(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119061010 A
(43)申请公布日 2024.12.03

(21)申请号 202410832977.3
(22)申请日 2019.12.09
(30)优先权数据
62/777677 2018.12.10 US
(62)分案原申请数据
201980081382.6 2019.12.09
(71)申请人 美国安进公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 J·K·默里 B·吴 Y·程 B·J·赫伯瑞奇
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 彭昶
(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2010.01)
A61K 31/713(2006.01)
A61P 31/20(2006.01)
A61P 31/22(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
A61P 31/18(2006.01)

权利要求书6页 说明书57页
序列表（电子公布） 附图10页

(54)发明名称

经化学修饰的RNAi构建体及其用途

(57)摘要

本发明涉及经化学修饰的RNAi构建体及其用途。本发明涉及用于降低靶基因的表达的经化学修饰的RNAi构建体。特别地,本发明涉及并入RNAi构建体以改善体内稳定性和有效性的经修饰的核苷酸的特定模式。还描述了包含该经化学修饰的RNAi构建体的药物组合物和通过施用该经化学修饰的RNAi构建体来抑制体内靶基因表达,例如,以治疗或减轻多种疾病病症的方法。

CN 119061010 A

1.一种抑制靶基因序列的表达的RNAi构建体,该RNAi构建体包含正义链和反义链,其中该反义链包含与该靶基因序列互补的序列并且该正义链包含与该反义链的该序列充分地互补以形成双链体区的序列,其中该RNAi构建体包含由式(A)表示的结构:

$$5'-(N_A)_x\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_F\ N_F\ N_F\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_T(n)_y-3'$$

$$3'-(N_B)_z\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_L\ N_F\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_L-5'$$

(A)

其中:

按5′至3′方向列出的上链是该正义链并且按3′至5′方向列出的下链是该反义链;

每个N_F代表2′-氟修饰的核苷酸;

每个N_M独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、二环核酸(BNA)和脱氧核糖核苷酸;

每个N_L独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

N_T代表选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

x是0至4的整数,条件是当x是1、2、3、或4时,这些N_A核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且这些N_A核苷酸中的一个或多个可以与该反义链中的核苷酸互补;

y是0至4的整数,条件是当y是1、2、3、或4时,一个或多个n核苷酸是不与该反义链中的核苷酸发生碱基配对的经修饰的或未经修饰的突出端核苷酸;并且

z是0至4的整数,条件是当z是1、2、3、或4时,这些N_B核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且当N_A核苷酸存在于该正义链中时,这些N_B核苷酸中的一个或多个可以与N_A核苷酸互补,或者这些N_B核苷酸中的一个或多个可以是不与该正义链中的核苷酸发生碱基配对的突出端核苷酸。

2.如权利要求1所述的RNAi构建体,其中该正义链和该反义链的长度各自独立地为19至30个核苷酸。

3.如权利要求1所述的RNAi构建体,其中该正义链和该反义链的长度各自独立地为19至25个核苷酸。

4.如权利要求1所述的RNAi构建体,其中x是0,y是2,并且z是2。

5.如权利要求1所述的RNAi构建体,其中x是1且N_A是反向无碱基核苷酸,y是2,并且z是2。

6.如权利要求1所述的RNAi构建体,其中x是2,y是0,并且z是4。

7.如权利要求1所述的RNAi构建体,其中x是2,y是0,并且z是2。

8.如权利要求1所述的RNAi构建体,其中x是3且5′端的该N_A是反向无碱基核苷酸,y是0,并且z是4。

9.如权利要求1所述的RNAi构建体,其中x是0,y是0,并且z是2。

10.如权利要求1所述的RNAi构建体,其中x是1且N_A是反向无碱基核苷酸,y是0,并且z是2。

11.如权利要求1至10中任一项所述的RNAi构建体,其中N_T是反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸或2′-O-甲基修饰的核苷酸。

12.如权利要求1至11中任一项所述的RNAi构建体,其中该正义链和反义链两者中的每个N_L均是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

13.如权利要求1至12中任一项所述的RNAi构建体,其中在从5′端开始计数的该反义链中的位置4和12处的该N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。

14.如权利要求13所述的RNAi构建体,其中在从5′端开始计数的该反义链中的位置6处的该N_M是2′-氟修饰的核苷酸。

15.如权利要求14所述的RNAi构建体,其中在从5′端开始计数的该反义链中的位置10处的该N_M是2′-氟修饰的核苷酸。

16.如权利要求1至12中任一项所述的RNAi构建体,其中在从5′端开始计数的该反义链中的位置10和12处的该N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。

17.如权利要求16所述的RNAi构建体,其中在从5′端开始计数的该反义链中的位置4处的该N_M是2′-氟修饰的核苷酸。

18.如权利要求1至12中任一项所述的RNAi构建体,其中在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6和10处的该N_M是2′-O-甲基修饰的核苷酸,并且在从5′端开始计数的该反义链中的位置12处的该N_M是2′-氟修饰的核苷酸。

19.如权利要求1至12中任一项所述的RNAi构建体,其中该正义链和反义链两者中的每个N_M均是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

20.如权利要求1至18中任一项所述的RNAi构建体,其中该正义链中的每个N_M是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

21.如权利要求1至18中任一项所述的RNAi构建体,其中该正义链中的每个N_M是2′-氟修饰的核苷酸。

22.一种抑制靶基因序列的表达的RNAi构建体,该RNAi构建体包含正义链和反义链,其中该反义链包含与该靶基因序列互补的序列并且该正义链包含与该反义链的该序列充分地互补以形成双链体区的序列,其中该RNAi构建体包含由式(B)表示的结构:

$$5'\text{-}(N_A)_x\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_F\ N_F\ N_F\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_T(n)_y\text{-}3'$$

$$3'\text{-}(N_B)_z\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_F\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_L\text{-}5'$$

(B)

其中:

按5′至3′方向列出的上链是该正义链并且按3′至5′方向列出的下链是该反义链;

每个N_F代表2′-氟修饰的核苷酸;

每个N_L独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖

核苷酸;

N_T代表选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

x是0至4的整数,条件是当x是1、2、3、或4时,这些N_A核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且这些N_A核苷酸中的一个或多个可以与该反义链中的核苷酸互补;

y是0至4的整数,条件是当y是1、2、3、或4时,一个或多个n核苷酸是不与该反义链中的核苷酸发生碱基配对的经修饰的或未经修饰的突出端核苷酸;并且

z是0至4的整数,条件是当z是1、2、3、或4时,这些N_B核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且当N_A核苷酸存在于该正义链中时,这些N_B核苷酸中的一个或多个可以与N_A核苷酸互补,或者这些N_B核苷酸中的一个或多个可以是不与该正义链中的核苷酸发生碱基配对的突出端核苷酸。

23.如权利要求22所述的RNAi构建体,其中x是0,y是2,并且z是2。

24.如权利要求22所述的RNAi构建体,其中x是0,y是0,并且z是2。

25.如权利要求22所述的RNAi构建体,其中x是1且N_A是反向无碱基核苷酸,y是2,并且z是2。

26.如权利要求22所述的RNAi构建体,其中x是2,y是0,并且z是4。

27.如权利要求22所述的RNAi构建体,其中x是3且5′端的该N_A是反向无碱基核苷酸,y是0,并且z是4。

28.如权利要求22至27中任一项所述的RNAi构建体,其中N_T是反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸或2′-O-甲基修饰的核苷酸。

29.如权利要求22至28中任一项所述的RNAi构建体,其中该正义链和反义链两者中的每个N_L均是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

30.一种抑制靶基因序列的表达的RNAi构建体,该RNAi构建体包含正义链和反义链,其中该反义链包含与该靶基因序列互补的序列并且该正义链包含与该反义链的该序列充分地互补以形成双链体区的序列,其中该RNAi构建体包含由式(C)表示的结构:

$$5'\text{-}(Ab)_x\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_F\ N_F\ N_F\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_T\text{-}3'$$
$$3'\text{-}N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_L\text{-}5'$$

(C)

其中:

按5′至3′方向列出的上链是该正义链并且按3′至5′方向列出的下链是该反义链;

每个N_F代表2′-氟修饰的核苷酸;

每个N_L独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

每个N_M独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

N_T代表选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;并且

x是0或1且Ab是反向无碱基核苷酸。

31.如权利要求30所述的RNAi构建体,其中该正义链和反义链两者中的每个N_M均是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

32.如权利要求31所述的RNAi构建体,其中N_T是反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸并且x是0。

33.如权利要求31所述的RNAi构建体,其中N_T是2′-O-甲基修饰的核苷酸并且x是1。

34.如权利要求30所述的RNAi构建体,其中该反义链中的该N_M是2′-氟修饰的核苷酸。

35.如权利要求34所述的RNAi构建体,其中该正义链中的每个N_M是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

36.如权利要求34所述的RNAi构建体,其中该正义链中的每个N_M是2′-氟修饰的核苷酸。

37.如权利要求34至36中任一项所述的RNAi构建体,其中N_T是反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸并且x是0。

38.如权利要求30至37中任一项所述的RNAi构建体,其中该正义链和反义链两者中的每个N_L均是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

39.一种抑制靶基因序列的表达的RNAi构建体,该RNAi构建体包含正义链和反义链,其中该反义链包含与该靶基因序列互补的序列并且该正义链包含与该反义链的该序列充分地互补以形成双链体区的序列,其中该RNAi构建体包含由式(D)表示的结构:

$$5'\text{-}(N_A)_x\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_F\ N_F\ N_F\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_T(n)_y\text{-}3'$$
$$3'\text{-}(N_B)_z\ N_L\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_L\ N_M\ N_L\ N_L\ N_M\ N_M\ N_M\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_L\text{-}5'$$

(D)

其中:

按5′至3′方向列出的上链是该正义链并且按3′至5′方向列出的下链是该反义链;

每个N_F代表2′-氟修饰的核苷酸;

每个N_M独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、二环核酸(BNA)和脱氧核糖核苷酸;

每个N_L独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

N_T代表选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

x是0至4的整数,条件是当x是1、2、3、或4时,这些N_A核苷酸中的一个或多个是独立地选

自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且这些N_A核苷酸中的一个或多个可以与该反义链中的核苷酸互补;

y是0至4的整数,条件是当y是1、2、3、或4时,一个或多个n核苷酸是不与该反义链中的核苷酸发生碱基配对的经修饰的或未经修饰的突出端核苷酸;并且

z是0至4的整数,条件是当z是1、2、3、或4时,这些N_B核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且当N_A核苷酸存在于该正义链中时,这些N_B核苷酸中的一个或多个可以与N_A核苷酸互补,或者这些N_B核苷酸中的一个或多个可以是不与该正义链中的核苷酸发生碱基配对的突出端核苷酸。

40.如权利要求39所述的RNAi构建体,其中该正义链和该反义链的长度各自独立地为19至30个核苷酸。

41.如权利要求39所述的RNAi构建体,其中该正义链和该反义链的长度各自独立地为19至25个核苷酸。

42.如权利要求39所述的RNAi构建体,其中x是2,y是0,并且z是4。

43.如权利要求39所述的RNAi构建体,其中x是1且N_A是反向无碱基核苷酸,y是2,并且z是2。

44.如权利要求39所述的RNAi构建体,其中x是1且N_A是反向无碱基核苷酸,y是0,并且z是2。

45.如权利要求39所述的RNAi构建体,其中x是0,y是0,并且z是2。

46.如权利要求39所述的RNAi构建体,其中x是2,y是0,并且z是2。

47.如权利要求39至46中任一项所述的RNAi构建体,其中N_T是反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸或2′-O-甲基修饰的核苷酸。

48.如权利要求39至47中任一项所述的RNAi构建体,其中该正义链和反义链两者中的每个N_L均是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

49.如权利要求39至48中任一项所述的RNAi构建体,其中在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6、8、9和16处的该N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸并且在从5′端开始计数的该反义链中的位置7和12处的N_M各自为2′-O-甲基修饰的核苷酸。

50.如权利要求39至48中任一项所述的RNAi构建体,其中在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6、8、9和16处的该N_M各自为2′-O-甲基修饰的核苷酸并且在从5′端开始计数的该反义链中的位置7和12处的N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。

51.如权利要求39至48中任一项所述的RNAi构建体,其中在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6、8、9和12处的该N_M各自为2′-O-甲基修饰的核苷酸并且在从5′端开始计数的该反义链中的位置7和16处的N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。

52.如权利要求39至48中任一项所述的RNAi构建体,其中在从5′端开始计数的该反义链中的位置7、8、9和12处的该N_M各自为2′-O-甲基修饰的核苷酸并且在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6和16处的N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。

53.如权利要求39至52中任一项所述的RNAi构建体,其中该正义链中的该N_M是2′-氟修

饰的核苷酸。

54.如权利要求39至52中任一项所述的RNAi构建体,其中该正义链中的该N_M是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

55.如权利要求1至54中任一项所述的RNAi构建体,其中该正义链、该反义链或该正义链和反义链两者包含一个或多个硫代磷酸酯核苷酸间键。

56.如权利要求55所述的RNAi构建体,其中该反义链在3′端和5′端两者的末端核苷酸之间包含两个连续的硫代磷酸酯核苷酸间键。

57.如权利要求55或56所述的RNAi构建体,其中该正义链在3′端的末端核苷酸之间包含单个硫代磷酸酯核苷酸间键。

58.如权利要求55或56所述的RNAi构建体,其中该正义链在3′端的末端核苷酸之间包含两个连续的硫代磷酸酯核苷酸间键。

59.如权利要求1至58中任一项所述的RNAi构建体,其中该RNAi构建体进一步包含配体。

60.如权利要求59所述的RNAi构建体,其中该配体包含胆固醇部分、维生素、类固醇、胆汁酸、叶酸部分、脂肪酸、碳水化合物、糖苷、抗体或其抗原结合片段。

61.如权利要求59所述的RNAi构建体,其中该配体靶向RNAi构建体向肝细胞的递送。

62.如权利要求59所述的RNAi构建体,其中该配体包含半乳糖、半乳糖胺、或N-乙酰基-半乳糖胺。

63.如权利要求62所述的RNAi构建体,其中该配体包含多价半乳糖部分或多价N-乙酰基-半乳糖胺部分。

64.如权利要求63所述的RNAi构建体,其中该多价半乳糖部分或多价N-乙酰基-半乳糖胺部分是三价或四价的。

65.如权利要求59至64中任一项所述的RNAi构建体,其中该配体任选地通过接头共价附接至该正义链。

66.如权利要求65所述的RNAi构建体,其中将该配体共价附接至该正义链的5′端。

67.一种药物组合物,该药物组合物包含如权利要求1至66中任一项所述的RNAi构建体,和药学上可接受的载剂或赋形剂。

68.一种用于在细胞中抑制靶基因的表达的方法,该方法包括使该细胞与如权利要求1至66中任一项所述的RNAi构建体接触。

69.如权利要求68所述的方法,其中该细胞是体内的。

70.一种用于在受试者中抑制靶基因的表达的方法,该方法包括向该受试者施用如权利要求1至66中任一项所述的RNAi构建体。

71.如权利要求70所述的方法,其中该RNAi构建体经由肠胃外施用途径施用至该受试者。

经化学修饰的RNAi构建体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年12月10日提交的美国临时申请号62/777,677的权益,将其通过引用以其全部内容并入本文。

[0003] 电子提交的文本文件的说明

[0004] 本申请包含已经以ASCII格式电子提交的序列表,并且将其通过引用以其整体结合在此。2019年12月9日创建的序列表的计算机可读格式副本命名为A-2327-WO-PCT_SeqList_ST25,并且大小为24.7千字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及用于降低靶基因的体内表达的经化学修饰的RNAi构建体。特别地,本发明涉及在体内赋予RNAi构建体改善的功效和稳定性的经修饰的核苷酸的特定模式。这类RNAi构建体可用于抑制靶基因表达以达到治疗目的。

背景技术

[0006] RNA干扰(RNAi)是在几乎所有门中都发现的转录后基因沉默机制并且被认为是进化保守的细胞防御机制(Fire等人,Nature[自然],第391卷;806-811,1998;Fire等人,Trends Genet[遗传学趋势],第15卷:358-363,1999;以及Hamilton和Baulcombe,Science[科学],第286卷,950-952,1999)。在生理学上,RNAi机制是由Dicer酶介导的来自更长的非编码RNA的18-25个碱基对的双链体的产生来启动。将这些短RNA分子加载到RNA诱导的沉默复合体(RISC)中,其中将正义链或过客链丢弃,并且将反义链或引导链与完全或部分互补的mRNA序列杂交(Nakanishi,Wiley Interdiscip.Rev.RNA[威利跨学科评论RNA],第7卷:637-660,2016)。然后经由Ago2介导的降解或翻译抑制来诱导mRNA的沉默(Bobbin和Rossi,Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.[药理学与毒理学年度评论],第56卷:103-122,2016)。

[0007] RNAi技术和递送方法的进展已导致基于RNAi的疗法的越来越多的积极结果。这类疗法代表一类有前途的治疗剂,尤其是针对被小分子或生物学方法认为是“无成药性”的靶标。尽管已经通过化学修饰发展和改进的递送方法在克服天然RNA的固有代谢问题方面取得了极大进展,但是在本领域中仍然需要适用于治疗目的施用的具有增强的体内功效和稳定性的RNAi药剂。

发明内容

[0008] 本发明部分基于用于RNAi构建体的化学修饰模式的设计,其改善了构建体的体内基因沉默活性的效力和/或持续时间。本文所述的修饰模式可普遍应用于具有不同序列和靶标的多种RNAi构建体。RNAi构建体可用于抑制体内靶基因表达,例如以达到治疗目的。

[0009] 因此,本发明提供了抑制靶基因序列的表达的RNAi构建体,其中这些RNAi构建体包含正义链和反义链,其中该反义链包含与靶基因序列互补的序列并且该正义链包含与该反义链的该序列充分地互补以形成双链体区的序列,其中这些RNAi构建体包含由本文所述

的式中的任一种表示的结构。在某些实施例中,本发明的RNAi构建体具有选自指定为如本文所述的P1至P30的模式中的一种的化学修饰模式。

[0010] 在一些实施例中,该RNAi构建体包含由式(A)表示的结构:

$5'-(N_A)_x\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_F\ N_F\ N_F\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_T(n)_y-3'$

[0011] $3'-(N_B)_z\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_L\ N_F\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_L-5'$

(A)

[0012] 在式(A)中,按5′至3′方向列出的上链是该正义链并且按3′至5′方向列出的下链是该反义链;每个N_F代表2′-氟修饰的核苷酸;每个N_M独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、二环核酸(BNA)和脱氧核糖核苷酸;每个N_L独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;并且N_T代表选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸。X可以是0至4的整数,条件是当x是1、2、3、或4时,这些N_A核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸。这些N_A核苷酸中的一个或多个可以与该反义链中的核苷酸互补。Y可以是0至4的整数,条件是当y是1、2、3、或4时,一个或多个n核苷酸是不与该反义链中的核苷酸发生碱基配对的经修饰的或未经修饰的突出端核苷酸。Z可以是0至4的整数,条件是当z是1、2、3、或4时,这些N_B核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸。这些N_B核苷酸中的一个或多个可以与N_A核苷酸互补(当N_A核苷酸存在于该正义链中时),或者可以是不与该正义链中的核苷酸发生碱基配对的突出端核苷酸。

[0013] 在一些实施例中,该RNAi构建体包含长度为19-23个核苷酸的正义链和长度为19-23个核苷酸是反义链,其中该反义链和正义链的序列彼此充分互补以形成19-21个碱基对的双链体区,其中:在反义链(从5′端开始计数)的位置2、7、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置8至11和13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;并且正义链或反义链均不具有超过7个的总的2′-氟修饰的核苷酸。RNAi构建体在正义链和反义链的3′端中的一个或两个处可以具有核苷酸突出端。在某些实施例中,RNAi构建体在反义链的3′端具有核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0014] 在本发明的其他实施例中,该RNAi构建体包含由式(D)表示的结构:

$5'-(N_A)_x\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_F\ N_F\ N_F\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_T(n)_y-3'$

[0015] $3'-(N_B)_z\ N_L\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_L\ N_M\ N_L\ N_L\ N_M\ N_M\ N_M\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_L-5'$

(D)

[0016] 在式(D)中,按5′至3′方向列出的上链是该正义链并且按3′至5′方向列出的下链

是该反义链;每个N_F代表2′-氟修饰的核苷酸;每个N_M独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;每个N_L独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;并且N_T代表选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸。X可以是0至4的整数,条件是当x是1、2、3、或4时,这些N_A核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸。这些N_A核苷酸中的一个或多个可以与该反义链中的核苷酸互补。Y可以是0至4的整数,条件是当y是1、2、3、或4时,一个或多个n核苷酸是不与该反义链中的核苷酸发生碱基配对的经修饰的或未经修饰的突出端核苷酸。Z可以是0至4的整数,条件是当z是1、2、3、或4时,这些N_B核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸。这些N_B核苷酸中的一个或多个可以与N_A核苷酸互补(当N_A核苷酸存在于该正义链中时),或者可以是不与该正义链中的核苷酸发生碱基配对的突出端核苷酸。

[0017] 在本发明的一些实施例中,该RNAi构建体包含长度为19-23个核苷酸的正义链和长度为19-23个核苷酸是反义链,其中该反义链和正义链的序列彼此充分互补以形成19-21个碱基对的双链体区,其中:在反义链(从5′端开始计数)的位置2、14、和16处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置10至13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;并且正义链或反义链均不具有超过7个的总的2′-氟修饰的核苷酸。RNAi构建体可以在反义链的3′端具有核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。替代性地,RNAi构建体在正义链和反义链的3′端处均可具有核苷酸突出端。

[0018] 本发明的RNAi构建体可以包含至少一个主链修饰,如经修饰的核苷酸间键或核苷间键。在某些实施例中,本文所述的RNAi构建体包含至少一个硫代磷酸酯核苷酸间键。在特定实施例中,硫代磷酸酯核苷酸间键可位于正义链和/或反义链的3′或5′端。

[0019] RNAi构建体可进一步包含配体,以促进RNAi构建体向特定组织或细胞(如肝细胞)的递送或摄取。在一些实施例中,该配体靶向RNAi构建体向肝细胞的递送。在这些和其他实施例中,该配体可以包含半乳糖、半乳糖胺、或N-乙酰基-半乳糖胺(GalNAc)。在某些实施例中,该配体包含多价半乳糖或多价GalNAc部分,如三价或四价半乳糖或GalNAc部分。该配体可以任选地通过接头共价附于RNAi构建体正义链的5′或3′端。在一些实施例中,这些RNAi构建体包含具有根据本文所述的式I至IX中任一项所述的结构的配体和接头。在一个实施例中,这些RNAi构建体包含具有根据式VI的结构的配体和接头。在另一个实施例中,这些RNAi构建体包含具有根据式VII的结构的配体和接头。在又另一个实施例中,这些RNAi构建体包含具有根据式IX的结构的配体和接头。

[0020] 本发明还提供了包含本文所述的RNAi构建体之一和药学上可接受的载剂、赋形剂/或稀释剂的药物组合物。这类药物组合物特别适用于减少或抑制受试者的细胞(例如肝

细胞)中的靶基因的表达,特别是当受试者中的靶基因产物的过表达与病理表型有关时。

[0021] 本发明包括用于减少或抑制细胞、组织或受试者中靶基因的表达的方法。在一个实施例中,这些方法包括将细胞或组织与本文所述的RNAi构建体之一接触。该细胞或组织可以是体外或体内的。在另一个实施例中,这些方法包括向受试者施用本文所述的RNAi构建体之一。可以将RNAi构建体肠胃外(例如静脉内或皮下)施用至受试者。

附图说明

[0022] 图1显示了RNAi构建体化学修饰模式的几个代表性实施例。在每个示意图中,上链代表5′至3′方向的正义链并且下链代表3′至5′方向的反义链。实心黑色圆代表2′-O-甲基(2′-OMe)修饰的核苷酸,条纹环代表2′-氟(2′-F)修饰的核苷酸并且白色环代表反向无碱基核苷酸(invAb)或反向脱氧核糖核苷酸(invdN)。连接圆的浅灰色线代表磷酸二酯键,而连接圆的黑线代表硫代磷酸酯键。黑框表示RNAi构建体内的假定的Ago2切割位点。

[0023] 图2是小鼠肝脏中人PNPLA3变体表达水平的条形图,该小鼠注射了编码人PNPLA3变体的AAV并且用5mg/kg皮下注射指示的具有P1或CM1化学修饰模式的RNAi构建体处理。人PNPLA3表达通过qPCR测量并且报告为相对于媒介物处理的动物的表达水平。在RNAi构建体施用后的第8天显示表达水平。

[0024] 图3是小鼠肝脏中人PNPLA3变体表达水平的条形图,该小鼠注射编码人PNPLA3变体的AAV并且用5mg/kg皮下注射指示的具有P1、P2、P3或P4化学修饰模式的RNAi构建体处理。人PNPLA3表达通过qPCR测量并且报告为相对于媒介物处理的动物的表达水平。在RNAi构建体施用后的第15天显示表达水平。

[0025] 图4A和4B是描绘小鼠中总通量(光子/秒)相对于RNAi构建体注射后的周数的线形图,这些小鼠接受皮下注射媒介物或剂量为1mg/kg(图4A)或3mg/kg(图4B)的具有P9化学修饰模式的RNAi构建体。总通量代表来自荧光素酶报告基因的信号,该荧光素酶报告基因含有与RNAi构建体的序列互补的序列,由小鼠表达。总通量的降低表明荧光素酶报告基因表达的降低。

[0026] 图5是小鼠肝脏中人PNPLA3变体表达水平的条形图,该小鼠注射了编码人PNPLA3变体的AAV并且用3mg/kg皮下注射指示的具有P9(双链体编号7318和8709)、CM2(双链体编号8103)、CM3(双链体编号8104)、或CM4(双链体编号8105)化学修饰模式的RNAi构建体处理。人PNPLA3表达通过qPCR测量并且报告为相对于媒介物处理的动物的表达水平。在RNAi构建体施用后的第28天显示表达水平。

[0027] 图6是用5mg/kg皮下注射指示的ASGR1RNAi构建体处理的小鼠肝脏中小鼠ASGR1表达水平的条形图。小鼠ASGR1表达通过qPCR测量并且报告为通过Gapdh表达水平归一化的表达水平。在RNAi构建体或缓冲液(磷酸盐缓冲盐水,PBS)施用后的第4天、第8天、和第15天显示表达水平。

[0028] 图7是显示在施用0.5mg/kg皮下注射指示的靶向LPA的RNAi构建体的双转基因小鼠中,血清Lp(a)水平相对于基线的百分比变化的线形图。两种RNAi构建体均具有相同的序列并且仅在化学修饰模式中不同;双链体编号3632具有CM1修饰模式并且双链体编号3635具有P1修饰模式。在单次皮下注射RNAi构建体后的第14天(D14)和第28天(D28)显示Lp(a)血清水平百分比变化。

具体实施方式

[0029] 本发明部分基于用于RNAi构建体的化学修饰模式的设计,其在体内通过多种序列和靶标产生有效并且持久的靶基因表达的敲低。与先前描述的具有替代性化学修饰模式的治疗性RNAi药剂相比,本文所述的经化学修饰的RNAi构建体显示在体内基因沉默活性方面具有改善的效力和/或持续时间。本发明的经修饰的RNAi构建体适用于抑制体内靶基因表达,例如,用于治疗或减轻多种疾病病症。因此,本发明提供了抑制靶基因序列的表达的RNAi构建体。

[0030] 如本文使用的,术语"RNAi构建体"是指包含RNA分子的活性剂,当被引入细胞中时该活性剂能够利用RNA干扰机制下调靶基因的表达。RNA干扰是核酸分子以序列特异性方式,例如经过RNA诱导的沉默复合体(RISC)通路,来诱导靶RNA分子(例如信使RNA或mRNA分子)的裂解和降解的过程。在一些实施例中,RNAi构建体包含双链RNA分子,该双链RNA分子包含彼此充分地互补以便杂交形成双链体区的连续核苷酸的两条反向平行链。"杂交(hybridize)"或"杂交(hybridization)"是指互补多核苷酸的配对,典型地是通过在两个多核苷酸中的互补碱基之间的氢键合(例如Watson-Crick氢键合、Hoogsteen氢键合、或反向Hoogsteen氢键合)而配对。包含具有与靶序列(例如靶mRNA)基本上互补的序列的区域的链被称为"反义链"。"正义链"是指包括与反义链的区域基本上互补的区域的链。在一些实施例中,正义链可包含具有与靶序列基本上相同的序列的区域。

[0031] 双链RNA分子可包含针对核糖核苷酸的化学修饰,包括针对核糖核苷酸的核糖、碱基或主链组分的修饰,如本文所述或在本领域中已知的修饰。为了本披露的目的,术语"双链RNA"包括在双链RNA分子(例如siRNA、shRNA等)中所采用的任何这类修饰。

[0032] 如本文使用的,如果包含第一序列的多核苷酸可以在某些条件(如生理条件)下与包含第二序列的多核苷酸杂交形成双链体区,则第一序列与第二序列为"互补"。其他的这类条件可包括本领域技术人员已知的中等或严格的杂交条件。如果包含第一序列碱基对的多核苷酸与包含第二序列的多核苷酸在一个或两个核苷酸序列的整个长度上配对并且没有任何错配,则认为第一序列与第二序列完全地互补(100%互补)。如果一个序列与靶序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、或约99%互补,则该序列与靶序列"基本上互补"。可以通过将第一序列中与第二序列或靶序列中相应位置的碱基为互补的碱基数除以第一序列的总长度来计算互补性百分率。当使两个序列杂交时,如果在30个碱基对双链体区上存在不超过5个、4个、3个或2个的错配,则一个序列也可以说与另一序列基本上互补。通常,如果存在如本文所定义的任何核苷酸突出端,则在确定两个序列之间的互补程度时不考虑这类突出端的序列。举例来说,杂交而形成在各链的3′端具有2个核苷酸突出端的19个碱基对双链体区的、长度为21个核苷酸的正义链与长度为21个核苷酸的反义链将会被认为如本文所使用术语那样完全地互补。

[0033] 在一些实施例中,反义链的区域包含与靶基因序列的区域(例如靶mRNA)完全地互补的序列。在这类实施例中,正义链可包含与反义链的序列完全地互补的序列。在其他的这类实施例中,正义链可包含与反义链的序列基本上互补的序列,例如在由正义链和反义链形成的双链体区中具有1、2、3、4、或5个错配。在某些实施例中,优选的是任何错配发生在末端区内(例如,在链的5'和/或3'端的6、5、4、3、或2个核苷酸内)。在一个实施例中,在由正义链和反义链形成的双链体区中的任何错配发生在反义链的5'端的6、5、4、3、或2个核苷酸

内。

[0034] 在某些实施例中,双链RNA的正义链和反义链可以是两个单独的分子,这两个分子杂交而形成双链体区,否则是未连接的。由两条单独链形成的这类双链RNA分子被称为“小干扰RNA”或“短干扰RNA”(siRNA)。因此,在一些实施例中,本发明的RNAi构建体包含siRNA。

[0035] 在其他实施例中,杂交而形成双链体区的正义链和反义链可以是单个RNA分子的一部分,即正义链和反义链是单个RNA分子的自我互补区的一部分。在这种情况下,单个RNA分子包含双链体区(也称为茎区)和环区。正义链的3′端经由未配对核苷酸的连续序列而连接至反义链的5′端,这将形成环区。环区典型地具有足够的长度从而允许RNA分子向后折叠到其自身上,使得反义链可以与正义链发生碱基配对而形成双链体区或茎区。环区可以包含约3至约25、约5至约15、或约8至约12个未配对核苷酸。具有至少部分地自我互补区的这类RNA分子被称为“短发夹RNA”(shRNA)。在某些实施例中,本发明的RNAi构建体包含shRNA。单个的至少部分自我互补的RNA分子的长度可以是约40个核苷酸至约100个核苷酸、约45个核苷酸至约85个核苷酸、或约50个核苷酸至约60个核苷酸,并且包含双链体区和环区,各区具有本文所列举的长度。

[0036] 本发明的RNAi构建体包含正义链和反义链,其中反义链包含具有与靶基因序列基本上或完全地互补的序列的区域。靶基因序列通常是指包含多肽的部分或完整编码序列的核酸序列。靶基因序列还可以包括非编码区,如5′或3′非翻译区(UTR)。在某些实施例中,靶基因序列是信使RNA(mRNA)序列。mRNA序列是指编码蛋白质、蛋白质变体或同种型(来自任何物种(例如小鼠、大鼠、非人灵长类动物、人))的任何信使RNA序列,包括剪接变体。在一个实施例中,靶基因序列是编码人蛋白质的mRNA序列。靶基因序列还可以是除mRNA序列以外的RNA序列,如tRNA序列、微RNA序列、或病毒RNA序列。

[0037] RNAi构建体的反义链的区域可以与靶基因序列的至少15个连续核苷酸基本上互补或完全地互补。在一些实施例中,反义链包含与之互补区域的基因序列的靶区域的范围可以为约15至约30个连续核苷酸、约16至约28个连续核苷酸、约18至约26个连续核苷酸、约17至约24个连续核苷酸、约19至约30个连续核苷酸、约19至约25个连续核苷酸、约19至约23个连续核苷酸或约19至约21个连续核苷酸。

[0038] RNAi构建体的正义链典型地包含与反义链的序列充分地互补的序列,使得这两条链在生理条件下杂交而形成双链体区。“双链体区”是指在两个互补或基本上互补的多核苷酸中的区域,这些多核苷酸通过沃森-克里克碱基配对或其他氢键合相互作用而相互形成碱基对,从而在两个多核苷酸之间形成双链体。RNAi构建体的双链体区应具有足够的长度从而允许RNAi构建体进入RNA干扰通路,例如通过使Dicer酶和/或RISC复合体接合。例如,在一些实施例中,双链体区的长度为约15至约30个碱基对。在此范围内的双链体区的其他长度也是合适的,例如约15至约28个碱基对、约15至约26个碱基对、约15至约24个碱基对、约15至约22个碱基对、约17至约28个碱基对、约17至约26个碱基对、约17至约24个碱基对、约17至约23个碱基对、约17至约21个碱基对、约19至约25个碱基对、约19至约23个碱基、或约19至约21个碱基对。在一个实施例中,双链体区的长度为约17至约24个碱基对。在另一个实施例中,双链体区的长度为约19至约21个碱基对。在某些实施例中,双链体区的长度为约19个碱基对。在其他实施例中,双链体区的长度为约21个碱基对。

[0039] 对于正义链和反义链是两个独立分子(例如RNAi构建体包含siRNA)的实施例而

言,正义链和反义链的长度无需与双链体区的长度相同。例如,一条或两条链可能比双链体区更长,并且具有在双链体区侧面的一个或多个未配对核苷酸或错配。因此,在一些实施例中,RNAi构建体包含至少一个核苷酸突出端。如本文使用的,“核苷酸突出端”是指延伸超过在链末端的双链体区的未配对的一个或多个核苷酸。当一条链的3′端延伸超过另一条链的5′端时或者当一条链的5′端延伸超过另一条链的3′端时,典型地形成核苷酸突出端。核苷酸突出端的长度通常是在1与6个核苷酸之间、1与5个核苷酸之间、1与4个核苷酸之间、1与3个核苷酸之间、2与6个核苷酸之间、2与5个核苷酸之间、或2与4个核苷酸之间。在一些实施例中,核苷酸突出端包含1、2、3、4、5或6个核苷酸。在一个特定的实施例中,核苷酸突出端包含1至4个核苷酸。在某些实施例中,核苷酸突出端包含2个核苷酸。在某些其他实施例中,核苷酸突出端包含单个核苷酸。

[0040] 突出端中的核苷酸可以是如本文所述的核糖核苷酸或经修饰的核苷酸。在一些实施例中,突出端中的核苷酸是2′-经修饰的核苷酸(例如2′-氟修饰的核苷酸,2′-O-甲基修饰的核苷酸)脱氧核糖核苷酸、反向核苷酸(例如反向无碱基核苷酸,反向脱氧核糖核苷酸)、或其组合。例如,在一个实施例中,突出端中的核苷酸是脱氧核糖核苷酸,例如脱氧胸苷。在另一个实施例中,突出端中的核苷酸是2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-氟修饰的核苷酸、2′-甲氧基乙基修饰的核苷酸、或其组合。在其他实施例中,突出端包含5′-尿苷-尿苷-3′(5′-UU-3′)二核苷酸。在这类实施例中,UU二核苷酸可以包含核糖核苷酸或经修饰的核苷酸,例如2′-修饰的核苷酸。在其他实施例中,突出端包含5’-脱氧胸苷-脱氧胸苷-3’(5’-dTdT-3’)二核苷酸。当核苷酸突出端存在于反义链中时,突出端中的核苷酸可以与靶基因序列互补,形成与靶基因序列的错配或包含一些其他序列(例如聚嘧啶或聚嘌呤序列,如UU、TT、AA、GG等)。

[0041] 核苷酸突出端可以在一条或两条链的5′端或3′端。例如,在一个实施例中,RNAi构建体在反义链的5′端和3′端包含核苷酸突出端。在另一个实施例中,RNAi构建体在正义链的5’端和3′端包含核苷酸突出端。在一些实施例中,RNAi构建体在正义链的5’端和反义链的5′端包含核苷酸突出端。在其他实施例中,RNAi构建体在正义链的3′端和反义链的3′端包含核苷酸突出端。

[0042] RNAi构建体可在双链RNA分子的一端包含核苷酸突出端,而在另一端包含平端。“平端”意味着正义链与反义链在分子末端完全地碱基配对,并且不存在延伸超出双链体区的未配对核苷酸。在一些实施例中,RNAi构建体在正义链的3′端包含核苷酸突出端,而在正义链的5′端和反义链的3′端包含平端。在其他实施例中,RNAi构建体在反义链的3′端包含核苷酸突出端,而在反义链的5′端和正义链的3′端包含平端。在某些实施例中,RNAi构建体在双链RNA分子的两端包含平端。在这类实施例中,正义链和反义链具有相同的长度,并且双链体区的长度与正义链和反义链相同(即该分子在其整个长度上是双链的)。

[0043] 本发明的RNAi构建体中的正义链和反义链可以各自独立地为约15至约30个核苷酸的长度、约19至约30个核苷酸的长度、约18至约28个核苷酸的长度、约19至约27个核苷酸的长度、约19至约25个核苷酸的长度、约19至约23个核苷酸的长度、约19至约21个核苷酸的长度、约21至约25个核苷酸的长度、或约21至约23个核苷酸的长度。在某些实施例中,正义链和反义链的长度各自独立地为约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、或约25个核苷酸。在一些实施例中,正义链和反义链具有相同的长度,但形成比这些链更短的双链体区,

使得RNAi构建体具有两个核苷酸突出端。例如,在一个实施例中,RNAi构建体包含(i)长度各自为21个核苷酸的正义链和反义链、(ii)长度为19个碱基对的双链体区、和(iii)具有在正义链的3′端和反义链的3′端的2个未配对核苷酸的核苷酸突出端。在另一个实施例中,RNAi构建体包含(i)长度各自为23个核苷酸的正义链和反义链、(ii)长度为21个碱基对的双链体区、和(iii)具有在正义链的3′端和反义链的3′端的2个未配对核苷酸的核苷酸突出端。在其他实施例中,正义链和反义链具有相同的长度,并且在它们的整个长度上形成双链体区,使得在该双链分子的任一端没有核苷酸突出端。在一个这类实施例中,RNAi构建体是平端的,并且包含(i)正义链和反义链(其中每条链的长度为21个核苷酸)、和(ii)长度为21个碱基对的双链体区。在另一个这类实施例中,RNAi构建体是平端的,并且包含(i)正义链和反义链(其中每条链的长度为23个核苷酸)、和(ii)长度为23个碱基对的双链体区。

[0044] 在其他实施例中,正义链或反义链比另一条链更长并且这两条链形成双链体区,该双链体区具有与较短链相等的长度,使得RNAi构建体包含至少一个核苷酸突出端。例如,在一个实施例中,RNAi构建体包含(i)长度为19个核苷酸的正义链、(ii)长度为21个核苷酸的反义链、(iii)长度为19个碱基对的双链体区、和(iv)具有在反义链的3′端的2个未配对核苷酸的核苷酸突出端。在另一个实施例中,RNAi构建体包含(i)长度为21个核苷酸的正义链、(ii)长度为23个核苷酸的反义链、(iii)长度为21个碱基对的双链体区、和(iv)具有在反义链的3′端的2个未配对核苷酸的核苷酸突出端。

[0045] 本发明的RNAi构建体优选地包含经修饰的核苷酸。“经修饰的核苷酸”是指具有针对核苷、核碱基、戊糖环、或磷酸基团的一个或多个经化学修饰的核苷酸。如本文使用的,经修饰的核苷酸不包括含有腺苷单磷酸酯、鸟苷单磷酸酯、尿苷单磷酸酯、和胞苷单磷酸酯的核糖核苷酸。然而,该RNAi构建体可包含经修饰的核苷酸和核糖核苷酸的组合。将经修饰的核苷酸并入双链RNA分子的一条或两条链中,可以例如通过降低分子对核酸酶和其他降解过程的敏感性来改善RNA分子的体内稳定性。RNAi构建体降低靶基因表达的效力也可通过并入经修饰的核苷酸(特别是以如本文中更详细的描述的特定模式并入)得以增强。

[0046] 在某些实施例中,经修饰的核苷酸具有核糖的修饰。这些糖修饰可以包括在戊糖环的2′和/或5′位置的修饰、以及二环糖修饰。2′-修饰的核苷酸是指具有戊糖环的核苷酸,该戊糖环在2′位置具有除OH以外的取代基。这类2′-修饰包括,但不限于,2′-H(例如脱氧核糖核苷酸)、2′-O-烷基(例如O-C_1-C_{10}或O-C_1-C_{10}经取代的烷基)、2′-O-烯丙基(O-CH_2CH=CH_2)、2′-C-烯丙基、2’-脱氧-2’-氟(也称为2’-F或2′-氟)、2′-O-甲基(OCH_3)、2′-O-甲氧基乙基(O-(CH_2)$_2$OCH_3)、2′-OCF_3、2′-O(CH_2)$_2$SCH_3、2′-O-氨基烷基、2′-氨基(例如NH_2)、2′-O-乙胺和2′-叠氮基。在戊糖环的5′位置的修饰包括但不限于:5′-甲基(R或S);5′-乙烯基、和5′-甲氧基。

[0047] “二环糖修饰”是指戊糖环的修饰,其中桥将环的两个原子连接而形成第二环从而得到二环糖结构。在一些实施例中,二环糖修饰包含在戊糖环的4′和2′碳之间的桥。包含具有二环糖修饰的糖部分的核苷酸在本文中被称为二环核酸或BNA。示例性的二环糖修饰包括但不限于α-L-亚甲基氧基(4′-CH_2—O-2′)二环核酸(BNA);β-D-亚甲基氧基(4′-CH_2—O-2′)BNA(也称为锁核酸或LNA);乙烯氧基(4′-(CH_2)$_2$—O-2′)BNA;氨基氧基(4′-CH_2—O—N(R)-2′)BNA;氧基氨基(4′-CH_2—N(R)—O-2′)BNA;甲基(亚甲基氧基)(4′-CH(CH_3)—O-2′)BNA(也称为受限乙基或cEt);亚甲基-硫基(4′-CH_2—S-2′)BNA;亚甲基-氨基(4′-CH_2-N(R)-

2′)BNA;甲基碳环(4′-CH_2—CH(CH_3)-2′)BNA;丙烯碳环(4′-$(CH_2)_3$-2′)BNA;和甲氧基(乙烯氧基)(4′-CH(CH_2OMe)-O-2′)BNA(也称为受限MOE或cMOE)。可以并入本发明RNAi构建体中的这些和其他糖修饰核苷酸在美国专利号9,181,551、美国专利公开号2016/0122761及Deleavey和Damha,Chemistry and Biology[化学与生物学],第19卷:937-954,2012年中有描述,这些的全部特此通过引用以其全文并入。

[0048] 在一些实施例中,RNAi构建体包含一个或多个2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、二环核酸(BNA)、脱氧核糖核苷酸、或其组合。在某些实施例中,RNAi构建体包含一个或多个2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、或其组合。在某些实施例中,RNAi构建体包含一个或多个2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、或其组合。

[0049] RNAi构建体的正义链和反义链两者均可以包含一个或多个经修饰的核苷酸。例如,在一些实施例中,正义链包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个经修饰的核苷酸。在某些实施例中,正义链中的所有核苷酸都是经修饰的核苷酸。在一些实施例中,反义链包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个经修饰的核苷酸。在其他实施例中,反义链中的所有核苷酸都是经修饰的核苷酸。在某些其他实施例中,正义链中的所有核苷酸和反义链中的所有核苷酸都是经修饰的核苷酸。在这些和其他实施例中,经修饰的核苷酸可以是2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、或其组合。

[0050] 在某些实施例中,并入本发明RNAi构建体的一条或两条链中的经修饰的核苷酸具有核碱基(在本文中也称为“碱基”)的修饰。“经修饰的核碱基”或“经修饰的碱基”是指除天然存在的嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)和嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)以外的碱基。经修饰的核碱基可以是合成的或天然存在的修饰,并且包括但不限于通用碱基、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤(X)、次黄嘌呤(I)、2-氨基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤,以及腺嘌呤和鸟嘌呤的其他烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基衍生物和其他烷基衍生物,2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶,5-卤尿嘧啶和胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶,6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代(特别是5-溴)、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及和3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0051] 在一些实施例中,经修饰的碱基是通用碱基。“通用碱基”是指在不改变所得到的双链体区的双螺旋结构的情况下,与RNA和DNA中的全部天然碱基不加选择地形成碱基对的碱基类似物。通用碱基对于本领域技术人员而言是已知的,包括但不限于:肌苷、C-苯基、C-萘基和其他芳香族衍生物、唑酰胺类、和硝基唑衍生物(如3-硝基吡咯、4-硝基吲哚、5-硝基吲哚和6-硝基吲哚)。

[0052] 可以并入本发明RNAi构建体中的其他合适的修饰碱基包括在Herdewijn,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.[反义核酸药物开发],第10卷:297-310,2000和Peacock等人,J.Org.Chem.[有机化学杂志],第76卷:7295-7300,2011中所描述的,这些文献特此通过引用以其全文并入。本领域技术人员众所周知的是,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸

腺嘧啶和尿嘧啶可以被其他核碱基(如上述的经修饰的核碱基)替代,而基本上不改变包含带有这类替代核碱基的核苷酸的多核苷酸的碱基配对性质。

[0053] 在一些实施例中,RNAi构建体的正义链和反义链可以包含一个或多个无碱基核苷酸。"无碱基核苷酸"或"无碱基核苷"是在核糖的1′位置处缺少核碱基的核苷酸或核苷。在某些实施例中,将无碱基核苷酸并入RNAi构建体的正义链和/或反义链的末端。在一个实施例中,正义链在其3′端、其5′端、或其3′和5′端两者处包含作为末端核苷酸的无碱基核苷酸。在另一个实施例中,反义链在其3′端、其5′端、或其3′和5′端两者处包含作为末端核苷酸的无碱基核苷酸。在其中无碱基核苷酸是末端核苷酸的这类实施例中,其可以是反向核苷酸-即通过3′-3′核苷酸间键(当在链的3′端时)或5′-5′核苷酸间键(当在链的5′端时)(不是天然的3′-5′核苷酸间键)与相邻核苷酸连接。无碱基核苷酸也可以包含糖修饰,如以上所述的任何糖修饰。在某些实施例中,无碱基核苷酸包含2′-修饰,如2′-氟修饰、2′-O-甲基修饰、或2′-H(脱氧)修饰。在一个实施例中,无碱基核苷酸包含2′-O-甲基修饰。在另一个实施例中,无碱基核苷酸包含2′-H修饰(即脱氧无碱基核苷酸)。

[0054] 发明人已发现,根据某些模式将经修饰的核苷酸并入RNAi构建体中导致了具有改善的体内基因沉默活性的RNAi构建体。例如,在一个实施例中,本发明的RNAi构建体包含含有彼此充分互补以形成至少15个碱基对的双链体区的序列的正义链和反义链,其中:

[0055] • 在反义链(从5′端开始计数)的位置2、7、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;

[0056] • 在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置8至11和13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;并且

[0057] • 正义链或反义链均不具有超过7个的总的2′-氟修饰的核苷酸。

[0058] 在其他实施例中,本发明的RNAi构建体包含含有彼此充分互补以形成至少19个碱基对的双链体区的序列的正义链和反义链,其中:

[0059] • 在反义链(从5′端开始计数)的位置2、7、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸,位置4、6、10、和12(从5′端开始计数)处的核苷酸任选地是2′-氟修饰的核苷酸,并且反义链中所有其他的核苷酸是除2′-氟修饰的核苷酸之外的经修饰的核苷酸;并且

[0060] • 在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置8至11和13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸,在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置3和5配对的位置处的核苷酸任选地是2′-氟修饰的核苷酸;且正义链中的所有其他核苷酸是除2′-氟修饰的核苷酸之外的经修饰的核苷酸。

[0061] 在这类实施例中,除2′-氟修饰的核苷酸之外的经修饰的核苷酸可以选自2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA、和脱氧核糖核苷酸。在这些和其他实施例中,正义链的3′端、5′端、或3′端和5′端两者处的末端核苷酸可以是无碱基核苷酸或脱氧核糖核苷酸。在这类实施例中,无碱基核苷酸或脱氧核糖核苷酸可以是反向的-即通过3′-3′核苷酸间键(当在链的3′端时)或5′-5′核苷酸间键(当在链的5′端时)(不是天然的3′-5′核苷酸间键)与相邻核苷酸连接。

[0062] 在上述任何实施例中,在反义链(从5′端开始计数)的位置2、7、12、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸。在其他实施例中,在反义链(从5′端开始计数)的位置2、4、7、12、

和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸。在又其他实施例中,在反义链(从5′端开始计数)的位置2、4、6、7、12、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸。在仍其他实施例中,在反义链(从5′端开始计数)的位置2、4、6、7、10、12、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸。在替代性实施例中,在反义链(从5′端开始计数)的位置2、7、10、12、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸。在某些其他实施例中,在反义链(从5′端开始计数)的位置2、4、7、10、12、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸。

[0063] 在上述任何实施例中,在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置3、8至11和13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸。在一些实施例中,在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置5、8至11和13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸。在其他实施例中,在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置3、5、8至11和13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸。

[0064] 在本发明的某些实施例中,RNAi构建体包含正义链和反义链,其中该反义链包含与靶基因序列互补的序列并且该正义链包含与该反义链的该序列充分地互补以形成双链体区的序列,其中该RNAi构建体包含由式(A)表示的结构:

[0065] $5'-(N_A)_x\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_F\ N_F\ N_F\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_T(n)_y-3'$

$3'-(N_B)_z\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_L\ N_F\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_L-5'$

(A)

[0066] 其中:

[0067] 按5′至3′方向列出的上链是该正义链并且按3′至5′方向列出的下链是该反义链;

[0068] 每个N_F代表2′-氟修饰的核苷酸;

[0069] 每个N_M独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、二环核酸(BNA)和脱氧核糖核苷酸;

[0070] 每个N_L独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

[0071] N_T代表选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

[0072] x是0至4的整数,条件是当x是1、2、3、或4时,这些N_A核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且这些N_A核苷酸中的一个或多个可以与该反义链中的核苷酸互补;

[0073] y是0至4的整数,条件是当y是1、2、3、或4时,一个或多个n核苷酸是不与该反义链中的核苷酸发生碱基配对的经修饰的或未经修饰的突出端核苷酸;并且

[0074] z是0至4的整数,条件是当z是1、2、3、或4时,这些N_B核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且当N_A核

苷酸存在于该正义链中时,这些N_B核苷酸中的一个或多个可以与N_A核苷酸互补,或者这些N_B核苷酸中的一个或多个可以是不与该正义链中的核苷酸发生碱基配对的突出端核苷酸。

[0075] 在其中RNAi构建体包含由式(A)表示的结构的一些实施例中,在正义链的3′端处有核苷酸突出端-即y是1、2、3、或4。在一个这类实施例中,y是2。在其中在正义链的3′端处有2个核苷酸的突出端(即y是2)的实施例中,x是0并且z是2或x是1并且z是2。在其中RNAi构建体包含由式(A)表示的结构的其他实施例中,RNAi构建体包含在正义链的3′端和反义链的5′端的平端(即y是0)。在其中正义链的3′端处无核苷酸突出端(即y是0)的这类实施例中:(i)x是2并且z是4,(ii)x是3并且z是4,(iii)x是0并且z是2,(iv)x是1并且z是2,或者(v)x是2并且z是2。在其中x大于0的任何实施例中,N_A核苷酸(正义链的5′端的末端核苷酸)可以是反向核苷酸,如反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸。

[0076] 在其中该RNAi构建体包含由式(A)表示的结构的某些实施例中,在从5′端开始计数的该反义链中的位置4和12处的该N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。在其他实施例中,在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6、和12处的该N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。在又其他实施例中,在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6、10、和12处的该N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。在其中该RNAi构建体包含由式(A)表示的结构的替代性实施例中,在从5′端开始计数的该反义链中的位置10和12处的该N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。在相关的实施例中,在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、10、和12处的该N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。在其中该RNAi构建体包含由式(A)表示的结构的其他替代性实施例中,在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6、和10处的该N_M是2′-O-甲基修饰的核苷酸,并且在从5′端开始计数的该反义链中的位置12处的该N_M是2′-氟修饰的核苷酸。在其中RNAi构建体包含由式(A)表示的结构的一些实施例中,正义链中的每个N_M是2′-O-甲基修饰的核苷酸。在其他实施例中,正义链中的每个N_M是2′-氟修饰的核苷酸。在其中RNAi构建体包含由式(A)表示的结构的仍其他实施例中,在正义链和反义链两者中的每个N_M均是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

[0077] 在其中RNAi构建体包含由式(A)表示的结构的上述任何实施例中,在正义链和反义链两者中的每个N_L均可以是2′-O-甲基修饰的核苷酸。在这些实施例和以上所述的任何实施例中,式(A)中的N_T可以是反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、或2′-O-甲基修饰的核苷酸。

[0078] 在本发明的某些实施例中,RNAi构建体包含正义链和反义链,其中该反义链包含与靶基因序列互补的序列并且该正义链包含与该反义链的该序列充分地互补以形成双链体区的序列,其中该RNAi构建体包含由式(B)表示的结构:

[0079] $$5'-(N_A)_x\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_F\ N_F\ N_F\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_T(n)_y-3'$$

$$3'-(N_B)_z\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_F\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_L-5' \quad \text{(B)}$$

[0080] 其中:

[0081] 按5′至3′方向列出的上链是该正义链并且按3′至5′方向列出的下链是该反义链;

[0082] 每个N_F代表2′-氟修饰的核苷酸;

[0083] 每个N_L独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

[0084] N_T代表选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

[0085] x是0至4的整数,条件是当x是1、2、3、或4时,这些N_A核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且这些N_A核苷酸中的一个或多个可以与该反义链中的核苷酸互补;

[0086] y是0至4的整数,条件是当y是1、2、3、或4时,一个或多个n核苷酸是不与该反义链中的核苷酸发生碱基配对的经修饰的或未经修饰的突出端核苷酸;并且

[0087] z是0至4的整数,条件是当z是1、2、3、或4时,这些N_B核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且当N_A核苷酸存在于该正义链中时,这些N_B核苷酸中的一个或多个可以与N_A核苷酸互补,或者这些N_B核苷酸中的一个或多个可以是不与该正义链中的核苷酸发生碱基配对的突出端核苷酸。

[0088] 在其中RNAi构建体包含由式(B)表示的结构的一些实施例中,在正义链的3′端处有核苷酸突出端-即y是1、2、3、或4。在一个这类实施例中,y是2。在其中在正义链的3′端处有2个核苷酸的突出端(即y是2)的实施例中,x是0并且z是2或x是1并且z是2。在其中RNAi构建体包含由式(B)表示的结构的其他实施例中,RNAi构建体包含在正义链的3′端和反义链的5′端的平端(即y是0)。在其中正义链的3′端处无核苷酸突出端(即y是0)的这类实施例中:(i)x是2并且z是4,(ii)x是3并且z是4,(iii)x是0并且z是2,(iv)x是1并且z是2,或者(v)x是2并且z是2。在其中x大于0的任何实施例中,N_A核苷酸(正义链的5′端的末端核苷酸)可以是反向核苷酸,如反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸。

[0089] 在其中RNAi构建体包含由式(B)表示的结构的上述任何实施例中,在正义链和反义链两者中的每个N_L均可以是2′-O-甲基修饰的核苷酸。在这类实施例和以上所述的任何实施例中,式(B)中的N_T可以是反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、或2′-O-甲基修饰的核苷酸。

[0090] 在本发明的一些实施例中,RNAi构建体包含正义链和反义链,其中该反义链包含与靶基因序列互补的序列并且该正义链包含与该反义链的该序列充分地互补以形成双链体区的序列,其中该RNAi构建体包含由式(C)表示的结构:

[0091] $5'\text{-}(Ab)_x\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_F\ N_F\ N_F\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_T\text{-}3'$

$3'\text{-}N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_F\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_F\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_L\text{-}5'$

(C)

[0092] 其中:

[0093] 按5′至3′方向列出的上链是该正义链并且按3′至5′方向列出的下链是该反义链;

[0094] 每个N_F代表2′-氟修饰的核苷酸;

[0095] 每个N_L独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

[0096] 每个N_M独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

[0097] N_T代表选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;以及

[0098] x是0或1且Ab是反向无碱基核苷酸。

[0099] 在其中RNAi构建体包含由式(C)表示的结构的某些实施例中,in the反义链中的N_M是2′-氟修饰的核苷酸。在这些和其他实施例中,正义链中的每个N_M是2′-O-甲基修饰的核苷酸。在替代性实施例中,正义链中的每个N_M是2′-氟修饰的核苷酸。在其中RNAi构建体包含由式(C)表示的结构的一些实施例中,在正义链和反义链两者中的每个N_M均是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

[0100] 在其中RNAi构建体包含由式(C)表示的结构的上述任何实施例中,在正义链和反义链两者中的每个N_L均可以是2′-O-甲基修饰的核苷酸。在这些实施例和以上所述的任何实施例中,式(C)中的N_T可以是反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、或2′-O-甲基修饰的核苷酸。例如,在一个实施例中,N_T是反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸并且x是0。在另一个实施例中,N_T是2′-O-甲基修饰的核苷酸并且x是1。在又另一个实施例中,N_T是反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸并且x是1。

[0101] 在某些实施例中,本发明的RNAi构建体包含正义链和反义链,其中该反义链包含与靶基因序列互补的序列并且该正义链包含与该反义链的该序列充分地互补以形成双链体区的序列,其中该RNAi构建体包含由式(D)表示的结构:

[0102] $5'-(N_A)_x\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_F\ N_F\ N_F\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_L\ N_T(n)_y-3'$

$3'-(N_B)_z\ N_L\ N_L\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_L\ N_M\ N_L\ N_L\ N_M\ N_M\ N_M\ N_M\ N_L\ N_M\ N_L\ N_F\ N_L-5'$

(D)

[0103] 其中:

[0104] 按5′至3′方向列出的上链是该正义链并且按3′至5′方向列出的下链是该反义链;

[0105] 每个N_F代表2′-氟修饰的核苷酸;

[0106] 每个N_M独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、二环核酸(BNA)和脱氧核糖核苷酸;

[0107] 每个N_L独立地代表选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

[0108] N_T代表选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸;

[0109] x是0至4的整数,条件是当x是1、2、3、或4时,这些N_A核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:无碱基核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-

烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且这些N_A核苷酸中的一个或多个可以与该反义链中的核苷酸互补;

[0110] y是0至4的整数,条件是当y是1、2、3、或4时,一个或多个n核苷酸是不与该反义链中的核苷酸发生碱基配对的经修饰的或未经修饰的突出端核苷酸;并且

[0111] z是0至4的整数,条件是当z是1、2、3、或4时,这些N_B核苷酸中的一个或多个是独立地选自以下的经修饰的核苷酸:2′-O-甲基修饰的核苷酸、2′-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2′-O-烷基修饰的核苷酸、2′-O-烯丙基修饰的核苷酸、BNA和脱氧核糖核苷酸,并且当N_A核苷酸存在于该正义链中时,这些N_B核苷酸中的一个或多个可以与N_A核苷酸互补,或者这些N_B核苷酸中的一个或多个可以是不与该正义链中的核苷酸发生碱基配对的突出端核苷酸。

[0112] 在其中RNAi构建体包含由式(D)表示的结构的一些实施例中,在正义链的3′端处有核苷酸突出端-即y是1、2、3、或4。在一个这类实施例中,y是2。在其中在正义链的3′端处有2个核苷酸的突出端(即y是2)的实施例中,x是0并且z是2或x是1并且z是2。在其中RNAi构建体包含由式(D)表示的结构的其他实施例中,RNAi构建体包含在正义链的3′端和反义链的5′端的平端(即y是0)。在其中正义链的3′端处无核苷酸突出端(即y是0)的这类实施例中:(i)x是2并且z是4,(ii)x是3并且z是4,(iii)x是0并且z是2,(iv)x是1并且z是2,或者(v)x是2并且z是2。在其中x大于0的任何实施例中,N_A核苷酸(正义链的5′端的末端核苷酸)可以是反向核苷酸,如反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸。

[0113] 在其中该RNAi构建体包含由式(D)表示的结构的某些实施例中,在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6、8、9和16处的该N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸并且在从5′端开始计数的该反义链中的位置7和12处的N_M各自为2′-O-甲基修饰的核苷酸。在其他实施例中,在从5′端开始计数的该反义链中的位置4和6处的该N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸并且在从5′端开始计数的该反义链中的位置7至9处的N_M各自为2′-O-甲基修饰的核苷酸。在仍其他实施例中,在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6、8、9和16处的该N_M各自为2′-O-甲基修饰的核苷酸并且在从5′端开始计数的该反义链中的位置7和12处的N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。在其中该RNAi构建体包含由式(D)表示的结构的替代性实施例中,在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6、8、9和12处的该N_M各自为2′-O-甲基修饰的核苷酸并且在从5′端开始计数的该反义链中的位置7和16处的N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。在其中该RNAi构建体包含由式(D)表示的结构的某些其他实施例中,在从5′端开始计数的该反义链中的位置7、8、9和12处的该N_M各自为2′-O-甲基修饰的核苷酸并且在从5′端开始计数的该反义链中的位置4、6、和16处的N_M各自为2′-氟修饰的核苷酸。在其中RNAi构建体包含由式(D)表示的结构的这些和其他实施例中,正义链中的N_M是2′-氟修饰的核苷酸。在替代性实施例中,正义链中的N_M是2′-O-甲基修饰的核苷酸。

[0114] 在其中RNAi构建体包含由式(D)表示的结构的上述任何实施例中,在正义链和反义链两者中的每个N_L均可以是2′-O-甲基修饰的核苷酸。在这些实施例和以上所述的任何实施例中,式(D)中的N_T可以是反向无碱基核苷酸、反向脱氧核糖核苷酸、或2′-O-甲基修饰的核苷酸。

[0115] 本发明的RNAi构建体还可包含一个或多个经修饰的核苷酸间键。如本文使用的,术语“经修饰的核苷酸间键”是指除天然3′至5′磷酸二酯键以外的核苷酸间键。在一些实施例中,经修饰的核苷酸间键是含磷的核苷酸间键,如磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、烷基膦

酸酯(例如甲基膦酸酯、3′-亚烷基膦酸酯)、次膦酸酯、氨基磷酸酯(例如3′-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫代磷酸酯(P=S)、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硫代磷酰胺酯、硫代烷基膦酸酯、硫代烷基磷酸三酯、和硼烷磷酸酯。在一个实施例中,经修饰的核苷酸间键是2′至5′磷酸二酯键。在其他实施例中,经修饰的核苷酸间键是不含磷的核苷酸间键,因此可以被称为经修饰的核苷间键。这类不含磷的键包括,但不限于:吗啉基键(morpholino linkage)(部分地由核苷的糖部分形成);硅氧烷键(—O—Si(H)$_2$—O—);硫化物、亚砜和砜键;甲酰基和硫代甲酰基键;含烯烃的主链;氨基磺酸酯主链;亚甲基甲亚氨基(—CH$_2$—N(CH$_3$)—O—CH$_2$—)和亚甲基肼基键;磺酸酯和磺酰胺键;酰胺键;及具有混合的N、O、S和CH$_2$组成部分的其他键。在一个实施例中,经修饰的核苷间键是用于形成肽核酸或PNA的基于肽的键(例如氨基乙基甘氨酸),如在美国专利号5,539,082;5,714,331;和5,719,262中所描述的。可在本发明RNAi构建体中所采用的其他合适的经修饰的核苷酸间键和核苷间键在美国专利号6,693,187、美国专利号9,181,551、美国专利公开号2016/0122761、及Deleavey和Damha,Chemistry and Biology[化学与生物学],第19卷:937-954,2012中有描述,这些文献特此通过引用以其全文并入。

[0116] 在某些实施例中,本发明的RNAi构建体包含一个或多个硫代磷酸酯核苷酸间键。硫代磷酸酯核苷酸间键可存在于RNAi构建体的正义链、反义链、或两种链中。例如,在一些实施例中,正义链包含1、2、3、4、5、6、7、8、或更多个硫代磷酸酯核苷酸间键。在其他实施例中,反义链包含1、2、3、4、5、6、7、8、或更多个硫代磷酸酯核苷酸间键。在仍其他实施例中,两条链均包含1、2、3、4、5、6、7、8、或更多个硫代磷酸酯核苷酸间键。RNAi构建体可以在正义链、反义链、或两条链的3′-端、5′-端、或者3′-和5′-端两者包含一个或多个硫代磷酸酯核苷酸间键。例如,在某些实施例中,RNAi构建体在正义链、反义链、或两条链的3′端包含约1至约6或更多个(例如,约1、2、3、4、5、6或更多个)连续硫代磷酸酯核苷酸间键。在其他实施例中,RNAi构建体在正义链、反义链、或两条链的5’端包含约1至约6或更多个(例如,约1、2、3、4、5、6或更多个)连续硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0117] 在一些实施例中,RNAi构建体包含在正义链的3′端的末端核苷酸之间的单个硫代磷酸酯核苷酸间键。在其他实施例中,RNAi构建体包含在正义链的3′端的末端核苷酸之间的两个连续的硫代磷酸酯核苷酸间键。在一个实施例中,RNAi构建体包含在正义链的3′端的末端核苷酸之间的单个硫代磷酸酯核苷酸间键和在反义链的3′端的末端核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键。在另一个实施例中,RNAi构建体在反义链的3′端的末端核苷酸之间的包含两个连续硫代磷酸酯核苷酸间键(即,在反义链的3′端的第一和第二核苷酸间键处的硫代磷酸酯核苷酸间键)。在另一个实施例中,RNAi构建体在反义链的3′端和5′端两者的末端核苷酸之间均包含两个连续硫代磷酸酯核苷酸间键。在又另一个实施例中,RNAi构建体在反义链的3′端和5′端两者的末端核苷酸之间均包含两个连续硫代磷酸酯核苷酸间键并且在正义链的5′端包含两个连续硫代磷酸酯核苷酸间键。在仍另一个实施例中,RNAi构建体在反义链的3′端和5′端两者的末端核苷酸之间均包含两个连续硫代磷酸酯核苷酸间键,在正义链的3′端末端核苷酸之间包含两个连续硫代磷酸酯核苷酸间键。在另一个实施例中,RNAi构建体在反义链的3′端和5′端两者的末端核苷酸之间均包含两个连续硫代磷酸酯核苷酸间键并且在正义链的3′端和5′端两者的末端核苷酸之间均包含两个连续硫代磷酸酯核苷酸间键(即,在反义链的5′端和3′端两者的第一和第二核苷酸间键处的硫代磷

酸酯核苷酸间键和在正义链的5′端和3′端两者的第一和第二核苷酸间键处的硫代磷酸酯核苷酸间键)。在又另一个实施例中,RNAi构建体在反义链的3′端和5′端两者的末端核苷酸之间均包含两个连续硫代磷酸酯核苷酸间键并且在正义链的3′端末端核苷酸之间包含单个硫代磷酸酯核苷酸间键。在其中一个或两条链包含一个或多个硫代磷酸酯核苷酸间键的任何实施例中,链内的其余核苷酸间键可以是天然的3′至5′磷酸二酯键。例如,在一些实施例中,正义链和反义链的各核苷酸间键选自磷酸二酯和硫代磷酸酯,其中至少一个核苷酸间键是硫代磷酸酯。

[0118] 在其中RNAi构建体包含核苷酸突出端的实施例中,突出端中的两个或更多个未配对核苷酸可以经由硫代磷酸酯核苷酸间键而连接。在某些实施例中,在反义链和/或正义链的3′端的核苷酸突出端中的所有未配对核苷酸是经由硫代磷酸酯核苷酸间键而连接。在其他实施例中,在反义链和/或正义链的5′端的核苷酸突出端中的所有未配对核苷酸是经由硫代磷酸酯核苷酸间键而连接。在仍其他实施例中,在任何核苷酸突出端中的所有未配对核苷酸是经由硫代磷酸酯核苷酸间键而连接。

[0119] 本发明的RNAi构建体可以具有图1中所描绘的化学修饰模式P1至P30中的任一种。例如,在一些实施例中,该RNAi构建体包含长度为19-23个核苷酸的正义链和长度为19-23个核苷酸是反义链,其中该反义链和正义链的序列彼此充分互补以形成19-21个碱基对的双链体区,其中:在反义链(从5′端开始计数)的位置2、7、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置8至11和13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;正义链或反义链均不具有超过7个的总的2′-氟修饰的核苷酸;并且RNAi构建体在正义链和反义链的3′端具有核苷酸突出端。

[0120] 在一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0121] (a)具有以下的正义链:

[0122] (i)21个核苷酸的长度;

[0123] (ii)位置7和9至12处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1至6、8、和13至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0124] (iii)位置19和20处的核苷酸之间和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0125] 和

[0126] (b)具有以下的反义链:

[0127] (i)21个核苷酸的长度;

[0128] (ii)位置2、4、6、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、8至11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0129] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0130] 其中RNAi构建体在正义链的3′端和反义链的3′端处具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端。

[0131] 在另一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0132] (a)具有以下的正义链:

[0133] (i)22个核苷酸的长度;

[0134] (ii)位置1处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸;位置8和10至13处的2′-氟修饰的核苷酸;和位置2至7、9、和14至22处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0135] (iii)位置20和21处的核苷酸之间和位置21和22处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0136] 和

[0137] (b)具有以下的反义链:

[0138] (i)21个核苷酸的长度;

[0139] (ii)位置2、4、6、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、8至11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0140] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0141] 其中RNAi构建体在正义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的3′端具有包含1至2个核苷酸的核苷酸突出端。

[0142] 在另一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0143] (a)具有以下的正义链:

[0144] (i)21个核苷酸的长度;

[0145] (ii)位置7和9至12处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1至6、8、和13至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0146] (iii)位置19和20处的核苷酸之间和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0147] 和

[0148] (b)具有以下的反义链:

[0149] (i)21个核苷酸的长度;

[0150] (ii)位置2、7、10、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8、9、11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0151] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0152] 其中RNAi构建体在正义链的3′端和反义链的3′端处具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端。

[0153] 在又另一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0154] (a)具有以下的正义链:

[0155] (i)21个核苷酸的长度;

[0156] (ii)位置7和9至12处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1至6、8、和13至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0157] (iii)位置19和20处的核苷酸之间和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0158] 和

[0159] (b)具有以下的反义链:

[0160] (i)21个核苷酸的长度;

[0161] (ii)位置2、4、6、7、10、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、8、9、11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0162] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0163] 其中RNAi构建体在正义链的3′端和反义链的3′端处具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端。

[0164] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0165] (a)具有以下的正义链:

[0166] (i)21个核苷酸的长度;

[0167] (ii)位置7和9至12处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1至6、8、和13至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸,以及位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0168] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0169] 和

[0170] (b)具有以下的反义链:

[0171] (i)21个核苷酸的长度;

[0172] (ii)位置2、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8至11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0173] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0174] 其中RNAi构建体在正义链的3′端和反义链的3′端处具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端。

[0175] 在某些实施例中,该RNAi构建体包含长度为19-21个核苷酸的正义链和长度为21-23个核苷酸是反义链,其中该反义链和正义链的序列彼此充分互补以形成19-21个碱基对的双链体区,其中:在反义链(从5′端开始计数)的位置2、7、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置8至11和13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;正义链或反义链均不具有超过7个的总的2′-氟修饰的核苷酸;并且RNAi构建体在反义链的3′端具有核苷酸突出端,而在反义链的5′端/正义链的3′端包含平端。

[0176] 在一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0177] (a)具有以下的正义链:

[0178] (i)21个核苷酸的长度;

[0179] (ii)位置9和11至14处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至8、10、和15至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0180] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0181] 和

[0182] (b)具有以下的反义链:

[0183] (i)23个核苷酸的长度;

[0184] (ii)位置2、4、6、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、8至11、13、和15至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0185] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0186] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0187] 在另一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0188] (a)具有以下的正义链:

[0189] (i)22个核苷酸的长度;

[0190] (ii)位置1处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸;位置10和12至15处的2′-氟修饰的核苷酸;和位置2至9、11、和16至22处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0191] (iii)位置20和21处的核苷酸之间和位置21和22处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0192] 和

[0193] (b)具有以下的反义链:

[0194] (i)23个核苷酸的长度;

[0195] (ii)位置2、4、6、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、8至11、13、和15至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0196] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0197] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含1-2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0198] 在又另一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0199] (a)具有以下的正义链:

[0200] (i)21个核苷酸的长度;

[0201] (ii)位置9和11至14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1至8、10、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0202] (iii)位置19和20处的核苷酸之间和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0203] 和

[0204] (b)具有以下的反义链:

[0205] (i)23个核苷酸的长度;

[0206] (ii)位置2、4、6、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、8至11、13、和15至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0207] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0208] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义

链的5′端具有平端。

[0209] 在仍另一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0210] (a)具有以下的正义链:

[0211] (i)22个核苷酸的长度;

[0212] (ii)位置1和22处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸;位置10和12至15处的2′-氟修饰的核苷酸;和位置2至9、11、和16至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0213] (iii)位置21和22处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键;

[0214] 和

[0215] (b)具有以下的反义链:

[0216] (i)23个核苷酸的长度;

[0217] (ii)位置2、4、6、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、8至11、13、和15至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0218] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0219] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含1-2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0220] 在一个特定的实施例中,RNAi构建体包含:

[0221] (a)具有以下的正义链:

[0222] (i)19个核苷酸的长度;

[0223] (ii)位置7和9至12处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1至6、8、和13至19处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0224] (iii)位置17和18处的核苷酸之间和位置18和19处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0225] 和

[0226] (b)具有以下的反义链:

[0227] (i)21个核苷酸的长度;

[0228] (ii)位置2、4、6、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、8至11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0229] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0230] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0231] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0232] (a)具有以下的正义链:

[0233] (i)19个核苷酸的长度;

[0234] (ii)位置7和9至12处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至6、8、和13至18处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置19处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0235] (iii)位置17和18处的核苷酸之间和位置18和19处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0236] 和

[0237] (b)具有以下的反义链:

[0238] (i)21个核苷酸的长度;

[0239] (ii)位置2、4、6、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、8至11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0240] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0241] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0242] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0243] (a)具有以下的正义链:

[0244] (i)21个核苷酸的长度;

[0245] (ii)位置9和11至14处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至8、10、和15至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0246] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0247] 和

[0248] (b)具有以下的反义链:

[0249] (i)23个核苷酸的长度;

[0250] (ii)位置2、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8至11、13、和15至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0251] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0252] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0253] 在又另一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0254] (a)具有以下的正义链:

[0255] (i)22个核苷酸的长度;

[0256] (ii)位置1处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸;位置10和12至15处的2′-氟修饰的核苷酸;和位置2至9、11、和16至22处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0257] (iii)位置20和21处的核苷酸之间和位置21和22处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键;

[0258] 和

[0259] (b)具有以下的反义链:

[0260] (i)23个核苷酸的长度;

[0261] (ii)位置2、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8至11、13、和15至23

处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0262] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0263] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含1-2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0264] 在仍另一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0265] (a)具有以下的正义链:

[0266] (i)21个核苷酸的长度;

[0267] (ii)位置9和11至14处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至8、10、和15至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0268] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0269] 和

[0270] (b)具有以下的反义链:

[0271] (i)23个核苷酸的长度;

[0272] (ii)位置2、4、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、6、8至11、13、和15至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0273] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0274] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0275] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0276] (a)具有以下的正义链:

[0277] (i)21个核苷酸的长度;

[0278] (ii)位置9、11至14、17、和19处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至8、10、15、16、18和20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0279] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0280] 和

[0281] (b)具有以下的反义链:

[0282] (i)23个核苷酸的长度;

[0283] (ii)位置2、4、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、6、8至11、13、和15至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0284] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0285] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0286] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0287] (a)具有以下的正义链:

[0288] (i)19个核苷酸的长度;

[0289] (ii)位置7和9至12处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至6、8、和13至18处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置19处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0290] (iii)位置18和19处的核苷酸之间和任选地位置17和18处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0291] 和

[0292] (b)具有以下的反义链:

[0293] (i)21个核苷酸的长度;

[0294] (ii)位置2、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8至11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0295] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0296] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0297] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0298] (a)具有以下的正义链:

[0299] (i)21个核苷酸的长度;

[0300] (ii)位置9和11至14处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至8、10、和15至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0301] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0302] 和

[0303] (b)具有以下的反义链:

[0304] (i)23个核苷酸的长度;

[0305] (ii)位置2、4、6、7、10、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、8、9、11、13、和15至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0306] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0307] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0308] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0309] (a)具有以下的正义链:

[0310] (i)21个核苷酸的长度;

[0311] (ii)位置9和11至14处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至8、10、和15至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0312] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0313] 和

[0314] (b)具有以下的反义链:

[0315] (i)23个核苷酸的长度;

[0316] (ii)位置2、7、10、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8、9、11、13、和15至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0317] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0318] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0319] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0320] (a)具有以下的正义链:

[0321] (i)21个核苷酸的长度;

[0322] (ii)位置9、11至14、17、和19处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至8、10、15、16、18、和20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0323] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0324] 和

[0325] (b)具有以下的反义链:

[0326] (i)23个核苷酸的长度;

[0327] (ii)位置2、7、10、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8、9、11、13、和15至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0328] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0329] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0330] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0331] (a)具有以下的正义链:

[0332] (i)21个核苷酸的长度;

[0333] (ii)位置9和11至14处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至8、10、和15至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0334] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0335] 和

[0336] (b)具有以下的反义链:

[0337] (i)23个核苷酸的长度;

[0338] (ii)位置2、4、7、10、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、6、8、9、11、13、和15至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0339] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0340] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义

链的5′端具有平端。

[0341] 在本发明的一些实施例中,该RNAi构建体包含长度为19-23个核苷酸的正义链和长度为19-23个核苷酸是反义链,其中该反义链和正义链的序列彼此充分互补以形成19-21个碱基对的双链体区,其中:在反义链(从5′端开始计数)的位置2、14、和16处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置10至13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;并且正义链或反义链均不具有超过7个的总的2′-氟修饰的核苷酸。在这类实施例中,RNAi构建体在反义链的3′端具有核苷酸突出端,而在反义链的5′端/正义链的3′端包含平端。在替代性实施例中,RNAi构建体在正义链和反义链的3′端处具有核苷酸突出端。

[0342] 在一个特定的实施例中,RNAi构建体包含:

[0343] (a)具有以下的正义链:

[0344] (i)21个核苷酸的长度;

[0345] (ii)位置7和9至12处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至6、8、和13至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0346] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0347] 和

[0348] (b)具有以下的反义链:

[0349] (i)23个核苷酸的长度;

[0350] (ii)位置2、4、6、8、9、14和16处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、7、10至13、15、和17至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0351] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0352] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0353] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0354] (a)具有以下的正义链:

[0355] (i)21个核苷酸的长度;

[0356] (ii)位置7和9至12处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至6、8、和13至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0357] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0358] 和

[0359] (b)具有以下的反义链:

[0360] (i)23个核苷酸的长度;

[0361] (ii)位置2、7、14和16处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8至13、15、和17至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0362] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0363] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0364] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0365] (a)具有以下的正义链:

[0366] (i)21个核苷酸的长度;

[0367] (ii)位置7和9至12处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至6、8、和13至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0368] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0369] 和

[0370] (b)具有以下的反义链:

[0371] (i)23个核苷酸的长度;

[0372] (ii)位置2、4、6、14和16处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、7至13、15、和17至23处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0373] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置21和22处的核苷酸之间、和位置22和23处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0374] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0375] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0376] (a)具有以下的正义链:

[0377] (i)19个核苷酸的长度;

[0378] (ii)位置5和7至10处的2′-氟修饰的核苷酸;位置1至4、6、和11至18处的2′-O-甲基修饰的核苷酸;和位置19处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0379] (iii)位置18和19处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0380] 和

[0381] (b)具有以下的反义链:

[0382] (i)21个核苷酸的长度;

[0383] (ii)位置2、4、6、8、9、14和16处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3、5、7、10至13、15、和17至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0384] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0385] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0386] 在另一个特定实施例中,RNAi构建体包含:

[0387] (a)具有以下的正义链:

[0388] (i)20个核苷酸的长度;

[0389] (ii)位置1处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸;位置8至11处的2′-氟修饰的核苷酸;和位置2至7和12至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0390] (iii)位置18和19处的核苷酸之间和位置19和20处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0391] 和

[0392] (b)具有以下的反义链:

[0393] (i)21个核苷酸的长度;

[0394] (ii)位置2、7、14和16处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8至13、15、和17至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0395] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0396] 其中RNAi构建体在反义链的3′端具有包含1-2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的5′端具有平端。

[0397] 在另一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0398] (a)具有以下的正义链:

[0399] (i)22个核苷酸的长度;

[0400] (ii)位置1处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸;位置8至11处的2′-氟修饰的核苷酸;和位置2至7和12至22处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0401] (iii)位置20和21处的核苷酸之间和位置21和22处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0402] 和

[0403] (b)具有以下的反义链:

[0404] (i)21个核苷酸的长度;

[0405] (ii)位置2、7、14和16处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8至13、15、和17至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0406] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0407] 其中RNAi构建体在正义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的3′端具有包含1至2个核苷酸的核苷酸突出端。

[0408] 在本发明的某些实施例中,该RNAi构建体包含长度为19-23个核苷酸的正义链和长度为19-23个核苷酸是反义链,其中该反义链和正义链的序列彼此充分互补以形成19-21个碱基对的双链体区,其中:在反义链(从5′端开始计数)的位置2、7、12、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置10至13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;正义链或反义链均不具有超过7个的总的2′-氟修饰的核苷酸;并且RNAi构建体在正义链和反义链的3′端具有核苷酸突出端。

[0409] 例如,在一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0410] (a)具有以下的正义链:

[0411] (i)21个核苷酸的长度;

[0412] (ii)位置7至10处的2′-氟修饰的核苷酸;和位置1至6和11至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0413] (iii)位置19和20处的核苷酸之间和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核

苷酸间键(从5′端开始计数);

[0414] 和

[0415] (b)具有以下的反义链:

[0416] (i)21个核苷酸的长度;

[0417] (ii)位置2、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8至11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0418] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0419] 其中RNAi构建体在正义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端。

[0420] 在另一个实施例中,RNAi构建体包含:

[0421] (a)具有以下的正义链:

[0422] (i)22个核苷酸的长度;

[0423] (ii)位置1处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸;位置8至11处的2′-氟修饰的核苷酸;和位置2至7和12至22处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0424] (iii)位置20和21处的核苷酸之间和位置21和22处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0425] 和

[0426] (b)具有以下的反义链:

[0427] (i)21个核苷酸的长度;

[0428] (ii)位置2、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8至11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0429] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0430] 其中RNAi构建体在正义链的3′端具有包含2个核苷酸的核苷酸突出端并且在反义链的3′端具有包含1至2个核苷酸的核苷酸突出端。

[0431] 在本发明的某些实施例中,该RNAi构建体包含长度为19-21个核苷酸的正义链和长度为19-21个核苷酸是反义链,其中该反义链和正义链的序列彼此充分互补以形成19-21个碱基对的双链体区,其中:在反义链(从5′端开始计数)的位置2、7、12、和14处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;在正义链的与反义链(从5′端开始计数)中的位置10、11、和13配对的位置处的核苷酸是2′-氟修饰的核苷酸;并且正义链或反义链均不具有超过7个的总的2′-氟修饰的核苷酸。在一个这类实施例中,RNAi构建体包含:

[0432] (a)具有以下的正义链:

[0433] (i)21个核苷酸的长度;

[0434] (ii)位置9和11至14处的2′-氟修饰的核苷酸;和位置1至8、10、和15至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸;(从5′端开始计数);以及

[0435] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0436] 和

[0437] (b)具有以下的反义链:

[0438] (i)21个核苷酸的长度;

[0439] (ii)位置2、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8至11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0440] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0441] 其中RNAi构建体具有两个平端。

[0442] 在另一个这类实施例中,RNAi构建体包含:

[0443] (a)具有以下的正义链:

[0444] (i)21个核苷酸的长度;

[0445] (ii)位置9至12处的2′-氟修饰的核苷酸;和位置1至8和13至20处的2′-O-甲基修饰的核苷酸和位置21处的反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸;(从5′端开始计数);以及

[0446] (iii)位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0447] 和

[0448] (b)具有以下的反义链:

[0449] (i)21个核苷酸的长度;

[0450] (ii)位置2、7、12和14处的2′-氟修饰的核苷酸和位置1、3至6、8至11、13、和15至21处的2′-O-甲基修饰的核苷酸(从5′端开始计数);以及

[0451] (iii)位置1和2处的核苷酸之间、位置2和3处的核苷酸之间、位置19和20处的核苷酸之间、和位置20和21处的核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键(从5′端开始计数);

[0452] 其中RNAi构建体具有两个平端。

[0453] 在本发明的一些实施例中,RNAi构建体的正义链、反义链或者反义链和正义链两者的5′端均包含磷酸酯部分。如本文使用的,术语“磷酸酯部分”是指包含未经修饰的磷酸酯(—O—P=O)(OH)OH)以及经修饰的磷酸酯的末端磷酸酯基。经修饰的磷酸酯包括如下的磷酸酯,其中一个或多个O和OH基被H、O、S、N(R)或烷基所替代,其中R是H、氨基保护基或者未经取代或经取代的烷基。示例性的磷酸酯部分包括但不限于:5′-单磷酸酯;5′-二磷酸酯;5′-三磷酸酯;5’-鸟苷帽(7-甲基化或非甲基化);5’-腺苷帽或者任何其他经修饰的或未经修饰的核苷酸帽结构;5’-单硫代磷酸酯(硫代磷酸酯);5’-单二硫代磷酸酯(二硫代磷酸酯);5’-α-硫代三磷酸酯;5’-γ-硫代三磷酸酯、5’-氨基磷酸酯;5’-乙烯基磷酸酯;5’-烷基膦酸酯(例如,烷基=甲基、乙基、异丙基、丙基等);和5’-烷基醚膦酸酯(例如,烷基醚=甲氧基甲基、乙氧基甲基等)。

[0454] 可以并入本发明的RNAi构建体中的经修饰的核苷酸可具有多于一种的本文所述的化学修饰。例如,经修饰的核苷酸可具有针对核糖的修饰以及针对核碱基的修饰。举例来说,经修饰的核苷酸可包含2′糖修饰(例如2′-氟或2′-O-甲基)并且包含经修饰的碱基(例如5-甲基胞嘧啶或假尿嘧啶)。在其他实施例中,经修饰的核苷酸可包含糖修饰组合针对5′磷酸酯的修饰,当将经修饰的核苷酸并入多核苷酸中时这将会形成经修饰的核苷酸间键或核苷间键。例如,在一些实施例中,经修饰的核苷酸可包含糖修饰,诸如2′-氟修饰、2′-O-甲基修饰或二环糖修饰、以及5′硫代磷酸酯基。因此,在一些实施例中,本发明的RNAi构建体

的一条或两条链包含2′修饰的核苷酸或BNA与硫代磷酸酯核苷酸间键的组合。在某些实施例中,本发明的RNAi构建体的正义链和反义链两者均包含2′-氟修饰的核苷酸、2′-O-甲基修饰的核苷酸、与硫代磷酸酯核苷酸间键的组合。

[0455] 在某些实施例中,RNAi构建体中从5'端开始计数的反义链的位置1处的核苷酸可以包含A、dA、dU、U、或dT。在一些实施例中,从反义链的5′端开始的双链体区内的前三个碱基对中的至少一对是AU碱基对。在一个特定的实施例中,从反义链的5′端开始的双链体区内的第一个碱基对是AU碱基对。

[0456] 利用本领域中已知的技术(例如,利用常规的核酸固相合成),可以容易地制作本发明的RNAi构建体。可以使用标准核苷酸或核苷前体(例如亚磷酰胺类),在合适的核酸合成仪上,组装RNAi构建体的多核苷酸。自动核酸合成仪是由若干供应商商业销售,包括来自应用生物系统公司(Applied Biosystems)(福斯特城,加利福尼亚州)的DNA/RNA合成仪、来自生物自动化公司(BioAutomation)(欧文市,德克萨斯州)的MerMade合成仪、和来自GE保健生命科学公司(GE Healthcare Life Sciences)(匹兹堡市,宾夕法尼亚州)的OligoPilot合成仪。实例1中描述了合成本发明的RNAi构建体的示例性方法。

[0457] 2′甲硅烷基保护基可以在核糖核苷的5′位置与酸不稳定的二甲氧基三苯甲基(DMT)结合使用,从而利用亚磷酰胺化学来合成寡核苷酸。已知最终去保护条件不会使RNA产物显著地降解。可以在任何自动或手动合成仪中,以大、中或小规模执行所有合成。合成也可在多个孔板、柱或载玻片中执行。

[0458] 可以通过暴露于氟离子来去除2′-O-甲硅烷基,这些氟离子可以包括任何氟离子源,例如含有与无机反离子配对的氟离子的盐(例如氟化铯和氟化钾)、或者含有与有机反离子配对的氟离子的盐(例如氟化四烷基铵)。在去保护反应中,可以将冠醚催化剂与无机氟化物组合使用。优选的氟离子源是氟化四丁基铵、或氨基氢氟化物(例如,在偶极非质子溶剂例如二甲基甲酰胺中,将水性HF与三乙胺合并)。

[0459] 对使用于亚磷酸三酯和磷酸三酯的保护基的选择,可以改变三酯对氟化物的稳定性。磷酸三酯或亚磷酸三酯的甲基保护作用可以使与氟离子的键稳定,并且改善工艺产率。

[0460] 因为核糖核苷具有反应性2′羟基取代基,所以可能理想的是用与5′-O-二甲氧基三苯甲基保护基垂直的保护基(例如,一个对使用酸的处理为稳定的保护基)来保护RNA中的反应性2′位置。甲硅烷基保护基满足这个标准,并且可以在最后的氟化物去保护步骤中容易地去除,这可以导致最小的RNA降解。

[0461] 在标准的亚磷酰胺偶联反应中,可以使用四唑催化剂。优选的催化剂包括例如:四唑、S-乙基-四唑、苄基巯基四唑、对硝基苯基四唑。

[0462] 正如本领域普通技术人员可以理解的,合成本文所述的RNAi构建体的其他方法对于本领域技术人员而言将是显而易见的。另外,各种合成步骤可以以交替的序列或顺序进行以得到所需化合物。在合成本文所述的RNAi构建体中有用的其他合成化学转化、保护基(例如,存在于碱基上的羟基、氨基等)和保护基方法(保护和去保护)在本领域中是已知的,并且包括例如,如在R.Larock,ComprehensiveOrganic Transformations[综合有机转化]VCH出版社(1989);T.W.Greene和P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis[有机合成中的保护基]第2版,John Wiley and Sons[约翰·威利父子公司](1991);L.Fieser和M.Fieser,Fieser and Fieser's Reagents for OrganicSynthesis[Fieser和

Fieser有机合成试剂]John Wiley and Sons[约翰·威利父子公司](1994);和L.Paquette编,Encyclopedia of Reagents forOrganic Synthesis[用于有机合成的试剂全书],John Wiley and Sons[约翰·威利父子公司](1995)及其后续版本中所描述的那些。也可从包括达摩昆公司(Dharmacon,Inc.)(科罗拉多州拉斐特市)、阿克索实验室(AxoLabs GmbH)(德国库尔姆巴赫市)、和阿姆宾公司(Ambion,Inc.)(加利福尼亚州福斯特市)的几家商业供应商那里实现RNAi构建体的定制合成。

[0463] 本发明的RNAi构建体可包含配体。如本文使用的,"配体"是指能够与另一种化合物或分子直接地或间接地相互作用的任何化合物或分子。配体与另一种化合物或分子的相互作用会引起生物反应(例如引发信号转导级联反应、诱导受体介导的内吞作用)或者仅仅是物理结合。配体可以改变与双链RNA分子相附接的一种或多种性质,如RNA分子的药效学、药代动力学、结合、吸收、细胞分布、细胞摄取、电荷和/或清除性质。

[0464] 配体可包括血清蛋白(例如,人血清白蛋白、低密度脂蛋白、球蛋白)、胆固醇部分、维生素(生物素、维生素E、维生素B_{12})、叶酸部分、类固醇、胆汁酸(例如胆酸)、脂肪酸(例如,棕榈酸、肉豆蔻酸)、碳水化合物(例如,右旋糖酐、支链淀粉、甲壳素、壳聚糖、菊粉、环糊精或透明质酸)、糖苷、磷脂、或者抗体或其结合片段(例如将RNAi构建体靶向到特定细胞类型(如肝脏)的抗体或其结合片段)。配体的其他实例包括染料、插入剂(例如吖啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、得克萨卟啉(Texaphyrin)、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(例如金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、犹牛儿基氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、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(例如黑腹果蝇触足肽、Tat肽、RGD肽)、烷化剂、聚合物(如聚乙二醇(PEG)(例如PEG-40K))、聚氨基酸和聚胺(例如精胺、亚精胺)。

[0465] 在某些实施例中,配体具有内体溶解(endosomolytic)性质。内体溶解配体促进内体的溶解和/或本发明的RNAi构建体或其组分从细胞的内体到细胞质的转运。内体溶解配体可以是显示pH依赖性膜活性和融合性的多聚阳离子肽或肽模拟物。在一个实施例中,内体溶解配体在内体pH下呈现其活性构象。"活性"构象是其中内体溶解配体促进内体的溶解和/或本发明的RNAi构建体或其组分从内体到细胞质的转运的构象。示例性的内体溶解配体包括GALA肽(Subbarao等人,Biochemistry[生物化学],第26卷:2964-2972,1987)、EALA肽(Vogel等人,J.Am.Chem.Soc.[美国化学社杂志]第118卷:1581-1586,1996)、及它们的衍生物(Turk等人,Biochem.Biophys.Acta[生物化学与生物物理学学报],第1559卷:56-68,2002)。在一个实施例中,内体溶解组分可含有化学基团(例如,氨基酸),该化学基团将随着pH的变化而经历电荷或质子化的变化。内体溶解组分可以是线性的或分支的。

[0466] 在一些实施例中,配体包含脂质或其他疏水性分子。在一个实施例中,配体包含胆固醇部分或其他类固醇。曾有报道胆固醇缀合寡核苷酸比它们的未缀合寡核苷酸更具活性(Manoharan,Antisense NucleicAcid Drug Development[反义核酸药物开发],第12卷:103-228,2002)。在美国专利号7,851,615;7,745,608;和7,833,992中已描述了包含胆固醇部分和用于与核酸分子缀合的其他脂质的配体,这些专利特此通过引用以其全文并入。在另一个实施例中,配体包含叶酸部分。与叶酸部分缀合的多核苷酸可以通过受体介导的内吞途径被细胞摄取。这类叶酸-多核苷酸缀合物在美国专利号8,188,247中有描述,该专利

特此通过援引以其全文并入。

[0467] 配体可以将RNAi构建体靶向至特定的组织或细胞类型,以选择性地抑制靶基因在该特定的组织或细胞类型中的表达。在一个实施例中,使用如下文更详细描述的各种方法使配体靶向RNAi构建体至肝细胞(例如肝细胞)的特异性递送。在某些实施例中,将RNAi构建体靶向至具有配体的肝细胞,该配体结合表面表达的去唾液酸糖蛋白受体(ASGR)或其组分(例如ASGR1,ASGR2)。

[0468] 在一些实施例中,通过使用与在肝细胞表面上所表达蛋白质结合或相互作用的配体,可以将RNAi构建体特异性靶向至肝脏。例如,在某些实施例中,配体可包含与在肝细胞上所表达受体(如去唾液酸糖蛋白受体或LDL受体)特异性结合的抗原结合蛋白(例如抗体或其结合片段(例如Fab、scFv))。在一个特定的实施例中,配体包含特异性结合ASGR1和/或ASGR2的抗体或其结合片段。在另一个实施例中,配体包含特异性结合ASGR1和/或ASGR2的抗体的Fab片段。"Fab片段"由一个免疫球蛋白轻链(即轻链可变区(VL)和恒定区(CL))以及一个免疫球蛋白重链的CH1区和可变区(VH)构成。在另一个实施例中,配体包含特异性结合ASGR1和/或ASGR2的抗体的单链可变抗体片段(scFv片段)。"scFv片段"包含抗体的VH和VL区,其中这些区存在于单个多肽链中,并且任选地在VH和VL区之间包含肽接头,该肽接头使Fv能形成所需的抗原结合结构。特异性结合ASGR1的可以用作用于将本发明的RNAi构建体靶向至肝脏的配体的示例性抗体及其结合片段描述于WIPO公开号WO2017/058944中,将其通过引用以其全文并入本文。特异性结合ASGR1、LDL受体、或其他肝脏表面表达的蛋白质的适用于用作本发明的RNAi构建体中的配体的其他抗体及其结合片段是可商购的。

[0469] 在某些实施例中,配体包含碳水化合物。"碳水化合物"是指由具有至少6个碳原子的一个或多个单糖单元(可以是线性的、分支的或环状的)所组成的化合物,其中氧、氮或硫原子键合至各碳原子。碳水化合物包括但不限于:糖类(例如,单糖类、二糖类、三糖类、四糖类、和含有约4、5、6、7、8、或9个单糖单元的寡糖类)、及多糖类(如淀粉类、糖原、纤维素和多糖胶)。在一些实施例中,并入配体中的碳水化合物选自戊糖、己糖、或庚糖的单糖及包括这类单糖单元的二糖和三糖。在其他实施例中,并入配体中的碳水化合物是氨基糖,诸如半乳糖胺、葡糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、和N-乙酰葡糖胺。

[0470] 在一些实施例中,配体包括己糖或己糖胺。己糖可选自葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、或果糖。己糖胺可选自果糖胺、半乳糖胺、葡糖胺、或甘露糖胺。在某些实施例中,配体包括葡萄糖、半乳糖、半乳糖胺、或葡糖胺。在一个实施例中,配体包括葡萄糖、葡糖胺、或N-乙酰葡糖胺。在另一个实施例中,配体包括半乳糖、半乳糖胺、或N-乙酰基-半乳糖胺。在特定实施例中,配体包括N-乙酰基-半乳糖胺。包括葡萄糖、半乳糖、和N-乙酰基-半乳糖胺(GalNAc)的配体在将化合物靶向至肝细胞方面特别有效,因为这类配体与在肝细胞表面表达的ASGR结合。参见,例如,D'Souza和Devarajan,J.ControlRelease[控制释放杂志],第203卷:126-139,2015。可以并入本发明RNAi构建体中的含GalNAc或半乳糖配体的实例在美国专利号7,491,805;8,106,022;和8,877,917;美国专利公开号20030130186;和WIPO公开号WO 2013166155中有描述,这些专利特此通过引用以其全文并入。

[0471] 在某些实施例中,配体包含多价碳水化合物部分。如本文使用的,"多价碳水化合物部分"是指包含能够独立地与其他分子结合或相互作用的两个或更多个碳水化合物单元的部分。例如,多价碳水化合物部分包含两个或更多个结合域,这些结合域是由可以与两个

或更多个不同分子或者同一分子上的两个或更多个不同部位结合的碳水化合物所组成。碳水化合物部分的价表示在碳水化合物部分内的单独结合结构域的数目。例如,关于碳水化合物部分的术语“一价”、“二价”、“三价”和“四价”分别是指具有一个、两个、三个和四个结合域的碳水化合物部分。多价碳水化合物部分可包含:多价乳糖部分、多价半乳糖部分、多价葡萄糖部分、多价N-乙酰基-半乳糖胺部分、多价N-乙酰基-葡糖胺部分、多价甘露糖部分、或多价岩藻糖部分。在一些实施例中,配体包含多价半乳糖部分。在其他实施例中,配体包含多价N-乙酰基-半乳糖胺部分。在这些和其他实施例中,多价碳水化合物部分可以是二价、三价或四价的。在这类实施例中,多价碳水化合物部分可以是双触角或三触角的。在一个特定实施例中,多价N-乙酰基-半乳糖胺部分是三价或四价的。在另一个特定实施例中,多价半乳糖部分是三价或四价的。下面详细描述了用于并入本发明RNAi构建体中的示例性三价和四价的含GalNAc配体。

[0472] 配体可以直接地或间接地附接或缀合至RNAi构建体的RNA分子。例如,在一些实施例中,配体直接地共价附接至RNAi构建体的正义链或反义链。在其他实施例中,配体经由接头共价附接至RNAi构建体的正义链或反义链。配体可以附接至本发明RNAi构建体的多核苷酸(例如正义链或反义链)的核碱基、糖部分、或核苷酸间键。与嘌呤核碱基或其衍生物的缀合或附接,可以发生在包括环内和环外原子的任意位置。在某些实施例中,嘌呤核碱基的2位置、6位置、7位置或8位置附接至配体。与嘧啶核碱基或其衍生物的缀合或附接也可以在任意位置发生。在一些实施例中,嘧啶核碱基的2位置、5位置和6位置可以附接至配体。与核苷酸的糖部分的缀合或附接可以在任何碳原子处发生。可以附接至配体的糖部分的示例性碳原子包括2′、3′、和5′碳原子。1′位置也可以附接至配体,如在无碱基核苷酸中。核苷酸间键也可以支持配体附接。对于含磷连键(例如,磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸酰胺等),配体可以直接附接至磷原子上或附接至与磷原子键合的O、N或S原子上。对于含胺或酰胺的核苷间连键(例如,PNA),配体可以附接至胺或酰胺的氮原子上或附接至相邻碳原子上。

[0473] 在某些实施例中,配体可以附接至正义链或反义链的3′端或5′端。在某些实施例中,配体共价附接至正义链的5′端。在这类实施例中,配体附接至正义链的5′-末端核苷酸。在这些和其他实施例中,配体是在正义链的5′-末端核苷酸的5′-位置附接。在实施例中,其中反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸是正义链的5′-末端核苷酸并且经由5′-5′核苷酸间键附接至相邻核苷酸,该配体可以在反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸的3′-位置处附接。在其他实施例中,配体共价附接至正义链的3′端。例如,在一些实施例中,配体附接至正义链的3′-末端核苷酸。在某些这类实施例中,配体是在正义链的3′-末端核苷酸的3′-位置附接。在实施例中,其中反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸是正义链的3′-末端核苷酸并且经由3′-3′核苷酸间键附接至相邻核苷酸,该配体可以在反向无碱基核苷酸或反向脱氧核糖核苷酸的5′-位置处附接。在替代性实施例中,配体是在正义链的3′端附近附接,但在一个或多个末端核苷酸之前(即在1、2、3或4个末端核苷酸之前)。在一些实施例中,配体是在正义链的3′-末端核苷酸的糖的2′-位置附接。在其他实施例中,配体是在正义链的5′-末端核苷酸的糖的2′-位置附接。

[0474] 在某些实施例中,配体经由接头附接至正义链或反义链。“接头”是使配体共价连接至RNAi构建体的多核苷酸组分的原子或基团。接头可为约1至约30个原子的长度、约2至

约28个原子的长度、约3至约26个原子的长度、约4至约24个原子的长度、约6至约20个原子的长度、约7至约20个原子的长度、约8至约20个原子的长度、约8至约18个原子的长度、约10至约18个原子的长度、以及约12至约18个原子的长度。在一些实施例中,接头可包含双官能连接部分,该连接部分通常包含具有个官能团的烷基部分。选择官能团中的一个使其与目的化合物(例如RNAi构建体的正义链或反义链)结合,并且选择另一个官能团使其与任何所选基团(如本文所述的配体)实质地结合。在某些实施例中,接头包含重复单元(诸如乙二醇或氨基酸单元)的链结构或低聚物。典型地在双官能连接部分中所采用官能团的实例包括但不限于:用于与亲核基团发生反应的亲电体、和用于与亲电基团发生反应的亲核体。在一些实施例中,双官能连接部分包括氨基、羟基、羧酸、硫醇、不饱和键(例如,双键或三键)等。

[0475] 可用于将配体附接至本发明RNAi构建体中的正义链或反义链的接头包括但不限于:吡咯烷、8-氨基-3,6-二氧杂辛酸、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯、6-氨基己酸、经取代的C_1-C_{10}烷基、经取代的或未经取代的C_2-C_{10}烯基、或者取代的或未取代的C_2-C_{10}炔基。用于这类接头的优选取代基包括但不限于:羟基、氨基、烷氧基、羧基、苄基、苯基、硝基、硫醇、硫代烷氧基、卤素、烷基、芳基、烯基和炔基。

[0476] 在某些实施例中,接头是可裂解的。可裂解接头是在细胞外部充分地稳定的接头,但在进入靶细胞后被裂解以释放接头将它们保持在一起的两个部分。在一些实施例中,可裂解接头在靶细胞中或在第一参考条件下(例如,可以选择第一参考条件来模拟或代表细胞内条件),比在受试者血液中或在第二参考条件下(例如可以选择第二参考条件来模拟或代表血液或血清中所存在的条件)裂解快至少10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或更多,或至少100倍。

[0477] 可裂解接头易受裂解剂的影响,例如pH、氧化还原电势或降解性分子的存在。通常,裂解剂在细胞内部比在血清或血液中更普遍或者以更高的水平或更高的活性被发现。这类降解剂的实例包括:为特定底物所选择的或没有底物特异性的氧化还原剂,包括例如可以通过还原作用而使氧化可还原裂解接头降解的存在于细胞中的氧化酶或还原酶或还原剂(如硫醇);酯酶;可以形成酸性环境的内体或药剂,例如,导致五或更低的pH的那些;通过起广义酸、肽酶(其可以是底物特异性的)、和磷酸酶的作用而使酸可裂解接头发生水解或降解的酶。

[0478] 可裂解接头可包含对pH敏感的部分。人血清的pH为7.4,而平均细胞内pH略较低,在约7.1-7.3的范围内。内体具有在5.5-6.0范围内的更加酸性pH,溶酶体具有在5.0附近的更加酸性的pH。一些接头将具有在优选pH下被裂解的可裂解基团,从而将RNA分子从在细胞内部的配体中释放出或者释放到期望的细胞室内。

[0479] 接头可以包括可被特定酶裂解的可裂解基团。并入接头中的可裂解基团的类型可以取决于待靶向的细胞。例如,靶向肝的配体可以经由包括酯基的接头而连接至RNA分子。肝细胞富含酯酶,因此与不富含酯酶的细胞类型相比,该接头在肝细胞中更高效地被裂解。富含酯酶的其他类型细胞包括肺、肾皮质、和睾丸的细胞。当靶向富含肽酶的细胞(如肝细胞和滑膜细胞)时,可以使用含有肽键的接头。

[0480] 通常,可以通过对降解剂(或条件)裂解候选接头的能力进行测试来评估候选可裂解接头的适合性。也将期望对候选可裂解接头在血液中或者与非靶组织接触时的抵抗裂解的能力进行测试。因此,可以确定在第一条件与第二条件之间的相对裂解敏感性,其中选择

第一条件作为在靶细胞中裂解的指示并且选择第二条件作为在其他组织或生物流体(例如,血液或血清)中裂解的指示。可以在无细胞系统、细胞、细胞培养物、器官或组织培养物或整个动物中进行评价。在无细胞或培养条件下进行初步评价并通过在整个动物中进行进一步评价来确认可能是有用的。在一些实施例中,有用候选接头在细胞中(或者在被选择用于模拟细胞内条件的体外条件下)的裂解,与在血液或血清中(或者在模拟细胞外条件的体外条件下)相比,至少快2、4、10、20、50、70或100倍。

[0481] 在其他实施例中,使用氧化可还原裂解接头。氧化可还原裂解接头在还原或氧化时被裂解。可还原裂解基团的实例是二硫连接基团(-S-S-)。为了确定候选可裂解接头是否是合适的"可还原裂解接头"或者例如是否适合与特定RNAi构建体和特定配体一起使用,可以采用本文所述的一种或多种方法。例如,通过与二硫苏糖醇(DTT)或者模仿将会在细胞(例如,靶细胞)中所观察的裂解速率的本领域中已知的其他还原剂一起进行孵化,可以对候选接头进行评估。也可以在被选择以模拟血液或血清条件的条件下,对候选接头进行评估。在特定实施例中,候选接头在血液中被裂解至多10%。在其他实施例中,有用候选接头在细胞中(或者在被选择以模拟细胞内条件的体外条件下)的降解,与在血液中(或者在被选择以模仿细胞外条件的条件下)相比,至少快2、4、10、20、50、70、或100倍。

[0482] 在又其他实施例中,采用被降解或水解磷酸酯基的药剂裂解的基于磷酸酯的可裂解接头来将配体共价附接至RNAi构建体的正义链或反义链。使细胞中的磷酸酯基发生水解的药剂的实例是酶,如细胞中的磷酸酯酶。基于磷酸酯的可裂解基团的实例是-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-、和-O-P(S)(Rk)-S-,其中Rk可以是氢或烷基。特定实施例包括-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-、和-O-P(S)(H)-S-。另一个特定实施例是-O-P(O)(OH)-O-。可以利用与上述方法类似的方法对这些候选接头进行评估。

[0483] 在其他实施例中,接头可包含酸可裂解基团,它们是在酸性条件下被裂解的基团。在一些实施例中,酸可裂解基团在pH约为6.5或更低(例如,约6.0、5.5、5.0或更低)的酸性环境中被裂解,或者被裂解剂(诸如可以起广义酸作用的酶)所裂解。在细胞中,特定的低pH细胞器(诸如内体和溶酶体)可以为酸可裂解基团提供裂解环境。酸可裂解的连接基的实例包括但不限于:腙、酯、氨基酸的酯。酸可裂解基团可具有通式-C=NN-、C(O)O、或-OC(O)。当附接至酯的氧(烷氧基)的碳是芳基时,特定实施例是经取代的烷基或叔烷基(如二甲基、戊基或叔丁基)。可以利用与上述方法类似的方法,对这些候选对象进行评估。

[0484] 在其他实施例中,接头可以包含基于酯的可裂解基团,它们被酶(诸如细胞中的酯酶和酰胺酶)所裂解。基于酯的可裂解基团的实例包括但不限于:亚烷基、亚烯基和亚炔基的酯。酯可裂解基团具有通式-C(O)O-、或-OC(O)-。可以利用与上述方法类似的方法对这些候选接头进行评估。

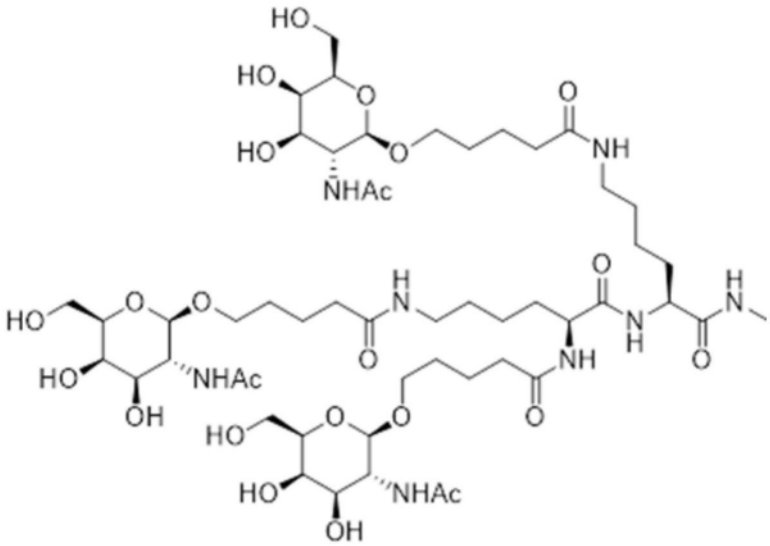
[0485] 在进一步的实施例中,接头可包含基于肽的可裂解基团,它们被酶(诸如细胞中的肽酶和蛋白酶)所裂解。基于肽的可裂解基团是在氨基酸之间所形成的肽键,用以产生寡肽

(例如,二肽、三肽等)和多肽。基于肽的可裂解基团包括酰胺基(-C(O)NH-)。酰胺基可以在任何的亚烷基、亚烯基或亚炔基之间形成。肽键是在氨基酸之间形成的特殊类型的酰胺键,用于产生肽和蛋白质。基于肽的裂解基团通常限于在产生肽的氨基酸和蛋白质之间所形成的肽键(即,酰胺键)。基于肽的可裂解连接基具有通式-NHCHR^{A}C(O)NHCHR^{B}C(O)-,其中R^{A}和R^{B}是两个相邻氨基酸的侧链。可以利用与上述方法类似的方法,对这些候选对象进行评估。

[0486] 适于将配体附接至本发明RNAi构建体中的正义链或反义链的其他类型接头在本领域中是已知的,并且可以包括在美国专利号7,723,509;8,017,762;8,828,956;8,877,917;和9,181,551(全部这些专利特此通过引用以其全文并入)中所描述的接头。

[0487] 在某些实施例中,与本发明RNAi构建体的正义链或反义链共价附接的配体包含GalNAc部分,例如多价GalNAc部分。在一些实施例中,多价GalNAc部分是三价GalNAc部分,并且附接至正义链的3′端。在其他实施例中,多价GalNAc部分是三价GalNAc部分,并且附接至正义链的5′端。在又其他实施例中,多价GalNAc部分是四价GalNAc部分,并且附接至正义链的3′端。在仍其他实施例中,多价GalNAc部分是四价GalNAc部分,并且附接至正义链的5′端。

[0488] 在某些实施例中,本发明的RNAi构建体包含具有以下结构的配体:

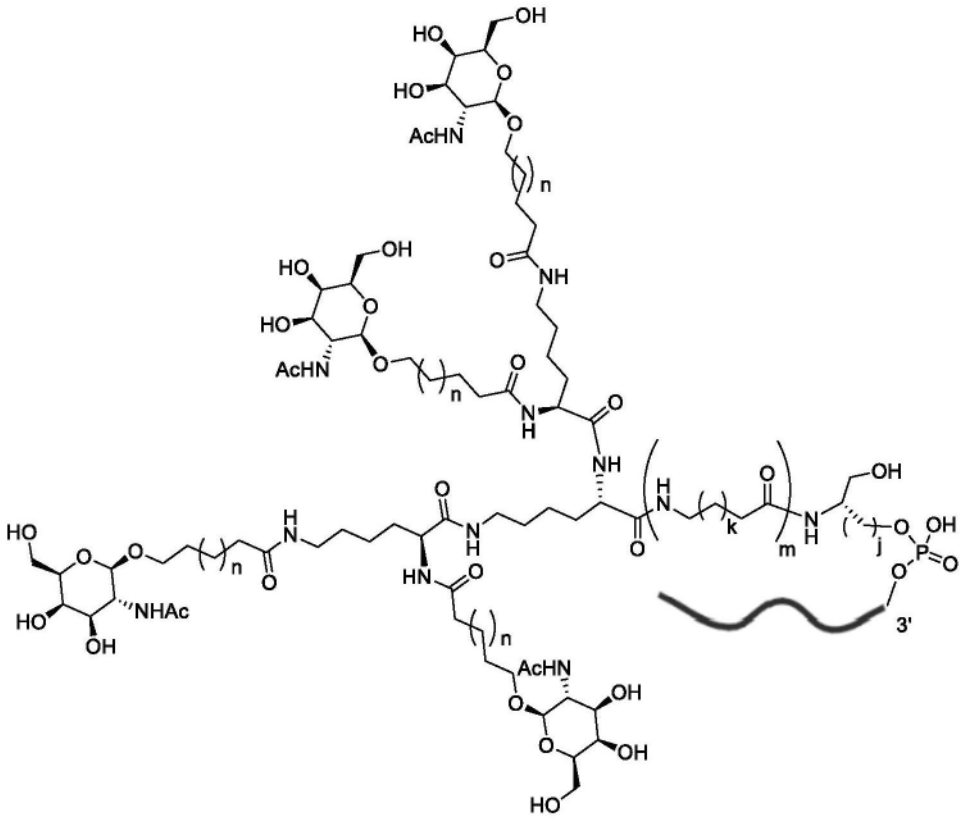
[0489] 

[0490] 在优选的实施例中,将具有此结构的配体经由接头(如本文所述的接头)共价附接至正义链的5′端。在一个实施例中,接头是氨基己基接头。

[0491] 以下结构式I-IX中提供了可以附接至本发明的RNAi构建体中的双链RNA分子的示例性三价和四价GalNAc部分和接头。本文列出的式中的“Ac”代表乙酰基。

[0492] 在一个实施例中,RNAi构建体包含具有以下式I的结构的配体和接头,其中每个n独立地是1至3,k是1至3,m是1或2,j是1或2,并且将配体附接至双链RNA分子(由实的波浪线表示)的正义链的3′端:

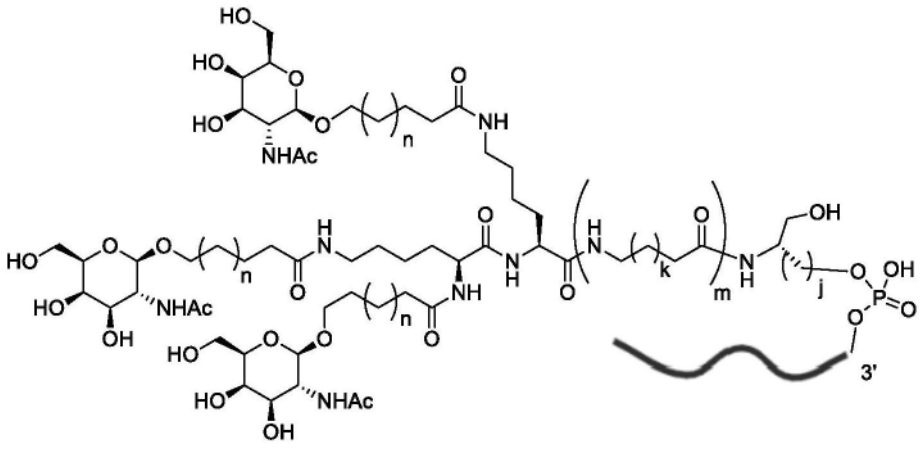
[0493]



式 I

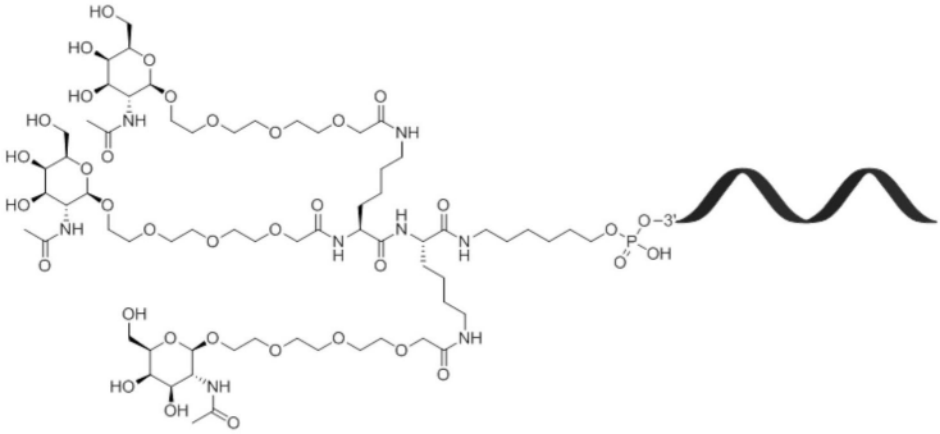
[0494] 在另一个实施例中,RNAi构建体包含具有以下式II的结构的配体和接头,其中每个n独立地是1至3,k是1至3,m是1或2,j是1或2,并且将配体附接至双链RNA分子(由实的波浪线表示)的正义链的3′端:

[0495]



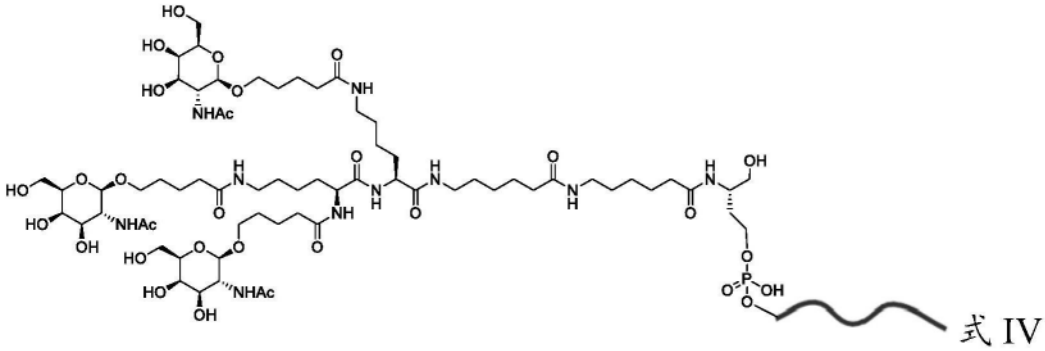
式 II

[0496] 在又另一个实施例中,RNAi构建体包含具有以下式III的结构的配体和接头,其中将配体附接至双链RNA分子(由实的波浪线表示)的正义链的3′端:

[0497] 

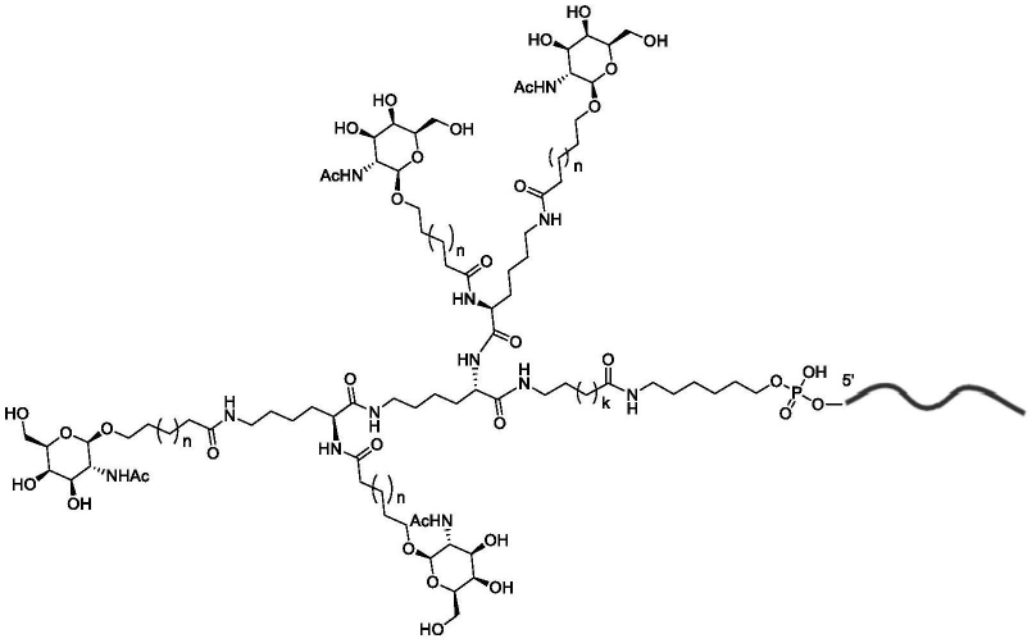
式 III

[0498] 在仍另一个实施例中,RNAi构建体包含具有以下式IV的结构的配体和接头,其中将配体附接至双链RNA分子(由实的波浪线表示)的正义链的3′端:

[0499] 

式 IV

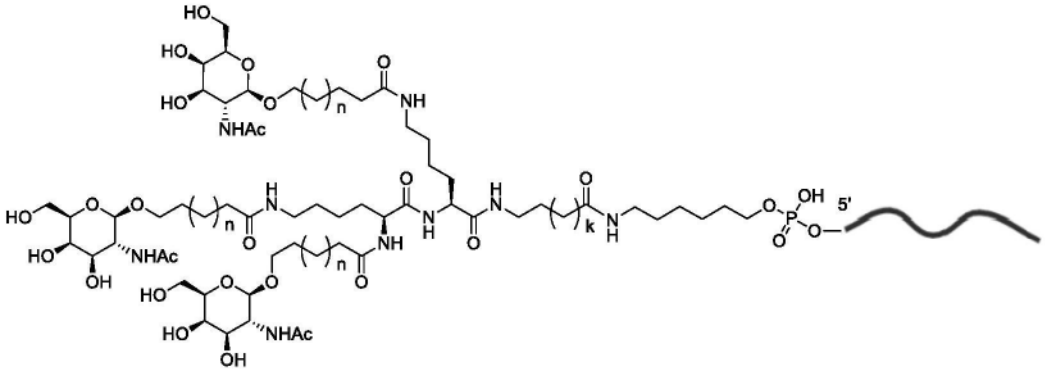
[0500] 在某些实施例中,RNAi构建体包含具有以下式V的结构的配体和接头,其中每个n独立地是1至3,k是1至3,并且将配体附接至双链RNA分子(由实的波浪线表示)的正义链的5′端:

[0501] 

式 V

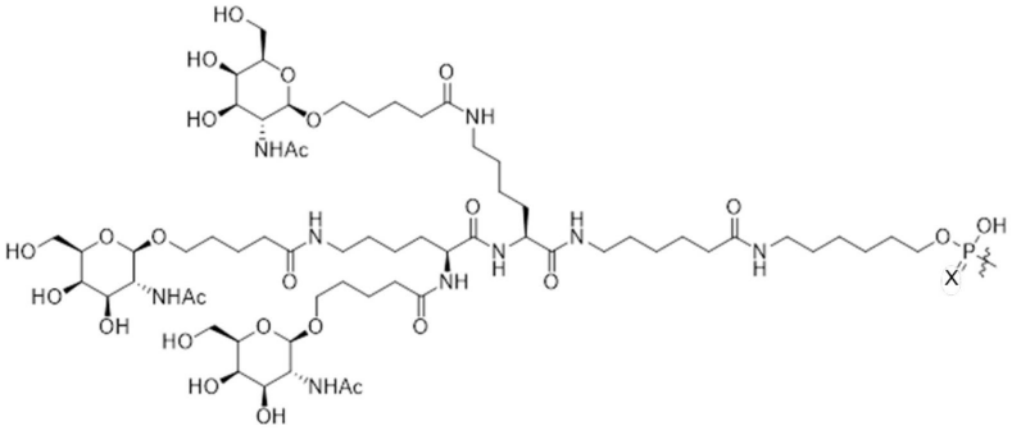
[0502] 在其他实施例中,RNAi构建体包含具有以下式VI的结构的配体和接头,其中每个n独立地是1至3,k是1至3,并且将配体附接至双链RNA分子(由实的波浪线表示)的正义链的

5′端：

[0503] 

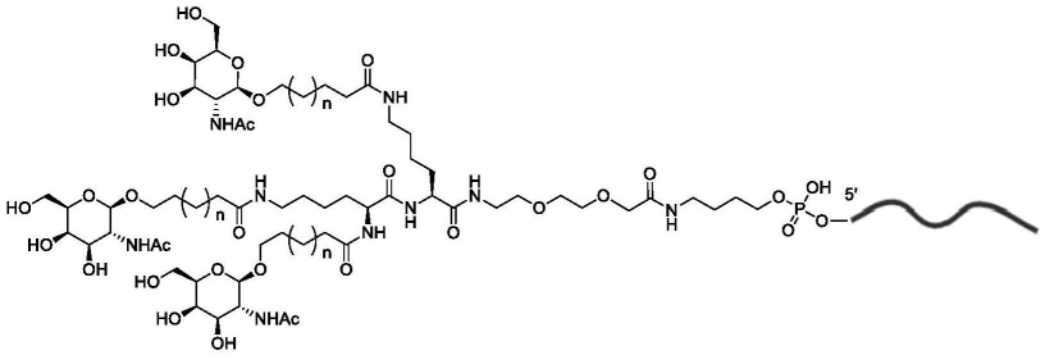
式 VI

[0504] 在一个特定的实施例中,RNAi构建体包含具有以下式VII的结构的配体和接头,其中X＝O或S并且其中将配体附接至双链RNA分子(由弯曲线表示)的正义链的5′端：

[0505] 

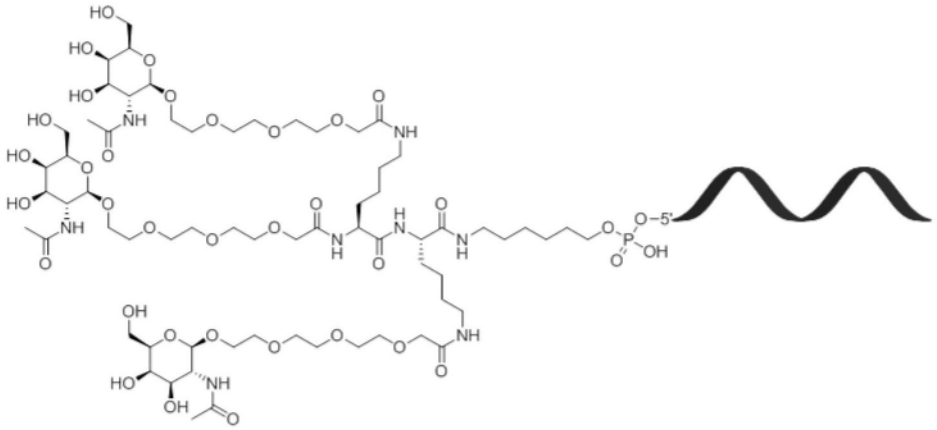
式 VII

[0506] 在一些实施例中,RNAi构建体包含具有以下式VIII的结构的配体和接头,其中每个n独立地是1至3并且将配体附接至双链RNA分子(由实的波浪线表示)的正义链的5′端：

[0507] 

式 VIII

[0508] 在某些实施例中,RNAi构建体包含具有以下式IX的结构的配体和接头,其中将配体附接至双链RNA分子(由实的波浪线表示)的正义链的5′端：

[0509] 

式 IX

[0510] 硫代磷酸酯键可以由式I-IX中任一个所示的磷酸二酯键取代,以将配体和接头共价附接至核酸链。

[0511] 本发明还包括药物组合物和配制品,它们包含本文所述的RNAi构建体及药学上可接受的载剂、赋形剂/或稀释剂。这类组合物和配制品可用于在有需要的受试者中降低靶基因的表达。在考虑临床应用的情况下,药物组合物和配制品将以适合于预期应用的形式而制备。通常,这将需要制备基本上没有热原以及可能对人或动物有害的其他杂质的组合物。

[0512] 短语“药学上可接受的”或“药理学上可接受的”是指在施用于动物或人时不产生不良反应、过敏反应或其他不利反应的分子实体和组合物。如本文使用的,“药学上可接受的载剂、赋形剂、或稀释剂”包括可接受的用于配制药物(如适合于向人施用的药物)的溶剂、缓冲剂、溶液、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。将这类介质和药剂用于药学活性物质的用途在本领域中是众所周知的。除非任何常规介质或药剂与本发明RNAi构建体不相容,可考虑将其使用于治疗组合物。补充的活性成分也可以并入组合物中,只要它们不使组合物的RNAi构建体失去活性。

[0513] 用于配制药物组合物的组合物及方法取决于一些条件,包括但不限于:施用途径、待治疗的疾病或障碍的类型和程度、或待施用的剂量。在一些实施例中,基于预期的递送途径来配制药物组合物。例如,在某些实施例中,药物组合物被配制用于肠胃外递送。肠胃外递送形式包括:静脉内、动脉内、皮下、鞘内、腹膜内或肌内注射或输注。在一个实施例中,药物组合物被配制用于静脉内递送。在这类实施例中,药物组合物可包含基于脂质的递送媒介物。在另一个实施例中,药物组合物被配制用于皮下递送。在这类实施例中,药物组合物可包含靶向配体(例如本文所述的含有GalNAc或含有抗体的配体)。

[0514] 在一些实施例中,药物组合物包含有效量的本文所述的RNAi构建体。“有效量”是足以产生有益或期望的临床结果的量。在一些实施例中,有效量是足以减少受试者的特定组织或细胞类型(例如肝或肝细胞)中靶基因表达的量。

[0515] 本发明药物组合物的施用可以经由任何普通途径进行,只要经由该途径可到达靶组织即可。这类途径包括但不限于:肠胃外(例如,皮下、肌内、腹膜内或静脉内)、口腔、鼻腔、颊部、皮内、透皮和舌下途径、或者通过直接注射入肝组织中或经过肝门静脉而递送。在一些实施例中,药物组合物是肠胃外施用。例如,在某些实施例中,药物组合物是静脉内施用。在其他实施例中,药物组合物是皮下施用。

[0516] 胶体分散系统(如大分子复合体、纳米胶囊、微球、珠粒)和基于脂质的系统(包括

水包油乳剂、微团、混合微团和脂质体)可用作本发明RNAi构建体的递送媒介物。适于递送本发明的核酸的市售脂肪乳剂包括:Intralipid®(百特国际有限公司(Baxter InternationalInc.))、Liposyn®(雅培制药公司(Abbott Pharmaceuticals))、Liposyn®II(赫升瑞公司(Hospira))、Liposyn®III(赫升瑞公司)、Nutrilipid(贝朗医疗公司(B.Braun Medical Inc.))、和其他类似的脂质乳剂。用作体内递送媒介物的优选胶体系统是脂质体(即,人工膜囊)。本发明的RNAi构建体可被包封于脂质体内或者可与其形成复合体,特别是阳离子脂质体。替代性地,本发明的RNAi构建体可与脂质特别是阳离子脂质形成复合体。合适的脂质和脂质体包括中性(例如,二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)和二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC))、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、及阴性(例如,二豆蔻酰磷脂酰甘油基甘油(DMPG)、和阳离子型(例如,二油酰基四甲基氨基丙基(DOTAP)和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOTMA))。这类胶体分散系统的制备和使用在本领域中是众所周知的。示例性的配制品还披露于美国专利号5,981,505;美国专利号6,217,900;美国专利号6,383,512;美国专利号5,783,565;美国专利号7,202,227;美国专利号6,379,965;美国专利号6,127,170;美国专利号5,837,533;美国专利号6,747,014;和WO 03/093449。

[0517] 在一些实施例中,本发明的RNAi构建体被完全地封装于脂质配制品中,例如,以形成SNALP或其他核酸-脂质颗粒。如本文使用的,术语“SNALP”是指稳定的核酸-脂质颗粒。SNALP典型地含有阳离子脂质、非阳离子脂质、和防止颗粒聚集的脂质(例如,PEG-脂质缀合物)。SNALP对于全身应用特别有用,因为它们在静脉注射后展现出循环寿命延长,并且在远端部位(例如,与施用部位物理分离的部位)累积。核酸-脂质颗粒典型地具有约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm或约70nm至约90nm的平均直径,并且基本上无毒。另外,当存在于核酸-脂质颗粒中时,核酸在水溶液中对核酸酶的降解有抵抗力。核酸-脂质颗粒及其制备方法披露于例如美国专利号5,976,567;5,981,501;6,534,484;6,586,410;6,815,432;和PCT公开号WO 96/40964。

[0518] 适于注射使用的药物组合物包括例如无菌水溶液或分散液、及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。通常,这些制剂是无菌的,并且在易于注射的程度上是流体。制剂应在制造和贮存的条件下稳定,并且应防止微生物(如细菌和真菌)的污染作用。适当的溶剂或分散介质可包括例如:水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇等)、它们的合适的混合物、和植物油。恰当的流动性可以(例如)通过使用包衣(如卵磷脂)来维持,在分散体的情况下通过维持所需的粒径来维持,以及通过使用表面活性剂来维持。对微生物作用的防止可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂来实现,例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下,包括等渗剂(例如,糖或氯化钠)将是更优选的。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中使用吸收延迟剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0519] 可以通过将适量的活性化合物与所需的任何其他成分(例如,如以上所列举的)一起掺入溶剂中,然后过滤灭菌来制备无菌注射溶液。通常,分散体通过以下方式来制备:将各种经灭菌的活性成分掺入无菌媒介物中,该媒介物含有基础分散介质和其他所需成分(例如,如以上所列举的)。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末情况下,优选的制备方法包

括真空干燥和冷冻干燥技术,这些技术产生一种或多种活性成分加来自其先前无菌过滤溶液的任何其他所需成分的粉末。

[0520] 本发明的组合物通常可以以中性或盐的形式来配制。药学上可接受的盐包括例如:源自无机酸(例如,盐酸或磷酸)或有机酸(例如,乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)(与游离氨基形成)的酸加成盐。与游离羧基所形成的盐也可以源自无机碱(例如,钠、钾、铵、钙、或铁的氢氧化物)或有机碱(例如,异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。

[0521] 例如,就在水溶液中的肠胃外施用而言,通常将溶液适当地缓冲,并且首先例如用充分的盐水或葡萄糖使液体稀释剂变为等渗。这类水溶液可以用于例如静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。优选地,如本领域技术人员已知的,特别地根据本披露,使用无菌水性介质。通过举例说明,可将单剂量溶解于1ml的等渗NaCl溶液中,或者添加到1000ml的皮下灌注液中,或者在建议的输注部位进行注射(参见例如,"Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明顿药物科学]",第15版,1035-1038页和1570-1580页)。就人施用而言,制剂应符合FDA标准所要求的无菌度、致热原性、一般安全性和纯度标准。在某些实施例中,本发明的药物组合物包含无菌盐溶液和本文所述的RNAi构建体或者由其组成。在其他实施例中,本发明的药物组合物包含本文所述的RNAi构建体和无菌水(例如注射用水,WFI)或者由其组成。在仍其他实施例中,本发明的药物组合物包含本文所述的RNAi构建体和磷酸盐缓冲盐水(PBS)或者由其组成。

[0522] 在一些实施例中,将本发明的药物组合物包装或贮存在装置中用以施用。用于注射配制品的装置包括但不限于:注射口、预充式注射器、自动注射器、注射泵、随身注射器、和注射笔。用于雾化或粉末配制品的装置包括但不限于:吸入器、吹入器、吸气器等。因此,本发明包括用于治疗或预防一种或多种疾病或障碍的、包含本发明药物组合物的施用装置。

[0523] 本发明提供了通过使细胞与本文所述的任一种RNAi构建体接触来减少或抑制细胞中靶基因的表达的方法。该细胞可以是体外或体内的。可以通过测量靶mRNA、靶蛋白或与靶基因表达相关的另一种生物标志物的量或水平来评估靶基因表达。相对于在未用RNAi构建体进行处理或未用对照RNAi构建体进行处理的细胞或动物中的靶基因表达,可以确定在用本发明的RNAi构建体进行处理的细胞或动物中靶基因表达的降低。例如,在一些实施例中,通过(a)测量用本发明的RNAi构建体处理的细胞中靶mRNA的量或水平,(b)测量用对照RNAi构建体(例如,针对未在细胞中表达的RNA分子的RNAi药剂或具有无义序列或错义序列的RNAi构建体)处理的或未用构建体处理的细胞中靶mRNA的量或水平,以及(c)比较(a)中从经过处理的细胞中测得的靶mRNA水平与(b)中从对照细胞中测得的靶mRNA水平来评估靶基因表达的降低或抑制。在比较之前,可以将经处理细胞和对照细胞中的靶mRNA水平相对于对照基因(例如18S核糖体RNA或管家基因)的RNA水平归一化。可以通过多种方法来测量靶mRNA水平,包括Northern印迹分析、核酸酶保护测定、荧光原位杂交(FISH)、逆转录聚合酶(RT)-PCR、实时RT-PCR、定量PCR、微滴式数字PCR等。

[0524] 在其他实施例中,通过(a)测量用本发明的RNAi构建体处理的细胞中靶蛋白的量或水平,(b)测量用对照RNAi构建体(例如,针对未在细胞中表达的RNA分子的RNAi药剂或具有无义序列或错义序列的RNAi构建体)处理的或未用构建体处理的细胞中靶mRNA的量或水平,以及(c)比较(a)中从经过处理的细胞中测得的靶蛋白水平与(b)中从对照细胞中测得

的靶蛋白水平来评估靶基因表达的降低或抑制。测量靶蛋白水平的方法对于本领域技术人员而言是已知的,并且包括Western印迹、免疫测定(例如ELISA)和流式细胞术。

[0525] 本发明还提供了用于在有需要的受试者中减少或抑制靶基因表达的方法,这些方法包括向受试者施用本文所述的任一种RNAi构建体。本发明的RNAi构建体可用于治疗或减轻与异常的靶基因表达或活性有关的病症、疾病或障碍,例如,基因产物的过表达引起病理表型。示例性的靶基因包括但不限于:LPA、PNPLA3、ASGR1、F7、F12、FXI、APOCIII、APOB、APOL1、TTR、PCSK9、SCAP、KRAS、CD274、PDCD1、C5、ALAS1、HAO1、LDHA、ANGPTL3、SERPINA1、AGT、HAMP、LECT2、EGFR、VEGF、KIF11、AT3、CTNNB1、HMGB1、HIF1A、和STAT3。靶基因还可以包括病毒基因,例如乙型肝炎和丙型肝炎病毒基因、人免疫缺陷病毒基因、疱疹病毒基因等。在一些实施例中,靶基因是编码人微RNA(miRNA)的基因。

[0526] 在某些实施例中,本发明的RNAi构建体将靶基因在细胞或受试者中的表达降低了至少50%。在一些实施例中,本发明的RNAi构建体将靶基因在细胞或受试者中的表达降低了至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、或至少85%。在其他实施例中,本发明的RNAi构建体将靶基因在肝细胞中的表达降低了约90%或更多,例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。可以利用本文所述的任何方法以及本领域中已知的其他方法来测量靶基因表达的降低百分比。

[0527] 以下实例,包括进行的实验和实现的结果,仅提供解释说明目的,并且不应被解释为限制所附权利要求的范围。

[0528] 实例

[0529] 实例1.具有不同化学修饰模式的PNPLA3RNAi构建体的体内活性

[0530] 为了评估不同化学修饰模式对RNAi构建体体内功效的影响,合成并且在如以下详细描述的表达PNPLA3的人源化小鼠模型中评估具有各种模式的2′-氟修饰的核苷酸和2′-O-甲基修饰的核苷酸的靶向含patatin样磷脂酶结构域蛋白3(PNPLA3)基因的RNAi构建体。

[0531] 使用固相亚磷酰胺化学方法合成RNAi构建体。在MerMade12(生物自动化公司)仪器上进行合成。

[0532] 材料

[0533] 乙腈(DNA合成分级,AXO152-2505,EMD)

[0534] 封端试剂A(80:10:10(v/v/v)四氢呋喃/二甲基吡啶/醋酸酐,BIO221/4000,EMD)

[0535] 封端试剂B(16%1-甲基咪唑/四氢呋喃,BIO345/4000,EMD)

[0536] 激活剂溶液(乙腈中的0.25M的5-(乙硫基)-1H-四唑(ETT),BIO152/0960,EMD)

[0537] 脱三苯甲基试剂(二氯甲烷中的3%的二氯乙酸,BIO830/4000,EMD)

[0538] 氧化试剂(70:20:10(v/v/v)四氢呋喃/吡啶/水中的0.02M的碘,BIO420/4000,EMD)

[0539] 二乙胺溶液(乙腈中的20%的DEA,NC0017-0505,EMD)

[0540] 巯基化试剂(Thiolation Reagent)(在40:60(v/v)吡啶/乙腈中的0.05M的5-N-[(二甲基氨基)亚甲基]氨基-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮(BIOSULII/160K))

[0541] 5′-氨基已基接头亚磷酰胺,磷酸化的亚磷酰胺,2′-脱氧胸苷亚磷酰胺,和腺苷、鸟苷、胞嘧啶和尿苷的2′-甲氧基和2′-氟亚磷酰胺(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)),经约10mL的分子筛(3Å,吉提贝可公司(J.T.Baker))的乙腈中的0.10M

[0542] CPG支持物(CPG Support)(Hi-Load Universal Support,500A(BH5-3500-G1),79.6μmol/g,0.126g(10μmol))

[0543] 氢氧化铵(浓缩的,吉提贝可公司)

[0544] 合成

[0545] 将试剂溶液、亚磷酰胺溶液和溶剂连接到MerMade12仪器上。将固体支持物添加至每个柱(具有顶部和底部玻璃料的4mL SPE管),并且将柱固定到仪器上。将柱用乙腈洗涤两次。冲洗亚磷酰胺和试剂溶液管线。使用Poseidon软件开启合成。通过重复去保护/偶联/氧化/封端合成循环来完成合成。特别地,向固体支持物中添加脱三苯甲基试剂以除去5′-二甲氧基三苯甲基(DMT)保护基。用乙腈洗涤固体支持物。向该支持物中添加亚磷酰胺和激活剂溶液,然后孵育以使进入的核苷酸与游离的5’-羟基偶联。用乙腈洗涤支持物。向该支持物中添加氧化或巯基化试剂,以将亚磷酸三酯转化为磷酸三酯或硫代磷酸酯。向该支持物中添加封端试剂A和B以终止任何未反应的寡核苷酸链。用乙腈洗涤支持物。在最终的反应循环后,用二乙胺溶液洗涤树脂以除去2-氰基乙基保护基。将支持物用乙腈洗涤并在真空下干燥。

[0546] GalNAc缀合

[0547] 用5′-氨基已基接头制备用于缀合至三价的N-乙酰基-半乳糖胺(GalNAc)部分的正义链(下式VII中所示的结构)。在自动合成后,将柱从仪器取出并且转移到罩中的真空歧管中。在真空过滤下,通过用二氯甲烷(DCM)中的1%三氟乙酸(TFA)的2mL等分试样连续处理来从固体支持物上除去5’-单甲氧基三苯甲基(MMT)保护基。当洗脱液中不再观察到橙色/黄色时,用二氯甲烷洗涤树脂。用5mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中的2%的二异丙基乙胺洗涤树脂。在单独的小瓶中,用1,1,3,3-四甲基鎓四氟硼酸酯(TATU,12.83mg,40μmol)和二异丙基乙胺(DIEA)(10.5μL,360μmol)来制备GalNAc3-Lys2-Ahx(67mg,40μmol)在DMF(0.5mL)中的溶液。将激活的偶联溶液添加至树脂并且将柱加盖并在室温下孵育过夜。将树脂用DMF,DCM洗涤,并在真空下干燥。

[0548] 裂解

[0549] 从合成器或真空歧管中移出合成柱。将来自每个柱的固体支持物转移至10mL小瓶中。向固体支持物中添加4mL浓缩的氢氧化铵。将盖紧紧地固定在瓶子上并且将混合物在55℃加热4h。将瓶子移至冷却器并且在罩中打开前冷却20分钟。将混合物通过8mL SPE管过滤以除去固体支持物。用1mL的50:50乙醇/水冲洗小瓶和固体支持物。

[0550] 分析和纯化

[0551] 分析并且通过阴离子交换色谱法纯化一部分合并的滤液。将合并的级分通过尺寸排阻色谱法脱盐并且通过离子对反相高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)分析。将合并的级分冻干以获得白色无定形粉末。

[0552] 分析型阴离子交换色谱法(AEX):

[0553] 柱:Thermo DNAPac PA200RS(4.6x 50mm,4μm)

[0554] 仪器:安捷伦(Agilent)1100HPLC

[0555] 缓冲液A:20mM磷酸钠,10%乙腈,pH 8.5

[0556] 缓冲液B:20mM磷酸钠,10%乙腈,pH 8.5,1M溴化钠

[0557] 流速:40℃下1mL/min

[0558] 梯度:6.2min内20％-65％B

[0559] 制备型阴离子交换色谱法(AEX):

[0560] 柱:Tosoh TSK Gel SuperQ-5PW,21x 150mm,13μm

[0561] 仪器:安捷伦1200HPLC

[0562] 缓冲液A:20mM磷酸钠,10％乙腈,pH 8.5

[0563] 缓冲液B:20mM磷酸钠,10％乙腈,pH 8.5,1M溴化钠

[0564] 流速:8mL/min

[0565] 注射体积:5mL

[0566] 梯度:35％-55％B经20min

[0567] 制备型尺寸排阻色谱法(SEC):

[0568] 柱:GE Hi-Prep 26/10

[0569] 仪器:GE AKTA Pure

[0570] 缓冲液:水中的20％的乙醇

[0571] 流速:10mL/min

[0572] 注射体积:15mL(使用样品装载泵)

[0573] 离子对反相(IP-RP)HPLC:

[0574] 柱:Water Xbridge BEH OST C18,2.5μm,2.1x 50mm

[0575] 仪器:安捷伦1100HPLC

[0576] 缓冲液A:15.7mM DIEA,水中的50mM已氟异丙醇(HFIP)

[0577] 缓冲液B:15.7mM DIEA,50:50水/乙腈中的50mM HFIP

[0578] 流速:0.5mL/min

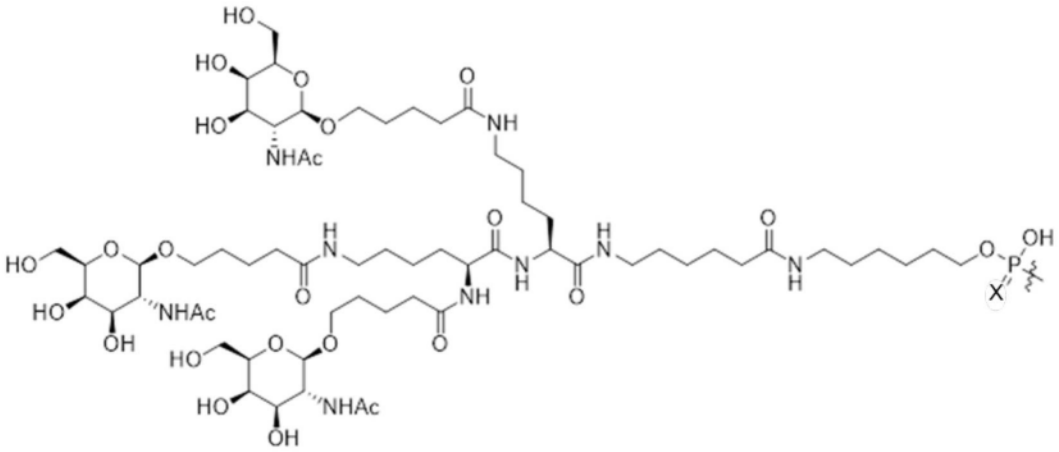
[0579] 梯度:10％-30％B经6min

[0580] 退火

[0581] 将少量的正义链和反义链称重到单独的小瓶。向小瓶中添加基于干重的约2mM浓度的siRNA重构缓冲液(凯杰公司(Qiagen))或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在NanoDrop One上测量实际样品浓度(ssDNA,消光系数＝33μg/OD260)。然后将两条链以等摩尔比混合,并且将样品在90℃的孵育箱中加热5分钟并且允许缓慢冷却至室温。通过AEX分析样品。将双链体注册并提交以用于如下文更详细描述的体内测试。

[0582] GalNAc3-Lys2-Ahx的制备

[0583] 式VII

[0584] 

[0585] 其中X＝O或S。弯曲线代表与RNAi构建体的正义链的5′末端核苷酸的附接点。

[0586] 向50mL的falcon管中添加在DCM(30mL)中的Fmoc-Ahx-OH(1.13g,3.19mmol),随后是DIEA(2.23mL,12.78mmol)。将该溶液添加至50mL离心管中的2-Cl三苯甲基氯树脂(3.03g,4.79mmol)中并加载到振荡器上2h。将溶剂排干并且将树脂用17:2:1DCM/MeOH/DIEA(30ml x 2),DCM(30mL x 4)洗涤并干燥。通过在290nm用UV分光光度检测,将负载确定为0.76mmol/g。

[0587] 将3g负载的2-Cl三苯甲基树脂悬浮在DMF(20mL)中的20％4-甲基哌啶中,并且在30min后排干溶剂。再重复该过程一次,并且用DMF(30mL x 3)和DCM(30mL x 3)洗涤树脂。

[0588] 向Fmoc-Lys(ivDde)-OH(3.45g,6mmol)在DMF(20mL)中的溶液中添加TATU(1.94g,6mmol),随后是DIEA(1.83mL,10.5mmol)。然后将溶液添加至以上去保护的树脂,并且将悬浮液在振荡器上放置过夜。排干溶剂并且用DMF(30mL x 3)和DCM(30mL x 3)洗涤树脂。

[0589] 用DMF(15mL)中的20％4-甲基哌啶处理树脂,并且在10min后,排干溶剂。再重复该过程一次并且用DMF(15mL x 4)和DCM(15mL x 4)洗涤树脂。

[0590] 向Fmoc-Lys(Fmoc)-OH(3.54g,6mmol)在DMF(20mL)中的溶液中添加TATU(1.94g,6mmol),随后是DIEA(1.83mL,10.5mmol)。然后将溶液添加至以上去保护的树脂并且将悬浮液在振荡器上放置过夜。排干溶剂并且用DMF(30mL x 3)和DCM(30mLx 3)洗涤树脂。

[0591] 用DMF(20mL)中的5％肼处理树脂,并且在5min后,排干溶剂。再重复该过程四次并且用DMF(30mL x 4)和DCM(30mL x4)洗涤树脂。

[0592] 向5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酸(4.47g,10mmol)在DMF(40mL)中的溶液中添加TATU(3.22g,10mmol),并且将溶液搅拌5min。将DIEA(2.96mL,17mmol)添加至该溶液,并且然后将混合物添加至以上树脂。将悬浮液在室温下保持过夜并且排干溶剂。用DMF(3x 30mL)和DCM(3x 30mL)洗涤树脂。

[0593] 用DCM(具有3％的三异丙基硅烷的30mL)中的1％TFA处理树脂,并且在5min后,排干溶剂。再重复三次该过程并且将合并的滤液真空浓缩。将残余物用二乙醚(50mL)研磨,并且将悬浮液过滤并干燥以给出粗产物。将粗产物用反相色谱法纯化并且用水中的0-20％的MeCN溶液洗脱。将级分合并并且冻干以给出呈白色固体的产物。

[0594] 下表1描绘了每个经修饰的PNPLA3RNAi构建体的正义序列和反义序列中修饰的位置。根据以下符号列出了核苷酸序列:dT、dA、dG、dC＝相应的脱氧核糖核苷酸;a、u、g、和c＝

相应的2′-O-甲基核糖核苷酸;Af、Uf、Gf、和Cf＝相应的2′-脱氧-2′-氟(“2′-氟”)核糖核苷酸;Phos＝末端核苷酸在其5′端具有单磷酸基团;invAb＝反向无碱基核苷酸(即当在链的3′端时,经由其3′位置处的取代连接至相邻核苷酸(3′-3′间键)或者当在链的5′端时,经由其5′位置处的取代连接至相邻核苷酸(5′-5′核苷酸间键)的无碱基核苷酸);和invdX＝反向脱氧核糖核苷酸(即当在链的3′端时,经由其3′位置处的取代连接至相邻核苷酸(3′-3′间键)或者当在链的5′端时,经由其5′位置处的取代连接至相邻核苷酸(5′-5′核苷酸间键)的脱氧核糖核苷酸)。在序列中“s”的插入表明两个相邻的核苷酸经由硫代磷酸二酯基(例如硫代磷酸酯核苷酸间键)而连接。除非另有说明,否则所有其他的核苷酸都是经由3′-5′磷酸二酯基而连接。所有RNAi构建体均经由正义链的5′端缀合至式VII所示的GalNAc部分。表1还列出了每种RNAi构建体的模式名称和序列家族名称。图1中示意性地表示了模式名称。如果RNAi构建体具有与另一个RNAi构建体相同的序列家族名称,则这两个构建体具有相同的核心序列,但化学修饰模式不同。

[0595] 表1.示例性经修饰的PNPLA3RNAi构建体

[0596]

双链体编号	模式名称	序列家族名称	正义序列（5′-3′）	SEQ ID NO:	反义序列（5′-3′）	SEQ ID NO:
2118	CM1	T2	CfgGfcCfaAfuGfUfCfcAfcCfaGfcUfsusUf	1	{Phos}asGfscUfgGfuGfgacAfuUfgGfcCfgsUfsu	40
4544	P1	T2	cggccaAfuGfUfCfCfaccagcususu	2	{Phos}asGfscUfgGfUfggacAfuUfggccgsusu	41
2119	CM1	T3	GfgUfcCfaGfcCfUfGfaAfcUfuCfuUfsusUf	3	{Phos}asAfsgAfaGfuUfcagGfcUfgGfaCfcsUfsu	42
3552	P1	T3	gguccaGfcCfUfGfAfacuucuususu	4	{Phos}asAfsgAfaGfUfucagGfcUfggaccsusu	43
2125	CM1	T5	GfcUfuCfaUfgCfCfCfuUfcUfaCfaGfsusUf	5	{Phos}csUfsgUfaGfaAfgggCfaUfgAfaGfcsUfsu	44
2393	P1	T5	gcuucaUfgCfCfCfUfucuacagsusu	6	{Phos}csUfsgUfaGfAfagggCfaUfgaagcsusu	45
2120	CM1	T6	GfcGfgCfuUfcCfUfGfgGfcUfuCfuAfsusUf	7	{Phos}usAfsgAfaGfcCfcagGfaAfgCfcGfcsUfsu	46
3464	P1	T6	gcggcuUfcCfUfGfGfgcuucuasusu	8	{Phos}usAfsgAfaGfCfccagGfaAfgccgcsusu	47
2121	CM1	T8	GfuGfaCfaAfcGfUfAfcCfcUfuCfaUfsusUf	9	{Phos}asUfsgAfaGfgGfuacGfuUfgUfcAfcsUfsu	48
3918	P1	T8	gugacaAfcGfUfAfCfccuucaususu	10	{Phos}asUfsgAfaGfGfguacGfuUfgucacsusu	49
2124	CM1	T11	GfgUfaUfgUfuCfCfUfgCfuUfcAfuGfsusUf	11	{Phos}csAfsuGfaAfgCfaggAfaCfaUfaCfcsUfsu	50
2390	P1	T11	ggsuaugUfuCfCfUfGfcuucaugsusu	12	{Phos}csAfsuGfaAfGfcaggAfaCfauaccsusu	51
2370	CM1	T12	GfuAfuGfuUfcCfUfGfcUfuCfaUfgCfsusUf	13	{Phos}gsCfsaUfgAfaGfcagGfaAfcAfuAfcsUfsu	52
2391	P1	T12	guauguUfcCfUfGfCfuucaugcsusu	14	{Phos}gsCfsaUfgAfAfgcagGfaAfcauacsusu	53
2371	CM1	T15	UfgUfuCfcUfgCfUfUfcAfuGfcCfcUfsusUf	15	{Phos}asGfsgGfcAfuGfaagCfaGfgAfaCfasUfsu	54
2392	P1	T15	uguuccUfgCfUfUfCfaugcccususu	16	{Phos}asGfsgGfcAfUfgaagCfaGfgaacasusu	55
2122	CM1	T16	GfuUfcCfuGfcUfUfCfaUfgCfcCfuUfsusUf	17	{Phos}asAfsgGfgCfaUfgaaGfcAfgGfaAfcsUfsu	56
3465	P1	T16	guuccuGfcUfUfCfAfugcccuususu	18	{Phos}asAfsgGfgCfAfugaaGfcAfggaacsusu	57
2368	CM1	T19	CfcUfgCfuUfcAfUfGfcCfcUfuCfuAfsusUf	19	{Phos}usAfsgAfaGfgGfcauGfaAfgCfaGfgsUfsu	58
3467	P1	T19	ccugcuUfcAfUfGfCfccuucuasusu	20	{Phos}usAfsgAfaGfGfgcauGfaAfgcaggsusu	59
2369	CM1	T23	CfuUfcAfuGfcCfCfUfuCfuAfcAfgUfsusUf	21	{Phos}asCfsuGfuAfgAfaggGfcAfuGfaAfgsUfsu	60
2394	P1	T23	cuucauGfcCfCfUfUfcuacagususu	22	{Phos}asCfsuGfuAfGfaaggGfcAfugaagsusu	61
2123	CM1	T24	UfuCfaUfgCfcCfUfUfcUfaCfaGfuGfsusUf	23	{Phos}csAfscUfgUfaGfaagGfgCfaUfgAfasUfsu	62
3539	P1	T24	uucaugCfcCfUfUfCfuacagugsusu	24	{Phos}csAfscUfgUfAfgaagGfgCfaugaasusu	63
3558	CM1	T27	AfuGfcCfcUfuCfUfAfcAfgUfgGfcCfsusUf	25	{Phos}gsGfscCfaCfuGfuagAfaGfgGfcAfusUfsu	64
3916	P1	T27	augcccUfuCfUfAfCfaguggccsusu	26	{Phos}gsGfscCfaCfUfguagAfaGfggcaususu	65
3540	P1	T5	gcuucaUfgCfCfCfUfucuacaususu	27	{Phos}asUfsgUfaGfAfagggCfaUfgaagcsusu	66
5241	P2	T5	[invAb]gcuucaUfgCfCfCfUfucuacaususu	28	{Phos}asUfsgUfaGfAfagggCfaUfgaagcsusu	66
5614	P3	T5	cugcuucaUfgCfCfCfUfucuacas[invAb]	29	{Phos}asUfsgUfaGfAfagggCfaUfgaagcagsusu	67
5615	P4	T5	[invAb]cugcuucaUfgCfCfCfUfucuacsasu	30	{Phos}asUfsgUfaGfAfagggCfaUfgaagcagsusu	67
6191	P3	T5.1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas[invAb]	31	{Phos}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	68
6267	P9	T5.1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas[invAb]	31	{Phos}asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	69
7320	P9	T5.1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas[invdA]	32	usUfsguagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	70
7318	P9	T5.1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas[invAb]	31	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	71
7062	P9	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuacags[invAb]	33	asCfsuguaGfaaagGfcAfugaagcasusu	72
8513	P9	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuacags[invdA]	34	usCfsuguaGfaaagGfcAfugaagcasusu	73
8709	P9	T5.1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas[invdT]	35	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	71
8103	CM2	T5.1	cugcuuCfaUfGfCfcuuucuacsasu	36	asUfsguaGfaaAfggcaUfgAfagcagsusu	74
8104	CM3	T5.1	cugcuuCfaUfGfCfcuuucuacsasu	36	asUfsguaGfaaaggcaUfgAfagcagsusu	75
8105	CM4	T5.1	cugcuuCfaUfGfCfcuuucuacsasu	36	asUfsguaGfaAfAfggcaUfgAfagcagsusu	76
7463	P11	T5.1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas[invAb]	31	asUfsgUfagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	77
7464	P10	T5.1	[invAb]cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacsasu	37	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	71
7466	P16	T5.1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas[invAb]	31	asUfsguagAfaaGfgCfaUfgaagcagsusu	78

[0597]

双链体编号	模式名称	序列家族名称	正义序列（5′-3′）	SEQ ID NO:	反义序列（5′-3′）	SEQ ID NO:
7469	P17	T5.1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucUfaCfas[invAb]	38	asUfsguagAfaaGfgCfaUfgaagcagsusu	78
7470	P15	T5.1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas[invAb]	31	asUfsgUfaGfAfaaGfgCfaUfgaagcagsusu	79
6883	P3	T5.1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas[invAb]	31	asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	80
7319	P9	T5.1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas[invAb]	31	usUfsguagAfaaggCfaUfgaagcagsusu	70
7064	P3	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuacags[invAb]	33	asCfsuGfuAfGfaaagGfcAfugaagcasusu	71
7576	P11	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuacags[invAb]	33	asCfsuGfuaGfaaagGfcAfugaagcasusu	72
7579	P18	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuacags[invAb]	33	asCfsuGfuaGfaaAfgGfcAfugaagcasusu	73
7580	P12	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuAfcAfgs[invAb]	39	asCfsuGfuaGfaaagGfcAfugaagcasusu	72

[0598] 在最初的一组实验中,合成了具有不同序列的十三种不同的PNPLA3RNAi构建体以具有P1化学修饰模式或CM1对照化学修饰模式。已经报道了具有CM1对照化学修饰模式的siRNA分子在体内具有有效和延长的基因沉默作用。参见Nair等人,J.Am.Chem.Soc.[美国化学会志],第136卷:16958-16961,2014。在表达野生型人PNPLA3或人PNPLA3的变体形式的人源化小鼠模型中评估了经化学修饰的RNAi构建体抑制PNPLA3基因表达的功效。为了创建小鼠模型,将在磷酸盐缓冲盐水(赛默飞世尔科技,14190-136)中稀释至1×10^{12}病毒颗粒/动物的相关的腺病毒(AAV;血清型AAV8或AAV7;无内毒素)静脉注射至C57BL/6NCrl雄性小鼠的尾静脉(查尔斯河实验室公司(Charles River Laboratories Inc.))以驱动人PNPLA3、$PNPLA3^{rs738409}$、或$PNPLA3^{rs738409\text{-}rs738408}$基因的表达。小鼠通常为10-12周龄,每治疗组包括4至6的n只动物。

[0599] 在注射了AAV-PNPLA3、$PNPLA3^{rs738409}$、和/或$PNPLA3^{rs738409\text{-}rs738408}$的小鼠中测试所有RNAi构建体。还包括至少两个媒介物治疗的对照组:AAV空载体和用媒介物治疗的AAV-PNPLA3、$PNPLA3^{rs738409}$、或$PNPLA3^{rs738409\text{-}rs738408}$。AAV注射后两周,用稀释于磷酸盐缓冲盐水(赛默飞世尔科技,14190-136)中的单剂量的RNAi构建体(0.5mM)(以0.5、1.0、3.0或5.0毫克/每千克动物)经由皮下注射处理小鼠。RNAi构建体注射后第8、15、22、28或42天,将肝脏从动物中收集,在液氮中速冻,使用凯杰QIACubeHT仪器(9001793)和凯杰RNeasy 96QIACube HT试剂盒(74171)根据制造商的说明进行纯化RNA的加工。使用QIAxpert系统(9002340)分析样品。将RNA用不含RQ1RNA酶的DNA酶(M6101)处理RNA,并使用应用生物系统公司TaqManTM RNA-to-CTTM1-Step试剂盒(4392653)进行制备以进行实时qPCR。在QuantStudio实时PCR机上运行实时qPCR。结果基于相对于小鼠Gapdh(来自英杰公司(Invitrogen)的TaqMan™测定,分别为hs00228747_m1和4352932E)归一化的人PNPLA3的基因表达,并且呈现为与人PNPLA3mRNA表达与媒介物处理的对照动物相比的相对敲低。

[0600] 比较具有P1化学修饰模式的RNAi构建体(双链体编号4544、3552、2393、3464、3918、2390、2391、2392、3465、3467、2394、3539、和3916)与具有CM1对照修饰模式的那些(双链体编号2118、2119、2125、2120、2121、2124、2370、2371、2122、2368、2369、2123、和3558)的该最初的一组实验的结果显示于图2中。当将RNAi构建体以5mg/kg皮下施用于表达人$PNPLA3^{rs738409}$变异基因的小鼠时,当在注射后的8天测量时,具有P1模式的构建体通常比具有CM1模式(无论序列如何)的构建体更大程度的降低PNPLA3表达。

[0601] 制备变化的P1修饰模式(以修改链的长度,RNAi构建体端的性质(即突出端相对于

平端),和/或在正义链的5′或3′端包括反向无碱基核苷酸)并将其应用于具有相同核心序列的RNAi构建体。在人源化小鼠模型中评估了具有新模式的RNAi构建体的体内功效的改善。特别地,将具有P1、P2、P3、或P4化学修饰模式(双链体编号3540、5241、5614、和5615)的RNAi构建体以5mg/kg的剂量皮下施用至表达人PNPLA3^{rs738409}变异基因的小鼠。在施用RNAi构建体后15天评估了人PNPLA3在肝脏中的表达水平。结果显示于图3中。具有P2、P3、或P4模式的RNAi构建体比具有P1模式的RNAi构建体产生更大的PNPLA3表达平均降低。

[0602] 制备进一步变化的P3模式以增加体内mRNA敲低的效力和持续时间。将P3模式(双链体编号6191)中从5′端开始计数的反义链的位置4和6处的2′-氟修饰的核苷酸改为2′-O-甲基修饰的核苷酸以产生P9模式。(双链体编号6267)。还合成了具有P9模式的,在正义链的3′端用反向脱氧核糖核苷酸代替反向无碱基核苷酸的RNAi构建体(双链体编号7320)。在以上所述的人源化小鼠模型中评估了所有三种构建体。在用5mg/kg双链体编号6267处理的动物中,在施用后22天人PNPLA3肝脏表达降低了97%,而用5mg/kg的双链体编号6191处理的动物在同一时间点显示人PNPLA3肝脏表达水平降低92%。双链体编号7320比双链体编号6191和6267更有效并且产生更长的基因敲低的持续时间,因为用3mg/kg的双链体编号7320处理的动物在施用后28天显示人PNPLA3肝脏表达水平降低95%。

[0603] 将P9模式应用于具有两个不同核心序列的PNPLA3RNAi构建体(双链体编号7318、7320、7062、8513、和8709)并且以1mg/kg和3mg/kg的剂量在体内生物发光成像测定中评估体内功效。为了生物发光成像测定,将相关腺病毒(AAV)载体设计为含有鼠巨细胞病毒启动子、萤火虫荧光素酶的完整序列、并且然后紧接萤火虫萤光素酶终止密码子的下游、对将测试的RNAi构建体具有特异性的一串合成的mRNA序列。在每个端,mRNA序列两侧是十个额外的核苷酸。将载体“PP3A(DM)”包装成AAV血清型,AAVDJ8(无内毒素)。注射前,将PP3A(DM)在磷酸盐缓冲盐水(赛默飞世尔科技,14190-136)中稀释至5×10^{11}个病毒颗粒/动物并且静脉注射到BALB/c雄性小鼠的尾静脉中(查尔斯河实验室公司)。小鼠通常为10-12周龄,每组包括n=5只动物。

[0604] 注射AAV后两周,按照制造商的说明为小鼠注射RediJect D-荧光素生物发光底物(珀金埃尔默公司(PerkinElmer),770504)。脉冲十分钟后,将小鼠在IVIS体内光谱成像系统(珀金埃尔默公司)上成像。然后根据来自涵盖肝脏的确定的感兴趣区域的基线总通量分数来将小鼠随机分组。一旦随机化后,将小鼠用在磷酸盐缓冲盐水中稀释(赛默飞世尔科技,14190-136)的单剂量的RNAi构建体(0.5mM)(经由皮下注射,以每千克体重1.0或3.0毫克)处理或者仅用磷酸盐缓冲盐水(表示为“媒介物”)处理。按照相同的方案每周对小鼠成像,并对总通量评分采用相同的门控约束。将数据表示为总通量(光子/秒,y轴)相对于RNAi构建体注射后的周数(x轴)。总通量的降低表明荧光素酶报告基因表达的降低。

[0605] 此实验的结果展示于图4A和4B中。在RNAi构建体的单剂量的1mg/kg后至少3周(图4A)和单剂量的3mg/kg后至少5周(图4B),与媒介物处理的动物的信号相比,来自用具有P9模式的不同RNAi构建体处理的动物的荧光素酶报告基因的信号显著降低。对许多RNAi构建体,单次3mg/kg的剂量足以抑制荧光素酶报告基因的表达长达6周。

[0606] 还在以上所述的人源化小鼠模型中评估了这些RNAi构建体(双链体编号7318、7320、7062、8513、和8709)。特别地,将RNAi构建体以0.5、1、或3mg/kg皮下施用至表达人源化PNPLA3$^{rs738409\text{-}rs738408}$变异基因的小鼠。在施用RNAi构建体后28或42天通过qPCR评估了人

PNPLA3在肝脏中的表达水平。结果表示为与媒介物处理的对照动物相比的人PNPLA3mRNA表达的相对敲低并且显示于下表2中。

[0607] 表2.PNPLA3RNAi构建体的体内功效

[0608]

		第28天		第42天	
双链体编号	剂量（mg/kg）	平均相对敲低（n＝4）	标准误差	平均相对敲低（n＝4）	标准误差
8709	0.5	-57.95	2.07	—	—
8513	0.5	-46.58	7.95	—	—
7318	0.5	-68.83	6.18	—	—
7320	0.5	-50.01	3.38	—	—
7062	0.5	-50.65	5.23	—	—
8709	1	-71.96	4.58	-54.55	5.67

[0609]

		第28天		第42天	
双链体编号	剂量（mg/kg）	平均相对敲低（n＝4）	标准误差	平均相对敲低（n＝4）	标准误差
8513	1	-74.47	2.17	-60.54	2.32
7318	1	-76.88	3.04	-71.07	2.41
7320	1	-66.30	3.27	-62.21	4.36
7062	1	-69.37	2.32	-57.74	4.30
8709	3	-91.70	2.00	-81.13	3.19
8513	3	-90.54	1.17	-74.77	3.28
7318	3	-93.25	1.13	-70.80	8.38
7320	3	-91.08	0.60	-80.12	4.64
7062	3	-90.52	1.42	-83.75	1.56

[0610] 具有P9修饰模式的RNAi构建体比先前测试的模式更有效并且产生更长的基因敲低持续时间。施用0.5mg/kg的单剂量的RNAi构建体导致单剂量施用后四周人PNPLA3肝脏表达降低约50％，而施用1mg/kg的剂量的构建体导致单剂量施用后四周人PNPLA3肝脏表达降低约70％。1mg/kg剂量足以在单剂量后六周内维持PNPLA3表达降低超过55％。在施用单剂量四周后，施用单剂量的3mg/kg的RNAi构建体导致人PNPLA3的肝脏表达降低了90％或更多。施用3mg/kg剂量后六周，人PNPLA3的肝脏表达仍降低至约75％或更高。用具有两个不同序列的RNAi构建体观察到了改善的基因敲低的效力和持续时间，这说明P9化学修饰模式有效地稳定了RNAi构建体(至少部分地不依赖于核碱基序列)。

[0611] 接着，比较了具有P9化学修饰模式的PNPLA3RNAi构建体与具有三种不同对照修饰模式之一的PNPLA3RNAi构建体的体内功效。先前已经报道了CM2、CM3、和CM4修饰模式提高了siRNA分子的代谢稳定性，从而导致改善的基因沉默效力和持续时间。参见Foster等人，Molecular Therapy[分子疗法]，第26卷:708-717，2018。所有RNAi构建体在正义链和反义链中均具有相同的核心核苷酸序列并且仅在化学修饰模式上不同。合成了两种具有P9修饰

模式的不同构建体-在正义链的3′端具有反向无碱基的一种(双链体编号7318)和在正义链的3′端具有反向脱氧胸苷的一种(双链体编号8709)。还合成了具有CM2、CM3、或CM4修饰模式之一的RNAi构建体(双链体编号分别为8103、8104、和8105)。然后将每个RNAi构建体以3mg/kg的剂量皮下施用至表达人源化PNPLA3$^{rs738409\text{-}rs738408}$变异基因的小鼠。在施用RNAi构建体后28天通过qPCR评估了人PNPLA3在肝脏中的表达水平。将结果显示于图5中。在所有测试的构建体中,具有P9修饰模式,在正义链的3′端具有反向无碱基的RNAi构建体(双链体编号7318)产生肝脏PNPLA3表达的最大降低。具有P9修饰模式,在正义链的3′端具有反向脱氧胸苷的RNAi构建体(双链体编号8709)产生了比具有CM4模式的构建体(双链体编号8105)更多的肝脏PNPLA3表达降低和与具有CM2和CM3模式的构建体(双链体编号分别为8103和8104)相当的肝脏PNPLA3表达的降低。

[0612] 在单独的一组实验中,设计了P3修饰模式的替代变化并评估了其在人源化PNPLA3小鼠模型中的体内功效。将P3模式的变化应用于具有两个不同序列的RNAi构建体。表1中显示了每个RNAi构建体的正义链和反义链的序列并且图1中示意性地显示了修饰模式。将RNAi构建体以3mg/kg的剂量皮下施用至表达人源化PNPLA3$^{rs738409\text{-}rs738408}$变异基因的小鼠。在施用RNAi构建体后28天通过qPCR评估了人PNPLA3在肝脏中的表达水平。将结果显示在下表3中。在单次皮下注射3mg/kg后第四周,所有RNAi构建体均产生约90%或更高的人PNPLA3的肝脏表达降低。

[0613] 表3.具有替代性化学修饰模式的PNPLA3RNAi构建体的体内功效

[0614]

双链体编号	模式名称	序列家族名称	在第28天的平均相对敲低(n=4)	标准误差
6883	P3	T5.1	-89.28	2.29
7319	P9	T5.1	-95.93	0.91

[0615]

7464	P10	T5.1	-90.63	1.52
7463	P11	T5.1	-93.78	0.90
7470	P15	T5.1	-90.58	2.70
7466	P16	T5.1	-95.25	0.26
7469	P17	T5.1	-95.43	0.78
7064	P3	T23	-95.67	1.42
7576	P11	T23	-89.20	1.90
7580	P12	T23	-93.68	1.29
7579	P18	T23	-91.35	1.84

[0616] 实例2.具有不同化学修饰模式的ASGR1RNAi构建体的体内活性

[0617] 如实例1中所示的,将P1化学修饰模式应用于具有靶向人PNPLA3mRNA的不同序列的13个不同RNAi构建体,改善这些构建体的基因沉默效力。为了探索P1化学修饰模式是否增强靶向另一种肝脏基因的RNAi构建体的效力,根据实例1中所述的方法用P1化学修饰模式合成了靶向去唾液酸糖蛋白受体1(ASGR1)mRNA的RNAi构建体。用CM1对照化学修饰模式

合成具有相同序列的RNAi构建体。下表4中提供了使用与表1相同的以上所述的符号的RNAi构建体的序列。将具有式VII所示结构的GalNAc部分缀合至RNAi构建体的正义链的5′端(指定为双链体编号1520)并且将具有式IX所示结构的GalNAc部分缀合至RNAi构建体的正义链的5′端(指定为双链体编号1421)。如实例1中所述的进行GalNAc部分至RNAi构建体的正义链的缀合,除了具有式IX所示的结构的GalNAc部分,如下制备GalNAc部分。向2-(2-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酸(5.37g,10mmol)在DMF(40mL)中的溶液中添加TATU(3.22g,10mmol),并且将溶液搅拌5min。将DIEA(2.96mL,17mmol)添加至该溶液,并且然后将混合物添加至以上实例1中所述的树脂。将悬浮液在室温下保持过夜并且排干溶剂。用DMF(3x 30mL)和DCM(3x 30mL)洗涤树脂。

[0618] 表4.示例性经修饰的ASGR1RNAi构建体

[0619]

双链体编号	模式名称	GalNAc部分	正义序列(5′-3′)	SEQ ID NO:	反义序列(5′-3′)	SEQ ID NO:
1421	CM1	式IX	GfuGfgGfaAfgAfAfAfgAfuGfaAfgUfsusUf	81	{Phos}asCfsuUfcAfuCfuuuCfuUfcCfcAfcsUfsu	83
1520	P1	式VII	gugggaAfgAfAfAfGfaugaagususu	82	{Phos}asCfsuUfcAfUfcuuuCfuUfcccacsusu	84

[0620] 通过向C57BL/6J小鼠施用RNAi构建体来评估RNAi构建体在抑制肝脏小鼠ASGR1表达中的体内功效。向10-12周大的野生型C57BL/6动物(查尔斯河实验室(Charles River))喂食标准饲料(chow)(2020×Teklad global无大豆蛋白的挤出的啮齿动物饮食;Harlan)。在第0天,小鼠接受缓冲液或0.25ml缓冲液中的5mg/kg体重的指定的RNAi构建体(每组n=9)。在第4天收获三只动物,在第8天收获三只动物并且在第15天收获三只动物以用于进一步分析。将来自收获的动物的肝脏总RNA进行加工以进行qPCR分析。通过比较用RNAi构建体处理的动物的肝脏组织中Asgr1mRNA的量与注射了缓冲液的动物肝脏组织中Asgr1mRNA的量来评估RNAi构建体的功效。结果表明,在所有测量的时间点上,接受了具有P1修饰模式的RNAi构建体(双链体编号1520)的动物表现出比接受具有CM1对照修饰模式的RNAi构建体的动物更大的肝脏ASGR1表达降低(图6)。与实例1中描述的靶向人PNPLA3mRNA的RNAi构建体的结果相似,P1化学修饰模式改善了RNAi构建体的效力。

[0621] 实例3.具有不同化学修饰模式的LPA RNAi构建体的体内活性

[0622] 为了进一步评估本文所述的化学修饰模式改善RNAi构建体的体内效力的能力,根据实例1中所述的方法,合成了靶向第三肝脏基因(LPA基因)的RNAi构建体并且将其与具有式VII所示的结构的GalNAc部分缀合。下表5中提供了使用与表1相同的以上所述的符号的RNAi构建体的序列。表5还列出了每种RNAi构建体的模式名称和序列家族名称。图1中示意性地表示了模式名称。如果RNAi构建体具有与另一个RNAi构建体相同的序列家族名称,则这两个构建体具有相同的核心序列,但化学修饰模式不同。

[0623] 表5.示例性经修饰的LPA RNAi构建体

[0624]

双链体编号	模式名称	序列家族名称	正义序列（5′-3′）	SEQ ID NO:	反义序列（5′-3′）	SEQ ID NO:
3632	CM1	T101	GfcCfcCfuUfaUfUfGfuUfaUfaCfgAfsusUf	85	{Phos}usCfsgUfaUfaAfcaaUfaAfgGfgGfcsUfsu	107
3635	P1	T101	gccccuUfaUfUfGfUfuauacgasusu	86	{Phos}usCfsgUfaUfAfacaaUfaAfggggcsusu	108
4973	P1	T102	acacaaUfgCfUfCfAfgacgcagsusu	87	{Phos}csUfsgCfgUfCfugagCfaUfugugususu	109
6248	P4	T102	[invAb]ugacacaaUfgCfUfCfAfgacgcsasg	88	{Phos}csUfsgCfgUfCfugagCfaUfugugucasusu	110
7934	P19	T102	ugacacAfaUfGfCfUfcagacgcas[invAb]	89	usUfsgCfgUfcUfGfagcaUfuGfugucasusu	111
10927	P27	T102	acacaaUfgCfUfCfAfgacgcaaus[invAb]	90	usUfsgcguCfugagCfaUfugugususu	112
11351	P28	T102	acacaaUfgCfUfCfAfgacgcas[invAb]	91	usUfsgcguCfugagCfaUfugugususu	112
4601	P1	T103	ccuagaGfgCfUfCfCfuucugaasusu	92	{Phos}usUfscAfgAfAfggagCfcUfcuaggsusu	113
6247	P6	T103	agccuagaGfgCfUfCfCfuucugsasa	93	{Phos}usUfscAfgAfAfggagCfcUfcuaggcususu	114
8336	P10	T104	[invAb]uucgcccuUfgGfUfGfUfuacacscsa	94	usGfsguguAfacacCfaAfgggcgaasusu	115
11313	P25	T104	[invAb]cgcccuUfGfGfUfguuacaccasusu	95	usGfsguguAfacacCfaAfgggcgsusu	116
11318	P22	T104	[invAb]cgcccuUfGfGfUfguuacacscsa	96	usGfsguguAfacaccaAfgGfgcgsusu	117
11372	P19	T105	cagaauCfaAfGfUfGfuccuugcas[invAb]	97	usUfsgCfaAfgGfAfcacuUfgAfuucugsusu	118
17183	P25	T105	[invAb]gaaucaAfGfUfGfuccuugcaasusu	98	usUfsgcaaGfgacaCfuUfgauucsusu	119
18444	P30	T105	cagaaucaAfGfUfGfuccuugcas[invAb]	99	usUfsgcaaGfgacaCfuUfgauucsusg	120
11580	P27	T106	aaucaaGfuGfUfCfCfuugcaauus[invAb]	100	asUfsugcaAfggacAfcUfugauususu	121
18436	P29	T106	agaaucaaGfuGfUfCfCfuugcaas[invAb]	101	asUfsugcaAfggacAfcUfugauuscsu	122
8395	P19	T107	agucuuGfgUfCfCfUfcuaugacas[invAb]	102	asUfsgUfcAfuAfGfaggaCfcAfagacususu	123
8401	P9	T107	agucuuggUfcCfUfCfUfaugacas[invAb]	103	asUfsgucaUfagagGfaCfcaagacususu	124
11344	P24	T107	agucuuGfgUfCfCfUfcuaugacas[invAb]	102	asUfsgUfcAfuagaggaCfcAfagacususu	125
4995	P1	T108	uucugaAfgAfAfGfCfaccaacususu	104	{Phos}asGfsuUfgGfUfgcuuCfuUfcagaasusu	126
6182	P2	T108	[invAb]uucugaAfgAfAfGfCfaccaacususu	105	{Phos}asGfsuUfgGfUfgcuuCfuUfcagaasusu	126
6150	P7	T108	[invAb]ccuucugaAfgAfAfGfCfaccaacs[invAb]	106	{Phos}asGfsuUfgGfUfgcuuCfuUfcagaaggsusu	127

[0625] 在最初的实验中,合成了具有相同核苷酸序列的RNAi构建体以具有CM1对照化学修饰模式(双链体编号3632)或P1化学修饰样式(双链体编号3635)。在双转基因小鼠模型中评估了两种构建体的体内功效,其表达具有平均约50-60mg/dL的血清基线Lp(a)水平的完全功能人Lp(a)颗粒。Lp(a)是由LDL颗粒和糖蛋白载脂蛋白(a)(apo(a))组成的低密度脂蛋白,其通过二硫键与LDL颗粒的载脂蛋白B连接。Apo(a)由LPA基因编码并且血清Lp(a)水平的变化反映了LPA基因表达的变化。通过将表达来自含有全长人LPA基因的酵母人工染色体(YAC)的人apo(a)的转基因小鼠(Frazer等人,Nature Genetics[自然遗传学],第9卷:424-431,1995)与表达人apoB-100的转基因小鼠(Linton等人,J.Clin.Invest.[临床研究杂志],第92卷:3029-3037,1993)杂交来产生双转基因小鼠。以0.5mg/kg的剂量单次皮下注射施用LPA RNAi构建体。在注射前和然后注射后的第14天和第28天取血清样品。使用Lp(a)ELISA测定法(目录号10-1106-01,MercodiaAB,乌普萨拉(Uppsala),瑞典)测量血清中Lp(a)的浓度。基于动物的基线Lp(a)水平计算特定时间点处每只动物的Lp(a)水平变化百分比。结果显示于图7中。在注射后两周,与具有对照CM1修饰模式的双链体编号3632(-35%)相比,具有P1修饰模式的双链体编号3635的施用导致更大的血清Lp(a)水平的平均下降(-49%)(虽然无统计学意义)。

[0626] 在第二系列的实验中,用P1化学修饰模式或该模式的变异合成了靶向与第一组实验中的那些的LPA mRNA的不同的区域的LPARNAi构建体。在双转基因小鼠模型中评估了具有新模式的RNAi构建体在体内LPA基因表达的抑制的幅度和持续时间上的改善。特别地,将来自具有P1修饰模式或模式变体(例如P2、P4、P6或P7化学修饰模式)之一的三个不同序列家族的LPA RNAi构建体以2mg/kg的剂量皮下施用至以上所述的双转基因小鼠。在注射前

(以获得基线水平)和施用LPA RNAi构建体后的第1、2和4周测量动物的血清Lp(a)水平。这组实验的结果显示在下表6中。在三个序列家族中,与具有P1修饰模式的RNAi构建体相比,具有P2、P4、P6、或P7修饰模式的RNAi构建体导致Lp(a)血清水平的更大的抑制降低和持续时间。在单次皮下注射2mg/kg后长达4周,具有P6或P7化学修饰模式的RNAi构建体导致血清Lp(a)水平大于80%的降低。

[0627] 表6.LPA RNAi构建体的体内功效

[0628]

			血清Lp(a)自基线的百分比变化（平均值 ±SEM）		
双链体编号	模式名称	序列家族名称	第1周	第2周	第4周
4973	P1	T102	-66 ± 6%	-73 ± 7%	16 ± 21%
6248	P4	T102	-73 ± 12%	-78 ± 10%	-37 ± 15%
4601	P1	T103	-92 ± 2%	-95 ± 1%	-76 ± 3%
6247	P6	T103	-93 ± 2%	-95 ± 1%	-86 ± 1%
4995	P1	T108	-70 ± 12%	-70 ± 12%	14 ± 33%
6182	P2	T108	-87 ± 1%	-82 ± 5%	-45 ± 7%
6150	P7	T108	-92 ± 2%	-93 ± 2%	-83 ± 1%

[0629] 接着,设计了化学修饰模式的替代变化并且评估了其在双转基因小鼠模型的体内功效。将化学修饰模式的变化应用于具有来自五个不同序列家族的序列的RNAi构建体。表5中提供了每个RNAi构建体的正义链和反义链的序列并且图1中示意性地显示了修饰模式。将RNAi构建体以1mg/kg的剂量皮下施用至表达人Lp(a)颗粒的双转基因小鼠。在注射前(以获得基线水平)和施用LPA RNAi构建体后的第2、3和4周测量动物的血清Lp(a)水平。将结果显示于下表7中。单次皮下注射1mg/kg后四周,几种模式变化(如P9、P19、P22、P24、P27、P28、和P29)导致Lp(a)血清水平降低了50%以上。具有P27化学修饰模式的RNAi构建体在抑制Lp(a)血清水平中特别有效,因为这些构建体在单次注射后四周产生Lp(a)水平约75%的可持续降低。

[0630] 表7.具有替代性化学修饰模式的LPA RNAi构建体的体内功效

[0631]

			血清Lp(a)自基线的平均百分比变化		
双链体编号	模式名称	序列家族名称	第2周	第3周	第4周
7934	P19	T102	-77%	-76%	-28%
10927	P27	T102	-92%	-85%	-77%
11351	P28	T102	-85%	-89%	-68%
8336	P10	T104	-39%	-59%	-16%
11318	P22	T104	-64%	-81%	-64%

[0632]

			血清Lp(a)自基线的平均百分比变化		
双链体编号	模式名称	序列家族名称	第2周	第3周	第4周
11313	P25	T104	-51%	-54%	+3
11372	P19	T105	-72%	-75%	-13%
17183	P25	T105	-56%	-37%	-16%
18444	P30	T105	-75%	-70%	-44%
11580	P27	T106	-86%	-78%	-74%
18436	P29	T106	-87%	-80%	-63%
8401	P9	T107	-90%	-82%	-58%
8395	P19	T107	-79%	-84%	-59%
11344	P24	T107	-87%	-75%	-67%

[0633] 本文讨论和引用的所有出版物、专利和专利申请均通过引用以其整体结合在此。应理解,披露的发明不限于所描述的特定方法、方案和材料,因为这些可以变化。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,并且不意图限制所附权利要求的范围。

[0634] 本领域技术人员仅使用常规实验就将认识到或能够确定本文所述的本发明的特定实施例的许多等效物。这类等效物旨在由以下权利要求所涵盖。

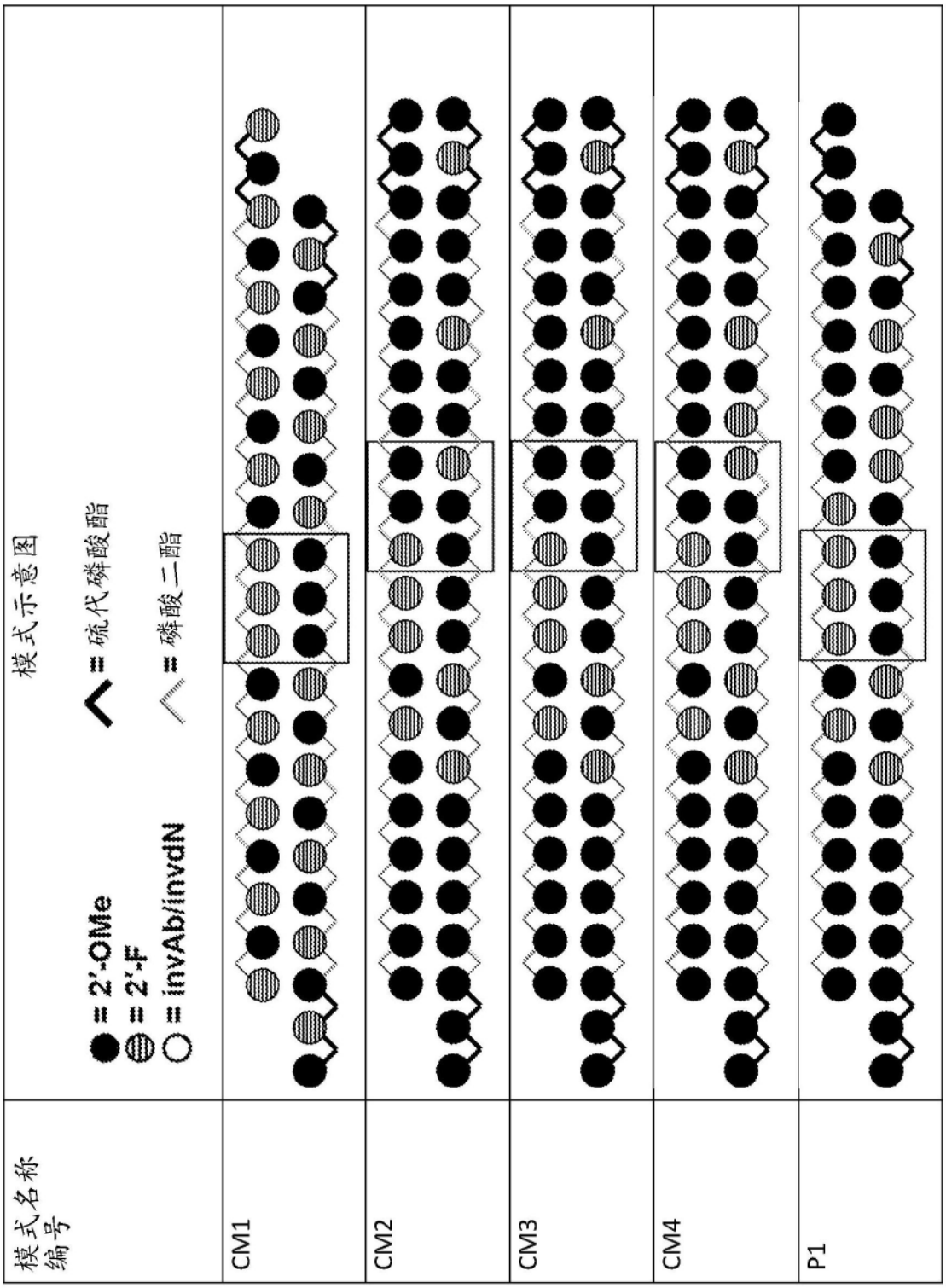

模式名称编号
模式示意图
● = 2'-OMe
◍ = 2'-F
○ = invAb/invdN
＜ = 硫代磷酸酯
／＼ = 磷酸二酯
CM1
CM2
CM3
CM4
P1

图1

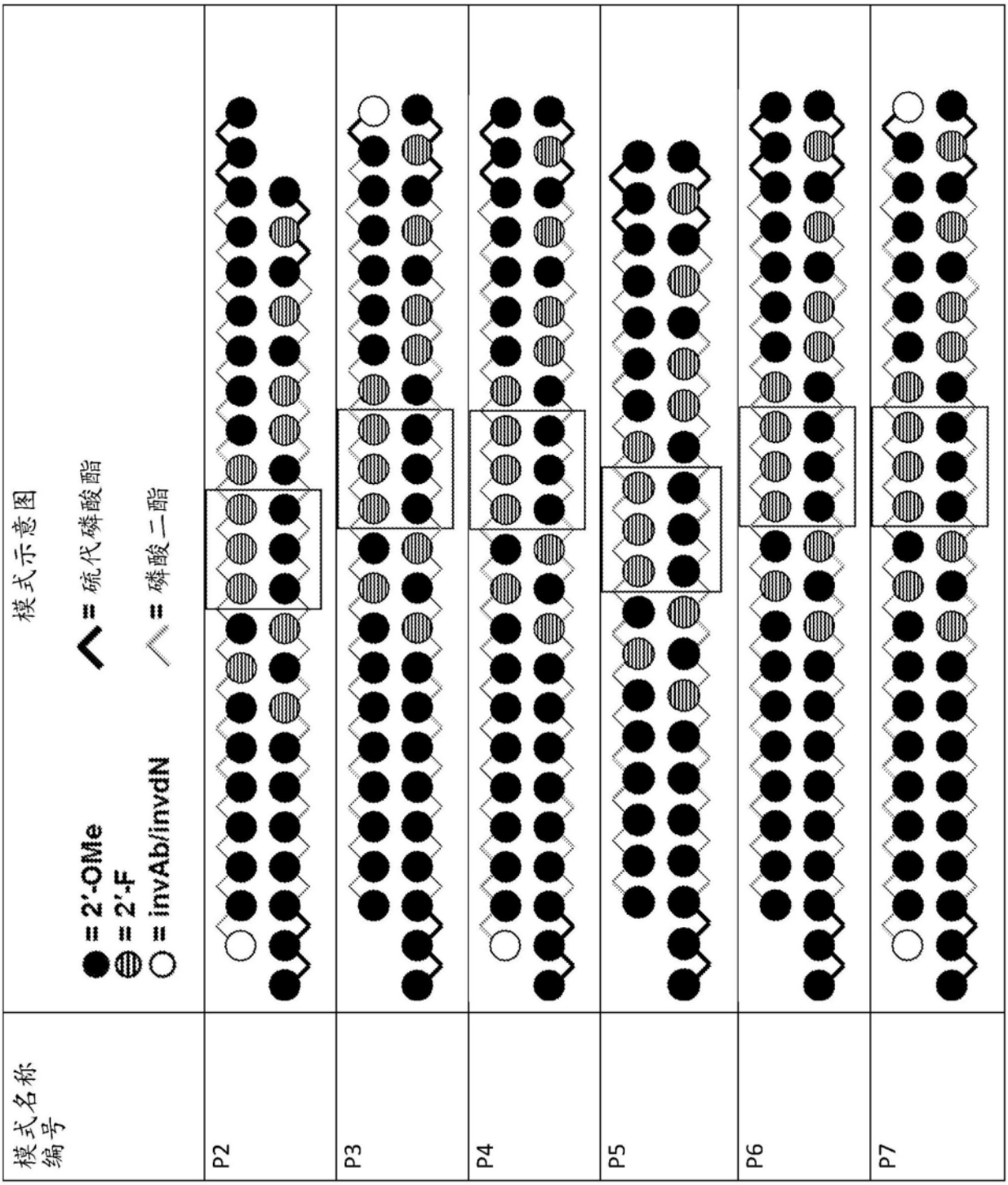


图1(续)

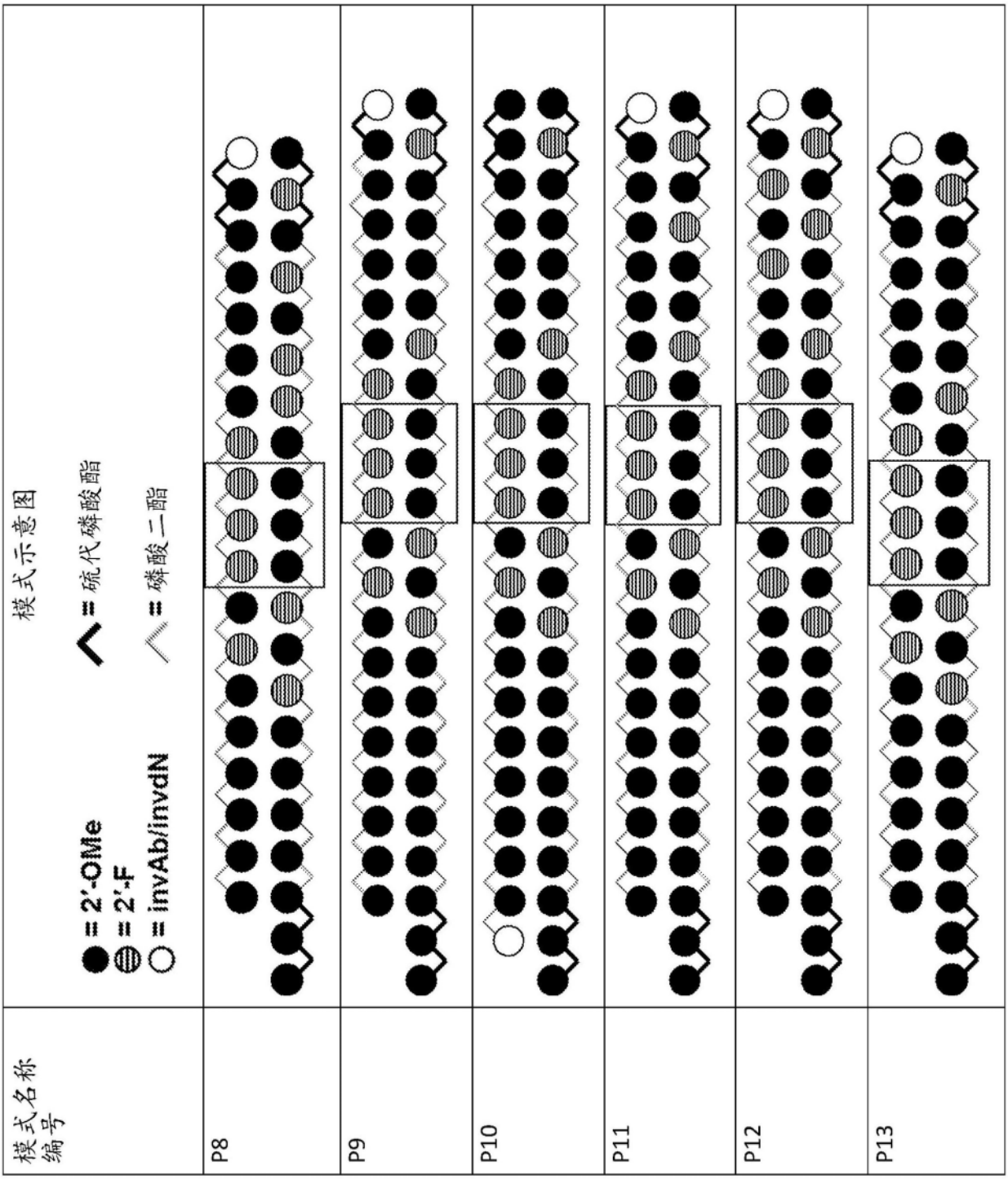

模式名称编号
模式示意图
● = 2'-OMe
◍ = 2'-F
○ = invAb/invdN
> = 硫代磷酸酯
/ = 磷酸二酯
P8
P9
P10
P11
P12
P13

图1(续)

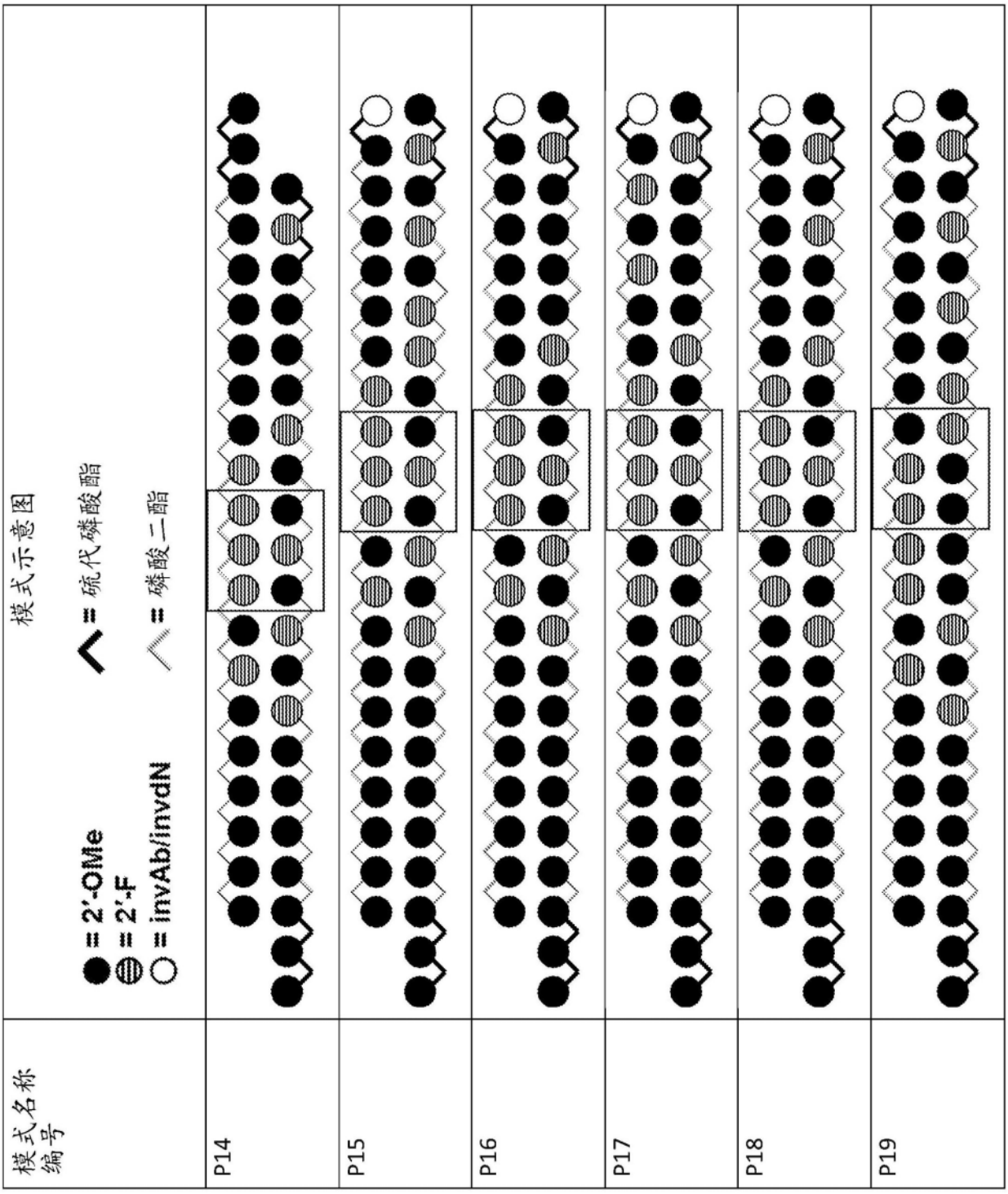

模式名称编号
模式示意图
● = 2'-OMe
◍ = 2'-F
○ = invAb/invdN
＼ = 硫代磷酸酯
／ = 磷酸二酯
P14
P15
P16
P17
P18
P19

图1(续)

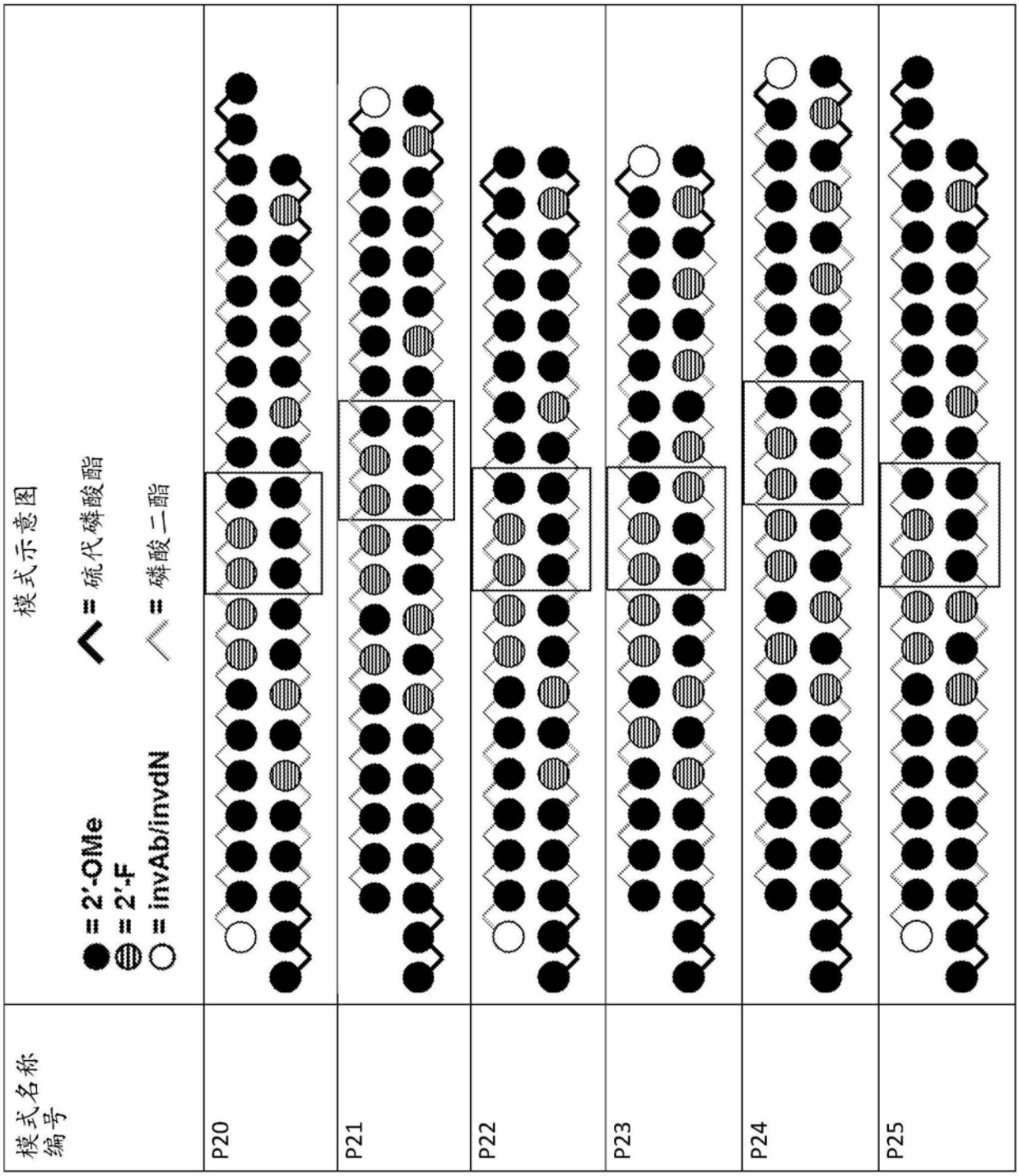

模式名称编号
模式示意图
● = 2'-OMe
◍ = 2'-F
○ = invAb/invdN
= 硫代磷酸酯
= 磷酸二酯
P20
P21
P22
P23
P24
P25

图1 (续)

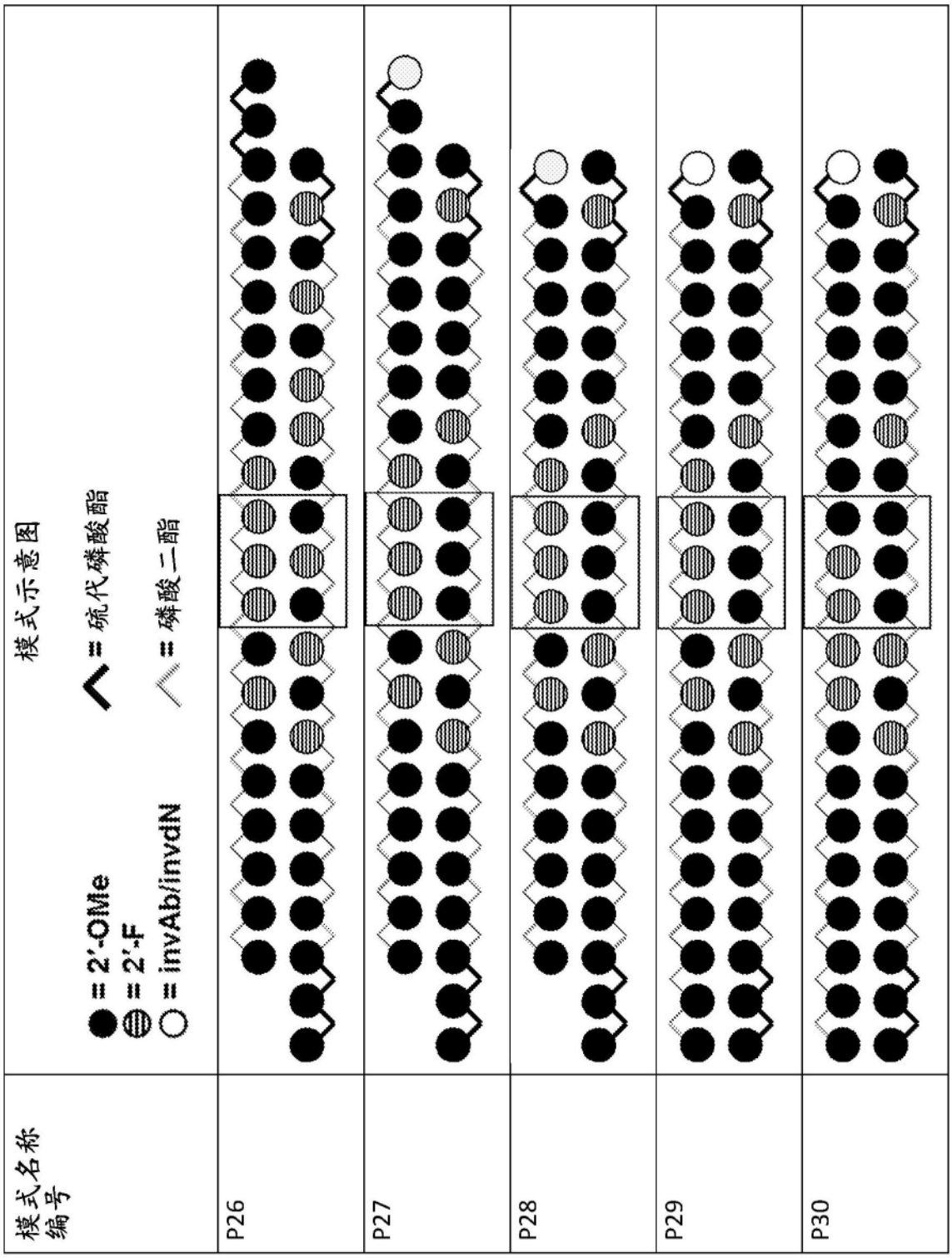

模式名称编号
模式示意图
● = 2'-OMe
◍ = 2'-F
○ = invAb/invdN
= 硫代磷酸酯
= 磷酸二酯
P26
P27
P28
P29
P30

图1(续)

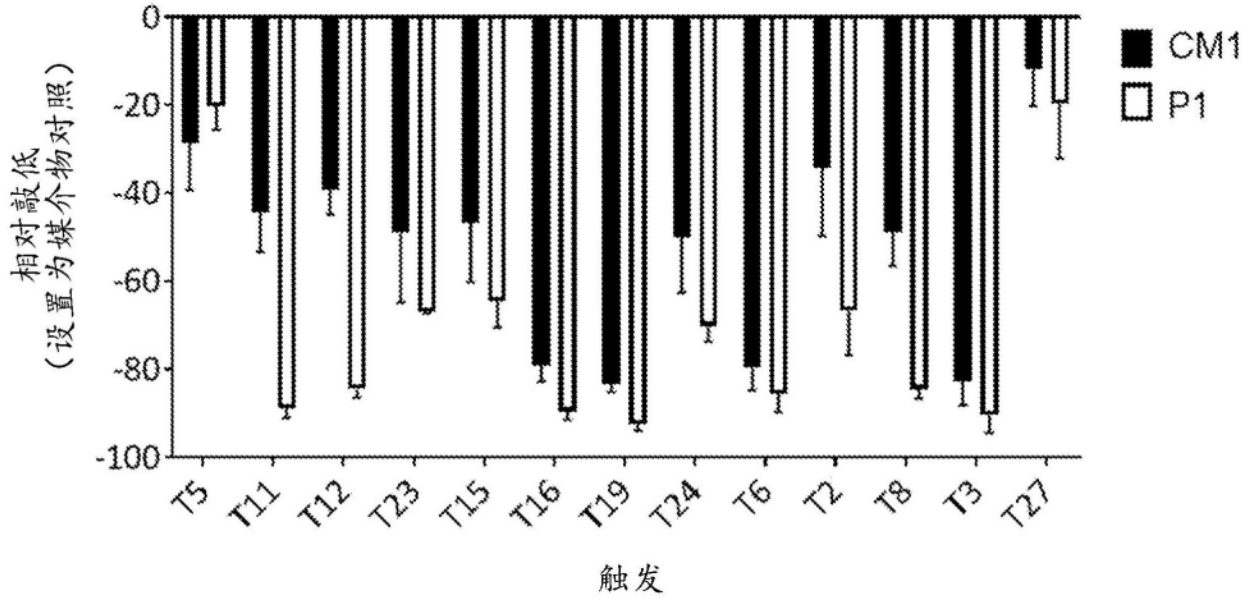

0
-20
-40
-60
-80
-100
相对敲低
（设置为媒介物对照）
CM1
P1
T5
T11
T12
T23
T15
T16
T19
T24
T6
T2
T8
T3
T27
触发

图2

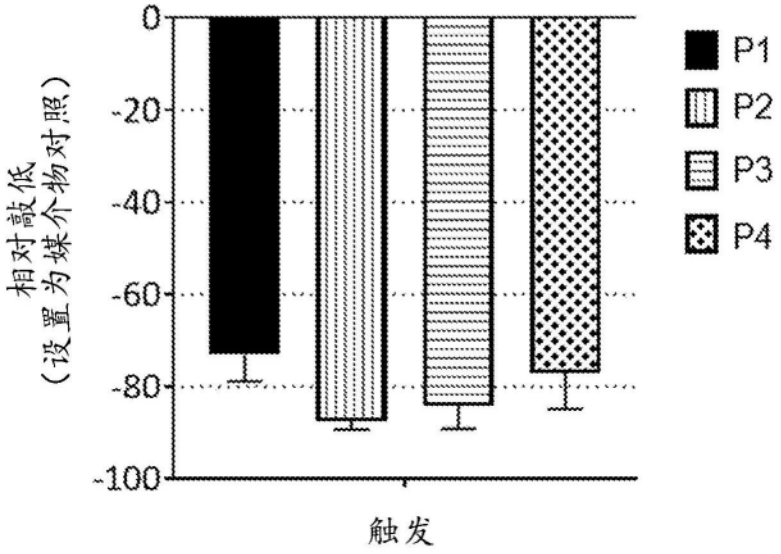

0
-20
-40
-60
-80
-100
相对敲低
（设置为媒介物对照）
P1
P2
P3
P4
触发

图3

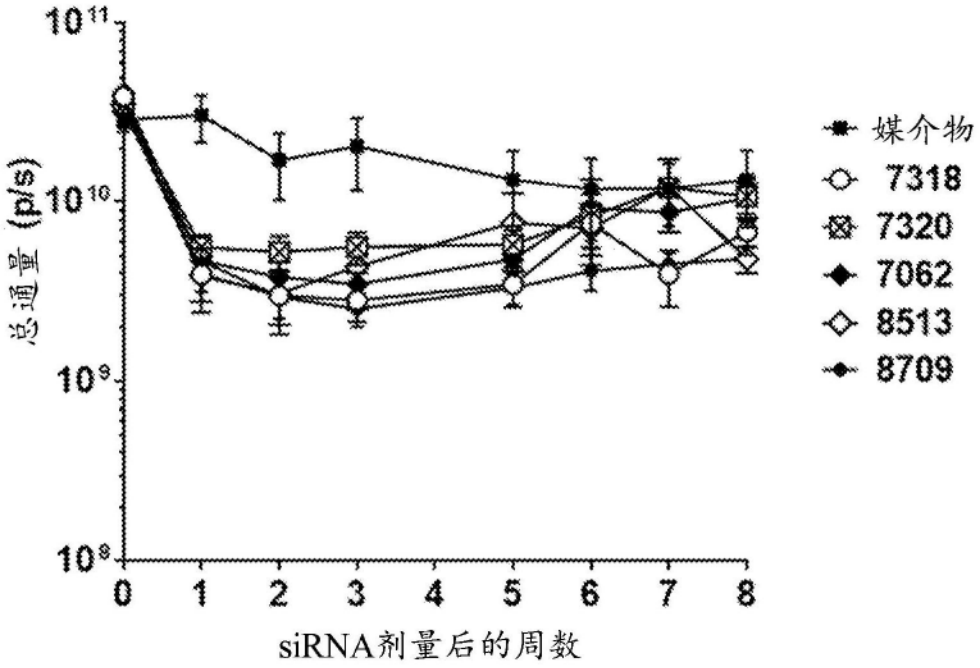

10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
总通量 (p/s)
0 1 2 3 4 5 6 7 8
siRNA剂量后的周数
媒介物
7318
7320
7062
8513
8709

图4A

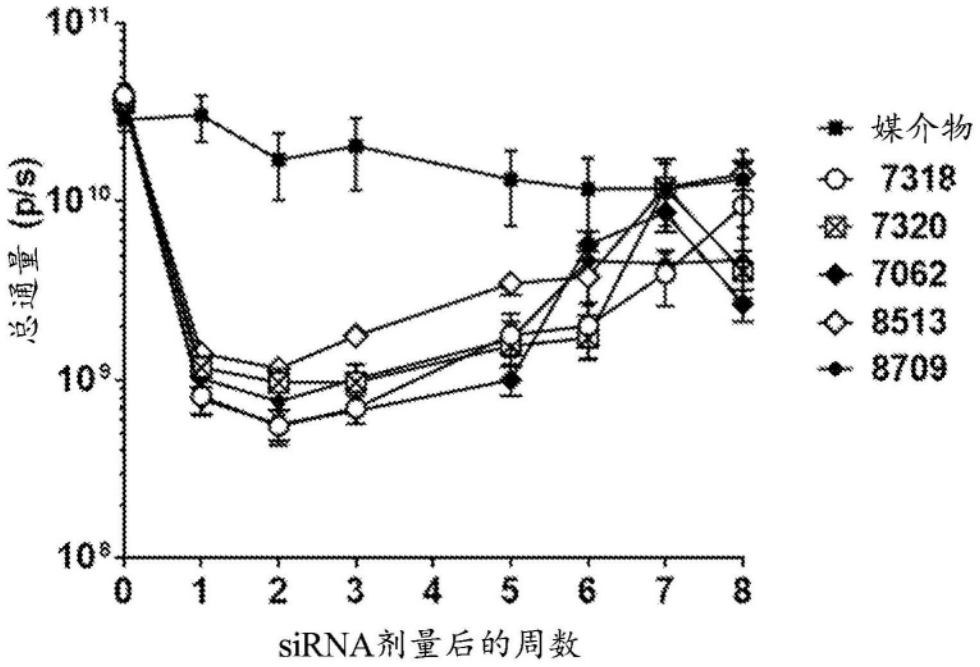

10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
总通量 (p/s)
0 1 2 3 4 5 6 7 8
siRNA剂量后的周数
媒介物
7318
7320
7062
8513
8709

图4B

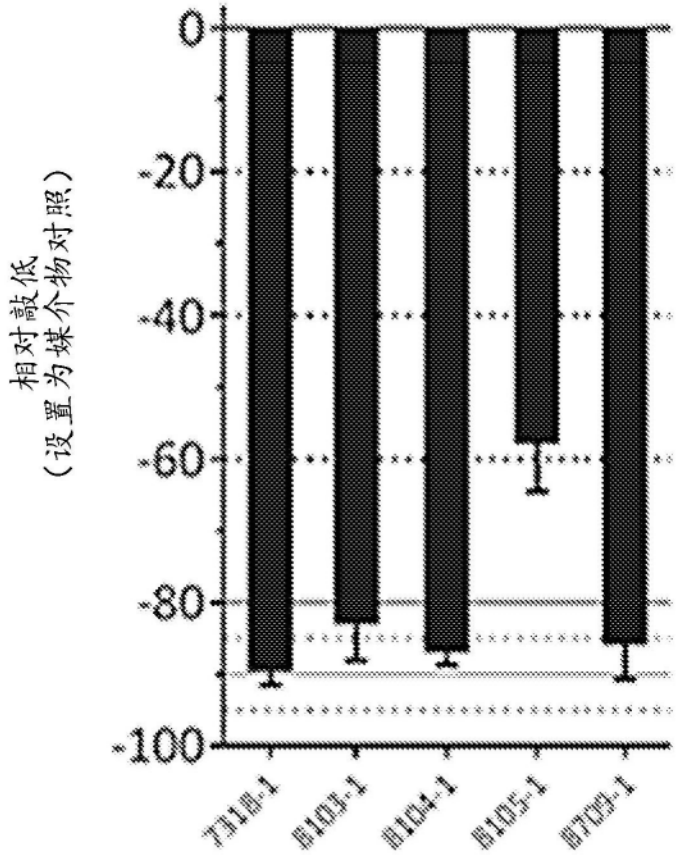

相对敲低
（设置为媒介物对照）
0
-20
-40
-60
-80
-100
7318-1
8103-1
8104-1
8105-1
8709-1

图5

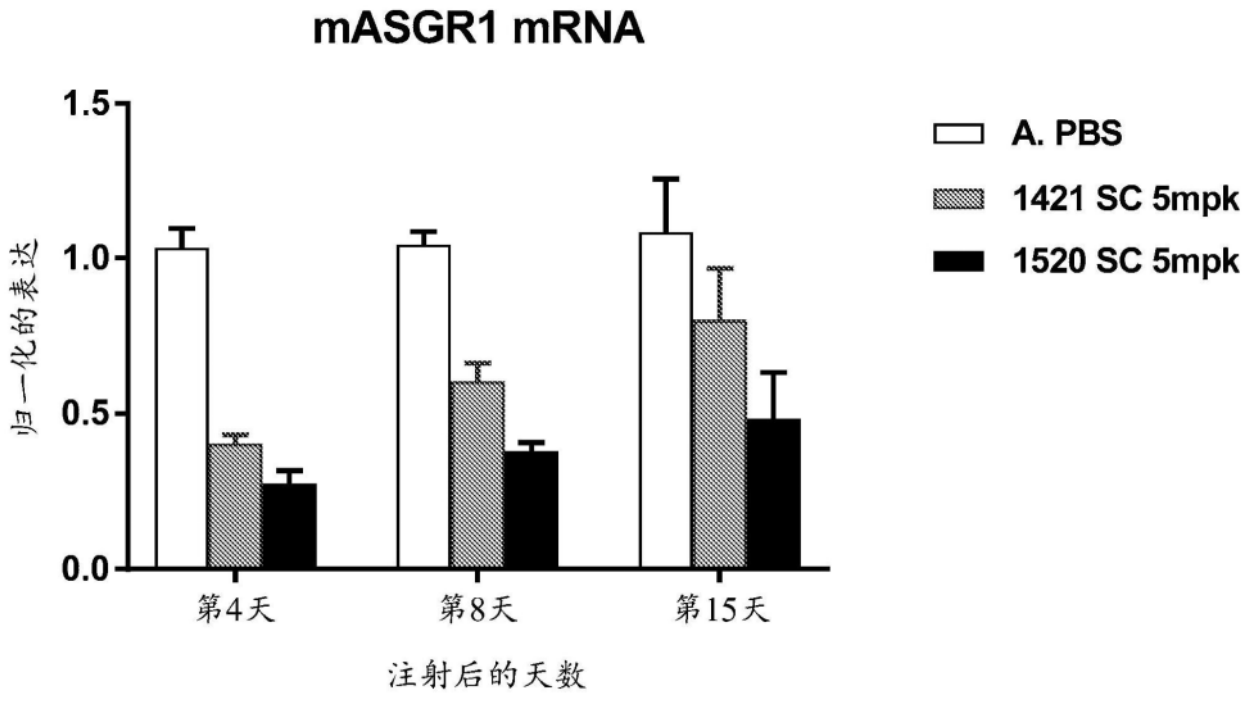

mASGR1 mRNA
归一化的表达
1.5
1.0
0.5
0.0
第4天
第8天
第15天
注射后的天数
A. PBS
1421 SC 5mpk
1520 SC 5mpk

图6

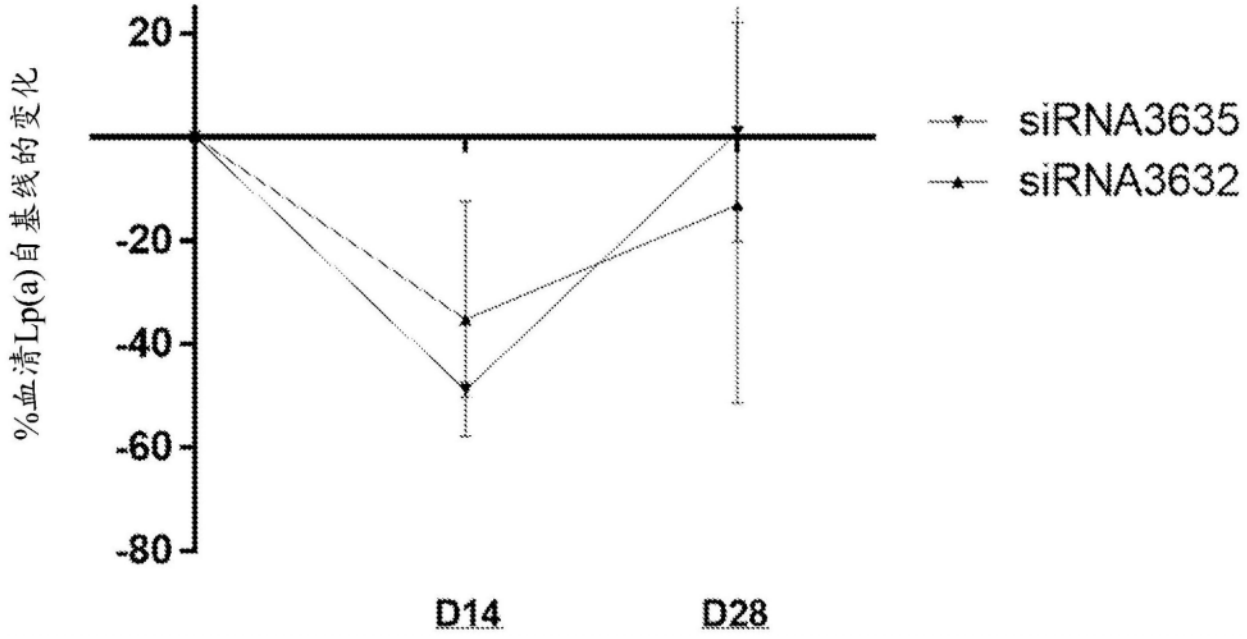


图7