



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119451683 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 14

(21) 申请号 202380049889.X

邓肯·布朗

(22) 申请日 2023.05.09

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

(30) 优先权数据

专利代理师 周蕾 张莹

63/340,365 2022.05.10 US

63/397,707 2022.08.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2024.12.25

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/021586 2023.05.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/220087 EN 2023.11.16

(71) 申请人 艾米利克斯制药公司

地址 美国

(72) 发明人 乔舒亚·巴里·科恩

贾斯汀·伯纳德·克利

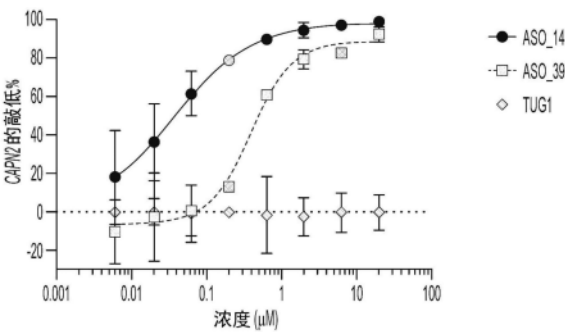
权利要求书8页 说明书85页 附图12页

(54) 发明名称

寡核苷酸组合物及其方法

(57) 摘要

除其他外,本公开提供了在糖残基的2'位置修饰的靶向钙蛋白酶-2的寡核苷酸及其组合物。在一些实施方案中,本公开提供了用于预防和治疗各种病况、病症或疾病,包括神经退行性病况的方法。



1. 寡核苷酸, 其中:

所述寡核苷酸的碱基序列包含ATCAGTTTCTGTAGGCTTCC、GGCATACTGGTTCAGTTGAT、GCTCAGGTCAGGCAGTGGTT、GAGAGCCTTTTTGCAGAGCT、TCCAGCTCTGTGCCTCTAGT、GTTCCAGCTTGGGCAGTTGT或GGAAGCTTAGTCCTTGGCTG的10个或更多个连续核碱基, 其中每个T任选地且独立地被U替代; 并且

所述寡核苷酸包含修饰的核碱基、修饰的糖或修饰的核苷酸间连接键。

2. 权利要求1所述的寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸的碱基序列为ATCAGTTTCTGTAGGCTTCC、GGCATACTGGTTCAGTTGAT、GCTCAGGTCAGGCAGTGGTT、GAGAGCCTTTTTGCAGAGCT、TCCAGCTCTGTGCCTCTAGT、GTTCCAGCTTGGGCAGTTGT或GGAAGCTTAGTCCTTGGCTG。

3. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸包含5'-翼-空位-翼-3'结构。

4. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中在所述5'-翼中有约3-10个核苷, 任选地在所述5'-翼中有5个核苷。

5. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中在所述5'-翼中的每个糖独立地是修饰的糖。

6. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中在5'-翼中的糖是2'-OR^s修饰的糖, 其中R^s是C₁₋₆脂肪族;

其中在5'-翼中的糖是2'-MOE修饰的糖;

其中在5'-翼中的糖是2'-OMe修饰的糖; 和/或

其中在5'-翼中的糖是双环糖, 任选地其中所述双环糖是LNA糖或cEt糖。

7. 权利要求1-6中任一项所述的寡核苷酸, 其中在5'-翼中的每个糖独立地是2'-OR^s修饰的糖, 其中R^s是C₁₋₆脂肪族或者

其中在5'-翼中的每个糖独立地是2'-MOE修饰的糖。

8. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中在所述空位中有约8-15个核苷, 任选地其中在所述空位中有10个核苷。

9. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中在所述空位中的每个糖独立地是天然DNA糖。

10. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中所述空位不含有胞嘧啶和/或其中所述空位包含一个或多个5-甲基胞嘧啶。

11. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中在所述3'-翼中有约3-10个核苷, 任选地在所述3'-翼中有5个核苷。

12. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中在所述3'-翼中的每个糖独立地是修饰的糖。

13. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中在所述3'-翼中的糖是2'-OR^s修饰的糖, 其中R^s是C₁₋₆脂肪族;

其中在3'-翼中的糖是2'-MOE修饰的糖;

其中在3'-翼中的糖是2'-OMe修饰的糖; 和/或

其中在3'-翼中的糖是双环糖, 任选地其中所述双环糖是LNA糖或cEt糖。

14. 权利要求1-13中任一项所述的寡核苷酸, 其中在3'-翼中的每个糖独立地是2'-OR^s修饰的糖, 其中R^s是C₁₋₆脂肪族或者

其中在3'-翼中的每个糖独立地是2'-MOE修饰的糖。

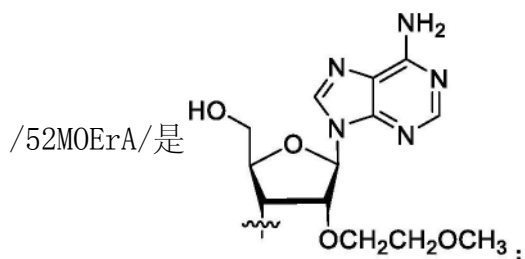
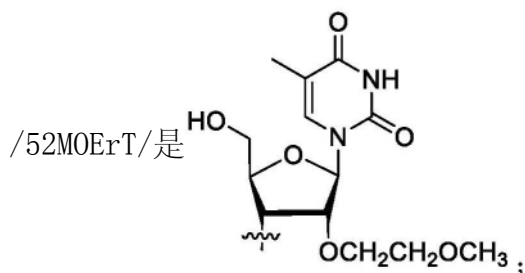
15. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸包含修饰的核苷酸间连接键, 任选地其中所述修饰的核苷酸间连接键是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

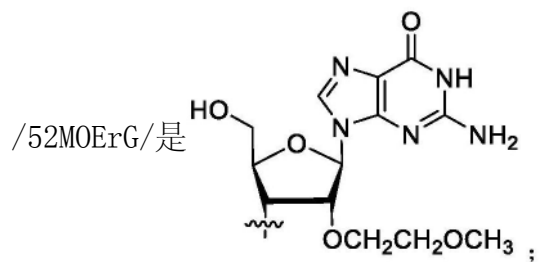
16. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中每个核苷酸间连接键独立地是修饰的核苷酸间连接键和/或

其中每个核苷酸间连接键独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

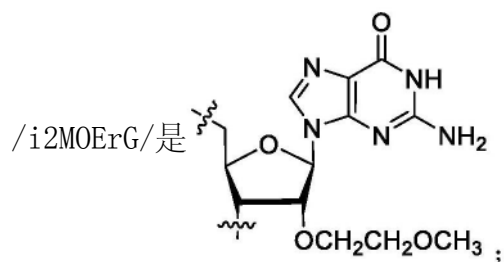
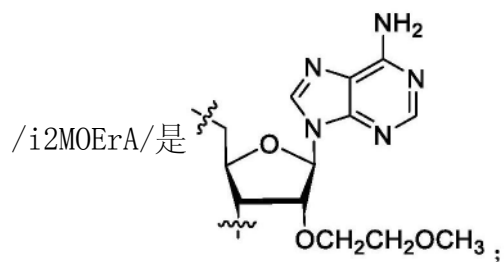
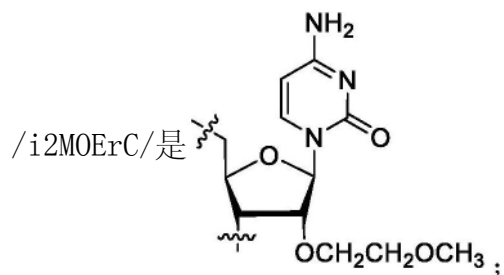
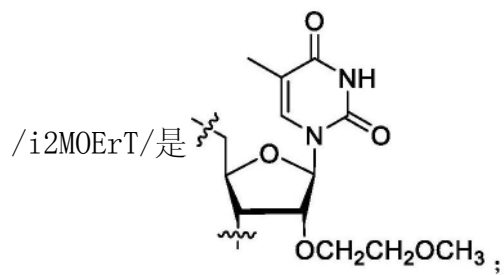
17. 寡核苷酸, 其具有结构:

/52MOErA/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*T*T*T*/iMe-dC/*T*G*T*A*G*G*/i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErC/、/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*A*/iMe-dC/*T*G*G*T*T*/iMe-dC/*A*G*/i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErA/*32MOErT/、/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*G*G*T*/iMe-dC/*A*G*G*/iMe-dC/*A*G*/i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErT/*32MOErT/、/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*T*T*G*/iMe-dC/*A*/i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*32MOErT/、/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*iMe-dC/*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*/iMe-dC/*iMe-dC/*T*/i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErT/、/52MOErG/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*A*G*/iMe-dC/*T*T*G*G*G*/iMe-dC/*A*/i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*32MOErT/、或/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErA/*i2MOErG/*iMe-dC/*T*T*A*G*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*/i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErG/、或其盐, 其中

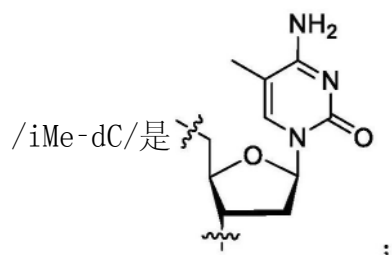


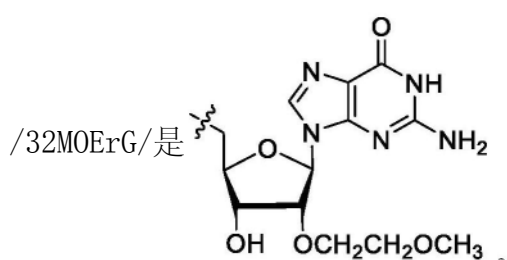
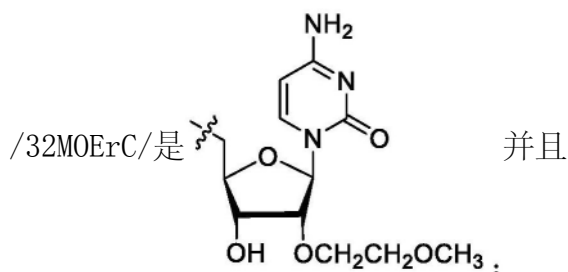
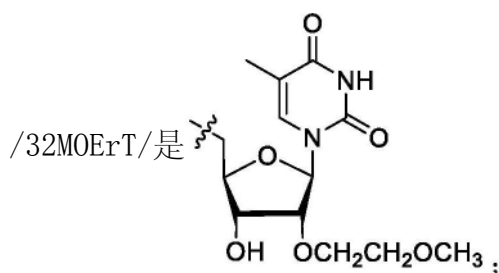


*是-O-P(O)(SH)-O-;



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；





18. 前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸是药学上可接受的盐, 任选地其中所述寡核苷酸是钠盐。

19. 组合物,其包含前述权利要求中任一项的寡核苷酸和所述寡核苷酸相对于手性连接键的磷的一个或更多个非对映异构体。

20. 组合物, 其包含:

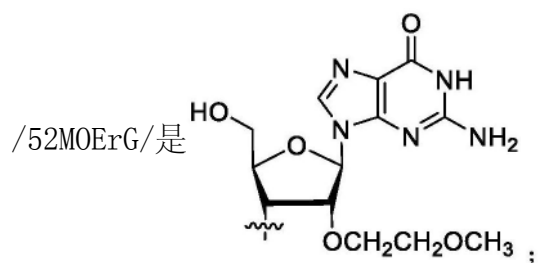
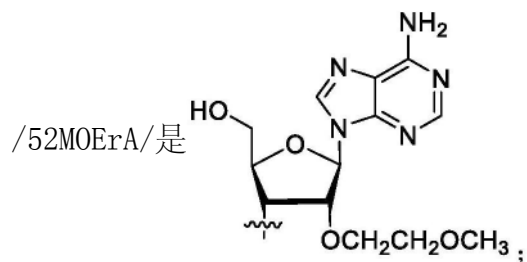
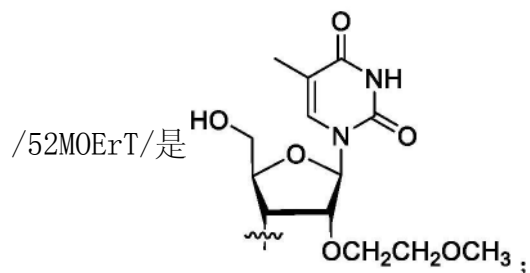
寡核苷酸或其盐,和

所述寡核苷酸相对于手性连接键的磷的一个或多个非对映异构体,或所述非对映异构体的一个或多个盐,

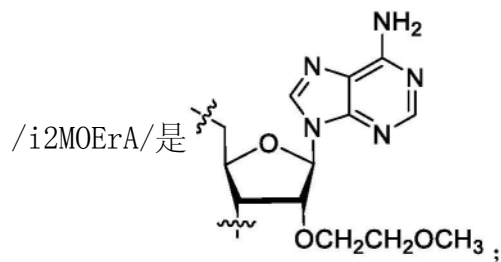
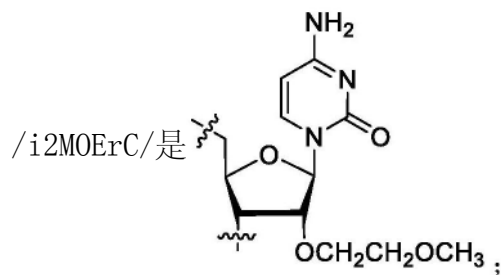
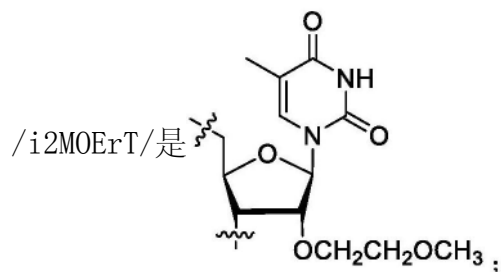
其中所述寡核苷酸是

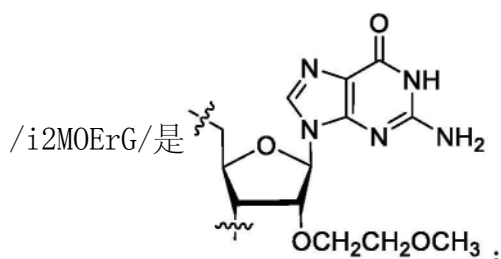
/52MOErA/*/i2MOErT/*/i2MOErC/*/i2MOErA/*/i2MOErG/*T*T*/iMe-dC/*T*G*T*AA*G*G*/i2MOErC/*/i2MOErT/*/i2MOErT/*/i2MOErC/*/32MOErC/、/52MOErG/*/i2MOErG/*/i2MOErC/*/i2MOErA/*/i2MOErT/*A*/iMe-dC/*T*G*G*T*T*/iMe-dC/*A*G*/i2MOErT/*/i2MOErT/*/i2MOErG/*/i2MOErA/*/32MOErT/、/52MOErG/*/i2MOErC/*/i2MOErT/*/i2MOErC/*/i2MOErA/*G*G*T*/iMe-dC/*A*G*G*/iMe-dC/*A*G*/i2MOErT/*/i2MOErG/*/i2MOErG/*/i2MOErT/*/32MOErT/、/52MOErT/*/i2MOErC/*/i2MOErC/*/i2MOErA/*/i2MOErG/*/iMe-dC/*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*/iMe-dC/*/iMe-dC/*T*/i2MOErC/*/i2MOErT/*/i2MOErA/*/i2MOErG/*/32MOErT/、/52MOErG/*/i2MOErT/*/i2MOErT/*/i2MOErC/*/i2MOErC/*A*G*/iMe-dC/*T*T*G*G*G*/iMe-dC/*A*/i2MOErG/*/i2MOErT/*/i2MOErT/*/i2MOErG/*/32MOErT/、/52MOErG/*/i2MOErG/*/i2MOErA/*/i2MOErA/*/i2MOErG/*/iMe-dC/*T*T*AA*G*T*/iMe-dC/*/iMe-dC/*T*T*/i2MOErG/*/i2MOErG/*/i2MOErC/*/i2MOErT/*/32MOErG/、或/52MOErG/*/i2MOErA/*/i2MOErG/*/i2MOErA/*/

i2MOErG/*/iMe-dC/*/iMe-dC/*T*T*T*T*G*/iMe-dC/*A*/i2MOErG/*/i2MOErA/*/
i2MOErG/*/i2MOErC/*/32MOErT/,其中:

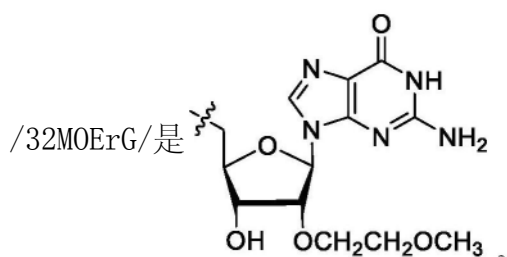
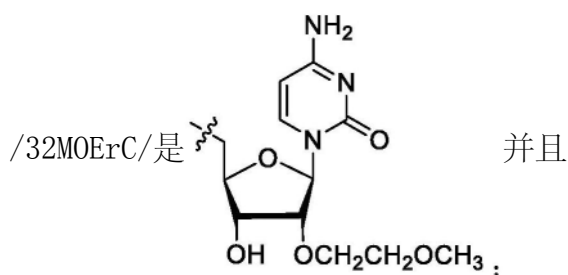
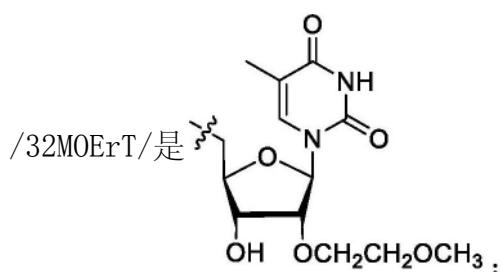
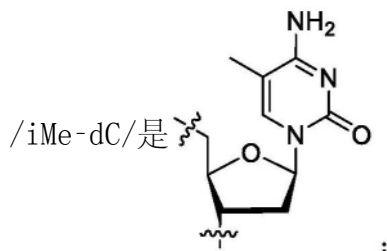


*是-O-P(O)(SH)-O-;





A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；



21. 权利要求19-20中任一项所述的组合物,其中对于每个手性连接键的磷,R_p构型的百分比独立地是约20%-80%、约30%-70%、约40%-60%、约45%-55%或约50%。

22. 权利要求19-21中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含所述寡核苷酸的盐和一个或多个非对映异构体的一个或多个盐。

23. 权利要求19-22中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物,并且还包含药学上可接受的载体。

24. 权利要求19-23中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含所述寡核苷酸的药学上可接受的盐、一个或多个非对映异构体的一个或多个药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体。

25. 药物组合物,其包含前述权利要求中任一项所述的寡核苷酸和药学上可接受的载体。

26. 权利要求25所述的组合物,其中所述组合物包含寡核苷酸的一个或更多个药学上可接受的盐。

27. 权利要求19-26中任一项所述的组合物,其中所述组合物是液体组合物。

28. 权利要求23-27中任一项所述的组合物,其中所述药学上可接受的载体是缓冲液、缓冲盐水或人工脑脊液。

29. 降低系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平的方法,其包括向系统施用或递送有效量的前述权利要求中任一项的寡核苷酸或组合物。

30. 降低系统中钙蛋白酶-2多肽的水平的方法,其包括向系统施用或递送有效量的前述权利要求中任一项的寡核苷酸或组合物。

31. 降低系统中钙蛋白酶-2活性的水平的方法,其包括向系统施用或递送有效量的前述权利要求中任一项的寡核苷酸或组合物。

32. 权利要求29-31中任一项所述的方法,其中所述系统表达钙蛋白酶-2mRNA。

33. 权利要求29-32中任一项所述的方法,其中所述系统是或包含细胞、组织、器官、脑或其部分、生物体、受试者或人。

34. 权利要求29-33中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

35. 权利要求29-33中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%。

36. 权利要求29-33中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性的水平降低了约或至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。

37. 权利要求29-33中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

38. 权利要求29-33中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%。

39. 权利要求29-33中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性的水平降低了约或至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。

40. 权利要求37-39中任一项所述的方法,其中所述参考寡核苷酸不靶向钙蛋白酶-2或者所述参考组合物不包含靶向钙蛋白酶-2的寡核苷酸。

41. 权利要求37-39中任一项所述的方法,其中所述参考寡核苷酸靶向TUG1或者所述参考组合物包含靶向TUG1的寡核苷酸。

42. 权利要求34-41中任一项所述的方法,其中在施用或递送所述寡核苷酸或组合物的

或其之后的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天,或者约1、2、3或4周,评估所述降低。

43. 权利要求34-42中任一项所述的方法,其中在去除或冲洗所述寡核苷酸或组合物的或其之后的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天,或者约1、2、3或4周,评估所述降低。

44. 权利要求34-43中任一项所述的方法,其中以采用裸递送的约20uM寡核苷酸浓度在源自iPSC的运动神经元中,评估所述降低。

45. 用于预防或治疗病况、病症或疾病的方法,其包括向易感病况、病症或疾病的受试者施用或递送有效量的权利要求1-28中任一项的寡核苷酸或组合物。

46. 权利要求45所述的方法,其中所述病况、病症或疾病的发生被延迟或被阻止。

47. 用于治疗病况、病症或疾病的方法,其包括向患有病况、病症或疾病的受试者施用或递送有效量的权利要求1-28中任一项的寡核苷酸或组合物。

48. 权利要求47所述的方法,其中所述病况、病症或疾病的症状的严重程度被降低。

49. 权利要求47-48中任一项所述的方法,其中所述受试者的一个或更多个临床评估结果独立地被改善。

50. 权利要求45-49中任一项所述的方法,其中所述病况、病症或疾病是神经退行性病况、病症或疾病、肌萎缩性侧索硬化、周围神经病、化疗引起的周围神经病、帕金森病、亨廷顿病、阿尔茨海默病、额颞叶痴呆、创伤性脑损伤、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性、沃尔弗拉姆综合征、弗里德赖希共济失调、多系统萎缩、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩、皮克病、进行性运动萎缩、卒中、脑震荡、脑出血、急性青光眼、癫痫发作、脊髓损伤和/或与沃勒变性相关的病况、病症或疾病。

51. 权利要求29-50中任一项所述的方法,其中NF-L分泌被减少。

52. 用于减少NF-L分泌的方法,其包括向受试者施用或递送有效量的权利要求1-28中任一项的寡核苷酸或组合物。

53. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中神经炎性变性被减少。

54. 用于减少神经炎性变性的方法,其包括向受试者施用或递送有效量的权利要求1-28中任一项的寡核苷酸或组合物。

55. 权利要求51-54中任一项所述的方法,其中NF-L分泌和/或神经炎性变性是毒性触发的。

56. 权利要求45-55中任一项所述的方法,其中所述寡核苷酸或组合物是鞘内和/或静脉内施用或递送的。

57. 示例实施方案1-181中任一项的寡核苷酸、组合物或方法。

寡核苷酸组合物及其方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年5月10日提交的美国临时申请序列号63/340365和2022年8月12日提交的美国临时申请序列号63/397707的优先权,这些中的每一个的全部内容都通过引用纳入本文。

背景技术

[0003] 寡核苷酸可用于各种应用,例如治疗应用、诊断应用和/或研究应用。例如,靶向各种基因的寡核苷酸可用于治疗与此类靶基因相关的病况、病症或疾病。

[0004] 概述

[0005] 除其他事项外,本公开提供了用于治疗与钙蛋白酶-2相关的各种病况、病症或疾病的技术(例如寡核苷酸、组合物、方法等)。在一些实施方案中,本公开提供了包含各种修饰(例如核碱基修饰、糖修饰、核苷酸间连接键修饰等)并可以杂交至钙蛋白酶-2转录物的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了当被施用或递送至包含或表达钙蛋白酶-2转录物的系统时,可以降低钙蛋白酶-2转录物的水平的寡核苷酸及其组合物。在一些实施方案中,提供的技术降低了系统中钙蛋白酶-2转录物和/或多肽的水平。在一些实施方案中,本公开提供了用于预防和/或治疗与钙蛋白酶-2相关的各种病况、病症或疾病的技术。

[0006] 在一些实施方案中,本公开涵盖这样的认识:某些碱基序列的寡核苷酸在降低钙蛋白酶-2转录物(例如钙蛋白酶-2mRNA)和/或其产物(例如钙蛋白酶-2多肽)的水平上可能更有效。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含ATCAGTTTCTGTAGGCTTCC、GGCATACTGGTTCAGTTGAT、GCTCAGGTCAGGCAGTGGTT、GAGAGCCTTTTTGCAGAGCT、TCCAGCTCTGTGCCTCTAGT、GTTCCAGCTTGGGCAGTTGT或GGAAGCTTAGTCCTTGGCTG的约5个或更多个(例如约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)连续核碱基,其中每个T任选地且独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列为ATCAGTTTCTGTAGGCTTCC、GGCATACTGGTTCAGTTGAT、GCTCAGGTCAGGCAGTGGTT、GAGAGCCTTTTTGCAGAGCT、TCCAGCTCTGTGCCTCTAGT、GTTCCAGCTTGGGCAGTTGT或GGAAGCTTAGTCCTTGGCTG。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸包含各种修饰,例如核碱基修饰、糖修饰、核苷酸间连接键修饰等。本领域中可获得各种有用的修饰,并且可以根据本公开进行利用。在一些实施方案中,修饰提供了各种益处,例如,改进的稳定性、结合亲和力、药代动力学特征(profile)、药效学特征(profile)等。

[0007] 例如,在一些实施方案中,提供的寡核苷酸包含各种糖修饰。在一些实施方案中,修饰的糖是具有2'-OR^s修饰的天然RNA糖,其中R^s是任选地取代的C₁₋₆脂肪族,并且-OR^s替代2'-OH基团("2'-OR^s修饰的糖")。在一些实施方案中,R^s为任选地取代的C₁₋₆烷基。在一些实施方案中,R^s为-CH₃。在一些实施方案中,R^s为-CH₂CH₂OCH₃。

[0008] 在一些实施方案中,提供的寡核苷酸包含翼-核心-翼(wing-core-wing)结构或由翼-核心-翼结构组成,其中每个翼中独立地存在约1-10个(例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)核苷,核心中存在约5个或更多个(例如,约5-20个,约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、

16、17、18、19或20个等)核苷,并且每个翼独立地包含一个或更多个(例如约1、2、3、4、5、6, 7,8,9,10或更多个)修饰的糖。在一些实施方案中,翼中的每个糖独立地为修饰的糖。在一些实施方案中,翼中的每个糖独立地为2'-OR^s修饰的糖。在一些实施方案中,修饰的糖为2'-MOE修饰的糖(2'-OR^s修饰的糖,其中R^s是-CH₂CH₂OCH₃)。在一些实施方案中,每个翼独立地包含一个或更多个(例如,约1、2、3、4、5或更多个)2'-MOE修饰的糖。在一些实施方案中,翼中的每个糖独立地为2'-MOE修饰的糖。在一些实施方案中,与一个或两个翼相比,核心区域包含更少的修饰的糖和/或更低水平的修饰的糖。在一些实施方案中,核心区域中不存在修饰的糖。在一些实施方案中,核心区域中的每个糖独立地为天然DNA糖。

[0009] 另外地或替代地,在一些实施方案中,提供的寡核苷酸包含修饰的核苷酸间连接键。在一些实施方案中,与天然的磷酸酯连接键相比,修饰的核苷酸间连接键提供了改进的性质和/或活性。各种核苷酸间连接键在本领域中可获得,并且可以根据本公开进行利用。在一些实施方案中,修饰的核苷酸间连接键是硫代磷酸酯核苷酸间连接键(-O-P(O)(SH)-O-,其可以以各种盐形式存在)。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸中的每个连接键是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

[0010] 在一些实施方案中,本发明提供了制备寡核苷酸及其组合物的技术。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸及其组合物具有高纯度。在一些实施方案中,寡核苷酸以作为相对于手性连接键的磷的非对映异构体混合物提供,例如在硫代磷酸酯核苷酸间连接键中。在一些实施方案中,相对于手性连接键的磷的一个或更多个非对映异构体在提供的组合物中富集。

[0011] 如本文所述,本公开的寡核苷酸和组合物可以以各种形式提供/利用。在一些实施方案中,本公开提供了包含一种或更多种形式的寡核苷酸的组合物,例如酸形式(例如,在酸形式中天然磷酸酯连接键以-O-P(O)(OH)-O-存在,硫代磷酸酯核苷酸间连接键以-O-P(O)(SH)-O-存在)、盐形式(例如,在盐形式中一个或更多个或所有的天然磷酸酯连接键以盐形式(例如,钠盐(-O-P(O)(O⁻Na⁺)-O-))独立地存在,一个或更多个或所有的硫代磷酸酯核苷酸间连接键以盐形式(例如,钠盐(-O-P(O)(S⁻Na⁺)-O-)等)存在)、水合物等。如本领域技术人员所理解的,寡核苷酸可以以各种盐形式(包括药学上可接受的盐)存在,并且在溶液(例如各种水性缓冲体系)中,阳离子可以从阴离子中解离。在一些实施方案中,本公开提供了包含提供的寡核苷酸和/或其一个或更多个药学上可接受的盐的药物组合物,以及药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药学上可接受的载体是或包含缓冲液。在一些实施方案中,药学上可接受的载体是缓冲盐水。在一些实施方案中,药学上可接受的载体是人工脑脊液(aCSF)。在一些实施方案中,药学上可接受的载体是脑脊液。

[0012] 在一些实施方案中,本公开描述了用于评估寡核苷酸及其组合物的有用的技术。实施例中描述了某些有用的技术。

[0013] 提供的技术可用于各种目的。例如,在一些实施方案中,提供的技术可用于预防和/或治疗与钙蛋白酶-2相关的各种病况、病症或疾病。在一些实施方案中,本公开提供了预防病况、病症或疾病的方法,其包括向对其敏感的受试者施用或递送有效量的提供的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了治疗病况、病症或疾病的方法,其包括向患有病况、病症或疾病的受试者施用或递送有效量的提供的寡核苷酸。在一些实施方案中,在药物组合物中施用或递送寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸以一种或多种形式施用或递

送,例如在一些实施方案中,以一种或多种药学上可接受的盐形式施用或递送。在一些实施方案中,寡核苷酸在溶液中施用或递送,例如在aCSF溶液中施用或递送。各种技术在本领域可获得,并且可用于施用或递送提供的寡核苷酸及其组合物。例如,在一些实施方案中,寡核苷酸和组合物是鞘内施用或递送的。

[0014] 在一些实施方案中,病况、病症或疾病为神经退行性病况、病症或疾病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为或包括沃勒变性 (Wallerian degeneration)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病与沃勒变性相关。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为肌萎缩侧索硬化症 (ALS)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为神经病 (neuropathy)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为周围神经病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为化疗诱导的周围神经病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为帕金森病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为亨廷顿病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为阿尔茨海默病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为额颞叶痴呆。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为脑损伤。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为创伤性脑损伤。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为进行性核上性麻痹。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为皮质基底节变性。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为沃尔弗拉姆综合征。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为弗里德赖希共济失调 (Friedreich's Ataxia)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为多系统萎缩。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为脊髓小脑性共济失调。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为脊髓性肌萎缩 (SMA)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为皮克病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为进行性运动萎缩。

附图说明

[0015] 图1。提供的寡核苷酸可以降低钙蛋白酶-2 (CAPN2) mRNA的水平。(A) 和 (B) :证明了各种寡核苷酸可以敲低CAPN2。使用靶向CAPN2的各种寡核苷酸通过裸摄取 (gymnotic uptake) 处理源自人iPSC的谷氨酸能神经元48小时。裂解细胞并收集RNA。RNA用于实时RT-qPCR以定量CAPN2表达的倍数变化。生物学重复 (黑点) 的CAPN2表达的平均倍数变化在上部图中表示,技术重复 (黑点) 的平均CAPN2 Cp值在中部图中表示,技术重复的平均RPLP0 Cp值 (黑点) 在下部图中表示。X轴表示寡核苷酸;Y轴描绘了CAPN2表达的倍数变化 (上部图)、CAPN2 Cp值 (中部图) 或RPLP0Cp值 (下部图)。虚线水平线表示来自用仅运载体的阴性对照处理的相应倍数变化或Cp值。误差棒表示标准偏差。

[0016] 图2。各种提供的寡核苷酸提供了钙蛋白酶-2 (CAPN2) 的敲低。评估了各种寡核苷酸来敲低CAPN2。使用靶向CAPN2或NEAT1的各种寡核苷酸 (阳性和阴性对照) 通过裸摄取处理源自人iPSC的谷氨酸能神经元48小时。裂解细胞并收集RNA。RNA用于实时RT-qPCR以定量CAPN2或NEAT1表达的倍数变化。生物学重复 (黑点) 的CAPN2或NEAT1表达的平均倍数变化在上部图中表示,技术重复 (黑点) 的平均CAPN2或NEAT1 Cp值在中部图中表示,技术性重复 (黑点) 的平均RPLP0 Cp值在下部图中表示。X轴表示寡核苷酸;Y轴描绘了CAPN2或NEAT1表达的倍数变化 (上部图)、CAPN2或NEAT1 Cp值 (中部图) 或RPLP0 Cp值 (下部图)。虚线水平线表示来自用仅运载体的阴性对照处理的相应倍数变化或Cp值。误差棒表示标准偏差。对于NEAT1,从左到右,运载体、阳性对照和阴性对照。对于钙蛋白酶-2 (CAPN2),从左到右,运载体、NEAT1的阳性对照、阴性对照和各种评估的寡核苷酸。

[0017] 图3。与运载体处理相比,各种提供的寡核苷酸没有显示出明显的细胞毒性。证实了各种寡核苷酸不显著改变活细胞的百分比。使用各种寡核苷酸通过裸摄取处理源自人 iPSC 的谷氨酸能神经元48小时。在此孵育期后,收获细胞并进行Hoechst染色(5 μ g/mL)。计数活细胞、死细胞和总(活+死)细胞的数量,并计算活细胞的百分比。生物学重复的平均活细胞百分比在上部图中表示,生物学重复的平均活细胞计数在下部图中表示。X轴表示寡核苷酸;Y轴描绘了活细胞占总细胞的百分比(上部图)或总活细胞计数(下部图)。虚线水平线表示用仅运载体处理时相应的活细胞百分比或总活细胞计数。误差棒表示标准偏差。

[0018] 图4。提供的寡核苷酸可以降低钙蛋白酶-2 (CAPN2) mRNA的水平。证明了提供的寡核苷酸以剂量依赖的方式敲低CAPN2。用不同浓度(例如20、6.329、2.003、0.634、0.201、0.063、0.020、0.006 μ M)的靶向CAPN2的指示的寡核苷酸或阴性对照(靶向TUG1)处理源自人 iPSC 的脊髓运动神经元72小时。裂解细胞并收集RNA。RNA用于实时RT-qPCR以定量CAPN2敲低。X轴表示寡核苷酸的浓度;Y轴表示钙蛋白酶-2 (CAPN2) 的敲低百分比。每个数据点代表重复处理的平均值,除了6.329 μ M的寡核苷酸39和0.201 μ M的寡核苷酸14和39的数据点代表单个重复。误差棒表示标准偏差。图5。提供的寡核苷酸可以提供神经保护作用。证明了提供的寡核苷酸在暴露于毒性触发物(例如长春新碱、鱼藤酮或秋水仙碱)后减少NF-L分泌。使用20 μ M的指示的靶向CAPN2的寡核苷酸或靶向TUG1的寡核苷酸通过裸摄取处理源自人 iPSC 的脊髓运动神经元48小时。在用寡核苷酸初次处理后48小时,再次用20 μ M的指示的寡核苷酸通过裸摄取和各种毒性触发物(例如长春新碱(1.5nM、3nM或6nM)、鱼藤酮(5 μ M、10 μ M或15 μ M)、秋水仙碱(10nM、100nM或1000nM))处理神经元24小时。在暴露于毒性触发物后24小时,收集上清液并使用市售试剂盒测定NF-L。X轴表示处理(例如,运载体(TE缓冲液)、靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸、寡核苷酸组合14);Y轴描绘了暴露于毒性触发物(例如长春新碱(A)、鱼藤酮(B)、秋水仙碱(C))后归一化至运载体对照的NF-L水平的相对浓度。平均值由具有由黑点表示的技术性重复(N=4)的条形图表示。误差棒表示标准偏差。使用Dunnett's t 检验的单因素方差分析(运载体与TUG1/AS014)以及非配对t检验(TUG1与AS014)进行统计分析;*= $p < 0.05$, **= $p < 0.005$, ***= $p < 0.0005$, ns=不显著。

[0019] 图6。提供的寡核苷酸可以提供钙蛋白酶-2 (CAPN2) mRNA的敲低。使用靶向CAPN2或TUG1的各种寡核苷酸组合通过裸摄取处理源自人 iPSC 的运动神经元48小时。48小时后,更换培养基以除去寡核苷酸。在去除寡核苷酸后,在不同时间点(0、3、7、10、14、21天)裂解细胞并收集RNA。RNA用于RT-qPCR以定量CAPN2表达。与相应时间点的平均阴性对照CAPN2的敲低%相比,确定了CAPN2的敲低%。平均值用棒表示,重复(N=3)用点或三角形指示。X轴表示去除寡核苷酸后的天数(D0、D3、D7、D10、D14、D21);Y轴描绘了CAPN2的敲低%。误差棒表示标准偏差。图7。提供的寡核苷酸可以提供钙蛋白酶-2蛋白的敲低。使用靶向钙蛋白酶-2 (CAPN2) 或TUG1(阴性对照)的寡核苷酸组合通过裸摄取处理源自人 iPSC 的运动神经元48小时。48小时后,更换培养基以除去寡核苷酸。在去除寡核苷酸后,在不同时间点(0、3、7、10、14、21天)裂解细胞。裂解物用于蛋白质印迹中以定量钙蛋白酶-2蛋白水平。显示了寡核苷酸14(A)和寡核苷酸39(B)的数据。平均值用棒表示,重复(N=2)用点或三角形指示。X轴表示去除寡核苷酸后的天数(D0、D3、D7、D10、D14、D21);Y轴描绘了钙蛋白酶-2蛋白的相对敲低(相对于在相应时间点的平均阴性对照钙蛋白酶-2蛋白水平的%)。误差棒表示标准偏差。

[0020] 图8。与运载体处理相比,提供的寡核苷酸对细胞形态没有显著影响。使用靶向钙蛋白酶-2 (CAPN2) 或TUG1 (阴性对照) 的寡核苷酸组合物通过裸摄取处理源自人iPSC的运动神经元48小时。48小时后,更换培养基以除去寡核苷酸。在去除寡核苷酸后,在不同时间点(0、3、21天),通过明场成像评估细胞形态。显示了代表性的图像。每行图像的时间点(D0、D3、D21)由左侧的标签表示;每列图像的处理(运载体(TE缓冲液)、靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸、寡核苷酸组合物14,寡核苷酸组合物39)由顶部的标签表示。

[0021] 某些实施方案的详细描述

[0022] 通过参考以下对某些实施方案的详细描述,可以更容易地理解本公开的技术。

[0023] 定义

[0024] 如本文所用,除非另有说明,以下定义适用于本文。为了本公开的目的,所述化学元素是根据元素周期表(Periodic Table of the Elements),CAS版本,Handbook of Chemistry and Physics,第75版确定的。此外,在“Organic Chemistry”,Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito:1999以及“March’s Advanced Organic Chemistry”,第5版,Ed.:Smith, M.B.和March, J., John Wiley&Sons, New York:2001中描述了有机化学的一般原理。

[0025] 如本文在本公开中所使用的,除非上下文另有明确说明,(i) 术语“一个(a)”或“一个(an)”可以理解为“至少一个”的意思;(ii) 术语“或”可理解为“和/或”的意思;(iii) 术语“包含(comprising)”、“包含(comprise)”、“包括(including)”(无论是否与“不限于”一起使用)和“包括(include)”(无论是否与“不限于”一起使用)可以理解为包括分项的组分或步骤,无论是由它们自身呈现还是与一个或更多个另外的组分或步骤一起呈现;(iv) 术语“另一个(another)”可以理解为至少一个另外的/第二的一个或更多个的意思;(v) 术语“约(about)”和“大约(approximately)”可以理解为允许将被本领域普通技术人员所理解的标准的变化;(vi) 如果提供范围,则包括端点。

[0026] 除非另有说明,寡核苷酸及其元件(例如碱基序列、糖修饰、核苷酸间连接键、连接键的磷立体化学、其模式等)的描述为从5’至3’。如本领域技术人员将理解的,在一些实施方案中,寡核苷酸可以以各种形式提供和/或利用,例如盐形式,特别是药学上可接受的盐形式,例如钠盐。正如本领域技术人员还将理解的,在一些实施方案中,组合物中的单独的寡核苷酸可以被认为具有相同的组成和/或结构,即使在这种组合物(例如液体组合物)中,特定的这种寡核苷酸在特定时间可以是不同的形式的,例如一种或多种盐形式(并且可以溶解,并且当例如在液体组合物中时,所述寡核苷酸链可以以阴离子形式存在)。例如,本领域技术人员将理解,在给定的pH下,沿着寡核苷酸链的单独的核苷酸间连接键可以是酸(H)形式的,或者是多种可能的盐形式(例如钠盐或不同阳离子的盐,这取决于制剂或组合物中可能存在的离子)中的一个,并且将理解,只要它们的酸形式(例如,用H⁺(如果有的话)取代所有阳离子)具有相同的组成和/或结构,那么这些单独的寡核苷酸可以适当地认为具有相同的组成和/或结构。

[0027] 脂肪族:如本文所用,“脂肪族”是指完全饱和的或含有一个或多个不饱和单元(但不是芳香族的)的直链的(即无支链的)或支链的,取代的或未取代的烃链,或完全饱和的或含有一个或多个不饱和单元(但不是芳香族的)的取代的或未取代的单环、双环或多环烃环,或者其组合。在一些实施方案中,脂肪族基团含有1-50个脂肪族碳原子。在一些实施方

案中,脂肪族基团含有1-20个脂肪族碳原子。在其他的实施方案中,脂肪族基团含有1-10个脂肪族碳原子。在其他的实施方案中,脂肪族基团含有1-9个脂肪族碳原子。在其他的实施方案中,脂肪族基团含有1-8个脂肪族碳原子。在其他的实施方案中,脂肪族基团含有1-7个脂肪族碳原子。在其他的实施方案中,脂肪族基团含有1-6个脂肪族碳原子。在另外其他的实施方案中,脂肪族基团含有1-5个脂肪族碳原子,并且在另外其他的实施方案中,脂肪族基团含有1、2、3或4个脂肪族碳原子。合适的脂肪族基团包括但不限于直链的或支链的取代的或未取代的烷基、烯基、炔基基团及其杂化物(hybrid),例如(环烷基)烷基、(环烯基)烷基或(环烷基)烯基。

[0028] 烷基:如本文所用,术语“烷基”在本领域中被赋予普通的含义,可以包括饱和的脂肪族基团,包括直链烷基基团、支链烷基基团、环烷基(脂环族)基团、烷基取代的环烷基基团和环烷基取代的烷基基团。在一些实施方案中,烷基具有1-100个碳原子。在某些实施方案中,直链或支链烷基在其主链(例如,对于直链为 C_1-C_{20} ,对于支链为 C_2-C_{20})中具有约1-20个碳原子,或者约1-10个碳原子。在一些实施方案中,环烷基环在其环结构中具有约3-10个碳原子,其中这些环是单环的、双环的或多环的,或者在环结构中具有约5、6或7个碳。在一些实施方案中,烷基基团可以是低烷基基团,其中低烷基基团包含1-4个碳原子(例如,对于直链低烷基为 C_1-C_4)。

[0029] 动物:如本文所用,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中,“动物”是指处于任何发育阶段的人。在一些实施方案中,“动物”是指处于任何发育阶段的非人动物。在某些实施方案中,所述非人动物是哺乳动物(例如啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、羊、牛、灵长类动物和/或猪)。在一些实施方案中,动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼类和/或蠕虫。在一些实施方案中,动物可以是转基因动物、基因工程动物和/或克隆。

[0030] 特征部分:如本文所用,术语“特征部分”在最广泛的意义上是指物质的一部分,其的存在(或不存在)与所述物质的特定特征、属性或活性的存在(或不存在)相关。在一些实施方案中,物质的特征部分是在物质中和共享所述特定特征、属性或活性的相关物质中发现的部分,但不存在于不共享所述特定特征、属性或活性的物质中。在某些实施方案中,特征部分与完整物质共享至少一个功能特征。例如,在一些实施方案中,核酸的“特征部分”是一个包含了许多(在一些实施方案中连续段的)核碱基的部分,所述核碱基是该核酸所特有的。

[0031] 可比较的:术语“可比较的”在本文中用于描述两组(或多组)彼此足够相似的情况或环境,以允许对获得的结果或观察到的现象进行比较。在一些实施方案中,可比较的情况或环境的组的特征在于多个基本相同的特征和一个或少量不同的特征。本领域普通技术人员将认识到,当以足够数量和类型的基本相同的特征表征以保证合理的结论时,情况的组是相互可比较的,所述合理的结论即在不同组的情况或环境的下获得的结果或观察到的现象的差异是由不同的那些特征的变化引起的或指示的。

[0032] 杂原子:术语“杂原子”如本文所用,是指不是碳或氢的原子。在一些实施方案中,杂原子是硼、氧、硫、氮、磷或硅(包括氮、硫、磷或硅的氧化形式;氮的带电形式(例如季铵化形式、亚胺(iminium)基团中的形式等)、磷、硫、氧;等)。在一些实施方案中,杂原子是硅、磷、氧、硫或氮。在一些实施方案中,杂原子是硅、氧、硫或氮。在一些实施方案中,杂原子是

氧、硫或氮。

[0033] 同一性:如本文所用,术语“同一性”是指聚合物分子之间(例如核酸分子(例如寡核苷酸、DNA、RNA等)之间和/或多肽分子之间)的整体相关性。在一些实施方案中,如果聚合物分子的序列为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%相同,则认为聚合物分子彼此“基本相同”。为了最佳比对目的(例如,为了最佳比对可以在第一和第二序列中的一个或两个中引入空位(gap),并且为了比较目的可以忽略非一致的序列)例如可以通过比对两个序列来计算两个核酸或多肽序列的同一性百分比。在某些实施方案中,为了比较目的比对的序列的长度是参考序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或基本上100%。然后比较了在相应位置的核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置相同的残基(例如核苷酸或氨基酸)占据时,则所述分子在该位置是相同的。考虑到空位的数量和每个空位的长度,两个序列之间的同一性百分比是所述序列共享的相同位置的数量,为了所述两个序列的最佳比对,需要引入空位。序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定可以使用数学算法完成。例如,使用Meyers和Miller的算法(CABIOS,1989,4:11-17)可以确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比,所述算法已被纳入ALIGN程序(版本2.0)。在一些示例性实施方案中,使用ALIGN程序进行的核酸序列比较使用了PAM120权重残基表,空位长度罚分为12,并且空位罚分为4。或者,使用NWSgapdna.CMP矩阵在GCG软件包中使用GAP程序可以确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。

[0034] 核苷酸间连接键:如本文所用,短语“核苷酸间连接键”通常是指连接寡核苷酸或核酸的核苷单元的连接键。在一些实施方案中,核苷酸间连接键是磷酸二酯连接键,如在天然存在的DNA和RNA分子中广泛发现的(天然磷酸酯连接键($-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})\text{O}-$),如本领域技术人员所理解的,其可以以盐形式存在)。在一些实施方案中,核苷酸间连接键是修饰的核苷酸间连接键(不是天然磷酸酯连接键)。在一些实施方案中,核苷酸间连接键是“修饰的核苷酸间连接键”,其中磷酸二酯连接键的至少一个氧原子或-OH被不同的有机或无机部分替代。在一些实施方案中,这样的有机或无机部分选自 $=\text{S}$ 、 $=\text{Se}$ 、 $=\text{NR}'$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{SeR}'$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $\text{B}(\text{R}')_3$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{Se}-$ 和 $-\text{N}(\text{R}')-$,其中每个 R' 独立地为-H或任选地取代的基团,所述基团选自 C_{1-10} 脂肪族、 C_{6-14} 芳基、具有1-5个杂原子的 C_{1-10} 杂脂肪族、具有1-5个杂原子的5-10元杂芳基和具有1-4个杂原子的3-10元杂环基,或者两个或更多个 R' 基团与它们的居间原子组成任选地取代的3-10元环,所述环除了居间原子外还具有0-5个杂原子。在一些实施方案中,修饰的核苷酸间连接键是硫代磷酸酯连接键。在一些实施方案中,核苷酸间连接键是例如PNA(肽核酸)或PMO(磷酰二胺吗啉代寡聚体,phosphorodiamidate Morpholino oligomer)连接键中之一。本领域普通技术人员理解,由于在连接键中酸或碱部分的存在,在给定的pH下,核苷酸间连接键可以作为阴离子或阳离子存在。

[0035] 体外:如本文所用,术语“体外”是指在人造环境中(例如在试管或反应容器中、在细胞培养中等),而不是在生物体(例如动物、植物和/或微生物)内发生的事件。

[0036] 体内:如本文所用,术语“体内”是指生物体(例如,动物、植物和/或微生物)内发生的事件。

[0037] 连接键的磷:如本文所定义,短语“连接键的磷”用于表示所指的特定磷原子是存在于核苷酸间连接键中的磷原子,所述磷原子对应于如在天然存在的DNA和RNA中所出现的

磷酸二酯核苷酸间连接键的磷原子。在一些实施方案中,连接键的磷原子是在修饰的核苷酸间连接键中,其中磷酸二酯连接键的每个氧原子任选地且独立地被有机或无机部分替代。在一些实施方案中,连接键的磷原子是手性的(例如,如在硫代磷酸酯核苷酸间连接键中)。在一些实施方案中,连接键的磷原子是非手性的(例如,如在天然磷酸酯连接键中)。

[0038] 修饰的核碱基:术语“修饰的核碱基”、“修饰的碱基”等是指化学上不同于核碱基但能够执行核碱基的至少一种功能的化学部分。在一些实施方案中,修饰的核碱基是包含修饰的核碱基。在一些实施方案中,修饰的核碱基能够具有核碱基的至少一种功能,例如,在能够与包含至少互补的碱基序列的核酸进行碱基配对的聚合物中形成部分。在一些实施方案中,修饰的碱基为取代的A、T、C、G或U,或A、T、C、G或U的取代的互变异构体。在一些实施方案中,寡核苷酸背景下的修饰的核碱基是指不是A、T、C、G或U的核碱基。

[0039] 修饰的核苷:术语“修饰的核苷”是指来源于或化学上类似于天然核苷的部分,但其包含使其不同于天然核苷的化学修饰。修饰的核苷的非限制性实例包括在碱基和/或糖上包含修饰的那些。修饰的核苷的非限制性实例包括在糖上具有2'修饰的那些。修饰的核苷的非限制性实例还包括无碱基核苷(缺乏核碱基)。在一些实施方案中,修饰的核苷能够具有核苷的至少一种功能,例如,在能够与包含至少互补的碱基序列的核酸进行碱基配对的聚合物中形成部分。

[0040] 修饰的核苷酸:术语“修饰的核苷酸”包括结构上与天然核苷酸不同但能够执行天然核苷酸的至少一种功能的任何化学部分。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包括在糖、碱基和/或核苷酸间连接键处的修饰。在一些实施方案中,修饰的核苷酸包含修饰的糖、修饰的核碱基和/或修饰的核苷酸间连接键。在一些实施方案中,修饰的核苷酸能够具有核苷酸的至少一种功能,例如,在能够与包含至少互补的碱基序列的核酸进行碱基配对的聚合物中形成亚基。

[0041] 修饰的糖:术语“修饰的糖”是指可以替代糖的部分。修饰的糖模仿糖的空间排列、电子性质或某些其他物理化学性质。在一些实施方案中,如本公开所描述,修饰的糖是取代的核糖或脱氧核糖。在一些实施方案中,修饰的糖包含2'-修饰。有用的2'-修饰的实例在本领域中广泛使用并且在本文中描述。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-F。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-OR,其中R是任选地取代的C₁₋₁₀脂肪族。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-OMe。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-MOE。在一些实施方案中,修饰的糖是双环糖(例如,在LNA、BNA等中使用的糖)。在一些实施方案中,在寡核苷酸的背景中,修饰的糖是这样的糖,所述糖不是在天然RNA或DNA中通常地发现的核糖或脱氧核糖。

[0042] 核酸:术语“核酸”,如本文所用,包括任何核苷酸及其聚合物。术语“多核苷酸”,如本文所用,是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸(RNA)或脱氧核糖核苷酸(DNA)或其组合)的聚合形式。这些术语是指分子的一级结构,并且因此,包括双链和单链DNA,以及双链和单链RNA。这些术语包括作为等价物的RNA或DNA的类似物,所述RNA或DNA的类似物包含修饰的核苷酸和/或修饰的多核苷酸(例如,但不限于甲基化的、保护的和/或加帽的核苷酸或多核苷酸)。这些术语涵盖多-或寡-核糖核苷酸(RNA)和多-或寡-脱氧核糖核苷酸(DNA);源自核碱基和/或修饰的核碱基的N-糖苷或C-糖苷的RNA或DNA;源自糖和/或修饰的糖的核酸;和源自磷酸酯桥和/或修饰的核苷酸间连接键的核酸。该术语涵盖含有核碱基、修饰的核碱基、糖、修饰的糖、磷酸酯桥或修饰的核苷酸间连接键的任何组合的核酸。实例包括但不限于含

有核糖部分的核酸、含有脱氧核糖部分的核酸,含有核糖和脱氧核糖部分两者的核酸、含有核糖和修饰的核糖部分的核酸。除非另有说明,否则前缀多- (poly-) 涉及含有2至约10000个核苷酸单体单元的核酸,并且其中前缀寡- (oligo-) 涉及含有2至约200个核苷酸单体单元的核酸。

[0043] 核碱基:术语“核碱基”是指参与氢键的核酸的部分,所述氢键以序列特异性方式将一条核酸链与另一条互补链结合。最常见的天然存在的核碱基是腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、尿嘧啶(U)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)。在一些实施方案中,天然存在的核碱基是修饰的腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶或胸腺嘧啶。在一些实施方案中,天然存在的核碱基是甲基化的腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶或胸腺嘧啶。在一些实施方案中,核碱基包含杂芳基环,其中环原子是氮,并且当在核苷中时,氮键合至糖部分。在一些实施方案中,核碱基包含杂环的环,其中环原子是氮,并且当在核苷中时,氮键合至糖部分。在一些实施方案中,核碱基是“修饰的核碱基”,是腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、尿嘧啶(U)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)以外的核碱基。在一些实施方案中,修饰的核碱基为取代的A、T、C、G或U。在一些实施方案中,修饰的碱基为A、T、C、G或U的取代的互变异构体。在一些实施方案中,修饰的核碱基是甲基化的腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶或胸腺嘧啶。在一些实施方案中,修饰的核碱基模拟核碱基的空间排列、电子性质或某些其他物理化学性质,并且保留以序列特异性方式将一条核酸链结合至另一条核酸链的氢键的性质。在一些实施方案中,修饰的核碱基可以与所有五种天然存在的碱基(尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶或鸟嘌呤)配对,而不会显著影响寡核苷酸双链的解链行为、被细胞内酶识别或活性。如本文所用,术语“核碱基”还涵盖用于代替天然或天然存在的核苷酸的结构类似物,例如修饰的核碱基和核碱基类似物。在一些实施方案中,核碱基是任选地取代的A、T、C、G或U,或A、T、C、G或U的任选取代的互变异构体。在一些实施方案中,“核碱基”是指寡核苷酸或核酸中的核碱基单元(例如寡核苷酸或核酸中的A、T、C、G或U)。

[0044] 核苷:术语“核苷”是指这样的部分,其中核碱基或修饰的核碱基共价结合至糖或修饰的糖。在一些实施方案中,核苷是天然核苷,例如腺苷、脱氧腺苷、鸟苷、脱氧鸟苷、胸苷、尿苷、胞苷或脱氧胞苷。在一些实施方案中,核苷是修饰的核苷,例如,选自腺苷、脱氧腺苷、鸟苷、脱氧鸟苷、胸苷、尿苷、胞苷和脱氧胞苷的取代的天然核苷。在一些实施方案中,核苷是修饰的核苷,例如,选自腺苷、脱氧腺苷、鸟苷、脱氧鸟苷、胸苷、尿苷、胞苷和脱氧胞苷的天然核苷的取代的互变异构体。在一些实施方案中,“核苷”是指寡核苷酸或核酸中的核苷单元。

[0045] 核苷酸:术语“核苷酸”如本文所用是指多核苷酸的单体单元,所述多核苷酸由核碱基、糖和一个或多个核苷酸间连接键(例如天然DNA和RNA中的磷酸酯键)组成。天然存在的碱基[鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)]是嘌呤或嘧啶的衍生物,尽管应该理解天然和非天然存在的碱基类似物也包括在内。天然存在的糖是戊糖(五碳糖)脱氧核糖(其形成DNA)或核糖(其形成RNA),尽管应该理解天然和非天然存在的糖类类似物也包括在内。核苷酸通过核苷酸间连接键连接,以形成核酸或多核苷酸。在本领域中已知许多核苷酸间连接键(例如,尽管不限于磷酸酯、硫代磷酸酯、硼磷酸酯等)。人工核酸包括PNA(肽核酸)、磷酸三酯、硫代磷酸酯、H-磷酸酯、氨基磷酸酯、硼磷酸盐(boranophosphate)、甲基磷酸酯、膦酰基乙酸酯、硫代膦酰基乙酸酯和天然核酸的磷酸酯

骨架的其他变体,例如本文所述的那些。在一些实施方案中,天然核苷酸包含天然存在的碱基、糖和核苷酸间连接键。如本文所用,术语“核苷酸”还涵盖用于代替天然或天然存在的核苷酸的结构类似物,例如修饰的核苷酸和核苷酸类似物。在一些实施方案中,“核苷酸”是指寡核苷酸或核酸中的核苷酸单元。

[0046] 寡核苷酸:术语“寡核苷酸”是指核苷酸的聚合物或寡聚体,并且可以包含天然和非天然核碱基、糖和核苷酸间连接键的任何组合。

[0047] 寡核苷酸可以是单链的或双链的。单链寡核苷酸可以具有双链区域(由单链寡核苷酸的两部分形成),并且包含两条寡核苷酸链的双链寡核苷酸可以具有单链区域,例如,在两条寡核苷酸链互相不互补的区域。实例寡核苷酸包括但不限于结构基因、包括控制区和终止区的基因、自我复制系统例如病毒或质粒DNA、单链和双链RNAi试剂和其他RNA干扰试剂(RNAi试剂或iRNA试剂)、shRNA、反义寡核苷酸、核酶、微小RNA、微小RNA模拟物、超微RNA(supermir)、适体、antimir、antagomir、U1衔接子(adaptor)、三链体形成的寡核苷酸、G-四链体寡核苷酸、RNA活化剂、免疫刺激寡核苷酸和诱饵寡核苷酸。

[0048] 本公开的寡核苷酸可以具有各种长度。在特定实施方案中,寡核苷酸的长度可以在约2至约200个核苷酸之间。在各种相关的实施方案中,寡核苷酸、单链、双链或三链的长度可以在从约4至约10个核苷、从约10至约50个核苷、从约20至约50个核苷、从约15至约30个核苷、从约20至约30个核苷之间。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约9至约39个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约25至约70个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约26至约70个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约27至约70个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约28至约70个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约29至约70个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约30至约70个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约31至约70个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约32至约70个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约25至约60个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约25至约50个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约25至约40个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为从约30至约40个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少4个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少5个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少6个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少7个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少8个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少9个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少10个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少11个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少12个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少15个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少16个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少17个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少18个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少19个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少20个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少25个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少26个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少27个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少28个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少

29个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少30个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少31个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少32个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少33个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少34个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少35个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少36个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少37个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少38个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少39个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少40个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为25个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为26个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为27个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为28个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为29个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为30个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为31个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为32个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为33个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为34个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为35个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为36个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为37个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为38个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为39个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为40个核苷。在一些实施方案中,在寡核苷酸长度中被计数的每个核苷独立地包含核碱基,所述核碱基包含具有至少一个氮环原子的环。在一些实施方案中,在寡核苷酸长度中被计数的每个核苷独立地包含A、T、C、G或U,或者任选地取代的A、T、C、G,或U,或者A、T、C、G或U的任选地取代的互变异构体。

[0049] 任选地取代的:如本文所述,本公开的化合物(例如寡核苷酸)可以含有任选地取代的部分和/或取代的部分。通常,术语“取代的”,无论之前是否有术语“任选地”,都意味着指定部分的一个或多个氢被合适的取代基替代。除非另有说明,“任选地取代的”基团可以在该基团的每个可取代的位置处具有合适的取代基,并且当任何给定结构中的多于一个位置可以被选自指定基团的多于一个取代基取代时,所述取代基可以在每个位置处相同或不同。在一些实施方案中,任选地取代的基团是未取代的。本公开设想的取代基组合优选是那些导致形成稳定或化学上可行的化合物的取代基的组合。术语“稳定的”,如本文所用,是指当经受允许其生产、检测以及在某些实施方案中其回收、纯化和用于本文所公开的一个或多个目的条件时,没有实质性改变的化合物。某些取代基描述如下。

[0050] 可取代的原子(例如合适的碳原子)上的合适的单价取代基,独立地为卤素; $-(CH_2)_{0-4}R^0$; $-(CH_2)_{0-4}OR^0$; $-O(CH_2)_{0-4}R^0$; $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^0$; $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^0)_2$; $-(CH_2)_{0-4}Ph$, 其可以用 R^0 取代; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$, 其可以用 R^0 取代; $-CH=CHPh$, 其可以用 R^0 取代; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$ -吡啶基, 其可以用 R^0 取代; $-NO_2$; $-CN$; $-N_3$; $(CH_2)_{0-4}N(R^0)_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^0)C(O)R^0$; $-N(R^0)C(S)R^0$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^0)C(O)NR^0_2$; $-N(R^0)C(S)NR^0_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^0)C(O)OR^0$; $-N(R^0)N(R^0)C(O)R^0$; $-N(R^0)N(R^0)C(O)NR^0_2$; $-N(R^0)N(R^0)C(O)OR^0$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^0$; $-C(S)R^0$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^0$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^0$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSi(R^0)_3$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^0$; $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR^0$; $-SC(S)SR^0$; $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^0$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^0_2$; $-C(S)NR^0_2$; $-C(S)SR^0$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^0_2$; $-C(O)N(OR^0)R^0$; $-C(O)C(O)R^0$; $-C(O)CH_2C(O)R^0$; $-C(NOR^0)R^0$; $(CH_2)_{0-4}SSR^0$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^0$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^0$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^0$; $-S(O)_2NR^0_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^0$; $-N(R^0)S(O)_2NR^0_2$; $-N(R^0)S(O)_2R^0$; $-N(OR^0)R^0$; $-C(NH)NR^0_2$; $-Si(R^0)_3$; $-OSi(R^0)_3$; $-B(R^0)_2$; $-OB(R^0)_2$; $-OB$

(OR^o)₂; -P(R^o)₂; -P(OR^o)₂; -P(R^o)(OR^o); -OP(R^o)₂; -OP(OR^o)₂; -OP(R^o)(OR^o); -P(O)(R^o)₂; -P(O)(OR^o)₂; -OP(O)(R^o)₂; -OP(O)(OR^o)₂; -OP(O)(OR^o)(SR^o); -SP(O)(R^o)₂; -SP(O)(OR^o)₂; -N(R^o)P(O)(R^o)₂; -N(R^o)P(O)(OR^o)₂; -P(R^o)₂[B(R^o)₃]; -P(OR^o)₂[B(R^o)₃]; -OP(R^o)₂[B(R^o)₃]; -OP(OR^o)₂[B(R^o)₃]; -(C₁₋₄直链或支链亚烷基)O-N(R^o)₂; 或-(C₁₋₄直链或支链亚烷基)C(O)O-N(R^o)₂, 其中每个R^o可以如本文所定义被取代, 并且独立地为氢、C₁₋₂₀脂肪族、具有1-5个独立选自氮、氧、硫、硅和磷的杂原子的C₁₋₂₀杂脂肪族、-CH₂-(C₆₋₁₄芳基)、-O(CH₂)₀₋₁(C₆₋₁₄芳基)、-CH₂-(5-14元杂芳基环), 具有0-5个独立选自氮、氧、硫、硅和磷的杂原子的5-20元的单环、双环或多环、饱和环、部分不饱和环或芳基环, 或者, 尽管有上述定义, 两个独立出现的R^o, 连同它们的一个或多个居间原子, 形成具有0-5个独立地选自氮、氧、硫、硅和磷的杂原子的5-20元的单环、双环或多环、饱和环、部分不饱和环或芳基环, 其可以按照以下定义取代。

[0051] R^o上合适的单价取代基(或由两个独立出现的R^o及其居间原子形成的环)独立地为卤素、-(CH₂)₀₋₂R●、-(卤R●)、-(CH₂)₀₋₂OH、-(CH₂)₀₋₂OR●、-(CH₂)₀₋₂CH(OR●)₂; -O(卤R●)、-CN、-N₃、-(CH₂)₀₋₂C(O)R●、-(CH₂)₀₋₂C(O)OH、-(CH₂)₀₋₂C(O)OR●、-(CH₂)₀₋₂SR●、-(CH₂)₀₋₂SH、-(CH₂)₀₋₂NH₂、-(CH₂)₀₋₂NHR●、-(CH₂)₀₋₂NR●₂、-NO₂、-SiR●₃、-OSiR●₃、-C(O)SR●、-(C₁₋₄直链或支链亚烷基)C(O)OR●或-SSR●, 其中每个R●为未取代的或前面带有“卤素”的仅被一种或多种卤素取代的, 并且独立地选自C₁₋₄脂肪族、-CH₂Ph、-O(CH₂)₀₋₁Ph和具有0-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元的饱和环、部分不饱和环或芳基环。R^o的饱和碳原子上合适的二价取代基包括=O和=S。

[0052] 合适的二价取代基, 例如在合适的碳原子上的合适的二价取代基, 独立地如下: =O、=S、=NNR^{*}₂、=NNHC(O)R^{*}、=NNHC(O)OR^{*}、=NNHS(O)₂R^{*}、=NR^{*}、=NOR^{*}、-O(C(R^{*})₂)₂₋₃O-或-S(C(R^{*})₂)₂₋₃S-, 其中每个独立出现的R^{*}选自氢、可以被如下定义取代的C₁₋₆脂肪族, 以及具有0-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的未取代的5-6元饱和环、部分不饱和环或芳基环。结合至“任选地取代的”基团的邻位的可取代碳的合适的二价取代基包括: -O(CR^{*})₂-₃O-, 其中每个独立出现的R^{*}选自氢、可被如下定义取代的C₁₋₆脂肪族, 以及具有0-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的未取代的5-6元饱和环、部分不饱和环和芳基环。

[0053] R^{*}的脂肪族基团上的合适的取代基独立地为卤素、-R●、(卤R●)、-OH、-OR●、-O(卤R●)、-CN、-C(O)OH、-C(O)OR●、-NH₂、-NHR●、-NR●₂或-NO₂, 其中每个R●为未取代的或前面带有“卤(halo)”的仅被一种或多种卤素取代的, 并且独立地为C₁₋₄脂肪族、-CH₂Ph、-O(CH₂)₀₋₁Ph或具有0-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元饱和环、部分不饱和环或芳基环。

[0054] 在一些实施方案中, 可取代的氮上的合适的取代基独立地为-R[†]、-NR[†]₂、-C(O)R[†]、-C(O)OR[†]、-

C(O)C(O)R[†]、-C(O)CH₂C(O)R[†]、-S(O)₂R[†]、-S(O)₂NR[†]₂、-C(S)NR[†]₂、-C(NH)NR[†]₂或-N(R[†])S(O)₂R[†]; 其中, 每个R[†]独立地是氢、可被如下定义取代的C₁₋₆脂肪族、未取代的-OPh, 或具有0-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的未取代的5-6元饱和环、部分不饱和环或芳基环, 或者, 尽管有上述定义, 两个独立出现的R[†], 连同它们的一个或多个居间原子形成具有0-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的3-12元的饱和环、部分不饱和环或芳基单环或芳基双环。

[0055] R^+ 的脂肪族基团上的合适的取代基独立地为卤素、 $-R$ 、 $(\text{卤}R)$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-O(\text{卤}R)$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR$ 、 $-NR_2$ 或 $-NO_2$,其中每个 R 为未取代的或前面带有“卤(halo)”的仅被一种或多种卤素取代的,并且独立地为 C_{1-4} 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ 或具有0-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元饱和环、部分不饱和环或芳基环。

[0056] 部分不饱和:如本文所用,术语“部分不饱和”是指包括至少一个双键或三键的环部分。术语“部分不饱和”旨在涵盖具有多个不饱和位点的环,但不旨在包括如本文定义的芳基或杂芳基部分。

[0057] 药物组合物:如本文所用,术语“药物组合物”是指与一种或多种药学上可接受的载体一起配制的活性剂。在一些实施方案中,活性剂以适合于在治疗中施用的单位剂量的量存在,其显示了当施用于相关群体时实现预定的治疗效果的统计学上显著的概率。在一些实施方案中,药物组合物可以特别配制用于以固体或液体形式施用,包括那些适合于以下的:口服施用,例如灌服(drench)(水溶液或非水溶液或混悬液)、片剂,例如用于颊部、舌下和全身吸收的片剂,大丸剂、粉剂、粒剂、应用于舌部的糊剂;胃肠外施用,例如,以例如无菌溶液或混悬液或缓释制剂通过皮下、肌内、静脉内或硬膜外注射;局部应用,例如,以乳膏、软膏或控释贴剂或喷剂应用于皮肤、肺,或口腔;阴道内或直肠内,例如,以子宫托、乳膏或泡沫;舌下;眼部;透皮;或经鼻、肺和至其他粘膜表面。

[0058] 药学上可接受的:如本文所用,短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适合与人和动物的组织接触使用的,没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的收益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0059] 药学上可接受的载体:如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或运载体(vehicle),例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料,其涉及在将主体化合物从一个器官或身体的一部分运送或运输到另一个器官或身体的一部分。每种载体在与制剂的其他成分相容和不会对患者造成伤害的意义上必须是“可接受的”。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;粉状黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;乙二醇,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;pH缓冲溶液;聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐;以及药物制剂中使用的其他无毒相容的物质。

[0060] 药学上可接受的盐:术语“药学上可接受的盐”,如本文所用,是指适用于制药环境中使用的此类化合物的盐,即在合理的医学判断范围内,适用于与人和低等动物的组织接触而没有过度毒性、刺激性、过敏反应等,并且与合理的收益/风险比相称的盐。药学上可接受的盐在本领域是众所周知的。例如,S.M.Berge等人在J.Pharmaceutical Sciences,66:1-19(1977)中详细描述了药学上可接受的盐。在一些实施方案中,药学上可接受的盐包括但不限于无毒的酸加成盐,其是由无机酸(例如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸)或通过使用本领域中使用的其他方法(例如离子交换)形成的氨基基团的盐。在一些实施方案中,药学上可接受的盐包

包括但不限于己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐 (camphorate)、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡萄糖庚酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘化物 (hydroiodide)、2-羟基乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐 (lauryl sulfate)、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。在一些实施方案中,提供的化合物包含一个或多个酸性基团,例如寡核苷酸,并且药学上可接受的盐是碱、碱土金属或铵 (例如N(R)₃的铵盐,其中每个R在本公开中独立地定义和描述) 盐。代表性的碱或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等。在一些实施方案中,药学上可接受的盐是钠盐。在一些实施方案中,药学上可接受的盐是钾盐。在一些实施方案中,药学上可接受的盐是钙盐。在一些实施方案中,药学上可接受的盐包括 (当合适时) 使用抗衡离子如卤化物、氢氧化物、羧酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、具有从1到6个碳原子的芳基、磺酸盐和芳基磺酸形成的无毒铵、季铵和胺阳离子。在一些实施方案中,提供的化合物包含多于一个的酸性基团,例如,寡核苷酸可以包含两个或更多个的酸性基团 (例如,在天然磷酸酯连接键和/或修饰的核苷酸间连接键中)。在一些实施方案中,这样的化合物的医药上可接受的盐或一般来说盐包含两个或更多个阳离子,其可以相同或不同。在一些实施方案中,在医药上可接受的盐 (或一般来说,盐) 中,酸性基团中的所有可电离的氢 (例如,在pKa不超过约11、10、9、8、7、6、5、4、3、2的水溶液中;在一些实施方案中,pKa不超过约7;在一些实施方案中,pKa不超过约6;在一些实施方案中,pKa不超过约5;在一些实施方案中,pKa不超过约4;在一些实施方案中,pKa不超过约3) 都被阳离子替代。在一些实施方案中,每个硫代磷酸酯和磷酸酯基团独立地以其盐形式 (例如,如果是钠盐,分别为-O-P(O) (SNa) -O-和-O-P(O) (ONa) -O-) 存在。在一些实施方案中,每个硫代磷酸酯和磷酸酯核苷酸间连接键独立地以其盐形式 (例如,如果是钠盐,分别为-O-P(O) (SNa) -O-和-O-P(O) (ONa) -O-) 存在。在一些实施方案中,药学上可接受的盐是寡核苷酸的钠盐。在一些实施方案中,药学上可接受的盐是寡核苷酸的钠盐,其中每个酸性磷酸酯和修饰的磷酸酯基团 (例如,硫代磷酸酯、磷酸酯等) (如果有的话) 以盐形式存在 (所有钠盐)。

[0061] 保护基团:如本文所用术语“保护基团”是本领域内众所周知的,并且包括在Protecting Groups in Organic Synthesis,T.W.Greene和P.G.M.Wuts,第三版,John Wiley&Sons,1999中详细描述的那些,其全部通过引用纳入本文。还包括Serge L.Beaucage等人2012年6月主编的Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry中描述的那些专门用于核苷和核苷酸化学的保护基团,此处引用第2章的全部内容。适宜的氨基保护基包括氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、9-苄基氨基甲酸酯 (Fmoc)、9-(2-磺基) 苄基氨基甲酸酯、9-(2,7-二溴) 苄基氨基甲酸酯、2,7-二叔丁基-[9-(10,10-二氧化-10,10,10-四氢噻吨基)]氨基甲酸酯 (DBD-Tmoc)、4-甲氧基苯甲酰氨基甲酸酯 (Phenoc)、2,2,2-三氯氨基甲酸乙酯 (Troc)、2-三甲基甲硅烷基氨基甲酸乙酯 (Teoc)、2-苯基氨基甲酸乙酯 (hZ)、1-(1-金刚烷基)-1-甲基氨基甲酸乙酯 (Adpoc)、1,1-二甲基-2-卤代氨基甲酸乙酯、1,1-二甲基-2,2-二溴氨基甲酸乙酯 (DB-t-BOC)、1,1-二甲基-2,2,2-三氯氨基甲酸乙酯 (TCBOC)、1-甲基-1-(4-联苯基) 氨基甲酸乙酯 (Bpoc)、1-(3,5-二叔丁基苯基)-1-甲基氨基甲酸乙酯 (t-

Bumeoc)、2-(2'-和4'-吡啶基)氨基甲酸乙酯(Pyoc)、2-(N,N-二环己基甲酰胺)氨基甲酸乙酯、氨基甲酸叔丁酯(BOC)、1-金刚烷基氨基甲酸酯(Adoc)、乙烯基氨基甲酸酯(Voc)、烯丙基氨基甲酸酯(Alloc)、1-异丙基烯丙基氨基甲酸酯(Ipaoc)、肉桂基氨基甲酸酯(Coc)、4-硝基肉桂基氨基甲酸酯(Noc)、8-喹啉基氨基甲酸酯、N-羟基哌啶基氨基甲酸酯、烷基二硫代氨基甲酸酯、苄基氨基甲酸酯(Cbz)、对甲氧基苄基氨基甲酸酯(Moz)、对硝基苄基氨基甲酸酯、对溴苄基氨基甲酸酯、对氯苄基氨基甲酸酯、2,4-二氯苄基氨基甲酸酯、4-甲基亚磺酰基苄基氨基甲酸酯(Msz)、9-蒎基甲基氨基甲酸酯、二苯基氨基甲酸甲酯、2-甲硫基氨基甲酸乙酯、2-甲磺酰基氨基甲酸乙酯、2-(对甲苯磺酰基)氨基甲酸乙酯、[2-(1,3-二噻吩基)]氨基甲酸甲酯(Dmoc)、4-甲硫基苯基氨基甲酸酯(Mtpc)、2,4-二甲基苯硫基氨基甲酸酯(Bmpc)、2-磷鎓基氨基甲酸乙酯(Peoc)、2-三苯基磷鎓基异丙基氨基甲酸酯(Ppoc)、1,1-二甲基-2-氰乙基氨基甲酸酯、间氯-对酰氧基苄基氨基甲酸酯、对-(二羟基甲硼基)苄基氨基甲酸酯、5-苯并异噁唑基氨基甲酸甲酯、2-(三氟甲基)-6-色酮基氨基甲酸甲酯(Tcroc)、间硝基苯基氨基甲酸酯、3,5-二甲氧基苄基氨基甲酸酯、邻硝基苄基氨基甲酸酯、3,4-二甲氧基-6-硝基苄基氨基甲酸酯、苯基(邻硝基苯基)氨基甲酸甲酯、吩噻嗪基-(10)-羰基衍生物、N'-对甲苯磺酰基氨基羰基衍生物、N'-苯基氨基硫羰基衍生物、氨基甲酸叔戊酯、S-苄基硫代氨基甲酸酯、对氰苄基氨基甲酸酯、环丁基氨基甲酸酯、环己基氨基甲酸酯、环戊基氨基甲酸酯、环丙基氨基甲酸甲酯、对癸氧基苄基氨基甲酸酯、2,2-二甲氧基羰基乙烯基氨基甲酸酯、邻-(N,N-二甲基甲酰胺)苄基氨基甲酸酯、1,1-二甲基-3-(N,N-二甲基甲酰胺)丙基氨基甲酸酯、1,1-二甲基丙炔基氨基甲酸酯、二(2-吡啶基)氨基甲酸甲酯、2-呋喃基氨基甲酸甲酯、2-碘乙基氨基甲酸酯、异冰片基氨基甲酸酯、异丁基氨基甲酸酯、异烟碱基氨基甲酸酯(isonicotinyl carbamate)、p-(p'-甲氧基苯偶氮基)苄基氨基甲酸酯、1-甲基环丁基氨基甲酸酯、1-甲基环己基氨基甲酸酯、1-甲基-1-环丙基氨基甲酸甲酯、1-甲基-1-(3,5-二甲氧基苯基)氨基甲酸乙酯、1-甲基-1-(对苯基苯偶氮基)氨基甲酸乙酯、1-甲基-1-苯基氨基甲酸乙酯、1-甲基-1-(4-吡啶基)氨基甲酸乙酯、氨基甲酸苯酯、对苯偶氮基苄基氨基甲酸酯、2,4,6-三叔丁基苯基氨基甲酸酯、4-(三甲基铵)苄基氨基甲酸酯、2,4,6-三甲基苄基氨基甲酸酯、甲酰胺、乙酰胺、氯乙酰胺、三氯乙酰胺、三氟乙酰胺、苯基乙酰胺、3-苯基丙酰胺、吡啶酰胺、3-吡啶基甲酰胺、N-苯甲酰基苯丙氨酰基衍生物、苯甲酰胺、对苯基苯甲酰胺、邻硝基苄基乙酰胺、邻硝基苯氧基乙酰胺、乙酰基乙酰胺、(N'-二硫代苄氧羰基氨基)乙酰胺、3-(对羟基苯基)丙酰胺、3-(邻硝基苯基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻硝基苯氧基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻苯基偶氮苯氧基)丙酰胺、4-氯丁酰胺、3-甲基3-硝基丁酰胺、邻硝基肉桂酰胺、N-乙酰基蛋氨酸衍生物、邻硝基苯甲酰胺、邻(苯甲酰氧甲基)苯甲酰胺、4,5-二苯基-3-噁唑啉-2-酮、N-邻苯二甲酰亚胺、N-二硫杂琥珀酰亚胺(N-dithiasuccinimide)(Dts)、N-2,3-二苯基马来酰亚胺、N-2,5-二甲基吡咯、N-1,1,4,4-四甲基二硅基氮杂环戊烷加合物(STABASE)、5-取代的1,3-二甲基-1,3,5-三氮杂环己烷-2-酮、5-取代1,3-二苄基-1,3,5-三氮杂环己烷-2-酮、1-取代3,5-二硝基-4-吡啶酮、N-甲胺、N-烯丙胺、N-[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲胺(SEM)、N-3-乙酰氧基丙胺、N-(1-异丙基-4-硝基-2-氧代-3-吡咯啉-3-基)胺(N-(1-isopropyl-4-nitro-2-oxo-3-pyrroline-3-yl)amine)、季铵盐、N-苄胺、N-二(4-甲氧基苯基)甲胺、N-5-二苯并环庚基胺、N-三苯基甲胺(Tr)、N-[4-甲氧基苯基]二苯基甲基胺(MMtr)、N-9-苯基苄基胺(Phf)、N-2,

7-二氯-9-芴基亚甲基胺、N-二茂铁基甲胺(Fcm)、N-2-吡啶氨基N'-氧化物(N-2-picolylamino N'-oxide)、N-1,1-二甲基硫代亚甲基胺、N-亚苄基胺、N-对甲氧基亚苄基胺、N-二苯基亚甲基胺、N-[(2-吡啶基)均三甲苯基(mesityl)亚甲基胺、N-(N',N'-二甲胺基亚甲基)胺、N,N'-异亚丙基二胺、N-对硝基亚苄基胺、N-亚水杨基胺、N-5-氯亚水杨基胺、N-(5-氯-2-羟基苯基)苯基亚甲基胺、N-亚环己基胺、N-(5,5-二甲基-3-氧代-1-环己烯基)胺、N-硼烷衍生物、N-二苯基硼酸衍生物、N-[苯基(五烷基铬或钨)羰基]胺、N-铜螯合物、N-锌螯合物、N-硝胺、N-亚硝胺、N-氧化物、二苯基膦酰胺(Dpp)、二甲基硫代膦酰胺(Mpt)、二苯基硫代膦酰胺(Ppt)、二烷基氨基磷酸酯、二苄基氨基磷酸酯、二苯基氨基磷酸酯、苯亚磺酰胺、邻硝基苯亚磺酰胺(Nps)、2,4-二硝基苯亚磺酰胺、五氯苯亚磺酰胺、2-硝基-4-甲氧基苯亚磺酰胺、三苯基甲基亚磺酰胺、3-硝基吡啶亚磺酰胺(Npys)、对甲苯磺酰胺(Ts)、苯磺酰胺、2,3,6-三甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Mtr)、2,4,6-三甲氧基苯磺酰胺(Mtb)、2,6-二甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Pme)、2,3,5,6-四甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Mte)、4-甲氧基苯磺酰胺(Mbs)、2,4,6-三甲基苯磺酰胺(Mts)、2,6-二甲氧基-4-甲基苯磺酰胺(iMds)、2,2,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰胺(Pmc)、甲磺酰胺(Ms)、 β -三甲基甲硅烷基乙磺酰胺、9-蒎磺酰胺、4-(4',8'-二甲氧基萘甲基)苯磺酰胺(Dnmb)、苯基磺酰胺、三氟甲基磺酰胺和苯甲酰甲基磺酰胺。

[0063] 合适的保护的羧酸进一步包括但不限于甲硅烷基-、烷基-、烯基-、芳基-和芳烷基-保护的羧酸。合适甲硅烷基基团的实例包括三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基等。合适的烷基基团的实例包括甲基、苄基、对甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基、三苯甲基、叔丁基、四氢吡喃-2-基等。合适的烯基基团的实例包括烯丙基。合适的芳基基团的实例包括任选地取代的苯基、联苯基或萘基。合适的芳基烷基基团的实例包括任选地取代的苄基(例如,对甲氧基苄(MPM))、3,4-二甲氧基苄基、0-硝基苄基、对硝基苄基、对卤苄基、2,6-二氯苄基、对氰苄基)以及2-和4-吡啶甲基(picoly1)。

[0064] 适宜的羟基保护基包括甲基、甲氧基甲基(MOM)、甲硫基甲基(MTM)、叔丁基硫甲基、(苯基二甲基甲硅烷基)甲氧基甲基(SMOM)、苄氧基甲基(BOM)、对甲氧基苄氧基甲基(PMBM)、(4-甲氧基苯氧基)甲基(p-AOM)、愈创木酚甲基(GUM)、叔丁氧基甲基、4-戊烯氧基甲基(POM)、硅氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(MEM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、双(2-氯乙氧基)甲基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基(SEMOR)、四氢吡喃基(THP)、3-溴四氢吡喃基、四氢硫代吡喃基、1-甲氧基环己基、4-甲氧基四氢吡喃基(MTHP)、4-甲氧基四氢硫代吡喃基、4-甲氧基四氢硫代吡喃基S,S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基(CTMP)、1,4-二噁烷-2-基、四氢呋喃基、四氢硫代呋喃基、2,3,3a,4,5,6,7,7a-八氢-7,8,8-三甲基-4,7-桥亚甲基苯并呋喃(methanobenzofuran)-2-基、1-乙氧乙酯基、1-(2-氯乙氧基)乙基、1-甲基-1-甲氧基乙基、1-甲基-1-苄氧基乙基、1-甲基-1-苄氧基-2-氟乙基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、2-(苯基氢硒基)乙基、叔丁基、烯丙基、对氯苯基、对甲氧基苯基、2,4-二硝基苯基、苄基、对甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基、邻硝基苄基、对硝基苄基、对卤代苄基、2,6-二氯苄基、对氰苄基、对苯基苄基、2-吡啶甲基、4-吡啶甲基、3-甲基-2-吡啶甲基N-氧化物、二苯甲基、p,p'-二硝基二苯甲基、5-二苯并环庚基、三苯基甲基、 α -萘基二苯基甲基、对甲氧基苯基二苯基甲基、二(对甲氧基苯基)苯基甲基、三(对甲氧

基苯基)甲基、4-(4'-溴苯甲酰甲氧基)二苯甲基、4,4',4''-三(4,5-二氯苯二甲酰亚胺苯基)甲基、4,4',4''-三-(乙酰丙酸氧基苯基)甲基(4,4',4''-tris(levulinoyloxyphenyl)methyl)、4,4',4''-三(苯甲酰氧基苯基)甲基、3-(咪唑-1-基)双(4',4''-二甲氧基苯基)甲基、1,1-二(4-甲氧基苯基)-1'-茈基甲基、9-蒎基、9-(9-苯基)吨基、9-(9-苯基-10-氧代)蒎基、1,3-苯并二硫杂环戊烷-2-基、苯并异噻唑基S,S-二氧化物(benzisothiazolyl S,S-dioxido)、三甲基甲硅烷基(TMS)、三乙基甲硅烷基(TEs)、三异丙基甲硅烷基(TIPS)、二甲基异丙基甲硅烷基(IPDMS)、二乙基异丙基甲硅烷基(DEIPS)、二甲基噻唑甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)、叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS)、三苄基甲硅烷基、三-对二甲苯基甲硅烷基、三苯基甲硅烷基、二苯基甲基甲硅烷基(DPMS)、叔丁基甲氧基苯基甲硅烷基(TBMPs)、甲酸酯、苯甲酰甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯氧基乙酸酯、对氯苯氧乙酸酯、3-苯基丙酸酯、4-氧代戊酸酯(乙酰丙酸)、4,4-(二硫代乙烯)戊酸酯(4,4-(ethylenedithio)pentanoate)(乙酰丙酸基二硫缩醛)、pivaloate、adamantoate、巴豆酸酯、4-甲氧基巴豆酸酯、苯甲酸酯、对苯基苯甲酸酯、2,4,6-三甲基苯甲酸酯(mesitoate)、甲基碳酸酯、9-芴甲基碳酸酯(Fmoc)、烷基乙基碳酸酯、烷基2,2,2-三氯乙基碳酸酯(Troc)、2-(三甲基甲硅烷基)乙基碳酸酯(TMSEC)、2-(苯基磺酰基)乙基碳酸酯(Psec)、2-(三苯基磷鎓基)乙基碳酸酯(Peoc)、烷基异丁基碳酸酯、烷基乙烯基碳酸酯烷基烯丙基碳酸酯、烷基对硝基苯基碳酸酯、烷基苄基碳酸酯、烷基对甲氧基苄基碳酸酯、烷基3,4-二甲氧基苄基碳酸酯、烷基邻硝基苄基碳酸酯、对硝基苄基碳酸酯、烷基S-苄基硫代碳酸酯、4-乙氧基-1-萘基碳酸酯、甲基二硫代碳酸酯、2-碘代苯甲酸酯、4-叠氮丁酸酯、4-硝基-4-甲基戊酸酯、邻-(二溴甲基)苯甲酸酯、2-甲酰基苯磺酸酯、2-(甲基硫代甲氧基)乙基、4-(甲基硫代甲氧基)丁酸酯、2-(甲基硫代甲氧基甲基)苯甲酸酯、2,6-二氯-4-甲基苯氧基乙酸酯、2,6-二氯-4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯氧基乙酸酯、2,4-双(1,1-二甲基丙基)苯氧基乙酸酯、氯代二苯基乙酸酯、异丁酸酯、单琥珀酸酯、(E)-2-甲基-2-丁烯酸酯、邻-(甲氧基羰基)苯甲酸酯、 α -萘酸酯、硝酸酯、烷基N,N,N,N',N',N'-四甲基二氨基磷酸酯、烷基N-苯基氨基甲酸酯、硼酸酯、二甲基硫磷基、烷基2,4-二硝基苯基磺酸酯、硫酸酯、甲磺酸酯(methanesulfonate)(甲磺酸酯(mesylate))、苄基磺酸酯和甲苯磺酸酯(Ts)。对于1,2-或1,3-二醇,保护基团包括亚甲基缩醛、亚乙基缩醛、1-叔丁基亚乙基缩酮、1-苯基亚乙基缩酮、(4-甲氧基苯基)亚乙基缩醛、2,2,2-三氯亚乙基缩醛、丙酮化合物、亚环戊基缩酮、亚环己基缩酮、亚环庚基缩酮、苯亚甲基缩醛、对甲氧基苯亚甲基缩醛、2,4-二甲氧基苯亚甲基缩酮、3,4-二甲氧基苯亚甲基缩醛、2-硝基苯亚甲基缩醛、甲氧基亚甲基缩醛、乙氧基亚甲基缩醛、二甲氧基亚甲基原酸酯、1-甲氧基亚乙基原酸酯、1-乙氧基亚乙基原酸酯、1,2-二甲氧基亚乙基原酸酯、 α -甲氧基亚苄基原酸酯、1-(N,N-二甲氨基)亚乙基衍生物、 α -(N,N'-二甲氨基)亚苄基衍生物、2-氧杂环亚戊基原酸酯、二叔丁基亚甲硅基基团(DTBS)、1,3-(1,1,3,3-四异丙基二硅亚氧烷基)衍生物(1,3-(1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxanylidene)derivative)

[0065] (TIPDS)、四叔丁氧基二硅氧烷-1,3-二亚基衍生物(TBDS)、环状碳酸酯、环状硼酸酯、乙基硼酸酯和苯基硼酸酯。

[0066] 在一些实施方案中,羟基保护基是乙酰基、叔丁基、叔丁氧基甲基、甲氧基甲基、四氢吡喃基、1-乙氧基乙基、1-(2-氯乙氧基)乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、对氯苯基、2,4-二

硝基苄基、苄基、苯甲酰基、对苯基苯甲酰基、2,6-二氯苄基、二苯基甲基、对硝基苄基、三苯基甲基(三苯甲基(trityl))、4,4'-二甲氧三苯甲基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、三苯甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、苯甲酰基甲酸、氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基、特戊酰基、9-苄基甲基碳酸酯、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、三氟甲磺酸酯、三苯甲基、单甲氧基三苯甲基(MMTr)、4,4'-二甲氧三苯甲基(DMTr)和4,4',4''-三甲氧基三苯甲基(TMTr)、2-氰乙基(CE或Cne)、2-(三甲基甲硅烷基)乙基(TSE)、2-(2-硝基苄基)乙基、2-(4-氰基苄基)乙基、2-(4-硝基苄基)乙基(NPE)、2-(4-硝基苄基磺酰基)乙基、3,5-二氯苄基、2,4-二甲苯基、2-硝基苄基、4-硝基苄基、2,4,6-三甲基苄基、2-(2-硝基苄基)乙基、丁基硫羰基、4,4',4''-三(苯甲酰氧基)三苯甲基、二苯基氨基甲酰基、乙酰丙酸基(levuliny1)、2-(二溴甲基)苯甲酰基(Dbmb)、2-(异丙基硫代甲氧基甲基)苯甲酰基(Ptmt)、9-苄基咕吨-9-基(pixyl)或9-(对甲氧基苄基)黄嘌呤-9-基(Mox)。在一些实施方案中,每个羟基保护基团独立地选自乙酰基、苄基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基和4,4'-二甲氧基三苯甲基。在一些实施方案中,羟基保护基团是选自三苯甲基、单甲氧基三苯甲基和4,4'-二甲氧基三苯甲基基团组成的组。在一些实施方案中,含磷连接键保护基团是在寡核苷酸合成过程中附接至含磷连接键(例如核苷酸间连接键)的基团。在一些实施方案中,保护基团附接至硫代磷酸酯基团的硫原子。在一些实施方案中,保护基团附接至核苷酸间硫代磷酸酯连接键的氧原子。在一些实施方案中,保护基团附接至核苷酸间磷酸酯连接键的氧原子。在一些实施方案中,保护基团是2-氰乙基(CE或Cne)、2-三甲基甲硅烷基乙基、2-硝基乙基、2-磺酰基乙基、甲基、苄基、邻硝基苄基、2-(对硝基苄基)乙基(NPE或Npe)、2-苄基乙基、3-(N-叔丁基甲酰胺基)-1-丙基、4-氧代戊基、4-甲硫基-1-丁基、2-氰基-1,1-二甲基乙基、4-N-甲氨基丁基、3-(2-吡啶基)-1-丙基、2-[N-甲基-N-(2-吡啶基)]氨基乙基、2-(N-甲酰基,N-甲基)氨基乙基或4-[N-甲基-N-(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]丁基。

[0067] 受试者:如本文所用,“受试者”或“试验受试者”是指根据本公开将化合物(例如寡核苷酸)或组合物施用至的任何生物体,例如用于实验、诊断、预防和/或治疗目的。典型的受试者包括动物(例如,哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人;昆虫;蠕虫等)和植物。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者可以患有和/或易感疾病、病症和/或病况。

[0068] 糖:术语“糖”是指封闭和/或开放形式的单糖或多糖。在一些实施方案中,糖是单糖。在一些实施方案中,糖是多糖。糖包括但不限于核糖、脱氧核糖、戊呋喃糖(pentofuranose)、戊吡喃糖(pentopyranose)和己吡喃糖(hexopyranose)部分。如本文所用,术语“糖”还涵盖用于代替常规糖分子的结构类似物,例如乙二醇(其的聚合物形成核酸类似物的骨架)、乙二醇核酸(“GNA”)等。如本文所用,术语“糖”还涵盖用于代替天然或天然存在的核苷酸的结构类似物,例如修饰的糖和核苷酸糖。在一些实施方案中,糖是RNA或DNA糖(核糖或脱氧核糖)。在一些实施方案中,糖是修饰的核糖或脱氧核糖,例如2'-修饰的、5'-修饰的等。如本文所述,在一些实施方案中,当用在寡核苷酸和/或核酸中时,修饰的糖可以提供一种或多种所需的性质、活性等。在一些实施方案中,糖是任选地取代的核糖或脱氧核糖。在一些实施方案中,“糖”是指寡核苷酸或核酸中的糖单元。

[0069] 易感:对疾病、病症和/或病况“易感”的个体是指比一般公众具有更高的疾病、病

症和/或病况发生风险的个体。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病况的个体容易患有该疾病、病症和/或病况。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病况的个体可能未被诊断出患有所述疾病、病症和/或病况。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病况的个体可能表现出所述疾病、病症和/或病况的症状。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病况的个体可能不表现出所述疾病、病症和/或病况的症状。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病况的个体将会发展所述疾病、病症和/或病况。在一些实施方案中,易感疾病、病症和/或病况的个体将不会发展所述疾病、病症和/或病况。

[0070] 治疗剂:如本文所用,术语“治疗剂”通常是指当施用于受试者时,引起期望的效果(例如,期望的生物学、临床或药理学效果)的任何药剂。在一些实施方案中,如果药剂在合适的群体中表现出统计学上显著的效果,则认为药剂是治疗剂。在一些实施方案中,合适的群体是患有和/或易感疾病、病症和/或病况的受试者的群体。在一些实施方案中,合适的群体是模式生物的群体。在一些实施方案中,合适的群体可以通过一个或多个标准(例如年龄组、性别、遗传背景、先前存在的临床状况、暴露前接受治疗)来定义。在一些实施方案中,治疗剂是当以有效量施用于受试者时,减轻受试者中疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、改善受试者中疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、缓解受试者中疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、抑制受试者中疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、预防受试者中疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、延迟受试者中疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征的发生(onset)、降低受试者中疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征的严重程度和/或降低受试者中疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征的发生率的物质。在一些实施方案中,“治疗剂”是在可以销售用于施用于人之前,已经或需要由政府机构批准的药剂。在一些实施方案中,“治疗剂”是需要施用于人的药物处方的药剂。在一些实施方案中,治疗剂是提供的化合物,例如提供的寡核苷酸。

[0071] 治疗有效量:如本文所用,术语“治疗有效量”是指当作为治疗方案的一部分施用引起所需的生物学反应的物质(例如,治疗剂、组合物和/或制剂)的量。在一些实施方案中,物质的治疗有效量是当施用于患有或易感疾病、病症和/或病况的受试者时,足以治疗疾病、病症和/或病况、诊断疾病、病症和/或病况、预防疾病、病症和/或病况和/或延迟疾病、病症和/或病况发生的量。如本领域普通技术人员将理解的,物质的有效量可以根据例如所需生物学终点、待递送的物质、靶细胞或靶组织等因素而变化。例如,用于治疗疾病、病症和/或病况的制剂中化合物的有效量是减轻疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、改善疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、缓解疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、抑制疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、预防疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、延迟疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征的发生、降低疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征的严重程度和/或降低疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征的发病率的量。在一些实施方案中,以单剂量施用治疗有效量;在一些实施方案中,需要多个单位剂量来递送治疗有效量。

[0072] 治疗:如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指用于部分或完全地缓解疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、改善疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、缓解疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特

征、抑制疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、预防疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征、延迟疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征的发生、降低疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征的严重程度和/或降低疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征的发病率的任何方法。可以向没有表现出疾病、病症和/或病况的迹象的受试者施用治疗。在一些实施方案中,可以向仅表现出疾病、病症和/或病况的早期迹象的受试者施用治疗,例如为了降低发展与疾病、病症和/或病况相关的病理学的风险的目的。

[0073] 野生型:如本文所用,术语“野生型”具有其本领域理解的含义,其是指在“正常”(与突变、患病、改变等相反)状态或背景下具有如自然界中发现的结构和/或活性的实体。本领域普通技术人员将理解,野生型基因和多肽通常以多种不同形式(例如等位基因)存在。

[0074] 如本领域技术人员将理解的,与提供的化合物(例如寡核苷酸)有关的本文所述的方法和组合物通常也适用于这些化合物的药学上可接受的盐。

[0075] 如在本公开中使用的,在一些实施方案中,“一个或更多个”是1-200个、1-150个、1-100个、1-90个、1-80个、1-70个、1-60个、1-50个、1-40个、1-30个、或者1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个或60个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是1个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是2个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是3个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是4个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是5个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是6个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是7个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是8个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是9个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是10个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是至少1个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是至少2个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是至少3个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是至少4个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是至少5个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是至少6个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是至少7个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是至少8个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是至少9个。在一些实施方案中,“一个或更多个”是至少10个。

[0076] 如在本公开中所使用的,在一些实施方案中,“至少一个”是如本文所述的“一个或更多个”。

[0077] 某些实施方案的描述

[0078] 除其他事项外,本公开提供了各种寡核苷酸和其组合物。在一些实施方案中,本公开的寡核苷酸靶向钙蛋白酶-2并且可以与钙蛋白酶-2转录物(例如钙蛋白酶-2mRNA)杂交。在一些实施方案中,提供的技术(例如寡核苷酸、组合物、方法等)降低了钙蛋白酶-2转录物和/或其产物的水平。天然存在的核酸的使用受到例如,它们对核酸内切酶和核酸外切酶的敏感性的限制。因此,已经开发了各种合成的对应物以规避这些缺点和/或进一步改进各种性质和活性。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸包含各种化学修饰,例如核碱基修饰、糖修饰、核苷酸间连接键修饰等,除其他外,其使这些分子不易被降解并改善其他性质和/或

活性。在一些实施方案中,寡核苷酸包含本文所述的一个或多个特征,例如核碱基序列、长度、翼、核心、活性等。在一些实施方案中,寡核苷酸具有本文所述的碱基序列和/或本文所述的翼-核心-翼结构。

[0079] 碱基序列

[0080] 各种寡核苷酸的碱基序列具有足够的长度,因此它们可以与靶核酸中的互补序列形成双链体,以实现一种或多种生物学功能。在一些实施方案中,寡核苷酸特异性靶向它们的靶核酸。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸的碱基序列是或包含与靶核酸中的部分(“靶部分”),例如钙蛋白酶-2基因或其转录物互补的序列。在一些实施方案中,与靶部分互补的这样的序列的长度为约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25个或更多个核碱基。在一些实施方案中,靶部分是或包含核酸序列(例如钙蛋白酶-2基因或其转录物)的特征部分,该特征部分在相关生物体中相对于其他定义了核酸序列;例如,所述特征部分不在相关生物体中的其他的基因组核酸序列(例如基因)或其转录物中(例如,对于人钙蛋白酶-2,其特征部分不在其他的人核酸序列或其转录物中)。在一些实施方案中,转录物的特征部分定义了该转录物相对于相关生物体中的其他的转录物;例如,在一些实施方案中,所述特征部分不在从不同核酸序列(例如,不同基因)转录的转录物中。在一些实施方案中,来自核酸序列的转录物变体(例如,基因的mRNA变体)可以共享共同的特征部分,其定义了来自其他核酸的转录物(例如,其他基因的转录物)的它们。在一些实施方案中,转录物中的特征部分定义了来自相同核酸序列(例如基因)的其他一个或多个转录物和/或核酸序列的其他等位基因的转录物。在一些实施方案中,特征部分定义了相对于其他一个或多个等位基因(和/或其转录物)的特定等位基因(和/或其转录物)。在一些实施方案中,特征部分包含在核酸中分离的序列。在一些实施方案中,特征部分是核酸中连续段(stretch)的核碱基(“特征序列”)。特征部分或序列可以具有不同数量的核碱基。在一些实施方案中,在特征部分或序列中存在约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25个或更多个核碱基;在一些实施方案中,有约10个;在一些实施方案中,有约11个;在一些实施方案中,有约12个;在一些实施方案中,有约13个;在一些实施方案中,有约14个;在一些实施方案中,有约15个;在一些实施方案中,有约16个;在一些实施方案中,有约17个;在一些实施方案中,有约18个;在一些实施方案中,有约19个;在一些实施方案中,有约20个;在一些实施方案中,有约21个;在一些实施方案中,有约22个;在一些实施方案中,有约23个;在一些实施方案中,有约24个;在一些实施方案中,有约25个;在一些实施方案中,有约25个或更多个。

[0081] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含与核酸的特征部分相同或互补的序列。在一些实施方案中,寡核苷酸包含与钙蛋白酶-2转录物的特征部分相同或互补的序列。在一些实施方案中,寡核苷酸包含与钙蛋白酶-2转录物的特征部分互补的序列。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列与核酸的特征部分相同或互补。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列与钙蛋白酶-2转录物的特征部分相同或互补。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列与钙蛋白酶-2转录物的特征部分互补。在一些实施方案中,特征部分是特征序列。

[0082] 在一些实施方案中,钙蛋白酶-2转录物的特征序列是或包含表1中寡核苷酸序列的互补序列。在一些实施方案中,特征序列是或包含GGAAGCCUACAGAAACUGAU,其中每个U可以独立地被T替代。在一些实施方案中,特征序列是或包含AUCAACUGAACCAGUAUGCC,其中每

个U可以独立地被T替代。在一些实施方案中,特征序列是或包含AACCACUGCCUGACCUGAGC,其中每个U可以独立地被T替代。在一些实施方案中,特征序列是或包含AGCUCUGCAAAAAGGCUCUC,其中每个U可以独立地被T替代。在一些实施方案中,特征序列是或包含ACUAGAGGCACAGAGCUGGA,其中每个U可以独立地被T替代。在一些实施方案中,特征序列是或包含ACAACUGCCCAAGCUGGAAC,其中每个U可以独立地被T替代。在一些实施方案中,特征序列是或包含CAGCCAAGGACUAAGCUUCC,其中每个U可以独立地被T替代。

[0083] 在一些实施方案中,寡核苷酸可以与核酸的区域杂交。在一些实施方案中,可以与核酸的一个或多个某些区域特异性杂交(例如,通过序列互补性)的寡核苷酸可以比与核酸的一个或多个参考区域特异性杂交(例如,通过序列互补性)的寡核苷酸更有效地降低核酸的水平。在一些实施方案中,区域具有约20-200(例如,约20-150、20-100、30-200、30-150、40-200、40-150、50-100或约20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200)个核碱基的长度。在一些实施方案中,区域的长度为约30个核碱基。在一些实施方案中,区域的长度为约40个核碱基。在一些实施方案中,区域的长度为约50个核碱基。在一些实施方案中,区域的长度为约60个核碱基。在一些实施方案中,区域的长度为约70个核碱基。在一些实施方案中,区域的长度为约80个核碱基。在一些实施方案中,区域的长度为约90个核碱基。在一些实施方案中,区域的长度为约100个核碱基。在一些实施方案中,区域的长度为约120个核碱基。在一些实施方案中,区域的长度为约150个核碱基。在一些实施方案中,区域的长度为约200个核碱基。在一些实施方案中,区域包括表1中的寡核苷酸的碱基序列,其在一些实施方案中位于区域的中部。例如,在一些实施方案中,区域是或包含GGAAGCCUACAGAAACUGAU。在一些实施方案中,区域是或包含AUCAACUGAACCAGUAUGCC。在一些实施方案中,区域是或包含AACCACUGCCUGACCUGAGC。在一些实施方案中,区域是或包含AGCUCUGCAAAAAGGCUCUC。在一些实施方案中,区域是或包含ACUAGAGGCACAGAGCUGGA。在一些实施方案中,区域是或包含ACAACUGCCCAAGCUGGAAC。在一些实施方案中,区域是或包含CAGCCAAGGACUAAGCUUCC。在一些实施方案中,参考区域是或包含UCCUCACCUUGAAUGAAGA。

[0084] 在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含或由以下组成:约10-50个(15-50、16-50、17-50、18-50、19-50、20-50、15-30、20-30、15-25或20-25或者至少约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45个;在一些实施方案中,至少约15个;在一些实施方案中,至少约16个;在一些实施方案中,至少约17个;在一些实施方案中,至少约18个;在一些实施方案中,至少约19个;在一些实施方案中,至少约20个;在一些实施方案中,至少约21个;在一些实施方案中,至少约22个;在一些实施方案中,至少约23个;在一些实施方案中,至少约24个;在一些实施方案中,至少约25个)与钙蛋白酶-2基因或其转录物(如mRNA)中相同长度的碱基序列相同或互补的连续碱基。在一些实施方案中,它们与钙蛋白酶-2转录物中相等长度的碱基序列互补。

[0085] 在某些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列与钙蛋白酶-2转录物中的靶序列至少约50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%、或100%互补。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列与钙蛋白酶-2转录物中的靶序列完全互补。

[0086] 在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列与表1中公开的寡核苷酸的碱基序列具

有约80%或更高的同一性,其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列与表1中公开的寡核苷酸的碱基序列具有约85%或更高的同一性,其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列与表1中公开的寡核苷酸的碱基序列具有约90%或更高的同一性,其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列与表1中公开的寡核苷酸的碱基序列具有约95%或更高的同一性,其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。

[0087] 在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含约15或更多个表1中公开的寡核苷酸的碱基的连续区段(span),其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含约16或更多个表1中公开的寡核苷酸的碱基的连续区段,其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含约17或更多个表1中公开的寡核苷酸的碱基的连续区段,其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含约18或更多个表1中公开的寡核苷酸的碱基的连续区段,其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含约19或更多个表1中公开的寡核苷酸的碱基的连续区段,其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含约20或更多个表1中公开的寡核苷酸的碱基的连续区段,其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。

[0088] 在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含表1中的寡核苷酸的碱基序列,其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是表1中的寡核苷酸的碱基序列,其中每个T可以独立地被U替换,并且反之亦然。例如,在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含ATCAGTTTCTGTAGGCTTCC,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含GGCATACTGGTTCAGTTGAT,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含GCTCAGGTCAGGCAGTGGTT,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含GAGAGCCTTTTGCAGAGCT,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含TCCAGCTCTGTGCCTCTAGT,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含GTTCCAGCTTGGGCAGTTGT,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含GGAAGCTTAGTCCTTGGCTG,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是ATCAGTTTCTGTAGGCTTCC,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是GGCATACTGGTTCAGTTGAT,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是GCTCAGGTCAGGCAGTGGTT,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是GAGAGCCTTTTGCAGAGCT,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是TCCAGCTCTGTGCCTCTAGT,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是GTTCCAGCTTGGGCAGTTGT,其中每个T可以独立地被U替代。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是GGAAGCTTAGTCCTTGGCTG,其中每个T可以独立地被U替代。

[0089] 在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含ATCAGTTTCTGTAGGCTTCC。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含GGCATACTGGTTCAGTTGAT。在一些实施方案中,寡核苷酸

的碱基序列包含GCTCAGGTCAGGCAGTGGTT。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含GAGAGCCTTTTTGCAGAGCT。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含TCCAGCTCTGTGCCTCTAGT。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含GTTCCAGCTTGGGCAGTTGT。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列包含GGAAGCTTAGTTCCTTGGCTG。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是ATCAGTTTTCTGTAGGCTTCC。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是GGCATACTGGTTCAGTTGAT。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是GCTCAGGTCAGGCAGTGGTT。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是GAGAGCCTTTTTGCAGAGCT。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是TCCAGCTCTGTGCCTCTAGT。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是GTTCCAGCTTGGGCAGTTGT。在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列是GGAAGCTTAGTTCCTTGGCTG。

[0090] 长度

[0091] 如本领域技术人员所理解的,寡核苷酸可以具有各种长度,以提供各种用途所需的特性和/或活性。本领域中存在许多用于评估、选择和/或优化寡核苷酸长度的技术,并且可以根据本公开进行利用。如本文所证明的,在许多实施方案中,提供的寡核苷酸具有合适的长度,以与它们的靶标进行杂交并且降低它们的靶标和/或靶标的产物的水平。在一些实施方案中,寡核苷酸足够长以识别靶核酸(例如,钙蛋白酶-2mRNA)。在一些实施方案中,寡核苷酸足够长以区分靶核酸和其它核酸(例如,核酸具有不是钙蛋白酶-2序列的碱基序列)以减少脱靶效应。在一些实施方案中,寡核苷酸足够短以降低制造或生产的复杂性并且降低产品的成本。

[0092] 在一些实施方案中,寡核苷酸的碱基序列的长度为约10-100个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约10-50个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约15-50个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约15-30个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约15-25个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约15-22个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约18-22个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约12个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约13个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约14个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约15个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约16个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约17个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约18个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约19个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约20个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约21个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约22个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约23个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约24个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约25个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约15个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约16个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约17个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约18个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约19个核

碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约20个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约21个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约22个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约23个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约24个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为约25个核碱基。在一些实施方案中,碱基序列的长度为至少约30个核碱基。在一些实施方案中,每个核碱基独立地包含任选地取代的单环、双环或多环的环,其中至少一个环原子是氮。在一些实施方案中,每个核碱基是独立地任选地取代的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟苷、胸腺嘧啶或尿嘧啶,或腺嘌呤、胞嘧啶、鸟苷、胸腺嘧啶或尿嘧啶的任选地取代的互变异构体。

[0093] 核碱基

[0094] 根据本公开,可以在提供的寡核苷酸中使用各种碱基。在一些实施方案中,核碱基是天然核碱基,最常存在的核碱基是A、T、C、G和U。在一些实施方案中,核碱基是修饰的核碱基,因为不是A、T、C、G和U。在一些实施方案中,核碱基是任选地取代的A、T、C、G或U,或A、T、C、G或U的取代的互变异构体。在一些实施方案中,核碱基是任选地取代的A、T、C、G或U,例如5mC、5-羟甲基C等。在一些实施方案中,核碱基是烷基取代的A、T、C、G或U。在一些实施方案中,核碱基是A。在一些实施方案中,核碱基是T。在一些实施方案中,核碱基是C。在一些实施方案中,核碱基是G。在一些实施方案中,核碱基是U。在一些实施方案中,核碱基是5mC。在一些实施方案中,核碱基是取代的A、T、C、G或U。在一些实施方案中,核碱基是A、T、C、G或U的取代的互变异构体。在一些实施方案中,取代保护了核碱基中的某些官能团,以最小化寡核苷酸合成过程中不期望的反应。在寡核苷酸合成中用于核碱基保护的合适的技术在本领域中是众所周知的,并且可以根据本公开进行利用。在一些实施方案中,修饰的核碱基改善了寡核苷酸的性质和/或活性。例如,在许多情况下,可以利用5mC代替C来调节某些不期望的生物学效应,例如免疫应答。在一些实施方案中,当确定序列同一性时,具有相同氢键模式的取代的核碱基被视为与未取代核碱基相同,例如,5mC可以被视为C[例如,具有5mC代替C的寡核苷酸(例如AT5mCG)被认为与在一个或多个相应位置具有C的寡核苷酸(例如ATCG)具有相同的碱基序列]。

[0095] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个A、T、C、G或U。在一些实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个任选地取代的A、T、C、G或U。在一些实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个5-甲基胞嘧啶(5mC)、5-羟甲基胞嘧啶、5-甲酰基胞嘧啶或5-羧基胞嘧啶。在一些实施方案中,寡核苷酸包含一个或多个5mC。在一些实施方案中,寡核苷酸中的每个核碱基独立地选自任选地取代的A、T、C、G和U,以及A、T、C、G和U的任选地取代的互变异构体。在一些实施方案中,寡核苷酸中的每个核碱基是独立地任选地受保护的A、T、C、5mC、G和U。在一些实施方案中,寡核苷酸中的每个核碱基是任选地取代的A、T、C、G或U。在一些实施方案中,寡核苷酸中的每个核碱基选自由A、T、C、G、U和5mC组成的组。

[0096] 在一些实施方案中,核碱基是任选地取代的2AP或DAP。在一些实施方案中,核碱基是任选地取代的2AP。在一些实施方案中,核碱基是任选地取代的DAP。在一些实施方案中,核碱基是2AP。在一些实施方案中,核碱基是DAP。

[0097] 在一些实施方案中,核碱基是天然核碱基或源自天然核碱基的修饰的核碱基。实例包括尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤(其任选地具有受酰基保护基团保护的它们各自的氨基基团)、2-氟尿嘧啶、2-氟胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、2,6-二氨基嘌

呤、氮杂胞嘧啶、嘧啶类似物(例如假异胞嘧啶和假尿嘧啶)以及其他修饰的核碱基(例如8-取代的嘌呤、黄嘌呤或次黄嘌呤(后两者是天然降解产物))。修饰的核碱基的某些例子在Chiu和Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048、Limbach等人Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196以及Revankar和Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol.7, 313中公开。

[0098] 在一些实施方案中,提供的寡核苷酸包含一个或更多个5-甲基胞嘧啶。在一些实施方案中,本公开提供了寡核苷酸,其碱基序列在本文中公开,例如在表1中,其中每个T可以独立地被U替代,反之亦然,并且每个胞嘧啶任选地并独立地被5-甲基胞嘧啶替代,反之亦然。如本领域技术人员所理解的,在一些实施方案中,相对于寡核苷酸的碱基序列,5mC可以被视为C,这种寡核苷酸在C位置处包含核碱基修饰(例如,参见表1或A2中的各种寡核苷酸)。在寡核苷酸的描述中,除非另有说明,核碱基、糖和核苷酸间连接键是未修饰的。

[0099] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是本领域(例如W02017/210647)中已知的修饰的核碱基。在一些实施方案中,修饰的核碱基是扩大尺寸的核碱基,其中已经添加了一个或更多个芳基和/或杂芳基环,例如苯环。

[0100] 在寡核苷酸合成过程中,可以保护核碱基。可获得各种保护技术,并且可以根据本公开进行利用。

[0101] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶、烷基或炔基取代的嘧啶、烷基取代的嘌呤或N-2、N-6和O-6取代的嘌呤。在某些实施方案中,修饰的核碱基选自2-氨基腺嘌呤、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-N-甲基鸟嘌呤、6-N-甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-CH₃)尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、5-核糖基尿嘧啶(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、8-氮杂和其他8-取代的嘌呤、5-卤代(特别是5-溴)、5-三氟甲基、5-卤尿嘧啶和5-卤胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤、3-脱氮腺嘌呤、6-N-苯甲酰基腺嘌呤、2-N-异丁酰基鸟嘌呤、4-N-苯甲酰基胞嘧啶、4-N-苯甲酰基尿嘧啶、5-甲基4-N-苯甲酰基胞嘧啶、5-甲基4-N-苯甲酰基尿嘧啶、通用的碱基、疏水的碱基、混杂的碱基、尺寸扩展的碱基和氟化的碱基。在一些实施方案中,修饰的核碱基是三环嘧啶,例如1,3-二氮杂吩噻嗪-2-酮、1,3-二氮杂吩噻嗪-2-酮或9-(2-氨基乙氧基)-1,3-二氮杂吩噻嗪-2-酮(G-clamp)。在一些实施方案中,修饰的核碱基是其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环替代的核碱基,例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶或2-吡啶酮。

[0102] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是取代的。在一些实施方案中,修饰的核碱基是取代的,使得其含有例如杂原子、烷基基团或连接到荧光部分、生物素或抗生物素蛋白部分或其他蛋白质或肽的连接部分。在一些实施方案中,修饰的核碱基是“通用的碱基”,其不是最经典意义上的核碱基,但其功能类似于核碱基。通用碱基的一个实例是3-硝基吡咯。

[0103] 在一些实施方案中,在提供的技术中可以利用的核苷包括修饰的核碱基和/或修饰的糖,例如4-乙酰胞苷;5-(羧基羟甲基)尿苷;2'-O-甲基胞苷;5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷;5-羧甲基氨基甲基胞苷;二氢尿苷;2'-O-甲基假尿苷;β,D-半乳糖基腺苷(beta, D-galactosylqueosine);2'-O-甲基鸟苷;N⁶-异戊烯基腺苷;1-甲基腺苷;1-甲基假尿苷;1-

甲基鸟苷;1-甲基肌苷;2,2-二甲基鸟苷;2-甲基腺苷;2-甲基鸟苷; N^7 -甲基鸟苷;3-甲基-胞苷;5-甲基胞苷;5-羟甲基胞苷;5-甲酰基胞嘧啶;5-羧基胞嘧啶; N^6 -甲基腺苷;7-甲基鸟苷;5-甲氨基乙基尿苷;5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿苷; β ,D-甘露糖基腺苷(beta,D-mannosylqueosine);5-甲氧羰基甲基尿苷;5-甲氧羰基尿苷;2-甲硫基- N^6 -异戊烯基腺苷; N -(9- β ,D-呋喃核糖基-2-甲硫基嘌呤-6-基)氨甲酰基)苏氨酸; N -(9- β ,D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)- N -甲基氨甲酰基)苏氨酸;尿苷-5-氧乙酸甲酯;尿苷-5-氧乙酸(v);假尿苷;腺苷(queosine);2-硫胞苷;5-甲基-2-硫尿苷;2-硫尿苷;4-硫尿苷;5-甲基尿苷;2'-0-甲基-5-甲基尿苷;和2'-0-甲基尿苷。

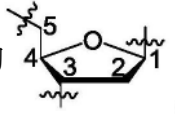
[0104] 在一些实施方案中,核碱基(例如修饰的核碱基)包含一个或多个生物分子结合部分,例如抗体、抗体片段、生物素、亲和素、链霉亲和素、受体配体或螯合部分。在其他实施方案中,核碱基是5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶或2,6-二氨基嘌呤。在一些实施方案中,核碱基包含用荧光或生物分子结合部分的取代。在一些实施方案中,取代基是荧光部分。在一些实施方案中,取代基是生物素或亲和素。

[0105] 在一些实施方案中,核碱基描述在US 9394333、US 9744183、US 9605019、US 9598458、US 9982257、US10160969、US10479995、US2020/0056173、US2018/0216107、US2019/0127733、US10450568、US2019/0077817、US2019/0249173、US2019/0375774、WO 2018/223056、WO 2018/223073、WO 2018/223081、WO 2018/237194、WO 2019/032607、WO 2019/055951、WO 2019/075357、WO 2019/200185、WO 2019/217784和/或WO 2019/032612中,其每个的核碱基都通过引用纳入本文。

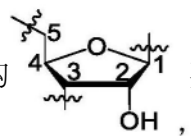
[0106] 糖

[0107] 各种糖(包括修饰的糖)可以根据本公开进行利用。在一些实施方案中,本公开提供任选地与其他结构元件(例如,碱基修饰及其模式,核苷酸间连接键修饰及其模式等)结合的糖修饰及其模式,当掺入寡核苷酸时可以提供改进的性质和/或活性。

[0108] 最常见的天然存在的核苷包括连接至核碱基腺苷(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)的核糖糖类(例如,在RNA中)或脱氧核糖糖类(例如,在DNA中)。在一些实施方案中,糖,例如表1中许多寡核苷酸中的各种糖(除非另有说明),是天然DNA糖(在

DNA核酸或寡核苷酸中,其具有结构  其中核碱基附接至1'位置,并且3'和5'位

置连接至核苷酸间连接键(如本领域技术人员所理解的,如果在寡核苷酸的5'端,则5'位置可以连接至5'末端基团(例如,-OH),并且如果在寡核苷酸的3'端,则3'位置可以连接至3'末端基团(例如,-OH))。在一些实施方案中,糖是天然RNA糖(在RNA核酸或寡核苷酸中,其具

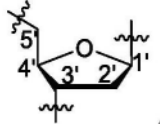
有结构  其中核碱基附接至1'位置,并且3'和5'位置连接至核苷酸间连接键(如

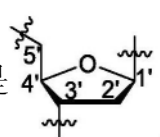
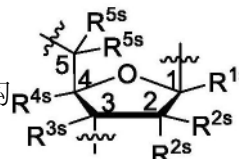
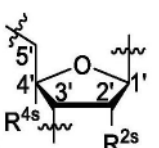
本领域技术人员所理解的,如果在寡核苷酸的5'端,则5'位置可以连接至5'末端基团(例如,-OH),并且如果在寡核苷酸的3'端,则3'位置可以连接至3'末端基团(例如,-OH))。在一些实施方案中,糖是修饰的糖,因为它不是天然DNA糖或天然RNA糖。除其他外,修饰的糖可以提供改进的稳定性和/或亲和力。在一些实施方案中,修饰的糖可以用来改变和/或优化

一种或多种杂交特性。在一些实施方案中,修饰的糖可以用来改变和/或优化靶标识别。在一些实施方案中,修饰的糖可以用来优化 T_m 。在一些实施方案中,修饰的糖可以用来改善寡核苷酸活性。

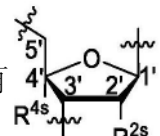
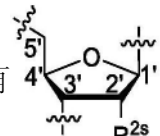
[0109] 糖可以在不同位置结合至核苷酸间连接键。作为非限制性实例,核苷酸间连接键可以键合至糖的2'、3'、4'或5'位置。如天然核酸中最常见的,除非另有说明,核苷酸间连接键通常在5'位置与一个糖连接并且在3'位置与另一个糖连接。

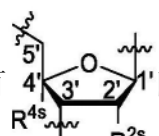
[0110] 在一些实施方案中,糖是任选地取代的天然DNA或RNA糖。在一些实施方案中,糖是

任选地取代的  在一些实施例中,2'位置是任选地取代的。在一些实施方案中,糖

是  在一些实施方案中,糖具有结构  或  其中 R^{1s} 、 R^{2s} 、

R^{3s} 、 R^{4s} 和 R^{5s} 中的每一个为独立地-H、合适的取代基或合适的糖修饰(例如在US 9394333、US 9744183、US 9605019、US 9982257、US20170037399、US20180216108、US20180216107、US 9598458、WO 2017/062862、WO 2018/067973、WO 2017/160741、WO 2017/192679、WO 2017/210647、WO 2018/098264、WO 2018/022473、WO 2018/223056、WO 2018/223073、WO 2018/223081、WO 2018/237194、WO 2019/032607、WO2019/032612、WO 2019/055951和/或WO 2019/075357中描述的那些、上述的每个中的取代基、糖修饰、 R^{1s} 、 R^{2s} 、 R^{3s} 、 R^{4s} 和 R^{5s} 的描述以及修饰的糖通过引用独立纳入本文)。在一些实施方案中, R^{1s} 、 R^{2s} 、 R^{3s} 、 R^{4s} 和 R^{5s} 中的每一个独立地为-F、-Cl、-Br、-I、-CN、-N₃、-NO、-NO₂、-L^s-R'、-L^s-OR'、-L^s-SR'、-L^s-N(R')₂、-O-L^s-OR'、-O-L^s-SR'或-O-L^s-N(R')₂,其中每个R'独立地为H或的选自以下的任选地取代的基团:C₁₋₁₀脂肪族、C₆₋₁₄芳基、具有1-5个杂原子的C₁₋₁₀杂脂肪族、具有1-5个杂原子的5-10元杂芳基和具有1-4个杂原子的3-10元杂环基,或者两个或更多个R'基团与它们的居间原子一起形成除了居间原子之外还具有0-5个杂原子的3-10元环。如本文所述独立地,L^s是具有1-4个杂原子的共价键或任选地取代的二价的C₁₋₆脂肪族或杂脂肪族。在一些实施方案中,糖

具有  的结构。在一些实施方案中, R^{4s} 为-H。在一些实施方案中,糖具有  的结构,其中 R^{2s} 为-H、卤素或-OR,其中R为任选地取代的C₁₋₆脂肪族。在一些实施方案中, R^{2s} 为-H。在一些实施方案中, R^{2s} 为-F。在一些实施方案中, R^{2s} 为-OMe。在一些实施方案中, R^{2s}

为-OCH₂CH₂OMe。在一些实施方案中,糖具有  的结构,其中 R^{2s} 和 R^{4s} 一起形成-L^s-

其中L^s是共价键或具有1-4个杂原子的任选地取代的二价C₁₋₆脂肪族或杂脂肪族。在一些实施方案中,每个杂原子独立地选自氮、氧或硫。在一些实施方案中,L^s为任选地取代的C2-O-CH₂-C4。在一些实施方案中,L^s为C2-O-CH₂-C4。在一些实施方案中, R^s 为C2-O-(R)-CH

(CH₂CH₃)-C₄。在一些实施方案中,R^s为C₂-O-(S)-CH(CH₂CH₃)-C₄。

[0111] 在一些实施方案中,修饰的糖在2'位置处含有一个或更多个取代基(通常是一个取代基,并且通常在轴向位置或R^{2s}处),独立地选自-F;-CF₃;-CN;-N₃;-NO;-NO₂;-OR'-SR'或-N(R')₂,其中每个R'在本公开中独立地描述,并且在一些实施方案中,任选地取代的C₁₋₁₀脂肪族;-O-(C₁-C₁₀烷基)、-S-(C₁-C₁₀烷基)、-NH-(C₁-C₁₀烷基)、或-N(C₁-C₁₀烷基)₂;-O-(C₂-C₁₀烯基)、-S-(C₂-C₁₀烯基)、-NH-(C₂-C₁₀烯基)、或-N(C₂-C₁₀烯基)₂;-O-(C₂-C₁₀炔基)、-S-(C₂-C₁₀炔基)、-NH-(C₂-C₁₀炔基)、或-N(C₂-C₁₀炔基)₂;或-O-(C₁-C₁₀亚烷基)-O-(C₁-C₁₀烷基)、-O-(C₁-C₁₀亚烷基)-NH-(C₁-C₁₀烷基)或-O-(C₁-C₁₀亚烷基)-NH(C₁-C₁₀烷基)₂;-NH-(C₁-C₁₀亚烷基)-O-(C₁-C₁₀烷基)、或-N(C₁-C₁₀烷基)-(C₁-C₁₀亚烷基)-O-(C₁-C₁₀烷基),其中烷基、亚烷基、烯基和炔基中的每一个是独立地且任选地取代的。在一些实施方案中,取代基是-O(CH₂)_nOCH₃、-O(CH₂)_nNH₂、MOE、DMAOE或DMAEOE,其中n是从1至约10。

[0112] 在一些实施方案中,修饰的糖是天然RNA糖,其的2'-OH被选自-F;-CF₃;-CN;-N₃;-NO;-NO₂;-OR'-SR'或-N(R')₂的基团替代,其中每个R'在本公开中独立地被描述;-O-(C₁-C₁₀烷基)、-S-(C₁-C₁₀烷基)、-NH-(C₁-C₁₀烷基)、或-N(C₁-C₁₀烷基)₂;-O-(C₂-C₁₀烯基)、-S-(C₂-C₁₀烯基)、-NH-(C₂-C₁₀烯基)、或-N(C₂-C₁₀烯基)₂;-O-(C₂-C₁₀炔基)、-S-(C₂-C₁₀炔基)、-NH-(C₂-C₁₀炔基)、或-N(C₂-C₁₀炔基)₂;或-O--(C₁-C₁₀亚烷基)-O--(C₁-C₁₀烷基)、-O-(C₁-C₁₀亚烷基)-NH-(C₁-C₁₀烷基)或-O-(C₁-C₁₀亚烷基)-NH(C₁-C₁₀烷基)₂;-NH-(C₁-C₁₀亚烷基)-O-(C₁-C₁₀烷基)、或-N(C₁-C₁₀烷基)-(C₁-C₁₀亚烷基)-O-(C₁-C₁₀烷基),其中烷基、亚烷基、烯基和炔基中的每一个是独立地且任选地取代的。在一些实施方案中,2'-OH被-H替代(脱氧核糖)。在一些实施方案中,2'-OH被-F替代。在一些实施方案中,2'-OH被-OR'替代。在一些实施方案中,2'-OH被-OMe替代。在一些实施方案中,2'-OH被-OCH₂CH₂OMe替代。

[0113] 在一些实施方案中,糖修饰是2'-修饰。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-OR^s修饰。在一些实施方案中,R^s为任选地取代的C₁₋₄脂肪族。在一些实施方案中,R^s为任选地取代的C₁₋₆烷基。在一些实施方案中,修饰是2'-OMe。在一些实施方案中,修饰是2'-MOE。在一些实施方案中,2'-修饰是S-cEt。在一些实施方案中,修饰的糖是LNA糖。在一些实施方案中,2'-修饰是-F。

[0114] 在一些实施方案中,糖修饰用另一个环或无环部分替代糖部分。此类部分的实例在本领域中是众所周知的,例如吗啉代、乙二醇核酸、PNA等中的那些,并且可以根据本公开进行利用。

[0115] 在一些实施方案中,寡核苷酸的一个或更多个糖是独立地修饰的。在一些实施方案中,寡核苷酸或其一部分(例如翼)的每个糖是独立地修饰的。在一些实施方案中,修饰的糖包含2'-修饰。在一些实施方案中,每个修饰的糖独立地包含2'-修饰。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-OR^s,其中R^s是任选地取代的C₁₋₆脂肪族。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-OMe修饰。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-MOE修饰。在一些实施方案中,2'-修饰是LNA糖修饰。在一些实施方案中,2'-修饰是2'-F。在一些实施方案中,每个糖修饰是独立地2'-修饰。在一些实施方案中,每个糖修饰是独立地2'-OR^s修饰。在一些实施方案中,每个糖修饰是独立地2'-OR^s,其中R^s是任选地取代的C₁₋₆烷基。在一些实施方案中,每个糖修饰是2'-OMe。在一些实施方案中,每个糖修饰是2'-MOE。在一些实施方案中,每个糖修饰独立地是2'-OMe或2'-MOE。在一些实施方案中,每个糖修饰独立地是2'-OMe、2'-MOE或LNA糖。如本领域

域技术人员将了解的那样,糖、核碱基、核苷酸间连接键等的修饰可以并且经常在寡核苷酸中组合利用,例如参见表1中的各种寡核苷酸。

[0116] 在一些实施方案中,糖是描述在US 9394333、US 9744183、US 9605019、US 9598458、US 9982257、US10160969、US10479995、US2020/0056173、US2018/0216107、US2019/0127733、US10450568、US2019/0077817、US2019/0249173、US2019/0375774、WO 2018/223056、WO 2018/223073、WO 2018/223081、WO 2018/237194、WO 2019/032607、WO 2019/055951、WO 2019/075357、WO 2019/200185、WO 2019/217784和/或WO 2019/032612中的糖,其每个的糖都通过引用纳入本文。

[0117] 本领域中已知用于制备寡核苷酸或其类似物的各种另外的糖,并且可以根据本公开进行利用。

[0118] 核苷酸间连接键

[0119] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含碱基修饰、糖修饰和/或核苷酸间连接键修饰。根据本公开,可以利用各种核苷酸间连接键来连接包含核碱基的单元,例如核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸包含一个或更多个修饰的核苷酸间连接键以及一个或更多个天然磷酸酯连接键两者。如本领域技术人员所众所周知的,天然磷酸酯连接键广泛存在于天然DNA和RNA分子中;它们具有 $-OP(O)(OH)O^-$ 的结构,连接DNA和RNA中核苷中的糖,并且可能以各种盐形式存在,例如,在生理pH(约7.4)下,天然磷酸酯连接键主要以带有阴离子 $-OP(O)(O^-)O^-$ 的盐形式存在。修饰的核苷酸间连接键或非天然磷酸酯连接键是指不是天然磷酸酯连接键或其盐形式的核苷酸间连接键。基于它们的结构,修饰的核苷酸间连接键也可以是盐形式的。例如,如本领域技术人员所理解的,具有 $-OP(O)(SH)O^-$ 的结构的硫代磷酸酯核苷酸间连接键可以是各种盐形式的,例如在生理pH(约7.4)下,带有阴离子 $-OP(O)(S^-)O^-$ 。

[0120] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含核苷酸间连接键,其是修饰的核苷酸间连接键,例如硫代磷酸酯(phosphorothioate)、二硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、氨基磷酸盐(phosphoroamidate)、硫代磷酸盐(thiophosphate)、3'-硫代磷酸盐或5'-硫代磷酸盐。

[0121] 在一些实施方案中,核苷酸间连接键在US 9394333、US 9744183、US 9605019、US 9598458、US 9982257、US10160969、US10479995、US2020/0056173、US2018/0216107、US2019/0127733、US10450568、US2019/0077817、US2019/0249173、US2019/0375774、WO 2018/223056、WO 2018/223073、WO 2018/223081、WO 2018/237194、WO 2019/032607、WO 2019/055951、WO 2019/075357、WO 2019/200185、WO 2019/217784和/或WO 2019/032612中描述,其每个中的核苷酸间连接键都通过引用纳入本文。

[0122] 在一些实施方案中,核苷酸间连接键是在美国专利号3687808、4469863、4476301、5177195、5023243、5034506、5166315、5185444、5188897、5214134、5216141、5235033、5264423、5264564、5276019、5278302、5286717、5321131、5399676、5405938、5405939、5434257、5453496、5455233、5466677、5466677、5470967、5476925、5489677、5519126、5536821、5541307、5541316、5550111、5561225、5563253、5571799、5587361、5596086、5602240、5608046、5610289、5618704、5623070、5625050、5633360、564562、5663312、5677437、5677439、6160109、6239265、6028188、6124445、6169170、6172209、6277603、6326199、6346614、6444423、6531590、6534639、6608035、6683167、6858715、6867294、6878805、7015315、7041816、7273933、7321029或RE39464中描述的,其每个中的核苷酸间连

接键都通过引用纳入本文。

[0123] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含一个或更多个修饰的核苷酸间连接键。在一些实施方案中,每个修饰的核苷酸间连接键独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,寡核苷酸中所有核苷酸间连接键的一个或更多个,例如约1-20、1-15、1-10或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或约10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多,独立地为硫代磷酸酯核苷酸间连接键核苷酸间连接键。在一些实施方案中,所有核苷酸间连接键中约10%或更多独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,所有核苷酸间连接键中约25%或更多独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,所有核苷酸间连接键中约50%或更多独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,所有核苷酸间连接键中约60%或更多独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,所有核苷酸间连接键中约70%或更多独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,所有核苷酸间连接键中约75%或更多独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,所有核苷酸间连接键中约80%或更多独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,所有核苷酸间连接键中约85%或更多独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,所有核苷酸间连接键中约90%或更多独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,所有核苷酸间连接键中约95%或更多独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,与天然DNA糖键合的每个核苷酸间键独立地是硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸中的每个连接键是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,寡核苷酸中的每个核苷酸间键独立地是硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施方案中,寡核苷酸包含一个或更多个天然磷酸酯连接键。在一些实施方案中,每个天然磷酸酯连接键独立地键合至至少一个修饰的糖。在一些实施方案中,键合至天然磷酸酯连接键的每个糖独立地是修饰的糖。在一些实施方案中,键合至天然磷酸酯连接键的每个糖独立地是2'-OR^s修饰的糖或双环糖(例如LNA糖)。在一些实施方案中,键合至天然磷酸酯连接键的每个糖独立地是2'-OR^s修饰的糖。在一些实施方案中,键合至天然磷酸酯连接键的每个糖独立地是2'-MOE修饰的糖。

[0124] 翼和核心

[0125] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含5'-翼-核心-翼-3'结构或由5'-翼-核心-翼-3'结构组成。

[0126] 翼和核心可以独立地具有各种合适的长度。在一些实施方案中,在翼或核心中独立地存在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或更多个核碱基。在一些实施方案中,每个核碱基独立地包含任选地取代的单环、双环或多环的环,其具有至少一个氮环原子;在一些实施方案中,每个核碱基独立地为任选地取代的A、T、C、G或U,或A、T、C、G或U的取代的互变异构体。在一些实施方案中,翼中的核碱基的数量为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施方案中,翼的所述数量为1。在一些实施方案中,翼的所述数量为2。在一些实施方案中,翼的所述数量为3。在一些实施方案中,翼的所述数量为4。在一些实施方案中,翼的所述数量为5。在一些实施方案中,翼的所述数量为6。在一些实施方案中,翼的所述数量为7。在一些实施方案中,翼的所述数量为8。在一些实施方案中,翼的所述数量为9。在一些实施方案中,翼的所述数量为10。在一些实施方案中,在翼-核心-翼结

构的翼中,两个翼具有相同的长度。在一些实施方案中,两个翼的长度不同。在一些实施方案中,核心的所述数量为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多。在一些实施方案中,核心的所述数量为5-15,例如约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15。在一些实施方案中,核心的所述数量为1。在一些实施方案中,核心的所述数量为2。在一些实施方案中,核心的所述数量为3。在一些实施方案中,核心的所述数量为4。在一些实施方案中,核心的所述数量为5。在一些实施方案中,核心的所述数量为6。在一些实施方案中,核心的所述数量为7。在一些实施方案中,核心的所述数量为8。在一些实施方案中,核心的所述数量为9。在一些实施方案中,核心的所述数量为10。在一些实施方案中,核心的所述数量为11。在一些实施方案中,核心的所述数量为12。在一些实施方案中,核心的所述数量为13。在一些实施方案中,核心的所述数量为14。在一些实施方案中,核心的所述数量为15。

[0127] 在一些实施方案中,翼-核心-翼被描述为“X-Y-Z”,其中“X”表示5'翼的长度(作为核碱基的数量)，“Y”表示核心的长度(作为核碱基的数量)，“Z”表示3'翼的长度(作为核碱基的数量)。X、Y和Z的实例实施方案包括描述为数字(例如,上文)并以寡核苷酸种类(例如,表1)为例的那些长度。在一些实施方案中,两个翼具有相同或不同的长度和/或具有相同或不同的修饰或修饰的模式。在一些实施方案中,Y在8和15之间。在一些实施方案中,X、Y或Z可以各自独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30或更多。在一些实施方案中,X、Y和Z中的每一个独立地为1-30。在一些实施方案中,X-Z-Z是5-10-5、5-10-4、4-10-4、4-10-3、3-10-3、2-10-2、5-9-5、5-9-4、4-9-5、5-8-5、5-8-4、4-8-5、5-7-5、4-7-5、5-7-4或4-7-4。

[0128] 在一些实施方案中,翼包含一个或更多个糖修饰。在一些实施方案中,翼中的每个糖是独立地修饰的。在一些实施方案中,寡核苷酸中的每个翼糖是独立地修饰的。在一些实施方案中,每个修饰的糖独立地包含2'-修饰(例如,2'-OR^s修饰的糖、LNA糖等)。在一些实施方案中,每个翼糖独立地是2'-OR^s修饰的糖。在一些实施方案中,翼中的每个糖修饰是相同的。在一些实施方案中,翼包含不同的糖修饰,例如不同的2'-OR^s修饰。在一些实施方案中,2'-OR^s是2'-OMe。在一些实施方案中,2'-OR^s是2'-MOE。在一些实施方案中,翼中的每个糖是2'-MOE修饰的糖。在一些实施方案中,翼中的每个糖是2'-OMe修饰的糖。在一些实施方案中,翼包含一个或更多个2'-OMe修饰的糖和一个或更多个2'-MOE修饰的糖。

[0129] 在一些实施方案中,翼-核心-翼结构的两个翼包含不同的糖修饰或其模式。

[0130] 在一些实施方案中,在某些条件下,某些糖修饰(例如2'-MOE)比其他糖修饰(例如2'-OMe或天然DNA或RNA糖)提供更高的稳定性。

[0131] 在一些实施方案中,翼包含双环糖。在一些实施方案中,双环糖是LNA、cEt或BNA糖。

[0132] 在一些实施方案中,键合至5'-翼糖的一个或更多个核苷酸间连接键是各自独立地修饰的核苷酸间连接键。在一些实施方案中,它们各自独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,键合至5'-翼糖的每个核苷酸间连接键独立地是修饰的核苷酸间连接键。在一些实施方案中,每个这样的核苷酸间连接键独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

[0133] 在一些实施方案中,键合至3'-翼糖的一个或更多个核苷酸间连接键是各自独立地修饰的核苷酸间连接键。在一些实施方案中,它们各自独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连

接键。在一些实施方案中,键合至3'-翼糖的每个核苷酸间连接键独立地是修饰的核苷酸间连接键。在一些实施方案中,每个这样的核苷酸间连接键独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

[0134] 在一些实施方案中,核心包含一个或更多个,例如约1-20、5-20、6-20、7-20、8-20、9-20、10-20或5-15个,或者约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含2个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含3个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含4个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含5个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含6个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含7个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含8个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含9个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含10个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含11个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含12个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含13个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含14个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,核心包含15个或更多个天然DNA糖。在一些实施方案中,这种DNA糖是连续的。在一些实施方案中,核心中的每个糖独立地是天然DNA糖。

[0135] 在一些实施方案中,键合至核心糖的一个或更多个核苷酸间连接键各自独立地是修饰的核苷酸间连接键。在一些实施方案中,它们各自独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。在一些实施方案中,键合至核心糖的每个核苷酸间连接键独立地是修饰的核苷酸间连接键。在一些实施方案中,每个这样的核苷酸间连接键独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

[0136] 在一些实施方案中,核心能够与靶mRNA杂交,形成可被RNA酶H(RNase H)识别的双链体结构,使得RNA酶H能够切割mRNA。

[0137] 寡核苷酸

[0138] 除其他事项外,本公开提供了各种寡核苷酸。如本文所述,寡核苷酸可以含有各种核碱基修饰、糖修饰、核苷酸间连接键和其模式。在一些实施方案中,本公开提供了表1中的寡核苷酸作为实例。

[0140]

[illegible]

[0141]

[illegible]

[0142]

[illegible]

[0143]

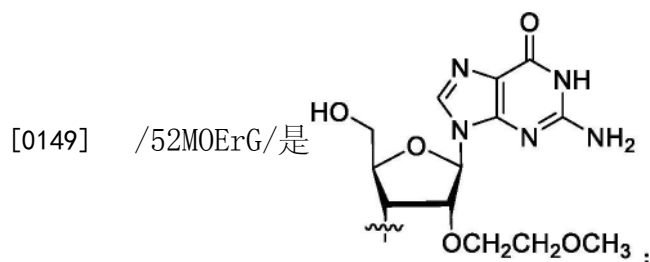
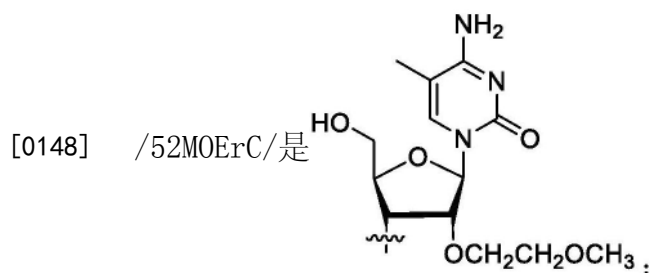
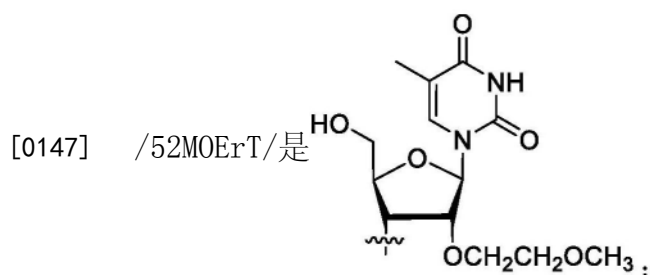
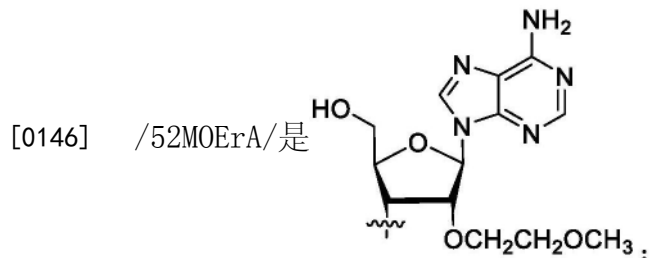
58	GCCTGACACCTGCCTCAGTC	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*A*iMe-dC/*A*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErC/
59	GGTGCCAGTGCTAGGTTCTC	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*iMe-dC/*A*G*T*G*iMe-dC/*T*A*G*G*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/
60	GCCTGGTCCCTCTCTGAGCC	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*G*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/
61	AGCAGCCAGCAGTCACCTGT	/52MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*A*G*T*iMe-dC/*A*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/
62	GGAGCAGTGGGTTCCTTTGG	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*A*G*T*G*G*G*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/
63	GGCTGGAGGCACCATCACCC	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*G*A*G*G*iMe-dC/*A*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/
64	GCTCTGTGGCCCTGGTATGC	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErT/*G*T*G*G*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*G*i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/
65	CCTTGCCCTGCTCCTGATGT	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/
66	GTCCCTTGTCCTCTCAGGCC	/52MOErG/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*T*G*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/
67	GCAGTTCTCTCTCTCTGGCTCC	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErT/*T*G*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/
68	AGGAGCCAGCCCTGAGCAG	/52MOErA/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/
69	GCTCTCCACCATCCAGGCCA	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErT/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*A*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/
70	GTTCCCTGCCTCTACCTCCC	/52MOErG/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/
71	GCTCAGGTCAGGCAGTGGTT	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*G*G*T*G*iMe-dC/*A*G*G*iMe-dC/*A*G*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/
72	GCTCCTCCCTGCTGG	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/

[0144]

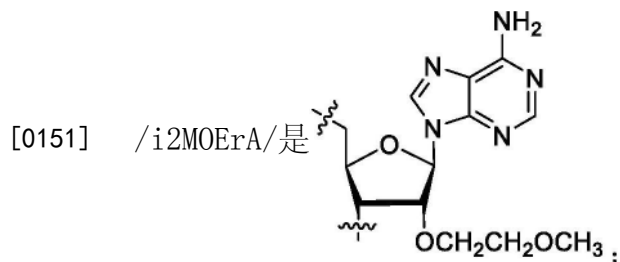
	TGATC	dC/*T*G*/i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErC/
73	GCTGGCCCTGGACTC TTCTT	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*G*A*/iMe- dC/*T*/iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErT/
74	CCCACCCCTCCATCTG TGCAg	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*/iMe-dC/*iMe- dC/*A*T*/iMe-dC/*T*G*/i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/
75	TCCTGCTTTTCCAC TGGCT	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*iMe-dC/*T*G*G*/iMe-dC/*iMe-dC/*iMe- dC/*A*/iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/
76	AGCCCTTGAGTGTG GGTCCA	/52MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*T*G*A*G*T*G*G*/i2MOErG/*i2MO ErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/
77	TCCAGCTCTGTGCCT CTAGT	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*iMe-dC/*T*G*G*G*/iMe- dC/*iMe-dC/*T*G*G*/i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErT/
78	CTGTCCACCTTCACC CTGCC	/52MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*iMe-dC/*A*/iMe-dC/*iMe- dC/*A*/iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/
79	GCCCTCTGTGGCCTT CCCTG	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*iMe-dC/*T*G*G*G*/iMe-dC/*iMe- dC/*T*G*G*/i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/
80	GCCTTAGACCTGCCC TCCTC	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*A*G*A*/iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*G*/iMe- dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/

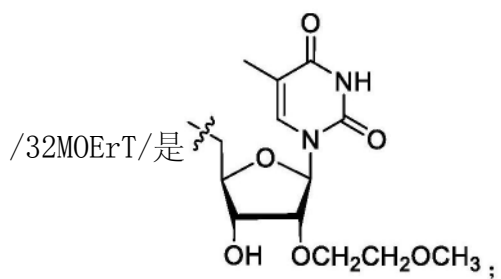
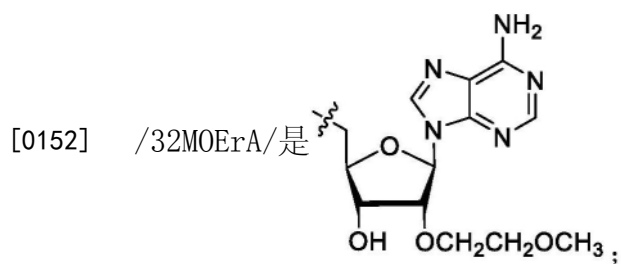
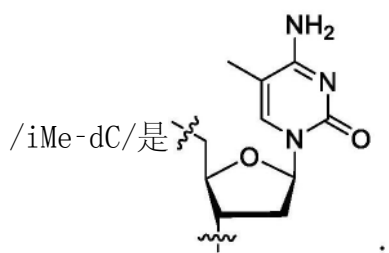
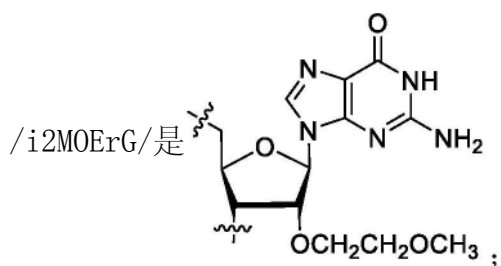
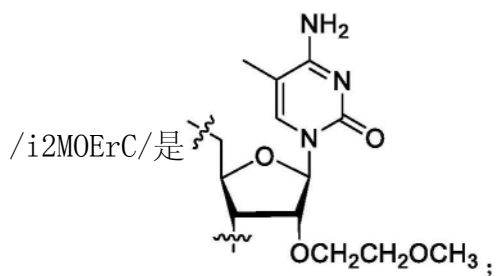
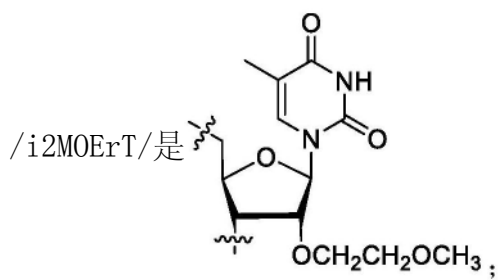
[0145] 注意:除非另有说明,寡核苷酸的描述是从5'至3'。如本领域技术人员所理解的,核苷酸间连接键连接了糖的5'和3'位置。除非另有说明(例如,用“*”表示硫代磷酸酯核苷

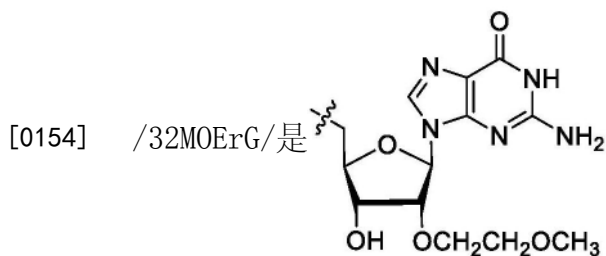
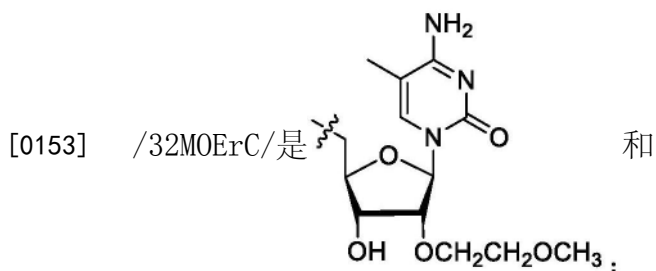
酸间连接键),核苷酸间连接键是天然的磷酸酯连接键。除非另有说明,A、T、C和G中的每一个分别独立地是(例如,通常在天然DNA中发现的)脱氧腺苷、胸苷、脱氧胞苷和脱氧鸟苷。“2MOEr”表示对糖的2'-MOE修饰;“5”表示核苷具有5'-OH基团(例如,当在寡核苷酸的5'末端处);“3”表示核苷具有3'-OH基团(例如,当在寡核苷酸的3'末端处);“i”表示核苷在寡核苷酸的中部,其5'和3'位置键合至所示的核苷酸间连接键;“Me-dC”表示5-甲基-2'-脱氧胞苷核苷。如本领域技术人员所理解的,寡核苷酸可以以各种形式(包括各种盐形式)存在。



[0150] *是-O-P(O)(SH)-O-;







在一些实施方案中,提供的寡核苷酸能够与钙蛋白酶-2转录物杂交。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸可以降低钙蛋白酶-2转录物或其产物的水平。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸可以降低钙蛋白酶-2mRNA的水平。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸可以降低钙蛋白酶-2多肽的水平。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸可以降低在系统(例如样品、受试者等)中观察到的钙蛋白酶-2多肽的活性水平。在一些实施方案中,寡核苷酸选自表1。在一些实施方案中,寡核苷酸是选自表1的寡核苷酸的药学上可接受的盐。

[0155] 在一些实施方案中,本公开提供了在降低钙蛋白酶-2转录物、多肽和/或活性水平方面特别有效的寡核苷酸。

[0156] 在一些实施方案中,寡核苷酸具有/52MOErA/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*T*T*T/iMe-dC/*T*G*T*A*G*G/i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErC/或其盐的结构。

[0157] 在一些实施方案中,寡核苷酸具有/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT*A*/iMe-dC/*T*G*G*T*T*/iMe-dC/*A*G*/i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErA/*32MOErT/或其盐的结构。

[0158] 在一些实施方案中,寡核苷酸具有/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*G*G*T*/iMe-dC/*A*G*G*/iMe-dC/*A*G*/i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErT/*32MOErT/或其盐的结构。

[0159] 在一些实施方案中,寡核苷酸具有/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*T*T*G*/iMe-dC/*A*/i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*32MOErT/或其盐的结构。

[0160] 在一些实施方案中,寡核苷酸具有/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*iMe-dC/*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*/iMe-dC/*iMe-dC/*T*/i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErT/或其盐的结构。

[0161] 在一些实施方案中,本公开提供了包含提供的寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,寡核苷酸组合物包含提供的寡核苷酸或其盐,以及各种非对映异构体和其盐。在一些实施方案中,寡核苷酸组合物包含提供的寡核苷酸或其盐,以及相对于手性连接键的磷和其盐的各种非对映异构体。在一些实施方案中,寡核苷酸可以一种或多种形式存在。在一些

实施方案中,组合物中的寡核苷酸以盐形式存在。在一些实施方案中,组合物中的寡核苷酸以一种或多种盐形式存在。在一些实施方案中,盐形式是药学上可接受的盐形式。在一些实施方案中,盐形式是金属盐。在一些实施方案中,盐形式是碱金属盐。在一些实施方案中,盐形式是钠盐。在一些实施方案中,盐形式是钾盐。在一些实施方案中,盐形式是钙盐。在一些实施方案中,盐形式是铵盐形式(例如, $N(R')_3$,其中 R' 如本文所述;在一些实施方案中,每个 R' 独立地是-H或任选地取代的 C_{1-6} 烷基)。在一些实施方案中,寡核苷酸组合物是液体组合物,其中寡核苷酸溶解在溶液中。在一些实施方案中,溶液是缓冲液。在一些实施方案中,溶液是缓冲盐水。在一些实施方案中,在组合物中,酸性的核苷酸间连接键,例如天然磷酸酯连接键,硫代磷酸酯核苷酸间连接键,例如独立地以阴离子形式存在和组合物包含一种或多种类型的阳离子,例如 Na^+ 、 K^+ 等。

[0162] 另外的化学部分

[0163] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含一个或更多个另外的化学部分。本领域已知各种另外的化学部分,例如靶向部分、碳水化合物部分、脂质部分等,并且可以根据本公开进行利用,以调节寡核苷酸的性质和/或活性,例如稳定性、半衰期、活性、递送、药效学性质、药代动力学性质等。在一些实施方案中,某些另外的化学部分有助于将寡核苷酸递送至期望的细胞、组织和/或器官,包括但不限于中枢神经系统的细胞。在一些实施方案中,某些另外的化学部分促进寡核苷酸的内化。在一些实施方案中,某些另外的化学部分增加寡核苷酸稳定性。在一些实施方案中,本公开提供了用于将各种另外的化学部分掺入寡核苷酸中的技术。

[0164] 某些有用的附加的化学部分描述在US 9394333、US 9744183、US 9605019、US 9598458、US 9982257、US10160969、US10479995、US2020/0056173、US2018/0216107、US2019/0127733、US10450568、US2019/0077817、US2019/0249173、US2019/0375774、WO 2018/223056、WO 2018/223073、WO 2018/223081、WO 2018/237194、WO 2019/032607、WO 2019/055951、WO 2019/075357、WO 2019/200185、WO 2019/217784和/或WO 2019/032612中,其每个中的另外的化学部分都通过引用纳入本文。

[0165] 制备

[0166] 本领域中可获得各种技术以制备所提供的寡核苷酸,并且可以根据本公开进行利用。例如,在一些实施方案中,使用亚磷酰胺在固体载体(support)上制备寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸是在溶液中制备的。在一些实施方案中,寡核苷酸的制备包含多个循环,在每个循环中添加一个或更多个核苷单元,通常是一个。在一些实施方案中,循环包括亚磷酰胺的偶联、封闭未反应的5'-OH基团、修饰(例如硫化)和/或在新偶联的核苷中去封闭保护的5'-OH基团。在一些实施方案中,当达到一定长度的寡核苷酸时,可以在循环结束时进行修饰。

[0167] 用于制备寡核苷酸的某些技术描述在US 3687808、US 4469863、US 4476301、US 5177195、US 5023243、US 5034506、US 5166315、US 5185444、US 5188897、US 5214134、US 5216141、US 5235033、US 5264423、US 5264564、US 5276019、US 5278302、US 5286717、US 5321131、US 5399676、US 5405938、US 5405939、US 5434257、US 5453496、US 5455233、US 5466677、US 5466677、US 5470967、US 5476925、US 5489677、US 5519126、US 5536821、US 5541307、US 5541316、US 5550111、US 5561225、US 5563253、US 5571799、US 5587361、US

5596086、US 5602240、US 5608046、US 5610289、US 5618704、US 5623070、US 5625050、US 5633360、US 564562、US 5663312、US 5677437、US 5677439、US 6160109、US 6239265、US 6028188、US 6124445、US 6169170、US 6172209、US 6277603、US 6326199、US 6346614、US 6444423、US 6531590、US 6534639、US 6608035、US 6683167、US 6858715、US 6867294、US 6878805、US 7015315、US 7041816、US 7273933、US 7321029、US RE39464、US 9394333、US 9744183、US 9605019、US 9598458、US 9982257、US10160969、US10479995、US 2020/0056173、US2018/0216107、US2019/0127733、US10450568、US2019/0077817、US2019/0249173、US2019/0375774、WO 2018/223056、WO 2018/223073、WO 2018/223081、WO 2018/237194、WO 2019/032607、WO 2019/055951、WO 2019/075357、WO 2019/200185、WO 2019/217784或WO 2019/032612中。

[0168] 在一些实施方案中,寡核苷酸和/或组合物作为相对于手性连接键的磷的立体无规组合物提供。例如,当使用包含N,N-二异丙胺基和2-氰乙氧基基团的传统亚磷酰胺进行寡核苷酸合成时,可以无立体选择性或低立体选择性地形成手性连接键。在一些实施方案中,寡核苷酸作为各种非对映异构体和/或其盐的混合物提供。在一些实施方案中,组合物包含寡核苷酸和/或其相对于手性连接键的磷的一个或更多个或全部的非对映异构体。在一些实施方案中,寡核苷酸和/或它的非对映异构体以一种或多种形式独立地存在。在一些实施方案中,寡核苷酸和/或它的非对映异构体以一种或多种盐形式(例如,一种或多种药学上可接受的盐形式)独立地存在。在一些实施方案中,对于每个手性连接键的磷,Rp和Sp构型两者存在于组合物中。在一些实施方案中,对于每个手性连接键的磷,Rp和Sp构型两者具有至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或45%的百分比。在一些实施方案中,对于手性核苷酸间连接键,Rp和Sp构型两者均具有约50%的百分比。在一些实施方案中,对于每个手性核苷酸间连接键,Rp和Sp构型两者均具有约50%的百分比。在一些实施方案中,对于每个手性核苷酸间连接键,Rp和Sp构型两者均具有约20-80%的百分比。在一些实施方案中,对于每个手性核苷酸间连接键,Rp和Sp构型两者均具有约30-70%的百分比。在一些实施方案中,对于每个手性核苷酸间连接键,Rp和Sp构型两者均具有约40-60%的百分比。在一些实施方案中,对于每个手性核苷酸间连接键,Rp和Sp构型两者均具有约45-55%的百分比。在一些实施方案中,对于每个连接键的磷,Rp构型独立地具有约20-80%、30-70%、40-60%或45-55%,或者约20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%的百分比。

[0169] 提供的寡核苷酸的量、浓度等可以利用根据本公开的各种技术进行评估,例如通过UV(例如,在260nm处)、重量等。在一些实施方案中,评估在组合物中存在的所有寡核苷酸的量、浓度等。在一些实施方案中,包括所有寡核苷酸的量、浓度等共享相同的组成(例如,相对于手性连接键的磷的非对映异构体),其包括包括药学上可接受的盐形式的所有形式。

[0170] 钙蛋白酶-2

[0171] 在一些实施方案中,钙蛋白酶-2(CAPN2)是指来自物种的基因或其基因产物(例如核酸(例如DNA,RNA等)、转录物(例如钙蛋白酶-2mRNA)、由其编码的蛋白质(例如钙蛋白酶-2多肽)等),其可称为CAPN2、CANP2、CANPL2、mCANP、CANPm1、钙蛋白酶-2、钙蛋白酶2、m-钙蛋白酶、毫摩尔钙蛋白酶、钙蛋白酶M型、钙蛋白酶-2大亚基、钙蛋白酶2(m/11)大亚基、钙蛋白酶大多肽L2、钙蛋白酶-2催化亚基、钙激活的神经蛋白酶2、CANP 2等。本领域技术人员容易获得各种CAPN2序列(包括其各种变体)。还已经报道了各种技术,例如测定、细胞、动物模型

等,并且可以根据本公开用于提供的技术(例如寡核苷酸、组合物、方法等)的表征和/或评估。

[0172] 据报道,CAPN2基因编码钙蛋白酶-2蛋白,根据各种报道,该蛋白包含622或700个氨基酸,具体取决于同工型,并且主要定位于包括中枢神经系统(CNS)在内的多种组织中的细胞质和细胞质膜。据报道,在一些实施方案中,人钙蛋白酶-2包含多个结构域,该结构域从N末端区域到C末端区域包括:(i) α -螺旋;(ii) 包含第一蛋白酶核心结构域(PC1)和第二蛋白酶核心结构域(PC2)的CysPc结构域;(iii) 钙蛋白酶型 β -三明治(CBSW)结构域;和(iv) 催化的大亚基(PEF(L))结构域中的penta-EF-hand。据报道,来自其他物种(例如猴、大鼠和小鼠)的钙蛋白酶-2蛋白如人钙蛋白酶-2一样包含各种保守的结构域。

[0173] 据报道,钙蛋白酶-2属于钙依赖性蛋白酶家族,据报道可切割多种蛋白质靶标,包括肌动蛋白、细胞质多腺苷酸化元件结合蛋白3(CPEB3)、p35、10号染色体上缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)、蛋白酪氨酸磷酸酶(PTPN13;也称为Fas相关蛋白-1(FAP1))、血影蛋白、TDP-43、神经丝轻链(Wang等人,Expert Opin.Ther.Targets,2018;Baudry,Curr.Neuropharmacol.,2019)等。据报道,钙蛋白酶-2的活化涉及相对高浓度的钙离子(Ca^{2+}),报道的范围包括近毫摩尔量,例如400-800 μM 。此外,一些研究表明,钙蛋白酶-2可能能够通过细胞外信号调节激酶(ERK)被表皮生长因子(EGF)或脑源性神经营养因子(BDNF)磷酸化激活(Glading等人,Mol.Cell Biol.,2004;Zadran等人,J.Neurosci.,2010)。据报道,钙蛋白酶-2作为突触可塑性的调节剂,并且可能会限制这种可塑性(Baudry和Bi,Trends Neurosci.,2017),并且据报道钙蛋白酶-2还参与了兴奋性神经毒性,因为钙蛋白酶-2的抑制可以降低这种毒性(Wang等人J.Neurosci.,2013)。

[0174] 据报道,钙蛋白酶-2的失调与各种形式的神经变性关联。钙蛋白酶-2与神经退行性病况、病症或疾病(包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)、阿尔茨海默病(AD)等)有关联。据报道,另一种神经退行性疾病沃尔弗拉姆综合征(WS)涉及钙蛋白酶2的过度活化和钙蛋白酶-2相关的细胞死亡(Lu等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,2014)。除了进行性神经退行性疾病外,钙蛋白酶-2的抑制已被报道作为治疗急性神经元损伤的潜在靶标(Wang等人Expert Opin.Ther.Targets,2018)。一些研究还将钙蛋白酶-2与创伤性脑损伤(TBI)关联起来,因为据报道钙蛋白酶-2缺失或抑制导致TBI小鼠模型的神经病理学特征的改善(Wang等人Sci.Adv.,2020)。据报道,钙蛋白酶-2抑制可能导致TBI中TDP-43定位的改善;据报道,TDP-43在某些形式的神经变性中形成包涵体(Gao等人,J.Neurochem.,2018)。因此,钙蛋白酶-2可能是进行性神经退行性疾病和急性神经元损伤两者的潜在治疗靶点。

[0175] CAPN2相关的病况、病症或疾病

[0176] 据报道,各种病况、病症或疾病与钙蛋白酶-2相关,并且可以通过本公开来预防或治疗。通常,如果钙蛋白酶-2和/或其产物(例如转录物、编码的蛋白等)的存在、水平、活性和/或形式与疾病、病症或病况的发生率和/或易感性(例如在相关群体中)相关,则疾病、病症或病况与钙蛋白酶-2相关。在一些实施方案中,通过降低钙蛋白酶-2转录物和/或蛋白质的表达、水平和/或活性可以来治疗和/或预防与钙蛋白酶-2相关的病况、病症或疾病。

[0177] 除其他外,本公开提供了用于预防和/或治疗各种病况、病症或疾病的技术。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是神经退行性疾病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是肌萎缩侧索硬化症(ALS)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是创伤性脑损伤(TBI)。

在一些实施方案中,病况、病症或疾病是阿尔茨海默病(AD)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是帕金森病(PD)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是额颞叶痴呆(FTD)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是进行性核上性麻痹(PSP)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是皮质基底节变性(CBD)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是沃尔弗拉姆综合征(WS)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是弗里德赖希共济失调(FRDA)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是多系统萎缩(MSA)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是脊髓小脑共济失调(SCA)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是脊髓性肌萎缩(SMA)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是皮克病(PD)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是进行性运动萎缩。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是脑震荡。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是脊髓损伤(SCI)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是慢性创伤性脑病(CTE)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是癫痫发作(seizure)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是卒中。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是脑出血。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是 τ 蛋白病(tauopathy)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病与沃勒变性有关。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是急性青光眼。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是癌症。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是糖尿病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是化疗引起的周围神经病。

[0178] 表征和评估

[0179] 在一些实施方案中,提供的寡核苷酸及其组合物的性质和/或活性可以使用本领域技术人员可用的各种技术进行表征和/或评估,例如生化测定(例如RNA酶H测定)、基于细胞的测定、动物模型、临床试验等。实施例中描述了某些有用的技术。阅读本公开的本领域技术人员将容易理解,可以根据本公开设计和/或使用其他技术,例如用于各种病况、病症或疾病的体外模型(例如细胞系)、用于各种病况、病症或疾病的动物模型、临床试验等,以评估提供的技术(例如寡核苷酸、组合物、方法等)。

[0180] 生物学应用

[0181] 如本领域技术人员所理解的,寡核苷酸对于许多目的是有用的。在一些实施方案中,提供的技术(例如寡核苷酸、组合物、方法等)对于降低各种钙蛋白酶-2转录物(例如RNA)和/或由此编码的产物(例如蛋白质)的水平和/或活性是有用的。在一些实施方案中,提供的技术降低了钙蛋白酶-2RNA转录物的水平和/或活性。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸和组合物提供了钙蛋白酶-2mRNA的敲低。在一些实施方案中,提供的技术降低了钙蛋白酶-2多肽的水平。在一些实施方案中,提供的技术降低了钙蛋白酶-2活性(例如蛋白酶活性)的水平。

[0182] 在一些实施方案中,本公开提供了降低系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平的方法,其包括向系统施用或递送有效量的寡核苷酸或寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,本公开提供了降低系统中钙蛋白酶-2多肽的水平的方法,其包括向系统施用或递送有效量的寡核苷酸或寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,本公开提供了降低系统中钙蛋白酶-2活性的水平的方法,其包括向系统施用或递送有效量的寡核苷酸或寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,本公开提供了降低系统中钙蛋白酶-2蛋白酶活性的水平的方法,其包括向系统施用或递送有效量的寡核苷酸或寡核苷酸组合物。在一些实施方案中,钙蛋白酶-2mRNA和/或多肽水平的降低增加了钙蛋白酶-2靶标的mRNA和/或多肽水平。在一些实施方案中,钙蛋白

酶-2mRNA和/或多肽水平的降低增加了钙蛋白酶抑制蛋白的mRNA和/或多肽水平。在一些实施方案中,本公开提供了用于增加系统中钙蛋白酶抑制蛋白mRNA和/或多肽的水平,其包括向系统施用或递送有效量的靶向钙蛋白酶-2的寡核苷酸或寡核苷酸组合物。钙蛋白酶-2据报道与各种配偶体(例如TDP43和其他ALS生物标志物)相互作用。在一些实施方案中,本公开提供了用于调节钙蛋白酶-2与配偶体之间相互作用的技术。在一些实施方案中,本公开提供了用于调节在系统中钙蛋白酶-2与配偶体之间相互作用的技术,其包括向系统施用或递送有效量的靶向钙蛋白酶-2的寡核苷酸或寡核苷酸组合物。

[0183] 在一些实施方案中,系统包含钙蛋白酶-2mRNA。在一些实施方案中,系统表达钙蛋白酶-2mRNA。在一些实施方案中,系统表达钙蛋白酶-2多肽。

[0184] 在某些情况下,系统是体外系统。在某些情况下,系统是体内系统。

[0185] 在一些实施方案中,系统包含细胞。在一些实施方案中,系统是细胞。在一些实施方案中,系统包含细胞群(a population of cells)。在一些实施方案中,系统是细胞群。在一些实施方案中,细胞是神经细胞。在一些实施方案中,细胞是神经系统中的细胞。在一些实施方案中,细胞是CNS中的细胞。在一些实施方案中,细胞具有神经细胞的一个或多个特征、性质和/或活性。

[0186] 在一些实施方案中,系统是组织。在一些实施方案中,系统包含组织。在一些实施方案中,系统是器官。在一些实施方案中,系统包含器官。在一些实施方案中,系统是脑或其部分。在一些实施方案中,系统包含脑或其部分。在一些实施方案中,系统是生物体。在一些实施方案中,系统包含生物体。在一些实施方案中,系统是受试者。在一些实施方案中,系统是哺乳动物,例如小鼠、大鼠、猴等。在一些实施方案中,系统是人。

[0187] 在一些实施方案中,与不存在提供的寡核苷酸或组合物和/或存在参考寡核苷酸或组合物相比,水平降低至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,这种降低是在某些寡核苷酸浓度(例如,1nM、5nM、10nM、100nM、500nM、1uM、5uM等)或剂量下实现的。在一些实施方案中,这种减少是在系统,例如各种合适的测定(例如,基于体外细胞的测定,实施例描述的测定等)中实现的。在一些实施方案中,参考组合物不包含靶向钙蛋白酶-2的寡核苷酸。在一些实施方案中,参考寡核苷酸靶向与钙蛋白酶-2不同的核酸。在一些实施方案中,水平是mRNA(例如钙蛋白酶2mRNA)的水平。在一些实施方案中,水平是多肽(例如钙蛋白酶2蛋白)的水平。在一些实施方案中,水平降低至少约10%。在一些实施方案中,水平降低至少约20%。在一些实施方案中,水平降低至少约30%。在一些实施方案中,水平降低至少约40%。在一些实施方案中,水平降低至少约50%。在一些实施方案中,水平降低至少约60%。在一些实施方案中,水平降低至少约70%。在一些实施方案中,水平降低至少约75%。在一些实施方案中,水平降低至少约80%。在一些实施方案中,水平降低至少约85%。在一些实施方案中,水平降低至少约90%。在一些实施方案中,水平降低至少约95%。在一些实施方案中,当例如使用实施例中的测定进行评估时,在约20uM寡核苷酸下,钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%;在一些实施方案中,在约15uM寡核苷酸下,其降低了约或至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%;在一些实施方案中,在约10uM寡核苷酸下,其降低了约或至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%;在一些

实施方案中,在约5uM寡核苷酸下,其降低了约或至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%;在一些实施方案中,在2.5uM寡核苷酸下,其降低了约或至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%;在一些实施方案中,在约1.25uM寡核苷酸下,其降低了约或至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%;在一些实施方案中,在约0.63uM寡核苷酸下,其降低了约10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%;在一些实施方案中,在约0.32uM寡核苷酸下,其降低了约或至少约10%、15%、20%、25%或30%。在一些实施方案中,降低是约或至少约50%。在一些实施方案中,降低是约或至少约55%。在一些实施方案中,降低是约或至少约60%。在一些实施方案中,降低是约或至少约65%。在一些实施方案中,降低是约或至少约70%。在一些实施方案中,降低是约或至少约75%。在一些实施方案中,降低是约或至少约80%。在一些实施方案中,降低是约或至少约85%。在一些实施方案中,降低是约或至少约90%。在一些实施方案中,降低是约或至少约95%。在一些实施方案中,在施用或递送提供的寡核苷酸或组合物的或其之后的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天,或者约1、2、3或4周,评估降低。在一些实施方案中,在去除或冲洗提供的寡核苷酸或组合物的或其之后的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天,或者约1、2、3或4周,评估降低。在一些实施方案中,降低是在第0天评估的。在一些实施方案中,降低是在约第3天评估的。在一些实施方案中,降低是在约第10天评估的。在一些实施方案中,降低是在约第14天评估的。在一些实施方案中,降低是在约第21天评估的。在一些实施方案中,(例如钙蛋白酶mRNA水平的)一个或多个评估的降低,独立地是约或至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%;在一些实施方案中,降低独立地是约或至少约75%;一些实施方案中,降低是约或至少约80%。在一些实施方案中,(例如钙蛋白酶2蛋白或活性的)一个或多个评估的降低,独立地是约或至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%;在一些实施方案中,降低是约或至少约20%;在一些实施方案中,降低是约或至少约25%;在一些实施方案中,降低是约或至少约30%;在一些实施方案中,降低是约或至少约35%;在一些实施方案中,降低是约或至少约40%;在一些实施方案中,降低是约或至少约45%;在一些实施方案中,降低是约或至少约50%;在一些实施方案中,降低是约或至少约55%;在一些实施方案中,降低是约或至少约60%;在一些实施方案中,降低是约或至少约70%。在一些实施方案中,降低是相对于不存在寡核苷酸。在一些实施方案中,降低相对于存在参考寡核苷酸或组合物(例如,如本文所述的靶向TUG1的寡核苷酸)。在一些实施方案中,根据实施例中描述的那些进行评估,例如在一些实施方案中,使用源自iPSC的运动神经元以采用裸递送(gymnotic delivery)的约20uM的寡核苷酸浓度进行评估。

[0188] 在一些实施方案中,提供的寡核苷酸或寡核苷酸组合物的活性可以通过IC₅₀来评估,所述IC₅₀是在适当条件下(例如基于细胞的体外测定,在实施例中描述的测定等)将例如钙蛋白酶-2mRNA、多肽、活性等的水平降低50%的浓度。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸或组合物具有约或不超过约0.001、0.01、0.1、0.5、1、2、5、10、50、100、200、500、1000、2000、5000或10000nM的IC₅₀。在一些实施方案中,寡核苷酸具有约或不超过约10000nM的IC₅₀。在一些实施方案中,寡核苷酸具有约或不超过约5000nM的IC₅₀。在一些实施方案中,寡核苷酸具有约或不超过约2000nM的IC₅₀。在一些实施方案中,寡核苷酸具有约或不超过约

约1000nM的IC50。在一些实施方案中,IC50是约或不超过约500nM。在一些实施方案中,IC50是约或不超过约200nM。在一些实施方案中,IC50是约或不超过约100nM。在一些实施方案中,IC50是约或不超过约50nM。在一些实施方案中,IC50是约或不超过约20nM。在一些实施方案中,IC50是约或不超过约10nM。在一些实施方案中,IC50是约或不超过约5nM。在一些实施方案中,IC50是约或不超过约2nM。在一些实施方案中,IC50是约或不超过约1nM。

[0189] 在一些实施方案中,提供的寡核苷酸和组合物通过降低与病况、病症或疾病相关的钙蛋白酶-2转录物和/或由其编码的产物的水平和/或活性可用于治疗各种病况、病症或疾病。

[0190] 在一些实施方案中,本公开提供了用于预防病况、病症或疾病的方法,其包括向易感病况、病症或疾病的受试者施用或递送有效量的本公开的寡核苷酸或组合物。在一些实施方案中,本公开提供了用于治疗病况、病症或疾病的方法,其包括向患有病况、病症或疾病的受试者施用或递送有效量的本公开的寡核苷酸或组合物。

[0191] 可以使用提供的技术预防或治疗与钙蛋白酶-2相关的各种病况、病症或疾病。在一些实施方案中,受试者受益于在某些细胞、组织和/或器官中的钙蛋白酶-2转录物、多肽和/或活性的水平的降低。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为神经退行性病况、病症或疾病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为或包括沃勒变性(Wallerian degeneration)。在一些实施方案中,沃勒变性与损伤有关。在一些实施方案中,沃勒变性与压力有关。在一些实施方案中,病况、病症或疾病与沃勒变性相关。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是肌萎缩侧索硬化症(ALS)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为神经病(neuropathy)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为周围神经病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为化疗诱导的周围神经病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为帕金森病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为亨廷顿病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为阿尔茨海默疾病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为额颞叶痴呆。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为脑损伤。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为创伤性脑损伤。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为进行性核上性麻痹。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为皮质基底节变性。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为沃尔弗拉姆综合征。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为弗里德赖希共济失调(Friedreich's Ataxia)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为多系统萎缩。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为脊髓小脑性共济失调。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为脊髓性肌萎缩(SMA)。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为皮克病。在一些实施方案中,病况、病症或疾病为进行性运动萎缩。在一些实施方案中,病况、病症或疾病与神经元损伤相关。在一些实施方案中,病况、病症或疾病与神经元细胞损伤相关。在一些实施方案中,病况、病症或疾病与神经元细胞死亡相关。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是轴突变性。在一些实施方案中,病况、病症或疾病是轴突变性是ALS。

[0192] 可以利用各种技术来施用或递送提供的寡核苷酸或组合物。在一些实施方案中,寡核苷酸或组合物是口服施用或递送的。在一些实施方案中,寡核苷酸或组合物是通过肠胃外途径施用或递送的。在一些实施方案中,肠胃外途径包括静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下、鼻内和腹膜内途径。在一些实施方案中,寡核苷酸或组合物通过眼内、眼眶内、结膜下、玻璃体内、视网膜下、经巩膜或耳蜗内途径施用或递送。在一些实施方案中,寡核苷酸或

组合物是肠胃外施用或递送的。在一些实施方案中,寡核苷酸或组合物是鞘内施用或递送的。在一些实施方案中,寡核苷酸或组合物是静脉内施用或递送的。在一些实施方案中,寡核苷酸是作为液体组合物施用或递送的。在一些实施方案中,寡核苷酸被溶解在液体中,例如缓冲盐水(例如aCSF),用于施用或递送。

[0193] 在一些实施方案中,寡核苷酸或组合物可以与另一种疗法(例如另一种治疗剂)组合进行利用。

[0194] 在一些实施方案中,提供的技术(例如寡核苷酸、组合物、方法等)延迟或阻止病况、病症或疾病的一种或多种症状和/或标志(hallmark)的发生。在一些实施方案中,提供的技术延迟、减缓或阻止病况、病症或疾病的进展。在一些实施方案中,提供的技术减轻(alleviate)、改善、缓解(relieve)、抑制、阻止、延迟病况、病症和/或病症的一种或多种症状或特征的发生、降低病况、病症和/或病症的一种或多种症状或特征的严重程度和/或降低病况、病症和/或病症的一种或多种症状或特征的发生率。在一些实施方案中,提供的技术在一个或更多个评估中改善了受试者的表现。在一些实施方案中,提供的技术在一个或更多个临床评估中改善了受试者的表现。在一些实施方案中,提供的技术独立地改善了受试者的一个或更多个临床评估结果。

[0195] 药物组合物

[0196] 在一些实施方案中,本公开提供了包含提供的化合物(例如寡核苷酸或其药学上可接受的盐)和药物载体的药物组合物。在一些实施方案中,例如,为了治疗和临床目的,本公开的寡核苷酸作为药物组合物提供。

[0197] 如本领域技术人员所理解的,寡核苷酸可以以各种形式提供。在一些实施方案中,寡核苷酸可以是酸形式,例如对于天然磷酸酯连接键,以 $-OP(O)(OH)O^-$ 的形式存在;对于硫代磷酸酯核苷酸间连接键,以 $-OP(O)(SH)O^-$ 的形式存在;等。在一些实施方案中,提供的寡核苷酸可以是盐形式,例如对于天然磷酸酯连接键,以在钠盐中 $-OP(O)(ONa)O^-$ 的形式存在;对于硫代磷酸酯核苷酸间连接键,以在钠盐中 $-OP(O)(SNa)O^-$ 的形式存在;等。除非另有说明,本公开的寡核苷酸可以以酸、碱和/或盐的形式存在。在一些实施方案中,组合物包含寡核苷酸的一种或多种形式。在一些实施方案中,组合物包含寡核苷酸的一种或多种盐形式。在一些实施方案中,组合物包含寡核苷酸的一种或多种药学上可接受的盐形式。

[0198] 当用作治疗剂时,提供的寡核苷酸或组合物通常作为药物组合物施用。在一些实施方案中,药物组合物适合于将寡核苷酸施用或递送至受病况、病症或疾病影响的身体的区域或部分。在一些实施方案中,药物组合物包含治疗有效量的提供的寡核苷酸或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药物组合物包含治疗有效量的彼此非对映异构体的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸以一种或多种形式存在。在一些实施方案中,药物组合物包含治疗有效量的相对于手性连接键的磷彼此非对映异构体的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸以一种或多种形式存在。

[0199] 在一些实施方案中,药学上可接受的载体是缓冲液。在一些实施方案中,药学上可接受的载体是缓冲盐水。在一些实施方案中,药学上可接受的载体是人工脑脊液。在一些实施方案中,组合物是包含溶解的寡核苷酸的液体组合物。

[0200] 在一些实施方案中,药物组合物被配制用于静脉注射、口服施用、颊部施用、吸入、鼻腔施用、局部施用、眼部施用或耳部施用。在一些实施方案中,药物组合物是片剂、丸剂、

胶囊、液体、吸入剂、鼻喷雾溶液、栓剂、混悬液、凝胶、胶体、分散液、混悬液、溶液、乳液、软膏、洗剂、滴眼液或滴耳液。在一些实施方案中，药物组合物被配制用于鞘内施用。

[0201] 正如本领域技术人员将理解的那样，寡核苷酸可以以各种盐形式存在。在一些实施方案中，盐是药学上可接受的盐。在一些实施方案中，药物组合物包含寡核苷酸(任选地盐形式的)和钠盐。在一些实施方案中，药物组合物包含寡核苷酸(任选地盐形式的)和氯化钠。在一些实施方案中，可以贡献给碱(例如，在水溶液、药物组合物等的条件下)的寡核苷酸的每个氢离子被非H⁺阳离子替代。例如，在一些实施方案中，寡核苷酸的药学上可接受的盐是全金属离子盐，其中每个核苷酸间连接键(例如天然磷酸酯连接键、硫代磷酸酯核苷酸间连接键等)的(例如-OH, -SH等的)每个氢离子被金属离子替代。用于药物组合物的各种合适的金属盐在本领域是众所周知的，并且可以根据本公开进行利用。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是钠盐。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是镁盐。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是钙盐。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是钾盐。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是铵盐(阳离子N(R')₄⁺)。在一些实施方案中，药学上可接受的盐包含一种且不超过一种类型的阳离子。在一些实施方案中，药学上可接受的盐包含两种或更多种类型的阳离子。在一些实施方案中，阳离子是Li⁺、Na⁺、K⁺、Mg²⁺或Ca²⁺。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是全钠盐。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是全钠盐，其中，作为天然磷酸酯连接键的每个核苷酸间连接键(酸形式-O-P(O)(OH)-O-)，如果有的话，以其钠盐形式(-O-P(O)(ONa)-O-)存在，并且作为硫代磷酸酯核苷酸间连接键的每个核苷酸间连接键(酸形式-O-P(O)(SH)-O-)，如果有的话，以其钠盐形式(-O-P(O)(SNa)-O-)存在。

[0202] 在一些实施方案中，寡核苷酸或组合物(例如药物组合物)作为固体提供。在一些实施方案中，寡核苷酸或组合物(例如药物组合物)被冻干。

[0203] 在一些实施方案中，寡核苷酸或组合物(例如药物组合物)储存在低于环境温度的温度下，例如在约或不高于约-78℃、-20℃、0℃、4℃或10℃下。

[0204] 用于递送核酸和/或寡核苷酸的各种技术在本领域是已知的，并且可以根据本公开进行利用。例如，各种超分子纳米载体可用于递送核酸。实例纳米载体包括脂质体、阳离子聚合物络合物和各种聚合物化合物。核酸与各种聚阳离子的络合是细胞内递送的另一种方法；这包括使用PEG化聚阳离子、聚乙烯胺(PEI)络合物、阳离子嵌段共聚物和树状大分子。几种阳离子纳米载体(包括PEI和聚乙烯胺树枝状大分子)可能有助于从内体释放内容物。其他方法可能包括使用聚合物纳米颗粒、微球、脂质体、树枝状大分子、生物可降解聚合物、缀合物、前药、无机胶体(例如硫或铁)、抗体、植入物、生物可降解植入物、生物可降解微球、渗透控制植入物、脂质纳米颗粒、乳液、油性溶液、水溶液、生物可降解聚合物、聚(丙交酯-共乙醇酸)、聚(乳酸)、液体贮库(liquid depot)、聚合物胶束、量子点和脂质复合物。在一些实施方案中，寡核苷酸缀合至另一分子。

[0205] 在一些实施方案中，寡核苷酸通过裸摄取(gymnotic uptake)施用或递送。

[0206] 在一些实施方案中，寡核苷酸或组合物被配制用于多种施用模式，包括全身和局部或小范围内施用。技术和配方通常可以在Remington, The Science and Practice of Pharmacy (2000年第20版)中找到。

[0207] 在某些实施方案中，寡核苷酸或组合物被递送至CNS。在某些实施方案中，寡核苷酸和组合物被递送至脑脊液。在某些实施方案中，将寡核苷酸和组合物被施用于脑实质。在

某些实施方案中,寡核苷酸和组合物通过鞘内施用或脑室内施用递送至动物/受试者。寡核苷酸和组合物的广泛分布可以用本文所述和/或本领域已知的施用方法实现。

[0208] 在某些实施方案中,肠胃外施用是通过注射,例如通过注射器、泵等注射。在某些实施方案中,注射是推注注射。在某些实施方案中,注射直接施用于组织或位置,例如脑脊液、纹状体、尾状体(caudate)、皮质、海马和/或小脑。

[0209] 提供的寡核苷酸及其组合物在宽的剂量范围内是有效的。在一些实施方案中,剂量为从约0.01至约1000mg、从约0.5至约100mg、从约1至约50mg、或从约5至约100mg。确切剂量可以取决于施用的途径、寡核苷酸在其中施用的形式、受试者(例如体重、年龄、体表面积等)、病况、病症或疾病,和/或医生的偏好和经验。在一些实施方案中,施用固定剂量。在一些实施方案中,施用或递送(例如通过注射或输注)提供的寡核苷酸或组合物,每周一次、每两周一次、每月一次、每两个月一次、每90天一次、每3个月一次、每6个月一次、每9个月一次或每年一次。在一些实施方案中,两个或更多个剂量是约相同的量。在一些实施方案中,一个或更多个剂量是独立地多于一个或更多个其他剂量。例如,在一些实施方案中,在一个或多个维持剂量(每个独立于更低量)之前,施用一个或更多个负荷剂量(每个独立于更高剂量)。在一些实施方案中,两个或更多个或所有的负荷剂量是约相同的量。在一些实施方案中,负荷剂量具有比另一负荷剂量更高的量。在一些实施方案中,两个或更多个或所有的维持剂量是约相同的量。在一些实施方案中,维持剂量具有比另一维持剂量更高的量。

[0210] 示例实施方案

[0211] 除其他外,本公开提供了以下示例实施方案:

[0212] 1.寡核苷酸,其中:

[0213] 所述寡核苷酸的碱基序列包含ATCAGTTTCTGTAGGCTTCC的10个或更多个连续碱基,其中每个T任选地且独立地被U替代;并且

[0214] 所述寡核苷酸包含修饰的核碱基、修饰的糖或修饰的核苷酸间连接键。

[0215] 2.实施方案1所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的碱基序列是ATCAGTTTCTGTAGGCTTCC。

[0216] 3.寡核苷酸,其中:

[0217] 所述寡核苷酸的碱基序列包含GGCATACTGGTTCAGTTGAT的10个或更多个连续碱基,其中每个T任选地且独立地被U替代;并且

[0218] 所述寡核苷酸包含修饰的核碱基、修饰的糖或修饰的核苷酸间连接键。

[0219] 4.实施方案3所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的碱基序列是GGCATACTGGTTCAGTTGAT。

[0220] 5.寡核苷酸,其中:

[0221] 所述寡核苷酸的碱基序列包含GCTCAGGTCAGGCAGTGGTT的10个或更多个连续碱基,其中每个T任选地且独立地被U替代;并且

[0222] 所述寡核苷酸包含修饰的核碱基、修饰的糖或修饰的核苷酸间连接键。

[0223] 6.实施方案5所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的碱基序列是GCTCAGGTCAGGCAGTGGTT。

[0224] 7.寡核苷酸,其中:

[0225] 所述寡核苷酸的碱基序列包含GAGAGCCTTTTGCAGAGCT的10个或更多个连续碱基,

其中每个T任选地且独立地被U替代;并且

[0226] 所述寡核苷酸包含修饰的核碱基、修饰的糖或修饰的核苷酸间连接键。

[0227] 8. 实施方案7所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的碱基序列是GAGAGCCTTTTTCAGAGCT。

[0228] 9. 寡核苷酸,其中:

[0229] 所述寡核苷酸的碱基序列包含TCCAGCTCTGTGCCTCTAGT的10个或更多个连续碱基,其中每个T任选地且独立地被U替代;并且

[0230] 所述寡核苷酸包含修饰的核碱基、修饰的糖或修饰的核苷酸间连接键。

[0231] 10. 实施方案9所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的碱基序列是TCCAGCTCTGTGCCTCTAGT。

[0232] 11. 寡核苷酸,其中:

[0233] 所述寡核苷酸的碱基序列包含GTTCCAGCTTGGGCAGTTGT的10个或更多个连续碱基,其中每个T任选地且独立地被U替代;并且

[0234] 所述寡核苷酸包含修饰的核碱基、修饰的糖或修饰的核苷酸间连接键。

[0235] 12. 实施方案11所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的碱基序列是GTTCCAGCTTGGGCAGTTGT。

[0236] 13. 寡核苷酸,其中:

[0237] 所述寡核苷酸的碱基序列包含GGAAGCTTAGTCCTTGGCTG的10个或更多个连续碱基,其中每个T任选地且独立地被U替代;并且

[0238] 所述寡核苷酸包含修饰的核碱基、修饰的糖或修饰的核苷酸间连接键。

[0239] 14. 实施方案13所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的碱基序列是GGAAGCTTAGTCCTTGGCTG。

[0240] 15. 前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含5'-翼-空位-翼-3'结构。

[0241] 16. 前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在所述5'-翼中有约3-10个核苷。

[0242] 17. 前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在所述5'-翼中有5个核苷。

[0243] 18. 前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在所述5'-翼中的每个糖独立地是修饰的糖。

[0244] 19. 前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在5'-翼中的糖是2'-OR^s修饰的糖,其中R^s是C₁₋₆脂肪族。

[0245] 20. 前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在5'-翼中的糖是2'-MOE修饰的糖。

[0246] 21. 前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在5'-翼中的糖是2'-OMe修饰的糖。

[0247] 22. 前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在5'-翼中的糖是双环糖。

[0248] 23. 实施方案22所述的寡核苷酸,其中所述双环糖是LNA糖。

[0249] 24. 实施方案22所述的寡核苷酸,其中所述双环糖是cEt糖。

[0250] 25. 实施方案1-19中任一项所述的寡核苷酸,其中在5'-翼中的每个糖独立地是

2'-OR^s修饰的糖,其中R^s是C₁₋₆脂肪族。

[0251] 26.实施方案1-19中任一项所述的寡核苷酸,其中在5'-翼中的每个糖独立地是2'-MOE修饰的糖。

[0252] 27.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在所述空位中有约8-15个核苷。

[0253] 28.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在所述空位中有10个核苷。

[0254] 29.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在所述空位中的每个糖独立地是天然DNA糖。

[0255] 30.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中所述空位不含胞嘧啶。

[0256] 31.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中所述空位包含一个或更多个5-甲基胞嘧啶。

[0257] 32.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在3'-翼中有约3-10个核苷。

[0258] 33.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在3'-翼中有5个核苷。

[0259] 34.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在所述3'-翼中的每个糖独立地是修饰的糖。

[0260] 35.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在3'-翼中的糖是2'-OR^s修饰的糖,其中R^s是C₁₋₆脂肪族。

[0261] 36.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在3'-翼中的糖是2'-MOE修饰的糖。

[0262] 37.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在3'-翼中的糖是2'-OMe修饰的糖。

[0263] 38.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中在3'-翼中的糖是双环糖。

[0264] 39.实施方案38所述的寡核苷酸,其中所述双环糖是LNA糖。

[0265] 40.实施方案38所述的寡核苷酸,其中所述双环糖是cEt糖。

[0266] 41.实施方案1-35中任一项所述的寡核苷酸,其中在3'-翼中的每个糖独立地是2'-OR^s修饰的糖,其中R^s是C₁₋₆脂肪族。

[0267] 42.实施方案1-35中任一项所述的寡核苷酸,其中在3'-翼中的每个糖独立地是2'-MOE修饰的糖。

[0268] 43.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含修饰的核苷酸间连接键。

[0269] 44.实施方案43所述的寡核苷酸,其中所述修饰的核苷酸间连接键是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

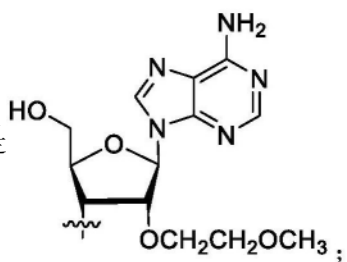
[0270] 45.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中每个核苷酸间连接键独立地是修饰的核苷酸间连接键。

[0271] 46.前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中每个核苷酸间连接键独立地是硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

[0272] 47.寡核苷酸,其具有结构:

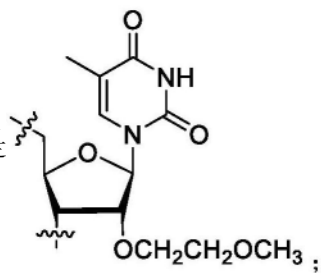
[0273] /52MOErA/*/i2MOErT/*/i2MOErC/*/i2MOErA/*/i2MOErG/*T*T*T*/iMe-dC/*T*G*T*A*G*G*/i2MOErC/*/i2MOErT/*/i2MOErT/*/i2MOErC/*/32MOErC/或其盐,其中:

[0274] /52M0ErA/是

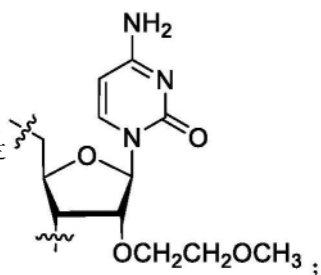


[0275] *是-O-P(O)(SH)-O-;

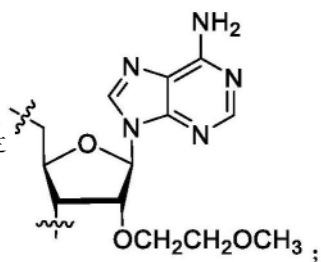
[0276] /i2M0ErT/是



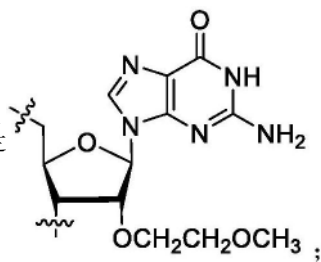
[0277] /i2M0ErC/是



[0278] /i2M0ErA/是

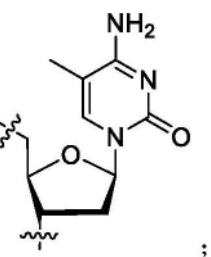


[0279] /i2M0ErG/是

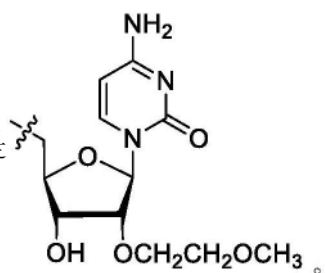


A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

[0280] /iMe-dC/是 并且



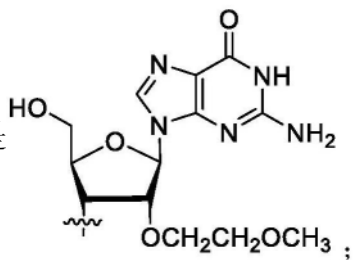
[0281] /32M0ErC/是



[0282] 48.寡核苷酸,其具有结构:

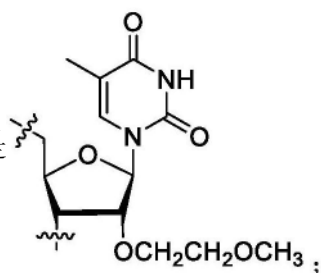
[0283] /52M0ErG/*/i2M0ErG/*/i2M0ErC/*/i2M0ErA/*/i2M0ErT/*A*/iMe-dC/*T*G*G*T*
T*/iMe-dC/*A*G*/i2M0ErT/*/i2M0ErT/*/i2M0ErG/*/i2M0ErA/*/32M0ErT/或其盐,其中:

[0284] /52M0ErG/是

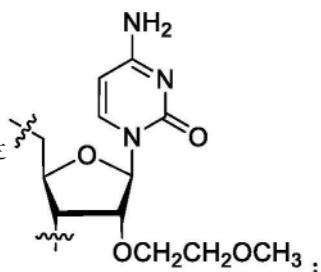


[0285] *是-O-P(0)(SH)-O-;

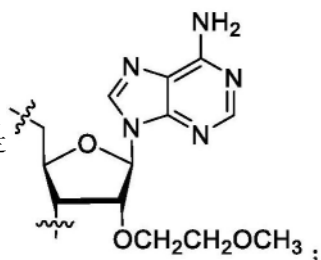
[0286] /i2M0ErT/是



[0287] /i2M0ErC/是

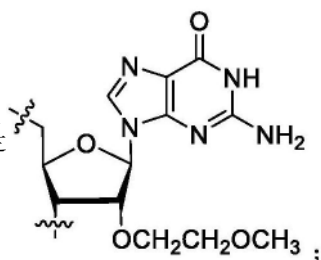


[0288] /i2M0ErA/是



[0289]

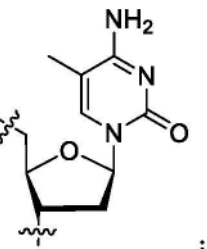
/i2M0ErG/是



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

[0290]

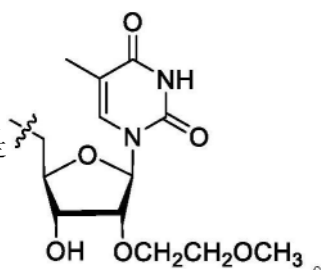
/iMe-dC/是



；

[0291]

/32M0ErT/是



[0292]

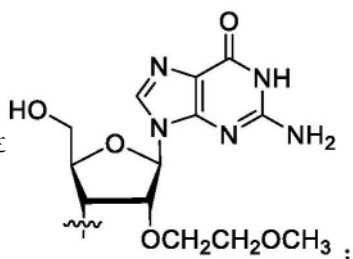
49.寡核苷酸,其具有结构:

[0293]

/52M0ErG/*i2M0ErC/*i2M0ErT/*i2M0ErC/*i2M0ErA/*G*G*T*/iMe-dC/*A*G*G*/iMe-dC/*A*G*/i2M0ErT/*i2M0ErG/*i2M0ErG/*i2M0ErT*/32M0ErT/或其盐,其中:

[0294]

/52M0ErG/是

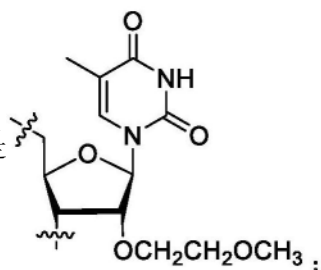


[0295]

*是-O-P(O)(SH)-O-；

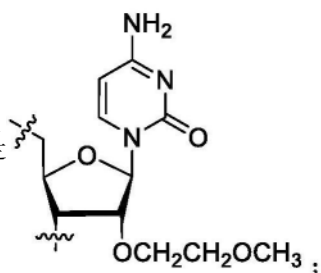
[0296]

/i2M0ErT/是



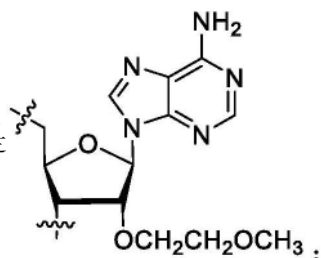
[0297]

/i2MOErC/是



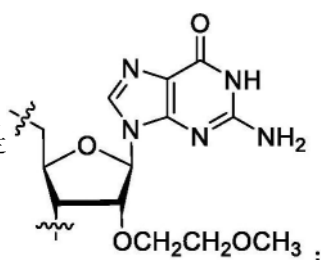
[0298]

/i2MOErA/是



[0299]

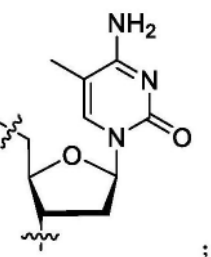
/i2MOErG/是



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

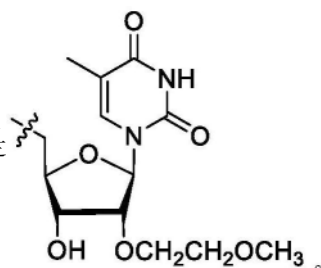
[0300]

/iMe-dC/是 并且



[0301]

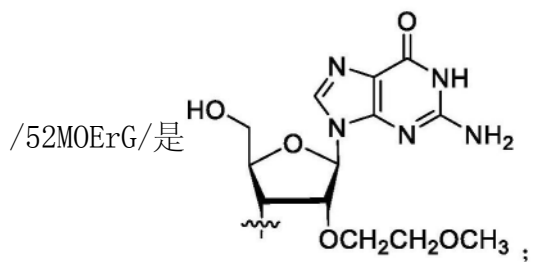
/32MOErT/是



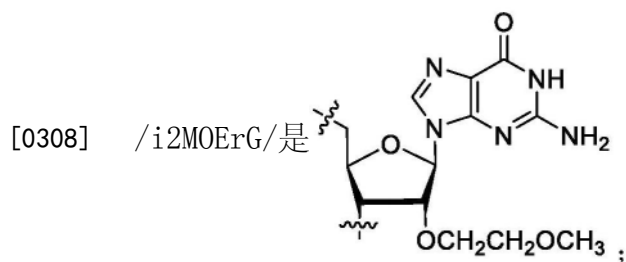
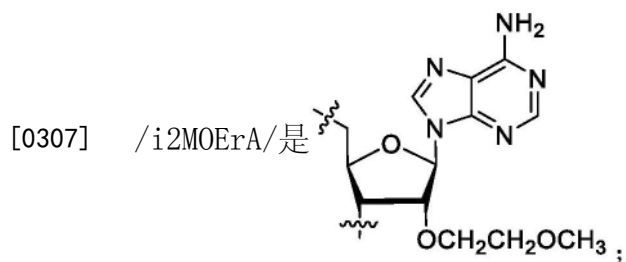
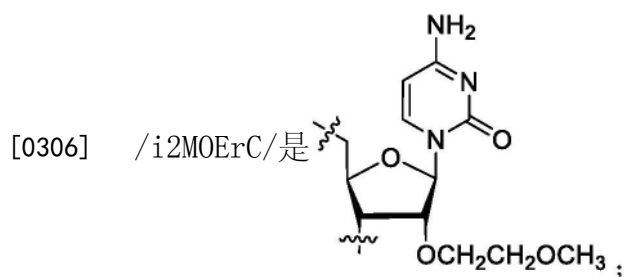
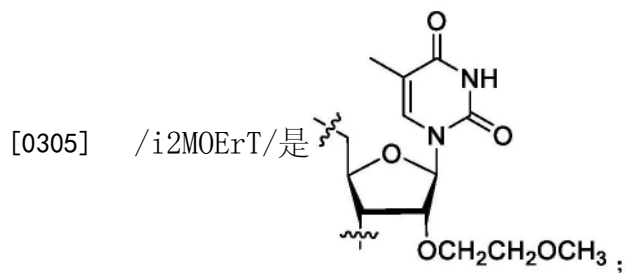
[0302] 50.寡核苷酸,其具有结构:

[0303]

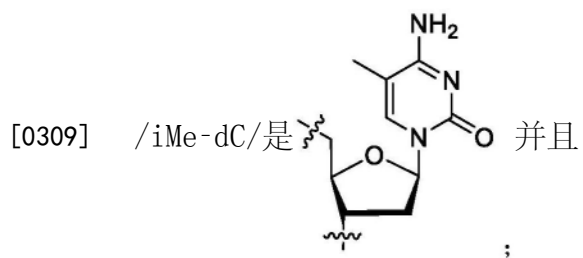
/52MOErG/*/i2MOErA/*/i2MOErG/*/i2MOErA/*/i2MOErG/*/iMe-dC/*/iMe-dC/*
T*T*T*T*T*G*/iMe-dC/*A*/i2MOErG/*/i2MOErA/*/i2MOErG/*/i2MOErC/*/32MOErT/或其
盐,其中:



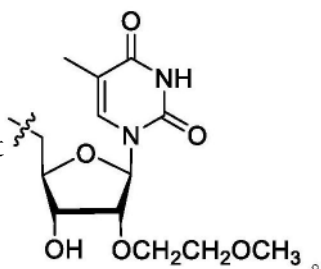
[0304] *是-O-P(O)(SH)-O-;



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；



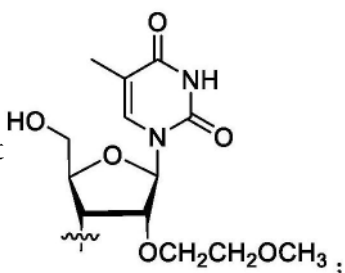
[0310] /32M0ErT/是



[0311] 51.寡核苷酸,其具有结构:

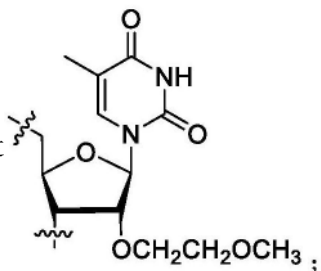
[0312] /52M0ErT/* /i2M0ErC/* /i2M0ErC/* /i2M0ErA/* /i2M0ErG/* /iMe-dC/*T* /iMe-dC/*T*G*T*G* /iMe-dC/* /iMe-dC/*T* /i2M0ErC/* /i2M0ErT/* /i2M0ErA/* /i2M0ErG/* /32M0ErT/或其盐,其中:

[0313] /52M0ErT/是

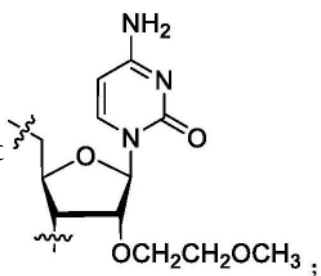


[0314] *是-O-P(O)(SH)-O-;

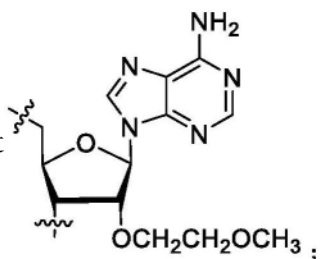
[0315] /i2M0ErT/是



[0316] /i2M0ErC/是

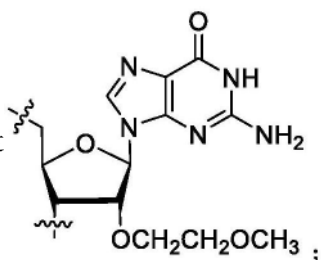


[0317] /i2M0ErA/是



[0318]

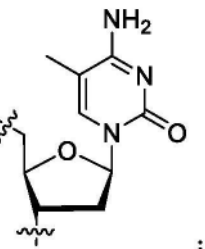
/i2M0ErG/是



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

[0319]

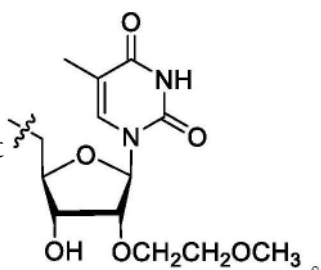
/iMe-dC/是



；

[0320]

/32M0ErT/是



[0321]

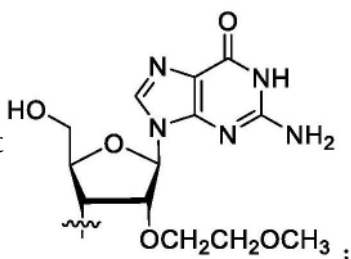
52.寡核苷酸,其具有结构:

[0322]

/52M0ErG/*i2M0ErT/*i2M0ErT/*i2M0ErC/*i2M0ErC/*A*G*/iMe-dC/*T*T*G*G*G*/iMe-dC/*A*/i2M0ErG/*i2M0ErT/*i2M0ErT/*i2M0ErG*/32M0ErT/或其盐,其中:

[0323]

/52M0ErG/是

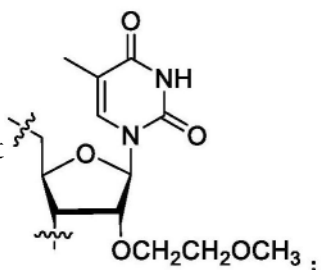


[0324]

*是-O-P(O)(SH)-O-；

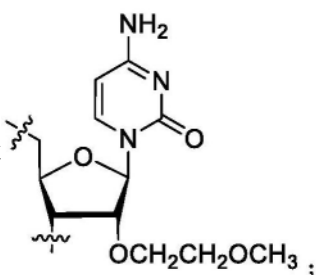
[0325]

/i2M0ErT/是



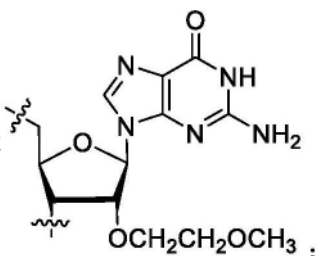
[0326]

/i2M0ErC/是



[0327]

/i2M0ErG/是



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

[0328]

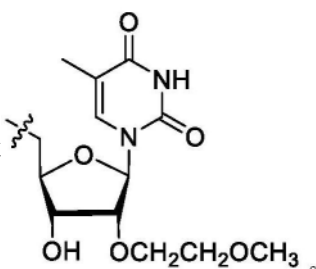
/iMe-dC/是



；

[0329]

/32M0ErT/是



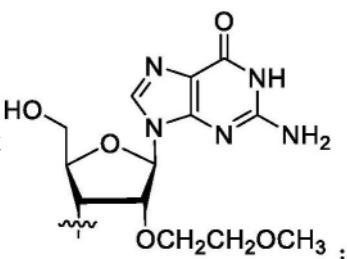
[0330] 53.寡核苷酸,其具有结构:

[0331]

/52M0ErG/* /i2M0ErG/* /i2M0ErA/* /i2M0ErA/* /i2M0ErG/* /iMe-dC/* T* T* A* G* T* /iMe-dC/* /iMe-dC/* T* T* /i2M0ErG/* /i2M0ErG/* /i2M0ErC/* /i2M0ErT/* /32M0ErG/或其盐,其中:

[0332]

/52M0ErG/是

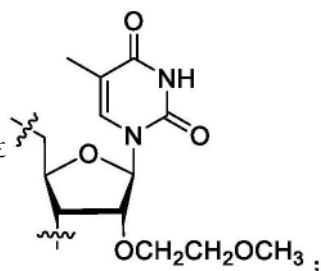


[0333]

*是-O-P(O)(SH)-O-;

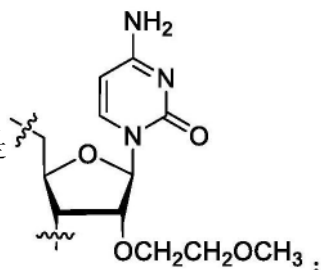
[0334]

/i2M0ErT/是



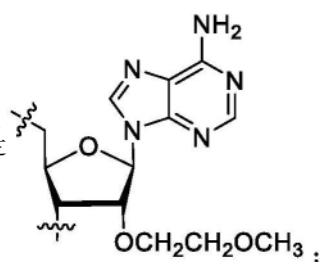
[0335]

/i2M0ErC/是



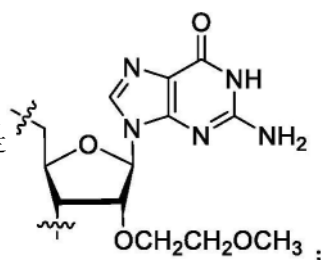
[0336]

/i2M0ErA/是



[0337]

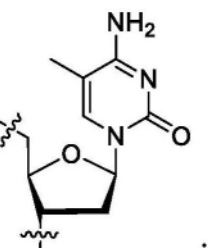
/i2M0ErG/是



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

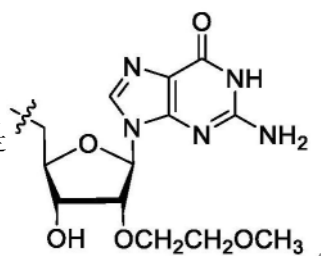
[0338]

/iMe-dC/是 并且



[0339]

/32M0ErG/是



[0340]

54. 前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸是药学上可接受的盐。

[0341]

55. 前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸是钠盐。

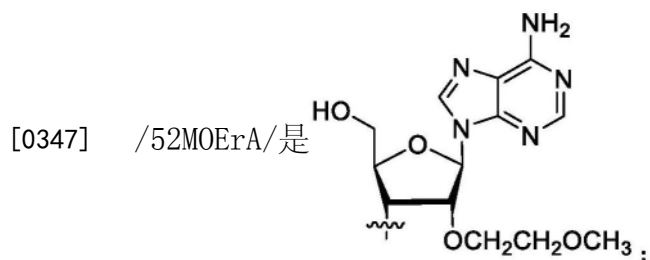
[0342] 56. 组合物, 其包含前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸和所述寡核苷酸相对于手性连接键的磷的一个或更多个非对映异构体。

[0343] 57. 组合物, 其包括:

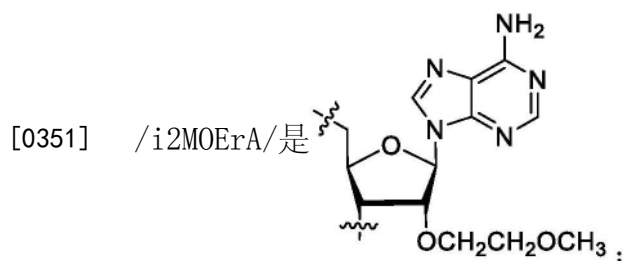
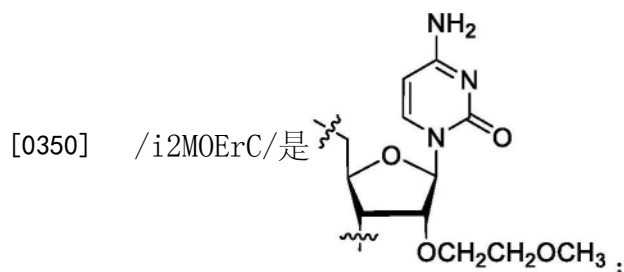
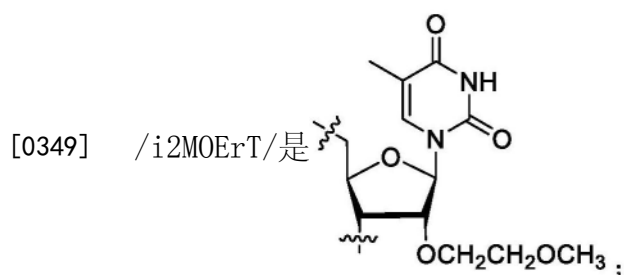
[0344] 寡核苷酸或其盐, 和

[0345] 所述寡核苷酸相对于手性连接键的磷的一个或更多个非对映异构体, 或所述非对映异构体的一个或更多个盐,

[0346] 其中所述寡核苷酸是 /52M0ErA/* /i2M0ErT/* /i2M0ErC/* /i2M0ErA/* /i2M0ErG/* T*T*T* /iMe-dC/* T*G*T*A*G*G* /i2M0ErC/* /i2M0ErT/* /i2M0ErT/* /i2M0ErC/* /32M0ErC/, 其中:

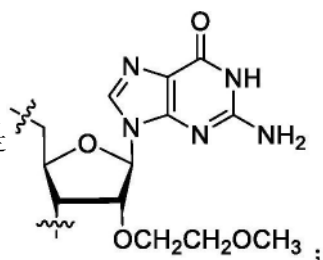


[0348] * 是 -O-P(O)(SH)-O-;



[0352]

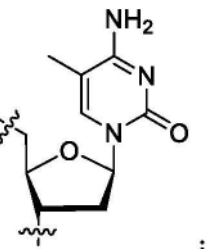
/i2M0ErG/是



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

[0353]

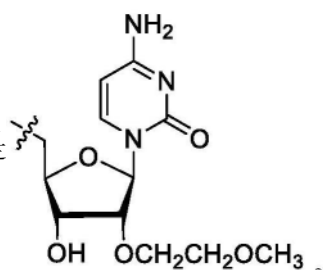
/iMe-dC/是



；

[0354]

/32M0ErC/是



[0355]

58. 组合物,其包含:

[0356]

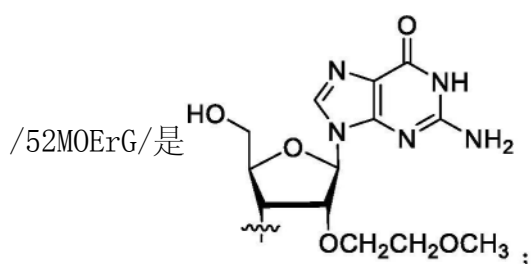
寡核苷酸或其盐,和

[0357]

所述寡核苷酸相对于手性连接键的磷的一个或更多个非对映异构体,或所述非对映异构体的一个或更多个盐,

[0358]

其中所述寡核苷酸是/52M0ErG/* /i2M0ErG/* /i2M0ErC/* /i2M0ErA/* /i2M0ErT/* A* /iMe-dC/* T* G* G* T* T* /iMe-dC/* A* G* /i2M0ErT/* /i2M0ErT/* /i2M0ErG/* /i2M0ErA/* /32M0ErT/,其中:

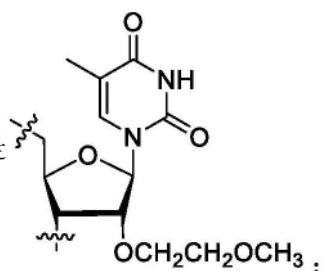


[0359]

*是-O-P(0)(SH)-O-;

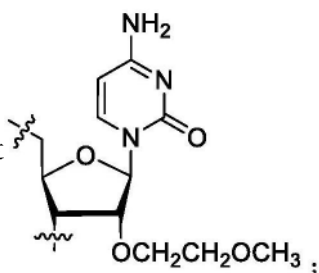
[0360]

/i2M0ErT/是



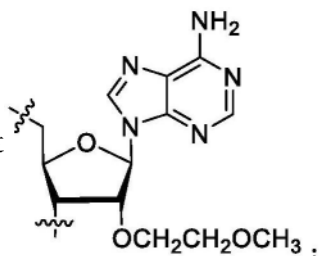
[0361]

/i2M0ErC/是



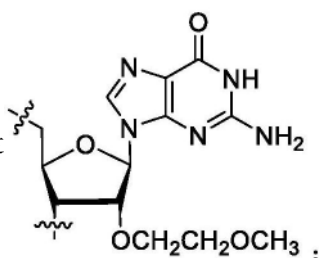
[0362]

/i2M0ErA/是



[0363]

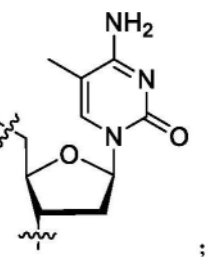
/i2M0ErG/是



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

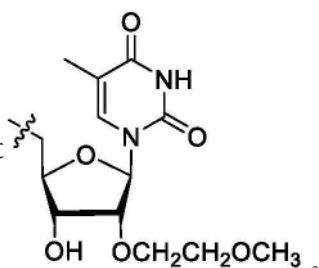
[0364]

/iMe-dC/是 并且



[0365]

/32M0ErT/是



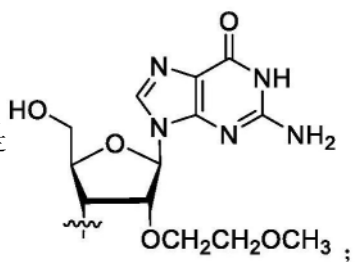
[0366] 59. 组合物, 其包含:

[0367] 寡核苷酸或其盐, 和

[0368] 所述寡核苷酸相对于手性连接键的磷的一个或更多个非对映异构体, 或所述非对映异构体的一个或更多个盐,

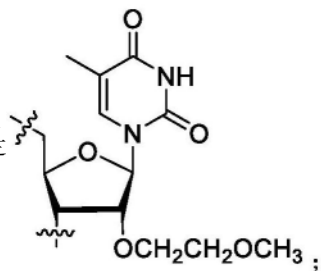
[0369] 其中所述寡核苷酸是/52M0ErG/*/i2M0ErC/*/i2M0ErT/*/i2M0ErC/*/i2M0ErA/*G*G*T*/iMe-dC/*A*G*G*/iMe-dC/*A*G*/i2M0ErT/*/i2M0ErG/*/i2M0ErG/*/i2M0ErT/*/32M0ErT/, 其中:

[0370] /52M0ErG/是

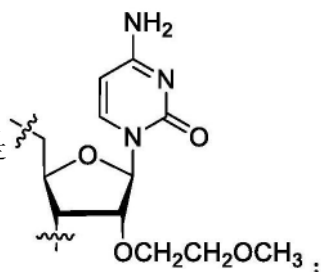


[0371] *是-O-P(O)(SH)-O-;

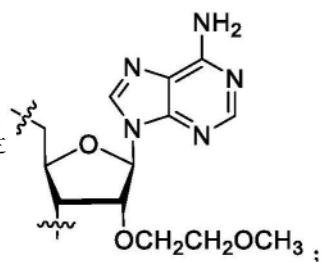
[0372] /i2M0ErT/是



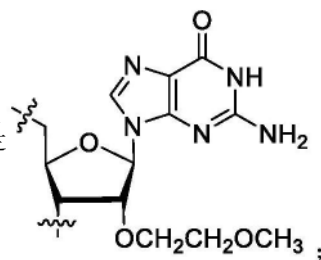
[0373] /i2M0ErC/是



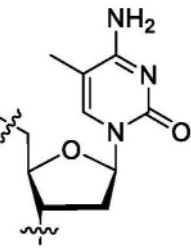
[0374] /i2M0ErA/是



[0375] /i2M0ErG/是

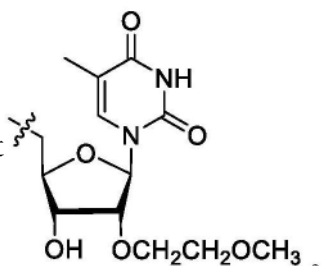


A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

/iMe-dC/是  并且

;

[0376] /32M0ErT/是



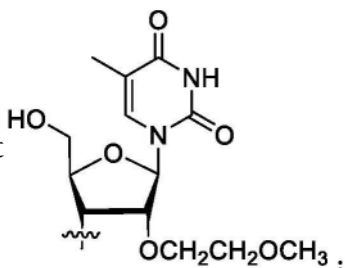
[0377] 60. 组合物, 其包含:

[0378] 寡核苷酸或其盐, 和

[0379] 所述寡核苷酸相对于手性连接键的磷的一个或更多个非对映异构体, 或所述非对映异构体的一个或更多个盐,

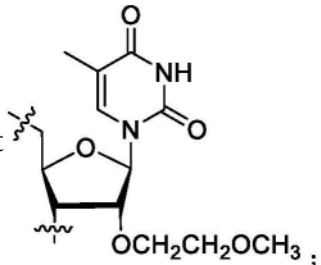
[0380] 其中所述寡核苷酸是/52M0ErT/* /i2M0ErC/* /i2M0ErC/* /i2M0ErA/* /i2M0ErG/* /iMe-dC/*T* /iMe-dC/*T*G*T*G* /iMe-dC/* /iMe-dC/*T* /i2M0ErC/* /i2M0ErT/* /i2M0ErA/* /i2M0ErG* /32M0ErT/, 其中:

[0381] /52M0ErT/是

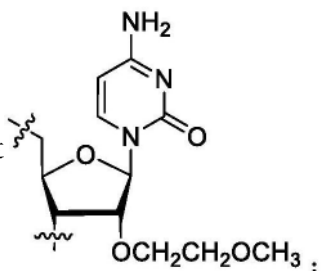


[0382] *是-O-P(O)(SH)-O-;

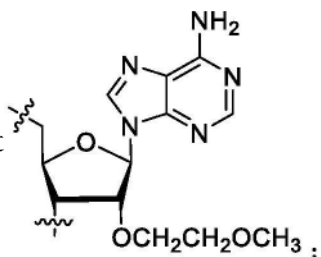
[0383] /i2M0ErT/是



[0384] /i2M0ErC/是

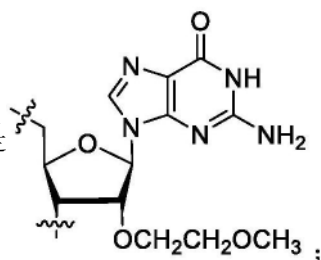


[0385] /i2M0ErA/是



[0386]

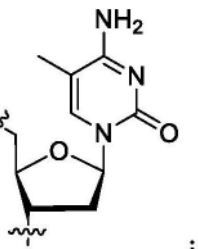
/i2M0ErG/是



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

[0387]

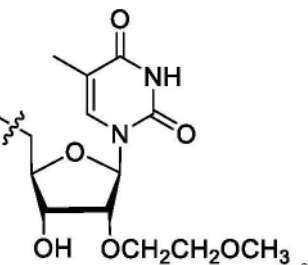
/iMe-dC/是



；

[0388]

/32M0ErT/是



[0389]

61. 组合物,其包含:

[0390]

寡核苷酸或其盐,和

[0391]

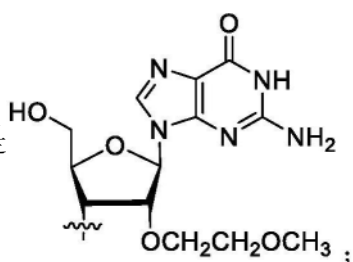
所述寡核苷酸相对于手性连接键的磷的一个或更多个非对映异构体,或所述非对映异构体的一个或更多个盐,

[0392]

其中所述寡核苷酸是/52M0ErG/* /i2M0ErT/* /i2M0ErT/* /i2M0ErC/* /i2M0ErC/* A*G* /iMe-dC/* T*T*G*G*G* /iMe-dC/* A* /i2M0ErG/* /i2M0ErT/* /i2M0ErT/* /i2M0ErG/* /32M0ErT/,其中:

[0393]

/52M0ErG/是

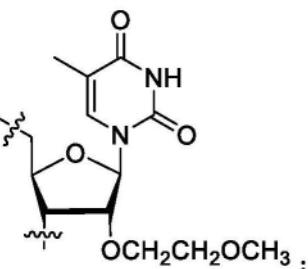


[0394]

*是-O-P(O)(SH)-O-;

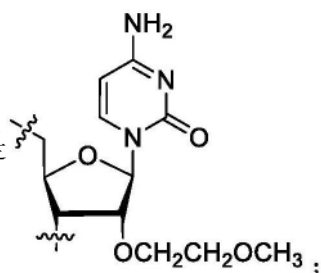
[0395]

/i2M0ErT/是



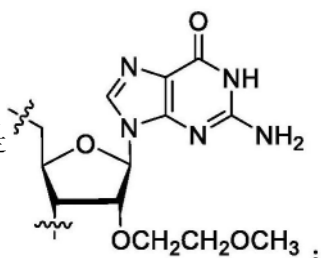
[0396]

/i2M0ErC/是



[0397]

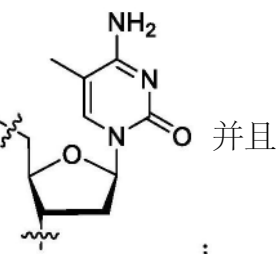
/i2M0ErG/是



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

[0398]

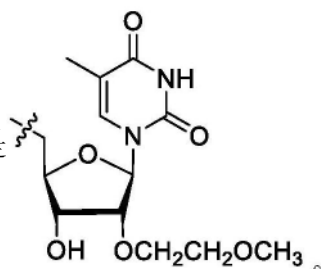
/iMe-dC/是



;

[0399]

/32M0ErT/是



[0400] 62. 组合物,其包含:

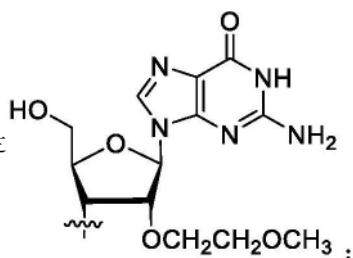
[0401] 寡核苷酸或其盐,和

[0402] 所述寡核苷酸相对于手性连接键的磷的一个或更多个非对映异构体,或所述非对映异构体的一个或更多个盐,

[0403] 其中所述寡核苷酸是/52M0ErG/*/i2M0ErG/*/i2M0ErA/*/i2M0ErA/*/i2M0ErG/*/iMe-dC/*T*T*A*G*T*/iMe-dC/*/iMe-dC/*T*T*/i2M0ErG/*/i2M0ErG/*/i2M0ErC/*/i2M0ErT/*/32M0ErG/,其中:

[0404]

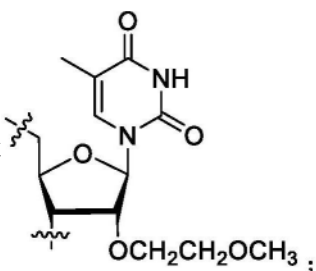
/52M0ErG/是



[0405] *是-O-P(O)(SH)-O-;

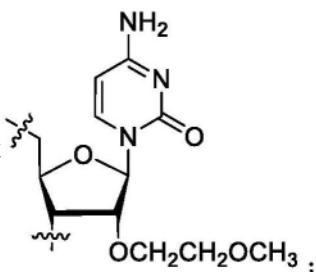
[0406]

/i2MOErT/是



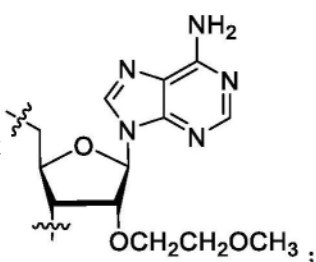
[0407]

/i2MOErC/是



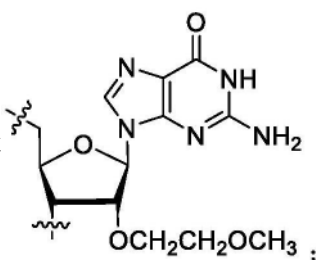
[0408]

/i2MOErA/是



[0409]

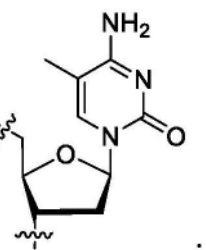
/i2MOErG/是



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷；

[0410]

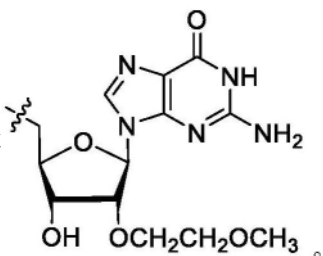
/iMe-dC/是 并且



;

[0411]

/32MOErG/是



[0412]

63. 组合物,其包含:

[0413]

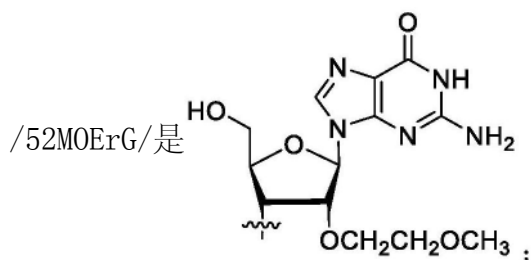
寡核苷酸或其盐,和

[0414]

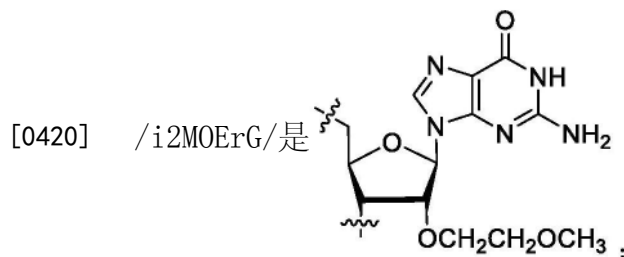
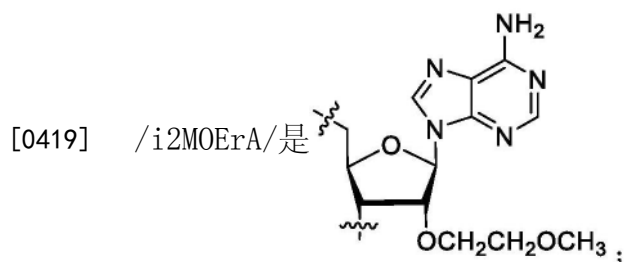
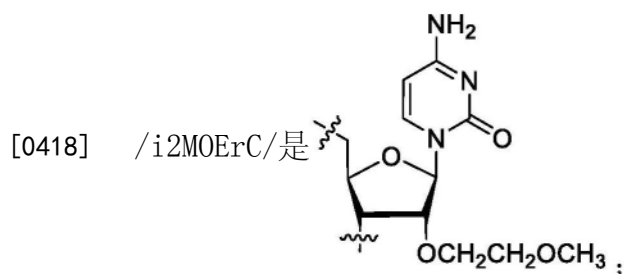
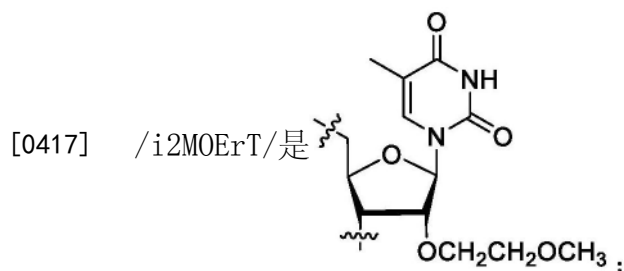
所述寡核苷酸相对于手性连接键的磷的一个或更多个非对映异构体,或所述非对

映异构体的一个或更多个盐,

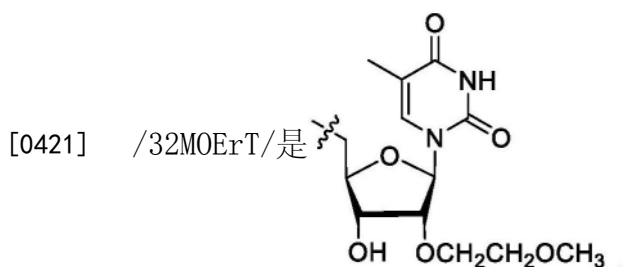
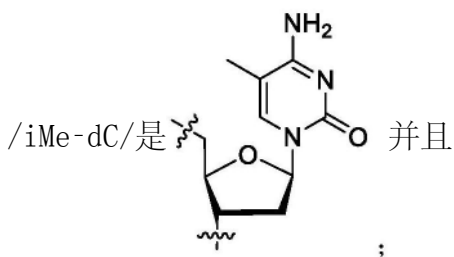
[0415] 其中所述寡核苷酸是/52M0ErG/*/i2M0ErA/*/i2M0ErG/*/i2M0ErA/*/i2M0ErG/*/iMe-dC/*/iMe-dC/*T*T*T*T*G*/iMe-dC/*A*/i2M0ErG/*/i2M0ErA/*/i2M0ErG/*/i2M0ErC/*/32M0ErT/,其中:



[0416] *是-O-P(O)(SH)-O-;



A、T和G的每一个分别独立地是脱氧腺苷、胸苷和脱氧鸟苷;



[0422] 64. 实施方案56-63中任一项所述的组合物,其中对于每个手性连接键的磷,Rp构型的百分比独立地是约20%-80%。

[0423] 65. 实施方案56-63中任一项所述的组合物,其中对于每个手性连接键的磷,Rp构型的百分比独立地是约30%-70%。

[0424] 66. 实施方案56-63中任一项所述的组合物,其中对于每个手性连接键的磷,Rp构型的百分比独立地是约40%-60%。

[0425] 67. 实施方案56-63中任一项所述的组合物,其中对于每个手性连接键的磷,Rp构型的百分比独立地是约45%-55%。

[0426] 68. 实施方案56-63中任一项所述的组合物,其中对于每个手性连接键的磷,Rp构型的百分比独立地是约50%。

[0427] 69. 实施方案56-68中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含所述寡核苷酸的盐和一个或多个非对映异构体的一个或多个盐。

[0428] 70. 实施方案56-69中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物,并且还包含药学上可接受的载体。

[0429] 71. 实施方案56-70中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含所述寡核苷酸的药学上可接受的盐、一个或多个非对映异构体的一个或多个药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体。

[0430] 72. 药物组合物,其包含前述实施方案中任一项所述的寡核苷酸和药学上可接受的载体。

[0431] 73. 实施方案72所述的组合物,其中所述组合物包含寡核苷酸的一个或多个药学上可接受的盐。

[0432] 74. 实施方案56-73中任一项所述的组合物,其中所述组合物是液体组合物。

[0433] 75. 实施方案70-74中任一项所述的组合物,其中所述药学上可接受的载体是缓冲液。

[0434] 76. 实施方案70-74中任一项所述的组合物,其中所述组合物是缓冲盐水。

[0435] 77. 实施方案70-74中任一项所述的组合物,其中所述药学上可接受的载体是人工脑脊液。

[0436] 78.降低系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平的方法,其包括向系统施用或递送有效量的前述实施方案中任一项的寡核苷酸或组合物。

[0437] 79.降低系统中钙蛋白酶-2多肽的水平的方法,其包括向系统施用或递送有效量的前述实施方案中任一项的寡核苷酸或组合物。

[0438] 80.降低系统中钙蛋白酶-2活性的水平的方法,其包括向系统施用或递送有效量的前述实施方案中任一项的寡核苷酸或组合物。

[0439] 81.实施方案78-80中任一项所述的方法,其中所述系统表达钙蛋白酶-2mRNA。

[0440] 82.实施方案78-81中任一项所述的方法,其中所述系统是或包含细胞。

[0441] 83.实施方案78-81中任一项所述的方法,其中所述系统是或包含组织。

[0442] 84.实施方案78-81中任一项所述的方法,其中所述系统是或包含器官。

[0443] 85.实施方案78-81中任一项所述的方法,其中所述系统是或包含脑或其部分。

[0444] 86.实施方案78-81中任一项所述的方法,其中所述系统是或包含生物体。

[0445] 87.实施方案78-81中任一项所述的方法,其中所述系统是受试者。

[0446] 88.实施方案78-81中任一项所述的方法,其中所述系统是人。

[0447] 89.实施方案78-88中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0448] 90.实施方案78-88中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约50%。

[0449] 91.实施方案78-88中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约60%。

[0450] 92.实施方案78-88中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约65%。

[0451] 93.实施方案78-88中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约70%。

[0452] 94.实施方案78-88中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约75%。

[0453] 95.实施方案78-88中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约80%。

[0454] 96.实施方案78-88中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约85%。

[0455] 97.实施方案78-96中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%。

[0456] 98.实施方案78-96中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约20%。

[0457] 99.实施方案78-96中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约30%。

[0458] 100.实施方案78-96中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物

相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约40%。

[0459] 101.实施方案78-96中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约50%。

[0460] 102.实施方案78-96中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约60%。

[0461] 103.实施方案78-102中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性的水平降低了约或至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。

[0462] 104.实施方案78-102中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性的水平降低了约或至少约20%。

[0463] 105.实施方案78-102中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性的水平降低了约或至少约30%。

[0464] 106.实施方案78-102中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性的水平降低了约或至少约40%。

[0465] 107.实施方案78-102中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性的水平降低了约或至少约50%。

[0466] 108.实施方案78-102中任一项所述的方法,其中与不存在所述寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性的水平降低了约或至少约60%。

[0467] 109.实施方案78-108中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0468] 110.实施方案78-108中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约50%。

[0469] 111.实施方案78-108中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约60%。

[0470] 112.实施方案78-108中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约65%。

[0471] 113.实施方案78-108中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约70%。

[0472] 114.实施方案78-108中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约75%。

[0473] 115.实施方案78-108中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约80%。

[0474] 116.实施方案78-108中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸或组合物相比,系统中钙蛋白酶-2mRNA的水平降低了约或至少约85%。

[0475] 117.实施方案78-116中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%。

[0476] 118.实施方案78-116中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合

物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约20%。

[0477] 119.实施方案78-116中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约30%。

[0478] 120.实施方案78-116中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约40%。

[0479] 121.实施方案78-116中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约50%。

[0480] 122.实施方案78-116中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2多肽的水平降低了约或至少约60%。

[0481] 123.实施方案78-122中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性的水平降低了约或至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。

[0482] 124.实施方案78-122中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性肽的水平降低了约或至少约20%。

[0483] 125.实施方案78-122中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性肽的水平降低了约或至少约30%。

[0484] 126.实施方案78-122中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性肽的水平降低了约或至少约40%。

[0485] 127.实施方案78-122中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性肽的水平降低了约或至少约50%。

[0486] 128.实施方案78-122中任一项所述的方法,其中与施用或递送参考寡核苷酸组合物相比,系统中钙蛋白酶-2活性肽的水平降低了约或至少约60%。

[0487] 129.实施方案109-128中任一项所述的方法,其中所述参考寡核苷酸不靶向钙蛋白酶-2或者所述参考组合物不包含靶向钙蛋白酶-2的寡核苷酸。

[0488] 130.实施方案109-128中任一项所述的方法,其中所述参考寡核苷酸靶向TUG1或者所述参考组合物包含靶向TUG1的寡核苷酸。

[0489] 131.实施方案89-130中任一项所述的方法,其中在施用或递送所述寡核苷酸或组合物的或其之后的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天,或者约1、2、3或4周,评估降低。

[0490] 132.实施方案89-131中任一项所述的方法,其中在施用或递送所述寡核苷酸或组合物后约D3时,评估所述降低。

[0491] 133.实施方案89-132中任一项所述的方法,其中在施用或递送所述寡核苷酸或组合物后约D7时,评估所述降低。

[0492] 134.实施方案89-133中任一项所述的方法,其中在施用或递送所述寡核苷酸或组合物后约D10时,评估所述降低。

[0493] 135.实施方案89-134中任一项所述的方法,其中在施用或递送所述寡核苷酸或组合物后约D14时,评估所述降低。

[0494] 136.实施方案89-135中任一项所述的方法,其中在施用或递送所述寡核苷酸或组合物后约D21时,评估所述降低。

- [0495] 137. 实施方案89-136中任一项所述的方法, 其中在去除或冲洗所述寡核苷酸或组合物的或其之后的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天, 或者约1、2、3或4周, 评估降低。
- [0496] 138. 实施方案89-137中任一项所述的方法, 其中在去除或冲洗所述寡核苷酸或组合后约D3时, 评估所述降低。
- [0497] 139. 实施方案89-138中任一项所述的方法, 其中在去除或冲洗所述寡核苷酸或组合后约D7时, 评估所述降低。
- [0498] 140. 实施方案89-139中任一项所述的方法, 其中在去除或冲洗所述寡核苷酸或组合后约D10时, 评估所述降低。
- [0499] 141. 实施方案89-140中任一项所述的方法, 其中在去除或冲洗所述寡核苷酸或组合后约D14时, 评估所述降低。
- [0500] 142. 实施方案89-141中任一项所述的方法, 其中在去除或冲洗所述寡核苷酸或组合后约D21时, 评估所述降低。
- [0501] 143. 实施方案89-142中任一项所述的方法, 其中以采用裸递送的约20 μ m寡核苷酸浓度在源自iPSC的运动神经元中, 评估所述降低。
- [0502] 144. 用于预防或治疗病况、病症或疾病的方法, 其包括向易感病况、病症或疾病的受试者施用或递送有效量的实施方案1-77中任一项的寡核苷酸或组合物。
- [0503] 145. 实施方案144所述的方法, 其中病况、病症或疾病的发生被延迟。
- [0504] 146. 实施方案144所述的方法, 其中病况、病症或疾病的发生被阻止。
- [0505] 147. 用于治疗病况、病症或疾病的方法, 其包括向患有病况、病症或疾病的受试者施用或递送有效量的实施方案1-77中任一项的寡核苷酸或组合物。
- [0506] 148. 实施方案147所述的方法, 其中病况、病症或疾病的症状的严重程度被降低。
- [0507] 149. 实施方案147-148中任一项所述的方法, 其中所述受试者的一个或多个临床评估结果独立地被改善。
- [0508] 150. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病与沃勒变性相关。
- [0509] 151. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是神经退行性病况、病症或疾病。
- [0510] 152. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是肌萎缩侧索硬化。
- [0511] 153. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是周围神经病。
- [0512] 154. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是化疗诱导的周围神经病。
- [0513] 155. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是帕金森病。
- [0514] 156. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是亨廷顿病。
- [0515] 157. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是阿尔茨海默疾病。
- [0516] 158. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是额颞叶痴

呆。

[0517] 159. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是创伤性脑损伤。

[0518] 160. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是进行性核上性麻痹。

[0519] 161. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是皮质基底节变性。

[0520] 162. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是沃尔弗拉姆综合征。

[0521] 163. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是弗里德赖希共济失调。

[0522] 164. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是多系统萎缩。

[0523] 165. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是脊髓小脑性共济失调。

[0524] 166. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是脊髓性肌萎缩。

[0525] 167. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是皮克病。

[0526] 168. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是进行性运动萎缩。

[0527] 169. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是卒中。

[0528] 170. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是脑震荡。

[0529] 171. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是脑出血。

[0530] 172. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是急性青光眼。

[0531] 173. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是癫痫发作。

[0532] 174. 实施方案144-149中任一项所述的方法, 其中病况、病症或疾病是脊髓损伤。

[0533] 175. 实施方案78-174中任一项所述的方法, 其中NF-L分泌被减少。

[0534] 176. 用于减少分泌排泄的方法, 其包括向受试者施用或递送有效量的实施方案1-77中任一项的寡核苷酸或组合物。

[0535] 177. 前述实施方案中任一项所述的方法, 其中神经炎性变性被减少。

[0536] 178. 用于减少神经炎性变性的方法, 其包括向受试者施用或递送有效量的实施方案1-77中任一项的寡核苷酸或组合物。

[0537] 179. 实施方案175-178中任一项所述的方法, 其中NF-L分泌和/或神经炎性变性是毒性触发的。

[0538] 180. 实施方案144-179中任一项所述的方法, 其中所述寡核苷酸或组合物是鞘内施用或递送的。

[0539] 181. 实施方案144-179中任一项所述的方法, 其中所述寡核苷酸或组合物是静脉内施用或递送的。

实施例

[0540] 本文展现了提供的技术(化合物(寡核苷酸,试剂等)、组合物、方法(制备、使用、评估的方法等)的某些实例。本领域技术人员理解,根据本公开,可以利用许多技术来制备和/或评估提供技术的性质和/或活性。

[0541] 实施例1各种寡核苷酸和组合物可以降低钙蛋白酶-2表达。

[0542] 本文所述的寡核苷酸和组合物可以提供钙蛋白酶-2 (CAPN2) 转录物的体外敲低。在评估中,将源自人诱导的多能干细胞(iPSC)的谷氨酸能神经元(bit.bio-ioGlutamatergic neurons,货号:io1001)以20000个细胞/孔接种在96孔形式中。所述细胞培养4天后,在5%TE缓冲液中以5 μ M的浓度将各种寡核苷酸组合物添加至所述细胞中。将细胞与所述寡核苷酸孵育48小时,以允许CAPN2表达的裸摄取和敲低。在此孵育期后,裂解细胞并收集RNA(Thermo Fisher货号#A25603)。RNA用于实时RT-qPCR以定量CAPN2表达的倍数变化。在一些实施方案中,如图1所示,各种寡核苷酸提供了钙蛋白酶-2表达的体外敲低。如图1所示,与参考条件相比,各种寡核苷酸提供了CAPN2表达的大量的体外敲低。阴性对照是/52MOErC/*/i2MOErC/*/i2MOErT/*/i2MOErA/*/i2MOErT/*A*G*G*A*/iMe-dC/*T*A*T*/iMe-dC/*/iMe-dC/*/i2MOErA/*/i2MOErG/*/i2MOErG/*/i2MOErA/*/32MOErA/。另参见图2中的数据(阳性对照是<T*G*C*A*A*>G*T*C*T*G*A*C*G*C*C*<C*A*T*C*T>,阴性对照是<A*C*C*A*G*>T*G*C*A*T*T*C*A*T*T*<C*G*A*G*T>;除<>中的2'-MOE修饰的那些外,所有核苷都是DNA核苷,并且每个*独立地代表硫代磷酸酯核苷酸间连接键)。

[0543] 实施例2各种寡核苷酸和组合物不显示出明显的细胞毒性。

[0544] 除其他外,本公开提供了具有低或无细胞毒性的寡核苷酸和组合物。在评估中,将源自人iPSC的谷氨酸能神经元(bit.bio-ioGlutamatergic neurons,货号:io1001)以20000个细胞/孔接种在96孔形式中。所述细胞培养4天后,在5%TE缓冲液中以5 μ M的浓度将各种寡核苷酸添加至所述细胞中。将细胞与所述寡核苷酸孵育48小时。在此孵育期后,细胞进行Hoechst染色(5 μ g/mL)。计数活细胞、死细胞和总(活+死)细胞的数量,并计算活细胞的百分比。如图3所示,与运载体处理(TE缓冲液)相比,用各种寡核苷酸处理后未观察到活细胞百分比的显著变化。阳性对照是<T*G*C*A*A*>G*T*C*T*G*A*C*G*C*C*<C*A*T*C*T>(靶向NEAT1),阴性对照是<A*C*C*A*G*>T*G*C*A*T*T*C*A*T*T*<C*G*A*G*T>;除<>中的2'-MOE修饰的那些外,所有核苷都是DNA核苷,并且每个*独立地代表硫代磷酸酯核苷酸间连接键)。利用星形孢菌素在单独的孔中诱导毒性。

[0545] 实施例3各种寡核苷酸和组合物可以提供钙蛋白酶-2表达的剂量依赖性降低。

[0546] 除其他外,本公开证明了各种提供的寡核苷酸和组合物可以提供钙蛋白酶-2mRNA水平的剂量依赖性降低。下面以来自评估的结果为例进行说明。

[0547] 细胞:人Bit.bio-ioGlutamatergic神经元,以20000个细胞/孔接种在96孔形式中。根据供应商的说明解冻、接种和培养(涂层:0.01%PL0和26ng/cm²层粘连蛋白)。

[0548] 寡核苷酸处理:寡核苷酸组合物14、15、36、39、71、77和TUG1(阴性对照)。浓度范围:20 μ M、15 μ M、10 μ M、5 μ M、2.5 μ M、1.25 μ M、0.63 μ M、0.31 μ M。阳性对照(靶向NEAT1):靶向NEAT1的寡核苷酸(5 μ M)。阴性对照:TUG1(5 μ M)。运载体:不含寡核苷酸的20%TE缓冲液(所有条件下TE缓冲液含量相同)。接种细胞后4天(通过裸摄取,48小时孵育),将寡核苷酸添加至细胞中。除了阴性对照TUG1寡核苷酸之外,处理在单独的平板上重复进行。阳性对照:<T*

G*C*A*A*>G*T*C*T*G*A*C*G*C*C*<C*A*T*C*T>(靶向NEAT1);阴性对照:<A*C*C*A*G*>T*G*C*A*T*T*C*AT*T*<C*G*A*G*T>;除<>中的2'-MOE修饰的那些外,所有核苷均为DNA核苷,并且每个*独立地代表硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

[0549] 收获:根据供应商的说明(无需单独的RNA纯化的细胞裂解和一步逆转录+实时PCR(实时RT-PCR)),Cells-to-Ct 1-Step TaqMan试剂盒(Life technologies)。30μL/孔裂解缓冲液。处理后2天。

[0550] RT-qPCR:10%的Cells-to-Ct裂解液样本(或者作为无模板对照的水;NTC)。单重反应,在384孔形式中,在技术重复中。使用LightCycler 480设备进行TaqMan基因表达测定。(仅用于对照寡核苷酸样本的NEAT1 Taqman测定,用于对照和测试寡核苷酸样品的CAPN2和RPLP0 Taqman测定)。

[0551]	引物-探针组	供应商	测定ID
	人NEAT1 FAM(靶标;对照样本)	IDT	
	人CAPN2 FAM(靶标)	Thermo Fisher	Hs00965097_m1
	人RPLP0VIC_PL(持家基因)	Thermo Fisher	Hs00420895_gH

[0552] 数据分析:使用二阶导数方法(Lightcycler软件)测定Cp值。通过 $\Delta\Delta C_p$ 方法(归一化为阴性对照寡核苷酸:5μM的TUG1)测定倍数变化基因表达。对于NEAT1表达: $\Delta C_p = C_{p_{NEAT1}} - C_{p_{RPLP0}}$; $\Delta\Delta C_p = \Delta C_{p_{NEAT1}} - \Delta C_{p_{TUG1}}$; NEAT1表达的倍数变化 = $2^{-\Delta\Delta C_p}$ 。对于CAPN2表达: $\Delta C_p = C_{p_{CAPN2}} - C_{p_{RPLP0}}$; $\Delta\Delta C_p = \Delta C_{p_{CAPN2}} - \Delta C_{p_{TUG1}}$; CAPN2表达的倍数变化 = $2^{-\Delta\Delta C_p}$ 。

[0553] 观察到阳性和阴性对照寡核苷酸的强烈分离。阳性和阴性对照之间没有明显的板内或板间变化。基于对照样品性能(运载体、阳性和阴性对照),未观察到板位置效应,并且在测试的板之间未观察到明显的板漂移。与运载体处理(倍数变化和/或Cp值)相比,未观察到对照处理在钙蛋白酶-2和/或RPLP0表达上的影响。观察到生物学重复之间的一致性。

[0554] 如下表所示,对于各种提供的寡核苷酸组合物,观察到钙蛋白酶-2基因敲低的浓度依赖性增加。没有观察到对RPLP0的表达的影响。靶向TUG1的阴性对照对钙蛋白酶-2表达没有显示处浓度依赖性作用。在评估的最高的寡核苷酸浓度(20μM)和较低浓度下,未观察到明显的细胞毒性。

[0555]	浓度	钙蛋白酶-2 mRNA的敲低%					
		14	39	71	77	36	15
	20 μM	74	68	55.5	57	42	27.5
	15 μM	70	69	56	50.5	32.5	21
	10 μM	64.5	61.5	48.5	45	31	-2
	5 μm	58.5	51.5	34	38.5	30.5	18.5
	2.5 μM	45.5	45	38	27	27	5.5
	1.25 μM	43.5	26.5	23	22.5	20.5	9
	0.63 μM	27	21.5	19.5	23	8	12.5
	0.32 μM	21.5	11	8.5	7.5	13	5

[0556] 实施例4各种寡核苷酸和组合物可以提供钙蛋白酶-2mRNA水平的剂量依赖性降低。

[0557] 除其他外,本公开证明了各种提供的寡核苷酸和组合物可以提供钙蛋白酶-2mRNA

水平的剂量依赖性降低。下面以来自评估的结果为例进行说明。

[0558] 细胞: iCell运动神经元, 以32000个细胞/孔接种在96孔形式中。可以根据供应商的说明进行解冻、接种和培养(例如, 涂层: 0.07% PEI+10 μ g/ml Cultrex 3D小鼠层粘连蛋白; 培养基: 第0天至第6天用含20mM DAPT的完全维持培养基, 第7天至第10天用不含DAPT的完全维持培养基)。通过用Hoechst (5 μ g/ml) 染色并成像以计数细胞核, 在第10天检查细胞活力。

[0559] 寡核苷酸处理: 寡核苷酸组合物14、39、71、和TUG1 (阴性对照)。浓度范围: 20 μ M、6.329 μ M、2.003 μ M、0.634 μ M、0.201 μ M、0.063 μ M、0.020 μ M、0.006 μ M。阳性对照 (靶向NEAT1): 靶向NEAT1的寡核苷酸 (20 μ M)。运载体: 不含寡核苷酸的2% (v/v) TE缓冲液。接种细胞后7天, 将寡核苷酸添加至细胞中, 并且在第9天更新 (通过裸摄取, 72小时总孵育)。除了阳性对照NEAT1寡核苷酸和运载体两者每板都有6个重复外, 处理在单独的平板上重复三次。阳性对照: <T*G*C*A*A*>G*T*C*T*G*A*C*G*C*C*<C*A*T*C*T> (靶向NEAT1); 阴性对照: <A*C*C*A*G*>T*G*C*A*T*T*C*A*T*T*<C*G*A*G*T>; 除<>中的2'-MOE修饰的那些外, 所有核苷均为DNA核苷, 每个*独立地代表硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

[0560] 收获: 根据供应商的说明 (无需单独的RNA纯化的细胞裂解和一步逆转录+实时PCR (实时RT-PCR)), 可以使用Cells-to-Ct 1-Step TaqMan试剂盒 (Life Technologies) 收获细胞。25 μ L/孔裂解缓冲液。处理后3天。

[0561] RT-qPCR: 15%的Cells-to-Ct裂解液样本 (或者作为无模板对照的水; NTC)。单重反应, 在384孔形式中, 在技术重复中。使用LightCycler 480设备进行TaqMan基因表达测定。(仅用于对照寡核苷酸样本的NEAT1 Taqman测定, 用于对照和测试寡核苷酸样品的CAPN2和RPLP0 Taqman测定)。

[0562]	引物-探针组	供应商	测定ID
	人NEAT1 FAM (靶标; 对照样本)	IDT	
	人CAPN2 FAM (靶标)	Thermo Fisher	Hs00965097_m1
	人RPLP0VIC_PL (持家基因)	Thermo Fisher	Hs00420895_gH

[0563] 数据分析: 使用二阶导数方法 (Lightcycler软件) 测定Cp值。通过Pfaffl方法测定基因表达的敲低%, 以解释引物效率错配: $RQ = (E_{\text{靶标}})^{\Delta Ct(\text{靶标})} / (E_{\text{参考}})^{\Delta Ct(\text{参考})}$ (归一化为阴性对照: TUG1), 其中 $\Delta Ct(\text{靶标}) = Ct(\text{校准物中的靶基因}) - Ct(\text{测试中的靶基因})$ 和 $\Delta Ct(\text{参考}) = Ct(\text{校准物中的参考基因}) - Ct(\text{测试中的参考基因})$ 。

[0564] 用靶向NEAT1的阳性对照寡核苷酸处理导致NEAT1的特异性敲低, 与运载体相比, 用靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸处理导致NEAT1 Cp值略低。当与运载体处理相比时, 用靶向NEAT1的阳性对照寡核苷酸或靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸处理不会显著影响RPLP0或CAPN2 Cp值。没有观察到明显的板间变化。在实验过程中, 通过明场成像观察到细胞活力的显著变化, 这导致RT-qPCR的样品输入发生变化并排除了一些数据点。观察到大多数技术重复之间的变化较小。NTC没有显示出扩增, 这表明没有污染。在平板之间未观察到总细胞计数的实质性变化。在任何浓度下均未观察到明显的寡核苷酸特异性细胞毒性。

[0565] 如图4和下表所示, 观察到CAPN2敲低中的浓度依赖性增加。寡核苷酸14在20 μ m下在72小时时可提供约96%的CAPN2的敲除。没有观察到对RPLP0的表达的显著影响。靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸对CAPN2 mRNA水平没有显示出浓度依赖性作用。使用非线性回归

(可变希尔斜率)将EC50值转换为pEC50值。

[0566]	寡核苷酸	pEC50	拟合优度 (R^2)
	14	7.44	0.9048
	39	6.41	0.9361

[0567] 实施例5各种寡核苷酸和组合物可以提供神经保护作用。

[0568] 除其他外,本公开证明了各种提供的寡核苷酸和组合物可提供神经保护作用,例如暴露于毒性触发物后减少的神经丝-L (NF-L) 分泌。下面以来自评估的结果为例进行说明。

[0569] 细胞:iCell运动神经元,以32000个细胞/孔接种在96孔形式中。可以根据供应商的说明进行解冻、接种和培养(例如,涂层:0.07%PEI+10 μ g/ml Cultrex 3D小鼠层粘连蛋白;培养基:第0天至第6天用含20mM DAPT的完全维持培养基,第7天至第10天用不含DAPT的完全维持培养基)。

[0570] 寡核苷酸处理:寡核苷酸组合物14和TUG1 (阴性对照)。浓度:20 μ M。运载体:不含寡核苷酸的2% (v/v) TE缓冲液(所有条件下TE缓冲液含量相同)。接种细胞后7天,将寡核苷酸添加至细胞中,并且在第9天更新(通过裸摄取,72小时总孵育)。处理在重复中进行(在一些实施方案中,每个毒性触发物每个寡核苷酸处理N=4)。阴性对照:<A*C*C*A*G*>T*G*C*A*T*T*C*A*T*T*<C*G*A*G*T> (靶向TUG1);除<>中的2'-MOE修饰的那些外,所有核苷均为DNA核苷,每个*独立地代表硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

[0571] 毒性触发物:在第9天添加了各种毒性触发物。使用的毒性触发物包括长春新碱(1.5nM、3nM、6nM)、鱼藤酮(5 μ M、10 μ M、15 μ M)和秋水仙碱(10nM、100nM、1000nM)。

[0572] 神经丝-L测定:在添加毒性触发后24小时,在第10天收获来自细胞的上清液。根据供应商的说明,使用R-PLEX人神经丝-L测定试剂盒(Meso Scale Discovery)测定神经丝-L (NF-L) 的浓度。

[0573] 如图5所示,与运载体相比,用寡核苷酸组合物14预处理降低了毒性触发物诱导的NF-L分泌。与运载体相比,用寡核苷酸组合物14预处理,观察到暴露于长春新碱(1.5nM、3nM或6nM;图5, (A)),鱼藤酮(5 μ M、10 μ M或15 μ M;图5, (B))或秋水仙碱(100nM;图5, (C))后,NF-L分泌的显著减少。与运载体相比,阴性对照(靶向TUG1)寡核苷酸组合物也降低了毒性触发物诱导的NF-L分泌。不受到任何理论的限制,采用TUG1靶向的寡核苷酸组合物的观察到的减少可能是由于钙蛋白酶非依赖性作用。此外,在各种情况下,与TUG1靶向的寡核苷酸组合物相比,采用寡核苷酸组合物14观察到NF-L分泌的更大的减少。在一些实施方案中,通过MSD进行的NF-L分析显示了相对于TUG1的寡核苷酸组合物14的可观察的测定窗口。

[0574] 当在神经炎变性测定中评估时,似乎寡核苷酸组合物14部分地阻止了触发物诱导的神经炎变性,例如,通过暴露于毒性触发物后的微管蛋白免疫反应性区域进行测量。在一些实施方案中,还观察到对于TUG1靶向的寡核苷酸组合物的某些作用。

[0575] 实施例6提供的技术可以减少钙蛋白酶-2mRNA和蛋白质水平的降低。

[0576] 除其他外,本公开证明了各种提供的寡核苷酸和组合物可以在某些情况下提供钙蛋白酶-2mRNA和蛋白质水平的降低,持续数天、数周或更长时间。下面以来自某些评估的结果为例进行说明。本领域技术人员理解,根据本公开,还可以利用其他技术来评估提供的技术,以确认提供的技术的技术效果、益处、优势等。

[0577] 细胞:iCell运动神经元,以32000个细胞/孔接种在96孔形式中。解冻、接种和培养可以根据供应商的说明进行。

[0578] 寡核苷酸处理:寡核苷酸组合物14、39、71、和TUG1 (阴性对照)。浓度:寡核苷酸组合物14为20 μ M、寡核苷酸组成39为18.9 μ M、靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸为20 μ M。运载体:不含寡核苷酸的2% (v/v) TE缓冲液。接种细胞后第7天,将寡核苷酸添加至细胞中(通过裸摄取),并且在第9天通过培养基更新进行去除(48小时总孵育)。在接种细胞后第7天(基线)和去除寡核苷酸组合物后3、7、10、14和21天收集细胞并裂解。对于mRNA收集,对于每种条件3个重复进行处理,对于每个收集时间点使用单独的平板。对于蛋白质收集,对于每种条件3个重复进行处理,对于每个收集时间点使用单独的平板。

[0579] 阴性对照:<A*C*C*A*G*>T*G*C*A*T*T*C*A*T*T*<C*G*A*G*T>;除<>中的2'-MOE修饰的那些外,所有核苷均为DNA核苷,每个*独立地代表硫代磷酸酯核苷酸间连接键。

[0580] mRNA收获:根据供应商的说明(25 μ L/孔裂解缓冲液),在接种细胞(基线)后第7天和去除寡核苷酸组合物后3、7、10、14和21天,使用Cells-to-Ct 1-Step TaqMan试剂盒(Thermo Fisher)收获细胞。

[0581] RT-PCR:15%的Cells-to-Ct裂解物样品和下表中的引物探针组,作为单重反应,在384孔形式中,在技术重复中。使用LightCycler 480设备(Roche)进行TaqMan基因表达测定。(对照和测试寡核苷酸样品的CAPN2和RPLP0 Taqman测定。)

[0582]	引物-探针组	供应商	测定ID
	人CAPN2 FAM(靶标)	Thermo Fisher	Hs00965097_m1
	人RPLP0 VIC_PL(持家基因)	Thermo Fisher	Hs00420895_gH

[0583] mRNA数据分析:使用二阶导数方法(Lightcycler软件)测定Cp值。通过Pfaffl方法测定基因表达的敲低%,以解释引物效率错配: $RQ = (E_{\text{靶标}})^{\Delta Ct(\text{靶标})} / (E_{\text{参考}})^{\Delta Ct(\text{参考})}$ (归一化为阴性对照:TUG1),其中 $\Delta Ct(\text{靶标}) = Ct(\text{校准物中的靶基因}) - Ct(\text{测试中的靶基因})$ 和 $\Delta Ct(\text{参考}) = Ct(\text{校准物中的参考基因}) - Ct(\text{测试中的参考基因})$ 。

[0584] 用运载体(TE缓冲液)或靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸处理细胞导致持家(RPLP0)和靶(CAPN2)基因Cp值的仅微小改变。在用运载体(TE缓冲液)或靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸处理后,在CAPN2和RPLP0的重复样品中观察到的Cp值小的变化,这可能是由于细胞活力的孔间差异。通过Hoechst染色(允许细胞核计数)和明场成像评估细胞活力。没有观察到主要的细胞毒性。在个别的孔之间观察到细胞活力的一些变化,但是与用运载体(TE缓冲液)或靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸的处理相比,用靶向CAPN2的寡核苷酸处理后的平均细胞核计数没有显著差异。此外,如图8所示,用运载体(TE缓冲液)、靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸或靶向CAPN2的寡核苷酸处理后,未观察到对细胞形态的显著影响。此外,在去除寡核苷酸后至少21天,细胞形态在处理条件之间没有显著差异。对于靶向CAPN2的寡核苷酸,在第21天观察到细胞团的形成,并且在对照条件下也观察到细胞团的形成。在所有处理条件下均观察到神经网络形成。

[0585] 如图6和下表所示,证实了钙蛋白酶-2(CAPN2)mRNA敲低。寡核苷酸14可以在20 μ M下在去除寡核苷酸后的第0天提供钙蛋白酶-2mRNA的约94%敲低,并且在20 μ M下在去除寡核苷酸后的第21天提供钙蛋白酶-2mRNA的约77%敲低。寡核苷酸39可以在18.9 μ M下在去除寡核苷酸后的第0天提供钙蛋白酶-2mRNA的约87%敲低,并且在18.9 μ M下在去除寡核苷酸

后的第21天提供钙蛋白酶-2mRNA的约82%敲低。从去除寡核苷酸后第0天至去除寡核苷酸后至少第21天,寡核苷酸14和寡核苷酸39均显示出钙蛋白酶-2mRNA的持续敲低。靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸没有显示出钙蛋白酶-2mRNA水平的敲低。除其他外,本实施例的数据证实了提供的技术可以提供钙蛋白酶-2mRNA的持续敲低,例如,在去除或冲洗寡核苷酸或组合物之后。

[0586] 蛋白质收获:使用RIPA裂解缓冲液(30 μ L/孔)(包括HaIt蛋白酶抑制剂混合物(Thermo Fisher)制备的细胞裂解物。每个重复合并三个孔,以确保获得足够量用于蛋白质检测。每个条件下每个时间点收获三个重复。通过BCA测定评估蛋白质产量。

[0587] 蛋白质检测:根据供应商的说明,通过Jess设备(ProteinSimple)使用蛋白质印迹检测钙蛋白酶-2蛋白。每个条件和时间点检查两个重复。钙蛋白酶-2抗体(EPR5977/ab126600;Abcam)以1:6的稀释度使用。

[0588] 蛋白质数据分析:基于化学发光的靶标免疫反应性检测。使用Compass软件对曲线下面积(AUC)、检测到的分子(MW)和信噪比进行信号分析。靶蛋白敲低%的定量,针对总蛋白进行归一化。与处理后48小时的未处理细胞相比,钙蛋白酶-2蛋白水平不受运载体(TE缓冲液)或阴性对照处理的影响。在某些时间点的某些条件下(例如在某些情况下,可能是由于细胞活力的孔间差异),观察到重复之间钙蛋白酶-2蛋白水平的一些变化。对于寡核苷酸39的阴性对照,由于高蛋白质载量和底物不足,在10、14和21天的样品中观察到轻微的钙蛋白酶-2蛋白质信号消耗,这可能导致蛋白质敲低的低估。通过Hoechst染色(允许细胞核计数)和明场成像评估细胞活力。没有观察到主要的细胞毒性。在个别的孔之间观察到细胞活力的一些变化,但是与用运载体(TE缓冲液)或靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸的处理相比,用靶向CAPN2的寡核苷酸处理后的平均细胞核计数没有显著差异。此外,如图8所示,用运载体(TE缓冲液)、靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸或靶向CAPN2的寡核苷酸处理后,未观察到对细胞形态的显著影响。此外,在去除寡核苷酸后至少21天,细胞形态在处理条件之间没有显著差异。对于靶向CAPN2的寡核苷酸,在第21天观察到细胞团的形成,并且在对照条件下也观察到细胞团的形成。在所有处理条件下均观察到神经网络形成。

[0589] 如图7和下表所示,证实了钙蛋白酶-2蛋白敲低。寡核苷酸14可以在20 μ M下在去除寡核苷酸后的第14天提供钙蛋白酶-2蛋白的约51%敲低,如图7A所示。寡核苷酸39可以在18.9 μ M下在去除寡核苷酸后的第14天提供钙蛋白酶-2蛋白的约60%敲低,如图7B所示。从去除寡核苷酸后第7天,寡核苷酸14和寡核苷酸39均显示出持续的钙蛋白酶-2蛋白敲低,并且在去除寡核苷酸后至少第21天保持持续的钙蛋白酶-2蛋白敲低。靶向TUG1的阴性对照寡核苷酸没有显示出钙蛋白酶-2蛋白水平的敲低。除其他外,本实施例的数据证实了提供的技术可以提供钙蛋白酶-2蛋白的持续敲低,例如,在去除或冲洗寡核苷酸或组合物之后。

[0590]

寡核苷酸 14		
天	mRNA % KD	蛋白质 % KD
0	94.47	3.25
3	87.12	23.32
7	84.36	45.47
10	82.16	31.39
14	83.80	51.07
21	77.25	40.75

寡核苷酸 39		
天	mRNA % KD	蛋白质 % KD
0	87.40	13.10
3	79.20	28.09
7	78.15	49.51
10	80.24	54.18
14	73.98	60.46
21	82.35	50.17

[0591] 根据本公开,各种其他技术可用于评估提供的技术的性质和/或活性。例如,可以通过蛋白质印迹或免疫染色评估钙蛋白酶-2多肽水平的降低。在一些实施方案中,对提供的寡核苷酸和组合物评估了钙蛋白酶-2活化的降低。在一些实施方案中,对提供的寡核苷酸和组合物评估了钙蛋白酶-2蛋白酶活性的降低。在一些实施方案中,(例如通过使用一个或多个细胞模型)来对提供的寡核苷酸和组合物评估神经元变性的减少。在一些实施方案中,对提供的寡核苷酸和组合物评估了从轴突切开术的加速恢复。虽然本文已经描述和说明了各种实施方案,但本领域的普通技术人员将容易地设想用于执行功能和/或获得结果和/或本公开中描述的一个或多个优点的各种其他方式和/或结构,并且认为包括这样的变化和/或修改的每一个。更一般地,本领域技术人员将容易理解,本文所述的所有参数、尺寸、材料和配置都是示例,并且实际参数、尺寸、材料和/或配置可能取决于使用本公开教导的具体一个或多个应用。本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本公开的实施方案的许多等同物。因此,应当理解,上述实施方案以仅示例的方式呈现,并且在所附权利要求及其等效物的范围内,所要求的技术可以以具体描述和要求保护以外的方式进行实施。此外,如果这些特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法不相互不一致,则两个或更多个特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法的任何组合被包括在本公开的范围內。

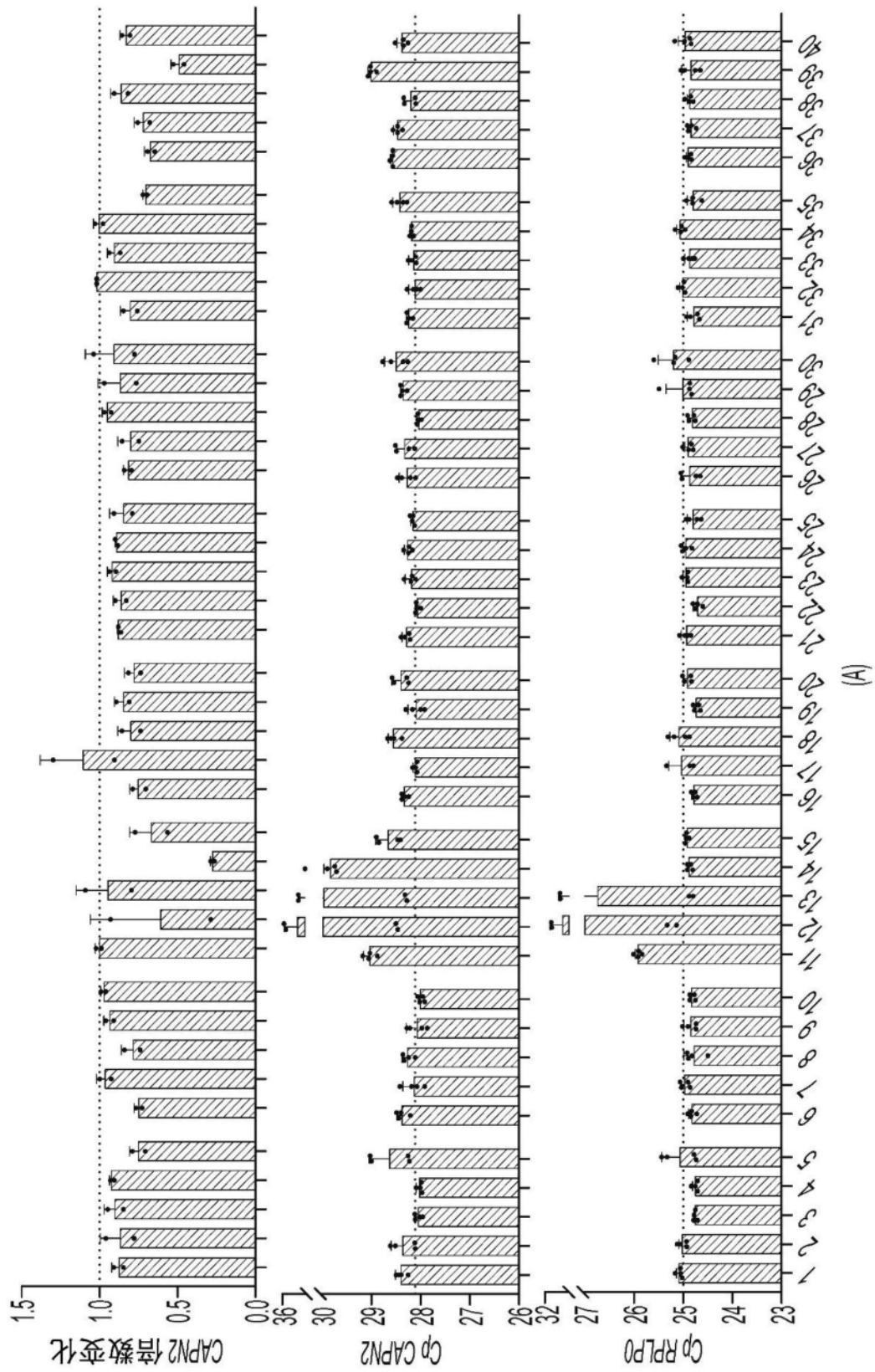


图1

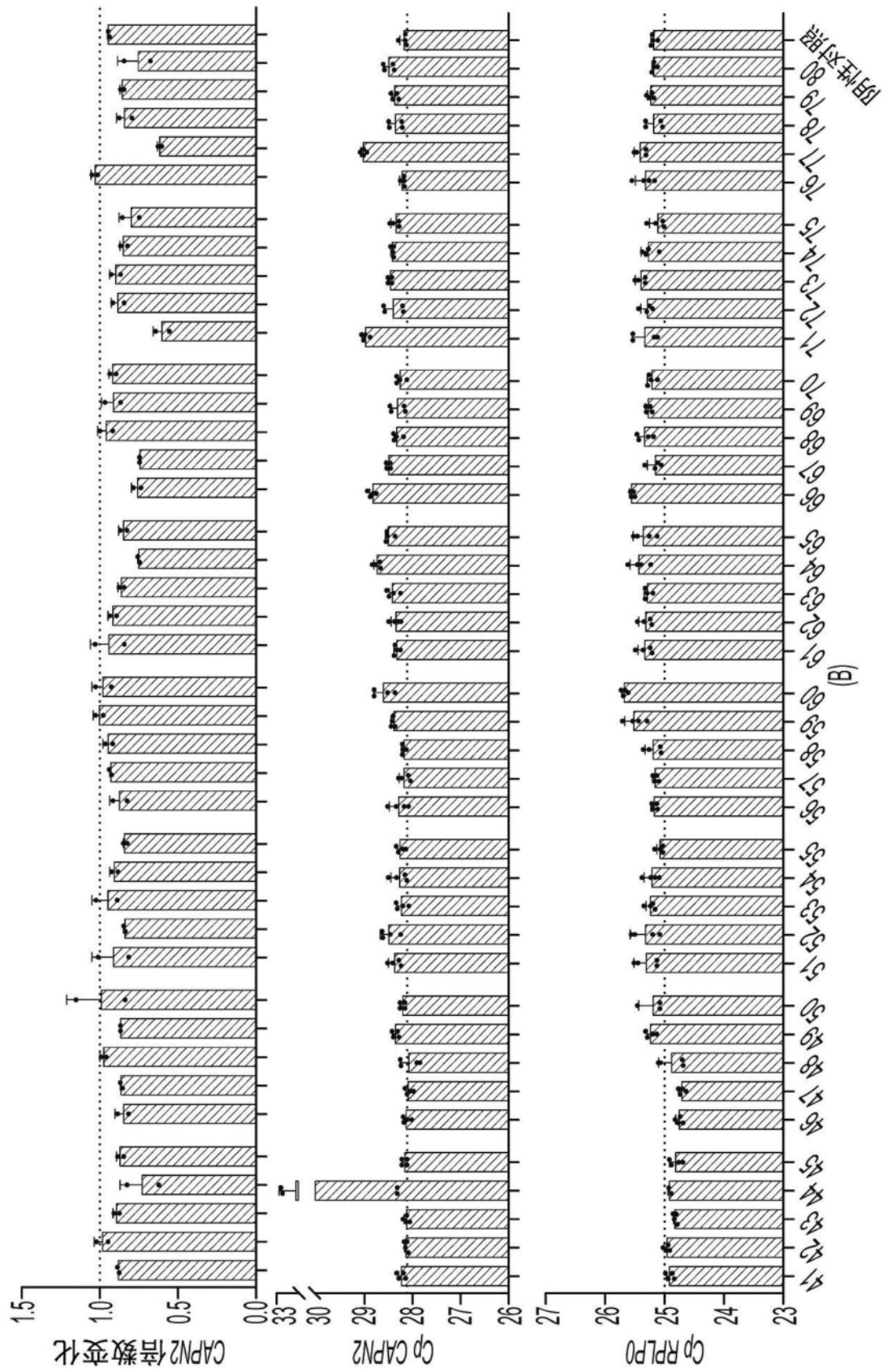


图1续

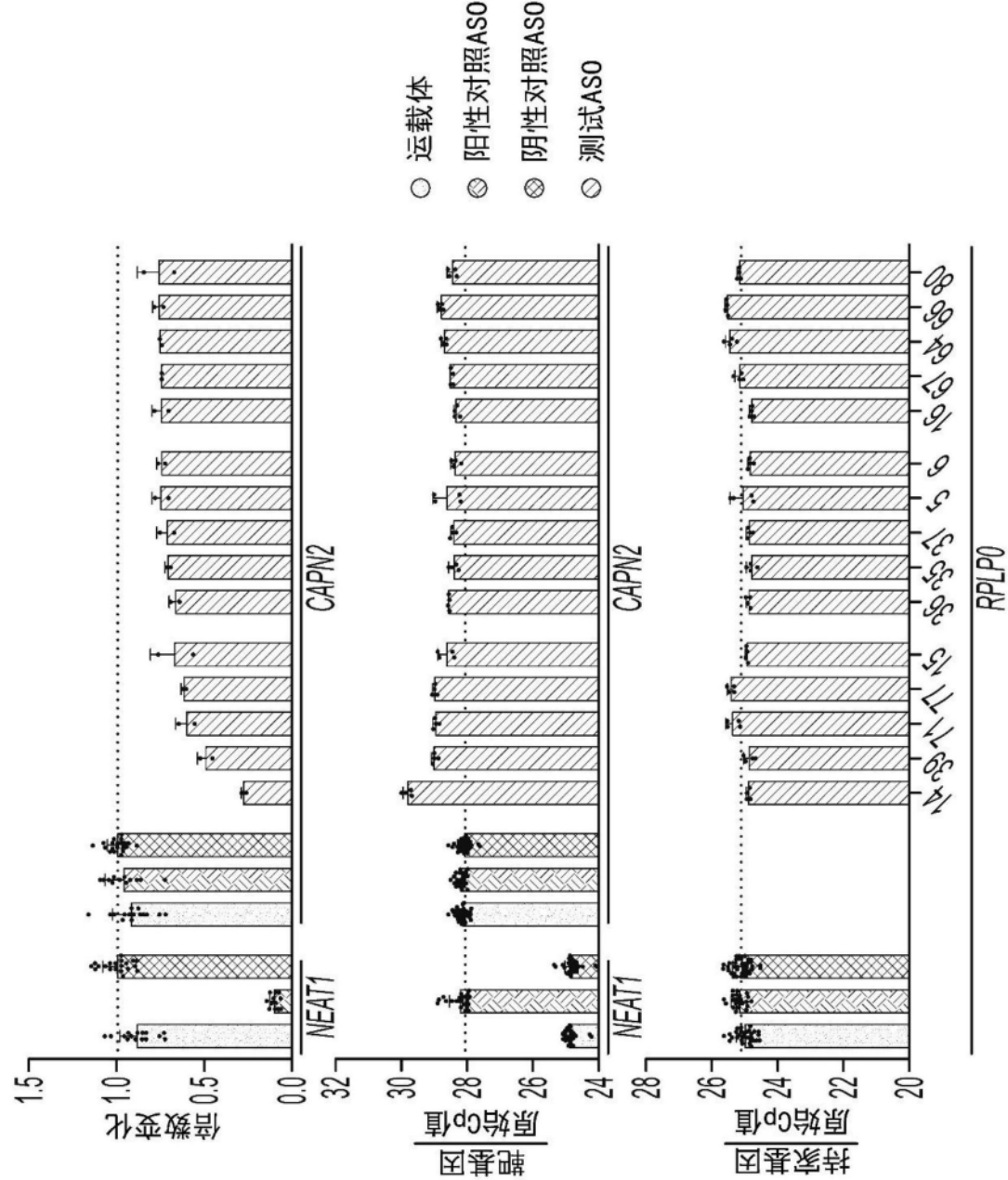


图2

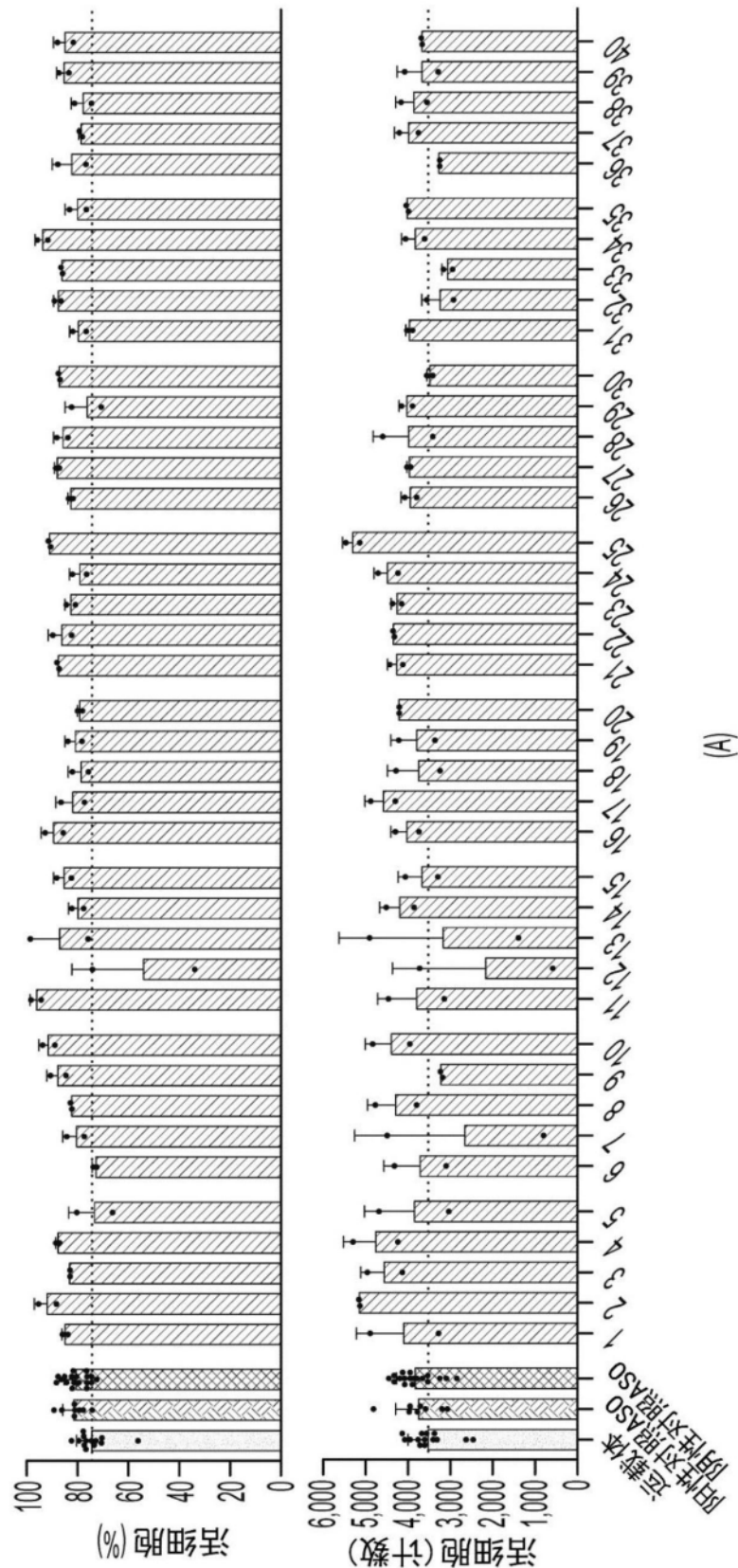


图3

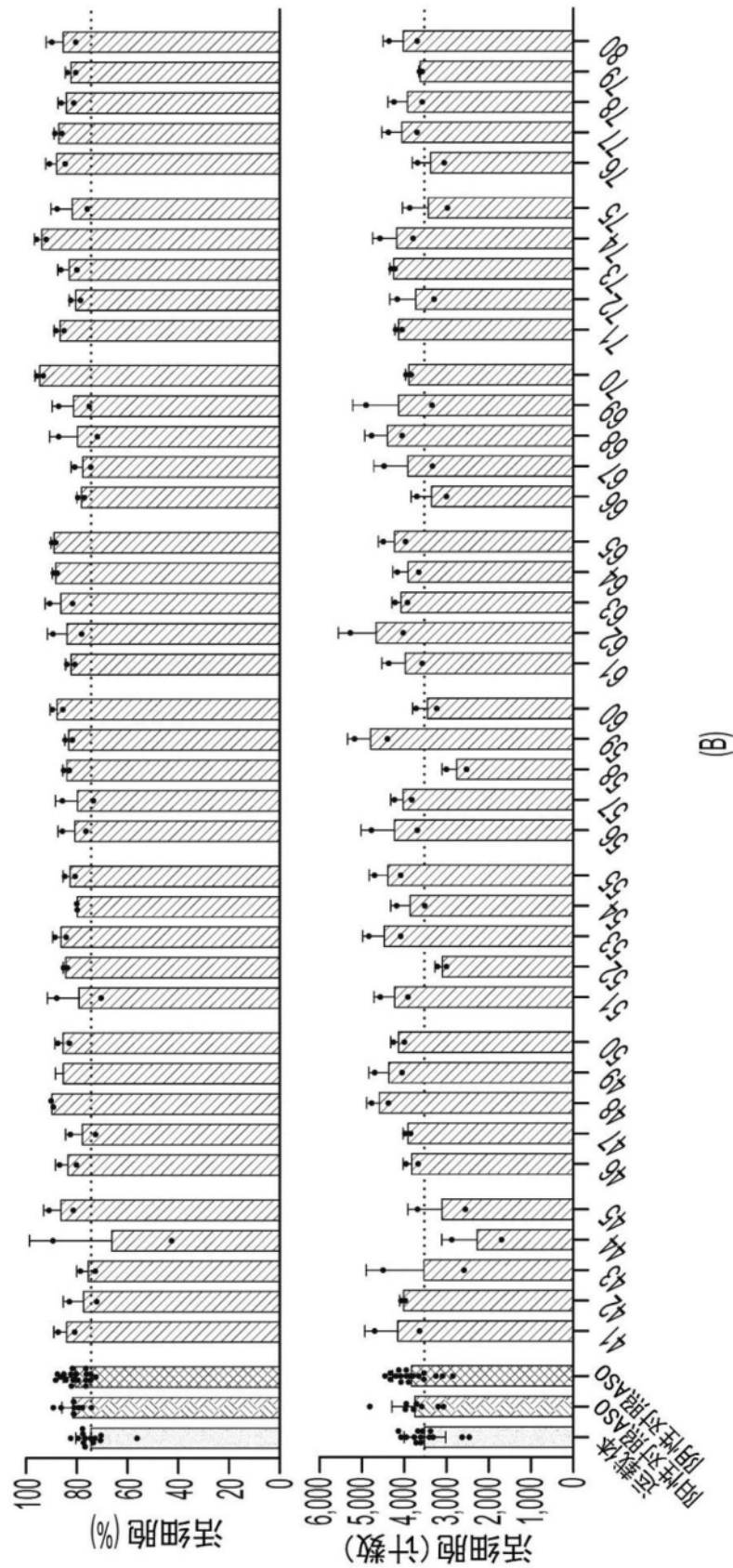


图3续

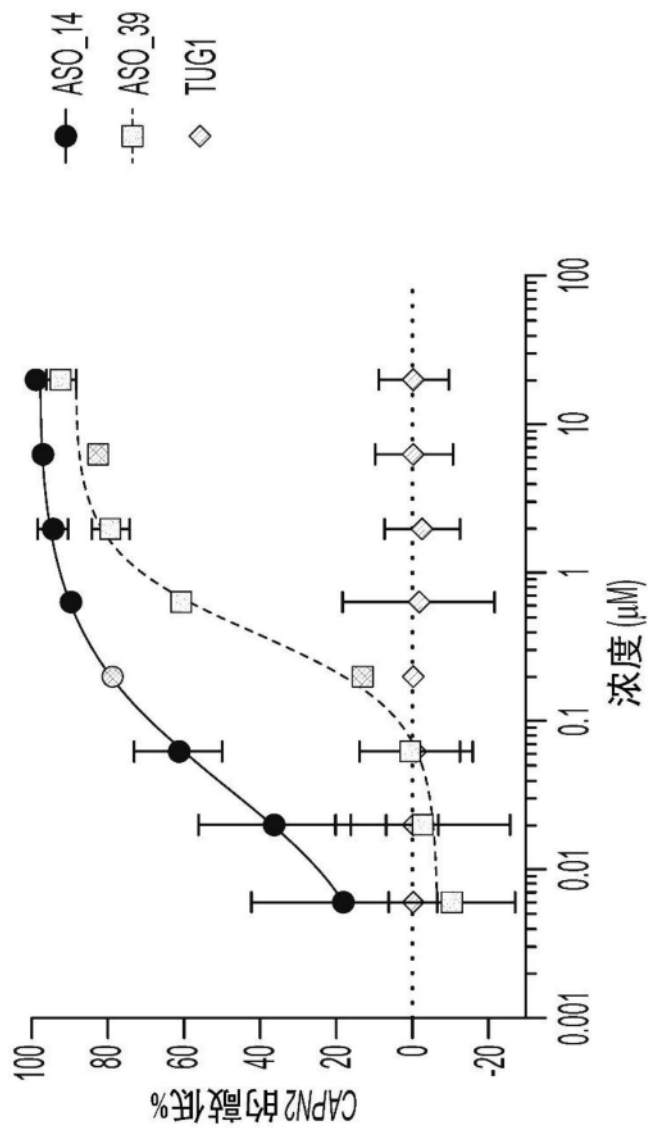


图4

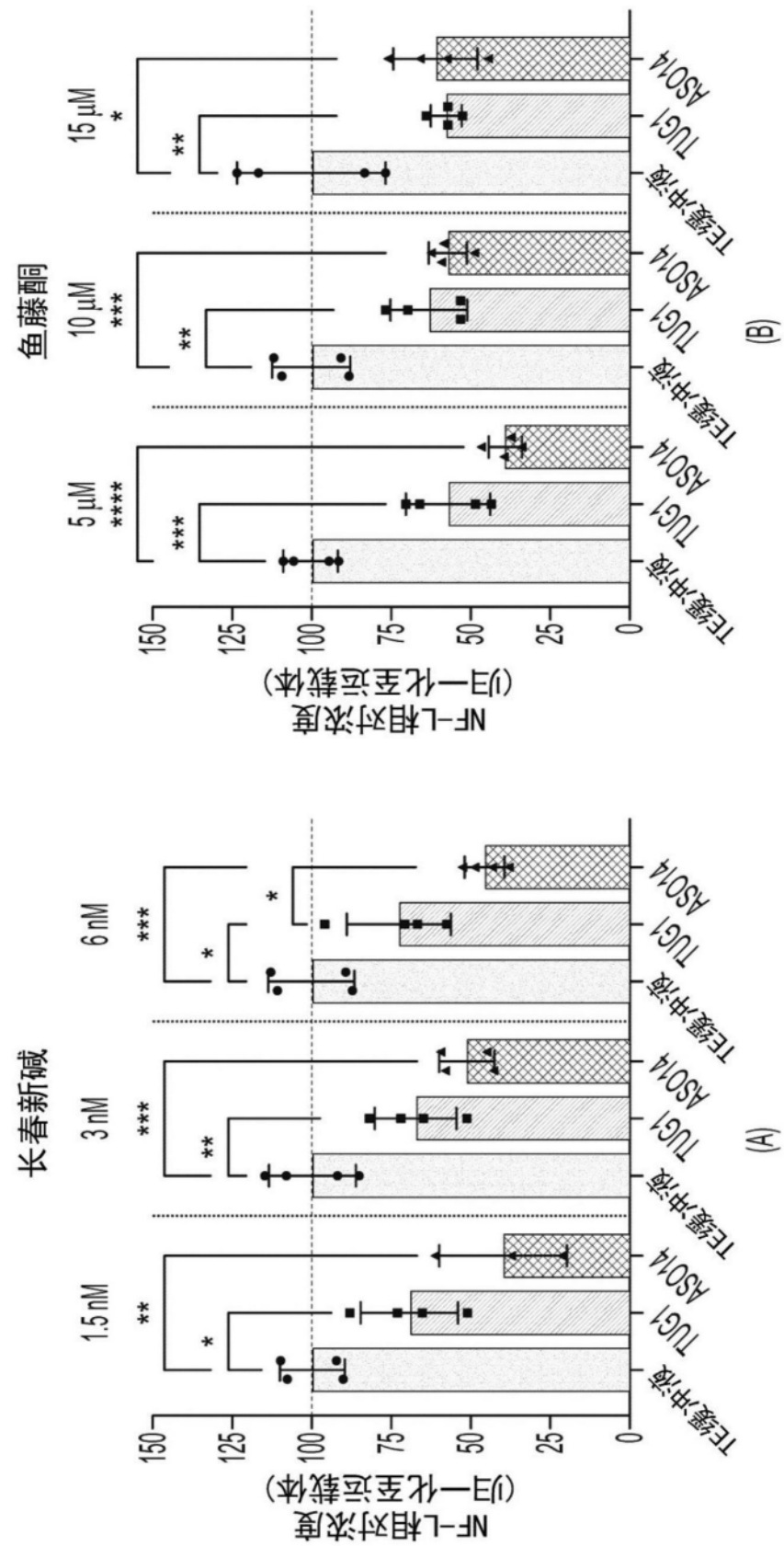


图5

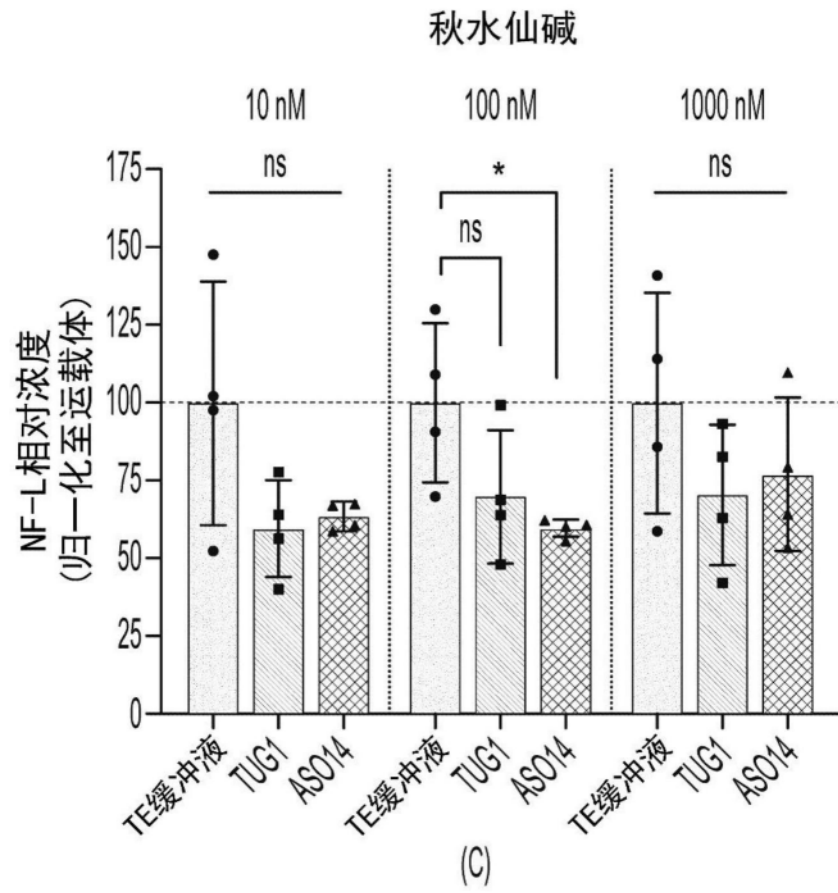


图5续

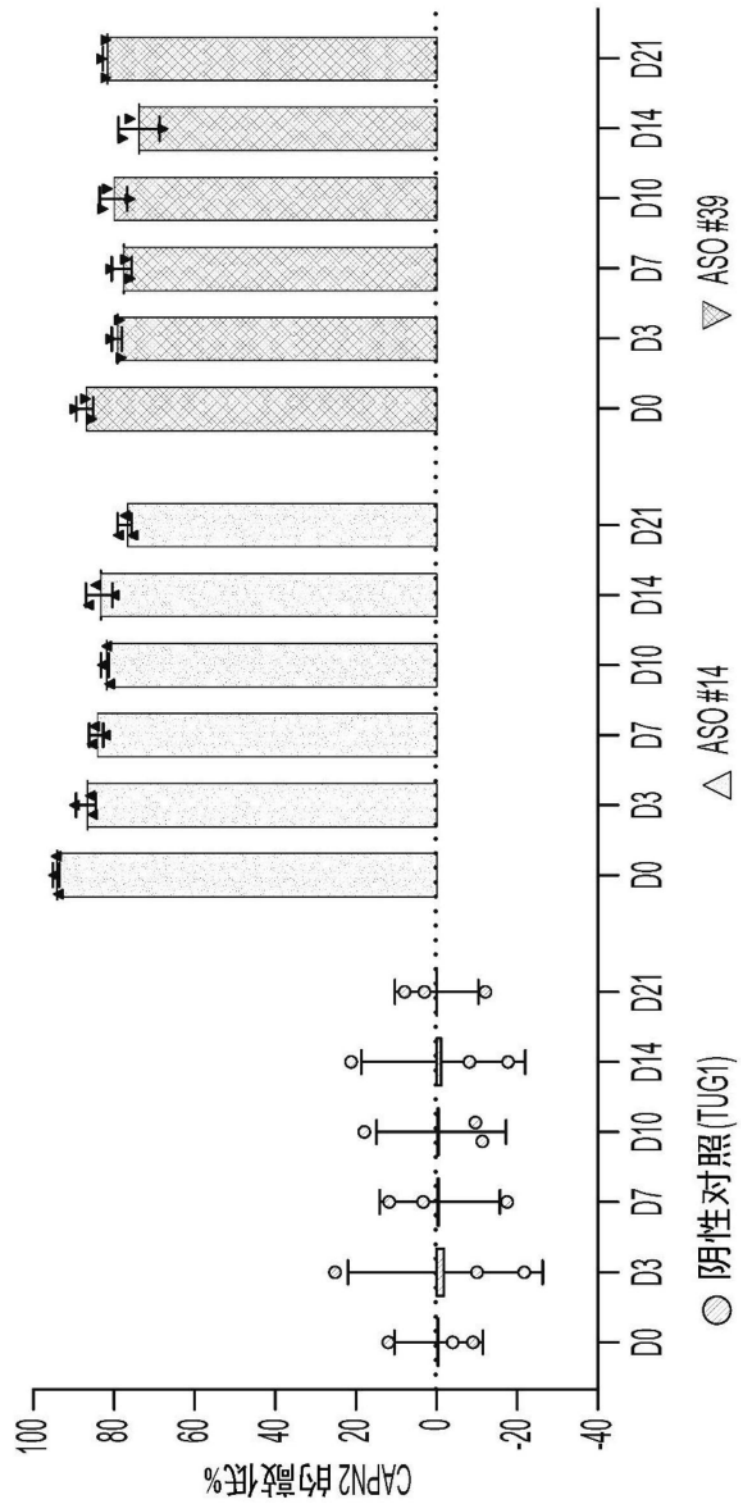


图6

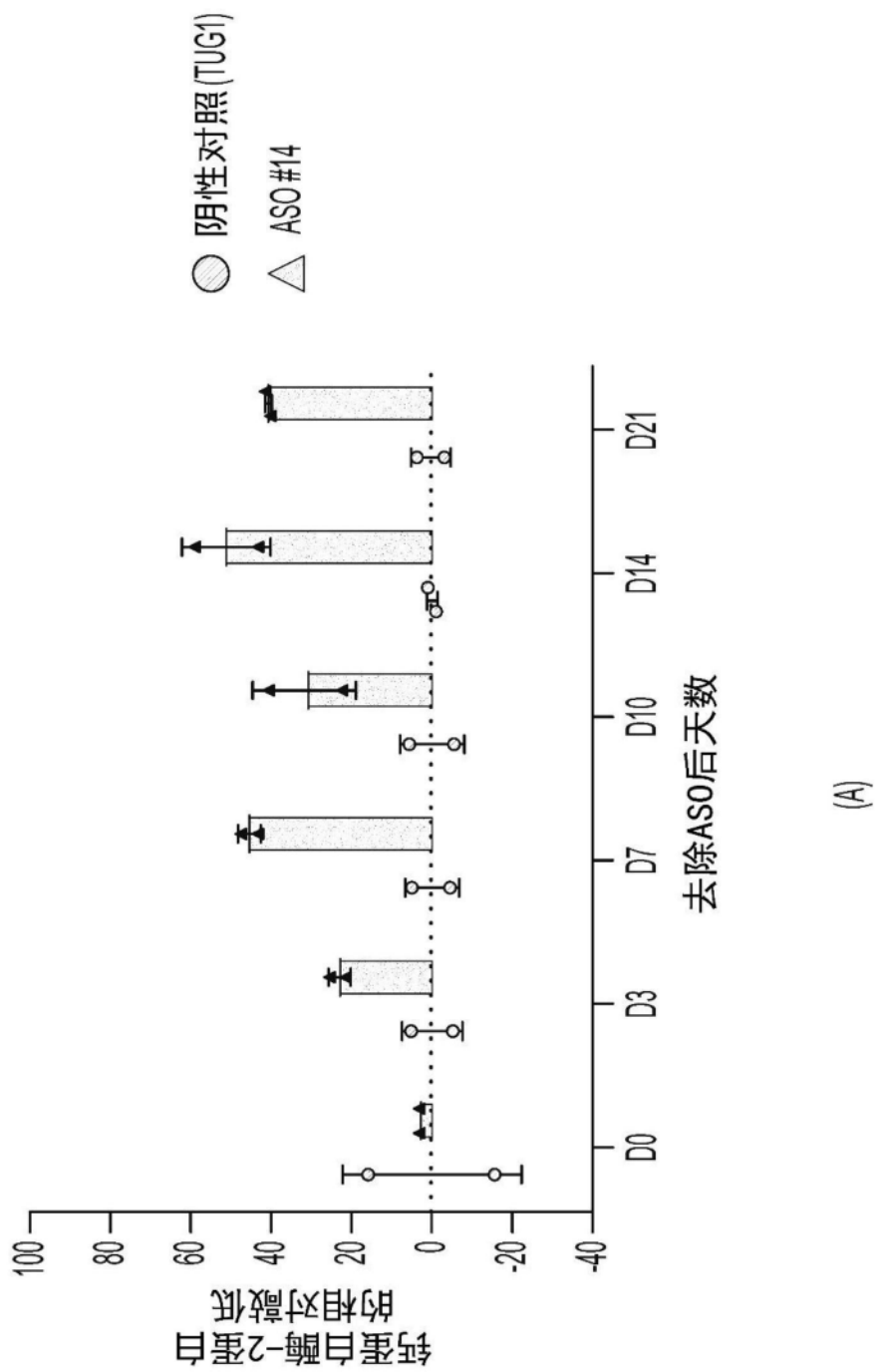


图7

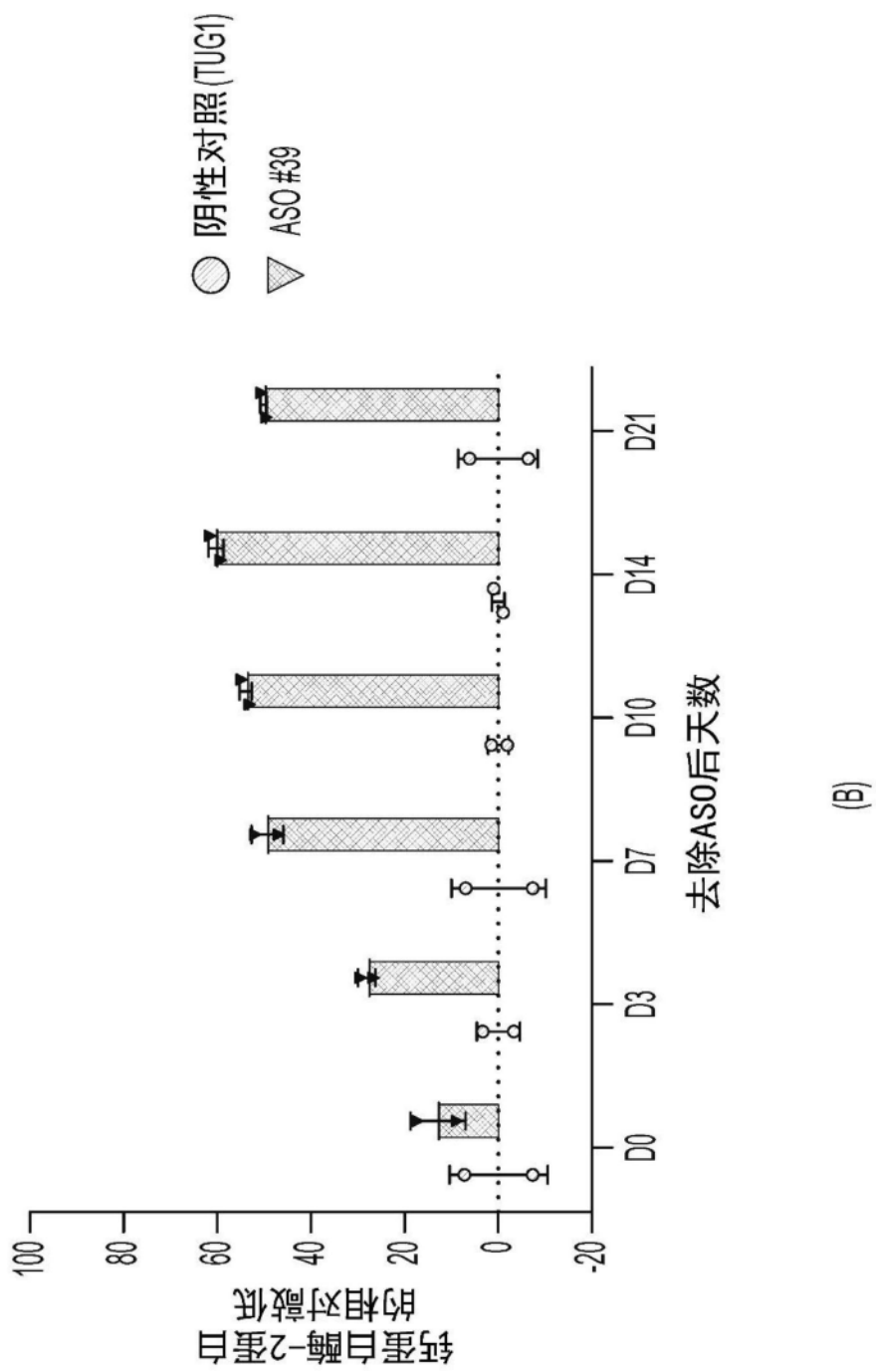


图7续

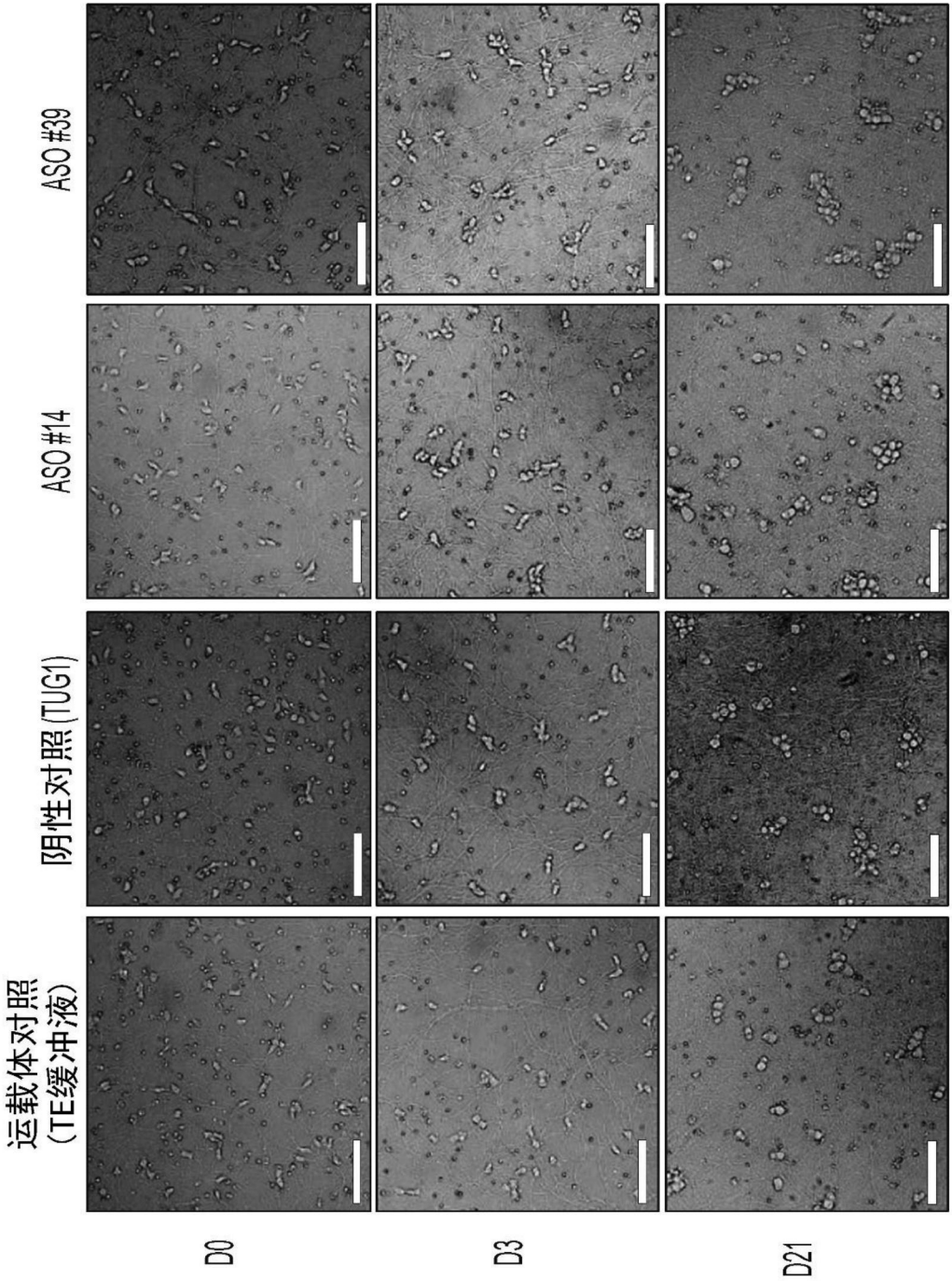


图8