



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104126010 B

(45) 授权公告日 2021.04.06

(21) 申请号 201280062110.X

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

(22) 申请日 2012.12.17

11247

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 胡志君 黄革生

申请公布号 CN 104126010 A

(51) Int.CI.

C12N 15/11 (2006.01)

(43) 申请公布日 2014.10.29

C12N 15/113 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/713 (2006.01)

2011-275488 2011.12.16 JP

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2005113571 A2, 2005.12.01

2014.06.16

Zhou et al. Fine Tuning of

(86) PCT国际申请的申请数据

Electrostatics around the

PCT/JP2012/083180 2012.12.17

Internucleotidic Phosphate through

(87) PCT国际申请的公布数据

Incorporation of Modified 2',4'-

W02013/089283 EN 2013.06.20

Carbocyclic-LNAs and -ENAs Leads to

(73) 专利权人 国立大学法人东京医科齿科大学

Significant Modulation of Antisense

地址 日本东京都

Properties".《J. Org. Chem》.2008, 摘要, 表1,

专利权人 国立大学法人大阪大学

图3.

(72) 发明人 横田隆德 仁科一隆 小比贺聪

审查员 马骞

水泽英洋

权利要求书2页 说明书35页

序列表15页 附图22页

(54) 发明名称

嵌合的双链核酸

(57) 摘要

本发明公开了借助反义作用抑制靶基因表达的双链核酸复合物,和使用该双链核酸复合物的方法。一种用于减少细胞中转录产物水平的方法包括使组合物与细胞接触,所述组合物包含双链核酸复合物,所述双链核酸复合物包含与第二核酸链复性的第一核酸链,其中第一核酸链(i)包含核苷酸和任选地核苷酸类似物,并且第一核酸链中核苷酸和核苷酸类似物的总数是8至100,(ii)包含当第一核酸链与转录产物杂交时由RNA酶H识别的至少4个连续核苷酸,并且(ii)第一核酸链与转录产物杂交;和第二核酸链包含核苷酸和任选地核苷酸类似物。

1. 双链核酸复合物的用途,用于制备减少哺乳动物中转录产物水平的药物,所述双链核酸复合物包含与第二核酸链复性的第一核酸链,其中:

(a) 第一核酸链,(i) 包含核苷酸和核苷酸类似物,并且第一核酸链中核苷酸和核苷酸类似物的总数是12至25个;(ii) 包含至少4个连续DNA核苷酸或经修饰的DNA核苷酸,其中当第一核酸链与转录产物杂交时所述至少4个连续DNA核苷酸或经修饰的DNA核苷酸由RNA酶H识别;(iii) 与转录产物杂交;和(iv) 包含位于RNA酶H识别的所述至少4个连续DNA核苷酸或经修饰的DNA核苷酸5'的一个或多个核苷酸类似物的5'翼区,和/或位于RNA酶H识别的所述至少4个连续DNA核苷酸或经修饰的DNA核苷酸3'的一个或多个核苷酸类似物的3'翼区;和

(b) 第二核酸链,(i) 包含至少4个连续RNA核苷酸,其中第二核酸链的至少4个连续RNA核苷酸是天然RNA核苷酸或2'-0-甲基化的RNA核苷酸,并且(ii) 还包含位于所述至少4个连续RNA核苷酸5'的一个或多个经修饰的核苷酸、核苷酸类似物和/或经修饰的核苷酸类似物的5'翼区,且具有抑制被酶分解的作用,和/或位于所述至少4个连续RNA核苷酸3'的一个或多个经修饰的核苷酸、核苷酸类似物和/或经修饰的核苷酸类似物的3'翼区且具有抑制被酶分解的作用;其中第二核酸链包含

(i) 位于至少4个连续核苷酸的5'和/或3'的一个或多个硫代磷酸酯化核苷酸;或

(ii) 位于至少4个连续核苷酸的5'和/或3'的一个或多个硫代磷酸酯化核苷酸类似物,其中所述核苷酸类似物是桥连核苷酸,和

其中所述至少4个连续核苷酸在第二核酸链与第一核酸链复性时被RNA酶H切割;并且其中第二核酸链还包含具有功能的功能性部分,所述功能选自标记功能、纯化功能和靶向递送功能。

2. 权利要求1所述的用途,其中第一核酸链包含5'翼区和3'翼区,并且其中5'翼区包含至少2个核苷酸类似物和3'翼区包含至少2个核苷酸类似物。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中

(i) 第一核酸链中核苷酸和核苷酸类似物的总数和第二核酸链中RNA核苷酸、DNA核苷酸、核苷酸类似物和PNA核苷酸的总数是相同的;或者

(ii) 第一核酸链中核苷酸和核苷酸类似物的总数和第二核酸链中RNA核苷酸、DNA核苷酸、核苷酸类似物和PNA核苷酸的总数是不同的。

4. 根据权利要求1—3中任一项所述的用途,其中第一核酸链包含至少一个核苷酸类似物,所述核苷酸类似物是桥连核苷酸。

5. 根据权利要求1—3中任一项所述的用途,其中第一核酸链中的至少一个核苷酸和/或至少一个核苷酸类似物是硫代磷酸酯化的。

6. 根据权利要求4所述的用途,其中第一核酸链中的至少一个核苷酸和/或至少一个核苷酸类似物是硫代磷酸酯化的。

7. 根据权利要求1或2所述的用途,其中双链核酸复合物还包含与第二核酸链复性的第三核酸链。

8. 根据权利要求4所述的用途,其中双链核酸复合物还包含与第二核酸链复性的第三核酸链。

9. 根据权利要求5所述的用途,其中双链核酸复合物还包含与第二核酸链复性的第三核酸链。

10. 根据权利要求6所述的用途,其中双链核酸复合物还包含与第二核酸链复性的第三核酸链。

11. 根据权利要求7所述的用途,其中第三核酸链包含PNA核苷酸。

12. 根据权利要求8所述的用途,其中第三核酸链包含PNA核苷酸。

13. 根据权利要求9所述的用途,其中第三核酸链包含PNA核苷酸。

14. 根据权利要求10所述的用途,其中第三核酸链包含PNA核苷酸。

15. 根据权利要求7所述的用途,其中第三核酸链还包含具有功能的功能性部分,所述功能选自标记功能、纯化功能和靶向递送功能。

16. 根据权利要求8所述的用途,其中第三核酸链还包含具有功能的功能性部分,所述功能选自标记功能、纯化功能和靶向递送功能。

17. 根据权利要求9所述的用途,其中第三核酸链还包含具有功能的功能性部分,所述功能选自标记功能、纯化功能和靶向递送功能。

18. 根据权利要求10所述的用途,其中第三核酸链还包含具有功能的功能性部分,所述功能选自标记功能、纯化功能和靶向递送功能。

19. 根据权利要求11所述的用途,其中第三核酸链还包含具有功能的功能性部分,所述功能选自标记功能、纯化功能和靶向递送功能。

20. 根据权利要求12所述的用途,其中第三核酸链还包含具有功能的功能性部分,所述功能选自标记功能、纯化功能和靶向递送功能。

21. 根据权利要求13所述的用途,其中第三核酸链还包含具有功能的功能性部分,所述功能选自标记功能、纯化功能和靶向递送功能。

22. 根据权利要求14所述的用途,其中第三核酸链还包含具有功能的功能性部分,所述功能选自标记功能、纯化功能和靶向递送功能。

## 嵌合的双链核酸

### 技术领域

[0001] 本申请涉及具有借助反义作用抑制靶基因表达的活性的双链核酸，并且更具体地，涉及包含反义核酸和与所述反义核酸互补的核酸的双链核酸，所述反义核酸与靶基因的转录产物互补并含有包含4个或更多个连续碱基的区域。

### 背景技术

[0002] 近年来，寡核苷酸已经成为正在开发的称作核酸药物的药物产品中的目的主题，并且特别地，从靶基因的高度选择性和低毒性的观点看，利用反义方法开发核酸药物正在活跃进行中。反义方法是通过引入与靶基因的mRNA(有义链)的部分序列互补的寡核苷酸(反义寡核苷酸(ASO))至细胞中，选择性抑制靶基因编码的蛋白质表达的方法。

[0003] 如图1(上半部分)中所示，将包含RNA的寡核苷酸作为ASO引入细胞时，ASO与靶基因的转录产物(mRNA)结合，并且形成部分的双链。已知这种双链发挥覆盖物的作用以防止核糖体翻译，并且因此抑制靶基因编码的蛋白质的表达。

[0004] 在另一方面，将包含DNA的寡核苷酸作为ASO引入细胞时，形成部分的DNA-RNA异双链体。由于RNA酶H识别这种结构，靶基因的mRNA因而分解，抑制靶基因编码的蛋白质的表达。(图1，下半部分)。另外，还已经发现在许多情况下，与使用RNA时相比，基因表达抑制效应在使用DNA作为ASO(RNA酶H依赖性途径)时更高。

[0005] 在利用寡核苷酸作为核酸药物的情况下，已经在考虑增强对靶RNA的结合亲和力、体内稳定性等时开发多种核酸类似物如锁核酸(LNA)(注册商标)、其他桥连的核酸等。

[0006] 如图2中所示，由于天然核酸(RNA或DNA)的糖部分具有含4个碳原子和1个氧原子的五元环，所以糖部分具有两种构象：N型和S型。已知这些构象从一种形式转变成另一种形式，并且因而核酸的螺旋结构也采取不同形式：A型和B型。由于充当前述ASO的靶的mRNA采取A型螺旋结构，糖部分主要处于N型，因此从增加对RNA的亲和力的观点看，ASO的糖部分采取N型是重要的。已经在这种概念下开发的产品是修饰的核酸，如LNA(2'-0,4'-C-亚甲基桥连的核酸(2',4'-BNA))。例如，在LNA中，由于2'-位置处的氧和4'-位置处的碳由亚甲基桥连，所以构象固定成N型，并且不存在构象之间的波动。因此，与采用常规天然核酸合成的寡核苷酸相比，通过掺入几个LNA单元所合成的寡核苷酸具有针对RNA的非常高的亲和力和非常高的序列特异性，并且还显示出优异的耐热性和核酸酶抗性(见PTL1)。由于其他人工核酸也具有这类特征，更多注意力投向与利用反义方法等有关的人工核酸(见PTL1至7)。

[0007] 另外，将寡核苷酸应用至药物时，重要的是相关寡核苷酸可以以高特异性和高效率递送至靶部位。此外，作为用于递送寡核苷酸的方法，已经开发了一种利用脂质如胆固醇和维生素E的方法(NPL1和2)、一种利用受体特异性肽如RVG-9R的方法(NPL3)和一种利用对靶部位特异的抗体的方法(NPL4)。

[0008] 引文目录

[0009] [专利文献]

[0010] [PTL1]JP10-304889A

- [0011] [PTL2] WO2005/021570
- [0012] [PTL3] JP10-195098A
- [0013] [PTL4] JP2002-521310W
- [0014] [PTL5] WO2007/143315
- [0015] [PTL6] WO2008/043753
- [0016] [PTL7] WO2008/029619
- [0017] [非专利文献]

[0018] [NPL1] Kazutaka Nishina等人, Molecular Therapy, 第16卷, 734-740 (2008)

[0019] [NPL2] Jurgen Soutscheck等人, Nature, 第432卷, 173-178 (2004)

[0020] [NPL3] Kazutaka Nishina等人, Molecular Therapy, 第16卷, 734-740 (2008)

[0021] [NPL4] Dan Peer等人, Science, 第319卷, 627-630 (2008)

[0022] 发明概述

[0023] 技术问题

[0024] 在某些实施方案中, 双链核酸复合物包含抑制靶基因表达或更广义地抑制RNA转录产物水平的反义核酸。本发明的又一个目的是双链核酸复合物以高特异性和高效率递送反义核酸链至靶部位。

[0025] 解决问题的方案

[0026] 出于研究怎样增强ASO稳定性、抑制靶基因体内表达的活性(反义作用)和在反义方法中递送ASO至靶部位的特异性和效率(递送特性)的目的, 发明人制备了与脂质(胆固醇)直接结合的包含LNA和DNA(LNA/DNA缺口聚体)的ASO, 并且通过静脉内施用这种ASO至小鼠, 发明人评价了递送特性和反义作用。作为结果, 发现当胆固醇与ASO结合时, ASO至肝脏的递送特性增强, 然而, 反义作用丧失。

[0027] 因而, 发明人进行了彻底研究, 目的是开发在增加ASO递送特性的同时, 具有高反义作用的核酸, 并且作为结果, 发明人在一个实施方案中构思了通过使LNA/DNA缺口聚体(gapmer)与RNA链复性所产生的新双链核酸复合物, 其中所述RNA链与缺口聚体互补, 并且首次评价反义作用。作为结果, 发现双链核酸的反义作用总体上好于单链LNA/DNA缺口聚体, 并且取决于所用ASO的链长度, 大大增强。发明人还产生了其中生育酚与包含RNA的互补链结合的双链核酸, 将该双链核酸静脉内施用至小鼠, 并评价其反义作用。作为结果, 发现含有与生育酚结合的互补链的双链核酸具有非常高的反义作用。此外, 发明人还发现通过与包含PNA(肽核酸)而非RNA的互补链复性产生的LNA/DNA缺口聚体的反义作用至少相似于或好于单链LNA/DNA缺口聚体, 并且另外, PNA提供了使ASO与能指导递送ASO至特定位点的肽、蛋白质或抗体间接结合的方式。

[0028] 即, 本申请涉及具有借助反义作用抑制靶基因表达的活性的双链核酸。

[0029] 在某些实施方案中, 提供了以下内容。

[0030] (1) 具有借助反义作用抑制靶基因表达的活性的双链核酸, 该双链核酸包含以下项(a)和(b)的核酸:

[0031] (a) 反义核酸, 其与靶基因的转录产物互补并且含有包含4个或更多个连续碱基的DNA的区域, 和

[0032] (b) 与(a)的核酸互补的核酸。

[0033] (2) 项(1)中所述的双链核酸,其中(a)的核酸还含有包含修饰核酸的区域,所述区域在包含4个或更多个连续碱基的DNA的区域的5'末端侧和3'末端侧的至少任一者上布置。

[0034] (3) 项(2)中所述的双链核酸,其中(a)的核酸的包含修饰核酸的区域是这样的包含修饰核酸的区域,所述修饰核酸在包含4个或更多个连续碱基的DNA的区域的5'末端侧和3'末端侧上布置,并且修饰核酸是LNA。

[0035] (4) 在项(1)至(3)的任一项中所述的双链核酸,其中(b)的核酸是RNA或PNA。

[0036] (5) 在项(1)至(3)的任一项中所述的双链核酸,其中(b)的核酸是RNA,与(a)的核酸的包含修饰核酸的区域互补的区域被修饰,并且该修饰具有抑制由核糖核酸酶(RNA酶)所致分解的作用。

[0037] (6) 在项(5)中所述的双链核酸,其中修饰是2'-0-甲基化和/或硫代磷酸酯化。

[0038] (7) 在项(1)至(6)的任一项中所述的双链核酸,其中功能性部分与(b)的核酸结合。

[0039] (8) 在项(1)至(7)的任一项中所述的双链核酸,其中(a)和(b)的核酸的链长度是相同的。

[0040] (9) 在项(1)至(7)的任一项中所述的双链核酸,其中(a)和(b)的核酸的链长度是不同的。

[0041] (10) 在项(9)中所述的双链核酸,还包括以下项(c)的核酸:

[0042] (c) 与(a)和(b)的核酸之间具有较长链长度的核酸中相对于另一个核酸突出的区域互补的核酸。

[0043] (11) 在项(10)中所述的双链核酸,其中(c)的核酸是PNA。

[0044] (12) 在项(10)或(11)中所述的双链核酸,其中功能性部分与(c)的核酸结合。

[0045] (13) 在项(7)或(12)中所述的双链核酸,其中功能性部分是具有递送双链核酸至靶部位的活性的分子。

[0046] (14) 借助反义作用抑制靶基因表达的组合物,所述组合物含有在项(1)至(13)的任一项中所述的双链核酸作为有效成分。

[0047] (15) 一种减少细胞中转录产物水平的方法,包括使组合物与细胞接触,所述组合物包含:

[0048] (a) 双链核酸复合物,所述双链核酸复合物包含与第二核酸链复性的第一核酸链,其中:

[0049] 第一核酸链(i)包含核苷酸和任选地核苷酸类似物,并且第一核酸链中核苷酸和任选地核苷酸类似物的总数是8至100,(ii)包含当第一核酸链与转录产物杂交时由RNA酶H识别的至少4个连续核苷酸,并且(iii)第一核酸链与转录产物杂交;和

[0050] 第二核酸链包含核苷酸和任选地核苷酸类似物。

[0051] (16) 一种减少哺乳动物中基因表达水平的方法,包括向所述哺乳动物施用有效量的药物组合物的步骤,所述组合物包含:

[0052] (a) 双链核酸复合物,所述双链核酸复合物包含与第二核酸链复性的第一核酸链,其中:

[0053] 第一核酸链(i)包含核苷酸和任选地核苷酸类似物,并且第一核酸链中核苷酸和任选地核苷酸类似物的总数是8至100,(ii)包含当第一核酸链与所述基因的转录产物杂交

时由RNA酶H识别的至少4个连续核苷酸，并且(iii)第一核酸链与转录产物杂交；和

[0054] 第二核酸链包含核苷酸和任选地核苷酸类似物；和(b)可药用载体。

[0055] (17)纯化的或分离的双链核酸复合物，包含与第二核酸链复性的第一核酸链，其中：

[0056] 第一核酸链(i)包含核苷酸和任选地核苷酸类似物，并且第一核酸链中核苷酸和核苷酸类似物的总数是8至100，(ii)包含当第一核酸链与转录产物杂交时由RNA酶H识别的至少4个连续核苷酸，(iii)包含至少一个非天然核苷酸，并且(iii)第一核酸链与转录产物杂交；并且

[0057] 第二核酸链包含核苷酸和任选地核苷酸类似物。

[0058] (18)用于治疗哺乳动物的药物组合物，包含项(17)的双链核酸复合物和可药用载体，其中转录产物是哺乳动物转录产物。

[0059] 在本发明的其他实施方案中，提供以下项。

[0060] <1>纯化的或分离的双链核酸复合物，包含与第二核酸链复性的第一核酸链，其中：

[0061] 第一核酸链包含DNA核苷酸和任选地核苷酸类似物，其中包含一个或多个抗核酸酶的核苷酸的5'翼区位于5'末端处和/或包含一个或多个抗核酸酶的核苷酸的3'翼区位于3'末端处，第一核酸链包含至少4个连续DNA核苷酸，并且第一核酸链中DNA核苷酸和核苷酸类似物的总数是10至100个核苷酸；

[0062] 第一核酸链还包含与转录产物的序列的一部分互补的至少10个连续核苷酸的序列；并且

[0063] 第二核酸链包含：

[0064] (i)RNA核苷酸和任选地核苷酸类似物，以及任选地DNA核苷酸；或

[0065] (ii)DNA核苷酸和/或核苷酸类似物；或

[0066] (iii)PNA核苷酸。

[0067] 其中包含一个或多个抗核酸酶的核苷酸的5'翼区位于5'末端处和/或包含一个或多个抗核酸酶的核苷酸的3'翼区位于3'末端处，并且其中第二核酸链中RNA核苷酸、DNA核苷酸、核苷酸类似物和PNA核苷酸的总数是10至100个核苷酸。

[0068] <2>项<1>的双链核酸复合物，其中转录产物是编码蛋白质的转录产物。

[0069] <3>项<1>的双链核酸复合物，其中转录产物是不编码蛋白质的转录产物。

[0070] <4>项<1>-<3>中任一项的双链核酸复合物，其中第一核酸链和第二核酸链中的核苷酸的数目是相同的。

[0071] <5>项<1>-<3>中任一项的双链核酸复合物，其中第一核酸链和第二核酸链中的核苷酸的数目是不同的。

[0072] <6>项<5>的双链核酸复合物，其中第二核酸链中核苷酸的数目大于第一核酸链中核苷酸的数目。

[0073] <7>项<1>-<6>中任一项的双链核酸复合物，其中第一核酸链包含范围从10至35个核苷酸的核苷酸总数。

[0074] <8>项<1>-<7>中任一项的双链核酸复合物，其中第一核酸链的核苷酸均是抗核酸酶的核苷酸。

[0075] <9>项<1>-<8>中任一项的双链核酸复合物,其中第一核酸链的5'翼区包含一个或多个核苷酸类似物和/或第一核酸链的3'翼区包含位于3'末端处的一个或多个核苷酸类似物。

[0076] <10>项<1>-<9>中任一项的双链核酸复合物,其中第一链包含在5'末端的至少2个连续核苷酸类似物的5'翼区和在3'末端的至少2个连续核苷酸类似物的3'翼区。

[0077] <11>项<10>的双链核酸复合物,其中5'翼区和3'翼区独立地由2至10个核苷酸类似物组成。

[0078] <12>项11的双链核酸复合物,其中5'翼区和3'翼区独立地由2-3个核苷酸类似物组成。

[0079] <13>项<1>-<12>中任一项的双链核酸复合物,其中第一核酸链包含至少一个核苷酸类似物,所述核苷酸类似物是桥连核苷酸。

[0080] <14>项<1>-<13>中任一项的双链核酸复合物,其中第一核酸链中所含有的核苷酸类似物是桥连核苷酸。

[0081] <15>项<14>的双链核酸复合物,其中第一核酸链的桥连核苷酸独立地选自LNA、cEt-BNA、酰胺BNA (AmNA) 和cMOE-BNA。

[0082] <16>项<14>的双链核酸复合物,其中第二核酸链的桥连核苷酸选自其中2'-位置处的碳原子和4'-位置处的碳原子由4'- $(CH_2)_p-0-2'$ 、4'- $(CH_2)_p-S-2'$ 、4'- $(CH_2)_p-OCO-2'$ 、4'- $(CH_2)_n-N(R_3)-0-(CH_2)_m-2'$ 桥连的核糖核苷酸,其中p、m和n分别代表1至4的整数、0至2的整数和1至3的整数,并且R<sub>3</sub>代表氢原子、烷基、烯基、环烷基、芳基、芳烷基、酰基、磺酰基、荧光标记物或化学发光标记物、具有核酸切割活性的官能团或胞内或核内定位信号肽。

[0083] <17>项<1>-<16>中任一项的双链核酸复合物,其中第一核酸链中的DNA核苷酸是硫代磷酸酯化的。

[0084] <18>项<1>-<17>中任一项的双链核酸复合物,其中第一核酸链中所含有的核苷酸类似物是硫代磷酸酯化的。

[0085] <19>项<1>-<18>中任一项的双链核酸复合物,其中第一核酸链包含4-20个连续DNA核苷酸的区段。

[0086] <20>项<1>-<19>中任一项的双链核酸复合物,其中第一链包含(i)在5'末端的至少2个连续核苷酸类似物的5'翼区,(ii)在3'末端的至少2个连续核苷酸类似物的3'翼区,和(iii)至少4个连续DNA核苷酸。

[0087] <21>项<1>-<19>中任一项的双链核酸复合物,其中第一链包含(i)在5'末端的至少2个连续核苷酸类似物的5'翼区,(ii)在3'末端的至少2个连续核苷酸类似物的3'翼区,其中5'翼区和3'翼区中的所述核苷酸类似物是桥连核苷酸;和(iii)至少4个连续DNA核苷酸;其中所述桥连核苷酸和所述DNA核苷酸是硫代磷酸酯化的。

[0088] <22>项<1>-<21>任一项的双链核酸,其中第一核酸链具有12-25个核苷酸长度。

[0089] <23>项<1>-<22>中任一项的双链核酸复合物,其中第二核酸链包含RNA核苷酸和/或核苷酸类似物,和任选地DNA核苷酸。

[0090] <24>项<23>的双链核酸复合物,其中第二核酸链的5'翼区包含至少一个核苷酸类似物,第二核酸链的3'翼区包含至少一个核苷酸类似物,并且第二核酸链包含至少4个连续RNA核苷酸。

[0091] <25>项<23>的双链核酸复合物,其中第二核酸链的5'翼区包含至少一个硫代磷酸酯化核苷酸,第二核酸链的3'翼区包含至少一个硫代磷酸酯化核苷酸,并且第二核酸链包含至少4个连续RNA核苷酸。

[0092] <26>项<24>或<25>的双链核酸复合物,其中第二核酸链的5'翼区和3'翼区的全部核苷酸均是硫代磷酸酯化的。

[0093] <27>项<24>-<26>任一项的双链核酸复合物,其中第二核酸链的抗核酸酶的核苷酸独立地选自桥连核苷酸和2'-0-甲基RNA。

[0094] <28>项<27>的双链核酸复合物,其中第二核酸链的桥连核苷酸独立地选自LNA、cEt-BNA、酰胺BNA (AmNA) 和cMOE-BNA。

[0095] <29>项<27>的双链核酸复合物,其中第二核酸链的桥连核苷酸选自其中2'-位置处的碳原子和4'-位置处的碳原子由4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-O-2'、4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-S-2'、4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-OCO-2'、4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sub>3</sub>)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-2'桥连的核糖核苷酸,其中p、m和n分别代表1至4的整数、0至2的整数和1至3的整数,并且R<sub>3</sub>代表氢原子、烷基、烯基、环烷基、芳基、芳烷基、酰基、磺酰基、荧光标记物或化学发光标记物、具有核酸切割活性的官能团或胞内或核内定位信号肽。

[0096] <30>项<24>的双链核酸复合物,其中第二核酸链包含括(i)在5'末端的至少2个硫代磷酸酯化、2'-0-甲基化的RNA核苷酸,(ii)在3'末端的至少2个硫代磷酸酯化、2'-0-甲基化的RNA核苷酸,和(iii)分别任选地硫代磷酸酯化的至少4个连续天然RNA核苷酸。

[0097] <31>项<24>的双链核酸复合物,其中第二核酸链包含括(i)在5'末端的至少2个硫代磷酸酯化、桥连的RNA核苷酸,(ii)在3'末端的至少2个硫代磷酸酯化、桥连的RNA核苷酸,和(iii)分别任选地硫代磷酸酯化的至少4个连续天然RNA核苷酸。

[0098] <32>项<1>-<22>任一项的双链核酸复合物,其中第二核酸链包含PNA核苷酸。

[0099] <33>项<23>-<32>任一项的双链核酸复合物,其中第二核酸链还包含具有功能的功能性部分,所述功能选自标记功能、纯化功能和靶向递送功能。

[0100] <34>根据项<1>至<3>和<5>至<33>中任一项的双链核酸复合物,其中双链核酸复合物还包含与第二核酸链复性的第三核酸链。

[0101] <35>根据项<34>的双链核酸,其中第三核酸链包含DNA核苷酸和任选地核苷酸类似物,并且包含至少4个连续DNA核苷酸,其中核苷酸的总数是10至100个核苷酸,所述第三核酸链还包括与转录产物的序列的一部分互补的至少10个连续核苷酸的序列。

[0102] <36>根据项<35>的双链核酸复合物,其中第三链包含(i)在5'末端的至少2个连续核苷酸类似物的5'翼区,(ii)在3'末端的至少2个连续核苷酸类似物的3'翼区,其中5'翼区和3'翼区中的所述核苷酸类似物是桥连核苷酸;和(iii)至少4个连续DNA核苷酸;其中所述桥连核苷酸和所述DNA核苷酸是硫代磷酸酯化的。

[0103] <37>根据项<34>的双链核酸,其中第三核酸链包含PNA核苷酸。

[0104] <38>项<34>-<37>任一项的双链核酸复合物,其中第三核酸链还包含具有功能的功能性部分,所述功能选自标记功能、纯化功能和靶向递送功能。

[0105] <39>根据项33或38的双链核酸复合物,其中所述功能性部分是选自脂质、肽和蛋白质的分子。

[0106] <40>根据项<39>的双链核酸复合物,其中功能性部分与3'末端核苷酸或5'末端核苷酸连接。

- [0107] <41>根据项<39>或<40>的双链核酸复合物,其中功能性部分是脂质。
- [0108] <42>根据项<41>的双链核酸复合物,其中功能性部分是选自胆固醇、脂肪酸、脂溶性维生素、糖脂和甘油酯的脂质。
- [0109] <43>根据项<41>的双链核酸复合物,其中功能性部分是选自胆固醇、生育酚和生育三烯酚的脂质。
- [0110] <44>根据项<39>或<40>的双链核酸复合物,其中功能分子是选自受体配体和抗体的肽或蛋白质。
- [0111] <45>药物组合物,包含可药用载体和项<1>至<44>任一项的双链核酸复合物。
- [0112] <46>项<1>至<44>任一项的双链核酸复合物的用途,用于制备减少哺乳动物中基因表达的药物。
- [0113] <47>项<1>至<44>任一项的双链核酸复合物的用途,用于减少哺乳动物中基因的表达。
- [0114] <48>一种减少哺乳动物中基因表达的方法,包括向所述哺乳动物施用有效量的药物组合物的步骤,所述组合物包含:
- [0115] 纯化或分离的双链核酸复合物,包含与第二核酸链复性的第一核酸链,其中:
- [0116] 第一核酸链包含DNA核苷酸和任选地核苷酸类似物,和包括至少4个连续DNA核苷酸,其中第一核酸链中DNA核苷酸和核苷酸类似物的总数是10至100个核苷酸;
- [0117] 第一核酸链还包含与哺乳动物转录产物的序列的一部分互补的至少10个连续核苷酸的序列;并且
- [0118] 第二核酸链包含:
- [0119] (i) RNA核苷酸和任选地核苷酸类似物,以及任选地DNA核苷酸;或
- [0120] (ii) DNA核苷酸和/或核苷酸类似物;或
- [0121] (iii) PNA核苷酸。
- [0122] 其中第二核酸链中RNA核苷酸、DNA核苷酸、核苷酸类似物和PNA核苷酸的总数是10至100个核苷酸;和
- [0123] 可药用载体。
- [0124] <49>项<48>的方法,其中施用途径是肠内途径。
- [0125] <50>项<48>的方法,其中施用途径是肠胃外途径。
- [0126] <51>项<48>-<50>任一项的方法,其中剂量是0.001mg/kg/日至50mg/kg/日的双链核酸复合物。
- [0127] <52>项<48>-<51>任一项的方法,其中哺乳动物是人。
- [0128] 本发明的有益效果
- [0129] 根据某些实施方案,反义核酸可以在双链复合物中递送并且可以通过反义核酸选择性地和非常有效地抑制靶基因的表达或转录产物的水平。在一些实施方案中,双链复合物可以通过结合递送部分与该复合物而以高特异性和高效率递送至靶部位。
- [0130] 附图简述
- [0131] [图1]图1是说明某些反义方法的一般机制的简图。如本图中所示,将与靶基因的mRNA的部分序列互补的寡核苷酸(反义寡核苷酸(ASO)) (该图中的“DNA”)引入细胞时,选择性地抑制由靶基因编码的蛋白质的表达。在划虚线的框中,显示其中RNA酶H在mRNA与ASO杂

交的位置处切割该mRNA的降解机制。作为RNA酶H切割的结果,该mRNA通常不翻译,从而不产生功能性基因表达产物。

[0132] [图2]图2是说明RNA、DNA和LNA核苷酸的结构的示意图。

[0133] [图3]图3A-B是说明双链核酸复合物的合适实施方案的例子的示意图。5'-LNA-DNA-LNA-3'链是与靶向的转录产物互补的反义核酸。在本图中,“(s)”表示具有硫代磷酸酯键的核酸;“(o)”表示具有天然硫代磷酸酯键的核酸;并且“(m/s)”表示已经硫代磷酸酯化和2'-0-甲基化的RNA。另外,“X”表示功能性部分,并且可以独立地代表脂质(例如,胆固醇或生育酚)、糖等或蛋白质、肽(例如,抗体)等。

[0134] [图4]图4A-B是说明双链核酸复合物的合适实施方案的例子的示意图,所述双链核酸复合物含有三条链:具有不同链长度的第一ASO核酸链和第二互补性核酸链以及包含与功能分子如肽、抗体等结合的PNA的第三核酸链。本图中的符号具有与图3中定义的那些符号相同的意思。

[0135] [图5]图5A-B是说明双链核酸复合物的合适实施方案的例子的示意图,所述双链核酸复合物具备至少具有不同链长度的第一ASO核酸链和第二互补性核酸链。在这些实施方案中,(A)核酸还包含与第二核酸链互补的第三核酸链或(B)第二核酸链还包含通过发夹接头与第二核酸链连接的硫代磷酸酯化DNA的自身互补区。另外,在本图中,“(m)”表示2'-0-甲基化RNA。其他符号具有与图3中定义的那些符号相同的意思。

[0136] [图6]图6A是说明具有结构5'-LNA-DNA-LNA-3'的核酸的示意图,所述核酸在5'末端用荧光染料Cy3标记。图6B是说明具有结构5'-LNA-DNA-LNA-3'的核酸的示意图,所述核酸在5'末端用荧光染料Cy3标记并且在3'末端用胆固醇(“Chol”)标记。

[0137] “(s)”表示硫代磷酸酯化核酸。

[0138] [图7]图7是荧光显微照片,其说明观察已经施用荧光(Cy3)标记的“LNA”(根据图6A)或荧光(Cy3)标记chol-LNA”(根据图6B)的小鼠的肝脏结果。

[0139] [图8]图8是说明通过以下方式获得的结果的图:向小鼠施用“12聚Cy3-Chol-LNA(ApoB1)”(根据图6B)、“20聚Cy3-Chol-LNA(ApoB1)”或“29聚Cy3-Chol-LNA(ApoB1)”或“12聚Cy3-LNA(ApoB1)”(根据图6A),它们均具有与ApoB1基因的碱基序列互补的序列,并且通过定量PCR分析这些小鼠的肝脏中ApoB1基因的表达量。

[0140] [图9]图9是说明双链核酸的某些实施方案的示意图。符号具有与图3-6中定义的那些符号相同的意思。

[0141] [图10]图10是说明用来评价根据一个实施方案的双链核酸复合物的反义作用的反义链(ASO)和其互补链(cRNA(o)、cRNA(G)和cRNA(m/s))的示意图。符号具有与图3-6和图9中定义的那些符号相同的意思。

[0142] [图11]图11显示说明结果的照片,所述结果通过采用电泳法分析存在或不存在图10中所示的反义链和其互补链的复性来获得。小图A表示在UV照射下拍照的结果,并且小图B显示凝胶的照片。

[0143] [图12]图12是在UV照射下拍摄的照片,所述照片说明通过使图10中所示的反义链及其互补链复性、用RNA酶H处理所述链并通过电泳法分析反应产物所获得的结果。

[0144] [图13]图13是说明结果的图,所述结果通过将图10中所示的反义链或由该反义链和图10中所示的互补链之一组成的双链核酸复合物(以0.4nM或10nM的浓度)引入细胞中获

得。通过定量PCR分析细胞中其转录产物由反义链靶向的ApoB1基因的表达量。

[0145] [图14]图14是说明结果的图,所述结果通过分析其中引入图10中所示的反义链或由该反义链和图10中所示的互补链之一组成的双链核酸复合物的细胞中ApoB1基因的表达量获得,所述表达量针对仅引入该反义链的细胞中获得的表达量归一化。

[0146] [图15]图15是说明用来评价双链核酸复合物的反义作用的反义链、互补链(cRNA(G))和具有生育酚功能性部分的互补链(Toc-cRNA(G))的示意图。“Toc”表示生育酚。其他符号具有与图3-6、图9和图10中定义的那些符号相同的意思。

[0147] [图16]图16是说明结果的图,所述结果通过以下方式获得:向小鼠施用图15中所示的反义链或由反义链和图15中所示的互补链之一组成的双链核酸并且分析小鼠中其转录产物由反义链靶向的ApoB1基因的表达量。

[0148] [图17]图17是说明结果的图,所述结果通过评价双链核酸复合物的反义作用的特异性获得,所述双链核酸复合物由如图15中所示的反义链和具有与之结合的生育酚的互补链组成。

[0149] [图18]图18是说明结果的图,所述结果通过评价双链核酸复合物的反义作用的剂量依存关系获得,所述双链核酸复合物由如图15中所示的反义链和具有与之结合的生育酚的互补链组成。

[0150] [图19A]图19A是说明结果的图,所述结果通过评价双链核酸复合物的反义作用的可持续性获得,所述双链核酸复合物由如图15中所示的反义链和具有与之结合的生育酚的互补链组成。在本图中,“d”表示在施用相关双链核酸后过去的天数。

[0151] [图19B]图19B是说明结果的图,所述结果通过评价双链核酸复合物的反义作用的可持续性获得,所述双链核酸复合物由如图15中所示的反义链和具有与之结合的生育酚的互补链组成。在本图中,“d”表示在施用相关双链核酸后过去的天数。

[0152] [图20A]图20A是说明根据某些实施方案的反义寡核苷酸和互补链的示意图。

[0153] [图20B]图20B是比较下述结果的图,所述结果通过评价根据本发明的一个实施方案的双链核酸复合物(LNA/cRNA(G)-OM)的反义作用获得,所述双链核酸复合物具有包含全部2'-0-甲基化的RNA的互补链。

[0154] [图21]图21是说明可以用来掺入肽、蛋白质等作为功能性部分的双链核酸的合适实施方案的示意图。本图中的符号具有与图3和图4中定义的那些符号相同的意思。

[0155] [图22]图22是说明结果的图,所述结果通过评价由以下三条链组成的双链核酸复合物的反义作用获得:反义链、包含RNA的互补链和与肽等结合的PNA链。

[0156] [图23]图23是说明结果的图,所述结果通过评价由反义链和包含PNA的互补链组成的双链核酸复合物的反义作用获得。

[0157] [图24]图24是说明根据某些实施方案的反义寡核苷酸和互补链的示意图。

[0158] [图25A]图25A是说明结果的图,所述结果对采用图24中所示链制备的双链核酸复合物获得。

[0159] [图25B]图25B是说明结果的图,所述结果对采用图24中所示链制备的双链核酸复合物获得。

[0160] [图26]图26是说明结果的图,所述结果在使用双链核酸复合物抑制表达的实施例11中获得。

[0161] [图27A]图27A是说明结果的图,所述结果在评价用不同长度的双链核酸复合物抑制hTTR表达的实施例12中获得。

[0162] [图27B]图27B是说明结果的图,所述结果在评价用不同长度的双链核酸复合物抑制hTTR表达的实施例12中获得。

[0163] [图28]图28是说明结果的图,所述结果在评价处理之前和之后由双链核酸复合物靶向的蛋白质的血清蛋白水平的实施例12中获得。

[0164] [图29]图29是显示在实施例13中获得的结果的荧光图像,显示了由三条链组成的双链核酸复合物的定位。

[0165] [图30]图30是说明实施例13的结果的图,显示了由三条链组成的双链核酸复合物所致的表达抑制。

[0166] [图31]图31是说明实施例14的结果的图,显示了抑制miRNA的水平。

[0167] [图32]图32是说明结果的图,所述结果在展示使用双链核酸复合物抑制表达的实施例15中获得,所述双链核酸复合物含有包含酰胺RNA (AmNA) 核苷酸类似物的ASO。

#### [0168] 实施方案的描述

[0169] 包含反义核酸和与该反义核酸互补的核酸的双链核酸复合物。

[0170] 某些实施方案包括包含与第二核酸复性的第一核酸的纯化或分离的双链核酸复合物,所述双链核酸复合物具有借助反义作用抑制靶基因表达或更普遍地抑制转录产物水平的活性。

[0171] 第一核酸链(i)包含核苷酸和任选地核苷酸类似物,并且第一核酸链中核苷酸和核苷酸类似物的总数是8至100,(ii)包含当第一核酸链与转录产物杂交时由RNA酶H识别的至少4个连续核苷酸,(iii)包含至少一个非天然核苷酸,并且(iii)第一核酸链与转录产物杂交;并且

[0172] 第二核酸链包含核苷酸和任选地核苷酸类似物,和

[0173] 第二核酸链可以与第一核酸链复性,

[0174] 第二核酸链包含:

[0175] (i) RNA核苷酸和任选地核苷酸类似物,以及任选地DNA核苷酸;或

[0176] (ii) DNA核苷酸和/或核苷酸类似物;或

[0177] (iii) PNA核苷酸。

[0178] “反义作用”意指抑制靶基因的表达或靶向的转录产物的水平,这因靶向的转录产物(RNA有义链)与例如与转录产物等的部分序列互补的DNA链或更一般地设计成引起该反义作用的链杂交而发生,其中在某些情况下,抑制翻译或剪接功能调节作用如外显子跳跃(见对图1中点线包围的区域之外上半部分中的描述)可以因转录产物被杂交产物覆盖引起,和/或转录产物的分解可以因杂交部分的识别而发生(见图1中点线包围的区域内部描述)。

[0179] 不特别地限制其表达被反义作用抑制的“靶基因”或“靶向的转录产物”,并且其例子包括其表达在多种疾病中增加的基因。另外,“靶基因的转录产物”是从编码靶基因的基因组DNA转录的mRNA,并且还包括未经历碱基修饰的mRNA、尚未剪接的mRNA前体等。更一般地,“转录产物”可以是由DNA依赖性RNA聚合酶合成的任何RNA。

[0180] 如本文所用的术语“纯化或分离的双链核酸复合物”意指这样的核酸复合物,它包

含自然界中不存在的至少一个核酸链或包含基本上不含天然存在的核酸物质的至少一个核酸链。

[0181] 如本文所用的术语“互补”意指其中所谓Watson-Crick碱基对(天然型碱基对)或非Watson-Crick碱基对(Hoogsteen碱基对等)可以借助氢键形成的关系。靶向的转录产物(例如靶基因的转录产物)的碱基序列和第一核酸链的碱基序列不必需是完美互补的，并且如果碱基序列具有至少70%或更高的、优选地80%或更高和更优选地90%或更高(例如，95%、96%、97%、98%或99%或更高的)的互补性，则这是可接受的。可以通过使用BLAST程序等确定序列的互补性。当序列互补时，第一链可以“与第二链复性”。本领域技术人员可以轻易地确定两个链可以复性的条件(温度、盐浓度等)。另外，本领域普通技术人员可以基于例如靶基因的碱基序列信息，容易地设计与靶向的转录产物互补的反义核酸。

[0182] 根据某些实施方案，第一核酸链是与转录产物(如靶基因的转录产物)互补的反义核酸，并且是含有下述区域的核酸，所述区域包含当第一核酸链与转录产物杂交时由RNA酶H识别的至少4个连续核苷酸。

[0183] 如本文所用，术语“核酸”可以指单体核苷酸或核苷，或可以意指由多个单体组成的寡核苷酸。术语“核酸链”在本文中还用来指寡核苷酸。核酸链可以通过化学合成方法(包括使用自动化合成仪)或通过酶促过程(包括但不限于聚合酶、连接酶或限制性反应)完全或部分地制备。

[0184] 不特别地限制第一核酸链的链长度，但是链长度通常是至少8个碱基、至少10个碱基、至少12个碱基或至少13个碱基。链长度可以是直至20个碱基、25个碱基或35个碱基。链长度可以甚至长约100个碱基。长度的范围可以是10至35个碱基、12至25个碱基或13至20个碱基。在某些情况下，长度的选择通常取决于反义作用的强度与针对靶的核酸链的特异性的平衡，连同其他因素如成本、合成产率等。

[0185] “由RNA酶H识别的至少4个连续核苷酸”通常是包含4至20个连续碱基的区域、包含5至16个连续碱基的区域或包含6至12个连续碱基的区域。另外，可以在这个区域中使用的核苷酸是如天然DNA那样当与RNA核苷酸杂交时由RNA酶H识别的那些核苷酸，其中RNA酶H切割RNA链。合适的核苷酸，如修饰的DNA核苷酸和其他碱基是本领域已知的。已知含有2'-羟基的核苷酸如RNA核苷酸不是合适的。本领域技术人员可以轻易地确定用于“至少4个连续核苷酸”的这个区域中的核苷酸的适宜性。

[0186] 在某些实施方案中，第一核酸链包含“核苷酸和任选地核苷酸类似物”。这个术语意指第一链包含DNA核苷酸、RNA核苷酸，并且任选地还可以在链中包含核苷酸类似物。

[0187] 如本文所用，“DNA核苷酸”意指天然存在的DNA核苷酸，或具有修饰的碱基、糖或磷酸酯键亚单位的DNA核苷酸。类似地，“RNA核苷酸”意指天然存在的RNA核苷酸，或具有修饰的碱基、糖或磷酸酯键亚单位的RNA核苷酸。修饰的碱基、糖或磷酸酯键亚单位是其中已经在亚单位中添加或取代单个取代基的那种，并且该亚单位总体上尚未替换为不同的化学基团。从包含核苷酸的区域的部分或整体具有高脱氧核糖核酸酶抗性等的观点看，DNA可以是修饰的核苷酸。这类修饰的例子包括胞嘧啶的5-甲基化、5-氟化、5-溴化、5-碘化和N4-甲基化；胸苷的5-去甲基化、5-氟化、5-溴化和5-碘化；腺嘌呤的N6-甲基化和8-溴化；鸟嘌呤的N2-甲基化和8-溴化；硫代磷酸酯化、甲基膦酸化、甲基硫代膦酸化、手性甲基膦酸化、二硫代磷酸酯化、磷酰胺化、2'-0-甲基化、2'-甲氧乙基(MOE)化、2'-氨基丙基(AP)化和2'-氟化。

然而,从具有优异药物代谢动力学的观点看,硫代磷酸酯化是优选的。可以如此实施这种修饰,从而相同的DNA可以经历组合的多种修饰。并且如下文讨论的那样,可以修饰RNA核苷酸以实现相似的效果。

[0188] 在某些情况下,修饰的DNA的数目和修饰位置可以影响如本文中公开的双链核酸提供的反义作用等。由于这些实施方案可以随靶基因等的序列变动,它可以根据情况变动,但是本领域普通技术人员可以通过参考与反义方法相关的文献的描述,确定合适的实施方案。另外,当测量由修饰后的双链核酸复合物拥有的反义作用时,如果如此获得的测量值并未显著低于修饰后的双链核酸复合物的测量值(例如,如果修饰后获得的测量值比修饰前该双链核酸复合物的测量值低30%或更多),可以是评价相关修饰。可以如下文实施例中所示,通过以下方式实施反义作用的测量:将受测试的核酸化合物引入细胞等中,并且通过适当使用已知技术如RNA印迹法、定量PCR和蛋白质印迹法测量其中表达被受测试的核酸化合物提供的反义作用抑制的细胞中靶基因的表达量(mRNA的量、cDNA的量、蛋白质的量等)。

[0189] 如本文所用,“核苷酸类似物”意指非天然存在的核苷酸,其中碱基、糖或磷酸酯键亚单位在亚单位中具有多于一个添加或取代的取代基,或该亚单位整体上已经替换为不同的化学基团。具有多于一个取代的类似物的例子是桥连核酸,其中桥连单元已经通过两个取代添加在糖环上,一般与2'和4'碳原子连接。就根据某些实施方案的第一核酸链而言,从增加针对靶基因转录产物的部分序列的亲和力和/或靶基因针对核酸酶的抗性观点看,第一核酸链还包含核苷酸类似物。“核苷酸类似物”可以是其中针对靶基因转录产物的部分序列的亲和力和/或核酸针对核酸酶的抗性由于修饰(桥连基团、取代基等)而增强的任何核酸,并且其例子包括在JP10-304889A、W02005/021570、JP10-195098A、JP2002-521310W、W02007/143315、W02008/043753、W02008/029619和W02008/049085中被公开为适用于反义方法中的核酸(下文中,这些文献将称作“与反义方法相关的文献”)。即,其例子包括在上文描述的文献中公开的核酸:己糖醇核酸(HNA)、环己烷核酸(CeNA)、肽核酸(PNA)、二醇核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、吗啉代核酸、三环DNA(tcDNA)、2'-O-甲基化核酸、2'-MOE(2'-O-甲氧乙基)化核酸、2'-AP(2'-O-氨基丙基)化核酸、2'-氟化核酸、2'-F-阿拉伯糖核酸(2'-F-ANA)和BNA(桥连核酸)。

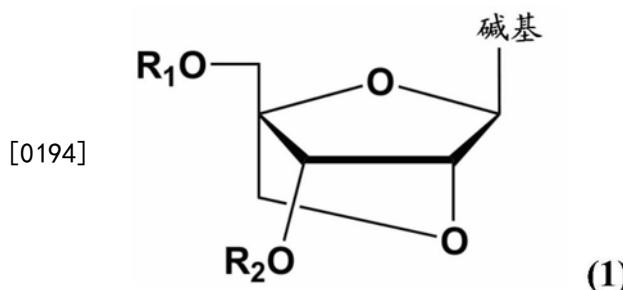
[0190] 根据某些实施方案,BNA可以是其中2'碳原子和4'碳原子由两个或更多个原子桥连的任何核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。桥连核酸的例子是本领域技术人员已知的。可以将这类BNA的一个亚组描述为具有由4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-O-2'、4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-S-2'、4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-OCO-2'、4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sub>3</sub>)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-2'桥连的2'-位置处碳原子和4'-位置处碳原子(这里,p、m和n分别代表1至4的整数、0至2的整数和1至3的整数;并且R<sub>3</sub>代表氢原子、烷基、烯基、环烷基、芳基、芳烷基、酰基、磺酰基、单元取代基(荧光标记分子或化学发光标记分子)、具有核酸切割活性的官能团、胞内或核内定位信号肽等)。另外,就根据某些实施方案的BNA而言,在3'-位置处碳原子上的OR<sub>2</sub>取代基和5'-位置处碳原子上的OR<sub>1</sub>取代基中,R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>一般是氢原子,但是可以彼此相同或不同,并且也可以是用于核酸合成的羟基的保护基、烷基、烯基、环烷基、芳基、芳烷基、酰基、磺酰基、甲硅烷基、磷酸基、受用于核酸合成的保护基保护的磷酸基或-P(R<sub>4</sub>)R<sub>5</sub>(这里,可以彼此相同或不同的R<sub>4</sub>和R<sub>5</sub>各自代表羟基、受用于核酸合成的保护基保护的羟基、巯基、受用于核酸合成的保护基保护的巯基、氨基、具有1至5个碳原子的烷氧基、具有1至5个碳原子的烷硫基、具有1至6个碳原子的氰基烷氧基或用具有1至5个碳原子的烷基

取代的氨基)。这种BNA的非限制性例子包括 $\alpha$ -L-亚甲氧基( $4'$ -CH<sub>2</sub>-O-2')BNA或 $\beta$ -D-亚甲氧基( $4'$ -CH<sub>2</sub>-O-2')BNA(又称作LNA(锁核酸(注册商标)、2',4'-BNA)、乙烯氧基( $4'$ -CH<sub>2</sub>)2-O-2')BNA(又称作ENA)、 $\beta$ -D-硫代( $4'$ -CH<sub>2</sub>-S-2')BNA、氨基氧( $4'$ -CH<sub>2</sub>-O-N(R<sub>3</sub>)-2')BNA、氧氨基( $4'$ -CH<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>)-O-2')BNA(又称作2',4'-BNANC)、2',4'-BNACOC、3'-氨基-2',4'-BNA、5'-甲基BNA、( $4'$ -CH(CH<sub>3</sub>)-O-2')BNA(又称作cEt-BNA)、( $4'$ -CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2')BNA(又称作cMOE-BNA、酰胺BNA( $4'$ -C(O)-N(R)-2')BNA(R=H、Me)(又称作AmNA)和本领域技术人员已知的其他BNA。

[0191] 另外,在核苷酸类似物中,根据某些实施方案,碱基部分可以被修饰。在碱基部分处修饰的例子包括胞嘧啶的5-甲基化、5-氟化、5-溴化、5-碘化和N4-甲基化;胸昔的5-去甲基化、5-氟化、5-溴化和5-碘化;腺嘌呤的N6-甲基化和8-溴化;鸟嘌呤的N2-甲基化和8-溴化。另外,在修饰的核酸中,根据某些实施方案,磷酸二酯结合位点可以被修饰。修饰磷酸二酯结合位点的例子包括硫代磷酸酯化、甲基膦酸化、甲基硫代膦酸化、手性甲基膦酸化、二硫代磷酸酯化、和磷酰胺化。然而,从具有优异药物代谢动力学的观点看,可以使用硫代磷酸酯化。另外,可以如此实施对碱基部分的这种修饰或对磷酸二酯结合位点的修饰,从而相同核酸可以经受组合的多种修饰。

[0192] 通常,修饰的核苷酸和修饰的核苷酸类似物不限于本文中例举的那些。众多修饰的核苷酸和修饰的核苷酸类似物是现有技术中已知的,例如在授予Tachas等人的美国专利号8,299,039中、特别是在第17—22栏中公开的那些,并且可以用于本申请的实施方案中。

[0193] 本领域普通技术人员可以适当地选择并且使用这类修饰的核酸当中的核苷酸类似物,同时考虑反义作用、针对靶基因转录产物的部分序列的亲和力、核酸酶抗性等。然而,在一些实施方案中,核苷酸类似物是下式(1)代表的LNA:[化学式1]



[0195] 在式(1)中,“碱基”表示可以取代的芳族杂环基或芳族烃环基,例如,天然核苷的碱基部分(嘌呤碱基或嘧啶碱基)或非天然(修饰的)核苷的碱基部分,另外对碱基部分修饰的例子包括上文描述的那些;并且

[0196] 可以彼此相同或不同的R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>各自代表氢原子、用于核酸合成的羟基的保护基、烷基、烯基、环烷基、芳基、芳烷基、酰基、磺酰基、甲硅烷基、磷酸基、受用于核酸合成的保护基保护的磷酸基或-P(R<sub>4</sub>)R<sub>5</sub>(这里,可以相同或彼此不同的R<sub>4</sub>和R<sub>5</sub>各自代表羟基、受用于核酸合成的保护基保护的羟基、巯基、受用于核酸合成的保护基保护的巯基、氨基、具有1至5个碳原子的烷氧基、具有1至5个碳原子的烷硫基、具有1至6个碳原子的氰基烷氧基或用具有1至5个碳原子的烷基取代的氨基)。

[0197] 由以上化学式显示的化合物表示核苷,但是“LNA”并且更一般地根据某些实施方案,BNA包括其中磷酸衍生基团与相关核苷结合的核苷酸形式(核苷酸)。换而言之,BNA类,

如LNA,作为核苷酸掺入至构成双链核酸复合物的核酸链中。

[0198] 根据某些实施方案,“包含一个或多个核苷酸类似物的翼区”位于包含至少4个连续DNA核苷酸的区域(下文,也称作“DNA缺口区”)的5’末端侧和/或3’末端侧上。

[0199] 包含相对于DNA缺口区5’末端布置的核苷酸类似物的区域(下文,也称作“5’翼区”)和包含相对于DNA缺口区3’末端布置的核苷酸类似物的区域(下文,也称作“3’翼区”)可以各自独立地包含在与反义方法相关的文献中讨论的至少一种核苷酸类似物,并且除这种核苷酸类似物之外,还可以包含天然核酸(DNA或RNA)。另外,5’翼区和3’翼区的链长度独立地通常是1至10个碱基、1至7个碱基或2至5个碱基。

[0200] 另外,存在5’翼区和3’翼区中核苷酸类似物和天然核苷酸的种类数和位置的合适实施方案,原因是这些核酸的数目和位置在某些实施方案中可以影响由双链核酸复合物提供的反义作用等。由于这些合适的实施方案可以随序列变动,它可以根据情况变动,但是本领域普通技术人员可以通过参考与反义方法相关的文献的描述,确定合适的实施方案。另外,当按照与包含“至少4个连续DNA核苷酸”的区域情况下相同的方式测量由修饰后的双链核酸拥有的反义作用时,如果如此获得的测量值并未显著地低于修饰前的双链核酸的测量值,可以将相关修饰评价为优选实施方案。

[0201] 同时,已经按传统方式尝试过的仅涉及RNA或LNA的反义方法具有因与靶mRNA结合而受抑制的翻译;然而,它们的效果一般不充分。在另一方面,在仅涉及DNA的反义方法中,由于获得由DNA和RNA组成的双链结构,一旦DNA与靶基因转录物结合,则可以预期通过使DNA-RNA异双链体成为RNA酶H的靶并且因而切割mRNA,获得强烈的靶基因表达抑制作用。然而,由于DNA自身与靶RNA的结合作用弱,则实际效果一般也是不充分的。

[0202] 因此,当具有至少4个或更多个碱基的链长度的DNA布置在第一核酸链的中心处并且针对RNA(即,针对靶向的转录产物)具有强大结合亲和力的LNA(或其他BNA)布置在这个第一链的两个末端时,则这种复合链因而促进RNA酶H切割靶RNA。然而“具有链长度4的DNA”不仅限于DNA核苷酸。构思了当第一核酸链与转录产物杂交时,第一核酸链包含由RNA酶H识别的至少4个连续核苷酸。从因与靶向的转录产物形成异双链体而出现的反义作用是优异的观点看,根据某些实施方案,在包含修饰的核酸的区域中任选纳入核苷酸类似物是合乎需要的,其中所述修饰的核酸布置在包含当第一核酸链与转录产物杂交时由RNA酶H识别的至少4个连续核苷酸的区域的5’侧和3’侧上。核苷酸类似物可以是BNA,例如,LNA。

[0203] 根据一些实施方案,第二核酸链是与上文描述的第一核酸链互补的核酸。第二核酸链的碱基序列和第一核酸链的碱基序列不必需是彼此完美互补的,并且碱基序列可以具有至少70%或更高的、优选地80%或更高和更优选地90%或更高(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更高)的互补性。

[0204] 第二核酸链是包含选自RNA、DNA、PNA(肽核酸)和BNA(例如,LNA)的至少一种核酸的寡核苷酸。更具体地,第二链包含(i)RNA核苷酸和任选地核苷酸类似物,以及任选地DNA核苷酸;或(ii)DNA核苷酸和/或核苷酸类似物;或(iii)PNA核苷酸。

[0205] 术语“RNA核苷酸和任选地核苷酸类似物和任选地DNA核苷酸”意指第二链包含RNA核苷酸,并且任选地还可以在链中包含核苷酸类似物,和任选地还可以在链中包含DNA核苷酸。术语“DNA核苷酸和/或核苷酸类似物”意指第二链可以包括DNA核苷酸或核苷酸类似物,或可以包括DNA核苷酸和核苷酸类似物这两者。术语“PNA核苷酸”意指第二链可以由PNA核

昔酸组成。

[0206] 然而,如将在后续的实施例中描述,从当某些实施方案的双链核酸复合物由细胞中的RNA酶H识别并且第二核酸链分解时,第一核酸链的反义作用轻易地显现的观点看,第二核酸链包含RNA核昔酸。另外,从功能分子如肽可以容易地与一些实施方案的双链核酸复合物结合的观点看,第二核酸链是PNA。

[0207] 如本文所用,“RNA核昔酸”意指天然存在的RNA核昔酸,或具有修饰的碱基、糖或磷酸酯键亚单位的RNA核昔酸。修饰的碱基、糖或磷酸酯键亚单位是其中已经在亚单位中添加或取代单个取代基的那种,并且该亚单位总体上尚未替换为不同的化学基团。

[0208] 就第二核酸链而言,从具有针对核酸酶如核糖核酸酶(RNA酶)的高抗性的观点看,核酸的部分或全部可以是修饰的核昔酸。这类修饰的例子包括胞嘧啶的5-甲基化、5-氟化、5-溴化、5-碘化和N4-甲基化;胸昔的5-去甲基化、5-氟化、5-溴化和5-碘化;腺嘌呤的N6-甲基化和8-溴化;鸟嘌呤的N2-甲基化和8-溴化;硫代磷酸酯化、甲基膦酸化、甲基硫代膦酸化、手性甲基膦酸化、二硫代磷酸酯化、磷酰胺化、2'-0-甲基化、2'-甲氧乙基(MOE)化、2'-氨基丙基(AP)化和2'-氟化。另外,还构思了胸昔碱基替换为尿嘧啶碱基的RNA核昔酸。然而,从具有优异药物代谢动力学的观点看,实施硫代磷酸酯化。另外,可以如此实施这种修饰,从而相同的核酸可以经历组合的多种修饰。例如,如下文描述的实施例中所用,相同的RNA可以经历硫代磷酸酯化和2'-0-甲基化以便提供酶切割抗性。然而,在期望或需要RNA核昔酸由RNA酶H切割的情况下,可以仅应用硫代磷酸酯化或2'-0-甲基化。

[0209] 存在就第二核酸链而言核昔酸类似物数目和修饰位置的合适实施方案,因为数目和修饰位置可以影响某些实施方案中双链核酸复合物提供的反义效果等。由于这些合适的实施方案可以随待修饰核酸的类型、序列等变动,它可以取决于情况,但是类型、序列等可以通过按照与上文描述的第一核酸链相同的方式测量修饰后的双链核酸拥有的反义效果来表征。根据这种合适的实施方案,从如下观点看:在核糖核酸酶(如RNA酶A)的分解作用受抑制直至第二核酸链递送入特定细胞的胞核时,第二核酸链可以因被特定细胞中RNA酶H分解而容易地显示反义作用,则第二核酸链是RNA、与第一核酸链的包含核昔酸类似物的区域(即,5'翼区和/或3'翼区)互补的区域是修饰的核酸或是核昔酸类似物,并且该修饰或类似物具有抑制被酶(如核糖核酸酶)分解的作用。根据某些实施方案,修饰是RNA的2'-0-甲基化和/或硫代磷酸酯化。另外,在这种情况下,与第一核酸链的包含核昔酸类似物的区域互补的整个区域可以是修饰的,或与第一核酸链的包含修饰核酸的区域互补的一部分区域可以是修饰的。此外,修饰的区域可以比第一核酸链的包含修饰核酸的区域长或可以较之更短,只要修饰的区域包含这个部分即可。

[0210] 在某些实施方案的双链核酸复合物中,功能性部分可以与第二核酸链结合。第二核酸链和功能性部分之间的键合作用可以是直接键合作用,或可以是由另一种物质介导的间接键合作用。然而,在某些实施方案中,优选功能性部分应当借助共价键合作用、离子键合作用、氢键合作用等与第二核酸链直接键合,并且从可以获得更稳定键合作用的观点看,共价键合作用是更优选的。

[0211] 对某些实施方案的“功能性部分”的结构没有特别的限制,条件是它赋予所需的功能至双链核酸复合物和/或与之结合的链。所需的功能包括标记功能、纯化功能和递送功能。提供标记功能的部分的例子包括化合物如荧光蛋白、萤光素酶等。提供纯化功能的部分

的例子包括化合物如生物素、抗生素蛋白、His标签肽、GST标签肽、FLAG标签肽等。

[0212] 另外,从以高特异性和高效率递送第一核酸链至靶部位并因而通过相关核酸非常有效地抑制靶基因表达的观点来看,优选具有递送一些实施方案的双链核酸复合物至身体内的“靶部位”的活性的分子应当作为功能性部分与第二核酸链结合。

[0213] 从能够以高特异性和高效率递送某些实施方案的双链核酸复合物至肝脏等的观点看,具有“靶向递送功能”的部分可以例如是脂质。这种脂质的例子包括多种脂质如胆固醇和脂肪酸(例如,维生素E(生育酚、生育三烯酚)、维生素A和维生素D);脂溶性维生素如维生素K(例如,酰基肉碱);中间体代谢物如酰基辅酶A;糖脂、甘油酯及它们的衍生物。然而,在这些脂质当中,从具有更高安全性的观点看,在某些实施方案中,使用胆固醇和维生素E(生育酚和生育三烯酚)。另外,从能够以高特异性和高效率递送某些实施方案的双链核酸复合物至脑等的观点看,某些实施方案的“功能性部分”的例子包括糖(例如,葡萄糖和蔗糖)。另外,从通过与多种器官的细胞表面上的存在的多种蛋白质结合,能够以高特异性和高效率递送某些实施方案的双链核酸复合物至多种器官等的观点看,某些实施方案的“功能性部分”的例子包括肽或蛋白质如受体配体和抗体和/或其片段。

[0214] 就某些实施方案的双链核酸复合物而言,第一核酸链的链长度和第二核酸链的链长度可以相同或可以不同。作为其中第一和第二核酸链具有相同链长度的一些实施方案的双链核酸复合物,例如,图3中所示的双链核酸是这类实施方案的例子。

[0215] 另外,作为其中第一和第二核酸链具有不同链长度的一些实施方案的双链核酸,例如,图4和图5中所示的双链核酸是这类实施方案的例子。即,一些实施方案可以提供一种双链核酸,除上文描述的第一和第二核酸链之外,所述双链核酸还包含第三核酸链。

[0216] 第三核酸链与第一和第二核酸链中具有较长链长度的核酸链中较长的区域互补。

[0217] 根据一些实施方案,第三核酸链可以如同第一核酸链那样充当反义寡核苷酸。就这一点而论,第三链可以靶向相同的序列或与第一链不同的序列。因此相对于第一链所讨论的结构和核苷酸组成可以类似地适用于第三链的结构和组成。另外,类似于第二核酸链,通过造成上文描述的官能部分直接或间接地与第三核酸链结合,可以向第三核酸链赋予多种官能性,例如,可以使它作为复合物的递送剂发挥作用。

[0218] 例如,如图4中所示,当使用PNA作为第三核酸链时,由于PNA和蛋白质(氨基酸)可以经肽键结合,可以容易地制备一些实施方案的具有功能性部分的双链核酸复合物,其中所述功能性部分包括蛋白质等。另外,由于图4中所示的双链核酸的PNA具有比图3下半部分中所示的一些实施方案的双链核酸的RNA短的链长度并且不需要PNA与靶基因的碱基序列匹配,所以可以实现大量生产。通常,由于PNA的合成是耗费成本的过程,从可以提供相对价廉的双链核酸的观点看,图4中所示的双链核酸是优选实施方案。特别地,由于图4下半部分中所示的双链核酸不仅具有包含蛋白质等的第一功能性部分,还具有可能包含脂质等的第二功能性部分,该双链核酸复合物可以以较高特异性和较高效率递送至靶部位。

[0219] 另外,通常,当化合物肠内施用(经口施用等)时,该化合物在身体内不经血管而经淋巴管扩散。然而,为了抵达淋巴管,该化合物的分子量一般应当是11,000道尔顿至17,000道尔顿或更大。另外,由于肠内施用的化合物暴露于肠管中的RNA酶A,一般优选含有RNA的核酸药物均具有受2'-0-甲基化等修饰的RNA部分。因此,图5中所示的双链核酸适用于经肠施用,所述双链核酸具有约18,000道尔顿的分子量并且均具有2'-0-甲基化的RNA部分。另

外,图5下半部分中所示的双链核酸具有DNA链(第三核酸链)以及连接该DNA链和包含RNA的互补链(第二核酸链)的发夹环核酸(优选地,包含4至9个碱基的核酸)。

[0220] 因而,已经描述了一些实施方案的双链核酸复合物的一些合适的示例性实施方案,但是一些实施方案的双链核酸不意限于上文描述的示例性实施方案。另外,具有本领域普通技术的任何人可以根据一些实施方案通过适当地选择已知方法,产生第一核酸链、第二核酸链和第三核酸链。例如,可以根据一些实施方案,通过以下方式产生所述核酸:基于靶向的转录产物的碱基序列(或,在一些情况下,被靶向基因的碱基序列)的信息,设计核酸的相应碱基序列,通过使用市售自动化核酸合成仪(Applied Biosystems, Inc.产品; Beckman Coulter, Inc.产品等)合成核酸,并随后通过使用反相柱等纯化所产生的寡核苷酸。将按照这种方式产生的核酸在适宜的缓冲溶液中混合并在约90°C至98°C变性几分钟(例如,5分钟),随后使核酸在约30°C至70°C复性约1至8小时,并且因此,可以产生一些实施方案的双链核酸复合物。另外,可以通过使用事先已经与功能性部分结合的核酸种类并如上文所述实施合成、纯化和复性,产生与功能性部分结合的双链核酸复合物。众多用于接合官能部分至核酸的方法是本领域熟知的。

[0221] 因此,已经描述了本发明双链核酸的合适示例性实施方案,但是作如将在以下实施例中公开,从反义核酸可以在不造成反义作用下降的情况下以高效率递送至靶部位的观点看,一些实施方案的“第二核酸链”是优异的。因此,一些实施方案的双链核酸不意在限于上文描述的示例性实施方案,并且例如,也可以提供一个实施方案,其包括以下反义核酸而非上文描述的第一核酸链:

[0222] 具有借助反义作用抑制靶基因表达的活性的双链核酸复合物,该双链核酸复合物包含(i)与该靶基因的转录产物互补的反义核酸,其中所述核酸不包含DNA,和(ii)与前述核酸(i)互补的核酸。

[0223] 即,在某些实施方案中,反义核酸具有非RNA酶H依赖性反义作用。“非RNA酶H依赖性反义作用”意指抑制靶基因表达的活性,所述活性因靶基因的转录产物(RNA有义链)和与转录产物的部分序列互补的核酸链杂交时抑制翻译或剪接功能调节作用如外显子跳跃而发生(见对图1中点线包围的区域之外上半部分的描述)。

[0224] “不包含DNA的核酸”意指不包含天然DNA和修饰的DNA的反义核酸,并且其例子可以是PNA或包含吗啉代核酸的核酸。另外,就“不包含DNA的核酸”而言,类似于第一核酸链或第二核酸链,从核酸酶抗性高的观点看,该核酸的部分或全部可以由修饰的核苷酸组成。这类修饰的例子包括上文描述的那些,并且相同的核酸可以经历组合的多种修饰。另外,与修饰核酸的数目和修饰位置相关的优选实施方案可以特征在于:测量修饰后的双链核酸拥有的反义作用,如同上文描述的第一核酸链中那样。

[0225] “不包含DNA的核酸”的碱基序列和与该核酸互补的核酸的碱基序列或靶基因的转录产物的碱基序列不必需是彼此完美互补的,并且碱基序列可以具有至少70%或更高的、优选地80%或更高和更优选地90%或更高(例如,95%、96%、97%、98%、99%或更高)的互补性。

[0226] 对“不包含DNA的核酸”的链长度没有特别的限制,但是就第一核酸而言,链长度如上文所述并且通常是8至35个碱基、10至35个碱基、12至25个碱基或13至20个碱基。

[0227] 根据一些实施方案,“与不包含DNA的核酸互补的核酸”与上文描述的第二核酸链

相同。另外，在不包含DNA的核酸的链长度和与该核酸互补的核酸的链长度不同的情况下，这个实施方案也可以包含第三核酸链。另外，这个实施方案也可以具有上文描述的官能部分，所述官能部分结合至“与不包含DNA的核酸互补的核酸”和/或第三核酸链。

[0228] 用于借助反义作用抑制靶基因表达或靶向的转录产物的水平的组合物。

[0229] 一些实施方案的双链核酸复合物可以以高特异性和高效率递送至靶部位并且可以非常有效地抑制靶基因表达或转录产物的水平，如将在下文描述的实施例中公开。因此，一些实施方案可以提供一种含有一些实施方案的双链核酸复合物作为有效成分并意在借助反义作用抑制例如靶基因表达的组合物。特别地，一些实施方案的双链核酸复合物可以产生高功效，甚至当以低浓度施用时也是如此，并且通过抑制反义核酸在器官而非递送靶向的区域内分布，可以减少不良副作用。因此，一些实施方案也可以提供意在治疗并阻止与例如靶基因表达增加相关的疾病（如代谢性疾病、肿瘤和感染）的药物组合物。

[0230] 可以通过已知的制药方法配制含有一些实施方案的双链核酸复合物的组合物。例如，组合物可以按如下形式肠内地（经口等）使用：胶囊剂、片剂、丸剂、液体剂、散剂、颗粒剂、细颗粒剂、薄膜包衣剂、丸粒剂、药锭剂（troche）、舌下剂、咀嚼剂、颊含剂、糊剂、糖浆剂、混悬剂、酏剂、乳剂、包衣剂、软膏剂、硬膏剂、巴布剂、经皮制剂、洗剂、吸入剂、气溶胶剂、注射剂和栓剂，或非肠内方式使用。

[0231] 就这些制剂的配制而言，可以适当地掺入药理学可接受的载体或作为食品和饮料可接受的载体，具体而言，灭菌水、生理盐水、植物油、溶剂、基质、乳化剂、助悬剂、表面活性剂、pH调节剂、稳定剂、香味剂、芳香剂、赋形剂、溶媒、防腐剂、粘合剂、稀释剂、等张剂、无痛化剂（soothing agent）、增量剂、崩解剂、缓冲剂、包衣剂、润滑剂、着色剂、甜味剂、增稠剂、矫味矫臭剂、溶解助剂和其他添加剂。

[0232] 在配制的情况下，如非专利文献1中公开，可以导致脂质作为功能性部分与之结合的一些实施方案的双链核酸复合物与脂蛋白形成复合物，如乳糜微粒或乳糜微粒残余物。另外，从增加肠内施用效率的观点看，除脂蛋白之外，也可以使用与具有大肠粘膜上皮通透性增强作用的物质（例如，中等链脂肪酸、长链不饱和脂肪酸或其衍生物（盐、酯形式或醚形式））和表面活性剂（非离子表面活性剂和阴离子表面活性剂）的复合物（混合胶束和乳液）。

[0233] 对施用一些实施方案的组合物的优选形式没有特别的限制，并且其例子包括肠内（经口等）或非肠内施用，更具体地，静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、皮下施用、皮内施用、气管支气管内施用、直肠施用和肌内施用以及通过输液施用。

[0234] 一些实施方案的组合物可以用于包括人类作为受试者的动物。然而，对不包括人类的动物没有特别的限制，并且各种家养动物、家禽、宠物、实验动物等可以是一些实施方案的受试者。

[0235] 当施用或摄入一些实施方案的组合物时，施用量或摄入量可以根据受试者的年龄、体重、症状和健康状况、组合物的类型（医药品、食品和饮料等）等适当地选择。然而，根据某些实施方案，组合物的有效摄入量是0.001mg/kg/日至50mg/kg/日双链核酸复合物。

[0236] 一些实施方案的双链核酸复合物可以以高特异性和高效率递送至靶部位，并且可以非常有效地抑制靶基因表达或转录产物的水平，如将在后续实施例中公开。因此，一些实施方案可以提供一种向受试者施用一些实施方案的双链核酸复合物并且借助反义作用抑制靶基因表达或转录产物水平的方法。另外，也可以提供一种通过向受试者施用一些实施

方案的组合物,治疗或预防与例如靶基因表达增加相关的多种疾病的方法。

### [实施例]

[0237] 下文,将通过实施例和比较例更具体地描述一些实施方案,但是实施方案不意在限于以下实施例。同时,向下文描述的实验供应小鼠为4至6周龄雌性ICR小鼠,体重20至25g。除非特别说明,否则使用小鼠的实验均以n=3至4实施。另外,本发明实施例中使用的BNA是由上式(1)代表的LNA。此外,表1-3中显示了比较例1和实施例1-15中所述的序列。

### [0238] [表1]

SEQ ID	序列	符号	链	解释
SEQ ID NO: 1	5'-G <sub>s</sub> C <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> C-3'	大写: LNA; 小写: DNA; S: 硫代磷酸酯	AS/12	CE1: 有两种形式, 5' Cy3 和 5' Cy3/3' Chol; 1(普通的); 2; 3; 7(普通的); 8(普通的); 9(普通的)
SEQ ID NO: 2	5'-g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> AUACCAAU <sub>s</sub> g <sub>s</sub> c-3'	大写: RNA; 小写: OMe-RNA; S: 硫代磷酸酯	c/12	1:(o) 2;
SEQ ID NO: 3	5'-g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> U <sub>s</sub> a <sub>s</sub> c <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> U <sub>s</sub> g <sub>s</sub> c-3'	大写: RNA; 小写: OMe-RNA; S: 硫代磷酸酯	c/12	3(有有两种形式,普通的和 5' Toc); 7
SEQ ID NO: 4	5'-g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> U <sub>s</sub> a <sub>s</sub> c <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> U <sub>s</sub> g <sub>s</sub> c-3'	大写: RNA; 小写: OMe-RNA; S: 硫代磷酸酯	c/12	1:(m/s) 2
SEQ ID NO: 5	5'-G <sub>s</sub> C <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> T <sub>s</sub> C <sub>s</sub> A-3'	大写: LNA; 小写: DNA; S: 硫代磷酸酯	AS/13	3; 4; 5; 6; 10
SEQ ID NO: 6	5'-A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> C <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> t <sub>s</sub> g <sub>s</sub> g <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> T <sub>s</sub> C <sub>s</sub> A-3'	大写: LNA; 小写: DNA; S: 硫代磷酸酯	AS/14	3
SEQ ID NO: 7	5'-u <sub>s</sub> g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> AUACCAAU <sub>s</sub> g <sub>s</sub> c-3'	大写: RNA; 小写: OMe-RNA; S: 硫代磷酸酯	c/13	3(有有两种形式,普通的和 5' Toc) 4(仅 5' Toc 形式); 5(仅 5' Toc 形式) 6(普通的和 5' Toc); 10(仅 5' Toc 形式) 11(仅 5' Toc 形式); 15(仅 5' Toc 形式)
SEQ ID NO: 8	5'-u <sub>s</sub> g <sub>s</sub> a <sub>s</sub> AUACCAAU <sub>s</sub> g <sub>s</sub> c <sub>s</sub> u-3'	大写: RNA; 小写: OMe-RNA; S: 硫代磷酸酯	c/14	3(有有两种形式,普通的和 5' Toc)

[0240] [表2]

SEQ ID	序列	符号	链	解释
SEQ ID NO: 9	5'- $\text{g}_s\text{a}_s\text{auaccaaa}\text{u}_s\text{g}_s\text{c}$ -3'	大写:RNA; 小写:OMe-RNA; S: 硫代磷酸酯	c/12	7 (cRNA(G)-OM)
SEQ ID NO: 10	5'- $\text{u}_s\text{u}_s\text{c}\text{GCA}\text{CAGAAUACCA}\text{A}\text{u}_s\text{g}_s\text{c}$ -3'	大写:RNA; 小写:OMe-RNA; S: 硫代磷酸酯	c/21	8
SEQ ID NO: 11	N'-TGGTGCGAA-C'	下划线: PNA	3 <sup>rd</sup> /9	8
SEQ ID NO: 12	N'-GAAUACCAAUUGC-C'	下划线: PNA	c/12	9
SEQ ID NO: 13	N'-GAAUACCAAU-C'	下划线: PNA	c/10	9
SEQ ID NO: 14	N'-GAAUACCA-C'	下划线: PNA	c/8	9
SEQ ID NO: 15	5'- $\text{u}_s\text{g}_s\text{a}_s\text{AUACCAAA}\text{U}_s\text{g}_s\text{c}$ -3'	大写:RNA; 小写:LNA; S: 硫代磷酸酯	c/13	10
SEQ ID NO: 16	5'- $\text{u}_s\text{g}_s\text{a}_s\text{A}_s\text{U}_s\text{A}_s\text{C}_s\text{C}_s\text{A}_s\text{A}_s\text{U}_s\text{g}_s\text{c}$ -3'	大写:RNA; 小写:LNA; S: 硫代磷酸酯	c/13	10
SEQ ID NO: 17	5'- $\text{u}_s\text{g}_s\text{a}_s\text{A}_s\text{U}_s\text{A}_s\text{C}_s\text{C}_s\text{A}_s\text{A}_s\text{U}_s\text{g}_s\text{c}$ -3'	大写:RNA; 小写:OMe-RNA; S: 硫代磷酸酯	c/13	10
SEQ ID NO: 18	5'- $\text{u}_s\text{g}_s\text{a}_s\text{AUACCAAU}\text{U}\text{g}\text{c}\text{u}\text{a}\text{c}\text{g}\text{c}\text{a}\text{c}\text{c}\text{a}_s\text{c}_s\text{c}_s\text{a}$ -3'	大写:RNA; 小写:OMe-RNA; S: 硫代磷酸酯	c/31	11

[0241]

[0242] [表3]

SEQ ID	序列	符号	链	解释
SEQ ID NO: 19	5'-T <sub>s</sub> G <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> t <sub>s</sub> E <sub>s</sub> C <sub>s</sub> T <sub>s</sub> G <sub>s</sub> G-3'	大写:LNA;小写:DNA;S: 硫代磷酸酯	AS/13	12
SEQ ID NO: 20	5'-c <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> GGCAGAGAGA <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a-3'	大写:RNA;小写:OMe- RNA;S: 硫代磷酸酯	c/13	12
SEQ ID NO: 21	5'-T <sub>s</sub> A <sub>s</sub> T <sub>s</sub> T <sub>s</sub> E <sub>s</sub> t <sub>s</sub> c <sub>s</sub> t <sub>s</sub> E <sub>s</sub> C <sub>s</sub> t <sub>s</sub> G <sub>s</sub> A <sub>s</sub> C <sub>s</sub> T-3'	大写:LNA;小写:DNA;S: 硫代磷酸酯	AS/20	12
SEQ ID NO: 22	5'-a <sub>s</sub> E <sub>s</sub> U <sub>s</sub> C <sub>s</sub> c <sub>s</sub> AGGCAGAGAC <sub>s</sub> a <sub>s</sub> U <sub>s</sub> a <sub>s</sub> a-3'	大写:RNA;小写:OMe- RNA;S: 硫代磷酸酯	c/20	12
SEQ ID NO: 23	5'-T <sub>s</sub> A <sub>s</sub> E <sub>s</sub> t <sub>s</sub> C <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> E <sub>s</sub> t <sub>s</sub> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> C-3'	大写:LNA;小写:DNA;S: 硫代磷酸酯	AS/13	13
SEQ ID NO: 24	5'-E <sub>s</sub> U <sub>s</sub> E <sub>s</sub> AACUGGACUauacgcac <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a-3'	大写:RNA;小写:OMe- RNA;S: 硫代磷酸酯	c/22	13
SEQ ID NOs: 25 and 31	N'-SPGARAFGGGS-ttgtcgta-C'	大写:AA;下划线小写: PNA	3 <sup>rd</sup> /9	13
SEQ ID NO: 26	5'-C <sub>s</sub> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> t <sub>s</sub> E <sub>s</sub> t <sub>s</sub> C <sub>s</sub> a <sub>s</sub> C <sub>s</sub> T <sub>s</sub> C <sub>s</sub> C-3'	大写:LNA;小写:DNA;S: 硫代磷酸酯	AS/15	14
SEQ ID NO: 27	5'-E <sub>s</sub> E <sub>s</sub> a <sub>s</sub> GUUGUAGCCA <sub>s</sub> U <sub>s</sub> E <sub>s</sub> -3'	大写:RNA;小写:OMe- RNA;S: 硫代磷酸酯	c/15	14 (5'Toc)
SEQ ID NO: 28	5'-G <sub>s</sub> C <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> E <sub>s</sub> E <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> T <sub>s</sub> C <sub>s</sub> A-3'	大写: N-甲酰胺 BNA;小写: DNA, S:硫代磷酸酯	AS/13	15
SEQ ID NO: 29	5'-T <sub>s</sub> C <sub>s</sub> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> t <sub>s</sub> E <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> E <sub>s</sub> t <sub>s</sub> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> T <sub>s</sub> G-3'	大写:LNA;小写:DNA;S: 硫代磷酸酯	AS/20	CE1 (3'-Chol)
SEQ ID NO: 30	5'-T <sub>s</sub> C <sub>s</sub> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> G <sub>s</sub> c <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> E <sub>s</sub> t <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> E <sub>s</sub> a <sub>s</sub> t <sub>s</sub> G <sub>s</sub> A <sub>s</sub> C <sub>s</sub> A <sub>s</sub> C-3'	大写:LNA;小写:DNA;S: 硫代磷酸酯	AS/29	CE1 (3'-Chol)

[0243]

[0244] (比较例1)

[0245] 对包含LNA核苷酸和DNA核苷酸的ASO (“LNA/DNA缺口聚体”) 评价反义寡核苷酸(ASO)在反义方法中的稳定性、在体内抑制靶基因表达的活性(反义作用)和体内递送特性及反义作用,其中胆固醇已经与所述ASO直接结合从而增强递送特性。

[0246] 制备了两种ASO,它们具有图6中示意性显示的LNA/DNA缺口聚体结构。制备了其中荧光染料Cy3与LNA/DNA缺口聚体ASO的5'末端共价结合的Cy3-ASO(图6A) 和其中胆固醇与Cy3-ASO的3'末端共价结合的Cy3-Chol-ASO(图6B)。这些ASO的靶基因是载脂蛋白B(ApoB)

基因，并且下文显示其序列。通过委托Gene Design, Inc.采用合成法产生这些ASO。

[0247] GCattggtatTC(大写:LNA,小写:DNA,核酸之间:硫代磷酸酯键)(SEQ ID NO:1)

[0248] 同时,Cy3和ASO根据已知技术由硫代磷酸酯键彼此结合，并且胆固醇和ASO经四乙二醇接头彼此结合。

[0249] 将这些ASO分别以10mg/kg的量经小鼠尾静脉注射，并且1小时后，解剖小鼠以提取肝脏。将如此获得的肝脏用4%福尔马林溶液固定，随后将该溶液更换为30%蔗糖溶液，将肝脏包埋于OCT混合物中，并且随后从中产生具有10μm厚度的切片。随后，通过使用DAPI将切片进行胞核染色，并且随后使用共聚焦显微镜观察切片中Cy3的信号强度。图7中展示如此获得的结果。

[0250] 另外，将Cy3-ASO和Cy3-Chol-ASO经尾静脉各自静脉内注射至三只小鼠，并且在三日后，实施第二次ASO施用。施用的ASO的量设定为10mg/kg。另外，通过仅施用PBS而非ASO，还准备好阴性对照组小鼠。在第二次施用后次日，将小鼠用PBS灌流，并且随后解剖小鼠以提取肝脏。将1ml核酸提取试剂(Isogen,由Gene Design, Inc.制造)添加至80mg如此提取的肝脏，并且根据附于该试剂的方案提取mRNA。随后，测量这些小鼠的mRNA浓度，并且通过使用SuperScript III(由Invitrogen, Inc.制造)根据所附的方案，从一定量的mRNA合成cDNA。使用如此产生的cDNA作为模板，并且使用TaqMan系统(由Roche Applied Bioscience Corp.制造)实施定量性RT-PCR。同时，定量性RT-PCR中所用的引物是由Life Technologies公司基于多种基因数目设计并生产的产品。另外，温度和时间的条件如下：将95°C 15秒、60°C 30秒和72°C 1秒称为一个循环，并且实施40个循环。基于如此获得的定量性RT-PCR结果，分别计算mApoB的表达量/mGAPDH(内标物基因)的表达量，并且将阴性对照组的计算结果和ASO施用组的计算结果比较并通过t-检验评价。图8中展示如此获得的结果。

[0251] 如从图7中展示的结果显而易见，与未结合胆固醇的LNA/DNA相比，已经与胆固醇直接结合的LNA/DNA缺口聚体以大得多的量积累在肝脏中。

[0252] 然而，如图8中展示，发现当胆固醇直接与LNA/DNA缺口聚体结合并且使用时，反义作用丧失。

[0253] (实施例1)

[0254] 由于发现当功能性部分如胆固醇与LNA/DNA缺口聚体(反义链)直接结合时反义作用受损，发明人设想使用一种双链核酸复合物，其中ASO的互补链携带指导ASO递送的功能性部分。图9示意性显示这种复合物的一个实施方案。

[0255] 例如，在使用RNA链作为反义LNA/DNA缺口聚体的互补链(包含LNA和DNA的ASO)并且还使功能性部分结合至该RNA的情况下，则通过与cRNA结合的功能性部分，将ASO和互补RNA链(cRNA)的复合物特异性和有效地递送至靶部位。另外，当递送该复合物进入靶部位处细胞的胞核时，由于cRNA自身是RNA-DNA异寡核苷酸，所以认为cRNA被胞核中存在的RNA酶H切割，因而使ASO暴露为单链。随后，这种ASO与靶基因的mRNA结合并形成新RNA-DNA异双链体，其中mRNA被RNA酶H分解以实现反义作用。

[0256] 即，发明人构思通过使用RNA酶H实施切割与功能性部分结合的cRNA并且分解靶基因的mRNA，可以将LNA/DNA缺口聚体(包含LNA和DNA的ASO)以高特异性和高效率递送靶部位，并且可以在ASO的反义作用不受功能性部分抑制的情况下非常有效地抑制靶基因的表达。

[0257] 随后,为了证实这种构思,发明人首先通过下文描述的方法产生LNA/DNA缺口聚体和cRNA的双链DNA,并评价特性。

[0258] 作为LNA/DNA缺口聚体,使用按照与比较例1中相同的方式所产生的Cy3-AS0。另外,作为cRNA,制备了三种不同的互补链结构。图10中示意性显示了这三种结构。一个结构仅包含常规RNA(天然RNA)(cRNA(o)),在第二种结构中,两个碱基各自在cRNA链的末端被化学修饰(2'-0-甲基化和硫代磷酸酯化)以具有RNA酶抗性(cRNA(G)),并且在第三种结构中,cRNA链中的全部碱基均被化学修饰(2'-0-甲基化和硫代磷酸酯化)以抵抗RNA酶切割(cRNA(m/s))。探针由Hokkaido System Science Co.,Ltd.按委托生产。cRNA链的序列如下:

[0259] cRNA(o):5'-GAAUACCAAUGC-3'(SEQ ID NO:2)

[0260] cRNA(G):5'-g<sub>s</sub>a<sub>s</sub>AUACCAAU<sub>sg</sub><sub>sc</sub>-3'(SEQ ID NO:3)

[0261] cRNA(m/s):5'-g<sub>s</sub>a<sub>s</sub>a<sub>s</sub>u<sub>s</sub>a<sub>s</sub>c<sub>s</sub>c<sub>s</sub>a<sub>s</sub>u<sub>s</sub>g<sub>s</sub>c-3'(SEQ ID NO:4)

[0262] (大写:RNA,小写:2'-OMe-RNA,s:核酸之间的硫代磷酸酯键)

[0263] 将LNA/DNA缺口聚体和相应的cRNA以等摩尔量混合,并且将混合物在95℃加热5分钟并且随后在37℃保温1小时以便使这些核酸链因而复性并形成双链核酸复合物。复性的核酸储存在4℃或在冰上。

[0264] 随后,将已经与相应cRNA复性的Cy3-AS0以及Cy3-AS0各自以LNA的量而言100pmol的量施加至15%丙烯酰胺凝胶,并且以100V实施电泳1小时。在电泳后,直接拍摄凝胶的照片,并且随后在UV光下拍摄照片。图11A、B中展示如此获得的结果。

[0265] 另外,将已经与相应cRNA复性的Cy3-AS0和Cy3-AS0用RNA酶H处理,经历如上文所述的电泳,并且在UV光下拍摄凝胶的照片。图12中展示如此获得的结果。

[0266] 图11中展示的结果表明与作为单链AS0的Cy3-AS0相比,通过使Cy3-AS0和cRNA(o)一起复性所获得的产物、通过使Cy3-AS0和cRNA(G)一起复性所获得的产物和通过使Cy3-AS0和cRNA(m/s)一起复性所获得的产物均具有较慢的迁移率(泳道1),证实复性的产物分别形成双链核酸。

[0267] 另外,虽然在该图中未显示,但是将DNA的互补链(cDNA)和Cy3-AS0如上文所述混合并复性,并且通过电泳法分析产物;然而,该产物具有与Cy3-AS0相同的条带高度。证实cDNA和Cy3-AS0不能在所用的条件下形成双链核酸。同时,接受评价的cDNA的序列和修饰与cRNA(o)、cRNA(G)和cRNA(m/s)的那些序列和修饰相同,不同之处在于将尿嘧啶变成胸腺嘧啶(下文同)。

[0268] 另外,如从图12中所示结果显而易见的是,甚至采用RNA酶H处理时,Cy3-AS0和cRNA(m/s)的双链体维持双链核酸结构。在另一方面,由于对cRNA(o)和cRNA(G)双链体的处理产生与Cy3-AS0具有相同迁移率的产物,从而证实这些双链体的互补RNA链被RNA酶H分解并且单链Cy3-AS0核酸因此从双链体释放并且可以作为单链迁移。

[0269] 随后,除上文描述的电泳之外,通过下文描述的方法评价由LNA/DNA缺口聚体和cRNA组成的双链核酸的解链温度(Tm)。

[0270] 将氯化钠终浓度调节至100mM、磷酸钠缓冲溶液(pH7.2)终浓度调节至10mM和相应寡核苷酸链终浓度调节至2μM的样品溶液(100μL)置于沸水浴中,并且将样品溶液冷却至室温12小时并在4℃静置2小时。在氮气流下,将样品溶液冷却至5℃,并且在样品于5℃维持15分钟后,开始分析。对于解链温度分析,将温度以0.5℃/分钟的速率增加至90℃,并且将

260nm处吸光度以间距0.5°C作图。通过微分方法计算Tm值。通过使用Shimadzu UV-1650PC分光光度计实施测量。表4中展示如此获得的结果。

[0271] [表4]

核酸	修饰	Tm ( °C)
cRNA	o	45.32
	G	47.65
	m/s	41.17
cDNA	o	37.51
	G	34.33
	m/s	26.45

[0272] [0273] 如表4中展示的结果所显示,在LNA/DNA缺口聚体和cDNA链之间形成的双链体的解链温度(Tm)在全部情况下均低于体温。相反,LNA/DNA缺口聚体和cRNA的双链体的解链温度(Tm)在全部情况下均维持在40°C范围内,并且因此发现相关的双链核酸在室温或体温未发生解离。

[0274] (实施例2)

[0275] 按照与实施例1相同的方式提供了仅包含常规RNA的互补链(cRNA(o)) (SEQ ID N0:2);其中全部RNA均经历2'-OMe(2'-O-甲基化)修饰和核酸之间硫代磷酸酯结合(S-转化)的互补链(cRNA(m/s)) (SEQ ID N0:4);和其中仅两个末端RNA碱基经历2'-OMe修饰及核酸之间S-转化并且在中心处的8个碱基为常规RNA的互补链(cRNA(G)) (SEQ ID N0:3)。这些互补链均与LNA/DNA缺口聚体(SEQ ID N0:1)复性,并且因此产生双链核酸。LNA/DNA缺口聚体的靶基因是大鼠载脂蛋白B(rApoB)基因。通过委托Gene Design, Inc.采用合成法产生该ASO。

[0276] 通过使用Lipofectamine2000(由Invitrogen, Inc.制造),根据随该试剂一起提供的使用方案,将LNA/DNA缺口聚体单独地和作为双链复合物的部分与上文描述的每种cRNA链一起转染至大鼠肝脏细胞培养系统(McA-RH7777)。将转染时添加至培养基的缺口聚体的浓度设定至0.4nM或10nM。另外,还制备其中无核酸链添加至细胞的对照。随后,转染后24小时,通过使用Isogen收集细胞,并且根据制造商的使用方案收集mRNA。

[0277] 测量这些mRNA的浓度,并且根据制造商的操作方案,通过使用SuperScript III从一定量的mRNA合成cDNA。随后,使用如此产生的cDNA作为模板,并且通过使用TaqMan系统实施定量性RT-PCR。同时,对于定量性RT-PCR中所用的引物,这些引物由Life Technologies公司基于多种基因数目设计并生产。另外,温度和时间的条件如下:将95°C15秒、60°C30秒和72°C1秒称为一个循环,并且实施40个循环。基于如此获得的定量性RT-PCR结果,分别计算rApoB的表达量/rGAPDH(内标物基因)的表达量,并且将对照组的计算结果和核酸施用组的计算结果比较并通过t-检验评价。图13中展示如此获得的结果。此外,对于用10nM浓度进行的转染,将双链核酸复合物的结果针对单独LNA/DNA缺口聚体(ASO)的结果归一化并且通过t-检验评价。图14中展示如此获得的结果。

[0278] 如图13中展示的结果所显示,当以较低浓度0.4nM施用时,包含LNA/DNA缺口聚体和cRNA(o)的双链核酸(LNA/cRNA(o))和包含LNA/DNA缺口聚体和cRNA(G)的双链核酸(LNA/

cRNA (G) ) 的反义作用与LNA/DNA缺口聚体 (ss-ASO) 引起的反义作用相似。然而,如图14中所显示,当以较高浓度10nM施用时,结果表明与作为单链施用的缺口聚体ASO相比,其中互补链易遭切割的双链复合物 (LNA/cRNA (o) 和LNA/cRNA (G)) 改善反义作用约20%。

[0279] 因此,发现即便LNA/DNA缺口聚体与包含RNA的互补链复性以获得双链核酸复合物,细胞中的靶基因表达抑制作用(反义作用)仍维持。另外,当使用对RNA酶H敏感的互补RNA链时,细胞中的反义作用进一步增加。认为反义作用的这种增加由胞核中互补链RNA的切割引起。

[0280] (实施例3)

[0281] 接下来,如图15中示意性显示,产生其中生育酚 (Toc) 与cRNA (G) 的5'末端结合的互补RNA链 (Toc-cRNA (G) ),并且这种链与LNA/DNA缺口聚体(反义链)复性。因而,成功地实现生育酚与反义链的间接结合。实施例中所用的LNA/DNA缺口聚体的序列、组成和链长度和互补链 (cRNA) 如下。

[0282] 反义LNA/DNA缺口聚体链

[0283] 1. AS012聚体:5'-GCattggtatTC-3' (SEQ ID NO:1)

[0284] 2. AS013聚体:5'-GCattggtatTCA-3' (SEQ ID NO:5)

[0285] 3. AS014聚体:5'-AGCattggtatTCA-3' (SEQ ID NO:6)

[0286] (大写:LNA,小写:DNA,核酸之间:在全部位点处的硫代磷酸酯键)

[0287] 互补链

[0288] 1. cRNA12聚体:5'-gsasAUACCAAUsgsC-3' (SEQ ID NO:2)

[0289] 2. cRNA13聚体:5'-usgsasAUACCAAUsgsC-3' (SEQ ID NO:7)

[0290] 3. cRNA14聚体:5'-usgsasAUACCAAUsgsCsU-3' (SEQ ID NO:8)

[0291] (大写:RNA,小写:2'-OMe-RNA,s:核酸之间的硫代磷酸酯键)

[0292] 通过制备其中生育酚的色烷环 (chromane) 的6位置处羟基与磷酰亚胺连接的生育酚亚酰胺,根据已知技术实施生育酚和cRNA之间的结合,并且随后通过标准偶联方法,将生育酚亚酰胺与RNA的5'末端偶联。

[0293] 接下来,将LNA/DNA缺口聚体 (ss-ASO) 、每个复合链中具有12个碱基、13个碱基或14个碱基的相同链长度配对的分别包含LNA/DNA缺口聚体和cRNA (G) 的双链核酸复合物 (LNA/cRNA (G) ) 和包含LNA/DNA缺口聚体和Toc-cRNA (G) 的双链核酸复合物 (LNA/Toc-cRNA (G) ) 各自经尾静脉以0.75mg/kg的量静脉内注射至小鼠。另外,作为阴性对照组,还制备了仅注射PBS而未注射单链ASO或双链核酸复合物的小鼠。在注射后72小时,将小鼠用PBS灌流,并且随后解剖小鼠以提取肝脏。随后,通过与比较例1中所述方法相同的方法实施mRNA提取、cDNA合成和定量性RT-PCR,并且计算mApoB的表达量/mGAPDH (内标物基因) 的表达量,并且在施以PBS的组(仅PBS) 和施以核酸的组之间进行比较。图16中展示如此获得的结果。

[0294] 如图16中所示,发现通过结合生育酚至互补链,ASO/Toc-cRNA (G) 以高特异性和高效率递送和积累在肝脏中,并且与ASO/cRNA (G) 相比显示突出的反义作用。如所示,由具有链长度13个碱基的ASO/Toc-cRNA显示的作用是特别大的。

[0295] (实施例4)

[0296] 通过与实施例3中所述方法相同的方法评价ASO/Toc-cRNA复合物针对其靶基因的特异性。即,制备了包含具有13个碱基链长度的LNA/DNA缺口聚体和互补链Toc-cRNA (G) 的

双链核酸(ASO/Toc-cRNA (G) ,并且将它静脉内注射至小鼠,并通过使用从小鼠获得的肝脏衍生的cDNA,通过定量PCR评价肝脏中靶基因(mApoB基因)和内源对照基因(mTTR基因、mSOD1基因和mGAPDH基因)的表达。同时,关于定量性RT-PCR中所用的引物,使用由LifeTechnologies公司基于多种基因数目设计并生产的引物。图17中展示如此获得的结果。

[0297] 如图17中作图的结果所显示,在施用ASO/Toc-cRNA13聚体的小鼠的肝脏中,仅在mApoB基因中观察到表达显著减少,其中LNA/DNA缺口聚体(ASO)靶向该基因转录产物。因此,发现包含LNA/DNA缺口聚体和Toc-cRNA (G) 的双链核酸复合物具有针对所靶向基因的高特异性。

[0298] (实施例5)

[0299] 使用13聚体链,通过与实施例3中所述方法相同的方法评价ASO/Toc-cRNA (G) 的反义作用的剂量-依存关系。即,ASO/Toc-cRNA (G) 13聚体双链复合物以0mg/kg、0.02mg/kg、0.05mg/kg、0.09mg/kg或0.75mg/kg的量静脉内注射至小鼠,和通过使用从小鼠获得的肝脏衍生的cDNA,通过定量PCR评价mApoB基因的表达。图18中展示如此获得的结果。

[0300] 如图18中所示的结果显示的那样,发现ASO/Toc-cRNA (G) 的反义作用显示剂量依赖性效应。另外,从这些结果中发现,为抑制靶基因的表达达半数所需要的ASO/Toc-cRNA (G) 的量(ED<sub>50</sub>)经计算是约0.036mg/kg,对于实现50%抑制作用而言这是一个低的浓度。

[0301] (实施例6)

[0302] 通过与实施例3中所述方法相同的方法评价ASO/cRNA和ASO/Toc-cRNA的反义作用的可持续性。即,将LNA/DNA缺口聚体(ss-ASO)、包含LNA/DNA缺口聚体和cRNA-G的双链核酸(ASO/cRNA (G))或包含LNA/DNA缺口聚体和Toc-cRNA的双链核酸(ASO/Toc-cRNA (G))静脉内注射至小鼠中。全部核酸链的链长度均是13个碱基。还包括其中仅注射PBS溶液并且不注射核酸的对照。在第一实验中,在静脉内注射后,在1日后、3日后、7日后、14日后和28日后提取肝脏,并且通过使用肝脏衍生的cDNA,通过定量PCR评价mApoB基因的表达。图19A中展示如此获得的结果。使用PBS溶液对照、仅单链LNA和双链复合物ASO/Toc-cRNA (G) 重复该实验,并且在注射后1日、3日、7日、14日、28日和42日,通过相同方法评价所得的mApoB表达水平。图19B中展示获得的结果。

[0303] 如图19A中所示的结果显示,在全部测试的核酸中施用后第三日显示出最大反义作用。另外,甚至在施用后7日显示出与施用后第一日所观察的相同程度的反义作用。另外,显示靶基因的表达甚至在施用后14日被抑制达60%抑制水平的程度,并且甚至在施用后28日被抑制达20%抑制水平的程度,所述抑制水平与单链ASO相比是可计量显著的。在第二实验中,观察到相同的总体趋势,如图19B所显示。注射后3日观察到最大反义作用,并且注射后7日显示在第一日观察到的抑制水平。14日和28日后观察到抑制作用分别是80%和50%,并且甚至注射后42日仍观察到可计量的作用。因此,还发现一些实施方案的双链核酸具有与反义作用相关的高度可持续性。

[0304] (实施例7)

[0305] 评价另一个实施方案的双链核酸复合物的反义作用。图20A中示意性显示所比较的核酸链的组成。其中先前实验使用cRNA (G) (SEQ ID N0:3) (其具有天然RNA碱基的中央区、带2'-OMe修饰的、硫代磷酸酯化的5'翼区和3'翼区),这里,使用这样的互补链,其含有

同样的5'翼和3'翼(两个末端2'-OMe修饰的RNA碱基和硫代磷酸酯键)、但是中央8个碱基是核苷酸之间存在天然磷酸二酯键的2'-OMe修饰的RNA(cRNA(G)-OM)(SEQ ID N0:9)。

[0306] 即,设计并产生针对小鼠载脂蛋白B(mApoB)的12聚体LNA/DNA缺口聚体和不同程度地掺入修饰RNA碱基的12聚体互补链。

[0307] 反义LNA/DNA缺口聚体链AS012聚体:5'-GCattggtatTC-3'(SEQ ID N0:1)(大写:LNA,小写:DNA,核酸之间的全部位点处均是硫代磷酸酯键)

[0308] 互补链

[0309] 1.cRNA (G):5'-gsasAUACCAAUsgsc-3'(SEQ ID N0:3)

[0310] 2.cRNA (G)-OM:5'-gsasauaccaaugs-3'(SEQ ID N0:9)

[0311] (大写:RNA,小写:2'-OMe-RNA,s:核酸之间的硫代磷酸酯键)

[0312] 关于LNA/DNA缺口聚体,使用通过委托Gene Design, Inc.产生的产品。关于互补链,使用通过委托Hokkaido System Science Co.,Ltd.产生的产品。

[0313] 另外,将LNA/DNA缺口聚体和每种互补链以等摩尔量混合,并且将混合物在95℃加热5分钟。随后,将混合物在37℃恒定温度静置1小时以使链复性。另外,如果任何产品不打算立即使用,则随后将该产品储存在4℃。

[0314] 随后,将包含LNA12聚体和cRNA12聚体的双链核酸(AS0/cRNA (G))或包含LNA12聚体和cRNA (G)-OM12聚体的双链核酸(AS0/cRNA (G)-OM)经小鼠尾静脉以0.75mg/kg的量静脉内注射。还制备仅接受PBS施用的对照小鼠。静脉内注射后三日,将小鼠用PBS灌流,并且随后提取肝脏。随后,通过与比较例1中所述方法相同的方法实施mRNA提取、cDNA合成和定量性RT-PCR,并且计算mApoB的表达量/mGAPDH(内标物基因)的表达量,并且在仅施以PBS的组(仅PBS)和施以核酸的组之间进行比较。图20B中展示如此获得的结果。

[0315] 如图20B中所示的结果显示,甚至当使用cRNA (G)-OM替代本发明的双链核酸复合物实施方案中的cRNA (G)时,反义作用不丧失。

[0316] 通常,当医药品肠内施用(口服施用等)时,由于医药品暴露于肠道中的RNA酶A,所以高度地优选含有RNA的核酸药物全部具有受2'-OMe等修饰的相关RNA部分。

[0317] 因此,由于由2'-OMe完全修饰的RNA链也可以用作一些实施方案的双链核酸的互补链,所以发现一些实施方案的双链核酸可以适用于肠内施用的实施方案。

[0318] (实施例8)

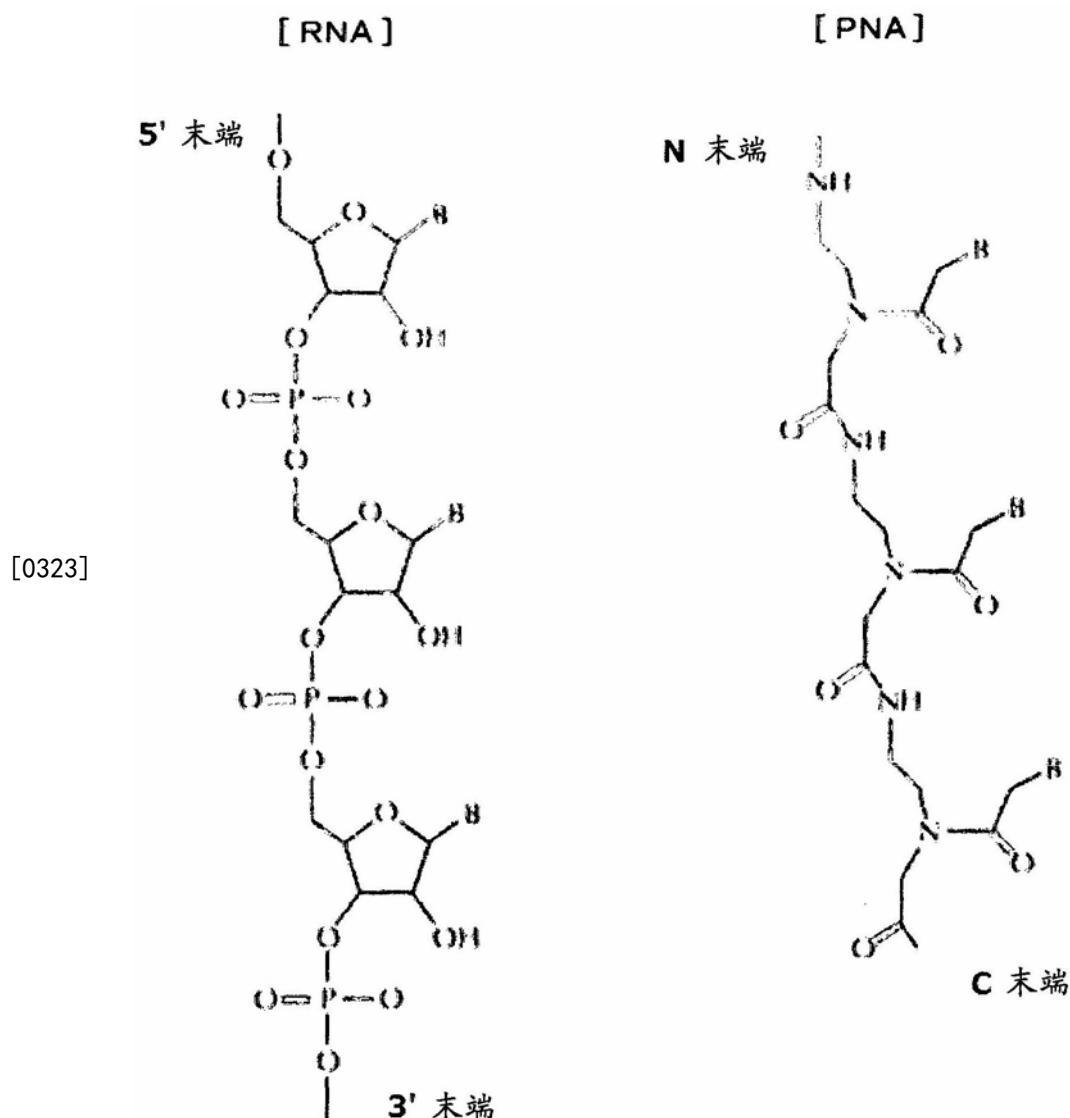
[0319] 就包含LNA/DNA缺口聚体和Toc-cRNA的双链核酸复合物而言,如上文讨论,发现该双链核酸具有高反义作用并且可以以高特异性和高效率递送至肝脏等。

[0320] 因而,已知当结合脂质如生育酚时,大幅度地增加抵达肝脏等的递送特性,但是相反,难以递送至其他器官。目前,最有效使用的递送至其他器官的方法是利用靶肽的方法,所述靶肽与多种器官的细胞表面上的多种蛋白质结合。在一些实施方案中,构思将肽作为递送部分直接结合至核酸,并且因而在如上文描述的含有包含RNA的互补链的双链核酸复合物中利用靶向肽。

[0321] 在其他实施方案中,如下文描述的实施例所展示,使用可以轻易与肽或基于抗体的官能部分连接的肽核酸(PNA)作为一些实施方案的双链核酸复合物中的互补链。如下文中所显示,PNA没有如常规核酸那样的磷酸酯键,反而具有肽键的有用特征,从而使得将肽与PNA链结合容易。此外,PNA以具有高T<sub>m</sub>值为特征,如LNA那样,从而该双链不可能解离,并

且以具有强的抗RNA酶切割为特征。

[0322] [化学式2]



[0324] 就该展示而言,构思了用于使靶向肽等(肽结合链)与核酸链结合的几个实施方案,所述核酸链是双链核酸复合物的部分,但是其中靶向肽功能性部分不与LNA/DNA缺口聚体直接结合。图21A-C中显示这类实施方案的实施例。在图21A中,功能性部分与互补RNA链结合。在图21B中,三条链用来形成该双链核酸复合物。这里,互补RNA与LNA/DNA反义链和PNA链这两者复性。基于肽的功能性部分与PNA链接合产生了携带递送功能性部分的复合物,但是该部分不与反义寡核苷酸直接结合。第三链不必需是PNA,但是可以包含DNA、RNA和/或核苷酸类似物。通常,通过使用比反义链更长的互补链并制备与互补链在突出部分中复性的第三链,这个实施方案提供了功能性部分可以与反义链间接结合。另外,如图21C中所显示,互补链可以本身用功能性部分制备。可以独立地选择图21C中所显示的功能性部分。

[0325] 接下来,基于这种构思,发明人设计并产生针对小鼠载脂蛋白B(mApoB)的LNA/DNA缺口聚体、包含RNA的互补链和肽结合链,如下文显示。

[0326] 反义LNA/DNA缺口聚体链

- [0327] AS012聚体:5'-GCattggtatTC-3' (SEQ ID NO:1)
- [0328] (大写:LNA,小写:DNA,核酸之间的全部位点处均是硫代磷酸酯键)
- [0329] 互补链
- [0330] cRNA21聚体:5'-us<sub>u</sub><sub>s</sub>cGCACCAAGAAUACCAAus<sub>g</sub><sub>s</sub>c-3' (SEQ ID NO:10)
- [0331] (大写:RNA,小写:2'-OMe-RNA,s:核酸之间的硫代磷酸酯键)
- [0332] 第三(肽)链
- [0333] PNA9聚体:N'-TGGTGCGAA-C' (SEQ ID NO:11)
- [0334] (加下划线:PNA)
- [0335] 关于LNA/DNA缺口聚体,使用通过委托Gene Design, Inc.产生的产品。关于互补链,使用通过委托Hokkaido System Science Co., Ltd.产生的产品。另外,关于肽结合链,使用通过委托Fasmac Co., Ltd.产生的产品。
- [0336] 将LNA/DNA缺口聚体、互补链和基于肽的链以等摩尔量混合,并且将混合物在95℃加热5分钟。随后,将混合物在37℃恒定温度静置1小时以使链复性。另外,如果链不打算立即使用,则随后将链储存在4℃。
- [0337] 随后,将AS012聚体(ss-AS0)或包含(1)AS012聚体、(2)cRNA(G)21聚体和(3)PNA9聚体的双链核酸复合物(AS0,PNA/cRNA(G))经尾静脉以0.75mg/kg的量静脉内注射至小鼠。另外,还制备仅施用PBS的小鼠作为对照。静脉内注射后三日,将小鼠用PBS灌流,并且随后提取肝脏。随后,通过与比较例1中所述方法相同的方法实施mRNA提取、cDNA合成和定量性RT-PCR,并且计算mApoB的表达量/mGAPDH(内标物基因)的表达量,并且在仅施以PBS的组(仅PBS)和施以核酸的组之间进行比较。图22中展示如此获得的结果。
- [0338] 如从图22中所示的结果显而易见,与LNA12聚体的作用相比,AS0,PNA/cRNA(G)复合物的反义作用未降低。
- [0339] (实施例9)
- [0340] 以下实例表明PNA链可以在作为一个实施方案的双链核酸复合物中用作互补链。
- [0341] 即,构思了PNA链可以用作互补链,替代RNA,如图3B中所示。这种安排还提供双链核酸复合物的实施方案,其中功能性部分如靶向肽不直接与反义链(例如,LNA/DNA缺口聚体)结合,而是间接地与它结合。
- [0342] 基于这种构思,设计并产生针对小鼠载脂蛋白B(mApoB)的LNA/DNA缺口聚体和包含PNA的互补链,如下文显示。
- [0343] 反义LNA/DNA缺口聚体链
- [0344] AS012聚体:5'-GCattggtatTC-3' (SEQ ID NO:1)
- [0345] (大写:LNA,小写:DNA,核酸之间的全部位点处均是硫代磷酸酯键)
- [0346] 互补链
- [0347] 1.cPNA12聚体:N'-GAAUACCAAUGC-C' (SEQ ID NO:12)
- [0348] 2.cPNA10聚体:N'-GAAUACCAAU-C' (SEQ ID NO:13)
- [0349] 3.cPNA8聚体:N'-GAAUACCA-C' (SEQ ID NO:14)
- [0350] (加下划线:PNA)
- [0351] 关于LNA/DNA缺口聚体,使用通过委托Gene Design, Inc.产生的产品。关于互补链,使用通过委托Fasmac Co., Ltd.产生的产品。

[0352] 将LNA/DNA缺口聚体和每种互补链以等摩尔量混合，并且将混合物在95°C加热5分钟。随后，将混合物在37°C恒定温度静置1小时以使链复性。另外，如果链不打算立即使用，则随后将链储存在4°C。

[0353] 随后，将AS012聚体(ss-AS0)、包含AS012聚体和cPNA12聚体的双链核酸(AS0/cPNA12聚体)、包含AS012聚体和cPNA10聚体的双链核酸(AS0/cPNA10聚体)或包含AS012聚体和cPNA8聚体的双链核酸(AS0/cPNA8聚体)经尾静脉以0.75mg/kg的量静脉内注射至小鼠。另外，还制备仅施用PBS的小鼠作为对照。静脉内注射后三日，将小鼠用PBS灌流，并且随后提取肝脏。随后，通过与比较例1中所述方法相同的方法实施mRNA提取、cDNA合成和定量性RT-PCR，并且计算mApoB的表达量/mGAPDH(内标物基因)的表达量，并且在仅施以PBS的组(仅PBS)和施以核酸的组之间进行比较。图23中展示如此获得的结果。

[0354] 如图23中所示的结果显示，任一种AS0/cPNA复合物的反义作用至少与对ss-AS012聚体所观察到的反义作用一样强烈。

[0355] (实施例10)

[0356] 这个实施例展示包含“RNA核苷酸和任选地核苷酸类似物”的互补链的多种结构可以用于双链核酸复合物中并且将产生反义作用。设计并制备4种类型的互补链结构。图24中示意性显示了所述结构。如该图显示，两种类型的5'翼区和3'翼区与两种类型的中央区组合。翼区包含带硫代磷酸酯键的2'-OMe修饰的RNA，或带硫代磷酸酯键的核苷酸类似物LNA。中央区包含天然磷酸二酯连接的RNA或硫代磷酸酯连接的RNA。

[0357] 产生并测试以下13聚体核酸链：

[0358] 反义LNA/DNA缺口聚体链

[0359] AS013聚体:5'-GCattggtatTC-3'(SEQ ID NO:5)

[0360] (大写:LNA,小写:DNA,核酸之间的全部位点处均是硫代磷酸酯键)

[0361] 互补链

[0362] 1.Toc-cRNA (G):5'-usgsasAUACCAAUsgsc-3'(SEQ ID NO:7)

[0363] 2.Toc-cLNA (G):5'-usgsasAUACCAAUsgsc-3'(SEQ ID NO:15)

[0364] 3.Toc-cLNA (s):5'-usgsasAsUsAsCsCsAsAsUsgsc-3'(SEQ ID NO:16)

[0365] 4.Toc-cRNA (s):5'-usgsasAsUsAsCsCsAsAsUsgsc-3'(SEQ ID NO:17)

[0366] (大写:RNA,小写:2'-OMe-RNA,加下划线的小写:LNA,s:核酸之间的硫代磷酸酯键)

[0367] 将LNA/DNA缺口聚体和每种互补链以相等的摩尔量混合并且如上文实施例7中所述复性。接下来，将复性的双链核酸复合物经小鼠尾静脉以0.75mg/kg的量静脉内注射。还通过经尾静脉注射PBS溶液，制备对照小鼠。在注射后三日，将小鼠用PBS灌流，提取肝脏，并随后如比较例1中所述那样实施mRNA提取、cDNA合成和定量性RT-PCR。与mGAPDH(内标物基因)相比，计算相对mApoB表达水平，并且结果展示在图25A-B中。

[0368] 如图25A所显示，将Toc-cRNA (G)的结果与Toc-cLNA (G)比较时，可以使用桥连核酸以及RNA制备互补链的5'翼区和3'翼区，并且可以获得类似的大的反义作用。数据进一步显示对于这些类型翼区的任一种，核酸链的中央RNA部分可以硫代磷酸酯化，并且反义作用仍保持与对链的中央部分中存在天然RNA时所观察到的反义作用同样大。图25A和图25B中分别比较了相对于Toc-cRNA (G)观察到的作用而言，Toc-cLNA (s)和Toc-cRNA (s)的作用。

[0369] 结合实施例7的讨论,这个实施例进一步显示其中可以在反义作用不丧失的情况下增加互补链的核酸酶抗性的其他实施方案。具体而言,全长链可以是硫代磷酸酯化的,并且在中央区包含硫代磷酸酯修饰的RNA情况下,仍可以释放反义链并且抑制mRNA转录物的水平。

[0370] (实施例11)

[0371] 这个实施例展示即便第一链和第二链(反义链和互补链)具有不同长度,仍获得反义作用。这里,13聚LNA/DNA缺口聚体与基于RNA的31聚体互补链复性并且对其测试抑制小鼠中ApoB基因的表达。另外,制备以下31聚体,其具有包含3个2'-OMe修饰的、硫代磷酸酯化RNA核苷酸的5'翼、包含20个2'-OMe修饰的、硫代磷酸酯化RNA核苷酸的3'翼和包含8个具有硫代磷酸酯键的RNA核苷酸的中央区。将这种13聚体/31聚体复合物的活性与一种13聚体/13聚体复合物的活性比较。

[0372] 反义LNA/DNA缺口聚体链

[0373] LNA13聚体:5'-GCattggtatTC-3' (SEQ ID NO:5)

[0374] (大写:LNA,小写:DNA,核酸之间的全部位点处均是硫代磷酸酯键)

[0375] 互补链

[0376] 1.13聚体Toc-cRNA (G):5'-usgsasAUACCAAUsgs-3' (SEQ ID NO:7)

[0377] 2.31聚体Toc-cRNA (s):5'-usgsasAUACCAAUgcuacgcauacgcaccascsa-3' (SEQ ID NO:18)

[0378] (大写:RNA,小写:2'-OMe-RNA,s:核酸之间的硫代磷酸酯键)

[0379] 将LNA/DNA缺口聚体和每种互补链以相等的摩尔量混合并且如上文实施例7中所述复性。接下来,将复性的双链核酸复合物经小鼠尾静脉以0.75mg/kg的量静脉内注射。还通过经尾静脉注射PBS溶液,制备对照小鼠。在注射后三日,将小鼠用PBS灌流,提取肝脏,并随后如比较例1中所述那样实施mRNA提取、cDNA合成和定量性RT-PCR。与mGAPDH(内标物基因)相比,计算相对mApob表达水平,并且结果展示在图26中。

[0380] 如图26所显示,比较采用具有31聚体Toc-cRNA (s) 互补链的双链复合物与具有13聚体Toc-cLNA (G) 互补链的那些双链复合物所实现的抑制作用显示,获得了类似的大的反义作用。数据进一步显示,核酸链的中央RNA部分可以硫代磷酸酯化,并且反义作用仍保持与对链的中央部分中存在天然RNA时所观察到的反义作用同样大,即便互补链还在长度方面不同。

[0381] (实施例12)

[0382] 为展示由本文中公开的双链核酸复合物提供的反义作用的序列特异性和通用适用性,制备靶向一种不同基因(人运甲状腺素蛋白(hTTR))的转录产物的反义探针。使用经改变以含有hTTR的转基因小鼠进行该实验(小鼠因此含有hTTR和mTTR)。将反义链和互补链以两种长度制备,作为13聚体链和20聚体链,并且将它们作为13聚体/13聚体双链复合物和20聚体/20聚体双链复合物测试。另外,制备了具有指导复合物至肝脏的5'生育酚功能性部分的互补链。另外,因为hTTR表达最终产生在血液中可观察的蛋白质,所以分析表达的蛋白质的血清浓度,并且发现它在注射双链核酸复合物后下降。下文显示设计、产生和测试的多种链的序列和组成。

[0383] 反义LNA/DNA缺口聚体链

- [0384] 1. AS013聚体:5'-TGtctctgccTGG-3' (SEQ ID NO:19)
- [0385] 2. AS020聚体:5'-TTATTgtctctgcctGGACT-3' (SEQ ID NO:21)
- [0386] (大写:LNA,小写:DNA,核酸之间的全部位点处均是硫代磷酸酯键)
- [0387] 互补链
- [0388] 1.13聚体Toc-cRNA (G):5'-cscasGGCAGAGAscsa-3' (SEQ ID NO:20)
- [0389] 2.20聚体Toc-cRNA (G):5'-asgsuscsAGGCAGAGACsasusasa-3' (SEQ ID NO:22)
- [0390] (大写:RNA,小写:2'-OMe-RNA,s:核酸之间的硫代磷酸酯键)
- [0391] 将13聚体反义链和互补链以及20聚体反义链和互补链分别以相等的摩尔量混合和如上文实施例7中所述那样复性。接下来,将13聚体单链反义链和13聚体复性的双链核酸复合物经转基因小鼠的尾静脉以0.75mg/kg的量静脉内注射。类似地,将20聚体反义单链复合物和20聚体双链复合物以6mg/kg的量静脉内注射。还通过经尾静脉注射PBS溶液,制备对照小鼠。在注射后三日,将小鼠用PBS灌流,提取肝脏,并随后如比较例1中所述那样实施mRNA提取、cDNA合成和定量性RT-PCR。与mGAPDH(内标物基因)相比,计算相对hTTR表达水平,并且13聚体链和20聚体链的结果分别展示在图27A和图27B中。
- [0392] 肝脏中合成的hTTR分泌至血液中。因而,如果反义探针可以递送至肝脏并且有效抑制hTTR表达,则抑制的结果应当是该蛋白质的血清浓度降低。在商业实验室,在13聚体核酸链注射处理之前测量血清浓度水平并且在注射后三日再次测量。在图28中展示观察到的血清浓度。
- [0393] 如图27A所显示,13聚体双链复合物有效抑制mRNA转录物超过95%。相比之下,单链ASO仅产生约50%的抑制。20聚体复合物还产生相似的约50%的抑制水平,而单链20聚体基本上没有抑制作用,如图27B中所示。随着寡核苷酸长度增加,常观察到抑制表达能力的这种下降。然而,较长的寡核苷酸还具有更多选择性并且因此可能更安全。可以通过调节例如投药量、给药方案和反义链的长度、序列和组成,调整治疗功效。然而,如这些实施例所显示,当相同反义链作为单链递送时,将反义链作为本发明的多个实施方案的双链核酸复合物递送产生了显著更大程度的抑制作用。
- [0394] 图28中显示处理前和处理后血清浓度水平,并且这些结果显示与单链13聚体(约44mg/dl至约28mg/dl)和PBS对照(大体无变化)相比,13聚体双链复合物引起hTTR从约40mg/dl显著降低至<5mg/dl。
- [0395] (实施例13)
- [0396] 这个实施例显示使用肽作为递送功能性部分,递送双链核酸复合物至神经系统的细胞。使用具有图21B中所示总体结构的包含三条链:反义链、互补链和PNA链的双链复合物。十二肽DRG1与9聚体PNA链的N末端连接以充当使复合物定位在背根神经节(DRG)细胞中的递送剂。这种9聚体PNA与下文描述的一个13聚体反义链和一个22聚体互补链复性以形成本实验中使用的双链复合物。由反义链靶向的基因是TRPV1。
- [0397] 反义LNA/DNA缺口聚体链
- [0398] AS013聚体:5'-TAgtccagttCAC-3' (SEQ ID NO:23)
- [0399] (大写:LNA,小写:DNA;核酸之间的全部位点处均是硫代磷酸酯键)
- [0400] 互补链

- [0401] cRNA (G) 22聚体:5'-gsusgsAACUGGACuauacgcacscsa-3' (SEQ ID NO:24)  
[0402] (大写:RNA;小写:2'-OMe-RNA;s:核酸之间的硫代磷酸酯键)
- [0403] 第三(肽)链
- [0404] pep-PNA9聚体:N'-SPGARAFGGGS-tggtgcgta-C' (SEQ ID NOS:25和31)  
[0405] (大写:氨基酸;加下划线,小写:PNA)
- [0406] 将LNA/DNA缺口聚体、互补链和肽-PNA链以等摩尔量混合,并且将混合物在95°C加热5分钟。随后,将混合物在37°C恒定温度静置1小时以使三条链复性("ts-TRPV1")。另外,如果链不打算立即使用,则将链储存在4°C。另外,按相同方式制备仅包含反义链和互补链的双链复合物("ds-TRPV1")。
- [0407] 小鼠从Sankyo Lab(日本东京)获得,在无病原体动物设施内部维持和提供随意采食和饮水。体重平均27g的8周龄雌性ICR小鼠接受2.66μg鞘内注射PBS、ds-TRPV1或ts-TRPV1。动物方案由获得动物实验许可的医师,根据东京医学和牙科大学动物实验委员会批准的伦理和安全方案执行。在通过腹内注射水合氯醛(0.5mg/g体重)和盐酸氯胺酮(0.05mg/g体重)诱导麻醉后施用鞘内注射。全部小鼠以卧姿安置并且接受第二和第三腰椎(L2-L3)局部椎板切除术。一旦暴露,使用27号针头穿刺这些椎骨之间的硬膜;随后,将与10μL Hamilton注射器连接的PE-10导管向尾部插入蛛网膜下腔中至大约L5水平并且经1分钟时间稳定施用10μL体积。在移除导管后,将筋膜和皮肤用4-0-尼龙线缝合并用抗生素溶液剂处理。将动物随后以头向上位置安置并允许在热垫上苏醒。
- [0408] 组织学分析如下进行。将小鼠在注射后2日借助3mg水合氯醛腹内注射实施安乐死并且在PBS灌流后用PFA(PBS中的4%多聚甲醛)经心脏固定。收获DRG(单侧L6)。将如此获得的DRG用4%福尔马林溶液固定,随后将该溶液更换为30%蔗糖溶液,将肝脏包埋于OCT混合物中,并且随后从中产生具有10μm厚度的切片。随后,通过使用DAPI将切片进行胞核染色,并且随后使用共聚焦显微镜观察切片中Cy3的信号强度。图29中显示共聚焦成像分析。
- [0409] TRPV1的相对表达水平分析如下进行。将小鼠在注射后7日通过诱导麻醉及经心脏PBS灌流处死。从每只小鼠收获三个单侧DRG:腰椎DRG(LSD) L4、L5和L6。此后,如比较例1中所述实施mRNA提取、cDNA合成和定量性RT-PCR。与mGAPDH(内标物基因)相比,计算相对mTRPV1表达水平,并且结果展示在图30中。
- [0410] 图29中所示的组织学分析揭示出定位至DRG细胞胞核的Cy3标记的反义链。这得到反义链上荧光标记物的核染色的重合荧光信号佐证。再次,这个实验显示包含三条链的双链复合物仍保持完整并且第三链上的递送部分指导该复合物并因而指导反义链至目的细胞。
- [0411] 如图30中所示,通过抑制mTRPV1表达观察到反义作用。复合物ts-PRPV1(其含有肽-PNA链并且因此可以导引该复合物至DRG细胞)展示约40%的抑制作用。与之相反,ds-TRPV1复合物(其缺少肽-PNA链)抑制基因表达,但是仅抑制约20%。这个实施例再次展示了使用包含三条链的复合物递送反义链至特定细胞类型的能力。另外,这个实施例显示使用肽来引导递送,并且在与其他实施例中所展示不同的细胞类型(DRG)和器官(神经系统而非肝脏)中实现这一点。
- [0412] (实施例14)
- [0413] 这个实施例通过针对不编码蛋白质的RNA转录产物(即,针对miRNA)的双链核酸复

合物展示反义作用。在小鼠肝脏中,已知miR-122(一种miRNA)表达。设计并制备15聚体抗-miR链,其具有包含三个核苷酸类似物(桥连核酸,LNA)的5'翼和3'翼和一个包含DNA的9碱基中央区,其中全部键均硫代磷酸酯化的。制备了具有包含2'-OMe、硫代磷酸酯化的RNA的5'翼和3'翼和包含天然RNA的中央区的互补链。

[0414] 抗-miR LNA/DNA缺口聚体链

[0415] AS015聚体:5'-CCAttgtcacacTCC-3'(SEQ ID NO:26)

[0416] (大写:LNA,小写:DNA;核酸之间的全部位点处均是硫代磷酸酯键)

[0417] 互补链

[0418] Toc-cRNA (G) 15聚体:5'-Toc-g<sub>s</sub>g<sub>s</sub>a<sub>s</sub>GUGUGACCA<sub>s</sub>u<sub>s</sub>g<sub>s</sub>-3'(SEQ ID NO:27)

[0419] (大写:RNA;小写:2'-OMe-RNA;s:核酸之间的硫代磷酸酯键)

[0420] 将抗-miR LNA/DNA缺口聚体和互补链以相等的摩尔量混合并且如上文实施例7中所述复性。接下来,单链抗-miR链和复性的双链核酸复合物经小鼠尾静脉以0.75mg/kg的量静脉内注射。还通过经尾静脉注射PBS溶液,制备对照小鼠。在注射后三日,将小鼠用PBS灌流,提取肝脏,并随后如比较例1中所述那样实施mRNA提取、cDNA合成和定量性RT-PCR。与mGAPDH(内标物基因)相比,计算相对mApoB表达水平,并且结果展示在图31中。

[0421] 如图31所显示,双链复合物提供miR-122水平几乎降低50%,而单链抗-miR寡核苷酸只提供约20%降低。还值得注意的是降低miRNA水平的常见方法使用混合聚体(mixmer)型探针结构,并且该探针需要以约10mg/kg的剂量递送以实现50%降低(ED<sub>50</sub>)。如所示,这个实施例中展示的一些实施方案的双链复合物以明显较低的剂量实现ED<sub>50</sub>。

[0422] (实施例15)

[0423] 这个实施例使用包含“酰胺BNA”酰氨基桥连的核酸的反义链来实现反义作用。酰氨基桥连的核酸(也称作“AmNA”)是具有接合糖环2'碳和4'碳的环状酰胺桥(4'-C(0)-N(R)-2';R=H,Me)的LNA类似物。AmNA的合成、它们掺入寡核苷酸中及其特性如结合亲和力和核酸酶抗性最近由A.Yahara等人在ChemBioChem2012,13,2513-2516中公开,所述文献的内容通过引用方式并入本文。如Yahara等人公开,AmNA显示出针对互补链的优异结合亲和力和高程度的核酸酶抗性,因此使得它们适用于反义寡核苷酸中。设计并制备13聚体反义链,其具有分别包含2个和3个核苷酸类似物(酰胺BNA,AmNA)的5'翼和3'翼和一个包含DNA的8碱基中央区,其中全部键均是硫代磷酸酯化的。制备了具有包含2'-OMe、硫代磷酸酯化RNA的5'翼和3'翼和包含天然RNA的中央区的互补链。

[0424] 反义酰胺BNA(AmNA)/DNA缺口聚体链

[0425] AS013聚体:5'-GCattggtatTC-3'(SEQ ID NO:28)

[0426] (大写:N-甲基酰胺BNA(AmNA),小写:DNA,核酸之间的全部位点处均是硫代磷酸酯键)

[0427] 互补链

[0428] 1.13聚体Toc-cRNA (G):5'-u<sub>s</sub>g<sub>s</sub>a<sub>s</sub>AUACCAAu<sub>s</sub>g<sub>s</sub>c-3'(SEQ ID NO:7)

[0429] (大写:RNA,小写:2'-OMe-RNA,s:核酸之间的硫代磷酸酯键)

[0430] 将反义酰氨基BNA/DNA缺口聚体(ASO)和互补链以相等的摩尔量混合并且如上文实施例7中所述复性。接下来,将单链ASO和复性的双链核酸复合物经小鼠尾静脉以多种量(ss-ASO:0.75mg/kg;2.25mg/kg;Toc-ASO/cRNA (G):0.33mg/kg;1.0mg/kg)静脉内注射。还

通过经尾静脉注射PBS溶液,制备对照小鼠。在注射后7日或14日,将小鼠用PBS灌流,提取肝脏,并随后如比较例1中所述那样实施mRNA提取、cDNA合成和定量性RT-PCR。与mGAPDH(内标物基因)相比,计算相对mApoB表达水平,并且结果展示在图32中。

[0431] 如图32所显示,将酰胺BNA(AmNA)掺入第一核酸(反义寡核苷酸)的5'翼区和3'翼区中的双链核酸复合物在体内产生反义作用。所述图显示甚至将双链复合物以比单链ASO更低的量注射入小鼠时,用这种双链复合物实现更大程度的抑制。例如,当注射后7日测量时,以1.0mg/kg注射的ASO/Toc-cRNA(G)复合物产生大约55%的抑制作用,其显著地低于采用ss-ASO以2.25mg/kg剂量时仅20%抑制的结果。如这个实施方案所展示,通过实施本文中公开的方法和使用本文中公开的双链复合物用更少试剂实现更大程度的表达抑制。

[0432] 工业适用性

[0433] 如上文讨论,使用根据本发明实施方案的双链核酸复合物,在一些实施方案中,可以将反义核酸以高特异性和高效率递送至特定器官(细胞),并且可以通过该反义核酸非常有效地抑制靶基因的表达或转录产物的水平。另外,由于各种分子如脂类(例如,生育酚和胆固醇),糖(例如,葡萄糖和蔗糖)、蛋白质、肽和抗体可以作为用于递送至特定器官的官能部分应用至一些实施方案的双链核酸,所以可以将一些实施方案的双链核酸复合物靶向至多种器官、组织和细胞。另外,由于即便一些实施方案的双链核酸经历修饰以便赋予RNA酶抗性等,反义作用也不降低,所以一些实施方案的双链核酸也可以用于肠内施用的实施方案中。

[0434] 因此,一些实施方案的双链核酸可以甚至在以低浓度施用时提供高功效,并且从通过抑制反义核酸在除靶器官之外的器官中分布而减少不良副作用的观点看,也是优异的。因此,双链核酸可用作药物组合物等用于治疗和预防与靶基因表达增加和/或转录产物的水平增加相关的疾病如代谢性疾病、肿瘤和感染。

## 序列表

<110>	国立大学法人东京医科齿科大学 国立大学法人大阪大学	
<120>	嵌合的双链核酸	
<130>	IBPF12-540W0	
<150>	JP2011/275488	
<151>	2011-12-16	
<160>	31	
<170>	PatentIn 版本 3.5	
<210>	1	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工合成的寡核苷酸序列	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	(1)..(2)	
<223>	LNA	
<220>		
[0001]	<221> 修饰的_碱基	
	<222> (1)..(12)	
	<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	(11)..(12)	
<223>	LNA	
<400>	1	
gcattggat tc		12
<210>	2	
<211>	12	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工合成的寡核苷酸序列	
<400>	2	
gaauaccaau gc		12
<210>	3	
<211>	12	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223> 人工合成的寡核苷酸序列		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(2)		
<223> OMe-RNA		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(3)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (10)..(12)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (11)..(12)		
<223> OMe-RNA		
<400> 3		
gaauaccaau gc		12
[0002]		
<210> 4		
<211> 12		
<212> RNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的寡核苷酸序列		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(12)		
<223> OMe-RNA		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(12)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
<400> 4		
gaauaccaau gc		12
<210> 5		
<211> 13		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的寡核苷酸序列		

<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(2)		
<223> LNA		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(13)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (11)..(13)		
<223> LNA		
<400> 5		
gcattggat tca		13
<210> 6		
<211> 14		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的寡核苷酸序列		
[0003]		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(3)		
<223> LNA		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(14)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (12)..(14)		
<223> LNA		
<400> 6		
agcattggta ttca		14
<210> 7		
<211> 13		
<212> RNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的寡核苷酸序列		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		

<222> (1)..(3)	
<223> OMe- <u>RNA</u>	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(4)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (11)..(13)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (12)..(13)	
<223> OMe- <u>RNA</u>	
<400> 7	
ugaauuaccaa ugc	13
<210> 8	
<211> 14	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
[0004]	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(3)	
<223> OMe- <u>RNA</u>	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(4)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (11)..(14)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (12)..(14)	
<223> OMe- <u>RNA</u>	
<400> 8	
ugaauuaccaa ugcu	14
<210> 9	
<211> 12	

<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(12)	
<223> OMe-RNA	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(3)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (10)..(12)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<400> 9	
gaauaccaau gc	12
<210> 10	
<211> 21	
[0005] <212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(3)	
<223> OMe-RNA	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(3)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (19)..(21)	
<223> OMe-RNA	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (19)..(21)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<400> 10	
uucgcaccag aaucaccaug c	21

<210>	11	
<211>	9	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工合成的寡核苷酸序列	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	(1)..(9)	
<223>	PNA	
<400>	11	
	tggtgcgaa	9
<210>	12	
<211>	12	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工合成的寡核苷酸序列	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
[0006]	<222> (1)..(12)	
	<223> PNA	
<400>	12	
	gaaauaccaau gc	12
<210>	13	
<211>	10	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工合成的寡核苷酸序列	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
	<222> (1)..(10)	
	<223> PNA	
<400>	13	
	gaaauaccaau	10
<210>	14	
<211>	8	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(8)	
<223> PNA	
<400> 14	
gaauacca	8
<210> 15	
<211> 13	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(3)	
<223> LNA	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(4)	
[0007] <223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (11)..(13)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (12)..(13)	
<223> LNA	
<400> 15	
ugaauaccaa ugc	13
<210> 16	
<211> 13	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(3)	
<223> LNA	
<220>	

<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(13)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (12)..(13)		
<223> LNA		
<400> 16		
ugaauuaccaa ugc		13
<210> 17		
<211> 13		
<212> RNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的寡核苷酸序列		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(3)		
<223> OMe-RNA		
<220>		
[0008] <221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(13)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (12)..(13)		
<223> OMe-RNA		
<400> 17		
ugaauuaccaa ugc		13
<210> 18		
<211> 31		
<212> RNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的寡核苷酸序列		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(3)		
<223> OMe-RNA		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(4)		

<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (12)..(31)	
<223> OMe-RNA	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (28)..(31)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<400> 18	
ugaauuaccaa ugcuacgcau acgcaccacc a	31
<210> 19	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(2)	
[0009] <223> LNA	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(13)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (11)..(13)	
<223> LNA	
<400> 19	
tgtctctgcc tgg	13
<210> 20	
<211> 13	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(3)	
<223> OMe-RNA	
<220>	

<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(4)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (11)..(13)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (12)..(13)	
<223> OMe-RNA	
<400> 20	
ccaggcagag aca	13
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
[0010] <221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(5)	
<223> LNA	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(20)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (16)..(20)	
<223> LNA	
<400> 21	
ttattgtctc tgcctggact	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(5)	

<223> OMe-RNA	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(6)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (15)..(20)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (16)..(20)	
<223> OMe-RNA	
<400> 22	
aguccaggca gagacaauaa	20
<210> 23	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
[0011] <223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(2)	
<223> LNA	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(13)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (11)..(13)	
<223> LNA	
<400> 23	
tagtccagtt cac	13
<210> 24	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	

<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(3)		
<223> OMe-RNA		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(4)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (12)..(22)		
<223> OMe-RNA		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (20)..(22)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
<400> 24		
gugaacugga cuauacgcac ca		22
<210> 25		
<211> 12		
<212> PRT		
[0012] <213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的多肽序列		
<400> 25		
Ser Pro Gly Ala Arg Ala Phe Gly Gly Gly Ser		
1	5	10
<210> 26		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的寡核苷酸序列		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(3)		
<223> LNA		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(15)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		

<222> (13)..(15)	
<223> LNA	
<400> 26	
ccattgtcac actcc	15
<210> 27	
<211> 15	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(3)	
<223> OMe-RNA	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(4)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (12)..(15)	
[0013] <223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (13)..(15)	
<223> OMe-RNA	
<400> 27	
ggagugugac caugg	15
<210> 28	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工合成的寡核苷酸序列	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(2)	
<223> N-甲基酰胺 BNA	
<220>	
<221> 修饰的_碱基	
<222> (1)..(13)	
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键	

<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (11)..(13)		
<223> N-甲基酰胺 BNA		
<400> 28		
gcattggat tca		13
<210> 29		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的寡核苷酸序列		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(5)		
<223> LNA		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(20)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
[0014]		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (16)..(20)		
<223> LNA		
<400> 29		
tccagcattg gtattcagtg		20
<210> 30		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的寡核苷酸序列		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(5)		
<223> LNA		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		
<222> (1)..(29)		
<223> 核酸之间的硫代磷酸酯键		
<220>		
<221> 修饰的_碱基		

---

<222>	(25)..(29)	
<223>	LNA	
<400>	30	
	tccagcattg gtattcagtg tcatgcac	29
<210>	31	
<211>	9	
<212>	DNA	
[0015]	<213> 人工序列	
<220>		
<223>	人工合成的寡核苷酸序列	
<220>		
<221>	修饰的_碱基	
<222>	(1)..(9)	
<223>	PNA	
<400>	31	
	tggtgcgta	9

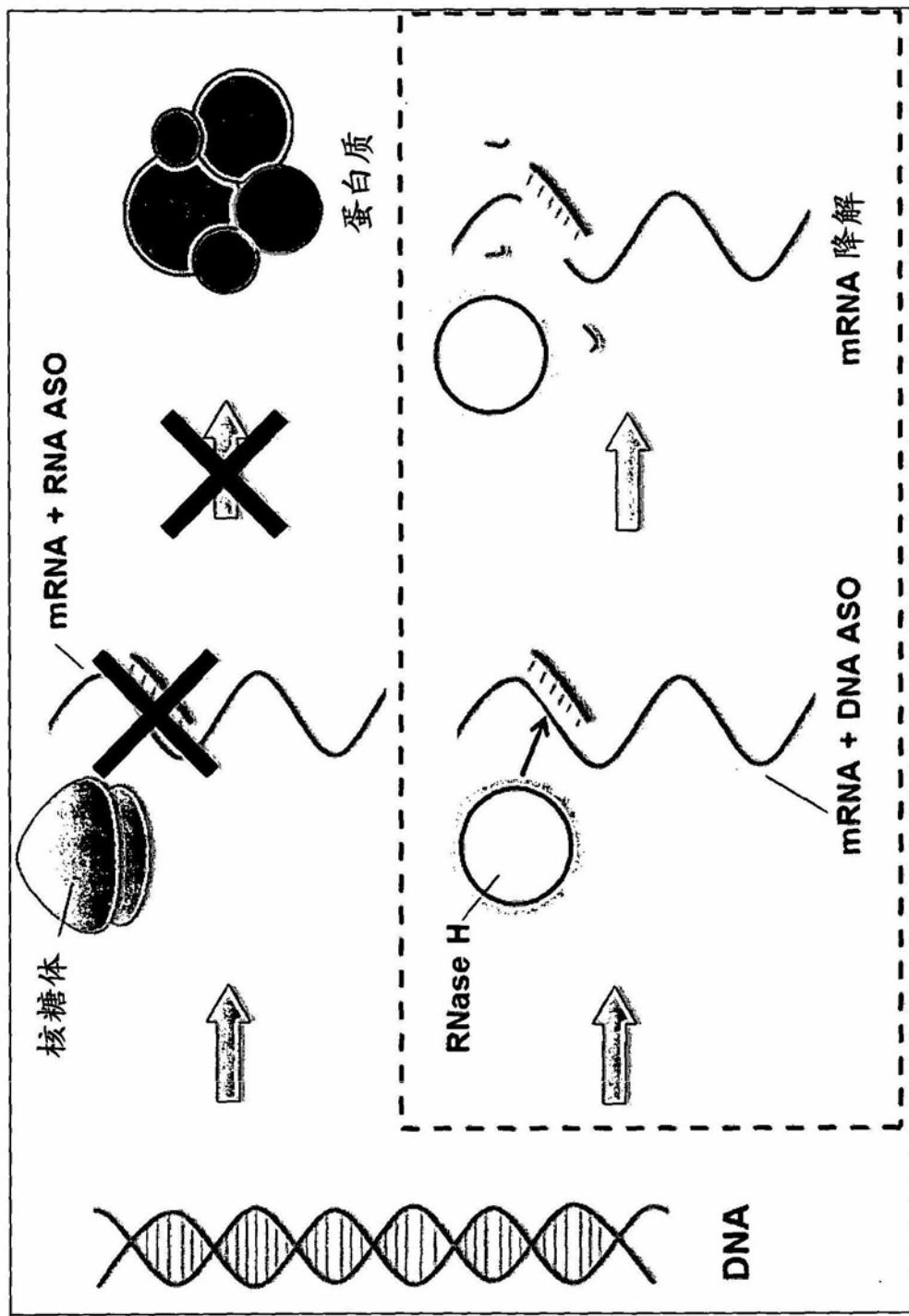


图1

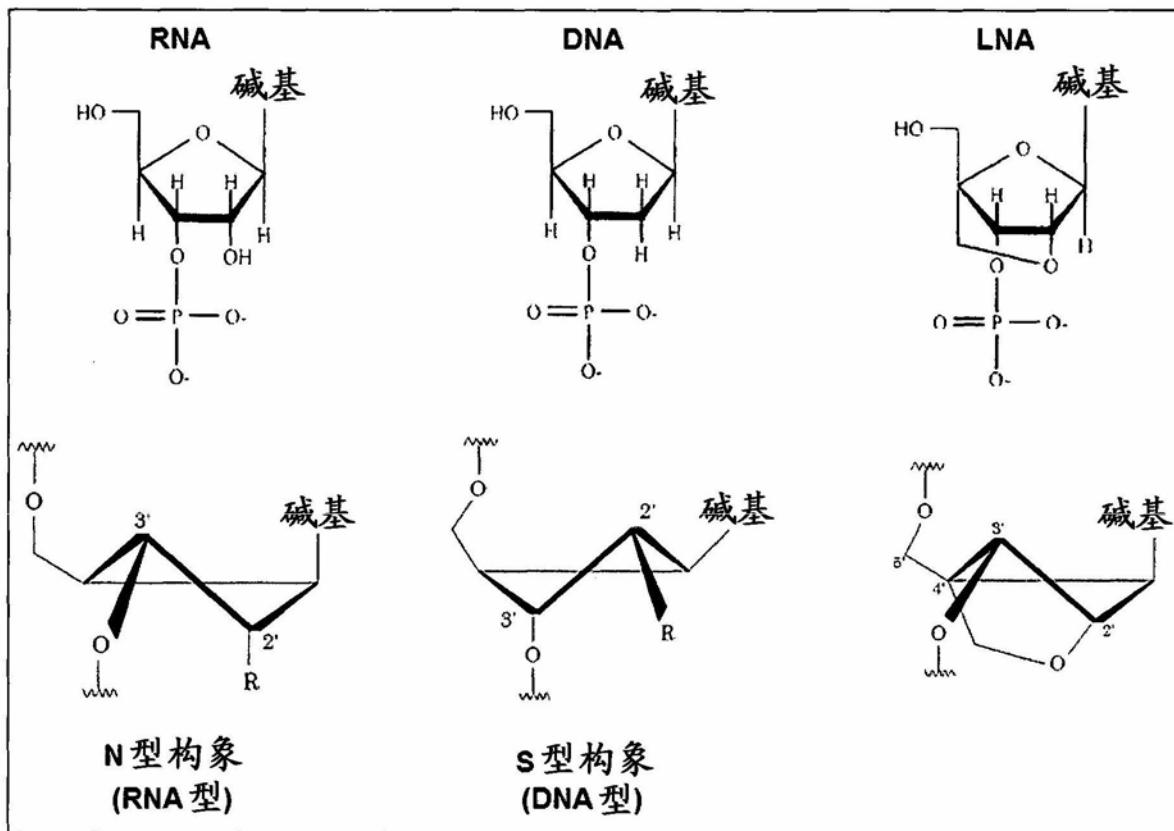
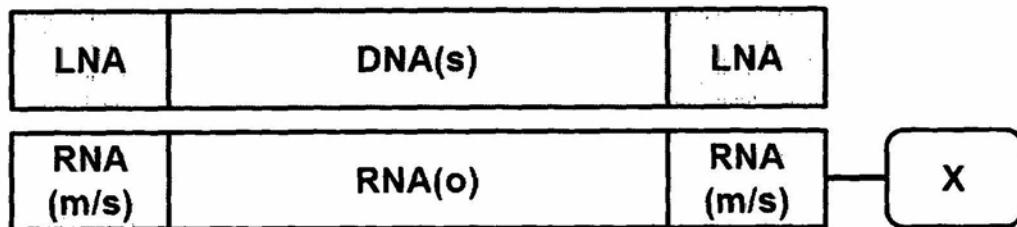


图2

3A



3B

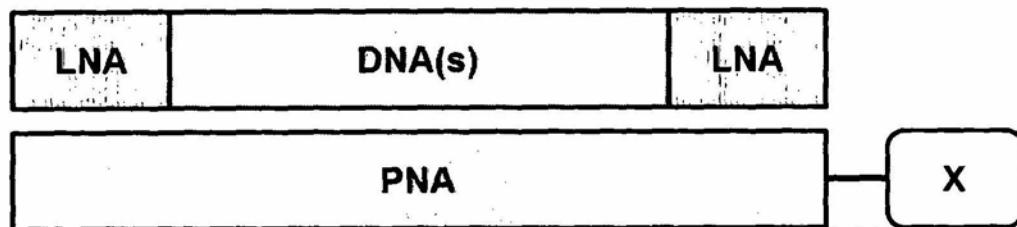
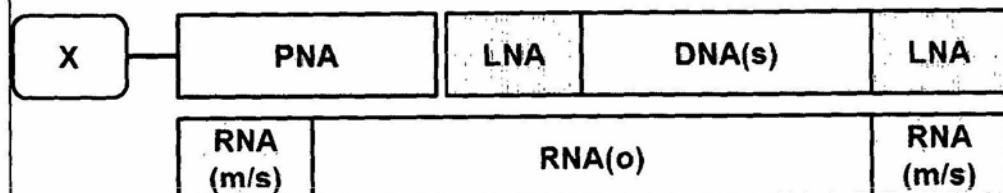


图3

4A



4B

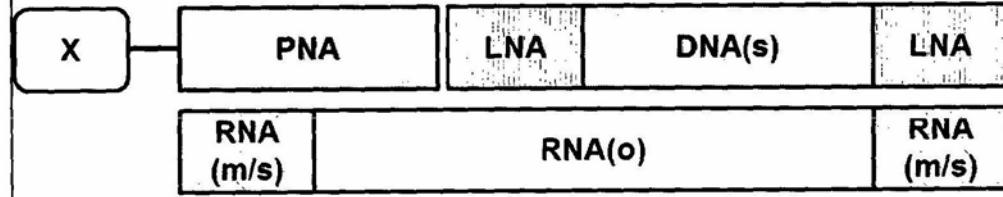
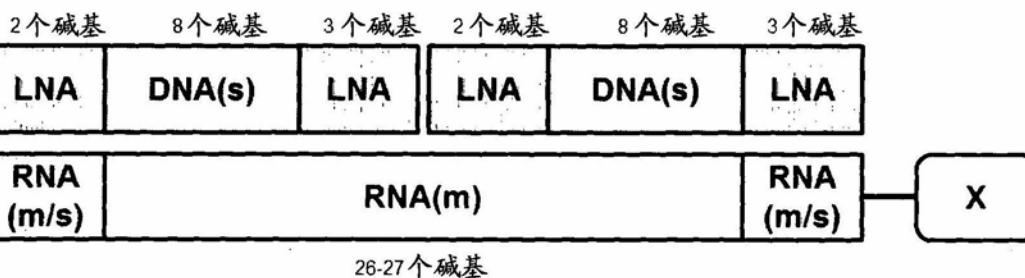


图4

5A



5B

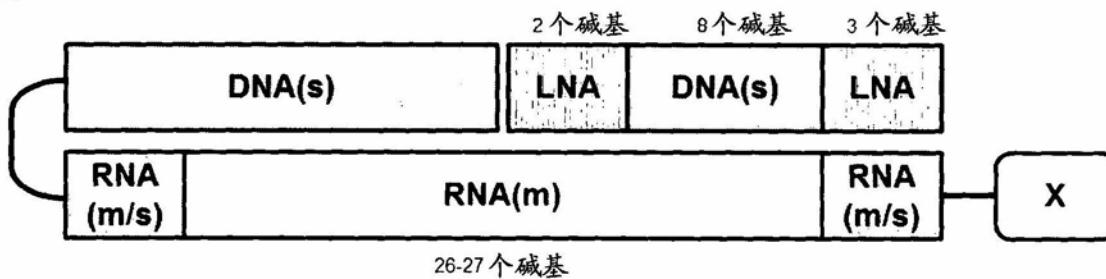
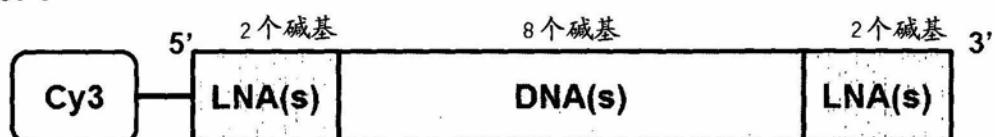


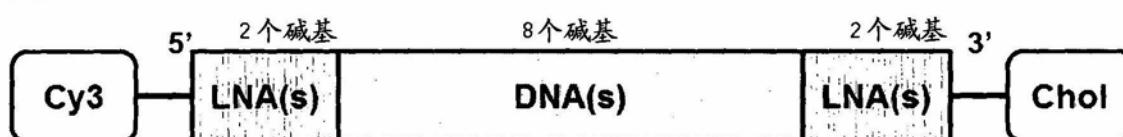
图5

6A



反义链: Cy3-标记的 LNA/DNA 缺口聚体  
“Cy3-ASO”

6B



反义链: Cy3-标记的、胆固醇标记的 LNA/DNA 缺口聚体  
“Cy3-Chol-ASO”

图6

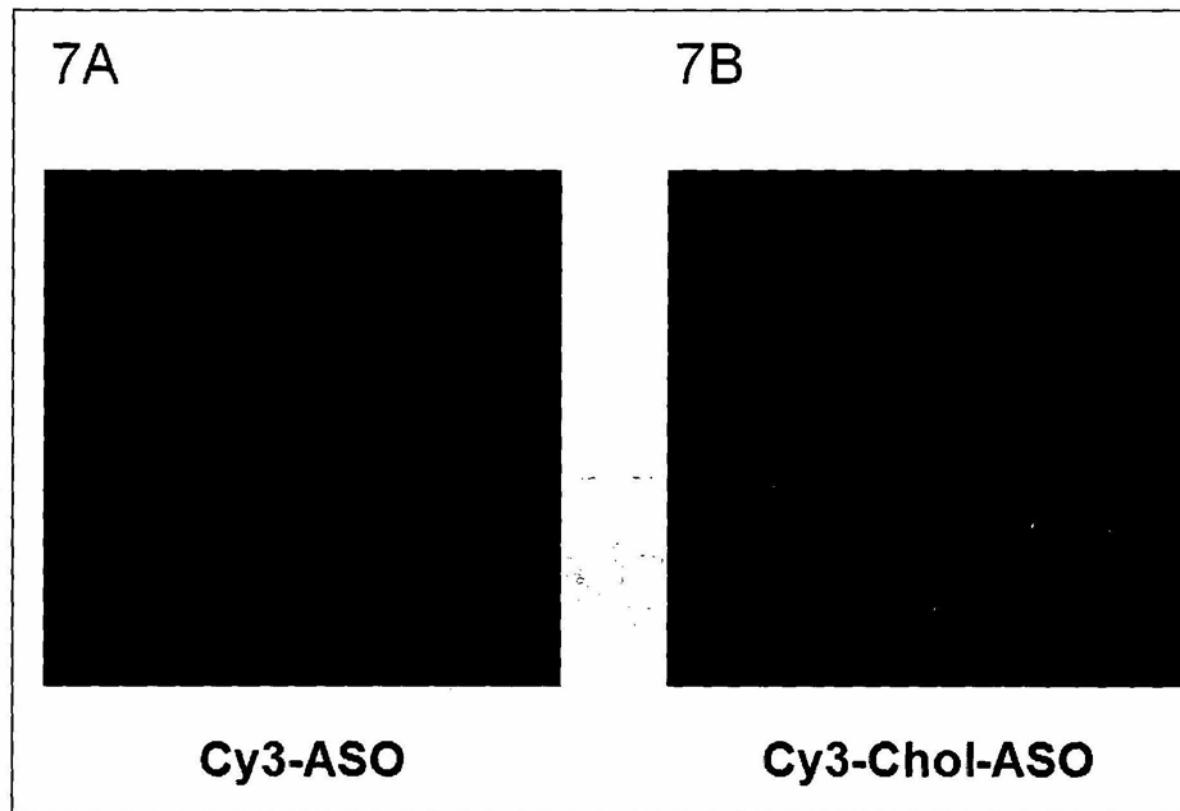


图7

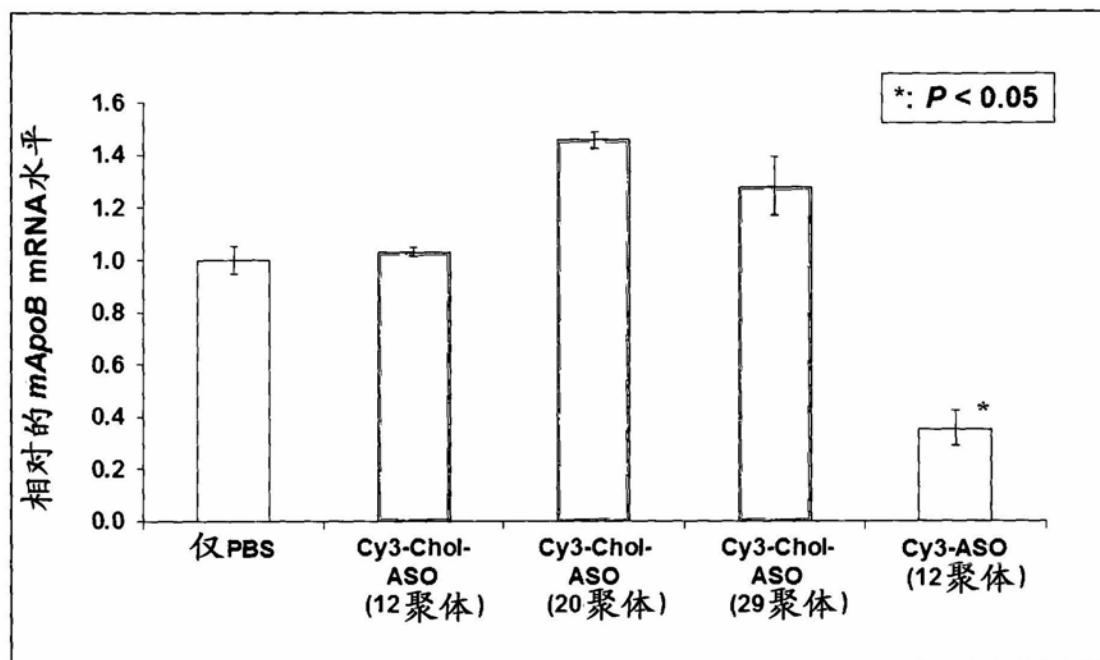


图8

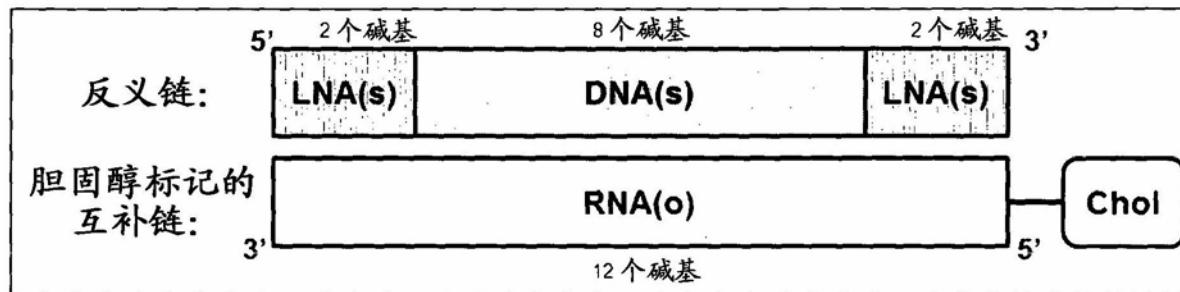


图9

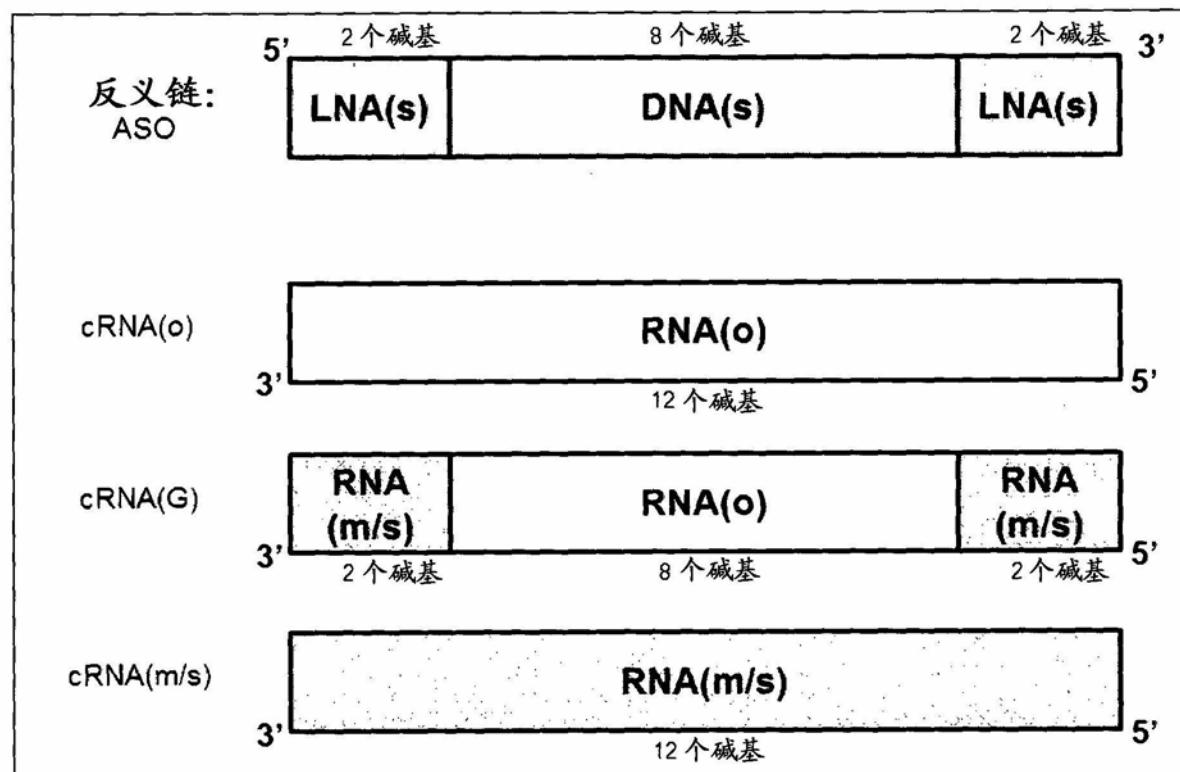


图10

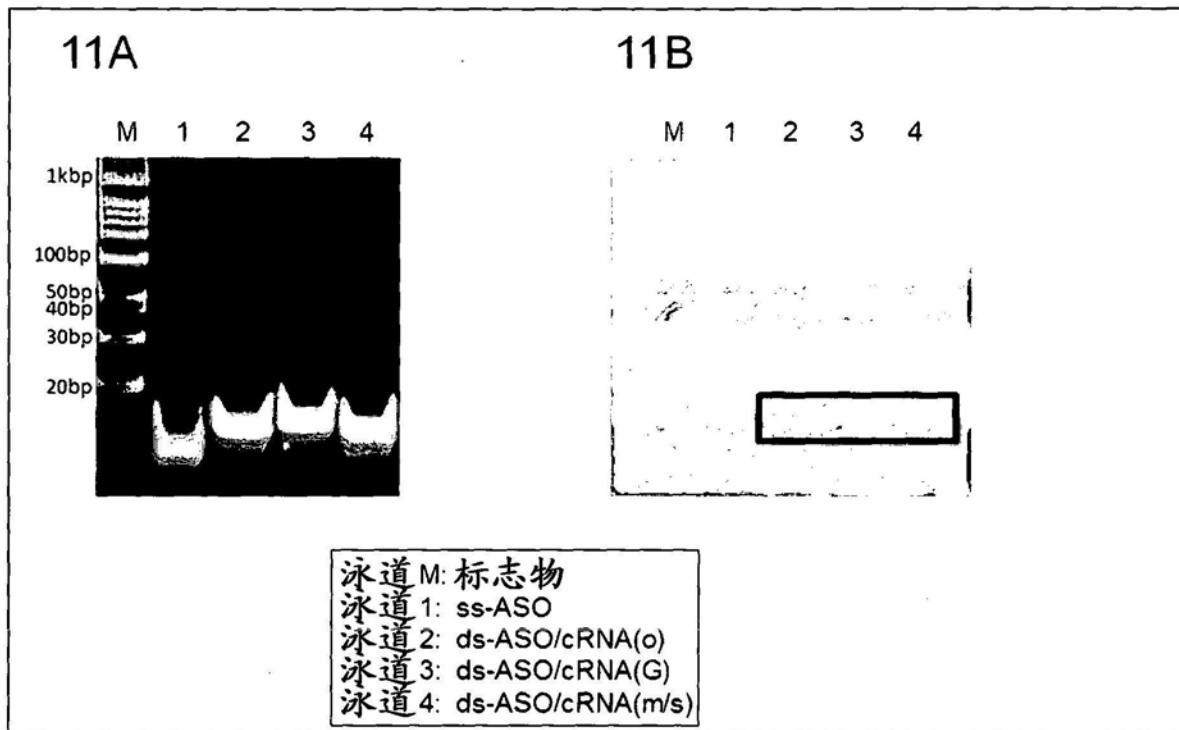


图11

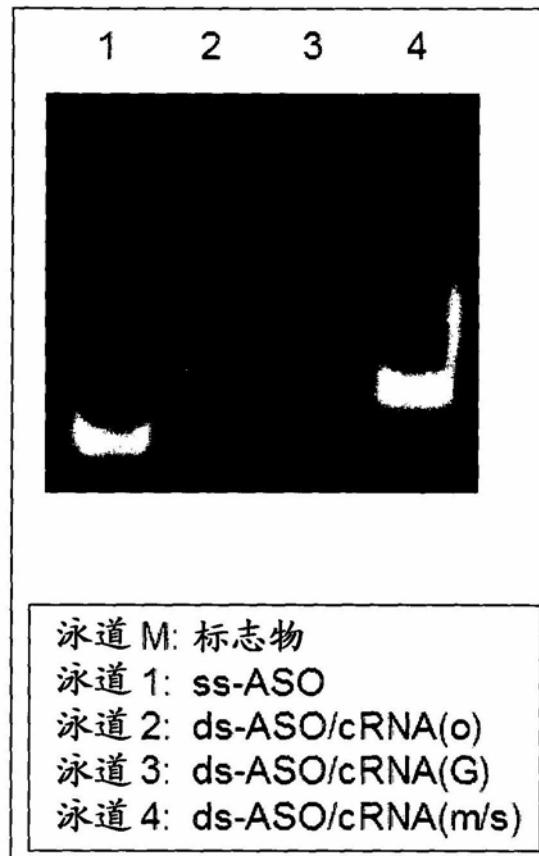


图12

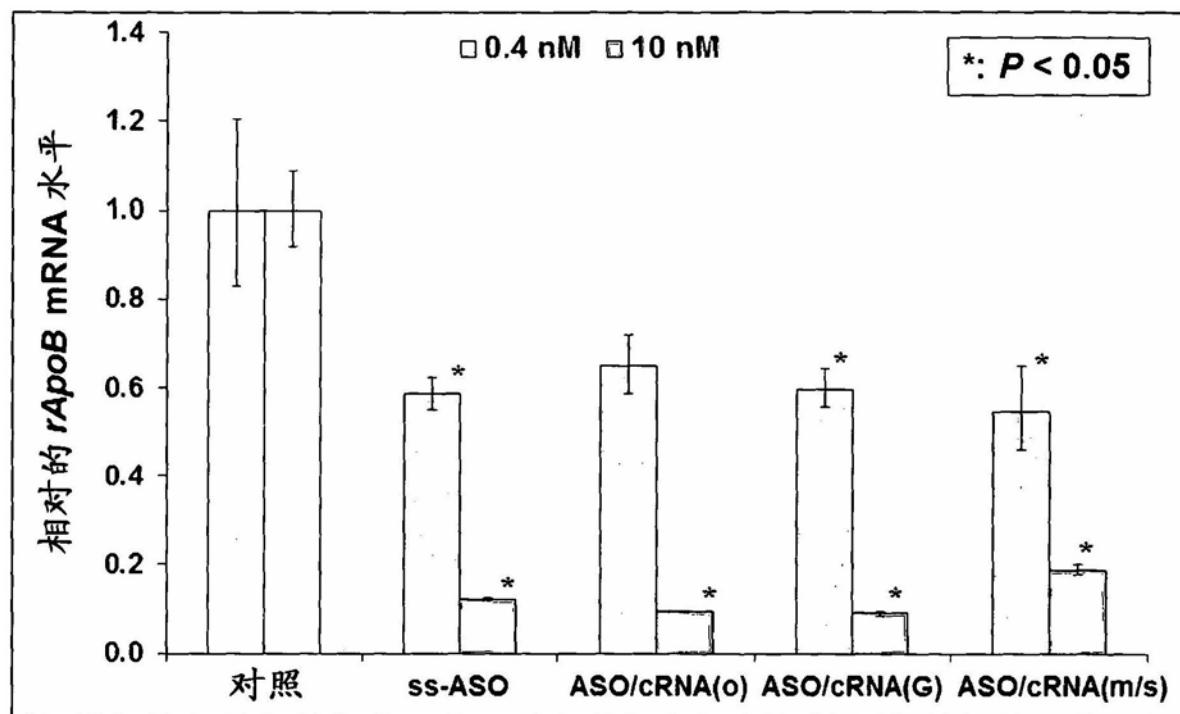


图13

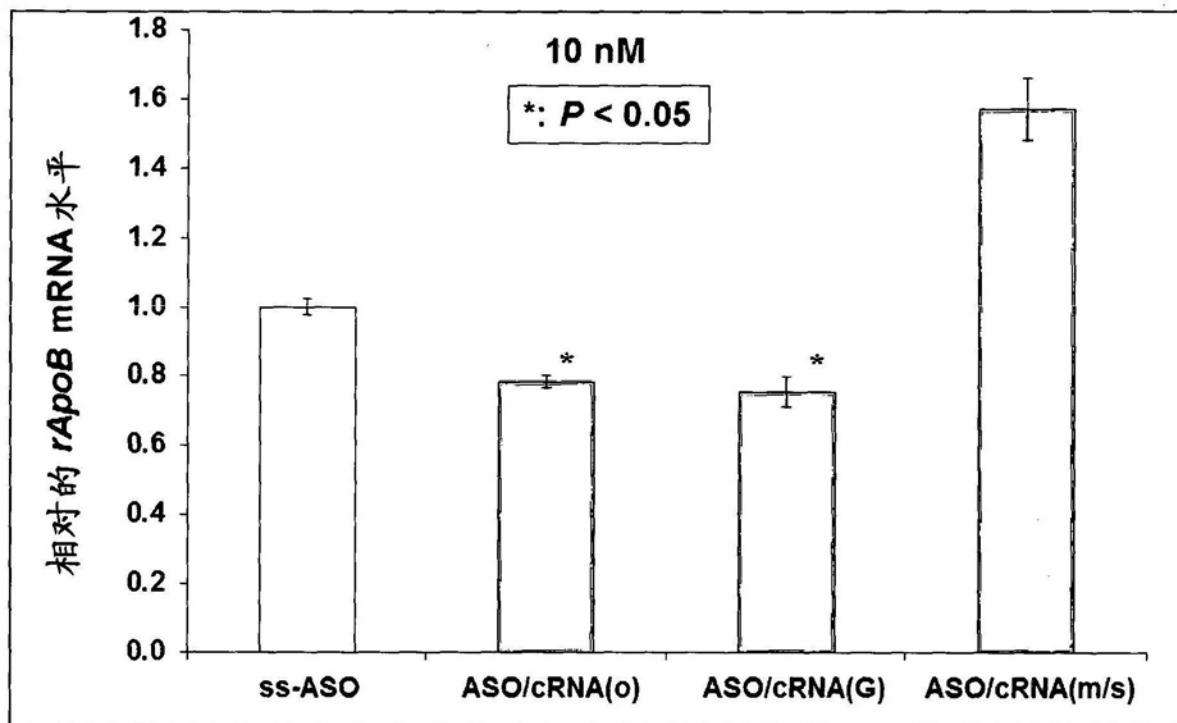


图14

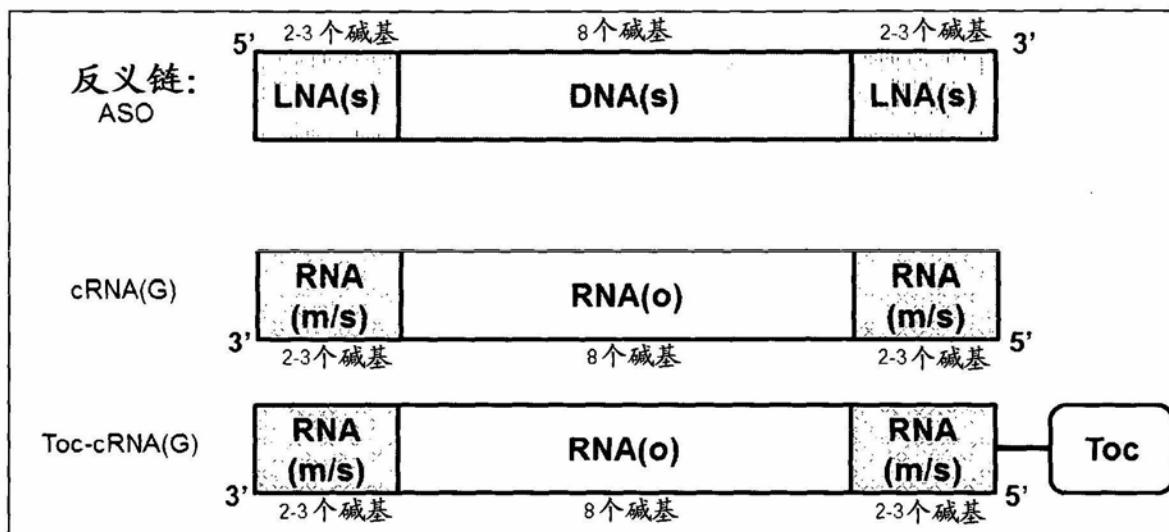


图15

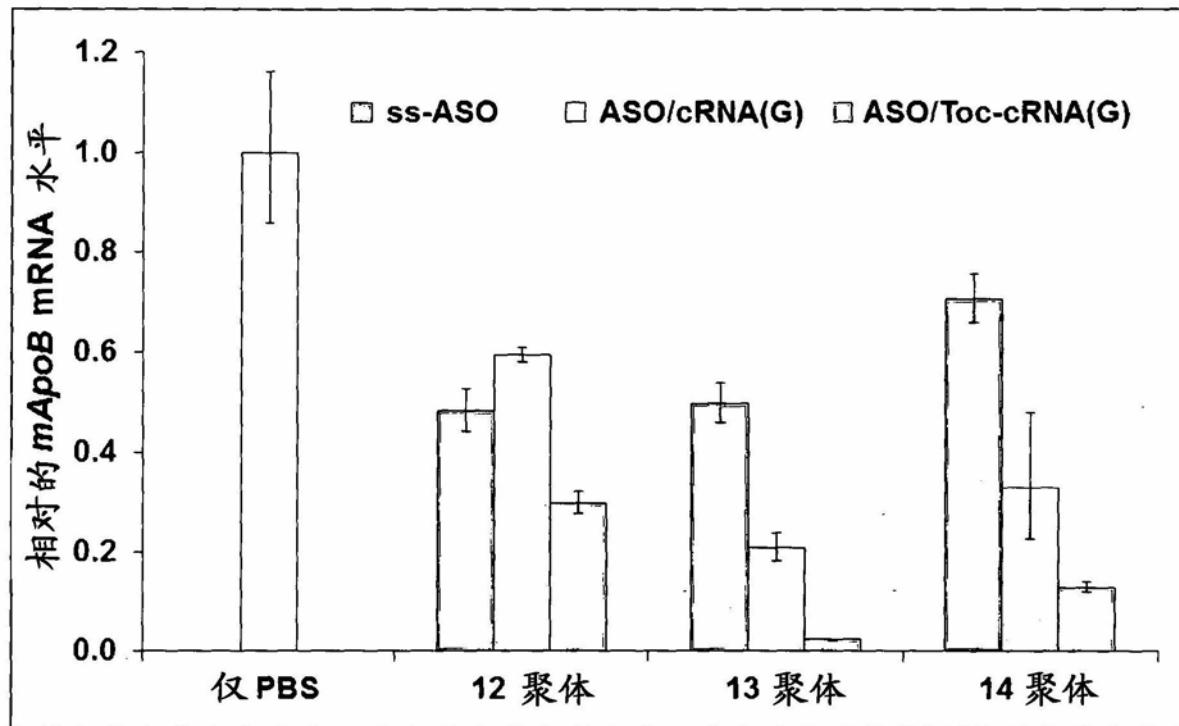


图16

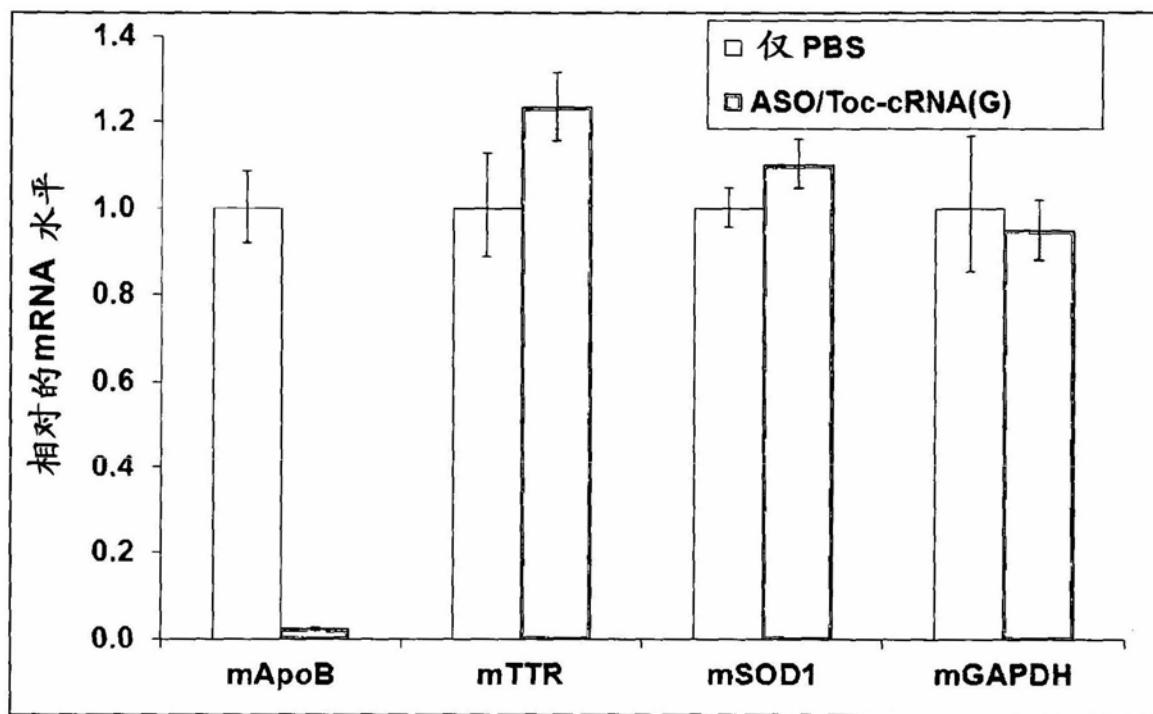


图17

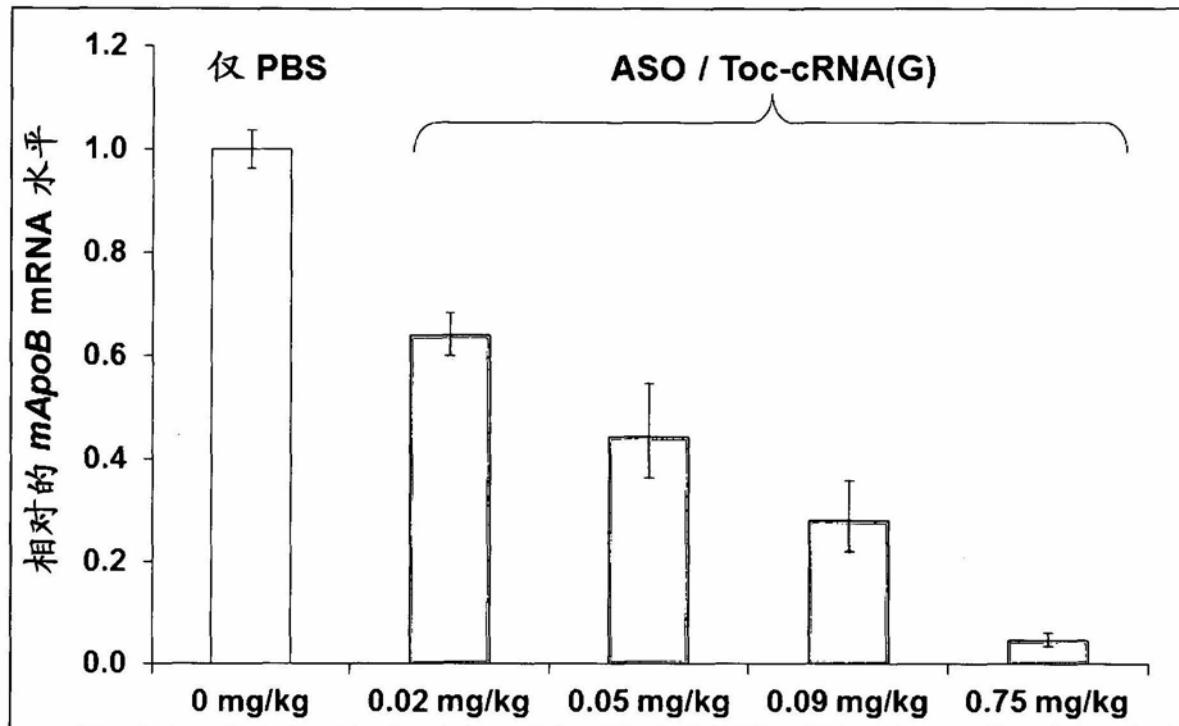


图18

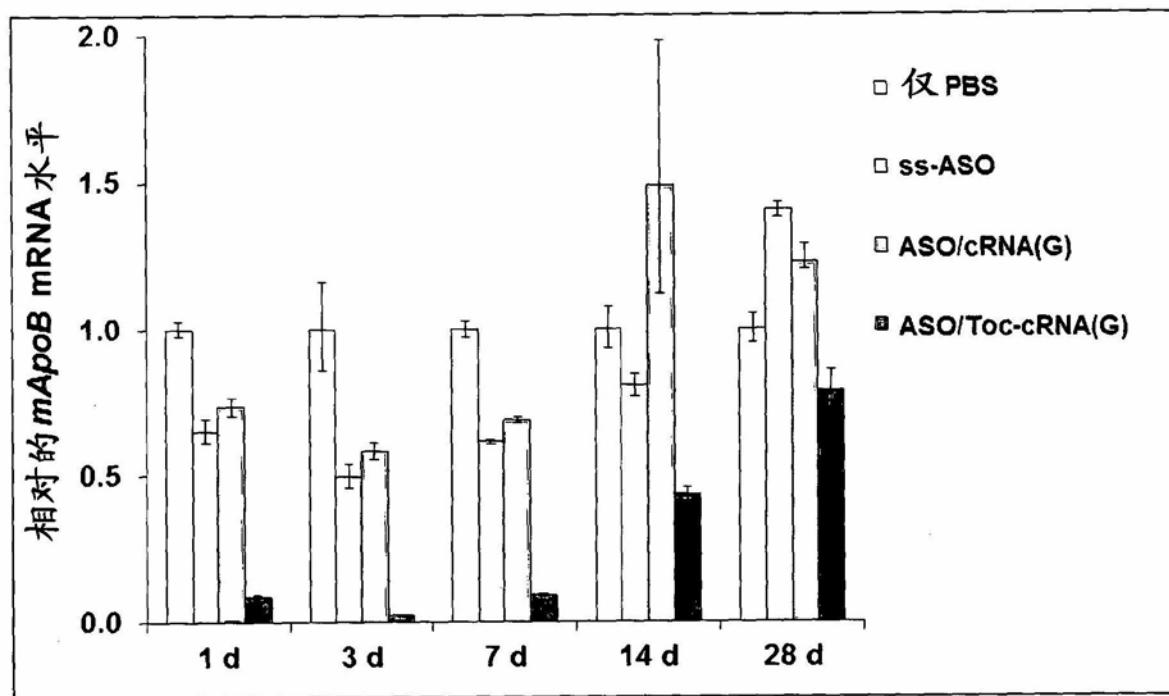


图19A

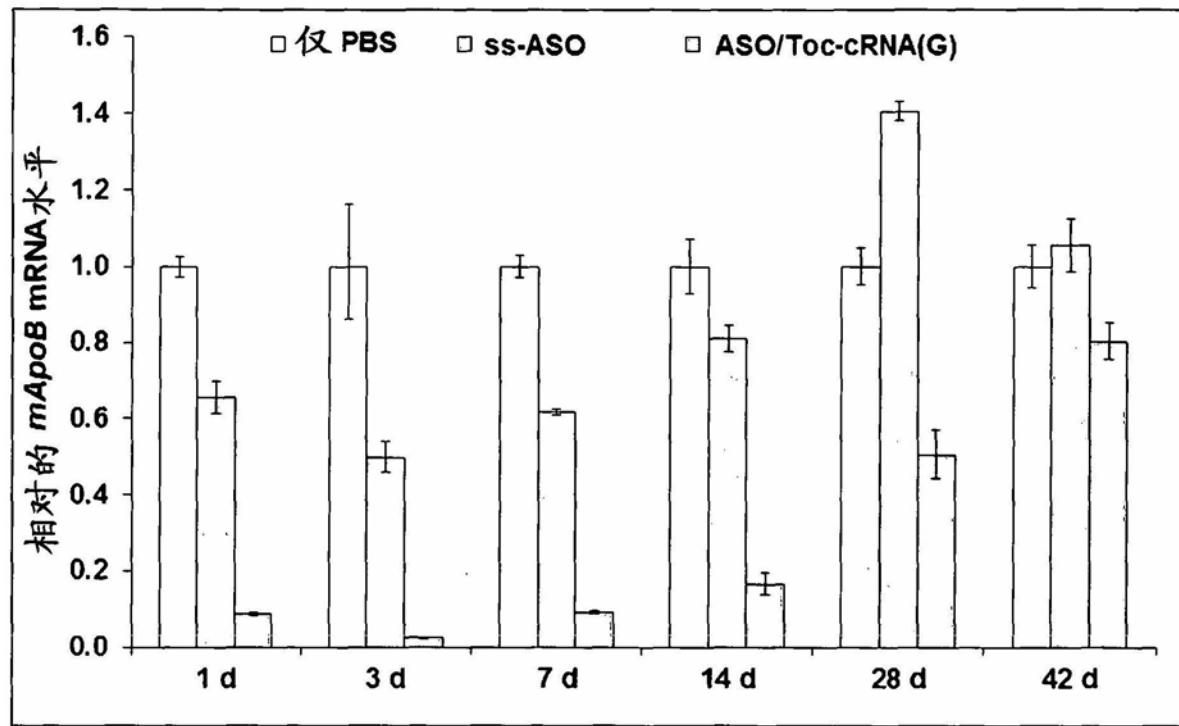


图19B

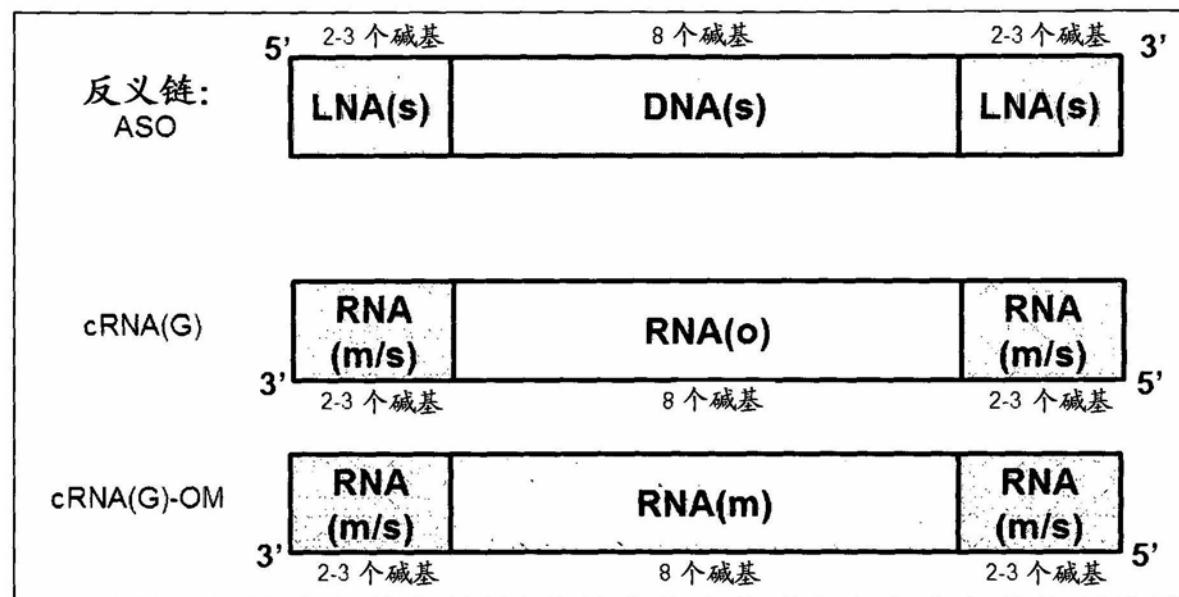


图20A

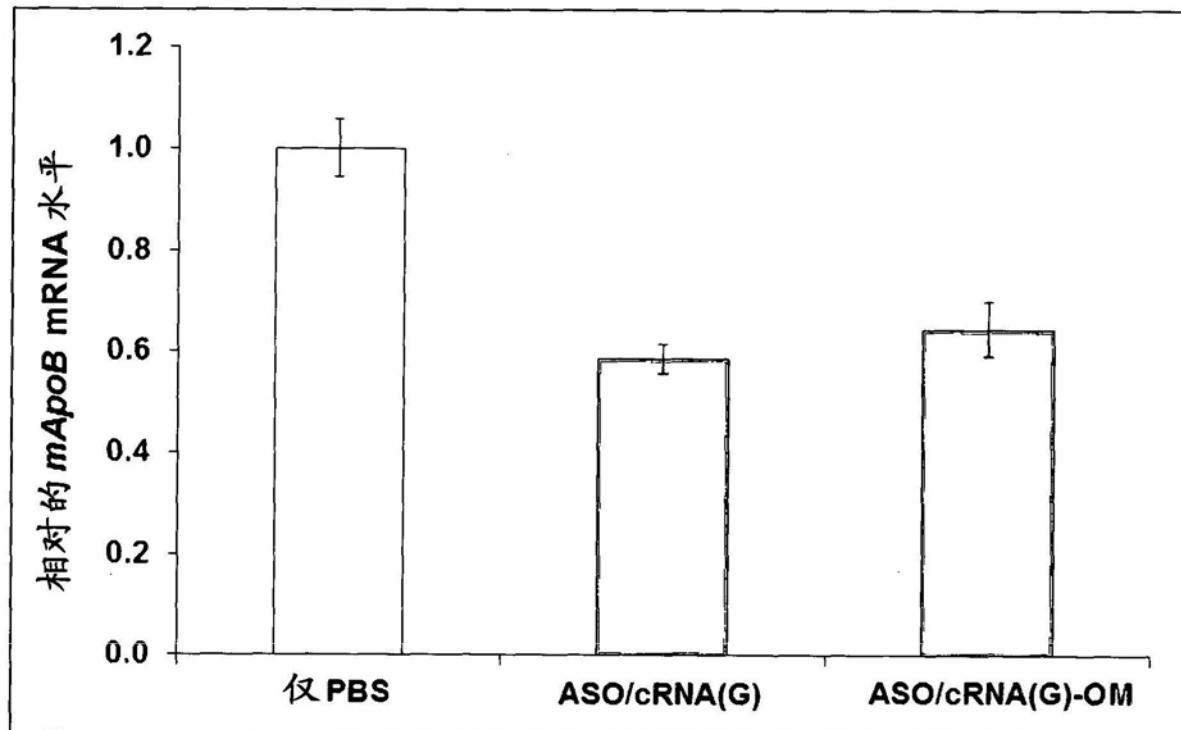
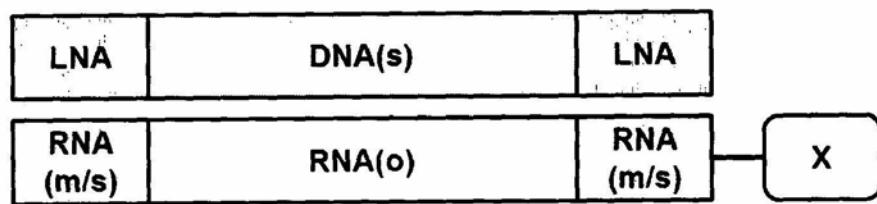
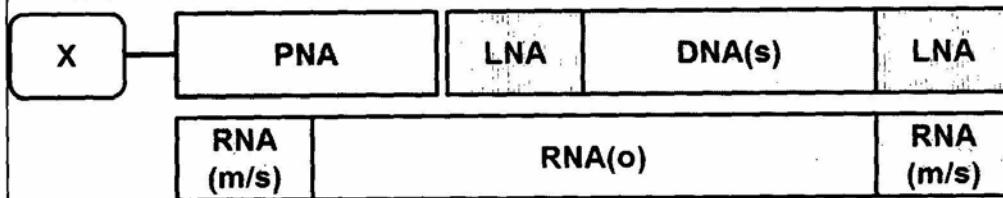


图20B

21A



21B



21C

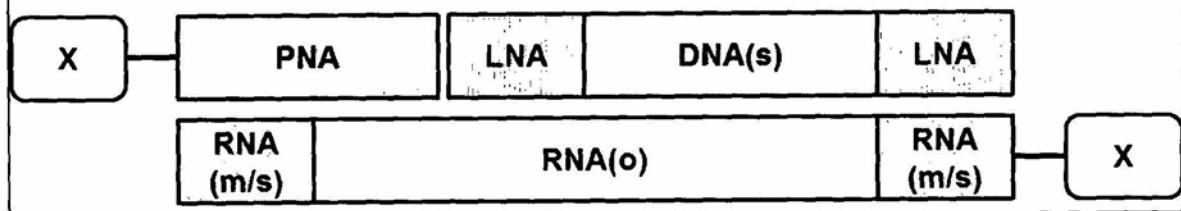


图21

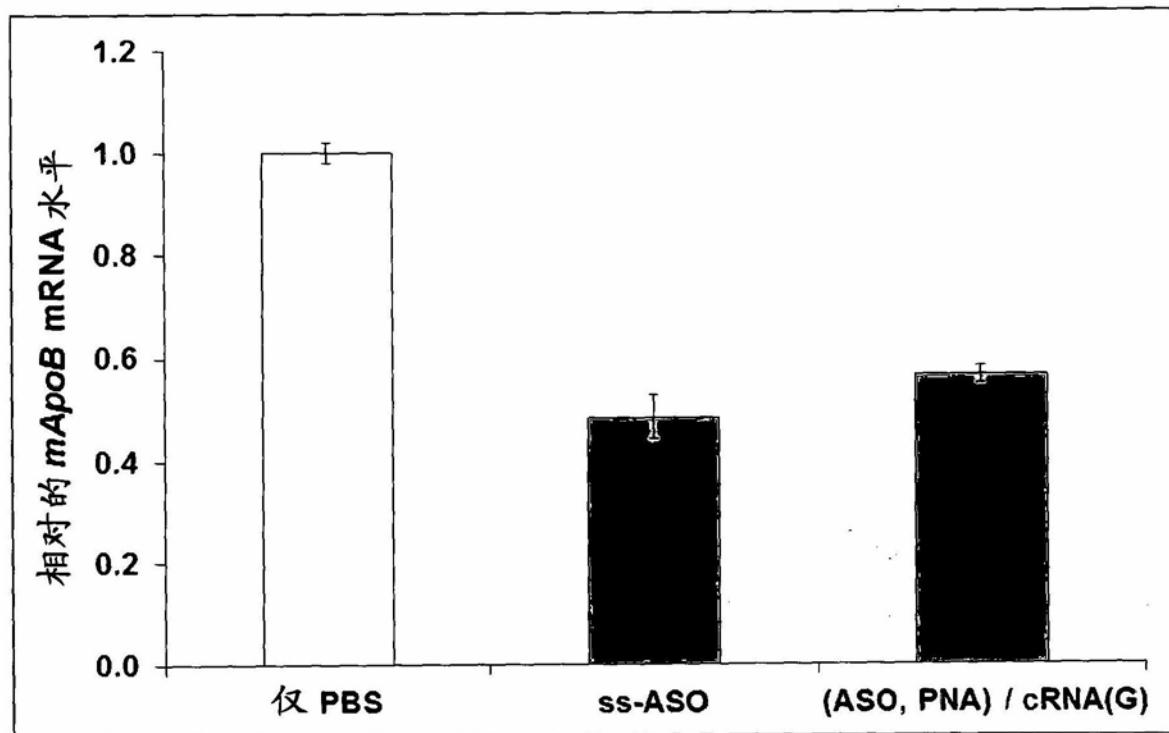


图22

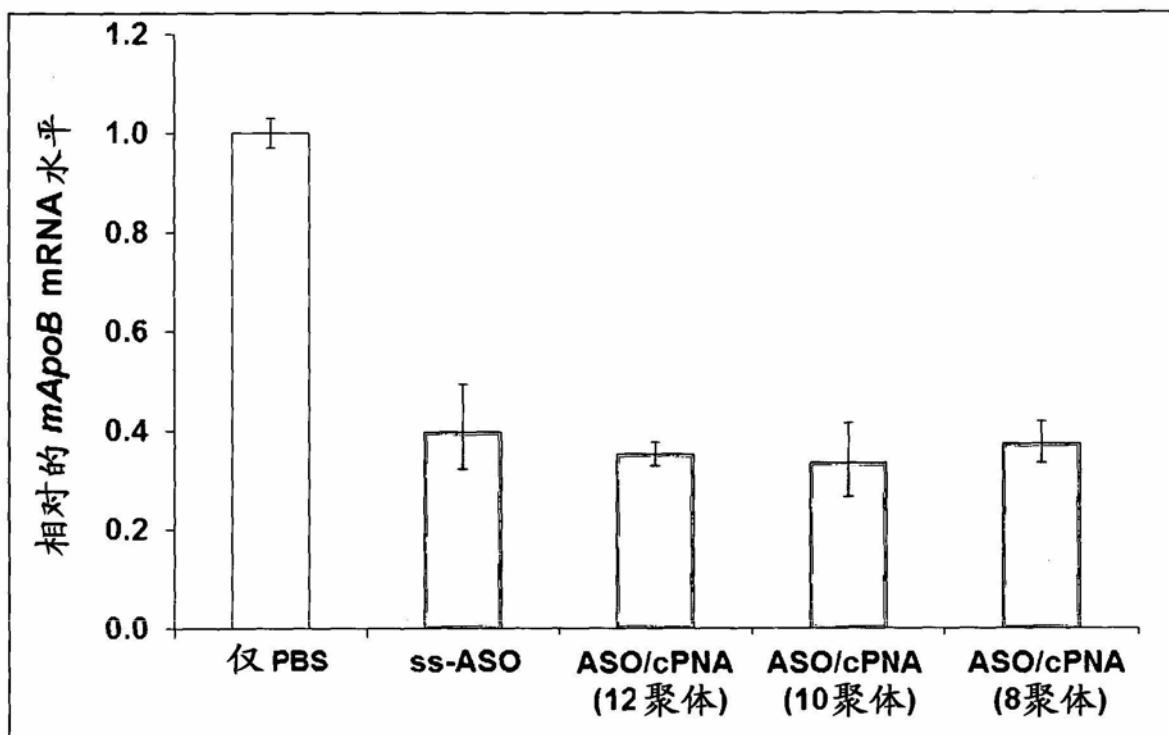


图23

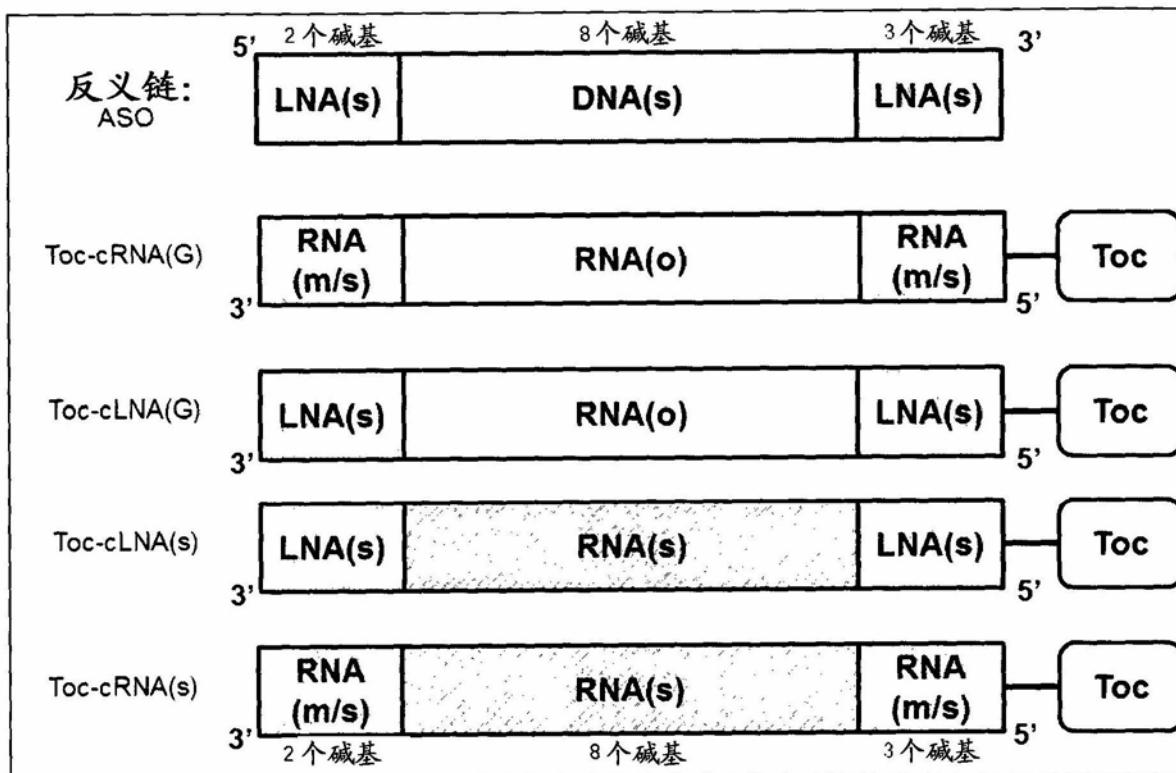


图24

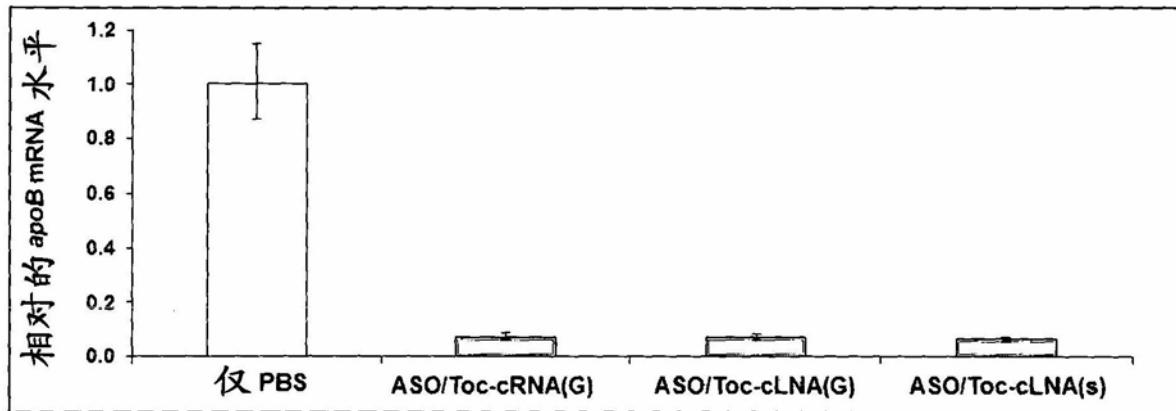


图25A

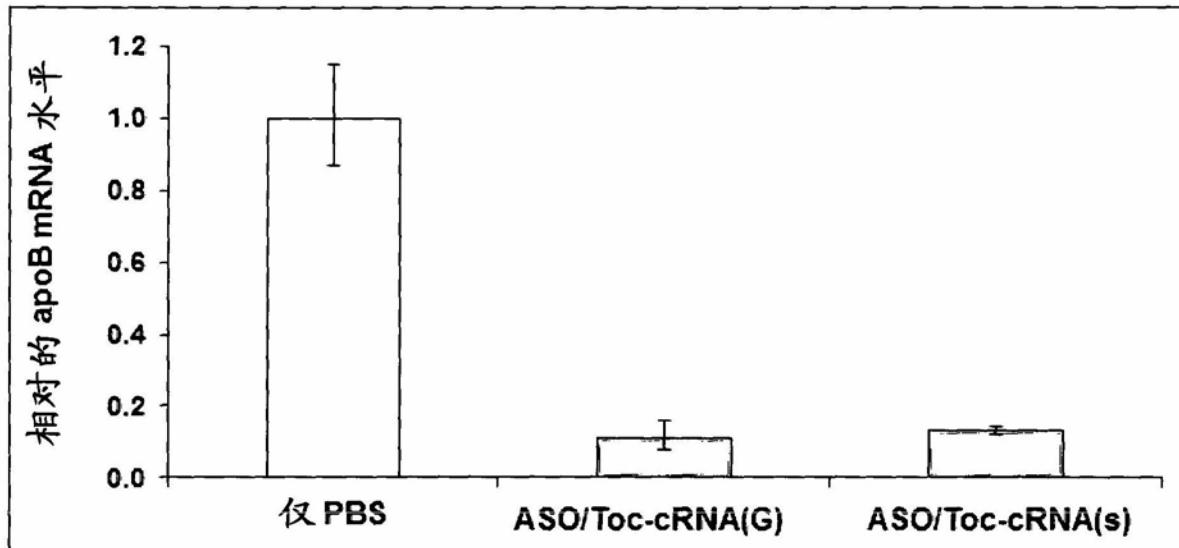


图25B

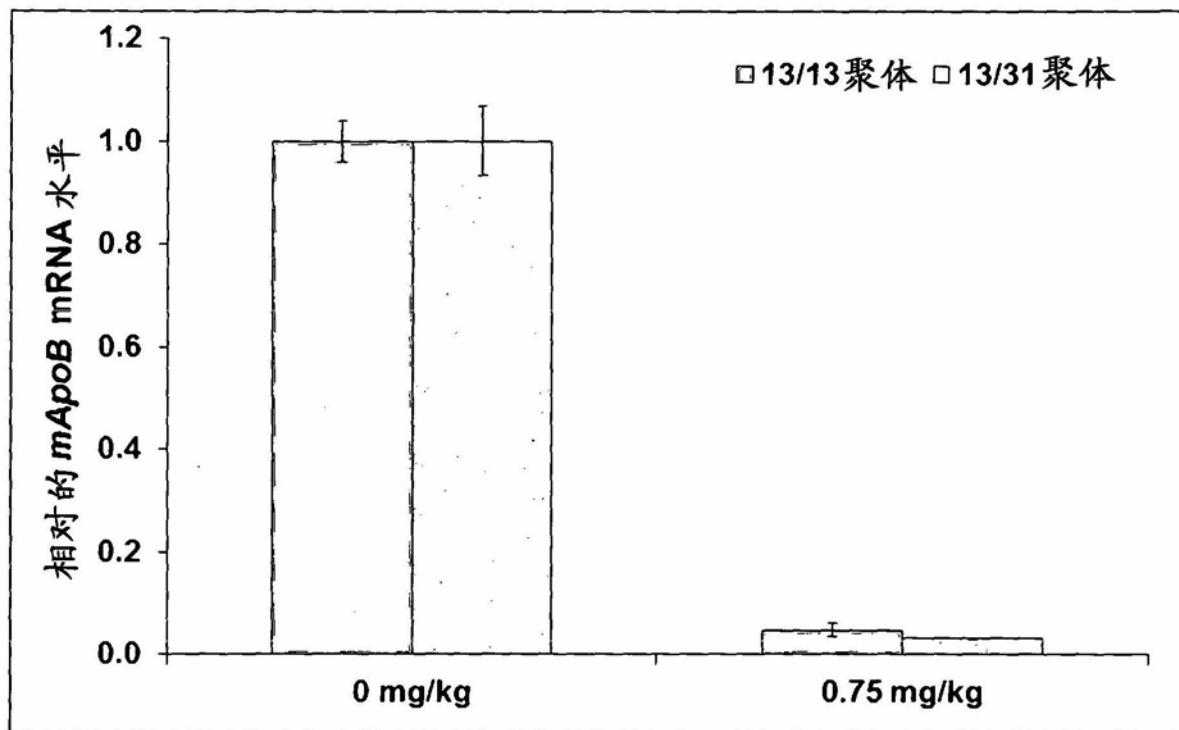


图26

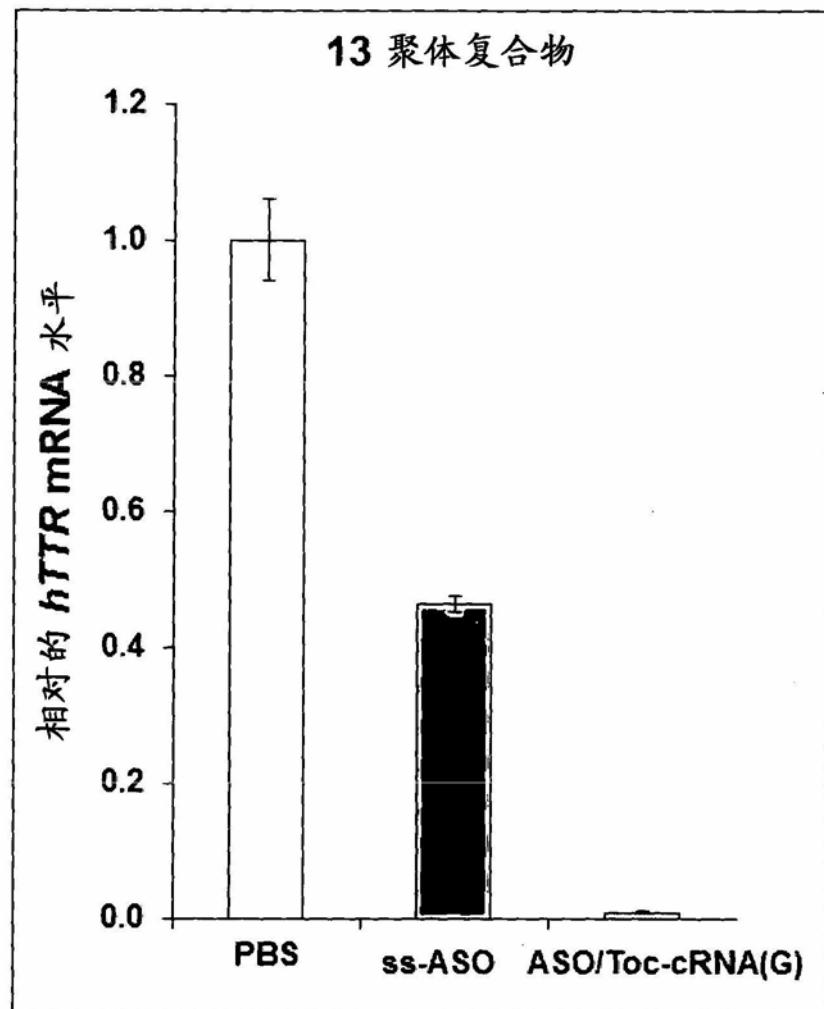


图27A

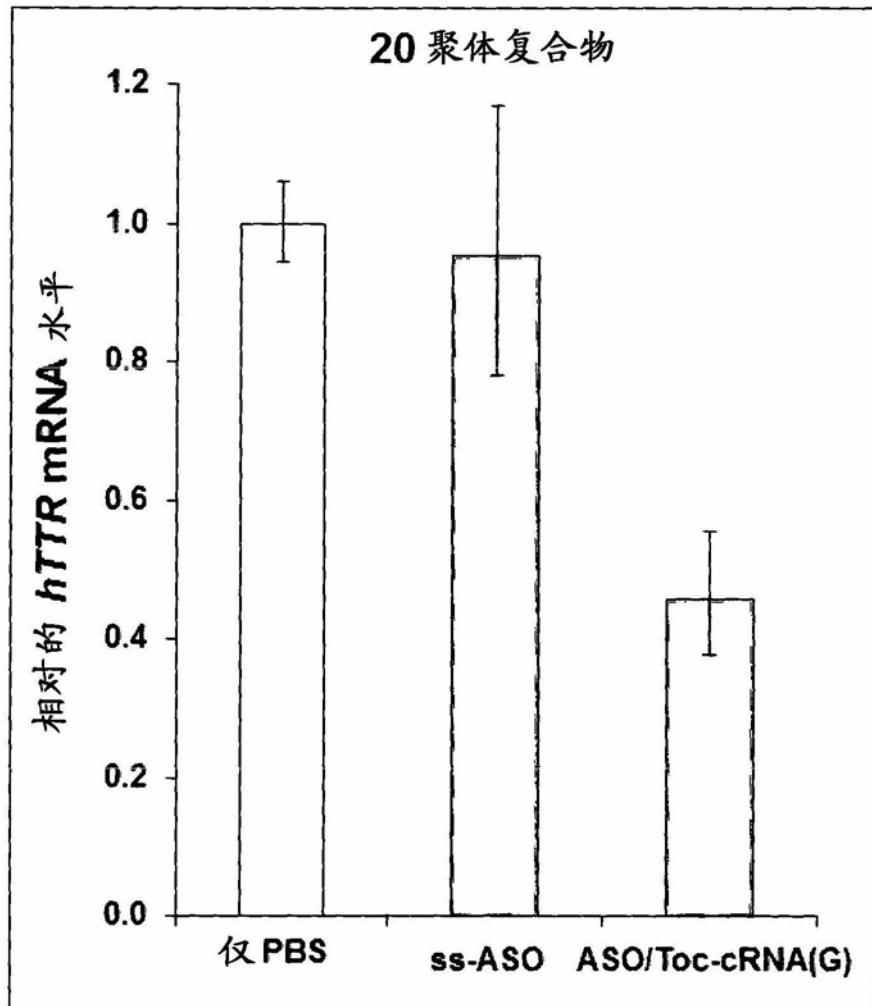


图27B

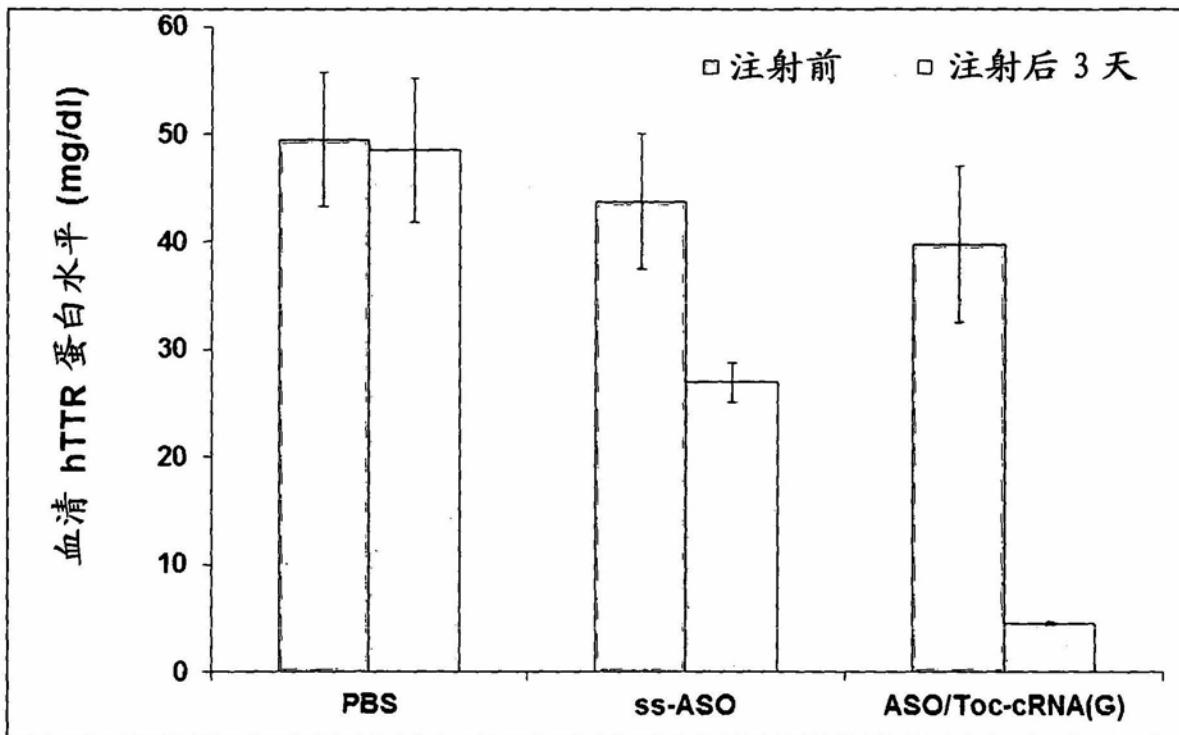


图28

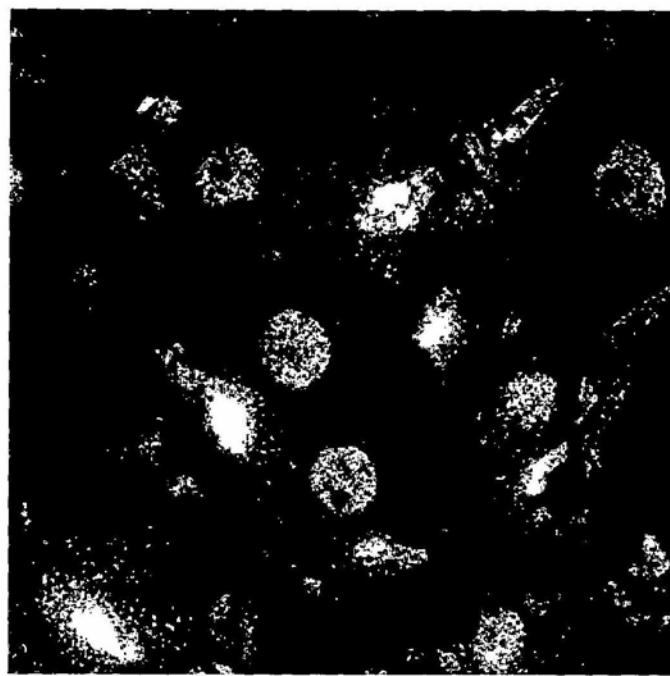


图29

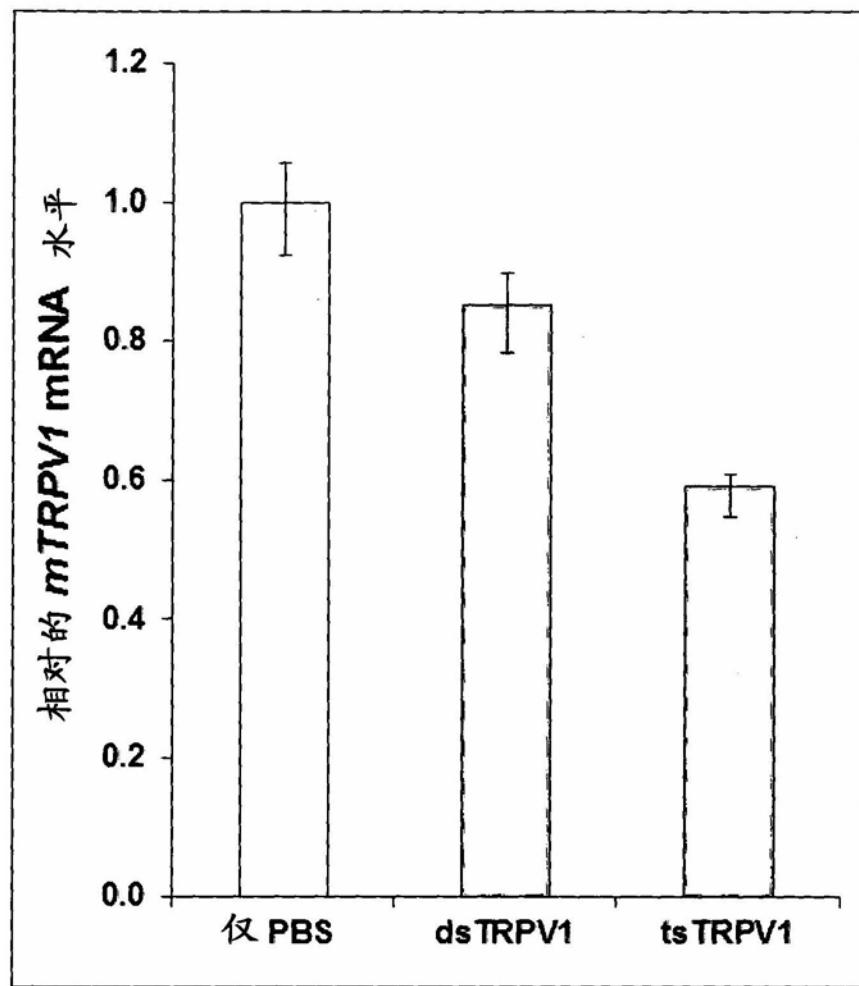


图30

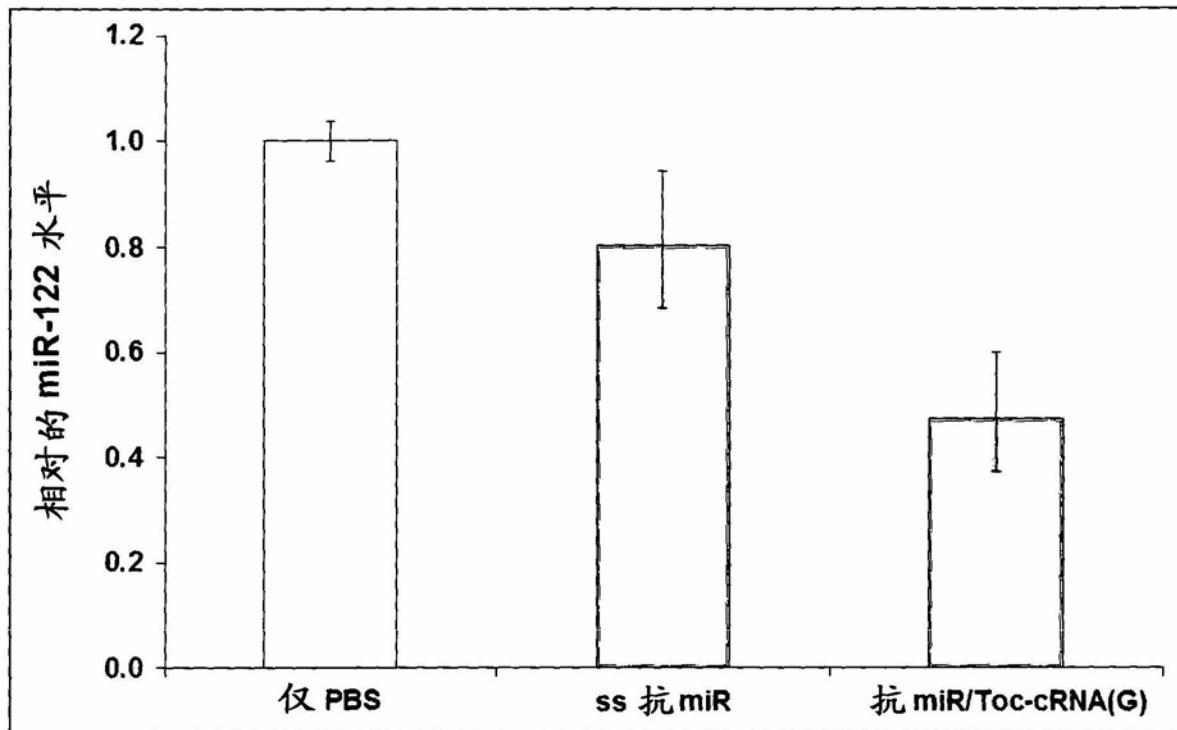


图31

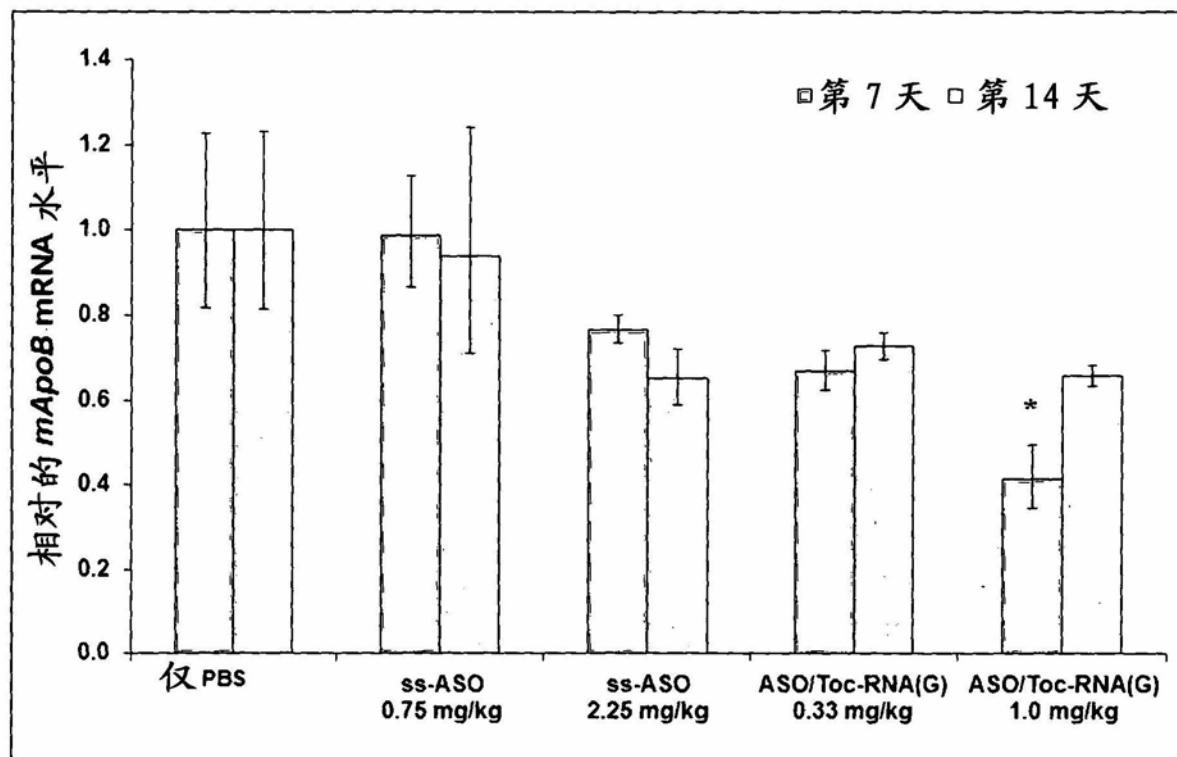


图32