(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118284697 A
(43)申请公布日 2024.07.02

(21)申请号 202280077557.8
(22)申请日 2022.09.22
(30)优先权数据
63/247,556 2021.09.23 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/044406 2022.09.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/049275 EN 2023.03.30
(71)申请人 阿尔奈科学有限责任公司
地址 美国马塞诸塞州舒兹伯利
(72)发明人 苏迪尔·阿格拉瓦尔
(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
专利代理师 赵晓琳
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/712(2006.01)
A61K 31/7125(2006.01)
C07H 21/00(2006.01)

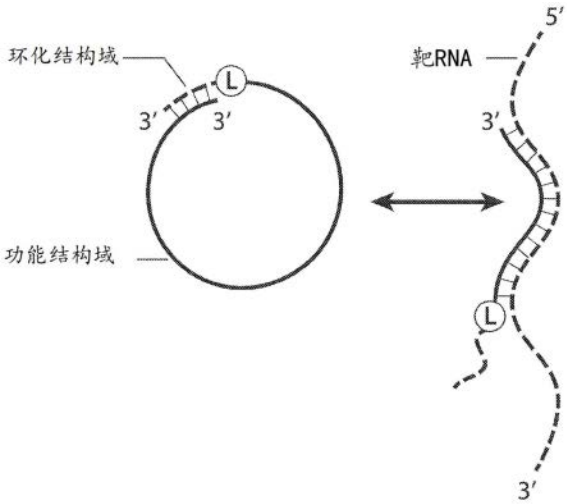
权利要求书7页 说明书52页 附图17页

(54)发明名称

作为治疗剂的环状结构寡核苷酸

(57)摘要

本发明提供称为环状结构寡核苷酸(“CSO”)的寡核苷酸,包含其的组合物,以及使用其的方法,其中所述环状寡核苷酸包含本文所述的功能结构域、环化结构域和接头片段。这种环状寡核苷酸的设计保持环状形式,直到它存在于靶RNA中并与靶RNA杂交。



CN 118284697 A

1.一种环状结构寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和所述环化结构域在其5'端连接;其中所述环化结构域包含长度在4-12个核苷酸之间的寡核苷酸,与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,且其极性与与其互补的功能结构域内的核苷酸序列的极性相反;其中所述环化结构域与所述功能结构域杂交,从而形成环状结构;其中所述功能结构域包含长度在17-25个核苷酸之间的反义寡核苷酸,并且包含与靶RNA序列的等长部分互补的至少12个连续的核碱基,其中所述反义寡核苷酸化合物包含3'结构域和与3'结构区相邻的5'结构域,

其中所述3'结构域的长度为10至12个核苷酸,并且其中每个核苷酸独立地为任何脱氧核糖核苷酸;并且其中相邻脱氧核糖核苷酸之间的每个核苷酸间连接为磷酸二酯或硫代磷酸酯核苷酸间连接或其组合;和

其中所述5'结构域的长度为5-15个核苷酸,并且其中所述5'结构域包含未修饰的脱氧核糖核苷酸、未修饰的核糖核苷酸、修饰的脱氧核苷酸、修饰的核糖核苷酸或其组合,条件是所述5`结构域包含至少1个修饰的脱氧核糖核酸或包含修饰的糖和/或主链的修饰的核糖核酸。

2.根据权利要求1所述的CSO,其中所述3'结构域的长度为12个核苷酸,并且包括从3'端起的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12处的核苷酸。

3.根据权利要求1所述的CSO,其中所述3'结构域的长度为11个核苷酸,并且包括从3'端起的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10和11处的核苷酸。

4.根据权利要求1所述的CSO,其中所述3'结构域的长度为10个核苷酸,并且包括从3'端起的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9和10处的核苷酸。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的CSO,其中所述5'结构域包含至少1个修饰的脱氧核糖核苷酸或包含修饰糖的修饰核糖核苷酸。

6.根据权利要求1-4中任一项所述的CSO,其中所述5'结构域包含至少1个修饰的脱氧核糖核苷酸或包含非磷基主链的修饰的核糖核苷酸。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的CSO,其中所述5'结构域的至少三个核苷酸是修饰的脱氧核糖核苷酸或包含修饰的糖和/或主链的修饰的核糖核苷酸。

8.根据权利要求1-6中任一项所述的CSO,其中所述5'结构域的所有核苷酸是修饰的脱氧核糖核苷酸或包含修饰的糖和/或主链的修饰的核糖核苷酸。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的CSO,其中所述环化结构域的长度为4-6个核苷酸。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的CSO,其中所述环化结构域的核苷酸包括未修饰的脱氧核糖核苷酸、未修饰的核糖核苷酸、修饰的脱氧核苷酸、修饰的核糖核苷酸或其组合。

11.根据权利要求10所述的CSO,其中所述环化的核苷酸包括未修饰的脱氧核糖核苷酸。

12.根据权利要求10所述的CSO,其中所述环化的核苷酸包括修饰的核糖核苷酸。

13.根据权利要求12所述的CSO,其中所述修饰的核糖核苷酸包括2'-取代的核糖核苷酸。

14.根据权利要求13所述的CSO,其中所述2'-取代的核糖核苷酸是2'-OMe核糖核苷酸。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的CSO,其中所述CSO的所述功能结构域和/或所

述环化结构域的所述寡核苷酸的所述核苷酸间连接包括硫代磷酸酯核苷酸间连接、磷酸二酯酶核苷酸间连接或其组合。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的CSO,其中所述接头是直接键。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的CSO,其中所述环化结构域与所述功能结构域杂交,从而形成环状结构。

18.一种环状结构寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和所述环化结构体在其5'端连接;其中所述环化结构域包含长度在4至50个核苷酸之间的寡核苷酸,与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,且其极性与与其互补的功能结构域内的核苷酸序列的极性相反;其中所述环化结构域与所述功能结构域杂交,从而形成环状结构;并且其中所述功能结构域包括siRNA。

19.根据权利要求18所述的CSO,其中所述环化结构域的长度在4-12个核苷酸之间。

20.根据权利要求18或19所述的CSO,其中所述环化结构域连接在所述siRNA的有义链的5'端。

21.根据权利要求18或19所述的CSO,其中所述环化结构域连接在所述siRNA的反义链的5'端。

22.根据权利要求18所述的CSO,其中所述功能结构域是所述siRNA的反义链,并且所述环化结构域是siRNA的有义链。

23.根据权利要求18所述的CSO,其中所述功能结构域是所述siRNA的有义链,并且所述环化结构域是siRNA的反义链。

24.根据权利要求18-23中任一项所述的CSO,其中所述环化结构域的核苷酸包括未修饰的脱氧核糖核苷酸、未修饰的核糖核苷酸、修饰的脱氧核苷酸、修饰的核糖核苷酸或其组合。

25.根据权利要求24所述的CSO,其中所述环化的核苷酸包括未修饰的脱氧核糖核苷酸。

26.根据权利要求24所述的CSO,其中所述环化的核苷酸包括修饰的核糖核苷酸。

27.根据权利要求26所述的CSO,其中所述修饰的核糖核苷酸包括2'-取代的核糖核苷酸。

28.根据权利要求27所述的CSO,其中所述2'-取代的核糖核苷酸是2'-OMe核糖核苷酸。

29.根据权利要求18至28中任一项所述的CSO,其中所述CSO的功能结构域和/或环化结构域的寡核苷酸的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯核苷酸间连接、磷酸二酯酶核苷酸间连接或其组合。

30.根据权利要求18-29中任一项所述的CSO,其中所述环化结构域与所述功能结构域杂交,从而形成环状结构。

31.根据权利要求18-30中任一项所述的CSO,其中所述siRNA被修饰。

32.根据权利要求18-31中任一项所述的CSO,其中所述接头片段是直接键。

33.一种环状结构寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和所述环化结构体在其3'端连接;其中所述环化结构域包含长度在4至400个核苷酸之间的寡核苷酸,与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,且其极性与与其互补的功能结构域内的核苷酸序列的极性相反;其中所述环化结构域与所述功能结构域杂交,从而形成

环状结构;其中功能结构域包括免疫刺激性寡核苷酸或免疫抑制性寡核苷酸;并且其中所述免疫刺激性寡核苷酸或所述免疫抑制性寡核苷酸包含长度在11至400个核苷酸之间的寡核苷酸。

34.根据权利要求33所述的CSO,其中所述免疫刺激性寡核苷酸能够在脊椎动物细胞中诱导干扰素应答。

35.根据权利要求33或34所述的CSO,其中所述免疫刺激性寡核苷酸或所述免疫抑制性寡核苷酸不是反义寡核苷酸并且不具有反义活性。

36.根据权利要求33-35中任一项所述的CSO,其中所述免疫刺激性寡核苷酸或所述免疫抑制性寡核苷酸的长度在17-40个核苷酸之间。

37.根据权利要求36所述的CSO,其中所述免疫刺激性寡核苷酸或所述免疫抑制性寡核苷酸的长度在20至30个核苷酸之间。

38.根据权利要求33-37中任一项所述的CSO,其中所述环化结构域的长度在4至40个核苷酸之间。

39.根据权利要求38所述的CSO,其中所述环化结构域的长度在4至30个核苷酸之间。

40.根据权利要求33-39中任一项所述的CSO,其中所述环化结构域是另一种免疫刺激性寡核苷酸或免疫抑制性寡核苷酸,其中,所述环合结构域的所述免疫刺激性寡聚核苷酸或所述免疫抑制性寡聚寡核苷酸与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,并且其极性与与其互补的功能结构域中的核苷酸序列的极性相反。

41.根据权利要求33-40中任一项所述的CSO,其中所述功能结构域的寡核苷酸被修饰,所述环化结构域的核苷酸被修饰,或者所述功能结构域的寡核苷酸和所述环合结构域的寡聚核苷酸两者都被修饰。

42.根据权利要求33-41中任一项所述的CSO,其中所述接头片段是直接键、长度在2-5个核苷酸之间的单核苷酸或寡核苷酸、或其他化学部分、或其组合。

43.根据权利要求33-42中任一项所述的CSO,其中所述功能结构域的寡核苷酸是免疫刺激性寡核苷酸。

44.根据权利要求33-42中任一项所述的CSO,其中所述功能结构域的寡核苷酸是免疫抑制性寡核苷酸。

45.一种环状结构寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和所述环化结构体通过所述连接体彼此连接,其中所说功能结构域包含长度在15至500个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与靶RNA互补;其中所述环化结构域包含长度在4至400个核苷酸之间的寡核苷酸,与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,且其极性与与其互补的功能结构域内的核苷酸序列的极性相反。

46.根据权利要求45所述的CSO,其中所述功能结构域的寡核苷酸被修饰。

47.根据权利要求45或46所述的CSO,其中所述功能结构域和所述环化结构域在其5'端连接。

48.根据权利要求45或46所述的CSO,其中所述功能结构域和所述环化结构域在其3'端连接。

49.根据权利要求47所述的CSO,其中所述环化结构域与所述功能结构域的寡核苷酸的3'-端杂交,从而形成环状结构。

50.根据权利要求48所述的CSO,其中所述环化结构域与所述功能结构域的寡核苷酸的5'-端杂交,从而形成环状结构。

51.根据权利要求46所述的CSO,其中所述功能结构域的寡核苷酸包括对所述核苷酸间连接、糖、杂环碱基或其组合的修饰。

52.根据权利要求45-51中任一项所述的CSO,其中所述接头片段是直接键、长度在2-5个核苷酸之间的单核苷酸或寡核苷酸、或其他化学部分、或其组合。

53.根据权利要求45-52中任一项所述的CSO,其中所述功能结构域的寡核苷酸选自反义寡核苷酸、小RNA(miRNA)、siRNA、piRNA、hnRNA、ncRNA、snRNA、sgRNA、esiRNA、shRNA、lncRNA、免疫刺激寡核苷酸、基于CRISPR的系统、作用于RNA的腺苷脱氨酶(ADAR)系统或剪接寡核苷酸。

54.一种环状结构寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和所述环化结构体在其5'端连接,其中,所述功能结构域包含长度在15至45个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与靶RNA互补;其中所述环化结构域包含长度在4-12个核苷酸之间的寡核苷酸,与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,且其极性与与其互补的功能结构域内的核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包括反义寡核苷酸,并且其中所述功能结构域的寡核苷酸被修饰。

55.根据权利要求54所述的CSO,其中所述环化结构域的长度在4至10个核苷酸之间。

56.根据权利要求54或55所述的CSO,其中所述环化结构域与所述功能结构域的寡核苷酸的3'-端杂交,从而形成环状结构。

57.根据权利要求54-56中任一项所述的CSO,其中所述功能结构域的寡核苷酸包括对所述核苷酸间连接、糖、杂环碱基或其组合的修饰。

58.根据权利要求54-57中任一项所述的CSO,其中所述接头片段是直接键、长度在2-5个核苷酸之间的单核苷酸或寡核苷酸、或其他化学部分、或其组合。

59.根据权利要求54-58中任一项所述的CSO,其中所述功能结构域的寡核苷酸选自反义寡核苷酸、小RNA(miRNA)、piRNA、hnRNA、ncRNA、snRNA、sgRNA、esiRNA、shRNA或lncRNA。

60.一种环状结构寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和所述环化结构体在其5'或3'端连接,其中,所述功能结构域包含长度在15至100个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与靶RNA互补;其中所述环化结构域包含长度在4至100个核苷酸之间的寡核苷酸,与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,且其极性与与其互补的功能结构域内的核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包括siRNA。

61.根据权利要求60所述的CSO,其中所述环化结构域连接在所述siRNA的有义链的5'端或所述siRNA的反义链的5'端。

62.根据权利要求60所述的CSO,其中所述功能结构域是所述siRNA的反义链,并且所述环化结构域是siRNA的有义链,并连接在所述反义链的3'端或5'端。

63.根据权利要求62所述的CSO,其中所述环化结构域连接到所述功能结构域的5'端。

64.根据权利要求62所述的CSO,其中所述环化结构域连接到所述功能结构域的3'端。

65.根据权利要求60-63中任一项所述的CSO,其中所述环化结构域与所述功能结构域的寡核苷酸的3'-端杂交,从而形成环状结构。

66.根据权利要求60、62或64中任一项所述的CSO,其中所述环化结构域与所述功能结

构域的寡核苷酸的5'-端杂交,从而形成环状结构。

67.根据权利要求60-66中任一项所述的CSO,其中所述siRNA被修饰。

68.根据权利要求60-67中任一项所述的CSO,其中所述接头片段是直接键、长度在2-5个核苷酸之间的单核苷酸或寡核苷酸,或其他化学部分,或其组合。

69.一种环状结构寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和所述环化结构体在其5'端连接,其中,所述功能结构域包含长度在15至45个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与靶RNA互补;其中所述环化结构域包含长度在4-12个核苷酸之间的寡核苷酸,与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,且其极性与与其互补的功能结构域内的核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包括剪接寡核苷酸,并且其中所述功能结构域的寡核苷酸被修饰。

70.根据权利要求69所述的CSO,其中所述环化结构域的长度在4至10个核苷酸之间。

71.根据权利要求69或70所述的CSO,其中所述环化结构域与所述功能结构域的寡核苷酸的3'-端杂交,从而形成环状结构。

72.根据权利要求69-71中任一项所述的CSO,其中所述功能结构域的寡核苷酸包括对所述核苷酸间连接、糖、杂环碱基或其组合的修饰。

73.根据权利要求69-72中任一项所述的CSO,其中所述连接片段是直接键、长度在2-5个核苷酸之间的单核苷酸或寡核苷酸、或其他化学部分、或其组合。

74.一种环状结构寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和所述环化结构体在其5'端连接,其中,所述功能结构域包含长度在15至500个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与靶RNA互补;其中所述环化结构域包含长度在4-12个核苷酸之间的寡核苷酸,与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,且其极性与与其互补的功能结构域内的核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包含作用于RNA系统的腺苷脱氨酶的反义寡核苷酸(ADAR)或基于CRISPR的系统的反义寡聚核苷酸或引导RNA。

75.根据权利要求74所述的CSO,其中所述环化结构域与所述功能结构域的寡核苷酸的3'-端杂交,从而形成环状结构。

76.根据权利要求74或75所述的CSO,其中所述接头片段是直接键、长度在2-5个核苷酸之间的单核苷酸或寡核苷酸、或其它化学部分、或其组合。

77.一种环状结构寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和所述环化结构体在其3'端连接,其中所所述功能结构域包含长度在11至400个核苷酸之间的寡核苷酸;其中所述环化结构域包含长度在4至400个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,且其极性与与其互补的功能结构域内的核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包括免疫刺激性寡核苷酸。

78.根据权利要求77所述的CSO,其中所述环化结构域连接在所述功能结构域的5'端。

79.根据权利要求77所述的CSO,其中所述环化结构域连接到所述功能结构域的3'端。

80.根据权利要求77或78所述的CSO,其中所述环化结构域与所述功能结构域的寡核苷酸的3'端杂交,从而形成环状结构。

81.根据权利要求77或79所述的CSO,其中所述环化结构域与所述功能结构域的寡核苷酸的5'端杂交,从而形成环状结构。

82.根据权利要求77-81中任一项所述的CSO,其中所述环化结构域是另一种免疫刺激

寡核苷酸,其中,所述环状结构域的所述免疫刺激寡核苷酸与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,且其极性与与其互补的功能结构域中的核苷酸序列的极性相反。

83.根据权利要求77-82中任一项所述的CSO,其中所述功能结构域的所述免疫刺激寡核苷酸被修饰,所述环化结构域的免疫刺激寡核苷酸被修饰,或者所述功能结构域的免疫激励寡核苷酸受到修饰和所述环合结构域的免疫刺激寡核苷酸两者均被修饰。

84.根据权利要求77-83中任一项所述的CSO,其中所述接头片段是直接键、长度在2-5个核苷酸之间的单核苷酸或寡核苷酸、或其他化学部分、或其组合。

85.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-84中任一项所述的CSO和药学上可接受的载体。

86.根据权利要求85所述的药物组合物,其进一步包含选自小分子、肽、疫苗、抗原、抗体、细胞毒性剂、激酶抑制剂、过敏原、抗生素、siRNA分子、反义寡核苷酸、TLR拮抗剂、化疗剂、靶向治疗剂、活化细胞、蛋白质、基因治疗载体、肽疫苗、蛋白质疫苗、DNA疫苗、佐剂和共刺激分子的一种或多种试剂,或其组合。

87.一种抑制基因表达的方法,包括施用根据权利要求1-84中任一项的环状结构寡核苷酸或根据权利要求85或86的组合物。

88.一种抑制等位基因特异性基因表达的方法,包括施用权利要求1-84中任一项所述的环状结构寡核苷酸或权利要求85或86所述的组合物。

89.根据权利要求88所述的方法,其中靶等位基因包括点突变。

90.一种用于调控RNA加工的方法,包括施用权利要求1-84中任一项所述的环状结构寡核苷酸或权利要求85或86所述的组合物。

91.一种在包含至少两种mRNA转录物的基因中选择第一mRNA转录物的方法,所述方法包括施用权利要求1-84中任一项所述的环状结构寡核苷酸或权利要求85或86所述的组合物。

92.一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其中调控RNA加工将有益于治疗所述受试者,所述方法包括施用权利要求1-84中任一项所述的环状结构寡核苷酸或权利要求85或86所述的组合物。

93.一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其中抑制基因表达将有益于治疗所述受试者,所述方法包括施用权利要求1-84中任一项所述的环状结构寡核苷酸或权利要求85或86所述的组合物。

94.一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其中诱导免疫应答将有益于治疗所述受试者,所述方法包括施用权利要求1-84中任一项所述的环状结构寡核苷酸或权利要求85或86所述的组合物。

95.一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其中抑制免疫应答将有益于治疗所述受试者,所述方法包括施用权利要求1-84中任一项所述的环状结构寡核苷酸或权利要求85或86所述的组合物。

96.一种诱导靶RNA的无义介导衰减的方法,包括施用权利要求1-84中任一项所述的环状结构寡核苷酸或权利要求85或86所述的组合物。

97.一种增加编码蛋白质或功能性mRNA的mRNA水平并增加所述蛋白质或所述功能性mRNA表达的方法,包括施用权利要求1-84中任一项所述的环状结构寡核苷酸或权利要求85

或86所述的组合物。

98.根据权利要求87-93、96或97中任一项所述的方法,其中所述方法可用于治疗患有疾病或病症的受试者,其中基因的调控表达将是有益的。

99.根据权利要求98所述的方法,其中所述疾病或病症由细胞基因的异常表达或产物引起。

100.根据权利要求87-99中任一项所述的方法,其中所述CSO是局部施用的。

作为治疗剂的环状结构寡核苷酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据《美国法典》第35篇第119(e)要求于2021年9月23日提交的序列号为63/247,556的美国专利临时申请的权益。上述引用的申请的内容在此通过引用整体并入本文作为参考。

背景技术

[0003] 反义寡核苷酸通过多种机制调控靶RNA的加工和翻译。这些包括通过RNase-H裂解靶RNA、调控异常剪接、加工靶RNA和增加翻译、通过空间位阻抑制翻译等。靶RNA可以是mRNA,也可以是非编码RNA。在其他机制中,双链siRNA的反义链可以被整合到AGO中,并通过siRNA机制抑制翻译。在其他机制中,如基于ADAR或CRISPR的模型,反义可以编辑RNA或DNA,从而调节翻译和加工。

[0004] 多年来,人们已经了解到反义杂交和亲和力会影响对靶RNA的选择性。此外,为了使用反义核酸作为药物,核酸酶的稳定性是重要的,稳定性是通过修饰核苷酸间的连接来提供,所述连接例如,硫代磷酸酯。

[0005] 假设核酸酶稳定性是效价的关键,由于反义核酸的降解显示为从3'端开始,因此重点是修饰3'端以减缓降解。这些设计包括在3'端加帽,在3'端加发夹环,产生具有包含3'-3'连接的二级结构的寡核苷酸,或在其3'端连接两(2)个反义寡核苷酸。这些类型的反义核酸表现出增加的核酸酶稳定性,但反义核酸的效力没有得到改善。不幸的是,这些修饰也增加了炎性反应,从而限制了治疗指数。

[0006] DNA和RNA以及含有硫代磷酸酯的2'-取代RNA都被作为反义药物进行了研究,并提供了不同的特性。当与RNA杂交时,DNA硫代磷酸反义寡核苷酸激活RNase H,而RNA或2'-取代RNA反义寡核苷酸以更高的亲和力与RNA结合,而不激活RNase H。为了进一步改善反义特性,反义寡核苷酸中采用了这两种修饰的混合物,通常称为杂交或缺口聚物(gapmer)反义寡核苷酸。在大多数研究的缺口聚物反义核酸中,修饰的RNA片段位于3'和5'端,而DNA位于中间。缺口聚物反义寡核苷酸是研究最广泛的反义寡核苷酸,采用这种化学物质的药物已获批准,且正在临床开发中。

[0007] DNA和RNA硫代磷酸酯的副作用之一是与蛋白质相互作用,更具体地说是与模式识别受体(PRR)家族相互作用。这些相互作用导致免疫级联反应的诱导,从而引起脱靶作用机制和相关的安全信号。详细的构效关系研究表明,免疫激活需要DNA和RNA硫代磷酸酯反义核酸5'端的可及性。含有两个5'端的硫代磷酸DNA和RNA显示出增强的免疫刺激活性。相比之下,以前的研究表明,含有两个3'端(且缺少5'端)的硫代磷酸DNA和RNA仅表现出轻微的炎性反应。

[0008] 在继续努力改善作为治疗剂的DNA和修饰RNA硫代磷酸酯反义核酸的特性时,考虑了寡核苷酸的结构变化。例如,在早期研究中,报告了自稳定寡核苷酸,其中在3'端含有发夹环区域的寡DNA硫代磷酸酯("PS-寡核苷酸")提供了增加的体内核酸酶稳定性和有限的生物活性。迄今为止,重点一直是通过各种修饰(包括在缺口聚物反义中)修饰3'端来提高

反义的稳定性。

[0009] 尽管已经取得了进展,但是仍然需要开发具有改进性质的反义寡核苷酸,以用作治疗剂和用于诊断应用。

发明内容

[0010] 本发明提供了一类结构寡核苷酸,在本文中称为“环状结构寡核苷酸”(CSO),或等效地称为“环状寡核苷酸”。在CSO中,两种寡核苷酸相互连接(直接或通过接头片段)。称为“功能结构域”的一种寡核苷酸向CSO提供功能(例如,功能段可以是反义寡核苷酸或免疫刺激寡核苷酸),称为“环化结构域”的第二种寡核苷酸包括与功能结构域的末端互补的核苷酸序列(例如,图1A-图1C)。

[0011] 由于功能结构域和环化结构域之间的互补性,CSO采用分子内环状结构,形成分子内双链体。这种分子内双链体的形成改变了功能结构域的形状和寡核苷酸末端的可及性。这种结构结合了关键属性,创造了最佳的反义和寡核苷酸及核酸为基础的治疗。

[0012] 在基因和RNA表达调控中,这种结构掩盖了5’端,从而减少了与PRR的相互作用,并允许内体逃逸。一旦进入细胞质或细胞核,环状结构将在靶RNA存在下打开,因为功能结构域和靶RNA序列的亲和力高于功能结构域和环化结构域之间的亲和力。当CSO为分子内环状时,由于暴露的硫代磷酸酯键更少,因此可能表现出较少已知与PS-寡核苷酸相关的聚阴离子相关的副作用(如补体激活和部分促凝血酶原激酶时间延长)。此外,CSO会降低蛋白结合。

[0013] 根据本发明的CSO可以使用合成组成寡核苷酸的标准技术制备,并且可用于功能寡核苷酸和核酸有用的所有目的。

[0014] 上述内容仅概括了本发明的某些方面,并不意味着也不应该被解释为以任何方式限制本发明。本说明书中引用的所有专利、专利申请和其他出版物在此全部引入作为参考。

附图说明

[0015] 图1A至图1C描述了根据本发明的环状结构寡核苷酸的各种实施方案。虚线表示环化结构域。实线代表功能结构域。L表示功能结构域和环化结构域直接或通过接头的连接。如图1A所示,环状结构的寡核苷酸保持环状形式,直到它存在于靶RNA中并与靶RNA杂交。在该实施方案中,功能结构域是与靶RNA互补的反义寡核苷酸。环状结构的寡核苷酸可以通过各种作用机制发挥作用,这取决于功能结构域的寡核苷酸的性质,这将在本文中进一步描述。图1B描述了根据本发明的CSO的一个实施方案,其中功能结构域的寡核苷酸是本文所述的分裂体(splitmer)。图1C描绘了根据本发明的CSO的一个实施方案,其中所述功能结构域的寡核苷酸是本文所述的剪接寡核苷酸。

[0016] 图2A和2B描述了根据本发明的环状结构寡核苷酸的各种实施方案,其中功能结构域的寡核苷酸是siRNA。图2A描述了一个实施方案,其中环化结构域连接在siRNA链的一条链的5’端。环化结构域可以连接到siRNA的反义链或有义链上。短虚线表示环化结构域。实线代表siRNA的有义链。虚线代表siRNA的反义链。L代表接头。图2B描绘了根据本发明的环状结构化寡核苷酸的另一个实施方案,其中功能结构域的寡核苷酸是siRNA的反义链(虚线),并且其中环化结构域(实线)连接在5’端。在该实施方案中,有义链与反义链连接,也作

为环化结构域。或者,如果图2B,功能结构域是siRNA链的有义链(虚线),环化结构域(实线)连接在5'端。在该实施方案中,反义链与有义链连接,也作为环化结构域。

[0017] 图3描述了根据本发明的CSO的递送以及其从内体释放到细胞质中,递送中功能结构域的寡核苷酸是基因调节寡核苷酸。

[0018] 图4A和图4B描绘了根据本发明的环状结构化寡核苷酸的示例性实施方案,其中功能结构域的寡核苷酸包含免疫刺激性寡核苷酸,并且其中不同长度的环化结构域连接在3'端。图4B描述了化合物编号为53和54的示例性环状结构。

[0019] 图5描述了Hepa1-6细胞中PCSK9的敲除。

[0020] 图6A至图6C描绘了在HepG2细胞中PNPLA3的敲除。

[0021] 图7描述了根据本发明的CSO的免疫刺激活性,其中与非环状TLR9激动剂相比,功能结构域的寡核苷酸是TLR9激动剂。

[0022] 图8描述了不同接头(即,直接键与三乙二醇)对本发明的CSO的免疫刺激活性的影响,其中所述功能结构域的寡核苷酸是TLR9激动剂。

[0023] 图9描述了不同长度的环化结构域对本发明的CSO的免疫刺激活性的影响,其中所述功能结构域的寡核苷酸是TLR9激动剂。

[0024] 图10描述了不同长度和不同连接体的环化结构域对本发明CSO的免疫刺激活性的作用,其中所述功能结构域的寡核苷酸是TLR9激动剂。

[0025] 图11描述了将环化结构域连接到功能结构域的5'或3'上对本发明的CSO的免疫刺激活性的影响,其中功能结构域的寡核苷酸是TLR9激动剂。

[0026] 图12描述了磷酸二酯核苷酸间连接对本发明的CSO的免疫刺激活性的影响,其中所述功能结构域的寡核苷酸是TLR9激动剂。

[0027] 图13描述了本发明的CSO的活性,其中功能结构域的寡核苷酸是TLR9拮抗剂。如图13所示,这些化合物不产生免疫应答。

[0028] 图14描述了本发明的CSO阻断TLR9激动剂的免疫刺激活性的能力,其中所述功能结构域的寡核苷酸是TLR9拮抗剂。

具体实施方式

[0029] 应当理解,上述的一般描述和下文的详细描述都只是示例性和解释性的,而不是限制性的。

[0030] 除非另有特别说明,在本文中,单数的使用包括复数。如本文所用,"或"的使用表示"和/或",除非另有说明。此外,术语"包括(including)"以及诸如"包括(includes)"和"包括(included)"的其他形式的使用不是限制性的。此外,诸如"元件"或"组件"之类的术语包括包含一个单元的元件和组件以及包含多于一个子单元的元件和组件,除非另有特别说明。

[0031] 此处使用的章节标题仅用于组织目的,不应理解为对所述主题的限制。本申请中引用的所有文件或文件的一部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文,在此通过引用明确并入本文所讨论的文件部分及其全部。

[0032] 为了清楚和简明的描述,在此可以将特征描述为本发明的相同或单独的方面或实施方案的一部分。本领域技术人员将会理解,本发明的范围可以包括具有作为相同或单独

实施方案的一部分在此描述的所有或一些特征的组合的实施方案。

[0033] 在整个公开内容中,本发明的各个方面可以以范围格式呈现。应该理解,范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,不应该被理解为对本发明范围的不灵活的限制。因此,范围的描述应该被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,诸如从1到6的范围的描述应当被认为具有具体公开的子范围,诸如从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等。以及具有该范围的单个数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围有多广,这都适用。

[0034] 如本文所用,术语“大约”将被本领域普通技术人员理解,并且将根据其使用的上下文在一定程度上变化。如在此所使用的,当涉及诸如量、时间持续时间等的可测量值时,术语“大约”意味着包括与指定值的±20%或±10%的变化,包括±5%、±1%和±0.1%的变化,因为这样的变化适合于执行所公开的方法。

[0035] 本发明提供了称为环状结构寡核苷酸(“CSO”)的寡核苷酸,其包含功能结构域、环化结构域和接头片段。除非另有说明,功能结构域和环化结构域在其5’端通过5’-5’连接。或者,在一些实施方案中,功能结构域和环化结构域在它们的3’端通过3’-3’键连接。

[0036] 在实施方案中,环化结构域通过5’-5’键与5’端的功能结构域连接。在这种构型中,环化结构域与功能结构域的寡核苷酸的3’端杂交,从而形成环状结构(例如,图1A-图1C)。环状寡核苷酸的这种设计保持环状形式,直到它存在于靶RNA中并且功能结构域与靶RNA杂交。这种结构允许增加特异性。

[0037] 在实施方案中,环化结构域在3’端通过3’-3’连接与功能结构域连接。在这种构型中,环化结构域与功能结构域的寡核苷酸的5’端杂交,从而形成环状结构。

[0038] 功能结构域为CSO提供所需的功能。例如,对于基因表达调控,功能结构域的寡核苷酸与靶RNA互补。

[0039] 在实施方案中,功能结构域和环化结构域的寡核苷酸是DNA或RNA或其组合。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸是DNA或RNA或其组合。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸是DNA或RNA或其组合。

[0040] 在实施方案中,功能结构域和/或环化结构域的寡核苷酸是未修饰的。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸是未修饰的。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸是未修饰的。在实施方案中,功能结构域和环化结构域的寡核苷酸是未修饰的。

[0041] 在实施方案中,功能结构域和/或环化结构域的寡核苷酸的至少一个核苷酸被修饰。在实施方案中,功能结构域和/或环化结构域的寡核苷酸的两个或多个核苷酸被修饰。

[0042] 在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸被修饰。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸包括核苷酸间连接、糖、杂环碱基或其组合的修饰。这些修饰也可以适当地置于功能结构域的寡核苷酸内的特定位置。其它化学和修饰在寡核苷酸领域是已知的,其可以根据本公开内容容易地使用,并且包括在本文寡核苷酸上下文中使用的术语“修饰”中。如本文所用,术语“功能结构域的寡核苷酸”或“功能结构域”可互换使用。

[0043] 在实施方案中,功能结构域包含长度在15至500个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸的长度为17和300个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸长度为17和200个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸的长度为17和100个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸长度为17和50个核苷酸。

[0044] 在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸长度为50和250个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸长度为50和150个核苷酸。

[0045] 在实施方案中,功能结构域包含长度在15至50个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,功能结构域包含长度在17和40个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,功能结构域包含长度在17和25个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸长度为17和22个核苷酸。

[0046] 在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸的长度为17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为17个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为18个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为19个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为20个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为21个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为22个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为23个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为24个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为25个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为26个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为27个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为28个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为29个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为30个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为31个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为32个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为33个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为34个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为35个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为36个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为37个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为38个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为39个核苷酸。在实施方案中,功能结构域的长度为40个核苷酸。

[0047] 在实施方案中,功能结构域包括但不限于选自反义寡核苷酸、microRNA(miRNA)、siRNA、piRNA、hnRNA、ncRNA、snRNA、sgRNA、esiRNA、shRNA、lncRNA、基于CRISPR的系统、作用于RNA的腺苷脱氨酶(ADAR)系统或剪接寡核苷酸的寡核苷酸。在实施方案中,功能结构域包括但不限于选自免疫刺激寡核苷酸或免疫抑制寡核苷酸的寡核苷酸,也称为免疫拮抗寡核苷酸。

[0048] 对功能结构域的寡核苷酸的核苷酸和核苷酸间连接的唯一限制是它们不消除(a)环化结构域在所需条件下与CSO的功能结构域杂交并形成双链体的能力,和(b)功能结构域执行其预期功能的能力(例如,在功能结构域是反义寡核苷酸的情况下,在生理条件下与互补RNA片段杂交并形成双链体的能力,该双链体是RNase H的底物)。优选的核苷酸和核苷酸间连接将增强CSO对核酸酶和其他形式的化学降解的稳定性和/或增强功能结构域执行其预期功能的能力。

[0049] 在实施方案中,功能结构域的核苷酸间连接是硫代磷酸酯核苷酸间连接、磷酸二酯核苷酸间连接或其组合。

[0050] 环化结构域的寡核苷酸与功能结构域内的核苷酸序列互补,其极性与与其互补的功能结构域内的核苷酸序列的极性相反。

[0051] 在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸被修饰。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸包括核苷酸间连接、糖、杂环碱基或其组合的修饰。这些修饰也可以位于环化结构域的寡核苷酸内的特定位置。如本文所用,术语“环化结构域的寡核苷酸”或“环化结构域”可互

换使用。

[0052] 在实施方案中,环化结构域的核苷酸间连接是硫代磷酸酯核苷酸间连接、磷酸二酯核苷酸间连接或其组合。

[0053] 在实施方案中,环化结构域包含长度在4至400个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在4至100个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在4至75个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在4至50个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在4至40个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在4至30个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在4至25个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在4至12个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在4至10个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在4至6个核苷酸之间的寡核苷酸。

[0054] 在实施方案中,环化结构域包含长度在5至8个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸的长度为4、5、6、7、8、9或10个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为4个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为5个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为6个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为7个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为8个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为9个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为10个核苷酸。

[0055] 在实施方案中,环化结构域包含长度在15至40个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在17和30个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸的长度为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为15个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为16个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸的长度为17个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为18个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为19个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为20个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为21个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸的长度为22个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为23个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为24个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为25个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为26个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为27个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为28个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为29个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸的长度为30个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸的长度为31个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为32个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为33个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为34个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸的长度为35个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为36个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸的长度为37个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为38个核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸长度为39个核苷酸。在实施方案

中,环化结构域的寡核苷酸长度为40个核苷酸。

[0056] 如本文所用,术语“极性”是指一级结构中的方向性概念(例如,对于DNA和RNA,3′→5′和5′→3′,或者对于PNA,N端→C端(或者相反))。在本发明的CSO包括例如通过Watson-Crick碱基配对以反平行方式杂交的寡核苷酸的情况下,环化结构域将处于5′→3′(或2′)构型,并且其在功能结构域中互补的核苷酸序列将处于3′(或2′)→5′构型。CSO中的极性变化可以发生在CSO中除环化结构域和与环化结构域互补的功能结构域中核苷酸序列之外的任何位置。在CSO包含寡核苷酸的优选实施方案中,功能结构域为3′→5′构型,环化结构域为5′→3′构型,使得功能结构域和环化结构域通过5′-5′键连接。在一些实施方案中,功能结构域处于5′→3′构型,环化结构域处于3′→5′构型,使得功能结构域和环化结构域通过3′-3′键连接。

[0057] 在实施方案中,功能结构域和环化结构域通过接头片段彼此共价连接。在实施方案中,接头片段是直接键、长度在2至5个核苷酸之间的核苷酸或寡核苷酸、或其它化学部分、或其组合。在一些实施方案中,接头片段可以是可切割的。

[0058] 对接头片段的唯一限制是它不消除CSO的基本功能,即(a)CSO在目的条件(例如生理条件)下形成分子内环状结构的能力和(b)功能结构域实现其预期功能的能力。优选的“其它化学部分”接头包括但不限于C_2-C_6烷基、乙二醇、三(乙二醇)、四(乙二醇)、五(乙二醇)、六(乙二醇)和-NH$(CH_2)_n$NH-,其中n是2、3、4、5或6。或者,接头片段可以是上述的组合。在一个优选的实施方案中,接头是直接键,在这种情况下,功能结构域和环化结构域是直接结合的。在一个实施方案中,接头是乙二醇。在实施方案中,接头是C_2-C_6烷基。在实施方案中,接头是C_2烷基。在实施方案中,接头是C_3烷基。在实施方案中,接头是C_4烷基。在实施方案中,接头是C_5烷基。在实施方案中,接头是C_6烷基。

[0059] 功能结构域的寡核苷酸具有末端和接头末端。顾名思义,接头末端是通过接头片段与环化结构域连接的寡核苷酸末端。一般而言,构建CSO时,功能结构域的末端将与环化结构域形成双链体,即环化结构域与功能结构域的末端互补。

[0060] 如本文所用,术语“互补的”是指在选定(例如生理)条件下(或在评估寡核苷酸的“互补性”的情况下上下文可能需要的某种程度的互补性)彼此优先于其它杂环碱基氢键结合的一对核碱基(或简单地“碱基”)。当碱基是修饰或未修饰的、天然或合成的嘌呤和嘧啶时,术语“互补的”是指Watson Crick意义上的互补。

[0061] 当发现一对核酸的至少一条链中的每个碱基与它的互补碱基对相反时,这种链被认为与其在另一条链中的序列完全互补。当发现这种链的一个或多个碱基与除其互补碱基对之外的任何其他碱基相对时,该碱基被视为“错配”,该链被视为部分互补。因此,链可以具有不同程度的部分互补(例如,0%<x<100%互补),直到没有碱基对齐,此时它们是非互补的(例如,0%互补)。如本领域技术人员容易理解和认识到的,核酸链(例如寡核苷酸、反义或其它)的杂交不需要完全(即完全,100%)互补。

[0062] 在实施方案中,靶RNA可以是mRNA、前mRNA、ncRNA、lncRNA或microRNA。在实施方案中,靶RNA是mRNA。

[0063] 在实施方案中,根据本发明的环状结构寡核苷酸是包含药学上可接受的载体的药物组合物的一部分。

[0064] 包含本发明环状结构寡核苷酸的药物组合物还可包含用于治疗或预防疾病或病

症的任何其它试剂或疗法,并且不减弱本发明环状结构寡核苷酸的基因表达调节作用。用于治疗或预防所述疾病或病症的试剂包括但不限于小分子、肽、疫苗、抗原、抗体(优选单克隆抗体)、细胞毒性剂、激酶抑制剂、过敏原、抗生素、siRNA分子、反义寡核苷酸、TLR拮抗剂(例如TLR3和/或TLR7的拮抗剂和/或TLR8的拮抗剂和/或TLR9的拮抗剂)、化疗剂(传统化疗和现代靶向治疗)、靶向治疗剂、活化细胞、肽、蛋白质、基因治疗载体、肽疫苗、蛋白质疫苗、DNA疫苗、佐剂和共刺激分子(例如细胞因子、趋化因子、蛋白质配体、反式激活因子、肽或包含修饰的氨基酸的肽)或其组合。或者,本发明的环状结构寡核苷酸可与其它化合物(例如与脂质或脂质体配制,并与肽、抗体或小分子缀合)联合给药,以增强本发明环状结构寡核苷酸的基因表达调控的特异性或幅度。

[0065] 在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间连接。在实施方案中,至少一半的核苷酸间连接是硫代磷酸酯。在实施方案中,所有的核苷酸间连接都是硫代磷酸酯。

[0066] 在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸是单链的。

[0067] 在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸在其整个长度上与靶RNA的一部分至少90%互补。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸在其整个长度上与靶RNA的一部分至少95%互补。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸在其整个长度上与靶RNA的一部分至少97%互补。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸在其整个长度上与靶RNA的一部分至少98%互补。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸在其整个长度上与靶RNA的一部分至少99%互补。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸在其整个长度上与靶RNA的一部分至少100%互补。

[0068] 在实施方案中,其中功能结构域的寡核苷酸是基于CRISPR的系统的寡核苷酸或作用于RNA的腺苷脱氨酶(ADAR)系统,那么寡核苷酸与靶RNA互补的部分(互补域)在其整个长度上与靶RNA的一部分至少90%互补,优选至少95%互补,优选至少97%互补,优选至少98%互补,优选至少99%互补,或优选至少100%互补。

[0069] 在本文所述的任何化合物、组合物或方法中,本发明的CSO不是具有序列3'-CGGTCACTCCTCCGTGCG-5'-5'-GCCAGT-3'、3'-CGGTCACTCCTCCGTGCG-5'-5'-GCGAAT-3'、5'-GCGTGCCTCCTCACTGGC-3'-3'-CGCACG-5'、5'-GCGTGCCTCCTCACGGC-3'-3'-GGAACC-5'、5'-GCGTGCCTCCTCACTGGC-3'-3'-CGCAC-5'、5'-GCGTGCCTCCTCA CTGGC-3'-3'-GGAACCG-5'、5'-GCGTGCCTCCTCACTGGC-3'-3'-CGCACGGA-5'、5'-GCGTGCCTCCTCACTGGC-3'-3'-GGAAC-5'、或5'-GCGTGCCTCCTCACTGGC-3'-3'-GGAACAG-5'的寡核苷酸。

[0070] 功能结构域

[0071] 在各种实施方案中,CSO的功能结构域是下文进一步描述的寡核苷酸。除非另有说明,否则CSO的环化结构域和接头如上所述。

[0072] 基因表达的抑制

[0073] 在实施方案中,本发明提供了环状结构寡核苷酸(CSO),其包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和环化结构域在其5'端连接,其中所述功能结构域包含长度为15至45个核苷酸的寡核苷酸,并且与靶RNA互补;其中所述环化结构域包含长度在4至12个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,并且其极性与它所互补的功能结构域中的核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包含基因调节寡核

苷酸。在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸被修饰。

[0074] 在实施方案中,功能结构域的基因调节寡核苷酸(即,可调节靶基因表达的寡核苷酸)包括但不限于反义寡核苷酸、microRNA(miRNA)、piRNA、hnRNA、ncRNA、snRNA、sgRNA、esiRNA、shRNA或lncRNA。

[0075] 在实施方案中,反义寡核苷酸的修饰包含至少一个修饰的碱基、糖和/或核苷酸间连接。

[0076] 如本文所示,包含通过5'-5'键连接到环化结构域的反义寡核苷酸的本发明的CSO令人惊讶地显示出增加的效力。该观察结果与早期的假设(即增加的稳定性(例如,3'-3'连接的寡核苷酸)将转化为增加的效力)完全相反。此外,5'端的缺失将使CSO的反义寡核苷酸的炎症性降低。这种设计允许反义寡核苷酸展开为线性结构,并在靶RNA表达的细胞中具有活性。

[0077] 在CSO是反义寡核苷酸的情况下,它是环状的,直到存在互补的靶RNA,它采用线性形式并与靶RNA结合。从环状形式到线性形式的变化可以通过热熔融和RNase H裂解研究得到证实。以线性形式,功能结构域与互补靶RNA杂交(在生理条件下,至少)形成双链体。该双链体是RNase H的底物,在RNase H存在和适当条件(如生理条件)下,双链体的RNA链会被RNase H切割,从而阻止表达。

[0078] 包含反义功能结构域的CSO在细胞培养中保持活性。这些CSO可预见的优势在于,其分子内环状结构的形成可减少与非靶向大分子(包括核酸和蛋白质)的相互作用,具有减少的聚阴离子相关副作用,并且仅在存在靶向基因或RNA时会线性化。此外,由于环状结构,这些CSO可因缺乏5'端相互作用而从内体中逃逸。

[0079] 本发明的寡核苷酸是分离的寡核苷酸。术语"分离的"是指通过人类干预而改变或脱离自然状态。例如,天然存在于活动物中的寡核苷酸不是"分离的",而是合成的寡核苷酸,或部分或完全与其天然状态的共存物质分离的寡核苷酸是"分离的"。分离的寡核苷酸可以以基本上纯化的形式存在,或者可以存在于非天然环境中,例如,递送寡核苷酸的细胞。本发明的寡核苷酸可以包含部分纯化的DNA和/或RNA、基本上纯的DNA和/或RNA、合成的DNA和/或RNA、或重组产生的DNA和/或RNA,以及通过添加、缺失、取代和/或改变一个或多个核苷酸而与天然存在的DNA和/或RNA不同的改变的DNA和/或RNA。这种改变可以包括添加非核苷酸物质,例如添加到寡核苷酸的末端或寡核苷酸的一个或多个内部核苷酸,包括使寡核苷酸对核酸酶消化具有抗性的修饰。

[0080] 术语"microRNA"、"miRNA"和"MiR"可以互换,是指能够调节基因表达的内源性或人工非编码RNA。人们认为miRNA通过RNA干扰发挥作用。这种microRNA的设计在普通技术人员的技能范围之内。

[0081] 术语"piRNA"和"Piwi相互作用RNA"可以互换,指一类参与基因沉默的小RNA。PiRNA分子的长度通常在26到31个核苷酸之间。这种PiRNA的设计在普通技术人员的能力范围之内。

[0082] 在实施方案中,功能结构域的反义寡核苷酸如WO2020/191177中所述,其全部内容通过引用结合于此。在实施方案中,所述功能结构域的反义寡核苷酸是修饰的寡核苷酸,其包含或由长度为17至25个核苷酸的反义寡核苷酸化合物组成,其中所述反义寡核苷酸化合物包含3'域和5'结构域,其中所述3'结构域的长度为10至12个核苷酸,并且每个核苷酸包

含脱氧核糖核苷酸和磷酸二酯酶或磷酸硫酯核苷酸间连接或其组合;并且其中所述5'结构域的长度为5至15个核苷酸,并且其中所述5'结构域包含未修饰的脱氧核糖核苷酸、未修饰的核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸或其组合,条件是所述5'结构域包含至少1个修饰的脱氧核糖核苷酸或包含修饰的糖和/或骨架的修饰的核糖核苷酸。这种反义寡核苷酸被称为"分裂体"。

[0083] 在实施方案中,功能结构域的分裂体包含17至25个连接的核苷酸,其具有与靶RNA的等长部分互补的至少12个连续的核碱基。

[0084] 在实施方案中,分裂体的修饰的核糖核苷酸包含如本文所述的2'-取代的核苷酸。在实施方案中,2'-取代的核苷酸选自2'-O-甲基核糖核苷酸或2'-MOE。

[0085] 在一些实施方案中,3'结构域包含距3'末端1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12位的核苷酸。在一些实施方案中,3'结构域包含距3'末端1、2、3、4、5、6、7、8、9、10和11位的核苷酸。在一些实施方案中,3'结构域包含距3'末端1、2、3、4、5、6、7、8、9和10位的核苷酸。

[0086] 在一些实施方案中,当反义寡核苷酸的3'结构域长度为12个核苷酸时,本发明的反义寡核苷酸由式(I)表示:

[0087] 5'-$N_mN_{14}N_{13}N_{12}N_{11}N_{10}N_9N_8N_7N_6N_5N_4N_3N_2N_1$-3'

[0088] 其中

[0089] N是任何核苷酸;

[0090] N_{13}至N_m包含5'结构域;

[0091] N_1至N_{12}包含3'结构域;和

[0092] m选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

[0093] 在一些实施方案中,当反义寡核苷酸的3'结构域长度为11个核苷酸时,本发明的反义寡核苷酸由式(Ia)表示:

[0094] 5'-$N_mN_{14}N_{13}N_{12}N_{11}N_{10}N_9N_8N_7N_6N_5N_4N_3N_2N_1$-3'

[0095] 其中

[0096] N是任何核苷酸;

[0097] N_{12}至N_m包含5'结构域;

[0098] N_1至N_{11}包含3'结构域;和

[0099] m选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

[0100] 在一些实施方案中,本发明的反义寡核苷酸由式(Ib)表示:

[0101] 5'-$N_mN_{14}N_{13}N_{12}N_{11}N_{10}N_9N_8N_7N_6N_5N_4N_3N_2N_1$-3'

[0102] 其中

[0103] N是任何核苷酸;

[0104] N_{11}至N_m包含5'结构域;

[0105] N_1至N_{10}包含3'结构域;和

[0106] m选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

[0107] 在一些实施方案中,m是0。在一些实施方案中,m选自1、2、3、4、5、6或7。在一些实施方案中,m选自1、2、3、4、5或6。在一些实施方案中,m选自1、2、3、4或5。在一些实施方案中,m选自1、2、3或4。在一些实施方案中,m选自1、2或3。在一些实施方案中,m是1。在一些实施方案中,m是2。在一些实施方案中,m是3。在一些实施方案中,m是4。在一些实施方案中,m是5。

在一些实施方案中,m是6。在一些实施方案中,m是7。在一些实施方案中,m是8。在一些实施方案中,m是9。在一些实施方案中,m是10。在一些实施方案中,m是11。

[0108] 在实施方案中,所述功能结构域的反义寡核苷酸化合物长度为17至25个核苷酸,包含与靶RNA序列的等长部分互补的至少12个连续的核碱基,其中所述反义寡核苷酸化合物包含3'结构域和与3'结构域连续的5'结构域,其中所述3'结构域长度为10至12个核苷酸,并且每个核苷酸包含脱氧核糖核苷酸和磷酸二酯酶或磷酸硫酯酶核苷酸键或其组合;和

[0109] 其中所述5'结构域的长度为5至15个核苷酸,并且其中所述5'结构域包含未修饰的脱氧核糖核苷酸、未修饰的核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸或其组合,条件是所述5'结构域包含至少1个修饰的脱氧核糖核苷酸或包含修饰的糖和/或骨架的修饰的核糖核苷酸。

[0110] 在实施方案中,3'结构域长度为12个核苷酸,并包含距3'末端(位置1为3'端)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12位的核苷酸。在实施方案中,3'结构域的长度为11个核苷酸,并包含距3'端1、2、3、4、5、6、7、8、9、10和11位的核苷酸。在实施方案中,3'结构域的长度为12个核苷酸,并包含距3'端1、2、3、4、5、6、7、8、9和10位的核苷酸。

[0111] 在实施方案中,3'结构域的核苷酸包含天然核碱基。在一些实施方案中,根据本发明的反义寡核苷酸的3'结构域的核苷酸的核碱基和糖是未修饰的。在这方面,根据本发明的反义寡核苷酸的3'结构域的核苷酸的碱基和糖是天然存在的。3'结构域的每个核苷酸包含脱氧核糖核苷酸和磷酸二酯或硫代磷酸酯核苷酸间连接或其组合。3'结构域的核苷酸包括天然脱氧核糖糖和硫代磷酸酯、磷酸二酯或其它基于磷的连接或其组合,已知它们能激活RNase H。

[0112] 在实施方案中,3'结构域的至少一个核苷酸包含修饰的核碱基。

[0113] 在实施方案中,3'端第9或第10位的核苷酸未被修饰。在实施方案中,3'端第11位的核苷酸未被修饰。

[0114] 在实施方案中,寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间连接。

[0115] 在实施方案中,至少一半的核苷酸间连接是硫代磷酸酯。

[0116] 在实施方案中,反义寡核苷酸是单链的。

[0117] 如本文所用,术语"5'结构域"是指从3'结构域之后的第一个核苷酸开始至5'末端的核苷酸。5'结构域与靶RNA杂交,但不允许RNase H切除该结构域中的靶RNA。术语"5'结构域"的长度通常为2至15个核苷酸,并且是指根据3'结构域的长度从3'端测量的反义寡核苷酸的第11至25个核苷酸(第1个核苷酸是3'端)、第12至25个核苷酸或第13至25个核苷酸。

[0118] 例如,长度为17个核苷酸的反义寡核苷酸化合物可以包含从位置1到位置10的3'结构域和从位置11到位置17的5'结构域。修饰核苷酸的命名是位置特异性的,而不是核苷酸特异性的。

[0119] 5'结构域包含具有非RNase H激活修饰的核苷酸,例如修饰的糖和/或不激活RNase H的修饰的主链。在一些实施方案中,5'结构域包含包含修饰的糖的核苷酸。在一些实施方案中,5'结构域包含包含修饰的主链的核苷酸。在一些实施方案中,5'结构域包含同时包含修饰的糖和修饰的主链的核苷酸。在实施方案中,修饰的主链是非磷基主链。

[0120] 反义设计允许在朝向3'结构域5'端的特定位点进行靶RNA切割。

[0121] 在这些实施方案的任一个中,预期5'结构域包含至少一个具有主链修饰或取代和/或糖修饰或取代的核苷酸。在一些实施方案中,5'结构域内一个位置、5'结构域内一些位置或5'结构域内所有位置的核苷酸包括主链修饰或取代和/或糖修饰或取代。在一个实施方案中,5'结构域包含一个包含修饰的主链和/或糖的核苷酸。在一个实施方案中,5'结构域包含至少两个包含修饰的主链和/或糖的核苷酸。在一个实施方案中,5'结构域包含至少三个核苷酸,所述核苷酸包含修饰的主链和/或糖。在一个实施方案中,5'结构域包含至少四个核苷酸,所述核苷酸包含修饰的主链和/或糖。在一个实施方案中,5'结构域包含至少五个核苷酸,所述核苷酸包含修饰的主链和/或糖。在一个实施方案中,5'结构域包含至少六个核苷酸,所述核苷酸包含修饰的主链和/或糖。在一个实施方案中,5'结构域包含至少七个核苷酸,所述核苷酸包含修饰的主链和/或糖。在一个实施方案中,5'结构域包含至少八个核苷酸,所述核苷酸包含修饰的主链和/或糖。在一个实施方案中,5'结构域的所有核苷酸是包含修饰的主链和/或糖的核苷酸。

[0122] 特别考虑的是,在特定核苷酸和位置的背景下,本文讨论的实施方案可以相对于3'端的位置实施。例如,在位置13具有修饰的核苷酸的反义寡核苷酸是指从反义寡核苷酸的3'端起在位置13具有修饰的核苷酸的反义寡核苷酸。

[0123] 在实施方案中,功能结构域的反义寡核苷酸在其整个长度上与靶RNA的一部分至少90%互补。

[0124] 在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸是"缺口聚物"。如本文所用,缺口聚物是嵌合反义寡核苷酸,其含有足够长以诱导RNase H切割的脱氧核苷酸单体的中心嵌段。通常,本发明的缺口聚物针对一种或多种编码靶mRNA的mRNA。这种缺口聚物的设计在普通技术人员的技能范围之内。

[0125] 在实施方案中,功能结构域的反义寡核苷酸是修饰的寡核苷酸,其包含或由具有缺口聚物基序的区域组成,所述缺口聚物基序由两个外部区域或"翼"和中心或内部区域或"缺口"限定。缺口聚物基序的三个区域(5'-翼、缺口和3'-翼)形成核苷的连续序列,其中每个翼的核苷的至少一些糖部分不同于缺口的核苷的至少一些糖部分。具体而言,至少最靠近缺口的每个翼的核苷的糖部分(5'-翼的最3'-核苷和3'-翼的最5'-核苷)不同于相邻缺口核苷的糖部分,因此限定了翼和缺口(即翼/缺口连接处)之间的边界。在某些实施方案中,缺口内的糖部分彼此相同。在某些实施方案中,缺口包括一种或多种核苷,其糖部分不同于缺口的一种或多种其它核苷的糖部分。在某些实施方案中,两翼的糖基序彼此相同(对称缺口聚物)。在某些实施方案中,5'-翼的糖基序不同于3'-翼的糖基序(不对称缺口聚物)。

[0126] 在某些实施方案中,缺口聚物的侧翼独立地包含1-6个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的侧翼独立地包含1-5个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的侧翼包含相同数量的核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的侧翼包含4个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的每个侧翼的每个核苷是修饰的核苷。

[0127] 在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含7-24个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含7-18个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含9-14个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含7-23个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含9个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含10个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的

缺口包含11个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含13个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含14个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含17个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口包含18个核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的缺口的每个核苷是未修饰的2'-脱氧核苷。

[0128] 在某些实施方案中,缺口聚物是脱氧缺口聚物。在实施方案中,每个翼/缺口连接的缺口侧上的核苷是未修饰的2'-脱氧核苷,每个翼/缺口连接的翼侧上的核苷是修饰的核苷。在某些实施方案中,缺口的每个核苷是未修饰的2'-脱氧核苷。在某些实施方案中,缺口聚物的每个侧翼的每个核苷是修饰的核苷。

[0129] 本文中,可以使用符号[#5'-翼中的核苷]-[#缺口中的核苷]-[#3'-翼中的核苷]提供缺口聚物的三个区域的长度(核苷的数目)。因此,5-10-5缺口聚物由每个翼中5个相连的核苷和缺口中10个相连的核苷组成。如果这种命名法之后是特定的修饰,则该修饰是翼中的修饰,缺口核苷包含未修饰的脱氧核苷糖。因此,5-11-5MOE或OMe缺口聚物由5'-翼中的5个连接的MOE或OMe修饰的核苷、缺口中的11个连接的脱氧核苷和3'-翼中的5个连接的MOE或OMe核苷组成。

[0130] 在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸是4-13-4MOE或OMe缺口聚物。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸是5-11-5MOE或OME缺口聚物。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸是3-15-3BNA缺口聚物。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸是3-15-3LNA缺口聚物。

[0131] 在本文所述的任何实施方案中,修饰的寡核苷酸包含或由具有完全修饰的糖基序的区域组成。在这样的实施方案中,修饰的寡核苷酸的完全修饰区域的每个核苷包含修饰的糖部分。在某些实施方案中,整个修饰的寡核苷酸的每个核苷包含修饰的糖部分。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸包含或由具有完全修饰的糖基序的区域组成,其中完全修饰的区域内的每个核苷包含相同的修饰的糖部分,在本文中称为均匀修饰的糖基序。在某些实施方案中,完全修饰的寡核苷酸是均匀修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,均匀修饰的每个核苷包含相同的2'-修饰。在某些实施方案中,均匀修饰的糖基序长度为12至30个核苷。在某些实施方案中,均匀修饰的糖基序的每个核苷是2'-取代的核苷、糖替代物或双环核苷。在某些实施方案中,均匀修饰的糖基序的每个核苷包含2'-$OCH_2CH_2OCH_3$基团或2'-OCH_3基团。在某些实施方案中,具有至少一个完全修饰的糖基序的修饰的寡核苷酸也可以具有至少1、至少2、至少3或至少4个2'-脱氧核苷。

[0132] 可用于基因沉默的环状结构寡核苷酸的实例包括但不限于表1的环状结构寡核苷酸。表1中的寡核苷酸#s 1-6针对前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/可辛9型(PCSK9)。表1中的寡核苷酸#s 1512-1520、1536-1545和1605靶向含patatin样磷脂酶结构域的蛋白3(PNPLA3)。具有指向任何其它目的靶的功能结构域的环状结构寡核苷酸完全在本领域技术人员的技能范围内。除非另有说明,所有核苷酸间连接都是硫代磷酸酯连接。

[0133] 表1

[0134]

化合物#	SEQ ID NO(s)	序列
1	SEQ ID NO: 146 & SEQ ID NO: 1	3'-$T_2C_2G_2T_2G_2$G-5'-5'-GGTCTCCTCCATCAGCACC-3'
2	SEQ ID NO: 147 & SEQ ID NO: 2	3'-$T_2C_2G_2T_2G_2G_2$-5'-5'-$G_1G_1U_1$CTCCTCCATCAGC$A_1C_1C_1$-3'
3	SEQ ID NO: 147 & SEQ ID NO: 3	3'-$T_2C_2G_2T_2G_2G_2$-5'-5'-$G_1G_1U_1C_1U_1C_1$CTCCATCAGCACC-3'
4	SEQ ID NO: 4	5'-GGTCTCCTCCATCAGCACC-3'
5	SEQ ID NO: 5 & SEQ ID NO: 148	5'-GGTCTCCTCCATCAGCACC-3'-3'-$C_2C_2A_2G_2A_2$G-5'
6	SEQ ID NO: 6 & SEQ ID NO: 6	3'-CCACGACTACCTCCTCTGG-5'-5'-GGTCTCCTCCATCAGCACC-3'
1605	SEQ ID NO: 59 & SEQ ID NO: 149	3'-GACGAAGTAGGGGAAGATG-5'-5'-CTGCTTC-3'
1512	SEQ ID NO: 61 & SEQ ID NO: 150	3'-GACGAAGTAGGGGAAGATG-5'-5'-CTGCTT-3'
1513	SEQ ID NO: 62 & SEQ ID NO: 151	3'-GACGAAGTAGGGGAAGATG-5'-5'-CTGCT-3'
1514	SEQ ID NO: 63 & SEQ ID NO: 152	3'-GACGAAGTAGGGGAAGATG-5'-5'-CTGC-3'

[0135]

1515	SEQ ID NO: 64 & SEQ ID NO: 153	3'-GACGAAGTAGGGGAAGATG-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3'
1516	SEQ ID NO: 65 & SEQ ID NO: 154	3'-GACGAAGTAGGGGAAGATG-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2$-3'
1517	SEQ ID NO: 66 & SEQ ID NO: 153	3'-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3'
1518	SEQ ID NO: 67 & SEQ ID NO: 154	3'-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2$-3'
1519	SEQ ID NO: 68 & SEQ ID NO: 153	3'-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3'
1520	SEQ ID NO: 69 & SEQ ID NO: 154	3'-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2$-3'
1536	SEQ ID NO:.70 & SEQ ID NO: 149	3'-GACGAAGTACGGGAAGATG-5'-5'-CTGCTTC-3'
1537	SEQ ID NO: 71 & SEQ ID NO: 150	3'-GACGAAGTACGGGAAGATG-5'-5'-CTGCTT-3'
1538	SEQ ID NO: 72 & SEQ ID NO: 151	3'-GACGAAGTACGGGAAGATG-5'-5'-CTGCT-3'
1539	SEQ ID NO: 73 & SEQ ID NO: 152	3'-GACGAAGTACGGGAAGATG-5'-5'-CTGC-3'
1540	SEQ ID NO: 74 & SEQ ID NO: 153	3'-GACGAAGTACGGGAAGATG-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3'
1541	SEQ ID NO: 75 & SEQ ID NO: 154	3'-GACGAAGTACGGGAAGATG-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2$-3'
1542	SEQ ID NO: 76 & SEQ ID NO: 153	3'-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3'
1543	SEQ ID NO: 77 & SEQ ID NO: 154	3'-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2$-3'
1544	SEQ ID NO: 78 & SEQ ID NO: 153	3'-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3'
1545	SEQ ID NO: 79 & SEQ ID NO: 154	3'-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-$C_2T_2G_2C_2T_2$-3'

[0136]

1546	SEQ ID NO: 130 & SEQ ID NO: 150	3'-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CTGCTT-3'
1547	SEQ ID NO: 131 & SEQ ID NO: 151	3'-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CTGCT-3'
1548	SEQ ID NO: 132 & SEQ ID NO: 150	3'-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CTGCTT-3'
1549	SEQ ID NO: 133 & SEQ ID NO: 151	3'-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CTGCT-3'
1550	SEQ ID NO: 134 & SEQ ID NO: 150	3'-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CTGCTT-3'
1551	SEQ ID NO: 135 & SEQ ID NO: 151	3'-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CTGCT-3'
1552	SEQ ID NO: 136 & SEQ ID NO: 150	3'-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CTGCTT-3'
1553	SEQ ID NO: 137 & SEQ ID NO: 151	3'-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CTGCT-3'
1554	SEQ ID NO: 138 & SEQ ID NO: 156	3'-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CT$_2$GC$_2$TT$_2$-3'
1555	SEQ ID NO: 139 & SEQ ID NO: 157	3'-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CT$_2$GC$_2$T-3'
1556	SEQ ID NO: 140 & SEQ ID NO: 156	3'-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CT$_2$GC$_2$TT$_2$-3'
1557	SEQ ID NO: 141 & SEQ ID NO: 157	3'-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CT$_2$GC$_2$T-3'
1558	SEQ ID NO: 142 & SEQ ID NO: 156	3'-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CT$_2$GC$_2$TT$_2$-3'
1559	SEQ ID NO: 143 & SEQ ID NO: 157	3'-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CT$_2$GC$_2$T-3'
1560	SEQ ID NO: 144 & SEQ ID NO: 156	3'-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CT$_2$GC$_2$TT$_2$-3'
1561	SEQ ID NO: 145 & SEQ ID NO: 157	3'-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-CT$_2$GC$_2$T-3'

[0137]

1562	SEQ ID NO: 138 & SEQ ID NO: 213	3'-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_2$TG$_2$CT$_2$T-3'
1563	SEQ ID NO: 139 & SEQ ID NO: 214	3'-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_2$TG$_2$CT$_2$-3'
1564	SEQ ID NO: 140 & SEQ ID NO: 213	3'-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_2$TG$_2$CT$_2$T-3'
1565	SEQ ID NO: 141 & SEQ ID NO: 214	3'-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_2$TG$_2$CT$_2$-3'
1566	SEQ ID NO: 142 & SEQ ID NO: 213	3'-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_2$TG$_2$CT$_2$T-3'
1567	SEQ ID NO: 143 & SEQ ID NO: 214	3'-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_2$TG$_2$CT$_2$-3'
1568	SEQ ID NO: 144 & SEQ ID NO: 213	3'-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_2$TG$_2$CT$_2$T-3'
1569	SEQ ID NO: 145 & SEQ ID NO: 214	3'-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_2$TG$_2$CT$_2$-3'
1570	SEQ ID NO: 138 & SEQ ID NO: 215	3'-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$T$_3$-3'
1571	SEQ ID NO: 139 & SEQ ID NO: 216	3'-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$-3'
1572	SEQ ID NO: 140 & SEQ ID NO: 215	3'-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$T$_3$-3'
1573	SEQ ID NO: 141 & SEQ ID NO: 216	3'-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$-3'
1574	SEQ ID NO: 142 & SEQ ID NO: 215	3'-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$T$_3$-3'
1575	SEQ ID NO: 143 & SEQ ID NO: 216	3'-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$-3'
1576	SEQ ID NO: 144 & SEQ ID NO: 215	3'-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$T$_3$-3'
1577	SEQ ID NO: 145 & SEQ ID NO: 216	3'-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5'-5'-C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$-3'

[0138] GCAT-DNA硫代磷酸酯连接;$G_1/C_1/A_1/U_1$-2'OME硫代磷酸酯连接;$A_2/T_2/C_2/G_2$-DNA磷酸二酯连接;G=7-去杂-G;$A_3/T_3/C_3/G_3$-RNA磷酸二酯连接

[0139] 在某些实施方案中,靶核酸(靶RNA)是靶标的鼠序列。在某些实施方案中,靶核酸(靶RNA)是靶标的人序列。

[0140] 在某些实施方案中,PCSK9核酸是GENBANK保藏号NM_153565.2(在此引入作为SEQ ID NO:57)中阐述的鼠序列。在某些实施方案中,PCSK9核酸是GENBANK保藏号NM_174936.3(在此引入作为SEQ ID NO:58)中阐述的人序列。

[0141] 在某些实施方案中,PNPLA3核酸是GENBANK保藏号NM_054088.3(在此引入作为SEQ ID NO:80)中阐述的鼠序列。在某些实施方案中,PCSK9核酸是GENBANK保藏号NM_025225.2(在此引入作为SEQ ID NO:81)中阐述的人序列。在某些实施方案中,PCSK9核酸是GENBANK保藏号XM 001109144.3(在此引入作为SEQ ID NO:82)中阐述的恒河猴序列。在某些实施方案中,PCSK9核酸是GENBANK保藏号XM_005567051.2(在此引入作为SEQ ID NO:83)中所述的食蟹猴序列。

[0142] siRNA

[0143] 在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸是siRNA。siRNA包含长度为约15至约50个核苷酸、优选长度为约18至约36个核苷酸的短双链RNA,其靶向于RNA。

[0144] 在实施方案中,本发明提供了环状结构寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和环化结构域在其5'或3'端连接,其中所述功能结构域包含长度为15至50个核苷酸的寡核苷酸,并且与靶RNA互补;其中所述环化结构域包含长度在4至100个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,并且其极性与与其互补的功能结构域中的核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包括siRNA。

[0145] 在实施方案中,环化结构域的长度与与之互补的功能结构域的siRNA链的序列相同。在实施方案中,环化结构域比与其互补的功能结构域的siRNA链的序列长。在实施方案中,环化结构域比与其互补的功能结构域的siRNA链的序列短。

[0146] 在实施方案中,环化结构域包含长度在4至50个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在15至45个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在15至45个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸的长度为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个核苷酸。

[0147] 在实施方案中,环化结构域包含长度在4至10个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在6至10个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域包含长度在6至8个核苷酸之间的寡核苷酸。在实施方案中,环化结构域的寡核苷酸的长度为4、5、6、7、8、9或10个核苷酸。

[0148] 在实施方案中,环化结构域与它互补的siRNA链至少95%互补。在实施方案中,环化结构域与它互补的siRNA链至少97%互补。在实施方案中,环化结构域与它互补的siRNA链至少98%互补。在实施方案中,环化结构域与它互补的siRNA链至少99%互补。在实施方案中,环化结构域与它互补的siRNA链至少100%互补。

[0149] 术语"siRNA"和"短干扰RNA"可互换,指能够诱导RNA干扰的单链或双链RNA分子。siRNA分子通常具有长度在18和36个碱基对之间的双链区。这种siRNA的设计在普通技术人员的技能范围之内。

[0150] 在一个实施方案中,当功能结构域的寡核苷酸是siRNA时,环化结构域通过接头片段连接在siRNA有义链的5'端(见图2A)。在一个实施方案中,当功能结构域的寡核苷酸是siRNA时,环化结构域通过接头片段连接在siRNA反义链的5'端。

[0151] 在另一个实施方案中,当功能结构域的寡核苷酸是siRNA的反义链时,环化结构域是siRNA的有义链,并连接在反义链的3'或5'端(见图2B和2C)。换句话说,在该实施方案中,siRNA的有义链也充当环化结构域。

[0152] 本发明的siRNA链的一条或两条链也可以包含3′-粘性末端(overhang)。"3'粘性末端"是指从RNA链的3'末端延伸的至少一个不成对的核苷酸。因此,在一个方面,本发明的siRNA包含长度为1至约6个核苷酸(包括核糖核苷酸或脱氧核苷酸)的至少一个3'粘性末端,优选长度为1至约5个核苷酸,更优选长度为1至约4个核苷酸,特别优选长度为约1至约2个核苷酸。

[0153] 如果siRNA分子的两条链都包含3'粘性末端,则每条链的粘性末端长度可以相同或不同。在一个最优选的实施方案中,3'粘性末端存在于siRNA的两条链上,长度为两个核苷酸。为了提高siRNA的稳定性,还可以稳定3'粘性末端以防降解。在一个实施方案中,通过包括嘌呤核苷酸,如腺苷或鸟苷核苷酸来稳定粘性末端。

[0154] 或者,可耐受经修饰类似物对嘧啶核苷酸的取代,例如用2′-脱氧胸苷取代3′粘性末端的尿苷核苷酸,且不影响RNAi降解效率。特别是,2′-脱氧胸苷中缺少2′羟基显著增强了组织培养基中3′粘性末端的核酸酶抗性。

[0155] 本发明的siRNA可以靶向靶mRNA序列的约18-30,优选19-25个连续核苷酸的任何延伸。用于选择siRNA的靶序列的技术在本领域中是众所周知的。因此,本发明siRNA的有义链包含与靶mRNA中约18至约30个核苷酸的任何连续区段相同的核苷酸序列。

[0156] 剪接寡核苷酸

[0157] 在实施方案中,本发明提供了环状结构寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和环化结构域在其5'端连接,其中所述功能结构域包含长度为15至45个核苷酸的寡核苷酸,并且与靶RNA互补;其中所述环化结构域包含长度在4至12个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,并且其极性与与其互补的功能结构域中的核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包含剪接寡核苷酸并且其中功能结构域的寡核苷酸被修饰。

[0158] 如本文所用,术语"剪接寡核苷酸"是指用于调节剪接的反义寡核苷酸。对于剪接调节,反义核酸与靶RNA结合并调节剪接,从而调节蛋白质的表达。在环状结构的寡核苷酸中,环化结构域可以连接在3'端或5'端以形成环状结构。在一个优选的实施方案中,环化结构域与功能结构域的寡核苷酸的5'端连接。环状结构允许减少蛋白质结合,减少聚阴离子特征,并且缺乏对末端的可及性,这允许内体逃逸并减轻与模式识别受体的相互作用。

[0159] 在实施方案中,用于调节剪接的寡核苷酸是snRNA。术语"snRNA"和"小核RNA"可互换,指一类参与多种过程的小RNA,包括RNA剪接和转录因子调节。也包括小核仁RNA(snoRNA)亚类。该术语还包括人工snRNA,如snRNA的反义衍生物。这种snRNA的设计在普通技术人员的技能范围之内。

[0160] 在实施方案中,所述功能结构域的寡核苷酸如WO 2021/055011中所述,其全部内容通过引用结合于此。具体而言,在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸包括与包含保留内含子的靶前mRNA互补的包含14至30个连接核苷酸的寡核苷酸,其中反义寡核苷酸包括1至3个区域,每个区域独立地包含2至5个连续的脱氧核糖核苷酸,其余核苷酸是2'-取代的、非离子的或受限制的糖核苷酸,或其组合。具有包含调节剪接的寡核苷酸的功能结构域的CSO

可用于在包含至少两个mRNA转录物的基因中选择第一mRNA转录物,其中所述寡核苷酸包含与靶前mRNA的等长部分互补的至少12个连续的核碱基;其中所述寡核苷酸针对第二mRNA转录物的前mRNA的剪接位点,从而阻断第二mRNA转录物的剪接位点并指导前mRNA与第一mRNA转录物的剪接。在实施方案中,2'-取代的核苷酸选自2'-O-甲基核糖核苷或2'-甲氧基乙基核糖核苷(MOE)。

[0161] 在实施方案中,剪接寡核苷酸包含1个区域,该区域包含2至5个连续的脱氧核糖核苷酸,其余核苷酸是2'-取代的、非离子的或限制性的糖核苷酸,或其组合。在实施方案中,剪接寡核苷酸包含2个区域,独立地包含2至5个连续的脱氧核糖核苷酸,其余核苷酸是2'-取代的、非离子的或限制性的糖核苷酸,或其组合。在实施方案中,剪接包括3个独立地包含2至5个连续脱氧核糖核苷酸的区域,其余核苷酸是2'-取代的、非离子的或受限制的糖核苷酸或其组合。在一些实施方案中,连续的脱氧核糖核苷酸的长度为2-4个核苷酸。在一些实施方案中,连续的脱氧核糖核苷酸的长度为4个核苷酸。

[0162] 在实施方案中,其中剪接寡核苷酸的连续脱氧核糖核苷酸在反义寡核苷酸的5'端,在剪接寡核苷酸的3'端,或侧翼为2'-取代的、非离子的或限制性的糖核苷酸、或其组合。在实施方案中,连续的脱氧核糖核苷酸位于剪接寡核苷酸的5'端。在实施方案中,连续的脱氧核糖核苷酸位于剪接寡核苷酸的3'端。在实施方案中,连续的脱氧核糖核苷酸的侧翼是2'-取代的、非离子的或限制性的糖核苷酸或其组合。

[0163] 在实施方案中,所述功能结构域的剪接寡核苷酸包含14至30个连接的核苷酸,所述核苷酸具有与包含保留内含子的靶前mRNA的等长部分互补的至少12个连续的核碱基,其中所述反义寡核苷酸包含1至3个区域,每个区域独立地包含2至5个连续的脱氧核糖核苷酸,剩余的核苷酸是2'-取代的、非离子的或限制性的糖核苷酸,或其组合。

[0164] 在实施方案中,2'-取代的核苷酸如本文所述。在实施方案中,2'-取代的核苷酸选自2'-O-甲基核糖核苷酸或2'-MOE。

[0165] 在实施方案中,功能结构域的寡核苷酸包含1个区域,该区域包含2至5个连续的脱氧核糖核苷酸。在实施方案中,连续的脱氧核糖核苷酸在剪接寡核苷酸的5'端、在反义寡核苷酸的3'端、侧翼为2'取代的、非离子的或限制性的糖核苷酸或其组合。在实施方案中,连续的脱氧核糖核苷酸位于剪接寡核苷酸的5'端。在实施方案中,连续的脱氧核糖核苷酸位于剪接寡核苷酸的3'端。

[0166] 在实施方案中,连续的脱氧核糖核苷酸的长度为2-4个核苷酸。在实施方案中,连续的脱氧核糖核苷酸的长度为4个核苷酸。

[0167] 在实施方案中,外显子位于保留内含子的5'剪接位点的侧翼。在实施方案中,外显子位于保留内含子的3'剪接位点的侧翼。在实施方案中,外显子位于保留的内含子的5'剪接位点的侧翼,外显子位于保留的内含子的3'剪接位点的侧翼。

[0168] 可用于剪接的环状寡核苷酸的实例包括但不限于表2的环状寡核苷酸。表2中的寡核苷酸靶向DMD。具有指向任何其它目的靶的功能结构域的环状寡核苷酸完全在本领域技术人员的技能范围内

[0169] 表2

[0170]

化合物#	SEQ ID NO:	序列
7	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 7	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5'-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3'
8	SEQ ID NO: 159 & SEQ ID NO: 8	3'-$A_2A_2T_2G_2G_2A_2$-5'-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3'
9	SEQ ID NO: 160 & SEQ ID NO: 9	3'-$A_1A_1U_1G_1G_1A_1$-5'-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3'
10	SEQ ID NO: 10 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
11	SEQ ID NO: 11 &	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3'-3'-$C_2C_2$

[0171]

	SEQ ID NO: 162	$G_2G_2T_2T_2$-5'
12	SEQ ID NO: 12 & SEQ ID NO: 163	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3'-3'-$C_1C_1G_1G_1U_1U_1$-5'
13	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 13	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_2G_2C_2C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'
14	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 14	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_2A_2A_2C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'
15	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 15	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_2T_2C_2G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'
16	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 16	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_2C_2T_2U_1A_1C_1C_1U_1$-3'
17	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 17	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_2G_2C_2C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_1U_1$-3'
18	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 18	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_2C_2T_2$-3'
19	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 19	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_2G_2C_2C_2A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'
20	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 20	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_2A_2A_2C_2C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'
21	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 21	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_2T_2C_2G_2G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'
22	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 22	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_2C_2T_2T_2A_1C_1C_1U_1$-3'
23	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 23	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_2T_2T_2A_2C_2C_2T_2$-3'
24	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 24	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1T_2T_2A_2C_2C_2T_2$-3'
25	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 25	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1T_2A_2C_2C_2T_2$-3'
26	SEQ ID NO: 158 & SEQ ID NO: 26	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_2C_2T_2$-3'
27	SEQ ID NO: 158	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$

[0172]

	& SEQ ID NO: 27	-5-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_2T_2$-3'
28	SEQ ID NO: 28 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_2G_2C_2C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
29	SEQ ID NO: 29 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_2A_2A_2C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
30	SEQ ID NO: 30 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_2T_2C_2G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
31	SEQ ID NO: 31 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_2C_2T_2U_1A_1C_1C_1U_1$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
32	SEQ ID NO: 32 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_2G_2C_2C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_1U_1$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
33	SEQ ID NO: 33 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_2C_2T_2$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
34	SEQ ID NO: 34 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_2G_2C_2C_2A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
35	SEQ ID NO: 35 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_2A_2A_2C_2C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
36	SEQ ID NO: 36 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_2T_2C_2G_2G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
37	SEQ ID NO: 37 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_2C_2T_2T_2A_1C_1C_1U_1$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
38	SEQ ID NO: 38 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_2T_2T_2A_2C_2C_2T_2$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
39	SEQ ID NO: 39 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1T_2T_2A_2C_2C_2T_2$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
40	SEQ ID NO: 40 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1T_2A_2C_2C_2T_2$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
41	SEQ ID NO: 41 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_2C_2T_2$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
42	SEQ ID NO: 42 & SEQ ID NO: 161	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_2T_2$-3'-3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
43	SEQ ID NO: 164	3'- $A_1U_1G_1G_1A_1$

[0173]

	& SEQ ID NO: 43	-5'-5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3'
44	SEQ ID NO: 44 & SEQ ID NO: 165	5'-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3'-3'-$C_1C_1G_1G_1U_1$-5'

[0174] $G_1/C_1/A_1/U_1$-2'OME核苷酸;$A_2/T_2/C_2/G_2$-脱氧核糖核苷酸

[0175] ADAR

[0176] 在实施方案中,本发明提供了环状结构的寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和环化结构域在其5'末端连接,其中所述功能结构域包含长度在15至500个核苷酸之间的寡核苷酸并且与靶RNA互补;其中所述环化结构域包含长度在4至12个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,并且其极性与与其互补的功能结构域中的核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包含作用于RNA系统的腺苷脱氨酶(ADAR)的反义寡核苷酸。

[0177] 在一些实施方案中,功能结构域的寡核苷酸是招募内源性ADAR(作用于RNA的腺苷脱氨酶)酶以编辑内源性转录物的反义寡核苷酸。ADAR是一组在RNA编辑过程中催化腺嘌呤核苷(A's)转化为肌苷(I's)的酶。虽然ADAR可以作用于不同类型的RNA,但mRNA编码区的编辑事件尤其令人关注,因为它与鸟苷(G's)一样是I的碱基对。因此,ADAR催化的每一个A-I变化都被解读为翻译过程中的A-G变化,可能会改变蛋白质序列和功能。这种重新编码的能力使ADAR成为一种有吸引力的治疗工具,以纠正mRNA内的遗传突变。

[0178] ADAR系统本身的寡核苷酸包含一个或多个结构域。一个结构域被称为互补结构域,由与靶RNA互补的连续核苷酸区域组成。在实施方案中,互补结构域的长度为约15至约120个核苷酸。在实施方案中,互补结构域的长度为约17至约60个核苷酸。另一个结构域,称为募集结构域,包含寡核苷酸中募集ADAR酶的区域。

[0179] CRISPR

[0180] 在实施方案中,本发明提供了环状结构的寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和环化结构域在其5'端连接,其中所述功能结构域包含长度在17至500个核苷酸之间的寡核苷酸并且与靶RNA互补;其中所述环化结构域包含长度在4至12个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,并且其极性与与其互补的功能结构域中的核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包含基于CRISPR的系统的反义寡核苷酸。

[0181] 功能结构域的寡核苷酸是一种反义寡核苷酸,在基于CRISPR的系统中起导向RNA的作用。术语"sgRNA"和"向导RNA"可以互换,指的是识别目标DNA或RNA目的区域并引导核酸内切酶进行编辑的特定RNA序列。gRNA通常由两部分组成:crispr RNA(crRNA),与靶DNA互补的17-30个核苷酸序列,以及tracr RNA,作为Cas核酸酶的结合支架。

[0182] 可以使用任何合适的工程化sgRNA或crRNA和tracrRNA,只要其能有效识别靶DNA或RNA。这种sgRNA或crRNA和tracrRNA的设计在普通技术人员的技能范围内。

[0183] 免疫刺激性寡核苷酸

[0184] 在实施方案中,本发明提供了环状结构的寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和环化结构域在其3'端连接,其中所述功能结构域包含长度为11至400个核苷酸的寡核苷酸;其中所述环化结构域包含长度在4至400个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,且其极性与与其互补的功能结构域中核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包含免疫刺激寡核苷酸。

[0185] 在实施方案中,免疫刺激性寡核苷酸能够在脊椎动物细胞中诱导干扰素应答。

[0186] 在实施方案中,免疫刺激性寡核苷酸的核苷酸序列与另一核苷酸序列(例如靶

RNA)不互补且不结合。在该实施方案中,免疫刺激寡核苷酸的核苷酸序列不是例如反义寡核苷酸,并且不具有反义活性。

[0187] 在实施方案中,免疫刺激寡核苷酸的长度在11和40个核苷酸之间。在实施方案中,免疫刺激寡核苷酸的长度在15和28个核苷酸之间。在实施方案中,免疫刺激寡核苷酸的长度在17和25个核苷酸之间。

[0188] 在实施方案中,环化结构域的长度与与其互补的功能结构域的序列相同。在实施方案中,环化结构域比与其互补的功能结构域的序列长。在实施方案中,环化结构域比与其互补的功能结构域的序列短。

[0189] 在实施方案中,环化结构域的长度在11和40个核苷酸之间。在实施方案中,环化结构域的长度在15和28个核苷酸之间。在实施方案中,环化结构域的长度在17和25个核苷酸之间。在实施方案中,环化结构域的长度在4和12个核苷酸之间。在实施方案中,环化结构域的长度在4和10个核苷酸之间。在实施方案中,环化结构域的长度在4和8个核苷酸之间。

[0190] 在实施方案中,免疫刺激寡核苷酸的核苷酸间连接是硫代磷酸酯、磷酸二酯或其组合。

[0191] 在实施方案中,免疫刺激寡核苷酸的核苷酸间连接是硫代磷酸酯核苷酸间连接。

[0192] 在实施方案中,免疫刺激寡核苷酸的核苷酸间连接是磷酸二酯。

[0193] 在实施方案中,免疫刺激性寡核苷酸的核苷酸间连接是硫代磷酸酯和磷酸二酯核苷酸间连接的组合。

[0194] 在实施方案中,环化结构域的核苷酸间连接是硫代磷酸酯、磷酸二酯或其组合。

[0195] 在实施方案中,环化结构域的核苷酸间连接是硫代磷酸酯核苷酸间连接。

[0196] 在实施方案中,环化结构域的核苷酸间连接是磷酸二酯。

[0197] 在实施方案中,环化结构域的核苷酸间连接是硫代磷酸酯和磷酸二酯核苷酸间连接的组合。

[0198] 在实施方案中,免疫刺激寡核苷酸的核苷酸间连接是硫代磷酸酯,环化结构域的核苷酸间连接是磷酸二酯,反之亦然。

[0199] 免疫刺激寡核苷酸包括但不限于通过内体toll样受体、RIG样受体、STING、cGAS和炎性小体诱导免疫刺激的寡核苷酸。Toll样受体(TLR)是模式识别受体(PRR),通过检测潜在的有害病原体在启动先天性免疫应答中发挥关键作用。每一个TLR都有广泛的特异性,例如,TLR1、2、4和6识别细菌脂质,TLR3、7和8识别病毒RNA,TLR9识别包含CG基序的细菌DNA,TLR5和10识别细菌或寄生虫蛋白质。这种免疫刺激性寡核苷酸的设计在普通技术人员的技能范围内。

[0200] 在实施方案中,当功能结构域的寡核苷酸是免疫刺激寡核苷酸时,环化结构域通过接头片段连接在功能结构域的5'端或3'端(参见例如图3)。在实施方案中,环化结构域连接在5'端。在实施方案中,环化结构域连接在3'端。

[0201] 在另一个实施方案中,所述功能结构域的寡核苷酸是免疫刺激寡核苷酸,所述环化结构域是另一种免疫刺激寡核苷酸,其中所述环化结构域的免疫刺激寡核苷酸与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,并且其极性与与其互补的功能结构域内的核苷酸序列的极性相反,并且连接在所述功能结构域的3'端。换句话说,在该实施方案中,环化结构域还充当免疫刺激寡核苷酸。

[0202] 可用于免疫刺激的环状寡核苷酸的实例包括但不限于表3的环状寡核苷酸。表3中的寡核苷酸包含一个CpG二核苷酸并激活Toll样受体9(TLR-9)。具有包含针对任何其它目的PRR或TLR的免疫刺激寡核苷酸的功能结构域的环状寡核苷酸完全在本领域技术人员的技能范围内。

[0203] 表3

[0204]

化合物 #	SEQ ID NO:	序列
45	SEQ ID NO: 166 & SEQ ID NO: 45	3'- TAGCA -5'-5'-TCGTAACGTTACGTATTCGAATCGT-3'
46	SEQ ID NO: 167 & SEQ ID NO: 46	3'-TTAGCA-5'-5'-TCGTAACGTTACGTATTCGAATCGT-3"
47	SEQ ID NO: 168 & SEQ ID NO: 47	3'-ATGCT-5'-5'-ACGATTCGAATACGTAACGTTACGA-3'
48	SEQ ID NO: 169 &	3'-AATGCT-5'-5'-ACGATTCGAATACGTAACGTTACGA-

[0205]

	SEQ ID NO: 48	3'
49	SEQ ID NO: 170 & SEQ ID NO: 49	5'-TTACGA-3'-3'-TGCTAAGCTTATGCATTGCAATGCT-5'
50	SEQ ID NO: 171 & SEQ ID NO: 50	5'-TACGA-3'-3'-TGCTAAGCTTATGCATTGCAATGCT-5'
51	SEQ ID NO: 172 & SEQ ID NO: 51	5'-AATGCT -3'-3'-AGCATTGCAATGCATAAGCTTAGCA-5'
52	SEQ ID NO: 173 & SEQ ID NO: 52	5'- ATGCT -3'-3'-AGCATTGCAATGCATAAGCTTAGCA-5'
53	SEQ ID NO: 53 & SEQ ID NO: 55	5'-TCGTAACGTTACGTATTCGAATCGT-3'-3'-AGCATTGCAATGCATAAGCTTAGCA-5'
54	SEQ ID NO: 54 & SEQ ID NO: 56	3'-AGCATTGCAATGCATAAGCTTAGCA-5'-5'-TCGTAACGTTACGTATTCGAATCGT-3'
55	SEQ ID NO: 84 & SEQ ID NO: 85	5'-$T_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2G_2T_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2C_2G_2T_2$-3'-3'-$A_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2C_2A_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2G_2C_2A_2$-5'
1101	SEQ ID NO: 86 & SEQ ID NO: 174	5'-TCGTATCGTAACGTATTCGAATCGT-3'-3'-AGCATAGCATTGCATAAGCTTAGCA-5'
1102	SEQ ID NO: 87 & SEQ ID NO: 175	5'-$T_2C_2G_2T_2A_2T_2$CGTAACGTATTCGAATCGT-3'-3'-AGCATAGCATTGCATAAGCT$_2T_2A_2G_2C_2A_2$-5'
1103	SEQ ID NO: 88 & SEQ ID NO: 176	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3'-3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5'
1104	SEQ ID NO: 89 & SEQ ID NO: 177	5'-TCGACUTGAACGATTCGAATACGTAAC-3'-3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5'
1105	SEQ ID NO: 90 & SEQ ID NO: 178	5'-TCGACTTIAACGATTCGAATACGTAAC-3'-3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5'
1106	SEQ ID NO: 91 & SEQ ID NO: 179	5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2$TGAACGATTCGAATACGTAAC-3'-3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATG$_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5'
1107	SEQ ID NO: 92 & SEQ ID NO: 180	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3'-3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTAT-5'
1108	SEQ ID NO: 93 & SEQ ID NO: 181	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3'-3'-AGCTGAACTTGCTAAGCT -5'

[0206]

1109	SEQ ID NO: 94 & SEQ ID NO: 182	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3'-3'-AGCTGAACTTGCT-5'
1110	SEQ ID NO: 95 & SEQ ID NO: 183	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3'-3'-AGCT GA -5'
1111	SEQ ID NO: 96 & SEQ ID NO: 184	5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2$TGAACGATTCGAATACGTAAC -3'-3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2$-5'
1112	SEQ ID NO: 97	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3'
1113	SEQ ID NO: 98 & SEQ ID NO: 185	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3'-L-3'-AG CTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5'
1114	SEQ ID NO: 99 & SEQ ID NO: 186	5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2$ $T_2A_2A_2C_2$-3'-L-3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C$ $_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5'
1115	SEQ ID NO: 100 & SEQ ID NO: 187	5'-TCGACTTG$A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A$ $_2C_2$-3'-L-3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A$ TGCATTG-5'
1116	SEQ ID NO: 101 & SEQ ID NO: 188	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3'-L-3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTAT-5'
1117	SEQ ID NO: 102 & SEQ ID NO: 189	5'-TCG ACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3'-L-3'-AGCTGAACTTGCTAAGCT -5'
1118	SEQ ID NO: 103 & SEQ ID NO: 190	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGT AAC -3'-L-3'-AGCTGAACTTGCT-5'
1119	SEQ ID NO: 104 & SEQ ID NO: 191	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGT AAC -3'-L-3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2$ -5'
1120	SEQ ID NO: 105 & SEQ ID NO: 192	5'-TCG ACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3'L-3'-AGCTGA -5'
1121	SEQ ID NO: 106	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5'
1122	SEQ ID NO: 107 & SEQ ID NO: 193	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5'-5'- TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3'
1123	SEQ ID NO: 108 & SEQ ID NO: 194	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5'-5'- TCGACT-3'
1124	SEQ ID NO: 109 & SEQ ID NO: 195	5'-$T_2C_2G_2T_2A_2T_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2G_2T_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2C_2$ G_2T_2-3'-3'-$A_2G_2C_2A_2T_2A_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2C_2A_2T_2A_2A_2G_2C_2T$

[0207]

		$_2T_2A_2G_2C_2A_2$-5'
1125	SEQ ID NO: 110 & SEQ ID NO: 196	5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2$-3'-3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5'
1126	SEQ ID NO: 111 & SEQ ID NO: 197	5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2$-3'-3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2$-5'
1127	SEQ ID NO: 112 & SEQ ID NO: 198	3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5'-5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2$-3'
1128	SEQ ID NO: 113 & SEQ ID NO: 199	5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2$-3'-3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5'
1129	SEQ ID NO: 114 & SEQ ID NO: 200	5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2$-3'-3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2$-5'
1130	SEQ ID NO: 115 & SEQ ID NO: 201	5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2$-3'-3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2$-5'
1131	SEQ ID NO: 116	5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2$-3'
1132	SEQ ID NO: 117	3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5'
1133	SEQ ID NO: 118 & SEQ ID NO: 202	5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2$-3'-3'-$A_2C_2G_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2G_2T_2T_2A_2T_2C_2G_2A_2T_2T_2G_2$-5'
1134	SEQ ID NO: 119 & SEQ ID NO: 203	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3'-L-3'-$A_3G_3C_3T_3G_3A_3A_3C_3T_3T_3G_3C_3T_3A_3A_3G_3C_3T_3T_3A_3T_3G_3C_3A_3T_3T_3G_3$-5'
1135	SEQ ID NO: 120 & SEQ ID NO: 204	5'-TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3'-L-3'-$A_3G_3C_3T_3G_3A_3A_3C_3T_3T_3G_3C_3T_3A_3A_3G_3C_3T_3$-5'

[0208]

1136	SEQ ID NO: 217 & SEQ ID NO: 204	5'-$T_3C_3G_3A_3C_3T_3T_3G_3A_3A_3C_3G_3A_3T_3T_3C_3G_3A_3A_3T_3A_3C_3G_3T_3A_3A_3C_3$ -3'-L-3'-$A_3G_3C_3T_3G_3A_3A_3C_3T_3T_3G_3C_3T_3A_3A_3G_3C_3T_3$-5'

[0209] GCAT-DNA硫代磷酸酯连接;$A_2/T_2/C_2/G_2$-DNA磷酸二酯连接;$A_3/T_3/C_3/G_3$-RNA磷酸二酯连接;U=脱氧尿苷;I=脱氧肌苷;L=三乙二醇

[0210] 免疫拮抗剂

[0211] 在实施方案中,本发明提供了环状结构的寡核苷酸(CSO),包含功能结构域、环化结构域和接头,其中所述功能结构域和环化结构域在其3'末端连接,其中所述功能结构域包含长度为11至400个核苷酸的寡核苷酸;其中所述环化结构域包含长度在4至400个核苷酸之间的寡核苷酸,并且与所述功能结构域内的核苷酸序列互补,并且其极性与与其互补的功能结构域中核苷酸序列的极性相反;其中功能结构域包含免疫拮抗剂寡核苷酸。

[0212] 在实施方案中,免疫拮抗剂寡核苷酸能够阻断脊椎动物细胞中的干扰素应答。

[0213] 在实施方案中,免疫拮抗剂寡核苷酸的核苷酸序列与另一核苷酸序列,例如靶RNA不互补且不结合。在该实施方案中,免疫拮抗剂寡核苷酸的核苷酸序列不是例如反义寡核苷酸,并且不具有反义活性。

[0214] 在实施方案中,免疫刺激寡核苷酸的长度在11和30个核苷酸之间。在实施方案中,免疫刺激寡核苷酸的长度在15和28个核苷酸之间。在实施方案中,免疫刺激寡核苷酸的长度在17和25个核苷酸之间。

[0215] 在实施方案中,环化结构域的长度与其互补的功能结构域的序列相同。在实施方案中,环化结构域比与其互补的功能结构域的序列长。在实施方案中,环化结构域比与其互补的功能结构域的序列短。

[0216] 在实施方案中,环化结构域的长度在11和40个核苷酸之间。在实施方案中,环化结构域的长度在15和28个核苷酸之间。在实施方案中,环化结构域的长度在17和25个核苷酸之间。在实施方案中,环化结构域的长度在4和12个核苷酸之间。在实施方案中,环化结构域的长度在4和10个核苷酸之间。在实施方案中,环化结构域的长度在4和8个核苷酸之间。

[0217] 在实施方案中,免疫拮抗剂寡核苷酸的核苷酸间连接是硫代磷酸酯、磷酸二酯或其组合。

[0218] 在实施方案中,免疫拮抗剂寡核苷酸的核苷酸间连接是硫代磷酸酯核苷酸间连接。

[0219] 在实施方案中,免疫拮抗剂寡核苷酸的核苷酸间连接是磷酸二酯。

[0220] 在实施方案中,免疫拮抗剂寡核苷酸的核苷酸间连接是硫代磷酸酯和磷酸二酯核苷酸间连接的组合。

[0221] 在实施方案中,环化结构域的核苷酸间连接是硫代磷酸酯、磷酸二酯或其组合。

[0222] 在实施方案中,环化结构域的核苷酸间连接是硫代磷酸酯核苷酸间连接。

[0223] 在实施方案中,环化结构域的核苷酸间连接是磷酸二酯。

[0224] 在实施方案中,环化结构域的核苷酸间连接是硫代磷酸酯和磷酸二酯核苷酸间连接的组合。

[0225] 在实施方案中,免疫拮抗剂寡核苷酸的核苷酸间连接是硫代磷酸酯,环化结构域的核苷酸间连接是磷酸二酯,反之亦然。

[0226] 免疫拮抗剂寡核苷酸包括但不限于通过内体toll样受体、RIG样受体、STING、cGAS和炎性小体阻断免疫刺激的寡核苷酸。Toll样受体(TLR)是模式识别受体(PRR),通过检测潜在的有害病原体在启动先天性免疫应答中发挥关键作用。每一个TLR都有广泛的特异性,

例如,TLR1、2、4和6识别细菌脂质,TLR3、7和8识别病毒RNA,TLR9识别包含CG基序的细菌DNA,TLR5和10识别细菌或寄生虫蛋白质。这种免疫拮抗剂寡核苷酸的设计在普通技术人员的技能范围内。

[0227] 在另一个实施方案中,功能结构域的寡核苷酸是免疫拮抗剂寡核苷酸,环化结构域是另一种免疫拮抗剂寡核苷酸,其中环化结构域的免疫拮抗剂寡核苷酸与功能结构域内的核苷酸序列互补,并且其极性与与其互补的功能结构域中核苷酸序列的极性相反,并且连接在功能结构域的3'端(见图3B)。换句话说,在该实施方案中,环化结构域还充当免疫拮抗剂寡核苷酸。

[0228] 可用于免疫刺激的环状寡核苷酸的实例包括但不限于表4的环状寡核苷酸。表4中的寡核苷酸包含CpG二核苷酸内的甲基化C,阻断Toll样受体9(TLR-9)的激活。具有包含针对任何其它目的PRR或TLR的免疫拮抗剂寡核苷酸的功能结构域的环状寡核苷酸完全在本领域技术人员的技能范围内。

[0229] 表4

[0230]

化合物 #	SEQ ID NO:	序列
1201	SEQ ID NO: 121 & SEQ ID NO: 205	5'-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC-3'-3'-AGC$_m$TGAACTTGC$_m$TAAGC$_m$TTATGC$_m$ATTG-5'
1202	SEQ ID NO: 122 & SEQ ID NO: 206	5'-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC-3'-3'-AGC$_m$TGAACTTGC$_m$TAAGC$_m$TTAT-5'
1203	SEQ ID NO: 123 & SEQ ID NO: 207	5'-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC-3'-3'-AGC$_m$TGAACTTGC$_m$TAAGC$_m$T -5'
1204	SEQ ID NO: 124 & SEQ ID NO: 208	5'-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC-3'-3'-AGC$_m$TGAACTTGC$_m$T -5'

[0231]

1205	SEQ ID NO: 125 & SEQ ID NO: 209	5'-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC-3'-3'-AGC$_m$TGA -5'
1206	SEQ ID NO: 126	5'-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC -3'
1207	SEQ ID NO: 127 & SEQ ID NO: 210	5'-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC -3'-3'-AGCTGAACTTG -5'
1208	SEQ ID NO: 128 & SEQ ID NO: 211	5'-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GT AAC -3'-3'-AGCTGAAC -5'
1209	SEQ ID NO: 129 & SEQ ID NO: 212	5'-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC -3'-3'-AGCTGA -5

[0232] C$_m$=5'-甲基化的C

[0233] 可用于本文所述环状寡核苷酸的环化结构域的实例包括但不限于表5的环化结构域。

[0234] 表5

[0235]

SEQ ID NO:	序列
SEQ ID NO: 146	3'-$T_2C_2G_2T_2G_2G$-5'
SEQ ID NO: 147	3'-$T_2C_2G_2T_2G_2G_2$-5'
SEQ ID NO: 148	3'-$C_2C_2A_2G_2A_2G$-5'
SEQ ID NO: 149	5'-CTGCTTC-3'
SEQ ID NO: 150	5'-CTGCTT-3'
SEQ ID NO: 151	5'-CTGCT-3'
SEQ ID NO: 152	5'-CTGC-3'
SEQ ID NO: 153	5'-$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3'
SEQ ID NO: 154	5'-$C_2T_2G_2C_2T_2$-3'
SEQ ID NO: 155	5'-$C_2T_2G_2C_2$-3'
SEQ ID NO: 156	5'-$CT_2GC_2TT_2$-3'
SEQ ID NO: 157	5'-CT_2GC_2T-3'
SEQ ID NO: 158	3'- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5'
SEQ ID NO: 159	3'-$A_2A_2T_2G_2G_2A_2$-5'
SEQ ID NO: 160	3'-$A_1A_1U_1G_1G_1A_1$-5'
SEQ ID NO: 161	3'-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5'
SEQ ID NO: 162	3'-$C_2C_2G_2G_2T_2T_2$-5'

[0236]

SEQ ID NO: 163	3'-$C_1C_1G_1G_1U_1U_1$-5'
SEQ ID NO: 164	3'- $A_1U_1G_1G_1A_1$ -5'
SEQ ID NO: 165	3'-$C_1C_1G_1G_1U_1$-5'
SEQ ID NO: 166	3'- TAGCA -5'
SEQ ID NO: 167	3'-TTAGCA-5'
SEQ ID NO: 168	3'-ATGCT-5'
SEQ ID NO: 169	3'-AATGCT-5'
SEQ ID NO: 170	5'-TTACGA-3'
SEQ ID NO: 171	5'-TACGA-3'
SEQ ID NO: 172	5'-AATGCT -3'
SEQ ID NO: 173	5'- ATGCT -3'
SEQ ID NO: 174	3'-AGCATAGCATTGCATAAGCTTAGCA-5'
SEQ ID NO: 175	3'-AGCATAGCATTGCATAAGC$T_2T_2A_2G_2C_2A_2$-5'
SEQ ID NO: 176	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5'
SEQ ID NO: 177	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5'
SEQ ID NO: 178	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5'
SEQ ID NO: 179	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATG$_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5'
SEQ ID NO: 180	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTAT-5'
SEQ ID NO: 181	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCT -5'
SEQ ID NO: 182	3'-AGCTGAACTTGCT-5'
SEQ ID NO: 183	3'-AGCTGA -5'
SEQ ID NO: 184	3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2$-5'
SEQ ID NO: 185	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5'
SEQ ID NO: 186	3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5'
SEQ ID NO: 187	3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2$ATGCATTG-5'
SEQ ID NO: 188	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCTTAT-5'
SEQ ID NO: 189	3'-AGCTGAACTTGCTAAGCT -5'
SEQ ID NO: 190	3'-AGCTGAACTTGCT-5'
SEQ ID NO: 191	3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2$ -5'
SEQ ID NO: 192	3'-AGCTGA -5'
SEQ ID NO: 193	5'- TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3'
SEQ ID NO: 194	5'- TCGACT-3'

[0237]

SEQ ID NO: 195	3'-$A_2G_2C_2A_2T_2A_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2C_2A_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2G_2C_2A_2$-5'
SEQ ID NO: 196	3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5'
SEQ ID NO: 197	3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2$-5'
SEQ ID NO: 198	5'-$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2$-3'
SEQ ID NO: 199	3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5'
SEQ ID NO: 200	3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2$-5'
SEQ ID NO: 201	3'-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2$-5'
SEQ ID NO: 202	3'-$A_2C_2G_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2G_2T_2T_2A_2T_2C_2G_2A_2T_2T_2G_2$-5'
SEQ ID NO: 203	3'-$A_3G_3C_3T_3G_3A_3A_3C_3T_3T_3G_3C_3T_3A_3A_3G_3C_3T_3T_3A_3T_3G_3C_3A_3T_3T_3G_3$-5'
SEQ ID NO: 204	3'-$A_3G_3C_3T_3G_3A_3A_3C_3T_3T_3G_3C_3T_3A_3A_3G_3C_3T_3$-5'
SEQ ID NO: 205	3'-AGC_mTGAACTTGC_mTAAGC_mTTATGC_mATTG-5'
SEQ ID NO: 206	3'-AGC_mTGAACTTGC_mTAAGC_mTTAT-5'
SEQ ID NO: 207	3'-AGC_mTGAACTTGC_mTAAGC_mT -5'
SEQ ID NO: 208	3'-AGC_mTGAACTTGC_mT -5'
SEQ ID NO: 209	3'-AGC_mTGA -5'
SEQ ID NO: 210	3'-AGCTGAACTTG -5'
SEQ ID NO: 211	3'-AGCTGAAC -5'
SEQ ID NO: 212	3'-AGCTGA -5
SEQ ID NO: 213	5'-$C_2TG_2CT_2T$-3'
SEQ ID NO: 214	5'-$C_2TG_2CT_2$-3'
SEQ ID NO: 215	5'-$C_3T_3G_3C_3T_3T_3$-3'
SEQ ID NO: 216	5'-$C_3T_3G_3C_3T_3$-3'
SEQ ID NO: 217	5'-$T_3C_3G_3A_3C_3T_3T_3G_3A_3A_3C_3G_3A_3T_3T_3C_3G_3A_3A_3T_3A_3C_3G_3T_3A_3A_3C_3$ -3'

[0238] C_m＝5'-甲基化C;GCAT-DNA硫代磷酸酯连接;$G_1/C_1/A_1/U_1$-2'OME硫代磷酸酯连接;$A_2/T_2/C_2/G_2$-DNA磷酸二酯连接;$A_3/T_3/C_3/G_3$-RNA磷酸二酯连接

[0239] 药物组合物

[0240] 在某些实施方案中,本文描述了包含一种或多种本发明的CSO化合物的药物组合物。在某些实施方案中,药物组合物包含药学上可接受的稀释剂或载体。在某些实施方案中,药物组合物包含无菌盐水溶液和一种或多种CSO化合物。在某些实施方案中,药物组合物由无菌盐水溶液和一种或多种CSO化合物组成。在某些实施方案中,无菌盐水是药物级盐水。在某些实施方案中,药物组合物包含一种或多种CSO化合物和无菌水。在某些实施方案中,药物组合物由一种CSO化合物和无菌水组成。在某些实施例中,无菌水是药物级水。在某些实施方案中,药物组合物包含一种或多种CSO化合物和磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在某些实施方案中,药物组合物由一种或多种CSO化合物和无菌PBS组成。在某些实施方案中,无菌PBS是药物级PBS。

[0241] 在某些实施方案中,药物组合物包含一种或多种CSO化合物和一种或多种赋形剂。在某些实施方案中,赋形剂选自水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、淀粉酶、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。

[0242] 在某些实施方案中,本发明的CSO化合物可以与药学上可接受的活性和/或惰性物质混合以制备药物组合物或制剂。用于配制药物组合物的组合物和方法取决于许多标准,包括但不限于给药途径、疾病程度或给药剂量。

[0243] 缀合基团

[0244] 在某些实施方案中,根据本发明的CSO任选地还包含一个或多个缀合基团。缀合基团由一个或多个缀合部分和将一个或多个缀合部分与寡核苷酸连接的缀合接头组成。缀合基团可以连接到寡核苷酸的一端或两端和/或任何内部位置。在某些实施方案中,缀合基团连接到修饰的寡核苷酸的核苷的2'-位置。在某些实施方案中,与寡核苷酸的任一端或两端连接的缀合基团是末端基团。在某些这样的实施方案中,缀合基团或末端基团连接在寡核苷酸的3'和/或5'端。在某些这样的实施方案中,缀合基团连接在寡核苷酸的3'端。在某些实施方案中,缀合基团连接在寡核苷酸的3'端附近。在某些实施方案中,缀合基团连接在寡核苷酸的5'端。在某些实施方案中,缀合基团连接在寡核苷酸的5'端附近。

[0245] 在本文的任何实施方案中,缀合基团包含含1-3个GalNAc配体的GalNAc簇。

[0246] 在本文的任何实施方案中,缀合接头由单键组成。

[0247] 在本文的任何实施方案中,缀合接头是可切割的。

[0248] 在本文的任何实施方案中,缀合接头包含1-3个接头-核苷。

[0249] 在本文的任何实施方案中,其中缀合基团在功能结构域的5'端与CSO连接。在本文的任何实施方案中,其中缀合基团在功能结构域的3'端与CSO连接。在本文的任何实施方案中,其中缀合基团在环化结构域的5'端与CSO连接。在本文的任何实施方案中,其中缀合基团在环化结构域的3'末端与CSO连接。

[0250] 在某些实施方案中,CSO共价连接到一个或多个缀合基团上。在某些实施方案中,缀合基团修饰CSO的一种或多种性质,包括但不限于药效学、药代动力学、稳定性、结合、吸收、组织分布、细胞分布、细胞摄取、电荷和清除。在某些实施方案中,缀合基团赋予CSO新的性质,例如能够检测寡核苷酸的荧光团或报告基团。前面已经描述了某些缀合基团和缀合部分,例如:胆固醇部分(Letsinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86,6553-6556),胆酸(Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1994,4,1053-1060),硫醚,例如己基-S-三丁基硫醇(Manohalan等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1992,660,306-309;Manoharaan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1993,3,2765-2770),巯基胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.,1992,20,533-538),脂族链,例如癸二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,EMBOJ.,1991,10,1111-1118;Kabanov等人,FEBSLett.,1990,259,327-330;Svinarchuk等人,Biochimie,1993,75,49-54),磷脂,例如二-十六烷基-rac-丙三醇(di-hexadecyl-rac-glycerol)或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-rac-丙三醇-3-羟基膦酸酯(triethyl-ammonium 1,2-di-O-hexadecyl-rac-glycerol-3-H-phosphonate)(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36,3651-3654;Shea等人,Nucl.AcidsRes.,1990,18,3777-3783),多胺或聚氧乙烯链(Manoharan等人,Nucleosides&Nucleotides,1995,14,969-973),或金刚烷-乙酸-棕榈基部分(Mishra等人,Biochim.Biophys.Acta,1995,1264,229-

237),十八胺或己基氨基羰基氧胆固醇部分(hexylamino-carbonyl-oxycholesterol moiety)(Crooke等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277,923-937),生育酚基团(Nishina等人,Molecular Therapy Nucleic Acids,2015,4,e220;and Nishina等人,Molecular Therapy,2008,16,734-740),或GalNAc簇(例如,WO2014/179620)。

[0251] 缀合部分包括但不限于嵌入剂、报告分子、聚胺、聚酰胺、肽、碳水化合物、维生素部分、聚乙二醇、硫醚、聚醚、胆固醇、硫代胆固醇、胆酸部分、叶酸、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、菲啶、蒽醌、金刚烷、吖啶、荧光素、罗丹明、香豆素、荧光团和染料。

[0252] 在某些实施方案中,缀合部分包含活性药物物质,例如阿司匹林、华法林、保泰松、布洛芬、舒洛芬、苯布芬(fen-bufen)、酮洛芬、(S)-(+)-普拉洛芬、卡普洛芬、丹磺酰肌氨酸(dansylsarcosine)、2,3,5-三碘苯甲酸、芬戈莫德、氟芬那酸、亚叶酸、苯并噻二嗪、氯噻嗪、地西泮、吲哚-甲氧西林、巴比妥酸盐、头孢菌素、磺胺类药物、抗糖尿病药物、抗菌或抗生素

[0253] 缀合部分通过缀合接头与CSO相连。在某些实施方案中,缀合接头是单个化学键(即,缀合部分通过单键直接连接到CSO)。在某些实施方案中,缀合接头包括链结构,例如烃基链,或重复单元的低聚物,例如乙二醇、核苷或氨基酸单元。

[0254] 在某些实施方案中,缀合接头包含一个或多个选自烷基、氨基、氧代、酰胺、二硫化物、聚乙二醇、醚、硫醚和羟氨基的基团。在某些这样的实施方案中,缀合接头包括选自烷基、氨基、氧代、酰胺和醚基的基团。在某些实施方案中,缀合接头包含选自烷基和酰胺基的基团。在某些实施方案中,缀合接头包含选自烷基和醚基的基团。在某些实施方案中,缀合接头包含至少一个磷部分。在某些实施方案中,缀合接头包含至少一个磷酸基团。在某些实施方案中,缀合接头包括至少一个中性连接基团。

[0255] 在某些实施方案中,缀合接头,包括上述缀合接头,是双功能连接部分,例如本领域已知可用于将缀合基团连接至母体化合物的那些,如本文提供的寡核苷酸。通常,双功能连接部分包含至少两个官能团。选择其中一个官能团与CSO上的特定位点结合,另一个官能团与缀合基团结合。用于双功能连接部分的官能团的实例包括但不限于用于与亲核基团反应的亲电子试剂和用于与亲电子基团反应的亲核试剂。在某些实施方案中,双功能连接部分包含一个或多个选自氨基、羟基、羧酸、硫醇、烷基、烯基和炔基的基团。

[0256] 缀合接头的实例包括但不限于吡咯烷、8-氨基-3,6-二氧辛酸(ADO)、琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)和6-氨基己酸(AHEX或AHA)。其它缀合接头包括但不限于取代或未取代的C_1-C_{10}烷基、取代或未取代的C_2-C_{10}烯基或取代或未取代的C_2-C_{10}炔基,其中优选取代基的非限制性列表包括羟基、氨基、烷氧基、羧基、苄基、苯基、硝基、硫醇、硫代烷氧基、卤素、烷基、芳基、烯基和炔基。

[0257] 在某些实施方案中,缀合接头包含1-10个接头-核苷。在某些实施方案中,缀合接头包含2-5个接头-核苷。在某些实施方案中,缀合接头精确地包含3个接头-核苷。在某些实施方案中,缀合接头包含TCA基序。在某些实施方案中,这样的接头-核苷是修饰的核苷。在某些实施方案中,这样的接头-核苷包含修饰的糖部分。在某些实施方案中,接头-核苷是未修饰的。在某些实施方案中,接头-核苷包含任选保护的杂环碱基,所述杂环碱基选自嘌呤、取代的嘌呤、嘧啶或取代的嘧啶。在某些实施方案中,可切割部分是选自尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、4-N-苯甲酰基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、4-N-苯甲酰基-5-甲基胞嘧啶、腺嘌呤、6-N-

苯甲酰基腺嘌呤、鸟嘌呤和2-N-异丁酰鸟嘌呤的核苷。通常希望接头-核苷在寡聚化合物到达靶组织后从寡聚化合物中裂解。因此,接头-核苷通常通过可裂解的键相互连接并与寡聚化合物的其余部分连接。在某些实施方案中,这种可裂解的键是磷酸二酯键。

[0258] 如本文所用,一般不认为接头核苷是CSO的一部分,也不认为接头核苷是环化结构域或功能结构域的一部分。因此,接头-核苷的核苷酸不计入CSO或其结构域的长度,也不用于测定寡核苷酸与参考核酸的互补百分比。除非另有说明,缀合接头包含不超过10个接头-核苷。在某些实施方案中,缀合接头包含不超过5个接头-核苷。在某些实施方案中,缀合接头包含不超过3个接头-核苷。在某些实施方案中,缀合接头包含不超过2个接头-核苷。在某些实施方案中,缀合接头包含不超过1个接头-核苷。

[0259] 在某些实施方案中,期望缀合基团从CSO裂解。例如,在某些情况下,包含特定缀合部分的CSO更容易被特定细胞类型摄取,但一旦CSO被摄取,则需要裂解缀合基团以释放未缀合或亲本CSO。因此,某些缀合接头可以包含一个或多个可裂解部分。在某些实施方案中,可裂解部分是可裂解的键。在某些实施方案中,可裂解部分是包含至少一个可裂解键的一组原子。在某些实施方案中,可裂解部分包括具有一个、两个、三个、四个或四个以上可裂解键的原子组。在某些实施方案中,可裂解部分在细胞或亚细胞区室如溶酶体内选择性裂解。在某些实施方案中,可裂解部分被内源酶如核酸酶选择性裂解。

[0260] 在某些实施方案中,可裂解的键选自:酰胺键、酯键、醚键、磷酸二酯的一个或两个酯键、磷酸酯键、氨基甲酸酯键或二硫化物键。在某些实施方案中,可裂解的键是磷酸二酯的一个或两个酯键。在某些实施方案中,可裂解部分包含磷酸酯或磷酸二酯键。在某些实施方案中,可裂解部分是寡核苷酸和缀合部分或缀合基团之间的磷酸酯键。

[0261] 应用

[0262] 环状结构的寡核苷酸可用于各种作用机制。这些包括mRNA、ncRNA、microRNA、lncRNA和剪接的反义。此外,双链环状结构可用于递送siRNA构建体。此外,环状结构可以为基于ADAR和CRISPR机制的反义药物传递提供新的途径。此外,环状结构可以提供一种新的途径来递送反义核酸以破坏RNA结构从而增加翻译。环状结构也为核酸提供了确定的结构,从而允许与PRR发生不同程度的相互作用并诱导免疫级联反应。

[0263] 例如,当功能结构域是反义寡核苷酸时,本发明的CSO也可用于其中需要抑制基因表达的治疗方法中。这可以包括,例如,抑制内源基因(例如,癌基因)或外源基因(例如,病原体生长和/或代谢必需的基因)。

[0264] 在实施方案中,本发明提供抑制基因表达的方法,包括施用本文所述的环状结构寡核苷酸或包含环状结构寡核苷酸的组合物。

[0265] 在实施方案中,本发明提供抑制等位基因特异性基因表达的方法,包括施用本文所述的环状结构寡核苷酸或包含环状结构寡核苷酸的组合物。

[0266] 根据本发明的方法可用于治疗患有疾病或病症的受试者,其中抑制基因表达是有益的。在实施方案中,所述疾病或病症由细胞基因的异常表达或产物引起。

[0267] 在实施方案中,局部施用本文所述的环状结构寡核苷酸或包含环状结构寡核苷酸的组合物。

[0268] 在实施方案中,全身性施用本文所述的环状结构寡核苷酸或包含环状结构寡核苷酸的组合物。

[0269] 在实施方案中,用于调节RNA加工的方法包括施用本文所述的CSO化合物,其中所述功能结构域包含反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸包含14至30个连接的核苷酸,所述核苷酸具有与靶RNA的等长度部分互补的至少12个连续的核碱基,其中所述反义寡核苷酸包含1至3个区域,每个区域独立地包含2至5个连续的脱氧核糖核苷酸,并且剩余的核苷酸是2'-取代的、非离子的或受限制的糖核苷酸,或其组合。在实施方案中,核糖核酸的加工包括剪接。

[0270] 在实施方案中,本发明提供了在包含至少两个mRNA转录物的基因中选择第一mRNA转录物的方法,所述方法包括施用本文所述的环状结构寡核苷酸或包含环状结构寡核苷酸的组合物。

[0271] 在实施方案中,本发明提供治疗受试者中的疾病或病症的方法,其中调节RNA加工将有益于治疗受试者,所述方法包括施用本文所述的环状结构寡核苷酸或包含所述环状结构寡核苷酸的组合物。

[0272] 在实施方案中,本发明提供诱导无意义介导的靶RNA衰变的方法,包括施用本文所述的环状结构寡核苷酸或包含环状结构寡核苷酸的组合物。

[0273] 在实施方案中,本发明提供了增加编码蛋白质或功能性mRNA的mRNA水平和增加蛋白质或功能性mRNA表达的方法,包括施用本文所述的环状结构寡核苷酸或包含环状结构寡核苷酸的组合物。

[0274] 本发明的环状结构寡核苷酸可以单独给药或与任何其它试剂或疗法联合给药。药物或治疗可以联合给药,也可以同时给药。这种试剂或疗法可用于治疗或预防疾病或病症,并且不减弱本发明环状寡核苷酸的基因表达调节作用。用于治疗或预防疾病或病症的试剂包括但不限于小分子、肽疫苗、抗原、抗体,优选单克隆抗体、细胞毒性剂、激酶抑制剂、过敏原、抗生素、siRNA分子、反义寡核苷酸、TLR拮抗剂(例如TLR3和/或TLR7的拮抗剂和/或TLR8的拮抗剂和/或TLR9拮抗剂)、化疗剂(传统化疗和现代靶向治疗)、靶向治疗剂、活化细胞、肽、蛋白质、基因治疗载体、肽疫苗、蛋白质疫苗、DNA疫苗、佐剂和共刺激分子(例如细胞因子、趋化因子、蛋白质配体、反式激活因子、肽或肽包括修饰的氨基酸)或其组合。或者,本发明的环状寡核苷酸可以与其它化合物(例如脂质或脂质体)联合给药,以增强本发明环状寡核苷酸的基因表达调节的特异性或幅度。

[0275] 本发明的环状寡核苷酸可以通过任何合适的途径给药,包括但不限于肠胃外、粘膜递送、口服、舌下、透皮、局部、吸入、瘤内、静脉内、皮下、鞘内、鼻内、气溶胶、眼内、气管内、直肠内、阴道,通过基因枪、皮肤贴片或滴眼剂或漱口水形式。在根据本发明的任何方法中,根据本发明的环状寡核苷酸的单独给药或与任何其它试剂的联合给药可以直接给予组织或器官,例如但不限于膀胱、肝脏、肺或肾。在某些实施方案中,根据本发明的环状寡核苷酸单独或与任何其它药物组合的施用是通过肌内施用。在某些实施方案中,根据本发明的反义寡核苷酸单独或与任何其它药物组合的施用是通过粘膜施用。在某些实施方案中,根据本发明的反义寡核苷酸单独或与任何其它药物组合的施用是通过口服施用。在某些实施方案中,根据本发明的反义寡核苷酸单独或与任何其它药物组合的施用是通过直肠内施用。在某些实施方案中,根据本发明的反义寡核苷酸单独或与任何其它药物组合的施用是通过鞘内施用。在某些实施方案中,根据本发明的反义寡核苷酸单独或与任何其它药物组合的施用是通过肿瘤内施用。在某些实施方案中,根据本发明的反义寡核苷酸单独或与任

何其它药物组合的施用是通过肠胃外施用。在某些实施方案中,根据本发明的反义寡核苷酸单独或与任何其它药物组合的施用是通过皮下施用。

[0276] 在实施方案中,本文所述的任何环状结构寡核苷酸可与提供CSO位点特异性递送的部分缀合。在实施方案中,此类缀合物包括但不限于抗体、肽、脂质或小分子。

[0277] 在实施方案中,本文所述的任何环状结构寡核苷酸可用提供CSO位点特异性递送的部分包封。在实施方案中,CSO可以被包封在例如脂质、脂质纳米颗粒(LNP)或肽大环结构中。

[0278] 用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和调节张力的试剂如氯化钠或葡萄糖。pH值可以用酸或碱调节,如盐酸或氢氧化钠。肠胃外制剂可装入安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。根据本发明的反义寡核苷酸的施用可以使用已知的方法进行,所述方法使用有效量并持续有效减少疾病症状或替代标记物的时间段。例如,用于治疗疾病和/或病症的本发明反义寡核苷酸的有效量可以是减轻或减少症状、或延迟或改善肿瘤、癌症、或细菌、病毒或真菌感染所必需的量。在施用调节基因表达的组合物的情况下,与不存在本发明的反义寡核苷酸时的基因表达相比,本发明的反义寡核苷酸的有效量是足以实现所需调节的量。任何特定应用的有效量可根据诸如所治疗的疾病或病症、所施用的特定寡核苷酸、受试者的大小或疾病或病症的严重性等因素而变化。本领域普通技术人员可以经验地确定特定反义寡核苷酸的有效量,而不需要过多的实验。

[0279] 合成

[0280] 本文所述的CSO可通过任何合适的本领域认可的方法制备,所述方法包括但不限于H-膦酸盐化学、亚磷酰胺化学、或H-膦酸盐化学和亚磷酰胺化学的组合(即,对于某些环化,H-膦酸盐化学,而对于其它环化,亚磷酰胺化学),所述方法可手动或通过自动合成器进行。本发明的寡核苷酸也可以以多种方式进行修饰,而不损害其与靶标杂交的能力(参见,例如,Agrawal和Gait,Advances in Nucleic Acid Therapeutics,(2019)https://doi.org/10.1039/9781788015714)。

[0281] 定义

[0282] 除非提供了具体的定义,否则本文所述的分析化学、合成有机化学以及药物和药物化学中所使用的术语以及过程和技术是本领域中众所周知和常用的术语。在允许的情况下,本公开全文中提及的所有专利、申请、公开的申请和其他出版物及其他数据均通过引用整体并入本文。

[0283] 除非另有说明,以下术语具有以下含义:

[0284] 如本文所用,“2'-脱氧核苷”是指包含2'-H(H)呋喃糖部分的核苷,如在天然存在的脱氧核糖核酸(DNA)中发现的。在某些实施方案中,2'-脱氧核苷可以包含修饰的核碱基或可以包含RNA核碱基(尿嘧啶)。

[0285] 如本文所用,“2'-取代的核苷”是指包含2'-取代的糖部分的核苷。如本文所用,涉及糖部分的“2'-取代的”是指包含至少一个不同于H或OH的2'-取代基的糖部分。

[0286] 如本文所用,“5-甲基胞嘧啶”是指用连接于5-位的甲基修饰的胞嘧啶。5-甲基胞

嘧啶是一种修饰的碱基。

[0287] 如本文所用,单数形式“一”、“一个”和“所述”包括单数和复数指代物,除非上下文另有明确说明。

[0288] 如本文所用,“施用”是指向动物提供药物制剂。

[0289] 如本文所用,“动物”指人或非人动物。

[0290] 如本文所用,“有需要的个体”是指被选择用于治疗或疗法的需要这种治疗或疗法的人或非人动物。

[0291] 如本文所用,“反义活性”是指可归因于反义化合物与其靶核酸杂交的任何可检测和/或可测量的变化。在某些实施方案中,反义活性是在不存在反义化合物的情况下,与靶核酸水平或靶蛋白水平相比,由这种靶核酸编码的靶核酸或蛋白的量或表达的降低。在某些实施方案中,反义活性是在不存在反义化合物的情况下,与靶核酸水平或靶蛋白水平相比,由这种靶核酸编码的靶核酸或蛋白的量或表达的增加。

[0292] 如本文所用,“反义化合物”是指能够实现至少一种反义活性的寡聚化合物。

[0293] 如本文所用,涉及治疗的“改善”是指在没有治疗的情况下,至少一种症状相对于相同症状的改善。在某些实施方案中,改善是症状严重性或频率的降低或症状严重性或频率的延迟发作或进展减慢。在某些实施方案中,症状或标志是共济失调、神经病变和聚集物形成。在某些实施方案中,这些症状的改善导致运动功能的改善、神经病变的减少或聚集体数量的减少。

[0294] 如本文所用,“双环核苷”或“BNA”是指包含双环糖部分的核苷。如本文所用,“双环糖”或“双环糖部分”是指包含两个环的修饰的糖部分,其中第二个环通过连接第一个环中两个原子的桥形成,从而形成双环结构。在某些实施方案中,双环糖部分的第一个环是呋喃糖基部分。在某些实施方案中,双环糖部分不包含呋喃糖基部分。

[0295] 如本文所用,“手性富集的群体”是指具有相同分子式的多个分子,其中群体中在特定手性中心含有特定立体化学构型的分子的数目或百分比大于如果特定手性中心是立体无规的,预期在群体中相同特定手性中心含有相同特定立体化学构型的分子的数目或百分比。在每个分子内具有多个手性中心的分子的手性富集的群体可以包含一个或多个立体无规手性中心。在某些实施方案中,分子是修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,分子是包含修饰的寡核苷酸的化合物。

[0296] 如本文所用,“可裂解部分”是指在生理条件下被裂解的键或原子团,例如,在细胞、动物或人的内部。

[0297] 如本文所用,涉及寡核苷酸的“互补”是指当寡核苷酸或其一个或多个区域的核碱基序列和另一个核酸或其一个或多个区域的核碱基序列在相反方向排列时,至少70%的核碱基能够彼此氢键合。互补碱基是指能够相互形成氢键的碱基。

[0298] 互补的碱基对包括腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)、腺嘌呤(A)和尿嘧啶(U)、胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)、5-甲基胞嘧啶(mC)和鸟嘌呤(G)。互补寡核苷酸和/或核酸不需要在每个核苷上具有碱基互补。相反,某些不匹配是可以容忍的。如本文所用,关于寡核苷酸的“完全互补”或“100%互补”是指寡核苷酸在寡核苷酸的每个核苷上与另一寡核苷酸或核酸互补。

[0299] 如本文所用,“缀合基团”是指直接或间接与寡核苷酸连接的一组原子。缀合基团包括缀合部分和将缀合部分与寡核苷酸连接的缀合接头。

[0300] 如本文所用,“缀合接头”是指包含至少一个将缀合部分连接到寡核苷酸上的键的一组原子。

[0301] 如本文所用,“缀合部分”是指通过缀合接头与寡核苷酸连接的一组原子。

[0302] 如本文所用,寡核苷酸上下文中的“邻接”是指彼此紧邻的核苷、碱基、糖部分或核苷间连接。例如,“相邻的碱基”是指序列中彼此紧邻的碱基。

[0303] 如本文所用,“接头-核苷”是指将本发明的CSO直接或间接连接到缀合部分的核苷。接头-核苷位于缀合接头内,即使它们与CSO相连,也不被视为CSO化合物的一部分。

[0304] 如本文所用,“缺口聚物”是指修饰的寡核苷酸,包含具有多个核苷的内部区域,所述核苷支持位于具有一个或多个核苷的外部区域之间的RNase H切割,其中包含内部区域的核苷在化学上不同于包含外部区域的一个或多个核苷。内部区域可以称为“缺口”,外部区域可以称为“翼”。除非另有说明,“缺口聚物”是指糖基序。除非另有说明,缺口聚物缺口的核苷的糖部分是未修饰的2'-脱氧呋喃糖基。因此,术语“MOE缺口聚物”表示在两翼具有2'-MOE核苷糖基序和2'-脱氧核苷缺口的缺口聚物。除非另有说明,否则MOE缺口聚物可能包含一个或多个修饰的核苷间连接和/或修饰的碱基,并且此类修饰不一定遵循糖修饰的缺口聚物模式。

[0305] 如本文所用,“热点区域”是靶核酸上的一系列核碱基,其顺应寡聚化合物以减少靶核酸的量或活性,如本文以下实施例中所证明。

[0306] 如本文所用,“杂交”是指互补寡核苷酸和/或核酸的配对或退火。虽然不限于特定的机制,但最常见的杂交机制涉及互补碱基之间的氢键,可能是Watson-Crick、Hoogsteen或反向Hoogsteen氢键。

[0307] 如本文所用,术语“核苷间连接”是寡核苷酸中相邻核苷之间的共价连接。本文所用的“修饰的核苷间连接”是指除磷酸二酯核苷间连接以外的任何核苷间连接。“硫代磷酸酯键”是修饰的核苷间连接,其中磷酸二酯核苷间连接的一个非桥氧原子被硫原子取代。

[0308] 如本文所用,短语“抑制表达或活性”是指相对于未处理或对照样品中的活性表达,表达或活性的降低或阻断,并且不一定表示表达或活性的完全消除。

[0309] 如本文所用,“接头-核苷”是指将寡核苷酸直接或间接连接到缀合部分的核苷。接头-核苷位于寡聚化合物的缀合接头内。接头核苷不被视为寡聚化合物的寡核苷酸部分的一部分,即使它们与寡核苷酸相邻。

[0310] 如本文所用,“非双环修饰的糖部分”是指包含修饰如取代基的修饰的糖部分,其不在糖的两个原子之间形成桥以形成第二个环。

[0311] 如本文所用,“错配”或“非互补的”是指当第一和第二寡聚化合物对齐时,第一寡核苷酸的核碱基与第二寡核苷酸或靶核酸的相应核碱基不互补。

[0312] 如本文所用,“MOE”是指甲氧基乙基。“2'-MOE”是指取代核糖基糖部分的2'-OH基团的2'-$OCH_2CH_2OCH_3$基团。

[0313] 如本文所用,“基序”是指寡核苷酸中未修饰和/或修饰的糖部分、核碱基和/或核苷间连接的模式。

[0314] 如本文所用,“mRNA”是指编码蛋白质的RNA转录物,包括前mRNA和成熟mRNA,除非另有说明。

[0315] 如本文所用,“核碱基”是指未修饰的核碱基或修饰的核碱基。如本文所用,“未修

饰的核碱基”是腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、尿嘧啶(U)和鸟嘌呤(G)。如本文所用,“修饰的核碱基”是除未修饰的A、T、C、U或G之外的一组原子,其能够与至少一个未修饰的核碱基配对。“5-甲基胞嘧啶”是修饰的核碱基的一个例子。通用碱基是经过修饰的核碱基,它可以与五个未经修饰的核碱基中的任何一个配对。修饰的碱基,也称为杂环碱基部分,包括其他核碱基,例如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、6-甲基腺嘌呤和鸟嘌呤的其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物、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-硫醇、8-硫烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(包括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、3-脱氮鸟氨酸和3-脱氮腺嘌呤。

[0316] 在某些实施方案中,修饰的核碱基选自:通用碱基、疏水碱基、混杂碱基、尺寸扩大碱基和本文定义的氟化碱基。5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶;5-丙炔基胞嘧啶;5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤和鸟嘌呤的烷基衍生物、2-丙基腺嘌呤和鸟嘌呤的烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤尿嘧啶和胞嘧啶、嘧啶碱基的其他炔基衍生物、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-硫代尿嘧啶、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟氨酸、5-卤代特别是5-溴、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和嘧啶、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-脱氮胍和7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。进一步修饰的核碱基包括三环嘧啶如苯并噁嗪胞苷([5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、G-钳如取代的苯并噁嗪胞苷(如9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮(9-(2-aminoethoxy)-H-pyrimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-one))、咔唑胞苷(2H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-2-酮)、吡啶并吲哚胞苷(H-吡啶并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮(H-pyrido[3',2':4,5]pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-2-one))。修饰的核碱基也可以包括嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环取代的碱基,例如7-去氮杂-腺嘌呤、7-去杂鸟苷、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。在某些实施方案中,修饰的核碱基是5-甲基胞嘧啶。

[0317] 代表性的修饰糖包括碳环或非环糖、在其2′、3′或4′位中的一个或多个上具有取代基的糖以及具有取代糖的一个或多个氢原子的取代基的糖。在某些实施方案中,糖通过在2'位具有取代基进行修饰。在另外的实施方案中,糖通过在3'位具有取代基进行修饰。在其他实施方案中,糖通过在4'位具有取代基进行修饰。还预期糖可以在这些位置中的一个以上具有修饰,或者反义寡核苷酸可以在一个位置具有一个或多个具有糖修饰的核苷酸,并且在不同位置还具有一个或多个具有糖修饰的核苷酸。

[0318] 在寡核苷酸中预期的糖修饰包括但不限于选自以下的糖取代基:OH;F;O-、S-、或N-烷基;O-、S-、或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C_1-C_{10}烷基或C_2-C_{10}烯基和炔基。在一些实施方案中,这些基团可选自:O$(CH_2)_xOCH_3$、O$((CH_2)_xO)_yCH_3$、O$(CH_2)_xNH_2$,、O$(CH_2)_xCH_3$、O$(CH_2)_xONH_2$和O$(CH_2)_xON((CH_2)_xCH_3)_2$,

其中x和y独立地为1至10。

[0319] 在一些实施方案中,修饰的糖包含选自以下的取代基:C_1-C_{10}低级烷基、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、Cl、Br、CN、OCN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、杂环烷基、杂环烷基芳基、氨基烷基氨基、多烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA裂解基团、报告基团、嵌入物、用于改善药物动力学性质的基团、或用于改善药效的基团反义寡核苷酸的性质以及具有类似性质的其他取代基。在一个实施方案中,所述修饰包括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)(Martin等人,1995),即烷氧基烷氧基。另一个修饰包括2′-二甲氨基乙氧基,即O$(CH_2)_2ON(CH_3)_2$基团,也称为2′-DMAOE和2′-二甲氨基乙氧基(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_2-O-CH_2-N$(CH_3)_2$。

[0320] 其他糖取代基包括烯丙基(-CH_2-CH=CH_2)、-O-烯丙基CH_2-CH=CH_2)、甲氧基(-O-CH_3)、氨基丙氧基(-O$CH_2CH_2CH_2NH_2$)和氟(F)。2'位(2'-)上的糖取代基可以位于阿拉伯糖(上)位或核糖(下)位。一个2′-阿拉伯糖修饰是2′-F。其他类似的修饰也可以在寡聚化合物的其他位置进行,特别是3′末端核苷上的糖的3′位置或2′-5′连接的寡核苷酸和5′末端核苷酸的5′位置。低聚化合物也可以具有糖模拟物,例如环丁基部分,来代替戊基呋喃糖。公开了修饰的糖结构的制备的美国专利的实例包括,但不限于,美国专利4,981,957、5,118,800、5,319,080、5,359,044、5,393,878、5,446,137、5,466,786、5,514,785、5,519,134、5,567,811、5,576,427、5,591,722、5,597,909、5,610,300、5,627,053、5,639,873、5,646,265、5,658,873、5,670,633、5,792,747和5,700,920,这些专利的全部内容通过引用结合于此。

[0321] 代表性的糖取代基包括美国专利申请公开2005/0261218中描述的基团,其通过引用结合于此。在特定实施方案中,糖修饰是2′-O-Me修饰、2′-F修饰、2′-H修饰、2′-氨基修饰、4′-硫代核糖修饰或与6′位碳连接的羧基上的硫代磷酸酯修饰,或其组合。

[0322] 在某些实施方案中,2'-取代的非二环修饰的核苷包含糖部分,所述糖部分包含选自F、OCH_3和$OCH_2CH_2OCH_3$的非桥连的2'-取代基。

[0323] 某些修饰的糖部分包含一个取代基,该取代基连接呋喃糖基环的两个原子形成第二个环,形成双环糖部分。在某些这样的实施方案中,双环糖部分包含4'和2'呋喃糖环原子之间的桥。这种4'至2'桥连糖取代基的实例包括但不限于:4'-CH_2-2'、4'-$(CH_2)_2$-2'、4'-$(CH_2)_3$-2'、4'-CH_2-O-2'(“LNA”)、4'-CH_2-S-2'、4'-$(CH_2)_2$-O-2'(“ENA”)、4'-CH(CH_3)-O-2'(称为“约束乙基”或“cEt”)、4'-CH_2-O-CH_2-2'、4'-CH_2-N(R)-2'、4'-CH(CH_2OCH_3)-O-2'(称为“受限MOE”或“cMOE”)及其类似物(参见Prakash等人,7,399,845,Bhat等人,U.S.7,569,686,Swayze等人,U.S.7,741,457,和Swayze等人,U.S.8,022,193)、4'-C(CH_3) (CH_3)-O-2'及其类似物(参见例如,Seth等人,U.S.8,278,283)、4'-CH_2-N(OCH_3)-2'及其类似物(参见例如,Prakash等人,U.S.8,278,425)、4'-CH_2-O-N(CH_3)-2'(参见例如Allerson等人,U.S.7,696,345和Allerson等人,U.S.8,124,745)、4'-CH_2-C(H)(CH_3)-2'(参见例如,Zhou等人,J.Org.Chem.,2009,74,118-134)、4'-CH_2-C(=CH_2)-2'及其类似物(参见例如Seth等人,U.S.8,278,426)、4'-C(R_aR_b)-N(R)-O-2'、4'-C(R_aR_b)-O-N(R)-2'、4'-CH_2-O-N(R)-2'和4'-CH_2-N(R)-O-2',其中每个R、R_a和R_b独立地为H、保护基或C_1-C_{12}烷基(参见,例如Imanishi等人,U.S.7,427,672)。

[0324] 在某些实施方案中,这样的4'至2'桥独立地包含1至4个独立地选自下列的连接基团:-[C(R_a)(R_b)]$_n$-、-[C(R_a)(R_b)]$_n$-O-、-C(R_a)=C(R_b)-、-C(R_a)=N-、-C(=NR_a)-、-C(=O)-、-C(=S)-、-O-、-Si(R_a)$_2$-、-S(=O)$_x$-和-N(R_a)-;

[0325] 其中:

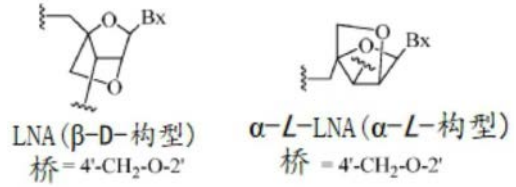
[0326] x是0、1或2;

[0327] n是1、2、3或4;

[0328] 每个R_a和R_b独立地是H、保护基团、羟基、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_5-C_{20}芳基、取代的C_5-C_{20}芳基、杂环基、取代的杂环基、杂芳基、取代的杂芳基、C5-C7脂环基、取代的C_5-C_7脂环基、卤素、OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、COOJ1、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、CN、磺酰基1(S(=O)$_2$-J_1),并且每个J1和J2独立地是H、C_1-C_{12}烷基、取代的C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯基、取代的C_2-C_{12}烯基、C_2-C_{12}炔基、取代的C_2-C_{12}炔基、C_5-C_{20}芳基、取代的C_5-C_{20}芳基、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、杂环基、取代的杂环基、C_1-C_{12}氨基烷基、取代的C_1-C_{12}氨基烷基或保护基团。

[0329] 额外的双环糖部分是本领域已知的,参见例如:Freier等人,NucleicAcids Research,1997,25(22),4429-4443,Albaek等人,J.Org.Chem.,2006,71,7731-7740,Singh等人,Chem.Commun.,1998,4,455-456;Koshkin等人,Tetrahedron,1998,54,3607-3630;Kumar等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1998,8,2219-2222;Singh等人,J Org.Chem.,1998,63,10035-10039;Srivastava等人,JAm.Chem.Soc,20017,129,8362-8379;Wengel等人,U.S.7,053,207;Imanishi等人,U.S.6,268,490;Imanishi等人,U.S.6,770,748;Imanishi等人,U.S.RE44,779;Wengel等人,U.S.6,794,499;Wengel等人,U.S.6,670,461;Wengel等人,U.S.7,034,133;Wengel等人,U.S.8,080,644;Wengel等人,U.S.8,034,909;Wengel等人,U.S.8,153,365;Wengel等人,U.S.7,572,582;and Ramasamy等人,U.S.6,525,191;Torsten等人,WO 2004/106356;Wengel等人,WO 1999/014226;Seth等人,WO 2007/134181;Seth等人,U.S.7,547,684;Seth等人,U.S.7,666,854;Seth等人,U.S.8,088,746;Seth等人,U.S.7,750,131;Seth等人,U.S.8,030,467;Seth等人,U.S.8,268,980;Seth等人,U.S.8,546,556;Seth等人,U.S.8,530,640;Migawa等人,U.S.9,012,421;Seth等人,U.S.8,501,805;和U.S.专利公开Nos.Allerson等人,US2008/0039618和Migawa等人,US2015/0191727。

[0330] 在某些实施方案中,双环糖部分和掺入这种双环糖部分的核苷进一步由异构构型定义。例如,LNA核苷(如本文所述)可能为α-L构型或β-D构型。

[0331] 

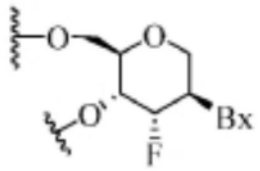
[0332] α-L-亚甲氧基(4'-CH2-O-2')或α-L-LNA双环核苷已被掺入显示出反义活性的寡核苷酸中(Frieden等人,NucleicAcids Research,2003,21,6365-6372)。这里,双环核苷的一般描述包括两种异构构型。除非另有说明,当在本文的示例性实施方案中确定特定双环核苷(如LNA或cEt)的位置时,它们处于β-D构型。

[0333] 在某些实施方案中,修饰的糖部分包含一个或多个非桥连糖取代基和一个或多个

桥连糖取代基(例如,5'-取代和4'-2'桥连糖)。

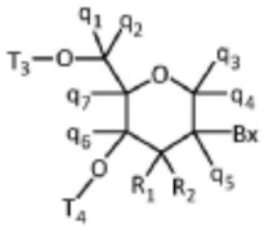
[0334] 在某些实施方案中,修饰的糖部分是糖替代物。在某些这样的实施方案中,糖部分的氧原子被例如硫、碳或氮原子取代。在某些此类实施方案中,此类修饰的糖部分还包含本文所述的桥连和/或非桥连取代基。例如,某些糖替代物包含4'-硫原子和在2'-位置(参见,例如,Bhat等人,U.S.7,875,733和Bhat等人,U.S.7,939,677)和/或5'位置的取代。

[0335] 在某些实施方案中,糖替代物包括具有不同于5个原子的环。例如,在某些实施方案中,糖替代物包含六元四氢吡喃("THP")。这些四氢吡喃可以进一步修饰或取代。包含此类经修饰的四氢吡喃的核苷包括但不限于己糖醇核酸("HNA")、己糖醇核酸("ANA")、甘露醇核酸("MNA")(参见例如Leumann,CJ.Bioorg.&Med.Chem.2002,10,841-854),氟HNA:

[0336] 

F-HNA

[0337] ("F-HNA",例如,见Swayze等人,U.S.8,088,904;Swayze等人,U.S.8,440,803;Swayze等人,U.S.8,796,437;和Swayze等人,U.S.9,005,906;F-HNA也可以称为F-THP或3'-氟四氢吡喃),并且核苷包括另外的修饰的THP化合物,其具有下式:

[0338] 

[0339] 其中,对于每一种所述修饰的THP核苷,独立地:

[0340] Bx是核碱基部分;

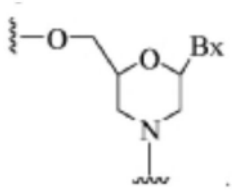
[0341] T3和T4各自独立地是将修饰的THP核苷连接到寡核苷酸的剩余部分的核苷间连接基团,或者T3和T4中的一个是将修饰的THP核苷连接到寡核苷酸的剩余部分的核苷间连接基团,并且T3和T4中的另一个是H、羟基保护基团、连接的缀合基团或5'或3'末端基团;

[0342] q1、q2、q3、q4、q5、q6和q7各自独立地是H、C_1-C_6烷基、取代的C_1-C_6烷基、C_2-C_6烯基、取代的C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基或取代的C_2-C_6炔基;并且R_1和R_2各自独立地选自:氢、卤素、取代或未取代的烷氧基、NJ1J2、SJ1、N3、OC(=X)J_1、OC(=X)NJ_1J_2、NJ_3C(=X)NJ_1J_2和CN,其中X是O、S或NJ1,并且J1、J2和J3各自独立地是H或C_1-C_6烷基。

[0343] 在某些实施方案中,提供了修饰的THP核苷,其中q1、q2、q3、q4、q5、q6和q7各自是H。在某些实施方案中,q1、q2、q3、q4、q5、q6和q7中的至少一个不是H。在某些实施方案中,q1、q2、q3、q4、q5、q6和q7中的至少一个是甲基。在某些实施方案中,提供了修饰的THP核苷,其中R_1和R_2的一个是F。在某些实施方案中,R_1是F,R_2是H,在某些实施方案中,R_1是甲氧基,R_2是H,在某些实施方案中,R_1是甲氧基乙氧基,R_2是H。

[0344] 在某些实施方案中,糖替代物包括具有多于5个原子和多于一个杂原子的环。例如,已经报道了包含吗啉糖部分的核苷及其在寡核苷酸中的用途(参见,例如,Braasch等

人,Biochemistry,2002,41,4503-4510和Summerton等人,U.S.5,698,685;Summerton等人,U.S.5,166,315;Summerton等人,U.S.5,185,444;和Summerton等人,U.S.5,034,506)。这里使用的术语“吗啉基”是指具有以下结构的糖替代物:

[0345] 

[0346] 在某些实施方案中,吗啉基可以被修饰,例如通过添加或改变来自上述吗啉基结构的各种取代基。这种糖替代物在本文中被称为“修饰的吗啉基”。

[0347] 在某些实施方案中,糖替代物包含无环部分。包含这种无环糖替代物的核苷和寡核苷酸的实例包括但不限于:肽核酸(“PNA”)、无环丁基核酸(参见,例如,Kumar等人,Org.Biomol.Chem.,2013,11,5853-5865),以及在Manoharan等人的WO2011/133876中描述的核苷和寡核苷酸。

[0348] 本领域已知许多其他双环和三环糖和糖替代环系统可用于修饰的核苷。

[0349] 功能结构域或环化结构域的寡核苷酸的核苷残基可以通过许多已知的核苷间连接中的任何一种相互偶联。核苷间连接基团的两个主要类别由磷原子的存在与否来定义。代表性的含磷核苷间连接包括但不限于含有磷酸二酯键(“P=O”)(也称为未修饰或天然存在的连接)、磷酸三酯、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯和硫代磷酸酯(“P=S”)以及二硫代磷酸酯(“HS-P=S”)的磷酸盐。代表性的不含磷的核苷间连接基团包括但不限于甲基烯甲基亚氨基(-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-)、硫代二酯、硫代氨基甲酸酯(-O-C(=O)(NH)-S-);硅氧烷(-O-SiH_2-O-);和N,N'-二甲基肼(-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-)。含磷和非含磷核苷间连接的制备方法是本领域技术人员熟知的。

[0350] 这样的核苷间连接包括但不限于磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、烷基膦酸酯、烷基膦酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、硅氧烷、碳酸酯、碳烷氧基、乙酰胺基、氨基甲酸酯、吗啉基、硼烷、硫醚、桥连氨基磷酸酯、桥连亚甲基膦酸酯、桥连硫代磷酸酯和砜核苷间连接。在一些实施方案中,本发明的合成反义寡核苷酸可以包含核苷酸间连接的组合。在一些实施方案中,本发明的合成反义寡核苷酸可以包含硫代磷酸酯和磷酸二酯核苷酸间连接的组合。在一些实施方案中,多于一半但少于全部的核苷酸间连接是硫代磷酸酯核苷酸间连接。在一些实施方案中,所有的核苷酸间连接都是硫代磷酸酯核苷酸间连接。

[0351] 包含具有手性中心的核苷间连接的修饰寡核苷酸可以制备为包含立体随机核苷间连接的修饰寡核苷酸群体,或制备为包含特定立体化学构型的硫代磷酸酯连接的修饰寡核苷酸群体。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸的群体包含硫代磷酸酯核苷间连接,其中所有的硫代磷酸酯核苷间连接是立体随机的。这种修饰的寡核苷酸可以使用导致随机选择每个硫代磷酸酯键的立体化学构型的合成方法产生。尽管如此,如本领域技术人员所充分理解的,每个单独的寡核苷酸分子的每个单独的硫代磷酸酯具有确定的立体构型。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸群体被富集,以得到在特定的、独立选择的立体化学构型中包含一个或多个特定的硫代磷酸酯核苷间连接的修饰的寡核苷酸。

[0352] 在某些实施方案中,硫代磷酸酯连接可以是混合的Rp和Sp对映异构体,或者它们可以以Rp或Sp形式制成立体规则的或基本立体规则的。在其中连接是混合的Rp和Sp对映异

构体的实施方案中,Rp和Sp形式可以在寡核苷酸内的定义位置处或随机地放置在整个寡核苷酸中。

[0353] 如本文所用,“核碱基序列”是指核酸或寡核苷酸中连续核碱基的顺序,与任何糖或核苷间连接修饰无关。

[0354] 如本文所用,“核苷”是指包含核碱基和糖部分的化合物。核碱基和糖部分各自独立地为未修饰或修饰的。如本文所用,“修饰的核苷”是指包含修饰的核碱基和/或修饰的糖部分的核苷。修饰的核苷包括缺乏碱基的碱基核苷。“连接的核苷”是以连续序列连接的核苷(即在被连接的核苷之间不存在额外的核苷)。

[0355] 如本文所用,“寡聚化合物”是指寡核苷酸和任选的一个或多个附加特征,如缀合基团或末端基团。寡聚化合物可以与第二寡聚化合物配对,第二寡聚化合物与第一寡聚化合物互补或可以不成对。“单链寡聚化合物”是一种不成对的寡聚化合物。

[0356] 如本文所用,“寡核苷酸”是指通过核苷间连接连接的连接核苷链,其中每个核苷和核苷间连接可以被修饰或未修饰。除非另有说明,寡核苷酸由8-50个相连的核苷组成。

[0357] 如本文所用,“修饰的寡核苷酸”是指其中至少一个核苷或核苷间连接被修饰的寡核苷酸。如本文所用,“未修饰的寡核苷酸”是指不包含任何核苷修饰或核苷间修饰的寡核苷酸。

[0358] 如本文所用,“药学上可接受的载体或稀释剂”是指适用于对动物给药的任何物质。某些这样的载体能够将药物组合物配制成例如片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液和锭剂,以供受试者口服摄取。在某些实施方案中,药学上可接受的载体或稀释剂是无菌水、无菌生理盐水、或无菌缓冲溶液。

[0359] 如本文所用,“药学上可接受的盐”是指化合物的生理学上和药学上可接受的盐,例如低聚化合物,即保留母体化合物的所需生物活性且不赋予其不希望的毒理学效应的盐。

[0360] 本文所用的“药物组合物”是指适于施用于受试者的物质的混合物。例如,药物组合物可以包含反义化合物和无菌水溶液。在某些实施方案中,药物组合物在某些细胞系中的游离摄取测定中显示活性。

[0361] 如本文所用,“磷部分”是指包含磷原子的一组原子。在某些实施方案中,磷部分包括单-、二-、或三-磷酸酯,或硫代磷酸酯。

[0362] 如本文所用,“前体药物”是指在体外形式的治疗剂,其在动物或其细胞内转化为不同的形式。通常,前体药物在动物体内的转化通过细胞或组织中存在的酶(例如,内源性或病毒性酶)或化学品的作用和/或通过生理条件来促进。

[0363] 如本文所用,“OMe”指甲氧基。“2’-OMe”是指取代核糖糖部分的2’-OH基团的2’-OCH_3基团。

[0364] 通过端点列举的数值范围包括包含在相应范围内的所有数字和分数,以及所列举的端点。

[0365] 此处提供的范围应理解为该范围内所有值的简写。例如,1至50的范围被理解为包括由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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50组成的组中的任何数字、数字的组合或子范围,以及上述整数之间的所有中间十进制值,例如1.1、

1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8和1.9。关于子范围特别考虑了从该范围的任一端点延伸的“嵌套子范围”。例如,1至50的示例性范围的嵌套子范围可以在一个方向上包括1至10、1至20、1至30和1至40,或者在另一个方向上包括50至40、50至30、50至20和50至10。

[0366] 如本文所用,“减少或抑制量或活性”是指相对于未处理或对照样品中的转录表达或活性,转录表达或活性的减少或阻断,并且不一定表示转录表达或活性的完全消除。

[0367] 如本文所用,涉及寡核苷酸的“自互补”是指至少部分与其自身杂交的寡核苷酸。

[0368] 如本文所用,“标准细胞测定法”是指实施例1中所述的测定法及其合理的变体。

[0369] 如本文所用,在相同分子式的分子群体的上下文中,“立体无规手性中心”是指具有无规立体化学构型的手性中心。例如,在包含立体无规手性中心的分子群体中,具有立体无规手性中心(S)构型的分子数量可以但不一定与具有立体无规手性中心(R)构型的分子数量相同。如果手性中心的立体化学构型是合成方法的结果,而不是为了控制立体化学构型而设计的,则认为它是随机的。在某些实施方案中,立体无规手性中心是立体无规硫代磷酸酯核苷间连接。

[0370] 如本文所用,“糖部分”是指未修饰的糖部分或修饰的糖部分。如本文所用,“未修饰的糖部分”是指在RNA中发现的2'-OH(H)呋喃糖基部分(“未修饰的RNA糖部分”),或在DNA中发现的2'-H(H)部分(“未修饰的DNA糖部分”)。未修饰的糖部分在3'和4'位置各有一个氢,在3'位置有一个氧,在5'位置有两个氢。如本文所用,“修饰的糖部分”或“修饰的糖”是指修饰的呋喃糖部分或糖替代物。如本文所用,修饰的呋喃糖部分是指包含非氢取代基取代未修饰的糖部分的至少一个氢的呋喃糖。在某些实施方案中,修饰的呋喃糖部分是2'-取代的糖部分。这种修饰的呋喃糖部分包括双环糖和非双环糖。

[0371] 如本文所用,“糖替代物”是指修饰的糖部分,其具有除呋喃糖基部分之外的可将核碱基连接至另一基团的部分,例如寡核苷酸中的核苷间连接、缀合基团或末端基团。可以将包含糖替代物的修饰的核苷掺入寡核苷酸内的一个或多个位置,并且这样的寡核苷酸能够与互补的寡聚化合物或核酸杂交。

[0372] 如本文所用,“靶核酸”和“靶RNA”是指反义化合物被设计为影响的核酸。

[0373] 如本文所用,“靶区”是指设计寡聚化合物与之杂交的靶核酸的一部分。

[0374] 如本文所用,“末端基团”是指共价连接到寡核苷酸末端的化学基团或原子团。

[0375] 如本文所用,“有效治疗量”是指向动物提供治疗益处的药剂的量。例如,有效治疗量可改善疾病症状。

[0376] 本文所用的“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指施用本文所述的化合物以实现疾病、症状或病症的改变或改善。

[0377] “部分”是指核酸的限定数量的连续(即连接的)核碱基。在某些实施方案中,部分是靶核酸的限定数目的连续核碱基。在某些实施方案中,一部分是反义化合物的限定数量的连续核碱基。

[0378] 术语“共同施用”或“共同给药”通常指施用至少两种不同的物质。联合给药是指以任何顺序同时给药至少两种不同物质,以及时间间隔最长为几天的顺序,以单剂量或单独剂量给药。

[0379] 术语“联合”通常是指施用本发明的基于寡核苷酸的化合物和用于治疗疾病或病症的另一种试剂,所述疾病或病症在治疗患者的过程中不消除所述化合物的活性。这种给

药可以按任何顺序进行,包括同时给药,也可以按时间间隔从几秒钟到几天的顺序进行。这种联合治疗还可以包括本发明化合物和/或独立地其它药物的不止一次给药。本发明化合物和其它药物的给药可以通过相同或不同的途径。

[0380] 术语“个体”或“受试者”或“患者”通常指哺乳动物,例如人。术语“哺乳动物”明确包括温血脊椎动物,包括但不限于人、非人灵长类、大鼠、小鼠、猫、狗、马、牛、母牛、猪、羊和兔。如本文所用,“有此需要的个体”是指被选择用于治或治疗的需要这种治疗或疗法的人或非人动物。如本文所用,“抑制表达或活性”是指RNA或蛋白质的表达或活性的降低或阻断,并不一定表示表达或活性的完全消除。

[0381] 实施例

[0382] 含反义寡核苷酸功能结构域的CSO的合成

[0383] 本发明的环状结构寡核苷酸可以通过本领域熟知的方法合成,例如氨基磷酸酯或H-膦酸酯化学,其可以手动或通过自动合成器进行。例如,本发明的寡核苷酸可以通过线性合成方法合成。

[0384] 本文使用的化合物是使用亚磷酰胺化学合成的。这些方案在pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781788012096-00453/978-1-78801-209-6中有详细描述,在此引入作为参考。

[0385] 本发明的CSO的熔融温度

[0386] 为了确定环化结构域与功能结构域寡核苷酸的3’端杂交,从而形成环状结构,将2μMCSO化合物样本混合在10mM磷酸钠、100nM氯化钠缓冲溶液(pH 7.2)中。将样本加热至95℃并保持5分钟,然后让其缓慢冷却至室温。在测量熔融温度(Tm)之前,将样本在冰箱中储存过夜。表6显示了20-90℃的冷却和加热曲线。

[0387] 表6

[0388]

化合物#	Tm (°C)
1009	N/A
1010	N/A
1101	43
1102	50
1103	37
1104	39
1105	45
1106	49
1107	41
1108	39
1109	31
1110	N/A
1111	N/A
1112	N/A
1124	64
1125	65
1126	62
1201	50
1202	44

[0389]

1203	44
1204	30
1205	N/A
1206	N/A
1207	31
1208	N/A
1209	N/A
53	45
54	46
55	64

[0390] 含反义寡核苷酸功能结构域的CSO对靶RNA的抑制作用

[0391] 设计了靶向PCSK9核酸的环状结构寡核苷酸,并在体外测试了其对PCSK9 mRNA的影响。

[0392] Hepa 1-6细胞在DMEM培养基加10％FBS和100U/ml Pen/Strep(来自ATCC的细胞)中培养。接种细胞并孵育过夜,使其在转染时约70％汇合至约100,000个细胞/ml/12孔板。更换细胞培养基,向每个孔中加入900μl。将寡核苷酸与Lipofectamine在Opti-MEM培养基中混合,加入脂质(1:1),并孵育15-20分钟。向每个孔中加入100μl,反义浓度为100nM。在约16至48小时的处理期后,收获细胞用于RNA和/或蛋白质分析。

[0393] 培养上清液用于AK释放细胞毒性试验。使用了mPCSK9和PPIB或HPRT1的Taqman探针(管家对照)(探针由ThermoFisher提供)。图5显示了每个实验的结果。

[0394] 设计了靶向PNPLA3核酸的环状结构寡核苷酸,并在体外测试了它们对PNPLA3mRNA的影响。

[0395] 按照ATCC推荐的条件和培养基(含10％胎牛血清的Eagle最低必需培养基)培养人HepG2细胞。将细胞置于PDL包被的96孔板中,密度为50K/孔,并用0.6ul/孔RNAiMax和指定浓度的寡核苷酸化合物反向转染。24小时后,使用Cells to CT裂解试剂(ThermoFisher4391851C)收获细胞。使用RT试剂盒(ThermoFisherA39110)将RNA逆转录至cDNA模板。使用qPCR Master Mix(ThermoFisher 4444964)进行定量PCR。PNPLA3表达水平使用PNPLA3-FAM探针(ThermoFisher 4351368分析ID:Hs00228747)进行定量,并使用管家基因POLR2A(ThermoFisher 4448491,分析ID:Hs01108291)进行归一化。数据在GraphPad Prism中进行分析。

[0396] 为了观察使用分裂体形式的修饰RNA使线性ASO环化是否能提供进一步的疗效,比较了使用具有不同形式和化学排列的相同碱基序列的寡核苷酸敲除PNPLA3的水平:浓度为200nM、100nM、50nM时,没有修饰RNAID 1521的线性ASO、线性缺口聚物1523、线性分裂体1527、1528、1529以及环形分裂体ASO 1542、1543、1544和1545(图6A)。如图6B和图6C所示,即使在200nM的较高浓度下,第一代形式的线性ASO1521也不具有活性,线性缺口聚物ASO 1523具有轻度活性,可实现约50％的敲除,IC50为252nM,线性分裂体形式的ASO 1527、1528和1529可实现比缺口聚物形式更好的敲除活性,并且所有环形分裂体ASO(CSO 1542、1543、1544和1545)在转染后24小时降低PNPLA3 mRNA水平方面最有效。

[0397] 包含免疫刺激寡核苷酸功能结构域的CSO免疫应答的产生

[0398] 小鼠脾细胞再刺激试验

[0399] 将C57BL/6J小鼠的脾脏机械分散到单细胞悬液中,用氯化铵裂解缓冲液(Cat#420302,BioLegend,San Diego,CA)去除红细胞。使用活性染料染色和自动细胞计数系统(Countess 3,Thermo Fisher,Waltham,MA)测定细胞活力。计数后,将$1x10^5$活小鼠脾细胞接种到RPMI 1640(Cat#A1049101,Thermo Fisher)的96孔平底无菌组织培养处理板(Cat#3596,Corning,Glendale,AZ)的每个孔中,该板含有10％胎牛血清(Cat#F2442,MilliporeSigma,Burlington,MA)。

[0400] 由Syngenis(Bentley,澳大利亚)使用标准方法合成了toll样受体9(TLR9)的免疫刺激性寡核苷酸(ISO)激动剂和包含TLR9免疫刺激性寡核苷酸(ISO)功能结构域的CSO,并将其作为冻干制剂提供,然后使用热阻断孵育步骤(95℃,5分钟)在退火缓冲液(10mM

Tris,50mM NaCl,1mM EDTA,pH 7.5)中重构所述冻干制剂。退火后,使用NanoDrop分光光度计(Thermo Fisher)采用吸光度法测定寡核苷酸浓度,测定样本浓度。对照TLR9激动剂是从Invivogen(加利福尼亚州圣地亚哥)获得的。按指定浓度向指定孔中加入指定剂量的CSO或对照激动剂,并在37℃、5%CO_2培养箱中刺激细胞24小时。孵育期结束后,收获细胞培养上清液,并使用定制的多重细胞因子/趋化因子检测试剂盒(U-PLEX定制生物标志物检测,Cat#K15069M-2,Meso Scale Diagnostics,Rockville,MD)进行分析,数据采集在MSD S600生物分析仪上进行(Meso Scale),原始数据分析通过MSD Discovery Workbench(Meso Scale)进行。结果见图7-12。

[0401] 为了评估包含免疫拮抗剂寡核苷酸功能结构域的CSO的活性,将此类CSO单独或与TLR9激动剂一起孵育,并在24小时后评估细胞因子。

[0402] 结果如图13和14所示。

[0403] 虽然已经参照本发明的优选实施例具体示出和描述了本发明,但是本领域技术人员将理解,在不脱离所附权利要求所包含的本发明的范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种改变。

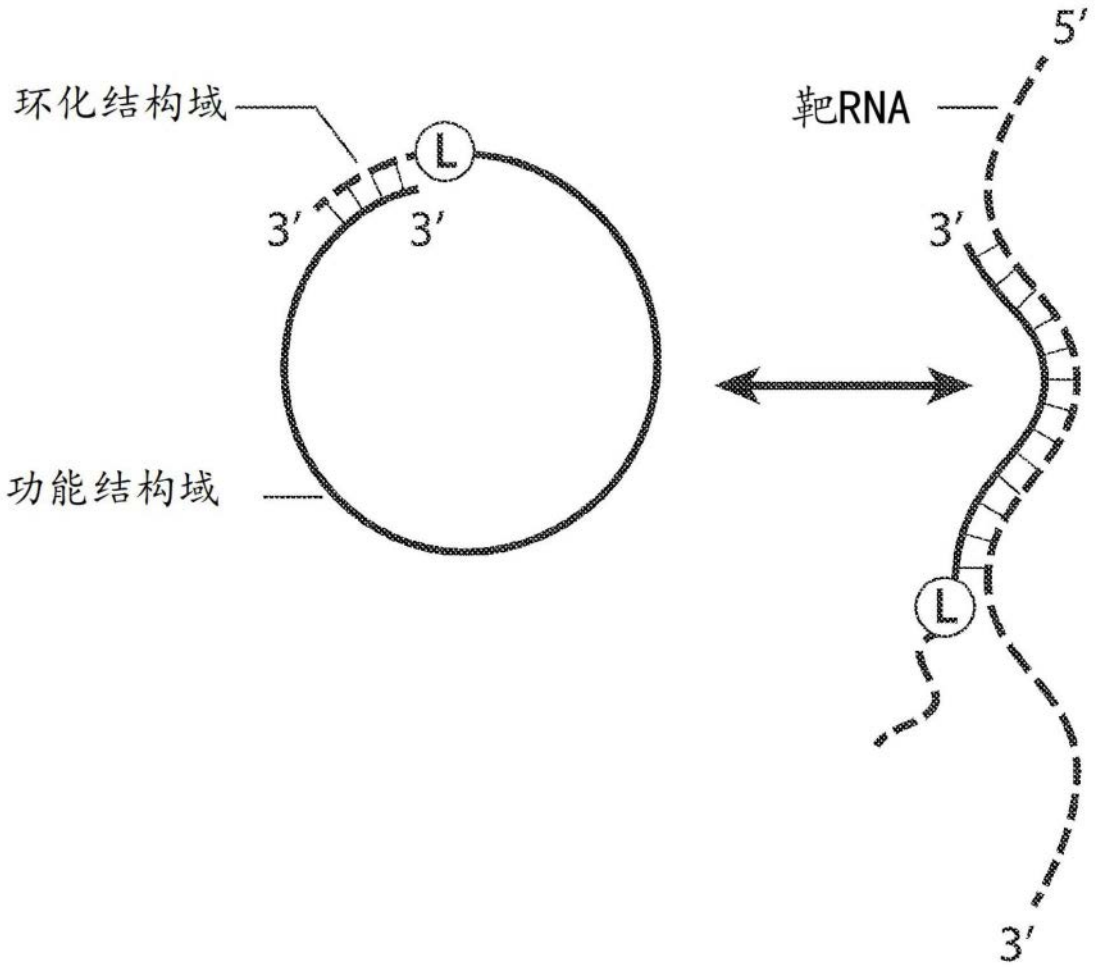


图1A

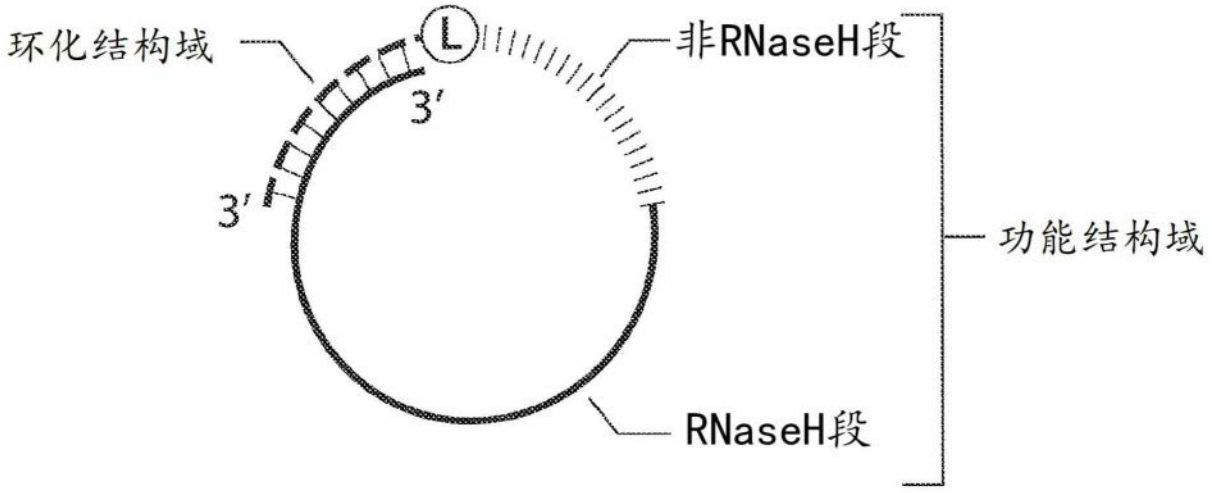


图1B

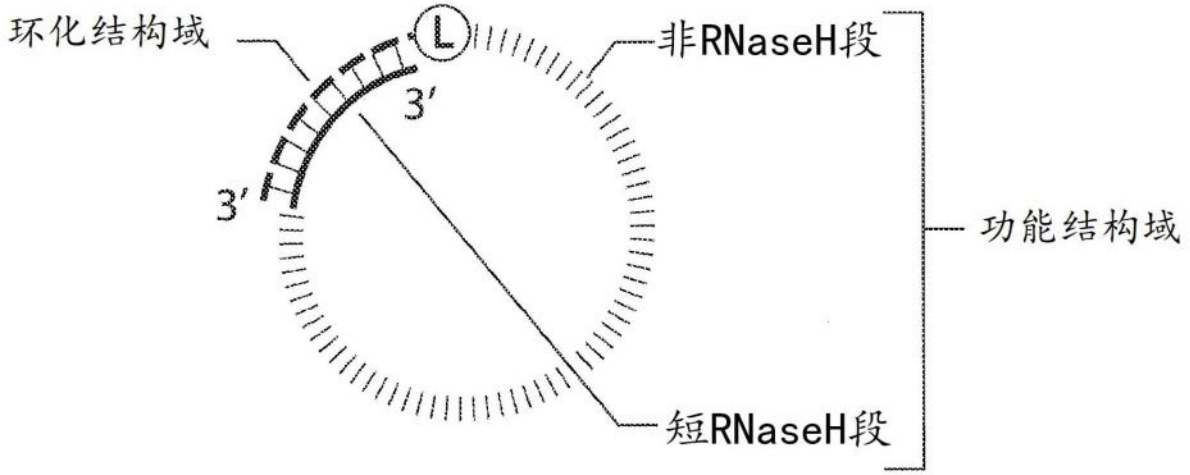


图1C

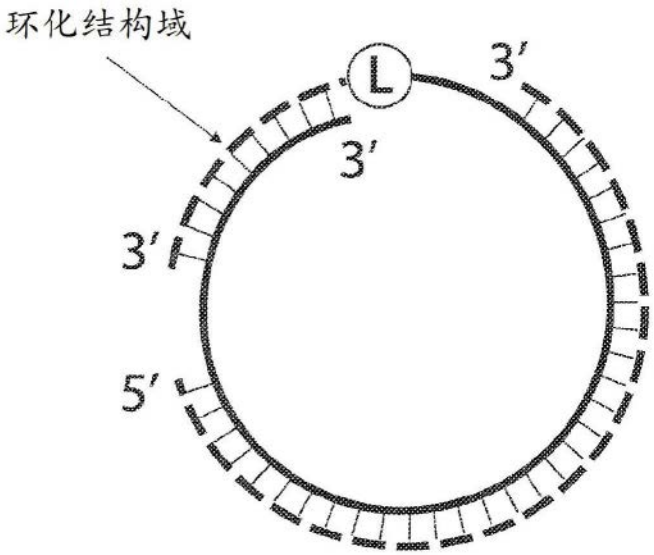


图2A

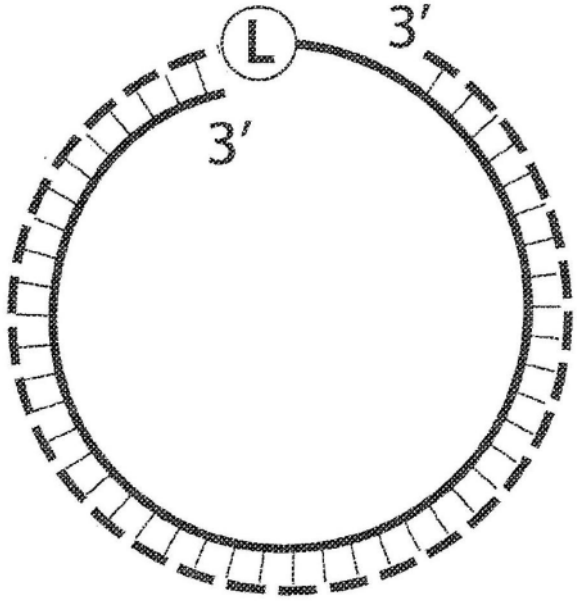


图2B

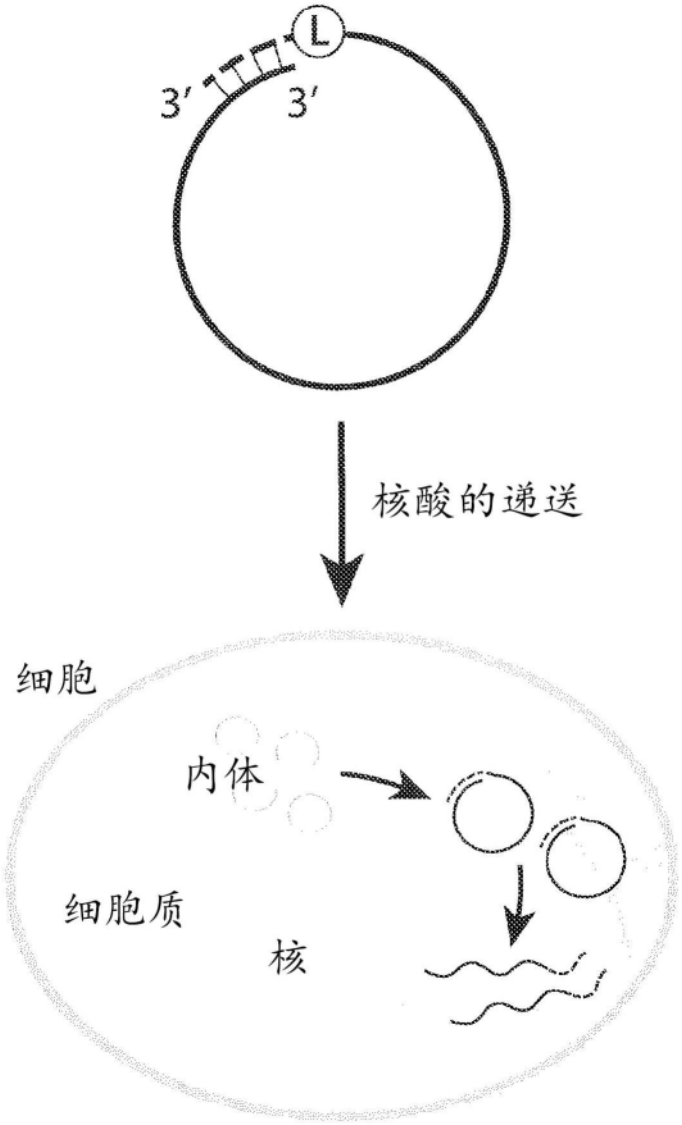


图3

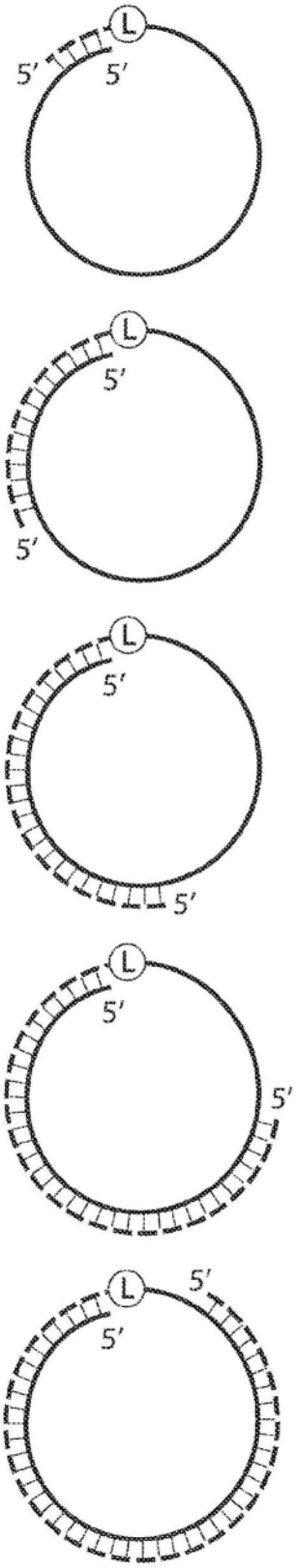


图4A

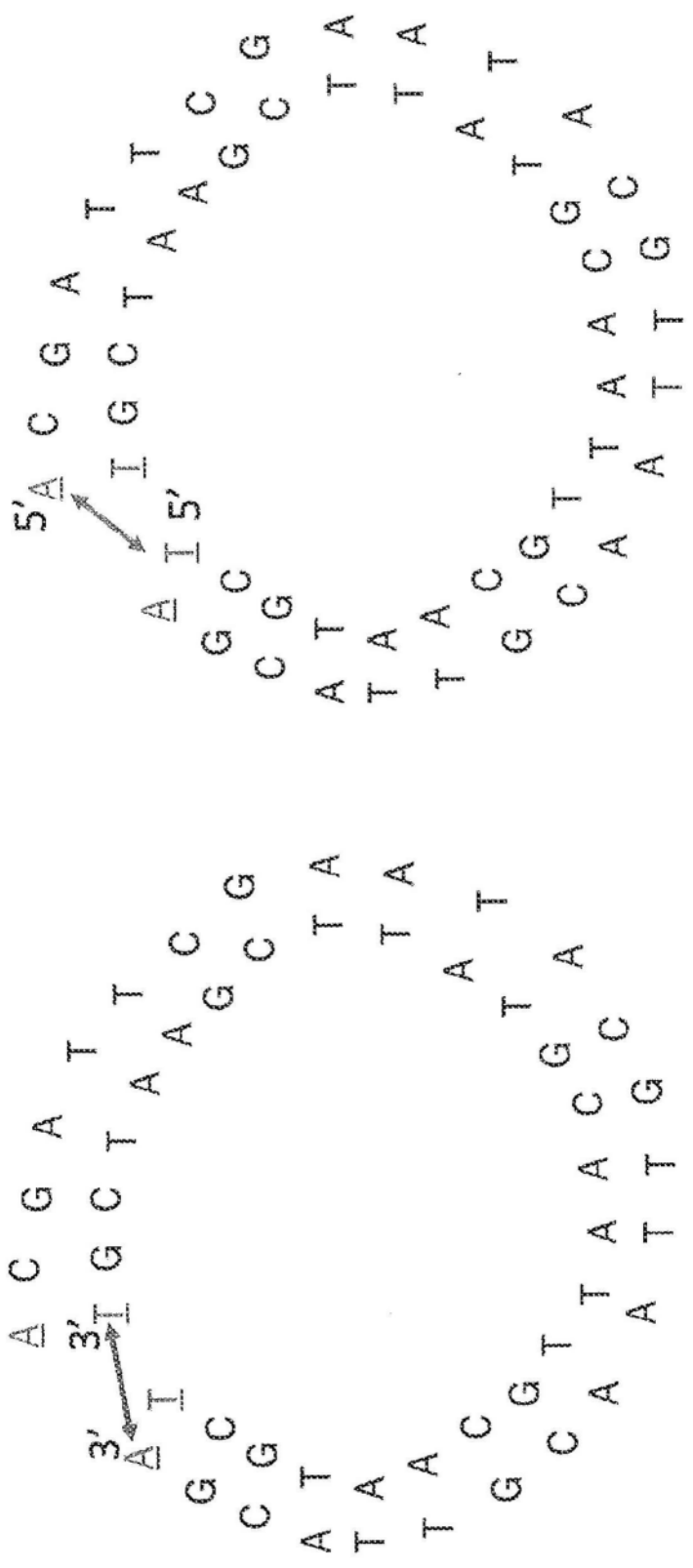


图4B

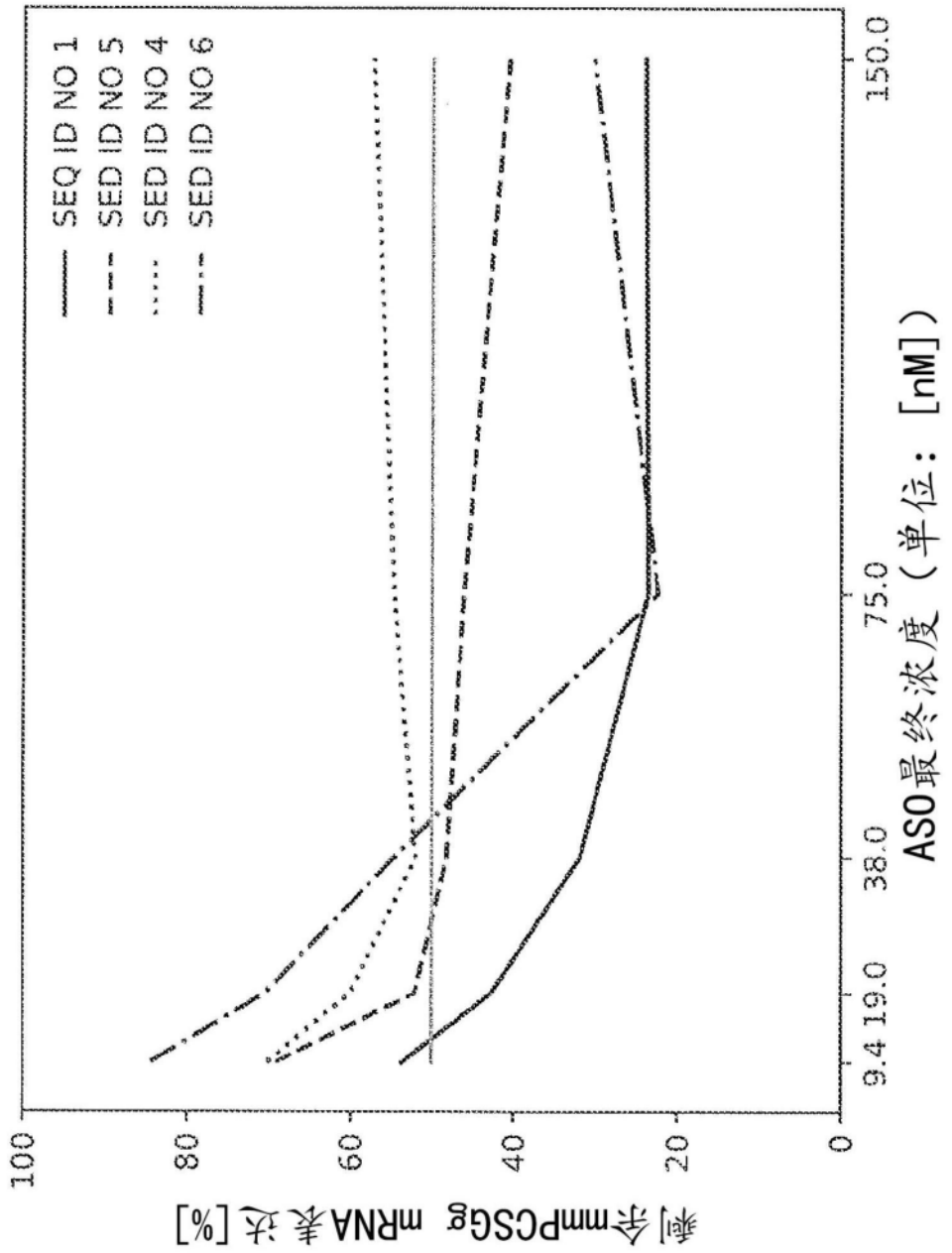

SEQ ID NO 1
SED ID NO 5
SED ID NO 4
SED ID NO 6
100
80
60
40
20
0
9.4
19.0
38.0
75.0
150.0
ASO最终浓度（单位：[nM]）
剩余mmPCSGg mRNA表达[%]

图5

靶mRNA区域5'		-.....TTCCTGCTTCATGCCCTTCTACAGT.....-3'
第一代 ASO	1521	3'-GACGAAGTACGGGAAGATG-5'
线性的缺口聚物	1523	3'-**GACG**AAGTACGGGAA**GATG**-5
线性的分裂体	1527	3'-GACGAAGTAC**GGGAAGATG**-5
	1528	3'-GACGAAGTACG**GGAAGATG**-5
	1529	3'-GACGAAGTACGG**GAAGATG**-5
环状分裂体	1542	3'-GACGAAGTAC**GGGAAGATG**-5'-5'-CTGCTT-3'
	1543	3'-GACGAAGTAC**GGGAAGATG**-5'-5'-CTGCT-3'
	1544	3'-GACGAAGTACG**GGAAGATG**-5'-5'-CTGCTT-3'
	1545	3'-GACGAAGTACG**GGAAGATG**-5'-5'-CTGCT-3'

所有具有PS连接的DNA，除了，粗体=修饰的RNA，下划线=PO连接

图6A

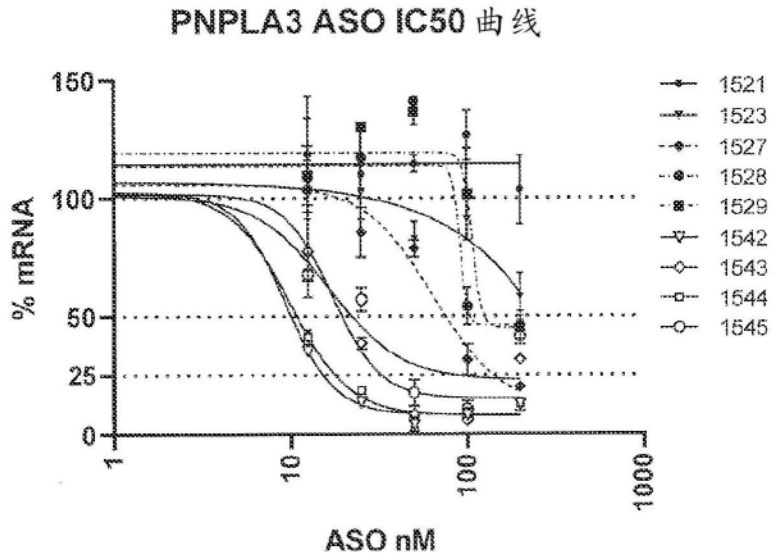


图6B

ASO ID	形状	形式	IC50 (nM)
1521	线性的	第一代	无
1523	线性的	缺口聚物	252
1527	线性的	分裂体	64.2
1528	线性的	分裂体	91.4
1529	线性的	分裂体	105.1
1542	环状的	分裂体	9.3
1543	环状的	分裂体	17.2
1544	环状的	分裂体	9.9
1545	环状的	分裂体	16.4

图6C

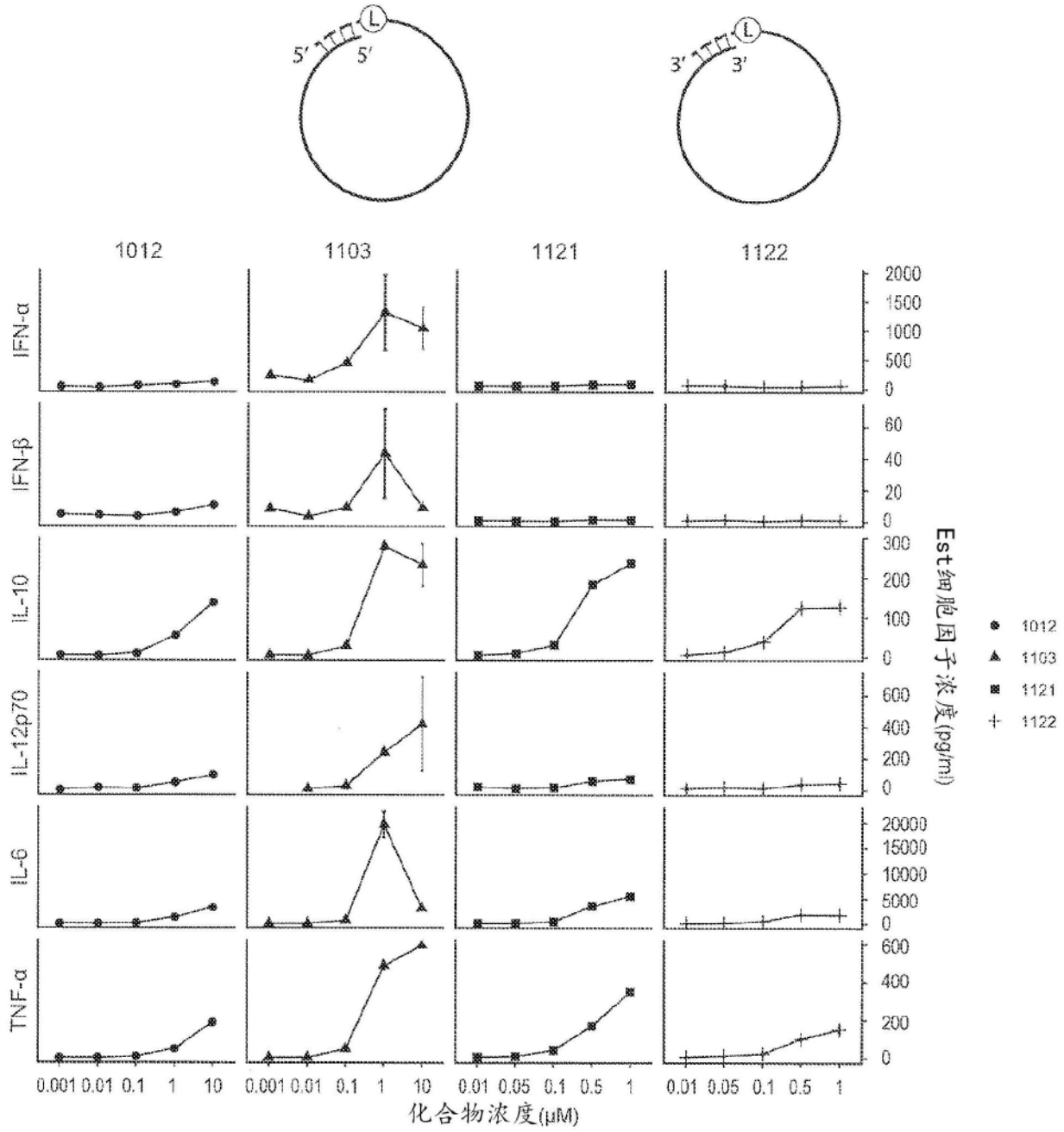

5′
5′
L
3′
3′
L
1012
1103
1121
1122
IFN-α
IFN-β
IL-10
IL-12p70
IL-6
TNF-α
2000
1500
1000
500
0
60
40
20
0
300
200
100
0
600
400
200
0
20000
15000
10000
5000
0
600
400
200
0
0.001 0.01 0.1 1 10
0.001 0.01 0.1 1 10
0.01 0.05 0.1 0.5 1
0.01 0.05 0.1 0.5 1
化合物浓度(μM)
Est细胞因子浓度(pg/ml)
1012
1103
1121
1122

图7

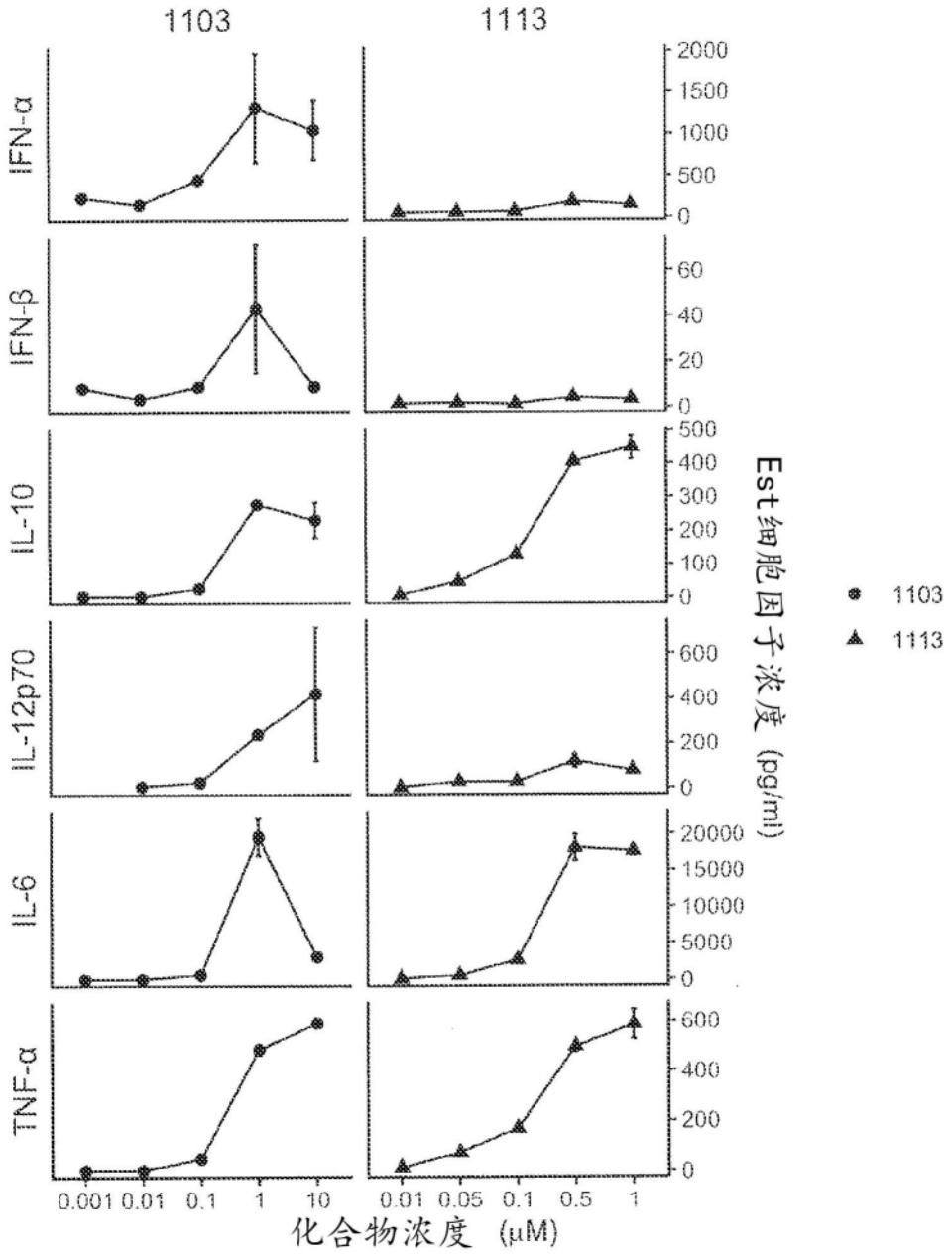

1103
1113
IFN-α
IFN-β
IL-10
IL-12p70
IL-6
TNF-α
2000
1500
1000
500
0
60
40
20
0
500
400
300
200
100
0
600
400
200
0
20000
15000
10000
5000
0
600
400
200
0
0.001 0.01 0.1 1 10
0.01 0.05 0.1 0.5 1
化合物浓度 (μM)
Est细胞因子浓度 (pg/ml)
1103
1113

图8

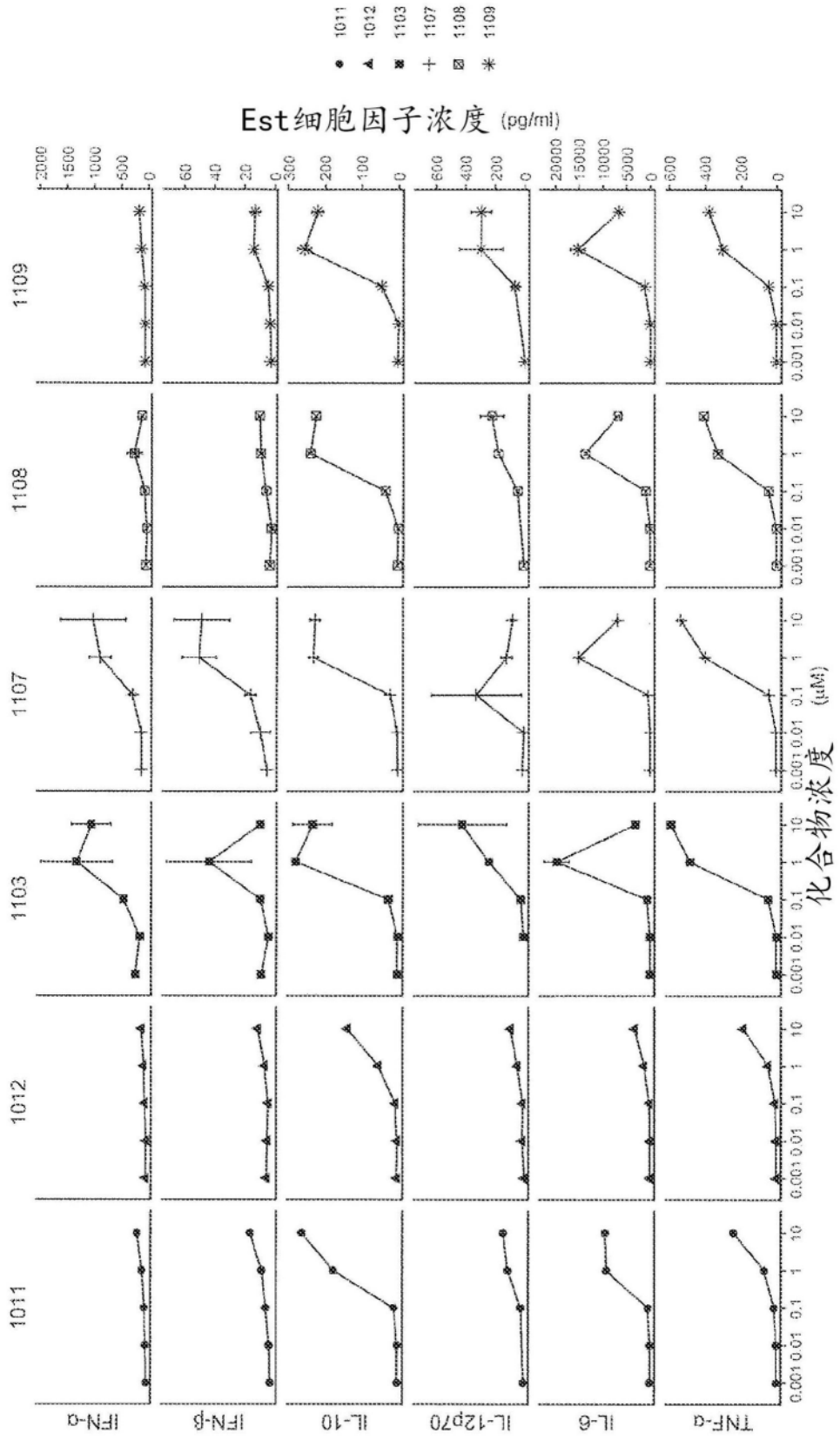

1011
1012
1103
1107
1108
1109
Est细胞因子浓度 (pg/ml)
IFN-α
IFN-β
IL-10
IL-12p70
IL-6
TNF-α
化合物浓度 (μM)

图9

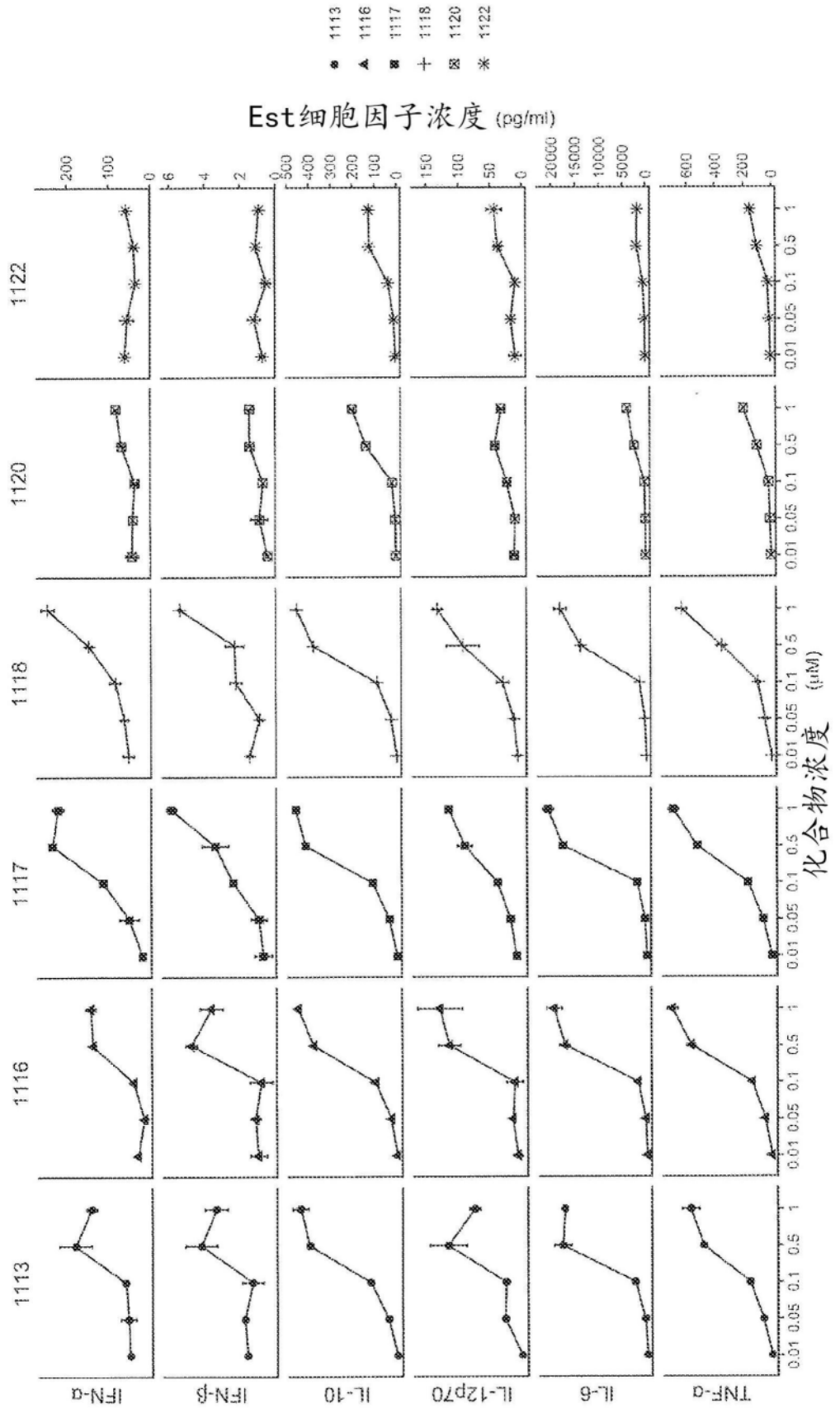

1113
1116
1117
1118
1120
1122
Est细胞因子浓度 (pg/ml)
IFN-α
IFN-β
IL-10
IL-12p70
IL-6
TNF-α
化合物浓度 (μM)

图10

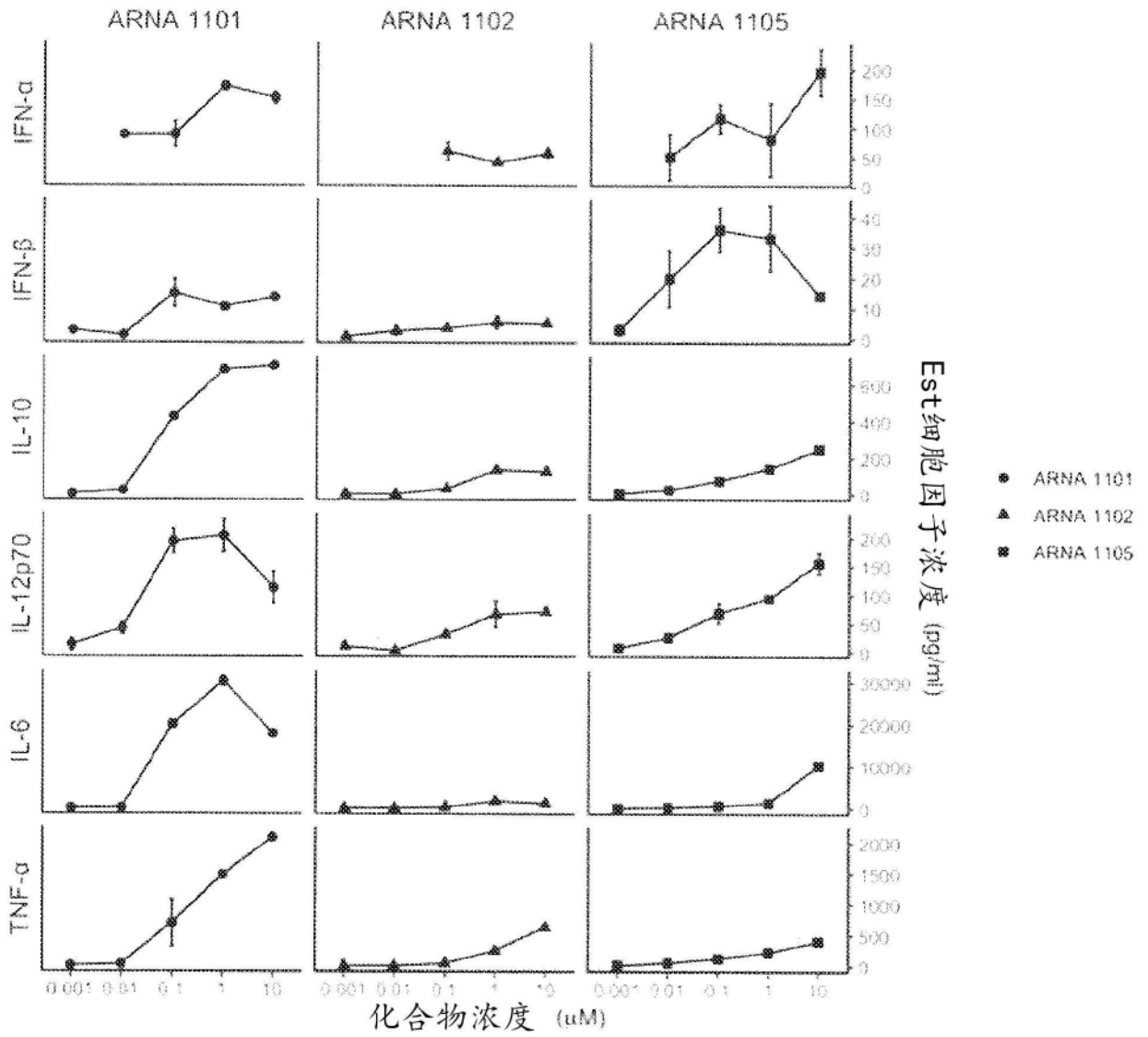

ARNA 1101
ARNA 1102
ARNA 1105
IFN-α
IFN-β
IL-10
IL-12p70
IL-6
TNF-α
Est细胞因子浓度 (pg/ml)
化合物浓度 (uM)
ARNA 1101
ARNA 1102
ARNA 1105

图11

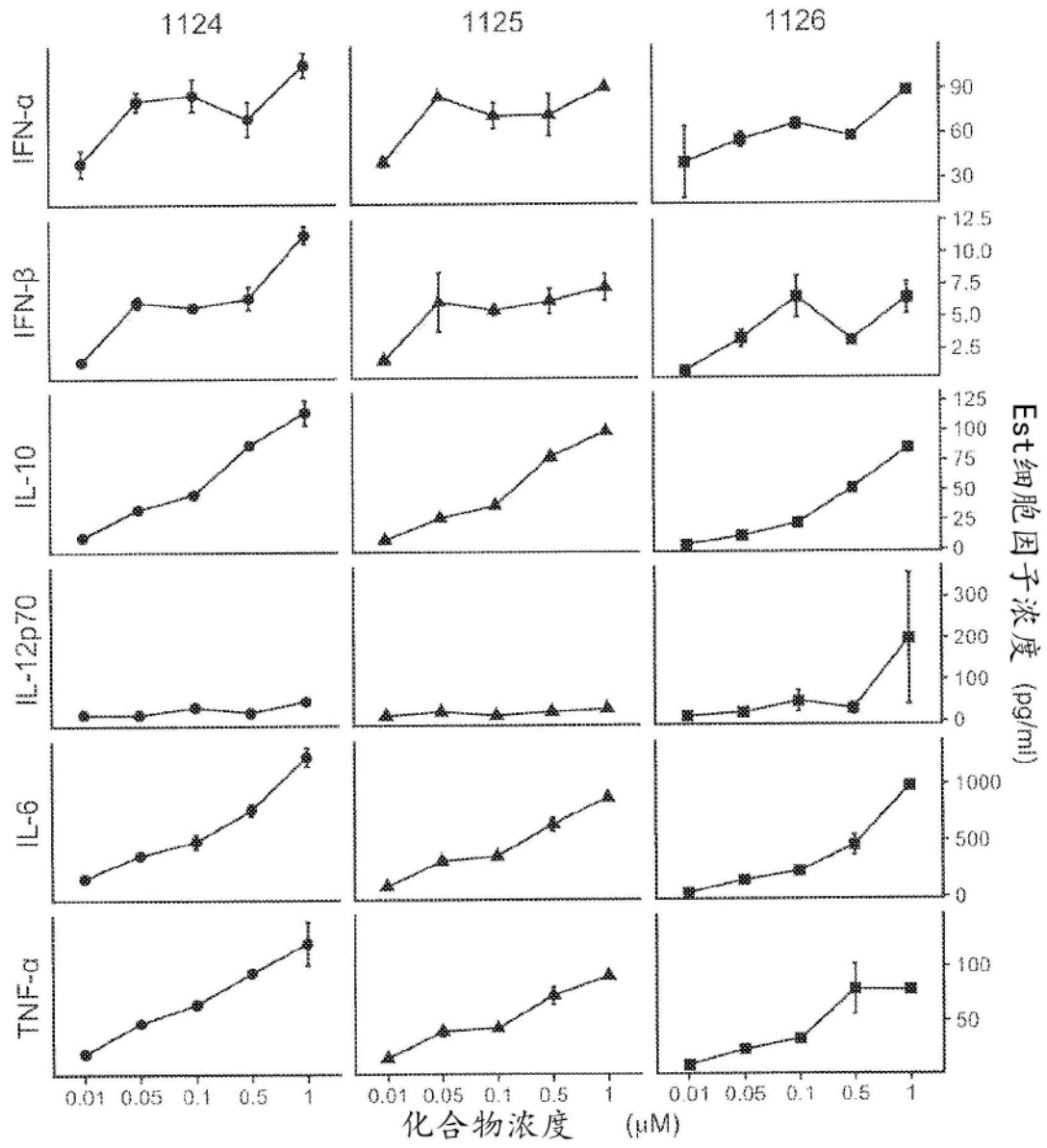

1124
1125
1126
IFN-α
IFN-β
IL-10
IL-12p70
IL-6
TNF-α
90
60
30
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
125
100
75
50
25
0
300
200
100
0
1000
500
0
100
50
0.01 0.05 0.1 0.5 1
化合物浓度 (μM)
Est细胞因子浓度 (pg/ml)
1124
1125
1126

图12

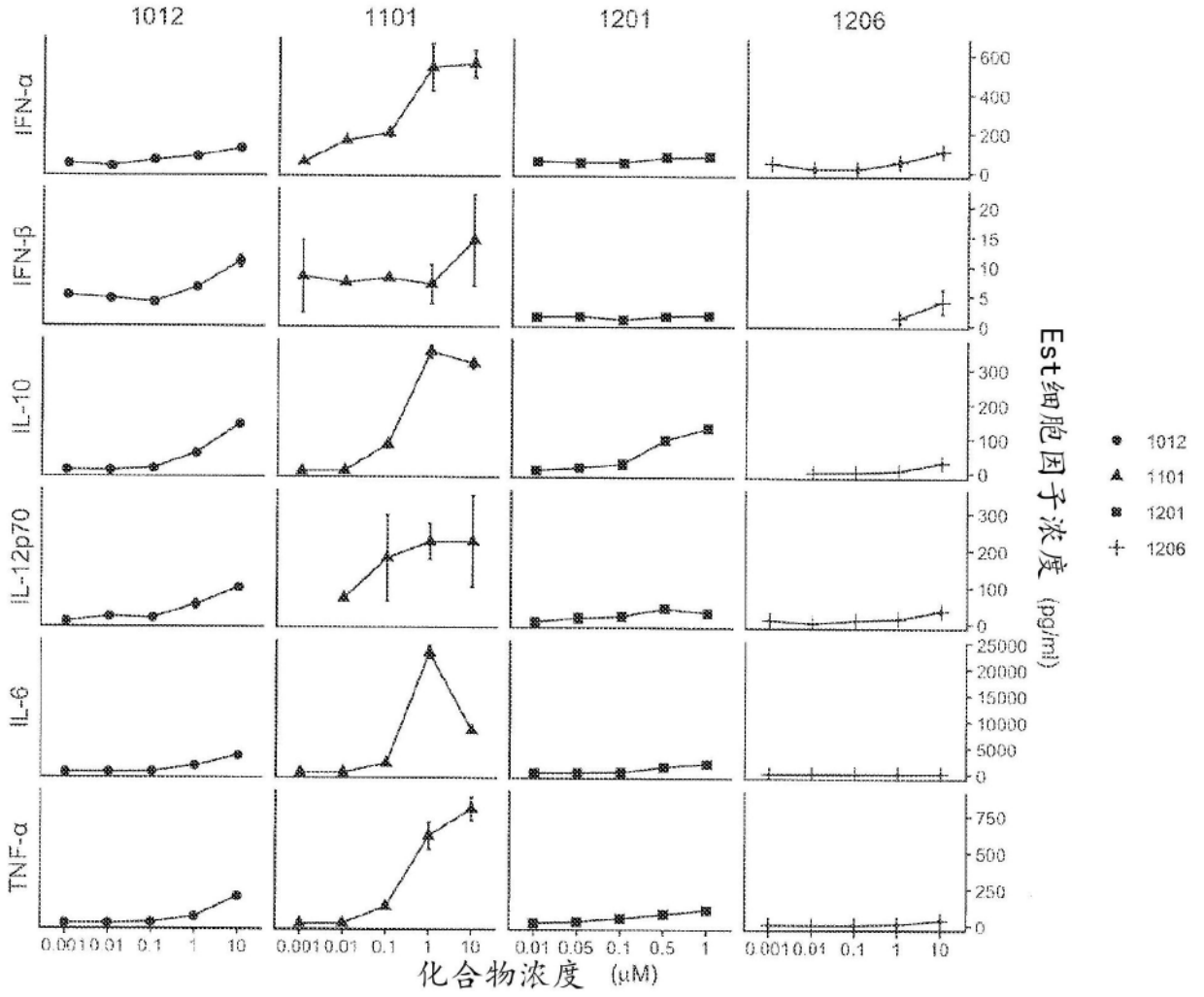

1012
1101
1201
1206
IFN-α
IFN-β
IL-10
IL-12p70
IL-6
TNF-α
Est细胞因子浓度 (pg/ml)
1012
1101
1201
1206
化合物浓度 (μM)

图13

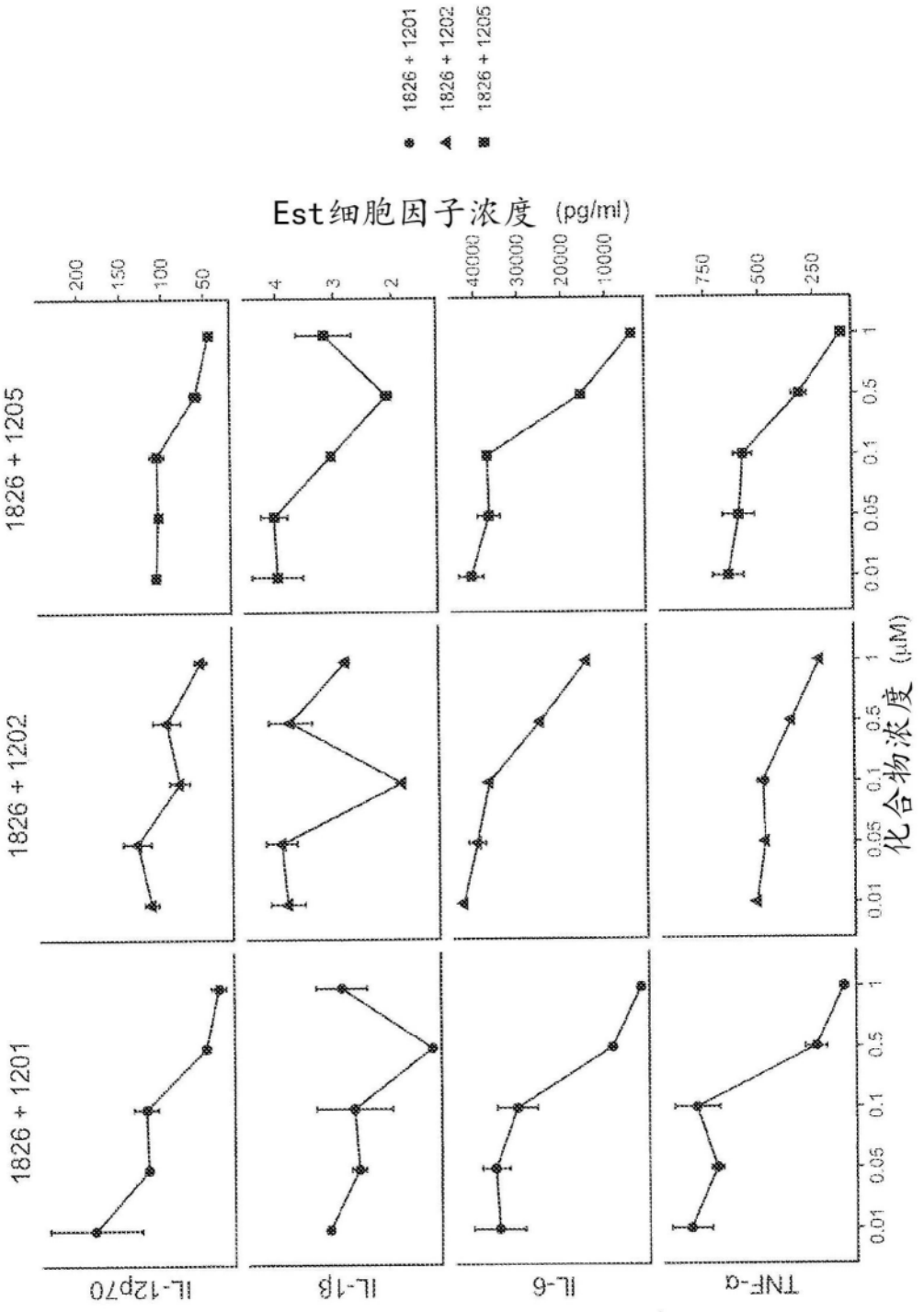

1826 + 1201
1826 + 1202
1826 + 1205
Est细胞因子浓度 (pg/ml)
IL-12p70
IL-1β
IL-6
TNF-α
化合物浓度 (μM)

图14