 初现年龄相反地关联。(Netravathi M, 等人, *J. Neurol Sci.* (2009) 2771-2:83-6)。

[0040] 野生型 ATXN3 等位基因的功能损失也已显示在泛素 - 介导的蛋白水解中起到作用,且该功能损失可为有害的。(Doss-Pepe EW, *Mol. Cell. Biol.* 2003 ;23:6469 - 6483)。因此,本发明的寡聚体化合物单独靶向病原性 (CAG)_n 伸展的策略可不是有益的。反之,在特定实施方式中,可优选战略性和辨别性地靶向突变的(例如,导致疾病的)ATXN3 等位基因。

[0041] 基于单核苷酸多态性 (SNP) 的存在的突变的 ATXN3 等位基因的战略性地靶向已被提议确保区别野生型和突变 ATXN3 等位基因。(Miller VM, 等人. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 ; 100:7195-7200)。该位于突变的 ATXN3 等位基因的病原性 (CAG)_n 伸展的一个核苷酸下游或 3' 侧的 SNP 与导致疾病的聚 - 谷氨酰胺伸展处于连锁不平衡,和一般随患病的等位基因分开。(Stevanin G, 等人. *Am J Hum Genet.* 1995 ;57:1247 - 1250 ;及 Gaspar C, 等人. *Hum Genet.* 1996 ;98:620-624)。在多数 SCA3 患者中,野生型 ATXN3 等位基因在第 987 位具有 G,然而伸展的 / 突变 ATXN3 等位基因在第 987 位具有 C。(Gaspar C, 等人. *Am J Hum Genet.* 2001 ;68:523-528)。全部编码聚 - 谷氨酰胺伸展的突变 ATX3 等位基因在第 987 位具有 C,而大致 50% 的野生型等位基因在此位置具有 G。

[0042] 减少的野生型 ATXN3 等位基因的表达不导致单倍不足,及因此减少的野生型 ATXN3 等位基因的表达未被预期为有害。因此, G- 到 -C SNP 或突变(在本文被称为“G987C”SNP 或突变)的存在提供使用本发明的寡聚体化合物来有区别地靶向伸展的或突变的 ATXN3 等位基因,而保存野生型 ATXN3 等位基因的功能的机会。

[0043] 因此,在一实施方式中,本公开涉及负责 SCA3 发展的编码 ATXN3 的突变体或伸展的等位基因的等位基因 - 特异性靶向或敲落。在这点上特别考虑的是,假定 (CAG)_n 重复子的末端不稳定性, (CAG)_n 段的复制是常见的。如之前讨论,正常等位基因已显示含有约 13 和 36 个之间的 CAG 重复子;但是,在特定实例中,正常等位基因可含有多至 47 个 CAG 重复子。SCA3 疾病病理学在具有更多末端复制,例如超过 52 个 CAG 重复子的伸展的等位基因中发生。(见, Kawaguchi Y., 等人. *Nat. Genet.* 1994 ;8 :221 ~ 228)。

[0044] 寡核苷酸,本文所述的药物组合和方法可,例如,通过调节一种或更多异常核酸分子(例如,伸展的 ATXN3)的表达或功能来用于改善或治疗共济失调诸如 SCA3。

[0045] 【寡核苷酸】

[0046] 在一些实施方式中,本文所述的寡核苷酸靶向编码异常 ATXN3 的核酸(例如,编码 ATXN3 的 mRNA,如 SEQ ID NO:4 中提供和/或其片段,如 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 中提供)和该核酸的天然存在的变体,由此调节 ATXN3 的表达。如本文所用,术语“寡核苷酸”指称由 2 个或多个核苷酸共价连接形成的分子。术语寡核苷酸通常包括寡核苷酸类似物,寡核苷酸模拟物和这些的嵌合组合。在本发明的情景中,单核苷酸单元也可被称为单体或单元。在一些实施方式中,术语“核苷”,“核苷酸”,“单元”和“单体”互换使用。需知,当指称核苷酸或单体的序列时,所指的是碱基,诸如,例如 A, T(或 U), G 或 C 的序列。

[0047] 在一些实施方式中,本文公开的寡核苷酸对于经反义作用机理调节核酸分子的表达(例如,调节异常 ATXN3 的表达)有用。此调节可,例如,通过提供互补于和/或杂交于一种或更多靶核酸分子,诸如 mRNA 的寡核苷酸(例如,SEQ ID NO:4 或 SNP ID rs12895357)来实现。在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸互补于靶核酸的特定区(例如,相邻于或邻接位于病原性 (CAG)_n 伸展的立即下游(3') 的 G987C 转变取代的编码 ATXN3 的核酸的区)。在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸能与靶核酸的特定区(例如,编码 G987C SNP 或转变取代的 ATXN3mRNA 的区)杂交(例如,在生理条件特异性杂交)。

[0048] 如本文所用,短语“靶核酸”旨在包括 DNA 和自该 DNA 转录的 RNA(包括前-mRNA 和 mRNA 或其部分),及也包括源于该 RNA 的 cDNA。例如,在一些实施方式中,短语“靶核酸”用于指称编码 ATXN3 的核酸(例如, mRNA) 或尤其是编码突变的或异常 ATXN3 的核酸。如本文所用,术语“基因产物”指称自基因或核酸的表达得到的任何生物化学物质(例如, DNA 或 RNA) 及包括,但不限于 mRNA, RNA 和/或蛋白。例如,在一些实施方式中,当关于 ATXN3 基因使用时,短语基因产物指称由 ATXN3 编码的 mRNA。在特定实施方式中,靶核酸包含选自下列的核酸序列:SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18。在其他实施方式中,本文公开的寡核苷酸互补于和/或杂交于包含下列之一或更多的核酸序列:SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 和/或 SEQ ID NO:18。

[0049] 在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸化合物互补于一种或更多靶核酸(例如, mRNA 编码 ATXN3) 及干扰靶向的核酸的正常功能(例如,由反义作用机理)。此靶核酸的功能由与之特异性杂交的本发明的寡核苷酸干扰或调节通常被称为“反义”。待干扰的 DNA 的功能可包括复制和转录。待干扰的 RNA 的功能可包括功能诸如,例如, RNA 转位到蛋白翻译的位点,蛋白自 RNA 翻译, RNA 剪接而产生一种或更多 mRNA 种,及可啮合 RNA 或由 RNA 辅助的催化性活性。在一些实施方式中,干扰靶核酸功能的总体效应是调节该靶核酸的产物的表达。

[0050] 如短语在本文所用,“反义化合物”和“反义寡核苷酸”指称至少部分互补(例如, 100%, 约 99%, 98%, 97.5%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% 或 50% 互补)于核酸分子,及尤其是靶核酸诸如编码异常或突变的蛋白或酶的 mRNA 的区的。在一些实施方式中,反义化合物或反义寡核苷酸能与靶核酸杂交,由此调节其表达。

[0051] 本发明的寡核苷酸包含约 8 ~ 50 个核苷酸长,诸如例如 8 ~ 30 个核苷酸长的连续的核苷酸序列或由其组成。在各种实施方式中,本发明的化合物不包含 RNA 单元或单体,而是,例如,包含 DNA 单元或单体和/或在一些实例中 LNA 单元或单体。优选的是,本发明

的化合物是线性分子或被合成为线性分子。在一些实施方式中,寡核苷酸是单链分子,及优选不包含,例如,至少 3,4 或 5 个连续的核苷酸的短区(其互补于相同的寡核苷酸之内的相当的区(即,双联体))。在这点上,寡核苷酸基本上不是双链的。

[0052] 【靶序列】

[0053] 在特定实施方式中,本文所述的寡核苷酸能调节,或在一些实施方式中,下调(例如减少或消除)ATXN3 的表达(例如,在 mRNA 水平下调编码异常或突变的 ATXN3 的核酸的翻译)。在这点上,本发明的寡核苷酸可一般在哺乳动物细胞诸如人细胞(例如,A549 细胞,HeLa 细胞,Purkinje 细胞或神经元细胞)中影响 ATXN3 的抑制。在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸与靶核酸(例如,编码伸展的,突变的或异常 ATXN3mRNA 的 mRNA)杂交,及相比正常表达水平影响表达的抑制或减小至少约 10%~100%(例如,诸如寡核苷酸或缀合物缺失下的表达水平)。例如,见于携带 ATXN3 突变等位基因的个体,本文公开的寡核苷酸可相比 ATXN3 的正常表达水平,影响 ATXN3 的表达的减小或抑制至少约 5%,10%,20%,25%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,97.5%,98%,99%或 100%。在一些实施方式中,该调节在使靶向的细胞或组织暴露于约 0.04nM~25nM 浓度(例如,约 0.8nM~20nM 浓度)的本发明的化合物之后显现。在相同的或不同实施方式中,靶核酸(例如,编码突变的 ATXN3 的 mRNA)的表达抑制小于 100%(例如,诸如小于约 98%抑制,小于约 95%抑制,小于约 90%抑制,小于约 80%抑制或小于约 70%抑制)。在一些实施方式中,本文公开的寡核苷酸能在 mRNA 水平调节 ATXN3 的表达(例如,通过靶向及杂交于编码突变的或异常 ATXN3 的 mRNA)。表达调节(例如,在 mRNA 水平)可通过测量蛋白水平或浓度测定(例如,由 SDS-PAGE 之后是使用针对靶蛋白产生的适合的抗体的蛋白印迹)。或者,表达调节(例如,在 mRNA 水平)可通过测量 mRNA 的水平或浓度来测定(例如,由 RNA 印迹或定量 RT-PCR)。当经 mRNA 水平或浓度的评估测量表达时,使用适当的剂量或浓度的寡核苷酸(例如,约 0.04nM~25nM,或约 0.8nM~20nM)的下调程度可相对于在缺失本发明的寡核苷酸、缀合物或组合物下观察到的正常水平或浓度为大于约 10%,约 10~20%,大于约 20%,大于约 25%,或大于约 30%。

[0054] 在本发明的情景中,术语“调节”和“调节”可指下列之一种或更多:基因或基因产物(例如,ATXN3mRNA)的表达增加(例如,刺激或上调),基因或基因产物(例如,ATXN3mRNA)的表达减少(例如,下调或抑制),和 2 种或更多基因产物之间相对表达变化(例如,相对于野生型 ATXN3 的表达,突变 ATXN3 的表达减少)。在本文所述的一些情景中,下调和抑制是调节的优选的形式,尤其是当其涉及调节突变的或伸展的 ATXN3(例如,包含病理性聚-谷氨酰胺段的 ATXN3)的表达时。在本文所述的一些情景中,术语“表达”是指来自基因或核酸(例如,DNA)的信息用于合成基因产物(例如,mRNA, RNA 和/或蛋白)的过程,及包括,但不限于,下列之一种或更多:复制步骤,转录和翻译。可由本发明的寡核苷酸调节的表达步骤可包括,例如,蛋白的转录,剪接,翻译和翻译后修饰。

[0055] 由于其涉及靶向,调节和表达,术语“ATXN3”广泛地可指称共济蛋白-3 基因或其基因产物(例如,前-mRNA,成熟 mRNA,cDNA 或蛋白)和可包括突变的及野生型形式,同种型和其变体(例如,编码人 ATXN3 及编码 ATXN3 蛋白的核酸)。用斜体显示的术语,“ATXN3”如本文所用,一般指称共济蛋白-3 基因。术语“野生型”(如其描述 ATXN3)指称受试者或群中最常观察到的 ATXN3 等位基因,核苷酸序列,氨基酸序列,或表型。例如,相对于由编码

该伸展的聚-谷氨酰胺段的核酸的存在表征的突变的 ATXN3 等位基因,术语“野生型”指称不包含该突变的余下等位基因。术语“突变体”和“突变的”(如它们描述 ATXN3)指称包含,例如,一个或更多导致单碱基核苷酸用遗传物质(例如,DNA 或 RNA)的另一核苷酸取代的转变和颠换点突变的受试者或群中改变的等位基因,核苷酸序列,氨基酸序列,或表型。突变的一例是作为病原性 (CAG)_n 伸展立即 3' 侧的 G- 到 -C 转变取代及位于 NM_004993 的第 987 位的 ATXN3 中的单核苷酸多态性(包括包含相同的 G- 到 -C 转变取代的其任何变体和多态型),及在本文被称为“G987C”突变或 SNP。G987C 突变与导致疾病的聚-谷氨酰胺伸展处于连锁不平衡,因此在多数患 SCA3 的患者中,G987C 突变随编码病原性聚-谷氨酰胺伸展的等位基因分开。G987C 突变的 SNP ID 是 SNP ID rs12895357。术语“突变体”和“突变的”也旨在包括导致单碱基核苷酸用遗传物质(DNA 或 RNA)的另一核苷酸取代的转变和颠换点突变。该突变以相邻于病原性 (CAG)_n 伸展的 G987C 转变取代为例,其在多数患 SCA3 的患者中呈现为在第 987 位 C 代替 G(如在正常患者中)。

[0056] 如本文所用,术语“伸展”或“伸展的”(如它们描述或定性 ATXN3 或编码 ATXN3 的核酸)指称遗传密码中迭代基因复制的区,及尤其是编码病原性聚-谷氨酰胺伸展的包含 (CAG)_n 三-核苷酸重复子的区(例如,编码包含区 (CAG)_n 的 ATXN 的核酸,其中“n”大于约 52)。伸展的一例是编码 ATXN3 的核酸中不稳定 (CAG)_n 重复子的迭代基因复制,其编码及导致翻译的 ATXN3 蛋白产物的病原性聚-谷氨酰胺伸展。

[0057] 如特别涉及 ATXN3,短语“调节表达”是指刺激,上调,下调和/或抑制 ATXN3 基因的基因产物(例如,野生型和/或突变的 ATXN3 的基因产物)。例如,靶向编码异常 ATXN3 的核酸(例如,mRNA),且与该核酸特异性杂交的本发明的寡核苷酸(例如,mRNA 编码 ATXN3)可调节 ATXN3 表达。本文所述的寡核苷酸可调节患 Machado-Joseph 病或 SCA3 的患者中野生型及突变的 ATXN3 的表达。或者,在优选的实施方式中,本文所述的寡核苷酸可优先下调或抑制突变体或伸展的 ATXN3 的表达(例如,在本文描述的寡核苷酸可调节由病原性 (CAG)_n 三-核苷酸重复子的存在表征的突变 ATXN3 的表达)。

[0058] 在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸能靶向特定核酸。在本文所述的反义寡核苷酸的情景中,靶向特定核酸可为多步过程。过程通常始于鉴定其功能待调节的核酸序列。此可为,例如,其表达相关于特定病症或疾病状态(例如,SCA3)的核酸(例如,mRNA)。在一些实施方式中,靶核酸(例如,mRNA)编码 ATXN3。在本发明的一些实施方式中,寡核苷酸能导致靶核酸的等位基因-特异性调节(例如,通过选择性地靶向编码病原性聚-谷氨酰胺段的等位基因,而由此辨别性地调节伸展的等位基因(相对于有功能的野生型等位基因)的表达)。例如,在特定实施方式中,靶核酸可包含编码 ATXN3 的 G987C 转变取代和/或 (CAG)_n 伸展段的核酸基因的区域或片段。或者,在一些实施方式中,靶核酸编码包含 ATXN3 的 G987C 突变和/或 (CAG)_n 伸展段的 ATXN3 的特定区(或对应 mRNA)。靶向过程也可包括在靶基因之内确定发生反义相互作用的位点,使得一个或更多期望效果会产生。一个或更多期望效果可包括,例如,基因产物(例如,野生型和/或突变 mRNA 或蛋白)的表达的调节,在相同的基因或 mRNA 上或在其他基因或 mRNA 上,相对于其他位点,就靶位点的选择性结合(例如,增加的结合亲和力),足够的或增强的递送到靶,及最小或不需要的副作用。在一些实施方式中,优选的靶向的核酸或 mRNA 位点编码 ATXN3 的 G987C SNP 和/或 (CAG)_n 伸展段和/或相邻区。

[0059] 聚-谷氨酰胺伸展呈现负责脊髓小脑共济失调3发展的最常见的突变。如上所述,术语“聚-谷氨酰胺伸展”指称由 $(CAG)_n$ 三-核苷酸编码及可存在于编码 ATXN3 的核酸中的谷氨酰胺残基的迭代和病原性重复子(在本文被称为“病原性 $(CAG)_n$ 伸展”,其中 $n \geq$ 约 52)。由 $(CAG)_n$ (其中 $n \geq$ 约 52) 编码的聚-谷氨酰胺伸展已相关于 SCA3,而 $n \leq$ 约 47 可为更常见的和欠可能导致 SCA3。聚-谷氨酰胺伸展也指称毗邻病原性 $(CAG)_n$ 三-核苷酸重复子的区,例如,自该聚-谷氨酰胺伸展(例如,G987C 突变)测量 2, 5, 10, 12, 20, 30, 50, 60, 75, 80 或 100 密码子上游和下游的区。聚-谷氨酰胺伸展给 ATXN3 赋予毒性功能获得,其导致神经元核内包裹体的形成,及呈现负责 SCA3 发展的最常见的突变。在本发明的情景中,术语“单-核苷酸多态性”或“SNP”指称当物种成员之间或个体中配对的染色体之间单核苷酸不同时发生的核苷酸序列中的变异,例如,位于病原性 $(CAG)_n$ 伸展的 3' 端的 G987C SNP。

[0060] 聚-谷氨酰胺伸展赋予 ATXN3 导致疾病的功能获得,因此,选择性地下调突变的或伸展的 ATXN3 等位基因的反义寡聚体化合物被预测改善或恢复余下(野生型)等位基因的正常 ATXN3 功能。特别是,在患 SCA3 的患者中,本发明的寡聚体化合物辨别性地靶向及杂交于编码突变的 ATXN3 等位基因的核酸(即, mRNA)(例如,包含 SEQ ID NO:4 或 SNP ID rs12895357 的核酸),使得突变的 ATXN3 等位基因的表达被下调或抑制,而相同的化合物不或以更少程度靶向或杂交于野生型等位基因(例如,SEQ ID NO:1),由此保存余下野生型等位基因的功能。

[0061] 本文所述的寡核苷酸可被递送到下列之一种或更多:动物,哺乳动物,人,或细胞。靶向的细胞类型可,在一些实施方式中,包括神经元细胞,脑细胞, Purkinje 细胞, HeLa 细胞, HEK-293 或 A549 细胞。在特定实施方式中,(例如, HEK-293 或 A549 细胞中)使用的寡核苷酸浓度可为约 0.025nM, 0.03nM, 0.05nM, 0.1nM, 0.25nM, 0.27nM, 0.3nM, 0.5nM, 0.81nM, 0.9nM, 1nM, 2.5nM, 5nM, 40nM, 100nM, 200nM, 250nM 或更。使用的寡核苷酸浓度可,在一些实施方式中,是 25nM(例如,在 Purkinje 细胞中)。在转染试剂缺失下(例如,使用剥裸递送),被表征为具有约 $1 \mu M \sim 25 \mu M$ 之间的寡核苷酸浓度(例如,诸如约 $5 \mu M$) 的介质可用于下调靶基因。

[0062] 使用的寡核苷酸浓度可,在一些实施方式中,是 0.1nM ~ 1nM(例如,在神经元细胞中)。在特定实施方式中,本文公开的寡核苷酸可以约 0.2 ~ 约 20mg/kg 的剂量(例如,以至少约 0.2mg/kg, 0.25mg/kg, 0.5mg/kg, 1.0mg/kg, 1.5mg/kg, 2.0mg/kg, 2.5mg/kg, 3.0mg/kg, 3.5mg/kg, 4.0mg/kg, 4.5mg/kg, 5.0mg/kg, 6.0mg/kg, 7.5mg/kg, 8.0mg/kg, 10mg/kg, 12.5mg/kg, 15mg/kg 或 20mg/kg 的每天或每周剂量施用)周期性地施用给受试者(例如,每天,每周,每月,每季,每半年或每年静脉内或皮下施用给人)。需知,在一些实施方式中,可在体外细胞测定中,使用转染试剂(例如,脂转染剂)实施用来处理细胞的寡核苷酸的适当的浓度的确定。

[0063] 在一些实施方式中,本文所述的寡核苷酸是 ATXN3 的有力的抑制物(即,在细胞或组织暴露于相对低浓度的寡核苷酸后,能调节该细胞或组织中 ATXN3 的表达)。在一些实施方式中,寡核苷酸能在相对低浓度的该寡核苷酸减少或另外抑制 ATXN3(例如,突变的 ATXN3) 的表达。例如,在一些实施方式中,寡核苷酸可以相对低浓度抑制 ATXN3 由细胞的表达(例如,如通过转染测定测定的小于约 5nM 的 IC_{50} , 或小于约 4nM, 诸如小于 2nM 的

IC₅₀)。如本文所用,术语“IC₅₀”指称足以抑制对象参数(例如,ATXN3 蛋白表达)约 50% 的寡核苷酸的浓度。在特定实施方式中,本文公开的反义寡核苷酸特征在于选择性地抑制突变 ATXN3 蛋白的表达(相对于野生型 ATXN3 蛋白的表达)。因此,寡核苷酸可特征在于相对于抑制野生型 ATXN3 蛋白的表达需要的浓度,以更低浓度(例如,约 2 倍更低)抑制突变 ATXN3 蛋白的表达。例如,反义寡核苷酸可展示突变体和野生型 ATXN3 蛋白的 IC₅₀ 的至少 2 倍差异(例如,在患 SCA3 的哺乳动物中,相对于正常或野生型蛋白,抑制 ATXN3 突变蛋白的表达需要的 IC₅₀ 中至少约 2-, 2.5-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- 或 10 倍差异)。

[0064] 本发明因此提供调节(例如,下调或抑制)表达该伸展的或突变的 ATXN3 蛋白和/或 mRNA 的细胞(例如,表达突变 ATXN3 蛋白和/或 mRNA 的 Purkinje 细胞)中编码伸展的或异常 ATXN3 蛋白和/或 ATXN 的 mRNA,及尤其是包含或编码聚-谷氨酰胺伸展的 ATXN3mRNA 的表达的方法。该方法包括给细胞施用本发明的寡核苷酸或缀合物(或另外使该细胞与该寡核苷酸或缀合物接触),以下调或抑制所述细胞中 ATXN3 蛋白和/或 mRNA 的表达。在一些实施方式中,细胞可为体外或体内哺乳动物细胞,诸如人细胞。例如,本发明的寡核苷酸靶向编码伸展的或突变的 ATXN3 的核酸和特异性杂交于其基因产物,由此调节伸展的或突变的 ATXN3 的表达。本发明的寡核苷酸可调节患 SCA3 的患者中野生型和/或突变的 ATXN3 等位基因的表达。施用于患者(例如,人或哺乳动物),受试者(例如,人或哺乳动物),和/或细胞(例如,人或哺乳动物)可体内,离体或体外发生。例如,在一些实施方式中,药学可接受的制剂和/或药学可接受的载体或递送媒质中的寡核苷酸可直接施用于患者的或受试者的身体,由本文所述的方法。或者,在一些实施方式中,寡核苷酸可在它们被移出之后及在它们回到患者的或受试者的身体之前施用于细胞。在一些实施方式中,细胞可在它们被移出之后及在它们回到患者的或受试者的身体之前维持在培养条件下。

[0065] 短语“靶核酸”,如本文所用指称编码哺乳动物 ATXN3 的核酸(例如,mRNA),及尤其是指称编码突变的或异常 ATXN3 的核酸(例如,mRNA)。例如,在本文公开的是编码包含病理性聚-谷氨酰胺伸展的 ATXN3 的靶核酸(例如,诸如由 SEQ ID NO:4 编码的)。适合的靶核酸包括编码 ATXN3 的核酸或其天然存在的变体,及源于其的 RNA 核酸(例如,包含或对应于 SEQ ID NO:15 ~ 20 的 mRNA 靶序列),优选 mRNA,诸如前-mRNA,尽管优选成熟 mRNA。在一些实施方式中,(例如,当在研究或诊断情景中使用)“靶核酸”可为源于以上 DNA 或 RNA 核酸靶的 cDNA 或合成寡核苷酸。本发明的寡核苷酸能与靶核酸或与该靶核酸的基因产物杂交。需知,在一些实施方式中,靶核酸序列是 cDNA 序列和像这样,对应于成熟 mRNA 靶序列,尽管在 cDNA 序列中尿嘧啶可用取代胸苷。

[0066] 术语“其天然存在的变体”指称定义的分类群之内,诸如哺乳动物,诸如小鼠,猴和优选人中天然地存在的 ATXN3 多肽或核酸序列的变体。一般而言,当说到多核苷酸的“天然存在的变体”时,术语也可包括由染色体转位或复制见于染色体的编码基因组 DNA 的 ATXN3,及 RNA,源于其的诸如 mRNA 的任何等位基因变体。例如,ATXN3 的天然存在的变体可包括 G987C 突变体,例如由 SEQ ID NO:4 编码,或其天然存在的变体(例如,SNP ID rs12895357)。天然存在的变体也可包括源于 ATXN3mRNA 的可变剪接的变体。当说到特定多肽序列时,术语也包括蛋白的天然存在的形式,其可因此,例如,由共翻译或翻译后修饰加工(例如,信号肽切割,蛋白水解切割,糖基化,等)。

[0067] 【序列】

[0068] 在一些实施方式中,寡核苷酸包含对应于 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列,或 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:4 的片段的反向互补体的连续的核苷酸序列或由其组成。由此,寡核苷酸可包含选自下列的序列或由其组成:SEQ ID NO:9,10,11,12,13 或 14,其中所述寡核苷酸(或其连续的核苷酸部分)可针对选择的靶序列任选地具有 1,2 或 3 个错配。在一些实施方式中,寡核苷酸可包含对应于编码包括 G987C SNP 和该 SNP 附近的核苷酸的 ATXN3 序列区的核苷酸序列的反向互补体的连续的核苷酸序列或由其组成。例如,在一些实施方式中,寡核苷酸可包含表 1 中鉴定的序列(即,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12)。寡核苷酸可互补于编码包括 G987C 突变的 ATXN3 的核酸(例如,mRNA)的区(例如,自 G987C 突变约 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20 或更多核苷酸上游和/或下游的区),诸如表 1 中鉴定的靶序列。例如,在一些实施方式中,寡核苷酸可互补于表 1 中鉴定的 mRNA 靶序列(例如,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:18)。在一些实施方式中,该互补寡核苷酸能与 ATXN3 的基因产物(即,ATXN3mRNA)和尤其是包含 G987C SNP 的 ATXN3 的基因产物杂交(例如,特异性杂交)。

[0069] 表 1

[0070]

寡核苷酸 SEQ ID NO	寡核苷酸序列	mRNA 靶序列标识	mRNA 靶序列
SEQ ID NO: 7	5'-ATAGGTCCCGCTGCT-3'	SEQ ID NO: 13	5'-AGCAGCGGGACCUAU-3'
SEQ ID NO: 8	5'-TGATAGGTCCCGCTGC-3'	SEQ ID NO: 14	5'-GCAGCGGGACCUAUCA-3'
SEQ ID NO: 9	5'-CTGATAGGTCCCGCTG-3'	SEQ ID NO: 15	5'-CAGCGGGACCUAUCAG-3'
SEQ ID NO: 10	5'-CTGATAGGTCCCGCT-3'	SEQ ID NO: 16	5'-AGCGGGACCUAUCAG-3'
SEQ ID NO: 11	5'-CTGATAGGTCCCGC-3'	SEQ ID NO: 17	5'-GCGGGACCUAUCAG-3'
SEQ ID NO: 12	5'-ATAGGTCCCGC-3'	SEQ ID NO: 18	5'-GCGGGACCUAU-3'

[0071] 寡核苷酸可包含完全互补(完美互补)于编码哺乳动物 ATXN3 的核酸的相当的区的连续的核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:1,SEQ IDNO:4 或其片段)或由其组成。由此,寡核苷酸可包含能与编码 ATXN3 的核酸(即,ATXN3mRNA)杂交的反义核苷酸序列或由其组成。

[0072] 但是,在一些实施方式中,当与靶序列杂交时,寡核苷酸可耐受 1,2,3 或 4 个(或更多)错配,和仍与靶足够结合,以显示期望效果(例如,靶 mRNA 的下调)。错配可,例如,由存在于核苷酸序列之内的增加的寡核苷酸序列长度和/或增加的核苷酸类似物,诸如锁核酸(LNA)数补偿。在一些实施方式中,当与靶序列,诸如与编码哺乳动物 ATXN3mRNA 的核酸的对应区杂交时,连续的核苷酸序列包含不多于 3 个错配(例如,不多于 1 个或不多于 2 个错配)。在一些实施方式中,当与靶序列,诸如与编码哺乳动物 ATXN3mRNA 的核酸的对应区杂交时,连续的核苷酸序列包含不多于单个错配。

[0073] 本发明的寡核苷酸的核苷酸序列或连续的核苷酸序列是优选至少 80% 互补于选自下列的序列:SEQ ID NO:15,16,17,18,19 或 20, 诸如至少 85%, 至少 90%, 至少 91%, 至少 92%, 至少 93%, 至少 94%, 至少 95%, 至少 96%, 至少 97%, 至少 98%, 至少 99%, 诸如至少 100% 互补。

[0074] 本发明的寡核苷酸的核苷酸序列或连续的核苷酸序列优选与存在于 SEQ ID NO:4 中的对应序列的反向互补体至少 80% 同源, 诸如至少 85%, 至少 90%, 至少 91%, 至少 92%, 至少 93%, 至少 94%, 至少 95%, 至少 96% 同源, 至少 97% 同源, 至少 98% 同源, 至少 99% 同源, 诸如 100% 同源 (同一)。

[0075] 本发明的寡核苷酸的核苷酸序列或连续的核苷酸序列优选与存在于 SEQ ID NO:4 中的亚序列至少 80% 互补, 诸如至少 85%, 至少 90%, 至少 91%, 至少 92%, 至少 93%, 至少 94%, 至少 95%, 至少 96% 互补, 至少 97% 互补, 至少 98% 互补, 至少 99% 互补, 诸如 100% 互补 (完美互补)。

[0076] 在一些实施方式中, 寡核苷酸 (或其连续的核苷酸部分) 选自或包含选自下列的序列之一:SEQ ID NO:9,10,11,12,13 或 14, 或其至少约 6 ~ 10 个连续的核苷酸的亚序列。在一些实施方式中, 所述寡核苷酸 (或其连续的核苷酸部分) 可相比该序列任选地包含 1, 2 或 3 个错配。

[0077] 在一些实施方式中, 亚序列可由 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21, 22,23,24,25,26,27,28 或 29 个连续的核苷酸, 诸如约 12 ~ 22, 诸如约 12 ~ 18 个核苷酸组成。适宜地, 在一些实施方式中, 亚序列与本发明的连续的寡核苷酸的核苷酸序列具有相同的长度。

[0078] 在本发明的一些实施方式中, 寡核苷酸包含根据 SEQ ID NO:9,10,11,12,13 或 14 的核苷酸序列或其亚序列, 或由其组成。

[0079] 在本发明的一些实施方式中, 寡核苷酸包含根据 SEQ ID NO:7 的核苷酸序列或其亚序列或由其组成。

[0080] 在本发明的一些实施方式中, 寡核苷酸包含根据 SEQ ID NO:8 的核苷酸序列或其亚序列或由其组成。

[0081] 在本发明的一些实施方式中, 寡核苷酸包含根据 SEQ ID NO:9 的核苷酸序列或其亚序列或由其组成。

[0082] 在本发明的一些实施方式中, 寡核苷酸包含根据 SEQ ID NO:10 的核苷酸序列或其亚序列或由其组成。

[0083] 在本发明的一些实施方式中, 寡核苷酸包含根据 SEQ ID NO:11 的核苷酸序列或其亚序列或由其组成。

[0084] 在本发明的一些实施方式中, 寡核苷酸包含根据 SEQ ID NO:12 的核苷酸序列或其亚序列或由其组成。

[0085] 在测定本发明的寡核苷酸 (或其区) 及核酸的靶区 (例如, 编码哺乳动物 ATXN3 蛋白的 mRNA) 之间的互补性程度中, 互补性 (或同源性或同一性) 程度表示为与之最佳对齐的寡核苷酸 (或其区) 序列及靶区 (或靶区的反向互补体) 的序列之间的百分率同一性 (或百分率同源性)。百分率通过对 2 个序列之间相同的对齐的碱基数进行计数, 除以寡核苷酸中连续的单体的总数, 及乘以 100 来计算。在该比较中, 如果存在间隔, 该间隔可优选

仅是错配,而非是间隔之内单体数在本发明的寡核苷酸和靶区之间不同的区。如本文所用,术语“同源”和“同源性”与术语“同一性”和“同一”可互换。

[0086] 短语“对应于”和“对应于”指称寡核苷酸的核苷酸序列(即,核碱基或碱基序列)或连续的核苷酸序列和选自下列的再一序列的相当体连续的核苷酸序列之间的比较:(i) 核酸靶(诸如编码 ATXN3 蛋白的 mRNA)的反向互补体的亚序列,和/或(ii) 本文提供的核苷酸的序列诸如由 SEQ ID NO:15,16,17,18,19 或 20 组成的,或其亚序列。核苷酸类似物与它们的相当体或对应核苷酸直接比较。对应于(i)或(ii)下的再一序列的第 1 序列一般在第 1 序列的长度上与该序列(诸如连续的核苷酸序列)相同,或,如本文所述可,在一些实施方式中,与对应序列至少 80%同源,诸如至少 85%,至少 90%,至少 91%,至少 92%至少 93%,至少 94%,至少 95%,至少 96%同源,诸如 100%同源(同一)。

[0087] 一旦已鉴定一个或更多靶位点,选择与靶足够互补的寡核苷酸(即,足够良好及以足够的特异性杂交,以给出期望效果)。例如,在鉴定针对靶的 ATXN3mRNA 区后,寡核苷酸可基于与 mRNA 靶或替代性地与编码该 mRNA 靶的 DNA 的互补性选择。在此情景中,“杂交”是指氢键合,其可为互补核苷或核苷酸碱基之间的 Watson-Crick, Hoogsteen 或逆转的 Hoogsteen 氢键合。例如,腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)是通过形成氢键配对的互补核碱基。“互补”,如本文所用,指称 2 个核苷酸之间精确的配对的能力。例如,如果在寡核苷酸的特定位置的核苷酸能与在 DNA 或 RNA 分子的相同的位置的核苷酸氢键合,则寡核苷酸和 DNA 或 RNA 被认为在该位置彼此互补。当各分子中足够数量的对应位置由可彼此氢键合的核苷酸占据时,寡核苷酸和 DNA 或 RNA 彼此互补。由此,“可特异性杂交的”和“互补”是用于指示互补性或精确的配对的足够的程度,使得寡核苷酸和 DNA 或 RNA 靶之间发生稳定的和特异性结合的术语。本领域明白,反义化合物的序列无需是 100%互补于待可特异性杂交的其靶核酸的序列。反义化合物的序列可为,例如,约 40%,50%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,97%,97.5%,99%或 100%互补于待可特异性杂交的其靶序列。当化合物与靶 DNA 或 RNA 分子结合干扰靶 DNA 或 RNA 的正常功能而导致功能或实用性损失,及有足够的互补性程度以避免在期望特异性结合的条件下(例如,在体内测定或治疗性治疗的情况,及在体外测定的情况中的生理条件下,在实施测定的条件下)反义化合物与非-靶序列非特异性结合时,反义化合物是可特异性杂交的。本文所用的短语“反向互补体”,“颠倒互补”和“反转互补性”指称可在给定核酸分子的相同的链上与另一给出的核酸序列杂交的寡核苷酸,因为其的互补相对于该核酸序列。例如,如果 5' 至 3' 靶核酸链中的碱基是 C,则 3' 至 5' 链中的对应碱基是 G。

[0088] 通过实验鉴定与靶核酸(例如,编码突变的 ATXN3 蛋白的 mRNA)杂交及抑制靶核酸的表达的本发明的反义和其他寡核苷酸,及这些化合物的序列是在本文鉴定为本发明的优选的实施方式(例如,表 1 中鉴定的序列)。这些优选的序列与之互补的靶核酸或位点在本文被称为“活性位点”及因此是优选的靶向用位点(例如,表 1 中鉴定的靶序列)。由本发明涵盖的活性位点的一例包括 G987C SNP 附近的区。因此,本发明的另一实施方式包括与此活性位点区(其可包括自活性位点立即上游和/或下游的核苷酸)杂交的化合物。例如,自 G987C 突变测量约 1,2,5,10,12,20,30,50,60,75,80,100 个或更多密码子上游和/或下游的区。

[0089] 短语“对应核苷酸类似物”和“对应核苷酸”旨在表示核苷酸类似物和天然存在的

核苷酸中的核碱基是相同的。像这样,在特定实施方式中,核苷酸类似物会与对应核苷酸,基于 Watson-Crick 碱基配对原理配对或杂交。例如,当核苷酸的 2'-脱氧核糖单元被连接到腺嘌呤时,对应核苷酸类似物含有与腺嘌呤连接的戊糖单元(不同于 2'-脱氧核糖),和该核苷酸类似物会与对应胸腺嘧啶碱基配对或杂交。

[0090] 【长度】

[0091] 寡核苷酸可包含总 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 或 30 个连续的核苷酸长的连续的核苷酸序列或由其组成。在一些实施方式中,寡核苷酸包含总约 8 ~ 25, 诸如约 10 ~ 22, 诸如约 12 ~ 18, 诸如约 13 ~ 17 或 12 ~ 16, 诸如约 13, 14, 15, 16 个连续的核苷酸长的连续的核苷酸序列或由其组成。在一些实施方式中,寡核苷酸包含总 8, 9, 10, 11, 12, 13 或 14 个连续的核苷酸长的连续的核苷酸序列或由其组成。在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸由不多于 22 个核苷酸,诸如不多于 20 个核苷酸,诸如不多于 18 个核苷酸,诸如 15, 16 或 17 个核苷酸。在本发明的一些实施方式中,寡核苷酸包含少于 20 个核苷酸组成。需知,当为寡核苷酸或连续的核苷酸序列长度给出范围时,其包括范围中提供的下限和上限长度,例如自 10 ~ 30(或之间),包括 10 和 30。

[0092] 【核苷和核苷类似物】

[0093] 本文所用的术语“核苷酸”,指称包含糖部分,碱基部分和共价连接的基团(连接基团),诸如磷酸酯或硫代磷酸酯核苷酸间连接基团的糖苷,及含盖天然存在的核苷酸,诸如 DNA 或 RNA,以及包含修饰的或取代的糖和/或碱基部分的非-天然存在的,合成或人工核苷酸,其也在本文被称为“核苷酸类似物”。在特定实施方式中,核苷酸类似物可包括寡核苷酸,其中核苷酸单元的糖和核苷间连接用新基团,诸如,例如,一个或更多肽核酸(PNA)取代。PNA 通常被表征为具有用含有酰胺的骨架,尤其是氨基乙基甘氨酸骨架取代的寡核苷酸糖-骨架。核碱基被保留及直接或间接结合于骨架的酰胺部分的氮杂氮原子。

[0094] 在本文中,单核苷酸单元也可被称为单体或核酸单元。

[0095] 在生物化学领域,术语“核苷”通常用来指称包含糖部分和碱基部分的糖苷,因此可在指称由寡核苷酸的核苷酸之间的核苷酸间键共价连接的核苷酸单元时使用。在生物技术领域,术语“核苷酸”通常用来指称核酸单体或单元,及像这样,在寡核苷酸的情景中,可指称碱基,诸如短语“核苷酸序列”一般指称核碱基序列(即隐含存在糖主链和核苷间连接)。同样,特别是在核苷间连接基团中的一个或更多被修饰的寡核苷酸的情况下,术语“核苷酸”可指称“核苷”,例如,术语“核苷酸”可甚至当特别指定核苷之间连接的存在或性质时使用。

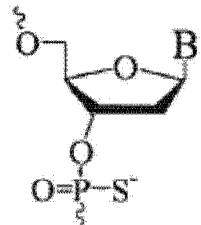
[0096] 如本领域普通技术人员会认可,寡核苷酸的 5' 末端核苷酸不包含 5' 核苷酸间连接基团,尽管其可包含或不包含 5' 末端基团。

[0097] 非-天然存在的核苷酸包括修饰了糖部分的核苷酸,诸如双环核苷酸或 2' 取代的核苷酸。

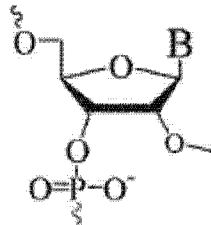
[0098] 在一些实施方式中,术语“核苷类似物”和“核苷酸类似物”互换使用。“核苷酸类似物”是天然的核苷酸,诸如 DNA 或 RNA 核苷酸的变体(依靠糖和/或碱基部分中的修饰)。类似物可在寡核苷酸的情景中,在原理上,仅是天然的核苷酸的“沉默”或“相当体”(例如,对寡核苷酸抑制靶基因表达的方式无功能性作用)。然而,该相当的类似物可为有用的,如

果,例如,它们是更容易制备或制备时更廉价,或在存储或生产条件更稳定,或表现标签或标记物。但是,优选,类似物会对寡核苷酸发挥功能而抑制表达的方式具有功能性作用(例如,通过产生增加的对靶结合亲和力和/或增加的对细胞内核酸酶的抗性和/或增加的运输到细胞的容易度)。核苷类似物的特定例描述于,例如, reier, 等人, Nucl. Acid Res. (1997) 25:4429-4443 和 Uhlmann, 等人, Curr. Opinion in Drug Development (2000) 3(2) : 293 ~ 213, 及以下:

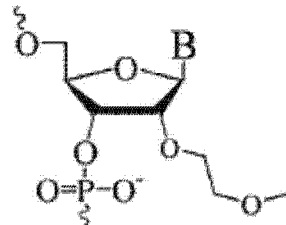
[0099]



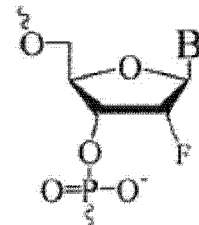
硫代磷酸酯



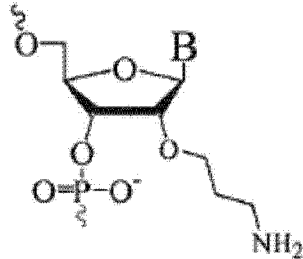
2'-O-甲基



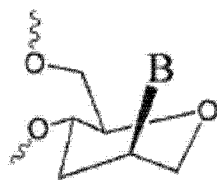
2'-MOE



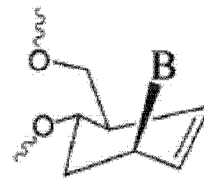
2'-氟



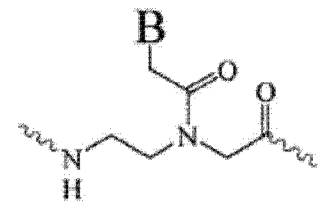
2'-AP



HNA

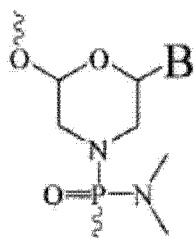


CeNA

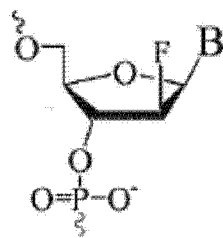


PNA

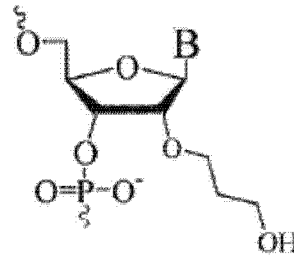
[0100]



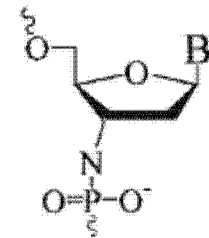
吗啉代



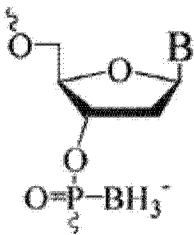
2'-F-ANA



2'-(3-羟基)丙基



3'-氨基磷酸酯



硼烷磷酸酯

[0101] 本文公开的寡核苷酸可由此包含天然存在的核苷酸,例如,优选 2'-脱氧核苷酸(在本文通常称为“DNA”),而且核糖核苷酸(在本文通常称为“RNA”),或该天然存在的核苷酸及一个或更多非-天然存在的核苷酸,(例如,核苷酸类似物)的组合的简单序列或由其组成。该核苷酸类似物可适宜地增强寡核苷酸对靶序列的亲合性。适合的及优选的核苷酸类似物的例提供于国际专利申请 WO 2007/031091,或该文中的参考文献。

[0102] 增强亲和力的核苷酸类似物,诸如锁核酸(LNA)或2'-取代的糖合并进寡核苷酸可使特异性结合寡核苷酸的尺寸减小,及也可在非特异性或异常结合发生之前减小寡核苷酸的尺寸的上限。因此,在一些实施方式中,寡核苷酸包含至少1个核苷类似物。在一些实施方式中,寡核苷酸包含至少2个核苷酸类似物。在一些实施方式中,寡核苷酸包含自3~8个核苷酸类似物,(例如,6或7个核苷酸类似物)。在特定实施方式中,所述核苷酸类似物中的至少一个是LNA,例如核苷酸类似物中的至少3或至少4,或至少5,或至少6,或至少7,或至少8可为LNA。在一些实施方式中,寡核苷酸的全部核苷酸类似物可为LNA。

[0103] 需知,当说到仅由核苷酸组成的优选的核苷酸序列基序或核苷酸序列时,被该序列定义的本发明的寡核苷酸可包含取代存在于该序列中的一个或更多核苷酸的对应核苷酸类似物或由取代存在于该序列中的一个或更多核苷酸的对应核苷酸类似物组成,诸如LNA单元或其他核苷酸类似物,其升高寡核苷酸/靶双联体的解离的溶解温度(T_m)或双联稳定性/ T_m (即增强亲和力的核苷酸类似物)。如本文所用,术语“ T_m ”指称溶解温度及关于一群互补双联的核酸分子(例如,反义寡核苷酸和对应mRNA靶序列)一半解离为单链的温度而使用。更高 T_m 通常指示更稳定的双联体。

[0104] 在一些实施方式中,寡核苷酸的核苷酸序列和靶序列之间的任何错配优选见于在增强亲和力的核苷酸类似物之外的区,诸如在本文所称的区B,和/或在本文所称的区D,和/或在寡核苷酸中非-修饰的核苷酸,诸如DNA核苷酸的位点,和/或对于连续的核苷酸序列是5'或3'的区中。

[0105] 该核苷酸修饰的例包括修饰糖部分以提供2'-取代基或以产生桥接的(LNA)结构,其增强结合亲和力和也可提供增加的核酸酶抗性。在一些实施方式中,优选的核苷酸类似物是LNA,诸如氧基-LNA(诸如 β -D-氧基-LNA,及 α -L-氧基-LNA)和/或氨基-LNA(诸如 β -D-氨基-LNA和 α -L-氨基-LNA)和/或硫代-LNA(诸如 β -D-硫代-LNA和 α -L-硫代-LNA)和/或ENA(诸如 β -D-ENA和 α -L-ENA)。最优选的是 β -D-氧基-LNA。

[0106] 在一些实施方式中,存在于本发明的寡核苷酸之内(诸如在本文提及的区A和C内)的核苷酸类似物独立地选自,例如:2'-O-烷基-RNA单元,2'-氨基-DNA单元,2'-氟-DNA单元,LNA单元,阿拉伯糖型核酸(ANA)单元,2'-氟-ANA单元,HNA单元,INA(插入核酸单元,如由Christensen,等人,Nucl. Acids. Res. (2002)30:4918-4925讨论)和2'MOE单元。在一些实施方式中,仅有存在于本发明的寡核苷酸,或其连续的核苷酸序列中的以上类型的核苷酸类似物之一。

[0107] 在一些实施方式中,核苷酸类似物是2'-O-甲氧基乙基-RNA(2'MOE),2'-氟-DNA单体或LNA核苷酸类似物,及像这样,本发明的寡核苷酸可包含独立地选自这3种类型的类似物的核苷酸类似物,或可包含仅一种类型的选自3种类型的类似物。在一些实施方式中,所述核苷酸类似物中的至少一个是2'-MOE-RNA,诸如2,3,4,5,6,7,8,9或10个2'-MOE-RNA核苷酸单元。在一些实施方式中,所述核苷酸类似物中的至少一个是2'-DNA氟,诸如2,3,4,5,6,7,8,9或10个2'-氟-DNA核苷酸单元。

[0108] 在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸包含至少一个锁核酸(LNA)单元,诸如1,2,3,4,5,6,7或8个LNA单元,诸如约3~7或4~8个LNA单元,或3,4,5,6或7个LNA单元。在一些实施方式中,全部核苷酸类似物是LNA。在一些实施方式中,寡核苷酸可包含 β -D-氧基-LNA,及以下LNA单元之一或更多:硫代-LNA,氨基-LNA,氧基-LNA和/或

β -D 或 α -L 构型的 ENA 或其组合。在一些实施方式中,全部 LNA 胞嘧啶单元是 5' 甲基-胞嘧啶。在本发明的一些实施方式中,寡核苷酸可包含 LNA 和 DNA 单元。优选 LNA 和 DNA 单元总共是约 8 ~ 25, 诸如 10 ~ 24, 优选 10 ~ 20, 诸如 10 ~ 18, 甚至更优选 12 ~ 16。在本发明的一些实施方式中,寡核苷酸的核苷酸序列,诸如连续的核苷酸序列包含至少一个 LNA 和余下核苷酸单元是 DNA 单元或由其组成。在一些实施方式中,寡核苷酸包含仅 LNA 核苷酸类似物和天然存在的核苷酸(诸如 RNA 或 DNA, 最优选 DNA 核苷酸),任选地具有修饰的核苷酸间键诸如硫代磷酸酯。

[0109] 如本文所用,术语“核碱基”指称核苷酸的碱基部分和含盖天然存在的以及非-天然存在的变体。由此,术语“核碱基”不仅含盖知道的嘌呤和其嘧啶杂环,而且杂环类似物和其互变异构体。核碱基的例基包括,但不限于腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,胸苷,尿嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,5-甲基胞嘧啶,异胞嘧啶,假异胞嘧啶,5-溴尿嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶,6-二氨基嘌呤,2-二氨基嘌呤,肌苷,二氨基嘌呤和 2-氯-6-二氨基嘌呤。在一些实施方式中,存在于寡核苷酸中的至少一个核碱基是选自下列的修饰的核碱基:5-甲基胞嘧啶,异胞嘧啶,假异胞嘧啶,5-溴尿嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶,6-二氨基嘌呤,2-二氨基嘌呤,肌苷,二氨基嘌呤和 2-氯-6-二氨基嘌呤。

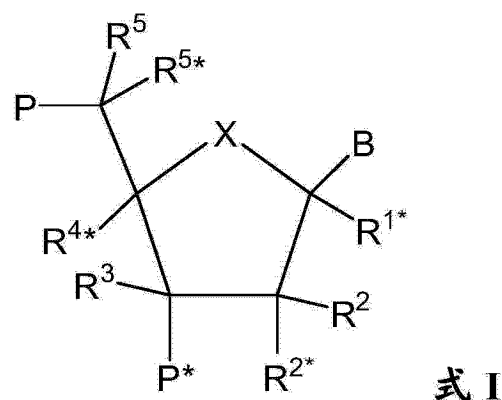
[0110] 在特定实施方式中,本发明涉及包含一个或更多 C5-甲基胞嘧啶核碱基的反义寡核苷酸。例如,寡核苷酸包含 SEQ ID NO:12,其中寡核苷酸在一个或更多选自下列的核苷酸包含至少一个核苷酸类似物:(i) 在第 1 和 3 位的一个或更多的腺嘌呤核苷酸是氧基-LNA;(ii) 在第 10 位的鸟嘌呤核苷酸是氧基-LNA;(iii) 在第 9 和 11 位的一个或更多的胞嘧啶核苷酸是氧基-LNA;及(iv) 在第 2 位的胸腺嘧啶核苷酸是氧基-LNA。

[0111] 【锁核酸】

[0112] 如本文所用,术语“LNA”指称双环核苷类似物,被称为锁核酸。其可指称 LNA 单体,或,当在“LNA 寡核苷酸”的情景中使用, LNA 可指称含有一个或更该双环核苷酸类似物的寡核苷酸。LNA 特征在于在核糖环的 C2' 和 C4' 之间存在接头基团(诸如桥),例如,如显示于以下描述的双基 R^{4*} - R^{2*} 。

[0113] 在本发明的寡核苷酸化合物中使用的 LNA 优选具有通式 I 的结构。

[0114]



[0115] 其中对于全部手性中心,不对称基团可被发现以 R 或 S 取向;

[0116] 其中 X 选自 -O-, -S-, -N(R^{N*})-, -C(R^6R^{6*})-, 诸如, 在一些实施方式中 -O-;

[0117] 其中 B 选自:氢,任选地取代的 $C_{1\sim 4}$ -烷氧基,任选地取代的 $C_{1\sim 4}$ -烷基,任选地取

代的 $C_{1\sim 4}$ - 酰氧基,核碱基包括天然存在的和核碱基类似物, DNA 嵌入剂,光化学活性基团,热化学活性基团,螯合基团,报告基团,及配体或优选是核碱基或核碱基类似物;

[0118] 其中 P 指定相邻单体的核苷酸间键,或 5' - 末端基团,该核苷酸间键或 5' - 末端基团任选地包括取代基 R^5 或等同可应用的取代基 R^{5*} ;

[0119] 其中 P* 指定相邻单体的核苷酸间键,或 3' - 末端基团;

[0120] 其中 R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定选自下列的由 1 ~ 4 个基团 / 原子组成的二价接头基团: $-C(R^aR^b)-$, $-C(R^a) = C(R^b)-$, $-C(R^a) = N-$, $-O-$, $-Si(R^a)_2-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-N(R^a)-$ 及 $>C = Z$, 其中 Z 选自: $-O-$, $-S-$ 及 $-N(R^a)-$, 及 R^a 和 R^b 各独立地选择自: 氢, 任选地取代的 $C_{1\sim 12}$ - 烷基, 任选地取代的 $C_{2\sim 12}$ - 烯基, 任选地取代的 $C_{2\sim 12}$ - 炔基, 羟基, 任选地取代的 $C_{1\sim 12}$ - 烷氧基, $C_{2\sim 12}$ - 烷氧基烷基, $C_{2\sim 12}$ - 烯氧基, 羧基, $C_{1\sim 12}$ - 烷氧羰基, $C_{1\sim 12}$ - 烷基羰基, 甲酰基, 芳基, 芳氧基 - 羰基, 芳氧基, 芳羰基, 杂芳基, 杂芳基氧基 - 羰基, 杂芳基氧基, 杂芳基羰基, 氨基, 单 - 及二 ($C_{1\sim 6}$ - 烷基) 氨基, 氨基甲酰基, 单 - 及二 ($C_{1\sim 6}$ - 烷基) - 氨基 - 羰基, 氨基 - $C_{1\sim 6}$ - 烷基 - 氨基羰基, 单 - 及二 ($C_{1\sim 6}$ - 烷基) 氨基 - $C_{1\sim 6}$ - 烷基 - 氨基羰基, $C_{1\sim 6}$ - 烷基 - 羰氨基, 脲基, $C_{1\sim 6}$ - 烷酰氧基, 砜代, $C_{1\sim 6}$ - 烷基磺酰氧基, 硝基, 叠氮基, 硫烷基, $C_{1\sim 6}$ - 烷硫基, 卤素, DNA 嵌入剂, 光化学活性基团, 热化学活性基团, 螯合基团, 报告基团, 及配体, 其中芳基和杂芳基可被任选地取代, 且其中 2 个成对的取代基 R^a 和 R^b 一起可指定任选地取代的亚甲基 ($=CH_2$), 其中对于全部手性中心, 不对称基团可被发现以 R 或 S 取向, 及;

[0121] 其中各取代基 R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 , R^{5*} , R^6 和 R^{6*} (其存在) 独立地选自: 氢, 任选地取代的 $C_{1\sim 12}$ - 烷基, 任选地取代的 $C_{2\sim 12}$ - 烯基, 任选地取代的 $C_{2\sim 12}$ - 炔基, 羟基, $C_{1\sim 12}$ - 烷氧基, $C_{2\sim 12}$ - 烷氧基烷基, $C_{2\sim 12}$ - 烯氧基, 羧基, $C_{1\sim 12}$ - 烷氧羰基, $C_{1\sim 12}$ - 烷基羰基, 甲酰基, 芳基, 芳氧基 - 羰基, 芳氧基, 芳羰基, 杂芳基, 杂芳基氧基 - 羰基, 杂芳基氧基, 杂芳基羰基, 氨基, 单 - 及二 ($C_{1\sim 6}$ - 烷基) 氨基, 氨基甲酰基, 单 - 及二 ($C_{1\sim 6}$ - 烷基) - 氨基 - 羰基, 氨基 - $C_{1\sim 6}$ - 烷基 - 氨基羰基, 单 - 及二 ($C_{1\sim 6}$ - 烷基) 氨基 - $C_{1\sim 6}$ - 烷基 - 氨基羰基, $C_{1\sim 6}$ - 烷基 - 羰氨基, 脲基, $C_{1\sim 6}$ - 烷酰氧基, 砜代, $C_{1\sim 6}$ - 烷基磺酰氧基, 硝基, 叠氮基, 硫烷基, $C_{1\sim 6}$ - 烷硫基, 卤素, DNA 嵌入剂, 光化学活性基团, 热化学活性基团, 螯合基团, 报告基团, 及配体, 其中芳基和杂芳基可被任选地取代, 且其中 2 个成对的取代基一起可指定氧代, 硫代, 亚氨基或任选地取代的亚甲基; 其中 R^N 选自: 氢和 $C_{1\sim 4}$ - 烷基, 且其中 2 个相邻 (非 - 成对的) 取代基可指定另外的导致双键的键; 及 R^{3*} , 当存在及不涉及双基时, 选自: 氢和 $C_{1\sim 4}$ - 烷基; 及其碱式盐和酸加成盐。对于全部手性中心, 不对称基团可被发现以 R 或 S 取向。

[0122] 在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定由选自下列的基团组成的双基: $C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-$, $C(R^aR^b)-O-$, $C(R^aR^b)-NR^a-$, $C(R^aR^b)-S-$ 及 $C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-O-$, 其中各 R^a 和 R^b 可任选地独立地选择。在一些实施方式中, R^a 和 R^b 可为, 任选地独立地选自: 氢和 $C_{1\sim 6}$ 烷基, 诸如甲基, 诸如氢。

[0123] 在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定 R- 或 S- 构型的双基 $-O-CH(CH_2OCH_3)-(2' O- 甲氧基乙基双环核酸)$ (Seth 等人, 2010, J. org. Chem)。

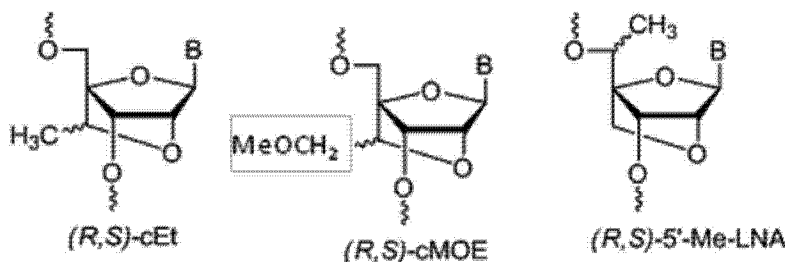
[0124] 在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定 R- 或 S- 构型的双基 $-O-CH(CH_2CH_3)-2' O-$ 乙基双环核酸。

[0125] 在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定 R- 或 S- 构型的双基 $-O-CH(CH_3)-$ 。在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定双基 $-O-CH_2-O-CH_2-$ 。

[0126] 在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定双基 $-O-NR-CH_3-$ 。

[0127] 在一些实施方式中, LNA 单元具有选自以下的结构:

[0128]



[0129] 在一些实施方式中, R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 , R^{5*} 独立地选自: 氢, 卤素, $C_{1\sim6}$ 烷基, 取代的 $C_{1\sim6}$ 烷基, $C_{2\sim6}$ 烯基, 取代的 $C_{2\sim6}$ 烯基, $C_{2\sim6}$ 炔基或取代的 $C_{2\sim6}$ 炔基, $C_{1\sim6}$ 烷氧基, 取代的 $C_{1\sim6}$ 烷氧基, 酰基, 取代的酰基, $C_{1\sim6}$ 氨基烷基或取代的 $C_{1\sim6}$ 氨基烷基。对于全部手性中心, 不对称基团可被发现以 R 或 S 取向。

[0130] 在一些实施方式中, R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 , R^{5*} 是氢。

[0131] 在一些实施方式中, R^{1*} , R^2 , R^3 独立地选自: 氢, 卤素, $C_{1\sim6}$ 烷基, 取代的 $C_{1\sim6}$ 烷基, $C_{2\sim6}$ 烯基, 取代的 $C_{2\sim6}$ 烯基, $C_{2\sim6}$ 炔基或取代的 $C_{2\sim6}$ 炔基, $C_{1\sim6}$ 烷氧基, 取代的 $C_{1\sim6}$ 烷氧基, 酰基, 取代的酰基, $C_{1\sim6}$ 氨基烷基或取代的 $C_{1\sim6}$ 氨基烷基。对于全部手性中心, 不对称基团可被发现以 R 或 S 取向。

[0132] 在一些实施方式中, R^{1*} , R^2 , R^3 是氢。

[0133] 在一些实施方式中, R^5 和 R^{5*} 是各独立地选自: H, $-CH_3$, $-CH_2-CH_3$, $-CH_2-O-CH_3$, 及 $-CH=CH_2$ 。适宜地, 在一些实施方式中, R^5 或 R^{5*} 均是氢, 其中作为其他基团 (分别 R^5 或 R^{5*}) 选自: $C_{1\sim5}$ 烷基, $C_{2\sim6}$ 烯基, $C_{2\sim6}$ 炔基, 取代的 $C_{1\sim6}$ 烷基, 取代的 $C_{2\sim6}$ 烯基, 取代的 $C_{2\sim6}$ 炔基或取代的酰基 ($-C(=O)-$); 其中各取代的基团被独立地选自下列的取代基单或多取代: 卤素, $C_{1\sim6}$ 烷基, 取代的 $C_{1\sim6}$ 烷基, $C_{2\sim6}$ 烯基, 取代的 $C_{2\sim6}$ 烯基, $C_{2\sim6}$ 炔基, 取代的 $C_{2\sim6}$ 炔基, OJ_1 , SJ_1 , NJ_1J_2 , N_3 , $COOJ_1$, CN , $O-C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=NH)NJ_2$ 或 $N(H)C(=X)N(H)J_2$, 其中 X 是 O 或 S; 及各 J_1 和 J_2 独立地是: H, $C_{1\sim6}$ 烷基, 取代的 $C_{1\sim6}$ 烷基, $C_{2\sim6}$ 烯基, 取代的 $C_{2\sim6}$ 烯基, $C_{2\sim6}$ 炔基, 取代的 $C_{2\sim6}$ 炔基, $C_{1\sim6}$ 氨基烷基, 取代的 $C_{1\sim6}$ 氨基烷基或保护基。在一些实施方式中, R^5 或 R^{5*} 均是取代的 $C_{1\sim6}$ 烷基。在一些实施方式中, R^5 或 R^{5*} 均是取代的亚甲基, 其中优选的取代基包括独立地选自下列的一个或更多基团: F, NJ_1J_2 , N_3 , CN , OJ_1 , SJ_1 , $O-C(=O)NJ_1J_2$, $N(H)C(=NH)NJ_2$, J_2 或 $N(H)C(O)N(H)J_2$ 。在一些实施方式中, 各 J_1 和 J_2 独立地是: H 或 $C_{1\sim6}$ 烷基。在一些实施方式中, R^5 或 R^{5*} 均是甲基, 乙基或甲氧甲基。在一些实施方式中, R^5 或 R^{5*} 均是甲基。在进一步实施方式中, R^5 或 R^{5*} 均是乙炔基。在一些实施方式中, R^5 或 R^{5*} 是取代的酰基。在一些实施方式中, R^5 或 R^{5*} 均是 $C(=O)NJ_1J_2$ 。对于全部手性中心, 不对称基团可被发现以 R 或 S 取向。该 5' 修饰的双环核苷酸公开于国际专利申请 WO 2007/134181。

[0134] 在一些实施方式中 B 是核碱基, 包括核碱基类似物和天然存在的核碱基, 诸如嘌呤或嘧啶, 或取代的嘌呤或取代的嘧啶, 诸如这里指称的核碱基, 诸如选自下列的核碱基: 腺嘌呤, 胞嘧啶, 胸腺嘧啶, 腺嘌呤, 尿嘧啶和 / 或修饰的或取代的核碱基, 诸如 5- 噻唑并 - 尿嘧啶, 2- 硫代 - 尿嘧啶, 5- 丙炔基 - 尿嘧啶, 2' 硫代 - 胸腺嘧啶, 5- 甲基胞嘧啶, 5- 噻

唑并-胞嘧啶,5-丙炔基-胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。

[0135] 在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定选自下列的双基: $-C(R^aR^b)-O-$, $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-O-$, $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-O-$, $-C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-$, $-C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-O-$, $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-$, $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-$, $-C(R^a) = C(R^b)-C(R^cR^d)-$, $-C(R^aR^b)-N(R^c)-$, $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-N(R^e)-$, $-C(R^aR^b)-N(R^c)-O-$ 及 $-C(R^aR^b)-S-$, $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-S-$, 其中 R^a , R^b , R^c , R^d , R^e 和 R^f 各独立地选自: 氢, 任选地取代的 $C_{1\sim 12}$ -烷基, 任选地取代的 $C_{2\sim 12}$ -烯基, 任选地取代的 $C_{2\sim 12}$ -炔基, 羟基, $C_{1\sim 12}$ -烷氧基, $C_{2\sim 12}$ -烷氧基烷基, $C_{2\sim 12}$ -烯氧基, 羧基, $C_{1\sim 12}$ -烷氧羰基, $C_{1\sim 12}$ -烷基羰基, 甲酰基, 芳基, 芳氧基-羰基, 芳氧基, 芳羰基, 杂芳基, 杂芳基氧基-羰基, 杂芳基氧基, 杂芳基羰基, 氨基, 单-及二($C_{1\sim 6}$ -烷基)氨基, 氨基甲酰基, 单-及二($C_{1\sim 6}$ -烷基)-氨基-羰基, 氨基- $C_{1\sim 6}$ -烷基-氨基羰基, 单-及二($C_{1\sim 6}$ -烷基)氨基- $C_{1\sim 6}$ -烷基-氨基羰基, $C_{1\sim 6}$ -烷基-羰氨基, 脲基, $C_{1\sim 6}$ -烷酰氧基, 砜代, $C_{1\sim 6}$ -烷基磺酰氧基, 硝基, 叠氮基, 硫烷基, $C_{1\sim 6}$ -烷硫基, 卤素, DNA 嵌入剂, 光化学活性基团, 热化学活性基团, 螯合基团, 报告基团, 及配体, 其中芳基和杂芳基可被任选地取代, 且其中 2 个成对的取代基 R^a 和 R^b 一起可指定任选地取代的亚甲基 ($=CH_2$)。对于全部手性中心, 不对称基团可被发现以 R 或 S 取向。

[0136] 在进一步实施方式中 R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定选自下列的双基 (二价基团): $-CH_2-O-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2-NH-$, $-CH_2-N(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-O-$, $-CH_2-CH(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-S-$, $-CH_2-CH_2-NH-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$, $-CH=CH-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-O-$, $-CH_2-NH-O-$, $-CH_2-N(CH_3)-O-$, $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH(CH_3)-O-$ 及 $-CH(CH_2-O-CH_3)-O-$, 和 / 或, $-CH_2-CH_2-$, 及 $-CH=CH-$, 对于全部手性中心, 不对称基团可被发现以 R 或 S 取向。

[0137] 在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定双基 $C(R^aR^b)-N(R^c)-O-$, 其中 R^a 和 R^b 独立地选自: 氢, 卤素, $C_{1\sim 6}$ 烷基, 取代的 $C_{1\sim 6}$ 烷基, $C_{2\sim 6}$ 烯基, 取代的 $C_{2\sim 6}$ 烯基, $C_{2\sim 6}$ 炔基或取代的 $C_{2\sim 6}$ 炔基, $C_{1\sim 6}$ 烷氧基, 取代的 $C_{1\sim 6}$ 烷氧基, 酰基, 取代的酰基, $C_{1\sim 6}$ 氨基烷基或取代的 $C_{1\sim 6}$ 氨基烷基, 诸如氢, 及 ; 其中 R^c 选自: 氢, 卤素, $C_{1\sim 6}$ 烷基, 取代的 $C_{1\sim 6}$ 烷基, $C_{2\sim 6}$ 烯基, 取代的 $C_{2\sim 6}$ 烯基, $C_{2\sim 6}$ 炔基或取代的 $C_{2\sim 6}$ 炔基, $C_{1\sim 6}$ 烷氧基, 取代的 $C_{1\sim 6}$ 烷氧基, 酰基, 取代的酰基, $C_{1\sim 6}$ 氨基烷基或取代的 $C_{1\sim 6}$ 氨基烷基, 诸如氢。

[0138] 在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定双基 $C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-O-$, 其中 R^a , R^b , R^c 和 R^d 独立地选自: 氢, 卤素, $C_{1\sim 6}$ 烷基, 取代的 $C_{1\sim 6}$ 烷基, $C_{2\sim 6}$ 烯基, 取代的 $C_{2\sim 6}$ 烯基, $C_{2\sim 6}$ 炔基或取代的 $C_{2\sim 6}$ 炔基, $C_{1\sim 6}$ 烷氧基, 取代的 $C_{1\sim 6}$ 烷氧基, 酰基, 取代的酰基, $C_{1\sim 6}$ 氨基烷基或取代的 $C_{1\sim 6}$ 氨基烷基, 诸如氢。

[0139] 在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 形成双基 $-CH(Z)-O-$, 其中 Z 选自: $C_{1\sim 6}$ 烷基, $C_{2\sim 6}$ 烯基, $C_{2\sim 6}$ 炔基, 取代的 $C_{1\sim 6}$ 烷基, 取代的 $C_{2\sim 6}$ 烯基, 取代的 $C_{2\sim 6}$ 炔基, 酰基, 取代的酰基, 取代的酰胺, 氢硫基或取代的硫代; 且其中各取代的基团独立地被独立地选自下列的保护的取代基任选地单或多取代: 卤素, 氧代, 羟基, OJ_1 , NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $OC(=X)J_1$, $OC(=X)NJ_1J_2$, $NJ^3C(=X)NJ_1J_2$ 和 CN , 其中各 J_1 , J_2 和 J_3 独立地是: H 或 $C_{1\sim 6}$ 烷基, 及 X 是 O, S 或 NJ_1 。在一些实施方式中, Z 是 $C_{1\sim 6}$ 烷基或取代的 $C_{1\sim 6}$ 烷基。在一些实施方式中, Z 是甲基。在一些实施方式中, Z 是取代的 $C_{1\sim 6}$ 烷基。在一些实施方式中, 所述取代基是 $C_{1\sim 6}$ 烷氧基。在一些实施方式中, Z 是 CH_3OCH_2- 。对于全部手性中心, 不对称基团可被发现以 R 或 S 取向。该双环核苷酸公开于美国专利 No. 7, 399, 845。在一些实施方式中, R^{1*} , R^2 , R^3 , R^5 ,

R^{5*} 是氢。在一些实施方式中, R^{1*}, R^2, R^{3*} 是氢, 及 R^5, R^{5*} 之一或二者可为以上提及及国际专利申请 WO 2007/134181 中提及的氢之外的基团。

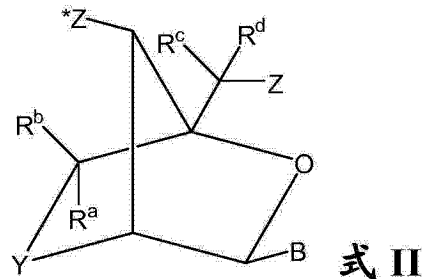
[0140] 在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定在桥中包含取代的氨基的双基, 诸如由双基 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^c)-$ 组成或包含双基 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^c)-$, 其中 R^c 是 $\text{C}_1 \sim 12$ 烷基氧基。在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定双基 $-\text{C}_{q_3}q_4-\text{NOR}-$, 其中 q_3 和 q_4 独立地选自: 氢, 卤素, $\text{C}_1 \sim 6$ 烷基, 取代的 $\text{C}_1 \sim 6$ 烷基, $\text{C}_2 \sim 6$ 烯基, 取代的 $\text{C}_2 \sim 6$ 烯基, $\text{C}_2 \sim 6$ 炔基或取代的 $\text{C}_2 \sim 6$ 炔基, $\text{C}_1 \sim 6$ 烷氧基, 取代的 $\text{C}_1 \sim 6$ 烷氧基, 酰基, 取代的酰基, $\text{C}_1 \sim 6$ 氨基烷基或取代的 $\text{C}_1 \sim 6$ 氨基烷基; 其中各取代的基团独立地被独立地选自下列的取代基单或多取代: 卤素, $\text{OJ}_1, \text{SJ}_1, \text{NJ}_1\text{J}_2, \text{COOJ}_1, \text{CN}, \text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{NJ}_1\text{J}_2, \text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{NH})\text{N} \text{J}_1\text{J}_2$ 或 $\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{X}=\text{N}(\text{H})\text{J}_2$, 其中 X 是 O 或 S; 及各 J_1 和 J_2 独立地是: H, $\text{C}_1 \sim 6$ 烷基, $\text{C}_2 \sim 6$ 烯基, $\text{C}_2 \sim 6$ 炔基, $\text{C}_1 \sim 6$ 氨基烷基或保护基。对于全部手性中心, 不对称基团可被发现以 R 或 S 取向。该双环核苷酸公开于 WO2008/150729。在一些实施方式中, $R^{1*}, R^2, R^3, R^5, R^{5*}$ 独立地选自: 氢, 卤素, $\text{C}_1 \sim 6$ 烷基, 取代的 $\text{C}_1 \sim 6$ 烷基, $\text{C}_2 \sim 6$ 烯基, 取代的 $\text{C}_2 \sim 6$ 烯基, $\text{C}_2 \sim 6$ 炔基或取代的 $\text{C}_2 \sim 6$ 炔基, $\text{C}_1 \sim 6$ 烷氧基, 取代的 $\text{C}_1 \sim 6$ 烷氧基, 酰基, 取代的酰基, $\text{C}_1 \sim 6$ 氨基烷基或取代的 $\text{C}_1 \sim 6$ 氨基烷基。在一些实施方式中, $R^{1*}, R^2, R^3, R^5, R^{5*}$ 是氢。在一些实施方式中, R^{1*}, R^2, R^3 是氢, 而 R^5, R^{5*} 之一或二者可为以上提及及国际专利申请 WO 2007/134181 中提及的氢之外的基团。在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 一起指定双基 (二价基团) $\text{C}(\text{R}^a\text{R}^b)-\text{O}-$, 其中 R^a 和 R^b 各独立地是: 卤素, $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 烷基, 取代的 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 烷基, $\text{C}_2 \sim \text{C}_{12}$ 烯基, 取代的 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{12}$ 烯基, $\text{C}_2 \sim \text{C}_{12}$ 炔基, 取代的 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{12}$ 炔基, $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 烷氧基, 取代的 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 烷氧基, $\text{OJ}_1\text{SJ}_1, \text{SOJ}_1, \text{SO}_2\text{J}_1, \text{NJ}_1\text{J}_2, \text{N}_3, \text{CN}, \text{C}(=\text{O})\text{OJ}_1, \text{C}(=\text{O})\text{NJ}_1\text{J}_2, \text{C}(=\text{O})\text{J}_1, \text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{NJ}_1\text{J}_2, \text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{NH})\text{NJ}_1\text{J}_2, \text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})\text{NJ}_1\text{J}_2$ 或 $\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{S})\text{NJ}_1\text{J}_2$; 或 R^a 和 R^b 一起是 $=\text{C}(q_3)(q_4)$; q_3 和 q_4 各独立地是: H, 卤素, $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 烷基或取代的 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ 烷基; 各取代的基团独立地被独立地选自下列的取代基单或多取代: 卤素, $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 烷基, 取代的 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 烷基, $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ 烯基, 取代的 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ 烯基, $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ 炔基, 取代的 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ 炔基, $\text{OJ}_1, \text{SJ}_1, \text{NJ}_1\text{J}_2, \text{N}_3, \text{CN}, \text{C}(=\text{O})\text{OJ}_1, \text{C}(=\text{O})\text{NJ}_1\text{J}_2, \text{C}(=\text{O})\text{J}_1, \text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{NJ}_1\text{J}_2, \text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})\text{NJ}_1\text{J}_2$ 或 $\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{S})\text{NJ}_1\text{J}_2$. 及; 各 J_1 和 J_2 独立地是: H, $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 烷基, 取代的 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 烷基, $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ 烯基, 取代的 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ 烯基, $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ 炔基, 取代的 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ 炔基, $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 氨基烷基, 取代的 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 氨基烷基或保护基。该化合物公开于国际专利申请 WO 2009/006478A。

[0141] 在一些实施方式中, R^{4*} 和 R^{2*} 形成双基 $-\text{Q}-$, 其中 Q 是 $\text{C}(q_1)(q_2)\text{C}(q_3)(q_4)$, $\text{C}(q_1) = \text{C}(q_3), \text{C}[=\text{C}(q_1)(q_2)]-\text{C}(q_3)(q_4)$ 或 $\text{C}(q_1)(q_2)-\text{C}[=\text{C}(q_3)(q_4)]$; q_1, q_2, q_3, q_4 各独立地是: H, 卤素, $\text{C}_1 \sim 12$ 烷基, 取代的 $\text{C}_1 \sim 12$ 烷基, $\text{C}_2 \sim 12$ 烯基, 取代的 $\text{C}_1 \sim 12$ 烷氧基, $\text{OJ}_1, \text{SJ}_1, \text{SOJ}_1, \text{SO}_2\text{J}_1, \text{NJ}_1\text{J}_2, \text{N}_3, \text{CN}, \text{C}(=\text{O})\text{OJ}_1, \text{C}(=\text{O})-\text{NJ}_1\text{J}_2, \text{C}(=\text{O})\text{J}_1, -\text{C}(=\text{O})\text{NJ}_1\text{J}_2, \text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{NH})\text{NJ}_1\text{J}_2, \text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{O})\text{NJ}_1\text{J}_2$ 或 $\text{N}(\text{H})\text{C}(=\text{S})\text{NJ}_1\text{J}_2$; 各 J_1 和 J_2 独立地是: H, $\text{C}_1 \sim 6$ 烷基, $\text{C}_2 \sim 6$ 烯基, $\text{C}_2 \sim 6$ 炔基, $\text{C}_1 \sim 6$ 氨基烷基或保护基; 及, 任选地其中当 Q 是 $\text{C}(q_1)(q_2)(q_3)(q_4)$ 及 q_3 或 q_4 之一是 CH_3 时, 则其他 q_3 或 q_4 中的至少一个或 q_1 和 q_2 之一是 H 之外的基团。在一些实施方式中, $R^{1*}, R^2, R^3, R^5, R^{5*}$ 是氢。对于全部手性中心, 不对称基团可被发现以 R 或 S 取向。该双环核苷酸公开于 WO/2008/154401。在一些实施方式中, $R^{1*}, R^2, R^3, R^5, R^{5*}$ 独立地选自: 氢, 卤素, $\text{C}_1 \sim 6$ 烷基, 取代的 $\text{C}_1 \sim 6$ 烷基, $\text{C}_2 \sim 6$ 烯基, 取代的 $\text{C}_2 \sim 6$ 烯基, $\text{C}_2 \sim 6$ 炔基或取代的 $\text{C}_2 \sim 6$ 炔基, $\text{C}_1 \sim 6$ 烷氧基, 取代的 $\text{C}_1 \sim 6$ 烷氧基, 酰基, 取代的酰基, $\text{C}_1 \sim 6$ 氨基烷基或取代的 $\text{C}_1 \sim 6$ 氨基烷基。在一些实施方式中, $R^{1*}, R^2, R^3, R^5, R^{5*}$ 是氢。在一些实施方式中, R^{1*}, R^2, R^3 是氢, 及

R^5, R^{5*} 之一或二者可为以上提及及国际专利申请 WO/2007/134181 和 WO2009/067647 中提及的氢之外的基团 (α -L- 双环核酸类似物)。

[0142] 在一些实施方式中,在本发明的寡核苷酸化合物中使用的 LNA 优选具有通式 II 的结构。

[0143]

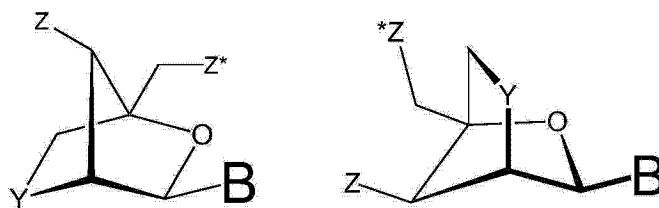


[0144] 其中 Y 选自: $-O-$, $-CH_2O-$, $-S-$, $-NH-$, $N(R^e)$ 和 / 或 $-CH_2-$;

[0145] 其中 Z 和 Z* 独立地选择自: 核苷酸间键, R^f , 末端基团或保护基;

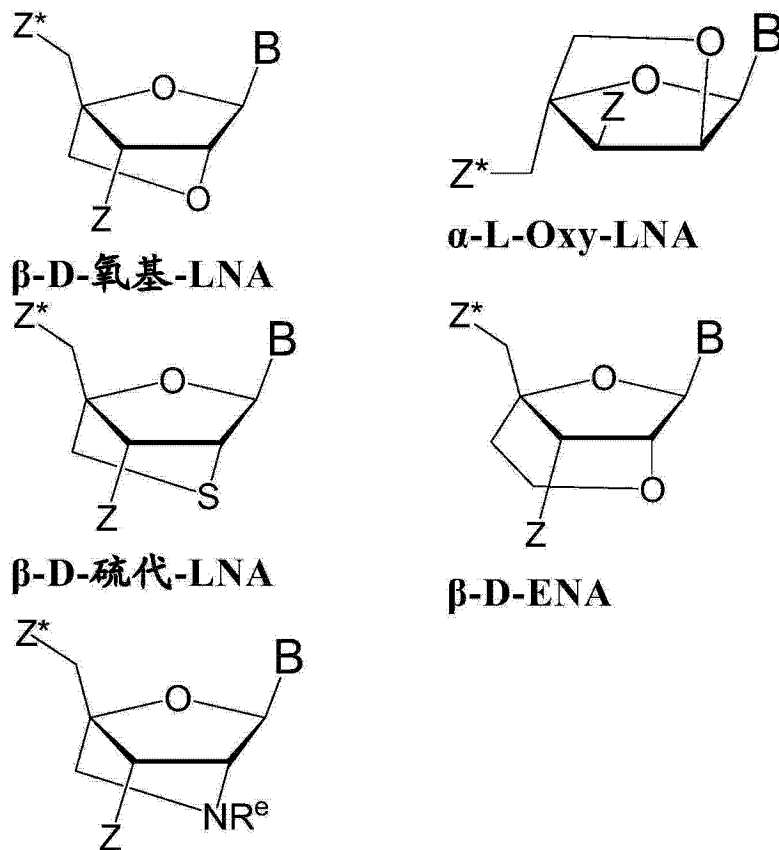
[0146] 其中 B 构成天然的或非-天然的核苷酸碱基部分 (核碱基), 及 R^f 选自: 氢和 $C_{1\sim 4}$ -烷基; R^a, R^b, R^c, R^d 和 R^e 任选地独立地选自: 氢, 任选地取代的 $C_{1\sim 12}$ -烷基, 任选地取代的 $C_{2\sim 12}$ -烯基, 任选地取代的 $C_{2\sim 12}$ -炔基, 羟基, $C_{1\sim 12}$ -烷氧基, $C_{2\sim 12}$ -烷氧基烷基, $C_{2\sim 12}$ -烯氧基, 羧基, $C_{1\sim 12}$ -烷氧羰基, $C_{1\sim 12}$ -烷基羰基, 甲酰基, 芳基, 芳氧基-羰基, 芳氧基, 芳羰基, 杂芳基, 杂芳基氧基-羰基, 杂芳基氧基, 杂芳基羰基, 氨基, 单-及二 ($C_{1\sim 6}$ -烷基) 氨基, 氨基甲酰基, 单-及二 ($C_{1\sim 6}$ -烷基)-氨基-羰基, 氨基- $C_{1\sim 6}$ -烷基-氨基羰基, 单-及二 ($C_{1\sim 6}$ -烷基) 氨基- $C_{1\sim 6}$ -烷基-氨基羰基, $C_{1\sim 6}$ -烷基-羰氨基, 脲基, $C_{1\sim 6}$ -烷酰氧基, 砜代, $C_{1\sim 6}$ -烷基磺酰氧基, 硝基, 叠氮基, 硫烷基, $C_{1\sim 6}$ -烷硫基, 卤素, DNA 嵌入剂, 光化学活性基团, 热化学活性基团, 螯合基团, 报告基团, 及配体, 其中芳基和杂芳基可被任选地取代, 且其中 2 个成对的取代基 R^a 和 R^b 一起可指定任选地取代的亚甲基 ($=CH_2$); 且其中 R^f 选自: 氢和 $C_{1\sim 4}$ -烷基。在一些实施方式中, R^a, R^b, R^c, R^d 和 R^e 任选地独立地选自: 氢和 $C_{1\sim 6}$ -烷基, 诸如甲基。对于全部手性中心, 不对称基团可被发现以 R 或 S 取向, 例如, 2 种例示立体化学异构体包括 β -D 和 α -L 同种型, 其可例证如下:

[0147]



[0148] 特定例示 LNA 单元示于下:

[0149]



[0150] β -D-氨基-LNA

[0151] 术语“硫代-LNA”包含锁核苷酸,其中以上通式中的Y选自S或 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 。硫代-LNA可处于 β -D和 α -L-构型。

[0152] 术语“氨基-LNA”包含锁核苷酸,其中以上通式中的Y选自: $-\text{N}(\text{H})-$, $\text{N}(\text{R})-$, $\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-$ 及 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-$ 其中R选自:氢和 $\text{C}_{1\sim 4}$ -烷基。氨基-LNA可处于 β -D和 α -L-构型。

[0153] 术语“氧基-LNA”包含锁核苷酸,其中以上通式中的Y表示 $-\text{O}-$ 。氧基-LNA可处于 β -D和 α -L-构型。在特定实施方式中,本文公开的反义寡核苷酸包含至少一个氧基-LNA。例如,在本文公开的是包含SEQ ID NO:12的寡核苷酸,其中寡核苷酸在一个或更多选自下列的位置包含至少一个核苷酸类似物:(a)在第1位的鸟嘌呤核苷酸是氧基-LNA;(b)在第2和3位之一或更多的腺嘌呤核苷酸是氧基-LNA;(c)在第10和11位之一或更多的胞嘧啶核苷酸是氧基-LNA;及(d)在第12位的胸腺嘧啶核苷酸是氧基-LNA。在一些实施方式中,该氧基-LNA之一或全部是 β -D-氧基-LNA。

[0154] 术语“ENA”包含锁核苷酸,其中以上通式中的Y是: $-\text{CH}_2-\text{O}-$ (其中相对于碱基B, $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 的氧原子附接于2'-位置)。r^e是氢或甲基。

[0155] 在一些例示实施方式中,LNA选自: β -D-氧基-LNA, α -L-氧基-LNA, β -D-氨基-LNA和 β -D-硫代-LNA,尤其是 β -D-氧基-LNA。

[0156] 【RNA 酶募集】

[0157] 需知,寡核苷酸可经靶mRNA的非RNA酶-介导的降解,诸如由翻译位阻,或其他方法发挥功能,但是,优选的本发明的寡核苷酸能募集核糖核酸内切酶(RNA酶),诸如RNA酶H。

[0158] 可优选的是,寡核苷酸,或连续的核苷酸序列,包含至少 6,诸如至少 7 个连续核苷酸单元,诸如至少 8 或至少 9 个连续核苷酸单元,包括 7,8,9,10,11,12,13,14,15 或 16 个连续核苷酸的区,其当与互补靶 RNA 形成双联体时能募集 RNA 酶。能募集 RNA 酶的连续的序列可在本文所述的间隔聚体的情景中为区 B。在一些实施方式中,能募集 RNA 酶的连续的序列,诸如区 B 的尺寸,可为更大,诸如 10,11,12,13,14,15,16,17,18,19 或 20 个核苷酸单元。

[0159] EP 1 222 309 提供测定 RNA 酶 H 活性的体外方法,其可用于测定募集 RNA 酶 H 的能力。如果,当提供互补 RNA 靶时,其具有通过使用仅 DNA 寡核苷酸(具有相同的碱基序列但仅含有 DNA 单体,无 2' 取代,寡核苷酸中的全部单体之间具有硫代磷酸酯连接基团),使用由 EP 1 222 309 的实施例 91 ~ 95 提供的方法测定的初速度(以 pmol/l/min 测量的)的至少 1%,诸如至少 5%,诸如至少 10%或大于 20%的初速度,则寡核苷酸被认为能募集 RNA 酶 H。

[0160] 在一些实施方式中,如果,当提供互补 RNA 靶及 RNA 酶 H 时, RNA 酶 H 初速度(以 pmol/l/min 测量的)是通过使用相当的仅 DNA 寡核苷酸(无 2' 取代,寡核苷酸中的全部核苷酸之间有硫代磷酸酯连接基团),使用由 EP 1222309 的实施例 91 ~ 95 提供的方法测定的初速度的小于 1%,诸如小于 5%,诸如小于 10%或小于 20%,则寡核苷酸被认为基本上不能募集 RNA 酶 H。

[0161] 在其他实施方式中,如果,当提供互补 RNA 靶及 RNA 酶 H 时, RNA 酶 H 初速度(以 pmol/l/min 测量的)是通过使用相当的仅 DNA 寡核苷酸(无 2' 取代,寡核苷酸中的全部核苷酸之间有硫代磷酸酯连接基团),使用由 EP 1222309 的实施例 91 ~ 95 提供的方法测定的初速度的至少 20%,诸如至少 40%,诸如至少 60%,诸如至少 80%,则寡核苷酸被认为能募集 RNA 酶 H。

[0162] 一般,当与互补靶 RNA 形成双联体时,形成能募集 RNA 酶的连续核苷酸单元的寡核苷酸的区由与 RNA 靶形成 DNA/RNA 样双联体及包括 DNA 单元和 α -L 构型的 LNA 单元(特别优选的是 α -L-氧基 LNA)的核苷酸单元组成。

[0163] 本发明的寡核苷酸可包含核苷酸序列,其包含核苷酸和核苷酸类似物,及可处于间隔聚体,头聚体或混聚体形式。

[0164] “头聚体”被定义为包含区 X 和与之连续的区 Y(区 Y 的 5' - 多数单体连与区 X 的 3' - 多数单体连接)的寡核苷酸。区 X 包含非 -RNA 酶募集核苷类似物的连续的延伸物,和区 Y 包含可被 RNA 酶识别的和可被 RNA 酶切割的 DNA 单体或核苷类似物单体的连续的延伸物(诸如至少 7 个连续的单体)。

[0165] “尾聚体”被定义为包含区 X 和与之连续的区 Y(区 Y 的 5' - 多数单体与区 X 的 3' - 多数单体连接)的寡核苷酸。区 X 包含可被 RNA 酶识别的和可被 RNA 酶切割的 DNA 单体或核苷类似物单体的连续的延伸物(诸如至少 7 个连续的单体),及区 X 包含非 -RNA 酶募集核苷类似物的连续的延伸物。

[0166] 其他“嵌合”寡核苷酸(被称为“混聚体”)由 (i) 可被 RNA 酶识别的和可被 RNA 酶切割的 DNA 单体或核苷类似物单体,及 (ii) 非 -RNA 酶募集核苷类似物单体的交替组合物组成。

[0167] 在一些实施方式中,除了增强寡核苷酸对靶区的亲和性之外,一些核苷类似物也

介导 RNA 酶（例如，RNA 酶 H）结合及切割。由于 α -L-LNA 单体募集 RNA 酶 H 活性至特定程度，在一些实施方式中，含有 α -L-LNA 单体的寡核苷酸的间隔区（例如，在本文称为区 B）由更少可被 RNA 酶 H 识别的和可被 RNA 酶 H 切割的单体组成，及混聚体构建中导入更多柔性。

[0168] 【间隔聚体设计】

[0169] 在本发明的一些实施方式中，寡核苷酸是间隔聚体。间隔聚体是包含能募集 RNA 酶，诸如 RNA 酶 H 的核苷酸的连续的延伸物的寡核苷酸，诸如至少 6 或 7 个 DNA 核苷酸的区，在本文称为区 B(B)，其中区 B 在 5' 和 3' 侧接增强亲和力的核苷酸类似物区，诸如能募集 RNA 酶的核苷酸的连续的延伸物的 5' 和 3' 侧约 1~6 个核苷酸类似物，这些区分别称为区 A(A) 和 C(C)。

[0170] 在一些实施方式中，能募集 RNA 酶的单体选自：DNA 单体， α -L-LNA 单体，C4' 烷基化的 DNA 单体（见 PCT/EP2009/050349 和 Vester 等人，Bioorg. Med. Chem. Lett. 18(2008)2296-2300），及 UNA（未连接的核酸）核苷酸（见 Fluiter 等人，Mol. Biosyst., (2009)10:1039）。UNA 是未锁的核酸，一般其中核糖的 C2~C3C-C 键已被去除，形成未锁的“糖”残基。优选地，间隔聚体包含式（5' 至 3'），A-B-C 或任选地 A-B-C-D 或 D-A-B-C 的（聚）核苷酸序列，其中：区 A(A)（5' 区）包含至少一个核苷酸类似物，诸如至少一个 LNA 单元，诸如约 1~6 个核苷酸类似物，诸如 LNA 单元或由其组成，及；区 B(B) 包含能募集 RNA 酶（当与互补 RNA 分子，诸如 mRNA 靶形成双联体时）的至少 5 个连续核苷酸，诸如 DNA 核苷酸或由其组成，及；区 C(C)（3' 区）包含至少一个核苷酸类似物，诸如至少一个 LNA 单元，诸如自 1~6 个核苷酸类似物，诸如 LNA 单元或由其组成，及；区 D(D)，当存在时，包含 1, 2 或 3 个核苷酸单元，诸如 DNA 核苷酸或由其组成。

[0171] 在一些实施方式中，区 A 由 1, 2, 3, 4, 5 或 6 个核苷酸类似物，诸如 LNA 单元，诸如约 2~5 个核苷酸类似物，诸如 2~5 个 LNA 单元，诸如 3 或 4 个核苷酸类似物，诸如 3 或 4 个 LNA 单元组成；和 / 或区 C 由 1, 2, 3, 4, 5 或 6 个核苷酸类似物，诸如 LNA 单元，诸如自 2~5 个核苷酸类似物，诸如 2~5 个 LNA 单元，诸如 3 或 4 个核苷酸类似物，诸如 3 或 4 个 LNA 单元组成。

[0172] 在一些实施方式中，B 包含能募集 RNA 酶的 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 或 12 个连续核苷酸，或能募集 RNA 酶的 6~10，或 7~9，诸如 8 个连续核苷酸或由其组成。在一些实施方式中，区 B 包含至少一个 DNA 核苷酸单元，诸如 1~12 个 DNA 单元，优选 4~12 个 DNA 单元，更优选 6~10 个 DNA 单元，诸如约 7~10 个 DNA 单元，最优选 8, 9 或 10 个 DNA 单元或由其组成。

[0173] 在一些实施方式中，区 A 由 3 或 4 个核苷酸类似物，诸如 LNA 组成，区 B 由 7, 8, 9 或 10 个 DNA 单元组成，及区 C 由 3 或 4 个核苷酸类似物，诸如 LNA 组成。该设计包括 (A-B-C)3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 3-7-3, 3-7-4, 4-7-3 和可还包括区 D，其可具有 1 个或 2 个核苷酸单元，诸如 DNA 单元。

[0174] 其他间隔聚体设计公开于国际申请 WO 2004/046160。国际申请 WO 2008/113832，其要求 US 临时申请 60/977, 409 的优先权，说到“短聚体”间隔聚体寡核苷酸。在一些实施方式中，本文呈现的寡核苷酸可为那样的短聚体间隔聚体。

[0175] 在一些实施方式中，寡核苷酸由总 10, 11, 12, 13 或 14 个核苷酸单元的连续的

核苷酸序列组成,其中连续的核苷酸序列具有式(5' -3'), A-B-C 或任选地 A-B-C-D 或 D-A-B-C,其中 ;A 由 1,2 或 3 个核苷酸类似物单元,诸如 LNA 单元组成 ;B 由当与互补 RNA 分子(诸如 mRNA 靶)形成双联体时能募集 RNA 酶的 7,8 或 9 个连续的核苷酸单元组成 ;及 C 由 1,2 或 3 个核苷酸类似物单元,诸如 LNA 单元组成。当存在时,D 由单 DNA 单元组成。

[0176] 在一些实施方式中,A 由 1 个 LNA 单元组成。在一些实施方式中,A 由 2 个 LNA 单元组成。在一些实施方式中,A 由 3 个 LNA 单元组成。在一些实施方式中,C 由 1 个 LNA 单元组成。在一些实施方式中,C 由 2 个 LNA 单元组成。在一些实施方式中,C 由 3 个 LNA 单元组成。在一些实施方式中,B 由 7 个核苷酸单元组成。在一些实施方式中,B 由 8 个核苷酸单元组成。在一些实施方式中,B 由 9 个核苷酸单元组成。在特定实施方式中,区 B 由 10 核苷单体组成。在特定实施方式中,区 B 包含 1 ~ 10 个 DNA 单体。在一些实施方式中,B 包含约 1-9 个 DNA 单元,诸如 2,3,4,5,6,7,8 或 9 个 DNA 单元。在一些实施方式中,B 由 DNA 单元组成。在一些实施方式中,B 包含至少 1 个 α -L- 构型的 LNA 单元,诸如 2,3,4,5,6,7,8 或 9 个 α -L- 构型的 LNA 单元。在一些实施方式中,B 包含至少 1 个 α -L- 氧基 LNA 单元或其中全部 α -L- 构型的 LNA 单元是 α -L- 氧基 LNA 单元。在一些实施方式中,存在于 A-B-C 中的核苷酸数选自:(核苷酸类似物单元-区 B-核苷酸类似物单元):1-8-1,1-8-2,2-8-1,2-8-2,3-8-3,2-8-3,3-8-2,4-8-1,4-8-2,1-8-4,2-8-4, 或 ;1-9-1,1-9-2,2-9-1,2-9-2,2-9-3,3-9-2,1-9-3,3-9-1,4-9-1,1-9-4, 或 ;1-10-1,1-10-2,2-10-1,2-10-2,1-10-3,3-10-1。在一些实施方式中,A-B-C 中的核苷酸数选自 :2-7-1,1-7-2,2-7-2,3-7-3,2-7-3,3-7-2,3-7-4 和 4-7-3。在特定实施方式中,各区 A 和 C 由 3 个 LNA 单体组成,及区 B 由 8 或 9 或 10 个核苷单体,优选 DNA 单体组成。在一些实施方式中,A 和 C 各由 2 个 LNA 单元组成,及 B 由 8 或 9 个核苷酸单元,优选 DNA 单元组成。在各种实施方式中,其他间隔聚体设计包括那些,其中区 A 和 / 或 C 由 3,4,5 或 6 个核苷类似物,诸如含有 2' -O- 甲氧基乙基 - 核糖 (2' -MOE) 的单体或含有 2' - 氟 - 脱氧核糖的单体组成,及区 B 由 8,9,10,11 或 12 个核苷,诸如 DNA 单体组成,其中区 A-B-C 具有 3-9-3,3-10-3,5-10-5 或 4-12-4 单体。其他间隔聚体设计公开于国际申请 WO/2007/146511A2。

[0177] 【核苷酸间连接】

[0178] 本文所述的寡核苷酸的单体经连接基团偶联在一起。适宜地,各单体经连接基团连接到 3' 相邻单体。本领域普通技术人员会明白,在本发明的情景中,在寡核苷酸末端的 5' 单体不包含 5' 连接基团,尽管其可或不包含 5' 末端基团。

[0179] 短语“连接基团”和“核苷酸间键”旨在表示能将 2 个核苷酸共价偶联在一起的基团。特定及优选的例包括磷酸酯基团和硫代磷酸酯基团。在特定实施方式中,本文公开的反义寡核苷酸在各核苷酸间键具有硫代磷酸酯核苷酸间键(例如,SEQ ID NO:19,20,21,22 和 23)。本发明的寡核苷酸或其连续的核苷酸序列的核苷酸经连接基团偶联在一起。适宜地各核苷酸经连接基团连接到 3' 相邻核苷酸。

[0180] 适合的核苷酸间键包括国际申请 WO 2007/031091 中所列的那些,例如在 WO2007/031091 的第 34 页第 1 段落所列的核苷酸间键。

[0181] 其是,在一些实施方式中,优选将核苷酸间键自其正常磷酸二酯修饰为更耐受核酸酶作用的键,诸如硫代磷酸酯或硼烷磷酸酯,这两种键(可被 RNA 酶 H 切割的)也允许减少靶基因的表达中反义抑制的途径。

[0182] 可优选在本文提供的适合的含硫(S)核苷酸间键。也优选硫代磷酸酯核苷酸间键,特别对于间隔聚体的间隔区(B)。硫代磷酸酯键也可用于侧翼区(A和C,及用于连接A或C与D,及在区D内,根据需要)。

[0183] 区A,B和C,可但是包含硫代磷酸酯之外的核苷酸间键,诸如磷酸二酯键,特别是,例如当使用核苷酸类似物保护区A和C之内的核苷酸间键免于内切核酸酶降解时—诸如当区A和C包含LNA核苷酸时。

[0184] 寡核苷酸中的核苷酸间键可为磷酸二酯,硫代磷酸酯或硼烷磷酸酯,以允许靶向的RNA的RNA酶H切割。硫代磷酸酯优选,用于改善的核酸酶抗性和其他原因,诸如制备容易性。

[0185] 在本发明的寡核苷酸的在一方面,核苷酸和/或核苷酸类似物利用硫代磷酸酯基团彼此连接。

[0186] 需知,特别在核苷酸类似物单元之间或相邻于核苷酸类似物单元(一般在区A及或C中)的另外的硫代磷酸寡核苷酸中包括磷酸二酯键,诸如1或2个连接,可修饰寡核苷酸的生物利用度和/或生物—分布,见国际申请WO 2008/053314。

[0187] 在一些实施方式中,诸如以上说到的实施方式中,如果适合,且不特别指示,全部其余连接基团是磷酸二酯或硫代磷酸酯,或其混合物。在一些实施方式中,全部核苷酸间连接基团是硫代磷酸酯。

[0188] 当说到特定间隔聚体寡核苷酸序列,诸如本文提供的那些时,会明白,在各种实施方式中,当连接是硫代磷酸酯键时,可使用替代性的连接,诸如本文公开的那些,例如可使用磷酸酯(磷酸二酯)连接,特别用于连接核苷酸类似物,诸如LNA,单元之间。同样,当说到特定间隔聚体寡核苷酸序列,诸如本文提供的那些时,当C残基被标注为5'甲基修饰的胞嘧啶时,在各种实施方式中,存在于寡核苷酸中的一个或更多C可为未修饰的C残基。

[0189] 【寡核苷酸】

[0190] 本发明的寡核苷酸可,例如,包含选自下列的序列:SEQ ID NO:9,10,11,12,13和14。在特定实施方式中,本发明的寡核苷酸可包含选自下列的序列:SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23。在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸可,例如,选自:表1或4中鉴定的序列。

[0191] 【缀合物】

[0192] 在本发明的情景中,术语“缀合物”旨在表示由本文所述的寡核苷酸与一个或更多非—核苷酸,或非—多核苷酸部分共价连接形成的异源分子。非—核苷酸或非—多核苷酸部分的例包括大分子剂诸如蛋白,脂肪酸链,糖残基,糖蛋白,聚合物或其组合。一般蛋白可为靶蛋白的抗体。典型聚合物可为聚乙二醇。

[0193] 因此,在各种实施方式中,本发明的寡核苷酸可包含:一般由核苷酸的连续的序列组成的多核苷酸区,及还包含非—核苷酸区。当说到由连续的核苷酸序列组成的本发明的寡核苷酸时,化合物可包含非—核苷酸组分,诸如缀合组分。

[0194] 在本发明的各种实施方式中,寡核苷酸被连接到配体/缀合物,其可,例如用来增加寡核苷酸的细胞摄取。国际申请WO 2007/031091提供适合的配体和缀合物。

[0195] 本发明也提供缀合物,其包含在本文描述的本发明的化合物,及至少一个共价附接于所述化合物的非—核苷酸或非—多核苷酸部分。因此,在各种实施方式中,当本发明的

化合物由在本文公开的特定的核酸或核苷酸序列组成时,化合物也可包含至少一个共价附接于所述化合物的非-核苷酸或非-多核苷酸部分(例如不包含一个或更多核苷酸或核苷酸类似物)。

[0196] 缀合可增强本发明的寡核苷酸的活性,细胞分布或细胞摄取。该部分包括,但不限于,抗体,多肽,脂质部分诸如胆甾醇部分,胆酸,硫醚,例如。己基-s-三苯甲基硫醇,硫代胆甾醇,脂肪族链,例如,十二烷二醇或十一碳烷基残基,磷脂,例如,二-十六碳烷基-消旋-甘油或三乙基铵 1,2-二-o-十六碳烷基-消旋-甘油基-3h-膦酸盐,聚胺或聚乙二醇链,金刚烷乙酸,棕榈基部分,十八烷基胺或己基氨基-羰基-氧基胆甾醇部分。

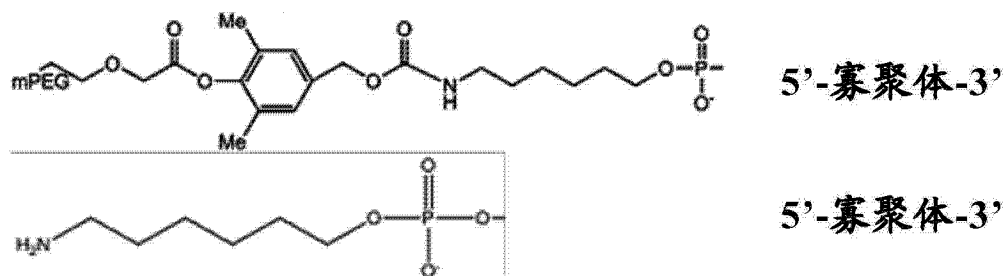
[0197] 本发明的寡核苷酸也可缀合于活性药物物质,例如,阿司匹林,布洛芬,磺胺药物,抗糖尿病药,抗细菌剂或抗生素。

[0198] 在特定实施方式中,缀合的部分是甾醇,诸如胆甾醇。

[0199] 在各种实施方式中,缀合的部分包含带正电的聚合物,诸如例如约 1 ~ 50,诸如 2 ~ 20 诸如 3 ~ 10 个氨基酸残基长的带正电的肽,和/或聚亚烷基氧化物诸如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇(见例如,国际申请 WO 2008/034123)或由其组成。适宜地带正电的聚合物,诸如聚亚烷基氧化物可经接头诸如描述于 WO 2008/034123 的可释放的接头附接于本发明的寡核苷酸。

[0200] 例如,在本发明的缀合物中可使用以下缀合部分:

[0201]



[0202] 【活化的寡核苷酸】

[0203] 术语“活化的寡核苷酸”,如本文所用,指称共价连接(即,官能化的)于至少一个官能部分的本发明的寡核苷酸,该官能部分允许寡核苷酸共价连接于一个或更多缀合的部分(即,本身不是核酸或单体的部分)而形成本文描述的缀合物。一般而言,官能部分会包含能经,例如,腺嘌呤碱基的 3'-羟基或环外 NH₂ 基团而共价键合于寡核苷酸的化学基团,优选是亲水的间隔物和能结合于缀合的部分的末端基团(例如,氨基,巯基或羟基)。在一些实施方式中,此末端基团未被保护(例如, NH₂ 基团)。在其他实施方式中,末端基团例如,由任何适合的保护基诸如描述于由 Theodora W Greene 和 Peter G M Wuts 的“Protective Groups in Organic Synthesis”,第 3 版(John Wiley&Sons, 1999)的那些保护。适合的羟基保护基的例包括酯诸如乙酸酯,芳烷基诸如苄基,二苯甲基或三苯甲基,及四氢吡喃基。适合的氨基保护基的例包括苄基, α-甲基苄基,二苯甲基,三苯甲基,苄氧基羰基,叔-丁氧羰基和酰基诸如三氯乙酰基或三氟乙酰基。在一些实施方式中,官能部分是自我切割的。在其他实施方式中,官能部分是可生物降解的(见例如,美国专利 No. 7, 087, 229)。

[0204] 在一些实施方式中,本发明的寡核苷酸在 5' 端官能化,以便允许缀合的部分共价连接于寡核苷酸的 5' 端。在其他实施方式中,本发明的寡核苷酸可在 3' 端官能化。在仍

其他实施方式中,本发明的寡核苷酸可沿着主链或在杂环碱基部分官能化。在仍其他实施方式中,本发明的寡核苷酸可在独立地选自 5' 端,3' 端,主链和碱基的多于一个位置官能化。

[0205] 在一些实施方式中,活化的本发明的寡核苷酸在合成共价附接于官能部分的一个或更多单体期间通过合并合成。在其他实施方式中,活化的本发明的寡核苷酸用未官能化的单体合成,及寡核苷酸在合成完成后官能化。在一些实施方式中,寡核苷酸用含有氨基烷基接头的阻碍的酯官能化,其中烷基部分具有式 $(\text{CH}_2)_w$, 其中 w 是 1 ~ 10 的整数,优选约 6, 其中烷氨基的烷基部分可为直链或支链,且其中官能团经酯基 $(-\text{O}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_w\text{NH})$ 附接于寡核苷酸。

[0206] 在其他实施方式中,寡核苷酸用含有 $(\text{CH}_2)_w$ - 巯基 (SH) 接头的阻碍的酯官能化,其中 w 是 1 ~ 10 的整数,优选约 6, 其中烷氨基的烷基部分可为直链或支链,且其中官能团经酯基 $(-\text{O}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_w\text{SH})$ 附接于寡核苷酸。

[0207] 在一些实施方式中,巯基-活化的寡核苷酸与聚合物部分诸如聚乙二醇或肽(经二硫键的形成)缀合。

[0208] 上述含有阻碍的酯的活化的寡核苷酸可由本领域知道的任何方法,及尤其是由国际申请 WO 2008/034122 和该文实施例中公开的方法合成。

[0209] 在仍其他实施方式中,本发明的寡核苷酸,利用基本上描述于美国专利 No. 4,962,029 和 4,914,210 的官能化剂(即,一端具有亚磷酰胺的基本上线性试剂,通过亲水间隔物链连接到包含保护的或未保护的巯基,氨基或羟基的对侧端),通过向寡核苷酸导入巯基,氨基或羟基来官能化。该试剂主要与寡核苷酸的羟基反应。在一些实施方式中,该活化的寡核苷酸具有与寡核苷酸的 5' - 羟基偶联的官能化剂。在其他实施方式中,活化的寡核苷酸具有与 3' - 羟基偶联的官能化剂。在仍其他实施方式中,本发明的活化的寡核苷酸具有与寡核苷酸的主链上的羟基偶联的官能化剂。在仍进一步实施方式中,本发明的寡核苷酸用多于一个描述于美国专利 No. 4,962,029 和 4,914,210 的官能化剂官能化。合成该官能化剂及将它们合并到单体或寡核苷酸的方法公开于美国专利 No. 4,962,029 和 4,914,210。

[0210] 在一些实施方式中,将固相结合的寡核苷酸的 5' - 端用二烯基亚磷酰胺衍生物官能化,之后去保护的寡核苷酸经 Diels-Alder 环加成反应缀合,例如,氨基酸或肽。

[0211] 在各种实施方式中,将含有 2' - 糖取代的单体,诸如 2' - 氨基甲酸取代的糖或 2' - (O- 戊基 -N- 酞酰亚氨基) - 脱氧核糖并合到寡核苷酸辅助缀合的部分共价连接于寡核苷酸的糖。在其他实施方式中,通过使用剂诸如,例如,5' - 二甲氧基三苯甲基 -2' -O-(e- 酞酰亚氨基氨基戊基) -2' - 脱氧腺苷 -3' --N, N- 二异丙基 - 氰基乙氧基亚磷酰胺来制备在一个或更多单体的 2' - 位置具有含有氨基的接头的寡核苷酸(见,例如,Manoharan, 等人, Tetrahedron Letters, (1991) 34:7171)。

[0212] 在仍进一步实施方式中,本发明的寡核苷酸可在核碱基上,包括在 N6 嘌呤氨基,在鸟嘌呤的环外 N2,或在胞嘧啶的 N4 或 5 位置具有含有胺的官能部分。在各种实施方式中,该官能化可通过使用已在寡核苷酸合成中官能化的商业试剂达到。

[0213] 一些官能部分是可商购的,例如,异双官能和同双官能连接部分可获自 Pierce Co (Rockford, Ill.)。其他可商购的连接基是 5' - 氨基 - 修饰物 C6 和 3' - 氨基 - 修饰物试

剂,二者可获自Glen研究公司(Sterling, Va.)。5'-氨基-修饰物C6也可获自ABI(Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif)。如Aminolink-2,及3'-氨基-修饰物也可获自Clontech Laboratories Inc(Palo Alto, Calif.)。

[0214] 【药学组合物】

[0215] 本发明的寡核苷酸可在药制剂和组合物中使用。适宜地,该组合物包含药学可接受的溶剂,诸如水或盐水,稀释剂,载体,盐或佐剂。PCT/DK2006/000512 提供适合的及优选的药学可接受的稀释剂,载体和佐剂。适合的剂量,制剂,施用途径,组合物,剂型,与其他治疗剂的组合,前药制剂也提供于PCT/DK2006/000512。

[0216] 本发明也包括药物组合物和制剂,其包括本发明的寡核苷酸。本发明的药物组合物可以许多方式,依赖于是否期望局部或系统性治疗及依赖于待治疗的区施用。施用可为局部(包括经眼及到粘膜包括阴道和直肠递送),肺部,例如,通过吸入或粉或气雾剂的吸入(包括由雾化器);气管内,鼻内,表皮和经皮),口腔或肠胃外。肠胃外施用包括静脉内,动脉内,皮下,腹膜内或肌内注射或输注;或颅内(例如,鞘内,脑室内或心室内施用)。具有至少一个2'-O-甲氧基乙基修饰的寡核苷酸被认为对于口服施用特别有用。

[0217] 用于局部施用的药物组合物和制剂可包括经皮贴剂,软膏,洗液,霜剂,凝胶,滴剂,栓剂,喷雾剂,液剂和粉剂。常规药学载体,水性,粉或油基,增稠剂等可为必需或期望的。优选的局部制剂包括本发明的寡核苷酸在与局部递送剂的混合物中的那些,所述局部递送剂诸如脂质,脂质体,脂肪酸,脂肪酸酯,甾,螯合剂和表面活性剂。优选的脂质和脂质体包括中性(例如二油酰磷脂酰DOPE乙醇胺,二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC,二硬脂酰磷脂酰胆碱),阴离子(例如二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子(例如二油酰基四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰磷脂酰乙醇胺DOTMA)。本发明的寡核苷酸可包裹在脂质体之内或可与其形成复合物,尤其是阳离子脂质体。或者,寡核苷酸可复合为脂质,尤其是阳离子脂质。优选的脂肪酸和酯包括但不限于花生四烯酸,油酸,二十烷酸,月桂酸,辛酸,癸酸,肉豆蔻酸,棕榈酸,硬脂酸,亚油酸,亚麻酸,二癸酸,三癸酸,甘油单油酸酯,甘油二月桂酸酯,甘油基1-单癸酸酯,1-十二烷基氮杂环己烷-2-酮,酰基肉毒碱,酰基胆碱,或C_{1~10}烷基酯(例如肉豆蔻酸异丙酯IPM),单甘油酯,二甘油酯或其药学可接受的盐。局部制剂详细描述于1999年5月20日提交的美国专利申请No. 09/315,298。

[0218] 用于口服施用的组合物和制剂包括粉或颗粒剂,微粒,纳米颗粒,悬浮液或水中的溶液,盐水或非-水性介质,胶囊,凝胶胶囊,囊,片剂或小片剂。增稠剂,调味剂,稀释剂,乳化剂,分散辅助物或粘合剂可为期望的。优选的口控制剂是本发明的寡核苷酸结合一种或更多穿透增强剂、表面活性剂和螯合剂施用的那些。优选的表面活性剂包括脂肪酸和/或其酯或盐,胆汁酸和/或其盐。优选的胆汁酸/盐包括鹅脱氧胆酸(CDCA)和熊脱氧胆酸(UDCA),胆酸,脱氢胆酸,脱氧胆酸,GLUCHOLIC酸,GLYCHOLIC酸,甘氨脱氧胆酸,牛磺胆酸,牛磺脱氧胆酸,钠牛磺-24,25-二氢-夫西地酸盐,GLYCODIHYDROFUSIDATE钠,优选的脂肪酸包括花生四烯酸,十一酸,油酸,月桂酸,辛酸,癸酸,肉豆蔻酸,棕榈酸,硬脂酸,亚油酸,亚麻酸,二癸酸,三癸酸,甘油单油酸酯,甘油二月桂酸酯,甘油基1-单癸酸酯,1-十二烷基氮杂环己烷-2-酮,酰基肉毒碱,酰基胆碱,或单甘油酯,二甘油酯或其药学可接受的盐(例如钠)。也优选的是穿透增强剂的组合,例如,脂肪酸/盐组合胆汁酸/盐。特别优选的组合是月桂酸,癸酸和UDCA的钠盐。其他穿透增强剂包括聚氧乙烯-9-月桂基

醚,聚氧乙烯-20-鲸蜡基醚。本发明的寡核苷酸可以粒状形式(包括喷射的干燥的粒子,或复合而形成微或纳米粒子)经口递送。寡核苷酸络合剂包括聚-氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚烷基丙烯酸酯, POLYOXETHANE, 聚烷基氰基丙烯酸酯;阳离子化的明胶,白蛋白,淀粉,丙烯酸酯,聚乙二醇(PEG)和淀粉;聚烷基氰基丙烯酸酯;DEAE-衍生的聚亚胺,出芽短梗孢糖,纤维素和淀粉。特别优选的络合剂包括壳聚糖, N-三甲基壳聚糖,聚-L-赖氨酸,聚组氨酸,聚鸟氨酸,聚精胺,鱼精蛋白,聚乙基吡啶,聚硫代二乙基氨基-甲基亚乙基 P(TDAE),聚氨基苯乙烯(例如 p-氨基),聚(甲基氰基丙烯酸酯),聚(乙基氰基丙烯酸酯),聚(丁基氰基丙烯酸酯),聚(异丁基氰基丙烯酸酯),聚(异己基氰基丙烯酸酯),DEAE-甲基丙烯酸酯,DEAE-己基丙烯酸酯,DEAE-丙烯酰胺,DEAE-白蛋白和 DEAE-葡聚糖,聚甲基丙烯酸酯,聚己基丙烯酸酯,聚(D,L-乳酸),聚(DL-乳酸-共-乙醇酸(PLGA)),藻酸和聚乙二醇(PEG)。对于口腔制剂,就寡核苷酸和它们的制备物详细描述于美国应用系列 No. 08/886,829(1997年7月1日提交的),美国系列 No. 09/108,673(1998年7月1日提交的),美国系列 No. 09/256,515(1999年2月23日提交的),美国系列 No. 09/082,624(1998年5月21日提交的)和美国系列 No. 09/315,298(1999年5月20日提交的)。

[0219] 用于肠胃外,鞘内,脑室内或心室内施用的组合物和制剂可包括无菌水溶液,其也可含有缓冲剂,稀释剂和其他适合的添加剂诸如但不限于穿透增强剂,载体化合物和其他药理学可接受的载体或赋形剂。

[0220] 本发明的药物组合物包括,但不限于,溶液,乳剂和含有脂质体的制剂。这些组合物可从包括,但不限于,预形成的液体,自身-乳化固体和自身-乳化半固体的各种组分产生。

[0221] 本发明的药制剂,其可便利地以单元剂型存在,可根据药理学工业熟知的常规技术制备。该技术包括以下步骤:使活性成分与药理学载体或赋形剂联合。一般而言,制剂通过使活性成分与液体载体或精细化的固体载体或二者均匀和密切地联合,然后,如果必需,使产物成形来制备。

[0222] 本发明的组合物可配制为任何许多可能的剂型,诸如但不限于片剂,胶囊,凝胶胶囊,液体糖浆,软凝胶,栓剂和灌肠剂。本发明的组合物也可在水性,非-水性或混合的培养基中制成悬浮液。水性悬浮液可还含有增加悬浮液的粘度的物质,包括,例如,羧甲基纤维素钠,山梨糖醇和/或葡聚糖。悬浮液也可含有稳定剂。

[0223] 在本发明的一实施方式中,药物组合物可配制及作为泡沫使用。药理学泡沫包括制剂诸如但不限于乳剂,微乳剂,霜剂,胶冻剂和脂质体。尽管性质上基本上类似,这些制剂在组分和最终产物的一致性方面有变化。该组合物和制剂的制备通常为药物和制剂领域技术人员所知,和可应用于本发明的组合物的制剂。

[0224] 在另一方面,提供方法以使本发明的化合物靶向身体中的特定组织,器官或位置。示例靶包括中枢神经系统的细胞和组织(例如,脑细胞和组织,神经元细胞, Purkinje 细胞, Schwann 细胞, 少突胶质细胞和星形胶质细胞)。靶向化合物的方法为本领域所熟知。在一实施方式中,化合物由直接或局部施用靶向。例如,当靶向血管时,化合物自血管腔之内直接施用到血管的关联部分,例如,单气囊或双气囊导管,或用辅助化合物的慢释放的材料(例如,描述于 Simons 等人, Nature(1992)359:67~70 的普流尼克凝胶系统)通过血管外膜施用。其他用于将化合物局部递送到血管的慢释放技术包括用化合物包被支架。将

寡核苷酸递送到血管的方法公开于美国专利 No. 6, 159, 946。

[0225] 本发明的反义化合物包括任何药学可接受的盐, 酯或该酯的盐, 或在施用到动物包括人之后, 能提供(直接或间接)有生物学活性的代谢物或其残留物的任何其他化合物。因此, 例如, 本公开也涉及本发明的化合物的药物前体和药学可接受的盐, 该药物前体的药学可接受的盐, 及其他生物等价体。

[0226] 术语“药物前体”指示以无活性形式制备的治疗剂, 其通过内源性酶或其他化学品和/或条件的作用而在身体或其细胞之内转化为有活性的形式(即, 药物)。尤其是, 本发明的寡核苷酸的药物前体形式根据国际申请 WO 1993/24510 和 WO 1994/26764 及美国专利 No. 5, 770, 713 中公开的方法制备为 SATE[(S-乙酰-2-硫代乙基)磷酸盐]衍生物。

[0227] 术语“药学可接受的盐”指称本发明的化合物的生理学和药学可接受的盐(即, 保留母化合物的期望的生物学活性及不向其附加不期望的毒理学效果的盐)。对于寡核苷酸, 药学可接受的盐的优选的例包括但不限于(a)与阳离子诸如钠, 钾, 铵, 镁, 钙, 聚胺诸如精胺和亚精胺, 等形成的盐;(b)与无机酸, 例如盐酸, 氢溴酸, 硫酸, 磷酸, 硝酸等形成的酸加成盐;(c)与有机酸诸如, 例如, 乙酸, 草酸, 酒石酸, 琥珀酸, 马来酸, 富马酸, 葡萄糖酸, 柠檬酸, 苹果酸, 抗坏血酸, 苯甲酸, 鞣酸, 棕榈酸, 藻酸, 聚谷氨酸, 萘磺酸, 甲基磺酸, p-甲苯磺酸, 萘二磺酸, 聚半乳糖醛酸等形成的盐;及(d)自元素阴离子形成的盐, 诸如氯, 溴和碘。

[0228] 【应用】

[0229] 本发明的寡核苷酸可用作研究试剂, 例如, 用于诊断学, 治疗学和预防学。在研究中, 该寡核苷酸可用于在细胞和实验动物中特异性抑制伸展的或另外突变的 ATXN3 的合成(一般通过降解或抑制 mRNA 和由此防止蛋白形成), 由此辅助靶的功能分析或评价其作为用于治疗性干预的靶的有用性。

[0230] 在诊断学中, 寡核苷酸可用于由 RNA 印迹, 原位杂交或类似技术检测及定量细胞和组织中 ATXN3 表达。

[0231] 对于治疗学, 通过施用根据本发明的寡核苷酸来治疗疑患可通过调节 ATXN3 的表达来治疗的疾病或病症(例如, SCA3)的动物或人。还提供的是通过施用治疗或预防性地有效量的一种或更多本发明的寡核苷酸或组合物来治疗疑患与 ATXN3 的表达关联的疾病或病情或有患与 ATXN3 的表达关联的疾病或病情的倾向的哺乳动物, 诸如治疗人的方法。本发明的寡核苷酸、缀合物或药物组合物一般以有效量施用。

[0232] 本发明也提供如描述的本发明的化合物或缀合物用于制备治疗在本文所到的病症的药物的用途, 或治疗在本文说到的病症的方法。

[0233] 本发明也提供治疗在本文说到的病症的方法, 所述方法包括给有需求的患者施用在本文描述的本发明的化合物, 和/或本发明的缀合物, 和/或本发明的药物组合物。

[0234] 也被本发明涵盖的是本文所述的寡核苷酸(例如, 寡核苷酸, 其与包含 G987C 单核苷酸多态性的 SEQ ID NO:4 的区杂交)作为药物的用途。类似地, 在本文提供的是本文所述的寡核苷酸(例如, 与编码或相邻于 ATXN3 聚-谷氨酰胺伸展段的 mRNA 杂交寡核苷酸)用于治疗疾病诸如 SCA3 的用途。

[0235] 【医疗适应症】

[0236] 本发明的寡核苷酸和其他组合物可用于治疗与突变的形式的 ATXN3 的过表达或

表达关联的病情（例如，脊髓小脑共济失调 3）。在一些实施方式中，本文公开的寡核苷酸及组合物可用作药物。在其他实施方式中，本文提供的寡核苷酸用于治疗疾病。例如，寡核苷酸（其与包含 G987C 单核苷酸多态性的 SEQ ID NO:4 的区杂交）可用于治疗脊髓小脑共济失调 3。本发明还提供本发明的化合物用于制备治疗在本文说到的疾病，病症或病情的药物的用途。

[0237] 总言之，本发明的一方面针对治疗哺乳动物患或敏感于与突变的，异常，伸展的或另外异常 ATXN3 关联（例如，相关于伸展的 ATXN3 的表达）的病情的方法，包括给哺乳动物施用治疗有效量的靶向包含一个或更多 LNA 单元的 ATXN3 的突变的或天然存在的变体的基因产物（例如，mRNA 编码突变的或伸展的 ATXN3）的寡核苷酸。在本文所说的疾病或病症可，在一些实施方式中，相关于 ATXN3 基因或其蛋白产物与 ATXN3 相关或相互作用的基因中的突变。因此，在一些实施方式中，靶 mRNA 是突变的形式的 ATXN3 mRNA。

[0238] 本发明的一方面针对寡核苷酸或缀合物用于制备治疗在本文说到的疾病，病症或病情的药物的用途。

[0239] 本发明的方法优选用于治疗或预防针对由异常 ATXN3 水平导致的疾病。换言之，在一些实施方式中，本发明是此外针对治疗异常 ATXN3 水平的方法，所述方法包括给有需求的患者施用本发明的寡核苷酸，或本发明的缀合物或本发明的药物组合物。

[0240] 本发明也涉及本文定义的寡核苷酸，组合物或缀合物，其用作药物。

[0241] 本发明还涉及本文定义的化合物，组合物，或缀合物用于制备治疗异常 ATXN3 水平或突变体形式的 ATXN3（诸如等位基因变体，诸如与在本文说到的疾病之一关联的那些）的表达的药物的用途。

[0242] 而且，本发明涉及治疗患疾病或病情诸如在本文说到的那些的受试者的方法。

[0243] 有治疗需求的患者是患或可能患疾病或病症的患者。

[0244] 在一些实施方式中，本文所用的术语“治疗”指称治疗既患疾病（例如在本文说到的疾病或病症），或防止疾病，（即，预防）。需知，在本文说到的治疗可，在一些实施方式中，是预防性的。

[0245] 本发明的反义化合物可用于诊断学，治疗学，预防及用作研究试剂和试剂盒。对于治疗学，通过施用根据本发明的寡核苷酸来治疗疑患可通过调节 ATXN3 的表达来治疗的疾病或病症的动物，优选人。本发明的寡核苷酸可通过向适合的药学可接受的稀释剂或载体添加有效量的寡核苷酸来在药物组合物中利用。

[0246] 本发明的反义化合物对于研究和诊断学有用，因为这些化合物与编码 ATXN3 的核酸杂交，致使容易构建夹层和其他测定来开拓此事实。本发明的寡核苷酸与编码 ATXN3 的核酸杂交可由本领域知道的手段检测。该手段可包括使酶缀合于寡核苷酸，寡核苷酸的放射性标记或任何其他适合的检测手段。也可制备使用用于检测样品中 ATXN3 蛋白或 mRNA 的水平该检测手段的试剂盒。

[0247] 尽管已根据特定实施方式描述本发明的特定化合物，组合物和方法，下列实施例仅旨在例证本发明的化合物及未旨在限制。在本文引用各出版物，参考材料，GenBank 登录号等来描述本发明的背景及提供关于其实施的另外的细节，其通过引用以其整体在此合并。

[0248] 本说明书及权利要求中所用的“a”和“an”，除非另外说明，应理解为包括复数个

指示物。权利要求或说明书在一组的一个或更多成员之间包括“或”被认为满足,如果一个,多于一个,或全部组成员存在于,采用于或另外关联于给定产物或过程,除非相反指示或自情景另外明白。本发明包括精确地组的一个成员存在于,采用于或另外关联于给定产物或过程的实施方式。本发明也包括多于一个,或全部组成员存在于,采用于或另外关联于给定产物或过程的实施方式。此外,需知,本发明包括全部变异,组合和置换,其中一个或更多限制,元件,从句,描述性术语,等,自所列的权利要求中的一个或更多导入从属于相同的基础权利要求的另一权利要求(或,如关联,任何其他权利要求),除非另外指示或除非本领域普通技术人员会明白会出现争议或不一致性。其中元件表示为列表,例如,以 Markush 组或类似形式,需知,元件的各亚组也公开,及任何元件可从组除去。应知,一般而言,当本发明或本发明的方面,被称作包含特定元件,特征,等时,本发明的特定实施方式或本发明的方面由该元件,特征,等组成,或基本上由该元件,特征,等组成。为简单起见,那些实施方式未在每情况中特别用如此多词汇描述。需知,本发明的任何实施方式或方面可自权利要求明确地排除,无论是否说明书叙述了特定排除。

【实施例】

【0249】 下列实施例描述靶向包含位于自病原性 (CAG)_n 重复子一个核苷酸的 G987C 单核苷酸多态性 (SNP) 的突变 ATXN3mRNA 转录物的几种寡核苷酸,以及这些寡核苷酸的各种更优性质。尤其是,实施例 1 展示 20 种寡核苷酸敲落突变体 / 伸展的 ATXN3 的表达的功效和那 20 种寡核苷酸的选择性(例如,相比野生型 ATXN3 表达的抑制而突变体 / 伸展的 ATXN3 表达的抑制)。实施例 2 展示各 12 种寡核苷酸抑制突变体 / 伸展的 ATXN3 的表达的如 IC₅₀ 值测量的强度,及抑制突变体 / 伸展的 ATXN3 表达相比野生型 ATXN3 表达的强度差异。实施例 3 描述各 12 种寡核苷酸及伸展的 G987C ATXN3 靶序列(完美互补性)或野生型 ATXN3 序列(在 G987C SNP 位点一个互补性错配)之间的如熔解温度(T_m)测量的结合能。实施例 4 展示 12 种寡核苷酸的如血浆稳定性测量的核酸酶灵敏度。实施例 5 描述在标准 16 天小鼠研究中选择的寡核苷酸的体内耐受性的评定。

【0250】 【实施例 1:就 20 种寡核苷酸测试的功效和选择性】

【0251】 总 20 种反义寡核苷酸(各具有一个或更多锁核酸(LNA))被设计为选择性地靶向人 ATXN3 突变的(即,伸展的)等位基因。尤其是,20 种 LNA 反义寡核苷酸被设计为选择性地靶向及杂交于在自 ATXN3mRNA 的病原性 (CAG)_n 伸展一个核苷酸的位置(即, G987CSNP)以及该位置的核苷酸上游和 / 或下游包括“C”的伸展的 ATXN3 等位基因的区域。

【0252】 为了表征各 20 种寡核苷酸,将 HEK-293 细胞用包含与萤火虫萤光素酶转录物融合的特征在于具有 81 个 (CAG) 重复子及包括 G987CSNP 的突变的 ATXN3 转录物的编码区的报告子构建体 (pFLAG-ATXN3Q81-FL-FF 萤光素酶) 稳定地转染。将萤光素酶活性与用作读取的突变的 ATXN3 蛋白量关联,及标准化到由 WST-1 测定测量的细胞增殖和活力。WST-1 测定是基于活细胞中四唑鎓盐 WST-1 由线粒体脱氢酶的切割的用于细胞增殖和细胞活力的定量的比色测定。设计定性 PCR (qPCR) 测定来通过靶向 FLAG 序列特异性识别载体表达产物。此外,设计 qPCR 测定来通过靶向 ATXN3 的 5' UTR (其未作为载体表达系统的部分包括) 来特异性识别内源地表达的 ATXN3 产物。

【0253】 为了研究反义寡核苷酸对野生型和伸展的 / 突变的 ATXN3 的表达的效应,优化

qPCR 测定来特异性识别突变的或野生型（内源性）ATXN3 的表达。关于突变的 ATXN3 报告子构建体，设计及优化靶向作为 ATXN3- 报告子构建体的部分的萤光素酶基因（位于 ATXN3 转录物的下游）的 qPCR 测定。关于测定野生型等位基因的表达（在 HEK-293 细胞中内源性表达），设计及优化靶向内源性 ATXN3 转录物的 5' UTR 的 qPCR 测定，及可区别突变 ATXN3 等位基因，因为靶向的 5' UTR 不存在于报告子构建体中。

[0254] 在 pFLAG-ATXN3Q81-FL-FF 萤光素酶-转染的 HEK-293 细胞中，使用剥裸递送（即，未辅助的摄取）作为将寡核苷酸导入细胞的手段，通过暴露于具有 1 μ M, 5 μ M 和 25 μ M 的终浓度的培养基来评定各寡核苷酸的功效和选择性。特别是，寡核苷酸由剥裸递送，之后将细胞洗涤彻底，以消除仍粘附于细胞表面或另外残留在培养容器中的任何寡核苷酸。收获细胞及在转染之后 48 小时由 qPCR 检定，和通过使用关联 qPCR 测定来测定 mRNA 表达的百分率。在全部实验中，包括被指定为 PCON2 的寡核苷酸（靶向萤火虫萤光素酶转录物的 16 聚体间隔聚体）作为突变 ATXN3（报告子构建体）的阳性对照，包括被指定为 PCON1 的寡核苷酸（靶向突变的及野生型 ATXN3 的 16 聚体间隔聚体）作为阳性对照，及包括被指定为 NCON 的寡核苷酸（乱序的寡核苷酸）作为阴性对照。在测试寡核苷酸的缺失下（用水取代）评价模拟物-处理的样品。读取值是相对于模拟物-处理的样品，突变的 ATXN3 转录物（报告子构建体）和内源性 ATXN3 转录物的 mRNA 水平的百分率。

[0255] 本研究的结果作为相对于模拟物-处理的样品的表达的 mRNA 的百分率而显示在图 1A 和 1B 中。用标识符辩识 20 种寡核苷酸，各以“SH”起始。对评价的多数寡核苷酸观察到具有显著的剂量应答的稳健的敲落及，如显示于图 1A 和 1B，及可建立清楚的排序。如显示于图 1A 和 1B，相比模拟物样品中观察的 ATXN3 的表达，依赖于寡核苷酸的浓度（1 μ M, 5 μ M 或 25 μ M），特定寡核苷酸调节（即，减小或另外减少）野生型 ATXN3 和 / 或突变 ATXN3 的表达约 60% 或更少，50% 或更少，40% 或更少，30% 或更少，25% 或更少，20% 或更少，及甚至 10% 或更少。而且，特定寡核苷酸相比野生型 ATXN3 表达，基本上和优先减少突变 ATXN3 的表达（即，下调表达）。例如，1 μ M 浓度的被指定为 SH10 的寡核苷酸（SEQ ID NO:20）减小突变 ATXN3 水平至对应野生型 ATXN3 水平的几乎一半。阳性对照，被指定为 5744，展示突变体和野生型 ATXN3 水平的实质性抑制，显示少到无特异性，因为其未针对突变位点。

[0256] 上述数据例证，各 20 种寡核苷酸在一个或更多评价的浓度显示功效和选择性。自该集体数据鉴定 12 种寡核苷酸及就另外的表征进行选择。

[0257] 【实施例 2：12 种寡核苷酸的 IC₅₀ 测试】

[0258] 对作为实施例 1 中描述的研究的结果选择的 12 种寡核苷酸，通过评定各寡核苷酸的 IC₅₀ 值来进一步评价它们的抑制强度。使选择的寡核苷酸候选体经历在已用之前-描述的报告构建体（pFLAG-ATXN3Q81-FL-FF 萤光素酶）稳定地转染的 HEK-293 细胞中实施的 IC₅₀ 测定。

[0259] 由剥裸，使用具有 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 9 μ M, 27 μ M 和 81 μ M 的终浓度的培养基向细胞导入寡核苷酸。随后在添加寡核苷酸之后 48 小时收获细胞，和提取突变的 ATXN3 转录物（报告子构建体）和内源性 ATXN3 转录物的 mRNA，及由 qPCR 分析。图 2A 和 2B 例证在选择寡核苷酸的剥裸递送后 ATXN3-Q81 转染的细胞中突变的 ATXN3 转录物（MUT）和内源性 ATXN3（WT）mRNA 的表达。结果标准化到内源性 GAPDH 水平，及表示为模拟物处理的样品的百分率。研究重复 3 次，并将值在针对 S 形应答曲线的 Graphpad Prism 中，使用非-线

性回归标绘。

[0260] 自回归测定报告测定中 IC_{50} 值的估计值。 IC_{50} 曲线显示于图 3, 和对应 IC_{50} 值列表于下表 2。作为针对突变的 ATXN3 (MUT) 对比内源性 ATXN3 (WT) 转录物的 IC_{50} 值的倍数差异计算 12 种寡核苷酸的计算的选择性, 和选择领先的 5 种寡核苷酸的 IC_{50} 值显示于下表 2。

[0261] 表 2

[0262]

SH No.	IC_{50} (MUT, 剥裸) μ M	IC_{50} (WT, 剥裸) μ M	选择性 (IC_{50} WT/MUT) 剥裸(倍数)
SH06	2.0	11.4	5.7
SH10	4.5	9.8	2.2
SH13	2.5	8.6	3.4
SH16	3.4	9.2	2.7
SH20	4.8	26.5	5.5

[0263] 关于选择的寡核苷酸对突变体 / 伸展的 ATXN3 报告子 (相对于野生型 ATXN3 转录物) 的选择性, 选择的 12 种中的 9 种寡核苷酸对突变体 / 伸展的报告子, 相比野生型转录物, 展示好于大致 3 倍选择性。

[0264] 【实施例 3: 退火到野生型或突变 ATXN3 的 12 种寡核苷酸的熔解温度】

[0265] 作为以上实施例 2 中描述的 12 种寡核苷酸候选体的表征的部分, 评价各寡核苷酸自互补突变体靶 RNA (指定为 cMUT) 的熔解温度 (T_m)。也针对代表野生型等位基因 (指定为 cWT) (其包括针对位于自 (CAG) 伸展一个核苷酸的 G987C SNP 的单互补性错配) 的 RNA 测试各 12 种寡核苷酸。

[0266] 测定各 12 种寡核苷酸的 T_m 值, 及 T_m 变化 (ΔT_m) 表示各寡核苷酸的熔解及退火温度的平均值。代表 5 种选择的领先寡核苷酸的 T_m 数据显示于表 3, 其中 ΔT_m 定义为 cMUT (完美互补) 和 cWT (在突变位点一个互补错配) 值之间的差异。

[0267] 表 3

[0268]

寡聚体	RNA cMUT T_m ($^{\circ}$ C)	RNA cWT T_m ($^{\circ}$ C)	ΔT_m (MUT-WT) ($^{\circ}$ C)
SH06	76.8	65.9	10.9
SH10	75.9	66.9	9.0
SH13	77.8	68.0	9.8
SH16	76.8	64.0	12.8
SH20	69.2	60.2	9.0

[0269] 当靶向针对 ATXN3 的 WT 等位基因的 12 种寡核苷酸时, 单错配是在位于病原性 (CAG) 伸展的 3' 侧一个核苷酸的 G987C SNP 的 G-C 错配。 ΔT_m 从高至 15.5 $^{\circ}$ C 到低至 -8.7 $^{\circ}$ C, 而对于 5 种选择的寡核苷酸, 如显示于表 3, ΔT_m 从高至 12.8 $^{\circ}$ C 到低至 9.0 $^{\circ}$ C。

[0270] 【实施例 4: 各 12 种寡核苷酸的血浆稳定性】

[0271] 作为实施例 2 和 3 中描述的 12 种寡核苷酸的表征的部分, 评定各 12 种寡核苷酸

的稳定性。特别是,将各 12 种寡核苷酸在含添加的脑组织的脑脊液中于 37°C 温育 120 小时,及取样品及在 0, 24, 48, 96 和 120 小时分析。将样品由 SDS-PAGE,就全长寡核苷酸的损失和降解产物的出现进行评价。将样品与被指定为 PCON 的不稳定的,18 聚体全硫代磷酸酯阳性对照寡核苷酸进行比较。

[0272] 全部寡核苷酸的血浆稳定性被发现在预期的范围之内。如显示于图 4,全部寡核苷酸被发现具有大于约 96 小时的总体半衰期。

[0273] 【实施例 5:寡核苷酸的体内耐受性研究】

[0274] 在 16 天小鼠研究中测试各 12 种寡核苷酸的体内耐受性。在雌性 NMRI 小鼠中测试各寡核苷酸的体内耐受性,主要以评定任何不期望的肝效应。给受试动物在第 0, 3, 7, 10 和 14 天,以 15mg/kg 静脉内施剂,然后在第 16 天处死。将小鼠血清采样及就丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 浓度进行分析。对照小鼠施用盐水对照。如显示于图 5A 和 5B,被指定为 SH06 (SEQ ID NO:19), SH10 (SEQ ID NO:20), SH13 (SEQ ID NO:21), SH16 (SEQ ID NO:22) 和 SH20 (SEQ ID NO:23) 的寡核苷酸相对于盐水对照,展示肝酶水平的可忽略的升高。

[0275] 基于在实施例 1~4 中鉴定的特征,5 种寡核苷酸 (即寡核苷酸指定的 SH06, SH10, SH13, SH16 和 SH20) 显示对于在给受试者施用以减少表达伸展的 (突变体) ATXN3 中使用具有更优性质,及被指定为领先化合物。如上所述,相对于未选择的寡核苷酸群,选择的寡核苷酸被选择为更优。这 5 种领先寡核苷酸的序列显示于下表 4,其中 β-D-氧基 LNA 以粗体大写字母显示,右侧上标“o”,小写字母指示脱氧核糖,及 ‘s’ 和 ‘m’ 分别对应于硫代磷酸酯和 C5-甲基胞嘧啶。

[0276] 表 4

[0277]

标识符	SEQ ID NO	ATXN3 靶核苷酸位置 NM_0049:93	寡核苷酸长度	寡核苷酸序列	mRNA 靶序列
SH06	19	980-994	15	5'-A ^o _s T ^o _s A ^o _s g _s g _s t _s c _s c _s ^m c _s g _s c _s t _s G ^{om} _s C _s ^o T ^o _s -3'	5'-AGCAGCGGGACCUAU-3' (SEQ ID NO: 13)
SH10	20	981-996	16	5'-T ^o _s G ^o _s A ^o _s t _s a _s g _s g _s t _s c _s c _s ^m c _s g _s c _s T ^o _s G _s ^o C ^o _s -3'	5'-GCAGCGGGACCUAUCA-3' (SEQ ID NO: 14)
SH13	21	982-997	16	5'- ^m C _s T ^o _s G ^o _s a _s t _s a _s g _s g _s t _s c _s c _s ^m c _s g _s ^m C _s ^o T ^o _s G ^o _s -3'	5'-CAGCGGGACCUAUCAG-3' (SEQ ID NO: 15)
SH16	22	983-997	15	5'- ^m C _s T ^o _s G ^o _s a _s t _s a _s g _s g _s t _s c _s c _s ^m c _s G _s ^{om} C _s T ^o _s -3'	5'-AGCGGGACCUAUCA G-3' (SEQ ID NO: 16)
SH20	23	984-997	14	5'- ^m C _s T ^o _s g _s a _s t _s a _s g _s g _s t _s c _s c _s ^m C _s G _s ^{om} C ^o _s -3'	5'-GCGGGACCUAUCAG-3' (SEQ ID NO: 17)

[0278] 【实施例 6:脊髓小脑共济失调 3 小鼠模型中寡核苷酸的治疗性益处的展示】

[0279] 将被指定为 SH06, SH10, SH13, SH16 和 SH20 的领先寡核苷酸 (分别对应于 SEQ ID NO:19, 20, 21, 22 和 23) 减少与伸展的 / 突变的 ATXN3 的表达相关的疾病病理学的能力如下进行测定。可开发或选择脊髓小脑共济失调 3 的动物模型。优选的动物模型与人 ATXN3 的

突变（例如，被表征为具有 G987C SNP 的延伸的 ATXN3）关联。活体内功效的主要终点可包括，例如，步态和肢共济失调，构音困难，锥体束征，张力失调，眼球运动病症，面舌虚弱，神经病变，进行性感觉损失，昏睡和帕金森特征的改善。可由本领域知道的各种方法，例如，由物理或组织检查确证疾病表型，及其被各寡核苷酸逆转。

[0280] 待研究的参数可包括，尤其是，相比寡核苷酸 - 未处理的小鼠，寡核苷酸 - 治疗的小鼠中步态和肢共济失调，构音困难，锥体束征，张力失调，眼球运动病症，面舌虚弱，神经病变，进行性感觉损失，昏睡和帕金森特征的统计学地更佳改善。

[0281] 此例中描述的研究可提供如下项的进一步表征：(1) 针对突变体或伸展的 ATXN3 的反义 - 锁核酸寡核苷酸，其作为疾病 SCA3 或 Machado-Joseph 病的有效治疗，(2) 用于特定脊髓小脑共济失调 3 疾病模型及用作药代动力学和毒理学研究的候选体的寡核苷酸和 (3) 用于临床施用本文所述的寡核苷酸的施剂及剂量 - 进程。

[0282] 【序列】

[0283]

SEQ ID NO: 1	野生型 ATXN3	NM_004993
SEQ ID NO: 2	WT ATXN3 的聚焦的区	961 cagcagcagc agcagcagca 981 gcagggggac ctatcaggac 1001 agagttcaca tccatgtgaa
SEQ ID NO: 3	WT ATXN3 的更聚焦的区	977 agcagcaggg ggacctatca 997g
SEQ ID NO: 4	突变 ATXN3 (G987C)	SNP ID rs12895357
SEQ ID NO: 5	编码 G987C 突变的约核苷酸 961 ~ 1020 的 MUT ATXN3 的聚焦的区	961 cagcagcagc agcagcagca 981 gcagggggac ctatcaggac 1001 agagttcaca tccatgtgaa
SEQ ID NO: 6	编码 G987C 突变的约核苷酸 977 ~ 997 的 MUT ATXN3 的更聚焦的区	977 agcagcaggg ggacctatca 997g
SEQ ID NO: 7	ATAGGTC <u>CCCG</u> CTGCT	
SEQ ID NO: 8	TGATAGGTC <u>CCCG</u> CTGC	
SEQ ID NO: 9	CTGATAGGTC <u>CCCG</u> CTG	
SEQ ID NO: 10	CTGATAGGTC <u>CCCG</u> T	
SEQ ID NO: 11	CTGATAGGTC <u>CCCG</u> C	
SEQ ID NO: 12	ATAGGTC <u>CCCG</u> C	
SEQ ID NO: 13	AGCAGC <u>GGG</u> ACC ^U AU	
SEQ ID NO: 14	GCAGC <u>GGG</u> ACC ^U AUCA	
SEQ ID NO: 15	CAGC <u>GGG</u> ACC ^U AUCAG	
SEQ ID NO: 16	AGC <u>GGG</u> ACC ^U AUCAG	
SEQ ID NO: 17	G <u>CGG</u> ACC ^U AUCAG	
SEQ ID NO: 18	G <u>CGG</u> ACC ^U AU	
SEQ ID NO: 19	SH06	5'-A _s ⁰ T _s ⁰ A _s ⁰ g _s g _s t _s c _s c _s ^m c _s g _s c _s t _s G _s ^{0m} C _s ⁰ T _s ⁰ -3'
SEQ ID NO: 20	SH10	5'-T _s ⁰ G _s ⁰ A _s ⁰ t _s a _s g _s g _s t _s c _s c _s ^m c _s g _s c _s T _s ⁰ G _s ^{0m} C _s ⁰ -3'
SEQ ID NO: 21	SH13	5'- ^m C _s ⁰ T _s ⁰ G _s ⁰ a _s t _s a _s g _s g _s t _s c _s c _s ^m c _s g _s ^m C _s ⁰ T _s ⁰ G _s ⁰ -3'
SEQ ID NO: 22	SH16	5'- ^m C _s ⁰ T _s ⁰ G _s ⁰ a _s t _s a _s g _s g _s t _s c _s c _s ^m c _s G _s ^{0m} C _s ⁰ T _s ⁰ -3'
SEQ ID NO: 23	SH20	5'- ^m C _s ⁰ T _s ⁰ g _s a _s t _s a _s g _s g _s t _s c _s c _s ^m C _s ⁰ G _s ^{0m} C _s ⁰ -3'

[0284] SEQ ID NO:1

[0285] 智人 (Homo sapiens) ATXN3 mRNA

[0286] NM_004993

[0287]

1 gagaggggca gggggcggag ctggaggggg tggttcggcg tgggggccgt tggctccaga

61 caaataaaca tggagtccat cttccacgag aaacaagaag gctcactttg tgctcaacat

121 tgcctgaata acttattgca aggagaatat tttagccctg tggaattatc ctcaattgca

[0288]

181 catcagctgg atgaggagga gaggatgaga atggcagaag gaggagtac tagtgaagat
241 tatcgcacgt ttttacagca gccttctgga aatatggatg acagtggttt tttctctatt
301 caggttataa gcaatgcctt gaaagtttgg ggtttagaac taatcctgtt caacagtcca
361 gagtatcaga ggctcaggat cgatcctata aatgaaagat catttatatg caattataag
421 gaacactggg ttacagttag aaaattagga aaacagtggg ttaacttgaa ttctctcttg
481 acgggtccag aattaatatc agatacatat cttgcacttt tcttggctca attacaacag
541 gaaggttatt ctatatttgt cgtaaagggt gatctgccag attgcgaagc tgaccaactc
601 ctgcagatga ttaggggtcca acagatgcat cgacccaaaac ttattggaga agaattagca
661 caactaaaag agcaaagagt ccataaaaaca gacctggaac gagtgttaga agcaaagat
721 ggctcaggaa tgtagacga agatgaggag gatttgcaga gggctctggc actaagtcgc
781 caagaaattg acatggaaga tgaggaagca gatctccgca gggctattca gctaagtatg
841 caaggtagtt ccagaaacat atctcaagat atgacacaga catcaggtac aaatcttact
901 tcagaagagc ttcggaagag acgagaagcc tactttgaaa aacagcagca aaagcagcaa
961 cagcagcagc agcagcagca gcagggggac ctatcaggac agagttcaca tccatgtgaa
1021 aggccagcca ccagttcagg agcacttggg agtgatctag gtgatgctat gagtgaagaa
1081 gacatgett caggcagctgt gaccatgtct ttagaaactg tcagaaatga tttgaaaaca
1141 gaaggaaaa aataatacct ttaaaaaata atttagatat tcatactttc caacattatc
1201 ctgtgtgatt acagcatagg gtccactttg gtaatgtgtc aaagagatga ggaaataaga
1261 cttttagcgg tttgcaaaca aaatgatggg aaagtggaac aatgcgtcgg ttgtaggact
1321 aaataatgat cttccaaata ttagccaaag aggcattcag caattaaaga catttaaaat
1381 agttttctaa atgtttcttt ttcttttttg agtgtgcaat atgtaacatg tctaaagtta
1441 gggcattttt ctggatcct tttgcagact agctaattag ctctcgctc aggcattttc
1501 catatagttt gttttcttt tctgtcttgt aggtaagttg gctcacatca tgtaatagtg
1561 gctttcattt cttattaacc aaattaacct ttcaggaaag tatctctact ttctgatgt
1621 tgataatagt aatggttcta gaaggatgaa cagttctccc ttcaactgta taccgtgtgc
1681 tccagtgtt tcttgtgtt ttttctctga tcacaacttt tctgctacct ggttttcatt
1741 atttccac aattctttt aaagatggta atctttctg aggttagcg ttttaagccc
1801 tacgatggga tcattatttc atgactggg cgttcctaaa ctctgaaatc agccttgcac
1861 aagtacttga gaataaatga gcatttttta aaatgtgtga gcatgtgctt tcccagatgc

[0289]

1921 tttatgaatg tcttttctact tatatcaaaa ccttacagct ttgttgcaac cccttcttcc
1981 tgcgccttat tttttccttt cttctccaat tgagaaaact aggagaagca tagtatgcag
2041 gcaagtctcc ttctgttaga agactaaaca tacgtaccca ccatgaatgt atgatacatg
2101 aaatttggcc ttcaatttta atagcagttt tattttattt tttctctat gactggagct
2161 ttgtgttctc tttacagttg agtcatggaa tgtaggtgtc tgcttcacat cttttagtag
2221 gtatagcttg tcaaagatgg tgatctggaa catgaaaata atttactaat gaaaatatgt
2281 ttaaatttat actgtgattt gacacttgca tcatgtttag atagcttaag aacaatggaa
2341 gtcacagtac ttagtggatc tataaataag aaagtccata gttttgataa atattctctt
2401 taattgagat gtacagagag tttcttgctg ggtcaatagg atagtatcat tttggtgaaa
2461 accatgtctc tgaaattgat gttttagttt cagtgtccc tatccctcat tctccatctc
2521 cttttgaagc tcttttgaat gttgaattgt tcataagcta aatccaaga aatttcagct
2581 gacaacttcg aaaattataa tatggtatat tgccctctg gtgtgtggct gcacacattt
2641 tatcagggaa agttttttga tctaggattt attgctaact aactgaaaag agaagaaaaa
2701 atatctttta tttatgatta taaaatagct tttcttcga tataacagat tttttaagtc
2761 attattttgt gccaatcagt tttctgaagt ttcccttaca caaaaggata gctttatttt
2821 aaaatctaaa gtttctttta atagttaaaa atgtttcaga agaattataa aactttaaaa
2881 ctgcaagga tgttggagtt tagtactact ccctcaagat ttaaaaagct aaatatttta
2941 agactgaaca tttatgttaa ttattaccag tgtgtttgtc atattttcca tggatatttg
3001 ttcattacct ttttcattg aaaagttaca ttaaactttt catacacttg aattgatgag
3061 ctacctaata taaaaatgag aaaaccaata tgcattttaa agttttaact ttagagttta
3121 taaagttcat atatacccta gttaaagcac ttaagaaaat atggcatgtt tgacttttag
3181 ttcttagaga gtttttgttt ttgtttttgt tttttttga gacggagtct tgctatgtct
3241 cccaggettg agggcagtg catgatctcg gctcactaca acttccacct cccgggttca
3301 agcaattctc ctgcctcagc ctccagagta gctgggatta caggcgcaca ccaccacacc
3361 cggcagattt ttgtattttt ggtagagacg cggtttcatc atgtttggcc aggctggctc
3421 cgaactcctg acctcaggtg atccgcctgc cttggcctcc caaagtgttg ggattacagg
3481 catgagccac tgcgcctggc cagctagaga gtttttaag cagagctgag cacacactgg
3541 atgcgtttga atgtgtttgt gtagtttgtt gtgaaattgt tacatttagc aggcagatcc
3601 agaagcacta gtgaactgtc atcttgggtg ggttggctta aatttaattg actgtttaga

[0290]

3661 ttccatttct taattgattg gccagtatga aaagatgcc a gtgcaagtaa ccatagtatc
3721 aaaaaagtta aaaattattc aaagctatag tttatacatc aggtactgcc atttactgta
3781 aaccacctgc aagaaagtca ggaacaacta aattcacaag aactgtcctg ctaagaagtg
3841 tattaagat ttccattttg ttttactaat tgggaacatc ttaatgttta atatttaaac
3901 tattggatc atttttctaa tgtataatth gtattactgg gatcaagtat gtacagtggg
3961 gatgctagta gaagtttaag ccttggaat accactttca tattttcaga tgtcatggat
4021 ttaatgagta atttatgttt ttaaaattca gaatagttaa tctctgatct aaaaccatca
4081 atctatgttt tttacggtaa tcatgtaa atttcagtaa tataaactgt ttgaaaaggc
4141 tgctgcaggt aaactctata ctaggatctt ggccaaataa tttacaattc acagaatatt
4201 ttatttaagg tgggtccttt ttttttgtc cttaaaactt gatttttctt aactttattc
4261 atgatgccaa agtaaagag gaaaaaaact caaaaccagt tgagtatcat tgcagacaaa
4321 actaccagta gtccatattg tttaatatta agttgaataa aataaatttt atttcagtca
4381 gagcctaaat cacattttga ttgtctgaat ttttgatact atttttaaaa tcatgctagt
4441 ggaggctggg cgtggtagct cacgcctgta atcccagcat tttgggaggc cgaagtgggt
4501 ggatcacgag gtcgggagtt cgagaccagc ttggccaaaa tggtgaaacc ccatctgtac
4561 taaaaactac aaaaattagc tgggcgcggt ggcaggtgcc tgtaatcca gctacctggg
4621 agtctgaggc aggagaattg cttgaaccct ggcgacagag gatgcagtga gccaagatgg
4681 tgccactgta ctccagactg ggcgacagag tgagactctg tctcaaaaaa aaaaaaaaaa
4741 tcatgctagt gccaagagct actaaattct taaaaccggc ccattggacc tgtacagata
4801 aaaaatagat tcagtgcata atcaaaat atgataattta aatcttaag tagaaaaata
4861 aatcttgatg ttttaaatc ttacgaggat tcaatagta atattgatga tctcccggct
4921 ggggtgcagt gctcacgcct gtaatcccag cagttctgga ggctgagggt ggccaatcac
4981 ttcaggccag gagttcaaga ccagtctggg caacatgggt aaacctcgtt tctactaaaa
5041 atacaaaaat tagccgggagc tggttgcaca cacttgtaat ccagctact caggaggcta
5101 agaatcgcat gagcctagga ggcagagggt gcagagtgcc aagggtcac cactgcattc
5161 cagcctgccc aacagagtga gacactgttt ctgaaaaaa aaaatatata tatatatata
5221 tatatgtgtg tatatatata tgtatatata tatgacttcc tattaataaac tttatcccag
5281 tcgggggagc tggctcacgc ctgtaatccc aacactttgg gaggtgagg caggtggatc
5341 acctgaagtc cggagtttga gaccagcctg gccaacatgg tgaaacccca tcttactaa

[0291]

5401 aaatacaaaa cttaagccag gtatggtggc gggcacctgt aatcccagtt acttgggagg
5461 ctgaggcagg agaatcgttt aaaccaggga ggtggaggtt gcagtgagct gagatcgtgc
5521 cattgcactc tagcctgggc aacaagagta aaactccatc ttaaaggttt gtttgttttt
5581 ttttaatccg gaaacgaaga ggcgttgggc cgctattttc tttttctttc tttctttctt
5641 tctttttttt tttttctgag acggagtcta gctctgctgc ccaggctgga gtacaatgac
5701 acgatgttgg ctcaactgcaa cctccacctc ctgggttcaa gcgattctcc tgcctcagcc
5761 tcccaagtac ctgggattac aggcacctgc cactacacct ggcgaaatatt tgtttttttt
5821 agtagagacg ggcttttacc atgttaggct ggtctcaaac tcctgacctc aggtgatctg
5881 cctgccttgg cctcccaaag tgctgggatt acaggtgcag gccaccacac ccggccttgg
5941 gccactgttt tcaaagtga ttgtttgttg tatcgagtcc ttaagtatgg atatatatgt
6001 gaccctaatt aagaactacc agattggatc aactaatcat gtcagcaatg taaataactt
6061 tatttttcat attcaaaata aaaactttct tttatttctg gcccctttat aaccagcatc
6121 tttttgcttt aaaaaatgac ctggctttgt attttttttag tcttaaacat aataaaaaata
6181 tttttgttct aatttgcttt catgagtga gattattgac atcgttggta aattctagaa
6241 ttttgatttt gtttttaat ttgaagaaaa tctttgctat tattattttt tccaagtggg
6301 ctggcatttt aagaattagt gctaataacg taacttctaa atttgctgta attggcatgt
6361 ttaatagcat atcaaaaaac attttaagcc tgtggattca tagacaaagc aatgagaaac
6421 attagtaaaa tataaatgga tattcctgat gcatttagga agctctcaat tgtctcttgc
6481 atagttcaag gaatgttttc tgaatttttt taatgctttt ttttttttg aaagaggaaa
6541 acatacattt ttaaatgtga ttatctaatt tttacaacac tgggctatta ggaataactt
6601 tttaaaaatt actgttctgt ataaatattt gaaattcaag tacagaaaat atctgaaaca
6661 aaaagcattg ttgtttggcc atgatacaag tgcactgtgg cagtgccgct tgctcaggac
6721 ccagcccctgc agcccttctg tgtgtgctcc ctcgttaagt tcatttgctg ttattacaca
6781 cacaggcctt cctgtctggg cgttagaaaa gccgggcttc caaagcactg ttgaacacag
6841 gattctgttg ttagtgtgga tgttcaatga gttgtatttt aaatatcaaa gattatataa
6901 taaagataat gtttgctttt cta

[0292] SEQ ID NO:2

[0293] 智人 (Homo sapiens) ATXN3mRNA (WT ;不包含 G987C SNP) 的核苷酸 961-1020

[0294] 961 cagcagcagc agcagcagca gcagggggac ctatcaggac agagttcaca tccatgtgaa

[0295] SEQ ID NO:3

[0296] 智人 (Homo sapiens) ATXN3mRNA (WT ;不包含 G987C SNP) 的核苷酸 977-997

- [0297] 977 agcagcaggg ggacctatca g
- [0298] SEQ ID NO:4
- [0299] SNP ID rs12895357
- [0300] SEQ ID NO:5
- [0301] 突变智人 (Homo sapiens)ATXN3, mRNA(包含 G987C SNP) 的核苷酸 961-1020
- [0302] 961 cagcagcagc agcagcagca gcagcgggac ctatcaggac agagttcaca tccatgtgaa
- [0303] SEQ ID NO:6
- [0304] 突变智人 (Homo sapiens)ATXN3, mRNA(包含 G987C SNP) 的核苷酸 977-997
- [0305] 977 agcagcagcg ggacctatca g
- [0306] SEQ ID NO:7
- [0307] 5' -ATAGGTCCCGCTGCT-3'
- [0308] SEQ ID NO:8
- [0309] 5' -TGATAGGTCCCGCTGC-3'
- [0310] SEQ ID NO:9
- [0311] 5' -CTGATAGGTCCCGCTG-3'
- [0312] SEQ ID NO:10
- [0313] 5' -CTGATAGGTCCCGCT-3'
- [0314] SEQ ID NO:11
- [0315] 5' -CTGATAGGTCCCGC-3'
- [0316] SEQ ID NO:12
- [0317] 5' -ATAGGTCCCGC-3'
- [0318] SEQ ID NO:13
- [0319] SH06 的 mRNA 靶
- [0320] 5' -AGCAGCGGGACCUAU-3'
- [0321] SEQ ID NO:14
- [0322] SH10 的 mRNA 靶
- [0323] 5' -GCAGCGGGACCUAUCA-3'
- [0324] SEQ ID NO:15
- [0325] SH13 的 mRNA 靶
- [0326] 5' -CAGCGGGACCUAUCAG-3'
- [0327] SEQ ID NO:16
- [0328] SH16 的 mRNA 靶
- [0329] 5' -AGCGGGACCUAUCAG-3'
- [0330] SEQ ID NO:17
- [0331] SH20 的 mRNA 靶
- [0332] 5' -GCGGGACCUAUCAG-3'
- [0333] SEQ ID NO:18
- [0334] mRNA 靶
- [0335] 5' -GCGGGACCUAU-3'

- [0336] SEQ ID NO:19
- [0337] SH06
- [0338] 5' -A_s^oT_s^oA_s^og_sg_st_sc_sc_s^mc_sg_sc_st_sG_s^{om}C_s^oT^o-3'
- [0339] SEQ ID NO:20
- [0340] SH10
- [0341] 5' -T_s^oG_s^oA_s^ot_sa_sg_sg_st_sc_sc_s^mc_sg_sc_sT_s^oG_s^{om}C^o-3'
- [0342] SEQ ID NO:21
- [0343] SH13
- [0344] 5' -^mC_s^oT_s^oG_s^oa_st_sa_sg_sg_st_sc_sc_s^mc_sg_s^mC_s^oT_s^oG^o-3'
- [0345] SEQ ID NO:22
- [0346] SH16
- [0347] 5' -^mC_s^oT_s^oG_s^oa_st_sa_sg_sg_st_sc_sc_s^mc_sG_s^{om}C_s^oT^o-3'
- [0348] SEQ ID NO:23
- [0349] SH20
- [0350] 5' -^mC_s^oT_s^og_sa_st_sa_sg_sg_st_sc_sc_s^mC_s^oG_s^{om}C^o-3'

剥裸后48h的Atxn3Q81细胞中Atxn3突变体(MUT)和野生型(WT) mRNA表达

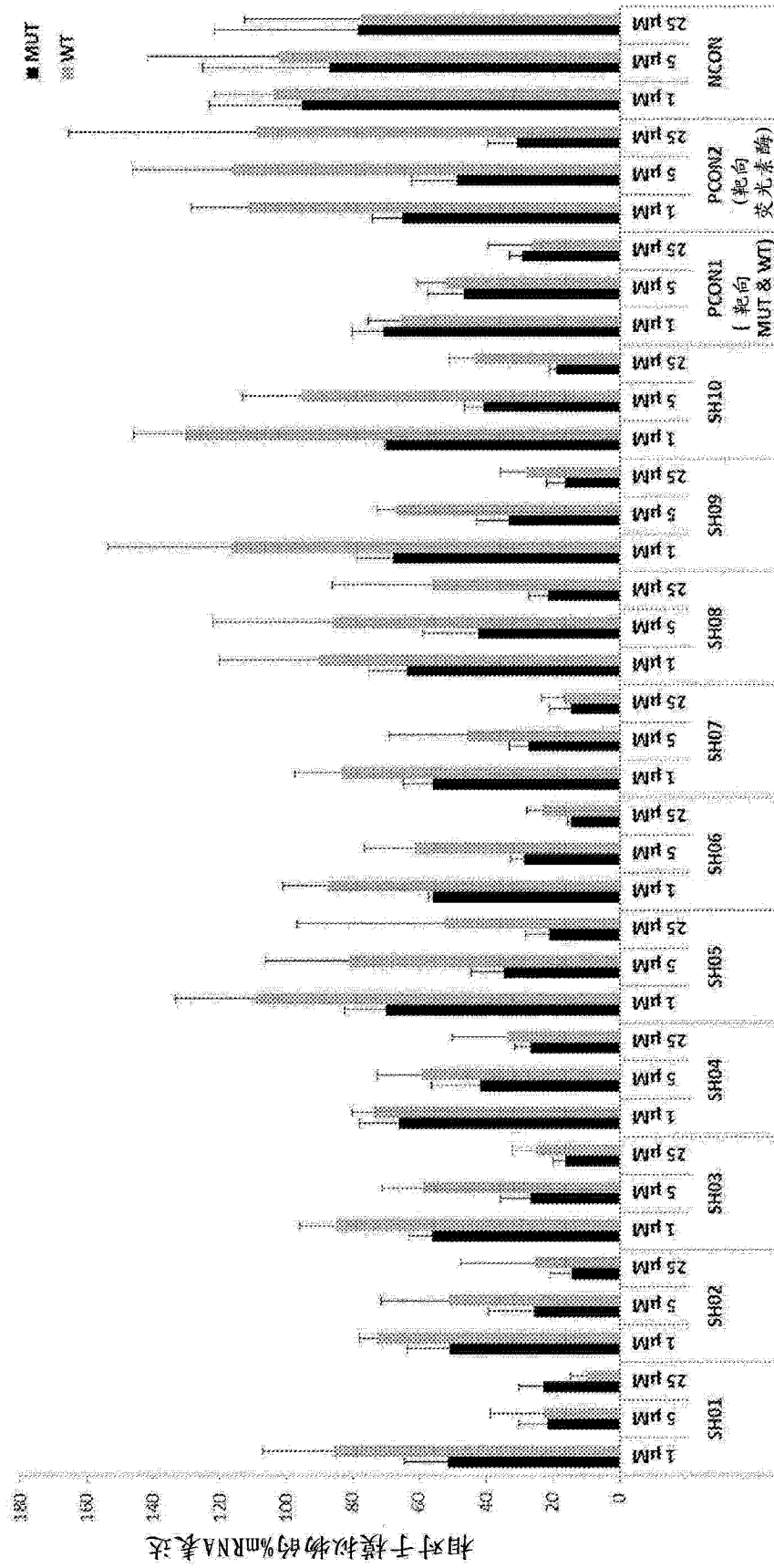


图 1A

剥裸后48h的Atxn3Q81细胞中Atxn3突变体(MUT)和野生型(WT)mRNA表达

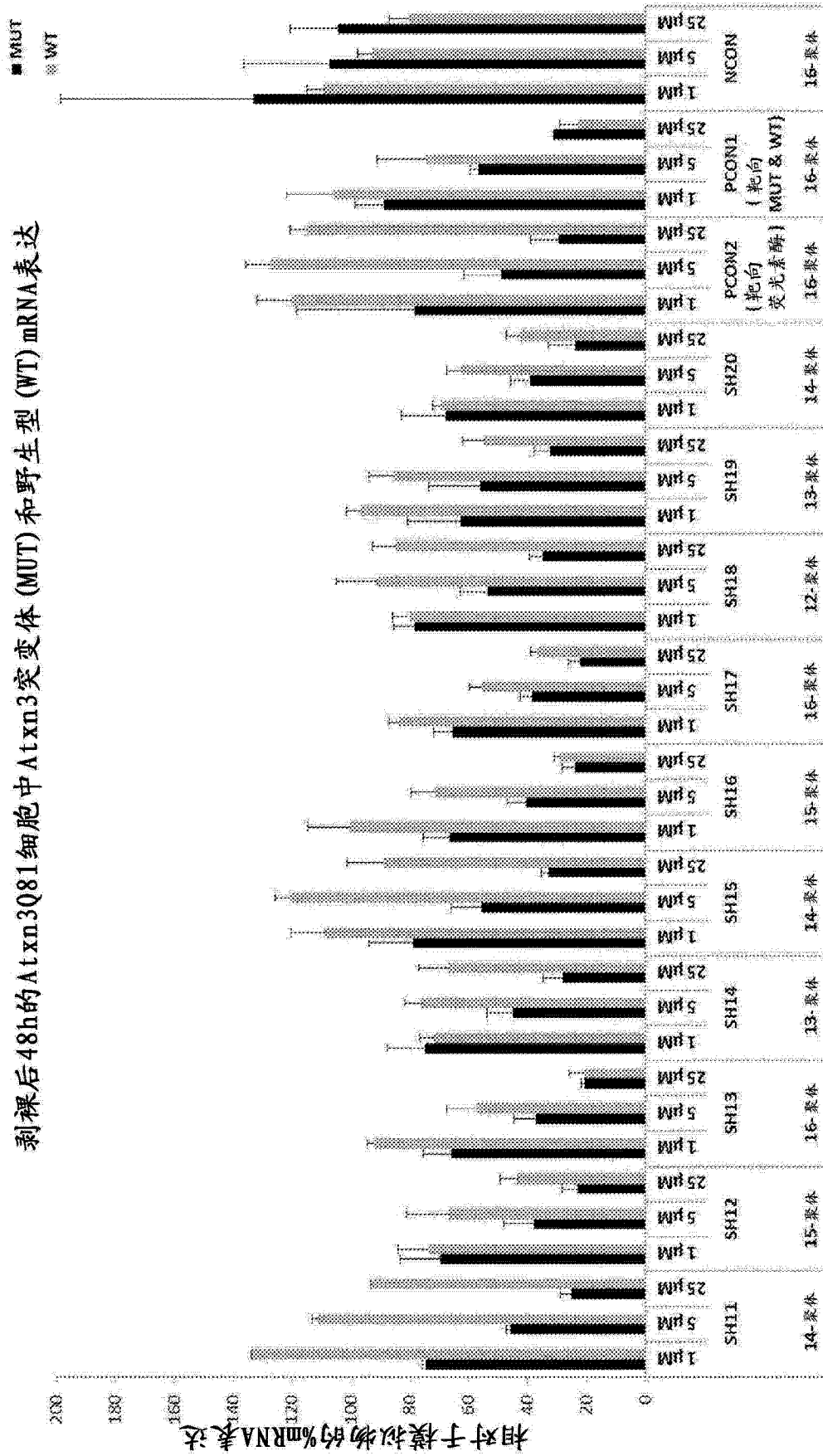


图 1B

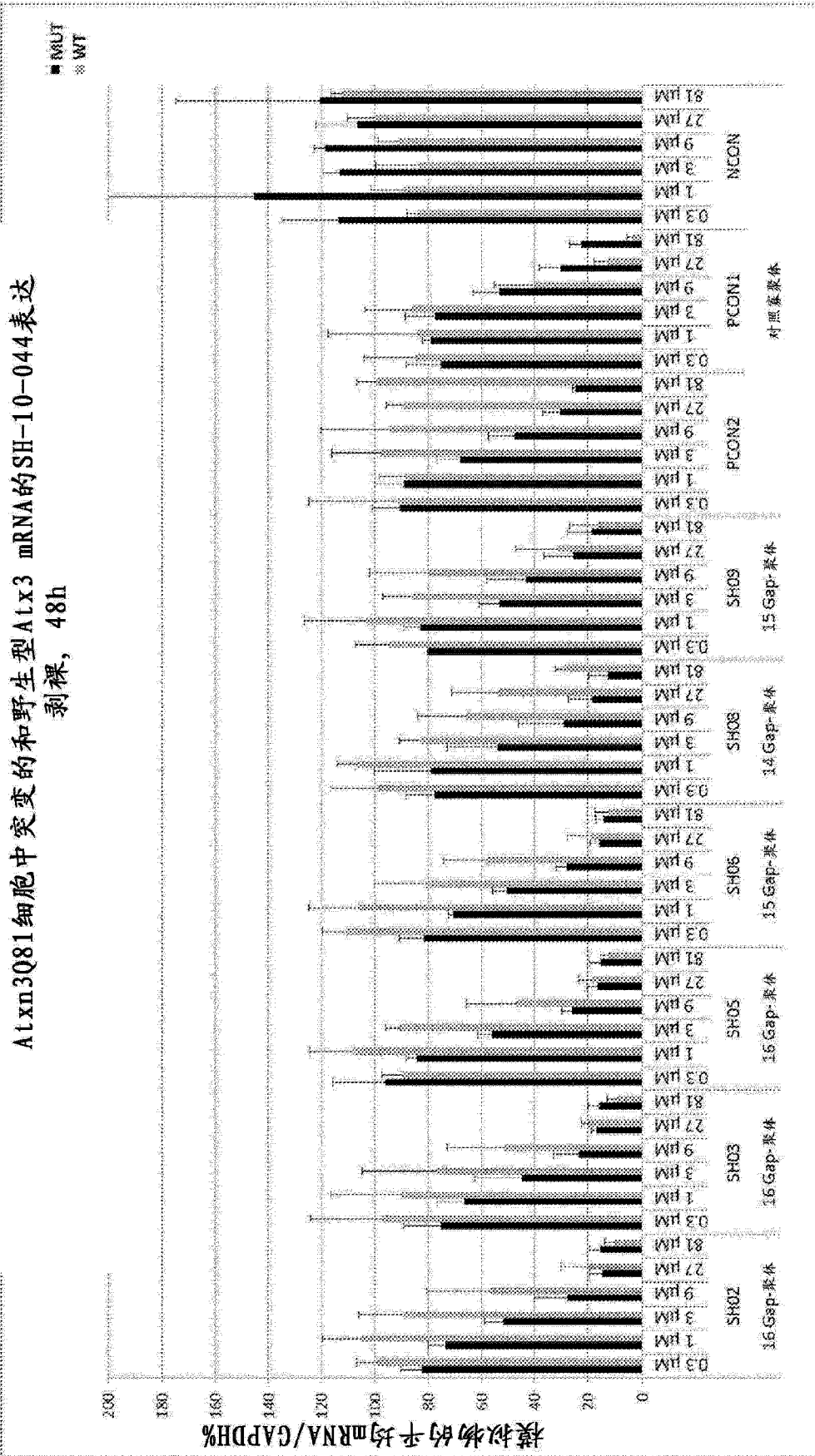


图 2A

Atxn3Q81细胞中突变的和野生型Atxn3 mRNA的SH-10-045表达
剥裸, 48h

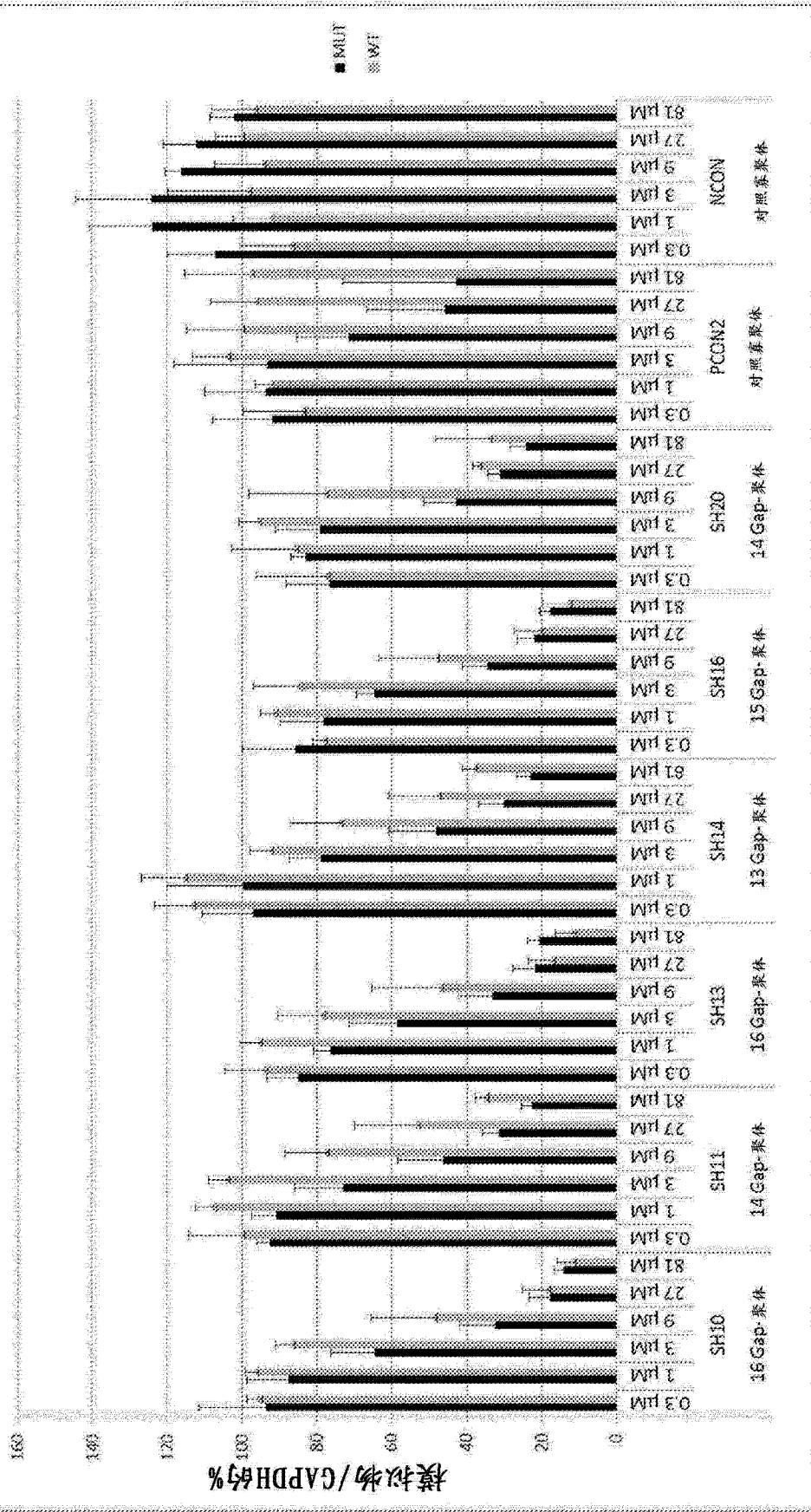


图 2B

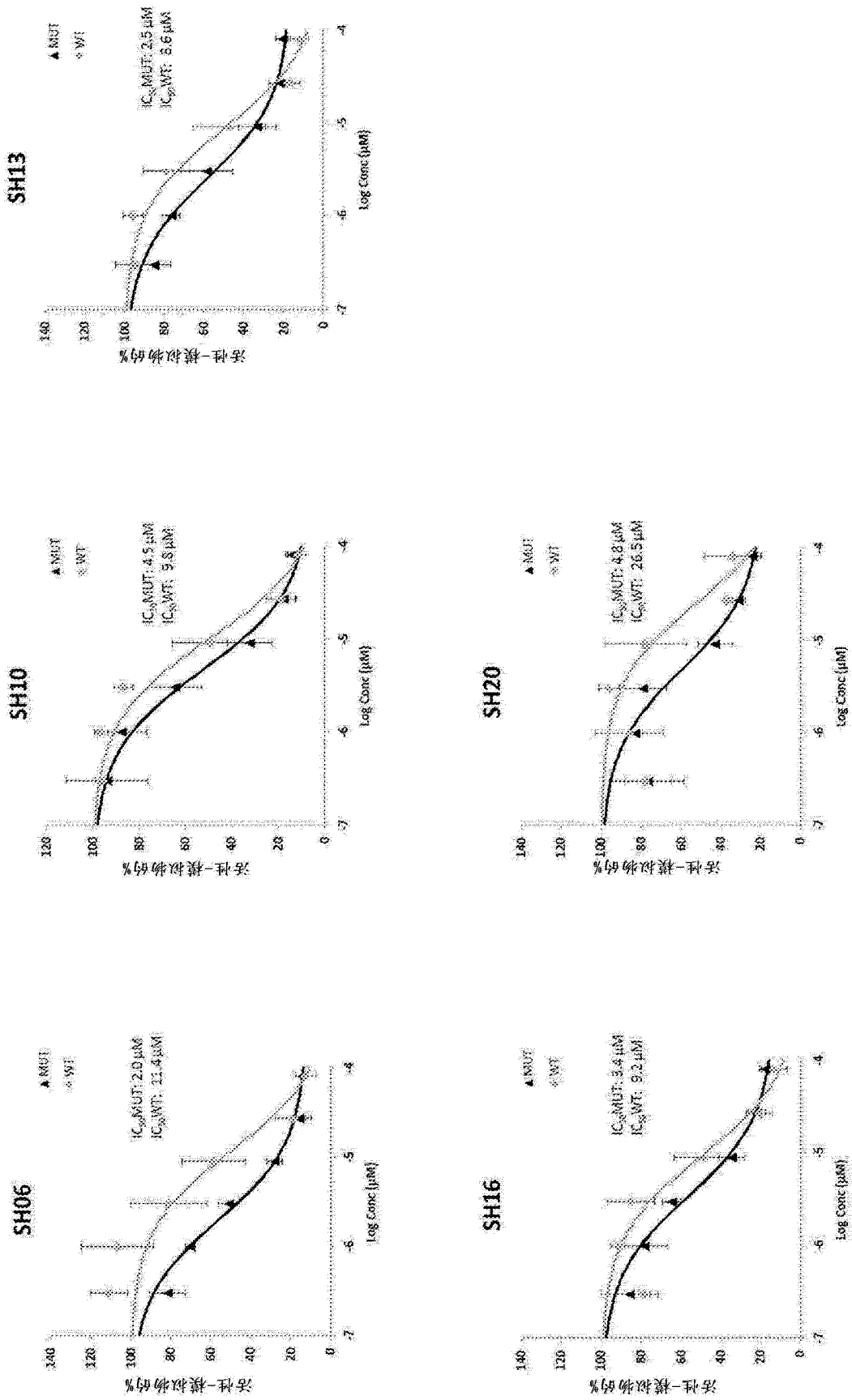


图 3

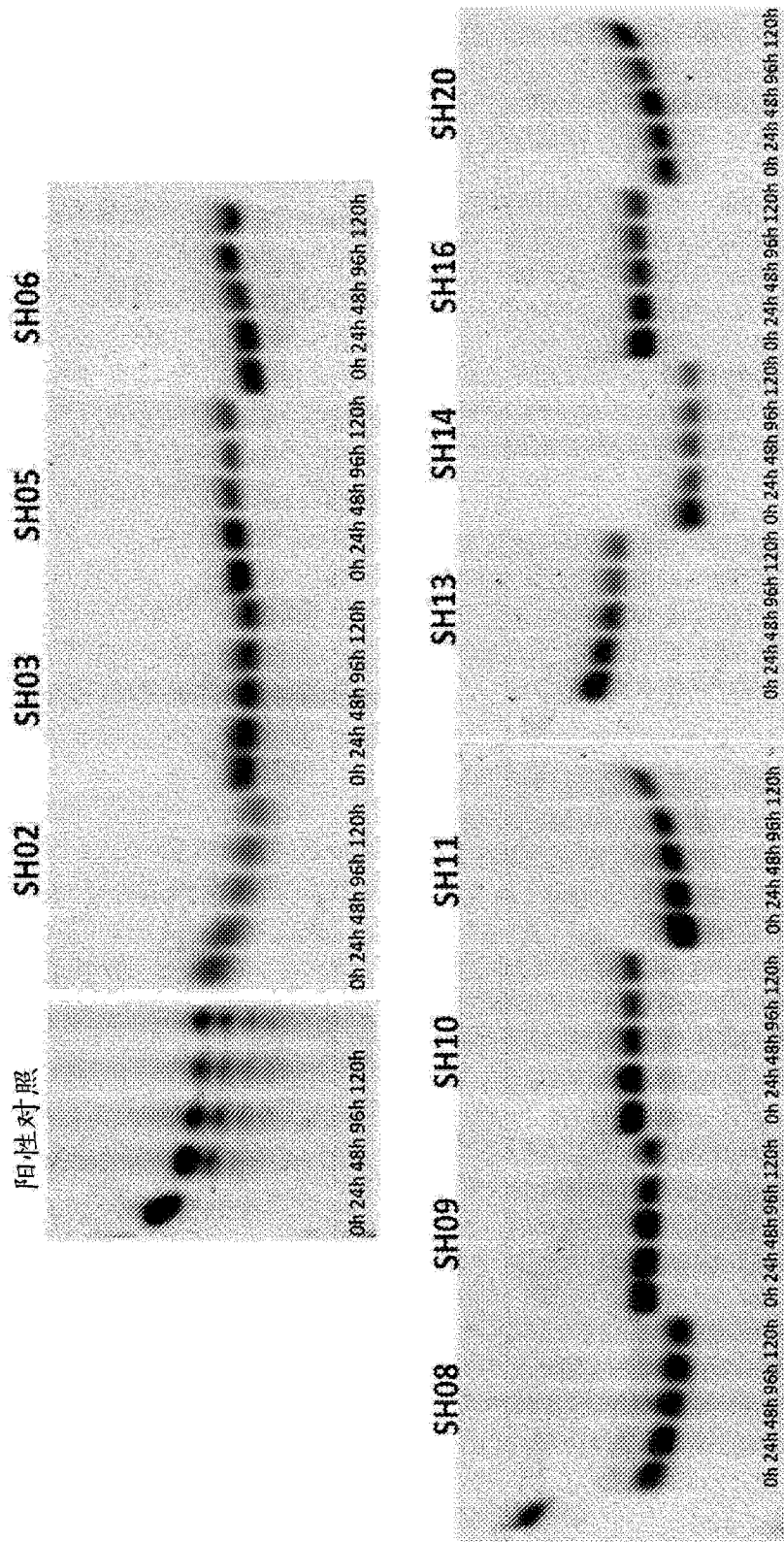


图 4

第16天血清中的SH-10-50 (PD-10-028) ALT活性
(5 x 15mg/kg)

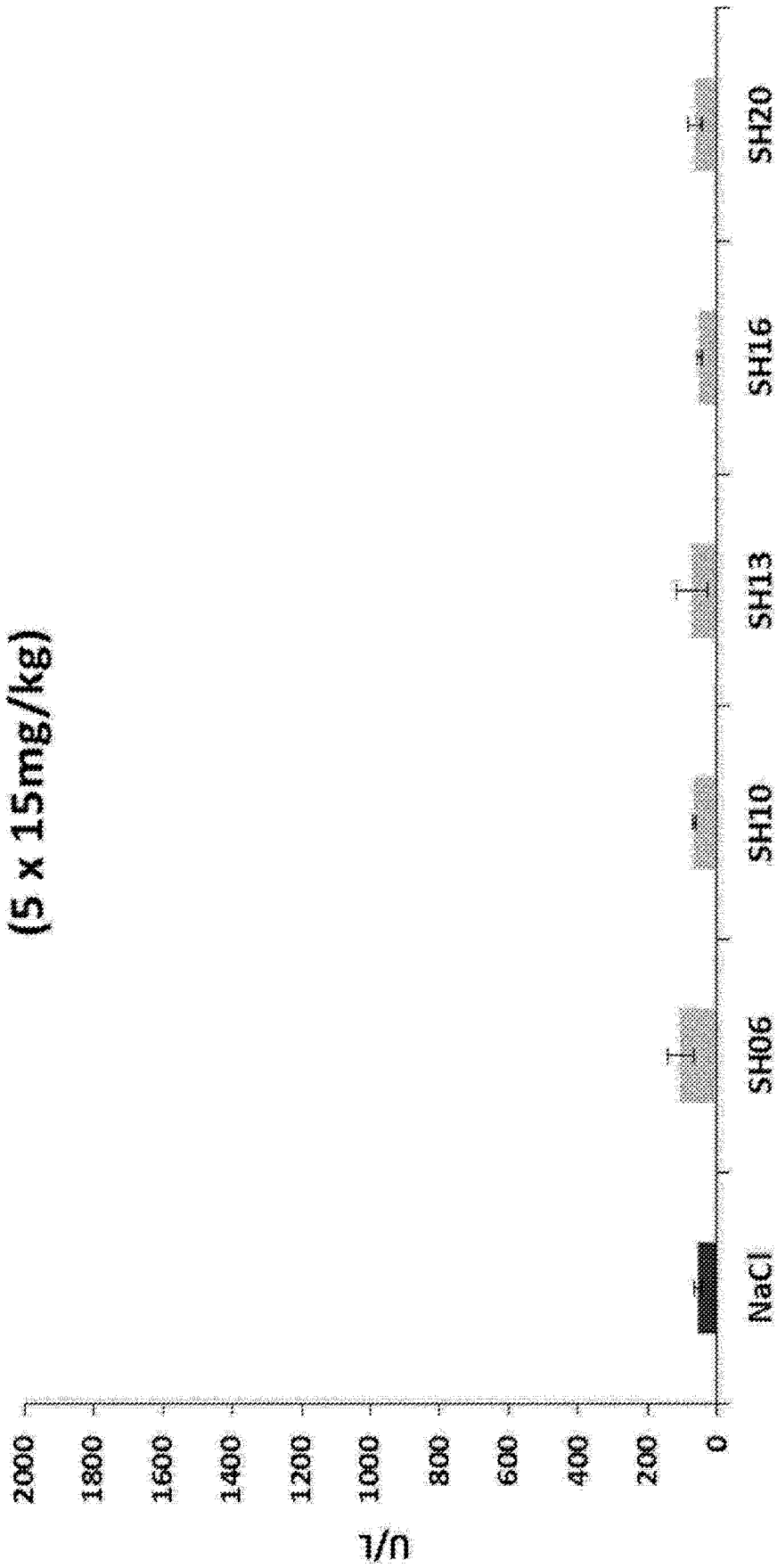


图 5A

第16天血清中的SH-10-050 (PD-10-028) AST活性
(5 x 15mg/kg)

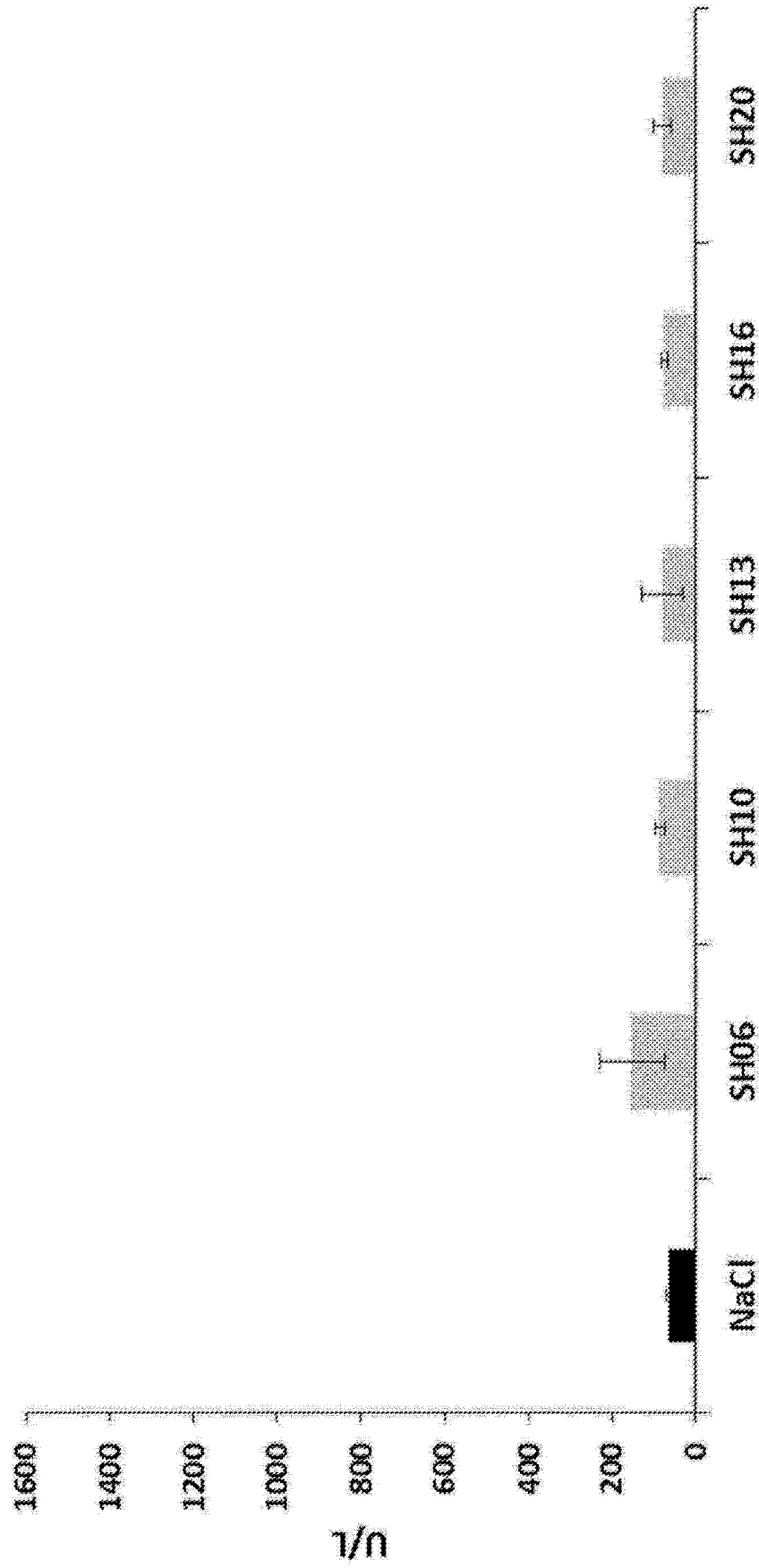


图 5B