(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120265774 A
(43)申请公布日 2025.07.04

(21)申请号 202380081577.7
(22)申请日 2023.09.28
(30)优先权数据
63/377,476 2022.09.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.05.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/075425 2023.09.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/073604 EN 2024.04.04
(71)申请人 阿塔兰塔治疗公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 C·加伦特-贝赫姆
W·科库拉帕兰 M·哈斯勒
D·库蒂斯
B·M·达·科鲁兹·格丁霍
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 郜红
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
C07H 21/02(2006.01)

权利要求书9页 说明书56页
序列表（电子公布）

(54)发明名称

用于治疗神经退行性疾病的组合物和方法

(57)摘要

本公开提供了靶向TAR DNA结合蛋白(TARDBP)基因的单链或双链干扰RNA分子(例如,siRNA)。所述干扰RNA分子可含有特定模式的核苷修饰和核苷间键联修饰,作为包含所述干扰RNA分子的药物组合物。所述siRNA分子可以是分支siRNA分子,诸如二分支、三分支或四分支siRNA分子。所公开的siRNA分子还可以特征在于5'磷稳定部分和/或疏水部分。另外,本公开提供了用于将本公开的siRNA分子递送至受试者,诸如鉴定为患有神经退行性疾病(例如,肌萎缩侧索硬化症或额颞叶痴呆)的受试者的中枢神经系统的方法。

CN 120265774 A

1.一种小干扰RNA(siRNA)分子,其包含反义链和与所述反义链具有互补性的有义链,其中所述反义链具有足够的互补性以与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的反式激活应答DNA结合蛋白43(TARDBP)mRNA转录物内的区域杂交。

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

3.如权利要求2所述的siRNA分子,其中所述反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的所述TARDBP mRNA转录物内21个连续核碱基的区域具有至少75%的互补性,任选地其中所述反义链与具有SEQ ID No:1-192中任一个的核酸序列的所述TARDBP mRNA转录物内的所述区域具有至少76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的互补性。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

式I;

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

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

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

每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

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

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

式A1;

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

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

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

式II;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

B由式$C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2$表示;

每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

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

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

式A2;

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

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

$E-(A')_m-F$

式III;

其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

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

A'、C、D、P^1和P^2如式II中所定义;并且

m是1至7的整数。

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

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

式S1;

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

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

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

式S2;

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

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

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

式S3;

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

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

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

式S4;

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

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

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

式IV;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

B由式$D-P^1-C-P^1-D-P^1$表示;

每个C是2'-O-Me核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

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

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

式A3;

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

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

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

式V;

其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

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

A'、C、D、P^1和P^2如式IV中所定义;并且

m是1至7的整数。

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

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

式S5;

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

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

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

式S6;

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

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

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

式S7;

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

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

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

式S8;

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

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

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

式VI;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个B由式C-P^2表示;

每个C是2'-O-Me核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个E由式D-P^2-C-P^2表示;

F由式D-P^1-C-P^1表示;

每个G由式C-P^1表示;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;

k是1至7的整数;并且

l是1至7的整数。

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

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

式A4;

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

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

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

式VII;

其中A'由式C-P^2-D-P^2表示;

每个H由式$(C\text{-}P^1)_2$表示;

每个I由式$(D\text{-}P^2)$表示;

B、C、D、P^1和P^2如式VI中所定义;

m是1至7的整数;

n是1至7的整数;并且

o是1至7的整数。

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

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

式S9;

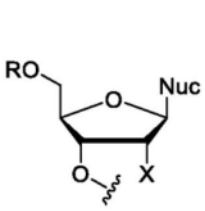
其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

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

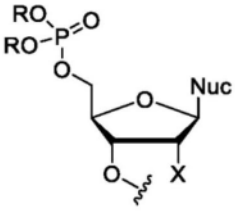
42.如权利要求1-41中任一项所述的siRNA分子,其中所述有义链还包含在所述有义链

的5’末端的5’磷稳定部分。

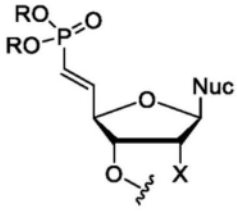
43.如权利要求41或42所述的siRNA分子,其中每个5’磷稳定部分独立地由式IX-XVI中的任一个表示:



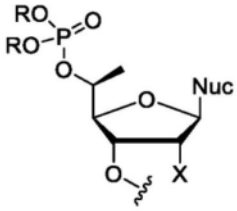
式IX



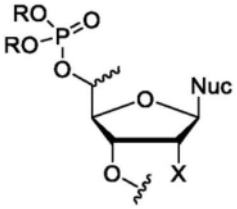
式X



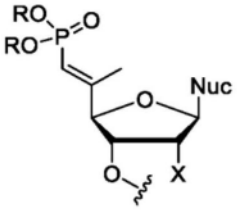
式XI



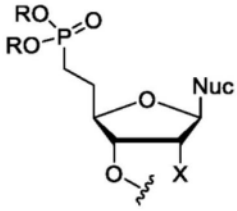
式XII



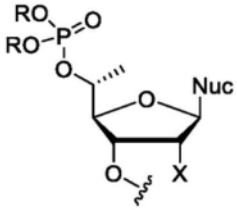
式XIII



式XIV



式XV



式XVI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

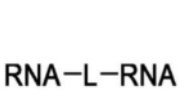
63.如权利要求61所述的siRNA分子,其中所述反义链的长度为20个核苷酸。

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

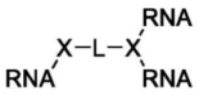
65.如权利要求1-64中任一项所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子是分支siRNA分子。

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

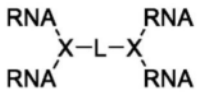
67.如权利要求66所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子是二分支siRNA分子,任选地其中所述二分支siRNA分子由式XVII-XIX中的任一个表示:



式XVII;



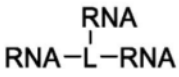
式XVIII;



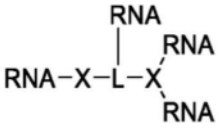
式XIX;

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

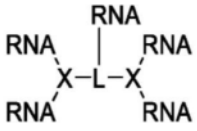
68.如权利要求66所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子是三分支siRNA分子,任选地其中所述三分支siRNA分子由式XX-XXIII中的任一个表示:



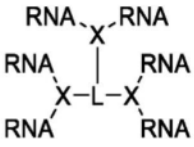
式XX;



式XXI;



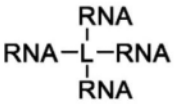
式XXII;



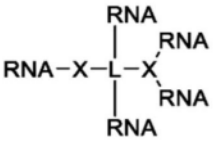
式XXIII;

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

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



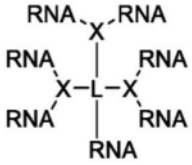
式XXIV;



式XXV;



式XXVI;



式XXVII;



式XXVIII;

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

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

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

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

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

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

75.如73或74所述的方法,其中所述神经退行性疾病是肌萎缩侧索硬化症(ALS)。

76.如权利要求73或74所述的方法,其中所述神经退行性疾病是额颞叶痴呆(FTD)。

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

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

79.如权利要求73-77中任一项所述的方法,其中所述siRNA分子或所述药物组合物通过静脉内、肌肉内,或皮下注射的方式施用给所述受试者。

80.如权利要求73-79中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

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

用于治疗神经退行性疾病的组合物和方法

[0001] 序列表

[0002] 本申请含有已经以XML格式以电子方式提交并且特此通过引用以其整体并入的序列表。所述XML副本创建于2023年9月19日,名为“51436-039WO2_Sequence_Listing_9_19_23”并且大小为505,859字节。

技术领域

[0003] 本公开涉及小干扰RNA(siRNA)分子以及含有所述siRNA分子的组合物,所述siRNA分子靶向反式激活应答DNA结合蛋白43(TARDBP)基因的RNA转录物(例如,mRNA)。本公开进一步描述了用于沉默TARDBP以及治疗可能受益于TARDBP的沉默的疾病(例如,神经退行性疾病,诸如肌萎缩侧索硬化症和额颞叶痴呆)的方法,所述方法通过将靶向TARDBP的siRNA分子递送到有需要的受试者的靶组织来实现。

背景技术

[0004] TARDBP(反式激活应答DNA结合蛋白43)编码与包括神经退行性疾病(例如肌萎缩侧索硬化症和额颞叶痴呆)在内的疾病的病理有关的蛋白质。因此,需要能够以为神经退行性疾病(例如肌萎缩侧索硬化症和额颞叶痴呆)或其他TARDBP相关疾病或病症提供有效治疗的方式选择性地降低TARDBP活性的治疗方法。

发明内容

[0005] 本公开提供了用于通过小干扰RNA(siRNA)介导的反式激活应答DNA结合蛋白43(TARDBP)转录物的沉默来降低TARDBP表达的组合物和方法。该组合物和方法的优点是,相对于其他基因对TARDBP表现出高选择性。

[0006] 本公开的siRNA分子可用于沉默TARDBP基因,从而阻止相应mRNA转录物的翻译并降低反式激活应答DNA结合蛋白43(TDP-43)蛋白表达。因此,TDP-43水平的这种降低可以防止疾病的发作或进展,因为TDP-43的错误定位和聚集是神经退行性疾病(诸如肌萎缩侧索硬化症(ALS)和额颞叶痴呆(FTD))的原因。本公开的siRNA分子可以通过例如鞘内注射、脑室内注射、纹状体内注射、实质内注射、小脑延髓池内注射(诸如经由导管插入)、静脉内注射、皮下注射或肌肉内注射直接递送至需要TARDBP沉默的受试者。

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

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

[0008] 在任一前述方面的一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的TARDBP mRNA转录物内15个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的TARDBP mRNA转录物内16个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的TARDBP mRNA转录物内17个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的TARDBP mRNA转录物内18个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的TARDBP mRNA转录物内19个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的TARDBP mRNA转录物内20个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)互补性。在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的TARDBP mRNA转录物内21个连续核碱基的区域具有至少70%(例如,至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少

80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)互补性。

[0009] 在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的TARDBP mRNA转录物内的区域具有至少70％(例如,至少71％、至少72％、至少73％、至少74％、至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％)互补性。

[0010] 在一些实施方案中,反义链与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的TARDBP mRNA转录物内的区域具有至少75％的互补性。例如,反义链可以与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的TARDBP mRNA转录物内的区域具有至少76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的互补性。

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

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

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

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

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

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

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

录物的所述区域内相等长度的连续多核苷酸区段完全互补。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0030] 式I;

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

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

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

[0034] 每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

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

[0036] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0037] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0038] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0039] j是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且

[0040] k是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

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

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

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

[0044] 式A1;

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

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

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

[0048] 式II;

[0049] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

[0050] 每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

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

[0052] 每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

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

[0054] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0055] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0056] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0057] j是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且

[0058] k是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

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

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

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

[0062] 式A2;

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

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

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

[0066] 式III;

[0067] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

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

[0069] A'、C、D、P^1和P^2如式II中所定义;并且

[0070] m是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

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

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

[0073] A-S-A

[0074] 式S1;

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

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

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

[0078] A-O-A

[0079] 式S2;

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

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

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

[0083] A-S-B

[0084] 式S3;

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

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

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

[0088] A-O-B

[0089] 式S4;

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

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

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

[0093] 式IV;

[0094] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

[0095] 每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

[0096] B由式$D-P^1-C-P^1-D-P^1$表示;

[0097] 每个C是2'-O-Me核糖核苷;

[0098] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

[0099] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0100] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0101] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0102] j是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且

[0103] k是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

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

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

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

[0107] 式A3;

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

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

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

[0111] 式V;

[0112] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

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

[0114] A'、C、D、P^1和P^2如式IV中所定义;并且

[0115] m是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

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

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

[0118] 式S5;

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

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

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

[0122] A-O-A

[0123] 式S6;

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

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

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

[0127] 式S7;

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

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

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

[0131] A-O-B

[0132] 式S8;

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

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

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

[0136] 式VI;

[0137] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

[0138] 每个B由式$C-P^2$表示;

[0139] 每个C是2'-O-Me核糖核苷;

[0140] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

[0141] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0142] 每个E由式D-P^2-C-P^2表示;

[0143] F由式D-P^1-C-P^1表示;

[0144] 每个G由式C-P^1表示;

[0145] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0146] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0147] j是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);

[0148] k是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且

[0149] l是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

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

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

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

[0153] 式A4;

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

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

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

[0157] 式VII;

[0158] 其中A'由式C-P^2-D-P^2表示;

[0159] 每个H由式$(C\text{-}P^1)_2$表示;

[0160] 每个I由式$(D\text{-}P^2)$表示;

[0161] B、C、D、P^1和P^2如式VI中所定义;

[0162] m是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);

[0163] n是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且

[0164] o是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。

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

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

[0167] A-S-A

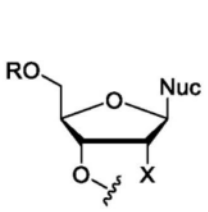
[0168] 式S9;

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

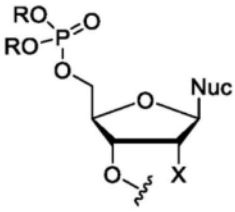
[0170] 在一些实施方案中,反义链还在该反义链的5'末端具有5'磷稳定部分。

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

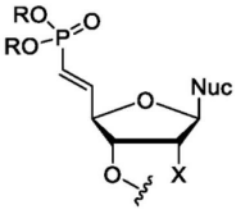
[0172] 在一些实施方案中,每个5'-磷稳定部分独立地由式IX、XX、XI、XII、XIII、XIV、XV或XVI中的任一个表示:



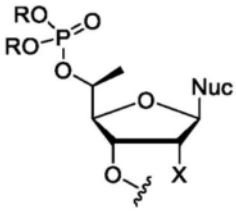
式IX



式X

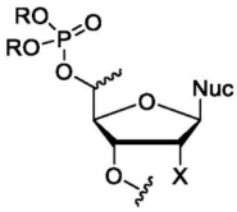


式XI

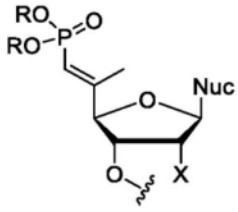


式XII

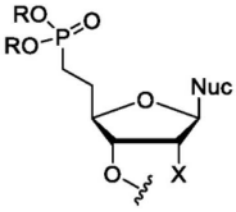
[0173]



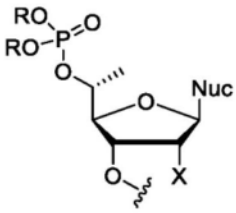
式XIII



式XIV



式XV



式XVI

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

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

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

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

[0178] 在一些实施方案中,所述疏水部分选自胆固醇、维生素D或生育酚。

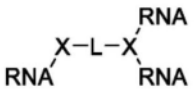
[0179] 在一些实施方案中,siRNA分子是分支siRNA分子。

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

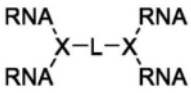
[0181] 在一些实施方案中,siRNA分子是二分支的,任选地其中所述二分支siRNA分子由式XVII、XVIII或XIX中的任一个表示:

[0182] RNA-L-RNA

式XVII;



式XVIII;



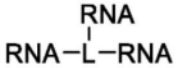
式XIX;

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

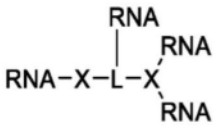
[0184] 在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式XVII表示。在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式XVIII表示。在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式XIX表示。

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

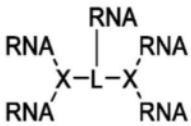
[0186]



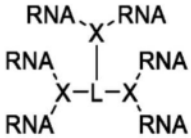
式XX;



式XXI;



式XXII;



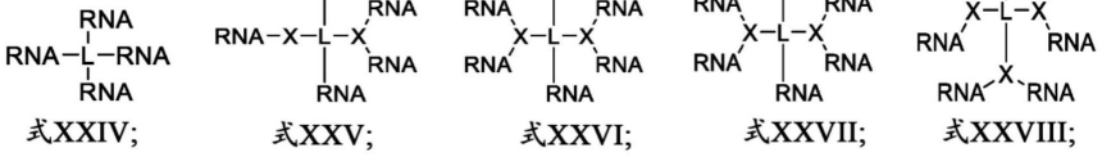
式XXIII;

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

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

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

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

[0190] 

式XXIV; 式XXV; 式XXVI; 式XXVII; 式XXVIII;

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

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

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

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

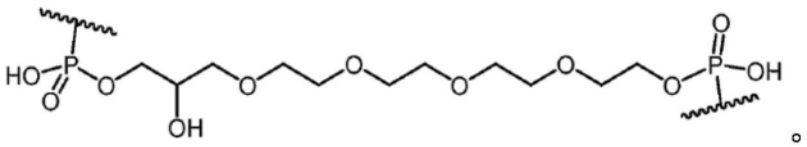
[0195] 在一些实施方案中,所述乙二醇寡聚体是PEG。在一些实施方案中,所述PEG是TrEG。在一些实施方案中,所述PEG是TEG。

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

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

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

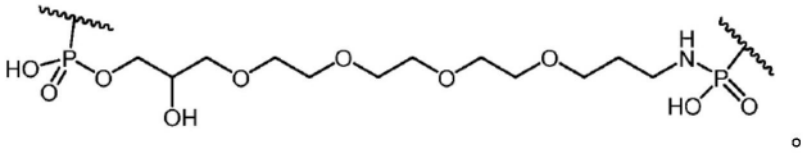
[0199] 在一些实施方案中,所述接头包括式L1的结构:

[0200] 

。

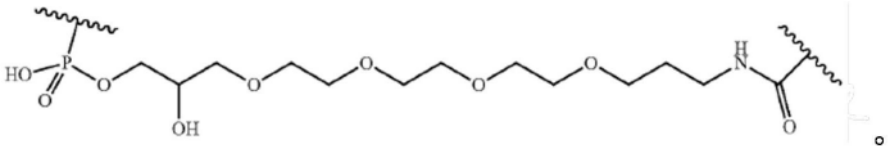
(式 L1)

[0201] 在一些实施方案中,所述接头包括式L2的结构:

[0202] 

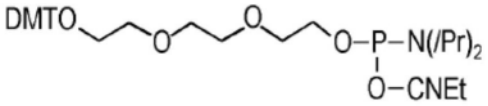
(式 L2)

[0203] 在一些实施方案中,所述接头包括式L3的结构:

[0204] 

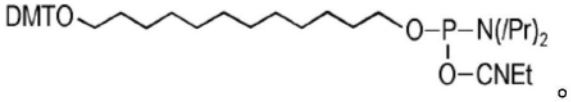
(式 L3)

[0205] 在一些实施方案中,所述接头包括式L4的结构:

[0206] 

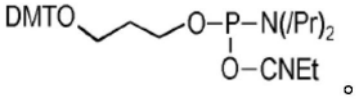
(式 L4)

[0207] 在一些实施方案中,所述接头包括式L5的结构:

[0208] 

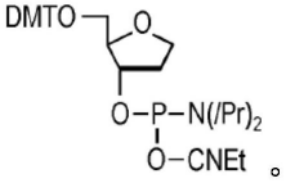
(式 L5)

[0209] 在一些实施方案中,所述接头包括式L6的结构:

[0210] 

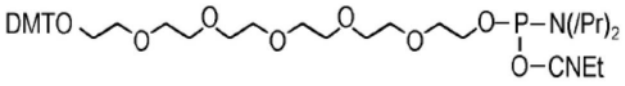
(式 L6)

[0211] 在一些实施方案中,所述接头包括式L7的结构:

[0212] 

(式 L7)

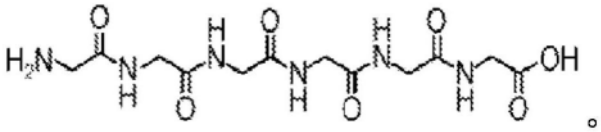
[0213] 在一些实施方案中,所述接头包括式L8的结构:



[0214] 。

(式 L8)

[0215] 在一些实施方案中,所述接头包括式L9的结构:

[0216] 

。

(式 L9)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0227] 在一些实施方案中,4个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

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

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

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

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

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

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

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

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

[0232] 在本文所述的方法的一些实施方案中,神经退行性疾病是肌萎缩侧索硬化症(ALS)。在本文所述的方法的一些实施例中,神经退行性疾病是额颞叶痴呆(FTD)。

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

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

[0235] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,受试者是人。

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

[0237] 定义

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

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

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

[0241] 如本文所用,术语“载体核酸”是指与治疗性核酸具有序列互补性并与治疗性核酸杂交的核酸分子(例如,核糖核酸)。如本文所用,术语“3’末端”是指在核糖环的3’碳处含有未修饰的羟基的核酸末端。

[0242] 如本文所用,术语“核苷”是指由杂环碱基及其糖组成的分子。

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

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

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

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

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

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

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

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

域退火。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0262] 如本文所用,术语“5’磷稳定部分”是指包括磷酸酯以及经修饰的磷酸酯(例如,硫代磷酸酯、磷酸二酯、膦酸酯)的末端磷酸基团。磷酸部分可位于任一末端,但优选位于5′-末端核苷处。在一个方面,末端磷酸是未修饰的,具有式-O-P(=O)(OH)OH。在另一方面,末端磷酸是经修饰的,使得O和OH基团中的一个或多个被H、O、S、N(R’)或烷基置换,其中R’是H、氨基保护基团,或未取代或经取代的烷基。在一些实施方案中,5’和或3’末端基团可包括1至3个磷酸部分,这些磷酸部分各自独立地是未修饰的(二磷酸或三磷酸)或经修饰的。

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

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

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

[0266] 100×(分数X/Y)

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

[0268] 相对于参考多核苷酸或多肽序列的“序列一致性百分比(%)”定义为在比对序列且引入空位(如果需要)以实现最大序列一致性百分比后,候选序列中与参考多核苷酸或多

肽序列中的核酸或氨基酸一致的核酸或氨基酸的百分比。用于确定核酸或氨基酸序列同一性百分比的比对可以以在本领域技术人员能力范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2或Megalign软件。本领域技术人员可确定适用于比对序列的参数,包括实现所比较序列的全长内的最大比对所需的任何算法。例如,可使用序列比较计算机程序BLAST生成序列同一性百分比值。例如,给定核酸或氨基酸序列A对、与或针对给定核酸或氨基酸序列B的序列同一性百分比(也可以可替代地表述为给定核酸或氨基酸序列A对、与或针对给定核酸或氨基酸序列B所具有的一定的序列同一性百分比)计算如下:

[0269] 100×(分数X/Y)

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

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

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

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

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

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

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

[0277] 如本文所用,“烷基”是指饱和烃基。烷基基团可以是无环的或环状的并且当未取代时仅含有C和H。当命名具有特定碳数的烷基残基时,旨在涵盖和描述具有该碳数的所有几何异构体;因此,例如,“丁基”意在包括正丁基、仲丁基和异丁基。烷基的实例包括乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基等。在一些实施方案中,烷基可以被取代。可以引入烷基基团的合适的取代基包括例如羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基和卤代等。

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

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

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

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

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

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

[0284] 如本文所用,术语“末端基团”是指碳链或核酸末端的基团。

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

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

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

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

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

[0290] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”可互换使用,并且是指经历神经退行性疾病

或病症(例如,额颞叶痴呆的肌萎缩侧索硬化症)和/或含有获得功能TARDBP变异等位基因的生物体,诸如哺乳动物(例如,人类)。

[0291] 如本文所用,术语“TARDBP”是指编码反式激活应答DNA结合蛋白43kDa(TDP-43)的基因,包括来自任何来源的任何天然TARDBP基因。该术语涵盖“全长”未处理TARDBP以及由细胞内加工产生的任何形式的TARDBP。该术语还涵盖TARDBP的天然存在的变体,例如剪接变体或等位基因变体。示例性TARDBP基因的核酸序列示于欧洲核苷酸档案库(ENA)登录号U23731.1。TARDBP基因编码的示例性蛋白质的氨基酸序列示于UNIPROT™登录号Q13148。

[0292] 如本文所用,术语“神经炎性疾病”和“神经炎性病症”可互换地用来指以某种方式由神经炎症引起的任何病状。“神经炎症”是指中枢神经系统(例如小胶质细胞)中的一系列免疫反应。神经炎症可能是由脑源性的,或者是由全身炎性反应引起的。

[0293] 如本文所用,术语“神经退行性疾病”和“神经退行性病症”可互换地用来指以某种方式由中枢神经系统或周围神经系统细胞功能丧失或死亡引起的任何病状。示例性的神经退行性疾病是阿尔茨海默病、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症、额颞叶痴呆和脊髓小脑性共济失调。

[0294] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”和“治疗(treating)”意指治疗性治疗和预防性(prophylactic或preventative)措施,其中目的是预防、改善或减缓(减轻)不期望的生理病状、病症或疾病,或获得有益或期望的临床结果。有益的或期望的临床结果包括但不限于患者对药物治疗的依赖性降低;症状的减轻;病状、病症或疾病的程度的减少;病状、病症或疾病的状态的稳定(即,不恶化);病状、病症或疾病进展的发作或减缓的延迟;病状、病症或疾病状态的改善或缓解(无论是部分或全部),无论是可检测到的还是不可检测到的;至少一个可测量的物理、认知或行为(如抑郁行为或冷漠)参数的改善,该改善不一定是患者可觉察得出的;或病状、病症或疾病的增强或改善。治疗包括引发临床显著反应而无过度水平的副作用。治疗还包括与不接受治疗情况下的预期存活相比延长存活。

[0295] 如本文所用,术语“益处”和“反应”在接受用于治疗例如神经退行性疾病如肌萎缩侧索硬化症(ALS)和额颞叶痴呆症(FTD)的疗法的受试者的背景下可互换使用。例如,在施用了本公开的siRNA分子或siRNA组合物的患有ALS的受试者的背景下的临床益处包括但不限于减少不自主运动、肌肉痉挛、虚弱、失去运动控制。作为进一步的实例,在施用了本公开的siRNA分子或siRNA组合物的患有FTD的受试者的背景下的临床益处包括但不限于减少记忆问题、行为问题和语言问题。“益处”和“反应”也可互换地用来指例如野生型TARDBP转录物、突变型TARDBP转录物、变异TARDBP转录物、TARDBP转录物的剪接同种型,和/或过度表达的TARDBP转录物的减少。

具体实施方式

[0296] 本公开提供了与TAR DNA结合蛋白-43(TARDBP)基因具有序列同源性的小干扰RNA(siRNA)分子的组合物,以及用于将所述siRNA分子施用至受试者的方法。此外,本文所述的siRNA分子可以组成为分支siRNA结构,诸如二分支、三分支和四分支siRNA结构,并且还可以包括特定模式的化学修饰(例如,2’核糖修饰或核苷间键联修饰)以改善针对核酸酶的抗性、毒性概况和物理化学特性(例如,热稳定性)。小干扰RNA分子是短的双链RNA分子。它们能够通过降解具有互补核苷酸序列的mRNA来介导RNA干扰(RNAi),从而阻止靶基因的翻译。

[0297] 相对于其他人基因,本公开的siRNA分子可以表现出例如对TARDBP的稳健的基因特异性阻抑。

[0298] 本公开的siRNA分子可特征在于具有与具有SEQ ID NO:1-192中任一个的核酸序列的TARDBP mRNA转录物的区域互补的核酸序列的反义链。反义链与TARDBP mRNA转录物的区域的互补程度可能足以使反义链在TARDBP mRNA转录物的区域的全长上退火。例如,反义链可具有与TARDBP mRNA转录物的区域至少60%互补(例如,60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%,74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%互补)的核酸序列。

[0299] 在一些实施方案中,本公开的siRNA分子的特征在于具有SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列或与之至少60%同一的核酸序列的反义链。例如,本公开的siRNA分子可特征在于具有与SEQ ID NO:385-576中任一个的核酸序列至少60%同一(例如,60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%,74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的核酸序列的反义链。

[0300] 在一些实施方案中,本公开的siRNA分子特征在于有义链,所述有义链具有SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列,或与之至少60%同一的核酸序列。例如,本公开的siRNA分子可特征在于具有与SEQ ID NO:193-384中任一个的核酸序列至少60%同一(例如,60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%,74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一)的核酸序列的有义链。

[0301] 本公开的示例性siRNA分子是下表1中所示的那些。表1汇总了反义链、有义链以及每条反义链所靶向的TARDBP mRNA转录物的相应区域。

[0302] 表1.基因特异性的靶向TARDBP的siRNA的核苷酸序列

[0303]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
1	UGAGCCCAUUG AAAUACCAUC	193	CCAUUGAAAU ACCAUA	385	UAUGGUAUUUC AAUGGGCUCA
2	UAGAAGGAAUU CUGCAUGCCC	194	GGAAUUCUGC AUGCCA	386	UGGCAUGCAGA AUUCCUUCUA
3	CAGUGAAAGUG AAAAGAGCAG	195	AAAGUGAAA AGAGCAA	387	UUGCUCUUUUCA CUUUCACUG
4	GUGAAAGUGAA AAGAGCAGUC	196	AGUGAAAAG AGCAGUA	388	UACUGCUCUUUU CACUUUCAC
5	UGAAAGUGAAA AGAGCAGUCC	197	GUGAAAAGA GCAGUCA	389	UGACUGCUCUUU UCACUUUCA
6	GAAAGUGAAAA GAGCAGUCCA	198	UGAAAAGAGC AGUCCA	390	UGGACUGCUCUU UUCACUUUC
7	GUGAAAAGAGC AGUCCAGAAA	199	AAGAGCAGUC CAGAAA	391	UUUCUGGACUGC UCUUUUCAC
8	UUUAAUAGUGU UGGGUCUCCC	200	UAGUGUUGG GUCUCCA	392	UGGAGACCCAAC ACUAUUAAA
9	UUAAUAGUGUU	201	AGUGUUGGG	393	UGGGAGACCCAA

[0304]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
	GGGUCUCCCA		UCUCCCA		CACUAUUAA
10	ACAAGUGAAAG UAAUGUCACA	202	UGAAAGUAA UGUCACA	394	UGUGACAUUAC UUUCACUUGU
11	CAAGUGAAAGU AAUGUCACAG	203	GAAAGUAAU GUCACAA	395	UUGUGACAUUA CUUUCACUUG
12	AUGAGCCUUUG AGAAGCAGAA	204	CCUUUGAGAA GCAGAA	396	UUCUGCUUCUCA AAGGCUCAU
13	UGAGCCUUUGA GAAGCAGAAA	205	CUUUGAGAAG CAGAAA	397	UUUCUGCUUCUC AAAGGCUCA
14	CGCUGUACAGA GGACAUGACU	206	UACAGAGGAC AUGACA	398	UGUCAUGUCCUC UGUACAGCG
15	GCUGUACAGAG GACAUGACUG	207	ACAGAGGACA UGACUA	399	UAGUCAUGUCCU CUGUACAGC
16	CUGUACAGAGG ACAUGACUGA	208	CAGAGGACAU GACUGA	400	UCAGUCAUGUCC UCUGUACAG
17	UGCGCAGUCUCU UUGUGGAGA	209	AGUCUCUUUG UGGAGA	401	UCUCCACAAAGA GACUGCGCA
18	GCGCAGUCUCUU UGUGGAGAG	210	GUCUCUUUGU GGAGAA	402	UUCUCCACAAAG AGACUGCGC
19	GGACUUGAUCA UUAAAGGAAU	211	UGAUCAUUAA AGGAAA	403	UUUCCUUUAAU GAUCAAGUCC
20	GCACAAUAGCA AUAGACAGUU	212	AUAGCAAUAG ACAGUA	404	UACUGUCUAUU GCUAUUGUGC
21	CACAAUAGCAA UAGACAGUUA	213	UAGCAAUAGA CAGUUA	405	UAACUGUCUAU UGCUAUUGUG
22	AUAGCAAUAGA CAGUUAGAAA	214	AAUAGACAGU UAGAAA	406	UUUCUAACUGUC UAUUGCUAU
23	UAGCAAUAGAC AGUUAGAAAG	215	AUAGACAGUU AGAAAA	407	UUUUCUAACUG UCUAUUGCUA
24	CAAUAGACAGU UAGAAAGAAG	216	GACAGUUAGA AAGAAA	408	UUUCUUUCUAAC UGUCUAUUG
25	AAUAGACAGUU AGAAAGAAGU	217	ACAGUUAGAA AGAAGA	409	UCUUCUUUCUAA CUGUCUAUU
26	UAGACAGUUAG AAAGAAGUGG	218	AGUUAGAAA GAAGUGA	410	UCACUUCUUUCU AACUGUCUA
27	ACAGUUAGAAA GAAGUGGAAG	219	UAGAAAGAA GUGGAAA	411	UUUCCACUUCUU UCUAACUGU
28	GUGGAAGAUUU GGUGGUAAUC	220	AGAUUUGGU GGUAAUA	412	UAUUACCACCAA AUCUUCCAC
29	GGAAGAUUUGG UGGUAAUCCA	221	AUUUGGUGG UAAUCCA	413	UGGAUUACCACC AAAUCUUCC
30	GAUUUGGUGGU AAUCCAGGUG	222	GGUGGUAAUC CAGGUA	414	UACCUGGAUUAC CACCAAAUC
31	AUUUGGUGGUA AUCCAGGUGG	223	GUGGUAAUCC AGGUGA	415	UCACCUGGAUUA CCACCAAAU
32	UUUGGUGGUAA UCCAGGUGGC	224	UGGUAAUCCA GGUGGA	416	UCCACCUGGAUU ACCACCAAA
33	GGUGGUAAUCC AGGUGGCUUU	225	UAAUCCAGGU GGCUUA	417	UAAGCCACCUGG AUUACCACC

[0305]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
34	UGGUAAUCCAG GUGGCUUUGG	226	AUCCAGGUGG CUUUGA	418	UCAAAGCCACCU GGAUUACCA
35	GGUAAUCCAGG UGGCUUUGGG	227	UCCAGGUGGC UUUGGA	419	UCCAAAGCCACC UGGAUUACC
36	UAAUCCAGGUG GCUUUGGGAA	228	CAGGUGGCUU UGGGAA	420	UUCCCAAAGCCA CCUGGAUUA
37	UCCAGGUGGCU UUGGGAAUCA	229	GUGGCUUUGG GAAUCA	421	UGAUUCCCAAAG CCACCUGGA
38	CAGGUGGCUUU GGGAAUCAGG	230	GGCUUUGGGA AUCAGA	422	UCUGAUUCCCAA AGCCACCUG
39	AGGUGGCUUUG GGAAUCAGGG	231	GCUUUGGGAA UCAGGA	423	UCCUGAUUCCCA AAGCCACCU
40	GGUGGCUUUGG GAAUCAGGGU	232	CUUUGGGAAU CAGGGA	424	UCCCUGAUUCCC AAAGCCACC
41	GUGGCUUUGGG AAUCAGGGUG	233	UUUGGGAAUC AGGGUA	425	UACCCUGAUUCC CAAAGCCAC
42	GGGUAUGAUGG GCAUGUUAGC	234	UGAUGGGCAU GUUAGA	426	UCUAACAUGCCC AUCAUACCC
43	UAUGAUGGGCA UGUUAGCCAG	235	UGGGCAUGUU AGCCAA	427	UUGGCUAACAU GCCCAUCAUA
44	GGGCAUGUUAG CCAGCCAGCA	236	UGUUAGCCAG CCAGCA	428	UGCUGGCUGGCU AACAUGCCC
45	GCAUGUUAGCC AGCCAGCAGA	237	UUAGCCAGCC AGCAGA	429	UCUGCUGGCUGG CUAACAUGC
46	GCCAGCCAGCAG AACCAGUCA	238	CCAGCAGAAC CAGUCA	430	UGACUGGUUCU GCUGGCUGGC
47	GUCGGGCAGUG GUUUUAAUGG	239	GCAGUGGUUU UAAUGA	431	UCAUUAAAACCA CUGCCCGAC
48	UUUCUAAACUC AUGGUAAGUA	240	AAACUCAUGG UAAGUA	432	UACUUACCAUGA GUUUAGAAA
49	UUCUAAACUCA UGGUAAGUAU	241	AACUCAUGGU AAGUAA	433	UUACUUACCAUG AGUUUAGAA
50	UCUAAACUCAU GGUAAGUAUA	242	ACUCAUGGUA AGUAUA	434	UAUACUUACCAU GAGUUUAGA
51	CUAAACUCAUG GUAAGUAUAU	243	CUCAUGGUAA GUAUAA	435	UUAUACUUACCA UGAGUUUAG
52	AACUCAUGGUA AGUAUAUUGU	244	AUGGUAAGU AUAUUGA	436	UCAAUAUACUU ACCAUGAGUU
53	CUCAUGGUAAG UAUAUUGUAA	245	GGUAAGUAU AUUGUAA	437	UUACAAUAUAC UUACCAUGAG
54	CAAAAUUGGUU UGUUCAGUGU	246	UUGGUUUGU UCAGUGA	438	UCACUGAACAAA CCAAUUUUG
55	AAAUUGGUUUG UUCAGUGUGG	247	GGUUUGUUCA GUGUGA	439	UCACACUGAACA AACCAAUUU
56	AAUUGGUUUGU UCAGUGUGGA	248	GUUUGUUCAG UGUGGA	440	UCCACACUGAAC AAACCAAUU
57	GUUUGUUCAGU GUGGAGUAUA	249	UUCAGUGUGG AGUAUA	441	UAUACUCCACAC UGAACAAAC
58	UGUUCAGUGUG	250	AGUGUGGAG	442	UAAUAUACUCCA

[0306]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
	GAGUAUAUUC		UAUAUUA		CACUGAACA
59	GUUCAGUGUGG AGUAUAUUCA	251	GUGUGGAGU AUAUUCA	443	UGAAUAUACUCC ACACUGAAC
60	CAGUGUGGAGU AUAUUCAGCA	252	UGGAGUAUA UUCAGCA	444	UGCUGAAUAUA CUCCACACUG
61	AGUGUGGAGUA UAUUCAGCAG	253	GGAGUAUAU UCAGCAA	445	UUGCUGAAUAU ACUCCACACU
62	GUGUGGAGUAU AUUCAGCAGU	254	GAGUAUAUUC AGCAGA	446	UCUGCUGAAUA UACUCCACAC
63	GGAGUAUAUUC AGCAGUAUUU	255	AUAUUCAGCA GUAUUA	447	UAAUACUGCUG AAUAUACUCC
64	UGGUUGAAAGU GAACUGCUGU	256	GAAAGUGAAC UGCUGA	448	UCAGCAGUUCAC UUUCAACCA
65	UGAAAGUGAAC UGCUGUUUGC	257	GUGAACUGCU GUUUGA	449	UCAAACAGCAGU UCACUUUCA
66	GAAAGUGAACU GCUGUUUGCC	258	UGAACUGCUG UUUGCA	450	UGCAAACAGCAG UUCACUUUC
67	AAAGUGAACUG CUGUUUGCCU	259	GAACUGCUGU UUGCCA	451	UGGCAAACAGCA GUUCACUUU
68	AAGUACAAUAU GAAGCCUUCA	260	CAAUAUGAAG CCUUCA	452	UGAAGGCUUCA UAUUGUACUU
69	CAAUAUGAAGC CUUCAUUUAA	261	UGAAGCCUUC AUUUAA	453	UUAAAUGAAGG CUUCAUAUUG
70	AUGAAGCCUUC AUUUAAUCUC	262	GCCUUCAUUU AAUCUA	454	UAGAUUAAAUG AAGGCUUCAU
71	GAAGCCUUCAU UUAAUCUCUG	263	CUUCAUUUAA UCUCUA	455	UAGAGAUUAAA UGAAGGCUUC
72	AAGCCUUCAUU UAAUCUCUGC	264	UUCAUUUAAU CUCUGA	456	UCAGAGAUUAA AUGAAGGCUU
73	AGCCUUCAUUU AAUCUCUGCA	265	UCAUUUAAUC UCUGCA	457	UGCAGAGAUUA AAUGAAGGCU
74	UUAAUCUCUGC AGUUCAUCUC	266	CUCUGCAGUU CAUCUA	458	UAGAUGAACUG CAGAGAUUAA
75	UAAUCUCUGCA GUUCAUCUCA	267	UCUGCAGUUC AUCUCA	459	UGAGAUGAACU GCAGAGAUUA
76	AAUCUCUGCAG UUCAUCUCAU	268	CUGCAGUUCA UCUCAA	460	UUGAGAUGAAC UGCAGAGAUU
77	CUCUGCAGUUCA UCUCAUUUC	269	CAGUUCAUCU CAUUUA	461	UAAAUGAGAUG AACUGCAGAG
78	UGCAGUUCAUC UCAUUUCAAA	270	UUCAUCUCAU UUCAAA	462	UUUGAAAUGAG AUGAACUGCA
79	CUCAUUUCAAA UGUUUAUGGA	271	UUCAAAUGUU UAUGGA	463	UCCAUAAACAUU UGAAAUGAG
80	CAAAUGUUUAU GGAAGAAGCA	272	GUUUAUGGA AGAAGCA	464	UGCUUCUUCCAU AAACAUUUG
81	AAAUGUUUAUG GAAGAAGCAC	273	UUUAUGGAA GAAGCAA	465	UUGCUUCUUCCA UAAACAUUU
82	AAUGUUUAUGG AAGAAGCACU	274	UUAUGGAAG AAGCACA	466	UGUGCUUCUUCC AUAAACAUU

[0307]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
83	UGUUUAUGGAA GAAGCACUUC	275	AUGGAAGAA GCACUUA	467	UAAGUGCUUCU UCCAUAAACA
84	GUUUAUGGAAG AAGCACUUCA	276	UGGAAGAAGC ACUUCA	468	UGAAGUGCUUC UUCCAUAAAC
85	GGAAGAAGCAC UUCAUUGAAA	277	AAGCACUUCA UUGAAA	469	UUUCAAUGAAG UGCUUCUUCC
86	AGAAGCACUUC AUUGAAAGUA	278	CACUUCAUUG AAAGUA	470	UACUUUCAAUG AAGUGCUUCU
87	GAAGCACUUCA UUGAAAGUAG	279	ACUUCAUUGA AAGUAA	471	UUACUUUCAAU GAAGUGCUUC
88	AAGCACUUCAU UGAAAGUAGU	280	CUUCAUUGAA AGUAGA	472	UCUACUUUCAAU GAAGUGCUU
89	AGCACUUCAUU GAAAGUAGUG	281	UUCAUUGAAA GUAGUA	473	UACUACUUUCAA UGAAGUGCU
90	ACUUCAUUGAA AGUAGUGCUG	282	AUUGAAAGU AGUGCUA	474	UAGCACUACUUU CAAUGAAGU
91	CUUCAUUGAAA GUAGUGCUGU	283	UUGAAAGUA GUGCUGA	475	UCAGCACUACUU UCAAUGAAG
92	UUCAUUGAAAG UAGUGCUGUA	284	UGAAAGUAG UGCUGUA	476	UACAGCACUACU UUCAAUGAA
93	UCAUUGAAAGU AGUGCUGUAA	285	GAAAGUAGU GCUGUAA	477	UUACAGCACUAC UUUCAAUGA
94	CAUUGAAAGUA GUGCUGUAAA	286	AAAGUAGUGC UGUAAA	478	UUUACAGCACUA CUUUCAAUG
95	AUUGAAAGUAG UGCUGUAAAU	287	AAGUAGUGCU GUAAAA	479	UUUUACAGCACU ACUUUCAAU
96	UUGAAAGUAGU GCUGUAAAUA	288	AGUAGUGCUG UAAAUA	480	UAUUUACAGCAC UACUUUCAA
97	UGAAAGUAGUG CUGUAAAUAU	289	GUAGUGCUGU AAAUAA	481	UUAUUUACAGC ACUACUUUCA
98	AAGUAGUGCUG UAAAUAUUCU	290	GUGCUGUAAA UAUUCA	482	UGAAUAUUUAC AGCACUACUU
99	AGUAGUGCUGU AAAUAUUCUG	291	UGCUGUAAAU AUUCUA	483	UAGAAUAUUUA CAGCACUACU
100	GUAGUGCUGUA AAUAUUCUGC	292	GCUGUAAAUA UUCUGA	484	UCAGAAUAUUU ACAGCACUAC
101	UAGUGCUGUAA AUAUUCUGCC	293	CUGUAAAUAU UCUGCA	485	UGCAGAAUAUU UACAGCACUA
102	AGUGCUGUAAA UAUUCUGCCA	294	UGUAAAUAU UCUGCCA	486	UGGCAGAAUAU UUACAGCACU
103	GUGCUGUAAAU AUUCUGCCAU	295	GUAAAUAUUC UGCCAA	487	UUGGCAGAAUA UUUACAGCAC
104	UGCUGUAAAUA UUCUGCCAUA	296	UAAAUAUUCU GCCAUA	488	UAUGGCAGAAU AUUUACAGCA
105	UGUAAAUAUUC UGCCAUAGGA	297	AUAUUCUGCC AUAGGA	489	UCCUAUGGCAGA AUAUUUACA
106	AUAUUCUGCCA UAGGAAUACU	298	CUGCCAUAGG AAUACA	490	UGUAUUCCUAU GGCAGAAUAU
107	UAUUCUGCCAU	299	UGCCAUAGGA	491	UAGUAUUCCUA

[0308]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
	AGGAAUACUG		AUACUA		UGGCAGAAUA
108	AAUACUGUCUA CAUGCUUUCU	300	UGUCUACAUG CUUUCA	492	UGAAAGCAUGU AGACAGUAUU
109	UACUGUCUACA UGCUUUCUCA	301	UCUACAUGCU UUCUCA	493	UGAGAAAGCAU GUAGACAGUA
110	ACUGUCUACAU GCUUUCUCAU	302	CUACAUGCUU UCUCAA	494	UUGAGAAAGCA UGUAGACAGU
111	CCGCGUCUUUGA CGGUGGGUG	303	UCUUUGACGG UGGGUA	495	UACCCACCGUCA AAGACGCGG
112	CGCGUCUUUGAC GGUGGGUGU	304	CUUUGACGGU GGGUGA	496	UCACCCACCGUC AAAGACGCG
113	UCCCAUUUUUA UCCGCUACUC	305	UUUUUAUCCG CUACUA	497	UAGUAGCGGAU AAAAAUGGGA
114	CCCAUUUUUAUC CGCUACUCU	306	UUUUAUCCGC UACUCA	498	UGAGUAGCGGA UAAAAAUGGG
115	CCAUUUUUAUCC GCUACUCUU	307	UUUAUCCGCU ACUCUA	499	UAGAGUAGCGG AUAAAAAUGG
116	CAUUUUUAUCC GCUACUCUUU	308	UUAUCCGCUA CUCUUA	500	UAAGAGUAGCG GAUAAAAAUG
117	AUCCGCUACUCU UUAUUUCAU	309	CUACUCUUUA UUUCAA	501	UUGAAAUAAAG AGUAGCGGAU
118	CCGCUACUCUUU AUUUCAUGG	310	ACUCUUUAUU UCAUGA	502	UCAUGAAAUAA AGAGUAGCGG
119	CGCUACUCUUUA UUUCAUGGA	311	CUCUUUAUUU CAUGGA	503	UCCAUGAAAUA AAGAGUAGCG
120	AGUCGUAUCAA CGCUAUGAAC	312	UAUCAACGCU AUGAAA	504	UUUCAUAGCGU UGAUACGACU
121	AACGCUAUGAA CGCAAGGCUG	313	UAUGAACGCA AGGCUA	505	UAGCCUUGCGUU CAUAGCGUU
122	CUAUGAACGCA AGGCUGUGAU	314	AACGCAAGGC UGUGAA	506	UUCACAGCCUUG CGUUCAUAG
123	UAUGAACGCAA GGCUGUGAUA	315	ACGCAAGGCU GUGAUA	507	UAUCACAGCCUU GCGUUCAUA
124	AAGGCUGUGAU AUGGAACCAG	316	UGUGAUAUG GAACCAA	508	UUGGUUCCAUA UCACAGCCUU
125	AGGCUGUGAUA UGGAACCAGA	317	GUGAUAUGG AACCAGA	509	UCUGGUUCCAUA UCACAGCCU
126	GCUGUGAUAUG GAACCAGAAG	318	GAUAUGGAAC CAGAAA	510	UUUCUGGUUCCA UAUCACAGC
127	GUGAUAUGGAA CCAGAAGGCU	319	AUGGAACCAG AAGGCA	511	UGCCUUCUGGUU CCAUAUCAC
128	UGAUAUGGAAC CAGAAGGCUG	320	UGGAACCAGA AGGCUA	512	UAGCCUUCUGGU UCCAUAUCA
129	GUCUGAACUUU UGAAACCUUG	321	AACUUUUGAA ACCUUA	513	UAAGGUUUCAA AAGUUCAGAC
130	UCUGAACUUUU GAAACCUUGU	322	ACUUUUGAAA CCUUGA	514	UCAAGGUUUCA AAAGUUCAGA
131	UUUUGAAACCU UGUGUGGGAU	323	AAACCUUGUG UGGGAA	515	UUCCCACACAAG GUUUCAAAA

[0309]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
132	UUGAAACCUUG UGUGGGAUUG	324	ACCUUGUGUG GGAUUA	516	UAAUCCCACACA AGGUUUCAA
133	UGAAACCUUGU GUGGGAUUGA	325	CCUUGUGUGG GAUUGA	517	UCAAUCCCACAC AAGGUUUCA
134	GAAACCUUGUG UGGGAUUGAU	326	CUUGUGUGGG AUUGAA	518	UUCAAUCCCACA CAAGGUUUC
135	AAACCUUGUGU GGGAUUGAUG	327	UUGUGUGGG AUUGAUA	519	UAUCAAUCCCAC ACAAGGUUU
136	UGUGUGGGAUU GAUGGUGGUG	328	GGGAUUGAU GGUGGUA	520	UACCACCAUCAA UCCCACACA
137	UGUGGGAUUGA UGGUGGUGCC	329	GAUUGAUGG UGGUGCA	521	UGCACCACCAUC AAUCCCACA
138	UGGGAUUGAUG GUGGUGCCGA	330	UUGAUGGUG GUGCCGA	522	UCGGCACCACCA UCAAUCCCA
139	GGGAUUGAUGG UGGUGCCGAG	331	UGAUGGUGG UGCCGAA	523	UUCGGCACCACC AUCAAUCCC
140	AUUGAUGGUGG UGCCGAGGCA	332	UGGUGGUGCC GAGGCA	524	UGCCUCGGCACC ACCAUCAAU
141	UGGUGGUGCCG AGGCAUGAAA	333	GUGCCGAGGC AUGAAA	525	UUUCAUGCCUCG GCACCACCA
142	UGGUGCCGAGG CAUGAAAGGC	334	CCGAGGCAUG AAAGGA	526	UCCUUUCAUGCC UCGGCACCA
143	UGCCGAGGCAU GAAAGGCUAG	335	AGGCAUGAAA GGCUAA	527	UUAGCCUUUCAU GCCUCGGCA
144	GCCGAGGCAUG AAAGGCUAGU	336	GGCAUGAAAG GCUAGA	528	UCUAGCCUUUCA UGCCUCGGC
145	GGCAUGAAAGG CUAGUAUGAG	337	GAAAGGCUAG UAUGAA	529	UUCAUACUAGCC UUUCAUGCC
146	GCAUGAAAGGC UAGUAUGAGC	338	AAAGGCUAGU AUGAGA	530	UCUCAUACUAGC CUUUCAUGC
147	GAAAGGCUAGU AUGAGCGAGA	339	GCUAGUAUGA GCGAGA	531	UCUCGCUCAUAC UAGCCUUUC
148	AGGCUAGUAUG AGCGAGAAAA	340	AGUAUGAGCG AGAAAA	532	UUUUCUCGCUCA UACUAGCCU
149	AGUAUGAGCGA GAAAAGGAGA	341	GAGCGAGAAA AGGAGA	533	UCUCCUUUUCUC GCUCAUACU
150	GAGAGAGCGCG UGCAGAGACU	342	AGCGCGUGCA GAGACA	534	UGUCUCUGCACG CGCUCUCUC
151	CGUGCAGAGAC UUGGUGGUGC	343	AGAGACUUGG UGGUGA	535	UCACCACCAAGU CUCUGCACG
152	GUCUCUCAAUCC UGUGGCUUU	344	UCAAUCCUGU GGCUUA	536	UAAGCCACAGGA UUGAGAGAC
153	AGAGUGUGCAG AGAGCAAUGA	345	GUGCAGAGAG CAAUGA	537	UCAUUGCUCUCU GCACACUCU
154	GAGUGUGCAGA GAGCAAUGAU	346	UGCAGAGAGC AAUGAA	538	UUCAUUGCUCUC UGCACACUC
155	GUGUGCAGAGA GCAAUGAUAG	347	CAGAGAGCAA UGAUAA	539	UUAUCAUUGCUC UCUGCACAC
156	UGUGCAGAGAG	348	AGAGAGCAAU	540	UCUAUCAUUGCU

[0310]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
	CAAUGAUAGC		GAUAGA		CUCUGCACA
157	UGCAGAGAGCA AUGAUAGCAA	349	AGAGCAAUGA UAGCAA	541	UUGCUAUCAUU GCUCUCUGCA
158	UAGAUGAAUGU GUUAAGUGAA	350	GAAUGUGUU AAGUGAA	542	UUCACUUAACAC AUUCAUCUA
159	AGAUGAAUGUG UUAAGUGAAA	351	AAUGUGUUA AGUGAAA	543	UUUCACUUAACA CAUUCAUCU
160	UGUCAACUGCU GUGAAUGCUG	352	ACUGCUGUGA AUGCUA	544	UAGCAUUCACAG CAGUUGACA
161	GUCAACUGCUG UGAAUGCUGU	353	CUGCUGUGAA UGCUGA	545	UCAGCAUUCACA GCAGUUGAC
162	CAACUGCUGUG AAUGCUGUAU	354	GCUGUGAAUG CUGUAA	546	UUACAGCAUUCA CAGCAGUUG
163	AACUGCUGUGA AUGCUGUAUG	355	CUGUGAAUGC UGUAUA	547	UAUACAGCAUUC ACAGCAGUU
164	CUGCUGUGAAU GCUGUAUGGU	356	GUGAAUGCUG UAUGGA	548	UCCAUACAGCAU UCACAGCAG
165	UGUGAAUGCUG UAUGGUGUGU	357	AUGCUGUAUG GUGUGA	549	UCACACCAUACA GCAUUCACA
166	CAAUGUGAACU GAAGCUGAUG	358	UGAACUGAAG CUGAUA	550	UAUCAGCUUCAG UUCACAUUG
167	UGUGAACUGAA GCUGAUGGGC	359	ACUGAAGCUG AUGGGA	551	UCCCAUCAGCUU CAGUUCACA
168	UGAGAACAUGG ACUGAGCUUG	360	ACAUGGACUG AGCUUA	552	UAAGCUCAGUCC AUGUUCUCA
169	UGAGCUUGUGG UGUGCUUUGC	361	UUGUGGUGU GCUUUGA	553	UCAAAGCACACC ACAAGCUCA
170	AGCUUGUGGUG UGCUUUGCAG	362	GUGGUGUGCU UUGCAA	554	UUGCAAAGCACA CCACAAGCU
171	UUGUGGUGUGC UUUGCAGGAG	363	GUGUGCUUUG CAGGAA	555	UUCCUGCAAAGC ACACCACAA
172	CUUGAAGCAGA GUUCACCAGU	364	AGCAGAGUUC ACCAGA	556	UCUGGUGAACUC UGCUUCAAG
173	UUGAAGCAGAG UUCACCAGUG	365	GCAGAGUUCA CCAGUA	557	UACUGGUGAAC UCUGCUUCAA
174	CCAGUGAGCUCA GGUGUCUCA	366	GAGCUCAGGU GUCUCA	558	UGAGACACCUGA GCUCACUGG
175	AGUGAGCUCAG GUGUCUCAAA	367	GCUCAGGUGU CUCAAA	559	UUUGAGACACCU GAGCUCACU
176	UGAGCUCAGGU GUCUCAAAGA	368	UCAGGUGUCU CAAAGA	560	UCUUUGAGACAC CUGAGCUCA
177	AGGUGUCUCAA AGAAGGGUGG	369	UCUCAAAGAA GGGUGA	561	UCACCCUUCUUU GAGACACCU
178	UGUCUCAAAGA AGGGUGGAAG	370	CAAAGAAGGG UGGAAA	562	UUUCCACCCUUC UUUGAGACA
179	UACCCAUAAGA AUGCUGUUUG	371	AUAAGAAUGC UGUUUA	563	UAAACAGCAUUC UUAUGGGUA
180	CCCAUAAGAAU GCUGUUUGCU	372	AAGAAUGCUG UUUGCA	564	UGCAAACAGCAU UCUUAUGGG

[0311]

基因区域 SEQ ID NO:	基因区域	有义 SEQ ID NO:	有义序列	反义 SEQ ID NO:	反义序列
181	AUAAGAAUGCU GUUUGCUGCA	373	AAUGCUGUUU GCUGCA	565	UGCAGCAAACAG CAUUCUUAU
182	AAUGCUGUUUG CUGCAGUUCU	374	UGUUUGCUGC AGUUCA	566	UGAACUGCAGCA AACAGCAUU
183	UGCUGUUUGCU GCAGUUCUGU	375	UUUGCUGCAG UUCUGA	567	UCAGAACUGCAG CAAACAGCA
184	UUGCUGCAGUU CUGUGUCCUG	376	GCAGUUCUGU GUCCUA	568	UAGGACACAGA ACUGCAGCAA
185	UUCUGUGUCCU GUGCUUGGAU	377	UGUCCUGUGC UUGGAA	569	UUCCAAGCACAG GACACAGAA
186	GUGUCCUGUGC UUGGAUGCUU	378	CUGUGCUUGG AUGCUA	570	UAGCAUCCAAGC ACAGGACAC
187	CCUGUGCUUGG AUGCUUUUUA	379	GCUUGGAUGC UUUUUA	571	UAAAAAGCAUCC AAGCACAGG
188	AGAGUUGUCAU UGUUGGAAAU	380	UGUCAUUGUU GGAAAA	572	UUUUCCAACAAU GACAACUCU
189	GAGUUGUCAUU GUUGGAAAUU	381	GUCAUUGUUG GAAAUA	573	UAUUUCCAACAA UGACAACUC
190	AGUUGUCAUUG UUGGAAAUUC	382	UCAUUGUUGG AAAUUA	574	UAAUUUCCAACA AUGACAACU
191	GUUGUCAUUGU UGGAAAUUCU	383	CAUUGUUGGA AAUUCA	575	UGAAUUUCCAAC AAUGACAAC
192	UGUCAUUGUUG GAAAUUCUUA	384	UUGUUGGAA AUUCUUA	576	UAAGAAUUUCC AACAAUGACA

[0312] siRNA结构

[0313] 本公开的siRNA分子可以是单链(ss)或双链(ds)寡核苷酸结构的形式。在一些实施方案中,siRNA分子可以是二分支、三分支或四分支的分子。此外,本公开的siRNA分子可含有一个或多个磷酸二酯核苷间键联和/或其类似物,诸如硫代磷酸酯核苷间键联。本公开的siRNA分子还可含有具有2’糖修饰的经化学修饰的核苷。

[0314] 最简单的siRNA由包含ss-或ds-结构的核糖核酸组成,所述结构由第一链(即,反义链)形成,并且在ds-siRNA的情况下还有第二链(即,有义链)。第一链包括与靶核酸至少部分互补的连续核苷酸链段。第二链也包括连续核苷酸链段,其中第二链段与靶核酸至少部分相同。第一链和所述第二链可以彼此杂交以形成双链结构。杂交通常通过沃森-克里克碱基配对发生。

[0315] 根据第一链和第二链的序列,杂交或碱基配对不一定是完全或完美的,这意味着第一链和第二链由于错配而不是100%碱基配对。双链体内也可能存在一个或多个错配,但不一定影响siRNA RNAi活性。

[0316] 第一链含有与靶核酸基本上互补的连续核苷酸链段。通常,根据干扰核糖核酸的作用模式,靶核酸序列是ss-RNA,优选mRNA。此类杂交最有可能通过沃森-克里克碱基配对发生,但不一定限于此。第一链具有与靶核酸序列互补的连续核苷酸链段的程度可以介于80%和100%之间,例如80%、85%、90%、95%或100%互补。

[0317] 本文所述的siRNA分子可以采用对核碱基、磷酸骨架、核糖核心、5’-末端和3’-末

端以及分支的修饰,其中siRNA的多条链可共价连接。

[0318] 小干扰RNA分子的长度

[0319] 在本公开的范围内,本领域已知的和先前未知的任何长度都可以用于本发明。如本文所述,本公开的siRNA分子的反义链的可能长度为10至30个核苷酸(例如,10个核苷酸、11个核苷酸、12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸或30个核苷酸)、15至25个核苷酸(例如,15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸或25个核苷酸)或18至23个核苷酸(例如,18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸或23个核苷酸)。在一些实施方案中,反义链为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为27个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为28个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为29个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为30个核苷酸。

[0320] 在一些实施方案中,本公开的siRNA分子的有义链为12至30个核苷酸(例如,12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸或30个核苷酸)或14至23个核苷酸(例如,14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸或23个核苷酸)。在一些实施方案中,有义链为15个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为16个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为17个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为18个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为19个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为20个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为21个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为22个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为23个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为24个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为25个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为26个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为27个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为28个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为29个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为30个核苷酸。

[0321] 2′糖修饰

[0322] 本公开可以包括ss-siRNA和ds-siRNA分子组合物,其包含至少一个(例如,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11个或更多)具有2’糖修饰的核苷。可能的2′-修饰包括所有可能取向的OH;F;O-烷基、S-烷基或N-烷基;O-烯基、S-烯基或N-烯基;O-炔基、S-炔基或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是经取代或未取代的C1至C10烷基或C2至C10烯基和炔基。在一些实施方案中,修饰包括2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰。其他可能的糖取代基基团包括:C1至C10低级烷基、经取代的低级烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、多烷基氨基、经取代的甲硅烷基、用于改善寡核苷酸的药代动力学性质的基团或用于改善寡核苷酸的药效学性质的基团,以及具有类似性质的其他取代基。

在一些实施方案中,修饰包括2'甲氧基乙氧基(2′-O-$CH_2CH_2OCH_3$,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2′-MOE)。在一些实施方案中,修饰包括2'-二甲基氨基氧基乙氧基,即O$(CH_2)_2$ON$(CH_3)_2$基团,也称为2′-DMAOE;和2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称为2'-O-二甲基氨基-乙氧基-乙基或2′-DMAEOE),即2′-O-$CH_2OCH_2N(CH_3)_2$。其他可能的糖取代基基团包括例如氨基丙氧基(-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)、烯丙基(-CH_2-CH=CH_2)、-O-烯丙基(-O-CH_2-CH=CH_2)和氟(F)。2'-糖取代基可以位于阿拉伯糖(上)位置或核糖(下)位置。在一些实施方案中,2'-阿拉伯糖修饰是2'-F。还可在siRNA分子上的其他位置上进行类似的修饰,具体地在3'末端核苷上或在2'-5'连接的寡核苷酸中的糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物诸如环丁基部分来代替戊呋喃糖基糖。

[0323] 核碱基修饰

[0324] 本公开的siRNA分子还可包括核苷或其他替代或模拟单体亚基,这些亚基包括核碱基(在本领域中通常简称为"碱基"或"杂环碱基部分")。核碱基是已被广泛修饰或取代的另一部分并且此类经修饰和或经取代的核碱基适用于本公开。如本文所用,"未修饰"或"天然"核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰的核碱基(本文也称为杂环碱基部分)包括其他合成和天然的核碱基诸如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基衍生物和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基衍生物和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C=C-CH3)尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物、6-偶氮基尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(具体为5-溴)、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。核碱基还可包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和2-吡啶酮置换的那些。另外的核碱基包括公开于US 3,687,808中的那些、公开于Kroschwitz,J.I.编辑The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering,New York,John Wiley&Sons,1990,第858-859页中的那些;由Englisch等人,Angewandte Chemie,国际版,30:613,1991公开的那些;以及由Sanghvi,Y.S.,第16章,Antisense Research and Applications,CRC Press,Gait,M.J.编辑,1993,第289-302页公开的那些。本公开的siRNA分子还可以包括多环杂环化合物来代替一个或多个杂环碱基部分。先前已报道了许多三环杂环化合物。这些化合物通常用于反义应用,以增加经修饰的链与靶链的结合性质。

[0325] 与第二链中的鸟苷产生三个氢键的代表性胞嘧啶类似物包括1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮(Kurchavov等人,Nucleosides and Nucleotides,16:1837-46,1997)、1,3-二氮杂吩噻嗪-2-酮(Lin等人Am.Chem.Soc.,117:3873-4,1995)和6,7,8,9-四氟-1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮(Wang等人,Tetrahedron Lett.,39:8385-8,1998)。经证实掺入寡核苷酸中的这些碱基修饰与互补鸟嘌呤杂交,并且经证实后者也与腺嘌呤杂交并通过扩展的堆积相互作用增强螺旋热稳定性(也参见US10/155,920和10/013,295,两者均通过引用整体并入本文)。当胞嘧啶类似物/取代物具有附接到刚性1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮支架上的氨基乙氧基部分时,已经观察到了进一步的螺旋稳定性质(Lin等人,Am.Chem.Soc.,120:8531-2,1998)。

[0326] 核苷间键联修饰

[0327] 本公开设计中的另一个变量是构成siRNA分子的磷酸骨架的核苷间键联。尽管此处可采用天然RNA磷酸骨架,但可以使用增强siRNA分子的所需特征的其衍生物。虽然不是限制性的,但在本公开中特别重要的是保护siRNA分子的部分或整体免于水解。降低水解速率的修饰的一个实例是硫代磷酸酯。骨架的任何部分或整体可以含有磷酸酯取代基(例如,硫代磷酸酯等)。例如,核苷间键联可以是0至100%硫代磷酸酯,例如0至100%、10至100%、20至100%、30至100%、40至100%、50至100%、60至100%、70至100%、80至100%、90至100%、0至90%、0至80%、0至70%、0至60%、0至50%、0至40%、0至30%、0至20%、0至10%、10至90%、20至80%、30至70%、40至60%、10至40%、20至50%、30至60%、40至70%、50至80%或60至90%硫代磷酸酯键联。类似地,核苷间键联可以是0至100%磷酸二酯键联,例如0至100%、10至100%、20至100%、30至100%、40至100%、50至100%、60至100%、70至100%、80至100%、90至100%、0至90%、0至80%、0至70%、0至60%、0至50%、0至40%、0至30%、0至20%、0至10%、10至90%、20至80%、30至70%、40至60%、10至40%、20至50%、30至60%、40至70%、50至80%或60至90%磷酸二酯键联。

[0328] 可用于本发明的一些可能的siRNA分子的具体实例包括含有经修饰的(例如非天然存在的)核苷间键联的寡核苷酸。如本说明书中所定义,具有经修饰的核苷间键联的寡核苷酸包括保留磷原子的核苷间键联和不具有磷原子的核苷间键联。出于本说明书的目的,并且如本领域有时所提及的,在其核苷间骨架中不具有磷原子的经修饰的寡核苷酸也可以被认为是寡核苷。优选含磷的经修饰的核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,其中含有磷原子的经修饰的寡核苷酸骨架包括例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基膦酸酯(包括3'-亚烷基膦酸酯、5'-亚烷基膦酸酯)、亚膦酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基膦酸酯、硫代烷基磷酸三酯、硒代磷酸酯和具有正常3'-5'键联的硼代磷酸酯、这些的2'-5'连接类似物以及具有反极性的那些,其中一个或多个核苷酸间键联为3'至3'、5'至5'或2'至2'键联。描述含磷键联的制备的示例性美国专利包括但不限于美国专利号3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,625,050;6,028,188;6,124,445;6,160,109;6,169,170;6,172,209;6,239,265;6,277,603;6,326,199;6,346,614;6,444,423;6,531,590;6,534,639;6,608,035;6,683,167;6,858,715;6,867,294;6,878,805;7,015,315;7,041,816;7,273,933;7,321,029;和美国专利RE39464,这些专利中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0329] 在一些实施方案中,不包括磷原子的经修饰的寡核苷酸骨架具有由短链烷基或环烷基核苷间键联、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键联或者一个或多个短链杂原子核苷间键联或杂环核苷间键联形成的骨架。这些包括具有以下的那些:吗啉代键联(部分地由核苷的糖部分形成);硅氧烷骨架;硫化物、亚砜和砜骨架;甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;核糖乙酰基(riboacetyl)骨架;含烯烃的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚胺基和亚甲基肼基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰氨骨架;以

及具有混合N、O、S和CH_2组成部分的其他骨架。教导非磷骨架的制备的美国专利的非限制性实例包括但不限于美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;和5,677,439,这些专利中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0330] siRNA分子的修饰模式

[0331] 以下部分提供了一组示例性支架,本公开的siRNA分子可以并入其中。

[0332] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式I表示的区域的反义链,其中式I按5'至3'方向是

[0333] $A\text{-}B\text{-}(A')_j\text{-}C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^1\text{-}(C'\text{-}P^1)_k\text{-}C'$

[0334] 式I;

[0335] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;每个A'由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;B由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;每个D是2'-F核糖核苷;每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;j是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);并且k是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,j为4。在一些实施方案中,k为4。在一些实施方案中,j为4并且k为4。反义与靶核酸序列互补(例如,完全或部分互补)。

[0336] 在一些实施方案中,反义链包括式A1表示的结构,其中式A1按5'至3'方向为:

[0337] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0338] A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[0339] 式A1;

[0340] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0341] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式II表示的区域的反义链,其中式II按5'至3'方向是:

[0342] $A\text{-}B\text{-}(A')_j\text{-}C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^1\text{-}(C\text{-}P^1)_k\text{-}C'$

[0343] 式II;

[0344] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;每个A'由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;B由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;每个D是2'-F核糖核苷;每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;j是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);并且k是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,j为4。在一些实施方案中,k为4。在一些实施方案中,j为4并且k为4。反义与靶核酸序列互补(例如,完全或部分互补)。

[0345] 在本公开的一些实施方案中,反义链包括式A2表示的结构,其中式A2按5'至3'方向为:

[0346] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0347] A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-A-S-A

[0348] 式A2;

[0349] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0350] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式III表示的结构,其中式III按5'至3'方向为:

[0351] $E-(A')_m-F$

[0352] 式III;

[0353] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;F由式$(C-P^2)_3-D-P^1-C-P^1-C$、$(C-P^2)_3-D-P^2-C-P^2-C$、$(C-P^2)_3-D-P^1-C-P^1-D$或$(C-P^2)_3-D-P^2-C-P^2-D$表示;A'、C、D、P^1和P^2如式I中所定义;并且m是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,m为4。在一些实施方案中,有义链与反义链互补(例如,完全或部分互补)。

[0354] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S1表示的结构,其中式S1按5'至3'方向为:

[0355] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-A

[0356] 式S1;

[0357] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0358] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S2表示的结构,其中式S2按5'至3'方向为:

[0359] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A

[0360] 式S2;

[0361] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0362] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S3表示的结构,其中式S3按5'至3'方向为:

[0363] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-B

[0364] 式S3;

[0365] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0366] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S4表示的结构,其中式S4按5'至3'方向为:

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

[0368] 式S4;

[0369] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0370] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式IV表示的区域的反义链,其中式IV按5'至3'方向是:

[0371] $A-(A')_j-C-P^2-B-(C-P^1)_k-C'$

[0372] 式IV;

[0373] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;B由式$D-P^1-C-P^1-D-P^1$表示;

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

[0374] 在本公开的一些实施方案中,反义链包括式A3表示的结构,其中式A3按5'至3'方向为:

[0375] A-S-B-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0376] A-O-B-S-A-S-B-S-A-S-A-S-A

[0377] 式A3;

[0378] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0379] 在本公开的一些实施方案中,本公开的siRNA可以具有式V表示的有义链,其中式V按5'至3'方向为:

[0380] $E-(A')_m-C-P^2-F$

[0381] 式V;

[0382] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;F由式$D-P^1-C-P^1-C$、$D-P^2-C-P^2-C$、$D-P^1-C-P^1-D$或$D-P^2-C-P^2-D$表示;A'、C、D、P^1和P^2如式IV中所定义;并且m是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,m为5。在一些实施方案中,有义链与反义链互补(例如,完全或部分互补)。

[0383] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S5表示的结构,其中式S5按5'至3'方向为:

[0384] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-

[0385] A-S-A

[0386] 式S5;

[0387] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0388] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S6表示的结构,其中式S6按5'至3'方向为:

[0389] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-

[0390] A-O-A

[0391] 式S6;

[0392] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0393] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S7表示的结构,其中式S7按5'至3'方向为:

[0394] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-

[0395] A-S-B

[0396] 式S7;

[0397] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并

且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0398] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S8表示的结构,其中式S8按5'至3'方向为:

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

[0400] A-O-B

[0401] 式S8;

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

[0403] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式VI表示的区域的反义链,其中式VI按5'至3'方向是:

[0404] $A\text{-}B_j\text{-}E\text{-}B_k\text{-}E\text{-}F\text{-}G_1\text{-}D\text{-}P^1\text{-}C'$

[0405] 式VI;

[0406] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;每个B由式$C\text{-}P^2$表示;每个C为2'-O-Me核糖核苷;每个C'独立地为2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;每个D为2'-F核糖核苷;每个E由式$D\text{-}P^2\text{-}C\text{-}P^2$表示;F由式$D\text{-}P^1\text{-}C\text{-}P^1$表示;每个G由式$C\text{-}P^1$表示;每个$P^1$是硫代磷酸酯核苷间键联;每个$P^2$是磷酸二酯键联;j是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);k是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);并且1是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,j为3。在一些实施方案中,k为6。在一些实施方案中,1为2。在一些实施方案中,j为3,k为6且1为2。反义链与靶核酸互补(例如,完全或部分互补)。

[0407] 在本公开的一些实施方案中,反义链包括式A4表示的结构,其中式A4按5'至3'方向为:

[0408] A-S-B-S-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-B-O-

[0409] A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[0410] 式A4;

[0411] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0412] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式VII表示的区域的有义链,其中式VII按5'至3'方向为:

[0413] $H\text{-}B_m\text{-}I_n\text{-}A'\text{-}B_o\text{-}H\text{-}C$

[0414] 式VII;

[0415] 其中A'由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;每个H由式$(C\text{-}P^1)_2$表示;每个I由式$(D\text{-}P^2)$表示;B、C、D、$P^1$和$P^2$如式VI中所定义;m是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);n是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且o是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,m为3。在一些实施方案中,n为3。在一些实施方案中,o为3。在一些实施方案中,m为3,n为3,并且o为3。反义链与有义链互补(例如,完全或部分互补)。

[0416] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S9表示的结构,其中式S9按5'至3'方向为:

[0417] A-S-A-S-A-O-A-O-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-S-

[0418] A-S-A

[0419] 式S9;

[0420] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0421] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式VIII表示的区域的反义链:

[0422] $Z-((A-P-)_n(B-P-)_m)_q$;

[0423] 式VIII

[0424] 其中Z是5'磷稳定部分;每个A是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;每个B是2'-氟-核糖核苷;每个P独立地是选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联的核苷间键联;n是1至5的整数(例如1、2、3、4或5);m是1至5的整数(例如1、2、3、4或5);并且q是介于1和30之间的整数(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30)。

[0425] siRNA合成方法

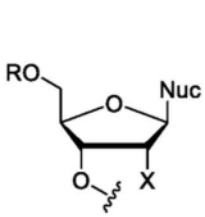
[0426] 本公开的siRNA分子可通过本领域已知的标准方法合成,如下文进一步讨论的,例如通过使用自动DNA合成仪,诸如可从例如Biosearch,Applied Biosystems,Inc.商购获得的。

[0427] siRNA试剂可以使用溶液相或固相有机合成或两者来制备。有机合成提供的优点是可以容易地制备包括非天然或修饰的核苷酸的寡核苷酸。本公开的siRNA分子可以使用溶液相或固相有机合成或两者来制备。

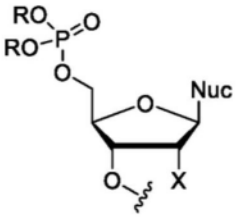
[0428] 此外,考虑到对于本文公开的任何siRNA试剂,可以通过系统地添加或去除连接的核苷以产生更长或更短的序列来实现进一步优化。此外,此类优化序列可以通过例如引入本文所述或本领域已知的修饰核苷和/或修饰核苷间键联,包括如本领域已知和/或本文讨论的替代核苷、替代糖部分和/或替代核苷间键联来调整,以进一步优化分子(例如,增加血清稳定性或循环半衰期、增加热稳定性、增强跨膜递送和/或靶向特定位置或细胞类型)。

[0429] 5′磷稳定部分

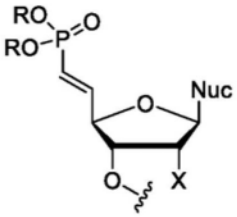
[0430] 为了进一步保护本公开的siRNA分子免于降解,可以采用5'-磷稳定部分。5'-磷稳定部分置换5'-磷酸盐以防止磷酸盐水解。5'-磷酸盐的水解防止与RISC的结合,这是基因沉默的必要步骤。本公开中考虑了任何不妨碍与RISC结合的磷酸盐置换。在一些实施方案中,5'-磷酸的替代品对体内水解也是稳定的。siRNA分子的每条链可以独立地并且任选地采用任何合适的5'-磷稳定部分。



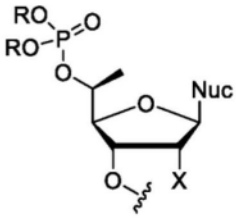
式IX



式X

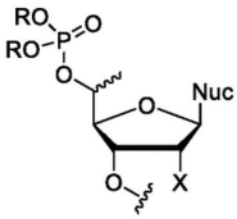


式XI

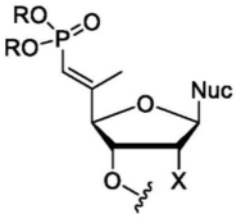


式XII

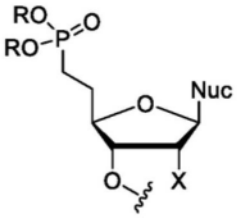
[0431]



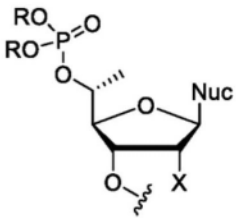
式XIII



式XIIV



式XV



式XVI

[0432] 一些示例性端帽在式IX-XVI中展示。式IX-XVI中的Nuc表示如本文所述的核碱基或核碱基衍生物或置换。式IX-XVI中的X表示如本文所述的2'-修饰。一些实施方案采用如式IX中的羟基、如式X中的磷酸酯、如式XI和式XIV中的乙烯基膦酸酯、如式XII、XIII和XVI中的5'-甲基取代的磷酸酯、如式XV中的亚甲基膦酸酯、或如式XI中展示的乙烯基5'-乙烯基膦酸酯作为5'-磷稳定部分。

[0433] 疏水部分

[0434] 本公开还提供了具有一个或多个与其附接的疏水部分的siRNA分子。疏水部分可以共价附接至本公开的siRNA分子的5'末端或3'末端。适合与本公开的siRNA分子一起使用的疏水部分的非限制性实例可包括胆固醇、维生素D、生育酚、磷脂酰胆碱(PC)、二十二碳六烯酸、二十二烷酸、PC-二十二烷酸、二十碳五烯酸、石胆酸或上述疏水部分与PC的任何组合。

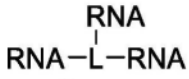
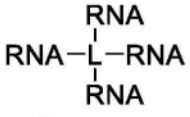
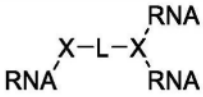
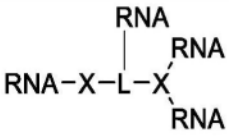
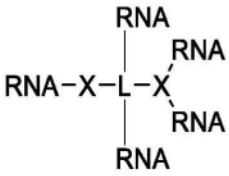
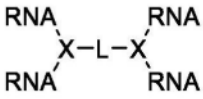
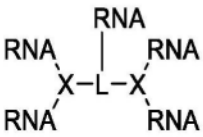
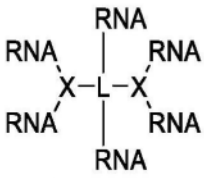
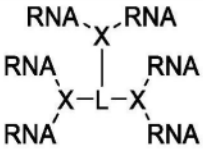
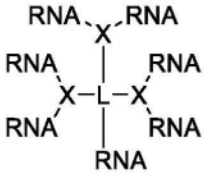
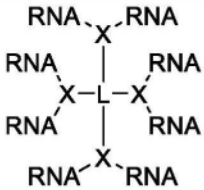
[0435] siRNA分支

[0436] 本公开的siRNA分子可以是分支的。例如,本公开的siRNA分子可以具有几种分支模式之一,如本文所述。

[0437] 根据本公开,本文公开的siRNA分子可以是分支siRNA分子。siRNA分子可以不是分支的,或者可以是二分支、三分支的或四分支的,通过接头连接。每个主分支可以进一步分支以允许2、3、4、5、6、7或8条单独的RNA单链或双链。接头上的分支点可以源自同一原子,或沿着接头的单独原子。表2中列出了一些示例性实施方案。

[0438] 表2.分支siRNA结构

[0439]

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

[0440] 在一些实施方案中,siRNA分子是分支siRNA分子。在一些实施方案中,所述分支siRNA分子是二分支、三分支或四分支的。在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式XVII-XIX中的任一个表示,其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分(例如,亚磷酰胺、甲苯磺酰化丙酮缩甘油、1,3-二氨基丙醇、季戊四醇、或US10,478,503中描述的分支点部分中的任一种)。

[0441] 在一些实施方案中,三分支siRNA分子由式XX-XXIII中的任一个表示,其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0442] 在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式XXIV-XXVIII中的任一个表示,其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0443] 接头

[0444] 本文所述的siRNA的多条链可以通过接头共价附接。这种分支的作用尤其改善细胞渗透性,从而允许更好地进入CNS中的细胞(例如,神经元或小胶质细胞)。可以采用与本发明的siRNA不相容的任何连接部分。接头包括2至10个亚基(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个亚基)的乙二醇链、烷基链、碳水化合物链、嵌段共聚物、肽、RNA、DNA等。在一些实施方案中,

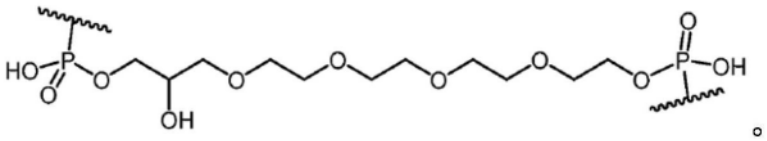
接头的任何碳或氧原子任选地被氮原子置换,带有羟基取代基,或带有氧代取代基。在一些实施方案中,接头是聚乙二醇(PEG)接头。适合与所公开的组合物和方法一起使用的PEG接头包括线性或非线性PEG接头。非线性PEG接头的实例包括分支PEG、线性叉状PEG或分支叉状PEG。

[0445] 各种重量的PEG接头可以与所公开的组合物和方法一起使用。例如,PEG接头可以具有介于5至500道尔顿之间的重量。在一些实施方案中,可以使用重量介于500至1,000道尔顿之间的PEG接头。在一些实施方案中,可以使用重量介于1,000至10,000道尔顿之间的PEG接头。在一些实施方案中,可以使用重量介于200至20,000道尔顿之间的PEG接头。在一些实施方案中,接头共价附接至siRNA的有义链。在一些实施方案中,接头共价附接至siRNA的反义链。在一些实施方案中,PEG接头是三乙二醇(TrEG)接头。在一些实施方案中,PEG接头是四乙二醇(TEG)接头。

[0446] 在一些实施方案中,接头是烷基链接头。在一些实施方案中,接头是肽接头。在一些实施方案中,接头是RNA接头。在一些实施方案中,接头是DNA接头。

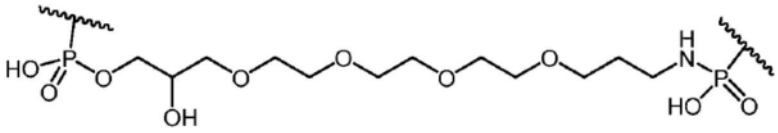
[0447] 接头可以共价连接2、3、4或5条独特的siRNA链。接头可以共价结合至siRNA寡聚物的任何部分。在一些实施方案中,接头附接至每条siRNA链的核苷的3'末端。在一些实施方案中,接头附接至每条siRNA链的核苷的5'末端。在一些实施方案中,接头通过共价键形成部分附接至siRNA链(例如有义链或反义链)的核苷。在一些实施方案中,共价键形成部分选自由烷基、酯、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯、三唑、脲、甲缩醛、膦酸酯、磷酸酯和磷酸酯衍生物(例如,硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等)组成的组。

[0448] 在一些实施方案中,所述接头具有式L1的结构:

[0449] 

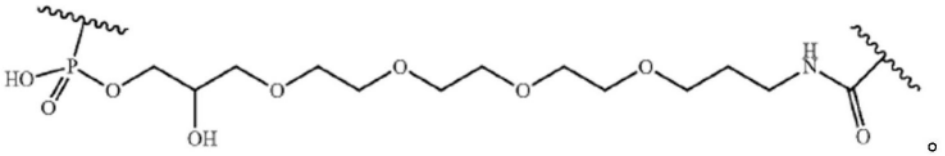
(式 L1)

[0450] 在一些实施方案中,所述接头具有式L2的结构:

[0451] 

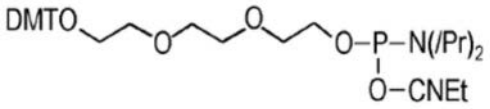
(式 L2)

[0452] 在一些实施方案中,所述接头具有式L3的结构:

[0453] 

(式 L3)

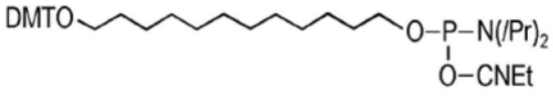
[0454] 在一些实施方案中,所述接头具有式L4的结构:



[0455] 。

(式 L4)

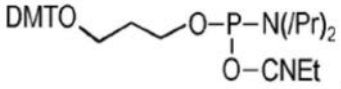
[0456] 在一些实施方案中,所述接头具有式L5的结构:



[0457] 。

(式 L5)

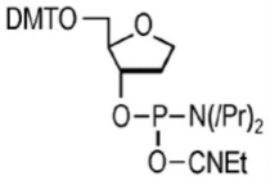
[0458] 在一些实施方案中,所述接头具有式L6的结构:



[0459] 。

(式 L6)

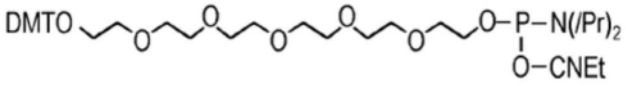
[0460] 在一些实施方案中,接头具有式L7的结构,如下所示:



[0461] 。

(式 L7)

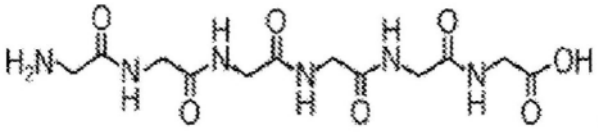
[0462] 在一些实施方案中,所述接头具有式L8的结构:



[0463] 。

(式 L8)

[0464] 在一些实施方案中,所述接头具有式L9的结构:



[0465] 。

(式 L9)

[0466] 在一些实施方案中,与本文公开的一种或多种分支siRNA分子一起使用的接头的选择可以基于接头的疏水性,使得例如,对于本公开的一种或多种分支siRNA分子实现期望

的疏水性。例如,与具有较低疏水性接头或亲水性接头的分支siRNA分子相比,含有烷基链的接头可用于增加分支siRNA分子的疏水性。

[0467] 本文公开的siRNA试剂可以通过本领域充分确立的方法合成和/或修饰,诸如Beaucage,S.L.等人(编辑),Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,John Wiley&Sons,Inc.,New York,N.Y.,2000中描述的那些方法,其特此通过引用并入本文。

[0468] 治疗方法

[0469] 可以将本公开的靶向TARDBP的siRNA分子递送至受试者,从而治疗神经退行性疾病如肌萎缩侧索硬化症(ALS)或额颞叶痴呆(FTD),和/或减轻与该病症相关的表型。例如,可以将siRNA分子递送至受试者,从而治疗ALS和/或减轻ALS疾病相关表型(例如,不自主运动、肌肉痉挛、虚弱、失去运动控制)。可替代地,可以将本公开的靶向TARDBP的siRNA分子递送至受试者,从而治疗FTD和/或减轻FTD相关表型(例如,记忆问题、行为问题和语言问题)。此外,还可以将本公开的siRNA分子递送至具有TARDBP基因变体的受试者,对于该受试者,siRNA介导的TARDBP变体基因的基因沉默降低了TARDBP转录物的表达水平,从而治疗神经退行性疾病(例如,ALS或FTD)或其他TARDBP相关疾病或病症。

[0470] 本公开提供了通过用本文所述的一种或多种siRNA分子进行TARDBP基因沉默来治疗受试者的方法。相对于健康受试者,可以在受试者中进行基因沉默,以使野生型TARDBP转录物、突变型TARDBP转录物、TARDBP转录物的剪接同种型和/或其过表达的TARDBP转录物沉默。该方法可以包括通过任何适当的施用途径(例如,脑室内、鞘内注射、纹状体内注射、经由导管插入在小脑延髓池内注射、实质内注射、静脉内注射、皮下注射,或肌肉内注射)将本公开的siRNA分子或含有其的药物组合物递送至受试者(例如,人)的CNS或受影响的组织。活性化合物可以以任何合适的剂量施用。施用给患者的本公开组合物的实际剂量可以通过物理和生理因素确定,诸如体重、病状的严重程度、先前或同时的治疗干预、患者的特发症以及施用途径。根据剂量和施用途径,优选剂量和/或有效量的施用次数可根据受试者的反应而变化。在任何情形下,负责施用的从业者将确定组合物中活性成分的浓度以及个体受试者的适当剂量。施用可以每天进行任何合适的次数,并且持续时间只要有必要。受试者可以是患有或未患共存疾病的成人或儿童。

[0471] 受试者选择

[0472] 可用本文公开的siRNA分子治疗的受试者是需要治疗例如神经退行性疾病(例如ALS或FTD)和/或与TARDBP基因的功能获得突变相关的任何一种或多种其他医学风险的受试者。可用本文公开的siRNA分子治疗的受试者可以包括例如人、猴子、大鼠、小鼠、猪和含有TARDBP基因的至少一个直系同源拷贝的其他哺乳动物。受试者可以是患有或未患共存疾病的成人或儿童。

[0473] 药物组合物

[0474] 本公开中的siRNA分子可以配制成药物组合物,以适合体内施用的生物相容形式施用于受试者。因此,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含与合适的稀释剂、载体或赋形剂混合的本公开的siRNA分子。siRNA分子可以例如直接施用到受试者的CNS或受影响的组织中(例如,通过脑室内、纹状体内、鞘内注射、经由导管插入在小脑延髓池内注射、实质内注射、静脉内注射、皮下注射或肌肉内注射的方式)。

[0475] 用于选择和制备合适制剂的常规程序和成分例如在Remington,J.P.The Science

and Practice of Pharmacy,Easton,PA.Mack Publ ishers,2012,第22版和The United States Pharmacopeial Conventio n,The National Formulary,United States Pharmacopeial,2015,US P 38NF 33)中有描述。

[0476] 在普通储存和使用条件下,药物组合物可含有防腐剂,例如以防止微生物生长。药物组合物可包含无菌水性溶液、分散液,或例如用于临时制备无菌溶液或分散液的粉末。在所有情况下,所述形式可使用本领域已知的技术灭菌,并且可流化至可容易地施用给需要治疗的受试者的程度。

[0477] 药物组合物可单独或与如本文所述的药学上可接受的载体组合施用给受试者,例如,人类受试者,其比例可通过化合物的溶解度和/或化学性质、所选的施用途径以及标准药物实践来确定。

[0478] 给药方案

[0479] 本领域普通技术的医师可以容易地确定向有需要的哺乳动物受试者(例如,人)施用的siRNA分子的有效量。例如,医师可以以低于获得期望治疗效果所需要的水平开始本公开siRNA分子之一的处方剂量,并逐渐增加剂量直至实现期望效果。可替代地,医师可以通过施用高剂量的本公开siRNA分子之一来开始治疗方案,并且随后逐渐施用较低的剂量,直至达到实现治疗效果(例如,靶基因序列的表达减少)的最低剂量。一般而言,本公开的siRNA分子之一的合适日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的siRNA分子的量。本公开的ss-siRNA或ds-siRNA分子可以通过注射施用,例如鞘内注射、脑室内注射、通过经由导管插入在小脑延髓池内注射、实质内注射、静脉内注射、皮下或肌肉内施用来施用。本公开的siRNA分子的治疗组合物的日剂量可以作为单剂量施用,或者作为在一天、一周、一个月或一年中以适当的间隔单独施用的两个、三个、四个、五个、六个或更多个剂量来施用,任选地,以单位剂型施用。虽然本公开的siRNA分子可以单独施用,但它也可以作为与赋形剂、载体和任选地另外的治疗剂组合的药物制剂施用。

[0480] 施用途径

[0481] 本公开的方法考虑了治疗组合物耐受的任何施用途径。所述方法的一些实施方案包括鞘内注射、脑室内注射、纹状体内注射、实质内注射,或通过经由导管插入在小脑延髓池内注射。

[0482] 鞘内注射是直接注射到脊柱或蛛网膜下腔。通过直接注射到脊柱的CSF中,本公开的siRNA分子可以直接进入脊柱中的细胞(例如,神经元和小胶质细胞),并且具有可以绕过血脑屏障进入脑部中的细胞的途径。

[0483] 脑室内(ICV)注射是直接注射到脑室CSF中的方法。与鞘内注射类似,ICV是一种绕过血脑屏障的注射方法。使用ICV的优点是可以进入脑部和脊柱的细胞,而不存在治疗剂在血液中降解的危险。

[0484] 纹状体内注射是直接注射到纹状体(striatum)或纹状体(corpus striatum)中。纹状体是脑部皮层下基底神经节的一个区域。注射到纹状体中绕过了血脑屏障和注射到血流中的药代动力学挑战,并且允许直接进入脑部细胞。

[0485] 实质内施用是直接注射到实质(例如脑实质)中。注射到脑实质中允许直接注射到受疾病或病症影响的脑部区域,同时绕过血脑屏障。

[0486] 通过导管插入在小脑延髓池内注射是直接注射到小脑延髓池中。小脑延髓池是位

于小脑和延髓背侧表面之间的脑部区域。注射到小脑延髓池中引起更直接地输送到小脑、脑干和脊髓的细胞。

[0487] 在本文所述的方法的一些实施方案中,治疗组合物可以通过全身施用的方式(例如静脉内、肌内或皮下)递送至受试者。

[0488] 静脉(IV)注射是一种直接注射到受试者血液中的方法。IV施用可以是推注剂量的形式或通过连续输注的方式,或治疗组合物耐受的任何其他方法。

[0489] 肌内(IM)注射是注射到受试者的肌肉,诸如三角肌或臀肌中。IM可以允许治疗组合物的快速吸收。

[0490] 皮下注射是注射到皮下组织中。皮下递送的组合物的吸收可能比IV或IM注射慢,这对于需要连续吸收的组合物可能是有益的。

[0491] 实施例

[0492] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供可如何使用、制备和评价本文所述的组合物和方法的描述,并且所述实施例仅旨在作为本公开的示例而不旨在限制发明人认为是他们的公开内容的范围。

[0493] 实施例1.TARDBP敲低

[0494] 目标

[0495] 本实施例描述了为研究与人TARDBP mRNA转录物内特定区域互补的siRNA分子实现减少TARDBP基因表达的能力而进行的一系列实验的结果。

[0496] 材料和方法

[0497] 以20nM或0.5nM浓度用TARDBP siRNA主动转染HeLa细胞。24小时后,细胞裂解,并使用标准试剂和Applied Biosystems TaqMan测定法,经由逆转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)评估TARDBP和管家基因(ATP5B)的mRNA水平。结果呈现为相同测定法中相对于未处理的对照细胞残留的TARDBP mRNA百分比。

[0498] 结果

[0499] 用本公开的具有如下表3和表4所示的反义链和正义链的siRNA分子处理细胞。siRNA分子的敲低效率是作为在20nM和0.5nM下残留mRNA表达占未处理物的百分比来测量的。敲低结果报告于表3(20nM)和表4(0.5nM)中。

[0500] 表3.在20nM下用本公开的siRNA分子敲低TARDBP

[0501]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)
193	385	57.97	289	481	56.60
194	386	62.72	290	482	62.17
195	387	42.01	291	483	57.20
196	388	43.33	292	484	61.84
197	389	48.66	293	485	69.17
198	390	49.85	294	486	67.95
199	391	56.24	295	487	73.05
200	392	43.97	296	488	51.63
201	393	61.00	297	489	69.24
202	394	59.18	298	490	92.57
203	395	59.51	299	491	47.11
204	396	37.98	300	492	53.71
205	397	41.14	301	493	77.28
206	398	101.77	302	494	53.49
207	399	44.37	303	495	53.20
208	400	63.01	304	496	62.42
209	401	48.44	305	497	40.74
210	402	44.94	306	498	63.56
211	403	46.55	307	499	70.72
212	404	52.33	308	500	73.51
213	405	47.83	309	501	48.97
214	406	44.40	310	502	55.45
215	407	89.80	311	503	45.39
216	408	73.94	312	504	48.58
217	409	34.26	313	505	48.98
218	410	44.54	314	506	57.55
219	411	38.35	315	507	80.36

[0502]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)
220	412	27.30	316	508	61.87
221	413	34.84	317	509	51.79
222	414	63.21	318	510	80.31
223	415	93.41	319	511	62.81
224	416	44.98	320	512	50.95
225	417	40.07	321	513	38.86
226	418	95.28	322	514	37.90
227	419	35.05	323	515	46.28
228	420	57.22	324	516	65.51
229	421	55.35	325	517	61.52
230	422	76.81	326	518	55.07
231	423	61.20	327	519	54.83
232	424	56.91	328	520	83.39
233	425	55.40	329	521	42.68
234	426	71.60	330	522	63.43
235	427	77.35	331	523	45.03
236	428	89.40	332	524	43.01
237	429	51.05	333	525	83.77
238	430	44.55	334	526	81.07
239	431	50.81	335	527	36.04
240	432	61.32	336	528	69.31
241	433	47.98	337	529	50.16
242	434	39.92	338	530	42.82
243	435	76.83	339	531	51.68
244	436	60.08	340	532	56.53
245	437	57.68	341	533	55.97
246	438	48.79	342	534	51.00
247	439	33.29	343	535	42.49
248	440	32.76	344	536	55.65
249	441	48.14	345	537	72.24
250	442	68.62	346	538	65.71
251	443	91.27	347	539	90.40
252	444	89.60	348	540	78.80
253	445	42.31	349	541	61.26
254	446	53.93	350	542	34.63
255	447	59.36	351	543	35.39
256	448	49.24	352	544	42.03
257	449	77.89	353	545	37.32
258	450	69.89	354	546	50.82
259	451	66.29	355	547	51.48
260	452	49.80	356	548	61.08
261	453	48.56	357	549	71.97
262	454	63.02	358	550	50.48
263	455	64.27	359	551	41.04
264	456	61.16	360	552	46.98
265	457	48.90	361	553	86.06
266	458	77.68	362	554	61.88
267	459	65.83	363	555	76.55
268	460	60.83	364	556	96.73
269	461	58.80	365	557	76.07
270	462	71.35	366	558	93.57
271	463	42.86	367	559	87.95

[0503]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 20 nM 下占未处理物的百分比)
272	464	70.53	368	560	55.71
273	465	81.17	369	561	38.29
274	466	70.23	370	562	36.25
275	467	58.26	371	563	81.59
276	468	59.59	372	564	68.37
277	469	65.48	373	565	39.05
278	470	60.45	374	566	41.59
279	471	70.19	375	567	52.24
280	472	53.59	376	568	42.81
281	473	63.88	377	569	85.14
282	474	78.88	378	570	44.52
283	475	92.98	379	571	68.43
284	476	89.56	380	572	38.84
285	477	73.38	381	573	42.79
286	478	57.15	382	574	41.96
287	479	66.94	383	575	38.42
288	480	78.33	384	576	40.96

[0504] 表4.在0.5nM下用本公开的siRNA分子敲低TARDBP

[0505]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.5 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.5 nM 下占未处理物的百分比)
193	385	81.11	289	481	98.29
194	386	87.99	290	482	92.53
195	387	71.76	291	483	99.91
196	388	72.70	292	484	92.47
197	389	77.02	293	485	99.22
198	390	81.09	294	486	96.88
199	391	85.76	295	487	101.99
200	392	74.59	296	488	95.51
201	393	89.70	297	489	97.19
202	394	73.53	298	490	96.31
203	395	88.73	299	491	58.11
204	396	73.28	300	492	72.93
205	397	87.56	301	493	95.29
206	398	99.44	302	494	95.10
207	399	77.12	303	495	103.43
208	400	86.57	304	496	101.40
209	401	95.65	305	497	95.80
210	402	94.70	306	498	98.46
211	403	63.63	307	499	98.58
212	404	77.74	308	500	95.56
213	405	69.99	309	501	93.88
214	406	72.30	310	502	97.61
215	407	100.86	311	503	98.77
216	408	98.97	312	504	95.32
217	409	74.75	313	505	99.99

[0506]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.5 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.5 nM 下占未处理物的百分比)
218	410	88.53	314	506	101.88
219	411	53.86	315	507	100.46
220	412	52.53	316	508	99.72
221	413	65.19	317	509	93.25
222	414	91.47	318	510	96.39
223	415	88.53	319	511	99.41
224	416	67.84	320	512	98.98
225	417	67.08	321	513	97.85
226	418	94.48	322	514	102.94
227	419	69.66	323	515	68.22
228	420	87.77	324	516	83.36
229	421	63.64	325	517	98.87
230	422	87.97	326	518	95.66
231	423	82.25	327	519	98.34
232	424	85.18	328	520	96.86
233	425	84.35	329	521	96.52
234	426	88.17	330	522	98.31
235	427	96.51	331	523	95.45
236	428	93.96	332	524	97.78
237	429	76.99	333	525	99.57
238	430	88.35	334	526	99.30
239	431	101.02	335	527	94.14
240	432	93.67	336	528	96.96
241	433	60.07	337	529	96.72
242	434	54.48	338	530	101.63
243	435	87.48	339	531	94.59
244	436	71.82	340	532	96.48
245	437	69.96	341	533	99.34
246	438	72.88	342	534	97.48
247	439	60.89	343	535	102.21
248	440	61.40	344	536	97.14
249	441	65.55	345	537	103.66
250	442	81.51	346	538	102.53
251	443	95.03	347	539	95.55
252	444	95.53	348	540	92.78
253	445	71.60	349	541	91.38
254	446	78.77	350	542	80.25
255	447	68.39	351	543	83.17
256	448	73.45	352	544	91.73
257	449	97.26	353	545	89.77
258	450	96.51	354	546	97.30
259	451	96.54	355	547	94.21
260	452	79.84	356	548	98.31
261	453	77.58	357	549	96.47
262	454	83.01	358	550	92.79
263	455	92.98	359	551	91.02
264	456	95.61	360	552	92.10

[0507]

有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.5 nM 下占未处理物的百分比)	有义 SEQ ID NO:	反义 SEQ ID NO:	残留 mRNA 表达(在 0.5 nM 下占未处理物的百分比)
265	457	85.95	361	553	102.04
266	458	93.87	362	554	119.39
267	459	84.17	363	555	98.20
268	460	81.68	364	556	100.21
269	461	80.03	365	557	98.89
270	462	72.17	366	558	93.92
271	463	58.86	367	559	98.34
272	464	87.50	368	560	92.78
273	465	99.21	369	561	86.93
274	466	91.67	370	562	91.70
275	467	70.07	371	563	88.37
276	468	62.30	372	564	79.20
277	469	82.02	373	565	92.20
278	470	85.97	374	566	86.49
279	471	87.33	375	567	89.44
280	472	88.66	376	568	84.30
281	473	86.07	377	569	105.61
282	474	89.17	378	570	94.54
283	475	91.18	379	571	77.20
284	476	90.82	380	572	58.42
285	477	90.19	381	573	79.60
286	478	76.65	382	574	63.95
287	479	102.79	383	575	47.86
288	480	108.17	384	576	46.84

[0508] 实施例2.生成靶向TARDBP的siRNA分子

[0509] 本公开的siRNA分子可通过本领域已知的标准方法合成,如下文进一步讨论的,例如通过使用自动DNA合成仪,诸如可从例如Biosearch,Applied Biosystems,Inc.商购获得的。

[0510] siRNA试剂可以使用溶液相或固相有机合成或两者来制备。有机合成提供的优点是可以容易地制备包括非天然或修饰的核苷酸的寡核苷酸。上表1中示出了siRNA分子的具体实例和有义链和反义链的核苷酸序列,以及TARDBP mRNA靶序列。可以理解的是,本领域技术人员可以将反义(AS)链与相应的有义(S)链退火以产生ds-siRNA分子。可替代地,本领域技术人员可以仅使用反义链来获得ss-siRNA分子。

[0511] 实施例3.优化靶向TARDBP的siRNA分子

[0512] 对于本文公开的任何小干扰RNA(siRNA)试剂,预期对siRNA的修饰可进一步优化分子的功效或生物物理特性(例如,增加血清稳定性或循环半衰期、增加热稳定性、增强跨膜递送和/或靶向特定位置或细胞类型)。此类优化可以通过系统地添加或去除连接的核苷以生成更长或更短的序列来实现。进一步的siRNA优化可以包括并入例如一个或多个替代核苷、替代2'糖部分和/或替代核苷间键联。此外,此类优化的siRNA分子可以包括在5'和/或3'末端引入疏水部分和/或稳定部分。

[0513] 用替代核苷进行siRNA优化

[0514] 本公开的siRNA分子的优化可以包括以下核苷修饰中的一种或多种:5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C＝C-CH3)尿嘧啶和胞嘧啶和嘧啶碱基的其它炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代尤其是5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤,和/或3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。siRNA分子还可包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和/或2-吡啶酮置换的核碱基。本公开的siRNA分子的进一步优化可以包括以下文献中公开的核碱基:US 3,687,808;Kroschwitz,J.I.编辑;The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering,New York,John Wiley&Sons,1990,第858-859页;Englisch等人,Angewandte Chemie,国际版,30:613,1991;以及Sanghvi,Y.S.,第16章,Antisense Research and Applications,CRC Press,Gait,M.J.编辑,1993,第289-302页。

[0515] 用替代糖修饰进行siRNA优化

[0516] 本公开的siRNA分子的优化可以包括以下2'糖修饰中的一种或多种:2'-O-甲基(2'-O-Me);2'-甲氧基乙氧基(2′-O-$CH_2CH_2OCH_3$,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE);2'-二甲氨基氧基乙氧基,即O$(CH_2)_2$ON$(CH_3)_2$基团,也称为2'-DMAOE;和/或2'-二甲氨基乙氧基乙氧基(本领域中也称为2'-O-二甲氨基-乙氧基-乙基或2'-DMAEOE),即2′-O-$CH_2OCH_2N(CH_3)_2$。可以优化本公开的siRNA分子的其他可能的2′-修饰包括所有可能取向的OH;F;O-烷基、S-烷基或N-烷基;O-烯基、S-烯基或N-烯基;O-炔基、S-炔基或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是经取代或未取代的C1至C10烷基或C2至C10烯基和炔基。其他可能的糖取代基基团包括例如氨基丙氧基(-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)、烯丙基(-CH_2-CH＝CH_2)、-O-烯丙基(-O-CH_2-CH＝CH_2)和氟(F)。2'-糖取代基可以位于阿拉伯糖(上)位置或核糖(下)位置。在一些实施方案中,2'-阿拉伯糖修饰是2'-F。还可在siRNA分子上的其他位置上进行类似的修饰,具体地在3'末端核苷上或在2'-5'连接的寡核苷酸中的糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物诸如环丁基部分来代替戊呋喃糖基糖。

[0517] 用替代核苷间键联进行siRNA优化

[0518] 本公开的siRNA分子的优化可以包括以下核苷间修饰中的一种或多种:硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基膦酸酯(包括3'-亚烷基膦酸酯、5'-亚烷基膦酸酯)、亚膦酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基膦酸酯、硫代烷基磷酸三酯、硒代磷酸酯和具有正常3'-5'键联的硼代磷酸酯、这些的2'-5'连接类似物以及具有反极性的那些,其中一个或多个核苷酸间键联为3'至3'、5'至5'或2'至2'键联。

[0519] 用疏水部分进行siRNA优化

[0520] 本公开的siRNA分子的优化可以包括共价附接至5'末端或3'末端的疏水部分。适合与本公开的siRNA分子一起使用的疏水部分的非限制性实例可包括胆固醇、维生素D、生育酚、磷脂酰胆碱(PC)、二十二碳六烯酸、二十二烷酸、PC-二十二烷酸、二十碳五烯酸、石胆

酸或上述疏水部分与PC的任何组合。

[0521] 用稳定部分进行siRNA优化

[0522] 本公开的siRNA分子的优化可以包括保护siRNA分子免于降解的5'-磷稳定部分。5'-磷稳定部分置换5'-磷酸盐以防止磷酸盐水解。5'-磷酸盐的水解防止与RISC的结合,这是基因沉默的必要步骤。本公开中考虑了任何不妨碍与RISC结合的磷酸盐置换。在一些实施方案中,5'-磷酸的替代品对体内水解也是稳定的。每条siRNA链可以独立地并且任选地采用任何合适的5'-磷稳定部分。适合与本公开的siRNA分子一起使用的5'稳定部分的非限制性实例可以包括上文式IX-XVI所示的那些。

[0523] 用分支siRNA进行siRNA优化

[0524] 本公开的siRNA分子的优化可以包括并入分支模式,例如通过接头连接的二分支、三分支或四分支siRNA。每个主分支可以进一步分支以允许2、3、4、5、6、7或8条单独的RNA单链或双链。接头上的分支点可以源自同一原子,或沿着接头的单独原子。上表2中列出了一些示例性实施方案。

[0525] 本公开的siRNA组合物可以优化为以下形式:二分支siRNA分子,如式XVII-XIX中的任一个所表示;三分支siRNA分子,如式XX-XXIII中的任一个所表示;和/或四分支siRNA分子,如式XXIV-XXVIII中的任一个所表示,其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分(例如,亚磷酰胺、甲苯磺酰化丙酮缩甘油、1,3-二氨基丙醇、季戊四醇、或US10,478,503中描述的分支点部分中的任一种)。

[0526] 实施例4.制备和施用靶向TARDBP的siRNA分子

[0527] 本公开中的siRNA分子可以配制成药物组合物,以适合体内施用的生物相容形式施用于受试者。例如,本公开的siRNA分子可以在合适的稀释剂、载体或赋形剂中施用,并且还可以含有防腐剂,例如,以防止微生物的生长。用于选择和制备合适制剂的常规程序和成分例如在Remington,J.P.The Science and Practice of Pharmacy,Easton,PA.Mack Publishers,2012,第22版和The United States Pharmacopeial Convention,The NationalFormulary,United States Pharmacopeial,2015,USP 38NF 33)中有描述。

[0528] 本公开的方法涵盖了本公开的siRNA组合物耐受的向受试者施用的任何途径。siRNA向CNS注射的非限制性实例包括鞘内注射、脑室内注射、纹状体内注射、实质内注射,或通过经由导管插入在小脑延髓池内注射。全身施用的实例包括静脉内注射、肌肉内注射和皮下注射。具有本领域普通技术的医师可以容易地确定有效的施用途径。

[0529] 实施例5.用于使用靶向TARDBP的siRNA分子治疗神经退行性疾病的方法

[0530] 需要治疗神经退行性疾病如3型肌萎缩侧索硬化症(ALS)或额颞叶痴呆(FTD)的受试者用一定剂量的本公开的siRNA分子或siRNA组合物(配制成盐)以从业者确定的频率进行治疗。本领域普通技术的医师可以容易地确定向有需要的哺乳动物受试者(例如,人)施用的siRNA分子的有效量。例如,医师可以以低于获得期望治疗效果所需要的水平开始本公开siRNA分子之一的处方剂量,并逐渐增加剂量直至实现期望效果。可替代地,医师可以通过施用高剂量的本公开的siRNA分子之一来开始治疗方案,并且随后逐渐施用较低的剂量,直至达到产生治疗效果(例如,TARDBP mRNA或合适生物标志物的表达减少,或ALS-或FTD相关表型的减少)的最小剂量。一般而言,本公开的siRNA分子之一的合适日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的量。本公开的ss-或ds-siRNA分子可以通过注射施用,例如鞘内注

射、脑室内注射、纹状体内注射、实质内注射、静脉内注射、肌肉内注射、皮下注射，或通过经由导管插入在小脑延髓池内注射来施用。本公开的siRNA分子之一的治疗组合物的日剂量可以作为单剂量施用，或者作为在一天、一周、一个月或一年中以适当的间隔单独施用的两个、三个、四个、五个、六个或更多个剂量来施用，任选地，以单位剂型施用。虽然本公开的siRNA分子之一可以单独施用，但它也可以作为与赋形剂、载体和任选地另外的治疗剂组合的药物制剂施用。剂量和频率根据受试者的身高、体重、年龄、性别和其他病症来确定。

[0531] 本公开的siRNA分子由从业者根据与受试者的相容性来选择。有单链或双链siRNA分子(例如，非分支siRNA、二分支siRNA、三分支siRNA、四分支siRNA)可供选择。选择的siRNA分子具有反义链，并且可以具有有义链，有义链具有的序列和RNA修饰(例如天然和非天然核苷间键联、经修饰的糖、5'-磷稳定部分、疏水不分和/或分支结构)最适合患者。

[0532] 通过最适合患者(例如，鞘内、脑室内、纹状体内、实质内、静脉内、肌肉内、皮下，或通过经由导管插入在小脑延髓池内注射)和病状的途径以患者可耐受的速率递送siRNA分子，直至受试者达到最大耐受剂量，或直至症状得到满意改善。

[0533] 其它实施方案

[0534] 本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请以引用的方式并入本文，其引用的程度犹如每个独立的出版物或专利申请被具体地和单独地指出以引用的方式并入。

[0535] 尽管本发明已经结合其具体的实施方案进行了描述，但应当了解能够对它进行进一步的修改并且本申请旨在涵盖任何基本根据本发明的原理而对本发明进行的变动、使用或适应性调整，并且包括虽然不属于本发明但属于本发明所属领域的已知或习用实施手段的和属于上文所述的实质特征的以及符合权利要求范围之内的变更。

[0536] 其他实施方案在权利要求内。