I859184

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I859184 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 10 月 21 日

(21)申請案號：109102604 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 01 月 22 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/10 (2006.01)* *C12N15/11 (2006.01)*
A61K31/7125 (2006.01)

(30)優先權：2019/01/22 美國 62/795,348
2019/03/22 美國 62/822,586
2019/09/13 美國 62/900,017

(71)申請人：美商科羅生物公司 (美國) KORRO BIO, INC. (US)
美國

(72)發明人：法萊利 安卓 W FRALEY, ANDREW W. (US)；羅比奈特 史帝芬 ROBINETTE, STEVEN (US)；伯明罕 尼森 BERMINGHAM, NESSAN (IE)；普塔 瑪莉卡萊那 瑞迪 PUTTA, MALLIKARJUNA REDDY (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 104640986A WO 2018/041973A1

期刊 Piet Herdewijn, "Nucleic Acids with a Six-Membered Carbohydrate Mimic in the Backbone", Chemistry & Biodiversity, Vol. 7, Issue 1, 無, 20 January 2010, Pages 1-59

期刊 Daniele DAlonzo, et al., "Enantiomeric Selection Properties of b-homoDNA: Enhanced Pairing for Heterochiral Complexes", Angew. Chem. Int. Ed., Vol. 52, 無, 2013, Pages 6662 -6665

審查人員：吳思瑩

申請專利範圍項數：45 項 圖式數：0 共 151 頁

(54)名稱

ＲＮＡ編輯之寡核苷酸及其用途

(57)摘要

本揭示案係關於例如在有此需要之受試者中治療病症之有用的組成物及方法，對於該等病症，在 mRNA 中腺苷之去胺作用產生治療結果。

The present disclosure features useful compositions and methods to treat disorders for which deamination of an adenosine in an mRNA produces a therapeutic result, e.g., in a subject in need thereof.

公告本

I859184

【發明摘要】

【中文發明名稱】RNA 編輯之寡核苷酸及其用途

【英文發明名稱】RNA-EDITING OLIGONUCLEOTIDES AND USES THEREOF

【中文】

本揭示案係關於例如在有此需要之受試者中治療病症之有用的組成物及方法，對於該等病症，在 mRNA 中腺苷之去胺作用產生治療結果。

【英文】

The present disclosure features useful compositions and methods to treat disorders for which deamination of an adenosine in an mRNA produces a therapeutic result, e.g., in a subject in need thereof.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】RNA 編輯之寡核苷酸及其用途

【英文發明名稱】RNA-EDITING OLIGONUCLEOTIDES AND USES THEREOF

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 作用於 RNA 之腺苷去胺酶(ADAR)為結合至雙股 RNA (dsRNA)並經由去胺作用將腺苷轉化成肌苷之酶。在 RNA 中，肌苷之轉譯及複製功能與鳥苷類似。因此，在 mRNA 中腺苷向肌苷之轉化可能造成密碼子改變，從而導致所編碼之蛋白質及其功能的改變。存在三種已知的在人類中表現之 ADAR 蛋白，亦即 ADAR1、ADAR2 及 ADAR3。ADAR1 及 ADAR2 在全身表現，而 ADAR3 僅在腦中表現。ADAR1 及 ADAR2 具有催化活性，而 ADAR3 則認為係無活性的。

【0002】 已顯示合成單股寡核苷酸能夠利用 ADAR 蛋白，藉由使靶 RNA 中之特定腺苷去胺基來編輯靶 RNA。寡核苷酸與靶 RNA 互補，例外之處在於至少一個與腺苷相反之錯配有待去胺基。然而，先前所揭露之方法未曾顯示具有允許其用作療法之所需選擇性及/或穩定性。因此，需要新型寡核苷酸，其能夠利用 ADAR 蛋白以治療有效之方式選擇性編輯靶 RNA。

【發明內容】

【0003】 本發明係關於例如在有此需要之受試者中對靶 mRNA 中之腺苷(例如，可經去胺基以產生治療結果之腺苷)去胺基之有用的組成物及方法。

【0004】 作用於 RNA 之腺苷去胺酶(ADAR)為編輯酶，其識別雙股 RNA (dsRNA)之某些結構模體並將腺苷編輯成肌苷，造成胺基酸密碼子之重編碼，由此導致對所編碼之蛋白質及其功能之改變。在編輯位點周圍之核鹼基(尤其是緊挨編輯位點之 5’處的核鹼基及緊挨編輯位點之 3’處的核鹼基，它們同編輯位點

一起稱為三聯體)在腺苷之去胺中起重要作用。對於相對於編輯位點在 5’位處之 U 及在 3’位處之 G 的偏好係由酵母 RNA 之分析所揭示，該酵母 RNA 有效地由過度表現之人類 ADAR2 及 ADAR1 所編輯。參見 Wang 等人 (2018) Biochemistry, 57: 1640-1651；Eifler 等人 (2013) Biochemistry, 52: 7857-7869 以及 Eggington 等人 (2011) Nat. Commun., 319: 1-9。將 ADAR 招募至所選轉錄物之特定位點並對腺苷進行去胺，而不考慮鄰近的鹼基，這對疾病之治療留下很大希望。基於 dsRNA/ADAR 複合物之編輯位點之結構及模型研究，已鑑別出可併入導向寡核苷酸中之若干結構特點，其特性能夠增強 ADAR 之招募並提高靶 RNA 之編輯效率。顯示出具有如 α-同型-DNA 之化學修飾之新穎寡核苷酸，該等新穎寡核苷酸能夠在靶 RNA 中招募 ADAR 蛋白並對具有不同周圍鹼基組成之腺苷去胺基。另外，結構-活性關係(SAR)研究揭示除三聯體修飾之外在導向寡核苷酸中一些而非所有核苷之核糖的 2’-O-甲基(2’-OMe)修飾亦與有效的 ADAR 接合及編輯相容。

【0005】 本發明之示範性實施例在下文列舉之段落中描述。

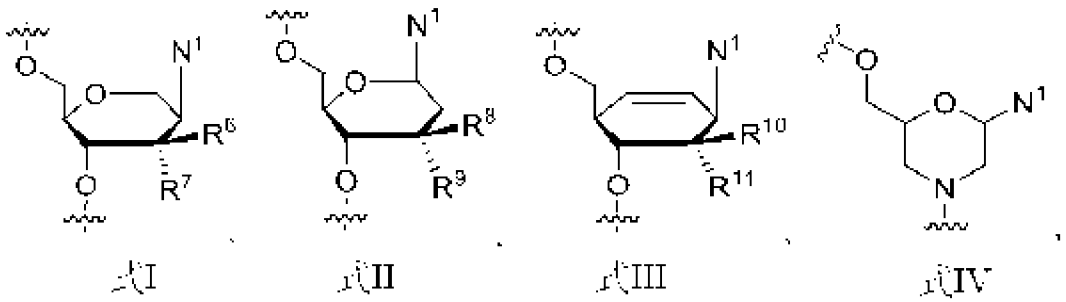
【0006】 E1. 一種包括以下結構之寡核苷酸：

$$[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

其中 A 與 B 各自為核苷酸；

m 與 n 各自獨立地為 1 至 50 之整數；

X^1、X^2 及 X^3 各自獨立地為核苷酸，其中 X^1、X^2 及 X^3 中之至少一者具有式 I-IV 中任一者之結構：



式I　式II　式III　式IV

其中 N^1 為氫或核鹼基；

R^6 為氫、羥基或鹵素；

R^7 為氫、羥基、鹵素或 C_1-C_6 烷氧基；

R^8 為氫或鹵素；

R^9 為氫或羥基、鹵素或 C_1-C_6 烷氧基；

R^{10} 為氫或鹵素；並且

R^{11} 為氫或羥基、鹵素或 C_1-C_6 烷氧基。

【0007】　E2. E1 之寡核苷酸，其中至少 80% (例如，至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99%或 100%)[A_m]及/或[B_n]之核苷酸包括核鹼基、糖及核苷間鍵。

【0008】　E3. E1 至 E2 中任一項之寡核苷酸，其中 X^1 包括腺嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核鹼基；X^1 包括腺嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基；X^1 包括腺嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶核鹼基；X^1 包括腺嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶核鹼基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核鹼基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶核鹼

基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶核鹼基；X^1 包括尿嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核鹼基；X^1 包括尿嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基；X^1 包括尿嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶核鹼基；X^1 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶核鹼基；X^1 包括胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核鹼基；X^1 包括胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基；X^1 包括胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶核鹼基；或 X^1 包括胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶或尿嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶核鹼基。

【0009】 E4. E1 至 E3 中任一項之寡核苷酸，其中鹵素為氟。

【0010】 E5. E1 至 E4 中任一項之寡核苷酸，其中 C_1-C_6 烷氧基為 OCH_3。

【0011】 E6. E1 至 E5 中任一項之寡核苷酸，其中 X^1、X^2 及 X^3 中之至少一者具有式 II 之結構，其中 R^8 與 R^9 各自為氫。

【0012】 E7. E6 之寡核苷酸，其中 X^1 具有式 II 之結構，其中 R^8 與 R^9 各自為氫。

【0013】 E8. E6 或 E7 之寡核苷酸，其中 X^2 具有式 II 之結構，其中 R^8 與 R^9 各自為氫。。

【0014】 E9. E1 至 E5 中任一項之寡核苷酸，其中 X^2 具有式 I-IV 中任一者之結構。

【0015】 E10. E1 至 E9 中任一項之寡核苷酸，其中當 X^1 具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^2 及 X^3 各自獨立地為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6 烷基-核苷酸、2’-

胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或 DNA-核苷酸；當 X^2 具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^1 及 X^3 各自獨立地為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或 DNA-核苷酸；當 X^3 具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^1 及 X^2 各自獨立地為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或 DNA-核苷酸；當 X^1 與 X^2 各自具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^3 為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或 DNA-核苷酸；當 X^1 與 X^3 各自具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^2 為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或 DNA-核苷酸；並且當 X^2 與 X^3 各自具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^1 為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或 DNA-核苷酸。

【0016】 E11. E10 之寡核苷酸，其中當 X^1 具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^2 與 X^3 各自獨立地為核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或 DNA-核苷酸；當 X^2 具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^1 與 X^3 各自獨立地為核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或 DNA-核苷酸； 當 X^3 具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^1 與 X^2 各自獨立地為核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或 DNA-核苷酸；當 X^1 與 X^2 各自具有式 I 至 IV 中任一

者之結構時，X^3 為核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或 DNA-核苷酸；當 X^1 與 X^3 各自具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^2 為核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或 DNA-核苷酸；並且當 X^2 與 X^3 各自具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^1 為核糖核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸或 DNA-核苷酸。

【0017】 E12. E11 之寡核苷酸，其中當 X^1 具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^2 與 X^3 各自為核糖核苷酸；當 X^2 具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^1 與 X^3 各自為核糖核苷酸；當 X^3 具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^1 與 X^2 各自為核糖核苷酸；當 X^1 與 X^2 各自具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^3 為核糖核苷酸；當 X^1 與 X^3 各自具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^2 為核糖核苷酸；並且當 X^2 與 X^3 各自具有式 I 至 IV 中任一者之結構時，X^1 為核糖核苷酸。

【0018】 E13. E1 至 E12 中任一項之寡核苷酸，其中 X^1 包括次黃嘌呤核鹼基。

【0019】 E14. E1 至 E12 中任一項之寡核苷酸，其中 X^1 包括尿嘧啶核鹼基。

【0020】 E15. E1 至 E12 中任一項之寡核苷酸，其中 X^1 包括胞嘧啶核鹼基。

【0021】 E16. E1 至 E15 中任一項之寡核苷酸，其中 X^3 包括次黃嘌呤核鹼基。

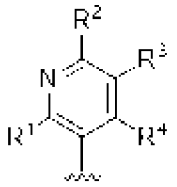
【0022】 E17. E1 至 E15 中任一項之寡核苷酸，其中 X^3 包括腺嘌呤核鹼基。

【0023】 E18. E1 至 E17 中任一項之寡核苷酸，其中 X^2 包括胞嘧啶核鹼基。

【0024】 E19. E1 至 E17 中任一項之寡核苷酸，其中 X^2 包括尿嘧啶核鹼基。

【0025】 E20. E1 至 E17 中任一項之寡核苷酸，其中 X^2 不包括核鹼基。

【0026】 E21. E1 至 E17 中任一項之寡核苷酸，其中 X^2 包括具有以下結構之核鹼基：



其中 R^1 為氫、三氟甲基、視情況經取代之胺基、羥基或視情況經取代之 C_1-C_6 烷氧基；

R^2 為氫、視情況經取代之胺基或視情況經取代之 C_1-C_6 烷基；並且

R^3 及 R^4 獨立地為氫、鹵素或視情況經取代之 C_1-C_6 烷基，

或其鹽。

【0027】 E22. E1 至 E21 中任一項之寡核苷酸，其中 X^2 不為 2’-O-甲基-核苷酸。

【0028】 E23. E1 至 E22 中任一項之寡核苷酸，其中 X^1、X^2 及 X^3 不為 2’-O-甲基-核苷酸。

【0029】 E24. E1 至 E23 中任一項之寡核苷酸，其中[A_m]包括至少一個核酸酶抗性核苷酸。

【0030】 E25. E1 至 E24 中任一項之寡核苷酸，其中[A_m]包括至少一個 2′-O-C_1-C_6 烷基-核苷酸、至少一個 2’-胺基-核苷酸、至少一個阿拉伯糖核酸-核苷酸、至少一個雙環核苷酸、至少一個 2’-F-核苷酸、至少一個 2’-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一個約束型乙基(cEt)-核苷酸、至少一個 LNA-核苷酸及/或至少一個 DNA-核苷酸。

【0031】 E26. E25 之寡核苷酸，其中[A_m]包括至少一個 2’-O-甲基-核苷酸、至少一個 2’-F-核苷酸、至少一個 2’-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一個 cEt-核苷酸、至少一個 LNA-核苷酸及/或至少一個 DNA-核苷酸。

【0032】 E27. E1 至 E26 中任一項之寡核苷酸，其中[A_m]包括至少五個末端 2’-O-甲基-核苷酸。

【0033】 E28. E1 至 E27 中任一項之寡核苷酸，其中[A_m]包括至少一個硫代磷酸酯鍵。

【0034】 E29. E1 至 E28 中任一項之寡核苷酸，其中[A_m]包括至少 4 個末端硫代磷酸酯鍵。

【0035】 E30. E29 或 E29 之寡核苷酸，其中至少一個硫代磷酸酯鍵為立體純的。

【0036】 E31. E1 至 E30 中任一項之寡核苷酸，其中[B_n]包括至少一個核酸酶抗性核苷酸。

【0037】 E32. E1 至 E31 中任一項之寡核苷酸，其中[B_n]包括至少一個 2′-O-C_1-C_6 烷基-核苷酸、至少一個 2’-胺基-核苷酸、至少一個阿拉伯糖核酸-核苷酸、至少一個雙環核苷酸、至少一個 2’-F-核苷酸、至少一個 2’-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一個 cEt-核苷酸、至少一個 LNA-核苷酸及/或至少一個 DNA-核苷酸。

【0038】 E33. E32 之寡核苷酸，其中[B_n]包括至少一個 2’-O-甲基-核苷酸、至少一個 2’-F-核苷酸、至少一個 2’-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一個 cEt-核苷酸、至少一個 LNA-核苷酸及/或至少一個 DNA-核苷酸。

【0039】 E34. E1 至 E33 中任一項之寡核苷酸，其中[B_n]包括至少五個末端 2’-O-甲基-核苷酸。

【0040】 E35. E1 至 E34 中任一項之寡核苷酸，其中[B_n]包括至少一個硫代磷酸酯鍵。

【0041】 E36. E1 至 E35 中任一項之寡核苷酸，其中[B_n]包括至少 4 個末端硫代磷酸酯鍵。

【0042】 E37. E35 或 E36 之寡核苷酸，其中至少一個硫代磷酸酯鍵為立體純的。

【0043】 E38. E1 至 E37 中任一項之寡核苷酸，其中至少 20% (例如，至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或 100%)[A_m]與[B_n]組合之核苷酸為 2’-O-甲基-核苷酸。

【0044】 E39. E1 至 E38 中任一項之寡核苷酸，其中該寡核苷酸進一步包括 5'-帽結構。

【0045】 E40. E39 之寡核苷酸，其中該 5'-帽結構為 2,2,7-三甲基鳥苷帽。

【0046】 E41. E1 至 E40 中任一項之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括至少一個替代性核鹼基。

【0047】 E42. E41 之寡核苷酸，其中該替代性核鹼基為 5-甲基胞嘧啶、5-羥基胞嘧啶、5-甲氧基胞嘧啶、N4-甲基胞嘧啶、N3-甲基胞嘧啶、N4-乙基胞嘧啶、假異胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、5-胺基胞嘧啶、5-乙炔基胞嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、吡咯并胞嘧啶、5-胺基甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶、萘啶、5-甲氧基尿嘧啶、假尿嘧啶、二氫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、4-硫代胸腺嘧啶、5,6-二氫胸腺嘧啶、5-鹵基尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-胺甲基尿嘧啶、5-羥甲基尿嘧啶、次黃嘌呤、7-去氮鳥嘌呤、8-氮雜-7-去氮鳥嘌呤、7-氮雜-2,6-二胺基嘌呤、噻吩并鳥嘌呤、N1-甲基鳥嘌呤、N2-甲基鳥嘌呤、6-硫代鳥嘌呤、8-甲氧基鳥嘌呤、8-烯丙氧基鳥嘌呤、7-胺基甲基-7-去氮鳥嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、咪唑并吡啶并并嘧啶、7-去氮腺嘌呤、3-去氮腺嘌呤、8-氮雜-7-去氮腺嘌呤、8-氮雜-7-去氮腺嘌呤、N1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-甲基腺嘌呤或 8-疊氮基腺嘌呤。

【0048】 E43. E41 之寡核苷酸，其中該替代性核鹼基為 2-胺基-嘌呤、2,6-二胺基-嘌呤、3-去氮-腺嘌呤、7-去氮-腺嘌呤、7-甲基-腺嘌呤、8-疊氮基-腺嘌呤、8-甲基-腺嘌呤、5-羥甲基-胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、吡咯并胞嘧啶、7-胺基甲基-7-去氮-鳥嘌呤、7-去氮-鳥嘌呤、7-甲基-鳥嘌呤、8-氮雜-7-去氮-鳥嘌呤、噻吩并鳥嘌呤、次黃嘌呤、4-硫代-尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、二氫尿嘧啶或假尿嘧啶。

【0049】 E44. E41 之寡核苷酸，其中該替代性核鹼基為 5-甲基-胞嘧啶或 2-胺基-嘌呤。

【0050】 E45. E1 至 E44 中任一項之寡核苷酸，其中該 5’-末端核苷酸為 2’-胺基-核苷酸。

【0051】 E46. E1 至 E45 中任一項之寡核苷酸，其中組合之 A 與 B 由 18 至 80 個核苷酸(例如 27 至 71、36 至 62、45 至 53 或 47 至 51 個核苷酸)組成。

【0052】 E47. E1 至 E46 中任一項之寡核苷酸，其中 m 為 5 至 40 (例如，8 至 36、12 至 32、16 至 28、20 至 24 或 30 至 40)。

【0053】 E48. E1 至 E47 中任一項之寡核苷酸，其中 n 為 5 至 40 (例如，7 至 17、8 至 36、12 至 32、16 至 28 或 20 至 24)。

【0054】 E49. E1 之寡核苷酸，其中 m 與 n 各自獨立地為 5 至 40 之整數；X^1、X^2 及 X^3 中之至少一者具有式 II 之結構，其中 R^8 及 R^9 各自為氫，且不具有式 II 之結構的 X^1、X^2 及 X^3 各自為核糖核苷酸；$[A_m]$與$[B_n]$各自包括至少五個末端 2’-O-甲基-核苷酸及至少四個末端硫代磷酸酯鍵；並且至少 20% $[A_m]$與$[B_n]$組合之核苷酸為 2’-O-甲基-核苷酸。

【0055】 E50. E49 之寡核苷酸，其中 X^1 包括腺嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核鹼基；X^1 包括腺嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基；X^1 包括腺嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基；X^1 包括腺嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核

鹼基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基；X^1 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核鹼基；X^1 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基；X^1 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基；X^1 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基；X^1 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核鹼基；X^1 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基；X^1 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基；或 X^1 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基。

【0056】 E51. E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中該寡核苷酸進一步包括一或多個作用於 RNA 之腺苷去胺酶(ADAR)招募結構域。

【0057】 E52. E51 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括 ADAR 招募結構域。

【0058】 E53. E52 之寡核苷酸，其中該 ADAR 招募結構域在該寡核苷酸之 5’端處。

【0059】 E54. E52 之寡核苷酸，其中該 ADAR 招募結構域在該寡核苷酸之 3’端處。

【0060】 E55. E51 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括第一 ADAR 招募結構域及第二 ADAR 招募結構域。

【0061】 E56. E55 之寡核苷酸，其中該第一 ADAR 招募結構域為在該寡核苷酸之 5’端處，其中該第二 ADAR 招募結構域在該寡核苷酸之 3’端處。

【0062】 E57. E51 至 E56 中任一項之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 V 之結構：

$$C\text{-}L_1\text{-}D\text{-}L_2\text{-}[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

式 V，

其中：

$[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$為 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸；

C 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸；

L_1 為環區；並且

D 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸；

L_2 為視情況選用之連結子；

其中寡核苷酸包括藉由長度為 10-50 個連結核苷之 C 及 D 形成的雙鏈體結構，其中雙鏈體結構包括介於 C 之核苷酸與 D 之核苷酸之間的至少一個錯配，其中 C 或 D 包括至少一個替代性核鹼基。

【0063】 E58. E57 之寡核苷酸，其中 C 與 D 包括至少一個替代性核鹼基。

【0064】 E59. E57 或 E58 之寡核苷酸，其中 L_1 包括連結核苷。

【0065】 E60. E59 之寡核苷酸，其中 L_1 由連結核苷組成。

【0066】 E61. E57 至 E60 中任一項之寡核苷酸，其中 L_1 包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0067】 E62. E57 至 E61 中任一項之寡核苷酸，其中 C 或 D 包括至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0068】 E63. E57 至 E61 中任一項之寡核苷酸，其中 C 及 D 各自獨立地包括至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0069】 E64. E51 至 E56 中任一項之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 VI 之結構：

$$C\text{-}L_1\text{-}D\text{-}L_2\text{-}[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

式 VI，

其中：

$[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$ 為 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸；

C 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸；

L_1 為不由連結核苷組成之環區；並且

D 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸；

L_2 為視情況選用之連結子，

其中寡核苷酸包括藉由長度為 10-50 個連結核苷之 C 及 D 形成的雙鏈體結構，其中雙鏈體結構包括介於 C 核苷酸與 D 核苷酸之間的至少一個錯配。

【0070】 E65. E55 之寡核苷酸，其中 L_1 具有式 VII 之結構：

$$F^1\text{-}(G^1)_j\text{-}(H^1)_k\text{-}(G^2)_m\text{-}(I)\text{-}(G^3)_n\text{-}(H^2)_p\text{-}(G^4)_q\text{–}F^2$$

式 VII，

其中 F^1 為介於環區與 C 之間的鍵；F^2 為介於 D 與 $[A_m]$ 之間或介於 D 與視情況選用之連結子之間的鍵；G^1、G^2、G^3 及 G^4 各自獨立地選自視情況經取代之 C1-C2 烷基、視情況經取代之 C1-C3 雜烷基、O、S 及 NR^N；R^N 為氫、視情況經取代

之 C_{1-4}烷基、視情況經取代之 C_{2-4}烯基、視情況經取代之 C_{2-4}炔基、視情況經取代之 C_{2-6}雜環基、視情況經取代之 C_{6-12}芳基或視情況經取代之 C_{1-7}雜烷基；C^1及 C^2各自獨立地選自羰基、硫羰基、磺醯基或磷醯基；j、k、m、n、p 及 q 各自獨立地為 0 或 1；並且 I 為視情況經取代之 C_{1-10}烷基、視情況經取代之 C_{2-10}烯基、視情況經取代之 C_{2-10}炔基、視情況經取代之 C_{2-6}雜環基、視情況經取代之 C_{6-12}芳基、視情況經取代之 C_2-C_{10}聚乙二醇或視情況經取代之 C_{1-10}雜烷基、或連結 F^1-$(G^1)_j$-$(H^1)_k$-$(G^2)_m$-(I)-$(G^3)_n$-$(H^2)_p$-$(G^4)_q$- F^2之化學鍵。

【0071】 E66. E64 或 E65 之寡核苷酸，其中 L_1包括含有醣之連結部分。

【0072】 E67. E64 至 E66 中任一項之寡核苷酸，其中 C 或 D 包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0073】 E68. E64 至 E66 中任一項之寡核苷酸，其中 C 與 D 各自獨立地包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0074】 E69. E51 至 E56 中任一項之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 VIII 之結構：

$$C\text{-}L_1\text{-}D\text{-}L_2\text{-}[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

式 VIII，

其中：

$[A_m]$-X^1-X^2-X^3-$[B_n]$為 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸；

C 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸；

L_1為包括至少一個替代性核鹼基或至少一個替代性核苷間鍵之環區；並且

D 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸；

L_2為視情況選用之連結子，

其中寡核苷酸包括藉由長度為 10-50 個連結核苷之 C 及 D 形成的雙鏈體結構，

其中雙鏈體結構包括介於 C 核苷酸與 D 核苷酸之間的至少一個錯配。

【0075】 E70. E69 之寡核苷酸，其中 L_1 包括至少一個替代性核鹼基及至少一個替代性核苷間鍵。

【0076】 E71. E51 至 E56 中任一項之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 IX 之結構：

$$C\text{-}L_1\text{-}D\text{-}L_2\text{-}[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

式 IX，

其中：

$[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$為 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸；

C 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸；

L_1 為包括至少一個替代性糖部分之環區，其中該替代性糖部分選自由以下組成之群：2′-O-C_1-C_6 烷基糖部分、2′-胺基-糖部分、2′-氟-糖部分、2’-O-MOE 糖部分、阿拉伯糖核酸(ANA)糖部分、去氧核糖糖部分及雙環核酸；

D 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸；並且

L_2 為視情況選用之連結子，

其中寡核苷酸包括藉由長度為 10-50 個連結核苷之 C 及 D 形成的雙鏈體結構，其中雙鏈體結構包括介於 C 核苷酸與 D 核苷酸之間的至少一個錯配。

【0077】 E72. E71 之寡核苷酸，其中該雙環糖部分選自氧基-LNA 糖部分、硫代-LNA 糖部分、胺基-LNA 糖部分、cEt 糖部分及乙烯橋連(ENA)糖部分及 LNA 糖部分。

【0078】 E73. E71 或 E72 之寡核苷酸，其中該 ANA 糖部分為 2’-氟-ANA 糖部分。

【0079】 E74. E71 至 E73 中任一項之寡核苷酸，其中 C 或 D 包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0080】 E75. E71 至 E73 中任一項之寡核苷酸，其中 C 與 D 各自獨立地包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0081】 E76. E60 至 E75 中任一項之寡核苷酸，其中 C 與 D 之至少 5 個連續核鹼基互補。

【0082】 E77. E60 至 E75 中任一項之寡核苷酸，其中至少 80% (例如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99%或 100%) C 之核鹼基與 D 之核鹼基互補。

【0083】 E78. E57 至 E77 中任一項之寡核苷酸，其中 C 包括與 SEQ ID NO. 1、4、7、10、13、16、19、22、25、28、31 及 34 中任一者所列之核鹼基序列具有至少 80%序列一致性的核鹼基序列。

【0084】 E79. E57 至 E78 中任一項之寡核苷酸，其中 D 包括與 SEQ ID NO. 2、5、8、11、14、17、20、23、26、29、32 及 35 中任一者所列之核鹼基序列具有至少 80%序列一致性的核鹼基序列。

【0085】 E80. E57 至 E78 中任一項之寡核苷酸，其中 C-L_1-D 包括與 SEQ ID NO. 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33 及 36 中任一者所列之核鹼基序列具有至少 80%序列一致性的核鹼基序列。

【0086】 E81. E57 至 E63、E66 至 E70、E74 或 E75 中任一項之寡核苷酸，其中該至少一個替代性核鹼基選自由以下組成之群：5-甲基胞嘧啶、5-羥基胞嘧啶、5-甲氧基胞嘧啶、N^4-甲基胞嘧啶、N^3-甲基胞嘧啶、N^4-乙基胞嘧啶、假異胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、5-胺基胞嘧啶、5-乙炔基胞嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、吡咯并胞嘧啶、5-胺基甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶、萘啶、5-甲氧基尿嘧啶、假尿嘧啶、二氫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、4-硫代胸腺嘧啶、5,6-二氫胸腺嘧啶、5-鹵基尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-胺甲基尿嘧啶、5-羥甲基尿嘧啶、次黃嘌呤、7-去氮鳥嘌呤、8-氮雜-7-去氮鳥嘌呤、7-氮雜-2,6-二胺基嘌呤、噻吩并鳥嘌呤、N^1-甲基鳥嘌呤、N^2-甲基

鳥嘌呤、6-硫代鳥嘌呤、8-甲氧基鳥嘌呤、8-烯丙氧基鳥嘌呤、7-胺基甲基-7-去氮鳥嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、咪唑并吡啶并并嘧啶、7-去氮腺嘌呤、3-去氮腺嘌呤、8-氮雜-7-去氮腺嘌呤、8-氮雜-7-去氮腺嘌呤、N^1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、N^6-甲基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-甲基腺嘌呤或 8-疊氮基腺嘌呤。

【0087】 E82. E57 至 E63、E67 至 E70、E74 或 E75 中任一項之寡核苷酸，其中該至少一個替代性核鹼基選自由以下組成之群：2-胺基-嘌呤、2,6-二胺基-嘌呤、3-去氮-腺嘌呤、7-去氮-腺嘌呤、7-甲基-腺嘌呤、8-疊氮基-腺嘌呤、8-甲基-腺嘌呤、5-羥甲基-胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、吡咯并胞嘧啶、7-胺基甲基-7-去氮-鳥嘌呤、7-去氮-鳥嘌呤、7-甲基-鳥嘌呤、8-氮雜-7-去氮-鳥嘌呤、噻吩并鳥嘌呤、次黃嘌呤、4-硫代-尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、二氫尿嘧啶或假尿嘧啶。

【0088】 E83. E57 至 E63、E67 至 E70、E74 或 E75 中任一項之寡核苷酸，其中該至少一個替代性核苷間鍵選自由下列各鍵組成之群：硫代磷酸酯核苷間鍵、2’-烷氧基核苷間鍵及磷酸烷基酯核苷間鍵。

【0089】 E84. E83 之寡核苷酸，其中該至少一個替代性核苷間鍵為至少一個硫代磷酸酯核苷間鍵。

【0090】 E85. E62、E63、E67 至 E71、E74 或 E75 中任一項之寡核苷酸，其中該至少一個替代性糖部分選自由以下組成之群：2′-O-烷基-糖部分、2′-O-甲基-糖部分、2′-胺基-糖部分、2′-氟-糖部分、2’-O-MOE 糖部分、ANA 糖部分、去氧核糖糖部分及雙環核酸。

【0091】 E86. E85 之寡核苷酸，其中該雙環糖部分選自氧基-LNA 糖部分、硫代-LNA 糖部分、胺基-LNA 糖部分、cEt 糖部分及乙烯橋連(ENA)糖部分及 LNA 糖部分。

【0092】 E87. E83 或 E85 之寡核苷酸，其中該 ANA 糖部分為 2’-氟-ANA 糖部分。

【0093】 E88. E85 之寡核苷酸，其中該至少一個替代性糖部分為 2′-O-甲基-糖部分、2′-氟-糖部分或 2’-O-MOE 糖部分。

【0094】 E89. E57 至 E87 中任一項之寡核苷酸，其中該至少一個錯配為成對的 A 至 C 錯配、成對的 G 至 G 錯配或成對的 C 至 A 錯配。

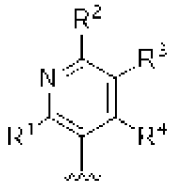
【0095】 E90. E89 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括介於 C 之核苷酸與 D 之核苷酸之間的至少兩個錯配。

【0096】 E91. E90 之寡核苷酸，其中該至少兩個錯配係由至少三個連結核苷分隔。

【0097】 E92. E91 之寡核苷酸，其中該至少兩個錯配係由三個連結核苷分隔。

【0098】 E93. E57 至 E92 中任一項之寡核苷酸，其中該至少一個錯配包括具有替代性核鹼基之核苷。

【0099】 E94. E93 之寡核苷酸，其中該替代性核鹼基具有以下結構：



其中 R^1 為氫、三氟甲基、視情況經取代之胺基、羥基或視情況經取代之 C_1-C_6 烷氧基；

R^2 為氫、視情況經取代之胺基或視情況經取代之 C_1-C_6 烷基；並且

R^3 及 R^4 獨立地為氫、鹵素或視情況經取代之 C_1-C_6 烷基，

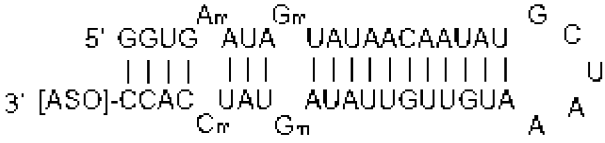
或其鹽。

【0100】 E95. E57 至 E94 中任一項之寡核苷酸，其中 C-L_1-D 為 ADAR 招募結構域。

【0101】 E96. E51 至 E55 或 E92 中任一項之寡核苷酸，其中該一或多個 ADAR 招募結構域為麩胺酸離子移變受體 AMPA 型次單元 2 (GluR2) ADAR 招募結構域。

【0102】 E97. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 37 之核苷酸序列。

【0103】 E98. E97 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 X 之結構：

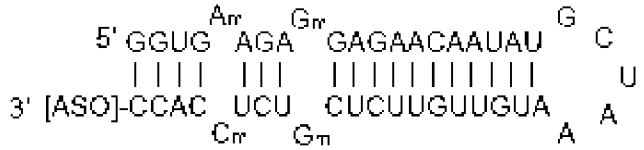


式 X，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0104】 E99. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 38 之核苷酸序列。

【0105】 E100. E99 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XI 之結構：

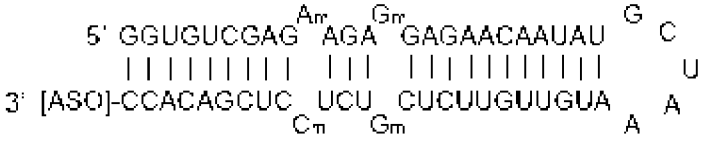


式 XI，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0106】 E101. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 39 之核苷酸序列。

【0107】 E102. E101 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XII 之結構：



式 XII，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0108】 E103. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 40 之核苷酸序列。

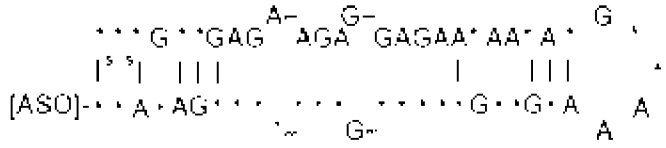
【0109】 E104. E51 至 E56 或 E95 至 E103 中任一項之寡核苷酸，其中該一或多個 ADAR 招募結構域包括至少一個核酸酶抗性核苷酸。

【0110】 E105. E104 之寡核苷酸，其中該核酸酶抗性核苷酸為 2'-O-甲基-核苷酸。

【0111】 E106. E51 至 E56 或 E95 至 E104 中任一項之寡核苷酸，其中該一或多個 ADAR 招募結構域包括至少一個替代性核苷間鍵。

【0112】 E107. E106 之寡核苷酸，其中該替代性核苷間鍵為硫代磷酸酯核苷間鍵。

【0113】 E108. E103 至 E107 中任一項之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XIII 之結構：

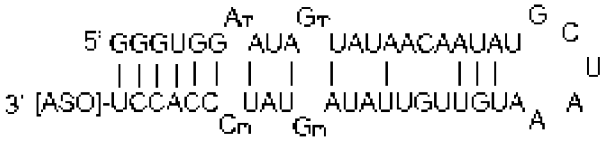


式 XIII，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中*為 2'-O-甲基核苷酸，其中 s 為硫代磷酸酯核苷間鍵，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0114】 E109. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 41 之核苷酸序列。

【0115】 E110. E109 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XIV 之結構：

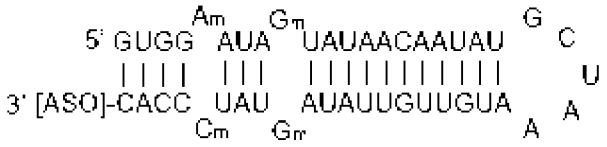


式 XIV，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0116】　E111. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 42 之核苷酸序列。

【0117】　E112. E111 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XV 之結構：

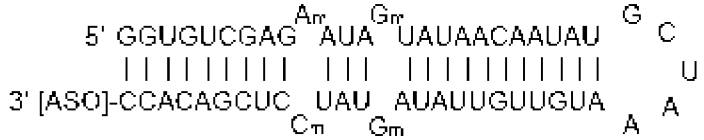


式 XV，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0118】　E113. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 43 之核苷酸序列。

【0119】　E114. E113 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XVI 之結構：

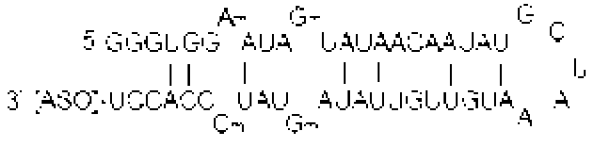


式 XVI，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0120】　E115. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 44 之核苷酸序列。

【0121】　E116. E115 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XVII 之結構：

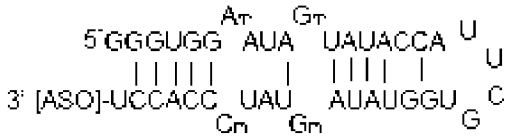


式 XVII，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0122】 E117. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 45 之核苷酸序列。

【0123】 E118. E117 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XVIII 之結構：

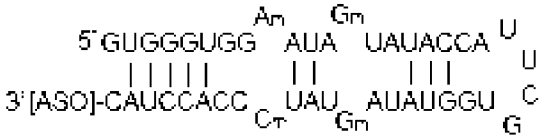


式 XVIII，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0124】 E119. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 46 之核苷酸序列。

【0125】 E120. E119 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XIX 之結構：

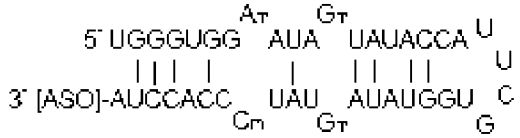


式 XIX，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0126】 E121. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 47 之核苷酸序列。

【0127】 E122. E121 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XX 之結構：

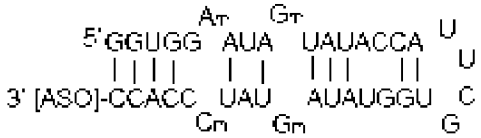


式 XX，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0128】 E123. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 48 之核苷酸序列。

【0129】 E124. E123 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XXI 之結構：

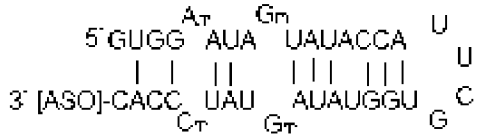


式 XXI，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0130】 E125. E96 之寡核苷酸，其中該 GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 49 之核苷酸序列。

【0131】 E126. E125 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸包括式 XXII 之結構：



式 XXII，

其中[ASO]包括 E1 至 E50 中任一項之寡核苷酸，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0132】 E127. E51 至 E56 中任一項之寡核苷酸，其中該一或多個 ADAR 招募結構域為 Z-DNA ADAR 招募結構域。

【0133】 E128. E51 至 E56 中任一項之寡核苷酸，其中該一或多個 ADAR 招募結構域為 MS2 ADAR 招募結構域。

【0134】 E129. E128 之寡核苷酸，其中該 MS2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 50 之核苷酸序列。

【0135】 E130. 一種偶聯物，其包括偶聯至靶標部分的 E1 至 E129 中任一項之寡核苷酸。

【0136】 E131. E130 之偶聯物，其中該靶標部分為脂質、固醇、碳水化合物及/或肽。

【0137】 E132. E131 之偶聯物，其中該寡核苷酸偶聯至固醇。

【0138】 E133. E132 之偶聯物，其中該固醇為膽固醇。

【0139】 E134. E131 至 E133 中任一項之偶聯物，其中該寡核苷酸偶聯至醣。

【0140】 E135. E134 之偶聯物，其中該醣為 N-乙醯半乳胺糖。

【0141】 E136. E131 至 E135 中任一項之偶聯物，其中該寡核苷酸偶聯至肽。

【0142】 E137. E136 之偶聯物，其中該肽為細胞穿透肽。

【0143】 E138. E131 至 E137 中任一項之偶聯物，其中該寡核苷酸偶聯至脂質。

【0144】 E139. E138 之偶聯物，其中該脂質為石膽酸、二十二碳六烯酸或二十二酸。

【0145】 E140. 一種複合物，其包括：

E1 至 E129 中任一項之寡核苷酸或 E130 至 E139 中任一項之偶聯物；及 mRNA，其中該寡核苷酸或偶聯物與 mRNA 彼此雜交並且該複合物包括在該 mRNA 之腺苷處的第一錯配。

【0146】 E141. E140 之複合物，其中該複合物包括距該第一錯配之 5’處有四個核苷酸之第二錯配。

【0147】 E142. E140 或 E141 之複合物，其中該複合物包括 1、2、3、4、5、6、7 或 8 個錯配。

【0148】 E143. E140 至 E142 中任一項之複合物，其中該 mRNA 包括可經去胺基以產生治療結果之腺苷。

【0149】 E144. E140 至 E143 中任一項之複合物，其中該 mRNA 與相應的天然 mRNA 相比包括鳥苷至腺苷突變。

【0150】 E145. E144 之複合物，其中該鳥苷至腺苷突變為誤義或無義突變。

【0151】 E146. E140 至 E145 中任一項之複合物，其中該第一錯配在 mRNA 之起始密碼子中的腺苷處。

【0152】 E147. E140 至 E145 中任一項之複合物，其中該第一錯配在 mRNA 之終止密碼子中的腺苷處。

【0153】 E148. E147 之複合物，其中該終止密碼子為過早終止密碼子。

【0154】 E149. 一種產生 E140 至 E148 中任一項之複合物的方法，該方法包括使細胞與 E1 至 E129 中任一項之寡核苷酸或 E130 至 E139 中任一項之偶聯物接觸。

【0155】 E150. 一種在 mRNA 中使腺苷去胺之方法，該方法包括使細胞與 E1 至 E129 中任一項之寡核苷酸或 E130 至 E139 中任一項之偶聯物接觸。

【0156】 E151. 一種治療有此需要之受試者中的病症之方法，該方法包括向該受試者投與有效量之 E1 至 E129 中任一項之寡核苷酸或 E130 至 E139 中任一項之偶聯物。

【0157】 E152. E151 之方法，其中該病症為囊腫纖維化、白化症、α-1-抗胰蛋白酶缺乏症、阿滋海默氏症、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症、氣喘、11-地中海貧血、卡達西症候群(Cadasil syndrome)、夏馬杜三氏病(Charcot-Marie-Tooth disease)、慢性阻塞性肺病、遠端脊肌萎縮症、杜興氏/貝克爾肌肉營養不良(Duchenne/Becker muscular, dystrophy)、失養性水皰性表皮鬆解症、水皰性表皮鬆解症、法布裡病(Fabry disease)、第五凝血因子(Factor V Leiden)相關病症、家族性腺瘤、息肉病、半乳糖血症、高歇氏病(Gaucher's disease)、葡萄糖-6-磷酸去氫酶缺乏症、血友病、遺傳性血色病、亨特氏症候群(Hunter syndrome)、杭丁頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、賀勒氏症候群(Hurler syndrome)、炎症性腸病、遺傳多凝集反應症候群、萊伯氏先天性黑蒙症(Leber congenital amaurosis)、勒-奈二氏症候群(Lesch-Nyhan syndrome)、林奇症候群(Lynch syndrome)、馬凡症候群(Marfan syndrome)、黏多糖病、肌肉營養不良、I 型及 II 型肌強直性營養不良、神經纖維瘤病、A 型、B 型及 C 型尼-皮二氏病(Niemann-Pick disease)、NY-ESO-1 相關癌症、帕金森氏病、Peutz-Jeghers 二氏症候群、苯酮尿症、龐貝氏病(Pompe's disease)、原發性纖毛病、凝血酶原突變相關病症(例如，凝血酶原 G20210A 突變)、肺高血壓、色素性視網膜炎、山多夫氏病(Sandhoff disease)、嚴重複合型免

疫缺乏症候群、鐮狀細胞性貧血、脊髓性肌萎縮、斯特格氏病(Stargardt's Disease)、泰-薩二氏病(Tay-Sachs disease)、烏謝爾症候群(Usher syndrome)、X連鎖免疫缺陷、斯特格-韋伯症候群(Sturge-Weber syndrome)、雷特氏症候群(Rett syndrome)或癌症。

【0158】 E153. E150 至 E152 中任一項之方法，其中該方法進一步包括向該細胞或該受試者投與 ADAR 融合蛋白。

【0159】 E154. E153 之方法，其中使用包括編碼 ADAR 融合蛋白之多核苷酸的表現載體構築體向該細胞或該受試者投與該 ADAR 融合蛋白。

【0160】 E155. E153 或 E154 之方法，其中該 ADAR 融合蛋白包括融合至 MS2 噬菌體外殼蛋白的 ADAR 之去胺酶結構域。

【0161】 E156. E155 之方法，其中 ADAR 之去胺酶結構域為 ADAR1 之去胺酶結構域。

【0162】 E157. E155 之方法，其中 ADAR 之去胺酶結構域為 ADAR2 之去胺酶結構域。

【0163】 E158. E151 至 E157 中任一項之方法，其中投與包括非經口投與、鞘內投與或顱內投與。

化學術語

【0164】 本文所用之術語僅係用於描述具體實施例，而不旨在限制。

【0165】 對於以下化學定義中之任一者，原子符號後面之數字表示某一特定化學部分中存在之元素的原子總數。如應理解，其他原子諸如 H 原子或如本文所述之取代基可在需要時存在以滿足原子之原子價。例如，未經取代之 C_2烷基具有式–CH_2CH_3。當與本文所定義之基團一起使用時，對碳原子數目之提及包括在縮醛及縮酮基團中之二價碳，但不包括在醯基、酯基、碳酸酯基或胺甲酸酯

基中之羰基碳。對雜芳基中之氧、氮或硫原子數目之提及僅包括形成雜環之一部分的彼等原子。

【0166】 當特定取代基可在同一結構中出現多次時，可自該取代基之可能定義列表中獨立地選擇該取代基之每個實例。

【0167】 如本文所用，術語「烷基」係指具有 1 至 20 個碳原子(例如，1 至 16 個碳原子、1 至 10 個碳原子、1 至 6 個碳原子或 1 至 3 個碳原子)之支鏈或直鏈單價飽和脂肪烴。

【0168】 伸烷基為二價烷基。如本文所用，術語「烯基」單獨或與其他基團組合時係指具有碳-碳雙鍵且具有 2 至 20 個碳原子(例如，2 至 16 個碳原子、2 至 10 個碳原子、2 至 6 個碳原子或 2 個碳原子)之直鏈或支鏈烴基。

【0169】 如本文所用，術語「鹵素」意指氟(氟基)、氯(氯基)、溴(溴基)或碘(碘基)基團。

【0170】 如本文所用，術語「雜烷基」係指其中一或多個組成碳原子已經氮、氧或硫置換的如本文所定義之烷基。在一些實施例中，雜烷基可進一步經 1、2、3 或 4 個如本文針對烷基所述之取代基取代。雜烷基之實例為「烷氧基」，其如本文所用係指烷基-O-(例如甲氧基及乙氧基)。伸雜烷基為二價雜烷基。如本文所用，術語「雜烯基」係指其中一或多個組成碳原子已經氮、氧或硫置換的如本文所定義之烯基。在一些實施例中，雜烯基可進一步經 1、2、3 或 4 個如本文針對烯基所述之取代基取代。雜烯基之實例為「烯氧基」，其如本文所用係指烯基-O-。伸雜烯基為二價雜烯基。如本文所用，術語「雜炔基」係指其中一或多個組成碳原子已經氮、氧或硫置換的如本文所定義之炔基。在一些實施例中，雜炔基可進一步經 1、2、3 或 4 個如本文針對炔基所述之取代基取代。雜炔基之實例為「炔氧基」，其如本文所用係指炔基-O-。伸雜炔基為二價雜炔基。

【0171】 如本文所用，術語「羥基」表示-OH 基團。

【0172】 烷基、雜烷基可為經取代或未經取代的。當經取代時，除非另作說明，否則通常將有 1 至 4 個取代基。取代基包括例如：烷基(例如未經取代及經取代，其中該取代基包括本文所述之任何基團，例如芳基、鹵基、羥基)、芳基(例如經取代及未經取代之苯基)、碳環基(例如經取代及未經取代之環烷基)、鹵基(例如氟)、羥基、雜烷基(例如經取代及未經取代之甲氧基、乙氧基或硫代烷氧基)、雜芳基、雜環基、胺基(例如 NH_2 或單烷基胺基或二烷基胺基)、疊氮基、氰基、硝基或硫醇。芳基、碳環基(例如環烷基)、雜芳基及雜環基亦可為經取代之烷基(未經取代及經取代，諸如芳基烷基(例如，經取代及未經取代之苄基))。

【0173】 本發明之化合物可具有一或多個不對稱碳原子且可以如下形式存在：光學純的鏡像異構物、鏡像異構物之混合物，諸如外消旋物、光學純的非鏡像異構物、非鏡像異構物之混合物、非對映異構外消旋物、或非對映異構外消旋物之混合物。光學活性形式可例如藉由拆分外消旋物、藉由不對稱合成或不對稱層析法(用對掌性吸附劑或溶析液之層析法)而獲得。換言之，某些所揭露之化合物可以各種立體異構形式存在。立體異構物係僅在其空間排列上不同之化合物。鏡像異構物為一對立體異構物，它們的鏡像不能重疊，最常見原因在於它們含有不對稱取代之碳原子作為對掌性中心。「鏡像異構物」意指一對互為鏡像且不能重疊之分子中之一者。非鏡像異構物為與鏡像不相關之立體異構物，最常見原因在於它們含有兩個或兩個以上不對稱取代之碳原子並且代表一或多個對掌性碳原子周圍之取代基構型。例如，化合物之鏡像異構物可使用一或多種眾所周知之技術及方法諸如對掌性層析法及基於其之分離方法，藉由自外消旋物中分離鏡像異構物來製備。用於自外消旋混合物中分離本文所述之化合物之鏡像異構物的適當技術及/或方法可易於由熟習此項技術者確定。「外消旋物」或「外消旋混合物」意指含有兩種鏡像異構物之化合物，其中此類混合物沒有光學活性；亦即，它們不會圍繞偏振光平面旋轉。「幾何異構物」意指

與碳-碳雙鍵、環烷基環或橋連雙環系統之關係在取代基原子之取向上不同的異構物。在碳-碳雙鍵之每側上的原子(除 H 以外)可呈 E (取代基在碳-碳雙鍵之 25 相對側上)或 Z (取代基在同一側上取向)構型。「R」、「S」、「S*」、「R*」、「E」、「Z」、「順式」及「反式」表示相對於核心分子之構型。某些所揭露之化合物可以構型異構形式存在。構型異構物係由圍繞單鍵之旋轉受阻而形成之立體異構物，其中立體應變對旋轉之屏障高至足以允許分離構形異構物。本發明化合物可藉由異構物特異性合成或自異構混合物之拆分而製備成單個異構物。習知拆分技術包括使用光學活性酸(繼之以分段結晶及使游離鹼再生)形成異構對之每種異構物的遊離鹼之鹽；使用光學活性胺(繼之以分段結晶及使游離鹼再生)形成異構對之每種異構物的酸式鹽；使用光學純的酸、胺或醇(繼之以層析分離及移除對掌性助劑)形成異構對之每種異構物的酯或醯胺 35；或使用各種眾所周知之層析法拆分起始材料或最終產物之異構混合物。當所揭露之化合物之立體化學係由結構命名或描繪時，所命名或描繪之立體異構物相對於其他立體異構物為至少 60 重量%、70 重量%、80 重量%、90 重量%、99 重量%或 99.9 重量%。當單個鏡像異構物係由結構命名或描繪時，所命名或描繪之鏡像異構物為至少 60 重量%、70 重量%、80 重量%、90 重量%、99 重量%或 99.9 重量%光學純的。當單個非鏡像異構物係由結構命名或描繪時，所命名或描繪之非鏡像異構物為至少 60 重量%、70 重量%、80 重量%、90 重量%、99 重量%或 99.9 重量%純的。光學純度百分比為鏡像異構物之重量在鏡像異構物之重量加上其光學異構物重量中的比率。以重量計之非鏡像異構物純度為一種非鏡像異構物之重量在所有非鏡像異構物重量中之比率。當所揭露之化合物之立體化學係由結構命名或描繪時，所命名或描繪之立體異構物相對於其他立體異構物為至少 60 莫耳分率%、70 莫耳分率%、80 莫耳分率%、90 莫耳分率%、99 莫耳分率%或 99.9 莫耳分率%純的。當單個鏡像異構物係由結構命名或描繪時，所命名或描繪之鏡

像異構物為至少 60 莫耳分率%、70 莫耳分率%、80 莫耳分率%、90 莫耳分率%、99 莫耳分率%或 99.9 莫耳分率%純的。當單個非鏡像異構物係由結構命名或描繪時，所命名或描繪之非鏡像異構物為至少 60 莫耳分率%、70 莫耳分率%、80 莫耳分率%、90 莫耳分率%、99 莫耳分率%或 99.9 莫耳分率%純的。以莫耳分率計之純度百分比為鏡像異構物之莫耳數在鏡像異構物之莫耳數加上其光學異構物莫耳數中的比率。類似地，以莫耳分率計之純度百分比為非鏡像異構物之莫耳數在非鏡像異構物之莫耳數加上其異構物莫耳數中的比率。當所揭露之化合物係由結構命名或描繪而沒有表示立體化學並且該化合物具有至少一個對掌性中心時，應理解，該名稱或結構涵蓋不含相應光學異構物的化合物之鏡像異構物、化合物之外消旋混合物、或一種鏡像異構物相對於其相應的光學異構物富集之混合物。當所揭露之化合物係由結構命名或描繪而沒有指示立體化學並且具有兩個或更多個對掌性中心時，應理解，該名稱或結構涵蓋不含其他非鏡像異構物之非鏡像異構物，不含其他非鏡像異構物對之許多非鏡像異構物、非鏡像異構物之混合物、非鏡像異構物對之混合物、其中一種非鏡像異構物相對於其他非鏡像異構物富集的非鏡像異構物之混合物、或其中一或多種非鏡像異構物相對於其他非鏡像異構物富集的非鏡像異構物之混合物。本發明包括所有此等形式。

【0174】　除非另外定義，否則本文所用之全部技術和科學術語皆具有本發明相關領域的普通技術人員通常理解之相同含義。本文所述之方法及材料用於本揭示案中；亦可使用此項技術中已知之其他合適的方法及材料。材料、方法及實例僅為說明性且不旨在限制。所有出版物、專利申請案、專利、序列、數據庫條目及本文提及之其他參考文獻皆以引用之方式全部併入。當發生衝突時，以本說明書(包括定義)為準。

定義

【0175】 為了方便起見，在說明書、實例及所附申請專利範圍中使用之一些術語及片語之含義在下文中提供。除非另有說明，或自上下文隱含，否則以下術語或片語包括下文提供之含義。提供該等定義以便於描述具體實施例，且不旨在限制所主張之技術，因為技術之範疇僅受申請專利範圍之限制。除非另外定義，否則本文所用之全部技術及科學術語皆具有技術相關領域的普通技術人員通常理解之相同含義。若此項技術中術語之使用與本文所提供之定義有明顯差異，則以說明書中提供之定義為準。

【0176】 在本申請案中，除非上下文中另外明晰，否則(i)術語「一」可理解為意指「至少一」；(ii)術語「或」可理解為意指「及/或」；以及(iii)術語「包括」及「包含」可理解為涵蓋詳細列舉之組分或步驟，不管此等組分或步驟係單獨提出抑或與一或多個額外組分或步驟一起提出。

【0177】 如本文所用，術語「約」及「大致」係指超過或低於所述值之 10% 內的值。例如，術語「約 5 nM」表示 4.5 至 5.5 nM 之範圍。

【0178】 術語「至少」在一個數字或一系列數字之前應理解為包括與術語「至少」相鄰之數字，以及邏輯上可包括的所有後續數字或整數，如上下文中所明晰。例如，核酸分子中之核苷酸數目必須為整數。舉例而言，「21 個核苷酸之核酸分子的至少 18 個核苷酸」意指具有指示特性之 18、19、20 或 21 個核苷酸。當至少出現在一系列數字或範圍之前時，應理解，「至少」可修飾該系列或範圍中之每個數字。

【0179】 如本文所用，「不超過」或「小於」應理解為與該片語相鄰之值及合理的下限值或整數(如上下文中合理的)至零。舉例而言，具有「不超過 5 個未經修飾之核苷酸」的寡核苷酸具有 5、4、3、2、1 或 0 個未經修飾之核苷酸。當「不超過」出現在一系列數字或範圍之前時，應理解，「不超過」可修飾該系列或範圍中之每個數字。

【0180】 如本文所用，術語「投與」係指向受試者或系統投與組成物(例如，如本文所述之化合物或包括如本文所述之化合物的製劑)。向動物受試者(例如向人類)之投與可藉由任何適當途徑諸如本文所述之一種途徑來進行。

【0181】 如本文所用，「組合療法」或「組合投與」意指向受試者投與兩種(或兩種以上)不同藥劑或治療作為用於特定疾病或病狀之明確治療方案之一部分。治療方案規定每種藥劑之劑量和投藥週期，以便使單獨的藥劑對受試者之效果重疊。在一些實施例中，兩種或兩種以上藥劑之遞送為同時或並行的且該等藥劑可經共調配。在一些實施例中，兩種或兩種以上藥劑不經共調配且以連續方式作為開出方案之一部分投與。在一些實施例中，組合投與兩種或兩種以上藥劑或治療時，症狀或與病症相關之其他參數的減少要大於單獨遞送一種藥劑或治療或不使用另一種藥劑或治療時所觀察到的。兩種治療之效果可為部分相加的、完全相加的或大於相加的(例如協同的)。每種治療劑之連續或實質上同時投與可藉由包括但不限於以下之任何適當途徑進行：經口途徑、靜脈內途徑、肌內途徑及經由黏膜組織之直接吸收。治療劑可藉由相同途徑或藉由不同途徑投與。例如，組合之第一治療劑可藉由靜脈內注射投與，而組合之第二治療劑可經口投與。

【0182】 「G」、「C」、「A」、「T」及「U」各自通常代表分別含有鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸苷及尿嘧啶作為鹼基的天然存在之核苷酸。然而，應理解，術語「核苷酸」亦可指的是如下進一步詳述之替代性核苷酸或替代替換部分。熟練技術人員充分知曉鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤及尿嘧啶可經其他部分置換，而沒有實質上改變寡核苷酸之鹼基配對特性，該寡核苷酸包括載有此類置換部分之核苷酸。例如，但不限於，包括肌苷作為其鹼基之核苷酸可與含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之核苷酸鹼基配對。因此，含有尿嘧啶、鳥嘌呤或腺嘌呤之核苷酸可在本發明之寡核苷酸之核苷酸序列中經含有例如肌苷之核苷酸

置換。在另一實例中，在寡核苷酸中任何地方的腺嘌呤及胞嘧啶皆可分別經鳥嘌呤及尿嘧啶置換以形成與靶 mRNA 之 G-U 擺動鹼基配對。含有此類置換部分之序列適用於本發明之組成物及方法。

【0183】 術語「核鹼基」及「鹼基」包括存在於在核酸雜交中形成氫鍵之核苷及核苷酸中的嘌呤(例如腺嘌呤及鳥嘌呤)及嘧啶(例如，尿嘧啶、胸腺嘧啶及胞嘧啶)。在本發明之上下文中，術語核鹼基亦涵蓋替代性核鹼基，其可不同於天然存在之核鹼基但在核酸雜交期間具有功能性。在此情形下，「核鹼基」係指天然存在之核鹼基，諸如腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、胸苷、尿嘧啶、黃嘌呤及次黃嘌呤；以及替代性核鹼基。此類變異體例如描述於 Hirao 等人 (2012) Accounts of Chemical Research 第 45 卷, 第 2055 頁及 Bergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry 增刊 37 1.4.1 中。

【0184】 在一些實施例中，核鹼基部分係藉由使嘌呤或嘧啶變為經修飾之嘌呤或嘧啶諸如經取代之嘌呤或經取代之嘧啶，諸如選自以下之「替代性核鹼基」而被修飾：異胞嘧啶、假異胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-噻唑并-胞嘧啶、5-丙炔基-胞嘧啶、5-丙炔基-尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-噻唑并-尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、假尿嘧啶、1-甲基假尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2′-硫代-胸腺嘧啶、次黃嘌呤、二胺基嘌呤、6-胺基嘌呤、2-胺基嘌呤、2,6-二胺基嘌呤及 2-氯-6-胺基嘌呤。

【0185】 核鹼基部分可由每個對應核鹼基之字母代碼來表示，例如 A、T、G、C 或 U，其中每個字母可視情況包括等效功能之替代性核鹼基。在一些實施例中，例如，對於 gapmer，可使用 5-甲基胞嘧啶 LNA 核苷。

【0186】 「糖」或「糖部分」包括具有呋喃糖環的天然存在之糖。糖亦包括「替代性糖」，定義為能夠置換核苷之呋喃糖環的結構。在某些實施例中，替代性糖為非呋喃糖(或 4′-經取代之呋喃糖)環或環系統或開放系統。此類結構包括相對於天然呋喃糖環之簡單變化，諸如六員環，或可為更複雜的，就像在肽

核酸中使用之非環系統一樣。替代性糖亦可包括糖替代品，其中呋喃糖環已經另一環系統諸如嗎啉或己糖醇環系統置換。適用於具有模體之寡核苷酸之製備中的糖部分包括但不限於 β-D-核糖、β-D-2′-去氧核糖、經取代之糖(諸如 2′、5′及經雙取代之糖)、4′-S-糖(諸如 4′-S-核糖、4′-S-2′-去氧核糖及 4′-S-2′-經取代之核糖)、雙環替代性糖(諸如 2′-O—CH_2-4′或 2′-O—$(CH_2)_2$-4′橋連之核糖來源的雙環糖)以及糖替代品(諸如當核糖環已經嗎啉或己糖醇環系統置換時)。在每個位置處使用的雜環鹼基及核苷間鍵之類型係可變的且並非確定模體之因素。在具有替代性糖部分之大部分核苷中，通常維持雜環核鹼基以允許雜交。

【0187】　如本文所用，「核苷酸」係指包括核苷及核苷間鍵的寡核苷酸或多核苷酸之單體單元。核苷間鍵可包括或不包括磷酸酯鍵。類似地，「連結核苷」可由或不由磷酸酯鍵連結。許多「替代性核苷間鍵」為此項技術中已知的，包括但不限於硫代磷酸酯及硼磷酸酯鍵。替代性核苷包括雙環核苷(BNA)(例如，鎖定核苷(LNA)及約束型乙基(cEt)核苷)、肽核苷(PNA)、磷酸三酯、硫代磷酸酯、胺基磷酸酯及天然核苷之磷酸酯主鏈之其他變異體，包括本文所述之彼等。

【0188】　如本文所用，「替代性核苷酸」係指具有替代性核苷或替代性糖及核苷間鍵(可包括替代性核苷鍵)之核苷酸。

【0189】　術語「核苷」係指具有核鹼基及糖部分的寡核苷酸或多核苷酸之單體單元。核苷可包括天然存在之核苷及替代性核苷，諸如本文所述之彼等。核苷之核鹼基可為天然存在之核鹼基或替代性核鹼基。類似地，核苷之糖部分可為天然存在之糖或替代性糖。

【0190】　術語「替代性核苷」係指具有替代性糖或替代性核鹼基(諸如本文所述之彼等)之核苷。

【0191】　如本文所用，術語「核酸酶抗性核苷酸」係指限制寡核苷酸之核酸酶降解的核苷酸。核酸酶抗性核苷酸通常藉由成為核酸酶之不良受質來提高寡

核苷酸之穩定性。核酸酶抗性核苷酸為此項技術中已知的，例如 2'-O-甲基-核苷酸及 2'-氟-核苷酸。

【0192】 如本文所用，術語「寡核苷酸」及「多核苷酸」係定義為通常由熟練技術人員所理解的包括兩個或兩個以上共價連結之核苷的分子。此類共價結合之核苷亦可稱為核酸分子或低聚物。寡核苷酸通常在實驗室中藉由固相化學合成繼之以純化來製得。當提及寡核苷酸之序列時，亦係提及共價連結之核苷酸或核苷的核鹼基部分之序列或順序、或其修飾。本發明之寡核苷酸可為人工的，且在化學上合成，且通常經純化或分離。寡核苷酸亦旨在包括：(i) 具有一或多個呋喃糖部分之化合物，該呋喃糖部分經呋喃糖衍生物或任何環狀或非環狀結構置換，其可用作與鹼基部分之共價連接點，(ii) 具有一或多個磷酸二酯鍵之化合物，該磷酸二酯鍵經修飾，就像胺基磷酸酯或硫代磷酸酯鍵一樣，或經合適的連結部分完全置換，就像甲縮醛或核酸縮醛鍵一樣，及/或(iii) 具有一或多個連結的呋喃糖-磷酸二酯鍵部分之化合物。該連結的呋喃糖-磷酸二酯鍵部分經任何環狀或非環狀結構置換，其可用作與鹼基部分之共價連接點。本發明之寡核苷酸可包括一或多個替代性核苷或核苷酸(例如，包括本文所述之彼等)。亦應理解，寡核苷酸包括缺少糖部分或核鹼基但仍能與靶序列配對或雜交之組成物。

【0193】 「寡核苷酸」係指短多核苷酸(例如，具有 100 或較少之連結核苷)。

【0194】 寡核苷酸可具有任意長度，該長度允許所需靶 RNA 之腺苷經由 ADAR 介導之途徑的去胺基，並且可在約 10-50 個鹼基對長度之範圍內，例如約 15-50 個鹼基對長度或約 18-50 個鹼基對長度，例如，約 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 個鹼基對長度，諸如約 15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、

15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23 或 21-22 個鹼基對長度。以上列舉之範圍及長度之中間範圍及長度亦涵蓋為本發明之一部分。

【0195】 如本文所用，術語「gapmer」係指包括 RNase H 招募寡核苷酸(gap)之區域的寡核苷酸，該區域在 5′及 3′處側接有包括一或多個親和力提高之替代性核苷的區域(側翼或側面)。在本文中描述各種 gapmer 設計。頭聚體(Headmer)及尾聚體(tailmer)為能夠招募 RNase H 之寡核苷酸，其中丟失一個側翼，亦即，寡核苷酸僅有一個末端包括親和力提高之替代性核苷。對於頭聚體，丟失 3′側翼(亦即，5′側翼包括親和力提高之替代性核苷)，且對於尾聚體，丟失 5′側翼(亦即，3′ 側翼包括親和力提高之替代性核苷)。「混合側翼 gapmer」係指其中側翼區包括至少一個替代性核苷之 gapmer，該替代性核苷係諸如至少一個 DNA 核苷或至少一個 2′經取代之替代性核苷，例如 2′-O-烷基-RNA、2′-O-甲基-RNA、2′-烷氧基-RNA、2′-O-甲氧基乙基-RNA (2′-O-MOE)、2′-胺基-DNA、2′-氟-RNA、2′-F-ANA 核苷或雙環核苷(例如，鎖定核苷或 cEt 核苷)。在一些實施例中，該混合側翼 gapmer 具有一個包括替代性核苷(例如 5′或 3′)之側翼及另一個包括 2′經取代之替代性核苷的側翼(分別為 3′或 5′)。

【0196】 術語「連結子」或「連結基團」為介於兩個原子之間的連接，其將一個感興趣之化學基團或區段經由一或多個共價鍵連結至另一個感興趣之化學基團或區段。偶聯物部分可直接或經由連結部分(例如連結子或拴系)連接於寡核苷酸。連結子用來將第三區域(例如偶聯物部分)共價地連接至寡核苷酸(例如，區域 A 或 C 之末端)。在本發明之一些實施例中，本發明之偶聯物或寡核苷酸偶

聯物可視情況包括位於寡核苷酸與偶聯物部分之間的連結子區域。在一些實施例中，介於偶聯物與寡核苷酸之間的連結子係生物可裂解的。含有生物可裂解的連結子之磷酸二酯更詳細地描述於 WO 2014/076195(以引用之方式併入本文)中。

【0197】 如本文所用，術語「ADAR 招募結構域」係指可共價連結至本發明之寡核苷酸並形成莖-環結構的核苷酸序列，該莖-環結構充當 ADAR 酶之招募及結合區。包括此類 ADAR 招募結構域之寡核苷酸可稱為『axiomer AON』或『自成環 AON』。ADAR 招募結構域部分可用於招募存在於細胞中之內源性 ADAR 酶。此類 ADAR 招募結構域不需要偶聯之實體或經修飾之重組 ADAR 酶的存在。或者，ADAR 招募部分可用於招募重組 ADAR 融合蛋白，該重組 ADAR 融合蛋白已經由包括編碼 ADAR 融合蛋白之多核苷酸的表現載體構築體遞送至細胞或受試者。此類 ADAR 融合蛋白可包括融合至另一種蛋白質(例如 MS2 噬菌體外殼蛋白)的 ADAR1 或 ADAR2 酶之去胺酶結構域。ADAR 招募結構域可為基於天然受質之核苷酸序列(例如，GluR2 受體前 mRNA；諸如 GluR2 ADAR 招募結構域)、Z-DNA 結構、或已知招募另一種蛋白質之結構域，該另一種蛋白質為 ADAR 融合蛋白之一部分，例如，已知由 ADAR 之 dsRNA 結合區域識別之 MS2 ADAR 招募結構域。ADAR 招募結構域之莖-環結構可為由兩個單獨的核酸股形成之分子間莖-環結構或在單一核酸股內形成之分子內莖環結構。

【0198】 如本文所用，術語「Z-DNA」係指 DNA 雙螺旋或 RNA 莖環結構之左旋構象。此類 DNA 或 dsRNA 螺旋以 Z 形圖案向左(與此相對為右，就像更常見之 B-DNA 形式)纏繞。Z-DNA 為已知的高親和力 ADAR 結合受質且已顯示結合至人類 ADAR1 酶。

【0199】 如本文所用且除非另外指出，術語「互補」當用於描述與第二核苷酸或核苷序列有關之第一核苷酸或核苷序列時係指包括第一核苷酸或核苷序列

之寡核苷酸或多核苷酸在一定條件下與包括第二核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸雜交並形成雙鏈體結構的能力，如熟練技術人員所理解的。此類條件可例如為嚴格條件，其中嚴格條件可包括：400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA，50°C或 70°C，持續 12-16 小時，繼之以洗滌(參見，例如"Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, 等人 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。亦可施加其他條件，諸如有機體內可能遇到之生理相關條件。熟練技術人員將能根據雜交核苷酸或核苷之最終應用來確定最適於兩個序列之互補性測試的條件集。

【0200】 如本文所用，「互補」序列亦可包括或完全由非沃森-克裡克鹼基對及/或由非天然及替代性核苷酸形成之鹼基對形成，只要滿足上述關於它們雜交能力之要求。此類非沃森-克裡克鹼基對包括但不限於 G:U 擺動或 Hoogstein 鹼基配對。介於如本文所述之寡核苷酸與靶序列之間的互補序列包括含有第一核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸與含有第二核苷酸序列之寡核苷酸或多核苷酸在一個或兩個核苷酸序列之全長上的鹼基配對。此類序列在本文中可稱為相對於彼此「完全互補」。然而，當第一序列在本文中稱為相對於第二序列「實質上互補」時，兩個序列可完全互補，或者它們在針對高達 30 個鹼基對之雙鏈體雜交後可形成一或多個，但通常不超過 5、4、3 或 2 個錯配鹼基對，同時保留在與它們的最終應用(例如，腺苷之去胺基)最相關之條件下雜交的能力。「實質上互補」亦可指的是與感興趣之 mRNA (例如，具有靶腺苷之 mRNA)之連續部分實質上互補之多核苷酸。例如，若序列與感興趣之 mRNA 之非中斷部分實質上互補，則多核苷酸與感興趣之 mRNA 之至少一部分互補。

【0201】 如本文所用，術語「互補區域」係指寡核苷酸上與基因、初級轉錄本、序列(例如，靶序列；例如具有靶腺苷之靶序列)或經加工之 mRNA 之全部或一部分實質上互補以便干擾內源性基因之表現的區域。當互補區域與靶序列

不完全互補時，錯配可在該分子之內部或末端區域中。通常，最耐受之錯配在末端區域中，例如在寡核苷酸之 5'-及/或 3'-末端的 5、4、3 或 2 個核苷酸內。

【0202】 片語「細胞與寡核苷酸接觸」包括諸如本文所用之寡核苷酸藉由任何可能的手段與細胞接觸。細胞與寡核苷酸接觸包括使細胞與寡核苷酸在活體外接觸或使細胞與寡核苷酸在活體內接觸。接觸可直接或間接進行。因此，例如，個體可藉由進行該方法將寡核苷酸置於與細胞之物理接觸中，或替代地，可將寡核苷酸試劑置於將允許或使得其隨後與細胞接觸之情形下。

【0203】 在活體外接觸細胞可例如藉由將細胞與寡核苷酸一起培育來完成。在活體內接觸細胞可例如藉由將寡核苷酸注射至或注射靠近細胞所位於的組織中或藉由將寡核苷酸試劑注射至另一區域(例如血流或皮下空間)中以便該試劑隨後將到達有待接觸之細胞所位於的組織來完成。例如，寡核苷酸可含有及/或偶合至配位體，例如 GalNAc3，該配位體將寡核苷酸引導至感興趣之部位，例如肝臟。活體外與活體內接觸方法之組合亦為可能的。例如，細胞亦可在活體外與寡核苷酸接觸且隨後移植至受試者中。

【0204】 在一實施例中，使細胞與寡核苷酸接觸包括藉由促進或實現該細胞中之攝取或吸收將寡核苷酸「引入」或「遞送」至該細胞中。寡核苷酸之吸收或攝取可經由獨立的擴散或主動細胞過程，或藉助於輔助試劑或裝置進行。寡核苷酸向細胞中之引入可在活體外及/或活體內。例如，對於活體內引入，可將寡核苷酸注射至組織部位中或全身投與。向細胞中之活體外引入包括此項技術中已知之方法，諸如電穿孔及脂質轉染。其他手段在下文中描述及/或為此項技術中已知的。

【0205】 如本文所用，「脂質奈米顆粒」或「LNP」為包括脂質層之囊泡，該脂質層封裝醫藥活性分子，諸如核酸分子，例如寡核苷酸。LNP 係指穩定的核酸-脂質顆粒。LNP 通常含有陽離子脂質、可電離脂質、非陽離子脂質及防止

顆粒聚集之脂質(例如，PEG-脂質偶聯物)。LNP 描述於例如美國專利第 6,858,225 號；第 6,815,432 號；第 8,158,601 號；及第 8,058,069 號中，其整個內容據此以引用之方式併入本文中。

【0206】 如本文所用，術語「脂質體」係指由在至少一個雙層(例如，一個雙層或多個雙層)中排列的雙性脂質構成之囊泡。脂質體包括具有由親油性材料形成之膜及水性內部的單層及多層囊泡。水性部分含有寡核苷酸組成物。親油性材料將水性內部與水性外部分隔開，該水性外部通常不包括寡核苷酸組成物，但在一些實施例中，可能包括。脂質體亦包括「空間上穩定之」脂質體，該術語如本文所用係指包括一或多種專化脂質之脂質體，該一或多種專化脂質當併入脂質體中時造成循環壽命相對於缺少此類專化脂質之脂質體有所延長。

【0207】 「膠束」在本文中定義為特定類型之分子組裝，其中雙性分子以球狀結構排列以使得分子之疏水性部分都向內導向，留下親水性部分與周圍水相接觸。若環境為疏水性的，則存在相反的排列。

【0208】 「互補」多核苷酸為能夠根據標準沃森-克裡克互補規則進行鹼基配對之彼等多核苷酸。具體而言，嘌呤將與嘧啶鹼基配對以形成以下組合：在 DNA 之情況下，鳥嘌呤與胞嘧啶配對(G:C)及腺嘌呤與胸腺嘧啶配對(A:T)，或在 RNA 之情況下，腺嘌呤與尿嘧啶配對(A:U)。應理解，兩個多核苷酸可彼此雜交，即使它們沒有彼此完全互補，其限制條件為各自具有至少一個實質上與另一者互補之區域。

【0209】 如本文所用，術語(例如在細胞或受試者中)產生本文所述之治療效果的藥劑之「有效量」、「治療有效量」及「足量」係指當向包括人類之受試者投與時足以實現有益或所需結果(包括臨床結果)之量且因而，「有效量」或其同義詞視其所應用之情形而定。例如，在治療病症之情形下，其為與在未投與時獲得的反應相比足以達成治療反應的藥劑之量。給定藥劑之量將視以下各種因

素而變化：諸如給定藥劑、醫藥調配物、投與途徑、疾病或病症類型、所治療之受試者或宿主之身份(例如年齡、性別及/或體重)及其類似因素，但仍可由熟習此項技術者常規地確定。再者，如本文所用，藥劑之「治療有效量」為與對照相比在受試者中產生有益或所需結果之量。如本文中所定義，藥劑之治療有效量可易於由普通熟習此項技術者藉由此項技術中已知之常規方法來確定。可對給藥方案進行調整以提供最佳治療反應。

【0210】 如本文所用，「預防有效量」旨在包括當向患有病症或易患病症之受試者投與時足以預防或緩解疾病或疾病之一或多種症狀的寡核苷酸之量。緩解疾病包括使疾病過程放緩或降低之後發展的疾病之嚴重程度。「預防有效量」可視以下因素而變化：寡核苷酸、如何投與藥劑、疾病之風險程度、以及病史、年齡、體重、家族史、基因組成、先前或伴隨治療(若有的話)之類型、及有待治療之患者之其他個體特徵。

【0211】 「治療有效量」或「預防有效量」亦包括在適用於任何治療之合理的利益/風險比下產生一些所需局部或全身作用的寡核苷酸之量(以單劑量或多劑量投與)。用於本發明方法中之寡核苷酸可以足以產生適用於此類治療之合理的利益/風險比之量投與。

【0212】 預防有效量亦可指的是例如當向包括人類之受試者投與時足以將本文所述之一或多種病症之發作與預測發作相比推遲至少 120 天(例如至少 6 個月、至少 12 個月、至少 2 年、至少 3 年、至少 4 年、至少 5 年、至少 10 年或更久)之量。

【0213】 「測定蛋白質之水準」意指藉由此項技術中已知之方法對蛋白質或編碼該蛋白質之 mRNA 的直接或間接偵測。「直接測定」意指進行製程(例如，對樣品進行檢定或測試或「分析樣品」，如本文中對該術語所定義)以獲得物理實體或值。「間接測定」係指自另一方或來源(例如，直接獲取物理實體或值之

第三方實驗室)接收物理實體或值。量測蛋白質水準之方法通常包括但不限於西方墨點、免疫墨點、酶聯免疫吸附檢定(ELISA)、放射免疫測定(RIA)、免疫沉澱、免疫螢光、表面電漿子共振、化學發光、螢光極化、磷光、免疫組織化學分析、基質輔助雷射脫附/遊離飛行時間(MALDI-TOF)質譜法、液相層析(LC)-質譜法、微型細胞計數法、顯微術、螢光激活細胞分選(FACS)、及流式細胞術、以及基於蛋白質之特性的檢定，該特性包括但不限於酶活性或與其他蛋白質配偶體之相互作用。量測 mRNA 水準之方法為此項技術中已知的。

【0214】　相對於參考多核苷酸或多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」係定義為在比對序列及引入缺口(必要時)以獲得最大序列一致性百分比後的候選序列之核酸或胺基酸與參考多核苷酸或多肽序列之核酸或胺基酸相同的百分比。為了測定核酸或胺基酸序列一致性百分比而進行之比對可例如使用公開可得之電腦軟體諸如 BLAST、BLAST-2 或 Megalign 軟體以在熟習此項技術者之能力範圍內的多種方式達成。熟習此項技術者可確定用於比對序列之適當參數，包括在所比較之序列全長上實現最大比對所需的任何算法。例如，可使用序列比較電腦程式 BLAST 生成序列一致性百分比值。作為說明，給定核酸或胺基酸序列 A 與或針對給定核酸或胺基酸序列 B (其可替代地表達為給定核酸或胺基酸序列 A，其與或針對給定核酸或胺基酸序列 B 具有某一序列一致性百分比)之序列一致性百分比計算如下：

(分數 X/Y)×100

其中 X 為在比對 A 與 B 之程式中藉由序列比對程式(例如 BLAST)評為相同匹配的核苷酸或胺基酸之數目，且其中 Y 為 B 中的核酸之總數。應當理解，當核酸或胺基酸序列 A 之長度不等於核酸或胺基酸序列 B 之長度時，A 與 B 之序列一致性百分比將不等於 B 與 A 之序列一致性百分比。

【0215】 「水準」意指與參考相比蛋白質或編碼該蛋白質之 mRNA 之水準或活性。參考可為如本文所定義之任何有用的參考。蛋白質之「降低水準」或「提高水準」意指與參考相比蛋白質水準之降低或提高(例如，與參考相比，降低或提高了約 5%、約 10%、約 15%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 100%、約 150%、約 200%、約 300%、約 400%、約 500%或更多；降低或提高大於約 10%、約 15%、約 20%、約 50%、約 75%、約 100%或約 200%；降低或提高了小於約 0.01 倍、約 0.02 倍、約 0.1 倍、約 0.3 倍、約 0.5 倍、約 0.8 倍或更小；或提高了大於約 1.2 倍、約 1.4 倍、約 1.5 倍、約 1.8 倍、約 2.0 倍、約 3.0 倍、約 3.5 倍、約 4.5 倍、約 5.0 倍、約 10 倍、約 15 倍、約 20 倍、約 30 倍、約 40 倍、約 50 倍、約 100 倍、約 1000 倍或更多)。蛋白質之水準可以質量/體積(例如，g/dL、mg/mL、μg/mL、ng/mL)或相對於樣品中之總蛋白質或 mRNA 的百分比表示。

【0216】 如本文所用，術語「醫藥組成物」表示含有與醫藥學上可接受之賦形劑調配的本文所述之化合物之組成物，並且較佳地在政府管理機構之批准下製造或銷售作為用於治療哺乳動物之疾病的治療方案之一部分。醫藥組成物可經調配以例如用於以單位劑型(例如錠劑、膠囊、囊片、囊形片或糖漿)經口投與；用於局部投與(例如，作為乳劑、凝膠、洗劑或軟膏)；用於靜脈內投與(例如，作為不含微粒栓子之無菌溶液及在適於靜脈內使用之溶劑系統中)；用於鞘內注射；用於腦室內注射；用於器官實質內注射；或在任何其他醫藥學上可接受之調配物中。

【0217】 如本文所用，「醫藥學上可接受之賦形劑」係指除本文所述之化合物以外的任何成分(例如，能夠懸浮或溶解活性化合物之媒介物)並且在患者中具有實質上無毒及非炎性之特性。賦形劑可包括例如：抗黏附劑、抗氧化劑、黏

合劑、塗料、壓縮助劑、崩解劑、染料(色素)、軟化劑、乳化劑、填充劑(稀釋劑)、成膜劑或塗料、調味劑、香料、助滑劑(流動增強劑)、潤滑劑、防腐劑、印刷油墨、吸附劑、懸浮劑或分散劑、甜味劑及水合水。示範性賦形劑包括但不限於：丁基化羥基甲苯(BHT)、碳酸鈣、磷酸鈣(二元)、硬脂酸鈣、交聯羧甲基纖維素、交聯聚乙烯吡咯啶酮、檸檬酸、交聯聚維酮、半胱胺酸、乙基纖維素、明膠、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、乳糖、硬脂酸鎂、麥芽糖醇、甘露醇、蛋胺酸、甲基纖維素、對羥基苯甲酸甲酯、微晶纖維素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯啶酮、聚維酮、預膠凝澱粉、對羥苯甲酸丙酯、軟脂酸視網酯、蟲膠、二氧化矽、羧甲基纖維素鈉、檸檬酸鈉、澱粉羥基乙酸鈉、山梨醇、澱粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化鈦、維生素 A、維生素 E、維生素 C 及木糖醇。

【0218】　如本文所用，術語「醫藥學上可接受之鹽」意指本文所述之化合物中之任一種化合物之任何醫藥學上可接受之鹽。例如，本文所述之化合物中任一種之醫藥學上可接受之鹽包括以下鹽：在合理醫學判斷範疇內，適於與人類及動物組織接觸而沒有不當毒性、刺激、過敏反應，並且與合理的利益/風險比相稱。醫藥學上可接受之鹽為此項技術中熟知的。例如，醫藥學上可接受之鹽描述於 Berge 等人, J. Pharmaceutical Sciences 66:1-19, 1977 以及 Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (P.H. Stahl 及 C.G. Wermuth 編), Wiley-VCH, 2008 中。鹽可在本文所述之化合物之最終分離及純化期間就地製備或藉由將遊離鹼基團與適合的有機酸反應而單獨製備。

【0219】　本文所述之化合物可具有可電離基團以便能夠製備成醫藥學上可接受之鹽。此等鹽可為涉及無機酸或有機酸之酸加成鹽，或該等鹽在酸性形式的本文所述之化合物之情況下可由無機鹼或有機鹼製備。常常，將化合物製備成或用作醫藥學上可接受之鹽，該醫藥學上可接受之鹽係製備成醫藥學上可接受

之酸或鹼的加成產物。合適的醫藥學上可接受之酸及鹼以及用於製備適當鹽之方法為此項技術中所熟知。鹽可由醫藥學上可接受之無毒酸及鹼製備，包括無機及有機酸及鹼。代表性酸加成鹽包括乙酸鹽、己二酸鹽、藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天冬胺酸鹽、苯磺酸鹽、苯甲酸鹽、硫酸氫鹽、硼酸鹽、丁酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙磺酸鹽、延胡索酸鹽、葡萄糖酸鹽、甘油磷酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、氫溴酸鹽、鹽酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥基-乙磺酸鹽、乳糖醛酸鹽、乳酸鹽、月桂酸鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、馬來酸鹽、丙二酸鹽、甲磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸酸鹽、硝酸鹽、油酸鹽、草酸鹽、軟脂酸鹽、雙羥萘酸鹽、果膠酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、特戊酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、琥珀酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、硫氰酸鹽、甲苯磺酸鹽、十一烷酸鹽及戊酸鹽。代表性鹼或鹼土金屬鹽包括鈉、鋰、鉀、鈣及鎂，以及無毒銨、四級銨及胺陽離子，包括但不限於銨、四甲銨、四乙銨、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺及乙胺。

【0220】　「參考」意指用於比較蛋白質或 mRNA 水準或活性的任何有用之參考。參考可為用於比較目的之任何樣品、標準、標準曲線或水準。參考可為正常參考樣品或參考標準或水準。「參考樣品」可為例如對照，例如預定陰性對照值，諸如取自同一受試者之「正常對照」或先前樣品；來自正常健康受試者諸如正常細胞或正常組織之樣品；來自不患病之受試者之樣品(例如細胞或組織)；來自經診斷患有疾病但未經本文所述之化合物治療的受試者之樣品；來自已由本文所述之化合物治療之受試者之樣品；或在已知標準濃度下的經純化之蛋白質(例如，本文所述之任一者)之樣品。「參考標準或水準」意指衍生自參考樣品之值或數字。「正常對照值」為指示非疾病狀態之預定值，例如，預期出現在健康對照受試者中之值。通常，正常對照值表示為範圍(「介於 X 與 Y 之

間」)、高閾值(「不高於 X」)或低閾值(「不低於 X」)。具有在針對具體生物標記之正常對照值內的量測值之受試者通常係稱為「在針對彼生物標記之正常限值內」。正常參考標準或水準可為衍生自以下受試者之值或數字：不患有疾病或病症之正常受試者；已經本文所述之化合物治療之受試者。在較佳實施例中，參考樣品、標準或水準與樣品受試者樣品在至少一種下列標準上相匹配：年齡、體重、性別、疾病階段及總體健康情況。經純化之蛋白質(例如本文所述之任一者)在正常參考範圍內之水準之標準曲線亦可用作參考。

【0221】 如本文所用，術語「受試者」係指例如出於實驗、診斷、預防及/或治療目的而可投與根據本發明之組成物的任何有機體。典型的受試者包括任何動物(例如哺乳動物，諸如小鼠、大鼠、兔、非人類靈長類動物及人類)。受試者可尋求或需要治療、要求治療、正接受治療、以後將接受治療或因特定疾病或病狀而在訓練有素之專業人員的護理下之人類或動物。

【0222】 如本文所用，術語「治療(treat)」、「治療(treated)」或「治療(treating)」意指治療性治療及預防性或預防措施，其中目標在於預防或減緩(緩解)不希望有的生理病狀、病症或疾病，或在於獲得有益或所需臨床結果。有益或所需臨床結果包括但不限於症狀之減輕；病狀、病症或疾病之程度的減弱；病狀、病症或疾病之狀態穩定(亦即不惡化)；病狀、病症或疾病之發作的推遲或進展減緩；病狀、病症或疾病狀態之改善或緩解(不管是部分抑或全部)，不管是可偵測抑或不可偵測；至少一個可量測之身體參數之改善(不一定可由患者辨別)；或者病狀、病症或疾病之改善或好轉。治療包括引發臨床上顯著之反應而不產生過度之副作用。治療亦包括與未接受治療所預期之存活期相比，延長存活期。

【0223】 如本文所用，術語「變異體」與「衍生物」可互換地使用且係指本文所述之化合物、肽、蛋白質或其他物質之天然存在之、合成及半合成類似物。

本文所述之化合物、肽、蛋白質或其他物質之變異體或衍生物可保留或改良原始材料之生物活性。

【0224】 本發明之一或多個實施例的細節在以下說明中闡述。本發明之其他特徵、目標及優勢將由說明及申請專利範圍中顯而易見。

【實施方式】

【0225】 本發明者已發現經修飾之寡核苷酸可用於使 mRNA 中之靶腺苷去胺基。因此，本發明描述了在有此需要之受試者中對 mRNA 上之靶腺苷(例如，可經去胺基以產生治療結果之腺苷)去胺基之有用的組成物及方法。

I. 病症

【0226】 本發明亦提供本發明之寡核苷酸，其係用於在哺乳動物(較佳如本文所述之人類細胞)之靶 RNA 序列中製造變化的方法中。類似地，本發明提供本發明之寡核苷酸構築體在製造供在哺乳動物(較佳如本文所述之人類細胞)之靶 RNA 序列中製造變化用之藥劑中的用途。

【0227】 本發明亦係關於一種使存在於細胞之靶 RNA 序列中之至少一個特定靶腺苷去胺基的方法，該方法包括以下步驟：向該細胞提供本文所述之寡核苷酸；允許該細胞攝取該寡核苷酸；允許該寡核苷酸退火成該靶 RNA 序列；允許包括見於野生型酶中之天然 dsRNA 結合結構域的哺乳動物 ADAR 酶將靶 RNA 序列中之該靶腺苷去胺基成肌苷；以及視情況鑑別該肌苷在該 RNA 序列中之存在。

【0228】 因此，本發明亦係關於寡核苷酸及方法，其中彼此相鄰之兩個腺苷係經 RNA 編輯酶諸如 ADAR 共同去胺基。在此具體情況下，UAA 終止密碼子轉化為編碼 UII Trp 之密碼子。由靶密碼子內的靶腺苷之去胺作用產生的修飾之其他實例在以下表 1 及 2 中提供。

表 1

靶密碼子	由靶密碼子編碼之胺基酸	經修飾之密碼子	由經修飾之密碼子編碼之胺基酸
AAA	Lys	IAA	Glu
		AIA	Arg
		IIA	Gly
		AII	Arg
		IAI	Glu
		III	Gly
AAC	Asn	IAC	Asp
		AIC	Ser
		IIC	Gly
AAG	Lys	IAG	Glu
		AIG	Arg
		IIG	Gly
AAU	Arg	IAU	Asp
		AIU	Ser
		IIU	Gly
ACA	Thr	ICA	Ala
		ICI	Ala
ACC	Thr	ICC	Ala
ACG	Thr	ICG	Ala
ACU	Thr	ICU	Ala
AGA	Arg	IGA	Gly
		IGI	Gly
AGC	Ser	IGC	Gly
AGG	Arg	IGG	Gly
AGU	Ser	IGU	Gly
AUA	Ile	IUA	Asp
		AUI	Met
		IUI	Val
AUC	Ile	IUC	Val
AUG	Met	IUG	Val
AUU	Ile	IUU	Val
CAA	Gln	CIA	Arg
		CII	Arg
CAC	His	CIC	Arg
CAG	Gln	CIG	Arg
CAU	His	CIU	Arg
GAA	Glu	GIA	Gly
		GII	Gly
GAC	Asp	GIC	Gly
GAG	Glu	GIG	Gly
GAU	Asp	GIU	Gly
UAA	Stop	UII	Trp
UGA	Stop	UGI	Trp
UAC	Tyr	UIC	Cys
UAG	Stop	UIG	Trp
UAU	Tyr	UIU	Cys

表 2. 三聯體鹼基組成及所得的經編輯之三聯體

靶密碼子	經修飾之密碼子
AAA	AIA
AAC	AIC
AAG	AIG
AAU	AIU
CAA	CIA
CAC	CIC
CAG	CIG
CAU	CIU
GAA	GIA
GAC	GIC
GAG	GIG
GAU	GIU
UAA	UIA
UAC	UIC
UAG	UIG
UAU	UIU

【0229】 因為腺苷去胺基成肌苷可產生在靶位置處不再具有突變 A 之蛋白質，所以對去胺成為肌苷之鑑別可為功能讀出，例如，評估功能蛋白是否存在或甚至評估由存在腺苷所引起之疾病為(部分)逆轉的。對於本文提及之每種疾病之功能評估通常將根據熟練技術人員已知之方法。當靶腺苷之存在造成異常剪接時，該讀出可為評估異常剪接是否仍在進行、或未進行、或減少。另一方面，當靶腺苷之去胺作用想要引入剪接位點時，則類似方法可用於檢查所需類型之剪接是否實際上正在進行。鑑別靶腺苷之去胺後肌苷之存在的極合適之方法當然為 RT-PCR 及定序，使用熟習此項技術者所熟知之方法進行。

【0230】 一般而言，使用根據本發明之寡核苷酸構築體可逆轉的任何靶 RNA 中之突變為 G 至 A 突變，且可相應地設計寡核苷酸構築體。可使用根據本發明之寡核苷酸構築體靶向之突變亦包括 C 至 A、在招募腺苷去胺酶之情況下 U 至 A (T 至 A，在 DNA 層面上)。雖然在後一情形下之 RNA 編輯不一定會將突變恢復為野生型，但經編輯之核苷酸可比原始突變更加改良。例如，引起框內終止密碼子之突變-在轉譯後產生截短蛋白質-可變成編碼胺基酸之密碼子，所述胺基

酸並非在彼位置處之原始胺基酸，而是產生具有至少一些官能性(至少比截短蛋白質更多之官能性)之(全長)蛋白質。

【0231】 本發明尤其適用於治療遺傳性疾病，諸如囊腫纖維化、白化症、α-1-抗胰蛋白酶(A1AT)缺乏症、阿滋海默氏症、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症、氣喘、11-地中海貧血、卡達西症候群、夏馬杜三氏病、慢性阻塞性肺病(COPD)、遠端脊肌萎縮症(DSMA)、杜興氏/貝克爾肌肉營養不良、失養性水皰性表皮鬆解症、水皰性表皮鬆解症、法布裡病、第五凝血因子相關病症、家族性腺瘤、息肉病、半乳糖血症、高歇氏病、葡萄糖-6-磷酸去氫酶缺乏症、血友病、遺傳性血色病、亨特氏症候群、杭丁頓氏舞蹈症、賀勒氏症候群、炎症性腸病(IBD)、遺傳多凝集反應症候群、萊伯氏先天性黑蒙症、勒-奈二氏症候群、林奇症候群、馬凡症候群、黏多糖病、肌肉營養不良、I 型及 II 型肌強直性營養不良、神經纖維瘤病、A 型、B 型及 C 型尼-皮二氏病、NY-ESO-1 相關癌症、帕金森氏病、Peutz-Jeghers 二氏症候群、苯酮尿症、龐貝氏病、原發性纖毛病、凝血酶原突變相關病症(例如，凝血酶原 G20210A 突變)、肺高血壓、色素性視網膜炎、山多夫氏病、嚴重複合型免疫缺乏症候群(SCID)、鐮狀細胞性貧血、脊髓性肌萎縮、斯特格氏病、泰-薩二氏病、烏謝爾症候群、X 連鎖免疫缺陷、斯特格-韋伯症候群、雷特氏症候群及各種形式之癌症(例如，BRCA1 及 2 連鎖之乳癌及卵巢癌)。

【0232】 本發明之寡核苷酸可對腺苷突變去胺基，造成蛋白質活性提高。

【0233】 在某些實施例中，對已經診斷在基因中具有突變但尚未具有疾病症狀之受試者(例如嬰兒，諸如 1 月齡至 12 之受試者或 2 歲以下之受試者)進行治療。在其他實施例中，對具有至少一種症狀之個體進行治療。

【0234】 治療可在自嬰兒期開始至成人期的任何年齡之受試者中進行。受試者可在例如出生時、6 個月、或 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15 或 18 歲時開始治療。

【0235】 在某些實施例中，寡核苷酸在活體外及/或活體內使蛋白質活性有所提高(例如，提高了 100%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多，或提高了大於 1.2 倍、1.4 倍、1.5 倍、1.8 倍、2.0 倍、3.0 倍、3.5 倍、4.5 倍、5.0 倍、10 倍、15 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、100 倍、1000 倍或更多)。

【0236】 在一些實施例中，寡核苷酸在腦中使蛋白質活性有所提高(例如，提高了 100%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多，或提高了大於 1.2 倍、1.4 倍、1.5 倍、1.8 倍、2.0 倍、3.0 倍、3.5 倍、4.5 倍、5.0 倍、10 倍、15 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、100 倍、1000 倍或更多)。

II. 寡核苷酸試劑

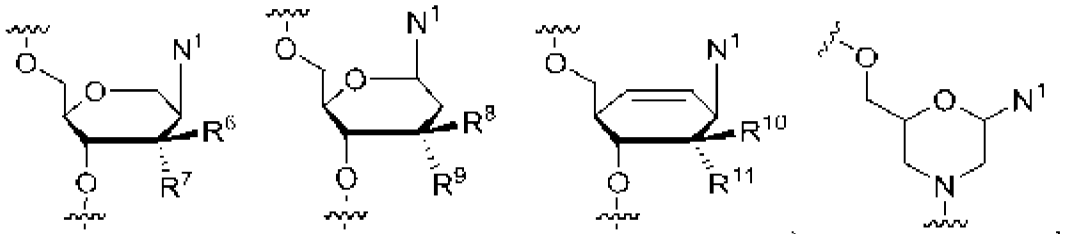
【0237】 本發明之寡核苷酸與靶 mRNA 互補，例外之處在於至少一個錯配能夠招募 ADAR 酶以便使靶 mRNA 上的所選腺苷去胺基。在一些實施例中，僅一個腺苷經去胺基。在一些實施例中，1、2 或 3 個腺苷經去胺基。寡核苷酸包括與靶腺苷相反之錯配，例如在 X^2 處。本發明之寡核苷酸可進一步包括修飾(例如替代性核苷酸)以提高穩定性及/或提高去胺效率。

A. 替代性寡核苷酸

【0238】 在一實施例中，本發明之寡核苷酸之一或多個核苷酸係天然產生的，且不包括例如在此項技術中已知及本文所述之化學修飾及/或偶聯。在另一實施例中，本發明之寡核苷酸之一或多個核苷酸在化學上經修飾以增強穩定性或其他有益的特徵(例如，替代性核苷酸)。在不受理論約束之情況下，咸信某些修飾能夠提高核酸酶抗性及/或血清穩定性或降低免疫原性。例如，本發明之多核苷酸可含有天然地存在於 DNA 或 RNA 中之核苷酸(例如，腺嘌呤、胸苷、鳥苷、胞苷、尿苷或肌苷)或可含有在核苷酸之一或多種組分(例如，核鹼基、糖或

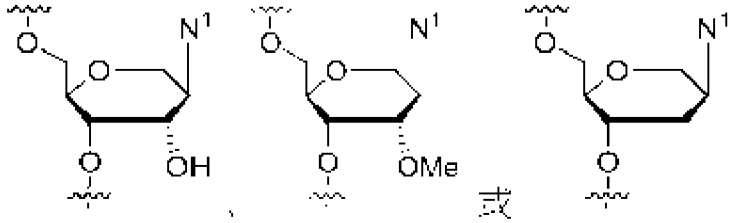
磷酸連結子部分)上具有一或多種化學修飾之核苷酸。本發明之寡核苷酸可經由天然存在之磷酸二酯鍵彼此連結，或可經修飾以經由以下各鍵共價連結：硫代磷酸酯、3’-亞甲基膦酸酯、5’-亞甲基膦酸酯、3’-亞磷醯胺、2’-5’磷酸二酯、胍、S-甲基硫脲或肽鍵。

【0239】　在一些實施例中，本發明之寡核苷酸之一或多個核苷酸具有式 I-IV 中任一者之結構：



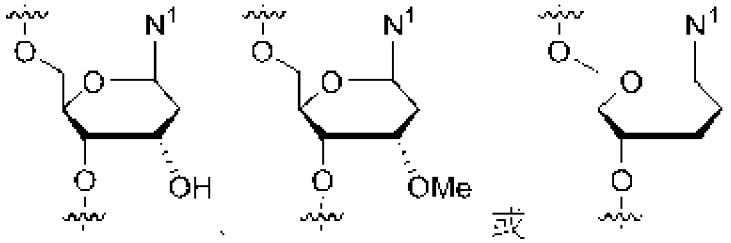
式I　式II　式III　式IV

【0240】　在一些實施例中，本發明之寡核苷酸之一或多個核苷酸具有式 I 中任一者之結構，例如具有以下結構：



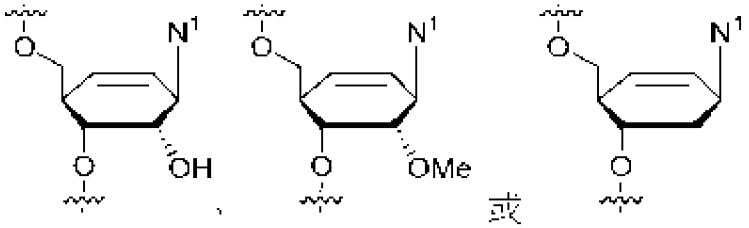
或。

【0241】　在一些實施例中，本發明之寡核苷酸之一或多個核苷酸具有式 II 中任一者之結構，例如具有以下結構：



或。

【0242】　在一些實施例中，本發明之寡核苷酸之一或多個核苷酸具有式 III 中任一者之結構，例如具有以下結構：



或

。

【0243】　在一些實施例中，本發明之寡核苷酸之一或多個核苷酸具有式 IV 中任一者之結構。

【0244】　在本發明之某些實施例中，本發明之寡核苷酸之實質上所有核苷酸為替代性核苷酸。在本發明之其他實施例中，本發明之寡核苷酸之所有核苷酸皆為替代性核苷酸。其中「實質上所有核苷酸為替代性核苷酸」的本發明之寡核苷酸很大程度上而非全部經修飾並且可包括不超過 5、4、3、2 或 1 個天然存在之核苷酸。在本發明之又一些實施例中，本發明之寡核苷酸可包括不超過 5、4、3、2 或 1 個替代性核苷酸。

【0245】　在一些實施例中，本發明之寡核苷酸包括以下結構：

$$[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

其中 A 與 B 各自為核苷酸；其中 m 與 n 各自獨立地為 5 至 40 之整數；X^1、X^2 及 X^3 中之至少一者具有式 II 之結構，其中 R^8 與 R^9 各自為氫，且不具有式 II 之結構的 X^1、X^2 及 X^3 各自為核糖核苷酸；$[A_m]$與$[B_n]$各自包括至少五個末端 2’-O-甲基-核苷酸並且至少四個末端硫代磷酸酯鍵，並且至少 20% $[A_m]$與$[B_n]$組合之核苷酸為 2’-O-甲基-核苷酸。在一些實施例中，其中 X^1 包括腺嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核鹼基；X^1 包括腺嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基；X^1 包括腺嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基；X^1 包括腺嘌呤核鹼基，

X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核鹼基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基；X^1 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基；X^1 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核鹼基；X^1 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基；X^1 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基；X^1 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基；X^1 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括腺嘌呤核鹼基；X^1 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括鳥嘌呤或次黃嘌呤核鹼基；X^1 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基；或 X^1 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基，X^2 包括胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、

尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基或不包括核鹼基，且 X^3 包括胞嘧啶或 5-甲基胞嘧啶核鹼基。

【0246】 本發明之示範性寡核苷酸示於下表 3 中。在表 3 中，A、C、G 及 U 為核糖核苷；mA、mC、mG 及 mU 為 2'-O-甲基核糖核苷；hC 表示 β-D-同型 DNA-胞苷；並且星號指示硫代磷酸酯鍵(其餘鍵為磷酸二酯鍵)。

表 3. 本發明之示範性寡核苷酸

5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 51
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**hCCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3''	SEQ ID NO. 52
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**ChCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3''	SEQ ID NO. 53
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**CCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3'	SEQ ID NO. 54
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**hCCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3''	SEQ ID NO. 55
5'-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGA AUmAmCUGCmCmG**ChCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3''	SEQ ID NO. 56

【0247】 在一些實施例中，本發明之寡核苷酸包括莖-環結構，該莖-環結構係用作 ADAR 酶之招募結構域(例如，ADAR 招募結構域)。此類寡核苷酸可稱為『axiomer AON』或『自成環 AON』。該招募部分用於將細胞中存在之天然 ADAR 酶招募至藉由靶序列與靶標部分雜交而形成之 dsRNA 中。該招募部分可為莖-環結構，其模擬天然受質(例如，麩胺酸離子移變受體 AMPA 型次單元 2(GluR2)受體；諸如 GluR2 ADAR 招募結構域)或已知由 ADAR 酶之 dsRNA 結合區識別之 Z-DNA 結構(例如，Z-DNA ADAR 招募結構域)。由於 GluR2 與 Z-DNA ADAR 招募結構域為 ADAR 之高親和力結合配偶體，所以不需要經偶聯之實體或存在經修飾之重組 ADAR 酶。莖-環結構可為由兩個單獨的核酸股形成之分子間莖-環結構或在單一核酸股內形成之分子內莖環結構。招募部分之莖-環結構可為以下文獻中描述之莖環結構：WO 2016/097212；US 2018/0208924；Merkle 等人

Nature Biotechnology, 37: 133-8 (2019)；Katrekar 等人 Nature Methods, 16(3): 239-42 (2019)；Fukuda 等人 Scientific Reports, 7: 41478 (2017)，其 ADAR 招募部分之莖-環結構以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，寡核苷酸包括一或多個 ADAR 招募結構域(例如，1 或 2 個 ADAR 招募結構域)。

【0248】 在一些實施例中，本發明之寡核苷酸包括具有式 V、VI、VIII 或 IX 中任一者之結構的彼等寡核苷酸。在一實施例中，本發明之寡核苷酸包括其中具有式 XXIII 之結構的 ADAR 招募結構域之彼等寡核苷酸：

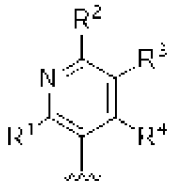
$C\text{-}L_1\text{-}D$，

式 XXIII，

其中 C 為長度約 10-50 個連結核苷(例如，長度約 10、15、20、25、30、35、40、45、46、47、48、49 或 50 個連結核苷)之單股寡核苷酸，L_1 為環區，並且 D 為長度約 10-50 個連結核苷(例如，長度約 10、15、20、25、30、35、40、45、46、47、48、49 或 50 個連結核苷)之單股寡核苷酸。

【0249】 在一些實施例中，C 包括與 D 互補之區域以使得兩條股在合適條件下雜交並形成雙鏈體。通常，雙鏈體結構之長度介於 5 與 50 個連結核苷之間，例如長度介於以下之間：5-49、5-45、5-40、5-35、5-30、5-25、5-20、5-15、5-10、5-6、8-50、8-45、8-40、8-35、8-30、8-25、8-20、8-15、8-10、15-50、15-45、15-40、15-35、15-30、15-25、15-20、15-16、20-50、20-45、20-40、20-35、20-30、20-25、25-50、25-45、25-40、25-35 或 25-30 個連結核苷。以上列舉之範圍及長度之中間範圍及長度亦涵蓋為本發明之一部分。在一些實施例中，C 與 D 之至少 5 個連續核鹼基(例如，5、10、15、20、25、30 或更多個連續核鹼基)互補，且寡核苷酸形成長度介於 10-50 個連結核苷之間(例如，長度為至少 10、15、20、25、30、35、40、45、46、47、48、49 或 50 個連結核苷)的雙鏈體結構。

【0250】 在一些實施例中，雙鏈體結構包括介於 C 之核苷酸與 D 之核苷酸之間的至少一個錯配(例如，至少 1、2、3、4 或 5 個錯配)。在一些實施例中，該錯配為成對的 A 至 C 錯配。在一些實施例中，A 至 C 錯配之 A 核苷在 C 股上且 A 至 C 錯配之 C 核苷在 D 股上。在一些實施例中，A 至 C 錯配之 A 核苷在 D 股上且 A 至 C 錯配之 C 核苷在 C 股上。在其他實施例中，該錯配為成對的 G 至 G 錯配。在仍另一些實施例中，該錯配為成對的 C 至 A 錯配。在一些實施例中，C 至 A 錯配之 C 核苷在 C 股上且 C 至 A 錯配之 A 核苷在 D 股上。在一些實施例中，C 至 A 錯配之 C 核苷在 D 股上且 C 至 A 錯配之 A 核苷在 C 股上。在一些實施例中，該錯配為成對的 I 至 I 錯配。在一些實施例中，該錯配為成對的 I 至 G 錯配。在一些實施例中，I 至 G 錯配之 I 核苷在 C 股上且 I 至 G 錯配之 G 核苷在 D 股上。在一些實施例中，I 至 G 錯配之 I 核苷在 D 股上且 I 至 G 錯配之 G 核苷在 C 股上。在一些實施例中，該錯配為成對的 G 至 I 錯配。在一些實施例中，G 至 I 錯配之 G 核苷在 C 股上且 G 至 I 錯配之 I 核苷在 D 股上。在一些實施例中，G 至 I 錯配之 G 核苷在 D 股上且 G 至 I 錯配之 I 核苷在 C 股上。在一些實施例中，該錯配包括具有替代性核鹼基之核苷。在一些實施例中，該替代性核鹼基具有以下結構：



其中 R^1 為氫、三氟甲基、視情況經取代之胺基、羥基或視情況經取代之 C_1-C_6 烷氧基；

R^2 為氫、視情況經取代之胺基或視情況經取代之 C_1-C_6 烷基；並且

R^3及 R^4獨立地為氫、鹵素或視情況經取代之 C_1-C_6烷基，或其鹽在一些實施例中，R^1為氫鍵供給基團(例如羥基、胺基)。在一些實施例中，R^1為氫鍵接受基團(例如烷氧基)。

【0251】 在一些實施例中，雙鏈體結構包括兩個錯配。在一些實施例中，錯配之間相隔至少三個連結核苷。例如，當錯配「由 3 個核苷酸分隔」時，寡核苷酸包括結構 M_1-N_1-N_2-N_3-M_2，其中 M_1為第一錯配，N_1、N_2及 N_3為成對的核鹼基，且 M_2為第二錯配。在一些實施方案中，M_1為成對的 A 至 C 錯配且 M_2為成對的 G 至 G 錯配。

【0252】 在一些實施例中，環區 L_1包括連結核苷。在一些實施例中，L_1包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0253】 在其他實施例中，環區具有式 VII 之結構：

$$F^1\text{-}(G^1)_j\text{-}(H^1)_k\text{-}(G^2)_m\text{-}(I)\text{-}(G^3)_n\text{-}(H^2)_p\text{-}(G^4)_q\text{–}F^2$$

式 VII，

其中 F^1為介於環區與 C 之間的鍵；F^2為介於 D 與核苷酸之間或介於 D 與視情況選用之連結子之間的鍵；G^1、G^2、G^3及 G^4各自獨立地選自視情況經取代之 C1-C2 烷基、視情況經取代之 C1-C3 雜烷基、O、S 及 NR^N；R^N為氫、視情況經取代之 $C_{1–4}$烷基、視情況經取代之 $C_{2–4}$烯基、視情況經取代之 $C_{2–4}$炔基、視情況經取代之 $C_{2–6}$雜環基、視情況經取代之 $C_{6–12}$芳基或視情況經取代之 $C_{1–7}$雜烷基；C^1及 C^2各自獨立地選自羰基、硫羰基、磺醯基或磷醯基；j、k、m、n、p 及 q 各自獨立地為 0 或 1；並且 I 為視情況經取代之 $C_{1–10}$烷基、視情況經取代之 $C_{2–10}$烯基、視情況經取代之 $C_{2–10}$炔基、視情況經取代之 $C_{2–6}$雜環基、視情況經取代之 $C_{6–12}$芳基、視情況經取代之 C_2-C_{10}聚乙二醇或視情況經取代之 $C_{1–10}$雜烷基、或連結 F^1-$(G^1)_j$-$(H^1)_k$-$(G^2)_m$-(I)-$(G^3)_n$-$(H^2)_p$-$(G^4)_q$– F^2之化學鍵。在一些實施例中，連結子為視情況選用的。

【0254】 在一些實施例中，環區，L_1包括含有醣之連結部分。

【0255】 在一實施例中，本發明之寡核苷酸之一或多個核苷酸係天然產生的，並且不包括例如在此項技術中已知及本文所述之化學修飾及/或偶聯。在另一實施例中，本發明之寡核苷酸之一或多個核苷酸在化學上經修飾以增強穩定性或其他有益的特徵(例如，替代性核苷酸)。在不受理論約束之情況下，咸信某些修飾能夠提高核酸酶抗性及/或血清穩定性或降低免疫原性。例如，本發明之多核苷酸可含有天然地存在於 DNA 或 RNA 中之核苷酸(例如，腺嘌呤、胸苷、鳥苷、胞苷、尿苷或肌苷)或可含有在核苷酸之一或多種組分(例如，核鹼基、糖或磷酸連結子部分)上具有一或多種化學修飾之核苷酸。本發明之寡核苷酸可經由天然存在之磷酸二酯鍵彼此連結，或可經修飾以經由以下各鍵共價連結：硫代磷酸酯、3’-亞甲基膦酸酯、5’-亞甲基膦酸酯、3’-亞磷醯胺、2’-5’磷酸二酯、胍、S-甲基硫脲或肽鍵。

【0256】 在一些實施例中，C 包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。在其他實施例中，D 包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。在一些實施例中，C 與 D 各自皆包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0257】 在本發明之某些實施例中，本發明之寡核苷酸之實質上所有核苷酸為替代性核苷酸。在本發明之其他實施例中，本發明之寡核苷酸之所有核苷酸皆為替代性核苷酸。其中「實質上所有核苷酸為替代性核苷酸」的本發明之寡核苷酸很大程度上而非全部經修飾並且可包括不超過 5、4、3、2 或 1 個天然存在之核苷酸。在本發明之又一些實施例中，本發明之寡核苷酸可包括不超過 5、4、3、2 或 1 個替代性核苷酸。

【0258】 在一實施例中，本發明之寡核苷酸包括具有式 XXIII 之結構的 ADAR 招募結構域，其中 C 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸，L_1 為環區，且 D 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸。在一些實施例中，C 與 D 之至少 5 個連續核鹼基互補，且寡核苷酸包括由長度介於 10-50 個連結核苷之間的 C 與 D 形成之雙鏈體結構。在一些實施例中，雙鏈體結構包括至少一個錯配。在一些實施例中，C 或 D 包括至少一個替代性核鹼基。在一些實施例中，C 與 D 各自包括至少一個替代性核鹼基。在一些實施例中，C 及/或 D 獨立地進一步包括至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。在一些實施例中，L_1 包括連結核苷酸。在其他實施例中，L_1 由連結核苷組成。在一些實施例中，L_1 包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0259】 在另一實施例中，本發明之寡核苷酸包括具有式 XXIII 之結構的 ADAR 招募結構域，其中 C 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸，L_1 為不由連結核苷組成之環區且 D 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸。在一些實施例中，C 與 D 之至少 5 個連續核鹼基互補，且寡核苷酸包括由長度介於 10-50 個連結核苷之間的 C 與 D 形成之雙鏈體結構。在一些實施例中，雙鏈體結構包括至少一個錯配。在一些實施例中，L_1 具有式 VII 之結構，如本文所述。在一些實施例中，L_1 包括含有醣之連結部分。在一些實施例中，C 及/或 D 獨立地包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0260】 在另一實施例中，本發明之寡核苷酸包括具有式 XXIII 之結構的 ADAR 招募結構域，其中 C 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸，L_1 為包括至少一個替代性核鹼基或至少一個替代性核苷間鍵之環區，並且 D 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸。在一些實施例中，C 與 D 之至少 5

個連續核鹼基互補，且寡核苷酸包括由長度介於 10-50 個連結核苷之間的 C 與 D 形成之雙鏈體結構。在一些實施例中，雙鏈體結構包括至少一個錯配。在一些實施例中，L_1 包括至少一個替代性核鹼基及至少一個替代性核苷間鍵。

【0261】 在另一實施例中，本發明之寡核苷酸包括具有式 XXIII 之結構的 ADAR 招募結構域，其中 C 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸，L_1 為環區，包括至少一個不為 2'-O-甲基糖部分之替代性糖部分(例如，該替代性糖部分選自由下列各部分組成之群：2′-O-C_1-C_6 烷基-糖部分、2′-胺基-糖部分、2′-氟-糖部分、2-O-MOE 糖部分、LNA 糖部分、阿拉伯糖核酸(ANA)糖部分、2′-氟-ANA 糖部分、去氧核糖糖部分及雙環核酸)，並且 D 為具有 10-50 個連結核苷長度之單股寡核苷酸。在一些實施例中，C 與 D 之至少 5 個連續核鹼基互補，且寡核苷酸包括由長度介於 10-50 個連結核苷之間的 C 與 D 形成之雙鏈體結構。在一些實施例中，雙鏈體結構包括至少一個錯配。在一些實施例中，C 及/或 D 獨立地包括至少一個替代性核鹼基、至少一個替代性核苷間鍵及/或至少一個替代性糖部分。

【0262】 在一些實施例中，C 包括與 SEQ ID NO. 1、4、7、10、13、16、19、22、25、28、31 及 34 中任一者所列之核鹼基序列具有至少 50%序列一致性(例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性)的核鹼基序列，且 D 包括與 C 之核鹼基序列互補之核鹼基序列，其中該序列包括至少一個如本文所述之錯配。在其他實施例中，D 包括與 SEQ ID NO. 2、5、8、11、14、17、20、23、26、29、32 及 35 中任一者所列之核鹼基序列具有至少 50%序列一致性(例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性)的核鹼基序列，且 C 包括與 C 之核鹼基序列互補之核鹼基序列，其中該序列包括至少

一個如本文所述之錯配。在一些實施例中，C-L_1-D 包括與 SEQ ID NO. 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33 及 36 中任一者所列之核鹼基序列具有至少 50%序列一致性(例如至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%序列一致性)的核鹼基序列，其中該序列包括至少一個如本文所述之錯配。

【0263】 SEQ ID NO. 1-36 之核鹼基序列在下文中提供：

表 4

GGUGAAUAGUAUAACAAUAU	SEQ ID NO. 1
AUGUUGUUAUAGUAUCCACC	SEQ ID NO. 2
GGUGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCACC	SEQ ID NO. 3
GGUGAAGAGGAGAACAAUAU	SEQ ID NO. 4
AUGUUGUUCUCGUCUCCACC	SEQ ID NO. 5
GGUGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCACC	SEQ ID NO. 6
GGUGUCGAGAAGAGGAGAACAAUAU	SEQ ID NO. 7
AUGUUGUUCUCGUCUCCUCGACACC	SEQ ID NO. 8
GGUGUCGAGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCUCGACACC	SEQ ID NO. 9
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAU	SEQ ID NO. 10
AUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 11
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 12
GUGGAAUAGUAUAACAAUAU	SEQ ID NO. 13
AUGUUGUUAUAGUAUCCCAC	SEQ ID NO. 14
GUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCAC	SEQ ID NO. 15
GGUGUCGAGAAUAGUAUAACAAUAU	SEQ ID NO. 16
AUGUUGUUAUAGUAUCCUCGACACC	SEQ ID NO. 17
GGUGUCGAGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCUCGACACC	SEQ ID NO. 18
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAU	SEQ ID NO. 19
AUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 20
GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 21
GGGUGGAAUAGUAUACCA	SEQ ID NO. 22
UGGUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 23
GGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCU	SEQ ID NO. 24
GUGGGUGGAAUAGUAUACCA	SEQ ID NO. 25
UGGUAUAGUAUCCCACCUAC	SEQ ID NO. 26
GUGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUAC	SEQ ID NO. 27
UGGGUGGAAUAGUAUACCA	SEQ ID NO. 28
UGGUAUAGUAUCCCACCUA	SEQ ID NO. 29

UGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUA	SEQ ID NO. 30
GGUGGAAUAGUAUACCA	SEQ ID NO. 31
UGGUAUAGUAUCCCACC	SEQ ID NO. 32
GGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACC	SEQ ID NO. 33
GUGGAAUAGUAUACCA	SEQ ID NO. 34
UGGUAUAGUAUCCCAC	SEQ ID NO. 35
GUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCAC	SEQ ID NO. 36

【0264】 應理解，雖然 SEQ ID NO. 1-36 中之序列被描述為未經修飾及/或未偶聯之序列，但本發明之寡核苷酸之 RNA 可包括 SEQ ID NO. 1-36 中所列之任一序列，其為替代性核苷及/或如下詳述進行偶聯。

【0265】 在一些實施例中，本發明之寡核苷酸可進一步包括 5’帽結構。在一些實施例中，該 5’帽結構為 2,2,7-三甲基鳥苷帽。

【0266】 本發明之寡核苷酸可藉由此項技術中已知之標準方法合成，如下文中進一步論述，例如藉由使用自動化 DNA 合成器，諸如可由例如 Biosearch, Applied Biosystems, Inc 市售。

【0267】 寡核苷酸化合物可使用液相或固相有機合成或這兩者來製備。有機合成提供以下優點：可易於包括非天然或替代性核苷酸之寡核苷酸。本發明之單股寡核苷酸可使用液相或固相有機合成或這兩者來製備。

【0268】 進一步預期，對於本文中所鑑別之任何序列，進一步之優化可藉由系統地添加或移除連結核苷以生成較長或較短序列來達成。仍進一步，此類優化序列可藉由例如引入如本文所述或如此項技術中已知之替代性核苷、替代性糖部分及/或替代性核苷間來調整，包括如此項技術中已知及/或本文所論述之替代性核苷、替代性糖部分及/或替代性核苷間鍵，以便進一步優化分子(例如，提高血清穩定性或循環半衰期、提高熱穩定性、增強跨膜遞送、靶向具體位置或細胞類型及/或增強與 RNA 編輯酶(例如 ADAR)之相互作用)。

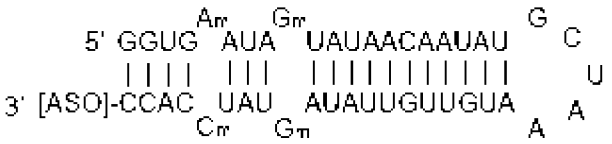
【0269】 在一些實施例中，寡核苷酸包括一個 ADAR 招募結構域。在一些實施例中，ADAR 招募結構域在寡核苷酸之 5’端處。在一些實施例中，ADAR 招

募結構域在寡核苷酸之 3’端處。在一些實施例中，寡核苷酸包括第一 ADAR 招募結構域及第二 ADAR 招募結構域。在一些實施例中，第一 ADAR 招募結構域為在寡核苷酸之 5’端處，其中第二 ADAR 招募結構域在寡核苷酸之 3’端處。在一些實施例中，該一或多個 ADAR 招募結構域為 GluR2 ADAR 招募結構域。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 37 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

GGUGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCACC

(SEQ ID NO. 37)

【0270】 在一些實施例中，寡核苷酸包括式 X 之結構，如下所示：



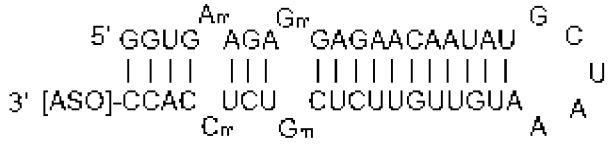
式 X，

其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 38 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

GGUGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCACC

(SEQ ID NO. 38)

【0271】 在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XI 之結構，如下所示：

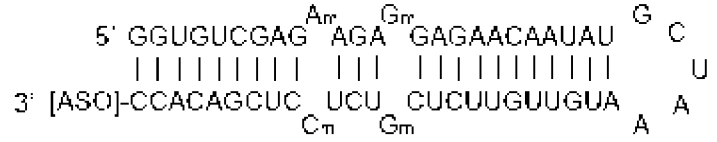


式 XI，

其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 39 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

GGUGUCGAGAAGAGGAGAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUCUCGUCUCCU CGACACC (SEQ ID NO. 39)

【0272】 在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XII 之結構，如下所示：



式 XII，

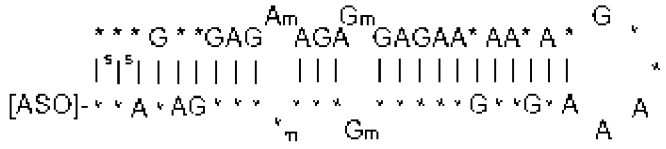
其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0273】 在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 40 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

*s*s*G**GAGAAGAGGAGAA*AA*A*G**AAA*G**G*****G*******GA*A**

(SEQ ID NO. 40)

其中*為 2’-O-甲基核苷酸且 s 為介於兩個連結核苷酸之間的硫代磷酸酯核苷間鍵。在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XIII 之結構，如下所示：



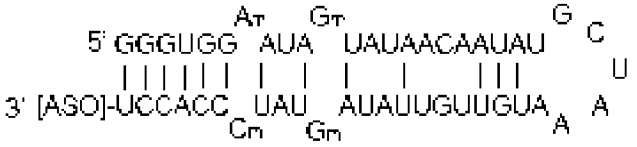
式 XIII，

其中[ASO]包括如請求項 1 至 38 中任一項或如請求項 45 至 49 中任一項之寡核苷酸，其中*為 2’-O-甲基核苷酸，其中 s 為硫代磷酸酯核苷間鍵，其中 m 表示錯配之核苷酸。在一些實施例中，ADAR 招募結構域進一步包括至少一個核酸酶抗性核苷酸(例如，2-O-甲基核苷酸)。在一些實施例中，ADAR 招募結構域包

括至少一個替代性核苷間鍵(例如，硫代磷酸酯核苷間鍵)。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 41 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACC U (SEQ ID NO. 41)

【0274】 在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XIV 之結構，如下所示：



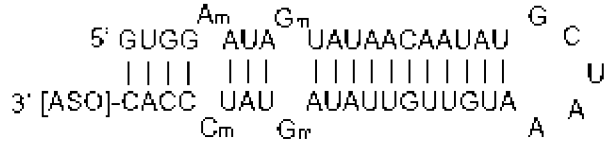
式 XIV，

其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 42 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

GUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCAC

(SEQ ID NO. 42)

【0275】 在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XV 之結構，如下所示：

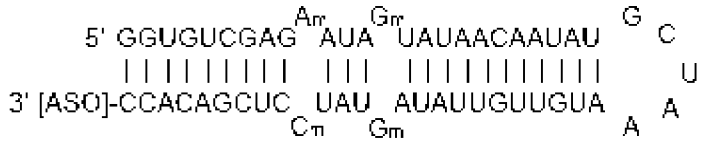


式 XV，

其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 43 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

GGUGUCGAGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCU CGACACC (SEQ ID NO. 43)

【0276】 在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XVI 之結構，如下所示：

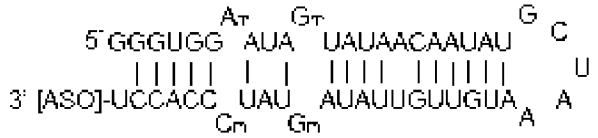


式 XVI，

其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 44 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

GGGUGGAAUAGUAUAACAAUAUGCUAAAUGUUGUUAUAGUAUCCCACCU (SEQ ID NO. 44)

【0277】 在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XVII 之結構，如下所示：

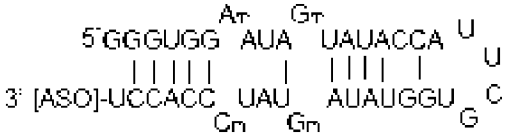


式 XVII，

其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 45 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

GGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCU (SEQ ID NO. 45)

【0278】 在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XVIII 之結構，如下所示：



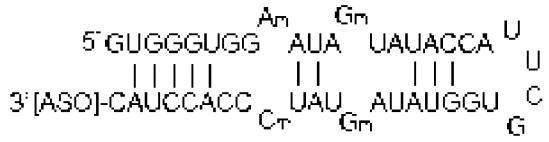
式 XVIII，

其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 46 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

GUGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUAC

(SEQ ID NO. 46)

【0279】　在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XIX 之結構，如下所示：

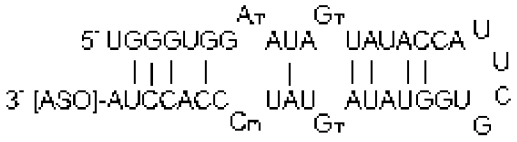


式 XIX，

其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 47 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

UGGGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACCUA (SEQ ID NO. 47)

【0280】　在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XX 之結構，如下所示：

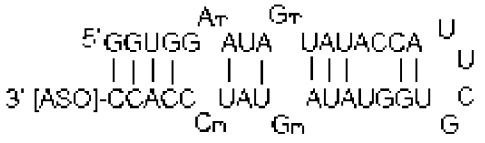


式 XX，

其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 48 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

GGUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCACC (SEQ ID NO. 48)

【0281】　在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XXI 之結構，如下所示：

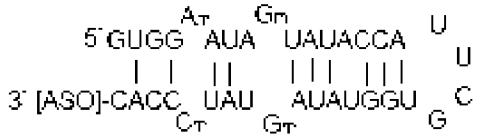


式 XXI，

其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。在一些實施例中，GluR2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 49 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

GUGGAAUAGUAUACCAUUCGUGGUAUAGUAUCCCAC (SEQ ID NO. 49)

【0282】 在一些實施例中，寡核苷酸包括式 XXII 之結構，如下所示：



式 XXII，

其中[ASO]包括本發明之寡核苷酸中之任一種，其中 m 表示錯配之核苷酸。

【0283】 在一些實施例中，ADAR 招募結構域為 Z-DNA ADAR 招募結構域。在一些實施例中，ADAR 招募結構域為 MS2 ADAR 招募結構域。在一些實施例中，MS2 噬菌體莖-環結構可用作 ADAR 招募結構域(例如及 MS2 ADAR 招募結構域)。已知 MS2 莖-環結合 MS2 噬菌體外殼蛋白，該外殼蛋白當融合至 ADAR 之去胺酶結構域(例如 ADAR 融合蛋白)時可用於靶標特異性去胺作用。在一些實施例中，MS2 ADAR 招募結構域具有 SEQ ID NO. 50 之核苷酸序列，如下在 5’至 3’方向上所示：

ACATGAGGATCACCCATGT (SEQ ID NO. 50)

【0284】 在一些實施例中，使用包括編碼 ADAR 融合蛋白之多核苷酸的表現載體構築體向細胞或受試者投與 ADAR 融合蛋白。在一些實施例中，ADAR 融合蛋白包括融合至 MS2 噬菌體外殼蛋白的 ADAR 之去胺酶結構域。在一些實施例中，ADAR 之去胺酶結構域為 ADAR1 之去胺酶結構域。在一些實施例中，ADAR 之去胺酶結構域為 ADAR2 之去胺酶結構域。ADAR 融合蛋白可為 Katrekar 等人 Nature Methods, 16(3): 239-42 (2019)中所述之融合蛋白，該 ADAR 融合蛋白以引用之方式併入本文中

【0285】 本發明中所述之核酸可藉由此項技術中充分確定之方法來合成及/或修飾，諸如以下文獻中所述之彼等方法："Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S. L.等人 (編), John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., USA，該文獻據此以引用之方式併入本文中。替代性核苷酸及核苷包括具有以下修飾之彼等：包括例如末端修飾，例如 5'-端修飾(磷酸化、偶聯、反向鍵)或 3'-端修飾(偶聯、DNA 核苷酸、反向鍵等)；鹼基修飾，例如用穩定化鹼、去穩定化鹼或與配偶體之擴增庫鹼基配對之鹼基的置換、移除鹼基(無鹼基核苷酸)、或偶聯鹼基；糖修飾(例如，在 2'-位置或 4'-位置處)或糖之替換；及/或主鏈修飾，包括磷酸二酯鍵之修飾或替換。核鹼基亦可為異核苷，其中將核鹼基自糖部分之 C1 位置移至不同位置處(例如，C2、C3、C4 或 C5)。適用於本文所述之實施例中的寡核苷酸化合物之特定實例包括但不限於含有經修飾之主鏈或不含天然核苷間鍵的替代性核苷。具有經修飾之主鏈的核苷酸及核苷尤其包括在主鏈中不具有磷原子之彼等。出於本說明書之目的且如此項技術中有時參考的，在其核苷間主鏈中不具有磷原子之替代性 RNA 亦可視為寡核苷。在一些實施例中，寡核苷酸將在其核苷間主鏈中具有磷原子。

【0286】 替代性核苷間鍵包括例如硫代磷酸酯、對掌性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基磷酸三酯、膦酸甲酯及其他膦酸烷酯包括 3'-伸烷基膦酸酯及對掌性膦酸酯、次膦酸酯、胺基磷酸酯包括 3'-胺基胺基磷酸酯和胺烷基胺基磷酸酯、硫代胺基磷酸酯、硫代烷基膦酸酯、硫代烷基磷酸三酯及具有正常 3'-5'鍵之硼磷酸酯、其 2'-5'-連結類似物、以及具有反向極性之彼等，其中相鄰的核苷單元對係 3'-5'連結至 5'-3'或 2'-5'連結至 5'-2'。亦包括各種鹽、混合鹽及遊離酸形式。

【0287】 教導以上含磷鍵之製備的代表性美國專利包括但不限於美國專利第 3,687,808 號；第 4,469,863 號；第 4,476,301 號；第 5,023,243 號；第 5,177,195

號；第 5,188,897 號；第 5,264,423 號；第 5,276,019 號；第 5,278,302 號；第 5,286,717 號；第 5,321,131 號；第 5,399,676 號；第 5,405,939 號；第 5,453,496 號；第 5,455,233 號；第 5,466,677 號；第 5,476,925 號；第 5,519,126 號；第 5,536,821 號；第 5,541,316 號；第 5,550,111 號；第 5,563,253 號；第 5,571,799 號；第 5,587,361 號；第 5,625,050 號；第 6,028,188 號；第 6,124,445 號；第 6,160,109 號；第 6,169,170 號；第 6,172,209 號；第 6,239,265 號；第 6,277,603 號；第 6,326,199 號；第 6,346,614 號；第 6,444,423 號；第 6,531,590 號；第 6,534,639 號；第 6,608,035 號；第 6,683,167 號；第 6,858,715 號；第 6,867,294 號；第 6,878,805 號；第 7,015,315 號；第 7,041,816 號；第 7,273,933 號；第 7,321,029 號；及美國專利 RE39464，其各自之全部內容據此以引用之方式併入本文中。

【0288】 其中不含磷原子之替代性核苷間鍵具有由短鏈烷基或環烷基核苷間鍵、混合雜原子及烷基或環烷基核苷間鍵或一個或多個短鏈雜原子或雜環核苷間鍵形成的主鏈。它們包括具有以下之彼等：嗎啉代鍵(部分係由核苷之糖部分形成)；矽氧烷主鏈；硫化物、亞碸及碸主鏈；甲醯乙醯基及硫代甲醯乙醯基主鏈；亞甲基甲醯乙醯基及硫代甲醯乙醯基主鏈；含有烯烴之主鏈；胺基磺酸酯主鏈；亞甲基亞胺基及亞甲基肼基主鏈；磺酸酯及磺醯胺主鏈；醯胺主鏈；以及具有混合的 N、O、S 及 CH_2 組成部分之其他物質。

【0289】 教導上述寡核苷之製備的代表性美國專利包括但不限於美國專利第 5,034,506 號；第 5,166,315 號；第 5,185,444 號；第 5,214,134 號；第 5,216,141 號；第 5,235,033 號；第 5,64,562 號；第 5,264,564 號；第 5,405,938 號；第 5,434,257 號；第 5,466,677 號；第 5,470,967 號；第 5,489,677 號；第 5,541,307 號；第 5,561,225 號；第 5,596,086 號；第 5,602,240 號；第 5,608,046 號；第 5,610,289 號；第 5,618,704 號；第 5,623,070 號；第 5,663,312 號；第 5,633,360 號；第 5,677,437 號；及第 5,677,439 號，其各自之全部內容據此以引用之方式併入本文中。

【0290】 在其他實施例中，合適的寡核苷酸包括其中核苷酸單元之糖及核苷間鍵(亦即主鏈)皆經置換之彼等。保留鹼基單元以便與適當的核酸靶化合物雜交。一種此類寡聚化合物係稱為肽核酸(PNA)，其為已顯示具有極佳雜交特性之模擬物。在 PNA 化合物中，核苷之糖經含有醯胺之主鏈(具體而言，胺基乙基甘氨酸主鏈)置換。保留核鹼基並且直接或間接地結合至主鏈之醯胺部分之氮雜氮原子上。教導 PNA 化合物之製備的代表性美國專利包括但不限於美國專利第 5,539,082 號；第 5,714,331 號；及第 5,719,262 號，其各自之全部內容據此以引用之方式併入本文中。適用於本發明之寡核苷酸中的額外 PNA 化合物描述於例如 Nielsen 等人, Science, 1991, 254, 1497-1500 中。

【0291】 本發明中描述之一些實施例包括具有硫代磷酸酯主鏈之寡核苷酸及具有雜原子主鏈之寡核苷酸，且具體而言為以上引用之美國專利第 5,489,677 號之-CH_2-NH-CH_2-、-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-[稱為亞甲基(甲亞胺基)或 MMI 主鏈]、-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-、-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-及-N(CH_3)-CH_2-CH_2-[其中天然磷酸二酯主鏈表示為-O-P-O-CH_2-]，以及以上引用之美國專利第 5,602,240 號之醯胺主鏈。在一些實施例中，本文中描述之寡核苷酸具有以上引用之美國專利第 5,034,506 號之嗎啉代主鏈結構。在其他實施例中，本文所述之寡核苷酸包括二胺基磷酸酯嗎啉代低聚物(PMO)，其中去氧核糖部分經嗎啉環置換，且帶電磷酸二酯次單元間鍵經不帶電之二胺基磷酸酯鍵置換，如 Summerton, 等人, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997, 7:63-70 中所述。

【0292】 替代性核苷及核苷酸亦可含有一或多個經取代之糖部分。寡核苷酸(例如，本文所述之寡核苷酸)可包括在 2'-位置處之以下之一者：OH；F；O-、S-或 N-烷基；O-、S-或 N-烯基；O-、S-或 N-炔基；或 O-烷基-O-烷基，其中烷基、烯基及炔基可經 C_1 至 C_{10} 烷基或 C_2 至 C_{10} 烯基及炔基取代或未經取代。示範性合適的修飾包括 -O[(CH_2)$_n$O]$_m$$CH_3$、-O($CH_2$)$_n$$OCH_3$、-O($CH_2$)$_n$-$NH_2$、

$-O(CH_2)_nCH_3$、$-O(CH_2)_n-ONH_2$及$-O(CH_2)_n-ON[(CH_2)_nCH_3]_2$，其中 n 及 m 為 1 至約 10。在其他實施例中，寡核苷酸包括在 2'位置處之以下之一者：C_1至 C_{10}低級烷基、經取代之低級烷基、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、雜環烷基、雜環烷芳基、胺基烷基胺基、聚烷基胺基、經取代之矽基、RNA 裂解基團、報導基團、嵌入子、用於改良寡核苷酸之藥物動力學特性的基團、或用於改良寡核苷酸之藥效學特性的基團、及其他具有類似特性之取代基。在一些實施例中，該修飾包括 2'-甲氧乙氧基(2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$，亦稱為 2'-O-(2-甲氧基乙基)或 2'-O-MOE)(Martin 等人, Helv. Chin. Acta, 1995, 78:486-504)，亦即烷氧基-烷氧基。2'-O-MOE 核苷向寡核苷酸賦予若干有益特性，包括但不限於與未經修飾之寡核苷酸相比增強之核酸酶抗性、改良之藥物動力學特性、減少之非特異性蛋白質結合、降低之毒性、減弱之免疫刺激特性、及提高之靶標親和力。

【0293】 另一種示範性替代物含有 2'-二甲基胺基氧基乙氧基，亦即$-O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$基團，亦稱為 2'-DMAOE，如下文之實例中所述；及 2'-二甲基胺基乙氧基乙氧基(在此項技術中亦稱為 2'-O-二甲基胺基乙氧基乙基或 2'-DMAEOE)，亦即 2'-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-$N(CH_3)_2$。其他示範性替代物包括：5'-Me-2'-F 核苷酸、5'-Me-2'-OMe 核苷酸、5'-Me-2'-去氧核苷酸(在此三個家族中 R 及 S 異構物兩者)；2'-烷氧基烷基；及 2'-NMA (N-甲基乙醯胺)。

【0294】 其他替代物包括 2'-甲氧基(2'-OCH_3)、2'-胺基丙氧基(2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$)及 2'-氟(2'-F)。相似修飾亦可在寡核苷酸之核苷及核苷酸上的其他位置處進行，特別是在 3'末端核苷酸或 2'-5'連結寡核苷酸上的糖之 3'位置或 5'末端核苷酸之 5'位置。寡核苷酸亦可具有糖模擬物諸如環丁基部分以代替呋喃戊糖基糖。教導此類經修飾之糖結構之製備的代表性美國專利包括但不限於

美國專利第 4,981,957 號；第 5,118,800 號；第 5,319,080 號；第 5,359,044 號；第 5,393,878 號；第 5,446,137 號；第 5,466,786 號；第 5,514,785 號；第 5,519,134 號；第 5,567,811 號；第 5,576,427 號；第 5,591,722 號；第 5,597,909 號；第 5,610,300 號；第 5,627,053 號；第 5,639,873 號；第 5,646,265 號；第 5,658,873 號；第 5,670,633 號；及第 5,700,920 號，其中一些係與本申請案共同擁有。先前專利各自之全部內容據此以引用之方式併入本文中。

【0295】 本發明之寡核苷酸亦可包括核鹼基(此項技術中常簡稱為「鹼基」)替代物(例如修飾或取代)。未經修飾或天然核鹼基包括嘌呤鹼基腺嘌呤(A)及鳥嘌呤(G)；以及嘧啶鹼基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。替代性核鹼基包括其他合成及天然核鹼基，諸如 5-甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶、5-甲醯基胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶、吡咯并胞嘧啶、雙去氧胞嘧啶、尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、5-羥基去氧尿嘧啶、二氫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、假尿嘧啶、1-甲基-假尿嘧啶、去氧尿嘧啶、5-羥基丁基-2'-去氧尿嘧啶、黃嘌呤、次黃嘌呤、7-去氮-黃嘌呤、噻吩并鳥嘌呤、8-氮雜-7-去氮鳥嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、7-去氮鳥嘌呤、6-胺基甲基-7-去氮鳥嘌呤、8-胺基鳥嘌呤、2,2,7-三甲基鳥嘌呤、8-甲基腺嘌呤、8-疊氮基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、7-去氮腺嘌呤、3-去氮腺嘌呤、2,6-二胺基嘌呤、2-胺基嘌呤、7-去氮-8-氮雜-腺嘌呤、8-胺基-腺嘌呤、胸腺嘧啶、雙去氧胸腺嘧啶、5-硝基吲哚、2-胺基腺嘌呤、腺嘌呤及鳥嘌呤之 6-甲基及其他烷基衍生物、腺嘌呤及鳥嘌呤之 2-丙基及其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶及 2-硫代胞嘧啶、5-鹵基尿嘧啶及胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶及胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶及胸腺嘧啶、4-硫尿嘧啶、8-鹵基、8-胺基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羥基及其他 8-經取代之腺嘌呤及鳥嘌呤、5-鹵基特別是 5-溴基、5-三氟甲基及其他 5-經取代之尿嘧啶及胞嘧啶、8-氮雜鳥嘌呤及 8-氮雜腺嘌呤、以及 3-去氮鳥嘌呤。其他核鹼基包括美國專利第 3,687,808 號中所揭露之彼等；在 Modified

Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. 編 Wiley-VCH, 2008 中所揭露之彼等；在 The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, 第 858-859 頁, Kroschwitz, J. L 編 John Wiley & Sons, 1990 中所揭露之彼等；由 Englisch 等人, (1991) Angewandte Chemie, International Edition, 30:613 所揭露之彼等；以及由 Sanghvi, Y S., 第 15 章, Antisense Research and Applications, 第 289-302 頁, Crooke, S. T.及 Lebleu, B.編, CRC Press, 1993 所揭露之彼等。此等核鹼基中之某些尤其適用於提高本發明中所述之寡聚化合物之結合親和力。它們包括 5-經取代之嘧啶、6-氮雜嘧啶、以及 N-2、N-6 及 0-6 經取代之嘌呤，包括 2-胺基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶及 5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已顯示使核酸雙鏈體穩定性提高了 0.6-1.2°C(Sanghvi, Y. S.、Crooke, S. T.及 Lebleu, B.編, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, 第 276-278 頁)並且為示範性鹼基取代，甚至更尤其當與 2'-O-甲氧基乙基糖修飾組合時。

【0296】 教導某些上述替代性核鹼基之製備以及其他替代性核鹼基的代表性美國專利包括但不限於上述美國專利第 3,687,808 號；第 4,845,205 號；第 5,130,30 號；第 5,134,066 號；第 5,175,273 號；第 5,367,066 號；第 5,432,272 號；第 5,457,187 號；第 5,459,255 號；第 5,484,908 號；第 5,502,177 號；第 5,525,711 號；第 5,552,540 號；第 5,587,469 號；第 5,594,121 號；第 5,596,091 號；第 5,614,617 號；第 5,681,941 號；第 5,750,692 號；第 6,015,886 號；第 6,147,200 號；第 6,166,197 號；第 6,222,025 號；第 6,235,887 號；第 6,380,368 號；第 6,528,640 號；第 6,639,062 號；第 6,617,438 號；第 7,045,610 號；第 7,427,672 號；及第 7,495,088 號，其各自之全部內容據此以引用之方式併入本文中。

【0297】 在其他實施例中，核苷酸中之糖部分可為核糖分子，視情況具有 2'-O-甲基、2'-O-MOE、2'-F、2'-胺基、2'-O-丙基、2'-胺基丙基或 2'-OH 修飾。

【0298】 本發明之寡核苷酸可包括一或多個雙環糖部分。「雙環糖」為藉由橋連兩個原子而修飾之呋喃糖環。「雙環核苷」(「BNA」)為具有糖部分之核苷，該糖部分包括連接糖環之兩個碳原子的橋，由此形成雙環環系統。在某些實施例中，該橋將糖環之 4'-碳與 2'-碳相連。因此，在一些實施例中，本發明之試劑可包括一或多個鎖定核苷。鎖定核苷為具有經修飾之核糖部分的核苷，其中核糖部分包括將 2'與 4'碳相連之額外橋。換言之，鎖定核苷為包括雙環糖部分之核苷，該雙環糖部分包括 4'-CH_2-O-2'橋。此結構將核糖有效地「鎖定」為 3'-內結構構形。已顯示向寡核苷酸中添加鎖定核苷提高寡核苷酸在血清中之穩定性並且減小脫靶效應 (Grunweller, A. 等人, (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193)。用於本發明之多核苷酸中的雙環核苷之實例包括但不限於包括介於 4'與 2'核糖基環原子之間的橋之核苷。在某些實施例中，本發明之多核苷酸試劑包括一或多個雙環核苷，該雙環核苷包括 4'至 2'橋。此類 4'至 2'橋連之雙環核苷之實例包括但不限於：4'-(CH_2)-O-2' (LNA)；4'-(CH_2)-S-2'；4'-(CH_2)$_2$-O-2' (ENA)；4'-CH(CH_3)-O-2' (亦稱為「約束型乙基」或「cEt」)及 4'-CH(CH_2OCH_3)-O-2' (及其類似物；參見，例如美國專利第 7,399,845 號)；4'-C(CH_3)(CH_3)-O-2' (及其類似物；參見，例如美國專利第 8,278,283 號)；4'-CH_2-N(OCH_3)-2' (及其類似物；參見，例如美國專利第 8,278,425 號)；4'-CH_2-O-N(CH_3)$_2$-2' (參見，例如美國專利公佈第 2004/0171570 號)；4'-CH_2-N(R)-O-2'，其中 R 為 H、C_1-C_{12}烷基或保護基團(參見，例如美國專利第 7,427,672 號)；4'-CH_2-C(H)(CH_3)-2' (參見，例如 Chattopadhyaya 等人, J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134)；以及 4'-CH_2-C(=CH_2)-2' (及其類似物；參見，例如美國專利第 8,278,426 號)。先前專利各自之全部內容據此以引用之方式併入本文中。

【0299】 教導鎖定核酸核苷酸之製備的額外代表性美國專利及美國專利公佈包括但不限於以下：美國專利第 6,268,490 號；第 6,525,191 號；第 6,670,461 號；

第 6,770,748 號；第 6,794,499 號；第 6,998,484 號；第 7,053,207 號；第 7,034,133 號；第 7,084,125 號；第 7,399,845 號；第 7,427,672 號；第 7,569,686 號；第 7,741,457 號；第 8,022,193 號；第 8,030,467 號；第 8,278,425 號；第 8,278,426 號；第 8,278,283 號；US 2008/0039618；及 US 2009/0012281，其各自之全部內容據此以引用之方式併入本文中。

【0300】 可製備任何上述雙環核苷，其具有一或多個立體化學糖構型，包括例如 α-L-呋喃核糖及 β-D-呋喃核糖(參見 WO 99/14226)。

【0301】 本發明之寡核苷酸亦可經修飾以包括一或多個約束型乙基核苷酸。如本文所用，「約束型乙基核苷酸」或「cEt」為包括含有 4'-CH(CH3)-O-2'橋之雙環糖部分的鎖定核酸。在一實施例中，約束型乙基核苷酸呈 S 構形，在本文中稱為「S-cEt」。

【0302】 本發明之寡核苷酸亦可包括一或多個「構象上受限之」核苷酸(「CRN」)。CRN 為核苷酸類似物，其具有連接核糖之 C2'與 C4'碳或核糖之 C3 與--C5'碳的連結子。CRN 將核糖環鎖定成穩定構形並且提高與 mRNA 之雜交親和力。連結子具有足夠之長度以將氧放置於對穩定性及親和力而言最佳之位置，造成較少的核糖環折疊。

【0303】 教導某些上述 CRN 之製備的代表性公佈包括但不限於美國專利公佈第 2013/0190383 號；及 PCT 公佈 WO 2013/036868，其各自之全部內容據此以引用之方式併入本文中。

【0304】 在一些實施例中，本發明之寡核苷酸包括一或多種單體，該一或多種單體為 UNA(未鎖定之核酸)核苷酸。UNA 為未鎖定之無環核酸，其中糖之任何鍵已經移除，形成未鎖定之「糖」殘基。在一實例中，UNA 亦涵蓋介於 C1'-C4'之間的鍵已經移除(亦即，介於 C1'與 C4'碳之間的共價碳-氧-碳鍵)之單體。在另一實例中，糖之 C2'-C3'鍵(亦即，介於 C2'與 C3'碳之間的共價碳-碳鍵)已經移除

(參見，Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008)及 Fluiter 等人, Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039，據此以引用之方式併入)。

【0305】 教導 UNA 之製備的代表性美國公佈包括但不限於美國專利第 8,314,227 號；及美國專利公佈第 2013/0096289 號；第 2013/0011922 號；及第 2011/0313020 號，其各自之全部內容據此以引用之方式併入本文中。

【0306】 核糖分子亦可用環丙烷環修飾以產生三環去氧核酸(三環 DNA)。核糖部分可經取代為另一種糖，諸如 1,5,-脫水己糖醇、蘇糖以產生蘇糖核苷(TNA)、或阿拉伯糖以產生阿拉伯糖核苷。核糖分子亦可經非糖物諸如環己烯置換以產生環己烯核苷或乙二醇以產生乙二醇核苷。

【0307】 核糖分子亦可經非糖物諸如環己烯置換以產生環己烯核酸(CeNA)或乙二醇以產生乙二醇核酸(GNA)。對核苷酸分子之末端的潛在穩定修飾可包括 N-(乙醯胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-NHAc)、N-(己醯基-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6)、N-(乙醯基-4-羥基脯胺醇(Hyp-NHAc)、胸苷-2'-O-去氧胸苷(ether)、N-(胺基己醯基)-4-羥基脯胺醇(Hyp-C6-胺基)、2-二十二烷基-尿苷-3''-磷酸、倒置鹼基 dT(idT)及其他。此修飾之揭露可見於 PCT 公佈第 WO 2011/005861 號中。

【0308】 本發明之寡核苷酸之其他替代性化合物包括 5'磷酸或 5'磷酸模擬物，例如，寡核苷酸之 5'-末端磷酸或磷酸模擬物。合適的磷酸模擬物揭露於例如美國專利公佈第 2012/0157511 號中，其全部內容以引用之方式併入本文中。

【0309】 本發明之示範性寡核苷酸包括糖修飾之核苷且亦可包括 DNA 或 RNA 核苷。在一些實施例中，寡核苷酸包括糖修飾之核苷及 DNA 核苷。替代性核苷向本發明之寡核苷酸中的併入可提高寡核苷酸對靶核酸之親和力。在那種情況下，替代性核苷可稱為提高親和力之替代性核苷酸。

【0310】 在一些實施例中，寡核苷酸包括至少 1 個替代性核苷，諸如至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、

至少 12、至少 13、至少 14、至少 15 或至少 16 個替代性核苷。在其他實施例中，寡核苷酸包括 1 至 10 個替代性核苷，諸如 2 至 9 個替代性核苷，諸如 3 至 8 個替代性核苷，諸如 4 至 7 個替代性核苷，諸如 6 或 7 個替代性核苷。在一實施例中，本發明之寡核苷酸可包括替代物，其獨立地選自此三種類型之替代物(替代性糖部分、替代性核鹼基及替代性核苷間鍵)或其組合。寡核苷酸較佳包括一或多個包括替代性糖部分之核苷，例如 2′糖替代性核苷。在一些實施例中，本發明之寡核苷酸包括一或多個 2′糖替代性核苷，該核苷獨立地選自由以下組成之群：2′-O-烷基-RNA、2′-O-甲基-RNA、2′-烷氧基-RNA、2′-O-甲氧基乙基-RNA、2′-胺基-DNA、2′-氟-DNA、ANA、2′-氟-ANA 及 BNA (例如 LNA)核苷。在一些實施例中，該一或多個替代性核苷為 BNA。

【0311】　在一些實施例中，該替代性核苷中至少 1 個為 BNA(例如 LNA)，諸如至少 2 個，諸如至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7 或至少 8 個替代性核苷為 BNA。在仍又一實施例中，所有替代性核苷皆為 BNA。

【0312】　在又一實施例中，寡核苷酸包括至少一個替代性核苷間鍵。在一些實施例中，連續核苷酸序列內之核苷間鍵為硫代磷酸酯或硼磷酸酯核苷間鍵。在一些實施例中，寡核苷酸之連續序列中之所有核苷酸間鍵皆為硫代磷酸酯鍵。在一些實施例中，硫代磷酸酯鍵為立體化學純的硫代磷酸酯鍵。在一些實施例中，硫代磷酸酯鍵為 Sp 硫代磷酸酯鍵。在其他實施例中，硫代磷酸酯鍵為 Rp 硫代磷酸酯鍵。

【0313】　在一些實施例中，本發明之寡核苷酸包括至少一個替代性核苷，其為 2′-O-MOE-RNA，諸如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個 2′-O-MOE-RNA 核苷單元。在一些實施例中，2′-O-MOE-RNA 核苷單元係由硫代磷酸酯鍵相連。在一些實施例中，該替代性核苷中至少一個為 2′-氟 DNA，諸如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個 2′-氟-DNA 核苷單元。在一些實施例中，本發明之寡核苷酸包

括至少一個 BNA 單元及至少一個 2'經取代之替代性核苷。在本發明之一些實施例中，寡核苷酸包括 2'糖修飾之核苷及 DNA 單元兩者。在一些實施例中，本發明之寡核苷酸或其連續核苷酸區域為 gapmer 寡核苷酸。

B. 偶聯至配位體之寡核苷酸

【0314】 本發明之寡核苷酸可在化學上連結至一或多個配位體、部分或偶聯物，此等物質增加寡核苷酸之活性、細胞分佈或細胞攝取。此類部分包括但不限於：脂質部分，諸如膽固醇部分(Letsinger 等人, (1989) Proc. Natl. Acid. Sci. USA, 86: 6553-6556)、膽酸 (Manoharan 等人, (1994) Biorg. Med. Chem. Let., 4:1053-1060)、硫醚，例如 beryl-S-三苯甲基硫醇(Manoharan 等人, (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci., 660:306-309；Manoharan 等人, (1993) Biorg. Med. Chem. Let., 3:2765-2770)、巯基膽固醇(Oberhauser 等人, (1992) Nucl. Acids Res., 20:533-538)、脂肪鏈，例如十二烷二醇或十一烷基殘基(Saison-Behmoaras 等人, (1991) EMBO J, 10:1111-1118；Kabanov 等人, (1990) FEBS Lett., 259:327-330；Svinarchuk 等人, (1993) Biochimie, 75:49-54)、磷脂，例如二-十六烷基-外消旋-甘油或 1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油基-3-膦酸酯三乙銨(Manoharan 等人, (1995) Tetrahedron Lett., 36:3651-3654；Shea 等人, (1990) Nucl. Acids Res., 18:3777-3783)、多胺或聚乙二醇鏈(Manoharan 等人, (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14:969-973)、或金剛烷乙酸(Manoharan 等人, (1995) Tetrahedron Lett., 36:3651-3654)、軟脂基部分(Mishra 等人, (1995) Biochim. Biophys. Acta, 1264:229-237)、或十八胺或己基胺基-羰氧基膽固醇部分(Crooke 等人, (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther., 277:923-937)。

【0315】 在一實施例中，配位體改變其所併入的寡核苷酸試劑之分佈、靶向性或壽命。在一些實施例中，配位體例如與不存在此類配位體之種類相比為以下各物或部位提供提高之親和力：選定之靶標，例如分子、細胞或細胞類型；區室，例如，細胞或器官區室、組織、器官或身體區域。

【0316】 配位體可包括天然存在之物質，諸如蛋白質(例如，人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白)；碳水化合物(例如，葡聚糖、支鏈澱粉、幾丁質、殼聚糖、菊粉、環糊精、N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯半乳糖胺或透明質酸)；或脂質。配位體亦可為重組或合成分子，諸如合成聚合物，例如合成多胺基酸。多胺基酸之實例包括聚離胺酸(PLL)、聚 L-天冬胺酸、聚 L-麩胺酸、苯乙烯-順丁烯二酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯醚-順丁烯二酸酐共聚物、N-(2-羥丙基)甲基丙烯醯胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚胺甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-異丙基丙烯醯胺聚合物或聚磷嗪。多胺之實例包括：聚乙烯亞胺、聚離胺酸(PLL)、精胺、亞精胺、多胺、偽肽-多胺、擬肽物多胺、樹狀體多胺、精胺酸、脒、魚精蛋白、陽離子脂質、陽離子卟啉、多胺之四級鹽或 α 螺旋肽。

【0317】 配位體亦可包括靶向基團，例如細胞或組織靶向劑，例如凝集素、醣蛋白、脂質或蛋白質，例如，結合至指定之細胞類型諸如腎細胞的抗體。靶向基團可為促甲狀腺激素、促黑激素、凝集素、醣蛋白、界面活性劑蛋白 A、黏蛋白碳水化合物、多價乳糖、多價半乳糖、N-乙醯基-半乳糖胺、N-乙醯基-葡萄糖胺多價甘露糖、多價岩藻糖、糖基化多胺基酸、多價半乳糖、轉鐵蛋白、雙膦酸酯、多麩胺酸、多天冬胺酸、脂質、膽固醇、類固醇、膽汁酸、葉酸、維生素 B12、維生素 A、生物素、或 RGD 肽或 RGD 肽模擬物。

【0318】 配位體之其他實例包括染料、嵌入劑(例如吖啶)、交聯劑(例如補骨脂素、絲裂黴素 C)、卟啉(TPPC4、得克薩卟啉(texaphyrin)、Sapphyrin)、多環芳香烴(例如吩嗪、二氫吩嗪)、人工核酸內切酶(例如 EDTA)、親油性分子例如、膽固醇、膽酸、金剛烷乙酸、1-芘丁酸、二氫睾酮、1,3-雙-O(十六基)甘油、香葉氧基己基、十六基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七基、軟脂酸、肉豆蔻酸、O3-(油醯基)石膽酸、O3-(油醯基)膽烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噁嗪)

及肽偶聯物(例如觸足肽、Tat 肽)、烷化劑、磷酸酯、胺基、巰基、PEG(例如PEG-40K)、MPEG、$[MPEG]_2$、多胺基、烷基、經取代之烷基、放射性標記之標記、酶、半抗原(例如生物素)、轉運/吸收促進劑(例如阿斯匹林、維生素 E、葉酸)、合成核糖核酸酶(例如咪唑、雙咪唑、組胺、咪唑團、吖啶-咪唑偶聯物、四氮雜大環之 Eu3+複合物)、二硝基苯基、HRP 或 AP。

【0319】 配位體可為蛋白質，例如，醣蛋白或肽，例如，對共配位體具有特異性親和力之分子；或抗體，例如結合至指定細胞類型諸如肝細胞之抗體。配位體亦可包括激素及激素受體。它們亦可包括非肽物質，諸如脂質、凝集素、碳水化合物、維生素、輔因子、多價乳糖、多價半乳糖、N-乙醯基-半乳糖胺、N-乙醯基-葡萄糖胺多價甘露糖或多價岩藻糖。

【0320】 配位體可為能夠例如藉由破壞細胞之細胞骨架(例如藉由破壞細胞之微管、微絲及/或中間絲)來增加寡核苷酸試劑在細胞中之攝取的物質，例如藥物。該藥物可為例如紫杉醇、長春新鹼、長春花鹼、細胞分裂抑素、諾考達唑、促微絲聚合劑(japlakinolide)、紅海海綿素(latrunculin) A、鬼筆環肽、海洋苔蘚素(swinholide) A、茚滿諾星(indanocine)或 myoservin。

【0321】 在一些實施例中，連接於如本文所述之寡核苷酸上的配位體係充當藥物動力學調節劑(PK 調節劑)。PK 調節劑包括親脂體、膽汁酸、類固醇、磷脂類似物、肽、蛋白質結合劑、PEG、維生素等。示範性 PK 調節劑包括但不限於膽固醇、脂肪酸、膽酸、石膽酸、二烷基甘油酯、二醯基甘油酯、磷脂、神經鞘脂質、萘普生、伊布洛芬(ibuprofen)、維生素 E、生物素等。亦已知包括許多硫代磷酸酯鍵之寡核苷酸結合至血清蛋白，因此，在主鏈中包括多個硫代磷酸酯鍵之短寡核苷酸，例如約 5 個鹼基、10 個鹼基、15 個鹼基或 20 個鹼基之寡核苷酸，在本發明中亦適用作配位體(例如 PK 調節配位體)。另外，結合血清組分(例如血清蛋白)之適體亦適用作本文所述之實施例中的 PK 調節配位體。

【0322】 本發明之配位體偶聯之寡核苷酸可藉由利用載有側懸反應性官能基之寡核苷酸來合成，該寡核苷酸係諸如衍生自將連結分子連接於寡核苷酸(如下所述)上者。此反應性寡核苷酸可直接與以下配位體反應：市售之配位體、經合成載有多種保護基中之任一者的配位體、或其上連接有連結部分之配位體。

【0323】 本發明之偶聯物中使用的寡核苷酸可便利及常規地經由熟知之固相合成技術製得。用於此類合成之設備係由包括例如 Applied Biosystems (Foster City, Calif.)之若干供應商出售。可另外或替代地採用此項技術中已知的用於此類合成之任何其他手段。亦已知使用類似技術來製備其他寡核苷酸，諸如硫代磷酸酯及烷化衍生物。

【0324】 在本發明之配位體偶聯之寡核苷酸(諸如本發明之載有配位體分子之序列特異性連結核苷)中，寡核苷酸及寡核苷利用以下各物在合適的 DNA 合成器上組裝：標準核苷酸或核苷前驅物、或已載有連結部分之核苷酸或核苷偶聯物前驅物、已載有配位體分子之配位體-核苷酸或核苷-偶聯物前驅物、或載有非核苷配位體之建構組元。

【0325】 當使用已載有連結部分的核苷酸-偶聯物前驅物時，通常完成序列特異性連結核苷之合成，且配位體分子接著與連結部分反應以形成配位體偶聯之寡核苷酸。在一些實施例中，本發明之寡核苷酸或連結核苷除市售及常規用於寡核苷酸合成中之標準亞磷醯胺及非標準亞磷醯胺之外亦使用衍生自配位體-核苷偶聯物之亞磷醯胺藉由自動合成器來合成。

i. 脂質偶聯物

【0326】 在一實施例中，配位體或偶聯物為脂質或基於脂質之分子。此類脂質或基於脂質之分子較佳結合血清蛋白，例如人血清白蛋白(HSA)。HSA 結合配位體允許偶聯物分佈於靶組織，例如，身體之非腎靶組織。例如，靶組織可為肝臟，包括肝臟之實質細胞。可結合 HSA 之其他分子亦可用作配位體。例如，

可使用萘普生或阿斯匹林。脂質或基於脂質之配位體可(a)提高對偶聯物之降解的抗性；(b)增強向靶細胞或細胞膜中之靶向或轉運；及/或(c)可用於調節與血清蛋白(例如 HSA)之結合。

【0327】 基於脂質之配位體可用於抑制，例如控制偶聯物與靶組織之結合。舉例而言，更強地結合至 HSA 的脂質或基於脂質之配位體將不太可能靶向腎，且因此不太可能自體內清除。不太強地結合至 HSA 的脂質或基於脂質之配位體可用於將偶聯物靶向腎。

【0328】 在另一態樣中，配位體為部分，例如維生素，其係由靶細胞(例如增殖細胞)攝取。示範性維生素包括維生素 A、E 及 K。

ii. 細胞滲透劑

【0329】 在另一態樣中，配位體為細胞滲透劑，較佳為螺旋細胞滲透劑。該試劑較佳為雙性的。示範性試劑為肽，諸如 tat 或觸角足蛋白。若該試劑為肽，則其可經修飾，包括肽基模擬物、反演體、非肽或偽肽鍵，以及 D-胺基酸之使用。螺旋試劑較佳為 α-螺旋試劑，其較佳具有親油相及疏油相。

【0330】 配位體可為肽或肽模擬物。肽模擬物(在本文中亦稱為寡肽模擬物)為能夠折疊成類似於天然肽之確定的三維結構之分子。肽及肽模擬物連接於寡核苷酸試劑可諸如藉由增加細胞識別及吸收影響寡核苷酸之藥物動力學分佈。肽或肽模擬物部分可為約 5-50 個胺基酸長，例如約 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 個胺基酸長。

【0331】 肽或肽模擬物可為例如細胞滲透肽、陽離子肽、雙性肽或疏水性肽(例如，主要由 Tyr、Trp 或 Phe 組成)。肽部分可為樹狀體肽、約束型肽或交聯肽。在另一替代方案中，肽部分可包括疏水性膜易位序列(MTS)。示範性含疏水性 MTS 之肽為具有胺基酸序列 AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 57)之 RFGF。RFGF 類似物(例如，含有疏水性 MTS 之胺基酸序列 AALLPVLLAAP (SEQ ID

NO: 58)亦可為靶向部分。肽部分可為「遞送」肽，其可能攜帶大的極性分子跨過細胞膜，包括肽、寡核苷酸及蛋白質。例如，已發現來自 HIV Tat 蛋白(GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 59) 及果蠅觸足蛋白(RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 60)之序列能夠用作遞送肽。肽或肽模擬物可由 DNA 之隨機序列編碼，諸如由噬菌體展示文庫或一珠一化(OBOC)組合文庫所鑑別之肽(Lam 等人, Nature, 354:82-84, 1991)。經由為了細胞靶向而併入之單體單元拴系至寡核苷酸試劑的肽或肽模擬物之實例為精胺酸-甘胺酸-天冬胺酸(RGD)-肽或 RGD 模擬物。肽部分之長度可在約 5 個胺基酸至約 40 個胺基酸範圍內。肽部分可具有結構修飾，以便提高穩定性或直接構象特性。可利用如下所述之任何結構修飾。

【0332】 用於本發明之組成物及方法中的 RGD 肽可為線性或環狀，並且可經修飾，例如糖基化或甲基化，以促進靶向特定的組織。含 RGD 之肽及肽模擬物可包括 D-胺基酸以及合成 RGD 模擬物。除 RGD 之外，亦可使用靶向整聯蛋白配位體之其他部分。此配位體之一些偶聯物靶向 PECAM-1 或 VEGF。

【0333】 細胞滲透肽能夠滲透細胞，例如，微生物細胞諸如細菌或真菌細胞，或哺乳動物細胞諸如人類細胞。微生物細胞滲透肽可為例如 α-螺旋線性肽(例如，LL-37 或 Ceropin P1)、含二硫鍵之肽(例如，α-防禦素、β-防禦素或牛抗菌肽(bactenecin))、或僅含一或兩個主要胺基酸之肽(例如，PR-39 或吲哚菌素(indolicidin))。細胞滲透肽亦可包括核定位信號(NLS)。例如，細胞滲透肽可為二分雙性肽，諸如 MPG，其衍生自 HIV-1 gp41 與 SV40 大 T 抗原之 NLS 的融合肽結構域(Simeoni 等人, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003)。

iii. 碳水化合物偶聯物

【0334】 在本發明之組成物及方法之一些實施例中，寡核苷酸進一步包括碳水化合物。碳水化合物偶聯之寡核苷酸有利於核酸之活體內遞送，以及適合在

活體內治療使用之組成物，如本文所述。如本文所用，「碳水化合物」係指一種化合物，它係由一或多個具有至少 6 個碳原子之單醣單元(其可為線性、分支或環狀)構成之碳水化合物本身，其中氧、氮或硫原子鍵結至各碳原子；或一種化合物，它具有碳水化合物部分作為其一部分，該碳水化合物部分係由一或多個具有至少 6 個碳原子之單醣單元(其可為線性、分支或環狀)構成，其中氧、氮或硫原子鍵結至各碳原子。代表性碳水化合物包括糖(單醣、二醣、三醣及含有約 4、5、6、7、8 或 9 個單醣單元之寡糖)及多醣，諸如澱粉、糖原、纖維素及多醣膠。特定的單醣包括 C5 及更高級(例如 C5、C6、C7 或 C8)糖；二醣及三醣，包括具有兩個或三個單醣單元(例如 C5、C6、C7 或 C8)之糖。

【0335】　在一實施例中，用於本發明之組成物及方法中的碳水化合物偶聯物為單醣。

【0336】　在一些實施例中，碳水化合物偶聯物進一步包括一或多種如上所述之額外配位體，諸如但不限於 PK 調節劑及/或細胞滲透肽。

【0337】　適用於本發明中之額外的碳水化合物偶聯物(及連結子)包括描述於 PCT 公佈第 WO 2014/179620 號及第 WO 2014/179627 號中之彼等，其各自之全部內容以引用之方式併入本文中。

iv. 連結子

【0338】　在一些實施例中，本文所述之偶聯物或配位體可用各種連結子連接於寡核苷酸，該等連結子係可裂解或不可裂解的。

【0339】　連結子通常包括直接鍵或原子，諸如氧或硫；單元諸如 NR^8、C(O)、C(O)NH、SO、SO_2、SO_2NH；或原子鏈，諸如但不限於經取代或未經取代之烷基、經取代或未經取代之烯基、經取代或未經取代之炔基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、雜芳基烷基、雜芳基烯基、雜芳基炔基、雜環烷基、雜環烯基、雜環炔基、芳基、雜芳基、雜環基、環烷基、環烯基、烷基芳基烷基、烷基芳

基烯基、烷基芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基雜芳基烷基、烷基雜芳基烯基、烷基雜芳基炔基、烯基雜芳基烷基、烯基雜芳基烯基、烯基雜芳基炔基、炔基雜芳基烷基、炔基雜芳基烯基、炔基雜芳基炔基、炔基雜環烷基、炔基雜環烯基、炔基雜環炔基、烯基雜環烷基、烯基雜環烯基、烯基雜環炔基、炔基雜環烷基、炔基雜環烯基、炔基雜環炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基雜芳基、烯基雜芳基、炔基雜芳基，其一或多個亞甲基可由 O、S、S(O)、SO_2、$N(R^8)$、C(O)、經取代或未經取代之芳基、經取代或未經取代之雜芳基、經取代或未經取代之雜環中斷或封端；其中 R^8 為氫、醯基、脂族或經取代之脂族。在一實施例中，連結子介於約 1-24 個原子、2-24、3-24、4-24、5-24、6-24、6-18、7-18、8-18 個原子、7-17、8-17、6-16、7-17 或 8-16 個原子之間。

【0340】　可裂解之連結基團在細胞外係足夠穩定的，但在進入靶細胞後，便裂解以釋放連結子結合在一起之兩個部分。在一較佳實施例中，可裂解之連結基團在靶細胞中或在第一參考條件(其可例如經選出以模擬或代表胞內條件)下比在受試者之血液中或在第二參考條件(其可例如經選出以模擬或代表見於血液或血清中之條件)下裂解快至少約 10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍或更多、或至少約 100 倍。

【0341】　可裂解之連結基團易受裂解劑之影響，例如 pH 值、氧化還原電位或降解分子之存在。一般而言，裂解劑在細胞內比在血清或血液中更普遍或在更高水準或活性下發現。此類降解劑之實例包括：氧化還原劑，其對於特定受質有選擇性或不具有受質特異性，包括例如氧化酶或還原酶或還原劑，諸如硫醇，存在於細胞中，其可藉由還原降解氧化還原可裂解之連結基團；酯酶；胞內體或因子，其可產生酸性環境，例如產生 5 或更低之 pH 值的彼等；酶，其可藉由

充當一般酸來水解或降解酸可裂解之連結基團；肽酶(其可為受質特異性的)及磷酸酶。

【0342】　可裂解之鍵聯基團(諸如二硫鍵)易受 pH 值之影響。人類血清之 pH 值為 7.4，而平均胞內 pH 值稍微較低，在約 7.1-7.3 範圍內。胞內體具有更酸性之 pH 值，在 5.5-6.0 範圍內，且溶酶體具有甚至更酸性之 pH 值，在約 5.0 下。一些連結子將具有可裂解之連結基團，該連結基團在較佳 pH 值下裂解，由此將來自配位體之陽離子脂質釋放至細胞內部或釋放至細胞之所需區室中。

【0343】　連結子可包括可由特定酶裂解之可裂解之連結基團。併入連結子中的可裂解之連結基團之類型可視有待靶向之細胞而定。例如，靶向肝臟之配位體可經由包括酯基之連結子連結至陽離子脂質。肝細胞富含酯酶，且因此，連結子在肝細胞中比在不富含酯酶之細胞類型中更有效地裂解。富含酯酶之其他細胞類型包括肺細胞、腎皮質細胞及睾丸細胞。

【0344】　當靶細胞類型富含肽酶(諸如肝細胞及滑膜細胞)時，可使用含有肽鍵之連結子。

【0345】　一般而言，藉由測試降解劑(或條件)裂解候選連結基團之能力，可評估候選可裂解之連結基團的適用性。亦需要測試候選可裂解之連結基團抵抗在血液中或與其他非靶組織接觸時之裂解的能力。因此，可確定第一條件與第二條件之間對裂解之相對易感性，其中該第一經選出以表示在靶細胞中之裂解且該第二經選出以表示在其他組織或生物流體(例如血液或血清)中之裂解。評估可在無細胞系統、細胞、細胞培養物、器官或組織培養物、或整個動物中進行。可能有用的是在無細胞或培養條件下進行初步評估，並藉由對整個動物之進一步評估加以確認。在較佳實施例中，有用的候選化合物在細胞(或在活體外條件下，其經選出以模擬胞內條件)中比在血液或血清(或在活體外條件下，其經選出

以模擬胞外條件)中裂解快至少約 2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90 或約 100 倍。

a. 氧化還原可裂解之連結基團

【0346】 在一實施例中，可裂解之連結基團為在還原或氧化後裂解的氧化還原可裂解之連結基團。還原性可裂解之連結基團之一實例為二硫化物連結基團(--S--S--)。為了確定候選可裂解之連結基團是否為合適的「還原性可裂解之連結基團」或例如是否適於與特定的寡核苷酸部分及特定靶向劑一起使用，可查看本文所述之方法。例如，候選物可藉由使用此項技術中已知之試劑與二硫蘇糖醇(DTT)或其他還原劑一起培育來評價，該等試劑模擬在細胞(例如靶細胞)中所觀察到之裂解速率。亦可在經選出以模擬血液或血清條件之條件下評價該等候選物。在一實施例中，候選化合物在血液中裂解至多約 10%。在其他實施例中，有用的候選化合物在細胞(或在活體外條件下，其經選出以模擬胞內條件)中比在血液(或在活體外條件下，其經選出以模擬胞外條件)中降解快至少約 2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90 或約 100 倍。候選化合物之裂解率可使用標準酶動力學檢定，在經選出以模擬胞內培養基且與經選出以模擬胞外培養基之條件相比的條件下測定。

b. 基於磷酸酯的可裂解之連結基團

【0347】 在另一實施例中，可裂解之連結子包括基於磷酸酯的可裂解之連結基團。基於磷酸酯的可裂解之連結基團係由降解或水解磷酸基團之試劑來裂解。在細胞中裂解磷酸基團的試劑之一實例為細胞中之酶，諸如磷酸酶。基於磷酸酯之連結基團之實例為-O-P(O)(OR^k)-O-、-O-P(S)(OR^k)-O-、-O-P(S)(SR^k)-O-、-S-P(O)(OR^k)-O-、-O-P(O)(OR^k)-S-、-S-P(O)(OR^k)-S-、-O-P(S)(OR^k)-S-、-S-P(S)(OR^k)-O-、-O-P(O)(R^k)-O-、-O-P(S)(R^k)-O-、-S-P(O)(R^k)-O-、-S-P(S)(R^k)-O-、-S-P(O)(R^k)-S-、-O-P(S)(R^k)-S-。可使用類似於如上所述之方法評價此等候選物。

c. 酸可裂解之連結基團

【0348】 在另一實施例中，可裂解之連結子包括酸可裂解之連結基團。酸可裂解之連結基團為在酸性條件下裂解之連結基團。在較佳實施例中，酸可裂解之連結基團在 pH 值約 6.5 或較低(例如，約 6.0、5.75、5.5、5.25、5.0 或較低)之酸性環境中或藉由試劑諸如可充當一般酸之酶來裂解。在細胞中，特定的低 pH 細胞器諸如胞內體及溶酶體可為酸可裂解之連結基團提供裂解環境。酸可裂解之連結基團之實例包括但不限於腙、酯及胺基酸之酯。酸可裂解之基團可具有通式–C=NN--、C(O)O 或--OC(O)。較佳實施例為當連接於酯(烷氧基)之氧的碳為芳基、經取代之烷基或第三烷基諸如二甲基戊基或第三丁基時。可使用類似於如上所述之方法評價此等候選物。

d. 基於酯之連結基團

【0349】 在另一實施例中，可裂解的連結子包括基於酯之可裂解的連結基團。基於酯之可裂解的連結基團在細胞中由酶諸如酯酶及醯胺酶裂解。基於酯之可裂解的連結基團之實例包括但不限於伸烷基、伸烯基及伸炔基之酯。酯可裂解之連結基團具有通式--C(O)O--或--OC(O)--。可使用類似於如上所述之方法評價此等候選物。

e. 基於肽之裂解基團

【0350】 在又一實施例中，可裂解的連結子包括基於肽之可裂解的連結基團。基於肽之可裂解的連結基團在細胞中係由酶諸如肽酶及蛋白酶裂解。基於肽之可裂解的連結基團為在胺基酸之間形成的肽鍵以產生寡肽(例如二肽、三肽等)及多肽。基於肽之可裂解的基團不包括醯胺基(--C(O)NH--)。醯胺基可在任何伸烷基、伸烯基或伸炔基之間形成。肽鍵為在胺基酸之間形成的一種特殊類型之醯胺鍵以產生肽及蛋白質。基於肽之裂解基團通常限於胺基酸之間形成的肽鍵(亦即醯胺鍵)，以產生肽及蛋白質且不包括整個醯胺官能基。基於肽之可裂解

的連結基團具有通式--NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)--，其中 RA 及 RB 為兩個相鄰胺基酸之 R 基團。可使用類似於如上所述之方法評價此等候選物。

【0351】 在一實施例中，本發明之寡核苷酸經由連結子偶聯至醣。連結子包括二價及三價支鏈連結子基團。本發明之組成物經由連結子之示範性寡核苷酸醣偶聯物及方法包括但不限於 PCT 公佈第 WO 2018/195165 號之式 24-35 中所述之彼等。

【0352】 教導寡核苷酸偶聯物之製備的代表性美國專利包括但不限於美國專利第 4,828,979 號；第 4,948,882 號；第 5,218,105 號；第 5,525,465 號；第 5,541,313 號；第 5,545,730 號；第 5,552,538 號；第 5,578,717, 5,580,731 號；第 5,591,584 號；第 5,109,124 號；第 5,118,802 號；第 5,138,045 號；第 5,414,077 號；第 5,486,603 號；第 5,512,439 號；第 5,578,718 號；第 5,608,046 號；第 4,587,044 號；第 4,605,735 號；第 4,667,025 號；第 4,762,779 號；第 4,789,737 號；第 4,824,941 號；第 4,835,263 號；第 4,876,335 號；第 4,904,582 號；第 4,958,013 號；第 5,082,830 號；第 5,112,963 號；第 5,214,136 號；第 5,082,830 號；第 5,112,963 號；第 5,214,136 號；第 5,245,022 號；第 5,254,469 號；第 5,258,506 號；第 5,262,536 號；第 5,272,250 號；第 5,292,873 號；第 5,317,098 號；第 5,371,241 號；第 5,391,723 號；第 5,416,203 號；第 5,451,463 號；第 5,510,475 號；第 5,512,667 號；第 5,514,785 號；第 5,565,552 號；第 5,567,810 號；第 5,574,142 號；第 5,585,481 號；第 5,587,371 號；第 5,595,726 號；第 5,597,696 號；第 5,599,923 號；第 5,599,928 號及第 5,688,941 號；第 6,294,664 號；第 6,320,017 號；第 6,576,752 號；第 6,783,931 號；第 6,900,297 號；第 7,037,646 號；第 8,106,022 號，其各自之全部內容據此以引用之方式併入本文中。

【0353】 在某些情況下，寡核苷酸之核苷酸可由非配位體基團修飾。許多非配位體分子已偶聯至寡核苷酸，以便增加寡核苷酸之活性、細胞分佈或細胞攝取，並且用於進行此類偶聯之程序可獲自科學文獻中。此類非配位體部分包括

脂質部分，諸如膽固醇(Kubo, T.等人, Biochem. Biophys. Res. Comm, 2007, 365(1):54-61；Letsinger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553)、膽酸(Manoharan 等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053)、硫醚例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan 等人, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306；Manoharan 等人, Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3:2765)、硫代膽固醇(Oberhauser 等人, Nucl. Acids Res., 1992, 20:533)、脂肪鏈例如十二烷二醇或十一烷基(Saison-Behmoaras 等人, EMBO J., 1991, 10:111；Kabanov 等人, FEBS Lett., 1990, 259:327；Svinarchuk 等人, Biochimie, 1993, 75:49)、磷脂例如二-十六烷基-外消旋-甘油或 1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油基-3-H-膦酸酯三乙銨(Manoharan 等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651；Shea 等人, Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777)、多胺或聚乙二醇鏈(Manoharan 等人, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969)、或金剛烷乙酸(Manoharan 等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651)、軟脂基部分(Mishra 等人, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229)、或十八胺或己基胺基-羰基-羥膽固醇部分(Crooke 等人, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923)。上文已列舉教導此類寡核苷酸偶聯物之製備的代表性美國專利。典型偶聯方案涉及合成在序列之一或多個位置處載有胺基連結子之寡核苷酸。胺基接著與使用適當偶合試劑或活化試劑經偶聯之分子反應。偶聯反應可用仍結合至固體支撐體之寡核苷酸進行或在寡核苷酸裂解之後在液相中進行。藉由 HPLC 純化寡核苷酸偶聯物通常得到純偶聯物。

III. 醫藥用途

【0354】 本發明之寡核苷酸可用於治療可經由腺苷之去胺來治療的任何病症。例如，任何病症係由鳥苷突變為腺苷、過早終止密碼子之引入或不希望有的蛋白質之表現引起。在一些實施例中，本發明之寡核苷酸當向受試者投與時可導致鳥苷向腺苷突變之校正。在一些實施例中，本發明之寡核苷酸可導致過

早終止密碼子之關閉，以便表現所需蛋白質。在一些實施例中，本發明之寡核苷酸可導致不希望有的蛋白質之表現的抑制。

【0355】 使用根據本發明之寡核苷酸編輯的尤其感興趣之靶腺苷為彼等：其為定義關鍵功能或特徵之氨基酸殘基之密碼子的一部分，該等功能或特徵係諸如催化位點、其他蛋白質之結合位點、由受質進行之結合、定位結構域、共轉譯或轉譯後修飾諸如醣基化、羥基化、豆蔻醯化及由蛋白酶進行之蛋白質裂解(以便使蛋白質成熟及/或作為胞內途徑之一部分)。

【0356】 許多遺傳性疾病係由 G 至 A 突變引起，且它們係有待由本發明之寡核苷酸治療的可能之疾病，因為在突變之靶腺苷處之腺苷去胺作用能將突變逆轉為野生型。然而，逆轉為野生型並非總是獲得有益效果所必需的。若野生型核苷酸並非 G，則在靶標中 A 至 G 之修飾亦可為有益的。在某些情形下，此可經預測為該情況，在另一些情形下，則可能需要一些測試。在某些情形下，在靶 RNA 中 A 至 G(當野生型不為 G 時)之修飾可為沉默的(未轉譯成不同胺基酸)，或相反為非結果的(例如，胺基酸經取代，但其構成不破壞蛋白質結構及功能之保守取代)，或者胺基酸為對變化具有一定穩健性的功能結構域之一部分。若根據本發明之編輯所造成的 A 至 G 之變化在非編碼 RNA 或 RNA 之非編碼部分中，則結果亦可為無關緊要的或沒有原始突變嚴重。熟習此項技術者應理解本發明之適用性極廣泛且甚至不限於預防或治療疾病。本發明亦可用於修飾轉錄本以研究其效果，即使，或特別是當此類修飾誘導疾病狀態時，例如在細胞或非人類動物模型中。

【0357】 可用本發明之寡核苷酸預防及/或治療的遺傳性疾病之實例為其中靶 RNA 中的一或多個腺苷之修飾將造成(潛在)有益變化之任何疾病。

【0358】 本發明不限於糾正突變，因為藉由應用本發明之寡核苷酸使野生型序列變為突變序列相反可為有用的。修飾野生型腺苷可能有利的一個實例為例

如藉由修飾腺苷造成外顯子之跳躍，該腺苷碰巧為剪接該外顯子所需之分支位點。另一實例為，腺苷定義或為蛋白質結合之識別序列之一部分或參與限定 RNA 之穩定性的二級結構。如上所述，因此，本發明可用於提供用於疾病之研究工具，引入新突變，該新突變與現有突變相比危害較小。

【0359】 使用本文所揭露之寡核苷酸進行的腺苷之去胺包括腺苷去胺之任何水準，例如在靶序列內至少 1 個去胺之腺苷(例如，在靶序列中至少 1、2、3 或 3 個以上去胺之腺苷)。

【0360】 腺苷去胺作用可由與對照水準相比靶序列內腺苷之絕對或相對水準之降低來評價。對照水準可為在此項技術中利用的任何類型之對照水準，例如，預給予之基線水準，或由未經治療或用對照(諸如，例如僅緩衝劑之對照或無活性劑之對照)治療之類似受試者、細胞或樣品確定之水準。

【0361】 因為 ADAR 之酶活性將腺苷轉化為肌苷，所以腺苷之去胺作用可替代地由與對照水準相比靶序列內肌苷之絕對或相對水準之提高來評價。類似地，對照水準可為此項技術中利用的任何類型之對照水準，例如，預給予之基線水準，或由未經治療或用對照(諸如，例如僅緩衝劑之對照或無活性劑之對照)治療之類似受試者、細胞或樣品確定之水準。

【0362】 可使用此項技術中已知用於確定多核苷酸序列之核苷酸組成的任何方法來評價靶序列內腺苷及/或肌苷之水準。例如，靶序列內腺苷或肌苷之相對或絕對水準可使用包括但不限於以下之核酸序列技術來評價：Sanger 定序方法、Next Generation Sequencing (NGS；例如焦磷酸定序、藉由可逆性終止子化學之定序、藉由連接之定序及即時定序)，諸如在市售平台(例如 Illumina、Qiagen、Pacific Biosciences、Thermo Fisher、Roche 及 Oxford Nanopore Technologies)上所提供之彼等。可在來自 Applied Biosystems、Roche、Stratagene、Cepheid、Eppendorf 或 Bio-Rad Laboratories 之市售平台上使用即時聚合酶鏈反應(亦稱為 qPCR)進行

NGS 之靶序列的純系擴增。另外或替代地，可在市售平台上使用乳液 PCR 方法諸如 Bio-Rad Laboratories 之 Droplet Digital PCR 進行靶序列之擴增。

【0363】 在某些實施例中，代替標記可用於偵測靶序列內腺苷之去胺作用。舉例而言，用本揭示案之寡核苷酸對患有涉及 G 至 A 突變之遺傳性病症的受試者之有效治療(如藉由可接受之診斷及監測標準所證明)可理解為表明了臨床上相關之腺苷去胺作用。在某些實施例中，該方法包括臨床上相關之腺苷去胺作用，例如，如由在用本揭示案之寡核苷酸治療受試者之後的臨床上相關結果所證明。

【0364】 感興趣之基因的腺苷去胺作用可藉由以下來表示：與實質上同第一細胞或細胞組相同但沒有接受治療之第二細胞或細胞組(對照細胞未用寡核苷酸治療或未用靶向感興趣之基因的寡核苷酸來治療)相比，由第一細胞或細胞組(此類細胞可存在於例如來源於受試者之樣品中)所表現之 mRNA 水準的提高或降低，其中感興趣之基因已轉錄且該或該等細胞已經治療(例如，藉由使該或該等細胞與本揭示案之寡核苷酸接觸，或藉由向其中存在細胞之受試者投與本發明之寡核苷酸)，以使得感興趣之基因之表現有所增加或減少。感興趣之基因之 mRNA 水準的提高或降低程度可根據以下來表示：

$$\frac{(\text{對照紅帕卡之mRNA}) - (\text{經治療之紅帕卡之mRNA})}{(\text{對照紅帕卡之mRNA})} \times 100\%$$

【0365】 在其他實施例中，基因水準之變化可依據參數之減小來評價，該參數與感興趣之基因之表現在功能上相關聯，例如，感興趣之基因之蛋白質表現或蛋白質下游之信號傳導。感興趣之基因水準之變化可在表現感興趣之基因(來自表現構築體之內源性或異源性基因)的任何細胞中且藉由此項技術中已知之任何檢定來測定。

【0366】 感興趣之基因之表現水準的變化可由以下來表示：由感興趣之基因(該基因係由細胞或細胞組表現)產生的蛋白質之水準之提高或降低(例如，在來源於受試者之樣品中表現的蛋白質水準)。如上關於 mRNA 抑制之評估所說明，在經治療之細胞或細胞組中蛋白質表現水準之變化可類似地表示為在對照細胞或細胞組中蛋白質水準之百分比。

【0367】 可用於評價 3 個感興趣之基因之表現中的變化之對照細胞或細胞組包括尚未與本揭示案之寡核苷酸接觸之細胞或細胞組。例如，對照細胞或細胞組可來源於在用寡核苷酸治療受試者之前的單個受試者(例如人類或動物受試者)。

【0368】 由細胞或細胞組表現的感興趣之基因之 mRNA 水準可使用此項技術中已知用於評價 mRNA 表現之任何方法來測定。在一實施例中，藉由偵測所轉錄之多核苷酸或其部分(例如感興趣之基因之 mRNA)來測定樣品中感興趣之基因之表現水準。RNA 可使用包括以下之 RNA 提取技術自細胞中提取：例如使用酸酚/異硫氰酸胍提取(RNAzol B; Biogenesis)、RNEASY™ RNA 製劑套組(Qiagen)或 PAXgene (PreAnalytix, Switzerland)。利用核糖核酸雜交之典型檢定格式包括核連綴轉錄檢定、RT-PCR、RNase 保護檢定、北方墨點、原位雜交及微陣列分析。可使用 PCT 公佈 WO2012/177906 中所述之方法偵測感興趣之基因之循環 mRNA，該專利之全部內容據此以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，使用核酸探針測定感興趣之基因之表現水準。如本文所用，術語「探針」係指能夠選擇性地結合至特定序列(例如 mRNA 或多肽)之任何分子。探針可由熟習此項技術者合成或來源於適當的生物製劑。探針可特別設計為經標記的。可用作探針之分子之實例包括但不限於 RNA、DNA、蛋白質、抗體及有機分子。

【0369】 經分離之 mRNA 可用於包括但不限於以下之雜交或擴增檢定中：南方或北方分析、聚合酶鏈反應(PCR)分析及探針陣列。用於測定 mRNA 水準之一

種方法涉及使經分離之 mRNA 與可雜交至感興趣之基因之 mRNA 的核酸分子(探針)接觸。在一實施例中，例如藉由使經分離之 mRNA 在瓊脂糖凝膠上跑膠並將 mRNA 自凝膠轉移至膜(諸如硝酸纖維)上，將 mRNA 固定在固體表面上並與探針接觸。在一替代實施例，將探針固定在固體表面上並使 mRNA 與探針在例如 AFFYMETRIX 基因晶片陣列中接觸。熟練技術人員可易於採納用於測定感興趣之基因之 mRNA 水準的已知 mRNA 偵測方法。

【0370】 用於測定樣品中的感興趣之基因之表現水準的一種替代方法涉及例如樣品中 mRNA 之核酸擴增及/或逆轉錄酶過程(以製備 cDNA)，例如藉由 RT-PCR (在 Mullis, 1987, 美國專利第 4,683,202 號中列出之實驗實施例)、連接酶鏈反應(Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193)、自我持續序列複製(Guatelli 等人 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、轉錄擴增系統(Kwoh 等人 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-Beta 複製酶(Lizardi 等人 (1988) Bio/Technology 6:1197)、滾環式複製(Lizardi 等人，美國專利第 5,854,033 號)或任何其他核酸擴增方法，接著使用熟習此項技術者所熟知之技術偵測擴增分子。若核酸分子以極低數量存在，則此等偵測流程尤其適用於偵測該類分子。在本發明之具體態樣中，感興趣之基因之表現水準係藉由定量螢光 RT-PCR (亦即 TAQMAN™ 系統)或 DUAL-GLO®螢光素酶檢定來測定。

【0371】 感興趣之基因之 mRNA 的表現水準可使用膜墨點(諸如在雜交分析諸如北方、南方、斑點及其類似分析中使用)或微孔、樣品管、凝膠、珠粒或纖維(或任何固體支撐體，包括結合之核酸)來監測。參見美國專利第 5,770,722 號；第 5,874,219 號；第 5,744,305 號；第 5,677,195 號；及第 5,445,934 號，其以引用之方式併入本文中。基因表現水準之測定亦可包括使用溶液中之核酸探針。

【0372】 在一些實施例中，使用分支 DNA (bDNA)檢定或即時 PCR (qPCR)來評估 mRNA 之表現水準。在本文提出之實例中描述並例示此種 PCR 方法之用途。此類方法亦可用於偵測感興趣之基因之核酸。

【0373】 藉由表現感興趣之基因產生的蛋白質之水準可使用此項技術中已知用於量測蛋白質水準之任何方法來測定。此類方法包括例如：電泳、毛細管電泳、高效液相層析法(HPLC)、薄層層析法(TLC)、超擴散層析法、液體或凝膠沉澱素反應、吸收光譜法、比色檢定、分光光度檢定、流式細胞術、免疫擴散(單向或雙向)、免疫電泳、西方墨點、放射免疫測定(RIA)、酶聯免疫吸附檢定(ELISA)、免疫螢光檢定、電化學發光檢定及其類似方法。此類檢定亦可用於偵測蛋白質，指示由感興趣之基因產生的蛋白質之存在或複製。另外，上述檢定可用於報告感興趣之 mRNA 序列的變化，其造成蛋白質功能之恢復或變化，由此提供治療效果及對受試者之益處、治療受試者之病症及/或減輕受試者之病症的症狀。

【0374】 在本發明方法之一些實施例中，向受試者投與本揭示案之寡核苷酸以便將該寡核苷酸遞送至該受試者內之特定部位。感興趣之基因之表現的變化可使用在來源於受試者內特定部位之樣品中由感興趣之基因產生的 mRNA 或蛋白質之水準或水準變化的量測來評價。

【0375】 在其他實施例中，投與有效量之寡核苷酸且持續一段時間以造成以下一項(或多項，例如兩項或兩項以上、三項或三項以上、四項或四項以上)：(a)在感興趣之基因之靶序列內腺苷數目之減少，(b)病症發作之延遲，(c)受試者生存期之延長，(d)受試者無進展生存期之延長，(e)蛋白質功能之恢復或變化，及(f)症狀之減輕。

【0376】 治療與 G 至 A 突變有關之病症亦可導致與未治療之群相比經治療之受試者群之死亡率的降低。例如，死亡率降低了大於 2% (例如大於 5%、10%或

25%)。經治療之受試者群之死亡率的降低可藉由任何可再現之手段量測，例如，藉由在開始用本文所述之化合物或本文所述之化合物之醫藥學上可接受之鹽治療之後計算針對群的每單位時間之疾病相關之死亡的平均數目。群之死亡率的降低亦可例如藉由在完成第一輪用本文所述之化合物或本文所述之化合物之醫藥學上可接受之鹽治療之後計算針對群的每單位時間之疾病相關之死亡的平均數目來量測。

A. 寡核苷酸之遞送

【0377】 向細胞，例如受試者諸如人類受試者(例如，有此需要之受試者，諸如患有病症之受試者)內之細胞遞送本發明之寡核苷酸可以許多不同方式達成。例如，遞送可藉由使細胞與本發明之寡核苷酸在活體外或活體內接觸來進行。活體內遞送亦可藉由向受試者投與包括寡核苷酸之組成物直接進行。或者，活體內遞送可藉由投與編碼並指導寡核苷酸之表現的一或多個載體來間接進行。活體外與活體內接觸細胞之方法之組合亦為可能的。接觸細胞可為直接或間接的，如上所論述。此外，接觸細胞可經由靶向配位體(包括本文所述或此項技術中已知之任何配位體)來實現。在一些實施例中，靶向配位體為碳水化合物部分，例如 $GalNAc_3$ 配位體，或將寡核苷酸導向感興趣之位點的任何其他配位體。細胞可包括中樞神經系統之彼等細胞或肌細胞。此等替代物在下文中進一步論述。

【0378】 細胞與寡核苷酸之接觸可在活體外或活體內完成。此可適於與本發明之寡核苷酸一起使用(參見，例如 Akhtar S.及 Julian R L., (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 以及 WO94/02595，其以引用之方式全部併入本文中)。對於活體內遞送，遞送寡核苷酸分子所考慮之因素包括例如所遞送分子之生物穩定性、非特異性作用之預防、以及所遞送分子在靶組織中之積聚。寡核苷酸之非特異性作用可藉由局部投藥最小化，例如藉由直接注射或植入組織中或局部投與該製劑。向治療部位之局部投藥使藥劑之局部濃度最大化，限制藥劑對於全

身組織之暴露(否則全身組織將受到該藥劑之損害或全身組織會降解該藥劑)，以及允許有待投與之寡核苷酸分子之較低總劑量。

【0379】 對於全身投與寡核苷酸以治療疾病，該寡核苷酸可包括替代性核鹼基、替代性糖部分及/或替代性核苷間鍵，或替代地使用藥物遞送系統進行遞送；兩種方法皆能阻止核酸內切酶及核酸外切酶在活體內對寡核苷酸之快速降解。寡核苷酸或醫藥載劑之修飾亦可允許寡核苷酸組成物靶向靶組織並且避免不希望有的脫靶效應。寡核苷酸分子可藉由化學偶聯至親油性基團諸如膽固醇來修飾以增加細胞攝取並防止降解。在一替代實施例中，寡核苷酸可使用以下藥物遞送系統遞送：諸如奈米顆粒、脂質奈米顆粒、polyplex 奈米顆粒、lipoplex 奈米顆粒、樹狀體、聚合物、脂質體或陽離子遞送系統。帶正電之陽離子遞送系統促進寡核苷酸分子(帶負電)之結合且亦增加在帶負電之細胞膜處的相互作用，以允許細胞對寡核苷酸之有效攝取。陽離子脂質、樹狀體或聚合物可結合至寡核苷酸，或經誘導以形成包住寡核苷酸之囊泡或膠束。囊泡或膠束之形成進一步防止寡核苷酸在全身投與時之降解。一般而言，此項技術中已知之遞送核酸之任何方法皆可適於遞送本發明之寡核苷酸。用於製備及投與陽離子寡核苷酸複合物之方法係在熟習此項技術者之能力範圍內(參見，例如 Sorensen, D R., 等人 (2003) J. Mol. Biol 327:761-766；Verma, U N.等人, (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300；Arnold, A S 等人, (2007) J. Hypertens. 25:197-205，其以引用之方式全部併入本文中)。適用於全身遞送寡核苷酸的藥物遞送系統之一些非限制性實例包括 DOTAP (Sorensen, D R.等人(2003), 上述；Verma, U N.等人, (2003), 上述)；Oligofectamine，亦即「固體核酸脂質顆粒」(Zimmermann, T S.等人, (2006) Nature 441:111-114)；心磷脂(Chien, P Y.等人, (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328；Pal, A.等人, (2005) Int J. Oncol. 26:1087-1091)；聚乙烯亞胺(Bonnet M E.等人, (2008) Pharm. Res. Aug 16 Epub ahead of print；Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol.

71659)；Arg-Gly-Asp (RGD)肽(Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3:472-487)；及聚醯胺-胺(Tomalia, D A.等人, (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67；Yoo, H.等人, (1999) Pharm. Res. 16:1799-1804)。在一些實施例中，寡核苷酸與環糊精形成複合物以用於全身投與。投藥方法及寡核苷酸與環糊精之醫藥組成物可見於美國專利第7,427,605 號中，該專利以引用之方式全部併入本文中。在一些實施例中，本發明之寡核苷酸係藉由 polyplex 或 lipoplex 奈米顆粒遞送。投藥方法及寡核苷酸與 polyplex 奈米顆粒及 lipoplex 奈米顆粒之醫藥組成物可見於美國專利申請第 2017/0121454 號；第 2016/0369269 號；第 2016/0279256 號；第 2016/0251478 號；第 2016/0230189 號；第 2015/0335764 號；第 2015/0307554 號；第 2015/0174549 號；第 2014/0342003 號；第 2014/0135376 號；及第 2013/0317086 號中，該等專利以引用之方式全部併入本文中。

i. 膜分子組裝遞送方法

【0380】 本發明之寡核苷酸亦可使用多種膜分子組裝遞送方法遞送，包括此項技術中已知之聚合、生物可降解之微粒或微膠囊遞送裝置。例如，膠體分散系統可用於靶向遞送本文所述之寡核苷酸試劑。膠體分散系統包括大分子複合物、奈米膠囊、微球體、珠粒、及基於脂質之系統，包括水包油乳液、膠束、混合膠束及脂質體。脂質體為適用作活體外及活體內遞送媒介物之人工膜囊泡。已顯示尺寸在 0.2-4.0 μm 範圍內之大單層囊泡(LUV)封裝相當大百分比的含有大分子之水性緩衝液。脂質體適用於將活性成分轉移並遞送至作用位點。因為脂質體膜在結構上類似於生物膜，所以當將脂質體施加於組織時，脂質體雙層與細胞膜融合。隨著脂質體與細胞融合之進展，包括寡核苷酸之內部水性內容物遞送至細胞中，其中寡核苷酸可特異性地結合至靶 RNA 並且可介導 RNase H 介導之基因沉默。在一些情況下，脂質體亦特異性地靶向，以例如將寡核苷酸導向特定的細胞類型。脂質體之組成物通常為磷脂之組合，通常與類固醇尤

其是膽固醇之組合。亦可使用其他磷脂或其他脂質。脂質體之物理特徵視 pH 值、離子強度及二價陽離子之存在而定。

【0381】 含有寡核苷酸之脂質體可藉由多種方法來製備。在一實例中，將脂質體之脂質組分溶於清潔劑中以便由脂質組分形成膠束。例如，脂質組分可為雙性陽離子脂質或脂質偶聯物。清潔劑可具有高臨界膠束濃度並且可為非離子的。示範性清潔劑包括膽酸鹽、CHAPS、辛基葡萄糖苷、去氧膽酸鹽及月桂醯基肌胺酸。接著將寡核苷酸製劑添加至包括脂質組分之膠束中。脂質上之陽離子基團與寡核苷酸相互作用並且凝聚在寡核苷酸周圍以形成脂質體。凝聚之後，例如藉由滲析移除清潔劑以產生寡核苷酸之脂質體製劑。

【0382】 必要時，在凝聚反應期間，可例如藉由受控添加來添加有助於凝聚之載劑化合物。例如，載劑化合物可為除核酸以外之聚合物(例如精胺或亞精胺)。亦可調節 pH 值以促進凝聚。

【0383】 用於產生穩定的多核苷酸遞送媒介物(其中併入有多核苷酸/陽離子脂質複合物作為遞送媒介物之結構組分)之方法進一步描述於例如 WO 96/37194 中，該專利之全部內容以引用之方式併入本文中。脂質體形成亦可包括以下文獻中所述之示範性方法之一或多個態樣：Feigner, P. L.等人, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:7413-7417；美國專利第 4,897,355 號；美國專利第 5,171,678 號；Bangham 等人, (1965) M. Mol. Biol. 23:238；Olson 等人, (1979) Biochim. Biophys. Acta 557:9；Szoka 等人, (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194；Mayhew 等人, (1984) Biochim. Biophys. Acta 775:169；Kim 等人, (1983) Biochim. Biophys. Acta 728:339；以及 Fukunaga 等人, (1984) Endocrinol. 115:757。用於製備用作遞送媒介物的具有適當尺寸之脂質聚集體的常用技術包括超聲處理及凍融加擠壓(參見，例如 Mayer 等人, (1986) Biochim. Biophys. Acta 858:161。當需要始終較小(50 至 200 nm)且相對較均勻之聚集體時，可使用微流體化(Mayhew 等人, (1984)

Biochim. Biophys. Acta 775:169。此等方法容易適於將寡核苷酸製劑包裝至脂質體中。

【0384】 脂質體可分為兩大類。陽離子脂質體為帶正電之脂質體，其與帶負電之核酸分子相互作用以形成穩定的複合物。帶正電之核酸/脂質體複合物結合至帶負電之細胞表面並於胞內體中內化。由於胞內體內之酸性 pH 值，脂質體破裂，將其內容物釋放至細胞胞質中(Wang 等人 (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., 147:980-985)。

【0385】 pH 敏感性或帶負電之脂質體截留核酸，而非與其形成之複合物。由於核酸與脂質皆帶相似電荷，所以存在排斥而非複合物形成。儘管如此，一些核酸仍截留在此等脂質體內之水性環境中。pH 敏感性脂質體已用於將編碼胸苷激酶基因之核酸遞送至培養中之細胞單層。在靶細胞中偵測到外源基因之表現(Zhou 等人 (1992) Journal of Controlled Release, 19:269-274)。

【0386】 一種主要類型之脂質體組成物包括除天然來源之磷脂醯膽鹼以外的磷脂。中性脂質體組成物例如可由二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)或二軟脂醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)形成。陰離子脂質體組成物一般由二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油形成，而陰離子膜融合脂質體主要由二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)形成。另一種類型之脂質體組成物係由磷脂醯膽鹼(PC)諸如例如大豆 PC 及卵 PC 形成。另一種類型係由磷脂及/或磷脂醯膽鹼及/或膽固醇之混合物形成。

【0387】 將脂質體在活體外及活體內引入細胞中的其他方法之實例包括美國專利第 5,283,185 號；美國專利第 5,171,678 號；WO 94/00569；WO 93/24640；WO 91/16024；Feigner, (1994) J. Biol. Chem. 269:2550；Nabel, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307；Nabel, (1992) Human Gene Ther. 3:649；Gershon, (1993) Biochem. 32:7143；以及 Strauss, (1992) EMBO J. 11:417。

【0388】 亦已檢查非離子脂質體系統以確定其在向皮膚遞送藥物中之效用，尤其是包括非離子界面活性劑及膽固醇之系統。包括 NOVASOME™ I (甘油二月桂酸酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)及 NOVASOME™ II (甘油二硬脂酸酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)之非離子脂質體調配物係用於將環孢菌素-A 遞送至小鼠皮膚之真皮中。結果表明，此類非離子脂質體系統有效促進環孢菌素 A 向皮膚之不同層中之沉積(Hu 等人, (1994) S.T.P.Pharma. Sci., 4(6):466)。

【0389】 脂質體亦可為空間上穩定之脂質體，包括一或多種專化脂質，其造成與缺乏此類專化脂質之脂質體相比循環壽命之增加。空間上穩定之脂質體之實例為彼等：其中脂質體之形成囊泡之脂質部分之一部分(A)包括一或多種糖脂，諸如單唾液酸神經節苷脂 G_{M1}，或(B)係以一或多種親水性聚合物諸如聚乙二醇(PEG)部分衍生而來。雖然不希望受任何特定理論束縛，但在此項技術中認為，至少對於含有神經節苷脂、鞘磷脂或 PEG 衍生之脂質的空間上穩定之脂質體而言，此等空間上穩定之脂質體的循環半衰期之增加係由於網狀內皮系統(RES)之細胞之攝取的減少(Allen 等人, (1987) FEBS Letters, 223:42；Wu 等人, (1993) Cancer Research, 53:3765)。

【0390】 包括一或多種醣脂之各種脂質體為此項技術中已知的。Papahadjopoulos 等人(Ann. N.Y. Acad. Sci., (1987), 507:64)報導單唾液酸神經節苷脂 G^{M1}、半乳糖腦苷脂硫酸酯及磷脂醯肌醇改良脂質體之血液半衰期的能力。此等研究結果係由 Gabizon 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1988), 85:6949)闡述。Allen 等人之美國專利第 4,837,028 號及 WO 88/04924 揭露包括(1)鞘磷脂及(2)神經節苷脂 G_{M1} 或半乳糖腦苷脂硫酸酯之脂質體。美國專利第 5,543,152 號(Webb 等人)揭露包括鞘磷脂之脂質體。包括 1,2-sn-二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼之脂質體揭露於 WO 97/13499 (Lim 等人)中。

【0391】 在一實施例中，使用陽離子脂質體。陽離子脂質體具有能夠融合至細胞膜之優點。非陽離子脂質體雖然不能有效地與質膜融合，但在活體內由巨噬細胞攝取並且可用於將寡核苷酸遞送至巨噬細胞。

【0392】 脂質體之其他優點包括：由天然磷脂獲得之脂質體為生物相容性及生物可降解的；脂質體可併入有廣泛的水溶性及脂溶性藥物；脂質體可保護在其內區室中經封裝之寡核苷酸以免代謝及降解(Rosoff，於「Pharmaceutical Dosage Forms,」 Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, 第 1 卷, 第 245 頁中)。在脂質體調配物之製備中的重要因素為脂質表面電荷、囊泡尺寸及脂質體之水體積。

【0393】 帶正電之合成陽離子脂質 N-[1-(2,3-二油烯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)可用於形成小脂質體，該小脂質體自發地與核酸相互作用以形成脂質-核酸複合物，該複合物能夠與組織培養細胞之細胞膜的帶負電之脂質融合，從而實現寡核苷酸之遞送(關於 DOTMA 及其與 DNA 一起之用途的說明，參見，例如 Feigner, P. L.等人, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:7413-7417 及美國專利第 4,897,355 號)。

【0394】 DOTMA 類似物 1,2-雙(油醯氧基)-3-(三甲基氨)丙烷(DOTAP)可與磷脂組合用於形成 DNA-複合囊泡。LIPOFECTIN™ Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.)為一種用於向活組織培養細胞遞送高陰離子核酸之有效試劑，該等活組織培養細胞包括帶正電之 DOTMA 脂質體，其自發地與帶負電之多核苷酸相互作用以形成複合物。當使用足夠多的帶正電之脂質體時，生成的複合物上之淨電荷亦為正的。以此方式製備的帶正電之複合物自發地附著於帶負電之細胞表面，與質膜融合，並且有效地將功能性核酸遞送至例如組織培養細胞中。另一種市售之陽離子脂質 1,2-雙(油醯氧基)-3,3-(三甲基氨)丙烷(「DOTAP」) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)不同於 DOTMA 之處在於油醯基部分係由酯鍵而非醚鍵連結。

【0395】 其他報告之陽離子脂質化合物包括已偶聯至多種部分之彼等，該等部分包括例如已偶聯至兩種類型脂質中之一者的羧基精胺，並且包括化合物諸如 5-羧基精胺基甘胺酸二八油醯基醯胺(「DOGS」)(TRANSFECTAM™，Promega, Madison, Wis.)及二軟脂醯基磷脂醯乙醇胺 5-羧基精胺基-醯胺(「DPPES」)(參見，例如美國專利第 5,171,678 號)。

【0396】 另一種陽離子脂質偶聯物包括用膽固醇對脂質之衍生化(「DC-Chol」)，其已經調配成與 DOPE 組合之脂質體(參見 Gao, X. and Huang, L., (1991) Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280)。已報告藉由將聚離胺酸偶聯至 DOPE 製得之脂聚離胺酸在血清存在下有效進行轉染(Zhou, X.等人, (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065:8)。對於某些細胞株，含有偶聯之陽離子脂質的此等脂質體據稱比含有 DOTMA 之組成物呈現更低之毒性且提供更有效之轉染。其他市售之陽離子脂質產物包括 DMRIE 及 DMRIE-HP (Vical, La Jolla, Calif.)以及 Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Md.)。適用於遞送寡核苷酸之其他陽離子脂質描述於 WO 98/39359 及 WO 96/37194 中。

【0397】 脂質體調配物尤其適合於局部投與，脂質體與其他調配物相比提供若干優點。此類優點包括與所投與藥物之高全身吸收有關之副作用的減少、所投與藥物在所需靶標處之積聚增加、以及向皮膚投與寡核苷酸之能力。在一些實施方式中，脂質體用於將寡核苷酸遞送至表皮細胞且亦增加寡核苷酸向真皮組織(例如向皮膚)中之滲透。例如，可局部施用脂質體。已經記錄調配成脂質體之藥物向皮膚之局部遞送(參見，例如 Weiner 等人, (1992) Journal of Drug Targeting, 第 2,405-410 卷及 du Plessis 等人, (1992) Antiviral Research, 18:259-265；Mannino, R. J.及 Fould-Fogerite, S., (1998) Biotechniques 6:682-690；Itani, T.等人, (1987) Gene 56:267-276；Nicolau, C.等人 (1987) Meth. Enzymol. 149:157-176；Straubinger, R. M.及 Papahadjopoulos, D. (1983) Meth. Enzymol.

101:512-527；Wang, C. Y.及 Huang, L., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851-7855)。

【0398】 亦已檢查非離子脂質體系統以確定其在向皮膚遞送藥物中之效用，尤其是包括非離子界面活性劑及膽固醇之系統。包括 Novasome I (甘油二月桂酸酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)及 Novasome II (甘油二硬脂酸酯/膽固醇/聚氧乙烯-10-硬脂醚)之非離子脂質體調配物係用於將藥物遞送至小鼠皮膚之真皮中。具有寡核苷酸之此類調配物適用於治療皮膚病症。

【0399】 脂質體之靶向亦可能基於例如器官特異性、細胞特異性及細胞器特異性並且為此項技術中已知的。在脂質體靶向遞送系統之情況下，脂質基團可併入脂質體之脂質雙層中以便維持靶向配位體與脂質體雙層之穩定締合。各種連結基團可用於將脂質鏈接合於靶向配位體上。額外的方法為此項技術中已知並且描述於例如美國專利申請公佈第 20060058255 號中，其連結基團以引用之方式併入本文中。

【0400】 包括寡核苷酸之脂質體可經製成高度可變形的。該種變形性使得脂質體能夠穿透小於脂質體之平均半徑的孔隙。例如，傳遞體(transfersome)為又一類型之脂質體，並且為高度可變形之脂質聚集體，其為藥物遞送媒介物之有吸引力的候選物。傳遞體可經描述為脂肪小滴，其係高度可變形的，使得它們容易穿透小於該小滴之孔隙。傳遞體可將表面邊緣活化劑(通常界面活性劑)添加至標準脂質體組成物中而製得。包括寡核苷酸之傳遞體可例如藉由感染皮下地遞送，以便將寡核苷酸遞送至皮膚之角質細胞。為了跨過完整的哺乳動物皮膚，脂質囊泡必須在合適的經皮梯度之影響下穿過一系列細小孔隙，其中每個孔隙具有小於 50 nm 之直徑。另外，由於脂質特性，此等傳遞體可為自動最佳化的(適合於孔隙之形狀，例如在皮膚中)、自修復的並且常常可到達其靶標而不破碎且

經常為自動裝載的。傳遞體已用於遞送血清白蛋白至皮膚。已顯示血清白蛋白之傳遞體介導之遞送與含有血清白蛋白之溶液的皮下注射一樣有效。

【0401】 適合於本發明之其他調配物描述於 2008 年 1 月 2 日申請之美國臨時申請案系列第 61/018,616 號；2008 年 1 月 2 日申請之第 61/018,611 號；2008 年 3 月 26 日申請之第 61/039,748 號；2008 年 4 月 22 日申請之第 61/047,087 號及 2008 年 5 月 8 日申請之第 61/051,528 號中。2007 年 10 月 3 日申請之 PCT 申請案第 PCT/US2007/080331 號亦描述適合於本發明之調配物。

【0402】 界面活性劑在調配物諸如乳液(包括微乳液)及脂質體中獲得廣泛應用。對許多不同類型之界面活性劑(天然及合成兩者)之特性進行分類及分等級之最常見方式係藉由使用親水/親油平衡(HLB)。親水基(亦稱為「頭部」)之性質提供用於對調配物中使用之不同界面活性劑進行分類之最有用的手段(Rieger，在 Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, 第 285 頁中)。

【0403】 若界面活性劑分子未經離子化，則將其歸類為非離子界面活性劑。非離子界面活性劑在醫藥及化妝產品中獲得廣泛應用並且適用於大範圍之 pH 值。一般而言，其 HLB 值在 2 至約 18 範圍內，視其結構而定。非離子界面活性劑包括非離子酯，諸如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油酯、聚甘油酯、山梨醇酯、蔗糖酯及乙氧基化酯。非離子烷醇醯胺及醚諸如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇及乙氧基化/丙氧基化嵌段聚合物亦包括在此類中。聚氧乙烯界面活性劑為非離子界面活性劑類中最受歡迎之成員。

【0404】 若界面活性劑分子在溶解或分散於水中時攜帶負電荷，則將該界面活性劑歸類為陰離子的。陰離子界面活性劑包括羧酸鹽諸如肥皂、醯基乳酸鹽、胺基酸之醯胺、硫酸酯諸如烷基硫酸酯及乙氧基化烷基硫酸酯、磺酸酯諸如烷

基苯磺酸酯、醯基羥乙基磺酸酯、醯基牛磺酸酯及磺基丁二酸酯、以及磷酸酯。陰離子界面活性劑類中最重要之成員為烷基硫酸酯及肥皂。

【0405】 若界面活性劑分子在溶解或分散於水中時攜帶正電荷，則將該界面活性劑歸類為陽離子的。陽離子界面活性劑包括第四銨鹽及乙氧化胺。第四銨鹽為此類中最常用之成員。

【0406】 若界面活性劑分子具有攜帶正電荷或負電荷之能力，則將界面活性劑歸類為兩性的。兩性界面活性劑包括丙烯酸衍生物、經取代之烷基醯胺、N-烷基甜菜鹼及磷脂。

【0407】 界面活性劑在藥物產品、調配物及乳液中之用途已有綜述(Rieger，在 Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, 第 285 頁中)。

【0408】 用於本發明之方法中的寡核苷酸亦可以膠束調配物形式提供。膠束為特定類型之分子組裝，其中雙性分子以球狀結構排列以使得分子之疏水性部分都向內導向，留下親水性部分與周圍水相接觸。若環境為疏水性的，則存在相反的排列。

ii. 基於脂質奈米顆粒之遞送方法

【0409】 本發明之寡核苷酸可完全封裝於脂質調配物例如脂質奈米顆粒(LNP)或其他核酸-脂質顆粒中。LNP 極其適合全身應用，因為它們在靜脈內(i.v.)注射之後呈現出延長之循環壽命並且在遠端部位(例如，與投藥部位在物理上分離之部位)處聚集。LNP 包括「pSPLP」，其包括封裝之凝聚劑-核酸複合物，如 PCT 公佈第 WO 00/03683 號中所列。本發明之顆粒通常具有以下平均直徑：約 50 nm 至約 150 nm、更通常約 60 nm 至約 130 nm、更通常約 70 nm 至約 110 nm、最通常約 70 nm 至約 90 nm，且為實質上無毒的。另外，核酸當存在於本發明之核酸-脂質顆粒中時在水溶液中對核酸酶之降解有抗性。核酸-脂質顆粒及其製備

方法揭露於例如美國專利第 5,976,567 號；第 5,981,501 號；第 6,534,484 號；第 6,586,410 號；第 6,815,432 號；美國公佈第 2010/0324120 號及 PCT 公佈第 WO 96/40964 號中。

【0410】　在一實施例中，脂質與藥物之比率(質量/質量比)(例如，脂質與寡核苷酸之比率)將在以下範圍內：約 1:1 至約 50:1、約 1:1 至約 25:1、約 3:1 至約 15:1、約 4:1 至約 10:1、約 5:1 至約 9:1、或約 6:1 至約 9:1。以上列舉之範圍之中間範圍亦涵蓋為本發明之一部分。

【0411】　陽離子脂質之非限制性實例包括 N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化銨(DODAC)、N,N-二硬脂醯基-N,N-二甲基溴化銨(DDAB)、N--(I-(2,3-二油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)、N--(I-(2,3-二油烯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油烯氧基)丙胺(DODMA)、1,2-二亞麻基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亞麻基胺甲醯基氧基-3-二甲胺基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亞麻氧基-3-(二甲胺基)乙醯氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亞麻氧基-3-嗎啉基丙烷(DLin-MA)、1,2-二亞油醯基-3-二甲胺基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亞麻基硫基-3-二甲胺基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亞油醯基-2-亞麻基氧基-3-二甲胺基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亞麻基氧基-3-三甲胺基丙烷氯鹽(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亞油醯基-3-三甲胺基丙烷氯鹽(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亞麻基氧基-3-(N-甲基哌嗪并)丙烷(DLin-MPZ)、或 3-(N,N-二亞麻基胺基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基胺基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亞麻基側氧基-3-(2-N,N-二甲胺基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二次亞麻基氧基-N,N-二甲胺基丙烷(DLinDMA)、2,2-二亞麻基-4-二甲胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-DMA)或其類似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基四氫--3aH-環戊[d][1,3]二氧雜環戊烯-5-胺(ALN100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-庚三烏頭酸-6,9,28,31-四

烯-19-基 4-(二甲胺基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(雙(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)(2-羥基十二烷基)胺基)乙基)呱嗪-1-基乙基氮烷二基二(十二烷)-2-醇(Tech G1)或其混合物。陽離子脂質可包括顆粒中存在的總脂質之例如約 20 莫耳%至約 50 莫耳%或約 40 莫耳%。

【0412】 可電離/非陽離子脂質可為陰離子脂質或中性脂質，包括但不限於二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、二軟脂醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二油醯基磷脂醯甘油(DOPG)、二軟脂醯基磷脂醯甘油(DPPG)、二油醯基-磷脂醯乙醇胺(DOPE)、軟脂醯基油醯基磷脂醯膽鹼(POPC)、軟脂醯基油醯基磷脂醯乙醇胺(POPE)、二油醯基-磷脂醯乙醇胺 4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二軟脂醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻醯基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂醯基-磷脂醯基-乙醇胺(DSPE)、16-O-單甲基 PE、16-O-二甲基 PE、18-1-反式 PE、1-硬脂醯基-2-油醯基-磷脂醯乙醇胺(SOPE)、膽固醇或其混合物。非陽離子脂質可為顆粒中存在的總脂質之例如約 5 莫耳%至約 90 莫耳%、約 10 莫耳%或約 58 莫耳%(若包括膽固醇的話)。

【0413】 抑制顆粒聚集之偶聯之脂質可為例如聚乙二醇(PEG)-脂質，包括但不限於 PEG-二醯基甘油(DAG)、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神經醯胺(Cer)或其混合物。PEG-DAA 偶聯物可為例如 PEG-二月桂氧基丙基(C_{i_2})、PEG-二肉豆蔻氧基丙基(C_{i_4})、PEG-二軟脂氧基丙基(C_{i_6})或 PEG-二硬脂氧基丙基$(C]_8)$。防止顆粒聚集之偶聯脂質可為例如顆粒中存在的總脂質之 0 莫耳%至約 20 莫耳%或約 2 莫耳%。

【0414】 在一些實施例中，核酸-脂質顆粒進一步包括膽固醇，其為例如顆粒中存在的總脂質之約 10 莫耳%至約 60 莫耳%或約 50 莫耳%。

B. 組合療法

【0415】　本發明之方法可單獨或與額外治療劑組合(例如，治療相同病症或與此相關之症狀的其他試劑)或與針對該病症之其他類型之療法組合使用。在組合治療中，一或多種治療化合物之劑量與單獨投與時之標準劑量相比可減少。例如，劑量可憑經驗由藥物組合及排列確定或可藉由等輻射分析來推斷(例如 Black 等人, Neurology 65:S3-S6 (2005))。在此情況下，化合物在組合時之劑量應提供治療作用。

【0416】　在一些實施例中，第二治療劑為化療劑(例如，細胞毒性劑或適用於治療病症之其他化合物)。

【0417】　第二試劑可為治療劑，其為非藥物治療。例如，第二治療劑為物理療法。

【0418】　在本文所述之組合實施例之任一者中，第一治療劑與第二治療劑同時或依次地以任一順序投與。第一治療劑可在第二治療劑之前或之後立即、長達 1 小時、長達 2 小時、長達 3 小時、長達 4 小時、長達 5 小時、長達 6 小時、長達 7 小時、長達 8 小時、長達 9 小時、長達 10 小時、長達 11 小時、長達 12 小時、長達 13 小時、14 小時、長達 16 小時、長達 17 小時、長達 18 小時、長達 19 小時、長達 20 小時、長達 21 小時、長達 22 小時、長達 23 小時、長達 24 小時或長達 1-7、1-14、1-21 或 1-30 天投與。

IV. 醫藥組成物

【0419】　本文所述之寡核苷酸較佳經調配成醫藥組成物以便以適於活體內投與之生物相容性形式向人類受試者投與。

【0420】　本文所述之化合物可以遊離鹼形式、鹽形式、溶劑合物形式及作為前藥使用。所有形式皆在本文所述之方法內。根據本發明之方法，可向患者以視所選投藥途徑而定之多種形式投與所述化合物或其鹽、溶劑合物或前藥，如熟習此項技術者所理解。本文所述之化合物可例如藉由以下途徑投與：經口、

非經口、鞘內、腦室內、器官實質內、頰內、舌下、鼻、直腸、貼劑、泵、腫瘤內或經皮投與，並且相應地調配醫藥組成物。非經口投藥包括靜脈內、腹膜內、皮下、肌內、經上皮、鼻、肺內、鞘內、腦室內、器官實質內、直腸及局部投藥模式。非經口投藥可在所選時間段內連續輸注。

【0421】 本文所述之化合物可例如用惰性稀釋劑或用可吸收可食用之載劑經口投與，或者可將其包封在硬殼或軟殼明膠膠囊中，或者可將其壓製製成錠劑，或者可將其與膳食食物直接合併。對於口服治療投藥而言，本文所述之化合物可合併有賦形劑，並且以可攝取之錠劑、頰錠劑、口含錠、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿及糯米紙形式使用。本文所述之化合物亦可非經口投與。本文所述之化合物之溶液可在水中適當地與界面活性劑諸如羥丙基纖維素混合來製備。亦可在甘油、液體聚乙二醇、DMSO 及其混合物中在有或沒有乙醇之情況下及在油中製備分散體。在普通的儲存及使用條件下，此等製劑可含有防腐劑以防止微生物之生長。用於選擇及製備合適的調配物之習知程序及成分描述於例如 Remington's Pharmaceutical Sciences (2012, 第 22 版)及 The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 41 NF 36)(於 2018 年出版)中。適於可注射使用之醫藥形式包括無菌水溶液或分散體及無菌散劑以用於無菌可注射溶液或分散體之臨時製備。在所有情況下，該形式必須為無菌的且必須為流體，以致於可易於經由注射器投與。用於鼻投藥之組成物可宜經調配成氣溶膠、滴劑、凝膠及散劑。氣溶膠調配物通常包括活性物質於生理上可接受之水性或非水性溶劑中之溶液或微細懸浮液且通常以單劑量或多劑量以無菌形式存在於密封容器中，該密封容器可採用盒形式或經再補充以便與噴霧裝置一起使用。或者，密封容器可為整體式分配裝置，諸如單劑量鼻吸入器，或裝有計量閥之氣溶膠分配器，供使用之後棄置。當劑型包括氣溶膠分配器時，其將含有推進劑，該推進劑可為壓縮氣體，諸如壓縮空氣；或有機推進劑，諸如氟氯烴。氣溶膠

劑型亦可採用泵-噴霧器形式。適於頰內或舌下投藥之組成物包括錠劑、口含錠及軟錠劑，其中活性成分係用載劑諸如糖、阿拉伯膠、黃蓍膠、明膠及甘油來調配。供直腸投藥之組成物宜呈含有習知栓劑基質諸如可可脂之栓劑形式。本文所述之化合物可在腫瘤內投與，例如作為腫瘤內注射。腫瘤內注射係直接注射至腫瘤血管系統中且特別預期用於離散、實體、可及之腫瘤。局部、區域或全身投藥亦可為適當的。本文所述之化合物可藉由向相距例如約 1 cm 之腫瘤一次或多次注射投與而有利地與之接觸。在外科手術之情況下，本發明可在術前使用，例如以使不宜手術之腫瘤能夠被切除。適當時亦可例如藉由將導管植入腫瘤或腫瘤血管系統中來進行連續投藥。

【0422】　本文所述之化合物可單獨或與如本文所示之醫藥學上可接受之載劑組合向動物例如人類投與，其比率係由以下因素決定：化合物之溶解性及化學性質、所選投藥途徑以及標準藥學實踐。

V. 劑量

【0423】　本文所述之組成物(例如，包括寡核苷酸之組成物)之劑量可視以下許多因素而變化：諸如化合物之藥效學特性；投藥模式；接受者之年齡、健康情況及體重；症狀之性質及程度；治療頻率及並行治療之類型(若有的話)；以及化合物在有待治療之動物中的清除率。熟習此項技術者可基於上述因素確定適當的劑量。本文所述之組成物最初可以根據需要視臨床反應來調節之合適的劑量投與。在一些實施例中，組成物(例如，包括寡核苷酸之組成物)之劑量為預防或治療有效量。

VI. 套組

【0424】　本發明亦描述套組，其包括(a)包括寡核苷酸試劑之醫藥組成物，其造成本文所述之細胞或受試者之 mRNA 中的腺苷去胺，及(b)具有用於執行本文所述之任何方法之說明書的包裝插頁。在一些實施例中，該套組包括(a)包括寡

核苷酸試劑之醫藥組成物，其造成本文所述之細胞或受試者之 mRNA 中的腺苷去胺，(b)額外的治療劑，及(c)具有用於執行本文所述之任何方法之說明書的包裝插頁。

實例

一般方法

【0425】 所有導向寡核苷酸皆使用標準 β-氰基乙基亞磷醯胺化學品及通用的固體支撐體諸如可控孔度玻璃(CPG)在自動化 RNA/DNA 合成器上以化學方式合成。N-經保護之 β-同型-DNA 之亞磷醯胺係利用所報導之程序來合成。參見 Matheus Froeyen 等人, (2001) Chem. Eur. J., 7: 5183-5794, Herdewijn, (2010) Chem. Biodivers., 7: 1-59, Jabgunde 等人, (2019) Tetrahedron, 75: 1107-1114。其他 5′-O-DMT-3′-亞磷醯胺 RNA、2’-O-甲基-RNA 及 DNA 單體(亦即 A、C、G、U 及 T)係購自商業來源。所有寡核苷酸皆由 BioSpring GmbH (Frankfurt, Germany) 以 200 nmol 規模合成。合成之後，將寡核苷酸自固體支撐體上裂解下來，去保護，並藉由使用標準方案之 HPLC 系統進行純化。將寡核苷酸去鹽、透析並凍乾。如藉由分析型逆相 HPLC 所測定，每種經凍乾之寡聚物之純度≥95%。藉由 ESI-MS 確定寡核苷酸之序列完整性。

【0426】 使用 BamHI 及 XbaI 限制位點(Quintara Bio, Berkeley, CA)將人類 ADAR2 序列(NM_001112.4)在 CMV 啟動子控制下選殖至 pcDNA3.1 質體中並且對正確的插入物進行序列驗證。此質體將在此後表示為 ADAR2/pcDNA3.1。對於編輯實驗，每 10 cm 平皿使用 25 µL Lipofectamine 3000 及 24 µL P3000 (Life Technologies)及將 2 µg ADAR2/pcDNA3.1 質體轉染至 $5x10^6$ 個 HEK293T 細胞(ATCC)中。4 小時之後，向培養基中補充新鮮的溫熱培養基(DMEM High Glucose；Life Technologies)。轉染之後 12-16 小時，用導向寡核苷酸轉染經轉染之 HEK293T 細胞以使得各孔中之最終濃度為 100 nM。所有轉染均根據製造商

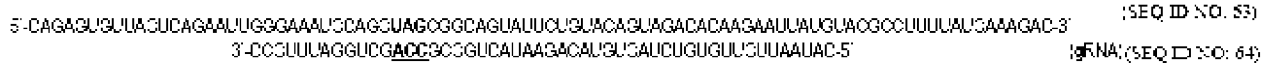
說明書以 96 孔格式用 Lipofectamine 3000 (0.4 μL/孔)進行。第二次轉染之後 12-16 小時，用冰冷的 PBS 洗滌細胞一次並且使用適合於 KingFisher Flex Purification (Life Technologies)之 Dyna Beads mRNA Direct Kit (Life Technologies)根據製造商說明書進行總 mRNA 分離。溶析之前，用 TURBO DNase (Life Technologies)處理樣品。使用 SuperScript IV Vilo，根據製造商說明書(Life Technologies)將所生成的經分離之 mRNA 用於 cDNA 合成。將 1 μl cDNA 用作 PCR (Platinum II Hot-Start PCR Master Mix；Life Technologies)之模板，使用基因特異性引子以生成用於 Sanger 定序(表 5)之擴增子。藉由 Quintara Biosciences (Berkeley, CA)進行 Sanger 定序。藉由量測腺苷及鳥苷之峰高並將鳥苷峰高除以腺苷與鳥苷組合之總峰高量測值來量化腺苷至鳥苷之編輯產率。

表 5. 用於 RT-PCR 之引子

名稱	序列(5’至 3’)
RAB7A 位點 1 正向	ACAGTATCCATTTATTATGTAATGCTTCTTAG (SEQ ID NO: 61)
RAB7A 位點 1 反向	TGAAAGGAGCGCCTTCTAGAAC (SEQ ID NO: 62)

實例 1：靶向人類 RAB7A 3′-UTR 靶標(UAG)之具有新穎核苷酸修飾的導向寡核苷酸之設計

靶向人類 RAB7A (3’-UTR)之導向寡核苷酸：



【0427】 以下表 6 中顯示靶向具有 UAG 三聯體之人類 RAB7A 的示範性經修飾之導向寡核苷酸。在表 6 中，A、C、G 及 U 為核糖核苷；加下劃線及粗體為中央三聯體；mA、mC、mG 及 mU 為 2’-O-甲基核糖核苷；hC 表示 β-D-同型 DNA-胞苷(式 II，R^8 =氫，R^9 =氫，並且 N^1 =胞嘧啶)；並且星號指示硫代磷酸酯鍵(其餘鍵為磷酸二酯鍵)。

表 6. 靶向人類 RAB7A 3’-UTR 靶標(UAG)之導向寡核苷酸

Seq.	**具有 20% 2’-O-甲基修飾之序列(5’至 3’)**	**編輯 (%)**	**SD**

51	5’-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**CCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3’	22.35	7.42
52	5’-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**hCCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3’’	17.55	9.60
53	5’-mC*mA*mU*mA*mAUUCUUGUGUCUACUGUACAGAAUACUGCCG**ChCA**GCUGGAUmU*mU*mC*mC*mC-3’’	25.74	4.73
	具有 50% 2’-O-甲基修飾之序列(5’至 3’)		
54	5’-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**CCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3’	17.17	5.26
55	5’-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**hCCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3’’	9.19	0.79
56	5’-mC*mA*mU*mA*mAUUCmUmUGUGmUmCUACmUmGUACmAmGAAUmAmCUGCmCmG**ChCA**mGmCUGmGmAUmU*mU*mC*mC*mC-3’’	26.76	9.83

其他實施例

【0428】　在本說明書中提及的所有公佈、專利及專利申請案以引用之方式全部併入本文中，其程度就如同每個單獨之公佈、專利或專利申請案具體且單獨地指明以引用之方式全部併入一般。當發現本申請案中之術語與在以引用之方式併入本文中的文獻中之定義不同時，以本文中提供之定義作為該術語之定義。

【0429】　雖然本發明已結合其特定實施例來描述，但應理解，本發明亦能進行進一步之修改且本申請案旨在包括本發明之任何改動、用途或改進，此係按照本發明之一般原理並且包括落在本發明所屬技術之已知或常規實踐內且可適用於以上所列基本特徵且在申請專利範圍之範疇內的本揭示案之此類偏離。

【序列表】

<110> 美商科羅生物公司(KORRO BIO, INC.)

<120> RNA編輯之寡核苷酸及其用途

<130> 51348-005TW4

<140> TW 109102604
<141> 2020-01-22

<150> US 62/900,017
<151> 2019-09-13

<150> US 62/822,586
<151> 2019-03-22

<150> US 62/795,348
<151> 2019-01-22

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 1
ggugaauaguauaacaauau 20

<210> 2
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 2
auguuguuauaguauccacc 20

<210> 3

<211> 45
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 3
ggugaauaguauaacaauaugcuaaauguuguuauaguauccacc 45

<210> 4
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 4
ggugaagaggagaacaauau 20

<210> 5
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 5
auguuguucucgucuccacc 20

<210> 6
<211> 45
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 6
ggugaagaggagaacaauaugcuaaauguuguucucgucuccacc 45

<210> 7
<211> 25
<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 7
ggugucgagaagaggagaacaauau 25

<210> 8
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 8
auguuguucucgucuccucgacacc 25

<210> 9
<211> 55
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 9
ggugucgagaagaggagaacaauaugcuaaauguuguucucgucuccucgacacc 55

<210> 10
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 10
ggguggaauaguauaacaau au 22

<210> 11
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 11
auguuguuauaguaucccac cu 22

<210> 12
<211> 48
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 12
ggguggaauaguauaacaauaugcuaaauguuguuauaguaucccacc 48

<210> 13
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 13
guggaauaguauaacaauau 20

<210> 14
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 14
auguuguuauaguaucccac 20

<210> 15
<211> 45
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 15
guggaauaguauaacaauaugcuaaauguuguuauaguaucccac 45

<210> 16
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 16
ggugucgagaauaguauaacaauau 25

<210> 17
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 17
auguuguuauaguauccucgacacc 25

<210> 18
<211> 55
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 18
ggugucgagaauaguauaacaauaugcuaaauguuguuauaguauccucgacacc 55

<210> 19
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 19

ggguggaauaguauaacaau au 22

<210> 20
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 20
auguuguuauaguaucccac cu 22

<210> 21
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 21
ggguggaauaguauaacaauaugcuaaauguuguuauaguaucccaccu 49

<210> 22
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 22
ggguggaauaguauacca 18

<210> 23
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 23
ugguauaguaucccaccu 18

<210> 24
<211> 40
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 24
ggguggaauaguauaccauucgugguauaguaucccaccu 40

<210> 25
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 25
gugggguggaauaguauacca 20

<210> 26
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 26
ugguauaguaucccaccuac 20

<210> 27
<211> 44
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 27
gugggguggaauaguauaccauucgugguauaguaucccaccuac 44

<210> 28

<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 28
uggguggaauaguauacca 19

<210> 29
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 29
ugguauaguaucccaccua 19

<210> 30
<211> 42
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 30
ugggguggaauaguauaccauucgugguauaguaucccaccua 42

<210> 31
<211> 17
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 31
gguggaauaguauacca 17

<210> 32
<211> 17
<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 32
ugguauaguaucccacc 17

<210> 33
<211> 38
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 33
gguggaauaguauaccauucgugguauaguaucccacc 38

<210> 34
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 34
guggaauaguauacca 16

<210> 35
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 35
ugguauaguaucccac 16

<210> 36
<211> 36
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 36
guggaauaguauaccauucgugguauaguaucccac 36

<210> 37
<211> 45
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 37
ggugaauaguauaacaauaugcuaaauguuguuauaguauccacc 45

<210> 38
<211> 45
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 38
ggugaagaggagaacaauaugcuaaauguuguucucgucuccacc 45

<210> 39
<211> 55
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 39
ggugucgagaagaggagaacaauaugcuaaauguuguucucgucuccucgacacc 55

<210> 40
<211> 55
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(28)
<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(35)
<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(41)
<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(49)

<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)
<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(55)
<223> n爲2'-O-甲基核苷酸

<400> 40
nnngnngagaagaggagaanaanangnnaaangnngnnnnngnnnnnnnganann 55

<210> 41
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 41
ggguggaauaguauaacaauaugcuaaauguuguuauaguaucccaccu 49

<210> 42
<211> 45
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 42
guggaauaguauaacaauaugcuaaauguuguuauaguaucccac 45

<210> 43
<211> 55
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 43
ggugucgagaauaguauaacaauaugcuaaauguuguuauaguauccucgacacc 55

<210> 44
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 44
ggguggaauaguauaacaauaugcuaaauguuguuauaguaucccaccu 49

<210> 45
<211> 40
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 45
ggguggaauaguauaccauucgugguauaguaucccaccu 40

<210> 46
<211> 44
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 46
guggguggaauaguauaccauucgugguauaguaucccaccuac 44

<210> 47
<211> 42
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 47
uggguggaauaguauaccauucgugguauaguaucccaccua 42

<210> 48
<211> 38
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 48
ggugggaauaguauaccauucgugguauaguaucccacc 38

<210> 49
<211> 36
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 49
guggaauaguauaccauucgugguauaguaucccac 36

<210> 50
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 50
acatgaggatcacccatgt 19

<210> 51
<211> 50
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (4)..(5)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (46)..(47)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (48)..(50)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<400> 51
cauaauucuugugucuacuguacagaauacugccgccagcuggauuuccc 50

<210> 52
<211> 50
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base

<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (4)..(5)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (36)..(36)
<223> β-D-同型DNA-胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (46)..(47)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (48)..(50)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<400> 52
cauaauucuugugucuacuguacagaauacugccgccagcuggauuuccc 50

<210> 53
<211> 50
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (4)..(5)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (37)..(37)
<223> β-D-同型DNA-胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (46)..(47)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (48)..(50)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<400> 53
cauaauucuugugucuacuguacagaauacugccgccagcuggauuuccc 50

<210> 54
<211> 50
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>

<221> modified_base
<222> (4)..(5)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (9)..(10)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (24)..(24)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (25)..(25)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (29)..(29)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (30)..(30)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>

<221> modified_base
<222> (34)..(34)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (35)..(35)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (39)..(39)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (40)..(40)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (43)..(43)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (44)..(44)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (46)..(47)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (48)..(50)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<400> 54
cauaauucuuugucuacuguacagaauacugccgccagcuggauuuccc 50

<210> 55
<211> 50
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (4)..(5)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (9)..(10)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (24)..(24)

<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (25)..(25)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (29)..(29)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (30)..(30)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (34)..(34)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (35)..(35)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (36)..(36)
<223> β-D-同型DNA-胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (39)..(39)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (40)..(40)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (43)..(43)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (44)..(44)

<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (46)..(47)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (48)..(50)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<400> 55
cauaauucuuugucuacuguacagaauacugccgccagcuggauuuccc 50

<210> 56
<211> 50
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (4)..(5)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (9)..(10)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (24)..(24)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (25)..(25)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (29)..(29)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (30)..(30)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (34)..(34)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (35)..(35)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (37)..(37)
<223> β-D-同型DNA-胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (39)..(39)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (40)..(40)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (43)..(43)
<223> 2'-O-甲基鳥苷

<220>
<221> modified_base
<222> (44)..(44)
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>
<221> modified_base
<222> (46)..(47)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (48)..(50)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<400> 56
cauaauucuugugucuacuguacagaauacugccgccagcuggauuuccc 50

<210> 57
<211> 16
<212> PRT
<213> 智慧人(Homo sapiens)

<400> 57

Ala Ala Val Ala LeuLeu Pro Ala Val LeuLeu Ala LeuLeu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 58

Ala AlaLeuLeu Pro Val LeuLeu Ala Ala Pro
1 5 10

<210> 59
<211> 13
<212> PRT
<213> 人類免疫缺陷病毒1型(Human immunodeficiency virus type 1)

<400> 59

GlyArg Lys LysArgArgGlnArgArgArg Pro ProGln
1 5 10

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> 果蠅觸足(Drosophila Antennapedia)

<400> 60

ArgGln Ile Lys Ile TrpPheGlnAsnArgArg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 61
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 61
acagtatccatttattatgtaatgcttctt ag 32

<210> 62
<211> 22

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 62
tgaaaggagcgccttctaga ac 22

<210> 63
<211> 88
<212> RNA
<213> 智慧人(Homo sapiens)

<400> 63
cagaguguuacucagaauugggaaauccagcuagcggcaguauucuguacaguagacaca 60

agaauuauguacgccuuuuaucaaagac 88

<210> 64
<211> 50
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 64
cauaauucuuugugucuacuguacagaauacugccgccagcuggauuuccc 50

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】　一種包含以下結構之寡核苷酸：

$$[A_m]\text{-}X^1\text{-}X^2\text{-}X^3\text{-}[B_n]$$

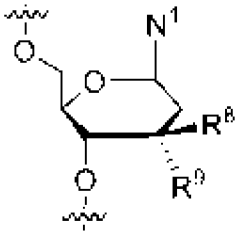
其中 A 與 B 各自為核苷酸；

m 與 n 各自獨立地為 1 至 50 之整數，且 A 及 B 合併係由 18 至 80 個核苷酸所組成；

$[A_m]$包括至少一個硫代磷酸酯鍵；

$[B_n]$包括至少一個硫代磷酸酯鍵；

X^1、X^2及 X^3各自獨立地為核苷酸，其中 X^1、X^2及 X^3中之至少一者具有式 II 之結構：



式 II

，

其中 N^1為氫或核鹼基；

R^8為氫或鹵素；以及

R^9為氫、羥基、鹵素或 C_1-C_6烷氧基。

【請求項 2】　如請求項 1 之寡核苷酸，其中至少 80% $[A_m]$及/或$[B_n]$之核苷酸包括核鹼基、糖及核苷間鍵。

【請求項 3】　如請求項 1 之寡核苷酸，其中鹵素為氟。

【請求項 4】　如請求項 1 之寡核苷酸，其中 C_1-C_6烷氧基為 OCH_3。

【請求項 5】　如請求項 1 之寡核苷酸，其中 X^1、X^2及 X^3中之至少一者具有式 II 之結構，在該式中 R^8與 R^9各自為氫。

【請求項6】 如請求項5之寡核苷酸，其中 X^2 具有式II之結構，在該式中 R^8 與 R^9 各自為氫。

【請求項7】 如請求項6之寡核苷酸，其中[A_m]與[B_n]合併至少20%之核苷酸為2'-O-甲基-核苷酸。

【請求項8】 如請求項7之寡核苷酸，其中至少80%、90%或95% [A_m]及/或[B_n]之核苷酸包括核鹼基、糖及核苷間鍵。

【請求項9】 如請求項1之寡核苷酸，其中 X^2 具有式II之結構。

【請求項10】 如請求項1之寡核苷酸，其中：

(i) 當 X^1 具有式II之結構時，X^2 與 X^3 各自獨立地為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；或

(ii) 當 X^2 具有式II之結構時，X^1 與 X^3 各自獨立地為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；或

(iii) 當 X^3 具有式II之結構時，X^1 與 X^2 各自獨立地為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；或

(iv) 當 X^1 與 X^2 各自具有式II之結構時，X^3 為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2'-胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2'-F-核苷酸、2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；或

(v) 當 X^1 與 X^3 各自具有式 II 之結構時，X^2 為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2’-胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2’-F-核苷酸、2’-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸；或

(vi) 當 X^2 與 X^3 各自具有式 II 之結構時，X^1 為核糖核苷酸、2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、2’-胺基-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸、雙環核苷酸、2’-F-核苷酸、2’-O-甲氧基乙基-核苷酸、約束型乙基-核苷酸、LNA-核苷酸或DNA-核苷酸。

【請求項 11】 如請求項 8 之寡核苷酸，其中 X^1 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基。

【請求項 12】 如請求項 11 之寡核苷酸，其中 X^3 包括次黃嘌呤核鹼基。

【請求項 13】 如請求項 11 之寡核苷酸，其中 X^2 包括胞嘧啶核鹼基。

【請求項 14】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中 X^2 不為 2’-O-甲基-核苷酸。

【請求項 15】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中 X^1、X^2 及 X^3 不為 2’-O-甲基-核苷酸。

【請求項 16】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中[A_m]包含至少一個 2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、至少一個 2’-胺基-核苷酸、至少一個阿拉伯糖核酸-核苷酸、至少一個雙環核苷酸、至少一個 2’-F-核苷酸、至少一個 2’-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一個約束型乙基(cEt)-核苷酸、至少一個 LNA-核苷酸及/或至少一個 DNA-核苷酸。

【請求項 17】 如請求項 16 之寡核苷酸，其中[A_m]包含至少一個 2’-O-甲基-核苷酸、至少一個 2’-F-核苷酸、至少一個 2’-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一個 cEt-核苷酸、至少一個 LNA-核苷酸及/或至少一個 DNA-核苷酸。

【請求項 18】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中[A_m]包含至少 5 個末端 2’-O-甲基-核苷酸。

【請求項 19】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中[A_m]包含至少 4 個末端硫代磷酸酯鍵。

【請求項 20】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中[B_n]包含至少一個 2′-O-C_1-C_6烷基-核苷酸、至少一個 2’-胺基-核苷酸、至少一個阿拉伯糖核酸-核苷酸、至少一個雙環核苷酸、至少一個 2’-F-核苷酸、至少一個 2’-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一個 cEt-核苷酸、至少一個 LNA-核苷酸及/或至少一個 DNA-核苷酸。

【請求項 21】 如請求項 20 之寡核苷酸，其中[B_n]包含至少一個 2’-O-甲基-核苷酸、至少一個 2’-F-核苷酸、至少一個 2’-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一個 cEt-核苷酸、至少一個 LNA-核苷酸及/或至少一個 DNA-核苷酸。

【請求項 22】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中[B_n]包含至少 5 個末端 2’-O-甲基-核苷酸。

【請求項 23】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中[B_n]包含至少 4 個末端硫代磷酸酯鍵。

【請求項 24】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中[A_m]與[B_n]合併至少 20%之核苷酸為 2’-O-甲基-核苷酸。

【請求項 25】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸進一步包含 5’-帽結構。

【請求項 26】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中 A 與 B 合併係由 27 至 71 個核苷酸組成。

【請求項 27】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中 m 為 5 至 40。

【請求項 28】 如請求項 27 之寡核苷酸，其中 m 為 12 至 32。

【請求項 29】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中 n 為 5 至 40。

【請求項 30】 如請求項 29 之寡核苷酸，其中 n 為 7 至 17。

【請求項 31】 如請求項 1 之寡核苷酸，其中該寡核苷酸進一步包含一或多個作用於 RNA 之腺苷去胺酶(ADAR)招募結構域。

【請求項 32】 如請求項 8 之寡核苷酸，其中 X^1 包括尿嘧啶或胸腺嘧啶核鹼基且 X^3 包括次黃嘌呤核鹼基；X^2 包括胞嘧啶核鹼基；且 X^1 及 X^3 各自獨立地是 2′-O-C_1-C_6 烷基-核苷酸、2'-F-核苷酸、阿拉伯糖核酸-核苷酸或 DNA-核苷酸。

【請求項 33】 如請求項 32 之寡核苷酸，其中至少 95% $[A_m]$及$[B_n]$之核苷酸包括核鹼基、糖及核苷間鍵；$[A_m]$及$[B_n]$各自包含至少一個硫代磷酸酯鍵；$[A_m]$及$[B_n]$各自包含至少一個 2'-O-甲基-核苷酸、至少一個 2'-F-核苷酸、至少一個 2'-O-甲氧基乙基-核苷酸、至少一個 cEt-核苷酸、至少一個 LNA-核苷酸，及/或至少一個 DNA-核苷酸；且 A 與 B 合併係由 27 至 71 個核苷酸組成。

【請求項 34】 一種偶聯物，其包含偶聯至靶標部分的如請求項 1 至 33 中任一項之寡核苷酸。

【請求項 35】 如請求項 34 之偶聯物，其中該靶標部分為脂質、固醇、碳水化合物及/或肽。

【請求項 36】 一種複合物，其包含：

如請求項 1 至 33 中任一項之寡核苷酸；及

mRNA，

其中該寡核苷酸與 mRNA 彼此雜交並且該複合物包含在該 mRNA 之腺苷處的第一錯配。

【請求項 37】 如請求項 36 之複合物，其中該 mRNA 包含可經去胺以產生治療結果之腺苷。

【請求項 38】 如請求項 36 之複合物，其中該 mRNA 與相應的天然 mRNA 相比包含鳥苷至腺苷突變。

【請求項 39】 如請求項 38 之複合物，其中該鳥苷至腺苷突變為誤義或無義突變。

【請求項40】 如請求項36之複合物，其中該第一錯配在該mRNA之起始密碼子中的腺苷處。

【請求項41】 如請求項36之複合物，其中該第一錯配在該mRNA之終止密碼子中的腺苷處。

【請求項42】 如請求項41之複合物，其中該終止密碼子為過早終止密碼子。

【請求項43】 一種如請求項1至33中任一項之寡核苷酸之用途，其係用於製備治療個體病症之藥物。

【請求項44】 如請求項43之用途，其中該病症為囊腫纖維化、白化症、α-1-抗胰蛋白酶缺乏症、阿滋海默氏症、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症、氣喘、11-地中海貧血、卡達西症候群(Cadasil syndrome)、夏馬杜三氏病(Charcot-Marie-Tooth disease)、慢性阻塞性肺病、遠端脊肌萎縮症、杜興氏/貝克爾肌肉營養不良(Duchenne/Becker muscular, dystrophy)、失養性水皰性表皮鬆解症、水皰性表皮鬆解症、法布裡病(Fabry disease)、第五凝血因子(Factor V Leiden)相關病症、家族性腺瘤、息肉病、半乳糖血症、高歇氏病(Gaucher's disease)、葡萄糖-6-磷酸去氫酶缺乏症、血友病、遺傳性血色病、亨特氏症候群(Hunter syndrome)、杭丁頓氏舞蹈症(Huntington's disease)、賀勒氏症候群(Hurler syndrome)、炎症性腸病、遺傳多凝集反應症候群、萊伯氏先天性黑蒙症(Leber congenital amaurosis)、勒-奈二氏症候群(Lesch-Nyhan syndrome)、林奇症候群(Lynch syndrome)、馬凡症候群(Marfan syndrome)、黏多糖病、肌肉營養不良、I型及II型肌強直性營養不良、神經纖維瘤病、A型、B型及C型尼-皮二氏病(Niemann-Pick disease)、NY-ESO-1相關癌症、帕金森氏病、Peutz-Jeghers二氏症候群、苯酮尿症、龐貝氏病(Pompe's disease)、原發性纖毛病、凝血酶原突變相關病症、肺高血壓、色素性視網膜炎、山多夫氏病(Sandhoff disease)、嚴重複合型免疫缺乏症候群、鐮狀細

胞性貧血、脊髓性肌萎縮、斯特格氏病(Stargardt's Disease)、泰-薩二氏病(Tay-Sachs disease)、烏謝爾症候群(Usher syndrome)、X 連鎖免疫缺陷、斯特格-韋伯症候群(Sturge-Weber syndrome)、雷特氏症候群(Rett syndrome)或癌症。

【請求項 45】 如請求項 44 之用途，其中該病症為 α-1-抗胰蛋白酶缺乏症。