(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118355119 A
(43)申请公布日 2024.07.16

(21)申请号 202280079432.9
(22)申请日 2022.11.29
(30)优先权数据
21211372.4 2021.11.30 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/083711 2022.11.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/099494 EN 2023.06.08
(71)申请人 艾伯哈特卡尔斯图宾根大学
地址 德国图宾根
(72)发明人 托斯顿·斯塔福斯特
恩加金姆·拉蒂菲
劳拉·索菲亚·普菲弗
(74)专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224
专利代理师 郑元博
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)

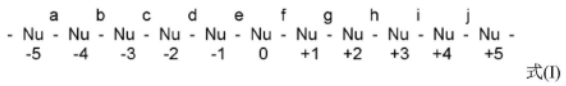
权利要求书2页 说明书15页
序列表（电子公布） 附图9页

(54)发明名称

反义寡核苷酸(ASO)与内源性作用于RNA的腺苷脱氨酶(ADAR)用于高效精确RNA编辑

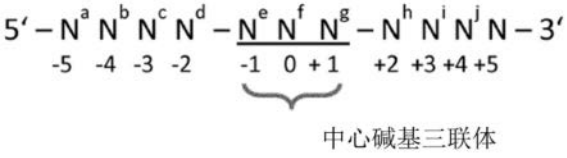
(57)摘要

本发明涉及一种用于在具有内源性ADAR的细胞内对靶RNA进行定点A到I编辑的经化学修饰的寡核苷酸,其包含能够与所述靶RNA中的靶序列结合的11至100个核苷酸长度的序列,所述序列具有3个核苷酸的中心碱基三联体,其中,中心核苷酸与所述靶RNA中待编辑为肌苷的靶腺苷相对,其中核心序列具有下式(I):



式(I)

其中Nu代表具有能够被修饰的糖部分的核苷酸,核苷酸序列下方的数字表示与具有数字0的所述中心碱基三联体的所述中心核苷酸相邻的核苷酸的位置,其中负数表示寡核苷酸的5'端,正数表示寡核苷酸的3'端,其中a-j表示单核苷酸之间的键的性质,其中至少a、d和e键是硫代磷酸酯键,并且其中至少2个键是磷酸酯键。



CN 118355119 A

1.一种用于在具有内源性ADAR的细胞内对靶RNA进行定点A到I编辑的经化学修饰的寡核苷酸,其包含能够与所述靶RNA中的靶序列结合的长度为11至100个核苷酸的序列,所述序列具有3个核苷酸的中心碱基三联体,其中,中心核苷酸与所述靶RNA中待编辑为肌苷的靶腺苷相对,其中核心序列具有下式I:

```
      a     b     c     d     e     f     g     h     i     j
- Nu - Nu - Nu - Nu - Nu - Nu - Nu - Nu - Nu - Nu - Nu -
   -5    -4    -3    -2    -1     0    +1    +2    +3    +4    +5
```

式I

其中Nu代表具有能够被修饰的糖部分的核苷酸,核苷酸序列下方的数字指定与具有数字0的所述中心碱基三联体的所述中心核苷酸相邻的核苷酸的位置,其中负数指定寡核苷酸的5'端,正数指定寡核苷酸的3'端,其中a到j指定单个核苷酸之间的键的性质,其中至少a、d和e键是硫代磷酸酯键,并且其中至少2个键是磷酸酯键。

2.根据权利要求1所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中h和i键是磷酸酯键。

3.根据前述权利要求中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中f键也是硫代磷酸酯键。

4.根据前述权利要求中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中j键也是硫代磷酸酯键。

5.根据前述权利要求中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中g键也是硫代磷酸酯键。

6.根据前述权利要求中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中f和j键也是硫代磷酸酯键。

7.根据前述权利要求中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中b和/或c键也是硫代磷酸酯键。

8.根据前述权利要求中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中至少一个键是立体纯的硫代磷酸酯键。

9.根据前述权利要求中任一项所述的经化学修饰的寡核糖核苷酸,其中,

a)所述中心碱基三联体之外的至少90%的嘧啶核苷在所述糖部分的2'位置被化学修饰或者是脱氧核糖核苷,或其组合,

b)不超过6个连续核苷在所述糖部分的2'位置被2'-O-甲基化学修饰,

c)所述中心碱基三联体的三个核苷中的至少两个在所述糖部分的2'位置被化学修饰或者是脱氧核糖核苷,或其组合。

10.根据前述权利要求中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中至少50%、更优选至少80%的从Nu-5到+5的核苷酸在核糖的2′位置彼此独立地被以下修饰中的一种所修饰:2′-氟,或2′-O-甲基,或2′-H(脱氧)。

11.根据前述权利要求中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中所有三个核苷酸Nu-1、Nu 0和Nu+1在核糖的2'位置处均具有H残基。

12.根据前述权利要求中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中核苷酸Nu+1携带N-杂环碱基,优选嘌呤衍生物,更优选次黄嘌呤碱基,或其衍生物。

13.根据前述权利要求中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中核苷酸Nu 0携带基于N-杂环的核碱基,优选嘧啶或吡啶,更优选胞嘧啶,或其衍生物。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其长度为20至80个核苷酸。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸,其长度为30至60个核苷酸。

16.根据权利要求1所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中在式I的所述核心序列中,仅a、d、e和可选地选自b、c、f、g和j的至多三个键是硫代磷酸酯键。

17.根据权利要求16所述的经化学修饰的寡核苷酸,其中在式I的所述核心序列中,仅a、d、e和f是硫代磷酸酯键。

18.用于治疗用途的根据权利要求1至17中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸。

19.一种组合物,其包含权利要求1至17中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸和药学上可接受的赋形剂。

20.用于细胞内靶RNA的定点A至I编辑的根据权利要求1至17中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸。

21.用于治疗或预防遗传疾病或遗传病症的根据权利要求1至17中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸。

22.根据权利要求21所述的用途的经化学修饰的寡核苷酸,其中所述遗传疾病或遗传病症是代谢疾病、自身免疫疾病、心血管疾病或神经疾病。

23.一种用于细胞内靶RNA的定点A至I编辑的方法,包括将权利要求1至17中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸施用至靶细胞。

24.一种治疗患有遗传疾病或遗传病症的对象的方法,包括向所述对象施用有效量的权利要求1至17中任一项所述的经化学修饰的寡核苷酸。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述遗传疾病或遗传病症是代谢疾病、自身免疫疾病、心血管疾病或神经疾病。

反义寡核苷酸(ASO)与内源性作用于RNA的腺苷脱氨酶(ADAR)用于高效精确RNA编辑

[0001] 本发明涉及用于靶RNA定点编辑的方法和经化学修饰的核酸。鉴于分子生物学取得的巨大进步,有可能改变细胞的遗传信息。虽然DNA编辑通常会导致细胞遗传信息的稳定修饰,但有时不改变DNA,而改变(m)RNA中的遗传信息是令人感兴趣的。与DNA相比,编辑(m)RNA的主要优点一方面是编辑产量的剂量依赖性,另一方面是处理的可逆性。通过调节靶RNA将被编辑的细胞中经化学修饰的核酸的浓度,可以实现对编辑产量的依赖性以及因此实现在靶RNA翻译后的经修饰的蛋白质的量。此外,处理是可逆的,因为当经化学修饰的核酸不再存在于相关细胞中时,靶RNA的编辑就会停止,并且经编辑的RNA会被新转录的未编辑的RNA取代。

[0002] 根据本发明的RNA分子编辑由属于作用于RNA的腺苷脱氨酶(Adenosine deaminases acting on RNA,ADAR)家族的酶介导。ADAR是催化双链RNA中腺苷(A)脱氨为肌苷(I)(A到I的RNA编辑)的酶家族成员。在该酶促催化反应过程中,腺苷通过水合中间体转变为肌苷。鸟苷可以与互补碱基胞苷形成三个氢键,而肌苷只能与胞苷形成两个氢键。翻译机制将肌苷读成鸟苷。因此,ADAR具有在RNA水平上引入功能性的腺苷变鸟苷突变的作用。

[0003] 属于ADAR家族的脱氨酶作用于RNA、特别是mRNA的要求是形成双链。因此,需要提供可形成ADAR可作用的双链分子的互补核酸(下文中:寡核苷酸或寡核糖核苷酸)。

[0004] 本发明公开了可引起从腺苷(A)到鸟苷(G)的功能改变的经化学修饰的核酸。取决于RNA的序列,这种改变可能会产生巨大的影响。它可以消除对mRNA编码的蛋白质具有有害作用的点突变,或者其他氨基酸可以通过取代而掺入翻译的蛋白质中。然而,当终止密码子(UAA、UAG、UGA)或剪接位点被编辑时,可以观察到强烈的影响。

[0005] 本发明的经化学修饰的寡核苷酸的显著优点是,这种脱靶编辑是可逆的,不太可能发生毁灭性副作用的危险。此外,治疗可以停止并在必要时复原。由于安全性更好,在RNA水平上对人类遗传信息的暂时和有限的操纵可能变得广泛适用,并可扩展到医学适应症,而DNA水平上的基因组编辑可能由于不可预见和不可逆的副作用而很危险。

[0006] 人体组织中表达多种ADAR酶,这些酶能够将腺苷转化为肌苷,而肌苷又在翻译中在生物化学上被读成鸟苷。几种ADAR是本领域已知的。ADAR已在非洲爪蟾(Xenopus levis)中发现,也在人类和鼠类细胞中发现。虽然所有三种人类ADAR都具有共同的C端脱氨酶结构域,但只有ADAR 1和ADAR 2显示出具有催化活性。ADAR具有共同的功能结构域,即双链RNA结合结构域(dsRBD)。ADAR 1包含三个dsRBD,而ADAR 2和ADAR 3仅具有两个dsRBD。已知ADAR 1有两种异构体。短的组成型表达的110kDa ADAR 1是p110异构体,而较长的150kDa ADAR 1是p150异构体,它由替代的干扰素诱导型启动子表达。据目前所知,ADAR 2主要编辑大脑中的编码位点。ADAR 1是编辑非编码位点的主要酶。

[0007] 为了有效编辑RNA,ADAR必须定向到mRNA转录物上的特定靶位点。现有技术中先前尝试过利用源自天然顺式作用ADAR募集序列的特定的具有环-发夹结构的ADAR募集部分来将ADAR的脱氨酶活性引导至特定位点,从而将ADAR的脱氨酶活性带到待编辑的mRNA分子上的正确位置。这种用于定点RNA编辑的人工核酸公开于WO2020/001793中。现有技术中公开

的人工核酸包含靶向序列,靶向序列又包含与靶RNA中的靶序列互补或至少部分互补的核酸序列和用于募集脱氨酶的募集部分。

[0008] 根据本发明的经化学修饰的核酸与其中公开的核酸寡核苷酸的不同之处在于它们优选不具有专门用于募集脱氨酶的具有环-发夹结构的募集部分。本发明的经化学修饰的核酸使用不同于现有技术中已知的构建体的另一种策略。众所周知,由于不同RNA消化酶(特别是RNase A和H)的普遍存在,RNA高度不稳定。

[0009] 利用现有技术的构建体对RNA进行编辑只能通过在募集部分(如内源性ADAR的不完美发夹)或其他寡核苷酸基序(如BoxB或MS2基序)的帮助下募集脱氨酶来实现。当使用根据本发明的化学修饰时,可能不再需要单独的募集部分基序。然而,在一些实施方式中,可以存在这样的基序以提高功效。通常,募集部分引导脱氨酶到达所需的作用位点,也就是将被转化为肌苷、但功能上为鸟苷的靶腺苷。

[0010] 根据本发明的经化学修饰的核酸不必须具有用于脱氨酶的具有环-发夹结构的募集部分。相反,本发明的经化学修饰的核酸形成ADAR酶粘附的RNA双链体,由此增加编辑效率。后者是通过使用在其全长上具有特定最佳化学修饰模式的经化学修饰的核酸来实现的。本发明的一个重要方面是ASO的化学修饰不限于中心三联体,而是延伸到邻近中心三联体的侧翼。

[0011] 靶RNA序列的三个中心碱基包括两侧各有一个核苷酸的腺苷,并将也称为中心碱基三联体。与本发明的经化学修饰的寡核苷酸中的中心碱基三联体互补的序列的特定的化学修饰是非常重要的。为了在mRNA的翻译水平上(编辑)实现功能改变,根据本发明的寡核苷酸必须允许对mRNA进行编辑。本发明的寡核苷酸必须一方面足够稳定,以防止降解(例如由RNase引起),这可以通过对寡核苷酸进行化学修饰来实现,特别是通过对寡核苷酸的糖部分进行修饰以及特别是通过对磷酸酯骨架进行修饰,优选通过用硫代磷酸酯键替换磷酸酯键来实现。

[0012] 另一方面,化学修饰必须允许对RNA分子进行编辑。如果寡核苷酸的化学修饰过于广泛,编辑的功效就会降低到不可接受的水平。因此,寡核苷酸的修饰必须遵循本文所述的指导以获得最佳的编辑功效。

[0013] EP3507366公开了用于通过ADAR酶使靶腺苷脱氨的经化学修饰的单链RNA编辑寡核苷酸,其中3个连续核苷酸的中心碱基三联体包含糖修饰和/或碱基修饰。在所有实施例(所述现有技术的图2)中,侧翼区结构域均在核糖单元处用2'-O-甲基化区块加以少量额外的末端硫代磷酸酯键进行统一修饰。

[0014] 然而,发现上述现有技术中使用的这种核酸的统一和区块式的2'-O-甲基修饰会导致天然ADAR酶在其内源表达水平上严重丧失编辑活性。这与大量2'-修饰对双链RNA结合结构域与dsRNA底物的结合的负面影响一致。一般来说,2'-F以及2'-F和2'-OMe的混合物是特别良好接受的,并且当它们被放置在核酸上的所有嘧啶碱基上时,仍然具有良好的稳定作用以防止核酸酶消化。然而,在中心碱基三联体中,2'-F和特别是2'-O-甲基化对编辑产量具有强烈的负面影响,这与文献一致。然而,还发现在中心碱基三联体的所有三个位置处脱氧核糖具有良好的耐受性,并且提供对核酸酶消化的显著稳定作用。在本发明的优选实施方式中,与中心三联体互补的寡核苷酸的三个糖单元是脱氧核糖单元。

[0015] 经化学修饰的核酸适用于靶mRNA的定点编辑。经化学修饰的核酸包含,除了中心

碱基三联体的与靶腺苷相对的中心核苷酸之外,与靶mRNA中的靶序列完全互补的序列。中心碱基三联体的中心核苷酸通常是胞嘧啶或其衍生物,但也可以是核碱基类似物(通常构建在N-杂环化合物上)并替代通常互补的胸苷或尿嘧啶,并且通常改善ADAR的编辑位点识别。通过腺苷脱氨酶的作用,靶腺苷在转录后功能性地转变为鸟苷。因此,核苷酸序列总是与mRNA的靶区域互补(但如前所述有一个例外)以提高当施用的寡核苷酸与靶RNA杂交时形成的dsRNA内ADAR对靶腺苷的识别。此外,重要的是寡核苷酸的修饰的模式,特别是糖部分及其之间的键的模式。

[0016] 本发明的原理基于以下事实:经化学修饰的核酸必须稳定足够长的时间以便允许编辑mRNA。通常,RNA分子在细胞中降解得非常快。因此,对核酸进行化学修饰,其中修饰必须进行到一定程度,以使得经化学修饰的核酸在细胞中存活足够的时间跨度,并且修饰同时不妨碍ADAR的识别。寡核苷酸的修饰涉及核苷酸的糖部分。RNA碱基是未修饰的部分。使寡核苷酸稳定的优选修饰是脱氧核糖部分或在核糖部分具有2'-O-甲基或2'-F修饰的RNA碱基。另一个重要的修饰是用硫代磷酸酯键取代糖部分之间的磷酸酯键,由此核心区域中硫代磷酸酯键的百分比和位置起着决定性作用。

[0017] 已知有许多种寡核苷酸化学修饰,这些修饰会影响寡核苷酸的性质。糖残基的修饰主要是2'-位置的取代,其中已知的是2'-F、2'-OMe和2'-NH_2以及构象锁定的糖,如LNA、cEt和/或ENA。此类修饰增加了核酸酶抗性并保持了ASO与许多生化活性的相容性。与本发明特别相关的修饰是其中磷酸残基被修饰为硫代磷酸酯的磷酸二酯键,该硫代磷酸酯中的磷酸酯基团的氧原子被硫原子取代。立体化学可能会影响寡核苷酸的性质。此类修饰增加了对核酸酶降解的抗性,但保持了ASO与许多生化活性的相容性。

[0018] 在这方面,不仅对核酸酶降解的抗性很重要,而且编辑效率也至关重要。因此,需要在对核酸酶降解的足够抗性与足够高的编辑效率之间取得平衡。根据本发明的寡核苷酸具有提供此类有利特性的特定模式的硫代磷酸酯键。

[0019] 本发明过程中发现,人工核酸(寡核苷酸)的长度为15至80个核苷酸,优选为25至65个核苷酸,更优选为30至60个核苷酸。这种长度的核酸在本申请中被称为寡核苷酸。

[0020] 根据本发明的经化学修饰的核酸(寡核苷酸)具有与靶mRNA中相应序列互补的序列,互补性接近100%。在一些实施方式中,经化学修饰的寡核苷酸与靶mRNA中相应序列的互补性至少为85%,优选95%。尽管完全互补对于杂交过程是最佳的,但天然ADAR底物通常含有少量错配和/或凸起(bulge),它们通过允许双链底物的结构扰动来协助编辑,从而改善由双链RNA结合结构域进行的或在脱氨酶活性位点内的底物识别。

[0021] 本发明的经化学修饰的寡核糖核苷酸包含式I的核心序列:

[0022]

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	
-	Nu	- Nu	- Nu	- Nu	- Nu	- Nu	- Nu	- Nu	- Nu	- Nu	-
	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5

式I

[0023] 在该式I中,存在由三个核苷酸组成的中心碱基三联体,其中,中心核苷酸指定为"0"。指定为"0"的核苷酸和与核苷酸"0"直接相邻的编号为-1和+1的两个核苷酸被指定为中心碱基三联体,其中指定为"0"的中心核苷酸与靶RNA中的靶腺苷直接相对。式I的核苷酸

在5'-端(与核苷酸-5相邻)和3'-端(与核苷酸+5相邻)的两侧有其他寡核苷酸序列,这些寡核苷酸序列的长度可以相同或不同。

[0024] 在根据本发明实施方式的经化学修饰的核酸的中心碱基三联体中,存在携带N-杂环碱基的核苷、吡啶或嘧啶衍生物,更优选胞嘧啶核苷或其衍生物,其与靶(m)RNA中的靶腺苷相对。在特别优选的实施方式中,该核苷和5'和3'-单个相邻核苷酸包含至少一个经修饰的核苷,更优选两个经修饰的核苷,甚至更优选三个经修饰的核苷,其在2'碳原子处具有取代基,其中取代基是2'-氟或2'-O-甲基。在最优选的实施方式中,所有三个碱基都是2'-脱氧核糖部分。

[0025] 当靶(m)RNA中的5′-CAN密码子(靶标A带下划线,N=任何核碱基)被靶向时,根据本发明的经化学修饰的核酸的中心碱基三联体包含2'-脱氧肌苷或任何含有次黄嘌呤核碱基或其衍生物的核苷酸,其与靶腺苷5'相邻的胞嘧啶碱基配对。优选地,2'-脱氧肌苷被放置在包含两个、更优选三个2'-脱氧核苷酸的中心碱基三联体中。

[0026] 由于本发明的经化学修饰的核酸表现出增加的抗降解稳定性和结合ADAR的最佳化学修饰模式,因此本发明的核酸优选不必须具有吸引脱氨酶的具有特定环-发夹结构的募集部分。

[0027] 在本发明的一个实施方式中,经化学修饰的核酸是对称的,这意味着与中心碱基三联体相邻的两个核苷酸序列具有相同的长度。当寡核苷酸具有例如59个核苷酸时,中心碱基三联体的每一侧有28个核苷酸。

[0028] 在另一个实施方式中,根据本发明的核酸是不对称的,这意味着中心碱基三联体两侧的两个序列具有不同的长度。非对称设计使得能够更灵活地利用靶标周围的序列空间。此外发现,与对称设计相比,非对称设计可以提高短核酸序列(例如45nt)的编辑产量,前提是核酸在正确的末端缩短。优选地,在非对称实施方式中,中心碱基三联体的5'侧翼序列比3'侧翼序列长。优选的实施方式在3'侧翼序列处包含至少4nt,更优选地至少9nt,并且在5'侧翼序列处包含至少19nt,更优选地至少28nt,最优选地至少33nt。

[0029] 包含根据式I的核心序列的本发明的核酸的至少40%、更优选大于50%并且特别优选60%通过硫代磷酸酯键连接。式I的核心序列中的硫代磷酸酯模式至关重要。键a、d和e总是硫代磷酸酯键,除此之外,选自由键b、c、f、g和j组成的组中的最多三个键也可以是硫代磷酸酯键。然而,排除了所有键a到j都是硫代磷酸酯键的情况。在特别优选的实施方式中,键f是硫代磷酸酯键。

[0030] 在本发明的优选实施方式中,式I的核心序列两侧的序列包含至少10个、更优选至少15个、最优选20个或更多个核苷键,这些核苷键是硫代磷酸酯键,它们从核酸的一端(5'或3')开始,几乎没有不连续性,更优选没有任何不连续性。在本发明的另一个实施方式中,所述优选连续的硫代磷酸酯键的区块从两端(5'和3')开始放置在核酸的两侧。

[0031] 然而,在寡核苷酸的式I的核心区域中,磷酸酯键的键少于60%,特别优选少于50%,优选少于40%,由此必须观察到特定模式。键h和i始终是磷酸酯键。在本发明的优选实施方式中,不仅键h和i是磷酸酯键,而且键b和/或c也可以是磷酸酯键。

[0032] 在特别优选的实施方式中,键a、d和e是硫代磷酸酯键,而键h和i是磷酸酯键。在优选的实施方式中,式I的核心序列优选包含十个中最多六个的硫代磷酸酯键。

[0033] 本发明的经化学修饰的核酸对通常由RNases引起的降解具有显著更高的稳定性,

这进而使它们能够在应要编辑(m)RNA的细胞中存在更长时间。不希望受理论的束缚,我们假设,既然经化学修饰的核酸在细胞环境中的寿命增加,那么不需要用于募集脱氨酶的募集部分,因为ADAR可以由于双链的稳定性更长而作用于mRNA。

[0034] 生物反应通常与时间有关。脊椎动物细胞中存在大量不同的RNA分子,这些分子会经历不断出现且快速的周转。RNA分子通常被不同的RNase降解。因此,RNA分子用于治疗目的通常受到RNA分子快速降解的限制。由于体内情况通常与使用细胞培养测试系统的体外情况不同,因此用于治疗目的的分子的稳定性可能对治疗的成功具有决定性作用。

[0035] 本发明的经化学修饰的核酸分子在编辑能力和细胞内足够的稳定性之间提供了良好的平衡,因此甚至可以耐受内体中的条件。此外,本发明的经化学修饰的寡核苷酸能够进行裸摄取(gymnotic uptake),并显示出可接受的编辑效率。

[0036] 当寡核苷酸中实现以下特征中的优选几个、至少两个以及更优选至少三个时,可以实现根据本发明的经化学修饰的核酸的最佳结果,即:

[0037] • 式I的中心核心序列中,键a到j中的最多4至6个是磷酸酯键,而其余的是硫代磷酸酯键;

[0038] • 中心碱基三联体中至少一个DNA糖核苷与要脱氨基的腺苷相对;

[0039] • 通过以大致相等的化学计量对核苷核糖部分进行2'-F或2'-OMe修饰来使中心碱基三联体之外的嘧啶碱基稳定,从而避免2'-OMe部分区块的模式是优选的;

[0040] • 通过具有双重修饰即糖部分上的2'-OMe修饰和硫代磷酸酯键的三个核苷酸区块使两个末端稳定。

[0041] 本发明的经化学修饰的核酸分子(寡核苷酸)具有以下优点:该分子在脊椎动物生物体中足够稳定,从而可以实现期望的效果。根据本发明的分子对于不同RNase的降解在足够长的时间内是稳定的,从而可以看到效果。

[0042] 本发明的经化学修饰的核酸的另一个优势是它们可以被直接带到靶细胞而不需要特定载体(vector)或其他辅助机制如特定转染方法。根据本发明的经化学修饰的核酸可以通过剥裸(gymnosis)发挥作用,这意味着它们可以直接应用于靶细胞,而不需要像载体或其他运载体(carrier)的帮助手段。

[0043] 本发明的经化学修饰的核酸的另一个优势是它们在临床相关靶标中具有较高的编辑效率。经修饰的核酸可以通过剥裸插入靶细胞中,并且可以在靶细胞中在翻译水平上实现较高的效果。

[0044] 本发明的经化学修饰的核酸的另一个优势是,从A到I的编辑不仅可以通过可比较容易编辑的靶标(如5'UAG)实现,还可以通过更困难的三联体(如5'CAA)实现。

[0045] 本发明涉及一种用于在具有内源性ADAR的细胞内对靶RNA进行定点A到I编辑的经化学修饰的寡核苷酸,其包含能够与靶RNA中的靶序列结合的长度为11至100个核苷酸、优选20至80个核苷酸的序列,该序列具有3个核苷酸的中心碱基三联体,其中,中心核苷酸与靶RNA中待编辑为肌苷的靶腺苷相对。该寡核苷酸具有下式I的核心序列:

[0046]

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	
-	Nu -	Nu -	Nu -	Nu -	Nu -	Nu -	Nu -	Nu -	Nu -	Nu -	Nu -
	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5

式I

[0047] 其中Nu代表具有可修饰的糖部分的核苷酸。核苷酸序列下方的数字指定与具有数字0的中心核苷酸相邻的核苷酸的位置,其中负数指定寡核苷酸的5'端,正数指定寡核苷酸的3'端。核苷酸(0)和核苷酸(-1)和(+1)形成中心碱基三联体。字母a到j指定根据式I的核心序列中单个核苷酸之间的键。在描述所用寡核苷酸的示例和表格中,硫代磷酸酯键用"*"表示。每个核苷酸Nu可以在碱基和糖及其修饰的方面上彼此独立地具有不同的含义。

[0048] 本发明的经化学修饰的寡核苷酸的总长度为11至100个核苷酸,其中长度优选在20至80个核苷酸之间。在特别优选的实施方式中,根据本发明的经化学修饰的寡核糖核苷酸的长度为30至60个核苷酸,其包括式I的核心序列。具有式I的核心序列两侧的序列可以具有相同的长度,范围为9个核苷酸至25个核苷酸。在替代实施方式中,核心序列两侧的链可以具有不同的长度。

[0049] 除了特定的硫代磷酸酯模式外,还可以使用其他修饰。此类修饰可以位于糖部分的2'位置。嘌呤和/或嘧啶可以是经修饰或未修饰的。

[0050] 根据本发明,核心序列在位置a、d和e处具有强制性的硫代磷酸酯键。此外,本发明在位置h和i处具有强制性的常规磷酸酯键。换句话说,十个键中有五个被定义为PS或常规磷酸酯。其余五个键b、c、f、g和j可以选自PS和常规磷酸酯,从而产生几个优选的实施方式:

[0051] 在一个优选实施方式中,位置f、g、j处的键为硫代磷酸酯,而位置b、c处的键为磷酸酯。其他五个键a、d、e和h、i如上定义。在另一个优选实施方式中,位置b、c、f处的键为硫代磷酸酯,而位置g、j处的键为磷酸酯。其他五个键a、d、e和h、i如上定义。在另一个优选实施方式中,位置f处的键为硫代磷酸酯,而位置b、c、g、j处的键为磷酸酯。其他五个键a、d、e和h、i如上定义。在一个优选实施方式中,位置f、j处的键为硫代磷酸酯,而位置b、c、g处的键为磷酸酯。其他五个键a、d、e和h、i如上定义。在一个优选实施方式中,位置f、g处的键为硫代磷酸酯,而位置b、c、j处的键为磷酸酯。其他五个键a、d、e和h、i如上定义。在另一个优选实施方式中,位置b、c、f、g、j处的键为硫代磷酸酯键。其他五个键a、d、e和h、i如上定义。

[0052] 本发明的经化学修饰的寡核苷酸可以与任何合适的赋形剂,特别是药学上可接受的赋形剂配制成组合物。

[0053] 本发明的经化学修饰的寡核苷酸可以用于治疗或诊断用途,优选用于治疗用途。

[0054] 本发明的经化学修饰的寡核苷酸可用于治疗遗传疾病或病症。具体而言,遗传疾病或病症可以是代谢疾病、心血管疾病、自身免疫疾病或神经系统疾病。在此背景下,本发明涵盖一种通过向有需要的对象施用有效量的所述经化学修饰的寡核苷酸来治疗这样的疾病或病症的方法。

[0055] 说明了本发明及其优选实施方式,但不限于实施例和附图所描述的那些。

[0056] 附图具体示出了本发明的具体优选实施方式。

[0057] 图1示出了硫代磷酸酯优化对稳定性和编辑功效的影响,其中中心核心已被修饰。在图1A中示出了中心核心序列和硫代磷酸酯修饰。此外,图1A示出了构建体的稳定性和各

构建体的编辑功效。可以清楚地看出,通过增加硫代磷酸酯键的数量,可以显著提高稳定性,然而,编辑效率却降低了(图1A)。

[0058] 在图1A中,只使用了在位置1(a)和10(j)处具有硫代磷酸酯键的寡核苷酸[v117.26]。尽管编辑效率相当高(59.2%±14),但稳定性(t_{50}(100% FBS))仅为30小时。

[0059] 图1示出了在位置1(a)、7(g)、8(h)、9(i)和10(j)处具有硫代磷酸酯键的寡核苷酸[v117.27]。虽然抗降解稳定性(t_{50})提高到40小时,但编辑效率降低到33.0%。

[0060] 图1示出了在位置1(a)、2(b)、3(c)、4(d)、5(e)和10(j)处具有6个硫代磷酸酯键的构建体[v117.28]。编辑效率提高至50.3%,但抗降解稳定性(t_{50})降低至仅20小时。

[0061] 图1A示出了进一步的实验[v117.29],其中所有键都是硫代磷酸酯键。编辑效率降低至仅32.0%。

[0062] 与此相反,图1A示出了实验[v117.30],其中10个键中有6个是硫代磷酸酯键,即在位置a、d、e、f、g和j处。编辑效率提高至52.0%,稳定性(t_{50})>7天。

[0063] 在图1A中所示的结果中,中心核心中的每个键都是硫代磷酸酯键[v117.29],显示出构建体的稳定性>7天。然而不幸的是,编辑效率降低到仅为32%。这表明,在实现合理的编辑效率时,必须观察硫代磷酸酯键的模式。

[0064] 另一方面,硫代磷酸酯键的数量并不是唯一重要的因素,因为仅用两个硫代磷酸酯键(在位置1和10),就可以实现在t_{50}(100% FBS)为30小时的稳定性[v117.26]。

[0065] 在图1A和图1B中,示出了相关样品中磷酸化键的位置以及编辑效果和稳定性。图1A显示,使用命名为v117.39的样品获得了高编辑功效和高抗降解稳定性之间的最佳平衡。在此样品中,核心结构中的硫代磷酸酯键位于a(1)、d(4)、e(5)、f(6)和j(10)处。根据本发明,这种硫代磷酸酯键模式是特别优选的。

[0066] 图1A示出了靶向SERPINA1 E342K突变的构建体中硫代磷酸酯键的精确位置,如实施例1中进一步解释的。用两个不同模型系统(质粒和piggyBac)示出了编辑功效。在100% FBS中测量构建体的半衰期(t(50))。n表示样品数。

[0067] 图1B示出了命名为a到j的核苷酸之间的键的方向。中心碱基三联体被突出显示。

[0068] 图2示出了实施例1中进行的实验的编辑产量结果。编辑结果显示在图2A中,而实施例1中的构建体的血清半衰期显示在图2B中。

[0069] 图3示出了实施例2中进行的实验的编辑功效结果,而100% FBS中的相应血清半衰期显示在图3B中。

[0070] 图4A示出了靶向小鼠MECP2中致病W104X突变的构建体的编辑功效。图4B示出了血清半衰期。

[0071] 图5示出了实施例4的结果。构建体的编辑功效在图5A中提供,而稳定性在图5B中显示。

[0072] 图6示出了实施例5的编辑结果。

[0073] 图7示出了实施例6的结果。图7A示出了编辑效率,图7B示出了稳定性。

[0074] 图8示出了实施例7的结果,其中将根据实施例1的优化的硫代磷酸酯设计(V117.39)转移至靶向鼠CTNNB1中的T41位点的寡核苷酸。该图示出了所公开的模式也可以应用于其他靶标。

[0075] 实施例1:在人类SERPINA1基因的致病E342K突变位点处中心碱基三联体附近的PS

定位的优化。

[0076] 长段的PS(硫代磷酸酯)键提高寡核苷酸的稳定性,进而提高其生物利用度。从治疗角度来看,这意味着与类似的磷酸二酯(PO)键构建体相比,使用PS键构建体以较低剂量或较低频率治疗就足以达到期望效果。然而,简单地用PS键替换所有PO键对编辑效果不利。在此,筛选了PS键在中心碱基三联体周围10个磷酸二酯键内的不同放置,这一区域对于PO/PS替换在编辑效率和稳定性方面特别敏感。该实施例基于治疗上高度相关的底物,即SERPINA1基因的E342K突变,它是α-1-抗胰蛋白酶缺乏症的严重Z表型的根本原因,代表了一项未解决的临床挑战。表1提供了所有使用的寡核苷酸构建体的列表。

[0077] 实施例1的编辑产量结果如图2A所示,而实施例1中构建体的血清半衰期如图2B所示。首先显示出,在所有10个位置统一放置硫代磷酸酯(PS)键大大降低了编辑效率(图1A和2A)。其次,有几个位置,特别是a、d和e,PS键非常良好接受的。再者,可以在特定位置添加额外的PS键,这可以进一步提高稳定性和/或编辑效率。总体而言,最佳PS模式可大大提高寡核苷酸的血清半衰期,而不会显著损失编辑产量(图1A和2A)。最佳解决方案结合了增强的稳定性和增加的编辑产量。

[0078] 将2.5×10^4个HeLa细胞(Cat.No.:ATCCCCL-2)接种于24孔板中。24h后,用含有人类SERPINA1 E342K突变cDNA或SERPINA1健康cDNA(“野生型”)的质粒正向转染细胞。300ng质粒和0.9μl FuGENE®6(Promega)分别用50μl Opti-MEM稀释,并孵育5分钟,然后合并且再孵育20分钟。更换培养基,并将转染混合物均匀分配到一个孔中。质粒转染后的24h,用5pmol构建体/孔和1.5μl/孔的脂质体RNAiMAX试剂(ThermoFisher Scientific)正向转染细胞。24h后,更换培养基。转染48小时后,收获细胞进行RNA分离和测序。

[0079] 如图2A所示,PS键在观察到的键位置处的放置会对编辑水平产生很大影响。V117.26(Seq.ID No.1)仅在位置a和j处包含PS键。在中心碱基三联体(CBT)附近没有稳定的PS位置。因此,虽然该实施例的编辑效率>50%,但在100% FBS中的半衰期仅为30h左右。

[0080] 当PS键位于CBT的3’处时,即v117.27(Seq.ID No.2)和v117.29(Seq.ID No.4),与v117.26相比,编辑水平下降约50%。因此,将PS键放置在位置h和i处证明会严重损害编辑,而将PS键放置在位置g处仅对编辑产生很小的影响,这在比较v117.39(Seq.ID No.9)与v117.40(Seq.ID No.10)和v117.30(Seq.ID No.5)时可见。将PS键添加到所有位置,如v117.29(Seq.ID No.4)所示,大大增加了ASO在100% FBS中的半衰期(>7天),但与v117.26相比,代价是编辑产量会大大降低。因此,需要精确放置PS键,以增加血清半衰期但不损害编辑效果。这包括避免在位置h和i放置PS键。

[0081] 与此相反,当PS键被放置在CBT的5’相邻的或内部的键处时,编辑产量保持与对v117.26观察到的类似,例如如在版本v117.28(Seq.ID No.3)、v117.30(Seq.ID No.5)和v117.40(Seq.ID No.10)中所见。对于一些实施方式,编辑产量甚至得到提高,如v117.33(Seq.ID No.6)、v117.34(Seq.ID No.7)、v117.35(Seq.ID No.8)和v117.39(Seq.ID No.9)中所见。这些实施例还表明,虽然位置b和c处的PS键不损害编辑,但它们对于ASO的稳定性似乎也不是非常必要的。因此,它们对整体构建体性能的作用是中性的。

[0082] 然而,特别是关于ASO的血清半衰期,CBT(位置d到g)处的PS键是必需的,如在实施例v117.28(Seq.ID No.3)与v117.30(Seq.ID No.5)相比中所见。两个版本具有相同数量的

键(6个PS,4个PO),但CBT处的键使ASO比5'-相邻的键明显更稳定(在100% FBS中,>7天相比于仅20小时)。这强调了ASO内PS键精确定位的重要性,通过比较具有相同PS键总数但排列不同的ASO的血清半衰期和编辑功效,可以强调这一点。例如,实施例v117.28(Seq.ID No.3)、v117.30(Seq.ID No.5)和v117.33(Seq.ID No.6)均具有六个PS键。然而,v117.28和v117.30的编辑效率相似(约50%),而v117.33的编辑效率更高(约66%)。此外,与v117.28(约20小时)相比,v117.30和v117.33的血清半衰期显著更高(>7天)。总体而言,这将使v117.33成为在高编辑功效和高血清耐受性的组合方面六个PS键的定位最有利的实施方式。类似地,可以比较实施例v117.27(Seq.ID No.2)、v117.39(Seq.ID No.9)和v117.40(Seq.ID No.10)以获得五个PS的最有利定位,后两者明显优于v117.27(Seq.IDNo.2)。图1提供了不同实施方式的概述以及它们精确的PS键放置、相应的编辑产量和100%FBS半衰期(t50)。

[0083] 因此,这使得位置a、d和e处的PS键对于延长100% FBS中半衰期而不损害构建体的编辑产量而言最为重要。然而,在位置b、c、f和j处引入PS键可进一步改善构建体的这些品质。位置g处的PS键也可改善构建体的血清半衰期,但可能会略微影响编辑功效。然而,PS键不应放置在位置h和i处,这显然不利于构建体的编辑功效。来自实施例v117.39(Seq.IDNo.9)的PS键的位置被选为在高编辑产量和100% FBS中长半衰期之间的最佳平衡,并在其他靶标中进一步测试(参见下文的进一步实施例)。相应的位置是a、d、e、f和j。

[0084] 表1:实施例1中使用的构建体序列和修饰。

[0085] mN=2'-O-甲基,fN=2'氟,N=2'OH(核糖),dN=2'H(DNA)

[0086] *=硫代磷酸酯键

[0087]

构建体名称	构建体序列 (5'到3'方向)	Seq. ID	图号
V117.26 (公开于 EP 21177135.7)	mC*mA*mU*G*G* fC*mC* fC* mC*A*G* fC* A*G* mC* fU* mU* fC* A*G* mU* fC* mC* fC* mU* fU mU fC **dTdCdI** mU fC G*A* mU* G*G* fU* mC* A*G* fC* A* mC*A*G* fC*mC* fU*mU* A* fU* G* fC*A* mC*mG*mG	1	1A, 1B
V117.27	mC*mA*mU* G*G* fC*mC* fC* mC* A*G* fC* A* G* mC* fU* mU* fC* A*G* mU* fC* mC* fC* mU *mUmU fC **dTdCdI*** mU* fC* G*A* mU* G*G* fU* mC* A*G* fC* A* mC* A*G* fC*mC* fU*mU* A* fU* G* mC*A* mC*mG*mG	2	1A, 1B
V117.28	mC*mA*mU* G*G* fC*mC* fC* mC* A*G* fC* A* G* mC* fU* mU* fC* A*G* mU* fC* mC* fC* mU *mU*mU* fC* **dT*dCdI** mU fC G*A* mU* G*G* fU * mC* A*G* fC* A* mC* A*G* fC*mC* fU*mU* A * fU* G* mC*A* mC*mG*mG	3	1A, 1B
V117.29	mC*mA*mU* G*G* fC*mC* fC* mC* A*G* fC* A* G* mC* fU* mU* fC* A*G* mU* fC* mC* fC* mU *mU*mU* fC* **dT*dC*dI*** mU* fC* G*A* mU* G*G * fU* mC* A*G* fC* A* mC* A*G* fC*mC* fU*m U* A* fU* G* mC*A* mC*mG*mG	4	1A, 1B
V117.30	mC*mA*mU* G*G* fC*mC* fC* mC* A*G* fC* A* G* mC* fU* mU* fC* A*G* mU* fC* mC* fC* mU *mUmU fC* **dT*dC*dI*** mU fC G*A* mU* G*G* fU * mC* A*G* fC* A* mC* A*G* fC*mC* fU*mU* A * fU* G* mC*A* mC*mG*mG	5	1A, 1B

[0088]

V117.33	mC*mA*mU* G*G* fC*mC* fC* mC* A*G* fC* A* G* mC* fU* mU* fC* A*G* mU* fC* mC* fC* mU *mU*mU* fC* **dT*dC*dI** mU fC GA* mU* G*G* fU * mC* A*G* fC* A* mC* A*G* fC*mC* fU*mU* A * fU* G* mC*A* mC*mG*mG	6	1A, 1B
V117.34	mC*mA*mU* G*G* fC*mC* fC* mC* A*G* fC* A* G* mC* fU* mU* fC* A*G* mU* fC* mC* fC* mU *mUmU fC* **dT*dC*dI** mU fC GA* mU* G*G* fU* mC* A*G* fC* A* mC* A*G* fC*mC* fU*mU* A* fU* G* mC*A* mC*mG*mG	7	1A, 1B
V117.35	mC*mA*mU* G*G* fC*mC* fC* mC* A*G* fC* A* G* mC* fU* mU* fC* A*G* mU* fC* mC* fC* mU *mUmU fC* **dT*dCdI** mU fC GA* mU* G*G* fU* mC* A*G* fC* A* mC* A*G* fC*mC* fU*mU* A* fU* G* mC*A* mC*mG*mG	8	1A, 1B
V117.39	mC*mA*mU*G*G* fC*mC*fC*mC*A*G* fC*A*G*mC *fU*mU*fC*A*G*mU*fC*mC*fC*mU*mUmUfC* **dT*d C*dI** mUfCG*A*mU*G*G*fU*mC*A*G*fC*A*mC*A* G*fC*mC*fU*mU*A*fU*G*mC*A*mC*mG*mG	9	1A, 1B
V117.40	mC*mA*mU*G*G*fC*mC* fC*mC*A*G*fC*A*G*mC* fU*mU*fC*A*G*mU*fC*mC*fC*mU*mUmUfC* **dT*dC *dI*** mU fC GA*mU*G*G*fU*mC*A*G*fC*A*mC*A* G*fC*mC*fU*mU*A* fU*G*mC*A*mC*mG*mG	10	1A, 1B

[0089] 实施例2:将优化的PS键模式转移到靶向内源性人类STAT1 Y701的寡核苷酸。

[0090] 实施例2的编辑功效结果如图3A所示,而构建体的血清半衰期如图3B所示。实施方式v117.39(Seq.ID No.9)中针对SERPINA1 E342K靶标发现的CBT周围的最佳PS键模式被转移到靶向内源性人类STAT1转录物的实施方式,其通过RNA编辑诱导氨基酸改变Y701C,从而去除STAT1蛋白中功能重要的磷酸酪氨酸。此处显示,实施例1中的优化PS键模式可以成功转移至不同的靶标。表2中提供了寡核苷酸构建体的列表。

[0091] 将10^5个HeLa细胞(Cat.No.:ATCC CCL-2)接种到24孔板中。24h后,通过在各自在50μl Opti-MEM(ThermoFisher Scientific)中稀释25pmol构建体/孔和1.5μl/孔Lipofectamine RNAiMAX试剂(ThermoFisher Scientific)对细胞进行正向转染,并在室温下孵育5分钟。孵育后,将两种溶液合并至总体积为100μl/孔,并在室温下再孵育20分钟。孵育后,将转染混合物缓慢分配到一个孔中。转染24小时后,收获细胞用于RNA分离和测序。

[0092] 如图3B和3A所示,v117.29(Seq.ID No.13)包含来自v117.39(Seq.ID No.9)的优化的PS键模式,其优于其相应的CBT周围缺乏PS键的构建体v117.28(Seq.ID No.12,在专利EP21177135.7中公开),无论分别是在100% FBS中稳定性(6天相比于30小时)还是编辑产量(50.5%相比于40.5%)方面。我们还包括了与v117.19(Seq.ID No.11)的比较,v117.19是一种仅经过最小程度修饰的构建体,其与v117.28(来自我们现有技术(EP21177135.7)的更密集修饰的构建体)相比,显示出更高的编辑产量。通过优化的PS模式,v117.29达到的编辑产量与修饰较少的v117.19相当。此外,与v117.28(30小时)相比,v117.29在100%FBS中的半衰期(6天)是其5倍。显然,优化的PS键排列在编辑产量和100% FBS中血清半衰期方面表现出与SERPINA1靶标(实施例1)所见的相同的改善。因此,可以得出结论,优化的PS键模式可以转移到其他相关靶标。

[0093] 表2:实施例2中使用的构建体序列和修饰。

[0094] mN=2'-O-甲基,fN=2'氟,N=2'OH(核糖),dN=2'H(DNA)

[0095] *＝硫代磷酸酯键

[0096]

构建体名称	构建体序列 (5‘到3‘方向)	Seq. ID	图号
V117.19	mC*mA*mG*A*C*A*C*A*G*A*A*A*U*C*A*A*C*U*C*A*G*U*C*U*U*GAU ACA UCC*A*G*U*U*C*C*U*U*U*A*G*G*G*C*C*A*U*C*A*A*G*U* mU*mC*mC	11	2A, 2B
V117.28 (公开于 EP 21177135.7)	mC*mA*mG*A* fC*A* fC*A*G*A*A*A* fU*fC* A*A* fC*fU*fC*A*G* fU*fC*fU*fU*GA fU **dAdCdA** fU fC fC*A*G* fU*fU*fC*fC*fU*fU*fU* A*G*G*G* fC*fC*A* fU*fC* A*A*G* fU* mU*mC*mC	12	2A, 2B
V117.29	mC*mA*mG*A*fC*A*mC*A*G*A*A*A*fU*mC*A*A*fC*mU*fC*A*G*mU*fC*mU*fU*GAmU* **dA*dC*dA** mUfC fC*A*G*mU*fU*mC*fC*mU*fU*mU*A*G*G*G* fC*mC*A*fU*mC*A*A*G*fU*mU*mC*mC – GalNAc	13	2A, 2B

[0097] 实施例3:将优化的PS键模式转移至靶向鼠MECP2中致病W104X突变的寡核苷酸。

[0098] 实施例3的结果如图4所示。构建体的编辑效果如图4A所示,而相应的100％ FBS中的血清半衰期如图4B所示。v117.39(Seq.ID No.9)的PS模式从SERPINA1 E342K靶标转移到内源性人类STAT1 Y701被证明是成功的。因此,为了进一步测试优化PS设计的可转移性,在靶向鼠MECP2中的W104X突变的构建体上进行了测试,该突变是严重雷特综合征(Rett syndrome)的根本原因。结果表明,来自实施例1和2中的优化PS键模式可以成功转移到临床相关序列环境中的另一个靶标。表3提供了所用寡核苷酸构建体的列表,显示了完整的修饰模式。

[0099] 将5×10^4个HeLa细胞(Cat.No.:ATCCCCL-2)接种于24孔板中。24h后,用含有鼠MECP2 W104X突变cDNA的质粒正向转染细胞。300ng质粒和0.9μl FuGENE®6(Promega)分别用50μl Opti-MEM稀释,并孵育5分钟,然后合并且再孵育20分钟。更换培养基,并将转染混合物均匀分配到一个孔中。质粒转染后的24h,用25pmol构建体/孔和1.5μl/孔的脂质体RNAiMAX试剂(ThermoFisher Scientific)正向转染细胞。24h后,更换培养基。转染48小时后,收获细胞进行RNA分离和测序。

[0100] 图4A和4B分别显示了所测试的三种不同构建体的编辑产量和100％ FBS中半衰期的比较。V120.17(Seq.ID No.14)是一种仅在位置a和j处具有PS键的构建体,在编辑中表现良好(约50％),但在100％ FBS中不稳定(半衰期约48小时)。另一方面,构建体v120.24(Seq.ID No.16)在每个位置都具有PS键,这大大提高了血清半衰期(约7天),但也损失了显著的编辑产量,编辑产量降至v120.17所观察到的近一半(约30％)。然而,当应用来自v117.39(Seq.ID No.9)的优化PS键模式时,构建体v120.23(Seq.ID No.15)达到与v120.17相同的编辑效率(约50％),同时实现1.5倍的100％ FBS中半衰期改善(约72小时)。这强调了PS键精确定位的威力,即使对于不同设计和长度的构建体也是如此(将实施例1和2中的构建体与实施例3进行比较),这进一步强调了该模式可转移到其他靶标和寡核苷酸序列设计。

[0101] 表3:实施例3中使用的构建体序列和修饰。

[0102] mN＝2’-O-甲基,fN＝2’氟,N＝2’OH(核糖),dN＝2’H(DNA)

[0103] *＝硫代磷酸酯键

[0104]

构建体名称	构建体序列 (5‘到3‘方向)	Seq. ID	图号
V120.21 (公开于 EP 21177135.7)	mU*mC*mG*G* fC*fC* A*G*A* fC*fU*fU*fC*fC*fU*fU*fU* G* fU*fU*fU*A*A*G* fC*fU*fU*fU*fC*G*fU G fU **dCdC** A A fC fC*fU*fU*fC* mA*mG*mG	14	3A, 3B
V120.23	mU*mC*mG*G* fC*fC* A*G*A* fC*fU*fU*fC*fC*fU*fU*fU* G* fU*fU*fU*A*A*G* fC*fU*fU*fU*fC*G*fU G fU* **dC*dC*** A A fC fC*fU*fU*fC* mA*mG*mG	15	3A, 3B
V120.24	mU*mC*mG*G* fC*fC* A*G*A* fC*fU*fU*fC*fC*fU*fU*fU* G* fU*fU*fU*A*A*G* fC*fU*fU*fU*fC*G*fU* G* fU* **dC*dC*** A* A* fC* fC*fU*fU*fC* mA*mG*mG	16	3A, 3B

[0105] 实施例4:将优化的PS键模式转移到靶向内源性人类L157 GAPDH位点的寡核苷酸。

[0106] 实施例4的结果如图5所示。构建体的编辑功效提供在图5A中,而相应的100％ FBS中血清半衰期显示在图5B中。优化的PS设计被转移到靶向内源GAPDH转录物L157位点的构建体中。优化的PS模式将100％ FBS中的半衰期稳定性提高到约两倍。表4提供了显示所用PS位置的构建体列表。

[0107] 将10^5个HeLa细胞(Cat.No.:ATCC CCL-2)接种到24孔板中。24h后,通过在各自在50μl Opti-MEM(ThermoFisher Scientific)中稀释25pmol构建体/孔和1.5μl/孔Lipofectamine RNAiMAX试剂(ThermoFisher Scientific)对细胞进行正向转染,并在室温下孵育5分钟。孵育后,将两种溶液合并至总体积为100μl/孔,并在室温下再孵育20分钟。孵育后,将转染混合物缓慢分配到一个孔中。转染24小时后,收获细胞用于RNA分离和测序。

[0108] 图5A和5B分别显示了构建体的编辑产量和在100％ FBS中的半衰期。与未对CBT区域中的PS键进行任何优化的构建体v120.21(Seq.ID No.17)相比,具有优化的PS键模式的构建体v120.22(Seq.ID No.18)显示出在100％ FBS中的半衰期增加到两倍。虽然与v120.21相比编辑产量确实有所下降,但v120.22的编辑产量仍然是所有键均为PS的构建体v120.23(Seq.ID No.19)的两倍。鉴于v120.21在100％ FBS中的半衰期已经较长(72小时)并且初始编辑产量较低(约25％),PS优化的效果不如实施例1、2和3中所示的靶标那么明显。尽管如此,它仍然提供了足够强的效果来强调本发明的可转移性和灵活性。

[0109] 表4:实施例4中使用的构建体序列和修饰。

[0110] mN＝2’-O-甲基,fN＝2’氟,N＝2’OH(核糖),dN＝2’H(DNA)

[0111] *＝硫代磷酸酯键

[0112]

构建体名称	构建体序列 (5‘到3‘方向)	Seq. ID	图号
V120.21 (公开于 EP 21177135.7)	mC*mA*mA*A*G*fU*mU*G*fU*mC*A*fU*G*G*A* mU*G*A*fC*mC*fU*mU*G*G*fC*mC*A*G*G*G*GfUG **dCdCdA** AGmC*A*G*fU*mU*mG*mG	17	4A, 4B
V120.22	mC*mA*mA*A*G*fU*mU*G*fU*mC*A*fU*G*G*A* mU*G*A*fC*mC*fU*mU*G*G*fC*mC*A*G*G*G*GfUG* **dC*dC*dA** AGmC*A*G*fU*mU*mG*mG	18	4A, 4B
V120.23	mC*mA*mA*A*G*fU*mU*G*fU*mC*A*fU*G*G*A* mU*G*A*fC*mC*fU*mU*G*G*fC*mC*A*G*G*G*G*fU*G* **dC*dC*dA*** A*G*mC*A*G*fU*mU*mG*mG	19	4A, 4B

[0113] 实施例5:将优化的PS键模式转移至靶向人类LRRK2中致病G2019S突变的寡核苷酸。

[0114] 实施例5的结果如图6所示。来自实施例1中的优化PS设计(SERPINA1中的v117.34和117.39)被转移到靶向带有导致帕金森病的G2019S突变的瞬时过表达的LRRK2转录物的寡核苷酸上。表5提供了显示所用PS位置的构建体列表。

[0115] 将5×10^{4}个HeLa细胞(Cat.No.:ATCCCCL-2)接种于24孔板中。24h后,用含有人类LRRK2 G2019S突变cDNA的质粒正向转染细胞。300ng质粒和0.9μl FuGENE®6(Promega)分别用50μl Opti-MEM稀释,并孵育5分钟,然后合并且再孵育20分钟。更换培养基,并将转染混合物均匀分配到一个孔中。质粒转染后的24h,用25pmol构建体/孔和1.5μl/孔的脂质体RNAiMAX试剂(ThermoFisher Scientific)正向转染细胞。转染24h后,收获细胞进行RNA分离和测序。

[0116] 图6A显示了编辑产量。PS模式v117.34(Seq.ID No.21)和117.39(Seq.ID No.22)均提供了与早前在中心区域缺乏PS的寡核苷酸V117.19(Seq.ID No.20)相当或相比之下甚至更好的编辑产量。

[0117] 表5:实施例5中使用的构建体序列和修饰。

[0118] mN=2'-O-甲基,fN=2'氟,N=2'OH(核糖),dN=2'H(DNA)

[0119] *=硫代磷酸酯键

[0120]

构建体名称	构建体序列 (5'到3'方向)	Seq. ID	图号
V117.19 (公开于 EP 21177135.7)	mC*mC*mC*C*A*U*U*C*U*A*C*A*G*C*A*G*U*A*C*U*G*A*G*C*A*AUG CC**dI** UAG*U*C*A*G*C*A*A*U*C*U*U*U*G*C*A*A*U*G*A*U*G*G*mC*mA*mG	20	
V117.20 (公开于 EP 21177135.7)	mC*mC*mC*fC* A*mU*fU*mC*fU* A*mC* A* G*fC* A* G*mU* A*fC*mU* G* A* G*fC* A* AmU G **dCdCdI** fUAG*mU*fC*A*G*mC*A*A*fU*mC*fU*mU*fU*G*mC*A*A*fU*G*A*mU*G*G*mC*mA*mG	21	
V117.34	mC*mC*mC*fC*A*mU*fU*mC*fU*A*mC*A*G*fC*A*G*mU*A*fC*mU*G*A*G*fC*A*AmUG* **dC*dC*dI** fU AGmU*fC*A*G*mC*A*A*fU*mC*mU*mU*mU*G*mC*A*A*fU*G*A*mU*G*G*mC*mA*mG	22	
V117.39	mC*mC*mC*fC*A*mU*fU*mC*fU*A*mC*A*G*fC*A*G*mU*A*fC*mU*G*A*G*fC*A*AmUG* **dC*dC*dI** fU AG* mU*fC*A*G*mC*A*A*fU*mC*mU*mU*mU*G*mC*A*A*fU*G*A*mU*G*G*mC*mA*mG	23	

[0121] 实施例6:将优化的PS键模式转移至靶向人类CRB1中致病C948Y突变的寡核苷酸。

[0122] 实施例6的结果如图7所示。将来自实施例1的优化PS设计(针对SERPINA1靶标的V117.39)转移至靶向人类CRB1中的C948Y突变位点的寡核苷酸。CRB1基因突变与包括色素性视网膜炎和莱伯氏先天性黑蒙症在内的各种早发性视网膜营养不良有关。此外,靶向视网膜的寡核苷酸将大大受益于稳定性的提高,从而需要更少的施用次数,并因此需要更少的对患者眼睛的潜在侵入性注射。表6显示了所使用的相应构建体的列表。

[0123] 将5×10^{4}个HeLa细胞(Cat.No.:ATCCCCL-2)接种于24孔板中。24h后,用含有人类CRB1 C948Y突变cDNA的质粒正向转染细胞。300ng质粒和0.9μl FuGENE®6(Promega)分别用50μl Opti-MEM稀释,并孵育5分钟,然后合并且再孵育20分钟。更换培养基,并将转染混合物均匀分配到一个孔中。质粒转染后的24h,用25pmol构建体/孔和1.5μl/孔的脂质体RNAiMAX试剂(ThermoFisher Scientific)正向转染细胞。24h后,收获细胞用于RNA分离和

测序。

[0124] 图7A显示了不同构建体的编辑产量。对于核心区域具有PS优化的长的对称的实施方式V117.20(Seq.ID 24),与不具有PS优化的不稳定构建体V117.19(Seq.ID 23)相比,仅观察到编辑产量的小幅下降。对于也具有PS优化核心区域的较短的不对称的实施方式V120.17(Seq.ID 25),编辑产量甚至保持与版本V117.19相当。然而,V117.20(>7天)和V120.17(10小时)的100% FBS半衰期(如图7B所示)与V117.19(<1分钟)相比大大增加。这强调了不依赖于构建体设计的稳定化措施(例如构建体核心区域中PS键的最佳放置)的影响。

[0125] 表6:实施例6中使用的构建体序列和修饰。

[0126] mN=2'-O-甲基,fN=2'氟,N=2'OH(核糖),dN=2'H(DNA)

[0127] *=硫代磷酸酯键

[0128]

构建体名称	构建体序列 (5'到3'方向)	Seq. ID	图号
V117.19	mU*mU*mU*G*U*C*C*A*U*U*A*A*A*A*A*C*A*G*C*A*U*U*U*G*C* AAU ACA UUC *A*A*A*U*C*C*U*U*G*A*A*G*C*A*C*C*G*G*C*U*G*G*mC*mA*mC	24	7
V117.20	mU*mU*mU*G*fU*mC*fC*A*mU*fU*A*A*A*A*A*mC*A*G*fC*A*mU*fU*mU*G*fC* AAmU* **dA*dC*dA**_mUfUfC *A*A*A*mU*fC*mC*fU*mU*G*A*A*G*fC*A*mC*fC*G*G*mC*fU*G*G*mC*mA*mC	25	7
V120.17	mA*mC*mC*G*fC*mU*fU*mU*G*fU*mC*fC*A*mU*fU*A*A*A*A*A*mC*A*G*fC*A*mU*fU*mU*G*fC* AAmU* **dA*dC*dA**_mUfUfC*A*A*A*mU*mC*mC	26	7

[0129] 实施例7:将优化的PS键设计转移到靶向鼠CTNNB1上内源性T41位点的ASO。

[0130] 实施例7的结果如图8所示。将来自实施例1的优化PS设计(针对SERPINA1靶标的V117.39)转移至靶向鼠CTNNB1中的T41位点的寡核苷酸。编码的蛋白质β-连环蛋白是细胞生长和组织稳态的关键成分,在T41位点磷酸化后降解。因此,T41位点的突变可以延长β-连环蛋白在细胞中的存在时间并有效加速组织再生。表7中列出了相应的构建体列表。

[0131] 将10^5个小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)接种到24孔板中。24小时后,通过在各自在50μl Opti-MEM(ThermoFisher Scientific)中稀释25pmol构建体/孔和1.5μl/孔Lipofectamine RNAiMAX试剂(ThermoFisher Scientific)对细胞进行正向转染,并在室温下孵育5分钟。孵育后,将两种溶液合并至总体积为100μl/孔,并在室温下再孵育20分钟。孵育后,将转染混合物缓慢分配到一个孔中。转染24小时后,收获细胞用于RNA分离和测序。

[0132] 图8A显示v117.20(Seq.ID26)的编辑产量达到约20%,而图8B则显示了构建体在100%FBS中的半衰期(>7天)。因此,鼠CTNNB1 T41位点提供了另一个可以应用优化PS键位置的示例。

[0133] 表7:实施例7中使用的构建体序列和修改。

[0134] mN=2'-O-甲基,fN=2'氟,N=2'OH(核糖),dN=2'H(DNA)

[0135] *=硫代磷酸酯键

[0136]

构建体名称	构建体序列 (5‘到3‘方向)	Seq. ID	图号
V117.20	mG*mC*mC*fC*mU*fU*G*mC*fC*A*mC*fU*mC*A*G*G*G*A*A*G*G*A*G*fC*mU* GfUG* **dG*dC*dI** GmUG* G*fC*A*mC*fC*A*G*A*A*mU*G*G*A*fU*mU*fC*mC*A*G*A*A*fU*mC*mC*mA	27	8

[0137] 本文公开的序列也显示在所附的序列表中。然而,序列表仅显示核苷酸的序列,而核苷酸的修饰和核苷酸之间的键未显示在序列表中。相关序列公开在上表中。

构建体名称	根据方案的PS位置(5' → 3')										PO数量	质粒中的编辑[%]	piggyBac中的编辑 [%]	100% FBS中的t(50)	n (样品)
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j					
v117.26	x									x	8	59.2 ± 14	54.7 ± 4.2	30 h	13
v117.27	x						x	x	x	x	5	33.0 ± 3.4	33.0 ± 16.5	40 h	4
v117.28	x	x	x	x	x					x	4	50.3 ± 1.8	66.2 ± 3.6	20 h	4
v117.29	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	32.0 ± 1.0	49.3 ± 7.3	> 7天	4
v117.30	x			x	x	x	x			x	4	52.0 ± 11.9	53.0 ± 19.3	> 7天	11
v117.33	x	x	x	x	x	x					4	65.6 ± 5.0	69.1 ± 3.4	7天	3
v117.34	x			x	x	x					6	73.3 ± 6.4	72.8 ± 0.9	60 h	6
v117.35	x			x	x						7	76.4 ± 2.2	70.0 ± 1.5	36 h	3
v117.39	x			x	x	x				x	5	65.3 ± 10.4	69.2 ± 2.4	96 h	14
v117.40	x			x	x	x	x				5	59.1 ± 6.7	67.6 ± 1.4	7天	3

图1A

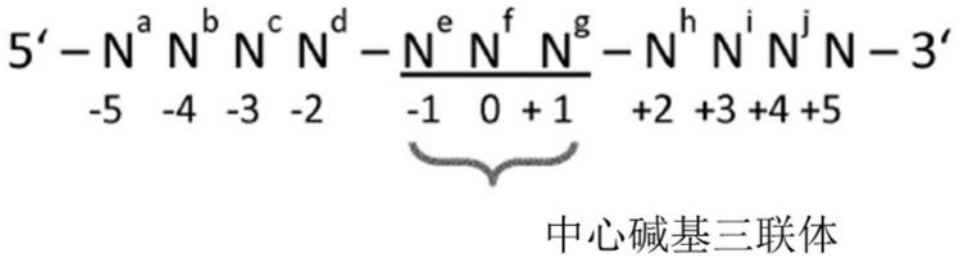


图1B

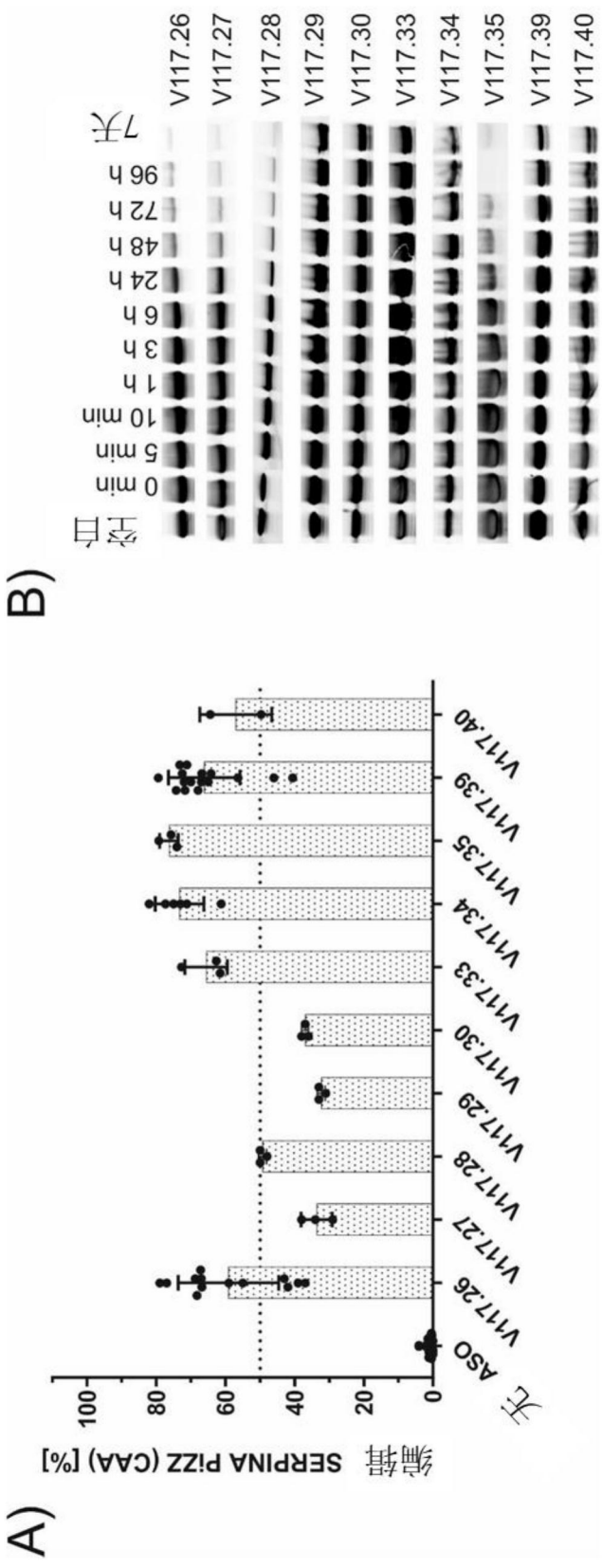

B)
空白
0 min
5 min
10 min
1 h
3 h
6 h
24 h
48 h
72 h
96 h
对
V117.26
V117.27
V117.28
V117.29
V117.30
V117.33
V117.34
V117.35
V117.39
V117.40
A)
SERPINA pi:ZZ (CAA) [%]
编辑
对
ASO
V117.26
V117.27
V117.28
V117.29
V117.30
V117.33
V117.34
V117.35
V117.39
V117.40
0
20
40
60
80
100

图2

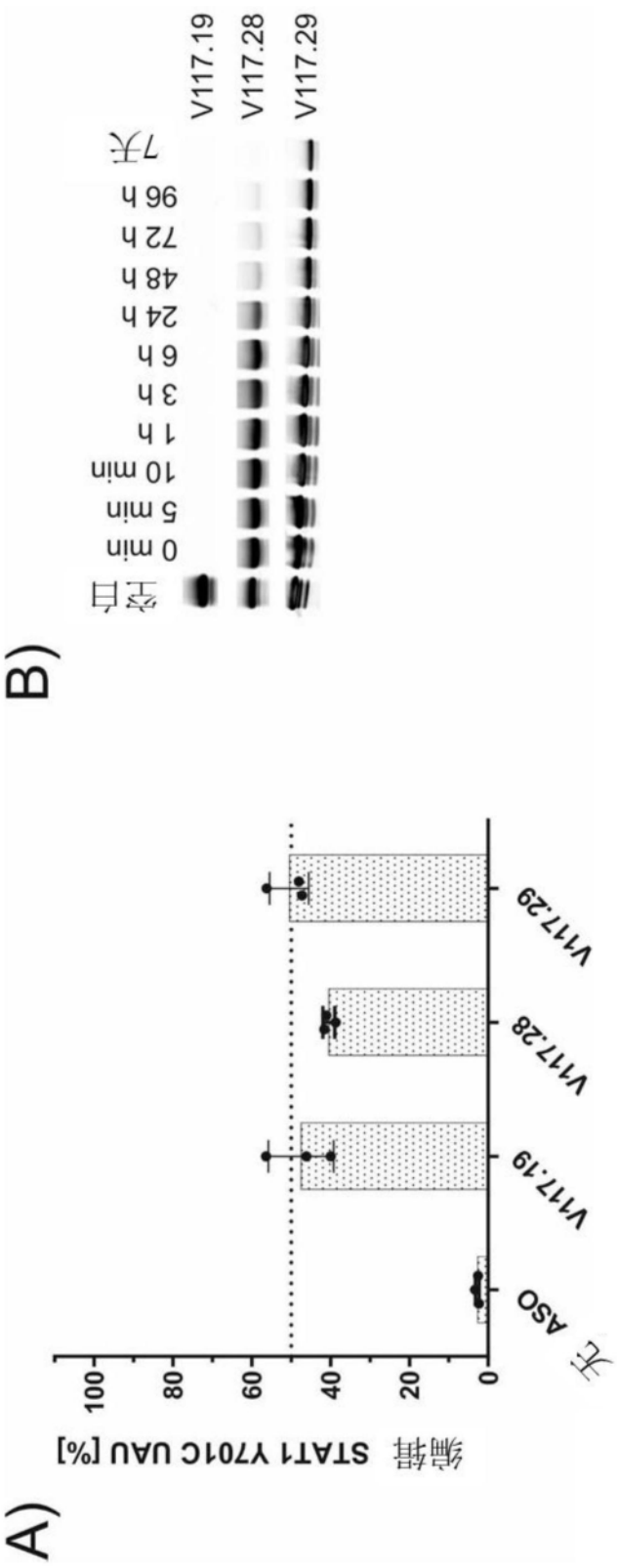

B)
空白
0 min
5 min
10 min
1 h
3 h
6 h
24 h
48 h
72 h
96 h
7天
V117.19
V117.28
V117.29
A)
编辑 STAT1 Y701C UAU [%]
100
80
60
40
20
0
天
ASO
V117.19
V117.28
V117.29

图3

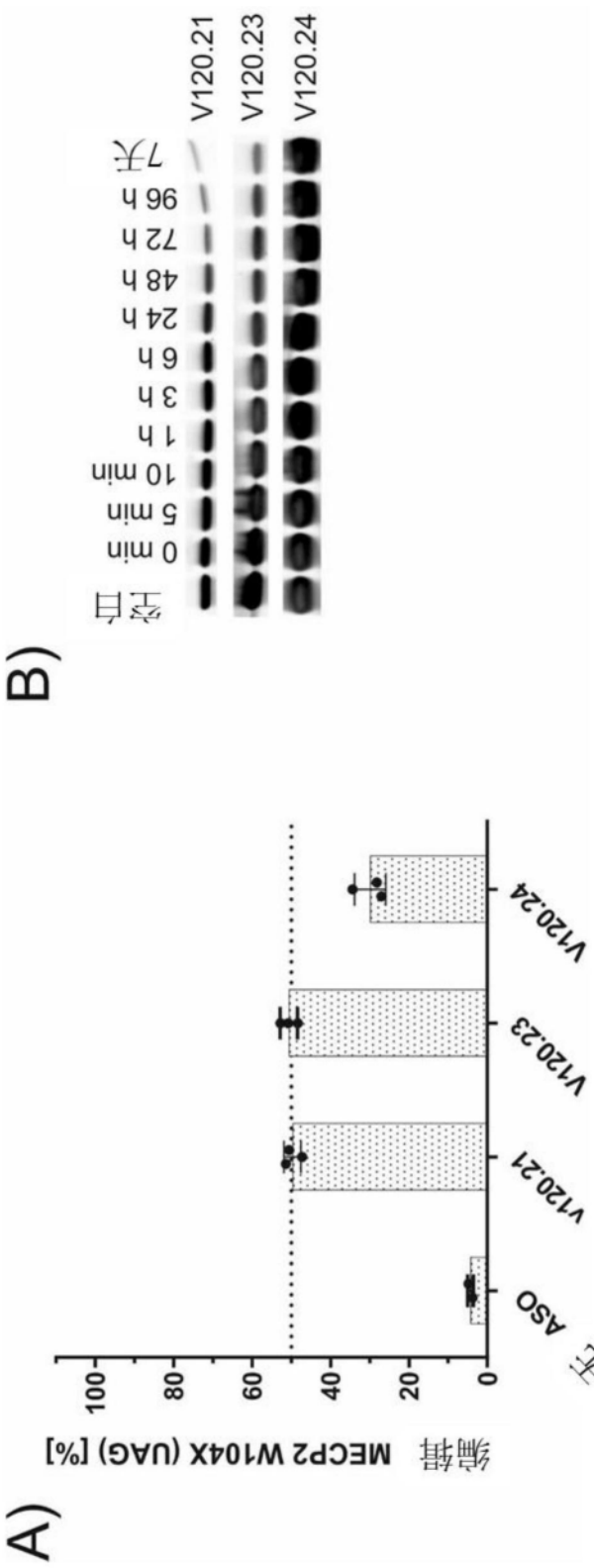

B)
空白
0 min
5 min
10 min
1 h
3 h
6 h
24 h
48 h
72 h
96 h
7天
V120.21
V120.23
V120.24
A)
编辑 MECP2 W104X (UAG) [%]
100
80
60
40
20
0
无
ASO
V120.21
V120.23
V120.24

图4

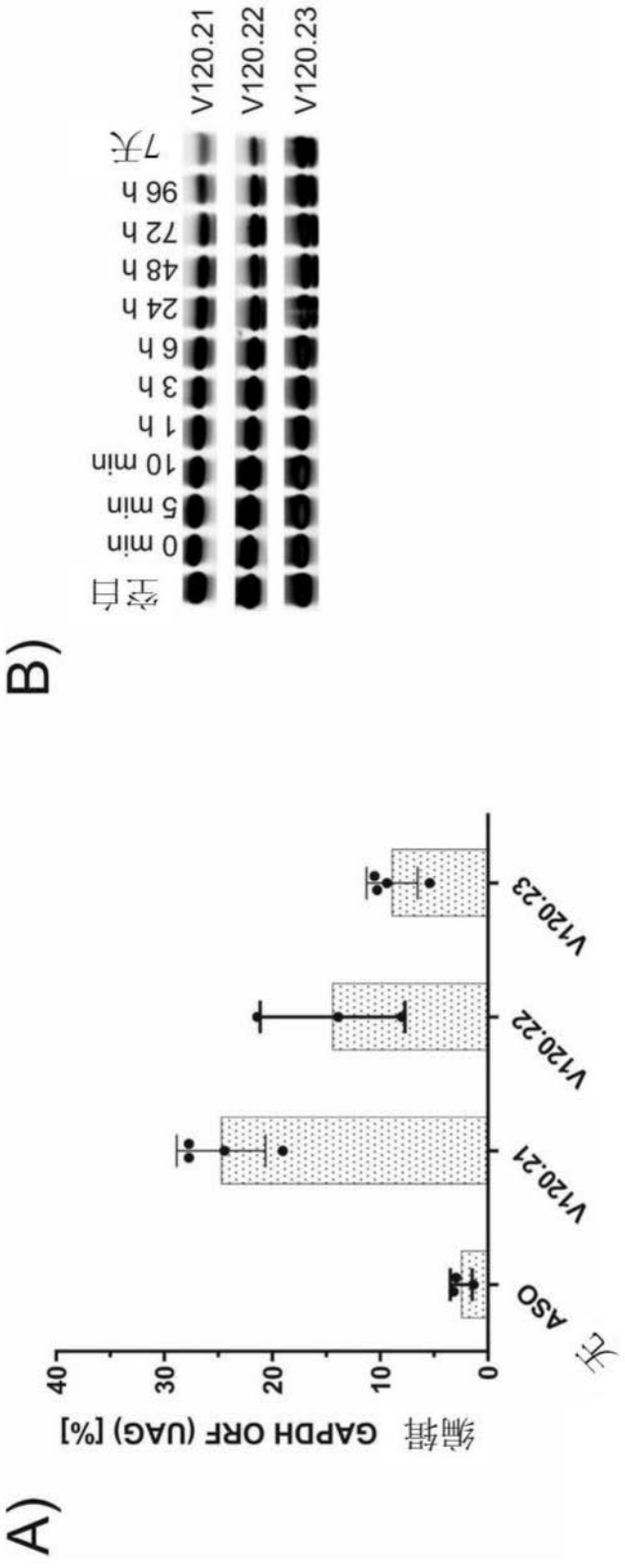

B)
空白
0 min
5 min
10 min
1 h
3 h
6 h
24 h
48 h
72 h
96 h
7天
V120.21
V120.22
V120.23
A)
编辑 GAPDH ORF (UAG) [%]
0
10
20
30
40
无
ASO
V120.21
V120.22
V120.23

图5

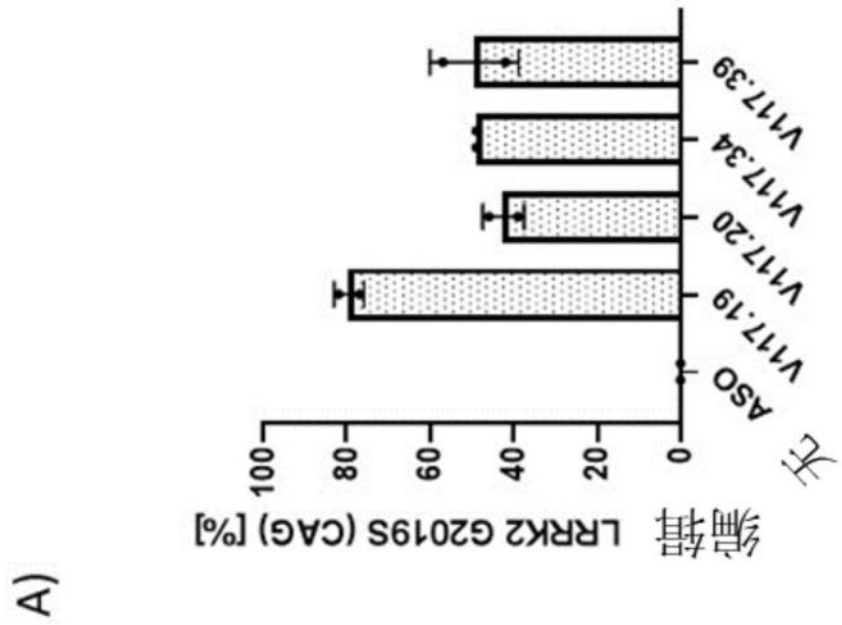

A)
LRRK2 G2019S (CAG) [%]
100
80
60
40
20
0
ASO
V117.19
V117.20
V117.34
V117.39
编辑
未

图6

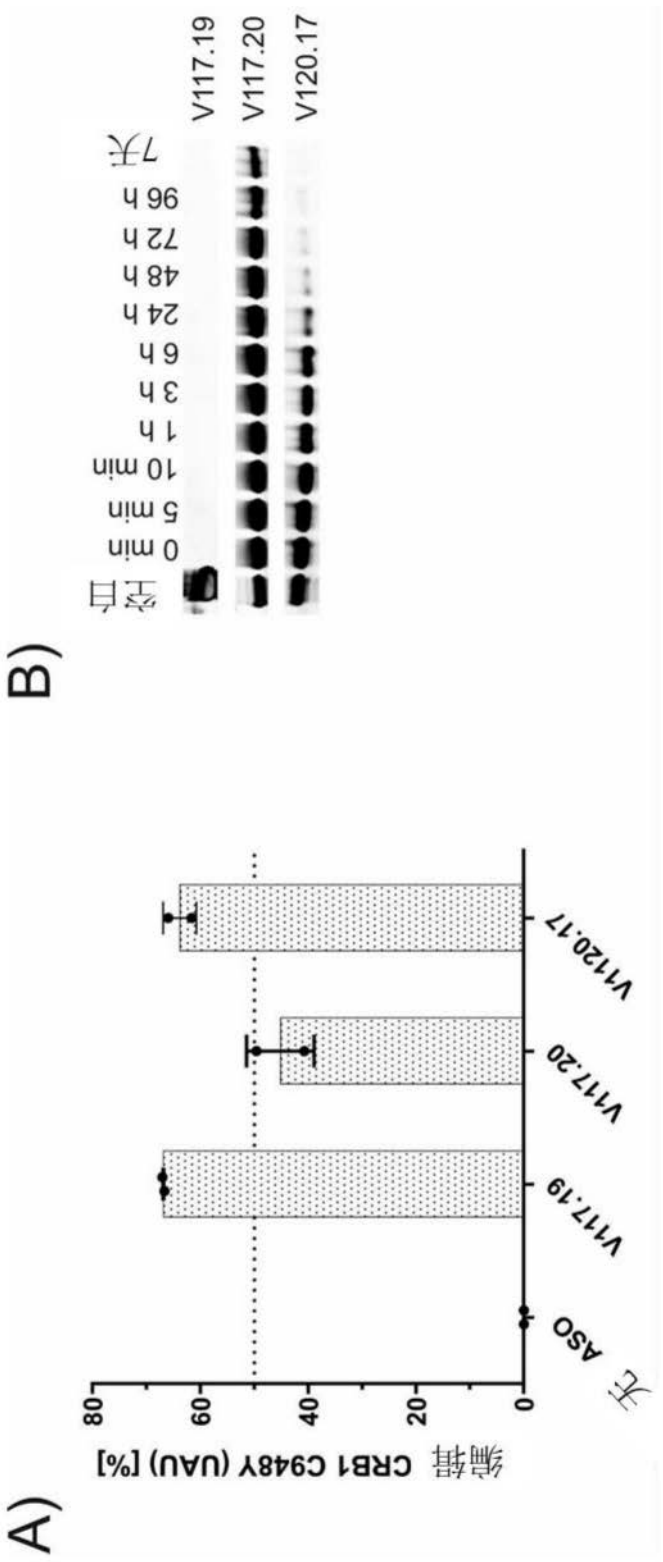

A)
编辑 CRB1 C948Y (UAU) [%]
80
60
40
20
0
未
ASO
V117.19
V117.20
V120.17
B)
空白
0 min
5 min
10 min
1 h
3 h
6 h
24 h
48 h
72 h
96 h
7天
V117.19
V117.20
V120.17

图7

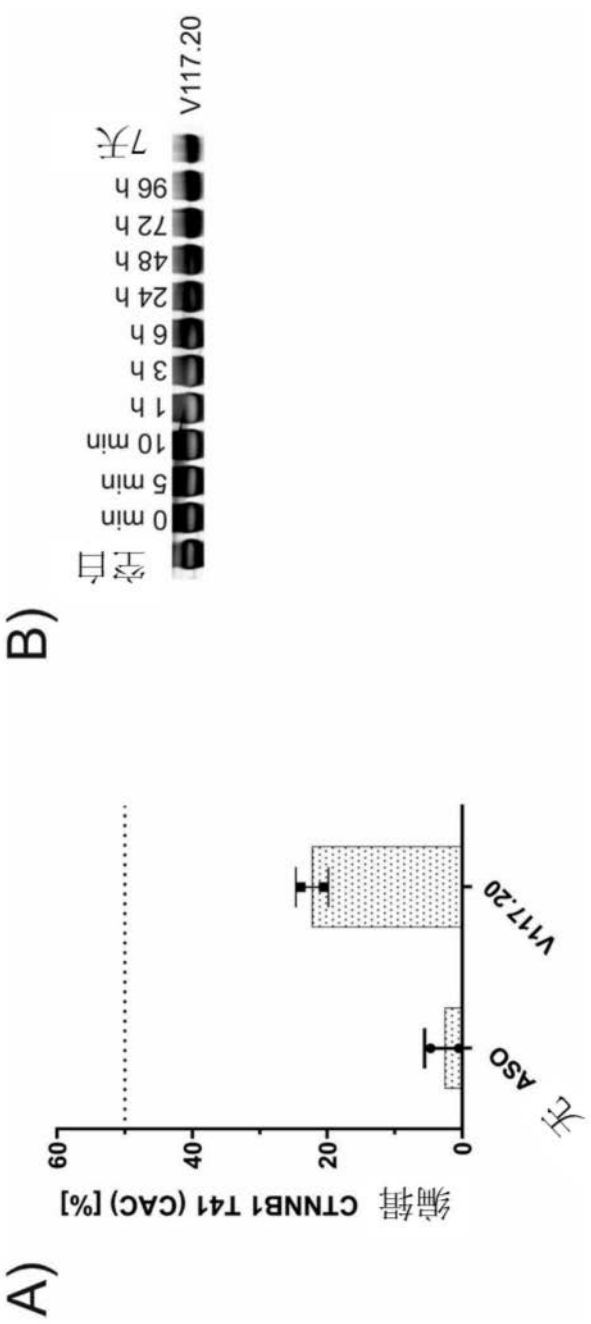

B)
空白
0 min
5 min
10 min
1 h
3 h
6 h
24 h
48 h
72 h
96 h
7天
V117.20
A)
编辑 CTNNB1 T41 (CAC) [%]
60
40
20
0
无
ASO
V117.20

图8