(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117795069 A
(43)申请公布日 2024.03.29

(21)申请号 202280052900.3
(22)申请日 2022.06.02
(30)优先权数据
63/195,993 2021.06.02 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.01.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/032014 2022.06.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/256565 EN 2022.12.08
(71)申请人 阿塔兰塔治疗公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 M·哈斯勒 G·A·基恩贝格尔
B·M·D·C·戈丁霍
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 郜红 何茜
(51)Int.Cl.
C12N 15/11(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)

权利要求书20页 说明书83页 附图8页

(54)发明名称

用于将治疗性寡核苷酸递送至中枢神经系统的组合物和方法

(57)摘要

本公开提供了单链或双链治疗性寡核苷酸(例如,siRNA、shRNA、miRNA、gRNA和ASO),其具有多个部分或完全被多种二价阳离子(例如,Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+},或其组合)饱和的阳离子结合位点。所述治疗性寡核苷酸可含有特定模式的核苷修饰和核苷间键联修饰,作为包含所述治疗性寡核苷酸的药物组合物。所述siRNA分子可以是分支siRNA分子,诸如二分支、三分支或四分支siRNA分子。所公开的siRNA分子还可以特征在于5'磷稳定部分和/或疏水部分。另外,本公开提供了用于将本公开的所述siRNA分子递送至受试者,诸如鉴定为患有疾病的受试者的中枢神经系统的方法。

CN 117795069 A

1.一种将短干扰RNA(siRNA)分子递送至受试者的方法,所述方法包括以包含一种或多种二价阳离子的盐的形式将所述siRNA分子施用至所述受试者的中枢神经系统。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述siRNA分子包含多个部分或完全被所述一种或多种二价阳离子饱和的阳离子结合位点。

3.如权利要求2所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为10％至100％,任选地其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为20％至100％、30％至100％、40％至100％、50％至100％、60％至100％、70％至100％、80％至100％或90％至100％。

4.如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述阳离子结合位点位于核苷间键联内,任选地其中所述核苷间键联选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联。

5.如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为30皮米至150皮米,任选地其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为30皮米至140皮米、40皮米至130皮米、50皮米至120皮米、60皮米至110皮米、60皮米至100皮米或60皮米至90皮米。

6.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+}或其组合。

7.如权利要求6所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ba^{2+}。

8.如权利要求6或7所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Be^{2+}。

9.如权利要求6-8中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ca^{2+}。

10.如权利要求6-9中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Cu^{2+}。

11.如权利要求6-10中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Mg^{2+}。

12.如权利要求6-11中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Mn^{2+}。

13.如权利要求6-12中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ni^{2+}。

14.如权利要求6-13中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Zn^{2+}。

15.如权利要求6-14中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ca^{2+}和Mg^{2+},任选地其中Ca^{2+}与Mg^{2+}的比率为1:100至100:1。

16.如权利要求15所述的方法,其中所述Ca^{2+}和Mg^{2+}以1:1摩尔比存在。

17.如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包含硬路易斯酸。

18.如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子置换来自所述siRNA分子的阳离子结合位点的水。

19.如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述siRNA分子是未分支的。

20.如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述siRNA分子是分支的。

21.如权利要求20所述的方法,其中所述siRNA分子是二分支、三分支或四分支的。

22.如权利要求21所述的方法,其中所述siRNA分子是二分支的。

23.如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述siRNA分子包含反义链和与所述反义链具有互补性的有义链。

24.如权利要求23所述的方法,其中所述反义链和有义链包含交替的2'-O-甲基和2'-氟核糖核苷。

25.如权利要求23或24所述的方法,其中所述反义链按5′至3′方向具有下式:

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

其中Z是5'磷稳定部分;

每个A独立地是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个B独立地是2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个P独立地是选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联的核苷间键联;

n是1至5的整数;

m是1至5的整数;并且

q是介于1和30之间的整数。

26.如权利要求23或24所述的方法,其中所述反义链包含式I表示的结构,其中式I按5′至3′方向是:

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

式I;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

B由式$C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2$表示;

每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

27.如权利要求26所述的方法,其中所述反义链包含式AI表示的结构,其中式A1按5′至3′方向是:

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

式A1;

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

28.如权利要求23或24所述的方法,其中所述反义链包含式II表示的结构,其中式II按5′至3′方向是:

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

式II;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

B由式$C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2$表示;

每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

29.如权利要求28所述的方法,其中所述反义链包含式A2表示的结构,其中式A2按5′至3′方向是:

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

式A2;

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

30.如权利要求23-29中任一项所述的方法,其中所述有义链包含式III表示的结构,其中式III按5'至3'方向是:

$E-(A')_m-F$

式III;

其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

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

A'、C、D、P^1和P^2如式II中所定义;并且

m是1至7的整数。

31.如权利要求30所述的方法,其中所述有义链包含式S1表示的结构,其中式S1按5′至3′方向是:

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

式S1;

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

32.如权利要求30所述的方法,其中所述有义链包含式S2表示的结构,其中式S2按5′至3′方向是:

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

式S2;

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

33.如权利要求30所述的方法,其中所述有义链包含式S3表示的结构,其中式S3按5′至3′方向是:

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

式S3;

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

34.如权利要求30所述的方法,其中所述有义链包含式S4表示的结构,其中式S4按5′至3′方向是:

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

式S4;

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

35.如权利要求23、24和30-34中任一项所述的方法,其中所述反义链包含式IV表示的结构,其中式IV按5'至3'方向是:

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

式IV;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

B由式$D-P^1-C-P^1-D-P^1$表示;

每个C是2'-O-Me核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

36.如权利要求35所述的方法,其中所述反义链包含式A3表示的结构,其中式A3按5′至3′方向是:

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

式A3;

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

37.如权利要求23-29、35和36中任一项所述的方法,其中所述有义链包含式V表示的结构,其中式V按5'至3'方向是:

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

式V;

其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

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

A'、C、D、P^1和P^2如式IV中所定义;并且

m是1至7的整数。

38.如权利要求37所述的方法,其中所述有义链包含式S5表示的结构,其中式S5按5′至3′方向是:

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

式S5;

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

39.如权利要求37所述的方法,其中所述有义链包含式S6表示的结构,其中式S6按5′至3′方向是:

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

式S6;

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

40.如权利要求37所述的方法,其中所述有义链包含式S7表示的结构,其中式S7按5′至3′方向是:

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

式S7;

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

41.如权利要求37所述的方法,其中所述有义链包含式S8表示的结构,其中式S8按5′至3′方向是:

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

式S8;

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

42.如权利要求23、24、30-34和37-41中任一项所述的方法,其中所述反义链包含式VI表示的结构,其中式VI按5'至3'方向是:

$A\text{-}B_j\text{-}E\text{-}B_k\text{-}E\text{-}F\text{-}G_l\text{-}D\text{-}P^1\text{-}C'$

式VI;

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

每个B由式$C\text{-}P^2$表示;

每个C是2'-O-Me核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

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

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

每个G由式$C\text{-}P^1$表示;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;

k是1至7的整数;并且

l是1至7的整数。

43.如权利要求42所述的方法,其中所述反义链包含式A4表示的结构,其中式A4按5′至3′方向是:

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

式A4;

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

44.如权利要求23-29、35、36、42和43中任一项所述的方法,其中所述有义链包含式VII表示的结构,其中式VII按5'至3'方向是:

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

式VII;

其中A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

每个H由式$(C-P^1)_2$表示;

每个I由式$(D-P^2)$表示;

B、C、D、P^1和P^2如式VI中所定义;

m为1至7的整数;

n是1至7的整数;并且

o是1至7的整数。

45.如权利要求44所述的方法,其中所述有义链包含式S9表示的结构,其中式S9按5′至3′方向是:

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

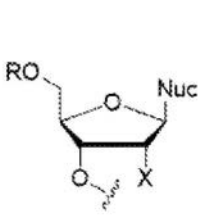
式S9;

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

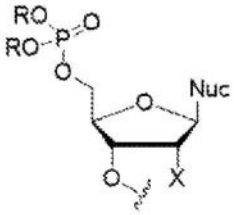
46.如权利要求23-45中任一项所述的方法,其中所述反义链还包含在所述反义链的5'末端的5'磷稳定部分。

47.如权利要求23-46中任一项所述的方法,其中所述有义链还包含在所述有义链的5'末端的5'磷稳定部分。

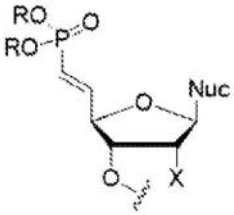
48.如权利要求25、46和47中任一项所述的方法,其中所述5'磷稳定部分由式IX-XVI中任一项表示:



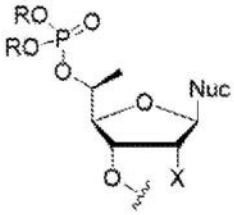
式 IX



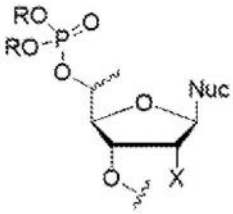
式 X



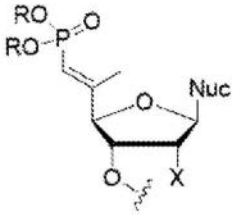
式 XI



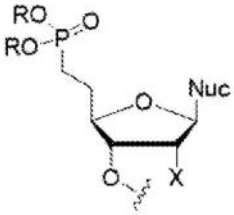
式 XII



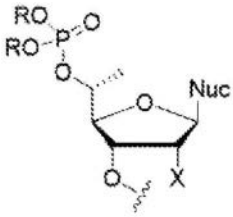
式 XIII



式 XIV



式 XV



式 XVI

其中Nuc表示选自由腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶组成的组的核碱基,并且R表示任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、苯基、苄基、羟基或氢。

49.如权利要求48所述的方法,其中所述5'-磷稳定部分是式XVI中表示的(E)-乙烯基膦酸酯。

50.如权利要求24-49中任一项所述的方法,其中所述核糖核苷的至少50%是2′-O-Me核糖核苷,任选地其中所述核糖核苷的至少60%、70%、80%、90%或更多是2′-O-Me核糖核苷。

51.如权利要求23-50中任一项所述的方法,其中所述反义链的长度为10至30个核苷酸。

52.如权利要求23-51中任一项所述的方法,其中所述有义链的长度为12至30个核苷酸。

53.如权利要求1-52中任一项所述的方法,其中所述siRNA分子以水溶液的形式或以悬浮液的形式施用。

54.如权利要求1-53中任一项所述的方法,其中所述siRNA分子直接施用至所述受试者的脑脊液,直接施用至所述受试者的脊髓,和/或直接施用至所述受试者的脑实质,任选地其中(i)施用至脑部的所述siRNA分子具体地施用至皮质、小脑、基底神经节或其它脑部结构和/或(ii)施用至所述基底神经节的所述siRNA分子具体地施用至尾状核、壳核、丘脑、苍白球或黑质。

55.如权利要求1-54中任一项所述的方法,其中所述siRNA分子经鞘内、脑室内、纹状体内或通过导管插入在小脑延髓池内注射施用。

56.如权利要求1-55中任一项所述的方法,其中所述受试者被诊断为患有亨廷顿病、帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、路易体痴呆(DLB)、单纯性自主神经衰竭、路易体吞咽困难、偶发性路易体病(ILBD)、遗传性路易体病、橄榄体脑桥小脑萎缩(OPCA)、纹状体黑质变性、Shy-Drager综合征、癫痫或癫痫病症、朊病毒病、或疼痛病症。

57.如权利要求23-56中任一项所述的方法,其中所述反义链具有足以与对应于选自由以下各项组成的组的基因的mRNA转录物的一部分杂交的互补性:ABCA7、ABI3、ADAM10、

APOC1、APOE、AXL、BIN1、C1QA、C3、C9ORF72、CASS4、CCL5、CD2AP、CD33、CD68、CLPTM1、CLU、CR1、CSF1、CST7、CTSB、CTSD、CTSL、CXCL10、CXCL13、DSG2、ECHDC3、EPHA1、FABP5、FERMT2、FTH1、GNAS、GRN、HBEGF、HLA-DRB1、HLA-DRB5、HTT、IFIT1、IFIT3、IFITM3、IFNAR1、IFNAR2、IGF1、IL10RA、IL1A、IL1B、IL1RAP、INPP5D、ITGAM、ITGAX、KCNT1、LILRB4、LPL、MAPT、MEF2C、MMP12、MS4A4A、MS4A6A、MSH3、NLRP3、NME8、NOS2、PICALM、PILRA、PLCG2、PRNP、PTK2B、SCIMP、SCN9A、SLC24A4、SNCA、SORL1、SPI1、SPP1、SPPL2A、TBK1、TNF、TREM2、TREML2、TYROBP和ZCWPW1。

58.如权利要求57所述的方法,其中所述基因选自由HTT、MAPT、SNCA、C9ORF72、APOE、SCN9A、KCNT1、PRNP和MSH3组成的组。

59.如权利要求1-58中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

60.如权利要求1-59中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸包含一个或多个具有负电荷的原子并且所述二价阳离子包含两个正电荷,并且其中负电荷与正电荷的比率为0.75至7.5,任选地其中负电荷与正电荷的比率为1.0至2.0。

61.如权利要求60所述的方法,其中

i.负电荷与正电荷的比率为0.75至6.5,任选地其中负电荷与正电荷的比率为0.75至5.5、0.75至4.5、0.75至3.5、0.75至2.5、0.75至1.5或0.75至1;或者

ii.负电荷与正电荷的比率为1至7.5、1.5至7.5、2.5至7.5、3.5至7.5、4.5至7.5、5.5至7.5或6.5至7.5。

62.如权利要求1-61中任一项所述的方法,其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:10至1:100。

63.如权利要求62所述的方法,其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:10至1:50,任选地其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:18至1:38,任选地其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:20至1:25,任选地其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为约1:20,任选地其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为约1:25。

64.如权利要求1-63中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为10mM至150mM。

65.如权利要求64所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为20mM至150mM,任选地其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为20mM至100mM、25mM至150mM、25mM至100mM、30mM至90mM、35mM至85mM、35mM至75mM、40mM至70mM、40mM至65mM、40mM至60mM或40mM至50mM。

66.一种siRNA分子,其配制为包含一种或多种二价阳离子的盐。

67.如权利要求66所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子包含多个部分或完全被所述一种或多种二价阳离子饱和的阳离子结合位点。

68.如权利要求67所述的siRNA分子,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为10%至100%,任选地其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为20%至100%、30%至100%、40%至100%、50%至100%、60%至100%、70%至100%、80%至100%或90%至100%。

69.如权利要求66-68中任一项所述的siRNA分子,其中所述阳离子结合位点位于核苷

间键联内,任选地其中所述核苷间键联选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联。

70.如权利要求66-69中任一项所述的siRNA分子,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为30皮米至150皮米,任选地其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为30皮米至140皮米、40皮米至130皮米、50皮米至120皮米、60皮米至110皮米、60皮米至100皮米或60皮米至90皮米。

71.如权利要求66-70中任一项所述的siRNA分子,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+}或其组合。

72.如权利要求66-71中任一项所述的siRNA分子,其中所述一种或多种二价阳离子包含硬路易斯酸。

73.如权利要求66-72中任一项所述的siRNA分子,其中所述一种或多种二价阳离子置换来自所述siRNA分子的阳离子结合位点的水。

74.如权利要求66-73中任一项所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子是未分支的。

75.如权利要求66-73中任一项所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子是分支的。

76.如权利要求75所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子是二分支、三分支或四分支的,任选地其中所述siRNA分子是二分支的。

77.如权利要求66-76中任一项所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子包含反义链和与所述反义链具有互补性的有义链,任选地其中所述反义链和有义链包含交替的2'-O-甲基和2'-氟核糖核苷。

78.如权利要求77所述的siRNA分子,其中所述反义链按5′至3′方向具有下式:

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

其中Z是5'磷稳定部分;

每个A独立地是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个B独立地是2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个P独立地是选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联的核苷间键联;

n是1至5的整数;

m是1至5的整数;并且

q是介于1和30之间的整数。

79.如权利要求77所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式I表示的结构,其中式I按5'至3'方向是:

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

式I;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

B由式$C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2$表示;

每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

80.如权利要求79所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式AI表示的结构,其中式A1按5'至3'方向是:

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

式A1;

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

81.如权利要求77所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式II表示的结构,其中式II按5'至3'方向是:

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

式II;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

B由式$C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2$表示;

每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

82.如权利要求81所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式A2表示的结构,其中式A2按5'至3'方向是:

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

式A2;

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

83.如权利要求77-82中任一项所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式III表示的结构,其中式III按5'至3'方向是:

$E-(A')_m-F$

式III;

其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

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

A'、C、D、P^1和P^2如式II中所定义;并且

m是1至7的整数。

84.如权利要求83所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S1表示的结构,其中式S1按5'至3'方向是:

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

式S1;

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

85.如权利要求83所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S2表示的结构,其中式S2按5'至3'方向是:

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

式S2;

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

86.如权利要求83所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S3表示的结构,其中式S3按5'至3'方向是:

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

式S3;

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

87.如权利要求83所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式S4表示的结构,其中式S4按5'至3'方向是:

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

式S4;

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

88.如权利要求77和83-87中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式IV表示的结构,其中式IV按5'至3'方向是:

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

式IV;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

B由式$D-P^1-C-P^1-D-P^1$表示;

每个C是2'-O-Me核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

89.如权利要求88所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式A3表示的结构,其中式A3

按5'至3'方向是：

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

式A3；

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

90.如权利要求77-82、88和89中任一项所述的siRNA分子，其中所述有义链包含式V表示的结构，其中式V按5'至3'方向是：

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

式V；

其中E由式$(C-P^1)_2$表示；

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

A'、C、D、P^1和P^2如式IV中所定义；并且

m是1至7的整数。

91.如权利要求90所述的siRNA分子，其中所述有义链包含式S5表示的结构，其中式S5按5'至3'方向是：

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

式S5；

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

92.如权利要求90所述的siRNA分子，其中所述有义链包含式S6表示的结构，其中式S6按5'至3'方向是：

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

式S6；

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

93.如权利要求90所述的siRNA分子，其中所述有义链包含式S7表示的结构，其中式S7按5'至3'方向是：

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

式S7；

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

94.如权利要求90所述的siRNA分子，其中所述有义链包含式S8表示的结构，其中式S8按5'至3'方向是：

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

式S8；

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

95.如权利要求77、83-87和90-94中任一项所述的siRNA分子，其中所述反义链包含式

VI表示的结构,其中式VI按5'至3'方向是:

$A\text{-}B_j\text{-}E\text{-}B_k\text{-}E\text{-}F\text{-}G_l\text{-}D\text{-}P^1\text{-}C'$

式VI;

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

每个B由式$C\text{-}P^2$表示;

每个C是2'-O-Me核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

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

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

每个G由式$C\text{-}P^1$表示;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;

k是1至7的整数;并且

l是1至7的整数。

96.如权利要求95所述的siRNA分子,其中所述反义链包含式A4表示的结构,其中式A4按5'至3'方向是:

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

式A4;

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

97.如权利要求77-82、88、89、95和96中任一项所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式VII表示的结构,其中式VII按5'至3'方向是:

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

式VII;

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

每个H由式$(C\text{-}P^1)_2$表示;

每个I由式$(D\text{-}P^2)$表示;

B、C、D、P^1和P^2如式VI中所定义;

m为1至7的整数;

n是1至7的整数;并且

o是1至7的整数。

98.如权利要求97所述的siRNA分子,其中所述有义链包含式s9表示的结构,其中式S9按5'至3'方向是:

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

式S9;

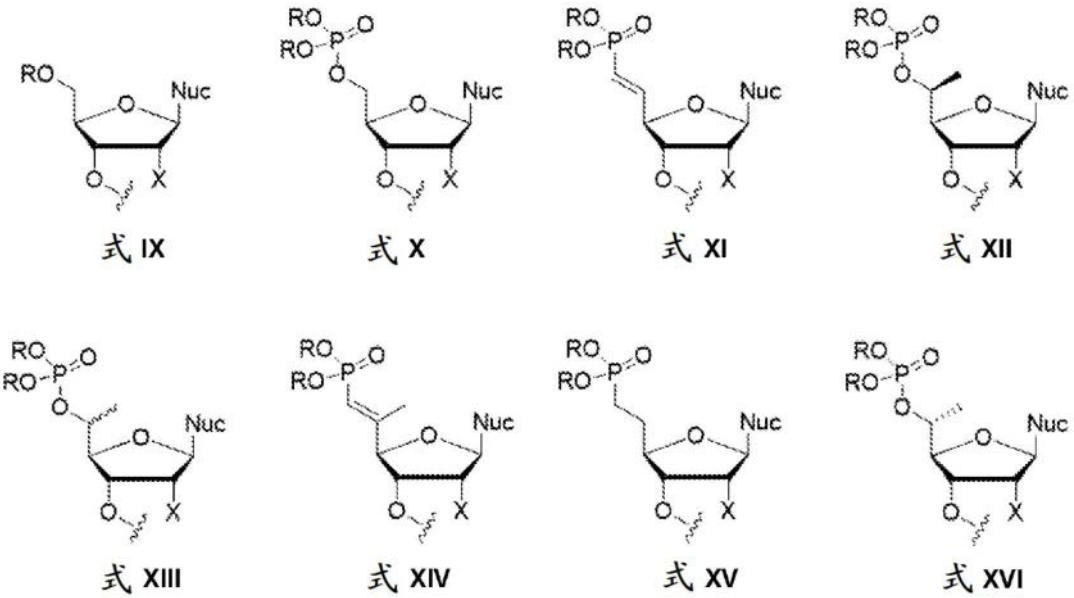
其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S

表示硫代磷酸酯核苷间键联。

99.如权利要求77-98中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链还包含在所述反义链的5'末端的5'磷稳定部分。

100.如权利要求77-99中任一项所述的siRNA分子,其中所述有义链还包含在所述有义链的5'末端的5'磷稳定部分。

101.如权利要求99或100所述的siRNA分子,其中所述5'磷稳定部分由式IX-XVI中任一项表示:



式 IX 式 X 式 XI 式 XII

式 XIII 式 XIV 式 XV 式 XVI

其中Nuc表示选自由腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶组成的组的核碱基,并且R表示任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、苯基、苄基、羟基或氢。

102.如权利要求66-101中任一项所述的siRNA分子,其中所述反义链具有足以与对应于选自由以下各项组成的组的基因的mRNA转录物的一部分杂交的互补性:ABCA7、ABI3、ADAM10、APOC1、APOE、AXL、BIN1、C1QA、C3、C9ORF72、CASS4、CCL5、CD2AP、CD33、CD68、CLPTM1、CLU、CR1、CSF1、CST7、CTSB、CTSD、CTSL、CXCL10、CXCL13、DSG2、ECHDC3、EPHA1、FABP5、FERMT2、FTH1、GNAS、GRN、HBEGF、HLA-DRB1、HLA-DRB5、HTT、IFIT1、IFIT3、IFITM3、IFNAR1、IFNAR2、IGF1、IL10RA、IL1A、IL1B、IL1RAP、INPP5D、ITGAM、ITGAX、KCNT1、LILRB4、LPL、MAPT、MEF2C、MMP12、MS4A4A、MS4A6A、MSH3、NLRP3、NME8、NOS2、PICALM、PILRA、PLCG2、PRNP、PTK2B、SCIMP、SCN9A、SLC24A4、SNCA、SORL1、SPI1、SPP1、SPPL2A、TBK1、TNF、TREM2、TREML2、TYROBP和ZCWPW1。

103.如权利要求102所述的siRNA分子,其中所述基因选自由HTT、MAPT、SNCA、C9ORF72、APOE、SCN9A、KCNT1、PRNP和MSH3组成的组。

104.如权利要求66-103中任一项所述的siRNA分子,其中所述治疗性寡核苷酸包含一个或多个具有负电荷的原子并且所述二价阳离子包含两个正电荷,并且其中负电荷与正电荷的比率为0.75至7.5,任选地其中负电荷与正电荷的比率为1.0至2.0。

105.如权利要求104所述的siRNA分子,其中:

i.所述负电荷与正电荷的比率为0.75至6.5,任选地其中所述负电荷与正电荷的比率为0.75至5.5、0.75至4.5、0.75至3.5、0.75至2.5、0.75至1.5或0.75至1;或者

ii.所述负电荷与正电荷的比率为1至7.5、1.5至7.5、2.5至7.5、3.5至7.5、4.5至7.5、5.5至7.5或6.5至7.5。

106.如权利要求66-105中任一项所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:10至1:100。

107.如权利要求106所述的siRNA分子,其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:10至1:50,任选地其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:18至1:38,任选地其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:20至1:25,任选地其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为约1:20,任选地其中所述siRNA分子与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为约1:25。

108.如权利要求66-107中任一项所述的siRNA分子,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为10mM至150mM。

109.如权利要求108所述的siRNA分子,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为20mM至150mM,任选地其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为20mM至100mM、25mM至150mM、25mM至100mM、30mM至90mM、35mM至85mM、35mM至75mM、40mM至70mM、40mM至65mM、40mM至60mM或40mM至50mM。

110.一种治疗性寡核苷酸,其配制为包含一种或多种二价阳离子的盐,其中:

i)所述一种或多种二价阳离子包括Mg^{2+}、Ba^{2+}、Be^{2+}、Cu^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+}或其组合,任选地其中所述一种或多种二价阳离子包括Mg^{2+};和/或

ii)所述治疗性寡核苷酸包含一个或多个具有负电荷的原子并且所述二价阳离子包含两个正电荷,并且其中负电荷与正电荷的比率为0.75至7.5,任选地其中负电荷与正电荷的比率为1.0至2.0;和/或

iii)所述治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:10至1:100;和/或

iv)所述一种或多种二价阳离子的浓度为10mM至150mM。

111.如权利要求110所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含多个部分或完全被所述一种或多种二价阳离子饱和的阳离子结合位点。

112.如权利要求111所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为10%至100%,任选地其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为20%至100%、30%至100%、40%至100%、50%至100%、60%至100%、70%至100%、80%至100%或90%至100%。

113.如权利要求110-112中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述阳离子结合位点位于核苷间键联内,任选地其中所述核苷间键联选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联。

114.如权利要求110-113中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为30皮米至150皮米,任选地其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为30皮米至140皮米、40皮米至130皮米、50皮米至120皮米、60皮米至110皮米、60皮米至100皮米或60皮米至90皮米。

115.如权利要求110-114中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包括Mg^{2+}。

116.如权利要求110-115中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价

阳离子包含硬路易斯酸。

117.如权利要求110-116中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子置换来自所述siRNA分子的阳离子结合位点的水。

118.如权利要求110-117中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含交替的2'-O-甲基和2'-氟核糖核苷。

119.如权利要求110-118中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸按5′至3′方向具有下式:

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

其中Z是5'磷稳定部分;

每个A独立地是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个B独立地是2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个P独立地是选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联的核苷间键联;

n是1至5的整数;

m是1至5的整数;并且

q是介于1和30之间的整数。

120.如权利要求110-118中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含式I表示的结构,其中式I按5'至3'方向是:

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

式I;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

B由式$C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2$表示;

每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

121.如权利要求120所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含式AI表示的结构,其中式A1按5'至3'方向是:

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

式A1;

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

122.如权利要求110-118中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含式II表示的结构,其中式II按5'至3'方向是:

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

式II;

其中A由式C-P^1-D-P^1表示;

每个A'由式C-P^2-D-P^2表示;

B由式C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2表示;

每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

123.如权利要求122所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含式A2表示的结构,其中式A2按5'至3'方向是:

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

式A2;

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

124.如权利要求110-118中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含式IV表示的结构,其中式IV按5'至3'方向是:

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

式IV;

其中A由式C-P^1-D-P^1表示;

每个A'由式C-P^2-D-P^2表示;

B由式D-P^1-C-P^1-D-P^1表示;

每个C是2'-O-Me核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;并且

k是1至7的整数。

125.如权利要求124所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含式A3表示的结构,其中式A3按5'至3'方向是:

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

式A3;

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

126.如权利要求110-118中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含式VI表示的结构,其中式VI按5'至3'方向是:

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

式VI;

其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

每个B由式$C-P^2$表示;

每个C是2'-O-Me核糖核苷;

每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

每个D是2'-F核糖核苷;

每个E由式$D-P^2-C-P^2$表示;

F由式$D-P^1-C-P^1$表示;

每个G由式$C-P^1$表示;

每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

j是1至7的整数;

k是1至7的整数;并且

l是1至7的整数。

127.如权利要求126所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含式A4表示的结构,其中式A4按5'至3'方向是:

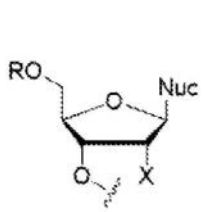
A-S-B-S-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

式A4;

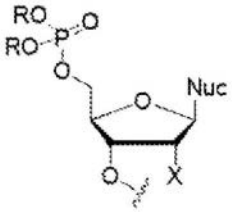
其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

128.如权利要求110-127中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸还包含在所述治疗性寡核苷酸的5'末端的5'磷稳定部分。

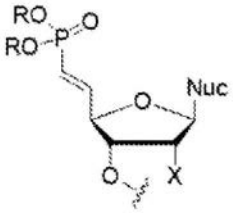
129.如权利要求128所述的治疗性寡核苷酸,其中所述5'磷稳定部分由式IX-XVI中任一项表示:



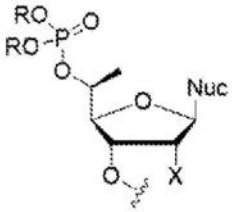
式 IX



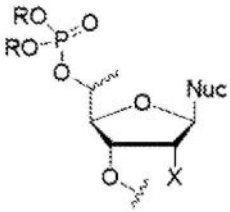
式 X



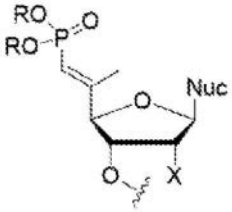
式 XI



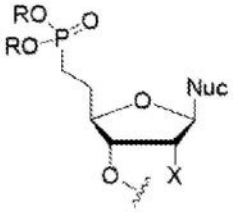
式 XII



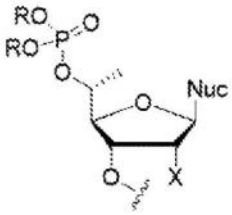
式 XIII



式 XIV



式 XV



式 XVI

其中Nuc表示选自由腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶组成的组的核碱基,并且R表示任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、苯基、苄基、羟基或氢。

130.如权利要求110-129中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸具有足以与对应于选自由以下各项组成的组的基因的mRNA转录物的一部分杂交的互补性:ABCA7、ABI3、ADAM10、APOC1、APOE、AXL、BIN1、C1QA、C3、C9ORF72、CASS4、CCL5、CD2AP、CD33、CD68、CLPTM1、CLU、CR1、CSF1、CST7、CTSB、CTSD、CTSL、CXCL10、CXCL13、DSG2、ECHDC3、EPHA1、FABP5、FERMT2、FTH1、GNAS、GRN、HBEGF、HLA-DRB1、HLA-DRB5、HTT、IFIT1、IFIT3、IFITM3、IFNAR1、IFNAR2、IGF1、IL10RA、IL1A、IL1B、IL1RAP、INPP5D、ITGAM、ITGAX、KCNT1、LILRB4、LPL、MAPT、MEF2C、MMP12、MS4A4A、MS4A6A、MSH3、NLRP3、NME8、NOS2、PICALM、PILRA、PLCG2、PRNP、PTK2B、SCIMP、SCN9A、SLC24A4、SNCA、SORL1、SPI1、SPP1、SPPL2A、TBK1、TNF、TREM2、TREML2、TYROBP和ZCWPW1。

131.如权利要求130所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因选自由HTT、MAPT、SNCA、C9ORF72、APOE、SCN9A、KCNT1、PRNP和MSH3组成的组。

132.如权利要求110-131中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含一个或多个具有负电荷的原子并且所述二价阳离子包含两个正电荷,并且其中所述负电荷与正电荷的比率为0.75至7.5,任选地其中所述负电荷与正电荷的比率为1.0至2.0。

133.如权利要求132所述的治疗性寡核苷酸,其中:

i.所述负电荷与正电荷的比率为0.75至6.5,任选地其中所述负电荷与正电荷的比率为0.75至5.5、0.75至4.5、0.75至3.5、0.75至2.5、0.75至1.5或0.75至1;或者

ii.所述负电荷与正电荷的比率为1至7.5、1.5至7.5、2.5至7.5、3.5至7.5、4.5至7.5、5.5至7.5或6.5至7.5。

134.如权利要求110-133中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:10至1:100。

135.如权利要求134所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:10至1:50,任选地其中所述治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:18至1:38,任选地其中所述治疗性寡核苷酸与所述一种或多种

二价阳离子的摩尔比为1:20至1:25,任选地其中所述治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为约1:20,任选地其中所述治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为约1:25。

136.如权利要求110-135中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为10mM至150mM。

137.如权利要求136所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为20mM至150mM,任选地其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为20mM至100mM、25mM至150mM、25mM至100mM、30mM至90mM、35mM至85mM、35mM至75mM、40mM至70mM、40mM至65mM、40mM至60mM或40mM至50mM。

138.如权利要求110-137中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸是反义寡核苷酸(ASO)。

139.如权利要求110-137中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸是干扰RNA分子,任选地其中所述干扰RNA分子是siRNA、miRNA或shRNA。

140.如权利要求139所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸是siRNA。

141.一种试剂盒,其包括如权利要求66-109中任一项所述的siRNA分子和包装说明书,任选地其中所述包装说明书指导所述试剂盒的使用者将所述siRNA分子施用至人类受试者的中枢神经系统。

142.一种试剂盒,其包括如权利要求110-140中任一项所述的治疗性寡核苷酸和包装说明书,任选地其中所述包装说明书指导所述试剂盒的使用者将所述ASO施用至人类受试者的中枢神经系统。

用于将治疗性寡核苷酸递送至中枢神经系统的组合物和方法

技术领域

[0001] 本公开涉及与一个或多个二价阳离子进行离子结合的干扰RNA分子(例如,短干扰RNA分子),以及将这些分子递送至需要调节一个或多个基因的受试者的中枢神经系统的方法。

背景技术

[0002] 在许多物种中,双链RNA的引入会诱导通过RNA干扰(RNAi)的方式有效且特异性的基因沉默。这种现象在植物和动物中都有发生,并且在病毒防御和转座子沉默机制中具有作用。例如,通常比靶基因短得多的短干扰RNA(siRNA),已被证明在基因沉默方面有效,因此可用作使基因沉默的治疗剂,以使遗传和生物化学途径的活性从疾病状态恢复到正常的健康状态。然而,将干扰RNA分子,诸如siRNA递送至受试者,特别是递送至受试者的中枢神经系统,会带来毒副作用的风险,其中包括癫痫、震颤和过度活跃的运动行为等。仍然需要在施用于有需要的受试者时实现降低的毒性的干扰RNA分子。

发明内容

[0003] 本公开提供了干扰RNA分子,其含有多个部分或完全被二价阳离子(例如,二价金属阳离子)饱和的阳离子结合位点。例如,本公开的干扰RNA分子可含有一个或多个磷酸二酯核苷间键联和/或其类似物,诸如硫代磷酸酯核苷间键联,其中氧离子部分通过与二价金属阳离子(诸如Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+})的离子键合得以静电中和。目前已发现,在将干扰RNA分子施用于受试者(例如,哺乳动物受试者,诸如人)之前将一种或多种二价阳离子掺入干扰RNA分子(例如,短干扰RNA(siRNA))强烈阻抑可能因施用干扰RNA分子而引起的毒副作用,特别是在受试者的中枢神经系统中。

[0004] 使用本公开的组合物和方法,可以通过以离子键合的方式掺入一种或多种二价阳离子来配制治疗性寡核苷酸,诸如干扰RNA分子(例如,siRNA)。这可以通过用含有感兴趣的二价阳离子的水溶液或悬浮液滴定含有治疗性寡核苷酸(例如,干扰RNA分子,诸如siRNA)的水溶液或悬浮液来实现。然后可以将随后的具有部分或完全被二价阳离子饱和的阳离子结合位点的治疗性寡核苷酸施用于受试者,例如以水溶液或悬浮液的形式施用,以便调节期望基因的表达。有利地,与在施用相同的治疗性寡核苷酸但缺乏一种或多种二价阳离子的受试者中观察到的副作用相比,所述受试者可能经历频率和/或幅度降低的副作用。

[0005] 在第一方面,本公开提供了一种用于将治疗性寡核苷酸(例如,siRNA或反义寡核苷酸,以及本文所述的其它寡核苷酸)递送至受试者(例如,哺乳动物受试者,诸如人)的方法,该方法是通过以含有一种或多种二价阳离子的盐的形式将治疗性寡核苷酸施用于受试者。所述治疗性寡核苷酸可包含多个部分或完全被所述一种或多种二价阳离子饱和的阳离子结合位点。

[0006] 在一些实施方案中,所述治疗性寡核苷酸以水溶液的形式或以悬浮液的形式施用于受试者。所述治疗性寡核苷酸可以全身施用于受试者或者直接施用于受试者的中枢神经

系统(CNS)。例如,可以将治疗性寡核苷酸施用于受试者的脑脊液(CSF)、脊髓、脑实质、皮质、小脑、基底神经节、尾状核、壳核、丘脑、苍白球、黑质或另一脑部结构。在一些实施方案中,所述治疗性寡核苷酸经鞘内、脑室内、纹状体内或通过导管插入在小脑延髓池内注射施用。在一些实施方案中,所述治疗性寡核苷酸经鞘内施用。在一些实施方案中,所述治疗性寡核苷酸经脑室内施用。

[0007] 在第二方面,本公开提供了一种配制为含有一种或多种二价阳离子的盐的治疗性寡核苷酸(例如,siRNA)。所述治疗性寡核苷酸可含有多个部分或完全被所述一种或多种二价阳离子饱和的阳离子结合位点。

[0008] 在本公开前述方面中任一方面的一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子对阳离子结合位点的饱和度为约10%至约100%(例如,约20%至约100%、约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%或约90%至约100%)。

[0009] 在一些实施方案中,所述阳离子结合位点位于核苷间键联,诸如磷酸二酯键联和/或硫代磷酸酯键联内。例如,所述阳离子结合位点可以是磷酸二酯键联或硫代磷酸酯键联内的氧离子部分。

[0010] 在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子表征为离子半径范围为约30皮米至约150皮米(例如,约30皮米至约140皮米、约40皮米至约130皮米、约50皮米至约120皮米、约60皮米至约110皮米、约60皮米至约100皮米或约60皮米至约90皮米)。

[0011] 在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子包括硬路易斯酸。在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子包括Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+}或其组合。

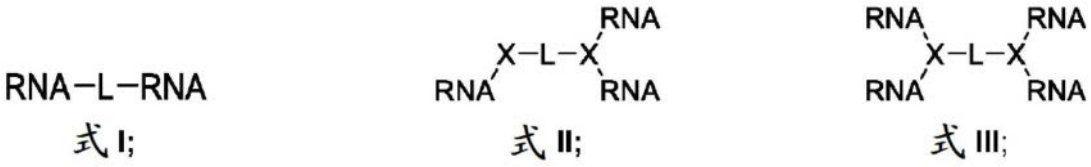
[0012] 在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子包括Ba^{2+}。在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子包括Be^{2+}。在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子包括Ca^{2+}。在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子包括Cu^{2+}。在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子包括Mg^{2+}。在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子包括Mn^{2+}。在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子包括Ni^{2+}。在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子包括Zn^{2+}。

[0013] 在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子包括Ca^{2+}和Mg^{2+},任选地其中Ca^{2+}与Mg^{2+}的比率为1:100至100:1(例如,1:75、1:50、1:25、1:10、1:5、1:1、5:1、10:1、25:1、50:1、75:1或100:1)。在一些实施方案中,Ca^{2+}和Mg^{2+}以1:1比率存在。

[0014] 在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子置换来自治疗性寡核苷酸的阳离子结合位点的水。

[0015] 在一些实施方案中,所述治疗性寡核苷酸是siRNA、短发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)、CRISPR向导RNA或RNA反义寡核苷酸(ASO)。在一些实施方案中,所述治疗性寡核苷酸是干扰RNA分子。在一些实施方案中,所述干扰RNA分子是siRNA。所述siRNA可以是分支siRNA,诸如二分支siRNA分子、三分支siRNA分子或四分支siRNA分子。

[0016] 在一些实施方案中,二分支siRNA由式I-III中的任一个表示:

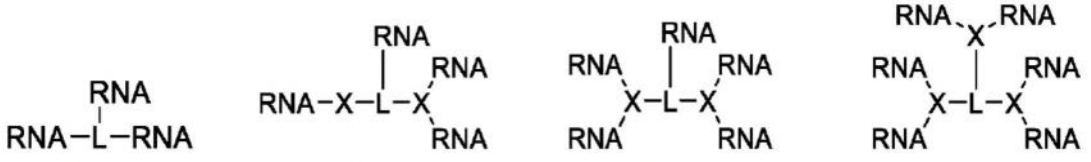
[0017] 

式 I; 式 II; 式 III;

[0018] 其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0019] 在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式I表示。在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式II表示。在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式III表示。

[0020] 在一些实施方案中,三分支siRNA由式IV-VII中的任一个表示:

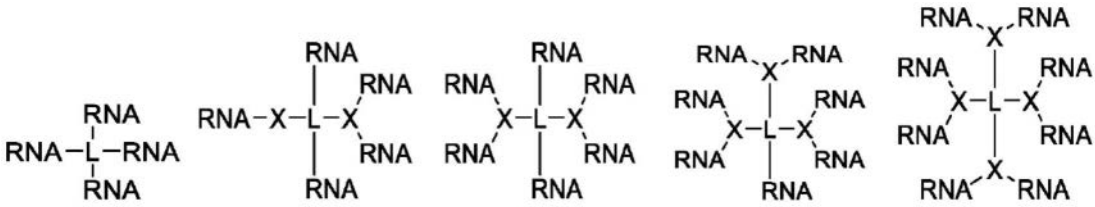
[0021] 

式 IV; 式 V; 式 VI; 式 VII;

[0022] 其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0023] 在一些实施方案中,三分支siRNA分子由式IV表示。在一些实施方案中,三分支siRNA分子由式V表示。在一些实施方案中,三分支siRNA分子由式VI表示。在一些实施方案中,三分支siRNA分子由式VII表示。

[0024] 在一些实施方案中,四分支siRNA由式VIII-XII中的任一个表示:

[0025] 

式 VIII; 式 IX; 式 X; 式 XI; 式 XII;

[0026] 其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0027] 在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式VIII表示。在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式IX表示。在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式X表示。在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式XI表示。在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式XII表示。

[0028] 在一些实施方案中,所述接头选自乙二醇(例如,聚乙二醇(PEG),诸如三乙二醇(TrEG)或四乙二醇(TEG))、烷基、碳水化合物、嵌段共聚物、肽、RNA和DNA的一个或多个连续亚基。

[0029] 在一些实施方案中,所述接头是乙二醇寡聚体。在一些实施方案中,所述接头是烷基寡聚体。在一些实施方案中,所述接头是碳水化合物寡聚体。在一些实施方案中,所述接头是嵌段共聚物。在一些实施方案中,所述接头是肽寡聚体。在一些实施方案中,所述接头是RNA寡聚体。在一些实施方案中,所述接头是DNA寡聚体。

[0030] 在一些实施方案中,所述乙二醇寡聚体是PEG。在一些实施方案中,所述PEG是TrEG。在一些实施方案中,所述PEG是TEG。

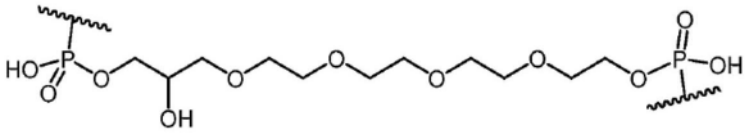
[0031] 在一些实施方案中,所述寡聚体或共聚物含有2至20个连续亚基(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续亚基)。

[0032] 在一些实施方案中,所述接头通过共价键形成部分的方式附接一个或多个(例如,

1、2、3、4个或更多个)siRNA分子。

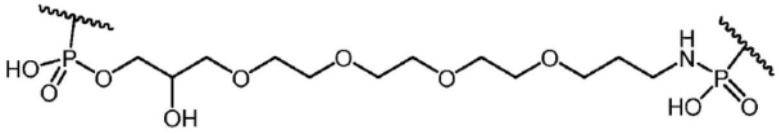
[0033] 在一些实施方案中,所述共价键形成部分选自烷基、酯、酰胺、氨基甲酸酯、膦酸酯、磷酸酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、三唑、脲和甲缩醛。

[0034] 在一些实施方案中,所述接头包括式L1的结构:

[0035] 

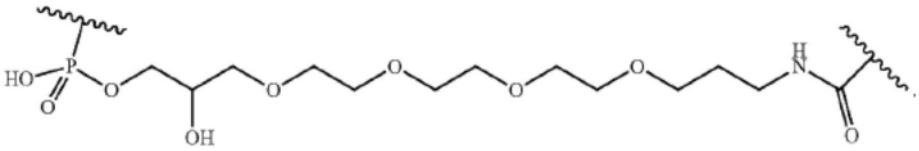
(式 L1)

[0036] 在一些实施方案中,所述接头包括式L2的结构:

[0037] 。

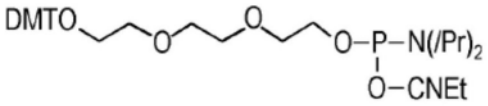
[0038] (式 L2)

[0039] 在一些实施方案中,所述接头包括式L3的结构:

[0040] 

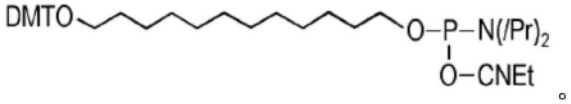
(式 L3)

[0041] 在一些实施方案中,所述接头包括式L4的结构:

[0042] 。

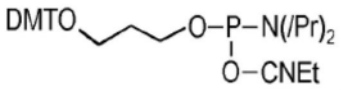
(式 L4)

[0043] 在一些实施方案中,所述接头包括式L5的结构:

[0044] 。

(式 L5)

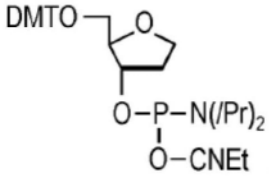
[0045] 在一些实施方案中,所述接头包括式L6的结构:

[0046] 

。

(式 L6)

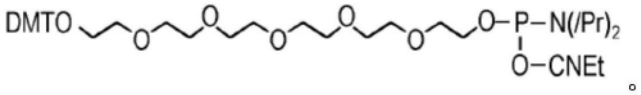
[0047] 在一些实施方案中,所述接头包括式L7的结构:

[0048] 

。

[0049] (式 L7)

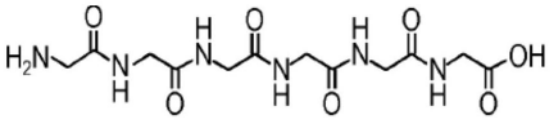
[0050] 在一些实施方案中,所述接头包括式L8的结构:

[0051] 

。

(式 L8)

[0052] 在一些实施方案中,所述接头包括式L9的结构:

[0053] 

。

(式 L9)

[0054] 在一些实施方案中,所述治疗性寡核苷酸包含反义链和与所述反义链具有互补性的有义链,或者所述治疗性寡核苷酸是仅包含反义链的ASO。在一些实施方案中,所述反义链和有义链还包含交替的2'-O-甲基和2'-氟核糖核苷。

[0055] 在一些实施方案中,干扰RNA反义链包含按5'至3'方向由以下化学式表示的区域:

[0056] Z-((A-P-)$_n$(B-P-)$_m$)$_q$;

[0057] 其中Z是5'磷稳定部分;每个A独立地是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;每个B独立地是2'-氟-核糖核苷;每个P独立地是选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联的核苷间键联;n是1至5的整数(例如1、2、3、4或5);m是1至5的整数(例如1、2、3、4或5);并且q是介于1和30之间的整数(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30)。

[0058] 在一些实施方案中,干扰RNA反义链包括式I表示的结构,其中式I按5'至3'方向是:

[0059] A-B-(A')$_j$-C-P^2-D-P^1-(C'-P^1)$_k$-C'

[0060] 式I;

[0061] 其中A由式C-P^1-D-P^{1}表示;

[0062] 每个A'由式C-P^2-D-P^{2}表示;

[0063] B由式C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2表示;

[0064] 每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

[0065] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

[0066] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0067] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0068] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0069] j是1至7的整数;并且

[0070] k是1至7的整数。

[0071] 在式I的一些实施方案中,反义链包括式AI表示的结构,其中式A1按5'至3'方向是:

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

[0073] 式A1;

[0074] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0075] 在一些实施方案中,干扰RNA反义链包括式II表示的结构,其中式II按5'至3'方向是:

[0076] A-B-$(A')_j$-C-P^2-D-P^1-$(C-P^1)_k$-C'

[0077] 式II;

[0078] 其中A由式C-P^1-D-P^1表示;

[0079] 每个A'由式C-P^2-D-P^2表示;

[0080] B由式C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2表示;

[0081] 每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

[0082] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

[0083] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0084] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0085] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0086] j是1至7的整数;并且

[0087] k是1至7的整数。

[0088] 在式II的一些实施方案中,反义链包括式A2表示的结构,其中式A2按5'至3'方向是:

[0089] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-A-S-A

[0090] 式A2;

[0091] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0092] 在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸有义链包括式III表示的结构,其中式III按5'至3'方向是:

[0093] E-$(A')_m$-F

[0094] 式III;

[0095] 其中E由式$(C\text{-}P^1)_2$表示;

[0096] F由式$(C\text{-}P^2)_3\text{-}D\text{-}P^1\text{-}C\text{-}P^1\text{-}C$、$(C\text{-}P^2)_3\text{-}D\text{-}P^2\text{-}C\text{-}P^2\text{-}C$、$(C\text{-}P^2)_3\text{-}D\text{-}P^1\text{-}C\text{-}P^1\text{-}D$或$(C\text{-}P^2)_3\text{-}D\text{-}P^2\text{-}C\text{-}P^2\text{-}D$表示;

[0097] A'、C、D、P^1和P^2如式II中所定义;并且

[0098] m是1至7的整数。

[0099] 在式III的一些实施方案中,有义链包括式S1表示的结构,其中式S1按5'至3'方向是:

[0100] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-A

[0101] 式S1;

[0102] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0103] 在式III的一些实施方案中,有义链包括式S2表示的结构,其中式S2按5'至3'方向是:

[0104] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A

[0105] 式S2;

[0106] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0107] 在式III的一些实施方案中,有义链包括式S3表示的结构,其中式S3按5'至3'方向是:

[0108] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-B

[0109] 式S3;

[0110] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0111] 在式III的一些实施方案中,有义链包括式S4表示的结构,其中式S4按5'至3'方向是:

[0112] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-B

[0113] 式S4;

[0114] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0115] 在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸反义链包括式IV表示的结构,其中式IV按5'至3'方向是:

[0116] $A\text{-}(A')_j\text{-}C\text{-}P^2\text{-}B\text{-}(C\text{-}P^1)_k\text{-}C'$

[0117] 式IV;

[0118] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;

[0119] 每个A'由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;

[0120] B由式$D\text{-}P^1\text{-}C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;

[0121] 每个C是2'-O-Me核糖核苷;

[0122] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

[0123] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0124] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0125] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0126] j是1至7的整数;并且

[0127] k是1至7的整数。

[0128] 在式IV的一些实施方案中,反义链包括式A3表示的结构,其中式A3按5'至3'方向是:

[0129] A-S-B-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-B-S-A-S-A-S-A

[0130] 式A3;

[0131] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0132] 在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸有义链包括式V表示的结构,其中式V按5'至3'方向是:

[0133] $E-(A')_m-C-P^2-F$

[0134] 式V;

[0135] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

[0136] F由式$D-P^1-C-P^1-C$、$D-P^2-C-P^2-C$、$D-P^1-C-P^1-D$或$D-P^2-C-P^2-D$表示;

[0137] A'、C、D、P^1和P^2如式IV中所定义;并且

[0138] m是1至7的整数。

[0139] 在式V的一些实施方案中,有义链包括式S5表示的结构,其中式S5按5'至3'方向是:

[0140] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A

[0141] 式S5;

[0142] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0143] 在式V的一些实施方案中,有义链包括式S6表示的结构,其中式S6按5'至3'方向是:

[0144] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A

[0145] 式S6;

[0146] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0147] 在式V的一些实施方案中,有义链包括式S7表示的结构,其中式S7按5'至3'方向是:

[0148] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-B

[0149] 式S7;

[0150] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0151] 在式V的一些实施方案中,有义链包括式S8表示的结构,其中式S8按5'至3'方向

是:

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

[0153] 式S8;

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

[0155] 在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸反义链包括式VI表示的结构,其中式VI按5'至3'方向是:

[0156] $A-B_j-E-B_k-E-F-G_l-D-P^1-C'$

[0157] 式VI;

[0158] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

[0159] 每个B由式$C-P^2$表示;

[0160] 每个C是2'-O-Me核糖核苷;

[0161] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

[0162] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0163] 每个E由式$D-P^2-C-P^2$表示;

[0164] F由式$D-P^1-C-P^1$表示;

[0165] 每个G由式$C-P^1$表示;

[0166] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0167] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0168] j是1至7的整数;

[0169] k是1至7的整数;并且

[0170] l是1至7的整数。

[0171] 在式VI的一些实施方案中,反义链包括式A4表示的结构,其中式A4按5'至3'方向是:

[0172] A-S-B-S-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[0173] 式A4;

[0174] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0175] 在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸有义链包括式VII表示的结构,其中式VII按5'至3'方向是:

[0176] $H-B_m-I_n-A'-B_o-H-C$

[0177] 式VII;

[0178] 其中A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

[0179] 每个H由式$(C-P^1)_2$表示;

[0180] 每个I由式$(D-P^2)$表示;

[0181] B、C、D、P^1和P^2如式VI中所定义;

[0182] m为1至7的整数;

[0183] n是1至7的整数;并且

[0184] 是1至7的整数。

[0185] 在式VII的一些实施方案中,有义链包括式s9表示的结构,其中式S9按5'至3'方向是:

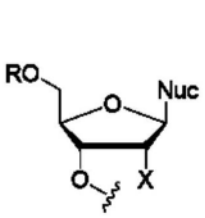
[0186] A-S-A-S-A-O-A-O-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-S-A-S-A

[0187] 式S9;

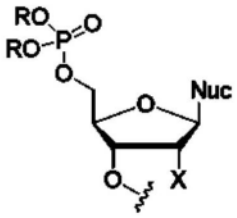
[0188] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0189] 在一些实施方案中,反义链还在反义链的5'末端包含5'磷稳定部分。在一些实施方案中,有义链还在有义链的5'末端包含5'磷稳定部分。

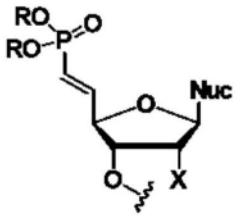
[0190] 在一些实施方案中,5'磷稳定部分由式IX-XVI中的任一个表示:



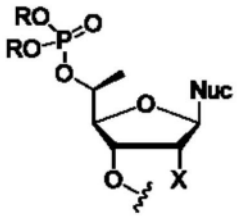
XIV



XV

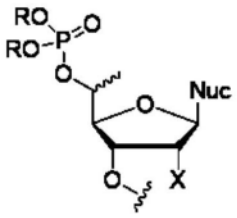


XVI

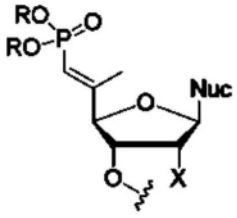


XVII

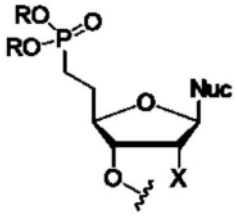
[0191]



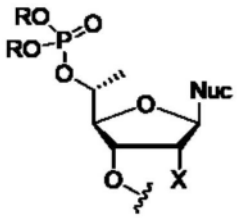
XVIII



XIX



XX



XXI

[0192] 其中Nuc表示核碱基,诸如腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶,并且R表示任选取代的烷基、任选取代的烯基或任选取代的炔基(例如,任选取代的C1-C6烷基、任选取代的C2-C6烯基或任选取代的C2-C6炔基)、苯基、苄基、羟基或氢。

[0193] 在一些实施方案中,5'磷稳定部分是如式XVI中表示的(E)-乙烯基膦酸酯。

[0194] 在一些实施方案中,n为1至4。在一些实施方案中,n为1至3。在一些实施方案中,n为1至2。在一些实施方案中,n为1。

[0195] 在一些实施方案中,m为1至4。在一些实施方案中,m为1至3。在一些实施方案中,m为1至2。在一些实施方案中,m为1。

[0196] 在一些实施方案中,n和m各自为1。

[0197] 在一些实施方案中,反义链中50%或更多的核糖核苷酸是2′-O-Me核糖核苷酸(例如,反义链中50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核糖核苷酸可以是2'-O-Me核糖核苷酸)。

[0198] 在一些实施方案中,反义链中60%或更多的核糖核苷酸是2′-O-Me核糖核苷酸(例

如,反义链中60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核糖核苷酸可以是2'-O-Me核糖核苷酸)。

[0199] 在一些实施方案中,反义链中70%或更多的核糖核苷酸是2′-O-Me核糖核苷酸(例如,反义链中70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核糖核苷酸可以是2'-O-Me核糖核苷酸)。

[0200] 在一些实施方案中,反义链中80%或更多的核糖核苷酸是2′-O-Me核糖核苷酸(例如,反义链中80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核糖核苷酸可以是2'-O-Me核糖核苷酸)。

[0201] 在一些实施方案中,反义链中90%或更多的核糖核苷酸是2′-O-Me核糖核苷酸(例如,反义链中90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的核糖核苷酸可以是2'-O-Me核糖核苷酸)。

[0202] 在一些实施方案中,10%或更少的核苷间键联是磷酸二酯键联或硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的核苷间键联是磷酸二酯键联或硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,100%的核苷间键联是磷酸二酯键联或硫代磷酸酯键联。

[0203] 在一些实施方案中,9个核苷间键联是磷酸二酯键联或硫代磷酸酯键联。

[0204] 在一些实施方案中,反义链的长度为10至30个核苷酸(例如,10个核苷酸、11个核苷酸、12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸或30个核苷酸)、15至25个核苷酸(例如,15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸或25个核苷酸)或18至23个核苷酸(例如,18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸或23个核苷酸)。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为27个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为28个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为29个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为30个核苷酸。

[0205] 在一些实施方案中,支链化合物的siRNA分子通过接头(例如,乙二醇低聚物,例如四乙二醇)彼此连接。在一些实施方案中,支链化合物的siRNA分子通过介于一个siRNA分子的有义链与另一个siRNA分子的有义链之间的接头彼此连接。在一些实施方案中,siRNA分子通过介于一个siRNA分子的反义链与另一个siRNA分子的反义链之间的接头连接。在一些实施方案中,支链化合物的siRNA分子通过介于一个siRNA分子的有义链与另一个siRNA分子的反义链之间的接头彼此连接。

[0206] 在一些实施方案中,有义链的长度为12至30个核苷酸(例如,12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸或30个核苷酸)或14至18个核苷酸(例如,14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸或18个核苷酸)。在一些实施方案中,有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为21个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为23个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为24个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为25个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为26个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为27个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为28个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为29个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为30个核苷酸。

[0207] 在一些实施方案中,4个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。

[0208] 在一些实施方案中,反义链的长度为18个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为18个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为18个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为18个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为18个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为19个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为14个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为15个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为16个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为17个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为19个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸并且有义链的长度为21个核苷酸。

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

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

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

[0209] 在一些实施方案中,向受试者施用治疗性寡核苷酸引起受试者中基因的沉默或产生基因的剪接同种型。基因的沉默可通过使基因的正调控因子沉默而发生,对所述基因而言相对于在参考受试者中观察到的所述表达和/或活性水平增加的表达和/或活性与疾病状态相关。基因的沉默可通过使基因的负调控因子沉默而发生,对所述基因而言相对于在参考受试者中观察到的所述表达和/或活性水平减少的表达和/或活性与疾病状态相关。基因的沉默可通过使特定基因或特定基因的剪接同种型沉默而发生,对所述特定基因而言相对于在参考受试者中所述基因或所述基因的剪接同种型的表达,所述基因或所述基因的剪接同种型的过表达与疾病状态相关。

[0210] 在一些实施方案中,所述基因或所述基因的剪接同种型在所述受试者的中枢神经

系统中转录表达。

[0211] 在一些实施方案中,所述基因或所述基因的剪接同种型的沉默用于治疗诊断患有中枢神经系统的疾病的受试者。

[0212] 在一些实施方案中,所述基因或所述基因的剪接同种型的沉默用于治疗诊断患有神经退行性疾病、神经精神性疾病或其它神经病症的受试者。

[0213] 在一些实施方案中,所述疾病是亨廷顿病(Huntington's disease)。在一些实施方案中,所述疾病是帕金森氏病(Parkinson's disease)。在一些实施方案中,所述疾病是阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)。在一些实施方案中,所述疾病是肌萎缩侧索硬化症(ALS)。在一些实施方案中,所述疾病是路易体痴呆(DLB)。在一些实施方案中,所述疾病是单纯性自主神经衰竭。在一些实施方案中,所述疾病是路易体吞咽困难。在一些实施方案中,所述疾病是偶发性路易体病(ILBD)。在一些实施方案中,所述疾病是遗传性路易体病。在一些实施方案中,所述疾病是橄榄体脑桥小脑萎缩(OPCA)。在一些实施方案中,所述疾病是纹状体黑质变性。在一些实施方案中,所述疾病是Shy-Drager综合征。在一些实施方案中,所述疾病是癫痫或癫痫病症。在一些实施方案中,所述疾病是朊病毒病。在一些实施方案中,所述疾病是疼痛或疼痛病症。

[0214] 在一些实施方案中,所述反义链具有足以与选自以下的基因的一部分杂交的互补性:ABCA7、ABI3、ADAM10、APOC1、APOE、AXL、BIN1、C1QA、C3、C9ORF72、CASS4、CCL5、CD2AP、CD33、CD68、CLPTM1、CLU、CR1、CSF1、CST7、CTSB、CTSD、CTSL、CXCL10、CXCL13、DSG2、ECHDC3、EPHA1、FABP5、FERMT2、FTH1、GNAS、GRN、HBEGF、HLA-DRB1、HLA-DRB5、HTT、IFIT1、IFIT3、IFITM3、IFNAR1、IFNAR2、IGF1、IL10RA、IL1A、IL1B、IL1RAP、INPP5D、ITGAM、ITGAX、KCNT1、LILRB4、LPL、MAPT、MEF2C、MMP12、MS4A4A、MS4A6A、MSH3、NLRP3、NME8、NOS2、PICALM、PILRA、PLCG2、PRNP、PTK2B、SCIMP、SCN9A、SLC24A4、SNCA、SORL1、SPI1、SPP1、SPPL2A、TBK1、TNF、TREM2、TREML2、TYROBP和ZCWPW1。在一些实施方案中,所述基因选自HTT、MAPT、SNCA、C9ORF72、APOE、SCN9A、KCNT1、PRNP和MSH3。在一些实施方案中,所述基因是HTT。在一些实施方案中,所述基因是MAPT。在一些实施方案中,所述基因是SNCA。在一些实施方案中,所述基因是C9ORF72。在一些实施方案中,所述基因是APOE。在一些实施方案中,所述基因是SCN9A。在一些实施方案中,所述基因是KCNT1。在一些实施方案中,所述基因是PRNP。在一些实施方案中,所述基因是MSH3。

[0215] 在一些实施方案中,所述受试者是人。

[0216] 在一些实施方案中,所述治疗性寡核苷酸包含一个或多个具有负电荷的原子并且二价阳离子包含两个正电荷。在一些实施方案中,负电荷与正电荷的比率为0.75至7.5(例如,0.76、0.77、0.78、0.79、0.80、0.81、0.82、0.83、0.84、0.85、0.86、0.87、0.88、0.89、0.90、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5)。在一些实施方案中,负电荷与正电荷的比率为1.0至2.0(例如,1.0至1.9、1.0至1.8、1.0至1.7、1.0至1.6、1.0至1.5、1.0至1.4、1.0至1.3、1.0至1.2、1.0至1.1、1.1至2.0、1.2至2.0、1.3至2.0、1.4至2.0、1.5至2.0、1.6至2.0、1.7至2.0、1.8至2.0或1.9至

2.0)。在一些实施方案中,负电荷与正电荷的比率为0.75至6.5(例如,0.75至5.5、0.75至4.5、0.75至3.5、0.75至2.5、0.75至1.5或0.75至1)。在一些实施方案中,负电荷与正电荷的比率为1至7.5(例如,1.5至7.5、2.5至7.5、3.5至7.5、4.5至7.5、5.5至7.5或6.5至7.5)。在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸与二价阳离子的摩尔比为1:10至1:100(例如,1:10至1:50、1:18至1:38、1:20至1:25、1:25或1:20)。在一些实施方案中,所述一种或多种二价阳离子的浓度为10mM至150mM(例如,20mM至150mM、20mM至100mM、25mM至150mM、25mM至100mM、30mM至90mM、35mM至85mM、35mM至75mM、40mM至70mM、40mM至65mM、40mM至60mM或40mM至50mM)。

[0217] 在第三方面,本公开提供了一种合成配制为包含一种或多种二价阳离子的盐的siRNA分子的方法,所述方法包括在一种或多种二价阳离子的存在下加热反义链和有义链。在一些实施方案中,所述加热包括加热到至少90℃。在一些实施方案中,所述siRNA分子是本公开的前述方面或实施方案中任一项的siRNA分子。

[0218] 在第四方面,本公开提供了一种合成配制为包含一种或多种二价阳离子的盐的siRNA分子的方法,所述方法包括在一种或多种二价阳离子的存在下不加热孵育杂交的siRNA双链体。在一些实施方案中,所述siRNA分子是本公开的前述方面或实施方案中任一项的siRNA分子。

[0219] 在第五方面,本公开提供了通过第三方面或第四方面的方法合成的siRNA分子。

[0220] 在另一个方面,本公开提供了一种药物组合物,其含有本公开的前一方面的治疗性寡核苷酸与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂的组合。

[0221] 在再一个方面,本公开提供了一种试剂盒,其含有本公开的第二方面的治疗性寡核苷酸或前一方面的药物组合物。所述试剂盒还可以包括指导试剂盒的使用者执行本文所述的方法的包装说明书,诸如本公开的前述第一方面或其任何实施方案的方法。

附图说明

[0222] 图1A是向FVB/NJ,F小鼠单侧ICV注射的实验概要,接着是本文描述的用于对实验程序的毒性进行监测和评分的方法。ICV注射以5μl或10μl体积进行并且以0.5μl/分钟的流量用10nmol或20nmol的siRNA施用。

[0223] 图1B是在实验ICV程序后小鼠EvADINT-A评分的散点图。每次ICV注射的实验条件包括在以下四种离子条件之一的存在下杂交的双链体siRNA的递送:A)$Mg2^{+}$;B)$Ca2^{+}$;C)$Mg2^{+}$和$Ca2^{+}$;或D)仅PBS(对照)。评分越高,认为实验条件的毒性越大。

[0224] 图2A是显示在各种二价阳离子的存在下本公开的di-siRNA分子的mRNA敲低的条形图。评价测试的每种条件(仅PBS、含Mg^{2+}的di-siRNA、含Ca^{2+}的di-siRNA、含Mg^{2+}和Ca^{2+}的di-siRNA及含PBS的di-siRNA)在脑部的四个不同部分中的敲低。每种条件的四个条形从左至右表示额叶皮质、运动皮质、纹状体和海马。

[0225] 图2B是显示本公开的di-siRNA分子对目标基因的剂量依赖性敲低的条形图。在x轴上,“对照”是指未处理的对照,“PBS”是指含PBS的di-siRNA,“Mg”是指含Mg^{2+}的di-siRNA,并且“Ca”是指含Ca^{2+}的di-siRNA。

[0226] 图2C是显示在各种二价阳离子的存在下本公开的di-siRNA分子的组织分布的散点图。评价测试的每种条件(仅PBS、含Mg^{2+}的di-siRNA、含Ca^{2+}的di-siRNA、含Mg^{2+}和Ca^{2+}的

di-siRNA及含PBS的di-siRNA)在脑部的四个不同部分中的摄取。y轴表示在PNA杂交测定中测量的寡核苷酸fmol/mg蛋白质。评价测试的每种条件(仅PBS、含Mg^{2+}的di-siRNA、含Ca^{2+}的di-siRNA、含Mg^{2+}和Ca^{2+}的di-siRNA及含PBS的di-siRNA)在四个不同的脑部区域中的摄取。对于测试的每种条件,从左至右的点分别指示额叶皮质、运动皮质、纹状体和海马。

[0227] 图3A是在不同浓度Mg^{2+}的存在下用20nmol的siRNA分子,或用在PBS中的Mg^{2+}的对照条件处理的小鼠的EvADINT-A评分的散点图。评分越高,认为实验条件的毒性越大。在图3A中,“添加”指示在siRNA双链体杂交之后向siRNA中添加Mg^{2+},并且“重新杂交”指示在添加Mg^{2+}之后,加热siRNA分子以使其重新杂交。对于每种浓度的Mg,下面示出了渗透压摩尔浓度、pH和siRNA与Mg的比率。

[0228] 图3B是在不同浓度Ca^{2+}的存在下用20nmol的siRNA分子处理的小鼠的EvADINT-A评分的散点图。评分越高,认为实验条件的毒性越大。

[0229] 图3C是在不同浓度Mg^{2+}/Ca^{2+}的存在下用20nmol的siRNA分子处理的小鼠的EvADINT-A评分的散点图。评分越高,认为实验条件的毒性越大。

[0230] 图3D是在恒定比率的Mg^{2+}的存在下用不同浓度的siRNA分子,或用在不含阳离子的PBS中的siRNA的对照条件处理的小鼠的EvADINT-A评分的散点图。评分越高,认为实验条件的毒性越大。对于每种实验条件,下面示出了渗透压摩尔浓度和pH。

[0231] 定义

[0232] 除非本文另外定义,否则本文使用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。如果存在任何潜在的歧义,本文提供的定义优先于任何字典或外部定义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。术语“包括(including)”以及其它形式如“包括(includes)”和“包括(included)”的使用不是限制性的。

[0233] 如本文所用,术语“核酸”是指分别由核糖核苷酸链或脱氧核糖核苷酸链组成的RNA分子或DNA分子。

[0234] 如本文所用,术语“载体核酸”是指与治疗性核酸具有序列互补性并与治疗性核酸杂交的核酸分子(例如,核糖核酸)。如本文所用,术语“3’末端”是指在核糖环的3’碳处含有羟基或经修饰的羟基的核酸末端。

[0235] 如本文所用,术语“核苷”是指由杂环碱基及其糖组成的分子。

[0236] 如本文所用,术语“核苷酸”是指在其3’或5’糖羟基上具有磷酸基团的核苷。磷酸基团变体的实例包括但不限于饱和烷基膦酸酯、不饱和烯基膦酸酯、硫代磷酸酯和亚磷酰胺。

[0237] 如本文所用,术语“siRNA”是指诱导RNA干扰(RNAi)途径的小干扰RNA双链体。siRNA分子的长度可能不同(通常介于10至30个碱基对之间),并且可能与其靶mRNA具有不同程度的互补性。术语“siRNA”包括两条单独的链的双链体,以及任选地形成包括双链体区的发夹结构的单链。

[0238] 如本文所用,术语“反义链”是指与靶基因具有一定程度的互补性的siRNA双链体的链。

[0239] 如本文所用,术语“有义链”是指与反义链具有互补性的siRNA双链体的链。

[0240] 如本文所用,术语“二价阳离子”是指化合价为2+的带正电荷的离子(即,阳离子)。

二价阳离子的实例包括Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+}。由于它们带正电荷,二价阳离子通常与带负电荷的原子(例如,来自带有单位或部分负电荷的磷酸基团或硫代磷酸酯基团的氧离子)形成离子键。

[0241] 如本文所用,术语“离子半径(ionic radius)”和“离子半径(ionic radii)”是指一种或多种单原子离子(例如,二价阳离子)当以其离子晶体结构的形式测量时的半径。离子半径通常以皮米或埃为单位进行测量。

[0242] 如本文所用,术语“盐”是指在阴离子组分(例如,来自带有单位或部分负电荷的磷酸基团或硫代磷酸酯基团的氧离子)和阳离子组分(例如,二价阳离子)之间含有离子缔合的任何化合物。盐可以有各种物理形式。例如,盐可以是固体、结晶、离子化合物,或者可以是溶液的形式,其中盐溶解在与该盐的组成离子可混溶的溶剂(例如,水或另一种极性、质子溶剂)中。盐也可以悬浮液存在,例如通过使(i)含有感兴趣的盐和第一溶剂的均匀溶液与(ii)和第一溶剂不完全混溶的第二溶剂接触而形成的悬浮液。悬浮液的实例是通过使含有感兴趣的盐的水溶液与和水不完全混溶的溶剂诸如含有一个或多个非极性官能团的有机溶剂接触而形成的悬浮液。在本公开的上下文中,“盐”包括含有多个阳离子结合位点的寡核苷酸,所述阳离子结合位点被一种或多种二价阳离子(例如,Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+}或其组合)饱和。

[0243] 术语“治疗性寡核苷酸”是指在被引入(i)编码感兴趣的蛋白质或核酸(例如,RNA)产物的感兴趣的基因后,减少或以其他方式调节蛋白质或核酸产物的表达的寡核苷酸。治疗性寡核苷酸的实例是例如通过RNA诱导的沉默复合物(RISC)减弱感兴趣的基因的表达,例如Tijsterman和Plasterk,Cell 117(1):1-3(2004)中所述,其公开内容通过引用并入本文。另外的治疗性寡核苷酸实例是下述那些治疗性寡核苷酸:通过退火为感兴趣的基因基因座或RNA转录物而调节基因表达并且(i)调控(例如,抑制)转录或翻译,(ii)通过干扰细胞的内源性剪接机制来调控(例如,诱导)外显子跳跃或包含,和/或(iii)通过本领域已知或本文描述的CRISPR相关蛋白技术(例如,gRNA)促进基因编辑或碱基编辑。本公开的治疗性寡核苷酸可以是单链的或双链的、单体的或分支的。治疗性寡核苷酸的具体实例是小干扰RNA(siRNA)分子、微RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、反义寡核苷酸(ASO)和CRISPR向导RNA(gRNA)分子。在本公开的上下文中,治疗性寡核苷酸可以是未结合的或结合(例如,缀合)至一个或多个另外的部分(例如,抗体或其它蛋白质)。

[0244] 术语“干扰RNA分子”是指阻抑靶RNA转录物的内源功能的RNA分子,诸如小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)或短发夹RNA(shRNA)。

[0245] 如本文所用,术语“表达”是指以下事件中的一项或多项:(1)从DNA序列产生RNA模板(例如,通过转录);(2)RNA转录物的加工(例如,通过剪接、编辑、5’帽形成和/或3’末端加工);以及(3)将RNA翻译成多肽或蛋白质。在编码蛋白质产物的基因的上下文中,术语“基因表达”等与术语“蛋白质表达”等可互换使用。患者中感兴趣的基因或蛋白质的表达可以例如通过检测从患者获得的样品中的以下各项来显现:编码相应蛋白质的mRNA的数量或浓度的增加(例如使用本文所述的或本领域已知的RNA检测程序进行评估,诸如定量聚合酶链式反应(qPCR)和RNA seq技术),相应蛋白质的数量或浓度的增加(例如使用本文所述的或本领域已知的蛋白质检测方法,诸如酶联免疫吸附测定法(ELISA)等进行评估),和/或相应蛋白质活性的增加(例如,在酶的情况下,如使用本文所述的或本领域已知的酶活性测定法进

行评估)。如本文所用,如果可以在细胞或细胞所在的培养基中检测到一种或多种或全部上述事件,则认为细胞“表达”感兴趣的基因或蛋白质。例如,如果可以检测到(i)细胞或细胞群产生相应的RNA转录物,诸如mRNA模板(例如,使用本文所述的RNA检测程序);(ii)RNA转录物的加工(例如,剪接、编辑、5’帽形成和/或3’末端加工,诸如使用本文所述的RNA检测程序);(iii)将RNA模板翻译成蛋白质产物(例如,使用本文所述的蛋白质检测程序);和/或(iv)蛋白质产物的翻译后修饰(例如,使用本文所述的蛋白质检测程序),则认为感兴趣的基因或蛋白质被所述细胞或细胞群“表达”。

[0246] 如本文所用,术语“靶标”、“靶向”和“靶向的”在siRNA设计的上下文中是指生成反义链以便使反义链以导致mRNA翻译成蛋白质产物减少的方式与mRNA转录物内感兴趣的区域退火。

[0247] 术语“阳离子结合位点”是指治疗性寡核苷酸中的取代基,其携带部分负电荷或单位负电荷(例如,磷酸盐或硫代磷酸酯的氧离子)并且能够与阳离子(例如,二价阳离子)形成离子缔合。

[0248] 术语“饱和度”是指被特定阳离子物质(例如,二价阳离子)以离子方式结合的阳离子结合位点的相对比例。

[0249] 术语“硬路易斯酸”是指特征在于低离子半径、高正电荷密度、强置换水能力和高能最低占用的分子轨道(LUMO)的化学酸。

[0250] 如本文所用,术语“化学修饰的核苷酸”、“核苷酸类似物”、“改变的核苷酸”或“修饰的核苷酸”是指非标准核苷酸,包括非天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。示例性的核苷酸类似物在任何位置被修饰,以改变核苷酸的某些化学性质,但保留核苷酸类似物执行其预期功能的能力。

[0251] 如本文所用,术语“代谢稳定的”是指含有已被化学修饰的核糖核苷酸,以便降低施用给受试者的RNA分子的代谢速率的RNA分子。示例性修饰包括2’-羟基修饰为2’-O-甲氧基或2’-氟,以及磷酸二酯修饰为硫代磷酸酯。

[0252] 如本文所用,术语“硫代磷酸酯”是指通过用硫取代磷酸基团的一个或多个氧而修饰的核苷酸的磷酸基团。

[0253] 如本文所用,术语“antagomir”是指可以充当miRNA活性的抑制剂的核酸。

[0254] 如本文所用,术语“缺口聚体(gapmer)”是指含有足够长以诱导RNA酶H裂解的脱氧核苷酸单体的中心嵌段的嵌合反义核酸。脱氧核苷酸嵌段的侧翼是核糖核苷酸单体或含有修饰的核糖核苷酸单体。

[0255] 如本文所用,术语“混合体(mixmer)”是指含有锁核酸(LNA)和DNA的混合物的核酸。

[0256] 如本文所用,术语“向导RNA”是指与基因组中的特定序列具有序列互补性的核酸,该特定序列紧邻原型间隔区相邻基序(PAM)序列的上游或1个碱基对,如在CRISPR/Cas9基因编辑系统中使用的。可替代地,“向导RNA”可以指与特定信使RNA(mRNA)序列具有序列互补性(例如,反义)的核酸。关于这一点,向导RNA还可以与长度相同或较短的“乘客RNA”序列具有序列互补性,“乘客RNA”序列与向导RNA杂交的mRNA的序列相同或基本上相同。

[0257] 如本文所用,术语“乙二醇链”是指具有式$((CH_2OH)_2)$的碳链。

[0258] 如本文所用,“烷基”是指饱和烃基。烷基基团可以是无环的或环状的并且当未取

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

[0259] 如本文所用,“烯基”是指具有至少一个烯属不饱和位点(即,具有至少一个式C=C的部分)的无环或环状不饱和烃基。当未取代时,烯基基团仅含有C和H。当命名具有特定碳数的烯基残基时,旨在涵盖和描述具有该碳数的所有几何异构体;因此,例如,“丁烯基”意在包括正-丁烯基、仲-丁烯基和异-丁烯基。烯基的实例包括-CH=CH_2、-CH_2-CH=CH_2和-CH_2-CH=CH-CH=CH_2。在一些实施方案中,烯基可以被取代。可以引入烯基基团的合适的取代基包括例如羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基和卤代等。

[0260] 如本文所用,“炔基”是指具有至少一个炔属不饱和位点(即,具有至少一个式C≡C的部分)的无环或环状不饱和烃基。当未取代时,炔基基团仅含有C和H。当命名具有特定碳数的炔基残基时,旨在涵盖和描述具有该碳数的所有几何异构体;因此,例如,“戊炔基”意在包括正-戊炔基、仲-戊炔基、异-戊炔基和叔-戊炔基。炔基的实例包括-C≡CH和-C≡C-CH_3。在一些实施方案中,炔基可以被取代。可以引入炔基基团的合适的取代基包括例如羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基和卤代等。

[0261] 如本文所用,术语“苯基”表示其中环的碳原子上的一个氢原子已被去除的单环芳烃。苯基基团可以是未取代的或被一个或多个合适的取代基取代,其中取代基置换苯基的H。

[0262] 如本文所用,术语“苄基”是指当附接到甲苯的甲基基团上的氢原子被去除时获得的一价基团。苄基通常具有苯基-CH_2-的式。苄基基团可以是未取代的或被一个或多个合适的取代基取代。例如,取代基可以置换苯基组分的H和/或亚甲基(-CH_2-)组分的H。

[0263] 如本文所用,术语“酰胺”是指附接至氨基-羰基官能团的烷基、烯基、炔基或芳族基团。

[0264] 如本文所用,术语“核苷间”和“核苷酸间”分别指核苷和核苷酸之间的键。

[0265] 如本文所用,术语“三唑”是指具有式($C_2H_3N_3$)的杂环化合物,杂环化合物具有两个碳和三个氮的五元环,其位置可以改变,从而产生多种异构体。

[0266] 如本文所用,术语“末端基团”是指碳链或核酸末端的基团。

[0267] 如本文所用,“氨基酸”是指含有胺和羧基官能团以及氨基酸特有的侧链的分子。

[0268] 在一些实施方案中,氨基酸选自蛋白氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸是L-氨基酸或D-氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸是合成氨基酸(例如,β-氨基酸)。

[0269] 如本文所用,术语“亲脂性氨基酸”是指包括疏水部分(例如,烷基链或芳香环)的氨基酸。

[0270] 如本文所用,术语“递送靶标”是指需要向其递送分支寡核苷酸组合物的身体器官或部分。

[0271] 如本文所用,术语“介于X和Y之间”包括X和Y值。例如,“介于X和Y之间”是指X值和Y值之间的值的范围,以及X值和Y值。

[0272] 如本文所用,术语“分支siRNA”是指含有两个或更多个彼此共价结合的双链siRNA

分子的化合物。作为一个实例,分支siRNA分子可以是“二分支的”,在本文中也称为“二-siRNA”,其中siRNA分子包括例如通过接头彼此共价结合的2个siRNA分子。分支siRNA分子可以是“三分支的”,在本文中也称为“三-siRNA”,其中siRNA分子包括例如通过接头彼此共价结合的3个siRNA分子。分支siRNA分子可以是“四分支的”,在本文中也称为“四-siRNA”,其中siRNA分子包括例如通过接头彼此共价结合的4个siRNA分子。

[0273] 如本文所用,术语“分支点部分”是指本公开的分支siRNA结构的化学部分,其可以共价连接至siRNA分子的反义链或有义链的5’末端或3’末端并且其可以支持另外的单链或双链siRNA分子的附接。适合连同所公开的方法和组合物一起使用的分支点部分的非限制性实例包括例如亚磷酰胺、甲苯磺酰化丙酮缩甘油、1,3-二氨基丙醇、季戊四醇和US10,478,503中描述的任何一种分支点部分。

[0274] 如本文所用,术语“5’磷稳定部分”是指包括磷酸酯以及经修饰的磷酸酯(例如,硫代磷酸酯、磷酸二酯、膦酸酯)的末端磷酸基团。磷酸部分可位于任一末端,但优选位于5′-末端核苷处。在一个方面,末端磷酸是未修饰的,具有式-O-P(=O)(OH)OH。在另一方面,末端磷酸是经修饰的,使得O和OH基团中的一个或多个被H、O、S、N(R’)或烷基置换,其中R’是H、氨基保护基团,或未取代或经取代的烷基。在一些实施方案中,5’和或3’末端基团可包括1至3个磷酸部分,这些磷酸部分各自独立地是未修饰的(二磷酸或三磷酸)或经修饰的。

[0275] 应当理解,本文提供的某些核苷间键联,包括例如磷酸二酯和硫代磷酸酯,在生理pH下包括-1的形式电荷,并且所述形式电荷将被阳离子部分,例如碱金属(诸如钠或钾)、碱土金属(诸如钙或镁)、或铵或胍离子,或多种二价阳离子(例如,Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}或其组合)平衡。

[0276] 核苷酸的磷酸基团也可以修饰,例如通过用硫取代磷酸基团的一个或多个氧(例如,硫代磷酸酯),或通过产生允许核苷酸执行其预期功能的其它取代,诸如在例如以下文献中描述的:Eckstein,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.10:117-21,2000;Rusckowski等人,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.10:333-45,2000;Stein,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.11:317-25,2001;Vorobjev等人,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.11:77-85,2001;和US 5,684,143。

[0277] 如本文所用,术语“互补”是指形成规范沃森-克里克(Watson-Crick)碱基对的两个核苷酸。为免生疑问,本公开的上下文中的沃森-克里克碱基对包括腺嘌呤-胸腺嘧啶、腺嘌呤-尿嘧啶和胞嘧啶-鸟嘌呤碱基对。在此上下文中,正确的沃森-克里克碱基对被称为“匹配”,而每个未配对的核苷酸和每个错误配对的核苷酸都被称为“错配”。用于确定核酸序列同一性百分比的比对可以以在本领域技术人员能力范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2或Megalign软件。

[0278] 相对于参考多核苷酸序列的“百分比(%)序列互补性”定义为在比对序列并引入缺口之后,候选序列中与参考多核苷酸序列中的核酸互补的核酸的百分比,如果需要的话,以实现最大百分比的序列互补性。如果给定的核苷酸形成规范的沃森-克里克碱基对,则认为给定的核苷酸与本文所述的参考核苷酸“互补”。为免生疑问,本公开的上下文中的沃森-克里克碱基对包括腺嘌呤-胸腺嘧啶、腺嘌呤-尿嘧啶和胞嘧啶-鸟嘌呤碱基对。在此上下文中,正确的沃森-克里克碱基对被称为“匹配”,而每个未配对的核苷酸和每个错误配对的核苷酸都被称为“错配”。用于确定核酸序列同一性百分比的比对可以以在本领域技术人员能

力范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2或Megalign软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括实现在所比较序列的全长上实现最大互补性所需的任何算法。例如,给定核酸序列A与给定核酸序列B的序列互补性百分比(也可以表述为给定核酸序列A与给定核酸序列B具有一定的互补性百分比)计算公式如下:

[0279] 100×(分数X/Y)

[0280] 其中X是在A和B的程序比对中,比对(例如,由计算机软件,诸如BLAST执行)中互补碱基对的数量,其中Y是B中的核酸总数。应当理解,当核酸序列A的长度不等于核酸序列B的长度时,A与B的序列互补性百分比将不等于B与A的序列互补性百分比。如本文所用,如果查询核酸序列与参考核酸序列具有100%的序列互补性,则认为查询核酸序列与参考核酸序列"完全互补"。

[0281] 相对于参考多核苷酸或多肽序列的"序列一致性百分比(%)"定义为在比对序列且引入空位(如果需要)以实现最大序列一致性百分比后,候选序列中与参考多核苷酸或多肽序列中的核酸或氨基酸一致的核酸或氨基酸的百分比。用于确定核酸或氨基酸序列同一性百分比的比对可以以在本领域技术人员能力范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2或Megalign软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括实现在所比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。例如,可以使用序列比较计算机程序BLAST生成百分比序列同一性值。例如,给定核酸或氨基酸序列A与给定核酸或氨基酸序列B的百分比序列同一性(也可以表述为给定核酸或氨基酸序列A与给定核酸或氨基酸序列B具有一定的百分比序列同一性)计算公式如下:

[0282] 100×(分数X/Y)

[0283] 其中X是通过序列比对程序(例如BLAST)在该程序对A和B的比对中评分为相同匹配的核苷酸或氨基酸的数目,并且其中Y是B中核酸的总数。应当理解在核酸或氨基酸序列A的长度不等于核酸或氨基酸序列B的长度时,A与B的百分比序列同一性将不等于B与A的百分比序列同一性。

[0284] 如本文所用,术语"足以杂交的互补性"是指不需要与靶区域完全互补(例如,100%互补)的核酸序列或其部分,或者是指相对于靶区域具有一个或多个核苷酸错配,但在指定条件下仍能够与靶区域杂交的核酸序列或其部分。例如,核酸可以是例如95%互补、90%互补、85%互补、80%互补、75%互补、70%互补、65%互补、60%互补、55%互补、50%互补或更少,但仍与靶标形成足够的碱基对,以便在其长度上杂交。

[0285] 当多核苷酸内的一个或多个核苷残基与一个或多个互补核苷碱基配对形成稳定的双链体时,实现核酸的"杂交"或"退火"。碱基配对通常由氢键合事件驱动。杂交包括由天然和/或修饰核碱基形成的沃森-克里克碱基对。杂交还可以包括非沃森-克里克碱基对,诸如不稳定碱基对(鸟苷-尿嘧啶、次黄嘌呤-尿嘧啶、次黄嘌呤-腺嘌呤和次黄嘌呤-胞嘧啶),以及霍氏(Hoogsteen)碱基对。核酸不需要100%互补才能进行杂交。例如,一个核酸可以相对于另一个核酸例如95%互补、90%互补、85%互补、80%互补、75%互补、70%互补、65%互补、60%互补、55%互补、50%互补或更少,但两个核酸仍可彼此形成足够的碱基对以便杂交。

[0286] 一个核酸与另一个核酸退火/杂交后形成的"稳定双链体"是不会因严格洗涤而变

性的双链体结构。示例性严格洗涤条件是本领域已知的并且包括比双链体的单个链的解链温度低约5℃的温度和低单价盐浓度,诸如小于0.2M(例如,0.2M、0.19M、0.18M、0.17M、0.16M、0.15M、0.14M、0.13M、0.12M、0.11M、0.1M、0.09M、0.08M、0.07M、0.06M、0.05M、0.04M、0.03M、0.02M、0.01M或更少)的单价盐浓度(例如,NaCl浓度)。

[0287] 术语“基因沉默”是指基因表达例如转基因、异源基因和/或内源基因表达的阻抑,其可以通过影响转录的过程和/或通过影响转录后机制的过程介导。在一些实施方案中,基因沉默发生在RNAi分子经由RNA干扰以序列特异性方式启动对从目标基因转录的mRNA的抑制或降解时,从而阻止基因产物的翻译。

[0288] 如本文所用,短语“过度活跃的疾病驱动基因”是指具有增加的活性和/或表达,在受试者(例如,人)中促成或引起疾病状态的基因。疾病状态可以由过度活跃的疾病驱动基因直接或通过中间基因引起或加剧。

[0289] 如本文所用,术语“负调控因子”是指负调控(例如,减少或抑制)另一个基因或基因集(例如,失调的基因或失调的基因途径)的表达和/或活性的基因。

[0290] 如本文所用,术语“正调控因子”是指正调控(例如,增加或饱和化)另一个基因或基因集(例如,失调的基因或失调的基因途径)的表达和/或活性的基因。

[0291] 如本文所用,术语“磷酸部分”是指包括磷酸以及经修饰的磷酸的末端磷酸基团。磷酸部分可位于任一末端,但优选位于5′-末端核苷处。在一个方面,末端磷酸是未修饰的,具有式—O—P(=O)(OH)OH。在另一方面,末端磷酸是经修饰的,使得O和OH基团中的一个或多个被H、O、S、N(R')或烷基置换,其中R'是H、氨基保护基团,或未取代或经取代的烷基。在一些实施方案中,5'和或3'末端基团可包括1至3个磷酸部分,这些磷酸部分各自独立地是未修饰的(二磷酸或三磷酸)或经修饰的。

[0292] 在本公开的上下文中,术语“寡核苷酸”是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)或其模拟物的寡聚体或聚合物。该术语包括由天然存在的核碱基、糖和共价核苷间(骨架)键联组成的寡核苷酸以及具有类似功能的非天然存在(例如,修饰)部分的寡核苷酸。此类经修饰或经取代的寡核苷酸常常优于天然形式,因为其具有所需的性质,例如增强的细胞摄取、增强的对核酸靶标的亲和力以及在核酸酶存在下增加的稳定性。

[0293] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”可互换使用,并且是指患有疾病、病症或病状,或处于疾病、病症或病状风险中的生物体,诸如哺乳动物(例如,人),正如由有资格的专业人员(例如,医生或从业护士)对来自受试者的样品进行或不进行本领域已知的实验室测试所确定的。

[0294] 如本文所用,术语“参考受试者”是指与用本公开的组合物治疗的受试者相同或相似,例如年龄、性别、地理区域和/或教育水平的健康对照受试者。健康参考受试者是未患有与失调的基因的表达或失调的基因途径相关的疾病的受试者。此外,健康参考受试者是未患有与基因的表达和/或活性改变(例如,增加或减少)相关的疾病的受试者。

[0295] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”和“治疗(treating)”意指治疗性治疗和预防性(prophylactic或preventative)措施,其中目的是预防或减缓(减轻)不期望的生理病状、病症或疾病,或获得有益或期望的临床结果。有益或期望的临床结果包括但不限于症状的减轻;病状、病症或疾病的程度减小;病状、病症或疾病的状态稳定(即,没有恶化);病状、病症或疾病进展的发作延迟或减缓;病状、病症或疾病状态的改善或缓解

(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的;至少一个可测量的物理参数的改善,不一定是患者可辨别的;或病状、病症或疾病的增强或改善。治疗包括在没有过度水平的副作用的情况下引发临床上显著的反应。治疗还包括与不接受治疗情况下的预期存活相比延长存活。

[0296] 如本文所用,术语"朊病毒病"是指生物体中其发病机制涉及生物体的朊病毒蛋白任何疾病或病症。朊病毒病包括但不限于克雅二氏症(Creutzfeldt-Jakob disease)、致命性家族性失眠(fatal familial insomnia)、格斯特曼-斯特劳斯勒-申克综合征(Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrome)、库鲁病(kuru)、痒病(scrapie)、牛海绵状脑病和慢性消耗性疾病。一般来说,朊病毒病是由PRNP编码的朊病毒蛋白的细胞同种型(PrP^{C})错误折叠引起的。错误折叠的蛋白质(PrP^{SC})会触发该疾病。该疾病可通过诱导PrP^{C}的错误折叠的PrP^{SC}传播。

[0297] 如本文所用,术语"癫痫"是指多种类型的癫痫综合征中的任一种,包括但不限于额叶癫痫、枕叶癫痫、内侧颞叶癫痫、顶叶癫痫、婴儿良性肌阵挛性癫痫、青少年肌阵挛性癫痫、儿童失神性癫痫、青少年失神性癫痫、儿童期癫痫伴全身性强直性阵挛发作、婴儿痉挛症、Lennox-Gastaut综合征、West综合征、睡眠相关性过度运动性癫痫、进行性肌阵挛癫痫、发热性痉挛、癫痫伴慢波睡眠期持续棘慢波、Laudau Kleffner综合征、Rasmussen综合征、先天性代谢缺陷引起的癫痫、婴儿期癫痫伴迁移局灶性发作、常染色体显性夜间额叶癫痫、Ohtahara综合征、早期肌阵挛性脑病、局灶性癫痫和/或多灶性癫痫。

[0298] 如本文所用,术语"疼痛"包括任何和所有形式的慢性和急性疼痛,包括神经病理性疼痛和伤害性疼痛,以及本文所述的其他疼痛。

[0299] 如本文所用,术语"益处"和"反应"在接受疾病治疗的疗法的受试者的上下文中可互换使用。例如,在施用本公开的siRNA分子或siRNA组合物的受试者的背景下的临床益处包括但不限于受试者所经历的疾病症状的持续时间和/或频率的减少,和/或疾病相关表型的减少,和/或野生型转录物、突变转录物、变异转录物或过表达转录物的减少,和/或靶基因转录物的剪接同种型的减少。

[0300] 如本文所用,术语"抗体"(Ab)是指与特定抗原特异性结合并且与特定抗原具有免疫反应性的免疫球蛋白分子,并且包括多克隆、单克隆、基因工程和其它修饰形式的抗体,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、异源缀合抗体(例如,双特异性、三特异性和四特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)及抗体的抗原结合片段,包括例如Fab'、$F(ab')_2$、Fab、Fv、重组IgG(rlgG)片段和scFv片段。而且,除非另外指出,否则术语"单克隆抗体"(mAb)意在包括完整分子,以及能够与靶蛋白特异性结合的抗体片段(诸如,Fab和$F(ab')_2$片段)。Fab和$F(ab')_2$片段缺乏从动物循环中更快速地清除的完整抗体的Fc片段,并且可具有比完整抗体更少的非特异性组织结合(参见Wahl等人,J.Nucl.Med.24:316,1983;通过引用并入本文)。

[0301] 如本文所用,术语"抗原结合片段"是指抗体的保持与靶抗原特异性结合的能力的一种或多种片段。抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段执行。抗体片段抗原是例如Fab、$F(ab')_2$、scFv、SMIP、双抗体、三抗体、亲和体(affibody)、纳米抗体、适体或结构域抗体。术语抗体的"抗原结合片段"涵盖的结合片段的实例包括但不限于:(I)Fab片段,一种由V_L、V_H、C_L和C_H1结构域组成的单价片段;(ii)$F(ab')_2$片段,一种包含两个在铰链区处通过二硫桥连接的Fab片段的二价片段;(iii)由V_H和C_H1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单臂的

V_L和V_H结构域组成的Fv片段;(v)包括V_H和V_L结构域的dAb;(vi)由V_H结构域组成的dAb片段(Ward等人,Nature 341:544-546,1989);(vii)由V_H或V_L结构域组成的dAb;(viii)分离的互补决定区(CDR);及(ix)可任选地通过合成接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合。此外,尽管Fv片段的两个结构域V_L和V_H是由单独的基因编码的,但是它们可以使用重组方法通过接头连接起来,所述接头使其能够制成单条蛋白链,其中V_L和V_H区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见,例如Bird等人,Science 242:423-426,1988,及Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883,1988)。这些抗体片段可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且可以针对实用性以与完好抗体相同的方式来筛选片段。抗原结合片段可以通过重组DNA技术、完整免疫球蛋白的酶促或化学裂解来产生,或者在一些实施方案中,通过本领域已知的化学肽合成方法来产生。

具体实施方式

[0302] 本公开提供了用于将治疗性寡核苷酸分子以含有一种或多种二价阳离子(例如,Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}或其组合)的形式施用于受试者的中枢神经系统的组合物和方法。治疗性寡核苷酸分子可具有特定模式的化学修饰(例如,2'核糖修饰或核苷间键联修饰)以改善针对核酸酶的抗性、毒性概况和物理化学特性(例如,热稳定性),伴有多种二价阳离子(例如,Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}或其组合)使预先存在的阳离子结合位点饱和以进一步改善治疗性寡核苷酸的毒性概况。另外,本公开的特征在于分支短干扰RNA(siRNA)结构,诸如二分支、三分支和四分支siRNA结构。

[0303] 治疗性寡核苷酸分子合成的方法

[0304] 本公开的siRNA分子可通过本领域已知的标准方法合成,如下文进一步讨论的,例如通过使用自动DNA合成仪,诸如可从例如Biosearch,Applied Biosystems,Inc.商购获得的。

[0305] siRNA试剂可以使用溶液相或固相有机合成或两者来制备。有机合成提供的优点是可以容易地制备包括非天然或修饰的核苷酸的寡核苷酸。本公开的siRNA分子可以使用溶液相或固相有机合成或两者来制备。

[0306] 此外,考虑到对于本文公开的任何siRNA试剂,可以通过系统地添加或去除连接的核苷以产生更长或更短的序列来实现进一步优化。此外,此类优化序列可以通过例如引入本文所述或本领域已知的修饰核苷和/或修饰核苷间键联,包括如本领域已知和/或本文讨论的替代核苷、替代糖部分和/或替代核苷间键联来调整,以进一步优化分子(例如,增加血清稳定性或循环半衰期、增加热稳定性、增强跨膜递送和/或靶向特定位置或细胞类型)。

[0307] 本公开的治疗性寡核苷酸分子(例如,siRNA、shRNA、miRNA、gRNA或ASO)的组合物可制备成包括多个阳离子结合位点,所述阳离子结合位点被一种或多种二价阳离子(例如,Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+}或其组合)饱和。所述组合物可以例如通过使治疗性寡核苷酸分子在二价阳离子的存在下杂交来制备。可替代地,所述组合物可以通过使治疗性寡核苷酸分子在没有二价阳离子的情况下杂交,接着在杂交之后添加二价阳离子来制备。在一种以上二价阳离子的情况下,二价阳离子可以同时或依次添加。例如,治疗性寡核苷酸分子可以在两种二价阳离子的存在下杂交。可替代地,治疗性寡核苷酸分子在一种二价阳离子的存在下杂交并且在杂交后添加第二二价阳离子。作为另一替代方案,治疗性寡

核苷酸分子可以在没有二价阳离子的情况下杂交,接着添加两种二价阳离子。

[0308] 二价阳离子

[0309] 本公开的治疗性寡核苷酸分子可包括多个被一种或多种二价阳离子(例如,Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+}或其组合)饱和的阳离子结合位点(例如,电子致密位点)。由于它们带正电荷,二价阳离子通常与带负电荷的原子(例如,来自带有单位或部分负电荷的磷酸基团或硫代磷酸酯基团的氧离子)具有反应性。本公开提供新证据表明,治疗性寡核苷酸分子上阳离子结合位点被二价阳离子饱和显著降低施用于受试者CNS时的毒性。

[0310] 所述一种或多种二价阳离子当以晶格形式测量时可以具有约30皮米至约150皮米的离子半径(例如,约30皮米至约140皮米、约40皮米至约130皮米、约50皮米至约120皮米、约60皮米至约110皮米、约60皮米至约100皮米或约60皮米至约90皮米)。R.D.Shannon,Acta Crystallographica A.32:751-767,1976公开的二价阳离子的计算晶体半径通过引用并入本文。

[0311] 所述一种或多种二价阳离子对治疗性寡核苷酸分子的阳离子结合位点的饱和度为约10%至约100%(例如,约20%至约100%、约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%或约90%至约100%)。

[0312] 在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸分子的反义链的长度可为10至30个核苷酸并且可与总共10至30个二价阳离子进行离子结合。例如,治疗性寡核苷酸分子中反义链核苷酸与二价阳离子的摩尔比范围可为1:3至3:1(例如,1:3、1.1:3、1.2:3、1.3:3、1.4:3、1.5:3、1.6:3、1.7:3、1.8:3、1.9:3、2:3、2.1:3、2.2:3、2.3:3、2.4:3、2.5:3、2.6:3、2.7:3、2.8:3、2.9:3、1:1、3:2.9、3:2.8、3:2.7、3:2.6、3:2.5、3:2.4、3:2.3、3:2.2、3:2.1、3:2、3:1.9、3:1.8、3:1.7、3:1.6、3:1.5、3:1.4、3:1.3、3:1.2、3:1.1或3:1)。

[0313] 在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸分子的有义链的长度可为10至30个核苷酸并且可与总共10至30个二价阳离子进行离子结合。例如,治疗性寡核苷酸分子中有义链核苷酸与二价阳离子的摩尔比范围可为1:3至3:1(例如,1:3、1.1:3、1.2:3、1.3:3、1.4:3、1.5:3、1.6:3、1.7:3、1.8:3、1.9:3、2:3、2.1:3、2.2:3、2.3:3、2.4:3、2.5:3、2.6:3、2.7:3、2.8:3、2.9:3、1:1、3:2.9、3:2.8、3:2.7、3:2.6、3:2.5、3:2.4、3:2.3、3:2.2、3:2.1、3:2、3:1.9、3:1.8、3:1.7、3:1.6、3:1.5、3:1.4、3:1.3、3:1.2、3:1.1或3:1)。

[0314] 本公开的治疗性寡核苷酸分子可与一种或多种二价阳离子以特定摩尔比组合。治疗性寡核苷酸分子与二价阳离子的特定摩尔比可与二价阳离子所实现的毒性益处相关。例如,治疗性寡核苷酸分子与二价阳离子的摩尔比的范围可为1:10至1:50(例如,1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39、1:40、1:41、1:42、1:43、1:44、1:45、1:46、1:47、1:48、1:49或1:50)。在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸分子与二价阳离子的摩尔比的范围可为1:18至1:38(例如,1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37或1:38)。在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸分子与二价阳离子的摩尔比的范围可为1:20至1:25(例如,1:20、1:21、1:22、1:23、1:24或1:25)。在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸与二价阳离子的摩尔比可为1:20。在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸与二价阳离子的摩尔比可为1:25。

[0315] 本公开的治疗性寡核苷酸可与一种或多种二价阳离子组合,其中二价阳离子以特定浓度或浓度范围存在。二价阳离子的浓度可与二价阳离子所实现的毒性益处相关。例如,二价阳离子的浓度可为20mM至150mM(例如,20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149或150mM)。在一些实施方案中,二价阳离子的浓度为20mM至100mM(例如,20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100mM)。在一些实施方案中,二价阳离子的浓度为35mM至75mM(例如,35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75mM)。在一些实施方案中,二价阳离子的浓度为40mM至70mM(例如,40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69或70mM)。

[0316] 治疗性寡核苷酸可包括一个或多个具有负电荷的原子并且二价阳离子可包括正电荷。在一些实施方案中,治疗性寡核苷酸和二价阳离子以一定量存在,使得组合物内存在特定比率的负电荷与正电荷。确定负电荷与正电荷比率的方法是本领域已知的,例如在Furst等人,Electrophoresis.,37:2685-2691,2016中已知的,其特此通过引用并入。在一些实施方案中,负电荷与正电荷的比率为0.75至7.5(例如,0.76、0.77、0.78、0.79、0.80、0.81、0.82、0.83、0.84、0.85、0.86、0.87、0.88、0.89、0.90、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5)。在一些实施方案中,负电荷与正电荷的比率为1.0至2.0(例如,1.0至1.9、1.0至1.8、1.0至1.7、1.0至1.6、1.0至1.5、1.0至1.4、1.0至1.3、1.0至1.2、1.0至1.1、1.1至2.0、1.2至2.0、1.3至2.0、1.4至2.0、1.5至2.0、1.6至2.0、1.7至2.0、1.8至2.0或1.9至2.0)。在一些实施方案中,负电荷与正电荷的比率为0.75至6.5(例如,0.75至5.5、0.75至4.5、0.75至3.5、0.75至2.5、0.75至1.5或0.75至1)。在一些实施方案中,负电荷与正电荷的比率为1至7.5(例如,1.5至7.5、2.5至7.5、3.5至7.5、4.5至7.5、5.5至7.5或6.5至7.5)。

[0317] 治疗性寡核苷酸

[0318] 本公开的治疗性寡核苷酸可以是单链(ss)或双链(ds)RNA结构的形式。在本公开的领域中,所述RNA结构可以指siRNA、短发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)、CRISPR向导RNA(gRNA)或寡核苷酸(ASO)。在一些实施方案中,siRNA分子可以是二分支、三分支或四分支的分子。本公开的治疗性寡核苷酸可含有一个或多个磷酸二酯核苷间键联和/或其类似物,诸如硫代磷酸酯核苷间键联,其中氧离子部分通过与二价金属阳离子(诸如Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、

Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+})的离子键合得以静电中和。

[0319] siRNA结构

[0320] 本公开的siRNA分子可以是单链(ss)或双链(ds)RNA结构的形式。在一些实施方案中,siRNA分子可以是二分支、三分支或四分支的分子。此外,本公开的siRNA分子可含有一个或多个磷酸二酯核苷间键联和/或其类似物,诸如硫代磷酸酯核苷间键联。本公开的siRNA分子还可含有具有2'糖修饰的经化学修饰的核苷。

[0321] 最简单的siRNA由包含ss-或ds-结构的核糖核酸组成,所述结构由第一链(即,反义链)形成,并且在ds-siRNA的情况下还有第二链(即,有义链)。第一链包括与靶核酸至少部分互补的连续核苷酸链段。第二链也包括连续核苷酸链段,其中第二链段与靶核酸至少部分相同。第一链和所述第二链可以彼此杂交以形成双链结构。杂交通常通过沃森-克里克碱基配对发生。

[0322] 根据第一链和第二链的序列,杂交或碱基配对不一定是完全或完美的,这意味着第一链和第二链由于错配而不是100%碱基配对。双链体内也可能存在一个或多个错配,但不一定影响siRNA RNA干扰(RNAi)活性。

[0323] 第一链含有与靶核酸基本上互补的连续核苷酸链段。通常,根据干扰核糖核酸的作用模式,靶核酸序列是ss-RNA,优选mRNA。此类杂交最有可能通过沃森-克里克碱基配对发生,但不一定限于此。第一链具有与靶核酸序列互补的连续核苷酸链段的程度可以介于80%和100%之间,例如80%、85%、90%、95%或100%互补。

[0324] 本文所述的siRNA可以采用对核碱基、磷酸骨架、核糖核心、5'-末端和3'-末端以及分支的修饰,其中siRNA的多条链可共价连接。

[0325] 治疗性寡核苷酸的长度

[0326] 在本公开的范围内,本领域已知的和先前未知的任何长度都可以用于本发明。如本文所述,本公开的治疗性寡核苷酸的反义链的可能长度为10至30个核苷酸(例如,10个核苷酸、11个核苷酸、12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸或30个核苷酸)、15至25个核苷酸(例如,15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸或25个核苷酸)或18至23个核苷酸(例如,18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸或23个核苷酸)。在一些实施方案中,反义链为20个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为22个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为24个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为25个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为26个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为27个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为28个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为29个核苷酸。在一些实施方案中,反义链为30个核苷酸。

[0327] 在一些实施方案中,本公开的治疗性寡核苷酸的有义链为12至30个核苷酸(例如,12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸或30个核苷酸)或14至23个核苷酸(例

如,14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸或23个核苷酸)。在一些实施方案中,有义链为15个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为16个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为17个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为18个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为19个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为20个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为21个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为22个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为23个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为24个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为25个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为26个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为27个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为28个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为29个核苷酸。在一些实施方案中,有义链为30个核苷酸。

[0328] 2′糖修饰

[0329] 本公开包括ss-和ds-RNA干扰分子组合物(例如,siRNA、shRNA、miRNA、gRNA或ASO),其包含至少一种(例如,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11种或更多种)具有2'糖修饰的核苷。可能的2′-修饰包括所有可能取向的OH;F;O-烷基、S-烷基或N-烷基;O-烯基、S-烯基或N-烯基;O-炔基、S-炔基或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是经取代或未取代的C1至C10烷基或C2至C10烯基和炔基。在一些实施方案中,修饰包括2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰。一些实施方案使用O[$(CH_2)_nO]_mCH_3$、$O(CH_2)_nOCH_3$、$O(CH_2)_nNH_2$、$O(CH_2)_nCH_3$、$O(CH_2)_nONH_2$和$O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$,其中n和m为1至约10。其它可能的糖取代基基团包括:其它可能的糖取代基基团包括:C1至C10低级烷基、经取代的低级烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、多烷基氨基、经取代的甲硅烷基、用于改善寡核苷酸的药代动力学性质的基团或用于改善寡核苷酸的药效学性质的基团,以及具有类似性质的其它取代基。在一些实施方案中,修饰包括2'甲氧基乙氧基(2′-O-$CH_2CH_2OCH_3$,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2′-MOE)。在一些实施方案中,修饰包括2'-二甲基氨基氧基乙氧基,即$O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$基团,也称为2′-DMAOE;和2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称为2'-O-二甲基氨基-乙氧基-乙基或2′-DMAEOE),即2′-O-$CH_2OCH_2N(CH_3)_2$。其它可能的糖取代基基团包括例如氨基丙氧基(-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)、烯丙基(-CH_2-CH=CH_2)、-O-烯丙基(-O-CH_2-CH=CH_2)和氟(F)。2'-糖取代基可以位于阿拉伯糖(上)位置或核糖(下)位置。在一些实施方案中,2'-阿拉伯糖修饰是2'-F。还可在治疗性寡核苷酸上的其它位置上进行类似的修饰,具体地在3'末端核苷上或在2'-5'连接的寡核苷酸中的糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物诸如环丁基部分来代替戊呋喃糖基糖。

[0330] 核碱基修饰

[0331] 治疗性寡核苷酸还可包括核苷或其它替代或模拟单体亚基,这些亚基包括核碱基(在本领域中通常简称为“碱基”或“杂环碱基部分”)。核碱基是已被广泛修饰或取代的另一部分并且此类经修饰和或经取代的核碱基适用于本公开。如本文所用,“未修饰”或“天然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰的核碱基(本文也称为杂环碱基部分)包括其它合成和天然的核碱基诸如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基衍生物和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基衍生物和其它烷基衍生

物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-CH3)尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其它炔基衍生物、6-偶氮基尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(具体为5-溴)、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。核碱基还可包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其它杂环例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和2-吡啶酮置换的那些。另外的核碱基包括公开于US 3,687,808中的那些、公开于Kroschwitz,J.I.编辑The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering,New York,John Wiley&Sons,1990,第858-859页中的那些;由Englisch等人,Angewandte Chemie,国际版,30:613,1991公开的那些;以及由Sanghvi,Y.S.,第16章,Antisense Research and Applications,CRC Press,Gait,M.J.编辑,1993,第289-302页公开的那些。本公开的治疗性寡核苷酸还可以包括多环杂环化合物来代替一个或多个杂环碱基部分。先前已报道了许多三环杂环化合物。这些化合物通常用于反义应用,以增加经修饰的链与靶链的结合性质。

[0332] 与第二链中的鸟苷产生三个氢键的代表性胞嘧啶类似物包括1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮(Kurchavov等人,Nucleosides and Nucleotides,16:1837-46,1997)、1,3-二氮杂吩噻嗪-2-酮(Lin等人Am.Chem.Soc.,117:3873-4,1995)和6,7,8,9-四氟-1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮(Wang等人,Tetrahedron Lett.,39:8385-8,1998)。经证实掺入寡核苷酸中的这些碱基修饰与互补鸟嘌呤杂交,并且经证实后者也与腺嘌呤杂交并通过扩展的堆积相互作用增强螺旋热稳定性(也参见US10/155,920和10/013,295,两者均通过引用整体并入本文)。当胞嘧啶类似物/取代物具有附接到刚性1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮支架上的氨基乙氧基部分时,已经观察到了进一步的螺旋稳定性质(Lin等人,Am.Chem.Soc.,120:8531-2,1998)。

[0333] 核苷间键联修饰

[0334] 本公开设计中的另一个变量是构成治疗性寡核苷酸的磷酸骨架的核苷间键联。尽管此处可采用天然RNA磷酸骨架,但可以使用增强治疗性寡核苷酸的所需特征的其衍生物。虽然不是限制性的,但在本公开中特别重要的是保护治疗性寡核苷酸的部分或整体免于水解。降低水解速率的修饰的一个实例是硫代磷酸酯。骨架的任何部分或整体可以含有磷酸酯取代基(例如,硫代磷酸酯、磷酸二酯等)。例如,核苷间键联可以是0至100%硫代磷酸酯,例如0至100%、10至100%、20至100%、30至100%、40至100%、50至100%、60至100%、70至100%、80至100%、90至100%、0至90%、0至80%、0至70%、0至60%、0至50%、0至40%、0至30%、0至20%、0至10%、10至90%、20至80%、30至70%、40至60%、10至40%、20至50%、30至60%、40至70%、50至80%或60至90%硫代磷酸酯键联。类似地,核苷间键联可以是0至100%磷酸二酯键联,例如0至100%、10至100%、20至100%、30至100%、40至100%、50至100%、60至100%、70至100%、80至100%、90至100%、0至90%、0至80%、0至70%、0至60%、0至50%、0至40%、0至30%、0至20%、0至10%、10至90%、20至80%、30至70%、40至60%、10至40%、20至50%、30至60%、40至70%、50至80%或60至90%磷酸二酯键联。

[0335] 可用于本发明的一些可能的治疗性寡核苷酸的具体实例包括含有经修饰的(例如非天然存在的)核苷间键联的寡核苷酸。如本说明书中所定义,具有经修饰的核苷间键联的寡核苷酸包括保留磷原子的核苷间键联和不具有磷原子的核苷间键联。出于本说明书的目

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

[0336] 在一些实施方案中,不包括磷原子的经修饰的寡核苷酸骨架具有由短链烷基或环烷基核苷间键联、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键联或者一个或多个短链杂原子核苷间键联或杂环核苷间键联形成的骨架。这些包括具有以下的那些:吗啉代键联(部分地由核苷的糖部分形成);硅氧烷骨架;硫化物、亚砜和砜骨架;甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;核糖乙酰基(riboacetyl)骨架;含烯烃的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚胺基和亚甲基肼基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰氨骨架;以及具有混合N、O、S和CH_2组成部分的其它骨架。教导非磷骨架的制备的美国专利的非限制性实例包括但不限于美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;和5,677,439,这些专利中的每一个的全部内容特此通过引用并入本文。

[0337] siRNA分子的修饰模式

[0338] 本公开的治疗性寡核苷酸(例如,siRNA分子)可具有各种模式的经化学修饰的残基,诸如该部分中描述的那些。本公开中使用的核苷耐受核碱基和糖中的一系列修饰。单链或双链的完整治疗性寡核苷酸(例如,siRNA分子),可以具有1、2、3、4、5个或更多个不同的核苷,每个核苷在一条或多条RNA链中出现一次或多次。核苷可以以重复模式出现(例如,在两个经修饰的核苷之间交替)或者可以是一种类型的核苷具有第二类型的核苷的取代的链。类似地,核苷间键联可以是以重复模式在单链或双链siRNA中出现的一种或多种类型(例如,在两种核苷间键联之间交替),或者可以是一种类型的核苷间键联具有第二类型的核苷间键联的取代的链。尽管本公开的治疗性寡核苷酸可耐受一系列取代模式,但以下举例说明了一些优选模式,其中A和B表示两种类型的核苷,并且T和P表示两种类型的核苷间键联:

[0339] 模式1:

[0340] A-T-B-T-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-B-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T

[0341] A-T-A-T-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-T-A-T

[0342] 模式2:

[0343] A-T-A-T-A-P-B-P-B-P-B-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-B-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T

[0344] A-T-A-T-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-T-A-T

[0345] 模式3:

[0346] A-T-B-T-A-P-B-P-B-P-B-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-B-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T

[0347] A-T-A-T-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-T-A-T

[0348] 模式4:

[0349] A-T-B-T-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-B-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T

[0350] A-T-A-T-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-B-P-A-P-A-P-B-P-B-P-A-P-A-P-A-T-A-T

[0351] 模式5:

[0352] A-T-B-T-A-P-A-P-A-P-A-P-B-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-B-T-A-T-B-T-A-T-A-T-A-T-A-T

[0353] A-T-A-T-A-P-A-P-A-P-A-P-A-P-B-P-A-P-B-P-B-P-B-P-A-P-A-P-A-T-A-T.

[0354] 在一些实施方案中,T表示硫代磷酸酯,并且P表示磷酸二酯。

[0355] 在一些实施方案中,本公开的siRNA分子的特征在于国际专利申请公开号WO 2016/161388和WO 2020/041769中描述的siRNA核苷酸修饰模式和/或核苷间键联修饰模式中的任一种,该专利申请的公开内容整体并入本文。

[0356] 以下部分提供了另一组示例性支架,本公开的siRNA分子可以并入其中。

[0357] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式I表示的区域的反义链,其中式I按5'至3'方向是

[0358] $A-B-(A')_j-C-P^2-D-P^1-(C'-P^1)_k-C'$

[0359] 式I;

[0360] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;B由式$C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2$表示;每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;每个D是2'-F核糖核苷;每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;j是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);并且k是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,j为4。在一些实施方案中,k为4。在一些实施方案中,j为4且k为4。反义链与靶核酸序列互补(例如,完全或部分互补)。

[0361] 在一些实施方案中,反义链包括式A1表示的结构,其中式A1按5'至3'方向为:

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

[0363] 式A1;

[0364] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0365] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式II表示的区域的反义链,其中式II按5'至3'方向是:

[0366] $A\text{-}B\text{-}(A')_j\text{-}C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^1\text{-}(C\text{-}P^1)_k\text{-}C'$

[0367] 式II;

[0368] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;每个A'由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;B由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;每个D是2'-F核糖核苷;每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;j是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);并且k是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,j为4。在一些实施方案中,k为4。在一些实施方案中,j为4且k为4。反义链与靶核酸序列互补(例如,完全或部分互补)。

[0369] 在本公开的一些实施方案中,反义链包括式A2表示的结构,其中式A2按5'至3'方向是:

[0370] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-A-S-A

[0371] 式A2;

[0372] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0373] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式III表示的结构,其中式III按5'至3'方向是:

[0374] $E\text{-}(A')_m\text{-}F$

[0375] 式III;

[0376] 其中E由式$(C\text{-}P^1)_2$表示;F由式$(C\text{-}P^2)_3\text{-}D\text{-}P^1\text{-}C\text{-}P^1\text{-}C$、$(C\text{-}P^2)_3\text{-}D\text{-}P^2\text{-}C\text{-}P^2\text{-}C$、$(C\text{-}P^2)_3\text{-}D\text{-}P^1\text{-}C\text{-}P^1\text{-}D$或$(C\text{-}P^2)_3\text{-}D\text{-}P^2\text{-}C\text{-}P^2\text{-}D$表示;A'、C、D、$P^1$和$P^2$如式I中所定义;并且m是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,m为4。在一些实施方案中,有义链与反义链互补(例如,完全或部分互补)。

[0377] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S1表示的结构,其中式S1按5'至3'方向是:

[0378] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-A

[0379] 式S1;

[0380] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0381] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S2表示的结构,其中式S2按5'至3'方向是:

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

[0383] 式S2;

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

[0385] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S3表示的结构,其中式S3按5'至3'方向是:

[0386] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-B

[0387] 式S3;

[0388] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0389] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S4表示的结构,其中式S4按5'至3'方向是:

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

[0391] 式S4;

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

[0393] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式IV表示的区域的反义链,其中式IV按5'至3'方向是:

[0394] $A-(A')_j-C-P^2-B-(C-P^1)_k-C'$

[0395] 式IV;

[0396] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;B由式$D-P^1-C-P^1-D-P^1$表示;每个C是2'-O-Me核糖核苷;每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;每个D是2'-F核糖核苷;每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;j是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);并且k是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,j为6。在一些实施方案中,k为4。在一些实施方案中,j为6且k为4。反义链与靶核酸互补(例如,完全或部分互补)。

[0397] 在本公开的一些实施方案中,反义链包括式A3表示的结构,其中式A3按5'至3'方向是:

[0398] A-S-B-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-B-S-A-S-A-S-A

[0399] 式A3;

[0400] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0401] 在本公开的一些实施方案中,本公开的siRNA可以具有式V表示的有义链,其中式V按5'至3'方向是:

[0402] $E-(A')_m-C-P^2-F$

[0403] 式V;

[0404] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;F由式$D-P^1-C-P^1-C$、$D-P^2-C-P^2-C$、$D-P^1-C-P^1-D$或$D-P^2-C-P^2-D$表示;A'、C、D、P^1和P^2如式IV中所定义;并且m是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,m为5。在一些实施方案中,有义链与反义链互补(例如,完全或部分互补)。

[0405] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S5表示的结构,其中式S5按5'至3'方向是:

[0406] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A

[0407] 式S5;

[0408] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0409] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S6表示的结构,其中式S6按5'至3'方向是:

[0410] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A

[0411] 式S6;

[0412] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S7表示的结构,其中式S7按5'至3'方向是:

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

[0414] 式S7;

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

[0416] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S8表示的结构,其中式S8按5'至3'方向是:

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

[0418] 式S8;

[0419] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0420] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式VI表示的区域的反义链,其中式VI按5'至3'方向是:

[0421] $A\text{-}B_j\text{-}E\text{-}B_k\text{-}E\text{-}F\text{-}G_l\text{-}D\text{-}P^1\text{-}C'$

[0422] 式VI;

[0423] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;每个B由式$C\text{-}P^2$表示;每个C是2'-O-Me核糖核苷;每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;每个D是2'-F核糖核苷;每个E由式$D\text{-}P^2\text{-}C\text{-}P^2$表示;F由式$D\text{-}P^1\text{-}C\text{-}P^1$表示;每个G由式$C\text{-}P^1$表示;每个$P^1$是硫代磷酸酯核苷间键联;每个$P^2$是磷酸二酯核苷间键联;j是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);k是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7);并且l是1至7的整数(例如,1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,j是3。在一些实施方案中,k是6。在一些实施方案中,l是2。在一些实施方案中,j为3,k为6且l为2。反义链与靶核酸互补(例如,完全或部分互补)。

[0424] 在本公开的一些实施方案中,反义链包括式A4表示的结构,其中式A4按5'至3'方向是:

[0425] A-S-B-S-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[0426] 式A4;

[0427] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0428] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式VII表示的区域的有义链,其

中式VII按5'至3'方向是:

[0429] $H\text{-}B_m\text{-}I_n\text{-}A'\text{-}B_o\text{-}H\text{-}C$

[0430] 式VII;

[0431] 其中A'由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;每个H由式$(C\text{-}P^1)_2$表示;每个I由式$(D\text{-}P^2)$表示;B、C、D、$P^1$和$P^2$如式VI中所定义;m是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);n是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7);并且o是1至7的整数(例如1、2、3、4、5、6或7)。在一些实施方案中,m为3。在一些实施方案中,n为3。在一些实施方案中,o为3。在一些实施方案中,m为3,n为3,且o为3。在一些实施方案中,有义链与反义链互补(例如,完全或部分互补)。

[0432] 在本公开的一些实施方案中,有义链包括式S9表示的结构,其中式S9按5'至3'方向是:

[0433] A-S-A-S-A-O-A-O-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-S-A-S-A

[0434] 式S9;

[0435] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0436] 在本公开的一些实施方案中,siRNA可以含有包括式VIII表示的区域的反义链:

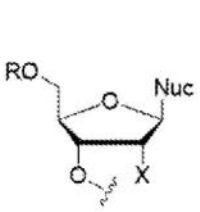
[0437] $Z\text{-}((A\text{-}P\text{-})_n(B\text{-}P\text{-})_m)_q$;

[0438] 式VIII

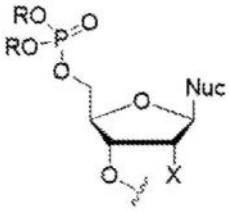
[0439] 其中Z是5'磷稳定部分;每个A是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;每个B是2'-氟-核糖核苷;每个P独立地是选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联的核苷间键联;n是1至5的整数(例如1、2、3、4或5);m是1至5的整数(例如1、2、3、4或5);并且q是介于1和30之间的整数(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30)。

[0440] 5′磷稳定部分

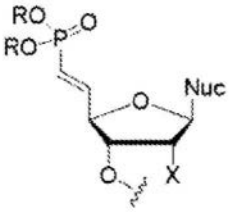
[0441] 为了进一步保护本公开的治疗性寡核苷酸免于降解,可以采用5'-磷稳定部分。5'-磷稳定部分置换5'-磷酸盐以防止磷酸盐水解。5'-磷酸盐的水解防止与RISC的结合,这是基因沉默的必要步骤。本公开中考虑了任何不妨碍与RISC结合的磷酸盐置换。在一些实施方案中,5'-磷酸的置换对于体内水解也是稳定的。每条干扰RNA链可以独立地并且任选地采用任何合适的5'-磷稳定部分。



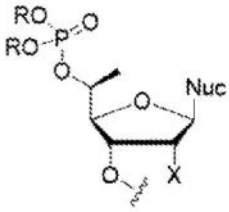
式 IX



式 X

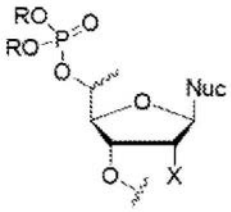


式 XI

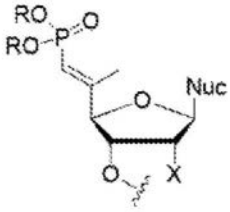


式 XII

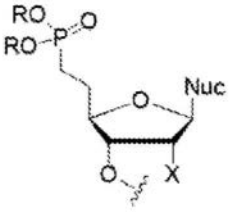
[0442]



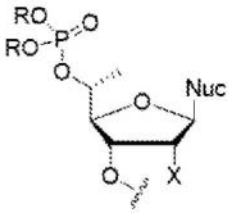
式 XIII



式 XIV



式 XV



式 XVI

[0443] 一些示例性端帽在式IX-XVI中展示。式IX-XVI中的Nuc表示如本文所述的核碱基或核碱基衍生物或置换。式IX-XVI中的X表示如本文所述的2'-修饰。一些实施方案采用如式XIV中的羟基、如式XV中的磷酸酯、如式XVI和式XIX中的乙烯基膦酸酯、如式XVII、式XIX和式XXI中的5'-甲基取代的磷酸酯或如式XX中的亚甲基膦酸酯。5′-乙烯基膦酸乙烯酯作为5'-磷稳定部分,如式XVI所示。

[0444] 疏水部分

[0445] 本公开还提供了具有一个或多个与其附接的疏水部分的治疗性寡核苷酸。疏水部分可以共价附接至本公开的治疗性寡核苷酸的5'末端或3'末端。适合与本公开的治疗性寡核苷酸一起使用的疏水部分的非限制性实例可包括胆固醇、维生素D、生育酚、磷脂酰胆碱(PC)、二十二碳六烯酸、二十二烷酸、PC-二十二烷酸、二十碳五烯酸、石胆酸或上述疏水部分与PC的任何组合。

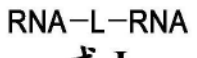
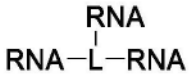
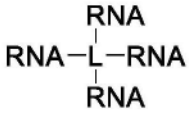
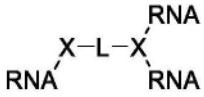
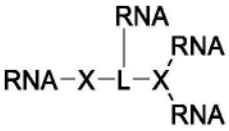
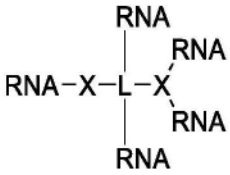
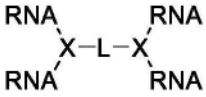
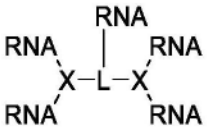
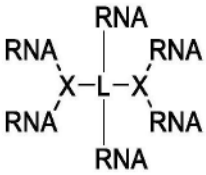
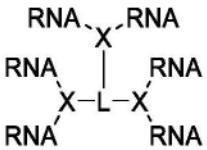
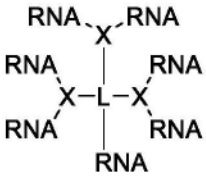
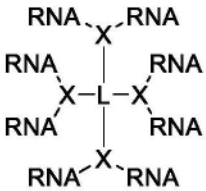
[0446] 干扰RNA分支

[0447] 本公开的治疗性寡核苷酸可以是分支的。例如,本公开的siRNA分子可以具有几种分支模式之一,如本文所述。

[0448] 根据本公开,本文公开的siRNA分子可以是分支siRNA分子。siRNA分子可以不是分支的,或者可以是二分支的、三分支的或四分支的,通过接头连接。每个主分支可以进一步分支以允许2、3、4、5、6、7或8条单独的RNA单链或双链。接头上的分支点可以源自同一原子,或沿着接头的单独原子。表1中列出了一些示例性实施方案。

[0449] 表1:分支siRNA结构

[0450]

二分支	三分支	四分支
 式 I	 式 IV	 式 VIII
 式 II	 式 V	 式 IX
 式 III	 式 VI	 式 X
	 式 VII	 式 XI
		 式 XII

[0451] 在一些实施方案中,siRNA分子是二分支的。在一些实施方案中,所述分支siRNA分子是二分支、三分支或四分支的。在一些实施方案中,二分支siRNA分子由式I-III中的任一个表示,其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分(例如,亚磷酰胺、甲苯磺酰化丙酮缩甘油、1,3-二氨基丙醇、季戊四醇、或US10,478,503中描述的分支点部分中的任一种)。

[0452] 在一些实施方案中,三分支siRNA分子由式IV-VII中的任一个表示,其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0453] 在一些实施方案中,四分支siRNA分子由式VIII-XII中的任一个表示,其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0454] 接头

[0455] 本文所述的siRNA的多条链可以通过接头共价附接。这种分支的作用尤其改善细胞渗透性,从而允许更好地进入CNS中的细胞(例如,神经元或小胶质细胞)。可以采用与本发明的siRNA不相容的任何连接部分。接头包括2至10个亚基(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个亚基)的乙二醇链、烷基链、碳水化合物链、嵌段共聚物、肽、RNA、DNA等。在一些实施方案中,

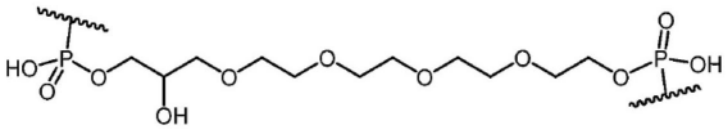
接头的任何碳或氧原子任选地被氮原子置换,带有羟基取代基,或带有氧代取代基。在一些实施方案中,接头是聚乙二醇(PEG)接头。适合与所公开的组合物和方法一起使用的PEG接头包括线性或非线性PEG接头。非线性PEG接头的实例包括分支PEG、线性叉状PEG或分支叉状PEG。

[0456] 各种重量的PEG接头可以与所公开的组合物和方法一起使用。例如,PEG接头可以具有介于5至500道尔顿之间的重量。在一些实施方案中,可以使用重量介于500至1,000道尔顿之间的PEG接头。在一些实施方案中,可以使用重量介于1,000至10,000道尔顿之间的PEG接头。在一些实施方案中,可以使用重量介于200至20,000道尔顿之间的PEG接头。在一些实施方案中,接头共价附接至siRNA的有义链。在一些实施方案中,接头共价附接至siRNA的反义链。在一些实施方案中,PEG接头是三乙二醇(TrEG)接头。在一些实施方案中,PEG接头是四乙烯接头(TEG)。

[0457] 在一些实施方案中,接头是烷基链接头。在一些实施方案中,接头是肽接头。在一些实施方案中,接头是RNA接头。在一些实施方案中,接头是DNA接头。

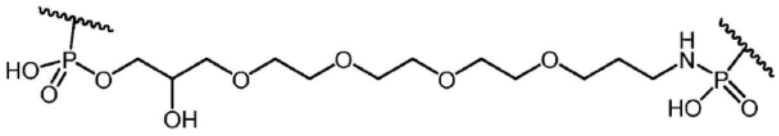
[0458] 接头可以共价连接2、3、4或5条独特的siRNA链。接头可以共价结合至siRNA寡聚体的任何部分。在一些实施方案中,接头附接至每条siRNA链的核苷的3'末端。在一些实施方案中,接头附接至每条siRNA链的核苷的5'末端。在一些实施方案中,接头通过共价键形成部分附接至siRNA链(例如有义链或反义链)的核苷。在一些实施方案中,共价键形成部分选自烷基、酯、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯、三唑、脲、甲缩醛、膦酸酯、磷酸酯和磷酸酯衍生物(例如,硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等)。

[0459] 在一些实施方案中,所述接头具有式L1的结构:

[0460] 

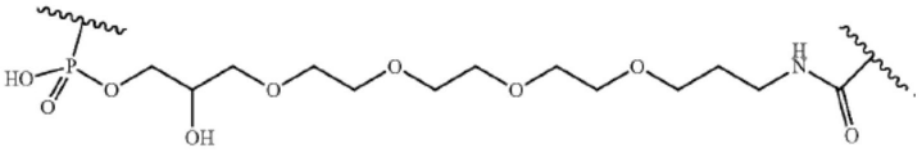
(式 L1)

[0461] 在一些实施方案中,所述接头具有式L2的结构:

[0462] 

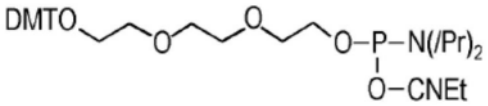
(式 L2)

[0463] 在一些实施方案中,所述接头具有式L3的结构:

[0464] 

(式 L3)

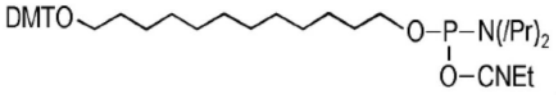
[0465] 在一些实施方案中,所述接头具有式L4的结构:



[0466]

(式 L4)

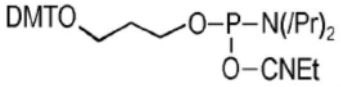
[0467] 在一些实施方案中,所述接头具有式L5的结构:



[0468]

(式 L5)

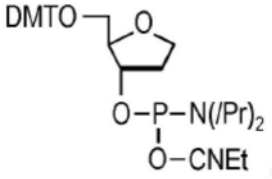
[0469] 在一些实施方案中,所述接头具有式L6的结构:



[0470]

(式 L6)

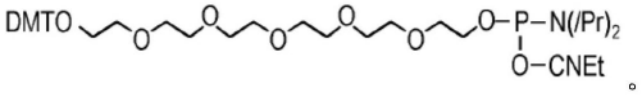
[0471] 在一些实施方案中,接头具有式L7的结构,如下所示:



[0472]

(式 L7)

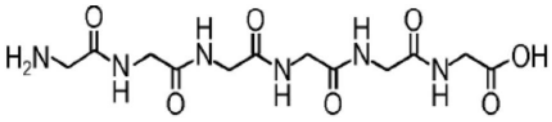
[0473] 在一些实施方案中,所述接头具有式L8的结构:



[0474]

(式 L8)

[0475] 在一些实施方案中,所述接头具有式L9的结构:



[0476]

(式 L9)

[0477] 在一些实施方案中,与本文公开的一种或多种分支siRNA分子一起使用的接头的选择可以基于接头的疏水性,使得例如,对于本公开的一种或多种分支siRNA分子实现期望

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

[0478] 本文公开的siRNA试剂可以通过本领域充分确立的方法合成和/或修饰,诸如Beaucage,S.L.等人(编辑),Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,John Wiley&Sons,Inc.,New York,N.Y.,2000中描述的那些方法,其特此通过引用并入本文。

[0479] 治疗方法

[0480] 本公开提供了治疗需要基因沉默的受试者的方法。除其它原因外,可以进行基因沉默是为了使有缺陷的或过度活跃的基因沉默,使具有降低的表达的基因的负调控因子沉默,使在增加疾病驱动基因的活性的途径中具有激活作用的野生型基因沉默,使选择性敲低时可以升高基因的总表达的基因的剪接同种型沉默,只要目标是将遗传和生物化学途径活性从疾病状态恢复到健康状态。该方法可以包括通过任何适当的施用途径(例如,纹状体内、脑室内、鞘内注射或通过导管插入在小脑延髓池内注射)将本公开的治疗性寡核苷酸或包含其的药物组合物递送至受试者(例如,人)的CNS。活性化合物可以以任何合适的剂量施用。施用给患者的本公开组合物的实际剂量可以通过物理和生理因素确定,诸如体重、病状的严重程度、先前或同时的治疗干预、患者的特发症以及施用途径。根据剂量和施用途径,优选剂量和/或有效量的施用次数可根据受试者的反应而变化。在任何情形下,负责施用的从业者将确定组合物中活性成分的浓度以及个体受试者的适当剂量。施用可以每天进行任何合适的次数,并且持续时间只要有必要。受试者可以是患有或未患共存疾病的成人或儿童。

[0481] 适应症

[0482] 需要基因沉默的受试者可能需要沉默CNS(例如,小胶质细胞)中发现的基因。该基因可能与特定的疾病或病症相关。例如,该基因可能与亨廷顿病、帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、路易体痴呆(DLB)、单纯性自主神经衰竭、路易体吞咽困难、偶发性路易体病(ILBD)、遗传性路易体病、橄榄体脑桥小脑萎缩(OPCA)、纹状体黑质变性、Shy-Drager综合征、癫痫或癫痫病症、朊病毒病、或疼痛或疼痛病症。

[0483] 靶基因

[0484] 除其它原因外,可以进行本文所述的基因沉默的方法是为了使有缺陷的或过度活跃的基因沉默,使具有降低的表达的基因的负调控因子沉默,使在增加疾病驱动基因的活性的途径中具有激活作用的野生型基因沉默,使选择性敲低时可以升高基因的总表达的基因的剪接同种型沉默,只要目标是将遗传和生物化学途径活性从疾病状态恢复到健康状态。

[0485] 所述疾病或病症可能与以下任何基因相关:ABCA7、ABI3、ADAM10、APOC1、APOE、AXL、BIN1、C1QA、C3、C9ORF72、CASS4、CCL5、CD2AP、CD33、CD68、CLPTM1、CLU、CR1、CSF1、CST7、CTSB、CTSD、CTSL、CXCL10、CXCL13、DSG2、ECHDC3、EPHA1、FABP5、FERMT2、FTH1、GNAS、GRN、HBEGF、HLA-DRB1、HLA-DRB5、HTT、IFIT1、IFIT3、IFITM3、IFNAR1、IFNAR2、IGF1、IL10RA、IL1A、IL1B、IL1RAP、INPP5D、ITGAM、ITGAX、KCNT1、LILRB4、LPL、MAPT、MEF2C、MMP12、MS4A4A、MS4A6A、MSH3、NLRP3、NME8、NOS2、PICALM、PILRA、PLCG2、PRNP、PTK2B、SCIMP、SCN9A、SLC24A4、SNCA、SORL1、SPI1、SPP1、SPPL2A、TBK1、TNF、TREM2、TREML2、TYROBP和ZCWPW1。在一些实施方案中,所述疾病或病症与以下任何基因相关:APOE、BIN1、C1QA、C3、C9ORF72、CCL5、

CD33、CLU/APOJ、CR1、CXCL10、CXCL13、IFIT1、IFIT3、IFITM3、IFNAR1、IFNAR2、IL10RA、IL1A、IL1B、IL1RAP、INPP5D、ITGAM、MEF2C、MMP12、NLRP3、NOS2、PILRA、PLCG2、PTK2B、SLC24A4、TBK1和TNF。在一些实施方案中,所述疾病或病症与以下任何基因相关:HTT、MAPT、SNCA、C9ORF72、APOE、SCN9A、KCNT1、PRNP和MSH3。在一些实施方案中,所述疾病或病症与HTT基因相关。在一些实施方案中,所述疾病或病症与MAPT基因相关。在一些实施方案中,所述疾病或病症与SNCA基因相关。在一些实施方案中,所述疾病或病症与C9ORF72基因相关。在一些实施方案中,所述疾病或病症与APOE基因相关。在一些实施方案中,所述疾病或病症与SCN9A基因相关。在一些实施方案中,所述疾病或病症与KCNT1基因相关。在一些实施方案中,所述疾病或病症与PRNP基因相关。在一些实施方案中,所述疾病或病症与MSH3基因相关。

[0486] 渗透压摩尔浓度

[0487] 施用本公开的治疗性寡核苷酸可影响受试者的渗透压摩尔浓度(例如,脑脊液(CSF)的渗透压摩尔浓度)。用本公开的治疗性寡核苷酸治疗的受试者的CSF渗透压摩尔浓度可为例如250至450mOsmol/kg。在一些实施方案中,CSF渗透压摩尔浓度为250至350mOsmol/kg。受试者的CSF渗透压摩尔浓度可受二价阳离子的浓度影响。监督受试者治疗的人可能能够监测受试者的CSF渗透压摩尔浓度并相应地调整剂量。例如,在表现出高于正常的渗透压摩尔浓度的受试者中可以降低剂量。

[0488] 可替代地,可以改变含有治疗性寡核苷酸的组合物中的钠离子浓度。例如,在治疗性寡核苷酸的液体制剂中,可以调节钠的浓度以增加或降低所得渗透压摩尔浓度,而不会对二价阳离子的毒性益处产生负面影响。降低制剂中的钠水平可以允许在接受本公开的治疗性寡核苷酸治疗的受试者中维持正常的生理渗透压摩尔浓度水平。

[0489] 药物组合物

[0490] 本公开中的治疗性寡核苷酸可以配制成药物组合物,以适合体内施用的生物相容形式施用于受试者。因此,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含与合适的稀释剂、载体或赋形剂混合的本公开的治疗性寡核苷酸。治疗性寡核苷酸可以例如直接施用到受试者的CNS中(例如,通过纹状体内、脑室内、鞘内注射的方式或通过导管插入在小脑延髓池内注射)。

[0491] 用于选择和制备合适制剂的常规程序和成分例如在Remington,J.P.The Science and Practice of Pharmacy,Easton,PA.Mack Publ ishers,2012,第22版和The United States Pharmacopeial Conventio n,The National Formulary,United States Pharmacopeial,2015,US P 38NF 33)中有描述。

[0492] 在普通储存和使用条件下,药物组合物可含有防腐剂,例如以防止微生物生长。药物组合物可包含无菌水性溶液、分散液,或例如用于临时制备无菌溶液或分散液的粉末。在所有情况下,所述形式可使用本领域已知的技术灭菌,并且可流化至可容易地施用给需要治疗的受试者的程度。

[0493] 药物组合物可单独或与如本文所述的药学上可接受的载体组合施用给受试者,例如,人类受试者,其比例可通过化合物的溶解度和/或化学性质、所选的施用途径以及标准药物实践来确定。

[0494] 给药方案

[0495] 本领域普通技术的医师可以容易地确定向有需要的哺乳动物受试者(例如,人)施用的治疗性寡核苷酸(例如,siRNA、shRNA、miRNA、gRNA或ASO)的有效量。例如,医师可以以低于获得期望治疗效果所需要的水平开始本公开治疗性寡核苷酸之一的处方剂量,并逐渐增加剂量直至实现期望效果。可替代地,医师可以通过施用高剂量的本公开治疗性寡核苷酸之一来开始治疗方案,并且随后逐渐施用较低的剂量,直到实现治疗效果(例如,靶基因序列的表达减少)。一般而言,本公开治疗性寡核苷酸之一的合适日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的治疗性寡核苷酸(例如,siRNA)的量。本公开的ss-或ds-治疗性寡核苷酸可以通过注射施用,例如经鞘内、脑室内、纹状体内或通过导管插入在小脑延髓池内注射施用(例如,注射到尾状核或壳核中)。本公开的治疗性寡核苷酸的治疗组合物的日剂量可以作为单剂量施用,或者作为在一天、一周、一个月或一年中以适当的间隔单独施用的两个、三个、四个、五个、六个或更多个剂量来施用,任选地,以单位剂型施用。虽然本公开的治疗性寡核苷酸可以单独施用,但它也可以作为与赋形剂、载体和任选地另外的治疗剂组合的药物制剂施用。

[0496] 施用途径

[0497] 本公开的方法考虑了治疗组合物耐受的任何施用途径。所述方法的一些实施方案包括经鞘内、脑室内、纹状体内、实质内注射或通过导管插入在小脑延髓池内注射。

[0498] 鞘内注射是直接注射到脊柱或蛛网膜下腔。通过直接注射到脊柱的CSF中,本公开的治疗性寡核苷酸可以直接进入脊柱中的细胞(例如,神经元和小胶质细胞),并且具有可以绕过血脑屏障进入脑部中的细胞的途径。

[0499] 脑室内(ICV)注射是直接注射到脑室CSF中的方法。与鞘内注射类似,ICV是一种绕过血脑屏障的注射方法。使用ICV的优点是可以进入脑部和脊柱的细胞,而不存在治疗剂在血液中降解的危险。

[0500] 纹状体内注射是直接注射到纹状体(striatum)或纹状体(corpus striatum)中。纹状体是脑部皮层下基底神经节的一个区域。注射到纹状体中绕过了血脑屏障和注射到血流中的药代动力学挑战,并且允许直接进入脑部细胞。

[0501] 实质内施用是直接注射到实质(例如脑实质)中。注射到脑实质中允许直接注射到受疾病或病症影响的脑部区域,同时绕过血脑屏障。

[0502] 通过导管插入在小脑延髓池内注射是直接注射到小脑延髓池中。小脑延髓池是位于小脑和延髓背侧表面之间的脑部区域。注射到小脑延髓池中引起更直接地输送到小脑、脑干和脊髓的细胞。

[0503] 在本文所述的方法的一些实施方案中,治疗组合物可以通过全身施用的方式(例如静脉内、肌内或皮下)递送至受试者。

[0504] 静脉(IV)注射是一种直接注射到受试者血液中的方法。IV施用可以是推注剂量的形式或通过连续输注的方式,或治疗组合物耐受的任何其它方法。

[0505] 肌内(IM)注射是注射到受试者的肌肉,诸如三角肌或臀肌中。IM可以允许治疗组合物的快速吸收。

[0506] 皮下注射是注射到皮下组织中。皮下递送的组合物的吸收可能比IV或IM注射慢,这对于需要连续吸收的组合物可能是有益的。

[0507] 实施例

[0508] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供可以如何使用、制备和评价本文所述的组合物和方法的描述，并且这些实施例仅旨在作为本公开的示例而不旨在限制发明人认为是他们的公开的范围。

[0509] 如在下面的实施例和本公开全篇其他地方所用，术语“DIO”和“di-siRNA”是指二分支siRNA分子，如该术语在本文中所定义的。如下面的实施例中所用，“基因A”、“基因B”、“基因C”和“基因D”全部是指不同的基因靶标。

[0510] 实施例1.减轻干扰RNA递送至中枢神经系统的毒性作用。

[0511] 简介

[0512] 在许多物种中，双链RNA的引入会诱导通过RNA干扰(RNAi)的方式有效且特异性的基因沉默。这种现象在植物和动物中都有发生，并且在病毒防御和转座子沉默机制中具有作用。例如，通常比靶基因短得多的短干扰RNA(siRNA)，已被证明在基因沉默方面有效，因此可用作使基因沉默的治疗剂，以使遗传和生物化学途径的活性从疾病状态恢复到正常的健康状态。然而，将治疗性寡核苷酸，诸如短干扰RNA(siRNA)递送至受试者，特别是递送至受试者的中枢神经系统，会带来毒副作用的风险，其中包括癫痫、震颤和过度活跃的运动行为等。仍然需要在施用于有需要的受试者时实现降低的毒性的治疗性寡核苷酸。

[0513] 方法

[0514] 双链体siRNA在以下四种离子条件之一的存在下杂交：A)$Mg2^{+}$；B)$Ca2^{+}$；C)$Mg2^{+}$和$Ca2^{+}$；或D)仅PBS(对照)。然后通过脑室内(ICV)注射将每种离子条件的siRNA以两种不同的剂量10nmol-DIO或20nmol-DIO，以10μl最终体积注射到8-10只FVB/NJ，F小鼠中(图1A)。注射以0.5μl/min的流量进行。还包括用于ICV注射的对照(仅PBS-无siRNA)。接下来24-48小时监测所有动物中的急性毒性(包括，癫痫、死亡)。急性CNS毒性的严重程度通过使用EvADINT评分测定来定量(表2)。评分越高，认为实验条件的毒性越大。

[0515] 表2:EvADINT评分测定

[0516]

行为要素	Atalanta_EvADINT 评分测定			
死亡	75			如果在前2小时内没有观察到主要/严重的急性毒性作用，则此时可以停止对恢复行为的监测。否则，监测动物的下述行为
严重程度	轻度	中度	重度	
癫痫/震颤	10	15	20	
过度活跃或其他运动行为	5	10	15	
恢复所需时间(h)	0.5h	1h	2h	24h/无恢复
胸骨姿势	0	5	10	20
无刺激运动 无共济失调的运动	0	5	10	15

[0517] 结果

[0518] ICV注射在$Mg2^{+}$的存在下(条件A)杂交的siRNA在注射10或20nmol-DIO的小鼠中未显示出急性毒性，各自产生100％存活率(图1B和表3)。ICV注射在$Ca2^{+}$的存在下(条件B)杂交的siRNA在注射10和20nmol-DIO的小鼠中显示出一定水平的毒性，分别产生90％和100％

存活率(图1B和表3)。ICV注射在$Mg2^{+}$和$Ca2^{+}$两者的存在下(条件C)杂交的siRNA在注射10和20nmol-DIO的小鼠中未显示出急性毒性,各自产生100%存活率(图1B和表3)。ICV注射在没有任何二价阳离子存在下(条件D)杂交的siRNA或仅PBS(无siRNA)显示出更明显水平的急性毒性,各自产生30%存活率(图1B和表3)。

[0519] 表3:ICV注射后siRNA离子调节的结果

[0520]

离子调节分组	注射体积(μl)	剂量(nmol-DIO)	动物总数	死亡数	存活率
PBS	5	10	10	7	30%
A: 含 $Mg2^{+}$ 的 di-siRNA	10	10	10	0	100%
B: 含 $Ca2^{+}$ 的 di-siRNA	10	10	10	1	90%
C: 含 $Mg2^{+}$ 和 $Ca2^{+}$ 的 di-siRNA	10	10	10	0	100%
D: 在 PBS 中的 di-siRNA	10	10	10	7	30%
A: 含 $Mg2^{+}$ 的 di-siRNA	10	20	8	0	100%
B: 含 $Ca2^{+}$ 的 di-siRNA	10	20	8	0	100%
C: 含 $Mg2^{+}$ 和 $Ca2^{+}$ 的 di-siRNA	10	20	8	0	100%

[0521]

[0522] 结论

[0523] 将治疗性寡核苷酸递送至CNS当前受到急性且致命的毒性作用挑战;然而,递送含二价阳离子的治疗性寡核苷酸降低CNS毒性。

[0524] 实施例2.治疗性寡核苷酸的离子调节不损害活性

[0525] 基因沉默

[0526] 评价实施例1中描述的siRNA分子相对于对照使感兴趣的基因(基因A)沉默的能力。用10nmol剂量的di-siRNA处理小鼠并且在3周后评价靶基因的敲低。图2A证明在Mg^{2+}、Ca^{2+}或Mg^{2+}和Ca^{2+}两者的存在下杂交的di-siRNA分子与在无二价阳离子的PBS中的di-siRNA分子相比时实现靶基因的沉默。

[0527] 在进一步的实例中,用不同剂量(0.1nmol、0.5nmol和2.5nmol)的di-siRNA分子处理小鼠,并在2周后评估它们相对于对照使基因A沉默的能力。在四种条件下(未处理的对

照、含PBS的di-siRNA、含Mg^{2+}的di-siRNA和含Ca^{2+}的di-siRNA)测试了四个脑部区域(额叶皮质、运动皮质、纹状体和海马)中的每个脑部区域中靶基因的表达。在所有用di-siRNA处理的三个组中,在所有分析的脑部区域中都观察到剂量依赖性基因沉默。在所有三个调节组(含单独的PBS、含Mg^{2+}或含Ca^{2+}的di-siRNA)中,在每个剂量水平都观察到类似的沉默,表明离子调节对活性没有影响。图2B示出了该实验的结果。

[0528] 组织分布

[0529] 评价实施例1中描述的siRNA分子相对于对照在脑部某些区域中的分布。用10nmol剂量的di-siRNA处理小鼠并且在3周后通过PNA杂交测定法评价siRNA定量。图2C证明在Mg^{2+}、Ca^{2+}或Mg^{2+}和Ca^{2+}两者的存在下杂交的di-siRNA分子与在无二价阳离子的PBS中的di-siRNA分子相比时被有效吸收到额叶皮质、运动皮质、纹状体和海马中。

[0530] 实施例3.di-siRNA分子在二价阳离子的存在下杂交具有促存活作用。

[0531] 研究将二价阳离子引入di-siRNA分子的方法。测试了两种条件:

[0532] i)通过在100mM NaCl的存在下加热4分钟至95℃,接着在室温下在50mM Mg^{2+}或50mM Ca^{2+}的存在下孵育15分钟来杂交siRNA分子

[0533] ii)通过在100mM NaCl及a)50mM Mg^{2+}或b)50mM Ca^{2+}的存在下加热4分钟至95℃来杂交siRNA分子

[0534] 靶向基因A的di-siRNA在这些条件下制备,施用于小鼠,并评价其毒性。这些实验的结果汇总于下表4。总的来说,这些结果表明上述第ii)项(在二价阳离子的存在下加热和杂交)的促存活作用。

[0535] 表4:ICV注射后siRNA离子调节的结果

[0536]

离子调节分组	添加二价阳离子的时间	剂量(nmol-DIO)	动物总数	死亡数	存活率
A: 含 $Mg2^{+}$ 的 di-siRNA	杂交后	20	4	4	0%
B: 含 $Mg2^{+}$ 的 di-siRNA	杂交前	20	8	6	25%
C: 含 $Ca2^{+}$ 的 di-siRNA	杂交后	20	4	4	0%
D: 含 $Ca2^{+}$ 的 di-siRNA	杂交前	20	4	3	25%

[0537] 实施例4.离子调节的促存活作用与离子浓度相关

[0538] 洗涤方案的影响

[0539] 靶向基因A的本公开的di-siRNA分子在50mM Mg^{2+}的存在下杂交。将di-siRNA分子分成三个组,每个组接受不同的洗涤方案:

[0540] 1)在3kDa amicon、2x 4mL水、1x 4mL PBS中洗涤

[0541] 2)在10kDa amicon、2x 4mL水、1x 4mL PBS中洗涤

[0542] 3)在10kDa amicon、4x 14mL水、1x 14mL PBS中洗涤

[0543] 计算每种样品中的Mg浓度,并且按照实施例1中描述的方案向小鼠注射每种样品。接受最剧烈的洗涤方案的样品含有最低浓度的Mg^{2+},因此对动物的毒性最大。表5汇总了该实验的结果。总的来说,这些数据表明Mg^{2+}的存在对于毒性益处至关重要,并且与离子浓度相关。

[0544] 表5:洗涤方案实验的结果

[0545]

洗涤条件	Mg^{2+}浓度	注射动物数量	死亡数	存活率
1	48 mM	4	0	100%

[0546]

洗涤条件	Mg^{2+}浓度	注射动物数量	死亡数	存活率
2	41 mM	4	0	100%
3	10 mM	4	3	25%

[0547] 测定有效的Mg^{2+}浓度

[0548] 检查本公开的靶向基因A的di-siRNA分子以测定离子的有效浓度的窗口。向小鼠注射20nmol剂量的di-siRNA分子,并改变Mg的量。对于每种离子浓度,还检查了杂交方案(在杂交后添加离子或在离子存在下杂交,如实施例3中所述)的影响。还包括用在不含任何siRNA的PBS中的不同浓度的Mg处理的小鼠对照组。使用表6中描述的EvADINT评分方案对条件进行评价。评分越高,认为实验条件的毒性越大。

[0549] 表6:EvADINT评分测定

[0550]

行为要素	EvADINT 评分测定			
死亡	75			如果在前 2 小时内没有观察到主要/严重的急性毒性作用，则此时可以停止对恢复行为的监测。否则，监测动物的下述行为
严重程度	轻度	中度	重度	
癫痫发作	20	35	50	
嗜睡、极度活跃或其它行为	5	10	15	
恢复所需时间(h)	<10m	>20m	>1h	24h/无恢复
胸骨姿势	0	5	10	20

[0551] 这些实验的结果示于图3A。这些结果表明,可以限定临界区域,Mg^{2+}的理想浓度为约40至约70mM。

[0552] 测定有效的Ca^{2+}浓度

[0553] 检查本公开的靶向基因A的di-siRNA分子以测定离子的有效浓度的窗口。向小鼠注射20nmol剂量的di-siRNA分子,并改变Ca^{2+}的量。使用表6中描述的EvADINT评分方案对条

件进行评价。评分越高,认为实验条件的毒性越大。结果示于图3B中,Ca^{2+}有效浓度的窗口落在25-100mM之间。

[0554] 测定Ca^{2+}和Mg^{2+}混合物的有效浓度

[0555] 检查本公开的靶向基因A的di-siRNA分子以测定离子的有效浓度的窗口。向小鼠注射20nmol剂量的di-siRNA分子,并改变1:1Ca^{2+}/Mg^{2+}混合物的量。使用表6中描述的EvADINT评分方案对条件进行评价。评分越高,认为实验条件的毒性越大。结果示于图3C中,Ca^{2+}有效浓度的窗口落在25-100mM之间。

[0556] 改变寡核苷酸的浓度和渗透压摩尔浓度

[0557] 使用表6中的EvADINT-A评分系统,在改变di-siRNA分子的浓度的同时重复实验。siRNA与Mg^{2+}的摩尔比保持恒定。在一项实验中,降低Na^{+}浓度以降低注射液的渗透压摩尔浓度。该实验的结果示于图3D。该实验证明,在不添加二价阳离子的情况下,在20nmol的剂量下siRNA分子不良好耐受。然而,添加Mg^{2+}时,耐受20nmol。当siRNA与Mg^{2+}的摩尔比保持恒定时,可以增加siRNA的浓度,同时仍良好耐受。此外,降低Na+浓度成功地降低渗透压摩尔浓度,且不会对毒性具有有害影响。

[0558] 实施例5.无论施用方法如何,离子调节均提高di-siRNA分子在大鼠中的耐受性

[0559] 通过单侧脑室内直接脑部注射(ICV)或鞘内注射(IT)以5uL/min的流量用靶向基因A的本公开的di-siRNA分子处理8周龄雌性Sprague-Dawley大鼠。表7汇总了用不含二价阳离子的siRNA分子处理的大鼠的结果,而表8汇总了用比率为1:25的含二价阳离子的siRNA分子处理的大鼠的结果。从表7和表8显而易见,当添加Mg^{2+}时,离子调节极大地改善了siRNA分子的耐受性,并且无论施用方法如何,都能观察到该益处。

[0560] 表7:在没有离子调节的情况下di-siRNA分子在大鼠中的耐受性

[0561]

分组	动物数	死亡数	存活数	存活率%	发作/发声	发作%
ICV 双侧，PBS	6	0	6	100.0	0.0	0.0
ICV 双侧，siRNA，60 nmol	1	0	1	100.0	1.0	100.0
ICV 双侧，siRNA，40 nmol	4	0	4	100.0	2.0	50.0
ICV 双侧，siRNA，30 nmol	4	0	4	100.0	4.0	100.0
ICV 双侧，siRNA，15 nmol	6	0	6	100.0	0.0	0.0
IT，PBS	6	0	6	100.0	0.0	0.0
IT，siRNA，60 nmol	6	2	4	66.7	5.0	83.3
IT，siRNA，40 nmol	6	1	5	83.3	3.0	50.0
IT，siRNA，30 nmol	6	0	6	100	0	0

[0562] 表8:在有离子调节的情况下di-siRNA分子在大鼠中的耐受性

[0563]

分组	动物数	死亡数	存活数	存活率%	发作/发声	发作/发声%
ICV 单侧，PBS	6	0	6	100	0	0

[0564]

分组	动物数	死亡数	存活数	存活率%	发作/发声	发作/发声%
(50 mM Mg2+)						
ICV 单侧, siRNA, 60 nmol	6	0	6	100	0	0
ICV 单侧, siRNA, 120 nmol	6	0	6	100	0	0
ICV 单侧, siRNA, 180 nmol	1	0	1	100	0	0
ICV 单侧, siRNA, 240 nmol	2	0	2	100	0	0
IT, PBS (50 mM Mg2+)	6	0	6	100	0	0
IT, siRNA, 60 nmol	6	0	6	100	0	0
IT, siRNA, 120 nmol	6	0	6	100	0	0
IT, siRNA, 180 nmol	2	0	2	100	0	0
IT, siRNA, 240 nmol	3	0	3	100	0	0

[0565] 实施例6.离子调节提高反义寡核苷酸和单-siRNA分子的耐受性

[0566] 除了上述实施例中测试的di-siRNA分子以外,还研究了添加一种或多种二价阳离子对单链反义寡核苷酸和单-siRNA的耐受性的影响。

[0567] 反义寡核苷酸

[0568] 经由单侧ICV注射以不同的Mg^{2+}浓度向小鼠施用20或40nmol靶向Malat-1的本公开的反义寡核苷酸。先前证实靶向Malat-1的反义寡核苷酸在配制成含Ca^{2+}的盐时毒性略低(Moazami等人,BioRxiv.2021)。评价每种条件表现出癫痫和/或死亡的动物数目。该测定的结果示于下表9中。从结果显而易见,当添加二价阳离子时毒性降低,特别是当施用20nmol的ASO时。

[0569] 表9:反义寡核苷酸在小鼠中的耐受性

[0570]

ASO	动物数	存活数	存活率%	发作	发作%
ASO (40 nmol), 无 Mg^{2+}	8	4	50	8	100
ASO (40 nmol), Mg^{2+} 25 mM	8	1	13	0	0
ASO (40 nmol), Mg^{2+}12.5 mM	8	0	0	3	38
ASO (20 nmol), 无 Mg^{2+}	6	2	33	6	100
ASO (20 nmol), Mg^{2+} 12.5 mM	6	6	100	2	33

[0571] 单-siRNA

[0572] 经由单侧ICV注射以不同的Mg^{2+}浓度向小鼠施用40nmol靶向基因A的本公开的单-siRNA。评价每种条件表现出癫痫和/或死亡的动物数目。该测定的结果示于下表10中。从结果显而易见,当添加二价阳离子时毒性显著降低。

[0573] 表10:单-siRNA在小鼠中的耐受性

[0574]

单-siRNA	动物数	存活数	存活率%	发作	发作%
单 siRNA (40 nmol), 无 Mg^{2+}	8	0	0	8	100
单 siRNA (40 nmol), 50 mM Mg^{2+}	8	8	100	0	0

[0575] 实施例7.无论序列或基因靶标如何,离子调节均提高寡核苷酸的耐受性

[0576] 在有和没有二价阳离子的不同条件下测试具有不同序列和靶向不同基因的三种di-siRNA分子的毒性

[0577] di-siRNA B和di-siRNA C

[0578] 经由单侧ICV注射以不同的Mg^{2+}浓度向小鼠施用20nmol两种单独的di-siRNA分子即di-siRNA B(靶向基因B)和di-siRNA C(靶向基因C)。di-siRNA A和di-siRNA B各自具有不同的核碱基序列,并且靶向彼此不同且与任何前述实施例中提及的di-siRNA分子不同的基因。评价测试的每种条件表现出癫痫和/或死亡的动物数目。该测定的结果示于下表11中。这些结果证明,无论核碱基序列或靶基因如何,向治疗性寡核苷酸中添加二价阳离子都具有毒性益处。

[0579] 表11:具有不同序列的di-siRNA分子在小鼠中的耐受性

[0580]

di-siRNA	动物数	存活数	存活率%	发作	发作%
di-siRNA B (20 nmol), 50 mM Mg^{2+}	8	8	100	8	100
di-siRNA B (20 nmol), 无 Mg^{2+}	8	0	0	8	100
di-siRNA C (20 nmol), 50 mM Mg^{2+}	8	8	100	4	50
di-siRNA C (20 nmol), 无 Mg^{2+}	8	4	50	7	87.5

[0581] di-siRNA D

[0582] 将不同剂量的本公开的di-siRNA分子即di-siRNA D(靶向基因D)在不同Mg^{2+}浓度的情况下施用于小鼠。di-siRNA D具有不同的核碱基序列并且靶向与di-siRNA B、di-siRNA C或任何前述实施例中提及的任何di-siRNA分子不同的基因。评价测试的每种条件表现出癫痫和/或死亡的动物数目。该测定的结果示于下表12中。这些结果证明,无论核碱基序列或靶基因如何,向治疗性寡核苷酸中添加二价阳离子都具有毒性益处。

[0583] 表12:di-siRNA C在小鼠中的耐受性

[0584]

	动物数	存活数	存活率%	发作	发作%
di-siRNA C (20 nmol), 无 Mg^{2+}	6	6	100	1	17
di-siRNA C (10 nmol), 无 Mg^{2+}	6	6	100	0	0
di-siRNA C 40 nmol; 100 mM Mg^{2+}	6	6	100	5	83
di-siRNA C, 30 nmol; 75 mM Mg^{2+}	6	6	100	0	0
di-siRNA C, 20 nmol; 50 mM Mg^{2+}	6	6	100	0	0

[0585] 实施例8.治疗需要基因沉默的患者的方法

[0586] 需要在中枢神经系统细胞中进行基因沉默的受试者用一定剂量的配制为盐的治疗性寡核苷酸以执业医师确定的频率治疗。例如,医师可以以低于获得期望治疗效果所需要的水平开始本公开治疗性寡核苷酸之一(例如,siRNA)的处方剂量,并逐渐增加剂量直至实现期望效果。可替代地,医师可以通过施用高剂量的本公开治疗性寡核苷酸之一来开始治疗方案,并且随后逐渐施用较低的剂量,直到实现治疗效果(例如,靶基因序列的表达减

少)。一般而言,本公开的治疗性寡核苷酸之一(例如,siRNA)的合适日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的量。本公开的ss-或ds-治疗性寡核苷酸可以通过注射施用,例如经鞘内、脑室内、纹状体内或通过导管插入在小脑延髓池内注射施用(例如,注射到尾状核或壳核中)。本公开的治疗性寡核苷酸之一的治疗组合物的日剂量可以作为单剂量施用,或者作为在一天、一周、一个月或一年中以适当的间隔单独施用的两个、三个、四个、五个、六个或更多个剂量来施用,任选地,以单位剂型施用。虽然本公开的任何治疗性寡核苷酸可以单独施用,但它也可以作为与赋形剂、载体和任选地另外的治疗剂组合的药物制剂施用。剂量和频率根据受试者的身高、体重、年龄、性别和其它病症来确定。

[0587] 治疗性寡核苷酸由执业医师根据与疾病和受试者的相容性来选择。单链或双链治疗性寡核苷酸(例如,分支siRNA)可供选择。选择的治疗性寡核苷酸具有反义链,并且可以具有有义链,有义链具有的序列和RNA修饰(例如天然和非天然核苷间键联、经修饰的糖、5'-磷稳定部分和离子键合的二价阳离子)最适合所靶向的患者和疾病。

[0588] 通过最适合患者(例如,经鞘内、脑室内、纹状体内或通过导管插入在小脑延髓池内注射)和病状的途径以患者可耐受的速率递送治疗性寡核苷酸,直至受试者达到最大耐受剂量,或直至疾病的症状得到满意改善。

[0589] 具体实施方案

[0590] 下面列出本发明的示例性实施方案。下面列举的实施方案不应被解释为限制本公开的范围,相反,下面呈现了本公开的实用性的实例。

[0591] E1.一种将治疗性寡核苷酸(例如,siRNA、ASO、miRNA、gRNA等)施用于受试者的方法,所述方法包括以包含一种或多种二价阳离子的盐的形式递送所述治疗性寡核苷酸,任选地其中所述治疗性寡核苷酸为干扰RNA分子(例如,siRNA、shRNA或miRNA)。

[0592] E2.如E1中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸包含多个部分或完全被所述一种或多种二价阳离子饱和的阳离子结合位点。

[0593] E3.如E1-E2中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约10%至约100%。

[0594] E4.如E3所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约20%至约100%。

[0595] E5.如E4所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约30%至约100%。

[0596] E6.如E5所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约40%至约100%。

[0597] E7.如E6所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约50%至约100%。

[0598] E8.如E7所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约60%至约100%。

[0599] E9.如E8所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约70%至约100%。

[0600] E10.如E9所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约80%至约100%。

[0601] E11.如E10所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约90%至约100%。

[0602] E12.如E1-E11中任一项所述的方法,其中所述阳离子结合位点位于核苷间键联内,任选地其中所述核苷间键联选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联。

[0603] E13.如E1-E12中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约30皮米至约150皮米。

[0604] E14.如E13所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约30皮米至约140皮米。

[0605] E15.如E14所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约40皮米至约130皮米。

[0606] E16.如E15所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约50皮米至约120皮米。

[0607] E17.如E16所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约60皮米至约110皮米。

[0608] E18.如E1-E12中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约60皮米至约100皮米。

[0609] E19.如E18所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约60皮米至约90皮米。

[0610] E20.如E1-E12中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}或Zn^{2+}或其组合。

[0611] E21.如E20所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ba^{2+}。

[0612] E22.如E20或E21所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Be^{2+}。

[0613] E23.如E20-E22中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ca^{2+}。

[0614] E24.如E20-E23中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Cu^{2+}。

[0615] E25.如E20-E24中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Mg^{2+}。

[0616] E26.如E20-E25中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Mn^{2+}。

[0617] E27.如E20-E26中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ni^{2+}。

[0618] E28.如E20-E27中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Zn^{2+}。

[0619] E29.如E20-E28中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ca^{2+}和Mg^{2+}。

[0620] E30.如E29所述的方法,其中Ca^{2+}和Mg^{2+}以1:1的比率存在。

[0621] E31.如E1-E30中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子包含硬路易斯酸。

[0622] E32.如E1-E31中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子置换来自所述治疗性寡核苷酸的阳离子结合位点的水。

[0623] E33.如E1-E32中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸是短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)、CRISPR向导RNA(gRNA)或RNA反义寡核苷酸(ASO)。

[0624] E34.如E1-E33中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸是短干扰RNA

(siRNA)分子。

[0625] E35.如E1-E33中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸是反义寡核苷酸(ASO)。

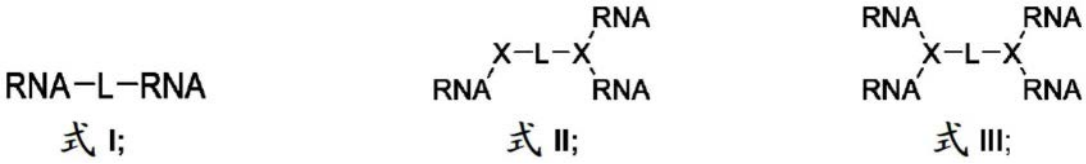
[0626] E36.如E35所述的方法,其中所述siRNA分子是分支的,任选地其中所述siRNA分子是二分支、三分支或四分支的。

[0627] E37.如E36所述的方法,其中所述siRNA分子是二分支的。

[0628] E38.如E36所述的方法,其中所述siRNA分子是三分支的。

[0629] E39.如E36所述的方法,其中所述siRNA分子是四分支的。

[0630] E40.如E36或E37所述的方法,其中所述二分支siRNA分子由式I-III中任一项表示:

[0631] 

式 I; 式 II; 式 III;

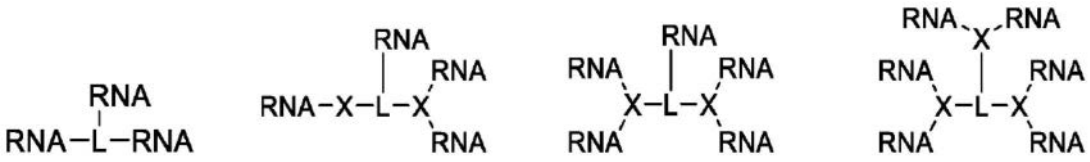
[0632] 其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0633] E41.如E40所述的方法,其中所述二分支siRNA分子由式I表示。

[0634] E42.如E40所述的方法,其中所述二分支siRNA分子由式II表示。

[0635] E43.如E40所述的方法,其中所述二分支siRNA分子由式III表示。

[0636] E44.如E36或E38所述的方法,其中所述三分支siRNA分子由式IV-VII中任一项表示:

[0637] 

式 IV; 式 V; 式 VI; 式 VII;

[0638] 其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

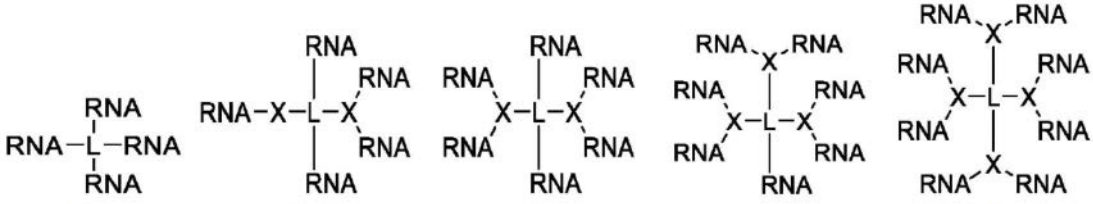
[0639] E45.如E44所述的方法,其中所述三分支siRNA分子由式IV表示。

[0640] E46.如E44所述的方法,其中所述三分支siRNA分子由式V表示。

[0641] E47.如E44所述的方法,其中所述三分支siRNA分子由式VI表示。

[0642] E48.如E44所述的方法,其中所述三分支siRNA分子由式VII表示。

[0643] E49.如E36或E39所述的方法,其中所述四分支siRNA分子由式VIII-XII中任一项表示:

[0644] 

式 VIII; 式 IX; 式 X; 式 XI; 式 XII;

[0645] 其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0646] E50.如E49所述的方法,其中所述四分支siRNA分子由式VIII表示。

[0647] E51.如E49所述的方法,其中所述四分支siRNA分子由式IX表示。

[0648] E52.如E49所述的方法,其中所述四分支siRNA分子由式X表示。

[0649] E53.如E49所述的方法,其中所述四分支siRNA分子由式XI表示。

[0650] E54.如E49所述的方法,其中所述四分支siRNA分子由式XII表示。

[0651] E55.如E40-E54中任一项所述的方法,其中所述接头选自乙二醇(例如,聚乙二醇(PEG),诸如三乙二醇(TrEG)或四乙二醇(TEG))、烷基、碳水化合物、嵌段共聚物、肽、RNA和DNA的一个或多个连续亚基。

[0652] E56.如E55所述的方法,其中所述接头是乙二醇寡聚体。

[0653] E57.如E56所述的方法,其中所述乙二醇寡聚体是PEG。

[0654] E58.如E57所述的方法,其中所述PEG是TrEG。

[0655] E59.如E57所述的方法,其中所述PEG是TEG。

[0656] E60.如E55所述的方法,其中所述接头是烷基寡聚体。

[0657] E61.如E55所述的方法,其中所述接头是碳水化合物寡聚体。

[0658] E62.如E55所述的方法,其中所述接头是嵌段共聚物。

[0659] E63.如E55所述的方法,其中所述接头是肽寡聚体。

[0660] E64.如E55所述的方法,其中所述接头是RNA寡聚体。

[0661] E65.如E55所述的方法,其中所述接头是DNA寡聚体。

[0662] E66.如E55-E65中任一项所述的方法,其中所述寡聚体或共聚物含有2至20个连续亚基。

[0663] E67.如E66所述的方法,其中所述寡聚体或共聚物含有4至18个连续亚基。

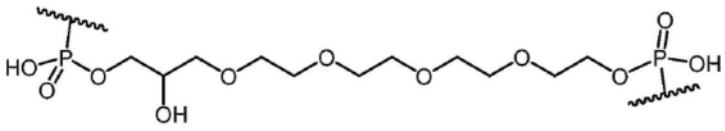
[0664] E68.如E67所述的方法,其中所述寡聚体或共聚物含有6至16个连续亚基。

[0665] E69.如E68所述的方法,其中所述寡聚体或共聚物含有8至14个连续亚基。

[0666] E70.如E69所述的方法,其中所述寡聚体或共聚物含有10至12个连续亚基。

[0667] E71.如E55所述的方法,其中所述接头通过共价键形成部分的方式附接一个或多个(例如,1个、2个或更多个)siRNA分子,任选地其中所述共价键形成部分选自烷基、酯、酰胺、氨基甲酸酯、膦酸酯、磷酸酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、三唑、脲和甲缩醛。

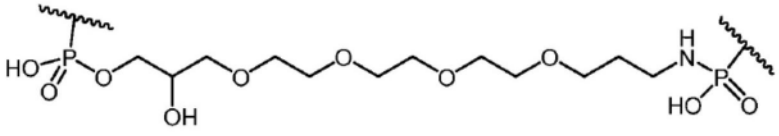
[0668] E72.如E55所述的方法,其中所述接头包括式L1的结构:

[0669] 

。

(式 L1)

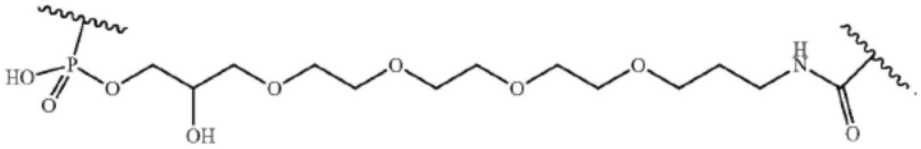
[0670] E73.如E55所述的方法,其中所述接头包括式L2的结构:

[0671] 

。

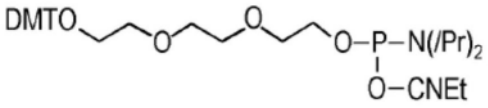
(式 L2)

[0672] E74.如E55所述的方法,其中所述接头包括式L3的结构:

[0673] 

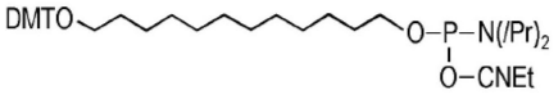
[0674] (式 L3)

[0675] E75.如E55所述的方法,其中所述接头包括式L4的结构:

[0676] 。

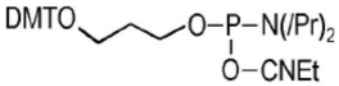
(式 L4)

[0677] E76.如E55所述的方法,其中所述接头包括式L5的结构:

[0678] 。

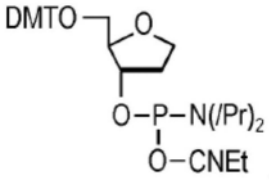
(式 L5)

[0679] E77.如E55所述的方法,其中所述接头包括式L6的结构:

[0680] 。

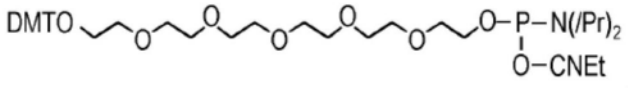
(式 L6)

[0681] E78.如E55所述的方法,其中所述接头包括式L7的结构:

[0682] 。

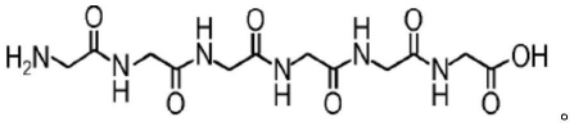
(式 L7)

[0683] E79.如E55所述的方法,其中所述接头包括式L8的结构:

[0684] 。

[0685] (式 L8)

[0686] E80.如E55所述的方法,其中所述接头包括式L9的结构:

[0687] 。

(式 L9)

[0688] E81.如E1-E80中任一项所述的方法,其中

[0689] a.所述治疗性寡核苷酸包含反义链和与所述反义链具有互补性的有义链;或者

[0690] b.所述治疗性寡核苷酸是仅包含反义链的反义寡核苷酸。

[0691] E82.如E81所述的方法,其中所述反义链和有义链包含交替的2'-O-甲基和2'-氟核糖核苷。

[0692] E83.如E81或E82所述的方法,其中所述反义链按5′至3′方向具有下式:

[0693] Z-((A-P-)$_n$(B-P-)$_m$)$_q$;

[0694] 式XIII

[0695] 其中Z是5'磷稳定部分;

[0696] 每个A独立地是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

[0697] 每个B独立地是2'-氟(2'-F)核糖核苷;

[0698] 每个P独立地是选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联的核苷间键联;

[0699] n是1至5的整数;

[0700] m是1至5的整数;并且

[0701] q是介于1和30之间的整数。

[0702] E84.如E83所述的方法,其中n为1至4。

[0703] E85.如E83所述的方法,其中n为1至3。

[0704] E86.如E83所述的方法,其中n为1至2。

[0705] E87.如E83所述的方法,其中n为1。

[0706] E88.如E83所述的方法,其中n为2。

[0707] E89.如E83所述的方法,其中n为3。

[0708] E90.如E83所述的方法,其中n为4。

[0709] E91.如E83所述的方法,其中n为5。

[0710] E92.如E83-E91中任一项所述的方法,其中m为1至4。

[0711] E93.如E92所述的方法,其中m为1至3。

[0712] E94.如E92所述的方法,其中m为1至2。

[0713] E95.如E92所述的方法,其中m为1。

[0714] E96.如E92所述的方法,其中m为2。

[0715] E97.如E92所述的方法,其中m为3。

[0716] E98.如E92所述的方法,其中m为4。

[0717] E99.如E92所述的方法,其中m为5。

[0718] E100.如E81所述的方法,其中所述反义链包含式I表示的结构,

[0719] 其中式I按5′至3′方向是:

[0720] A-B-(A')$_j$-C-P^2-D-P^1-(C'-P^1)$_k$-C'

[0721] 式I;

[0722] 其中A由式C-P^1-D-P^1表示;

[0723] 每个A'由式C-P^2-D-P^2表示;

[0724] B由式C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2表示;

[0725] 每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

[0726] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

[0727] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0728] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0729] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0730] j是1至7的整数;并且

[0731] k是1至7的整数。

[0732] E101.如E100所述的方法,其中所述反义链包含式AI表示的结构,其中式A1按5′至3′方向是:

[0733] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[0734] 式A1;

[0735] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0736] E102.如E100所述的方法,其中所述反义链包含式II表示的结构,其中式II按5′至3′方向是:

[0737] $A-B-(A')_j-C-P^2-D-P^1-(C-P^1)_k-C'$

[0738] 式II;

[0739] 其中A由式C-P^1-D-P^1表示;

[0740] 每个A'由式C-P^2-D-P^2表示;

[0741] B由式C-P^2-D-P^2-D-P^2-D-P^2表示;

[0742] 每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

[0743] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

[0744] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0745] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0746] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0747] j是1至7的整数;并且

[0748] k是1至7的整数。

[0749] E103.如E102所述的方法,其中所述反义链包含式A2表示的结构,其中式A2按5′至3′方向是:

[0750] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-A-S-A

[0751] 式A2;

[0752] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0753] E104.如E81-E103中任一项所述的方法,其中所述有义链包含式III表示的结构,其中式III按5'至3'方向是:

[0754] $E-(A')_m-F$

[0755] 式III;

[0756] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

[0757] F由式$(C-P^2)_3-D-P^1-C-P^1-C$、$(C-P^2)_3-D-P^2-C-P^2-C$、$(C-P^2)_3-D-P^1-C-P^1-D$或$(C-P^2)_3-D-P^2-C-P^2-D$表示;

[0758] A'、C、D、P^1和P^2如式II中所定义;并且

[0759] m是1至7的整数。

[0760] E105.如E104所述的方法,其中所述有义链包含式S1表示的结构,其中式S1按5′至3′方向是:

[0761] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-A

[0762] 式S1;

[0763] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0764] E106.如E104所述的方法,其中所述有义链包含式S2表示的结构,其中式S2按5′至3′方向是:

[0765] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A

[0766] 式S2;

[0767] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0768] E107.如E104所述的方法,其中所述有义链包含式S3表示的结构,其中式S3按5′至3′方向是:

[0769] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-B

[0770] 式S3;

[0771] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0772] E108.如E104所述的方法,其中所述有义链包含式S4表示的结构,其中式S4按5′至3′方向是:

[0773] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-B

[0774] 式S4;

[0775] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0776] E109.如E81、E82和E104-E108中任一项所述的方法,其中所述反义链包含式IV表示的结构,其中式IV按5'至3'方向是:

[0777] $A-(A')_j-C-P^2-B-(C-P^1)_k-C'$

[0778] 式IV;

[0779] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

[0780] 每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

[0781] B由式D-P^1-C-P^1-D-P^1表示;

[0782] 每个C是2'-O-Me核糖核苷;

[0783] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

[0784] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0785] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0786] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0787] j是1至7的整数;并且

[0788] k是1至7的整数。

[0789] E110.如E109所述的方法,其中所述反义链包含式A3表示的结构,其中式A3按5′至3′方向是:

[0790] A-S-B-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-B-S-A-S-A-S-A

[0791] 式A3;

[0792] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0793] E111.如E81-E103、E109和E110中任一项所述的方法,其中所述有义链包含式V表示的结构,其中式V按5'至3'方向是:

[0794] E-$(A')_m$-C-P^2-F

[0795] 式V;

[0796] 其中E由式$(C\text{-}P^1)_2$表示;

[0797] F由式D-P^1-C-P^1-C、D-P^2-C-P^2-C、D-P^1-C-P^1-D或D-P^2-C-P^2-D表示;

[0798] A'、C、D、P^1和P^2如式IV中所定义;并且

[0799] m是1至7的整数。

[0800] E112.如E111所述的方法,其中所述有义链包含式S5表示的结构,其中式S5按5′至3′方向是:

[0801] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A

[0802] 式S5;

[0803] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0804] E113.如E111所述的方法,其中所述有义链包含式S6表示的结构,其中式S6按5′至3′方向是:

[0805] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A

[0806] 式S6;

[0807] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0808] E114.如E111所述的方法,其中所述有义链包含式S7表示的结构,其中式S7按5′至3′方向是:

[0809] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-B

[0810] 式S7;

[0811] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0812] E115.如E111所述的方法,其中所述有义链包含式S8表示的结构,其中式S8按5′至3′方向是:

[0813] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B

[0814] 式S8;

[0815] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0816] E116.如E81、E82、E104-E108和E111-E114中任一项所述的方法,其中所述反义链包含式VI表示的结构,其中式VI按5'至3'方向是:

[0817] $A\text{-}B_j\text{-}E\text{-}B_k\text{-}E\text{-}F\text{-}G_1\text{-}D\text{-}P^1\text{-}C'$

[0818] 式VI;

[0819] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;

[0820] 每个B由式$C\text{-}P^2$表示;

[0821] 每个C是2'-O-Me核糖核苷;

[0822] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

[0823] 每个D是2'-F核糖核苷;

[0824] 每个E由式$D\text{-}P^2\text{-}C\text{-}P^2$表示;

[0825] F由式$D\text{-}P^1\text{-}C\text{-}P^1$表示;

[0826] 每个G由式$C\text{-}P^1$表示;

[0827] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[0828] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[0829] j是1至7的整数;

[0830] k是1至7的整数;并且

[0831] 1是1至7的整数。

[0832] E117.如E116所述的方法,其中所述反义链包含式A4表示的结构,其中式A4按5′至3′方向是:

[0833] A-S-B-S-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[0834] 式A4;

[0835] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0836] E118.如E81-E103、E109、E110、E116和E117中任一项所述的方法,其中所述有义链包含式VII表示的结构,其中式VII按5'至3'方向是:

[0837] $H\text{-}B_m\text{-}I_n\text{-}A'\text{-}B_o\text{-}H\text{-}C$

[0838] 式VII;

[0839] 其中A'由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;

[0840] 每个H由式$(C\text{-}P^1)_2$表示;

[0841] 每个I由式$(D\text{-}P^2)$表示;

[0842] B、C、D、P^1和P^2如式VI中所定义；

[0843] m为1至7的整数；

[0844] n是1至7的整数；并且

[0845] o是1至7的整数。

[0846] E119.如E118所述的方法，其中所述有义链包含式s9表示的结构，其中式S9按5′至3′方向是：

[0847] A-S-A-S-A-O-A-O-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-S-A-S-A

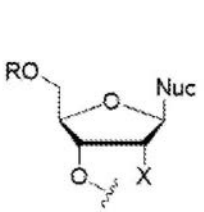
[0848] 式S9；

[0849] 其中A表示2’-O-Me核糖核苷，B表示2’-F核糖核苷，O表示磷酸二酯核苷间键联，并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

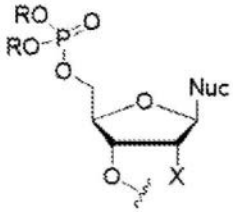
[0850] E120.如E81-E119中任一项所述的方法，其中所述反义链还包含在所述反义链的5’末端的5’磷稳定部分。

[0851] E121.如E81-E120中任一项所述的方法，其中所述有义链还包含在所述有义链的5’末端的5’磷稳定部分。

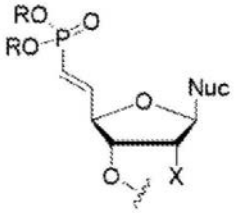
[0852] E122.如E81-E97、E120和E121中任一项所述的方法，其中所述5’磷稳定部分由式IX-XVI中任一项表示：



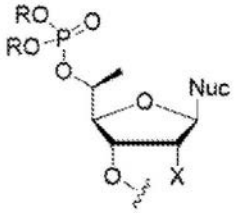
式 IX



式 X

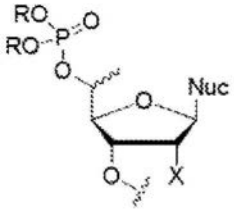


式 XI

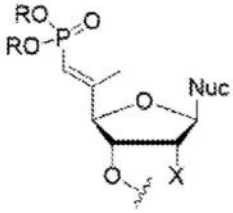


式 XII

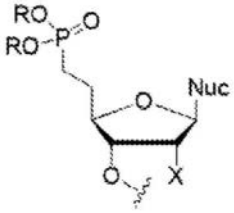
[0853]



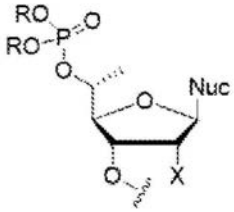
式 XIII



式 XIV



式 XV



式 XVI

[0854] 其中Nuc表示选自腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶的核碱基，并且R表示任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、苯基、苄基、羟基或氢。

[0855] E123.如E122所述的方法，其中所述5’-磷稳定部分是式XVI中表示的(E)-乙烯基膦酸酯。

[0856] E124.如E82-E123中任一项所述的方法，其中所述核糖核苷的至少50％是2′-O-Me核糖核苷。

[0857] E125.如E82-E124中任一项所述的方法，其中所述核糖核苷的至少60％是2′-O-Me核糖核苷。

[0858] E126.如E82-E125中任一项所述的方法，其中所述核糖核苷的至少70％是2′-O-Me核糖核苷。

[0859] E127.如E82-E126中任一项所述的方法,其中所述核糖核苷的至少80％是2′-O-Me核糖核苷。

[0860] E128.如E82-E127中任一项所述的方法,其中所述核糖核苷的至少90％是2′-O-Me核糖核苷。

[0861] E129.如E81-E128中任一项所述的方法,其中所述反义链的长度为10至30个核苷酸。

[0862] E130.如E81-E129中任一项所述的方法,其中所述反义链的长度为15至25个核苷酸。

[0863] E131.如E130所述的方法,其中所述反义链的长度为20个核苷酸。

[0864] E132.如E130所述的方法,其中所述反义链的长度为21个核苷酸。

[0865] E133.如E130所述的方法,其中所述反义链的长度为22个核苷酸。

[0866] E134.如E130所述的方法,其中所述反义链的长度为23个核苷酸。

[0867] E135.如E130所述的方法,其中所述反义链的长度为24个核苷酸。

[0868] E136.如E130所述的方法,其中所述反义链的长度为25个核苷酸。

[0869] E137.如E129所述的方法,其中所述反义链的长度为26个核苷酸。

[0870] E138.如E129所述的方法,其中所述反义链的长度为27个核苷酸。

[0871] E139.如E129所述的方法,其中所述反义链的长度为28个核苷酸。

[0872] E140.如E129所述的方法,其中所述反义链的长度为29个核苷酸。

[0873] E141.如E129所述的方法,其中所述反义链的长度为30个核苷酸。

[0874] E142.如E81-E141中任一项所述的方法,其中所述有义链的长度为12至30个核苷酸。

[0875] E143.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为14个核苷酸。

[0876] E144.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为15个核苷酸。

[0877] E145.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为16个核苷酸。

[0878] E146.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为17个核苷酸。

[0879] E147.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为18个核苷酸。

[0880] E148.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为19个核苷酸。

[0881] E149.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为20个核苷酸。

[0882] E150.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为21个核苷酸。

[0883] E151.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为22个核苷酸。

[0884] E152.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为23个核苷酸。

[0885] E153.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为24个核苷酸。

[0886] E154.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为25个核苷酸。

[0887] E155.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为26个核苷酸。

[0888] E156.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为27个核苷酸。

[0889] E157.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为28个核苷酸。

[0890] E158.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为29个核苷酸。

[0891] E159.如E142所述的方法,其中所述有义链的长度为30个核苷酸。

[0892] E160.如E1-E159中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸以水溶液的形式

或以悬浮液的形式施用。

[0893] E161.如E1-E160中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸施用至循环系统(例如,全身性地)。

[0894] E162.如E1-E160中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸施用至中枢神经系统。

[0895] E163.如E1-E160中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸直接施用至所述受试者的脑脊液,任选地其中所述治疗性寡核苷酸经鞘内、脑室内、纹状体内或通过导管插入在小脑延髓池内注射施用。

[0896] E164.如E1-E160中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸直接施用至所述受试者的脊髓,任选地其中所述治疗性寡核苷酸经鞘内、脑室内、纹状体内或通过导管插入在小脑延髓池内注射施用。

[0897] E165.如E1-E160所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸直接施用至所述受试者的脑实质。

[0898] E166.如E165所述的方法,其中施用于所述脑部的所述治疗性寡核苷酸具体地施用至皮质、小脑、基底神经节或其它脑部结构。

[0899] E167.如E166所述的方法,其中施用于所述基底神经节的所述治疗性寡核苷酸具体地施用至尾状核、壳核、丘脑、苍白球或黑质。

[0900] E168.如E1-E160中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸经鞘内、脑室内、纹状体内或通过导管插入在小脑延髓池内注射施用。

[0901] E169.如E168所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸经鞘内施用。

[0902] E170.如E168所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸经脑室内施用。

[0903] E171.如E1-E170中任一项所述的方法,其中将所述治疗性寡核苷酸施用于所述受试者引起所述受试者中基因或基因的剪接同种型的沉默。

[0904] E172.如E171所述的方法,其中基因的沉默包括基因的正调控因子的沉默,对所述基因而言相对于在参考受试者中观察到的所述表达和/或活性水平增加的表达和/或活性与疾病状态相关。

[0905] E173.如E171所述的方法,其中基因的沉默包括基因的负调控因子的沉默,对所述基因而言相对于在参考受试者中观察到的所述表达和/或活性水平降低的表达和/或活性与疾病状态相关。

[0906] E174.如E171-E173中任一项所述的方法,其中基因的沉默包括基因或基因的剪接同种型的沉默,对所述特定基因而言相对于在参考受试者中所述基因或所述基因的剪接同种型的表达,所述基因或所述基因的剪接同种型的过表达与疾病状态相关。

[0907] E175.如E171-E174中任一项所述的方法,其中所述基因或所述基因的剪接同种型在所述受试者的中枢神经系统中转录表达。

[0908] E176.如E171-E175中任一项所述的方法,其中所述基因或所述基因的剪接同种型的沉默用于治疗诊断患有中枢神经系统的疾病的受试者。

[0909] E177.如E176所述的方法,其中所述疾病是亨廷顿病、帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、路易体痴呆(DLB)、单纯性自主神经衰竭、路易体吞咽困难、偶发性路易体病(ILBD)、遗传性路易体病、橄榄体脑桥小脑萎缩(OPCA)、纹状体黑质变性、Shy-

Drager综合征、癫痫或癫痫综合征、朊病毒病、或疼痛病症。

[0910] E178.如E81-E177中任一项所述的方法,其中所述反义链具有足以与选自下组的基因的一部分杂交的互补性:ABCA7、ABI3、ADAM10、APOC1、APOE、AXL、BIN1、C1QA、C3、C9ORF72、CASS4、CCL5、CD2AP、CD33、CD68、CLPTM1、CLU、CR1、CSF1、CST7、CTSB、CTSD、CTSL、CXCL10、CXCL13、DSG2、ECHDC3、EPHA1、FABP5、FERMT2、FTH1、GNAS、GRN、HBEGF、HLA-DRB1、HLA-DRB5、HTT、IFIT1、IFIT3、IFITM3、IFNAR1、IFNAR2、IGF1、IL10RA、IL1A、IL1B、IL1RAP、INPP5D、ITGAM、ITGAX、KCNT1、LILRB4、LPL、MAPT、MEF2C、MMP12、MS4A4A、MS4A6A、MSH3、NLRP3、NME8、NOS2、PICALM、PILRA、PLCG2、PRNP、PTK2B、SCIMP、SCN9A、SLC24A4、SNCA、SORL1、SPI1、SPP1、SPPL2A、TBK1、TNF、TREM2、TREML2、TYROBP和ZCWPW1。

[0911] E179.如E178所述的方法,其中所述基因选自HTT、MAPT、SNCA、C9ORF72、APOE、SCN9A、KCNT1、PRNP和MSH3。

[0912] E180.如E179所述的方法,其中所述基因是HTT。

[0913] E181.如E179所述的方法,其中所述基因是MAPT。

[0914] E182.如E179所述的方法,其中所述基因是SNCA。

[0915] E183.如E179所述的方法,其中所述基因是C9ORF72。

[0916] E184.如E179所述的方法,其中所述基因是APOE。

[0917] E185.如E179所述的方法,其中所述基因是SCN9A。

[0918] E186.如E179所述的方法,其中所述基因是KCNT1。

[0919] E187.如E179所述的方法,其中所述基因是PRNP。

[0920] E188.如E179所述的方法,其中所述基因是MSH3

[0921] E189.如E1-E188中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

[0922] E190.如E1-E189中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:10至1:100。

[0923] E191.如E190所述的方法,其中治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:10至1:50

[0924] E192.如E191所述的方法,其中治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:18至1:38。

[0925] E193.如E192所述的方法,其中治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:20至1:25,任选地其中治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:20。

[0926] E194.如E193所述的方法,其中治疗性寡核苷酸与所述一种或多种二价阳离子的摩尔比为1:25。

[0927] E195.如E1-E194中任一项所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为10mM至150mM。

[0928] E196.如E195所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为20mM至150mM。

[0929] E197.如E196所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为20mM至100mM。

[0930] E198.如E196所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为25mM至

150mM。

[0931] E199.如E198所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为25mM至100mM。

[0932] E200.如E199所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为30mM至90mM。

[0933] E201.如E200所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为35mM至85mM。

[0934] E202.如E201所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为35mM至75mM。

[0935] E203.如E202所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为40mM至70mM。

[0936] E204.如E203所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为40mM至65mM。

[0937] E205.如E204所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为40mM至60mM。

[0938] E206.如E205所述的方法,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为40mM至50mM。

[0939] E207.如E1-E206中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸包含一个或多个具有负电荷的原子并且所述二价阳离子包含两个正电荷,并且其中负电荷与正电荷的比率为0.75至7.5,任选地其中负电荷与正电荷的比率为1.0至2.0。

[0940] E208.如E207所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至6.5。

[0941] E209.如E208所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至5.5

[0942] E210.如E209所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至4.5。

[0943] E211.如E210所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至3.5。

[0944] E212.如E211所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至2.5。

[0945] E213.如E212所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至1.5。

[0946] E214.如E213所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至1。

[0947] E215.如E208所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为1至7.5。

[0948] E216.如E215所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为1.5至7.5。

[0949] E217.如E216所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为2.5至7.5。

[0950] E218.如E217所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为3.5至7.5。

[0951] E219.如E218所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为4.5至7.5。

[0952] E220.如E219所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为5.5至7.5。

[0953] E221.如E220所述的方法,其中负电荷与正电荷的比率为6.5至7.5。

[0954] E222.一种治疗性寡核苷酸(例如,siRNA、shRNA、miRNA、gRNA、ASO),其配制为包含一种或多种二价阳离子的盐,其中所述治疗性寡核苷酸是干扰RNA分子(例如,siRNA、shRNA、miRNA)。

[0955] E223.如E222所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸是siRNA分子。

[0956] E224.如E222所述的治疗性寡核苷酸,其中所述siRNA分子包含多个部分或完全被所述一种或多种二价阳离子饱和的阳离子结合位点。

[0957] E225.如E224所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约10%至约100%。

[0958] E226.如E225所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约20%至约100%。

[0959] E227.如E226所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约30%至约100%。

[0960] E228.如E227所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约40%至约100%。

[0961] E229.如E228所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约50%至约100%。

[0962] E230.如E229所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约60%至约100%。

[0963] E231.如E230所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约70%至约100%。

[0964] E232.如E231所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约80%至约100%。

[0965] E233.如E232所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子对所述阳离子结合位点的饱和度为约90%至约100%。

[0966] E234.如E224-E233中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述阳离子结合位点位于核苷间键联内,任选地其中所述核苷间键联选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联。

[0967] E235.如E222-E234中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约30皮米至约150皮米。

[0968] E236.如E235中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约30皮米至约140皮米。

[0969] E237.如E236中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约40皮米至约130皮米。

[0970] E238.如E237中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约50皮米至约120皮米。

[0971] E239.如E238中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约60皮米至约110皮米。

[0972] E240.如E239中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约60皮米至约100皮米。

[0973] E241.如E240中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的特征在于离子半径为约60皮米至约90皮米。

[0974] E242.如E222-E234中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ba^{2+}、Be^{2+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}或其组合。

[0975] E243.如E242所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ba^{2+}。

[0976] E244.如E242或E243所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包括Be^{2+}。

[0977] E245.如E242-E244中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ca^{2+}。

[0978] E246.如E242-E245中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包括Cu^{2+}。

[0979] E247.如E242-E246中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包括Mg^{2+}。

[0980] E248.如E242-E247中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包括Mn^{2+}。

[0981] E249.如E242-E248中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ni^{2+}。

[0982] E250.如E242-E249中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包括Zn^{2+}。

[0983] E251.如E242-E250中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包括Ca^{2+}和Mg^{2+}。

[0984] E252.如E222-E251中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子包含硬路易斯酸。

[0985] E253.如E222-E252中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子置换来自所述siRNA分子的阳离子结合位点的水。

[0986] E254.如E222-E253中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述siRNA分子是分支的,任选地其中所述siRNA分子是二分支、三分支或四分支的。

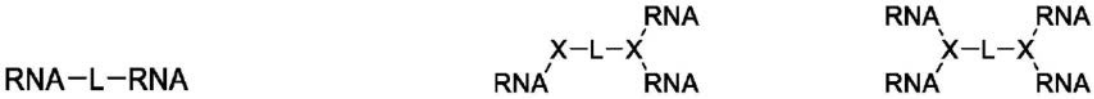
[0987] E255.如E254所述的治疗性寡核苷酸,其中所述siRNA分子是二分支的。

[0988] E256.如E254所述的治疗性寡核苷酸,其中所述siRNA分子是三分支的。

[0989] E257.如E254所述的治疗性寡核苷酸,其中所述siRNA分子是四分支的。

[0990] E258.如E254或E255所述的治疗性寡核苷酸,其中所述二分支siRNA分子由式I-III中任一项表示:

[0991]



式 I; 式 II; 式 III;

[0992] 其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0993] E259.如E258所述的治疗性寡核苷酸,其中所述二分支siRNA分子由式I表示。

[0994] E260.如E258所述的治疗性寡核苷酸,其中所述二分支siRNA分子由式II表示。

[0995] E261.如E258所述的治疗性寡核苷酸,其中所述二分支siRNA分子由式III表示。

[0996] E262.如E254或E256所述的治疗性寡核苷酸,其中所述三分支siRNA分子由式IV-VII中任一项表示:

[0997]



式 IV; 式 V; 式 VI; 式 VII;

[0998] 其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[0999] E263.如E262所述的治疗性寡核苷酸,其中所述三分支siRNA分子由式IV表示。

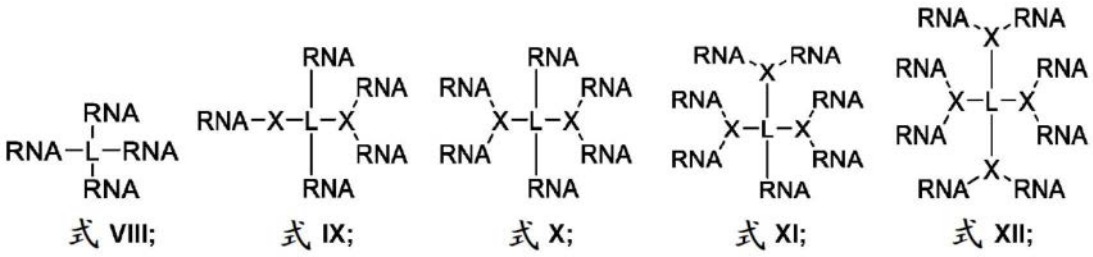
[1000] E264.如E262所述的治疗性寡核苷酸,其中所述三分支siRNA分子由式V表示。

[1001] E265.如E262所述的治疗性寡核苷酸,其中所述三分支siRNA分子由式VI表示。

[1002] E266.如E262所述的治疗性寡核苷酸,其中所述三分支siRNA分子由式VII表示。

[1003] E267.如E254或E257所述的治疗性寡核苷酸,其中所述四分支siRNA分子由式

VIII-XII中任一项表示：

[1004] 

[1005] 其中每个RNA独立地是siRNA分子,L是接头,并且每个X独立地表示分支点部分。

[1006] E268.如E267所述的治疗性寡核苷酸,其中所述四分支siRNA分子由式VIII表示。

[1007] E269.如E267所述的治疗性寡核苷酸,其中所述四分支siRNA分子由式IX表示。

[1008] E270.如E267所述的治疗性寡核苷酸,其中所述四分支siRNA分子由式X表示。

[1009] E271.如E267所述的治疗性寡核苷酸,其中所述四分支siRNA分子由式XI表示。

[1010] E272.如E267所述的治疗性寡核苷酸,其中所述四分支siRNA分子由式XII表示。

[1011] E273.如E258-E272中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头选自乙二醇(例如,聚乙二醇(PEG),诸如三乙二醇(TrEG)或四乙二醇(TEG))、烷基、碳水化合物、嵌段共聚物、肽、RNA和DNA的一个或多个连续亚基。

[1012] E274.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头是乙二醇寡聚体。

[1013] E275.如E274所述的治疗性寡核苷酸,其中所述乙二醇寡聚体是PEG。

[1014] E276.如E275所述的治疗性寡核苷酸,其中所述PEG是TrEG。

[1015] E277.如E276所述的治疗性寡核苷酸,其中所述PEG是TEG。

[1016] E278.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头是烷基寡聚体。

[1017] E279.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头是碳水化合物寡聚体。

[1018] E280.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头是嵌段共聚物。

[1019] E281.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头是肽寡聚体。

[1020] E282.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头是RNA寡聚体。

[1021] E283.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头是DNA寡聚体。

[1022] E284.如E273-E283中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述寡聚体或共聚物含有2至20个连续亚基。

[1023] E285.如E284所述的治疗性寡核苷酸,其中所述寡聚体或共聚物含有4至18个连续亚基。

[1024] E286.如E284所述的治疗性寡核苷酸,其中所述寡聚体或共聚物含有6至16个连续亚基。

[1025] E287.如E286所述的治疗性寡核苷酸,其中所述寡聚体或共聚物含有8至14个连续亚基。

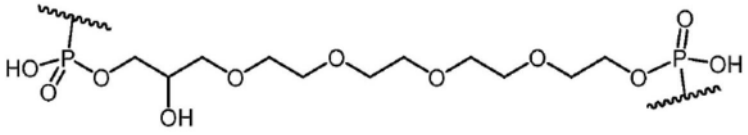
[1026] E288.如E287所述的治疗性寡核苷酸,其中所述寡聚体或共聚物含有10至12个连续亚基。

[1027] E289.如E243所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头通过共价键形成部分的方式附接一个或多个(例如,1、2个或多个)siRNA分子。

[1028] E290.如E289所述的治疗性寡核苷酸,其中所述共价键形成部分选自烷基、酯、酰

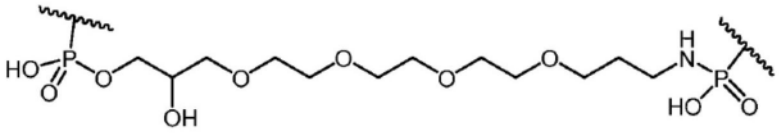
胺、氨基甲酸酯、膦酸酯、磷酸酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、三唑、脲和甲缩醛。

[1029] E291.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头包括式L1的结构:

[1030] 

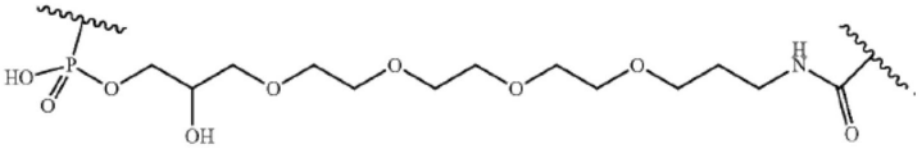
(式 L1)

[1031] E292.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头包括式L2的结构:

[1032] 。

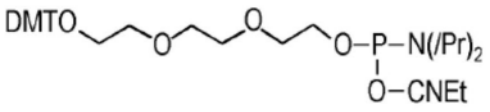
(式 L2)

[1033] E293.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头包括式L3的结构:

[1034] 

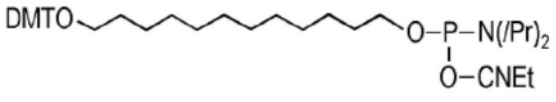
(式 L3)

[1035] E294.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头包括式L4的结构:

[1036] 。

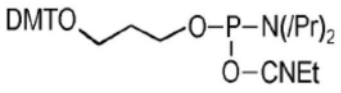
(式 L4)

[1037] E295.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头包括式L5的结构:

[1038] 。

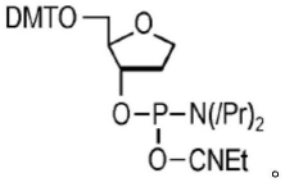
(式 L5)

[1039] E296.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头包括式L6的结构:

[1040] 。

(式 L6)

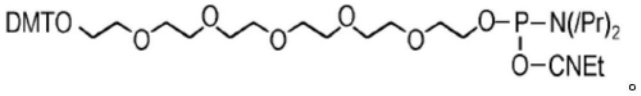
[1041] E297.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头包括式L7的结构:

[1042] 

。

(式 L7)

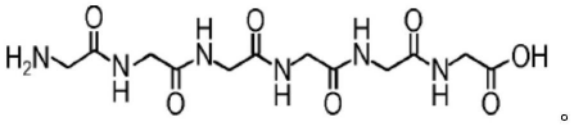
[1043] E298.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头包括式L8的结构:

[1044] 

。

(式 L8)

[1045] E299.如E273所述的治疗性寡核苷酸,其中所述接头包括式L9的结构:

[1046] 

。

(式 L9)

[1047] E300.如E222-E299中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述siRNA分子包含反义链和与所述反义链具有互补性的有义链。

[1048] E301.如E300所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链和有义链包含交替的2'-O-甲基和2'-氟核糖核苷。

[1049] E302.如E300或E301所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链按5′至3′方向具有下式:

[1050] $Z-((A-P-)_n(B-P-)_m)_q$;

[1051] 式XIII

[1052] 其中Z是5'磷稳定部分;

[1053] 每个A独立地是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

[1054] 每个B独立地是2'-氟(2'-F)核糖核苷;

[1055] 每个P独立地是选自磷酸二酯键联和硫代磷酸酯键联的核苷间键联;

[1056] n是1至5的整数;

[1057] m是1至5的整数;并且

[1058] q是介于1和30之间的整数。

[1059] E303.如E302所述的治疗性寡核苷酸,其中n为1至4。

[1060] E304.如E302所述的治疗性寡核苷酸,其中n为1至3。

[1061] E305.如E302所述的治疗性寡核苷酸,其中n为1至2。

[1062] E306.如E302所述的治疗性寡核苷酸,其中n为1。

[1063] E307.如E302所述的治疗性寡核苷酸,其中n为2。

[1064] E308.如E302所述的治疗性寡核苷酸,其中n为3。

[1065] E309.如E302所述的治疗性寡核苷酸,其中n为4。

[1066] E310.如E302所述的治疗性寡核苷酸,其中n为5。

[1067] E311.如E302-E310中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中m为1至4。

[1068] E312.如E311所述的治疗性寡核苷酸,其中m为1至3。

[1069] E313.如E311所述的治疗性寡核苷酸,其中m为1至2。

[1070] E314.如E311所述的治疗性寡核苷酸,其中m为1。

[1071] E315.如E311所述的治疗性寡核苷酸,其中m为2。

[1072] E316.如E311所述的治疗性寡核苷酸,其中m为3。

[1073] E317.如E311所述的治疗性寡核苷酸,其中m为4。

[1074] E318.如E311所述的治疗性寡核苷酸,其中m为5。

[1075] E319.如E300或E301所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链包含按5′至3′方向由式I表示的结构:

[1076] $A\text{-}B\text{-}(A')_j\text{-}C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^1\text{-}(C'\text{-}P^1)_k\text{-}C'$

[1077] 式I;

[1078] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;

[1079] 每个A'由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;

[1080] B由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;

[1081] 每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

[1082] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

[1083] 每个D是2'-F核糖核苷;

[1084] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[1085] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[1086] j是1至7的整数;并且

[1087] k是1至7的整数。

[1088] E320.如权利要求E319所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链包含式AI表示的结构,其中式A1按5'至3'方向是:

[1089] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[1090] 式A1;

[1091] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1092] E321.如E319所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链包含式II表示的结构,其中式II按5′至3′方向是:

[1093] $A\text{-}B\text{-}(A')_j\text{-}C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^1\text{-}(C\text{-}P^1)_k\text{-}C'$

[1094] 式II;

[1095] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;

[1096] 每个A'由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;

[1097] B由式$C\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2\text{-}D\text{-}P^2$表示;

[1098] 每个C是2'-O-甲基(2'-O-Me)核糖核苷;

[1099] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-氟(2'-F)核糖核苷;

[1100] 每个D是2'-F核糖核苷;

[1101] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[1102] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[1103] j是1至7的整数;并且

[1104] k是1至7的整数。

[1105] E322.如E321所述的治疗性寡核苷酸,所述反义链包含式A2表示的结构,其中式A2按5′至3′方向是:

[1106] A-S-B-S-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-A-S-A

[1107] 式A2;

[1108] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1109] E323.如E300-E322中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链包含式III表示的结构,其中式III按5'至3'方向是:

[1110] $E-(A')_m-F$

[1111] 式III;

[1112] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

[1113] F由式$(C-P^2)_3-D-P^1-C-P^1-C$、$(C-P^2)_3-D-P^2-C-P^2-C$、$(C-P^2)_3-D-P^1-C-P^1-D$或$(C-P^2)_3-D-P^2-C-P^2-D$表示;

[1114] A'、C、D、P^1和P^2如式II中所定义;并且

[1115] m是1至7的整数。

[1116] E324.如E323所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链包含式S1表示的结构,其中式S1按5′至3′方向是:

[1117] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-A

[1118] 式S1;

[1119] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1120] E325.如E323所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链包含式S2表示的结构,其中式S2按5′至3′方向是:

[1121] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A

[1122] 式S2;

[1123] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1124] E326.如E323所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链包含式S3表示的结构,其中式S3按5′至3′方向是:

[1125] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-S-A-S-B

[1126] 式S3;

[1127] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并

且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1128] E327.如E323所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链包含式S4表示的结构,其中式S4按5′至3′方向是:

[1129] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-B

[1130] 式S4;

[1131] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1132] E328.如E300、E301和E323-E327中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链包含式IV表示的结构,其中式IV按5'至3'方向是:

[1133] $A-(A')_j-C-P^2-B-(C-P^1)_k-C'$

[1134] 式IV;

[1135] 其中A由式$C-P^1-D-P^1$表示;

[1136] 每个A'由式$C-P^2-D-P^2$表示;

[1137] B由式$D-P^1-C-P^1-D-P^1$表示;

[1138] 每个C是2'-O-Me核糖核苷;

[1139] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

[1140] 每个D是2'-F核糖核苷;

[1141] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[1142] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[1143] j是1至7的整数;并且

[1144] k是1至7的整数。

[1145] E329.如E328所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链包含式A3表示的结构,其中式A3按5′至3′方向是:

[1146] A-S-B-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-B-S-A-S-A-S-A

[1147] 式A3;

[1148] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1149] E330.如E300-E292、E328和E329中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链包含式V表示的结构,其中式V按5'至3'方向是:

[1150] $E-(A')_m-C-P^2-F$

[1151] 式V;

[1152] 其中E由式$(C-P^1)_2$表示;

[1153] F由式$D-P^1-C-P^1-C$、$D-P^2-C-P^2-C$、$D-P^1-C-P^1-D$或$D-P^2-C-P^2-D$表示;

[1154] A'、C、D、P^1和P^2如式IV中所定义;并且

[1155] m是1至7的整数。

[1156] E331.如E330所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链包含式S5表示的结构,其中式S5按5′至3′方向是:

[1157] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A

[1158] 式S5;

[1159] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1160] E332.如E330所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链包含式S6表示的结构,其中式S6按5′至3′方向是:

[1161] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A

[1162] 式S6;

[1163] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1164] E333.如E330所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链包含式S7表示的结构,其中式S7按5′至3′方向是:

[1165] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-B

[1166] 式S7;

[1167] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1168] E334.如E330所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链包含式S8表示的结构,其中式S8按5′至3′方向是:

[1169] A-S-A-S-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B-O-A-O-B

[1170] 式S8;

[1171] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷,B表示2'-F核糖核苷,O表示磷酸二酯核苷间键联,并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1172] E335.如E300、E301、E23-E327和E330-E334中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链包含式VI表示的结构,其中式VI按5'至3'方向是:

[1173] $A\text{-}B_j\text{-}E\text{-}B_k\text{-}E\text{-}F\text{-}G_1\text{-}D\text{-}P^1\text{-}C'$

[1174] 式VI;

[1175] 其中A由式$C\text{-}P^1\text{-}D\text{-}P^1$表示;

[1176] 每个B由式$C\text{-}P^2$表示;

[1177] 每个C是2'-O-Me核糖核苷;

[1178] 每个C'独立地是2'-O-Me核糖核苷或2'-F核糖核苷;

[1179] 每个D是2'-F核糖核苷;

[1180] 每个E由式$D\text{-}P^2\text{-}C\text{-}P^2$表示;

[1181] F由式$D\text{-}P^1\text{-}C\text{-}P^1$表示;

[1182] 每个G由式$C\text{-}P^1$表示;

[1183] 每个P^1是硫代磷酸酯核苷间键联;

[1184] 每个P^2是磷酸二酯核苷间键联;

[1185] j是1至7的整数;

[1186] k是1至7的整数;并且

[1187] 1是1至7的整数。

[1188] E336.如E335所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链包含式A4表示的结构,其中

式A4按5′至3′方向是：

[1189] A-S-B-S-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-A-O-B-O-A-O-B-S-A-S-A-S-A-S-B-S-A

[1190] 式A4；

[1191] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷，B表示2'-F核糖核苷，O表示磷酸二酯核苷间键联，并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[1192] E337.如权利要求E300-E322、E328、E329、E335和E336中任一项中任一项所述的治疗性寡核苷酸，其中所述有义链包含式VII表示的结构，其中式VII按5'至3'方向是：

[1193] $H-B_m-I_n-A'-B_o-H-C$

[1194] 式VII；

[1195] 其中A'由式$C-P^2-D-P^2$表示；

[1196] 每个H由式$(C-P^1)_2$表示；

[1197] 每个I由式$(D-P^2)$表示；

[1198] B、C、D、P^1和P^2如式VI中所定义；

[1199] m为1至7的整数；

[1200] n是1至7的整数；并且

[1201] 是1至7的整数。

[1202] E338.如E337所述的治疗性寡核苷酸，其中所述有义链包含式s9表示的结构，其中式S9按5′至3′方向是：

[1203] A-S-A-S-A-O-A-O-A-O-B-O-B-O-B-O-A-O-B-O-A-O-A-O-A-O-A-S-A-S-A

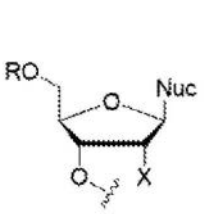
[1204] 式S9；

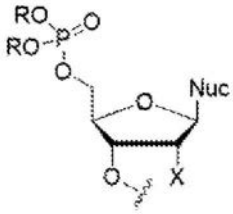
[1205] 其中A表示2'-O-Me核糖核苷，B表示2'-F核糖核苷，O表示磷酸二酯核苷间键联，并且S表示硫代磷酸酯核苷间键联。

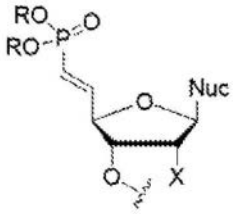
[1206] E339.如E300-E338中任一项所述的治疗性寡核苷酸，其中所述反义链还包含在所述反义链的5'末端的5'磷稳定部分。

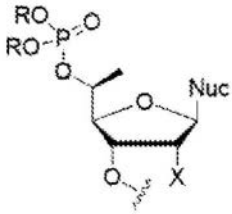
[1207] E340.如E300-E339中任一项所述的治疗性寡核苷酸，其中所述有义链还包含在所述有义链的5'末端的5'磷稳定部分。

[1208] E341.如E302-E318、E338和E339中任一项所述的治疗性寡核苷酸，其中所述5'磷稳定部分由式IX-XVI中任一项表示：

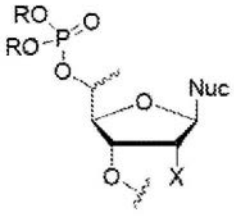

式 IX

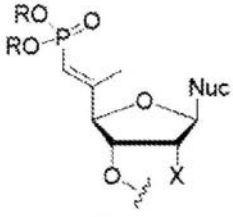

式 X

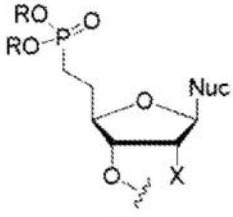

式 XI

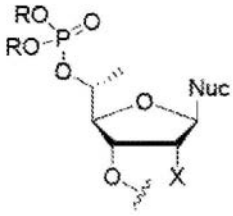

式 XII

[1209]


式 XIII


式 XIV


式 XV


式 XVI

[1210] 其中Nuc表示选自腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶的核碱基,并且R表示任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、苯基、苄基、羟基或氢。

[1211] E342.如E341所述的治疗性寡核苷酸,其中所述5'-磷稳定部分是式XVI中表示的(E)-乙烯基膦酸酯。

[1212] E343.如E301-E342中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述核糖核苷的至少50%是2′-O-Me核糖核苷。

[1213] E344.如E301-E343中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述核糖核苷的至少60%是2′-O-Me核糖核苷。

[1214] E345.如E301-E344中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述核糖核苷的至少70%是2′-O-Me核糖核苷。

[1215] E346.如E301-E345中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述核糖核苷的至少80%是2′-O-Me核糖核苷。

[1216] E347.如E301-E346中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述核糖核苷的至少90%是2′-O-Me核糖核苷。

[1217] E348.如E300-E347中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为10至30个核苷酸。

[1218] E349.如E300-E348中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为15至25个核苷酸。

[1219] E350.如E349所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为20个核苷酸。

[1220] E351.如E349所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为21个核苷酸。

[1221] E352.如E349所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为22个核苷酸。

[1222] E353.如E349所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为23个核苷酸。

[1223] E354.如E349所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为24个核苷酸。

[1224] E355.如E349所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为25个核苷酸。

[1225] E356.如E348所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为26个核苷酸。

[1226] E357.如E348所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为27个核苷酸。

[1227] E358.如E348所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为28个核苷酸。

[1228] E359.如E348所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为29个核苷酸。

[1229] E360.如E348所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链的长度为30个核苷酸。

[1230] E361.如E300-E360中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为12至30个核苷酸。

[1231] E362.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为14个核苷酸。

[1232] E363.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为15个核苷酸。

[1233] E364.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为16个核苷酸。

[1234] E365.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为17个核苷酸。

[1235] E366.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为18个核苷酸。

[1236] E367.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为19个核苷酸。

[1237] E368.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为20个核苷酸。

[1238] E369.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为21个核苷酸。

[1239] E370.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为22个核苷酸。

[1240] E371.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为23个核苷酸。

[1241] E372.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为24个核苷酸。

[1242] E373.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为25个核苷酸。

[1243] E374.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为26个核苷酸。

[1244] E375.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为27个核苷酸。

[1245] E376.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为28个核苷酸。

[1246] E377.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为29个核苷酸。

[1247] E378.如E361所述的治疗性寡核苷酸,其中所述有义链的长度为30个核苷酸。

[1248] E379.如E222-E378中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述siRNA分子以水溶液的形式或以悬浮液的形式施用至所述受试者的中枢神经系统。

[1249] E380.如E222-E379中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中将所述siRNA分子施用于所述受试者引起所述受试者中基因或基因的剪接同种型的沉默。

[1250] E381.如E380所述的治疗性寡核苷酸,其中基因的沉默包括基因的正调控因子的沉默,对所述基因而言相对于在参考受试者中观察到的所述表达和/或活性水平增加的表达和/或活性与疾病状态相关。

[1251] E382.如E380所述的治疗性寡核苷酸,其中基因的沉默包括基因的负调控因子的沉默,对所述基因而言相对于在参考受试者中观察到的所述表达和/或活性水平降低的表达和/或活性与疾病状态相关。

[1252] E383.如E380-E382中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中基因的沉默包括基因或基因的剪接同种型的沉默,对所述特定基因而言相对于在参考受试者中所述基因或所述基因的剪接同种型的表达,所述基因或所述基因的剪接同种型的过表达与疾病状态相关。

[1253] E384.如E380-E383中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因或所述基因的剪接同种型在所述受试者的中枢神经系统中转录表达。

[1254] E385.如E380-E384中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因或基因的剪接同种型的沉默用于治疗诊断患有中枢神经系统的疾病的受试者。

[1255] E386.如E385所述的治疗性寡核苷酸,其中所述疾病是亨廷顿病、帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、路易体痴呆(DLB)、单纯性自主神经衰竭、路易体吞咽困难、偶发性路易体病(ILBD)、遗传性路易体病、橄榄体脑桥小脑萎缩(OPCA)、纹状体黑质变性、Shy-Drager综合征、癫痫或癫痫病症、朊病毒病、或疼痛病症。

[1256] E387.如E300-E386中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述反义链具有足以与选自下组的基因的一部分杂交的互补性:ABCA7、ABI3、ADAM10、APOC1、APOE、AXL、BIN1、C1QA、C3、C9ORF72、CASS4、CCL5、CD2AP、CD33、CD68、CLPTM1、CLU、CR1、CSF1、CST7、CTSB、CTSD、CTSL、CXCL10、CXCL13、DSG2、ECHDC3、EPHA1、FABP5、FERMT2、FTH1、GNAS、GRN、HBEGF、HLA-DRB1、HLA-DRB5、HTT、IFIT1、IFIT3、IFITM3、IFNAR1、IFNAR2、IGF1、IL10RA、IL1A、IL1B、IL1RAP、INPP5D、ITGAM、ITGAX、KCNT1、LILRB4、LPL、MAPT、MEF2C、MMP12、MS4A4A、MS4A6A、MSH3、NLRP3、NME8、NOS2、PICALM、PILRA、PLCG2、PRNP、PTK2B、SCIMP、SCN9A、SLC24A4、SNCA、SORL1、SPI1、SPP1、SPPL2A、TBK1、TNF、TREM2、TREML2、TYROBP和ZCWPW1。

[1257] E388.如E387所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因选自HTT、MAPT、SNCA、C9ORF72、APOE、SCN9A、KCNT1、PRNP和MSH3。

[1258] E389.如E388所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因是HTT。

[1259] E390.如E388所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因是MAPT。

[1260] E391.如E388所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因是SNCA。

[1261] E392.如E388所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因是C9ORF72。

[1262] E393.如E388所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因是APOE。

[1263] E394.如E388所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因是SCN9A。

[1264] E395.如E388所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因是KCNT1。

[1265] E396.如E388所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因是PRNP。

[1266] E397.如E388所述的治疗性寡核苷酸,其中所述基因是MSH3。

[1267] E398.如E222-E397中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述受试者是人。

[1268] E399.如E222-E398中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中治疗性寡核苷酸与二价阳离子的摩尔比为1:10至1:100(例如,1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95或1:100)。

[1269] E400.如E399所述的治疗性寡核苷酸,其中治疗性寡核苷酸与二价阳离子的摩尔比为1:10至1:50

[1270] E401.如E400所述的治疗性寡核苷酸,其中治疗性寡核苷酸与二价阳离子的摩尔比为1:18至1:38。

[1271] E402.如E401所述的治疗性寡核苷酸,其中治疗性寡核苷酸与二价阳离子的摩尔比为1:20至1:25,任选地其中治疗性寡核苷酸与二价阳离子的摩尔比为1:20。

[1272] E403.如E402所述的治疗性寡核苷酸,其中治疗性寡核苷酸与二价阳离子的摩尔比为1:25。

[1273] E404.如E222-E403中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为10mM至150mM。

[1274] E405.如E404所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为20mM至150mM。

[1275] E406.如E405所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为20mM至100mM。

[1276] E407.如E405所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为25mM至150mM

[1277] E408.如E407所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为25mM至100mM

[1278] E409.如E408所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为30mM至90mM。

[1279] E410.如E409所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为35mM至85mM。

[1280] E411.如E410所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为35mM至75mM。

[1281] E412.如E411所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为40mM至70mM。

[1282] E413.如E412所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为40mM至65mM。

[1283] E414.如E413所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为40mM至60mM。

[1284] E415.如E414所述的治疗性寡核苷酸,其中所述一种或多种二价阳离子的浓度为40mM至50mM。

[1285] E416.如E222-E398中任一项所述的治疗性寡核苷酸,其中所述治疗性寡核苷酸包含一个或多个具有负电荷的原子并且所述二价阳离子包含两个正电荷,并且其中负电荷与正电荷的比率为0.75至7.5,任选地其中负电荷与正电荷的比率为1.0至2.0。

[1286] E417.如E416所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至6.5。

[1287] E418.如E417所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至5.5

[1288] E419.如E418所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至4.5。

[1289] E420.如E419所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至3.5。

[1290] E421.如E420所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至2.5。

[1291] E422.如E421所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至1.5。

[1292] E423.如E422所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为0.75至1。

[1293] E424.如E416所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为1至7.5。

[1294] E425.如E424所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为1.5至7.5。

[1295] E426.如E425所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为2.5至7.5。

[1296] E427.如E426所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为3.5至7.5。

[1297] E428.如E427所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为4.5至7.5。

[1298] E429.如E428所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为5.5至7.5。

[1299] E430.如E429所述的治疗性寡核苷酸,其中负电荷与正电荷的比率为6.5至7.5。

[1300] E431.一种合成配制为包含一种或多种二价阳离子的盐的治疗性寡核苷酸的方法,所述方法包括在一种或多种二价阳离子的存在下加热反义链和有义链。

[1301] E432.如E431所述的方法,其中所述加热包括加热到至少90℃。

[1302] E433.一种制备配制为包含一种或多种二价阳离子的盐的治疗性寡核苷酸的方法,所述方法包括在一种或多种二价阳离子的存在下不加热孵育杂交的siRNA双链体。

[1303] E434.如E431-E433中任一项所述的方法,其中所述治疗性寡核苷酸是如E222-E400中任一项所述的治疗性寡核苷酸。

[1304] E435.一种治疗性寡核苷酸,其通过如E431-E434中任一项所述的方法合成。

[1305] E436.一种药物组合物,其包含如E222-E430和E435中任一项所述的治疗性寡核苷酸和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[1306] E437.如E436所述的药物组合物,其中所述盐配制为水溶液。

[1307] E438.如E436所述的药物组合物,其中所述盐配制为悬浮液。

[1308] E439.一种试剂盒,其包括如E222-E430和E435中任一项所述的分支siRNA分子,或如E436-E438中任一项所述的药物组合物,以及包装说明书,其中所述包装说明书指导所述试剂盒的使用者进行如E1-E221中任一项所述的方法。

[1309] 其它实施方案

[1310] 在不偏离本公开的范围和精神的情况下,所述公开的各种修改和变化对本领域技术人员将是显而易见的。尽管已结合具体实施方案对本公开进行了描述,但是应当理解所要求保护的本公开不应当不适当地限定于此类具体实施方案。实际上,所描述的用于执行本公开的方式的各种修改对于本领域技术人员是显而易见的,且旨在包含在本公开的范围内。其它实施方案在权利要求范围内。

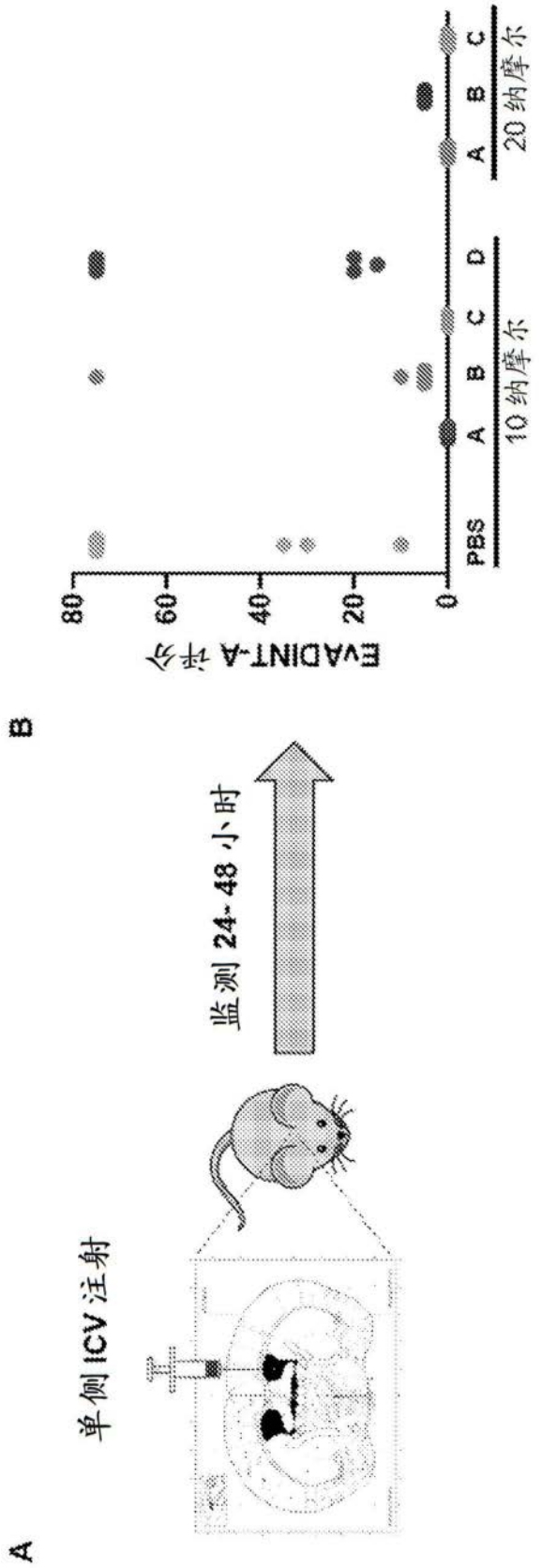

A
单侧 ICV 注射
监测 24-48 小时
B
EvADINT-A 评分
80
60
40
20
0
PBS
A
B
C
D
10 纳摩尔
A
B
C
20 纳摩尔

图1

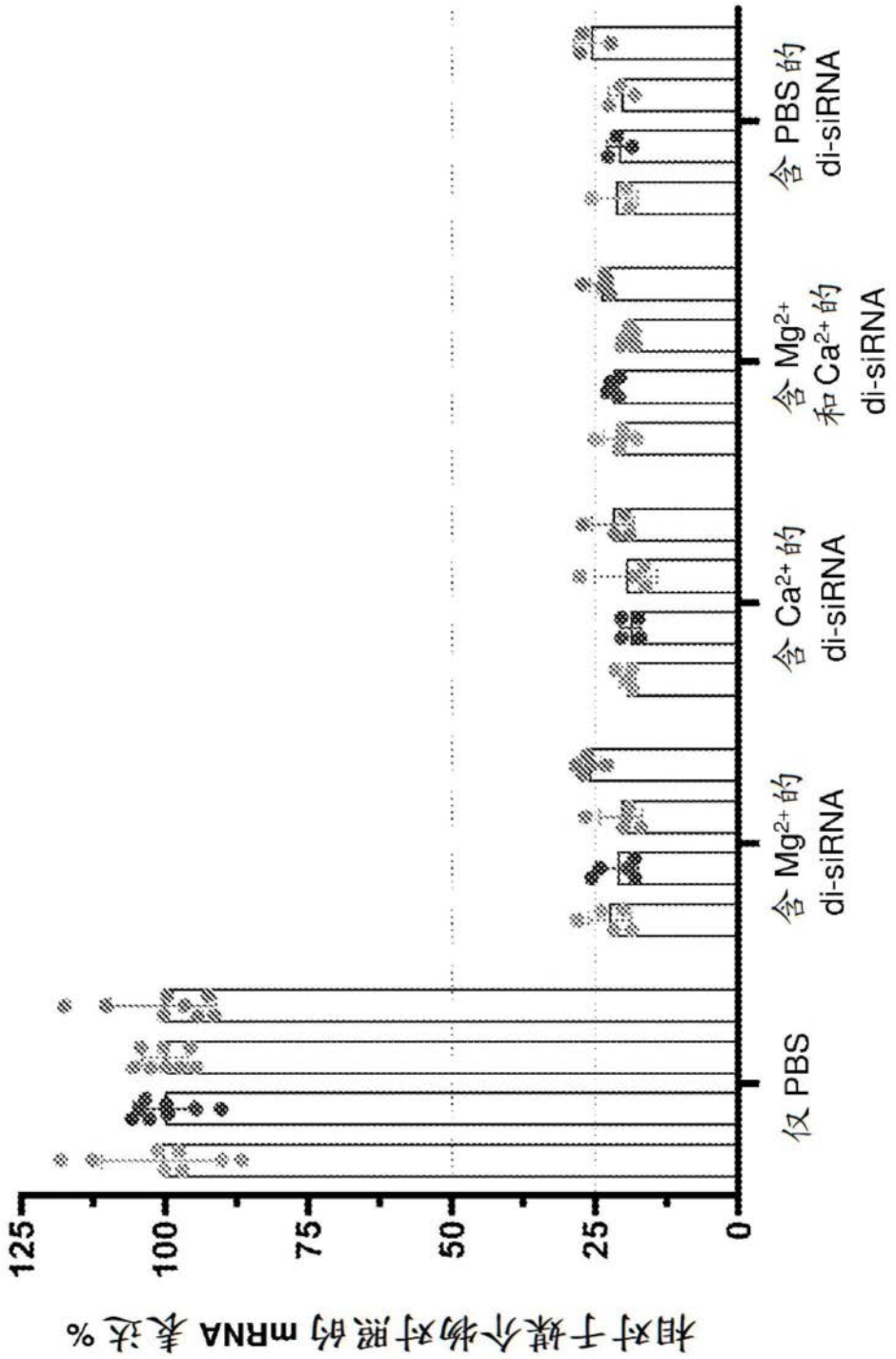

相对于媒介物对照的 mRNA 表达 %
125
100
75
50
25
0
仅 PBS
含 Mg2+ 的 di-siRNA
含 Ca2+ 的 di-siRNA
含 Mg2+ 和 Ca2+ 的 di-siRNA
含 PBS 的 di-siRNA

图2A

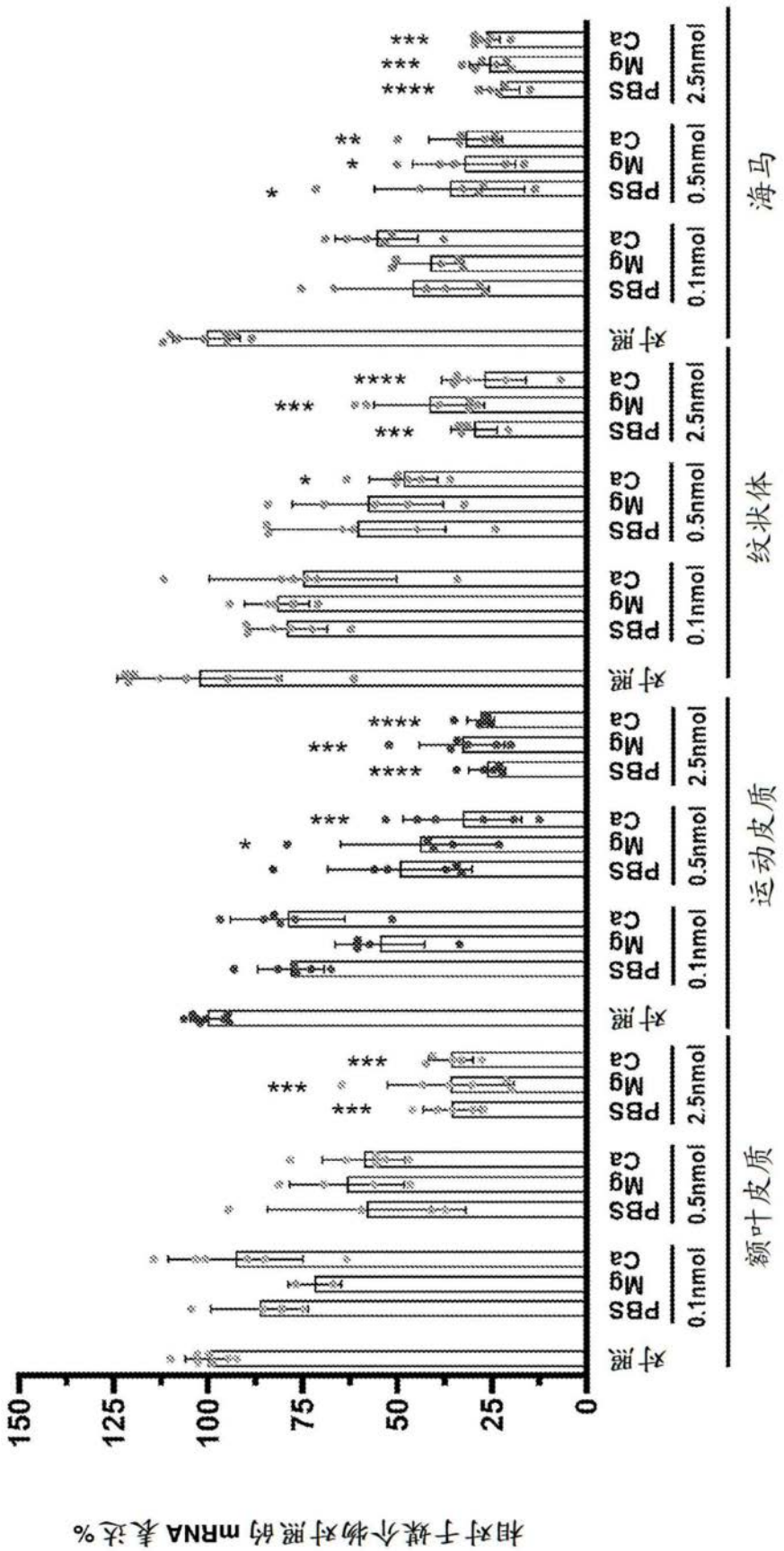

相对于媒介物对照的 mRNA 表达%
150
125
100
75
50
25
0
对照
PBS
Mg
Ca
0.1nmol
0.5nmol
2.5nmol
额叶皮质
运动皮质
纹状体
海马

图2B

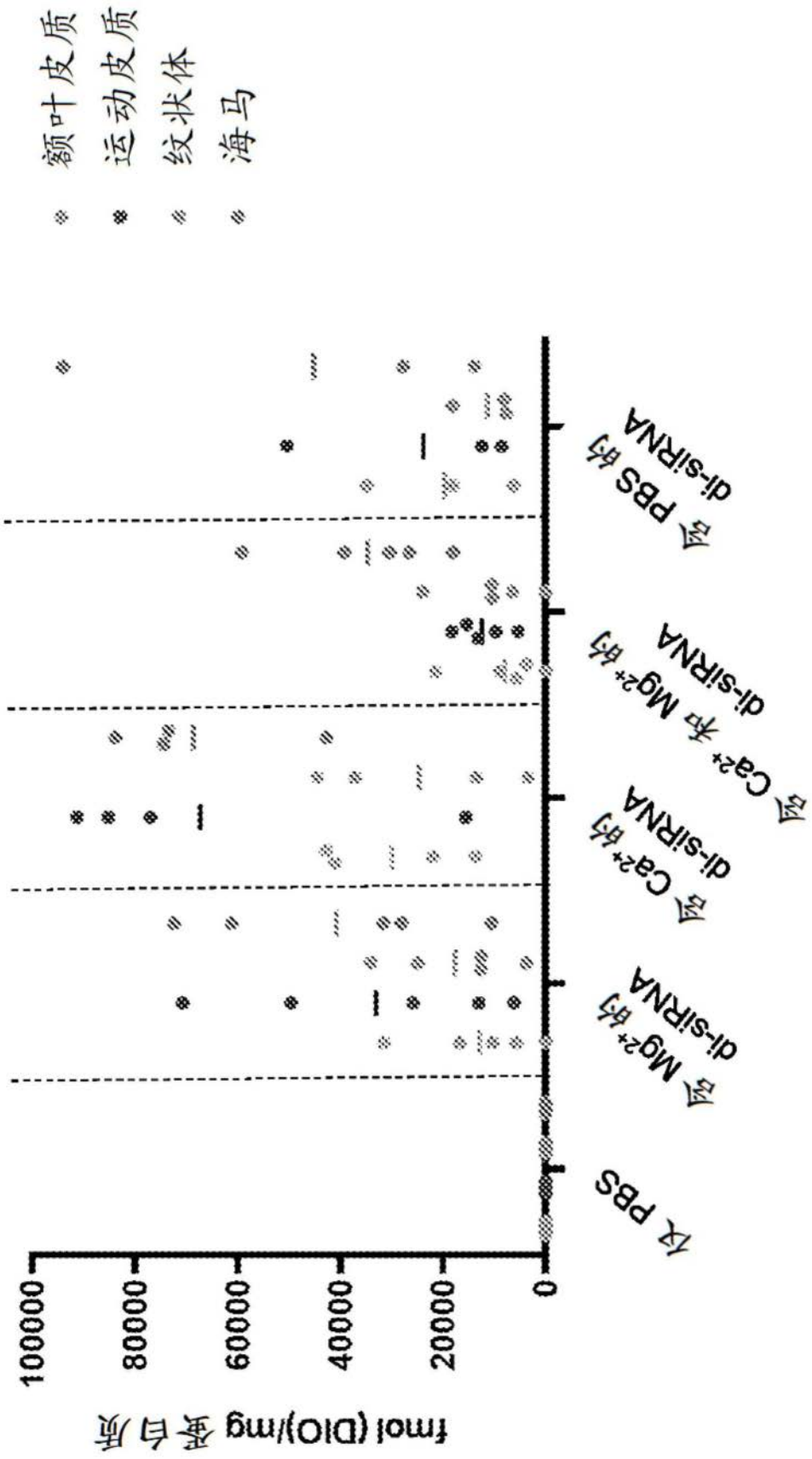

额叶皮质
运动皮质
纹状体
海马
fmol (DiO)/mg 蛋白质
100000
80000
60000
40000
20000
0
经 PBS
鼻 Mg2+ 的 di-siRNA
鼻 Ca2+ 的 di-siRNA
鼻 Ca2+ 和 Mg2+ 的 di-siRNA
鼻 PBS 的 di-siRNA

图2C

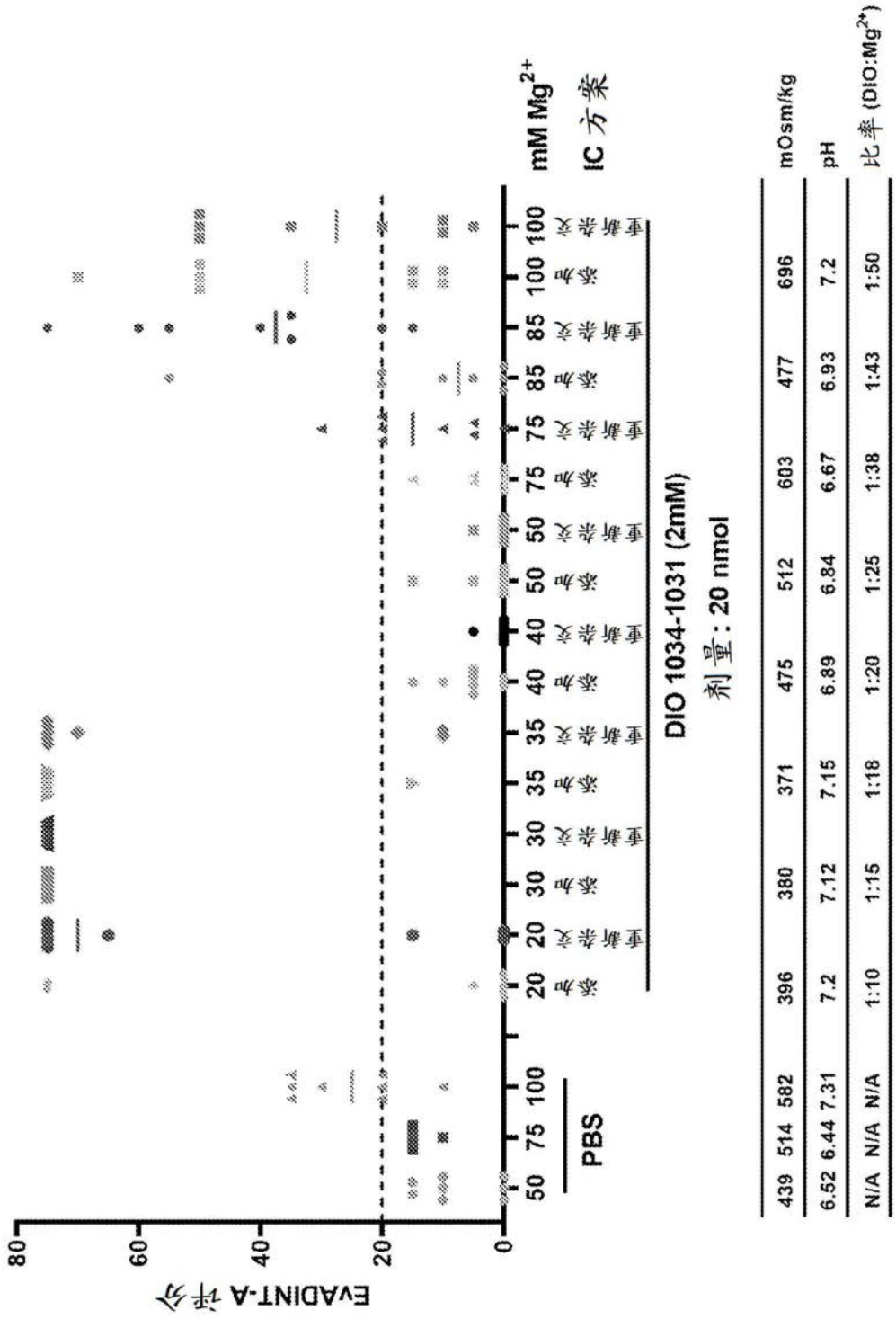

EVADINT-A 评分
0
20
40
60
80
PBS
DIO 1034-1031 (2mM)
剂量: 20 nmol
mM Mg^{2+}
IC 方案
添加
重新杂交
mOsm/kg
pH
比率 (DIO:Mg^{2+})
439 514 582 396 380 371 475 512 603 477 696
6.52 6.44 7.31 7.2 7.12 7.15 6.89 6.84 6.67 6.93 7.2
N/A N/A N/A 1:10 1:15 1:18 1:20 1:25 1:38 1:43 1:50

图3A

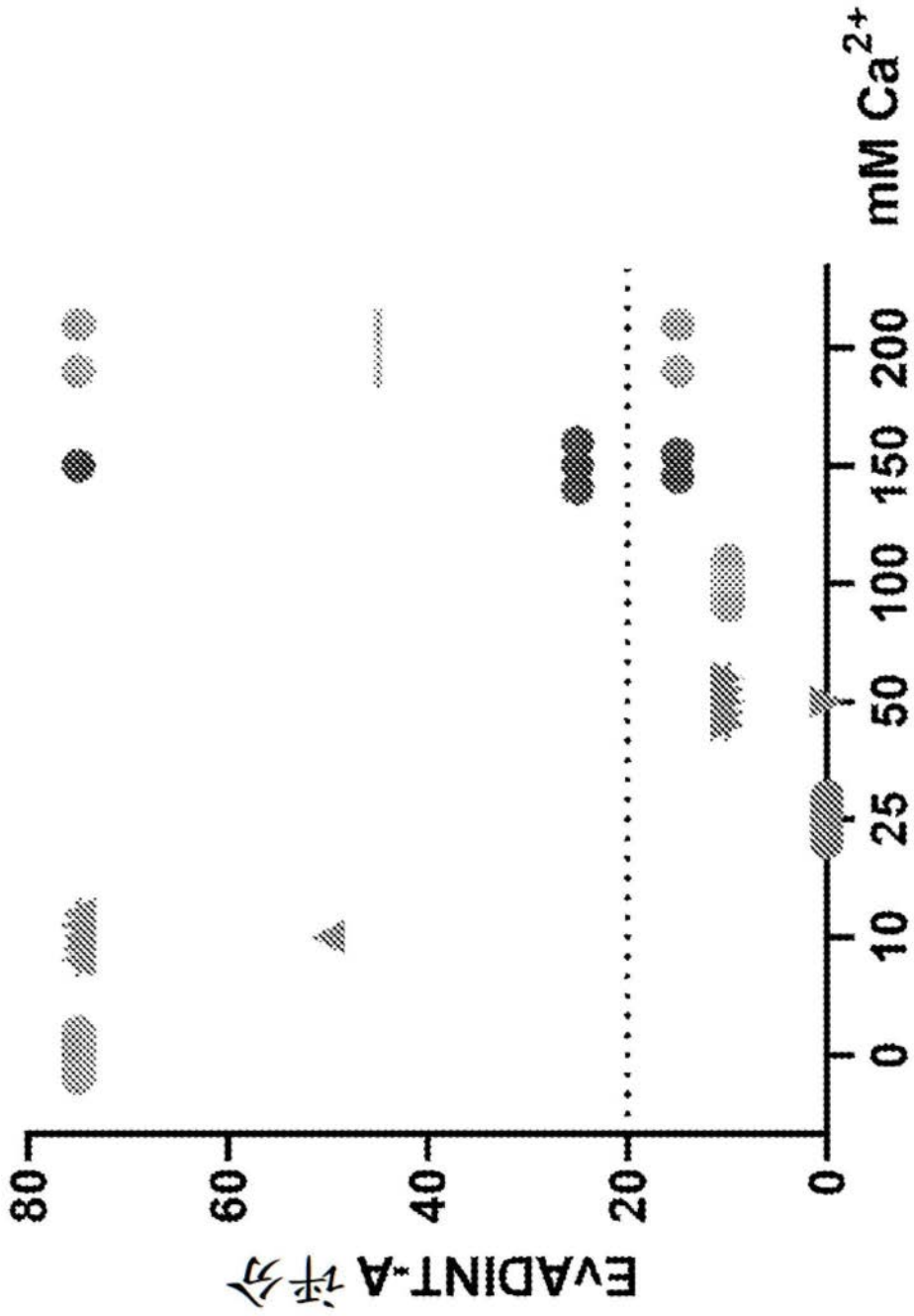


图3B

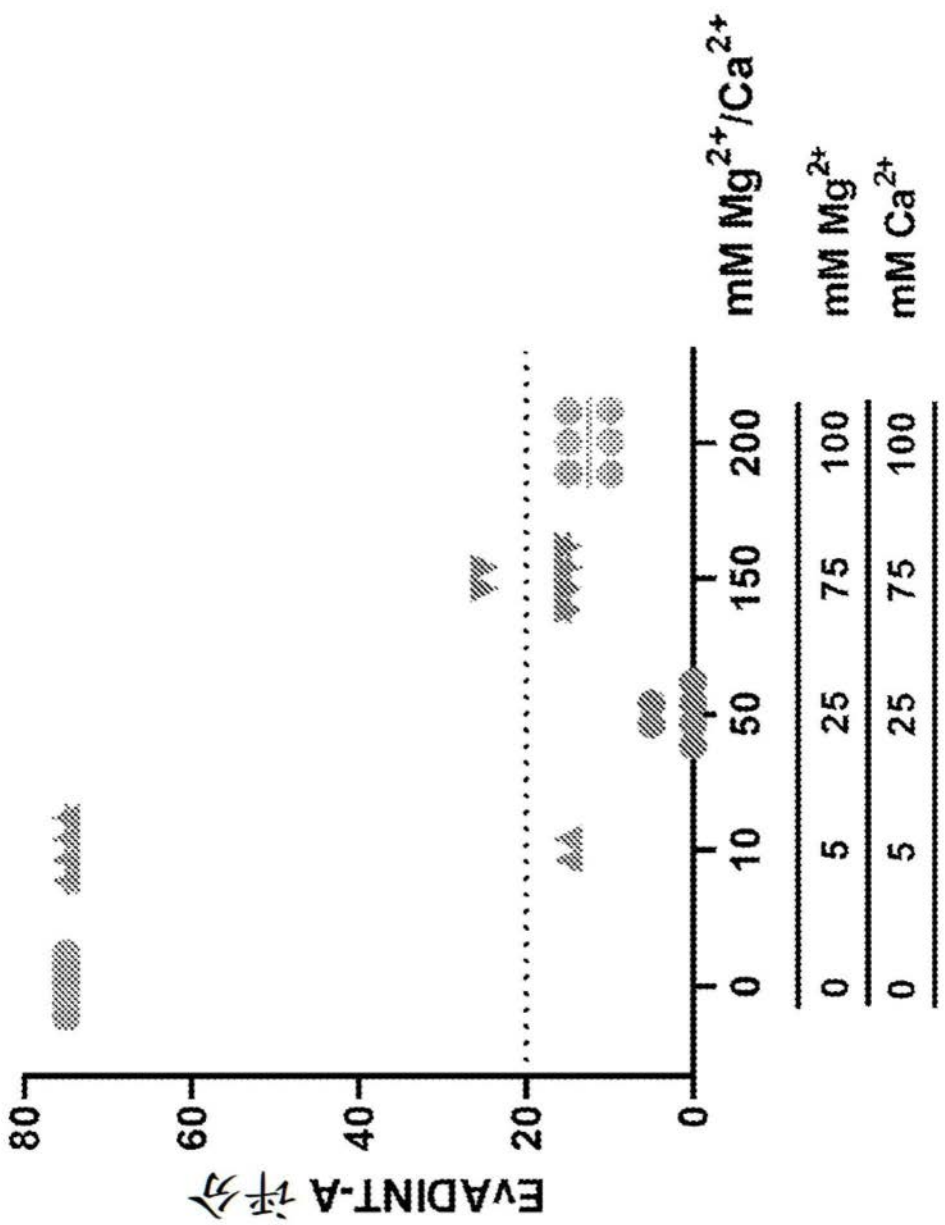

EvADINT-A 评分
80
60
40
20
0
0
10
50
150
200
mM Mg2+/Ca2+
0
5
25
75
100
mM Mg2+
0
5
25
75
100
mM Ca2+

图3C

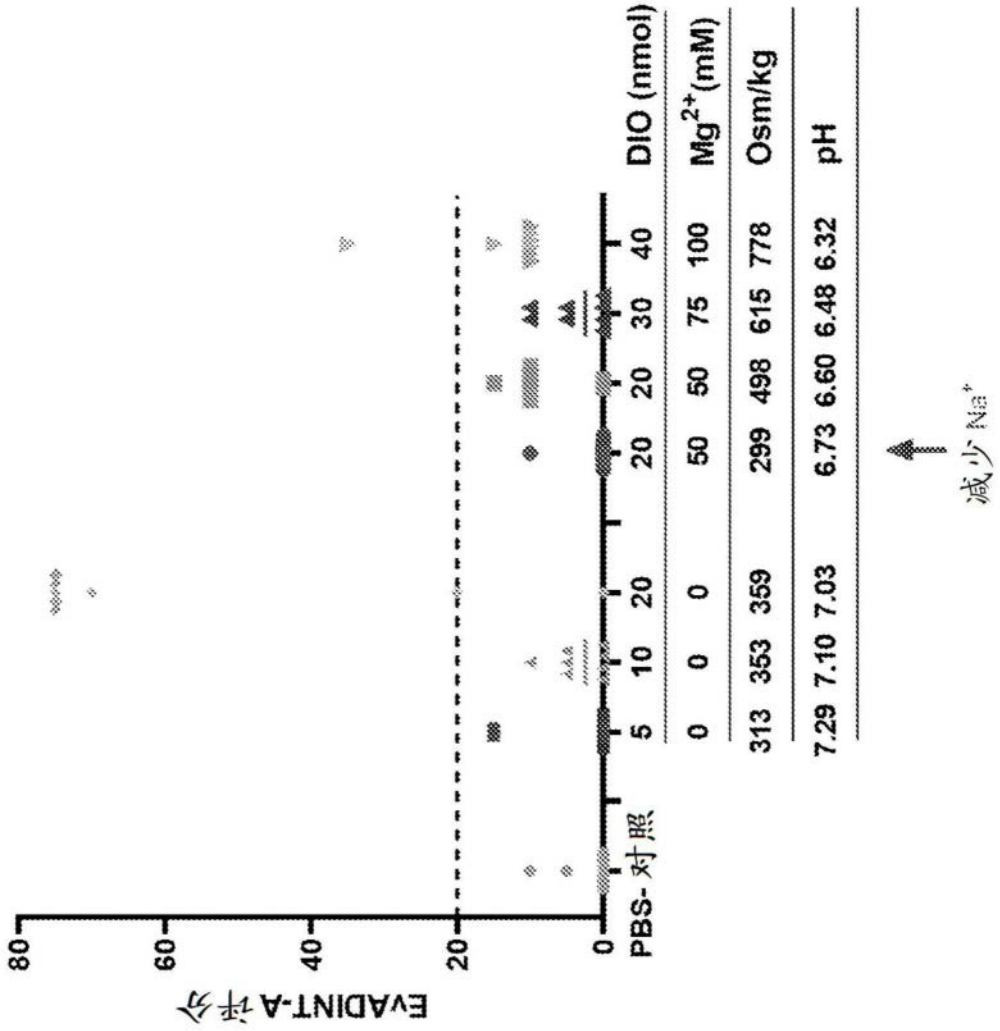

EVADINT-A 评分
80
60
40
20
0
PBS-对照
5
10
20
20
30
40
DIO (nmol)
0
0
0
50
75
100
Mg^{2+}(mM)
313
353
359
299
615
778
Osm/kg
7.29
7.10
7.03
6.73
6.48
6.32
pH
减少 Na^+

图3D