(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120019145 A
(43)申请公布日 2025.05.16

(21)申请号 202380068981.0
(22)申请日 2023.09.28
(30)优先权数据
63/410,872 2022.09.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/075406 2023.09.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/073589 EN 2024.04.04
(71)申请人 阿塔兰塔治疗公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 C·加伦特-贝赫姆
W·科库拉帕兰 B·安德昂
M·哈斯勒 D·库蒂斯
B·M·达·科鲁兹·格丁霍
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 郜红 王北南
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
C07H 21/02(2006.01)

权利要求书9页 说明书62页
序列表（电子公布）

(54)发明名称

用于治疗神经炎性疾病的组合物和方法

(57)摘要

本公开提供了靶向跨膜4结构域AGA(MS4A6A)基因的单链或双链干扰RNA分子(例如,siRNA)。所述干扰RNA分子可含有特定模式的核苷修饰和核苷间键联修饰,作为包含所述干扰RNA分子的药物组合物。所述siRNA分子可以是分支siRNA分子,诸如二分支、三分支或四分支siRNA分子。所公开的siRNA分子还可以特征在于5'磷稳定部分和/或疏水部分。另外,本公开提供了用于将本公开的所述siRNA分子递送至受试者,诸如鉴定为患有神经炎性疾病(例如阿尔茨海默病)的受试者的中枢神经系统的方法。

CN 120019145 A

1.一种小干扰RNA(siRNA)分子,其包含反义链和与所述反义链具有互补性的有义链,其中所述反义链具有足够的互补性以与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的跨膜4结构域A6A(MS4A6A)mRNA转录物内的区域杂交。

2.如权利要求1所述的siRNA分子,其中所述反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A mRNA转录物内19、20、21个或更多个连续核碱基的区域具有至少70%的互补性,任选地其中所述反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A mRNA转录物具有至少70%的互补性。

3.如权利要求2所述的siRNA分子,其中所述反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A mRNA转录物内21个连续核碱基的区域具有至少75%的互补性,任选地其中所述反义链与具有SEQ ID No:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6AmRNA转录物内的所述区域具有至少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100%的互补性。

4.如权利要求1-3中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链包含至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个或30个连续核苷酸,所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A RNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

5.如权利要求4所述的siRNA分子,其中所述反义链包含10至30个连续核苷酸,所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A RNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

6.如权利要求5所述的siRNA分子,其中所述反义链包含12至30个连续核苷酸,所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A RNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

7.如权利要求6所述的siRNA分子,其中所述反义链包含15至30个连续核苷酸,所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A RNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

8.如权利要求7所述的siRNA分子,其中所述反义链包含18至30个连续核苷酸,所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A RNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

9.如权利要求8所述的siRNA分子,其中所述反义链包含18至25个连续核苷酸,所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A RNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

10.如权利要求9中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链包含18至21个连续核苷酸,所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A RNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

11.如权利要求10所述的siRNA分子,其中所述反义链包含21个连续核苷酸,所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A RNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

12.如权利要求1-11中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链相对于具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A RNA转录物的21个连续核碱基的区域包含9个或更少的核苷酸错配,任选地其中所述反义链相对于具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述MS4A6A RNA转录物的所述区域包含8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、2个或更少,或仅1个错配。

13.如权利要求1-12中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链具有与SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列至少85%同一的核酸序列。

14.如权利要求13所述的siRNA分子,其中所述反义链具有与SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列至少90%同一的核酸序列。

15.如权利要求14所述的siRNA分子,其中所述反义链具有与SEQ ID NO:385-576的核酸序列至少95%同一的核酸序列,任选地其中所述反义链具有与SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列至少96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。

16.如权利要求15所述的siRNA分子,其中所述反义链具有SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列。

17.如权利要求1-16中任一项所述的siRNA分子,其中所述有义链具有与SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列至少85%同一的核酸序列。

18.如权利要求17所述的siRNA分子,其中所述有义链具有与SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列至少90%同一的核酸序列。

19.如权利要求18所述的siRNA分子,其中所述有义链具有与SEQ ID NO:193-384的核酸序列至少95%同一的核酸序列,任选地其中所述有义链具有与SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列至少96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。

20.如权利要求19所述的siRNA分子,其中所述有义链具有SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列。

21.如权利要求1-20中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式I表示的结构,其中式I按5'至3'方向是:

$A\text{-}B\text{-}(A')_j\text{-}C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^1\text{-}(C'\text{-}P^1)_k\text{-}C'$

式I;

其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;

每个A'由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;

B由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;

每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

22.如权利要求21所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式A1表示的结构,其中式A1按5'至3'方向是:

A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

式A1;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

23.如权利要求1-20中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式II表示的结构,其中式II按5'至3'方向是:

$A-B-(A')_j-C-P^2-D-P^1-(C-P^1)_k-C'$

式II;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

B由式$C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2$表示;

每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

24.如权利要求23所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式A2表示的结构,其中式A2按5'至3'方向是:

A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-A-S-A

式A2;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

25.如权利要求1-24中任一项所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式III表示的结构,其中式III按5'至3'方向是:

$E-(A')_m-F$

式III;

其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

F由式$(C-P^2)_3-D-P^1-C-P^1-C$、$(C-P^2)_3-D-P^2-C-P^2-C$、$(C-P^2)_3-D-P^1-C-P^1-D$或$(C-P^2)_3-D-P^2-C-P^2-D$表示;

A'、C、D、P^1和P^2如式II所定义;并且

m是1至7的整数。

26.如权利要求25所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S1表示的结构,其中式S1按5'至3'方向是:

A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-A

式S1;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

27.如权利要求25所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S2表示的结构,其中式S2按5'至3'方向是:

A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A

式S2;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

28.如权利要求25所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S3表示的结构,其中式S3按5'至3'方向是:

A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-B

式S3;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

29.如权利要求25所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S4表示的结构,其中式S4按5'至3'方向是:

A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-B

式S4;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

30.如权利要求1-20和25-29中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式IV表示的结构,其中式IV按5'至3'方向是:

$A-(A')_j-C-P^2-B-(C-P^1)_k-C'$

式IV;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

B由式$D-P^1-C-P^1-D-P^1$表示;

每个C是2'-O-Me核糖核苷;

每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

31.如权利要求30所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式A3表示的结构,其中式A3按5'至3'方向是:

A-S-B-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-B-S-A-S-A-S-A

式A3;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

32.如权利要求1-24、30和31中任一项所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式V表示的结构,其中式V按5'至3'方向是:

$E-(A')_m-C-P^2-F$

式V;

其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

F由式$D-P^1-C-P^1-C$、$D-P^2-C-P^2-C$、$D-P^1-C-P^1-D$或$D-P^2-C-P^2-D$表示;

A'、C、D、P^1和P^2如式IV所定义;并且

m是1至7的整数。

33.如权利要求32所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S5表示的结构,其中式S5按5'至3'方向是:

A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A

式S5;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

34.如权利要求32所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S6表示的结构,其中式S6按5'至3'方向是:

A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A

式S6;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

35.如权利要求32所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S7表示的结构,其中式S7按5'至3'方向是:

A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-B

式S7;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

36.如权利要求32所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S8表示的结构,其中式S8按5'至3'方向是:

A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B

式S8;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

37.如权利要求1-20、25-29和32-36中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式VI表示的结构,其中式VI按5'至3'方向是:

$A-B_j-E-B_k-E-F-G_l-D-P^1-C'$

式VI;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个B由式C-P^2表示;

每个C是2'-O-Me核糖核苷;

每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个E由式D-P^2-C-P^2表示;

F由式D-P^1-C-P^1表示;

每个G由式C-P^1表示;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;

k是1至7的整数;并且

l是1至7的整数。

38.如权利要求37所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式A4表示的结构,其中式A4按5'至3'方向是:

A-S-B-S-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

式A4;

其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

39.如权利要求1-24、30、31、37和38中任一项所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式VII表示的结构,其中式VII按5'至3'方向是:

H-B_m-I_n-A'-B_o-H-C

式VII;

其中A'由式C-P^2-D-P^2表示;

每个H由式$(C\text{-}P^1)_2$表示;

每个I由式$(D\text{-}P^2)$表示;

B、C、D、P^1和P^2如式VI所定义;

m是1至7的整数;

n是1至7的整数;并且

o是1至7的整数。

40.如权利要求39所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S9表示的结构,其中式S9按5'至3'方向是:

A-S-A-S-A-O-A-O-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-S-A-S-A

式S9;

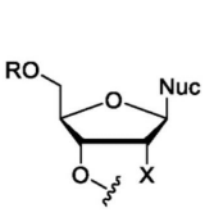
其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

41.如权利要求1-40中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链还包含在所述反义链的5'末端的5'磷稳定部分。

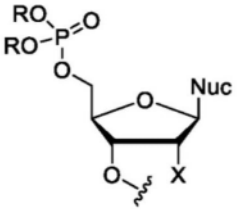
42.如权利要求1-41中任一项所述的siRNA分子,其中所述有义链还包含在所述有义链

的5’末端的5’磷稳定部分。

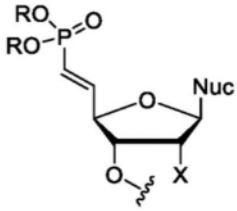
43.如权利要求41或42所述的siRNA分子,其中每个5’磷稳定部分独立地由式IX-XVI中的任一个表示:



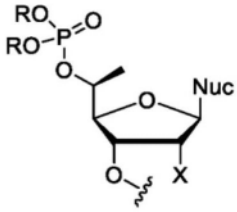
式IX



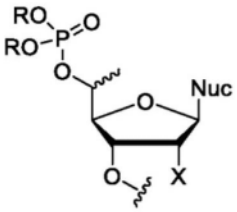
式X



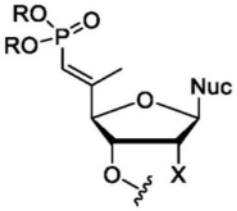
式XI



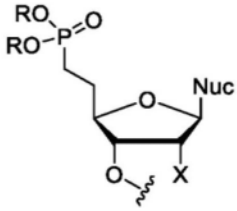
式XII



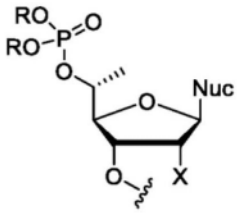
式XIII



式XIV



式XV



式XVI

其中Nuc表示核碱基,任选地其中所述核碱基选自腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶,并且R表示任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、苯基、苄基、阳离子或氢。

44.如权利要求43所述的siRNA分子,其中所述核碱基是腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶。

45.如权利要求41-44中任一项所述的siRNA分子,其中所述5’磷稳定部分是由式XI表示的(E)-乙烯基膦酸酯。

46.如权利要求1-45中任一项所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子还包含在所述siRNA分子的5’末端或3’末端的疏水部分。

47.如权利要求46所述的siRNA分子,其中所述疏水部分选自胆固醇、维生素D或生育酚。

48.如权利要求1-47中任一项所述的siRNA分子,其中所述有义链的长度为10至30个核苷酸。

49.如权利要求48所述的siRNA分子,其中所述有义链的长度为10至25个核苷酸。

50.如权利要求49所述的siRNA分子,其中所述有义链的长度为12至25个核苷酸。

51.如权利要求50所述的siRNA分子,其中所述有义链的长度为12至20个核苷酸。

52.如权利要求51所述的siRNA分子,其中所述有义链的长度为12至19个核苷酸。

53.如权利要求52所述的siRNA分子,其中所述有义链的长度为15个核苷酸。

54.如权利要求52所述的siRNA分子,其中所述有义链的长度为16个核苷酸。

55.如权利要求52所述的siRNA分子,其中所述有义链的长度为18个核苷酸。

56.如权利要求1-55中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链的长度为10至30个核苷酸。

57.如权利要求56所述的siRNA分子,其中所述反义链的长度为12至30个核苷酸。

58.如权利要求57所述的siRNA分子,其中所述反义链的长度为15至30个核苷酸。

59.如权利要求58所述的siRNA分子,其中所述反义链的长度为18至30个核苷酸。

60.如权利要求59所述的siRNA分子,其中所述反义链的长度为18至25个核苷酸。

61.如权利要求60所述的siRNA分子,其中所述反义链的长度为18至21个核苷酸。

62.如权利要求61所述的siRNA分子,其中所述反义链的长度为18个核苷酸。

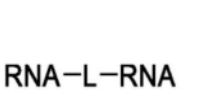
63.如权利要求61所述的siRNA分子,其中所述反义链的长度为20个核苷酸。

64.如权利要求61所述的siRNA分子,其中所述反义链的长度为21个核苷酸。

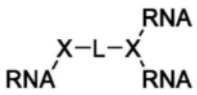
65.如权利要求1-64中任一项所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子是分支siRNA分子。

66.如权利要求65所述的siRNA分子,其中所述分支siRNA分子是二分支、三分支或四分支的。

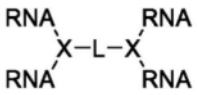
67.如权利要求66所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子是二分支siRNA分子,任选地其中所述二分支siRNA分子由式XVII-XIX中的任一个表示:



式XVII;



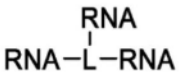
式XVIII;



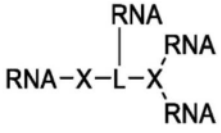
式XIX;

其中每个RNA独立地为siRNA分子,L为接头,并且每个X独立地代表分支点部分。

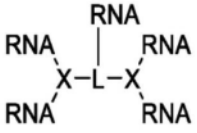
68.如权利要求66所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子是三分支siRNA分子,任选地其中所述三分支siRNA分子由式XX-XXIII中的任一个表示:



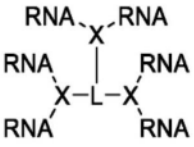
式XX;



式XXI;



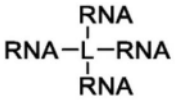
式XXII;



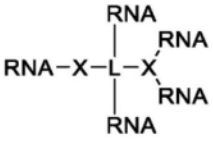
式XXIII;

其中每个RNA独立地为siRNA分子,L为接头,并且每个X独立地代表分支点部分。

69.如权利要求66所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子是四分支siRNA分子,任选地其中所述四分支siRNA分子由式XXIV-XXVIII中的任一个表示:



式XXIV;



式XXV;



式XXVI;



式XXVII;



式XXVIII;

其中每个RNA独立地为siRNA分子,L为接头,并且每个X独立地代表分支点部分。

70.如权利要求67-69中任一项所述的siRNA分子,其中所述接头选自乙二醇、烷基、碳水化合物、嵌段共聚物、肽、RNA和DNA的一个或多个连续亚基。

71.如权利要求70所述的siRNA分子,其中所述一个或多个连续亚基是2至20个连续亚基。

72.一种药物组合物,其包含权利要求1-71中任一项所述的siRNA分子和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

73.一种将siRNA分子递送至诊断为患有神经炎性疾病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-71中任一项所述的siRNA分子或权利要求72所述的药物组合物。

74.一种治疗有需要的受试者的神经炎性疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-71中任一项所述的siRNA分子或权利要求72所述的药物组合物。

75.如权利要求73或74所述的方法,其中所述神经炎性疾病是阿尔茨海默病。

76.一种降低有需要的受试者中的MS4A6A表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-71中任一项所述的siRNA分子或权利要求72所述的药物组合物。

77.如权利要求73-76中任一项所述的方法,其中所述siRNA分子或所述药物组合物通过脑室内、纹状体内、实质内或鞘内注射的方式施用给所述受试者。

78.如权利要求73-76中任一项所述的方法,其中所述siRNA分子或所述药物组合物通过静脉内、肌肉内,或皮下注射的方式施用给所述受试者。

79.如权利要求73-78中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

80.一种试剂盒,其包含权利要求1-71中任一项所述的siRNA分子,或权利要求72所述的药物组合物,以及包装说明书,其中所述包装说明书指导所述试剂盒的使用者进行权利要求73-79中任一项所述的方法。

用于治疗神经炎性疾病的组合物和方法

[0001] 序列表

[0002] 本申请含有已经以XML格式以电子方式提交并且特此通过引用以其整体并入的序列表。所述XML副本创建于2023年9月19日,名为“51436-036WO2_Sequence_Listing_9_19_23”并且大小为505,859字节。

技术领域

[0003] 本公开涉及小干扰RNA(siRNA)分子以及含有所述siRNA分子的组合物,所述siRNA分子靶向跨膜4结构域亚家族A(MS4A)基因(例如,MS4A6A)的RNA转录物(例如,mRNA)。本公开进一步描述了用于沉默MS4A6A以及治疗可能受益于MS4A6A沉默的疾病(例如,神经炎性疾病,诸如阿尔茨海默氏病)的方法,该方法通过将靶向MS4A6A的siRNA分子递送至有需要的受试者的靶组织来实现。

背景技术

[0004] MS4A(跨膜4结构域亚家族A)基因家族编码与包括神经炎性疾病(例如阿尔茨海默病)在内的疾病的病理有关的蛋白质。因此,需要能够以为神经炎性疾病(例如阿尔茨海默病)或其他MS4A相关疾病或病症提供有效治疗的方式选择性地降低MS4A活性(例如,MS4A6A)的治疗方法。

发明内容

[0005] 本公开提供了用于通过小干扰RNA(siRNA)介导的跨膜4结构域亚家族A(MS4A)转录物(具体地是MS4A6A)的沉默来降低MS4A表达的组合物和方法。该组合物和方法的优点是,相对于其他基因(例如,其他MS4A家族成员)对MS4A6A表现出高选择性。

[0006] 本公开的siRNA分子可用于沉默MS4A6A基因,从而阻止相应mRNA转录物的翻译并降低跨膜4结构域A6A蛋白表达。因此,跨膜4结构域A6A水平的这种降低可防止疾病的发生或进展,因为MS4A6A基因的变体与神经炎性疾病(例如阿尔茨海默病)的发生相关。本公开的siRNA分子可以通过例如鞘内注射、脑室内注射、纹状体内注射、实质内注射、小脑延髓池内注射(诸如经由导管插入)、静脉内注射、皮下注射或肌肉内注射直接递送至需要MS4A6A沉默的受试者。

[0007] 在一个方面,本公开提供了含有反义链和与所述反义链具有互补性的有义链的siRNA分子。反义链具有足够的互补性以与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物内的区域杂交。反义链可以例如长度为10至50个核苷酸(例如,长度为10至45个核苷酸、长度为10至40个核苷酸、长度为10至35个核苷酸、长度为10至30个核苷酸、长度为10至29个核苷酸、长度为10至28个核苷酸、长度为10至27个核苷酸、长度为10至26个核苷酸、长度为10至25个核苷酸、长度为10至24个核苷酸、长度为10至23个核苷酸、长度为10至22个核苷酸、长度为10至21个核苷酸、或长度为10至20个核苷酸)。在一些实施方案中,反义链的长度为10个核苷酸、长度为11个核苷酸、长度为12个核苷酸、长度为13个核

苷酸、长度为14个核苷酸、长度为15个核苷酸、长度为16个核苷酸、长度为17个核苷酸、长度为18个核苷酸、长度为19个核苷酸、长度为20个核苷酸、长度为21个核苷酸、长度为22个核苷酸、长度为23个核苷酸、长度为24个核苷酸、长度为25个核苷酸、长度为26个核苷酸、长度为27个核苷酸、长度为28个核苷酸、长度为29个核苷酸、长度为30个核苷酸或更长。

[0008] 在任一前述方面的一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物内15个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物内16个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物内17个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物内18个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物内19个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物内20个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物内21个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少

80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或100%)互补性。

[0009] 在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物内的区域具有至少70%(例如,至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或100%)互补性。

[0010] 在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物内的区域具有至少75%的互补性。例如,反义链可以与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物内的区域具有至少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100%的互补性。

[0011] 在一些实施方案中,反义链具有至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个或30个连续核苷酸,所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

[0012] 在一些实施方案中,反义链具有10至30个连续核苷酸(例如,10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸),所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

[0013] 在一些实施方案中,反义链具有12至30个连续核苷酸(例如,10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸),所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

[0014] 在一些实施方案中,反义链具有15至30个连续核苷酸(例如,15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸),所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

[0015] 在一些实施方案中,反义链具有18至30个连续核苷酸(例如,18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个连续核苷酸),所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A RNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

[0016] 在一些实施方案中,反义链具有18至25个连续核苷酸(例如,18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸),所述连续核苷酸与具有SEQ ID No:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

[0017] 在一些实施方案中,反义链具有18至21个连续核苷酸(例如,18、19、20或21个连续核苷酸),所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转

录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

[0018] 在一些实施方案中,反义链具有21个连续核苷酸,所述连续核苷酸与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

[0019] 在一些实施方案中,反义链相对于具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A RNA转录物的21个连续核碱基的区域具有9个或更少的核苷酸错配,任选地其中反义链相对于具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物的所述区域含有8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、2个或更少、或仅1个错配。

[0020] 在一些实施方案中,反义链具有与SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列至少85%同一(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的核酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,反义链具有与SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列至少90%同一(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的核酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,反义链具有与SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列至少95%同一(例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的核酸序列,任选地其中反义链具有与SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列至少96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。

[0023] 在一些实施方案中,反义链具有SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列。

[0024] 在一些实施方案中,有义链具有与SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列至少85%同一(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的核酸序列。

[0025] 在一些实施方案中,有义链具有与SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列至少90%同一(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的核酸序列。

[0026] 在一些实施方案中,有义链具有与SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列至少95%同一(例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的核酸序列,任选地其中有义链具有与SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列至少96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,所述siRNA分子具有有义链,所述有义链具有SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,反义链具有式I表示的结构,其中式I按5'至3'方向为:

[0029] $A\text{-}B\text{-}(A')_j\text{-}C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^1\text{-}(C'\text{-}P^1)_k\text{-}C'$

[0030] 式I;

[0031] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;

[0032] 每个A'由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;

[0033] B由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;

[0034] 每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

[0035] 每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

[0036] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0037] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0038] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0039] j是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且

[0040] k是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

[0041] 在一些实施方案中,反义链具有式A1表示的结构,其中式A1按5'至3'方向为:

[0042] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0043] A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[0044] 式A1;

[0045] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0046] 在一些实施方案中,反义链具有式II表示的结构,其中式II按5'至3'方向为:

[0047] $A-B-(A')_j-C-P^2-D-P^1-(C-P^1)_k-C'$

[0048] 式II;

[0049] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

[0050] 每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

[0051] B由式$C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2$表示;

[0052] 每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

[0053] 每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

[0054] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0055] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0056] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0057] j是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且

[0058] k是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

[0059] 在一些实施方案中,反义链具有式A2表示的结构,其中式A2按5'至3'方向为:

[0060] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0061] A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-A-S-A

[0062] 式A2;

[0063] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0064] 在一些实施方案中,有义链具有III表示的结构,其中式III按5'至3'方向为:

[0065] $E-(A')_m-F$

[0066] 式III;

[0067] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

[0068] F由式$(C-P^2)_3-D-P^1-C-P^1-C$、$(C-P^2)_3-D-P^2-C-P^2-C$、$(C-P^2)_3-D-P^1-C-P^1-D$或$(C-P^2)_3-D-P^2-C-P^2-D$表示;

[0069] A'、C、D、P^1和P^2如式II所定义;并且

[0070] m是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

[0071] 在一些实施方案中,有义链具有S1表示的结构,其中式S1按5'至3'方向为:

[0072] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-

[0073] A-S-A

[0074] 式S1;

[0075] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0076] 在一些实施方案中,有义链具有S2表示的结构,其中式S2按5'至3'方向为:

[0077] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-

[0078] A-O-A

[0079] 式S2;

[0080] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0081] 在一些实施方案中,有义链具有S3表示的结构,其中式S3按5'至3'方向为:

[0082] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-

[0083] A-S-B

[0084] 式S3;

[0085] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0086] 在一些实施方案中,有义链具有S4表示的结构,其中式S4按5'至3'方向为:

[0087] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-

[0088] A-O-B

[0089] 式S4;

[0090] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0091] 在一些实施方案中,反义链具有式IV表示的结构,其中式IV按5'至3'方向为:

[0092] $A-(A')_j-C-P^2-B-(C-P^1)_k-C'$

[0093] 式IV;

[0094] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

[0095] 每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

[0096] B由式$D-P^1-C-P^1-D-P^1$表示;

[0097] 每个C是2'-O-Me核糖核苷;

[0098] 每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

[0099] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0100] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0101] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0102] j是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且

[0103] k是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

[0104] 在一些实施方案中,反义链具有式A3表示的结构,其中式A3按5'至3'方向为:

[0105] A-S-B-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0106] A-O-B-S-A-S-B-S-A-S-A-S-A

[0107] 式A3;

[0108] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0109] 在一些实施方案中,有义链具有V表示的结构,其中式V按5'至3'方向为:

[0110] $E-(A')_m-C-P^2-F$

[0111] 式V;

[0112] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

[0113] F由式$D-P^1-C-P^1-C$、$D-P^2-C-P^2-C$、$D-P^1-C-P^1-D$或$D-P^2-C-P^2-D$表示;

[0114] A'、C、D、P^1和P^2如式IV所定义;并且

[0115] m是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

[0116] 在一些实施方案中,有义链具有S5表示的结构,其中式S5按5'至3'方向为:

[0117] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A

[0118] 式S5;

[0119] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0120] 在一些实施方案中,有义链具有S6表示的结构,其中式S6按5'至3'方向为:

[0121] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0122] A-O-A

[0123] 式S6;

[0124] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0125] 在一些实施方案中,有义链具有S7表示的结构,其中式S7按5'至3'方向为:

[0126] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-B

[0127] 式S7;

[0128] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0129] 在一些实施方案中,有义链具有S8表示的结构,其中式S8按5'至3'方向为:

[0130] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0131] A-O-B

[0132] 式S8;

[0133] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0134] 在一些实施方案中,反义链具有式VI表示的结构,其中式VI按5'至3'方向为:

[0135] $A-B_j-E-B_k-E-F-G_1-D-P^1-C'$

[0136] 式VI;

[0137] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

[0138] 每个B由式$C-P^2$表示;

[0139] 每个C是2'-O-Me核糖核苷;

[0140] 每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

[0141] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0142] 每个E由式D-P^2-C-P^2表示;

[0143] F由式D-P^1-C-P^1表示;

[0144] 每个G由式C-P^1表示;

[0145] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0146] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0147] j是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);

[0148] k是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且

[0149] l是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

[0150] 在一些实施方案中,反义链具有式A4表示的结构,其中式A4按5'至3'方向为:

[0151] A-S-B-S-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-B-O-

[0152] A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[0153] 式A4;

[0154] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0155] 在一些实施方案中,有义链具有VII表示的结构,其中式VII按5'至3'方向为:

[0156] H-B_m-I_n-A'-B_o-H-C

[0157] 式VII;

[0158] 其中A'由式C-P^2-D-P^2表示;

[0159] 每个H由式$(C\text{-}P^1)_2$表示;

[0160] 每个I由式$(D\text{-}P^2)$表示;

[0161] B、C、D、P^1和P^2如式VI所定义;

[0162] m是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);

[0163] n是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且

[0164] o是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

[0165] 在一些实施方案中,有义链具有S9表示的结构,其中式S9按5'至3'方向为:

[0166] A-S-A-S-A-O-A-O-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-S-

[0167] A-S-A

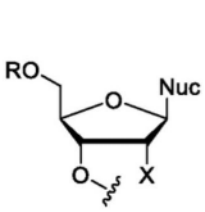
[0168] 式S9;

[0169] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

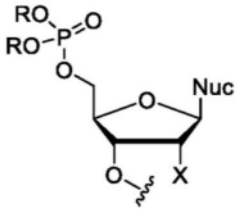
[0170] 在一些实施方案中,反义链还在该反义链的5'末端具有5'磷稳定部分。

[0171] 在一些实施方案中,有义链还在该有义链的5'末端具有5'磷稳定部分。

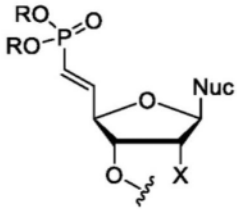
[0172] 在一些实施方案中,每个5'-磷稳定部分独立地由式IX、XX、XI、XII、XIII、XIV、XV或XVI中的任一个表示:



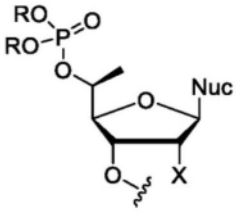
式IX



式X

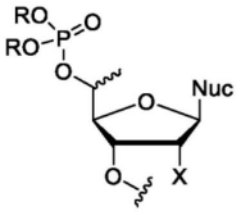


式XI

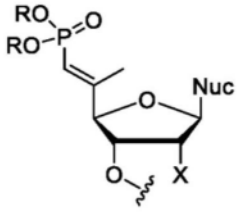


式XII

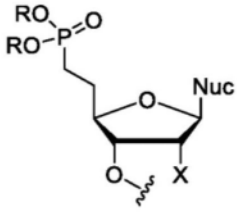
[0173]



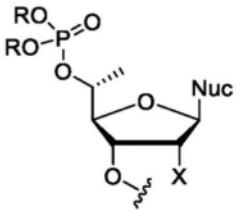
式XIII



式XIV



式XV



式XVI

[0174] 其中Nuc表示核碱基,任选地其中所述核碱基选自腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶,并且R表示任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、苯基、苄基、阳离子(例如,单价阳离子)或氢。

[0175] 在一些实施方案中,所述核碱基是腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶。

[0176] 在一些实施方案中,5'磷稳定部分是式XI表示的(E)-乙烯基膦酸酯。

[0177] 在一些实施方案中,siRNA分子还在该siRNA分子的5'或3'末端具有疏水部分。

[0178] 在一些实施方案中,所述疏水部分选自胆固醇、维生素D和生育酚。

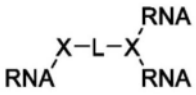
[0179] 在一些实施方案中,siRNA分子是分支siRNA分子。

[0180] 在一些实施方案中,所述分支siRNA分子是二分支、三分支或四分支的。

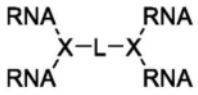
[0181] 在一些实施方案中,siRNA分子是二分支的,任选地其中所述二分支siRNA分子由式XVII、XVIII或XIX中的任一个表示:

[0182] RNA-L-RNA

式XVII;



式XVIII;



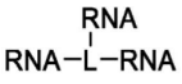
式XIX;

[0183] 其中每个RNA独立地为siRNA分子,L为接头,并且每个X独立地代表分支点部分。

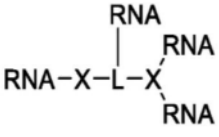
[0184] 在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式XVII表示。在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式XVIII表示。在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式XIX表示。

[0185] 在一些实施方案中,siRNA分子是三分支的,任选地其中所述三分支siRNA分子由式XX、XXI、XXII或XXIII中的任一个表示:

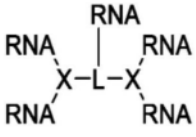
[0186]



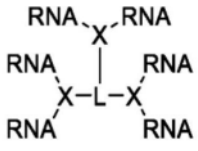
式XX;



式XXI;



式XXII;



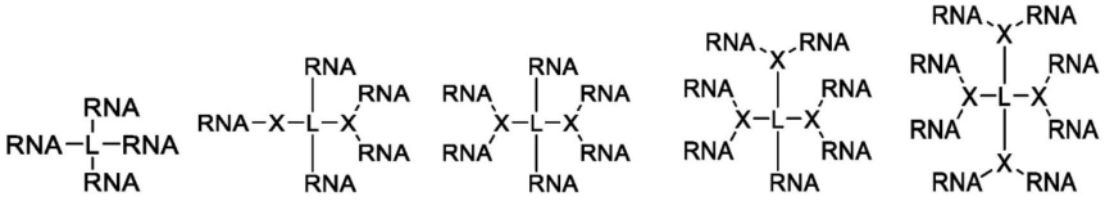
式XXIII;

[0187] 其中每个RNA独立地为siRNA分子,L为接头,并且每个X独立地代表分支点部分。

[0188] 在一些实施方案中,三分支siRNA分子由式XX表示。在一些实施方案中,三分支

siRNA分子由式XXI表示。在一些实施方案中,三分支siRNA分子由式XXII表示。在一些实施方案中,三分支siRNA分子由式XXIII表示。

[0189] 在一些实施方案中,siRNA分子是四分支的,任选地其中所述四分支siRNA分子由式XXIV、XXV、XXVI、XXVII或XXVIII中的任一个表示:

[0190] 

式XXIV; 式XXV; 式XXVI; 式XXVII; 式XXVIII;

[0191] 其中每个RNA独立地为siRNA分子,L为接头,并且每个X独立地代表分支点部分。

[0192] 在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式XXIV表示。在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式XXV表示。在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式XXVI表示。在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式XXVII表示。在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式XXVIII表示。

[0193] 在分支siRNA的一些实施方案中,接头选自乙二醇(例如,聚乙二醇(PEG),诸如三乙二醇(TrEG)或四乙二醇(TEG))、烷基、碳水化合物、嵌段共聚物、肽、RNA和DNA的一个或多个连续亚基。

[0194] 在一些实施方案中,所述接头是乙二醇寡聚体。在一些实施方案中,所述接头是烷基寡聚体。在一些实施方案中,所述接头是碳水化合物寡聚体。在一些实施方案中,所述接头是嵌段共聚物。在一些实施方案中,所述接头是肽寡聚体。在一些实施方案中,所述接头是RNA寡聚体。在一些实施方案中,所述接头是DNA寡聚体。

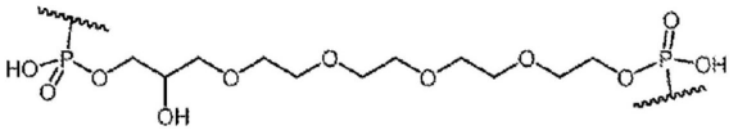
[0195] 在一些实施方案中,所述乙二醇寡聚体是PEG。在一些实施方案中,所述PEG是TrEG。在一些实施方案中,所述PEG是TEG。

[0196] 在一些实施方案中,所述寡聚体或共聚物含有2至20个连续亚基(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续亚基)。

[0197] 在一些实施方案中,所述接头通过共价键形成部分的方式附接一个或多个(例如,1、2、3、4个或更多个)siRNA分子。

[0198] 在一些实施方案中,所述共价键形成部分选自烷基、酯、酰胺、氨基甲酸酯、膦酸酯、磷酸酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、三唑、脲和甲缩醛。

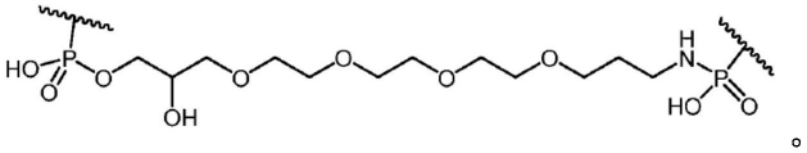
[0199] 在一些实施方案中,所述接头包括式L1的结构:

[0200] 

。

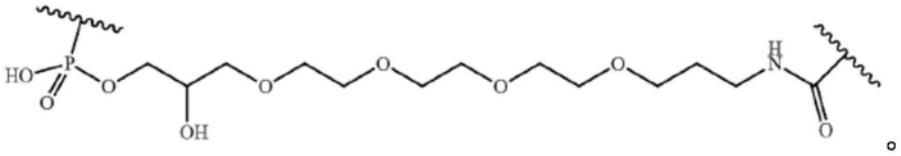
(式 L1)

[0201] 在一些实施方案中,所述接头包括式L2的结构:

[0202] 

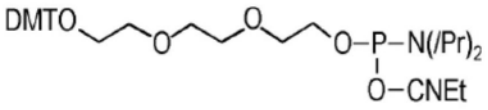
(式 L2)

[0203] 在一些实施方案中,所述接头包括式L3的结构:

[0204] 

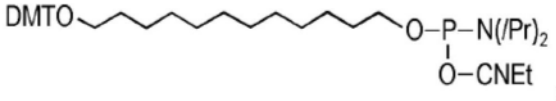
(式 L3)

[0205] 在一些实施方案中,所述接头包括式L4的结构:

[0206] 

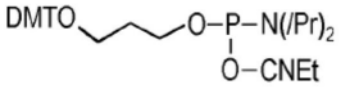
(式 L4)

[0207] 在一些实施方案中,所述接头包括式L5的结构:

[0208] 

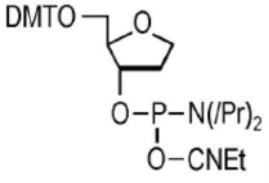
(式 L5)

[0209] 在一些实施方案中,所述接头包括式L6的结构:

[0210] 

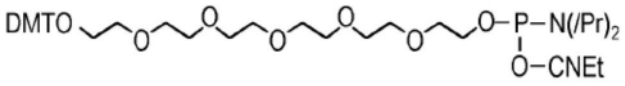
(式 L6)

[0211] 在一些实施方案中,所述接头包括式L7的结构:

[0212] 

(式 L7)

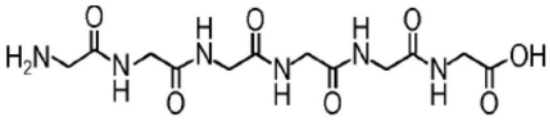
[0213] 在一些实施方案中,所述接头包括式L8的结构:



[0214]

(式 L8)

[0215] 在一些实施方案中,所述接头包括式L9的结构:



[0216]

(式 L9)

[0217] 在本文所述的任何siRNA分子的一些实施方案中,反义链中50%或更多的核糖核苷酸是2′-O-Me核糖核苷酸(例如,反义链中50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核糖核苷酸可以是2'-O-Me核糖核苷酸)。

[0218] 在一些实施方案中,反义链中60%或更多的核糖核苷酸是2′-O-Me核糖核苷酸(例如,反义链中60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核糖核苷酸可以是2'-O-Me核糖核苷酸)。

[0219] 在一些实施方案中,反义链中70%或更多的核糖核苷酸是2′-O-Me核糖核苷酸(例如,反义链中70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核糖核苷酸可以是2'-O-Me核糖核苷酸)。

[0220] 在一些实施方案中,反义链中80%或更多的核糖核苷酸是2′-O-Me核糖核苷酸(例如,反义链中80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核糖核苷酸可以是2'-O-Me核糖核苷酸)。

[0221] 在一些实施方案中,反义链中90%或更多的核糖核苷酸是2′-O-Me核糖核苷酸(例如,反义链中90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核糖核苷酸可以是2'-O-Me核糖核苷酸)。

[0222] 在一些实施方案中,10%或更少的核苷间键联是磷酸二酯键联或硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的核苷间键联是磷酸二酯键联或硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,100%的核苷间键联是磷酸二酯键联或硫代磷酸酯键联。

[0223] 在一些实施方案中,9个核苷间键联是磷酸二酯键联或硫代磷酸酯键联。

[0224] 在一些实施方案中,反义链的长度为10至30个核苷酸(例如,10个核苷酸、11个核

苷酸、12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸或30个核苷酸)、15至25个核苷酸(例如,15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸或25个核苷酸)或18至23个核苷酸(例如,18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸或23个核苷酸)。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸。

[0225] 在一些实施方案中,支链化合物的siRNA分子通过接头(例如,乙二醇低聚物,例如四乙二醇)彼此连接。在一些实施方案中,支链化合物的siRNA分子通过介于一个siRNA分子的有义链与另一个siRNA分子的有义链之间的接头彼此连接。在一些实施方案中,siRNA分子通过介于一个siRNA分子的反义链与另一个siRNA分子的反义链之间的接头连接。在一些实施方案中,支链化合物的siRNA分子通过介于一个siRNA分子的有义链与另一个siRNA分子的反义链之间的接头彼此连接。

[0226] 在一些实施方案中,有义链的长度为12至30个核苷酸(例如,12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸或30个核苷酸)或14至18个核苷酸(例如,14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸或18个核苷酸)。在一些实施方案中,有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为27个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为28个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为29个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为30个核苷酸。

[0227] 在一些实施方案中,4个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0228] 在本文所述的siRNA分子的一些实施方案中,反义链的长度为18个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为18个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为18个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为18个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为18个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实

施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸并且有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸并且有义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸并且有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸并且有义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸并且有义链的长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷

酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸并且有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸并且有义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸并且有义链的长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸并且有义链的长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸并且有义链的长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸并且有义链的长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为23个核苷酸。

在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸并且有义链的长度为27个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为27个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸并且有义链的长度为28个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为27个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为28个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸并且有义链的长度为29个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为

30个核苷酸并且有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为27个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为28个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为29个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸并且有义链的长度为30个核苷酸。

[0229] 在另一方面,本公开提供了一种药物组合物,其包含本公开的前述方面或实施方案中任一个的siRNA分子和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0230] 在另一方面,本公开提供了一种将siRNA分子递送至被诊断为患有神经炎性疾病的受试者的方法,所述方法通过向受试者施用治疗有效量的本公开前述方面或实施方案中任一个的siRNA分子或药物组合物来实现。

[0231] 在另一方面,本公开提供了一种治疗有需要的受试者的神经炎性疾病的方法,所述方法通过向受试者施用治疗有效量的本公开前述方面或实施方案中任一个的siRNA分子或药物组合物来实现。

[0232] 在本文所述方法的一些实施方案中,神经炎性疾病是阿尔茨海默病。

[0233] 在另一方面,本公开提供了一种降低有需要的受试者中的MS4A6A表达的方法,所述方法通过施用治疗有效量的本公开前述方面或实施方案中任一个的siRNA或药物组合物来实现。

[0234] 在本文所述方法的一些实施方案中,所述siRNA分子或所述药物组合物通过脑室内、纹状体内、实质内或鞘内注射的方式施用给所述受试者。在一些实施方案中,所述siRNA分子或所述药物组合物通过静脉内、肌肉内,或皮下注射的方式施用给所述受试者。

[0235] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,受试者是人。

[0236] 在另一方面,本公开内容提供了一种试剂盒,所述试剂盒含有本公开前述方面或实施方案中任一个的siRNA分子或药物组合物,以及指示所述试剂盒的使用者进行本公开前述方面或实施方案中任一个的方法的包装说明书。

[0237] 定义

[0238] 除非本文另外定义,本文使用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。如果存在任何潜在的歧义,本文提供的定义优先于任何字典或外部定义。除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。术语“包括(including)”以及其他形式如“包括(includes)”和“包括(included)”的使用不是限制性的。

[0239] 如本文所用,术语“核酸”是指分别由核糖核苷酸链或脱氧核糖核苷酸链组成的RNA分子或DNA分子。

[0240] 如本文所用,术语“治疗性核酸”是指与疾病相关靶mRNA具有部分或完全互补性并相互作用并介导mRNA表达沉默的核酸分子(例如,核糖核酸)。

[0241] 如本文所用,术语“载体核酸”是指与治疗性核酸具有序列互补性并与治疗性核酸

杂交的核酸分子(例如,核糖核酸)。如本文所用,术语“3’末端”是指在核糖环的3’碳处含有未修饰的羟基的核酸末端。

[0242] 如本文所用,术语“核苷”是指由杂环碱基及其糖组成的分子。

[0243] 如本文所用,术语“核苷酸”是指在其3’或5’糖羟基基团上具有磷酸基团或其变体的核苷。磷酸基团变体的实例包括但不限于饱和烷基膦酸酯、不饱和烯基膦酸酯、硫代磷酸酯和亚磷酰胺。

[0244] 在本公开的上下文中,术语“寡核苷酸”是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)或其模拟物的寡聚物或多聚物。该术语包括由天然存在的核碱基、糖和共价核苷间(骨架)键联组成的寡核苷酸以及具有类似功能的非天然存在(例如,修饰)部分的寡核苷酸。此类经修饰或经取代的寡核苷酸常常优于天然形式,因为其具有所需的性质,例如增强的细胞摄取、增强的对核酸靶标的亲和力以及在核酸酶存在下增加的稳定性。

[0245] 如本文所用,术语“siRNA”是指诱导RNA干扰(RNAi)途径的小干扰RNA双链体。siRNA分子的长度可能不同(通常介于10至30个碱基对之间),并且与其靶mRNA可具有不同程度的互补性。术语“siRNA”包括两条单独的链的双链体,以及任选地形成包括双链体区的发夹结构的单链。

[0246] 如本文所用,术语“反义链”是指与靶基因具有一定程度的互补性的siRNA双链体的链。

[0247] 如本文所用,术语“有义链”是指与反义链具有互补性的siRNA双链体的链。

[0248] 术语“干扰RNA分子”是指阻抑靶RNA转录物的内源功能的RNA分子,诸如小干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)或反义寡核苷酸(ASO)。

[0249] 如本文所用,术语“表达”是指以下事件中的一个或多个:(1)从DNA序列产生RNA模板(例如,通过转录);(2)RNA转录物的加工(例如,通过剪接、编辑、5’帽形成和/或3’末端加工);和(3)将RNA翻译成多肽或蛋白质。在编码蛋白质产物的基因的上下文中,术语“基因表达”等与术语“蛋白质表达”等可互换使用。患者中感兴趣的基因或蛋白质的表达可以例如通过检测从患者获得的样品中的以下各项来显现:编码相应蛋白质的mRNA的数量或浓度的增加(例如使用本文所述的或本领域已知的RNA检测程序进行评估,诸如定量聚合酶链式反应(qPCR)和RNAseq技术),相应蛋白质的数量或浓度的增加(例如使用本文所述的或本领域已知的蛋白质检测方法,诸如酶联免疫吸附测定法(ELISA)等进行评估),和/或相应蛋白质活性的增加(例如,在酶的情况下,如使用本文所述的或本领域已知的酶活性测定法进行评估)。如本文所用,如果可以在细胞或细胞所在的培养基中检测到一种或多种或全部上述事件,则认为细胞“表达”感兴趣的基因或蛋白质。例如,如果可以检测到以下事件,则认为所关注的基因或蛋白质由细胞或细胞群“表达”:(i)细胞或细胞群产生相应的RNA转录物,诸如mRNA模板(例如,使用本文所述的RNA检测程序);(ii)RNA转录物的加工(例如,剪接、编辑、5’帽形成和/或3’末端加工,诸如使用本文所述的RNA检测程序);(iii)将RNA模板翻译成蛋白质产物(例如,使用本文所述的蛋白质检测程序);和/或(iv)蛋白质产物的翻译后修饰(例如,使用本文所述的蛋白质检测程序)。

[0250] 如本文所用,术语“靶标”、“靶向”和“靶向的”在siRNA设计的上下文中是指生成反义链以便使反义链以导致mRNA翻译成蛋白质产物减少的方式与mRNA转录物内感兴趣的区域退火。

[0251] 如本文所用,术语“化学修饰的核苷酸”、“核苷酸类似物”、“改变的核苷酸”或“修饰的核苷酸”是指非标准核苷酸,包括非天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。示例性的核苷酸类似物在任何位置被修饰,以改变核苷酸的某些化学性质,但保留核苷酸类似物进行其预期功能的能力。

[0252] 如本文所用,术语“代谢稳定的”是指含有已被化学修饰的核糖核苷酸,以便降低施用给受试者的RNA分子的代谢速率的RNA分子。示例性修饰包括2’-羟基修饰为2’-O-甲氧基或2’-氟,以及磷酸二酯修饰为硫代磷酸酯。

[0253] 如本文所用,术语“硫代磷酸酯”是指通过用硫取代磷酸基团的一个或多个氧而修饰的核苷酸的磷酸基团。

[0254] 如本文所用,术语“核苷间”和“核苷酸间”分别指核苷和核苷酸之间的键。

[0255] 如本文所用,术语“antagomir”是指可以充当miRNA活性的抑制剂的核酸。

[0256] 如本文所用,术语“缺口聚体(gapmer)”是指含有足够长以诱导RNA酶H裂解的脱氧核苷酸单体的中心嵌段的嵌合反义核酸。脱氧核苷酸嵌段的侧翼是核糖核苷酸单体或含有修饰的核糖核苷酸单体。

[0257] 如本文所用,术语“混合体(mixmer)”是指含有锁核酸(LNA)和DNA的混合物的核酸。

[0258] 如本文所用,术语“向导RNA”是指与基因组中的特定序列具有序列互补性的核酸,该特定序列紧邻原间隔相邻基序(PAM)序列的上游或1个碱基对,如在CRISPR/Cas9基因编辑系统中使用的。可替代地,“向导RNA”可以指与特定信使RNA(mRNA)序列具有序列互补性(例如,反义)的核酸。关于这一点,向导RNA还可以与长度相同或较短的“乘客RNA”序列具有序列互补性,“乘客RNA”序列与向导RNA杂交的mRNA的序列相同或基本上相同。

[0259] 如本文所用,术语“分支siRNA”是指含有两个或更多个彼此共价结合的双链siRNA分子的化合物。分支siRNA分子可以是“二分支的”,在本文中也称为“二-siRNA”,其中siRNA分子包括例如通过接头彼此共价结合的2个siRNA分子。分支siRNA分子可以是“三分支的”,在本文中也称为“三-siRNA”,其中siRNA分子包括例如通过接头彼此共价结合的3个siRNA分子。分支siRNA分子可以是“四分支的”,在本文中也称为“四-siRNA”,其中siRNA分子包括例如通过接头彼此共价结合的4个siRNA分子。

[0260] 如本文所用,术语“分支点部分”是指本公开的分支siRNA结构的化学部分,其可以共价连接至siRNA分子的反义链或有义链的5’末端或3’末端,并且可以支持额外的单链或双链siRNA分子的附接。适合连同所公开的方法和组合物一起使用的分支点部分的非限制性实例包括例如亚磷酰胺、甲苯磺酰化丙酮缩甘油、1,3-二氨基丙醇、季戊四醇和US10,478,503中描述的任何一种分支点部分。

[0261] 如本文所用,术语“磷酸部分”是指包括磷酸以及经修饰的磷酸的末端磷酸基团。磷酸部分可位于任一末端,但优选位于5′-末端核苷处。在一个方面,末端磷酸是未修饰的,具有式—O—P(=O)(OH)OH。在另一方面,末端磷酸是经修饰的,使得O和OH基团中的一个或多个被H、O、S、N(R’)或烷基置换,其中R’是H、氨基保护基团,或未取代或经取代的烷基。在一些实施方案中,5’和或3’末端基团可包括1至3个磷酸部分,这些磷酸部分各自独立地是未修饰的(二磷酸或三磷酸)或经修饰的。

[0262] 如本文所用,术语“5’磷稳定部分”是指包括磷酸酯以及经修饰的磷酸酯(例如,硫

代磷酸酯、磷酸二酯、膦酸酯)的末端磷酸基团。磷酸部分可位于任一末端,但优选位于5′-末端核苷处。在一个方面,末端磷酸是未修饰的,具有式-O-P(=O)(OH)OH。在另一方面,末端磷酸是经修饰的,使得O和OH基团中的一个或多个被H、O、S、N(R')或烷基置换,其中R'是H、氨基保护基团,或未取代或经取代的烷基。在一些实施方案中,5'和或3'末端基团可包括1至3个磷酸部分,这些磷酸部分各自独立地是未修饰的(二磷酸或三磷酸)或经修饰的。

[0263] 还可以修饰核苷酸的磷酸基团,例如通过用硫取代磷酸基团的一个或多个氧(例如,硫代磷酸酯),或通过进行允许核苷酸进行其预期功能的其他取代,诸如在例如Eckstein,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.10:117-21,2000;Rusckowski等人,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.10:333-45,2000;Stein,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.11:317-25,2001;Vorobjev等人,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.11:77-85,2001;和US 5,684,143中所述。某些上述修饰(例如,磷酸基团修饰)优选降低例如包括所述类似物的多核苷酸在体内或体外的水解速率。

[0264] 如本文所用,术语"互补"是指形成规范沃森-克里克碱基对的两个核苷酸。为免生疑问,本公开的上下文中的沃森-克里克碱基对包括腺嘌呤-胸腺嘧啶、腺嘌呤-尿嘧啶和胞嘧啶-鸟嘌呤碱基对。在本文中,正确的沃森-克里克碱基对被称为"匹配",而每个未配对的核苷酸和每个错误配对的核苷酸都被称为"错配"。用于确定核酸序列同一性百分比的比对可以以在本领域技术人员能力范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2或Megalign软件。

[0265] 相对于参考多核苷酸序列的"百分比(%)序列互补性"定义为在比对序列并引入缺口之后,候选序列中与参考多核苷酸序列中的核酸互补的核酸的百分比,如果需要的话,以实现最大百分比的序列互补性。如果两个核苷酸形成规范的沃森-克里克碱基对,则认为给定的核苷酸与本文所述的参考核苷酸"互补"。为免生疑问,本公开的上下文中的沃森-克里克碱基对包括腺嘌呤-胸腺嘧啶、腺嘌呤-尿嘧啶和胞嘧啶-鸟嘌呤碱基对。在本文中,正确的沃森-克里克碱基对被称为"匹配",而每个未配对的核苷酸和每个错误配对的核苷酸都被称为"错配"。用于确定核酸序列同一性百分比的比对可以以在本领域技术人员能力范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2或Megalign软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括实现在所比较序列的全长上实现最大互补性所需的任何算法。例如,给定核酸序列A与给定核酸序列B的序列互补性百分比(也可以表述为给定核酸序列A与给定核酸序列B具有一定的互补性百分比)计算公式如下:

[0266] 100×(分数X/Y)

[0267] 其中X是在A和B的程序比对中,比对(例如,由计算机软件,诸如BLAST执行)中互补碱基对的数量,其中Y是B中的核酸总数。应当理解,当核酸序列A的长度不等于核酸序列B的长度时,A与B的序列互补性百分比将不等于B与A的序列互补性百分比。如本文所用,如果查询核酸序列与参考核酸序列具有100%的序列互补性,则认为查询核酸序列与参考核酸序列"完全互补"。

[0268] 相对于参考多核苷酸或多肽序列的"序列一致性百分比(%)"定义为在比对序列且引入空位(如果需要)以实现最大序列一致性百分比后,候选序列中与参考多核苷酸或多肽序列中的核酸或氨基酸一致的核酸或氨基酸的百分比。用于确定核酸或氨基酸序列同一

性百分比的比对可以以在本领域技术人员能力范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2或Megalign软件。本领域技术人员可确定适用于比对序列的参数,包括实现所比较序列的全长内的最大比对所需的任何算法。例如,可使用序列比较计算机程序BLAST生成序列同一性百分比值。例如,给定核酸或氨基酸序列A对、与或针对给定核酸或氨基酸序列B的序列同一性百分比(也可以可替代地表述为给定核酸或氨基酸序列A对、与或针对给定核酸或氨基酸序列B所具有的一定的序列同一性百分比)计算如下:

[0269] 100×(分数X/Y)

[0270] 其中X是通过序列比对程序(例如,BLAST)在所述程序的A和B的比对中评分为相同匹配的核苷酸或氨基酸的数目,并且其中Y是B中核酸的总数。应当理解,在核酸或氨基酸序列A的长度不等于核酸或氨基酸序列B的长度的情况下,A对于B的序列同一性百分比将不等于B对于A的序列同一性百分比。

[0271] 如本文所用,术语“足以杂交的互补性”是指不需要与靶区域完全互补(例如,100%互补)的核酸序列或其部分,或者是指相对于靶区域具有一个或多个核苷酸错配,但在指定条件下仍能够与靶区域杂交的核酸序列或其部分。例如,核酸可以是例如95%互补、90%互补、85%互补、80%互补、75%互补、70%互补、65%互补、60%互补、55%互补、50%互补互补或更少,但仍与靶标形成足够的碱基对,以便在其长度上杂交。

[0272] 当多核苷酸内的一个或多个核苷残基与一个或多个互补核苷碱基配对形成稳定的双链体时,实现核酸的“杂交”或“退火”。碱基配对通常由氢键合事件驱动。杂交包括由自然和/或修饰核碱基形成的沃森-克里克碱基对。杂交还可以包括非沃森-克里克碱基对,诸如不稳定碱基对(鸟苷-尿嘧啶、次黄嘌呤-尿嘧啶、次黄嘌呤-腺嘌呤和次黄嘌呤-胞嘧啶),以及Hoogsteen碱基对。核酸不需要100%互补才能进行杂交。例如,一个核酸可以相对于另一个核酸例如95%互补、90%互补、85%互补、80%互补、75%互补、70%互补、65%互补、60%互补、55%互补、50%互补互补或更少,但两个核酸仍可彼此形成足够的碱基对以便杂交。

[0273] 一个核酸与另一个核酸退火/杂交后形成的“稳定双链体”是不会因严格洗涤而变性的双链体结构。示例性严格洗涤条件是本领域已知的并且包括比双链体的单个链的解链温度低约5℃的温度和低单价盐浓度,诸如小于0.2M(例如,0.2M、0.19M、0.18M、0.17M、0.16M、0.15M、0.14M、0.13M、0.12M、0.11M、0.1M、0.09M、0.08M、0.07M、0.06M、0.05M、0.04M、0.03M、0.02M、0.01M或更少)的单价盐浓度(例如,NaCl浓度)。

[0274] 术语“基因沉默”是指基因表达例如MS4A6A内源基因表达的阻抑,其可以通过影响转录的过程和/或通过影响转录后机制的过程介导。在一些实施方案中,基因沉默发生在RNAi分子通过RNA干扰以序列特异性方式启动对从目标基因转录的mRNA的抑制或降解时,从而阻止基因产物的翻译。

[0275] 如本文所用,短语“过度活跃的疾病驱动基因”是指具有增加的活性和/或表达,在受试者(例如,人)中促成或引起疾病状态的基因。疾病状态可以由过度活跃的疾病驱动基因直接或通过一种或多种中间基因引起或加剧。

[0276] 如本文所用,术语“乙二醇链”是指具有式$((CH_2OH)_2)$的碳链。

[0277] 如本文所用,“烷基”是指饱和烃基。烷基基团可以是无环的或环状的并且当未取

代时仅含有C和H。当命名具有特定碳数的烷基残基时,旨在涵盖和描述具有该碳数的所有几何异构体;因此,例如,“丁基”意在包括正丁基、仲丁基和异丁基。烷基的实例包括乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基等。在一些实施方案中,烷基可以被取代。可以引入烷基基团的合适的取代基包括例如羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基和卤代等。

[0278] 如本文所用,“烯基”是指具有至少一个烯属不饱和位点(即,具有至少一个式C=C的部分)的无环或环状不饱和烃基。当未取代时,烯基基团仅含有C和H。当命名具有特定碳数的烯基残基时,旨在涵盖和描述具有该碳数的所有几何异构体;因此,例如,“丁烯基”意在包括正丁烯基、仲丁烯基和异丁烯基。烯基的实例包括-CH=CH_2、-CH_2-CH=CH_2和-CH_2-CH=CH-CH=CH_2。在一些实施方案中,烯基可以被取代。可以引入烯基基团的合适的取代基包括例如羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基和卤代等。

[0279] 如本文所用,“炔基”是指具有至少一个炔属不饱和位点(即,具有至少一个式C≡C的部分)的无环或环状不饱和烃基。当未取代时,炔基基团仅含有C和H。当命名具有特定碳数的炔基残基时,旨在涵盖和描述具有该碳数的所有几何异构体;因此,例如,“戊炔基”意在包括正戊炔基、仲戊炔基、异戊炔基和叔戊炔基。炔基的实例包括-C≡CH和-C≡C-CH_3。在一些实施方案中,炔基可以被取代。可以引入炔基基团的合适的取代基包括例如羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基和卤代等。

[0280] 如本文所用,术语“苯基”表示其中环的碳原子上的一个氢原子已被去除的单环芳烃。苯基基团可以是未取代的或被一个或多个合适的取代基取代,其中取代基置换苯基的H。

[0281] 如本文所用,术语“苄基”是指当附接到甲苯的甲基基团上的氢原子被去除时获得的一价基团。苄基基团通常具有苯基-CH_2-的式。苄基基团可以是未取代的或被一个或多个合适的取代基取代。例如,取代基可以置换苯基组分的H和/或亚甲基(-CH_2-)组分的H。

[0282] 如本文所用,术语“酰胺”是指附接至氨基-羰基官能团的烷基、烯基、炔基或芳族基团。

[0283] 如本文所用,术语“三唑”是指具有式($C_2H_3N_3$)的杂环化合物,杂环化合物具有两个碳和三个氮的五元环,其位置可以改变,从而产生多种异构体。

[0284] 如本文所用,术语“末端基团”是指碳链或核酸末端的基团。

[0285] 如本文所用,“氨基酸”是指含有胺和羧基官能团以及氨基酸特有的侧链的分子。

[0286] 在一些实施方案中,氨基酸选自蛋白氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸是L-氨基酸或D-氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸是合成氨基酸(例如,β-氨基酸)。

[0287] 如本文所用,术语“亲脂性氨基酸”是指包括疏水部分(例如,烷基链或芳香环)的氨基酸。

[0288] 如本文所用,术语“递送靶标”是指需要向其递送分支寡核苷酸组合物的身体器官或部分。

[0289] 如本文所用,术语“介于X和Y之间”包括X和Y值。例如,“介于X和Y之间”是指X值和Y值之间的值的范围,以及X值和Y值。

[0290] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”可互换使用,并且是指经历神经炎性疾病或病症(例如阿尔茨海默病)和/或含有获得功能MS4A6A变异等位基因或与疾病病理相关的

MS4A6A基因多态性的生物体,诸如哺乳动物(例如人类)。

[0291] 如本文所用,术语“MS4A6A”是指编码跨膜4结构域A6A的基因,包括来自任何来源的任何天然MS4A6A基因。该术语涵盖“全长”未处理MS4A6A以及由细胞内加工产生的任何形式的MS4A6A。该术语还涵盖MS4A6A的天然存在的变体,例如剪接变体或等位基因变体。示例性MS4A6A基因的核酸序列示于欧洲核苷酸档案库(ENA)登录号AF237908.1。MS4A6A基因编码的示例性蛋白质的氨基酸序列示于UNIPROT™登录号Q9H2W1。

[0292] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”和“治疗(treating)”意指治疗性治疗和预防性(prophylactic或preventative)措施,其中目的是预防、改善或减缓(减轻)不期望的生理病状、病症或疾病,或获得有益或期望的临床结果。有益的或期望的临床结果包括但不限于患者对药物治疗的依赖性降低;症状的减轻;病状、病症或疾病的程度的减少;病状、病症或疾病的状态的稳定(即,不恶化);病状、病症或疾病进展的发作或减缓的延迟;病状、病症或疾病状态的改善或缓解(无论是部分或全部),无论是可检测到的还是不可检测到的;至少一个可测量的物理、认知或行为(如抑郁行为或冷漠)参数的改善,该改善不一定是患者可觉察得出的;或病状、病症或疾病的增强或改善。治疗包括引发临床显著反应而无过度水平的副作用。治疗还包括与不接受治疗情况下的预期存活相比延长存活。

[0293] 如本文所用,术语“益处”和“反应”在接受用于治疗例如神经炎性疾病(诸如阿尔茨海默病)的疗法的受试者的背景下可互换使用。例如,在施用了本公开的siRNA分子或siRNA组合物的患有阿尔茨海默病的受试者的背景下的临床益处包括但不限于认知障碍或记忆丧失的减少。“益处”和“反应”也可互换地用来指例如野生型MS4A6A转录物、突变型MS4A6A转录物、变异MS4A6A转录物、MS4A6A转录物的剪接同种型,和/或过度表达的MS4A6A转录物的减少。

具体实施方式

[0294] 本公开提供了与跨膜4结构域A6A(MS4A6A)基因具有序列同源性的小干扰RNA(siRNA)分子的组合物,以及将所述siRNA分子施用至受试者的方法。此外,本文所述的siRNA分子可以组成为分支siRNA结构,诸如二分支、三分支和四分支siRNA结构,并且还可以包括特定模式的化学修饰(例如,2’核糖修饰或核苷间键联修饰)以改善针对核酸酶的抗性、毒性概况和物理化学特性(例如,热稳定性)。小干扰RNA分子是短的双链RNA分子。它们能够通过降解具有互补核苷酸序列的mRNA来介导RNA干扰(RNAi),从而阻止靶基因的翻译。

[0295] 相对于其他人基因,本公开的siRNA分子可以表现出例如对MS4A6A的稳健的基因特异性阻抑。

[0296] 本公开的siRNA分子可特征在于具有与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的MS4A6A mRNA转录物的区域互补的核酸序列的反义链。反义链与MS4A6A mRNA转录物的区域的互补程度可能足以使反义链在MS4A6A mRNA转录物的区域的全长上退火。例如,反义链可具有与MS4A6A mRNA转录物的区域至少60%互补(例如,60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%,74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%互补)的核酸序列。

[0297] 在一些实施方案中,本公开的siRNA分子的特征在于具有SEQ ID NO:385-576中任

一个的核酸序列或与之至少60％同一的核酸序列的反义链。例如,本公开的siRNA分子可特征在于具有与SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列至少60％同一(例如,60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％,74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一)的核酸序列的反义链。

[0298] 在一些实施方案中,本公开的siRNA分子特征在于有义链,所述有义链具有SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列,或与之至少60％同一的核酸序列。例如,本公开的siRNA分子可特征在于具有与SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列至少60％同一(例如,60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％,74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一)的核酸序列的有义链。

[0299] 本公开的示例性siRNA分子是下表1中所示的那些。表1汇总了反义链、有义链以及每条反义链所靶向的MS4A6A mRNA转录物的相应区域。

[0300] 表1.基因特异性的靶向MS4A6A的siRNA的核苷酸序列

[0301]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
1	GAUGACUU UCAGAAGA UGAAG	193	CUUUCAGA AGAUGAAA	385	UUUCAUCU UCUGAAAG UCAUC
2	AUGACUUU CAGAAGAU GAAGG	194	UUUCAGAA GAUGAAGA	386	UCUUCAUC UUCUGAAA GUCAU
3	UGACUUUC AGAAGAUG AAGGU	195	UUCAGAAG AUGAAGGA	387	UCCUUCAU CUUCUGAA AGUCA
4	UUCAGAAG AUGAAGGU AAGUA	196	AAGAUGAA GGUAAGUA	388	UACUUACC UUCAUCUU CUGAA
5	UCAGAAGA UGAAGGUA AGUAG	197	AGAUGAAG GUAAGUAA	389	UUACUUAC CUUCAUCU UCUGA
6	CAGAAGAU GAAGGUAA GUAGA	198	GAUGAAGG UAAGUAGA	390	UCUACUUA CCUUCAUC UUCUG
7	AGAAGAUG AAGGUAAG UAGAA	199	AUGAAGGU AAGUAGAA	391	UUCUACUU ACCUUCAU CUUCU
8	GAAGAUGA AGGUAAGU AGAAA	200	UGAAGGUA AGUAGAAA	392	UUUCUACU UACCUUCA UCUUC
9	GAUGAAGG UAAGUAGA AACCG	201	AGGUAAGU AGAAACCA	393	UGGUUUCU ACUUACCU UCAUC
10	ACCGUUGA UGGGACUG AGAAA	202	UGAUGGGA CUGAGAAA	394	UUUCUCAG UCCCAUCA ACGGU
11	GAAACCAG AGUUAAAA CCUCU	203	CAGAGUUA AAACCUCA	395	UGAGGUUU UAACUCUG GUUUC
12	AACCAGAG UUAAAACC UCUUU	204	GAGUUAAA ACCUCUUA	396	UAAGAGGU UUUAACUC UGGUU
13	UUUGGAGC UUCUGAGG ACUCA	205	AGCUUCUG AGGACUCA	397	UGAGUCCU CAGAAGCU CCAAA

[0302]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
14	UUGGAGCU UCUGAGGA CUCAG	206	GCUUCUGA GGACUCAA	398	UUGAGUCC UCAGAAGC UCCAA
15	CGGGCACAG UUGGCAAC ACCA	207	ACAGUUGG CAACACCA	399	UGGUGUUG CCAACUGU GCCCG
16	GGCACAGU UGGCAACAC CAUC	208	AGUUGGCA ACACCAUA	400	UAUGGUGU UGCCAACU GUGCC
17	GCACAGUU GGCAACACC AUCA	209	GUUGGCAA CACCAUCA	401	UGAUGGUG UUGCCAAC UGUGC
18	CACAGUUG GCAACACCA UCAU	210	UUGGCAAC ACCAUCAA	402	UUGAUGGU GUUGCCAA CUGUG
19	AGUUGGCA ACACCAUCA UGAC	211	GCAACACC AUCAUGAA	403	UUCAUGAU GGUGUUGC CAACU
20	GUUGGCAA CACCAUCAU GACA	212	CAACACCA UCAUGACA	404	UGUCAUGA UGGUGUUG CCAAC
21	CAACACCAU CAUGACAUC ACA	213	CCAUCAUG ACAUCACA	405	UGUGAUGU CAUGAUGG UGUUG
22	AACACCAUC AUGACAUC ACAA	214	CAUCAUGA CAUCACAA	406	UUGUGAUG UCAUGAUG GUGUU
23	ACACCAUCA UGACAUCAC AAC	215	AUCAUGAC AUCACAAA	407	UUUGUGAU GUCAUGAU GGUGU
24	UCAUGACA UCACAACCU GUUC	216	ACAUCACA ACCUGUUA	408	UAACAGGU UGUGAUGU CAUGA
25	CAUGACAUC ACAACCUGU UCC	217	CAUCACAA CCUGUUCA	409	UGAACAGG UUGUGAUG UCAUG
26	AUGACAUC ACAACCUGU UCCC	218	AUCACAAC CUGUUCCA	410	UGGAACAG GUUGUGAU GUCAU
27	UGACAUCAC AACCUGUUC CCA	219	UCACAACC UGUUCCCA	411	UGGGAACA GGUUGUGA UGUCA
28	ACAUCACAA CCUGUUCCC AAU	220	ACAACCUG UUCCCAAA	412	UUUGGGAA CAGGUUGU GAUGU

[0303]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
29	CAUCACAAC CUGUUCCCA AUG	221	CAACCUGU UCCCAAUA	413	UAUUGGGA ACAGGUUG UGAUG
30	UCACAACCU GUUCCCAAU GAG	222	ACCUGUUC CCAAUGAA	414	UUCAUUGG GAACAGGU UGUGA
31	CACAACCUG UUCCCAAUG AGA	223	CCUGUUCC CAAUGAGA	415	UCUCAUUG GGAACAGG UUGUG
32	CAACCUGUU CCCAAUGAG ACC	224	UGUUCCCA AUGAGACA	416	UGUCUCAU UGGGAACA GGUUG
33	CAUCAUAG UGCUCCCAU CAAA	225	UAGUGCUC CCAUCAAA	417	UUUGAUGG GAGCACUA UGAUG
34	AUCAUAGU GCUCCCAUC AAAU	226	AGUGCUCC CAUCAAAA	418	UUUUGAUG GGAGCACU AUGAU
35	UCAUAGUG CUCCCAUCA AAUG	227	GUGCUCCC AUCAAAUA	419	UAUUUGAU GGGAGCAC UAUGA
36	CAUAGUGC UCCCAUCAA AUGU	228	UGCUCCCA UCAAAUGA	420	UCAUUUGA UGGGAGCA CUAUG
37	AAUCAAAG UUAUUGGG ACUAU	229	AAGUUAUU GGGACUAA	421	UUAGUCCC AAUAACUU UGAUU
38	AUCAAAGU UAUUGGGA CUAUC	230	AGUUAUUG GGACUAUA	422	UAUAGUCC CAAUAACU UUGAU
39	UCAAAGUU AUUGGGAC UAUCC	231	GUUAUUGG GACUAUCA	423	UGAUAGUC CCAAUAAC UUUGA
40	CAAAGUUA UUGGGACU AUCCA	232	UUAUUGGG ACUAUCCA	424	UGGAUAGU CCCAAUAA CUUUG
41	AAAGUUAU UGGGACUA UCCAG	233	UAUUGGGA CUAUCCAA	425	UUGGAUAG UCCCAAUA ACUUU
42	AAGUUAUU GGGACUAU CCAGA	234	AUUGGGAC UAUCCAGA	426	UCUGGAUA GUCCCAAU AACUU
43	AGUUAUUG GGACUAUCC AGAU	235	UUGGGACU AUCCAGAA	427	UUCUGGAU AGUCCCAA UAACU

[0304]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
44	GUUAUUGG GACUAUCCA GAUC	236	UGGGACUA UCCAGAUA	428	UAUCUGGA UAGUCCCA AUAAC
45	UUAUUGGG ACUAUCCAG AUCU	237	GGGACUAU CCAGAUCA	429	UGAUCUGG AUAGUCCC AAUAA
46	UAUUGGGA CUAUCCAGA UCUU	238	GGACUAUC CAGAUCUA	430	UAGAUCUG GAUAGUCC CAAUA
47	AUUGGGAC UAUCCAGA UCUUG	239	GACUAUCC AGAUCUUA	431	UAAGAUCU GGAUAGUC CCAAU
48	UUGGGACU AUCCAGAUC UUGU	240	ACUAUCCA GAUCUUGA	432	UCAAGAUC UGGAUAGU CCCAA
49	UGGGACUA UCCAGAUCU UGUG	241	CUAUCCAG AUCUUGUA	433	UACAAGAU CUGGAUAG UCCCA
50	GGACUAUCC AGAUCUUG UGUG	242	AUCCAGAU CUUGUGUA	434	UACACAAG AUCUGGAU AGUCC
51	ACUAUCCAG AUCUUGUG UGGC	243	CCAGAUCU UGUGUGGA	435	UCCACACA AGAUCUGG AUAGU
52	AUUUUGGC AUCUGCUUC CUUC	244	GGCAUCUG CUUCCUUA	436	UAAGGAAG CAGAUGCC AAAAU
53	UUUUGGCA UCUGCUUCC UUCU	245	GCAUCUGC UUCCUUCA	437	UGAAGGAA GCAGAUGC CAAAA
54	UUGGCAUC UGCUUCCUU CUCU	246	AUCUGCUU CCUUCUCA	438	UGAGAAGG AAGCAGAU GCCAA
55	UGGCAUCU GCUUCCUUC UCUC	247	UCUGCUUC CUUCUCUA	439	UAGAGAAG GAAGCAGA UGCCA
56	GCAUCUGCU UCCUUCUCU CCA	248	UGCUUCCU UCUCUCCA	440	UGGAGAGA AGGAAGCA GAUGC
57	CAUCUGCUU CCUUCUCUC CAA	249	GCUUCCUU CUCUCCAA	441	UUGGAGAG AAGGAAGC AGAUG
58	GCUUCCUUC UCUCCAAAU UUU	250	CUUCUCUC CAAAUUUA	442	UAAAUUUG GAGAGAAG GAAGC

[0305]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
59	CUUCCUUCUCUCCAAAUUUUA	251	UUCUCUCCAAAUUUUA	443	UAAAAUUUGGAGAGAAGGAAG
60	UUCCUUCUCUCCAAAUUUUAC	252	UCUCUCCAAAUUUUAA	444	UUAAAAUUUGGAGAGAAGGAA
61	UCCUUCUCUCCAAAUUUUACC	253	CUCUCCAAAUUUUACA	445	UGUAAAAUUUGGAGAGAAGGA
62	CCUUCUCUCCAAAUUUUACCC	254	UCUCCAAAUUUUACCA	446	UGGUAAAAUUUGGAGAGAAGG
63	CUUCUCUCCAAAUUUUACCCA	255	CUCCAAAUUUUACCCA	447	UGGGUAAAAUUUGGAGAGAAG
64	UUCUCUCCAAAUUUUACCCAA	256	UCCAAAUUUUACCCAA	448	UUGGGUAAAAUUUGGAGAGAA
65	UCUCUCCAAAUUUUACCCAAG	257	CCAAAUUUUACCCAAA	449	UUUGGGUAAAAUUUGGAGAGA
66	UCUCCAAAUUUUACCCAAGUG	258	AAAUUUUACCCAAGUA	450	UACUUGGGUAAAAUUUGGAGA
67	CUCCAAAUUUUACCCAAGUGA	259	AAUUUUACCCAAGUGA	451	UCACUUGGGUAAAAUUUGGAG
68	UCCAAAUUUUACCCAAGUGAC	260	AUUUUACCCAAGUGAA	452	UUCACUUGGGUAAAAUUUGGA
69	CAAAUUUUACCCAAGUGACUU	261	UUUACCCAAGUGACUA	453	UAGUCACUUGGGUAAAAUUUG
70	AAAUUUUACCCAAGUGACUUC	262	UUACCCAAGUGACUUA	454	UAAGUCACUUGGGUAAAAUUU
71	AAUUUUACCCAAGUGACUUCU	263	UACCCAAGUGACUUCA	455	UGAAGUCACUUGGGUAAAAUU
72	AUUUUACCCAAGUGACUUCUA	264	ACCCAAGUGACUUCUA	456	UAGAAGUCACUUGGGUAAAAU
73	UUUUACCCAAGUGACUUCUAC	265	CCCAAGUGACUUCUAA	457	UUAGAAGUCACUUGGGUAAAA

[0306]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
74	UUUACCCAAGUGACUUCUACA	266	CCAAGUGACUUCUACA	458	UGUAGAAGUCACUUGGGUAAA
75	UUACCCAAGUGACUUCUACAC	267	CAAGUGACUUCUACAA	459	UUGUAGAAGUCACUUGGGUAA
76	UACCCAAGUGACUUCUACACU	268	AAGUGACUUCUACACA	460	UGUGUAGAAGUCACUUGGGUA
77	ACCCAAGUGACUUCUACACUG	269	AGUGACUUCUACACUA	461	UAGUGUAGAAGUCACUUGGGU
78	CCAAGUGACUUCUACACUGUU	270	UGACUUCUACACUGUA	462	UACAGUGUAGAAGUCACUUGG
79	CAAGUGACUUCUACACUGUUG	271	GACUUCUACACUGUUA	463	UAACAGUGUAGAAGUCACUUG
80	AAGUGACUUCUACACUGUUGA	272	ACUUCUACACUGUUGA	464	UCAACAGUGUAGAAGUCACUU
81	UGACUUCUACACUGUUGAACU	273	UCUACACUGUUGAACA	465	UGUUCAACAGUGUAGAAGUCA
82	GACUUCUACACUGUUGAACUC	274	CUACACUGUUGAACUA	466	UAGUUCAACAGUGUAGAAGUC
83	CUUCUACACUGUUGAACUCUG	275	ACACUGUUGAACUCUA	467	UAGAGUUCAACAGUGUAGAAG
84	UCUACACUGUUGAACUCUGCU	276	ACUGUUGAACUCUGCA	468	UGCAGAGUUCAACAGUGUAGA
85	CUACACUGUUGAACUCUGCUU	277	CUGUUGAACUCUGCUA	469	UAGCAGAGUUCAACAGUGUAG
86	UACACUGUUGAACUCUGCUUA	278	UGUUGAACUCUGCUUA	470	UAAGCAGAGUUCAACAGUGUA
87	CACUGUUGAACUCUGCUUACC	279	UUGAACUCUGCUUACA	471	UGUAAGCAGAGUUCAACAGUG
88	ACUGUUGAACUCUGCUUACCC	280	UGAACUCUGCUUACCA	472	UGGUAAGCAGAGUUCAACAGU

[0307]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
89	CUGUUGAA CUCUGCUUA CCCA	281	GAACUCUG CUUACCCA	473	UGGGUAAG CAGAGUUC AACAG
90	UGUUGAAC UCUGCUUAC CCAU	282	AACUCUGC UUACCCAA	474	UUGGGUAA GCAGAGUU CAACA
91	GUUGAACU CUGCUUACC CAUU	283	ACUCUGCU UACCCAUA	475	UAUGGGUA AGCAGAGU UCAAC
92	UGAACUCU GCUUACCCA UUCA	284	UCUGCUUA CCCAUUCA	476	UGAAUGGG UAAGCAGA GUUCA
93	AACUCUGCU UACCCAUUC AUA	285	UGCUUACC CAUUCAUA	477	UAUGAAUG GGUAAGCA GAGUU
94	ACUCUGCUU ACCCAUUCA UAG	286	GCUUACCC AUUCAUAA	478	UUAUGAAU GGGUAAGC AGAGU
95	CUCUGCUUA CCCAUUCAU AGG	287	CUUACCCA UUCAUAGA	479	UCUAUGAA UGGGUAAG CAGAG
96	UCUGCUUAC CCAUUCAUA GGA	288	UUACCCAU UCAUAGGA	480	UCCUAUGA AUGGGUAA GCAGA
97	UGCUUACCC AUUCAUAG GACC	289	ACCCAUUC AUAGGACA	481	UGUCCUAU GAAUGGGU AAGCA
98	GCUUACCCA UUCAUAGG ACCC	290	CCCAUUCA UAGGACCA	482	UGGUCCUA UGAAUGGG UAAGC
99	CUUACCCAU UCAUAGGA CCCU	291	CCAUUCAU AGGACCCA	483	UGGGUCCU AUGAAUGG GUAAG
100	UUACCCAUU CAUAGGACC CUU	292	CAUUCAUA GGACCCUA	484	UAGGGUCC UAUGAAUG GGUAA
101	UACCCAUUC AUAGGACCC UUU	293	AUUCAUAG GACCCUUA	485	UAAGGGUC CUAUGAAU GGGUA
102	ACCCAUUCA UAGGACCCU UUU	294	UUCAUAGG ACCCUUUA	486	UAAAGGGU CCUAUGAA UGGGU
103	CCCAUUCAU AGGACCCUU UUU	295	UCAUAGGA CCCUUUUA	487	UAAAAGGG UCCUAUGA AUGGG

[0308]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
104	CCAUUCAUAGGACCCUUUUUU	296	CAUAGGACCCUUUUUA	488	UAAAAAGGGUCCUAUGAAUGG
105	CAUAGGACCCUUUUUUUUAU	297	GACCCUUUUUUUUUAA	489	UUAAAAAAAAAGGGUCCUAUG
106	UAGGACCCUUUUUUUUAUCA	298	CCCUUUUUUUUUAUCA	490	UGAUAAAAAAAAAGGGUCCUA
107	CAUCUCUGGCUCUCUAUCAAU	299	CUGGCUCUCUAUCAAA	491	UUUGAUAGAGAGCCAGAGAUG
108	AUCUCUGGCUCUCUAUCAAUC	300	UGGCUCUCUAUCAAUA	492	UAUUGAUAGAGAGCCAGAGAU
109	GUUAACCAAGCUUUUGGUGCA	301	CCAAGCUUUUGGUGCA	493	UGCACCAAAAGCUUGGUUAAC
110	UAACCAAGCUUUUGGUGCAUA	302	AAGCUUUUGGUGCAUA	494	UAUGCACCAAAAGCUUGGUUA
111	AACCAAGCUUUUGGUGCAUAG	303	AGCUUUUGGUGCAUAA	495	UUAUGCACCAAAAGCUUGGUU
112	ACCAAGCUUUUGGUGCAUAGC	304	GCUUUUGGUGCAUAGA	496	UCUAUGCACCAAAAGCUUGGU
113	CCAAGCUUUUGGUGCAUAGCA	305	CUUUUGGUGCAUAGCA	497	UGCUAUGCACCAAAAGCUUGG
114	CAAGCUUUUGGUGCAUAGCAG	306	UUUUGGUGCAUAGCAA	498	UUGCUAUGCACCAAAAGCUUG
115	AAGCUUUUGGUGCAUAGCAGC	307	UUUGGUGCAUAGCAGA	499	UCUGCUAUGCACCAAAAGCUU
116	AGCUUUUGGUGCAUAGCAGCC	308	UUGGUGCAUAGCAGCA	500	UGCUGCUAUGCACCAAAAGCU
117	GCUUUUGGUGCAUAGCAGCCU	309	UGGUGCAUAGCAGCCA	501	UGGCUGCUAUGCACCAAAAGC
118	UUGGUGCAUAGCAGCCUGGUU	310	GCAUAGCAGCCUGGUA	502	UACCAGGCUGCUAUGCACCAA

[0309]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
119	UGGUGCAU AGCAGCCUG GUUG	311	CAUAGCAG CCUGGUUA	503	UAACCAGG CUGCUAUG CACCA
120	AGCAGCCUG GUUGGAAG CAUU	312	CCUGGUUG GAAGCAUA	504	UAUGCUUC CAACCAGG CUGCU
121	GCAGCCUGG UUGGAAGC AUUC	313	CUGGUUGG AAGCAUUA	505	UAAUGCUU CCAACCAG GCUGC
122	CAGCCUGGU UGGAAGCA UUCU	314	UGGUUGGA AGCAUUCA	506	UGAAUGCU UCCAACCA GGCUG
123	AGCCUGGU UGGAAGCA UUCUG	315	GGUUGGAA GCAUUCUA	507	UAGAAUGC UUCCAACC AGGCU
124	GCCUGGUU GGAAGCAU UCUGA	316	GUUGGAAG CAUUCUGA	508	UCAGAAUG CUUCCAAC CAGGC
125	CUGGUUGG AAGCAUUC UGAGU	317	UGGAAGCA UUCUGAGA	509	UCUCAGAA UGCUUCCA ACCAG
126	GCCCUGGUG GGUUUCAU UAUC	318	GGUGGGUU UCAUUAUA	510	UAUAAUGA AACCCACC AGGGC
127	CCCUGGUGG GUUUCAUU AUCC	319	GUGGGUUU CAUUAUCA	511	UGAUAAUG AAACCCAC CAGGG
128	CCUGGUGG GUUUCAUU AUCCU	320	UGGGUUUC AUUAUCCA	512	UGGAUAAU GAAACCCA CCAGG
129	CUGGUGGG UUUCAUUA UCCUG	321	GGGUUUCA UUAUCCUA	513	UAGGAUAA UGAAACCC ACCAG
130	UGGUGGGU UUCAUUAU CCUGU	322	GGUUUCAU UAUCCUGA	514	UCAGGAUA AUGAAACC CACCA
131	GGGUUUCA UUAUCCUG UCUGU	323	UCAUUAUC CUGUCUGA	515	UCAGACAG GAUAAUGA AACCC
132	GUUUCAUU AUCCUGUCU GUCA	324	AUUAUCCU GUCUGUCA	516	UGACAGAC AGGAUAAU GAAAC
133	CUGCAGUG UGAGUUGG ACAAA	325	GUGUGAGU UGGACAAA	517	UUUGUCCA ACUCACAC UGCAG

[0310]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
134	UGCAGUGU GAGUUGGA CAAAA	326	UGUGAGUU GGACAAAA	518	UUUUGUCC AACUCACA CUGCA
135	GCAGUGUG AGUUGGAC AAAAA	327	GUGAGUUG GACAAAAA	519	UUUUUGUC CAACUCAC ACUGC
136	CAGUGUGA GUUGGACA AAAAU	328	UGAGUUGG ACAAAAAA	520	UUUUUUGU CCAACUCA CACUG
137	AGUGUGAG UUGGACAA AAAUA	329	GAGUUGGA CAAAAAUA	521	UAUUUUUG UCCAACUC ACACU
138	GUGUGAGU UGGACAAA AAUAA	330	AGUUGGAC AAAAAUAA	522	UUAUUUUU GUCCAACU CACAC
139	UGUGAGUU GGACAAAA AUAAU	331	GUUGGACA AAAAUAAA	523	UUUAUUUU UGUCCAAC UCACA
140	GUGAGUUG GACAAAAA UAAUA	332	UUGGACAA AAAUAAUA	524	UAUUAUUU UUGUCCAA CUCAC
141	UACCACGGA CUGCUAUAC AGC	333	CGGACUGC UAUACAGA	525	UCUGUAUA GCAGUCCG UGGUA
142	UCUGAUGC UGAUUUGC ACUCU	334	UGCUGAUU UGCACUCA	526	UGAGUGCA AAUCAGCA UCAGA
143	CUGAUGCU GAUUUGCA CUCUG	335	GCUGAUUU GCACUCUA	527	UAGAGUGC AAAUCAGC AUCAG
144	CUGAUUUG CACUCUGCU GGAA	336	UUGCACUC UGCUGGAA	528	UUCCAGCA GAGUGCAA AUCAG
145	UGAUUUGC ACUCUGCUG GAAU	337	UGCACUCU GCUGGAAA	529	UUUCCAGC AGAGUGCA AAUCA
146	UUUGCACUC UGCUGGAA UUCU	338	ACUCUGCU GGAAUUCA	530	UGAAUUCC AGCAGAGU GCAAA
147	UUGCACUCU GCUGGAAU UCUG	339	CUCUGCUG GAAUUCUA	531	UAGAAUUC CAGCAGAG UGCAA
148	CUCUGCUGG AAUUCUGCC UAG	340	CUGGAAUU CUGCCUAA	532	UUAGGCAG AAUUCCAG CAGAG

[0311]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
149	UGCUGGAA UUCUGCCUA GCUG	341	GAAUUCUG CCUAGCUA	533	UAGCUAGG CAGAAUUC CAGCA
150	GCUGGAAU UCUGCCUAG CUGU	342	AAUUCUGC CUAGCUGA	534	UCAGCUAG GCAGAAUU CCAGC
151	CUGGAAUU CUGCCUAGC UGUG	343	AUUCUGCC UAGCUGUA	535	UACAGCUA GGCAGAAU UCCAG
152	UGGAAUUC UGCCUAGCU GUGC	344	UUCUGCCU AGCUGUGA	536	UCACAGCU AGGCAGAA UUCCA
153	CUGCGGUG GAAACAGG CUUAC	345	GUGGAAAC AGGCUUAA	537	UUAAGCCU GUUUCCAC CGCAG
154	UGCGGUGG AAACAGGC UUACU	346	UGGAAACA GGCUUACA	538	UGUAAGCC UGUUUCCA CCGCA
155	GCGGUGGA AACAGGCU UACUC	347	GGAAACAG GCUUACUA	539	UAGUAAGC CUGUUUCC ACCGC
156	CGGUGGAA ACAGGCUU ACUCU	348	GAAACAGG CUUACUCA	540	UGAGUAAG CCUGUUUC CACCG
157	UGGAAACA GGCUUACUC UGAC	349	ACAGGCUU ACUCUGAA	541	UUCAGAGU AAGCCUGU UUCCA
158	GGAAACAG GCUUACUCU GACU	350	CAGGCUUA CUCUGACA	542	UGUCAGAG UAAGCCUG UUUCC
159	GAAACAGG CUUACUCUG ACUU	351	AGGCUUAC UCUGACUA	543	UAGUCAGA GUAAGCCU GUUUC
160	AAACAGGC UUACUCUG ACUUC	352	GGCUUACU CUGACUUA	544	UAAGUCAG AGUAAGCC UGUUU
161	AACAGGCU UACUCUGAC UUCC	353	GCUUACUC UGACUUCA	545	UGAAGUCA GAGUAAGC CUGUU
162	ACAGGCUU ACUCUGACU UCCC	354	CUUACUCU GACUUCCA	546	UGGAAGUC AGAGUAAG CCUGU
163	CAGGCUUAC UCUGACUUC CCU	355	UUACUCUG ACUUCCCA	547	UGGGAAGU CAGAGUAA GCCUG

[0312]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
164	AGGCUUAC UCUGACUUC CCUG	356	UACUCUGA CUUCCCUA	548	UAGGGAAG UCAGAGUA AGCCU
165	GGCUUACUC UGACUUCCC UGG	357	ACUCUGAC UUCCCUGA	549	UCAGGGAA GUCAGAGU AAGCC
166	UGUACUUU UCCUGCCUC ACAG	358	UUUUCCUG CCUCACAA	550	UUGUGAGG CAGGAAAA GUACA
167	CUUUUCCUG CCUCACAGU UAC	359	CCUGCCUC ACAGUUAA	551	UUAACUGU GAGGCAGG AAAAG
168	UUUUCCUGC CUCACAGUU ACA	360	CUGCCUCA CAGUUACA	552	UGUAACUG UGAGGCAG GAAAA
169	UUUCCUGCC UCACAGUU ACAU	361	UGCCUCAC AGUUACAA	553	UUGUAACU GUGAGGCA GGAAA
170	GAAGAACU AUUGACUU CUUAA	362	ACUAUUGA CUUCUUAA	554	UUAAGAAG UCAAUAGU UCUUC
171	AGAACUAU UGACUUCU UAAGA	363	UAUUGACU UCUUAAGA	555	UCUUAAGA AGUCAAUA GUUCU
172	GAACUAUU GACUUCUU AAGAA	364	AUUGACUU CUUAAGAA	556	UUCUUAAG AAGUCAAU AGUUC
173	UGACUUCU UAAGAAAA AAGGG	365	UCUUAAGA AAAAAGGA	557	UCCUUUUU UCUUAAGA AGUCA
174	GACUUCUU AAGAAAAA AGGGA	366	CUUAAGAA AAAAGGGA	558	UCCCUUUU UUCUUAAG AAGUC
175	ACUUCUUA AGAAAAAA GGGAG	367	UUAAGAAA AAAGGGAA	559	UUCCCUUU UUUCUUAA GAAGU
176	CUUCUUAA GAAAAAAG GGAGA	368	UAAGAAAA AAGGGAGA	560	UCUCCCUU UUUUCUUA AGAAG
177	UUCUUAAG AAAAAAGG GAGAA	369	AAGAAAAA AGGGAGAA	561	UUCUCCCU UUUUUCUU AAGAA
178	CUUAAGAA AAAAGGGA GAAAU	370	GAAAAAAG GGAGAAAA	562	UUUUCUCC CUUUUUUC UUAAG

[0313]

基因区域SEQ ID NO:	基因区域	有义SEQ ID NO:	有义序列	反义SEQ ID NO:	反义序列
179	AAGGGAGAAAUAUUAAUCAGA	371	AGAAAUAUUAAUCAGA	563	UCUGAUUAAUAUUUCUCCCUU
180	AGGGAGAAAUAUUAAUCAGAA	372	GAAAUAUUAAUCAGAA	564	UUCUGAUUAAUAUUUCUCCCU
181	GGGAGAAAUAUUAAUCAGAAA	373	AAAUAUUAAUCAGAAA	565	UUUCUGAUUAAUAUUUCUCCC
182	UCAGAAAGUUGAUUCUUAUGA	374	AAGUUGAUUCUUAUGA	566	UCAUAAGAAUCAACUUUCUGA
183	CAGAAAGUUGAUUCUUAUGAU	375	AGUUGAUUCUUAUGAA	567	UUCAUAAGAAUCAACUUUCUG
184	AUAGAAAAGCAAAGCUUGAGU	376	AAAGCAAAGCUUGAGA	568	UCUCAAGCUUUGCUUUUCUAU
185	UAGAAAAGCAAAGCUUGAGUU	377	AAGCAAAGCUUGAGUA	569	UACUCAAGCUUUGCUUUUCUA
186	AGAAAAGCAAAGCUUGAGUUU	378	AGCAAAGCUUGAGUUA	570	UAACUCAAGCUUUGCUUUUCU
187	GAAAAGCAAAGCUUGAGUUUC	379	GCAAAGCUUGAGUUUA	571	UAAACUCAAGCUUUGCUUUUC
188	AAAAGCAAAGCUUGAGUUUCC	380	CAAAGCUUGAGUUUCA	572	UGAAACUCAAGCUUUGCUUUU
189	AAAGCAAAGCUUGAGUUUCCU	381	AAAGCUUGAGUUUCCA	573	UGGAAACUCAAGCUUUGCUUU
190	AGCAAAGCUUGAGUUUCCUAA	382	AGCUUGAGUUUCCUAA	574	UUAGGAAACUCAAGCUUUGCU
191	GCAAAGCUUGAGUUUCCUAAA	383	GCUUGAGUUUCCUAAA	575	UUUAGGAAACUCAAGCUUUGC
192	CAAAGCUUGAGUUUCCUAAAU	384	CUUGAGUUUCCUAAAA	576	UUUUAGGAAACUCAAGCUUUG

[0314] siRNA结构

[0315] 本公开的siRNA分子可以是单链(ss)或双链(ds)寡核苷酸结构的形式。在一些实施方案中,siRNA分子可以是二分支、三分支或四分支的分子。此外,本公开的siRNA分子可

含有一个或多个磷酸二酯核苷间键联和/或其类似物,诸如硫代磷酸酯核苷间键联。本公开的siRNA分子还可含有具有2'糖修饰的经化学修饰的核苷。

[0316] 最简单的siRNA由包含ss-或ds-结构的核糖核酸组成,所述结构由第一链(即,反义链)形成,并且在ds-siRNA的情况下还有第二链(即,有义链)。第一链包括与靶核酸至少部分互补的连续核苷酸链段。第二链也包括连续核苷酸链段,其中第二链段与靶核酸至少部分相同。第一链和所述第二链可以彼此杂交以形成双链结构。杂交通常通过沃森-克里克碱基配对发生。

[0317] 根据第一链和第二链的序列,杂交或碱基配对不一定是完全或完美的,这意味着第一链和第二链由于错配而不是100%碱基配对。双链体内也可能存在一个或多个错配,但不一定影响siRNA RNAi活性。

[0318] 第一链含有与靶核酸基本上互补的连续核苷酸链段。通常,根据干扰核糖核酸的作用模式,靶核酸序列是ss-RNA,优选mRNA。此类杂交最有可能通过沃森-克里克碱基配对发生,但不一定限于此。第一链具有与靶核酸序列互补的连续核苷酸链段的程度可以介于80%和100%之间,例如80%、85%、90%、95%或100%互补。

[0319] 本文所述的siRNA分子可以采用对核碱基、磷酸骨架、核糖核心、5'-末端和3'-末端以及分支的修饰,其中siRNA的多条链可共价连接。

[0320] 小干扰RNA分子的长度

[0321] 在本公开的范围内,本领域已知的和先前未知的任何长度都可以用于本发明。如本文所述,本公开的siRNA分子的反义链的可能长度为10至30个核苷酸(例如,10个核苷酸、11个核苷酸、12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸或30个核苷酸)、15至25个核苷酸(例如,15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸或25个核苷酸)或18至23个核苷酸(例如,18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸或23个核苷酸)。在一些实施方案中,反义链为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为27个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为28个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为29个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为30个核苷酸。

[0322] 在一些实施方案中,本公开的siRNA分子的有义链为12至30个核苷酸(例如,12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸或30个核苷酸)或14至23个核苷酸(例如,14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸或23个核苷酸)。在一些实施方案中,有义链为15个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为16个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为17个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为18个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为19个核苷酸。在一些实施方案中,

有义链为20个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为21个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为22个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为23个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为24个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为25个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为26个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为27个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为28个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为29个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为30个核苷酸。

[0323] 2′糖修饰

[0324] 本公开可以包括ss-siRNA和ds-siRNA分子组合物,其包含至少一个(例如,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11个或更多)具有2'糖修饰的核苷。可能的2′-修饰包括所有可能取向的OH;F;O-烷基、S-烷基或N-烷基;O-烯基、S-烯基或N-烯基;O-炔基、S-炔基或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是经取代或未取代的C1至C10烷基或C2至C10烯基和炔基。在一些实施方案中,修饰包括2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰。其他可能的糖取代基基团包括:C1至C10低级烷基、经取代的低级烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、多烷基氨基、经取代的甲硅烷基、用于改善寡核苷酸的药代动力学性质的基团或用于改善寡核苷酸的药效学性质的基团,以及具有类似性质的其他取代基。在一些实施方案中,修饰包括2'甲氧基乙氧基(2′-O-$CH_2CH_2OCH_3$,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2′-MOE)。在一些实施方案中,修饰包括2'-二甲基氨基氧基乙氧基,即O$(CH_2)_2$ON$(CH_3)_2$基团,也称为2′-DMAOE;和2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称为2'-O-二甲基氨基-乙氧基-乙基或2′-DMAEOE),即2′-O-$CH_2OCH_2N(CH_3)_2$。其他可能的糖取代基基团包括例如氨基丙氧基(-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)、烯丙基(-CH_2-CH=CH_2)、-O-烯丙基(-O-CH_2-CH=CH_2)和氟(F)。2'-糖取代基可以位于阿拉伯糖(上)位置或核糖(下)位置。在一些实施方案中,2'-阿拉伯糖修饰是2'-F。还可在siRNA分子上的其他位置上进行类似的修饰,具体地在3'末端核苷上或在2'-5'连接的寡核苷酸中的糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物诸如环丁基部分来代替戊呋喃糖基糖。

[0325] 核碱基修饰

[0326] 本公开的siRNA分子还可包括核苷或其他替代或模拟单体亚基,这些亚基包括核碱基(在本领域中通常简称为"碱基"或"杂环碱基部分")。核碱基是已被广泛修饰或取代的另一部分并且此类经修饰和或经取代的核碱基适用于本公开。如本文所用,"未修饰"或"天然"核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰的核碱基(本文也称为杂环碱基部分)包括其他合成和天然的核碱基诸如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基衍生物和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基衍生物和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C=C-CH3)尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物、6-偶氮基尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(具体为5-溴)、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。核碱基还可包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和2-吡啶

酮置换的那些。另外的核碱基包括公开于U S 3,687,808中的那些、公开于Kroschwitz,J.I.编辑The Concise Enc yclopedia of Polymer Science and Engineering,New York,John Wi ley&Sons,1990,第858-859页中的那些;由Englisch等人,Ange wandte Chemie,国际版,30:613,1991公开的那些;以及由Sanghvi,Y.S.,第16章,Antisense Research and Applications,CRC Press,G ait,M.J.编辑,1993,第289-302页公开的那些。本公开的siRNA分子还可以包括多环杂环化合物来代替一个或多个杂环碱基部分。先前已报道了许多三环杂环化合物。这些化合物通常用于反义应用,以增加经修饰的链与靶链的结合性质。

[0327] 与第二链中的鸟苷产生三个氢键的代表性胞嘧啶类似物包括1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮(Kurchavov等人,Nucleosides and Nucleotides,16:1837-46,1997)、1,3-二氮杂吩噻嗪-2-酮(Lin等人Am.Chem.Soc.,117:3873-4,1995)和6,7,8,9-四氟-1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮(Wang等人,Tetrahedron Lett.,39:8385-8,1998)。经证实掺入寡核苷酸中的这些碱基修饰与互补鸟嘌呤杂交,并且经证实后者也与腺嘌呤杂交并通过扩展的堆积相互作用增强螺旋热稳定性(也参见US10/155,920和10/013,295,两者均通过引用整体并入本文)。当胞嘧啶类似物/取代物具有附接到刚性1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮支架上的氨基乙氧基部分时,已经观察到了进一步的螺旋稳定性质(Lin等人,Am.Chem.Soc.,120:8531-2,1998)。

[0328] 核苷间键联修饰

[0329] 本公开设计中的另一个变量是构成siRNA分子的磷酸骨架的核苷间键联。尽管此处可采用天然RNA磷酸骨架,但可以使用增强siRNA分子的所需特征的其衍生物。虽然不是限制性的,但在本公开中特别重要的是保护siRNA分子的部分或整体免于水解。降低水解速率的修饰的一个实例是硫代磷酸酯。骨架的任何部分或整体可以含有磷酸酯取代基(例如,硫代磷酸酯等)。例如,核苷间键联可以是0至100%硫代磷酸酯,例如0至100%、10至100%、20至100%、30至100%、40至100%、50至100%、60至100%、70至100%、80至100%、90至100%、0至90%、0至80%、0至70%、0至60%、0至50%、0至40%、0至30%、0至20%、0至10%、10至90%、20至80%、30至70%、40至60%、10至40%、20至50%、30至60%、40至70%、50至80%或60至90%硫代磷酸酯键联。类似地,核苷间键联可以是0至100%磷酸二酯键联,例如0至100%、10至100%、20至100%、30至100%、40至100%、50至100%、60至100%、70至100%、80至100%、90至100%、0至90%、0至80%、0至70%、0至60%、0至50%、0至40%、0至30%、0至20%、0至10%、10至90%、20至80%、30至70%、40至60%、10至40%、20至50%、30至60%、40至70%、50至80%或60至90%磷酸二酯键联。

[0330] 可用于本发明的一些可能的siRNA分子的具体实例包括含有经修饰的(例如非天然存在的)核苷间键联的寡核苷酸。如本说明书中所定义,具有经修饰的核苷间键联的寡核苷酸包括保留磷原子的核苷间键联和不具有磷原子的核苷间键联。出于本说明书的目的,并且如本领域有时所提及的,在其核苷间骨架中不具有磷原子的经修饰的寡核苷酸也可以被认为是寡核苷。优选含磷的经修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,其中含有磷原子的经修饰的寡核苷酸骨架包括例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基膦酸酯(包括3'-亚烷基膦酸酯、5'-亚烷基膦酸酯)、亚膦酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基膦酸酯、硫代烷基磷酸三酯、硒代磷酸酯和具有正常3'-5'键联的硼代

磷酸酯、这些的2'-5'连接类似物以及具有反极性的那些,其中一个或多个核苷酸间键联为3'至3'、5'至5'或2'至2'键联。描述含磷键联的制备的示例性美国专利包括但不限于美国专利号3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,625,050;6,028,188;6,124,445;6,160,109;6,169,170;6,172,209;6,239,265;6,277,603;6,326,199;6,346,614;6,444,423;6,531,590;6,534,639;6,608,035;6,683,167;6,858,715;6,867,294;6,878,805;7,015,315;7,041,816;7,273,933;7,321,029;和美国专利RE39464,这些专利中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0331] 在一些实施方案中,不包括磷原子的经修饰的寡核苷酸骨架具有由短链烷基或环烷基核苷间键联、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键联或者一个或多个短链杂原子核苷间键联或杂环核苷间键联形成的骨架。这些包括具有以下的那些:吗啉代键联(部分地由核苷的糖部分形成);硅氧烷骨架;硫化物、亚砜和砜骨架;甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;核糖乙酰基(riboacetyl)骨架;含烯烃的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚胺基和亚甲基肼基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰氨骨架;以及具有混合N、O、S和CH_2组成部分的其他骨架。教导非磷骨架的制备的美国专利的非限制性实例包括但不限于美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;和5,677,439,这些专利中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0332] siRNA分子的修饰模式

[0333] 以下部分提供了一组示例性支架,本公开的siRNA分子可以并入其中。

[0334] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式I表示的区域的反义链,其中式I按5'至3'方向是

[0335] $A-B-(A')_j-C-P^2-D-P^1-(C'-P^1)_k-C'$

[0336] 式I;

[0337] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;B由式$C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2$表示;每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;每个D是2'-F核糖核苷;每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;j是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);并且k是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,j为4。在一些实施方案中,k为4。在一些实施方案中,j为4并且k为4。反义与靶核酸序列互补(例如,完全或部分互补)。

[0338] 在一些实施方案中,反义链包括式A1表示的结构,其中式A1按5'至3'方向为:

[0339] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0340] A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[0341] 式A1;

[0342] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并

且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0343] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式II表示的区域的反义链,其中式II按5'至3'方向是

[0344] A-B-(A')$_j$-C-P^2-D-P^1-(C-P^1)$_k$-C'

[0345] 式II;

[0346] 其中A由式C-P^1-D-P^{1}表示;每个A'由式C-P^2-D-P^{2}表示;B由式C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^{2}表示;每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;每个D是2'-F核糖核苷;每个P^{1}是硫代磷酸酯核苷间键联;每个P^{2}是磷酸二酯核苷间键联;j是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);并且k是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,j为4。在一些实施方案中,k为4。在一些实施方案中,j为4并且k为4。反义与靶核酸序列互补(例如,完全或部分互补)。

[0347] 在本公开的一些实施方案中,反义链包括式A2表示的结构,其中式A2按5'至3'方向为:

[0348] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0349] A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-A-S-A

[0350] 式A2;

[0351] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0352] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式III表示的结构,其中式III按5'至3'方向为:

[0353] E-(A')$_m$-F

[0354] 式III;

[0355] 其中E由式(C-P^1)$_2$表示;F由式(C-P^2)$_3$-D-P^1-C-P^1-C、(C-P^2)$_3$-D-P^2-C-P^2-C、(C-P^2)$_3$-D-P^1-C-P^1-D或(C-P^2)$_3$-D-P^2-C-P^2-D表示;A'、C、D、P^{1}和P^{2}如式I中所定义;并且m是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,m为4。在一些实施方案中,有义链与反义链互补(例如,完全或部分互补)。

[0356] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S1表示的结构,其中式S1按5'至3'方向为:

[0357] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-

[0358] A-S-A

[0359] 式S1;

[0360] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0361] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S2表示的结构,其中式S2按5'至3'方向为:

[0362] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-

[0363] A-O-A

[0364] 式S2;

[0365] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并

且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0366] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S3表示的结构,其中式S3按5'至3'方向为:

[0367] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-

[0368] A-S-B

[0369] 式S3;

[0370] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0371] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S4表示的结构,其中式S4按5'至3'方向为:

[0372] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-

[0373] A-O-B

[0374] 式S4;

[0375] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0376] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式IV表示的区域的反义链,其中式IV按5'至3'方向是

[0377] $A-(A')_j-C-P^2-B-(C-P^1)_k-C'$

[0378] 式IV;

[0379] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;B由式$D-P^1-C-P^1-D-P^1$表示;每个C是2'-O-Me核糖核苷;每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;每个D是2'-F核糖核苷;每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;j是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);并且k是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,j为6。在一些实施方案中,k为4。在一些实施方案中,j为6且k为4。反义链与靶核酸互补(例如,完全或部分互补)。

[0380] 在本公开的一些实施方案中,反义链包括式A3表示的结构,其中式A3按5'至3'方向为:

[0381] A-S-B-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0382] A-O-B-S-A-S-B-S-A-S-A-S-A

[0383] 式A3;

[0384] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0385] 在本公开的一些实施方案中,本公开的siRNA可以具有式V表示的有义链,其中式V按5'至3'方向为:

[0386] $E-(A')_m-C-P^2-F$

[0387] 式V;

[0388] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;F由式$D-P^1-C-P^1-C$、$D-P^2-C-P^2-C$、$D-P^1-C-P^1-D$或$D-P^2-C-P^2-D$表示;A'、C、D、P^1和P^2如式IV中所定义;并且m是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,m为5。在一些实施方案中,有义链与反义链互补(例如,完全或部分互补)。

[0389] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S5表示的结构,其中式S5按5'至3'方向为:

[0390] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-

[0391] A-S-A

[0392] 式S5;

[0393] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0394] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S6表示的结构,其中式S6按5'至3'方向为:

[0395] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0396] A-O-A

[0397] 式S6;

[0398] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S7表示的结构,其中式S7按5'至3'方向为:

[0399] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-

[0400] A-S-B

[0401] 式S7;

[0402] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0403] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S8表示的结构,其中式S8按5'至3'方向为:

[0404] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0405] A-O-B

[0406] 式S8;

[0407] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0408] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式VI表示的区域的反义链,其中式VI按5'至3'方向是

[0409] $A\text{-}B_j\text{-}E\text{-}B_k\text{-}E\text{-}F\text{-}G_1\text{-}D\text{-}P^1\text{-}C'$

[0410] 式VI;

[0411] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;每个B由式$C\text{-}P^2$表示;每个C为2'-O-Me核糖核苷;每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;每个D为2'-F核糖核苷;每个E由式$D\text{-}P^2\text{-}C\text{-}P^2$表示;F由式$D\text{-}P^1\text{-}C\text{-}P^1$表示;每个G由式$C\text{-}P^1$表示;每个$P^1$是硫代磷酸酯核苷间键联;每个$P^2$是磷酸二酯键联;j是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);k是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);并且l是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,j为3。在一些实施方案中,k为6。在一些实施方案中,l为2。在一些实施方案中,j为3,k为6且l为2。反义链与靶核酸互补(例如,完全或部分互补)。

[0412] 在本公开的一些实施方案中,反义链包括式A4表示的结构,其中式A4按5'至3'方

向为:

[0413] A-S-B-S-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[0414] 式A4;

[0415] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0416] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式VII表示的区域的有义链,其中式VII按5'至3'方向为:

[0417] $H-B_m-I_n-A'-B_o-H-C$

[0418] 式VII;

[0419] 其中A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;每个H由式$(C-P^1)_2$表示;每个I由式$(D-P^2)$表示;B、C、D、P^1和P^2如式VI中所定义;m是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);n是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且o是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,m为3。在一些实施方案中,n为3。在一些实施方案中,o为3。在一些实施方案中,m为3,n为3,并且o为3。反义链与有义链互补(例如,完全或部分互补)。

[0420] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S9表示的结构,其中式S9按5'至3'方向为:

[0421] A-S-A-S-A-O-A-O-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-S-

[0422] A-S-A

[0423] 式S9;

[0424] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0425] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式VIII表示的区域的反义链:

[0426] $Z-((A-P-)_n(B-P-)_m)_q$;

[0427] 式VIII

[0428] 其中Z是5'磷稳定部分;每个A是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;每个B是2'-氟-核糖核苷;每个P独立地是选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联的核苷间键联;n是1至5的整数(例如1、2、3、4或5);m是1至5的整数(例如1、2、3、4或5);并且q是介于1和30之间的整数(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30)。

[0429] siRNA合成方法

[0430] 本公开的siRNA分子可通过本领域已知的标准方法合成,如下文进一步讨论的,例如通过使用自动DNA合成仪,诸如可从例如Biosearch,Applied Biosystems,Inc.商购获得的。

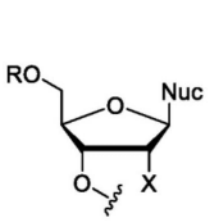
[0431] siRNA剂可以使用溶液相或固相有机合成或两者来制备。有机合成提供的优点是可以容易地制备包括非天然或修饰的核苷酸的寡核苷酸。本公开的siRNA分子可以使用溶液相或固相有机合成或两者来制备。

[0432] 此外,考虑到对于本文公开的任何siRNA剂,可以通过系统地添加或去除连接的核苷以产生更长或更短的序列来实现进一步优化。此外,此类优化序列可以通过例如引入本

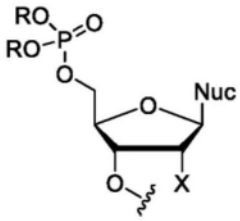
文所述或本领域已知的修饰核苷和/或修饰核苷间键联,包括如本领域已知和/或本文讨论的替代核苷、替代糖部分和/或替代核苷间键联来调整,以进一步优化分子(例如,增加血清稳定性或循环半衰期、增加热稳定性、增强跨膜递送和/或靶向特定位置或细胞类型)。

[0433] 5′磷稳定部分

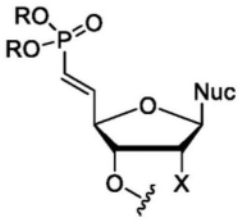
[0434] 为了进一步保护本公开的siRNA分子免于降解,可以采用5'-磷稳定部分。5'-磷稳定部分置换5'-磷酸盐以防止磷酸盐水解。5'-磷酸盐的水解防止与RISC的结合,这是基因沉默的必要步骤。本公开中考虑了任何不妨碍与RISC结合的磷酸盐置换。在一些实施方案中,5'-磷酸的替代品对体内水解也是稳定的。siRNA分子的每条链可以独立地并且任选地采用任何合适的5'-磷稳定部分。



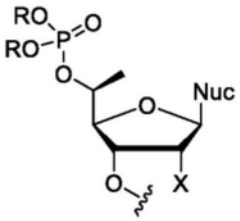
式IX



式X

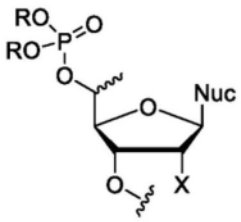


式XI

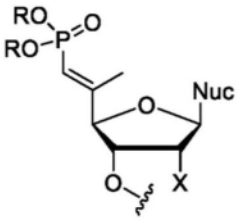


式XII

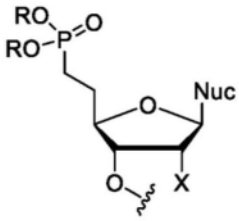
[0435]



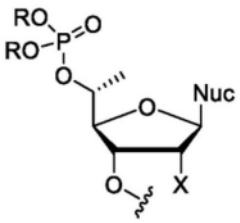
式XIII



式XIV



式XV



式XVI

[0436] 一些示例性端帽在式IX-XVI中展示。式IX-XVI中的Nuc表示如本文所述的核碱基或核碱基衍生物或置换。式IX-XVI中的X表示如本文所述的2'-修饰。一些实施方案采用如式IX中的羟基、如式X中的磷酸酯、如式XI和式XIV中的乙烯基膦酸酯、如式XII、XIII和XVI中的5'-甲基取代的磷酸酯、如式XV中的亚甲基膦酸酯、或如式XI中展示的乙烯基5'-乙烯基膦酸酯作为5'-磷稳定部分。

[0437] 疏水部分

[0438] 本公开还提供了具有一个或多个与其附接的疏水部分的siRNA分子。疏水部分可以共价附接至本公开的siRNA分子的5'末端或3'末端。适合与本公开的siRNA分子一起使用的疏水部分的非限制性实例可包括胆固醇、维生素D、生育酚、磷脂酰胆碱(PC)、二十二碳六烯酸、二十二烷酸、PC-二十二烷酸、二十碳五烯酸、石胆酸或上述疏水部分与PC的任何组合。

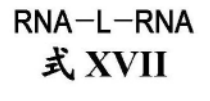
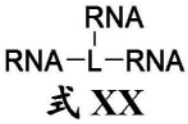
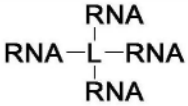
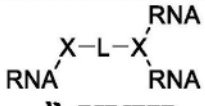
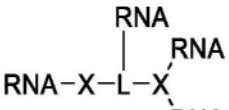
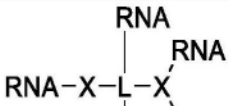
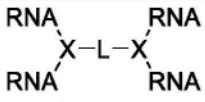
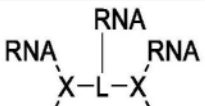
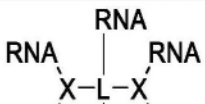
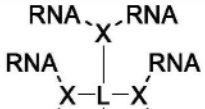
[0439] siRNA分支

[0440] 本公开的siRNA分子可以是分支的。例如,本公开的siRNA分子可以具有几种分支模式之一,如本文所述。

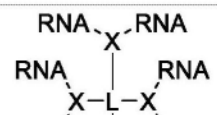
[0441] 根据本公开,本文公开的siRNA分子可以是分支siRNA分子。siRNA分子可以不是分支的,或者可以是二分支、三分支的或四分支的,通过接头连接。每个主分支可以进一步分支以允许2、3、4、5、6、7或8条单独的RNA单链或双链。接头上的分支点可以源自同一原子,或

沿着接头的单独原子。表2中列出了一些示例性实施方案。

[0442] 表2:分支siRNA结构

二分支	三分支	四分支
 式 XVII	 式 XX	 式 XXIV
 式 XVIII	 式 XXI	 式 XXV
 式 XIX	 式 XXII	 式 XXVI
	 式 XXIII	 式 XXVII

[0443]

		 式 XXVIII

[0444]

[0445] 在一些实施方案中,siRNA分子是分支siRNA分子。在一些实施方案中,所述分支siRNA分子是二分支、三分支或四分支的。在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式XVII-XIX中的任一个表示,其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分(例如,亚磷酰胺、甲苯磺酰化丙酮缩甘油、1,3-二氨基丙醇、季戊四醇、或US10,478,503中描述的分支点部分中的任一种)。

[0446] 在一些实施方案中,三分支siRNA分子由式XX-XXIII中的任一个表示,其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0447] 在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式XXIV-XXVIII中的任一个表示,其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0448] 接头

[0449] 本文所述的siRNA的多条链可以通过接头共价附接。这种分支的作用尤其改善细胞渗透性,从而允许更好地进入CNS中的细胞(例如,神经元或小胶质细胞)。可以采用与本

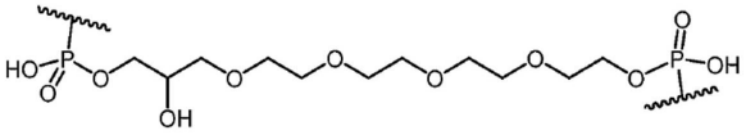
发明的siRNA不相容的任何连接部分。接头包括2至10个亚基(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个亚基)的乙二醇链、烷基链、碳水化合物链、嵌段共聚物、肽、RNA、DNA等。在一些实施方案中,接头的任何碳或氧原子任选地被氮原子置换,带有羟基取代基,或带有氧代取代基。在一些实施方案中,接头是聚乙二醇(PEG)接头。适合与所公开的组合物和方法一起使用的PEG接头包括线性或非线性PEG接头。非线性PEG接头的实例包括分支PEG、线性叉状PEG或分支叉状PEG。

[0450] 各种重量的PEG接头可以与所公开的组合物和方法一起使用。例如,PEG接头可以具有介于5至500道尔顿之间的重量。在一些实施方案中,可以使用重量介于500至1,000道尔顿之间的PEG接头。在一些实施方案中,可以使用重量介于1,000至10,000道尔顿之间的PEG接头。在一些实施方案中,可以使用重量介于200至20,000道尔顿之间的PEG接头。在一些实施方案中,接头共价附接至siRNA的有义链。在一些实施方案中,接头共价附接至siRNA的反义链。在一些实施方案中,PEG接头是三乙二醇(TrEG)接头。在一些实施方案中,PEG接头是四乙二醇(TEG)接头。

[0451] 在一些实施方案中,接头是烷基链接头。在一些实施方案中,接头是肽接头。在一些实施方案中,接头是RNA接头。在一些实施方案中,接头是DNA接头。

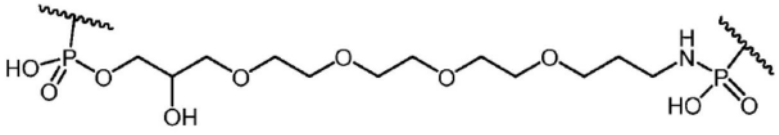
[0452] 接头可以共价连接2、3、4或5条独特的siRNA链。接头可以共价结合至siRNA寡聚物的任何部分。在一些实施方案中,接头附接至每条siRNA链的核苷的3'末端。在一些实施方案中,接头附接至每条siRNA链的核苷的5'末端。在一些实施方案中,接头通过共价键形成部分附接至siRNA链(例如有义链或反义链)的核苷。在一些实施方案中,共价键形成部分选自烷基、酯、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯、三唑、脲、甲缩醛、膦酸酯、磷酸酯和磷酸酯衍生物(例如,硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等)。

[0453] 在一些实施方案中,所述接头具有式L1的结构:

[0454] 。

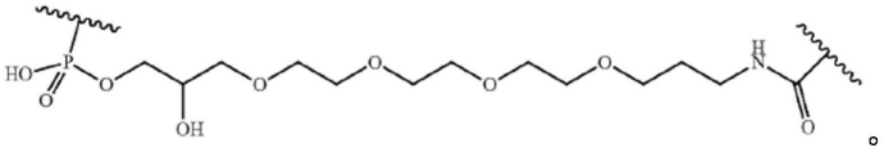
(式 L1)

[0455] 在一些实施方案中,所述接头具有式L2的结构:

[0456] 。

(式 L2)

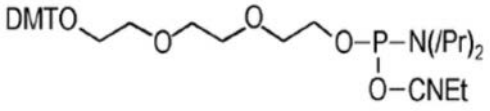
[0457] 在一些实施方案中,所述接头具有式L3的结构:

[0458] 

。

(式 L3)

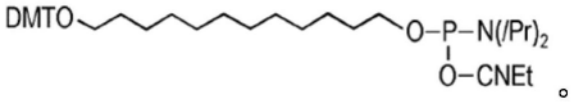
[0459] 在一些实施方案中,所述接头具有式L4的结构:

[0460] 

。

(式 L4)

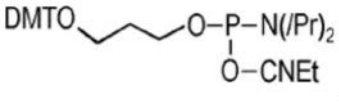
[0461] 在一些实施方案中,所述接头具有式L5的结构:

[0462] 

。

(式 L5)

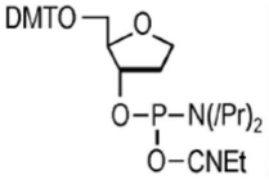
[0463] 在一些实施方案中,所述接头具有式L6的结构:

[0464] 

。

(式 L6)

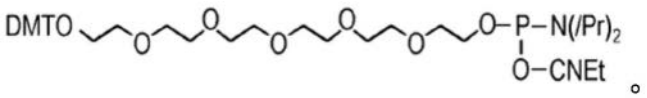
[0465] 在一些实施方案中,接头具有式L7的结构,如下所示:

[0466] 

。

(式 L7)

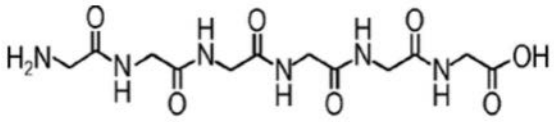
[0467] 在一些实施方案中,所述接头具有式L8的结构:

[0468] 

。

(式 L8)

[0469] 在一些实施方案中,所述接头具有式L9的结构:

[0470]  。

(式 L9)

[0471] 在一些实施方案中,与本文公开的一种或多种分支siRNA分子一起使用的接头的选择可以基于接头的疏水性,使得例如,对于本公开的一种或多种分支siRNA分子实现期望的疏水性。例如,与具有较低疏水性接头或亲水性接头的分支siRNA分子相比,含有烷基链的接头可用于增加分支siRNA分子的疏水性。

[0472] 本文公开的siRNA剂可以通过本领域充分确立的方法合成和/或修饰,诸如Beaucage,S.L.等人(编辑),Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,John Wiley&Sons,Inc.,New York,N.Y.,2000中描述的那些方法,其特此通过引用并入本文。

[0473] 治疗方法

[0474] 可以将本公开的靶向MS4A6A的siRNA分子递送至受试者,从而治疗神经炎性疾病(诸如阿尔茨海默病),和/或减轻与神经炎性疾病相关的表型。例如,可以将该siRNA分子递送至受试者,从而治疗阿尔茨海默病和/或减轻阿尔茨海默病相关表型(例如,认知障碍或记忆丧失)。此外,还可以将本公开的siRNA分子递送至具有MS4A6A基因变体的受试者,对于该受试者,siRNA介导的MS4A6A变体基因的基因沉默降低了MS4A6A转录物的表达水平,从而治疗神经炎性疾病(例如,阿尔茨海默病)或其他MS4A相关疾病或病症。

[0475] 本公开提供了通过用本文所述的一种或多种siRNA分子进行MS4A6A基因沉默来治疗受试者的方法。相对于健康受试者,可以在受试者中进行基因沉默,以使野生型MS4A6A转录物、突变型MS4A6A转录物、MS4A6A转录物的剪接同种型和/或其过表达的MS4A6A转录物沉默。该方法可以包括通过任何适当的施用途径(例如,脑室内、鞘内注射、纹状体内注射、经由导管插入在小脑延髓池内注射、实质内注射、静脉内注射、皮下注射,或肌肉内注射)将本公开的siRNA分子或含有其的药物组合物递送至受试者(例如,人)的CNS或受影响的组织。活性化合物可以以任何合适的剂量施用。施用给患者的本公开组合物的实际剂量可以通过物理和生理因素确定,诸如体重、病状的严重程度、先前或同时的治疗干预、患者的特发症以及施用途径。根据剂量和施用途径,优选剂量和/或有效量的施用次数可根据受试者的反应而变化。在任何情形下,负责施用的从业者将确定组合物中活性成分的浓度以及个体受试者的一种或多种适当剂量。施用可以每天进行任何合适的次数,并且持续时间只要有必要。受试者可以是患有或未患共存疾病的成人或儿童。

[0476] 受试者选择

[0477] 可用本文公开的siRNA分子治疗的受试者是需要治疗例如神经炎性疾病(例如阿尔茨海默氏病)和/或与MS4A6A基因的功能获得突变相关的任何一种或多种其他医学风险的受试者。可用本文公开的siRNA分子治疗的受试者可以包括例如人、猴子、大鼠、小鼠、猪和含有MS4A6A基因的至少一个直系同源拷贝的其他哺乳动物。受试者可以是患有或未患共存疾病的成人或儿童。

[0478] 药物组合物

[0479] 本公开中的siRNA分子可以配制成药物组合物,以便以适合体内施用的生物相容

形式施用于受试者。因此,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含与合适的稀释剂、载体或赋形剂混合的本公开的siRNA分子。siRNA分子可以例如直接施用到受试者的CNS或受影响的组织中(例如,通过脑室内、纹状体内、鞘内注射、经由导管插入在小脑延髓池内注射、实质内注射、静脉内注射、皮下注射或肌肉内注射的方式)。

[0480] 用于选择和制备合适制剂的常规程序和成分例如在Remington,J.P.The Science and Practice of Pharmacy,Easton,PA.Mack Publishers,2012,第22版和The United States Pharmacopeial Convention,The National Formulary,United States Pharmacopeial,2015,USP 38NF 33)中有描述。

[0481] 在普通储存和使用条件下,药物组合物可含有防腐剂,例如以防止微生物生长。药物组合物可包含无菌水性溶液、分散液,或例如用于临时制备无菌溶液或分散液的粉末。在所有情况下,所述形式可使用本领域已知的技术灭菌,并且可流化至可容易地施用给需要治疗的受试者的程度。

[0482] 药物组合物可单独或与如本文所述的药学上可接受的载体组合施用给受试者,例如,人类受试者,其比例可通过化合物的溶解度和/或化学性质、所选的施用途径以及标准药物实践来确定。

[0483] 给药方案

[0484] 本领域普通技术的医师可以容易地确定向有需要的哺乳动物受试者(例如,人)施用的siRNA分子的有效量。例如,医师可以以低于获得期望治疗效果所需要的水平开始本公开siRNA分子之一的处方剂量,并逐渐增加剂量直至实现期望效果。可替代地,医师可以通过施用高剂量的本公开siRNA分子之一来开始治疗方案,并且随后逐渐施用较低的剂量,直至达到实现治疗效果(例如,靶基因序列的表达减少)的最低剂量。一般而言,本公开的siRNA分子之一的合适日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的siRNA分子的量。本公开的ss-或ds-siRNA分子可以通过注射施用,例如鞘内注射、脑室内注射、通过经由导管插入在小脑延髓池内注射、实质内注射、静脉内注射、皮下或肌肉内施用来施用。本公开的siRNA分子的治疗组合物的日剂量可以作为单剂量施用,或者作为在一天、一周、一个月或一年中以适当的间隔单独施用的两个、三个、四个、五个、六个或更多个剂量来施用,任选地,以单位剂型施用。虽然本公开的siRNA分子可以单独施用,但它也可以作为与赋形剂、载体和任选地另外的治疗剂组合的药物制剂施用。

[0485] 施用途径

[0486] 本公开的方法考虑了治疗组合物耐受的任何施用途径。所述方法的一些实施方案包括鞘内注射、脑室内注射、纹状体内注射、实质内注射,或通过经由导管插入在小脑延髓池内注射。

[0487] 鞘内注射是直接注射到脊柱或蛛网膜下腔。通过直接注射到脊柱的CSF中,本公开的siRNA分子可以直接进入脊柱中的细胞(例如,神经元和小胶质细胞),并且具有可以绕过血脑屏障进入脑部中的细胞的途径。

[0488] 脑室内(ICV)注射是直接注射到脑室CSF中的方法。与鞘内注射类似,ICV是一种绕过血脑屏障的注射方法。使用ICV的优点是可以进入脑部和脊柱的细胞,而不存在治疗剂在血液中降解的危险。

[0489] 纹状体内注射是直接注射到纹状体(striatum)或纹状体(corpus striatum)中。

纹状体是脑部皮层下基底神经节的一个区域。注射到纹状体中绕过了血脑屏障和注射到血流中的药代动力学挑战,并且允许直接进入脑部细胞。

[0490] 实质内施用是直接注射到实质(例如脑实质)中。注射到脑实质中允许直接注射到受疾病或病症影响的脑部区域,同时绕过血脑屏障。

[0491] 通过导管插入在小脑延髓池内注射是直接注射到小脑延髓池中。小脑延髓池是位于小脑和延髓背侧表面之间的脑部区域。注射到小脑延髓池中引起更直接地输送到小脑、脑干和脊髓的细胞。

[0492] 在本文所述的方法的一些实施方案中,治疗组合物可以通过全身施用的方式(例如静脉内、肌内或皮下)递送至受试者。

[0493] 静脉(IV)注射是一种直接注射到受试者血液中的方法。IV施用可以是推注剂量的形式或通过连续输注的方式,或治疗组合物耐受的任何其他方法。

[0494] 肌内(IM)注射是注射到受试者的肌肉,诸如三角肌或臀肌中。IM可以允许治疗组合物的快速吸收。

[0495] 皮下注射是注射到皮下组织中。皮下递送的组合物的吸收可能比IV或IM注射慢,这对于需要连续吸收的组合物可能是有益的。

[0496] 实施例

[0497] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供可如何使用、制备和评价本文所述的组合物和方法的描述,并且所述实施例仅旨在作为本公开的示例而不旨在限制发明人认为是他们的公开内容的范围。

[0498] 实施例1.MS4A6A敲低

[0499] 目标

[0500] 本实施例描述了为研究与人MS4A6A mRNA转录物内特定区域互补的siRNA分子实现减少MS4A6A基因表达的能力而进行的一系列实验的结果。

[0501] 材料和方法

[0502] 以20nM或0.2nM浓度用MS4A siRNA主动转染稳定表达M S4A6A的HEK细胞(HEK-MS4A6A)。24小时后,细胞裂解,并使用标准试剂和Applied Biosystems TaqMan测定法,经由逆转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)评估MS4A6A和管家基因(ATP5B)的mRNA水平。结果呈现为相同测定法中相对于未处理的对照细胞残留的MS4A6A mRNA百分比。

[0503] 结果

[0504] 用本公开的具有如下表3和表4所示的反义链和正义链的siRNA分子处理细胞。siRNA分子的敲低效率是作为在20nM和0.2nM下残留mRNA表达占未处理物的百分比来测量的。敲低结果报告于表3(20nM)和表4(0.2nM)中。

[0505] 表3.在20nM下用本公开的siRNA分子敲低MS4A6A

[0506]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)
193	385	18.03	289	481	41.62
194	386	18.80	290	482	37.47
195	387	36.39	291	483	33.03
196	388	38.52	292	484	23.88
197	389	26.72	293	485	20.44
198	390	19.26	294	486	61.06
199	391	30.97	295	487	51.88
200	392	13.13	296	488	41.71
201	393	35.24	297	489	54.85
202	394	61.09	298	490	19.34
203	395	13.02	299	491	29.00
204	396	40.99	300	492	19.94

[0507]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)
205	397	38.33	301	493	11.57
206	398	23.69	302	494	16.76
207	399	25.35	303	495	22.63
208	400	17.69	304	496	16.23
209	401	23.15	305	497	24.11
210	402	66.35	306	498	13.22
211	403	29.93	307	499	17.45
212	404	69.37	308	500	99.81
213	405	16.93	309	501	48.18
214	406	44.02	310	502	30.25
215	407	58.46	311	503	24.28
216	408	34.53	312	504	13.45
217	409	47.31	313	505	77.97
218	410	36.04	314	506	27.48
219	411	43.77	315	507	15.53
220	412	13.84	316	508	10.30
221	413	21.23	317	509	22.49
222	414	40.14	318	510	12.22
223	415	30.23	319	511	15.33
224	416	24.93	320	512	28.58
225	417	28.60	321	513	17.57
226	418	29.28	322	514	16.29
227	419	69.21	323	515	12.16
228	420	88.56	324	516	23.40
229	421	37.11	325	517	32.36
230	422	32.29	326	518	21.39
231	423	75.50	327	519	32.31
232	424	59.48	328	520	33.87
233	425	43.15	329	521	50.34
234	426	22.27	330	522	28.95
235	427	69.13	331	523	15.44
236	428	73.87	332	524	26.94
237	429	46.62	333	525	28.93
238	430	33.26	334	526	15.00
239	431	93.42	335	527	13.24
240	432	35.95	336	528	49.70
241	433	16.50	337	529	63.30
242	434	32.21	338	530	53.25
243	435	14.18	339	531	14.47
244	436	57.74	340	532	17.91
245	437	16.51	341	533	16.55
246	438	14.35	342	534	16.44
247	439	11.01	343	535	52.40
248	440	46.29	344	536	38.34

[0508]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)
249	441	19.20	345	537	29.62
250	442	23.30	346	538	26.80
251	443	26.75	347	539	24.84
252	444	25.87	348	540	20.08
253	445	19.36	349	541	10.93
254	446	34.32	350	542	24.27
255	447	48.69	351	543	21.05
256	448	20.73	352	544	21.08
257	449	19.54	353	545	16.99
258	450	24.21	354	546	28.28
259	451	38.72	355	547	34.30
260	452	19.56	356	548	13.28
261	453	54.93	357	549	36.39
262	454	36.84	358	550	12.89
263	455	90.59	359	551	17.64
264	456	59.04	360	552	34.04
265	457	36.31	361	553	85.84
266	458	16.14	362	554	19.91
267	459	33.63	363	555	15.55
268	460	31.75	364	556	14.83
269	461	27.08	365	557	17.16
270	462	35.96	366	558	17.83
271	463	39.24	367	559	19.61
272	464	13.78	368	560	18.43
273	465	22.56	369	561	34.44
274	466	27.36	370	562	16.32
275	467	19.37	371	563	13.55
276	468	28.93	372	564	13.90
277	469	22.03	373	565	12.93
278	470	17.25	374	566	13.20
279	471	27.92	375	567	9.43
280	472	28.01	376	568	18.28
281	473	23.14	377	569	13.02
282	474	27.67	378	570	15.14
283	475	21.80	379	571	12.61
284	476	18.17	380	572	12.76
285	477	72.05	381	573	12.91
286	478	33.01	382	574	17.17
287	479	26.51	383	575	12.08
288	480	48.45	384	576	12.47

[0509] 表4.在0.2nM下用本公开的siRNA分子敲低MS4A6A

[0510]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.2 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.2 nM 下占未处理物的百分比)
193	385	77.87	289	481	95.83
194	386	89.78	290	482	97.49
195	387	94.38	291	483	99.56
196	388	96.59	292	484	93.72
197	389	94.74	293	485	100.54
198	390	93.58	294	486	105.32
199	391	91.20	295	487	102.95
200	392	74.18	296	488	96.31
201	393	83.43	297	489	87.37
202	394	94.08	298	490	66.45
203	395	88.71	299	491	87.84
204	396	104.23	300	492	83.85
205	397	104.69	301	493	60.06
206	398	95.38	302	494	81.62
207	399	96.83	303	495	86.99
208	400	82.48	304	496	71.10
209	401	85.18	305	497	84.93
210	402	106.03	306	498	72.88
211	403	102.54	307	499	81.82
212	404	103.04	308	500	93.12
213	405	70.29	309	501	92.30
214	406	110.34	310	502	91.66
215	407	116.37	311	503	78.43
216	408	116.00	312	504	73.15
217	409	104.73	313	505	86.83
218	410	98.82	314	506	84.15
219	411	102.79	315	507	90.02
220	412	68.64	316	508	89.28
221	413	94.26	317	509	89.98
222	414	95.86	318	510	68.51
223	415	94.96	319	511	73.08
224	416	94.69	320	512	95.40
225	417	96.72	321	513	81.98
226	418	95.79	322	514	69.68
227	419	103.80	323	515	56.95
228	420	102.47	324	516	80.44
229	421	92.68	325	517	94.66
230	422	90.53	326	518	76.36
231	423	101.73	327	519	87.43
232	424	101.30	328	520	97.72
233	425	93.27	329	521	98.01
234	426	91.38	330	522	89.84
235	427	103.52	331	523	65.22
236	428	97.97	332	524	70.08

[0511]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.2 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.2 nM 下占未处理物的百分比)
237	429	86.71	333	525	90.77
238	430	92.40	334	526	86.39
239	431	97.78	335	527	68.68
240	432	88.88	336	528	94.56
241	433	95.23	337	529	95.49
242	434	92.36	338	530	97.13
243	435	78.65	339	531	77.17
244	436	99.18	340	532	80.63
245	437	80.85	341	533	81.83
246	438	72.41	342	534	86.00
247	439	44.18	343	535	93.63
248	440	76.42	344	536	92.90
249	441	81.83	345	537	93.35
250	442	77.71	346	538	94.56
251	443	96.80	347	539	95.98
252	444	94.05	348	540	93.35
253	445	54.93	349	541	71.68
254	446	74.16	350	542	87.35
255	447	91.20	351	543	84.84
256	448	71.87	352	544	94.60
257	449	75.82	353	545	80.24
258	450	87.41	354	546	92.84
259	451	81.12	355	547	96.35
260	452	82.61	356	548	70.05
261	453	81.59	357	549	94.00
262	454	79.52	358	550	73.56
263	455	93.59	359	551	85.00
264	456	91.20	360	552	88.88
265	457	89.25	361	553	89.62
266	458	71.33	362	554	74.62
267	459	86.47	363	555	69.17
268	460	83.82	364	556	79.70
269	461	68.05	365	557	70.70
270	462	89.02	366	558	82.53
271	463	88.70	367	559	81.92
272	464	58.95	368	560	80.63
273	465	82.25	369	561	97.69
274	466	81.79	370	562	85.52
275	467	67.37	371	563	70.87
276	468	72.60	372	564	68.38
277	469	72.49	373	565	66.82
278	470	52.73	374	566	54.84
279	471	73.24	375	567	30.96
280	472	63.73	376	568	75.64

[0512]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.2 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.2 nM 下占未处理物的百分比)
281	473	78.52	377	569	46.07
282	474	90.95	378	570	44.37
283	475	85.17	379	571	39.95
284	476	73.22	380	572	40.68
285	477	96.43	381	573	43.08
286	478	82.44	382	574	59.07
287	479	78.94	383	575	36.39
288	480	91.53	384	576	43.58

[0513] 实施例2.靶向MS4A6A的siRNA分子的IC50确定

[0514] 目标

[0515] 本实施例描述了为确定与人MS4A6A mRNA内特定区域互补的siRNA分子的IC50而进行的一系列实验的结果。

[0516] 材料和方法

[0517] 以1fM至100nM浓度用MS4A siRNA主动转染稳定表达MS4A6A的HEK细胞(HEK-MS4A6A)24小时。如上所述,在72小时时使用RT-qPCR评估MS4A6AmRNA的表达,并计算每种化合物的IC50。

[0518] 结果

[0519] 用本公开的具有如下表5所示的反义链和正义链的siRNA分子处理细胞。计算了IC50并将敲低结果报告于表5中。

[0520] 表5.靶向MS4A6A的siRNA分子的IC50

[0521]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	IC50 (pM)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	IC50 (pM)
200	392	194	331	523	76.6
220	412	665	332	524	81.9

[0522]

246	438	437	335	527	145
247	439	281	349	541	81.7
253	445	964	356	548	122
254	446	833	358	550	78.9
266	458	157	363	555	133
272	464	126	371	563	193
272	464	126	372	564	308
275	467	137	373	565	338
276	468	510	374	566	171
278	470	158	375	567	17.2
280	472	136	377	569	48.2
298	490	84.9	378	570	92.8
301	493	585	379	571	52.3
306	498	442	380	572	50.5
312	504	144	381	573	42.9
318	510	66.5	382	574	71.6
319	511	122	383	575	7.23
323	515	20.7	384	576	69.9

[0523] 实施例3.生成靶向MS4A6A的siRNA分子

[0524] 本公开的siRNA分子可通过本领域已知的标准方法合成,如下文进一步讨论的,例如通过使用自动DNA合成仪,诸如可从例如Biosearch,Applied Biosystems,Inc.商购获得的。

[0525] siRNA剂可以使用溶液相或固相有机合成或两者来制备。有机合成提供的优点是可以容易地制备包括非天然或修饰的核苷酸的寡核苷酸。上表1中示出了siRNA分子的具体实例和有义链和反义链的核苷酸序列,以及MS4A6A mRNA靶序列。可以理解的是,本领域技术人员可以将反义(AS)链与相应的有义(S)链退火以产生ds-siRNA分子。可替代地,本领域技术人员可以仅使用反义链来获得ss-siRNA分子。

[0526] 实施例4.优化靶向MS4A6A的siRNA分子

[0527] 对于本文公开的任何小干扰RNA(siRNA)剂,预期对siRNA的修饰可进一步优化分子的功效或生物物理特性(例如,增加血清稳定性或循环半衰期、增加热稳定性、增强跨膜递送和/或靶向特定位置或细胞类型)。此类优化可以通过系统地添加或去除连接的核苷以生成更长或更短的序列来实现。进一步的siRNA优化可以包括并入例如一个或多个替代核苷、替代2'糖部分和/或替代核苷间键联。此外,此类优化的siRNA分子可以包括在5'和/或3'末端引入疏水部分和/或稳定部分。

[0528] 用替代核苷进行siRNA优化

[0529] 本公开的siRNA分子的优化可以包括以下核苷修饰中的一种或多种:5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-CH3)尿嘧啶和胞嘧啶和嘧啶碱基的其它炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧

啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代尤其是5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤，和/或3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。siRNA分子还可包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和/或2-吡啶酮置换的核碱基。本公开的siRNA分子的进一步优化可以包括以下文献中公开的核碱基:US 3,687,808;Kroschwitz,J.I.编辑;The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering,New York,John Wiley&Sons,1990,第858-859页;Englisch等人,Angewandte Chemie,国际版,30:613,1991;以及Sanghvi,Y.S.,第16章,Antisense Research and Applications,CRC Press,Gait,M.J.编辑,1993,第289-302页。

[0530] 用替代糖修饰进行siRNA优化

[0531] 本公开的siRNA分子的优化可以包括以下2'糖修饰中的一种或多种:2'-O-甲基(2'-O-Me);2'-甲氧基乙氧基(2′-O-$CH_2CH_2OCH_3$,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE);2'-二甲氨基氧基乙氧基,即O$(CH_2)_2$ON$(CH_3)_2$基团,也称为2'-DMAOE;和/或2'-二甲氨基乙氧基乙氧基(本领域中也称为2'-O-二甲氨基-乙氧基-乙基或2'-DMAEOE),即2′-O-$CH_2OCH_2N(CH_3)_2$。可以优化本公开的siRNA分子的其他可能的2′-修饰包括所有可能取向的OH;F;O-烷基、S-烷基或N-烷基;O-烯基、S-烯基或N-烯基;O-炔基、S-炔基或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是经取代或未取代的C1至C10烷基或C2至C10烯基和炔基。其他可能的糖取代基基团包括例如氨基丙氧基(-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)、烯丙基(-CH_2-CH=CH_2)、-O-烯丙基(-O-CH_2-CH=CH_2)和氟(F)。2'-糖取代基可以位于阿拉伯糖(上)位置或核糖(下)位置。在一些实施方案中,2'-阿拉伯糖修饰是2'-F。还可在siRNA分子上的其他位置上进行类似的修饰,具体地在3'末端核苷上或在2'-5'连接的寡核苷酸中的糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物诸如环丁基部分来代替戊呋喃糖基糖。

[0532] 用替代核苷间键联进行siRNA优化

[0533] 本公开的siRNA分子的优化可以包括以下核苷间修饰中的一种或多种:硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基膦酸酯(包括3'-亚烷基膦酸酯、5'-亚烷基膦酸酯)、亚膦酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基膦酸酯、硫代烷基磷酸三酯、硒代磷酸酯和具有正常3'-5'键联的硼代磷酸酯、这些的2'-5'连接类似物以及具有反极性的那些,其中一个或多个核苷酸间键联为3'至3'、5'至5'或2'至2'键联。

[0534] 用疏水部分进行siRNA优化

[0535] 本公开的siRNA分子的优化可以包括共价附接至5'末端或3'末端的疏水部分。适合与本公开的siRNA分子一起使用的疏水部分的非限制性实例可包括胆固醇、维生素D、生育酚、磷脂酰胆碱(PC)、二十二碳六烯酸、二十二烷酸、PC-二十二烷酸、二十碳五烯酸、石胆酸或上述疏水部分与PC的任何组合。

[0536] 用稳定部分进行siRNA优化

[0537] 本公开的siRNA分子的优化可以包括保护siRNA分子免于降解的5'-磷稳定部分。5'-磷稳定部分置换5'-磷酸盐以防止磷酸盐水解。5'-磷酸盐的水解防止与RISC的结合,这是基因沉默的必要步骤。本公开中考虑了任何不妨碍与RISC结合的磷酸盐置换。在一些实

施方案中,5'-磷酸的替代品对体内水解也是稳定的。每条siRNA链可以独立地并且任选地采用任何合适的5'-磷稳定部分。适合与本公开的siRNA分子一起使用的5'稳定部分的非限制性实例可以包括上文式IX-XVI所示的那些。

[0538] 用分支siRNA进行siRNA优化

[0539] 本公开的siRNA分子的优化可以包括并入分支模式,例如通过接头连接的二分支、三分支或四分支siRNA。每个主分支可以进一步分支以允许2、3、4、5、6、7或8条单独的RNA单链或双链。接头上的分支点可以源自同一原子,或沿着接头的单独原子。上表2中列出了一些示例性实施方案。

[0540] 本公开的siRNA组合物可以优化为以下形式:二分支siRNA分子,如式XVII-XIX中的任一个所表示;三分支siRNA分子,如式XX-XXIII中的任一个所表示;和/或四分支siRNA分子,如式XXIV-XXVIII中的任一个所表示,其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分(例如,亚磷酰胺、甲苯磺酰化丙酮缩甘油、1,3-二氨基丙醇、季戊四醇、或US10,478,503中描述的分支点部分中的任一种)。

[0541] 实施例5.制备和施用靶向MS4A6A的siRNA分子

[0542] 本公开中的siRNA分子可以配制成药物组合物,以便以适合体内施用的生物相容形式施用于受试者。例如,本公开的siRNA分子可以在合适的稀释剂、载体或赋形剂中施用,并且还可以含有防腐剂,例如,以防止微生物的生长。用于选择和制备合适制剂的常规程序和成分例如在Remington,J.P.The Science and Practice of Pharmacy,Easton,PA.Mack Publishers,2012,第22版和The United States P harmacopeial Convention,The National Formulary,United States Ph armacopeial,2015,USP 38NF 33)中有描述。

[0543] 本公开的方法涵盖了本公开的siRNA组合物耐受的向受试者施用的任何途径。siRNA向CNS注射的非限制性实例包括鞘内注射、脑室内注射、纹状体内注射、实质内注射,或通过经由导管插入在小脑延髓池内注射。全身施用的实例包括静脉内注射、肌肉内注射和皮下注射。具有本领域普通技术的医师可以容易地确定有效的施用途径。

[0544] 实施例6.用于使用靶向MS4A6A的siRNA分子治疗神经炎性疾病的方法

[0545] 需要治疗神经炎性疾病(例如阿尔茨海默病)的受试者用一定剂量的本公开的siRNA分子或siRNA组合物(配制成盐)以从业者确定的频率进行治疗。本领域普通技术的医师可以容易地确定向有需要的哺乳动物受试者(例如,人)施用的siRNA分子的有效量。例如,医师可以以低于获得期望治疗效果所需要的水平开始本公开siRNA分子之一的处方剂量,并逐渐增加剂量直至实现期望效果。可替代地,医师可以通过施用高剂量的本公开的siRNA分子之一来开始治疗方案,并且随后逐渐施用较低的剂量,直至达到产生治疗效果(例如,MS4A6A mRNA或合适生物标志物的表达减少,或阿尔茨海默病相关表型的减少)的最小剂量。一般而言,本公开的siRNA分子之一的合适日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的量。本公开的ss-或ds-siRNA分子可以通过注射施用,例如鞘内注射、脑室内注射、纹状体内注射、实质内注射、静脉内注射、肌肉内注射、皮下注射,或通过经由导管插入在小脑延髓池内注射来施用。本公开的siRNA分子之一的治疗组合物的日剂量可以作为单剂量施用,或者作为在一天、一周、一个月或一年中以适当的间隔单独施用的两个、三个、四个、五个、六个或更多个剂量来施用,任选地,以单位剂型施用。虽然本公开的siRNA分子之一可以单独施用,但它也可以作为与赋形剂、载体和任选地另外的治疗剂组合的药物制剂施用。剂量

和频率根据受试者的身高、体重、年龄、性别和其他病症来确定。

[0546] 本公开的一种或多种siRNA分子由从业者根据与受试者的相容性来选择。有单链或双链siRNA分子(例如,非分支siRNA、二分支siRNA、三分支siRNA、四分支siRNA)可供选择。选择的siRNA分子具有反义链,并且可以具有有义链,有义链具有的序列和RNA修饰(例如天然和非天然核苷间键联、经修饰的糖、5'-磷稳定部分、疏水不分和/或分支结构)最适合患者。

[0547] 通过最适合患者(例如,鞘内、脑室内、纹状体内、实质内、静脉内、肌肉内、皮下,或通过经由导管插入在小脑延髓池内注射)和病状的途径以患者可耐受的速率递送siRNA分子,直至受试者达到最大耐受剂量,或直至症状得到满意改善。

[0548] 其它实施方案

[0549] 本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请以引用的方式并入本文,其引用的程度犹如每个独立的出版物或专利申请被具体地和单独地指出以引用的方式并入。

[0550] 尽管本发明已经结合其具体的实施方案进行了描述,但应当了解能够对它进行进一步的修改并且本申请旨在涵盖任何基本根据本发明的原理而对本发明进行的变动、使用或适应性调整,并且包括虽然不属于本发明但属于本发明所属领域的已知或习用实施手段的和属

[0551] 于上文所述的实质特征的以及符合权利要求范围之内的变更。

[0552] 其他实施方案在权利要求内。