



(10) 申请公布号 CN 115702243 A

(43) 申请公布日 2023. 02. 14

(21) 申请号 202180040833.9

(22) 申请日 2021.06.08

(30) 优先权数据

20179011.0 2020.06.09 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/065266 2021.06.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/249993 EN 2021.12.16

(71) 申请人 罗氏创新中心哥本哈根有限公司

地址 丹麦霍尔斯霍姆

(72) 发明人 N·阿尔贝克 P·哈格多恩

M·拉迪福吉德 L·佩德森

J·拉夫恩

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 胡晨曦 黄革生

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

权利要求书7页 说明书35页

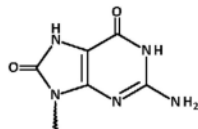
序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

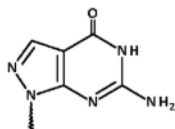
用于治疗性多核苷酸的鸟苷类似物

(57) 摘要

本发明涉及一种多核苷酸,其包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键合以及至少一个鸟苷类似物,所述鸟苷类似物包含选自由式(I)和式(II)组成的组的鸟嘌呤核碱基类似物。与具有天然鸟苷的多核苷酸相比,包含此类鸟苷类似物的多核苷酸显示出相对降低的神经毒性。



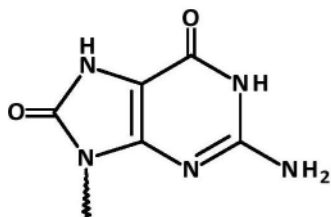
(I)



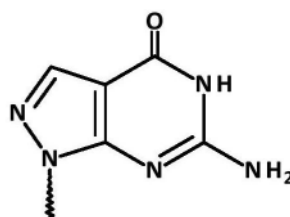
(II)

1. 一种多核苷酸, 其包含:

- 至少一个硫代磷酸酯核苷间键合, 以及
- 至少一个鸟苷类似物, 其包含选自由以下项组成的组的鸟嘌呤类似物:

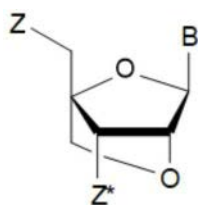
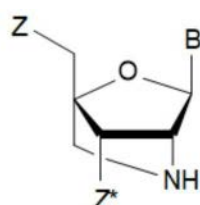
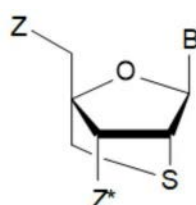
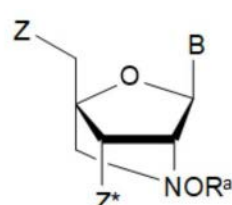


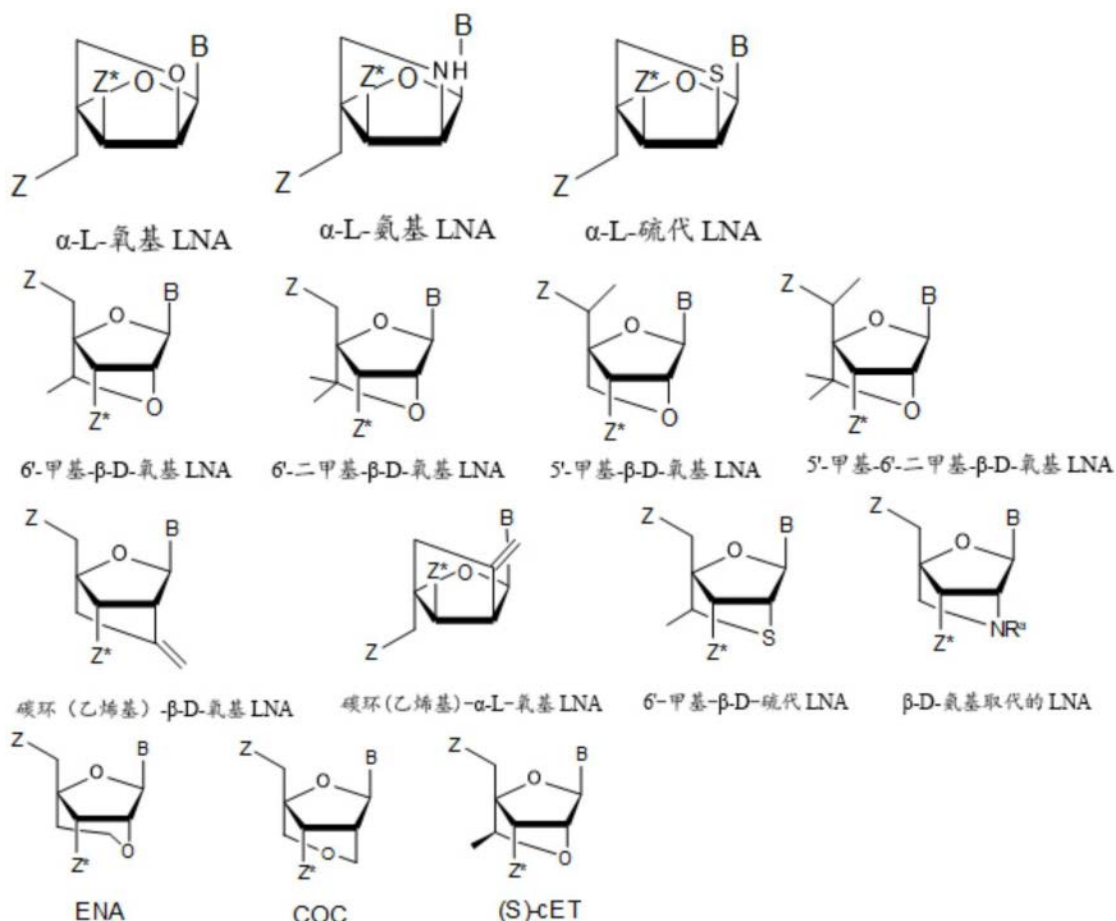
(II)



(III)

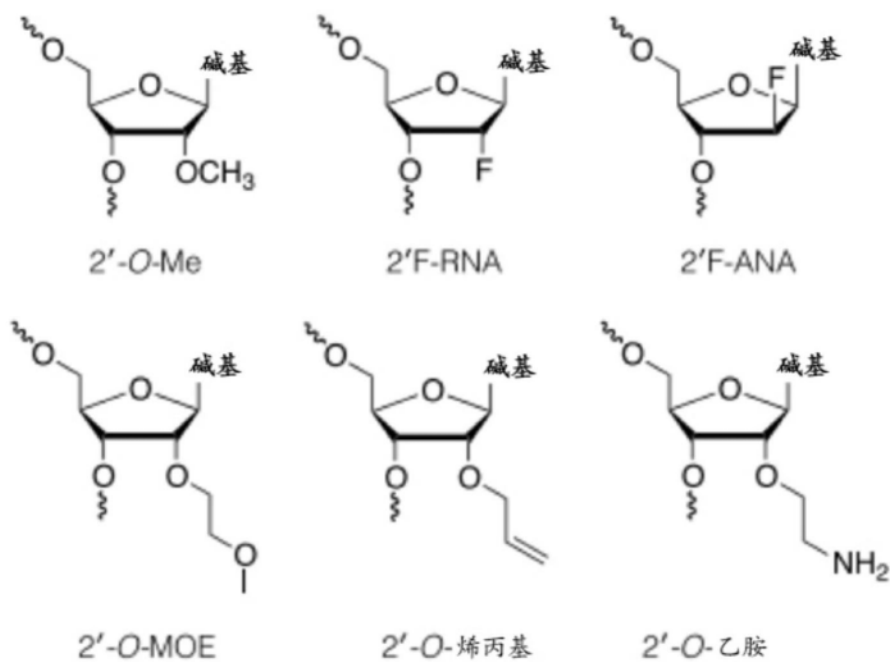
2. 根据权利要求1所述的多核苷酸, 其中所述多核苷酸为单链的。
3. 根据权利要求2所述的多核苷酸, 其中所述多核苷酸为反义寡核苷酸。
4. 根据权利要求1所述的多核苷酸, 其中所述多核苷酸为双链的。
5. 根据权利要求4所述的多核苷酸, 其中所述多核苷酸为siRNA或shRNA。
6. 根据权利要求1所述的多核苷酸, 其进一步包含一个或多个2'糖修饰的核苷。
7. 根据权利要求2或3所述的多核苷酸, 其中所述2'糖修饰的核苷独立地选自由锁核酸和2'糖取代的核苷组成的组。
8. 根据权利要求6或7所述的多核苷酸, 其中所述2'糖修饰的核苷中的一者或多者为选自由以下项组成的组的锁核酸:

 $\beta$ -D-氧基 LNA $\beta$ -D-氨基 LNA $\beta$ -D-硫代 LNA $\beta$ -D-氨基取代的 LNA



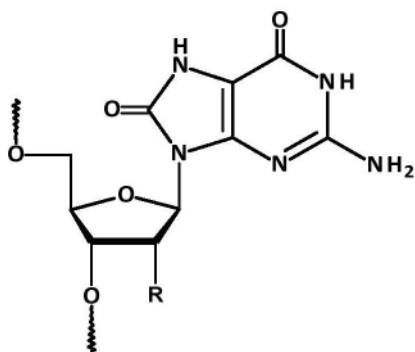
其中B为天然或经修饰的核碱基,并且Z为与相邻核苷或5'-末端基团的核苷间键合,并且Z\*为与相邻核苷或3'-末端基团的核苷间键合。

9. 根据权利要求6或7中任一项所述的多核苷酸,其中一个或多个2'糖修饰的核苷选自以下项组成的组:

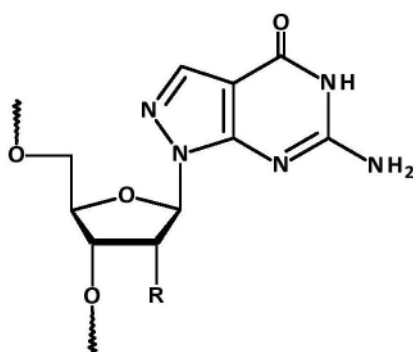


10. 根据权利要求1至9中任一项所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物选自由以下项

组成的组：

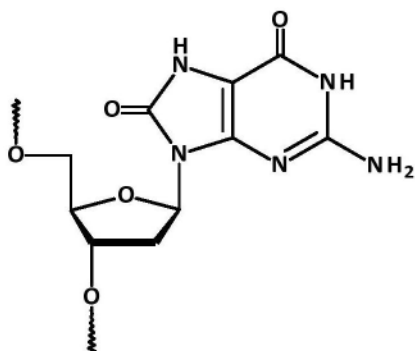


(Ia)

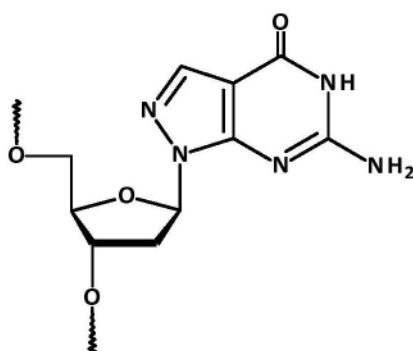


(IIa)

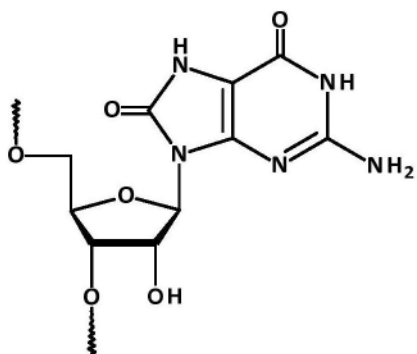
其中R为H或OH



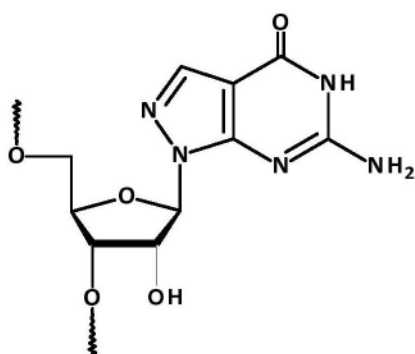
(Ia1)



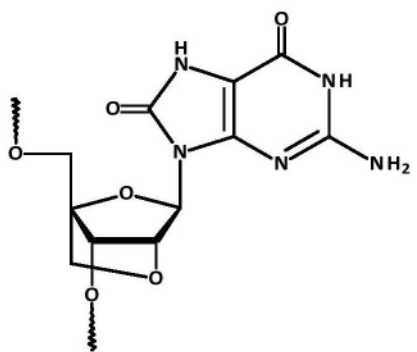
(IIa1)



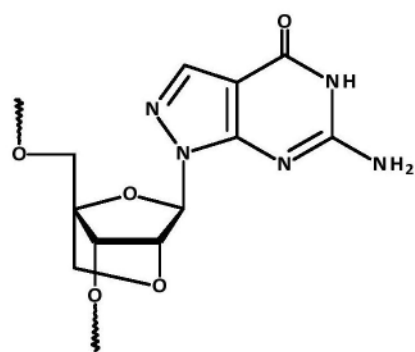
(Ia2)



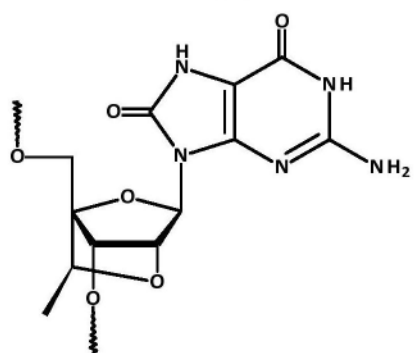
(IIa2)



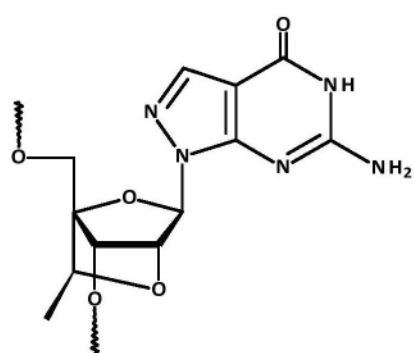
(Ib)



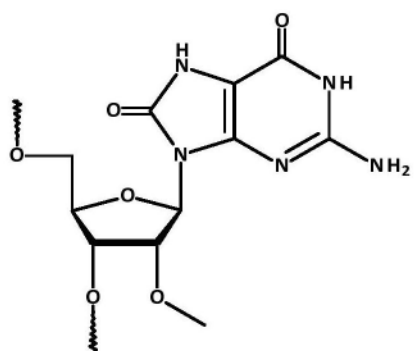
(IIb)



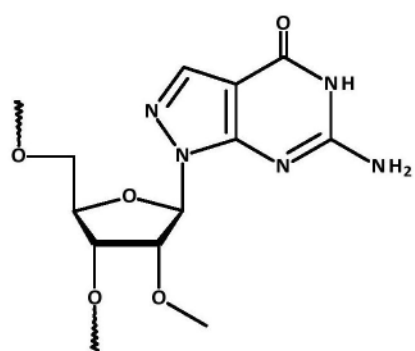
(Ic)



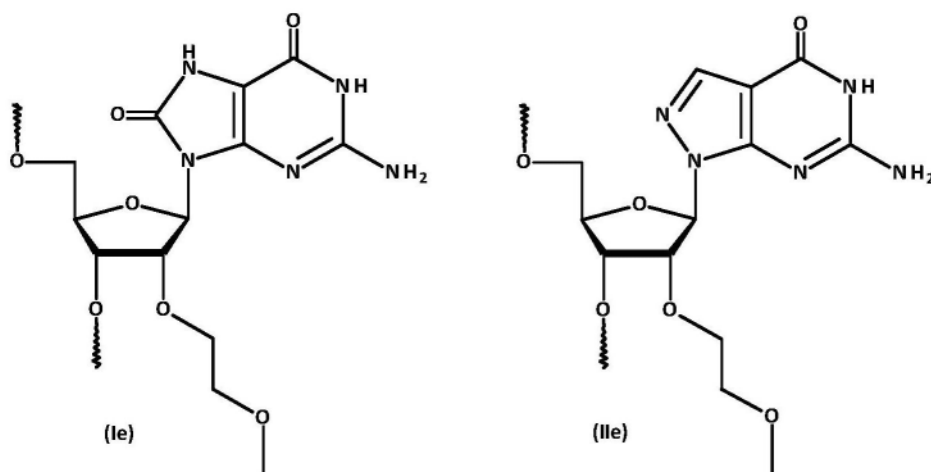
(IIc)



(Id)



(IIId)



11. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(Ia)。
12. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(Ia1)。
13. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(Ia2)。
14. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(Ib)。
15. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(IIa)。
16. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(IIa1)。
17. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(IIa2)。
18. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(IIb)。
19. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(Ic)。
20. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(IIc)。
21. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(Id)。
22. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(IId)。
23. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(Ie)。
24. 根据权利要求10所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物为(IIe)。
25. 根据权利要求2至3或6至20中任一项所述的多核苷酸,其中所述反义寡核苷酸为gapmer。
26. 根据权利要求2至3或6至21中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含至少一个具有经修饰的核糖的额外核苷,并且其中核糖修饰选自锁核酸或2'修饰组成的组。
27. 根据权利要求25至26中任一项所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物在所述gapmer的缺口区域中并且具有式Ia或式IIb,并且其中R为H。
28. 根据权利要求25至27中任一项所述的多核苷酸,其中所述鸟苷类似物不在所述gapmer的侧翼中。
29. 根据权利要求1至20中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含一个根据权利要求1至28中任一项所述的鸟苷类似物。
30. 根据权利要求1至29中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含两个根据权利要求1至24中任一项所述的鸟苷类似物。
31. 根据权利要求1至30中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含三个根据权利要求1至24中任一项所述的鸟苷类似物。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的多核苷酸, 其中所述多核苷酸不包含天然鸟苷。

33. 根据权利要求1至28中任一项所述的多核苷酸, 其中所述多核苷酸选自以下项组成的组:

CTCAacttg<sup>oxo</sup>ctttaAT (SEQ ID No.4);  
CTCAacttg<sup>N</sup>ctttaAT (SEQ ID No.5);  
CTCAacttg<sup>PPG</sup>ctttaAT (SEQ ID No.6);  
CTAcatctcactTgC (SEQ ID No.9);  
CTAcatctcactTg<sup>PPG</sup>C (SEQ ID No.10);  
CTAcatctcactTg<sup>oxo</sup>C (SEQ ID No.11);  
CTAcatctcactTg<sup>N</sup>C (SEQ ID No.13);  
ACAg<sup>oxo</sup>g<sup>oxo</sup>attag<sup>oxo</sup>ttCTA (SEQ ID No.15); 以及  
ACAg<sup>PPG</sup>g<sup>PPG</sup>attag<sup>PPG</sup>ttCTA (SEQ ID No.16);

其中这些序列中的大写字母表示具有LNA修饰的核糖的核苷, 所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶, 并且这些序列中的小写字母表示DNA,

g<sup>PPG</sup>为7-脱氮-8-氮杂-脱氧鸟苷,

g<sup>N</sup>为8-氨基-dG, 并且

g<sup>oxo</sup>为8-氧代-脱氧鸟苷。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的多核苷酸, 其用作药物。

35. 根据权利要求34所述的多核苷酸, 其中用于向中枢神经系统施用, 或用于治疗神经系统疾病, 诸如选自以下项组成的组的CNS疾病: 肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (ALS)、Angelman病、阿尔茨海默病、动脉瘤、背痛、贝尔麻痹、先天性脑和脊髓缺陷、脑损伤、脑肿瘤、脑瘫、慢性疲劳综合征、脑震荡、痴呆、颈部和下背部椎间盘疾病、头晕、癫痫、格林-巴利综合征、头痛和偏头痛、多发性硬化症、肌萎缩、神经痛、神经病、神经肌肉疾病和相关疾病、帕金森病、精神病况 (严重抑郁症、强迫症)、脊柱侧凸、惊厥发作、脊髓损伤、脊柱畸形和疾病、脊柱肿瘤、卒中以及眩晕。

36. 根据权利要求35所述的多核苷酸, 其中所述多核苷酸用于经由鞘内注射来施用。

37. 根据权利要求1至34中任一项所述的多核苷酸, 其用作药物以治疗其中调节Ube3A是有益的医学病况, 诸如用于治疗Angelman病。

38. 根据权利要求1至34中任一项所述的多核苷酸, 其用作药物以治疗其中调节ATXN2是有益的医学病况。

39. 根据权利要求1至34中任一项所述的多核苷酸, 其用作药物以治疗其中调节ATXN3是有益的医学病况。

40. 根据权利要求1至38中任一项所述的多核苷酸, 其中所述多核苷酸用作其中需要降低的神经毒性的药物。

41. 一种用于合成具有降低的毒性的根据权利要求1至34中任一项所述的多核苷酸的方法, 所述方法包括将核苷酸单体诸如亚磷酰胺偶联到另一核苷酸或寡核苷酸, 其中所述核苷酸单体包含如权利要求1至24中任一项中所定义的鸟苷类似物。

42. 一种用于选择与参考多核苷酸选择相比具有降低的毒性的多核苷酸的方法, 其中

所述多核苷酸是根据权利要求1至24中任一项的,并且其中所述参考多核苷酸和神经毒性较小的反义寡核苷酸具有相同的核苷酸序列并且包含至少一个鸟苷,区别在于,与所述参考多核苷酸相比,神经毒性较小的多核苷酸包含至少一个鸟苷类似物。

43. 含有鸟苷类似物的化合物在制造多核苷酸中的用途,所述鸟苷类似物选自由以下项组成的组:(Ia)、(Ib)、(Ic)、(Id)、(Ie)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)和(IIe)。

44. 一种用于在表达Ube3a-ATS的靶细胞中上调Ube3a表达的方法,所述方法包括以有效量向所述细胞施用靶向Ube3a-ATS的根据权利要求1至24中任一项所述的多核苷酸。

45. 根据权利要求38所述的方法,其中所述方法为体内方法或体外方法。

46. 一种用于治疗或预防患有或可能患有神经系统疾病的受试者诸如人的神经系统疾病的方法,所述方法包括施用治疗或预防有效量的根据权利要求1至24中任一项所述的多核苷酸,诸如以预防或减轻神经系统疾病。

## 用于治疗性多核苷酸的鸟苷类似物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用作药物活性成分的多核苷酸,诸如反义寡核苷酸或siRNA或shRNA。更详细地,本发明涉及用于此类多核苷酸中的鸟苷类似物。

### 背景技术

[0002] 目前,人们对开发用于治疗神经系统疾病的多核苷酸诸如反义寡核苷酸(ASO)或siRNA治疗剂具有相当大的兴趣。此类多核苷酸可以例如通过鞘内施用来施用。然而,新的多核苷酸治疗剂的发现受到了在动物研究中发现很大比例的多核苷酸会引发神经毒性的阻碍(例如参见W02016/126995)。施用一些多核苷酸的小鼠在施用后30分钟至1小时内显示出急性神经毒性迹象,这表明毒性不太可能是由杂交事件引起的。

[0003] W02016/127000报告了一种使用钙振荡测定来鉴别可能在体内引发急性神经毒性的核酸分子诸如反义寡核苷酸的用途,以及用于通过计算胞嘧啶核苷酸或其类似物的数目减去鸟苷核苷酸或其类似物的数目,除以多核苷酸的总长度来选择具有可耐受体内神经毒性的多核苷酸的方法。

[0004] Seela等人,Chim.Acta 1988,71,1191-1198描述了使用6-氯-7-脱氮嘌呤以及7-脱氮-6-(甲硫基)嘌呤)作为吡咯并[2,3-d]嘧啶糖基化的通用候选物。

[0005] Seela,F.,Becher,G.,Chemical Communications(1998), (18),2017-2018描述了将7-卤代7-脱氮嘌呤(吡咯并-[2,3-d]嘧啶A)引入寡核苷酸。这种引入到DNA中的目的似乎是作为报告基团、裂解剂或残基,可用于通过质谱或原子力显微镜进行测序。Kutyavin等人,NAR 2002,第30卷,第4952-4959页公开了8-氮杂-7-脱氮鸟嘌呤(吡唑并[3,4-d]嘧啶,PPG)减少富含鸟嘌呤的寡脱氧核糖核苷酸的鸟嘌呤自缔合,并且PPG取代鸟嘌呤增强富含鸟嘌呤的DNA探针的亲合力、特异性、敏感性和可预测性。

[0006] Hara等人,J Org Chem对于LNA-7-脱氮鸟嘌呤和LNA-8-氮杂-7-脱氮鸟嘌呤修饰的磷酸二酯寡核苷酸进行了报告,发现其具有低于天然DNA的结合亲和力,并且即使在富含鸟嘌呤的序列中,LNA-7-脱氮鸟嘌呤也能有效抑制聚集。

[0007] 这一对文献的简要回顾表明,在解决某些多核苷酸被施用于中枢神经系统时所观察到的神经毒性问题方面,文献仍然非常缺乏。

[0008] 发明目的

[0009] 本发明人惊讶地发现,多核苷酸序列内天然(即未修饰)的鸟苷核碱基的比例与多核苷酸(诸如反义寡核苷酸或siRNA)具有神经毒性的可能性直接相关。本发明提供了用于治疗性寡核苷酸中的鸟苷类似物,从而提供降低的神经毒性。

### 发明内容

[0010] 本发明基于以下发现:多核苷酸序列内天然(即未修饰)的鸟苷(G)核碱基的比例与多核苷酸(诸如反义寡核苷酸或siRNA)具有神经毒性的可能性直接相关。由于已将未修饰的G核碱基鉴别为神经毒性的触发因素,本发明人已筛选了许多G类似物,并且鉴别了某

些G类似物,这些类似物在用于代替未修饰的G时,可降低或减轻多核苷酸的神经毒性,这一点通过降低硫代磷酸酯多核苷酸(诸如反义寡核苷酸或siRNA)的神经毒性来说明。特别地,本发明人已确定,在硫代磷酸酯反义寡核苷酸或siRNA中用未修饰的G核碱基取代8-氮杂-7-脱氮鸟嘌呤(PPG)或8-氧代-脱氧鸟苷(8-氧代-dG)碱基会减轻体内神经毒性以及在体外神经毒性测定中也如此。

[0011] 此外,本发明人已确定,虽然将PPG碱基并入多核苷酸可以降低多核苷酸的结合亲和力;但这高度依赖于所并入的PPG碱基的序列背景。本发明人已使用这一观察结果来鉴别与维持的有效结合亲和力相关的短双链体和三链体基序。替代地,结合亲和力可以通过例如将其他高亲和力核苷诸如LNA并入寡核苷酸中来补偿。

[0012] 序列表

[0013] 与本申请一起提交的序列表通过引用并入本文。序列表中列出的反义寡核苷酸序列基序示出为DNA序列。

[0014] 图

[0015] 图1是显示在根据实例3的研究中使用鸟嘌呤类似物拯救急性神经毒性的图。

[0016] 定义

[0017] 寡核苷酸

[0018] 如本文所用,术语“寡核苷酸”定义为如技术人员通常理解的包含两个或以上共价联接的核苷的分子。这样的共价结合的核苷也可以称为核酸分子或寡聚物。寡核苷酸通常是在实验室中制作,先经固相化学合成后再加以纯化和分离。当提及寡核苷酸的序列时,提及的是共价联接的核苷酸或核苷的核碱基部分或其修饰的序列或顺序。本发明的寡核苷酸是人造的,并且是化学合成的,并且通常是纯化或分离的。本发明的寡核苷酸可包含一个或多个修饰的核苷,诸如2'糖修饰的核苷。本发明的寡核苷酸可包含一个或多个修饰的核苷间键,诸如一个或多个硫代磷酸酯核苷间键。

[0019] 反义寡核苷酸

[0020] 如本文所用,术语“反义寡核苷酸”定义为能够通过靶核酸特别是与靶核酸上的连续序列杂交来调节靶基因表达的寡核苷酸。反义寡核苷酸基本上不是双链的,因此不是siRNA或shRNA。优选地,本发明的反义寡核苷酸是单链的。应理解的是,只要序列内或序列间自身互补的程度低于跨寡核苷酸全长的50%,本发明的单链寡核苷酸便可形成发夹或分子间双链体结构(同一寡核苷酸的两个分子之间的双链体)。

[0021] 在一些实施例中,本发明的单链反义寡核苷酸可不含未修饰的RNA核苷。

[0022] 有利的是,本发明的反义寡核苷酸包含一个或多个经修饰的核苷或核苷酸,诸如2'糖修饰的核苷。此外,优选的是未修饰的核苷是DNA核苷。

[0023] 连续核苷酸序列

[0024] 术语“连续核苷酸序列”是指与靶核酸互补的反义寡核苷酸的区域。该术语在本文中与术语“连续核碱基序列”和术语“寡核苷酸基序序列”互换地使用。在一些实施例中,寡核苷酸的所有核苷构成连续核苷酸序列。在一些实施例中,寡核苷酸包含连续核苷酸序列,诸如F-G-F' gapmer区域,并且可任选地包含其他核苷酸,例如可用于将官能团(例如缀合物基团)连接至连续核苷酸序列的核苷酸接头区域。核苷酸接头区域可以与靶核酸互补或可以不互补。在一些实施例中,反义寡核苷酸的核碱基序列是连续核苷酸序列。

[0025] 核苷酸和核苷

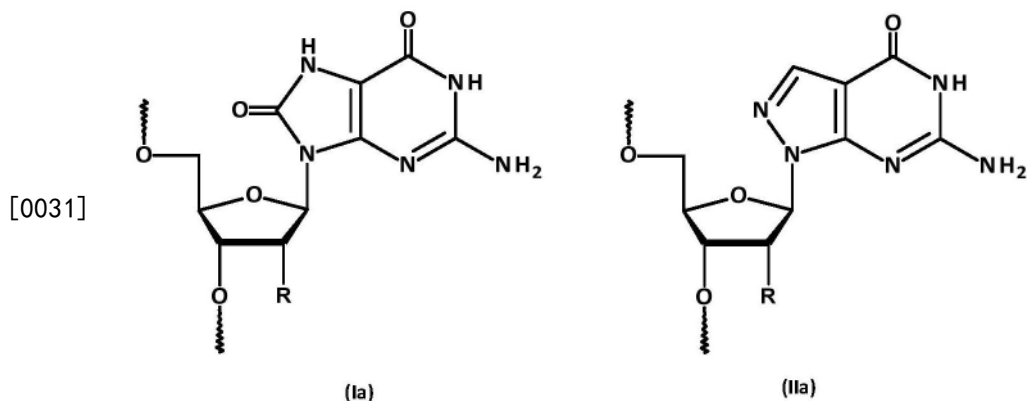
[0026] 核苷酸和核苷是寡核苷酸和多核苷酸的组成部分,并且出于本发明的目的,包括天然存在的和非天然存在的核苷酸和核苷。实际上,核苷酸诸如DNA和RNA核苷酸包括核糖糖部分、核碱基部分和一个或多个磷酸酯基团(它们在核苷中不存在)。核苷和核苷酸也可以可互换地称为“单元”或“单体”。

[0027] 修饰的核苷

[0028] 如本文所用,术语“经修饰的核苷”或“核苷修饰”是指与同等的DNA或RNA核苷相比,通过引入糖部分或(核)碱基部分的一种或多种修饰而被修饰的核苷。有利地,本发明的反义寡核苷酸的一种或多种修饰的核苷包含修饰的糖部分。术语“修饰的核苷”在本文中还可与术语“核苷类似物”或修饰的“单元”或修饰的“单体”互换使用。具有未修饰的DNA或RNA糖部分的核苷在本文中称为DNA或RNA核苷。如果允许Watson Crick碱基配对,则DNA或RNA核苷的碱基区域中修饰的核苷通常仍称为DNA或RNA。

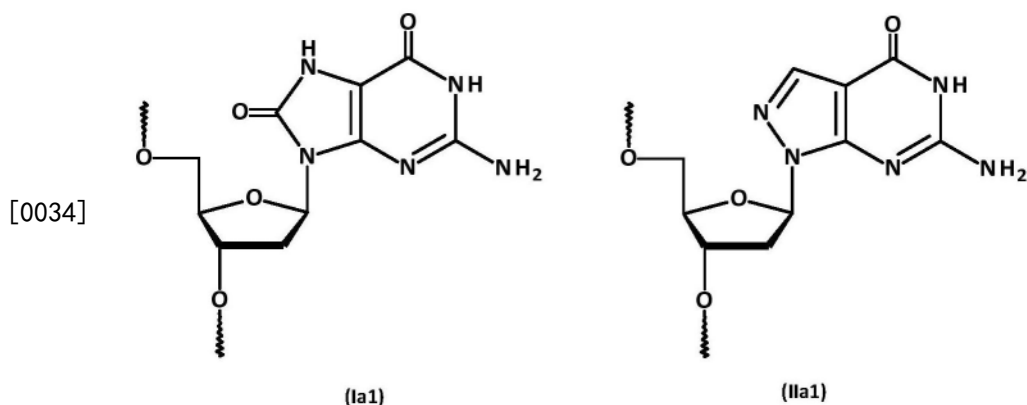
[0029] 鸟苷类似物

[0030] 如本文所用,术语“鸟嘌呤类似物”或“G类似物”是指含有下式的核碱基8-氧代-鸟嘌呤(8-氧代-G)和/或7-脱氮-8-氮杂-鸟嘌呤(PPG)的核苷或核苷酸:



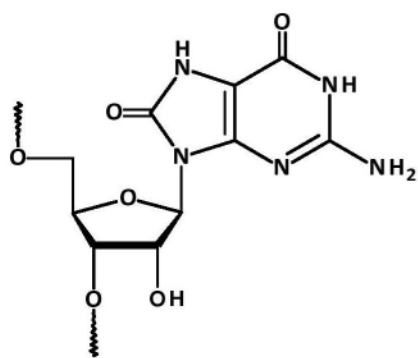
[0032] 其中R为H或OH

[0033] 8-氧代-脱氧鸟苷(8-氧代-dG)和/或7-脱氮-8-氮杂-脱氧鸟苷(PPG)也可以更详细地表示为:

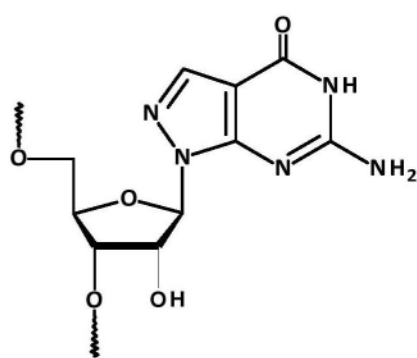


[0035] 或者

[0036]

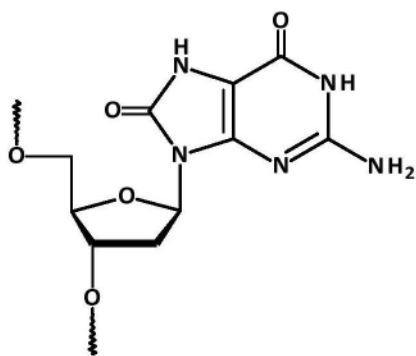


(Ia2)

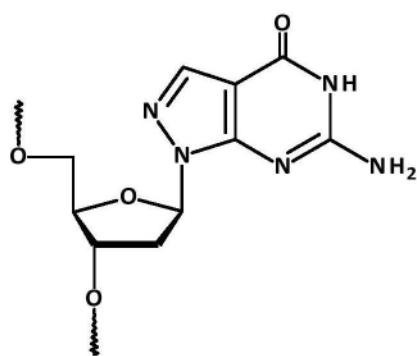


(IIa2)

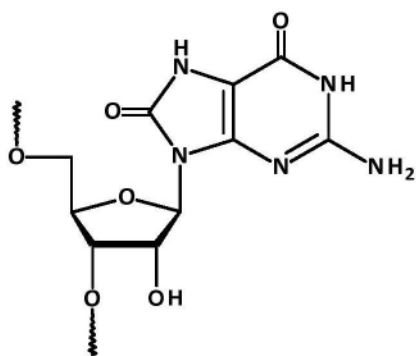
[0037] 应当理解,这也涵盖包含糖修饰的鸟苷类似物,诸如以下部分:



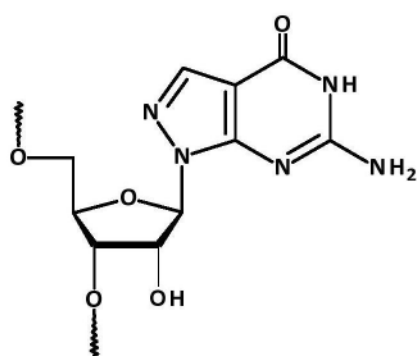
(Ia1)



(IIa1)

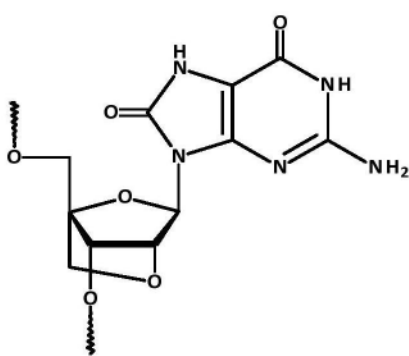


(Ia2)

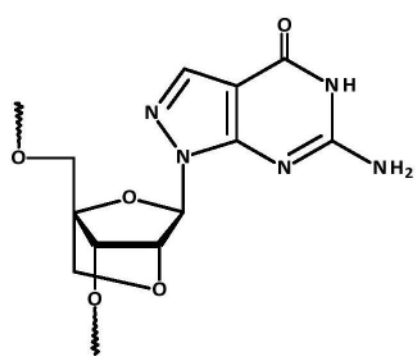


(IIa2)

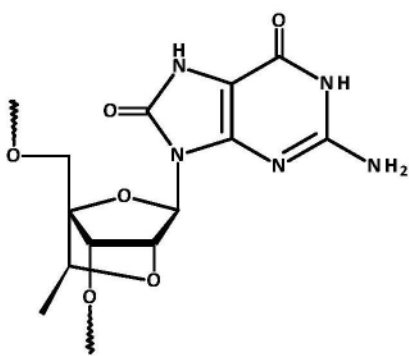
[0038]



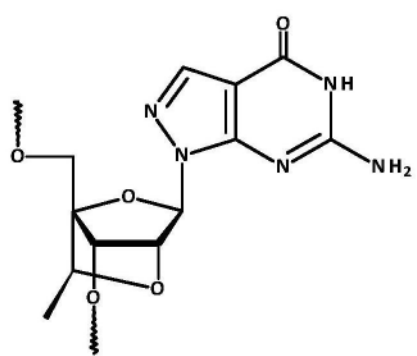
(Ib)



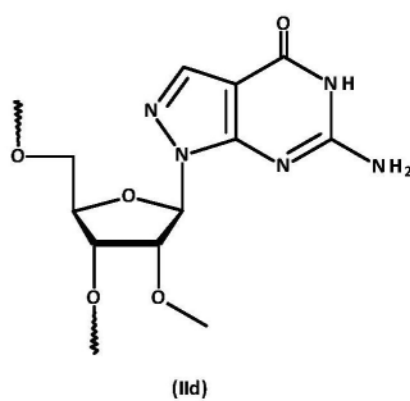
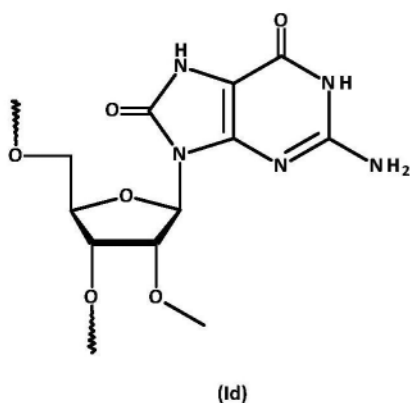
(IIb)



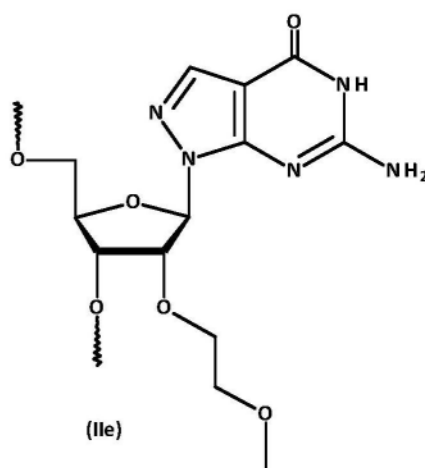
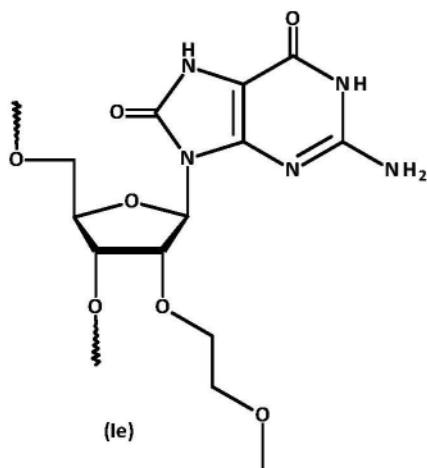
(Ic)



(IIc)



[0039]



[0040] 可以使用可从Glen Research (Sterling, VA) 商购的亚磷酰胺来获得部分 (Ia) 和 (IIa)。

[0041] 部分 (IIb) 和 (IIc) 可以按照Hara等人于J.Org.Chem.2017,82,25-36中和Blade等人于J.Org.Chem.2015,80,5337-5343中描述的合成路径获得。

[0042] 部分 (Ib)、(Ic)、(Id) 和 (Ie) 可以从相应的鸟苷核苷获得,如Kannan等人于J.Org.Chem.2011,76,720-723中所描述。

[0043] 部分 (IId) 和 (IIe) 可以从相应的戊呋喃糖基氯中间体获得,如Seela等人于Nucleosides&Nucleotides (1989),8 (5-6),789-792和Seela等人于Helvetica Chimica Acta (1986),69 (7),1602-1613中所描述。

[0044] 修饰的核苷间键

[0045] 如技术人员通常所理解的,术语“经修饰的核苷间键”定义为除磷酸二酯 (PO) 键以外的键,其将两个核苷共价偶联在一起。本发明的寡核苷酸因此可包含一个或多个修饰的核苷间键,诸如一个或多个硫代磷酸酯核苷间键,或一个或多个二硫代磷酸酯核苷间键。

[0046] 在一些实施例中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列中至少50%的核苷间键是硫代磷酸酯,寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的诸如至少60%、诸如至少70%、诸如至少75%、诸如至少80%或诸如至少90%的核苷间键是硫代磷酸酯。在一些实施例中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列的全部核苷间键均为硫代磷酸酯。

[0047] 在一些有利实施例中,寡核苷酸的连续核苷酸序列的所有核苷间键均为硫代磷酸酯,或寡核苷酸的所有核苷间键均为硫代磷酸酯键。

[0048] 应当认识到,如EP 2 742 135中所公开的,反义寡核苷酸可包含其他核苷间键(除

磷酸二酯、硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯以外),例如烷基膦酸酯/甲基膦酸酯核苷间,其根据 EP 2 742 135可以例如以其他方式被DNA硫代磷酸酯的间隔区域中所耐受。

#### [0049] 核碱基

[0050] 术语“核碱基”包括存在于核苷和核苷酸中的嘌呤(例如腺嘌呤和鸟嘌呤)和嘧啶(例如尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶)部分,其在核酸杂交中形成氢键。在本发明的背景中,术语“核碱基”也涵盖经修饰的核碱基,其可以不同于天然存在的核碱基,但是在核酸杂交期间起作用。在此背景中,“核碱基”是指天然存在的核碱基,例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、黄嘌呤和次黄嘌呤,以及非天然存在的变体。此类变体例如描述于Hirao等人(2012)Accounts of Chemical Research第45卷第2055页和Bergstrom(2009)Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl.37 1.4.1中。

[0051] 在一些实施例中,通过以下方式修饰核碱基部分:将嘌呤或嘧啶改变为修饰的嘌呤或嘧啶,诸如取代的嘌呤或取代的嘧啶,诸如选自异胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-噻唑并-胞嘧啶、5-丙炔基-胞嘧啶、5-丙炔基-尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-噻唑并-尿嘧啶、2-硫代-尿嘧啶、2'-硫代-胸腺嘧啶、肌苷、二氨基嘌呤、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤和2-氯-6-氨基嘌呤的核碱基。

[0052] 核碱基部分可由每个相应核碱基的字母代码来表示,例如A、T、G、C或U,其中每个字母可任选地包括具有同等功能的修饰的核碱基。例如,在示例性的寡核苷酸中,核碱基部分选自A、T、G、C和5-甲基胞嘧啶。任选地,对于LNA gapmer,可以使用5-甲基胞嘧啶LNA核苷。

#### [0053] 修饰的寡核苷酸

[0054] 术语“修饰的寡核苷酸”描述了一种寡核苷酸,其包含一个或多个糖修饰的核苷和/或修饰的核苷间键。术语“嵌合”寡核苷酸是已在文献中用于描述包含修饰的核苷和DNA核苷的寡核苷酸的术语。本发明的反义寡核苷酸优选地是嵌合寡核苷酸。

#### [0055] 互补性

[0056] 术语“互补性”描述了核苷/核苷酸的Watson-Crick碱基配对的能力。Watson-Crick碱基对是鸟嘌呤(G)-胞嘧啶(C)和腺嘌呤(A)-胸腺嘧啶(T)/尿嘧啶(U)。应当理解,寡核苷酸可包含具有修饰的核碱基的核苷,例如经常使用5-甲基胞嘧啶代替胞嘧啶、如本文所描述的鸟苷类似物,并且因此,术语互补性涵盖未修饰的核碱基和修饰的核碱基之间的沃森克里克碱基配对(参见例如Hirao等人(2012)Accounts of Chemical Research第45卷第2055页和Bergstrom(2009)Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry增刊37 1.4.1)。

[0057] 如本文所用,术语“互补性百分比”是指核酸分子(例如寡核苷酸)中连续核苷酸序列的与参考序列(例如靶序列或序列基序)互补的核苷酸的比例(以百分比表示),该核酸分子跨连续核苷酸序列。因此,通过计数两个序列之间(当与靶序列5'-3'和3'-5'的寡核苷酸序列比对时)互补(形成Watson Crick碱基对)的对准的核碱基数,将其除以寡核苷酸中核苷酸的总数,然后乘以100,来计算互补性的百分比。在这种比较中,未对齐(形成碱基对)的核碱基/核苷酸被称为错配。在计算连续核苷酸序列的互补性百分比时,不允许插入和删除。应当理解,在确定互补性时,只要保留了形成沃森克里克碱基配对的核碱基的功能能力,就不考虑核碱基的化学修饰(例如,为了计算同一性百分比时,认为5'-甲基胞嘧啶和如

本文所描述的鸟苷类似物分别与胞嘧啶和鸟苷相同)。

[0058] 术语“完全互补”是指100%的互补性。

[0059] 同一性

[0060] 如本文所用,术语“同一性”是指核酸分子(例如寡核苷酸)中连续核苷酸序列的与参考序列(例如序列基序)相同的核苷酸比例(以百分比表示),该核酸分子跨连续核苷酸序列。因此,通过计数两个序列(在本发明的化合物的连续核苷酸序列中和在参考序列中)相同(匹配)的对准核碱基数,将该数除以寡核苷酸的核苷酸总数再乘以100,来计算同一性百分比。因此,同一性百分比 = (匹配数 × 100) / 比对区域的长度(例如,连续核苷酸序列)。在计算连续核苷酸序列的同一性百分比时,不允许插入和删除。应当理解,在确定同一性时,只要保留了形成Watson Crick碱基配对的核碱基的功能能力,就不考虑核碱基的化学修饰(例如,在计算同一性百分比时,认为5-甲基胞嘧啶与胞嘧啶相同)。

[0061] 杂交

[0062] 如本文所用,术语“杂交”(hybridizing/hybridizes)应当理解为两条核酸链(例如寡核苷酸和靶核酸)在相反链上的碱基对之间形成氢键,从而形成双链体。两条核酸链之间结合的亲和力是杂交的强度。通常用解链温度( $T_m$ )来描述,其定义为一半寡核苷酸与靶核酸形成双链体的温度。在生理条件下, $T_m$ 并非确实与亲和力严格成比例(Mergny与Lacroix,2003年,Oligonucleotides 13:515-537)。标准状态Gibbs自由能 $\Delta G^\circ$ 是结合亲和力的更精确的表述并且与反应的解离常数( $K_d$ )通过 $\Delta G^\circ = -RT \ln(K_d)$ 相关,其中R是气体常数并且T是绝对温度。因此,寡核苷酸与靶核酸之间反应的非常低的 $\Delta G^\circ$ 反映了寡核苷酸和靶核酸之间强力杂交。 $\Delta G^\circ$ 是与其中水浓度为1M、pH为7并且温度为37°C的反应相关的能量。寡核苷酸与靶核酸杂交是自发反应,并且对于自发反应, $\Delta G^\circ$ 小于零。 $\Delta G^\circ$ 可实验上测量,例如,可利用如Hansen等人,1965,Chem.Comm.36-38及Holdgate等人2005年在Drug Discov Today中所描述的等温滴定量热(ITC)法测量。本领域的技术人员将知道商业设备可用于测量 $\Delta G^\circ$ 。也可以通过使用如SantaLucia,1998,Proc Natl Acad Sci USA.95:1460-1465所述的最近相邻模型,适当使用Sugimoto等人,1995,Biochemistry 34:11211-11216和McTigue等人,2004,Biochemistry 43:5388-5405描述的推导的热力学参数在数值上估计 $\Delta G^\circ$ 。为了具有通过杂交调节其预期的核酸靶标的可能性,对于长度为10-30个核苷酸的寡核苷酸,本发明的寡核苷酸以低于-10kcal的 $\Delta G^\circ$ 估值与靶核酸杂交。在一些实施例中,杂交的程度或强度通过标准状态Gibbs自由能 $\Delta G^\circ$ 测量。对于长度为8-30个核苷酸的寡核苷酸,寡核苷酸可与靶核酸以低于-10kcal,诸如低于-15kcal、诸如低于-20kcal和诸如低于-25kcal的 $\Delta G^\circ$ 估值杂交。在一些实施例中,寡核苷酸以-10至-60kcal,诸如-12至-40、诸如-15至-30kcal或-16至-27kcal,诸如-18至-25kcal的 $\Delta G^\circ$ 估值与靶核酸杂交。

[0063] 靶核酸

[0064] 根据本发明,靶核酸可以是编码人基因的核酸、RNA、mRNA和前体mRNA、成熟mRNA或cDNA序列。如果在研究或诊断中采用本发明的寡核苷酸,则靶核酸可以是cDNA或衍生自DNA或RNA的合成核酸。

[0065] 靶序列

[0066] 本文所用的术语“靶序列”意指存在于靶核酸中的核苷酸的序列,其包含与本发明的反义寡核苷酸为互补的核碱基序列。在一些实施例中,靶序列由靶核酸上具有与本发明

反义寡核苷酸的连续核苷酸序列互补的核碱基序列的区域组成。靶核酸的这一区域可以互换地称为靶标核苷酸序列、靶序列或靶标区域。在一些实施例中，靶序列比单个寡核苷酸的互补序列更长，并且可以例如代表靶核酸的优选区域，其可以被本发明的几种反义寡核苷酸靶向。

[0067] 在一些实施例中，本发明的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列与靶序列互补，诸如完全互补。

[0068] 本发明的反义寡核苷酸包含与靶核酸（诸如本文所述的靶序列）互补和杂交的连续核苷酸序列。

[0069] 与反义寡核苷酸互补的靶序列通常包含至少10个核苷酸的连续核碱基序列。该连续核苷酸序列的长度介于10至30个核苷酸，诸如12至30个、诸如14至20个、诸如长度为15至18个连续核苷酸、诸如长度为15、16、17个连续核苷酸。

[0070] 在一些实施例中，本发明的反义寡核苷酸在跨反义寡核苷酸的全长上与靶序列完全互补。

[0071] 靶细胞

[0072] 本文所用的术语“靶细胞”是指正在表达靶核酸的细胞。在一些实施例中，靶细胞可以是体内或体外的。在一些实施例中，靶细胞是哺乳动物细胞，诸如啮齿动物细胞，诸如小鼠细胞或大鼠细胞，或灵长类动物细胞，诸如猴细胞或人细胞。

[0073] 通常，靶细胞表达靶标mRNA，诸如靶标前体mRNA或靶标成熟mRNA。对于实验评估，可以使用表达包含靶序列的核酸的靶细胞。

[0074] 本发明的反义寡核苷酸通常能够在表达靶核酸的细胞（靶细胞）中抑制靶核酸的表达，例如体内或体外。

[0075] 本发明的反义寡核苷酸的核碱基的连续序列如在整个反义寡核苷酸的长度上所测量与靶核酸互补，诸如完全互补，任选地排除可以将反义寡核苷酸连接至诸如缀合物的任选官能基团或其他非互补末端核苷酸的基于核苷的接头区域（例如区域D'或D''）。靶核酸可以例如是编码给定蛋白的信使RNA，诸如成熟的mRNA或前体mRNA。

[0076] 自然产生变体

[0077] 术语“天然存在的变体（naturally occurring variant）”是指与靶核酸源自相同基因座但可有差异的基因或转录物的变体，所述差异可例如是出于遗传密码的简并性造成多重密码子编码同一个氨基酸，或因前体mRNA的可变剪接，或多态性的存在，诸如单核苷酸多态性（SNP），以及等位基因变体。基于与寡核苷酸足够互补序列的存在，本发明的寡核苷酸因此可以靶向靶核酸及其天然存在的变体。

[0078] 在一些实施例中，天然存在的变体与哺乳动物靶核酸具有至少95%，诸如至少98%或至少99%的同源性。

[0079] 表达的抑制

[0080] 如本文所用，术语“表达的抑制”应理解为，寡核苷酸抑制靶细胞中既定蛋白的数量或活性的能力的总称。活性的抑制可以通过测量靶标前体mRNA或靶标mRNA的水平，或通过测量细胞中靶标基因或靶标活基因性的水平来确定。因此，可以在体外或体内确定表达的抑制。靶标表达的抑制也可以通过测量活性或蛋白质水平来确定。

[0081] 通常，通过比较由于向靶细胞施用有效量的反义寡核苷酸而导致的对活性的抑制

并将该水平与从未施用反义寡核苷酸的靶细胞(对照实验)获得的参考水平或已知的参考水平(例如,在施用有效量的反义寡核苷酸之前的表达的水平,或预先确定的或以其他方式已知的表达水平)进行比较来确定表达的抑制。

[0082] 例如,对照实验可以是动物或人,或用盐水组合物或参考寡核苷酸(通常是乱序对照)处理的靶细胞。

[0083] 术语抑制(名词)或抑制(动词)也可称为下调、降低、抑制、减少、减低给定基因A的表达。

[0084] 表达的抑制可能例如通过降解前体mRNA或mRNA(例如,使用RNA酶H募集寡核苷酸,例如gapmer)发生。

[0085] 高亲和力修饰的核苷

[0086] 高亲和力修饰的核苷是一种经修饰的核苷,当并入反义寡核苷酸中时,可增强反义寡核苷酸对其互补靶的亲和力,例如以解链温度( $T_m$ )所测定的。本发明的高亲和力修饰的核苷优选地使每一经修饰的核苷的解链温度增加介于 $+0.5^{\circ}\text{C}$ 至 $+12^{\circ}\text{C}$ 之间,更优选地是介于 $+1.5^{\circ}\text{C}$ 至 $+10^{\circ}\text{C}$ 之间,最优选地是介于 $+3^{\circ}\text{C}$ 至 $+8^{\circ}\text{C}$ 之间。许多高亲和力修饰的核苷是本领域已知的,并且包括例如许多2'取代的核苷以及锁定的核酸(LNA)(参见例如Freier&Altmann;Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443和Uhlmann;Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3 (2), 293-213)。

[0087] 糖修饰

[0088] 与DNA和RNA中发现的核糖部分相比时,本发明的反义寡核苷酸可包含一种或多种具有经修饰的糖部分(即糖部分的修饰)的核苷。

[0089] 已经制备了许多具有核糖部分的修饰的核苷,主要目的是改善寡核苷酸的某些性质,诸如亲和力和/或核酸酶抗性。在本发明的一些实施例中,术语“糖修饰”是指“核糖修饰”或“修饰的核糖”或“核糖的修饰”。

[0090] 此类修饰包括其中核糖环结构如下被修饰的那些:例如通过用己糖环(HNA)或通常在核糖环上的C2和C4碳之间具有双基桥的双环(LNA)或通常在C2和C3碳之间缺乏键的未连接的核糖环(例如UNA)替换。其他糖修饰的核苷包括,例如,双环己糖核酸(WO2011/017521)或三环核酸(WO2013/154798)。经修饰的核苷还包括其中糖部分被替换为非糖部分的核苷,例如在肽核酸(PNA)或吗啉代核酸的情况下。

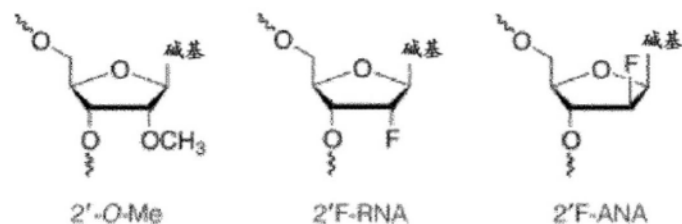
[0091] 糖修饰还包括通过将核糖环上的取代基更改为氢以外的基团或天然存在于DNA和RNA核苷中的2'-OH基团所做出的修饰。例如,可以在2'、3'、4'或5'位置引入取代基。

[0092] 2'糖修饰的核苷

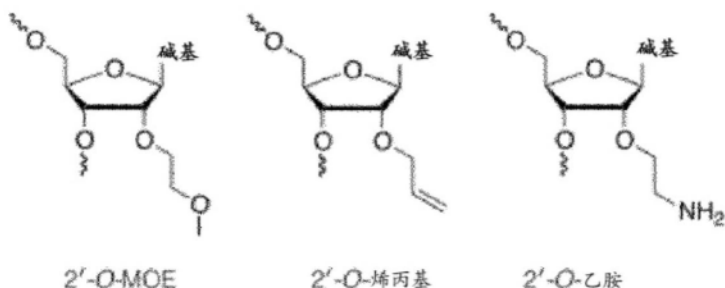
[0093] 2'糖修饰的核苷(也称为2'糖修饰)是一个核苷,其在2'位置具有除H或-OH以外的取代基(2'取代的核苷)或包含能够在2'碳与核糖环中的第二个碳之间形成桥的2'连接双基,诸如LNA(2'-4'双基桥连)核苷。

[0094] 事实上,人们已花费很多精力开发2'糖取代的核苷,并且发现许多2'取代的核苷掺入反义寡核苷酸后具有有益的特性。例如,2'修饰的糖可以提供增强的结合亲和力和/或增加的对反义寡核苷酸的核酸酶抗性。2'取代的核苷的实例是2'-O-烷基-RNA/DNA、2'-O-甲基-RNA/DNA、2'-烷氧基-RNA/DNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA/DNA(MOE)、2'-氨基-DNA、2'-氟-RNA/DNA和2'-F-ANA核苷。有关进一步的实例,请参见例如Freier&Altmann;Nucl. Acid

Res., 1997, 25, 4429-4443 和 Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3 (2), 293-213 以及 Deleavey 和 Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937。下面是一些 2' 取代的修饰的核苷的示意图。



[0095]



[0096] 关于本发明, 2' 取代的糖修饰的核苷不包括像 LNA 那样的 2' 桥连的核苷。

[0097] 锁定的核酸核苷 (LNA 核苷)

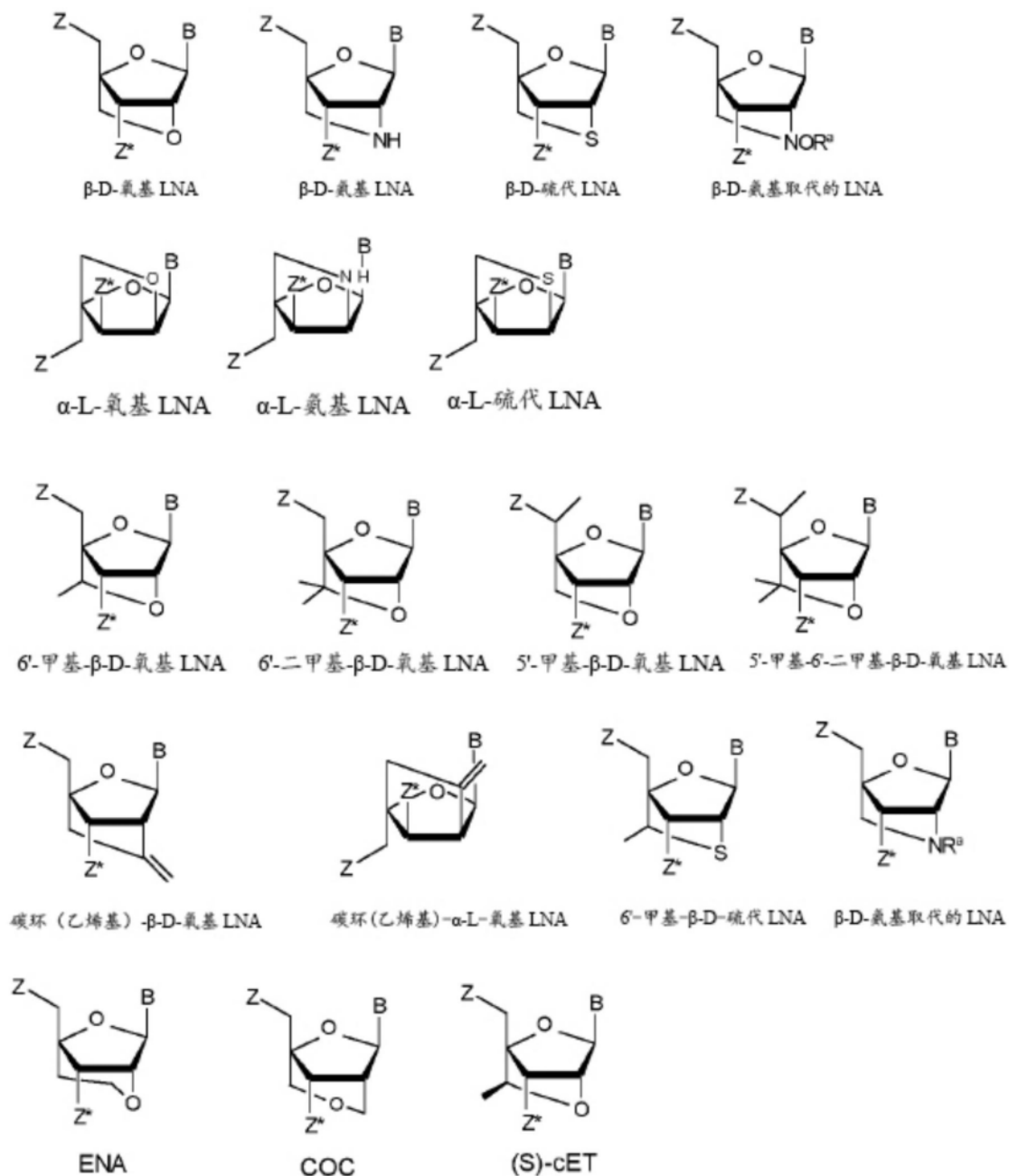
[0098] “LNA 核苷”是一种 2'-修饰的核苷, 其包含连接所述核苷的核糖环的 C2' 和 C4' 的双基 (也称为“2'-4' 桥”), 其限制或锁定核糖环的构象。这些核苷在文献中也称为桥连核酸或双环核酸 (BNA)。当将 LNA 掺入互补 RNA 或 DNA 分子的反义寡核苷酸中时, 核糖构象的锁定与杂交的增强亲和力 (双链体稳定化) 有关。这可通过测量反义寡核苷酸/互补双链体的解链温度来常规确定。

[0099] 非限制性的示例性 LNA 核苷公开于 WO 99/014226、WO 00/66604、WO98/039352、WO 2004/046160、WO 00/047599、WO 2007/134181、WO2010/077578、WO 2010/036698、WO 2007/090071、WO 2009/006478、WO2011/156202、WO 2008/154401、WO 2009/067647、WO 2008/150729、Morita 等人 Bioorganic & Med. Chem. Lett. 12, 73-76, Seth et al. J. Org. Chem. 2010, Vol 75 (5) pp. 1569-81 和 Mitsuoka et al., Nucleic Acids Research 2009, 37 (4), 1225-1238 以及 Wan 和 Seth, J. Medical Chemistry 2016, 59, 9645-9667 中。

[0100] 其他非限制性的示例性 LNA 核苷公开于方案 1 中。

[0101] 方案 1

[0102]

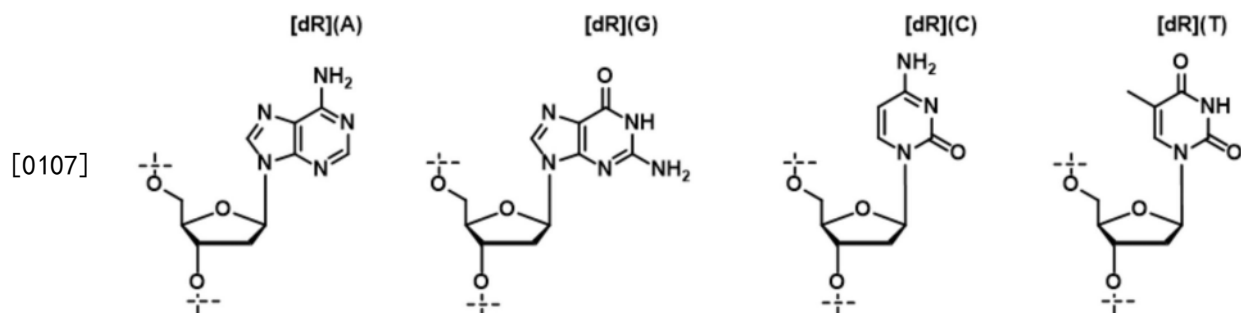


[0103] 其中B为天然或非天然(修饰的)核碱基,并且Z为与相邻核苷或5'-末端基团的核苷间键合,并且Z\*为与相邻核苷或3'-末端基团的核苷间键合;

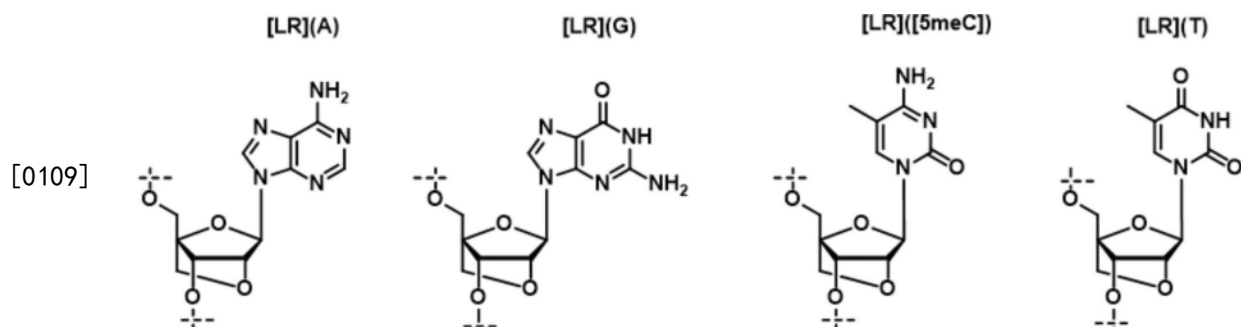
[0104] 应当认识到,除非另外说明,否则LNA核苷可处于β-D或α-L立体异构形式。

[0105] 示例性核苷,具有HELM注释

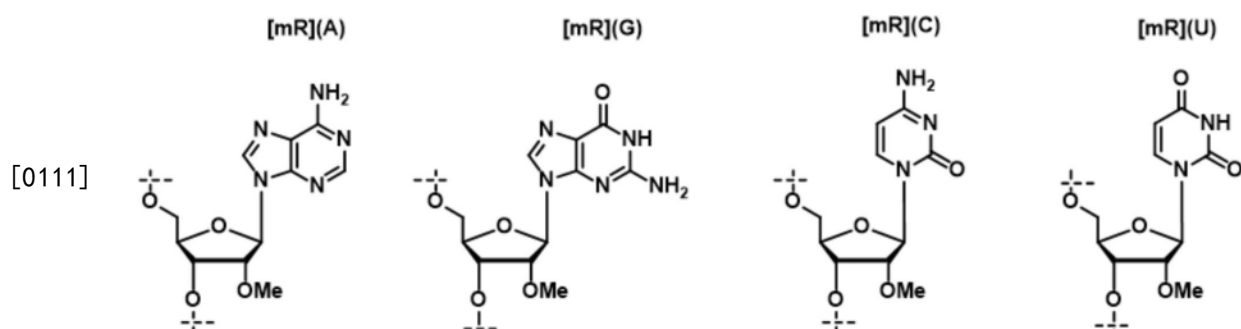
[0106] DNA核苷



[0108]  $\beta$ -D-氧基-LNA核苷



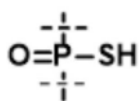
[0110] 2'-O-甲基核苷



[0112] 具有HELM注释的示例性硫代磷酸酯核苷间键合

[sP].

[0113]



[0114] 虚线表示每个核苷与5'或3'硫代磷酸酯核苷间键之间的共价键。在5'末端核苷，5'虚线表示与氢原子的键(形成5'末端-OH基团)。在3'末端核苷，3'虚线表示与氢原子的键(形成3'末端-OH基团)。

[0115] RNA酶H活性和募集

[0116] 反义寡核苷酸的RNA酶H活性是指其与互补RNA分子形成双链体时募集RNA酶H的能力。WO 01/23613提供了用于确定RNA酶H活性的体外方法,该方法可用于确定募集RNA酶H的能力。如果在向反义寡核苷酸提供互补靶核酸序列时具有以下初始速率(以pmol/l/min计),则一般认为其能够募集RNA酶H,该初始速率是使用W 001/23613(通过引用在此并入)的实例91至95提供的方法学,使用具有与所测试的经修饰的寡核苷酸相同的碱基序列但在反义寡核苷酸中的所有单体之间仅包含具有硫代磷酸酯键的DNA单体的寡核苷酸确定的初

始速率的至少5%，诸如至少10%或超过20%。为了用于确定RNA酶H活性，可从Creative Biomart® (与大肠杆菌中表达的His标签融合的重组人RNASEH1) 获得重组人RNA酶H1。

[0117] Gapmer

[0118] 本发明的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列可以是gapmer，也称为gapmer反义寡核苷酸或gapmer设计。Gapmer一般用于通过RNA酶H介导的降解来抑制靶核酸。Gapmer寡核苷酸包含至少三个不同的结构区域，即'5-→3'方向的5'-侧翼、缺口和3'侧翼F-G-F'。“缺口”区域(G)包含一段使gapmer能够募集RNA酶H的连续DNA核苷酸。该缺口区域的侧翼是包含一个或多个糖修饰的核苷(优选地是高亲和力糖修饰的核苷)的5'侧翼区域(F)，以及包含一个或多个糖修饰的核苷(优选地是高亲和力糖修饰的核苷)的3'侧翼区域(F')。区域F和F'中的一个或多个糖修饰的核苷增强gapmer对靶核酸的亲和力(即，亲和力增强的糖修饰的核苷)。在一些实施例中，区域F和F'中的一个或多个糖修饰的核苷是2'糖修饰的核苷，诸如高亲和力的2'糖修饰、诸如独立地选自LNA和2'-MOE。

[0119] 在gapmer设计中，缺口区域的5'和3'最末端核苷是DNA核苷，分别位于5'(F)或3'(F')区域的糖修饰核苷附近。侧翼可进一步定义为在距缺口区域最远的端，即在5'侧翼的5'端和3'侧翼的3'端，具有至少一个糖修饰的核苷。

[0120] 区域F-G-F'形成连续核苷酸序列。本发明的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列可包含式F-G-F'的gapmer区域。

[0121] Gapmer设计F-G-F'的总长度可以是例如12个至32个核苷，诸如13个至24个核苷、诸如14个至22个核苷、诸如14个至17个核苷、诸如16个至18个核苷。

[0122] 举例来说，本发明的gapmer寡核苷酸可以由下式表示：

[0123]  $F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{1-8}$ ，诸如

[0124]  $F_{1-8}-G_{7-16}-F'_{2-8}$

[0125] 前提条件是gapmer区域F-G-F'的总长度至少为12个，诸如至少14个核苷酸。

[0126] 在本发明的方面，反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列由式5'-F-G-F'-3'的gapmer组成或包含式5'-F-G-F'-3'的gapmer，其中区域F和F'独立地包含1-8个核苷或由1至8个核苷组成，其中1至4个经2'糖修饰且限定F和F'区域的5'和3'端，并且G为能够募集RNA酶H的介于6个与16个核苷之间的区域。

[0127] 以下进一步定义了区域F、G和F'，并且可以将其掺入到F-G-F'式中。

[0128] LNA gapmer

[0129] LNA gapmer是其中区域F和F'中的一者或两者包含LNA核苷或由LNA核苷组成的gapmer。β-D-氧基gapmer是其中区域F和F'中的一者或两者包含β-D-氧基LNA核苷或由其组成的gapmer。

[0130] 在一些实施例中，LNA gapmer具有下式： $[LNA]_{1-5}-[区域G]-[LNA]_{1-5}$ ，其中区域G是或包含能够募集RNA酶H的连续DNA核苷区域。

[0131] MOE gapmer

[0132] MOE gapmer是其中区域F和F'由MOE核苷组成的gapmer。在一些实施例中，MOE gapmer的设计为 $[MOE]_{1-8}-[区域G]_{5-16}-[MOE]_{1-8}$ ，诸如 $[MOE]_{2-7}-[区域G]_{6-14}-[MOE]_{2-7}$ ，诸如 $[MOE]_{3-6}-[区域G]_{8-12}-[MOE]_{3-6}$ ，其中区域G具有如gapmer定义中的定义。具有5-10-5设计的MOE gapmer(MOE-DNA-MOE)已在本领域中广泛使用。

[0133] 混合型翼gapmer

[0134] 混合型翼gapmer为以下LNA gapmer,其中区域F和区域F'中的一者或两者包含2'取代的核苷,诸如独立地选自由以下项组成的组中的2'取代的核苷:2'-O-烷基-RNA单元、2'-O-甲基-RNA、2'-氨基-DNA单元、2'-氟-DNA单元、2'-烷氧基-RNA、MOE单元、阿糖核酸(ANA)单元和2'-氟-ANA单元诸如MOE核苷。在一些实施例中,其中区域F和F'中的至少一者或区域F和F'两者均包含至少一个LNA核苷,区域F和F'的其余核苷独立地选自由MOE和LNA组成的组。在一些实施例中,其中区域F或F'中的至少一者或区域F和F'两者均包含至少两个LNA核苷,区域F和F'的其余核苷独立地选自由MOE和LNA组成的组。在一些混合型翼的实施例中,区域F和F'中的一者或两者可进一步包含一个或多个DNA核苷。

[0135] 交替性侧翼gapmer

[0136] 侧翼区域可包含LNA和DNA核苷两者,并且由于其包含LNA-DNA-LNA核苷的交替基序,因此称为“交替侧翼”。包含此种交替侧翼的gapmer称为“交替侧翼gapmer”。因此,“交替侧翼gapmer”是LNA gapmer寡核苷酸,其中至少一个侧翼(F或F')除LNA核苷以外还包含DNA。在一些实施例中,区域F或F'中的至少一者或两者都包含LNA核苷和DNA核苷两者。在这样的实施例中,侧翼区域F或F',或F和F'两者都包含至少三个核苷,其中F和/或F'区域的5'和3'最末端核苷是LNA核苷。

[0137] 反义寡核苷酸中的区域D'或D''

[0138] 本发明的反义寡核苷酸可在一些实施例中包含或由所述寡核苷酸的所述连续核苷酸序列以及其他的5'和/或3'核苷组成,所述连续核苷酸序列与所述靶核酸(诸如gapmer区域F-G-F')互补。另外的5'和/或3'核苷可以与靶核酸完全互补或可以不与靶核酸完全互补。这种另外的5'和/或3'核苷在本文中可以称为区域D'和D''。

[0139] 出于将连续核苷酸序列(诸如gapmer)与缀合物部分或另一个官能团接合的目的,可以使用添加区域D'或D''。当用于将连续核苷酸序列与缀合物部分接合时,其可用作可生物裂解的接头。另选地,其可用于提供核酸外切酶保护或促进合成或制造。

[0140] 可以将区域D'和D''分别连接到区域F的5'端或区域F'的3'端,以生成下式:D'-F-G-F'、F-G-F'-D''或D'-F-G-F'-D''。在这种情况下,F-G-F'是反义寡核苷酸的gapmer部分,且区域D'或D''构成反义寡核苷酸的单独部分。

[0141] 区域D'或D''可以独立地包含1个、2个、3个、4个或5个另外的核苷酸或由其组成,它们可以与靶核酸互补或不互补。与F或F'区域相邻的核苷酸不是糖修饰的核苷酸,诸如DNA或RNA或这些的碱基修饰形式。D'或D''区域可以用作核酸酶敏感的可生物裂解的连接基(参见接头的定义)。在一些实施例中,另外的5'和/或3'端核苷酸与磷酸二酯键合联接,并且是DNA或RNA。W02014/076195中公开了适合用作区域D'或D''的基于核苷酸的可生物裂解的接头,其包括例如磷酸二酯连接的DNA二核苷酸。W02015/113922中公开了在聚寡核苷酸构建体中可生物裂解的接头的用途,其中它们被用于在单个反义寡核苷酸内连接多个反义构建体(例如gapmer区域)。

[0142] 在一个实施例中,本发明的反义寡核苷酸除构成gapmer的连续核苷酸序列外还包含区域D'和/或D''。

[0143] 在一些实施例中,本发明的反义寡核苷酸可由下式表示:

[0144] F-G-F';特别是F<sub>1-8</sub>-G<sub>5-16</sub>-F'<sub>2-8</sub>

[0145] D'-F-G-F',特别是 $D'_{1-3}-F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{2-8}$

[0146] F-G-F'-D'',特别是 $F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{2-8}-D''_{1-3}$

[0147] D'-F-G-F'-D'',特别是 $D'_{1-3}-F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{2-8}-D''_{1-3}$

[0148] 在一些实施例中,位于区域D'与区域F之间的核苷间键是磷酸二酯键合。在一些实施例中,位于区域F'与区域D''之间的核苷间键是磷酸二酯键合。

[0149] 缀合物

[0150] 如本文所用,术语“缀合物”是指与非核苷酸部分(缀合物部分或区域C或第三区域)共价连接的反义寡核苷酸。缀合物部分可以与反义寡核苷酸共价连接,任选地经由接头基团,例如区域D'或D''。

[0151] 反义寡核苷酸缀合物及其合成也已报导在Manoharan的综述中(Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S.T. Crooke, ed., Ch.16, Marcel Dekker, Inc., 2001 and Manoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103)。

[0152] 在一些实施例中,所述非核苷酸部分(缀合物部分)选自由碳水化合物(例如GalNAc)、细胞表面受体配体、药物、激素、亲脂性物质、聚合物、蛋白质、肽、毒素(例如细菌毒素)、维生素、病毒蛋白质(例如衣壳)或其组合组成的组。

[0153] 连接基

[0154] 键或接头是两个原子之间的连接,其经由一个或多个共价键将一个目标化学基团或区段与另一个目标化学基团或区段联接。缀合物部分可直接或通过连接部分(例如接头或系链)连接到寡核苷酸。接头用于将第三区域诸如缀合物部分(区域C)与第一区域共价连接,该第一区域例如与靶核酸互补的反义寡核苷酸或连续核苷酸序列(区域A)。

[0155] 在本发明的一些实施例中,本发明的缀合物或反义寡核苷酸缀合物可以任选地包含位于与靶核酸互补的反义寡核苷酸或连续核苷酸序列(区域A或第一区域)和缀合物部分(区域C或第三区域)之间的接头区域(第二区域或区域B和/或区域Y)。

[0156] 区域B是指包含生理上不稳定的键或由其组成的可生物裂解的连接基,该键在哺乳动物体内通常遇到的条件下或与之相似的条件可裂解。生理上不稳定的连接基经历化学转化(例如裂解)的条件包括化学条件,诸如pH、温度、氧化或还原条件或试剂,以及在哺乳动物细胞中遇到的盐浓度或与之相似的盐浓度。哺乳动物细胞内条件还包括通常存在于哺乳动物细胞中的酶活性,诸如来自蛋白水解酶或水解酶或核酸酶的酶活性。在一个实施例中,可生物裂解的接头对S1核酸酶裂解敏感。在一些实施例中,核酸酶敏感接头包含1至5个核苷,诸如包含至少两个连续磷酸二酯键合的DNA核苷。包含可生物裂解的接头的磷酸二酯的详细说明请参阅W0 2014/076195。

[0157] 区域Y是指不一定是可生物裂解的但主要用于将缀合物部分(区域C或第三区域)与反义寡核苷酸(区域A或第一区域)共价连接的接头。区域Y连接基可以包含重复单元诸如乙二醇、氨基酸单元或氨基烷基的链结构或寡聚物。本发明的反义寡核苷酸缀合物可以由以下区域性元件A-C、A-B-C、A-B-Y-C、A-Y-B-C或A-Y-C构成。在一些实施例中,接头(区域Y)为氨基烷基(诸如C2-C36氨基烷基基团),包括例如C6至C12氨基烷基基团。在一些实施例中,接头(区域Y)是C6氨基烷基基团。在一些实施例中,接头为NA。

[0158] siRNA

[0159] “小干扰”或“短干扰RNA”或siRNA是靶向感兴趣的基因的核苷酸的RNA双链体。“RNA双链体”是指由RNA分子的两个区域之间的互补配对形成的结构。siRNA被“靶向”至基因,因为siRNA的双链体部分的核苷酸序列与被靶向的基因的核苷酸序列互补。在一些实施例中,siRNA双链体的长度小于30个核苷酸。在一些实施例中,双链体的长度可以是29个、28个、27个、26个、25个、24个、23个、22个、21个、20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个或10个核苷酸。在一些实施例中,双链体的长度为19-25个核苷酸长度。siRNA的RNA双链体部分可以是发夹结构的一部分。除了双链体部分之外,发夹结构可以含有位于形成双链体的两个序列之间的环部分。环的长度可以不同。在一些实施例中,环的长度为5、6、7、8、9、10、11、12或13个核苷酸。发夹结构也可以含有3'或5'突出端部分。在一些实施例中,突出端是长度为0、1、2、3、4或5个核苷酸的3'或5'突出端。

[0160] 如本文所用,“shRNA分子”包括形成前体miRNA(pre-miRNA)的常规茎-环shRNA。“shRNA”还包括嵌入微RNA的shRNA(基于miRNA的shRNA),其中将miRNA双链体的引导链和过客链并入现有的(或天然的)miRNA或修饰的或合成的(设计的)miRNA中。转录时,常规shRNA形成初级miRNA(pri-miRNA)或与天然pri-miRNA非常相似的结构。pri-miRNA随后由Drosha和其辅因子加工成pre-miRNA。因此,术语“shRNA”包括pri-miRNA(shRNA-mir)分子和pre-miRNA分子。

[0161] “茎-环结构”是指具有二级结构的核酸,该二级结构包括已知或预测形成双链或双链体的核苷酸区域(茎部分),其在一侧通过主要是单链核苷酸的区域(环部分)连接。术语“发夹”和“折回”结构在本文中也用于指茎-环结构。这种结构在本领域中是众所周知的,并且该术语的使用与其在本领域中的已知含义一致。如本领域中已知,该二级结构不需要精确的碱基配对。因此,茎可以包括一个或多个碱基错配或凸出。替代地,碱基配对可以是精确的,即不包括任何错配。

[0162] “表达RNAi的构建体”或“RNAi构建体”是一通用术语,包括设计用于实现RNA干扰效果的核酸制剂。表达RNAi的构建体包含可以在体内裂解以形成siRNA或成熟shRNA的RNAi分子。例如,RNAi构建体是能够在体内产生siRNA或成熟shRNA的表达载体。可以根据本发明使用的载体的非限制性实例在本文中描述,例如在第4.6节中描述。可以在例如W001/68836和W001/75164中找到制备和递送长或短RNAi构建体的示例性方法。

[0163] siRNA可以由核酸序列编码,并且该核酸序列还可以包括启动子。核酸序列还可以包括聚腺苷酸化信号。在一些实施例中,聚腺苷酸化信号是合成的最小聚腺苷酸化信号。

[0164] 治疗

[0165] 本文所用的术语“治疗”是指既存疾病(例如本文所指的疾病或病症)的治疗或疾病的阻止(即预防)。因此将认识到,在一些实施例中,本文所指的治疗可以是预防性的。

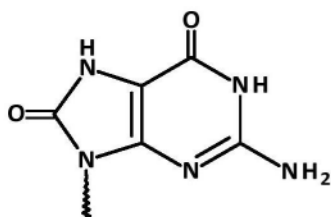
## 具体实施方式

[0166] 在第一方面,本发明涉及一个多核苷酸,其包含:

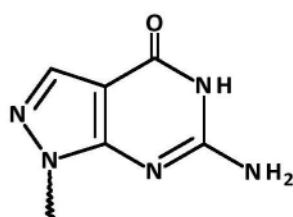
[0167] -至少一个硫代磷酸酯核苷间键合,以及

[0168] -至少一个鸟苷类似物,其包含选自由以下项组成的组的鸟嘌呤类似物:

[0169]



(I)



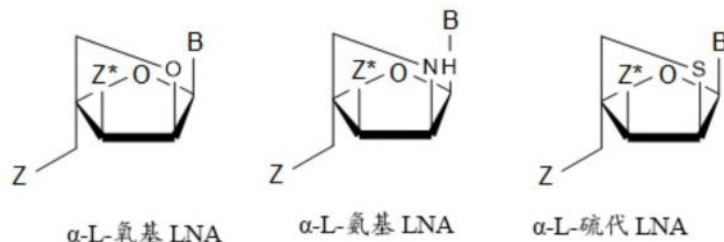
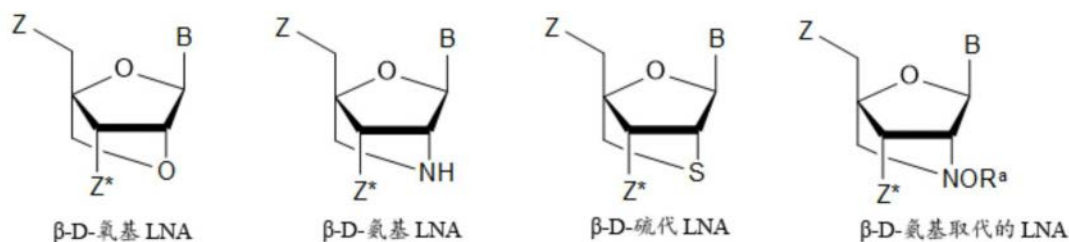
(II)

[0170] 多核苷酸可以是单链的, 诸如例如反义寡核苷酸。

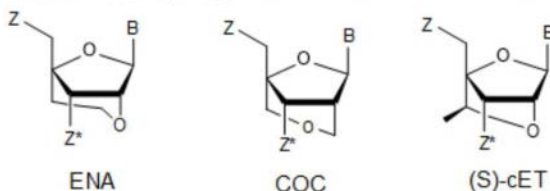
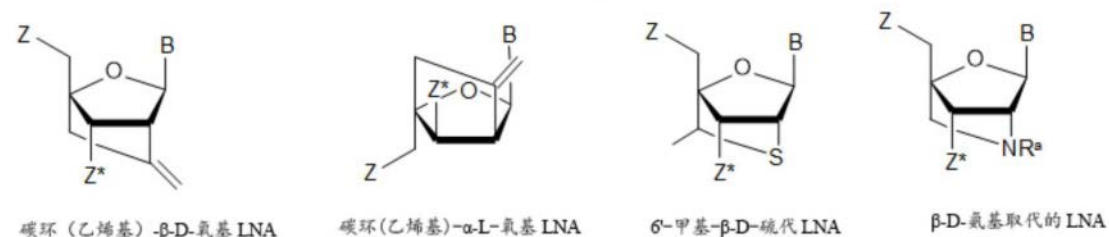
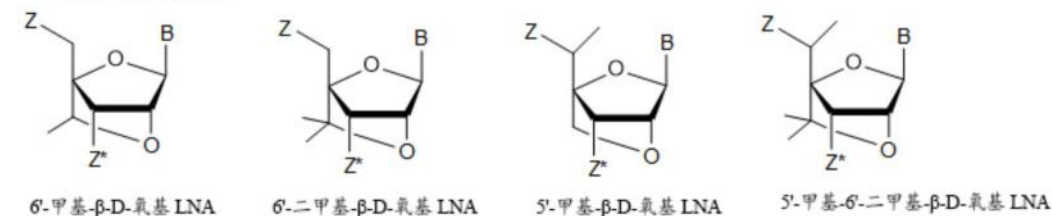
[0171] 多核苷酸可以是双链的, 诸如siRNA或shRNA。

[0172] 多核苷酸可以包含一个或多个2'糖修饰的核苷。此类2'糖修饰的核苷可以独立地选自自由锁核酸和2'糖取代的核苷组成的组。

[0173] 2'糖修饰的核苷可以是选自以下项所组成的组的锁核酸:



[0174]

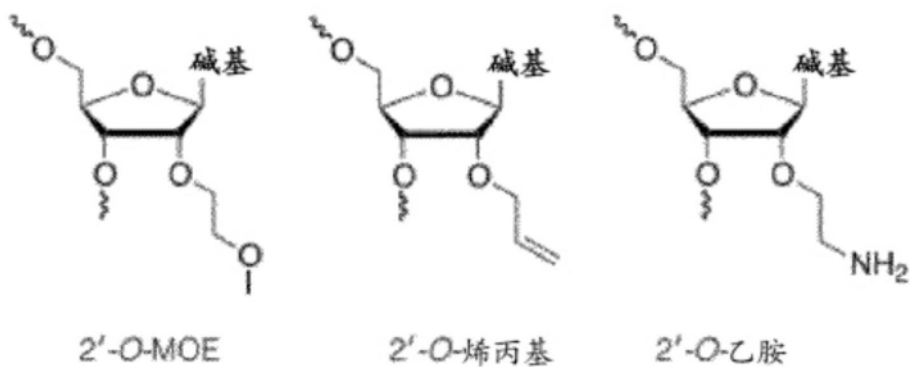


[0175] 其中B为天然或经修饰的核碱基, 并且Z为与相邻核苷或5'-末端基团的核苷间键合, 并且Z\*为与相邻核苷或3'-末端基团的核苷间键合。

[0176] 2'糖修饰的核苷可以选自以下项所组成的组:

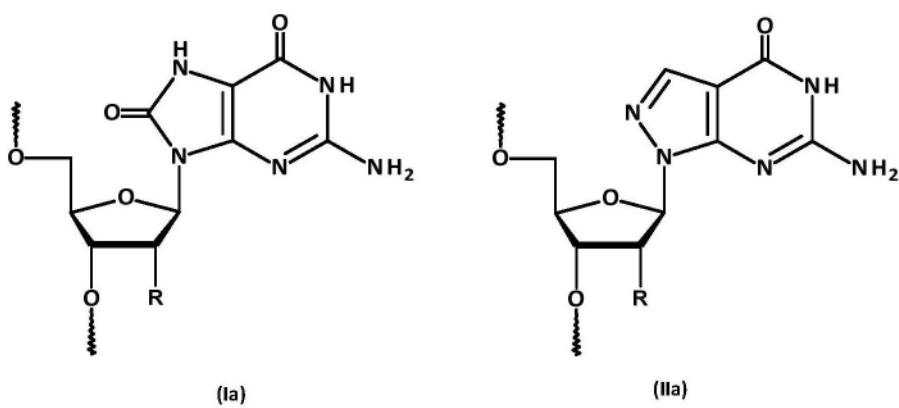


[0177]



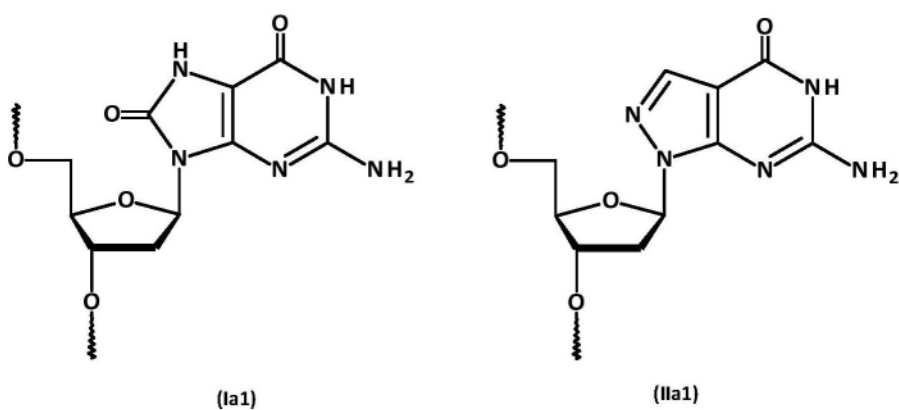
[0178] 鸟苷类似物可以选自由以下各项组成的组：

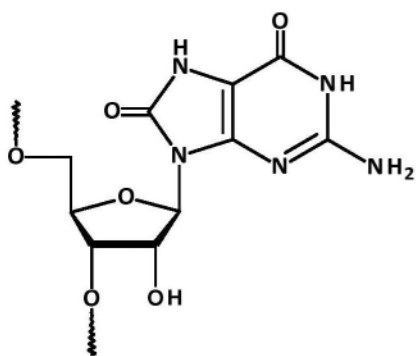
[0179]



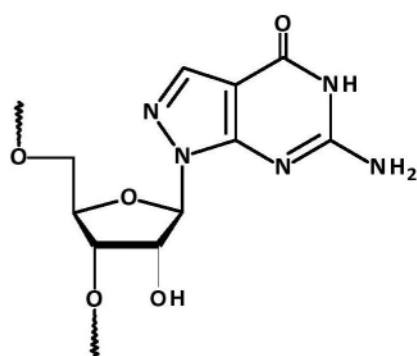
[0180] 其中R为H或OH

[0181]

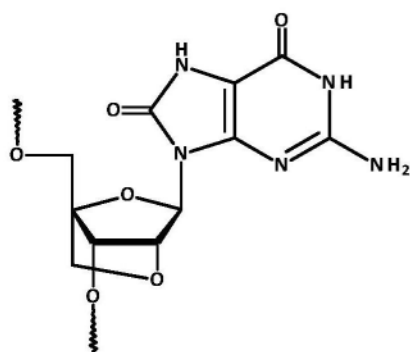




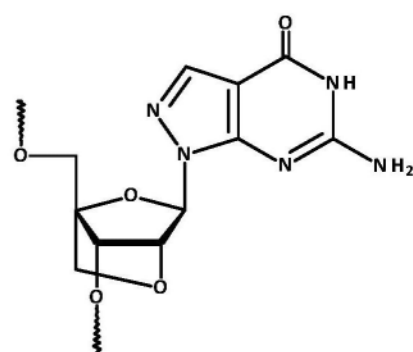
(Ia2)



(IIa2)

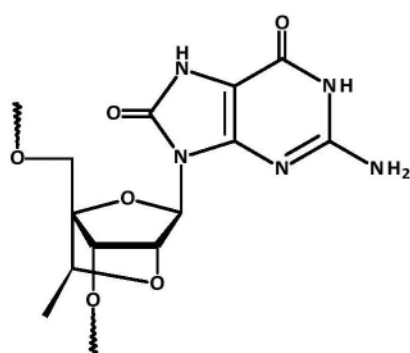


(Ib)

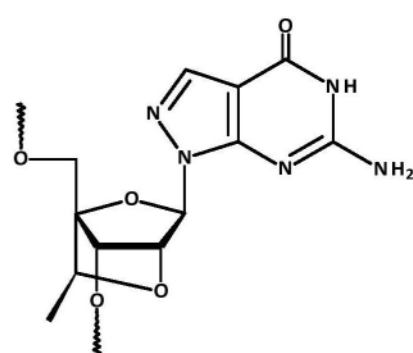


(IIb)

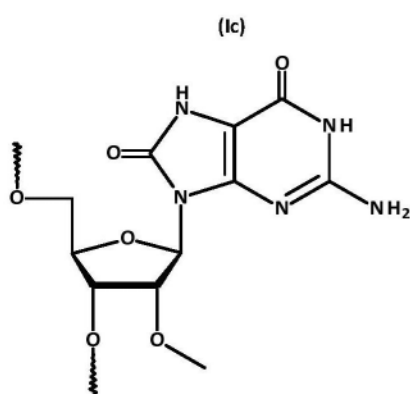
[0182]



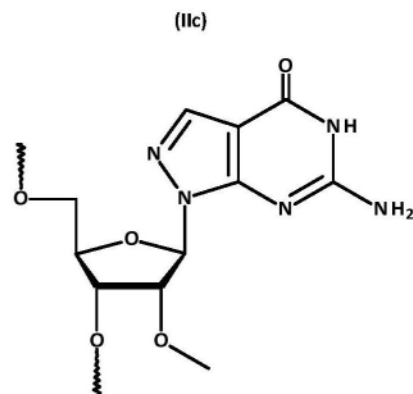
(Ic)



(IIc)

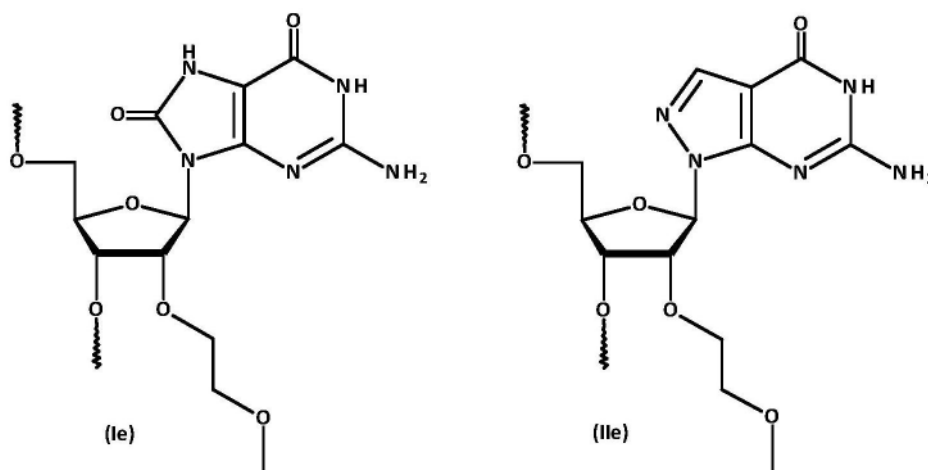


(Id)



(IIId)

[0183]



[0184] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物为(Ia)。

[0185] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物为(Ib)。

[0186] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物为(IIa)。

[0187] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物为(IIb)。

[0188] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物为(Ic)。

[0189] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物为(IIc)。

[0190] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物为(Id)。

[0191] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物为(IId)。

[0192] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物为(Ie)。

[0193] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物为(IIe)。

[0194] 根据本发明,反义寡核苷酸可以是gapmer。

[0195] 根据本发明,多核苷酸可以包含至少一个具有经修饰核糖的额外核苷,并且其中核糖修饰选自自由锁核酸或其他2'修饰组成的组。

[0196] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物在gapmer的缺口区并且具有式Ia或式IIb,并且其中其中R为H。

[0197] 在本发明的一实施例中,鸟苷类似物不在gapmer的侧翼中。

[0198] 在本发明的一实施例中,多核苷酸包含一个鸟苷类似物。

[0199] 在本发明的一实施例中,多核苷酸包含两种鸟苷类似物。

[0200] 在本发明的一实施例中,多核苷酸包含三种鸟苷类似物。

[0201] 在本发明的一实施例中,多核苷酸不包含天然鸟苷。

[0202] 在本发明的一实施例中,多核苷酸是选自由以下项所组成的组的反义寡核苷酸:

[0203] CTCActtg<sup>oxo</sup>ctttaAT (SEQ ID No.4);[0204] CTCAtacttg<sup>N</sup>ctttaAT (SEQ ID No.5);[0205] CTCAtacttg<sup>PPG</sup>ctttaAT (SEQ ID No.6);

[0206] CTAcatctcatactTgC (SEQ ID No.9);

[0207] CTAcatctcatactTg<sup>PPG</sup>C (SEQ ID No.10);[0208] CTAcatctcatactTg<sup>oxo</sup>C (SEQ ID No.11);[0209] CTAcatctcatactTg<sup>N</sup>C (SEQ ID No.13);[0210] ACAg<sup>oxo</sup>g<sup>oxo</sup>attag<sup>oxo</sup>ttCTA (SEQ ID No.15);以及

- [0211]  $ACA g^{PPG} g^{PPG} attag^{PPG} ttCTA$  (SEQ ID No.16) ;
- [0212] 其中这些序列中的大写字母表示具有LNA修饰的核糖的核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,并且这些序列中的小写字母表示DNA,
- [0213]  $g^{PPG}$ 为7-脱氮-8-氮杂-脱氧鸟苷,
- [0214]  $g^N$ 为8-氨基-dG,并且
- [0215]  $g^{oxo}$ 为8-氧代-脱氧鸟苷。
- [0216] 在本发明的一实施例中,反义寡核苷酸为CTCAacttg<sup>oxo</sup>ctttaAT (SEQ ID No.4)。
- [0217] 在本发明的一实施例中,反义寡核苷酸为CTCAacttg<sup>N</sup>ctttaAT (SEQ ID No.5)。
- [0218] 在本发明的一实施例中,反义寡核苷酸为CTCAacttg<sup>PPG</sup>ctttaAT (SEQ ID No.6)。
- [0219] 在本发明的一实施例中,反义寡核苷酸为CTAcatctcatactTgC (SEQ ID No.9)。
- [0220] 在本发明的一实施例中,反义寡核苷酸为CTAcatctcatactTg<sup>PPG</sup>C (SEQ IDNo.10)。
- [0221] 在本发明的一实施例中,反义寡核苷酸为CTAcatctcatactTg<sup>oxo</sup>C (SEQ ID No.11)。
- [0222] 在本发明的一实施例中,反义寡核苷酸为CTAcatctcatactTg<sup>N</sup>C (SEQ ID No.13)。
- [0223] 在本发明的一实施例中,反义寡核苷酸为ACA g<sup>oxo</sup> g<sup>oxo</sup> attag<sup>oxo</sup> ttCTA (SEQ IDNo.15)。
- [0224] 在本发明的一实施例中,反义寡核苷酸为ACA g<sup>PPG</sup> g<sup>PPG</sup> attag<sup>PPG</sup> ttCTA (SEQ ID No.16) ,
- [0225] 其中以上序列中的大写字母表示具有LNA修饰的核糖的核苷,所有LNA C均为5-甲基胞嘧啶,并且这些序列中的小写字母表示DNA,以及
- [0226] 并且其中:
- [0227]  $g^{PPG}$ 为7-脱氮-8-氮杂-脱氧鸟苷,
- [0228]  $g^N$ 为8-氨基-dG,并且
- [0229]  $g^{oxo}$ 为8-氧代-脱氧鸟苷。
- [0230] 本发明还涉及用作药物的根据本发明的多核苷酸。其可以用于向中枢神经系统施用,或用于治疗神经系统疾病,诸如选自以下项组成的组的中枢神经系统疾病:肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、Angelman病、阿尔茨海默病、动脉瘤、背痛、贝尔麻痹、先天性脑和脊髓缺陷、脑损伤、脑肿瘤、脑瘫、慢性疲劳综合征、脑震荡、痴呆、颈部和下背部椎间盘疾病、头晕、癫痫、格林-巴利综合征、头痛和偏头痛、多发性硬化症、肌萎缩、神经痛、神经病、神经肌肉疾病和相关疾病、帕金森病、精神状况(严重抑郁症、强迫症)、脊柱侧凸、惊厥发作、脊髓损伤、脊柱畸形和疾病、脊柱肿瘤、卒中以及眩晕。
- [0231] 根据本发明的多核苷酸可以经由鞘内注射施用。
- [0232] 根据本发明的多核苷酸可以用作药物以治疗其中调节Ube3A是有益的医学病况,诸如用于治疗Angelman病。
- [0233] 根据本发明的多核苷酸可以用作药物以治疗其中调节ATXN2是有益的医学病况。
- [0234] 根据本发明的多核苷酸可以用作药物以治疗其中调节ATXN3是有益的医学病况。
- [0235] 本发明的多核苷酸可用作需要降低的神经毒性的药物。
- [0236] 本发明还涉及用于合成本发明的具有降低的毒性的多核苷酸的方法,所述方法包括将核苷酸单体(诸如亚磷酰胺)偶联到另一核苷酸或寡核苷酸上,其中核苷酸单体包含如上文中所定义的鸟苷类似物。

[0237] 本发明还涉及用于选择与参考多核苷酸相比具有降低的毒性的多核苷酸的方法，其中多核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键合，并且其中参考多核苷酸和神经毒性较小的反义寡核苷酸具有相同的核苷酸序列并且包含至少一个鸟苷，区别在于，与参考多核苷酸相比，神经毒性较小的多核苷酸包含至少一个鸟苷类似物。

[0238] 本发明还涉及含有鸟苷类似物的化合物在制造反义寡核苷酸或shRNA或siRNA中的用途，该鸟苷类似物选自由以下项组成的组：(Ia)、(Ib)、(Ic)、(Id)、(Ie)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)和(IIe)。

[0239] 本发明还涉及包含根据本发明的多核苷酸和与该多核苷酸共价连接的至少一个缀合物部分的缀合物。

[0240] 本发明还涉及本发明的多核苷酸的药用盐，或如上文中所定义的缀合物。

[0241] 在一些实施例中，药用盐为钠盐或钾盐。

[0242] 一种药物组合物，其包含根据本发明的反义寡核苷酸、或根据本发明的缀合物，或根据本发明的药用盐，以及药用稀释剂、溶剂、载体、盐和/或佐剂。

[0243] 本发明还涉及用于在表达Ube3a-ATS的靶细胞中上调Ube3a表达的方法，该方法包括以有效量向该细胞施用靶向Ube3a-ATS的根据本发明的反义寡核苷酸、或根据本发明的缀合物或根据本发明的药用盐。

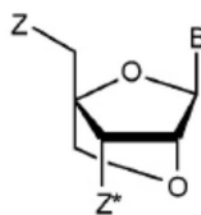
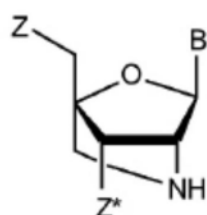
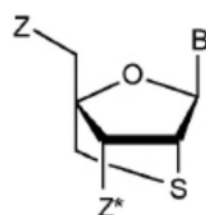
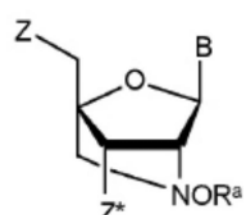
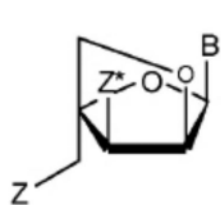
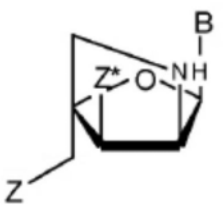
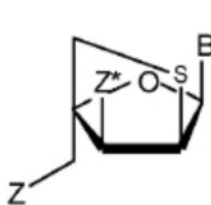
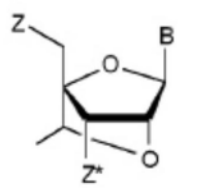
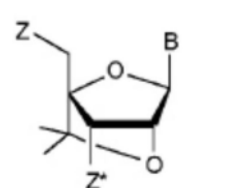
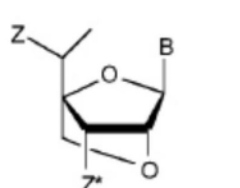
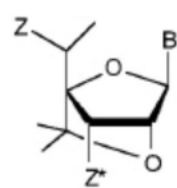
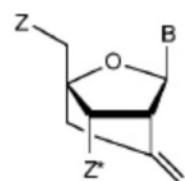
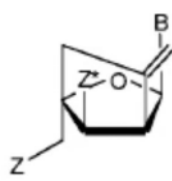
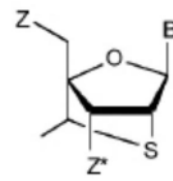
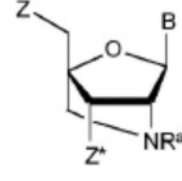
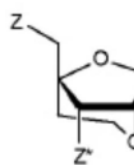
[0244] 在一些实施例中，该方法为体内方法或体外方法。

[0245] 本发明还涉及一种用于治疗或预防患有或可能患有神经系统疾病的受试者诸如人的神经系统疾病的方法，该方法包括施用治疗或预防有效量的根据本发明的多核苷酸、或根据本发明的缀合物、或根据本发明的药用盐，诸如以预防或减轻神经系统疾病。

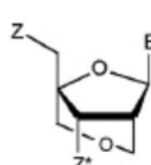
[0246] 包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键合的反义寡核苷酸。应当理解，本发明的反义寡核苷酸可以包含多于一个硫代磷酸酯。因此，本发明的寡核苷酸可包含一个或多个修饰的核苷间键合，诸如一个或多个硫代磷酸酯核苷间键合，或一个或多个硫代磷酸酯核苷间键合。在一些实施例中，寡核苷酸或其连续核苷酸序列中至少50%的核苷间键是硫代磷酸酯，寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的诸如至少60%、诸如至少70%、诸如至少75%、诸如至少80%或诸如至少90%的核苷间键是硫代磷酸酯。在一些实施例中，寡核苷酸或其连续核苷酸序列的全部核苷间键均为硫代磷酸酯。

[0247] 在一实施例中，锁核酸选自由以下项组成的组：

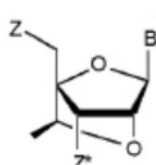
[0248]

 $\beta$ -D-氧基 LNA $\beta$ -D-氨基 LNA $\beta$ -D-硫代 LNA $\beta$ -D-氨基取代的 LNA $\alpha$ -L-氧基 LNA $\alpha$ -L-氨基 LNA $\alpha$ -L-硫代 LNA6'-甲基- $\beta$ -D-氧基 LNA6'-二甲基- $\beta$ -D-氧基 LNA5'-甲基- $\beta$ -D-氧基 LNA5'-甲基-6'-二甲基- $\beta$ -D-氧基 LNA碳环(乙烯基)- $\beta$ -D-氧基 LNA碳环(乙烯基)- $\alpha$ -L-氧基 LNA6'-甲基- $\beta$ -D-硫代 LNA $\beta$ -D-氨基取代的 LNA

ENA



COC



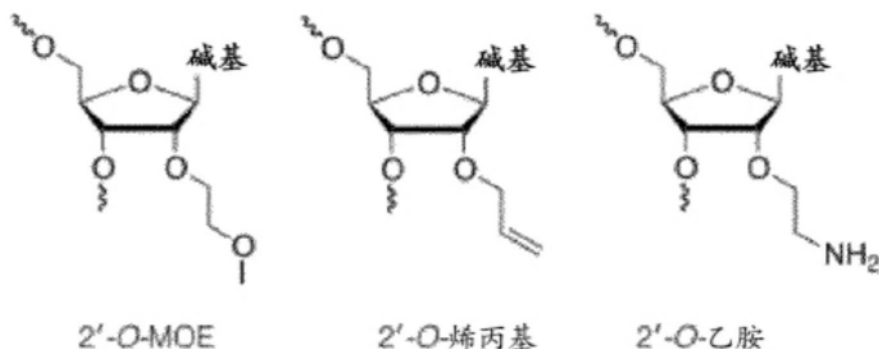
(S)-cET

[0249] 其中B为天然或经修饰的核碱基,并且Z为与相邻核苷或5'-末端基团的核苷间键合,并且Z\*为与相邻核苷或3'-末端基团的核苷间键合。

[0250] 在本发明的反义寡核苷酸的一实施例中,2'修饰可以选自由以下项组成的组:



[0251]



[0252] 在本发明的一实施例中,反义寡核苷酸可以包含至少一个具有经修饰核糖的额外核苷,并且其中核糖修饰选自锁核酸或2'修饰组成的组。

[0253] 在本发明的一实施例中,反义寡核苷酸是如上文中所定义的gapmer。

[0254] 在一些实施例中,本发明的反义寡核苷酸可由下式表示:

[0255]  $F-G-F'$ ; 特别是  $F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{2-8}$

[0256]  $D'-F-G-F'$ , 特别是  $D'_{1-3}-F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{2-8}$

[0257]  $F-G-F'-D''$ , 特别是  $F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{2-8}-D''_{1-3}$

[0258]  $D'-F-G-F'-D''$ , 特别是  $D'_{1-3}-F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{2-8}-D''_{1-3}$

[0259] 其中F是侧翼,并且G是缺口。

[0260] 在一些实施例中,位于区域D'与区域F之间的核苷间键是磷酸二酯键合。在一些实施例中,位于区域F'与区域D''之间的核苷间键是磷酸二酯键合。

[0261] 在本发明的反义寡核苷酸中,鸟苷类似物可以在gapmer的缺口中。在根据本发明的一些实施例中,鸟苷类似物不在gapmer的侧翼中。

[0262] 本发明的反义寡核苷酸可以包含一个鸟苷类似物。本发明的反义寡核苷酸可以包含两种鸟苷类似物。本发明的反义寡核苷酸可以包含三种鸟苷类似物。

[0263] 在本发明的一些实施例中,反义寡核苷酸不包含天然鸟苷。

[0264] 因为本发明的反义寡核苷酸提供比常规反义寡核苷酸相对较低的神经毒性,因此本发明的反义寡核苷酸可以用作药物。其可以向中枢神经系统例如经由鞘内注射来施用。

[0265] 根据本发明的反义寡核苷酸可以用作药物以治疗其中调节Ube3A是有益的医学病况,例如Angelman综合征。

[0266] 根据本发明的反义寡核苷酸可以用作药物以治疗其中调节ATXN2是有益的医学病况,例如脊髓小脑共济失调II型(SCA2)和肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)。

[0267] 根据本发明的反义寡核苷酸可以用作药物以治疗其中调节ATXN3是有益的医学病况,例如脊髓小脑共济失调3型(SCA3)。

[0268] 根据本发明的反义寡核苷酸可用作药物以治疗需要降低的神经毒性的药物的医学病况。

[0269] 本发明还涉及一种用于相对于参考化合物设计本发明的神经毒性较小的反义寡核苷酸的方法,其中参考化合物和神经毒性较小的反义寡核苷酸具有相同的核苷酸序列并且包含至少一个鸟苷,其不同之处在于:与参考化合物相比,神经毒性较小的反义寡核苷酸至少包含鸟苷类似物。

[0270] 本发明进一步涉及鸟苷类似物在制造寡核苷酸中的用途,该鸟苷类似物选自自由以下项组成的组:(Ia)、(Ib)、(Ic)、(Id)、(Ie)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)和(IIe)。

[0271] 本发明还涉及一个缀合物,其包含本发明的反义寡核苷酸和与该反义寡核苷酸共价连接的至少一个缀合物部分。

[0272] 本发明还涉及本发明的反义寡核苷酸的药用盐或其缀合物。在一些实施例中,所述非核苷酸部分(缀合物部分)选自自由碳水化合物(例如GalNAc)、细胞表面受体配体、药物、激素、亲脂性物质、聚合物、蛋白质、肽、毒素(例如细菌毒素)、维生素、病毒蛋白质(例如衣壳)或其组合组成的组。

[0273] 本发明的反义寡核苷酸可以呈药用盐的形式,诸如钠盐或钾盐。

[0274] 本发明还涉及药物组合物,其包含本发明的反义寡核苷酸或缀合物或药用盐和一种或多种药用稀释剂、溶剂、载体、盐和/或佐剂。

[0275] 本发明还涉及一种在表达Ube3a的靶细胞中抑制Ube3a表达的方法,该方法包括以有效量向该细胞施用本发明的反义寡核苷酸或缀合物或其药用盐。该方法可为体内方法或体外方法。

[0276] 本发明进一步涉及一种用于治疗或预防患有或可能患有神经系统疾病的受试者诸如人的神经系统疾病的方法,该方法包括施用治疗或预防有效量的本发明的反义寡核苷酸、或根据本发明的缀合物、或本发明的药用盐,诸如以预防或减轻神经系统疾病。

[0277] 反义寡核苷酸

[0278] 在一些实施例中,本发明的反义寡核苷酸能够通过抑制或调降靶标的表达而对其产生调节的效果。优选地,与靶标的正常表达水平相比,这种调节产生至少20%的表达抑制,更优选地与靶标的正常表达水平相比,至少30%、至少40%、至少50%的抑制。在一些实施例中,在将0.031 $\mu$ M、0.1 $\mu$ M和0.4 $\mu$ M反义寡核苷酸施加到靶细胞后,本发明的反义寡核苷酸可以能够在体外将靶标mRNA的表达水平抑制至少60%或70%。在一些实施例中,在将0.031 $\mu$ M、0.1 $\mu$ M和0.4 $\mu$ M寡核苷酸施加到靶细胞后,本发明的反义寡核苷酸可以能够在体外将靶基因的表达水平抑制至少50%。合适地,实例提供了可用于测量靶标RNA或蛋白质抑制的测定法。通过反义寡核苷酸的连续核苷酸序列与靶核酸之间的杂交触发靶标调节。在一些实施例中,本发明的反义寡核苷酸包含反义寡核苷酸和靶核酸之间的错配。尽管错配,与靶核酸的杂交仍可足以显示出对靶基因表达的所需调节。由错配导致降低的结合亲和力可以优选地通过寡核苷酸中核苷酸数量的增加和/或能够提高与靶标的结合亲和力的修饰核苷数量的增加来补偿,所述修饰核苷诸如存在于寡核苷酸序列中的2'糖修饰的核苷,包括LNA。

[0279] 本发明的一方面涉及反义寡核苷酸,其包含长度为10个至30个核苷酸的连续核苷酸序列,该序列与靶标前体mRNA或mRNA或由其衍生的转录变体至少90%互补。

[0280] 在一些实施例中,反义寡核苷酸包含长度为10个至30个核苷酸的连续序列,该序列与靶核酸的区域或靶序列至少90%互补,诸如至少91%、诸如至少92%、诸如至少93%、诸如至少94%、诸如至少95%、诸如至少96%、诸如至少97%、诸如至少98%或100%互补。

[0281] 如果本发明的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列与靶核酸的区域完全互补(100%互补),或者在一些实施例中可包含反义寡核苷酸与靶核酸之间的一个或两个错配,则是优选的。

[0282] 在一些实施例中,反义寡核苷酸包含与靶核酸区域完全(或100%)互补的连续核苷酸序列。

[0283] 本发明的反义寡核苷酸包含与靶核酸的区域(诸如本文所述的靶序列)互补或杂交的连续核苷酸序列。

[0284] 与治疗性反义寡核苷酸互补或杂交的靶核酸序列通常包含一段至少10个核苷酸的连续核碱基。该连续核苷酸序列的长度介于12个至70个核苷酸,诸如12个至50个、诸如13个至30个、诸如14个至25个、诸如14个至20个连续核苷酸之间。

[0285] 在一些实施例中,本发明的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列在其长度上包含10个至30个核苷酸或由其组成,诸如在长度上包含从12个至25个,诸如11个至22个,诸如从12个至20个,诸如从14个至18个或14个至16个连续核苷酸或由其组成。

[0286] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列包含22个或更少的核苷酸(诸如20个或更少的核苷酸,诸如18个或更少的核苷酸,诸如14、15、16或17个核苷酸)或由其组成。应当理解的是,本文中给出的任何范围均包括范围的端点。据此,如果称反义寡核苷酸包括10至30个核苷酸,则10个和30个核苷酸均包含在内。

[0287] 在一些实施例中,所述连续核苷酸序列在长度上包含10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个连续核苷酸或由其组成。

[0288] 在一些实施例中,连续核苷酸序列在长度上包含12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个或22个连续核苷酸或由其组成。

[0289] 在优选地的实施例中,本发明的反义寡核苷酸包含一个或多个糖修饰的核苷,诸如一个或多个2'糖修饰的核苷,诸如一个或多个2'糖修饰的核苷独立地选自2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、阿糖核酸(ANA)、2'-氟-ANA和LNA核苷。如果一个或多个修饰的核苷是锁定的核酸(LNA),则是优选的。

[0290] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含LNA核苷。

[0291] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含LNA核苷和DNA核苷。

[0292] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含LNA核苷和DNA核苷以及2'-O-甲基RNA核苷。

[0293] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含LNA核苷和DNA核苷以及2'-O-甲基RNA核苷,并且连续核苷酸键的每个核苷之间的核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。

[0294] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含LNA核苷和DNA核苷以及2'-O-甲基RNA核苷,并且连续核苷酸键的每个核苷之间的核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。

[0295] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含2'-O-甲氧基乙基(2'MOE)核苷。

- [0296] 在一些实施例中,连续核苷酸序列包含2'-O-甲氧基乙基(2'MOE)核苷和DNA核苷。
- [0297] 有利地,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列的3'最末端核苷为2'糖修饰的核苷。
- [0298] 优选地,反义寡核苷酸包含至少一个修饰的核苷间键,例如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯。
- [0299] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。
- [0300] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的至少一个核苷间键是二硫代磷酸酯核苷间键。
- [0301] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的至少一个核苷间键是磷酸二酯核苷间键。
- [0302] 在一些实施例中,连续核苷酸序列中的所有核苷间键都是硫代磷酸酯核苷间键。
- [0303] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的至少75%核苷间键是硫代磷酸酯核苷间键。
- [0304] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的所有核苷间键都是硫代磷酸酯核苷间键。
- [0305] 在本发明的一个有利实施例中,本发明的反义寡核苷酸能够募集RNA酶H,诸如RNA酶H1。在一些实施例中,本发明的反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列是一个gapmer。
- [0306] 在一些实施例中,反义寡核苷酸或其连续核苷酸序列,包含式5'-F-G-F'-3'的gapmer或由其组成。
- [0307] 在一些实施例中,区域G由6个至16个DNA核苷组成。
- [0308] 在一些实施例中,区域F和F'各自包含至少一个LNA核苷。
- [0309] 药用盐
- [0310] 在另一方面,本发明提供了反义寡核苷酸或其缀合物的药用盐,诸如药用钠盐、铵盐或钾盐。
- [0311] 制造方法
- [0312] 在另一方面,本发明提供了用于制造本发明的反义寡核苷酸的方法,该方法包括使核苷酸单元反应并由此形成包含在反义寡核苷酸中的共价连接的连续核苷酸单元。优选地,该方法使用亚磷酰胺化学方法(参见例如Caruthers et al,1987,Methods in Enzymology vol.154,pages 287-313)。在另一个实施例中,该方法进一步包括使连续核苷酸序列与缀合部分(配体)反应以将缀合物部分共价连接到反义寡核苷酸。在另一方面,提供了一种用于制造本发明的组合物的方法,该方法包括将本发明的反义寡核苷酸或缀合的反义寡核苷酸与药用稀释剂、溶剂、载体、盐和/或佐剂混合。
- [0313] 药物组合物
- [0314] 在另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含前述反义寡核苷酸和/或反义寡核苷酸缀合物或其盐以及药用稀释剂、载体、盐和/或佐剂中的任一者。药用稀释剂包括磷酸盐缓冲盐水(PBS),而药用盐包括但不限于钠盐和钾盐。在一些实施例中,药用稀释剂是无菌磷酸盐缓冲盐水或无菌碳酸钠缓冲液。
- [0315] 在一些实施例中,本发明的反义寡核苷酸是在药用稀释剂中的溶液形式,例如溶解在PBS或碳酸钠缓冲液中。在一些实施例中,本发明的反义寡核苷酸或其药用盐为固体形式,诸如粉末、诸如冻干粉末。在一些实施例中,反义寡核苷酸可以预先配制在溶液中,或者

在一些实施例中,可以是干粉(例如冻干粉)的形式,其可以在施用前溶解在药用稀释剂中。

[0316] 适当地,例如反义寡核苷酸能够以0.1-100mg/ml(诸如1-10mg/ml)的浓度溶解在药用稀释剂中。

[0317] 在一些实施例中,本发明的寡核苷酸配制成介于0.5-100mg之间(诸如1mg-50mg或2-25mg)的单位剂量。

[0318] 在一些实施例中,反义寡核苷酸以50-300 $\mu$ M的浓度在药用稀释剂中使用。

[0319] 本发明的反义寡核苷酸或反义寡核苷酸缀合物可与药用活性或惰性物质混合,用以制备药物组合物或制剂。药物组合物的组成和配制方法取决于许多标准,包括但不限于施用途、疾病程度或施用剂量。

[0320] 药物组合物(诸如溶液)可以通过常规的灭菌技术进行灭菌,或者可以进行无菌过滤。所得的溶液可以包装后直接使用或冻干,在施用前将冻干的制剂与无菌水性载体混合。制剂的pH通常为介于3至11之间,更优选地介于5和9之间或介于6和8之间,并且最优选地介于7和8之间,诸如7至7.5。可以将固体形式的所得组合物包装在多个单剂量单元中,每一个单元包含固定量的一种或多种上述试剂,诸如在片剂或胶囊的密封包装中。固体形式的组合物也可以灵活的量包装在容器中,诸如在设计用于局部适用的乳膏或软膏的可挤压管中。

[0321] 在一些实施例中,本发明的反义寡核苷酸或反义寡核苷酸缀合物是前药。特别地,对于反义寡核苷酸缀合物,一旦前药被递送至作用位点例如靶细胞,缀合物部分就从反义寡核苷酸上裂解下来。

[0322] 应用

[0323] 本发明的反义寡核苷酸可作为研究试剂使用,例如用于诊断、治疗和预防。

[0324] 在研究中,此类反义寡核苷酸可用于特异性调节细胞(例如体外细胞培养物)和实验动物中蛋白质的合成,从而有助于靶标的功能分析或对其作为治疗干预靶标的可用性的评估。通常,通过降解或抑制产生蛋白质的mRNA从而防止蛋白质形成,或通过降解或抑制产生蛋白质的基因或mRNA来实现靶标调节。

[0325] 如果在研究或诊断中采用本发明的反义寡核苷酸,则靶核酸可以是cDNA或衍生自DNA或RNA的合成核酸。

[0326] 本发明提供了在表达靶标蛋白的靶细胞中调节基因表达的体内或体外方法,该方法包括向该细胞施用有效量的本发明的反义寡核苷酸。

[0327] 在一些实施例中,靶细胞是哺乳动物细胞,特别是人细胞。靶细胞可以是形成哺乳动物组织的一部分的体外细胞培养物或体内细胞。在优选的实施例中,靶细胞存在于中枢神经系统中。

[0328] 治疗应用

[0329] 本发明的反义寡核苷酸或本发明的反义寡核苷酸缀合物、盐或药物组合物可施用于动物或人以预防或治疗神经系统疾病。

[0330] 可用本发明的反义寡核苷酸或本发明的反义寡核苷酸缀合物、盐或药物组合物治疗的神经病症可以是肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、阿尔茨海默病、动脉瘤、背痛、贝尔麻痹、先天性脑和脊髓缺陷、脑损伤、脑肿瘤、脑瘫、慢性疲劳综合征、脑震荡、痴呆、颈部和下部背部椎间盘疾病、头晕、癫痫、格林-巴利综合征、头痛和偏头痛、多发性硬化症、肌萎缩、神

经痛、

[0331] 神经病、神经肌肉疾病和相关疾病、帕金森病、精神病况(严重抑郁症、强迫症)、脊柱侧凸、惊厥发作、脊髓损伤、脊柱畸形和疾病、脊柱肿瘤、卒中以及眩晕,这些神经疾病可以使用本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物、药物组合物或盐来预防、治疗或改善。

[0332] 本发明提供本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物、组合物或盐用于预防或治疗上述神经系统疾病。

[0333] 本发明进一步涉及本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物或药物组合物用于制造用于治疗或预防上述神经系统疾病的药物的用途。

[0334] 本发明提供用作药物的本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物、药物组合物或盐。

[0335] 本发明提供本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物、药物组合物或盐用于制造药物的用途。

[0336] 本发明提供本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物、药物组合物或盐用于预防或治疗上述神经系统疾病。

[0337] 本发明进一步涉及本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物或药物组合物用于制造用于治疗或预防上述神经系统疾病的药物的用途。

[0338] 治疗方法

[0339] 本发明提供用于治疗或预防患有或可能患有上述神经系统疾病的受试者诸如人的神经系统疾病的方法,其包括向患有或易于患有上述神经系统疾病的受试者施用治疗或预防有效量的本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物或药物组合物。

[0340] 例如,治疗方法可以在罹患选自上述神经系统疾病组成的组的适应症的个体中进行。

[0341] 本发明的方法可以用于治疗上述神经系统疾病。

[0342] 本发明的方法优选用于治疗或预防上述神经系统疾病。

[0343] 施用

[0344] 本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物或药物组合物可以经由肠胃外施用来施用。

[0345] 在一些实施例中,施用途径是皮下或静脉内。

[0346] 在一些实施例中,施用途径选自以下项组成的组:静脉内、皮下、肌肉内、脑内、硬膜外、脑室内眼内、鞘内施用和经孔施用。

[0347] 在一些实施例中,本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物或药物组合物靶向脑部,即被递送至脑部。

[0348] 在一些有利的实施例中,施用是通过鞘内施用、或硬膜外施用或经孔施用。

[0349] 优选地,本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物或药物组合物是鞘内施用。

[0350] 本发明还提供本发明的反义寡核苷酸,或其反义寡核苷酸缀合物,诸如本发明的药用盐或组合物用于制造用于预防或治疗神经系统疾病的药物的用途,其中该药物呈鞘内施用的剂型。

[0351] 本发明还提供如所描述的本发明的反义寡核苷酸或反义寡核苷酸缀合物用于制

造用于预防或治疗神经系统疾病的药物的用途,其中该药物呈鞘内施用的剂型。

[0352] 本发明还提供本发明的反义寡核苷酸,或其反义寡核苷酸缀合物,诸如本发明的药用盐或组合物,作为预防或治疗神经系统疾病的药物使用,其中该药物呈鞘内施用的剂型。

[0353] 本发明还提供本发明的反义寡核苷酸或反义寡核苷酸缀合物,作为预防或治疗神经系统疾病的药物使用,其中该药物呈鞘内施用的剂型。

[0354] 组合疗法

[0355] 在一些实施例中,本发明的反义寡核苷酸、反义寡核苷酸缀合物或药物组合物是用于与另一治疗剂联合治疗。治疗剂可以例如是上述疾病或疾患的护理标准。在一些实施例中,本发明的化合物与可与本发明的化合物或组合物的同时施用或独立地施用的小分子镇痛剂联合使用。本发明的化合物与小分子镇痛剂的联合治疗的一个优点是,小分子镇痛剂具有快速起效的神经疼痛缓解活性,通常作用持续时间短(数小时-数天),而本发明化合物具有延迟起效的活性(通常几天或甚至一周+),但作用持续时间较长(几周-几个月,例如2+、3+或4个月+)。

[0356] 实例

[0357] 实例A:寡聚化合物的合成

[0358] 使用标准亚磷酰胺化学物质合成单链寡核苷酸。未修饰的DNA亚磷酰胺和所有标准试剂均购自Merck KGaA (Darmstadt, Germany)。LNA亚磷酰胺内部生产(LNA亚磷酰胺也可商购自例如Merck KGaA)。8-氨基-dG、8-氧代-dG、7-脱氮-8-氮杂-dG (PPG) 和2'-脱氧肌苷亚磷酰胺购自Glen Research (Sterling, VA)。

[0359] 在MerMade 12 (LGC BioAutomation, Irving, TX) 上以20 μmol 规模在NittoPhase HL UnyLinker 350 支撑物 (Kinovate, Oceanside, CA) 上合成寡核苷酸。在合成后,在65℃使用氨水将寡核苷酸从支撑物裂解过夜。在SuperQ-5PW凝胶 (Tosoh Bioscience, Griesheim, Germany) 上使用10mM NaOH缓冲液和2M NaCl梯度通过离子交换纯化寡核苷酸,并且使用Millipore膜脱盐。在冻干后,最终通过液相色谱-质谱法(反相和电喷雾电离-质谱法)对化合物进行表征。

[0360] 实例1:在小鼠中对包含鸟苷类似物的寡核苷酸的体内研究

[0361] 在此实例中,在以下急性神经毒性测定中研究了包含天然鸟苷或鸟苷类似物的gapmer反义寡核苷酸的神经毒性:

[0362] 每组六只C57BL/6黑色小鼠,共九组,经由脑室内注射单剂量100 μg的反义寡核苷酸来注射。

[0363] 向第1组的小鼠注射生理盐水。向第2组的小鼠注射SEQ ID No.1(对照)。向第3组至第9组的小鼠分别注射SEQ ID No.2至8。

[0364] 根据以下行为评分类别(0-4),观察、报告注射后小鼠的行为,并且在30分钟、1小时、24小时和14天时观察、报告:

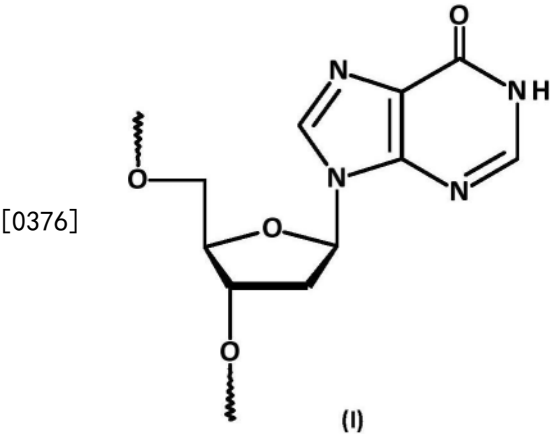
[0365] A. “多动、刻板动作和家笼行为”

[0366] B. “警惕性、探索性和反应能力下降”

[0367] C. “运动协调和强度”

[0368] D. “姿势、外表和呼吸”

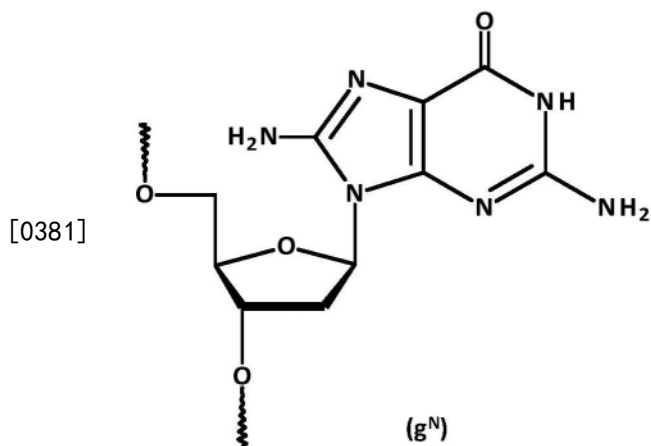
- [0369] E. “震颤、多动、抽搐”
- [0370] 通常,高神经毒性表现为在注射后30分钟内出现共济失调、抽搐和惊厥发作。
- [0371] 表1:
- [0372] 这些序列中的大写字母表示具有LNA修饰的核糖的核苷。所有LNA C都是5-甲基胞嘧啶
- [0373] 这些序列中的小写字母表示DNA。
- [0374] N.a.:无异常
- [0375] I:肌苷核苷



- [0377] 在这些序列中使用了以下经修饰的鸟苷核苷:
- [0378]  $g^{PPG}$ :7-脱氮-8-氮杂-脱氧鸟苷

| SEQ ID No. |                                     | 30 min |      | 1 小时 |      | 24 小时 |      | 14 天 |      | 恢复至基线的中位时间 | 因伦理原因被安乐死 |
|------------|-------------------------------------|--------|------|------|------|-------|------|------|------|------------|-----------|
|            |                                     | 评分     | N.a. | 评分   | N.a. | 评分    | N.a. | 评分   | N.a. |            |           |
|            | 盐水                                  | 0      | 6    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 0.5        | 0         |
| [0379]     | 1 CcAAAtcttataataACtAC (无毒性对照)      | 0      | 6    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 0.5        | 0         |
|            | 2 CTCAtacttgctttaAT                 | 3.7    | 2    | 3.8  | 3    | 0     | 4    | 0    | 4    | 0.8        | 2         |
|            | 3 CTCAtacttIctttaAT                 | 5.8    | 0    | 4.7  | 1    | 0     | 5    | 0    | 5    | 4          | 1         |
|            | 4 CTCAacttg <sup>oxo</sup> ctttaAT  | 0.3    | 4    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 0.5        | 0         |
|            | 5 CTCAtacttg <sup>N</sup> ctttaAT   | 3.8    | 1    | 3.3  | 1    | 0     | 5    | 0    | 5    | 3          | 1         |
|            | 6 CTCAtacttg <sup>PPG</sup> ctttaAT | 1.3    | 3    | 0.2  | 5    | 0     | 6    | 2.7  | 2    | 0.8        | 0         |
|            | 7 TTTTaaccagagtggCAT                | 8.2    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | -          | 6         |
|            | 8 TTTTaaccagagtggcaTC               | 8.7    | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | -          | 6         |

- [0380]  $g^N$ :8-氨基-dG:



[0382] g<sup>oxo</sup>:8-氧代-脱氧鸟苷

[0383] 这项研究显示:

[0384] -无g的序列 (SEQ ID No 1.,对照) 未显示出神经毒性

[0385] -与具有一个g的序列 (SEQ ID No.2) 相比,具有两个或三个g的序列 (SEQ ID No.7和8) 显示出相对较高的神经毒性

[0386] -具有g的序列 (SEQ ID No.2) 显示出神经毒性

[0387] -具有I的序列 (SEQ ID No.3) 显示出神经毒性

[0388] 结论:

[0389] -序列中有许多g:相对较高的神经毒性

[0390] -与具有未经修饰的g的序列相比,在序列中有修饰的g显示出相对较低的神经毒性。

[0391] -序列中有g<sup>oxo</sup>和g<sup>PPG</sup>显示出最小的相对较低的神经毒性

[0392] 急性神经毒素出现于第7组和第8组,导致安乐死

[0393] 表明g有毒性,许多g毒性较大,修饰的g毒性较小。

[0394] 实例2

[0395] 按照实例1的程序,对8组6只C57BL/6小鼠测试表2的gapmer化合物。结果在表2中示出。

[0396] 表2:

| SEQ ID No. |                                 | 30 min |      | 1 小时 |      | 24 小时 |      | 14 天 |      | 恢复至基线<br>的中位<br>时间 | 因伦理原因被安乐死 |
|------------|---------------------------------|--------|------|------|------|-------|------|------|------|--------------------|-----------|
|            |                                 | 评分     | N.a. | 评分   | N.a. | 评分    | N.a. | 评分   | N.a. |                    |           |
| -          | 盐水                              | 0      | 6    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 0.5                | 0         |
| 1          | CcAAAtcttataataACtAC<br>(无毒性对照) | 0      | 6    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 0.5                | 0         |
| 9          | CTAcattcactTgC                  | 4.7    | 0    | 4.5  | 3    | 0     | 4    | 0    | 4    | 1                  | 2         |
| 10         | CTAcattcactTg <sup>PPG</sup> C  | 0.2    | 5    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 0.5                | 0         |
| 11         | CTAcattcactTg <sup>oxo</sup> C  | 0      | 6    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 0.5                | 0         |
| 12         | CTAcattcactTIC                  | 3.3    | 2    | 3.5  | 3    | 0     | 5    | 0    | 5    | 1                  | 1         |
| 13         | CTAcattcactTg <sup>N</sup> C    | 8.3    | 0    | 9.7  | 0    | 0     | 0    | 0    | 0    | -                  | 6         |

[0398] 这些序列中的大写字母表示具有LNA修饰的核糖的核苷。所有LNA C都是5-甲基胞嘧啶

[0399] 这些序列中的小写字母表示DNA。

[0400] N.a.:无异常

[0401] I:肌苷核苷

[0402] 在这些序列中使用了以下经修饰的鸟苷核苷:

[0403]  $g^{PPG}$ :7-脱氮-8-氮杂-脱氧鸟苷

[0404]  $g^N$ :8-氨基-dG

[0405]  $g^{oxo}$ :8-氧代-脱氧鸟苷

[0406] 此研究显示,不具有鸟苷的序列未显示出神经毒性,参见序列 (SEQ ID No.1,对照)。与具有天然鸟苷的相同序列 (SEQ ID No.9) 相比,具有 $g^{PPG}$ 的序列 (SEQ ID No.10) 显示出低得多的神经毒性。具有 $g^{oxo}$ 的序列 (SEQ ID No.11) 未显示神经毒性。其可以与具有天然鸟苷 (SEQ ID No.9) 和 $g^{PPG}$  (SEQ ID No.10) 的相同序列进行比较。具有I的序列 (SEQ ID No.12) 显示出比具有鸟苷的相同序列相对更高的神经毒性。具有 $g^N$ 的序列 (SEQ ID No.13) 显示出比具有鸟苷的相同序列相对更高的神经毒性。

[0407] 结论:本发明人惊讶地发现多核苷酸序列内天然的(即未修饰的)鸟苷核碱基的比例与多核苷酸(如反义寡核苷酸)具有神经毒性的可能性直接相关。此类神经毒性显示为急性且致命的。通过鸟苷类似物 $g^{PPG}$ 和 $g^{oxo}$ 替代天然鸟苷提供降低的神经毒性。

[0408] 实例3

[0409] 按照实例1的程序,对9组6只C57BL/6小鼠测试表2的gapmer化合物。结果在表3中示出。

[0410] 表3:

[0411]

| SEQ ID No. |                                                                 | 剂量     | 30 min |      | 1 小时 |      | 24 小时 |      | 14 天 |      | 恢复至基线<br>的中位时间 | 因伦理原因被安乐死 |
|------------|-----------------------------------------------------------------|--------|--------|------|------|------|-------|------|------|------|----------------|-----------|
|            |                                                                 |        | 评分     | N.a. | 评分   | N.a. | 评分    | N.a. | 评分   | N.a. |                |           |
|            | 盐水                                                              |        | 0      | 6    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 0.5            | 0         |
| 1          | CcAAAtcttataataA<br>CtAC (无毒性对照)                                | 50 µg  | 0      | 6    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 0.5            | 0         |
| 1          | CcAAAtcttataataA<br>CtAC (无毒性对照)                                | 100 µg | 1.2    | 0    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 1.0            | 0         |
| 14         | ACAggattagttCTA                                                 | 50 µg  | 1.5    | 0    | 0.7  | 2    | 0     | 6    | 0    | 6    | 2.0            | 0         |
| 14         | ACAggattagttCTA                                                 | 100 µg | 5.3    | 0    | 6.0  | 0    | 0     | 6    | 0    | 6    | 4.0            | 0         |
| 15         | ACAg <sup>oxo</sup> g <sup>oxo</sup> attag <sup>oxo</sup> ttCTA | 50 µg  | 1.0    | 1    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 1.0            | 0         |
| 15         | ACAg <sup>oxo</sup> g <sup>oxo</sup> attag <sup>oxo</sup> ttCTA | 100 µg | 0.7    | 2    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 1.0            | 0         |
| 16         | ACAg <sup>PPG</sup> g <sup>PPG</sup> attag <sup>PPG</sup> ttCTA | 50 µg  | 0.2    | 5    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 0.5            | 0         |
| 16         | ACAg <sup>PPG</sup> g <sup>PPG</sup> attag <sup>PPG</sup> ttCTA | 100 µg | 0.2    | 5    | 0    | 6    | 0     | 6    | 0    | 6    | 0.5            | 0         |

[0412] 这些序列中的大写字母表示具有LNA修饰的核糖的核苷。所有LNA C都是5-甲基胞嘧啶

[0413] 这些序列中的小写字母表示DNA。

[0414] N.a.:无异常

[0415] I:肌苷核苷

[0416] 在这些序列中使用了以下经修饰的鸟苷核苷:

[0417] g<sup>PPG</sup>:7-脱氮-8-氮杂-脱氧鸟苷

[0418] g<sup>N</sup>:8-氨基-dG

[0419] g<sup>oxo</sup>:8-氧代-脱氧鸟苷

[0420] 此研究揭示,在50µg和100µg下测试的缺口中具有三个天然鸟苷的相同核苷酸序列(SEQ ID No.14)在神经毒性方面显示出剂量依赖性增加。

[0421] 在50µg和100µg下测试了与SEQ ID No.14的gapmer相同但具有三个鸟苷类似物(g<sup>oxo</sup>)的核苷酸序列(SEQ ID.No.15),并显示出与SEQ ID No.14的gapmer相比相对低得多的神经毒性。有趣的是,当剂量从50µg增加到100µg时,神经毒性并没有增加。

[0422] 在50µg和100µg下测试了与SEQ ID No.14的gapmer相同但具有三个鸟苷类似物(g<sup>PPG</sup>)的核苷酸序列(SEQ ID.No.16),并且显示出与SEQ ID No.14的gapmer相比相对低得多的神经毒性。有趣的是,当剂量从50µg增加到100µg时,神经毒性并没有增加。

## 序列表

|       |                       |    |
|-------|-----------------------|----|
| <110> | 罗氏创新中心哥本哈根有限公司        |    |
| <120> | 用于治疗性多核苷酸的鸟苷类似物       |    |
| <130> | P35939-W0             |    |
| <150> | EP20179011            |    |
| <151> | 2020-06-09            |    |
| <160> | 16                    |    |
| <170> | PatentIn 版本 3.5       |    |
| <210> | 1                     |    |
| <211> | 20                    |    |
| <212> | DNA                   |    |
| <213> | 人工序列                  |    |
| <220> |                       |    |
| <223> | 反义寡核苷酸                |    |
| <400> | 1                     |    |
|       | ccaaatctta taataactac | 20 |
| <210> | 2                     |    |
| <211> | 17                    |    |
| <212> | DNA                   |    |
| <213> | 人工序列                  |    |
| <220> |                       |    |
| <223> | 反义寡核苷酸                |    |
| <400> | 2                     |    |
|       | ctcatacttg ctttaat    | 17 |
| <210> | 3                     |    |
| <211> | 17                    |    |
| <212> | DNA                   |    |
| <213> | 人工序列                  |    |
| <220> |                       |    |
| <223> | 反义寡核苷酸                |    |
| <220> |                       |    |
| <221> | misc_feature          |    |
| <222> | (10) .. (10)          |    |
| <223> | n 为 Inosine           |    |
| <400> | 3                     |    |
|       | ctcataacttn ctttaat   | 17 |
| <210> | 4                     |    |
| <211> | 16                    |    |

|                      |    |
|----------------------|----|
| <212> DNA            |    |
| <213> 人工序列           |    |
| <220>                |    |
| <223> 反义寡核苷酸         |    |
| <400> 4              |    |
| ctcaacttgc tttaat    | 16 |
| <210> 5              |    |
| <211> 17             |    |
| <212> DNA            |    |
| <213> 人工序列           |    |
| <220>                |    |
| <223> 反义寡核苷酸         |    |
| <400> 5              |    |
| ctcatacttg ctttaat   | 17 |
| <210> 6              |    |
| <211> 17             |    |
| <212> DNA            |    |
| <213> 人工序列           |    |
| <220>                |    |
| <223> 反义寡核苷酸         |    |
| <400> 6              |    |
| ctcatacttg ctttaat   | 17 |
| <210> 7              |    |
| <211> 18             |    |
| <212> DNA            |    |
| <213> 人工序列           |    |
| <220>                |    |
| <223> 反义寡核苷酸         |    |
| <400> 7              |    |
| ttttaaccag agtggcat  | 18 |
| <210> 8              |    |
| <211> 19             |    |
| <212> DNA            |    |
| <213> 人工序列           |    |
| <220>                |    |
| <223> 反义寡核苷酸         |    |
| <400> 8              |    |
| ttttaaccag agtggcatc | 19 |
| <210> 9              |    |

|                    |              |    |
|--------------------|--------------|----|
| <211>              | 17           |    |
| <212>              | DNA          |    |
| <213>              | 人工序列         |    |
| <220>              |              |    |
| <223>              | 反义寡核苷酸       |    |
| <400>              | 9            |    |
| ctacatctca tacttgc |              | 17 |
| <210>              | 10           |    |
| <211>              | 17           |    |
| <212>              | DNA          |    |
| <213>              | 人工序列         |    |
| <220>              |              |    |
| <223>              | 反义寡核苷酸       |    |
| <400>              | 10           |    |
| ctacatctca tacttgc |              | 17 |
| <210>              | 11           |    |
| <211>              | 17           |    |
| <212>              | DNA          |    |
| <213>              | 人工序列         |    |
| <220>              |              |    |
| <223>              | 反义寡核苷酸       |    |
| <400>              | 11           |    |
| ctacatctca tacttgc |              | 17 |
| <210>              | 12           |    |
| <211>              | 17           |    |
| <212>              | DNA          |    |
| <213>              | 人工序列         |    |
| <220>              |              |    |
| <223>              | 反义寡核苷酸       |    |
| <220>              |              |    |
| <221>              | misc_feature |    |
| <222>              | (16) .. (16) |    |
| <223>              | n 为 Inosine  |    |
| <400>              | 12           |    |
| ctacatctca tacttnc |              | 17 |
| <210>              | 13           |    |
| <211>              | 17           |    |
| <212>              | DNA          |    |
| <213>              | 人工序列         |    |

|                    |    |
|--------------------|----|
| <220>              |    |
| <223> 反义寡核苷酸       |    |
| <400> 13           |    |
| ctacatctca tacttgc | 17 |
| <210> 14           |    |
| <211> 15           |    |
| <212> DNA          |    |
| <213> 人工序列         |    |
| <220>              |    |
| <223> 反义寡核苷酸       |    |
| <400> 14           |    |
| acaggattag ttcta   | 15 |
| <210> 15           |    |
| <211> 15           |    |
| <212> DNA          |    |
| <213> 人工序列         |    |
| <220>              |    |
| <223> 反义寡核苷酸       |    |
| <400> 15           |    |
| acaggattag ttcta   | 15 |
| <210> 16           |    |
| <211> 15           |    |
| <212> DNA          |    |
| <213> 人工序列         |    |
| <220>              |    |
| <223> 反义寡核苷酸       |    |
| <400> 16           |    |
| acaggattag ttcta   | 15 |

研究 3: Ataxin-3

对 C57 黑色小鼠进行 ICV 注射，每组 6 只小鼠。  
剂量：50 µg 和 100 µg 单剂量

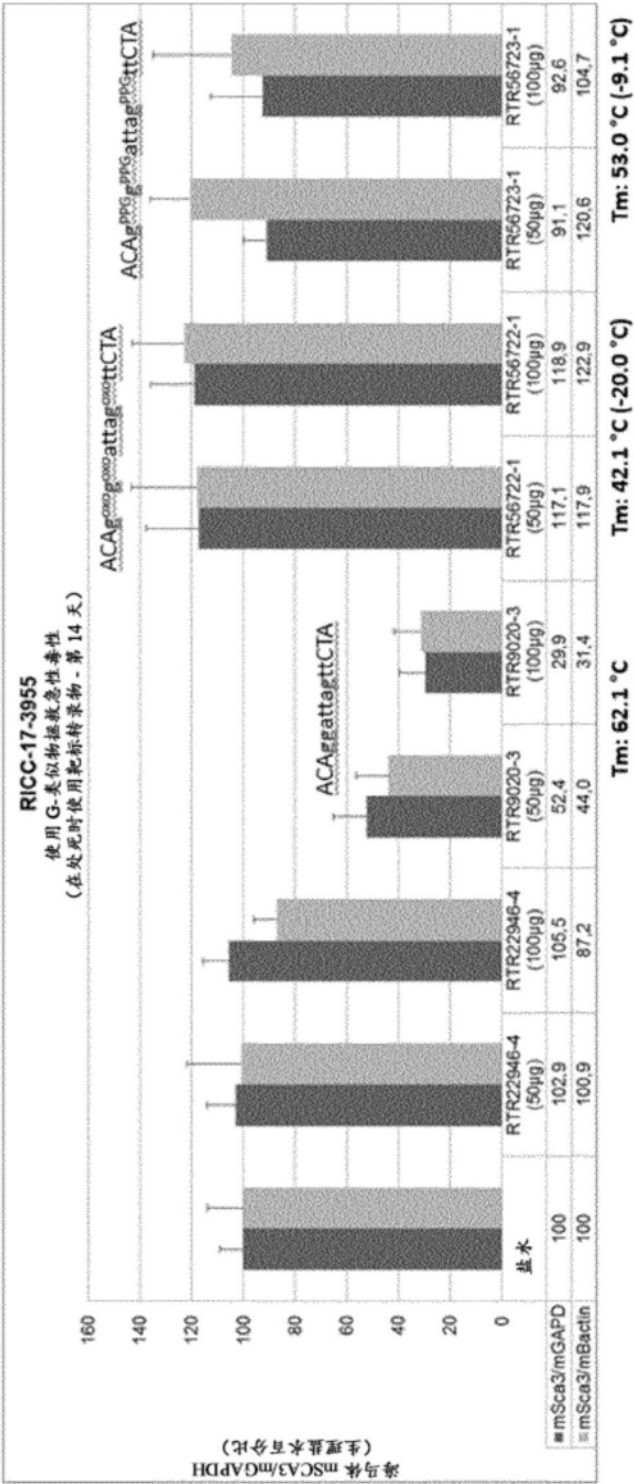
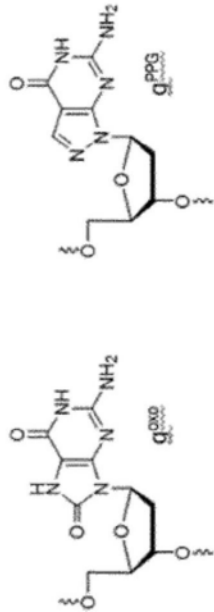


图1