



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118202048 A

(43) 申请公布日 2024.06.14

(21) 申请号 202280060503.0

(22) 申请日 2022.07.05

(30) 优先权数据

63/218,833 2021.07.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/073426 2022.07.05

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/283546 EN 2023.01.12

(71) 申请人 斯威齐治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 韩思平 罗伯特·达夫

丽莎·谢勒

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

C12N 15/111 (2006.01)

G07H 21/00 (2006.01)

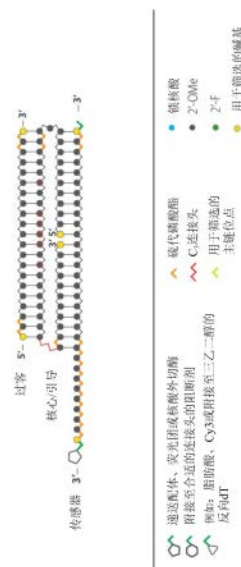
权利要求书4页 说明书41页
序列表(电子公布) 附图19页

(54) 发明名称

条件可激活核酸复合物

(57) 摘要

本文提供的公开内容包括条件可激活小干扰RNA (siRNA) 复合物、组分、组合物以及相关的方法和系统。siRNA复合物可以通过该核酸复合物的传感器核酸链中的序列在与输入核酸链(例如对靶细胞特异的生物标志物基因的mRNA) 互补结合时被条件激活。激活的核酸复合物可以释放由核心核酸链和过客核酸链形成的有效RNAi双链体,该双链体可以特异性抑制靶RNA。



1. 一种核酸复合物,包含:
第一核酸链,所述第一核酸链包含20-70个连接的核苷;
第二核酸链,所述第二核酸链与所述第一核酸链的中心区域结合以形成第一核酸双链体;以及
第三核酸链,所述第三核酸链与所述第一核酸链的5'区域和3'区域结合以形成第二核酸双链体,其中所述第三核酸链包含突出部分,其中所述突出部分不与所述第一核酸链互补并且能够与输入核酸链结合以引起所述第三核酸链从所述第一核酸链置换,
其中所述第一核酸链的中心区域包含与靶RNA互补的序列,其中所述序列长度为10-35个核苷。
2. 根据权利要求1所述的核酸复合物,其中与所述靶RNA互补的序列长度为10-21个核苷酸。
3. 根据权利要求1-2中任一项所述的核酸复合物,其中所述第二核酸链与所述第一核酸链的中心区域中的19-25个连接的核苷酸结合以形成所述第一核酸双链体。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的核酸复合物,其中所述第一核酸双链体不包含Dicer裂解位点。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的核酸复合物,其中所述核酸复合物不包含Dicer裂解位点。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的核酸复合物,其中所述第一核酸链的中心区域经由5'接头与所述第一核酸链的5'区域连接。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的核酸复合物,其中所述第一核酸链的中心区域经由3'接头与所述第一核酸链的3'区域连接。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的核酸复合物,其中所述5'接头、所述3'接头或两者包含C₃ 3-碳接头、核苷酸、修饰的核苷酸、或抗核酸外切酶裂解的部分或其组合。
9. 根据权利要求8所述的核酸复合物,其中所述修饰的核苷酸是2'-O-甲基核苷酸或2'-F核苷酸。
10. 根据权利要求1-7中任一项所述的核酸复合物,其中所述5'接头包含以下或是以下:C₃ 3-碳接头、2'-O-甲基核苷酸、2'-F核苷酸、具有当处于单链形式时可被核酸外切酶裂解的磷酸二酯5'和3'连接的核苷酸或其组合。
11. 根据权利要求10所述的核酸复合物,其中所述3'接头是C₃ 3-碳接头。
12. 根据权利要求1-7中任一项所述的核酸复合物,其中所述3'接头包含C₃ 3-碳接头、核苷酸、修饰的核苷酸、当处于单链形式时抗核酸外切酶裂解的部分或其组合。
13. 根据权利要求12所述的核酸复合物,其中所述3'接头包含2'-O-甲基核苷酸或者是2'-O-甲基核苷酸,并且其中所述2'-O-甲基核苷酸任选地是2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基尿苷或2'-O-甲基胞苷。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的核酸复合物,其中所述第二核酸链与所述第一核酸链的中心区域完全互补,从而在所述第一核酸双链体中的第二核酸链的5'末端和3'末端形成平端。
15. 根据权利要求1-13中任一项所述的核酸复合物,其中所述第二核酸链在所述第一核酸双链体中的3'末端或5'末端或两者处不具有突出部分。

16. 根据权利要求1-13中任一项所述的核酸复合物,其中所述第二核酸链在所述第一核酸双链体中具有3'突出部分、5'突出部分或两者。

17. 根据权利要求16所述的核酸复合物,其中所述第二核酸链具有3'突出部分,并且所述3'突出部分长度为1至5个核苷。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的核酸复合物,其中所述第一核酸链的中心区域的5'末端、所述第一核酸链的中心区域的3'末端或两者包含至少一个硫代磷酸酯核苷间连键。

19. 根据权利要求1-17中任一项所述的核酸复合物,其中所述第一核酸链的中心区域的5'末端和所述第一核酸链的中心区域的3'末端中的每一个独立地包含一个或更多个硫代磷酸酯核苷间连键。

20. 根据权利要求1-17中任一项所述的核酸复合物,其中除了在所述中心区域的5'末端、3'末端或两者处的两个或三个核苷之间的核苷间连键以外,所述第一核酸链的中心区域不包含硫代磷酸酯核苷间连键。

21. 根据权利要求1-20中任一项所述的核酸复合物,其中(1)所述第一核酸链的中心区域、(2)所述第一核酸链的5'区域和(3)所述第一核酸链的3'区域中的一个或更多个的核苷中的至少80%、至少85%、至少90%或至少95%被化学修饰。

22. 根据权利要求1-20中任一项所述的核酸复合物,其中所述第一核酸链、所述第二核酸链和所述第三核酸链中的一个或更多个的核苷中的至少80%、至少85%、至少90%或至少95%被化学修饰。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的核酸复合物,其中所述核酸复合物的核苷中的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或全部被化学修饰。

24. 根据权利要求20-23中任一项所述的核酸复合物,其中所述化学修饰是为了抵抗核酸酶降解、为了提高所述核酸复合物的解链温度(T_m)或两者。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的核酸复合物,其中所述核酸复合物的核苷酸中的至少90%、至少95%或全部是非DNA和非RNA核苷酸。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的核酸复合物,其中所述第二核酸链的核苷中的至多5%、至多10%或至多15%是LNA。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的核酸复合物,其中所述碱基中的约10%-50%具有2'-4'桥接修饰。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的核酸复合物,其中所述碱基中的约10%-50%是锁核酸(LNA)或其类似物。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的核酸复合物,其中所述碱基中的约10%-50%包含2'-O-甲基修饰、2'-F修饰或两者。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的核酸复合物,其中所述第一核酸链中少于5%、少于10%、少于25%、少于50%的核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键。

31. 根据权利要求1-29中任一项所述的核酸复合物,其中所述第一核酸链不包含硫代磷酸酯核苷间连键。

32. 根据权利要求1-29中任一项所述的核酸复合物,其中(1)与所述5'连接头的3'相邻的1-3个核苷酸,和/或(2)与所述3'连接头的5'相邻的1-2个核苷酸,和/或(3)与所述3'连

接头的3'相邻的1-3个核苷酸之间的核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键。

33. 根据权利要求1-32中任一项所述的核酸复合物,其中所述输入核酸链是RNA。

34. 根据权利要求33所述的核酸复合物,其中所述靶RNA是mRNA、miRNA、非编码RNA、病毒RNA转录物、细胞RNA转录物或其组合。

35. 根据权利要求1-34中任一项所述的核酸复合物,其中所述第二核酸链的突出部分能够与所述输入核酸链结合以形成支点,从而引起所述第二核酸链从所述第一核酸链置换。

36. 根据权利要求1-35中任一项所述的核酸复合物,其中所述第二核酸链的突出部分的长度为5-20个核苷,并且任选地长度为9个核苷酸。

37. 根据权利要求1-36中任一项所述的核酸复合物,其中所述第三核酸链的突出部分的全部核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键。

38. 根据权利要求1-37中任一项所述的核酸复合物,其中所述第三核酸链的5'末端、3'末端或两者包含末端部分;并且任选地,所述末端部分包含配体、荧光团、核酸外切酶、脂肪酸、Cy3、附接至三乙二醇的反向dT或其组合。

39. 一种调节靶RNA的方法,包括:

使包含靶RNA的细胞与权利要求1-38中任一项所述的核酸复合物接触,其中输入链与所述第三核酸链的突出部分结合,引起所述第三核酸链从所述第一核酸链的置换,以使与所述靶RNA互补的序列释放到细胞中,从而调节所述靶RNA。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中使所述细胞与所述核酸复合物接触在体外、体内、离体或以其组合进行。

41. 根据权利要求39所述的方法,其中使所述细胞与所述核酸复合物的接触发生在受试者的身体内。

42. 根据权利要求39-41中任一项所述的方法,其中所述细胞是疾病细胞,并且任选地所述细胞是癌细胞。

43. 根据权利要求39-41中任一项所述的方法,其中所述细胞是神经元。

44. 一种治疗疾病或状况的方法,包括将权利要求1-38中任一项所述的核酸复合物施用于有相应需要的受试者,其中所述输入链与所述第三核酸链的突出部分结合,以引起所述第三核酸链从所述第一核酸链置换,以释放与靶RNA互补的序列,从而降低所述受试者中所述靶RNA的活性或来自所述靶RNA的蛋白质表达,以治疗所述疾病或状况。

45. 根据权利要求0所述的方法,其中所述疾病或状况是中枢神经系统(CNS)疾病或紊乱或癌症。

46. 根据权利要求39-45中任一项所述的方法,其中所述靶RNA是mRNA或miRNA。

47. 根据权利要求39-46中任一项所述的方法,其中所述核酸复合物经由脂质介导的递送系统,任选地经由脂质体、纳米颗粒或胶束被施用于受试者。

48. 根据权利要求39-46中任一项所述的方法,其中所述核酸复合物经由纳米颗粒、无机纳米颗粒、核酸脂质颗粒、聚合物纳米颗粒、类脂质纳米颗粒(LNP)、壳聚糖和菊粉纳米颗粒、环糊精纳米颗粒、碳纳米管、脂质体、胶束结构、衣壳、聚合物、聚合物基质、水凝胶、树枝状大分子、核酸纳米结构、外来体、GalNAc缀合的蜂毒肽样肽或其组合被施用于受试者。

49. 根据权利要求39-48中任一项所述的方法,其中所述核酸复合物经由皮下注射或静

脉注射被施用于有相应需要的受试者。

50. 根据权利要求39-49中任一项所述的方法,其中所述核酸复合物以约0.1nM-10nM, 任选地约0.1nM-1.0nM的浓度被施用于有相应需要的受试者。

条件可激活核酸复合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119(e) 要求2021年7月6日提交的美国临时专利申请第63/218,833号的权益,其内容出于所有目的通过引用以其整体并入本文。

[0003] 对序列表的引用

[0004] 本申请连同电子格式的序列表一起提交。序列表作为题为75EN-329791-W0的文件提供,该文件创建于2022年7月3日,大小是200千字节。电子格式的序列表的信息通过引用以其整体并入本文。

[0005] 背景

[0006] 领域

[0007] 本公开内容大体上涉及核酸领域,例如条件可激活小干扰RNA复合物。

[0008] 对相关技术的描述

[0009] 尽管在动态核酸纳米技术和生物分子计算领域出现了新的发展,但开发可以使用核酸逻辑开关来感测RNA转录物(诸如mRNA和miRNA),从而将RNA干扰(RNAi)疗法限制在疾病相关细胞的特定群体的靶向RNAi疗法仍然是一个挑战。特别是,需要开发具有改进的药物效力、敏感性和稳定性、低设计复杂性和低剂量要求的靶向的和条件激活的RNAi疗法。

[0010] 概述

[0011] 本文的公开内容包括一种核酸复合物,包含:包含20-70个连接的核苷的第一核酸链;与第一核酸链的中心区域结合以形成第一核酸双链体的第二核酸链;以及与第一核酸链的5'区域和3'区域结合以形成第二核酸双链体的第三核酸链,其中第三核酸链包含突出部分,其中突出部分不与第一核酸链互补,并且能够与输入核酸链结合以引起第三核酸链从第一核酸链置换。在一些实施方案中,第一核酸链的中心区域包含与靶RNA互补的序列,其中该序列长度为10-35个核苷。

[0012] 与靶RNA互补的序列的长度可以是,例如10-21个核苷酸。在一些实施方案中,第二核酸链与第一核酸链的中心区域的19-25个连接的核苷酸结合,以形成第一核酸双链体。在一些实施方案中,第一核酸双链体、核酸复合物或两者不包含Dicer裂解位点。

[0013] 第一核酸链的中心区域可以例如经由5'连接头与第一核酸链的5'区域连接。第一核酸链的中心区域可以例如经由3'连接头与第一核酸链的3'区域连接。在一些实施方案中,5'连接头、3'连接头或两者包含C₃ 3-碳接头、核苷酸、修饰的核苷酸或抗核酸外切酶裂解的部分或其组合。在一些实施方案中,修饰的核苷酸是2'-O-甲基核苷酸或2'-F核苷酸。在一些实施方案中,5'连接头包含以下或是以下:C₃ 3-碳接头、2'-O-甲基核苷酸、2'-F核苷酸、具有当处于单链形式时可被核酸外切酶裂解的磷酸二酯5'和3'连接的核苷酸或其组合。3'连接头可以是,例如C₃ 3-碳接头。在一些实施方案中,3'连接头包含C₃ 3-碳接头、核苷酸、修饰的核苷酸、当处于单链形式时抗核酸外切酶裂解的部分或其组合。在一些实施方案中,3'连接头包含2'-O-甲基核苷酸或是2'-O-甲基核苷酸,并且其中2'-O-甲基核苷酸任选地为2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基尿苷或2'-O-甲基胞苷。

[0014] 在一些实施方案中,第二核酸链与第一核酸链的中心区域完全互补,从而在第一

核酸双链体中的第二核酸链的5'和3'末端形成平端。在一些实施方案中,第二核酸链在第一核酸双链体中的3'末端或5'末端或两者不具有突出部分。在一些实施方案中,第二核酸链在第一核酸双链体中具有3'突出部分、5'突出部分或两者。在一些实施方案中,第二核酸链具有3'突出部分,并且3'突出部分的长度为1-5个核苷。在一些实施方案中,第一核酸链中心区域的5'末端、第一核酸链的中心区域的3'末端或两者包含至少一个硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,第一核酸链的中心区域的5'末端和第一核酸链的中心区域的3'末端中的每一个独立地包含一个或更多个硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,除了在中心区域的5'末端、3'末端或两者处的两个或三个核苷之间的核苷间连键以外,第一核酸链的中心区域不包含硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,(1)第一核酸链的中心区域、(2)第一核酸链的5'区域和(3)第一核酸链的3'区域中的一个或更多个的至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的核苷被化学修饰。在一些实施方案中,第一核酸链、第二核酸链和第三核酸链中的一条或更多条的至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的核苷被化学修饰。在一些实施方案中,核酸复合物的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或全部的核苷被化学修饰。化学修饰可以是,例如为了抵抗核酸酶降解、为了提高核酸复合物的解链温度(T_m)或两者。

[0015] 在一些实施方案中,核酸复合物的至少90%、至少95%或全部的核苷酸是非DNA和非RNA核苷酸。在一些实施方案中,第二核酸链的至多5%、至多10%或至多15%的核苷是LNA。在一些实施方案中,约10%-50%的碱基具有2'-4'桥接修饰。在一些实施方案中,约10%-50%的碱基是锁核酸(LNA)或其类似物。在一些实施方案中,约10%-50%的碱基包含2'-O-甲基修饰、2'-F修饰或两者。在一些实施方案中,第一核酸链中少于5%、少于10%、少于25%、少于50%的核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,第一核酸链不包含硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,(1)邻近5'连接头的3'的一至三个核苷酸,和/或(2)邻近3'连接头的5'的一个或两个核苷酸,和/或(3)邻近3'连接头的3'的一至三个核苷酸之间的核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键。

[0016] 输入核酸链可以是RNA。在一些实施方案中,靶RNA是细胞RNA转录物。在一些实施方案中,靶RNA是mRNA、miRNA、非编码RNA、病毒RNA转录物或其组合。

[0017] 在一些实施方案中,第二核酸链的突出部分能够与输入核酸链结合以形成支点,从而引起第二核酸链从第一核酸链置换。在一些实施方案中,第二核酸链的突出部分长度为5至20个核苷,并且任选地长度为9个核苷酸。在一些实施方案中,第三核酸链的突出部分的全部核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,第三核酸链的5'末端、3'末端或两者包含末端部分。在一些实施方案中,末端部分包含配体、荧光团、核酸外切酶、脂肪酸、Cy3、附接至三乙二醇的反向dT或其组合。

[0018] 本文提供的公开内容包括一种调节靶RNA的方法,其中该方法包括:使包含靶RNA的细胞与本文公开的任何一种或更多种核酸复合物接触,其中输入链与第三核酸链的突出部分结合,以引起第三核酸链从第一核酸链置换,以将与靶RNA互补的序列释放到细胞中,从而调节靶RNA。

[0019] 使细胞与核酸复合物接触可以在体外、体内、离体或其组合进行。在一些实施方案中,细胞与核酸复合物接触发生在受试者身体内。在一些实施方案中,细胞是疾病细胞,并且任选地,细胞是癌细胞。在一些实施方案中,细胞是神经元。

[0020] 本文提供的公开内容还包括一种治疗疾病或状况的方法,其中该方法包括向有相应需要的受试者施用本文公开的任何一种或更多种核酸复合物,其中输入链与第三核酸链的突出部分结合,以引起第三核酸链从第一核酸链置换,释放出与靶RNA互补的序列,从而降低受试者中靶RNA的活性或来自靶RNA的蛋白质的表达,以治疗疾病或状况。在一些实施方案中,疾病或状况是中枢神经系统(CNS)疾病或紊乱或癌症。在一些实施方案中,靶RNA是mRNA或miRNA。在一些实施方案中,核酸复合物经由脂质介导的递送系统,任选地经由脂质体、纳米颗粒或胶束施用于受试者。在一些实施方案中,核酸复合物经由纳米颗粒、无机纳米颗粒、核酸脂质颗粒、聚合物纳米颗粒、类脂质纳米颗粒(LNP, lipidoid nanoparticles)、壳聚糖和菊粉纳米颗粒、环糊精纳米颗粒、碳纳米管、脂质体、胶束结构、衣壳、聚合物、聚合物基质、水凝胶、树枝状大分子、核酸纳米结构、外来体(exosomes)、GalNAc缀合的蜂毒肽样肽或其组合施用于受试者。在一些实施方案中,核酸复合物经由皮下注射施用于有相应需要的受试者。在一些实施方案中,权利要求1至40中任一项所述的核酸复合物经由静脉注射施用于有相应需要的受试者。在一些实施方案中,核酸复合物以约0.1nM-10nM,任选地约0.1nM-1.0nM的浓度施用于有相应需要的受试者。

[0021] 本说明书中描述的主题的一种或更多种实施方式的细节在附图和以下描述中阐述。根据本说明书、附图和权利要求书,其他特征、方面和优点将变得明显。本发明概述和以下详细描述均不旨在限定或限制本发明主题的范围。

[0022] 附图简述

[0023] 图1图示了来自设计1和设计2的两种非限制性示例性核酸复合物构建体的示意图。

[0024] 图2图示了具有组分链(传感器核酸链、核心核酸链和过客核酸链)和化学修饰模式的非限制性示例性核酸复合物的示意图。

[0025] 图3图示了非限制性示例性核酸复合物构建体的示意图,其中用于筛选的区域以黄色高亮显示。

[0026] 图4A是示出了传感器链与RNA标志物碱基配对后靶细胞中核酸复合物的激活的示意图。图4B是示出了传感器核酸链从核心核酸链置换和核心核酸链的突出部分降解后活性RNAi双链体形成的示意图。

[0027] 图5A和图5B示出了具有相同过客链但不同核心链的两种非限制性示例性核酸复合物构建体的序列图。过客链v3p1和过客链1:SEQ ID NO:2;核心链v3c1:由C3间隔区连接的SEQ ID NO:3-5;核心链v3c5:SEQ ID NO:11。

[0028] 图6示出了两个阳性对照构建体的序列图。HTT Guide 1:SEQ ID NO:21;HTT Pass 1:SEQ ID NO:22;HTT Guide 2:SEQ ID NO:23;HTT Pass 2:SEQ ID NO:24。

[0029] 图7示出了图5中示出的并在图8中示出的靶蛋白表达中使用的具有与示例性核心链(包括两个C3接头的v3c1)装配的不同过客链(V3P1、V3P2、V3P3、V3P4、V3P5、V3P6、V3P7、V3P8和V3P9)的多种siRNA复合物变体。

[0030] 图8示出了使用在图7中示出的siRNA复合物设计变体产生的靶蛋白表达数据的图形表示。

[0031] 图9示出了具有与在图5中示出的示例性核心链(不包括C3接头的v3c5)装配的不同过客链(V3P1、V3P2、V3P3、V3P4、V3P5、V3P6、V3P7、V3P8和V3P9)的多种siRNA复合物变体。

[0032] 图10示出了使用在图9中示出的siRNA复合物变体产生的靶蛋白表达数据的图形表示。

[0033] 图11A和图11B示出了多种示例性核酸复合物构建体的序列图,每个构建体具有相同的过客链(过客链1)和相同的传感器链(Mir23 Sensor 1),但具有不同的核心链(核心链v3c1、核心链v3c2、核心链v3c3、核心链v3c4、核心链v3c5和核心链v3c6,它们在图13-图14及其描述中分别被称为C1、C2、C3、C4、C5、C6)。在表1中列出了图11A和图11B示出的序列。

[0034] 图12示出了多种核酸复合物构建体的非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)。

[0035] 图13示出了不同浓度的双链装配体的RNAi活性,每个双链装配体具有相同的过客链v3p1和不同的核心链(C1、C2、C3、C4、C5和C6)。

[0036] 图14示出了三种不同浓度的三链装配体的RNAi活性,每个三链装配体具有相同的过客链v3p1、相同的传感器链(Mir23 Sensor 1)和不同的核心链(C1、C2、C3、C4、C5和C6)。

[0037] 图15示出了本文公开的非限制性示例性核酸复合物构建体(上方:V3C3a)和部分修饰的核酸复合物(下方:G1C1S1)的序列图。在表2中列出了图15中示出的序列。

[0038] 图16示出了与在图15中示出的部分修饰的双链构建体(G1C1 siRNA)和部分修饰的三链构建体(G1C1S1)相比,三种不同浓度的示例性双链核酸复合物构建体(V3C3a siRNA)和三链核酸复合物构建体(V3C3a和V3C3b)的RNAi活性。

[0039] 贯穿附图,可以重复使用附图标记来指示所提及的要素之间的对应关系。提供附图以图示出本文描述的示例性实施方案,而不旨在限制本公开内容的范围。

[0040] 详细描述

[0041] 在以下详细描述中,参考了构成本文的一部分的附图。在附图中,除非上下文另有指示,否则相似的符号通常标识相似的部件。在详细描述、附图和权利要求书中描述的说明性实施方案不意味着是限制性的。在不脱离本文提出的主题的精神或范围的情况下,可以利用其他实施方案,并且可以做出其他改变。将容易理解的是,如本文一般描述的以及附图中图示的本公开内容的方面能够以各种不同的配置来布置、替换、组合、分离和设计,所有这些都都在本文中明确设想并且构成本公开内容的一部分。

[0042] 本文提及的所有专利、公布的专利申请、其他出版物和来自GenBank的序列,以及其他数据库关于相关技术通过引用以其整体并入本文。

[0043] RNA干扰(RNAi)是大多数真核生物中保守的一种内在细胞机制,有助于调节对细胞命运决定、分化、存活和防御病毒感染至关重要的基因的表达。研究人员通过设计用于序列特异性基因沉默的合成的双链RNA来利用这种自然机制。动态核酸纳米技术和生物分子计算领域的新兴发展也为设计可编程RNAi剂提供了一种概念性的方法。然而,在开发可以使用核酸逻辑开关来感测RNA转录物(诸如mRNA和miRNA),以便将RNA沉默限制在疾病相关细胞的特定群体中并使正常组织免受毒副作用的靶向RNAi疗法方面仍然存在挑战。重大挑战包括抑制不良的背景药物活性、弱激活状态药物效力、输入和输出序列重叠、高设计复杂性、短寿命(<24小时)和高所需装置浓度(>10nM)。

[0044] 本文提供的公开内容包括条件可激活小干扰RNA(siRNA)复合物、组分、组合物和相关的方法和系统。当由输入核酸链(例如对疾病相关细胞特异的疾病生物标志物基因)与siRNA复合物的互补结合触发时,条件可激活siRNA复合物可以从未激活状态转换至激活状态,从而激活siRNA复合物的RNA干扰活性以靶向特定的靶RNA(例如待沉默的RNA)。本文描

述的核酸复合物可以介导条件激活的RNA干扰活性以沉默疾病相关细胞的特定群体中的靶RNA,具有在低浓度的改进的效力以及可以减少脱靶效应的改进的特异性。

[0045] 本文的公开内容包括核酸复合物。核酸复合物包含第一核酸链(例如核心核酸链),与第一核酸链的中心区域结合以形成第一核酸双链体(例如RNAi双链体)的第二核酸链(例如过客核酸链),和与核心核酸链的5'区域和3'区域结合以形成第二核酸双链体(例如传感器双链体)的第三核酸链(例如传感器核酸链)。传感器核酸链包含突出部分,其中突出部分不与第一核酸链互补,并且能够与输入核酸链结合以引起传感器核酸链从核心核酸链的置换。核心核酸链的中心区域包含与靶RNA互补的序列。该序列长度可为10-35个核苷。第一核酸链(例如,核心核酸链)可包含20-70个连接的核苷。

[0046] 本文的公开内容还包括一种调节靶RNA的方法。该方法包括使包含靶RNA的细胞与本文描述的核酸复合物接触。当检测到输入核酸链时,输入核酸链可以与传感器核酸链的突出部分结合,以引起传感器核酸链从核心核酸链的置换,以将与靶RNA互补的序列释放到细胞中,从而调节靶RNA。

[0047] 本文的公开内容还包括一种治疗疾病或状况的方法。该方法包括将本文描述的核酸复合物施用于有相应需要的受试者。当检测到输入核酸链时,输入链可以与传感器核酸链的突出部分结合,以引起传感器核酸链从核心核酸链置换,以释放与靶RNA互补的序列,从而降低受试者中靶RNA的活性或来自靶RNA的蛋白质的表达,以治疗疾病或状况。

[0048] 定义

[0049] 除非另外定义,否则本文使用的技术术语和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。参见,例如,Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,第2版,J.Wiley&Sons (New York,NY 1994); Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor,NY 1989)。出于本公开内容的目的,以下术语在下文定义。

[0050] 如本文使用的,术语“核苷”指的是具有与核糖或脱氧核糖共价连接的嘌呤或嘧啶碱基的分子。示例性核苷包括腺苷、鸟苷、胞苷、尿苷和胸苷。

[0051] 术语“核苷酸”指的是具有以酯连键连接至糖部分的一个或多个磷酸基团的核苷。示例性核苷酸包括核苷单磷酸、二磷酸和三磷酸。

[0052] 术语“多核苷酸”和“核酸分子”在本文中可互换使用,并且指的是经由5'和3'碳原子之间的磷酸二酯连键连接在一起的核苷酸的聚合物。

[0053] 术语“RNA”或“RNA分子”或“核糖核酸分子”指的是核糖核苷酸的聚合物。术语“DNA”或“DNA分子”或“脱氧核糖核酸分子”指的是脱氧核糖核苷酸的聚合物。DNA和RNA可以被天然合成(例如,分别通过DNA复制或DNA的转录)。RNA可以被转录后修饰。DNA和RNA也可以被化学合成。DNA和RNA可以是单链的或多链的(例如,双链的或三链的)。“mRNA”或“信使RNA”是与基因的DNA链中的一条互补的单链RNA分子。“miRNA”或“microRNA”是一种在RNA沉默和基因表达的转录后调节中起作用的小的单链非编码RNA分子。

[0054] 术语“RNA类似物”指的是与相应的未改变或未修饰的RNA相比,具有至少一个改变的或修饰的核苷酸的多核苷酸。核苷酸可以保持与相应的未改变的或未修饰的RNA相同或相似的性质或功能,诸如形成碱基对。

[0055] 单链多核苷酸具有5'末端(或5'端)和3'末端(或3'端)。单链多核苷酸的术语“5'

端”、“5' 末端”和“3' 端”、“3' 末端”表示单链多核苷酸的末端残基,并基于每个末端上游离基团的性质来区分。单链多核苷酸的5' -末端表示末端(5' 末端)具有脱氧核糖或核糖的糖环中的第五个碳原子的单链多核苷酸的末端残基。单链多核苷酸的3' -末端表示在末端(3' 末端)终止于核苷酸或核苷的糖环中第三个碳原子的羟基基团的残基。在各种情况下,5' 末端和3' 末端可以被化学或生物修饰,例如通过添加官能团或其他化合物,如本技术人员所理解的。

[0056] 如本文使用的,术语“互补结合”和“互补地结合”指的是两条单链彼此碱基配对以形成核酸双链体或双链核酸。本文使用的术语“碱基对”表示遵循Watson-Crick碱基配对规则在相对的互补多核苷酸链或序列上的碱基对之间形成氢键。例如,在规范的Watson-Crick DNA碱基配对中,腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)形成碱基对,并且鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)形成碱基对。在RNA碱基配对中,腺嘌呤(A)与尿嘧啶(U)形成碱基对,并且鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)形成碱基对。只要能够形成稳定的双链双链体(double-stranded duplex),两条单链之间一定百分比的错配是允许的。在一些实施方案中,互补结合的两条链可以具有可以是、大约是、至多是或至多大约是以下的错配:1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%或50%。

[0057] 如本文所使用的,术语“RNA干扰”、“RNA干扰”或“RNAi”指的是RNA的选择性细胞内降解。RNAi可以天然发生在细胞中,以去除外源RNA(例如,病毒RNA)。天然RNAi通过从游离dsRNA裂解的片段继续进行,这些片段将降解机制导向其他类似的RNA序列。可选地,RNAi可以由人工启动,例如以沉默靶基因的表达。

[0058] 如本文使用的,术语“小干扰RNA”和“siRNA”指的是当siRNA在与靶基因相同的细胞中被激活时,能够减少或抑制基因或靶基因的表达的RNA或RNA类似物。本文使用的siRNA可以包含天然存在的核酸碱基和/或化学修饰的核酸碱基(RNA类似物)。

[0059] 核酸复合物

[0060] 本文提供的公开内容包括一种核酸复合物,其可以通过核酸复合物的传感器核酸链中的序列在与输入核酸链(例如,对靶细胞(例如,疾病相关细胞)特异的疾病生物标志物基因的mRNA)互补结合时被条件激活。激活的核酸复合物可以释放由核心核酸链和过客核酸链形成的有效RNAi双链体,该双链体可以特异性地抑制或沉默靶RNA。靶RNA可以具有独立于输入核酸链的序列。靶RNA可以来自与输入核酸链来自的基因不同的基因。靶RNA可以来自与输入核酸链来自的基因相同的基因。

[0061] 图1图示了两种非限制性示例性核酸复合物构建体的示意图。在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物包含如图2的非限制性实施方案中示出的核心核酸链(例如第一核酸链)、过客核酸链(例如第二核酸链)和传感器核酸链(例如第三核酸链)。这三条链可以彼此碱基配对,以形成例如RNAi双链体(例如第一核酸双链体)和传感器双链体(例如第二核酸双链体)。核心核酸链、过客核酸链和传感器核酸链中的一条或更多条可以是包含修饰的核苷酸的RNA类似物。

[0062] 本文使用的术语“核酸双链体”指的是通过互补结合而彼此结合的两条单链多核苷酸。核酸双链体可以形成螺旋结构,诸如双链RNA分子,其主要通过两条单链多核苷酸之

间碱基对的非共价键合和通过碱基堆叠相互作用来维持。

[0063] 核心核酸链可以包含5'区域、3'区域和5'区域与3'区域之间的中心区域。核心核酸链的中心区域可以经由连接头与核心核酸链的5'区域和/或3'区域连接。在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域经由5'连接头与核心核酸链的5'区域相连。在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域经由3'连接头与核心核酸链的3'区域连接。核心核酸链的中心区域与过客核酸链互补结合,以形成RNAi双链体(例如第一核酸双链体)。并非核心核酸链的整个序列与过客核酸链互补结合。例如,核心核酸链的5'区域和3'区域不与过客核酸链互补结合。

[0064] 核心核酸链的中心区域可以包含与靶核酸(例如待沉默的RNA)互补的序列。核酸复合物的核心核酸链因此充当引导链(反义链),并用于与靶RNA进行碱基配对。过客核酸链可以因此包含与相同靶核酸同源的序列。

[0065] 当激活核酸复合物(例如与输入核酸链结合)时,释放的RNAi双链体可以通过靶核酸和核心核酸链的中心区域之间的结合与靶核酸互补结合。在一些实施方案中,核心核酸链中与靶RNA互补的序列长度可以是大约10-35个核苷。在一些实施方案中,核心核酸链包含20-70个连接的核苷。

[0066] 传感器核酸链与核心核酸链的5'区域和3'区域互补结合以形成传感器双链体(例如第二核酸双链体)。传感器核酸链不与核心核酸链的中心区域结合,也不与过客核酸链结合。

[0067] 传感器核酸链可以包含突出部分。本文使用的术语“突出部分”指的是在双链多核苷酸(例如双链体)的一端突出的一串不配对核苷酸。突出部分可以在多核苷酸的任一链上,并且可以被包含在链的3'末端(3'突出部分)或在链的5'末端(5'突出部分)。突出部分可以位于传感器核酸链的3'末端。传感器核酸链的突出部分不与核心核酸链的任何区域结合。

[0068] 传感器核酸链可以包含能够与输入核酸链(例如,对靶细胞(包括疾病相关细胞)特异的疾病生物标志物基因的mRNA)结合的序列。当激活时,传感器核酸链与输入核酸链的结合可引起传感器核酸链从核心核酸链的置换和随后的释放,从而释放有效的RNAi双链体并开启RNAi双链体的RNA干扰活性。在缺乏输入核酸链或可检测量的输入核酸链的情况下,本文描述的核酸复合物保持在未激活状态(关闭),并且不会发生传感器核酸链从核心核酸链的置换。因此,输入核酸链可以作为激活(开启)核酸复合物(例如RNAi双链体)的RNA干扰活性的触发器。

[0069] 在不同的实施方案中,本文描述的核酸复合物的RNAi双链体的长度可以不同。在一些实施方案中,RNAi双链体的长度可以是10-35个核苷酸,任选地是10-30个核苷酸。例如,RNAi双链体的长度可以是10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个或这些值中任何两个的范围的核苷酸。在一些实施方案中,RNAi双链体的长度可以是19-25个核苷酸。在一些实施方案中,RNAi双链体的长度可以是17-22个核苷酸。在一些实施方案中,RNAi双链体的长度为约21个核苷酸。

[0070] 在不同的实施方案中,本文描述的核酸复合物的传感器双链体的长度可以不同。在一些实施方案中,传感器双链体的长度可以是10-35个核苷酸。例如,传感器双链体的长

度可以是10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个,这些值中任何两个的范围的核苷酸。

[0071] 在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物不具有dicer裂解位点,并且因此由核酸复合物介导的RNAi干扰可以绕过dicer介导的裂解。

[0072] 如对熟练技术人员将明显的,Dicer是RNA酶III家族中的核糖内切核酸酶,其可以通过将双链RNA(dsRNA)分子裂解成长度为约20-25个核苷酸的dsRNA短片段来启动RNAi途径。

[0073] 在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物与公布为WO 2020/033938的国际申请中公开的条件激活的小干扰RNA(Cond-siRNA)的区别在于,本文描述的核酸复合物可以绕过Dicer加工。Cond-siRNA先前已经被证明可以在体外控制RNAi活性。然而,Cond-siRNA需要在特定位点的Dicer裂解(参见,例如,图1中的设计1)来激活RNAi。此外,经由Dicer结合和活性的空间位阻实现了对关闭状态RNAi活性的抑制。

[0074] 在一些实施方案中,本文公开的核酸复合物具有阻碍Dicer结合的结构特征。在一些实施方案中,RNAi双链体不产生Dicer底物。例如,由过客核酸链和核心核酸链的中心区域形成的RNAi双链体不具有3'和/或5'突出部分,而是形成平端,这可以使得过客核酸链不利于Dicer结合。在一些实施方案中,过客核酸链具有大约17-22个核苷酸的长度(例如,21个核苷酸),使得其短到足以绕过Dicer裂解。在一些实施方案中,过客核酸链在过客核酸链的3'和/或5'末端不具有富含G/C的碱基。在一些实施方案中,过客核酸链与末端部分附接以避免Dicer结合。

[0075] 在本文公开的核酸复合物的一些实施方案中,向核酸复合物的一条或更多条链中引入大量的或完全的化学修饰以增强体内效力、药物活性持续时间和背景RNAi活性的抑制。siRNA结构域和传感器结构域的完全化学修饰会阻碍Dicer裂解,因为已知化学修饰诸如2'-O-甲基碱基和硫代磷酸酯主链会阻碍核酸内切酶的活性。为了允许siRNA结构域的完全化学修饰,与原始Cond-siRNA相比,改变修饰的核酸复合物构建体上的核心链和过客链的几何形状和功能是有利的。

[0076] 在一些实施方案中,本文公开的修饰的核酸复合物中的siRNA结构域双链体被缩短,使得核酸复合物的siRNA结构域不需要经历通过Dicer的核酸内切酶裂解就可以获得有活性的RNAi活性。在一些实施方案中,与Cond-siRNA构建体中的siRNA结构域双链体为23个碱基对相比,修饰的核酸复合物的siRNA结构域双链体为约21个碱基对。

[0077] 为了允许传感器在关闭状态下仍然阻断RNAi活性,siRNA的引导链(与靶向的mRNA反义用于RNAi敲低的链)被整合到核心链中,而与mRNA靶同源的链现在是过客链。因此,修饰的核酸复合物不能具有针对mRNA靶的RNAi活性,直到siRNA结构域上的5'突出部分被核酸外切酶或核酸内切酶活性去除。当核酸复合物处于关闭状态时,传感器双链体保护突出部分免受降解,确保RNAi活性保持关闭。当传感器链通过与RNA标志物的碱基配对而被去除时,siRNA结构域上的5'和3'突出部分被暴露出来,允许它们被细胞核酸酶降解。为了防止核酸外切酶降解释放的siRNA,在一些实施方案中,5'和3'核酸外切酶阻断结构域被整合到核心链中(参见,例如,图2)。

[0078] 本文描述的核酸复合物可以使用本领域熟知的寡核苷酸合成标准方法合成,包括

例如Herdewijin, Piet (2005)的Oligonucleotide Synthesis和Verma和Eckstein, *Annul Rev. Biochem.* (1998):67:99-134的Modified oligonucleotides: Synthesis and Strategy for Users, 其内容通过引用整体并入本文。合成的核酸复合物可以被允许在理想的生理条件下形成其二级结构, 如对于技术人员来说将明显的。可以使用本领域已知的标准方法诸如化学作图、NMR或计算模拟来测试形成的二级结构。根据测试结果, 可以根据需要通过引入或去除化学修饰或错配来进一步修饰核酸复合物构建体, 直到获得期望的结构。

[0079] 合适的软件套件可用于帮助核酸结构的设计和分析。例如, Nupack可用于检查双链体的形成, 并对双链体的热力学稳定性进行等级排列。寡核苷酸设计工具可用于优化LNA修饰的位置。本文描述的核酸复合物中一条或更多条链的任何区域都可以被筛选用于输入核酸序列、靶核酸序列和/或本文描述的化学修饰。例如, 图3图示了非限制性示例性核酸复合物构建体的示意图, 用黄色高亮显示的末端碱基可以被筛选用于诸如LNA放置和本文描述的其他核苷酸类似物的化学修饰。

[0080] RNA干扰 (RNAi)

[0081] 本文描述了核酸复合物, 其可以响应于检测到具有与核酸复合物的传感器核酸链中的序列互补的序列的输入核酸 (例如对靶细胞, 包括疾病相关细胞特异的核酸序列) 被条件激活, 以从装配的未激活状态切换到激活状态, 从而作用于 (例如降解或抑制) 特定的靶核酸。以装配的未激活构型, 核酸复合物的传感器核酸链抑制RNAi双链体的酶促加工, 从而保持RNAi活性关闭。在存在与核酸复合物的传感器核酸链互补的输入核酸链的情况下, 输入核酸链可以通过经由支点介导的链置换诱导传感器核酸链与核心核酸链分离来激活核酸复合物。置换可以从在传感器核酸链的3' 或5' 末端形成的支点 (例如在传感器核酸链的3' 末端形成的支点) 开始, 通过输入核酸链和传感器核酸链的突出部分之间的互补结合。图4A是示出了传感器链与RNA标志物碱基配对后靶细胞中核酸复合物的激活的示意图。去除传感器核酸链后, 核心核酸链的3' 和5' 区域变成可被核酸酶 (如核酸外切酶) 降解的3' 和5' 突出部分。由于化学修饰的核苷酸和/或核酸外切酶裂解抗性部分的存在, 这样的降解在RNAi双链体的3' 端和5' 端停止, 从而使得活性RNAi双链体用于进一步的核酸内切酶加工 (如果需要) 和RNA诱导的沉默复合物 (RISC) 装载。RISC是一种多蛋白复合物, 包含一条siRNA或miRNA链, 并使用siRNA或miRNA作为识别互补靶核酸的模板。在识别出靶核酸后, RISC激活RNA酶 (例如Argonaute) 并通过裂解抑制靶核酸。在一些实施方案中, 将RNAi双链体加载到RISC中不需要Dicer。图4B是示出了传感器核酸链从核心核酸链置换和核心核酸链突出部分降解后活性RNAi双链体形成的示意图。

[0082] 然后过客核酸链被丢弃, 而核心核酸链 (核心核酸链的中心区域) 被整合到RISC中。本文公开的核酸复合物的核心核酸链充当引导链 (反义链) 并用于与靶RNA碱基配对。在将核心核酸链装载到RISC之前, 过客核酸链充当保护链。RISC使用整合的核心核酸链作为模板, 用于识别与核心核酸链, 特别是核心核酸链的中心区域具有互补序列的靶RNA。当与靶RNA结合时, RISC的催化成分Argonaute被激活, 这可以降解结合的靶RNA。靶RNA可被降解或者靶RNA的翻译可被抑制。

[0083] 当激活时, 本文描述的核酸复合物可以抑制靶细胞中的靶核酸, 从而导致靶细胞中靶核酸表达的减少或丢失。靶细胞是与疾病或紊乱相关或有关系的细胞。本文使用的术

语“相关”、“相关于”指的是细胞和疾病或状况之间的关系,使得疾病或状况的出现伴随着靶细胞的出现,其包括但不限于因果关系和体征/症状-疾病关系。本文使用的靶细胞通常具有输入核酸的可检测表达。

[0084] 在一些实施方案中,靶核酸在靶细胞中的表达被抑制约、至少、至少约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、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%,或这些值中的任何值之间的数值或范围。

[0085] 如本文使用的,基因表达的抑制指的是靶细胞中来自靶基因的蛋白质和/或mRNA产物水平的缺失或可观察到的降低。抑制程度可以通过检查靶基因的表达水平来评估,如实施例中所展示的。

[0086] 基因表达和/或靶基因表达的抑制可以通过使用蛋白质产物易于分析的报告基因或耐药基因来确定。示例性报告基因包括但不限于乙酰羟酸合酶(AHAS)、碱性磷酸酶(AP)、 β 半乳糖苷酶(LacZ)、 β 葡萄糖醛酸酶(GUS)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、绿色荧光蛋白(GFP)、辣根过氧化物酶(HRP)、萤光素酶(Luc)、胭脂碱合酶(NOS)、章鱼碱合酶(OCS)及其衍生物。可获得多种选择性标记,其赋予对氨基苄西林、博来霉素、氯霉素、庆大霉素、潮霉素、卡那霉素、林可霉素、氨甲蝶呤、膦丝菌素、嘌呤霉素和四环素的耐药性。与未用核酸复合物处理或用阴性或阳性对照处理的细胞相比,基因表达量的定量允许人们确定抑制程度。可以采用对技术人员来说明显的多种生物化学技术,诸如RNA溶液杂交、核酸酶保护、Northern杂交、逆转录、用微阵列监测基因表达、抗体结合、酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、放射免疫测定(RIA)、其他免疫测定和荧光激活细胞分析(FACS)。

[0087] 在一些实施方案中,本文公开的核酸复合物表现出改进的开关性能和降低的脱靶效应。当核酸复合物处于未激活状态(关闭)时,本文公开的核酸复合物可以具有降低的不需要的RNAi活性,并且当检测到输入核酸链,核酸复合物被激活时,可以具有增强的RNAi活性。

[0088] 在一些实施方案中,靶核酸在非靶细胞(例如,不具有输入核酸链的细胞)中的表达被抑制约、至多或至多约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、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%或这些值中的任何值之间的数值或范围。非靶细胞可以包括除了靶细胞以外的受试者的细胞。

[0089] 在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物具有增强的效力,因此能够在低浓度唤起RNAi活性。通过使用低浓度的核酸复合物,可以将非特异性、脱靶效应和毒性(例如,不希望的促炎响应)降至最低。

[0090] 在不同的实施方案中,本文公开的核酸复合物的浓度可以不同。在一些实施方案中,本文公开的核酸复合物可以以约、至多或至多约0.001nM、0.01nM、0.02nM、0.03nM、

0.04nM、0.05nM、0.06nM、0.07nM、0.08nM、0.09nM、0.1nM、0.2nM、0.3nM、0.4nM、0.5nM、0.6nM、0.7nM、0.8nM、0.9nM、1.0nM、1.5nM、2.0nM、2.5nM、3.0nM、3.5nM、4.0nM、4.5nM、5.0nM、5.5nM、6.0nM、6.5nM、7.0nM、7.5nM、8.0nM、8.5nM、9.0nM、9.5nM、10nM、11nM、12nM、13nM、14nM、15nM、16nM、17nM、18nM、19nM、20nM、30nM、40nM、50nM或这些值中的任何两个之间的数值或范围的浓度提供。例如，本文公开的核酸复合物可以以约0.1nM-10nM之间，优选地约0.1nM-1.0nM之间的浓度提供。在一些实施方案中，本文公开的核酸复合物具有约0.1nM或更低的转染浓度。

[0091] 本文描述的核酸复合物可以允许在低浓度产生持久和持续有效的抑制作用。例如，核酸复合物可以在延长的时间内保持活性，诸如至少12小时、至少24小时、至少36小时、至少48小时、至少60小时、至少72小时、至少84小时或至少96小时。在一些实施方案中，核酸复合物可以保持活性持续至多30天、至多60天或至多90天。

[0092] 化学修饰

[0093] 本文描述的核酸复合物中包含的核酸链(核心核酸链、过客核酸链和/或传感器核酸链)可以是非标准的、包含非标准的修饰的核苷酸(核苷酸类似物)或非标准的修饰的核苷(核苷类似物)的修饰的核酸链。术语“核苷酸类似物”或“修饰的核苷酸”指的是包含一种或更多种修饰(例如化学修饰)的非标准核苷酸，包括非天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。术语“核苷类似物”或“修饰的核苷”指的是包含一种或更多种修饰(例如化学修饰)的非标准核苷，包括除胞苷、尿苷、腺苷、鸟苷和胸苷之外的非天然存在的核苷。修饰的核苷可以是不具有磷酸基团的修饰的核苷酸。化学修饰可以包括用不同的原子或不同的部分或官能团(例如甲基基团或羟基基团)代替一个或更多个原子或部分。

[0094] 引入修饰以改变核苷酸/核苷的某些化学性质，诸如增加热力学稳定性，以增加对核酸酶降解的抗性(例如核酸外切酶抗性)，和/或增加结合特异性并使脱靶效应最小化。例如，热力学稳定性可以基于解链温度 T_m 的测量来确定。更高的 T_m 可以与热力学上更稳定的化学实体相关。

[0095] 在一些实施方案中，修饰可以使核酸复合物中的一条或更多条核酸链抵抗核酸外切酶降解/裂解。本文使用的术语“核酸外切酶”表示一种通过从多核苷酸链的末端(外部)一次裂解一个核苷酸来工作的酶。发生水解反应，破坏3'或5'端的磷酸二酯键。3'和5'核酸外切酶能降解细胞内的RNA和DNA，并能降解细胞间隙和血浆中的RNA和DNA，具有高效率 and 快的动力学速率。密切的相关是核酸内切酶，它在多核苷酸链中间(内部)裂解磷酸二酯键。3'和5'核酸外切酶和核酸外切酶复合物可以降解细胞内的RNA和DNA，并且可以降解细胞间隙和血浆中的RNA和DNA。本文使用的术语“核糖核酸外切酶”指的是核酸外切酶核糖核酸酶，其是通过从RNA分子的5'末端或3'末端去除末端核苷酸来降解RNA的酶。从5'端去除核苷酸的酶称为5'-3'核糖核酸外切酶，并且从3'端去除核苷酸的酶称为3'-5'核糖核酸外切酶。

[0096] 修饰可包括磷酸酯修饰、核糖修饰(在糖部分)和/或碱基修饰。本文使用的优选的修饰的核苷酸包括糖修饰的和/或主链修饰的核糖核苷酸。

[0097] 在一些实施方案中，修饰的核苷酸可以包含对核苷酸的糖部分的修饰。例如，核苷酸的2' OH-基团可以被选自H、OR、R、F、Cl、Br、I、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、COOR或OR的基团代替，其中R是被取代的或未被取代的C₁-C₆烷基、烯基、炔基、芳基等。在一些实施方案中，核苷酸

或核苷的2' OH-基团被2' O-甲基基团代替,并且修饰的核苷酸或核苷是2' -O-甲基核苷酸或2' -O-甲基核苷(2' -OMe)。2' -O-甲基核苷酸或2' -O-甲基核苷可以是2' -O-甲基腺苷、2' -O-甲基鸟苷、2' -O-甲基尿苷或2' -O-甲基胞苷。在一些实施方案中,核苷酸的2' OH-基团被氟(F)代替,并且修饰的核苷酸或核苷是2' -F核苷酸或2' -F核苷(2' -脱氧-2' -氟或2' -F)。2' -F核苷酸或2' -F核苷可以是2' -F-腺苷、2' -F-鸟苷、2' -F-尿苷或2' -F-胞苷。修饰还可以包括其它修饰,诸如核苷类似物亚磷酰胺。在一些实施方案中,可以使用二醇核酸(glycol nucleic acids)。

[0098] 在一些实施方案中,修饰的核苷酸可以包含核苷酸的磷酸基团中的修饰,例如通过用硫或甲基基团取代磷酸基团的一个或更多个氧。在一些实施方案中,核苷酸的磷酸基团的一个或更多个非桥接氧被硫代替。

[0099] 在一些实施方案中,本文描述的核酸链包含一个或更多个不是磷酸二酯连键的非标准核苷间连键。在一些实施方案中,本文描述的核酸链包含一个或更多个硫代磷酸酯核苷间连键。本文使用的术语“硫代磷酸酯连键”(PS)表示核苷酸之间的键,其中一个非桥接氧被硫代替。在一些实施方案中,两个非桥接氧都可以被硫代替(PS2)。在一些实施方案中,一个非桥接氧可以被甲基基团代替。本文描述的术语“磷酸二酯连键”表示DNA和RNA中正常的糖磷酸主链连键,其中磷酸桥接两种糖。在一些实施方案中,在核心核酸链、过客核酸链和/或传感器核酸链中引入一个或更多个硫代磷酸酯连键可以赋予修饰的核苷酸对核酸酶(例如核酸内切酶和/或核酸外切酶)增加的抗性。

[0100] 在一些实施方案中,修饰的核苷酸可以包括对核苷酸碱基部分的修饰或取代。例如,尿苷和胞苷残基可以被假尿苷、2-硫尿苷、N6-甲基腺苷、5-甲基胞苷或尿苷和胞苷残基的其他碱基类似物取代。腺苷可包含对腺苷的Hoogsteen(例如7-三唑-8-氮杂-7-脱氮腺苷)和/或Watson-Crick面(例如N²-烷基-2-氨基嘌呤)修饰。腺苷类似物的实例还包括Hoogsteen或Watson-Crick面定位的N-乙基哌啶三唑修饰的腺苷类似物、N-乙基哌啶7-EAA三唑(例如7-EAA,7-乙炔基-8-氮杂-7-脱氮腺苷)和本领域技术人员可识别的其他腺苷类似物。胞嘧啶可以被本领域技术人员可识别的任何合适的胞嘧啶类似物取代。例如,胞嘧啶可以被6'-苯基吡咯胞嘧啶(PhpC)取代,其已经显示出相当的碱基配对保真度、热稳定性和高荧光。

[0101] 本文公开的核酸复合物中的一个或更多个核苷酸可以被通用碱基取代。术语“通用碱基”指的是与每个天然核苷酸形成碱基对而它们之间几乎没有区别的核苷酸类似物。通用碱基的实例包括但不限于,本领域已知的C-苯基、C-萘基和其它芳香族衍生物、肌苷、唑甲酰胺和硝基唑衍生物,诸如3-硝基吡咯、4-硝基吡咯、5-硝基吡咯和6-硝基吡咯(参见,例如Loakes,2001,Nucleic Acids Research,29,2437-2447)。

[0102] 在一些实施方案中,本文公开的碱基修饰可以减少先天免疫识别,同时使核酸复合物对核酸酶更具抗性。例如,可用于本文公开的核酸复合物中的碱基修饰的实例在Hu等人(Signal Transduction and targeted Therapy 5:101(2020))中也进行了描述,其内容通过引用整体并入本文。

[0103] 在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物中包含的核酸链(核心核酸链、过客核酸链和/或传感器核酸链)可以包含一个或更多个锁核酸或其类似物。示例性锁核酸类似物包括例如它们相应的锁类似物亚磷酰胺和其他对技术人员明显的衍生物。

[0104] 如本文使用的术语“锁核酸”(LNA)表示修饰的RNA核苷酸。LNA核苷酸的核糖部分用连接2'和4'碳的额外桥(2'-O,4'-C亚甲基桥)修饰。该桥将核糖“锁定”在3'-内(3'-endo)结构构象中,并限制呋喃核糖环的柔性,从而将该结构锁定为刚性双环形式。只要需要,LNA核苷酸可以与寡核苷酸中的DNA或RNA碱基混合。将LNA掺入本文公开的核酸复合物中可以增加热稳定性(例如解链温度)、寡核苷酸的杂交特异性以及等位基因辨别的准确性。LNA寡核苷酸显示出对互补单链RNA和互补单链或双链DNA的杂交亲和力。关于LNA的另外的信息可以在例如www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/locked-nucleic-acids-faq.html找到。在一些实施方案中,可以使用二醇核酸。

[0105] 本文描述的核酸复合物中包含的核酸链(核心核酸链、过客核酸链和/或传感器核酸链)可以包含具有2'-4'桥接修饰的其他化学修饰的核苷酸或核苷。2'-4'桥接修饰指的是引入连接核苷酸的2'和4'碳的桥。该桥可以是2'-O,4'-C亚甲基桥(例如在LNA中)。桥也可以是2'-O,4'-C乙烯桥(例如在乙烯基桥联的核酸(ENA)中)或本领域已知可识别的任何其他化学键。

[0106] 在本文描述的核酸复合物中引入LNA、其类似物或其他具有2'-4'桥接修饰的化学修饰的核苷酸可以增强杂交稳定性以及错配辨别力。例如,包含具有LNA的传感器核酸链、其类似物或具有2'-4'桥接修饰的其他化学修饰的核苷酸的核酸复合物可以具有增强的灵敏度来区分匹配和错配的输入核酸链(例如,在输入核酸链和传感器核酸链之间的互补结合中)。

[0107] 核酸复合物的一条或更多条核酸链可以包含与链的3'和/或5'末端连接的化学部分。末端部分可以包含一个或多个任何合适的末端接头或修饰。例如,末端部分可以包含将寡核苷酸与另一分子或特定表面(生物素、氨基修饰剂、炔烃、硫醇修饰剂、叠氮化物、N-羟基琥珀酰亚胺和胆固醇)连接的接头、染料(例如荧光团或猝灭剂)、氟修饰的核糖、间隔区(例如C3间隔区、Spacer 9、Spacer 18、dSpacer、三乙二醇间隔区、六乙二醇间隔区)、涉及点击化学的部分和化学修饰(例如炔烃和叠氮化物部分),以及可用于将3'和5'末端附接至其他化学部分的任何接头或末端修饰,诸如抗体、金或其他金属纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、树枝状大分子纳米颗粒、小分子、单链或支链脂肪酸、肽、蛋白质、适配体和其他核酸链和核酸纳米结构。末端部分可以作为能够检测的标记或阻断剂来保护单链核酸免受核酸酶降解。可以附接至传感器核酸链末端的另外的接头和末端修饰在www.idtdna.com/pages/products/custom-dna-rna/oligo-modifications和www.glenresearch.com/browse/labels-and-modifiers中描述,其内容通过引用整体并入本文。

[0108] 对核苷酸和/或核苷的另外的修饰也可以引入到本文描述的核酸复合物的一条或更多条链中,诸如Hu等人(Signal Transduction and targeted Therapy 5:101(2020))中描述的修饰,其内容通过引用整体并入本文。

[0109] 核糖修饰

[0110] 在不同的实施方案中,核酸复合物的修饰的核苷的百分比可以不同。在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物的修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、85%、90%或95%。例如,本文描述的核酸复合物的修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%或这些值中的任何两个

之间的数字或范围。在一些实施方案中,核酸复合物的核苷酸中的至少90%、91%、92%、93%、94%、95%或这些值中的任何两个之间的数量或范围被修饰(例如是非DNA和非RNA)。在一些实施方案中,核酸复合物的全部核苷酸都被修饰(例如是非DNA和非RNA)。

[0111] 在不同的实施方案中,核酸复合物的一条或更多条链中修饰的核苷的百分比可以不同。在一些实施方案中,本文描述的核心核酸链中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、85%、90%或95%。例如,本文描述的核心核酸链中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%或这些值中的任何两个之间的数字或范围。在一些实施方案中,核心核酸链的全部核苷都被化学修饰。

[0112] 本文描述的核心核酸链的中心区域中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、85%、90%或95%。例如,本文描述的核心核酸链的中心区域中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%或者这些值中任何两个之间的数字或范围。

[0113] 本文描述的核心核酸链的5'区域中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、85%、90%或95%。例如,本文描述的核心核酸链的5'区域中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%或者这些值中任何两个值之间的数字或范围。在一些实施方案中,核心核酸链的5'区域的全部核苷都被化学修饰。

[0114] 本文描述的核心核酸链的3'区域中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、85%、90%或95%。例如,本文描述的核心核酸链的3'区域中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%或者这些值中任何两个值之间的数字或范围。在一些实施方案中,核心核酸链的3'区域的全部核苷都被化学修饰。

[0115] 本文描述的过客核酸链中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、85%、90%或95%。例如,本文描述的过客核酸链中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%或这些值中任何两个之间的数字或范围。在一些实施方案中,过客核酸链的全部核苷都被化学修饰。

[0116] 本文描述的传感器核酸链中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,本文描述的传感器核酸链中修饰的核苷的百分比可以是、大约是、至少是或至少大约是80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%或这些值中任何两个值之间的数字或范围。在一些实施方案中,传感器核酸链的全部核苷都被化学修饰。

[0117] 核心核酸链、过客核酸链和传感器核酸链中的一个或多个中的修饰的核苷可以

包含2'-O-甲基核苷和/或2'-F核苷。

[0118] 在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物中2'-O-甲基核苷和/或2'-F核苷的百分比可以是、大约是、至少是、至少大约是、至多是或至多大约是10%-50%。例如,本文描述的核酸复合物中2'-O-甲基核苷和/或2'-F核苷的百分比可以是、大约是、至少是、至少大约是、至多是或至多大约是10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或这些值中任何两个值之间的数字或范围。

[0119] 在一些实施方案中,本文描述的核心核酸链中的2'-O-甲基核苷和/或2'-F核苷的百分比可以是、大约是、至少是、至少大约是、至多是或至多大约是10%-50%。例如,本文描述的核心核酸链中2'-O-甲基核苷和/或2'-F核苷的百分比可以是、大约是、至少是、至少大约是、至多是或至多大约是10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或这些值中任何两个值之间的数字或范围。

[0120] 在一些实施方案中,本文描述的过客核酸链中2'-O-甲基核苷和/或2'-F核苷的百分比可以是、大约是、至少是、至少大约是、至多是或至多大约是10%-50%。例如,本文描述的过客核酸链中的2'-O-甲基核苷和/或2'-F核苷的百分比可以是、大约是、至少是、至少大约是、至多是或至多大约是10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或这些值中任何两个值之间的数字或范围。

[0121] 在一些实施方案中,本文描述的传感器核酸链中的2'-O-甲基核苷和/或2'-F核苷的百分比可以是、大约是、至少是、至少大约是、至多是或至多大约是10%-50%。例如,本文描述的传感器核酸链中的2'-O-甲基核苷和/或2'-F核苷的百分比可以是、大约是、至少是、至少大约是、至多是或至多大约是10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或这些值中任何两个值之间的数字或范围。

[0122] 磷酸酯修饰

[0123] 在不同的实施方案中,本文描述的核酸复合物中核苷酸的磷酸酯修饰的百分比可以不同。在一些实施方案中,磷酸酯修饰包含硫代磷酸酯核苷间连键或是硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,核心核酸链中硫代磷酸酯核苷间连键的百分比小于5%、小于10%、小于25%、小于50%,或者这些值中的任何两个之间的数字或范围。例如,核心核酸链中硫代磷酸酯核苷间连键的百分比为约、小于或小于约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或这些值中任何两个之间的数字或范围。在一些实施方案中,核心核酸链不包含硫代磷酸酯核苷间连键修饰。

[0124] 在一些实施方案中,核心核酸链中磷酸二酯核苷间连键的百分比为约、至少、或至少约50%、80%或95%,或者是这些值中任何两个之间的数字或范围。例如,核心核酸链中磷酸二酯核苷间连键的百分比为约、至少或至少约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%、或者是这些值中任何两个之间的数字或范围。在一些实施方案中,核心核酸链中的全部核苷间连键是磷酸二酯核苷间连键。

[0125] 在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域的5'末端包含至少一个硫代磷酸酯核苷间连键(例如,一个、两个或三个硫代磷酸酯核苷间连键)。在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域的3'末端包含至少一个硫代磷酸酯核苷间连键(例如一个、两个或三个硫代磷酸酯核苷间连键)。在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域的5'末端和核心核酸链的中心区域的3'末端中的每一个独立地包含一个或多个硫代磷酸酯核苷间连键(例如一个、两个或三个硫代磷酸酯核苷间连键)。在一些实施方案中,除了位于中心区域的5'末端、3'末端或两者的两个或三个核苷之间的硫代磷酸酯核苷间连键以外,核心核酸链的中心区域不包含硫代磷酸酯核苷间连键。

[0126] 在一些实施方案中,与核心核酸链的5'连接头的3'相邻的1-3个核苷酸(例如一个、两个或三个核苷酸)之间的核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,与核心核酸链的3'连接头的5'相邻的一个或两个核苷酸之间的核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,与核心核酸链的3'连接头的3'相邻的1-3个核苷酸(例如一个、两个或三个核苷酸)之间的核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,除了与核心核酸链的3'连接头的3'相邻的1-3个核苷酸(例如一个、两个或三个核苷酸)之间的硫代磷酸酯核苷间连键以外,核心核酸链的3'区域不包含硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,核心核酸链的5'区域不包含硫代磷酸酯核苷间连键。

[0127] 在一些实施方案中,过客核酸链包含一个或多个硫代磷酸酯核苷间连键。过客核酸链中硫代磷酸酯核苷间连键的百分比小于5%、小于10%、小于25%、小于50%,或者是这些值中任何两个之间的数字或范围。例如,过客核酸链中硫代磷酸酯核苷间连键的百分比为约、小于或小于约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或这些值中任何两个之间的数字或范围。

[0128] 在一些实施方案中,过客核酸链的5'末端包含至少一个硫代磷酸酯核苷间连键(例如一个、两个或三个硫代磷酸酯核苷间连键)。在一些实施方案中,过客核酸链的3'末端包含至少一个硫代磷酸酯核苷间连键(例如一个、两个或三个硫代磷酸酯核苷间连键)。在一些实施方案中,除了过客核酸链的5'末端、3'末端或两者的最后两个、三个或四个核苷之间的硫代磷酸酯核苷间连键以外,过客核酸链不包含硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,除了位于过客核酸链5'末端的最后两到三个核苷和位于3'末端的最后两到三个核苷之间的硫代磷酸酯核苷间连键以外,过客核酸链不包含硫代磷酸酯核苷间连键。

[0129] 在一些实施方案中,传感器核酸链包含一个或多个硫代磷酸酯核苷间连键。传

感器核酸链中硫代磷酸酯核苷间连键的百分比可以小于5%、小于10%、小于25%、小于50%，或者是这些值中任何两个之间的数字或范围。例如，传感器核酸链中硫代磷酸酯核苷间连键的百分比为约、小于或小于约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或这些值中任何两个之间的数字或范围。

[0130] 在一些实施方案中，传感器核酸链的5'末端包含至少一个硫代磷酸酯核苷间连键（例如一个、两个或三个硫代磷酸酯核苷间连键）。在一些实施方案中，传感器核酸链的3'末端包含至少一个硫代磷酸酯核苷间连键（例如1-20个硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中，传感器核酸链的5'末端和传感器核酸链的3'末端中的每一个独立地包含一个或多个硫代磷酸酯核苷间连键（例如位于5'末端的一个、两个或三个或位于3'末端的1-20个）。在一些实施方案中，除了位于过客核酸链的5'末端、3'末端或两者处的硫代磷酸酯核苷间连键以外，传感器核酸链不包含硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中，位于过客核酸链3'末端的硫代磷酸酯核苷间连键位于过客核酸链的单链突出部分。

[0131] LNA、其类似物和2'-4'桥接修饰

[0132] 在不同的实施方案中，核酸复合物的LNA或其类似物的百分比可以不同。在一些实施方案中，本文描述的核酸复合物的LNA或其类似物的百分比可以是约10%-50%。例如，本文描述的核酸复合物的LNA或其类似物的百分比可以是约、至多、至多约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或这些值中任何两个之间的数字或范围。

[0133] 在不同的实施方案中，核酸复合物的一条或更多条链中LNA或其类似物的百分比可以不同。在一些实施方案中，本文描述的核心核酸链中的LNA或其类似物的百分比可以是、大约是、至多是或至多大约是5%、10%或15%。例如，本文描述的核心核酸链的LNA或其类似物的百分比可以是、大约是、至多是或至多大约是5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%或者这些值中的任何两个之间的数字或范围。

[0134] 在一些实施方案中，本文描述的过客核酸链中LNA或其类似物的百分比可以是、大约是、至多是或至多大约是5%、10%或15%。例如，本文描述的过客核酸链的LNA或其类似物的百分比可以是、大约是、至多是或至多大约是5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%或者这些值中的任何两个之间的数字或范围。在一些实施方案中，本文描述的过客核酸链中LNA或其类似物的百分比大于5%、大于10%或大于15%可降低核酸复合物的RNAi活性（参见实施例1）。

[0135] 在一些实施方案中，本文描述的传感器核酸链中LNA或其类似物的百分比可以是、大约是、至少是、至少大约是、至多是或至多大约是10%-50%。例如，本文描述的传感器核酸链的LNA或其类似物的百分比可以是、大约是、至少是、至少大约是、至多是或至多大约是10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或这些值中任何两个之间的数字或范围。

[0136] 在不同的实施方案中,核酸复合物的2'-4'桥接修饰的百分比可以不同。在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物的2'-4'桥接修饰的百分比可以是约10%-50%。例如,本文描述的核酸复合物的2'-4'桥接修饰的百分比可以是约、至多、至多约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%或这些值中任何两个之间的数字或范围。

[0137] 核心链

[0138] 本文描述的核酸复合物的核心核酸链可以包含5'区域、3'区域和5'区域与3'区域之间的中心区域。5'区域、3'区域和中心区域中的每一个都可以彼此直接相邻,即两个相邻区域之间没有核苷酸。在一些实施方案中,5'区域的3'端可以距离中心区域的5'端1个、2个、3个、4个、5个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、20个,或者这些值中的任何两个之间的数字或范围的核苷酸。在一些实施方案中,3'区域的5'端可以距离中心区域的3'1个、2个、3个、4个、5个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、20个,或者这些值中的任何两个之间的数字或范围的核苷酸。

[0139] 在不同的实施方案中,核心核酸链的长度可以不同。在一些实施方案中,核心核酸链包含20-70个连接的核苷。例如,核心核酸链可以包含20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个或70个连接的核苷。

[0140] 在不同的实施方案中,核心核酸链的中心区域的长度可以不同。在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域包含10-35个连接的核苷。例如,核心核酸链的中心区域可以包含10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个或35个连接的核苷。

[0141] 核心核酸链的3'区域和5'区域可以具有相同或不同的长度。在不同的实施方案中,核心核酸链的3'区域和5'区域的长度可以不同。在一些实施方案中,核心核酸链的3'区域和5'区域的长度包含2-33个连接的核苷。例如,核心核酸链的3'区域和5'区域可以包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个或33个连接的核苷。在一些实施方案中,3'区域和5'区域各自包含11个与传感器链碱基配对以形成传感器双链体的连接的核苷酸。

[0142] 核心核酸链的中心区域包含与靶RNA互补的序列。在不同的实施方案中,与靶RNA互补的序列的长度可以不同。在一些实施方案中,与靶RNA互补的序列的长度为10-21个核苷酸。例如,与靶RNA互补的序列的长度为10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或21个核苷酸。在一些实施方案中,核心核酸链包含与过客核酸链碱基配对以形成siRNA双链体的长度为21个核苷酸的中心区域。

[0143] 核心核酸链的中心区域包含与过客核酸链互补的序列。在不同的实施方案中,与过客核酸链互补的序列的长度可以不同。在一些实施方案中,与过客核酸链互补的序列的长度为19-25个核苷酸。例如,与过客核酸链互补的序列的长度为19个、20个、21个、22个、23

个、24个或25个核苷酸。

[0144] 在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域经由连接头与核心核酸链的5'区域和3'区域相连。例如,核心核酸链的中心区域经由5'连接头与核心核酸链的5'区域相连。在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域经由3'连接头与核心核酸链的3'区域相连。

[0145] 5'连接头和/或3'连接头可包括三碳接头(C₃接头)、核苷酸、本文描述的任何修饰的核苷酸,或当核心核酸链是单链时可以抵抗核酸外切酶裂解的任何部分(例如,在传感器核酸链从核心核酸链置换之后)。例如,5'连接头和/或3'连接头可以包含2'-F核苷酸,诸如2'-F-腺苷、2'-F-鸟苷、2'-F-尿苷或2'-F-胞苷。5'连接头和/或3'连接头可以包含2'-O-甲基核苷酸,诸如2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基尿苷或2'-O-甲基胞苷。5'连接头和/或3'连接头可以包含天然存在的核苷酸,诸如胞苷、尿苷、腺苷或鸟苷。核心核酸链的5'连接头和/或3'连接头可以包含当处于单链形式时可被核酸外切酶裂解的磷酸二酯连接(磷酸二酯5'和3'连接)。核心核酸链的5'连接头和/或3'连接头可以包含当处于单链形式时可以抵抗核酸外切酶裂解的任何合适的部分。

[0146] 在一些实施方案中,5'连接头可以包括以下或是以下:C₃ 3-碳接头、核苷酸、修饰的核苷酸(2'-O-甲基核苷酸、2'-F核苷酸)、具有当处于单链形式时可被核酸外切酶裂解的磷酸二酯5'和3'连接的核苷酸,或其组合。在一些实施方案中,5'连接头可以包含2'-O-甲基核苷酸或是2'-O-甲基核苷酸,诸如2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基尿苷或2'-O-甲基胞苷。

[0147] 在一些实施方案中,3'连接头包括以下或是以下:C₃ 3-碳接头、核苷酸、修饰的核苷酸、当处于单链形式时抗核酸外切酶裂解的部分或其组合。在一些实施方案中,3'连接头可以包含2'-O-甲基核苷酸或是2'-O-甲基核苷酸,诸如2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基尿苷或2'-O-甲基胞苷。

[0148] 在一些实施方案中,3'连接头包含2'-O-甲基核苷酸或是2'-O-甲基核苷酸,诸如2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基尿苷或2'-O-甲基胞苷,并且5'连接头包含2'-O-甲基核苷酸或是2'-O-甲基核苷酸,诸如2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基尿苷或2'-O-甲基胞苷。

[0149] 在一些实施方案中,核心核酸链的5'连接头不包含C₃ 3-碳接头或不是C₃ 3-碳接头。在一些实施方案中,核心核酸链的3'连接头包含C₃ 3-碳接头或是C₃ 3-碳接头。在一些实施方案中,有利的是没有C₃ 3-碳接头作为5'连接头。在一些实施方案中,有利的是具有C₃ 3-碳接头作为3'连接头。在一些实施方案中,核心核酸链的5'连接头不包含C₃ 3-碳接头或不是C₃ 3-碳接头,而核心核酸链的3'连接头包含C₃ 3-碳接头或是C₃ 3-碳接头。

[0150] 在一些实施方案中,不具有C₃ 3-碳接头作为5'连接头的核酸复合物表现出较高的RNA干扰活性(参见实施例1-实施例2)。核酸复合物可以具有修饰的核苷酸或作为5'连接头的核苷酸。核酸复合物可以不具有5'连接头。核酸复合物可以具有C₃ 3-碳接头、修饰的核苷酸或核苷酸作为3'连接头。核酸复合物可以不具有3'连接头。在一些实施方案中,不具有C₃ 3-碳接头作为5'连接头使核酸复合物的RNA干扰活性比具有C₃ 3-碳接头作为5'连接头的核酸复合物增加至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或这些值中的任何值之间的数量或范围。

[0151] 在一些实施方案中,具有C₃ 3-碳接头作为3'连接头的核酸复合物表现出较高的

RNA干扰活性(参见实施例1-实施例2)。核酸复合物可以具有修饰的核苷酸或核苷酸作为5'连接头。核酸复合物可以不具有5'连接头。核酸复合物不具有C₃ 3-碳接头作为5'连接头。在一些实施方案中,具有C₃ 3-碳接头作为3'连接头使核酸复合物的RNA干扰活性比具有修饰的核苷酸(例如2'-O-甲基核苷酸)作为3'连接头的核酸复合物增加至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍或这些值中的任何值之间的数量或范围。在一些实施方案中,具有C₃ 3-碳接头作为3'连接头使核酸复合物的RNA干扰活性比不具有3'连接头的核酸复合物增加至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍或这些值中的任何值之间的数量或范围。

[0152] 在一些实施方案中,核心核酸链不包含5'连接头和/或3'连接头。相反,核心核酸链的中心区域经由标准的磷酸二酯连键与3'区域和/或5'区域相连。在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域经由磷酸二酯连键与核心核酸链的5'区域连接。在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域经由磷酸二酯连键与核心核酸链的3'区域连接。在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域经由磷酸二酯连键与核心核酸链的3'区域连接,而核心核酸链的中心区域经由2'-O-甲基核苷酸诸如2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基尿苷或2'-O-甲基胞苷与核心核酸链的5'区域连接。在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域经由磷酸二酯连键与核心核酸链的5'区域连接,而核心核酸链的中心区域经由2'-O-甲基核苷酸诸如2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基尿苷或2'-O-甲基胞苷与核心核酸链的3'区域连接。在一些实施方案中,核心核酸链的中心区域经由磷酸二酯连键与核心核酸链的3'区域和5'区域连接。

[0153] 在示例性实施方案中,化学修饰的核心链可以包含与传感器链碱基配对以形成传感器双链体的各自具有11个连接的核苷酸的长度的3'区域和5'区域,和与过客链碱基配对以形成siRNA双链体的具有21个核苷酸的长度的中心区域(参见,例如,图2)。连接传感器双链体和siRNA双链体的5'接头可以由具有磷酸二酯主链连接的2'-O-甲基修饰的碱基组成,并且3'接头可以是C3间隔区。核心链可另外包含:由通过两个硫代磷酸酯主链连键连接的三个化学修饰的碱基组成的5'核酸外切酶阻断结构域和由通过3'接头和硫代磷酸酯主链连键连接的三个化学修饰的碱基组成的3'核酸外切酶阻断结构域。核心链中的全部核苷酸都被化学修饰,要么通过2-O-甲基化,要么通过2'-F修饰。例如,如图2中示出的,来自中心区域5'端的碱基2、6、14和16是2'-F修饰的,而核心链的其余部分被2'-O-甲基化。

[0154] 在一些实施方案中,不具有5'连接头和/或3'连接头使核酸复合物的RNA干扰活性比具有C₃ 3-碳接头作为5'连接头的核酸复合物增加至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或这些值中的任何值之间的数量或范围。

[0155] 过客核酸链

[0156] 本文描述的核酸复合物的过客核酸链与核心核酸链的中心区域互补结合,以形成RNAi双链体(例如第一核酸双链体)。由于核心核酸链的中心区域与靶核酸链互补,核酸复合物的过客核酸链可以包含与靶核酸链同源的序列。

[0157] 如本文使用的,术语“同源的”或“同源”指的是至少两个序列之间的序列同一性。在两个核酸或多肽序列的上下文中的术语“序列同一性”或“同一性”指的是,当在指定的比较窗口内为了最大对应对齐时,两个序列中相同的核苷酸碱基或残基。

[0158] 在一些实施方案中,过客核酸链和靶核酸或其一部分之间的序列同一性可以是、大约是、至少是或至少大约是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%或这些值中的任何两个之间的数字或范围。核酸复合物的过客核酸链可以具有与靶核酸或其一部分大体相同,例如至少80%、90%或100%相同的序列。

[0159] 在不同的实施方案中,过客核酸链的长度可以不同。在一些实施方案中,过客核酸链包含10-35个连接的核苷。例如,核心核酸链可以包含10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个或35个连接的核苷。在一些实施方案中,过客核酸链包含17-21个连接的核苷。

[0160] 在一些实施方案中,RNAi双链体中过客核酸链具有3'突出部分、5'突出部分或两者。在一些实施方案中,过客核酸链具有3'突出部分,并且3'突出部分的长度为1-5个核苷。

[0161] 在一些实施方案中,过客核酸链的突出部分能够与输入核酸链结合形成支点,从而启动支点介导的链置换,并导致过客核酸链从核心核酸链置换。

[0162] 在一些实施方案中,过客核酸链的突出部分的长度为5-20个核苷。例如,过客核酸链的突出部分的长度可以是5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个核苷。在一些实施方案中,过客核酸链的突出部分的长度为9个核苷。

[0163] 在一些实施方案中,过客核酸链的突出部分的一个或多个核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键,其可以保护突出部分不被降解。在一些实施方案中,过客核酸链的突出部分的全部核苷间连键可以是硫代磷酸酯核苷间连键。

[0164] 在一些实施方案中,过客核酸链在RNAi双链体中不具有3'突出部分、5'突出部分或两者。在一些实施方案中,含有不具有突出部分的平端会使过客核酸链不利于Dicer结合,从而绕过Dicer介导的裂解。

[0165] 在示例性实施方案中,过客核酸链被完全化学修饰并包含与核心链的中心区域碱基配对以形成siRNA复合物的21个核苷酸(参见,例如,图2)。为了提供对核酸酶活性的抗性,过客链的5'和3'端的第一个和最后两个主链连键是硫代磷酸酯。来自过客链的5'端的碱基9、10和11是2'-F修饰的,以减少由过客链掺入RISC引起的意外RNAi活性。可以添加LNA修饰(例如,在图4中示出的过客链的5'端的碱基2)以增强siRNA双链体的热力学稳定性,这可以增强RNAi转换。

[0166] 传感器核酸链

[0167] 本文描述的核酸复合物的传感器核酸链包含与核心核酸链的5'区域和3'区域互补结合以形成传感器双链体(例如第二核酸双链体)的区域。在不同的实施方案中,与核心核酸链的5'区域和3'区域互补结合的区域长度可以不同。在一些实施方案中,与核心核酸链的5'区域和3'区域互补结合的区域包含10-35个连接的核苷。例如,与核心核酸链的5'区域和3'区域互补结合的传感器核酸链中的区域可以包含10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个或35个连接的核苷。

[0168] 传感器核酸链可以包含突出部分。突出部分可以位于传感器核酸链的3'端或5'端,或两者。突出部分不与核心核酸链互补,并且能够与输入核酸链结合,从而启动支点介导的链置换,并导致过客核酸链从核心核酸链置换。

[0169] 在不同的实施方案中,传感器核酸链中突出部分的长度可以不同。在一些实施方案中,突出部分的长度可以是5-20个连接的核苷酸。例如,传感器核酸链中突出部分的长度可以包含5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个核苷酸。在一些实施方案中,传感器核酸链的突出部分长度为12个核苷酸。

[0170] 传感器核酸链的突出部分可包含为提高单链突出部分的碱基配对亲和力、核酸酶抗性以及热力学稳定性而引入的核苷酸修饰,以避免虚假的核酸外切酶诱导的链的激活。示例性修饰包括但不限于,2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、硫代磷酸酯核苷间连键、掺入LNA (inclusions of LNA) 和可由技术人员识别的修饰。在一些实施方案中,传感器核酸链突出部分中至少50%的核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键。例如,传感器核酸链的突出部分的核苷间连键中的至少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%或任何两个值之间的数字或范围是硫代磷酸酯核苷间连键。在一些实施方案中,传感器核酸链突出部分的全部核苷间连键是硫代磷酸酯核苷间连键。

[0171] 在一些实施方案中,传感器核酸链的5'末端和/或3'末端可以包含末端部分。可以使用本文描述的任何合适的末端部分。在一些实施方案中,末端部分可以包含三乙二醇或六乙二醇间隔区、C3间隔区、反向dT、胺接头、配体(例如靶向配体)、荧光团、核酸外切酶、脂肪酸、Cy3、附接至三乙二醇的反向dT或其组合。

[0172] 在示例性实施方案中,传感器链被完全化学修饰并包含31个核苷酸(参见,例如,图2)。来自传感器链的5'端的前22个核苷酸与核心链的3'和5'区域完全碱基配对以形成传感器双链体,并且来自5'端的最后9个核苷酸是单链的,以形成传感器支点(突出部分)。位于3'端的传感器支点在相邻核苷酸之间包含硫代磷酸酯主链连键,以降低核酸酶活性并增强蛋白质结合以进行自我递送。为了进一步降低核酸酶活性,传感器链5'端的前两个碱基也经由硫代磷酸酯主链连键进行连接。配体,诸如C16棕榈酸,可以附接至传感器链以增强自我递送。配体可以与传感器链上的任何核苷酸附接。传感器链的5'端也可以用三乙二醇间隔区修饰,以提高对核酸酶活性的抗性。

[0173] 传感器核酸链的序列可以设计成感测输入核酸链或其一部分。例如,从输入生物标志物的序列,可以产生与输入链反义的所有可能的传感器区段的列表。可以使用NCBI BLAST对靶动物转录组中的传感器序列的独特性进行等级排列。对于人类癌细胞系,可以使用BLASTn算法对照人类转录物和基因集合来检查序列。在一些实施方案中,可以消除对已知或预测的RNA转录物具有多于17个序列互补性的碱基和完全突出互补性的传感器区段。例如,在WO 2020/033938中公开了传感器核酸链的设计特征的示例,其内容通过引用并入本文。

[0174] 输入核酸链

[0175] 本文描述的输入核酸链在与核酸复合物中的传感器核酸链的序列结合时,作为激

活(开启)核酸复合物(例如RNAi双链体)的RNA干扰活性的触发器。

[0176] 输入核酸链包含与核酸复合物的传感器核酸链中的序列互补的序列。输入核酸链和传感器核酸链(例如突出部分)之间的互补结合导致传感器核酸链从核心核酸链置换,从而激活由过客核酸链和核心核酸链的中心区域形成的RNAi双链体的RNA干扰活性。

[0177] 输入核酸链可以是在一组靶细胞(例如癌细胞)中以相对高的表达水平存在,并且在一组非靶细胞(例如正常细胞)中以相对低的表达水平存在的细胞RNA转录物。在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物在靶细胞中被激活(开启)。而在非靶细胞中,核酸复合物保持未激活(关闭)。

[0178] 在靶细胞中,输入核酸链的表达水平可以比非靶细胞中高、高约、高至少或高至少约2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍。

[0179] 在靶细胞中,输入核酸链的表达可以在、在大约、在至少、在至少大约50个、100个、200个、300个、400个、500个、600个、700个、800个、900个、1000个转录物的水平。在一些实施方案中,在非靶细胞中,输入核酸链的表达在少于50个、少于40个、少于30个、少于20个或少于10个转录物的水平。优选地,非靶细胞没有可检测的输入核酸链的表达。

[0180] 输入核酸链可以包含mRNA、miRNA或非编码RNA,诸如长的非编码RNA、RNA片段或病毒的RNA转录物。在一些实施方案中,输入核酸链是在导致疾病进展的一组细胞中表达的RNA转录物,并因此被靶向用于RNAi治疗。非靶细胞通常是其中靶RNA的沉默会导致不利于治疗的副作用的一组细胞。为了治疗输入RNA在靶细胞中过表达的疾病或状况,可以设计核酸复合物,使得传感器核酸链包含与输入RNA序列互补的序列。在施用核酸复合物时,传感器核酸链与输入RNA的结合诱导靶细胞中的RNAi双链体从传感器双链体解离,从而激活靶向疾病或状况的RNAi。

[0181] 在一些实施方案中,输入核酸链包含生物标志物。术语“生物标志物”指的是作为疾病或紊乱、对疾病或紊乱的易感性和/或对治疗或其他干预的响应的指标的核酸序列(DNA或RNA)。生物标志物可以反映基因的表达、功能或调节。输入核酸链可以包含本领域已知的任何疾病生物标志物。

[0182] 输入核酸链可以是mRNA,包括细胞类型或细胞状态特异性mRNA。细胞类型或细胞状态特异性mRNA的实例包括但不限于C3、GFAP、NPPA、CSF1R、SLC1A2、PLP1和MBP mRNA。在一些实施方案中,输入核酸是微RNA(也称为miRNA),包括但不限于hsa-mir-23a-3p、hsa-mir-124-3p和hsa-mir-29b-3p。在一些实施方案中,输入核酸链是非编码RNA,例如MALAT1(转移相关肺腺癌转录物1,也称为NEAT2(非编码的核富集的丰富转录物2))。

[0183] 靶RNA

[0184] 核心核酸链的中心区域包含与靶RNA互补的序列,以引导靶特异性RNA干扰。在一些实施方案中,靶RNA是细胞RNA转录物。靶RNA可以是mRNA、miRNA、非编码RNA、病毒RNA转录物、细胞RNA转录物或其组合。

[0185] 如本文使用的,“靶RNA”指的是其表达通过RNA干扰被选择性抑制或沉默的RNA。靶RNA可以是包含其表达或活性与疾病、紊乱或状况相关的任何细胞基因或基因片段的靶基因。靶RNA也可以是其表达或活性与疾病、紊乱或某种状况相关的外来的或外源的RNA或RNA片段(例如病毒RNA转录物或前病毒基因)。

[0186] 在一些实施方案中,靶RNA可以包含癌基因、细胞分裂素基因、独特型蛋白基因(Id

蛋白基因)、朊病毒基因、表达诱导血管产生的蛋白的基因、黏附分子、细胞表面受体、参与转移和/或侵袭过程的蛋白的基因、蛋白酶的基因、调节凋亡和细胞周期的蛋白的基因、表达EGF受体的基因、多药耐药1的基因(MDR1)、人类乳头瘤病毒的基因、丙型肝炎病毒的基因或人类免疫缺陷病毒的基因、涉及心脏肥大的基因或其片段。

[0187] 靶RNA可以包含编码参与凋亡的蛋白质的基因。示例性靶RNA基因包括但不限于bcl-2、p53、半胱天冬酶、细胞毒性细胞因子诸如TNF- α 或Fas配体,以及本领域已知的能够介导凋亡的许多其他基因。靶RNA可以包含参与细胞生长的基因。示例性靶RNA基因包括但不限于癌基因(例如编码ABL1、BCL1、BCL2、BCL6、CBFA2、CBL、CSF1R、ERBA、ERBB、EBR2、ETSI、ETSI、ETV6、FGR、FOS、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM 1、PML、RET、SRC、TALI、TCL3和YES的基因),以及编码肿瘤抑制蛋白(例如APC、BRCA1、BRCA2、MADH4、MCC、NF 1、NF2、RB 1、TP53和WT1)的基因。靶RNA可包含人类主要组织相容性复合体(MHC)基因或其片段。示例性的MHC基因包括MHC I类基因,诸如I类 α 链基因的HLA-A、HLA-B或HLA-C亚区,或 β_2 -微球蛋白和MHC II类基因,诸如II类 α 链和 β 链基因的DP、DQ和DR亚区的任何基因(即DP α 、DP β 、DQ α 、DQ β 、DR α 和DR β)。

[0188] 在一些实施方案中,靶RNA可以包含编码病原体相关蛋白的基因。病原体相关蛋白包括但不限于参与宿主免疫抑制、病原体复制、病原体传播或感染维持的病毒蛋白,或促进病原体进入宿主、病原体或宿主的药物代谢、病原体基因组的复制或整合、宿主中感染的建立或传播或下一代病原体装配的宿主蛋白。在一些实施方案中,病原体可以是病毒(诸如疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒、水痘带状疱疹病毒、EB病毒、巨细胞病毒(CMV))、丙型肝炎、HIV、JC病毒)、细菌或酵母。

[0189] 靶RNA包含与中枢神经系统(CNS)的疾病或状况相关的基因。与CNS疾病或状况相关的示例性基因包括但不限于以下:APP、MAPT、SOD1、BACE1、CASP3、TGM2、NFE2L3、TARDBP、ADRB1、CAMK2A、CBLN1、CDK5R1、GABRA1、MAPK10、NOS1、NPTX2、NRGN、NTS、PDCD2、PDE4D、PENK、SYT1、TTR、FUS、LRDD、CYBA、ATF3、ATF6、CASP2、CASP1、CASP7、CASP8、CASP9、HRK、C1QBP、BNIP3、MAPK8、MAPK14、Rac1、GSK3B、P2RX7、TRPM2、PARG、CD38、STEAP4、BMP2、GJA1、TYROBP、CTGF、ANXA2、RHOA、DUOX1、RTP801、RTP801L、NOX4、NOX1、NOX2(gp91pho、CYBB)、NOX5、DUOX2、NOXO1、NOXO2(p47phox、NCF1)、NOXA1、NOXA2(p67phox、NCF2)、p53(TP53)、HTRA2、KEAP1、SHC1、ZNHIT1、LGALS3、HI95、SOX9、ASPP1、ASPP2、CTSD、CAPNS1、FAS和FASLG、NOMO和NOMO-R; TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、IL1bR、MYD88、TICAM、TIRAP和HSP47。

[0190] 药物组合物和施用方法

[0191] 组合物

[0192] 本文提供的公开内容还包括包含如本文描述的核酸复合物与一种或更多种相容且药学上可接受的载体组合的药物组合物。

[0193] 本文描述的核酸复合物可以被适当配制并通过任何方式引入细胞环境,该方式允许足够部分的构建体进入细胞以诱导基因沉默(如果发生的话)。

[0194] 核酸复合物可以与其它分子、分子结构、化合物或剂的混合物或其它制剂混合、封装、缀合或缔合,以帮助在递送过程中摄取、分布和/或吸收。

[0195] 本文采用短语“药学上可接受的”来指在合理医学判断的范围内适合用于与人类和动物的组织接触而无过度毒性、刺激、过敏反应或其他的问题或并发症,与合理的益处/

风险比率相称的那些剂、材料、组合物和/或剂型。

[0196] 如本文使用的短语“药学上可接受的载体”意指药学上可接受的物质、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料,参与将主题化学品从身体的一个器官或一部分运载或运输到身体的另一个器官或一部分。每种载体必须是“可接受的”,其意义在于与制剂的其他成分相容并且对受试者不是有害的。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:(1)糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;(4)黄耆粉;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,诸如可可脂和栓剂蜡;(9)油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)乙二醇,诸如丙二醇;(11)多元醇,诸如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;和(21)药物制剂中使用的其他无毒相容的物质。

[0197] 在一些实施方案中,药学上可接受的载体包括药学上可接受的盐。如本文使用的,“药学上可接受的盐”包括本文描述的组合物的一部分的酸形式的盐。这些包括胺的有机或无机酸盐。优选的酸盐是盐酸盐、乙酸盐、水杨酸盐、硝酸盐和磷酸盐。其他合适的药学上可接受的盐是本领域技术人员熟知的,并且包括各种无机酸和有机酸的碱性盐。

[0198] 在一些实施方案中,与本文描述的核酸复合物一起使用的药学上可接受的盐包括但不限于(1)由阳离子诸如钠、钾、铵、镁、钙、多胺诸如精胺和亚精胺形成的盐;(2)与无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等形成的酸加成盐;(3)与有机酸,诸如乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、葡萄糖酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、单宁酸、棕榈酸、海藻酸、聚谷氨酸、萘磺酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、多聚半乳糖醛酸等形成的盐;和(4)与元素阴离子诸如氯、溴和碘形成的盐。

[0199] 递送囊泡

[0200] 可以采用多种递送系统来递送本文描述的核酸复合物,诸如抗体缀合物、胶束、天然多糖、肽、合成阳离子聚合物、微粒、基于脂质的纳米载体等。

[0201] 在不同的实施方案中,用于递送本文描述的核酸复合物的递送系统和相关赋形剂可以不同。可以基于所使用的施用模式、制剂类型、靶部位和待治疗的疾病或紊乱的类型来选择递送系统,以促进组织渗透、细胞摄取并防止外渗和内体逃逸。

[0202] 在一些实施方案中,核酸复合物可以用一种或更多种聚合物配制,以形成包含核酸复合物和多维聚合物网络的超分子复合物。聚合物可以是直链的或支链的。超分子复合物可以采取任何合适的形式,并且优选为颗粒形式。

[0203] 核酸复合物可以经由脂质介导的递送系统递送。在一些实施方案中,核酸复合物可以被封装或与脂质体缔合。例如,核酸复合物可以用悬浮在低离子强度水性介质中的聚阳离子缩合剂和由阳离子形成囊泡的脂质形成的阳离子脂质体进行缔合。

[0204] 如本文使用的,术语“脂质体”指的是具有外部脂质外壳的脂质囊泡,通常形成一个或多个脂质双层上,封装着水相的内部。在一些实施方案中,脂质体是阳离子脂质体,由约20-80摩尔百分比之间的阳离子形成囊泡的脂质和剩余的中性形成囊泡的脂质和/或其他组分组成。如本文所用,“形成囊泡的脂质”指的是具有疏水和极性头部基团部分的任何两亲性脂质,并且其自身可以在水中自发形成双层囊泡(例如磷脂)。优选的形成囊泡

的脂质是二酰基链脂质,诸如磷脂,其酰基链长度通常在约14-22个碳原子之间,并且具有不同程度的不饱和。

[0205] 阳离子形成囊泡的脂质是在操作pH,例如pH 4-9,其极性头部基团带有净正电荷的形成囊泡的脂质。实例包括磷脂(例如,磷脂酰乙醇胺)、糖脂(例如,具有阳离子极性头部基团的脑苷脂和神经节苷脂)、胆固醇胺和相关阳离子甾醇(例如,1,2-二油酰基氧基-3-(三甲基氯化胺)丙烷(1,2-diolelyloxy-3-(trimethylamino)propane, DOTAP)、N-[1-(2,3,-双十四烷基氧)丙基]-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)、N-[1-(2,3,-二油基氧基)丙基]-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DORIE)、N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、 3β [N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(DC-Choi)和双十八烷基二甲基铵(DDAB))。

[0206] 中性形成囊泡的脂质是不具有净电荷或包括少部分的极性头部基团中带负电荷的脂质的形成囊泡的脂质。形成囊泡的脂质的实例包括磷脂,诸如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)和鞘磷脂(SM),以及胆固醇、胆固醇衍生物和其他不带电的甾醇。

[0207] 在一些实施方案中,本文使用的递送系统包括但不限于纳米颗粒(NP)、无机纳米颗粒(例如二氧化硅NP、金NP、量子点、超顺磁性氧化铁NP、顺磁性镧系离子)和其他纳米材料、核酸脂质颗粒、聚合物纳米颗粒、类脂质纳米颗粒(LNP)、壳聚糖和菊粉纳米颗粒、环糊精纳米颗粒、碳纳米管、脂质体、胶束结构、衣壳、聚合物(例如聚乙烯亚胺、阴离子聚合物)、聚合物基质、水凝胶、树枝状大分子(例如聚丙烯亚胺(PPI)和聚酰胺-胺(PAMAM))、核酸纳米结构、外来体和GalNAc缀合的蜂毒肽样肽(NAG-MLP)。在一些实施方案中,核酸复合物可以被配制成缓冲溶液,诸如磷酸盐缓冲盐溶液。

[0208] 在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物经由类脂质纳米颗粒(LNP)递送。LNP可以包括可电离的LNP、阳离子LNP和/或中性的LNP。可电离的LNP在循环过程中几乎不带电,但在低pH环境中,例如在内体和溶酶体中被质子化。阳离子LNP在血液循环和内体或溶酶体中表现出组成性正电荷。中性LNP是中性的,在循环过程中和在内体或溶酶体中不带电。

[0209] 本文描述的核酸复合物可以以裸的或与配体缀合的被提供。裸siRNA指的是不包含与siRNA共价或非共价结合的递送系统的系统。当以裸的形式递送时,裸siRNA可以被局部注射到靶部位,诸如相对封闭且含有少量核酸酶的特定器官(例如眼睛)。

[0210] 在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物可以附接至(例如融合或缀合至)配体,以形成配体-siRNA缀合物,其可以通过配体和细胞或组织的表面受体之间的特异性识别和相互作用将siRNA转运到所需的组织和细胞。常见的靶向配体包括糖类、适体、抗体或抗体片段、肽(例如,细胞穿透肽、内渗肽)和小分子(例如,N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)),以及其他对于技术人员来说明显的。

[0211] 核酸复合物可以与适体缀合。本文使用的术语“适体”指的是以高亲和力和特异性结合特定靶的寡核苷酸或肽分子。特别地,核酸适体可以包括例如通过反复的体外选择或等效的SELEX(通过指数富集的配体的系统演化)而被工程化的核酸物质,以结合多种分子靶,诸如小分子、蛋白质、核酸,以及甚至细胞、组织和生物体。肽适体是设计用于特异性结合并干扰细胞内蛋白-蛋白相互作用的肽。特别地,肽适体可以从例如根据源自酵母双杂交

(Y2H) 系统的选择策略得到。适体在生物技术和治疗应用中是有用的,因为它们提供了与抗体相媲美的分子识别特性。

[0212] 在一些实施方案中,核酸复合物与小分子缀合。本文使用的术语“小分子”表示合成的或生物来源的有机化合物,并且虽然可以包括单体和/或初级代谢物,但不是聚合物。在一些实施方案中,小分子可以包括不是蛋白质或核酸的分子,其发挥内源性(例如,靶的抑制或激活)或外源性(例如,细胞信号传导)的生物学作用,其用作分子生物学中的工具,或者其适合用作医学中的药物。小分子也可以和天然生物分子没有关系。通常,小分子具有低于1kg/mol的摩尔质量。示例性小分子包括次级代谢物(例如放线菌素-D)、某些抗病毒药物(诸如金刚烷胺和金刚乙胺)、致畸剂和致癌物(诸如佛波醇12-肉豆蔻酸13-乙酸酯)、天然产物(诸如青霉素、吗啡和紫杉醇)以及可由技术人员可识别的另外的分子。在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物与GalNAc缀合。

[0213] 适于用于将核酸复合物靶向特定细胞类型的配体的实例包括但不限于能够与上皮性癌和骨髓干细胞的叶酸受体结合的叶酸,能与多种细胞的维生素受体结合的水溶性维生素,能够与CD4⁺淋巴细胞的CD4结合的吡哆醛磷酸盐、能够与肝脏肝细胞和血管内皮细胞的LDL结合的载脂蛋白、能够与胰岛素受体结合的胰岛素、能够与内皮细胞的转铁蛋白受体结合的转铁蛋白、能够与肝脏肝细胞的去唾液酸糖蛋白受体结合的半乳糖、能够与活化内皮细胞的E、P选择素结合的唾液酸基-Lewis_x、能够与中性粒细胞和白细胞的L选择素结合的Mac-1、能够与肿瘤上皮细胞的Flk-1,2结合的VEGF、能够与肿瘤上皮细胞的FGF受体结合的碱性FGF、能够与上皮细胞的EFG受体结合的EFG、能够与血管内皮细胞的 $\alpha_4\beta_1$ 整合素结合的VCAM-1、能够与血管内皮细胞的 $\alpha_L\beta_2$ 整合素结合的ICAM-1、能够与血管内皮细胞和活化血小板的 $\alpha_V\beta_3$ 整合素结合的PECAM-1/CD31、能够与动脉粥样硬化斑块中内皮细胞和平滑肌细胞的 $\alpha_V\beta_5$ 整合素和 $\alpha_V\beta_1$ 整合素结合的骨调素、能够与肿瘤内皮细胞和血管平滑肌细胞的 $\alpha_V\beta_3$ 整合素结合的RGD序列或能够与CD4⁺淋巴细胞的CD4结合的HIV GP 120/41或GP120,以及可由技术人员识别的其他。

[0214] 在一些实施方案中,本文描述的核酸复合物的递送使得至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的靶细胞掺入核酸复合物。在一些实施方案中,约0.1nM-10nM的核酸复合物被递送至靶细胞。

[0215] 制剂

[0216] 可以使用任何合适的药物制剂。在一些实施方案中,可以专门配制本公开内容的药物组合物用于以固体或液体形式施用,包括采用以下的那些:(1)口服施用,例如浸液(水性或非水性溶液或悬浮液)、片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、糊剂;(2)肠胃外施用,例如作为无菌溶液或悬浮液通过皮下、肌内或静脉内注射;(3)表面施用,例如作为乳膏、软膏或喷雾应用于皮肤;(4)阴道内或直肠内,例如作为阴道栓剂、乳膏或泡沫;或(5)气雾剂,例如作为含水气雾剂、脂质体制剂或含有水凝胶组合物的固体颗粒。药物组合物可以包含一种或更多种药学上可接受的载体。

[0217] 在本公开内容的方法中有用的制剂包括那些适用于口服、鼻腔、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道、气雾剂和/或肠胃外施用的制剂。制剂可以方便地以单位剂型呈现,并且可以通过药学领域熟知的任何方法制备。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将取决于所治疗的宿主、特定的施用模式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂

型的活性成分的量通常将是产生治疗效果的RNAi构建体的量。通常,在100%中,该量将在活性成分的约1%至约99%的范围内,优选从约5%至约70%,最优选从约10%至约30%。

[0218] 适合于口服施用的制剂可以呈胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基底,通常是蔗糖和阿拉伯树胶或黄蓍胶)、粉末、颗粒剂的形式,或作为在水性或非水性液体中的溶液或悬浮液,或作为水包油或油包水液体乳剂,或作为酞剂或糖浆剂,或作为糖果锭剂(使用惰性基底,诸如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯树胶)和/或作为漱口剂及类似物,其各自包含预定量的呼吸解偶联剂作为活性成分。核酸复合物组合物也可以作为大丸剂、药糖剂或糊剂施用。

[0219] 在用于口服施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉剂、颗粒剂等)中,活性成分与一种或更多种药学上可接受的载体混合,诸如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或以下任何一种:(1) 填料或增量剂,诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2) 粘合剂,诸如例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯树胶;(3) 保湿剂,诸如甘油;(4) 崩解剂,诸如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5) 溶液阻断剂,诸如石蜡;(6) 吸收加速剂,诸如季铵化合物;(7) 润湿剂,诸如例如乙酰醇和单硬脂酸甘油酯;(8) 吸收剂,诸如高岭土和膨润土;(9) 润滑剂,诸如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物;以及(10) 着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可以包含缓冲剂。相似类型的固体组合物还可以用作使用诸如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂软填充和硬填充的明胶胶囊中的填料。

[0220] 片剂可通过任选地与一种或更多种辅助成分一起压制或模制来制备。压制的片剂可以使用粘合剂(例如,明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,淀粉乙醇酸钠或交联的羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂来制备。模制的片剂可以通过在合适的机器中模制湿润的粉末化肽或模拟肽与惰性液体稀释剂的混合物来制备。

[0221] 本公开内容的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以通过本发明的方法来确定,以便获得活性成分的量,其有效地实现对特定受试者、组合物和施用方式的期望治疗响应,并且对受试者无毒。

[0222] 片剂和其他固体剂型诸如糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂可以任选地用包衣和壳刻痕或制备,诸如肠溶包衣和药物配制技术中熟知的其他包衣。它们可以被配制,以便提供其中的活性成分的缓慢释放或控制释放,例如使用不同比例的羟丙基甲基纤维素以提供期望的释放概况、其他聚合物基质、脂质体和/或微球。它们可以通过例如过滤经过细菌滞留过滤器来灭菌,或通过无菌固体组合物的形式中掺入灭菌剂来灭菌,此形式可以在即将使用之前被溶解在无菌水中或一些其他无菌可注射介质中。这些组合物还可以任选地包含乳浊剂(opacifying agent),并且可以是这样的组合物:该组合物仅仅或优先地在胃肠道的某一部分中释放活性成分,任选地以延迟方式释放。可以被使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。如果合适的话,活性成分还可以与上文描述的赋形剂中的一种或更多种一起呈微囊化形式。

[0223] 用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆剂和酞剂。除了活性成分之外,液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂,诸如例如水或

其他溶剂、增溶剂和乳化剂,诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油类(特别地,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。

[0224] 除惰性稀释剂之外,口服组合物还可以包含辅料,诸如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、增香剂和防腐剂。

[0225] 除了活性剂之外,悬浮液可以包含悬浮剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄耆胶及其混合物。

[0226] 用于直肠或阴道施用的制剂可以呈现为栓剂,其可以通过将一种或更多种呼吸解偶联剂与一种或更多种合适的无刺激性赋形剂或载体混合来制备,该赋形剂或载体包括例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸酯,并且其在室温为固体但在体温为液体,并且因此将在直肠或阴道腔中融化并释放活性剂。

[0227] 适用于阴道施用的制剂还包括包含本领域已知的合适的载体的阴道栓剂、卫生棉条、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。

[0228] 水凝胶组合物的表面或透皮施用的剂型包括粉末、喷雾、软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。可以在无菌条件下将活性成分与药学上可接受的载体以及可能与需要的任何防腐剂、缓冲剂或喷射剂混合。

[0229] 除了呼吸解偶联剂之外,软膏、糊剂、乳膏和凝胶可以包含赋形剂,诸如动物脂肪和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄耆胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌或其混合物。

[0230] 眼部制剂、眼膏、粉末、溶液(例如眼药水)等也被认为在本公开内容的范围内。

[0231] 可以被用于本发明的药物组合物的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、以及其合适的混合物、植物油(诸如橄榄油)、和可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。例如,通过使用包衣材料诸如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需要的粒度以及通过使用表面活性剂,可以维持合适的流动性。

[0232] 这些组合物还可以包含佐剂诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。防止微生物的作用可以通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等来确保。还可以合意的是,在组合物中包含等渗剂,诸如糖、氯化钠以及类似物。此外,可注射的药物形式的延长的吸收可以通过包含延迟吸收的剂诸如单硬脂酸铝和明胶来引起。

[0233] 本文描述的药物组合物包含治疗有效量的核酸复合物。

[0234] 本文使用的短语“治疗有效量”指的是本文公开的核酸复合物的量,其以合理的效益/风险比有效地产生一些期望的治疗效果,例如癌症治疗。如本领域技术人员所理解的,治疗有效量也取决于构建体的结构、所使用的施用途径、靶部位和待治疗的特定疾病或紊乱而变化。例如,如果当与疾病或紊乱相关的可测量参数降低至少20%时给定的临床治疗被认为是有效的,则用于治疗该疾病或紊乱的构建体的治疗有效量是实现该可测量参数降低至少20%所必需的量。

[0235] 在一些实施方案中,本文描述的药物组合物包含足以抑制被治疗的受试者(例如动物或人类)中靶基因表达的合适剂量的核酸复合物。在一些实施方案中,核酸复合物的合适剂量在受试者每天每千克体重0.001毫克至0.25毫克的范围内,或者在每天每千克体重0.01微克至20微克的范围内,或者在每天每千克体重0.01微克至10微克的范围内,或者在

每天每千克体重0.10至5微克的范围内,或者在每天每千克体重0.1微克至2.5微克的范围内。包含核酸复合物的药物组合物可以每天施用一次,每天施用两次,每天施用三次,或者根据需要或医生的处方施用。本文描述的药物组合物也可以以剂量单位提供,该剂量单位包括在一天中以适当的间隔施用的两个、三个、四个、五个、六个或更多个子剂量。剂量单位也可以混合成单剂量(例如使用持续或控制释放制剂),其可以以控制的方式持续释放若干天。

[0236] 对于技术人员来说明显的是,本文描述的药物组合物的合适剂量单位可以从细胞培养试验获得的数据估计,并进一步从动物研究中获得的数据确定。例如,本文描述的药物组合物的毒性和治疗效力可以通过细胞培养物或实验动物中的标准药物程序来确定,例如,用于确定LD50(对50%群体致死的剂量)和ED50(对50%群体治疗有效的剂量)的标准药物程序。毒性作用与治疗作用之间的剂量比率为治疗指数,并且治疗指数可以表示为比率LD50/ED50。表现出大治疗指数的组合物是优选的。可以选择组合物与特定递送系统组合的合适剂量,以使毒性最小化,诸如使对非靶向细胞的潜在损伤最小化并减少副作用。

[0237] 施用

[0238] 如对本技术人员将明显的,本文描述的核酸复合物及其组合物可以使用任何合适的施用途径施用于受试者。核酸复合物及其组合物可以局部地或全身地施用于靶部位。

[0239] 本文使用的短语“局部施用(local administration)”或“局部施用(topic administration)”表示使组合物与个体的身体接触的任何施用途径,使得产生的组合物在身体中的位置是局部的(限于期望成像处的特定组织、器官或其他身体部位)。示例性的局部施用途径包括通过针头注射至特定组织中,灌胃到胃肠道中,以及将含有水凝胶组合物的溶液涂在皮肤表面上。

[0240] 本文使用的术语“全身施用”表示将核酸复合物组合物与个体的身体接触的任何施用途径,使得获得的组合物在体内的位置是全身性的(即,不限于期望成像处的特定组织、器官或其他身体部位)。全身施用包括肠内和胃肠外施用。肠内施用是一种全身施用途径,其中物质经由消化道提供,并且包括但不限于口服施用、通过胃饲管施用、通过十二指肠饲管施用、胃造口术、肠内营养和直肠施用。胃肠外施用是一种全身施用途径,其中物质通过除消化道以外的途径施用,并且包括但不限于静脉内施用、动脉内施用、肌肉内施用、皮下施用、皮内施用、腹膜内施用和膀胱内输注。

[0241] 在一些实施方案中,施用方法可以包括气雾剂递送、鼻腔递送、阴道递送、直肠递送、口腔递送、眼部递送、局部递送、表面递送、脑池内递送、腹膜内递送、口服递送、肌肉注射、静脉内(IV)注射、皮下(SC)注射、结节内注射、肿瘤内注射、腹膜内注射和/或皮内注射或其任何组合。施用也可以是部位特异性注射(例如在眼睛或脑脊液中)。

[0242] 在一些实施方案中,施用可以是离体转导、细胞注射、皮下注射、静脉内注射、鞘内递送、脑室内注射、皮内注射、玻璃体内递送、肿瘤内递送或局部应用(例如局部滴眼液)。

[0243] 施用方法取决于靶部位、待靶向的细胞/组织类型以及构建体的配制方式。在一些实施方案中,脂质制剂可以通过诸如静脉内、肌肉或腹膜内注射、或通过口服或吸入或本领域已知的其他方法施用于动物。

[0244] 在一些实施方案中,施用可以是SC注射到表皮和真皮下的脂肪组织中。在一些实施方案中,SC施用可以与本文描述的配体缀合的核酸复合物相关联。在一些实施方案中,SC

施用可以使药物进入体循环和进入淋巴系统的释放速率较慢,从而为介导摄取的细胞受体的再循环提供更多时间。在一些实施方案中,SC施用可以更快且更容易施用,从而减少治疗负担。

[0245] 例如,IV施用可以与本文描述的纳米颗粒和脂质纳米颗粒配制的核酸复合物相关联。在一些实施方案中,IV施用可以避免肝脏中的首过代谢,并提供通过体循环快速接近靶组织的途径。

[0246] 靶部位

[0247] 本文描述的组合物可以施用到任何合适的靶部位。靶部位可以是体外的、体内的或者离体的。示例性靶部位可以包括在体外培养物中生长的细胞,包括原代哺乳动物细胞、永生化细胞系、肿瘤细胞、干细胞等。另外的示例性靶部位包括离体培养物中的细胞、组织和器官和在受试者体内的细胞、组织、器官或器官系统,例如肺、脑、肾脏、肝脏、心脏、中枢神经系统、外周神经系统、胃肠系统、循环系统、免疫系统、骨骼系统、感觉系统、个体身体内和技术人员可识别的另外的环境。

[0248] 靶部位可以包括疾病或紊乱的部位,或者可以位于疾病或紊乱的部位附近。可以预先确定疾病或紊乱的一个或更多个部位的位置。可以在该方法期间(例如,通过诸如超声或MRI的基于成像的方法)确定疾病或紊乱的一个或更多个部位的位置。例如靶部位可包括组织,诸如肾上腺组织、阑尾组织、膀胱组织、骨、肠组织、脑组织、乳房组织、支气管、冠状组织、耳组织、食道组织、眼组织、胆囊组织、生殖器组织、心脏组织、下丘脑组织、肾组织、大肠组织、肠道组织、喉组织、肝组织、肺组织、淋巴结、口腔组织、鼻组织、胰腺组织、甲状旁腺组织、脑垂体组织、前列腺组织、直肠组织、唾液腺组织、骨骼肌组织、皮肤组织、小肠组织、脊髓、脾组织、胃组织、胸腺组织、气管组织、甲状腺组织、输尿管组织、尿道组织、软组织和结缔组织、腹膜组织、血管组织和/或脂肪组织。组织可以是发炎的组织。组织可以包括:(i) I级、II级、III级或IV级癌组织;(ii) 转移癌组织;(iii) 混合级癌组织;(iv) 亚分级癌组织;(v) 健康组织或正常组织;和/或(vi) 癌组织或异常组织。在一些实施方案中,在施用,核酸复合物及其组合物在癌组织的脉管系统中积累。在一些实施方案中,靶部位可以包括实体瘤。

[0249] 在不同的实施方案中,核酸复合物或其组合物可以被施用处的靶部位可以根据所使用的施用模式和待治疗的疾病或紊乱的类型而变化。在一些实施方案中,靶部位可以与眼组织、呼吸系统、肌肉、肝脏、中枢神经系统、实体瘤、造血系统、皮肤、眼睛、胎盘、骨骼或个体中的其他靶部位相关,这对于技术人员来说是明显的。

[0250] 本文在成像上下文中使用的术语“个体”或“受试者”或“患者”包括动物,并且特别是高等动物,并且特别是脊椎动物诸如哺乳动物,并且更特别是人类。

[0251] 在一些实施方案中,受试者靶部位处的核酸复合物浓度与靶部位外(例如受试者血液循环、血清或血浆中)的核酸复合物浓度的比率可以不同。在一些实施方案中,受试者靶部位处的核酸复合物的浓度与靶部位外(例如,受试者血液循环、血清或血浆中)的核酸复合物的浓度的比率可以是、或大约是、至少是、至少大约是、至多是或至多大约是以下:1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.5:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、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、49:1、50:1、51:1、52:1、53:1、54:1、55:1、56:1、57:1、58:1、59:1、60:1、61:1、62:1、63:1、64:1、65:1、66:1、67:1、68:1、69:1、70:1、71:1、72:1、73:1、74:1、75:1、76:1、77:1、78:1、79:1、80:1、81:1、82:1、83:1、84:1、85:1、86:1、87:1、88:1、89:1、90:1、91:1、92:1、93:1、94:1、95:1、96:1、97:1、98:1、99:1、100:1、200:1、300:1、400:1、500:1、600:1、700:1、800:1、900:1、1000:1、2000:1、3000:1、4000:1、5000:1、6000:1、7000:1、8000:1、9000:1、10000:1或这些值中任何两个之间的数字或范围。

[0252] 靶部位可以包括靶细胞。靶细胞可以是肿瘤细胞(例如实体瘤细胞)。在一些实施方案中,将本文描述的核酸复合物和/或组合物施用于受试者的靶部位导致靶细胞的至少约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约100%或这些值中任何两个之间的数量或范围的死亡。在施用核酸复合物和/或组合物后,靶细胞死亡与非靶细胞死亡的比率可以为至少约2:1。在一些实施方案中,施用核酸复合物和/或组合物后靶细胞死亡与非靶细胞死亡的比率可以是、或大约是、或至少是、或至少大约是、或至多是、或至多大约是以下:1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.5:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、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、49:1、50:1、51:1、52:1、53:1、54:1、55:1、56:1、57:1、58:1、59:1、60:1、61:1、62:1、63:1、64:1、65:1、66:1、67:1、68:1、69:1、70:1、71:1、72:1、73:1、74:1、75:1、76:1、77:1、78:1、79:1、80:1、81:1、82:1、83:1、84:1、85:1、86:1、87:1、88:1、89:1、90:1、91:1、92:1、93:1、94:1、95:1、96:1、97:1、98:1、99:1、100:1、200:1、300:1、400:1、500:1、600:1、700:1、800:1、900:1、1000:1、2000:1、3000:1、4000:1、5000:1、6000:1、7000:1、8000:1、9000:1、10000:1或这些值中任何两个之间的数字或范围。

[0253] 调节靶RNA的方法

[0254] 本文还提供了使用本文描述的核酸复合物或其组合物调节靶RNA的方法。该方法可以包括使包含靶RNA的细胞与本文描述的核酸复合物接触。当检测到输入核酸链时,输入链可以结合到传感器核酸链的突出部分,以引起传感器核酸链从核心核酸链的置换,从而将与靶RNA互补的序列释放到细胞中,从而调节靶RNA。

[0255] 使细胞与核酸复合物接触可以用在体外的、体内的或者离体的细胞进行。例如,细胞可以在体外培养物中生长的细胞,包括原代哺乳动物细胞、永生化细胞系、肿瘤细胞、干细胞等。细胞可包括在离体培养物中的细胞、组织和器官以及在受试者体内的细胞、组织、器官或器官系统,例如肺、脑、肾脏、肝脏、心脏、中枢神经系统、外周神经系统、胃肠系统、循环系统、免疫系统、骨骼系统、感觉系统、个体的身体内和技术人员可识别的另外的环境。细胞可以是疾病细胞或紊乱的细胞。细胞可以是癌细胞。使细胞与核酸复合物的接触也可以在体外、离体或者体内发生,例如,在受试者的身体中。

[0256] 治疗疾病或紊乱的方法

[0257] 本文还提供了使用本文描述的核酸复合物或其组合物治疗疾病或状况的方法。该方法可包括将本文所述的核酸复合物施用于有相应需要的受试者。当检测到输入核酸链

时,输入核酸链可以结合到传感器核酸链的突出部分,以引起传感器核酸链从核心核酸链置换,从而释放与靶RNA互补的序列,从而降低受试者中靶RNA的活性或靶RNA的蛋白质表达,以治疗疾病或状况。

[0258] 本文使用的术语“状况”表示不符合与个人完全身体、精神和社会健康状态相关的标准身体状态的个体身体的身体状态(作为一个整体或作为其一个或多个部分)。本文描述的状况包括但不限于紊乱和疾病,其中术语“紊乱”表示与身体或其任何部分的功能异常相关的活着的个体的状况,并且术语“疾病”表示损害身体或其任何部分的正常功能的活着的个体的状况,并且通常通过区分体征和症状来表现。

[0259] 如本文使用的,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”指的是针对于患者表现出的疾病、紊乱或生理状况而进行的干预。治疗的目的是包括但不限于以下中的一个或多个:减轻或预防症状,减缓或终止疾病、紊乱或状况的进展或恶化,以及缓解疾病、紊乱或状况。术语“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”包括,例如,治疗性治疗、预防性治疗以及其中降低受试者将发展紊乱或其他风险因素的风险的应用。治疗不需要完全治愈紊乱,并且涵盖降低症状或潜在风险因素的实施方案。在一些实施方案中,“治疗”指的是治疗性治疗和预防性(prophylactic)措施或预防性(preventive)措施。有治疗需要的那些包括已经受疾病或紊乱或不期望的生理状况影响的那些,以及待预防疾病或紊乱或不期望的生理状况的那些。如本文使用的,术语“预防”指的是降低个体以后表现这些症状的负担的任何活动。这可以在一级、二级和/或三级预防水平上进行,其中:a)一级预防避免症状/紊乱/状况的发展;b)二级预防活动针对状况/紊乱/症状治疗的早期阶段,从而增加干预措施防止状况/紊乱/症状的发展和症状的出现的几率;以及c)三级预防通过例如恢复功能和/或降低任何状况/紊乱/症状或相关并发症来降低已经确定的状况/紊乱/症状的负面影响。术语“预防”并不需要100%消除事件的可能性。而是,它表示在存在化合物或方法的情况下,事件发生的可能性已经降低。

[0260] 各种疾病和紊乱可以用本文提供的核酸复合物组合物治疗。本文公开的疾病和紊乱包括但不限于HIV感染伴淋巴瘤、血友病A、血友病B、高胆固醇血症、动脉粥样硬化性心血管疾病、肾损害、慢性乙型肝炎、急性间歇性卟啉症、非典型溶血性尿毒症综合征、原发性高草酸尿症、遗传性甲状腺素运载蛋白淀粉样变性(hATTR)、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏性肝病、乙型肝炎、镰状细胞病、原发性高草酸尿症、尤文肉瘤、晚期妇科癌症、III/IV期卵巢癌、胰腺癌、晚期实体瘤、肝细胞癌/肝癌、淋巴瘤和白血病、心脏病、心力衰竭、瘢痕疙瘩、增生性瘢痕、复发或难治性B细胞淋巴瘤、增生性瘢痕、年龄相关性黄斑变性、视网膜瘢痕、心脏外科手术、心脏肥大、非动脉炎性前部缺血性视神经病变、奥尔波特综合征、HIV感染/AIDS、胰腺导管腺癌/胰腺癌、干眼症和各种实体瘤。

[0261] 在一些实施方案中,疾病或紊乱可以是癌症。癌症可以是实体瘤、液体瘤或其组合。本文描述的核酸复合物或其组合物可以使用任何合适的施用途径施用于包含肿瘤的细胞、组织和/或器官。例如,核酸复合物或其组合物可以经由皮下注射或肿瘤内递送施用于包含肿瘤的细胞、组织和/或器官。

[0262] 癌症可以选自由以下组成的组:结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌、食道癌、黑色素瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈部癌症、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区域的癌症、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈

癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症、所述癌症的组合以及所述癌症的转移病灶。

[0263] 癌症可以是选自以下中的一种或更多种的血液学癌症：慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性白血病、急性淋巴白血病(ALL)、B细胞急性淋巴白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴白血病(T-ALL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、B细胞前淋巴细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、Burkitt淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴增生性状况、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症或白血病前期。

[0264] 可以使用本文公开的核酸复合物和组合物来预防和/或治疗的癌症的非限制性实例包括：肾癌(renal cancer)；肾癌(kidney cancer)；多形性胶质母细胞瘤；转移性乳腺癌；乳腺癌；乳腺肉瘤；神经纤维瘤；神经纤维瘤病；儿童肿瘤；神经母细胞瘤；恶性黑色素瘤；表皮癌；白血病诸如但不限于：急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病诸如成髓细胞、早幼粒细胞、髓单核细胞、单核细胞、红细胞白血病和骨髓增生异常综合征、慢性白血病诸如但不限于：慢性髓细胞(粒细胞)性白血病、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞性白血病；真性红细胞增多症；淋巴瘤，诸如但不限于霍奇金氏病、非霍奇金氏病；多发性骨髓瘤，诸如但不限于阴燃多发性骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、浆细胞白血病、孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤；Waldenstrom巨球蛋白血症；意义未明单克隆丙种球蛋白血症；良性单克隆丙种球蛋白病；重链病；骨癌和结缔组织肉瘤，诸如但不限于骨肉瘤、骨髓瘤骨病、多发性骨髓瘤、胆脂瘤诱导的骨性骨肉瘤、佩吉特骨病(Paget's disease of bone)、骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、恶性巨细胞瘤、骨纤维肉瘤、脊索瘤、骨膜肉瘤、软组织肉瘤、血管肉瘤(血管内皮瘤)、纤维肉瘤、卡波西肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、神经鞘瘤、横纹肌肉瘤和滑膜肉瘤；脑肿瘤，诸如但不限于：胶质瘤、星形细胞瘤、脑干胶质瘤、室管膜瘤、少突胶质细胞瘤、非神经肿瘤、听神经瘤、颅咽管瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、松果体细胞瘤、松果体母细胞瘤和原发性脑淋巴瘤；乳腺癌，包括但不限于腺癌、小叶(小细胞)癌、导管内癌、髓样乳腺癌、黏液性乳腺癌、管状乳腺癌、乳头状乳腺癌、佩吉特病(包括少年佩吉特病)和炎性乳腺癌；肾上腺癌，诸如但不限于嗜铬细胞瘤和肾上腺皮质癌；甲状腺癌，诸如但不限于乳头状或滤泡状甲状腺癌、甲状腺髓样癌和间变性甲状腺癌；胰腺癌，诸如但不限于胰岛细胞瘤、胃泌素瘤、胰高血糖素瘤、脂肪瘤、生长抑素分泌瘤和类癌或胰岛细胞瘤；垂体癌，诸如但不限于库欣病、催乳素分泌瘤、肢端肥大症和尿崩症；眼部癌症，诸如但不限于眼部黑色素瘤，诸如虹膜黑色素瘤、脉络膜黑色素瘤、和睫状体黑色素瘤和视网膜母细胞瘤；阴道癌，诸如鳞状细胞癌、腺癌和黑色素瘤；外阴癌，诸如鳞状细胞癌、黑色素瘤、腺癌、基底细胞癌、肉瘤和佩吉特病；宫颈癌，诸如但不限于鳞状细胞癌和腺癌；子宫癌，诸如但不限于子宫内膜癌和子宫肉瘤；卵巢癌，诸如但不限于卵巢上皮癌、交界性肿瘤、生殖细胞瘤和间质瘤；食管癌，诸如但不限于鳞状癌、腺癌、腺样囊性癌、黏液表皮样癌、腺鳞状癌、肉瘤、黑色素瘤、浆细胞瘤、疣状癌和燕麦细胞(小细胞)癌；胃癌，诸如但不限于腺癌、真菌

(息肉样)、溃疡、浅表扩散、弥漫性扩散、恶性淋巴瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和癌肉瘤；结肠癌；结肠直肠癌、KRAS突变结肠直肠癌；结肠癌；直肠癌；肝癌，诸如但不限于肝细胞癌和肝母细胞瘤、胆囊癌，诸如腺癌；胆管癌，诸如但不限于乳头状、结节状和弥漫性胆管癌；肺癌，诸如KRAS突变的非小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鳞状细胞癌（表皮样癌）、腺癌、大细胞癌和小细胞肺癌；肺癌；睾丸癌，诸如但不限于胚性肿瘤、精原细胞瘤、间变性、经典（典型）、精母细胞瘤、非精原细胞瘤、胚胎性癌、畸胎瘤、绒毛膜癌（卵黄囊肿瘤）；前列腺癌，诸如但不限于雄激素非依赖型前列腺癌、雄激素依赖型前列腺癌、腺癌、平滑肌肉瘤和横纹肌肉瘤；阴茎癌；口腔癌，诸如但不限于鳞状细胞癌；基底癌；唾液腺癌，诸如但不限于腺癌、黏液表皮样癌和腺样囊性癌；咽喉癌，诸如但不限于鳞状细胞癌和疣状；皮肤癌，诸如但不限于，基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤、浅表性扩散黑色素瘤、结节性黑色素瘤、黄斑恶性黑色素瘤、粉刺性黑色素瘤；肾癌，诸如但不限于肾细胞癌、腺癌、高肾瘤、纤维肉瘤、移行细胞癌（肾盂和/或子宫）；肾癌；威耳姆氏肿瘤（Wilms' tumor）；以及膀胱癌，诸如但不限于移行细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌、癌肉瘤。在一些实施方案中，癌症是黏液肉瘤、骨肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、间皮瘤、滑膜瘤、血管母细胞瘤、上皮癌、囊腺癌、支气管源性癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌或乳头状腺癌。

[0265] 在一些实施方案中，疾病或紊乱可以是中枢神经系统（CNS）疾病或状况。本文描述的核酸复合物或其组合物可使用任何合适的施用途径施用于CNS的细胞、组织和/或器官。例如，核酸复合物或其组合物可经由鞘内注射、脑室内注射或脑内注射施用于受试者的CNS的细胞、组织和/或器官以穿透血脑屏障。在一些实施方案中，CNS的细胞、组织和/或器官包括受损或发炎的细胞、组织或器官。在一些实施方案中，CNS的细胞、组织和/或器官包括脑、白质、灰质、脑干、小脑、间脑、大脑、脊髓、颅神经、上述任何一种的细胞、上述任何一种的组织或其组合。

[0266] 在一些实施方案中，CNS疾病是运动紊乱、记忆紊乱、成瘾、注意缺陷/多动紊乱（ADHD）、自闭症、双相情感紊乱、抑郁症、脑炎、癫痫/痉挛、偏头痛、多发性硬化症、神经退行性紊乱、精神疾病、神经炎性疾病、阿尔茨海默症、亨廷顿病、帕金森病、图雷特综合征、肌张力障碍或其组合。在一些实施方案中，疾病是神经炎性疾病。例如，神经炎性疾病是帕金森病、阿尔茨海默症、多发性硬化症或其组合。

[0267] 试剂盒

[0268] 本文提供的公开内容还包括包含本文描述的一种或更多种组合物的试剂盒，在合适的包装诸如在容器、包装或分配器中，并且可以还包含可以包括使用说明、临床研究的讨论、副作用的列表等的书面材料。这样的试剂盒还可以包括诸如科学文献参考、包装插入材料、临床试验结果和/或这些的摘要等信息，这些信息指示或确定组合物的活性和/或优点，和/或描述剂量、施用、副作用、药物相互作用或对医疗保健提供者有用的其他信息。这些信息可以基于多种研究的结果，例如，使用涉及体内模型的实验动物的研究和基于人体临床试验的研究。试剂盒可包括本文描述的一个或更多个单位剂量。组合物可以是以各部分的试剂盒的形式。在各部分的试剂盒中，本文公开的组合物的一种或更多种组分被彼此独立地提供（例如，构建体、赋形剂和/或稀释剂作为单独的组合物提供），并且然后被使用（例如，由用户）以生成组合物。

实施例

[0269] 以上讨论的实施方案的一些方面在以下实施例中进一步详细公开,其并非意图以任何方式限制本公开内容的范围。

[0270] 实施例1

[0271] 具有或不具有C3接头的RNAi活性

[0272] 本实施例展示了具有或不具有作为5' 和3' 连接头的C3接头的多种siRNA结构域变体的RNAi活性。

[0273] 装配新构建体的过客链和核心链以形成新构建体的siRNA结构域。测试这些siRNA结构域的不同变体的RNAi活性。

[0274] 为了测试构建体,通过在1x磷酸盐缓冲盐水中使过客链和核心链热退火来装配CASi siRNA区段。使用双萤光素酶测定法测量CASi siRNA区段的RNAi活性。使用lipofectamine2000将CASi siRNA区段与携带亨廷顿蛋白基因siRNA靶序列的双萤光素酶载体共转染至HCT 116细胞中。48小时后,裂解细胞,并通过比较携带靶序列的海肾萤光素酶与用作参考对照的萤火虫萤光素酶的发光值来分析靶基因的敲低。装配CASi siRNA、细胞转染和双萤光素酶测定的方法和程序可以在例如国际申请WO 2020/033938中找到,其内容通过引用整体并入本文。

[0275] 图5A和图5B示出了在本实施例中确定其RNAi活性的两个示例性核酸复合物构建体的序列图。上方核酸复合物构建体包含与过客链v3p1碱基配对的核心链v3c1,其中C3接头被用作5' 和3' 连接头。下方核酸复合物构建体包含与相同过客链碱基配对的核心链v3c5,其中不具有C3接头被用作5' 和3' 连接头。相反,v3c5核心链有一个3' mU连接头,并且在5' 端不具有连接头。

[0276] 图6示出了在本实施例中描述的测定中使用的两种阳性对照核酸复合物构建体的序列图(示出的过客链包含靶向亨廷顿蛋白基因(HTT)的siRNA)。

[0277] 图7示出了在图5中示出并在本实施例中测试的具有与v3c1核心链装配的不同过客链(V3P1、V3P2、V3P3、V3P4、V3P5、V3P6、V3P7、V3P8和V3P9)的多种siRNA变体。v3c1核心链具有作为5' 和3' 连接头的C3接头。在三种不同浓度:10nM、1.0nM和0.1nM用siRNA变体测试靶蛋白表达。图8示出了在图7中示出的siRNA变体的靶蛋白表达数据的图形表示。更高的RNAi活性由更低的靶蛋白的表达展示。

[0278] 图9示出了在图5中示出并在本实施例中测试的具有与v3c5核心链装配的不同过客链(V3P1、V3P2、V3P3、V3P4、V3P5、V3P6、V3P7、V3P8和V3P9)的不同siRNA变体。v3c5核心链不具有作为5' 和3' 连接头的C3接头。相反,v3c5核心链具有一个3' mU连接头,并且在5' 端不具有连接头。在三种不同浓度:10nM、1.0nM和0.1nM用siRNA变体测试靶蛋白表达。图10示出了在图9中示出的siRNA变体的靶蛋白表达数据的图形表示。与图7-图8相似,更高的RNAi活性由更低的靶蛋白的表达展示。

[0279] 这些数据表明,作为5' 连接头的C3接头抑制了siRNA结构域的RNAi活性。不同过客变体(V3P1、V3P2、V3P3、V3P4、V3P5、V3P6、V3P7、V3P8和V3P9)之间靶蛋白表达数据的比较表明,用LNA对过客链进行广泛修饰(例如HTT V3P8)可以降低RNAi活性。

[0280] 实施例2

[0281] 具有不同5' 和3' 连接头的RNAi活性

[0282] 在本实施例中,用相同的传感器链(Mir23 Sensor 1)和过客链(过客链1)测试不同样式的核心链,以研究不同的5'和3'连接头对RNAi活性的影响。还评估了双链构建体和三链构建体之间的RNAi活性。

[0283] 双链构建体由与核心链碱基配对形成活性siRNA结构域的过客链组成。三链构建体由全部三条链组成:过客链、核心链和传感器链。

[0284] CASi siRNA区段(双链构建体)和三链构建体通过在1x磷酸盐缓冲盐水中使过客链和核心链,或过客链、核心链和传感器链热退火来装配。

[0285] 使用lipofectamine 2000,将CASi siRNA区段或三链构建体与携带亨廷顿蛋白基因siRNA靶序列的双萤光素酶载体以不同浓度(例如,0.1nM、1.0nM和10nM)共转染至HCT 116细胞中。48小时后,裂解细胞,并通过比较携带靶序列的海肾萤光素酶与用作参考对照的萤火虫萤光素酶的发光值来检测靶基因的敲低。装配CASi siRNA、细胞转染和双萤光素酶测定的方法和程序的实例在例如国际申请WO 2020/033938中描述。

[0286] 图11A和图11B示出了本文公开的多种核酸复合物的序列图,每种核酸复合物具有相同的过客链(过客链1)和传感器链(Mir23 Sensor 1),但具有不同的核心链(核心链v3c1、核心链v3c2、核心链v3c3、核心链v3c4、核心链v3c5和核心链v3c6),并且特别是核心链中不同的5'和3'连接头。例如,CASi 1具有5' C3连接头和3' C3连接头两者。CASi 2具有5' C3连接头和2-0-甲基化的U作为3'接头。CASi 3具有2-0-甲基化的A作为5'接头和3' C3连接头。CASi 4具有2-0-甲基化的A作为5'接头和2-0-甲基化的U作为3'接头。CASi 5具有磷酸二酯主链连键作为5'接头和2-0-甲基化的U作为3'接头。CASi 6具有磷酸二酯主链连键作为5'接头和硫代磷酸酯连键作为3'接头。

[0287] 下文表1中也提供了图11A和图11B中图示的序列。

表 1. 示例性 CASi 键的序列。	
mir23 传感键	
mir23 Sensor 1	/5Sp9/*mC*+G*mA.+A.mG.mA.+A.mC.mG.+G.mA.+A.mA.mU.+C.mC.mC.+T.mG.mG.+C.mA*mA*+T*mG*mU*+G*+A*+T*/3CholTEG/ (SEQ ID NO: 1)
过客键	
HTT V3P1	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA (SEQ ID NO: 2)
核心键	
CASi 1: V3C1	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG./iSpC3/.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA./iSpC3/.mU*mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU (由 iSpC3 分隔的 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5)
CASi 2: V3C2	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG./iSpC3/.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA*mU*mU.mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU (由 iSpC3 分隔的 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7)
CASi 3: V3C3	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG.mA.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA./iSpC3/.mU*mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU (由 iSpC3 分隔的 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9)
CASi 4: V3C4	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG.mA.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA*mU*mU.mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU (SEQ ID NO: 10)
CASi 5: V3C5	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA*mU*mU.mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU (SEQ ID NO: 11)
CASi 6: V3C6	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA*mU*mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU (SEQ ID NO: 12)
/Sp9/=三乙二醇间隔区 CholTEG=胆固醇-TEG /iSpC3/=内部 C3 间隔区 *=硫代磷酸酯主链 =磷酸二酯主链 mA、mG、mC、mU=2'-O-甲基碱基 +A、+T、+C、+G=锁核酸(LNA)碱基 fA、fU、fC、fG=2'-氟代碱基 NH2=伯胺接头。 rA、rU、rC、rG=RNA	

[0288]

[0289] 图12示出了多种核酸复合物构建体的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE), 表明所有复合物都如期望地装配。泳道如下 (从左至右): P1C1; P1C1S2; P1C2; P1C2S2; P1C3; P1C3S2; P1C4; P1C4S2; P1C5; P1C5S2; P1C6; P1C6S2; G1RC1和G1RC1S2。P1表示过客链1。

[0290] 图13示出了不同浓度的双链装配体的RNAi活性, 每个双链装配体具有相同的过客

链v3p1和不同的核心链(C1、C2、C3、C4、C5和C6)。过客链和核心链的序列在图11A和图11B中示出。

[0291] 图14示出了三种不同浓度与来自图13的双链装配体(siRNA 1:C1;siRNA 2:C2;siRNA 3:C3;siRNA4:C4;siRNA5:C5;siRNA6:C6)相比的三链装配体(CASi 1、CASi 2、CASi3、CASi 4、CASi 5和CASi 6)的RNAi活性,每个装配体具有相同的过客链v3p1、相同的传感器链(Mir23 Sensor 1)和不同的核心链(C1、C2、C3、C4、C5和C6)。过客链、传感器链、核心链的序列在图11A、图11B和表1中示出。

[0292] 这些数据表明,具有5' mA连接头和3' C3(3-碳接头)连接头(例如,CASi 3构建体和siRNA 3双链体)的装配体,包括双链和三链装配体,具有最高的RNAi活性。siRNA 3双链体与CASi 3构建体之间不同的RNAi活性也表明CASi具有良好的RNAi活性切换。不具有5' C3连接头的装配体(诸如C3、C4、C5、C6),包括双链和三链装配体,比具有5' C3连接头的装配体(C1和C2)具有更高的RNAi活性。不具有5' 连接头的装配体(C5和C6)比具有5' 连接头(诸如mA)但不具有C3接头的装配体(C3和C4)具有更低的RNAi活性。对于相同的核心链,通常预期三链装配体比两链装配体具有更低的RNAi活性。

[0293] 实施例3

[0294] 不同RNA复合物设计的RNAi活性

[0295] 在本实施例中,进行实验以比较在图1中示出的设计1与本文公开的RNA复合物设计(例如,在图1中示出的设计2)的RNAi开关和RNAi活性。V3C3a和V3C3b是设计2形式的构建体。G1C1S1是设计1形式的构建体。

[0296] CASi siRNA区段(双链构建体)和三链构建体通过在1x磷酸盐缓冲盐水中使过客链和核心链,或过客链、核心链和传感器链热退火进行装配。使用lipofectamine 2000将CASi siRNA区段(双链构建体)和三链构建体共转染至HCT 116细胞中。使用由Pol III启动子驱动的短RNA转录物,HCT 116细胞可以表达能够激活CASi传感器的RNA生物标志物(例如编码心房利钠肽(ANP)的NPPA基因序列)(在图16中标为“Act”)或不能激活CASi传感器的对照核酸链(在图16中标为“Neg”)。HCT 116细胞还具有携带PPP3CA(钙调磷酸酶)基因siRNA靶序列的双萤光素酶载体。钙调磷酸酶是一种钙和钙调素依赖性丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶,并且已被确定为心脏肥大的关键驱动因素。ANP已被用作心脏肥大的诊断标志物。因此,三链CASi siRNA构建体的传感器链被设计用于检测ANP mRNA,而siRNA结构域(例如过客链)被设计用于抑制钙调磷酸酶。

[0297] 72小时后,裂解细胞,并通过比较海肾萤光素酶(携带靶序列)和萤火虫萤光素酶的发光值来检测靶基因(钙调磷酸酶)的敲低。

[0298] 图15示出了在图1中示出的形式为设计2的包括核心链V3C3a(T2 CASi构建体)的核酸复合物和在图1(下方:G1C1S1)中示出的形式为设计1的核酸复合物(Cond-siRNA构建体)的序列图。表2提供了T2 CASi和Cond-siRNA链的序列。

表 2: 设计 2 的 T2 CASi 和设计 1 的 Cond-siRNA 的序列。	
T2 ANP-钙调磷酸酶 CASi 的过客链	
Calc V3P3 过客	/5Cy3/*mU*+A*mC.mA.mG.mG.fA.mA.fA.fA.fG.mC.mC.mA.mA.mA.mC.mA.mA*mC*mA (SEQ ID NO: 13)
T2 CASi 和 Cond-siRNA 二者的传感器链	
ANP Sensor 1	/5Sp9/.mC.+T.mU.mC.+A.mC.mC.+A.mC.+C.mU.mC.mU.+C.mA.mG.+T.mG.+G.mC.mA.+A.mU*mG*mC*+G*mA*+C*mC*+A*mA*/3TEGChol/ (SEQ ID NO: 14)
T2 ANP-钙调磷酸酶 CASi 的核心链	
大鼠 ANP V3C3a	mA.mG.mG.mU.mG.mG.mU.mG.mA.mA.mG.mA.mU*fG*mU.mU.mG.fU.mU.mU.mG.mG.mC.fU.mU.fU.mU.mC.mC.mU.mG.mU.mA*/iSpC3/*mU*mU.mG.mC.mC.mA.mC.mU.mG.mA.mG (由 iSpC3 分隔的 SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16)
Cond-siRNA 的 PPP3CA 引导链	
Calc G4	/5Cy3/.*C*+G.rA.rG.rU.rG.rU.rU.rG.rU.mU.rU.mG.mG.mC.rU.mU.rU.rU.rC.mC.mU.mG*mU*mU (SEQ ID NO: 17)
Cond-siRNA 的核心链	
ANP-Calc 核心链	mA.mG.mG.mU.mG.mG.mU.mG.mA.mA.mG./iSpC3/.mC*+A*mG.rG.rA.rA.rA.rA.rG.rC.rC.rA.rA.rA.rA.rC.rA.rA.rC.rA.rC.rU.rC*mG./iSpC3/.mA.mU.mU.mG.mC.mC.mA.mU.mU.mG.mA.mG (由 iSpC3 分隔的 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20)

[0299]

[0300] 图16示出了在三种不同浓度,经修饰的双链构建体(V3C3a siRNA)和三链构建体(V3C3a和V3C3b)与原始双链(G1C1 siRNA)和三链构建体(G1C1S1)相比的RNAi活性。

[0301] 这些数据表明,在不存在RNA生物标志物(Neg)时修饰的CASi构建体显示较低的RNAi活性,并且在存在RNAi生物标志物(Act)时显示较高的RNAi活性,因此表明当RNA生物标志物不存在时,修饰的CASi构建体的RNAi活性被关闭。与原始设计(Cond-siRNA构建体G1C1S1)相比,修饰的构建体(T2 CASi:V3C3a和V3C3b)的RNAi活性也显著提高。与原始双链设计(G1C1 siRNA)相比,修饰的CASi siRNA区段(双链装配体,例如V3C3a siRNA)也显示出显著提高的RNAi活性。

[0302] 术语

[0303] 在至少一些先前描述的实施方案中,在一种实施方案中使用的一个或多个要素可以可互换地用于另一种实施方案中,除非这样的替换在技术上不可行。本领域技术人员将理解,在不脱离所要求保护的的主题的范围的情况下,可以对上文描述的方法和结构进行多种其他的省略、添加和修改。所有这样的修改和改变都意在落入由所附权利要求书限定的主题的范围。

[0304] 关于本文中基本上任何复数和/或单数术语,在对于背景和/或应用适当的情况下,本领域技术人员可以从复数转换为单数和/或从单数转换为复数。为了清楚起见,可以在本文明确阐述多种单数/复数排列。如本说明书和所附权利要求书中使用的,除非上下文另有清楚指示,否则单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数的提示物。除非另外说明,否则在本文中对“或”的任何提及意在涵盖“和/或”。

[0305] 本领域技术人员将理解,一般来说,本文使用的术语,并且尤其是所附权利要求

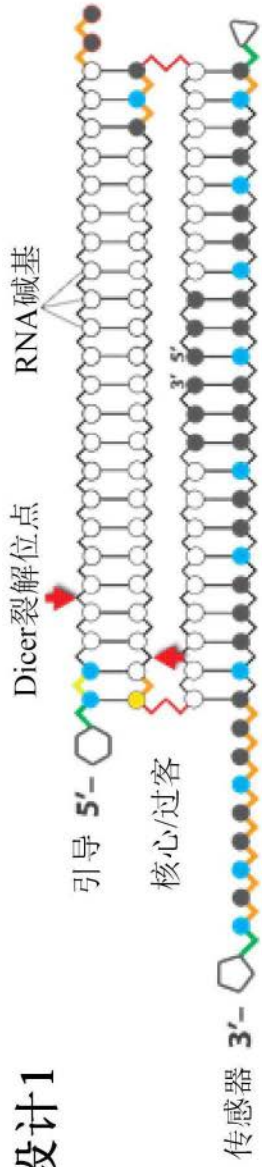
(例如,所附权利要求的主体)中的术语,通常意在作为“开放式”术语(例如,术语“包括(including)”应解释为“包括但不限于(including but not limited to)”,术语“具有(having)”应解释为“具有至少(having at least)”,术语“包括(includes)”应解释为“包括但不限于(includes but is not limited to)”,等等)。本领域技术人员还将理解,如果所引入的权利要求陈述的特定数目是所预期,这样的预期将明确地陈述于权利要求中,并且在不存在这样的陈述的情况下,不存在这样的预期。例如,作为对理解的帮助,以下所附权利要求可以包含前置词“至少一个/至少一种(at least one)”和“一个或更多个/一种或更多种(one or more)”的使用,以引入权利要求陈述。然而,此类措辞的使用不应解读为意味着由不定冠词“一(a)”或“一(an)”介绍权利要求陈述会将任何包含此类介绍的权利要求陈述的具体权利要求限制为包含仅一种此类陈述的实施方案,甚至当同一权利要求包括介绍性措辞“一种或更多种”或“至少一种”以及不定冠词诸如“一(a)”或“一(an)”时也是如此(例如,“一(a)”和/或“一(an)”应解释为意指“至少一种”或“一种或更多种”);这对于使用定冠词来介绍权利要求陈述同样适用。此外,即使明确地陈述了介绍的权利要求陈述的特定数字,本领域技术人员将认识到,此类陈述应解释为意指至少所陈述的数字(例如,仅陈述“两种陈述”而没有其他修饰词意指至少两种陈述或两种或更多种陈述)。此外,在使用类似于“A、B和C等中的至少一种”的惯例的那些情况下,通常这种句法结构意图为本领域技术人员将理解该惯例的意义(例如,“具有A、B和C中的至少一种的系统”将包括但不限于具有单独的A,具有单独的B,具有单独的C,A和B一起,A和C一起,B和C一起,和/或A、B和C一起等的系统)。在使用类似于“A、B或C等中的至少一种”的惯例的那些情况下,通常这种句法结构意图为本领域技术人员将理解该惯例的意义(例如,“具有A、B或C中的至少一种的系统”将包括但不限于具有单独的A,具有单独的B,具有单独的C,A和B一起,A和C一起,B和C一起,和/或A、B和C一起等的系统)。本领域技术人员还将理解,实际上,无论在说明书、权利要求书还是在附图中,呈现两个或更多个替代术语的任何转折性词语和/或短语应被理解为考虑到包括术语之一、任一术语或两个术语的可能性。例如,短语“A或B”将被理解为包括“A”或“B”或“A和B”的可能性。

[0306] 此外,当本公开内容的特征或方面以马库什组(Markush group)描述时,本领域技术人员将意识到,本公开内容还由此以马库什组的任何单独的成员或成员的子组描述。

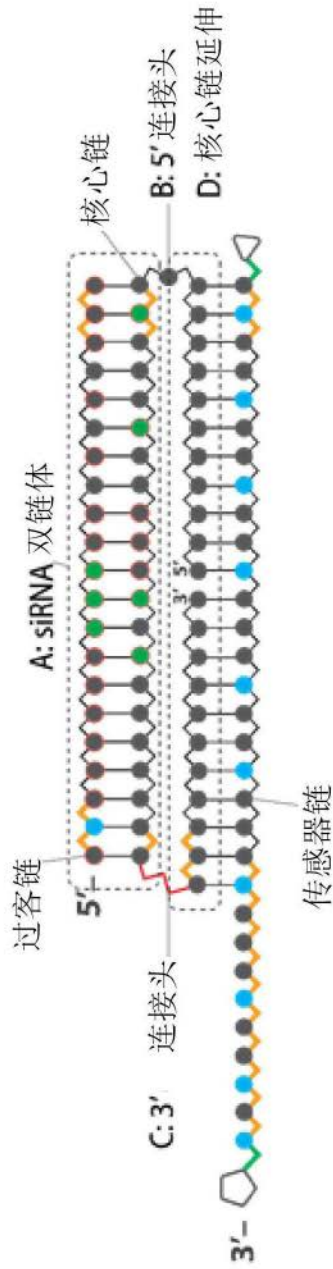
[0307] 如本领域技术人员将理解的,出于任何和所有目的,诸如在提供书面描述方面,本文公开的所有范围还涵盖其任何和所有可能的子范围和子范围的组合。任何列出的范围都可以很容易地被识别为充分描述并使相同的范围能被分解为至少相等的一半、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等。作为非限制性实例,本文讨论的每个范围可以容易地分解为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域技术人员还将理解的,所有语言,诸如“多达”、“至少”、“大于”、“小于”等包括所陈述的数字,并且指可以随后分解为如上文讨论的子范围的范围。最后,如本领域技术人员将理解的,范围包括每个单独的成员。因此,例如,具有1-3个物品的组指的是具有1个、2个或3个物品的组。类似地,具有1-5个物品的组指的是具有1个、2个、3个、4个或5个物品的组,等等。

[0308] 尽管本文已经公开了多种方面和实施方案,但其他方面和实施方案对本领域技术人员将是明显的。本文公开的多种方面和实施方案用于说明的目的而并不意图限制由所附权利要求书所指出的真实范围和精神。

设计1



设计2



- 递送配体、荧光团或核酸外切酶
- 附接至合适的连接头的阻断剂
例如：脂肪酸、Cy3或附接至三乙二醇的反向dT
- 硫代磷酸酯
- C₃连接头
- 用于筛选的主链位点
- 锁核酸
- 2'-OMe
- 2'-F
- 用于筛选的碱基

图1

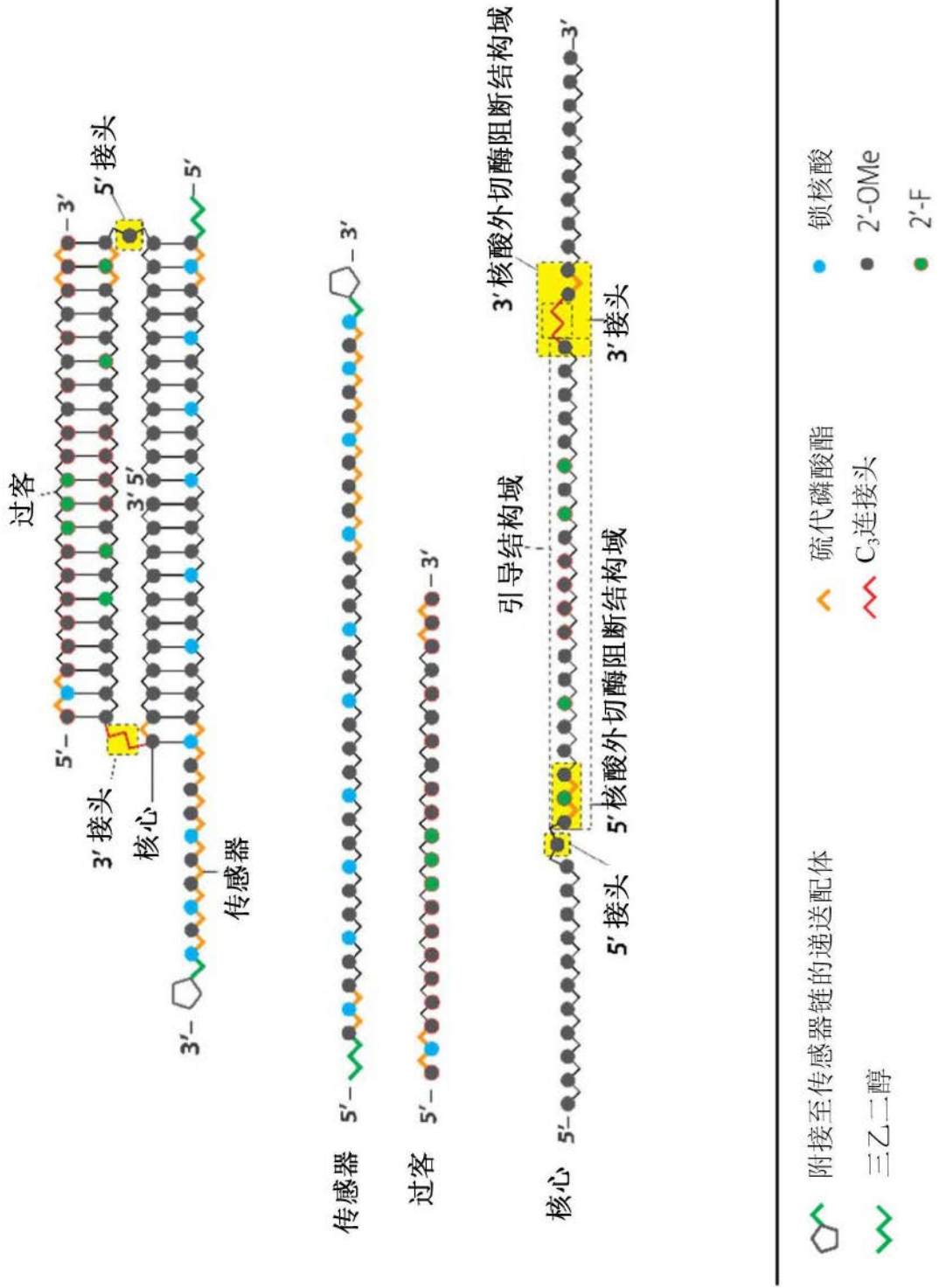


图2

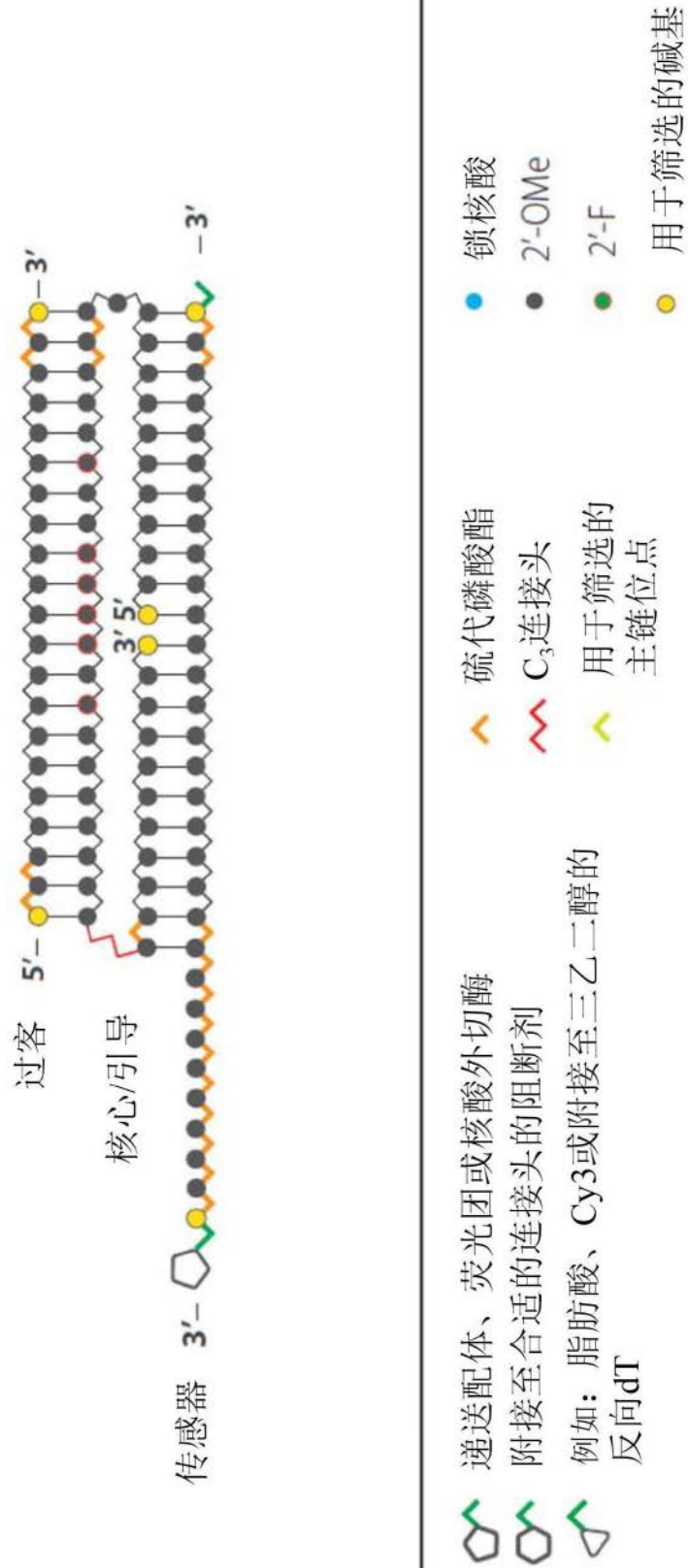


图3

靶细胞中的激活

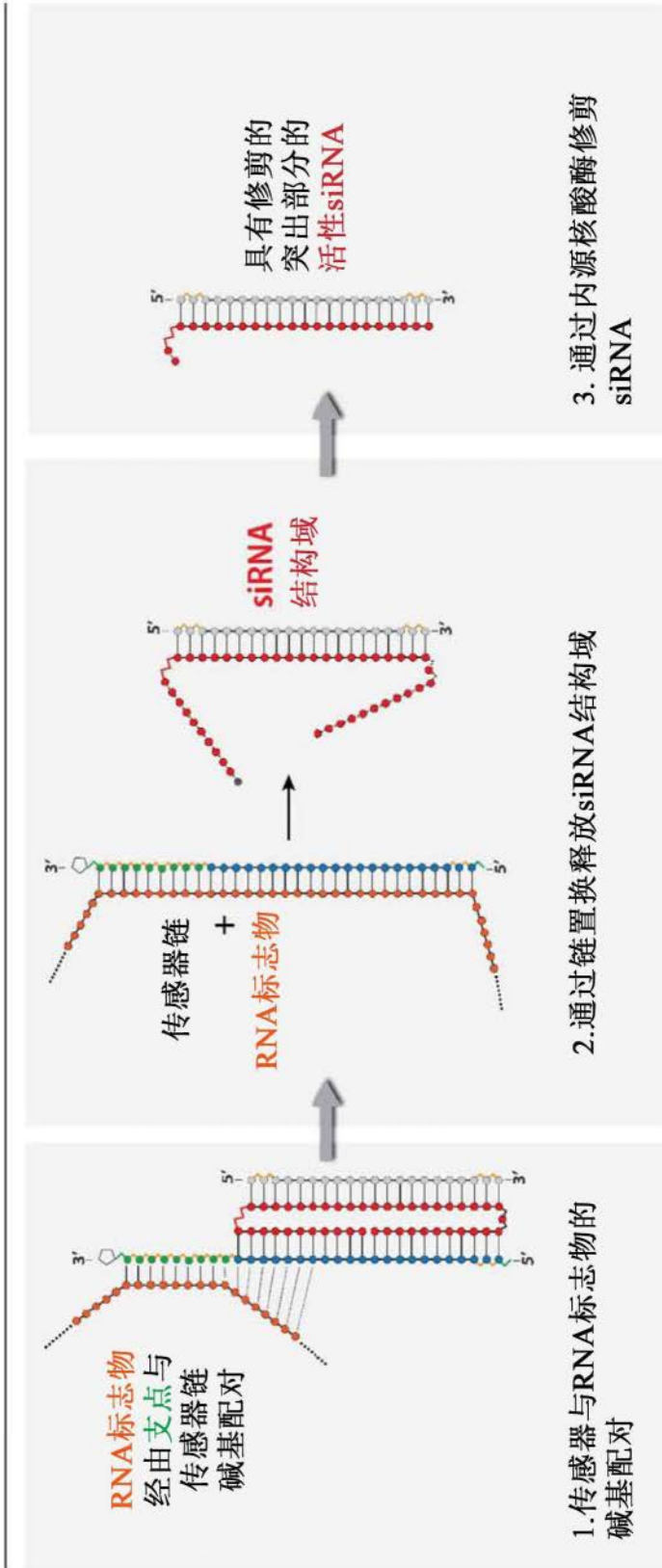
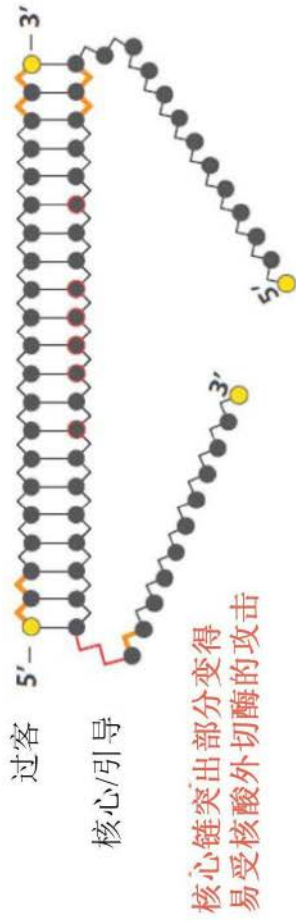
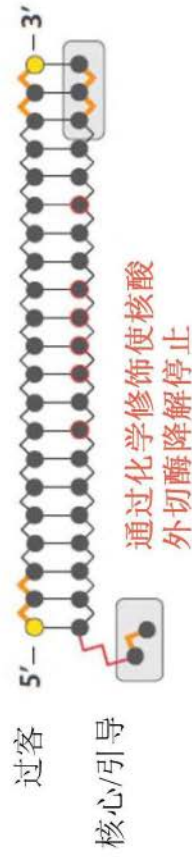


图4A

通过支点介导的 链置换去除传感器链



核酸外切酶将siRNA 结构域加工成 活性siRNA



递送配体、荧光团或核酸外切酶
 附接至合适的连接头的阻断剂
 例如：脂肪酸、Cy3或附接至三乙二醇的
 反向dT

-  硫代磷酸酯
-  C₃连接头
-  用于筛选的主链位点
-  锁核酸
-  2'-OMe
-  2'-F
-  用于筛选的碱基

图4B

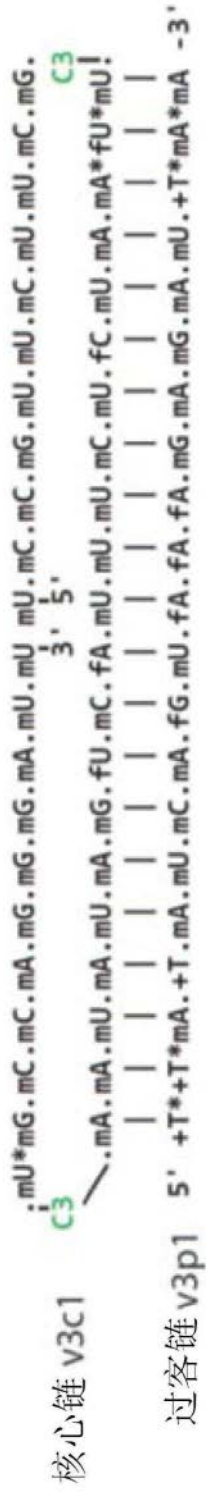


图5A

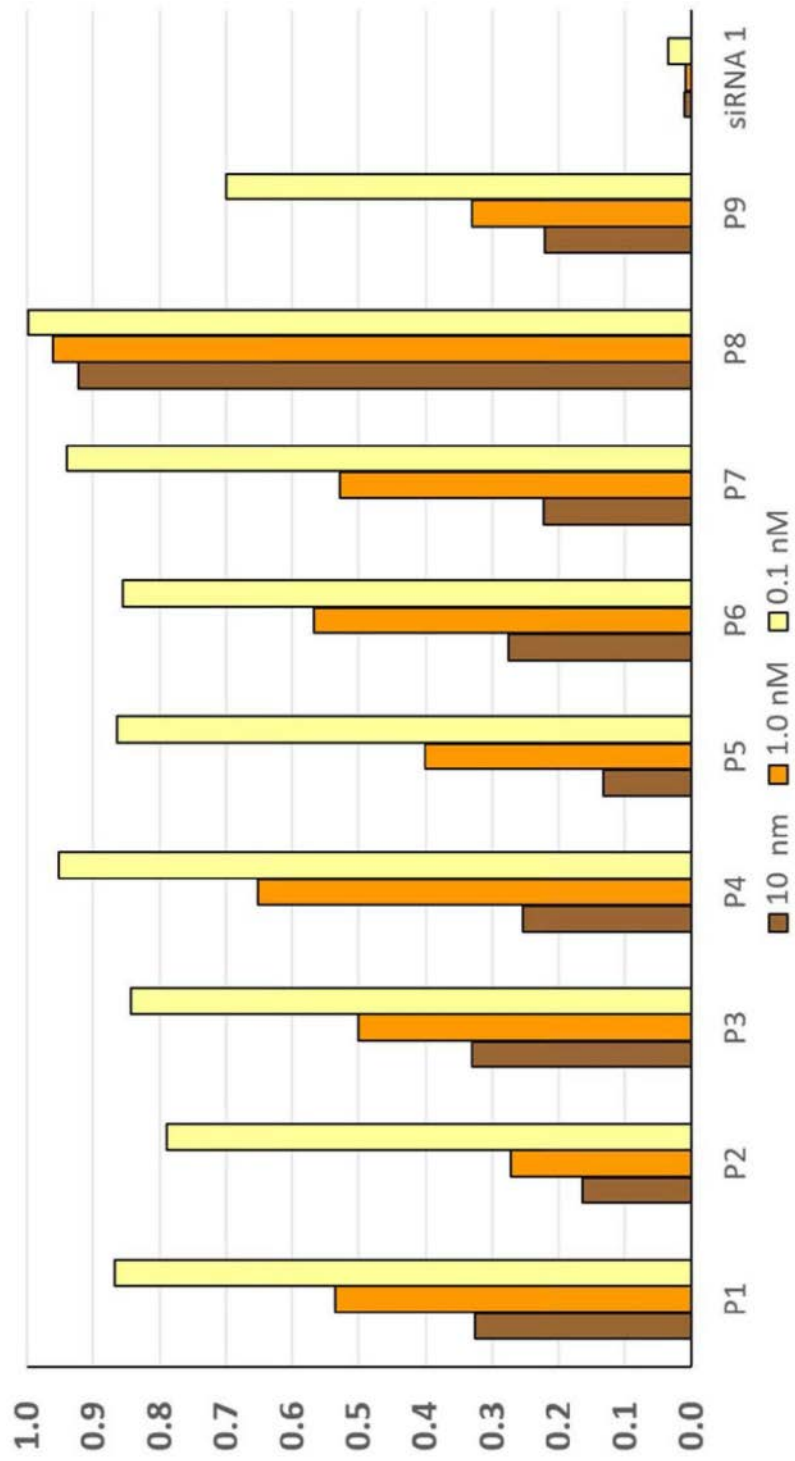


图8

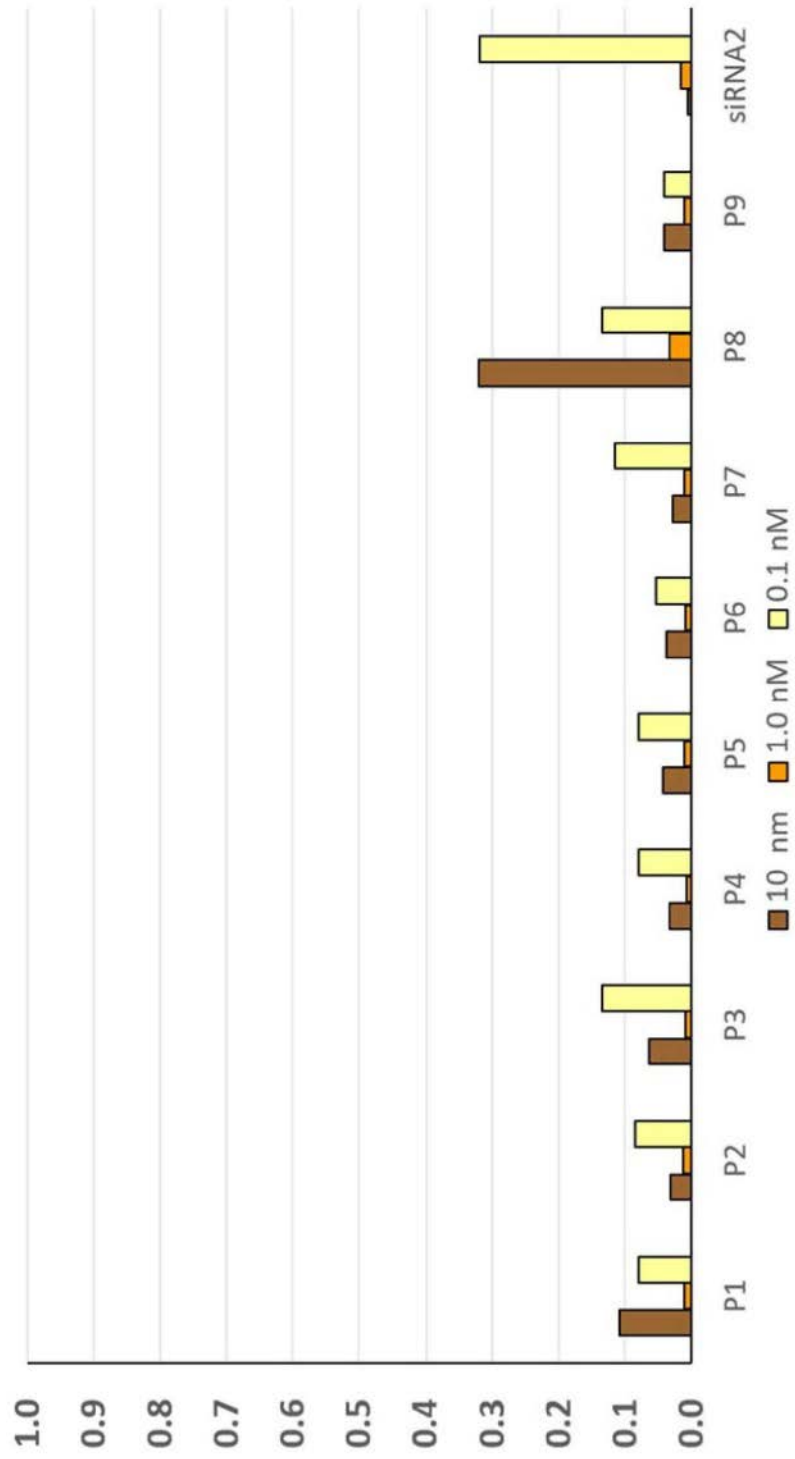
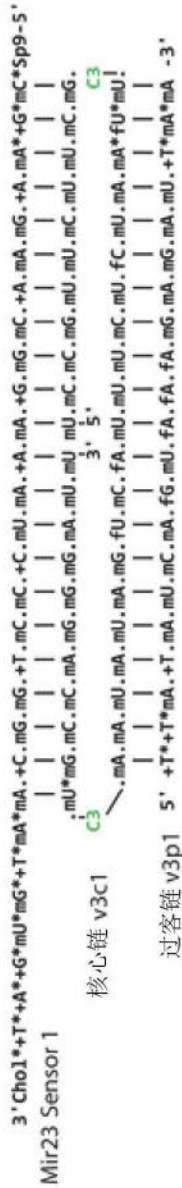
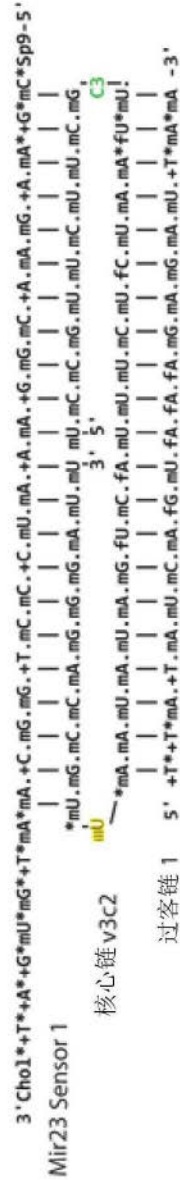


图10

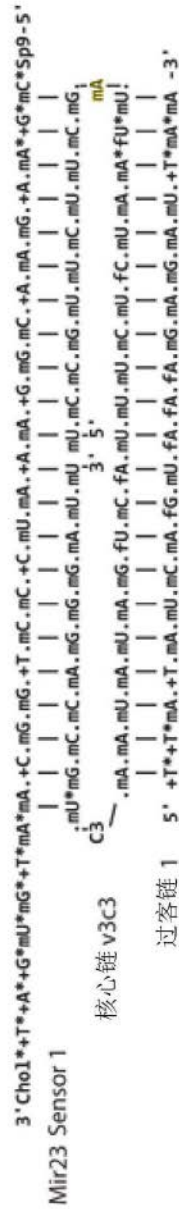
CASI 1



CASI 2

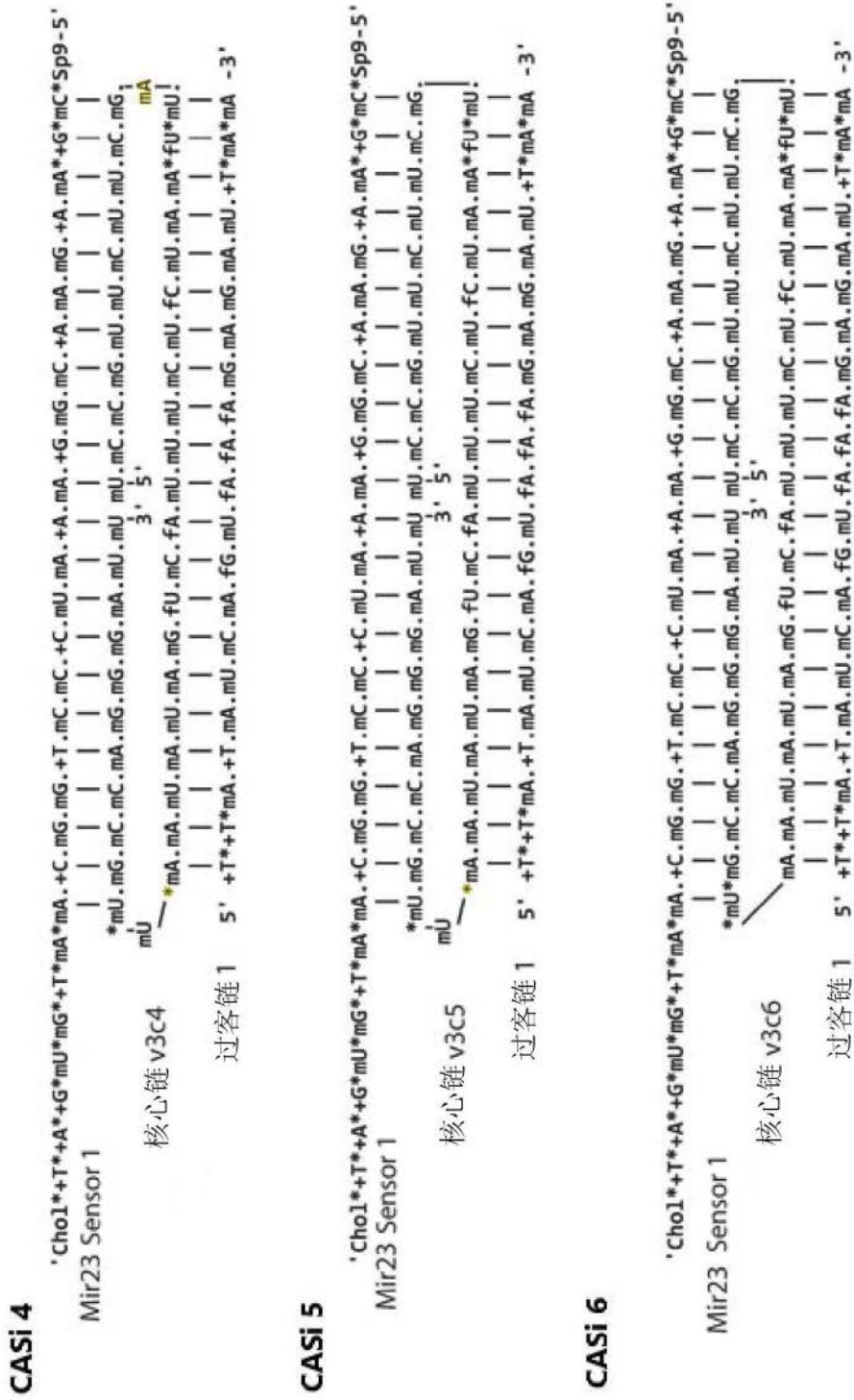


CASI 3



+A, +T, +C, +G = LNA; mA, mU, mC, mG = 2'-OMe; rA, rU, rC, rG = RNA; NH2 = 伯胺接头
 *=硫代磷酸酯; =磷酸二酯; C3=C₃间隔区; Sp9=三乙醇; † =Dicer裂解位点

图11A



+A, +T, +C, +G = LNA; mA, mU, mC, mG = 2'-OMe; rA, rU, rC, rG = RNA; NH2 = 伯胺接头
 *=硫代磷酸酯; =磷酸二酯; C3=C, 间隔区; Sp9=三乙二醇; † =Dicet裂解位点

图11B

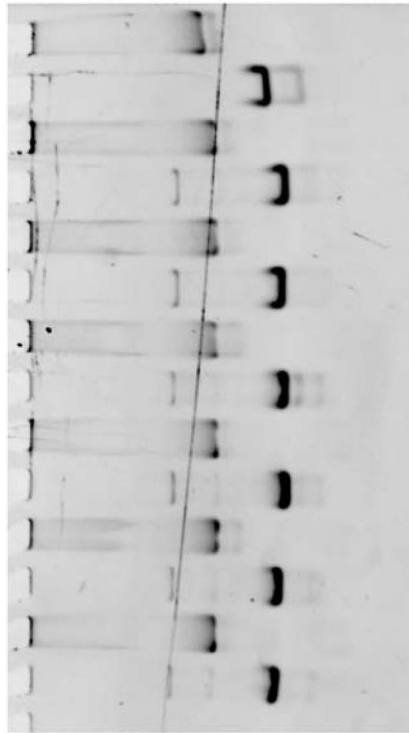


图12

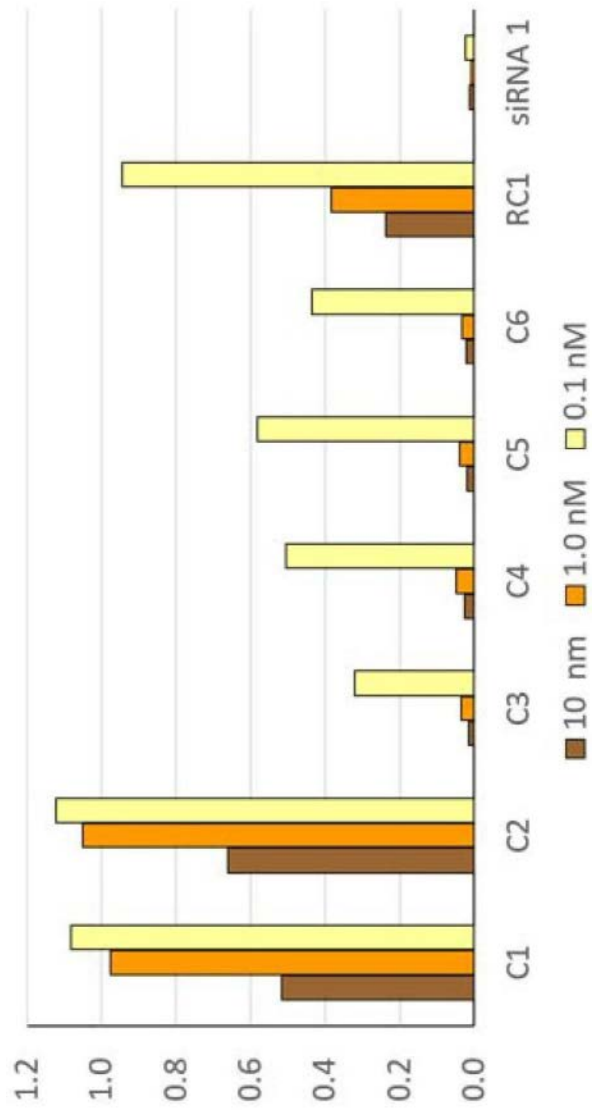


图13

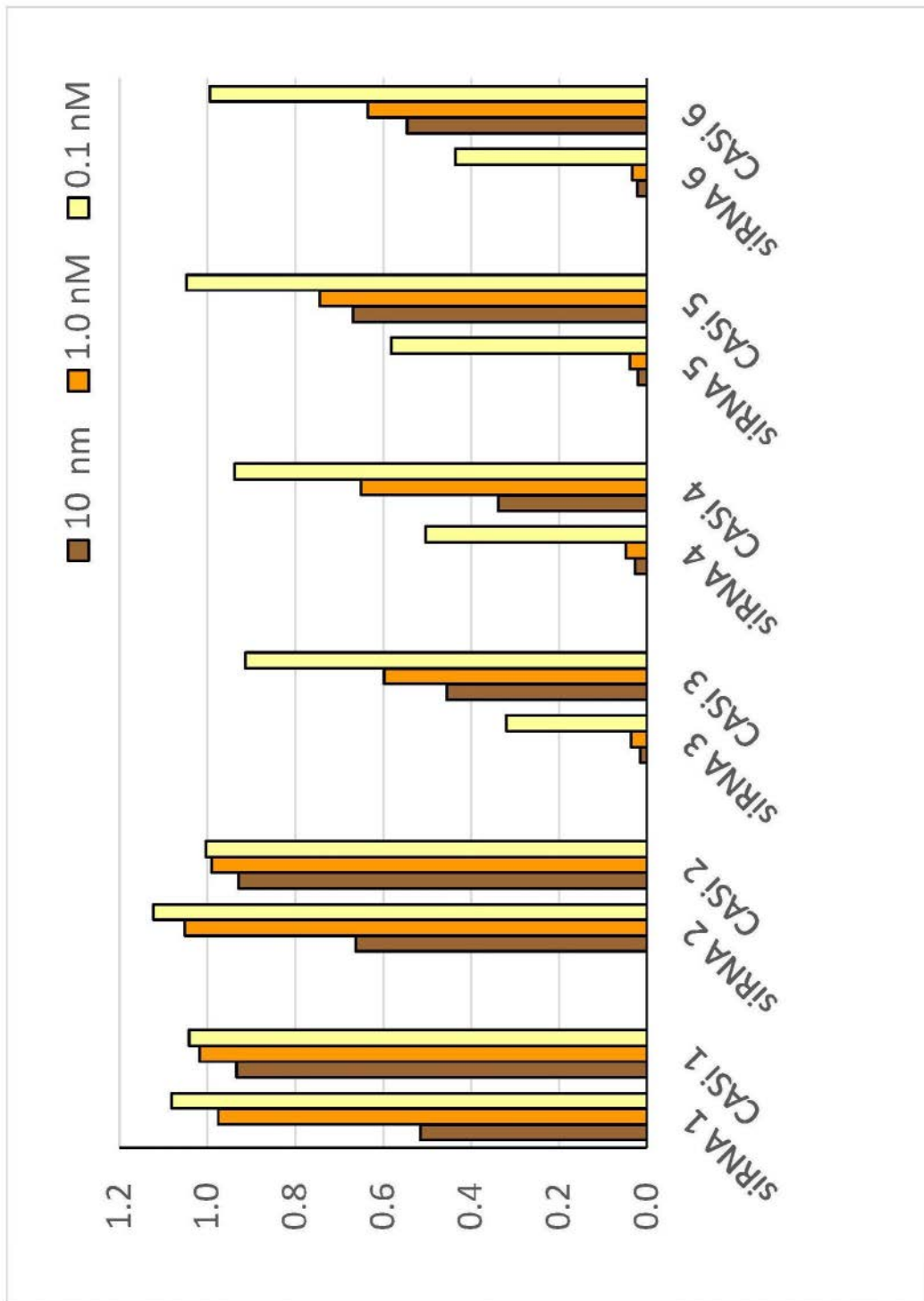


图14

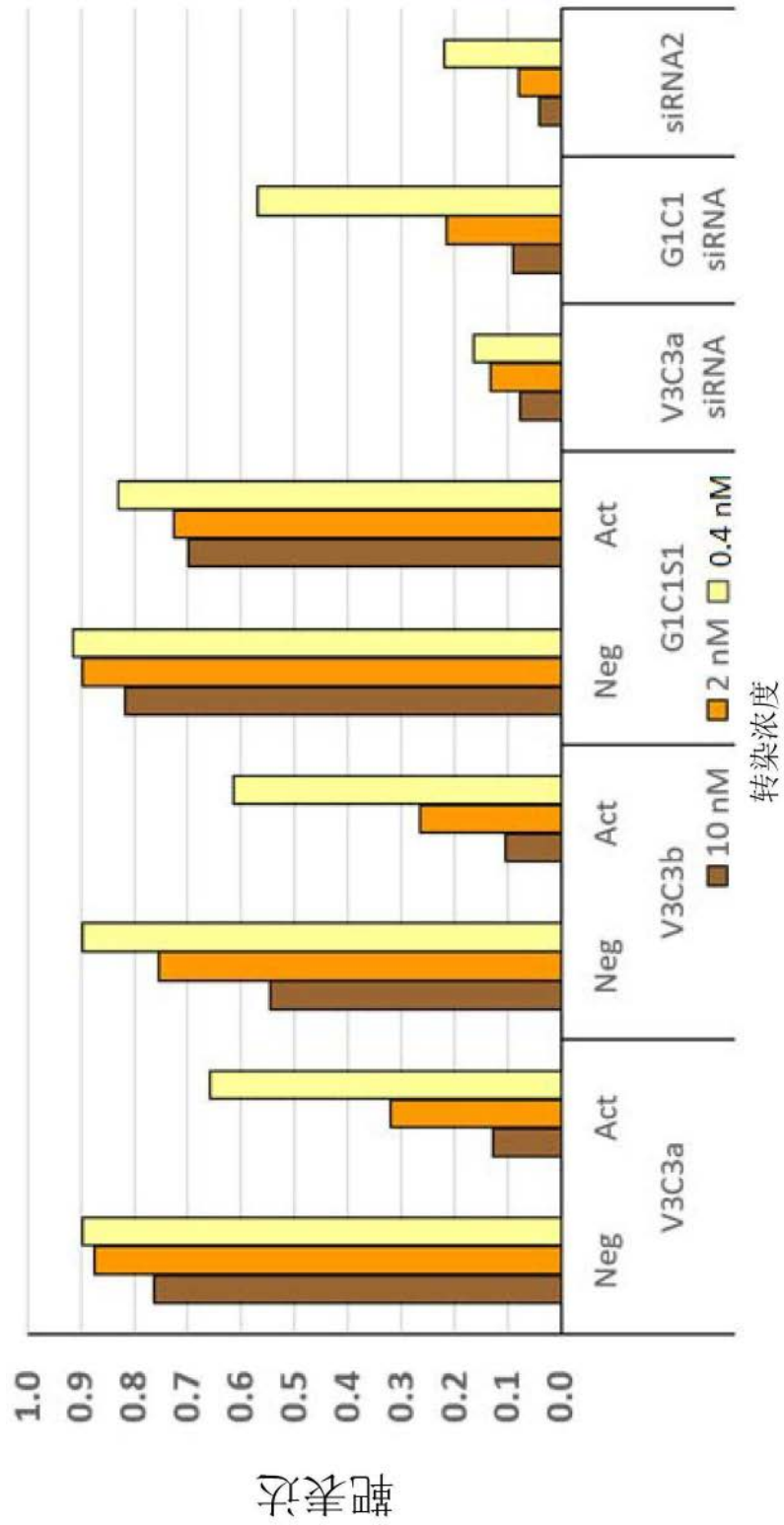


图16