(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114945669 B
(45)授权公告日 2025.01.10

(21)申请号 202080093231.5
(22)申请日 2020.11.06
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114945669 A
(43)申请公布日 2022.08.26
(30)优先权数据
62/931,631 2019.11.06 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.06.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/059399 2020.11.06
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/092371 EN 2021.05.14
(73)专利权人 阿尔尼拉姆医药品有限公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 J·K·奈尔 M·A·迈尔
J·C·萨利纳斯 松田茂夫
A·V·凯尔因 S·P·兰蒂尼
何果 M·H·郑 J·M·皮尔森
M·马诺哈兰 D·C·冈瑟
I·兹拉特夫 C·S·锡尔
V·R·贾达夫 S·米尔斯坦
M·贾纳斯 D·达塔
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 谌侃
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)
(56)对比文件
WO 2009/073809 A2,2009.06.11
US 2008108801 A1,2008.05.08
US 2018256729 A1,2018.09.13
WO 2009073809 A2,2009.06.11
审查员 程珂

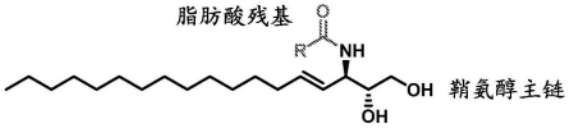
权利要求书3页 说明书199页
序列表64页 附图14页

(54)发明名称

肝外递送

(57)摘要

本发明的一个方面涉及一种化合物,该化合物包含:与靶基因互补的反义链;与所述反义链互补的有义链;和一个或多个亲脂性单体,这些亲脂性单体含有任选地经由接头或载体与至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分。本发明的另一个方面涉及基因沉默的方法,该方法包括向细胞或有需要的受试者施用治疗有效量的亲脂性单体缀合的化合物。



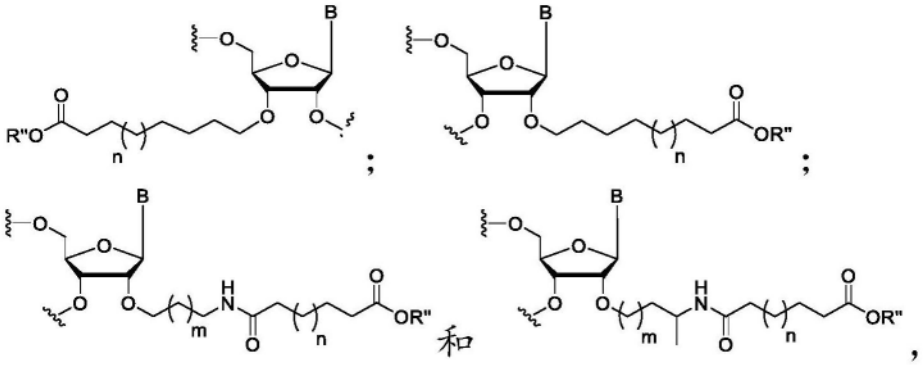
CN 114945669 B

1.一种化合物,该化合物包含:

与靶基因互补的反义链;

与所述反义链互补的有义链;和

一个或多个亲脂性单体,其中该亲脂性单体选自由以下组成的组:



其中:

m是0-8的整数;

n是1-21的整数;

B是经修饰的或未修饰的核碱基;并且

R”各自独立地是H或C_1-C_4烷基;并且

其中至少一个亲脂性单体与至少一条链上的一个或多个内部位置缀合。

2.如权利要求1所述的化合物,其中所述有义链和反义链的长度各自为15至30个核苷酸。

3.如权利要求1所述的化合物,其中所述有义链和反义链的长度各自为19至25个核苷酸。

4.如权利要求1所述的化合物,其中所述有义链和反义链的长度各自为21至23个核苷酸。

5.如权利要求4所述的化合物,其中该有义链的长度为21个核苷酸,并且该反义链的长度为23个核苷酸,其中这些链形成21个连续碱基对的双链区,该双链区在3’端具有2个核苷酸长的单链突出端。

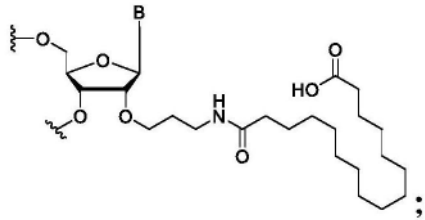
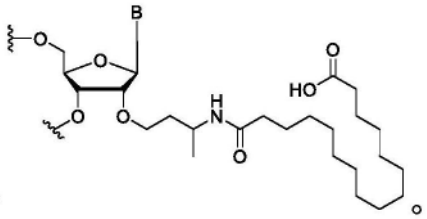
6.如权利要求1所述的化合物,其中所述化合物在多个末端中的至少一个上包含单链突出端。

7.如权利要求6所述的化合物,其中所述单链突出端的长度为1、2或3个核苷酸。

8.如权利要求1-7中任一项所述的化合物,其中该有义链和反义链包含少于十个经2’-氟修饰的核苷酸。

9.如权利要求1-7中任一项所述的化合物,其中该有义链和反义链包含至少50%的经2’-OMe修饰的核苷酸。

10.如权利要求1所述的化合物,其中该亲脂性单体选自由以下组成的组:

；和。

11.如权利要求1-10中任一项所述的化合物,其中该有义链在3’端包含至少一个硫代磷酸酯键。

12.如权利要求1-10中任一项所述的化合物,其中该有义链在3’端包含至少两个硫代磷酸酯键。

13.如权利要求11或12所述的化合物,其中这些硫代磷酸酯键中的一个位于该亲脂性单体与该有义链3’端的第一个核苷酸之间。

14.如权利要求1-13中任一项所述的化合物,该化合物进一步包含在该反义链的5’端的磷酸酯或磷酸酯模拟物。

15.如权利要求14所述的化合物,其中该磷酸酯模拟物是5’-乙烯基膦酸酯(VP)。

16.如权利要求1-15中任一项所述的化合物,其中该反义链在种子区包含至少一个GNA。

17.如权利要求16所述的化合物,其中该种子区位于该反义链5’端的位置5-7处。

18.如权利要求1-17中任一项所述的化合物,该化合物进一步包含靶向配体,该靶向配体靶向介导向CNS组织递送的受体。

19.如权利要求18所述的化合物,其中该靶向配体选自由以下组成的组:血管肽-2、脂蛋白受体相关蛋白(LRP)配体、bEnd.3细胞结合配体、运铁蛋白受体(TfR)配体、甘露糖受体配体、葡萄糖转运蛋白以及LDL受体配体。

20.如权利要求1-17中任一项所述的化合物,该化合物进一步包含靶向配体,该靶向配体靶向介导向眼组织递送的受体。

21.如权利要求20所述的化合物,其中该靶向配体选自由以下组成的组:反式视黄醇、RGD肽和LDL受体配体。

22.如权利要求21所述的化合物,其中该靶向配体是RGD肽并且该RGD肽是H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-Cys-OH(SEQ ID NO:1)或Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys)。

23.如权利要求20所述的化合物,其中该靶向配体是基于碳水化合物的配体。

24.如权利要求1所述的化合物,其中所述内部位置包括除链的各3’端和5’端的末端位置以外,或除链的各3’端和5’端的末端两个位置以外,或除链的各3’端和5’端的末端三个位置以外的所有位置。

25.如权利要求1所述的化合物,其中所述内部位置不包括有义链的裂解位点区。

26.如权利要求25所述的化合物,其中所述内部位置不包括从有义链的5’端计数的位置9-12,或从有义链的3’端计数的位置11-13。

27.如权利要求1所述的化合物,其中所述内部位置不包括反义链的裂解位点区。

28.如权利要求27所述的化合物,其中所述内部位置不包括从反义链的5’端计数的位置12-14。

29.如权利要求1所述的化合物,其中所述内部位置不包括有义链上自3’端计数的位置

11-13,以及反义链上自5’端计数的位置12-14。

30.如权利要求1-17中任一项所述的化合物,其中至少一个亲脂性单体位于双链体区的反义链5’端的前五个碱基对内的有义链上。

31.如权利要求1-17中任一项所述的化合物,其中一个或多个亲脂性单体位于以下内部位置中的一个或多个:自各链的5’端计数,有义链上的位置4-8和13-18,以及反义链上的位置6-10和15-18。

32.如权利要求1-17中任一项所述的化合物,其中一个或多个亲脂性单体位于以下内部位置中的一个或多个:自各链的5’端计数,有义链上的位置5、6、7、15和17,以及反义链上的位置15和17。

33.如权利要求9所述的化合物,其中该有义链和反义链包含至少60%的经2’-OMe修饰的核苷酸。

34.如权利要求9所述的化合物,其中该有义链和反义链包含至少70%的经2’-OMe修饰的核苷酸。

35.如权利要求1-17中任一项所述的化合物,其中至少一个亲脂性单体位于双链体区的反义链5’端的前四个碱基对内的有义链上。

36.如权利要求1-17中任一项所述的化合物,其中至少一个亲脂性单体位于双链体区的反义链5’端的前三个碱基对内的有义链上。

37.如权利要求1-17中任一项所述的化合物,其中至少一个亲脂性单体位于双链体区的反义链5’端的前两个碱基对内的有义链上。

38.如权利要求1-17中任一项所述的化合物,其中至少一个亲脂性单体位于双链体区的反义链5’端的前一个碱基对内的有义链上。

39.如权利要求25-32中任一项所述的化合物,其中所述化合物仅含有一个亲脂性单体。

40.如权利要求1-17和39中任一项所述的化合物,其中一个亲脂性单体位于有义链上的位置5,自链的5’端计数。

41.如权利要求1-17和39中任一项所述的化合物,其中一个亲脂性单体位于有义链上的位置6,自链的5’端计数。

42.如权利要求1-17和39中任一项所述的化合物,其中一个亲脂性单体位于有义链上的位置7,自链的5’端计数。

肝外递送

[0001] 序列表

[0002] 本申请包括已经以ASCII格式电子提交的序列表,并在此通过引用整体并入。所述ASCII副本创建于2022年5月6日,名为29520_1503_SL.txt,大小为52,281字节。

背景技术

[0003] 在体内将iRNA剂有效递送至细胞需要特异性靶向以及来自细胞外环境(特别是血清蛋白)的实质性保护。基于RNAi的疗法显示针对治疗肝脏相关障碍的临床数据前景很好。然而,将siRNA递送至肝外组织仍存在障碍,这使得基于siRNA的疗法的使用颇为受限。

[0004] iRNA剂的体内实验及治疗应用的限制因素之一是有效递送完整siRNA的能力。已将特定难题与非病毒基因在体内转移至视网膜关联起来。挑战之一是克服阻碍视网膜转染的内界膜。另外,已显示玻璃体的带负电荷的糖与阳性DNA-转染试剂复合物相互作用,促进其聚集,这阻碍扩散及细胞摄取。

[0005] 由于游离寡核苷酸无法穿过的血脑屏障(BBB),寡核苷酸向中枢神经系统(CNS)的递送引起特定问题。将寡核苷酸递送至CNS中的一种方式是通过鞘内递送。然而,寡核苷酸也需要有效内化至CNS的靶细胞中以实现期望的治疗效果。先前的研究通常使用诸如脂质体、阳离子脂质及纳米颗粒形成复合物的递送试剂,以帮助寡核苷酸细胞内内化至神经元起源的细胞中。

[0006] 因此,持续需要新的改进的方法:用于在体内递送siRNA分子而不使用组织递送试剂,以实现及增强iRNA剂的治疗潜力。

发明内容

[0007] 本发明的一个方面提供了一种化合物(例如,可以是单链或双链的寡核苷酸),其包含一个或多个亲脂性单体,这些亲脂性单体含有任选地经由接头或载体与寡核苷酸的至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分。例如,本发明的一些实施例提供了一种化合物(例如,双链iRNA剂),其包含:与靶基因互补的反义链;与所述反义链互补的有义链;和一个或多个亲脂性单体,这些亲脂性单体含有任选地经由接头或载体与至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分。

[0008] 在一些实施例中,通过辛醇-水分配系数$\log K_{ow}$测量的亲脂性部分的亲脂性超过0。亲脂性部分的$\log K_{ow}$可超过1、超过1.5、超过2、超过3、超过4、超过5或超过10。

[0009] 在一些实施例中,通过化合物的血浆蛋白结合测定中的未结合分数测量的化合物的疏水性超过0.2。在一个实施例中,测定的血浆蛋白结合测定是使用人类血清白蛋白的电泳迁移率变化测定(EMSA)。通过结合测定中未结合的siRNA的分数测量的化合物的疏水性超过0.15、超过0.2、超过0.25、超过0.3、超过0.35、超过0.4、超过0.45或超过0.5以增强siRNA的体内递送。

[0010] 在一些实施例中,亲脂性部分为脂肪族、环状诸如脂环族、或多环,诸如聚脂环化合物,诸如类固醇(例如固醇)或直链或支链脂肪族烃。示例性亲脂性部分是脂质、胆固醇、

视黄酸、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶氧基己醇、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆烯酸、布洛芬、萘普生、二甲氧基三苯甲基或吩噁嗪。

[0011] 适合的亲脂性部分也包括含有饱和或不饱和C_4-C_{30}烃链(例如C_4-C_{30}烷基或烯基)及选自由以下组成的组的任选的官能团的亲脂性部分:羟基、胺、羧酸、磺酸酯、磷酸酯、硫醇、叠氮基及炔烃。这些官能团可用于将亲脂性部分附接至iRNA剂。在一些实施例中,亲脂性部分含有饱和或不饱和C_6-C_{18}烃链(例如直链C_6-C_{18}烷基或烯基)。在一个实施例中,亲脂性部分含有饱和或不饱和C_{16}烃链(例如直链C_{16}烷基或烯基)。在一些实施例中,亲脂性部分含有两个或更多个碳-碳双键。

[0012] 在一些实施例中,亲脂性部分为具有游离末端羧酸官能团(例如,己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一烷酸、十二烷酸、十三烷酸、十四烷酸、十五烷酸、十六烷酸、十七烷酸、十八烷酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸、顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸)的C_6-C_{30}部分。

[0013] 在一些实施例中,亲脂性部分为C_6-C_{30}酸(例如,己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一烷酸、十二烷酸、十三烷酸、十四烷酸、十五烷酸、十六烷酸、十七烷酸、十八烷酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸、顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸、维生素A、维生素E、胆固醇等)或C_6-C_{30}醇(例如,己醇、庚醇、辛醇、壬醇、癸醇、十一烷醇、十二烷醇、十三烷醇、十四烷醇、十五烷醇、十六烷醇、十七烷醇、十八烷醇、油醇、亚麻醇、花生四烯醇、顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯醇、视黄醇、维生素E、胆固醇等)。

[0014] 亲脂性单体可以包含与iRNA剂的任何部分(例如核碱基、糖部分或核苷间键)缀合的亲脂性部分。当亲脂性部分经由直接附接于iRNA剂的核碱基、核糖或核苷间键与iRNA剂缀合,则亲脂性单体包含核碱基、核糖或核苷间键和亲脂性部分。可替代地,亲脂性单体可以包含与非核糖替换单元,如接头或载体缀合的亲脂性部分。当亲脂性部分经由非核糖替换单元(如接头或载体)缀合至iRNA剂时,则亲脂性单体包含非核糖替换单元(如接头或载体)和亲脂性部分。

[0015] 在某些实施例中,亲脂性单体不含有核碱基。

[0016] 在某些实施例中,亲脂性单体包含经由一个或多个接头(系链)与化合物缀合的亲脂性部分。

[0017] 在一些实施例中,亲脂性单体包含经由接头与化合物缀合的亲脂性部分,该接头含有醚、硫醚、脲、碳酸酯、胺、酰胺、马来酰亚胺-硫醚、二硫化物、磷酸二酯、磺酰胺键、点击反应的产物(例如,来自叠氮化物-炔烃环加成的三唑)或氨基甲酸酯。

[0018] 在一些实施例中,至少一个接头(系链)是氧化还原可裂解接头(诸如还原可裂解接头,例如二硫化物基团)、酸可裂解接头(例如,腙基、酯基、缩醛基或缩酮基)、酯酶可裂解接头(例如,酯基)、磷酸酶可裂解接头(例如,磷酸酯)或肽酶可裂解接头(例如,肽键)。

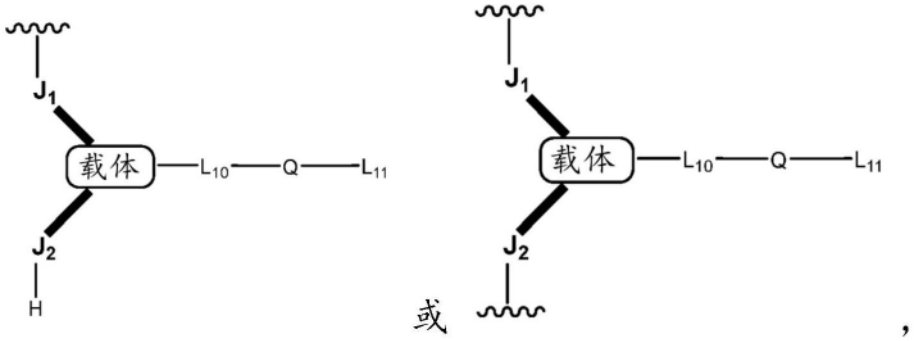
[0019] 在其他实施例中,至少一个接头(系链)是生物可裂解接头,该生物可裂解接头选自由以下组成的组:DNA,RNA,二硫化物,酰胺,半乳糖胺、葡糖胺、葡萄糖、半乳糖、甘露糖的官能化单糖或寡糖及其组合。

[0020] 在某些实施例中,亲脂性单体包含经由替换一个或多个核苷酸的非核糖替换单元(即载体)与化合物缀合的亲脂性部分。载体可以是环状基团或非环状基团。在一个实施例

中,环状基团选自由以下组成的组:吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基及十氢化萘。在一个实施例中,非环状基团为基于丝氨醇主链、甘油主链或二乙醇胺主链的部分。

[0021] 在一些实施例中,载体替换双链iRNA剂中的一个或多个核苷酸。在一些实施例中,载体替换双链iRNA剂的内部位置中的一个或多个核苷酸。在其他实施例中,载体替换有义链或反义链末端的核苷酸。在一个实施例中,载体替换有义链3'端上的末端核苷酸,从而充当保护有义链3'端的端帽。在一个实施例中,载体为具有胺的环状基团,例如,载体可以是吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基或十氢化萘基。

[0022] 在一些实施例中,亲脂性单体可以由以下式中的一种表示:

[0023] 

,

[0024] 其中:

[0025] J_1和J_2各自独立地是O、S、NR^N,任选地经取代的烷基、OC(O)NH、NHC(O)O、C(O)NH、NHC(O)、OC(O)、C(O)O、OC(O)O、NHC(O)NH、NHC(S)NH、OC(S)NH、OP(N(R^P)$_2$)O、或OP(N(R^P)$_2$);

[0026] 载体是环状基团或非环状基团;

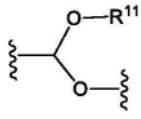
[0027] R^N是H、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的环烷基、任选地经取代的芳烷基、任选地经取代的杂芳基、或氨基保护基;

[0028] R^P在每次出现时独立地是H、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的环烷基、或任选地经取代的杂芳基;

[0029] L_{10}是经取代或未经取代的、饱和或不饱和的C3-C8烃,(例如,C3-C8烷基、烯基或炔基,或含有两个或多个双键的C3-C8烃);经取代的基团包括本文已对"经取代的"烃、烷基、烯基或炔基所述的那些;

[0030] L_{11}是经取代或未经取代的、饱和或不饱和的C6-C26烃,(例如,C6-C26烷基、烯基或炔基,或含有两个或多个双键的C3-C8烃);经取代的基团包括本文已对"经取代的"烃、烷基、烯基或炔基所述的那些;并且

[0031] 当载体上没有核碱基时,Q不存在,或者Q是将在体内将L_{10}从L_{11}上裂解至少10%的可裂解基团。例如,Q可以是可在体内裂解以将L_{11}从亲脂性单体上裂解约10%-70%、约15%-50%、约20%-40%或约20%-30%的可裂解基团。示例性可裂解基团包括-OC(O)-、-C(O)O-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(S)-、-C(S)O-、-S-S-、-C(R^5)=N-、-N=C(R^5)-、-C(R^5)=N-

O-、-O-N=C(R^5)-、-C(O)N(R^5)-、-N(R^5)C(O)-、-C(S)N(R^5)-、-N(R^5)C(S)-、-N(R^5)C(O)N(R^5)-、-N(R^5)C(O)C(R^3)(R^4)OC(O)-、-C(O)OC(R^3)(R^4)C(O)N(R^5)-、-OC(O)O-、-OSi(R^5)$_2$O-、-C(O)(CR^3R^4)C(O)O-、-OC(O)(CR^3R^4)C(O)-、、或其组合，R^{11}是C_2-C_8烷基或烯基。在每次出现时，R^3、R^4和R^5各自独立地是H或C_1-C_4烷基。

[0032] 在一个实施例中，Q的裂解性通过配体在脑脊液(CSF)中的稳定性、配体在血浆中的稳定性、配体在脑匀浆或组织匀浆(肝、眼等)中的稳定性或配体在玻璃体液中的稳定性。

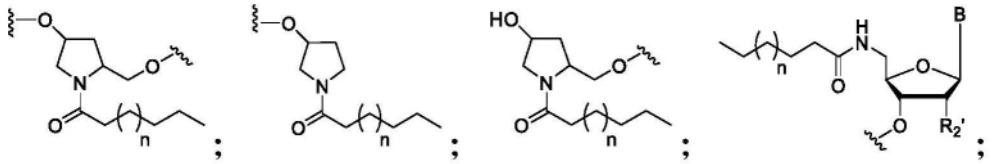
[0033] 环状和非环状基团包括本文已经描述的那些。

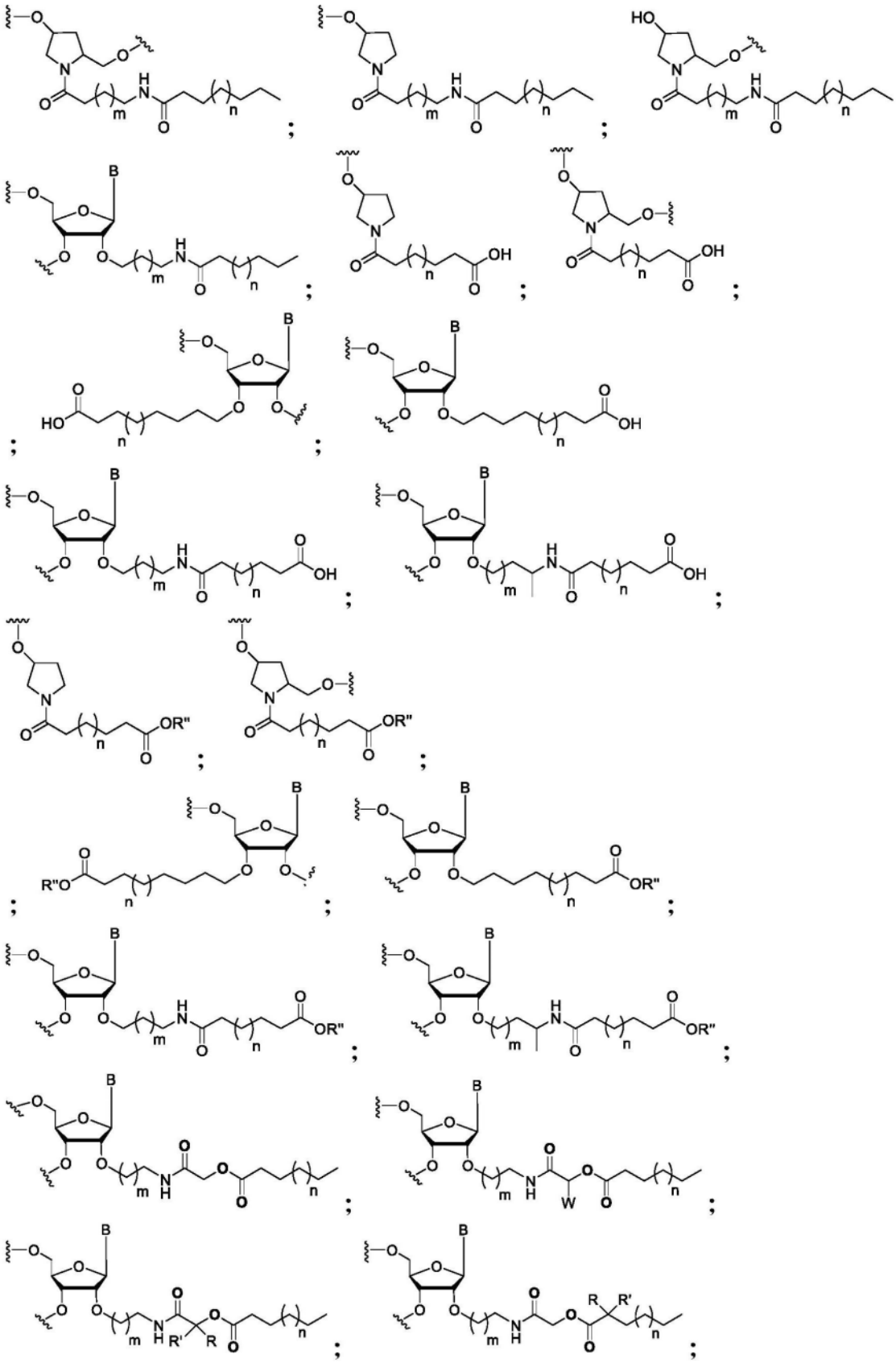
[0034] 在一个实施例中，非环状基团是丝氨醇、甘油或二乙醇胺主链。

[0035] 在一个实施例中，环状基团选自吡咯烷基、羟基脯氨酸基(hydroxyprolinyl)、环戊基、环己基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基和十氢化萘基。

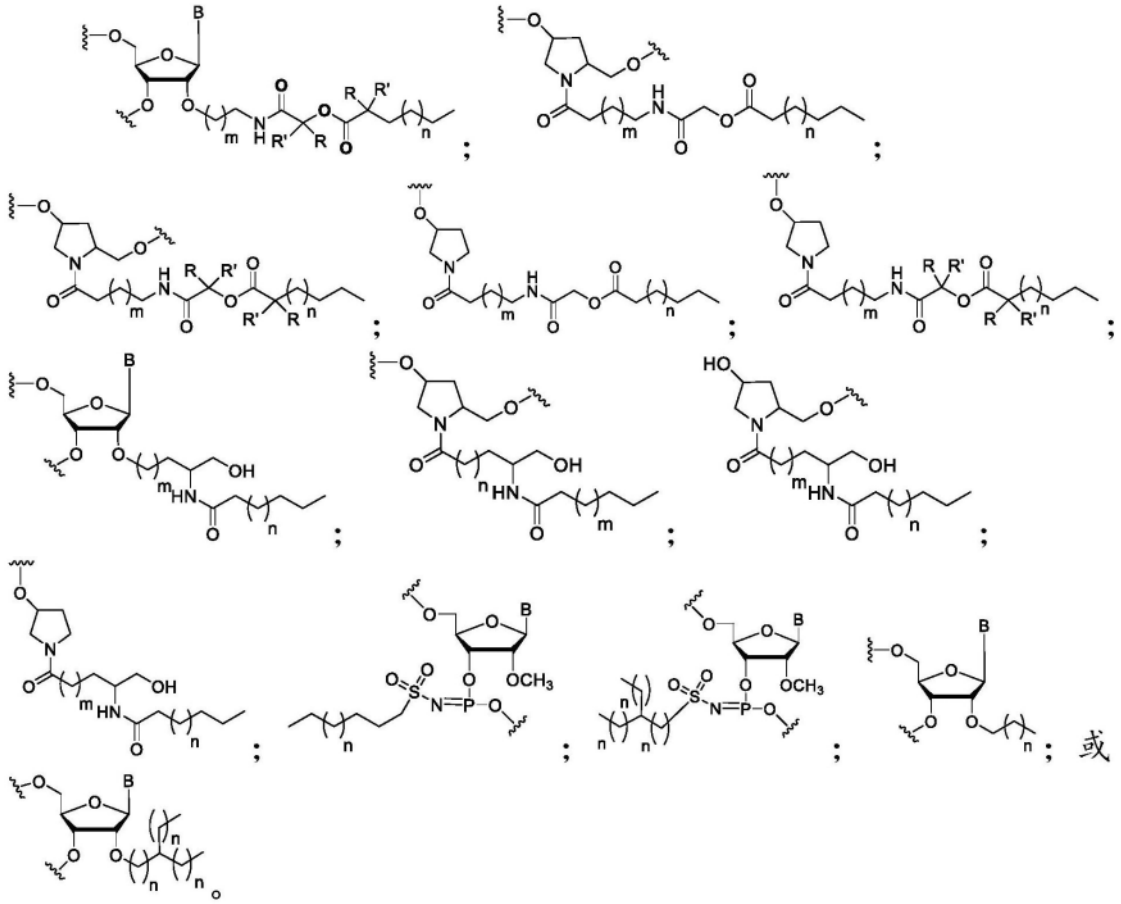
[0036] 在一个实施例中，环状基团是核糖或核糖类似物。核糖类似物的实例包括阿拉伯糖、4'-硫代核糖、2'-O-甲基核糖、GNA、UNA和LNA类似物。

[0037] 在一些实施例中，与化合物的链的一个或多个位置缀合的亲脂性单体具有以下结构：

[0038] 



[0039]

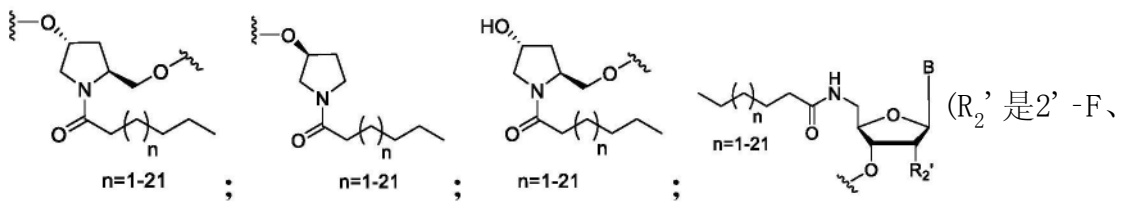
[0040] 

[0041] 在亲脂性单体的以上结构中,单体也可含有一个或多个不对称中心,并且因此以外消旋体及外消旋混合物、单一对映异构体、个别非对映异构体及非对映异构体混合物形式存在。明确包括单体的所有此类异构形式。

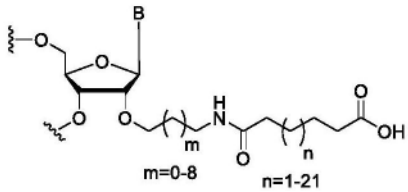
[0042] 在上述亲脂性单体的结构中,亚烷基链可以包含一个或多个不饱和键。

[0043] 整数m是0-8。整数n是1-21。R_2'可以是任何官能团(其是对核糖可接受的2'修饰),如2'-O-甲氧基烷基(例如,2'-O-甲氧基甲基、2'-O-甲氧基乙基或2'-O-2-甲氧基丙烷基)修饰、2'-O-烯丙基修饰、2'-C-烯丙基修饰、2'-氟修饰、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰,2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)修饰、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)修饰或2'-ara-F修饰。例如,R_2'可以是H、OH、F、OMe、O-甲氧基烷基、O-烯丙基、O-N-甲基乙酰胺基、O-二甲基氨基乙氧基乙基、或O-氨基丙基。B是经修饰的或未修饰的核碱基。W是烷基,如C_1-C_4烷基(例如,甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基)。R、R'、和R"各自独立地是H或烷基,如C_1-C_4烷基(例如,甲基、乙基、丙基、异丙基、叔丁基)。

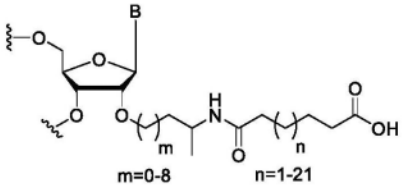
[0044] 在一些实施例中,与化合物的链的一个或多个位置缀合的亲脂性单体具有以下结构:

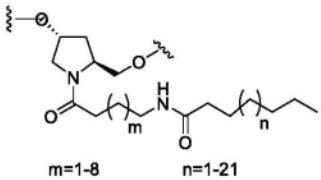
[0045] 

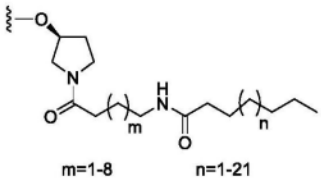
(R_2'是2'-F、

2’-OMe、2’-NMA、2’-脱氧、或2’-OH）；

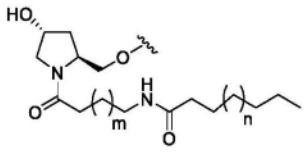
；

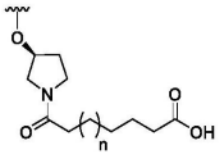


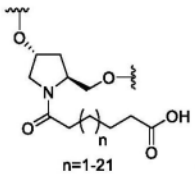
；

；

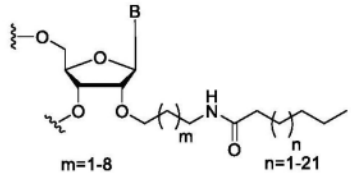
；

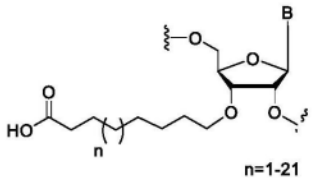


；

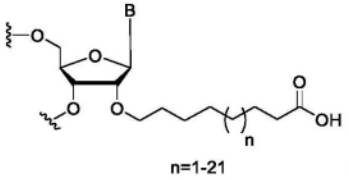
；

；

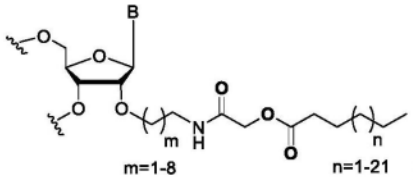


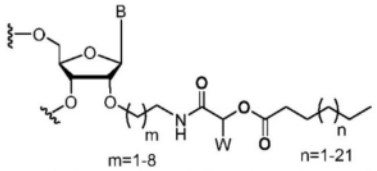
；

；

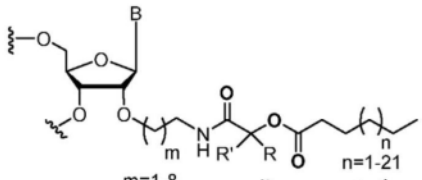


；

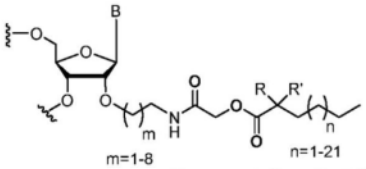


；

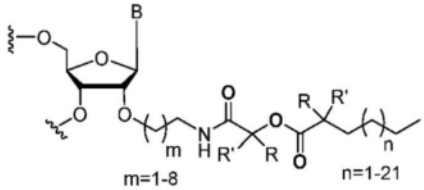
W=甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基；



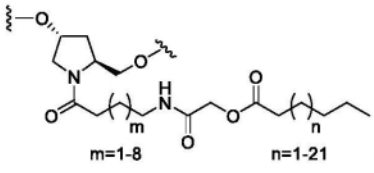
R, R'= H或CH_3、乙基、异丙基、叔丁基；



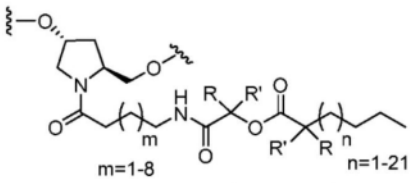
R, R'= H或CH_3、乙基、异丙基、叔丁基；



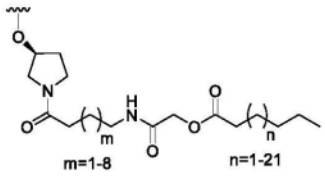
R, R'= H或CH_3、乙基、异丙基、叔丁基；



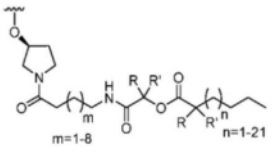
；



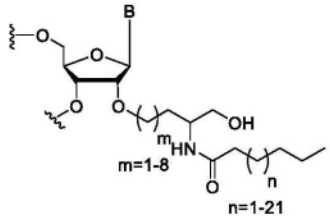
R, R'= H或CH_3、乙基、异丙基、叔丁基；



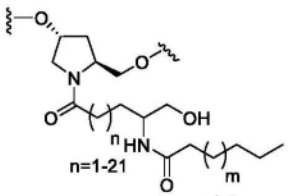
；



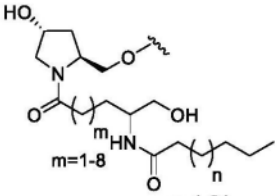
R, R'= H或CH_3、乙基、异丙基、叔丁基；



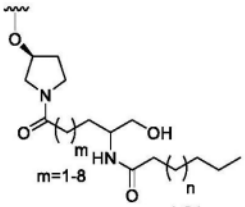
；



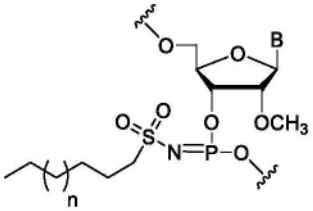
；



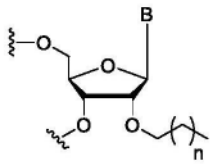
；



；



；或

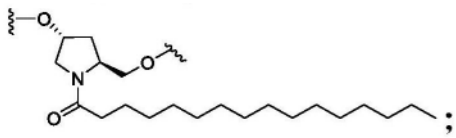


。

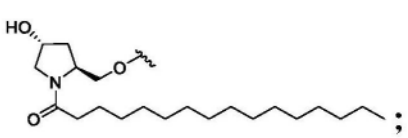
在这些结构中,B是经修饰的或未修饰的核碱基。

[0046] 亲脂性单体的具体实施例包括：

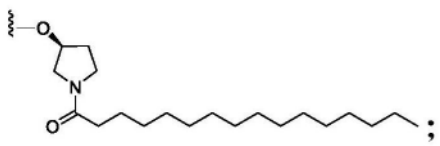
[0047]



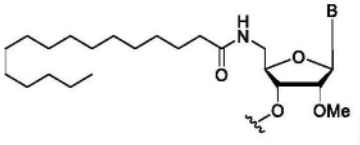
；



；

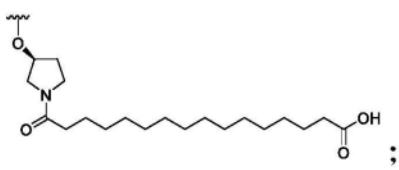
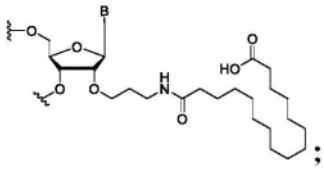
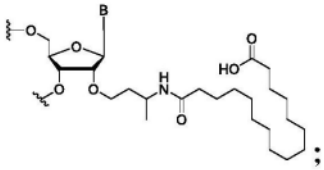
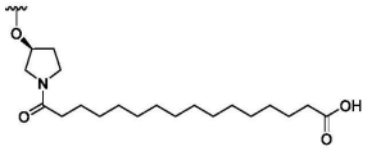
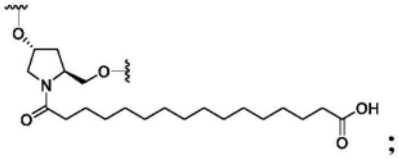
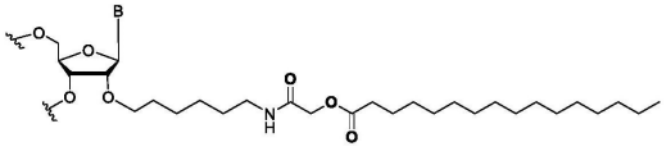
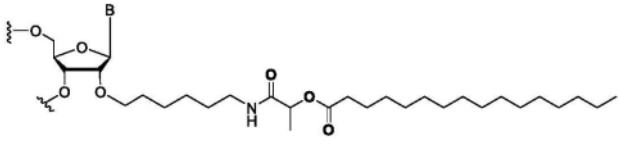
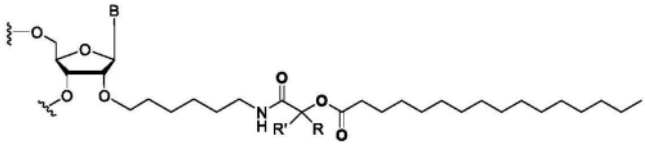
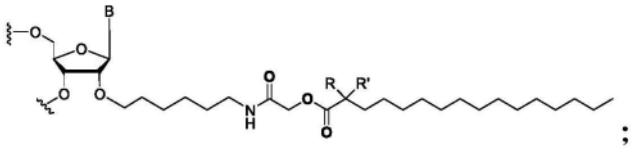
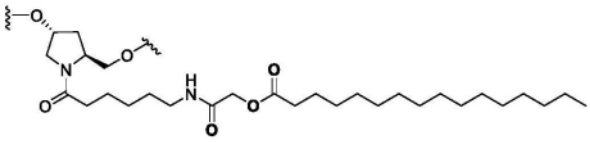
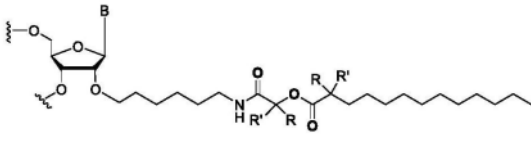
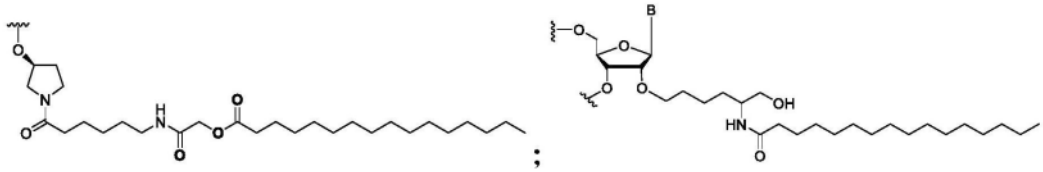
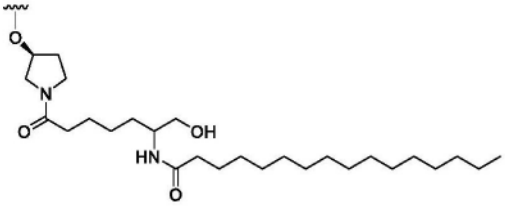
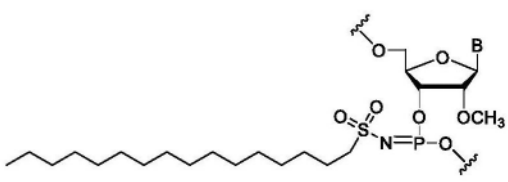


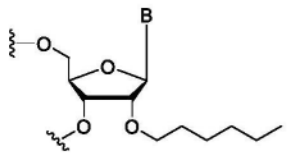
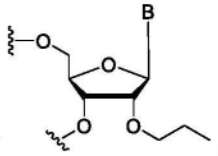
；



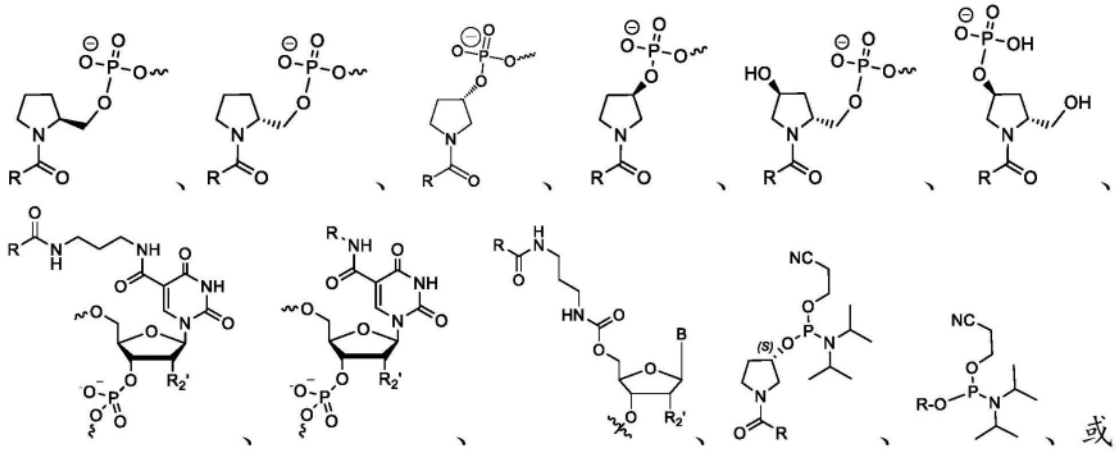
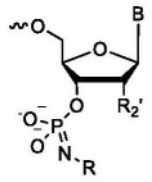
；

[0048]

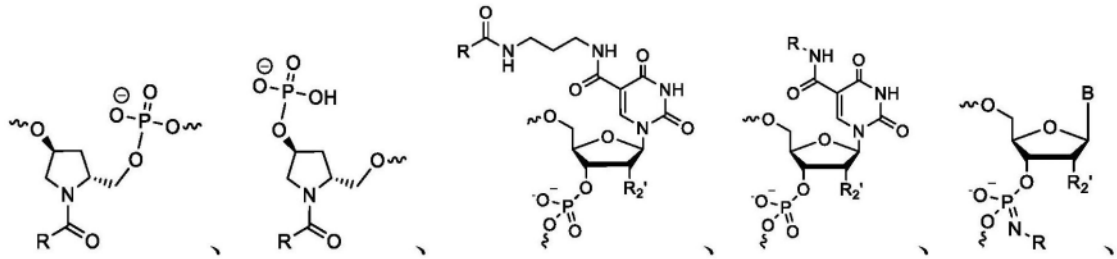
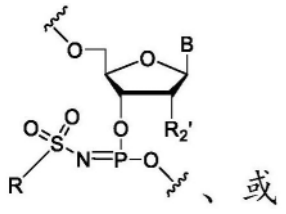

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

[0049]  ；和  。在这些结构中，B是经修饰的或未修饰的核碱基；并且R和R'各自独立地是H、甲基、乙基、异丙基、或叔丁基。

[0050] 在一些实施例中，亲脂性单体含有经由以下载体与化合物的链(单链寡核苷酸的单链；或双链寡核苷酸的有义链和/或反义链)缀合的亲脂性部分：

[0051]  、  。在这些实施例中，R是如本文定义的亲脂性部分。R_2' 是H、OH、F、OMe、O-甲氧基烷基、O-烯丙基、O-N-甲基乙酰胺基、O-二甲基氨基乙氧基乙基、或O-氨基丙基。B是经修饰的或未修饰的核碱基。

[0052] 在一些实施例中，亲脂性单体含有经由以下载体与化合物的链(单链寡核苷酸的单链；或双链寡核苷酸的有义链和/或反义链)的内部位置缀合的亲脂性部分：

[0053]  、  。在这些实施例中，R是如本文定义的亲脂性部分。n是1-21的整数。R_2' 是H、OH、F、OMe、O-甲氧基烷基、O-烯丙基、O-N-甲基乙酰胺基、O-二甲基氨基乙氧基乙基、或O-氨基丙基。B是经修饰的或未修饰的核碱基。

[0054] 亲脂性单体的额外实例可见于实例中。

[0055] 在一些实施例中，化合物的有义链及反义链的长度各自为15至30个核苷酸。

[0056] 在一个实施例中,化合物的有义链及反义链的长度各自为19至25个核苷酸。

[0057] 在一个实施例中,化合物的有义链及反义链的长度各自为21至23个核苷酸。

[0058] 在一些实施例中,化合物在多个末端中的至少一个上包含单链突出端,例如长度为1-10个核苷酸的3'和/或5'突出端,例如1、2、3、4、5或6个核苷酸的突出端。在一些实施例中,两条链在双链区中具有至少一段1-5(例如,1、2、3、4或5)个单链核苷酸。在一个实施例中,单链突出端长度为1、2或3个核苷酸。在一些实施例中,化合物也可具有平端,位于反义链的5'端(或有义链的3'端),或反之亦然。在一个实施例中,化合物在反义链的3'端包含3'突出端,并且任选地在反义链的5'端包含平端。在一个实施例中,化合物在有义链的5'端包含5'突出端,并且任选地在反义链的5'端包含平端。在一个实施例中,化合物在iRNA双链体的两端具有两个平端。

[0059] 在一个实施例中,化合物的有义链长度为21个核苷酸,并且反义链长度为23个核苷酸,其中这些链形成21个连续碱基对的双链区(在3'端具有2个核苷酸长的单链突出端)。

[0060] 在一些实施例中,有义链在3'端进一步包含至少一个硫代磷酸酯键。在一些实施例中,有义链在3'端进一步包含至少两个硫代磷酸酯键。在一些实施例中,一个或多个亲脂性单体位于有义链的3'端。在一个实施例中,这些硫代磷酸酯键中的一个位于该亲脂性单体与该有义链3'端的第一个核苷酸之间。

[0061] 在一些实施例中,有义链在5'端进一步包含至少一个硫代磷酸酯键。在一些实施例中,有义链在5'端进一步包含至少两个硫代磷酸酯键。在一些实施例中,一个或多个亲脂性单体位于有义链的5'端。在一个实施例中,这些硫代磷酸酯键中的一个位于该亲脂性单体与该有义链5'端的第一个核苷酸之间。

[0062] 在一些实施例中,反义链在3'端进一步包含至少一个硫代磷酸酯键。在一些实施例中,反义链在3'端进一步包含至少两个硫代磷酸酯键。在一些实施例中,一个或多个亲脂性单体位于反义链的3'端。在一个实施例中,这些硫代磷酸酯键中的一个位于该亲脂性单体与该反义链3'端的第一个核苷酸之间。

[0063] 在一些实施例中,化合物进一步包含在反义链的5'端的磷酸酯或磷酸酯模拟物。在一个实施例中,磷酸酯模拟物为5'-乙烯基膦酸酯(VP)。

[0064] 在一些实施例中,化合物的反义链的5'端不含有5'-乙烯基膦酸酯(VP)。

[0065] 在一些实施例中,化合物进一步包含至少一个末端手性磷原子。

[0066] 核苷酸间键的位点特异性手性修饰可发生在链的5'端、3'端或5'端及3'端。其在本文中称为“末端”手性修饰。末端修饰可发生在末端区的3'或5'末端位置,例如在链的末端核苷酸上或在最后2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸内的位置。手性修饰可发生在有义链、反义链或有义链及反义链。每个手性纯磷原子可呈Rp构型或Sp构型及其组合。关于手性修饰及经手性修饰的dsRNA剂的更多详情可见于2018年12月21日提交的名称为“Chirally-Modified Double-Stranded RNA Agents[经手性修饰的双链RNA剂]”的PCT/US 18/67103,将其通过引用以其全文并入本文。

[0067] 在一些实施例中,化合物进一步包含在反义链3'端的第一核苷酸间键处发生的具有Sp构型的键磷原子的末端手性修饰;在反义链5'端的第一核苷酸间键处发生的具有Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;以及在有义链5'端的第一核苷酸间键处发生的具有Rp构型或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

[0068] 在一个实施例中,化合物进一步包含在反义链3'端的第一核苷酸间键和第二核苷酸间键处发生的具有Sp构型的键磷原子的末端手性修饰;在反义链5'端的第一核苷酸间键处发生的具有Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;以及在有义链5'端的第一核苷酸间键处发生的具有Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

[0069] 在一个实施例中,化合物进一步包含在反义链3'端的第一核苷酸间键、第二核苷酸间键和第三核苷酸间键处发生的具有Sp构型的键磷原子的末端手性修饰;在反义链5'端的第一核苷酸间键处发生的具有Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;以及在有义链5'端的第一核苷酸间键处发生的具有Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

[0070] 在一个实施例中,化合物进一步包含在反义链3'端的第一核苷酸间键和第二核苷酸间键处发生的具有Sp构型的键磷原子的末端手性修饰;在反义链3'端的第三核苷酸间键处发生的具有Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;在反义链5'端的第一核苷酸间键处发生的具有Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;以及在有义链5'端的第一核苷酸间键处发生的具有Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

[0071] 在一个实施例中,化合物进一步包含在反义链3'端的第一核苷酸间键和第二核苷酸间键处发生的具有Sp构型的键磷原子的末端手性修饰;在反义链5'端的第一及第二核苷酸间键处发生的具有Rp构型的键磷原子的末端手性修饰;以及在有义链5'端的第一核苷酸间键处发生的具有Rp或Sp构型的键磷原子的末端手性修饰。

[0072] 在一些实施例中,化合物在反义链上的前五个核苷酸处具有至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自5'端计数)。

[0073] 在一些实施例中,反义链包含被1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个磷酸酯核苷酸间键分开的具有一个、两个或三个硫代磷酸酯核苷酸间键的两个嵌段。

[0074] 在一些实施例中,化合物进一步包含靶向配体,该靶向配体靶向介导递送至特定CNS组织的受体。在一个实施例中,靶向配体选自由以下组成的组:血管肽-2(Angiopep-2)、脂蛋白受体相关蛋白(LRP)配体、bEnd.3细胞结合配体、运铁蛋白受体(TfR)配体、甘露糖受体配体、葡萄糖转运蛋白及LDL受体配体。

[0075] 在一些实施例中,化合物进一步包含靶向配体,其靶向介导递送至眼组织的受体。在一个实施例中,靶向配体选自由以下组成的组:反式视黄醇、RGD肽、LDL受体配体及基于碳水化合物的配体。在一个实施例中,靶向配体为RGD肽,诸如H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-Cys-OH(SEQ ID NO:1)或Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys)。

[0076] 在一些实施例中,化合物进一步包含靶向肝组织的靶向配体。在一些实施例中,靶向配体为基于碳水化合物的配体。在一个实施例中,靶向配体为GalNAc缀合物。

[0077] 在一些实施例中,100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%或30%的化合物的反义链和有义链经修饰。例如,当50%的化合物经修饰时,化合物中存在的所有核苷酸的50%含有如本文所述的修饰。

[0078] 在一些实施例中,化合物的反义链和有义链包含至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%,或几乎100%的经2'-O-甲基修饰的核苷酸。

[0079] 在一个实施例中,化合物为寡核苷酸,例如双链dsRNA剂,并且双链dsRNA剂的至少

50％的核苷酸独立地经2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-脱氧或2'-氟修饰。

[0080] 在一个实施例中,寡核苷酸为反义的,并且反义的至少50％的核苷酸独立地经LNA、CeNA、2'-甲氧基乙基或2'-脱氧修饰。

[0081] 在一些实施例中,化合物的有义链和反义链包含少于12个、少于10个、少于8个、少于6个、少于4个、少于2个、或不包含经2'-F修饰的核苷酸。在一些实施例中,化合物在有义链上具有少于12个、少于10个、少于8个、少于6个、少于4个、少于2个或不具有2'-F修饰。在一些实施例中,化合物在反义链上具有少于12个、少于10个、少于8个、少于6个、少于4个、少于2个或不具有2'-F修饰。

[0082] 在一些实施例中,化合物在有义链或反义链的任何位置上具有一个或多个2'-F修饰。

[0083] 在一些实施例中,化合物具有少于20％、少于15％、少于10％、少于5％的非天然核苷酸,或基本上不含非天然核苷酸。非天然核苷酸的实例包括无环核苷酸、LNA、HNA、CeNA、2'-O-甲氧基烷基(例如,2'-O-甲氧基甲基、2'-O-甲氧基乙基或2'-O-2-甲氧基丙基)、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-ara-F、L-核苷修饰(诸如2'-修饰的L-核苷,例如2'-脱氧-L-核苷)、BNA无碱基糖、无碱基环状及开链烷基。

[0084] 在一些实施例中,化合物具有大于80％、大于85％、大于90％、大于95％或几乎100％的天然核苷酸。出于这些实施例的目的,天然核苷酸可以包括具有2'-OH、2'-脱氧及2'-OMe的天然核苷酸。

[0085] 在一些实施例中,反义链(例如,在反义链的种子区)含有至少一个解锁核酸(UNA)或甘油核酸(GNA)修饰。在一个实施例中,种子区在反义链5'端的位置2-8(或位置5-7)。

[0086] 在一个实施例中,化合物包含有义链及反义链,每条链具有15-30个核苷酸的长度;在反义链上的前五个核苷酸处的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自5'端计数);其中双链体区在19至25个碱基对之间(优选地19、20、21或22个);其中化合物具有少于20％、少于15％、少于10％、少于5％的非天然核苷酸,或基本上不含非天然核苷酸。

[0087] 在一个实施例中,化合物包含有义链及反义链,每条链具有15-30个核苷酸的长度;在反义链上的前五个核苷酸处的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自5'端计数);其中双链体区在19至25个碱基对之间(优选地19、20、21或22个);其中化合物具有大于80％、大于85％、大于95％或几乎100％的天然核苷酸,诸如具有2'-OH、2'-脱氧或2'-OMe的天然核苷酸。

[0088] 本发明的一个方面提供了一种化合物,该化合物包含有义链和反义链(每条链独立地具有15至35个核苷酸的长度);前五个核苷酸之间的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自反义链的5'端计数);有义链和/或反义链上的至少三个、四个、五个或六个2'-脱氧修饰;其中该化合物具有19至25个碱基对之间的双链(双链体)区;其中该化合物包含配体;并且其中该有义链不包含二醇核酸(GNA)。

[0089] 应理解,反义链与靶序列具有足够的互补性以介导RNA干扰。换言之,该化合物能抑制靶基因的表达。

[0090] 在一个实施例中,化合物包含至少三个2'-脱氧修饰。2'-脱氧修饰位于反义链的位置2和14(自反义链的5'端计数)和有义链的位置11(自有义链的5'端计数)。

[0091] 在一个实施例中,化合物包含至少五个2'-脱氧修饰。2'-脱氧修饰位于反义链的位置2、12和14(自反义链的5'端计数)和有义链的位置9和11(自有义链的5'端计数)。

[0092] 在一个实施例中,化合物包含至少七个2'-脱氧修饰。2'-脱氧修饰位于反义链的位置2、5、7、12和14(自反义链的5'端计数)和有义链的位置9和11(自有义链的5'端计数)。

[0093] 在一个实施例中,反义链包含位于位置2、5、7、12和14(自反义链的5'端计数)的至少五个2'-脱氧修饰。反义链具有18-25个核苷酸的长度或18-23个核苷酸的长度。

[0094] 在一个实施例中,化合物可以包含一种或多种非天然核苷酸。例如,化合物可以包含少于20%,例如少于15%、少于10%或少于5%的非天然核苷酸,或者化合物不包含非天然核苷酸。例如,化合物包含所有天然核苷酸。一些示例性非天然核苷酸包括,但不限于,非环状核苷酸、锁核酸(LNA)、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-氟、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、和2'-ara-F。

[0095] 在一个实施例中,化合物包含有义链及反义链,每条链独立地具有15至35个核苷酸的长度;前五个核苷酸之间的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自反义链的5'端计数);有义链和/或反义链上的至少三个、四个、五个或六个2'-脱氧核苷酸;并且其中该化合物具有19至25个碱基对之间的双链体区;其中该化合物包含配体;其中该有义链不包含二醇核酸(GNA);并且其中该化合物包含少于20%,例如少于15%、少于10%或少于5%的非天然核苷酸,或者化合物包含所有天然核苷酸。

[0096] 在一个实施例中,有义链和反义链中的至少一条在有义链或反义链的中心区包含至少一个,例如至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少七个或更多个2'-脱氧修饰。因此,在一个实施例中,化合物包含有义链及反义链,每条链独立地具有15至35个核苷酸的长度;前五个核苷酸之间的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自反义链的5'端计数);有义链和/或反义链上的至少三个、四个、五个或六个2'-脱氧核苷酸;并且其中该化合物具有19至25个碱基对之间的双链体区;其中该化合物包含配体;并且其中有义链和/或反义链在有义链和/或反义链的中心区包含至少一个,例如至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少七个或更多个2'-脱氧修饰。

[0097] 在一些实施例中,有义链具有18至30个核苷酸的长度并且在有义链的中心区包含至少两个2'-脱氧修饰。例如,有义链具有18至30个核苷酸的长度并且在位置7、8、9、10、11、12和13内(自有义链的5'端计数)包含至少两个2'-脱氧修饰。

[0098] 在一个实施例中,反义链具有18至30个核苷酸的长度并且在反义链的中心区包含至少两个2'-脱氧修饰。例如,反义链具有18至30个核苷酸的长度并且在位置10、11、12、13、14、15和16内(自反义链的5'端计数)包含至少两个2'-脱氧修饰。

[0099] 在一个实施例中,化合物包含有义链和反义链;其中有义链具有17-30个核苷酸的长度并且在有义链的中心区包含至少一个2'-脱氧修饰;并且其中反义链独立地具有17-30个核苷酸的长度并且在反义链的中心区包含至少两个2'-脱氧修饰。

[0100] 在一个实施例中,化合物包含有义链和反义链;其中有义链具有17-30个核苷酸的长度并且在有义链的中心区包含至少两个2'-脱氧修饰;并且其中反义链独立地具有17-30个核苷酸的长度并且在反义链的中心区包含至少一个2'-脱氧修饰。

[0101] 在一个实施例中,化合物包含有义链及反义链,每条链独立地具有15至35个核苷

酸的长度;前五个核苷酸之间的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自反义链的5'端计数);有义链和/或反义链上的至少三个、四个、五个或六个2'-脱氧核苷酸;并且其中该化合物具有19至25个碱基对之间的双链体区;其中该化合物包含配体;并且其中有义链在有义链中心区包含至少一个,例如至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个或更多个2'-脱氧修饰。

[0102] 在一个实施例中,化合物包含有义链及反义链,每条链独立地具有15至35个核苷酸的长度;前五个核苷酸之间的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自反义链的5'端计数);有义链和/或反义链上的至少三个、四个、五个或六个2'-脱氧核苷酸;并且其中该化合物具有19至25个碱基对之间的双链体区;其中该化合物包含配体;并且其中反义链在反义链中心区包含至少一个,例如至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个或更多个2'-脱氧修饰。

[0103] 在一个实施例中,化合物包含有义链及反义链,每条链独立地具有15至35个核苷酸的长度;前五个核苷酸之间的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自反义链的5'端计数);有义链和/或反义链上的至少三个、四个、五个或六个2'-脱氧核苷酸;并且其中该化合物具有19至25个碱基对之间的双链体区;其中该化合物包含配体;其中该化合物包含少于20%,例如少于15%、少于10%或少于5%的非天然核苷酸,或者化合物包含所有天然核苷酸;并且其中有义链和/或反义链在有义链和/或反义链的中心区包含至少一个,例如至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个或更多个2'-脱氧修饰。

[0104] 在一个实施例中,化合物包含有义链及反义链,每条链独立地具有15至35个核苷酸的长度;前五个核苷酸之间的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自反义链的5'端计数);有义链和/或反义链上的至少三个、四个、五个或六个2'-脱氧核苷酸;并且其中该化合物具有19至25个碱基对之间的双链体区;其中该化合物包含配体;其中该化合物包含少于20%,例如少于15%、少于10%或少于5%的非天然核苷酸,或者化合物包含所有天然核苷酸;并且其中有义链在有义链中心区包含至少一个,例如至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个或更多个2'-脱氧修饰。

[0105] 在一个实施例中,化合物包含有义链及反义链,每条链独立地具有15至35个核苷酸的长度;前五个核苷酸之间的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自反义链的5'端计数);有义链和/或反义链上的至少三个、四个、五个或六个2'-脱氧核苷酸;并且其中该化合物具有19至25个碱基对之间的双链体区;其中该化合物包含配体;其中该化合物包含少于20%,例如少于15%、少于10%或少于5%的非天然核苷酸,或者化合物包含所有天然核苷酸;并且其中反义链在反义链中心区包含至少一个,例如至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个或更多个2'-脱氧修饰。

[0106] 在一个实施例中,当化合物包含少于8个非2'OMe核苷酸时,反义链包含至少一个DNA。例如,在本发明的任一实施例中,当化合物包含少于8个非2'OMe核苷酸时,反义链包含至少一个DNA。

[0107] 在一个实施例中,当反义包含两个脱氧核苷酸并且所述核苷酸位于位置2和14(自反义链的5'端计数)时,化合物包含8个或更少的(例如,8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个、1个或0个)非2'OMe核苷酸。例如,在本发明的任一实施例中,当反义包含两个脱氧核苷酸并且所述核苷酸位于位置2和14(自反义链的5'端计数)时,化合物包含0个、1个、2个、3个、4

个、5个、6个、7个或8个非2'OMe核苷酸。

[0108] 在另一方面,本发明进一步提供了用于通过皮下或静脉内施用向受试者中的特定靶递送本发明的化合物的方法。本发明进一步提供了将本发明的化合物用于通过皮下或静脉内施用将所述药剂递送至受试者中的特定靶的方法。

[0109] 本发明的另一方面涉及降低细胞中的靶基因表达的方法,该方法包括使所述细胞与化合物接触,该化合物包含与靶基因互补的反义链;与所述反义链互补的有义链;和一个或多个亲脂性单体,这些亲脂性单体含有任选地经由接头或载体与至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分。

[0110] 在涉及化合物的本发明的第一方面中,涉及亲脂性单体、亲脂性部分及其与化合物的缀合的所有上述实施例适合于与降低细胞中的靶基因表达的方法相关的本发明的此方面。

[0111] 在一个实施例中,细胞为肝外细胞。

[0112] 在一个实施例中,细胞不是肝细胞。

[0113] 本发明的另一方面涉及降低受试者体内的靶基因表达的方法,该方法包括向该受试者施用化合物,包括使所述细胞与化合物接触,该化合物包含与靶基因互补的反义链;与所述反义链互补的有义链;和一个或多个亲脂性单体,这些亲脂性单体含有任选地经由接头或载体与至少一条链上的一个或多个内部位置缀合的一个或多个亲脂性部分。

[0114] 在涉及化合物的本发明的第一方面中,涉及亲脂性单体、亲脂性部分及其与化合物的缀合的所有上述实施例适合于与降低受试者中的靶基因表达的方法相关的本发明的此方面。

[0115] 在一些实施例中,将化合物肝外施用。

[0116] 在一个实施例中,鞘内或脑室内施用该化合物。通过鞘内或脑室内施用化合物,该方法可降低脑或脊柱组织(例如皮质、小脑、颈椎、腰椎及胸椎)中的靶基因表达。

[0117] 在一些实施例中,示例性靶基因为APP、ATXN2、C9orf72、TARDBP、MAPT(Tau)、HTT、SNCA、FUS、ATXN3、ATXN1、SCA1、SCA7、SCA8、MeCP2、PRNP、SOD1、DMPK和TTR。为了降低受试者中这些靶基因的表达,可将化合物直接(例如玻璃体内)施用于一只或多只眼睛。通过玻璃体内施用化合物,该方法可降低眼组织中的靶基因的表达。

[0118] 本发明的另一方面涉及治疗患有CNS障碍的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的双链RNAi剂,从而治疗该受试者。双链RNAi剂包含与靶基因互补的反义链;与所述反义链互补的有义链;和一个或多个亲脂性单体,这些亲脂性单体含有任选地经由接头或载体与至少一条链上的一个或多个内部位置缀合的一个或多个亲脂性部分。

[0119] 在涉及化合物的本发明的第一方面中,涉及亲脂性单体、亲脂性部分及其与化合物的缀合的所有上述实施例适合于与治疗患有CNS障碍的受试者的方法相关的本发明的此方面。可通过本发明的方法治疗的示例性CNS障碍包括阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶型痴呆、亨廷顿病、帕金森病、脊髓小脑病、朊病毒病及拉福拉病。

附图说明

[0120] 图1是显示神经酰胺的一般结构的示意图。

[0121] 图2是描绘用大鼠CSF孵育siRNA双链体24小时后siRNA缀合物在大鼠CSF中的稳定

性的图。

[0122] 图3是描绘siRNA缀合物在兔和食蟹猴玻璃体液(NHP)中24小时的稳定性的图。绘制了配体缀合的双链体的剩余量。

[0123] 图4是描绘siRNA缀合物在兔和食蟹猴玻璃体液(NHP)中24小时的稳定性的图。绘制了配体缀合的双链体的剩余量。

[0124] 图5A和5B是描绘siRNA缀合物在大鼠脑匀浆中4小时的稳定性的图。图5A中绘制了配体缀合的双链体的剩余量,并且图5B中绘制了PS键的稳定性。

[0125] 图6是描绘具有酯酶可裂解缀合物的siRNA缀合物在兔和食蟹猴玻璃体液(NHP)中24小时的稳定性的图。绘制了水解的配体缀合的双链体的百分比。

[0126] 图7是描绘具有酯酶可裂解缀合物的siRNA缀合物在大鼠血浆、CSF和脑匀浆中24小时的稳定性的图。绘制了水解的配体缀合的双链体的百分比。

[0127] 图8是描绘在不同HSA浓度下siRNA缀合物与人类血清白蛋白结合的图。结合siRNA的分数对人类血清白蛋白浓度作图。

[0128] 图9是描绘在不同HSA浓度下具有暴露的羧酸的siRNA缀合物与人类血清白蛋白结合的图。结合siRNA的分数对人类血清白蛋白浓度作图。

[0129] 图10是描述与PBS对照相比,在玻璃体内施用单剂量7.5μg的siRNA双链体后,小鼠眼中眼部TTR表达抑制(通过qPCR)的图。

[0130] 图11是描述与PBS对照相比,在玻璃体内施用单剂量1μg的siRNA双链体后,大鼠眼中眼部TTR表达抑制(通过qPCR)的图。

[0131] 图12是描述与PBS对照相比,在玻璃体内施用单剂量7.5μg的siRNA双链体后,小鼠眼中眼部TTR表达抑制(通过qPCR)的图。

[0132] 图13是描述与PBS对照相比,在玻璃体内施用单剂量1μg的siRNA双链体后,大鼠眼中眼部TTR表达抑制(通过qPCR)的图。

[0133] 图14是描述与PBS对照相比,在玻璃体内施用单剂量7.5μg的siRNA双链体后,小鼠眼中眼部TTR表达抑制(通过qPCR)的图。

[0134] 图15是描述与PBS对照相比,在玻璃体内施用单剂量1μg的siRNA双链体后,大鼠眼中眼部TTR表达抑制(通过qPCR)的图。

[0135] 图16是描述在三种不同浓度下,与对照双链体AD-900954相比,用经Q367修饰的siRNA双链体转染细胞后24小时,原代小鼠肝细胞中TTR基因表达抑制的图。每个核苷酸都经Q367跨有义链修饰。

[0136] 图17是描述在三种不同浓度下,与对照双链体AD-900954相比,用经Q367修饰的siRNA双链体转染细胞后24小时,原代小鼠肝细胞中SOD1基因表达抑制的图。每个核苷酸都经Q367跨有义链修饰。

[0137] 图18A-18D是描绘14天后,与人工CSF给药对照组相比,在IT施用单次0.9mg的siRNA双链体/大鼠后,大鼠脊髓(图18A)、小脑(图18B)、额叶皮质(图18C)和心脏(图18D)中SOD1表达抑制(通过qPCR)的图。

[0138] 图19A-19E是描绘14天后,与人工CSF给药对照组相比,在IT施用单次0.9mg的siRNA双链体/大鼠后,大鼠脊髓(图19A)、脑干(图19B)、小脑(图19C)、额叶皮质(图19D)和心脏(图19E)中SOD1表达抑制(通过qPCR)的图。

[0139] 图20是描绘14天后,与人工CSF给药对照组相比,在IT施用单次0.9mg的siRNA双链体/大鼠后,大鼠脑(小脑和额叶皮质)和脊髓(胸部脊髓)中SOD1表达抑制(通过qPCR)的图。

[0140] 图21A和21B是描绘14天(图21A)和7天(图21B)后,与人工CSF给药对照组相比,ICV施用单次50μg(图21A)和110μg(图21B)的siRNA双链体/小鼠后,小鼠大脑(右半球)和心脏中SOD1表达抑制(通过qPCR)的图。

具体实施方式

[0141] 本发明的诸位发明人尤其发现,将含有亲脂性部分的亲脂性单体与化合物的至少一条链上的一个或多个位置缀合为在体内眼部递送(例如玻璃体内递送)及鞘内或脑室内递送双链iRNA提供令人惊讶的良好结果,使得有效进入CNS组织及眼组织且有效内化至CNS系统及眼系统的细胞中。

[0142] 本发明的一个方面提供了一种化合物,该化合物包含:

[0143] 与靶基因互补的反义链;与所述反义链互补的有义链;和一个或多个亲脂性单体,这些亲脂性单体含有任选地经由接头或载体与至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分。

[0144] 术语“亲脂体”或“亲脂性部分”广义上是指对脂质具有亲和力的任何化合物或化学部分。表征亲脂性部分的亲脂性的一种方式是通过辛醇-水分配系数$\log K_{ow}$,其中K_{ow}为二相系统在平衡时化学物质在辛醇相中的浓度与其在水相中的浓度的比率。辛醇-水分配系数为实验室测量的物质特性。然而,其也可通过使用归因于化学物质的结构组分的系数来预测,这些系数是使用第一原理或经验方法计算的(参见例如Tetko等人,J.Chem.Inf.Comput.Sci.[化学信息与计算机科学杂志]41:1407-21(2001),将其通过引用以其全文并入本文)。其提供物质偏好非水性或油性环境而不是水的倾向的热力学量度(即其亲水性/亲脂性平衡)。原则上,当$\log K_{ow}$超过0时,化学物质具有亲脂性。典型地,亲脂性部分的$\log K_{ow}$超过1、超过1.5、超过2、超过3、超过4、超过5或超过10。举例而言,预测例如6-氨基己醇的$\log K_{ow}$为大约0.7。使用相同方法,预测胆固醇基N-(己-6-醇)氨基甲酸酯的$\log K_{ow}$为10.7。

[0145] 分子的亲脂性可相对于其携带的官能团而改变。举例而言,在亲脂性部分的末端添加羟基或胺基可增加或降低亲脂性部分的分配系数(例如$\log K_{ow}$)值。

[0146] 可替代地,与一个或多个亲脂性单体(含有一个或多个亲脂性部分)缀合的化合物(例如双链iRNA剂)的疏水性可通过其蛋白质结合特征来测量。举例而言,可以确定化合物的血浆蛋白结合测定中的未结合分数与双链iRNA剂的相对疏水性正相关,其可以与双链iRNA剂的沉默活性正相关。

[0147] 在一个实施例中,测定的血浆蛋白结合测定是使用人类血清白蛋白的电泳迁移率变化测定(EMSA)。通过结合测定中未结合的siRNA的分数测量的双链iRNA剂的疏水性超过0.15、超过0.2、超过0.25、超过0.3、超过0.35、超过0.4、超过0.45或超过0.5以增强siRNA的体内递送。

[0148] 因此,将亲脂性单体(含有亲脂性部分)与化合物缀合为增强siRNA的体内递送提供最佳疏水性。

[0149] 在某些实施例中,亲脂性部分为脂肪族、环状诸如脂环族、或多环诸如聚脂环化合

物,诸如类固醇(例如固醇)或直链或支链脂肪族烃。亲脂性部分可一般包含烃链,该烃链可以是环状或非环状的。烃链可包含各种取代基和/或一个或多个杂原子,诸如氧或氮原子。此类亲脂性脂肪族部分包括但不限于饱和或不饱和C_4-C_{30}烃(例如C_6-C_{18}烃)、饱和或不饱和脂肪酸、蜡(例如脂肪酸及脂肪二酰胺的一元醇酯)、萜烯(例如,C_{10}萜烯、C_{15}倍半萜烯、C_{20}二萜烯、C_{30}三萜烯及C_{40}四萜烯)及其他聚脂环烃。举例而言,亲脂性部分可含有C_4-C_{30}烃链(例如C_4-C_{30}烷基或烯基)。在一些实施例中,亲脂性部分含有饱和或不饱和C_6-C_{18}烃链(例如直链C_6-C_{18}烷基或烯基)。在一个实施例中,亲脂性部分含有饱和或不饱和C_{16}烃链(例如直链C_{16}烷基或烯基)。

[0150] 含有亲脂性部分的亲脂性单体可通过本领域已知的任何方法附接至iRNA剂,包括经由已存在于亲脂性单体中或引入iRNA剂中的官能团,诸如羟基(例如-CO-CH_2-OH)。已存在于亲脂性单体中或引入iRNA剂中的官能团包括但不限于羟基、胺、羧酸、磺酸酯、磷酸酯、硫醇、叠氮基及炔烃。

[0151] iRNA剂与亲脂性单体的缀合可例如通过在羟基与烷基R-、烷酰基RCO-或经取代的氨基甲酰基RNHCO-之间形成醚或羧基或氨基甲酰基酯键来发生。烷基R可以是环状的(例如环己基)或非环状的(例如直链或支链的;及饱和或不饱和的)。烷基R可以是丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基或十八烷基等。

[0152] 在一些实施例中,包含亲脂性部分的亲脂性单体经由接头与化合物缀合,该接头含有醚、硫醚、脲、碳酸酯、胺、酰胺、马来酰亚胺-硫醚、二硫化物、磷酸二酯、磺酰胺键、点击反应的产物(例如,来自叠氮化物-炔烃环加成的三唑)或氨基甲酸酯。

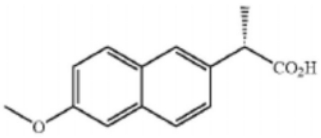
[0153] 在另一个实施例中,亲脂性部分为类固醇,诸如固醇。类固醇为含有全氢-1,2-环戊菲环系统的多环化合物。类固醇包括但不限于胆汁酸(例如胆酸、去氧胆酸及脱氢胆酸)、可的松、地高辛(digoxigenin)、睾酮、胆固醇及阳离子类固醇,诸如可的松。“胆固醇衍生物”是指例如通过取代、添加或移除取代基衍生自胆固醇的化合物。

[0154] 在另一个实施例中,亲脂性部分为芳族部分。在此上下文中,术语“芳族”泛指单芳烃及多芳烃。芳基包括但不限于包含一至三个芳环的C_6-C_{14}芳基部分,其可以任选地经取代;包含与烷基共价连接的芳基的“芳烷基”或“芳基烷基”,其中的任一个可独立地任选地经取代或未经取代;及“杂芳基”。如本文所用,术语“杂芳基”是指具有5至14个环原子,优选地5、6、9或10个环原子;具有在环阵列中共享的6、10或14个π电子,并且除碳原子外具有一至约三个选自由氮(N)、氧(O)及硫(S)组成的组的杂原子的基团。

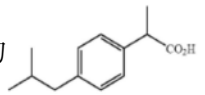
[0155] 如本文所用,“经取代的”烷基、环烷基、芳基、杂芳基或杂环基为具有一至约四个、优选地一至约三个、更优选地一或两个非氢取代基的基团。适合的取代基包括但不限于卤基、羟基、硝基、卤代烷基、烷基、烷芳基、芳基、芳烷基、烷氧基、芳氧基、氨基、酰氨基、烷基氨基甲酰基、芳基氨基甲酰基、氨基烷基、烷氧基羰基、羧基、羟烷基、烷磺酰基、芳磺酰基、烷磺酰胺基、芳磺酰胺基、芳磺酰胺基、烷基羰基、酰氧基、氰基及脲基。

[0156] 在一些实施例中,亲脂性部分为芳烷基,例如2-芳基丙酰基部分。选择芳烷基的结构特征使得亲脂性部分在体内将结合至少一种蛋白质。在某些实施例中,选择芳烷基的结构特征使得亲脂性部分结合血清、血管或细胞蛋白。在某些实施例中,芳烷基的结构特征促进与白蛋白、免疫球蛋白、脂蛋白、α-2-巨球蛋白或α-1-糖蛋白的结合。

[0157] 在某些实施例中,配体为萘普生或萘普生的结构衍生物。合成萘普生的方法可见于美国专利号3,904,682及美国专利号4,009,197,将其通过引用以其全文并入本文。萘普生的化学名称为(S)-6-甲氧基-α-甲基-2-萘乙酸,并且结构为



[0158] 在某些实施例中,配体是布洛芬或布洛芬的结构衍生物。合成布洛芬的方法可见于美国专利号3,228,831,将其通过引用以其全文并入本文。布洛芬的结构为



[0159] 额外的示例性芳烷基在美国专利号7,626,014中说明,将其通过引用以其全文并入本文。

[0160] 在另一个实施例中,适合的亲脂性部分包括脂质、胆固醇、视黄酸、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶氧基己醇、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆烯酸、布洛芬、萘普生、二甲氧基三苯甲基或吩噁嗪。

[0161] 在一些实施例中,亲脂性部分为C_6-C_{30}酸(例如,己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一烷酸、十二烷酸、十三烷酸、十四烷酸、十五烷酸、十六烷酸、十七烷酸、十八烷酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸、顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸、维生素A、维生素E、胆固醇等)或C_6-C_{30}醇(例如,己醇、庚醇、辛醇、壬醇、癸醇、十一烷醇、十二烷醇、十三烷醇、十四烷醇、十五烷醇、十六烷醇、十七烷醇、十八烷醇、油醇、亚麻醇、花生四烯醇、顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯醇、视黄醇、维生素E、胆固醇等)。

[0162] 在某些实施例中,含有一个或多个亲脂性部分的亲脂性单体可并入双链iRNA剂中,特别是当亲脂性部分具有低亲脂性或疏水性时。在一个实施例中,含有两个或更多个亲脂性部分的亲脂性单体并入双链iRNA剂的同一条链中。在一个实施例中,双链iRNA剂的各链具有并入的含有一个或多个亲脂性部分的亲脂性单体。在一个实施例中,含有两个或更多个亲脂性部分的亲脂性单体并入双链iRNA剂的相同位置(即,相同核碱基、相同糖部分或相同核苷间键)。这可以通过例如使用含有载体、和/或直链接头和/或一个或多个接头(可以连接两个或更多个亲脂性部分)的亲脂性单体来实现。

[0163] 当亲脂性部分经由直接附接于iRNA剂的核碱基、核糖或核苷间键与iRNA剂缀合,则亲脂性单体包含核碱基、核糖或核苷间键和亲脂性部分。可替代地,亲脂性单体可以包含与非核糖替换单元,如接头或载体缀合的亲脂性部分。当亲脂性部分经由非核糖替换单元(如接头或载体)缀合至双链iRNA剂时,则亲脂性单体包含非核糖替换单元(如接头或载体)和亲脂性部分。

[0164] 在某些实施例中,亲脂性单体包含经由一个或多个接头(系链)与iRNA剂缀合的亲脂性部分。

[0165] 在一个实施例中,亲脂性单体包含经由接头与化合物缀合的亲脂性部分,该接头含有醚、硫醚、脲、碳酸酯、胺、酰胺、马来酰亚胺-硫醚、二硫化物、磷酸二酯、磺酰胺键、点击反应的产物(例如,来自叠氮化物-炔烃环加成的三唑)或氨基甲酸酯。

[0166] 接头/系链

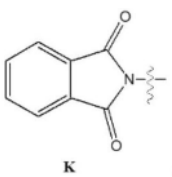
[0167] 接头/系链在“系链附接点(TAP)”处与亲脂性部分连接。接头/系链可以包括任何

C_1-C_{100}含碳部分(例如C_1-C_{75}、C_1-C_{50}、C_1-C_{20}、C_1-C_{10};C_1、C_2、C_3、C_4、C_5、C_6、C_7、C_8、C_9或C_{10}),并且可具有至少一个氮原子。在某些实施例中,氮原子在接头/系链上形成末端氨基或酰氨基(NHC(O)-)的一部分,该部分可充当亲脂性部分的连接点。接头/系链(加下划线)的非限制性实例包括TAP-$(CH_2)_n$NH-;TAP-C(O)$(CH_2)_n$NH-;TAP-NR″″$(CH_2)_n$NH-;TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)-;TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)O-;TAP-C(O)-O-;TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-NH-C(O)-;TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-;TAP-C(O)-NH-;TAP-C(O)-;TAP-$(CH_2)_n$-C(O)-;TAP-$(CH_2)_n$-C(O)O-;TAP-$(CH_2)_n$-;或TAP-$(CH_2)_n$-NH-C(O)-;其中n为1-20(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)并且R″″为C_1-C_6烷基。优选地,n是5、6或11。在其他实施例中,氮可形成末端氧基氨基例如-ONH_2或肼基-$NHNH_2$的一部分。接头/系链可任选地例如被羟基、烷氧基、全卤代烷基取代,和/或任选地插入有一个或多个额外杂原子,例如N、O或S。优选的系链配体可以包括例如TAP-$(CH_2)_n$NH(配体);TAP-C(O)$(CH_2)_n$NH(配体);TAP-NR″″$(CH_2)_n$NH(配体);TAP-$(CH_2)_n$ONH(配体);TAP-C(O)$(CH_2)_n$ONH(配体);TAP-NR″″$(CH_2)_n$ONH(配体);TAP-$(CH_2)_n$$NHNH_2$(配体);TAP-C(O)$(CH_2)_n$$NHNH_2$(配体);TAP-NR″″$(CH_2)_n$$NHNH_2$(配体);TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)(配体);TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-C(O)O(配体);TAP-C(O)-O(配体);TAP-C(O)-$(CH_2)_n$-NH-C(O)(配体);TAP-C(O)-$(CH_2)_n$(配体);TAP-C(O)-NH(配体);TAP-C(O)(配体);TAP-$(CH_2)_n$-C(O)(配体);TAP-$(CH_2)_n$-C(O)O(配体);TAP-$(CH_2)_n$(配体);或TAP-$(CH_2)_n$-NH-C(O)(配体)。在一些实施例中,氨基封端的接头/系链(例如NH_2、ONH_2、NH_2NH_2)可以与配体形成亚氨基键(即,C=N)。在一些实施例中,氨基封端的接头/系链(例如NH_2、ONH_2、NH_2NH_2)可例如用C(O)CF_3酰化。

[0168] 在一些实施例中,接头/系链可用巯基(即SH)或烯烃(例如CH=CH_2)封端。例如,系链可以是TAP-$(CH_2)_n$-SH、TAP-C(O)$(CH_2)_n$SH、TAP-$(CH_2)_n$-(CH=CH_2)或TAP-C(O)$(CH_2)_n$(CH=CH_2),其中n可如别处所述。系链可任选地例如被羟基、烷氧基、全卤代烷基取代,和/或任选地插入有一个或多个额外杂原子,例如N、O或S。双键可以是顺式或反式或者E或Z。

[0169] 在其他实施例中,接头/系链可以包括亲电子部分,优选地在接头/系链的末端位置。示例性亲电子部分包括例如醛、烷基卤化物、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、硝基苯磺酸酯或溴苯磺酸酯,或活化的羧酸酯,例如NHS酯或五氟苯酯。优选的接头/系链(加下划线)包括TAP-$(CH_2)_n$CHO;TAP-C(O)$(CH_2)_n$CHO;或TAP-NR″″$(CH_2)_n$CHO,其中n为1-6且R″″为C_1-C_6烷基;或TAP-$(CH_2)_n$C(O)ONHS;TAP-C(O)$(CH_2)_n$C(O)ONHS;或TAP-NR″″$(CH_2)_n$C(O)ONHS,其中n为1-6且R″″为C_1-C_6烷基;TAP-$(CH_2)_n$C(O)OC_6F_5;TAP-C(O)$(CH_2)_n$C(O)OC_6F_5;或TAP-NR″″$(CH_2)_n$C(O)OC_6F_5,其中n为1-11且R″″为C_1-C_6烷基;或-$(CH_2)_n$$CH_2$LG;TAP-C(O)$(CH_2)_n$$CH_2$LG;或TAP-NR″″$(CH_2)_n$$CH_2$LG,其中n可如别处所述且R″″为$C_1$-$C_6$烷基(LG可以是离去基团,例如卤化物、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、硝基苯磺酸酯、溴苯磺酸酯)。系链连接可通过使配体的亲核基团(例如硫醇或氨基)与系链上的亲电子基团偶联来进行。

[0170] 在其他实施例中,可能需要单体在接头/系链的末端位置包括苯二酰亚氨基(K)。



K

[0171] 在其他实施例中,其他受保护的氨基可在接头/系链的末端位置,例如烯丙氧羰基、单甲氧基三苯甲基(MMT)、三氟乙酰基、Fmoc或芳基磺酰基(例如,芳基部分可以是邻硝

基苯基或邻、对-二硝基苯基)。

[0172] 本文所述的任何接头/系链可以进一步包括一个或多个额外的连接基团,例如-O-$(CH_2)_n$-、-$(CH_2)_n$-SS-、-$(CH_2)_n$-或-(CH=CH)-。

[0173] 可裂解接头/系链

[0174] 在一些实施例中,接头/系链中的至少一个可以是氧化还原可裂解接头、酸可裂解接头、酯酶可裂解接头、磷酸酶可裂解接头或肽酶可裂解接头。

[0175] 在一个实施例中,接头/系链中的至少一个可以是还原可裂解接头(例如二硫化物基团)。

[0176] 在一个实施例中,接头/系链中的至少一个可以是酸可裂解接头(例如,腙基、酯基、缩醛基或缩酮基)。

[0177] 在一个实施例中,接头/系链中的至少一个可以是酯酶可裂解接头(例如酯基)。

[0178] 在一个实施例中,接头/系链中的至少一个可以是磷酸酶可裂解接头(例如磷酸酯)。

[0179] 在一个实施例中,接头/系链中的至少一个可以是肽酶可裂解接头(例如肽键)。

[0180] 可裂解连接基团易受裂解剂(例如pH、氧化还原电位或降解分子的存在)的影响。一般而言,裂解剂在细胞内比在血清或血液中更普遍或以更高水平或活性发现。此类降解剂实例包括:针对特定底物选择的或没有底物特异性的氧化还原剂,包括例如存在于细胞中的氧化性酶或还原性酶或还原剂例如硫醇,其可以通过还原作用降解可经氧化还原裂解的连接基团;酯酶;可产生酸性环境的内体或药剂,例如导致pH为5或更低的内体或药剂;可通过充当一般酸、肽酶(其可以是底物特异性的)及磷酸酶水解或降解酸可裂解连接基团的酶。

[0181] 可裂解连接基团(诸如二硫键)可对pH敏感。人类血清的pH为7.4,而平均细胞内pH略微较低,范围介于约7.1-7.3。内体具有在5.5-6.0范围内的更酸的pH,并且溶酶体具有约为5.0的甚至更酸的pH。一些系链将具有在优选的pH下裂解的连接基团,从而自细胞内的配体(例如,靶向或细胞渗透性配体,诸如胆固醇)释放iRNA剂,或进入细胞的所需区室。

[0182] 将配体与iRNA剂连接的化学连接点(chemical junction)(例如,连接基团)可以包括二硫键。当iRNA剂/配体复合物通过内吞作用吸收至细胞中时,内体的酸性环境将导致二硫键裂解,从而从配体释放iRNA剂(Quintana等人,Pharm Res.[药物研究]19:1310-1316,2002;Patri等人,Curr.Opin.Curr.Biol.[化学生物当前观点]6:466-471,2002)。配体可以是靶向配体或第二治疗剂,其可补充iRNA剂的治疗效果。

[0183] 系链可以包括通过特定酶可裂解的连接基团。并入系链中的连接基团的类型可视iRNA剂所靶向的细胞而定。例如,靶向肝细胞中的mRNA的iRNA剂可以与包括酯基的系链缀合。肝细胞富含酯酶,并且因此系链在肝细胞中将比在不富含酯酶的细胞类型中更有效地裂解。系链的裂解从附接至系链远端的配体释放iRNA剂,从而潜在地增强iRNA剂的沉默活性。富含酯酶的其他细胞类型包括肺、肾皮质及睾丸的细胞。

[0184] 含有肽键的系链可以与靶向富含肽酶的细胞类型(诸如肝细胞及滑膜细胞)的iRNA剂缀合。例如,靶向滑膜细胞诸如用于治疗炎性疾病(例如类风湿性关节炎)的iRNA剂可以与含有肽键的系链缀合。

[0185] 一般而言,可通过测试降解剂(或条件)裂解候选连接基团的能力来评估候选可裂

解连接基团的适合性。还将希望,另外测试候选可裂解连接基团在血液中或当与其他非靶组织(例如当向受试者施用时,iRNA剂将暴露于其中的组织)接触时抵抗裂解的能力。因此,可以确定第一与第二条件之间对裂解的相对易感性,其中选择第一条件以指示靶细胞中的裂解,并且选择第二条件以指示其他组织或生物流体(例如血液或血清)中的裂解。评估可在无细胞系统、细胞、细胞培养物、器官或组织培养物或整个动物中进行。在无细胞或培养条件中进行初始评估且通过在整个动物中进一步评估进行确认可以是有用的。在优选的实施例中,有用的候选化合物在细胞中(或在选择用于模拟细胞内条件的体外条件下)的裂解比在血液或血清(或在选择用于模拟细胞外条件的体外条件下)中快至少2、4、10或100倍。

[0186] 氧化还原可裂解连接基团

[0187] 一类可裂解连接基团是氧化还原可裂解连接基团,其在还原或氧化时裂解。还原可裂解连接基团的实例为二硫化物连接基团(-S-S-)。为了确定候选可裂解连接基团是否为适合的"还原可裂解连接基团"或例如是否适合与特定iRNA部分及特定靶向剂一起使用,可考虑本文所述的方法。例如,候选物可通过使用本领域已知的试剂,与二硫苏糖醇(DTT)或其他还原剂一起孵育来评估,其模拟将在细胞(例如靶细胞)中观察到的裂解速率。候选物也可在选择用于模拟血液或血清条件的条件下进行评估。在优选的实施例中,候选化合物在血液中裂解至多10%。在优选的实施例中,有用的候选化合物在细胞中(或在选择用于模拟细胞内条件的体外条件下)的降解比在血液(或在选择用于模拟细胞外条件的体外条件下)中快至少2、4、10或100倍。候选化合物的裂解速率可在选择用于模拟细胞内介质的条件下使用标准酶动力学测定来测定,并且与选择用于模拟细胞外介质的条件进行比较。

[0188] 基于磷酸酯的可裂解连接基团

[0189] 基于磷酸酯的连接基团通过降解或水解磷酸酯的药剂来裂解。裂解细胞中磷酸酯基的药剂的实例为细胞中的酶,诸如磷酸酶。基于磷酸酯的连接基团的实例为—O—P(O)(ORk)-O—、—O—P(S)(ORk)-O—、—O—P(S)(SRk)-O—、—S—P(O)(ORk)-O—、—O—P(O)(ORk)-S—、—S—P(O)(ORk)-S—、—O—P(S)(ORk)-S—、—S—P(S)(ORk)-O—、—O—P(O)(Rk)-O—、—O—P(S)(Rk)-O—、—S—P(O)(Rk)-O—、—S—P(S)(Rk)-O—、—S—P(O)(Rk)-S—、—O—P(S)(Rk)-S—。优选的实施例为—O—P(O)(OH)—O—、—O—P(S)(OH)—O—、—O—P(S)(SH)—O—、—S—P(O)(OH)—O—、—O—P(O)(OH)—S—、—S—P(O)(OH)—S—、—O—P(S)(OH)—S—、—S—P(S)(OH)—O—、—O—P(O)(H)—O—、—O—P(S)(H)—O—、—S—P(O)(H)—O—、—S—P(S)(H)—O—、—S—P(O)(H)—S—、—O—P(S)(H)—S—。优选的实施例为—O—P(O)(OH)—O—。这些候选物可使用与上文所述类似的方法评估。

[0190] 酸可裂解连接基团

[0191] 酸可裂解连接基团为在酸性条件下裂解的连接基团。在优选的实施例中,酸可裂解连接基团在pH为约6.5或更低(例如,约6.0、5.5、5.0或更低)的酸性环境中,或通过诸如可充当一般酸的酶的药剂来裂解。在细胞中,特定的低pH细胞器,诸如内体及溶酶体,可为酸可裂解连接基团提供裂解环境。酸可裂解连接基团的实例包括但不限于腙、缩酮、缩醛、酯及氨基酸的酯。酸可裂解基团可具有通式-C=NN-、C(O)O或-OC(O)。优选的实施例是当附接至酯的氧(烷氧基)的碳为芳基、经取代的烷基或三级烷基,诸如二甲基戊基或叔丁基时。这些候选物可使用与上文所述类似的方法评估。

[0192] 基于酯的连接基团

[0193] 基于酯的连接基团通过细胞中诸如酯酶及酰胺酶的酶来裂解。基于酯的可裂解连接基团的实例包括但不限于亚烷基、亚烯基及亚炔基的酯。酯可裂解连接基团具有通式-C(O)O-或-OC(O)-。这些候选物可使用与上文所述类似的方法评估。

[0194] 基于肽的裂解基团

[0195] 基于肽的连接基团是通过细胞中诸如肽酶及蛋白酶的酶来裂解。基于肽的可裂解连接基团是在氨基酸之间形成以产生寡肽(例如二肽、三肽等)及多肽的肽键。基于肽的可裂解基团不包括酰胺基(-C(O)NH-)。酰胺基可在任何亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键是在氨基酸之间形成以产生肽及蛋白质的特殊类型的酰胺键。基于肽的裂解基团一般限于在产生肽及蛋白质的氨基酸之间形成的肽键(即酰胺键),并且不包括整个酰胺官能团。肽可裂解的连接基团具有通式-NHCHR^{1}C(O)NHCHR^{2}C(O)-,其中R^{1}及R^{2}是两个相邻氨基酸的R基团。这些候选物可使用与上文所述类似的方法评估。

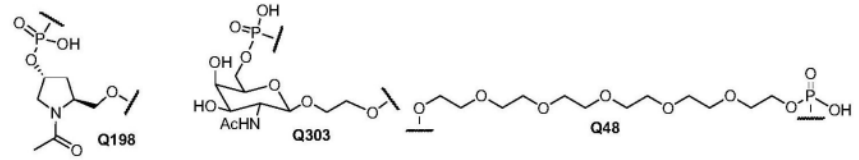
[0196] 生物可裂解接头/系链

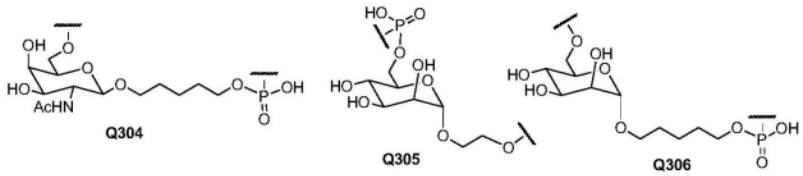
[0197] 接头也可以包括生物可裂解接头,该生物可裂解接头为核苷酸及非核苷酸接头或其组合,该生物可裂解接头连接分子的两个部分,例如两个单独siRNA分子的一个或两条链以产生双(siRNA)。在一些实施例中,仅两个单独siRNA之间的静电或堆栈相互作用可表示接头。非核苷酸接头包括衍生自单糖、二糖、寡糖及其衍生物、脂肪族、脂环族、杂环及其组合的系链或接头。

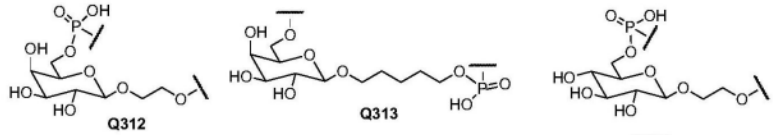
[0198] 在一些实施例中,接头(系链)中的至少一个是生物可裂解接头,该选自由以下组成的组:DNA,RNA,二硫化物,酰胺,半乳糖胺、葡糖胺、葡萄糖、半乳糖及甘露糖的官能化单糖或寡糖及其组合。

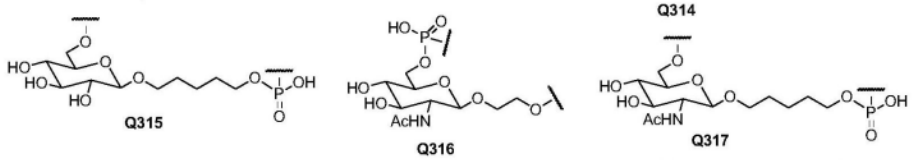
[0199] 在一个实施例中,生物可裂解的碳水化合物接头可具有1至10个糖单元,其具有能够连接两个siRNA单元的至少一个变旋异构异头键。当存在两种或更多种醣时,这些单元可经由1-3、1-4或1-6个糖键或经由烷基链连接。

[0200] 示例性生物可裂解接头包括:

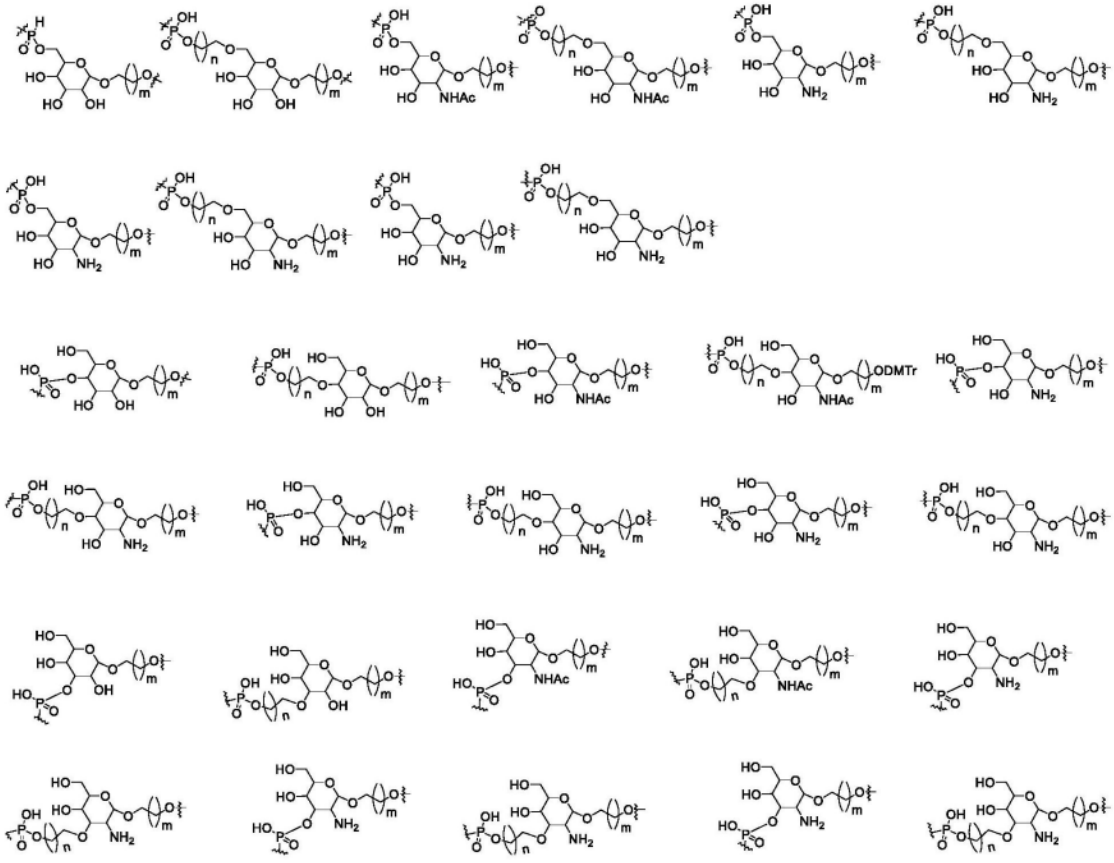




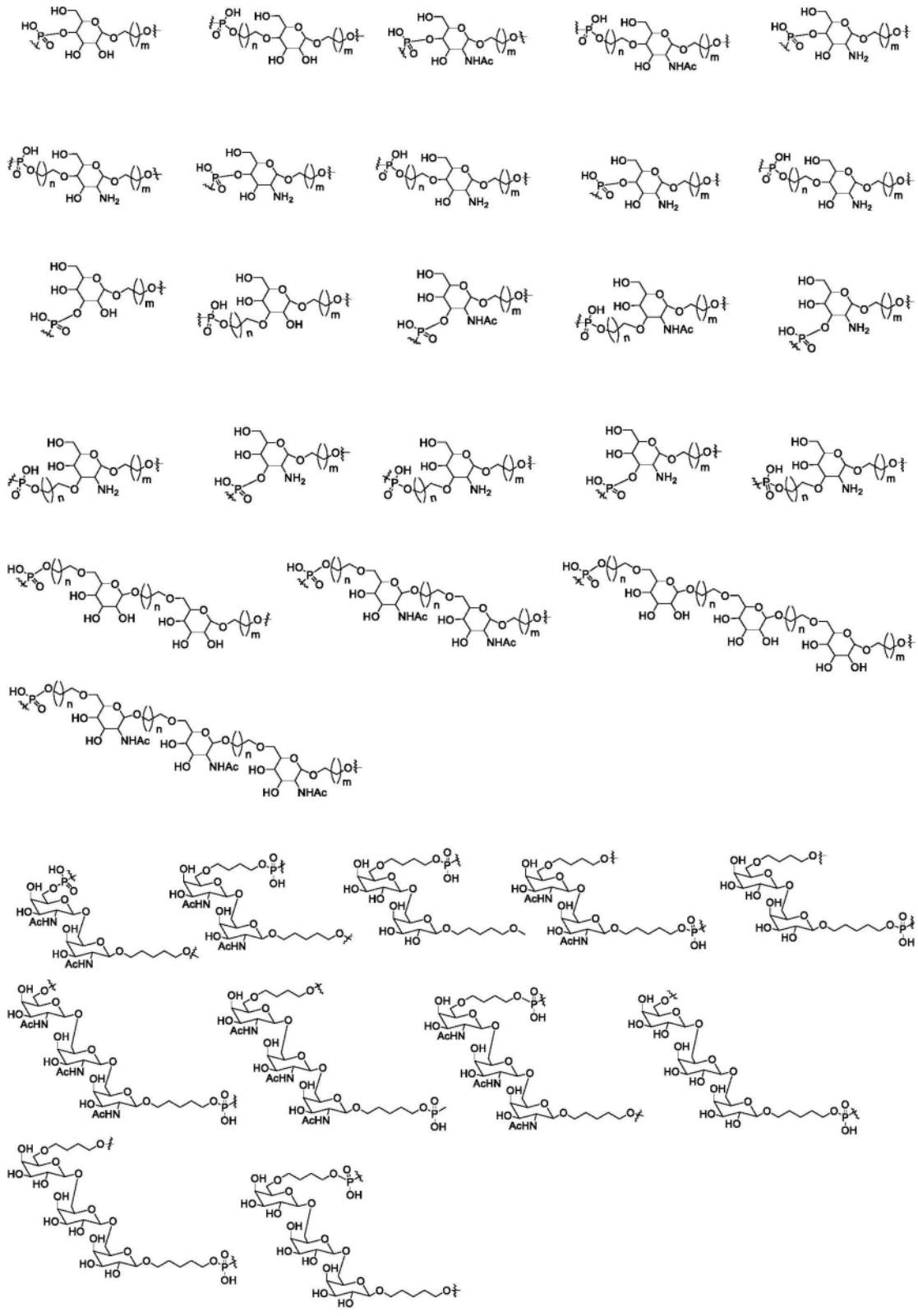


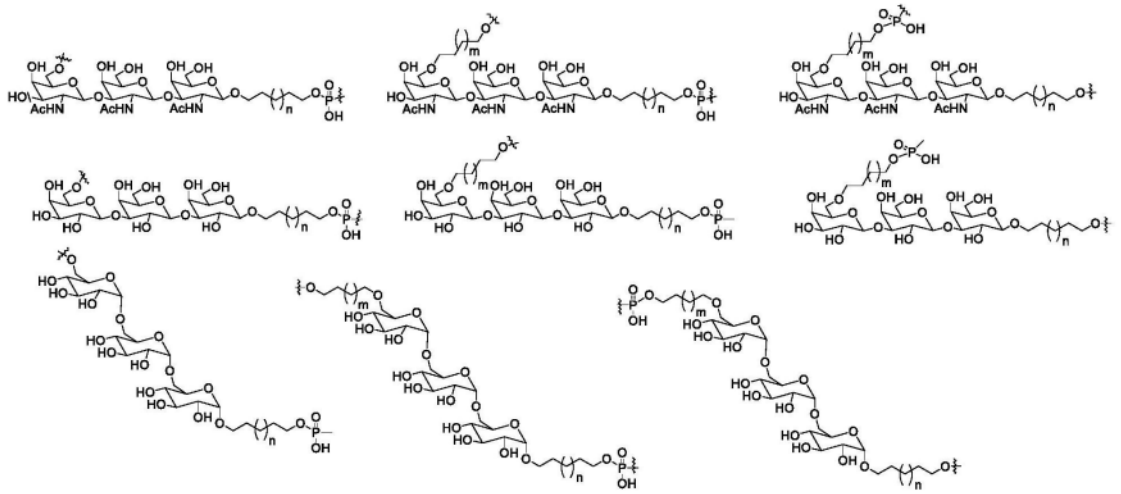


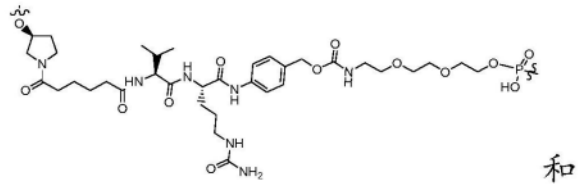
[0201]



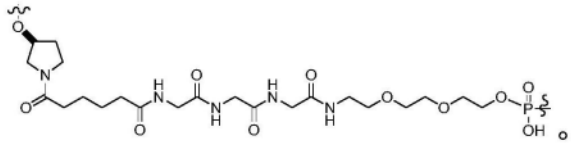
[0202]



[0203] 



和



[0204] 关于生物可裂解接头的更多论述可见于2018年1月18日提交的名称为“Endosomal Cleavable Linkers[内体可裂解接头]”的PCT申请号PCT/US 18/14213,将其内容通过引用以其全文并入本文。

[0205] 载体

[0206] 在某些实施例中,亲脂性单体包含经由替换一个或多个核苷酸的非核糖替换单元(即载体)与iRNA剂缀合的亲脂性部分。

[0207] 载体可以是环状基团或非环状基团。在一个实施例中,环状基团选自由以下组成的组:吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基及十氢化萘。在一个实施例中,非环状基团为基于丝氨醇主链或二乙醇胺主链的部分。

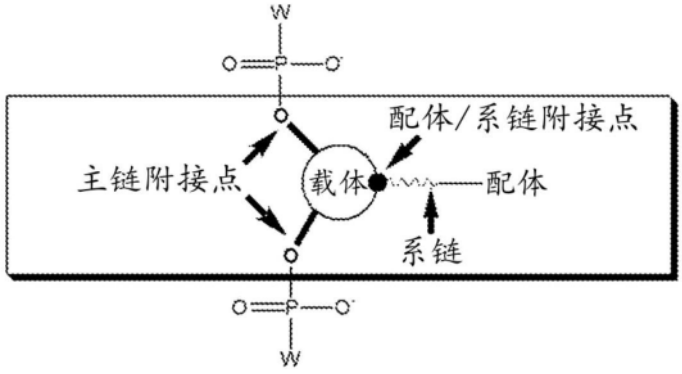
[0208] 载体可以替换双链iRNA剂的一个或多个核苷酸。

[0209] 在一些实施例中,载体替换双链iRNA剂的内部位置中的一个或多个核苷酸。

[0210] 在其他实施例中,载体替换有义链或反义链末端的核苷酸。在一个实施例中,载体替换有义链3’端上的末端核苷酸,从而充当保护有义链3’端的端帽。在一个实施例中,载体为具有胺的环状基团,例如,载体可以是吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基或十氢化萘基。

[0211] 其中亚单元的核糖已如此替换的核糖核苷酸亚单元在本文中称为核糖替换修饰亚单元(RRMS)。载体可以是环状或非环状部分,并且包括两个“主链附接点”(例如羟基)及配体(例如亲脂性部分)。亲脂性部分可以直接附接至载体或通过插入的接头/系链间接附

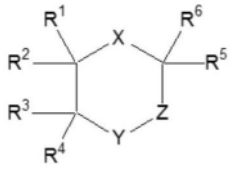
接至载体,如上所述。

[0212] 

[0213] 配体缀合的单体亚单元可以是iRNA分子的5'或3'末端亚单元,即两个"W"基团中的一个可以是羟基,并且另一个"W"基团可以是两个或更多个未修饰或经修饰的核糖核苷酸的链。可替代地,配体缀合的单体亚单元可占据内部位置,并且两个"W"基团均可以是一个或多个未修饰或经修饰的核糖核苷酸。多于一个配体缀合的单体亚单元可存在于iRNA剂中。

[0214] 基于糖替换的单体,例如配体缀合的单体(环状)

[0215] 基于糖替换的环状单体,例如基于糖替换的配体缀合的单体在本文中也称为RRMS单体化合物。载体可具有下面提供的通式(LCM-2)(在该结构中,优选的主链附接点可选自R^1或R^2;R^3或R^4;或者如果Y为CR^9R^{10},则R^9及R^{10}(选择两个位置以给出两个主链附接点,例如R^1及R^4或R^4及R^9))。优选的系链附接点包括R^7;当X为CH_2时,R^5或R^6。载体在下文描述为实体,其可并入链中。因此,应理解,该结构也涵盖如下情形,其中一个(在末端位置的情况下)或两个(在内部位置的情况下)附接点,例如R^1或R^2;R^3或R^4;或R^9或R^{10}(当Y为CR^9R^{10}时),与例如含硫主链的磷酸酯或经修饰的磷酸酯连接。例如,上述R基团中的一个可以是-CH_2-,其中一个键与载体连接并且一个键与主链原子(例如连接氧或中心磷原子)连接。

[0216] 

(LCM-2)

[0217] 其中:

[0218] X为N(CO)R^7、NR^7或CH_2;

[0219] Y为NR^8、O、S、CR^9R^{10};

[0220] Z为$CR^{11}R^{12}$或不存在;

[0221] R^1、R^2、R^3、R^4、R^9及R^{10}中的每个独立地是H、OR^a或$(CH_2)_nOR^b$,其条件为R^1、R^2、R^3、R^4、R^9及R^{10}中的至少两个为OR^a和/或$(CH_2)_nOR^b$;

[0222] R^5、R^6、R^{11}及R^{12}中的每个独立地是配体、H、任选地经1-3个R^{13}取代的C_1-C_6烷基、或C(O)NHR^7;或R^5与R^{11}一起为任选地经R^{14}取代的C_3-C_8环烷基;

[0223] R^7可以是配体,例如R^7可以是R^d,或R^7可以是例如通过系链部分(例如经NR^cR^d取代的C_1-C_{20}烷基)间接系留于载体的配体;或经$NHC(O)R^d$取代的C_1-C_{20}烷基;

[0224] R^8为H或C_1-C_6烷基;

[0225] R^{13}为羟基、C_1-C_4烷氧基或卤基；

[0226] R^{14}为NR^cR^7；

[0227] R^{15}为任选地经氰基取代的C_1-C_6烷基，或C_2-C_6烯基；

[0228] R^{16}为C_1-C_{10}烷基；

[0229] R^{17}为液相或固相支持试剂；

[0230] L为-C(O)$(CH_2)_q$C(O)-或-C(O)$(CH_2)_q$S-；

[0231] R^a为保护基，例如CAr_3；(例如二甲氧基三苯甲基)或Si$(X^{5'})(X^{5''})(X^{5'''})$，其中$(X^{5'})$、$(X^{5''})$及$(X^{5'''})$如别处所述。

[0232] R^b为P(O)(O^-)H、P(OR^{15})N$(R^{16})_2$或L-R^{17}；

[0233] R^c为H或C_1-C_6烷基；

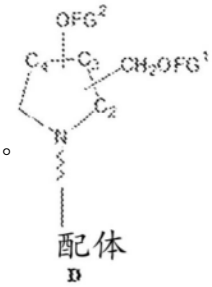
[0234] R^d为H或配体；

[0235] 每个Ar独立地是任选地经C_1-C_4烷氧基取代的C_6-C_{10}芳基；

[0236] n为1-4；并且q是0-4。

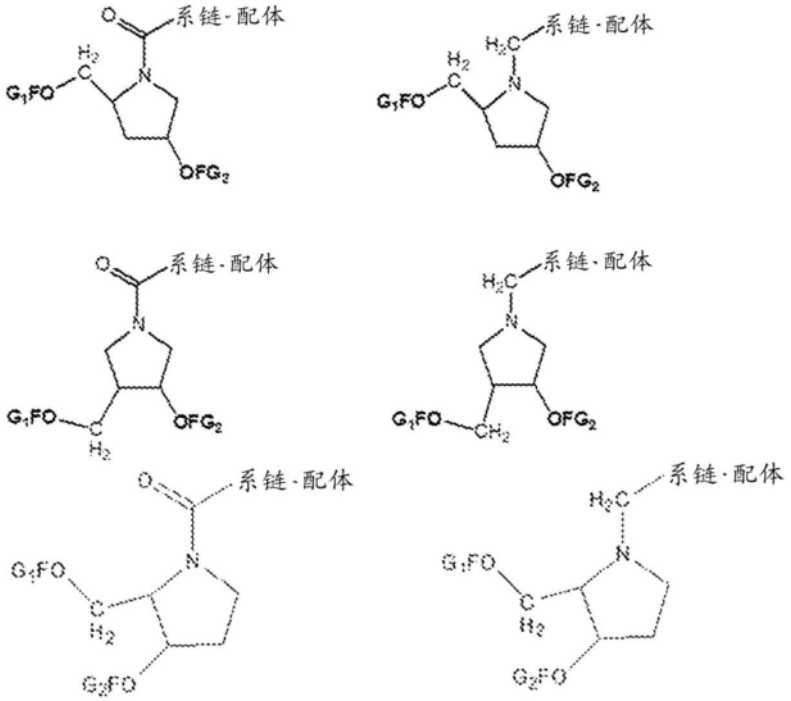
[0237] 示例性载体包括以下那些：其中例如X为N(CO)R^7或NR^7，Y为CR^9R^{10}并且Z不存在；或X为N(CO)R^7或NR^7，Y为CR^9R^{10}且Z为$CR^{11}R^{12}$；或X为N(CO)R^7或NR^7，Y为NR^8且Z为$CR^{11}R^{12}$；或X为N(CO)R^7或NR^7，Y为O且Z为$CR^{11}R^{12}$；或X为CH_2；Y为CR^9R^{10}；Z为$CR^{11}R^{12}$，并且R^5与R^{11}一起形成C_6环烷基(H，z＝2)或茚满环系统，例如X为CH_2；Y为CR^9R^{10}；Z为$CR^{11}R^{12}$，并且R^5与R^{11}一起形成C_5环烷基(H，z＝1)。

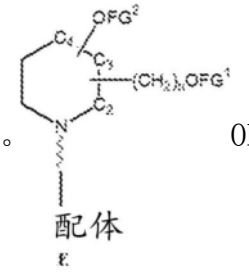
[0238] 在某些实施例中，载体可基于吡咯啉环系统或4-羟脯氨酸环系统，例如X为N(CO)R^7或NR^7，Y为CR^9R^{10}并且Z不存在(D)。



D

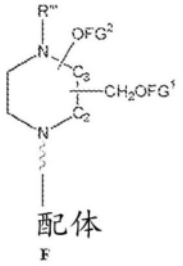
OFG^1优选地附接至与五元环中的一个碳连接的伯碳，例如环外亚烷基，例如亚甲基(D中的-CH_2OFG^1)。OFG^2优选地直接附接至五元环中的一个碳(D中的-OFG^2)。对于基于吡咯啉的载体，-CH_2OFG^1可以附接至C-2并且OFG^2可以附接至C-3；或-CH_2OFG^1可以附接至C-3并且OFG^2可以附接至C-4。在某些实施例中，CH_2OFG^1及OFG^2可经偕位取代至上文提及的碳中的一个。对于基于3-羟脯氨酸的载体，-CH_2OFG^1可以附接至C-2并且OFG^2可以附接至C-4。基于吡咯啉及4-羟脯氨酸的单体可因此含有键(例如碳-碳键)，其中键旋转围绕该特定键被限制，例如由于环存在产生的限制。因此，CH_2OFG^1及OFG^2在上文描述的任何配对中可相对于彼此为顺式或反式的。因此，明确地包括所有顺式/反式异构体。单体也可含有一个或多个不对称中心，并且因此以外消旋体及外消旋混合物、单一对映异构体、个别非对映异构体及非对映异构体混合物形式存在。明确地包括单体的所有此类异构形式(例如，带有CH_2OFG^1及OFG^2的中心均可具有R构型；或均具有S构型；或一个中心可具有R构型且另一个中心可具有S构型，反之亦然)。系链附接点优选地为氮。载体D的优选的实例包括以下：

[0239] 

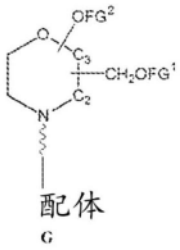
[0240] 在某些实施例中,载体可基于哌啶环系统(E),例如X为$N(CO)R^7$或NR^7,Y为CR^9R^{10}且Z为$CR^{11}R^{12}$。

OFG^1优选地附接至与六元环中的一个碳连接的伯碳,例如环外亚烷基,例如亚甲基(n=1)或亚乙基(n=2)[E中的$-(CH_2)_nOFG^1$]。OFG^2优选地直接附接至六元环中的一个碳(E中的$-OFG^2$)。$-(CH_2)_nOFG^1$及OFG^2可以偕位方式安置于环上,即两个基团可以附接至相同碳上,例如C-2、C-3或C-4。可替代地,$-(CH_2)_nOFG^1$及OFG^2可以邻位方式安置于环上,即两个基团可以附接至相邻环碳原子,例如$-(CH_2)_nOFG^1$可以附接至C-2并且OFG^2可以附接至C-3;$-(CH_2)_nOFG^1$可以附接至C-3并且OFG^2可以附接至C-2;$-(CH_2)_nOFG^1$可以附接至C-3并且OFG^2可以附接至C-4;或$-(CH_2)_nOFG^1$可以附接至C-4并且OFG^2可以附接至C-3。基于哌啶的单体可因此含有键(例如碳-碳键),其中键旋转围绕该特定键被限制,例如由于环存在产生的限制。因此,$-(CH_2)_nOFG^1$及OFG^2在上文描述的任何配对中可相对于彼此为顺式或反式的。因此,明确地包括所有顺式/反式异构体。单体也可含有一个或多个不对称中心,并且因此以外消旋体及外消旋混合物、单一对映异构体、个别非对映异构体及非对映异构体混合物形式存在。明确地包括单体的所有此类异构形式(例如,带有CH_2OFG^1及OFG^2的中心均可具有R构型;或均具有S构型;或一个中心可具有R构型且另一个中心可具有S构型,反之亦然)。系链附接点优选地为氮。

[0241] 在某些实施例中,载体可基于哌嗪环系统(F),例如X为$N(CO)R^7$或NR^7,Y为NR^8且Z为$CR^{11}R^{12}$,或吗啉环系统(G),例如X为$N(CO)R^7$或NR^7,Y为O且Z为$CR^{11}R^{12}$。



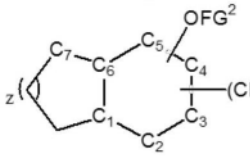
F



G

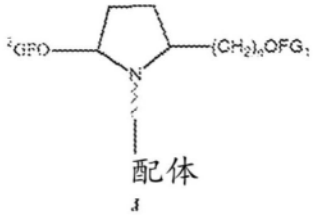
OFG^1优选地附接至与六元环中的一个碳连接的伯碳,例如环外亚烷基,例如亚甲基(F或G中的$-CH_2OFG^1$)。OFG^2优选地直接附接至六元环中的一个碳(F或G中的$-OFG^2$)。对于F及G两者,$-CH_2OFG^1$可以附接至C-2并且OFG^2可以附接至C-3;或反之亦然。在某些实施例中,CH_2OFG^1及OFG^2可经偕位取代至上文提及的碳中的一个。基于哌嗪及吗啉的单体可因此含有键(例如碳-碳键),其中键旋转围绕该特定键被限制,例如由于环存在产生的限制。因此,CH_2OFG^1及OFG^2在上文描述的任何配对中可相对于彼此为顺式或反式的。因此,明确地包括所有顺式/反式异构体。单体也可含有一个或多个不对称中心,并且因此以外消旋体及外消旋混合物、单一对映异构体、个别非对映异构体及非对映异构体混合物形式存在。明确地包括单体的所有此类异构形式(例如,带有CH_2OFG^1及OFG^2的中心均可具有R构型;或均具有S构型;或一个中心可具有R构型且另一个中心可具有S构型,反之亦然)。R″′可以是例如C_1-C_6烷基,优选地CH_3。系链附接点优选地为F及G中的氮。

[0242] 在某些实施例中,载体可基于十氢化萘环系统,例如X为CH_2;Y为CR^9R^{10};Z为$CR^{11}R^{12}$,并且R^5与R^{11}一起形成C_6环烷基(H,z=2)或茚满环系统,例如X为CH_2;Y为CR^9R^{10};Z为$CR^{11}R^{12}$,并且R^5与R^{11}一起形成C_5环烷基(H,z=1)。



H

OFG^1优选地附接至伯碳,例如与C-2、C-3、C-4或C-5中的一个连接的环外亚甲基(n=1)或亚乙基(n=2)[H中的$-(CH_2)_nOFG^1$]。OFG^2优选地直接附接至C-2、C-3、C-4或C-5中的一个(H中的$-OFG^2$)。$-(CH_2)_nOFG^1$及OFG^2可以偕位方式安置于环上,即两个基团可以附接至相同碳上,例如C-2、C-3、C-4或C-5。可替代地,$-(CH_2)_nOFG^1$及OFG^2可以邻位方式安置于环上,即两个基团可以附接至相邻环碳原子,例如$-(CH_2)_nOFG^1$可以附接至C-2并且OFG^2可以附接至C-3;$-(CH_2)_nOFG^1$可以附接至C-3并且OFG^2可以附接至C-2;$-(CH_2)_nOFG^1$可以附接至C-3并且OFG^2可以附接至C-4;或$-(CH_2)_nOFG^1$可以附接至C-4并且OFG^2可以附接至C-3;$-(CH_2)_nOFG^1$可以附接至C-4并且OFG^2可以附接至C-5;或$-(CH_2)_nOFG^1$可以附接至C-5并且OFG^2可以附接至C-4。基于十氢化萘或茚满的单体可因此含有键(例如碳-碳键),其中键旋转围绕该特定键被限制,例如由于环存在产生的限制。因此,$-(CH_2)_nOFG^1$及OFG^2在上文描述的任何配对中可相对于彼此为顺式或反式的。因此,明确地包括所有顺式/反式异构体。单体也可含有一个或多个不对称中心,并且因此以外消旋体及外消旋混合物、单一对映异构体、个别非对映异构体及非对映异构体混合物形式存在。明确地包括单体的所有此类异构形式(例如,带有CH_2OFG^1及OFG^2的中心均可具有R构型;或均具有S构型;或一个中心可具有R构型且另一个中心可具有S构型,反之亦然)。在优选的实施例中,C-1及C-6处的取代基相对于彼此为反式。系链附接点优选地为C-6或C-7。

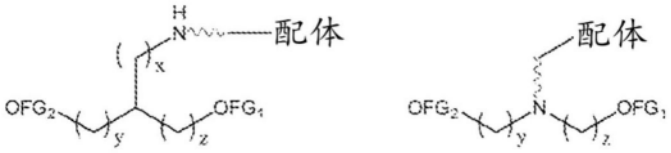
[0243] 其他载体可以包括基于3-羟脯氨酸的载体(J)。

因此,-$(CH_2)_nOFG^1$及OFG^2可相对于彼此为顺式或反式的。因此,明确地包括所有顺式/反式异构体。单体也可含有一个或多个不对称中心,并且因此以外消旋体及外消旋混合物、单一对映异构体、个别非对映异构体及非对映异构体混合物形式存在。明确地包括单体的所有此类异构形式(例如,带有CH_2OFG^1及OFG^2的中心均可具有R构型;或均具有S构型;或一个中心可具有R构型且另一个中心可具有S构型,反之亦然)。系链附接点优选地为氮。

[0244] 关于更具代表性的基于糖替换的环状载体的细节可见于美国专利号7,745,608及8,017,762,将其通过引用以其全文并入本文。

[0245] 基于糖替换的单体(非环状)

[0246] 基于糖替换的非环状单体,例如基于糖替换的配体缀合的单体,在本文中也称为核糖替换单体亚单元(RRMS)单体化合物。优选的非环状载体可具有式LCM-3或LCM-4:

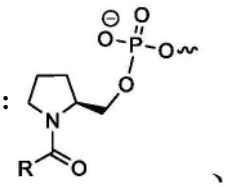
[0247] 

LCM-3 LCM-4

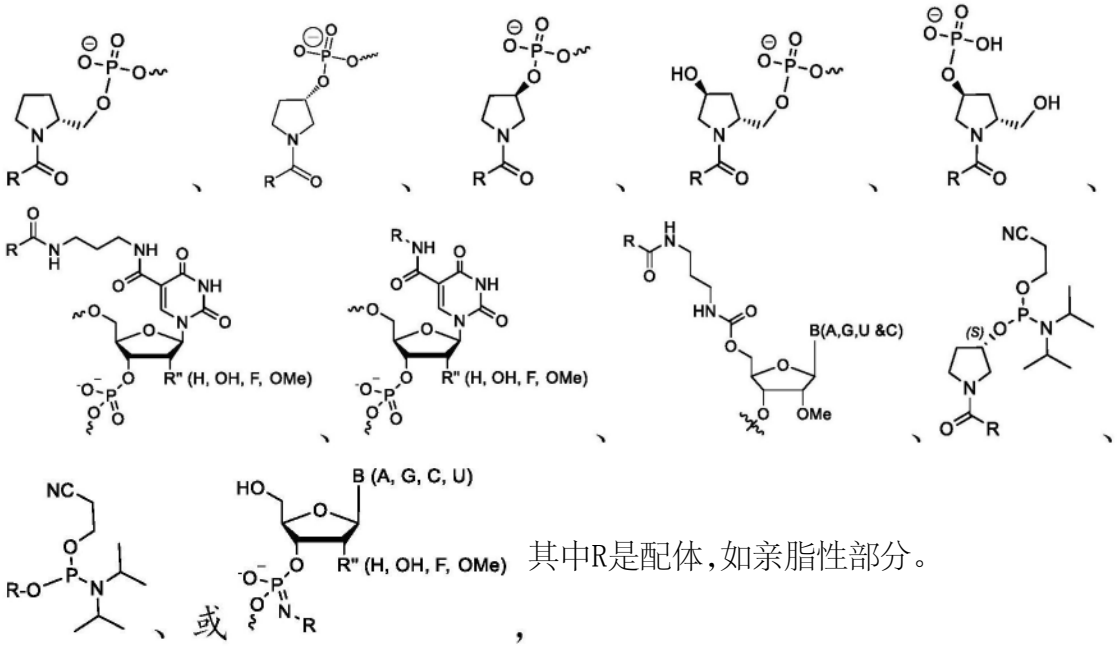
[0248] 在一些实施例中,x、y和z中的每个可彼此独立地是0、1、2或3。在式LCM-3中,当y与z不同时,则三级碳可具有R或S构型。在优选的实施例中,式LCM-3中的x为零且y与z各自为1(例如基于丝氨醇),式LCM-3中的y与z各自为1。下式LCM-3或LCM-4中的每个可任选地例如经羟基、烷氧基、全卤代烷基取代。

[0249] 关于更具代表性的基于糖替换的非环状载体的细节可见于美国专利号7,745,608及8,017,762,将其通过引用以其全文并入本文。

[0250] 在一些实施例中,化合物包含含有与有义链的5'端或反义链的5'端缀合的亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体。

[0251] 在某些实施例中,亲脂性单体含有经由载体和/或接头与链的5'端缀合的亲脂性部分。在一个实施例中,亲脂性单体含有经由具有下式的载体与链的5'端缀合的亲脂性部分:

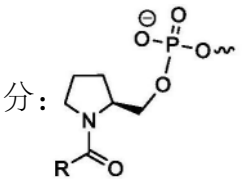
、

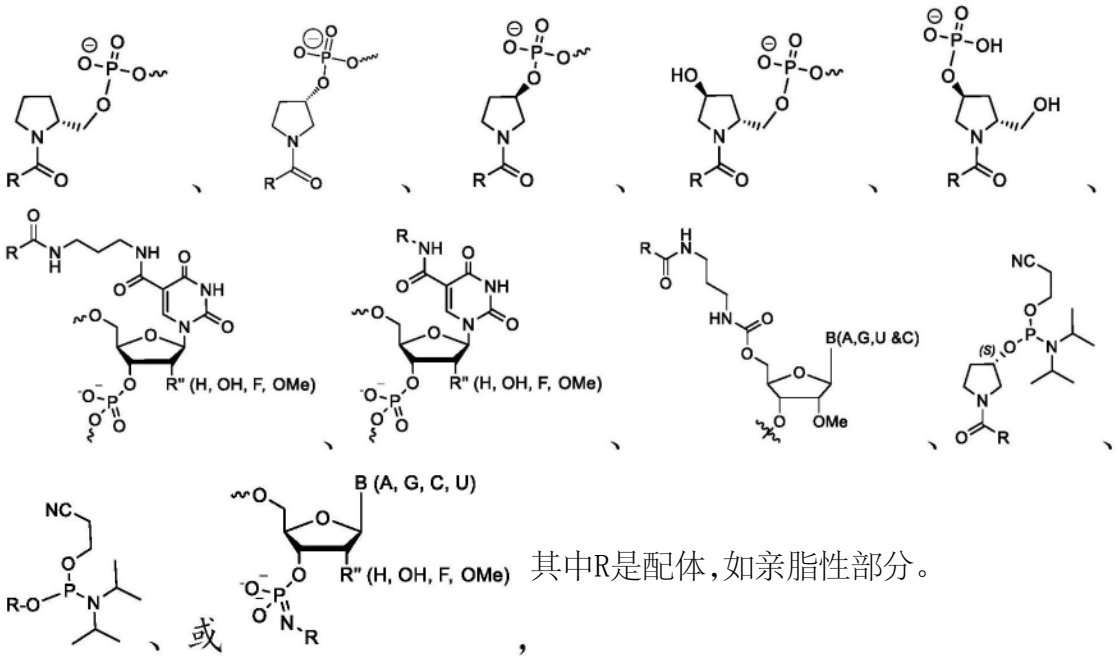


其中R是配体,如亲脂性部分。

[0252] 在一些实施例中,化合物包含含有与有义链的3'端或反义链的3'端缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体。

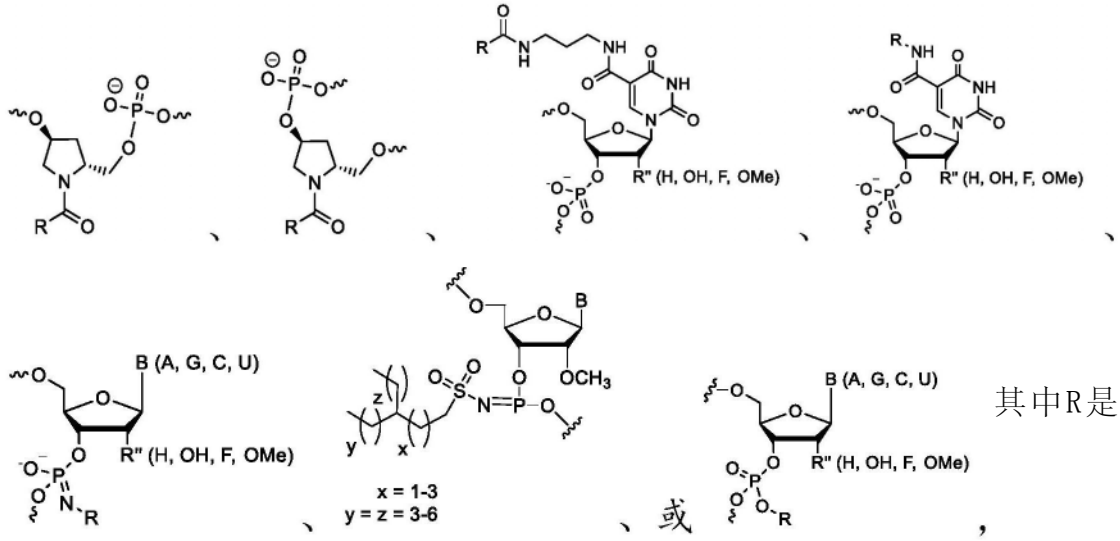
[0253] 在某些实施例中,亲脂性单体含有经由载体和/或接头与链的3'端缀合的亲脂性部分。在一个实施例中,亲脂性单体含有经由具有下式的载体与链的3'端缀合的亲脂性部分:





其中R是配体,如亲脂性部分。

[0254] 在某些实施例中,亲脂性单体含有经由载体和/或接头与链的内部位置缀合的亲脂性部分。在一个实施例中,亲脂性单体含有经由具有下式的载体与链的内部位置缀合的亲脂性部分:



其中R是配体，如

亲脂性部分。

[0255] 在一些实施例中，化合物包含含有与有义链的两端缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体。

[0256] 在一些实施例中，化合物包含含有与反义链的两端缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体。

[0257] 在一些实施例中，化合物包含含有与有义链或反义链的内部位置缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体。在一些实施例中，一个或多个亲脂性部分与核糖、核碱基和/或核苷酸间键缀合。在一些实施例中，一个或多个亲脂性部分在核糖的2'位置、3'位置、4'位置和/或5'位置与核糖缀合。在一些实施例中，一个或多个亲脂性部分在天然核碱基(如A、T、G、C或U)或如本文定义的经修饰的核碱基处缀合。在一些实施例中，一个或多个亲脂性部分在磷酸基或如本文所定义的经修饰的磷酸基处缀合。

[0258] 在一些实施例中，化合物包含含有与有义链的5'端或3'端缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体，和含有与反义链的5'端或3'端缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体。

[0259] 在一些实施例中，亲脂性单体含有经由一个或多个接头(系链)和/或载体与链的末端缀合亲脂性部分。

[0260] 在一个实施例中，亲脂性单体含有经由一个或多个接头(系链)与链的末端缀合亲脂性部分。

[0261] 在一个实施例中，亲脂性单体含有经由环状载体，任选地经由一个或多个插入接头(系链)与有义链或反义链的5'端缀合的亲脂性部分。

[0262] 在一些实施例中，至少一个亲脂性单体位于有义链或反义链的一个或多个末端位置。在一个实施例中，至少一个亲脂性单体位于有义链的3'端或5'端。在一个实施例中，至少一个亲脂性单体位于反义链的3'端或5'端。

[0263] 在一些实施例中，亲脂性单体含有与至少一条链上的一个或多个内部位置缀合的亲脂性部分。链的内部位置是指链的任何位置上的核苷酸，链的3'端及5'端的末端位置除外(例如，不包括2个位置：从3'端计数的位置1及从5'端计数的位置1)。

[0264] 在一个实施例中，至少一个亲脂性单体位于至少一条链上的一个或多个内部位置

处,这些位置包括除链的各端的末端两个位置以外的所有位置(例如,不包括4个位置:从3'端计数的位置1和2以及从5'端计数的位置1和2)。在一个实施例中,亲脂性单体位于至少一条链上的一个或多个内部位置,这些位置包括除链各端的末端三个位置以外的所有位置(例如,不包括6个位置:从3'端计数的位置1、2和3以及从5'端计数的位置1、2和3)。

[0265] 在一个实施例中,至少一个亲脂性单体位于双链体区的至少一端的一个或多个位置,其包括双链体区内的所有位置,但不包括突出端区或替换了有义链3'端的末端核苷酸的载体。

[0266] 在一个实施例中,至少一个亲脂性单体位于双链体区的反义链5'端的前五个、四个、三个、两个或一个碱基对内的有义链上。

[0267] 在一个实施例中,至少一个亲脂性单体位于至少一条链上的一个或多个内部位置,有义链的裂解位点区除外,例如,亲脂性单体不位于从有义链的5'端计数的位置9-12,例如,亲脂性单体不位于从有义链的5'端计数的位置9-11。可替代地,内部位置不包括自有义链3'端计数的位置11-13。

[0268] 在一个实施例中,至少一个亲脂性单体位于至少一条链上的一个或多个内部位置,其不包括反义链的裂解位点区。举例而言,内部位置不包括自有义链5'端计数的位置12-14。

[0269] 在一个实施例中,至少一个亲脂性单体位于至少一条链上的一个或多个内部位置,其不包括有义链上自3'端计数的位置11-13及反义链上自5'端计数的位置12-14。

[0270] 在一个实施例中,一个或多个亲脂性单体位于以下内部位置中的一个或多个:从各链的5'端计数,有义链上的位置4-8和13-18,以及反义链上的位置6-10和15-18。

[0271] 在一个实施例中,一个或多个亲脂性单体位于以下内部位置中的一个或多个:从各链的5'端计数,有义链上的位置5、6、7、15和17,以及反义链上的位置15和17。

[0272] 定义

[0273] 除非提供具体定义,否则本文所述的结合分子生物学、分析化学、合成有机化学以及医学及药物化学所用的命名法及这些学科的方法及技术是本领域熟知且常用的那些命名法以及方法及技术。标准技术可用于化学合成及化学分析。某些此类技术及方法可见于例如"Carbohydrate Modifications in Antisense Research[反义研究中的碳水化合物修饰]"由Sangvi及Cook编,American Chemical Society[美国化学学会],华盛顿,1994;"Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿氏药物科学],"Mack Publishing Co.[麦克出版公司],Easton,Pa.,[宾夕法尼亚州伊斯顿]第18版,1990;以及"Antisense Drug Technology,Principles,Strategies,and Applications[反义药物技术、原理、策略和应用]"由Stanley T.Crooke编,CRC Press[CRC出版社],Boca Raton,Fla.[佛罗里达州波卡拉顿];以Sambrook等人,"Molecular Cloning,A laboratory Manual,[分子克隆:实验室手册]"第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室],1989,将其出于任何目的通过引用并入。在允许的情况下,本披露通篇引用的所有专利、申请、公开申请以及其他出版物及其他数据以全文引用的方式并入。

[0274] 如本文所用,术语"靶核酸"是指其表达或活性能够由siRNA化合物调节的任何核酸分子。靶核酸包括但不限于由编码靶蛋白DNA的转录的RNA(包括但不限于mRNA前体及mRNA或其部分),以及衍生自此类RNA的cDNA,及miRNA。例如,靶核酸可以是细胞基因(或自

基因转录的mRNA),其表达与特定障碍或疾病状态相关联。在一些实施例中,靶核酸可以是来自感染物的核酸分子。

[0275] 如本文所用,术语“iRNA”是指介导RNA转录物的靶向裂解的药剂。这些药剂与称为RNAi诱导型沉默复合物(RISC)的细胞质多蛋白复合物缔合。有效诱导RNA干扰的药剂在本文中也称为siRNA、RNAi剂或iRNA剂。因此,这些术语在本文中可互换使用。如本文所用,术语iRNA包括微RNA及微RNA前体。此外,如本文所用的本发明的“化合物(compound或compounds)”也指iRNA剂,并且可以与iRNA剂互换使用。

[0276] iRNA剂应包括与靶基因具有足够同源性并且在核苷酸方面具有足够长度的区域,使得iRNA剂或其片段可介导靶基因的下调。(为了便于说明,术语核苷酸或核糖核苷酸有时在本文中用于指iRNA剂的一个或多个单体亚单元。在本文中应理解,在本文中术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”可在经修饰的RNA或核苷酸替代物的情况下使用,也指在一个或多个位置的经修饰的核苷酸或替代替换部分。)因此,iRNA剂是或包括至少部分地、并且在一些实施例中完全地与靶RNA互补的区域。iRNA剂与靶标之间不必具有完美的互补性,但对应性必须足以使iRNA剂或其裂解产物能够指导序列特异性沉默,例如通过RNAi裂解靶RNA,例如mRNA。与靶链的互补性或同源性程度为反义链中最关键的。虽然通常需要完美的互补性,特别是在反义链中,但一些实施例可以包括,特别是在反义链中,一个或多个或例如6个、5个、4个、3个、2个或更少的错配(相对于靶RNA)。有义链仅需要与反义链充分互补以维持分子的整体双链特征。

[0277] iRNA剂包括:足够长的分子以触发干扰素反应(这些分子可被Dicer裂解(Bernstein等人2001.Nature[自然],409:363-366)且进入RISC(RNAi诱导型沉默复合物));以及足够短的分子,这些分子不会触发干扰素反应(这些分子也可由Dicer裂解和/或进入RISC),例如具有允许进入RISC的尺寸的分子,例如类似Dicer裂解产物的分子。足够短以至于不触发干扰素反应的分子在本文中称为siRNA剂或较短的iRNA剂。如本文所用,“siRNA剂或较短的iRNA剂”是指足够短以至于其不在人类细胞中诱导有害的干扰素反应的iRNA剂,例如双链RNA剂或单链剂,例如其具有少于60、50、40或30个核苷酸对的双链体区。siRNA剂或其裂解产物可下调靶基因,例如通过相对于靶RNA诱导RNAi,其中该靶可包含内源性或病原体靶RNA。

[0278] 如本文所用,“单链iRNA剂”是由单分子构成的iRNA剂。其可以包括由链内配对形成的双链体区,例如,其可以是或包括发夹或锅-柄(pan-handle)结构。相对于靶分子,单链iRNA剂可以是反义的。单链iRNA剂可足够长以至于其可进入RISC并且参与RISC介导的靶mRNA的裂解。单链iRNA剂的长度为至少14,并且在其他实施例中至少15、20、25、29、35、40或50个核苷酸。在某些实施例中,其长度小于200、100或60个核苷酸。

[0279] 环是指当iRNA链的一部分与另一条链或与同一条链的另一部分形成碱基对时,iRNA链与双链体中相对核苷酸未配对的区域。

[0280] 发夹iRNA剂将具有等于或至少17、18、19、29、21、22、23、24或25个核苷酸对的双链体区。双链体区的长度可等于或小于200、100或50。在某些实施例中,双链体区的长度范围为15-30、17至23、19至23及19至21个核苷酸对。发夹可具有单链突出端或末端未配对区,在一些实施例中在3',并且在某些实施例中在发夹的反义侧。在一些实施例中,突出端长度为2-3个核苷酸。

[0281] 如本文所用,“双链(ds)iRNA剂”为包括多于一条链,并且在一些情况下两条链的iRNA剂,其中链间杂交可形成双链体结构区。

[0282] 如本文所用,术语“siRNA活性”及“RNAi活性”是指通过siRNA的基因沉默。

[0283] 如本文所用,通过RNA干扰分子的“基因沉默”是指靶基因的细胞中mRNA水平的降低是无miRNA或RNA干扰分子存在下细胞中发现的mRNA水平的至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%直至且包括100%,及其间的任何整数。在一个优选的实施例中,mRNA水平降低至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%直至且包括100%,以及5%与100%之间的任何整数。

[0284] 如本文所用,术语“调节基因表达”意指基因的表达、或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的RNA分子或等效RNA分子的水平被上调或下调,以使得表达、水平或活性大于或小于在调节剂不存在下所观察到的。例如,术语“调节”可意指“抑制”,但词语“调节”的使用不限于此定义。

[0285] 如本文所用,当基因的表达、或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的RNA分子或等效RNA分子的水平是在siRNA(例如RNAi剂)不存在下观察到的至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍或更多不同时,发生基因表达调节。可相对于对照或非对照计算%和/或倍数差异,例如,

[0286] $$\%\text{差异} = \frac{[\text{在 siRNA 存在下的表达}-\text{在 siRNA 不存在下的表达}]}{\text{在 siRNA 不存在下的表达}}$$

[0287] 或

[0288] $$\%\text{差异} = \frac{[\text{在 siRNA 存在下的表达}-\text{在 siRNA 不存在下的表达}]}{\text{在 siRNA 不存在下的表达}}$$

[0289] 如本文所用,与基因表达相关的术语“抑制”、“下调”或“降低”意指基因表达、或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的RNA分子或等效RNA分子的水平、或一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的活性降低至低于在调节剂不存在下所观察到的。当基因表达、或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的RNA分子或等效RNA分子的水平、或一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的活性相对于相应非调节对照降低至少10%,并且优选地至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或最佳100%(即无基因表达)时,基因表达下调。

[0290] 如本文所用,与基因表达相关的术语“增加”或“上调”意指基因的表达、或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的RNA分子或等效RNA分子的水平、或一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的活性增加至高于在调节剂不存在下所观察到的。当基因表达、或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的RNA分子或等效RNA分子的水平、或一种或多种蛋白质或蛋白质亚单元的活性相对于相应非调节对照增加至少10%,并且优选地至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、100%、1.1倍、1.25倍、1.5倍、1.75倍、

2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍数、100倍或更多时,基因表达上调。

[0291] 如本文所用,术语“增加(increased或increase)”通常意指增加静态上显著的量;为避免任何疑问,“增加”意指与参考水平相比增加了至少10%,例如与参考水平相比增加了至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或直至且包括100%或10%-100%之间的任何增加,或与参考水平相比增加至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍或至少约10倍或2倍与10倍之间的任何增加或更大。

[0292] 如本文所用,术语“降低(reduced或reduce)”通常意指降低统计学上显著的量。然而,为了避免疑问,“降低”意指与参考水平相比降低了至少10%,例如与参考水平相比降低了至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或直至并且包括100%(即,与参考样品相比不存在水平),或10%-100%之间的任何降低。

[0293] 双链iRNA包含两个寡核苷酸链,其充分互补以杂交形成双链体结构。通常,双链体结构的长度为15至30个、更通常18至25个、还更通常19至24个、并且最通常19至21个碱基对。在一些实施例中,25至30个碱基对长度的较长双链iRNA为优选的。在一些实施例中,10至15个碱基对长度的较短双链iRNA为优选的。在另一个实施例中,双链iRNA为至少21个核苷酸长。

[0294] 在一些实施例中,双链iRNA包含有义链及反义链,其中反义RNA链具有与靶序列的至少一部分互补的互补区,并且双链体区长度为14-30个核苷酸。类似地,靶序列的互补区的长度为14至30个、更通常18至25个、还更通常19至24个、并且最通常19至21个核苷酸。

[0295] 如本文所用,术语“化合物”是指一种寡聚化合物,其可以是寡核苷酸、反义或iRNA剂,如siRNA。

[0296] 如本文所用,短语“反义链”是指与感兴趣的靶序列基本上或100%互补的寡聚化合物。短语“反义链”包括由两个单独链形成的两种寡聚化合物的反义区以及能够形成发夹或哑铃型结构的单分子寡聚化合物。术语“反义链”及“引导链”在本文中可互换使用。

[0297] 短语“有义链”是指具有与靶序列(诸如信使RNA或DNA序列)的全部或部分相同的核苷序列的寡聚化合物。术语“有义链”及“随从链”在本文中可互换使用。

[0298] 通过“可特异性杂交”及“互补”意指核酸可通过传统沃森-克里克(Watson-Crick)或其他非传统类型与另一种核酸序列形成氢键。关于本发明的核分子,核酸分子与其互补序列的结合自由能足以允许进行核酸的相关功能,例如RNAi活性。核酸分子的结合自由能的测定是本领域熟知的(参见例如Turner等人,1987,CSH Symp.Quant.Biol.[冷泉港定量生物学研讨会]LII第123-133页;Frier等人,1986,Proc.Nat.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]83:9373-9377;Turner等人,1987,/.Am.Chem.Soc.[美国化学会志]109:3783-3785)。百分比互补性指示核酸分子中可以与第二核酸序列形成氢键(例如,沃森-克里克碱基配对)的连续残基的百分比(例如,10个中的5、6、7、8、9、10个为50%、60%、70%、80%、90%及100%互补)。“完美互补”或100%互补性意指核酸序列的所有连续残基将与第二核酸序列中的相同数目的连续残基氢键结合。不够完美互补性是指两条链中的一些而非全部核苷单元可以彼此氢键结合的情形。“显著互补性”是指多核苷酸链展现90%或更高的互补性,不包括经选择从而是非互补的多核苷酸链的区域,诸如突出端。特异性结合需要足够程

度的互补性以避免寡聚化合物与非靶序列在需要特异性结合的条件下,即在体内测定或治疗性治疗的情况下在生理条件下,或在体外测定的情况下在进行测定的条件下的非特异性结合。非靶序列典型地相差至少5个核苷酸。

[0299] 在一些实施例中,化合物的双链区的长度等于或至少为10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个核苷酸对。

[0300] 在一些实施例中,化合物的反义链的长度等于或至少为14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0301] 在一些实施例中,化合物的有义链的长度等于或至少为10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0302] 在一个实施例中,化合物的有义链及反义链的长度各自为15至30个核苷酸。

[0303] 在一个实施例中,化合物的有义链及反义链的长度各自为19至25个核苷酸。

[0304] 在一个实施例中,化合物的有义链及反义链的长度各自为21至23个核苷酸。

[0305] 在一些实施例中,一条链在双链区中具有至少一段1-5个单链核苷酸。“双链区中的单链核苷酸段”意指在单嵌段的两端存在至少一个核苷酸碱基对。在一些实施例中,两条链在双链区中具有至少一段1-5(例如,1、2、3、4或5)个单链核苷酸。当两条链在双链区中具有一段1-5(例如,1、2、3、4或5)个单链核苷酸时,此类单链核苷酸可以彼此相反(例如,一段错配)或其可被定位以使得第二条链不具有与第一条链的单链iRNA相反的单链核苷酸,反之亦然(例如,单链环)。在一些实施例中,单链核苷酸存在于任一端的8个核苷酸内,例如两条链之间互补区的5’或3’端的8、7、6、5、4、3或2个核苷酸。

[0306] 在一个实施例中,化合物在多个末端中的至少一个上包含单链突出端。在一个实施例中,单链突出端长度为1、2或3个核苷酸。

[0307] 在一个实施例中,iRNA剂的有义链长度为21个核苷酸,并且反义链长度为23个核苷酸,其中这些链形成21个连续碱基对的双链区(在3’端具有2个核苷酸长的单链突出端)。

[0308] 在一些实施例中,双链iRNA的各链具有ZXY结构,诸如PCT公开号2004080406中所述,将其通过引用以其全文并入本文。

[0309] 在特定实施例中,双链寡聚化合物的两条链可以连接在一起。两条链可在两端彼此连接,或仅在一端连接。在一端连接意指第一条链的5’端与第二条链的3’端连接或第一条链的3’端与第二条链的5’端连接。当两条链在两端彼此连接时,第一条链的5’端与第二条链的3’端连接并且第一条链的3’端与第二条链的5’端连接。两条链可以通过寡核苷酸接头连接在一起,该寡核苷酸接头包括但不限于$(N)_n$;其中N独立地是经修饰或未修饰的核苷酸并且n使3-23。在一些实施例中,n为3-10,例如3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施例中,寡核苷酸接头选自由以下组成的组:GNRA、$(G)_4$、$(U)_4$及$(dT)_4$,其中N为经修饰或未修饰的核苷酸且R为经修饰或未修饰的嘌呤核苷酸。接头中的一些核苷酸可涉及接头中的其他核苷酸的碱基对相互作用。两条链也可通过非核苷接头连接在一起,例如本文所述的接头。本领域技术人员应了解,本文描述的任何寡核苷酸化学修饰或变化均可用于寡核苷酸接头。

[0310] 发夹及哑铃型寡聚化合物具有等于或至少14、15、15、16、17、18、19、29、21、22、23、24或25个核苷酸对的双链体区。双链体区的长度可等于或小于200、100或50。在一些实施例中,双链体区的长度范围为15-30、17至23、19至23及19至21个核苷酸对。。

[0311] 发夹寡聚化合物可以具有单链突出端或末端未配对区,在一些实施例中在3’,并

且在一些实施例中在发夹的反义侧。在一些实施例中,突出端长度为1-4、更通常2-3个核苷酸。可以诱导RNA干扰的发夹寡聚化合物在本文中也称为“shRNA”。

[0312] 在某些实施例中,两个寡聚链在存在足够程度的互补性时特异性杂交,以避免反义化合物与非靶核酸序列在需要特异性结合的条件下即在体内测定或治疗性治疗的情况下在生理条件下,以及在体外测定的情况下在进行测定的条件下的非特异性结合。

[0313] 如本文所用,“严格杂交条件”或“严格条件”是指反义化合物将与其靶序列杂交但与最少数目的其他序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的并且在不同情况下使不同的,并且反义化合物与靶序列杂交的“严格条件”是由反义化合物的性质及组成以及对其进行研究的测定来决定。

[0314] 本领域中应理解,与未修饰的化合物相比,并入核苷酸亲和力修饰可允许更大数目的错配。类似地,某些寡核苷酸序列可比其他寡核苷酸序列对错配更具耐受性。本领域普通技术人员能够确定寡核苷酸之间、或寡核苷酸与靶核酸之间的适当数目的错配,诸如通过测定解链温度(Tm)。Tm或ΔTm可通过本领域普通技术人员熟悉的技术来计算。例如,Freier等人(Nucleic Acids Research[核酸研究],1997,25,22:4429-4443)中所述的技术允许本领域普通技术人员评估核苷酸修饰增加RNA:DNA双链体的解链温度的能力。

[0315] siRNA设计

[0316] 在一个实施例中,iRNA剂是具有19个nt长度的双端平物,其中该有义链在从5’端起的位置7、8、9处含有在三个连续核苷酸上具有三个2’-F修饰的至少一个基序。反义链含有在从5’末端起的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上具有三个2’-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0317] 在一个实施例中,iRNA剂是具有20个nt长度的双端钝物,其中该有义链在从5’端起的位置8、9、10处含有至少一个在三个连续核苷酸上具有三个2’-F修饰的基序。反义链含有在从5’末端起的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上具有三个2’-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0318] 在一个实施例中,iRNA剂是具有21个nt长度的双端钝物,其中该有义链在从5’端起的位置9、10、11处含有至少一个在三个连续核苷酸上具有三个2’-F修饰的基序。反义链含有在从5’末端起的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上具有三个2’-O-甲基修饰的至少一个基序。

[0319] 在一个实施例中,iRNA剂包含一个21个核苷酸(nt)的有义链和一个23个核苷酸(nt)的反义链,其中该有义链在从5’端起的位置9、10、11处含有在三个连续核苷酸上具有三个2’-F修饰的至少一个基序;反义链在5’端的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个2’-O-甲基修饰的基序,其中iRNA的一端为平端,而另一端包含2nt突出端。优选地,2nt突出端位于反义的3’端。任选地,iRNA剂进一步包含配体(例如$GalNAc_3$)。

[0320] 在一个实施例中,iRNA剂包含有义链及反义链,其中:有义链的长度为25-30个核苷酸残基,其中自所述第一条链的5’末端核苷酸(位置1)位置1至23开始包含至少8个核糖核苷酸;反义链的长度为36-66个核苷酸残基,并且自3’末端核苷酸开始,在与有义链的位置1-23配对的位置包含至少8个核糖核苷酸以形成双链体;其中至少反义链的3’末端核苷酸与有义链未配对,并且至多6个连续3’末端核苷酸与有义链未配对,从而形成1-6个核苷酸的3’单链突出端;其中反义链的5’端包含10-30个与有义链未配对的连续核苷酸,从而形

成10-30个核苷酸单链5'突出端;其中当比对有义链及反义链的最大互补性时,至少有义链5'末端及3'末端核苷酸与反义链的核苷酸碱基配对,从而在有义链与反义链之间形成基本上双链体区;且当所述双链核酸引入哺乳动物细胞中时,反义链与靶RNA沿着至少19个核糖核苷酸的反义链长度充分互补以减少靶基因表达;并且其中有义链在三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个2'-F修饰的基序,其中至少一个基序出现在裂解位点处或附近。反义链在裂解位点处或附近的三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0321] 在一个实施例中,iRNA剂包含有义链和反义链,其中所述iRNA剂包含第一条链和第二条链,该第一条链具有至少25个且至多29个核苷酸的长度,并且该第二条链具有至多30个核苷酸的长度,其中在从5'端起的位置11、12、13处在三个连续核苷酸上具有三个2'-O-甲基修饰的至少一个基序;其中所述第一条链的所述3'端及所述第二条链的所述5'端形成平端并且所述第二条链在其3'端比第一条链长1-4个核苷酸,其中双链体区长度为至少25个核苷酸,并且当所述iRNA剂引入哺乳动物细胞中时,所述第二条链与靶mRNA沿着所述第二条链的至少19nt的长度充分互补以降低靶基因表达,并且其中所述iRNA的dicer裂解优选地产生包含所述第二条链的所述3'端的siRNA,从而降低哺乳动物中的靶基因表达。任选地,iRNA剂进一步包含配体(例如$GalNAc_3$)。

[0322] 在一个实施例中,iRNA剂的有义链在三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个同一修饰的基序,其中一个基序出现在有义链的裂解位点。举例而言,有义链可在5'端的7-15个位置内的三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个2'-F修饰的基序。

[0323] 在一个实施例中,iRNA剂的反义链也可在三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个同一修饰的基序,其中一个基序出现在反义链的裂解位点处或附近。举例而言,反义链可在5'端的9-15个位置内的三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0324] 对于具有长度为17-23nt的双链体区的iRNA剂,反义链的裂解位点典型地在5'端的10、11及12位附近。因此,具有三个同一修饰的基序可以出现在反义链的9、10、11位;10、11、12位;11、12、13位;12、13、14位;或13、14、15位,自反义链的5'端的第1个核苷酸开始计数,或自反义链的5'端的双链体区内的第1个配对核苷酸开始计数。反义链中的裂解位点也可根据iRNA的双链体区距离5'端的长度而改变。

[0325] 在一些实施例中,iRNA剂包含各自具有14至30个核苷酸的有义链及反义链,其中有义链在三个连续核苷酸上含有至少两个具有三个同一修饰的基序,其中至少一个基序出现在链内的裂解位点处或附近,并且至少一个基序出现在链的另一部分(该基序与裂解位点处的基序分隔至少一个核苷酸)。在一个实施例中,反义链也在三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个同一修饰的基序,其中至少一个基序出现在链内的裂解位点处或附近。在有义链中的裂解位点处或附近出现的基序中的修饰不同于在反义链中的裂解位点处或附近出现的基序中的修饰。

[0326] 在一些实施例中,iRNA剂包含各自具有14至30个核苷酸的有义链及反义链,其中有义链在三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个2'-F修饰的基序,其中至少一个基序出现在链中的裂解位点处或附近。在一个实施例中,反义链也在裂解位点处或附近的三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0327] 在一些实施例中,iRNA剂包含各自具有14至30个核苷酸的有义链及反义链,其中有义链在5'端的位置9、10、11处的三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个2'-F修饰的基序,并且其中反义链在5'端的位置11、12、13处的三个连续核苷酸上含有至少一个具有三个2'-O-甲基修饰的基序。

[0328] 在一个实施例中,iRNA剂在双链体内包含与靶标的一个或多个错配、或其组合。错配可以存在于突出区域或双链体区域中。碱基对可基于其促进解离或解链的倾向排序(例如,基于特定配对的缔合或解离的自由能,最简单的方法为在单个对的基础上检查配对,但也可使用下一个邻近或类似分析)。就促进解离而言:A:U优于G:C;G:U优于G:C;并且I:C优于G:C(I=肌苷)。错配(例如非典型或不是典型配对(如本文别处所述))优于典型(A:T、A:U、G:C)配对;且包括通用碱基的配对优于典型配对。

[0329] 在一个实施例中,iRNA剂包含在反义链的5'端的双链体区内的前1、2、3、4或5个碱基对中的至少一个,其可独立地选自以下的组:A:U,G:U,I:C、及错配的配对,如,包括通用碱基的非典型配对或除经典配对之外,以促进该反义链在该双链体的5'末端解离。

[0330] 在一个实施例中,反义链中5'端双链体区内的1位核苷酸选自由以下组成的组:A、dA、dU、U及dT。可替代地,反义链的5'端的双链体区内的前1、2或3个碱基对中的至少一个为AU碱基对。例如,反义链的5'端的双链体区内的第一个碱基对为AU碱基对。

[0331] 在一个实施例中,100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%或30%的dsRNA剂经修饰。例如,当50%的dsRNA剂经修饰时,dsRNA剂中存在的所有核苷酸的50%含有如本文所述的修饰。

[0332] 在一个实施例中,有义链及反义链中的每个独立地经非环状核苷酸、LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-脱氧、2'-氟、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)或2'-ara-F修饰。

[0333] 在一个实施例中,dsRNA剂的有义链及反义链中的每个含有至少两个不同的修饰。

[0334] 在一个实施例中,dsRNA剂不含有任何2'-F修饰。

[0335] 在一个实施例中,dsRNA剂的有义链和/或反义链包含具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的一个或多个嵌段。在一个实例中,有义链包含具有两个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的一个嵌段。在一个实例中,反义链包含具有两个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段。例如,具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段被16-18个磷酸酯核苷酸间键分隔开。

[0336] 在一个实施例中,dsRNA剂的有义链及反义链中的每个具有15-30个核苷酸。在一个实例中,有义链具有19-22个核苷酸,并且反义链具有19-25个核苷酸。在另一个实例中,有义链具有21个核苷酸,并且反义链具有23个核苷酸。

[0337] 在一个实施例中,双链体反义链的5'端的位置1处的核苷酸选自由A、dA、dU、U及dT组成的组。在一个实施例中,来自反义链的5'端的第一、第二及第三碱基对中的至少一个为AU碱基对。

[0338] 在一个实施例中,dsRNA剂的反义链与靶RNA 100%互补以与其杂交并且通过RNA干扰抑制其表达。在另一个实施例中,dsRNA剂的反义链与靶RNA至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%或至少50%互补。

[0339] 在一个方面中,本发明涉及能够抑制靶基因表达的如本文所定义的dsRNA剂。dsRNA剂包含有义链及反义链,每条链具有14至40个核苷酸。有义链含有至少一个热去稳定化核苷酸,其中至少一个所述热去稳定化核苷酸出现在与反义链的种子区相对的位点处或附近(即在反义链的5'端的位置2-8处)。

[0340] 当有义链长度为21个核苷酸时,热去稳定化核苷酸可以出现在例如有义链的5'端的位置14-17之间。反义链含有至少两个经修饰的核酸,其小于空间上苛刻的2'-OMe修饰。优选地,小于空间上苛刻的2'-OMe的两个经修饰的核酸被11个核苷酸长分隔。例如,两个经修饰的核酸位于反义链的5'端的位置2及14处。

[0341] 在一个实施例中,dsRNA剂包含:

[0342] (a)有义链,其具有:

[0343] (i)18-23个核苷酸的长度;

[0344] (ii)在位置7-15处的三个连续2'-F修饰;和

[0345] (b)反义链,其具有:

[0346] (i)18-23个核苷酸的长度;

[0347] (ii)在该链上任何地方的至少2'-F修饰;以及

[0348] (iii)在前五个核苷酸处的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自5'端计数);

[0349] 其中dsRNA剂具有含有与至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体;并且具有在反义链的3'端处的两个核苷酸突出端,及在反义链的5'端处的平端;或双链体两端均为平端。

[0350] 在一个实施例中,dsRNA剂包含:

[0351] (a)有义链,其具有:

[0352] (i)18-23个核苷酸的长度;

[0353] (ii)少于四个2'-F修饰;

[0354] (b)反义链,其具有:

[0355] (i)18-23个核苷酸的长度;

[0356] (ii)少于十二个2'-F修饰;和

[0357] (iii)在前五个核苷酸处的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自5'端计数);

[0358] 其中dsRNA剂具有含有与至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体;并且具有在反义链的3'端处的两个核苷酸突出端,及在反义链的5'端处的平端;或双链体两端均为平端。

[0359] 在一个实施例中,dsRNA剂包含:

[0360] (a)有义链,其具有:

[0361] (i)19-35个核苷酸的长度;

[0362] (ii)少于四个2'-F修饰;

[0363] (b)反义链,其具有:

[0364] (i)19-35个核苷酸的长度;

[0365] (ii)少于十二个2'-F修饰;和

[0366] (iii)在前五个核苷酸处的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自5'端计数);

[0367] 其中双链体区在19至25个碱基对之间(优选地19、20、21或22个);并且其中dsRNA

剂具有含有与至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体;并且具有在反义链的3'端处的两个核苷酸突出端,及在反义链的5'端处的平端;或双链体两端均为平端。

[0368] 在一个实施例中,dsRNA剂包含具有15-30个核苷酸长度的有义链及反义链;在反义链上的前五个核苷酸处的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自5'端计数);其中双链体区在19至25个碱基对之间(优选地19、20、21或22个);其中dsRNA剂具有含有与至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体;并且其中dsRNA剂具有少于20%、少于15%及少于10%的非天然核苷酸。

[0369] 非天然核苷酸的实例包括非环状核苷酸、LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-脱氧、2'-氟、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)或2'-ara-F等。

[0370] 在一个实施例中,dsRNA剂包含具有15-30个核苷酸长度的有义链及反义链;在反义链上的前五个核苷酸处的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自5'端计数);其中双链体区在19至25个碱基对之间(优选地19、20、21或22个);其中dsRNA剂具有含有与至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体;并且其中dsRNA剂具有大于80%、大于85%及大于90%的天然核苷酸,诸如2'-OH、2'-脱氧及2'-OMe为天然核苷酸。

[0371] 在一个实施例中,dsRNA剂包含具有15-30个核苷酸长度的有义链及反义链;在反义链上的前五个核苷酸处的至少两个硫代磷酸酯核苷酸间键(自5'端计数);其中双链体区在19至25个碱基对之间(优选地19、20、21或22个);其中dsRNA剂具有含有与至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体;并且其中dsRNA剂具有100%天然核苷酸,诸如2'-OH、2'-脱氧及2'-OMe为天然核苷酸。

[0372] 在一个实施例中,dsRNA剂包含有义链及反义链,每条链具有14至30个核苷酸,其中有义链序列由式(I)表示:

[0373] $5'n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q3'$

[0374] (I)

[0375] 其中:

[0376] i及j各自独立地是0或1;

[0377] p及q各自独立地是0-6;

[0378] 每个N_a独立地表示包含0-25个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列,每个序列包含至少两个经不同修饰的核苷酸;

[0379] 每个N_b独立地表示包含1、2、3、4、5或6个经修饰的核苷酸的寡核苷酸序列;

[0380] 每个n_p及n_q独立地表示突出端核苷酸;

[0381] 其中N_b及Y不具有相同的修饰;

[0382] 其中XXX、YYY及ZZZ各自独立地表示在三个连续核苷酸上具有三个同一修饰的一个基序;

[0383] 其中dsRNA剂具有含有与至少一条链上的一个或多个位置缀合的一个或多个亲脂性部分的一个或多个亲脂性单体;并且

[0384] 其中dsRNA的反义链包含被1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18

个磷酸酯核苷酸间键分开的具有一个、两个或三个硫代磷酸酯核苷酸间键的两个嵌段。

[0385] 各种公开描述多聚体siRNA,并且全部可以与本发明的iRNA一起使用。此类公开文件包括WO 2007/091269、美国专利号7858769、WO 2010/141511、WO 2007/117686、WO 2009/014887及WO 2011/031520,将其通过引用以其全文并入本文。

[0386] 在一些实施例中,100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%或30%的本发明的iRNA剂被2'-OMe修饰。

[0387] 在一些实施例中,iRNA剂的有义链及反义链中的每个独立地经非环状核苷酸、LNA、HNA、CeNA、2'-甲氧基乙基、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基、2'-脱氧、2'-氟、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)或2'-ara-F修饰。

[0388] 在一些实施例中,iRNA剂的有义链及反义链中的每条含有至少两个不同的修饰。

[0389] 在一些实施例中,本发明的化合物不含有任何2'-F修饰。

[0390] 在一些实施例中,本发明的化合物含有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个2'-F修饰。在一个实例中,本发明的化合物含有九或十个2'-F修饰。

[0391] 本发明的iRNA剂可以进一步包含至少一个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰可以出现在链中任何位置的有义链或反义链或两个的任何核苷酸上。举例而言,核苷酸间键修饰可以出现在有义链或反义链上的每一核苷酸上;各核苷酸间键修饰可以交替模式出现在有义链或反义链上;或有义链或反义链可以交替模式含有两个核苷酸间键修饰。有义链上的核苷酸间键修饰的交替模式可以与反义链相同或不同,并且有义链上的核苷酸间键修饰的交替模式可相对于反义链上的核苷酸间键修饰的交替模式具有迁移。

[0392] 在一个实施例中,iRNA在突出端区域中包含硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键修饰。例如,突出端区域可含有两个核苷酸,在该两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。也可进行核苷酸间键修饰以将突出端核苷酸与双链体区内的末端配对核苷酸连接。例如,至少2、3、4个或所有突出端核苷酸可通过硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键连接,并且任选地,可存在将突出端核苷酸与紧邻突出端核苷酸的配对核苷酸连接的额外硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键。例如,在末端三个核苷酸之间可以存在至少两个硫代磷酸酯核苷酸间连接,其中这三个核苷酸中的两个是突出核苷酸,并且第三个是紧挨着该突出核苷酸的配对的核苷酸。优选地,这些末端三个核苷酸可处于反义链的3'端。

[0393] 在一些实施例中,iRNA剂的有义链和/或反义链包含具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的一个或多个嵌段。在一个实例中,有义链包含具有两个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的一个嵌段。在一个实例中,反义链包含具有两个硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段。例如,具有硫代磷酸酯或甲基膦酸酯核苷酸间键的两个嵌段被16-18个磷酸酯核苷酸间键分隔开。

[0394] 在一些实施例中,iRNA剂的反义链与靶RNA 100%互补以与其杂交并且通过RNA干扰抑制其表达。在另一个实施例中,iRNA剂的反义链与靶RNA至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%或至少50%互补。

[0395] 核酸修饰

[0396] 在一些实施例中,化合物包含至少一种本文所述的核酸修饰。例如,至少一种修饰选自由经修饰的核苷间键、经修饰的核碱基、经修饰的糖及其任何组合组成的组。在没有限制的情况下,此种修饰可存在于化合物中的任何位置。例如,修饰可存在于RNA分子中的一个中。

[0397] 核酸修饰(核碱基)

[0398] 核苷的天然存在的碱基部分典型地为杂环碱基。此类杂环碱基的两种最常见的类别为嘌呤及嘧啶。对于包括呋喃戊醣基糖的那些核苷,磷酸酯基团可连接于糖的2'、3'或5'羟基部分。在形成寡核苷酸时,那些磷酸酯将相邻的核苷彼此共价连接以形成线性聚合化合物。在寡核苷酸内,磷酸酯通常称为形成寡核苷酸的核苷间主链。RNA及DNA的天然存在的键或主链为3'至5'磷酸二酯键。

[0399] 除"未修饰"或"天然"核碱基(诸如嘌呤核碱基腺嘌呤(A)及鸟嘌呤(G),以及嘧啶核碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U))之外,本领域技术人员已知的许多经修饰的核碱基或核碱基模拟物适用于本文所述的化合物。未修饰或天然的核碱基可经修饰或替换以提供具有改进的特性的iRNA。例如,可用这些碱基或用合成及天然核碱基(例如,肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、水粉蕈素(nubularine)、异鸟苷(isoguanisine)或杀结核菌素(tubercidine))及本文所述的寡聚物修饰中的任一个来制备核酸酶抗性寡核苷酸。可替代地,可采用任何上述碱基及"通用碱基"的经取代或经修饰的类似物。当天然碱基经非天然和/或通用碱基替换时,该核苷酸称为包含本文中的经修饰的核碱基和/或核碱基修饰。经修饰的核碱基和/或核碱基修饰也包括天然、非天然及通用碱基,其包含缀合部分,例如本文所述的配体。用于与核碱基缀合的优选的缀合部分包括阳离子氨基,其可经由适当烷基、烯基或具有酰胺键的接头与核碱基缀合。

[0400] 本文所述的寡聚化合物也可以包括核碱基(本领域通常简称为"碱基")修饰或取代。如本文所用,"未修饰"或"天然"核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)及鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。示例性经修饰的核碱基包括但不限于其他合成及天然核碱基,诸如肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、水粉蕈素、异鸟苷、杀结核菌素、2-(卤基)腺嘌呤、2-(烷基)腺嘌呤、2-(丙基)腺嘌呤、2-(氨基)腺嘌呤、2-(氨基烷基)腺嘌呤、2-(氨基丙基)腺嘌呤、2-(甲硫基)-N^6-(异戊烯基)腺嘌呤、6-(烷基)腺嘌呤、6-(甲基)腺嘌呤、7-(去氮)腺嘌呤、8-(烯基)腺嘌呤、8-(烷基)腺嘌呤、8-(炔基)腺嘌呤、8-(氨基)腺嘌呤、8-(卤基)腺嘌呤、8-(羟基)腺嘌呤、8-(硫代烷基)腺嘌呤、8-(硫醇)腺嘌呤、N^6-(异戊基)腺嘌呤、N^6-(甲基)腺嘌呤、N^6,N^6-(二甲基)腺嘌呤、2-(烷基)鸟嘌呤、2-(丙基)鸟嘌呤、6-(烷基)鸟嘌呤、6-(甲基)鸟嘌呤、7-(烷基)鸟嘌呤、7-(甲基)鸟嘌呤、7-(去氮)鸟嘌呤、8-(烷基)鸟嘌呤、8-(烯基)鸟嘌呤、8-(炔基)鸟嘌呤、8-(氨基)鸟嘌呤、8-(卤基)鸟嘌呤、8-(羟基)鸟嘌呤、8-(硫代烷基)鸟嘌呤、8-(硫醇)鸟嘌呤、N-(甲基)鸟嘌呤、2-(硫基)胞嘧啶、3-(去氮)-5-(氮杂)胞嘧啶、3-(烷基)胞嘧啶、3-(甲基)胞嘧啶、5-(烷基)胞嘧啶、5-(炔基)胞嘧啶、5-(卤基)胞嘧啶、5-(甲基)胞嘧啶、5-(丙炔基)胞嘧啶、5-(丙炔基)胞嘧啶、5-(三氟甲基)胞嘧啶、6-(偶氮基)胞嘧啶、N^4-(乙酰基)胞嘧啶、3-(3-氨基-3-羧丙基)尿嘧啶、2-(硫基)尿嘧啶、5-(甲基)-2-(硫基)尿嘧啶、5-(甲氨基甲基)-2-(硫基)尿嘧啶、4-(硫基)尿嘧啶、5-(甲基)-4-(硫基)尿嘧啶、5-(甲氨基甲基)-4-(硫基)尿嘧啶、5-(甲基)-2,4-(二硫基)尿嘧啶、5-(甲氨基甲基)-2,4-(二硫基)尿嘧啶、5-(2-氨基丙基)尿嘧啶、5-(烷基)尿嘧啶、5-

(炔基)尿嘧啶、5-(烯丙基氨基)尿嘧啶、5-(氨基烯丙基)尿嘧啶、5-(氨基烷基)尿嘧啶、5-(胍烷基)尿嘧啶、5-(1,3-二唑-1-烷基)尿嘧啶、5-(氰基烷基)尿嘧啶、5-(二烷基氨基烷基)尿嘧啶、5-(二甲基氨基烷基)尿嘧啶、5-(卤基)尿嘧啶、5-(甲氧基)尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸、5-(甲氧基羰基甲基)-2-(硫基)尿嘧啶、5-(甲氧基羰基-甲基)尿嘧啶、5-(丙炔基)尿嘧啶、5-(丙炔基)尿嘧啶、5-(三氟甲基)尿嘧啶、6-(偶氮基)尿嘧啶、二氢尿嘧啶、N^3-(甲基)尿嘧啶、5-尿嘧啶(即假尿嘧啶)、2-(硫基)假尿嘧啶、4-(硫基)假尿嘧啶、2,4-(二硫基)假尿嘧啶、5-(烷基)假尿嘧啶、5-(甲基)假尿嘧啶、5-(烷基)-2-(硫基)假尿嘧啶、5-(甲基)-2-(硫基)假尿嘧啶、5-(烷基)-4-(硫基)假尿嘧啶、5-(甲基)-4-(硫基)假尿嘧啶、5-(烷基)-2,4-(二硫基)假尿嘧啶、5-(甲基)-2,4-(二硫基)假尿嘧啶、1-取代的假尿嘧啶、1-取代的2(硫基)-假尿嘧啶、1-取代的4-(硫基)假尿嘧啶、1-取代的2,4-(二硫基)假尿嘧啶、1-(氨基羰基乙烯基)-假尿嘧啶、1-(氨基羰基乙烯基)-2(硫基)-假尿嘧啶、1-(氨基羰基乙烯基)-4-(硫基)假尿嘧啶、1-(氨基羰基乙烯基)-2,4-(二硫基)假尿嘧啶、1-(氨基烷氨基羰基乙烯基)-假尿嘧啶、1-(氨基烷氨基-羰基乙烯基)-2(硫基)-假尿嘧啶、1-(氨基烷氨基羰基乙烯基)-4-(硫基)假尿嘧啶、1-(氨基烷氨基羰基乙烯基)-2,4-(二硫基)假尿嘧啶、1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噁嗪-1-基、1-(氮杂)-2-(硫基)-3-(氮杂)-吩噁嗪-1-基、1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-啡噻嗪-1-基、1-(氮杂)-2-(硫基)-3-(氮杂)-啡噻嗪-1-基、7-取代的1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噁嗪-1-基、7-取代的1-(氮杂)-2-(硫基)-3-(氮杂)-吩噁嗪-1-基、7-取代的1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-啡噻嗪-1-基、7-取代的1-(氮杂)-2-(硫基)-3-(氮杂)-啡噻嗪-1-基、7-(氨基烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噁嗪-1-基、7-(氨基烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫基)-3-(氮杂)-吩噁嗪-1-基、7-(氨基烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-啡噻嗪-1-基、7-(氨基烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫基)-3-(氮杂)-啡噻嗪-1-基、7-(胍烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噁嗪-1-基、7-(胍烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫基)-3-(氮杂)-吩噁嗪-1-基、7-(胍烷基-羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-啡噻嗪-1-基、7-(胍烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫基)-3-(氮杂)-啡噻嗪-1-基、1,3,5-(三氮杂)-2,6-(二氧杂)-萘、肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、水粉蕈素、杀结核菌素、异鸟苷、肌苷基、2-氮杂-肌苷基、7-去氮-肌苷基、硝基咪唑基、硝基吡唑基、硝基苯并咪唑基、硝基吲唑基、氨基吲哚基、吡咯并嘧啶基、3-(甲基)异喹诺酮基、5-(甲基)异喹诺酮基、3-(甲基)-7-(丙炔基)异喹诺酮基、7-(氮杂)吲哚基、6-(甲基)-7-(氮杂)吲哚基、咪唑并吡啶基、9-(甲基)-咪唑并吡啶基、吡咯并吡嗪基、异喹诺酮基、7-(丙炔基)异喹诺酮基、丙炔基-7-(氮杂)吲哚基、2,4,5-(三甲基)苯基、4-(甲基)吲哚基、4,6-(二甲基)吲哚基、苯基、萘基、蒽基、菲基、芘基、芴基、并四苯基、并五苯基、二氟甲苯基、4-(氟)-6-(甲基)苯并咪唑、4-(甲基)苯并咪唑、6-(偶氮基)胸腺嘧啶、2-吡啶酮、5-硝基吲哚、3-硝基吡咯、6-(氮杂)嘧啶、2-(氨基)嘌呤、2,6-(二氨基)嘌呤、5-取代的嘧啶、N^2-取代的嘌呤、N^6-取代的嘌呤、O^6-取代的嘌呤、经取代的1,2,4-三唑、吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、对取代的6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、邻取代的6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、双邻取代的6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、对(氨基烷基羟基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、邻(氨基烷基羟基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、双邻(氨基烷基羟基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基、吡啶并嘧啶-3-基、2-氧代-7-氨基-吡啶并嘧啶-3-基、2-氧代-吡啶并嘧啶-3-基或其任何O-烷基化或N-烷基化衍生物。可替代地,可采用任何上述碱基及“通用碱

基”的经取代或经修饰的类似物。

[0401] 如本文所用,通用核碱基为可以与所有四种天然存在的核碱基碱基配对而基本上不影响解链行为、细胞内酶识别或iRNA双链体的活性的任何核碱基。一些示例性通用核碱基包括但不限于2,4-二氟甲苯、硝基吡咯基、硝基吲哚基、8-氮杂-7-去氮腺嘌呤、4-氟-6-甲基苯并咪唑、4-甲基苯并咪唑、3-甲基异喹诺酮基、5-甲基异喹诺酮基、3-甲基-7-丙炔基异喹诺酮基、7-氮杂吲哚基、6-甲基-7-氮杂吲哚基、咪唑并吡啶基、9-甲基-咪唑并吡啶基、吡咯并吡嗪基、异喹诺酮基、7-丙炔基异喹诺酮基、丙炔基-7-氮杂吲哚基、2,4,5-三甲基苯基、4-甲基吲哚基、4,6-二甲基吲哚基、苯基、萘基、蒽基、菲基、芘基、芴基、并四苯基、并五苯基及其结构衍生物(参见例如Loakes,2001,Nucleic Acids Research[核酸研究],29,2437-2447)。

[0402] 其他核碱基包括美国专利号3,687,808中所披露的核碱基;2009年3月26日提交的国际申请号PCT/US 09/038425中所披露的核碱基;Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering[高分子科学与工程简明百科全书],第858-859页,Kroschwitz,J.I.编,John Wiley&Sons[约翰·威利父子出版公司],1990中所披露的核碱基;English等人,Angewandte Chemie[德国应用化学],国际版,1991,30,613中所披露的核碱基;Modified Nucleosides in Biochemistry,Biotechnology and Medicine[生物化学、生物技术和医学中的经修饰核苷],Herdewijin,P.编Wiley-VCH[威利出版公司],2008中所披露的核碱基;及Sanghvi,Y.S.,第15章,dsRNA Research and Applications[dsRNA研究与应用],第289-302页,Crooke,S.T.及Lebleu,B.编,CRC Press[CRC出版公司],1993中所披露的核碱基。所有上述内容通过引用并入本文中。

[0403] 在某些实施例中,经修饰的核碱基为在结构上与亲本核碱基非常相似的核碱基,诸如7-去氮嘌呤、5-甲基胞嘧啶或G形夹。在某些实施例中,核碱基模拟物包括更复杂的结构,诸如三环吩噁嗪核碱基模拟物。制备上述经修饰的核碱基的方法是本领域技术人员所熟知的。

[0404] 核酸修饰(糖)

[0405] 本文所提供的本发明的化合物可包含一种或多种(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多种)单体,包括具有经修饰的糖部分的核苷或核苷酸。例如,核苷的呋喃糖基糖环可以多种方式修饰,包括但不限于添加取代基、桥连两个非偕位环原子以形成锁核酸或双环核酸。在某些实施例中,寡聚化合物包含一种或多种(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多种)单体,其为LNA。

[0406] 在锁核酸的一些实施例中,呋喃糖基的2’位置通过独立地选自以下的接头连接至4’位置:-[C(R1)(R2)]$_n$-、-[C(R1)(R2)]$_n$-O-、-[C(R1)(R2)]$_n$-N(R1)-、-[C(R1)(R2)]$_n$-N(R1)-O-、-[C(R1R2)]$_n$-O-N(R1)-、-C(R1)=C(R2)-O-、-C(R1)=N-、-C(R1)=N-O-、-C(=NR1)-、-C(=NR1)-O-、-C(=O)-、-C(=O)O-、-C(=S)-、-C(=S)O-、-C(=S)S-、-O-、-Si(R1)2-、-S(=O)$_x$-及-N(R1)-;

[0407] 其中:

[0408] x是0、1或2;

[0409] n是1、2、3或4;

[0410] 每个R1及R2独立地是H、保护基、羟基、C1-C12烷基、经取代的C1-C12烷基、C2-C12

烯基、经取代的C2-C12烯基、C2-C12炔基、经取代的C2-C12炔基、C5-C20芳基、经取代的C5-C20芳基、杂环基、经取代的杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、C5-C7脂环基、经取代的C5-C7脂环基、卤素、OJ1、NJ1J2、SJ1、N3、COOJ1、酰基(C(=O)-H)、经取代的酰基、CN、磺酰基(S(=O)2-J1)或磺基(S(=O)-J1);并且

[0411] 每个J1及J2独立地是H、C1-C12烷基、经取代的C1-C12烷基、C2-C12烯基、经取代的C2-C12烯基、C2-C12炔基、经取代的C2-C12炔基、C5-C20芳基、经取代的C5-C20芳基、酰基(C(=O)-H)、经取代的酰基、杂环基、经取代的杂环基、C1-C12氨基烷基、经取代的C1-C12氨基烷基或保护基。

[0412] 在一些实施例中,LNA化合物的每个接头独立地是-[C(R1)(R2)]n-、-[C(R1)(R2)]n-O-、-C(R1R2)-N(R1)-O-或-C(R1R2)-O-N(R1)-。在另一个实施例中,所述接头中的每个独立地是4'-CH_2-2'、4'-$(CH_2)_2$-2'、4'-$(CH_2)_3$-2'、4'-CH_2-O-2'、4'-$(CH_2)_2$-O-2'、4'-CH_2-O-N(R1)-2'及4'-CH_2-N(R1)-O-2'-,其中每个R1独立地是H、保护基或C1-C12烷基。

[0413] 某些LNA已经制备并且披露于专利文献以及科学文献中(Singh等人,Chem.Commun.[化学通讯],1998,4,455-456;Koshkin等人,Tetrahedron[四面体],1998,54,3607-3630;Wahlestedt等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊],2000,97,5633-5638;Kumar等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.[生物有机与药物化学快报],1998,8,2219-2222;WO 94/14226;WO 2005/021570;Singh等人,J.Org.Chem.[有机化学杂志],1998,63,10035-10039;披露LNA的颁布的美国专利及公开的申请的实例包括例如美国专利号7,053,207;6,268,490;6,770,748;6,794,499;7,034,133;和6,525,191;以及美国预授予公开号2004-0171570;2004-0219565;2004-0014959;2003-0207841;2004-0143114;以及20030082807)。

[0414] 本文也提供LNA,其中核糖基糖环的2'-羟基与糖环的4'碳原子连接,从而形成亚甲基氧基(4′-CH_2-O-2′)键以形成双环糖部分(综述于Elayadi等人,Curr.Opinion Invens.Drugs[研究药物的最新意见],2001,2,558-561;Braasch等人,Chem.Biol.[生物化学],2001,8 1-7;及Orum等人,Curr.Opinion Mol.Ther.[分子治疗学的最新观点],2001,3,239-243;也参见美国专利号6,268,490及6,670,461)。键可以是桥连2'氧原子及4'碳原子的亚甲基(-CH_2-),其中术语亚甲基氧基(4'-CH_2-O-2')LNA用于双环部分;在此位置是亚乙基的情况下,使用术语亚乙基氧基(4'-CH_2CH_2-O-2')LNA(Singh等人,Chem.Commun.[化学通讯],1998,4,455-456:Morita等人,Bioorganic Medicinal Chemistry[生物有机与药物化学],2003,11,2211-2226)。亚甲基氧基(4'-CH_2-O-2')LNA及其他双环糖类似物显示具有互补DNA及RNA的极高的双链体热稳定性(Tm=+3至+10℃),朝向3'-核酸外切降解的稳定性及良好的溶解特性。已描述包含BNA的有效且无毒的反义寡核苷酸(Wahlestedt等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊],2000,97,5633-5638)。

[0415] 也已论述的亚甲基氧基(4'-CH_2-O-2')LNA的异构体为α-L-亚甲基氧基(4'-CH_2-O-2')LNA,其已显示具有针对3'-核酸外切酶的优良稳定性。将α-L-亚甲基氧基(4'-CH_2-O-2')LNA并入反义缺口体(gapmer)及显示有效反义活性的嵌合体中(Frieden等人,Nucleic Acids Research[核酸研究],2003,21,6365-6372)。

[0416] 已描述亚甲基氧基(4'-CH_2-O-2')LNA单体腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶及尿嘧啶的合成及制备,以及其寡聚化及核酸识别特性(Koshkin等人,

Tetrahedron[四面体],1998,54,3607-3630)。BNA及其制备也描述于WO 98/39352及WO99/14226中。

[0417] 也已制备亚甲基氧基(4'-CH_2-O-2')LNA的类似物硫代磷酸酯-亚甲基氧基(4'-CH_2-O-2')LNA及2'-硫基-LNA(Kumar等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.[生物有机与药物化学快报],1998,8,2219-2222)。也已描述包含寡脱氧核苷酸双链体作为核酸聚合酶底物的锁核苷类似物的制备(Wengel等人,WO 99/14226)。此外,本领域已描述2'-氨基-LNA的合成,其是一种新颖的构形受限的高亲和力寡核苷酸类似物(Singh等人,J.Org.Chem.[有机化学杂志],1998,63,10035-10039)。另外,已制备2'-氨基-及2'-甲氨基-LNA,并且先前已报导其与互补RNA及DNA链的双链体的热稳定性。

[0418] 经修饰的糖部分是熟知的,并且可用以改变,典型地增加反义化合物对其靶标的亲和力和/或增加核酸酶抗性。优选的经修饰的糖的代表性清单包括但不限于经双环修饰的糖,包括亚甲基氧基(4'-CH_2-O-2')LNA及亚乙基氧基(4'-$(CH_2)_2$-O-2'桥键)ENA;经取代的糖,尤其具有2'-F、2'-OCH_3或2'-O$(CH_2)_2$-OCH_3取代基的2'-取代的糖;及经4'-硫基修饰的糖。糖也可经糖模拟基团以及其他替换。用于制备经修饰的糖的方法是本领域技术人员熟知的。教示此类经修饰的糖的制备的一些代表性专利及公开包括但不限于美国专利号4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;5,792,747;5,700,920;6,531,584;和6,600,032;以及WO2005/121371。

[0419] "氧基"-2′羟基修饰的实例包括烷氧基或芳氧基(OR,例如R=H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖);聚乙二醇(PEG)、O$(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$,n=1-50;"锁"核酸(LNA),其中核苷的呋喃醣部分包括连接呋喃醣环上的两个碳原子的桥键,从而形成双环系统;O-胺或O-$(CH_2)_n$胺(n=1-10,胺=NH_2;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基、二杂芳基氨基、乙二胺或聚氨基);及O-$CH_2CH_2(NCH_2CH_2NMe_2)_2$。

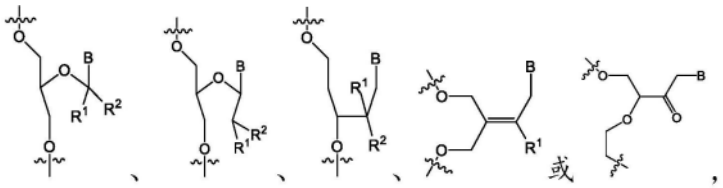
[0420] "脱氧"修饰包括氢(即脱氧核糖,其与单链突出端特别相关);卤基(例如氟);氨基(例如NH_2;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基、二杂芳基氨基或氨基酸);$NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$-胺(胺=NH_2;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基);-NHC(O)R(R=烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖);氰基;巯基;烷基-硫基-烷基;硫代烷氧基;硫代烷基;烷基;环烷基;芳基;烯基及炔基,其可任选地经例如氨基官能团取代。

[0421] 其他适合的2'-修饰(例如经修饰的MOE)描述于美国专利申请公开号20130130378中,将其内容通过引用以其全文并入本文。

[0422] 在2'位置处的修饰可存在于阿拉伯糖构型中。术语"阿拉伯糖构型"是指取代基在核糖的C2'上的位置与2'-OH在阿拉伯糖中的构型相同。

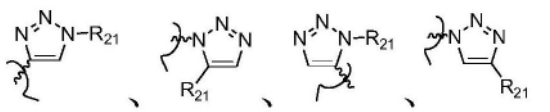
[0423] 糖可在糖中的相同碳处包含两种不同的修饰,例如偕位修饰。糖基也可含有一个或多个碳,其具有与核糖中的相应碳相反的立体化学构型。因此,寡聚化合物可以包括一种或多种含有例如阿拉伯糖作为糖的单体。单体可在糖的1'位置处具有α键,例如α-核苷。单体也可在4'-位置处具有相反的构型,例如C5'及H4'或替换其的取代基彼此互换。当C5'及H4'或替换其的取代基彼此互换时,糖称为在4'位置处经修饰。

[0424] 本文所披露的本发明的化合物也可以包括无碱基糖,即在C-1'处缺乏核碱基或在C1'处具有其他化学基团代替核碱基的糖。参见例如美国专利号5,998,203,将其内容以其整体并入本文中。这些无碱基(abasic)糖也可以进一步在组成性糖原子中的一个或多个处含有修饰。本发明的化合物也可含有一种或多种呈L异构体的糖,例如L-核苷。对糖基的修饰也可以包括用硫、任选地经取代的氮或CH_2基团替换4'-O。在一些实施例中,C1'与核碱基之间的键呈α构型。

[0425] 糖修饰也可以包括"非环状核苷酸",其是指具有非环状核糖的任何核苷酸,例如其中核糖碳之间的C-C键(例如,C1'-C2'、C2'-C3'、C3'-C4'、C4'-O4'、C1'-O4')不存在和/或核糖碳或氧中的至少一个(例如,C1'、C2'、C3'、C4'或O4')独立地或组合地不存在于核苷酸。在一些实施例中,非环状核苷酸为  或 ,其中B为经修饰或未修饰的核碱基,R_1及R_2独立地是H、卤素、OR_3或烷基;并且R_3为H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖。

[0426] 在一些实施例中,糖修饰选自由以下组成的组:2'-H、2'-O-Me(2'-O-甲基)、2'-O-MOE(2'-O-甲氧基乙基)、2'-F、2'-O-[2-(甲氨基)-2-氧代乙基](2'-O-NMA)、2'-S-甲基、2'-O-CH_2-(4'-C)(LNA)、2'-O-CH_2CH_2-(4'-C)(ENA)、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲氨基丙基(2'-O-DMAP)、2'-O-二甲氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)及偕位2'-OMe/2'F,其在阿拉伯糖构型中具有2'-O-Me。

[0427] 应理解,当特定核苷酸通过其2'-位置与下一个核苷酸连接时,本文所述的糖修饰可置于该特定核苷酸(例如通过其2'-位置连接的核苷酸)的糖的3'-位置。3'位置处的修饰可以木糖构型存在。术语"木糖构型"是指取代基在核糖的C3'上的位置与3'-OH在木糖中的构型相同。

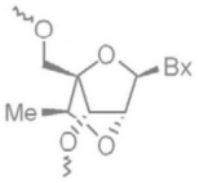
[0428] 附接至C4'和/或C1'的氢可经直链或支链的任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基替换,其中烷基、烯基及炔基的主链可含有O、S、S(O)、SO_2、N(R')、C(O)、N(R')C(O)O、OC(O)N(R')、CH(Z')、含磷键、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基、任选地经取代的杂环或任选地经取代的环烷基中的一个或多个,其中R'为氢、酰基或任选地经取代的脂肪族,Z'选自由以下组成的组:OR_{11}、COR_{11}、CO_2R_{11}、 、$NR_{21}R_{31}$、$CONR_{21}R_{31}$、$CON(H)NR_{21}R_{31}$、$ONR_{21}R_{31}$、$CON(H)N{=}CR_{41}R_{51}$、$N(R_{21})C(=NR_{31})NR_{21}R_{31}$、$N(R_{21})C(O)NR_{21}R_{31}$、$N(R_{21})C(S)NR_{21}R_{31}$、$OC(O)NR_{21}R_{31}$、$SC(O)NR_{21}R_{31}$、$N(R_{21})C(S)OR_{11}$、$N(R_{21})C(O)OR_{11}$、$N(R_{21})C(O)SR_{11}$、$N(R_{21})N{=}CR_{41}R_{51}$、$ON{=}CR_{41}R_{51}$、$SO_2R_{11}$、$SOR_{11}$、$SR_{11}$及经取代或未经取代的杂环;$R_{21}$和$R_{31}$在每次出现时独立地是氢、酰基、未经取代或经取代的脂肪族基、芳基、杂芳基、杂环基、OR_{11}、COR_{11}、CO_2R_{11}或$NR_{11}R_{11}$';或R_{21}和R_{31}与其所附接的原子一起形成杂环;R_{41}和R_{51}在每次出现时独立地是氢、酰基、未经取代或经取代的脂肪族基、芳基、杂芳基、杂环基、OR_{11}、COR_{11}或CO_2R_{11}或$NR_{11}R_{11}$';并且R_{11}和R_{11}'独立地是氢、脂肪族基、经取代的脂肪族基、芳基、杂芳基或杂环基。在一些实施例中,附接至5'末

端核苷酸的C4'的氢被替换。

[0429] 在一些实施例中,C4'及C5'一起形成任选地经取代的杂环基,其优选地包含至少一个-PX(Y)-,其中X为H、OH、OM、SH、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烷氧基、任选地经取代的烷硫基、任选地经取代的烷基氨基或任选地经取代的二烷基氨基,其中M在每次出现时独立地是总电荷为+1的碱金属或过渡金属;并且Y为O、S或NR',其中R'为氢、任选地经取代的脂肪族基。优选地,此修饰处于iRNA的5末端。

[0430] 在某些实施例中,本发明的化合物包含具有至少两个连续的上式单体的至少两个区域。在某些实施例中,本发明的化合物包含有缺口的基序。在某些实施例中,本发明的化合物包含至少一个具有约8至约14个连续的β-D-2'-脱氧呋喃核糖基核苷的区域。在某些实施例中,本发明的化合物包含至少一个具有约9至约12个连续的β-D-2'-脱氧呋喃核糖基核苷的区域。

[0431] 在某些实施例中,本发明的化合物包含至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个)包含至少一个具有下式的(S)-cEt单体:

[0432] 

S-cEt (C) ,

[0433] 其中Bx为杂环碱基部分。

[0434] 在某些实施例中,单体包括糖模拟物。在某些此类实施例中,使用模拟物代替糖或糖-核苷间键组合,并且保持核碱基以便与选定的靶标杂交。糖模拟物的代表性实例包括但不限于环己烯基或N-吗啉基。糖-核苷间键组合的模拟物的代表性实例包括但不限于通过不带电荷的非手性键连接的肽核酸(PNA)及N-吗啉基。在一些情况下,使用模拟物代替核碱基。代表性核碱基模拟物是本领域熟知的,并且包括但不限于三环吩噁嗪类似物及通用碱基(Berger等人,Nuc Acid Res.[核酸研究]2000,28:2911-14,将其以引用的方式并入本文中)。糖、核苷及核碱基模拟物的合成方法是本领域技术人员熟知的。

[0435] 核酸修饰(糖间键)

[0436] 本文描述的是将单体(包括但不限于经修饰及未修饰的核苷及核苷酸)连接在一起的连接基团,从而形成寡聚化合物,例如寡核苷酸。此类连接基团也称为糖间键。两种主要类别的连接基团是由磷原子的存在或不存在来定义。代表性含磷键包括但不限于磷酸二酯(P=O)、磷酸三酯、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯及硫代磷酸酯(P=S)。代表性不含磷的连接基团包括但不限于亚甲基甲基亚胺基(-CH_2-N(CH_3)-O-CH2-)、硫代二酯(-O-C(O)-S-)、硫代氨基甲酸酯(-O-C(O)(NH)-S-);硅氧烷(-O-Si(H)$_2$-O-);及N,N'-二甲基肼(-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-)。与天然磷酸二酯键相比,经修饰的键可用于改变,典型地增加寡核苷酸的核酸酶抗性。在某些实施例中,具有手性原子的键可制备为外消旋混合物,制备为单独的对映异构体。代表性手性键包括但不限于烷基膦酸酯及硫代磷酸酯。含磷及不含磷的键的制备方法是本领域技术人员熟知的。

[0437] 连接基团中的磷酸酯可通过用不同取代基替换一个氧来修饰。此修饰的一种结果可以是增加寡核苷酸对溶核分解的抗性。经修饰的磷酸酯的实例包括硫代磷酸酯、硒代磷

酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷磷酸酯、氢膦酸酯、氨基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯及磷酸三酯。在一些实施例中,键中的非桥连磷酸氧原子中的一个可经以下中的任一个替换:S、Se、BR_3(R为氢、烷基、芳基)、C(即烷基、芳基等)、H、NR_2(R为氢、任选地经取代的烷基、芳基)或(R为任选地经取代的烷基或芳基)。未修饰的磷酸酯中的磷原子为非手性的。然而,用上述原子或原子团中的一个替换非桥连氧中的一个使得磷原子呈手性;换言之,以此方式修饰的磷酸酯中的磷原子为立体对称中心。立体对称磷原子可具有"R"构型(本文中为Rp)或"S"构型(本文中为Sp)。

[0438] 二硫代磷酸酯具有被硫替换的两个非桥连氧。二硫代磷酸酯中的磷中心为非手性的,其杜绝寡核苷酸非对映异构体的形成。因此,尽管不希望受理论束缚,但对两个非桥连氧的修饰消除手性中心(例如二硫代磷酸酯形成)可以是合乎需要的,因为其无法产生非对映异构体混合物。因此,非桥连氧可独立地是O、S、Se、B、C、H、N或OR(R为烷基或芳基)中的任一个。

[0439] 磷酸酯接头也可通过用氮(桥连氨基磷酸酯)、硫(桥连硫代磷酸酯)及碳(桥连亚甲基膦酸酯)替换桥连氧(即连接磷酸酯与单体的糖的氧)来修饰。替换可发生在任一连接氧或两个连接氧处。当桥连氧为核苷的3'-氧时,用碳替换优选的。当桥连氧为核苷的5'-氧时,用氮替换优选的。

[0440] 经修饰的磷酸酯键,其中至少一个与磷酸酯连接的氧已经替换或磷酸酯已被非磷基团替换,也称为"非磷酸二酯糖间键"或"非磷酸二酯接头"。

[0441] 在某些实施例中,磷酸酯可经不含磷的连接体替换,例如去磷接头。去磷接头在本文中也称为非磷酸二酯接头。尽管不希望受理论束缚,但据信由于带电荷的磷酸二酯基为溶核降解的反应中心,因此其用中性结构模拟物替换应赋予增强的核酸酶稳定性。同样,尽管不希望受理论束缚,但在一些实施例中,可能需要引入其中带电荷的磷酸酯经中性部分替换的改变。

[0442] 可替换磷酸酯基团的部分的实例包括但不限于酰胺(例如酰胺-3(3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5')及酰胺-4(3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5'))、羟基氨基、硅氧烷(二烷基硅氧烷)、甲酰胺、碳酸酯、羧甲基、氨基甲酸酯、羧酸酯、硫醚、环氧乙烷接头、硫化物、磺酸酯、磺酰胺、磺酸酯、硫代甲缩醛(3'-S-CH_2-O-5')、甲缩醛(3'-O-CH_2-O-5')、肟、亚甲基亚氨基、亚甲基羰氨基、亚甲基甲基亚氨基(MMI,3'-CH_2-N(CH_3)-O-5')、亚甲基肼、亚甲基二甲基肼、亚甲氧基甲基亚氨基、醚(C3'-O-C5')、硫醚(C3'-S-C5')、硫代乙酰胺(C3'-N(H)-C(=O)-CH_2-S-C5'、C3'-O-P(O)-O-SS-C5'、C3'-CH_2-NH-NH-C5'、3'-NHP(O)(OCH_3)-O-5'及3'-NHP(O)(OCH_3)-O-5')及含有混合的N、O、S及CH_2组成部分的非离子键。参见例如Carbohydrate Modifications in Antisense Research[反义研究中的碳水化合物修饰];Y.S.Sanghvi和P.D.Cook编ACSSymposium Series[ACS研讨会系列]580;第3章及第4章,(第40-65页)。优选的实施例包括亚甲基甲基亚氨基(MMI)、亚甲基羰氨基、酰胺、氨基甲酸酯及环氧乙烷接头。

[0443] 本领域技术人员充分意识到,在某些情况下,非桥连氧的替换会引起相邻2'-OH对糖间键的增强的裂解,因此在许多情况下,非桥连氧的修饰可能需要修饰2'-OH,例如不参与相邻糖间键的裂解的修饰,例如阿拉伯糖、2'-O-烷基、2'-F、LNA及ENA。

[0444] 优选的非磷酸二酯糖间键包括硫代磷酸酯,具有至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多对映异构体过量的Sp异构体的硫代磷酸酯,

具有至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多对映异构体过量的Rp异构体的硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯,磷酸三酯,氨基烷基磷酸三酯,烷基-膦酸酯(例如甲基-膦酸酯),硒代磷酸酯,氨基磷酸酯(例如N-烷基氨基磷酸酯)和硼烷膦酸酯。

[0445] 在一些实施例中,本发明的化合物包含至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个且至多包括所有)经修饰的或非磷酸二酯键。在一些实施例中,本发明的化合物包含至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个且至多包括所有)硫代磷酸酯键。

[0446] 也可构筑本发明的化合物,其中磷酸酯接头及糖经核酸酶抗性核苷或核苷酸替代物替换。尽管不希望受理论束缚,但据信不存在重复带电的主链减少了与识别聚阴离子的蛋白质(例如核酸酶)的结合。同样,尽管不希望受理论束缚,但在一些实施例中,可能需要引入其中碱基通过中性替代主链束缚的改变。实例包括N-吗啉基、环丁基、吡咯啶、肽核酸(PNA)、氨基乙基甘氨酰PNA(aegPNA)及主链延伸的吡咯啶PNA(bepPNA)核苷替代物。优选的替代物为PNA替代物。

[0447] 本文所述的本发明的化合物可含有一个或多个不对称中心,并且因此产生对映异构体、非对映异构体及其他立体异构构型,就绝对立体化学而言,可定义为(R)或(S),诸如对于糖端基异构体,或定义为(D)或(L),诸如对于氨基酸等。本文提供的本发明的化合物包括所有此类可能的异构体,以及其外消旋及光学纯形式。

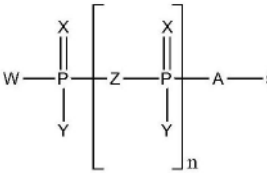
[0448] 核酸修饰(末端修饰)

[0449] 在一些实施例中,化合物进一步包含在反义链的5'端的磷酸酯或磷酸酯模拟物。在一个实施例中,磷酸酯模拟物为5'-乙烯基膦酸酯(VP)。

[0450] 在一些实施例中,化合物的反义链的5'端不含有5'-乙烯基膦酸酯(VP)。

[0451] 本发明的iRNA剂的末端可经修饰。此类修饰可在一端或两端。例如,iRNA的3'和/或5'端可以与其他功能性分子实体缀合,诸如标记部分,例如荧光团(例如,芘、TAMRA、荧光素、Cy3或Cy5染料)或保护基(基于例如硫、硅、硼或酯)。功能性分子实体可通过磷酸酯和/或接头附接至糖。接头的末端原子可连接至或替换磷酸酯或糖的C-3′或C-5′O、N、S或C基团的连接原子。可替代地,接头可连接至或替换核苷酸替代物(例如PNA)的末端原子。

[0452] 当接头/磷酸酯-功能性分子实体-接头/磷酸酯阵列插入双链寡聚化合物的两条链之间时,此阵列可取代发夹型寡聚化合物中的发夹环。

[0453] 可用于调节活性的末端修饰包括用磷酸酯或磷酸酯类似物修饰iRNA的5'端。在某些实施例中,iRNA的5'端经磷酸化或包括磷酰基类似物。示例性5'-磷酸酯修饰包括与RISC介导的基因沉默相容的那些修饰。在5'末端处的修饰也可用于刺激或抑制受试者的免疫系统。在一些实施例中,寡聚化合物的5'端包含修饰其中W、X及Y各自独立地选自由以下组成的组:O、OR(R为氢、烷基、芳基)、S、Se、BR_3(R为氢、烷基、芳基)、BH_3^-、C(即烷基、芳基等……)、H、NR_2(R为氢、烷基、芳基)或OR(R为氢、烷基或芳基);A及Z在每次出现时各自独立地是不存在、O、S、CH_2、NR(R为氢、烷基、芳基)或任选地经取代的亚烷基,其中

亚烷基的主链可在内部和/或末端包含O、S、SS及NR(R为氢、烷基、芳基)中的一个或多个;并且n是0-2。在一些实施例中,n为1或2。应理解,A替换与糖的5'碳连接的氧。当n是0时,W和Y与其所附接的P一起可形成任选地经取代的5-8元杂环,其中W及Y各自独立地是O、S、NR'或亚烷基。优选地,杂环经芳基或杂芳基取代。在一些实施例中,5'末端核苷酸的C5'上的一个或两个氢经卤素(例如F)替换。

[0454] 示例性5'-修饰包括但不限于5'-单磷酸酯((HO)$_2$(O)P-O-5');5'-二磷酸酯((HO)$_2$(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');5'-三磷酸酯((HO)$_2$(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');5'-单硫代磷酸酯(硫代磷酸酯;(HO)2(S)P-O-5');5'-单二硫代磷酸酯(二硫代磷酸酯;(HO)(HS)(S)P-O-5')、5'-硫代磷酸酯((HO)2(O)P-S-5');5'-α-硫代三磷酸酯;5'-β-硫代三磷酸酯;5'-γ-硫代三磷酸酯;5'-氨基磷酸酯((HO)$_2$(O)P-NH-5'、(HO)(NH$_2$)(O)P-O-5')。其他5'-修饰包括5'-烷基膦酸酯(R(OH)(O)P-O-5',R=烷基,例如甲基、乙基、异丙基、丙基等)、5'-烷基醚膦酸酯(R(OH)(O)P-O-5',R=烷基醚,例如甲氧基甲基(CH_2OMe)、乙氧基甲基等)。其他示例性5'-修饰包括其中Z被任选地经取代的烷基至少一次,例如((HO)$_2$(X)P-O[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$-5'、((HO)$_2$(X)P-O[-$(CH_2)_a$-P(X)(OH)-O]$_b$-5'、((HO)2(X)P-[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$-5';二烷基末端磷酸酯及磷酸酯模拟物:HO[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$-5'、H_2N[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$-5'、H[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$-5'、Me_2N[-$(CH_2)_a$-O-P(X)(OH)-O]$_b$-5'、HO[-$(CH_2)_a$-P(X)(OH)-O]$_b$-5'、H_2N[-$(CH_2)_a$-P(X)(OH)-O]$_b$-5'、H[-$(CH_2)_a$-P(X)(OH)-O]$_b$-5'、Me_2N[-$(CH_2)_a$-P(X)(OH)-O]$_b$-5',其中a及b各自独立地是1-10。其他实施例包括用BH_3、BH_3^-和/或Se替换氧和/或硫。

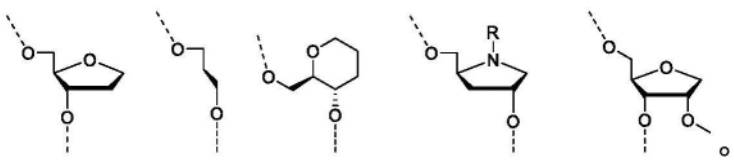
[0455] 末端修饰也可用于监测分布,并且在此类情况下,待添加的优选的基团包括荧光团,例如荧光素或Alexa染料,例如Alexa488。末端修饰也可用于增强摄取,对此有用的修饰包括靶向配体。末端修饰也可用于将寡核苷酸与另一部分交联;对此有用的修饰包括丝裂霉素C、补骨脂素及其衍生物。

[0456] 热去稳定化修饰

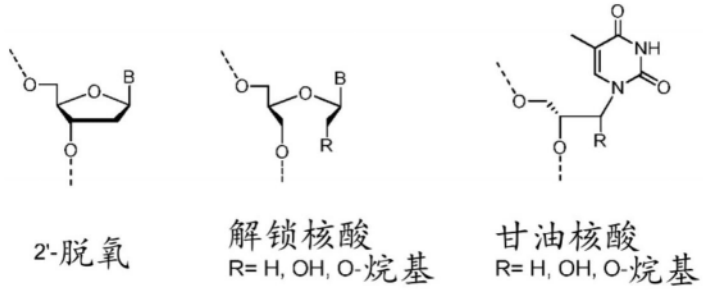
[0457] 本发明的化合物(诸如iRNA或dsRNA剂)可通过在有义链中在反义链的种子区相对的位点处(即,在反义链的5'端的位置2-8处)引入热去稳定化修饰增加iRNA双链体解离或解链的倾向(降低双链体缔合的自由能)而经优化用于RNA干扰。此修饰可增加双链体在反义链的种子区中解离或解链的倾向。

[0458] 热去稳定化修饰可以包括无碱基修饰;与相对链中的相对核苷酸错配;及糖修饰,诸如2'-脱氧修饰或非环状核苷酸,例如解锁核酸(UNA)或甘油核酸(GNA)。

[0459] 例示性无碱基修饰为:

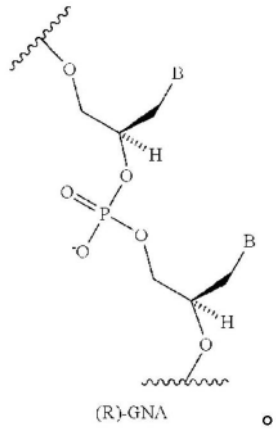
[0460] 

[0461] 例示性糖修饰为:

[0462] 

[0463] 术语“UNA”是指解锁的非环状核酸,其中糖的任何键已移除,形成解锁的“糖”残基。在一个实例中,UNA也涵盖移除C1’-C4’之间的键(即C1’与C4’碳之间的共价碳-氧-碳键)的单体。在另一个实例中,移除糖的C2’-C3’键(即C2’与C3’碳之间的共价碳-碳键)(参见Mikhailov等人,Tetrahedron Letters[四面体通讯],26(17):2059(1985);及Fluiter等人,Mol.Biosyst.[分子生物系统],10:1039(2009),将其通过引用以其全文并入本文。非环状衍生物提供更大的主链挠曲性而不影响沃森-克里克配对。非环状核苷酸可经由2’-5’或3’-5’键连接。

[0464] 术语‘GNA’是指二醇核酸,其为与DNA或RNA类似,但其“主链”组成不同的聚合物,其由通过磷酸二酯键连接的重复甘油单元构成:

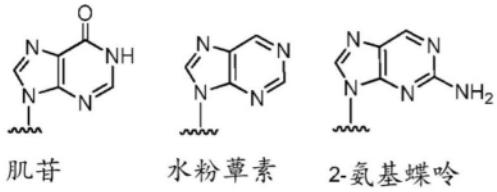
[0465] 

[0466] 热去稳定化修饰可以是dsRNA双链体内的热去稳定化核苷酸与相对链中的相对核苷酸之间的错配(即,非互补碱基对)。示例性错配碱基配对包括G:G,G:A,G:U,G:T,A:A,A:C,C:C,C:U,C:T,U:U,T:T,U:T,或其组合。本领域已知的其他错配碱基配对也适用于本发明。错配可发生在核苷酸(天然存在的核苷酸或经修饰的核苷酸的)之间,即,错配碱基配对可发生在相应核苷酸的核碱基之间,而与核苷酸的核糖上的修饰无关。在某些实施例中,本发明的化合物(诸如siRNA或iRNA剂)在错配配对中含有至少一个核碱基,即2’-脱氧核碱基;例如2’-脱氧核碱基在有义链中。

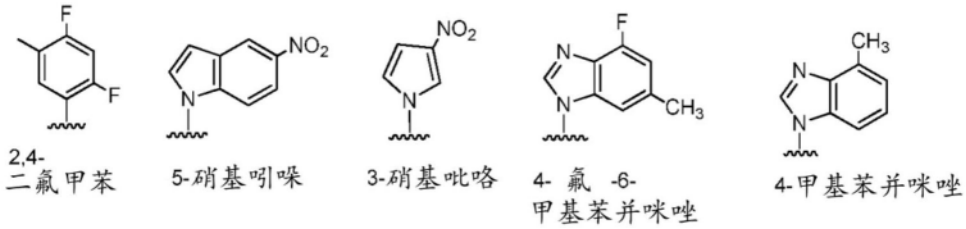
[0467] 无碱基核苷酸、非环状核苷酸修饰(包括UNA及GNA)及错配修饰的更多实例已详细描述于WO 2011/133876中,将其通过引用以其全文并入本文。

[0468] 热去稳定化修饰也可以包括具有降低或消除与相对碱基形成氢键的能力的通用碱基,以及磷酸酯修饰。

[0469] 已针对dsRNA双链体中心区的去稳定化评估具有受损或完全消除的与相对链中的碱基形成氢键的能力的核碱基修饰,如WO 2010/0011895中所述,将其通过引用以其全文并入本文。示例性核碱基修饰为:



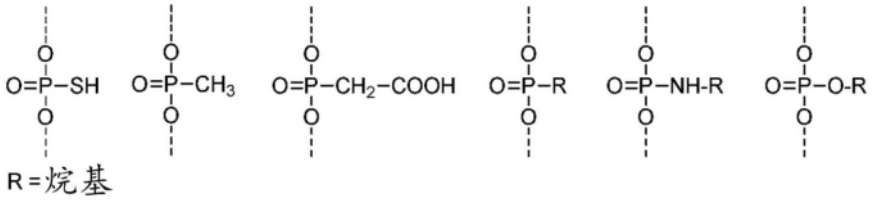
[0470]



。

[0471] 与天然磷酸二酯键相比,已知降低dsRNA双链体的热稳定性的示例性磷酸酯修饰为:

[0472]



。

[0473] 在一些实施例中,本发明化合物可包含2'-5'键(具有2'-H、2'-OH及2'-OMe且具有P=O或P=S)。例如,2'-5'键修饰可用于促进核酸酶抗性或抑制有义链与反义链的结合,或可在有义链的5'端使用以避免RISC的有义链活化。

[0474] 在另一个实施例中,本发明化合物可包含L糖(例如,L核糖、具有2'-H、2'-OH及2'-OMe的L-阿拉伯糖)。例如,这些L糖修饰可用于促进核酸酶抗性或抑制有义链与反义链的结合,或可在有义链的5'端使用以避免RISC的有义链活化。

[0475] 在一个实施例中,本发明的iRNA剂经由载体与配体缀合,其中载体可以是环状基团或非环状基团;优选地,环状基团选自吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、[1,3]二氧戊环、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基及十氢化萘;优选地,非环状基团系选自丝氨醇主链或二乙醇胺主链。

[0476] 在一些实施例中,本文披露的iRNA剂的至少一条链经5'磷酸化或在5'末端包括磷酰基类似物。5'-磷酸酯修饰包括与RISC介导的基因沉默相容的那些修饰。适合的修饰包括:5'-单磷酸酯((HO)$_2$(O)P-O-5');5'-二磷酸酯((HO)$_2$(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');5'-三磷酸酯((HO)$_2$(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');5'-鸟苷帽(7-甲基化或非甲基化)(7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');5'-腺苷帽(Appp)及任何经修饰或未修饰的核苷酸帽结构(N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');5'-单硫代磷酸酯(硫代磷酸酯;(HO)$_2$(S)P-O-5');5'-单二硫代磷酸酯(二硫代磷酸酯;(HO)(HS)(S)P-O-5')、5'-硫代磷酸酯((HO)$_2$(O)P-S-5');任何额外的氧/硫替换的单磷酸酯、二磷酸酯及三磷酸酯的组合(例如5'-α-硫代三磷酸酯、5'-γ-硫代三磷酸酯等)、5'-氨基磷酸酯((HO)$_2$(O)P-NH-5'、(HO)(NH2)(O)P-O-5')、5'-烷基膦酸酯(R=烷基=甲基、乙基、异丙基、丙基等,例如RP(OH)(O)-O-5'-、5'-烯基膦酸酯(即乙烯基、经取代的乙烯基)、(OH)$_2$(O)P-5'-

CH_2-)、5'-烷基醚膦酸酯(R＝烷基醚＝甲氧基甲基(MeOCH2-)、乙氧基甲基等,例如RP(OH)(O)-O-5'-)。

[0477] 靶基因

[0478] 在没有限制的情况下,siRNA的靶基因包括但不限于促进不需要的细胞增殖的基因、生长因子基因、生长因子受体基因、表达激酶的基因、接附蛋白基因、编码G蛋白超家族分子的基因、编码转录因子的基因、介导血管生成的基因、病毒基因、病毒复制所需的基因、介导病毒功能的细胞基因、细菌病原体的基因、变形虫病原体的基因、寄生病原体的基因、真菌病原体的基因、介导不需要的免疫反应的基因、介导疼痛处理的基因、介导神经疾病的基因、在以杂合性缺失为特征的细胞中发现的等位基因或多形性基因的一个等位基因。

[0479] siRNA的具体示例性靶基因包括但不限于PCSK-9、ApoC3、AT3、AGT、ALAS1、TMPR、HAO1、AGT、C5、CCR-5、PDGFβ基因;Erb-B基因、Src基因;CRK基因;GRB2基因;RAS基因;MEKK基因;JNK基因;RAF基因;Erk1/2基因;PCNA(p21)基因;MYB基因;c-MYC基因;JUN基因;FOS基因;BCL-2基因;细胞周期素D基因;VEGF基因;EGFR基因;细胞周期素A基因;细胞周期素E基因;WNT-1基因;β-联蛋白基因;c-MET基因;PKC基因;NFKB基因;STAT3基因;存活素基因;Her2/Neu基因;拓朴异构酶I基因;拓朴异构酶IIα基因;p73基因;p21(WAF1/CIP1)基因、p27(KIP1)基因;PPM1D基因;小窝蛋白I基因;MIB I基因;MTAI基因;M68基因;肿瘤抑制基因;p53基因;DN-p63基因;pRb肿瘤抑制基因;APC1肿瘤抑制基因;BRCA1肿瘤抑制基因;PTEN肿瘤抑制基因;MLL融合基因,例如MLL-AF9、BCR/ABL融合基因;TEL/AML1融合基因;EWS/FLI1融合基因;TLS/FUS1融合基因;PAX3/FKHR融合基因;AML1/ETO融合基因;αv-整合素基因;Flt-1受体基因;微管蛋白基因;人类乳头状瘤病毒基因、人类乳头状瘤病毒复制所需的基因、人类免疫缺陷病毒基因、人类免疫缺陷病毒复制所需的基因、甲型肝炎病毒基因、甲型肝炎病毒复制所需的基因、乙型肝炎病毒基因、乙型肝炎病毒复制所需的基因、丙型肝炎病毒基因、丙型肝炎病毒复制所需的基因、丁型肝炎病毒基因、丁型肝炎病毒复制所需的基因、戊型肝炎病毒基因、戊型肝炎病毒复制所需的基因、己型肝炎病毒基因、己型肝炎病毒复制所需的基因、庚型肝炎病毒基因、庚型肝炎病毒复制所需的基因、重型肝炎(Hepatitis H)病毒基因、重型肝炎病毒复制所需的基因、呼吸道合胞病毒基因、呼吸道合胞病毒复制所需的基因、单纯疱疹病毒基因、单纯疱疹病毒复制所需的基因、疱疹巨细胞病毒基因、疱疹巨细胞病毒复制所需的基因、疱疹埃-巴二氏病毒(Epstein Barr Virus)基因、疱疹埃-巴二氏病毒复制所需的基因、卡波西肉瘤(Kaposi's Sarcoma)相关疱疹病毒基因、卡波西肉瘤相关疱疹病毒复制所需的基因、JC病毒基因、JC病毒复制所需的人类基因、黏液病毒基因、黏液病毒基因复制所需的基因、鼻病毒基因、鼻病毒复制所需的基因、冠状病毒基因、冠状病毒复制所需的基因、西尼罗河病毒基因、西尼罗河病毒复制所需的基因、圣路易脑炎(St.Louis Encephalitis)基因、圣路易脑炎复制所需的基因、森林脑炎病毒基因、森林脑炎病毒复制所需的基因、墨莱溪谷脑炎(Murray Valley encephalitis)病毒基因、墨莱溪谷脑炎病毒复制所需的基因、登革热病毒基因、登革热病毒基因复制所需的基因、猿猴病毒40基因、猿猴病毒40复制所需的基因、人类T细胞嗜淋巴细胞病毒基因、人类T细胞嗜淋巴细胞病毒复制所需的基因、莫罗尼小鼠(Moloney-Murine)白血病病毒基因、莫罗尼小鼠白血病病毒复制所需的基因、脑心肌炎病毒基因、脑心肌炎病毒复制所需的基因、麻疹病毒基因、麻疹病毒复制所需的基因、水痘带状疱疹病毒基因、水痘带状疱疹病毒复制所需的基

因、腺病毒基因、腺病毒复制所需的基因、黄热病病毒基因、黄热病病毒复制所需的基因、脊髓灰质炎病毒基因、脊髓灰质炎病毒复制所需的基因、痘病毒基因、痘病毒复制所需的基因、疟原虫基因、疟原虫基因复制所需的基因、溃疡分枝杆菌基因、溃疡分枝杆菌复制所需的基因、结核分枝杆菌基因、结核分枝杆菌复制所需的基因、麻风分支杆菌基因、麻风分支杆菌复制所需的基因、金黄色葡萄球菌基因、金黄色葡萄球菌复制所需的基因、肺炎链球菌基因、肺炎链球菌复制所需的基因、化脓性链球菌基因、化脓性链球菌复制所需的基因、肺炎衣原体基因、肺炎衣原体复制所需的基因、肺炎支原体基因、肺炎支原体复制所需的基因、整合素基因、选择素基因、补体系统基因、趋化因子基因、趋化因子受体基因、GCSF基因、Gro1基因、Gro2基因、Gro3基因、PF4基因、MIG基因、前血小板碱性蛋白基因、MIP-1I基因、MIP-1J基因、RANTES基因、MCP-1基因、MCP-2基因、MCP-3基因、CMBKR1基因、CMBKR2基因、CMBKR3基因、CMBKR5v、AIF-1基因、I-309基因、离子通道的组分的基因、神经传递质受体基因、神经传递质配体基因、类淀粉蛋白家族基因、早老素基因、HD基因、DRPLA基因、SCA1基因、SCA2基因、MJD1基因、CACNL1A4基因、SCA7基因、SCA8基因、杂合性缺失(LOH)细胞中发现的等位基因、多形性基因的一个等位基因、及其组合。

[0480] 杂合性缺失(LOH)可导致LOH区域中序列(例如基因)的半合子性。这可导致正常细胞与病态细胞(例如癌细胞)之间的显著基因差异,并且提供正常细胞与病态细胞(例如癌细胞)之间的有用差异。此差异可以是因为基因或其他序列在二倍体细胞中是杂合的,但在具有LOH的细胞中为半合子的而产生。LOH区通常包括基因,其缺失引起不需要的增殖,例如肿瘤抑制基因;及其他序列,包括例如其他基因,在一些情况下为正常功能(例如生长)所必需的基因。本发明的方法部分依赖于用本发明的组合物对必需基因的一个等位基因的特异性调节。

[0481] 在某些实施例中,本发明提供调节微RNA的本发明的化合物。

[0482] 靶向CNS

[0483] 在一些实施例中,本发明提供一种化合物,其靶向早发性家族性阿尔茨海默病的APP、脊髓小脑共济失调2及ALS的ATXN2、以及肌萎缩侧索硬化症及额颞叶型痴呆的C9orf72。

[0484] 在一些实施例中,本发明提供一种化合物,其靶向ALS的TARDBP、额颞叶型痴呆的MAPT(Tau)及亨廷顿病的HTT。

[0485] 在一些实施例中,本发明提供一种化合物,其靶向帕金森病的SNCA、ALS的FUS,脊髓小脑共济失调3的ATXN3,SCA1的ATXN1,SCA7及SCA8的基因,DRPLA的ATN1,XLMR的MeCP2,朊病毒疾病、隐性CNS障碍:拉福拉病的PRNP、DM1(CNS及骨骼肌)的DMPK,及hATTR(CNS、眼及全身)的TTR。

[0486] 脊髓小脑共济失调是遗传性脑功能障碍。显性遗传形式的脊髓小脑共济失调(诸如SCA1-8)是没有疾病改善疗法的破坏性障碍。示例性靶标包括SCA2、SCA3及SCA1。

[0487] 靶向SCA2的ATXN2

[0488] 脊髓小脑共济失调2(SCA2),一种进行性共济失调,是第二常见的SCA。与此靶标相关的另一种疾病为肌萎缩侧索硬化症(ALS)。这些疾病是使人衰弱且最终致死的疾病,没有疾病改善疗法。SCA的患病率为每100,000人中有2-6人;ATXN2造成全球15%的SCA人口且在一些国家中SCA人口多得多,尤其是古巴(每100,000人中有40人)。经由人类分子遗传学靶

向ATXN2可以是优异的,例如,在家族性及偶发性SCA及ALS中,在诸如脊髓、脑干或小脑的组织中发现ATXN2中的编码CAG重复扩增。此靶向的机制可以是因为ATXN2的常染色体显性编码CAG扩增导致有毒、错误折叠的蛋白质的表达以及浦金埃氏细胞(Purkinje cell)及神经元死亡。已通过ATXN2 mRNA的70％敲低(KD)显示功效;且已证实mATXN2小鼠KD POC。关于安全性,已报告mATXN2基因剔除(KO)小鼠是健康的。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF CAG mRNA及肽重复蛋白

[0489] 靶向SCA3的ATXN3

[0490] 脊髓小脑共济失调3(SCA3),一种进行性共济失调,是全球最常见的SCA。此疾病是使人衰弱且最终致死的疾病,没有疾病改善疗法。其为SCA的最常见病因,并且SCA的患病率为每100,000人中有2-6人;ATXN3在美国造成21％的SCA人口且在欧洲(尤其在葡萄牙)多得多。经由人类分子遗传学靶向ATXN3可以是优异的,例如,在家族性及偶发性SCA中,在诸如脊髓、脑干或小脑的组织中发现ATXN3中的编码CAG重复扩增。此靶向的机制可以是因为ATXN3的常染色体显性编码CAG扩增导致有毒、错误折叠的蛋白质的表达、浦金埃氏细胞及神经元死亡。已通过ATXN3 mRNA的70％KD显示功效;且已证实mATXN3 KD小鼠POC。关于安全性,已报告mATXN3 KO小鼠是健康的。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF CAG mRNA及肽重复蛋白。

[0491] 靶向SCA1的ATXN1

[0492] 脊髓小脑共济失调1(SCA1),一种进行性共济失调,是1993年发现的第一个SCA基因。此疾病是使人衰弱且最终致死的疾病,没有疾病改善疗法。SCA的患病率为每100,000人中有2-6人;ATXN1在美国及全球造成6％的SCA人口,并且在一些国家多得多(在日本为25％),尤其在波兰(64％)及西伯利亚(100％)。经由人类分子遗传学靶向ATXN1可以是优异的,例如,在家族性及偶发性SCA中,在诸如脊髓、脑干或小脑的组织中发现ATXN1中的编码CAG重复扩增。此靶向的机制可以是因为ATXN1的常染色体显性编码CAG扩增导致有毒、错误折叠的蛋白质的表达、浦金埃氏细胞及神经元死亡。已通过ATXN1 mRNA的70％KD显示功效;且已证实mATXN1小鼠POC。关于安全性,已报告mATXN1 KO小鼠是健康的。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF CAG mRNA及肽重复蛋白。

[0493] 靶向SCA7的ATXN7

[0494] 脊髓小脑共济失调7(SCA7)造成进行性共济失调及视网膜变性。此疾病是使人衰弱且最终致死的视网膜及小脑障碍,没有疾病改善疗法。SCA的患病率为每100,000人中有2-6人;ATXN7造成全球5％的SCA人口,并且在一些国家(尤其在南非)多得多。经由人类分子遗传学靶向ATXN7可以是优异的,例如,在家族性及偶发性SCA中,在诸如脊髓、脑干、小脑或视网膜的组织中发现ATXN7中的编码CAG重复扩增。此靶向的机制可以是因为ATXN1的常染色体显性编码CAG扩增导致有毒、错误折叠的蛋白质的表达,从而引发视锥及视杆变性、浦金埃氏细胞及神经元致死性。经由鞘内(IT)及玻璃体内(IVT)施用,已通过ATXN1 mRNA的70％KD显示功效。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF CAG mRNA及肽重复蛋白。

[0495] 靶向SCA8的ATXN8

[0496] 脊髓小脑共济失调8(SCA8),一种进行性神经退化性共济失调,是由ATXN8中的CTG

重复扩增引起。此疾病是使人衰弱且最终致死的疾病,没有疾病改善疗法。患病率:SCA是每100,000人中有2-6人;ATXN8造成全球3%的SCA人口,并且在一些国家(尤其在芬兰)多得多。经由人类分子遗传学靶向ATXN8可以是优异的,例如,在家族性及偶发性SCA中,在诸如脊髓、脑干或小脑的组织中发现ATXN8中的编码CTG重复扩增。此靶向的机制可以是因为ATXN8的常染色体显性编码CTG扩增导致有毒、错误折叠的蛋白质的表达,从而引发浦金埃氏细胞及神经元致死性。已通过ATXN8mRNA的70%KD显示功效。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF CTG mRNA及肽重复蛋白。

[0497] 靶向SCA6的CACNA1A

[0498] 脊髓小脑共济失调6(SCA6)是进行性共济失调。此疾病是使人衰弱且最终致死的疾病,没有疾病改善疗法。SCA的患病率为每100,000人中有2-6人;且CACNA1A造成全球15%的SCA人口。经由人类分子遗传学靶向CACNA1A可以是优异的,例如,在家族性及偶发性SCA中,在诸如脊髓、脑干或小脑的组织中发现CACNA1A中的编码CAG重复扩增。此靶向的机制可以是因为CACNA1A的常染色体显性编码CAG扩增导致有毒、错误折叠的蛋白质的表达以及浦金埃氏细胞及神经元死亡。已通过CACNA1A CAG扩增的70%KD显示功效。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF CAG mRNA及肽重复蛋白。

[0499] 遗传性聚谷氨酰胺障碍的示例性靶标包括亨廷顿病(HD)。

[0500] 靶向亨廷顿病的HTT

[0501] 亨廷顿突变导致HD,一种进行性CNS退化疾病。此疾病是使人衰弱且最终致死的疾病,没有疾病改善疗法。全球HD的患病率为每100,000人中有5-10人,并且在某些国家(尤其在委内瑞拉)更加常见。经由人类分子遗传学靶向HTT可以是优异的,例如,在家族性及偶发性HD中,在诸如纹状体或皮质的组织中发现的HTT中的编码CAG重复扩增。此靶向的机制可以是因为HTT的常染色体显性编码CAG扩增导致有毒、错误折叠的蛋白质的表达及神经元死亡。已通过仅HTT CAG扩增的70%KD显示功效;且已证实小鼠POC。关于安全性,小鼠HTT的KO可以是致死性的;已证实人类的KD。可能的诊断包括家族病史;基因测试;早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及肽重复蛋白。

[0502] 靶向DRPLA的ATN1

[0503] Atrophin 1突变导致齿状核红核苍白球路易体萎缩症(DRPLA),其是与HD类似的进行性脊髓小脑障碍。此疾病是使人衰弱且最终致死的疾病,没有疾病改善疗法。在日本,DRPLA的患病率为每1,000,000人中有2-7人。经由人类分子遗传学靶向ATN1可以是优异的,例如,在家族性及偶发性SCA中,在诸如脊髓、脑干、小脑或皮质的组织中发现ATN1中的编码CAG重复扩增。此靶向的机制可以是因为ATN1的常染色体显性编码CAG扩增导致有毒、错误折叠的蛋白质的表达及神经元死亡。已通过ATN1的70%KD显示功效。关于安全性,已报告ATN1 KO小鼠是健康的。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF CAG mRNA及肽重复蛋白。

[0504] 靶向脊髓延髓肌肉萎缩的AR

[0505] 雄激素受体突变导致脊髓和延髓肌肉萎缩(SBMA,肯尼迪病(Kennedy disease)),一种进行性肌肉萎缩疾病,及其他疾病。此疾病是使人衰弱且最终致死的疾病,没有疾病改善疗法。SBMA的患病率为每100,000个男性中有2例;女性有轻微表型。经由人类分子遗传学

靶向AR可以是优异的,例如,在家族性SBMA中,在诸如脊髓或脑干的组织中发现的AR中的编码CAG重复扩增。此靶向的机制可以是因为AR的X连锁的编码CAG扩增导致毒性功能获得性(gain-or-function)及运动神经元致死性。已通过AR的70％KD显示功效。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF CAG mRNA及肽重复蛋白。

[0506] 靶向弗里德里希共济失调(Friedrich Ataxia)的FXN

[0507] FXN的隐性功能丧失GAA扩增导致弗里德里希共济失调(FA),一种进行性退化性共济失调。此疾病是使人衰弱且最终致死的疾病,没有疾病改善疗法。FA的患病率为全球每100,000人中有2人。经由人类分子遗传学靶向FXN可以是优异的,例如,在家族性FA中,在诸如脊髓、小脑或可能视网膜及心脏的组织中发现FXN中的内含子GAA重复扩增。此靶向的机制可以是因为FXN的常染色体隐性非编码FAA扩增导致FXN(重要的粒线体蛋白)的死亡表达。已通过FXN内含子GAS扩增的70％KD显示功效。关于安全性,内含子GAA的KD在小鼠中是安全且有效的。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及肽重复蛋白。

[0508] 靶向FXTAS的FMR1

[0509] 脆性X相关性震颤/共济失调综合征(FXTAS),一种成人进行性共济失调及认知丧失障碍,由FMR1过表达引起。此疾病是使人衰弱的疾病,没有疾病改善疗法。FMR1预突变的患病率为500个男性中有1个。经由人类分子遗传学靶向FMR1可以是优异的,例如在FXTAS中,在诸如脊髓、小脑或皮质的组织中发现FMR1中的编码CCG重复扩增预突变。此靶向的机制可以是因为FMR1的X连锁的编码CCG扩增导致毒性mRNA。已通过毒性mRNA的70％KD显示功效。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及肽重复蛋白。

[0510] 靶向脆性X综合征的FMR1的上游

[0511] 脆性X综合征(FRAXA),一种进行性智力迟钝障碍,可通过靶向FMR1的上游mRNA来治疗。此疾病是使人衰弱的疾病,没有疾病改善疗法。FRAXA的患病率为每4,000个男性中有1个及每8,000个女性中有1个。经由人类分子遗传学靶向FMR1可以是优异的,例如,在FRAXA中,在诸如CNS的组织中发现FMR1中的编码CCG重复扩增。此靶向的机制可以是因为FMR1的X连锁的编码CCG扩增导致LOF;且正常FMR1用于自细胞核转运特异性mRNA。已通过毒性mRNA的70％KD显示功效。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及肽重复蛋白。

[0512] 显性遗传性肌萎缩侧索硬化症为破坏性障碍,没有疾病改善疗法。示例性靶标包括C9orf72、ATXN2(也造成SCA2)及MAPT。

[0513] 靶向ALS的C9orf72

[0514] C9orf72为肌萎缩侧索硬化症(ALS)及额颞叶型痴呆(FTD)的最常见病因。这些疾病是运动神经元的致死性障碍,没有疾病改善疗法。ALS的患病率为每100,000人中有2-5人(10％为家族性);C9orf72造成美国及欧洲39％的家族性ALS及7％的偶发性ALS。经由人类分子遗传学靶向C9orf72可以是优异的,例如,在家族性及偶发性ALS中,在诸如上部及下部运动神经元(对于ALS);或皮质(对于FTD)的组织中发现六核苷酸扩增。此靶向的机制可以是因为常染色体显性六核苷酸扩增导致毒性二肽重复蛋白的重复相关的非AUG依赖性转译

及神经元致死性。已通过C9orf72的70％KD显示功效。关于安全性,C9orf72的杂合LOF突变似乎在人类及小鼠中为安全的。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF六核苷酸重复mRNA及二肽重复蛋白。

[0515] 靶向ALS的TARDBP

[0516] TARDBP突变导致ALS及额颞叶型痴呆(FTD)。这些疾病是运动神经元的致死性障碍,没有疾病改善疗法。ALS的患病率为每100,000人中有2-5人(10％为家族性);TARDBP造成5％的家族性ALS及1.5％的偶发性ALS。经由人类分子遗传学靶向TARDBP可以是优异的,例如,在家族性及偶发性ALS中,在诸如上部及下部运动神经元(对于ALS);或皮质(对于FTD)的组织中发现突变。此靶向的机制可以是因为常染色体显性TRDBP突变导致毒性TRDBP蛋白及神经元致死性。已通过TARDBP突变等位基因的70％KD显示功效。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF蛋白。

[0517] 靶向ALS的FUS

[0518] FUS突变导致ALS及FTD。这些疾病为运动神经元的致死性障碍,没有疾病改善疗法。ALS的患病率为每100,000人中有2-5人(10％为家族性);FUS造成5％的家族性ALS;FUS内含物常见于偶发性ALS。经由人类分子遗传学靶向FUS可以是优异的,例如,在家族性ALS中,在诸如对于ALS的上部及下部运动神经元的组织中发现突变。此靶向的机制可以是因为常染色体显性FUS突变导致异常蛋白质折叠及神经元致死性。已通过FUS突变等位基因的70％KD显示功效。关于安全性,KO小鼠挣扎但存活且具有ADHD表型。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF蛋白。

[0519] 靶向ALS的SOD1

[0520] SOD1的显性及隐性突变导致ALS。此疾病为运动神经元的致死性障碍,没有疾病改善疗法。ALS的患病率为每100,000人中有2-5人(10％为家族性);SOD1造成5％-20％的家族性ALS。经由人类分子遗传学靶向SOD1可以是优异的,例如,在诸如对于ALS的上部及下部运动神经元的组织中,许多SOD1突变与家族中的AD及AR ALS相关。此靶向的功效可能需要突变特异性KD。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。生物标志物可以是突变特异性的。

[0521] 显性遗传性额颞叶型痴呆及进行性核上麻痹。靶标包括MAPT(因为其对于AD可以是重要的)或C9orf72。

[0522] 靶向FTD-17及PSP的微管相关蛋白Tau

[0523] 家族性额颞叶型痴呆17(FTD-17),一种排列于染色体17的家族性FTD形式,及家族性进行性核上麻痹可能由MAPT突变引起,其也可引起罕见形式的进行性核上麻痹、皮质基底核退化症、伴有呼吸衰竭的Tau蛋白病、伴有癫痫的痴呆。这些疾病为致死性神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。FTD的患病率为每100,000人中有15-22人;荷兰的FTD-17患病率为1,000,000人口中有1人。经由人类分子遗传学靶向MAPT可以是优异的,例如,在家族性及偶发性FTD中,在诸如额叶或颞叶皮质的组织中发现MAPT的GOF点突变及剪接位点突变。此靶向的机制可以是因为MAPT的常染色体显性GOF突变导致毒性Tau肽及神经元死亡。已通过MAPT的70％KD显示功效。关于安全性,已报告MAPT KO小鼠是健康的。可能的诊断包括家族病史;基因测试;早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF Tau mRNA及蛋白质。

[0524] 靶向FTD及ALS的死骨片(Sequestosome)1

[0525] 偶发性FTD/ALS与显性SQSTM1突变相关。此疾病为致死性神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。这是一种非常罕见的疾病。在散发病例中,在诸如额叶及颞叶皮质、或小脑及脊髓的组织中,经由人类分子基因关联靶向死骨片1是合理的。可能的诊断包括基因测试;早期症状。

[0526] 显性遗传性帕金森病为破坏性障碍,没有疾病改善疗法。靶标包括SNCA。

[0527] 靶向帕金森病的SNCA

[0528] α突触核蛋白突变导致家族性帕金森病(PD)及路易体性痴呆(Lewy body dementia)。这些疾病为致死性神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。PD的患病率为全球4百万;1/3的PD为家族性的;1%的fPD由SNCA引起。经由人类分子遗传学靶向SNCA可以是优异的,例如,在诸如延髓;或中脑的黑质的组织中,SNCA点突变及重复引起家族性PD。此靶向的机制可以是因为异常SNCA蛋白的过表达或表达导致毒性肽及神经元死亡。已通过SNCA的70%KD显示功效。关于安全性,SNCA KO小鼠是健康的。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF SNCA mRNA及蛋白质。

[0529] 靶向帕金森病的LRRK2

[0530] 富含亮氨酸的重复激酶2突变导致家族性帕金森病。此疾病为致死性神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。PD的患病率为全球4百万;1/3的PD为家族性的;3%-7%的fPD由LRRK2引起。经由人类分子遗传学靶向LRRK2可以是优异的,例如,在诸如延髓;或中脑的黑质的组织中,LRRK2点突变引起家族性PD。可能的诊断包括家族病史;基因测试;早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及蛋白质。

[0531] 靶向脊髓性肌萎缩V的GARS

[0532] 常染色体显性甘氨酰-tRNA合成酶突变导致脊髓性肌萎缩V(SMAV)或远程遗传性运动神经病Va。这些疾病为神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。这些为非常罕见的疾病。经由人类分子遗传学靶向GARs可以是良好的,例如,在诸如脊髓的组织中,GARS点突变引起家族性SMA。可能的诊断包括家族病史;基因测试;早期症状。

[0533] 靶向脊髓性肌萎缩的Seipin

[0534] 常染色体显性Seipin突变导致脊髓性肌萎缩(SMA)或远程遗传性运动神经病。这些疾病为神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。这些为非常罕见的疾病。经由人类分子遗传学靶向Seipin可以是良好的,例如,在诸如脊髓的组织中,Seipin点突变引起家族性SMA。此靶向的机制可能为GOF及毒性肽。已通过50%KD显示功效。关于安全性,隐性LOF突变导致伴有或不伴有脂质营养不良的进行性脑病。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。

[0535] 显性遗传性阿尔茨海默病为破坏性障碍,没有疾病改善疗法。由于在家族性疾病中的中心机制作用及在常见AD中的可能作用,靶标包括APP。

[0536] 靶向阿尔茨海默病的APP

[0537] 类淀粉前体蛋白质突变导致早发性家族性阿尔茨海默病(EOFAD);唐氏综合征中的AD;或AD。这些疾病为致死性神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。EOFAD-APP的患病率为1%AD;21三体症的患病率为1%AD;且在美国,AD的患病率为约2.5-5百万。经由人类分子遗传学靶向APP可以是优异的,例如,在诸如大脑皮质或海马体的组织中,APP重复及点突变导致EOFAD。此靶向的机制可以是因为APP过表达或毒性代谢物的表达引起进行性神经元死

亡。已通过APP的70％KD显示功效。关于安全性,已报告KD小鼠是健康的,有一些行为异常;已报告KD小鼠是健康的,有一些空间记忆影响。可能的诊断包括家族病史;基因测试;早期症状;或MRI。可以使用的生物标志物包括例如CSF APP mRNA及肽。

[0538] 靶向阿尔茨海默病的PSEN1

[0539] 早老素1突变导致早发性家族性阿尔茨海默病(EOFAD);或AD。这些疾病是致死性神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。经由人类分子遗传学靶向PSEN1可以是优异的,例如,在诸如大脑皮质或海马体的组织中,PSEN1点突变导致EOFAD。此靶向的机制可以是因为PSEN1的常染色体显性突变引起异常APP代谢且毒性肽引起进行性神经元死亡。已通过APP KD可免除对PSEN1特异性疗法的需求来显示功效。可能的诊断包括家族病史;基因测试;早期症状;或MRI。可以使用的生物标志物包括例如CSF PSEN1及APP肽。

[0540] 靶向阿尔茨海默病的PSEN2

[0541] 早老素2突变导致早发性家族性阿尔茨海默病(EOFAD);或AD。这些疾病是致死性神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。经由人类分子遗传学靶向PSEN2可以是优异的,例如,在诸如大脑皮质或海马体的组织中,PSEN2点突变导致EOFAD。此靶向的机制可以是因为PSEN2的常染色体显性突变引起异常APP代谢且毒性肽引起进行性神经元死亡。可能的诊断包括家族病史;基因测试;早期症状;或MRI。可以使用的生物标志物包括例如CSF PSEN2及APP肽。

[0542] 靶向阿尔茨海默病的Apo E

[0543] 载脂蛋白E4与老年人偶发性AD相关联。此疾病为致死性神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。在美国,AD的患病率为2.5-5百万。靶向Apo E可以是有效的,因为支持ApoE4与AD之间关联的基因组证据在许多群体中是优异的。靶组织可以是大脑皮质。尽管在许多群体中存在强烈关联,但尚不清楚Apo E4是否促成AD的发病机制。迄今为止,数据表明Apo E4纯合子指示老年人AD风险增加,但即使在老年人中仍不足以引起AD。关于安全性,CNS中Apo E的KD可以是安全的,因为Apo E中的人类LOF突变与明显的神经缺陷无关,尽管全身暴露可能引起III型高脂蛋白血症。可能的诊断包括AD的临床诊断;排除EOFAD突变;Apo E4基因型的基因测试。可以使用的生物标志物包括例如CSF APP、Tau mRNA及肽。

[0544] CNS基因重复障碍。一致的KD减半可改善这些障碍。靶标包括MeCP2。

[0545] 靶向X连锁的智力迟钝的MeCP2

[0546] 甲基CpG结合蛋白2基因重复导致X连锁的智力迟钝(XLMR)。此疾病为致死性认知障碍,没有疾病改善疗法。1％-15％的X连锁的MR由MeCP2重复引起;2％-3％的人口患有MR。经由人类分子遗传学靶向MeCP2可以是优异的,例如,在诸如大脑皮质的组织中,MeCP2重复导致XLMR。此靶向的机制可以是因为MeCP2过表达导致其他基因的调节异常及神经退化。已通过MeCP2的50％KD显示功效;且小鼠模型中的ASO KD逆转表型。关于安全性,MeCP2 LOF突变可能引起雷特氏综合征(Rett syndrome)。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF MeCP2 mRNA及肽。

[0547] 显性遗传性脑类淀粉蛋白血管病为破坏性障碍,没有疾病改善疗法。靶标包括TTR。

[0548] 靶向hATTR CAA的TTR

[0549] 此靶向可以是CNS siRNA的低风险引入。脑类淀粉蛋白血管病(CAA)及脑膜类淀粉

蛋白为致死性障碍,没有疾病改善疗法。经由人类遗传学及药理学靶向TTR可以是优异的。靶组织可以是CNS血管系统或CNS。此靶向的机制可以是因为突变蛋白在血管外膜中积聚,引起CNS出血。已通过TTR的70％KD显示功效。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及蛋白质。

[0550] 靶向CAA的ITM2B

[0551] 整合膜蛋白2B突变导致脑类淀粉蛋白血管病(CAA)、英国型或家族性英国痴呆(FBD)。特异性突变也可导致显性视网膜变性。此疾病为致死性障碍,没有疾病改善疗法。此为一种罕见的疾病。经由人类分子遗传学靶向ITM2B可以是优异的。靶组织可以是CNS血管系统或CNS。此靶向的机制可能涉及GOF突变。已通过ITM2B突变等位基因的70％KD显示功效。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及可能的蛋白质。

[0552] 靶向CAA的CST3

[0553] 血清胱抑素C突变导致冰岛型家族性脑类淀粉蛋白血管病。此疾病为致死性障碍,没有疾病改善疗法。除冰岛及丹麦外,此为一种罕见的疾病。经由人类遗传学靶向CST3可以是优异的。靶组织可以是CNS血管系统。此靶向的机制可以是因为突变蛋白在血管外膜中积聚,引起CNS出血。已通过突变等位基因的可能70％KD显示功效。关于安全性,CST3 KO小鼠可能有患关节炎的风险。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及可能的蛋白质。

[0554] 靶向痉挛性截瘫的SPAST

[0555] SPASTIN突变导致伴有认知丧失的痉挛性截瘫(SP)4。此疾病是下部运动神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。SP的患病率为每100,000人口中有5人;SP4是45％的显性SP。经由人类分子遗传学靶向SPAST可以是优异的,例如,在诸如脊髓;或CNS的组织中,SPAST三核苷酸突变导致家族性SP。此靶向的机制可以是因为无义及可能的显性负突变引起异常微管代谢及神经退化。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF SPAST mRNA及可能的蛋白质。

[0556] 靶向痉挛性截瘫的KIF5A

[0557] 驱动蛋白家族成员5A突变导致伴有周围神经病变及其他障碍的痉挛性截瘫(SP)10。此疾病是下部运动神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。SP的患病率为每100,000人中有5人;SP10为每1,000,000人中有1人。经由人类分子遗传学靶向KIF5A可以是优异的,例如,KIF5A氨基端错义突变导致SP10;并且KIF5A在CNS中表达且编码微管运动蛋白。靶组织可以是脊髓。此靶向的机制可以是因为常染色体显性错义突变导致可能影响与运动神经结合的微管的SP10。功效可通过突变等位基因的可能KD提供。关于安全性,KIF5A移码突变导致新生儿难治性肌阵挛,并且剪接位点突变可能通过LOF机制与家族性ALS相关联。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及可能的蛋白质。

[0558] 靶向痉挛性截瘫的ATL1

[0559] Atlastin突变导致痉挛性截瘫3A及感觉神经病1D、遗传性感觉神经病(HSN)。此疾病为下部运动神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。SP的患病率为每100,000人中有5人;SP3A为一种罕见的显性形式。经由人类分子遗传学靶向ATL1可以是优异的,例如,ATL1点突

变导致家族性SP。靶组织可以是脊髓。此靶向的机制可以是因为显性负ATL1蛋白的常染色体显性表达导致SP3A;然而,LOF突变导致感觉神经病1D。已通过特异性ATL1等位基因的70％KD显示功效。关于安全性,ATL1杂合LOF突变导致HSN1D。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF ATL1 mRNA及蛋白质。

[0560] 靶向痉挛性截瘫的NIPA1

[0561] LOF NIPA1突变导致伴有癫痫症及癫痫发作的痉挛性截瘫6。此疾病是下部运动神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。SP的患病率为每100,000人中有5人;SP6为一种罕见的显性形式。经由人类分子遗传学靶向NIPA1可以是优异的,例如,NIPA1点突变导致家族性SP。靶组织可以是脊髓;或CNS。此靶向的机制可以是因为缺陷膜蛋白的常染色体显性表达导致SP3A;及可能地LOF。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及可能的蛋白质。

[0562] 显性遗传性肌紧张性营养障碍为需要CNS及全身性疗法的CNS、骨骼肌及心肌障碍。靶标包括DM1的MPK。

[0563] 靶向肌紧张性营养障碍1的DMPK

[0564] 靶向肌紧张性营养障碍蛋白激酶的有效疗法需要CNS及全身性疗法。肌紧张性营养障碍1(DM1)为肌肉及CNS的退化性障碍。其为致死性障碍,没有疾病改善疗法。DM1的患病率为全球每8,000人中有1人。经由人类分子遗传学靶向DMPK可以是优异的,例如,DMPK CTG重复扩增导致家族性DM1。靶组织可以是骨骼肌、心肌或CNS。此靶向的机制可以是因为常染色体显性非编码CTG重复导致异常RNA加工及显性负效应;极端扩增的预期导致早发性疾病。已通过70％的DMPK显示功效;且已在小鼠中证实ASO功效。已在KO及ASO KD小鼠中证明安全性。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如血液及CSF mRNA及蛋白质。

[0565] 靶向肌紧张性营养障碍2的ZNF9

[0566] 锌指蛋白9突变导致肌紧张性营养障碍2(DM2),一种骨骼肌的退化性障碍。此为严重障碍,没有疾病改善疗法。DM2的患病率为全球每8,000人中有1人;其是成人中最常见的肌营养不良症。经由人类分子遗传学靶向ZNF9可以是优异的,例如,内含子1中的ZNF9 CTTG重复扩增导致家族性DM2。靶组织可以是骨骼肌或心肌。此靶向的机制可以是因为内含子1中的常染色体显性CTTG重复扩增导致异常RNA代谢及显性负效应。已通过70％的ZNF9显示功效。已证实小鼠中的安全KD。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如血液mRNA及蛋白质。

[0567] 显性遗传性朊病毒疾病为遗传性、偶发性及传染性PRNP障碍。靶标包括PRNP。

[0568] 靶向肌紧张性朊病毒疾病的PRNP

[0569] 肌紧张性朊病毒疾病为显性遗传性朊病毒疾病,包括PRNP相关的脑类淀粉蛋白血管病、吉斯氏病(Gerstmann-Straussler Disease,GSD)、库贾氏病(Creutzfeldt-Jakob Disease,CJD)、致死性家族性失眠(FFI)、类亨廷顿病1(HDL1)及库鲁易感性(Kuru susceptibility)。这些疾病为致死性神经退化性障碍,没有疾病改善疗法。此类疾病的患病率为每1,000,000人中有1人。经由人类分子遗传学靶向PRNP可以是优异的,例如,PRNP突变导致家族性及偶发性朊病毒疾病。靶组织可以是CNS。此靶向的机制可以是因为常染色体显性蛋白中折叠(mid-folding)导致神经毒性。已通过70％的PRNP KD显示功效;并且PRNP

多态性似乎对库鲁病有保护作用。关于安全性,已报告PRNP KO小鼠是健康的。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及蛋白质。

[0570] 靶向拉福拉的肌痉挛癫痫症的糖原合成酶

[0571] Laforin(EPM2A)基因突变导致AR肌痉挛癫痫症,一种遗传性进行性癫痫发作障碍。此疾病为癫痫发作及认知减退的致死性障碍,没有疾病改善疗法。此疾病的患病率为每1,000,000人中有4人。经由人类分子遗传学靶向糖原合成酶可以是优异的,例如,突变导致拉福拉的AR家族性肌痉挛癫痫症。靶组织可以是CNS。此靶向的机制可以是因为Laforin的常染色体隐性功能障碍导致糖原的错误折叠及癫痫发作的病灶。已通过糖原合成酶GYS1的70%KD显示功效。关于安全性,GYS1缺乏导致骨骼肌及心肌糖原缺乏;存活的GYS1小鼠具有肌肉缺陷。可能的诊断包括家族病史;基因测试;或早期症状。可以使用的生物标志物包括例如CSF mRNA及蛋白质。

[0572] 在一些实施例中,本发明提供了靶向疾病基因的化合物,这些疾病包括但不限于年龄相关性黄斑变性(AMD)(干性及湿性)、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、显性色素性视网膜炎4、富克氏营养不良(Fuch's dystrophy)、hATTR淀粉样变性、遗传性及偶发性青光眼以及斯特格特氏病(stargardt's disease)。

[0573] 在一些实施例中,本发明提供了靶向湿性(或渗出性)AMD的VEGF的化合物。

[0574] 在一些实施例中,本发明提供了靶向干性(或非渗出性)AMD的C3的化合物。

[0575] 在一些实施例中,本发明提供了靶向干性(或非渗出性)AMD的CFB的化合物。

[0576] 在一些实施例中,本发明提供了靶向青光眼的MYOC的化合物。

[0577] 在一些实施例中,本发明提供了靶向青光眼的ROCK2的化合物。

[0578] 在一些实施例中,本发明提供了靶向青光眼的ADRB2的化合物。

[0579] 在一些实施例中,本发明提供了靶向青光眼的CA2的化合物。

[0580] 在一些实施例中,本发明提供了靶向白内障的CRYGC的化合物。

[0581] 在一些实施例中,本发明提供了靶向干眼综合征的PPP3CB的化合物。

[0582] 配体

[0583] 在某些实施例中,本发明的化合物通过共价附接一个或多个缀合物基团来进一步修饰。一般而言,缀合物基团调节所附接的本发明的化合物的一个或多个特性,包括但不限于药效学、药代动力学、结合、吸收、细胞分布、细胞摄取、电荷及清除。缀合物基团通常用于化学技术,并且直接或经由任选的连接部分或连接基团连接至母体化合物,诸如寡聚化合物。缀合物基团的优选的清单包括但不限于嵌入剂、报导分子、聚胺、聚酰胺、聚乙二醇、硫醚、聚醚、胆固醇、硫代胆固醇、胆酸部分、叶酸、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、菲啶、蒽醌、金刚烷、吖啶、荧光素、若丹明、香豆素及染料。

[0584] 在一些实施例中,化合物进一步包含靶向配体,该靶向配体靶向介导递送至特定CNS组织的受体。这些靶向配体可以与亲脂性部分组合缀合,以实现特异性鞘内及全身递送。

[0585] 靶向介导递送至CNS组织的受体的示例性靶向配体为肽配体,诸如血管肽-2、脂蛋白受体相关蛋白(LRP)配体、bEnd.3细胞结合配体;运铁蛋白受体(TfR)配体(其可利用脑中的铁转运系统且负荷转运至脑实质中);甘露糖受体配体(其靶向嗅鞘细胞、胶细胞)、葡萄

糖转运蛋白及LDL受体配体。

[0586] 在一些实施例中,化合物进一步包含靶向配体,其靶向介导递送至特定眼组织的受体。这些靶向配体可以与亲脂性部分组合缀合,以实现特异性眼部递送(例如玻璃体内递送)及全身递送。靶向介导递送至眼组织的受体的示例性靶向配体为亲脂性配体,诸如全反式视黄醇(其靶向视黄酸受体);RGD肽(其靶向视网膜色素上皮细胞),诸如H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-Cys-OH(SEQ ID NO:1)或Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys;LDL受体配体;和基于碳水化合物的配体(其靶向后眼中的内皮细胞)。

[0587] 适用于本发明的优选的缀合物基团包括脂质部分,诸如胆固醇部分(Letsinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],1989,86,6553);胆酸(Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.[生物有机与药物化学快报],1994,4,1053);硫醚,例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.[纽约科学院年报],1992,660,306;Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Let.[生物有机化学与药物化学通讯],1993,3,2765);硫代胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.[核酸研究],1992,20,533);脂肪族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志],1991,10,111;Kabanov等人,FEBS Lett.[欧洲生化学会联盟通讯],1990,259,327;Svinarchuk等人,Biochimie[生物化学],1993,75,49);磷脂,例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙铵-1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油基-3-H-膦酸酯(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.[四面体通讯],1995,36,3651;Shea等人,Nucl.Acids Res.[核酸研究],1990,18,3777);聚胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,Nucleosides&Nucleotides[核苷与核苷酸],1995,14,969);金刚烷乙酸(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.[四面体通讯],1995,36,3651);棕榈基部分(Mishra等人,Biochim.Biophys.Acta[生物化学与生物物理学学报],1995,1264,229);或十八基胺或己基氨基-羰基-羟胆固醇部分(Crooke等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.[药理学与实验疗法杂志],1996,277,923)。

[0588] 一般而言,广泛多种实体(例如配体)可以与本文所述的寡聚化合物偶联。配体可以包括天然存在的分子,或重组或合成分子。示例性配体包括但不限于聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG,例如PEG-2K、PEG-5K、PEG-10K、PEG-12K、PEG-15K、PEG-20K、PEG-40K)、MPEG、$[MPEG]_2$、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物、聚磷嗪、聚乙烯亚胺、阳离子基团、精胺、亚精胺、聚胺、伪肽-聚胺、肽模拟物聚胺、树枝状聚合物聚胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、聚胺的季盐、促甲状腺激素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白A、粘蛋白、糖基化聚氨基酸、运铁蛋白、双膦酸盐、聚谷氨酸盐、聚天冬氨酸、适体、去唾液酸胎球蛋白、透明质酸、前胶原、免疫球蛋白(例如抗体)、胰岛素、运铁蛋白、白蛋白、糖-白蛋白缀合物、嵌入剂(例如吖啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(例如TPPC4、德卟啉(texaphyrin)、赛卟啉(Sapphyrin))、多环芳烃(例如吩嗪、二氢吩嗪)、人工核酸内切酶(例如EDTA)、亲脂性分子(例如类固醇、胆汁酸、胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-邻(十六烷基)甘油、香叶氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噁嗪)、肽(例如α螺旋肽、两亲性肽、RGD肽、细胞渗透肽、内体裂解/膜融

合肽)、烷基化剂、磷酸酯、氨基、巯基、聚氨基、烷基、经取代的烷基、放射性标记的标志物、酶、半抗原(例如生物素)、转运/吸收促进剂(例如萘普生、阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶(例如咪唑、双咪唑、组织胺、咪唑簇、吖啶-咪唑缀合物、四氮杂大环的Eu3+复合物)、二硝基苯基、HRP、AP、抗体、激素及激素受体、凝集素、碳水化合物、多价碳水化合物、维生素(例如维生素A、维生素E、维生素K、维生素B,例如叶酸、B12、核黄素、生物素及吡哆醛)、维生素辅因子、脂多醣、p38 MAP激酶的活化因子、NF-κB的活化因子、塔克酮(taxon)、长春新碱、长春花碱、细胞松弛素、诺考达唑(nocodazole)、杰普肯立德(japlakinolide)、拉春库林A(latrunculin A)、鬼笔环肽(phalloidin)、斯文霍立德A(swinholide A)、引达哚新(indanocine)、美瑟文(myoservin)、肿瘤坏死因子α(TNFα)、白介素-1β、γ干扰素、天然或重组低密度脂蛋白(LDL)、天然或重组高密度脂蛋白(HDL)及细胞渗透剂(例如螺旋细胞渗透剂)。

[0589] 肽及肽模拟物配体包括具有天然存在或经修饰的肽的配体,例如D或L肽;α、β或γ肽;N-甲基肽;氮杂肽;具有一个或多个酰胺的肽,即键经一个或多个脲、硫脲、氨基甲酸酯或磺酰脲键替换的肽;或环肽。肽模拟物(在本文中也称为寡肽模拟物)为能够折叠成与天然肽类似的确定三维结构的分子。肽或肽模拟物配体可以是约5-50个氨基酸长,例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[0590] 示例性两亲性肽包括但不限于天蚕抗菌肽(cecropin)、洛克托辛(lycotoxin)、帕拉达辛(paradaxin)、蟾蜍苷元(buforin)、CPF、铃蟾抗菌肽样肽(bombinin-like肽,BLP)、抗菌肽(cathelicidin)、克拉托辛(ceratotoxin)、柄海鞘(S.clava)肽、八目鳗肠道抗微生物肽(hagfish intestinal antimicrobial peptide,HFIAP)、爪蟾抗菌肽(magainine)、林蛙抗菌肽-2(brevinin-2)、德玛普汀(dermaseptin)、蜂毒肽(melittin)、普洛西汀(pleurocidin)、H_2A肽、非洲爪蟾(Xenopus)肽、艾库尼丝-1(esculentini-1)及卡厄林(caerin)。

[0591] 如本文所用,术语“内体裂解配体”是指具有内体裂解特性的分子。内体裂解配体促进本发明的组合物或其组分的溶解和/或自细胞内的细胞区室,诸如内体、溶酶体、内质网(ER)、高尔基体、微管、过氧化体或其他囊泡体转运至细胞的细胞质。一些示例性内体裂解配体包括但不限于咪唑、聚咪唑或寡聚咪唑、直链或支链聚乙烯亚胺(PEI)、直链及支链聚胺(例如精胺、阳离子直链及支链聚胺)、聚羧酸酯、聚阳离子、经掩蔽的寡聚或聚阳离子或阴离子、缩醛、聚缩醛、缩酮/聚缩酮、原酸酯、具有经掩蔽或未掩蔽的阳离子或阴离子电荷的直链或支链聚合物、具有经掩蔽或未掩蔽的阳离子或阴离子电荷的树枝状聚合物、聚阴离子肽、聚阴离子肽模拟物、pH敏感肽、天然及合成膜融合脂质、天然及合成阳离子脂质。

[0592] 示例性内体裂解/膜融合肽包括但不限于AALEALAEALEALAEALEALAEAAAAGGC(GALA)(SEQ ID NO:3);AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC(EALA)(SEQ ID NO:4);ALEALAEALEALAEA(SEQ ID NO:5);GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG(INF-7)(SEQ ID NO:6);GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG(Inf HA-2)(SEQ ID NO:7);GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGCGLFEAIEGFIENGWEGMID GWYGC(diINF-7)(SEQ ID NO:8);GLFEAIEGFIENGWEGMIDGGCGLFEAIEGFIENGWEGMIDGGC(diINF-3)(SEQ ID NO:9);GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAGGSC(GLF)(SEQ ID NO:10);GLFEAIEGFIENGWEGLAEALAEALEALAAGGSC(GALA-INF3)(SEQ ID NO:11);GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG KGLF EAI EGFI ENGW EGnI DG(INF-5,n为正亮氨酸)(SEQ

ID NO:12);LFEALLELLESLWELLLEA(JTS-1)(SEQ ID NO:13);GLFKALLKLLKSLWKLLLKA(ppTG1)(SEQ ID NO:14);GLFRALLRLLRSLWRLLLRA(ppTG20)(SEQ ID NO:15);WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA(KALA)(SEQ ID NO:16);GLFFEAIAEFIEGGWEGLIEGC(HA)(SEQ ID NO:17);GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ(蜂毒肽)(SEQ ID NO:18);H_5WYG(SEQ ID NO:19);及CHK$_6$HC(SEQ ID NO:20)。

[0593] 不希望受理论所束缚,膜融合脂质与膜融合且因此使膜不稳定。膜融合脂质通常具有小的头部基团及不饱和酰基链。示例性膜融合脂质包括但不限于1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-醇(Di-Lin)、N-甲基(2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊环-4-基)甲胺(DLin-k-DMA)及N-甲基-2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊环-4-基)乙胺(在本文中也称为XTC)。

[0594] 适用于本发明的具有内体裂解活性的合成聚合物描述于美国专利申请公开号号2009/0048410;2009/0023890;2008/0287630;2008/0287628;2008/0281044;2008/0281041;2008/0269450;2007/0105804;20070036865;及2004/0198687中,将其内容通过引用以其全文并入本文。

[0595] 示例性细胞渗透肽包括但不限于RQIKIWFQNRRMKWKK(穿膜肽)(SEQ ID NO:21);GRKKRRQRRRPPQC(Tat片段48-60)(SEQ ID NO:22);GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV(基于信号序列的肽)(SEQ ID NO:23);LLIILRRRIRKQAHAHSK(PVEC)(SEQ ID NO:24);GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL(转运肽)(SEQ ID NO:25);KLALKLALKALKAALKLA(两亲性模型肽)(SEQ ID NO:26);RRRRRRRRR(Arg9)(SEQ ID NO:27);KFFKFFKFFK(细菌细胞壁渗透肽)(SEQ ID NO:28);LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES(LL-37)(SEQ ID NO:29);SWLSKTAKKLENSAKKRISEGIAIAIQGGPR(杀菌肽P1)(SEQ ID NO:30);ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC(α-防御素)(SEQ ID NO:31);DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK(β-防御素)(SEQ ID NO:32);RRRPRPPYLPRPRPPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPGKR-NH2(PR-39)(SEQ ID NO:33);ILPWKWPWWPWRR-NH2(肽抗生素)(SEQ ID NO:34);AAVALLPAVLLALLAP(RFGF)(SEQ ID NO:35);AALLPVLLAAP(RFGF类似物)(SEQ ID NO:36);及RKCRIVVIRVCR(牛抗菌肽)(SEQ ID NO:37)。

[0596] 示例性阳离子基团包括但不限于质子化氨基,其衍生自例如O-胺(胺=NH_2;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基、乙二胺、聚氨基);氨基烷氧基,例如O(CH_2)$_n$胺(例如胺=NH_2;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基);氨基(例如NH_2;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基、二杂芳基氨基或氨基酸);及NH(CH_2CH_2NH)$_n$$CH_2CH_2$-胺(胺=$NH_2$;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基)。

[0597] 如本文所用,术语“靶向配体”是指对所选靶标提供增强的亲和力的任何分子,所选靶标例如细胞、细胞类型、组织、器官、身体区域或区室,例如细胞、组织或器官区室。一些示例性靶向配体包括但不限于抗体、抗原、叶酸、受体配体、碳水化合物、适体、整合素受体配体、趋化因子受体配体、运铁蛋白、生物素、血清素受体配体、PSMA、内皮素、GCPII、生长抑素、LDL及HDL配体。

[0598] 基于碳水化合物的靶向配体包括但不限于D-半乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-D-半乳糖胺(GalNAc)、多价GalNAc,例如$GalNAc_2$及$GalNAc_3$(GalNAc及多价GalNAc在本文中统称为GalNAc缀合物);D-甘露糖、多价甘露糖、多价乳糖、N-乙酰基-葡糖胺、葡萄糖、多价葡萄糖、多价海藻糖、经糖基化的聚氨基酸及凝集素。术语多价指示存在多于一个单糖单元。此类单糖亚单元可通过糖苷键彼此连接或连接至骨架分子。

[0599] 作为配体适用于本发明的许多叶酸及叶酸类似物描述于美国专利号2,816,110;5,552,545;6,335,434及7,128,893中,将其内容通过引用以其全文并入本文。

[0600] 如本文所用,术语"PK调节配体"及"PK调节剂"是指可调节本发明组合物的药代动力学的分子。一些示例性PK调节剂包括但不限于亲脂性分子、胆汁酸、固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、维生素、脂肪酸、吩噁嗪、阿司匹林、萘普生、布洛芬、舒洛芬、酮洛芬、(S)-(+)-普拉洛芬、卡洛芬、PEG、生物素及甲状腺素转运蛋白结合配体(例如四碘甲状腺乙酸、2,4,6-三碘苯酚及氟芬那酸)。也已知包含多个硫代磷酸酯糖间键的寡聚化合物与血清蛋白结合,因此短寡聚化合物,例如包含约5至30个核苷酸(例如,5至25个核苷酸,优选地5至20个核苷酸,例如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸)并且在主链中包含多个硫代磷酸酯键的寡核苷酸也作为配体(例如作为PK调节配体)适用于本发明。PK调节寡核苷酸可包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个硫代磷酸酯和/或二硫代磷酸酯键。在一些实施例中,PK调节寡核苷酸中的所有核苷酸间键为硫代磷酸酯和/或二硫代磷酸酯键。另外,结合血清组分(例如血清蛋白)的适体也作为PK调节配体适用于本发明。可以从白蛋白结合测定预测与血清组分(例如血清蛋白)的结合,诸如Oravcova等人,Journal of Chromatography B[色谱杂志B](1996),677:1-27中所述的测定。

[0601] 当存在两个或更多个配体时,配体可皆具有相同特性,皆具有不同特性,或一些配体具有相同特性而其他配体具有不同特性。例如,配体可具有靶向特性,具有内体裂解活性或具有PK调节特性。在优选的实施例中,所有配体皆具有不同特性。

[0602] 当单体并入本发明的化合物的组分(例如本发明的化合物或接头)中时,配体或系链配体可存在于所述单体上。在一些实施例中,在"前体"单体已并入本发明的化合物的组分(例如本发明的化合物或接头)中后,配体可经由偶联并入所述"前体"单体。例如,具有例如氨基封端的系链(即,无相关配体)的单体,例如单体-接头-NH_2可并入本发明化合物的组分(例如本发明的化合物或接头)中。在后续操作中,即在前体单体并入本发明化合物的组分(例如本发明的化合物或接头)之后,具有亲电子基团的配体,例如五氟苯基酯或醛基,可随后通过将配体的亲电子基团与前体单体的系链的末端亲核基团偶联而附接至前体单体。

[0603] 在另一个实例中,可并入具有适于参与点击化学反应的化学基团的单体,例如叠氮基或炔烃封端的系链/接头。在后续操作中,即在将前体单体并入链中之后,可通过将炔烃及叠氮基偶联在一起而将具有互补化学基团(例如炔烃或叠氮基)的配体附接至前体单体。

[0604] 在一些实施例中,配体可以与本发明的化合物的核碱基、糖部分或核苷间键缀合。与嘌呤核碱基或其衍生物的缀合可发生在包括内环及环外原子的任何位置。在一些实施例中,嘌呤核碱基的2-、6-、7-或8-位置附接至缀合物部分。与嘧啶核碱基或其衍生物的缀合也可发生在任何位置。在一些实施例中,嘧啶核碱基的2-、5-及6-位置可经缀合物部分取代。当配体与核碱基缀合时,优选的位置为不干扰杂交,即不干扰碱基配对所需的氢键相互

作用的位置。

[0605] 与核苷的糖部分的缀合可发生在任何碳原子处。可以附接至缀合物部分的糖部分的示例性碳原子包括2'、3'及5'碳原子。1'位置也可附接至缀合物部分,诸如在无碱基残基中。核苷间键也可带有缀合物部分。对于含磷键(例如磷酸二酯、硫代硫酸酯、二硫代磷酸酯、氨基磷酰酯等)而言,可以直接将缀合物部分附接至磷原子或与该磷原子结合的O、N或S原子。对于含有胺或酰胺的核苷间键(例如PNA),缀合物部分可以附接至胺或酰胺的氮原子或相邻碳原子。

[0606] 存在许多制备寡核苷酸缀合物的方法。一般而言,通过使寡核苷酸上的反应性基团(例如OH、SH、胺、羧基、醛及其类似基团)与缀合物部分上的反应性基团接触而将寡核苷酸附接至缀合物部分。在一些实施例中,一个反应性基团为亲电子的且其他为亲核的。

[0607] 例如,亲电子基团可以是含羰基的官能团且亲核基团可以是胺或硫醇。在存在及不存在连接基团的情况下用于缀合核酸及相关寡聚化合物的方法充分描述于文献中,诸如Manoharan,在Antisense Research and Applications[反义研究和应用]中,Crooke及LeBleu编,CRC Press[CRC出版社],Boca Raton,Fla.[佛罗里达州博卡拉顿],1993,第17章,将其通过引用以其全文并入本文。

[0608] 配体可经由接头或载体单体(例如配体载体)附接至本发明的化合物。载体包括(i)至少一个"主链附接点",优选地两个"主链附接点"及(ii)至少一个"系链附接点"。如本文所用,"主链附接点"是指可用于且适用于将载体单体并入主链(例如寡核苷酸的磷酸酯或经修饰的磷酸酯,例如含硫主链)的官能团,例如羟基,或通常是键。"系链附接点"(TAP)是指连接选定部分的载体单体的原子,例如碳原子或杂原子(不同于提供主链附接点的原子)。选定部分可以是例如碳水化合物,例如单糖、二糖、三糖、四糖、寡醣及多醣。任选地,选定部分通过插入的系链连接至载体单体。因此,载体将通常包括官能团,例如氨基,或通常提供键,其适于将另一种化学实体(例如配体)并入或系栓至组成原子。

[0609] 教示核酸缀合物的制备的代表性美国专利包括但不限于美国专利号4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717;5,580,731;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,149,782;

[0610] 5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241,5,391,723;5,416,203,5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928;5,672,662;5,688,941;5,714,166;6,153,737;6,172,208;6,300,319;6,335,434;6,335,437;6,395,437;6,444,806;6,486,308;6,525,031;6,528,631;6,559,279;将其内容通过引用以其全文并入本文。

[0611] 在一些实施例中,化合物进一步包含靶向肝组织的靶向配体。在一些实施例中,靶向配体为基于碳水化合物的配体。在一个实施例中,靶向配体为GalNAc缀合物。

[0612] 因为配体可经由接头或载体与iRNA剂缀合,并且因为接头或载体可含有支链接头,所以iRNA剂可随后经由载体的相同或不同主链附接点,或经由支链接头含有多个配体。

举例而言,支链接头的分支点可以是二价、三价、四价、五价或六价原子,或呈现此类多价的基团。在某些实施例中,分支点为-N、-N(Q)-C、-O-C、-S-C、-SS-C、-C(O)N(Q)-C、-OC(O)N(Q)-C、-N(Q)C(O)-C或-N(Q)C(O)O-C;其中Q在每次出现时独立地是H或任选地经取代的烷基。在其他实施例中分支点为甘油或甘油衍生物。

[0613] 候选iRNA的评估

[0614] 我们可通过将药剂或经修饰的分子及对照分子暴露于适当条件且评估所选特性的存在来针对所选特性评估候选iRNA剂,例如经修饰的RNA。例如,可如下评估对降解剂的抗性。候选经修饰的RNA(及对照分子,通常为未修饰的形式)可暴露于降解条件,例如暴露于包括降解剂(例如核酸酶)的环境。例如,我们可使用生物样品,例如与治疗用途可能遇到的环境类似的生物样品,例如血液或细胞部分,例如无细胞匀浆或破碎的细胞。随后可通过多种方法中的任一个来评估候选物及对照物对降解的抗性。例如,候选物及对照物可在暴露之前,用例如放射性或酶标记物或荧光标记物(诸如Cy3或Cy5)来标记。对照及经修饰的RNA可以与降解剂及任选的对照(例如不活化,例如加热不活化)降解剂一起孵育。随后测定经修饰的分子及对照分子的物理参数,例如大小。其可通过物理方法来测定,例如通过聚丙烯酰胺凝胶电泳或分级柱,以评定分子是否保持其原始长度,或在功能上评定。可替代地,可使用RNA印迹测定来测定未标记的经修饰的分子的长度。

[0615] 功能测定也可用于评估候选药剂。功能测定可在最初或在较早的非功能性测定(例如,对降解的抗性的测定)之后应用,以确定修饰是否改变分子使基因表达沉默的能力。例如,细胞(例如哺乳动物细胞,诸如小鼠或人类细胞)可以与表达荧光蛋白(例如GFP)的质粒及与编码荧光蛋白的转录物同源的候选RNA剂共转染(参见例如WO 00/44914)。例如,与转染不包括候选dsiRNA的对照细胞(例如,未添加药剂的对照和/或添加未修饰的RNA的对照)相比,可通过监测细胞荧光的降低来测定与GFP mRNA同源的经修饰的dsiRNA抑制GFP表达的能力。可通过在经修饰及未修饰的dssiRNA化合物存在下比较细胞荧光来评定候选药剂对基因表达的功效。

[0616] 在另一功能测定中,与内源性小鼠基因(例如母系表达的基因,诸如c-mos)同源的候选dssiRNA化合物可注射至未成熟的小鼠卵母细胞中,以评定药剂在体内抑制基因表达的能力(参见例如WO 01/36646)。可监测卵母细胞的表型(例如在中期II维持停滞的能力)作为该药剂抑制表达的指标。例如,通过dssiRNA化合物裂解c-mos mRNA将导致卵母细胞退出中期停滞且引发单性发育(Colledge等人Nature[自然]370:65-68,1994;Hashimoto等人Nature[自然],370:68-71,1994)。与阴性对照相比,经修饰的药剂对靶RNA水平的影响可通过RNA印迹测定靶mRNA的水平降低,或通过蛋白质印迹测定靶蛋白的水平降低来验证。对照可以包括其中未添加药剂的细胞和/或其中添加未修饰的RNA的细胞。

[0617] 生理效应

[0618] 本文所述的siRNA化合物可经设计以使得更容易通过siRNA与人类及非人类动物序列的互补性来确定治疗毒性。通过这些方法,siRNA可由与来自人类的核酸序列及来自至少一种非人类动物(例如,非人类哺乳动物,诸如啮齿动物、反刍动物或灵长类动物)的核酸序列完全互补的序列组成。例如,非人类哺乳动物可以是小鼠、大鼠、狗、猪、山羊、绵羊、牛、猴、倭黑猩猩、黑猩猩、恒河猴或食蟹猴。siRNA化合物的序列可以与非人类哺乳动物及人类的同源基因(例如致癌基因或肿瘤抑制基因)内的序列互补。通过确定siRNA化合物在非人

类哺乳动物中的毒性,我们可以推断siRNA化合物在人类中的毒性。对于更繁重的毒性测试,siRNA可以与人类及多于一种(例如两种或三种或更多种)非人类动物互补。

[0619] 本文所述的方法可用于关联siRNA化合物对人类的任何生理效应,例如任何不需要的效应,诸如毒性效应,或任何阳性或所需效应。

[0620] 增加siRNA的细胞摄取

[0621] 本文描述各种siRNA组合物,其含有共价附接的增加siRNA的细胞摄取和/或细胞内靶向的缀合物。

[0622] 另外提供了本发明的方法,其包括施用siRNA化合物及影响siRNA摄入细胞的药物。可以在施用siRNA化合物之前、之后或同时施用药物。药物可以与siRNA化合物共价或非共价连接。药物可以是例如脂多醣、p38 MAP激酶的活化剂或NF-κB的活化剂。药物可对细胞具有短暂影响。药物可例如通过破坏细胞的细胞骨架,例如通过破坏细胞的微管、微丝和/或中间丝来增加siRNA化合物摄入细胞。药物可以是例如塔克酮、长春新碱、长春花碱、细胞松弛素、诺考达唑、杰普肯立德、拉春库林A、鬼笔环肽、斯文霍立德A、引达喏新或美瑟文。药物也可通过例如活化发炎反应来增加siRNA化合物摄入给定细胞或组织。具有此类效应的示例性药物包括肿瘤坏死因子α(TNFα)、白介素-1β、CpG基序、γ干扰素或更通常为活化toll样受体的药剂。

[0623] siRNA产生

[0624] siRNA可例如通过多种方法大量产生。示例性方法包括:有机合成及RNA裂解,例如体外裂解。

[0625] 有机合成。siRNA可通过分别合成单链RNA分子或双链RNA分子的各条链来制备,之后再对组成链进行退火。

[0626] 大型生物反应器,例如来自药物生物技术公司(Pharmacia Biotec AB)(瑞典乌普萨拉(Uppsala Sweden))的OligoPilot II,可用于产生给定siRNA的大量特定RNA链。OligoPilot II反应器可仅使用1.5莫耳过量的亚磷酰胺核苷酸有效偶联核苷酸。为了制造RNA链,使用核糖核苷酸胺基酸酯。单体添加的标准循环可用于合成siRNA的21至23个核苷酸链。典型地,两条互补链分开制备且随后退火,例如在自固体支撑物释放及去保护之后。

[0627] 有机合成可用于产生离散的siRNA物种。可精确指定物种与特定靶基因的互补性。例如,物种可以与包括多态性(例如单核苷酸多态性)的区域互补。另外,可精确确定多态性的位置。在一些实施例中,多态性位于内部区域,例如来自一个或两个末端的至少4、5、7或9个核苷酸。

[0628] dsiRNA裂解。siRNA也可通过裂解较大siRNA来制备。可体外或在体内介导裂解。例如,为了通过体外裂解产生iRNA,可使用以下方法:

[0629] 体外转录。dsiRNA是通过在两个方向上转录核酸(DNA)区段产生的。例如,HiScribe™ RNAi转录试剂盒(新英格兰生物实验室(New England Biolabs))提供了用于产生核酸区段的dsiRNA的载体及方法,该核酸区段在任一侧与T7启动子侧接的位置处克隆至载体中。为dsiRNA的两条互补链的T7转录产生单独的模板。通过添加T7 RNA聚合酶体外转录模板且产生dsiRNA。使用PCR和/或其他RNA聚合酶(例如T3或SP6聚合酶)的类似方法也可以是可能污染重组酶制剂的毒素。

[0630] 体外裂解。在一个实施例中,通过此方法产生的RNA经仔细纯化以移除末端siRNA,

其例如使用Dicer或类似的基于RNA酶III的活性体外裂解成siRNA。例如,dsiRNA可在来自果蝇的体外提取物中或使用经纯化的组分(例如经纯化的RNA酶或RISC复合物(RNA诱导沉默复合物))来孵育。参见例如Ketting等人Genes Dev[基因与发育]2001年10月15日;15(20):2654-9;及Hammond Science[科学]2001年8月10日;293(5532):1146-50。

[0631] dsiRNA裂解一般产生多个siRNA物种,每个是源dsiRNA分子的特定21至23nt片段。例如,可存在包括与源dsiRNA分子的重叠区域及相邻区域互补的序列的siRNA。

[0632] 无论合成方法如何,siRNA制剂可在适于配制品的溶液(例如水溶液和/或有机溶液)中制备。例如,siRNA制剂可沉淀且再溶解于双蒸溜水中,并且冻干。干燥的siRNA可随后再悬浮于适合于预期配制方法的溶液中。

[0633] 制造与亲脂性部分缀合的双链iRNA剂

[0634] 在一些实施例中,亲脂性单体含有经由核碱基、糖部分或核苷间键与化合物缀合的亲脂性部分。

[0635] 与嘌呤核碱基或其衍生物的缀合可发生在包括内环及环外原子的任何位置。在一些实施例中,嘌呤核碱基的2-、6-、7-或8-位置附接至缀合物部分。与嘧啶核碱基或其衍生物的缀合也可发生在任何位置。在一些实施例中,嘧啶核碱基的2-、5-及6-位置可经缀合物部分取代。当亲脂性部分与核碱基缀合时,优选的位置为不干扰杂交(即不干扰碱基配对所需的氢键相互作用)的位置。在一个实施例中,含有亲脂性部分的亲脂性单体可经由含有烷基、烯基或酰胺键的接头与核碱基缀合。

[0636] 与核苷的糖部分的缀合可发生在任何碳原子处。亲脂性部分可以附接的糖部分的示例性碳原子包括2'、3'及5'碳原子。亲脂性部分也可以附接至1'位置,诸如在无碱基残基中。在一个实施例中,亲脂性部分可在存在或不存在接头的情况下经由2'-O修饰与糖部分缀合。

[0637] 核苷间键也可带有亲脂性部分。对于含磷键(例如磷酸二酯、硫代磷酸酯、硫代磷酸二酯、磷酰氨酸等),亲脂性部分可直接附接至磷原子或与磷原子键连的O、N或S原子。对于含有胺或酰胺的核苷间键(例如PNA),亲脂性部分可以附接至胺或酰胺的氮原子或相邻碳原子。

[0638] 存在许多制备寡核苷酸缀合物的方法。一般而言,通过使寡核苷酸上的反应性基团(例如OH、SH、胺、羧基、醛及其类似基团)与缀合物部分上的反应性基团接触而将寡核苷酸附接至缀合物部分。在一些实施例中,一个反应性基团为亲电子的且其他为亲核的。

[0639] 例如,亲电子基团可以是含羰基的官能团且亲核基团可以是胺或硫醇。在存在及不存在连接基团的情况下用于缀合核酸及相关寡聚化合物的方法充分描述于文献中,诸如Manoharan,在Antisense Research and Applications[反义研究和应用]中,Crooke及LeBleu编,CRC Press[CRC出版社],Boca Raton,Fla.[佛罗里达州博卡拉顿],1993,第17章,将其通过引用以其全文并入本文。

[0640] 在一个实施例中,可分别合成第一(互补)RNA链及第二(有义)RNA链,其中RNA链中的一个包含侧接亲脂性部分,并且第一及第二RNA链可以混合形成dsRNA。合成RNA链的步骤优选地涉及固相合成,其中各个核苷酸通过在连续合成循环中形成核苷酸间3'-5'磷酸二酯键而端与端相接。

[0641] 在一个实施例中,具有亚磷酰胺基团的亲脂性分子在最后的合成循环中与第一

(互补)或第二(有义)RNA链的3'端或5'端偶联。在RNA的固相合成中,核苷酸最初为核苷亚磷酰胺的形式。在每个合成循环中,另一个核苷亚磷酰胺与先前并入的核苷酸的-OH基团连接。如果亲脂性分子具有亚磷酰胺基团,则其可以类似于核苷亚磷酰胺的方式与先前在固相合成中合成的RNA的游离OH末端偶联。合成可使用常规的RNA合成仪以自动化及标准化方式进行。具有亚磷酰胺基团的亲脂性分子的合成可以包括游离羟基的亚磷酰化以产生亚磷酰胺基团。

[0642] 一般而言,寡核苷酸可使用本领域已知的方案合成,例如,如Caruthers等人,Methods in Enzymology[酶学方法](1992)211:3-19;WO 99/54459;Wincott等人,Nucl.Acids Res.[核酸研究](1995)23:2677-2684;Wincott等人,Methods Mol.Bio.[分子生物学方法],(1997)74:59;Brennan等人,Biotechnol.Bioeng.[生物技术与生物工程](1998)61:33-45;以及美国专利号6,001,311中所述;将其各自通过引用以其全文并入本文。一般而言,寡核苷酸的合成涉及常规的核酸保护及偶联基团,诸如5'端处的二甲氧基三苯甲基及3'端处的亚磷酰胺。在一非限制性实例中,使用由奥德里奇化学基因公司(ChemGenes Corporation)(亚什兰马萨诸塞州(Ashland,Mass.))销售的核苷亚磷酰胺,在由应用生物系统公司(Applied Biosystems,Inc.)(德国威特史丹特(Weiterstadt,Germany))销售的Expedite 8909RNA合成仪上进行小规模合成。可替代地,合成可在96孔盘合成仪,诸如由Protogene公司(加利福尼亚帕洛阿尔托(Palo Alto,Calif.))生产的仪器上,或通过诸如Usman等人,J.Am.Chem.Soc.[美国化学会志](1987)109:7845;Scaringe等人,Nucl.Acids Res.[核酸研究](1990)18:5433;Wincott等人,Nucl.Acids Res.[核酸研究](1990)23:2677-2684;及Wincott等人,Methods Mol.Bio.[分子生物学方法](1997)74:59中所述的方法来进行,将其各自通过引用以其全文并入本文。

[0643] 本发明的核酸分子可单独合成并且在合成后相接在一起,例如在合成和/或去保护后通过连接(Moore等人,Science[科学](1992)256:9923;WO 93/23569;Shabarova等人,Nucl.Acids Res.[核酸研究](1991)19:4247;Bellon等人,Nucleosides&Nucleotides[核苷与核苷酸](1997)16:951;Bellon等人,Bioconjugate Chem.[生物缀合化学](1997)8:204);或通过杂交。核酸分子可通过使用常规方法的凝胶电泳纯化,或可通过高压液相色谱法(HPLC;参见Wincott等人,见上文,将其全部通过引用并入本文中)纯化且再悬浮于水中。

[0644] 药物组合物

[0645] 在一个方面中,本发明的特征在于药物组合物,其包括siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA),该化合物包括与靶RNA互补(例如基本上和/或精确互补)的核苷酸序列。靶RNA可以是内源性人类基因的转录物。在一个实施例中,siRNA化合物(a)为19-25个核苷酸长,例如21-23个核苷酸,(b)与内源性靶RNA互补,并且任选地,(c)包括至少一个1-5nt长的3'突出端。在一个实施例中,药物组合物可以是乳液、微乳液、乳膏、胶冻或脂质体。

[0646] 在一个实例中,药物组合物包括与局部递送剂混合的siRNA化合物。局部递送剂可以是多个微观囊泡。微观囊泡可以是脂质体。在一些实施例中,脂质体为阳离子脂质体。

[0647] 在另一个方面中,药物组合物包括siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物

(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA)与局部渗透增强剂混合。在一个实施例中,局部渗透增强剂为脂肪酸。脂肪酸可以是花生四烯酸、油酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、单油酸甘油酯、二月桂酸甘油酯、1-单癸酸甘油酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、或C_{1-10}烷基酯、单甘油酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐。

[0648] 在另一个实施例中,局部渗透增强剂为胆汁盐。胆汁盐可以是胆酸、脱氢胆酸、去氧胆酸、谷氨胆酸、甘氨胆酸、甘氨去氧胆酸、牛胆酸、牛去氧胆酸、鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、牛磺酸-24,25-二氢-夫西地酸钠、二醇二氢夫西地酸钠、聚氧乙烯-9-月桂基醚或其药学上可接受的盐。

[0649] 在另一个实施例中,渗透增强剂为螯合剂。螯合剂可以是EDTA、柠檬酸、水杨酸盐、胶原蛋白的N-酰基衍生物、月桂醇醚-9、β-二酮的N-氨基酰基衍生物或其混合物。

[0650] 在另一个实施例中,渗透增强剂为表面活性剂,例如离子或非离子表面活性剂。表面活性剂可以是十二烷基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-十六烷基醚、全氟化学乳液或其混合物。

[0651] 在另一个实施例中,渗透增强剂可选自由不饱和环脲、1-烷基-烷酮、1-烯基氮杂环-丙烷酮、类固醇抗炎剂及其混合物组成的组。在另一个实施例中,渗透增强剂可以是二醇、吡咯、氮酮或萜烯。

[0652] 在一个方面中,本发明的特征在于呈适于口服递送的形式的药物组合物,其包括siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA)。在一个实施例中,口服递送可用于将siRNA化合物组合物递送至胃肠道的细胞或区域,例如小肠、结肠(例如治疗结肠癌)等。口服递送形式可以是片剂、胶囊或凝胶胶囊。在一个实施例中,药物组合物的siRNA化合物调节细胞黏附蛋白的表达、调节细胞增殖速率、或具有针对真核病原体或反转录病毒的生物活性。在另一个实施例中,药物组合物包括肠溶材料,其基本上防止片剂、胶囊或凝胶胶囊在哺乳动物胃中溶解。在一些实施例中,肠溶材料为包衣。包衣可以是乙酸邻苯二甲酸酯、丙二醇、脱水山梨糖醇单油酸酯、乙酸偏苯三酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯或乙酸邻苯二甲酸纤维素。

[0653] 在另一个实施例中,药物组合物的口服剂型包括渗透增强剂。渗透增强剂可以是胆汁盐或脂肪酸。胆汁盐可以是熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸及其盐。脂肪酸可以是癸酸、月桂酸及其盐。

[0654] 在另一个实施例中,药物组合物的口服剂型包括赋形剂。在一个实例中,赋形剂为聚乙二醇。在另一个实例中,赋形剂为硬脂酸甘油酯(precirol)。

[0655] 在另一个实施例中,药物组合物的口服剂型包括增塑剂。增塑剂可以是邻苯二甲酸二乙酯、三乙酸甘油酯癸二酸二丁酯、邻苯二甲酸二丁酯或柠檬酸三乙酯。

[0656] 在一个方面中,本发明的特征在于包括siRNA化合物及递送媒介物的药物组合物。在一个实施例中,siRNA化合物(a)为19-25个核苷酸长,例如21-23个核苷酸,(b)与内源性靶RNA互补,并且任选地,(c)包括至少一个1-5个核苷酸长的3'突出端。

[0657] 在一个实施例中,递送媒介物可通过局部施用途径将siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化合物,

或编码siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA)递送至细胞。递送媒介物可以是微观囊泡。在一个实例中,微观囊泡为脂质体。在一些实施例中,脂质体为阳离子脂质体。在另一个实例中,微观囊泡为微胞。在一个方面中,本发明的特征在于呈可注射剂型的药物组合物,其包括siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA)。在一个实施例中,药物组合物的可注射剂型包括无菌水溶液或分散液及无菌粉末。在一些实施例中,无菌溶液可以包括稀释剂,诸如水;生理食盐水溶液;不挥发性油、聚乙二醇、甘油或丙二醇。

[0658] 在一个方面中,本发明的特征在于呈口服剂型的药物组合物,其包括siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA)。在一个实施例中,口服剂型选自由片剂、胶囊及凝胶胶囊组成的组。在另一个实施例中,药物组合物包括肠溶材料,其基本上防止片剂、胶囊或凝胶胶囊在哺乳动物胃中溶解。在一些实施例中,肠溶材料为包衣。包衣可以是乙酸邻苯二甲酸酯、丙二醇、脱水山梨糖醇单油酸酯、乙酸偏苯三酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯或乙酸邻苯二甲酸纤维素。在一个实施例中,药物组合物的口服剂型包括渗透增强剂,例如本文所述的渗透增强剂。

[0659] 在另一个实施例中,药物组合物的口服剂型包括赋形剂。在一个实例中,赋形剂为聚乙二醇。在另一个实例中,赋形剂为硬脂酸甘油酯(precirol)。

[0660] 在另一个实施例中,药物组合物的口服剂型包括增塑剂。增塑剂可以是邻苯二甲酸二乙酯、三乙酸甘油酯癸二酸二丁酯、邻苯二甲酸二丁酯或柠檬酸三乙酯。

[0661] 在一个方面中,本发明的特征在于呈直肠剂型的药物组合物,其包括siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA)。在一个实施例中,直肠剂型为灌肠剂。在另一个实施例中,直肠剂型为栓剂。

[0662] 在一个方面中,本发明的特征在于呈阴道剂型的药物组合物,其包括siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA)。在一个实施例中,阴道剂型为栓剂。在另一个实施例中,阴道剂型为泡沫、乳膏或凝胶。

[0663] 在一个方面中,本发明的特征在于呈经肺或经鼻剂型的药物组合物,其包括siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA)。在一个实施例中,将siRNA化合物并入颗粒中,例如大颗粒,例如微球体。颗粒可通过喷雾干燥、冻干、蒸发、流化床干燥、真空干燥或其组合来产生。微球体可配制为悬浮液、粉末或可植入固体。

[0664] 治疗方法及递送途径

[0665] 本发明的另一方面涉及降低细胞中靶基因的表达的方法,该方法包括使所述细胞与本发明的化合物接触。在一个实施例中,细胞为肝外细胞。

[0666] 本发明的另一方面涉及降低受试者体内的靶基因表达的方法,该方法包括向该受试者施用本发明的化合物。

[0667] 本发明的另一方面涉及治疗患有CNS障碍的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的本发明的双链RNAi剂,从而治疗该受试者。可通过本发明的方法治疗的示例性CNS障碍包括阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶型痴呆、亨廷顿病、帕金森病、脊髓小脑病、朊病毒病及拉福拉病。

[0668] 本发明的化合物可通过多种途径递送至受试者,这取决于所靶向的基因的类型及待治疗的障碍的类型。在一些实施例中,化合物是肝外施用,诸如眼部施用(例如玻璃体内施用)或鞘内或脑室内施用。

[0669] 在一个实施例中,鞘内或脑室内施用该化合物。通过鞘内或脑室内施用双链iRNA剂,该方法可降低脑或脊柱组织(例如皮质、小脑、颈椎、腰椎及胸椎)中的靶基因表达。

[0670] 在一些实施例中,示例性靶基因为APP、ATXN2、C9orf72、TARDBP、MAPT(Tau)、HTT、SNCA、FUS、ATXN3、ATXN1、SCA1、SCA7、SCA8、MeCP2、PRNP、SOD1、DMPK和TTR。为了降低受试者中这些靶基因的表达,可将化合物直接(例如玻璃体内)施用于一只或多只眼睛。通过玻璃体内施用双链iRNA剂,该方法可降低眼组织中的靶基因的表达。

[0671] 为了便于说明,此部分中的配制品、组合物及方法主要针对经修饰的siRNA化合物进行论述。然而,可理解,这些配制品、组合物及方法可用其他siRNA化合物(例如未修饰的siRNA化合物)加以实践,并且此类实践在本发明内。包括iRNA的组合物可通过多种途径递送至受试者。示例性途径包括:静脉内、局部、直肠、肛门、阴道、经鼻、经肺、经眼。

[0672] 本发明的iRNA分子可并入适于施用的药物组合物中。此类组合物典型地包括一个或多个iRNA物种及药学上可接受的载体。如本文所用,语言“药学上可接受的载体”旨在包括与药物施用相容的任何及所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂及抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂及其类似物。此类介质及药剂用于药物活性物质的用途是本领域熟知的。除非任何常规的介质或药剂与活性化合物不相容,否则考虑将其用于组合物中。补充活性化合物也可并入组合物中。

[0673] 本发明的药物组合物能以多种方式施用,这取决于是否需要局部或全身治疗及待治疗的区域。施用可以是局部(包括眼部、阴道、直肠、鼻内、经皮)、口服或肠胃外的。非经肠施用包括静脉内滴注,皮下、腹膜内或肌肉内注射,或鞘内或心室内或脑室内施用。

[0674] 可选择施用途径及位点以增强靶向。例如,为了靶向肌肉细胞,肌肉内注射至感兴趣的肌肉中将是合乎逻辑的选择。通过以气溶胶形式施用iRNA可靶向肺细胞。可通过用iRNA涂覆球囊导管且以机械方式引入DNA来靶向血管内皮细胞。

[0675] 用于局部施用的配制品可以包括经皮贴片、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体及粉末。常规的药物载体、水性、粉末或油性基质、增稠剂及其类似物可以是必需或合乎需要的。经涂覆的避孕套、手套及其类似物也可以是有用的。

[0676] 用于口服施用的组合物包括粉末或颗粒、在水中的悬浮液或溶液、糖浆、酏剂或非水性介质、片剂、胶囊、锭剂或糖锭。在片剂的情况下,可使用的载体包括乳糖、柠檬酸钠及磷酸盐。各种崩解剂诸如淀粉及润滑剂诸如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠及滑石常用于片剂中。对于胶囊形式的口服施用,有用的稀释剂为乳糖及高分子量聚乙二醇。当口服使用需要水性悬浮液时,核酸组合物可以与乳化剂及悬浮剂组合。如果需要,可添加某些甜味剂和/

或调味剂。

[0677] 用于鞘内或心室内或脑室内施用的组合物可以包括无菌水溶液,其也可含有缓冲液、稀释剂及其他适合的添加剂。

[0678] 用于非经肠施用的配制品可以包括无菌水溶液,其也可含有缓冲液、稀释剂及其他适合的添加剂。心室内注射可通过例如附接至储集器的心室内导管来促进。对于静脉内使用,可控制溶质的总浓度以使制剂等渗。

[0679] 对于眼部施用,软膏或可滴注液体可通过此项技术已知的眼部递送系统递送,诸如施加器或滴眼器。此类组合物可以包括黏液模拟物(mucomimetic)诸如透明质酸、硫酸软骨素、羟丙基甲基纤维素或聚(乙烯醇),防腐剂诸如山梨酸、EDTA或苄基氯化铵,及常用量的稀释剂和/或载体。

[0680] 在一个实施例中,siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物)、组合物的施用为肠胃外的,例如静脉内(例如,以推注或可扩散的输注形式)、皮内、腹膜内、肌肉内、鞘内、心室内、脑室内、颅内、皮下、经黏膜、颊内、舌下、内视镜检、直肠、口服、阴道、局部、经肺、鼻内、尿道或眼部。施用可由受试者或另一个人(例如医疗服务人员)提供。药物可以测量的剂量或在分配器(递送计量的剂量)中提供。下文更详细地论述所选递送模式。

[0681] 鞘内施用。在一个实施例中,将化合物通过鞘内注射(即注射至沐浴脑及脊髓组织的脊髓液中)来递送。将iRNA剂鞘内注射至脊髓液中可以推注注射形式或经由微型泵来进行,这些微型泵可植入皮肤下方,从而提供将siRNA规律且恒定地递送至脊髓液中。脊髓液从产生其的脉络丛向下循环至脊髓及背根神经节周围且随后向上通过小脑及皮质达到蛛网膜颗粒,在此处液体可离开CNS,这取决于所注射的化合物的尺寸、稳定性及溶解度,鞘内递送的分子可在整个CNS中击中靶标。

[0682] 在一些实施例中,鞘内施用经由泵。泵可以是手术植入的渗透泵。在一个实施例中,将渗透泵植入椎管的蛛网膜下腔以促进鞘内施用。

[0683] 在一些实施例中,鞘内施用是经由用于药物的鞘内递送系统,该鞘内递送系统包括含有一定体积药剂的储集器以及配制以递送储集器中所含的一部分药剂的泵。关于此鞘内递送系统的更多细节可见于2015年1月28日提交的PCT/US 2015/013253,将其通过引用以其全文并入本文。

[0684] 鞘内或脑室内注射的iRNA剂的量可自一种靶基因至另一种靶基因而变化,并且必须针对各靶基因单独确定必须施用的适当量。典型地,此量范围介于10μg至2mg,优选地50μg至1500μg,更优选地100μg至1000μg。

[0685] 直肠施用。本发明也提供用于直肠施用或递送本文所述的siRNA化合物的方法、组合物及试剂盒。

[0686] 因此,本文所述的siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA),例如治疗有效量的本文所述的siRNA化合物,例如具有少于40且例如少于30个核苷酸的双链区且具有一或两个1-3个核苷酸的单链3'突出端的siRNA化合物可经直肠施用,例如通过直肠引入下结肠或上结肠。此方法特别适用于治疗发炎性障碍、以不需要的细胞增殖为特征的障碍,例如息肉或结肠癌。

[0687] 药物可通过引入施配装置递送至结肠中的部位,该施配装置为例如与用于检查结

肠或移除息肉类似的可挠性摄影机引导装置,其包括用于递送药物的构件。

[0688] siRNA化合物的直肠施用是通过灌肠剂的方式。灌肠剂的siRNA化合物可溶解于生理食盐水或缓冲溶液中。直肠施用也可通过栓剂的方式,其可以包括其他成分,例如赋形剂,例如可可脂或羟丙基甲基纤维素。

[0689] 眼部递送。本文所述的iRNA剂可施用至眼组织。例如,药物可施用于眼睛表面或附近组织,例如眼睑内侧。其可例如通过喷雾、滴剂、作为洗眼剂或软膏局部施用。施用可由受试者或另一个人(例如医疗服务人员)提供。药物可以测量的剂量或在分配器(递送计量的剂量)中提供。药物也可施用至眼睛内部,并且可通过针或可将药物引入所选区域或结构的其他递送装置引入。眼部治疗特别适用于治疗眼睛或附近组织的炎症。

[0690] 在某些实施例中,双链iRNA剂可通过眼组织注射,诸如眼周、结膜、筋膜下、前房内、玻璃体内、眼内、前或后近巩膜、视网膜下、结膜下、眼球后或小管内注射;通过使用导管或其他置放装置(诸如视网膜球粒、眼内插入物、栓剂或包含多孔、无孔或胶状材料的植入物)直接施用;通过局部眼滴剂或软膏;或通过盲管或邻近巩膜植入(经巩膜)或巩膜中(巩膜内)或眼内的缓慢释放装置直接递送至眼。前房内注射可通过角膜进入前房,以使药剂到达小梁网。小管内注射可进入静脉收集器通道,从而排出施累姆氏管(Schlemm'scanal)或进入施累姆氏管(Schlemm's canal)。

[0691] 在一个实施例中,双链iRNA剂可诸如使用以准备注射形式供医务人员使用的预填充注射器,通过玻璃体内注射施用至眼睛中,例如眼睛的玻璃体房。

[0692] 对于眼科递送,双链iRNA剂可以与眼科学上可接受的防腐剂、共溶剂、表面活性剂、黏度增强剂、渗透增强剂、缓冲液、氯化钠或水组合以形成水性无菌眼用悬浮液或溶液。溶液配制品可通过将缀合物溶解于生理学上可接受的等渗水性缓冲液中来制备。另外,溶液可以包括可接受的表面活性剂以帮助溶解双链iRNA剂。可将黏度构成剂,诸如羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或其类似物添加至药物组合物中以改进的双链iRNA剂的保留。

[0693] 为了制备无菌眼用软膏配制品,将双链iRNA剂与防腐剂在适当媒介物(诸如矿物油、液体羊毛蜡或白凡士林)中组合。无菌眼用凝胶配制品可根据本领域已知的方法,通过将双链iRNA剂悬浮于由例如CARBOPOL®-940(百路驰公司(BF Goodrich),加利福尼亚州福斯特市(Charlotte,N.C.))或其类似物的组合制备的亲水性基质中来制备。

[0694] 局部递送。本文所述的任何siRNA化合物可直接施用至皮肤。例如,药物可局部施用或递送至皮肤层中,例如通过使用微针或一组微针,其穿透至皮肤中,但例如不进入下面的肌肉组织。siRNA化合物组合物的施用可以是局部的。局部施用可例如将组合物递送至受试者的真皮或表皮。局部施用可以是经皮贴片、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体或粉末形式。用于局部施用的组合物可配制为脂质体、微胞、乳液或其他亲脂性分子组装体。经皮施用可以与至少一种渗透增强剂一起应用,诸如离子导入疗法、超声波透入疗法及超声波电渗法。

[0695] 为了便于说明,此部分中的配制品、组合物及方法主要针对经修饰的siRNA化合物进行论述。然而,可理解,这些配制品、组合物及方法可用其他siRNA化合物(例如未修饰的siRNA化合物)加以实践,并且此类实践在本发明内。在一些实施例中,将siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化

合物,或编码siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA)经由局部施用递送至受试者。“局部施用”是指通过使配制品直接与受试者表面接触而递送至受试者。最常见的局部递送形式系至皮肤,但本文所披露的组合物也可直接施用于身体的其他表面,例如眼睛、黏膜、体腔表面或内表面。如上文所提及,最常见的局部递送系至皮肤。该术语涵盖几种施用途径,包括但不限于局部及经皮。这些施用模式典型地包括渗透皮肤的渗透性障壁并且有效递送至靶组织或层。局部施用可用作穿透表皮及真皮且最终实现组合物的全身递送的手段。局部施用也可用作将寡核苷酸选择性递送至受试者的表皮或真皮、或其特定层、或下层组织的手段。

[0696] 如本文所用,术语“皮肤”是指动物的表皮和/或真皮。哺乳动物皮肤由两个主要的不同层组成。皮肤的外层称为表皮。表皮由角质层、颗粒层、棘层及基底层构成,其中角质层位于皮肤表并且基底层为表皮的最深部分。表皮的厚度在50μm与0.2mm之间,这取决于其在身体上的位置。

[0697] 表皮下方为真皮,其明显比表皮厚。真皮主要由纤维束形式的胶原蛋白构成。胶原束尤其为血管、淋巴毛细管、腺体、神经末梢及免疫活性细胞提供支持。

[0698] 皮肤作为器官的主要功能之一是调节物质进入体内。皮肤的主要渗透障壁由角质层提供,角质层由处于各种分化状态的多层细胞形成。角质层中的细胞间的空隙用不同的脂质填充,这些脂质以网格状形式排列,提供密封以进一步增强皮肤渗透性障壁。

[0699] 由皮肤提供的渗透性障壁使其对分子量大于约750Da的分子很大程度上为不可渗透的。对于较大分子穿过皮肤的渗透性障壁,必须使用除正常渗透以外的机制。

[0700] 几个因素决定皮肤对所施用的药剂的渗透性。这些因素包括经治疗的皮肤的特征、递送剂的特征、药物及递送剂与药物及皮肤之间的相互作用、所应用的药物的剂量、治疗形式及后治疗方案。为了选择性靶向表皮及真皮,有时可以配制包含一种或多种渗透增强剂的组合物,该一种或多种渗透增强剂使得药物能够渗透至预先选择的层中。

[0701] 经皮传递是用于施用脂溶性治疗剂的有价值的途径。真皮比表皮更具渗透性,因此通过磨损、烧伤或裸露的皮肤吸收快得多。增加血液流向皮肤的炎症及其他生理条件也增强经皮吸附。经由此途径的吸收可通过使用油性媒介物(涂油)或通过使用一种或多种渗透增强剂来增强。经由经皮途径递送本文所披露的组合物的其他有效方式包括皮肤的水合及控制释放局部贴片的使用。经皮途径提供递送本文所披露的组合物用于全身和/或局部疗法的潜在有效手段。

[0702] 另外,离子导入疗法(在电场影响下穿过生物膜转移离子溶质)(Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems[治疗性药物载体系统的严格评论],1991,第163页)、超声波透入疗法或超声波电渗法(使用超声波增强各种治疗剂跨越生物膜,特别是皮肤及角膜的吸收)(Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems[治疗性药物载体系统的严格评论],1991,第166页)及相对于剂量位置及在施用部位处的保留的媒介物特征的优化(Lee等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems[治疗性药物载体系统的严格评论],1991,第168页)可以是用于增强局部施用的组合物跨越皮肤及黏膜部位的转运的有用方法。

[0703] 所提供的组合物及方法也可用于体外检查各种蛋白质及基因在培养或保存的真皮组织中及动物体内的功能。因此,本发明可用于检查任何基因的功能。本发明的方法也可

在治疗上或预防上使用。例如,用于治疗已知或疑似患有以下疾病的动物:诸如牛皮癣、扁平苔癣、中毒性表皮坏死溶解、多形性红斑、基底细胞癌、鳞状细胞癌、恶性黑素瘤、佩吉特氏病(Paget's disease)、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、肺纤维化、莱姆病(Lyme disease)及皮肤的病毒、真菌及细菌感染。

[0704] 肺部递送。本文所述的任何siRNA化合物可施用至肺部系统。肺部施用可通过吸入或通过将递送装置引入肺部系统,例如通过引入可施配药物的递送装置来实现。某些实施例可使用通过吸入的肺部递送方法。药物可提供于分配器中,该分配器以足够小的形式递送药物(例如湿的或干的),以使其可被吸入。该装置可递送计量剂量的药物。受试者或另一个人可以施用药物。肺部递送不仅对直接影响肺部组织的障碍有效,并且也对影响其他组织的障碍有效。siRNA化合物可配制为用于肺部递送的液体或非液体,例如粉末、晶体或气溶胶。

[0705] 为了便于说明,此部分中的配制品、组合物及方法主要针对经修饰的siRNA化合物进行论述。然而,可理解,这些配制品、组合物及方法可用其他siRNA化合物(例如未修饰的siRNA化合物)加以实践,并且此类实践在本发明内。包括siRNA化合物,例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物(例如前体,例如可加工成ssiRNA化合物的较大siRNA化合物,或编码siRNA化合物(例如双链siRNA化合物或ssiRNA化合物或其前体)的DNA)的组合物可通过肺部递送施用受试者。肺部递送组合物可通过患者吸入分散体来递送,使得分散体内的组合物(例如iRNA)可到达肺,在此处其可容易地通过肺泡区直接吸收至血液循环中。肺部递送对于全身递送及治疗肺病的局部递送可以是有效的。

[0706] 肺部递送可通过不同方法来实现,包括使用基于雾化、气溶胶化、微胞化及干燥粉末的配制品。递送可通过液体喷雾器、基于气溶胶的吸入器及干粉分散装置来实现。可使用计量剂量装置。使用雾化器或吸入器的好处之一是将污染的可能性降至最低,因为这些装置为独立的。举例而言,干粉分散装置递送可容易地配制为干粉的药物。iRNA组合物可作为冻干或喷雾干燥粉末单独或与适合的粉末载体组合稳定地储存。用于吸入的组合物的递送可通过给药定时组件来介导,其可以包括定时器、剂量计数器、时间测量装置或时间指示器,当并入装置中时能够在气溶胶药物施用期间实现剂量追踪、顺应性监测和/或剂量触发患者。

[0707] 术语“粉末”意指由细分散的固体颗粒组成的组合物,这些颗粒自由流动且能够容易地分散于吸入装置中并随后由受试者吸入,使得颗粒到达肺以允许渗透至肺泡中。因此,该粉末称为“可吸入的”。例如,平均粒度为直径小于约10μm,具有相对均一的球形分布。在一些实施例中,直径小于约7.5μm且在一些实施例中小于约5.0μm。通常,粒度分布为直径在约0.1μm与约5μm之间,有时为约0.3μm至约5μm。

[0708] 术语“干燥”意指组合物的水分含量低于约10重量%(%w)水,通常低于约5%w并且在一些情况下低于约3%w。干燥组合物可使得颗粒易于分散在吸入装置中以形成气溶胶。

[0709] 术语“治疗有效量”是组合物中存在的在待治疗的受试者中提供所需水平的药物以给出预期生理反应所需的量。

[0710] 术语“生理学有效量”是递送至受试者以给出所需缓解性或治愈性效应的量。

[0711] 术语“药学上可接受的载体”意指可进入肺而对肺没有显著不良毒理作用的载体。

[0712] 可用作载体的药物赋形剂的类型包括稳定剂,诸如人类血清白蛋白(HSA);膨胀剂,诸如碳水化合物、氨基酸及多肽;pH调节剂或缓冲液;盐,诸如氯化钠;及其类似物。这些载体可呈结晶或无定形形式,或可以是两个的混合物。

[0713] 特别有价值的膨胀剂包括相容性碳水化合物、多肽、氨基酸或其组合。适合的碳水化合物包括单糖,诸如半乳糖、D-甘露糖、山梨糖及其类似物;二糖,诸如乳糖、海藻糖及其类似物;环糊精,诸如2-羟丙基-β-环糊精;及多糖,诸如棉子糖、麦芽糊精、葡聚糖及其类似物;醛醣醇,诸如甘露糖醇、木糖醇及其类似物。一组碳水化合物可以包括乳糖、海藻糖、棉子糖麦芽糊精及甘露糖醇。适合的多肽包括阿斯巴甜。氨基酸包括丙氨酸及甘氨酸,在一些实施例中使用甘氨酸。

[0714] 可以包括添加剂(其为本发明组合物的次要组分)用于喷雾干燥期间的构形稳定性及改进的粉末的分散性。这些添加剂包括疏水性氨基酸,诸如色氨酸、酪氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等。

[0715] 适合的pH调节剂或缓冲液包括由有机酸及碱制备的有机盐,诸如柠檬酸钠、抗坏血酸钠等;在一些实施例中可使用柠檬酸钠。

[0716] 微胞iRNA配制品的肺部施用可通过计量剂量喷雾装置来实现,这些装置具有推进剂,诸如四氟乙烷、七氟乙烷、二甲基氟丙烷、四氟丙烷、丁烷、异丁烷、二甲醚及其他非CFC及CFC推进剂。

[0717] 口服或经鼻递送。本文所述的任何siRNA化合物可例如以片剂、胶囊、凝胶胶囊、锭剂、糖锭或液体糖浆形式口服施用。另外,该组合物可局部施用于口腔表面。

[0718] 本文所述的任何siRNA化合物可经鼻施用。经鼻施用可通过将递送装置引入鼻中来实现,例如通过引入可施配药物的递送装置。经鼻递送的方法包括喷雾剂、气溶胶、液体(例如通过滴剂),或通过局部施用至鼻腔表面。药物可提供于分配器中,该分配器以足够小的形式递送药物(例如湿的或干的),以使其可被吸入。该装置可递送计量剂量的药物。受试者或另一个人可以施用药物。

[0719] 经鼻递送不仅对直接影响鼻组织的障碍有效,并且也对影响其他组织的障碍有效。siRNA化合物可配制为液体或非液体,例如粉末、晶体或用于经鼻递送。如本文所用,术语“结晶”描述具有晶体结构或特征的固体,即三维结构的颗粒,其中平面以特定角度相交并且其中存在规则的内部结构。本发明的组合物可具有不同的结晶型。结晶型可通过多种方法制备,包括例如喷雾干燥。

[0720] 为了便于说明,此部分中的配制品、组合物及方法主要针对经修饰的siRNA化合物进行论述。然而,可理解,这些配制品、组合物及方法可用其他siRNA化合物(例如未修饰的siRNA化合物)加以实践,并且此类实践在本发明内。口腔膜及鼻膜均提供优于其他施用途径的优点。例如,通过这些膜施用的药物快速起效,提供治疗性血浆水平,避免肝脏代谢的首过效应并且避免药物暴露于恶劣的胃肠(GI)环境。额外优点包括容易进入膜位点,从而可容易地施用、定位及移除药物。

[0721] 在口服递送中,组合物可靶向口腔表面,例如舌下黏膜,其包括舌头腹面的膜及口腔底部,或构成面颊内层的颊黏膜。舌下黏膜相对可渗透,因此许多药物具有快速吸收及可接受的生物利用度。另外,舌下黏膜方便,可接受且易于接近。

[0722] 分子渗透通过口腔黏膜的能力似乎与分子大小、脂溶性及肽蛋白电离相关。小于

1000道尔顿的小分子似乎迅速穿过黏膜。随着分子大小增加,渗透性迅速下降。脂溶性化合物比非脂溶性分子更具渗透性。当分子未电离或电荷中性时,发生最大吸收。因此带电分子对通过口腔黏膜的吸收提出最大的挑战。

[0723] iRNA的药物组合物也可通过从计量剂量喷雾分配器将如上所述的混合微胞药物配制品及推进剂喷雾至颊腔中而不吸入来施用至人类的颊腔。在一个实施例中,首先震荡分配器,随后将药物配制品及推进剂喷雾至颊腔中。例如,药物可喷雾至颊腔中或例如以液体、固体或凝胶形式直接施用至颊腔中的表面。此施用特别适用于治疗颊腔(例如牙龈或舌头)的炎症,例如在一个实施例中,颊内施用是通过从分配器,例如施配药物组合物及推进剂的计量剂量喷雾分配器喷雾至颊腔中而例如不吸入。

[0724] 本发明的一个方面也涉及将寡核苷酸通过鞘内或脑室内递送而递送至CNS中或通过眼部递送(例如玻璃体内递送)至眼组织中的方法。

[0725] 一些实施例涉及降低细胞中靶基因的表达的方法,该方法包括使所述细胞与具有一个或多个亲脂性单体的寡核苷酸接触,这些亲脂性单体含有任选地经由接头或载体与寡核苷酸缀合的亲脂性部分。在一个实施例中,细胞为CNS系统中的细胞。在一个实施例中,细胞为眼细胞。

[0726] 一些实施例涉及降低受试者体内的靶基因表达的方法,该方法包括向该受试者施用具有一个或多个亲脂性单体的寡核苷酸,这些亲脂性单体含有任选地经由接头或载体与寡核苷酸缀合的亲脂性部分。在一个实施例中,寡核苷酸缀合物是鞘内或脑室内施用(以降低脑或脊柱组织中靶基因的表达)。在一个实施例中,寡核苷酸缀合物是经眼(例如玻璃体内)施用(以降低眼组织中靶基因的表达)。

[0727] 在一些实施例中,寡核苷酸为双链的。在一个实施例中,寡核苷酸为化合物,其包含与靶基因互补的反义链以及与所述反义链互补的有义链。

[0728] 在一些实施例中,寡核苷酸为单链的。在一个实施例中,寡核苷酸为反义的。

[0729] 在一些实施例中,含有亲脂性部分的亲脂性单体位于寡核苷酸的至少一条链上的一个或多个内部位置。在一些实施例中,含有亲脂性部分的亲脂性单体位于寡核苷酸的至少一条链上的一个或多个末端位置。

[0730] 通过以下实例进一步说明本发明,这些实例不应理解为进一步限制性的。本申请通篇引用的所有参考文献、申请中的专利申请及公开专利的内容特此以引用的方式明确地并入。

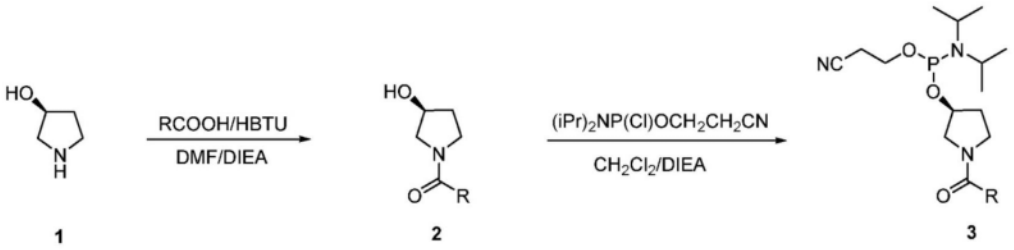
[0731] 实例

[0732] 现已总体上描述本发明,参考以下实例将更容易理解本发明,这些实例仅用于说明本发明的某些方面及实施例的目的而包括,并且不旨在限制本发明。

[0733] 实例1.亲脂性单体的合成

[0734] 合成亲脂性单体以在siRNA的不同位置(末端和/或内部位置)引入亲脂性配体(作为固体支撑物或亚磷酰胺)。可以经由羟基脯氨醇衍生物使用以下方案中所示的方法(例如,一般程序的方案1-3)来缀合多种脂质,并且可以将所得结构单元亚磷酰胺并入siRNA中。

[0735] 方案1

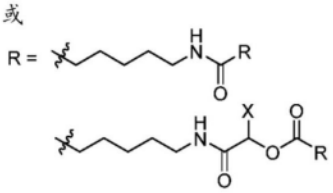


1 2 3

[0736]

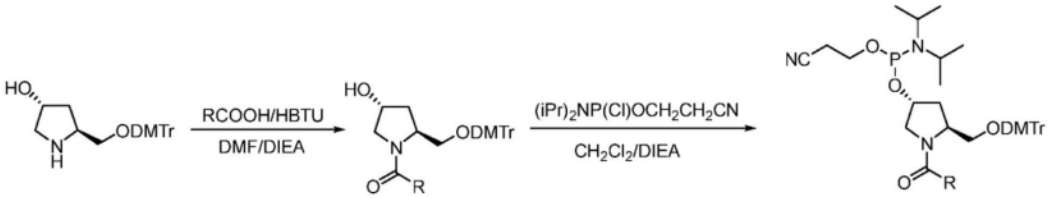
RCOOH :
(a) 癸酸 (C10)
(b) 月桂酸 (C12)
(c) 肉豆蔻酸 (C14)
(d) 棕榈酸 (C16)
(e) 硬脂酸 (C18)
(f) 山嵛酸 (C22)
(g) 油酸
(h) 亚油酸
(i) 二十二碳六烯酸

或



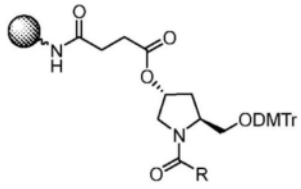
X = Me, Et, iPr,烷基

[0737] 方案2



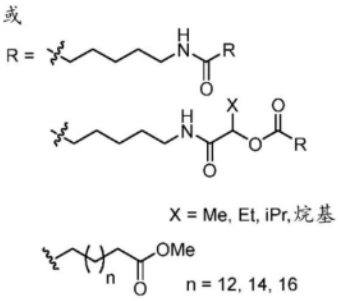
[0738]

(i) 琥珀酐 /DMAP/CH_2Cl_2
(ii) 氨基烷基 CPG/HBTU/DIEA/DMF



RCOOH :
(a) 癸酸 (C10)
(b) 月桂酸 (C12)
(c) 肉豆蔻酸 (C14)
(d) 棕榈酸 (C16)
(e) 硬脂酸 (C18)
(f) 山嵛酸 (C22)
(g) 油酸
(h) 亚油酸
(i) 二十二碳六烯酸

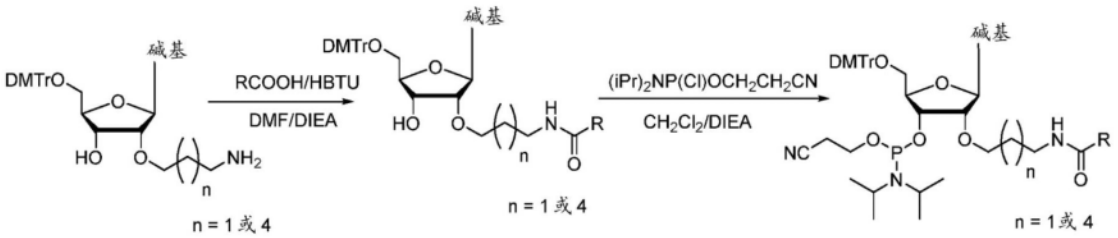
或



X = Me, Et, iPr,烷基

n = 12, 14, 16

[0739] 方案3



n = 1 或 4

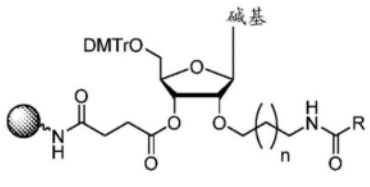
n = 1 或 4

n = 1 或 4

碱基 = $U/C^{Ac}/A^{Bz}/G^{iBu}$

(i) 琥珀酐 /DMAP/CH_2Cl_2
(ii) 氨基烷基 CPG/HBTU/DIEA/DMF

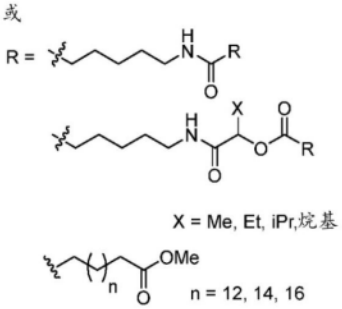
[0740]



n = 1 或 4

RCOOH :
(a) 癸酸 (C10)
(b) 月桂酸 (C12)
(c) 肉豆蔻酸 (C14)
(d) 棕榈酸 (C16)
(e) 硬脂酸 (C18)
(f) 山嵛酸 (C22)
(g) 油酸
(h) 亚油酸
(i) 二十二碳六烯酸

或

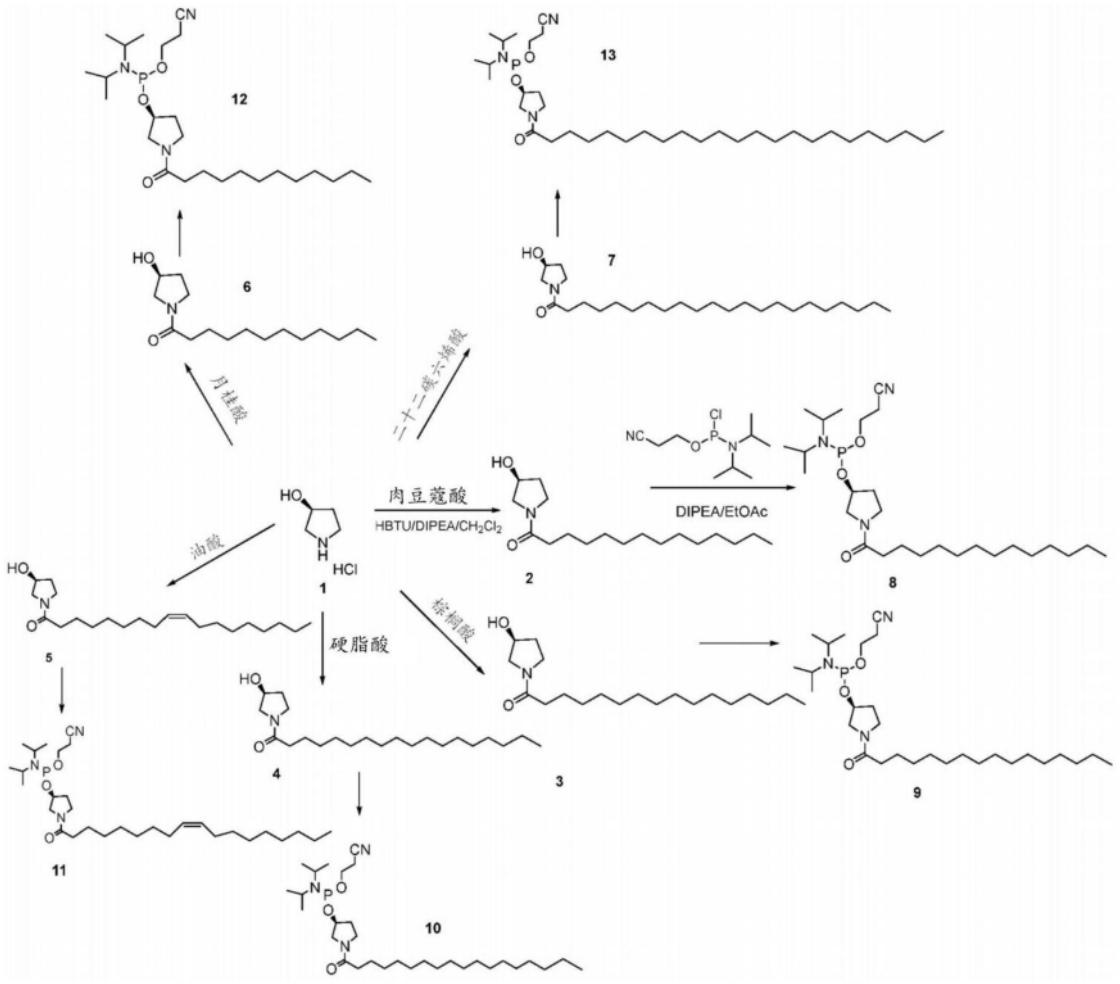


X = Me, Et, iPr,烷基

n = 12, 14, 16

[0741] 5'端脯氨醇上亲脂性缀合物的合成

[0742] 方案4

[0743] 

[0744] 化合物2:向热烘箱干燥的100mL圆底烧瓶中添加化合物1(3g,24.28mmol,1.0当量)在无水DCM(50mL)中的溶液。将十四烷酸2a(6.10g,26.70mmol,1.1当量)添加至溶液中,随后添加HBTU(10.13g,26.70mmol,1.1当量)和DIPEA(12.68mL,72.53mmol,3当量)。将所得溶液在室温下在氩气下搅拌过夜。用80%EtOAc/己烷的TLC显示产物的形成。将反应混合物用盐水溶液淬灭,并用DCM萃取。将合并的有机溶液经无水Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩至油状残余物。通过用80g硅胶柱的ISCO柱色谱法的纯化用0%-70%EtOAc/己烷洗脱化合物2。产生了白色油状化合物(7.2g)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ4.58-4.45(m,1H),3.70-3.37(m,4H),2.31-2.18(m,2H),2.09-1.87(m,3H),1.63(t,J=7.4Hz,2H),1.36-1.27(m,6H),1.25(s,14H),0.87(t,J=6.8Hz,3H)。M+1=298.3。

[0745] 化合物3:通过使用化合物1和棕榈酸以与以上合成化合物2的程序类似的程序获得化合物3。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ8.00(s,1H),3.67-3.47(m,2H),2.95(s,3H),2.87(s,3H),2.79(s,6H),2.30-2.18(m,1H),2.04(h,J=3.5Hz,1H),1.62(p,J=7.2,6.8Hz,2H),1.32-1.26(m,4H),1.24(s,11H),0.87(t,J=6.8Hz,2H)。M+1=326.4。

[0746] 化合物4:通过使用化合物1和硬脂酸以与以上合成化合物2的程序类似的程序获得化合物4。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ4.57-4.45(m,1H),3.56(dddd,J=31.4,13.1,10.0,6.5Hz,4H),2.80(s,3H),2.31-2.18(m,3H),2.04(td,J=5.8,2.9Hz,1H)),1.28(d,J=

8.1Hz,28H),0.87(t,J=6.7Hz,3H)。M+1=354.4。

[0747] 化合物5:通过使用化合物1和油酸以与以上合成化合物2的程序类似的程序获得化合物5。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ5.40-5.27(m,2H),3.67-3.46(m,4H),2.80(s,9H),2.36-2.16(m,3H),1.36-1.21(m,20H),0.91-0.83(m,3H)。M+1=352.3。

[0748] 化合物6:通过使用化合物1和月桂酸以与以上合成化合物2的程序类似的程序获得化合物6。M+1=270.3。

[0749] 化合物7:通过使用化合物1和山嵛酸以与以上合成化合物2的程序类似的程序获得化合物7。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ4.52(d,J=18.9Hz,2H),3.69-3.15(m,5H),2.32-2.18(m,2H),2.03(ddp,J=13.4,9.0,4.4Hz,2H),1.73-1.60(m,3H),1.32(t,J=9.6Hz,8H),1.25(s,25H),0.88(t,J=6.6Hz,3H)。M+1=410.4。

[0750] 化合物8:将化合物2(7.2g,24.2mmol,1当量)溶解于无水EtOAc(120mL)中。在冰浴中并在氩气下,将DIPEA(12.65mL,72.61mmol,3当量)添加至溶液中,随后添加N,N-二异丙基氨基氰基乙基膦酰胺酸-Cl(6.30g,26.61mmol,1.1当量)。将所得反应混合物在室温下搅拌过夜。TLC(以50%EtOAc/已烷)显示反应完成。将反应混合物用盐水淬灭,并用EtOAc萃取。将有机层分离,经Na_2SO_4干燥并浓缩至白色油状物。ISCO纯化用0%-50%EtOAc/已烷洗脱化合物8,产率为65%(7.71g)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ4.54(dddt,J=17.4,10.1,5.8,2.8Hz,1H),3.88-3.34(m,7H),2.66(q,J=5.7Hz,2H),2.33-2.15(m,3H),2.09(ddt,J=11.9,7.8,3.9Hz,1H),1.62-1.51(m,2H),1.38-1.25(m,20H),1.25-1.13(m,13H),0.95-0.87(m,3H)。^{31}P NMR(162MHz,CD_3CN)δ147.33,147.15,146.97,146.88。

[0751] 化合物9:使用化合物3和N,N-二异丙基氨基-氰基乙基膦酰胺酸-Cl以与以上合成化合物8的程序类似的程序获得化合物9。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ4.61-4.43(m,1H),3.87-3.70(m,2H),3.70-3.34(m,6H),2.67(t,J=5.8Hz,2H),2.33-2.14(m,3H),2.09(ddt,J=12.1,7.9,3.9Hz,1H),1.30(s,25H),1.25-1.14(m,13H),0.97-0.87(m,3H)。^{31}P NMR(162MHz,CD_3CN)δ147.33,147.15,146.97,146.88。

[0752] 化合物10:使用化合物4和N,N-二异丙基氨基-氰基乙基膦酰胺酸-Cl以与以上合成化合物8的程序类似的程序获得化合物10。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ4.66-4.40(m,1H),3.87-3.34(m,8H),2.67(t,J=5.8Hz,2H),2.30-2.16(m,3H),2.15-2.02(m,1H),1.30(s,27H),1.29-1.16(m,15H),0.95-0.87(m,3H)。^{31}P NMR(162MHz,CD_3CN)δ147.32,147.15,146.97,146.88。

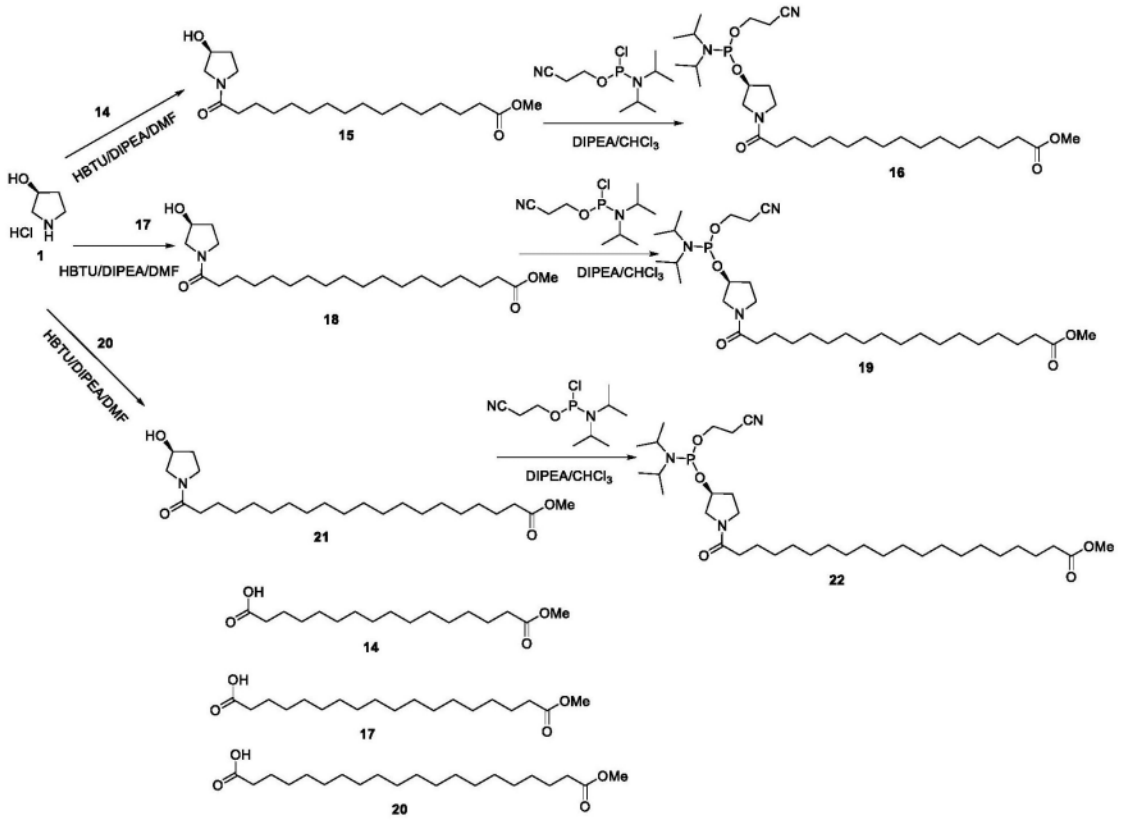
[0753] 化合物11:使用化合物5和N,N-二异丙基氨基-氰基乙基膦酰胺酸-Cl以与以上合成化合物8的程序类似的程序获得化合物11。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ5.43-5.33(m,2H),4.54(dddd,J=20.3,9.7,4.8,2.1Hz,1H),3.88-3.72(m,2H),3.72-3.34(m,6H),2.66(q,J=5.7Hz,2H),2.33-2.16(m,4H),1.42-1.28(m,21H),1.28-1.14(m,14H),0.95-0.87(m,3H)。^{31}P NMR(162MHz,CD_3CN)δ147.34,147.17,147.00,146.90。

[0754] 化合物12:使用化合物6和N,N-二异丙基氨基-氰基乙基膦酰胺酸-Cl以与以上合成化合物8的程序类似的程序获得化合物12。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ4.63-4.43(m,1H),3.88-3.70(m,2H),3.70-3.34(m,6H),2.67(t,J=5.8Hz,2H),2.33-2.15(m,5H),2.09(ddt,J=12.3,8.1,3.9Hz,1H),1.40-1.13(m,29H),0.95-0.87(m,3H)。^{31}P NMR(162MHz,CD_3CN)δ147.33,147.15,146.97,146.86。

[0755] 化合物13:使用化合物7和N,N-二异丙基氨基-氰基乙基膦酰胺酸-Cl以与以上合成化合物8的程序类似的程序获得化合物13。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ4.64-4.38(m,1H),3.86-3.70(m,2H),3.70-3.34(m,6H),2.66(q,J=5.7Hz,2H),2.32-2.15(m,3H),1.30(s,37H),1.25-1.12(m,13H),0.95-0.87(m,3H)。^{31}P NMR(162MHz,CD_3CN)δ148.29,147.33,147.19,147.01,146.94。

[0756] 5'端脯氨醇上含末端酸的亲脂性缀合物的合成

[0757] 方案5

[0758] 

[0759] 化合物15:向配备有机械搅拌器的3-L,三颈圆底烧瓶中装入化合物14(15g,49.9mmol,1当量)、HBTU(20.8g,54.9mmol)和无水DMF(350mL)。将混合物搅拌30分钟以溶解原材料,然后在室温下在剧烈搅拌的同时滴加DIPEA(17.3mL,99.8mmol)。将混合物在室温下搅拌1.5小时并且然后冷却至0℃。在0℃下,将(S)-3-吡咯烷醇1(6.78g,54.9mmol)和DIPEA(17.3mL,99.8mmol)在DMF(110mL)中的混合物经30分钟滴加至反应混合物中,并且然后温热至室温。将反应混合物在室温下搅拌12小时。通过TLC(5%MeOH/乙酸乙酯或50%乙酸乙酯/己烷)监测反应进程。将反应混合物冷却至0-5℃并用水(1.5L)稀释,搅拌30分钟,并且然后过滤以收集棕色固体化合物15,将其通过柱色谱法纯化以获得呈浅棕色固体的化合物15(17g,92%产率)。^{1}H NMR(600MHz,$CDCl_3$):δ4.52(d,1H,J=30Hz);3.66(s,3H);3.60-3.51(m,2H);3.41(d,1H,12Hz);2.34-2.20(m,4H);2.07-2.01(m,4H);1.68-1.56(m,4H);1.36-1.20(m,20H)。

[0760] 化合物16:在氩气下,向烘箱干燥的500mL单颈圆底烧瓶中装入化合物15(8g,21.6mmol,1当量)和氯仿(100mL)。将反应混合物冷却至0℃,并且然后在0℃下,添加DIPEA,随后滴加2-氰基乙基-N,N-二异丙基-氯亚磷酰胺(5.31mL,23.8mmol)。

[0761] 将反应混合物缓慢温热至室温并搅拌3小时。通过TLC监测反应进程。将反应混合物冷却至0℃,用MeOH(3ml)淬灭,搅拌30分钟,并且然后浓缩以获得粗产物16,将其通过硅胶柱色谱法纯化。将纯级分合并,并浓缩以获得呈粘稠浆状物的化合物16(4.38g,36%产率)。^{1}H NMR(600MHz,CD_3CN):δ4.58-4.45(m,1H);4.08-3.93(m,2H);3.82-3.68(m,2H);3.65(s,3H);3.27-3.20(m,1H);2.72-2.59(m,4H);2.27(t,J=6Hz,2H);1.94-1.93(m,4H);1.58-1.48(m,6H);1.33-1.21(m,20H);1.19-1.14(m,12H)。^{31}P NMR(243MHz,CD_3CN):147.34,147.16,146.99,146.89。

[0762] 化合物18:向配备有机械搅拌器的3-L,三颈圆底烧瓶中装入化合物17(14g,42.6mmol,1当量)、HBTU(17.8g,46.9mmol)和无水DMF(330mL)。将混合物搅30分钟以溶解固体,并且然后在室温下在剧烈搅拌的同时滴加DIPEA(14.8mL,85.2mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1.5小时并且然后冷却至0℃。在0℃下,将(S)-3-吡咯烷醇1(5.79g,46.9mmol)和DIPEA(14.8mL,85.2mmol)在无水DMF(125mL)中的混合物经30分钟滴加至反应混合物中。将混合物温热至室温并搅拌18小时。通过TLC(5%MeOH/乙酸乙酯)监测反应进程。将混合物冷却至0-5℃,用水(1.5L)缓慢淬灭,搅拌30分钟,并且然后过滤以收集棕色固体化合物18。将粗产物通过柱色谱法纯化以获得呈浅棕色固体的化合物18(16.1g,95%产率)。^{1}H NMR(600MHz,$CDCl_3$):δ4.53(d,1H,J=30Hz);3.66(s,3H);3.60-3.49(m,2H);3.41(d,1H,12Hz);2.33-2.21(m,4H);2.04-2.03(m,4H);1.64-1.58(m,4H);1.33-1.22(m,24H)。

[0763] 化合物19:在氩气下,向烘箱干燥的500mL单颈圆底烧瓶中装入化合物18(13g,32.6mmol,1当量)和氯仿(130mL)。将混合物冷却至0℃并添加催化量的DMAP和DIPEA(17.1mL,98.0mmol,3当量),随后经15分钟的时间段滴加2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(8.02mL,35.9mmol)。将反应混合物温热至室温并搅拌5小时。通过TLC(5%MeOH/乙酸乙酯)监测反应进程。将混合物冷却至0℃,用MeOH(7ml)淬灭,搅拌1小时,并且然后浓缩以获得粗产物19。将粗产物通过硅胶柱色谱法纯化。将纯级分合并,浓缩,并在高真空下干燥以获得呈粘稠浆状物的化合物19(10.17g,52%产率)。^{1}H NMR(600MHz,CD_3CN):δ4.58-4.45(m,1H);4.08-3.93(m,2H);3.82-3.68(m,2H);3.65(s,3H);3.27-3.20(m,1H);2.72-2.59(m,4H);2.27(t,J=6Hz,2H);1.94-1.93(m,4H);1.58-1.48(m,6H);1.33-1.21(m,20H);1.19-1.14(m,12H)。^{31}P NMR(243MHz,CD_3CN):147.4,147.3,147.2,147.0,146.9。

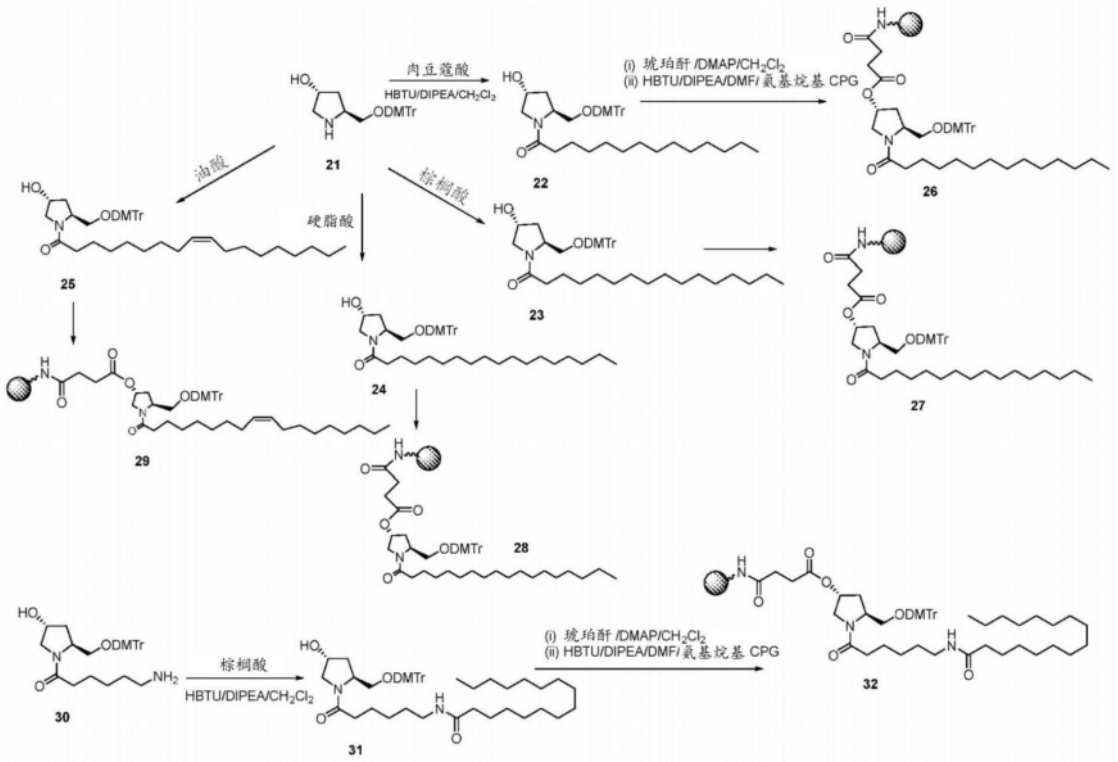
[0764] 化合物21:向配备有机械搅拌器的3-L,三颈圆底烧瓶中装入化合物20(15g,35.2mmol,1当量)、HBTU(14.7g,38.7mmol)和DMF(600mL)。将混合物搅拌30分钟以溶解固体,并在室温下在剧烈搅拌的同时滴加DIPEA(12.3mL,70.5mmol)。将反应混合物在室温下搅拌1.5小时并且然后冷却至0℃。在0℃下,将(S)-3-吡咯烷醇1(4.79g,38.7mmol)和DIPEA(12.3mL,70.5mmol)在无水DMF(110mL)中的混合物经30分钟滴加至反应混合物中,并且然后温热至室温。将反应混合物在室温下搅拌15小时。通过TLC(5%MeOH/乙酸乙酯)监测反应进程。将混合物冷却至0-5℃,用水(1.5L)缓慢淬灭,搅拌1.5小时,并且然后过滤以收集棕色固体化合物21,将其通过柱色谱法纯化以获得呈浅棕色固体的化合物21(16.1g,90%产率)。^{1}H NMR(600MHz,$CDCl_3$):δ4.52(d,1H,J=30Hz);3.66(s,3H);3.62-3.51(m,2H);3.39(d,1H,12Hz);2.31-2.19(m,4H);2.06-2.02(m,4H);1.62-1.55(m,4H);1.31-1.26(m,28H)。

[0765] 化合物22:在氩气下,向烘箱干燥的500mL单颈圆底烧瓶中装入化合物21(16g,37.6mmol,1当量)和氯仿(200mL)。将混合物冷却至0℃并添加催化量的DMAP和DIPEA

(14.4mL,83.0mmol,3当量),随后经15分钟的时间段滴加2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(6.78mL,30.4mmol)。将反应混合物温热至室温并搅拌4小时。通过TLC(5%MeOH/乙酸乙酯)监测反应进程。将混合物冷却至0℃,用MeOH(7ml)淬灭,搅拌30分钟,并且然后浓缩以获得粗产物6,将其通过硅胶柱色谱法纯化。将纯级分合并,浓缩,并在高真空下干燥以获得呈粘稠浆状物的化合物22(9.7g,41%产率)。^{1}H NMR(600MHz,CDCN):δ4.58-4.55(m,1H);4.08-3.93(m,2H);3.83-3.67(m,2H);3.65(m,4H);2.68-2.59(m,4H);2.27(t,J=6Hz,2H);1.97-1.91(m,4H);1.60-1.49(m,6H);1.33-1.21(m,28H);1.19-1.14(m,12H)。^{31}P NMR(243MHz,CD_3CN):147.34,147.16,146.99,146.90。

[0766] 3'端脯氨醇上亲脂性缀合物的合成

[0767] 方案6

[0768] 

[0769] 化合物22:使用化合物21和肉豆蔻酸在标准肽偶联条件下在CH_2Cl_2中合成化合物22。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ7.35-7.26(m,6H),7.25-7.15(m,7H),6.90-6.83(m,6H),4.97(d,J=4.0Hz,1H),4.39(dd,J=8.8,4.3Hz,1H),4.28(dd,J=9.6,4.4Hz,1H),4.18-4.08(m,1H),3.73(s,9H),3.57(dt,J=10.2,5.1Hz,1H),3.35-3.30(m,4H),3.28-3.20(m,1H),3.17(dd,J=8.8,5.0Hz,1H),3.01-2.94(m,2H),2.69(s,9H),2.25-2.16(m,2H),2.10-2.05(m,2H),1.83(ddd,J=12.8,8.4,4.7Hz,1H),1.51-1.40(m,2H),1.20(d,J=18.9Hz,30H),0.90-0.81(m,5H)。

[0770] 化合物23:使用化合物21和棕榈酸在标准肽偶联条件下在CH_2Cl_2中合成化合物23。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ7.36-7.24(m,7H),7.24-7.15(m,8H),6.91-6.81(m,7H),4.97(s,1H),4.39(t,J=4.8Hz,1H),4.20-4.07(m,2H),3.71(d,J=12.4Hz,10H),3.57(dt,J=10.5,5.3Hz,1H),3.38-3.28(m,4H),3.18(dd,J=8.8,5.0Hz,1H),3.02-2.94(m,2H),2.71-2.64(m,14H),2.20(t,J=7.4Hz,2H),2.02-1.96(m,4H),1.46(q,J=7.1Hz,2H),1.30-1.20(m,33H),0.84(t,J=6.6Hz,5H)。

[0771] 化合物24:使用化合物21和硬脂酸在标准肽偶联条件下在CH_2Cl_2中合成化合物24。^1H NMR(400MHz,DMSO)δ7.35-7.25(m,6H),7.23-7.15(m,8H),6.90-6.83(m,6H),4.97(d,J=4.0Hz,1H),4.42-4.36(m,1H),4.18-4.11(m,1H),3.72(s,9H),3.57(dt,J=10.1,5.1Hz,1H),3.45(dd,J=12.1,3.9Hz,1H),3.24(dd,J=12.1,5.6Hz,1H),3.18(dd,J=8.8,5.0Hz,1H),3.02-2.95(m,2H),2.69(s,14H),2.20(t,J=7.4Hz,2H),2.04-1.96(m,2H),1.52-1.43(m,2H),1.30-1.14(m,40H),0.84(t,J=6.7Hz,4H)。

[0772] 化合物25:使用化合物21和油酸在标准肽偶联条件下在CH_2Cl_2中合成化合物25。^1H NMR(400MHz,DMSO)δ7.36-7.24(m,6H),7.24-7.15(m,7H),6.90-6.83(m,6H),5.35-5.26(m,3H),4.97(d,J=3.9Hz,1H),4.39(d,J=5.3Hz,1H),4.20-4.07(m,2H),3.71(d,J=12.7Hz,9H),3.57(dt,J=8.8,4.4Hz,1H),3.17(dd,J=8.9,5.1Hz,1H),3.02-2.94(m,2H),2.67(d,J=13.5Hz,13H),2.22-2.16(m,2H),2.02-1.92(m,7H),1.47(t,J=7.1Hz,2H),1.25(t,J=11.6Hz,26H),0.83(td,J=6.4,2.1Hz,4H)。

[0773] 化合物26:向化合物22(5.67g,9.00mmol)在无水二氯甲烷(86.26mL)中的溶液中添加DMAP(1.10g,9.00mmol)和琥珀酐(1.80g,18.00mmol)。将混合物冷却至0℃,并滴加三乙胺(3.76mL,27.01mmol)。将反应混合物在室温下搅拌18小时,此时显示不存在原材料(DCM中5%MeOH中的5%Et_3N)。将混合物在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用DCM中0%-5%MeOH的梯度)纯化,以获得4.91g的琥珀酸酯(75%产率)。向琥珀酸酯(4.91g,6.73mmol)在无水DMF(331.64mL)中的溶液中添加DIPEA(4.69mL,26.91mmol),并且然后搅拌直至完全溶解。将HBTU(2.68g,7.06mmol)添加至混合物中并搅拌5分钟。将可控孔度玻璃(CPG)(152μmol/g,48.68g,7.40mmol)添加至混合物中。将圆瓶烧瓶盖上橡胶隔片,牢固地封上封口膜,并且然后在机械振荡器上振荡过夜。将混合物在真空下通过烧结玻璃漏斗(glass fritted funnel)过滤,并用乙腈、甲醇、乙腈和乙醚(300mL)平行冲洗。弃去滤液,并将经过滤的材料在玻璃料上真空干燥20分钟。将经过滤的材料放回原始的烧瓶中并在高真空下干燥过夜。通过UV-Vis和比尔定律在Beckman Coulter分光光度计上检查固体支撑物上的材料负载。将固体支撑材料称重(53.5mg)并溶解于250mL容量瓶中的乙腈中的0.1M对甲苯磺酸中。将混合物超声处理并静置1小时。将机器用相同的溶剂进行空白处理,并一式三份测量溶液在411nm处的UV吸光度。将剩余的固体支撑材料用吡啶中的30%乙酸酐和1%Et_3N(325mL)加盖。将烧瓶加盖并封上封口膜,并且然后在机械振荡器上振荡3小时。将混合物在真空下在烧结玻璃漏斗上过滤并按以下顺序洗涤:THF中10%H_2O、MeOH、THF中10%H_2O、MeOH、ACN和二乙醚(各300mL)。弃去滤液,并将固体支撑材料在玻璃料上在真空下干燥。将固体支撑材料转移至圆底烧瓶中,并且然后在高真空下干燥过夜,以获得化合物26(48.96g,106.92μmol/g负载)。

[0774] 化合物27:向化合物23(5.10g,7.75mmol)在无水二氯甲烷(74.28mL)中的溶液中添加DMAP(947mg,7.75mmol)和琥珀酐(1.55g,15.50mmol)。将混合物冷却至0℃,并滴加三乙胺(3.24mL,23.26mmol)。将反应混合物在室温下搅拌18小时,此时显示不存在原材料(DCM中5%MeOH中的5%Et_3N)。将混合物在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用DCM中0%-5%MeOH的梯度)纯化,以获得3.85g的琥珀酸酯(65%产率)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.36-7.24(m,6H),7.20(ddd,J=8.9,6.0,3.1Hz,7H),6.87(ddd,J=8.9,5.2,2.4Hz,6H),5.36(t,J=4.4Hz,1H),4.20(dq,J=9.2,4.7,4.2Hz,1H),3.73(s,

10H),3.55(dd,J=11.4,3.0Hz,1H),3.24(dd,J=9.0,4.6Hz,1H),3.03(ddd,J=20.0,9.9,3.9Hz,2H),2.66(q,J=7.2Hz,2H),2.49-2.41(m,5H),2.19(ddp,J=22.3,9.0,5.1,4.6Hz,4H),2.06-1.91(m,1H),1.50-1.41(m,2H),1.30-1.14(m,32H),1.01(t,J=7.2Hz,2H),0.84(t,J=6.8Hz,4H)。向琥珀酸酯(3.85g,5.08mmol)在无水DMF(250.42mL)中的溶液中添加DIPEA(3.54mL,20.32mmol),并且然后搅拌直至完全溶解。将HBTU(2.02g,5.33mmol)添加至混合物中并搅拌5分钟。将可控孔度玻璃(CPG)(152μmol/g,36.77g,5.59mmol)添加至混合物中。将圆瓶烧瓶盖上橡胶隔片,牢固地封上封口膜,并且然后在机械振荡器上振荡过夜。将混合物在真空下通过烧结玻璃漏斗(glass fritted funnel)过滤,并用乙腈、甲醇、乙腈和乙醚(300mL)平行冲洗。弃去滤液,并将经过滤的材料在玻璃料上真空干燥20分钟。将经过滤的材料放回原始的烧瓶中并在高真空下干燥过夜。通过UV-Vis和比尔定律在Beckman Coulter分光光度计上检查固体支撑物上的材料负载。将固体支撑材料称重(59.7mg)并溶解于250mL容量瓶中的乙腈中的0.1M对甲苯磺酸中。将混合物超声处理并静置1小时。将机器用相同的溶剂进行空白处理,并一式三份测量溶液在411nm处的UV吸光度。将剩余的固体支撑材料用吡啶中的30%乙酸酐和1%Et_3N(325mL)加盖。将烧瓶加盖并封上封口膜,并且然后在机械振荡器上振荡3小时。将混合物在真空下在烧结玻璃漏斗上过滤并按以下顺序洗涤:THF中10%H_2O、MeOH、THF中10%H_2O、MeOH、ACN和二乙醚(各300mL)。弃去滤液,并将固体支撑材料在玻璃料上在真空下干燥。将固体支撑材料转移至圆底烧瓶中,并在高真空下干燥过夜,以获得化合物27(38.53g,112.87μmol/g负载)。

[0775] 化合物28:向化合物24(5.53g,8.06mmol)在无水二氯甲烷(77.24mL)中的溶液中添加DMAP(984mg,8.06mmol)和琥珀酐(1.61g,16.12mmol)。将混合物冷却至0℃,并滴加三乙胺(3.37mL,24.18mmol)。将反应混合物在室温下搅拌18小时,此时显示不存在原材料(DCM中5%MeOH中的5%Et_3N)。将混合物在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用DCM中0%-5%MeOH的梯度)纯化,以获得5.18g的琥珀酸酯(81%)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ8.13-8.08(m,1H),7.37-7.24(m,6H),7.20(ddd,J=9.1,6.2,3.3Hz,7H),6.87(ddd,J=8.7,5.1,2.4Hz,6H),6.63-6.57(m,1H),5.39-5.32(m,1H),4.24-4.15(m,2H),3.73(s,10H),3.55(dd,J=11.6,3.0Hz,1H),3.23(dd,J=9.0,4.6Hz,1H),3.09-2.97(m,2H),2.96(s,4H),2.78(q,J=7.2Hz,1H),2.49-2.43(m,6H),2.26-2.11(m,4H),2.09-1.91(m,1H),1.45(q,J=7.1Hz,2H),1.22(d,J=4.9Hz,36H),1.06(t,J=7.2Hz,1H),0.84(t,J=6.8Hz,4H)。向琥珀酸酯(5.18g,6.59mmol)在无水DMF(324.91mL)中的溶液中添加DIPEA(4.59mL,26.36mmol),并且搅拌直至完全溶解。将HBTU(2.62g,6.92mmol)添加至混合物中并搅拌5分钟。将可控孔度玻璃(CPG)(152μmol/g,47.69g,7.25mmol)添加至混合物中。将圆瓶烧瓶盖上橡胶隔片,牢固地封上封口膜,并且然后在机械振荡器上振荡过夜。将混合物在真空下通过烧结玻璃漏斗(glass fritted funnel)过滤,并用乙腈、甲醇、乙腈和乙醚(300mL)平行冲洗。弃去滤液,并将经过滤的材料在玻璃料上真空干燥20分钟。将经过滤的材料放回原始的烧瓶中并在高真空下干燥过夜。通过UV-Vis和比尔定律在Beckman Coulter分光光度计上检查固体支撑物上的材料负载。将固体支撑材料称重(54.0mg)并溶解于250mL容量瓶中的乙腈中的0.1M对甲苯磺酸中。将混合物超声处理并静置1小时。将机器用相同的溶剂进行空白处理,并一式三份测量溶液在411nm处的UV吸光度。将剩余的固体支撑材料用吡啶中的30%乙酸酐和1%Et_3N(325mL)加盖。将烧瓶加盖并封上封口膜并且然

后在机械振荡器上振荡3小时。将混合物在真空下在烧结玻璃漏斗上过滤并按以下顺序洗涤:THF中10％H_2O、MeOH、THF中10％H_2O、MeOH、ACN和二乙醚(各300mL)。弃去滤液,并将固体支撑材料在玻璃料上在真空下干燥。将固体支撑材料转移至圆底烧瓶中,并在高真空下干燥过夜,以获得化合物28(50.60g,108.88μmol/g负载)。

[0776] 化合物29:向化合物25(5.19g,7.59mmol)在无水二氯甲烷(72.71mL)中的溶液中添加DMAP(927mg,7.59mmol)和琥珀酐(1.52g,15.18mmol)。将混合物冷却至0℃,并滴加三乙胺(3.37mL,24.18mmol)。将反应混合物在室温下搅拌18小时,此时显示不存在原材料(DCM中5％MeOH中的5％Et_3N)。将混合物在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用DCM中0％-5％MeOH的梯度)纯化,以获得5.47g的化合物3d(R＝$C_{18}H_{33}$)(92％)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.37-7.25(m,4H),7.25-7.15(m,5H),6.91-6.81(m,4H),5.39-5.21(m,3H),4.24-4.14(m,1H),3.73(s,6H),3.23(dd,J＝9.1,4.6Hz,1H),3.07-2.97(m,1H),2.58(q,J＝7.2Hz,1H),2.49-2.41(m,4H),2.26-2.13(m,2H),1.97(q,J＝6.9,6.4Hz,4H),1.45(q,J＝6.9Hz,1H),1.24(d,J＝9.3Hz,19H),0.99(t,J＝7.2Hz,2H),0.83(td,J＝6.9,1.9Hz,3H)。向琥珀酸酯(5.47g,6.98mmol)在无水DMF(343.98mL)中的溶液中添加DIPEA(4.86mL,27.91mmol),然后搅拌直至完全溶解。将HBTU(2.78g,7.33mmol)添加至混合物中并搅拌5分钟。将可控孔度玻璃(CPG)(152μmol/g,50.46g,7.67mmol)添加至混合物中。将圆瓶烧瓶盖上橡胶隔片,牢固地封上封口膜,并且然后在机械振荡器上振荡过夜。将混合物在真空下通过烧结玻璃漏斗(glass fritted funnel)过滤,并用乙腈、甲醇、乙腈和乙醚(300mL)平行冲洗。弃去滤液,并将经过滤的材料在玻璃料上真空干燥20分钟。将经过滤的材料放回原始的烧瓶中并在高真空下干燥过夜。通过UV-Vis和比尔定律在Beckman Coulter分光光度计上检查固体支撑物上的材料负载。称取固体支撑材料(52.7mg),并将其溶解于250mL容量瓶中的乙腈中的0.1M对甲苯磺酸中。将混合物超声处理并静置1小时。将机器用相同的溶剂进行空白处理,并一式三份测量溶液在411nm处的UV吸光度。将剩余的固体支撑材料用吡啶中的30％乙酸酐和1％Et_3N(325mL)加盖。将烧瓶加盖并封上封口膜并且然后在机械振荡器上振荡3小时。将混合物在真空下在烧结玻璃漏斗上过滤并按以下顺序洗涤:THF中10％H_2O、MeOH、THF中10％H_2O、MeOH、ACN和二乙醚(各300mL)。弃去滤液,并将固体支撑材料在玻璃料上在真空下干燥。将固体支撑材料转移至圆底烧瓶中,并在高真空下干燥过夜,以获得化合物29(51.63g,106.29μmol/g负载)。

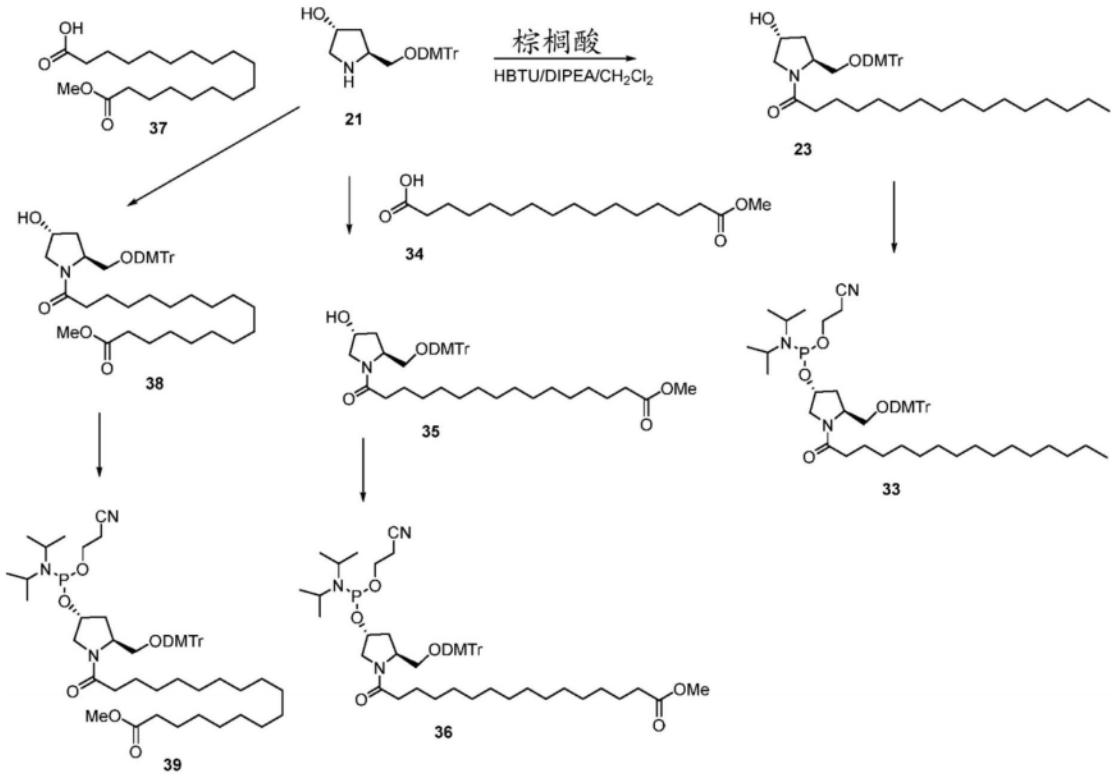
[0777] 化合物31:使用化合物30和棕榈酸在标准肽偶联条件下在CH_2Cl_2中合成化合物31。

[0778] 化合物32:向化合物31(4.90g,6.35mmol)在无水二氯甲烷(60.89mL)中的溶液中添加DMAP(776mg,6.35mmol)和琥珀酐(1.27g,12.71mmol)。将混合物冷却至0℃,并滴加三乙胺(2.66mL,19.06mmol)。将反应混合物在室温下搅拌18小时,此时显示不存在原材料(DCM中5％MeOH中的5％Et_3N)。将混合物在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用DCM中0％-10％MeOH的梯度)纯化,以获得4.34g的琥珀酸酯(78％)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.68(q,J＝5.5Hz,2H),7.35-7.25(m,6H),7.19(ddt,J＝8.9,6.2,2.9Hz,8H),6.90-6.81(m,6H),5.38-5.31(m,1H),4.18(d,J＝4.5Hz,1H),3.72(s,9H),3.53(dd,J＝11.3,3.2Hz,1H),3.21(dd,J＝9.0,4.7Hz,1H),3.04-2.90(m,12H),2.48-2.42(m,5H),2.28-2.08(m,4H),2.08-1.97(m,4H),1.40(dq,J＝31.8,7.0Hz,7H),1.32-1.16(m,42H),1.14(t,J＝7.2Hz,9H),0.83(t,J＝6.6Hz,4H)。向琥珀酸酯(4.34g,4.98mmol)在无水

DMF(245.63mL)中的溶液中添加DIPEA(3.74mL,19.93mmol),然后搅拌直至完全溶解。将HBTU(1.98g,5.23mmol)添加至混合物中并搅拌5分钟。将可控孔度玻璃(CPG)(152μmol/g,36.05g,5.48mmol)添加至混合物中。将圆瓶烧瓶盖上橡胶隔片,牢固地封上封口膜,并且然后在机械振荡器上振荡过夜。将混合物在真空下通过烧结玻璃漏斗(glass fritted funnel)过滤,并用乙腈、甲醇、乙腈和乙醚(300mL)平行冲洗。弃去滤液,并将经过滤的材料在玻璃料上真空干燥20分钟。将经过滤的材料放回原始的烧瓶中并在高真空下干燥过夜。通过UV-Vis和比尔定律在Beckman Coulter分光光度计上检查固体支撑物上的材料负载。将固体支撑材料称重(52.6mg)并溶解于250mL容量瓶中的乙腈中的0.1M对甲苯磺酸中。将混合物超声处理并静置1小时。将机器用相同的溶剂进行空白处理,并一式三份测量溶液在411nm处的UV吸光度。将剩余的固体支撑材料用吡啶中的30%乙酸酐和1%Et_3N(325mL)加盖。将烧瓶加盖并封上封口膜,并且然后在机械振荡器上振荡3小时。将混合物在真空下在烧结玻璃漏斗上过滤并按以下顺序洗涤:THF中10%H_2O、MeOH、THF中10%H_2O、MeOH、CAN和二乙醚(各300mL)。弃去滤液,并将固体支撑材料在玻璃料上在真空下干燥。将固体支撑材料转移至圆底烧瓶中,并在高真空下干燥过夜,以获得化合物32(37.59g,80.09μmol/g负载)。

[0779] 3'端脯氨醇上含末端酸的亲脂性缀合物的合成

[0780] 方案7

[0781] 

[0782] 化合物23:将棕榈酸(12.22g,47.67mmol)和HBTU(19.89g,52.44mmol)在无水二氯甲烷中的溶液冷却至0℃。将DIPEA(24.91mL,143.02mmol)滴加至溶液中。搅拌5分钟后,将化合物21(20g,47.67mmol)添加至反应中。将混合物在室温下搅拌24小时,此时显示不存在原材料(己烷中的60%EtOAc)。将反应混合物用DCM稀释并用饱和$NaHCO_3$水溶液进行标准水性后处理。将有机层合并,用饱和NaCl水溶液洗涤,经无水硫酸钠干燥,并在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用己烷中的0%-50%EtOAc的梯度)纯化,以

获得28.01g的化合物23(89%产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.36-7.26(m,5H),7.23-7.16(m,6H),6.90-6.83(m,5H),4.96(d,J=4.1Hz,1H),4.39(q,J=4.5Hz,1H),4.18-4.07(m,2H),3.73(s,8H),3.58(dd,J=10.6,5.1Hz,1H),3.17(dd,J=8.9,5.0Hz,1H),3.02-2.94(m,2H),2.69(s,12H),2.20(t,J=7.4Hz,2H),2.06-1.90(m,2H),1.83(ddd,J=12.9,8.5,4.7Hz,1H),1.46(q,J=7.3Hz,2H),1.30-1.16(m,28H),0.87-0.81(m,4H)。

[0783] 化合物33:在反应前,将化合物23(9.57g,14.55mmol)用乙腈共蒸发两次,并且然后在高真空下干燥过夜。将化合物23溶解于无水二氯甲烷(169.75mL)中,并滴加DIPEA(7.60mL,43.64mmol)和1-甲基咪唑(579.7uL,7.27mmol)。将混合物冷却至0℃并滴加氯-2-氰基乙氧基-N,N-二异丙基氨基膦(3.90mL,17.46mmol)。将混合物在室温下搅拌2小时。通过TLC(EtOAc中的60%己烷)检查反应混合物,并在减压下去除溶剂。将残余物重悬于EtOAc中并用饱和$NaHCO_3$水溶液快速进行水性后处理。将有机层合并,用饱和NaCl水溶液洗涤,经无水硫酸钠干燥,并在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用己烷中的0%-30%EtOAc的梯度)纯化,以获得10.11g的化合物33($C_{16}H_{31}$)(81%产率)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ7.39(ddd,J=8.1,4.0,1.4Hz,3H),7.32-7.18(m,11H),6.88-6.79(m,6H),4.69(td,J=9.1,4.7Hz,1H),4.20(ddq,J=7.6,4.9,2.5Hz,1H),3.76(s,12H),3.59(ddt,J=13.5,11.3,6.8Hz,4H),3.33(ddd,J=14.7,9.1,4.6Hz,1H),3.02(td,J=8.9,3.0Hz,1H),2.62(tq,J=6.0,4.1Hz,3H),2.29-2.19(m,3H),1.54(t,J=7.3Hz,2H),1.33-1.21(m,35H),1.20-1.11(m,20H),0.91-0.84(m,4H)。^{31}P NMR(162MHz,CD_3CN)δ148.28,147.41,147.37,147.23,147.19,146.85,146.82。

[0784] 化合物35:将甲酯脂质羧酸34(2.15g,7.15mmol)和HBTU(2.98g,7.87mmol)在无水二氯甲烷中的溶液冷却至0℃。将DIPEA(3.74mL,21.45mmol)滴加至溶液中。搅拌5分钟后,将化合物21(3g,7.15mmol)添加至反应中。将混合物在室温下搅拌24小时,此时显示不存在原材料(己烷中的60%EtOAc)。将反应混合物用DCM稀释并用饱和$NaHCO_3$水溶液进行标准水性后处理。将有机层合并,用饱和NaCl水溶液洗涤,经无水硫酸钠干燥,并在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用己烷中的0%-62%EtOAc的梯度)纯化,以获得4.04g的化合物35(80%产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.35-7.25(m,7H),7.24-7.15(m,8H),6.90-6.83(m,6H),4.95(d,J=4.0Hz,1H),4.42-4.35(m,1H),4.20-4.07(m,2H),3.73(s,9H),3.57(s,5H),3.27-3.15(m,2H),2.98(dt,J=8.9,4.5Hz,2H),2.69(s,9H),2.27(t,J=7.4Hz,3H),2.23-2.17(m,2H),2.04-1.96(m,2H),1.87-1.79(m,1H),1.53-1.43(m,5H),1.22(d,J=5.9Hz,31H)。

[0785] 化合物36:在反应前,将化合物35(4.04g,5.76mmol)用乙腈共蒸发两次,并且然后在高真空下干燥过夜。将化合物35溶解于无水二氯甲烷(66.94mL)中,并滴加DIPEA(3.01mL,17.27mmol)和1-甲基咪唑(458.7uL,5.76mmol)。将混合物冷却至0℃并滴加氯-2-氰基乙氧基-N,N-二异丙基氨基膦(1.54mL,6.91mmol)。将混合物在室温下搅拌1.5小时。通过TLC(EtOAc中的60%己烷)检查反应混合物并在减压下去除溶剂。将残余物重悬于EtOAc中并用饱和$NaHCO_3$水溶液快速进行水性后处理。将有机层合并,用饱和NaCl水溶液洗涤,经无水硫酸钠干燥,并在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用己烷中的0%-30%EtOAc的梯度)纯化,以获得4.09g的化合物36(79%)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ7.39(ddd,J=8.2,4.0,1.4Hz,6H),7.33-7.15(m,20H),6.88-6.79(m,11H),4.69(d,J

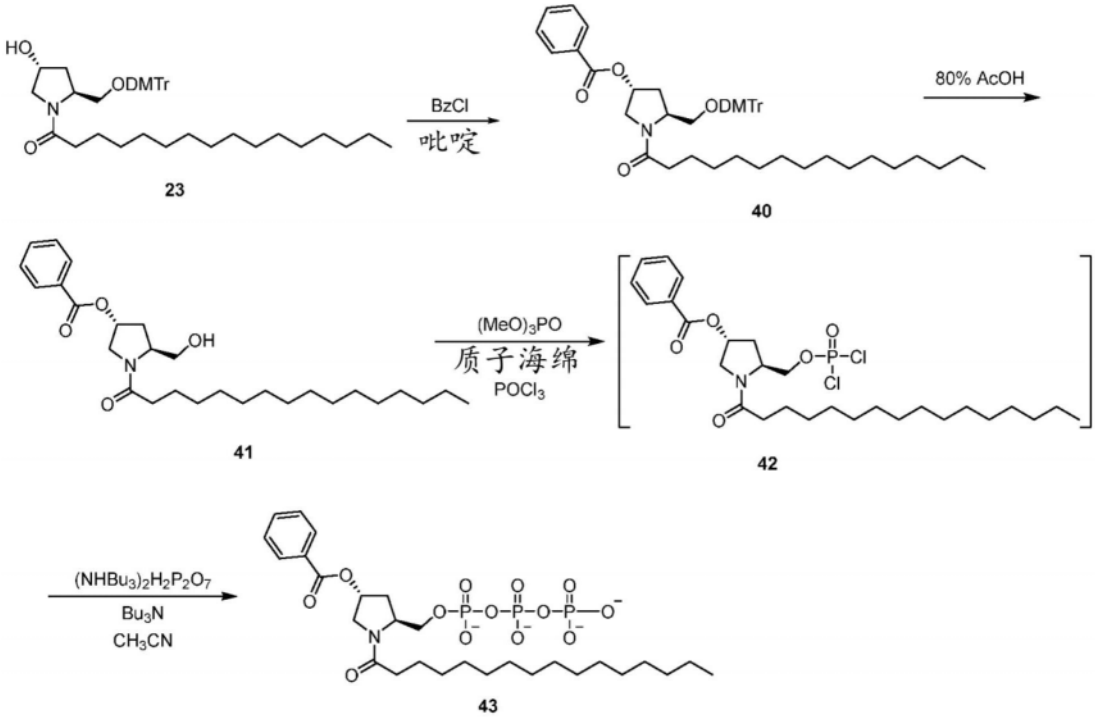
＝4.7Hz,1H),4.21(dp,J＝7.8,2.4Hz,2H),3.85-3.67(m,24H),3.59(s,16H),3.38-3.27(m,2H),3.02(td,J＝8.9,3.0Hz,2H),2.62(tdd,J＝7.5,4.5,2.9Hz,6H),2.26(q,J＝7.5Hz,9H),1.55(h,J＝7.5Hz,11H),1.34-1.20(m,58H),1.21-1.10(m,37H)。^{31}PNMR(162MHz,CD_3CN)δ149.70,148.82,148.80,148.63,148.60,148.26,148.23。

[0786] 化合物38:将甲酯脂质羧酸37(2.35g,7.15mmol)和HBTU(2.98g,7.87mmol)在无水二氯甲烷中的溶液冷却至0℃。将DIPEA(3.74mL,21.45mmol)滴加至溶液中。搅拌5分钟后,将化合物21(3g,7.15mmol)添加至反应中。将混合物在室温下搅拌24小时,此时显示不存在原材料(已烷中的60％EtOAc)。将反应混合物用DCM稀释并用饱和$NaHCO_3$水溶液进行标准水性后处理。将有机层合并,用饱和NaCl水溶液洗涤,经无水硫酸钠干燥,并在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用已烷中的0％-68％EtOAc的梯度)纯化,以获得4.44g的化合物38(85％产率)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.36-7.25(m,5H),7.20(td,J＝8.9,2.8Hz,6H),6.90-6.83(m,5H),4.97(d,J＝4.0Hz,1H),4.39(q,J＝4.5Hz,1H),3.73(d,J＝0.7Hz,8H),3.57(s,4H),3.17(dd,J＝8.9,5.0Hz,1H),3.01-2.94(m,2H),2.69(s,15H),2.27(t,J＝7.4Hz,3H),2.20(t,J＝7.4Hz,2H),2.04-1.96(m,1H),1.83(s,0H),1.49(q,J＝5.6,4.5Hz,2H),1.22(d,J＝4.6Hz,30H)。

[0787] 化合物39:在反应前,将化合物38(4.44g,6.08mmol)用乙腈共蒸发两次,并且然后在高真空下干燥过夜。将化合物38溶解于无水二氯甲烷(70.74mL)中,并滴加DIPEA(3.18mL,18.25mmol)和1-甲基咪唑(484.8uL,6.08mmol)。将混合物冷却至0℃并滴加氯-2-氰基乙氧基-N,N-二异丙基氨基膦(1.63mL,7.30mmol)。将混合物在室温下搅拌1.5小时。通过TLC(EtOAc中的30％己烷)检查反应混合物并在减压下去除溶剂。将残余物重悬于EtOAc中并用饱和$NaHCO_3$水溶液快速进行水性后处理。将有机层合并,用饱和NaCl水溶液洗涤,经无水硫酸钠干燥,并在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用已烷中的0％-30％EtOAc的梯度)纯化,以获得4.43g的化合物39(78％产率)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ7.39(ddd,J＝8.1,3.9,1.4Hz,3H),7.32-7.17(m,10H),6.87-6.80(m,5H),4.69(ddq,J＝13.6,9.3,4.3Hz,1H),4.21(ddt,J＝7.7,5.4,2.6Hz,1H),3.82-3.67(m,12H),3.59(s,7H),3.33(ddd,J＝14.7,9.1,4.6Hz,1H),3.02(td,J＝8.9,2.9Hz,1H),2.62(tq,J＝6.0,4.2Hz,3H),2.25(dt,J＝14.0,7.0Hz,4H),2.19-2.13(m,3H),1.55(h,J＝7.9,7.2Hz,5H),1.37-1.21(m,33H),1.21-1.09(m,17H)。^{31}P NMR(162MHz,CD_3CN)δ149.69,148.81,148.78,148.62,148.59,148.55,148.26,148.22。

[0788] 十六烷基羟基脯氨醇三磷酸酯的合成

[0789] 方案8

[0790] 

[0791] 化合物40:在合成前,将原材料(化合物23)用吡啶共蒸发两次并在高真空下干燥过夜。将原材料(1.01g,1.54mmol)溶解于无水吡啶(7.46mL)中并冷却至0℃,并滴加苯甲酰氯(214μL,1.84mmol)。将混合物在室温下搅拌1小时,并检查TLC(乙酸乙酯中的80%己烷)。在减压下脱除溶剂,并将残余物重悬于乙酸乙酯中。用饱和$NaHCO_3$水溶液进行标准水性后处理。将有机层合并,用饱和NaCl水溶液洗涤,经无水硫酸钠干燥,并在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用己烷中的0%-20%EtOAc的梯度)纯化,以获得890mg的化合物40(76%产率)。^1H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.93(ddt,J=12.8,7.0,1.4Hz,3H),7.68-7.62(m,1H),7.56-7.46(m,3H),7.35(ddt,J=8.1,3.2,1.8Hz,3H),7.30(q,J=7.9,7.5Hz,3H),7.27-7.17(m,7H),6.88(ddd,J=9.0,6.1,2.9Hz,6H),5.60(p,J=4.5Hz,1H),4.29(q,J=5.5,5.1Hz,2H),3.90(ddd,J=28.0,12.4,3.9Hz,1H),3.80-3.75(m,1H),3.73(d,J=1.0Hz,9H),3.36(s,1H),3.27(dd,J=9.0,4.7Hz,1H),3.15-3.04(m,2H),2.36-2.16(m,5H),1.44(q,J=7.4Hz,2H),1.29-1.20(m,29H),0.87-0.81(m,4H)。

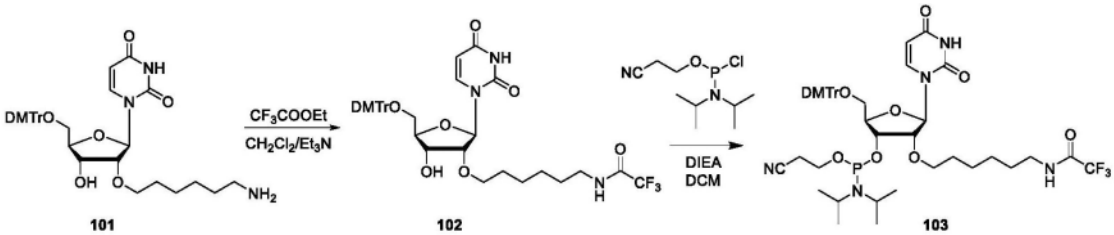
[0792] 化合物41:在装入搅拌棒的圆底烧瓶中,将化合物40(890mg,1.17mmol)溶解于水中的80%AcOH(13mL)中。将混合物在室温下搅拌48小时,并在减压下去除溶剂。将残余物用甲苯共蒸发两次,并在高真空下干燥。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用己烷中的0%-60%EtOAc的梯度)纯化,以获得301mg的化合物41(56%产率)。^1H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.97-7.89(m,3H),7.66(td,J=6.8,6.1,1.6Hz,1H),7.51(td,J=7.7,6.0Hz,3H),5.51-5.40(m,1H),4.84(t,J=5.5Hz,1H),4.15(dp,J=11.7,3.8Hz,1H),3.77(dd,J=11.8,5.0Hz,1H),3.59(dt,J=10.5,5.2Hz,1H),3.47(ddd,J=14.8,9.0,4.7Hz,2H),2.33-2.11(m,5H),1.57-1.39(m,3H),1.30-1.11(m,37H),0.85(t,J=6.8Hz,4H)。

[0793] 化合物42:在合成前,将原材料(化合物41)(200mg,0.435mmol)在高真空下干燥过夜。在配备有搅拌棒的圆底烧瓶中,在室温下,向原材料中装入质子海绵(93mg,0.435mmol)和三甲基磷酸酯(1.81mL,15.64mmol)。将反应烧瓶用真空管抽真空,然后用氩气吹扫,重复3次,并且然后保持在氩气下。将混合物在室温下搅拌10分钟,并在冰和NaCl浴中冷却至-5

℃至-10℃之间30分钟。冷却后,经由密封玻璃注射器添加磷酰氯(28.30μL,0.305mmol),搅拌4分钟,并经由密封玻璃注射器添加另一部分的磷酰氯(20.22μL,0.217mmol)。将混合物在-5℃至-10℃下搅拌10分钟。用溶解于无水乙腈(1.75mL)和三丁胺(621.95μL,2.61mmol)中的三丁基焦磷酸铵(255.50mg,0.348mmol)制备焦磷酸酯混合物,并在干冰/丙酮浴中保持在-20℃下。搅拌10分钟后,将焦磷酸酯混合物快速但小心地滴加至冷反应混合物中,并且然后再搅拌10分钟。从烧瓶中除去氩气管后,经由加料漏斗添加水(12mL)。将混合物转移到分液漏斗中,并将水层用二氯甲烷洗涤3次(每次5mL)。将水层合并并使用氢氧化铵(3滴,使用注射器)将pH调节至6.5。将混合物在4℃下储存过夜。在减压下脱除溶剂,并将剩余残余物在-80℃下在丙酮/干冰浴中冷冻。将残余物冻干过夜并在D_2O中进行^{31}PNMR分析。^{31}P NMR(202MHz,D_2O)δ3.72,-10.12,-20.99。

[0794] 2'-O-C6-氨基-TFA尿苷胺基酸酯的合成

[0795] 方案9

[0796] 

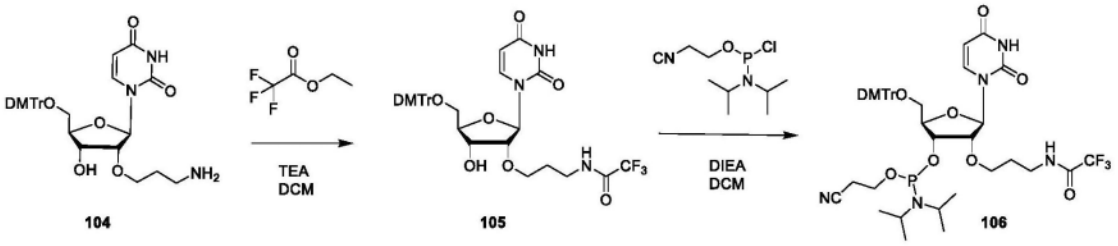
[0797] 化合物102:将化合物101(5g,7.75mmol)添加至反应烧瓶中。将原材料溶解于二氯甲烷(50ml)中,并经由注射器添加三乙胺(4.23ml,31mmol)。将三氟乙酸乙酯(2.75g,19.38mmol)滴加至反应物中。将反应混合物在室温下搅拌过夜并通过TLC(5%MeOH/DCM)检查,使用磷钼酸显色,并在减压下浓缩。将残余物溶解于二氯甲烷中,添加至分液漏斗中,并将有机层用饱和碳酸氢钠洗涤。将有机层分离并用盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。将固体滤出,并将母液浓缩并置于高真空下,以产生化合物102(4.32g,75%)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d6)δ11.36(d,J=2.6Hz,2H),9.36(s,1H),7.71(d,J=8.1Hz,2H),7.36(d,J=8.4Hz,4H),7.31(t,J=7.6Hz,4H),7.27-7.20(m,10H),6.89(d,J=8.5Hz,8H),5.78(d,J=3.6Hz,2H),5.27(dd,J=8.1,2.1Hz,2H),5.10(dd,J=6.7,2.7Hz,2H),4.16(m,2H),3.95(m,2H),3.88(m,2H),3.73(s,13H),3.55(m,4H),3.36(m,1H),3.28(d,J=4.4Hz,1H),3.22(dd,J=10.9,2.8Hz,2H),3.14(m,3H),2.11(s,2H),1.48(m,8H),1.36-1.19(m,8H)。$C_{38}H_{42}F_3N_3O_9$的质量计算值:741.76,实验值:740.2(M-H)。

[0798] 化合物103:将化合物102(4.3g,5.8mmol)添加至反应烧瓶中,抽真空并用氩气净化。将原材料溶解于二氯甲烷(40ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(2.02ml,11.6mmol)。添加N,N-二异丙基氯亚磷酰胺2-氰基乙酯(1.93ml,8.7mmol)并将反应物在室温下搅拌1-2小时。将反应混合物通过TLC(75%EtOAc/己烷)检查并在减压下浓缩。将残余物溶解于乙酸乙酯中,添加至分液漏斗中,并将有机层用饱和碳酸氢钠洗涤。将有机层分离并用盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(10%至100%EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物103(4.62g,85%)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d3)δ9.06(s,1H),7.74(d,J=8.1Hz,1H),7.49-7.39(m,2H),7.39-7.21(m,7H),6.93-6.83(m,4H),5.84(dd,J=7.0,3.2Hz,1H),5.21(m,1H),4.45(m,1H),4.20-3.97(m,3H),3.91-3.79(m,1H),3.77(d,J=2.4Hz,7H),3.63(m,

4H),3.48-3.31(m,3H),3.23(m,1H),2.67(m,1H),2.52(t,J=6.0Hz,1H),2.08(d,J=1.9Hz,1H),1.64-1.45(m,4H),1.42-1.28(m,4H),1.27-1.09(m,9H),1.05(d,J=6.7Hz,3H)。^{31}P NMR(162MHz,乙腈-d3)δ149.53,149.06。^{19}F NMR(376MHz,乙腈-d3)δ-83.43,-83.89(d,J=2.4Hz)。

[0799] 2'-O-C3-氨基-TFA尿苷胺基酸酯的合成

[0800] 方案10

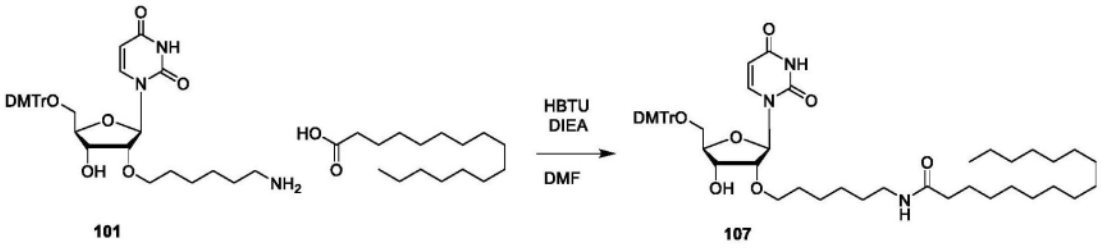
[0801] 

[0802] 化合物105:将化合物104(2.5g,4.14mmol)添加至反应烧瓶中。将原材料溶解于二氯甲烷(20ml)中,并经由注射器添加三乙胺(2.26ml,16.56mmol)。将三氟乙酸乙酯(1.47g,10.35mmol)滴加至反应物中。将反应混合物在室温下搅拌过夜并通过TLC(3%MeOH/DCM)检查,使用磷钼酸显色,并在减压下浓缩。将残余物溶解于二氯甲烷中,添加至分液漏斗中,并将有机层用饱和碳酸氢钠洗涤。将有机层分离并用盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(0%至10%MeOH/DCM)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物105(1.83g,63%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.39(m,1H),7.79(d,J=8.1Hz,1H),7.37(d,J=7.3Hz,3H),7.31(t,J=7.5Hz,3H),7.27-7.16(m,7H),6.93-6.85(m,5H),5.81-5.73(m,2H),5.54(d,J=4.9Hz,1H),5.38(d,J=8.1Hz,1H),5.19(dd,J=8.6,6.4Hz,1H),4.15-4.02(m,2H),4.01-3.87(m,2H),3.83-3.74(m,2H),3.73(s,8H),3.31-3.14(m,5H),2.07(s,1H),1.74(dd,J=11.4,4.6Hz,3H)。^{19}F NMR(376MHz,DMSO-d6)δ-81.24(d,J=43.2Hz)。$C_{35}H_{36}F_3N_3O_9$的质量计算值:699.68,实验值:698.2(M-H)。

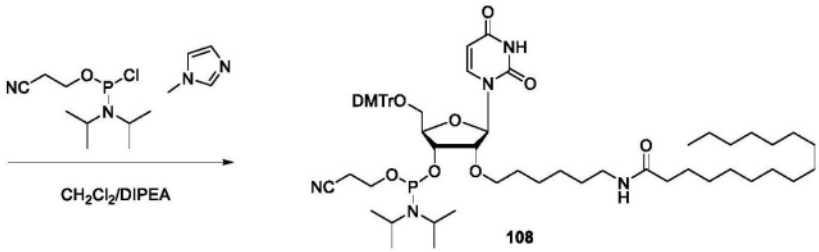
[0803] 化合物106:将化合物105(1.70g,2.43mmol)添加至反应烧瓶中,抽真空并用氩气净化。将原材料溶解于二氯甲烷(2ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(0.846ml,4.86mmol)。添加N,N-二异丙基氯亚磷酰胺2-氰基乙酯(0.649ml,2.92mmol)并将反应物在室温下搅拌1-2小时。将反应混合物通过TLC(50%EtOAc/己烷)检查并在减压下浓缩。将残余物溶解于乙酸乙酯中,添加至分液漏斗中,并将有机层用饱和碳酸氢钠洗涤。将有机层分离并用盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(10%至100%EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物106(0.787g,36%)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d3)δ7.89-7.63(m,2H),7.49-7.39(m,2H),7.38-7.20(m,7H),6.88(m,4H),6.13-5.97(m,1H),5.53-5.34(m,1H),4.52-4.32(m,2H),4.24(m,1H),3.94-3.80(m,4H),3.80-3.74(m,7H),3.71-3.53(m,5H),3.52-3.29(m,3H),3.25(m,2H),2.64(m,3H),1.86-1.75(m,2H),1.36-0.96(m,25H)。^{19}F NMR(376MHz,乙腈-d3)δ-77.26,-143.51。^{31}P NMR(202MHz,乙腈-d3)δ152.03(d,J=6.2Hz),151.47-150.50(m)。

[0804] 与2'-O-C6-酰胺-C16缀合的尿苷胺基酸酯的合成

[0805] 方案11



[0806]

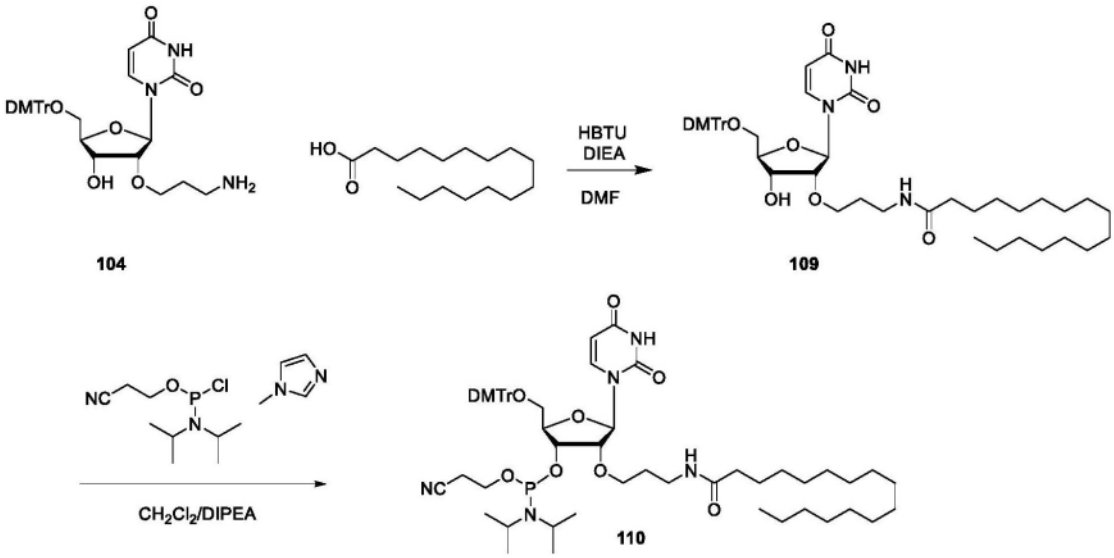


[0807] 化合物107:将化合物101(5.7g,8.83mmol),与棕榈酸(2.51g,9.8mmol)和HBTU(4.08g,10.77mmol)添加至反应烧瓶中。将固体溶解于DMF(25ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(4.61ml,26.5mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。通过MS检查反应混合物。将反应混合物用乙醚和稀碳酸氢钠溶液稀释,并添加至分液漏斗中。将有机层用稀碳酸氢钠溶液、饱和碳酸氢钠、以及然后饱和盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(0%至100%EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物107(6.33g,81%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ11.40(dd,J=27.8,2.2Hz,1H),7.76-7.63(m,2H),7.33(m,4H),7.23(m,5H),6.89(dd,J=9.3,3.0Hz,4H),5.78(d,J=3.5Hz,1H),5.27(dd,J=8.1,2.1Hz,1H),5.21-5.07(m,1H),4.26-4.06(m,1H),3.91(m,2H),3.73(s,6H),3.63-3.43(m,2H),3.29-3.18(m,2H),2.98(q,J=6.6Hz,2H),2.00(t,J=7.4Hz,2H),1.47(m,4H),1.34(t,J=6.9Hz,2H),1.21(s,23H),0.83(t,J=6.7Hz,3H)。$C_{52}H_{73}N_3O_9$的质量计算值:884.17,实验值:882.5(M-H)。

[0808] 化合物108:将化合物107(5.83g,6.59mmol)添加至反应烧瓶中,抽真空并用氩气净化。将原材料溶解于二氯甲烷(60ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(3.45ml,19.78mmol)。将反应混合物经由冰浴冷却至0℃。将N,N-二异丙基氯亚磷酰胺2-氰基乙酯(1.91ml,8.57mmol)和1-甲基咪唑(0.525ml,6.6mmol)添加至反应混合物中,并允许反应混合物温热至室温并搅拌1小时。将反应混合物通过TLC(80%EtOAc/己烷)检查并在减压下浓缩。将残余物溶解于二氯甲烷中,添加至分液漏斗中,并将有机层用饱和碳酸氢钠洗涤。将有机层分离并用盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(10%至80%EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物108(4.6g,64%)。^{1}H NMR(500MHz,乙腈-d3)δ9.16(s,1H),7.71(d,J=8.1Hz,1H),7.52-7.39(m,2H),7.37-7.22(m,7H),6.92-6.84(m,4H),6.28(d,J=7.2Hz,1H),5.86(dd,J=9.1,3.7Hz,1H),5.23(t,J=8.2Hz,1H),4.54-4.32(m,1H),4.20-4.09(m,1H),4.07-3.97(m,1H),3.77(d,J=2.8Hz,7H),3.62(m,4H),3.55-3.33(m,3H),3.09(m,2H),2.75(s,1H),2.67(m,1H),2.52(s,1H),2.06(m,2H),1.62-1.49(m,4H),1.45-1.39(m,2H),1.34(m,3H),1.25(d,J=16.3Hz,27H),1.16(dd,J=10.8,6.8Hz,8H),1.05(d,J=6.8Hz,3H),0.88(t,J=6.9Hz,3H)。^{31}P NMR(202MHz,乙腈-d3)δ151.06,150.60。

[0809] 与2'-O-C3-酰胺-C16缀合的尿苷胺基酸酯的合成

[0810] 方案12

[0811] 

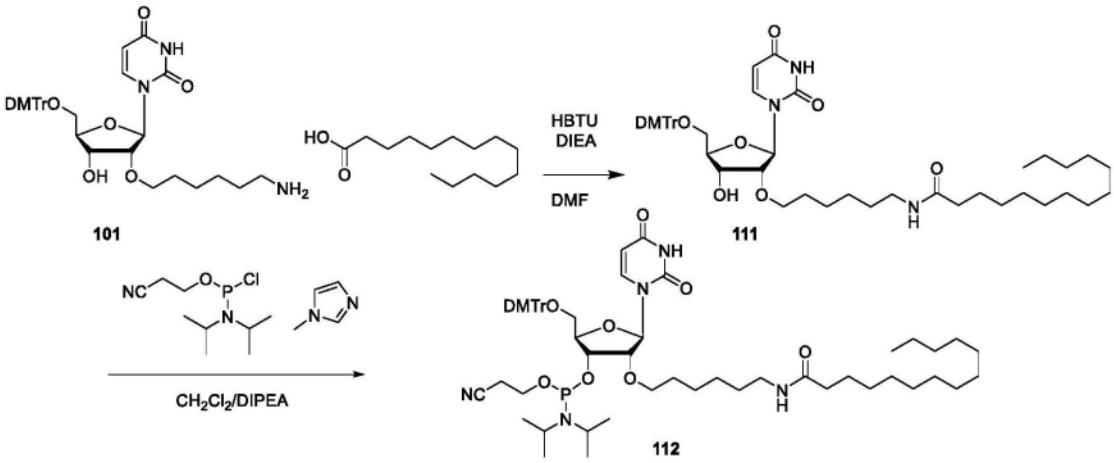
[0812] 化合物109:将化合物104(5.3g,8.78mmol),与棕榈酸(2.50g,9.75mmol)和HBTU(4.06g,10.71mmol)添加至反应烧瓶中。将固体溶解于DMF(25ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(4.59ml,26.34mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。通过MS检查反应混合物。将反应混合物用乙醚和稀碳酸氢钠溶液稀释,并添加至分液漏斗中。将有机层用稀碳酸氢钠溶液、饱和碳酸氢钠、以及然后饱和盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(0%至100%EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物109(4.66g,63%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ11.37(s,1H),7.75-7.67(m,2H),7.34(dd,J=19.6,7.3Hz,4H),7.29-7.14(m,6H),6.89(d,J=8.5Hz,4H),5.78(d,J=3.4Hz,1H),5.27(d,J=8.0Hz,1H),5.19(d,J=6.6Hz,1H),4.18(q,J=6.2Hz,1H),3.92(m,2H),3.73(s,6H),3.57(q,J=5.7,5.0Hz,2H),3.30-3.18(m,2H),3.09(m,2H),2.01(t,J=7.4Hz,2H),1.63(m,2H),1.45(t,J=7.2Hz,2H),1.21(d,J=5.1Hz,23H),0.83(t,J=6.7Hz,3H)。$C_{49}H_{67}N_3O_9$的质量计算值:842.09,实验值:840.5(M-H)。

[0813] 化合物110:将化合物109(4.66g,5.53mmol)添加至反应烧瓶中,抽真空并用氩气净化。将原材料溶解于二氯甲烷(40ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(2.89ml,16.6mmol)。将反应混合物经由冰浴冷却至0℃。将N,N-二异丙基氯亚磷酰胺2-氰基乙酯(1.61ml,7.19mmol)和1-甲基咪唑(0.441ml,5.53mmol)添加至反应混合物中,并允许反应混合物温热至室温并搅拌2小时。将反应混合物通过TLC(80%EtOAc/己烷)检查并在减压下浓缩。将残余物溶解于二氯甲烷中,添加至分液漏斗中,并将有机层用饱和碳酸氢钠洗涤。将有机层分离并用盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(10%至80%EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物110(3.86g,67%)。^{1}H NMR(500MHz,乙腈-d3)δ9.01(s,1H),7.74(d,J=8.2Hz,1H),7.52-7.40(m,3H),7.36-7.21(m,7H),6.92-6.85(m,4H),6.40(d,J=5.4Hz,1H),5.85(dd,J=7.6,2.9Hz,1H),5.21(t,J=8.3Hz,1H),4.46(m,1H),4.22-4.09(m,2H),4.09-3.98(m,2H),3.91-3.80(m,1H),3.80-3.69(m,9H),3.68-3.55(m,3H),3.55-3.34(m,3H),3.22(m,2H),2.75(t,J=5.9Hz,1H),2.68(m,1H),2.52(t,J=5.9Hz,1H),2.06(m,2H),

1.71(m,2H),1.54-1.49(m,2H),1.25(dd,J＝9.5,6.5Hz,28H),1.22-1.10(m,10H),1.05(d,J＝6.7Hz,3H),0.88(t,J＝6.8Hz,3H)。^{31}P NMR(202MHz,乙腈-d3)δ151.01,150.56。

[0814] 与2'-O-C6-酰胺-C14缀合的尿苷胺基酸酯的合成

[0815] 方案13

[0816] 

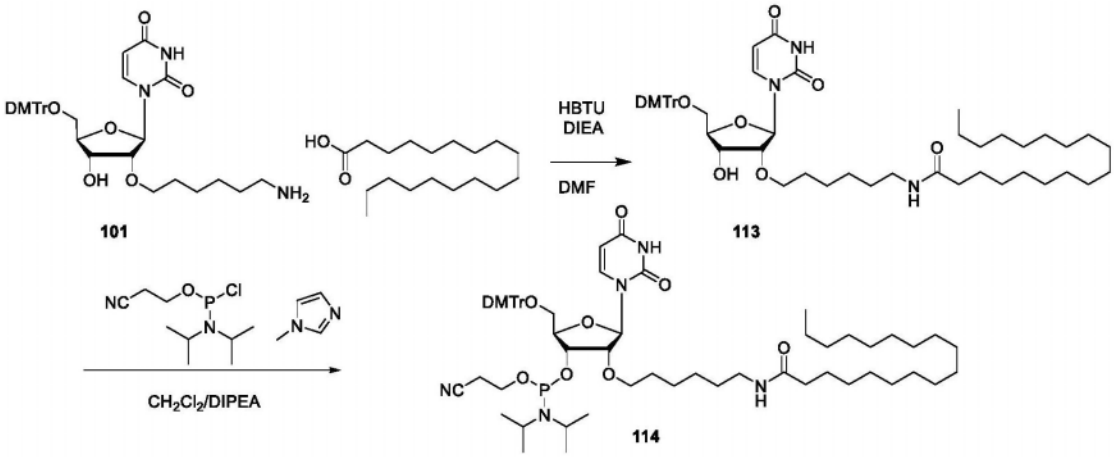
[0817] 化合物111:将化合物101(5.0g,7.74mmol),与肉豆蔻酸(1.96g,8.6mmol)和HBTU(3.58g,9.45mmol)添加至反应烧瓶中。将固体溶解于DMF(25ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(4.05ml,23.23mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。通过TLC(80％EtOAc/己烷)检查反应混合物。将反应混合物用乙醚和稀碳酸氢钠溶液稀释,并添加至分液漏斗中。将有机层用稀碳酸氢钠溶液、饱和碳酸氢钠、以及然后饱和盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(0％至100％EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物111(3.78g,57％)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ11.37(d,J＝2.2Hz,1H),7.72(d,J＝8.1Hz,1H),7.67(t,J＝5.6Hz,1H),7.41-7.28(m,4H),7.23(m,5H),6.89(d,J＝8.6Hz,4H),5.78(d,J＝3.6Hz,1H),5.27(dd,J＝8.0,2.1Hz,1H),5.11(d,J＝6.6Hz,1H),4.16(q,J＝6.2Hz,1H),3.95(m,1H),3.73(s,6H),3.63-3.47(m,2H),3.31-3.18(m,3H),2.98(q,J＝6.5Hz,2H),2.00(t,J＝7.4Hz,2H),1.47(m,4H),1.34(m,3H),1.21(s,23H),0.83(t,J＝6.7Hz,3H)。

[0818] 化合物112:将化合物111(3.78g,4.42mmol)添加至反应烧瓶中,抽真空并用氩气净化。将原材料溶解于二氯甲烷(40ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(2.31ml,13.25mmol)。将反应混合物经由冰浴冷却至0℃。添加N,N-二异丙基氯亚磷酰胺2-氰基乙酯(1.28ml,5.74mmol)和1-甲基咪唑(0.352ml,4.42mmol),并允许反应混合物温热至室温并搅拌1小时。将反应混合物通过TLC(80％EtOAc/己烷)检查并在减压下浓缩。将残余物溶解于二氯甲烷中,添加至分液漏斗中,并将有机层用饱和碳酸氢钠洗涤。将有机层分离并用盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(10％至80％EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物112(4.04g,87％)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d3)δ9.18(s,1H),7.44(m,2H),7.38-7.21(m,7H),6.93-6.83(m,4H),6.29(d,J＝5.9Hz,1H),5.86(dd,J＝7.4,3.7Hz,1H),5.23(dd,J＝8.1,6.7Hz,1H),4.53-4.33(m,1H),4.15(m,1H),4.08-3.97(m,1H),3.86(m,1H),3.77(d,J＝2.3Hz,6H),3.62(m,4H),3.48-3.32(m,2H),3.09(m,2H),2.67(m,1H),2.52(t,J＝6.0Hz,1H),2.06(m,2H),1.54(m,4H),1.41(m,2H),1.26(s,25H),1.16(dd,J＝8.7,6.8Hz,10H),

1.05(d,J＝6.8Hz,3H),0.92-0.83(m,3H)。^{31}P NMR(202MHz,乙腈-d3)δ151.06,150.60。

[0819] 与2'-O-C6-酰胺-C18缀合的尿苷胺基酸酯的合成

[0820] 方案14

[0821] 

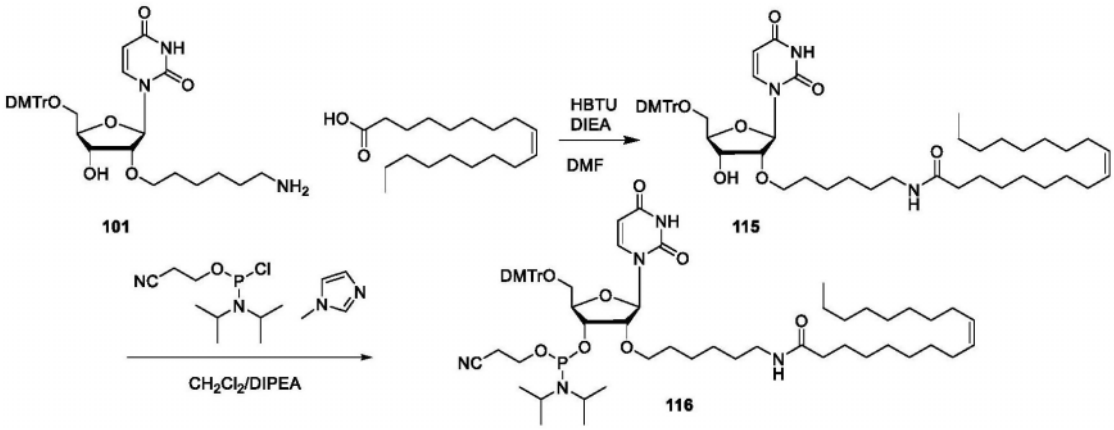
[0822] 化合物113:将化合物101(5.0g,7.74mmol),与硬脂酸(2.45g,8.6mmol)和HBTU(3.58g,9.45mmol)添加至反应烧瓶中。将固体溶解于DMF(25ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(4.05ml,23.23mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。通过TLC(80％EtOAc/己烷)检查反应混合物。将反应混合物用乙醚和稀碳酸氢钠溶液稀释,并添加至分液漏斗中。将有机层用稀碳酸氢钠溶液、饱和碳酸氢钠、以及然后饱和盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(0％至100％EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物113(3.56g,50％)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ11.36(d,J＝2.0Hz,1H),7.72(d,J＝8.1Hz,1H),7.67(t,J＝5.6Hz,1H),7.42-7.27(m,4H),7.27-7.18(m,5H),6.89(d,J＝8.6Hz,4H),5.78(d,J＝3.6Hz,1H),5.27(m,1H),5.11(d,J＝6.6Hz,1H),4.16(q,J＝6.1Hz,1H),4.02(q,J＝7.1Hz,1H),3.95(m,1H),3.87(m,1H),3.73(s,6H),3.63-3.47(m,2H),3.31-3.18(m,2H),2.98(q,J＝6.5Hz,2H),2.04-1.95(m,2H),1.48(m,4H),1.34(m,3H),1.30-1.15(m,31H),0.83(t,J＝6.7Hz,3H)。

[0823] 化合物114:将化合物113(5.86g,6.44mmol)添加至反应烧瓶中,抽真空并用氩气净化。将原材料溶解于二氯甲烷(60ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(3.36ml,19.31mmol)。将反应混合物经由冰浴冷却至0℃。将N,N-二异丙基氯亚磷酰胺2-氰基乙酯(1.87ml,1.98mmol)和1-甲基咪唑(0.513ml,6.44mmol)添加至反应混合物中,并允许反应混合物温热至室温并搅拌1小时。将反应混合物通过TLC(80％EtOAc/己烷)检查并在减压下浓缩。将残余物溶解于二氯甲烷中,添加至分液漏斗中,并将有机层用饱和碳酸氢钠洗涤。将有机层分离并用盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(0％至50％EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物114(4.67g,65％)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d3)δ9.17(s,1H),7.49-7.39(m,2H),7.37-7.21(m,7H),6.93-6.83(m,4H),6.29(d,J＝6.0Hz,1H),5.86(dd,J＝7.4,3.7Hz,1H),5.23(dd,J＝8.1,6.6Hz,1H),4.43(m,1H),4.21-4.09(m,1H),4.09-3.96(m,2H),3.87(m,1H),3.77(d,J＝2.3Hz,6H),3.61(m,4H),3.46-3.32(m,2H),3.09(m,2H),2.73(s,1H),2.67(m,1H),2.52(t,J＝6.0Hz,1H),2.06(m,2H),1.54(m,4H),1.41(m,2H),1.26

(s,31H),1.16(dd,J=8.8,6.8Hz,11H),1.05(d,J=6.8Hz,3H),0.88(t,J=6.7Hz,3H)。^{31}P NMR(202MHz,乙腈-d3)δ151.06,150.60。

[0824] 与2'-O-C6-酰胺-油基缀合的尿苷胺基酸酯的合成

[0825] 方案15

[0826] 

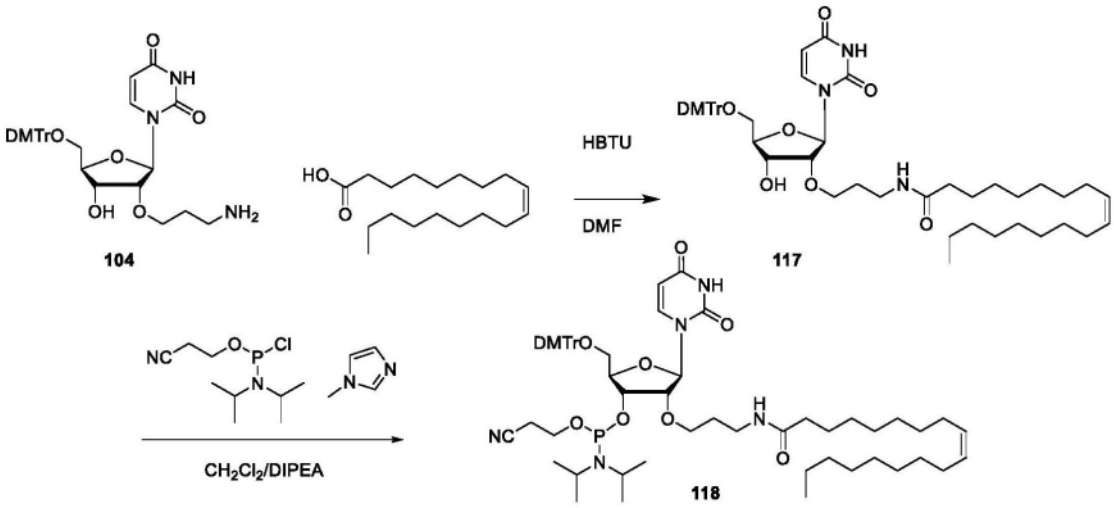
[0827] 化合物115:将化合物101(5.0g,7.74mmol),与油基酸(oleyl acid)(2.43g,8.6mmol)和HBTU(3.58g,9.45mmol)添加至反应烧瓶中。将固体溶解于DMF(75ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(4.05ml,23.23mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。通过TLC(80%EtOAc/己烷)检查反应混合物。将反应混合物用乙醚和稀碳酸氢钠溶液稀释,并添加至分液漏斗中。将有机层用稀碳酸氢钠溶液、饱和碳酸氢钠、以及然后饱和盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(0%至100%EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物115(5.86g,84%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ11.37(d,J=2.0Hz,1H),7.73(d,J=8.1Hz,1H),7.67(t,J=5.6Hz,1H),7.41-7.28(m,4H),7.28-7.19(m,5H),6.89(d,J=8.7Hz,4H),5.78(d,J=3.6Hz,1H),5.35-5.23(m,3H),5.11(d,J=6.7Hz,1H),4.16(q,J=6.2Hz,1H),3.95(m,1H),3.88(m,1H),3.73(s,6H),3.63-3.47(m,2H),3.30-3.17(m,2H),2.99(q,J=6.5Hz,2H),1.98(m,6H),1.47(m,4H),1.35(q,J=7.0Hz,2H),1.23(d,J=12.7Hz,22H),0.83(t,J=6.7Hz,3H)。$C_{54}H_{75}N_3O_9$的质量计算值:910.21,实验值:908.5(M-H)

[0828] 化合物116:将化合物115(3.56g,3.90mmol)添加至反应烧瓶中,抽真空并用氩气净化。将原材料溶解于二氯甲烷(35ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(2.04ml,11.71mmol)。将反应混合物经由冰浴冷却至0℃。将N,N-二异丙基氯亚磷酰胺2-氰基乙酯(1.13ml,5.07mmol)和1-甲基咪唑(0.311ml,3.9mmol)添加至反应混合物中,并允许反应混合物温热至室温并搅拌1小时。将反应混合物通过TLC(80%EtOAc/己烷)检查并在减压下浓缩。将残余物溶解于二氯甲烷中,添加至分液漏斗中,并将有机层用饱和碳酸氢钠洗涤。将有机层分离并用盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(0%至100%EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物116(3.5g,80%)。^{1}H NMR(500MHz,乙腈-d3)δ9.16(s,1H),7.48-7.40(m,2H),7.38-7.22(m,7H),6.92-6.84(m,4H),6.28(d,J=6.9Hz,1H),5.86(dd,J=9.2,3.7Hz,1H),5.34(m,2H),5.23(t,J=8.2Hz,1H),4.51-4.36(m,1H),4.15(m,1H),4.07-3.97(m,1H),3.93-3.81(m,1H),3.77(d,J=2.9Hz,7H),3.61(m,4H),3.45-3.33(m,2H),3.09(m,2H),2.81-2.69(m,1H),2.69-2.58(m,1H),2.52(t,J=6.0Hz,1H),2.10-1.97(m,6H),1.54

(m,4H),1.47-1.39(m,2H),1.39-1.19(m,25H),1.16(dd,J=10.8,6.8Hz,9H),1.05(d,J=6.7Hz,3H),0.88(t,J=6.8Hz,3H)。^{31}P NMR(202MHz,乙腈-d3)δ151.06,150.60。

[0829] 与2'-O-C3-酰胺-油基缀合的尿苷胺基酸酯的合成

[0830] 方案16

[0831] 

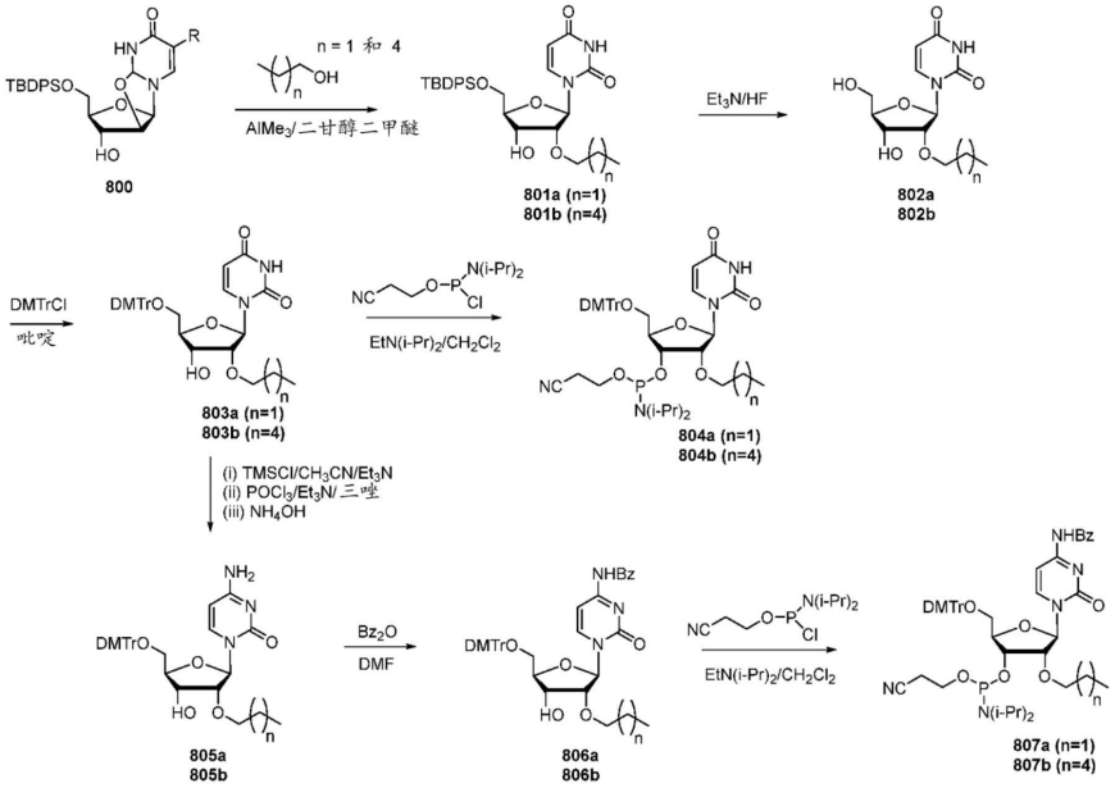
[0832] 化合物117:将化合物104(5.0g,8.28mmol),与油基酸(2.6g,9.19mmol)和HBTU(3.83g,10.11mmol)添加至反应烧瓶中。将固体溶解于DMF(70ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(4.33ml,24.85mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。通过TLC(80%EtOAc/己烷)检查反应混合物。将反应混合物用乙醚和稀碳酸氢钠溶液稀释,并添加至分液漏斗中。将有机层用稀碳酸氢钠溶液、饱和碳酸氢钠、以及然后饱和盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(0%至100%EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物117(4.6g,64%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ11.37(d,J=2.2Hz,1H),7.75-7.67(m,2H),7.41-7.26(m,4H),7.23(m,5H),6.89(d,J=8.5Hz,4H),5.78(d,J=3.4Hz,1H),5.33-5.23(m,3H),5.18(d,J=6.6Hz,1H),4.18(q,J=6.3Hz,1H),3.95(m,1H),3.89(dd,J=5.2,3.5Hz,1H),3.73(s,6H),3.57(q,J=5.6,4.9Hz,2H),3.31-3.18(m,2H),3.09(m,2H),2.05-1.90(m,6H),1.63(m,2H),1.45(q,J=7.2Hz,2H),1.23(m,20H),0.83(t,J=6.6Hz,3H)。$C_{51}H_{69}N_3O_9$的质量计算值:868.13,实验值:867.5(M-H)。

[0833] 化合物118:将化合物117(4.6g,5.3mmol)添加至反应烧瓶中,抽真空并用氩气净化。将原材料溶解于二氯甲烷(45ml)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(2.77ml,15.9mmol)。将反应混合物经由冰浴冷却至0℃。将N,N-二异丙基氯亚磷酰胺2-氰基乙酯(1.54ml,6.89mmol)和1-甲基咪唑(0.422ml,5.3mmol)添加至反应混合物中,并允许反应混合物温热至室温并搅拌1小时。将反应混合物通过TLC(80%EtOAc/己烷)检查并在减压下浓缩。将残余物溶解于二氯甲烷中,添加至分液漏斗中,并将有机层用饱和碳酸氢钠洗涤。将有机层分离并用盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(0%至60%EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生化合物118(4.64g,82%)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d3)δ9.12(s,1H),7.52-7.42(m,2H),7.42-7.24(m,7H),6.96-6.86(m,4H),6.45(d,J=4.9Hz,1H),5.88(dd,J=6.6,2.8Hz,1H),5.41-5.32(m,2H),5.24(dd,J=8.2,7.2Hz,1H),4.49(m,1H),4.16(m,1H),4.12-4.02

(m,1H),3.84-3.72(m,9H),3.72-3.56(m,3H),3.56-3.36(m,3H),3.25(m,2H),2.78(t,J=5.9Hz,1H),2.71(m,1H),2.55(t,J=6.0Hz,1H),2.15-2.07(m,2H),2.04(m,4H),1.74(m,F2H),1.55(d,J=7.2Hz,2H),1.40-1.23(m,26H),1.23-1.12(m,9H),1.07(d,J=6.8Hz,3H),0.94-0.86(m,3H)。^{31}P NMR(162MHz,乙腈-d3)δ149.59(d,J=2.2Hz),149.11(d,J=2.6Hz)。

[0834] A、G、C和U的2'-O-C3和2'-O-C6亚磷酰胺的合成

[0835] 方案17

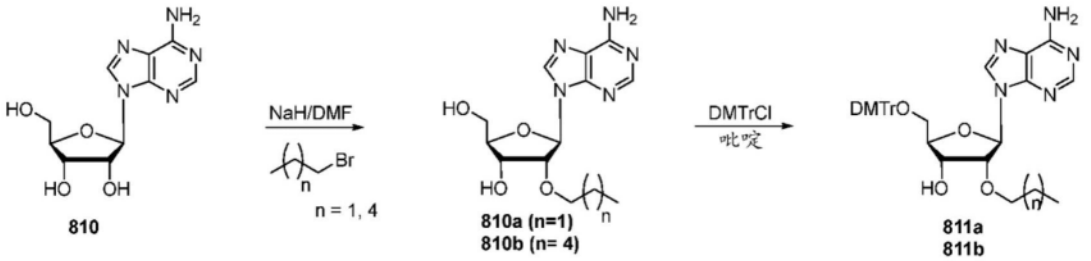
[0836] 

[0837] 2'-O-C3尿苷亚磷酰胺804a的合成:在合成前,将原材料(化合物803a)(4.00g,6.80mmol)用乙腈共蒸发两次并在高真空下干燥过夜。添加化合物803a在无水二氯甲烷(79.03mL)和DIPEA(4.14mL,23.78mmol)中的溶液。将混合物在冰浴上冷却至0℃并滴加N,N-二异丙基氯亚磷酰胺2-氰基乙酯(2.73mL,12.23mmol)。将混合物温热至室温并搅拌4小时,并检查TLC(已烷中的60%EtOAc)。在减压下脱除溶剂,并将残余物在高真空下干燥1小时。将残余物重悬于EtOAc中并用饱和$NaHCO_3$水溶液快速进行标准水性后处理。将有机层合并,用饱和NaCl水溶液洗涤,经无水硫酸钠干燥,并在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱法(用Et_3N预处理)(用已烷中的0%-60%EtOAc的梯度)纯化,以获得4.53g的化合物804a(84%产率)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ9.09(s,1H),7.79(dd,J=35.3,8.1Hz,1H),7.45(ddt,J=10.6,8.2,1.3Hz,2H),7.38-7.21(m,7H),6.92-6.83(m,4H),5.85(dd,J=6.0,3.2Hz,1H),5.22(dd,J=8.2,5.3Hz,1H),4.46(dddd,J=31.1,10.0,6.6,4.9Hz,1H),4.15(ddt,J=13.4,6.3,2.9Hz,1H),4.04(ddd,J=13.8,4.9,3.2Hz,1H),3.80-3.73(m,7H),3.68-3.54(m,3H),3.45-3.37(m,2H),2.70-2.63(m,1H),2.15(s,1H),1.64-1.52(m,2H),1.16(dd,J=9.9,6.8Hz,9H),1.05(d,J=6.8Hz,3H),0.91(td,J=7.4,5.2Hz,3H)。^{31}P NMR(162MHz,CD_3CN)δ150.15,150.10,149.74,149.69,14.24,6.08。

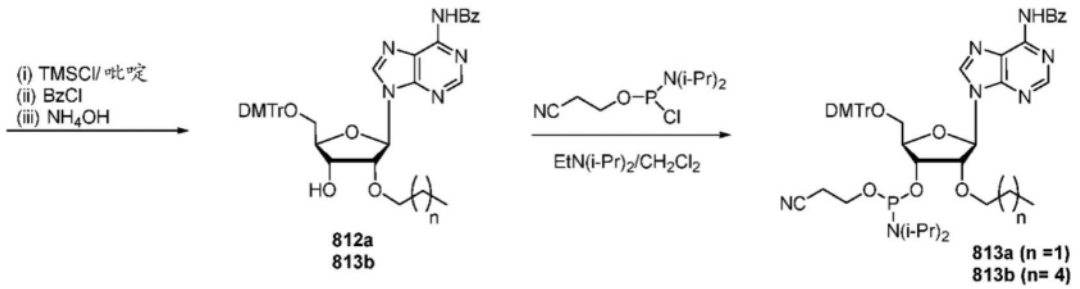
[0838] 2'-O-C6尿苷亚磷酰胺804b的合成:将化合物803b(4.0g,6.35mmol)添加至反应烧瓶中,抽空并且用氩气净化。将起始材料溶解于二氯甲烷中,并经由注射器添加二异丙胺(2.21ml,12.7mmol)。添加N,N-二异丙基氯亚磷酰胺2-氰基乙酯(2.12ml,9.53mmol)并在室温下搅拌3小时。通过TLC(已烷中的70%的EtOAc)检查反应物,并在减压下浓缩反应物。将残余物溶解于二氯甲烷中,添加至分液漏斗中,并将有机层用饱和碳酸氢钠溶液洗涤。将有机层分离并用盐水溶液洗涤。将有机层分离并用硫酸钠干燥。滤出固体并浓缩母液。将残余物通过硅胶快速色谱法(30%至100%EtOAc/己烷)纯化,并将产物级分合并并在减压下浓缩以产生804b(3.42g,65%)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ8.98(s,1H),7.86-7.66(m,1H),7.49-7.39(m,2H),7.39-7.21(m,7H),6.93-6.83(m,4H),5.85(dd,J=6.2,3.5Hz,1H),5.22(dd,J=8.2,6.3Hz,1H),4.44(m,1H),4.20-3.98(m,2H),3.93-3.82(m,1H),3.77(d,J=2.4Hz,7H),3.71-3.55(m,5H),3.47-3.32(m,2H),2.72-2.61(m,1H),2.52(t,J=6.0Hz,1H),1.62-1.49(m,2H),1.41-1.23(m,6H),1.17(dd,J=8.8,6.8Hz,9H),1.05(d,J=6.8Hz,3H),0.88(m,3H)。31P NMR(202MHz,乙腈-d_3)δ149.63,149.26。

[0839] 2'-O-C6和2'-O-C3腺苷亚磷酰胺的合成

[0840] 方案18



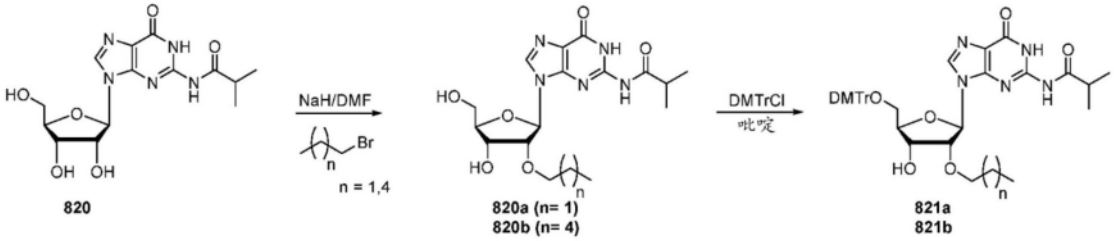
[0841]



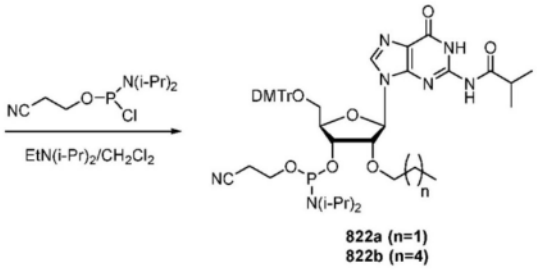
[0842] 化合物813a和813b的合成:通过利用上述合成方案18中所示的程序和与合成化合物804b所述的亚磷酰化方法类似的程序,合成并表征化合物813a和813b。

[0843] 2'-O-C6和2'-O-C3鸟苷亚磷酰胺的合成

[0844] 方案19



[0845]

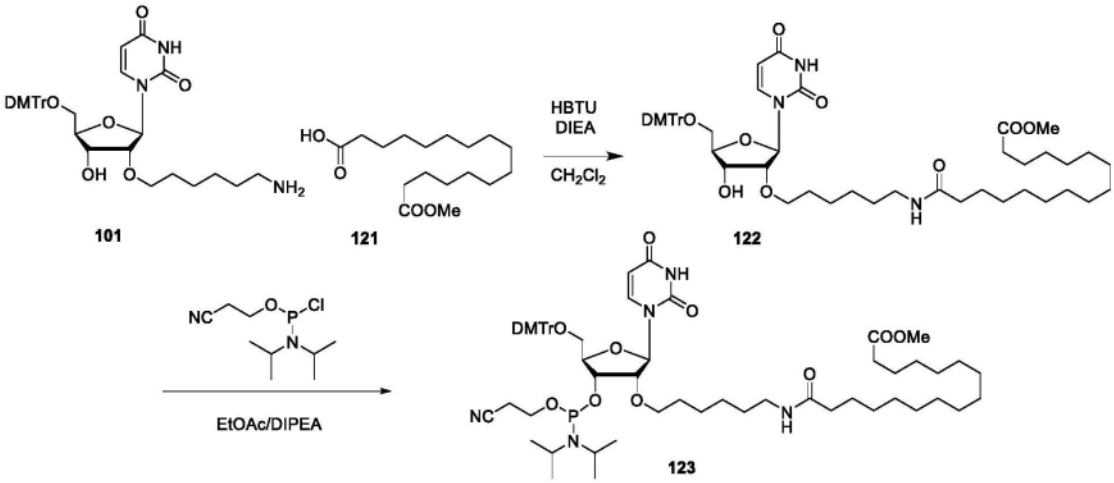


[0846] 化合物822a和822b的合成:通过利用上述合成方案19中所示的程序和与合成化合物804b所述的亚磷酰化方法类似的程序,合成并表征化合物822a和822b。

[0847] 与2'-O-C6-酰胺-C16酯缀合的尿苷胺基酸酯的合成

[0848] 方案20

[0849]

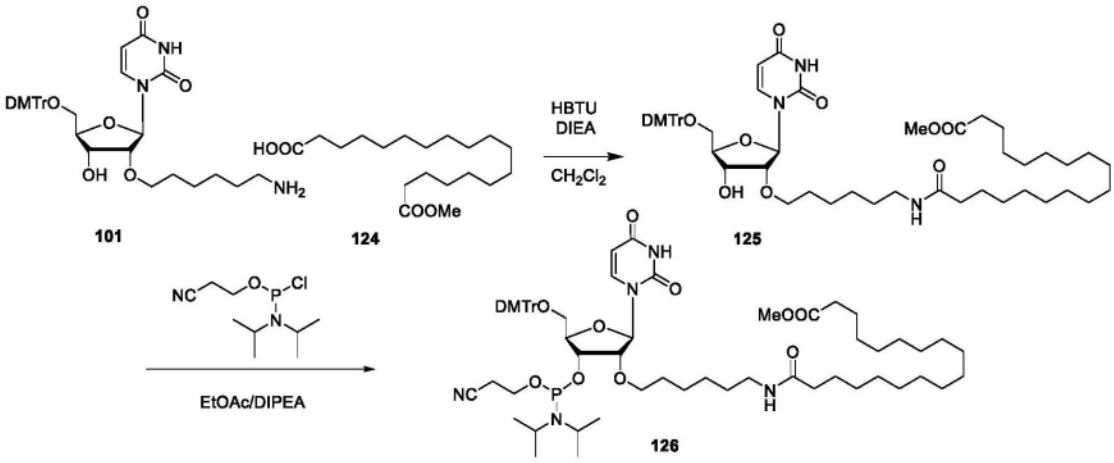


[0850] 化合物122:向热烘箱干燥的100mL圆底烧瓶中添加化合物101(4g,6.19mmol,1.0当量)在无水DCM(120mL)中的溶液。将16-甲氧基-16-氧代十六烷酸(化合物121)(2.05g,6.81mmol,1.1当量)添加至溶液中,随后添加HBTU(2.58g,6.81mmol,1.1当量)和DIPEA(3.24mL,18.58mmol,3当量)。将所得溶液在室温下在氩气下搅拌过夜。用100%EtOAc/己烷的TLC显示产物的形成。将反应混合物用盐水溶液淬灭,并用DCM萃取。将合并的有机溶液经无水Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩至油状物。通过用80g硅胶柱的ISCO柱色谱法(用0%-100%EtOAc/己烷洗脱)纯化,给出化合物122。产生粘稠油状产物(4.81g,84%)。^1H NMR(500MHz,氯仿-d)δ8.41(s,1H),8.00(d,J=8.2Hz,1H),7.41-7.35(m,2H),7.34-7.20(m,10H),6.88-6.81(m,4H),5.94(d,J=1.9Hz,1H),5.48(t,J=5.6Hz,1H),5.32-5.23(m,1H),4.49-4.41(m,1H),4.03(dt,J=7.6,2.4Hz,1H),3.93-3.84(m,2H),3.80(d,J=1.1Hz,6H),3.66(s,4H),3.54(qd,J=11.1,2.4Hz,2H),3.24(td,J=7.2,5.9Hz,2H),2.80(s,10H),2.75(d,J=8.7Hz,1H),2.30(t,J=7.5Hz,2H),2.18-2.11(m,2H),1.49(q,J=7.3Hz,2H),1.29-1.23(m,17H)。

[0851] 化合物123:将化合物122(4.81g,5.18mmol,1当量)溶解于无水EtOAc(120mL)中。在氩气下并在冰浴中冷却,添加DIPEA(2.71ml,15.55mmol,3当量),随后添加N,N-二异丙基氨基氰基乙基膦酰胺酸-Cl(1.35g,5.70mmol,1.1当量)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。TLC(以100%EtOAc/己烷)显示反应完成。将反应混合物用盐水淬灭,并用EtOAc萃取。将有机层分离,经Na_2SO_4干燥并浓缩至白色油状物。用0%-100%EtOAc/己烷洗脱的ISCO纯化,给出化合物123(产率:78.3%)(4.58g)。^{1}H NMR(500MHz,乙腈-d_3)δ9.41(s,1H),7.90(s,1H),7.78(dd,J=42.9,8.1Hz,1H),7.48-7.40(m,2H),7.38-7.21(m,7H),6.92-6.84(m,4H),6.39-6.32(m,1H),5.86(dd,J=9.1,3.6Hz,1H),5.45(s,3H),5.24(t,J=7.9Hz,1H),4.15(ddt,J=17.6,6.1,2.9Hz,1H),4.07-3.98(m,1H),3.77(d,J=3.1Hz,8H),3.66-3.56(m,7H),3.47-3.34(m,2H),3.13-3.05(m,2H),2.73(s,8H),2.71-2.62(m,1H),2.26(t,J=7.5Hz,2H),2.06(td,J=7.5,2.2Hz,2H),1.54(dtd,J=13.4,6.3,3.4Hz,6H),1.47-1.38(m,2H),1.34(t,J=7.3Hz,2H),1.26(d,J=6.2Hz,22H),1.05(d,J=6.8Hz,3H)。^{31}P NMR(202MHz,乙腈-d_3)δ151.59,151.11。

[0852] 与2'-O-C6-酰胺-C18酯缀合的尿苷胺基酸酯的合成

[0853] 方案21

[0854] 

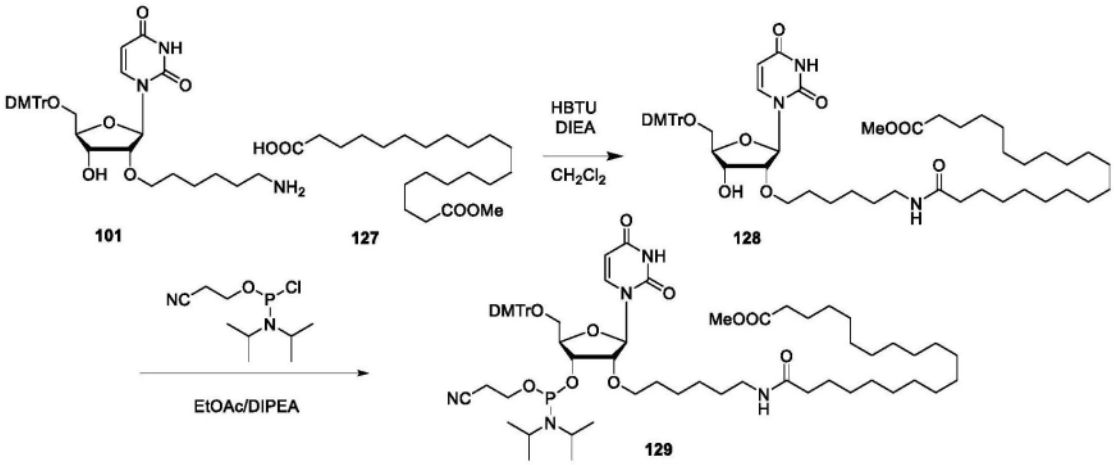
[0855] 化合物125:通过使用化合物101和18-甲氧基-18-氧代十八烷酸124以与以上合成化合物122的程序类似的程序获得化合物125。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ8.57(s,1H),8.00(d,J=8.2Hz,1H),7.41-7.35(m,2H),7.33-7.20(m,9H),6.88-6.81(m,4H),5.51(t,J=5.8Hz,1H),5.31-5.24(m,1H),4.45(td,J=8.1,5.2Hz,1H),4.03(dt,J=7.6,2.4Hz,1H),3.88(td,J=6.6,6.0,4.5Hz,2H),3.79(d,J=1.1Hz,6H),3.66(s,4H),3.54(qd,J=11.2,2.4Hz,2H),3.24(td,J=7.2,5.9Hz,2H),2.80(s,11H),2.76(d,J=8.7Hz,2H),2.30(t,J=7.6Hz,2H),2.18-2.07(m,2H),1.48(q,J=7.2Hz,2H),1.29-1.23(m,21H)。

[0856] 化合物126:通过使用化合物125与N,N-二异丙基氨基氰基乙基膦酰胺酸-Cl以与以上合成化合物123的程序类似的程序获得化合物126。^{1}H NMR(500MHz,乙腈-d_3)δ9.44(s,1H),7.78(dd,J=42.6,8.2Hz,1H),7.48-7.40(m,2H),7.38-7.21(m,7H),6.92-6.83(m,4H),6.37(q,J=5.6Hz,1H),5.86(dd,J=9.1,3.5Hz,1H),5.24(dd,J=8.1,7.1Hz,1H),4.15(ddt,J=17.5,6.2,2.9Hz,1H),4.10-3.98(m,2H),3.82-3.54(m,15H),3.46-3.34(m,2H),3.09(tdd,J=7.0,5.8,3.3Hz,2H),2.71-2.62(m,1H),2.55-2.49(m,1H),2.26(t,J=7.5Hz,2H),2.06(td,J=7.4,2.2Hz,2H),1.61-1.49(m,6H),1.41(dtd,J=12.2,7.2,6.3,

3.4Hz,2H),1.37-1.20(m,30H),1.17-1.13(m,7H),1.05(d,J＝6.8Hz,3H)。^{31}P NMR(202MHz,乙腈-d_3)δ151.36。

[0857] 与2'-O-C6-酰胺-C20酯缀合的尿苷胺基酸酯的合成

[0858] 方案22

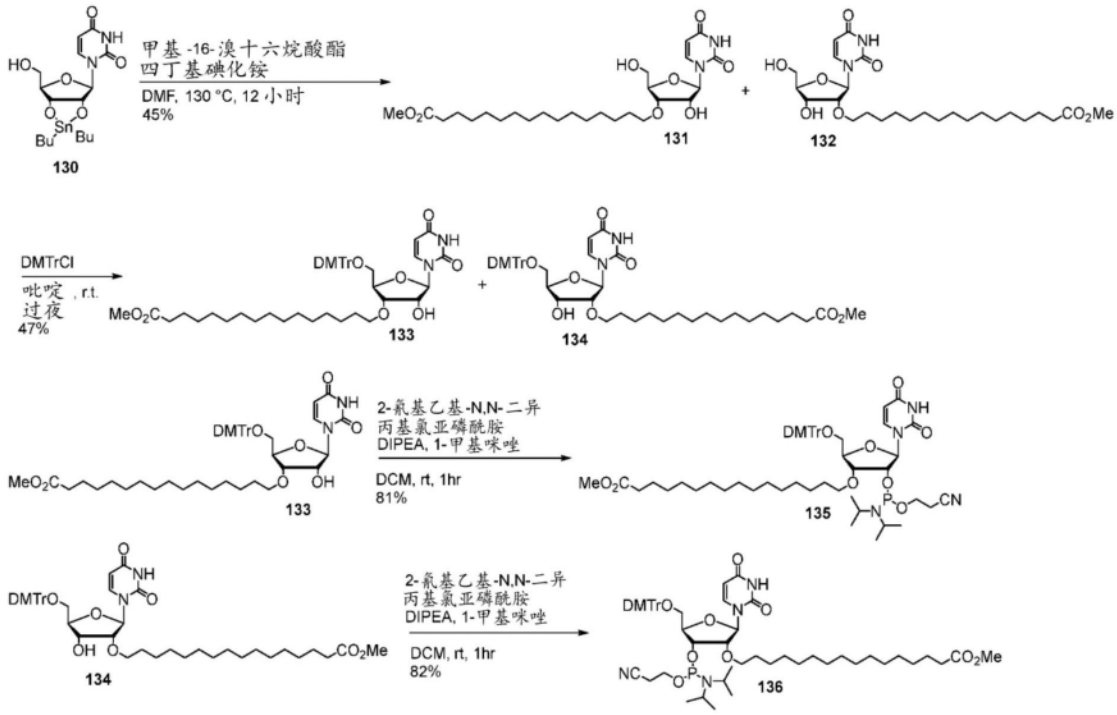
[0859] 

[0860] 化合物128:通过使用化合物101和20-甲氧基-20-氧代二十烷酸127以与以上合成化合物128的程序类似的程序获得化合物128。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ8.00(d,J＝8.2Hz,1H),7.41-7.35(m,2H),7.34-7.21(m,10H),6.88-6.81(m,4H),5.94(d,J＝1.8Hz,1H),5.27(d,J＝8.2Hz,1H),4.45(td,J＝8.1,5.3Hz,1H),4.03(dt,J＝7.6,2.5Hz,1H),3.93-3.85(m,2H),3.80(d,J＝1.0Hz,6H),3.66(s,4H),3.59-3.49(m,2H),3.24(q,J＝6.8Hz,2H),2.80(s,11H),2.75(d,J＝8.6Hz,1H),2.30(t,J＝7.6Hz,2H),2.18-2.11(m,2H),1.49(q,J＝7.3Hz,2H),1.25(d,J＝6.6Hz,25H)。

[0861] 化合物129:通过使用化合物128与N,N-二异丙基氨基氰基乙基膦酰胺酸-Cl以与以上合成化合物123的程序类似的程序获得化合物129。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ9.27(s,1H),7.76(dd,J＝34.6,8.1Hz,1H),7.49-7.39(m,2H),7.38-7.21(m,7H),6.93-6.83(m,4H),6.33(d,J＝5.9Hz,1H),5.86(dd,J＝7.4,3.6Hz,1H),5.23(dd,J＝8.1,6.3Hz,1H),4.15(ddt,J＝13.6,6.1,2.9Hz,1H),4.08-3.97(m,1H),3.77(d,J＝2.3Hz,7H),3.71-3.54(m,7H),3.46-3.33(m,2H),3.09(qd,J＝7.1,2.5Hz,2H),2.27(t,J＝7.5Hz,2H),2.17(s,6H),2.06(td,J＝7.4,1.9Hz,2H),1.61-1.47(m,6H),1.47-1.37(m,3H),1.26(s,32H),1.18-1.12(m,7H),1.05(d,J＝6.7Hz,3H)。^{31}P NMR(162MHz,乙腈-d_3)δ151.08,150.60(d,J＝7.1Hz)。

[0862] 2',3'-O-十五烷基ω羧甲基酯尿苷亚磷酰胺的合成方案23

[0863]



[0864] 化合物131和132:向化合物130(3.3g,6.95mmol)在二甲基甲酰胺(DMF)(60mL)中的溶液中一次性添加甲基-16-溴十六烷酸酯(5.00g,13.89mmol)和四丁基碘化铵(5.24g,13.89mmol)。将所得混合物在130℃下加热至回流持续12小时。在高真空下除去所得红色溶液的DMF以得到胶状棕色物质,将其通过combiflash色谱法(梯度:DCM中的0%-10%MeOH)纯化,以获得呈黄棕色固体的化合物131和132的混合物(1.45g,41%产率)。^{1}HNMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.32(dd,J=5.1,2.3Hz,2H),7.93(d,J=8.1Hz,1H),7.88(d,J=8.1Hz,1H),5.83(d,J=5.2Hz,1H),5.74(d,J=5.3Hz,1H),5.64(dt,J=8.1,2.6Hz,2H),5.31(d,J=6.1Hz,1H),5.13(td,J=5.1,1.9Hz,2H),5.04(d,J=5.8Hz,1H),4.16(q,J=5.5Hz,1H),4.08(q,J=5.0Hz,1H),3.99(t,J=6.4Hz,1H),3.91(q,J=3.5Hz,1H),3.87-3.80(m,2H),3.75(t,J=4.6Hz,1H),3.68-3.49(m,10H),3.43(tt,J=9.6,6.7Hz,2H),3.22-3.06(m,8H),2.28(dd,J=8.3,6.6Hz,4H),1.66-1.43(m,17H),1.31-1.15(m,58H),0.93(t,J=7.3Hz,11H)ppm。^{13}C NMR(126MHz,DMSO-d_6)δ173.30,172.84,163.05,163.00,150.69,150.49,140.52,140.34,101.76,101.65,87.99,86.06,85.12,82.77,81.04,79.16,77.44,72.61,69.74,69.60,68.33,63.54,60.75,60.50,57.55,57.53,57.50,51.11,33.56,33.24,29.33,29.05,29.02,29.00,28.94,28.91,28.88,28.84,28.79,28.63,28.55,28.42,28.38,28.09,25.53,25.36,24.51,24.40,23.06,19.20,19.18,13.46ppm。

[0865] 化合物133和134:向化合物131和132(1.5g,2.92mmol)在干燥吡啶(30mL)中的澄清溶液中分三部分添加4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(1.25g,3.51mmol)。将反应混合物在22℃下搅拌12小时,并且然后用饱和$NaHCO_3$溶液(30mL)淬灭。将所得混合物用DCM(2×40mL)萃取。将合并的有机层分离,用盐水(40mL)洗涤,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将粗化合物通过combiflash色谱法(梯度:己烷中的10%-50%乙酸乙酯)纯化,以获得呈白色泡沫状物的化合物133(0.32g,13%)和呈黄白色泡沫状物的化合物134(0.81g,34%)。化合物133的光谱数据:^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ11.34(d,J=2.3Hz,1H),7.77(d,J=8.1Hz,1H),7.46-7.13(m,9H),6.89(dd,J=9.0,1.8Hz,4H),5.70(d,J=3.6Hz,1H),5.40

(s,1H),5.30(dd,J=8.1,2.3Hz,1H),4.24(t,J=4.3Hz,1H),4.03-3.94(m,1H),3.92(dd,J=6.5,4.9Hz,1H),3.74(s,6H),3.57(s,4H),3.43-3.33(m,1H),3.27(ddd,J=31.4,10.8,3.6Hz,2H),2.27(t,J=7.4Hz,2H),1.60-1.41(m,4H),1.22(d,J=6.6Hz,23H)ppm。^{13}C NMR(126MHz,DMSO-d_6)δ173.66,163.25,158.34,150.52,144.75,140.73,135.46,135.35,129.92,129.89,129.09,128.08,127.85,127.79,127.62,127.02,113.40,112.96,101.54,89.62,86.15,80.58,76.85,72.08,69.86,62.49,55.22,51.35,33.45,29.32,29.15,29.13,29.10,29.00,28.81,28.60,25.63,24.59ppm。化合物134的光谱数据:^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ11.36(d,J=2.2Hz,1H),7.72(d,J=8.1Hz,1H),7.47-7.14(m,9H),6.90(d,J=8.9Hz,4H),5.80(d,J=3.9Hz,1H),5.29(dd,J=8.0,2.2Hz,1H),5.10(s,1H),4.17(t,J=5.7Hz,1H),3.96(ddd,J=6.4,4.4,2.8Hz,1H),3.90(dd,J=5.2,4.0Hz,1H),3.74(s,6H),3.57(s,4H),3.55-3.50(m,1H),3.34-3.28(m,2H),3.23(dd,J=10.7,2.8Hz,1H),2.27(t,J=7.4Hz,2H),1.50(td,J=7.5,7.0,3.3Hz,4H),1.22(s,24H)ppm。^{13}C NMR(126MHz,DMSO-d_6)δ173.32,162.92,158.13,150.27,144.60,140.15,135.33,135.05,129.75,127.88,127.69,126.78,113.25,113.23,101.48,86.97,85.90,82.72,80.80,69.77,68.49,62.69,55.03,51.11,33.24,29.02,29.00,28.94,28.84,28.79,28.63,28.42,25.37,24.40ppm。

[0866] 化合物135:在22℃下,向化合物133(1.0g,1.23mmol)在干燥二氯甲烷(30mL)中的澄清溶液中缓慢添加二异丙基乙胺(800.89mg,6.13mmol,1.08mL)和N-甲基咪唑(152.63mg,1.84mmol,148.19μL)。将所得溶液搅拌5分钟,之后一次性添加2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(611.38mg,2.45mmol,576.77μL)。将反应混合物在22℃保持搅拌1小时并检查TLC。将反应混合物用二氯甲烷(50mL)稀释,并用10%碳酸氢钠溶液(2×50mL)洗涤。将有机层分离,经无水Na_2SO_4干燥并过滤,并将滤液蒸发至干。将得到的粗物质通过combiflash色谱法(梯度:己烷中的20%-50%乙酸乙酯)纯化,以获得化合物135(1.01g,81%产率)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ8.92(s,1H),7.75(dd,J=12.7,8.2Hz,1H),7.43(dt,J=8.3,1.2Hz,2H),7.35-7.25(m,7H),6.98-6.74(m,4H),6.16-5.66(m,1H),5.30(dd,J=18.4,8.1Hz,1H),4.61-4.35(m,1H),4.06(ddt,J=15.5,6.4,3.6Hz,2H),3.89-3.72(m,8H),3.60(s,6H),3.48-3.27(m,3H),2.73-2.57(m,2H),2.27(t,J=7.5Hz,2H),1.54(q,J=6.8Hz,4H),1.26(q,J=3.7,2.5Hz,19H),1.16(dd,J=10.7,6.8Hz,12H)ppm。^{31}PNMR(162MHz,CD_3CN)δ150.91,150.18ppm。

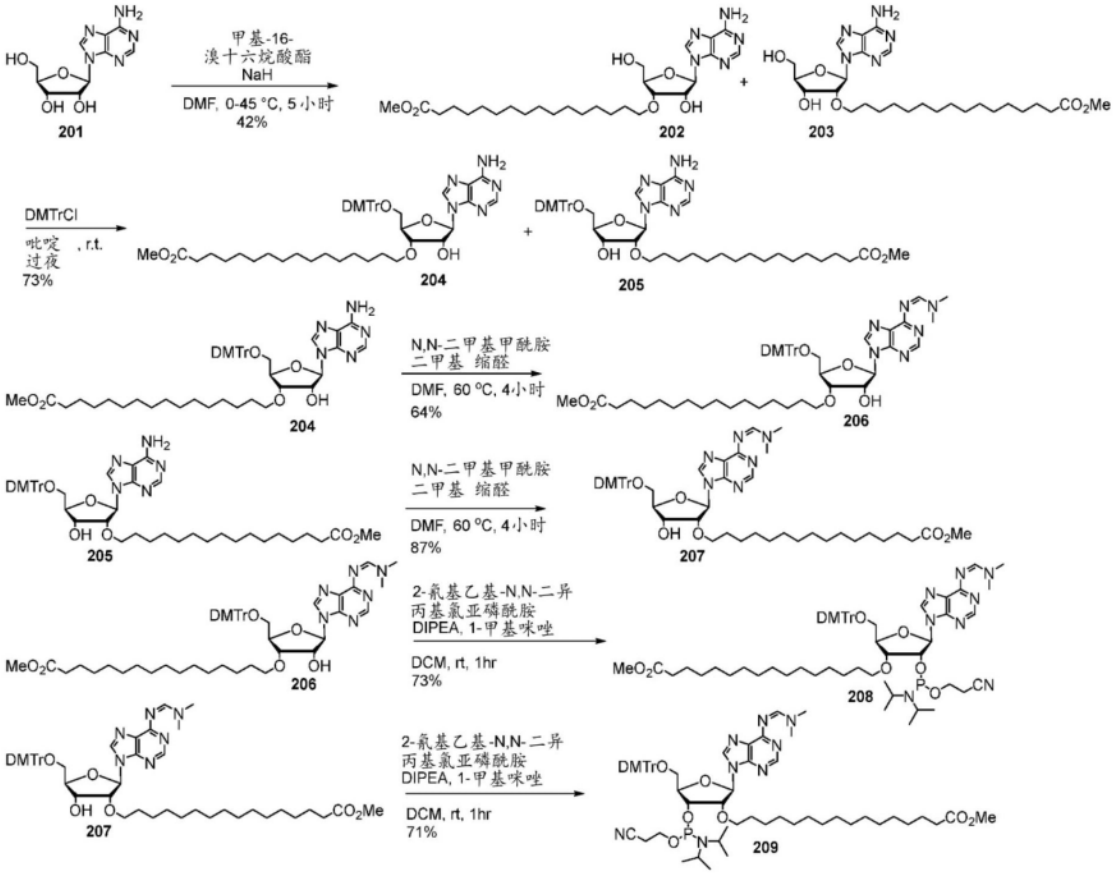
[0867] 化合物136:在22℃下,向135(0.95g,1.17mmol)在干燥二氯甲烷(40mL)中的澄清溶液中缓慢添加二异丙基乙胺(760.85mg,5.83mmol,1.03mL)和N-甲基咪唑(193.33mg,2.33mmol,187.70μL)。将所得溶液搅拌5分钟,之后一次性添加2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(580.81mg,2.33mmol,547.93μL)。将反应混合物在22℃保持搅拌1小时并检查TLC。将反应混合物用二氯甲烷(50mL)稀释,并用10%碳酸氢钠溶液(2×50mL)洗涤。将有机层分离,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将得到的粗物质通过combiflash色谱法(梯度:己烷中的20%-50%乙酸乙酯)纯化至136(0.97g,82%产率)。^{1}H NMR(400MHz,CD_3CN)δ8.91(s,1H),7.76(dd,J=34.7,8.2Hz,1H),7.44(ddt,J=9.9,8.1,1.3Hz,2H),7.38-7.20(m,7H),6.95-6.78(m,4H),5.85(dd,J=6.0,3.5Hz,1H),5.22(dd,J=8.1,5.9Hz,1H),4.68-4.31(m,1H),4.21-4.09(m,1H),4.03(ddd,J=11.5,4.9,3.5Hz,1H),3.77

(d,J＝2.4Hz,7H),3.69-3.54(m,7H),3.45-3.30(m,2H),2.66(ddd,J＝6.5,5.4,3.7Hz,1H),2.52(t,J＝6.0Hz,1H),2.27(t,J＝7.5Hz,2H),1.54(d,J＝10.2Hz,4H),1.27(d,J＝5.4Hz,21H),1.16(dd,J＝8.9,6.8Hz,9H),1.05(d,J＝6.8Hz,2H)ppm。^{31}P NMR(162MHz,CD_3CN)δ149.96,149.58ppm。

[0868] 2',3'-O-十五烷基ω羧甲基酯腺苷亚磷酰胺的合成

[0869] 方案24

[0870]



[0871] 化合物202和203:在0℃下,向化合物201(5.0g,18.71mmol)在干燥二甲基甲酰胺(50mL)中的悬浮液中添加氢化钠(矿物油中的60%分散体)(748.32mg,18.71mmol)并搅拌30分钟。去除冰浴,并将反应混合物温热至45℃并搅拌5小时,之后在高真空泵中蒸发溶剂并将固体物质通过combiflash色谱法(梯度:DCM的0%-10%MeOH)纯化,以获得呈白色固体的化合物202和203的混合物(4.2g,42%产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ8.37(s,1H),8.35(s,0.2H),8.13(s,1H),7.33(s,3H),5.98(d,J＝6.4Hz,0.8H),5.88(d,J＝6.2Hz,0.2H),5.51-5.40(m,1H),5.38(d,J＝6.4Hz,0.2H),5.14(d,J＝5.0Hz,1H),4.47(dd,J＝6.4,4.8Hz,1H),4.29(td,J＝4.9,2.9Hz,1H),4.06-3.86(m,1H),3.67(tt,J＝15.5,5.0Hz,2H),3.57(s,5H),3.33(dt,J＝9.5,6.5Hz,2H),2.27(t,J＝7.4Hz,2H),1.57-1.00(m,27H)ppm。^{13}C NMR(126MHz,DMSO-d_6)δ173.30,156.16,156.14,152.38,148.96,139.73,119.34,86.48,86.11,80.76,69.62,69.02,61.53,51.11,33.25,29.07,29.05,29.02,28.99,28.97,28.94,28.86,28.72,28.66,28.44,25.25,24.42ppm。

[0872] 化合物204和205:向化合物2和3的混合物(3.6g,6.72mmol)在干燥吡啶(25mL)中的澄清溶液中分三部分添加4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(2.88g,8.06mmol)。将反应混合物

在22℃下搅拌24小时,并且然后用饱和$NaHCO_3$溶液(30mL)淬灭。将所得混合物用DCM(2×40mL)萃取。将合并的有机层分离,用盐水(40mL)洗涤,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将粗化合物通过combiflash色谱法(梯度:己烷中的10%-90%乙酸乙酯)纯化,以获得呈白色泡沫状物的化合物204(0.36g,6%)和205(3.8g,67%)。化合物204的光谱数据:^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ8.27(s,1H),8.10(s,1H),7.42-7.06(m,10H),6.82(dd,J=9.1,2.7Hz,4H),5.90(d,J=4.4Hz,1H),5.46(d,J=5.9Hz,1H),4.86(q,J=5.1Hz,1H),4.18(t,J=5.2Hz,1H),4.07(q,J=4.6Hz,1H),3.72(s,6H),3.62(dt,J=9.5,6.4Hz,1H),3.43(dt,J=9.5,6.7Hz,1H),3.32(s,5H),3.17(dd,J=10.5,4.8Hz,1H),2.27(t,J=7.4Hz,2H),1.50(td,J=7.7,7.3,4.1Hz,4H),1.22(s,24H)ppm。^{13}C NMR(126MHz,DMSO-d_6)δ173.32,158.02,156.04,152.54,149.23,144.77,139.57,135.50,135.48,129.62,129.59,127.72,127.63,126.60,119.16,113.07,88.21,85.48,80.84,77.63,71.69,69.66,63.07,54.97,51.11,33.24,29.19,29.00,28.99,28.93,28.83,28.63,28.42,25.47,24.40ppm。化合物205的光谱数据:^1H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ8.25(s,1H),8.08(s,1H),7.48-7.04(m,10H),6.83(dd,J=8.8,6.0Hz,4H),6.00(d,J=5.1Hz,1H),5.16(d,J=5.9Hz,1H),4.58(t,J=5.1Hz,1H),4.37(q,J=5.1Hz,1H),4.06(q,J=4.6Hz,1H),3.72(s,6H),3.57(s,4H),3.47-3.40(m,1H),3.24(d,J=4.7Hz,2H),2.26(d,J=7.5Hz,2H),1.46(dt,J=31.8,7.0Hz,4H),1.27-1.08(m,23H)ppm。^{13}C NMR(126MHz,DMSO-d_6)δ173.32,158.03,158.01,156.06,152.57,149.22,144.81,139.54,135.54,135.43,129.68,127.72,127.67,126.60,119.19,113.08,85.89,85.50,83.56,80.04,69.79,69.11,63.55,54.98,51.11,33.24,29.00,28.98,28.94,28.84,28.71,28.63,28.42,25.30,24.40ppm。

[0873] 化合物206:向化合物204(1.27g,1.52mmol)在二甲基甲酰胺(30mL)中的澄清溶液中一次性添加N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛(288.16mg,2.27mmol,323.77μL),并将反应混合物在60℃下搅拌4小时。检查TLC,并在高真空泵下除去挥发物。将残留物溶解于DCM(100mL)中,并将有机层用盐水(3×50mL)洗涤。然后将DCM层经无水Na_2SO_4干燥,过滤并将滤液蒸发至干。将由此得到的粗物质通过combiflash色谱法(梯度:DCM中的0%-5%MeOH)纯化,以获得呈白色吸湿性固体的206(0.87g,64%产率)。^1H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.95(s,1H),8.50(s,1H),8.09(s,1H),7.47-7.36(m,2H),7.31-7.15(m,8H),6.83-6.74(m,4H),6.02(d,J=5.5Hz,1H),4.82(d,J=5.5Hz,1H),4.27(q,J=4.0Hz,1H),4.19(dd,J=5.5,3.5Hz,1H),3.78(d,J=0.8Hz,6H),3.69(d,J=6.5Hz,1H),3.66(s,3H),3.56(tdd,J=9.3,6.7,2.6Hz,2H),3.46(dd,J=10.4,4.4Hz,1H),3.31(dd,J=10.5,3.9Hz,1H),3.26(s,3H),3.20(s,3H),2.30(t,J=7.6Hz,2H),1.60(p,J=6.9Hz,5H),1.27(d,J=8.3Hz,25H)ppm。^{13}C NMR(101MHz,$CDCl_3$)δ174.49,159.87,158.66,158.33,152.76,151.62,144.62,140.30,135.82,135.79,130.13,130.10,128.22,128.02,127.03,126.60,113.31,89.27,86.66,82.39,78.68,74.07,71.14,63.42,55.35,51.58,41.42,35.30,34.26,29.88,29.80,29.77,29.74,29.72,29.60,29.40,29.29,26.22,25.10ppm。

[0874] 化合物207:向205(2.0g,2.39mmol)在二甲基甲酰胺(30mL)中的澄清溶液中一次性添加N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛(453.79mg,3.58mmol,505.90μL),并将反应混合物在60℃下搅拌4小时。检查TLC,并在高真空泵下除去挥发性材料。将残留物溶解于DCM(100mL)中,并将有机层用盐水(3×50mL)洗涤。然后将DCM层经无水Na_2SO_4干燥,过滤并将滤液蒸发

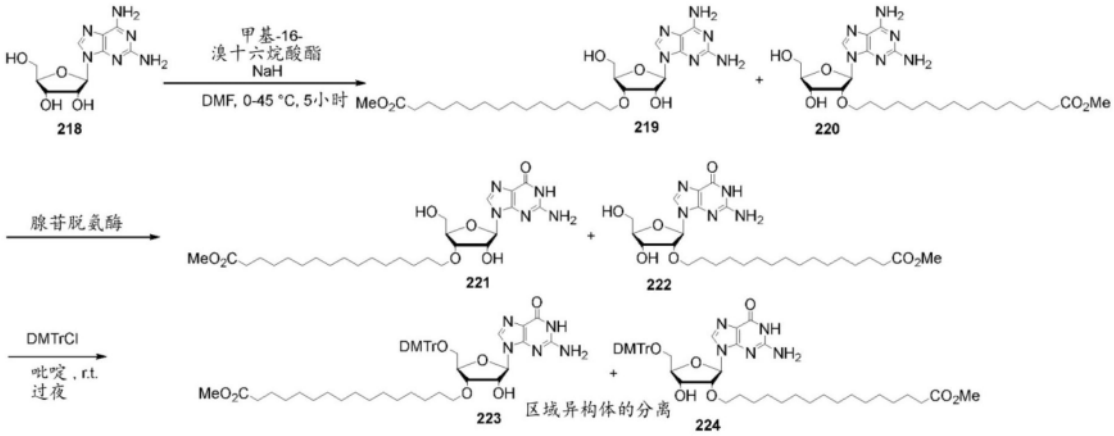
至干。将由此得到的粗物质通过combiflash色谱法(梯度:DCM中的0%-5%MeOH)纯化,以获得呈白色吸湿性固体的化合物207(1.85g,87%产率)。^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.95(s,1H),8.49(s,1H),8.10(s,1H),7.47-7.41(m,2H),7.36-7.30(m,4H),7.28-7.17(m,3H),6.89-6.67(m,4H),6.17(d,J=4.2Hz,1H),4.52(dd,J=5.3,4.2Hz,1H),4.45(q,J=5.3Hz,1H),4.21(td,J=4.6,3.1Hz,1H),3.78(d,J=1.0Hz,6H),3.74-3.67(m,1H),3.66(s,3H),3.60-3.54(m,1H),3.51(dd,J=10.6,3.2Hz,1H),3.41(dd,J=10.6,4.4Hz,1H),3.26(s,3H),3.20(s,3H),2.73(d,J=5.9Hz,1H),2.30(t,J=7.6Hz,2H),1.67-1.52(m,4H),1.37-1.04(m,25H)ppm。^{13}C NMR(126MHz,$CDCl_3$)δ174.47,159.73,158.66,158.24,152.89,151.46,144.70,140.20,135.93,135.83,130.23,130.20,128.32,128.00,127.01,126.60,113.32,86.89,86.69,84.04,81.75,71.60,70.23,63.39,55.34,51.56,41.40,35.30,34.25,29.77,29.74,29.72,29.65,29.58,29.48,29.39,29.28,26.04,25.09ppm。

[0875] 化合物208:在22℃下,向化合物206(0.68g,761.38μmol)在干燥二氯甲烷(20mL)中的澄清溶液中缓慢添加二异丙基乙胺(496.97mg,3.81mmol,669.77μL)和N-甲基咪唑(94.71mg,1.14mmol,91.95μL)。将所得溶液搅拌5分钟,之后一次性添加2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(379.37mg,1.52mmol,357.90μL)。将反应混合物在22℃保持搅拌1小时并检查TLC。将反应混合物用二氯甲烷(50mL)稀释,并用10%碳酸氢钠溶液(2×50mL)洗涤。将有机层分离,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将得到的粗物质通过combiflash色谱法(梯度:已烷中的40%-70%乙酸乙酯)纯化,以获得呈白色吸湿性固体的化合物208(0.61g,73%产率)。^{1}H NMR(500MHz,CD_3CN)δ8.89(d,J=2.3Hz,1H),8.34(d,J=10.8Hz,1H),8.08(d,J=11.5Hz,1H),7.46-7.38(m,2H),7.34-7.15(m,7H),6.88-6.73(m,4H),6.04(dd,J=5.2,3.3Hz,1H),4.95-4.60(m,2H),4.28(dq,J=21.0,4.2Hz,1H),4.14-3.84(m,1H),3.77-3.70(m,7H),3.67-3.58(m,5H),3.30(dd,J=15.2,4.7Hz,1H),3.19-3.10(m,7H),2.50(t,J=6.0Hz,1H),2.27(t,J=7.5Hz,2H),1.51(dt,J=45.3,7.0Hz,4H),1.32-1.07(m,40H)ppm。^{31}P NMR(202MHz,CD_3CN)δ151.07,150.64ppm。

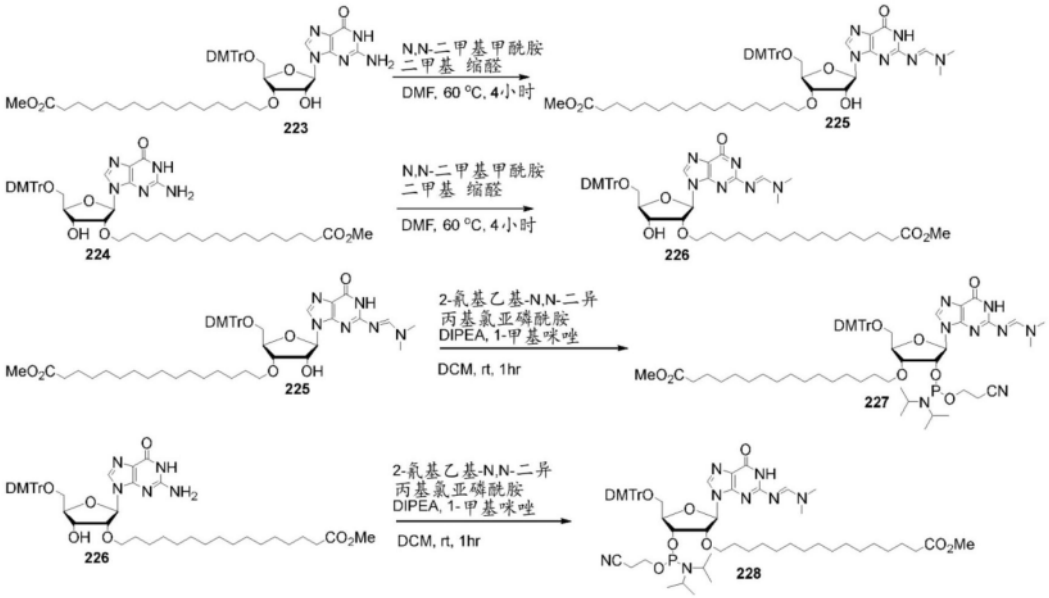
[0876] 化合物209:在22℃下,向化合物207(0.2g,223.93μmol)在干燥二氯甲烷(35mL)中的澄清溶液中缓慢添加二异丙基乙胺(146.17mg,1.12mmol,196.99μL)和N-甲基咪唑(27.86mg,335.90μmol,27.04μL)。将所得溶液搅拌5分钟,之后一次性添加2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(111.58mg,447.87μmol,105.26μL)。将反应混合物在22℃保持搅拌1小时并检查TLC。将反应混合物用二氯甲烷(50mL)稀释,并用10%碳酸氢钠溶液(2×50mL)洗涤。将有机层分离,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将得到的粗物质通过combiflash色谱法(梯度:已烷中的20%-50%乙酸乙酯)纯化,以获得呈吸湿性固体的化合物209(0.173g,71%产率)。^{1}H NMR(400MHz,CD_3CN)δ8.89(d,J=1.8Hz,1H),8.34(d,J=9.0Hz,1H),8.08(d,J=9.6Hz,1H),7.50-7.37(m,2H),7.35-7.14(m,6H),6.81(ddd,J=9.1,6.0,3.2Hz,4H),6.03(dd,J=5.2,3.0Hz,1H),4.79(dt,J=15.9,5.0Hz,1H),4.68(tt,J=9.4,4.6Hz,1H),4.34-4.20(m,1H),3.95-3.78(m,1H),3.76-3.73(m,5H),3.59(s,6H),3.51-3.37(m,2H),3.29(ddd,J=12.6,10.7,4.7Hz,1H),3.16(d,J=8.3Hz,5H),2.71-2.62(m,1H),2.50(t,J=6.0Hz,1H),2.27(t,J=7.5Hz,2H),1.50(dt,J=36.2,7.1Hz,4H),1.35-1.04(m,31H)。^{31}P NMR(162MHz,CD_3CN)δ149.86,149.42ppm。

[0877] 2',3'-O-十五烷基ω羧甲基酯鸟苷亚磷酰胺的合成

[0878] 方案25



[0879]



[0880] 化合物219和220:在0℃下,向化合物218在干燥二甲基甲酰胺中的悬浮液中添加氢化钠(矿物油中的60%分散体)并搅拌30分钟。去除冰浴,并将反应混合物温热至45℃并搅拌5小时,之后在高真空泵中蒸发溶剂并将固体物质通过combiflash色谱法纯化,以获得化合物219和220的混合物。

[0881] 化合物221和222:将化合物219和220分别用腺苷脱氨酶(ADA)转化为化合物221和222,如Robins等人(Can.J.Chem.[加拿大化学杂志]1997,75,762-767)中所述。

[0882] 化合物223和224:向化合物221和222的混合物在干燥吡啶中的澄清溶液中分三部分添加4,4'-二甲氧基三苯甲基氯。将反应混合物在22℃下搅拌24小时,并且然后用饱和$NaHCO_3$溶液淬灭。将所得混合物用DCM萃取。将合并的有机层分离,用盐水洗涤,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将粗化合物通过combiflash色谱法纯化,以获得化合物223和224。

[0883] 化合物225:向化合物223在二甲基甲酰胺中的澄清溶液中一次性添加N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛,并将反应混合物在60℃下搅拌4小时。检查TLC,并在高真空泵下除去挥发性材料。将残留物溶解于DCM(100mL)中,并将有机层用盐水洗涤。然后将DCM层经无水Na_2SO_4干燥,过滤并将滤液蒸发至干。将由此得到的粗物质通过combiflash色谱法纯化,以

获得化合物225。

[0884] 化合物226:向化合物224在二甲基甲酰胺中的澄清溶液中一次性添加N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛,并将反应混合物在60℃下搅拌4小时。检查TLC,并在高真空泵下除去挥发性材料。将残留物溶解于DCM中,并将有机层用盐水洗涤。然后将DCM层经无水Na_2SO_4干燥,过滤并将滤液蒸发至干。将由此得到的粗物质通过combiflash色谱法纯化,以获得化合物226。

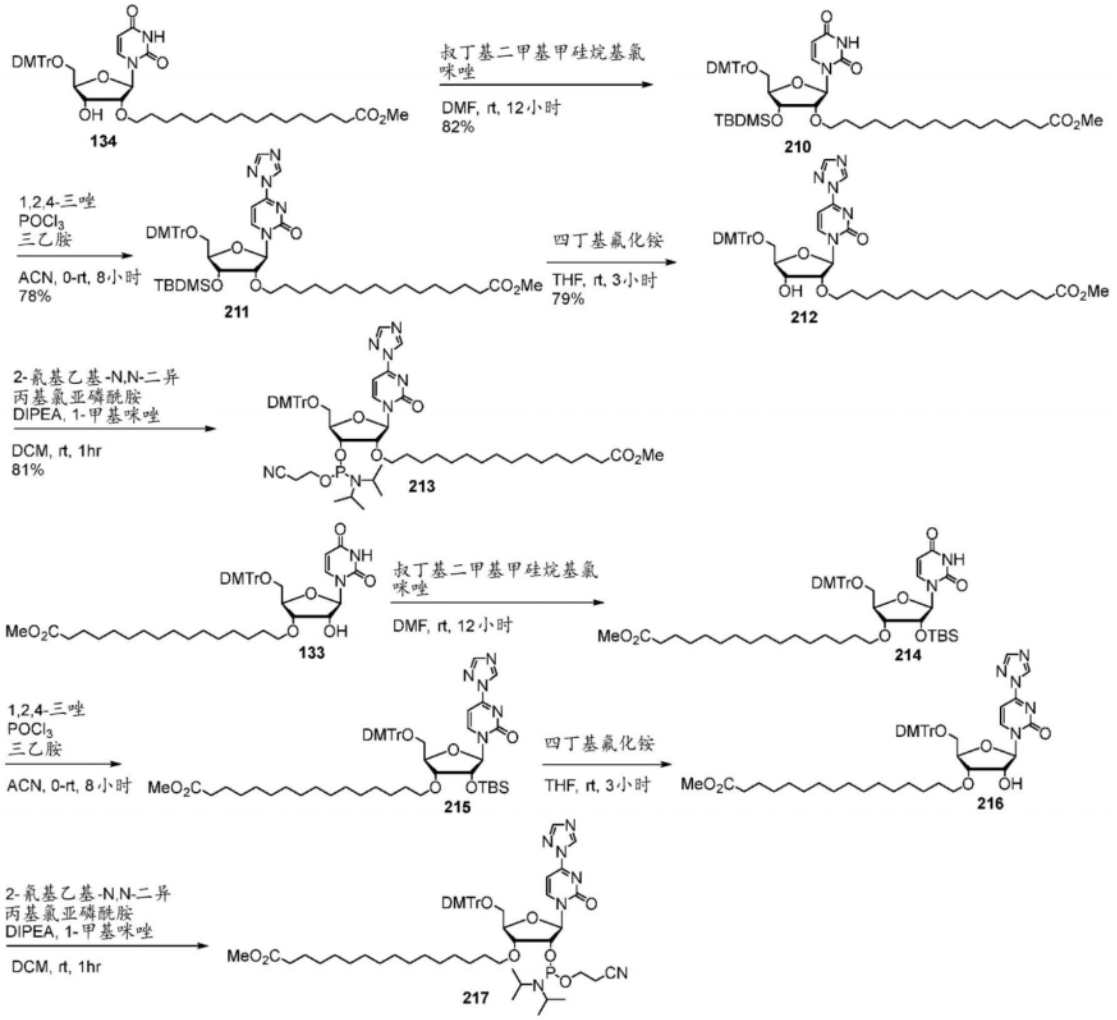
[0885] 化合物227:在22℃下,向化合物225在干燥二氯甲烷中的澄清溶液中缓慢添加二异丙基乙胺和N-甲基咪唑。将所得溶液搅拌5分钟,之后一次性添加2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺。将反应混合物在22℃保持搅拌1小时并检查TLC。将反应混合物用添加10%碳酸氢钠溶液的二氯甲烷稀释。将有机层分离,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将得到的粗物质通过combiflash色谱法纯化以获得化合物227。

[0886] 化合物228:在22℃下,向化合物226在干燥二氯甲烷中的澄清溶液中缓慢添加二异丙基乙胺和N-甲基咪唑。将所得溶液搅拌5分钟,之后一次性添加2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺。将反应混合物在22℃保持搅拌1小时并检查TLC。将反应混合物用添加10%碳酸氢钠溶液的二氯甲烷稀释。将有机层分离,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将得到的粗物质通过combiflash色谱法纯化以获得化合物228。

[0887] 2',3'-O-十五烷基ω羧甲基酯胞苷亚磷酰胺的合成

[0888] 方案26

[0889]



[0890] 化合物210:向化合物134(1.2g,1.47mmol)在二甲基甲酰胺(15mL)中的澄清溶液中添加咪唑(202.51mg,2.94mmol)并搅拌5分钟。向所得溶液中一次性添加叔丁基二甲基甲硅烷基氯(343.17mg,2.21mmol)并在22℃下搅拌12小时。然后将反应混合物用乙酸乙酯(50mL)和盐水(50mL)稀释。将有机层分离,并进一步用盐水(2×50mL)和水(50mL)洗涤。然后将有机层经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将由此得到的粗化合物通过combiflash色谱法(梯度:己烷中的0%-50%乙酸乙酯)纯化,以获得呈白色泡沫状物的化合物210(1.12g,82%产率)。^1H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.38(s,1H),8.14(d,J=8.1Hz,1H),7.42-7.15(m,10H),6.84(dd,J=8.9,3.8Hz,3H),5.92(d,J=1.6Hz,1H),5.24(d,J=8.1Hz,1H),4.35(dd,J=7.9,4.8Hz,1H),4.11(d,J=7.9Hz,1H),3.80(d,J=1.2Hz,7H),3.72(dd,J=4.9,1.7Hz,1H),3.66(s,4H),3.52(dt,J=9.2,6.6Hz,1H),3.36(dd,J=11.1,2.3Hz,1H),2.30(t,J=7.6Hz,2H),1.69-1.50(m,8H),1.37-1.22(m,24H),0.81(s,9H),0.05(s,3H),-0.04(s,3H)ppm。^{13}C NMR(101MHz,$CDCl_3$)δ174.51,163.10,158.90,149.97,144.22,140.41,135.26,135.10,130.40,128.47,128.09,127.38,113.38,113.34,102.04,88.35,87.16,82.89,82.79,71.01,69.51,60.90,55.41,51.59,34.28,30.00,29.81,29.79,29.76,29.74,29.64,29.60,29.41,29.30,26.27,25.76,25.11,18.19,-4.37,-4.87ppm。

[0891] 化合物211:向化合物210(1.2g,1.29mmol)在乙腈(30mL)中的澄清溶液中添加1,

2,4-三唑(2.00g,28.41mmol)和三乙胺(2.89g,28.41mmol,3.98mL)。将反应混合物冷却至0℃并且然后缓慢添加三氯氧磷(V)(594.02mg,3.87mmol,362.21μL)。15分钟后去除冰浴并在22℃下继续搅拌8小时。在高真空下除去挥发性物质并将残余物在DCM(50mL)中稀释并将有机层用水(30mL)和盐水(50mL)洗涤。将DCM层分离,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将粗化合物通过Combiflash色谱法(梯度:已烷中的20%-60%乙酸乙酯)纯化,以获得呈白色固体的化合物211(0.99g,78%产率)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ9.44(s,1H),8.78(d,J=7.2Hz,1H),8.39(s,1H),7.40-7.12(m,23H),7.06(d,J=8.8Hz,5H),6.47(d,J=7.2Hz,1H),6.19(s,2H),5.85(s,1H),4.39(dd,J=9.1,4.7Hz,1H),4.08(d,J=9.1Hz,1H),3.94(d,J=4.8Hz,1H),3.84(s,0H),3.75(d,J=6.1Hz,7H),3.55(s,5H),3.31-3.28(m,1H),2.25(t,J=7.4Hz,2H),1.50(dt,J=24.9,6.9Hz,4H),1.21(d,J=8.1Hz,26H),0.72(s,10H),0.01(s,3H),-0.10(s,3H)ppm。

[0892] 化合物212:在22℃下,向化合物211(0.99g,1.01mmol)在THF(20mL)中的溶液中,一次性缓慢添加四丁基氟化铵,THF中的1M(346.72mg,1.31mmol,383.97μL),并且然后搅拌3小时。在高真空泵中除去挥发性物质,并将由此得到的粗残余物通过combiflash色谱法(梯度:DCM中的0%-5%甲醇)纯化,以获得呈白色固体的化合物212(0.69g,79%产率)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ9.24(s,1H),8.86(d,J=7.2Hz,1H),8.10(s,1H),7.44-7.27(m,9H),6.87(dd,J=9.0,0.9Hz,4H),6.56(d,J=7.2Hz,1H),6.01(s,1H),4.49(ddd,J=10.7,9.2,5.1Hz,1H),4.24-4.04(m,2H),3.94(d,J=5.2Hz,1H),3.82(d,J=0.8Hz,6H),3.78-3.73(m,1H),3.66(s,3H),3.63(t,J=2.6Hz,2H),2.61(d,J=10.7Hz,1H),2.30(t,J=7.5Hz,2H),1.79-1.61(m,4H),1.42-1.08(m,24H)ppm。^{13}C NMR(101MHz,$CDCl_3$)δ174.51,159.49,158.91,154.41,154.08,147.44,144.17,143.34,135.62,135.25,130.34,130.28,128.43,128.23,127.40,113.51,94.82,89.38,87.36,83.69,82.20,71.44,67.62,60.66,53.57,51.59,34.27,29.79,29.74,29.60,29.40,29.30,26.18,25.11ppm。

[0893] 化合物213:在22℃下,向化合物212(0.23g,265.57μmol)在干燥DCM(10mL)中的澄清溶液中缓慢添加二异丙基乙胺(173.35mg,1.33mmol,233.62μL)和N-甲基咪唑(33.04mg,398.36μmol,32.07μL)。将所得溶液搅拌5分钟,之后一次性添加2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(132.33mg,531.15μmol,124.84μL)。将反应混合物在22℃保持搅拌1小时并检查TLC。将反应混合物用DCM(50mL)稀释,并用10%碳酸氢钠溶液(2×50mL)洗涤。将有机层分离,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将得到的粗物质通过Combiflash色谱法(梯度:已烷中的30%-60%乙酸乙酯)纯化,以获得呈白色固体的化合物213(0.23g,81%产率)。^{1}H NMR(500MHz,CD_3CN)δ9.17(s,1H),8.72(dd,J=35.4,7.2Hz,1H),8.13(s,1H),7.64-7.17(m,9H),6.89(ddt,J=6.8,5.4,1.4Hz,4H),6.44(dd,J=24.2,7.2Hz,1H),5.88(s,1H),4.79-4.41(m,1H),4.31-4.01(m,2H),3.97-3.45(m,18H),2.73-2.45(m,2H),2.27(t,J=7.5Hz,2H),1.73-1.50(m,4H),1.40-1.05(m,35H)ppm。^{13}C NMR(126MHz,CD_3CN)δ174.82,160.22,159.86,159.84,154.96,154.88,148.55,145.41,144.07,136.70,136.54,136.35,136.29,131.32,131.28,131.22,131.17,129.32,129.02,128.14,114.21,100.98,95.04,94.93,91.54,91.30,87.85,87.76,83.10,82.86,81.65,81.63,71.83,71.60,70.67,69.94,69.86,61.57,61.28,59.31,59.24,59.14,59.08,55.97,55.95,51.83,44.13,44.06,43.96,34.51,30.64,30.61,30.35,30.34,30.30,30.28,30.25,30.18,29.97,

29.78,26.87,25.70,25.14,25.08,25.04,24.99,24.88,24.82,21.19,21.13ppm。^{31}P NMR (202MHz,CD_3CN)δ151.23,149.91ppm。

[0894] 化合物214:向化合物133(1.3g,1.60mmol)在二甲基甲酰胺(15mL)中的澄清溶液中添加咪唑(219.38mg,3.19mmol)并搅拌5分钟。向所得溶液中一次性添加叔丁基二甲基甲硅烷基氯(371.77mg,2.39mmol)并在22℃下搅拌16小时。然后将反应混合物用乙酸乙酯(50mL)和盐水(50mL)稀释。将有机层分离,并进一步用盐水(2×50mL)和水(50mL)洗涤。然后将有机层经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将由此得到的粗化合物通过combiflash色谱法(梯度:己烷中的0%-50%乙酸乙酯)纯化,以获得呈白色泡沫状物的化合物214(1.29g,1.39mmol,87.03%产率)。

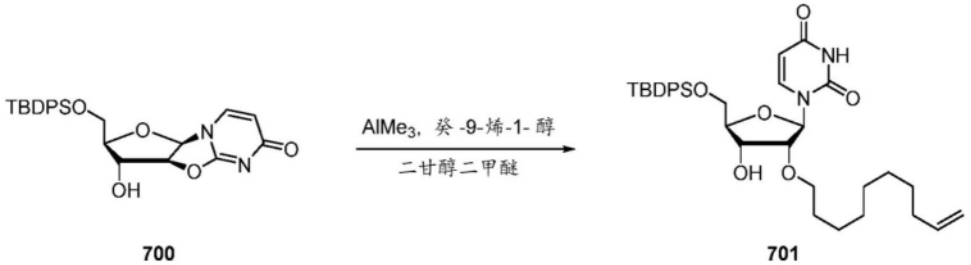
[0895] 化合物215:向化合物214(1.29mmol)在乙腈(30mL)中的澄清溶液中添加1,2,4-三唑(28.41mmol)和三乙胺(28.41mmol,3.98mL)。将反应混合物冷却至0℃并且然后缓慢添加三氯氧磷(V)(3.87mmol,362.21μL)。15分钟后去除冰浴并在22℃下继续搅拌9小时。在高真空下除去挥发性物质并将残余物在DCM(60mL)中稀释并将有机层用水(30mL)和盐水(2×50mL)洗涤。将DCM层分离,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将粗化合物通过Combiflash色谱法(梯度:己烷中的20%-70%乙酸乙酯)纯化,以获得呈白色固体的215(0.92g,72%产率)。

[0896] 化合物216:在22℃下,向化合物215(0.92g)在THF(20mL)中的溶液中,一次性缓慢添加四丁基氟化铵,THF中的1M(1.31mmol,383.97μL),并且然后搅拌3小时。在高真空泵中除去挥发性物质,并将由此得到的粗残余物通过combiflash色谱法(梯度:DCM中的0%-5%甲醇)纯化,以获得呈白色固体的化合物216(0.70g,79%产率)。

[0897] 化合物217:在22℃下,向化合物216(0.25g)在干燥DCM(10mL)中的澄清溶液中缓慢添加二异丙基乙胺(1.33mmol,233.62μL)和N-甲基咪唑(398.36μmol,32.07μL)。将所得溶液搅拌5分钟,之后一次性添加2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(531.15μmol,124.84μL)。将反应混合物在22℃保持搅拌1小时并检查TLC。将反应混合物用DCM(50mL)稀释,并用10%碳酸氢钠溶液(2×50mL)洗涤。将有机层分离,经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并将滤液蒸发至干。将得到的粗物质通过Combiflash色谱法(梯度:己烷中的30%-80%乙酸乙酯)纯化,以获得呈白色泡沫状物的化合物217(0.24g,82%产率)。

[0898] 2'-O-三、七和九-癸基ω羧甲基酯尿苷亚磷酰胺的合成

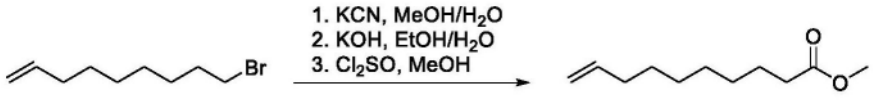
[0899] 方案27

[0900] 

[0901] 化合物701:将三甲基铝(35.2mL,70.3mmol)在庚烷中的2M溶液滴加至癸-9-烯-1-醇(41.05mL,230.14mmol)和无水二甘醇二甲醚(24mL)的混合物中。将所得混合物加热至100℃1小时,冷却至室温,随后一次性添加5'-OTBDPS脱水尿苷700(14.85g,31.96mmol)。将反应混合物在125℃下加热过夜。将混合物冷却至室温并在10%H_3PO_4(400mL)与乙酸乙酯

(500mL)之间分配。将有机层分离,用盐水洗涤,经无水Na_2SO_4干燥并过滤。在真空下除去挥发物,并将残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-40%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物701(10.5g,52%)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d6)δ11.37(d,J=2.2Hz,1H),7.71(d,J=8.1Hz,1H),7.66-7.60(m,5H),7.51-7.40(m,7H),5.85(d,J=4.5Hz,1H),5.78(ddt,J=17.0,10.2,6.7Hz,1H),5.26(dd,J=8.1,2.2Hz,1H),5.15(s,1H),5.01-4.90(m,2H),4.18(t,J=5.1Hz,1H),4.01-3.86(m,3H),3.85-3.76(m,1H),3.59(dt,J=9.7,6.5Hz,1H),3.48(dt,J=9.7,6.6Hz,1H),3.33(s,2H),2.03-1.95(m,2H),1.53-1.45(m,2H),1.37-1.17(m,12H),1.03(s,9H)。^{13}C NMR(126MHz,DMSO)δ162.84,150.30,139.82,138.79,135.13,134.96,132.68,132.17,130.05,130.00,127.97,114.56,101.55,86.45,84.02,80.90,69.73,68.08,63.27,39.52,33.14,28.98,28.83,28.72,28.46,28.23,26.67,25.33,18.82。$C_{35}H_{49}N_2O_6Si$的LRMS(ESI)计算值:$[M+H]^+$m/z=621.33,实验值:621.4。

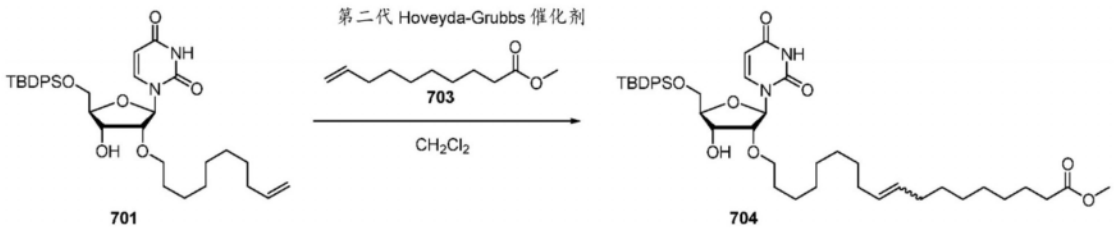
[0902] 方案28

[0903] 

702 703

[0904] 化合物703:将9-溴壬-1-烯702(13.3g,62.24mmol)在MeOH(105mL)中的溶液与氰化钾(5.27g,80.9mmol)在H_2O(25mL)中的溶液混合。将所得混合物加热至回流持续24小时。在减压下除去有机溶剂,将水性残余物用乙酸乙酯萃取,用无水Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩,以给出粗腈。向氢氧化钾(31.43g,560.18mmol)在100mL乙醇和100mL水中的溶液中添加先前合成的腈,并将所得混合物加热至回流持续24小时。将混合物的总体积在减压下减半,并且然后用Et_2O(100mL)萃取。将浓HCl滴加至所得水层中直至其达到酸性pH(1-2),随后用Et_2O(2x 100mL)萃取。将有机萃取物经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并蒸发至干,以获得粗羧酸(9.81g)。将粗羧酸溶解于无水MeOH(130mL)中并在0℃下滴加亚硫酰氯(6.77mL,93.36mmol)。去除冰浴,并将所得混合物搅拌3小时。在减压下除去挥发物,将残余物通过硅胶垫(5cm)(使用EtOAc/已烷2:8作为洗脱剂)过滤,以给出化合物703(10.5g,91%,经3步)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ5.80(ddt,J=16.9,10.1,6.7Hz,1H),5.04-4.89(m,2H),3.66(s,3H),2.30(t,J=7.5Hz,2H),2.09-1.99(m,2H),1.68-1.53(m,3H),1.45-1.25(m,9H)。$C_{11}H_{21}O_2$的LRMS(ESI)计算值:$[M+H]^+$m/z=185.15,实验值:185.1。

[0905] 方案29

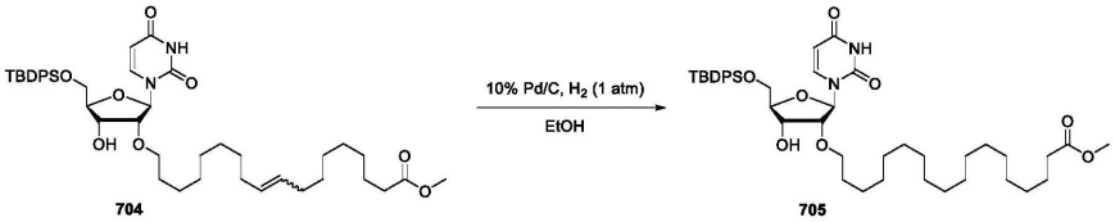
[0906] 

701 704

[0907] 化合物704:将化合物701(5.42g,8.73mmol)溶解于无水DCM(175mL)中,随后添加甲基癸-9-烯酸酯703(10.46g,56.74mmol)、苯醌(141.56mg,1.31mmol)和第二代Hoveyda-Grubbs催化剂(547.04mg,873.0μmol)。将所得混合物在回流下搅拌3.5小时,冷却至室温,并在减压下将反应混合物的总体积减半。将所得溶液装载到120g硅胶柱筒中并通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-60%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出呈绿色油状物的化合物704

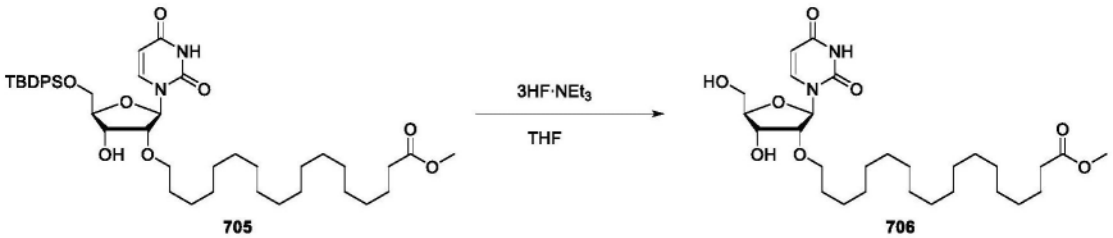
(5.37g,79%)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d6)δ11.37(d,J=2.2Hz,1H),7.71(d,J=7.9Hz,1H),7.67-7.58(m,5H),7.52-7.38(m,7H),5.85(d,J=4.5Hz,1H),5.39-5.29(m,2H),5.25(ddd,J=8.1,2.3,1.0Hz,1H),5.17-5.12(m,1H),4.18(q,J=5.5Hz,1H),3.97-3.86(m,3H),3.83-3.76(m,1H),3.61-3.55(m,4H),3.52-3.40(m,2H),3.31(s,2H),2.27(td,J=7.4,4.1Hz,2H),1.95-1.87(m,4H),1.54-1.44(m,4H),1.34-1.19(m,20H),1.08-0.95(m,11H)。^{13}C NMR(101MHz,DMSO)δ173.33,170.32,162.86,150.31,139.81,135.15,134.98,132.66,132.15,130.08,130.06,130.02,130.00,128.00,115.62,101.55,86.44,84.02,80.93,71.28,69.72,69.57,68.08,63.27,59.75,58.05,51.14,39.52,33.25,31.95,31.91,28.99,28.91,28.87,28.76,28.48,28.43,28.30,26.68,25.35,24.40,20.76,18.84,14.09。$C_{44}H_{65}N_2O_8Si$的LRMS(ESI)计算值:$[M+H]^+$m/z=777.44,实验值:777.5。

[0908] 方案30

[0909] 

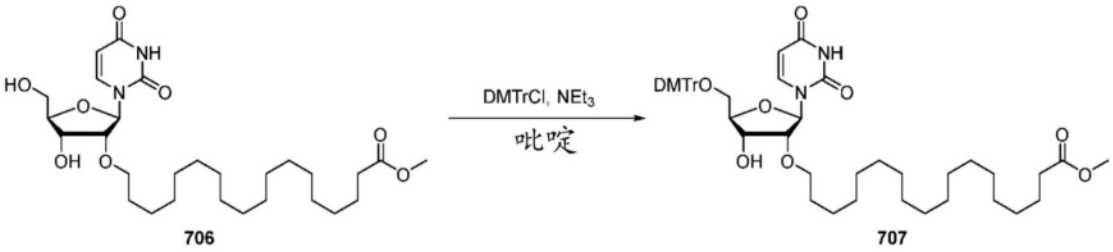
[0910] 化合物705:将10%钯碳(735.42mg,0.69mmol)添加至核苷704(5.37g,6.91mmol)在EtOH(170mL)中的搅拌溶液中。烧瓶配备有连接至充满氢气的气球的三通适配器(three-way adapter)。将烧瓶进行一系列真空-H_2再填充(x3)以使溶液饱和。0.5小时后,将混合物用MeOH稀释并通过硅藻土垫(用更多甲醇冲洗)过滤。将滤液在减压下蒸发,以给出粗化合物705(5.01g,93%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ11.37(d,J=2.2Hz,1H),7.71(d,J=8.1Hz,1H),7.67-7.59(m,5H),7.52-7.39(m,7H),5.85(d,J=4.5Hz,1H),5.25(dd,J=8.1,2.2Hz,1H),5.16(d,J=6.1Hz,1H),4.18(q,J=5.5Hz,1H),3.97-3.86(m,3H),3.83-3.76(m,1H),3.62-3.54(m,4H),3.52-3.40(m,2H),2.27(td,J=7.4,2.4Hz,2H),1.53-1.44(m,4H),1.30-1.15(m,28H),1.03(d,J=1.3Hz,9H)。^{13}C NMR(101MHz,DMSO)δ173.35,162.85,150.32,139.82,135.16,134.98,132.66,132.15,130.09,130.03,128.01,101.55,86.44,84.03,80.93,69.71,68.08,63.28,56.02,51.15,39.52,33.26,29.04,29.02,29.00,28.96,28.86,28.76,28.66,28.44,26.69,25.36,24.43,18.84,18.56。$C_{44}H_{67}N_2O_8Si$的LRMS(ESI)计算值:$[M+H]^+$m/z=779.46,实验值:779.4。

[0911] 方案31

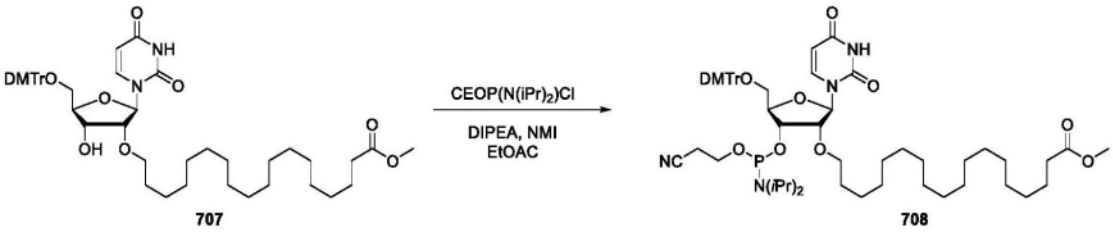
[0912] 

[0913] 化合物706:将三乙胺(3.59mL,25.72mmol)和三乙胺三氢氟酸盐(3.14mL,19.3mmol)依次添加至化合物705(5.01g,6.43mmol)在THF(50mL)中的搅拌溶液中。将所得混合物在45℃下加热4小时,随后在减压下除去挥发物。将粗残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-100%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物706(1.46g,42%)。

[0914] 方案32

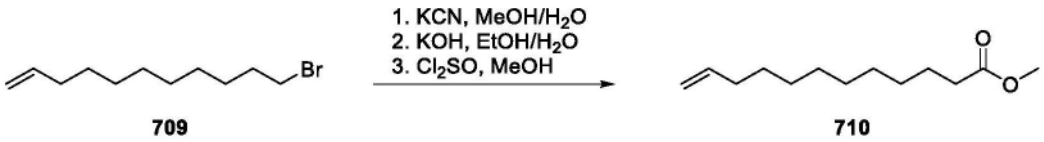
[0915] 

[0916] 化合物707:将4,4′-二甲氧基三苯甲基氯(1.10g,3.24mmol)和三乙胺(0.45mL,3.24mmol)添加至核苷706(1.46g,2.70mmol)在吡啶(20mL)中的搅拌溶液中。3小时后,在减压下除去溶剂,将残余物溶解于EtOAc中并用水,盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并蒸发至干。将残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-50%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物707(1.325g,58%)方案33

[0917] 

[0918] 化合物708:在0℃下,将DIPEA、2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺和N-甲基咪唑依次添加至化合物707在无水EtOAc中的搅拌溶液中。去除冷浴,并将反应混合物搅拌1小时。将反应用三乙醇胺(2.7M,50mL)在MeCN/甲苯中的溶液淬灭并搅拌5分钟。将混合物用乙酸乙酯稀释,转移至分液漏斗中,分离各层,并将有机层依次用5%NaCl溶液和盐水洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥并蒸发至干。将残余物预吸附在经三乙胺预处理的硅胶上。将柱用含有1%NEt_3的己烷平衡。将残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-40%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物708。

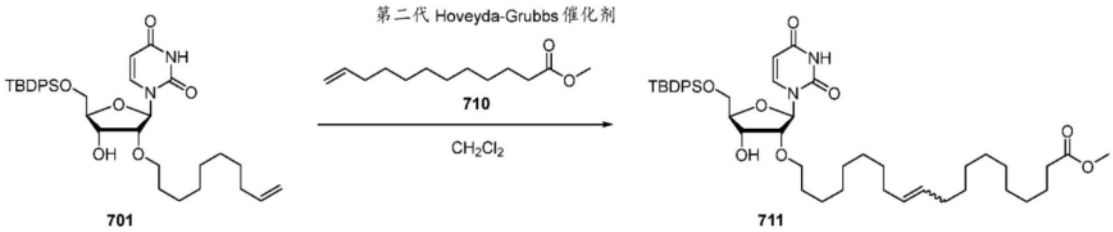
[0919] 方案34

[0920] 

[0921] 化合物710:将11-溴癸-1-烯(25.08g,103.25mmol)在MeOH(180mL)中的溶液与氰化钾(8.74g,134.2mmol)在H_2O(45mL)中的溶液混合。将所得混合物加热至回流持续24小时。在减压下除去有机溶剂,将水性残余物用乙酸乙酯萃取,用无水Na_2SO_4干燥,过滤,并浓缩,以给出粗腈。向氢氧化钾(52.14g,929.3mmol)在150mL乙醇和150mL水中的溶液中添加先前合成的腈,并将所得混合物加热至回流持续24小时。将混合物的总体积在减压下减半,并且然后用Et_2O(200mL)萃取。将浓HCl滴加至所得水层中直至其达到酸性pH(1-2),随后用Et_2O(2x 200mL)萃取。将有机萃取物经无水Na_2SO_4干燥,过滤,并蒸发至干,以获得粗羧酸(16.6g)。将粗羧酸溶解于无水MeOH(150mL)中并在0℃下滴加亚硫酰氯(8.24mL,113.6mmol)。去除冰浴,并将所得混合物搅拌3小时。在减压下除去挥发物,将残余物通过硅胶垫(5cm)(使用EtOAc/已烷2:8作为洗脱剂)过滤,以给出化合物710(17.5g,79%,经3步)。^1H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ5.79(ddt,J=16.9,10.2,6.7Hz,1H),5.03-4.90(m,2H),3.57(s,

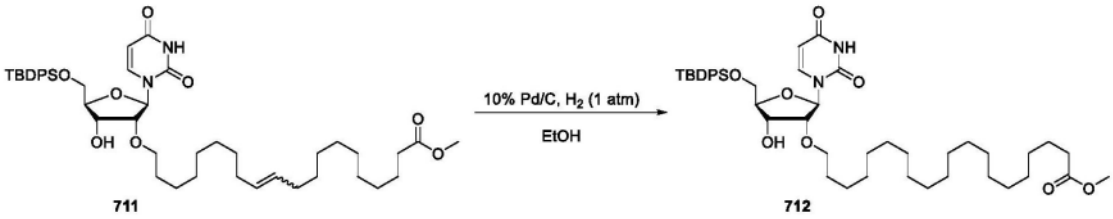
3H),2.28(t,J＝7.4Hz,2H),2.04-1.96(m,2H),1.55-1.46(m,2H),1.37-1.21(m,13H)。

[0922] 方案35

[0923] 

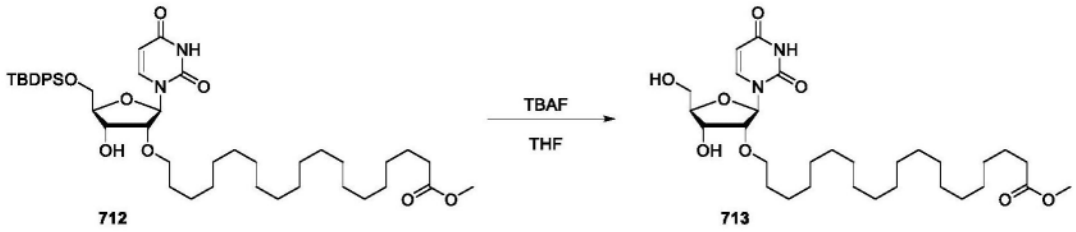
[0924] 化合物711:将化合物701(4.44g,7.15mmol)溶解于无水DCM(145mL)中,随后添加甲基癸-9-烯酸酯710(15.18g,71.5mmol)、苯醌(116mg,1.07mmol)和第二代Hoveyda-Grubbs催化剂(448mg,0.715mmol)。将所得混合物在回流下搅拌3.5小时,冷却至室温,并在减压下将反应混合物的总体积减半。将所得溶液装载到120g硅胶柱筒中并通过ISCO自动柱(使用已烷中的0％-60％EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出呈绿色油状物的化合物711(4.63g,80％)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.39(d,J＝2.2Hz,1H),7.71(d,J＝8.1Hz,1H),7.67-7.59(m,4H),7.50-7.40(m,6H),5.84(d,J＝4.4Hz,1H),5.40-5.29(m,2H),5.24(dd,J＝8.0,2.2Hz,1H),5.17(d,J＝6.2Hz,1H),4.18(q,J＝5.5Hz,1H),3.97-3.86(m,3H),3.83-3.75(m,1H),3.62-3.53(m,4H),3.52-3.40(m,1H),1.92(q,J＝6.4Hz,4H),1.54-1.42(m,4H),1.32-1.19(m,22H),1.03(s,10H)。

[0925] 方案36

[0926] 

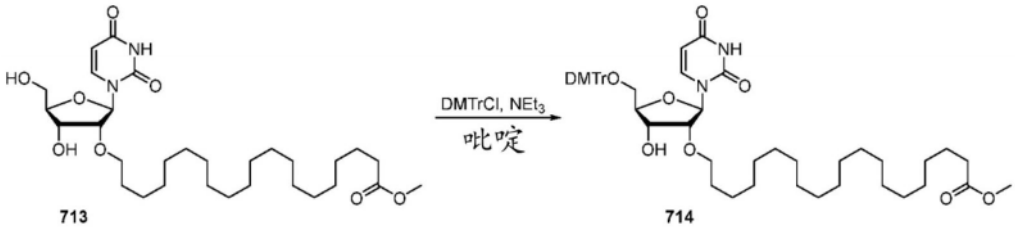
[0927] 化合物712:将10％钯碳(612mg,0.575mmol)添加至核苷711(4.63g,5.75mmol)在EtOH(150mL)中的搅拌溶液中。烧瓶配备有连接至充满氢气的气球的三通适配器(three-way adapter)。将烧瓶进行一系列真空-H_2再填充(x3)以使溶液饱和。0.5小时后,将混合物用MeOH稀释并通过硅藻土垫(用更多甲醇冲洗)过滤。将滤液在减压下蒸发,以给出粗品712(4.52g,97％)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ11.40-11.37(m,1H),7.71(d,J＝8.1Hz,1H),7.67-7.59(m,4H),7.52-7.39(m,7H),5.85(d,J＝4.4Hz,1H),5.24(dd,J＝8.1,2.2Hz,1H),5.17(d,J＝6.1Hz,1H),4.18(q,J＝5.4Hz,1H),3.99-3.87(m,3H),3.83-3.75(m,1H),3.56(s,4H),3.46(ddt,J＝14.0,9.0,6.6Hz,2H),2.27(t,J＝7.4Hz,2H),1.54-1.43(m,4H),1.30-1.13(m,31H),1.05-1.00(m,10H)。^{13}C NMR(101MHz,DMSO)δ173.32,162.85,150.31,139.80,135.15,134.97,132.66,132.14,130.08,130.02,128.00,101.55,86.44,84.02,80.95,69.71,68.08,63.27,56.02,54.91,51.13,39.52,33.26,29.04,29.01,28.96,28.86,28.76,28.67,28.45,26.68,25.36,24.43,18.84,18.56。$C_{46}H_{71}N_2O_8Si$的LRMS(ESI)计算值:$[M+H]^+$m/z＝807.49,实验值:807.5。

[0928] 方案37

[0929] 

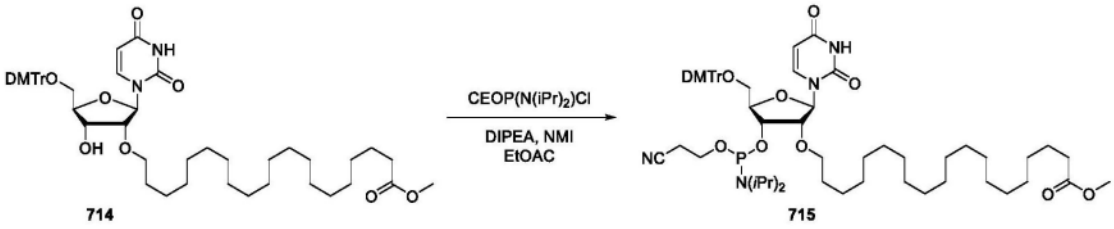
[0930] 化合物713:将四丁基氟化铵(1M,THF中)添加至化合物712在THF中的搅拌溶液中。将混合物在室温下搅拌3小时,随后在减压下除去挥发物。将残余物在CH_2Cl_2中重构并用水分配。分离各层,并将水性部分用CH_2Cl_2(3×20mL)萃取。将合并的有机萃取物经Na_2SO_4干燥,并且在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速柱色谱法(2:8EtOAc/己烷)纯化以给出化合物713。

[0931] 方案38

[0932] 

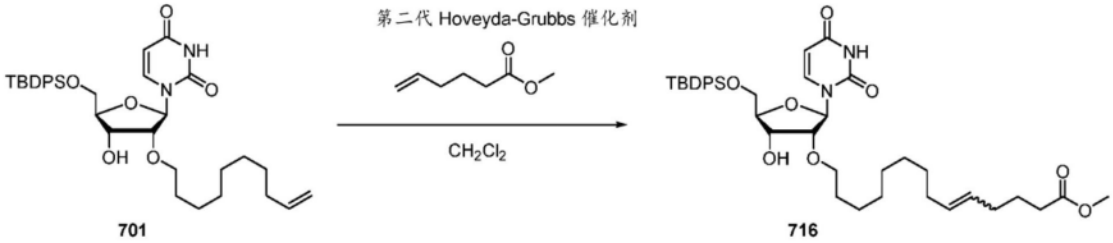
[0933] 化合物714:将4,4′-二甲氧基三苯甲基氯(x g,x mmol)和三乙胺(x mL,x mmol)添加至核苷713(x g,x mmol)在吡啶(x mL)中的搅拌溶液中。3小时后,在减压下除去溶剂,将残余物溶解于EtOAc中并用水,盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并蒸发至干。将残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-50%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物714。

[0934] 方案39

[0935] 

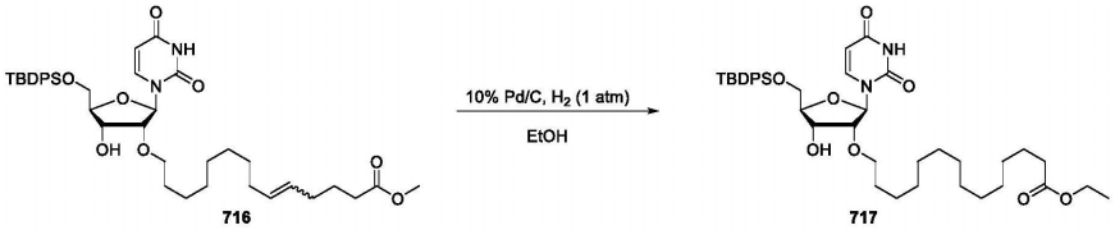
[0936] 化合物715:在0℃下,将DIPEA、2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺和N-甲基咪唑依次添加至化合物714在无水EtOAc中的搅拌溶液中。去除冷浴,并将反应混合物搅拌1小时。将反应用三乙醇胺(2.7M,50mL)在MeCN/甲苯中的溶液淬灭并搅拌5分钟。将混合物用乙酸乙酯稀释,转移至分液漏斗中,分离各层,并将有机层依次用5%NaCl溶液和盐水洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥并蒸发至干。将残余物预吸附在经三乙胺预处理的硅胶上。将柱用含有1%NEt_3的己烷平衡。将残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-40%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物715。

[0937] 方案40

[0938] 

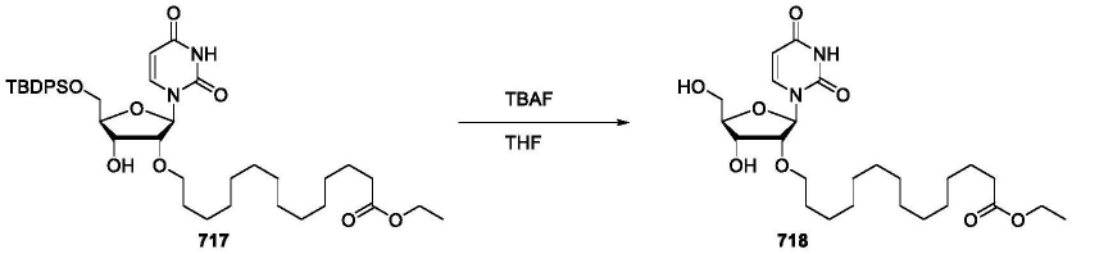
[0939] 化合物717:将化合物701溶解于无水DCM中,随后添加甲基己-5-烯酸酯、苯醌和第二代Hoveyda-Grubbs催化剂。将所得混合物在回流下搅拌3.5小时,冷却至室温,并在减压下将反应混合物的总体积减半。将所得溶液装载到120g硅胶柱筒中并通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-60%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出呈绿色油状物的化合物716。

[0940] 方案41

[0941] 

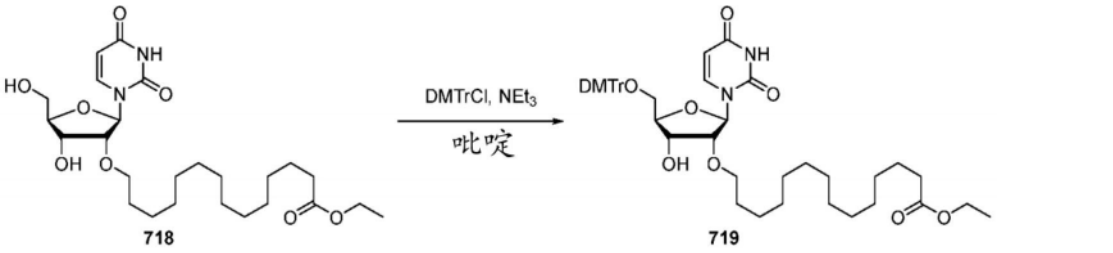
[0942] 化合物717:将10%钯碳添加至核苷716在EtOH中的搅拌溶液中。烧瓶配备有连接至充满氢气的气球的三通适配器(three-way adapter)。将烧瓶进行一系列真空-H_2再填充(×3)以使溶液饱和。0.5小时后,将混合物用MeOH稀释并通过硅藻土垫(用更多甲醇冲洗)过滤。将滤液在减压下蒸发,以给出粗品717。

[0943] 方案42

[0944] 

[0945] 化合物718:将四丁基氟化铵(1M,THF中)添加至化合物717在THF中的搅拌溶液中。将混合物在室温下搅拌3小时,随后在减压下除去挥发物。将残余物在CH_2Cl_2中重构并用水分配。分离各层,并将水性部分用CH_2Cl_2(3×20mL)萃取。将合并的有机萃取物经Na_2SO_4干燥,在减压下浓缩。将残余物通过硅胶快速柱色谱法(2:8EtOAc/己烷)纯化以给出化合物718。

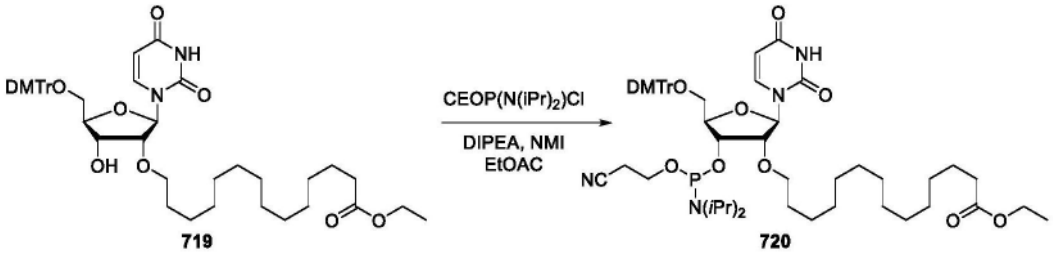
[0946] 方案43

[0947] 

[0948] 化合物719:将4,4′-二甲氧基三苯甲基氯和三乙胺添加至核苷718在吡啶中的搅

拌溶液中。3小时后,在减压下除去溶剂,将残余物溶解于EtOAc中并用水,盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并蒸发至干。将残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-50%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物719。

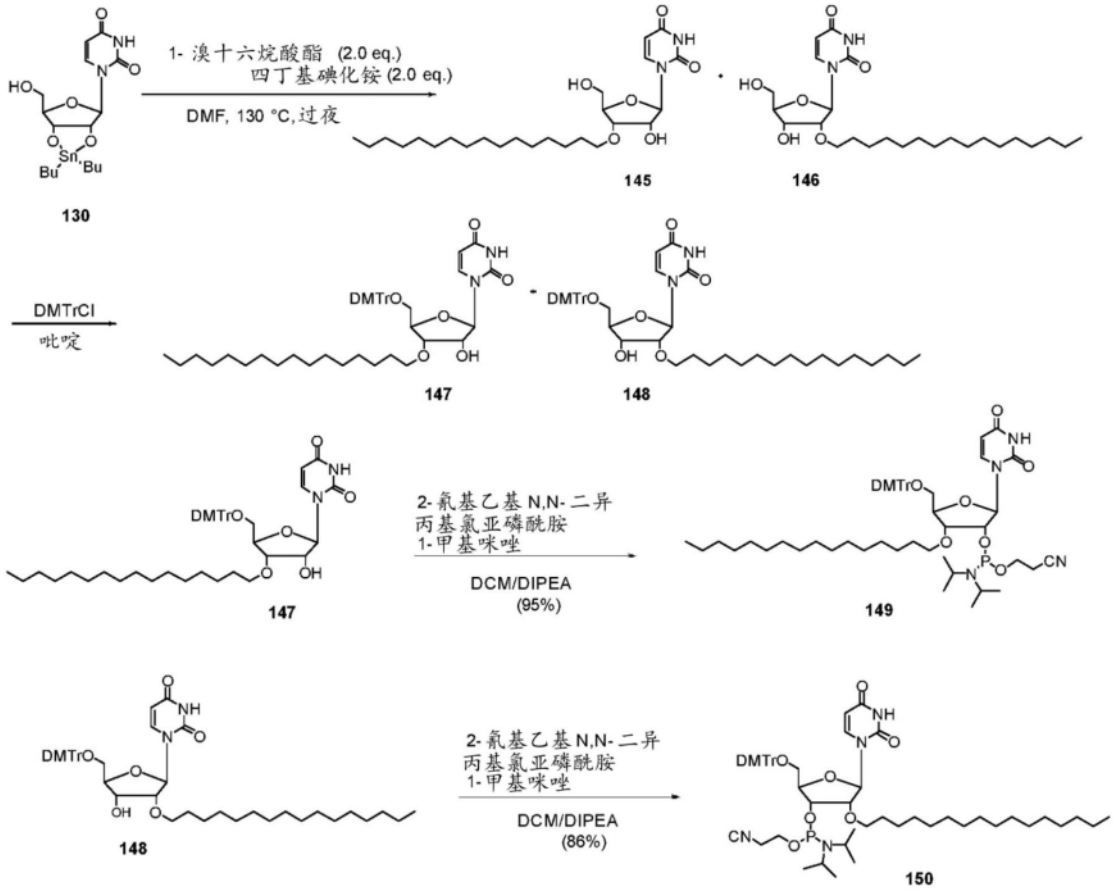
[0949] 方案44

[0950] 

[0951] 化合物720:在0℃下,将DIPEA、2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺和N-甲基咪唑依次添加至化合物719在无水EtOAc中的搅拌溶液中。去除冷浴,并将反应混合物搅拌1小时。将反应用三乙醇胺(2.7M,50mL)在MeCN/甲苯中的溶液淬灭并搅拌5分钟。将混合物用乙酸乙酯稀释,转移至分液漏斗中,分离各层,并将有机层依次用5%NaCl溶液和盐水洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥并蒸发至干。将残余物预吸附在经三乙胺预处理的硅胶上。将柱用含有1%NEt_3的己烷平衡。将残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-40%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物720。

[0952] 2',3'-O-十六烷基尿苷亚磷酰胺的合成

[0953] 方案45

[0954] 

[0955] 化合物145和146:向2,3'-O-二丁基甲锡亚烷基尿苷130(6.6g,13.89mmol)在DMF

(150mL)中的溶液中添加1-溴十六烷(8.48g,27.78mmol)和四丁基碘化铵(10.26g,27.78mmol)。将混合物在回流设置中在130℃下搅拌过夜,形成深棕色溶液。将溶液在二氧化硅(30%MeOH/DCM)上洗脱并收集所有UV活性级分。将级分真空浓缩并将产物残余物在二氧化硅(5%MeOH/DCM)上洗脱以获得化合物145和化合物146的粗混合物(3.38g)。

[0956] 化合物147和148:将吡啶(10mL)添加至化合物145和化合物146的粗混合物(2.34g,4.99mmol)中,并真空浓缩以除去痕量水。将混合物残余物置于高真空下并用氩气回填3次。将化合物145和化合物146在吡啶中的溶液(42mL)用4,4′-二甲氧基三苯甲基氯(1.86g,5.49mmol)处理并在氩气下在室温下搅拌过夜。将反应用MeOH(5mL)淬灭并真空浓缩。将产物残余物溶解于3%TEA/DCM中并用饱和$NaHCO_3$(水溶液)和盐水洗涤。将有机层用Na_2SO_4干燥并真空浓缩。在加载产物残余物前,通过洗脱3%TEA/DCM 3次来中和硅胶柱。将产物在二氧化硅(3%TEA/己烷中的40%-60%乙酸乙酯)上纯化。将化合物147(1.32g,34%)和化合物148(660mg,17%)分离并获得(呈白色固体)。147:^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ11.3(brs,1H),7.74(d,1H),7.33(d,2H),7.28(t,2H),7.20-7.22(m,5H),6.85-6.87(m,4H),5.66(d,1H),5.38(d,1H),5.30(d,1H),4.19-4.22(m,1H),3.88-3.96(m,2H),3.70(s,6H),3.53-3.57(m,1H),3.34-3.38(m,1H),3.22-3.31(m,2H),1.45-1.48(m,2H),1.21-1.27(m,26H),0.84(t,3H)。^{13}C NMR(126MHz,DMSO-d_6)δ163.0,158.1,150.4,144.6,140.4,135.3,135.1,129.7,127.9,127.7,126.8,113.2,101.3,89.4,85.9,80.4,76.7,72.0,69.7,62.3,55.0,52.0,31.3,29.2,29.0,29.0,29.0,28.9,28.7,25.5,22.1,13.9,7.2。

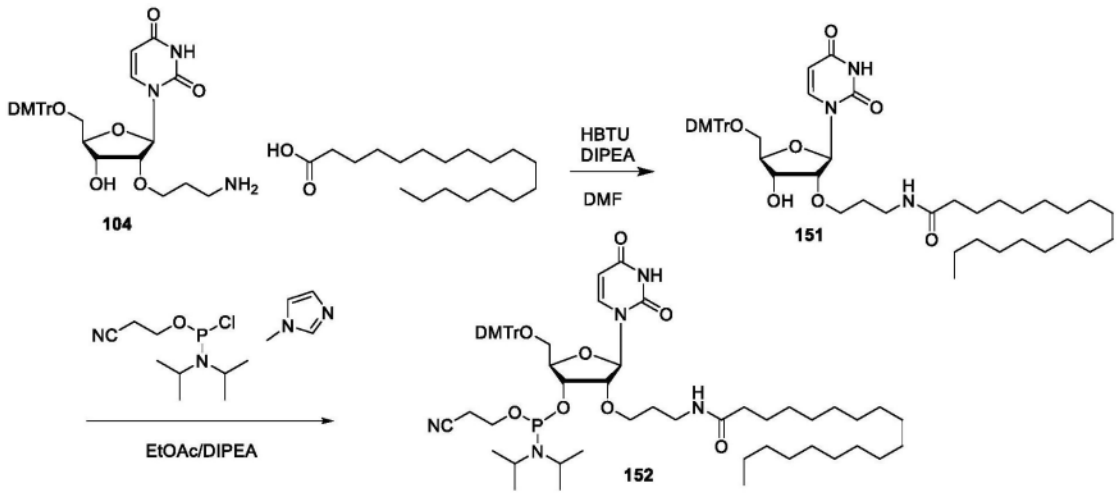
[0957] 化合物149:将吡啶(8mL)添加至化合物147(660mg,0.856mmol)中,并真空浓缩3次以除去痕量水。将残余物置于高真空下并用氩气回填3次。添加DCM(12mL)以形成溶液并置于冰浴(伴随搅拌)中。添加N,N-二异丙基乙胺(447μL,2.57mmol)和1-甲基咪唑(13.7μL,0.171mmol)并将其在0℃下搅拌20分钟。添加N,N-二异丙基氯-亚磷酰胺2-氰基乙酯(382μL,1.71mmol)并将溶液从冰浴中移出并在室温下搅拌2小时。将产物混合物用饱和$NaHCO_3$(水溶液)洗涤并用3%TEA/DCM萃取。将有机层用Na_2SO_4干燥并真空浓缩。在加载产物残余物前,通过洗脱3%TEA/DCM 3次来中和硅胶柱。将产物在二氧化硅(3%TEA/己烷中的50%乙酸乙酯)上纯化。获得呈白色固体的化合物149(790mg,95%)。^{1}H NMR(500MHz,CD_3CN)δ8.84(brs,1H),7.77(d,0.5H),7.74(d,0.5H),7.44(d,2H),7.25-7.35(m,7H),6.84-6.94(m,4H),5.91(d,0.5H),5.86(d,0.5H),4.48-4.51(m,1H),4.04-4.12(m,2H),3.80-3.90(m,2H),3.78(s,6H),3.58-3.76(m,4H),3.34-3.36(m,1H),2.59-2.69(m,2H),1.48-1.58(m,2H),1.24-1.31(m,28H),1.18(d,9H),1.15(d,3H),0.89(t,3H)^{31}PNMR(202MHz,CD_3CN)δ150.69(s),151.38(s)。

[0958] 化合物150:将吡啶(6mL)添加至化合物148(1.32g,1.71mmol)中,并真空浓缩3次以除去痕量水。将残余物置于高真空下并用氩气回填3次。添加DCM(12mL)以形成溶液并置于冰浴(伴随搅拌)中。添加N,N-二异丙基乙胺(894μL,5.14mmol)和1-甲基咪唑(28μL,0.342mmol)并将其在0℃下搅拌20分钟。添加N,N-二异丙基氯-亚磷酰胺2-氰基乙酯(765μL,3.42mmol)并将溶液从冰浴中移出并在室温下搅拌2小时。将产物混合物用饱和$NaHCO_3$(水溶液)洗涤并用3%TEA/DCM萃取。将有机层用Na_2SO_4干燥并真空浓缩。在加载产物残余物前,通过洗脱3%TEA/DCM 3次来中和硅胶柱。将产物在二氧化硅(3%TEA/己烷中的50%乙酸乙酯)上纯化。获得呈白色固体的化合物150(1.43g,86%)。^{1}H NMR(500MHz,CD_3CN)δ8.92

(brs,1H),7.81(d,0.6H),7.72(d,0.4H),7.43-7.47(m,2H),7.23-7.36(m,8H),6.86-6.93(m,3H),5.86(d,0.5H),5.85(d,0.6H),5.18-5.27(m,1H),4.46-4.50(m,0.6H),4.40-4.44(m,0.4H),4.05(t,0.6H),4.02(t,0.4H),3.82-3.93(m,1H),3.77-3.79(m,6H),3.58-3.71(m,4H),3.33-3.39(m,1H),2.64-2.69(m,1H),2.53(t,1H),1.49-1.60(m,2H),1.23-1.37(m,28H),1.17(dd,9H),1.06(d,3H),0.89(t,3H)^{31}P NMR(202MHz,CD_3CN)δ150.69(s),151.38(s)。^{31}PNMR(202MHz,CD_3CN)δ150.69(s),151.06(s)。

[0959] 与2'-O-C3-酰胺-C18缀合的尿苷胺基酸酯的合成

[0960] 方案46

[0961] 

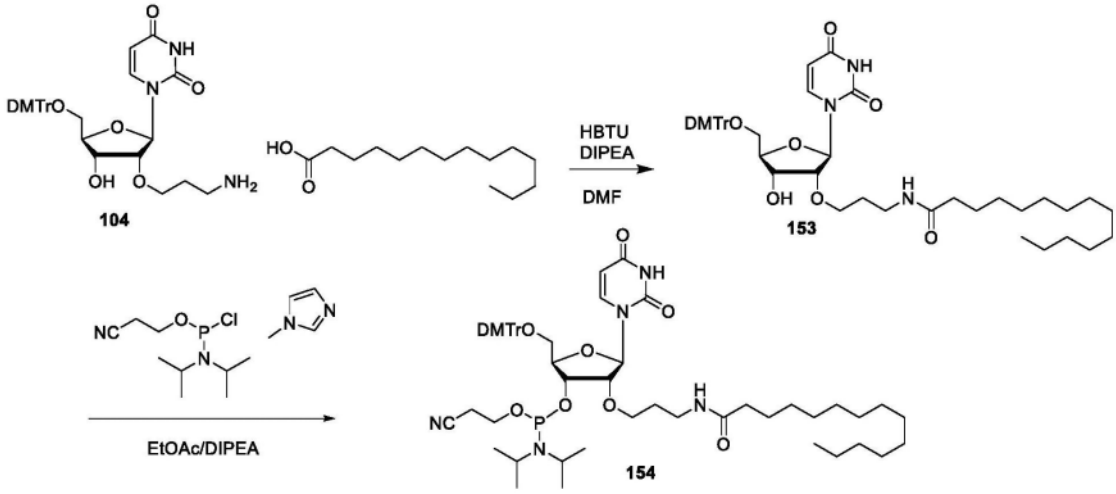
[0962] 化合物151:将化合物104(6.0g,9.94mmol)、硬脂酸(3.39g,11.9mmol)和HBTU(4.6g,12.13mmol)在配备有磁力搅拌棒的空烧瓶中合并。将烧瓶的内容物用氩气冲洗5分钟,随后添加DMF(25mL)和DIPEA(5.2mL,29.8mmol)。搅拌20小时后,将反应混合物用$NaHCO_3$的饱和溶液和乙醚稀释。分离各层,并将有机层用$NaHCO_3$的饱和溶液和盐水洗涤,并经Na_2SO_4干燥。在减压下除去挥发物,并将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-6%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物151(5.5g,64%)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ8.39(s,1H),8.04(d,J=8.2Hz,1H),7.41-7.36(m,2H),7.32-7.27(m,6H),6.86-6.81(m,4H),5.89(d,J=1.6Hz,1H),5.81(t,J=6.3Hz,1H),5.26(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),4.51-4.42(m,1H),4.08(dt,J=7.9,2.4Hz,1H),3.91(ddd,J=10.3,6.1,4.7Hz,1H),3.86(dd,J=5.2,1.7Hz,1H),3.80(d,J=1.3Hz,6H),3.72-3.64(m,2H),3.62(d,J=8.2Hz,1H),3.55(d,J=2.4Hz,2H),3.26-3.17(m,1H),2.21-2.13(m,2H),1.91-1.70(m,2H),1.67-1.59(m,2H),1.31-1.21(m,28H),0.88(t,J=6.9Hz,3H)。

[0963] 化合物152:将化合物151(5.5g,6.32mmol)与乙腈共蒸发(两次)并连接到高真空管线2小时。将残余物溶解于乙酸乙酯(125mL)中并冷却至0℃。向先前溶液中顺序添加DIPEA(2.75mL,15.80mmol)、2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(3.53mL,15.80mmol)、和1-甲基咪唑(0.50mL,6.3mmol)。去除冷浴,并将反应混合物搅拌30分钟。将反应用三乙醇胺(2.7M,17.5mL)在MeCN/甲苯中的溶液淬灭并搅拌5分钟。将混合物用乙酸乙酯稀释,转移至分液漏斗中,分离各层,并将有机层依次用5%NaCl溶液(50mL)和盐水洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥并蒸发至干。将残余物预吸附在经三乙胺预处理的硅胶上。将柱用含有1%NEt_3的己烷平衡。将残余物通过ISCO自动柱(使用己烷中的0%-60%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以

给出化合物152(4.5g,67%)。^{1}H NMR(500MHz,乙腈-d3)δ8.95(s,1H),7.77(dd,J=48.2,8.1Hz,1H),7.46-7.40(m,2H),7.35-7.27(m,6H),6.90-6.84(m,4H),6.39(d,J=5.4Hz,1H),5.84(dd,J=7.6,2.9Hz,1H),5.20(t,J=8.4Hz,1H),4.45(dddd,J=41.9,10.0,6.9,5.0Hz,1H),4.18-4.11(m,1H),4.04-3.99(m,1H),3.76(d,J=3.1Hz,6H),3.74-3.65(m,4H),3.65-3.54(m,3H),3.53-3.35(m,3H),3.25-3.16(m,3H),2.74(t,J=5.9Hz,1H),2.67(td,J=5.9,2.1Hz,1H),2.54-2.50(m,2H),2.08-2.02(m,2H),1.70(h,J=6.2Hz,2H),1.54-1.47(m,2H),1.29-1.22(m,28H),1.18-1.01(m,12H),0.87(t,J=6.8Hz,3H)。^{31}P NMR(202MHz,CD_3CN)δ149.59,149.15。

[0964] 与2'-O-C3-酰胺-C14缀合的尿苷胺基酸酯的合成

[0965] 方案47

[0966] 

[0967] 化合物153:将化合物104(5.0g,8.3mmol)、十四烷酸(2.10g,9.19mmol)和HBTU(3.83g,10.1mmol)在配备有磁力搅拌棒的空烧瓶中合并。将烧瓶的内容物用氩气冲洗5分钟,随后添加DMF(25mL)和DIPEA(4.3mL,24.8mmol)。搅拌20小时后,将反应混合物用$NaHCO_3$的饱和溶液和乙醚稀释。分离各层,并将有机层用$NaHCO_3$的饱和溶液和盐水洗涤,并经Na_2SO_4干燥。在减压下除去挥发物,并将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-6%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物153(3.93g,58%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.94(s,1H),7.44-7.23(m,9H),6.91-6.78(m,4H),5.95-5.85(m,2H),5.32-5.22(m,1H),4.46(q,J=6.6Hz,1H),4.08(dt,J=8.0,2.4Hz,1H),3.98-3.89(m,1H),3.86(dd,J=5.2,1.6Hz,1H),3.80(d,J=1.0Hz,6H),3.72-3.52(m,4H),2.20-2.13(m,2H),1.89-1.53(m,5H),1.31-1.19(m,20H),0.87(t,J=6.7Hz,3H)。

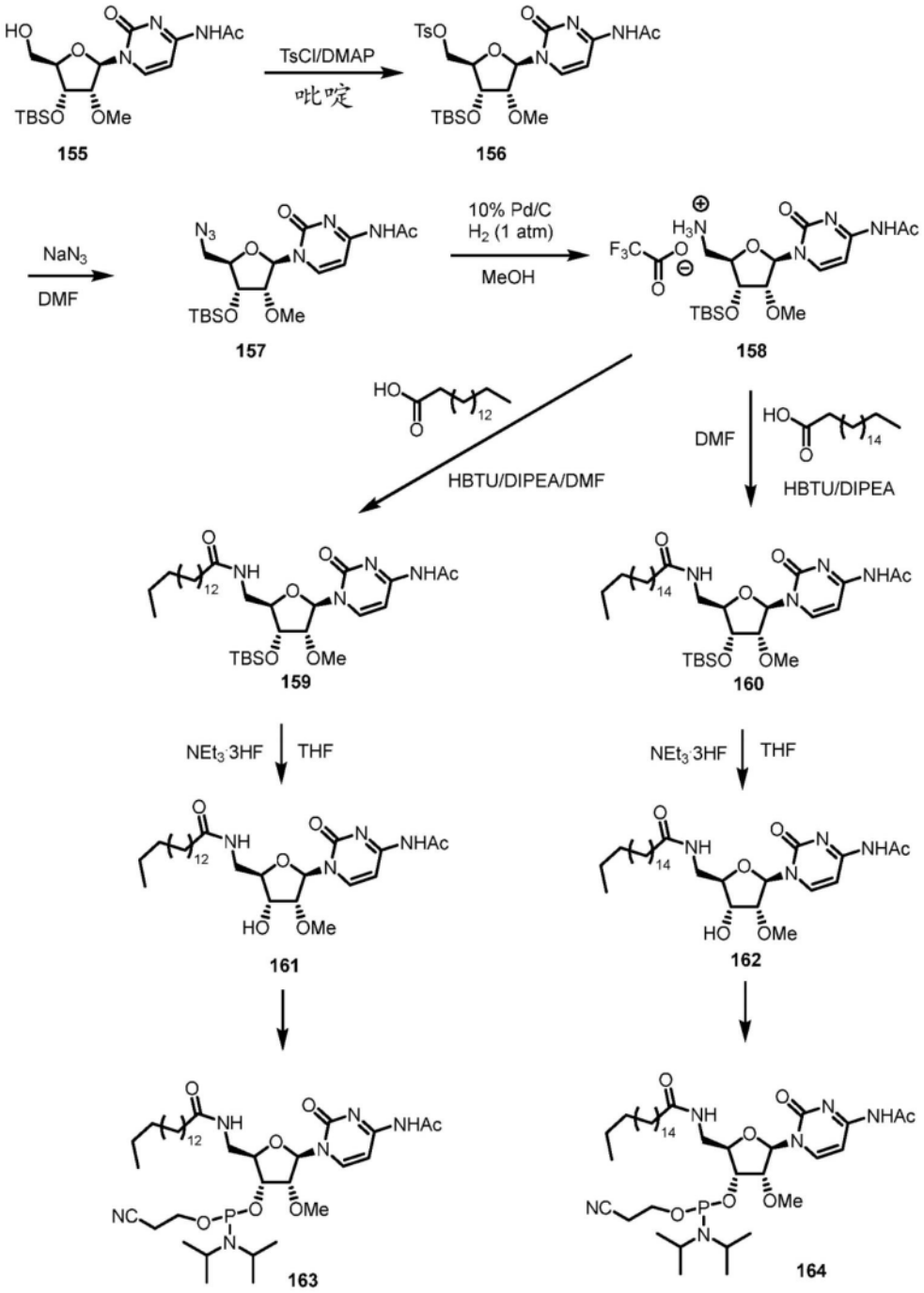
[0968] 化合物154:将化合物153(3.93g,4.83mmol)与乙腈共蒸发(两次)并连接到高真空管线2小时。将残余物溶解于乙酸乙酯(100mL)中并冷却至0℃。向先前溶液中顺序添加DIPEA(2.1mL,12.1mmol)、2-氰基乙基-N,N-二异丙基氯亚磷酰胺(2.69mL,12.1mmol)、和1-甲基咪唑(0.38mL,4.83mmol)。去除冷浴,并将反应混合物搅拌30分钟。将反应用三乙醇胺(2.7M,14mL)在MeCN/甲苯中的溶液淬灭并搅拌5分钟。将混合物用乙酸乙酯稀释,转移至分液漏斗中,分离各层,并将有机层依次用5%NaCl溶液(50mL)和盐水洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥并蒸发至干。将残余物预吸附在经三乙胺预处理的硅胶上。将柱用含有1%NEt_3的己烷平衡。将残余物通过ISCO自动柱(使用己烷中的0%-60%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化

合物154(4.38g,89%)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ8.03(dd,J=29.4,8.2Hz,1H),7.44-7.35(m,2H),7.34-7.21(m,10H),6.84(ddd,J=8.9,7.1,3.1Hz,4H),6.20(q,J=6.3Hz,1H),5.91(dd,J=7.1,2.0Hz,1H),5.23(dd,J=19.9,8.1Hz,1H),4.66-4.43(m,1H),4.26-4.18(m,1H),4.01(ddd,J=11.6,4.9,2.0Hz,1H),3.94-3.67(m,11H),3.67-3.39(m,7H),3.32(tq,J=13.0,6.1Hz,1H),2.68-2.56(m,2H),2.49-2.39(m,1H),2.13(q,J=7.9Hz,2H),1.86-1.76(m,2H),1.59(s,5H),1.28-1.22(m,21H),1.21-1.12(m,10H),1.04(d,J=6.8Hz,3H),0.88(t,J=6.9Hz,3H)。^{31}P NMR(202MHz,$CDCl_3$)δ150.21,149.86。

[0969] 与5'-酰胺-亲脂性缀合的2'-OMe-胞苷胺基酸酯的合成

[0970] 方案48

[0971]



[0972] 化合物156:将对甲苯磺酰氯(20.7g,0.108mol)添加至化合物155(30.0g,

72.5mmol)和吡啶(29.3mL,0.363mmol)在无水CH_2Cl_2(220mL)中的搅拌溶液中。将反应混合物加热至回流持续48小时。冷却后,缓慢添加CH_2Cl_2(200mL)和$NaHCO_3$饱和水溶液(500mL)并剧烈搅拌1小时。将混合物转移至分液漏斗中,分离各层,并将有机层用1M HCl和盐水洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥,过滤,并蒸发至干,以给出粗甲苯磺酸酯化合物156(41.2g)。将粗甲苯磺酸酯不经进一步纯化而用于下一反应。

[0973] 化合物157:将叠氮化钠(14.15g,0.217mol)添加至化合物156(41.2g,72.6mmol)在DMF(360mL)中的搅拌溶液中。将所得混合物在90℃下加热8小时,冷却至室温,并与水(300mL)和乙醚(200mL)合并。将混合物转移至分液漏斗中,分离各层,并将水层用乙醚萃取两次。将有机层合并,经Na_2SO_4干燥,并蒸发至干。将残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-60%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物157(27.5g,86%,经两步)。^1H NMR(500MHz,氯仿-d)δ9.06(s,1H),8.24(d,J=7.5Hz,1H),7.46(d,J=7.5Hz,1H),5.89(s,1H),4.17(dt,J=8.9,2.8Hz,1H),4.01(dd,J=8.9,4.8Hz,1H),3.94(dd,J=13.5,2.8Hz,1H),3.69-3.60(m,6H),2.26(s,3H),0.90(s,9H),0.08(s,6H)。

[0974] 化合物158:向化合物157(17.0g,38.8mmol)在甲醇(300mL)中的搅拌溶液中添加10%Pd/C Degussa型(4.13g,3.88mmol)。烧瓶配备有连接至充满氢气的气球和真空管线的三通适配器(3-way adapter)。对烧瓶的内容物进行一系列真空/氢气再填充(三次)。40分钟后,添加TFA(3ml),并将所得混合物通过硅藻土垫过滤,并将挥发物蒸发至干。将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-10%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物158(12.5g,77%)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ10.98(s,1H),8.15(d,J=7.5Hz,1H),8.03(s,3H),7.25(d,J=7.5Hz,1H),5.87(d,J=3.3Hz,1H),4.21(t,J=5.7Hz,1H),4.12-4.06(m,1H),4.03-3.93(m,1H),3.40(s,3H),3.30-3.17(m,1H),3.15-3.03(m,1H),2.11(s,3H),0.88(s,9H),0.09(d,J=2.0Hz,6H)。^{19}F NMR(376MHz,DMSO)δ-73.75。

[0975] 化合物159:将化合物158(5.1g,9.7mmol)、棕榈酸(2.74g,10.7mmol)和HBTU(4.41g,11.6mmol)在配备有磁力搅拌棒的空烧瓶中合并。将烧瓶的内容物用氩气冲洗5分钟,随后添加DMF(32mL)和DIPEA(6.76mL,38.8mmol)。搅拌4小时后,将反应混合物用$NaHCO_3$的饱和溶液和乙醚稀释。分离各层,并将有机层用$NaHCO_3$的饱和溶液和盐水洗涤,并经Na_2SO_4干燥。在减压下除去挥发物,并将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-6%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物159。(4.97g,78%)。^1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.64(s,1H),7.78(d,J=7.4Hz,1H),7.46(d,J=7.4Hz,1H),5.47(d,J=3.9Hz,1H),4.23-4.19(m,1H),4.18-4.09(m,2H),3.84-3.75(m,1H),3.46(s,3H),3.44-3.36(m,1H),2.28-2.20(m,5H),1.64-1.59(m,2H),1.31-1.23(m,24H),0.94-0.86(m,12H),0.09(s,6H)。

[0976] 化合物160:将化合物158(5.85g,11.1mmol)、硬脂酸(3.47g,12.2mmol)和HBTU(5.05g,13.3mmol)在配备有磁力搅拌棒的空烧瓶中合并。将烧瓶的内容物用氩气冲洗5分钟,随后添加DMF(37mL)和DIPEA(7.74mL,44.4mmol)。搅拌4小时后,将反应混合物用$NaHCO_3$的饱和溶液和乙醚稀释。分离各层,并将有机层用$NaHCO_3$的饱和溶液和盐水洗涤,并经Na_2SO_4干燥。在减压下除去挥发物,并将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-6%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物160。(3.87g,51%)。^1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ8.44(s,1H),7.77(d,J=7.5Hz,1H),7.45(d,J=7.4Hz,1H),5.46(d,J=3.9Hz,1H),4.24-4.19(m,1H),4.17-4.10(m,2H),3.46(s,3H),3.41-3.36(m,1H),2.27-2.24(m,2H),1.29-1.23

(m,28H),0.92-0.86(m,12H),0.10-0.08(m,6H)。

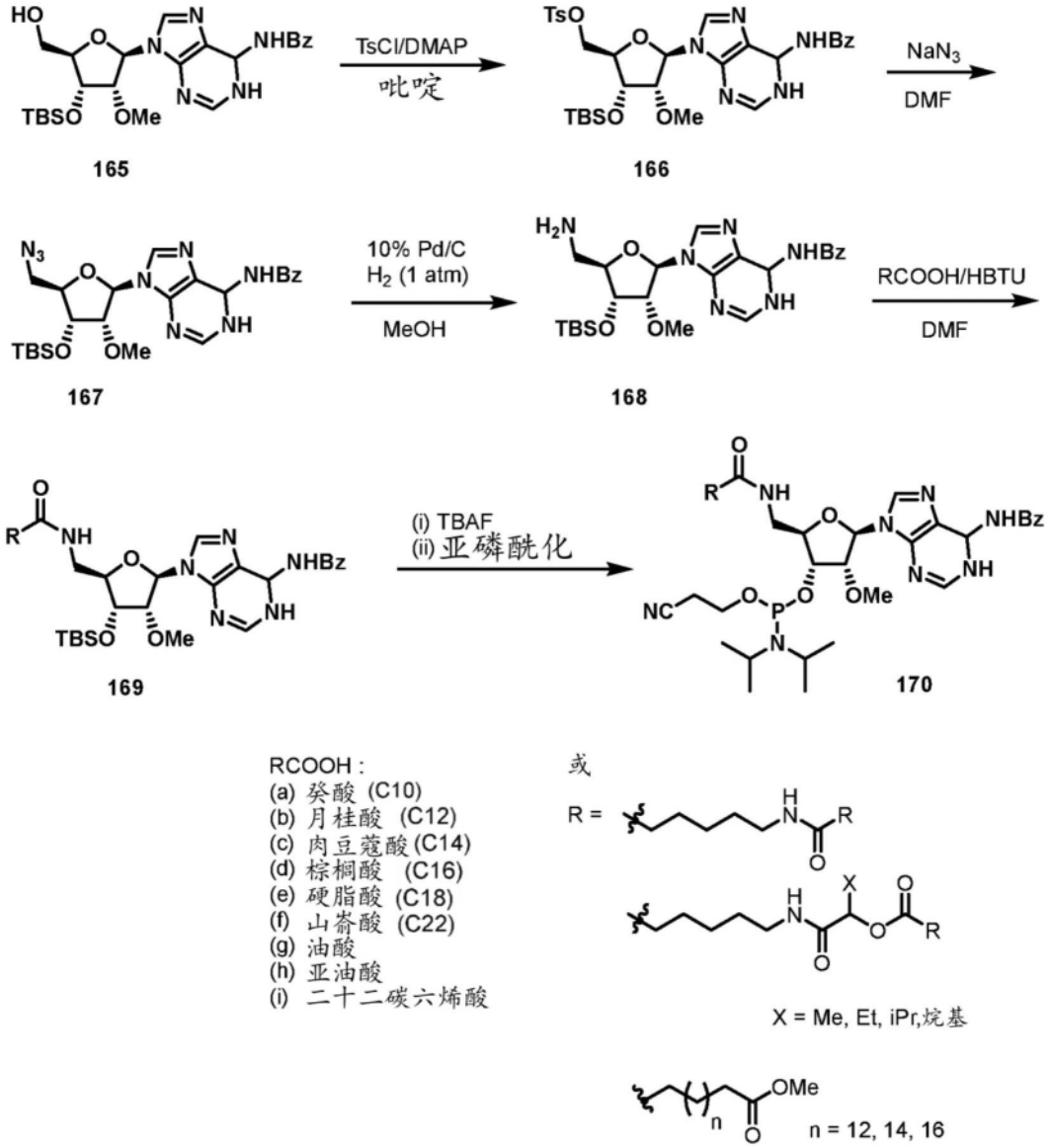
[0977] 化合物161:在0℃下,将三氢氟化三乙胺(3.5mL,21.7mmol)添加至化合物159(4.7g,7.2mmol)在THF(50mL)中的搅拌溶液中。在室温下搅拌24小时后,在减压下除去挥发物,并将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-6%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物161(3.49g,90%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ10.94(s,1H),8.12(d,J=7.5Hz,1H),8.01(t,J=5.9Hz,1H),7.24(d,J=7.5Hz,1H),5.82(d,J=3.3Hz,1H),5.19(d,J=5.7Hz,1H),3.93-3.84(m,2H),3.78(t,J=3.9Hz,1H),3.42(s,3H),2.13-2.05(m,5H),1.48(s,2H),1.34-1.16(m,25H),0.86(t,J=6.6Hz,3H)。

[0978] 化合物162:在0℃下,将三氢氟化三乙胺(2.66mL,16.5mmol)添加至化合物160(3.74g,5.51mmol)在THF(50mL)中的搅拌溶液中。在室温下搅拌24小时后,在减压下除去挥发物,并将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-6%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物162。

[0979] 化合物163/164:分别将化合物161和162标准亚磷酰化以给出化合物163和164。

[0980] 与5'-酰胺-亲脂性缀合的2'-OMe-腺苷胺基酸酯的合成

[0981] 方案49



[0982]

[0983] 化合物166:将对甲苯磺酰氯(34.3g,0.180mmol)添加至化合物165(30.0g,60.0mmol)和吡啶(24.3mL,300mmol)在无水CH_2Cl_2(180mL)中的搅拌溶液中。将反应混合物加热至回流持续48小时。冷却后,缓慢添加CH_2Cl_2(200mL)和$NaHCO_3$饱和水溶液(500mL)并剧烈搅拌1小时。将混合物转移至分液漏斗中,分离各层,并将有机层用1M HCl和盐水洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥,过滤,并蒸发至干,以给出粗甲苯磺酸酯化合物166。将粗甲苯磺酸酯不经进一步纯化而用于下一反应。

[0984] 化合物167:将叠氮化钠(11.93g,183.5mmol)添加至粗化合物166(40.0g,61.2mmol)在DMF(300mL)中的搅拌溶液中。将所得混合物在90℃下加热8小时,冷却至室温,并与水(300mL)和乙醚(200mL)合并。将混合物转移至分液漏斗中,分离各层,并将水层用乙醚萃取两次。将有机层合并,经Na_2SO_4干燥,并蒸发至干。将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-8%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物167(29.8g,92%)。^1H NMR(500MHz,氯仿-d,旋转异构体的混合物)δ8.97(s,1H),8.83-8.78(m,1H),8.32-8.28(m,1H),8.06-8.00(m,2H),7.65-7.60(m,1H),7.53(dd,J=8.4,7.0Hz,2H),6.13(d,J=3.4Hz,1H),4.57-4.50(m,1H),4.38(dd,J=4.9,3.5Hz,1H),4.21(dt,J=6.0,4.0Hz,1H),3.78

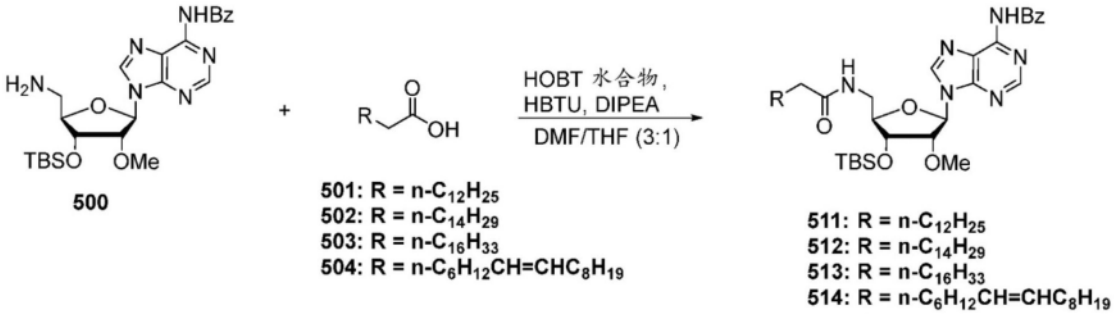
(dd,J＝13.4,3.9Hz,1H),3.61(dd,J＝13.3,4.3Hz,1H),3.55-3.49(m,3H),0.98-0.90(m,9H),0.20-0.09(m,6H)。

[0985] 化合物168:向化合物167(13.58g,25.88mmol)在甲醇(130mL)中的搅拌溶液中添加10％Pd/C Degussa型(2.75g,2.59mmol)。烧瓶配备有连接至充满氢气的气球和真空管线的三通适配器。对烧瓶的内容物进行一系列真空/氢气再填充(三次)。40分钟后,将反应混合物通过硅藻土垫过滤,并将挥发物蒸发至干。将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0％-10％MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物168(9.4g,72％)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ 8.99(s,1H),8.79(s,1H),8.28(s,1H),8.03(d,J＝7.2Hz,2H),7.65-7.59(m,1H),7.57-7.50(m,2H),6.07(d,J＝4.6Hz,1H),4.56-4.45(m,2H),4.15-4.08(m,1H),3.43(s,3H),3.14(dd,J＝13.6,3.5Hz,1H),2.96(dd,J＝13.6,5.2Hz,1H),0.95(s,9H),0.14(d,J＝4.0Hz,6H)。

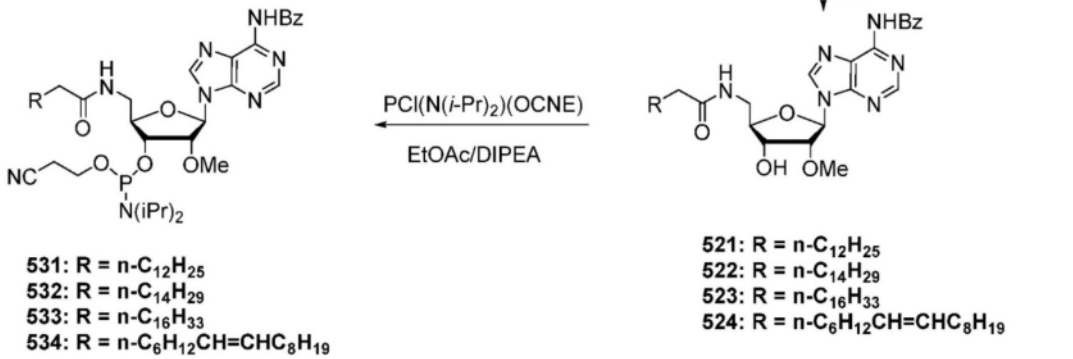
[0986] 化合物168和如RCOOH所示的脂肪酸的标准酰胺偶联产生各种2'-Ome-腺苷的5'-亲脂性缀合物。这些化合物可以转化为亚磷酰胺结构单元,如以上方案49所示。

[0987] 5'-氨基腺苷脂质胺基酸酯的合成

[0988] 方案50



[0989]



[0990] 化合物511:将化合物501(1.26g,5.5mmol)和HOBT水合物(1.27g,8.3mmol)在氩气气氛下溶解于无水DMF(30mL)和THF(10ml)中并在水/冰浴中冷却至0-5℃。添加HBTU(2.45g,6.5mmol)和N,N-二异丙基乙胺(3.0mL,17.1mmol)并将溶液搅拌10分钟。添加化合物500(2.3g,4.6mmol)并将反应在0-5℃下搅拌2小时。将反应混合物用乙酸乙酯(50ml)和5％NaCl(200mL)稀释,并搅拌5分钟。将有机层分离并用10％H_3PO_4(1×200mL)、5％NaCl(1×200mL)、4％$NaHCO_3$(1×200mL)和饱和NaCl(1×200mL)洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥,过滤并在减压下在25℃下浓缩成泡沫状物。经由硅胶快速色谱法、80g硅胶柱和乙酸乙酯:己烷(1:1至10:1梯度)进行纯化。将级分在减压下浓缩并用乙腈追踪(chase)(两次)。将级分在高真

空下干燥过夜。将化合物511分离为白色泡沫状物,产率为87%(2.86g)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.23(s,1H),8.77(d,J=8.6Hz,2H),8.13-7.96(m,3H),7.64(t,J=7.4Hz,1H),7.54(t,J=7.6Hz,2H),6.11(d,J=6.9Hz,1H),4.72(dd,J=6.9,4.5Hz,1H),4.54(dd,J=4.6,2.2Hz,1H),4.01-3.88(m,1H),3.55-3.42(m,1H),3.39-3.29(m,1H),3.27(s,3H),2.08(t,J=7.4Hz,2H),1.48(t,J=7.1Hz,2H),1.20(s,20H),0.91(s,9H),0.83(t,J=6.7Hz,3H),0.12(s,6H)。^{13}C NMR(101MHz,DMSO-d_6)δ172.42,165.57,152.12,151.68,150.58,143.79,132.43,128.47,128.41,85.37,84.69,80.66,70.96,57.50,40.54,35.31,31.28,29.03,29.00,28.98,28.87,28.79,28.70,28.68,25.60,25.11,22.08,17.79,13.90,-4.89。

[0991] 化合物512:由化合物500和化合物502以与化合物511类似的方式合成化合物512。将化合物512分离为玻璃状固体,产率为90%(3.05g)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.23(s,1H),8.77(d,J=8.8Hz,2H),8.05(d,J=7.5Hz,3H),7.64(t,J=7.4Hz,1H),7.54(t,J=7.6Hz,2H),6.11(d,J=6.9Hz,1H),4.72(dd,J=7.0,4.5Hz,1H),4.53(dd,J=4.5,2.2Hz,1H),3.99-3.92(m,1H),3.55-3.42(m,1H),3.36-3.27(m,1H),3.26(s,3H)2.08(t,J=7.4Hz,2H),1.53-1.41(m,2H),1.30-1.15(m,24H),0.91(s,9H),0.87-0.78(m,3H),0.12(s,6H)。^{13}C NMR(101MHz,DMSO-d_6)δ172.41,152.11,151.68,150.58,143.79,132.43,128.47,128.42,126.05,85.37,84.70,80.66,70.96,57.50,40.54,35.30,31.27,29.03,29.01,28.99,28.96,28.86,28.78,28.69,28.67,25.60,25.11,22.07,17.79,13.90,-4.89。

[0992] 化合物513:由化合物500和化合物503以与化合物511类似的方式合成化合物513。分离化合物513,产率为87%(3.05g)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.24(s,1H),8.77(d,J=11.1Hz,2H),8.09-7.99(m,3H),7.67-7.59(m,1H),7.59-7.49(m,2H),6.11(d,J=6.9Hz,1H),4.73(dd,J=7.0,4.5Hz,1H),4.53(dd,J=4.5,2.1Hz,1H),3.99-3.91(m,1H),3.55-3.43(m,1H),3.38-3.22(m,4H),2.08(t,J=7.4Hz,2H),1.54-1.42(m,2H),1.30-1.12(m,28H),0.91(s,9H),0.86-0.78(m,3H),0.11(s,6H)。^{13}C NMR(101MHz,DMSO-d_6)δ172.40,165.57,151.68,150.59,143.80,133.26,132.44,128.48,128.42,85.37,84.71,80.64,70.96,57.50,40.54,35.31,31.30,29.04,29.01,28.99,28.89,28.81,28.72,25.60,25.12,22.09,17.79,13.90,-4.89,-4.91。

[0993] 化合物514:由化合物500和化合物504以与化合物511类似的方式合成化合物514。将化合物514分离为白色泡沫状物,产率为77%(2.08g)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.23(s,1H),8.77(d,J=9.7Hz,2H),8.05(d,J=7.4Hz,3H),7.64(t,J=7.3Hz,1H),7.54(t,J=7.6Hz,2H),6.11(d,J=6.9Hz,1H),5.35-5.22(m,2H),4.73(dd,J=7.0,4.5Hz,1H),4.54(dd,J=4.6,2.1Hz,1H),4.00-3.90(m,1H),3.55-3.42(m,1H),3.39-3.20(m,4H),2.08(t,J=7.4Hz,2H),2.01-1.85(m,4H),1.55-1.41(m,2H),1.41-1.09(m,20H),0.91(s,9H),0.87-0.77(m,3H),0.12(s,6H)。^{13}C NMR(101MHz,DMSO-d_6)δ172.37,165.56,152.10,151.66,143.77,132.41,129.54,129.52,128.46,128.40,126.04,85.37,84.69,80.64,70.96,57.49,40.54,35.29,31.25,29.06,28.80,28.69,28.66,28.56,28.47,26.57,26.53,25.58,25.11,22.06,17.78,13.87,-4.91。

[0994] 化合物521:在氩气气氛下,将化合物511(2.99g,3.9mmol)溶解于无水THF(12mL)中。添加三氢氟化三乙胺(2.6mL,15.7mmol)并将反应在室温下搅拌19小时,并且然后加热

至45℃保持3小时。将反应混合物冷却至室温并在减压下浓缩至油状物。将油状物用乙酸乙酯(50mL)稀释并用5％NaCl(2×150mL)和饱和NaCl(1×150mL)洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥,过滤,在25℃下在减压下浓缩,并在高真空下干燥过夜。将化合物521分离为白色泡沫状物,产率为97％(2.28g)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.22(s,1H),8.74(d,J＝15.4Hz,2H),8.11-7.94(m,3H),7.64(t,J＝7.4Hz,1H),7.54(t,J＝7.6Hz,2H),6.12(d,J＝6.2Hz,1H),5.38(s,1H),4.53(t,J＝5.5Hz,1H),4.30(t,J＝4.0Hz,1H),4.02-3.92(m,1H),3.55-3.21(m,5H),2.08(t,J＝7.4Hz,2H),1.55-1.40(m,J＝6.8Hz,2H),1.20(d,J＝4.7Hz,20H),0.83(t,J＝6.7Hz,3H)。

[0995] 化合物522:由化合物512以与化合物521类似的方式合成化合物522。分离化合物522,产率为96％(2.42g)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.22(s,1H),8.74(d,J＝15.8Hz,2H),8.10-7.94(m,3H),7.64(t,J＝7.4Hz,1H),7.54(t,J＝7.6Hz,2H),6.12(d,J＝6.2Hz,1H),5.38(d,J＝5.4Hz,1H),4.53(t,J＝5.6Hz,1H),4.32-4.27(m,1H),4.02-3.94(m,1H),3.52-3.24(m,5H),2.12-2.02(m,2H),1.53-1.40(m,J＝6.9Hz,2H),1.20(d,J＝6.9Hz,24H),0.83(t,J＝6.7Hz,3H)。

[0996] 化合物523:由化合物513以与化合物521类似的方式合成化合物523。分离化合物523,产率为100％(2.57g)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ11.24(s,1H),8.74(d,J＝12.6Hz,2H),8.08-7.97(m,3H),7.67-7.59(m,1H),7.59-7.49(m,2H),6.12(d,J＝6.2Hz,1H),5.40(s,1H),4.53(dd,J＝6.3,4.9Hz,1H),4.30(dd,J＝4.9,3.3Hz,1H),4.01-3.93(m,1H),3.51-3.23(m,5H),2.08(t,J＝7.4Hz,2H),1.51-1.41(m,2H),1.19(d,J＝7.9Hz,28H),0.86-0.78(m,3H)。^{13}CNMR(101MHz,DMSO-d_6)δ172.45,165.58,151.68,150.55,143.53,133.27,132.44,128.48,128.42,85.62,84.20,81.58,69.46,57.51,40.82,35.33,31.28,29.04,29.00,28.94,28.81,28.70,28.68,25.24,22.08,13.92。

[0997] 化合物524:由化合物514以与化合物521类似的方式合成化合物524。将化合物524分离为白色固体,产率为98％(1.67g)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ9.58(s,1H),8.70(d,J＝1.4Hz,1H),8.33(d,J＝1.7Hz,1H),8.08-7.99(m,2H),7.69-7.62(m,1H),7.58-7.52(m,2H),7.47-7.38(m,1H),6.04(t,J＝6.4Hz,1H),4.71-4.54(m,2H),4.41-4.26(m,1H),3.99-3.63(m,5H),3.44-3.29(m,4H),2.83-2.67(m,2H),2.34-2.16(m,3H),1.67-1.52(m,2H),1.35-1.17(m,36H),0.88(t,J＝6.8Hz,3H)。

[0998] 化合物531:在氩气气氛下,将化合物521(2.24g,3.7mmol)溶解于无水THF(20mL)中。添加N,N-二异丙基乙胺(0.86mL,4.9mmol)和N,N-二异丙基氯亚磷酰胺2-氰基乙酯(1.1mL,4.9mmol)并将其在室温下搅拌3小时。将三乙醇胺(3.7mL,10mmol,2.7M溶液,在乙腈:甲苯(4:9)中)添加至反应混合物中并搅拌5分钟。将反应混合物用乙酸乙酯(80mL)稀释,在减压下浓缩至30mL,用乙酸乙酯(50mL)稀释,并且然后用5％NaCl(3×100mL)和饱和NaCl(1×100mL)洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥,过滤并在减压下浓缩至泡沫状物。经由硅胶快速色谱法、80g硅胶柱和乙酸乙酯(+0.5％三乙胺):己烷(1:1至100％乙酸乙酯梯度)进行纯化。将级分在减压下浓缩并用乙腈追踪(2x)。将级分在高真空下干燥过夜。将化合物531分离为白色泡沫状物,产率为67％(2.00g)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ8.70(d,J＝1.4Hz,1H),8.33(d,J＝1.7Hz,1H),8.08-7.99(m,2H),7.69-7.62(m,1H),7.55(t,J＝7.7Hz,2H),7.48-7.40(m,1H),6.04(t,J＝6.4Hz,1H),4.71-4.54(m,2H),4.41-4.26(m,1H),3.99-3.63

(m,5H),3.44-3.29(m,4H),2.83-2.67(m,2H),2.34-2.16(m,3H),1.67-1.52(m,2H),1.35-1.17(m,32H),0.88(t,J=6.8Hz,3H)。^{13}C NMR(101MHz,乙腈-d_3)δ174.21,174.15,152.70,151.40,144.57,144.48,134.89,133.66,129.70,129.21,126.33,119.73,119.66,88.57,85.59,82.48,72.19,60.24,60.07,59.43,59.23,59.12,59.07,58.64,44.35,44.23,44.18,44.05,41.61,41.46,37.07,37.02,32.70,30.45,30.43,30.41,30.30,30.19,30.14,30.10,30.07,26.56,26.51,25.12,25.04,24.99,24.96,24.93,23.46,21.15,21.12,21.08,21.05,14.47。^{31}P NMR(162MHz,乙腈-d_3)δ150.87,149.79。

[0999] 化合物532:由化合物522以与化合物531类似的方式合成化合物532。将化合物532分离为白色泡沫状物,产率为81%(2.56g)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ9.56(s,1H),8.71(d,J=1.3Hz,1H),8.33(d,J=1.6Hz,1H),8.07-7.96(m,2H),7.66(t,J=7.4Hz,1H),7.56(t,J=7.6Hz,2H),7.46-7.38(m,1H),6.04(t,J=6.3Hz,1H),4.71-4.53(m,2H),4.41-4.25(m,1H),3.99-3.63(m,5H),3.44-3.30(m,4H),2.82-2.67(m,2H),2.31-2.18(m,3H),1.65-1.52(m,2H),1.35-1.18(m,35H),0.89(t,J=6.8Hz,3H)。^{13}C NMR(101MHz,乙腈-d_3)δ174.21,174.14,152.70,151.41,144.57,144.48,134.90,133.67,129.72,129.21,126.34,126.29,119.66,88.58,85.59,85.49,85.46,72.02,60.25,60.07,59.43,59.24,59.12,59.08,58.64,44.36,44.24,44.18,44.06,41.60,41.46,37.08,37.02,32.71,30.46,30.44,30.43,30.40,30.30,30.18,30.15,30.10,30.07,26.56,26.51,25.13,25.05,25.00,24.96,24.93,23.46,21.15,21.12,21.09,21.05,14.48。^{31}P NMR(162MHz,乙腈-d_3)δ150.87,149.80。

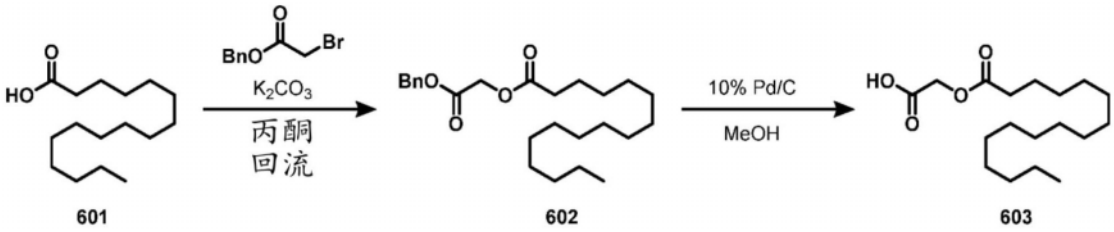
[1000] 化合物533:由化合物523以与化合物531类似的方式合成化合物533。分离化合物533,产率为89%(2.95g)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ9.63(s,1H),8.69(d,J=1.4Hz,1H),8.33(d,J=1.5Hz,1H),8.07-7.97(m,2H),7.70-7.60(m,1H),7.58-7.51(m,2H),7.48-7.40(m,1H),6.04(t,J=6.6Hz,1H),4.71-4.52(m,2H),4.41-4.25(m,1H),3.99-3.64(m,5H),3.44-3.29(m,4H),2.82-2.69(m,2H),2.37-2.15(m,3H),1.65-1.52(m,2H),1.45-1.16(m,39H),0.94-0.84(m,3H)。^{13}C NMR(101MHz,乙腈-d_3)δ174.20,174.13,166.46,152.68,151.41,151.39,144.57,144.47,134.89,133.65,129.69,129.21,126.33,126.28,119.71,119.64,88.57,85.58,85.49,85.45,82.51,82.48,72.19,60.24,60.07,59.43,59.23,59.12,59.07,58.64,44.35,44.23,44.18,44.05,41.62,41.47,37.08,37.02,32.71,30.48,30.46,30.44,30.43,30.41,30.30,30.19,30.15,30.11,30.08,26.56,26.51,25.13,25.05,25.00,24.97,24.94,23.46,21.15,21.12,21.08,21.05,14.49。^{31}P NMR(162MHz,乙腈-d_3)δ150.87,149.79。

[1001] 化合物534:由化合物524以与化合物531类似的方式合成化合物534。将化合物534分离为白色泡沫状物,产率为77%(1.65g)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ9.56(s,1H),8.71(d,J=1.4Hz,1H),8.33(d,J=1.7Hz,1H),8.07-7.98(m,2H),7.69-7.62(m,1H),7.60-7.51(m,2H),7.48-7.33(m,1H),6.04(t,J=6.4Hz,1H),5.38-5.27(m,2H),4.71-4.54(m,2H),4.41-4.26(m,1H),3.99-3.63(m,5H),3.45-3.29(m,4H),2.84-2.67(m,2H),2.34-2.17(m,3H),2.09-1.92(m,3H),1.66-1.52(m,2H),1.39-1.18(m,32H),0.94-0.83(m,3H)。^{13}CNMR(101MHz,乙腈-d_3)δ174.11,152.70,151.40,144.56,134.90,133.67,130.83,130.76,129.71,129.21,118.34,88.57,44.36,44.23,44.18,44.05,41.62,41.47,37.07,37.01,

32.69,30.52,30.50,30.25,30.10,30.07,30.04,29.91,27.86,26.56,26.51,25.13,25.05,25.00,24.97,24.93,23.45,14.48,2.01,1.19。^{31}P NMR(162MHz,乙腈-d_3)δ150.86,149.79。

[1002] 含有空间位阻酯的脂质的合成

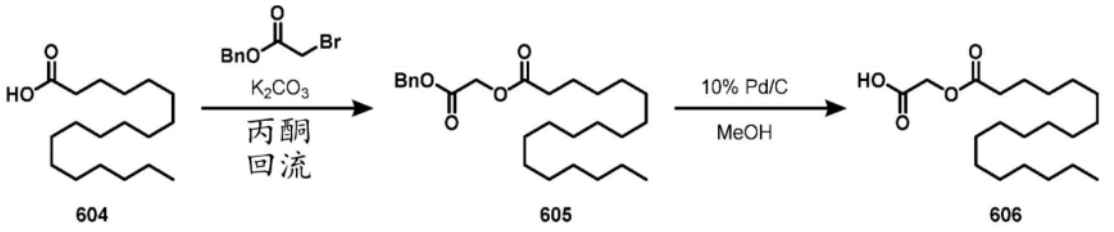
[1003] 方案51

[1004] 

601 602 603

[1005] 化合物603:将棕榈酸601(3.53g,13.1mmol)和碳酸钾(3.71g,26.85mmol)添加至苄基2-溴乙酸酯(3.0g,13.1mmol,2.05mL)在丙酮(250mL)中的搅拌溶液中。在回流加热24小时后,将反应混合物冷却至室温并过滤以除去过量的K_2CO_3。在减压下蒸发滤液,并将残余物在乙醚(50mL)与水(50mL)之间分配。将有机级分经$MgSO_4$干燥,过滤并在减压下蒸发,以给出粗苄基酯602(5.2g)。将残余物溶解于乙酸乙酯/甲醇的4:1混合物(100mL)中,随后添加10%Pd/C(0.75g,0.71mmol)。烧瓶配备有连接至充满氢气的橡胶气囊和真空管线的三通适配器。将烧瓶置于真空下20秒,随后用氢气再填充。将该系列再重复两次。4小时后,将反应混合物通过硅藻土垫过滤,将滤液用乙酸乙酯(x3)和甲醇(x2)冲洗。将合并的滤液在减压下蒸发。将残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-20%EtOAc作为洗脱剂,已烷含有1%的乙酸)纯化,以给出化合物603(2.22g,51%)^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ4.67(s,2H),2.42(t,J=7.5Hz,2H),1.66(p,J=7.5Hz,2H),1.38-1.23(m,23H),0.88(t,J=6.9Hz,3H)。

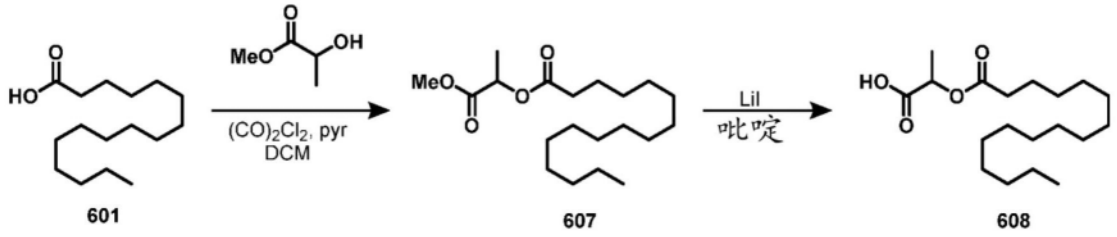
[1006] 方案52

[1007] 

604 605 606

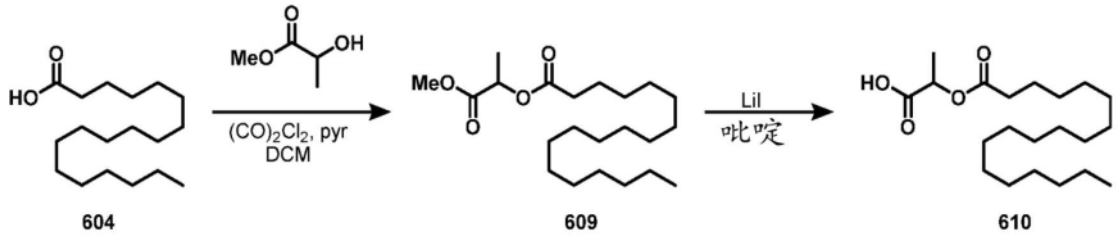
[1008] 化合物606:将硬脂酸604(2.0g,7.03mmol)和碳酸钾(1.99g,14.41mmol)添加至苄基2-溴乙酸酯(1.61g,7.03mmol)在丙酮(250mL)中的搅拌溶液中。在回流加热24小时后,将反应混合物冷却至室温并过滤以除去过量的K_2CO_3。在减压下蒸发滤液,并将残余物在乙醚与水(50mL)之间分配。将有机级分经$MgSO_4$干燥,过滤并在减压下蒸发,以给出粗苄基酯605(3.0g)。将残余物溶解于乙酸乙酯/甲醇的1:1混合物(100mL)中,随后添加10%Pd/C(738mg,0.693mmol)。烧瓶配备有连接至充满氢气的橡胶气囊和真空管线的三通适配器。将烧瓶置于真空下20秒,随后用氢气再填充。将该系列再重复两次。4小时后,将反应混合物通过硅藻土垫过滤,将滤液用乙酸乙酯(×3)和甲醇(×2)冲洗。将合并的滤液在减压下蒸发。将残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-20%EtOAc作为洗脱剂,已烷含有1%的乙酸)纯化,以给出化合物606(1.5g,62%,经2步)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ4.53(s,2H),2.35(t,J=7.4Hz,2H),1.59-1.49(m,2H),1.23(s,28H),0.85(t,J=6.7Hz,3H)。

[1009] 方案53

[1010] 

[1011] 化合物608:将棕榈酸601(2.66g,10.37mmol)在氩气下溶解于干燥DCM(100mL)中并冷却至0℃。添加草酰氯(2M,10.37mL,20.73mmol),随后添加DMF(一滴)。去除冰浴,并将反应混合物在室温下搅拌。当气体逸出停止时(约2小时),将混合物真空浓缩,以给出粗棕榈酰氯。在另一个烧瓶中,将甲基2-羟基丙酸酯(0.9mL,9.42mmol)溶解于干燥DCM(60mL)中,随后添加吡啶(3.81mL,47.1mmol)。将反应混合物冷却至0℃,随后经由套管滴加棕榈酰氯在DCM(10mL)中的溶液。去除冰浴,并将反应搅拌过夜。将反应用去离子水(50mL)淬灭并剧烈搅拌30分钟。将双相混合物转移到分液漏斗中。分配并分离各层。保存有机层,而将水层用二氯甲烷(150mL×2)萃取。将有机物合并并用1M盐酸水溶液、饱和碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤,干燥(硫酸钠),过滤并浓缩。将粗残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-10%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物607(2.28g,70%)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ5.10(q,J=7.1Hz,1H),3.74(s,3H),2.37(hept,J=7.7Hz,2H),1.64(h,J=7.1Hz,2H),1.48(d,J=7.1Hz,3H),1.36-1.23(m,24H),0.88(t,J=6.8Hz,3H)。将碘化锂(3.89g,29.05mmol)添加至化合物607(2g,5.84mmol)在无水吡啶(30mL)中的搅拌溶液中。回流搅拌24小时后,蒸发混合物。用1M HCl和EtOAc的混合物悬浮残余油状物。分离各层并将水层用EtOAc(×3)萃取。将有机萃取物合并,用饱和硫代硫酸钠的水溶液、盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥并预吸附在硅胶中。将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-20%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物608(1.01g,52%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ12.94(s,1H),4.88(q,J=7.1Hz,1H),2.32(t,J=7.3Hz,2H),1.57-1.47(m,2H),1.37(d,J=7.1Hz,3H),1.24(s,24H),0.88-0.83(m,3H)。

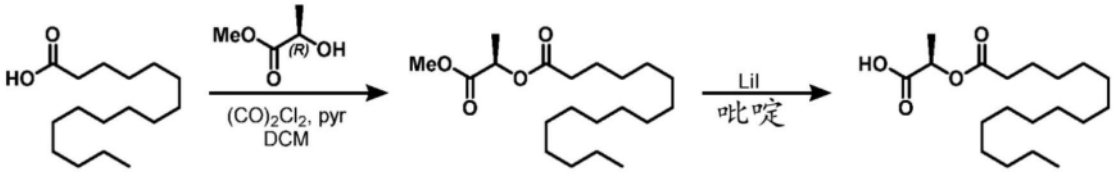
[1012] 方案54

[1013] 

[1014] 化合物610:将硬脂酸604(2.95g,10.37mmol)在氩气下溶解于干燥DCM(100mL)中并冷却至0℃。添加草酰氯(2M,10.37mL,20.73mmol),随后添加DMF(一滴)。去除冰浴,并将反应混合物在室温下搅拌。当气体逸出停止时(约2小时),将混合物真空浓缩,以给出粗硬脂酰氯。在另一个烧瓶中,将甲基2-羟基丙酸酯(0.981g,9.42mmol,0.9mL)溶解于干燥DCM(60mL)中,随后添加吡啶(3.81mL,47.12mmol)。将反应混合物冷却至0℃,随后经由套管滴加硬脂酰氯在DCM(10mL)中的溶液。去除冰浴,并将反应搅拌过夜。将反应用去离子水(50mL)淬灭并剧烈搅拌30分钟。将双相混合物转移到分液漏斗中。分配并分离各层。保存有机层,而将水层用二氯甲烷(150mL×2)萃取。将有机物合并并用1M盐酸水溶液、饱和碳酸氢

钠水溶液、盐水洗涤,干燥(硫酸钠),过滤并浓缩。将粗残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-10%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物609(3.09g,88%)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ5.10(q,J=7.1Hz,1H),3.75(s,3H),2.38(td,J=7.6,6.2Hz,2H),1.64(q,J=7.4Hz,2H),1.48(d,J=7.0Hz,3H),1.32-1.23(m,28H),0.88(t,J=6.9Hz,3H)。将碘化锂(5.58g,41.7mmol)添加至化合物609(3.09g,8.34mmol)在无水吡啶(40mL)中的搅拌溶液中。回流搅拌24小时后,蒸发混合物。用1M HCl和EtOAc的混合物悬浮残余油状物。分离各层并将水层用EtOAc(×3)萃取。将有机萃取物合并,用饱和硫代硫酸钠的水溶液、盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥并预吸附在硅胶中。将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-20%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物610(1.29g,43%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ12.94(s,1H),2.32(t,J=7.3Hz,2H),1.59-1.47(m,2H),1.37(d,J=7.1Hz,3H),1.23(s,28H),0.85(t,J=6.7Hz,3H)。

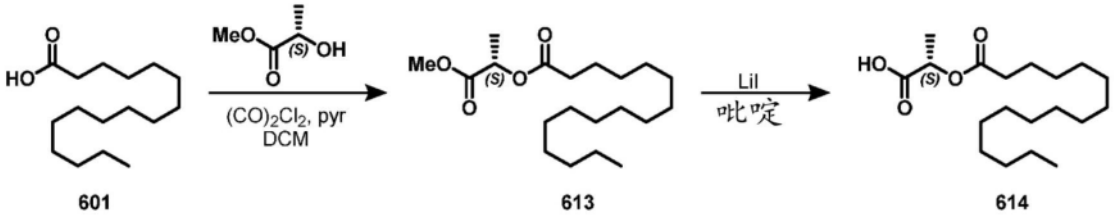
[1015] 方案55

[1016] 

601 611 612

[1017] 化合物612:将棕榈酸601(2.66g,10.37mmol)在氩气下溶解于干燥DCM(100mL)中并冷却至0℃。添加草酰氯(1.79mL,20.73mmol),随后添加DMF(一滴)。去除冰浴,并将反应混合物在室温下搅拌。当气体逸出停止时(约2小时),将混合物真空浓缩,以给出粗棕榈酰氯。在另一个烧瓶中,将甲基-(R)-乳酸酯(0.9mL,9.42mmol)溶解于干燥DCM(60mL)中,随后添加吡啶(3.81mL,47.1mmol)。将反应混合物冷却至0℃,随后经由套管滴加棕榈酰氯在DCM(10mL)中的溶液。去除冰浴,并将反应搅拌过夜。将反应用去离子水(50mL)淬灭并剧烈搅拌30分钟。将双相混合物转移到分液漏斗中。分配并分离各层。保存有机层,而将水层用二氯甲烷(150mL×2)萃取。将有机物合并并用1M盐酸水溶液、饱和碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤,干燥(硫酸钠),过滤并浓缩。将粗残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-10%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物611(3.02g,93%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ5.10(q,J=7.1Hz,1H),3.75(s,3H),2.38(td,J=7.5,4.3Hz,2H),1.70-1.60(m,2H),1.48(d,J=7.1Hz,3H),1.38-1.22(m,26H),0.91-0.85(m,3H)。将碘化锂(5.90g,44.1mmol)添加至化合物611(3.02g,8.82mmol)在无水吡啶(47mL)中的搅拌溶液中。回流搅拌24小时后,蒸发混合物。用1M HCl和EtOAc的混合物悬浮残余油状物。分离各层并将水层用EtOAc(×3)萃取。将有机萃取物合并,用饱和硫代硫酸钠的水溶液、盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥并预吸附在硅胶中。将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-20%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物612(1.2g,41%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ5.11(q,J=7.1Hz,1H),2.38(td,J=7.5,3.0Hz,2H),1.69-1.60(m,2H),1.53(d,J=7.1Hz,3H),1.35-1.23(m,24H),0.94-0.84(m,3H)。$C_{19}H_{35}O_4$的LRMS(ESI)计算值:$[M-H]^-$ m/z=327.26,实验值:327.2。对映异构体过量:100%。

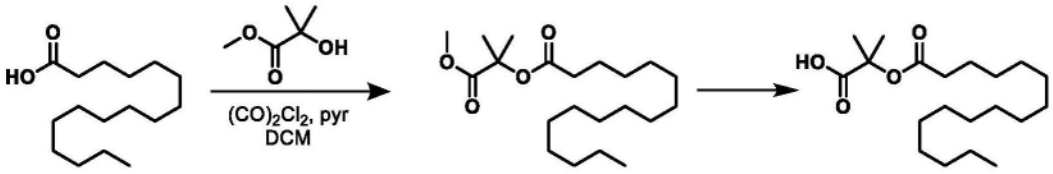
[1018] 方案56

[1019] 

601 613 614

[1020] 化合物614:将棕榈酸601(2.66g,10.37mmol)在氩气下溶解于干燥DCM(100mL)中并冷却至0℃。添加草酰氯(1.79mL,20.73mmol),随后添加DMF(一滴)。去除冰浴,并将反应混合物在室温下搅拌。当气体逸出停止时(约2小时),将混合物真空浓缩,以给出粗棕榈酰氯。在另一个烧瓶中,将甲基-(S)-乳酸酯(0.9mL,9.42mmol)溶解于干燥DCM(60mL)中,随后添加吡啶(3.81mL,47.1mmol)。将反应混合物冷却至0℃,随后经由套管滴加棕榈酰氯在DCM(10mL)中的溶液。去除冰浴,并将反应搅拌过夜。将反应用去离子水(50mL)淬灭并剧烈搅拌30分钟。将双相混合物转移到分液漏斗中。分配并分离各层。保存有机层,而将水层用二氯甲烷(150mL×2)萃取。将有机物合并并用1M盐酸水溶液、饱和碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤,干燥(硫酸钠),过滤并浓缩。将粗残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-70%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物613(3.2g,99%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ5.10(q,J=7.1Hz,1H),3.74(s,3H),2.46-2.31(m,2H),1.70-1.59(m,2H),1.48(d,J=7.1Hz,3H),1.34-1.22(m,24H),0.91-0.85(m,3H)。将碘化锂(6.25g,46.7mmol)添加至化合物613(3.2g,9.34mmol)在无水吡啶(30mL)中的搅拌溶液中。回流搅拌24小时后,蒸发混合物。用1M HCl和EtOAc的混合物悬浮残余油状物。分离各层并将水层用EtOAc(×3)萃取。将有机萃取物合并,用饱和硫代硫酸钠的水溶液、盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥并预吸附在硅胶中。将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-20%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物614(1.81g,59%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ5.12(q,J=7.1Hz,1H),2.42-2.35(m,2H),1.70-1.60(m,2H),1.53(d,J=7.1Hz,3H),1.32-1.24(m,24H),0.90-0.85(m,3H)。$C_{19}H_{35}O_4$的LRMS(ESI)计算值:$[M-H]^-$ m/z=327.26,实验值:327.3。对映异构体过量:100%。

[1021] 方案57

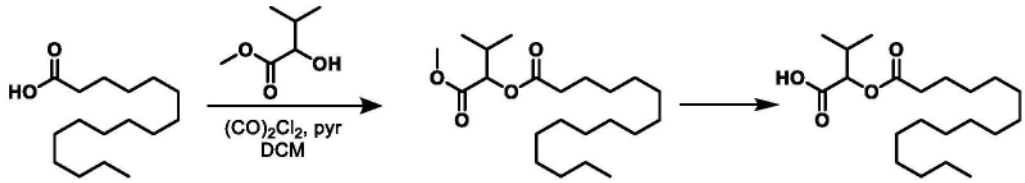
[1022] 

601 615 616

[1023] 化合物616:将棕榈酸601(2.46g,9.59mmol)溶解于干燥DCM(100mL)中并冷却至0℃。添加草酰氯(1.66mL,20.3mmol),随后添加DMF(一滴)。去除冰浴,并将反应混合物在室温下搅拌。当气体逸出停止时(约2小时),将混合物真空浓缩,以给出粗棕榈酰氯。在另一个烧瓶中,将甲基2-羟基-2-甲基-丙酸酯(1.03g,8.72mmol)溶解于干燥DCM(60mL)中,随后添加吡啶(3.5mL,43.6mmol)。将反应混合物冷却至0℃,随后经由套管滴加棕榈酰氯在DCM(20mL)中的溶液。去除冰浴,并将反应搅拌过夜。将反应用NH_4Cl饱和水溶液淬灭。将双相混合物转移到分液漏斗,并将各层分离。将水层用二氯甲烷(150mL×2)萃取。将合并的有机层合并并用1M盐酸水溶液、饱和碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将粗残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-10%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物615

(1.78g,57%)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ3.72(s,3H),2.30(t,J=7.5Hz,2H),1.61(p,J=7.4Hz,2H),1.54(s,7H),1.33-1.24(m,24H),0.88(t,J=6.9Hz,3H)。$C_{21}H_{41}O_4$的LRMS(ESI)计算值:[M+H]$^+$m/z=357.29,实验值:357.3。将碘化锂(3.34g,24.9mmol)添加至化合物615(1.78g,4.99mmol)在无水吡啶(25mL)中的搅拌溶液中。回流搅拌24小时后,在减压下除去挥发物。用1M HCl和EtOAc的混合物悬浮残余油状物。分离各层并将水层用EtOAc(×3)萃取。将有机萃取物合并,用饱和硫代硫酸钠的水溶液、盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥并预吸附在硅胶中。将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-20%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物616(1.23g,72%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ2.31(t,J=7.5Hz,2H),1.66-1.55(m,8H),1.37-1.20(m,25H),0.91-0.84(m,3H)。$C_{20}H_{37}O_4$的LRMS(ESI)计算值:[M-H]$^-$m/z=341.28,实验值:341.3。

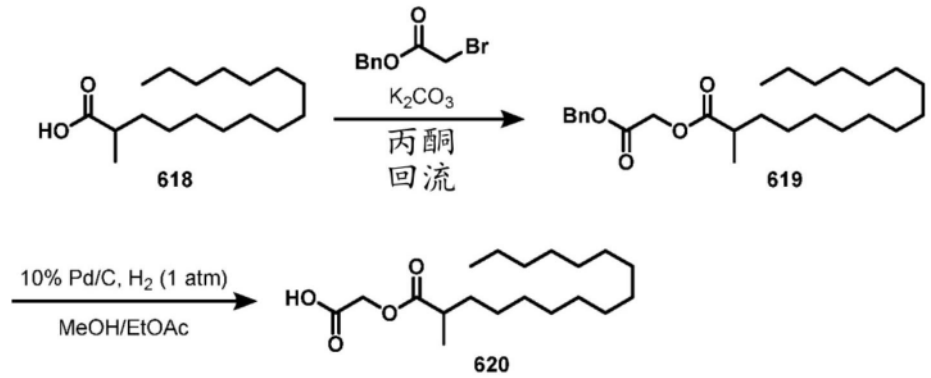
[1024] 方案58

[1025] 

601 617 618

[1026] 化合物618:将棕榈酸601(2.19g,8.54mmol)溶解于干燥DCM(100mL)中并冷却至0℃。添加草酰氯(1.47mL,17.1mmol),随后添加DMF(一滴)。去除冰浴,并将反应混合物在室温下搅拌。当气体逸出停止时(约2小时),将混合物真空浓缩,以给出粗棕榈酰氯。在另一个烧瓶中,将甲基2-羟基-3-甲基-丁酸酯(1.08g,7.76mmol)溶解于干燥DCM(60mL)中,随后添加吡啶(3.14mL,38.8mmol)。将反应混合物冷却至0℃,随后经由套管滴加棕榈酰氯在DCM(10mL)中的溶液。去除冰浴,并将反应搅拌过夜。将反应用NH_4Cl饱和水溶液淬灭。将双相混合物转移到分液漏斗,并将各层分离。将水层用二氯甲烷(150mL×2)萃取。将合并的有机层合并并用1M盐酸水溶液、饱和碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将粗残余物通过ISCO自动柱(使用己烷中的0%-10%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物617(2.18g,75%)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ4.84(d,J=4.6Hz,1H),3.74(s,3H),2.40(td,J=7.5,2.5Hz,2H),2.22(heptd,J=6.9,4.6Hz,1H),1.65(p,J=7.5Hz,2H),1.35-1.24(m,24H),0.98(dd,J=9.7,6.9Hz,6H),0.88(t,J=6.9Hz,3H)。$C_{22}H_{43}O_4$的LRMS(ESI)计算值:[M+H]$^+$m/z=371.31,实验值:371.3。将碘化锂(3.94g,29.4mmol)添加至化合物617(2.18g,5.88mmol)在无水吡啶(25mL)中的搅拌溶液中。回流搅拌24小时后,在减压下除去挥发物。用1M HCl和EtOAc的混合物悬浮残余油状物。分离各层并将水层用EtOAc(×3)萃取。将有机萃取物合并,用饱和硫代硫酸钠的水溶液、盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥并预吸附在硅胶中。将残余物通过ISCO自动柱(使用CH_2Cl_2中的0%-20%MeOH作为洗脱剂)纯化,以给出化合物618(1.59g,75%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ4.90(d,J=4.3Hz,1H),2.45-2.37(m,2H),2.28(pd,J=6.9,4.3Hz,1H),1.66(p,J=7.5Hz,2H),1.36-1.22(m,24H),1.03(dd,J=6.9,5.9Hz,6H),0.92-0.84(m,2H)。$C_{21}H_{39}O_4$的LRMS(ESI)计算值:[M-H]$^-$m/z=355.29,实验值:355.3。

[1027] 方案59

[1028] 

[1029] 化合物620:将2-甲基十六烷酸618(2.42g,8.95mmol)和碳酸钾(2.54g,18.34mmol)添加至苄基溴乙酸酯(1.48mL,9.40mmol)在丙酮(250mL)中的搅拌溶液中。在回流24h后,将反应混合物冷却至室温并过滤以除去过量的K_2CO_3。在减压下蒸发滤液。残余物为白色固体,并将其在乙醚(50mL)与水(50mL)之间分配。将有机级分经硫酸镁干燥,过滤并在减压下蒸发,以给出粗苄基酯。将残余物预吸附在硅胶中并使用0%至8%梯度的EtOAc/己烷纯化,以给出化合物619(2.03g,54%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.41-7.31(m,5H),5.19(s,2H),4.65(s,2H),2.53(h,J=7.0Hz,1H),1.76-1.64(m,1H),1.55(s,1H),1.46-1.37(m,1H),1.35-1.21(m,25H),1.18(d,J=7.0Hz,3H),0.91-0.85(m,3H)。$C_{26}H_{42}O_4Na$的LRMS(ESI)计算值:$[M+Na]^+$ m/z=441.31,实验值:441.3。将化合物618(2.03g,4.85mmol)溶解于乙酸乙酯/甲醇的4:1混合物(80mL)中,随后添加10%Pd/C(516mg,0.484mmol)。烧瓶配备有连接至充满氢气的橡胶气囊和真空管线的三通适配器。将烧瓶置于真空下20秒,随后用氢气再填充。将该系列再重复两次。4小时后,将反应混合物通过硅藻土垫过滤,将滤液用乙酸乙酯(×3)和甲醇(×2)冲洗。将合并的滤液在减压下蒸发。将残余物通过ISCO自动柱(使用已烷中的0%-60%EtOAc作为洗脱剂,已烷含有1%的乙酸)纯化,以给出化合物620(1.13g,70%)。^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δ4.66(d,J=1.0Hz,2H),2.54(h,J=7.0Hz,1H),1.76-1.64(m,1H),1.51-1.39(m,1H),1.36-1.17(m,28H),0.92-0.84(m,2H)。)。$C_{19}H_{35}O_4$的LRMS(ESI)计算值:$[M-H]^-$ m/z=327.26,实验值:327.2。

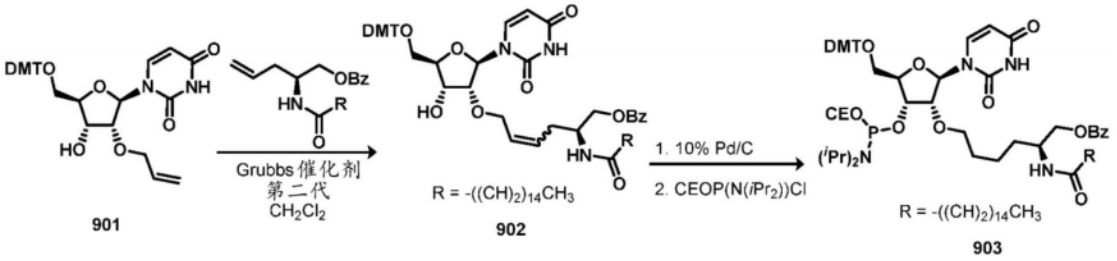
[1030] 可裂解的神经酰胺型接头

[1031] 神经酰胺酶(CDase)是调节神经酰胺形成和降解的鞘脂代谢的关键酶。神经酰胺由鞘氨醇主结构(sphingosine bone)和脂肪酸残基组成,如图1所示。通过酰胺键的断裂的神经酰胺的酶促降解受三个CDase家族(酸性、中性和碱性)控制,这些CDase的区别在于它们的最适pH、亚细胞定位、一级结构、机制和功能。

[1032] 2'-O-神经酰胺型核苷氨基磷酸酯可以使用基于人中性CDase的机制和结构要求的策略合成。合成的单体核苷被策略性地引入siRNA中,并且一旦进入体内,就会被CDase选择性裂解,释放脂肪酸和寡核苷酸链。

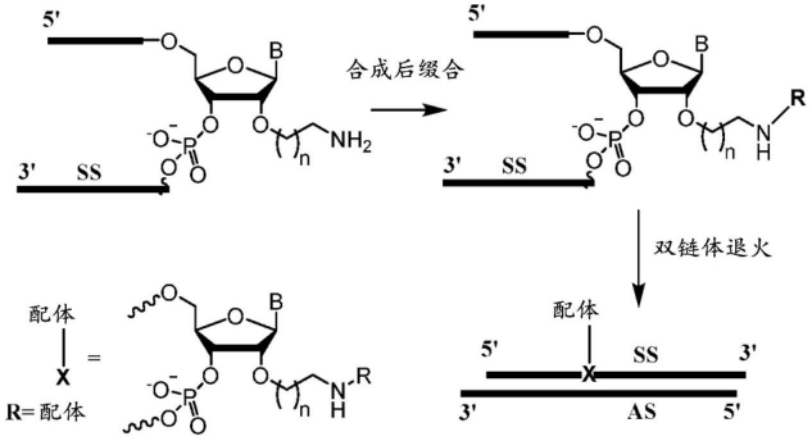
[1033] 2'-O-神经酰胺型核苷氨基磷酸酯的合成程序如方案60所示。化合物901是可商购的或可由尿苷分2步制备。核苷的2'-位末端烯烃与(S)-烯丙基甘氨酸衍生物交叉复分解以给出化合物902。氢化内部烯烃,随后形成氨基磷酸酯,以获得化合物903。

[1034] 方案60

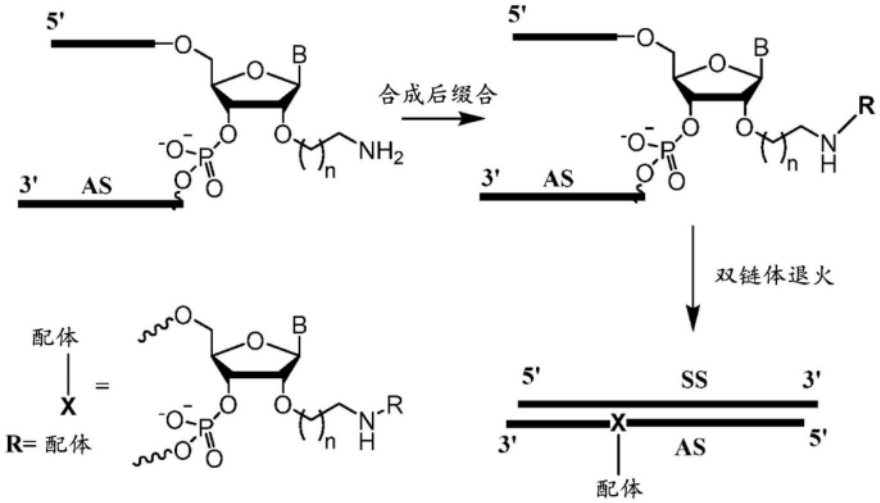
[1035] 

[1036] 实例2.亲脂性部分与siRNA的合成后缀合

[1037] 方案61

[1038] 

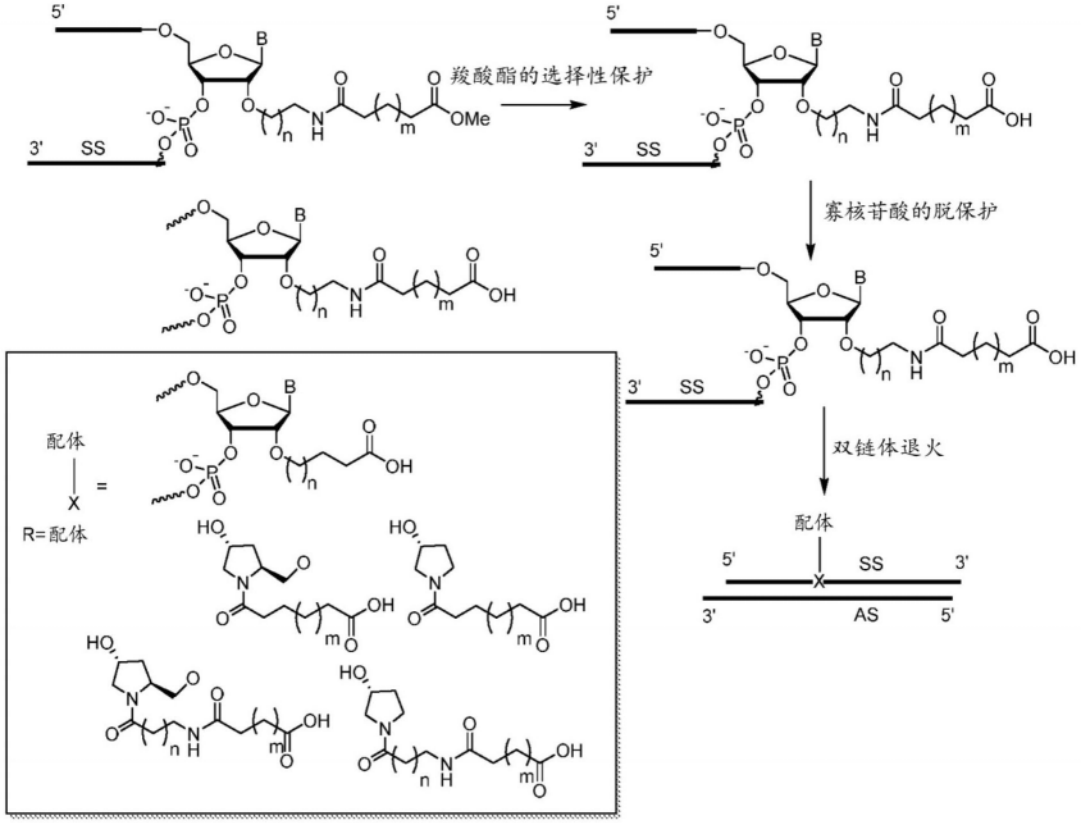
[1039] 方案62

[1040] 

[1041] 各种配体(包括各种亲脂性部分)经由合成后缀合方法与siRNA剂缀合,如方案61及62中所示。siRNA的有义链或反义链的氨基衍生物与亲脂性配体的NHS酯或羧酸在肽偶联条件下反应。然后将这些单链纯化,并与其他链结合,以制成siRNA双链体。

[1042] 实例3.具有末端酸官能团的siRNA缀合物的合成

[1043] 方案62

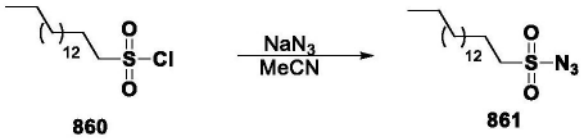
[1044] 

[1045] 各种配体(包括具有羧基部分的各种亲脂性配体)经由柱上或合成后缀合在末端和内部位置与siRNA剂缀合,如方案62所示。

[1046] 首先将含有具有末端酯的亲脂性部分的固体支持单链用水中的20%哌啶处理过夜,随后在室温下用乙醇中的2:1NH_4OH处理15小时以产生具有末端羧酸的单链。将这些单链与相应的反义链组合以产生用于各种测定的siRNA双链体(参见,例如表11、12、18和19)。

[1047] 实例4.具有附接至磷酸主链的亲脂性基团的siRNA缀合物的合成。

[1048] 方案63

[1049] 

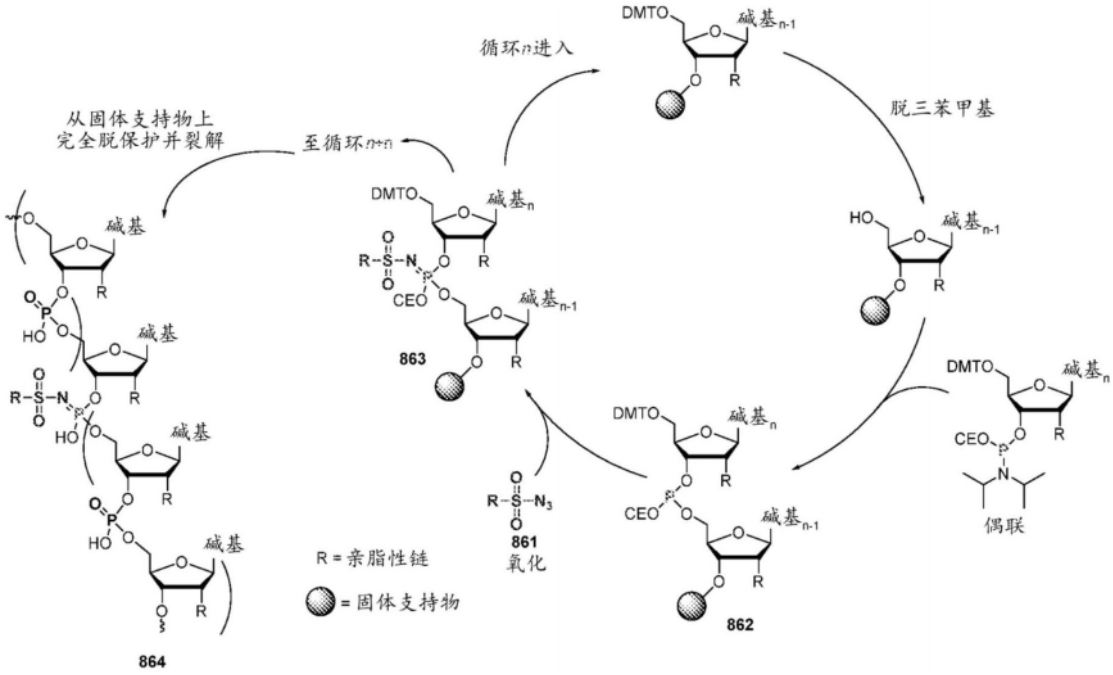
860 861

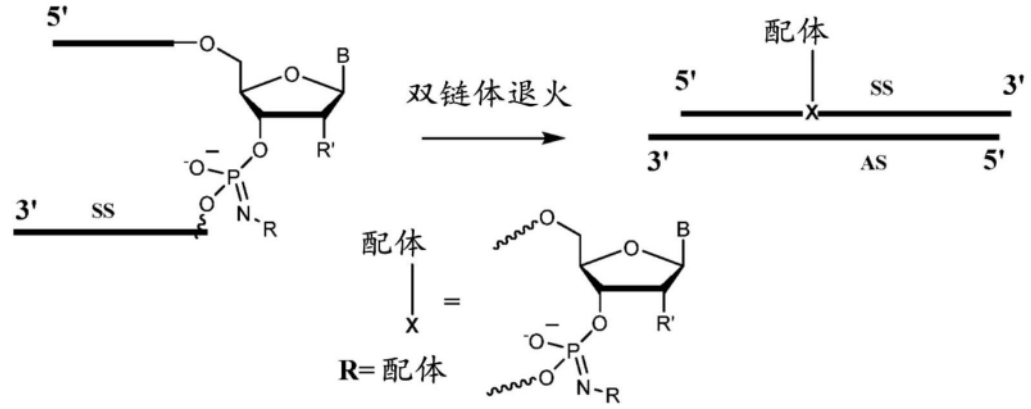
[1050] 化合物861:将叠氮化钠(2.57g,39.53mmol)添加至十六烷-1-磺酰氯(10.08g,30.4mmol)在MeCN(100mL)中的搅拌溶液中。在室温下搅拌10小时后,将反应混合物用EtOAc(200mL)稀释并用水(50mL)洗涤。将有机相经Na_2SO_4干燥并蒸发至干。将残余物通过ISCO自动柱(使用己烷中的0%-5%EtOAc作为洗脱剂)纯化,以给出化合物861(7.71g,76%)。^1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ3.33-3.28(m,2H),1.96-1.87(m,2H),1.51-1.41(m,2H),1.33-1.23(m,24H),0.92-0.86(m,3H)。

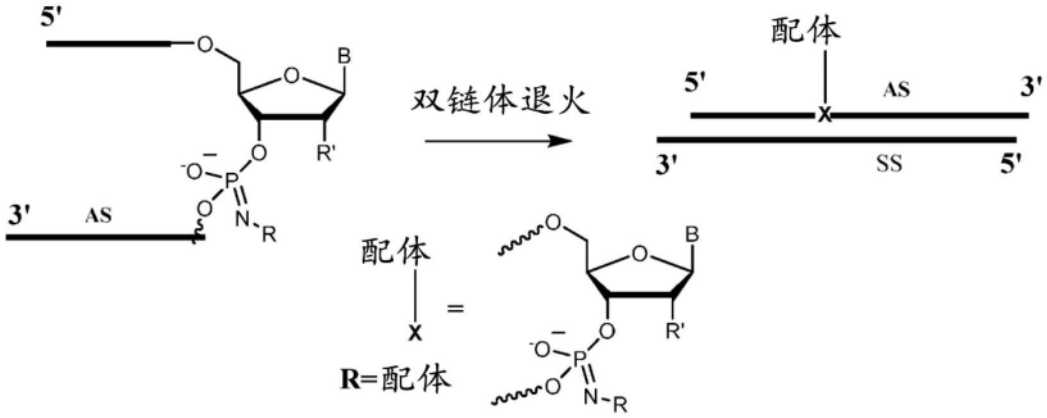
[1051] 化合物861与寡核苷酸(有义链或反义链)之间的反应。在寡核苷酸的固相合成期间(方案64),将化合物861的溶液(0.5M,在乙腈中)用于氧化P(III)亚磷酸酯中间体862以产生磺酰基亚磷酰胺化合物863。此氧化步骤用于代替常见的氧化试剂(I_2或硫化试剂)并且可以在涉及P(III)亚磷酸酯氧化的寡核苷酸合成的任何阶段进行。在合成结束时,使用标准条件将寡核苷酸完全去保护,并从固体支持物上裂解下来,以给出含有磺酰基氨基磷

酸酯的寡核苷酸864。

[1052] 方案64

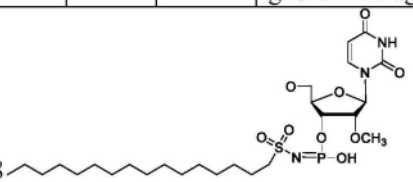
[1053] 



[1054] 

[1055] 表1.具有经亲脂性部分修饰的磷酸主链的siRNA

[1056]

双链体 Id	寡核苷酸 Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	精确质量
AD-1033233	A-1840408	有义	TTR	asascagY158GfuUfCfUfugcucuausasa	38	7217.13	7213.25
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-1427063	A-2248662	有义	SOD1	csasuuuY158AfaUfCfCfucacucuasasa	40	7121.08	7117.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
	Y158 						

[1057] 斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯。

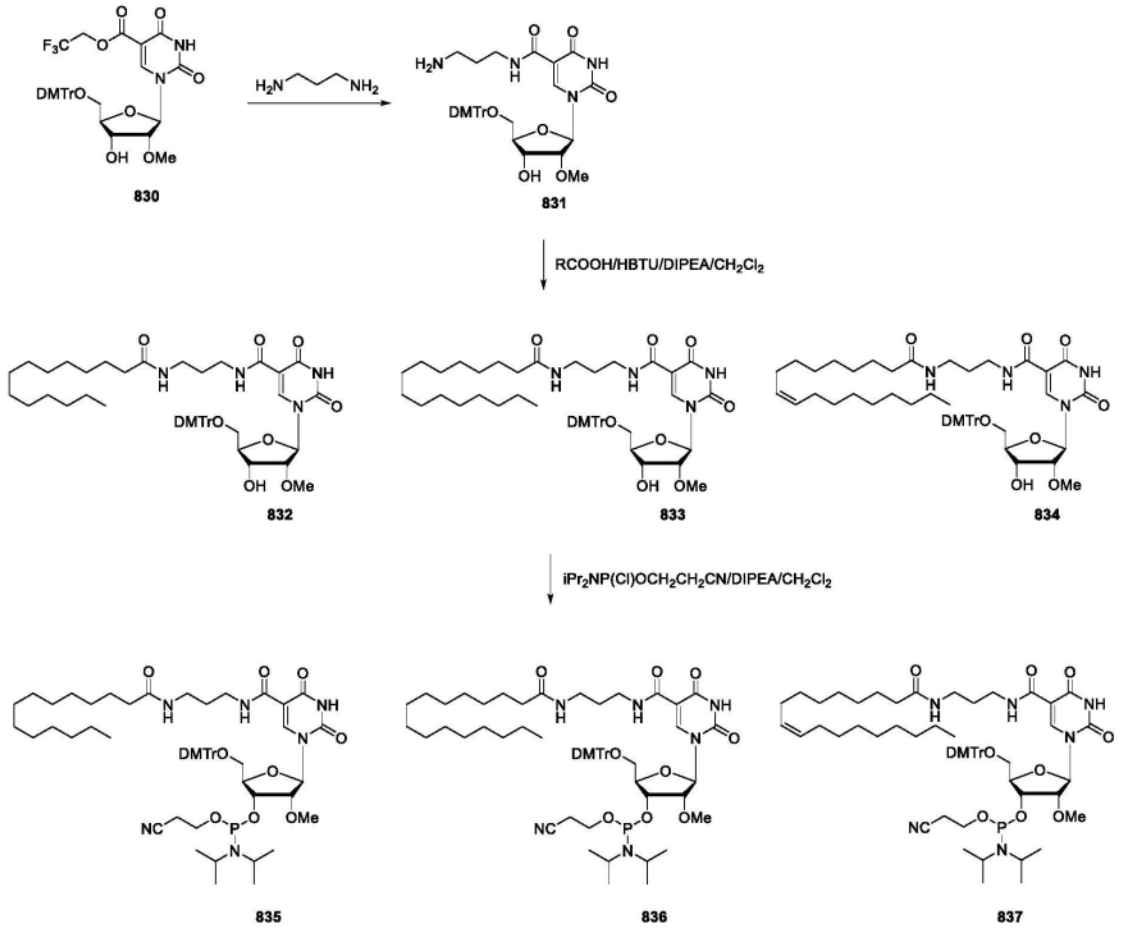
[1058] 实例5:用于经核碱基修饰的亲脂性缀合物的单体合成

[1059] 如下所示,可以将多种脂质在嘧啶的C5位置与氨基接头缀合,并且可以将结构单元亚磷酰胺并入siRNA中。

[1060] 与C5-脂质缀合的尿苷亚磷酰胺的合成

[1061] 方案65

[1062]



[1063] 化合物831:在室温下,将1,3-二氨基丙烷(81.0g,1.09mol)添加至化合物830(15.0g,21.9mmol)在MeOH(120mL)中的溶液中。将反应混合物在室温下搅拌15小时。将反应混合物用DCM稀释,并将此溶液用H_2O和盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,并真空浓缩,以获得粗物质(14.5g)。将此粗品直接用于下一步偶联反应。ESI-MS:661.3(M+H)。

[1064] 化合物832:将化合物831(5.0g,7.57mmol),与肉豆蔻酸(3.46g,15.1mmol)和HBTU(3.44g,9.08mmol)添加至反应烧瓶中。将固体溶解于CH_2Cl_2(150mL)中,并经由注射器添加二异丙基乙胺(2.93g,22.7mmol)。将反应物在室温下搅拌过夜。通过TLC(EtOAc)检查反应以确认原材料的消耗。将反应用CH_2Cl_2稀释,然后通过饱和$NaHCO_3$溶液洗涤。将有机层分离,经无水Na_2SO_4干燥并浓缩。将粗残余物通过硅胶快速色谱法(0%至100%EtOAc/己烷)纯化,以给出化合物832(4.98g,5.72mmol,76%)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ8.68(s,1H),7.52-7.42(m,2H),7.42-7.33(m,5H),7.19(d,J=7.3Hz,1H),6.86-6.77(m,5H),6.31(t,J=6.2Hz,1H),5.91(d,J=3.3Hz,1H),4.20(t,J=6.0Hz,1H),4.05(ddd,J=6.8,4.7,2.8Hz,1H),3.94(dd,J=5.6,3.3Hz,1H),3.77(s,6H),3.71(hept,J=6.6Hz,3H),3.56(s,3H),3.50(dd,J=11.0,2.9Hz,1H),3.46-3.29(m,4H),1.25-1.23(m,24H),0.88(t,J=6.9Hz,3H)。

[1065] 化合物833:通过使用棕榈酸以与以上关于合成化合物832所述类似的方式获得化合物833(3.62g,53.2%)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ8.67(s,1H),8.62(t,J=6.4Hz,1H),7.52-7.43(m,2H),7.43-7.33(m,5H),7.27-7.15(m,2H),6.84-6.79(m,4H),6.32(t,J=6.2Hz,1H),5.91(d,J=3.4Hz,1H),4.21(t,J=6.0Hz,1H),4.05(ddd,J=6.8,4.7,2.8Hz,

1H),3.94(dd,J=5.6,3.3Hz,1H),3.77(s,6H),3.71(p,J=6.7Hz,1H),3.56(s,3H),3.50(dd,J=11.0,2.9Hz,1H),3.45-3.32(m,3H),1.24(d,J=9.7Hz,28H),0.88(t,J=6.9Hz,3H)。

[1066] 化合物834:通过使用油酸以与以上关于合成化合物832所述类似的方式获得化合物834(5.29g,79.5%)。^{1}H NMR(500MHz,氯仿-d)δ8.66(d,J=9.4Hz,2H),7.46(tt,J=6.1,1.3Hz,2H),7.37(ddd,J=9.0,4.7,2.2Hz,4H),7.30-7.23(m,3H),7.22-7.14(m,1H),6.82(dt,J=8.9,1.6Hz,4H),6.37(dt,J=20.2,6.0Hz,1H),5.92(d,J=3.3Hz,1H),5.34(td,J=3.7,2.0Hz,4H),4.20(dd,J=7.5,4.7Hz,1H),4.05(ddd,J=7.0,4.7,2.9Hz,1H),3.95(dd,J=5.6,3.3Hz,1H),3.77(s,6H),3.56(s,3H),3.53-3.45(m,1H),2.01(d,J=6.0Hz,4H),1.34-1.11(m,24H),0.88(t,J=7.0,2.4Hz,3H)。

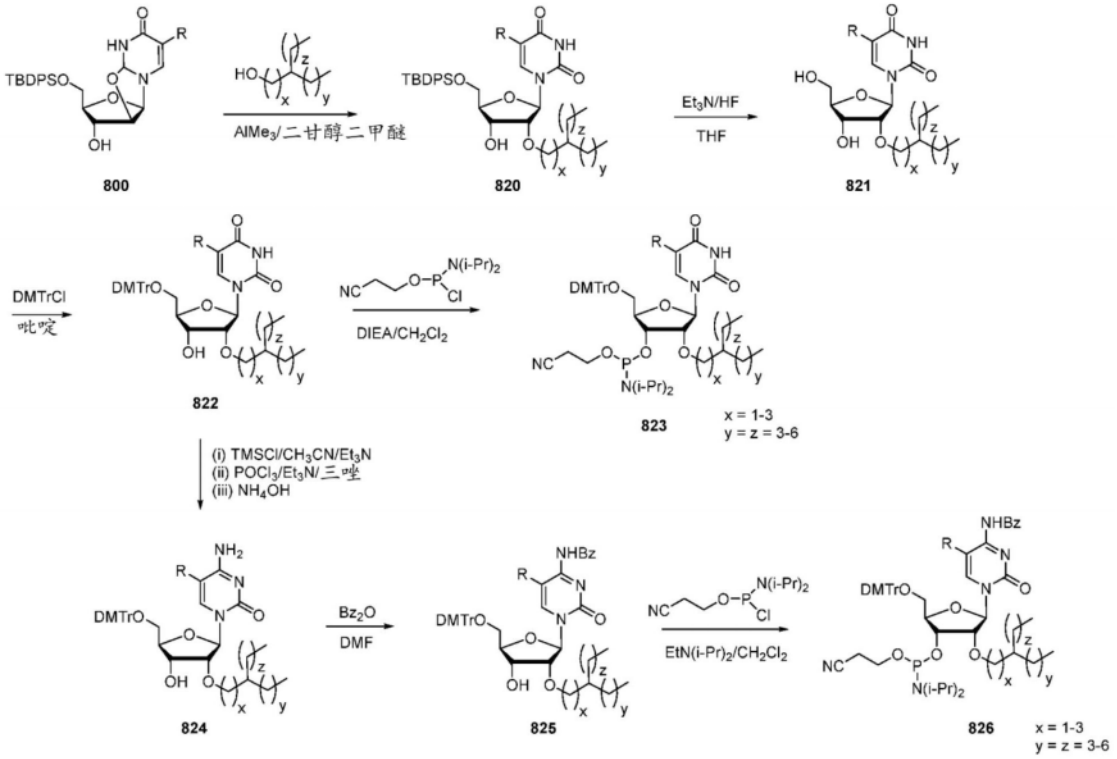
[1067] 化合物835:在氩气下向200mL圆底烧瓶中添加无水EtOAc(80mL)中的化合物832(4.98g,5.72mmol)并在冰浴中冷却。然后添加N,N-二异丙基氨基氰基乙基膦酰胺酸氯(1.49g,6.29mmol),随后添加DIPEA(2.22g,17.2mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后将反应混合物用盐水淬灭,用EtOAc萃取。将有机层分离,经无水Na_2SO_4干燥并浓缩至粗油状物。经硅胶快速色谱法(己烷中的0%至60%EtOAc),以给出化合物835(2.22g,2.07mmol,36.25%)。^{1}H NMR(500MHz,乙腈-d_3)δ8.65(t,J=6.2Hz,1H),8.49(s,1H),7.53-7.44(m,2H),7.44-7.33(m,4H),7.33-7.26(m,2H),7.20(td,J=7.1,1.3Hz,1H),6.91-6.81(m,4H),6.49(t,J=6.0Hz,1H),5.91(d,J=4.5Hz,1H),4.28-4.14(m,2H),3.98(t,J=4.7Hz,1H),3.88-3.77(m,1H),3.75(s,6H),3.63-3.49(m,2H),3.45(s,3H),3.40-3.21(m,4H),3.12(qd,J=6.4,3.7Hz,2H),2.65(dt,J=6.4,5.5Hz,2H),1.62-0.96(m,36H),0.88(t,J=6.9Hz,3H)。^{31}P NMR(202MHz,乙腈-d_3)δ150.37,150.26

[1068] 化合物836:以与以上关于合成化合物836所述类似的方式获得化合物833(2.16g,48.8%)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ8.65(t,J=6.3Hz,1H),8.59(s,1H),7.54-7.44(m,2H),7.45-7.32(m,4H),7.28(dd,J=8.3,6.9Hz,2H),7.25-7.12(m,1H),6.86(dt,J=8.2,1.5Hz,4H),6.50(t,J=6.1Hz,1H),5.89(dd,J=19.7,4.4Hz,1H),4.31(dt,J=9.1,5.4Hz,1H),4.19(ddd,J=6.7,4.5,2.3Hz,1H),4.11-4.02(m,1H),3.75(d,J=1.9Hz,6H),3.72-3.47(m,4H),3.50-3.37(m,4H),3.39-3.00(m,6H),2.81-2.70(m,1H),2.45(t,J=6.0Hz,2H),1.66-1.09(m,40H),0.92-0.81(m,3H)。^{31}P NMR(202MHz,乙腈-d_3)δ150.37,150.25

[1069] 化合物837:以与以上关于合成化合物837所述类似的方式获得化合物834(1.42g,22.1%)。^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d_3)δ8.66(q,J=6.5Hz,1H),8.61-8.45(m,1H),7.59-7.14(m,10H),6.85(dt,J=8.8,2.1Hz,4H),6.50(t,J=6.1Hz,1H),5.89(dd,J=19.7,4.4Hz,1H),5.34(t,J=5.0Hz,3H),4.39-3.96(m,4H),3.75(d,J=1.9Hz,6H),3.68-3.02(m,13H),2.76(t,J=6.0Hz,1H),2.54-2.24(m,2H),1.99(dd,J=11.0,5.0Hz,4H),1.69-0.96(m,34H),0.87(t,J=6.5Hz,3H)。^{31}P NMR(162MHz,乙腈-d_3)δ150.46,150.34。

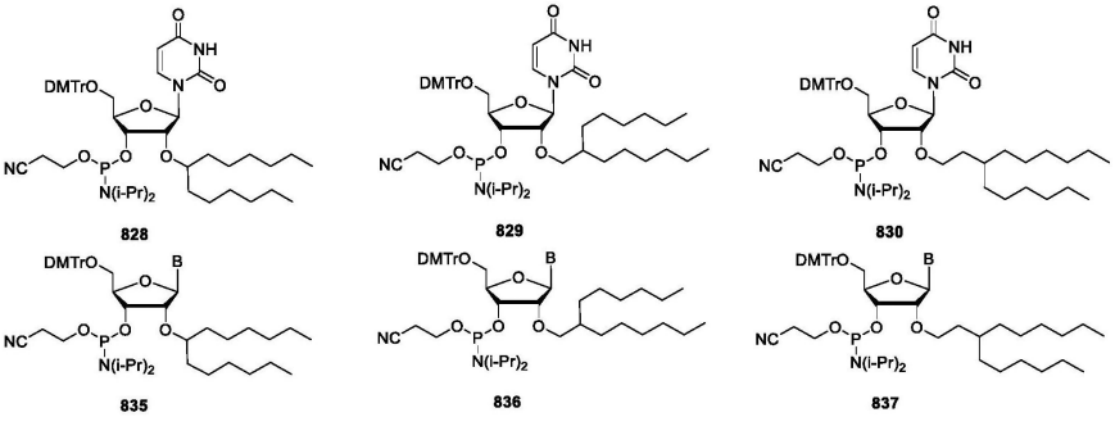
[1070] 方案66

[1071]



[1072] 如方案66中所示,可以通过任何支链烷基醇来开环受保护的脱水核苷800以给出化合物820。去除5'-位的保护基以给出化合物822。通过DMTr基团保护游离核苷822的5'-位以给出化合物823,并将3'-位的仲羟基亚磷酰化以给出化合物824。可以使用标准三唑条件将化合物825转化为胞嘧啶衍生物以给出化合物826。通过苯甲酰基保护环外氨基以给出化合物826,并且随后亚磷酰化以给出化合物827。2'位置的支链烷基核苷的一些实例包括,但不限于以下所示的那些:

[1073]



[1074] 实例6.各种基质中siRNA缀合物的代谢稳定性测定

[1075] 配体在脑脊液(CSF)中的稳定性:通过在96孔板中将50μL大鼠来源的CSF(BioIVT,目录号RAT00CSFXZN)用12.5μL siRNA(0.1mg/mL)在37℃下伴随轻轻振荡孵育24小时来评估配体的稳定性。之后,通过添加25μL含有0.0875mg蛋白酶K的蛋白酶K溶液(在4.1%吐温20、0.3%Triton X-100、24.7mM Tris-HCl,pH 8.0中)并在50℃下伴随轻轻振荡孵育1小时来消化蛋白质。然后用450μL裂解缓冲液(Phenomenex,目录号AL0-8579)稀释样品,在制备中,将该裂解缓冲液使用氢氧化铵调节至pH 5.5,以固相萃取。

[1076] 配体在脑匀浆中的稳定性:通过在96孔板中将50μL大鼠脑匀浆(BioIVT,目录号

S05966)用12.5μL siRNA(0.1mg/mL)在37℃下伴随轻轻振荡孵育24小时来评估配体的稳定性。之后,通过添加25μL含有0.0875mg蛋白酶K的蛋白酶K溶液(在4.1%吐温20、0.3% Triton X-100、24.7mM Tris-HCl,pH 8.0中)并在50℃下伴随轻轻振荡孵育1小时来消化蛋白质。然后用450μL裂解缓冲液(Phenomenex,目录号AL0-8579)稀释样品,在制备中,将该裂解缓冲液使用氢氧化铵调节至pH 5.5,以固相萃取。

[1077] 配体在玻璃体液中的稳定性:通过在96孔板中将50μL大鼠来源的(BioIVT,目录号RAB00VITHUMPZN)或食蟹猴来源的(BioIVT,目录号NHP01HUMPZN)玻璃体液用12.5μL siRNA(0.1mg/mL)在37℃下伴随轻轻振荡孵育24小时来评估配体的稳定性。之后,通过添加25μL含有0.0875mg蛋白酶K的蛋白酶K溶液(在4.1%吐温20、0.3%Triton X-100、24.7mM Tris-HCl,pH 8.0中)并在50℃下伴随轻轻振荡孵育1h来消化蛋白质。然后用450μL裂解缓冲液(Phenomenex,目录号AL0-8579)稀释样品,在制备中,将该裂解缓冲液使用氢氧化铵调节至pH 5.5,以固相萃取。

[1078] 固相萃取:然后使用Clarity OTX固相萃取板(Phenomenex,目录号8E-S103-EGA)进行固相萃取。首先通过将1mL甲醇(用正压歧管),然后1.9mL平衡缓冲液(50mM乙酸铵和2mM叠氮化钠,pH 5.5)通过板来调节板,然后将样品加载到柱上。然后将柱用1.5mL洗涤缓冲液(50%乙腈中的50mM乙酸铵,pH 5.5)洗涤5次。将样品用0.6mL洗脱缓冲液(10mM EDTA,100mM碳酸氢铵,40%乙腈和10%THF中的10mM DTT,pH 8.8)洗脱,并使用氮气流(TurboVap,65psi N_2,40℃)干燥。

[1079] 分析方法:SPE后,将样品在120μL水中重构,并使用与质谱检测结合的液相色谱法在Thermo QExactive上通过电喷雾电离(ESI)进行分析。使用保持在80℃的XBridge BEH C8 XP柱130 Å,2.5μm,2.1×30mm(Waters,目录号176002554)注射(30μL)并分离样品。流动相A为16mM三乙胺和200mM六氟异丙醇,并且流动相B为甲醇,并使用以1mL/min 6.2分钟内的0%-65%流动相B的梯度。ESI源以负离子模式,全扫描,使用喷雾电压=2800V,保护气体流速=65单位,辅助气体流速=20单位,吹扫气体流速=4单位,毛细管温度=300℃(并且辅助气体加热到300℃)操作。Promass软件用于解卷积信号。

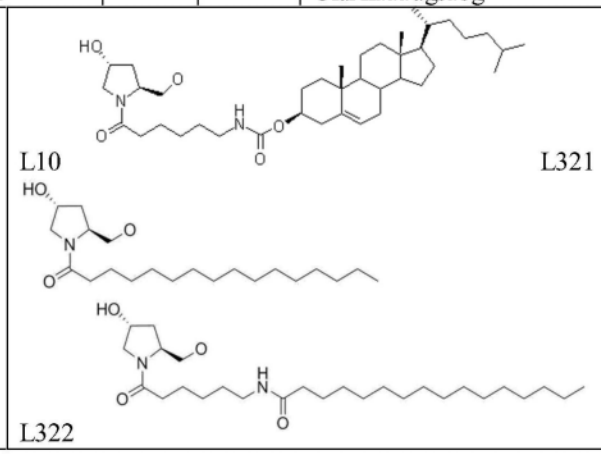
[1080] siRNA缀合物在CSF中的稳定性研究

[1081] 表2.用于稳定性研究的siRNA缀合物

[1082]

双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-224937	A-444399	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacuc uaaaL10	42	7506.36	7502.51
	A-268862	反义	SOD1	usUfsuagAfgUfGfaggaUfu Afaaaugsasg	43	7775.15	7771.17

[1083]

AD-454834	A-809914	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuaaasL10	44	7522.43	7518.49
	A-268862	反义	SOD1	usUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	43	7775.15	7771.17
AD-953560	A-1700504	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuaasasL322	45	7364.25	7360.36
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-953561	A-1700503	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuaasasL321	46	7251.10	7247.28
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
	 L10 L321 L322						

[1084] 斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯。

[1085] 图2显示在将siRNA双链体用大鼠CSF孵育24小时后,与各种亲脂性单体缀合的siRNA(列于上表2)在大鼠CSF中的稳定性。

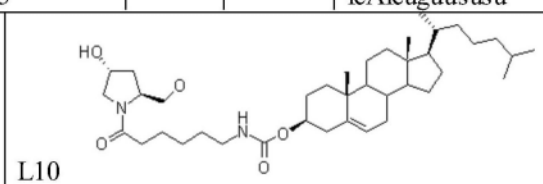
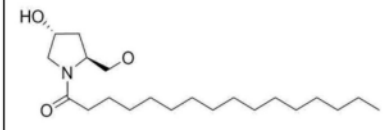
[1086] siRNA缀合物在玻璃体液中的稳定性研究

[1087] 表3.用于稳定性研究的siRNA缀合物

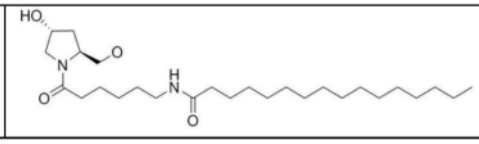
[1088]

双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子

[1089]

							量
AD-70500	A-140611	有义	h/c TTR	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL10	47	7704.51	7700.58
	A-131902	反义	h/c TTR	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	48	7633.01	7628.1
AD-224937	A-444399	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuaaaL10	42	7506.36	7502.51
	A-268862	反义	SOD1	usUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	43	7775.15	7771.17
AD-290674	A-515644	有义	h/c TTR	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL57	49	7558.33	7554.50
	A-131902	反义	h/c TTR	VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	48	7633.01	7628.10
AD-954308	A-1700512	有义	mTTR	asascaguGfuUfCfUfugcucuauasasL321	50	7347.15	7343.29
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954311	A-1700513	有义	mTTR	asascaguGfuUfCfUfugcucuauasasL322	51	7460.30	7456.37
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
	 L10				 L57		
					L321		
					L322		

[1090]

[1091] 斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯。

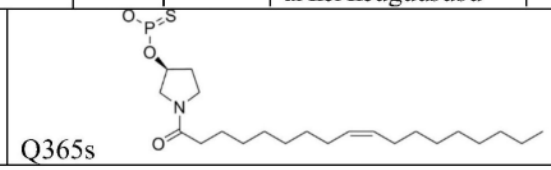
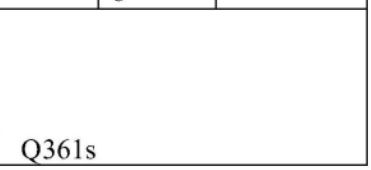
[1092] 图3显示与各种亲脂性单体缀合的siRNA(列于上表3)分别在兔和食蟹猴(NHP)的玻璃体液中24小时的稳定性。图中绘制了配体缀合的siRNA双链体的剩余量。

[1093] 表4.用于兔和NHP玻璃体液中的稳定性研究的siRNA缀合物

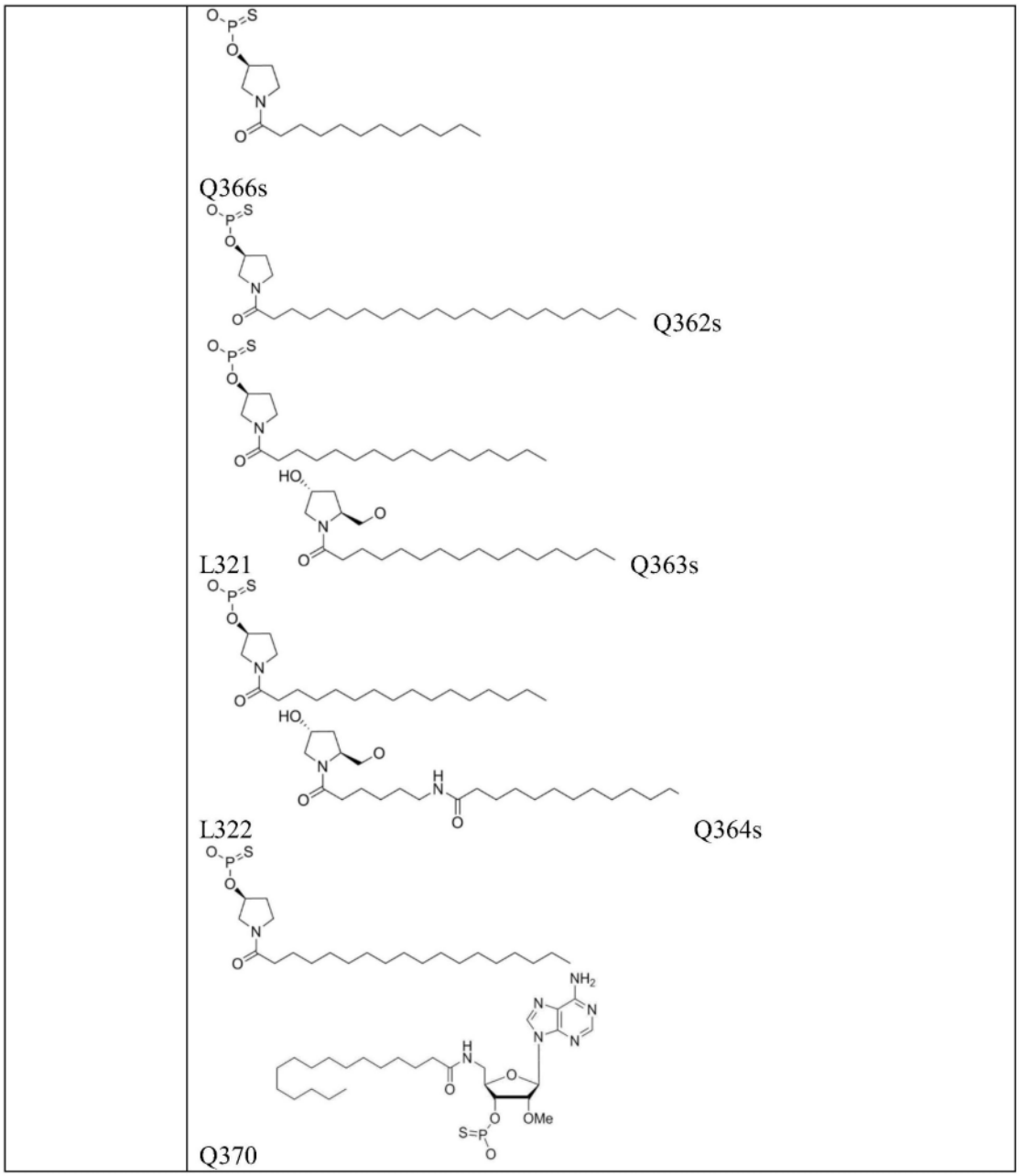
[1094]

双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-224937	A-444399	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuaaaL10	42	7506.36	7502.51
	A-268862	反义	SOD1	usUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	43	7775.15	7771.17
AD-953560	A-1700504	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuaasasL322	45	7364.25	7360.36
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-954303	A-1700507	有义	mTTR	Q362sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	52	7289.07	7285.24
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954304	A-1700508	有义	mTTR	Q363sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	53	7317.12	7313.28
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19

[1095]

AD-954305	A-1700510	有义	mTTR	Q365sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	54	7343.16	7339.29
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954306	A-1700506	有义	mTTR	Q361sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	55	7261.01	7257.21
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954307	A-1700509	有义	mTTR	Q364sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	56	7345.18	7341.31
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954308	A-1700512	有义	mTTR	asascaguGfuUfCfUfugcucuauasasL321	50	7347.15	7343.29
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954309	A-1700511	有义	mTTR	Q366sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	57	7401.28	7397.37
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954310	A-1700514	有义	mTTR	Q370sascaguGfuUfCfUfugcucuausasa	58	7167.05	7163.27
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
	 Q365s				 Q361s		

[1096]



[1097] 斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯。

[1098] 图4显示与各种亲脂性单体缀合的siRNA(列于上表4)在兔和食蟹猴(NHP)玻璃体液中24小时的稳定性。图中绘制了配体缀合的siRNA双链体的剩余量。

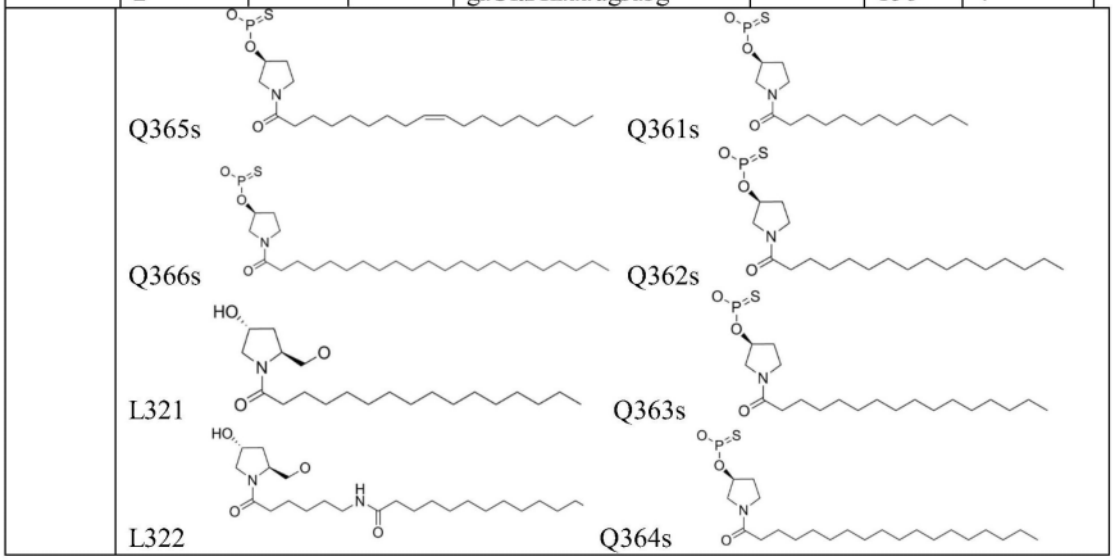
[1099] 表5.用于大鼠脑匀浆中的代谢稳定性研究的siRNA缀合物

[1100]

双链体 Id	寡核苷酸 Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-953557	A-1700497	有义	SOD1	Q361scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	59	7164.964	7161.211
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-953559	A-1700498	有义	SOD1	Q362scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	60	7193.024	7189.242
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-953556	A-1700499	有义	SOD1	Q363scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	61	7221.074	7217.274
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-953558	A-1700500	有义	SOD1	Q364scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	62	7249.134	7245.305
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-953554	A-1700501	有义	SOD1	Q365scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	63	7247.114	7243.289
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-953555	A-1700502	有义	SOD1	Q366scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	64	7305.234	7301.368
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-953561	A-1700503	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuaasasL321	46	7251.109	7247.284
	A-44440	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfag	41	7851.	7847.15

	2			gaUfuAfaaaugsasg		156	4
AD-953560	A-1700504	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuaasasL322	45	7364.259	7360.368
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154

[1101]



[1102] 斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯。

[1103] 图5A和5B分别显示与各种亲脂性单体缀合的siRNA(列于上表5)在大鼠脑匀浆中4小时和24小时的稳定性。图5A中绘制了配体缀合的siRNA双链体的剩余量。图5B显示PS键的稳定性。

[1104] 表6.用于玻璃体液中的稳定性研究的与酯酶可裂解缀合物缀合的siRNA

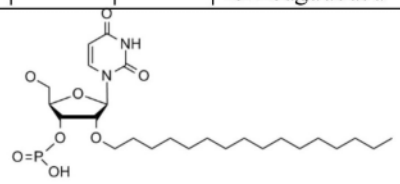
[1105]

双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-307571	A-594427	有义	TTR	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	65	7140.02	7136.26
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19

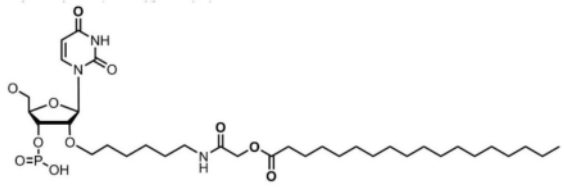
AD-890095	A-1543023	有义	TTR	asascagY132GfuUfCfUfugcucuausasa	66	7325.25	7321.36
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-890096	A-1543024	有义	TTR	asascagY133GfuUfCfUfugcucuausasa	67	7353.30	7349.39
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-890097	A-1543025	有义	TTR	asascagY134GfuUfCfUfugcucuausasa	68	7311.22	7307.35
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-890094	A-1543026	有义	TTR	asascagY135GfuUfCfUfugcucuausasa	69	7339.28	7335.38
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19

[1106]

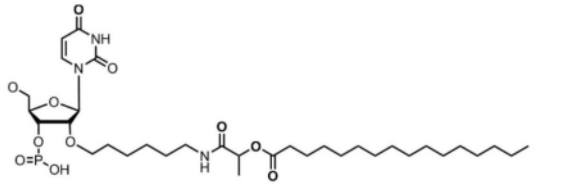
(Uhd)



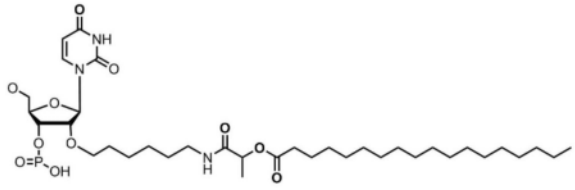
Y135



Y132

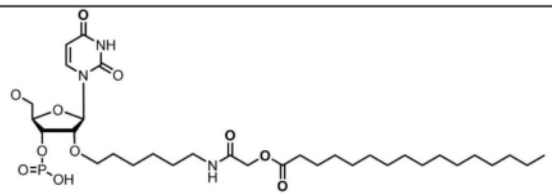


Y133



[1107]

Y134



[1108] 斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯。

[1109] 图6显示具有酯酶可裂解缀合物的siRNA缀合物(列于上表6)在兔和食蟹猴(NHP)玻璃体液中24小时的稳定性。图中绘制了水解的配体缀合的siRNA双链体的百分比。

[1110] 表7.用于血浆、CSF和脑匀浆中的稳定性研究的与酯酶可裂解缀合物缀合的siRNA

[1111]

双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-401824	A-637448	有义	SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	70	7043.97	7040.25
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900813	A-1543019	有义	SOD1	csasuuuY132AfaUfCfCfucacucuasasa	71	7229.20	7225.36
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900810	A-1543020	有义	SOD1	csasuuuY133AfaUfCfCfucacucuasasa	72	7257.26	7253.39
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugs	41	7851.15	7847.15

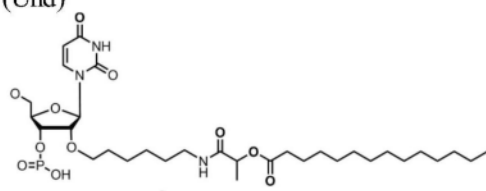
[1112]

				asg			
AD-900811	A-1543021	有义	SOD1	csasuuuY134AfaUfCfCfucacucuasasa	73	7215.18	7211.34
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900812	A-1543022	有义	SOD1	csasuuuY135AfaUfCfCfucacucuasasa	74	7243.23	7239.37
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-1399901	A-2208106	有义	SOD1	csasuuuY164AfaUfCfCfucacucuasasa	75	7229.20	7225.36
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.154
AD-1399902	A-2208107	有义	SOD1	csasuuuY165AfaUfCfCfucacucuasasa	76	7229.20	7225.36
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-1399903	A-2208108	有义	SOD1	csasuuuY166AfaUfCfCfucacucuasasa	77	7243.23	7239.37
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-1399904	A-2208109	有义	SOD1	csasuuuY167AfaUfCfCfucacucuasasa	78	7257.25	7253.39
	A-44440	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUf	41	7851.15	7847.15

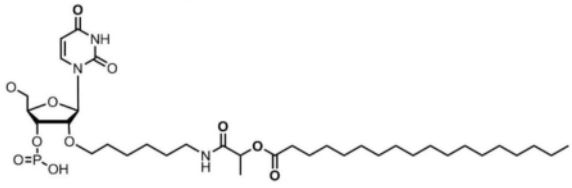
	2			GfaggaUfuAfaaaugsasg			
AD-1399905	A-2208110	有义	SOD1	csasuuuY168AfaUfCfCfucacucuasasa	79	7229.20	7225.36
	A-4444042	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15

[1113]

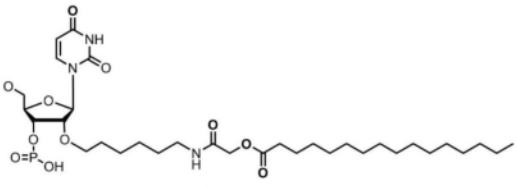
(Uhd) Y132



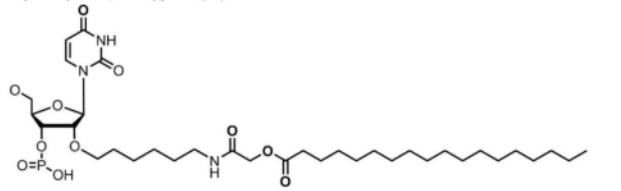
Y133



Y134

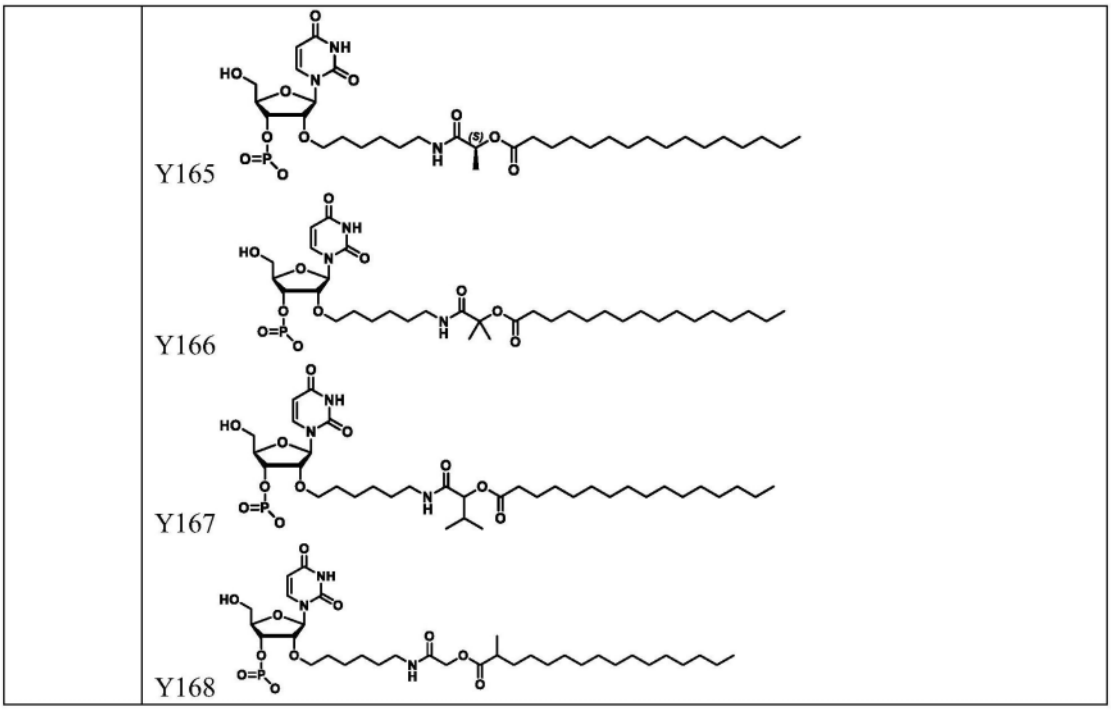


Y135



Y164

[1114]



[1115] 斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯。

[1116] 图7显示具有酯酶可裂解缀合物的siRNA缀合物(列于上表7)在大鼠血浆、CSF和脑匀浆中24小时的稳定性。绘制了水解的配体缀合的siRNA双链体的百分比。

[1117] 实例7.CNS组织中疏水性和活性的相关性

[1118] 为了评估疏水性在CNS组织中脂质缀合物的摄取和活性中的作用,在有义链或反义链中引入了许多较短的脂质(表8),而不是单个较长的脂质链。基于通过EMSA测定的疏水性测量确定,具有引入的许多较短脂质链的siRNA缀合物可以获得与具有单个长链的siRNA缀合物相似的疏水性。通过如下文给出的EMSA测定测量siRNA缀合物的蛋白质结合特性。

[1119] 用于Kd测定的EMSA测定方案:将Bio Rad 10%标准TBE聚丙烯酰胺凝胶在标准凝胶电泳槽中在1X TBE中以100V预运行20分钟进行平衡。在预运行前后,用20μL 1X TBE电泳缓冲液(Bio Rad)冲洗每个样品孔。一式两份地制备两个凝胶/siRNA双链体的样品(共一式四份)。将1X PBS中10μM储备浓度的双链体稀释至0.5μM的最终浓度(20μL总体积),其中含有1X PBS和增加浓度的非变性人类血清白蛋白(HSA)溶液(卡比化学公司(Calbiochem))。人类血清白蛋白浓度范围为从0μM至1000μM(增量为100,最大1mM)和0μM至2000μM(增量不同,最大2mM)。将样品混合,在3000RPM下离心30秒,并且随后在室温下孵育10分钟。

[1120] 一旦孵育完成,将4μL 6x EMSA凝胶加载溶液(生命技术公司(LifeTechnologies))添加至每个样品中,在3000RPM下离心30秒,并且将12μL各样品加载于凝胶上。首先将凝胶电泳在50V下运行约20分钟,以使整个样品完全加载至凝胶上。然后将凝胶电泳在100V下运行1小时。在电泳完成时,将凝胶从外壳中移出并置于50mL 1X TBE中。为了染色,将5μL SYBR Gold(生命技术公司)添加到容器中,并将凝胶在室温下在平台摇床上孵育10分钟。将凝胶用50mL 1X TBE冲洗并置于额外的50mL缓冲液中。

[1121] Bio Rad ChemiDoc MP成像系统用于使用以下参数对凝胶进行成像:成像应用设置为SYBR Gold,尺寸设置为Bio-Rad标准凝胶,曝光设置为自动用于强烈的条带,高光饱和

像素转为1并且颜色设置为灰色。检测、分子量分析及输出均被禁用。一旦获得干净的凝胶照片,使用Image Lab 5.2(Bio Rad)处理图像。手动设置泳道及条带以测量条带强度。每个样品的条带强度相对于无人类血清白蛋白(对照0μM)的双链体标准化,以获得结合的siRNA相对于HSA浓度的分数。在GraphPad Prism 7上,使用非线性回归曲线拟合与希尔斜率方程的单位点特异性结合来计算结合亲和解离常数。

[1122] 通过在双链体结构中引入多个较短的脂质(而不是在siRNA缀合物中引入单个脂质链)获得了类似的体内活性。siRNA缀合物的活性取决于序列中不同较短脂质的位置。通过利用这些设计,可以限制siRNA缀合物对肝、肾和心脏的全身暴露(图21B)

[1123] 表8:用于蛋白质结合测定的siRNA缀合物的Kd和双链体信息

[1124]

双链体 ID	修饰的位置	修饰总数	K_D 值（μM）
AD-1321422	S6、16、17	C6 × 3	1176 ± 446
AD-1321423	S6、16、21	C6 × 3	745.5 ± 156.9
AD-1321424	S1、6、16	C6 × 3	882 ± 97.7
AD-1321425	S1、6、16、21	C6 × 4	372.1 ± 47.1
AD-1321426	S1、6、15、16、21	C3 × 5	1766 ± 1224
AD-1321427	S6、17	C6 × 2	≥ 2 mM HSA
AD-1321428	S6、16	C6 × 2	≥ 2 mM HSA
AD-1321429	S1、6、16、17、21	C6 × 5	189.5 ± 24.4
AD-1321430	S6、16、17	C6 × 2 + C3 × 1	1312 ± 49.4
AD-1321431	S6、17; AS16	C6 × 3	1284 ± 46.7
AD-1321432	S6、16; AS16	C6 × 3	1313 ± 70.9
AD-1321433	S6、16、17; AS16	C6 × 3 + C3 × 1	≥ 2 mM HSA
AD-401824	S6	C16	176.4 ± 17

[1125]

[1126] siRNA缀合物的疏水性对siRNA在不同CNS组织中的活性和分布至关重要,并且在鞘内施用后siRNA缀合物的全身暴露中也起主要作用。通过检查多种缀合物的蛋白质结合特性,发现(参见表8-9和图8-9)具有烷基链(有暴露羧基)的缀合物在CNS组织中具有活性,但在心脏中的活性较低。

[1127] 表9:用于蛋白质结合测定的缀合物的Kd和双链体信息

[1128]

系列	双链体编号	n	K_D 值（μM HSA）
烷基链	AD-401824	16	176.4 ± 17
具有羧酸酯的烷基链	AD-1025226	16	无结合（≥ 1 mM HSA）
	AD-1025223	16	无结合（≥ 1 mM HSA）

[1129] 实例8.使用亲脂性缀合siRNA的小鼠眼中的mRNA敲低

[1130] 在玻璃体内施用单剂量7.5μg或1μg的siRNA双链体后,通过qPCR,用表10中列出的siRNA缀合物在小鼠眼中研究TTR基因沉默,其中在第14天处死小鼠,并将结果与PBS对照进行比较。结果示于图10-11中。

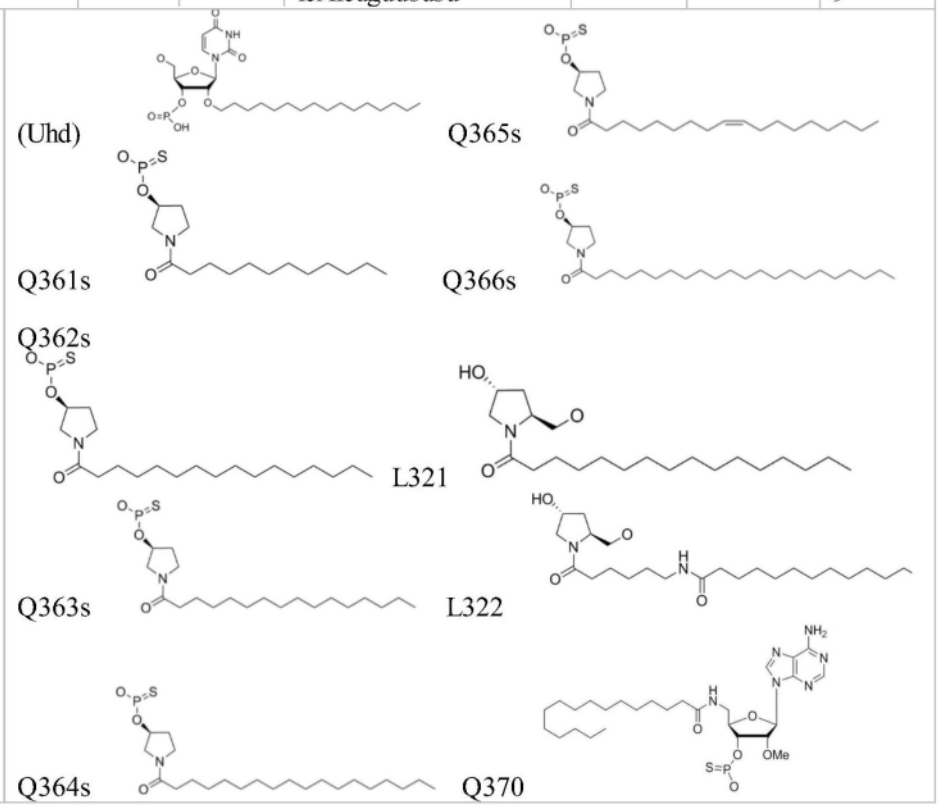
[1131] 表10.用于体内眼部研究的5’-3’亲脂性siRNA缀合物

[1132]

双链体ID	寡核苷酸ID	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-307571	A-594427	有义	TTR	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	65	7140.02	7136.26
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954306	A-170005 06	有义	mTTR	Q361sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	55	7261.01	7257.21
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954303	A-170005 07	有义	mTTR	Q362sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	52	7289.07	7285.24
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954304	A-170005 08	有义	mTTR	Q363sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	53	7317.12	7313.28
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954307	A-170005 09	有义	mTTR	Q364sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	56	7345.18	7341.31
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954305	A-170005 10	有义	mTTR	Q365sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	54	7343.16	7339.29
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-95	A-17005	有义	mTTR	Q366sasacaguGfuUfCfU	57	7401.28	7397.3

[1133]

4309	11			fUfugcucuausasa			7
	A-55571 5	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaA fcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954308	A-17005 12	有义	mTTR	asascaguGfuUfCfUfug cucuauasasL321	50	7347.15	7343.29
	A-55571 5	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaA fcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954311	A-17005 13	有义	mTTR	asascaguGfuUfCfUfug cucuauasasL322	51	7460.30	7456.37
	A-55571 5	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaA fcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-954310	A-17005 14	有义	mTTR	Q370sascaguGfuUfCf Ufugcucuausasa	58	7167.05	7163.27
	A-55571 5	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaA fcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19



[1134] *斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯;Nhd表示2'-O-十六烷基。

[1135] 还在玻璃体内施用单剂量7.5μg的siRNA双链体后,通过qPCR,用表11中列出的

siRNA缀合物在小鼠眼中研究TTR基因沉默,其中在第14天处死小鼠,并将结果与PBS对照进行比较。结果示于图12中。将以下列出的siRNA双链体与酯酶可裂解的缀合物缀合。

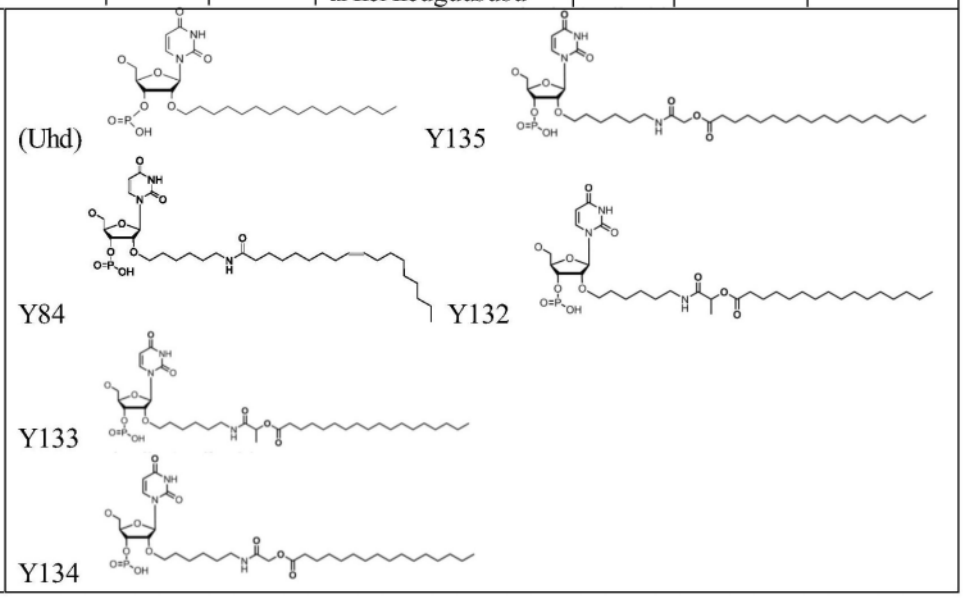
[1136] 表11.TTR序列的酯酶可裂解亲脂性siRNA缀合物

[1137]

双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-307571	A-594427	有义	TTR	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	65	7140.02	7136.26
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-418424	A-637431	有义	TTR	asascagY84GfuUfCfUfugcucuausasa	80	7279.23	7275.36
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-890095	A-1543023	有义	TTR	asascagY132GfuUfCfUfugcucuausasa	66	7325.25	7321.36
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-890096	A-1543024	有义	TTR	asascagY133GfuUfCfUfugcucuausasa	67	7353.30	7349.39
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-89	A-15430	有义	TTR	asascagY134GfuUf	68	7311.22	7307.35

0097	25			CfUfugcucuausasa			
	A-55571 5	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaag aAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-89 0094	A-15430 26	有义	TTR	asascagY135GfuUf CfUfugcucuausasa	69	7339.28	7335.38
	A-55571 5	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaag aAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19

[1138]



[1139] *斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯;Nhd表示2'-O-十六烷基。

[1140] 还在玻璃体内施用单剂量1μg的siRNA双链体后,通过qPCR,用表12中列出的siRNA缀合物在大鼠眼中研究TTR基因沉默,其中在第14天处死大鼠,并将结果与PBS对照进行比较。结果示于图13中。

[1141] 表12.用于大鼠体内研究的亲脂性siRNA缀合物(5'、3'、内部和末端羧酸)

[1142]

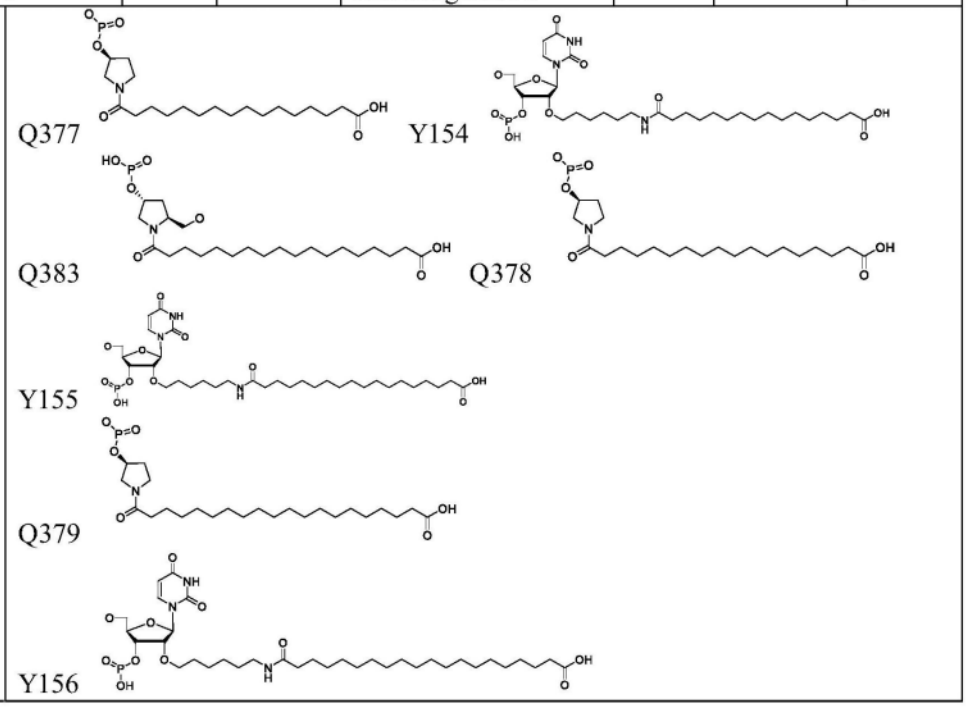
双链体 Id	寡核苷酸 Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量

[1143]

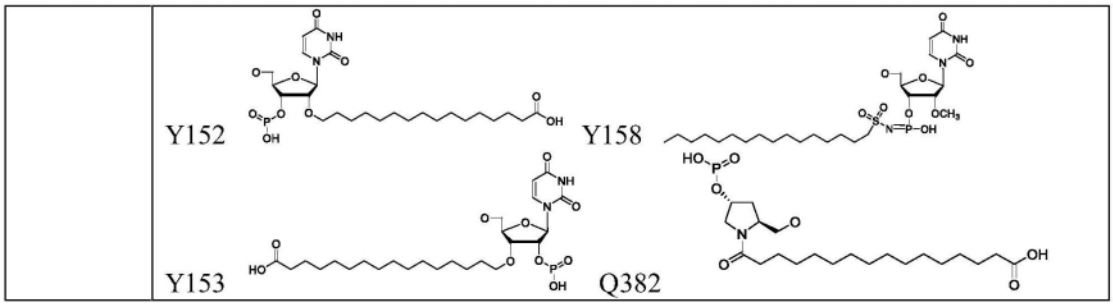
AD-1023144	A-1812977	有义	m/rTTR	Q377sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	81	7347.09	7343.255
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-1023148	A-1812978	有义	m/rTTR	Q378sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	82	7375.15	7371.28
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-1033231	A-1812979	有义	m/rTTR	Q379sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	83	7403.20	7399.31
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-1023147	A-1812980	有义	m/rTTR	asascagY152GfuUfCfUfugcucuausasa	84	7170.01	7166.23
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-1023145	A-1812981	有义	m/rTTR	asascagY153GfuUfCfUfugcucuausasa	85	7170.01	7166.23
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-1023146	A-1812982	有义	m/rTTR	asascagY154GfuUfCfUfugcucuausasa	86	7283.17	7279.32
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-1023149	A-1812983	有义	m/rTTR	asascagY155GfuUfCfUfugcucuausasa	87	7311.22	7307.35
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-103	A-18129	有义	m/rTTR	asascagY156GfuUfC	88	7339.28	7335.3

[1144]

3232	84			fUfugcucuausasa			8
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-1033233	A-1840408	有义	m/rTTR	asascagY158GfuUfCfUfugcucuausasa	38	7217.13	7213.25
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-1033234	A-1866827	有义	mTTR	asascagQ382GfuUfCfUfugcucuausasa	89	7056.94	7053.22
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19
AD-1033235	A-1866828	有义	mTTR	asascagQ383GfuUfCfUfugcucuausasa	90	7084.99	7081.25
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.98	7696.19



[1145]



[1146] *斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯;Nhd表示2'-O-十六烷基。

[1147] 还在玻璃体内施用单剂量7.5μg的siRNA双链体后,通过qPCR,用表13中列出的siRNA缀合物在小鼠眼中研究TTR基因沉默,其中在第14天处死小鼠,并将结果与PBS对照进行比较。结果示于图14中。将以下列出的siRNA双链体与多个较短的脂质分子缀合。

[1148] 表13.具有沿TTR序列的有义链和反义链分布的多个较短脂质的亲脂性siRNA缀合物

[1149]

双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-579804	A-594427	有义	TTR	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	65	7140.02	7136.26
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.11	7728.14
AD-1334071	A-2219775	有义	TTR	(Ahs)ascag(Uh)GfuUfCfUfugcuc(Uh)ausas(Ah)	92	7210.16	7206.34
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.11	7728.14
AD-1334072	A-2219776	有义	TTR	asascag(Uh)uGfuUfCfUfugcu(Ch)(Uh)ausas(Ah)	93	7530.35	7526.38

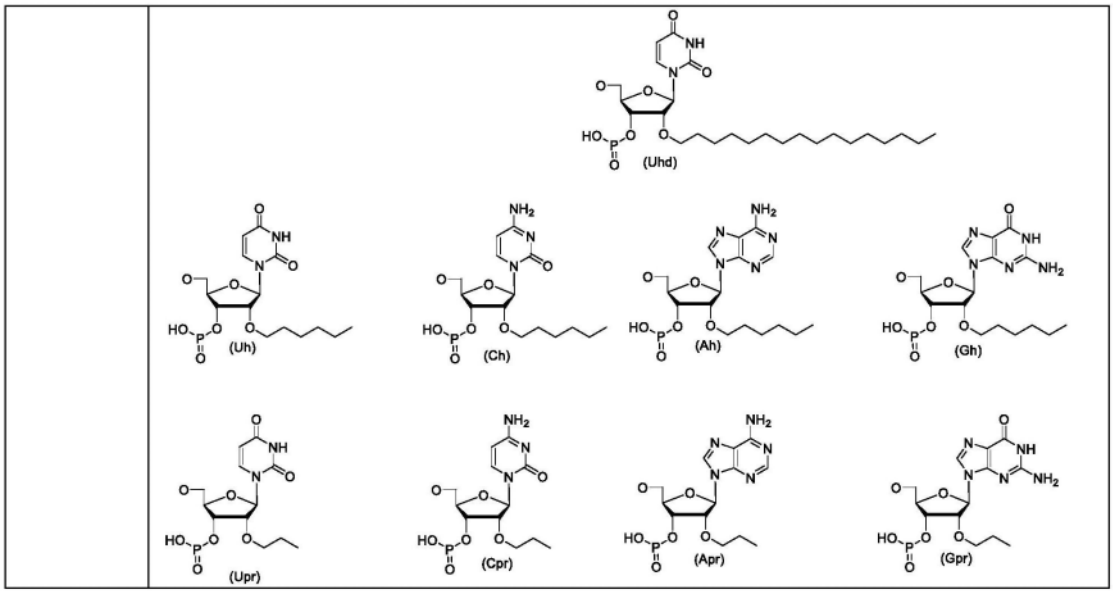
[1150]

	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.11	7728.14
AD-1334073	A-2219777	有义	TTR	asascag(Uh)(Gh)uUfCfUfug(Ch)(Uh)cuausasa	94	7222.19	7218.36
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.11	7728.14
AD-1334074	A-2219778	有义	TTR	asascag(Uh)GfuUfCfUfug(Ch)(Uh)cuausasa	95	7140.02	7136.26
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.11	7728.14
AD-1334083	A-2219778	有义	TTR	asascag(Uh)GfuUfCfUfug(Ch)(Uh)cuausasa	95	7140.02	7136.26
	A-2219785	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfc(Ah)cuguususu	96	7782.15	7778.29
AD-1334084	A-2219778	有义	TTR	asascag(Uh)GfuUfCfUfug(Ch)(Uh)cuausasa	95	7140.02	7136.26
	A-2219786	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfc(Apr)cuguususu	97	7740.07	7736.24
AD-1334075	A-2219779	有义	TTR	asascag(Uh)GfuUfCfUfugcu(Ch)uausasa	98	7069.88	7066.18
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.11	7728.14
AD-1334081	A-2219779	有义	TTR	asascag(Uh)GfuUfCfUfugcu(Ch)uausasa	98	7069.88	7066.18
	A-2219785	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfc(Ah)cuguususu	96	7782.15	7778.29
AD-1334082	A-2219779	有义	TTR	asascag(Uh)GfuUfCfUfugcu(Ch)uausasa	98	7069.88	7066.18

[1151]

	A-2219786	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfc(Apr)cuguususu	97	7740.07	7736.24
AD-1334076	A-2219780	有义	TTR	(Aprs)ascag(Upr)GfuUfCfUfugcu(Cpr)(Upr)ausasa	99	7041.83	7038.15
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.11	7728.14
AD-1334077	A-2219781	有义	TTR	(Aprs)ascag(Upr)GfuUfCfUfugcuc(Upr)ausas(Apr)	100	7041.84	7038.15
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.11	7728.14
AD-1334078	A-2219782	有义	TTR	(Aprs)ascag(Upr)GfuUfCfUfugcuc(Upr)ausasa	101	7013.78	7010.12
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.11	7728.14
AD-1334079	A-2219783	有义	TTR	(Aprs)ascag(Uh)GfuUfCfUfugcu(Cpr)(Upr)ausasa	102	7083.91	7080.20
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.11	7728.14
AD-1334080	A-2219784	有义	TTR	(Aprs)ascag(Uh)GfuUfCfUfugcu(Ch)uausasa	103	7097.94	7094.22
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.11	7728.14
	符号						

[1152]



[1153] 还在玻璃体内施用单剂量1μg的siRNA双链体后,通过qPCR,用表14中列出的siRNA缀合物在大鼠眼中研究TTR基因沉默,其中在第14天处死大鼠,并将结果与PBS对照进行比较。结果示于图15中。将以下列出的siRNA双链体与酯酶可裂解的缀合物缀合。

[1154] 表14:用于大鼠体内评估的亲脂性siRNA缀合物(无碱基位移(abasic walk))

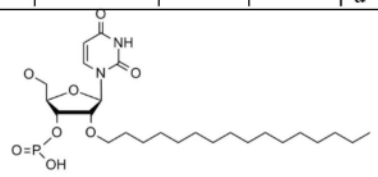
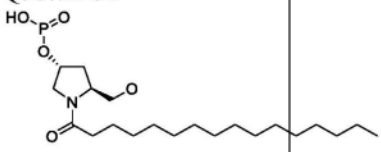
[1155]

双链体 Id	寡核苷酸 Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-307571	A-594427	有义	TTR	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	65	7140.023	7136.262
	A-555715	反义	TTR	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	39	7699.985	7696.194
AD-900960	A-1700680	有义	TTR	asascaQ367uGfuUfCfUfugcucuausasa	104	6987.924	6984.228
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149

[1156]

AD-900961	A-1700681	有义	TTR	asascagQ367GfuUfCfUfugcucuausasa	105	7026.963	7023.25
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900962	A-1700682	有义	TTR	asascaguQ367uUfCfUfugcucuausasa	106	6999.96	6996.248
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900963	A-1700683	有义	TTR	asascaguGfQ367UfCfUfugcucuausasa	107	7026.963	7023.25
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900965	A-1700685	有义	TTR	asascaguGfuUfQ367Ufugcucuausasa	108	7039.984	7036.254
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900969	A-1700689	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfugQ367ucuausasa	109	7027.948	7024.234
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900970	A-1700690	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfugcQ367cuausasa	110	7026.963	7023.25
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguusus	91	7732.116	7728.149

[1157]

				u			
AD-900971	A-1700691	有义	TTR	asascaguGfuUfC fUfugcuQ367uausasa	111	7027.948	7024.234
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900972	A-1700692	有义	TTR	asascaguGfuUfC fUfugcucQ367ausasa	112	7026.963	7023.25
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
(Uhd) 					Q367/L231 		

[1158] 实例9.无碱基亲脂性修饰(Q367)在siRNA序列中的位置影响

[1159] 使用经Q367配体修饰的siRNA缀合物在原代小鼠肝细胞中评估了与对照双链体AD-900954相比,亲脂性修饰在有义链的整个siRNA序列中的位置影响(如表15所示)。将细胞用0.1、1和10nM浓度的各siRNA缀合物孵育以进行自由摄取(无转染剂),并在24小时后测量TTR mRNA。将值绘制为未处理对照细胞的分数。结果示于图16中。

[1160] 表15.TTR序列的有义链中的无碱基亲脂性配体位移

[1161]

双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-900954	A-331806	有义	TTR	asascaguGfuUfC fUfugcucuausasa	113	6929.626	6926.027

[1162]

	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-579804	A-594427	有义	TTR	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	65	7140.023	7136.262
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900955	A-1700675	有义	TTR	Q367sasacaguGfuUfCfUfugcucuausasa	114	7347.151	7343.291
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900956	A-1700676	有义	TTR	Q367sascaguGfuUfCfUfugcucuausasa	115	7003.918	7000.223
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900957	A-1700677	有义	TTR	asQ367scaguGfuUfCfUfugcucuausasa	116	7003.918	7000.223
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900958	A-1700678	有义	TTR	asasQ367aguGfuUfCfUfugcucuausasa	117	7027.948	7024.234
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-90	A-1700	有义	TTR	asascQ367guGfuUf	118	7003.923	7000.2

[1163]

0959	679			CfUfugcucuausasa			23
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900960	A-1700680	有义	TTR	asascaQ367uGfuUfCfUfugcucuausasa	104	6987.924	6984.228
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900961	A-1700681	有义	TTR	asascagQ367GfuUfCfUfugcucuausasa	105	7026.963	7023.25
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900962	A-1700682	有义	TTR	asascaguQ367uUfCfUfugcucuausasa	106	6999.96	6996.248
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900963	A-1700683	有义	TTR	asascaguGfQ367UfCfUfugcucuausasa	107	7026.963	7023.25
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900964	A-1700684	有义	TTR	asascaguGfuQ367CfUfugcucuausasa	119	7038.999	7035.27
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149

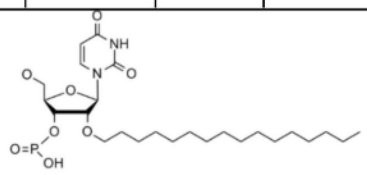
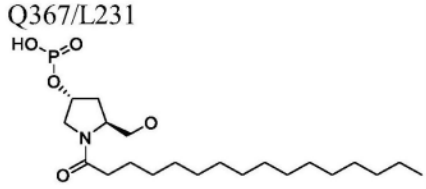
[1164]

AD-900965	A-1700685	有义	TTR	asascaguGfuUfQ367Ufugcucuausasa	108	7039.984	7036.254
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900966	A-1700686	有义	TTR	asascaguGfuUfCfQ367ugcucuausasa	120	7038.999	7035.27
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900967	A-1700687	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfQ367gcucuausasa	121	7026.963	7023.25
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900968	A-1700688	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfuQ367cucuausasa	122	6987.924	6984.228
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900969	A-1700689	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfugQ367ucuausasa	109	7027.948	7024.234
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900970	A-1700690	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfugcQ367cuausasa	110	7026.963	7023.25
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguusus	91	7732.116	7728.149

[1165]

				u			
AD-900971	A-1700691	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfugcuQ367uausasa	111	7027.948	7024.234
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900972	A-1700692	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfugcucQ367ausasa	112	7026.963	7023.25
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900973	A-1700693	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfugcucuQ367usasa	123	7003.923	7000.223
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900974	A-1700694	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfugcucuaQ367sasa	124	7026.958	7023.25
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900975	A-1700695	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfugcucuausQ367sa	125	7003.918	7000.223
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
AD-900976	A-1700696	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfugcucuausasQ367	126	7003.923	7000.223
	A-5557	反义	TTR	VPusUfsauaGfagca	91	7732.116	7728.1

[1166]

	13			agaAfcAfcuguususu			49
AD-900977	A-1700697	有义	TTR	asascaguGfuUfCfUfugcucuauasasL231	127	8109.006	8104.708
	A-555713	反义	TTR	VPusUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	91	7732.116	7728.149
(Uhd) 					Q367/L231 		

[1167] *斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯;Nhd表示2'-O-十六烷基。

[1168] 还使用经Q367配体修饰的siRNA缀合物在原代小鼠肝细胞中评估了与对照双链体AD-463791相比,亲脂性修饰在有义链的整个SOD1 siRNA序列中的位置影响(如表16所示)。将细胞用0.1、1和10nM浓度的各siRNA缀合物孵育以进行自由摄取(无转染剂),并在24小时后测量SOD1 mRNA。将值绘制为未处理对照细胞的分数。结果示于图17中。

[1169] 表16.SOD1序列的有义链中的无碱基亲脂性配体位移

[1170]

双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-401824	A-637448	有义	SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	70	7043.97	7040.25
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15

[1171]

AD-463791	A-899929	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	128	6833.57	6830.02
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900978	A-1700698	有义	SOD1	Q367scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	129	7251.10	7247.28
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900979	A-1700699	有义	SOD1	Q367sasuuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	130	6931.89	6928.22
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900980	A-1700700	有义	SOD1	csQ367suuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	131	6907.87	6904.21
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900981	A-1700701	有义	SOD1	csasQ367uuuAfaUfCfCfucacucuasasa	132	6930.91	6927.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900982	A-1700702	有义	SOD1	csasuQ367uuAfaUfCfCfucacucuasasa	133	6930.91	6927.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900983	A-1700703	有义	SOD1	csasuuQ367uAfaUfCfCfucacucuasasa	134	6930.91	6927.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900	A-17007	有义	SOD1	csasuuuQ367AfaUfC	135	6930.91	6927.24

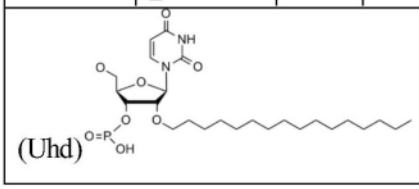
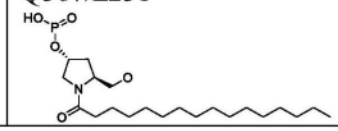
[1172]

984	04			fCfucacucuasasa			
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900985	A-1700705	有义	SOD1	csasuuuuQ367aUfCfCfucacucuasasa	136	6919.91	6916.23
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900986	A-1700706	有义	SOD1	csasuuuuAfQ367UfCfCfucacucuasasa	137	6907.87	6904.21
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900987	A-1700707	有义	SOD1	csasuuuuAfaQ367CfCfucacucuasasa	138	6942.95	6939.26
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900988	A-1700708	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfQ367CfCfucacucuasasa	139	6943.93	6940.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900989	A-1700709	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfQ367ucacucuasasa	140	6943.93	6940.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900990	A-1700710	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfQ367cacucuasasa	141	6930.91	6927.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900991	A-1700711	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfuQ367acucuasasa	142	6931.90	6928.22

[1173]

	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900992	A-1700712	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucQ367cucuasasa	143	6907.87	6904.21
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900993	A-1700713	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucaQ367ucuasasa	144	6931.90	6928.22
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900994	A-1700714	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacQ367cuasasa	145	6930.91	6927.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900995	A-1700715	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacuQ367uasasa	146	6931.90	6928.22
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900996	A-1700716	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucQ367asasa	147	6930.91	6927.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900997	A-1700717	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuQ367sasa	148	6907.87	6904.21
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900998	A-1700718	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuasQ367sa	149	6907.87	6904.21
	A-44440	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGf	41	7851.15	7847.15

[1174]

	2			aggaUfuAfaaaugsasg			
AD-900999	A-1700719	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuasasQ367	150	6907.87	6904.21
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-901000	A-1700720	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuaasasL231	151	8012.95	8008.70
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
 (Uhd)					 Q367/L231		

[1175] *斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯。

[1176] 实例10.使用亲脂性缀合siRNA的CNS中的mRNA敲低

[1177] 在鞘内施用单剂量0.9mg的siRNA双链体后,通过qPCR,用表17中列出的siRNA缀合物在大鼠脑(小脑和额叶皮质)、脊髓(胸部脊髓)和心脏中研究SOD1基因沉默,其中在第14天处死大鼠,并将结果与人工CSF给药对照进行比较。结果示于图18中。

[1178] 表17.SOD1序列的亲脂性siRNA缀合物(5'、3'和内部)

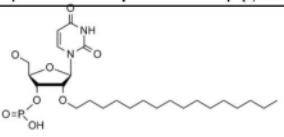
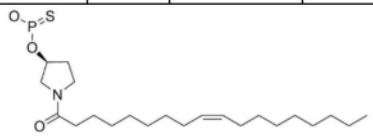
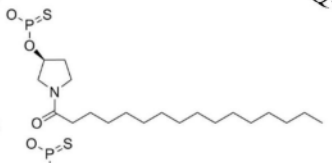
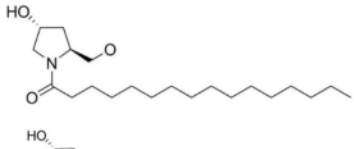
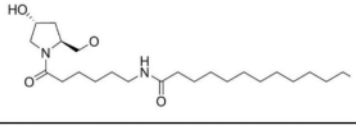
[1179]

双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-401824	A-637448	有义	SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	70	7043.97	7040.25
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15

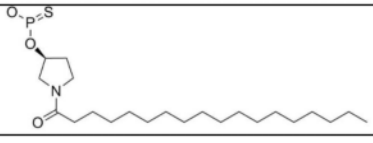
[1180]

AD-953557	A-1700497	有义	SOD1	Q361scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	59	7164.96	7161.21
	A-4444002	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-953559	A-1700498	有义	SOD1	Q362scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	60	7193.02	7189.24
	A-4444002	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-953556	A-1700499	有义	SOD1	Q363scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	61	7221.07	7217.27
	A-4444002	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-953558	A-1700500	有义	SOD1	Q364scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	62	7249.13	7245.30
	A-4444002	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-953554	A-1700501	有义	SOD1	Q365scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	63	7247.11	7243.28
	A-4444002	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaau	41	7851.15	7847.15

[1181]

				gsasg			
AD-953555	A-1700502	有义	SOD1	Q366scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	64	7305.23	7301.36
	A-4444002	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-953561	A-1700503	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuaasasL321	46	7251.10	7247.28
	A-4444002	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-953560	A-1700504	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacucuaasasL322	45	7364.25	7360.36
	A-4444002	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
	(Uhd)  Q365s  Q361s  Q366s  Q362s  L321  Q363s  L322 						

[1182]

	Q364s 

[1183] 斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-

F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯。

[1184] 还在鞘内施用单剂量0.9mg的siRNA双链体后,通过qPCR,用表18中列出的siRNA缀合物在大鼠脑(脑干、小脑和额叶皮质)、脊髓(胸部脊髓)和心脏中研究SOD1基因沉默,其中在第14天处死大鼠,并将结果与人工CSF给药对照进行比较。结果示于图19中。

[1185] 表18.用于大鼠研究的SOD1序列的亲脂性siRNA缀合物

[1186]

双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-401824	A-637448	有义	SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	70	7043.97	7040.25
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900984	A-170704	有义	SOD1	csasuuuQ367AfaUfCfCfucacucuasasa	135	6930.91	6927.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900994	A-170714	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacQ367cuasasa	145	6930.91	6927.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900995	A-170715	有义	SOD1	csasuuuuAfaUfCfCfucacuQ367uasasa	146	6931.90	6928.22
	A-44440	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGf	41	7851.15	7847.15

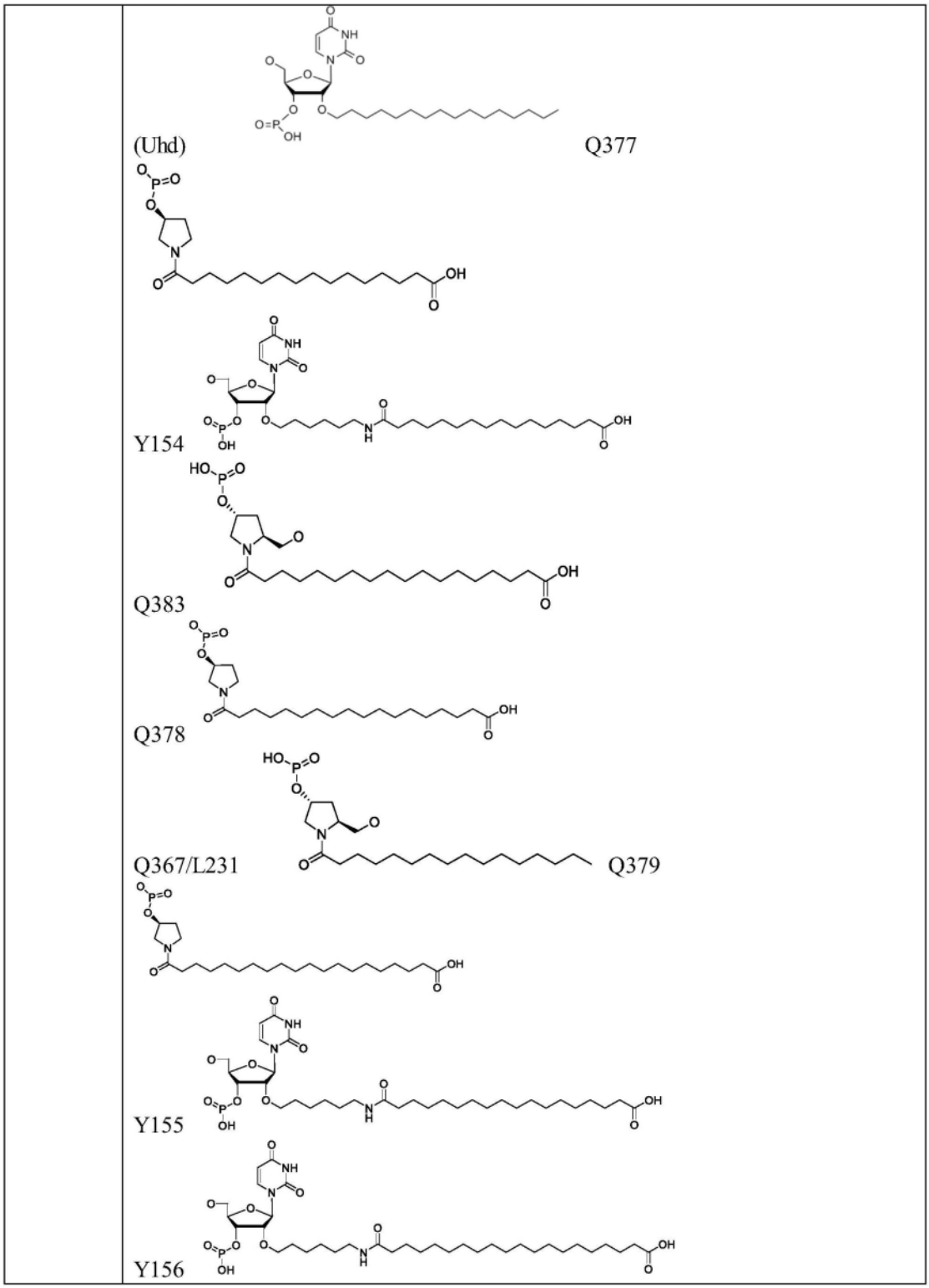
[1187]

	2			aggaUfuAfaaaugsasg			
AD-1025226	A-1866829	有义	SOD1	csasuuuY152AfaUfCfCfucacucuasasa	152	7073.96	7070.22
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-1025223	A-1866830	有义	SOD1	csasuuuY154AfaUfCfCfucacucuasasa	153	7187.12	7183.31
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-1025222	A-1866831	有义	SOD1	csasuuuY155AfaUfCfCfucacucuasasa	154	7215.17	7211.34
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-1025225	A-1866832	有义	SOD1	csasuuuY156AfaUfCfCfucacucuasasa	155	7243.23	7239.37
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-1025224	A-1866833	有义	SOD1	csasuuuQ382AfaUfCfCfucacucuasasa	156	6960.89	6957.21
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-1025228	A-1866834	有义	SOD1	csasuuuQ383AfaUfCfCfucacucuasasa	157	6988.94	6985.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-1025227	A-1866835	有义	SOD1	Q377scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	158	7251.05	7247.24
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15

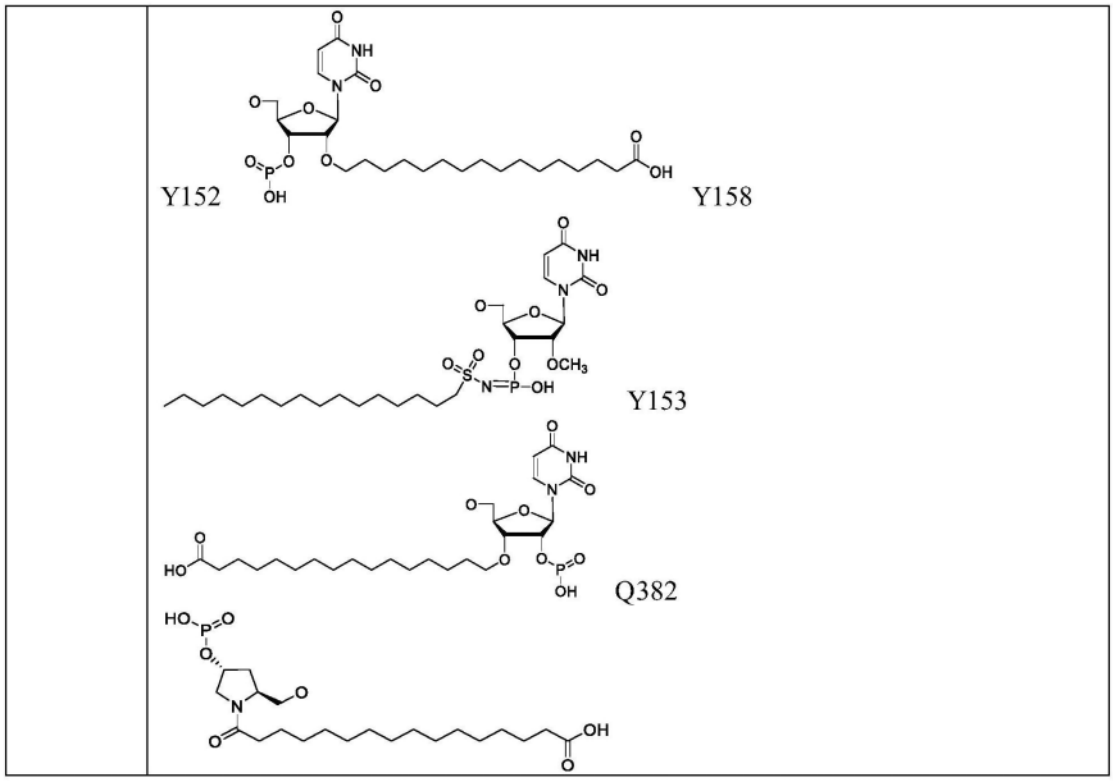
[1188]

AD-1025229	A-1866836	有义	SOD1	Q378scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	159	7279.11	7275.27
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-1025230	A-1866837	有义	SOD1	Q379scsauuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	160	7307.16	7303.31
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-1025217	A-1875194	有义	SOD1	Q363sgscaaagGfuGfGfAfaaugaagasasa	161	7591.42	7587.45
	A-1287139	反义	SOD1	VPusUfsucuUfcAfUfuuccAfcCfuuugcscsc	162	7446.77	7442.97
AD-1025220	A-1875195	有义	SOD1	Q363sasaagguGfgAfAfAfugaagaaasgsa	163	7615.45	7611.46
	A-1287141	反义	SOD1	VPusCfsuuuCfuUfCfauuuCfcAfccuuusgsc	164	7447.76	7443.95
AD-1025218	A-1875196	有义	SOD1	Q363sgsacuugGfgCfAfAfafagguggaasasa	165	7560.36	7556.41
	A-1136073	反义	SOD1	VPusUfsuucc(Agn)ccuuugCfcCfaagucsasu	166	7496.92	7493.07
AD-1025221	A-1875197	有义	SOD1	Q363sasggaugAfaGfAfGfaggcaugususa	167	7561.35	7557.39
	A-1286811	反义	SOD1	VPusAfsacaUfgCfCfucucUfuCfauccususu	168	7493.84	7490.01
AD-1025219	A-1875239	有义	SOD1	csasuuQ367uAfaUfCfCfucacucusasa	169	6587.68	6584.17
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15

[1189]



[1190]



[1191] 斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯。

[1192] 还在鞘内施用单剂量0.9mg的siRNA双链体后,通过qPCR,用表19中列出的siRNA缀合物在大鼠脑(小脑和额叶皮质)、脊髓(胸部脊髓)和心脏中研究SOD1基因沉默,其中在第7天处死大鼠,并将结果与人工CSF给药对照进行比较。结果示于图20中。

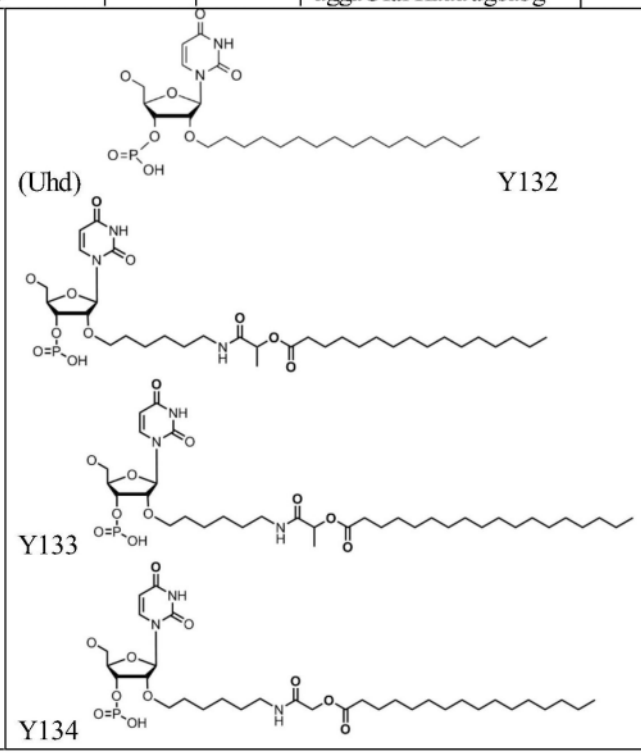
[1193] 表19.SOD1序列的酯酶可裂解亲脂性siRNA缀合物

[1194]

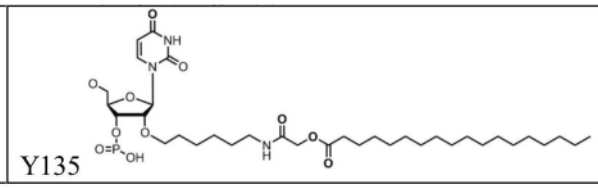
双链体Id	寡核苷酸Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	实验分子量
AD-401824	A-637448	有义	SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	70	7043.97	7040.25
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15

[1195]

AD-900813	A-1543019	有义	SOD1	csasuuuY132AfaUfCfCfucacucuasasa	71	7229.20	7225.36
	A-4444042	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900810	A-1543020	有义	SOD1	csasuuuY133AfaUfCfCfucacucuasasa	72	7257.26	7253.39
	A-4444042	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900811	A-1543021	有义	SOD1	csasuuuY134AfaUfCfCfucacucuasasa	73	7215.18	7211.34
	A-4444042	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15
AD-900812	A-1543022	有义	SOD1	csasuuuY135AfaUfCfCfucacucuasasa	74	7243.23	7239.37
	A-4444042	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.15	7847.15



[1196]

	 Y135

[1197] 斜体的大写和小写字母分别表示对腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷的2'-脱氧-2'-氟(2'-F)和2'-O-甲基(2'-OMe)糖修饰;s表示硫代磷酸酯(PS)键;VP表示乙烯基膦酸酯。

[1198] 还在ICV施用单剂量50或150ug的siRNA双链体后,通过qPCR,用表20中列出的siRNA缀合物在小鼠脑和心脏中研究SOD1基因沉默,其中在第14天或第7天处死小鼠,并将结果与人工CSF给药对照进行比较。结果示于图21中。

[1199] 表20.用于小鼠ICV实验的SOD1序列的亲脂性siRNA缀合物

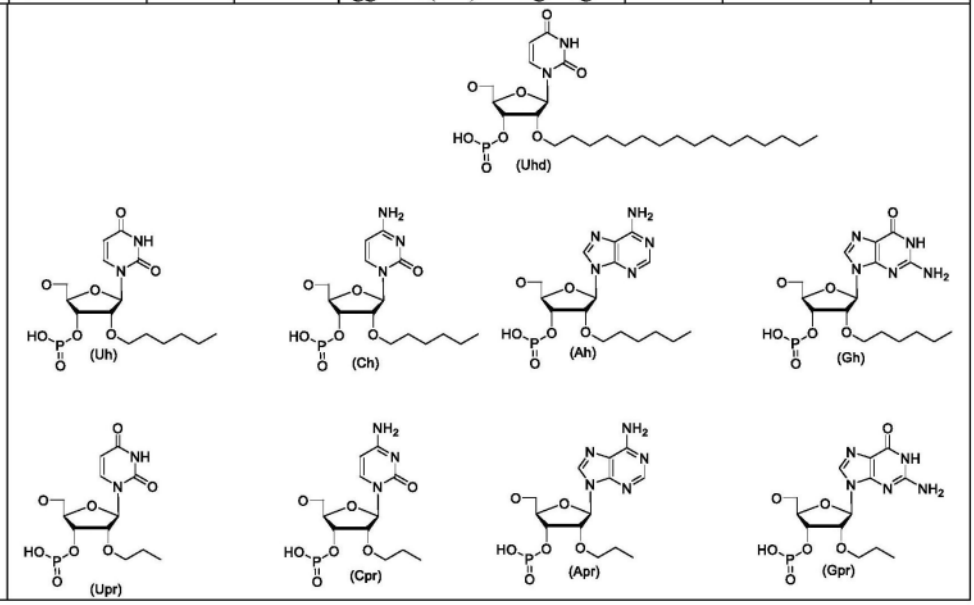
[1200]

双链体 Id	寡核苷酸 Id	链	靶标	寡核苷酸序列	SEQ ID NO:	分子量	精确质量
AD-401824	A-637448	有义	SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	70	7043.976	7040.254
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-1321422	A-2219765	有义	SOD1	csasuuu(Uh)AfaUfCfCfucac(Uh)(Ch)uasasa	170	7043.973	7040.261
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-1321423	A-2219766	有义	SOD1	csasuuu(Uh)AfaUfCfCfucac(Uh)cuasas(Ah)	171	7043.978	7040.256
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-1321424	A-2219767	有义	SOD1	(Chs)asuuu(Uh)AfaUfCfCfucac(Uh)cuasasa	172	7043.975	7040.254
	A-44440	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfa	41	7851.156	7847.

[1201]

	2			ggaUfuAfaaaugsasg			154
AD-1321425	A-2219768	有义	SOD1	(Chs)asuuu(Uh)AfaUfCfCfucac(Uh)cuasas(Ah)	173	7114.113	7110.331
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-1321426	A-2219769	有义	SOD1	(Cprs)asuuu(Upr)AfaUfCfCfuca(Cpr)(Upr)cuasas(Apr)	174	6973.847	6970.175
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-1321427	A-2219770	有义	SOD1	csasuuu(Uh)AfaUfCfCfucacu(Ch)uasasa	175	6973.84	6970.182
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-1321431	A-2219770	有义	SOD1	csasuuu(Uh)AfaUfCfCfucacu(Ch)uasasa	175	6973.84	6970.182
	A-2219774	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfu(Ah)aaaugsasg	176	7933.328	7929.252
AD-1321428	A-2219771	有义	SOD1	csasuuu(Uh)AfaUfCfCfucac(Uh)cuasasa	177	6973.84	6970.178
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-1321432	A-2219771	有义	SOD1	csasuuu(Uh)AfaUfCfCfucac(Uh)cuasasa	177	6973.84	6970.178
	A-2219774	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfu(Ah)aaaugsasg	176	7933.328	7929.252
AD-1321429	A-2219772	有义	SOD1	(Chs)asuuu(Uh)AfaUfCfCfucac(Uh)(Ch)uasa	178	7184.246	7180.415

[1202]

				s(Ah)			
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-1321430	A-2219773	有义	SOD1	csasuuu(Uh)AfaUfCfCfucac(Uh)(Cpr)uasasa	2	7001.896	6998.209
	A-444402	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	41	7851.156	7847.154
AD-1321433	A-2219773	有义	SOD1	csasuuu(Uh)AfaUfCfCfucac(Uh)(Cpr)uasasa	2	7001.896	6998.209
	A-2219774	反义	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfu(Ah)aaaugsasg	176	7933.328	7929.252
							

序列表

<110> 阿尔尼拉姆医药品有限公司

<120> 肝外递送

<130> 29520.1503

<140>
<141>

<150> PCT/US2020/059399
<151> 2020-11-06

<150> 62/931,631
<151> 2019-11-06

<160> 178

<170> Patentin Version 3.5

[0001]

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> 未知的

<220>
<223> 未知的 RGD 肽的描述

<400> 1
Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys Cys
1 5

<210> 2
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 2

cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 3
Ala Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
1 5 10 15

Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys
20 25

[0002]

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的多肽的描述

<400> 4
Ala Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys
20 25 30

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 5
Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
1 5 10 15

<210> 6
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 6
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Trp Asp Tyr Gly
20

[0003]

<210> 7
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 7
Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly
20

<210> 8
<211> 48
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的多肽的描述

<400> 8
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Cys Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly
20 25 30

Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Cys
35 40 45

<210> 9
<211> 44
<212> PRT
[0004] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的多肽的描述

<400> 9
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Gly Cys Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile
20 25 30

Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Ile Asp Gly Gly Cys
35 40

<210> 10
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的多肽的描述

<400> 10
Gly Leu Phe Gly Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu
1 5 10 15

His Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ser Cys
35

<210> 11
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

[0005]

<220>
<223> 人工序列合成的多肽的描述

<400> 11
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala Gly Gly
20 25 30

Ser Cys

<210> 12
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的多肽的描述

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> 正亮氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (38)..(38)
<223> 正亮氨酸

<400> 12
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Xaa Ile Asp Gly Lys Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu
20 25 30

Asn Gly Trp Glu Gly Xaa Ile Asp Gly
35 40

[0006]

<210> 13
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 13
Leu Phe Glu Ala Leu Leu Glu Leu Leu Glu Ser Leu Trp Glu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Glu Ala

<210> 14
<211> 20

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 14
Gly Leu Phe Lys Ala Leu Leu Lys Leu Leu Lys Ser Leu Trp Lys Leu
1 5 10 15

Leu Leu Lys Ala
20

<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0007] <223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 15
Gly Leu Phe Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu
1 5 10 15

Leu Leu Arg Ala
20

<210> 16
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的多肽的描述

<400> 16
Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His
1 5 10 15

Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala
20 25 30

<210> 17
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 17
Gly Leu Phe Phe Glu Ala Ile Ala Glu Phe Ile Glu Gly Gly Trp Glu
1 5 10 15

Gly Leu Ile Glu Gly Cys
20

[0008]

<210> 18
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 18
Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu
1 5 10 15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
20 25

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 19
His His His His His Trp Tyr Gly
1 5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 20
Cys His Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Cys
1 5 10

[0009]

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> 果蝇 (Drosophila sp.)

<400> 21
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> 人类免疫缺陷病毒

<400> 22
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Cys
1 5 10

<210> 23
<211> 27
<212> PRT

<213> 未知的

<220>
<223> 未知的基于信号序列的肽的描述

<400> 23
Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus sp.)

<400> 24
Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
[0010] 1 5 10 15

Ser Lys

<210> 25
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 25
Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Lys Ile Asn Leu Lys
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 26
Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
[0011] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 27
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 28
Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys
1 5 10

<210> 29
<211> 37
<212> PRT
<213> 未知的

<220>
<223> 未知的 LL37 序列的描述

<400> 29
Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
20 25 30

Pro Arg Thr Glu Ser
35

[0012]

<210> 30
<211> 31
<212> PRT
<213> 未知的

<220>
<223> 未知的猪源抗菌肽的描述

<400> 30
Ser Trp Leu Ser Lys Thr Ala Lys Lys Leu Glu Asn Ser Ala Lys Lys
1 5 10 15

Arg Ile Ser Glu Gly Ile Ala Ile Ala Ile Gln Gly Gly Pro Arg
20 25 30

<210> 31
<211> 30
<212> PRT
<213> 未知的

<220>

<223> 未知的α-防御素序列的描述

<400> 31
Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
20 25 30

<210> 32
<211> 36
<212> PRT
<213> 未知的

<220>
<223> 未知的β-防御素序列的描述

<400> 32
Asp His Tyr Asn Cys Val Ser Ser Gly Gly Gln Cys Leu Tyr Ser Ala
[0013] 1 5 10 15

Cys Pro Ile Phe Thr Lys Ile Gln Gly Thr Cys Tyr Arg Gly Lys Ala
20 25 30

Lys Cys Cys Lys
35

<210> 33
<211> 42
<212> PRT
<213> 未知的

<220>
<223> 未知的 PR-39 序列的描述

<400> 33
Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro
1 5 10 15

Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro Gly Lys Arg
35 40

<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> 未知的

<220>
<223> 未知的吲哚西丁序列的描述

<400> 34
Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg
1 5 10

[0014] <210> 35
<211> 16
<212> PRT
<213> 未知的

<220>
<223> 未知的 RFGF 肽序列的描述

<400> 35
Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> 未知的

<220>
<223> 未知的 RFGF 肽类似物序列的描述

<400> 36

Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的肽的描述

<400> 37
Arg Lys Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg
1 5 10

<210> 38
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0015]

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 38
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 39
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 39
uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 40
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 40
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 41
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 41
uuuagaguga ggauuaaaau gag 23

[0016] <210> 42
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 核糖置换

<400> 42
cauuuuaauc cucacucuaa an 22

<210> 43
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 43
uuuagaguga ggauuaaaau gag 23

<210> 44
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 核糖置换

[0017]
<400> 44
cauuuuaauc cucacucuaa an 22

<210> 45
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 核糖置换

<400> 45
cauuuuaauc cucacucuaa an 22

<210> 46

<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 核糖置换

<400> 46
cauuuuaauc cucacucuaa an 22

<210> 47
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

[0018]

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 核糖置换

<400> 47
ugggauuuca uguaaccaag an 22

<210> 48
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 48

ucuugguuac augaaauccc auc 23

<210> 49
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 核糖置换

<400> 49
ugggauuuca uguaaccaag an 22

[0019] <210> 50
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 核糖置换

<400> 50
aacaguguuc uugcucuaua an 22

<210> 51
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 核糖置换

<400> 51
aacaguguuc uugcucuaua an 22

<210> 52
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

[0020]

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 52
naacaguguu cuugcucuau aa 22

<210> 53
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 53
naacaguguu cuugcucuau aa 22

<210> 54
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 54
naacaguguu cuugcucuau aa 22

[0021]

<210> 55
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 55
naacaguguu cuugcucuau aa 22

<210> 56
<211> 22
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 56
naacaguguu cuugcucuau aa 22

<210> 57
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

[0022]

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 57
naacaguguu cuugcucuau aa 22

<210> 58
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base

<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 58
nacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 59
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

[0023]
<400> 59
ncauuuuaau ccucacucua aa 22

<210> 60
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 60
ncauuuuaau ccucacucua aa 22

<210> 61

<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 61
ncauuuuaau ccucacucua aa 22

<210> 62
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

[0024]

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 62
ncauuuuaau ccucacucua aa 22

<210> 63
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 63
ncauuuuaau ccucacucua aa 22

<210> 64
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
[0025] <223> 核糖置换

<400> 64
ncauuuuaau ccucacucua aa 22

<210> 65
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 65
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 66
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 66
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 67
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 67
aacaguguuc uugcucuaua a 21

[0026]

<210> 68
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 68
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 69
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 69
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 70

<210> 21
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 70
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 71
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 71
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

[0027]

<210> 72
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 72
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 73
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 73

cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 74
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 74
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 75
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
[0028] <223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 75
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 76
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 76
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 77
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 77
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 78
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 78
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

[0029]

<210> 79
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 79
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 80
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 80
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 81

<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 81
naacaguguu cuugcucuau aa 22

<210> 82
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

[0030]

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 82
naacaguguu cuugcucuau aa 22

<210> 83
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 83
naacaguguu cuugcucuau aa 22

<210> 84
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 84
aacaguguuc uugcucuaua a 21

[0031] <210> 85
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 85
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 86
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 86
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 87
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 87
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 88
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 88
[0032] aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 89
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 核糖置换

<400> 89
aacagnguuc uugcucuaua a 21

<210> 90

<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 核糖置换

<400> 90
aacagnguuc uugcucuaua a 21

<210> 91
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

[0033]

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 91
uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 92
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 92
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 93
<211> 22
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 93
aacaguuguu cuugcucuau aa 22

<210> 94
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 94
aacaguguuc uugcucuaua a 21

[0034] <210> 95
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 95
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 96
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 96
uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 97
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 97
uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 98
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 98
[0035] aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 99
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 99
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 100
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 100
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 101
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 101
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 102
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0036] <220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 102
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 103
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 103
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 104
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 核糖置换

<400> 104
aacanuguuc uugcucuaua a 21

<210> 105
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

[0037]

<220>
<221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 核糖置换
<400> 105
aacagnguuc uugcucuaua a 21

<210> 106
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (7)..(7)

<223> 核糖置换

<400> 106
aacagunuuc uugcucuaua a 21

<210> 107
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 核糖置换

<400> 107
[0038] aacagugnuc uugcucuaua a 21

<210> 108
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 核糖置换

<400> 108
aacaguguun uugcucuaua a 21

<210> 109
<211> 21

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 核糖置换

<400> 109
aacaguguuc uugnucuaua a 21

<210> 110
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0039]
<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 核糖置换

<400> 110
aacaguguuc uugcncuaua a 21

<210> 111
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>

<220>
<221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 核糖置换

<400> 111
aacaguguuc uugcunuaua a 21

<210> 112
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 核糖置换

[0040]

<400> 112
aacaguguuc uugcucnaua a 21

<210> 113
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 113
aacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 114
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 114
naacaguguu cuugcucuau aa 22

<210> 115
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

[0041] <220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 115
nacaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 116
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 核糖置换

<400> 116
ancaguguuc uugcucuaua a 21

<210> 117
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 核糖置换

<400> 117
aanaguguuc uugcucuaua a 21

[0042]

<210> 118
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 核糖置换

<400> 118
aacnguguuc uugcucuaua a 21

<210> 119
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 核糖置换

<400> 119
aacagugunc uugcucuaua a 21

<210> 120
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

[0043]

<220>
<221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 核糖置换

<400> 120
aacaguguuc nugcucuaua a 21

<210> 121
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (12)..(12)

<223> 核糖置换

<400> 121
aacaguguuc ungcucuaua a 21

<210> 122
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 核糖置换

<400> 122
[0044] aacaguguuc uuncucuaua a 21

<210> 123
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> 核糖置换

<400> 123
aacaguguuc uugcucunua a 21

<210> 124
<211> 21

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 核糖置换

<400> 124
aacaguguuc uugcucuana a 21

<210> 125
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0045]

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 核糖置换

<400> 125
aacaguguuc uugcucuaun a 21

<210> 126
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>

<221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 核糖置换

<400> 126
aacaguguuc uugcucuaua n 21

<210> 127
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 核糖置换

[0046]

<400> 127
aacaguguuc uugcucuaua an 22

<210> 128
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 128
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 129
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 129
ncauuuuaau ccucacucua aa 22

<210> 130
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

[0047] <220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 130
nauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 131
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (2)..(2)
<223> 核糖置换

<400> 131
cnuuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 132
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (3)..(3)
<223> 核糖置换

<400> 132
canuuuaauc cucacucuaa a 21

[0048]
<210> 133
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (4)..(4)
<223> 核糖置换

<400> 133
caunuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 134
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 核糖置换

<400> 134
cauunuaauc cucacucuaa a 21

<210> 135
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

[0049]

<220>
<221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 核糖置换

<400> 135
cauuunaauc cucacucuaa a 21

<210> 136
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (7)..(7)

<223> 核糖置换

<400> 136
cauuuunauc cucacucuaa a 21

<210> 137
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (8)..(8)
<223> 核糖置换

<400> 137
[0050] cauuuuanuc cucacucuaa a 21

<210> 138
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (9)..(9)
<223> 核糖置换

<400> 138
cauuuuaanc cucacucuaa a 21

<210> 139
<211> 21

<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (10)..(10)
<223> 核糖置换

<400> 139
cauuuuaaun cucacucuaa a 21

<210> 140
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0051]
<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (11)..(11)
<223> 核糖置换

<400> 140
cauuuuaauc nucacucuaa a 21

<210> 141
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>

<221> modified_base
<222> (12)..(12)
<223> 核糖置换

<400> 141
cauuuuaauc cncacucuaa a 21

<210> 142
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (13)..(13)
<223> 核糖置换

[0052]

<400> 142
cauuuuaauc cunacucuaa a 21

<210> 143
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (14)..(14)
<223> 核糖置换

<400> 143
cauuuuaauc cucncucuaa a 21

<210> 144
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> 核糖置换

<400> 144
cauuuuaauc cucanucuaa a 21

<210> 145
<211> 21
<212> RNA
[0053] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (16)..(16)
<223> 核糖置换

<400> 145
cauuuuaauc cucacncuaa a 21

<210> 146
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (17)..(17)
<223> 核糖置换

<400> 146
cauuuuaauc cucacunuaa a 21

<210> 147
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
[0054] <223> 核糖置换

<400> 147
cauuuuaauc cucacucnaa a 21

<210> 148
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(19)
<223> 核糖置换

<400> 148
cauuuuaauc cucacucuna a 21

<210> 149
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> 核糖置换
<400> 149
cauuuuaauc cucacucuan a 21

<210> 150
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

[0055]

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (21)..(21)
<223> 核糖置换

<400> 150
cauuuuaauc cucacucuaa n 21

<210> 151
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> 核糖置换

<400> 151
cauuuuaauc cucacucuaa an 22

<210> 152
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 152
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

[0056]
<210> 153
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 153
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 154
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 154

cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 155
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 155
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 156
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

[0057]

<220>
<221> modified_base
<222> (6)..(6)
<223> 核糖置换

<400> 156
cauuunaauc cucacucuaa a 21

<210> 157
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base

<222> (6)..(6)
<223> 核糖置换

<400> 157
cauuunaauc cucacucuaa a 21

<210> 158
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

[0058] <400> 158
ncauuuuaau ccucacucua aa 22

<210> 159
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 159
ncauuuuaau ccucacucua aa 22

<210> 160

<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 160
ncauuuuaau ccucacucua aa 22

<210> 161
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

[0059]

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 161
ngcaaaggug gaaaugaaga aa 22

<210> 162
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 162

uuucuucauu uccaccuuug ccc 23

<210> 163
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 163
naaaggugga aaugaagaaa ga 22

[0060]

<210> 164
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 164
ucuuucuuca uuuccaccuu ugc 23

<210> 165
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base

<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 165
ngacuugggc aaagguggaa aa 22

<210> 166
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 166
uuuuccaccu uugcccaagu cau 23

[0061]

<210> 167
<211> 22
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> 核糖置换

<400> 167
naggaugaag agaggcaugu ua 22

<210> 168
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 168
uaacaugccu cucuucaucc uuu 23

<210> 169
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<220>
<221> modified_base
<222> (5)..(5)
<223> 核糖置换

<400> 169
cauunuaauc cucacucuaa 20

[0062]

<210> 170
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 170
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 171
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 171

cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 172
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 172
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 173
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
[0063] <223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 173
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 174
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 174
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 175
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 175
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 176
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 176
uuuagaguga ggauuaaaau gag 23

<210> 177
[0064] <211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 177
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

<210> 178
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成的寡核苷酸的描述

<400> 178
cauuuuaauc cucacucuaa a 21

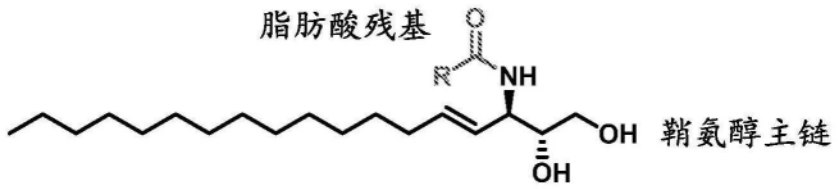

脂肪酸残基
O
R
NH
OH
OH
鞘氨醇主链

图1

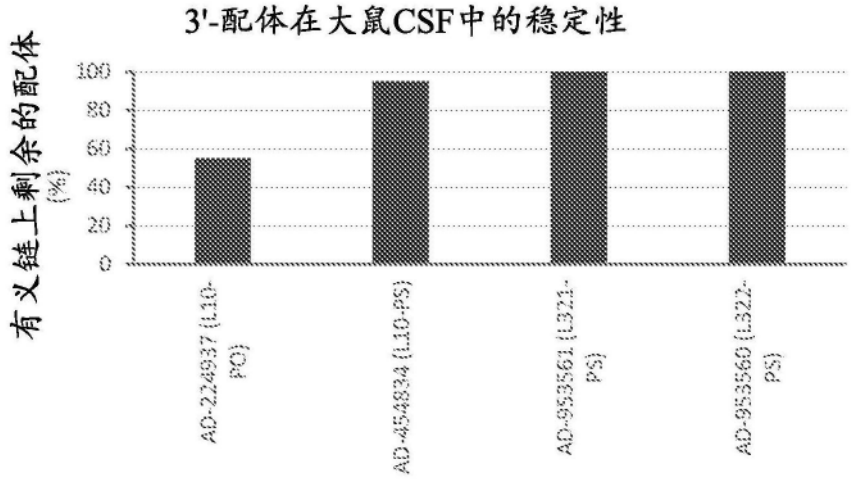

3'-配体在大鼠CSF中的稳定性
有义链上剩余的配体(%)
0
20
40
60
80
100
AD-224937 (L10-PO)
AD-454834 (L10-PS)
AD-953561 (L321-PS)
AD-953560 (L322-PS)

图2

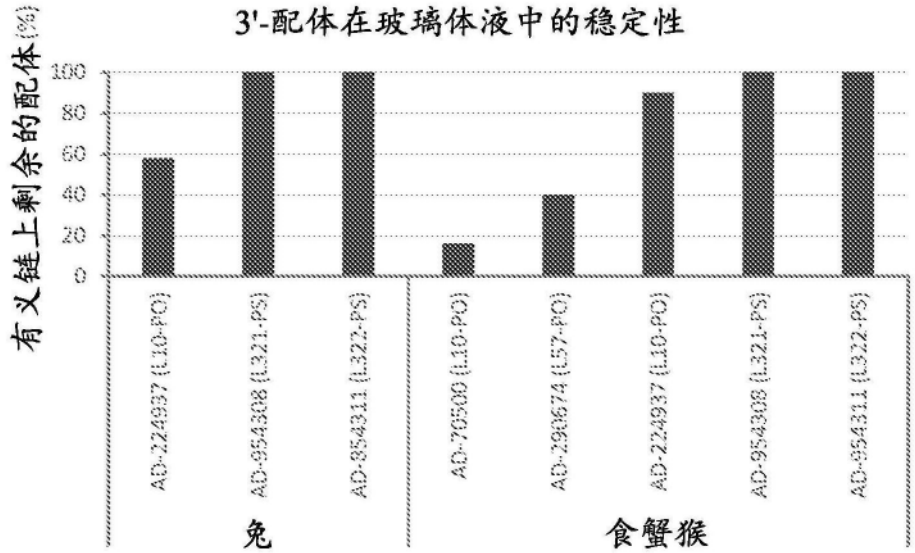

3'-配体在玻璃体液中的稳定性
有义链上剩余的配体(%)
0
20
40
60
80
100
AD-224937 (L10-PO)
AD-954308 (L321-PS)
AD-954311 (L322-PS)
AD-76500 (L10-PO)
AD-290674 (L57-PO)
AD-224937 (L10-PO)
AD-954308 (L321-PS)
AD-954311 (L322-PS)
兔
食蟹猴

图3

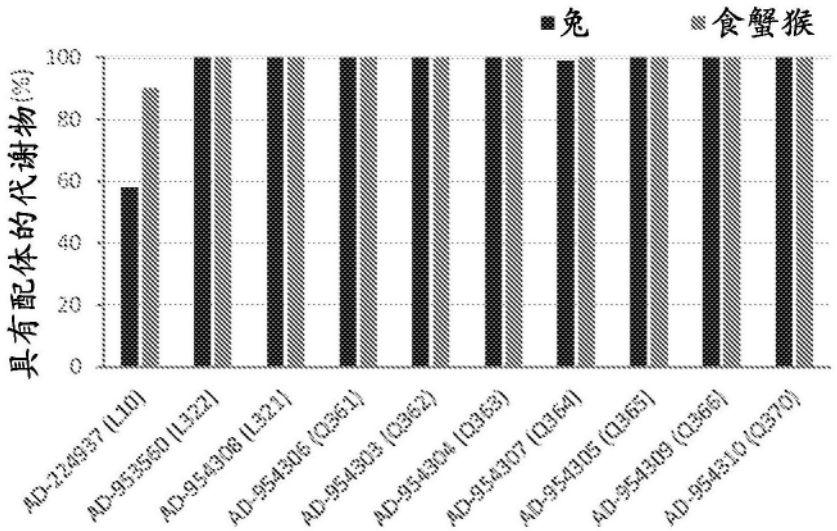

兔
食蟹猴
具有配体的代谢物(%)
100
80
60
40
20
0
AD-224937 (L10)
AD-953560 (L322)
AD-954306 (L321)
AD-954306 (Q361)
AD-954303 (Q362)
AD-954304 (Q363)
AD-954307 (Q364)
AD-954305 (Q365)
AD-954309 (Q366)
AD-954310 (Q370)

图4

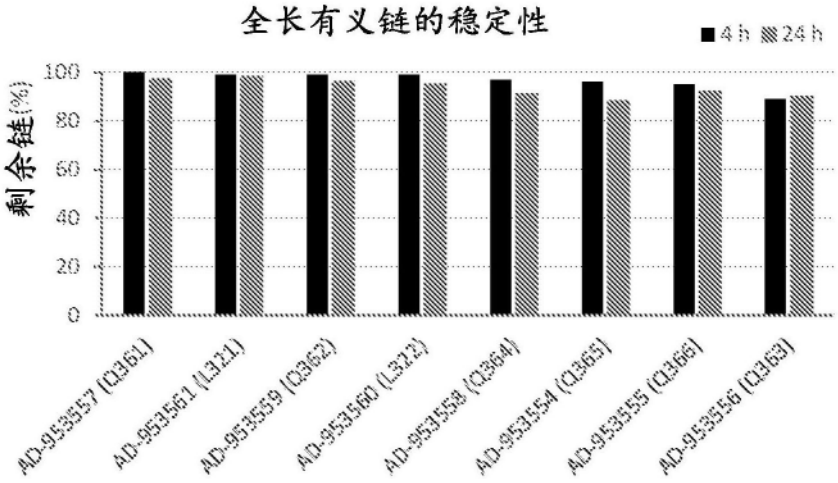

全长有义链的稳定性
4 h
24 h
剩余链(%)
100
80
60
40
20
0
AD-953557 (Q361)
AD-953561 (L321)
AD-953559 (Q362)
AD-953560 (L322)
AD-953558 (Q364)
AD-953554 (Q365)
AD-953555 (Q366)
AD-953556 (Q363)

图5A

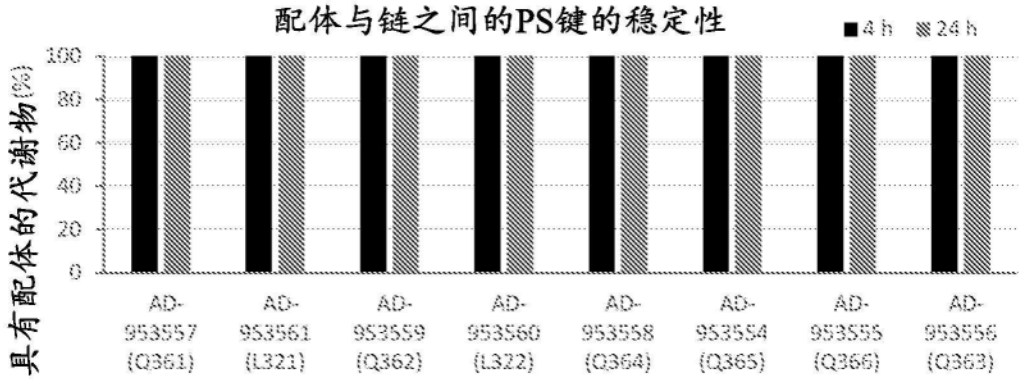

配体与链之间的PS键的稳定性
4 h
24 h
具有配体的代谢物(%)
100
80
60
40
20
0
AD-953557 (Q361)
AD-953561 (L321)
AD-953559 (Q362)
AD-953560 (L322)
AD-953558 (Q364)
AD-953554 (Q365)
AD-953555 (Q366)
AD-953556 (Q363)

图5B

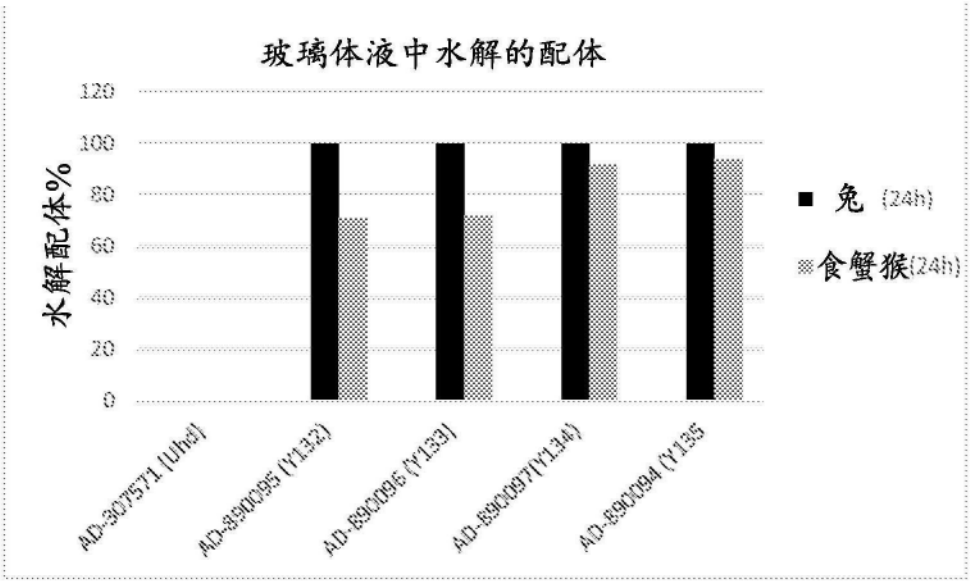

玻璃体液中水解的配体
水解配体%
120
100
80
60
40
20
0
AD-307571 (Uhd)
AD-890095 (Y132)
AD-890096 (Y133)
AD-890097(Y134)
AD-890094 (Y135
兔 (24h)
食蟹猴(24h)

图6

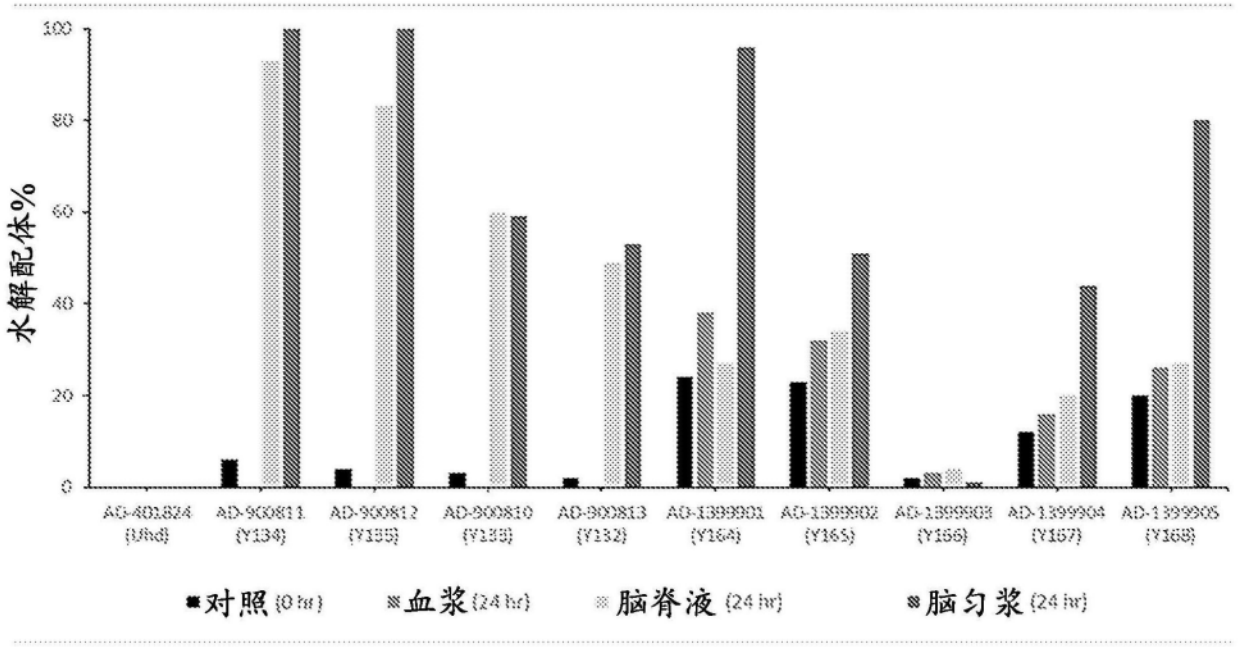

水解配体%
100
80
60
40
20
0
AD-401824 (Uhd)
AD-900811 (Y134)
AD-900812 (Y135)
AD-900810 (Y133)
AD-900813 (Y132)
AD-1399901 (Y164)
AD-1399902 (Y165)
AD-1399903 (Y166)
AD-1399904 (Y167)
AD-1399905 (Y168)
对照 (0 hr)
血浆 (24 hr)
脑脊液 (24 hr)
脑匀浆 (24 hr)

图7

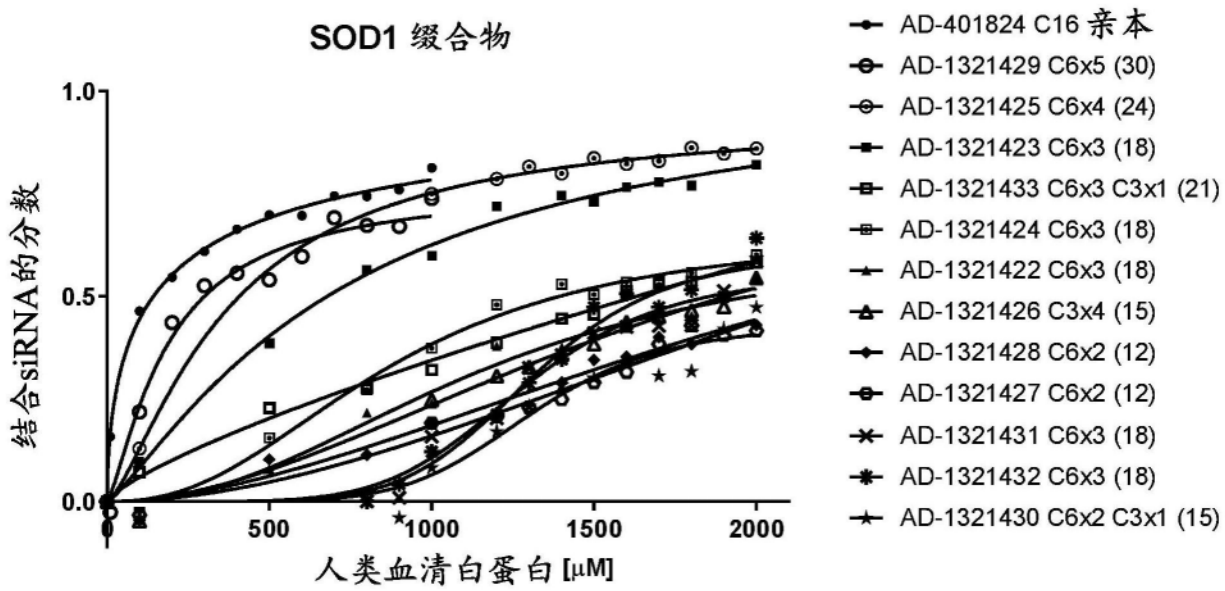

SOD1 缀合物
结合siRNA的分数
1.0
0.5
0.0
500
1000
1500
2000
人类血清白蛋白 [μM]
AD-401824 C16 亲本
AD-1321429 C6x5 (30)
AD-1321425 C6x4 (24)
AD-1321423 C6x3 (18)
AD-1321433 C6x3 C3x1 (21)
AD-1321424 C6x3 (18)
AD-1321422 C6x3 (18)
AD-1321426 C3x4 (15)
AD-1321428 C6x2 (12)
AD-1321427 C6x2 (12)
AD-1321431 C6x3 (18)
AD-1321432 C6x3 (18)
AD-1321430 C6x2 C3x1 (15)

图8

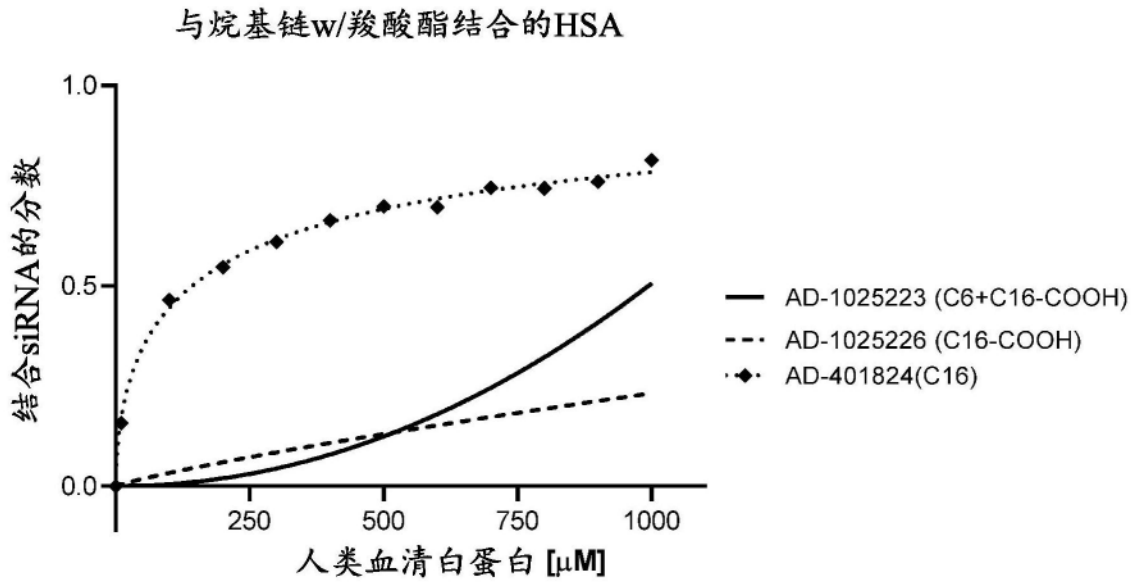

与烷基链w/羧酸酯结合的HSA
结合siRNA的分数
1.0
0.5
0.0
250
500
750
1000
人类血清白蛋白 [μM]
AD-1025223 (C6+C16-COOH)
AD-1025226 (C16-COOH)
AD-401824(C16)

图9

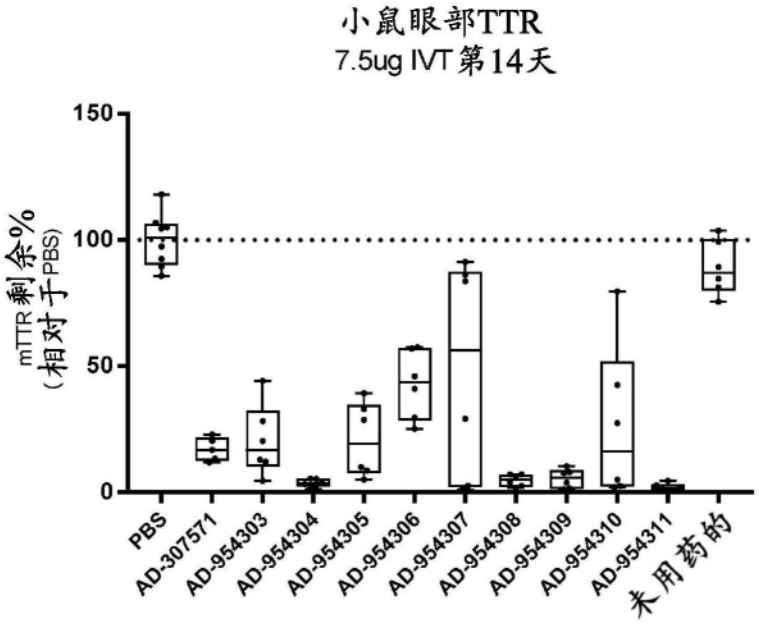

小鼠眼部TTR
7.5ug IVT第14天
mTTR剩余%
(相对于PBS)
150
100
50
0
PBS
AD-307571
AD-954303
AD-954304
AD-954305
AD-954306
AD-954307
AD-954308
AD-954309
AD-954310
AD-954311
未用药的

图10

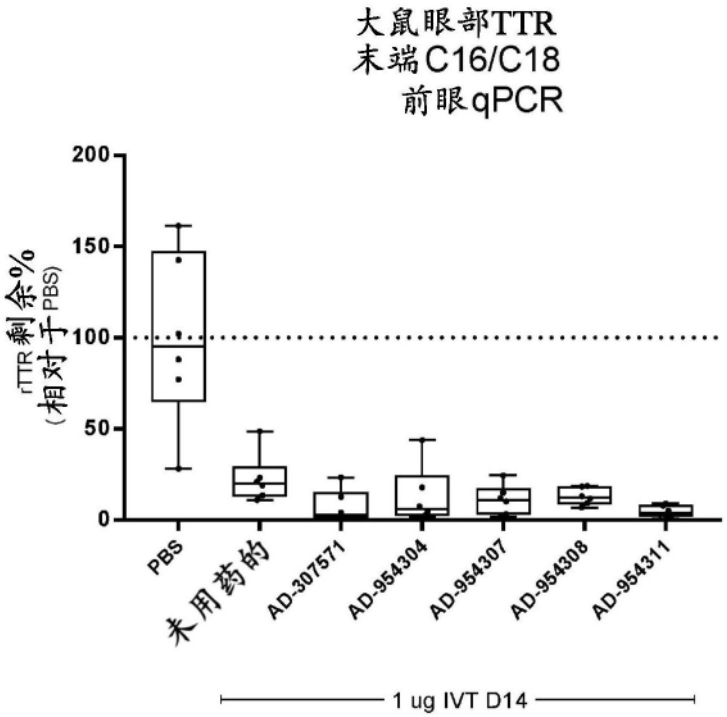

大鼠眼部TTR
末端C16/C18
前眼qPCR
rTTR剩余%
(相对于PBS)
200
150
100
50
0
PBS
未用药的
AD-307571
AD-954304
AD-954307
AD-954308
AD-954311
1 ug IVT D14

图11

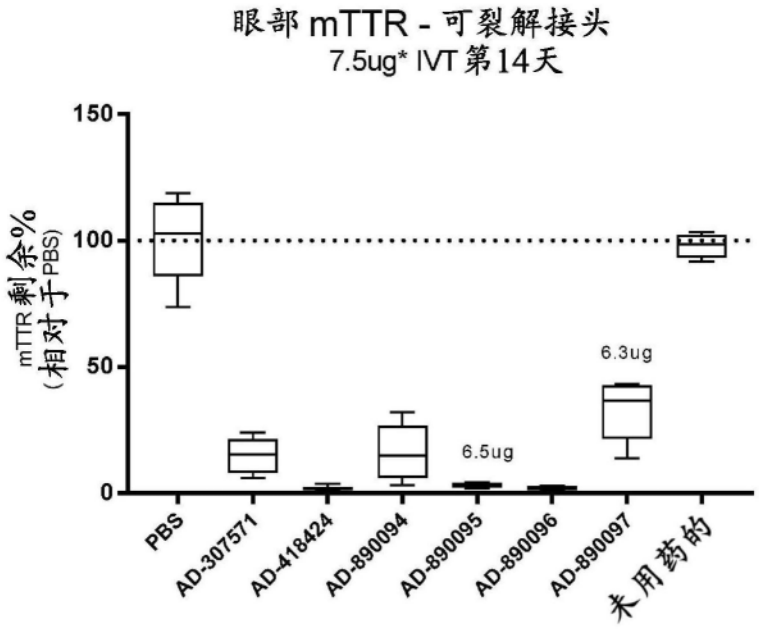

眼部 mTTR - 可裂解接头
7.5ug* IVT 第14天
mTTR 剩余%
(相对于 PBS)
150
100
50
0
6.3ug
6.5ug
PBS
AD-307571
AD-418424
AD-890094
AD-890095
AD-890096
AD-890097
未用药的

图12

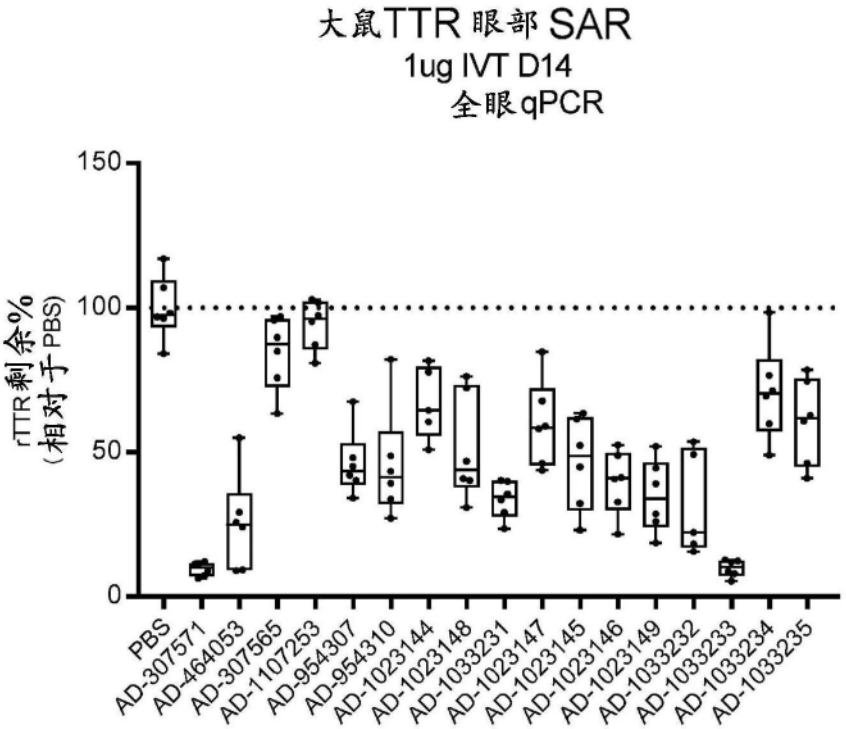

大鼠TTR 眼部 SAR
1ug IVT D14
全眼qPCR
rTTR 剩余%
(相对于 PBS)
150
100
50
0
PBS
AD-307571
AD-464053
AD-307565
AD-1107253
AD-954307
AD-954310
AD-1023144
AD-1023148
AD-1033231
AD-1023147
AD-1023145
AD-1023146
AD-1023149
AD-1033232
AD-1033233
AD-1033234
AD-1033235

图13

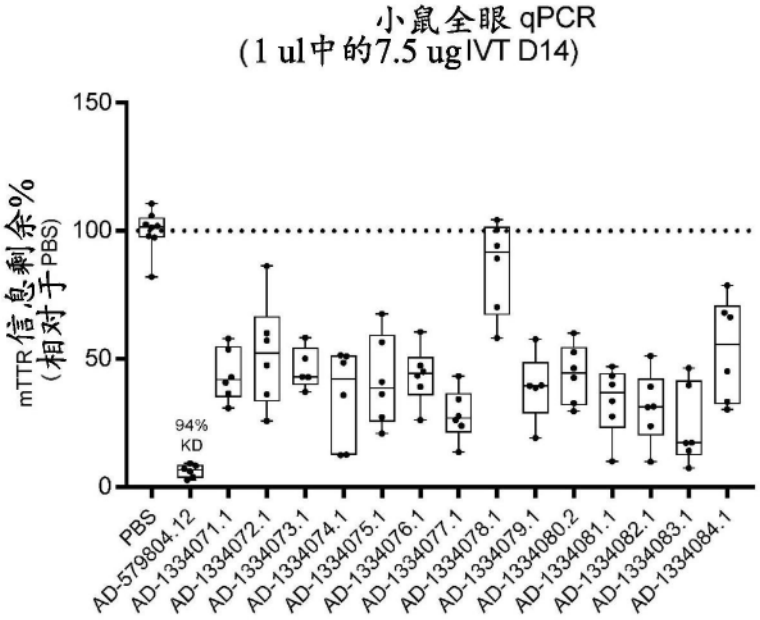

小鼠全眼 qPCR
(1 ul中的7.5 ug IVT D14)
mTTR信息剩余%
(相对于PBS)
150
100
50
0
94%
KD
PBS
AD-579804.12
AD-1334071.1
AD-1334072.1
AD-1334073.1
AD-1334074.1
AD-1334075.1
AD-1334076.1
AD-1334077.1
AD-1334078.1
AD-1334079.1
AD-1334080.2
AD-1334081.1
AD-1334082.1
AD-1334083.1
AD-1334084.1

图14

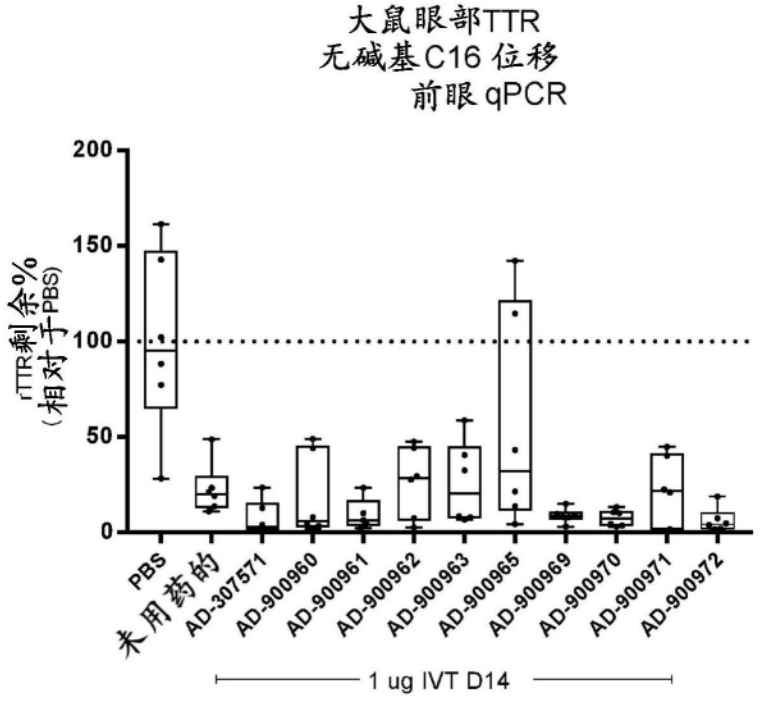

大鼠眼部TTR
无碱基C16 位移
前眼 qPCR
rTTR剩余%
(相对于PBS)
200
150
100
50
0
PBS
未用药的
AD-307571
AD-900960
AD-900961
AD-900962
AD-900963
AD-900965
AD-900969
AD-900970
AD-900971
AD-900972
1 ug IVT D14

图15

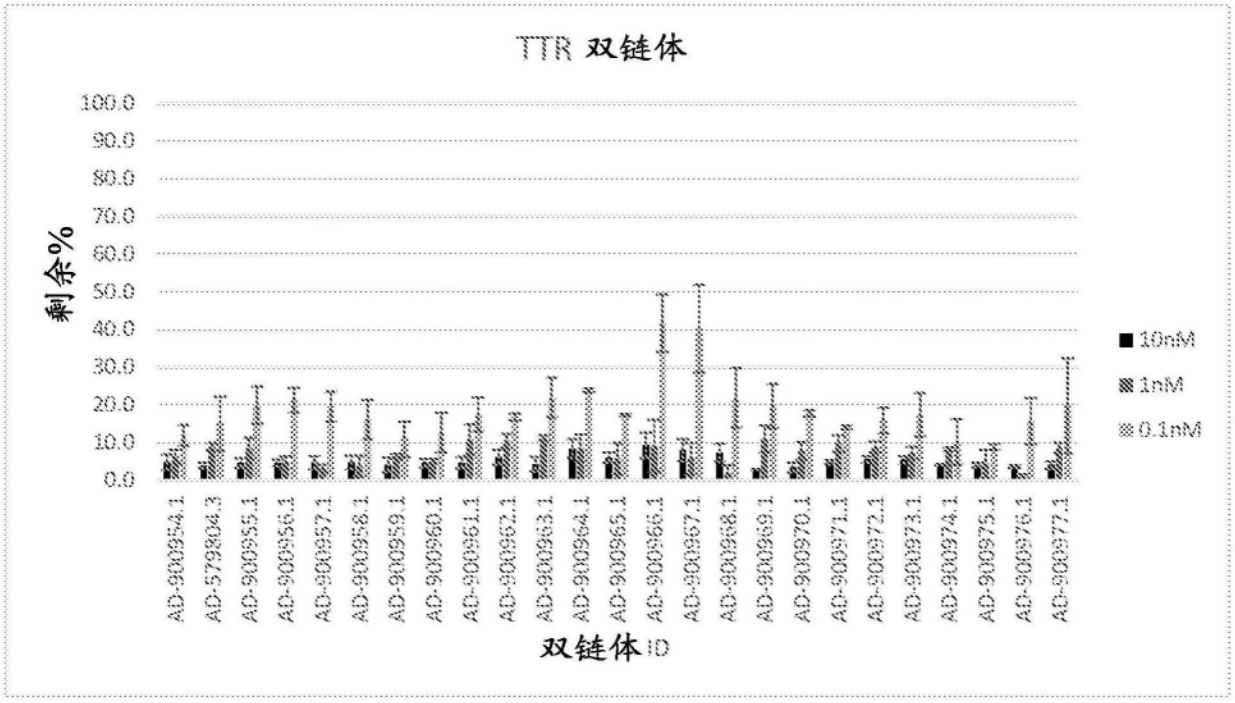

TTR 双链体
剩余%
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
10nM
1nM
0.1nM
AD-900954.1
AD-579804.3
AD-900955.1
AD-900956.1
AD-900957.1
AD-900958.1
AD-900959.1
AD-900960.1
AD-900961.1
AD-900962.1
AD-900963.1
AD-900964.1
AD-900965.1
AD-900966.1
AD-900967.1
AD-900968.1
AD-900969.1
AD-900970.1
AD-900971.1
AD-900972.1
AD-900973.1
AD-900974.1
AD-900975.1
AD-900976.1
AD-900977.1
双链体ID

图16

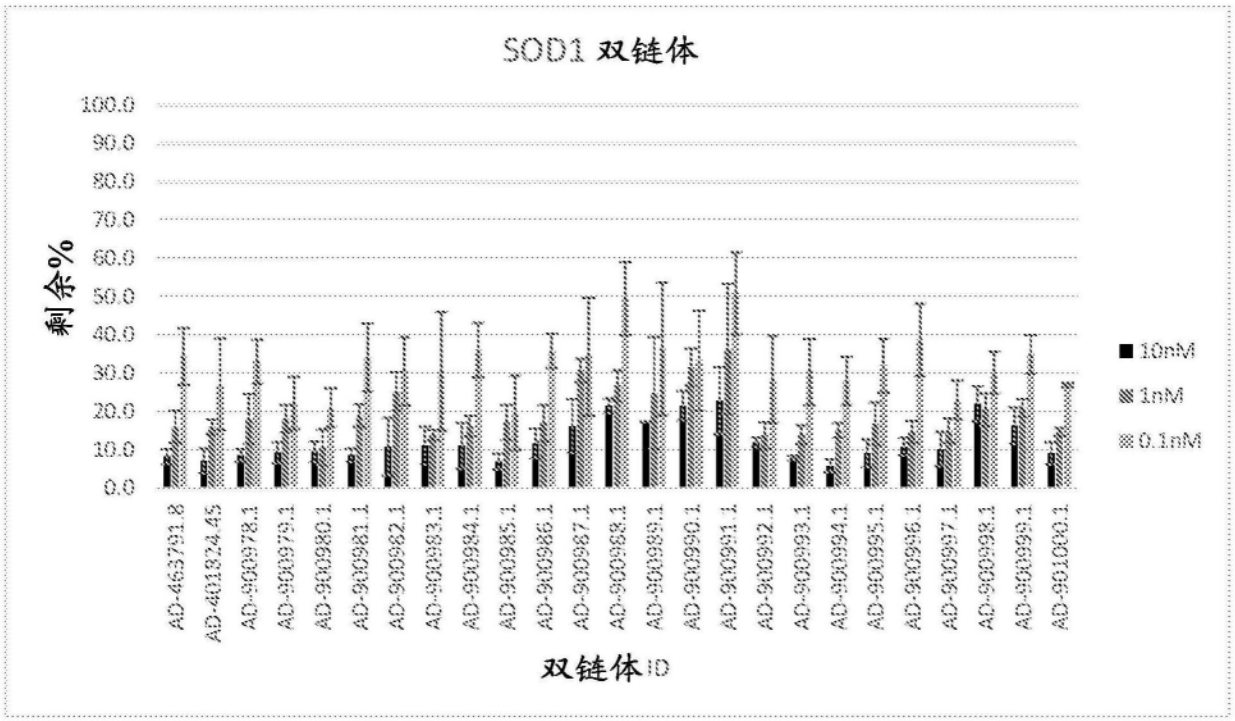

SOD1 双链体
剩余%
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
10nM
1nM
0.1nM
AD-463791.8
AD-401824.45
AD-900978.1
AD-900979.1
AD-900980.1
AD-900981.1
AD-900982.1
AD-900983.1
AD-900984.1
AD-900985.1
AD-900986.1
AD-900987.1
AD-900988.1
AD-900989.1
AD-900990.1
AD-900991.1
AD-900992.1
AD-900993.1
AD-900994.1
AD-900995.1
AD-900996.1
AD-900997.1
AD-900998.1
AD-900999.1
AD-901000.1
双链体ID

图17

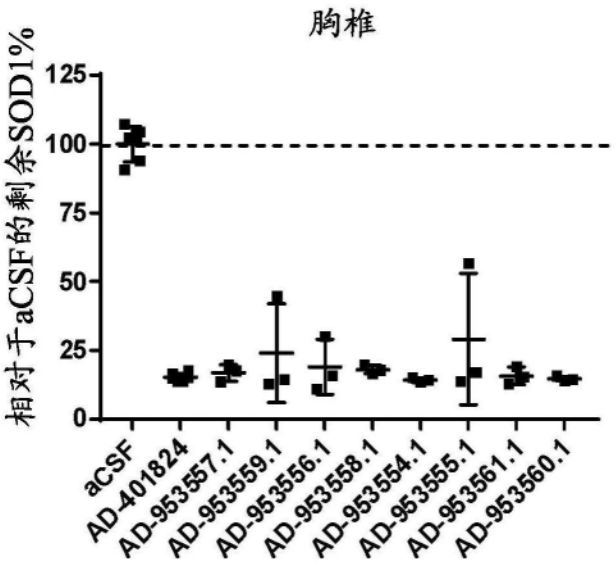

胸椎
相对于aCSF的剩余SOD1%
125
100
75
50
25
0
aCSF
AD-401824
AD-953557.1
AD-953559.1
AD-953556.1
AD-953558.1
AD-953554.1
AD-953555.1
AD-953561.1
AD-953560.1

图18A

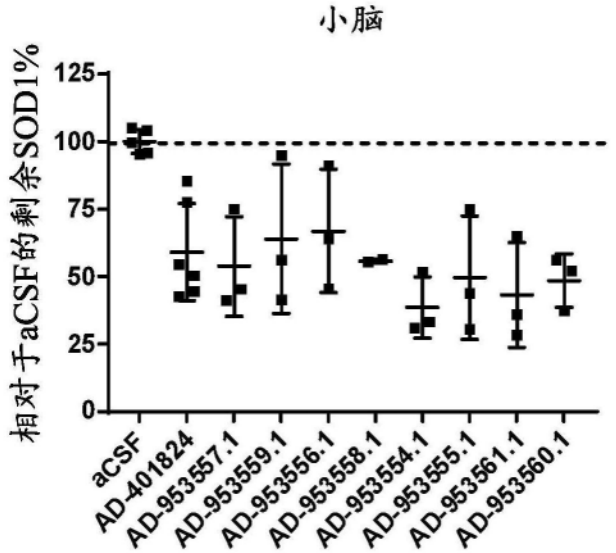

小脑
相对于aCSF的剩余SOD1%
125
100
75
50
25
0
aCSF
AD-401824
AD-953557.1
AD-953559.1
AD-953556.1
AD-953558.1
AD-953554.1
AD-953555.1
AD-953561.1
AD-953560.1

图18B

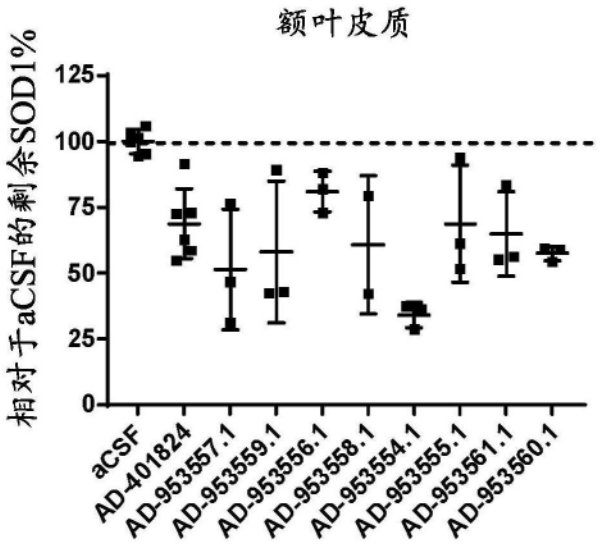

额叶皮质
相对于aCSF的剩余SOD1%
125
100
75
50
25
0
aCSF
AD-401824
AD-953557.1
AD-953559.1
AD-953556.1
AD-953558.1
AD-953554.1
AD-953555.1
AD-953561.1
AD-953560.1

图18C

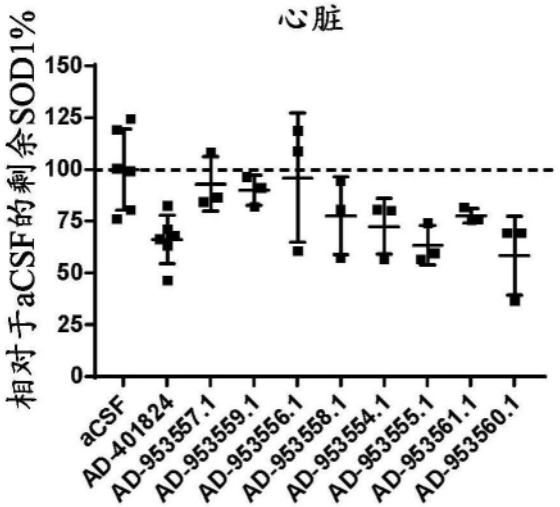

心脏
相对于aCSF的剩余SOD1%
150
125
100
75
50
25
0
aCSF
AD-401824
AD-953557.1
AD-953559.1
AD-953556.1
AD-953558.1
AD-953554.1
AD-953555.1
AD-953561.1
AD-953560.1

图18D

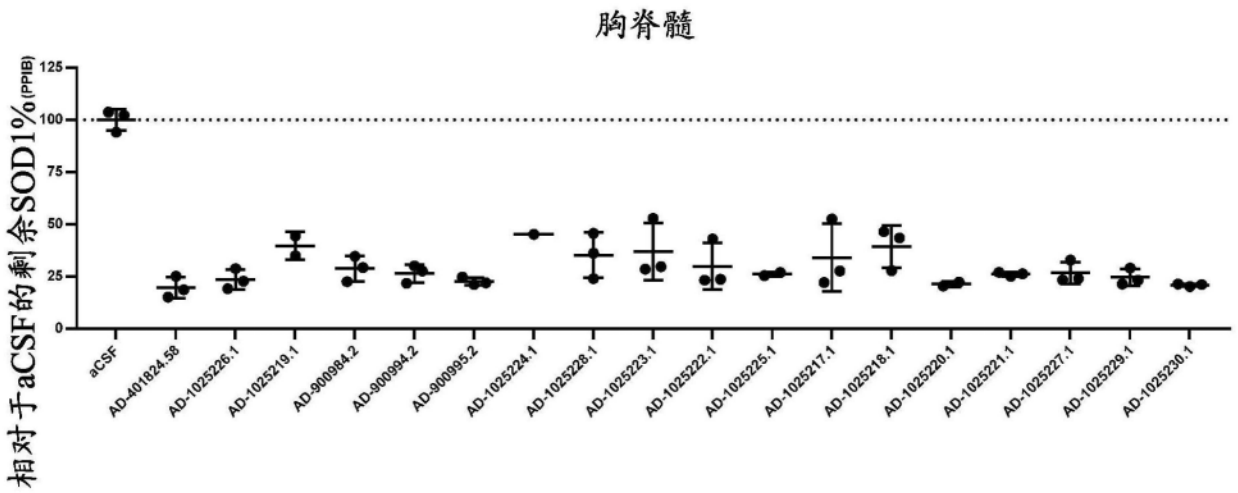

胸脊髓
相对于aCSF的剩余SOD1%(PPIB)
125
100
75
50
25
0
aCSF
AD-401824.58
AD-1025226.1
AD-1025219.1
AD-900984.2
AD-900994.2
AD-900995.2
AD-1025224.1
AD-1025228.1
AD-1025223.1
AD-1025222.1
AD-1025225.1
AD-1025217.1
AD-1025218.1
AD-1025220.1
AD-1025221.1
AD-1025227.1
AD-1025229.1
AD-1025230.1

图19A

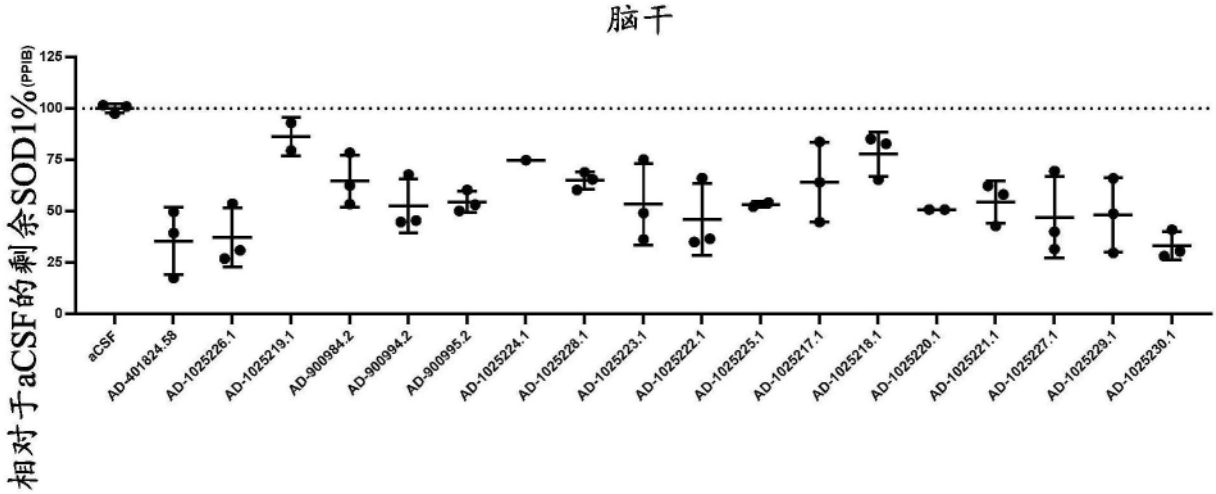

脑干
相对于aCSF的剩余SOD1%(PPIB)
125
100
75
50
25
0
aCSF
AD-401824.58
AD-1025226.1
AD-1025219.1
AD-900984.2
AD-900994.2
AD-900995.2
AD-1025224.1
AD-1025228.1
AD-1025223.1
AD-1025222.1
AD-1025225.1
AD-1025217.1
AD-1025218.1
AD-1025220.1
AD-1025221.1
AD-1025227.1
AD-1025229.1
AD-1025230.1

图19B

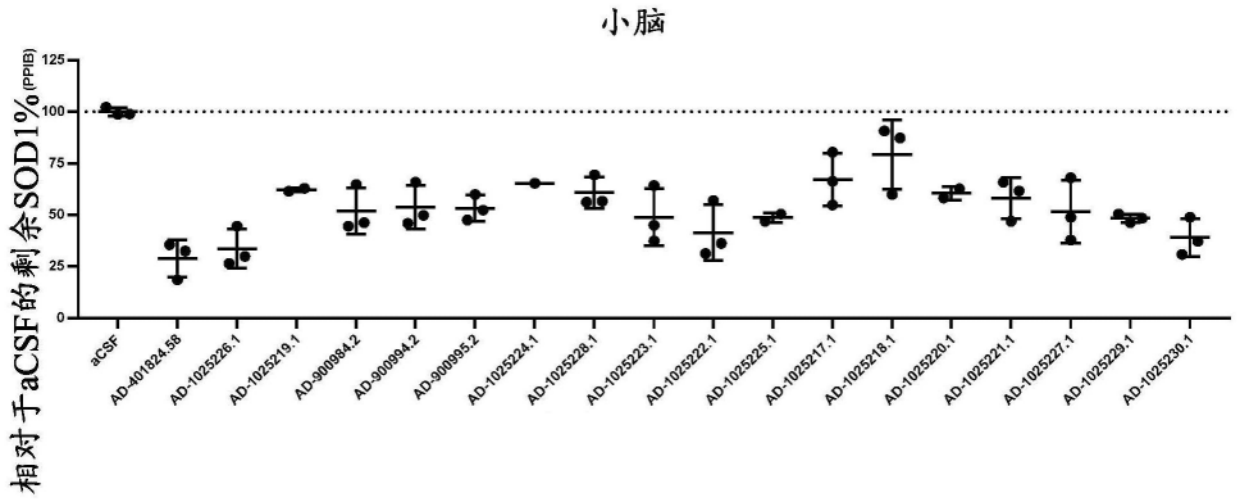

小脑
相对于aCSF的剩余SOD1%(PPIB)
125
100
75
50
25
0
aCSF
AD-401824.58
AD-1025226.1
AD-1025219.1
AD-900984.2
AD-900994.2
AD-900995.2
AD-1025224.1
AD-1025228.1
AD-1025223.1
AD-1025222.1
AD-1025225.1
AD-1025217.1
AD-1025218.1
AD-1025220.1
AD-1025221.1
AD-1025227.1
AD-1025229.1
AD-1025230.1

图19C

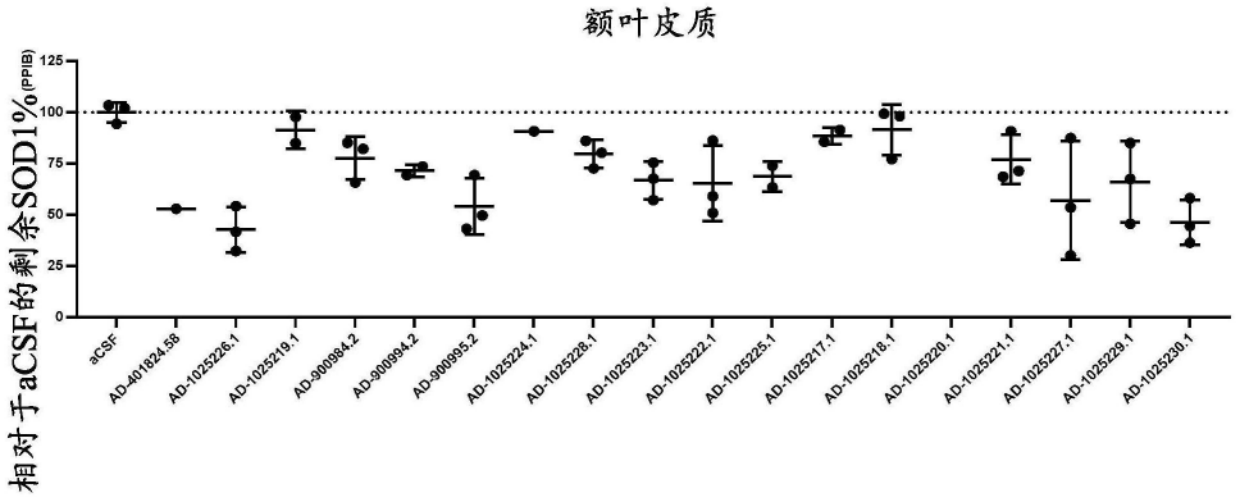

额叶皮质
相对于aCSF的剩余SOD1%(PPIB)
125
100
75
50
25
0
aCSF
AD-401824.58
AD-1025226.1
AD-1025219.1
AD-900984.2
AD-900994.2
AD-900995.2
AD-1025224.1
AD-1025228.1
AD-1025223.1
AD-1025222.1
AD-1025225.1
AD-1025217.1
AD-1025218.1
AD-1025220.1
AD-1025221.1
AD-1025227.1
AD-1025229.1
AD-1025230.1

图19D

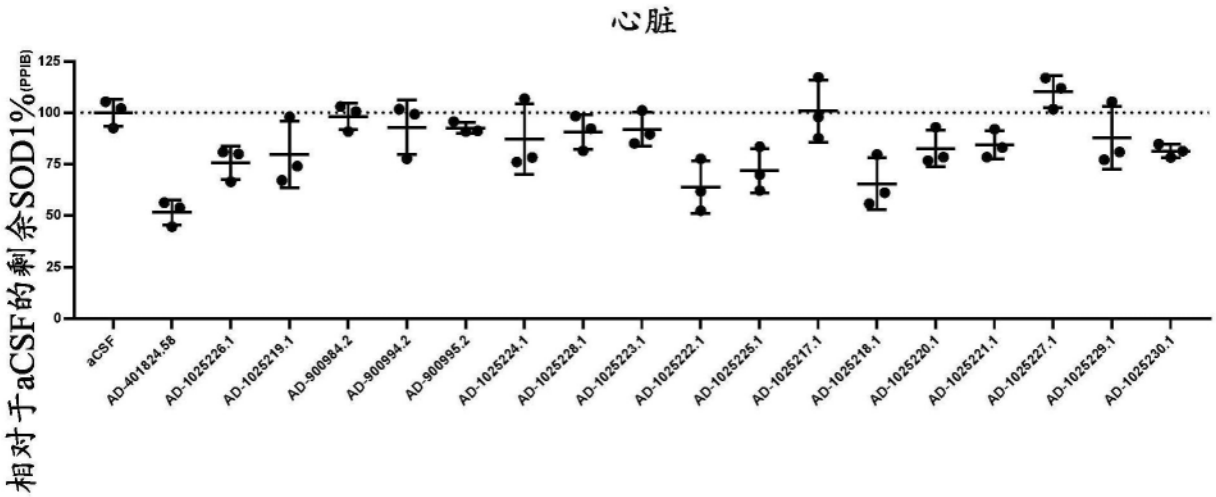

心脏
相对于aCSF的剩余SOD1%(PPIB)
125
100
75
50
25
0
aCSF
AD-401824.58
AD-1025226.1
AD-1025219.1
AD-900984.2
AD-900994.2
AD-900995.2
AD-1025224.1
AD-1025228.1
AD-1025223.1
AD-1025222.1
AD-1025225.1
AD-1025217.1
AD-1025218.1
AD-1025220.1
AD-1025221.1
AD-1025227.1
AD-1025229.1
AD-1025230.1

图19E

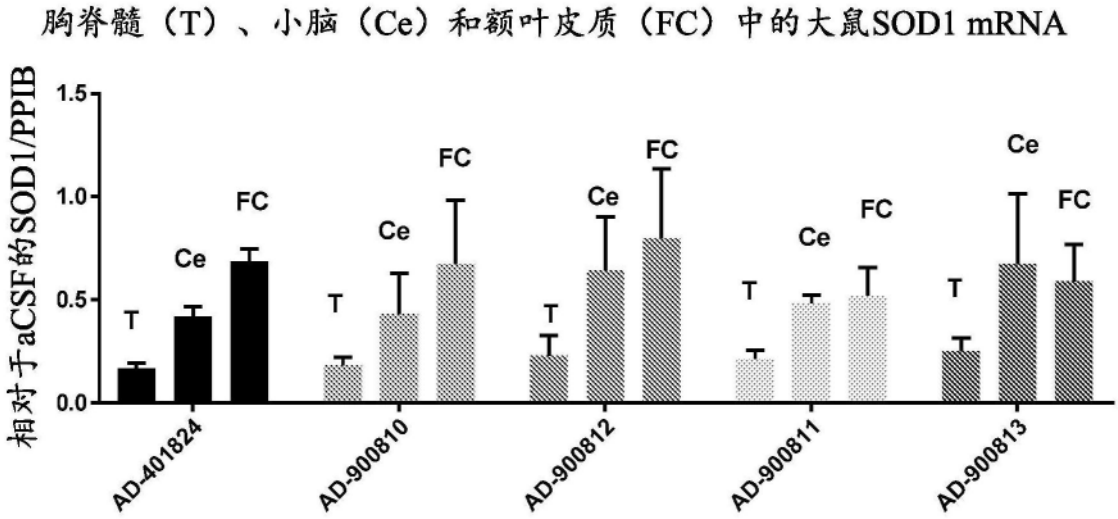

胸脊髓（T）、小脑（Ce）和额叶皮质（FC）中的大鼠SOD1 mRNA
相对于aCSF的SOD1/PPIB
1.5
1.0
0.5
0.0
T
Ce
FC
AD-401824
AD-900810
AD-900812
AD-900811
AD-900813

图20

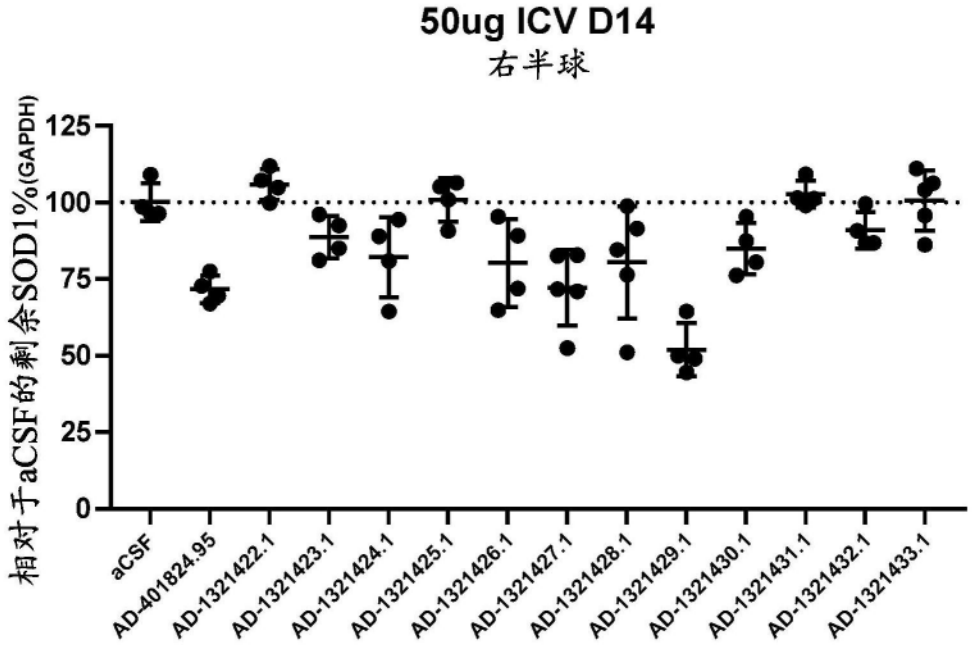

50ug ICV D14
右半球
相对于aCSF的剩余SOD1%(GAPDH)
125
100
75
50
25
0
aCSF
AD-401824.95
AD-1321422.1
AD-1321423.1
AD-1321424.1
AD-1321425.1
AD-1321426.1
AD-1321427.1
AD-1321428.1
AD-1321429.1
AD-1321430.1
AD-1321431.1
AD-1321432.1
AD-1321433.1

图21A

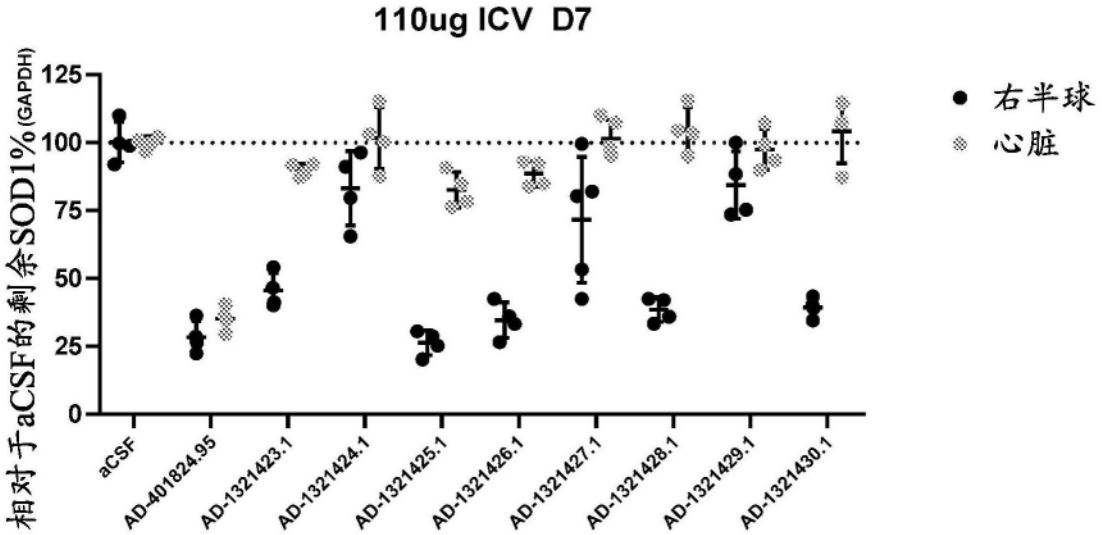

110ug ICV D7
相对于aCSF的剩余SOD1%(GAPDH)
125
100
75
50
25
0
aCSF
AD-401824.95
AD-1321423.1
AD-1321424.1
AD-1321425.1
AD-1321426.1
AD-1321427.1
AD-1321428.1
AD-1321429.1
AD-1321430.1
右半球
心脏

图21B