



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117425664 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 19

(21) 申请号 202280034139.0

(22) 申请日 2022.04.13

(30) 优先权数据

63/174,507 2021.04.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/024692 2022.04.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/221457 EN 2022.10.20

(71) 申请人 阿达尔克斯制药有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 李珍 志清·乔尔·周

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

专利代理师 张福誉 韩晓帆

(51) Int.Cl.

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

权利要求书3页 说明书18页

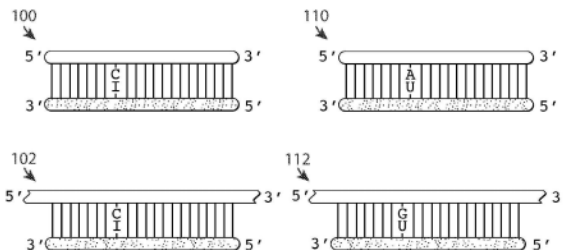
序列表12页 附图2页

(54) 发明名称

RNA沉默剂及使用方法

(57) 摘要

本公开内容的一些方面提供了用于降低靶RNA表达的核酸。在一些方面中,本公开内容提供了在设计用于RNA干扰的核酸中可用的核酸修饰和碱基配对构型。



1. 用于降低靶mRNA表达的核酸,所述核酸包含长度为15至31个核苷酸的具有与所述靶mRNA的连续序列至少90%互补的序列的反义链,其中所述反义链的序列在自其5'末端的第14位包含无碱基位点或包含不与所述靶mRNA的连续序列上的相应位置处的靶核苷酸形成规范碱基对的核苷酸。

2. 权利要求1所述的核酸,其中所述靶核苷酸包含胞苷或鸟苷。

3. 权利要求1或2所述的核酸,其中所述反义链上第14位的核苷酸和所述靶核苷酸包含错配碱基对。

4. 权利要求3所述的核酸,其中所述错配碱基对是摆动碱基对。

5. 权利要求1或2所述的核酸,其中所述反义链上第14位的核苷酸与所述靶核苷酸形成摆动碱基对。

6. 权利要求4或5所述的核酸,其中所述反义链上第14位的核苷酸包含肌苷或尿苷。

7. 权利要求4至6中任一项所述的核酸,其中所述摆动碱基对是I:C或U:G。

8. 权利要求4至7中任一项所述的核酸,其中:

如果所述靶核苷酸包含胞苷,则所述反义链上第14位的核苷酸包含肌苷;或者

如果所述靶核苷酸包含鸟苷,则所述反义链上第14位的核苷酸包含尿苷。

9. 权利要求1至8中任一项所述的核酸,其中所述反义链包含至少一个经修饰的核苷酸和/或至少一个经修饰的核苷酸间键联。

10. 权利要求1至9中任一项所述的核酸,其中所述反义链包含一个或更多个选自2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基、和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿拉伯糖核酸的核苷修饰。

11. 权利要求1至10中任一项所述的核酸,其中所述反义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键联。

12. 权利要求1至11中任一项所述的核酸,其中所述反义链的长度为15至25个核苷酸。

13. 权利要求1至12中任一项所述的核酸,其中所述反义链的长度为19至25个核苷酸。

14. 权利要求1至13中任一项所述的核酸,其中所述反义链的长度为21个核苷酸。

15. 权利要求1至14中任一项所述的核酸,其中所述反义链的序列与表1的核苷酸序列具有至少80%同一性。

16. 权利要求1至15中任一项所述的核酸,其还包含长度为15至40个核苷酸的有义链,其中所述有义链与所述反义链形成双链体区域。

17. 权利要求16所述的核酸,其中所述双链体区域包含在所述有义链上的核苷酸与所述反义链上第14位的核苷酸之间的规范或非规范碱基配对。

18. 权利要求17所述的核酸,其中:

如果所述反义链上第14位的核苷酸包含肌苷,则所述有义链上的核苷酸包含胞苷、腺苷、或尿苷;或者

如果所述反义链上第14位的核苷酸包含尿苷,则所述有义链上的核苷酸包含腺苷。

19. 权利要求16至18中任一项所述的核酸,其中所述有义链包含至少一个经修饰的核苷酸和/或至少一个经修饰的核苷酸间键联。

20. 权利要求16至19中任一项所述的核酸,其中所述有义链包含一个或更多个选自2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基、和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿拉伯糖核酸的核

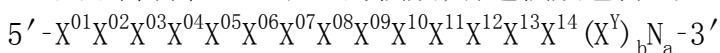
苷修饰。

21. 权利要求16至20中任一项所述的核酸,其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键联。

22. 权利要求16至21中任一项所述的核酸,其中所述有义链与至少一个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分缀合。

23. 权利要求1至22中任一项所述的核酸,其中所述反义链的序列,除形成所述摆动碱基对的核苷酸以外,与所述靶mRNA的连续序列是100%互补的。

24. 用于降低靶mRNA表达的核酸,所述核酸包含式(I)的反义链:



(I),

其中:

N和 X^Y 的每个实例独立地是任何类型的核苷酸;

a是0至2(包括端值)的整数;

b是1至17(包括端值)的整数;

X^{01} 至 X^{13} 各自独立地是任何类型的核苷酸,前提是 X^{01} 至 $(X^Y)_b$ 与所述靶mRNA的连续核苷酸序列是至少90%互补的;并且

X^{14} 是无碱基位点或是不与所述靶mRNA的连续核苷酸序列上的相应位置处的靶核苷酸形成规范碱基对的核苷酸。

25. 权利要求24所述的核酸,其中所述靶核苷酸包含胞苷或鸟苷。

26. 权利要求24或25所述的核酸,其中 X^{14} 和所述靶核苷酸包含错配碱基对。

27. 权利要求26所述的核酸,其中所述错配碱基对是摆动碱基对。

28. 权利要求24或25所述的核酸,其中 X^{14} 是与所述靶核苷酸形成摆动碱基对的核苷酸。

29. 权利要求27或28所述的核酸,其中 X^{14} 包含肌苷或尿苷。

30. 权利要求27至29中任一项所述的核酸,其中所述摆动碱基对是I:C或U:G。

31. 权利要求27至30中任一项所述的核酸,其中:

如果所述靶核苷酸包含胞苷,则 X^{14} 包含肌苷;或者

如果所述靶核苷酸包含鸟苷,则 X^{14} 包含尿苷。

32. 权利要求24至31中任一项所述的核酸,其中所述反义链包含至少一个经修饰的核苷酸和/或至少一个经修饰的核苷酸间键联。

33. 权利要求24至32中任一项所述的核酸,其中所述反义链包含一个或更多个选自2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基、和2'-脱氧-2'-氟- β -d-阿拉伯糖核酸的核苷修饰。

34. 权利要求24至33中任一项所述的核酸,其中所述反义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键联。

35. 权利要求24至34中任一项所述的核酸,其中a是0。

36. 权利要求24至35中任一项所述的核酸,其中b是1至11(包括端值)的整数。

37. 权利要求24至36中任一项所述的核酸,其中b是5至11(包括端值)的整数。

38. 权利要求24至37中任一项所述的核酸,其中b是7。

39. 权利要求24至38中任一项所述的核酸,其中 X^{01} 至 $(X^Y)_b$ 的序列与表1的核苷酸序列具

有至少80%同一性。

40. 权利要求24至39中任一项所述的核酸,其还包含长度为15至40个核苷酸的有义链,其中所述有义链与所述反义链形成双链体区域。

41. 权利要求40所述的核酸,其中所述双链体区域包含在所述有义链上的核苷酸与 X^{14} 之间的规范或非规范碱基配对。

42. 权利要求41所述的核酸,其中:

如果 X^{14} 包含肌苷,则所述有义链上的核苷酸包含胞苷、腺苷、或尿苷;或者

如果 X^{14} 包含尿苷,则所述有义链上的核苷酸包含腺苷。

43. 权利要求40至42中任一项所述的核酸,其中所述双链体区域排除N的每个实例。

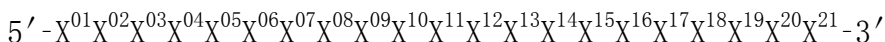
44. 权利要求40至43中任一项所述的核酸,其中所述有义链包含至少一个经修饰的核苷酸和/或至少一个经修饰的核苷酸间键联。

45. 权利要求40至44中任一项所述的核酸,其中所述有义链包含一个或更多个选自2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基、和2'-脱氧-2'-氟- β -d-阿拉伯糖核酸的核苷修饰。

46. 权利要求40至45中任一项所述的核酸,其中所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键联。

47. 权利要求40至46中任一项所述的核酸,其中所述有义链与至少一个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分缀合。

48. 权利要求24至47中任一项所述的核酸,其中所述反义链具有式(II):



(II),

其中:

X^{01} 至 X^{13} 和 X^{15} 至 X^{21} 各自独立地是任何类型的核苷酸,前提是 X^{01} 至 X^{21} 与所述靶mRNA的连续核苷酸序列是至少90%互补的;并且

X^{14} 是包含肌苷或尿苷的核苷酸。

49. 组合物,其包含前述权利要求中任一项所述的核酸以及反离子。

50. 组合物,其包含前述权利要求中任一项所述的核酸以及可药用载体。

51. 在细胞中降低靶mRNA表达的方法,所述方法包括使所述细胞与权利要求1至50中任一项所述的核酸或组合物接触。

52. 权利要求51所述的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

53. 权利要求51或52所述的方法,其中所述细胞是体内的。

54. 权利要求51或52所述的方法,其中所述细胞是体外的。

RNA沉默剂及使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119 (e) 要求于2021年4月13日提交的美国临时专利申请 No. 63/174507 的优先权,其通过引用整体并入本文。

[0003] 作为文本文件所提交的序列表的引用

[0004] 本申请包含以ASCII格式进行提交的序列表,并在此通过引用以其整体并入。所述ASCII副本创建于2022年4月12日,名称为A127870007W000-SEQ-JIB,并且大小为10,192字节。

背景技术

[0005] 近年来,RNA干扰(RNA interference, RNAi)领域已经受到了相当大的关注,因为RNA沉默剂提供了以高度的序列特异性敲低特定蛋白质表达的能力。RNAi已经可用于科学研究中,例如以研究遗传学和生物化学途径,以阐明单个基因和基因产物的功能,以及在制药行业中作为用于靶标验证的工具。另外,为了开发能够介导RNAi作为治疗策略的RNA沉默剂,人们做出了大量努力。

发明内容

[0006] 在其他方面中,本公开内容提供了可用于RNA沉默剂的设计的核酸设计策略。在一些方面中,本公开内容涉及这样的发现:使用反义链能够实现靶RNA水平的有效降低,所述反义链被配置为介导其第14位核苷酸和所述靶RNA之间的摆动碱基配对。因此,在一些方面中,本公开内容提供了包含反义链的核酸,所述反义链在自其5'末端的第14位具有与所述靶RNA上相应位置处的靶核苷酸形成摆动碱基对的核苷酸。

[0007] 在一些方面中,本公开内容提供了用于降低靶mRNA的表达的核酸,所述核酸包含长度为15至31个核苷酸的具有与所述靶mRNA的连续序列是至少90%互补的序列的反义链,其中所述反义链的序列在自其5'末端的第14位包含无碱基位点或包含不与所述靶mRNA的连续序列上的相应位置处的靶核苷酸形成规范(例如Watson-Crick)碱基对的核苷酸。

[0008] 在一些实施方案中,所述反义链上第14位的核苷酸和所述靶mRNA上相应位置处的靶核苷酸是错配的(例如,核苷酸形成错配碱基对,例如摆动碱基对)。在一些实施方案中,所述错配碱基对是摆动碱基对。例如,在一些实施方案中,所述反义链上第14位的核苷酸与所述靶核苷酸形成摆动碱基对。在一些实施方案中,所述靶核苷酸包含胞苷或鸟苷。在一些实施方案中,所述反义链上第14位的核苷酸包含肌苷或尿苷。在一些实施方案中,所述摆动碱基对是I:C或U:G。在一些实施方案中,如果所述靶核苷酸包含胞苷,则所述反义链上第14位的核苷酸包含肌苷。在一些实施方案中,如果所述靶核苷酸包含鸟苷,则所述反义链上第14位的核苷酸包含尿苷。

[0009] 在一些实施方案中,所述反义链包含至少一个经修饰的核苷酸和/或至少一个经修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述反义链包含一个或更多个选自2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基、和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿拉伯糖核酸的核苷修

饰。核苷修饰的另外一些实例在本文中的其他地方进行了描述,并且包括但不限于经修饰的糖,例如对糖(例如核糖)的2'-O取代,包括2'-O-甲氧基乙基糖、2'-氟糖修饰(2'-氟)、2'-O-甲基糖(2'-O-甲基)、2'-O-乙基糖、2'-Cl、2'-SH、及其取代(例如,2'-SCH₃)、双环糖部分、或例如以下的取代:具有低级烷基或其取代(例如,-CH₃、-CF₃)的2'-O部分、2'-氨基或其取代、2',3'-seco核苷酸模拟物、2'-F-阿拉伯糖核苷酸、反向核苷酸、反向2'-O-甲基核苷酸、2'-O脱氧核苷酸、烯基、炔基、甲氧基乙基(2'-O-MOE)、-H(如在DNA中)、或其他取代基。在一些实施方案中,所述反义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述反义链的序列,除形成所述摆动碱基对的核苷酸以外,与所述靶mRNA的连续序列是100%互补的。

[0010] 在一些实施方案中,所述反义链的长度为15至25个核苷酸(例如,长度为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或25个核苷酸)。在一些实施方案中,所述反义链的长度为19至25个核苷酸。在一些实施方案中,所述反义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,所述反义链的序列与表1的核苷酸序列具有至少80%同一性。在一些实施方案中,所述反义链的序列与表1的核苷酸序列具有至少85%同一性(例如,至少90%同一性、至少95%同一性、或100%同一性)。在一些实施方案中,所述反义链的序列与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48和50中的任一者具有至少80%同一性。在一些实施方案中,所述反义链的序列与SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、和50中的任一者具有至少85%同一性(例如,至少90%同一性、至少95%同一性、或100%同一性)。

[0011] 在一些实施方案中,所述核酸还包含长度为15至40个核苷酸(例如,长度为15至35、15至30、15至25、19至30、19至25、或25至30个核苷酸)的有义链。在一些实施方案中,所述有义链与所述反义链形成双链体区域。在一些实施方案中,所述双链体区域包含在所述有义链上的核苷酸与所述反义链上第14位的核苷酸之间的规范或非规范碱基配对。在一些实施方案中,如果所述反义链上第14位的核苷酸包含肌苷,则所述有义链上的核苷酸包含胞苷、腺苷、或尿苷。在一些实施方案中,如果所述反义链上第14位的核苷酸包含尿苷,则所述有义链上的核苷酸包含腺苷。在一些实施方案中,所述有义链的序列与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、和49中任一者具有至少80%同一性。在一些实施方案中,所述有义链的序列与SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、和49中任一者具有至少85%同一性(例如,至少90%同一性、至少95%同一性、或100%同一性)。

[0012] 在一些实施方案中,所述有义链包含至少一个经修饰的核苷酸和/或至少一个经修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述有义链包含一个或更多个选自2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基、和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿拉伯糖核酸的核苷修饰。核苷修饰和经修饰的核苷酸的另一些实例在本文中的其他地方进行了描述,在一些实施方案中,所述有义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述有义链与至少一个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分缀合。

[0013] 在一些方面中,本公开内容提供了用于降低靶mRNA的表达的核酸,所述核酸包含式(I)的反义链:

[0014] $5'-X^{01}X^{02}X^{03}X^{04}X^{05}X^{06}X^{07}X^{08}X^{09}X^{10}X^{11}X^{12}X^{13}X^{14}(X^Y)_bN_a-3'$

[0015] (I),

[0016] 其中: N 和 X^Y 的每个实例独立地是任何类型的核苷酸; a 是0至2(包括端值)的整数; b 是1至17(包括端值)的整数; X^{01} 至 X^{13} 各自独立地是任何类型的核苷酸,前提是 X^{01} 至 $(X^Y)_b$ 与所述靶mRNA的连续核苷酸序列是至少90%互补的;以及 X^{14} 是无碱基位点或是不与在所述靶mRNA的连续核苷酸序列上的相应位置处的靶核苷酸形成规范(例如Watson-Crick)碱基对的核苷酸。

[0017] 在一些实施方案中,式(I)的“X”核苷酸表示如本文中其他地方所述的与靶mRNA形成互补区域的核苷酸。在一些实施方案中,式(I)的“N”核苷酸表示所述互补区域之外的任选的核苷酸。在一些实施方案中,在所述核酸还包含与式(I)的反义链形成双链体的有义链的情况下,“N”核苷酸表示如本文中其他地方所述的形成突出端的任选的核苷酸。

[0018] 在一些实施方案中, a 是1至2(包括端值)的整数。在一些实施方案中, a 是0。在一些实施方案中, b 是1至11(包括端值)的整数。在一些实施方案中, b 是5至11(包括端值)的整数。在一些实施方案中, b 是7。在一些实施方案中, X^{01} 至 $(X^Y)_b$ 的序列与表1的核苷酸序列具有至少80%同一性。在一些实施方案中, X^{01} 至 $(X^Y)_b$ 的序列与表1的核苷酸序列具有至少85%同一性(例如,至少90%同一性、至少95%同一性、或100%同一性)。

[0019] 在一些实施方案中, X^{01} 至 $(X^Y)_b$ 的序列与靶mRNA的连续核苷酸序列是至少95%互补的。在一些实施方案中, X^{01} 至 $(X^Y)_b$ 的序列与靶mRNA的天然存在的连续核苷酸序列是100%互补的(除 X^{14} 外),其中:(i) X^{14} 包含肌苷,并且所述靶mRNA上相应位置处的靶核苷酸包含胞苷;或者(ii) X^{14} 包含尿苷,并且所述靶核苷酸包含鸟苷。在一些实施方案中, b 是7,并且 X^{01} 至 X^{21} 的序列与靶mRNA的天然存在的连续核苷酸序列是100%互补的(除 X^{14} 外),其中:(i) X^{14} 包含肌苷,并且所述靶核苷酸包含胞苷;或者(ii) X^{14} 包含尿苷,并且所述靶核苷酸包含鸟苷。在一些实施方案中, X^{01} 至 $(X^Y)_b$ 的序列与靶mRNA的天然存在的连续核苷酸序列是100%互补的(如前所述除 X^{14} 外,并且除 X^{01} 外),其中 X^{01} 和所述靶mRNA上相应位置处的核苷酸包含错配碱基对。

[0020] 在一些实施方案中,所述靶核苷酸包含胞苷或鸟苷。在一些实施方案中, X^{14} 和所述靶核苷酸包含错配碱基对。在一些实施方案中,所述错配碱基对是摆动碱基对。在一些实施方案中, X^{14} 是与所述靶核苷酸形成摆动碱基对的核苷酸。在一些实施方案中, X^{14} 包含肌苷或尿苷。在一些实施方案中,所述摆动碱基对是I:C或U:G。在一些实施方案中,如果所述靶核苷酸包含胞苷,则 X^{14} 包含肌苷。在一些实施方案中,如果所述靶核苷酸包含鸟苷,则 X^{14} 包含尿苷。

[0021] 在一些实施方案中, X^{01} 和所述靶mRNA上相应位置处的核苷酸包含错配碱基对。在一些实施方案中,所述错配碱基对是A:G或U:C。在一些实施方案中, X^{01} 包含腺苷或尿苷。在一些实施方案中,如果所述靶mRNA上相应位置处的核苷酸包含鸟苷,则 X^{01} 包含腺苷。在一些实施方案中,如果所述靶mRNA上相应位置处的核苷酸包含胞苷,则 X^{01} 包含尿苷。

[0022] 在一些实施方案中,式(I)的反义链包含至少一个经修饰的核苷酸和/或至少一个经修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述反义链包含一个或更多个选自2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基、和2'-脱氧-2'-氟- β -d-阿拉伯糖核酸的核苷修饰。在一些实施方案中,所述反义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中,所述核酸还包含与式(I)的反义链所缀合的至少一个靶部分(例如,N-乙酰半乳糖胺

(GalNAc))。在一些实施方案中,所述至少一个靶部分通过可切割的接头与所述反义链缀合。

[0023] 在一些实施方案中,所述核酸还包含长度为15至40个核苷酸的有义链,其中所述有义链与所述反义链形成双链体区域。在一些实施方案中,所述双链体区域包含在所述有义链上的核苷酸与X¹⁴之间的规范或非规范碱基配对。在一些实施方案中,如果X¹⁴包含肌苷,则所述有义链上的核苷酸包含胞苷、腺苷、或尿苷。在一些实施方案中,如果X¹⁴包含尿苷,则所述有义链上的核苷酸包含腺苷。在一些实施方案中,所述双链体区域排除N的每个实例。

[0024] 在一些实施方案中,所述反义链是式(II):

[0025] 5'-X⁰¹X⁰²X⁰³X⁰⁴X⁰⁵X⁰⁶X⁰⁷X⁰⁸X⁰⁹X¹⁰X¹¹X¹²X¹³X¹⁴X¹⁵X¹⁶X¹⁷X¹⁸X¹⁹X²⁰X²¹-3'

[0026] (II),

[0027] 其中:X⁰¹至X¹³和X¹⁵至X²¹各自独立地是任何类型的核苷酸,前提是X⁰¹至X²¹与所述靶mRNA的连续核苷酸序列是至少90%互补的;以及X¹⁴是包含肌苷或尿苷的核苷酸。

[0028] 在一些实施方案中,本公开内容的核酸是小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)。在一些实施方案中,所述核酸是短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)。

[0029] 在一些方面中,本公开内容提供了这样的组合物,其包含本文中所述的核酸以及反离子。在一些方面中,本公开内容提供了这样的组合物,其包含本文中所述的核酸以及可药用载体。

[0030] 在一些方面中,本公开内容提供了在细胞中降低靶mRNA的表达的方法。在一些实施方案中,所述方法包括使所述细胞与本公开内容的核酸或组合物接触。在一些实施方案中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述哺乳动物细胞是人细胞或非人灵长类动物细胞。在一些实施方案中,所述细胞与所述核酸或所述组合物体内接触。在一些实施方案中,所述细胞与所述核酸或所述组合物体外接触。在一些实施方案中,所述靶mRNA编码突变蛋白。在一些实施方案中,所述突变蛋白包含相对于野生型变体的一个或更多个突变。在一些实施方案中,所述靶mRNA编码在所述细胞中过表达的蛋白质。在一些实施方案中,所述蛋白质相对于参考表达水平(例如,相对于野生型变体,相对于正常健康细胞)是过表达的。在一些实施方案中,所述靶mRNA是选自血管紧张肽原(Angiotensinogen, AGT)、蛋白质原转换酶枯草杆菌蛋白酶/Kexin型(Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type, 9PCSK9)、补体因子B、二酰基甘油0-酰基转移酶2(Diacylglycerol 0-Acyltransferase 2, DGAT2)、和微管相关蛋白质Tau(Microtubule Associated Protein Tau, MAPT)的基因的转录物。在一些实施方案中,所述基因编码相对于相应的野生型序列的突变蛋白。在一些实施方案中,所述基因编码野生型蛋白质。

[0031] 在一些方面中,本公开内容提供了治疗对象的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向对象施用本公开内容的核酸。在一些实施方案中,所述对象已知患有或被怀疑患有与所述核酸的靶mRNA相关的疾病或病症。在一些实施方案中,所述对象已知具有或被怀疑具有所述靶mRNA。在一些实施方案中,所述对象是人。在一些实施方案中,所述对象是非人动物(例如,小鼠、大鼠、兔、狗、猫、猪、或非人灵长类动物(例如猴或黑猩猩))。在一些实施方案中,所述靶mRNA编码突变蛋白。在一些实施方案中,所述突变蛋白包含相对于野生型变体的一个或更多个突变。在一些实施方案中,所述靶mRNA编码在所述细胞中过表达的蛋白

质。在一些实施方案中,所述蛋白质相对于参考表达水平(例如,相对于野生型变体,相对于正常健康细胞)是过表达的。在一些实施方案中,所述对象已知患有或被怀疑患有与选自血管紧张肽原(AGT)、蛋白质原转换酶枯草杆菌蛋白酶/Kexin型(9PCSK9)、补体因子B、二酰基甘油O-酰基转移酶2(DGAT2)、和微管相关蛋白质Tau(MAPT)的基因相关的疾病或病症。在一些实施方案中,所述靶mRNA是所述基因的转录物。在一些实施方案中,所述基因编码相对于相应的野生型序列的突变蛋白。在一些实施方案中,所述基因编码野生型蛋白质。

[0032] 本发明的某些实施方案的细节在具体实施方式中阐述,如下所述。本发明的其他特征、目的、和优点从实施例、附图、和权利要求中将是明显的。

附图说明

[0033] 构成本说明书一部分的附图举例说明了本发明的数个非限制性实施方案,并且与说明书一起用以解释本发明的原理。

[0034] 图1示出了示例性核酸结构,其中反义链与有义链或靶RNA链形成双链体。

[0035] 图2示出了具有有义链(显示为5'至3')和反义链(显示为3'至5')的核酸的示例性的式。

[0036] 图3A至3B示出了来自食蟹猴中的siRNA(RD1354)的体内测试的结果。个体猴的结果在图3A中示出,组的平均结果在图3B中示出。

具体实施方式

[0037] 本公开内容的一些方面涉及这样的发现:即使用反义链能够实现靶RNA水平的有效降低,该反义链被配置为介导其第14位核苷酸和靶RNA之间的非规范相互作用(例如,错配相互作用,例如摆动碱基配对)。在一些方面中,本公开内容提供了用于有效反义分子的设计的新策略,补充了常规指南,以在不牺牲效率的情况下允许更多数目和更多种类的潜在靶mRNA位点。

[0038] 短干扰RNA(siRNA)分子的效率取决于不同的因素,包括靶点的可用性、mRNA的二级结构、匹配的位置、和siRNA和mRNA的内在特征。siRNA的精确设计是关键步骤,因为只有序列中核苷酸的少量变化才能够改变其功能。

[0039] 发明人已经认识到并理解到,常规siRNA设计策略遵循某些规则,所述规则能够限制潜在RNA靶位点的数目和种类。在一些方面中,本公开内容通过提供包含反义链的核酸克服了这些限制中的某些限制,所述反义链在自其5'末端的第14位处具有无碱基位点或具有不与靶RNA上的相应位置处的靶核苷酸形成规范碱基对的核苷酸。在一些实施方案中,非规范相互作用(例如摆动碱基对)是在第14位核苷酸和靶RNA上的G或C核苷酸之间形成的。因此,在一些实施方案中,本公开内容的所述摆动碱基对和其他非规范相互作用为靶分子上该位置处的A或U核苷酸的常规偏好(conventional preference)提供了替代的设计策略。在一些方面中,本公开内容涉及令人惊讶的发现:即与靶RNA形成这样的摆动碱基对的核酸导致靶RNA水平的高效降低。

[0040] 图1示出了示例性核酸结构,其中反义链(带点形状)与有义链或靶链(实心形状(solid shape))形成双链体。在一些实施方案中,包含与有义链形成双链体的反义链的核酸在本文中通常可被称为RNA沉默剂。RNA沉默剂的一些实例在本文中的其它地方提供,并

且包括但不限于siRNA和shRNA。

[0041] RNA沉默剂100显示出具有与有义链(实心形状)形成双链体的反义链(带点形状)。如本文中所用,在一些实施方案中,RNA沉默剂的反义链是指具有与靶链(例如靶RNA,例如mRNA)的互补区域的链。在一些实施方案中,所述互补区域具有与所期望靶链充分互补的核苷酸序列以指导靶特异性沉默,例如通过RNAi机制或过程(RNAi干扰)足以触发所期望靶链的破坏的互补性或足以触发所期望靶mRNA的翻译抑制的互补性。

[0042] 如所示, RNA沉默剂100包含反义链上的第14位核苷酸处的肌苷。如本文中所用,在一些实施方案中,所述第14位核苷酸是指在反义链上的核苷酸,其能够与在靶链上相应位置处的G或C核苷酸形成非规范相互作用(例如摆动碱基对)。在一些实施方案中,反义链上的第14位核苷酸是相对于其5'末端进行编号的,其中在反义链上最靠近5'端的核苷酸可以指定为第1位核苷酸。在一些实施方案中,反义链上的第14位核苷酸是相对于其与靶链的互补区域进行编号的,其中互补区域最靠近5'端的核苷酸可以指定为第1位核苷酸。例如,在一些实施方案中, RNA沉默剂包含这样的反义链,所述反义链在相对于有义链的5'突出端区域中具有一个或更多个核苷酸。在这种情况下,第14位核苷酸是相对于不在突出端区域的最靠近5'端的核苷酸进行编号的,后者可被指定为第1位核苷酸。

[0043] 如通常所描述的,在RNA沉默剂100的反义链上的第14位核苷酸处的肌苷与在有义链上相应位置处的胞苷形成摆动碱基对。举例来说,虽然RNA沉默剂100在有义链上的相应位置显示胞苷,但在该位置处能够利用其他核苷。例如,由于肌苷可以与胞苷、腺苷、或尿苷形成摆动碱基对,因此有义链上相应位置处的核苷酸可以包含这些核苷中的任一种。然而,如本文中所述,第14位核苷酸可以有利地与靶RNA上的相应位置形成非规范相互作用(例如,摆动碱基对)。因此,应当理解,在RNA沉默剂100的情况下,反义链上的第14位核苷酸不需要与有义链上相应位置处的核苷酸形成摆动碱基对。例如,在一些实施方案中, RNA沉默剂的反义链上相应位置处的核苷酸包含不与第14位核苷酸的肌苷碱基配对的核苷。因此,在一些实施方案中, RNA沉默剂100的反义链上的相应位置可以包含任何核苷(例如,腺苷、鸟苷、胞苷、尿苷、胸苷、肌苷、或其类似物),其可以与第14位核苷酸的肌苷碱基配对,也可以不与第14位核苷酸的肌苷碱基配对。

[0044] 靶双链体102显示与靶链(实心形状)形成双链体的RNA沉默剂100的反义链(带点形状)。在一些实施方案中,所述靶链是靶RNA(例如,mRNA)。如通常所描述的,反义链上第14位核苷酸处的肌苷与靶链上相应位置处的胞苷形成摆动碱基对。根据本公开内容,I:C的摆动碱基对在该位置提供了对反之不利的G:C碱基对的有利替代。如本文中所述,在一些实施方案中,反义链包含互补区,所述互补区是指与靶链的核苷酸形成碱基对的反义链的核苷酸。

[0045] 在一些实施方案中,反义链上的第14位可以包含无碱基位点或包含不与靶链上相应位置处的靶核苷酸形成规范碱基对的核苷酸。靶双链体102描绘了这样的实例,其中有义链上第14位的肌苷与靶链上的相应位置处的胞苷形成摆动碱基对。应当理解,在一些实施方案中,摆动碱基对是根据本公开内容的错配碱基对的一个实例。因此,在一些实施方案中,在靶核苷酸包含胞苷的情况下,第14位核苷酸包含除鸟苷以外的核苷。例如,在一些实施方案中,靶核苷酸包含胞苷,并且第14位核苷酸包含腺苷、尿苷、或胞苷。然而,在一些实施方案中,反义链上的第14位包含无碱基位点,使得在该位置处不存在核碱基。

[0046] RNA沉默剂110显示出具有与有义链(实心形状)形成双链体的反义链(带点形状),其中第14位核苷酸包含尿苷。在该实例中,RNA沉默剂110的有义链在对应于第14位核苷酸的尿苷的位置处包含腺苷。如关于RNA沉默剂100所述,该位置处的核苷酸互补性不是RNA沉默剂110的要求,因为本文中所述的一些优点涉及在靶双链体的情况下在该位置处所形成的非规范相互作用(例如,摆动碱基对)。因此,在一些实施方案中,RNA沉默剂110的有义链上的相应位置可以包含任何核苷(例如,腺苷、鸟苷、胞苷、尿苷、胸苷、肌苷、或其类似物),其可以与第14位核苷酸的尿苷碱基配对,也可以不与第14位核苷酸的尿苷碱基配对。

[0047] 靶双链体112显示与靶链(实心形状)形成双链体的RNA沉默剂110的反义链(带点形状)。在一些实施方案中,所述靶链是靶RNA(例如,mRNA)。如通常所描述的,反义链上第14位核苷酸的尿苷与靶链上相应位置处的鸟苷形成摆动碱基对。根据本公开内容,U:G的摆动碱基对在该位置提供了对反之不利的C:G碱基对的有利替代。

[0048] 靶双链体112描绘了这样的实例,其中有义链上第14位的尿苷与靶链上的相应位置处的鸟苷形成摆动碱基对。应当理解,在一些实施方案中,摆动碱基对是根据本公开内容的错配碱基对的一个实例。因此,在一些实施方案中,在靶核苷酸包含鸟苷的情况下,第14位核苷酸包含除胞苷以外的核苷。例如,在一些实施方案中,靶核苷酸包含鸟苷,并且第14位核苷酸包含腺苷、鸟苷、或尿苷。然而,在一些实施方案中,反义链上的第14位包含无碱基位点,使得在该位置不存在核碱基。

[0049] 图1的核酸结构是一般性描述的,并且不应被解释为对本公开内容的限制。例如,RNA沉默剂100和110各自显示为具有长度为21个核苷酸的反义链,其与有义链完全互补。类似地,靶双链体102和112各自显示为具有长度为21个核苷酸的反义链,其与靶链完全互补。应当理解,提供这些实例是出于举例说明的目的,并且反义链或有义链的长度可以大于或小于21个核苷酸,并且RNA沉默剂或靶双链体的互补性程度可以小于100%,如本文中其他地方所述。

[0050] 图2示出了具有有义链(显示为5'至3')和反义链(显示为3'至5')的RNA沉默剂的示例性式。变量N、X、和Z表示单个核苷酸,并且变量a和b在本文中被限定。在一些实施方案中,RNA沉默剂包含通过在 $(Z^Y)_b$ 至 Z^{14} 处的有义链和在 $(X^Y)_b$ 至 X^{01} 处的反义链之间的碱基对相互作用所形成的双链体区域。在一些实施方案中,b是1至17(包括端值)的整数。举例来说,对于长度为21个核苷酸的双链体区域,例如RNA沉默剂100和110所显示的双链区域,b为7。

[0051] 在一些实施方案中, $(X^Y)_b$ 和 X^{13} 至 X^{01} 各自独立地是任何类型的核苷酸,前提是 $(X^Y)_b$ 至 X^{01} 与 $(Z^Y)_b$ 至 Z^{14} 是至少80%互补的。因此,在一些实施方案中,RNA沉默剂的双链体区域是指至少80%互补的(例如,至少85%互补的、至少90%互补的、至少95%互补的、或100%互补的)有义链和反义链的序列。

[0052] 在一些实施方案中,RNA沉默剂包含至少一个突出端区域,如图2中 N_a 所示。在一些实施方案中,a独立地为0至2的整数,使得RNA沉默剂可以任选地包含至少一个最多2个核苷酸的突出端。如本文中所用,在一些实施方案中,突出端是指由延伸超过互补链端的一条链或一个区域产生的端的非碱基配对核苷酸,所述互补链与所述一条链或一个区域形成双链体。在一些实施方案中,突出端包含从RNA沉默剂的5'端或3'端的双链体区域延伸的一个或更多个未配对核苷酸。在一些实施方案中,突出端是RNA沉默剂的反义链或有义链上的5'或3'突出端。在一些实施方案中,RNA沉默剂包含有义链上的5'突出端和3'突出端。在一些实

实施方案中, RNA沉默剂包括有义链上的3'突出端和反义链上的3'突出端。在一些实施方案中, RNA沉默剂包含有义链上的3'突出端、反义链上的3'突出端, 并且既不包含有义链上的5'突出端也不包含反义链上的5'突出端。尽管没有描述, 但应当理解, 在一些实施方案中, 在反义链上具有3'突出端的RNA沉默剂可以被配置为使得3'突出端是可从RNA沉默剂去除的(例如, 可切割的)。

[0053] 在一些实施方案中, RNA沉默剂包含至少一个茎-环。在一些实施方案中, a 独立地为0至30的整数, 使得RNA沉默剂能够任选地包含至少一个最多30个核苷酸的茎-环。因此, 在一些实施方案中, “N”核苷酸表示在核酸的任一末端或两个末端形成茎-环的任选核苷酸。例如, 在一些实施方案中, 一条链5'末端处的N核苷酸和另一条链3'末端处的N核苷酸通过具有干区和环区的茎-环共价连接。在一些实施方案中, 干区包含长度为约1个至最多约26个碱基对的双链体。在一些实施方案中, 环区包含长度为约4个至最多10个核苷酸的单链部分。

[0054] 在一些实施方案中, RNA沉默剂包含无碱基位点或核苷酸, 在图2中由 X^{14} 表示, 其不与靶链(例如, 靶RNA, 例如mRNA)上相应位置处的靶核苷酸形成规范碱基对。如所示, Z^{01} 是在有义链上的与反义链上的 X^{14} 相应的位置处的核苷酸。在一些实施方案中, X^{14} 是无碱基位点。在一些实施方案中, X^{14} 是腺苷、肌苷、或尿苷。在一些实施方案中, Z^{01} 是任何类型的核苷酸。在一些实施方案中, Z^{01} 是鸟苷、胞苷、腺苷、或尿苷。在一些实施方案中, X^{14} 是肌苷, 并且 Z^{01} 是胞苷、腺苷、或尿苷。在一些实施方案中, X^{14} 是尿苷, 并且 Z^{01} 是腺苷或鸟苷。

[0055] 在一些实施方案中, 图2中的RNA沉默剂的反义链是式(I)的反义链, 如本文中其它地方所述。

[0056] 如本文中所述, 在一些实施方案中, RNA沉默剂是指这样的核酸, 其包含与靶链(例如, 靶RNA序列)具有足够互补性的反义链以介导RNA介导的沉默机制(例如, RNAi)。在一些实施方案中, 核酸是包含有义链和互补反义链(或其部分)的双链体分子(或具有双链体样结构的分子)。在一些实施方案中, 反义链在自其5'末端的第14位处包含与在靶链上相应位置处的核苷酸形成摆动碱基对的核苷酸。在一些实施方案中, 第14位核苷酸包含选自肌苷和尿苷的核苷。

[0057] 在一些实施方案中, 术语核苷是指具有与核糖或脱氧核糖共价连接的嘌呤或嘧啶碱基的分子。核苷由核碱基(例如, 含氮碱基(例如, 核碱基))和戊糖(例如, 核糖)组成。戊糖可以是核糖或脱氧核糖。核苷是作为RNA和DNA的组成组分的核苷酸的生物化学前体。如本文中可使用的术语“核苷酸”是指核碱基和戊糖(即核苷), 以及一个或更多个磷酸基团。在核苷中, 异头碳通过糖苷键与嘌呤的N9或嘧啶的N1连接。核苷和核碱基的一些实例包括但不限于胞苷(C)、尿苷(U)、腺苷(A)、鸟苷(G)、胸苷(T)和肌苷(I), 然而还应理解, 该术语描述由修饰产生的核苷(如本文中所定义的这样的术语), 因为它们含有核碱基和戊糖。例如, 核苷包括天然核苷(例如脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷、和脱氧胞苷)、核苷类似物(例如, 2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基尿苷、C5-丙炔基胞苷、C5-甲基胞苷、7-脱氮杂(deaza)腺苷、7-脱氮杂鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、0(6)-甲基鸟嘌呤、4-乙酰基胞苷、5-(羧基羟甲基)尿苷、二氢尿苷、甲基假尿苷、1-甲基腺苷、1-甲基鸟苷、N6-甲基腺苷、和2-硫代胞苷)、经化学修饰的碱基、经生物修饰的碱基(例如甲基化碱基)、插入碱基(intercalated base)、经修

饰的糖(例如2'氟核糖、核糖、2'脱氧核糖、2'0甲基胞苷、阿拉伯糖、和己糖)、或经修饰的磷酸基团(例如,硫代磷酸酯和5'N亚磷酰胺键联)、黄嘌呤、次黄嘌呤、水粉蕈素(nubularine)、异鸟苷、杀结核菌素(tubercidine)、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、3-脱氮杂腺苷、7-脱氮杂腺苷、7-甲基腺苷、8-叠氮腺苷、8-甲基腺苷、5-羟甲基胞嘧啶、5-甲基胞苷、吡咯并胞苷、7-氨基甲基-7-脱氮杂鸟苷、7-脱氮杂鸟苷、7-甲基鸟苷、8-氮杂-7-脱氮杂鸟苷、噻吩并鸟苷、肌苷、4-硫代-尿苷、5-甲氧基尿苷、二氢尿苷和假尿苷。在一些实施方案中,术语核苷酸是指核苷具有以酯键连接至糖部分的一个或更多个磷酸基团。核苷酸的一些实例包括核苷单磷酸、核苷二磷酸、和核苷三磷酸。在一些实施方案中,术语核酸是指通过5'和3'碳原子之间的磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接在一起的核苷酸的聚合物。如本文中所用,在一些实施方案中,核酸可以指单链分子,或者核酸可以指双链分子(例如,与反义链形成双链体的有义链)。

[0058] 在一些实施方案中,本公开内容的核酸包含长度为至少19个核苷酸的反义链。例如,在一些实施方案中,反义链的长度为19至31个核苷酸(例如,长度为19至25、19至21、21至31、21至25、19、20、21、22、23、24、或25个核苷酸)。在一些实施方案中,反义链包含与靶链(例如,靶mRNA)互补的区域。在一些实施方案中,互补区域是指这样的反义链的核苷酸序列,其与靶mRNA的连续序列是至少80%(例如,至少85%、至少90%、至少95%、或100%)互补的。在一些实施方案中,互补区域的长度为19至31个核苷酸(例如,长度为19至25、19至21、21至31、21至25、19、20、21、22、23、24、或25个核苷酸)。

[0059] 在一些实施方案中,本公开内容的核酸包含与反义链形成双链体区域的有义链。在一些实施方案中,有义链的长度为至少19个核苷酸。例如,在一些实施方案中,有义链的长度为19至40个核苷酸(例如,长度为19至35、19至30、19至25、19至21、21至30、25至30、或30至40个核苷酸)。在一些实施方案中,双链体区域是指通过核苷酸的两个反向平行序列的互补碱基配对所形成的结构。在一些实施方案中,在有义链和反义链之间所形成的双链体区域是至少80%(例如,至少85%、至少90%、至少95%、或100%)互补的。

[0060] 在一些实施方案中,双链体区域包含双链体的至少一个错配碱基对(例如,不根据规范的Watson-Crick碱基配对规则进行碱基配对的核苷酸)。在一些实施方案中,如本文所述,至少一个错配碱基对的错配包含反义链上的第14位核苷酸。例如,在一些实施方案中,反义链上的第14位核苷酸可以与反义链(例如,在双链体区域中)上的相应核苷酸和/或靶链上相应位置处的靶核苷酸形成错配碱基对。在一些实施方案中,双链体区域含有超过一个错配。在一些实施方案中,双链体区域含有少于30个错配。在一些实施方案中,双链体区域含有超过一个错配,但少于30个错配。在一些实施方案中,双链体区域含有至少一个但少于11个错配。在一些实施方案中,双链体区域含有至少一个但少于6个错配。在一些实施方案中,双链体区域含有至少一个但少于4个错配。在一些实施方案中,在双链体区域含有超过一个错配的情况下,在核酸中错配是连续的(例如,相邻的)。在一些实施方案中,在双链体区域含有超过一个错配的情况下,在核酸中错配是不连续的(例如,不相邻的)。在一些实施方案中,在双链体区域含有超过两个错配的情况下,存在彼此相邻的两个或更多个错配的至少一个组。在一些实施方案中,在双链体区域含有超过两个错配的情况下,不存在彼此相邻的两个或更多个错配。在一些实施方案中,双链体区域不包含错配。在一些实施方案中,双链体区域的错配包含摆动碱基对。

[0061] 在一些实施方案中,双链体区域包含一个或更多个摆动碱基对。在一些实施方案中,一个或更多个摆动碱基对的摆动碱基对包含反义链上的第14位核苷酸,如本文中所述。例如,在一些实施方案中,反义链上的第14位核苷酸可以与反义链(例如,在双链体区域中)上的相应核苷酸和/或靶链上相应位置处的靶核苷酸形成摆动碱基对。在一些实施方案中,摆动碱基对是本领域公知的术语,指特定核苷酸的碱基配对(例如,摆动碱基对),其是非规范的,因为其不是Watson-Crick碱基对(例如,是错配碱基对的形式或子集)。具体地,术语摆动被用作描述次黄嘌呤(肌苷(I))和尿嘧啶(U)(I:U碱基对);鸟嘌呤(G)和U(G:U碱基对);I和腺嘌呤(A)(I:A碱基对);以及I和胞嘧啶(C)(I:C碱基对)的碱基配对的术语。

[0062] 在一些实施方案中,有义链和/或反义链包含至少一个经修饰的核苷酸。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸在其糖、核碱基和/或磷酸基团中具有一个或更多个化学修饰。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸具有与相应参考核苷酸缀合的一个或更多个化学部分。通常来说,经修饰的核苷酸赋予其中存在经修饰的核苷酸的核酸一种或更多种所期望的特性。例如,经修饰的核苷酸可以提高热稳定性、对降解的抗性、核酸酶抗性、溶解性、生物利用度、生物活性、降低的免疫原性等。经修饰的核苷酸的一些实例包括但不限于2-氨基-鸟苷、2-氨基-腺苷、2,6-二氨基-鸟苷、和2,6-二氨基-腺苷。可以衍生的核苷酸的位置的一些实例包括第5位,例如,5-(2-氨基)丙基尿苷、5-溴尿苷、5-丙炔尿苷、5-丙烯基尿苷等;第6位,例如,6-(2-氨基)丙基尿苷;第8位,腺苷和/或鸟苷,例如,8-溴鸟苷、8-氯鸟苷、8-氟鸟苷等。核苷酸类似物还包括脱氮杂核苷酸,例如,7-脱氮杂-腺苷;O-修饰的和N-修饰的(例如,烷基化的,例如,N6-甲基腺苷,或如本领域中其他已知的)核苷酸;和本领域已知的其他杂环修饰的核苷酸类似物。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个选自2'-氨基乙基、2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基、和2'-脱氧-2'-氟-β-d-阿拉伯糖核酸的核苷修饰。

[0063] 根据本公开内容的经修饰的核苷酸的一些另外的实例包括具有经修饰的嘌呤核碱基或经修饰的嘧啶核碱基的核苷酸。嘌呤核碱基和/或嘧啶核碱基可以例如通过杂环的氨基化作用或脱氨基作用进行修饰。此外,经修饰的糖,例如对糖(例如核糖)的2'-O取代,包括但不限于2'-O-甲氧基乙基糖、2'-氟糖修饰(2'-氟)、2'-O-甲基糖(2'-O-甲基)、2'-O-乙基糖、2'-Cl、2'-SH、及其取代(例如,2'-SCH₃)、双环糖部分、或例如以下的取代:具有低级烷基或其取代(例如,-CH₃、-CF₃)的2'-O部分、2'-氨基或其取代、2',3'-seco核苷酸模拟物、2'-F-阿拉伯糖核苷酸、反向核苷酸、反向2'-O-甲基核苷酸、2'-O脱氧核苷酸、烯基、炔基、甲氧基乙基(2'-O-MOE)、-H(如在DNA中)、或其他取代基可被引入。也可考虑核糖模拟物,例如但不限于吗啉代、乙二醇核酸(glycol nucleic acid,GNA)、UNA、环己烯基核酸(cyclohexenyl nucleic acid,CeNA)。

[0064] 另一些实例包括2'-4'糖桥接变体,例如锁核酸(locked-nucleic acid,LNA),和2'-O,4'-C-乙烯桥接核酸(ethylene-bridged nucleic acid,ENA)。锁核酸是其中核糖通过连接2'氧和4'碳的桥(通常被视为2'氧和4'碳之间的亚甲基桥)被修饰的经修饰的RNA核苷酸。该桥可操作地将核糖“锁定”在3'-endo构型中。锁核糖构型能够增强碱基堆积和主链预组织,其可影响(例如,提高)其杂交特性(例如,热稳定性和杂交特异性)。根据典型的沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对原则(即互补性),可将锁核酸插入到RNA和DNA寡核苷酸二者中以与DNA或RNA杂交。

[0065] 其他化学和修饰在寡核苷酸领域是已知的,其能够根据本公开内容容易地使用并且涵盖在核酸修饰的定义内,例如,术语修饰还应包括导致形成除天然核苷以外的任何核苷的任何改变、变化或操作。

[0066] 在一些实施方案中,核酸包含超过一个核苷修饰。在一些实施方案中,核酸包含超过两个核苷修饰。在一些实施方案中,核酸中超过25%但小于或等于100%的核苷包含核苷修饰。在一些实施方案中,核酸中超过50%的核苷包含核苷修饰。在一些实施方案中,核酸中超过75%但小于或等于100%的核苷包含核苷修饰。在一些实施方案中,核酸中至少75% (例如75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更多)的核苷包含核苷修饰。在一些实施方案中,核酸中至少95%但小于或等于100%的核苷包含核苷修饰。

[0067] 在一些实施方案中,有义链和/或反义链包含至少一个经修饰的核苷酸间键联。如本文中所用,在一些实施方案中,经修饰的核苷酸间键联是指与包含磷酸二酯键的参考核苷酸间键联相比具有一个或更多个化学修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸间键联是非天然存在的键联。通常来说,经修饰的核苷酸间键联赋予其中存在经修饰的核苷酸键联的核酸一种或更多种所期望的特性。例如,经修饰的核苷酸间键联可以提高热稳定性、对降解的抗性、核酸酶抗性、溶解性、生物利用度、生物活性、降低的免疫原性等。在一些实施方案中,反义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键联。对键联的进一步修饰包括酰胺化和肽接头。另一些实例包括磷酸二酯、磷酸三酯、(二)硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、磷-酰胺接头、膦酸酯、3'-亚甲基膦酸酯、5'-亚甲基膦酸酯、硼烷膦酸酯等。此外,异构体的手性可以被修饰(例如,Rp和Sp)。

[0068] 在一些实施方案中,核酸包含超过两个经修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,核酸包含超过三个经修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,核酸的超过25%的核苷酸间键联包含修饰。在一些实施方案中,核酸的超过50%的核苷酸间键联包含修饰。在一些实施方案中,核酸的超过75%的核苷酸间键联包含修饰。在一些实施方案中,核酸中至少75% (例如75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更多)的核苷酸间键联包含修饰。在一些实施方案中,核酸的至少95%的核苷酸间键联包含修饰。

[0069] 在一些实施方案中,有义链和/或反义链与至少一个N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 部分缀合。

[0070] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于降低靶mRNA的表达的核酸。在一些实施方案中,降低靶mRNA的表达可通过指导靶特异性沉默来实现,例如通过通过RNAi机制或过程(RNAi干扰)来触发靶mRNA的破坏和/或通过触发所期望靶mRNA的翻译抑制。

[0071] 实施例

[0072] 实施例1.用于siRNA敲低的AGT基因表达测定

[0073] 在转染之前的那天,将HepG2细胞以10,000个细胞/孔接种在96孔板中在无抗生素培养基中。将AGT siRNA从10mM的储备溶液稀释至1mM和0.10mM的工作储备物。如下所示分别制备混合物(所显示的量为一式三份的量),轻轻混合,并在室温下孵育5分钟。

组分	体积 (μL) /次反应 (一式三份的)
1uM (或 0.1 uM) AGT siRNA	4
Opti-MEM	36
	40
组分	体积 (μL) /次反应
Dharmafect 4	1.6
Opti-MEM	38.4
	40

[0075] 将混合物组合并在室温下孵育20分钟。在孵育期间,用80μL无抗生素的培养基替代96孔板中的培养基。将体积为20μL的混合物添加至每个孔,并且轻轻拍打板以混合孔中的内容物。将细胞在37℃下在5%CO₂中孵育24小时(用于mRNA分析)。

[0076] 在24小时之后,通过进行以下制备裂解溶液:将49.5μL/次反应的RT裂解溶液与0.5μL/次反应的DNA酶I组合,乘以总反应数目。将细胞培养基抽吸并用50μL冰冷的PBS冲洗。添加体积为50μL的裂解溶液/孔并移液以混合,随后在室温下孵育5分钟。添加体积为5μL的终止溶液(室温)并移液以混合,然后在室温下孵育2分钟。主混合物在冰上制备,如下所示。

组分	体积 (μL)/次反应
TaqMan 1-步 qRT-PCR 混合物	5
AGT(FAM) TaqMan 基因表达测定	1
GAPDH(VIC) TaqMan 基因表达测定	1
不含核酸酶的水	11
	18

[0079] 在冰上,将体积为18μL的主混合物添加至光学96孔PCR板的每个孔。将体积为2μL的裂解液(或用于NTC的水)添加至每个孔。将板用光学黏性膜(Optical Adhesive cover)密封,涡旋5至10秒,并短暂旋转以除去气泡。将反应设置为在QuantStudio3-qPCR机器中运行,如下所示。

50°C	1 分钟	
95°C	20 秒	
95°C	15 秒	40 个循环
60°C	1 分钟	

[0081] 将板装载至qPCR机器中,并运行反应。在运行完成之后,下载结果,并根据以下使用Cq值(与Ct相同)分析数据:(i) 记录每个样品的GAPDH和AGT的Ct值;(ii) $\Delta \Delta Ct = AGT\ Ct$

值-GAPDH Ct值; (iii) $\Delta \Delta CtRQ = \Delta \Delta Ct$ 测试样品 - $\Delta \Delta Ct$ 未经转染的测试样品; (iv) RQ (表达倍数变化) = $2^{-\Delta \Delta Ct}$; (v) %AGT剩余 = $2^{-\Delta \Delta Ct} \times 100$; (vi) %AGT敲低 = $100 - \%AGT$ 剩余。

[0082] 在这些实验中所评价的siRNA的序列信息在下表1中提供。

[0083] 表1.siRNA序列信息

[0084]

标识符 [†]	序列 [‡]	SEQ ID NO
RD1292/ IS0333	rU.rC.rC.rA.rC.rC.rU.rC.rA.rU.rC.rA.rU.rC.rA.rC.rA.rA.rU.rG.rA.rU	1
RD1292/ IA0334	rU.rC.rA.rU.rU.rG.rU.rG.rG.rA.rU.rG.rA.rU.rG.rA.rG.rG.rU.rG.rG	2
RD1354/ IS0340	H2.mC*mC.mA.fC.mC.mU.fC.mA.mU.fC.fA.fU.mC.mC.fA.mC.mA.fA.mU. mG*mA*mU	3
RD1354/ IA0336	mU*fC*mA.mU.mU.fG.mU.fG.mG.mA.mU.mG.mA.fU.mG.fA.mG.mG.mU* fG*mG.mA	4
RD1276/ IS0317	rU.rG.rG.rU.rG.rG.rA.rG.rA.rG.rU.rC.rU.rC.rA.rC.rU.rU.rU.rC.rC.rA.rU	5
RD1276/ IA0318	rU.rG.rG.rA.rA.rA.rG.rU.rG.rA.rG.rA.rC.rU.rC.rU.rC.rC.rA.rC.rC	6
RD1324/ IS0336	H2.mG*mG.mU.fG.mG.mA.fG.mA.mG.fU.fC.fU.mC.mA.fC.mU.mU.fU.mC. mC*mA*mU	7
RD1324/ IA0335	mU*fG*mG.mA.mA.fA.mG.fU.mG.mA.mG.mA.mC.fU.mC.fU.mC.mC.mA* fC*mC.mA	8
RD1270/ IS0311	rU.rA.rG.rG.rU.rG.rA.rC.rC.rG.rG.rG.rU.rG.rU.rA.rC.rA.rU.rA.rC.rA.rU	9

[0085]

RD1270/ IA0312	rU.rG.rU.rA.rU.rG.rU.rA.rC.rA.rC.rC.rC.rI.rG.rU.rC.rA.rC.rC.rU	10
RD1271/ IS0312	rU.rG.rA.rG.rA.rC.rA.rU.rC.rC.rC.rC.rU.rG.rU.rG.rG.rA.rU.rG.rA.rA.rU	11
RD1271/ IA0313	rU.rU.rC.rA.rU.rC.rC.rA.rC.rA.rG.rG.rG.rI.rA.rU.rG.rU.rC.rU.rC	12
RD1272/ IS0313	rU.rA.rC.rC.rC.rU.rG.rG.rC.rC.rU.rC.rU.rC.rU.rC.rU.rA.rU.rC.rU.rA.rU	13
RD1272/ IA0314	rU.rA.rG.rA.rU.rA.rG.rA.rG.rA.rG.rA.rG.rI.rC.rC.rA.rG.rG.rG.rU	14
RD1273/ IS0314	rU.rC.rA.rC.rC.rC.rU.rG.rA.rC.rU.rU.rU.rC.rA.rA.rC.rA.rC.rC.rU.rA.rU	15
RD1273/ IA0315	rU.rA.rG.rG.rU.rG.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rG.rU.rC.rA.rG.rG.rG.rU.rG	16
RD1274/ IS0315	rU.rC.rC.rU.rU.rC.rC.rA.rA.rC.rA.rC.rU.rG.rG.rA.rG.rU.rG.rA.rC.rA.rU	17
RD1274/ IA0316	rU.rG.rU.rC.rA.rC.rU.rC.rC.rA.rG.rU.rG.rU.rU.rG.rG.rA.rA.rG.rG	18
RD1275/ IS0316	rU.rC.rU.rC.rA.rA.rG.rU.rA.rC.rC.rC.rU.rU.rC.rA.rC.rU.rG.rA.rG.rA.rU	19
RD1275/ IA0317	rU.rC.rU.rC.rA.rG.rU.rG.rA.rA.rG.rG.rG.rU.rA.rC.rU.rU.rG.rA.rG	20
RD1276/ IS0317	rU.rG.rG.rU.rG.rG.rA.rG.rA.rG.rU.rC.rU.rC.rA.rC.rU.rU.rU.rC.rC.rA.rU	21
RD1276/ IA0318	rU.rG.rG.rA.rA.rA.rG.rU.rG.rA.rG.rA.rC.rU.rC.rU.rC.rC.rA.rC.rC	22
RD1278/ IS0319	rU.rG.rA.rA.rC.rC.rG.rC.rC.rC.rA.rU.rU.rC.rC.rU.rG.rU.rU.rU.rG.rA.rU	23
RD1278/ IA0320	rU.rC.rA.rA.rA.rC.rA.rG.rG.rA.rA.rU.rG.rI.rG.rC.rG.rG.rU.rU.rC	24
RD1279/ IS0320	rU.rG.rC.rC.rC.rA.rU.rU.rC.rC.rU.rG.rU.rU.rU.rG.rC.rU.rG.rU.rG.rU.rU	25
RD1279/ IA0321	rA.rC.rA.rC.rA.rG.rC.rA.rA.rA.rC.rA.rG.rI.rA.rA.rU.rG.rG.rG.rC	26
RD1280/ IS0321	rU.rC.rC.rU.rG.rU.rU.rU.rA.rC.rU.rG.rU.rG.rU.rA.rU.rG.rA.rU.rC.rA.rU	27
RD1280/ IA0322	rU.rG.rA.rU.rC.rA.rU.rA.rC.rA.rC.rA.rG.rU.rA.rA.rA.rC.rA.rG.rG	28
RD1281/ IS0322	rU.rA.rA.rG.rC.rA.rG.rC.rC.rG.rU.rU.rU.rC.rU.rC.rC.rU.rU.rG.rG.rU.rU	29
RD1281/ IA0323	rA.rC.rC.rA.rA.rG.rG.rA.rG.rA.rA.rA.rC.rI.rG.rC.rU.rG.rC.rU.rU	30
RD1282/ IS0323	rU.rG.rC.rU.rG.rC.rA.rU.rA.rG.rA.rG.rU.rG.rA.rG.rC.rA.rG.rU.rA.rG.rU	31
RD1282/ IA0324	rC.rU.rA.rC.rU.rG.rC.rU.rC.rA.rC.rU.rC.rU.rA.rU.rG.rC.rA.rG.rC	32

[0086]

RD1283/ IS0324	rU.rU.rA.rG.rC.rG.rC.rG.rA.rG.rA.rC.rU.rA.rC.rU.rG.rU.rU.rC.rC.rA.rU	33
RD1283/ IA0325	rU.rG.rG.rA.rA.rC.rA.rG.rU.rA.rG.rU.rC.rU.rC.rG.rC.rG.rC.rU.rA	34
RD1284/ IS0325	rU.rC.rA.rG.rU.rG.rU.rU.rC.rC.rC.rU.rU.rU.rU.rC.rA.rA.rG.rU.rU.rG.rU	35
RD1284/ IA0326	rC.rA.rA.rC.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rA.rG.rG.rI.rA.rA.rC.rA.rC.rU.rG	36
RD1285/ IS0326	rU.rA.rG.rU.rG.rU.rU.rC.rC.rC.rU.rU.rU.rU.rC.rA.rA.rG.rU.rU.rG.rA.rU	37
RD1285/ IA0327	rU.rC.rA.rA.rC.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rA.rG.rI.rG.rA.rA.rC.rA.rC.rU	38
RD1286/ IS0327	rU.rC.rG.rU.rG.rU.rU.rC.rC.rC.rU.rU.rU.rU.rC.rA.rA.rG.rU.rU.rG.rA.rU	39
RD1286/ IA0328	rU.rC.rA.rA.rC.rU.rU.rG.rA.rA.rA.rA.rG.rI.rG.rA.rA.rC.rA.rC.rG	40
RD1287/ IS0328	rU.rU.rU.rG.rC.rA.rU.rU.rA.rC.rC.rU.rU.rC.rG.rG.rU.rU.rU.rG.rU.rA.rU	41
RD1287/ IA0329	rU.rA.rC.rA.rA.rA.rC.rC.rG.rA.rA.rG.rG.rU.rA.rA.rU.rG.rC.rA.rA	42
RD1288/ IS0329	rU.rC.rU.rG.rC.rA.rU.rU.rA.rC.rC.rU.rU.rC.rG.rG.rU.rU.rU.rG.rU.rA.rU	43
RD1288/ IA0330	rU.rA.rC.rA.rA.rA.rC.rC.rG.rA.rA.rG.rG.rU.rA.rA.rU.rG.rC.rA.rG	44
RD1289/ IS0330	rU.rC.rG.rC.rC.rU.rU.rC.rA.rG.rU.rU.rU.rG.rU.rA.rU.rU.rU.rA.rG.rU.rU	45
RD1289/ IA0331	rA.rC.rU.rA.rA.rA.rU.rA.rC.rA.rA.rA.rC.rU.rG.rA.rA.rG.rG.rC.rG	46
RD1290/ IS0331	rU.rU.rG.rA.rC.rC.rU.rC.rC.rG.rU.rG.rU.rA.rG.rU.rG.rU.rC.rU.rG.rU.rU	47
RD1290/ IA0332	rA.rC.rA.rG.rA.rC.rA.rC.rU.rA.rC.rA.rC.rI.rG.rA.rG.rG.rU.rC.rA	48
RD1291/ IS0332	rU.rC.rG.rA.rC.rC.rU.rC.rC.rG.rU.rG.rU.rA.rG.rU.rG.rU.rC.rU.rG.rU.rU	49
RD1291/ IA0333	rA.rC.rA.rG.rA.rC.rA.rC.rU.rA.rC.rA.rC.rI.rG.rA.rG.rG.rU.rC.rG	50
† 每个“RD”标识符包括有义链（“IS”子标识符）和反义链（“IA”子标识符）的序列信息。 ‡ 序列符号如下 未经修饰的RNA：rA, rU, rC, rG； 2'-O-甲基RNA：mA, mG, mC, mU； 2'-氟RNA：fA, fU, fG, fC； H2: GalNAc部分； “.”表示磷酸（磷酸二酯）键联； “*”表示硫代磷酸酯键联。		

[0087] 来自用siRNA分子进行的AGT敲低实验的体外结果如下表2中所示。

[0088] 表2. 体外siRNA结果

[0089]

siRNA	平均% AGT敲低 (10nM)
RD1270	66
RD1271	39
RD1272	59
RD1273	83

RD1274	69
RD1275	71
RD1276	73
RD1278	81
RD1279	62
RD1280	75
RD1281	86
RD1282	40
RD1283	84
RD1284	78
RD1285	87
RD1286	87
RD1287	36
RD1288	39
RD1289	22
RD1290	21
RD1291	27
RD1292	70
RD1324	65
RD1354	44

[0090] 本实施例中使用的材料列表如下:HepG2细胞(ATCC目录号HB-8065);AGT siRNA SMARTpool (Dharmacon目录号L-010988-00-0005);Dharmafect 4 (Dharmacon目录号T-2004-01);Cells-To-CT 1步TaqMan试剂盒(Fisher目录号A25603);AGT TaqMan基因表达测定250 rxns-Hs01586213_m1 (Fisher目录号4331182);GAPDH TaqMan基因表达测定250 rxns-Hs02786624_g1 (Fisher目录号4331182);不含核酸酶的水;MicroAmp光学96孔板, 0.2mL (10个板) (Fisher目录号N8010560);MicroAmp光学黏性膜(100) (Fisher目录号4311971)。

[0091] 实施例2.RD1354 siRNA的体内测试

[0092] 在食蟹猴中评价了siRNA“RD1354”。在该研究之前,猴保持隔离,期间每天观察动物的一般健康。在研究的第1天,向两只食蟹猴注射单次3mg/kg皮下剂量的寡核苷酸。在研究期间,每天观察猴是否有疾病或痛苦的体征。在第-6天和第1天(给药前)、第4天、第8天、第15天、第22天、第29天、第36天、和第43天对动物进行放血用于血清分析。使用对人血管紧张素原具有特异性的ELISA(并与食蟹猴交叉反应)根据制造商的方案(IBLAmerica#27412)对循环AGT水平进行量化。数据以基线值的百分比表示(给药之前第1天),并以平均值加/减标准差表示。个体猴的结果在图3A中示出,组的平均结果在图3B中示出。

[0093] 等同方案和范围

[0094] 在权利要求书中,未用数量词限定的名词可以意指一个/种或超过一个/种,除非指示相反情况或从上下文中明显看出。在组的一个或更多个成员之间包含“或”的权利要求或描述被认为满足以下:对于给定的产品或过程,存在、使用或以其他方式相关的一个、多

于一个或所有的组成员,除非指示相反情况或从上下文中明显看出。本发明包括其中对于给定产品或过程存在、使用或以其他方式相关的恰好一个组成员的实施方案。本发明包括其中对于给定产品或过程存在、使用或以其他方式相关的多于一个或所有组成员的实施方案。

[0095] 此外,本发明涵盖其中将来自所列权利要求的一个或更多个的一个或更多个限制、要素、条款和描述性术语引入到另一个权利要求中的所有变形、组合和排列。例如,可以对从属于另一权利要求的任何权利要求进行修改,以包含在从属于相同基础权利要求的任何其他权利要求中发现的一个或更多个限制。在要素以列表形式提出时,例如马库什组格式,则还公开了要素的每个子组,并且可以从组中删除任何要素。应当理解,通常,在将本发明或本发明的方面称为包含特定要素和/或特征的情况下,则本发明的某些实施方案或本发明的方面由或基本上由这样的要素和/或特征组成。为了简单起见,这些实施方案未在本文言语中明确给出。

[0096] 在本文在说明书和权利要求中所使用的短语“和/或”应理解为意指如此结合的要素中的“任一者或二者”,即在一些情况下结合存在而在另一些情况下分离存在的要素。用“和/或”所列出的多个要素应以相同的方式理解,即如此结合的要素的“一个/种或更多个/种”。除由“和/或”从句具体指明的要素以外,其他要素任选地存在,无论这些要素与具体指明的那些要素是相关的还是无关的。因此,作为非限制性实例,当与例如“包含”的开放式语言组合使用时,对“A和/或B”的引用可以在一个实施方案中仅指A(任选地包括除B以外的要素);在另一个实施方案中仅指B(任选地包括除A以外的要素);在又一个实施方案中指A和B二者(任选地包括其它要素);等。

[0097] 如本文在说明书和权利要求中所用,“或/或者”应理解为具有与如上文定义的“和/或”相同的含义。例如,当分离列表中的项目时,“或/或者”或“和/或”应被解释为是包括的,即包括许多要素或要素列表中的至少一个,但也包括多于一个,并且任选地包括另外的未列出的项目。只有明确表示相反的术语,例如“仅一个/种”或“恰好一个/种”,或者当在权利要求中使用,“由……组成”是指包含许多要素或要素列表中的恰好一个要素。通常来说,当在前面有排他性术语(例如“任一”、“其一”、“仅其一”或“恰好其一”)时,如本文中所用的术语“或/或者”仅应被理解为表示排他性替代方案(即,“一个/种或另一个/种,但并非二者”)。“基本上由……组成”当在权利要求中使用时应具有其在专利法领域中所使用的普通含义。

[0098] 如本文中在说明书和权利要求中所用的,短语“至少一者”在提及一个或更多个要素的列表时,应理解为意指选自要素列表中的任何一个或更多个要素的至少一个要素,但不必需包括在要素列表内具体列出的每个要素中的至少一者,并且不排除要素列表中的要素的任何组合。该定义还允许可以任选地存在除在短语“至少一个”所提及的要素列表中具体指出的要素之外的要素,无论其与具体指出的那些要素相关还是不相关。因此,作为非限制性实例,“A和B的至少一者”(或等同地,“A或B的至少一者”,或等同地“A和/或B的至少一者”),在一个实施方案中,可以指至少一个A,任选地包括多于一个A,而不存在B(并且任选地包括除B以外的要素);在另一个实施方案中,可以指至少一个B,任选地包括多于一个B,而不存在A(并且任选地包括除A以外的要素);在又一个实施方案中,可以指至少一个A,任选地包括多于一个A,和至少一个B,任选地包括多于一个B(并且任选地包括其它要素);等。

[0099] 还应理解,除非明确指出相反,否则在本文中所要求保护的包括多于一个步骤或动作的任何方法中,该方法的步骤或动作顺序不必限于所叙述的方法的这些步骤或动作的顺序。

[0100] 在权利要求以及上述说明书中,所有过渡性短语,例如“包含”、“包括”、“携带”、“具有”、“含有”、“涉及”、“持有”、“由……构成”等,都理解为开放式的,即意指包括但不限于。如美国专利局专利审查程序手册第2111.03节所阐述的,只有过渡性短语“由……组成”和“基本上由……组成”分别应为封闭或半封闭过渡性短语。应当理解,在本文件中使用开放式过渡性短语(例如,“包含”)所描述的实施方案在替代性实施方案中也被考虑为““由该开放式过渡性短语描述的特征组成”和“基本上由该开放式过渡性短语描述的特征组成”。例如,如果本申请描述了“包含A和B的组合物”,则本申请还考虑了替代性实施方案“由A和B组成的组合物”和“基本上由A和B组成的组合物”。

[0101] 在给定范围的情况下,包括端点。此外,除非另有指明或从上下文和本领域普通技术人员的理解中以其他方式明显可见,否则在本发明的不同实施方案中,表达为范围的值可以假定在所述范围内的任何特定值或子范围,至该范围的下限单位的十分之一,除非上下文另有明确规定。

[0102] 本申请涉及多个已授权的专利、公开的专利申请、期刊文章、和其他出版物,其所有都通过引用并入本文。如果任何所并入的参考文献与本说明书之间存在冲突,应以本说明书为准。另外,落入现有技术范围内的本发明的任何特定实施方案可以明确地从任何一项或更多项权利要求中排除。因为这样的实施方案被认为是本领域普通技术人员已知的,所以即使在本文中未明确提出排除,其也可以被排除。本发明的任何特定实施方案可以出于任何原因从任何权利要求中排除,无论是否与现有技术存在相关。

[0103] 本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验就能够确定本文中所述的具体实施方案的许多等同方案。本文中所述的本发明实施方案的范围并不旨在限制上述描述,而是如所附权利要求中所阐述的。本领域的普通技术人员将理解,在不偏离本发明的精神或范围的情况下,可以对本说明书进行多种改变和修改,如以下权利要求所限定的。

[0104] 本文中对变量的任何定义中化学基团的列表的记载包括将该变量定义为所列举的基团的任何单个基团或组合。本文中对变量的实施方案的记载包括作为任何单个实施方案或者与任何其他实施方案或其部分组合的实施方案。本文中对实施方案的记载包括作为任何单个实施方案或者与任何其他实施方案或其部分组合的实施方案。

序列表

<110>	ADARx Pharmaceuticals, Inc	
<120>	RNA沉默剂及使用方法	
<130>	A1278.70007W000	
<140>	尚未分配	
<141>	与此同时	
<150>	US 63/174,507	
<151>	2021-04-13	
<160>	50	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	1	
	uccaccucau cauccacaau gau	23
<210>	2	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	2	
	ucauugugga ugaugaggug g	21
<210>	3	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	3	
	ccaccucauc auccacaaug au	22
<210>	4	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	

<220>	
<223> 合成的	
<400> 4	
ucauugugga ugaugaggug	20
<210> 5	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 5	
ugguggagag ucucacuuuc cau	23
<210> 6	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 6	
uggaaaguga gacucuccac c	21
<210> 7	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 7	
gguggagagu cucacuuucc au	22
<210> 8	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 8	
uggaaaguga gacucuccac ca	22
<210> 9	
<211> 23	
<212> RNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 9	
uaggugaccg gguguacaua cau	23
<210> 10	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (14) .. (14)	
<223> N是肌苷	
<400> 10	
uguauuguaca cccngucacc u	21
<210> 11	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 11	
ugagacaucc ccuguggaug aaU	23
<210> 12	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (14) .. (14)	
<223> N是肌苷	
<400> 12	
uucauccaca gggnaugucu c	21
<210> 13	
<211> 23	

<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 13	
uacccuggcc ucucucuauc uau	23
<210> 14	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (14) .. (14)	
<223> N是肌苷	
<400> 14	
uagauagaga gagnccaggg u	21
<210> 15	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 15	
ucacccugac uuucaacacc uau	23
<210> 16	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 16	
uagguguuga aagucagggu g	21
<210> 17	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 合成的	
<400> 17	
uccuuccaac acuggaguga cau	23
<210> 18	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 18	
ugucacucca guguuggaag g	21
<210> 19	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 19	
ucucaaguac ccuucacuga gau	23
<210> 20	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 20	
ucucagugaa gguacuuga g	21
<210> 21	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 21	
ugguggagag ucucacuuuc cau	23
<210> 22	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成的	
<400>	22	
uggaaaguga gacucuccac c		21
<210>	23	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	23	
ugaaccgccc auuccuguuu gau		23
<210>	24	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(14) .. (14)	
<223>	N是肌苷	
<400>	24	
ucaaacagga augngcgguu c		21
<210>	25	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	25	
ugcccauucc uguuugcugu guu		23
<210>	26	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		

〈221〉	经修饰的碱基	
〈222〉	(14) .. (14)	
〈223〉	N是肌苷	
〈400〉	26	
	acacagcaaa cagnaauogg c	21
〈210〉	27	
〈211〉	23	
〈212〉	RNA	
〈213〉	人工序列	
〈220〉		
〈223〉	合成的	
〈400〉	27	
	uccuguuuac uguguaugau cau	23
〈210〉	28	
〈211〉	21	
〈212〉	RNA	
〈213〉	人工序列	
〈220〉		
〈223〉	合成的	
〈400〉	28	
	ugaucauaca caguaaacag g	21
〈210〉	29	
〈211〉	23	
〈212〉	RNA	
〈213〉	人工序列	
〈220〉		
〈223〉	合成的	
〈400〉	29	
	uaagcagccg uuucuccuug guu	23
〈210〉	30	
〈211〉	21	
〈212〉	RNA	
〈213〉	人工序列	
〈220〉		
〈223〉	合成的	
〈220〉		
〈221〉	经修饰的碱基	
〈222〉	(14) .. (14)	
〈223〉	N是肌苷	

<400> 30	
accaaggaga aacngcugcu u	21
<210> 31	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 31	
ugcugcauag agugagcagu agu	23
<210> 32	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 32	
cuacugcuca cucuaugcag c	21
<210> 33	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 33	
uuagcgcgag acuacuguuc cau	23
<210> 34	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 34	
uggaacagua gucucgcgcu a	21
<210> 35	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 合成的	
<400> 35	
ucaguguucc cuuuucaagu ugu	23
<210> 36	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (14) .. (14)	
<223> N是肌苷	
<400> 36	
caacuugaaa agгнаacacu g	21
<210> 37	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 37	
uaguguuccc uuуucaaguу gau	23
<210> 38	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (14) .. (14)	
<223> N是肌苷	
<400> 38	
ucaacuugaa aagngaacac u	21
<210> 39	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成的	
<400>	39	
ucguguuccc uuucagaau gau		23
<210>	40	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(14) .. (14)	
<223>	N是肌苷	
<400>	40	
ucaacuugaa aaggaacac g		21
<210>	41	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	41	
uuugcauuac cuucgguug uau		23
<210>	42	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	42	
uacaaaccga agguaaugca a		21
<210>	43	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	43	

ucugcauuac cuucgguuug uau	23
<210> 44	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 44	
uacaaaccga agguaaugca g	21
<210> 45	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 45	
ucgccuucag uuuguauuuu guu	23
<210> 46	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 46	
acuaaaauaca aacugaaggc g	21
<210> 47	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 47	
uugaccuccg uguagugucu guu	23
<210> 48	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	

<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(14) .. (14)	
<223>	N是肌苷	
<400>	48	
acagacacua cacngagguc a		21
<210>	49	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	49	
ucgaccuccg uguagugucu guu		23
<210>	50	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(14) .. (14)	
<223>	N是肌苷	
<400>	50	
acagacacua cacngagguc g		21

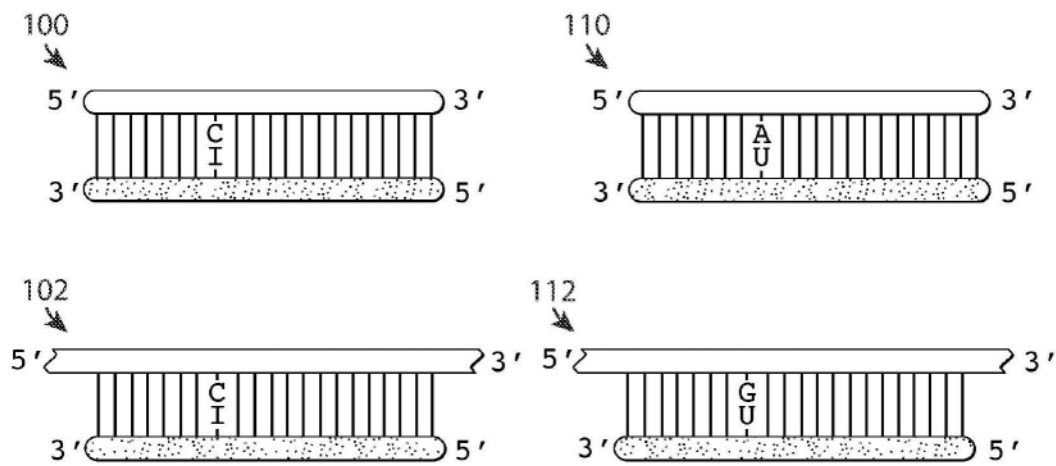


图1

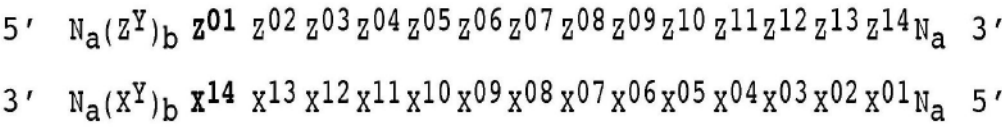


图2

AGT水平-RD1354 Inotiv研究
组中的个体猴

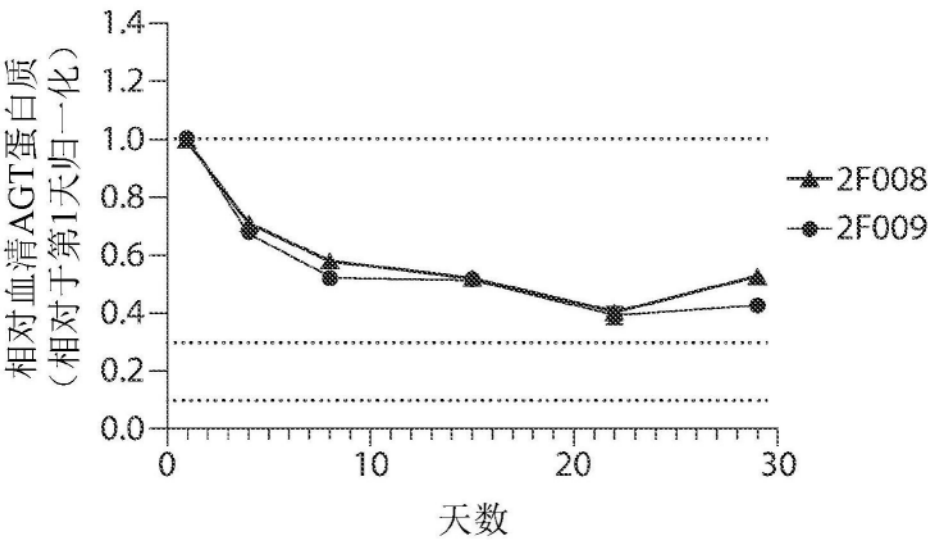


图3A

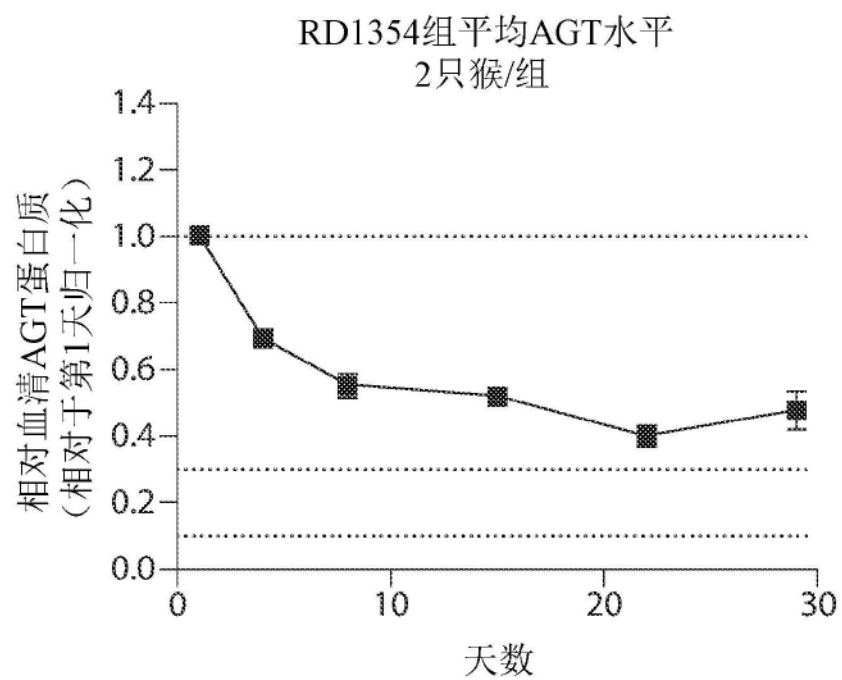


图3B