



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104673795 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 03

(21) 申请号 201410573396. 9 *A61P 31/00*(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 26 *A61P 11/00*(2006. 01)

(30) 优先权数据 *A61P 29/00*(2006. 01)

61/275, 252 2009. 08. 27 US *A61P 17/00*(2006. 01)

61/240, 553 2009. 09. 08 US *A61P 37/08*(2006. 01)

(62) 分案原申请数据 *A61P 11/06*(2006. 01)

201080048450. 8 2010. 08. 26 *A61P 33/00*(2006. 01)

(71) 申请人 艾德拉药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S. 阿格拉瓦尔 E. 坎迪马拉

M. 普塔 兰涛 L. 巴加特 王大庆

郁东

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010. 01)

A61K 31/7088(2006. 01)

A61P 37/06(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书54页 附图14页

(54) 发明名称

用于抑制基因表达的组合物及其用途

(57) 摘要

本发明人已经检查了用于提供更有效的基因表达封闭化合物的手段。本发明人发现了令人惊奇地提高基因表达封闭分子的效率的新结构特征。这些特征包括存在多个 3' 端以及 5' 端的接头。令人惊奇的是, 这些特征以降低基因表达封闭化合物的生物不稳定性的方式提高了该化合物的效率。更令人惊奇的是, 已经发现这些效果可以用于基于 DNA 和 RNA 寡核苷酸的化合物两者并且可以用于传统的反义以及 RNAi 技术。

1. 一种合成的基于寡核苷酸的化合物,其包含与不同的单链 RNA 序列互补的两个寡核苷酸,其中所述寡核苷酸通过核苷酸联接 (linkage) 或非核苷酸接头在它们的 5' 端连接,使得所述基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端。

2. 权利要求 1 的基于寡核苷酸的化合物,其中所述各寡核苷酸独立地具有 15 至 40 个核苷酸的长度。

3. 权利要求 1 的基于寡核苷酸的化合物,其中所述各寡核苷酸包含一个或多个核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、锁定核酸、阿拉伯糖核苷酸或它们的组合。

4. 权利要求 1 的基于寡核苷酸的化合物,其中所述各寡核苷酸中的至少一个是经修饰的。

5. 权利要求 1 的基于寡核苷酸的化合物,其中所述寡核苷酸具有至少一个选自下组的核苷酸间联接:烷基膦酸酯、硫代膦酸酯、二硫代膦酸酯、甲基膦酸酯、以及非核苷酸接头。

6. 权利要求 4 的基于寡核苷酸的化合物,其中所述经修饰的寡核苷酸包括至少一个 2' -O- 取代的核苷酸,所述 2' -O- 取代选自 2' -O- 甲基、2' -O- 甲氧基、2' -O- 乙氧基、2' -O- 甲氧基乙基、2' -O- 烷基、2' -O- 芳基、以及 2' -O- 烯丙基基团。

7. 依照权利要求 1-6 中任一项的基于寡核苷酸的化合物,其包含

(i) 具有下述结构的两个寡核苷酸:



其中所述寡核苷酸与单链 RNA 序列互补,其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接,使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端,并且该基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述单链 RNA 序列杂交并抑制所述单链 RNA 序列的表达,并且其中域 A 或域 B 中的一个的是与互补的寡核糖核苷酸杂交以形成 siRNA 的寡核糖核苷酸。

8. 根据权利要求 3-7 中任一项的基于寡核苷酸的化合物,其中所述各寡核苷酸独立地具有 15 至 40 个核苷酸的长度。

9. 一种组合物,其包含权利要求 1-8 中任一项的基于寡核苷酸的化合物以及生理学可接受的载体。

10. 权利要求 1-8 中任一项的合成的基于寡核苷酸的化合物在制备用于抑制细胞中的基因表达的药物中的用途。

11. 权利要求 1-8 中任一项的基于寡核苷酸的化合物在制备用于抑制体内基因表达的药物中的用途。

12. 根据权利要求 10 或 11 的用途,其中所述寡核苷酸与来自编码 Bcl-2、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白、TLR 或 VEGF 的 RNA 的序列互补。

13. 根据权利要求 12 的用途,其中所述 TLR 选自:TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8 和 TLR9。

14. 根据权利要求 10-13 中任一项的用途,其中所述化合物用于与一种或多种疫苗、抗原、细胞毒剂、抗生素、TLR 激动剂、TLR 拮抗剂、siRNA 分子、miRNA 分子、反义寡核苷酸、适体、蛋白质、肽、基因疗法载体、蛋白质活性拮抗剂、佐剂或共刺激分子或它们的组合共同施用。

15. 根据权利要求 14 的用途, 其中所述疫苗包括 DNA 疫苗, 蛋白质包括抗体, 抗原包括变应原。

16. 根据权利要求 10-15 中任一项的用途, 其中所述基于寡核苷酸的化合物包含

(i) 具有如下结构的两个寡核苷酸:



其中所述多核苷酸与单链 RNA 序列互补, 其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 并且所述基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述单链 RNA 序列杂交并且抑制该单链 RNA 序列的表达, 且其中域 A 或域 B 中的一个与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 的寡核糖核苷酸。

用于抑制基因表达的组合物及其用途

[0001] 本申请是基于申请日为2010年8月26日,优先权日为2009年8月27日,申请号为201080048450.8,发明名称为:“用于抑制基因表达的组合物及其用途”的专利申请的分案申请。

[0002] 发明背景

发明领域

[0003] 本发明涉及:用于抑制基因表达和/或活性的化合物、组合物及使用方法;或者用于诊断、治疗和/或预防对所述基因表达和/或活性的抑制有响应的疾病和/或病况的化合物、组合物及方法。

[0004] 相关技术的概述

[0005] 一种抑制基因表达的方法是反义技术或RNA抑制(RNAi)。这些方法利用基于DNA和/或RNA的寡核苷酸(DNA and/or RNA-based oligonucleotides)对选自mRNA、微小RNA、preRNA或线粒体RNA的靶标的序列特异性结合,及其由此产生的翻译抑制。这样的基于寡核苷酸的翻译的抑制以及最终的基因表达的抑制是一个或多个细胞机制的结果,其中可以包括但不限于(i)翻译的直接(立体)阻断,(ii)RNA酶H介导的抑制,以及(iii)RNAi介导的抑制(例如短干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、DNA指导的RNAi(ddRNAi)、以及单链RNAi(ssRNAi))。

[0006] 反义技术的历史解释尽管与mRNA结合的反义寡核苷酸的确定是相对直接的,但优化具有实际的基因表达抑制能力并且由此作为良好的临床候选药物的过程并不是如此。相应地,如果一种基于寡核苷酸的基因表达下调方法要取得成功,需要最为有效地获得该结果的经优化的反义寡核苷酸。这样经优化的反义寡核苷酸可以单独使用或与其它预防性和/或治疗性组合物一起使用。

[0007] 自从Zamecnik和Stephenson发表了使用反义寡核苷酸作为抑制病毒蛋白质翻译的手段的第一个示例(Zamecnik和Stephenson(1978)Proc. Natl. Acad. Sci. 75:285-288)以来,就存在对于利用基于寡核苷酸的化合物抑制基因的表达的巨大关注。这些初步的努力利用在体内固有地不稳定的单链、未修饰的寡脱氧核糖核苷酸或寡核糖核苷酸(Agrawal等人(1992)Ann. NY Acad. Sci. 660:2-10)在体内结合mRNA并产生双链RNA模板,用于酶或RNA酶降解。随后进行的努力确定引入了抗核酸酶的硫代磷酸酯和/或甲基膦酸酯联接的寡脱氧核糖核苷酸的用途(Agrawal等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. 85:7079-7083; Metelev和Agrawal US 5,652,355;Metelev和Agrawal US 6,143,881;Matsukura等人(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. 84:7706)。

[0008] 另一类抑制基因表达的基于RNA的分子被称为核酶(ribozymes)。核酶形成茎环结构并且结合于RNA靶标从而直接调节其切割(Cech, T. (1990)Ann. Rev. Biochem. 59:543)。核酶选择性地与靶RNA结合并且催化酯交换或水解反应,以切割单链RNA中特定的磷酸二酯联接。如果被导入到细胞中,核酶具有与靶mRNA结合并抑制该mRNA的翻译的能力。和单链反义技术一样,已经通过向核酶结构中引入一定的化学修饰证明了核酶的稳定

性和活性 (Goodchild US 6, 204, 027 ;Goodchild US 6, 573, 072)。随着反义寡核苷酸和核酶技术的持续进步,也发现了其它基于寡核苷酸的技术。

[0009] 基于 Fire 和 Mello 的开拓性发现 (Fire 等人 (1998) *Nature*, 391 :806-811), 人们的努力已经转向在哺乳动物系统中的 RNA 干扰 (RNAi) 技术 (例如短干扰 RNA (siRNA)、微小 RNA (miRNA)、DNA 指导的 RNAi (ddRNAi)、以及单链 RNAi (ssRNAi))。RNAi 是指利用设计为与特定的 mRNA 靶标杂交的短寡核苷酸的转录后基因表达抑制过程 (Fire 等人 (1998) *Nature* 391 :806-811 ;Zamore 等人 (2000) *Cell*, 101 :25-33)。在 siRNA 的情况下, 短的、双链的 RNA 分子利用细胞酶机制来切割同源靶 RNA 分子 (Rana (2007) *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 8 :23-36)。双链 RNAi 技术依赖于双链 RNA (dsRNA) 的施用或表达, 双链 RNA 一旦出现在细胞内, 则会与被称为 dicer 的酶结合并切割成 21-23 个核苷酸。结果产生的 dicer-dsRNA 复合物被转移至含有 Argonaut 的蛋白质复合物并与之相互作用, 该复合物被称为 RNA- 诱导的沉默复合物 (RISC)。认为 RISC 存在于细胞中并且催化地分解特定的 mRNA 分子。一旦与 RISC 结合, 该 dsRNA 会展开得到 ssRNA-RISC 复合物, 其能够水解靶 mRNA。一旦发生杂交, 则该 RISC 复合物分解 mRNA。在一些情况下, 使用单链 RNAi (ssRNAi) 组合物可以避免 dicer 的 dsRNA 特异性过程, 该单链 RNAi (ssRNAi) 组合物与 RISC 直接相互作用从而实现基因表达的抑制 (Holen 等人 (2003) *Nuc. Acids Res.* 31 :2401-2407)。尽管 RNAi 技术能够选择性地与靶 mRNA 结合, 但已经认识到这样的分子会通过 TLR3 的相互作用诱导非特异性的免疫刺激 (Kleinman 等人 (2008) *Nature* 452 :591-597 ;De Veer 等人 (2005) *Immun. Cell Bio.* 83 :224-228 ;Kariko 等人 (2004) *J. Immunol.* 172 :6545-6549)。这样的非特异性免疫激活在 RNAi 技术作为药剂的应用方面引发了问题。

[0010] 尽管上述每种基于反义的技术在使用时均取得了一定的成功, 但由于它们是基于寡核苷酸的, 这些技术均具有在体内不稳定以及可能产生脱靶效应 (例如非期望的免疫刺激, (Agrawal 和 Kandimalla (2004) *Nature Biotech.* 22 :1533-1537)) 等固有问题。在 dsRNA 的情况下, 这些寡核苷酸还存在到细胞的体内传递不充分的问题 (Medarova 等人 (2007) *Nature Med.* 13 :372-377)。尽管有很多反义寡核苷酸药物候选产品的临床实验, 但仅有一个这样的化合物得到了 FDA 的批准作为药物。该反义化合物被证实可以用于治疗 CMV, 但是从未作为产品上市。另外, 尚没有核酶或 siRNA 药物候选产品通过了 FDA 的批准。

[0011] 所有这些技术的优化手段都聚焦于解决生物稳定性、靶标识别 (例如, 细胞渗透性、热稳定性) 以及体内活性等问题。通常, 这些考虑因素是相互竞争的。例如, 传统的反义寡核苷酸利用磷酸酯核苷酸间联接, 其被证实在生物学上过于不稳定以至于无法有效地使用。因此, 人们曾关注于对反义寡核苷酸进行修饰以使得其生物学上更为稳定。早期的方法关注于对核苷酸间联接进行修饰以使得它们对于细胞核酸酶的降解更有抗性。这些手段导致大量具有非天然核苷酸间联接 (例如硫代磷酸酯、甲基膦酸酯 (Sarin 等人 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 :7448-7451)), 以及基于肽的联接 (Matsukura 等人 (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 :7706 ;Agrawal 等人 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 :7079-7083 ;Miller (1991) *Bio-Technology* 9 :358) 的反义寡核苷酸的开发。但是, 这些修饰使得分子的靶标特异性降低, 并且产生不需要的生物活性。

[0012] 后来的改善稳定性并且保持特异性及生物活性的方法使用了混合的主链寡核苷酸, 混合的主链寡核苷酸含有磷酸二酯和硫代磷酸酯核苷酸间联接。该混合的主链使得

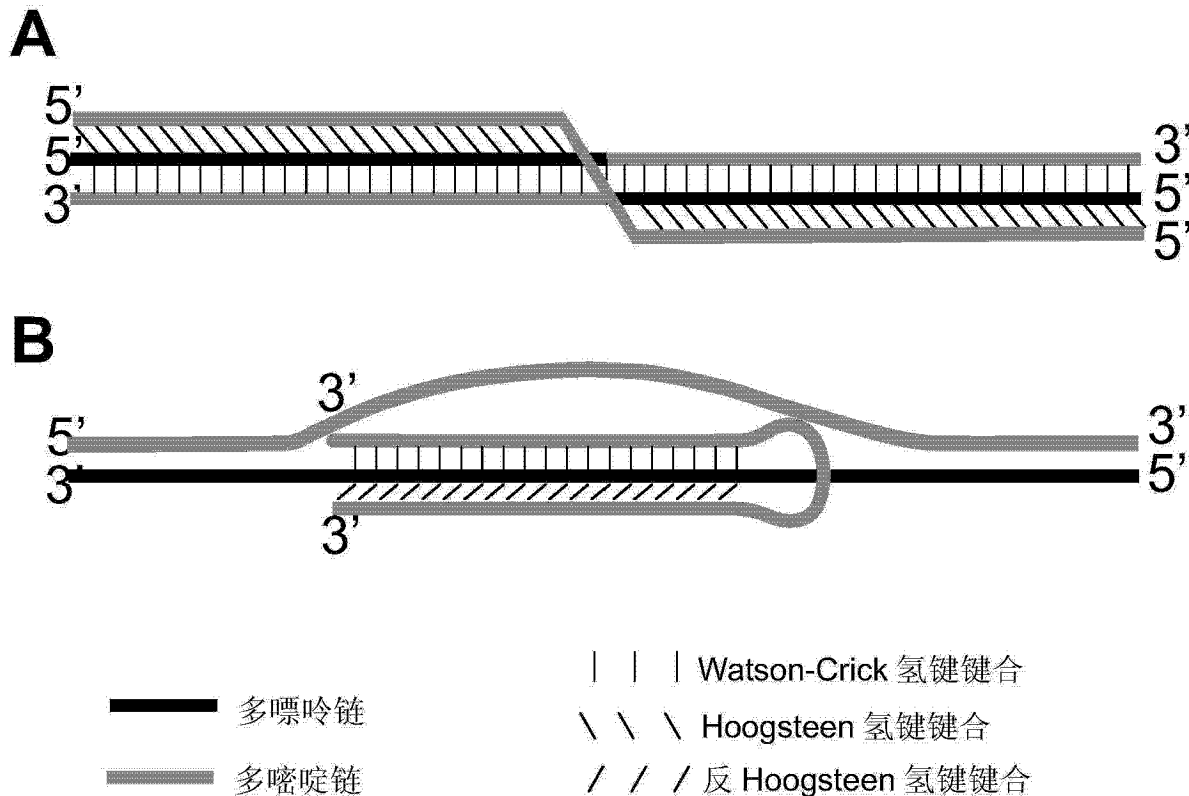
与仅具有磷酸二酯联接的寡核苷酸相比,它们的生物稳定性得到保持或改善 (Agrawal 等人 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 :1401-1405 ;US 专利公开 No. 20010049436)。纵观寡核苷酸研究,已经认识到这些分子在体内对于外切核酸酶的降解敏感,其中主要的降解出现在分子的 3' 端 (Shaw 等人 (1991) *Nucleic Acids Res.* 19 :747-750 ;Temsamani 等人 (1993) *Analytical Bioc.* 215 :54-58)。因此,避免该外切核酸酶活性的途径采用了下述方式:(i) 在 5' 和 / 或 3' 末端的帽状结构 (Temsamani 等人 (1992) *Ann. NY Acad. Sci.* 660 :318-320 ;Temsamani 等人 (1993) *Antisense Res. Dev.* 3 :277-284 ;Tang 等人 (1993) *Nucl. Acids Res.* 20 :2729-2735), (ii) 通过分子之间的 5' -3'、5' -2'、2' -3'、3' -2' 或 3' -3' 联接连接两个或多个寡核苷酸 (Agrawal 等人 US6, 489, 464), (iii) 在 3' 端折叠回自身的自杂交寡核苷酸,其可产生发夹,并移除 3' - 外切核酸酶活性启动所需的接触位点 (point of access) (Tang 等人 (1993) *Nucl. Acids Res.* 20 :2729-2735), 或者 (iv) 将 RNA 引入到寡核苷酸分子中,从而产生 RNA/DNA 杂合分子 (Metelev 等人 (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4 :2929-2934 ;Metelev US 5, 652, 355 ;Metelev 和 Agrawal US 6, 143, 881 ;Metelev 和 Agrawal US 6, 346, 614 ;Metelev 和 Agrawal US 6, 683, 167, Metelev 和 Agrawal US 7, 045, 609)。

[0013] 其它提高反义寡核苷酸稳定性、保持反义寡核苷酸的特异性和生物学活性的手段利用可形成三链体的 (triplex-forming)、与双链 DNA 或 RNA 靶标结合的多嘧啶寡核苷酸。多嘧啶寡核苷酸可以通过 Hoogsteen 氢键在大沟与双链体 DNA 结合并形成含有具有 T:A-T 和 C:G-C⁺ 碱基三链体的一个多嘌呤和两个多嘧啶链 (Moser, H. E. 和 Dervan, P. B. (1987) *Science* 238,645-650 ;Cooney 等 (1988) *Science* 241,456-459)。当 DNA 同型嘌呤和同型嘧啶链解链和再折叠时也会形成分子内三链体 (Vasquez, K. M. and Wilson, J. H. (1998) *Trends Bioche. Sci.* 23,4-9)。第三条链的存在对 DNA 柔性产生严格的限制,改变其沿着大沟识别特异蛋白质的能力 (Shields, G. C. 等人 (1997) *Am. Chem. Soc.*, 119, 7463-7469 ;Jimenez-Garcia, E. 等人 (1998) *J. Biol. Chem.* 273,24640-24648), 导致对转录的抑制并最终会减少基因表达。能够序列特异性地与双链 DNA 或 RNA 结合的寡核苷酸可以作为转录 / 翻译的调节剂,并且提供了有前景的控制基因表达的调节的抗原 / 反义策略 (Giovannangeli, C. 和 Helene, C. (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 413 ;Giovannangeli, C. 等 (1996) *Biochemistry* 35,10539 ;Maher, L. J. 等 (1992) *Biochemistry* 31,70)。但是,形成稳定三链体的条件是有问题的,原因是碱基识别受限制,以及在形成三链体的寡核苷酸中胞嘧啶质子化所需的非生理学的酸性 pH 条件。

[0014] 在尝试形成这样稳定的三链体的过程中,描述了通过接头连接具有反转极性的多嘧啶寡核苷酸 (即,具有 5' → 3' 极性的一个序列后续具有 3' → 5' 极性的另一个序列,或相反) (Froehler, US5, 399, 676 ;Froehler US5, 527, 899 ;Froehler US5, 721, 218)。在这样反转极性的寡核苷酸中,在反转一侧的序列根据三螺旋编码与双链体的多嘌呤链结合,而另一侧的序列会结合至双链体的相对链中的相邻位置的多嘌呤位点 (示意图 1A)。以这种方式,如果需要并且有这样的靶标序列段可用的话,可以通过使识别从双链体的一条链转换到另一条链,然后又转换回来,使三螺旋识别 (triple helix recognition) 延伸。此外,这些寡核苷酸也可以与双链体形成 D- 环,如示意图 1B 所示。在这种情况下,具有第一种极性的区域可以形成三链体,而反转的部分取代双链体的一个链的一部分,结果在相关

区域中形成取代双链体 (substitute duplex)。由于这样的回转寡核苷酸 (switchback oligonucleotide) 具有显著的双链体结合活性, 可以利用这些寡核苷酸来使可致病的不期望的双链体形式的 DNA 或 RNA 失活。但是, 该分子的组成仅限于靶向双链 RNA 或 DNA 的多嘌呤位点的多嘧啶序列。

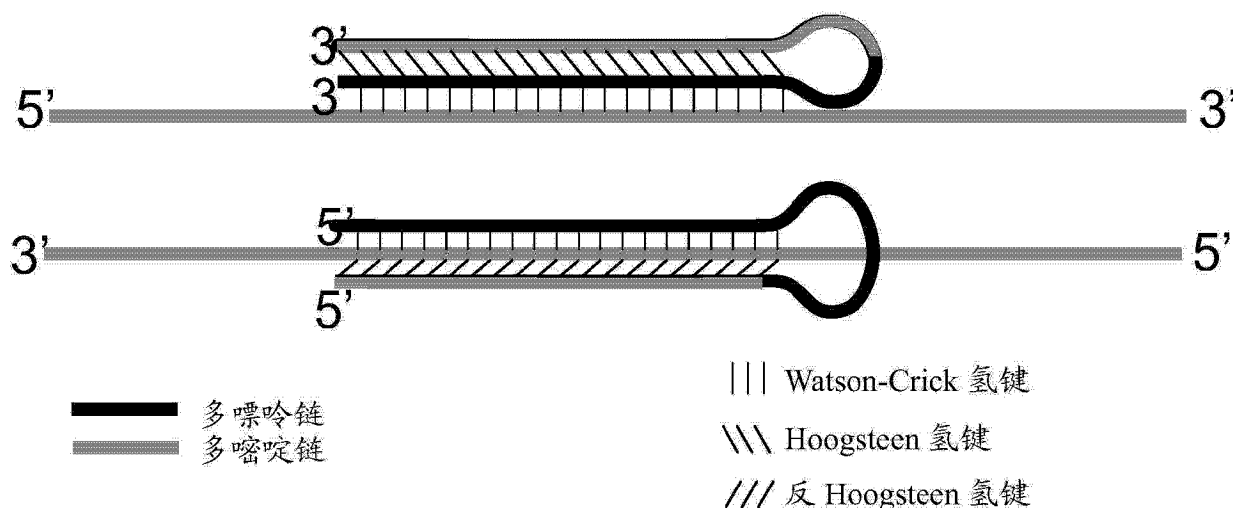
[0015]



[0016] 示意图 1. 具有反转极性的结合性寡核苷酸的 (A) 形成回转的三链体模式和 (B) D-环模式。

[0017] 作为另一种选择, 已经开发出通过三螺旋形成而靶定单链 DNA 和 RNA 的策略。这些方法中的一种是利用具有反转极性的回折 (foldback) 三链体形成性寡核苷酸来靶定多嘧啶 DNA 或 RNA 单链 (Kandimalla, E. R. 等人 (1995) J. Am. Chem. Soc. 117, 6416-6417; Kandimalla, E. R. 和 Agrawal, S. (1996) Biochemistry 35, 15332)。在这样的回折三链体形成性寡核苷酸中, 通过 3'-3' 联结或 5'-5' 联结而联结有多嘧啶寡核苷酸以及其互补多嘌呤链。这样的含有通过 3'-3' 或 5'-5' 联接联结的互补序列的寡核苷酸通过 Hoogsteen 或反 Hoogsteen 碱基配对形成平行链双链体。当有互补的多嘧啶链可用时, 它们形成三螺旋结构 (示意图 2)。

[0018]



[0019] 示意图 2. 含有共价联结于它们的 3' -3' 或 5' -5' 末端的嘌呤 - 嘧啶链的寡核苷酸的平行链夹模式。

[0020] 尽管进行了大量的努力,但是为了提高稳定性并保持靶标识别,同时不产生脱靶效应的努力总的来说尚未能产生被认为具有临床实用性的寡核苷酸。因此,创造出具有生物稳定性、靶标特异性、以及是基因表达的有效抑制剂的化合物仍然是现有的基于反义的技术所面临的一项挑战。因此需要新的方法。

[0021] 发明概述

[0022] 本发明涉及用于调节基因表达的化合物、组合物和方法,所述调节基因表达使用基于寡核苷酸的化合物,该化合物包括两个或多个单链反义寡核苷酸,它们藉由它们的 5' 端连接,从而容许两个或多个可及的 3' 端的存在,这可有效地抑制或降低基因表达。令人惊奇的是,本发明人发现与未连接的反义寡核苷酸相比,这样的寡核苷酸化合物更为有效。

[0023] 在第一个方面,本发明提供新的合成的基于寡核苷酸的化合物,其包括与一个或多个 mRNA 序列互补的两个或多个寡核苷酸,其中所述寡核苷酸藉由它们的 5' 端连接从而容许两个或多个可及的 3' 端的存在,并且特异性地与该一个或多个 mRNA 序列杂交并抑制其表达。

[0024] 在第二个方面,本发明提供药物组合物。这些组合物可以包括处于药学上或生理学可接受载体中的任何根据第一个方面的合成的基于寡核苷酸的化合物。

[0025] 在第三个方面,本发明提供用于抑制基因表达的方法,该方法包括使细胞与依照本发明第一方面的合成的基于寡核苷酸的化合物接触。

[0026] 在第四个方面,本发明提供用于在哺乳动物中抑制基因表达的方法,该方法包括对哺乳动物施用依照本发明第一方面的合成的基于寡核苷酸的化合物。

[0027] 在第五个方面,本发明提供在哺乳动物中抑制 TLR 介导的、Bcl-2 介导的、EGFR 介导的、mdm2 介导的、MyD88 介导的、PCSK9 介导的、存活蛋白介导的或 VEGF 介导的应答的方法,该方法是通过施用依照本发明第一方面的合成的基于寡核苷酸的化合物来进行的,其中所述寡核苷酸与 TLR、Bcl-2、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白或 VEGF mRNA 序列中的一个或多个互补。

[0028] 在第六个方面,本发明提供在哺乳动物中抑制 TLR 介导的、Bcl-2 介导的、EGFR 介导的、mdm2 介导的、MyD88 介导的、PCSK9 介导的、存活蛋白介导的或 VEGF 介导的应答的方

法,该方法是通过组合施用依照本发明第一个方面的合成的基于寡核苷酸的化合物与 TLR、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白或 VEGF 蛋白活性的拮抗剂来进行的,其中所述寡核苷酸与 TLR、Bcl-2、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白或 VEGF mRNA 序列中一个或多个互补。

[0029] 在第七个方面,本发明提供用于在哺乳动物中抑制基因表达的方法,该方法包括对哺乳动物施用依照本发明的基于寡核苷酸的化合物。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人。在一些优选的实施方案中,将所述依照本发明的基于寡核苷酸的化合物施用给需要抑制其免疫应答的哺乳动物。

[0030] 在第八个方面,本发明提供用于治疗性处理具有疾病或病症的患者的方法,该方法包括以治疗有效量对患者施用依照本发明的基于寡核苷酸的化合物。在多个实施方案中,待治疗的所述疾病或病症为癌症、自身免疫性病症、感染性疾病、气道炎症、炎性病症、皮肤病症、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。病原体包括但不限于:细菌、寄生虫、真菌、病毒、类病毒、以及朊病毒。

[0031] 在第九个方面,本发明提供用于预防疾病或病症的方法,该方法包括以药有效量对有发生疾病或病症的风险的受试者施用依照本发明的基于寡核苷酸的化合物。在多个实施方案中,所述待预防的疾病或病症选自癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、感染性疾病、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。病原体包括但不限于细菌、寄生虫、真菌、病毒、类病毒、以及朊病毒。

[0032] 在第十个方面,本发明提供预防或治疗病症的方法,该方法包括分离能够产生细胞因子或趋化因子的细胞,所述细胞包括但不限于:免疫细胞、调节性 T 细胞、B 细胞、PBMC、pDC、以及淋巴样细胞;在标准细胞培养条件下培养该细胞,在体外利用依照本发明第一个方面的基于寡核苷酸的化合物处理该细胞,使得该分离的细胞产生或分泌降低水平的细胞因子或趋化因子,以及对需要治疗抑制细胞因子和 / 或趋化因子从而预防和 / 或治疗的患者施用或重新施用经处理的细胞。本发明的这一方面可以遵照标准的过继细胞免疫治疗技术以产生激活的免疫细胞。

[0033] 在第十一个方面,本发明提供组合物,其包括依照本发明第一个方面的化合物和一种或多种疫苗、抗原、抗体、细胞毒剂、化疗剂(传统的化学疗法和现代靶向疗法两者)、激酶抑制剂、变应原、抗生素、激动剂、拮抗剂、反义寡核苷酸、核酶、RNAi 分子、siRNA 分子、miRNA 分子、适体、蛋白质、基因疗法载体、DNA 疫苗、佐剂、共刺激分子或它们的组合。

[0034] 本发明包括以下内容:

[0035] 项 1. 一种合成的基于寡核苷酸的化合物,其包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的两个或多个寡核苷酸,其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接,使得所述基于寡核苷酸的化合物具有两个或多个可及的 3' 端,并且所述基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制所述一个或多个单链 RNA 序列的表达。

[0036] 项 2. 项 1 的基于寡核苷酸的化合物,其中所述各寡核苷酸独立地具有 15 至 40 个核苷酸的长度。

[0037] 项 3. 项 1 的基于寡核苷酸的化合物,其中所述各寡核苷酸通过核苷酸联接彼此连接。

[0038] 项 4. 项 1 的基于寡核苷酸的化合物,其中所述各寡核苷酸通过接头彼此连接。

[0039] 项 5. 项 4 的基于寡核苷酸的化合物,其中所述接头是非核苷酸接头。

[0040] 项 6. 项 1 的基于寡核苷酸的化合物, 其中所述各寡核苷酸包含一个或多个核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、锁定核酸、阿拉伯糖核苷酸或它们的组合。

[0041] 项 7. 项 1 的基于寡核苷酸的化合物, 其中所述各寡核苷酸中的至少一个是经修饰的。

[0042] 项 8. 项 7 的基于寡核苷酸的化合物, 其中所述经修饰的寡核苷酸具有至少一个选自下组的核苷酸间联接: 烷基膦酸酯、硫代膦酸酯、二硫代膦酸酯、甲基膦酸酯、以及非核苷酸接头。

[0043] 项 9. 项 7 的基于寡核苷酸的化合物, 其中所述经修饰的寡核苷酸包括至少一个 2'-O- 取代的核苷酸。

[0044] 项 10. 项 9 的基于寡核苷酸的化合物, 其中所述 2'-O- 取代选自 2'-O- 甲基、2'-O- 甲氧基、2'-O- 乙氧基、2'-O- 甲氧基乙基、2'-O- 烷基、2'-O- 芳基、以及 2'-O- 烯丙基基团。

[0045] 项 11. 根据项 1 的基于寡核苷酸的化合物, 其中所述基于寡核苷酸的化合物被 RNAi 介导的基因表达抑制中涉及的蛋白质选择性地结合和 / 或切割。

[0046] 项 12. 根据项 11 的基于寡核苷酸的化合物, 其中所述 RNAi 介导的基因表达抑制中涉及的蛋白质选自 Dicer、Argonaut、和 RISC。

[0047] 项 13. 根据项 1 的基于寡核苷酸的化合物, 其中所述基于寡核苷酸的化合物被 RNaseH 介导的基因表达抑制中涉及的蛋白质选择性地结合和 / 或切割。

[0048] 项 14. 一种组合物, 其包含根据项 1 的基于寡核苷酸的化合物和生理学可接受的载体。

[0049] 项 15. 一种基于寡核苷酸的化合物, 其包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的两个寡核苷酸, 其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 并且该基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制所述一个或多个单链 RNA 序列的表达, 该基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

[0050]

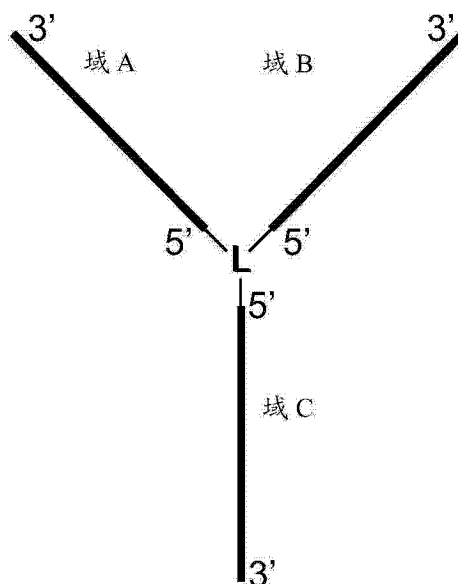


[0051] 其中域 A 或域 B 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交以形成 siRNA 的寡核糖核苷酸。

[0052] 项 16. 一种基于寡核苷酸的化合物, 其包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的三个寡核苷酸, 其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个或多个可及的 3' 端, 并且该基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制所述一个或多个单链 RNA 序列的表达, 该基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

[0053]

式 III

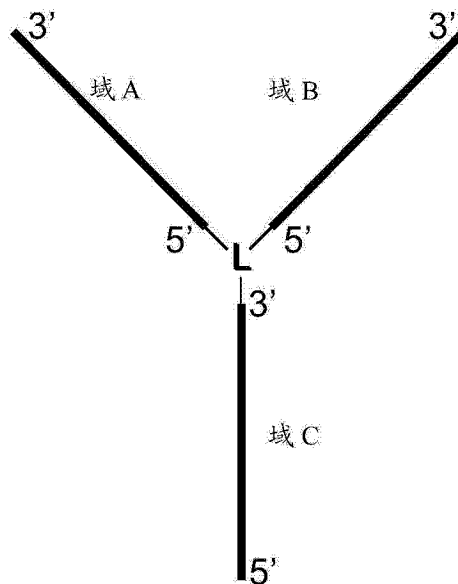


[0054] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0055] 项 17. 一种基于寡核糖核苷酸的化合物, 其包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的三个寡核糖核苷酸, 其中, 所述各寡核糖核苷酸中的两个在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核糖核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 并且该基于寡核糖核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制所述一个或多个单链 RNA 序列的表达, 该基于寡核糖核苷酸的化合物具有如下结构:

[0056]

式 IV

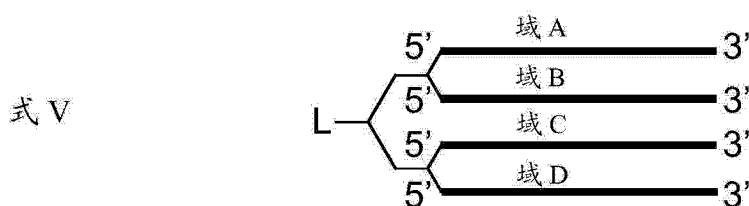


[0057] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0058] 项 18. 一种基于寡核糖核苷酸的化合物, 其包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的四个寡核糖核苷酸, 其中所述各寡核糖核苷酸在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核糖核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 并且该基于寡核糖核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制所述一个或多个单链 RNA 序列的表达, 该基于寡核糖核苷酸的化合物具有如下结

构：

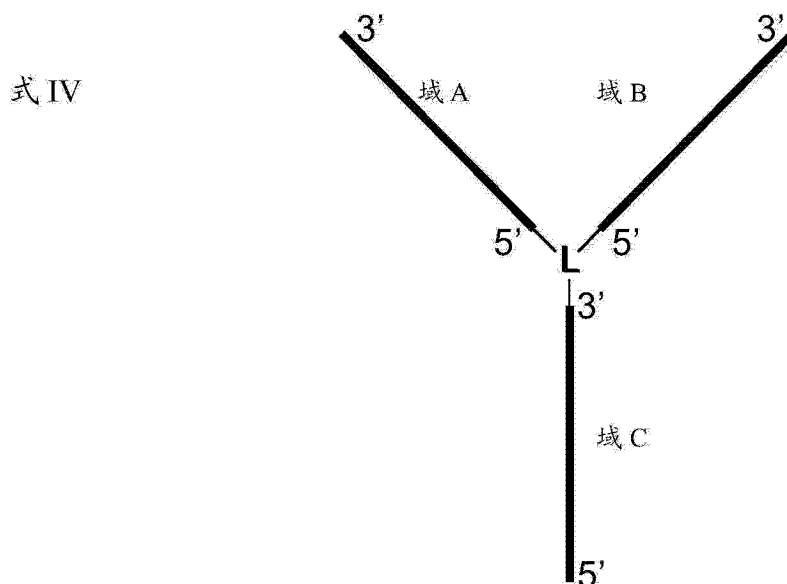
[0059]



[0060] 其中域 A 或域 B 或域 C 或域 D 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0061] 项 19. 一种基于寡核苷酸的化合物, 其包含三个寡核苷酸, 其中所述各寡核苷酸中的两个在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 该基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

[0062]



[0063] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与单链 RNA 序列互补的寡核苷酸, 使得所述基于寡核苷酸的化合物特异性地与至少一个单链 RNA 序列杂交并抑制所述至少一个单链 RNA 序列的表达, 以及其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个作为细胞内或细胞外受体的拮抗剂的寡核苷酸。

[0064] 项 20. 根据项 19 的所述基于寡核苷酸的化合物, 其中所述受体是 TLR。

[0065] 项 21. 一种用于抑制基因表达的方法, 该方法包括使细胞与合成的基于寡核苷酸的化合物接触, 所述合成的基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的两个或多个寡核苷酸, 其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接, 使得该寡核苷酸具有两个或多个可及的 3' 端, 并且所述各寡核苷酸特异性地与该一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达。

[0066] 项 22. 一种用于抑制体内基因表达的方法, 该方法包括以药学有效量对哺乳动物施用基于寡核苷酸的化合物, 所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的两个或多个寡核苷酸, 其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接, 使得该寡核苷酸具有两个或多个可及的 3' 端并且所述各寡核苷酸特异性地与该一个或多个单链 RNA 序列杂

交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达。

[0067] 项 23. 根据项 22 的方法,其中所述寡核苷酸与一个或多个编码 Bcl-2、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白或 VEGF 的 RNA 互补。

[0068] 项 24. 根据项 22 的方法,其中所述寡核苷酸与一个或多个编码 TLR 的 RNA 互补。

[0069] 项 25. 根据项 24 的方法,其中所述 TLR 选自:TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8 和 TLR9。

[0070] 项 26. 根据项 22 的方法,其中施用路径选自:胃肠外、肌肉内、皮下、腹膜内、静脉内、粘膜投递、口服、舌下、经皮、局部、吸入、鼻内、气雾剂、眼内、气管内、直肠内、阴道、基因枪、皮肤贴片、滴眼剂或漱口剂。

[0071] 项 27. 根据项 22 的方法,其中每一个所述寡核苷酸与不同的单链 RNA 序列互补。

[0072] 项 28. 一种用于治疗性处理患有由一种或多种蛋白质介导的疾病或病症的哺乳动物的方法,该方法包括以药学有效量对所述哺乳动物施用合成的基于寡核苷酸的化合物,该合成的基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的两个或多个寡核苷酸,其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接,使得所述寡核苷酸具有两个或多个可及的 3' 端,并且所述各寡核苷酸特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达,其中所述各寡核苷酸中的至少一个与编码所述一种或多种蛋白质的单链 RNA 互补。

[0073] 项 29. 根据项 28 的方法,其中多于一个的所述各寡核苷酸与编码所述一种或多种蛋白质的单链 RNA 互补。

[0074] 项 30. 根据项 28 的方法,其中所述一种或多种蛋白质中的至少一种选自:Bcl-2、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白、VEGF、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8 和 TLR9。

[0075] 项 31. 根据项 28 的方法,其中所述一种或多种蛋白质选自:Bcl-2、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白、VEGF、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8 和 TLR9。

[0076] 项 32. 根据项 28 的方法,其中所述疾病或病症选自:癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、感染性疾病、皮肤病症、变态反应、哮喘、细菌、病毒或真菌感染、或由病原体引起的疾病。

[0077] 项 33. 根据项 28 的方法,其包括进一步施用一种或多种疫苗、抗原、抗体、细胞毒剂、变应原、抗生素、TLR 激动剂、TLR 拮抗剂、siRNA 分子、miRNA 分子、反义寡核苷酸、适体、蛋白质、肽、基因疗法载体、DNA 疫苗、佐剂、共刺激分子或它们的组合。

[0078] 项 34. 根据项 28 的方法,其中施用路径选自:胃肠外、肌肉内、皮下、腹膜内、静脉内、粘膜投递、口服、舌下、经皮、局部、吸入、鼻内、气雾剂、眼内、气管内、直肠内、阴道、基因枪、皮肤贴片、滴眼剂或漱口剂。

[0079] 项 35. 一种用于在有风险发生由一种或多种蛋白质介导的疾病或病症的哺乳动物中预防该疾病或病症的方法,该方法包括以预防有效量对哺乳动物施用合成的基于寡核苷酸的化合物,所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的两个或多个寡核苷酸,其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接,使得所述各寡核苷酸具有两个或多个可及的 3' 端,并且所述各寡核苷酸特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达,其中所述各寡核苷酸中的至少一个与编码一个或多

个蛋白质的单链 RNA 互补。

[0080] 项 36. 根据项 35 的方法,其中所述一种或多种蛋白质中的至少一个选自:Bcl-2、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白、VEGF、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8 和 TLR9。

[0081] 项 37. 根据项 35 的方法,其中所述一种或多种蛋白质选自:Bcl-2、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白、VEGF、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8 和 TLR9。

[0082] 项 38. 根据项 35 的方法,其中所述疾病或病症选自:癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、感染性疾病、皮肤病症、变态反应、哮喘、细菌、病毒或真菌感染、或由病原体引起的疾病。

[0083] 项 39. 根据项 35 的方法,其中所述哺乳动物是人。

[0084] 项 40. 根据项 35 的方法,其中施用路径选自:胃肠外、肌肉内、皮下、腹膜内、静脉内、粘膜投递、口服、舌下、经皮、局部、吸入、鼻内、气雾剂、眼内、气管内、直肠内、阴道、基因枪、皮肤贴片、滴眼剂或漱口剂。

[0085] 项 41. 根据项 35 的方法,其包括进一步施用一种或多种疫苗、抗原、抗体、细胞毒剂、变应原、抗生素、反义寡核苷酸、TLR 激动剂、TLR 拮抗剂、siRNA 分子、miRNA 分子、反义寡核苷酸、适体、蛋白质、肽、基因疗法载体、DNA 疫苗、佐剂、共刺激分子或它们的组合。

[0086] 项 42. 一种在哺乳动物中抑制单链 RNA 表达和选定的分子的蛋白质活性的方法,该方法包括以药学有效量对所述哺乳动物施用基于寡核苷酸的化合物与蛋白质活性拮抗剂的组合,所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的两个或多个寡核苷酸,其中各所述寡核苷酸在它们的 5' 端连接,使得所述各寡核苷酸具有两个或多个可及的 3' 端,并且所述各寡核苷酸特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达。

[0087] 项 43. 根据项 42 的方法,其中所述选定的分子是 TLR。

[0088] 项 44. 根据项 42 的方法,其中所述 TLR 拮抗剂选自下组:抗-TLR 抗体或其结合片段或其模拟肽、基于 RNA 的化合物、基于寡核苷酸的化合物、以及该 TLR 活性的小分子抑制剂。

[0089] 项 45. 根据项 21 的方法,其中所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的两个寡核苷酸,其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接,使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端,并且该基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达,所述基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

[0090]



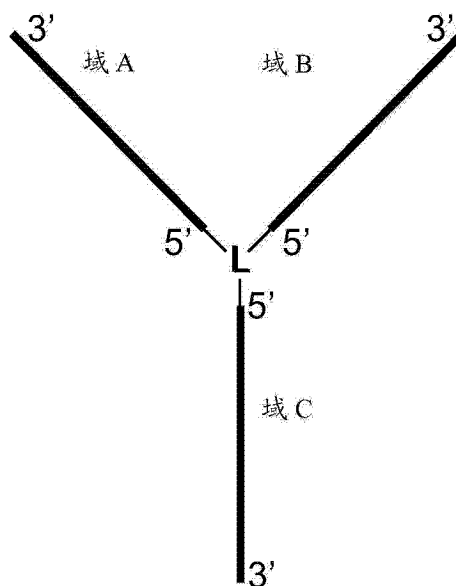
[0091] 其中域 A 或域 B 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交以形成 siRNA 的寡核糖核苷酸。

[0092] 项 46. 根据项 21 的方法,其中所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的三个寡核苷酸,其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接,使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个或多个可及的 3' 端,并且该基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述

一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达,所述基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

[0093]

式 III

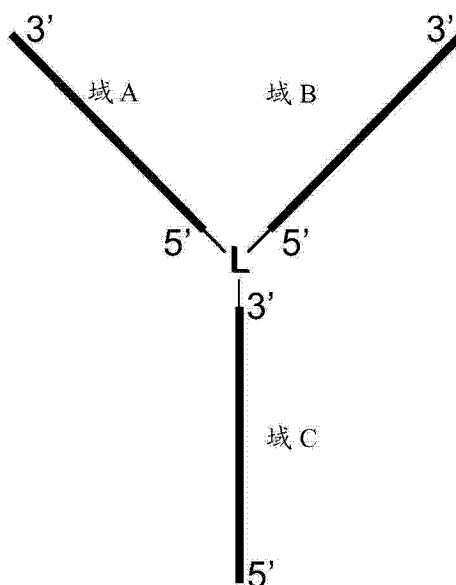


[0094] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0095] 项 47. 根据项 21 的方法,其中所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的三个寡核苷酸,其中所述各寡核苷酸中的两个在它们的 5' 端连接,使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端,并且该基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达,所述基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

[0096]

式 IV

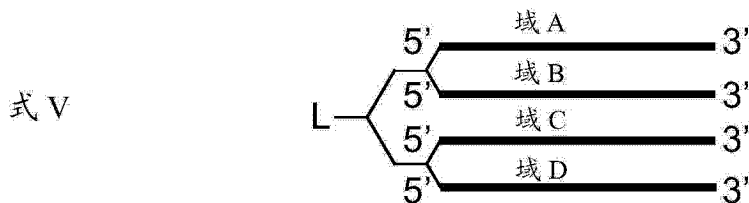


[0097] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸以形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0098] 项 48. 根据项 21 的方法,其中所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链

RNA 序列互补的四个寡核苷酸,其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接,使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端,并且该基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达,所述基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

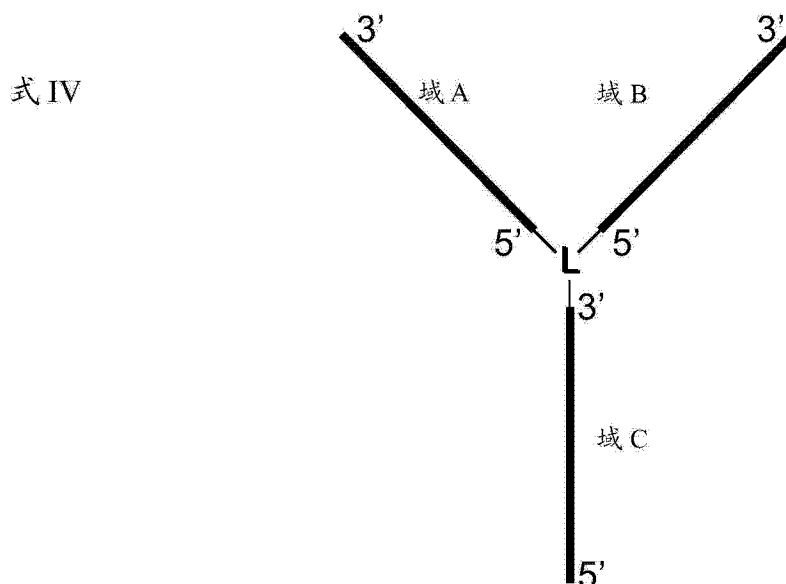
[0099]



[0100] 其中域 A 或域 B 或域 C 或域 D 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0101] 项 49. 根据项 21 的方法,其中所述基于寡核苷酸的化合物包含三个寡核苷酸,其中所述各寡核苷酸中的两个在它们的 5' 端连接,使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端,所述基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

[0102]



[0103] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与单链 RNA 序列互补的寡核苷酸,使得所述基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述至少一个单链 RNA 序列杂交并抑制该至少一个单链 RNA 序列的表达,以及其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是作为细胞内或细胞外受体的拮抗剂的寡核苷酸。

[0104] 项 50. 根据项 49 的方法,其中所述受体是 TLR。

[0105] 项 51. 根据项 28 的方法,其中所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的两个寡核苷酸,其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接,使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端,并且该基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达,所述基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

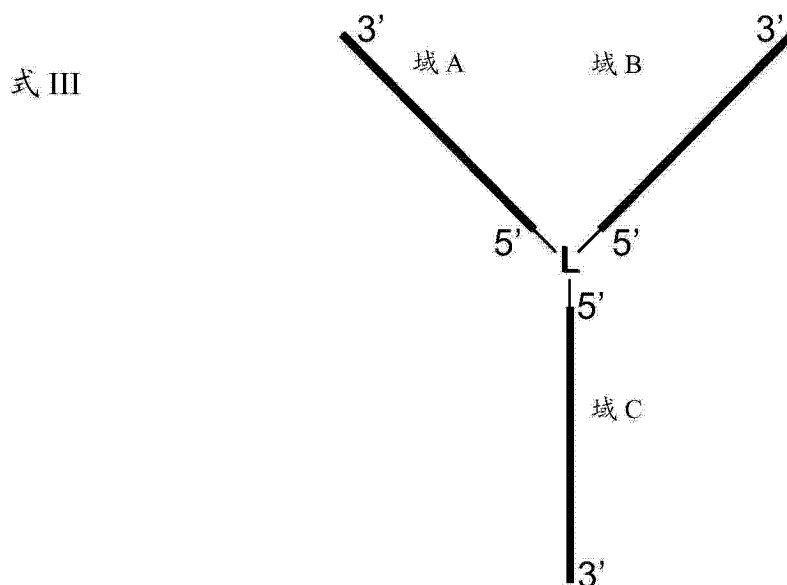
[0106]



[0107] 其中域 A 或域 B 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交以形成 siRNA 的寡核糖核苷酸。

[0108] 项 52. 根据项 28 的方法, 其中所述基于寡核糖核苷酸的化合物包括与一个或多个单链 RNA 序列互补的三个寡核糖核苷酸, 其中所述寡核糖核苷酸在它们的 5' 端连接, 使得所述基于寡核糖核苷酸的化合物具有两个或多个可及的 3' 端并且所述基于寡核糖核苷酸的化合物特异性地与一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达, 所述基于寡核糖核苷酸的化合物具有如下结构:

[0109]

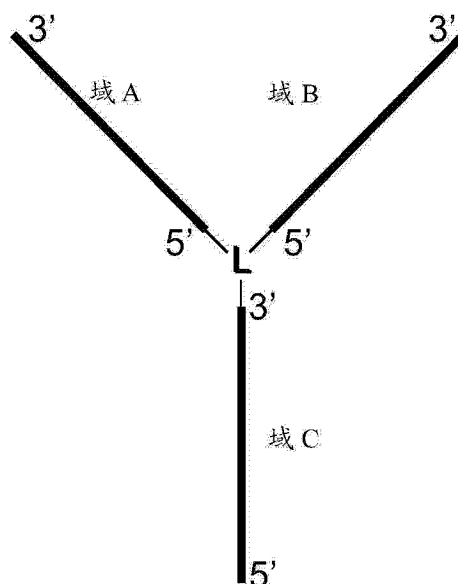


[0110] 其中域 A, 域 B 或域 C 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0111] 项 53. 根据项 28 的方法, 其中所述基于寡核糖核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的三个寡核糖核苷酸, 其中各所述寡核糖核苷酸中的两个在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核糖核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 并且该基于寡核糖核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达, 所述基于寡核糖核苷酸的化合物具有如下结构:

[0112]

式 IV

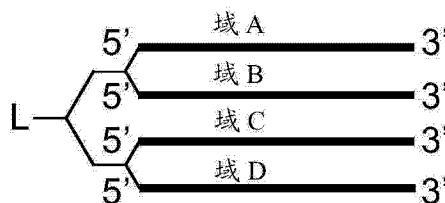


[0113] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0114] 项 54. 根据项 28 的方法, 其中所述基于寡核糖核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的四个寡核糖核苷酸, 其中所述各寡核糖核苷酸在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核糖核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 并且该基于寡核糖核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达, 所述基于寡核糖核苷酸的化合物具有如下结构:

[0115]

式 V

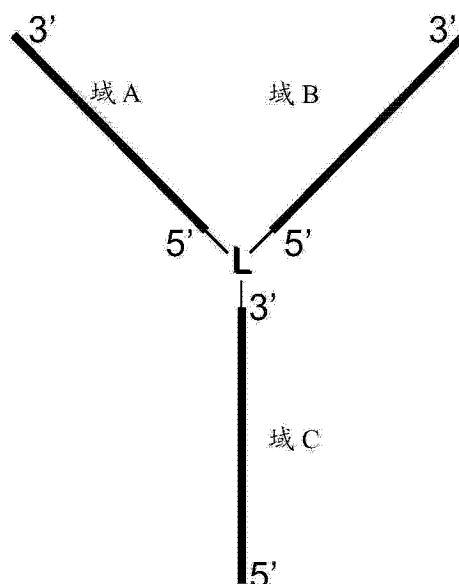


[0116] 其中域 A 或域 B 或域 C 或域 D 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0117] 项 55. 根据项 28 的方法, 其中所述基于寡核糖核苷酸的化合物包含三个寡核糖核苷酸, 其中所述各寡核糖核苷酸中的两个在它们的 5' 端连接, 使得该所述基于寡核糖核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 该基于寡核糖核苷酸的化合物具有如下结构:

[0118]

式 IV



[0119] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与单链 RNA 序列互补的寡核苷酸,使得该基于寡核苷酸的化合物特异性地与至少一个单链 RNA 序列杂交并抑制所述至少一个单链 RNA 序列的表达,以及其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是作为细胞内或细胞外受体的拮抗剂的寡核苷酸。

[0120] 项 56. 根据项 55 的方法,其中所述受体是 TLR。

[0121] 项 57. 根据项 35 的方法,其中所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的两个寡核苷酸,其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接,使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端,并且该基于寡核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并且抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达,所述基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

[0122]

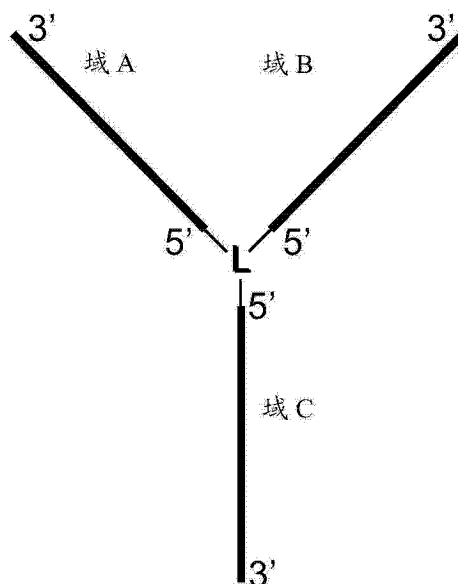


[0123] 其中域 A 或域 B 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 的寡核糖核苷酸。

[0124] 项 58. 根据项 35 的方法,其中所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的三个寡核苷酸,其中所述各寡核苷酸在它们的 5' 端连接,使得该基于寡核苷酸的化合物具有两个或多个可及的 3' 端,并且所述基于寡核苷酸的化合物特异性地与一个或多个单链 RNA 序列杂交并且抑制一个或多个单链 RNA 序列的表达,所述基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

[0125]

式 III

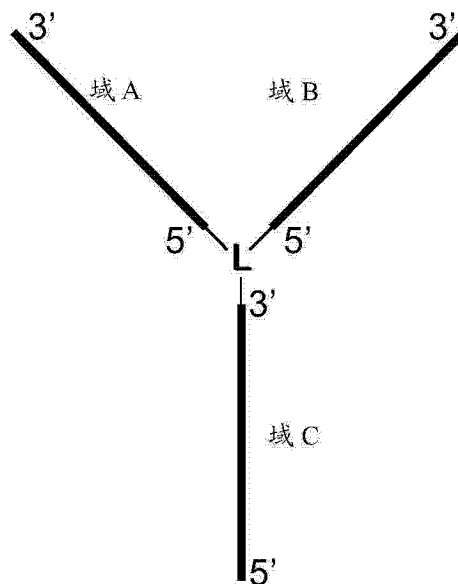


[0126] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0127] 项 59. 根据项 35 的方法, 其中所述基于寡核糖核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的三个寡核糖核苷酸, 其中所述各寡核糖核苷酸中的两个在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核糖核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 并且该基于寡核糖核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并且抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达, 所述基于寡核糖核苷酸的化合物具有如下结构:

[0128]

式 IV

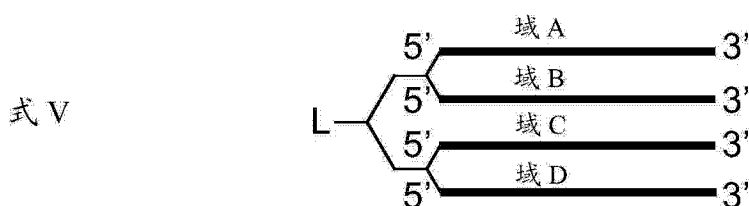


[0129] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0130] 项 60. 根据项 35 的方法, 其中所述基于寡核糖核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的四个寡核糖核苷酸, 其中所述各寡核糖核苷酸在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核糖核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 并且所述基于寡核糖核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达, 所述基于寡核糖核苷酸的

化合物具有如下结构：

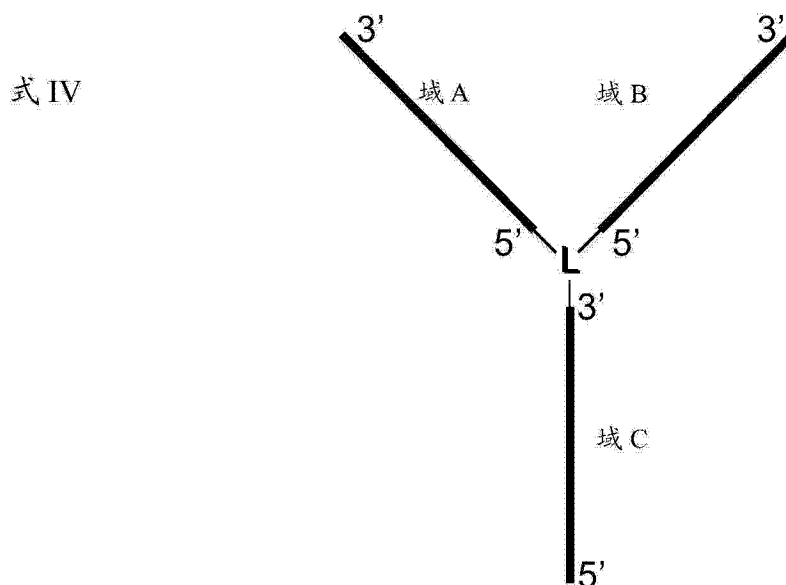
[0131]



[0132] 其中域 A 或域 B 或域 C 或域 D 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0133] 项 61. 根据项 35 的方法, 其中所述基于寡核核苷酸的化合物包含三个寡核核苷酸, 其中所述各寡核核苷酸中的两个在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 所述基于寡核核苷酸的化合物具有如下结构:

[0134]



[0135] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与单链 RNA 序列互补的寡核核苷酸, 该基于寡核核苷酸的化合物特异性地与至少一个单链 RNA 序列杂交并抑制所述至少一个单链 RNA 序列的表达, 以及其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个作为细胞内或细胞外受体的拮抗剂的寡核核苷酸。

[0136] 项 62. 根据项 61 的方法, 其中所述受体是 TLR。

[0137] 项 63. 根据项 42 的方法, 其中所述基于寡核核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的两个寡核核苷酸, 其中所述各寡核核苷酸在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 并且所述基于寡核核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并且抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达, 所述基于寡核核苷酸的化合物具有如下结构:

[0138]

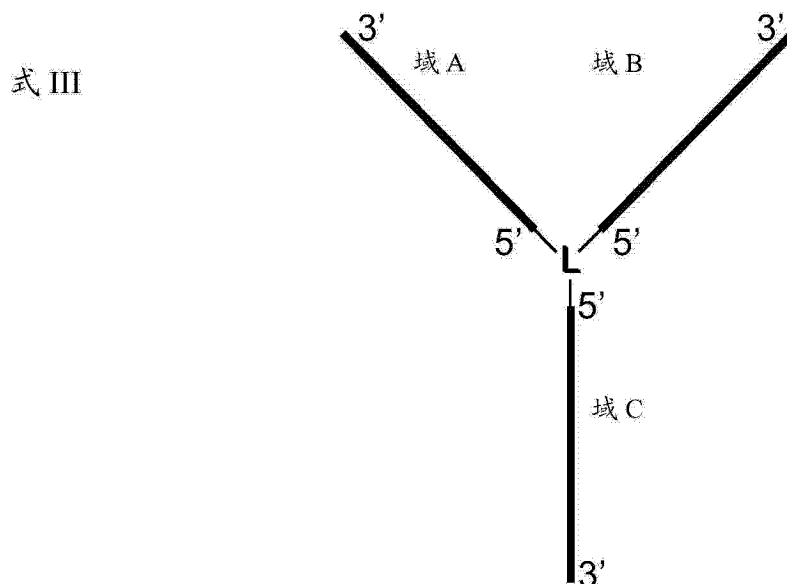


[0139] 其中域 A 或域 B 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 的寡核

糖核苷酸。

[0140] 项 64. 根据项 42 的方法, 其中所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的三个寡核苷酸, 其中所述寡核苷酸在它们的 5' 端连接, 该基于寡核苷酸的化合物具有两个或多个可及的 3' 端并且所述基于寡核苷酸的化合物特异性地与一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达, 所述基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

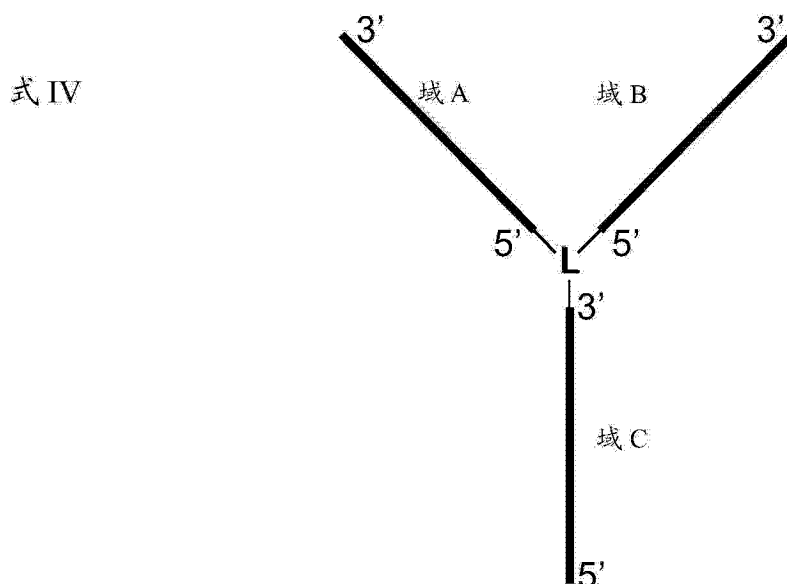
[0141]



[0142] 其中域 A, 域 B 或域 C 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0143] 项 65. 根据项 42 的方法, 其中所述基于寡核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的三个寡核苷酸, 其中所述各寡核苷酸中的两个在它们的 5' 端连接, 该基于寡核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端并且所述基于寡核苷酸的化合物特异性地与一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达, 所述基于寡核苷酸的化合物具有如下结构:

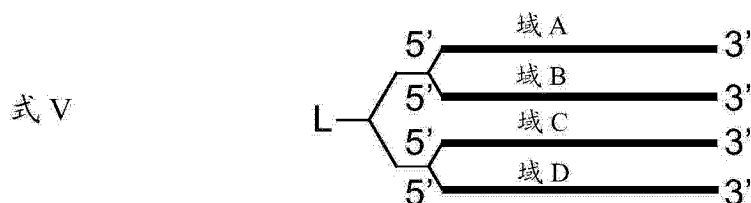
[0144]



[0145] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0146] 项 66. 根据项 42 的方法, 其中所述基于寡核糖核苷酸的化合物包含与一个或多个单链 RNA 序列互补的四个寡核糖核苷酸, 其中所述各寡核糖核苷酸在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核糖核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 并且该基于寡核糖核苷酸的化合物特异性地与所述一个或多个单链 RNA 序列杂交并抑制该一个或多个单链 RNA 序列的表达, 所述基于寡核糖核苷酸的化合物具有如下结构:

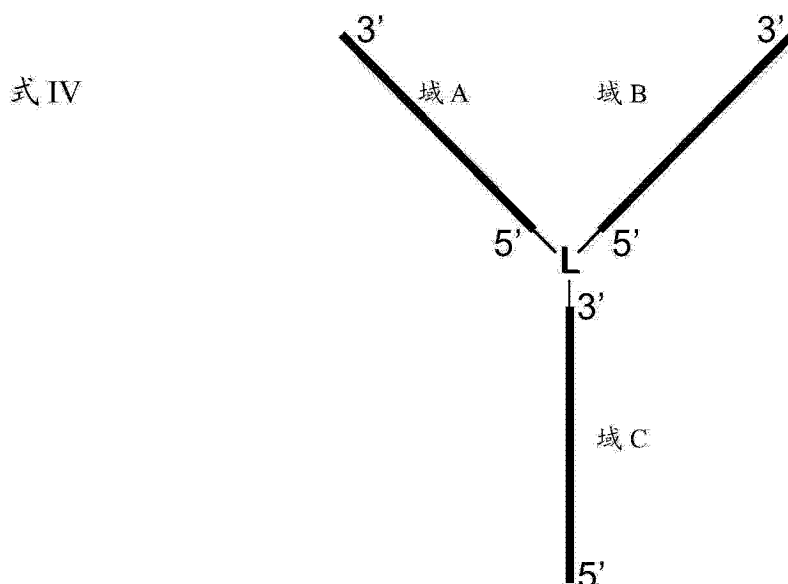
[0147]



[0148] 其中域 A 或域 B 或域 C 或域 D 中的至少一个是与互补的寡核糖核苷酸杂交而形成 siRNA 分子的寡核糖核苷酸。

[0149] 项 67. 根据项 46 的方法, 其中所述基于寡核糖核苷酸的化合物包含三个寡核糖核苷酸, 其中所述各寡核糖核苷酸中的两个在它们的 5' 端连接, 使得该基于寡核糖核苷酸的化合物具有两个可及的 3' 端, 所述基于寡核糖核苷酸的化合物具有如下结构:

[0150]



[0151] 其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是与单链 RNA 序列互补的寡核苷酸,使得该基于寡核苷酸的化合物特异性地与至少一个单链 RNA 序列杂交并抑制所述至少一个单链 RNA 序列的表达,以及其中域 A、域 B 或域 C 中的至少一个是作为细胞内或细胞外受体的拮抗剂的寡核苷酸。

[0152] 项 68. 根据项 67 的方法,其中所述受体是 TLR。

[0153] 附图简述

[0154] 图 1A 是一种用于线性合成本发明的反义寡核苷酸的合成方案。DMTr = 4,4'-二甲氧基三苯甲基;CE = 氰乙基。

[0155] 图 1B 是一种用于平行合成本发明的反义寡核苷酸的合成方案。DMTr = 4,4'-二甲氧基三苯甲基;CE = 氰乙基。

[0156] 图 2A 和 2B 描述了在表达鼠 TLR9 的 HEK293 细胞中,依照本发明的示例性反义寡核苷酸的反义活性。该数据显示了在根据实施例 2 培养和处理的细胞中,依照本发明的反义寡核苷酸抑制 TLR9 激动剂活性的能力。

[0157] 图 2C 描述了在表达鼠 TLR7 的 HEK293 细胞中,依照本发明的示例性反义寡核苷酸的反义活性。该数据显示了在根据实施例 2 培养和处理的细胞中,依照本发明的反义寡核苷酸抑制 TLR7 激动剂活性的能力。

[0158] 图 2D 描述了在表达鼠 MyD88 的 HEK293 细胞中,依照本发明的示例性反义寡核苷酸的反义活性。该数据显示了在根据实施例 2 培养和处理的细胞中,依照本发明的反义寡核苷酸抑制 MyD88 激动剂活性的能力。

[0159] 图 3 显示了在小鼠脾细胞中依照本发明的示例性反义寡核苷酸的反义活性。该数据显示了在根据实施例 2 处理的脾细胞中,依照本发明的反义寡核苷酸抑制 TLR9mRNA 翻译、或蛋白质合成的能力。

[0160] 图 4 描述了在人 PBMC 中依照本发明的示例性反义寡核苷酸的反义活性。该数据显示了在根据实施例 2 处理的人 PBMC 中,依照本发明的反义寡核苷酸抑制 TLR9mRNA 翻译、或蛋白质合成的能力。

[0161] 图 5A 和 5B 描述了在依照实施例 3 体内施用后,依照本发明的示例性反义寡核苷酸

酸抑制 TLR9 诱导的 IL-12 的活性。该数据显示了施用依照本发明的示例性 TLR9 反义寡核苷酸可以引起体内 TLR9 表达的下调并且阻止由 TLR9 激动剂引起的 IL-12 诱导。更概括地说,该数据显示了依照本发明的 TLR9 反义寡核苷酸抑制由 TLR9 激动剂引起的促炎症细胞因子的诱导的能力。

[0162] 图 5C 描述了在依照实施例 3 体内施用后,依照本发明的示例性反义寡核苷酸抑制 MyD88 诱导的 IL-12 的体内活性 (in vivo activity to inhibit MyD88-induced IL-12) 的持续时间。该数据显示了施用依照本发明的示例性 MyD88 反义寡核苷酸,与施用线性的反义寡核苷酸或 3' -3' 连接的反义寡核苷酸相比,可以在更长的持续时间内引起在体内的 MyD88 表达的下调并且阻止由 TLR9 激动剂引起的 IL-12 的诱导。更概括地说,该数据显示了依照本发明的 MyD88 反义寡核苷酸抑制由 TLR 激动剂引起的促炎症细胞因子的诱导的能力。

[0163] 图 6 描述了在依照实施例 3 体内施用后,依照本发明的示例性反义寡核苷酸以剂量依赖方式抑制 TLR9 诱导的 IL-12 的活性。该数据显示了依照本发明的 TLR9 反义寡核苷酸的体内施用可以在体内以剂量依赖方式引起 TLR9 表达的下调,并且阻止由 TLR9 激动剂引起的 IL-12 的诱导。更概括地说,该数据显示了依照本发明的 TLR9 反义寡核苷酸选择性地抑制由 TLR9 激动剂引起的促炎症细胞因子的诱导的能力。

[0164] 图 7 显示了按照根据实施例 3 的体内施用,依照本发明的示例性反义寡核苷酸以时间依赖方式抑制 TLR9 诱导的 IL-12 的活性。该数据显示了体内施用依照本发明的 TLR9 反义寡核苷酸可以在体内以时间依赖方式引起 TLR9 表达的下调,并且可以长时间阻止由 TLR9 激动剂引起的 IL-12 的诱导。更概括地说,该数据显示了依照本发明的 TLR9 反义寡核苷酸以时间依赖方式抑制由 TLR9 激动剂引起的促炎症细胞因子的诱导的能力。

[0165] 图 8A、8B、8C 描述了在鼠 J774 细胞中,依照本发明的示例性反义寡核苷酸的反义活性。该数据显示了在根据实施例 2 处理的鼠 J774 细胞中,依照本发明的反义寡核苷酸抑制 TLR9mRNA,转录、翻译、或蛋白质合成的能力。

[0166] 图 8D 描述了在人 HeLa 细胞中,依照本发明的示例性反义寡核苷酸的反义活性。该数据显示了在根据实施例 2 处理的人 HeLa 细胞中,依照本发明的反义寡核苷酸抑制 VEGF mRNA 转录的能力。

[0167] 图 9 描述了在人 B 细胞中,依照本发明的示例性反义寡核苷酸的反义活性。该数据显示了在根据实施例 2 处理的人 B 细胞中,依照本发明的反义寡核苷酸抑制 TLR9mRNA 翻译、或蛋白质合成的能力。

[0168] 图 10 描述了在人 pDC 中,依照本发明的示例性反义寡核苷酸的反义活性。该数据显示了在根据实施例 2 处理的人 pDC 中,依照本发明的反义寡核苷酸抑制 TLR9mRNA 翻译、或蛋白质合成的能力。

[0169] 图 11 描述了在依照实施例 3 体内施用后,依照本发明的示例性反义寡核苷酸抑制 TLR9 诱导的 IL-12 的活性。该数据显示了依照本发明的示例性 TLR9 反义寡核苷酸的体内施用可以在体内引起 TLR9 表达的下调,并且阻止由 TLR9 激动剂引起的 IL-12 的诱导。更概括地说,该数据显示了依照本发明的 TLR9 反义寡核苷酸抑制由 TLR9 激动剂引起的促炎症细胞因子的诱导的能力。

[0170] 图 12 描述了在表达小鼠 TLR7 的 HEK293 细胞中,依照本发明的示例性反义寡核苷

酸的反义活性。该数据显示了在根据实施例 2 培养和处理的细胞中,依照本发明的反义寡核苷酸抑制 TLR7 激动剂活性的能力。

[0171] 图 13 描述了根据实施例 4 处理的,依照本发明的示例性反义寡核苷酸的选择性结合和切割。在图 13 中,泳道 1 为单独的底物;泳道 2 为 T1 核酸酶;泳道 3 为 5'-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-3' (SEQ ID NO. 28);泳道 4 为 5'-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-X-CUGACGUGUCUGUUCGUAA-5';泳道 5 为 3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-3' (SEQ ID 21);泳道 6 为 5'-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-3';泳道 7 为 5'-CUGUCCoAoAoAoUoGoCoUoUoGoUoCoUoGoUoCoCoACGAU-3' (SEQ ID NO. 29);泳道 8 为 dsRNA;以及泳道 9 为 20-mer DNA 反义;其中所有的序列均具有硫代磷酸酯主链,除了用“o”(磷酸二酯联接)指出的部分之外;加下划线的核苷酸表示 2'-O-甲基核糖核苷酸。该数据显示,依照本发明的寡核苷酸为与 RNAi 介导的基因表达抑制相关的蛋白质和酶的结合和切割提供了优化的结构。

[0172] 优选实施方案的详述

[0173] 本发明涉及新的反义寡核苷酸用于下调基因表达的治疗以及预防应用。这样的分子在例如提供如下所述的组合物的方面是有用的:所述组合物用于在患者、受试者、动物或生物体中调节基因表达、或治疗和/或预防能够响应于基因表达调节的疾病和/或病患。

[0174] 本文中所引用的专利和出版物反映了本领域的知识水平,在此通过提及完整并入它们。这些专利和出版物的教导与本说明书之间的任何冲突应当以有利于后者的方式来解决。

[0175] 在连同附图阅读下文的描述后,可以更为完整地理解本发明的上述及其它目的、其各种特征、及发明本身,其中:

[0176] 术语“2'-O-取代的”指用下述基团取代戊糖模块的 2' 位置:含有 1-6 个饱和的或不饱和的碳原子的 -O- 低级烷基 (alkyl) 基团 (例如但不限于 2'-O-甲基) 或用 O-芳基或具有 2-6 个碳原子的烯丙基基团 (allyl group) 取代戊糖模块的 2' 位置,其中所述烷基、芳基或烯丙基基团可以是未取代的或者可以是取代的 (例如用 2'-O-甲氧基乙基、乙氧基、甲氧基、卤素、羟基、三氟甲基、氰基、硝基、酰基、酰氧基、烷氧基、羧基、烷氧羰基、或氨基基团);或者用羟基、氨基或卤素基团,但不用 2'-H 基团。在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸在其 5' 末端包含 4 个或 5 个 2'-O-烷基核苷酸和/或在其 3' 末端包含 4 个或 5 个 2'-O-烷基核苷酸。

[0177] 在方向上使用时,术语“3'”通常指多核苷酸或寡核苷酸中的某个区域或位置位于相同多核苷酸或寡核苷酸中的另一区域或位置的 3' 侧 (指向核苷酸的 3' 端)。

[0178] 术语“3' 端”通常指成分寡核苷酸的 3' 末端核苷酸。“两个或更多个寡核苷酸在它们的 3' 端连接”通常是指各寡核苷酸的 3' 末端核苷酸之间的联接,其可以直接藉由 5'、3' 或 2' 羟基基团,或间接地藉由非核苷酸接头来实现。这样的联接还可以藉由核苷实现,利用核苷的 2' 和 3' 羟基这两个位置。这样的联接还可以利用 3' 末端核苷酸的功能化的糖或核碱基。

[0179] 在方向上使用时,术语“5'”通常指多核苷酸或寡核苷酸中的某个区域或位置位于相同多核苷酸或寡核苷酸中的另一区域或位置的 5' 侧 (指向核苷酸的 5' 端)。

[0180] 术语“5' 端”通常指成分寡核苷酸的 5' 末端核苷酸。“两个或多个单链反义寡核

苷酸在它们的 5' 端连接”通常是指各核苷酸的 5' 末端之间的联接,该联接可以直接藉由 5'、3' 或 2' 羟基基团,或可以间接地通过非核苷酸接头来实现。这样的联接还可以是藉由核苷的,其利用核苷的 2' 和 3' 羟基两个位置。这样的联接还可以利用 5' 末端核苷酸的功能化的糖或核碱基。

[0181] 术语“约”一般意味着精确的数字不是至关重要的。因此,意图涵盖少 1 或 2 个核苷残基或多 1 个到几个核苷残基的寡核苷酸作为上文所描述的每个实施方案的等同方案。

[0182] 术语“可及的 (accessible)”当涉及依照本发明的化合物时通常表示,分子的相关部分能够被引发针对化合物的延长应答所必需的细胞成分识别。

[0183] 术语“激动剂”通常指结合细胞的受体并诱导应答的物质。激动剂常常模拟天然存在的物质诸如配体的作用。

[0184] 术语“拮抗剂”通常指减弱激动剂或配体效果的物质。

[0185] 术语“气道炎症”一般包括但不限于由变应原引起的呼吸道炎症,包括哮喘。

[0186] 术语“变应原”通常指暴露于受试者后引发变应性应答的抗原或分子(通常为蛋白质)的抗原性部分。通常,受试者对变应原是变应性的,如按照例如风团和潮红测试(wheal and flare test)或本领域已知的任何方法所表明的。即使仅有一小部分的受试者在暴露于分子后表现出变应性(例如 IgE)免疫应答,也称该分子为变应原。

[0187] 术语“变态反应”一般包括但不限于食物变态反应、呼吸系统变态反应和皮肤变态反应。

[0188] 术语“抗原”通常指被抗体或 T 细胞抗原受体识别和选择性结合的物质。抗原可以包括但不限于肽、蛋白质、脂质、碳水化合物、核苷、核苷酸、核酸及它们的组合。抗原可以是天然的或合成的,而且一般诱导对所述抗原特异性的免疫应答。

[0189] 术语“自身免疫性病症”通常指“自身”抗原经受免疫系统攻击的病症。该术语包括但不限于红斑狼疮、多发性硬化、I 型糖尿病、肠易激综合征、克罗恩氏病(Chron's disease)、类风湿性关节炎、感染性休克、普秃、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森氏综合征、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、大疱性类天疱疮、查加斯病(chagas disease)、慢性阻塞性肺病、hydrox 病(hydrox disease)、皮炎、子宫内膜异位症、肺出血肾炎综合征、格雷夫斯氏病、格-巴二氏综合征、桥本氏病、化脓性汗腺炎、特发性血小板减少性紫癜、间质性膀胱炎、硬斑病、重症肌无力、发作性睡病、神经性肌强直、天疱疮、恶性贫血、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、精神分裂症、斯耶格伦氏综合征、颞动脉炎(“巨细胞动脉炎”)、血管炎、白癜风、外阴痛和韦格纳氏肉芽肿病、自身免疫性哮喘、感染性休克和银屑病。

[0190] 术语“生物不稳定性”通常是指分子在体内被降解以及随后失活的能力。对于寡核苷酸,这样的降解是外切核酸酶活性和/或内切核酸酶活性作用的结果,其中外切核酸酶活性是指从寡核苷酸的 3' 或 5' 端切割核苷酸,内切核酸酶活性是指在寡核苷酸除了末端之外的位点切割磷酸二酯键。

[0191] 术语“癌症”通常指,但不限于由异常的或不受控制的细胞增殖和/或分裂引起的任何恶性生长或肿瘤。癌症可以在人和/或哺乳动物中发生,而且可以发生在任何组织中。治疗癌症患者可以包括施用依照本发明的化合物、药物制剂或疫苗以影响异常的或不受控制的细胞增殖和/或分裂。

[0192] 术语“载体”一般涵盖任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、油、脂质、含有脂质的囊泡、微球体、脂质体包囊、或用于药用制剂的其它材料。要理解的是，载体、赋形剂、或稀释剂的特征会取决于用于特定应用的施用路径。含有这些材料的药学可接受制剂的制备记载于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, A. Gennaro 编, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990。

[0193] 术语“共施用”或“共施用的”通常指在时间上足够接近地施用至少两种不同物质以调制免疫应答。共施用是指至少两种不同物质同时施用, 或者按照时间上有间隔的(多至相隔几天)次序, 作为单个剂量或分多个不同的剂量以任何次序施用。

[0194] 术语“与... 组合”通常指在治疗患者的过程中施用依照本发明的化合物与其他作用剂, 所述作用剂对治疗疾病或疾患有用, 且不消除所述化合物的 TLR9 反义活性。所述施用可以以任何次序完成, 包括同时施用, 以及相隔几秒至数天的时间上有间隔的次序。此类组合处理还可以包括施用的依照本发明的化合物和 / 或独立地所述其他作用剂超过一次。依照本发明的化合物和其它药剂可以通过相同或不同的路径施用。

[0195] 术语“个体”或“受试者”或“患者”通常指哺乳动物诸如人。

[0196] 术语“激酶抑制剂”一般指在细胞中拮抗或抑制磷酸化依赖性细胞信号传导和 / 或生长途径的分子。激酶抑制剂可以是天然存在的或合成的, 而且包括具有要作为口服治疗剂施用的潜力的小分子。激酶抑制剂具有快速且特异性抑制靶标激酶分子的激活的能力。蛋白质激酶是有吸引力的药物靶物, 这部分是因为它们调节极其多种信号传导和生长途径, 而且包括许多不同蛋白质。因此, 它们在治疗牵涉激酶信号传导的疾病, 包括癌症、心血管疾病、炎症病症、糖尿病、黄斑变性和神经病学病症中具有极大的潜力。激酶抑制剂的非限制性实例为索拉非尼 (sorafenib)。

[0197] 术语“线性合成”通常指在寡核苷酸的一端开始并线性行进至另一端的合成。线性合成容许将相同或不同(就长度、碱基组成和 / 或掺入的化学修饰而言)的单体单元掺入寡核苷酸中。

[0198] 术语“哺乳动物”明确意图包括温血的脊椎动物, 包括但不限于人、非人灵长类、大鼠、小鼠、猫、犬、马、牛、奶牛 (cow)、猪、绵羊和兔。

[0199] 术语“核苷”通常指由糖(通常为核糖、脱氧核糖、戊糖、阿拉伯糖或己糖), 和嘌呤或嘧啶碱基组成的化合物。

[0200] 术语“核苷酸”通常指包含衔接于糖的含磷基团的核苷。

[0201] 术语“经修饰的核苷”或“核苷酸衍生物”一般是包含经修饰的杂环碱基、经修饰的糖模块、或其任意组合的核苷。在一些实施方案中, 经修饰的核苷或核苷酸衍生物是非天然的嘧啶或嘌呤核苷, 如本文中所描述的。为本发明的目的, 经修饰的核苷或核苷酸衍生物、嘧啶或嘌呤类似物、或非天然存在的嘧啶或嘌呤可互换使用, 指包含非天然存在的碱基和 / 或非天然存在的糖模块的核苷。为本发明的目的, 若碱基不是鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶, 则认为它是非天然的, 而若糖不是 β -核糖-呋喃糖苷或 2'-脱氧核糖-呋喃糖苷, 则认为它是非天然的。

[0202] 如本文中所使用的, 术语“经修饰的寡核苷酸”描述了这样的寡核苷酸, 其至少两个核苷酸是经由合成联接(即一个核苷酸的 5' 端与另一个核苷酸的 3' 端之间的不同于磷酸二酯联接的联接, 其中 5' 核苷酸磷酸根已经被替换成任何数目的化学基团)而连接的。

术语“经修饰的寡核苷酸”还涵盖了 2'-O, 4'-C- 亚甲基 -b-D- 呋喃核糖基核酸、阿拉伯糖核酸、取代的阿拉伯糖核酸、己糖核酸、肽核酸、吗啉代、以及具有至少一个如下的核苷酸的寡核苷酸, 所述核苷酸具有经修饰的碱基和 / 或糖, 诸如 2'-O- 取代的、5- 甲基胞嘧啶和 / 或 3'-O- 取代的核糖核苷酸。

[0203] 术语“核酸”涵盖基因组区或自其转录的 RNA 分子。在一些实施方案中, 核酸是 mRNA。

[0204] 术语“接头”一般指可以经由糖、碱基、或主链通过共价或非共价键合而附接于寡核苷酸的任何模块。非共价联接可以为但不限于: 静电相互作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用、氢键以及它们的组合。这样的非共价联接的非限制性实例包括 Watson-Crick 碱基配对、Hoogsteen 碱基配对、以及碱基堆积。接头可以用于附接两个或更多个核苷或者可以被附接于寡核苷酸中的 5' 和 / 或 3' 末端核苷酸。此类接头可以是非核苷酸接头或核苷接头。

[0205] 术语“非核苷酸接头”一般指不同于两个核苷酸之间的直接联结的、可以通过共价或非共价键合而附接于寡核苷酸的化学模块。优选地, 此类非核苷酸接头长约 2 埃至约 200 埃, 而且可以为顺式或反式取向。

[0206] 术语“核苷酸间联结”一般指在相邻核苷之间经由其糖连接两个核苷的化学联结 (例如 3'-3'、2'-3'、2'-5'、3'-5'、5'-5'), 其由磷原子和带电荷或中性基团组成 (例如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、或甲基膦酸酯)。

[0207] 术语“寡核苷酸”指由多个连接起来的核苷单元形成的多核苷, 该核苷单元可以包括例如: 脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸、合成的或天然的核苷酸、磷酸二酯或经修饰的联接、天然的碱基或经修饰的碱基天然的糖或经修饰的糖、或这些成分的组合。核苷单元可以是病毒、细菌、细胞碎片或基于寡核苷酸的组合物 (例如 siRNA 和微小 RNA) 的部分。该寡核苷酸也可以从现有的核酸来源 (包括基因组或 cDNA) 获得, 但是优选是通过合成方法生成的。在某些实施方案中, 每个核苷单元包括杂环碱基和呋喃戊糖基、海藻糖、阿拉伯糖、2'-脱氧-2'-取代的核苷、2'-脱氧-2'-取代的阿拉伯糖、2'-O-取代的阿拉伯糖或己糖基团。核苷残基可以通过多种已知的核苷间联接之任一种而彼此偶联。所述核苷间联接包括但不限于磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、烷基膦酸酯、烷基硫代膦酸酯 (alkylphosphonothioate)、磷酸三酯、氨基膦酸酯 (phosphoramidate)、硅氧烷、碳酸酯、烷氧羰基、氨基乙酸酯 (acetamidate)、氨基甲酸酯、吗啉代 (morpholino)、硼代 (borano)、硫醚、桥接氨基膦酸酯 (bridged phosphoramidate)、桥接亚甲基膦酸酯、桥接硫代磷酸酯、和砷核苷间连接。术语“寡核苷酸”还涵盖具有一个或多个立体有择的核苷间联接 (例如 (Rp)- 或 (Sp)- 硫代磷酸酯、烷基膦酸酯、或磷酸三酯联接) 的多核苷。如本文中所使用的, 术语“寡核苷酸”和“二核苷酸”明确意图包括具有任何所述核苷间连接的多核苷和二核苷, 无论所述连接是否包含磷酸根基团。在某些示例性的实施方案中, 这些核苷间连接可以是磷酸二酯、硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯联接, 或它们的组合。在示例的实施方案中, 合成的寡核苷酸的核苷酸是通过至少一个硫代磷酸酯核苷酸间联接来连接起来的。硫代磷酸酯联接可以是混合的 Rp 和 Sp 对映体, 或者它们可以是呈 Rp 或 Sp 形式有规立构的 (stereospecific) 或基本上有规立构的 (参见 Iyer 等 (1995) Tetrahedron Asymmetry 6: 1051-1054)。在某些实施方案中, 在本发明反义组合物中的一个或多个寡核苷酸含有一个

或多个 2'-O, 4'-C- 亚甲基 -b-D- 呋喃核糖基核酸, 其中该核糖被修饰为在 2' 和 4' 碳之间具有一个键, 其将该核糖固定为 3' 内型 (3'-endo) 结构构象。

[0208] “与单链 RNA 序列互补的寡核苷酸”及类似的短语意在表示在生理学条件下, 寡核苷酸通过其核碱基与单链 RNA 序列的核碱基的 Watson-Crick 相互作用形成足够数量的氢键, 以与单链 RNA 序列形成双螺旋。这与通过 Hoogsteen 氢键与双链 DNA 或 RNA 形成三螺旋的寡核苷酸相对。

[0209] 术语“互补的”意图指在生理学条件下结合核酸序列, 例如通过 Watson-Crick 碱基配对 (寡核苷酸与单链核酸之间的相互作用) 或者通过 Hoogsteen 碱基配对 (寡核苷酸与双链核酸之间的相互作用) 或者通过任何其它手段 (包括在寡核苷酸的情况下, 结合 RNA 并引起假结形成) 结合核酸序列的寡核苷酸。实际上, 生理学条件下通过 Watson-Crick 或 Hoogsteen 碱基配对的结合是通过观察对核酸序列功能的干扰来测量的。

[0210] 术语“肽”通常指具有足以影响生物学应答 (例如抗体生成或细胞因子活性, 无论所述肽是否为半抗原) 长度和组成的氨基酸的寡聚物或聚合物。术语“肽”可以包括经修饰的氨基酸 (无论是天然存在的还是非天然存在的), 其中所述修饰包括但不限于磷酸化、糖基化、PEG 化、脂化 (lipidization) 和甲基化。

[0211] 术语“药学可接受的”指不干扰依照本发明的化合物的效力或依照本发明的化合物的生物学活性的无毒性材料。

[0212] 术语“生理学可接受的”指与生物学系统如细胞、细胞培养物、组织、或生物体相容的无毒性材料。优选地, 生物学系统是活的生物体, 诸如哺乳动物, 特别是人。

[0213] 术语“预防有效量”通常指足以预防或降低不期望的生物学效应形成的量。

[0214] 术语“治疗有效量”或“药学有效量”通常指足以影响期望的生物学效应, 诸如有益的结果 (包括但不限于预防、减少、改善或消除疾病或病症的体征或症状), 的量。因此, 药物组合物或方法的每种活性成分的总量足以显示有意义的患者效益 (patient benefit), 例如但不限于以免疫刺激为特征的慢性疾患的康复。因此, “药学有效量”会取决于其被施用的语境。药学有效量可以在一次或多次预防性或治疗性施用中施用。在应用于单独施用的个别活性成分时, 所述术语指单独的该成分。在应用于组合时, 所述术语指活性成分导致治疗效果的总量, 无论是联合地、连续地或是同时地施用。

[0215] 术语“治疗”或“处理”通常指意图获得有益的或想要的结果的方法, 其可以包括症状的减轻或病情进展的延迟或改善。

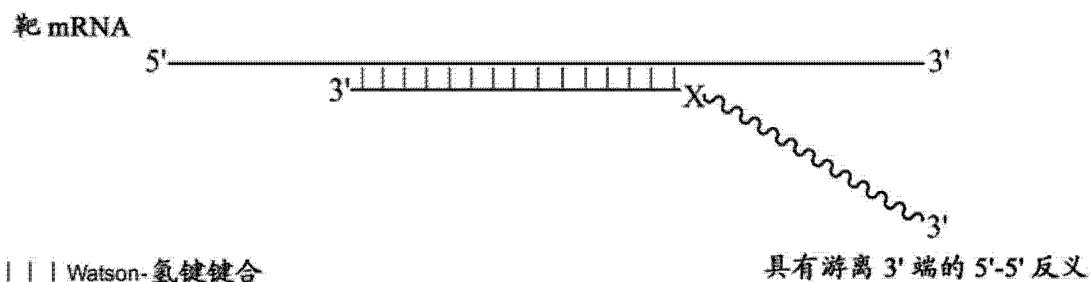
[0216] 术语“基因表达”通常是指在合成功能性基因产物 (可以是蛋白质) 中利用来自基因的信息的过程。该过程可涉及转录、RNA 剪接、翻译、以及蛋白质的翻译后修饰, 以及可以包括 mRNA、preRNA、核糖体 RNA、以及其它用于蛋白质合成的模板。

[0217] 在第一个方面, 本发明提供新的基于寡核苷酸的化合物, 其包括两个或多个在它们的 5' 端连接的单链反义寡核苷酸, 其中所述化合物具有两个或多个可及的 3' 端。组分寡核苷酸 5' 端的联接独立于其它寡核苷酸联接, 并且可以是经由 5'、3' 或 2' 羟基基团的直接联接, 或者是经由非核苷酸接头或核苷的间接联接; 其利用核苷的 2' 或 3' 羟基位点。联接也可以利用 5' 末端核苷酸的功能化的糖或核碱基。

[0218] 依照本发明的基于寡核苷酸的化合物包括两个经由磷酸二酯、硫代磷酸酯或非核苷接头在它们的 5'-5' 端偶联的相同或不同的序列 (示意图 3)。该化合物包含与感

兴趣的 mRNA 靶标的特定部分互补的 15 ~ 27 个核苷酸,用于反义下调基因产物表达。对于包含相同的序列的依照本发明的基于寡核苷酸的化合物,它们能够通过 Watson-Crick 氢键相互作用与特定的 mRNA 结合,并且抑制蛋白质表达(示意图 3)。对于包含不同的序列的依照本发明的基于寡核苷酸的化合物,它们能够与一个或多个 mRNA 靶标的两个或多个不同区域结合,并且抑制蛋白质表达。这样的化合物由与靶标 mRNA 互补的异质核苷酸(heteronucleotide)构成,并且通过 Watson-Crick 氢键形成稳定的双链体结构。令人惊奇的是,这样含有两个游离 3' 端(5' -5' - 附接的反义)的序列,与那些含有一个游离 3' 端以及或不游离 3' 端的序列相比,是更为强有力的基因表达抑制剂。

[0219]



[0220] 示意图 3. 依照本发明的于寡核苷酸的化合物的结合的反义模式。

[0221] 依照本发明的基于寡核苷酸的化合物对于治疗和 / 或预防可受益于基因表达的抑制的疾病是有用的。依照本发明的基于寡核苷酸的化合物包括但不限于:包含天然存在的核苷酸、经修饰的核苷酸、经修饰的寡核苷酸和 / 或主链经修饰的寡核苷酸的反义寡核苷酸。但是,抑制编码蛋白质的 mRNA 的翻译的反义寡核苷酸可能会产生不期望的生物效应,包括但不限于:反义活性不足、生物利用率不足、药物代谢动力学或药物效应动力学未达到最优、意图之外的免疫刺激、脱靶活性、以及生物不稳定性。依照本发明的反义寡核苷酸的最优设计需要考虑多方因素,而不仅仅是简单地设计与靶 RNA 序列互补的分子。因此,依照本发明的反义寡核苷酸的制备意图纳入对下述目的而言必须的改变:限制二级结构对反义活性的干扰、提高寡核苷酸的靶标特异性、最小化与结合或竞争因素(例如,蛋白质)的相互作用、优化细胞摄取、生物利用度、药物代谢动力学、药物效应动力学和 / 或抑制、防止或阻抑免疫细胞激活。

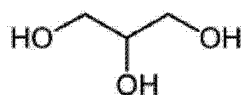
[0222] 本发明的基于寡核苷酸的化合物的通式结构可以通过下式来描述。

[0223] $3' \text{ Nn} \dots \text{N1N2N3N4}-5' -\text{L}-5' -\text{N8N7N6N5} \dots \text{Nm}-3'$ (式 I)

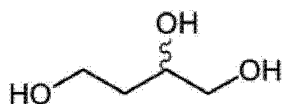
[0224] 其中, L 是核苷酸接头或非核苷酸接头; N1-N8 每次出现均独立地表示核苷酸或核苷酸衍生物; Nm 和 Nn 每次出现均独立地表示核苷酸或核苷酸衍生物; 以及其中 m 和 n 独立地表示 0 ~ 约 40 的数。代表性的非核苷酸接头在表 1 中列出。

[0225] 表 1:代表性的非核苷酸接头

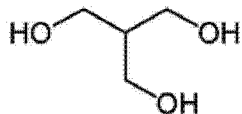
[0226]



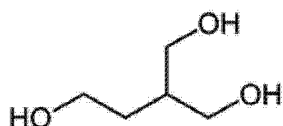
甘油 (1,2,3- 丙三醇)



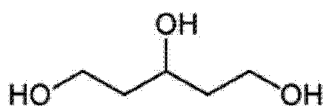
1,2,4- 丁三醇



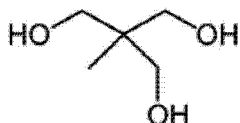
2-(羟甲基)-1,3- 丙三醇



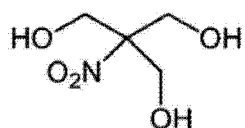
2-(羟甲基)1,4- 丁二醇



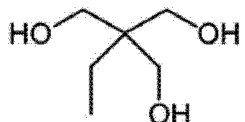
1,3,5- 戊三醇



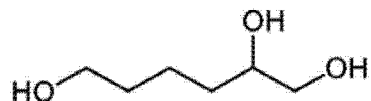
1,1,1- 三 (羟甲基) 乙烷



1,1,1- 三 (羟甲基) 硝基甲烷



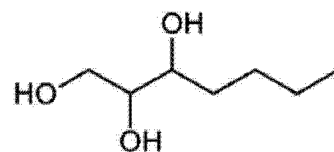
1,1,1- 三 (羟甲基) 丙烷



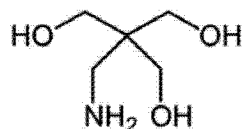
1,2,6- 己三醇



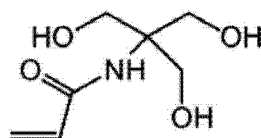
3- 甲基 -1,3,5- 戊三醇



1,2,3- 己三醇



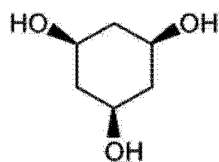
2- 氨基 -2-(羟甲基)-1,3- 丙二醇



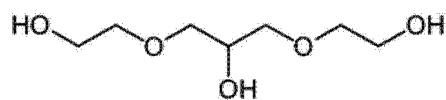
N-[三 (羟甲基) 甲基] 丙烯酰胺

[0227] 表 1 :续

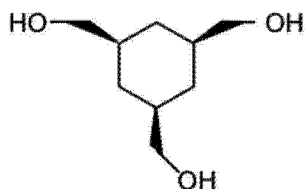
[0228]



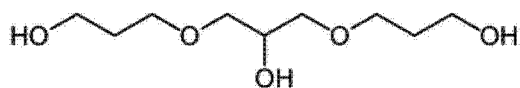
顺-1,3,5-环己三醇



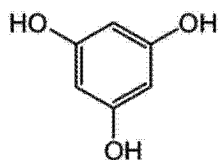
1,3-二(羟乙氧基)-2-羟基-丙烷



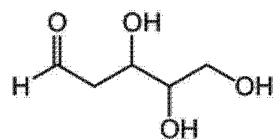
顺-1,3,5-三(羟甲基)环己烷



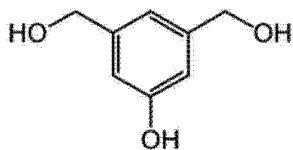
1,3-二(羟丙氧基)-2-羟基-丙烷



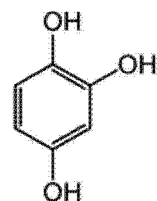
1,3,5-三羟基-苯



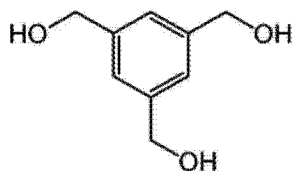
2-脱氧-D-核糖



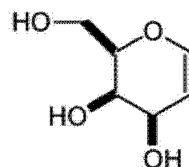
3,5-二(羟甲基)苯酚



1,2,4-三羟基-苯



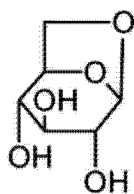
1,3,5-三(羟甲基)苯



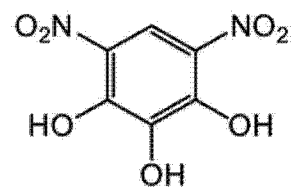
D-Galactose

[0229] 表 1 :续

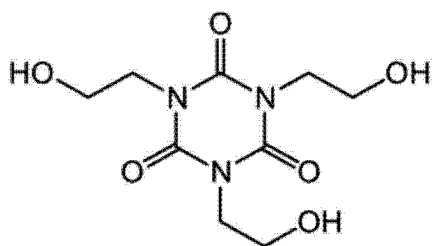
[0230]



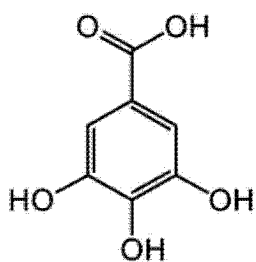
1,6-脱水-β-D-葡萄糖



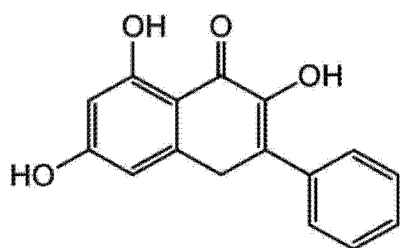
4,6-硝基邻苯三酚



1,3,5-三(2-羟乙基)-氰尿酸



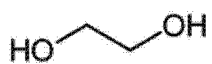
没食子酸



3,5,7-三羟基黄酮

[0231] 表1:续

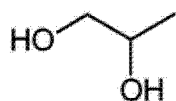
[0232]



乙二醇



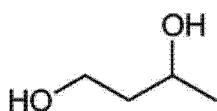
1,3- 丙二醇



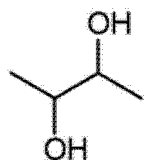
1,2- 丙二醇



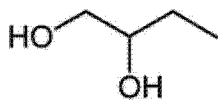
1,4- 丁二醇



1,3- 丁二醇



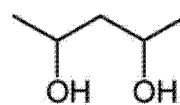
2,3- 丁二醇



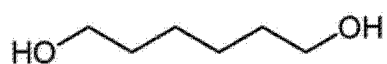
1,4- 丁二醇



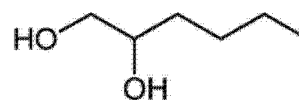
1,5- 戊二醇



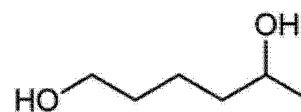
2,4- 戊二醇



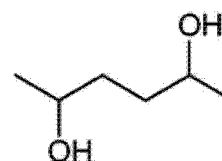
1,6- 己二醇



1,2- 己二醇



1,5- 己二醇



2,5- 己二醇

[0233] 表 1 :续

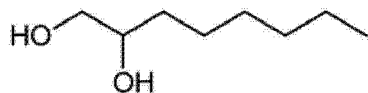
[0234]



1,7-庚二醇



1,8-辛二醇



1,2-辛二醇



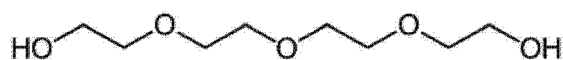
1,9-壬二醇



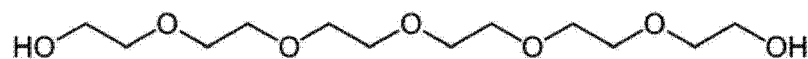
1,12-十二烷醇



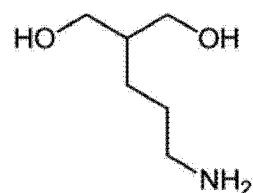
三甘醇



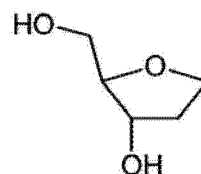
四甘醇



六甘醇



2-(1-氨基丙基)-1,3-丙二醇



1,2-二脱氧核糖

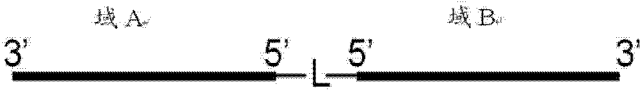
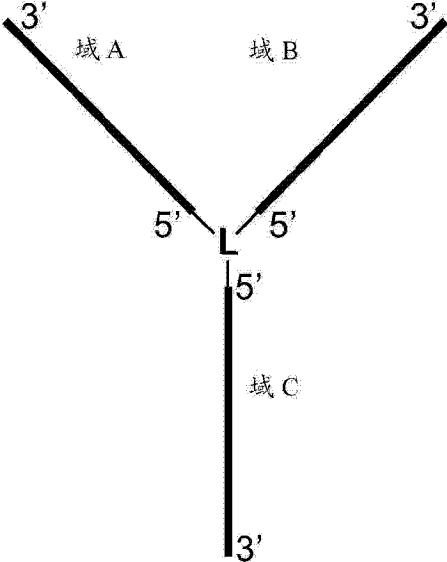
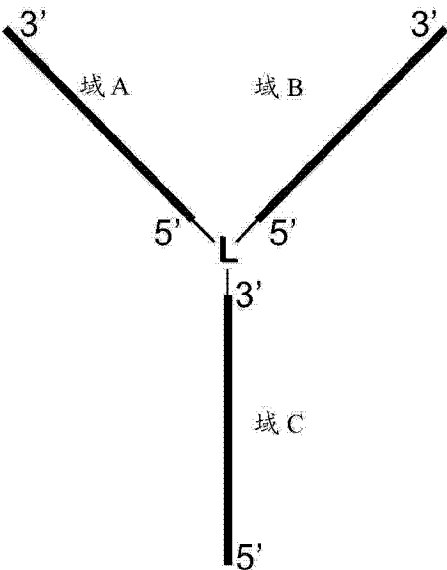
[0235] 在一些实施方案中,小分子接头是甘油或式 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$ 的甘油同系物,其中 o 和 p 独立地为 1~约 6、1~约 4、或 1~约 3 的整数。在一些其它的实施方案中,小分子接头是 1,3-二氨基-2-羟基丙烷的衍生物。一些这样的衍生物具有下式结构:式 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$,其中 m 为 0~约 10、0~约 6、2~约 6、或 2~约 4 的整数。

[0236] 一些依照本发明的非核苷酸接头允许附接多于两个本发明的基于寡核苷酸的化合物。例如,小分子接头甘油具有三个可共价附接所述寡核苷酸的羟基。因此,一些本发明的基于寡核苷酸的化合物包括两个或多个连接至核苷酸或非核苷酸接头的寡核苷酸。这样的依照本发明的寡核苷酸被称为“分支的 (branched)”。

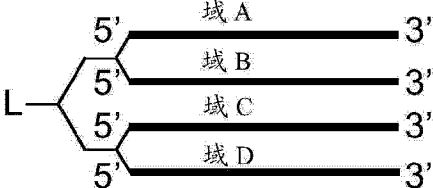
[0237] 依照本发明的基于寡核苷酸的化合物可以包括至少两个连接在一起的、具有两个或多个游离 3' 端的反义寡核苷酸。能够将两个或多个寡核苷酸连接在一起的方式中的一

些示出在表 2 中。

[0238]

表 2: 寡核糖核苷酸式 II-V	
式 II	
式 III	
式 IV	

[0239]

式 V	
-----	--

[0240] 在式 II 和 / 或 V 的特定的实施方案中,L 是接头或核苷酸联接,且域 A 和 / 或域 B 是被设计成选择性地与相同的靶标 RNA 序列或不同的靶标 RNA 序列杂交的反义寡核核苷酸。

[0241] 在式 II、III、IV 或 V 的特定的实施方案中, L 是接头, 而域 A 和 / 或域 B 和 / 或域 C 是被设计成选择性地与相同的靶标 RNA 序列或不同的靶标 RNA 序列杂交的反义寡核苷酸。例如, 在一个实施方案中, 式 II 和 / 或 III 的域 A 和 / 或域 B 和 / 或域 C 是被设计成选择性地与相同的靶标 RNA 序列杂交的反义寡核苷酸。在这个实施方案中, 可以设计域 A 和 / 或域 B 和 / 或域 C 使得其与靶标 RNA 序列上的相同区域杂交或者与相同的靶标 RNA 序列的不同区域杂交。

[0242] 在本发明该方面的进一步的实施方案中, 域 A、域 B 以及域 C 独立地为基于 RNA 或 DNA 的寡核苷酸。在该实施方案的某些特定方面, 该寡核苷酸包括混合的主链寡核苷酸。

[0243] 在另外的实施方案中, 式 IV 的域 A 和 / 或域 B 和 / 或域 C 中的一个或多个是被设计成选择性地与一个靶标 RNA 序列杂交的反义寡核苷酸, 而剩下的域 A 和 / 或域 B 和 / 或域 C 中的一个或多个是被设计成选择性地与另一不同的靶标 RNA 序列杂交的反义寡核苷酸。

[0244] 在另外的实施方案中, 式 IV 的域 A、域 B 或域 C 中的一个或多个是细胞表面受体或细胞内受体的拮抗剂。在特定的实施方案中, 拮抗剂是 TLR 拮抗剂。

[0245] 在另外的实施方案中, 式 II、III、IV 和 / 或 V 的域 A 和 / 或域 B 和 / 或域 C 中的一个或多个是基于 RNA 的寡核苷酸, 该寡核苷酸与互补的基于 RNA 的寡核苷酸杂交使得该域包含 siRNA 分子。

[0246] 本发明的基于寡核苷酸的化合物的组分寡核苷酸的长度为至少 14 个核苷酸, 但优选地长度为 15 至 40 个核苷酸, 优选地长度为 20 至 30 个核苷酸。因此, 本发明的基于寡核苷酸的化合物的组分寡核苷酸的长度可以独立地为 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40 个核苷酸。可以通过本领域公知的方法, 例如氨基磷酸酯或 H- 磷酸酯化学, 手工或者通过自动合成仪制备这些寡核苷酸。代表性的合成途径如图 1A 和 1B 所示。本发明的合成的反义寡核苷酸还可以在不损害其与 mRNA 杂交的能力的前体下以多种方式修饰。这样的修饰可以包括: 寡核苷酸的至少一个核苷酸间联接是烷基磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、羟基磷酸酯 (phosphate hydroxyl)、氨基乙酸酯 (acetamidate) 或羧甲酯或这些的组合, 以及一个核苷酸的 5' 端与另一个核苷酸的 3' 端之间的其它核苷酸间联接, 其中 5' 核苷酸磷酸二酯联接已经被替换成任意数目的化学基团。

[0247] 本发明的合成的反义寡核苷酸可以包括核苷酸间联接的组合。例如, 美国专利 No. 5, 149, 797 描述了传统的嵌合寡核苷酸, 其具有插入甲基磷酸酯或氨基磷酸酯侧翼区之间的硫代磷酸酯核心区。另外, 美国专利 No. 5, 652, 356 披露了“反转型” (inverted) 嵌合寡核苷酸, 其包括一个或多个非离子寡核苷酸区 (例如烷基磷酸酯和 / 或氨基磷酸酯和 / 或磷酸三酯核苷间联接), 所述非离子寡核苷酸区的侧翼有一个或多个寡核苷酸硫代磷酸酯区域。可以根据标准方法来制备多种多样的具有经修饰的核苷酸间联接的合成反义寡核苷酸。在特定的实施方案中, 硫代磷酸酯联接可以是混合的 Rp 和 Sp 对映体, 或者可以使它们呈现有规立构或基本上有规立构的 Rp 或 Sp 形式。

[0248] 本发明的基于寡核苷酸的化合物的其它修饰包括在寡核苷酸分子内部或在末端的修饰, 以及包括向分子添加核苷间磷酸酯联接, 例如胆固醇、胆固醇基 (cholesteryl)、或在氨基之间具有不同数目的碳残基的二胺化合物, 以及末端核糖、脱氧核糖和磷酸根修饰, 其粘附 (cleave) 或交联相对链或结合基因组的相关酶或其它蛋白质。此类经修饰的寡核

苷酸的例子包括具有经修饰的碱基和 / 或糖 (例如用 2'-O, 4'-C- 亚甲基 -b-D- 呋喃核糖基或阿拉伯糖代替核糖), 或 3', 5'- 取代的寡核苷酸, 该寡核苷酸含有这样的糖, 该糖的 3' 和 5' 这两个位置附接有不同于羟基基团 (在其 3' 位置) 和与不同于磷酸根基团 (在其 5' 位置) 的化学基团。

[0249] 对本发明的基于寡核苷酸的化合物的糖的修饰的其它实例包括对核糖模块的 2' 位置的修饰, 其包括但不限于用含有 1-6 个饱和的或不饱和的碳原子的 -O- 烷基 (alkyl) 基团或用 -O- 芳基 (aryl) 或具有 2-6 个碳原子的 -O- 烯丙基型 (allyl) 基团进行的 2'-O- 取代, 其中所述 -O- 烷基、-O- 芳基或 -O- 烯丙基基团可以是未取代的或可以是取代的, 例如用卤素、羟基、三氟甲基、氰基、硝基、酰基、酰氧基、烷氧基、羧基、烷氧羰基、或氨基基团取代。这些取代均无意排除天然 2'-羟基基团 (在核糖的场合) 或 2'-H- (在脱氧核糖的场合) 的存在。

[0250] 依照本发明的基于寡核苷酸的化合物可以包括一个或多个核糖核苷酸。例如, 美国专利 No. 5, 652, 355 披露了传统的杂合寡核苷酸, 其具有 DNA 核心区侧翼的 2'-O- 取代的核糖核苷酸区。美国专利 No. 5, 652, 356 披露了一种“反转型”杂合寡核苷酸, 其包括这样一种寡核苷酸, 它包含位于两个寡脱氧核糖核苷酸区之间的 2'-O- 取代的 (或 2' OH, 未取代的) RNA 区, 这是一种相对于“传统的”杂合寡核苷酸而言反向的结构。本发明的特别有用的寡核苷酸的非限制性例子在其 3'、5'、或 3' 和 5' 端具有 2'-O- 烷基化 (alkylated) 的核糖核苷酸, 其中至少 4 个连续的核苷酸, 或在一些示例性的实施方案中是 5 个连续的核苷酸, 是如此修饰的。2'-O- 烷基化基团的非限制性例子包括 2'-O- 甲基、2'-O- 乙基、2'-O- 丙基、2'-O- 丁基和 2'-O- 甲氧基 - 乙基。

[0251] 可以使用自动合成仪和亚磷酰胺路径 (如示出在图 1B 中的) 方便地合成本发明的基于寡核苷酸的化合物, 进一步在实施例 1 中对其进行了描述。在一些实施方案中, 可以通过线性合成途径 (参见图 1A) 合成本发明的基于寡核苷酸的化合物。

[0252] 合成的备选方式是“平行合成”, 其中合成从中间接头部分向外进行 (参见图 1)。附接固体支持物的接头可以用于平行合成, 如美国专利 No. 5, 912, 332 所描述的。备选地, 可以使用通用的固体支持物 (例如附接磷酸酯的可控球度玻璃) 支撑。

[0253] 本发明的基于寡核苷酸的化合物的平行合成与线性合成相比具有一些优势: (1) 平行合成允许引入同样的单体单元; (2) 不像线性合成, 所有的单体单元在相同的时间合成, 因此合成步骤的数量以及合成所需的时间与单体单元合成步骤的数量和合成所需的时间相同; 以及 (3) 合成步骤的减少可提高最终免疫调节寡核糖核苷酸产物的纯度和收率。

[0254] 在通过线性合成或平行合成程序的合成的终点, 如果引入经修饰的核苷, 本发明的基于寡核苷酸的化合物可以方便地用浓缩的氨水或根据亚磷酰胺供应商的推荐进行脱保护。优选利用反相 HPLC、脱三苯甲基化、脱盐、透析来纯化产物基于寡核苷酸的化合物。

[0255] 在下表 3 中的 SEQ ID NO. 1 到 SEQ ID NO. 175 显示了本发明的基于寡核苷酸的化合物的非限制性列表。如表 3 所示, 基于寡核苷酸的化合物具有硫代磷酸酯 (PS) 联接, 但也可以包括磷酸二酯 (o) 联接。然而, 本领域技术人员会认可, 也可以包括基于磷酸二酯或非磷酸二酯部分的其它联接。

[0256]

表 3.

SEQ ID NO./AS#	mRNA 靶标	DNA/RNA (种类)	本发明和对比寡核苷酸的示例性序列	结构
1/AS1	TLR9	DNA (h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-3' (对照)	5'-(SEQ ID NO. 1)-3'
2/AS2	TLR9	DNA (h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAG GAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 2)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 2)-3'
3/AS3	TLR9	DNA (h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCCA-X-ACAGACTTCAG GAACAGCCA-3' (对照)	5'-(SEQ ID NO. 3)-3'-X-3'-(SEQ ID NO. 3)-5'
4/AS4	TLR9	RNA (h)	5'-ACAGACUUCAGGAACAGCCA-3' (对照)	5'-(SEQ ID NO. 4)-3'
5/AS5	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCA GGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 5)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 5)-3'
6/AS6	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAG GAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 6)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 6)-3'
7/AS7	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAG GAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 7)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 7)-3'
8/AS8	TLR9	DNA (m/h)	3'-AoCCoGACAAGGACTTCAGoGAoCAo-X-oACoAGoA CTTCAGGAACAGCoCCoA-3'	3'-(SEQ ID NO. 8)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 8)-3'
9/AS9	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X3-ACAGACTTCA GGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 9)-5'-X3-5'-(SEQ ID NO. 9)-3'
10/AS10	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X1-ACAGACTTCA GGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 10)-5'-X1-5'-(SEQ ID NO. 10)-3'
11/AS11	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-Z-ACAGACTTCAG GAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 11)-5'-Z-5'-(SEQ ID NO. 11)-3'
12/AS12	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-M-ACAGACTTCAG GAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 12)-5'-M-5'-(SEQ ID NO. 12)-3'
13/AS13	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-L-ACAGACTTCAG GAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 13)-5'-L-5'-(SEQ ID NO. 13)-3'
14/AS14	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACUUCAG GAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 14)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 14)-3'
15/AS15	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAG GAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 15)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 15)-3'
16/AS16	TLR9	DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACTUCAG GAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 16)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 16)-3'
17/AS17	TLR9	RNA (m/h)	3'-AGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 17)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 17)-3'

[0257]

18/AS18	TLR9	RNA (m/h)	3'-CAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAAC-3'	17)-3' 3'-(SEQ ID NO. 18)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 18)-3'
19/AS19	TLR9	RNA (h)	3'-ACGCCGUAGAGUUGGAGUUC-X-CUUGAGGUUGAGAUGCCGCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 19)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 19)-3'
20/AS20	TLR7	DNA (m)	3'-CCTGACGTGTCTGTTCGTAA-X-AATGCTTGTCTGTGTCAGTCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 20)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 20)-3'
21/AS21	TLR7	RNA (m)	3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 21)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 21)-3'
22/AS22	TLR7	RNA (m)	3'-UCGUGUGUUUCCAGUUUCA-X-ACUUUGACCUUUGUGUGCU-3'	3'-(SEQ ID NO. 22)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 22)-3'
23/AS23	TLR7	RNA (h)	3'-UUGUAGUUGUUUGAGGUCC-X-CCUGGAGUUUGUUGAUGUU-3'	3'-(SEQ ID NO. 23)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 23)-3'
24/AS24	MyD88	DNA (m)	3'-GTCCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTAGCAGCCTG-3'	3'-(SEQ ID NO. 24)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 24)-3'
25/AS25	MyD88	RNA (m)	3'-GUCCGACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUCUAGCAGCCUG-3'	3'-(SEQ ID NO. 25)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 25)-3'
26/AS26	TLR7	DNA (m)	5'-AATGCTTGTCTGTGCAGTCC-3' (对照)	5'-(SEQ ID NO. 26)-3'
27/AS27	TLR7	DNA (m)	3'-CCTGACGTGTCTGTTCGTAA-X-AATGCTTGTCTGTGTCAGTCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 27)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 27)-3'
28/AS28	TLR7	RNA (m/h)	3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUA-5' (对照)	3'-(SEQ ID NO. 28)-5'
29/AS29	TLR7	RNA (m/h)	5'-CUGUCoAoAoAoUoGoCoUoGoUoGoUoGoUoGoCoAoGoUoCoCo ACGAU-3' (对照)	5'-(SEQ ID NO. 29)-3'
30/AS30	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGG AACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 30)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 30)-3'
31/AS31	TLR9	DNA (m/h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCC-X-CCGACAAAGGACTTCAGACA-5' (对照)	5'-(SEQ ID NO. 31)-3'-X-3'-(SEQ ID NO. 31)-5'
32/AS32	TLR9	DNA (m/h)	5'-ACAGACTTCAGGAACAGCC-3' (对照)	5'-(SEQ ID NO. 32)-3'
33/AS33	TLR7	DNA (m/h)	3'-CTGACGTGTCTGTTCGTAA-X-AATGCTTGTCTGTGCAGTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 33)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 33)-3'
34/AS34	TLR7	DNA (m/h)	5'-AATGCTTGTCTGTGCAGTC-X-CTGACGTGTCTGTTCGTAA-5' (对照)	5'-(SEQ ID NO. 34)-3'-X-3'-(SEQ ID NO. 34)-5'
35/AS35	TLR7	DNA (m/h)	5'-AATGCTTGTCTGTGCAGTCC-3' (对照)	5'-(SEQ ID NO. 35)-3'
36/AS36	MyD88	DNA (h)	3'-CGTTGACCTGTGTTCGC-X-CGCTTGTGTCTCCAGTTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 36)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 36)-3'
37/AS37	MyD88	DNA (h)	5'-CGCTTGTGTCTCCAGTTGC-X-CGTTGACCTCTGT	5'-(SEQ ID NO. 37)-3'-X-3'-(SEQ ID NO. 37)-5'

[0258]

38/AS38	MyD88	DNA (h)	GTTCGC-5' (对照)	37)-5'
39/AS39	VEGF	DNA (h)	5'-CGCTGTGTCTCCAGTTGC-3' (对照) 3'- GAAAGACGACAGAAACCCAC-X-CACCCAAAGACAGC AGAAAG-3'	5'-(SEQ ID NO. 38)-3' 3'-(SEQ ID NO. 39)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 39)-3'
40/AS40	VEGF	DNA (h)	5'-CACCCAAAGACAGCAGAAAG-X-GAAAGACGACA GAACCCAC-5' (对照)	5'-(SEQ ID NO. 40)-3'-X-3'-(SEQ ID NO. 40)-5'
41/AS41	VEGF	DNA (h)	5'-CACCCAAAGACAGCAGAAAG-3' (对照)	5'-(SEQ ID NO. 41)-3'
42/AS42	TLR9	DNA (m/h)	3'-CAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAAC-3' ,	3'-(SEQ ID NO. 42)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 42)-3'
43/AS43	TLR9	DNA (m/h)	3'-GACAAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGGAA CAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 43)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 43)-3'
44/AS44	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGG AACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 44)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 44)-3'
45/AS45	TLR9	DNA (m/h)	3'-AACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCA GGAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 45)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 45)-3'
46/AS46	TLR9	DNA (m/h)	3'-TTAACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTT CAGGAACAGCCAATT-3'	3'-(SEQ ID NO. 46)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 46)-3'
47/AS47	TLR9	DNA (m/h)	3'-CGTTAACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGAC TTCAGGAACAGCCAATTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 47)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 47)-3'
48/AS48	TLR9	DNA (m/h)	3'-GACGTTAACCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAG ACTTCAGGAACAGCCAATTGCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 48)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 48)-3'
49/AS49	TLR9	DNA (h)	3'-GACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUC AGGAACAGCCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 49)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 49)-3'
50/AS50	TLR9	DNA (h)	3'-TTGACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUC CAGGAACAGCCAGTT-3'	3'-(SEQ ID NO. 50)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 50)-3'
51/AS51	TLR9	DNA (m/h)	3'-CoCoGoAoCoAoGoAoCoToToCoAoGoAoCoAo- X-oAoCoAoGoAoCoToToCoAoGoAoCoAoGoCoC- 3'	3'-(SEQ ID NO. 51)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 51)-3'
52/AS52	TLR9	DNA (m/h)	5'-C-3'-3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACT TCAGGAACAGCC-3'-3'-C-5'	3'-(SEQ ID NO. 52)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 52)-3'
53/AS53	TLR9	DNA (m/h)	5'-GCC-3'-3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGA CTTCAGGAACAGCC-3'-3'-CCG-5'	3'-(SEQ ID NO. 53)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 53)-3'
54/AS54	TLR9	DNA (m/h)	5'-CAGCC-3'-3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACA GACTTCAGGAACAGCC-3'-3'-CCGAC-5'	3'-(SEQ ID NO. 54)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 54)-3'
55/AS55	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAGGACTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGG AACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 55)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 55)-3'

[0259]

56/AS56	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAAGGACTTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGG AACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 56)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 56)-3'
57/AS57	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAAGGACTTTCAGACA-ACAGACTTCAGGA ACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 57)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 57)-3'
58/AS58	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAAGGACTTTCAGACA-Y-ACAGACTTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 58)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 58)-3'
59/AS59	TLR9	DNA (m/h)	3'-CTTCAGACA-X-ACAGACTTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 59)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 59)-3'
60/AS60	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAAGGACTTTCAGACA-X-ACAGACTTCAGG AACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 60)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 60)-3'
61/AS61	TLR9	DNA (m/h)	3'-TTGACCGACAAGGACTTTCAGACA-X-ACAGACTT CAGGAACAGCCAGTT-3'	3'-(SEQ ID NO. 61)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 61)-3'
62/AS62	TLR9	DNA (m/h)	3'-CCGACAAAGGACTTTCAGACA-X5-ACAGACTTCAG GAACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 62)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 62)-3'
63/AS63	TLR7	DNA (m/h)	3'-GACGTGCTGTTCGTAA-X-AATGCTGTGTGTC AG-3'	3'-(SEQ ID NO. 63)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 63)-3'
64/AS64	TLR7	DNA (m/h)	3'-CTGACGTGCTGTTCGTAA-X-AATGCTGTGTGT GCAGTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 64)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 64)-3'
65/AS65	TLR7	DNA (m/h)	3'-ACCTGACGTGTCTGTTCGTAA-X-AATGCTGTGT GTGCAGTCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 65)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 65)-3'
66/AS66	MyD88	DNA (m)	3'-ACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTAGCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 66)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 66)-3'
67/AS67	MyD88	DNA (m)	3'-CGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTAGC AGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 67)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 67)-3'
68/AS68	MyD88	DNA (m)	3'-TCCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTA GCAGCCT-3'	3'-(SEQ ID NO. 68)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 68)-3'
69/AS69	MyD88	DNA (m)	3'-CGTCCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTC TAGCAGCCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 69)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 69)-3'
70/AS70	MyD88	DNA (m)	3'-GCCGTCCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGC TCTAGCAGCCTGCCG-3'	3'-(SEQ ID NO. 70)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 70)-3'
71/AS71	MyD88	DNA (m)	3'-CAGCCGTCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCA GCTTAGCAGCCTGCCGAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 71)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 71)-3'
72/AS72	MyD88	DNA (h)	3'-GACCTCTGTGTCGC-X-CGCTTGTGTCTCCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 72)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 72)-3'
73/AS73	MyD88	DNA (h)	3'-TTGACCTCTGTGTCGC-X-CGCTTGTGTCTCCAG TT-3'	3'-(SEQ ID NO. 73)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 73)-3'

[0260]

74/AS74	MyD88	DNA (h)	3'-CGTTGACCTCTGTGTTCGC-X-CGCTTGTGTCTCC AGTTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 74)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 74)-3'
75/AS75	MyD88	DNA (h)	3'-GCCGTTGACCTCTGTGTTCGC-X-CGCTTGTGTCT CCAGTTGCCG-3'	3'-(SEQ ID NO. 75)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 75)-3'
76/AS76	MyD88	DNA (h)	3'-AGCCGTTGACCTCTGTGTTCGC-X-CGCTTGTGT CTCCAGTTGCCGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 76)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 76)-3'
77/AS77	MyD88	DNA (h)	3'-CTAGCCGTTGACCTCTGTGTTCGC-X-CGCTTGT GTCTCCAGTTGCCGATC-3'	3'-(SEQ ID NO. 77)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 77)-3'
78/AS78	MyD88	DNA (m)	3'-UCCGACGATCTCGACGACC-X-CCAGCAGCTCTA GCAGCCU-3'	3'-(SEQ ID NO. 78)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 78)-3'
79/AS79	MyD88	DNA (h)	3'-CGUUGACCTCTGTGTTCGC-X-CGCTTGTGTCTCC AGUUGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 79)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 79)-3'
80/AS80	MyD88	DNA (h)	3'-CGTTGACCTCTGTGTTCGC-X-CGCTTGTGTCTCC AGTTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 80)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 80)-3'
81/AS81	MyD88	DNA (h)	(3'-CGTTGACCTCTGTGTTCGC)-Z-Z-(CGCTTGTGT CTCCAGTTGC-3') ₂	3'-(SEQ ID NO. 81)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 81)-3'
82/AS82	TLR3	DNA (m)	3'-CTTGGAGGTTCTTGACG-X-GCAGTTCTTGGAGGT TC-3'	3'-(SEQ ID NO. 82)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 82)-3'
83/AS83	TLR3	DNA (m)	3'-CTCTTGGAGGTTCTTGACG-X-GCAGTTCTTGGAG GTTCTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 83)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 83)-3'
84/AS84	TLR3	DNA (m)	3'-ACCTCTTGGAGGTTCTTGACG-X-GCAGTTCTTGG AGTTCTCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 84)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 84)-3'
85/AS85	TLR3	DNA (h)	3'-CGTGGAAATTGTACCTTC-X-CTTCCATGTTAAGGT GC-3'	3'-(SEQ ID NO. 85)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 85)-3'
86/AS86	TLR3	DNA (h)	3'-CTCGTGGAAATTGTACCTTC-X-CTTCCATGTTAAG GTGCTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 86)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 86)-3'
87/AS87	TLR3	DNA (h)	3'-ACCTCGTGGAAATTGTACCTTC-X-CTTCCATGTTA AGTGCTCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 87)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 87)-3'
88/AS88	VEGF	DNA (h)	3'- GAAAGACGACAGAACCCAC-X-CACCCAAAGACAGC AGAAAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 88)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 88)-3'
89/AS89	Mdm2	DNA (h)	3'-CACTCTTGTCCACAG-X-GACACCTGTTCTCAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 89)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 89)-3'
90/AS90	Mdm2	DNA (h)	3'-CTCACTTGTCCACAG-X-GACACCTGTTCTCAC TC-3'	3'-(SEQ ID NO. 90)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 90)-3'
91/AS91	Mdm2	DNA (h)	3'-CACTCACTTGTCCACAG-X-GACACCTGTTCTC ACTCAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 91)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 91)-3'

[0261]

92/AS92	Mdm2	DNA (h)	3'-GACACTCACTCTTGTCACAG-X-GACACCTGTTC TCACTCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 92)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 92)-3'
93/AS93	Mdm2	DNA (h)	3'-TAGACACTCACTCTTGTCACAG-X-GACACCTGT TCTCACTCAGAT-3'	3'-(SEQ ID NO. 93)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 93)-3'
94/AS94	Mdm2	DNA (h)	3'-CACTCACTCTTGTCACAG-Y-GACACCTGT-3'	3'-(SEQ ID NO. 94)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 94)-3'
95/AS95	Mdm2	DNA (h)	3'-TGTCCACAG-X-GACACCTGT-3'	3'-(SEQ ID NO. 95)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 95)-3'
96/AS96	BCL2	DNA (h)	3'-CCTCTATCACTACTTCATG-X-GTACTTCATCACT ATCTCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 96)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 96)-3'
97/AS97	存活蛋白	DNA (h)	3'-CCTGTCTCTTCTCGGTTC-X-CTTGGCTCTTCTC TGTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 97)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 97)-3'
98/AS98	EGFR	DNA (h)	3'-GTTCGACACTGTCTAGTAT-X-TATGATCTGTGAC AGCTTG-3'	3'-(SEQ ID NO. 98)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 98)-3'
99/AS99	EGFR	DNA (h)	3'-CTTCCCTCCTTTGGATCG-X-GCTAGGTTTCCTCC CTTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 99)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 99)-3'
100/AS100	PCSK9	DNA (h)	3'-CTCCGTCTCTGACTAGGTG-X-GTGGATCAGTCTC TGCCTC-3'	3'-(SEQ ID NO. 100)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 100)-3'
101/AS101	PCSK9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACTCCACAT-Y-TACACCTCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 101)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 101)-3'
102/AS102	PCSK9	DNA (h)	3'-CTCCGTCTCTGACTAGGTG-Y-GTGGATCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 102)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 102)-3'
103/AS103	PCSK9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCAGTTC-Y-CTTGACTTT-3'	3'-(SEQ ID NO. 103)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 103)-3'
104/AS104	PCSK9	DNA (h)	3'-CCTCCACAT-X-TACACCTCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 104)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 104)-3'
105/AS105	PCSK9	DNA (h)	3'-GACTAGGTG-X-GTGGATCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 105)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 105)-3'
106/AS106	PCSK9	DNA (h)	3'-TTTCAGTTC-X-CTTGACTTT-3'	3'-(SEQ ID NO. 106)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 106)-3'
107/AS107	PCSK9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCA-X-ACTTTGCATTCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 107)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 107)-3'
108/AS108	PCSK9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCACT-X-TGACTTTGCATTCCA GA-3'	3'-(SEQ ID NO. 108)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 108)-3'
109/AS109	PCSK9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCACTTC-X-CTTGACTTTGCAT TCCAGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 109)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 109)-3'
110/AS110	PCSK9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCACTTCCT-X-TCCTTGACTTT	3'-(SEQ ID NO. 110)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 110)-3'

[0262]

I11/AS111	PCSK9	DNA (h)	GCATTCCAGA-3'	NO. 110)-3'	3'-(SEQ ID NO. 111)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 111)-3'
I12/AS112	PCSK9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCAGTTCCTCG-X-GCTCCTTGA CTTGCAATCCAGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 112)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 112)-3'	
I13/AS113	PCSK9	DNA (h)	3'-AGACCTTACGTTTCAGTTCCTCGTA-X-ATGCTCC TTGACTTTGCATTCCAGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 113)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 113)-3'	
I14/AS114	PCSK9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACTCC-X-CCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 114)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 114)-3'	
I15/AS115	PCSK9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACTCCAC-X-CACCTCCACCAGGCT GC-3'	3'-(SEQ ID NO. 115)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 115)-3'	
I16/AS116	PCSK9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACTCCACAT-X-TACACCTCCACCACCA GGCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 116)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 116)-3'	
I17/AS117	PCSK9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACTCCACATAG-X-GATACACCTC CACCAGGCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 117)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 117)-3'	
I18/AS118	PCSK9	DNA (h)	3'-CGTCGGACCACTCCACATAGAGGA-X-AGGAGA TACACCTCCACCAGGCTGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 118)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 118)-3'	
I19/AS119	PCSK9	DNA (m)	3'-CCAGGAAGTCTCGTCCAGT-X-TGACCTGCTCTGA AGGACC-3'	3'-(SEQ ID NO. 119)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 119)-3'	
I20/AS120	TLR9	RNA (m/h)	3'-GACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGA ACAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 120)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 120)-3'	
I21/AS121	TLR9	RNA (m/h)	3'-CCGACAAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAG GAACAGCC-3'	3'-(SEQ ID NO. 121)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 121)-3'	
I22/AS122	TLR9	RNA (m)	3'-AACCGACAAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUC AGGAACAGCCAA-3'	3'-(SEQ ID NO. 122)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 122)-3'	
I23/AS123	TLR9	RNA (m)	3'-UUAACCGACAAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACU UCAGGAACAGCCAAUU-3'	3'-(SEQ ID NO. 123)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 123)-3'	
I24/AS124	TLR9	RNA (m)	3'-CGUUAACCGACAAAGGACUUCAGACA-X-ACAGA CUUCAGGAACAGCCAAUUGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 124)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 124)-3'	
I25/AS125	TLR9	RNA (m)	3'-GACGUUAACCGACAAAGGACUUCAGACA-X-ACA GACUUCAGGAACAGCCAAUUGCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 125)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 125)-3'	
I26/AS126	TLR9	RNA (h)	3'-GACCGACAAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUC AGGAACAGCCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 126)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 126)-3'	
I27/AS127	TLR9	RNA (h)	3'-UUGACCGACAAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACU UCAGGAACAGCCAGUU-3'	3'-(SEQ ID NO. 127)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 127)-3'	
I28/AS128	TLR9	RNA (h)	3'-CGUUGACCGACAAAGGACUUCAGACA-X-ACAGA CUUCAGGAACAGCCAGUUGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 128)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 128)-3'	

[0263]

129/AS129	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y-AC-3'	3'-(SEQ ID NO. 129)-3'	3'-(SEQ ID NO. 129)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 129)-3'
130/AS130	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y-ACAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 130)-3'	3'-(SEQ ID NO. 130)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 130)-3'
131/AS131	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y-ACAGAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 131)-3'	3'-(SEQ ID NO. 131)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 131)-3'
132/AS132	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X3-ACAGACUUCAGGAAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 132)-3'	3'-(SEQ ID NO. 132)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 132)-3'
133/AS133	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X1-ACAGACUUCAGGAAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 133)-3'	3'-(SEQ ID NO. 133)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 133)-3'
134/AS134	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Z-ACAGACUUCAGGAAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 134)-3'	3'-(SEQ ID NO. 134)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 134)-3'
135/AS135	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-M-ACAGACUUCAGGAAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 135)-3'	3'-(SEQ ID NO. 135)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 135)-3'
136/AS136	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-L-ACAGACUUCAGGAAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 136)-3'	3'-(SEQ ID NO. 136)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 136)-3'
137/AS137	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 137)-3'	3'-(SEQ ID NO. 137)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 137)-3'
138/AS138	TLR9	RNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 138)-3'	3'-(SEQ ID NO. 138)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 138)-3'
139/AS139	TLR9	RNA (m)	3'-AACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 139)-3'	3'-(SEQ ID NO. 139)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 139)-3'
140/AS140	TLR9	RNA (m)	3'-AACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 140)-3'	3'-(SEQ ID NO. 140)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 140)-3'
141/AS141	TLR9	RNA (m)	3'-AACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 141)-3'	3'-(SEQ ID NO. 141)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 141)-3'
142/AS142	TLR9	RNA (m)	3'-AACCGACAAGGACUUCAGACA-X-ACAGACUUCAGGAAACAGCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 142)-3'	3'-(SEQ ID NO. 142)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 142)-3'
143/AS143	TLR9/TLR7	RNA/DNA (m/h)	3'-ACCGACAAGGACUUCAGACA-Y-d(AATGCTTGTCGTGTCAGTCC)-3'	3'-(SEQ ID NO. 132)-3'	3'-(SEQ ID NO. 132)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 132)-3'
144/AS144	MyD88	RNA (m)	3'-ACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUCUAGCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 144)-3'	3'-(SEQ ID NO. 144)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 144)-3'
145/AS145	MyD88	RNA (m)	3'-CGACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUCUAGCAGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 145)-3'	3'-(SEQ ID NO. 145)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 145)-3'
146/AS146	MyD88	RNA (m)	3'-UCCGACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUCUAGCAGCCU-3'	3'-(SEQ ID NO. 146)-3'	3'-(SEQ ID NO. 146)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 146)-3'
147/AS147	MyD88	RNA (m)	3'-CGUCCGACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUC	3'-(SEQ ID NO. 147)-3'	3'-(SEQ ID NO. 147)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 147)-3'

[0264]

148/AS148	MyD88	RNA (m)	UAGCAGCCUGC-3'	NO. 147)-3'	3'-(SEQ ID NO. 148)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 148)-3'
149/AS149	MyD88	RNA (m)	3'-GCCGUCCGACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUCUAGCAGCCUGCCG-3'	3'-(SEQ ID NO. 149)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 149)-3'	
150/AS150	MyD88	RNA (h)	3'-CAGCCGUCCGACGAUCUCGACGACC-X-CCAGCAGCUCUAGCAGCCUGCCGAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 150)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 150)-3'	
151/AS151	MyD88	RNA (h)	3'-GACCUCUGUGUUCGC-X-CGCUGUGUCUCCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 151)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 151)-3'	
152/AS152	MyD88	RNA (h)	3'-UUGACCUCUGUGUUCGC-X-CGCUGUGUCUCCAGUU-3'	3'-(SEQ ID NO. 152)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 152)-3'	
153/AS153	MyD88	RNA (h)	3'-CGUUGACCUCUGUGUUCGC-X-CGCUGUGUCUCCAGUUGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 153)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 153)-3'	
154/AS154	MyD88	RNA (h)	3'-GCCGUUGACCUCUGUGUUCGC-X-CGCUGUGUGUCCAGUUGCCG-3'	3'-(SEQ ID NO. 154)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 154)-3'	
155/AS155	MyD88	RNA (h)	3'-AGGCCGUUGACCUCUGUGUUCGC-X-CGCUGUGUGUCCAGUUGCCGGA-3'	3'-(SEQ ID NO. 155)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 155)-3'	
156/AS156	TLR7	RNA (m/h)	3'-CUAGGCCGUUGACCUCUGUGUUCGC-X-CGCUGUGUGUCUCCAGUUGCCGGAUC-3'	3'-(SEQ ID NO. 156)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 156)-3'	
157/AS157	TLR7	RNA (m/h)	3'-CGUGUCUGUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUC-GCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 157)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 157)-3'	
158/AS158	TLR7	RNA (m/h)	3'-GACGUGUCUGUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAG-3'	3'-(SEQ ID NO. 158)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 158)-3'	
159/AS159	TLR7	RNA (m/h)	3'-CUGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUC-3'	3'-(SEQ ID NO. 159)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 159)-3'	
160/AS160	TLR7	RNA (m/h)	3'-ACCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 160)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 160)-3'	
161/AS161	TLR7	RNA (m/h)	3'-GCACGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCCACG-3'	3'-(SEQ ID NO. 161)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 161)-3'	
162/AS162	TLR7/TLR9	RNA/DNA (m/h)	3'-UAGCAGCUGACGUGUCUGUUCGUAA-X-AAUGCUUGUCUGUGCAGUCCACGAAU-3'	3'-(SEQ ID NO. 21)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 1)-3'	
163/AS163	TLR3	RNA (m)	3'-CCUGACGUGUCUGUUCGUAA-Y-d(ACAGACTTCAGGAACAGCCA)-3'	3'-(SEQ ID NO. 163)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 163)-3'	
164/AS164	TLR3	RNA (m)	3'-CUUGGAGGUUCUUGACG-X-GCAGUUCUUGGAGGUUC-3'	3'-(SEQ ID NO. 164)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 164)-3'	
165/AS165	TLR3	RNA (m)	3'-CUCUUGGAGGUUCUUGACG-X-GCAGUUCUUGGAGGUUCUC-3'	3'-(SEQ ID NO. 165)-5'-X-5'-(SEQ ID NO. 165)-3'	

[0265]

166/AS166	TLR3	RNA (m)	3'-CAAGUCGUUCGAUAAACUCG-X-GCUCAAUAGCU UGCUGAAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 166)-3'	NO. 166)-5'-X-5'-(SEQ ID
167/AS167	TLR3	RNA (h)	3'-CGUGGAAUUGUACCUUC-X-CUUCCAUGUUAAG GUGC-3'	3'-(SEQ ID NO. 167)-3'	NO. 167)-5'-X-5'-(SEQ ID
168/AS168	TLR3	RNA (h)	3'-CUCGUGGAAUUGUACCUUC-X-CUUCCAUGUUA AGGUGCUC-3'	3'-(SEQ ID NO. 168)-3'	NO. 168)-5'-X-5'-(SEQ ID
169/AS169	TLR3	RNA (h)	3'-ACCUCGUGGAAUUGUACCUUC-X-CUUCCAUGU UAAAGGUGCUC-3'	3'-(SEQ ID NO. 169)-3'	NO. 169)-5'-X-5'-(SEQ ID
170/AS170	TLR3	RNA (h)	3'-GUUGUUGUUAUCGGUUG-X-GUUGGCUAUGU UGUUGUUG-3'	3'-(SEQ ID NO. 170)-3'	NO. 170)-5'-X-5'-(SEQ ID
171/AS171	MDM2	RNA (h)	3'-UCACUCUUGUCCACAGU-X-UGACACCUUGUUCU ACU-3'	3'-(SEQ ID NO. 171)-3'	NO. 171)-5'-X-5'-(SEQ ID
172/AS172	MDM2	RNA (h)	3'-ACUCACUCUUGUCCACAGU-X-UGACACCUUGU UCACUCA-3'	3'-(SEQ ID NO. 172)-3'	NO. 172)-5'-X-5'-(SEQ ID
173/AS173	MDM2	RNA (h)	3'-ACACUCACUCUUGUCCACAGU-X-UGACACCU UCUCACUCACA-3'	3'-(SEQ ID NO. 173)-3'	NO. 173)-5'-X-5'-(SEQ ID
174/AS174	MDM2	RNA (m)	3'-GGACUUCACCCUCACUAG-X-GAUCACUCCAC CUUCAGG-3'	3'-(SEQ ID NO. 174)-3'	NO. 174)-5'-X-5'-(SEQ ID
175/AS175	VEGF	RNA (h)	3'-CACCCAAAGACAGCAGAAAG-X-GAAAGACGACA GAACCCAC-3'	3'-(SEQ ID NO. 175)-3'	NO. 175)-5'-X-5'-(SEQ ID

X=甘油接头；X1=1,2,4-丁三醇接头；X3=2-羟甲基-1,3-丙二醇接头；X5=双-1,5-O-(3'胸苷基(thymidyI))-1,3,5-戊三醇接头；Y=1,3-丙二醇接头；Z=1,3,5-戊三醇接头；M=顺,顺-1,3,5-环己三醇接头；L=顺,反-1,3,5-环己三醇接头；A,U,C,G=2'-OMe；o=磷酸二酯核苷酸间联接；h=人；m=小鼠；除非另有说明，表 3 中的所有分子均含有硫代磷酸酯核苷酸间联接。

[0266] 在本发明的这方面，所述组合物缺少特定寡核苷酸组合物的免疫刺激活性。已知特定的基于寡核苷酸的组合物能够具有免疫刺激基序 (immune stimulatory motif)。这样

的免疫刺激活性需要寡核苷酸是未连接的或是在它们的 3' 端连接的。因此, 预计作为依照本发明的基于寡核苷酸的组合物利用 5' 端连接 (如式 I、II、III 或 IV 所示) 的结果, 与未连接的、或在它们的 3' 端连接的、或以 2' -5' 方式连接的基于寡核苷酸的组合物的免疫刺激活性相比, 任何固有的免疫刺激活性均被阻抑。

[0267] 发明人惊奇地发现, 依照本发明的基于寡核苷酸的化合物的结构可提供用于参与 RNA 酶 H 介导的和 / 或 RNAi 介导的基因表达抑制的酶或其它蛋白质结合的最优的化合物。因此, 在本发明这一方面的进一步的实施方案中, 依照本发明的基于寡核苷酸的化合物可以选择性地被涉及 RNAi 介导的基因表达抑制的 RNA 酶 H、Dicer、Argonaut、RISC 或其它蛋白质结合。为了利用体外以及体内的 RNA 酶 H 介导的和 / 或 RNAi 介导的基因表达抑制的目的, 这样的选择性结合提供了最佳的基于寡核苷酸的化合物。

[0268] 在第二个方面, 本发明提供了包括依照本发明的基于寡核苷酸的化合物和生理学可接受载体的药物制剂。

[0269] 在第三个方面, 本发明提供了用于抑制基因表达的方法, 该方法包括使细胞与依照本发明第一个方面的合成的基于寡核苷酸的化合物接触。

[0270] 在第四个方面, 本发明提供用于在哺乳动物中抑制基因表达的方法, 该方法包括对哺乳动物施用依照本发明第一个方面的合成的基于寡核苷酸的化合物。在本发明这一方面的进一步的实施方案中, 预计依照本发明第一个方面的合成的基于寡核苷酸的化合物可以抑制特定基因的表达和活性, 该基因涉及细胞增殖, 包括但不限于癌基因。

[0271] 在第五个方面, 本发明提供通过施用依照本发明第一方面的合成的基于寡核苷酸的化合物, 在哺乳动物中抑制 TLR 介导的、Bcl-2 介导的、EGFR 介导的、mdm2 介导的、MyD88 介导的、PCSK9 介导的、存活蛋白介导的或 VEGF 介导的应答的方法, 其中所述寡核苷酸与一个或多个 mRNA 序列互补, 该 mRNA 序列编码涉及 TLR 信号传导或 Bcl-2、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白或 VEGF 活性的分子。

[0272] 在第六个方面, 本发明提供通过组合施用依照本发明第一个方面的合成的基于寡核苷酸的化合物与 TLR、Bcl-2、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白或 VEGF 蛋白活性的拮抗剂的组合, 在哺乳动物中抑制 TLR 介导的、Bcl-2 介导的、EGFR 介导的、mdm2 介导的、MyD88 介导的、PCSK9 介导的、存活蛋白介导的或 VEGF 介导的应答的方法, 其中所述寡核苷酸与 TLR、Bcl-2、EGFR、mdm2、MyD88、PCSK9、存活蛋白或 VEGF 中的一个或多个 mRNA 序列互补。

[0273] 在第七个方面, 本发明提供用于在哺乳动物中抑制基因表达的方法, 该方法包括对哺乳动物施用依照本发明的基于寡核苷酸的化合物。在一些实施方案中, 所述哺乳动物是人。在优选的实施方案中, 将所述依照本发明的基于寡核苷酸的化合物施用给需要抑制其免疫应答的哺乳动物。

[0274] 在第八个方面, 本发明提供用于治疗地处理具有疾病或病症的患者的方法, 该方法包括以治疗有效量对患者施用依照本发明的基于寡核苷酸的化合物。在多个实施方案中, 待治疗的所述疾病或病症为癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病、气道炎症、炎症病症、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。病原体包括但不限于: 细菌、寄生虫、真菌、病毒、类病毒、以及朊病毒。

[0275] 在第九个方面, 本发明提供用于预防疾病或病症的方法, 该方法包括以药学有效量对有风险发展为疾病或病症的受试者施用依照本发明的基于寡核苷酸的化合物。如果受

试者已经或可以或将会暴露于疾病或病症的病原体、或一般性地容易患上疾病或病症,则认为该受试者有发展为疾病或病症的风险。在多个实施方案中,所述待预防的疾病或病症选自癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、感染性疾病、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。病原体包括但不限于细菌、寄生虫、真菌、病毒、类病毒、以及朊病毒。

[0276] 在第十个方面,本发明提供预防或治疗病症的方法,该方法包括分离能够产生细胞因子或趋化因子的细胞,所述细胞因子或趋化因子包括但不限于:免疫细胞、调节性 T 细胞、B 细胞、PBMC、pDC、以及淋巴样细胞;在标准细胞培养条件下培养该细胞,在离体条件下利用依照本发明第一个方面的基于寡核苷酸的化合物处理该细胞,使得该分离的细胞产生或分泌降低水平的细胞因子或趋化因子,并将经处理的细胞施用或重新施用给需要细胞因子和 / 或趋化因子抑制治疗的患者,以实现预防和 / 或治疗目的。本发明的这一方面可以遵照标准的过继细胞免疫治疗技术以产生激活的免疫细胞。

[0277] 在本发明的这一方面的一些实施方案中,能够产生细胞因子或趋化因子的细胞可以从具有或不具有疾病或病症的受试者上分离。此类分离可以包括识别和选择,并且可以利用标准的细胞分离步骤来进行,包括在下述具体的实施例中所列出的。可以根据标准的细胞培养步骤以及利用标准的细胞培养条件来培养此类细胞,可以包括在下述具体的实施例中所列出的培养步骤和条件。在本发明的这一实施方案的另一个方面中,可以至少一种依照本发明的基于寡核苷酸的化合物的存在下培养经分离的细胞,其量和培养的时间足以当与不存在这样的一种或多种依照本发明的基于寡核苷酸的化合物的条件下培养的经分离的细胞相比充分地阻抑或抑制细胞因子和 / 或趋化因子的产生和 / 或分泌。所述时间可以是数分钟到数小时到数天。这样的经过分离和处理的细胞在重新施用给提供者或施用给第二患者后可产生效用,其中上述提供者或第二患者需要阻抑或抑制细胞因子和 / 或趋化因子的产生和 / 或分泌。例如,向具有癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、感染性疾病、变态反应、哮喘、或由病原体引起的疾病的提供者重新施用或者向具有上述疾病的第二患者施用。此类重新施用或施用可以利用多种方式来完成,所述方式包括导管或注射施用或任何其它有效的途径。本发明的这一方面还可以用于具有受限的或不完整的产生免疫应答的能力或者是免疫低下的患者(例如感染 HIV 的患者或者骨髓移植患者)。

[0278] 在第十一个方面,本发明提供组合物,其包括依照本发明第一个方面的化合物和一种或多种疫苗、抗原、抗体、细胞毒剂、化疗剂(传统的化学疗法和现代靶向疗法两者)、激酶抑制剂、变应原、抗生素、激动剂、拮抗剂、反义寡核苷酸、核酶、RNAi 分子、siRNA 分子、miRNA 分子、适体、蛋白质、基因疗法载体、DNA 疫苗、佐剂、共刺激分子或它们的组合。

[0279] 在依照本发明的任何方法中,依照本发明的基于寡核苷酸的化合物可以通过多种方式作用:单独地产生直接的基因表达调节效果,和 / 或与其它可用于治疗或预防疾病或病患、且不会损害依照本发明的基于寡核苷酸的化合物的基因表达调节效果的其它任何试剂组合。在依照本发明的任何方法中,可用于治疗或预防疾病或病患的(一种或多种)试剂可以包括但不限于:疫苗、抗原、抗体(优选单克隆抗体)、细胞毒剂、激酶抑制剂、变应原、抗生素、siRNA 分子、反义寡核苷酸、TLR 拮抗剂(例如 TLR3 和 / 或 TLR7 的拮抗剂和 / 或 TLR8 的拮抗剂和 / 或 TLR9 的拮抗剂)、化疗剂(传统化学疗法和现代靶向疗法两者)、靶向性治疗剂、激活的细胞、肽、蛋白质、基因疗法载体、肽疫苗、蛋白质疫苗、DNA 疫苗、佐剂和共刺激分子(例如细胞因子、趋化因子、蛋白质配体、反式激活因子、肽或包括经修饰的

氨基酸的肽)、或它们的组合。例如,在癌症的治疗中,预计可以将依照本发明的基于寡核苷酸的化合物与一种或多种化疗化合物、靶向性治疗剂和/或单克隆抗体组合施用。备选地,该试剂可以包括编码抗原或变应原的 DNA 载体。备选地,依照本发明的基于寡核苷酸的化合物可以与其它化合物(例如脂质或脂质体)组合施用,以提高依照本发明的基于寡核苷酸的化合物调节基因表达的特异性或幅度。

[0280] 在依照本发明的任何方法中,依照本发明的基于寡核苷酸的化合物的施用(单独或与其它任何试剂的组合施用)可以通过任何合适的路径,包括但不限于:胃肠外、粘膜投递、口服、舌下、经皮、局部、吸入、鼻内、气雾剂、眼内、气管内、直肠内、阴道、通过基因枪、皮肤贴片或以滴眼剂或漱口剂形式。依照本发明的基于寡核苷酸的化合物的治疗性组合物的施用可以利用已知规程,以有效地减少疾病的症状或替代指标的剂量和时间段来实施。例如,用于治疗疾病和/或病症的依照本发明的基于寡核苷酸的化合物的有效量可以是对于减轻或减少症状、或延迟或改善肿瘤、癌症、或细菌、病毒或真菌感染所必须的量。在施用调制基因表达的组合物语境中,依照本发明的基于寡核苷酸的化合物的有效量,是与不存在依照本发明的基于寡核苷酸的化合物时的基因表达相比,足够实现所需的调节的量。针对任何特定用途的有效量根据如待治疗的疾病或病患、待施用的特定的寡核苷酸、受试者的大小、或疾病或病患的严重度等因素而改变。本领域的普通技术人员可以根据经验确定特定寡核苷酸的有效量而不必须进行过度的实验。

[0281] 在系统施用,优选地,以如下的剂量施用治疗性组合物,所述剂量足以达到血液水平为约 0.0001 微摩尔~约 10 微摩尔的依照本发明的基于寡核苷酸的化合物。对于局部施用,比这低得多的浓度可能是有效的,而且可以高得多的浓度可能被耐受。优选地,依照本发明的基于寡核苷酸的化合物的总剂量范围为每天每名患者约 0.001mg 至每天每 kg 体重约 200mg。在特定的实施方案中,总剂量可以是每天、一星期两次或一星期一次,每 kg 体重施用 0.08、0.16、0.32、0.48、0.32、0.64、1、10 或 30mg。可以期望以单一治疗事件对受试者同时或顺序施用治疗有效量的一种或多种本发明的治疗性组合物。

[0282] 依据本发明这一方面的方法可用于基因抑制的模型研究。该方法还可以用于人或动物疾病的预防性或治疗性处理。例如,该方法可用于小儿科和兽医的抑制基因表达用途。

[0283] 以下实施例例示了进行和实施本发明的例示性模式,但是并不意图限制本发明的范围。

[0284] 实施例 1:

[0285] 基于寡核苷酸的化合物的制备

[0286] 在自动的 DNA/RNA 合成仪中利用亚磷酰胺化学化学合成本发明的基于寡核苷酸的化合物。TAC 保护的(除了 U)2'-O-TBDMS RNA 单体、A、G、C 和 U 购自 Sigma-Aldrich。7-脱氮-G、肌苷和洛索立宾单体购自 ChemGenes Corporation。0.25M 5-乙硫基-1H-四氮唑、PAC-酸酐 Cap A 和 Cap B 购自 Glen Research。在实验室制备了在二氯甲烷(DCM)中的 3%三氯乙酸(TCA)以及 5% 3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮-1,1-二氧化物(Beaucage 试剂)。

[0287] 利用标准的 RNA 合成程序在 1 至 2 μ M 规模合成本发明的基于寡核苷酸的化合物。

[0288] 切割和碱基脱保护

[0289] 从固体支持物上切割下本发明的基于寡核苷酸的化合物,并且进一步将该溶液加

热至 65℃以除去外环胺保护基团。在 SpeedVac 中完全干燥得到的溶液。

[0290] IE HPLC 纯化

[0291] 利用离子交换 HPLC 纯化本发明的基于寡核苷酸的化合物。

[0292] 柱:Dionex DNAPac 100 柱 (22X250)

[0293] 柱加热器:ChromTech TL-105HPLC 柱加热器,将温度设定为 80℃。

[0294] 缓冲液 A:20mM Tris-HCl, pH 7.0, 20%乙腈

[0295] 缓冲液 B:3.0M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.0, 20%乙腈

[0296] 流速:10ml/ 分钟

[0297] 梯度:

[0298] 0-2 分钟:0% B

[0299] 2-11 分钟:0% B 至 35% B

[0300] 11-41 分钟:35% B to 90% B

[0301] 41-45 分钟:100% B

[0302] 将本发明的基于寡核苷酸的化合物的粗溶液注射到 HPLC 中。以上述梯度进行实验并且收集级分。混合含有超过 90%期望的产品的所有级分,然后通过 RotoVap 浓缩该溶液至基本全干。加入无 RNA 酶水使得总体积为 10ml。

[0303] C-18 反相脱盐

[0304] 对购自 Waters 的 CC-18Sep-Pak 筒先用 10ml 乙腈,然后用 10ml 0.5M 乙酸钠进行预处理(condition)。上样 10ml 本发明的基于寡核苷酸的化合物溶液。然后利用 15ml 水冲掉盐。用 1ml 的 50%乙腈水溶液洗脱出本发明的基于寡核苷酸的化合物。

[0305] 将该溶液放置在 SpeedVac 中 30 分钟。剩余的溶液通过 0.2 微米滤膜过滤然后将其冻干至干燥。然后将该固体重新溶解在水中以得到所期望的浓度。

[0306] 将终溶液储存在 0℃以下。

[0307] 毛细管电泳

[0308] 依照下述条件利用毛细管电泳分析本发明的基于寡核苷酸的化合物。

[0309] 设备:Beckman 5010

[0310] 毛细管:62cm ssDNA 毛细管

[0311] 样品制备:将 0.20D 的依照本发明的基于寡核苷酸的组合物溶解在 200 μ l 无 RNA 酶-水中。

[0312] 注射:在 5KV 电动注射 5 秒

[0313] 运行条件:在 30℃,14KV 运行 50 分钟。

[0314] 离子交换 HPLC 分析

[0315] 依照下述条件利用离子交换 HPLC 对本发明的基于寡核苷酸的化合物进行分析。

[0316] 柱:Dionex DNAPac 预柱(guard column) (22X250)

[0317] 柱加热器:ChromTech TL-105HPLC 柱加热器,温度设定为 80℃。

[0318] 缓冲液 A:100mM Tris-HCl, pH 8.0, 20%乙腈

[0319] 缓冲液 B:2.0M LiCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 20%乙腈

[0320] 流速:2ml/ 分钟

[0321] 梯度:

[0322] 0-2 分钟 :0% B

[0323] 2-10 分钟 :0% B 至 100% B

[0324] 10-15 分钟 :100% B

[0325] PAGE 分析

[0326] 将 0.30D 本发明的基于寡核苷酸的化合物上样到 20% 丙烯酰胺凝胶上,在 4 瓦恒定功率下运行约 5 小时。在短波长 UV 光下观察凝胶。

[0327] 实施例 2 :

[0328] 人 PBMC 分离

[0329] 通过 Ficoll 密度梯度离心法 (Histopaque-1077, Sigma) 从新鲜抽取的健康志愿者血液 (CRB Laboratories, Brighton, MA) 分离外周血单核细胞 (PBMC)。

[0330] 人 pDC 分离

[0331] 使用 BDCA4 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec) 依照制造商的说明书通过正向选择自新鲜获取的健康人志愿者的血液 PBMC 分离人的类浆细胞树突细胞 (pDC)。

[0332] PBMC 和 pDC 的处理

[0333] 使用 5×10^6 个细胞 /ml 将人 PBMC 分配在 48 孔板中。使用 1×10^6 个细胞 /ml 将人 pDC 分配在 96 孔皿中。将本发明示例性的基于寡核苷酸的化合物溶解在 DPBS (pH 7.4 ; Mediatech) 中,以 0、0.01、1.0 或 $10.0 \mu\text{g/ml}$ 的剂量添加至细胞培养物。然后,将细胞于 37°C 温育 24 小时,以及随后利用 $10.0 \mu\text{g/ml}$ TLR9 激动剂刺激 24 小时。在处理和刺激之后,并收集上清液以进行 Luminex 多种检测或 ELISA 测定。在某些实验中,通过夹心式 ELISA 来测量 IFN- α 、IL-6 和 / 或 IL-12 的水平。需要的试剂,包括细胞因子抗体和标准品,均购自 PharMingen。

[0334] TLR9 反义活性的人 B 细胞测定法

[0335] 使用 CD 19 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 依照制造商的说明书通过正向选择自 PBMC 分离人 B 细胞。

[0336] 用于测定的培养基由补充有 1.5mM 谷氨酰胺、1mM 丙酮酸钠、0.1mM 非必需氨基酸、 $50 \mu\text{M}$ 2- 巯基乙醇、100IU/ml 青霉素 - 链霉素混合物和 10% 热灭活的胎牛血清的 RPMI 1640 培养基组成。

[0337] 在 96 孔平底板中用 $50 \mu\text{g/ml}$ 本发明示例性的基于寡核苷酸的化合物温育总共 0.5×10^6 个 B 细胞 (即 $1 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ / 孔)。24 小时后,利用 $10 \mu\text{g/ml}$ TLR9 激动剂刺激细胞 24 小时。在处理和刺激之后,制备细胞提取物并且分析 TLR9mRNA 的量。

[0338] 用于 TLR9 或 TLR7 反义活性的 HEK293 细胞培养物测定法

[0339] 将表达小鼠 TLR9 或 TLR7 的 HEK293 细胞 (Invivogen, San Diego, CA) 在 5% CO_2 培养箱中在 $250 \mu\text{L}$ / 孔补充有 10% 热灭活的 FBS 的 DMEM 中的 48 孔板中培养。在 80% 汇合时,在培养基中存在 $4 \mu\text{L/mL}$ Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的条件下用 400ng/mL 人胚胎碱性磷酸酶 (SEAP) 的分泌形式的报告质粒 (pNifty2-Seap) (Invivogen) 瞬时转染培养物。将质粒 DNA 和 Lipofectamine 分别在无血清的培养基中稀释,并于室温温育 5 分钟。温育后,将稀释的 DNA 和 Lipofectamine 混合,并将混合物于室温进一步温育 20 分钟。在细胞培养板的每孔中加入含有 100ng 质粒 DNA 和 $1 \mu\text{L}$ Lipofectamine 的 $25 \mu\text{L}$ DNA/Lipofectamine 混合物的等分试样,并转染细胞 6 小时。转染后,用新鲜的培养培养基

(无抗生素) 替换培养基,并向孔中加入 0、0.01、1 或 10 $\mu\text{g/ml}$ 本发明的 TLR9 或 TLR7 特异的基于寡核苷酸的化合物,并继续温育 24 小时。在反义处理之后,再用 10 $\mu\text{g/ml}$ TLR9 或 TLR7 激动剂刺激细胞 24 小时。

[0340] 在处理和刺激结束时,从每个孔中取出 20 μL 的培养物上清液,并依照制造商 (Invivogen) 的规程,以 Quanti Blue 法进行 SEAP 测定。数据以与 PBS 对照相比 NF- κ B 活性的增长倍数显示。

[0341] 针对 TLR7、TLR8 或其它特异 RNA 靶标反义活性的 HEK293 细胞培养物测定

[0342] 为了测定依照本发明的反义寡核苷酸抑制 TLR7 或 TLR8 或任何其它特异 RNA 靶标的活性,进行了如下步骤:将稳定表达小鼠 TLR7 或 TLR8 或其它特异 RNA 靶标的 HEK293 细胞 (Invivogen, San Diego, CA),在 5% CO_2 培养箱中以 250 μL /孔分配补充有 10% 热灭活的 FBS 的 DMEM 中的 48 孔板中。在 80% 汇合时,在培养基中存在 4 $\mu\text{L/mL}$ Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的条件下用 400ng/mL 人胚胎碱性磷酸酶 (SEAP) 的分泌形式的报告质粒 (pNifty2-Seap) (Invivogen) 瞬时转染培养物。将质粒 DNA 和 Lipofectamine 分别在无血清的培养基中稀释,并于室温温育 5 分钟。温育后,将稀释的 DNA 和 Lipofectamine 混合,并将混合物于室温温育 20 分钟。在细胞培养板的每个孔中加入含有 100ng 质粒 DNA 和 1 μL Lipofectamine 的 25 μL DNA/Lipofectamine 混合物的等分试样,并将转染细胞 6 小时。转染后,用新鲜的培养培养基 (无抗生素) 替换培养基,并向孔中加入 0、0.01、1 或 10 $\mu\text{g/ml}$ 依照本发明的特异的反义寡核苷酸,并继续温育 24 小时。在反义处理之后,用靶标的激动剂刺激细胞最长 24 小时。

[0343] 在处理和刺激结束时,从每个孔中取出 20 μL 的培养物上清液,并依照制造商 (Invivogen) 的规程,以 Quanti Blue 法进行 SEAP 测定。该数据以与 PBS 对照相比 NF- κ B 活性的增长倍数来表示。

[0344] 针对 TLR9 反义活性鼠的 J774 细胞测定法

[0345] 在补充有 10% (v/v) 胎牛血清 (FBS) 和抗生素 (100IU/ml 青霉素 G/100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素) 的 Dulbecco 的改良 Eagle 培养基中培养鼠 J774 巨噬细胞 (美国标准培养物保藏中心, Rockville, MD)。将 J774 细胞以 5×10^6 个细胞/孔的密度分配在 6 孔板中。对于剂量依赖性实验,接下来利用 0、1、10、50 或 100 $\mu\text{g/ml}$ 的本发明的 TLR9 特异的基于寡核苷酸的化合物处理该 J774 细胞,并继续温育 24 小时。对于测定对 mRNA 的影响的实验,接下来利用 0、1 或 3 $\mu\text{g/ml}$ 本发明的 TLR9 特异的基于寡核苷酸的化合物或对照寡核苷酸处理该 J774 细胞,并继续温育 48 小时。对于测定对蛋白质的影响的实验,接下来利用 0 或 50 $\mu\text{g/ml}$ 本发明的 TLR9 特异的基于寡核苷酸的化合物或对照寡核苷酸处理该 J774 细胞,并继续温育 48 小时。在反义处理之后,制备细胞提取物并用于分析 TLR9mRNA 或 TLR9 蛋白质的量。

[0346] 针对 VEGF 反义活性的 HeLa 细胞测定法

[0347] 在补充有 10% (v/v) 胎牛血清 (FBS, Mediatech, Manassas, VA) 的 Dulbecco 的改良 Eagle 培养基 (DMEM, Mediatech, Manassas, VA) 中培养 5×10^6 个 HeLa 细胞 (ATCC, Manassas, VA)。对于细胞转染,在无血清的 100 μL DMEM 中混合 5 μL Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和 5 μg 反义寡核苷酸,并且在室温下温育 15 分钟。利用无血清的 DMEM 冲洗细胞一次,并将 100 μL 的 lipofectamine/寡核苷酸混合物添加到无血清的 900 μL DMEM 中,随后在 5% CO_2 中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 小时。用仅 lipofectamine 的

组作为对照。将培养基替换为具有 10% FBS 的 DMEM, 并温育 24 小时。温育 24 小时后, 利用 QIAGEN RNeasy 迷你试剂盒 (QIAGEN, Valencia, CA) 依照制造商的建议分离总 RNA。利用大容量 cDNA 反转录试剂盒 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) 依照制造商的说明使用 1 μ g RNA 反转录成 cDNA。对于定量实时 PCR (qPCR), 从 Applied Biosystems 购买用于 VEGF (批号 Hs00900057_m1) 和 GAPDH (Hs99999905_m1) 的引物和探针。qPCR 中使用 50ng cDNA 和 Taqman® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 在 Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR 系统中依照制造商的说明进行反应。数据图 8D 中描述为使用 $\Delta\Delta CT$ 方法得到的 mRNA 对经 lipofectamine 处理的细胞的相对量, 其中 $\Delta CT = CT_{VEGF} - CT_{GAPDH}$, $\Delta\Delta CT = \Delta C_{\text{寡核苷酸}} - \Delta CT_{\text{lipofectamine}}$ 。每个柱代表 2 ~ 3 次单独实验。

[0348] 针对 TLR9 反义活性的 C57BL/6 小鼠脾细胞测定法

[0349] 在 RPMI 完全培养基中培养来自 4 ~ 8 周龄 C57BL/6 小鼠的脾细胞。使用 5×10^6 细胞 /ml 在 24 孔盘中分配小鼠脾细胞, 利用溶解在 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA) 中的本发明的 TLR9 特异的基于寡核苷酸的化合物处理, 并在 37°C 温育 24 小时。在反义处理之后, 再利用 10 μ g/ml TLR9 激动剂刺激细胞 24 小时。在处理和刺激之后, 收集上清液并且利用夹心式 ELISA 检测在细胞培养物上清液中分泌的 IL-12 和 IL-6。

[0350] 实施例 3:

[0351] 基于寡核苷酸的组合物的体内活性

[0352] 为了评估依照本发明的反义寡核苷酸的体内活性, 从左肋向雌性 C57BL/6 小鼠 (5-6 周龄) (N = 3/组) 中皮下注射 0.25、2、或 5mg/kg 依照本发明的示例性的基于寡核苷酸的组合物, 或 PBS。在施用基于寡核苷酸的组合物之后 24 小时, 从右肋向小鼠皮下注射 TLR 激动剂 0.25mg/kg。在施用 TLR 激动剂之后 2 小时, 收集血液并且利用 ELISA 分析血清 IL-12 浓度。示出的数据是绝对 IL-12 浓度或是 IL-12 产量的百分比。

[0353] 基于寡核苷酸的组合物的体内活性的持续时间

[0354] 为了评估依照本发明的反义寡核苷酸的体内活性的持续时间, 从左肋向雌性 C57BL/6 小鼠 (5-6 周龄) (N = 3/组) 中皮下注射 5mg/kg 依照本发明的示例性的基于寡核苷酸的组合物, 或 PBS。在施用基于寡核苷酸的组合物之后 24 小时, 在 1、3、5、7、10 或 14 天从右侧肋腹向小鼠皮下注射 TLR 激动剂 0.25mg/kg。在施用 TLR 激动剂之后 2 小时, 收集血液并且利用 ELISA 分析血清 IL-12 浓度。示出的数据是绝对 IL-12 浓度或是 IL-12 产量的百分比。

[0355] 实施例 4:

[0356] 反义相关的蛋白质和酶选择性地结合并切割基于寡核苷酸的化合物

[0357] 为了评估反义相关的蛋白质和酶对依照本发明的基于寡核苷酸的化合物或对照寡核苷酸的结合或切割的特异性, 进行了如下处理: 将在 30ml 缓冲液 (10X 缓冲液, Invitrogen) 中的 5' 端 [γ -32P] 标记的靶 mRNA (例如 SED ID NO. 21; 10nM 人 / 小鼠 TLR7) 和互补的 RNA 或 DNA (10nM; 人 / 小鼠 TLR7) 在 85°C 加热 5 分钟, 然后将其冷却至室温 20 分钟使得双链退火。向反应溶液中添加人 dicer 酶 (0.025U, Invitrogen), 以及然后在 37°C 温育 1 小时。向样品溶液中添加 1ml 终止溶液 (Invitrogen) 以及 10ml 凝胶上样染料并充分混合。立即将样品冷冻在 -80°C。利用 16% 变性 PAGE 分析 RNA 降解产物并且将凝胶对 x 射线胶片曝光, 显影得到放射自显影图。结果如图 13 所示。

[0358] 等同方案

[0359] 本领域技术人员仅使用常规的实验就会认可或者能够确定本文中所描述的具体物质和规程的许多等同方案。例如可以使用与所述寡核苷酸重叠的反义寡核苷酸。认为此类等同方案落入在本发明的范围内而且被所附权利要求书所涵盖。

寡核苷酸的平行合成

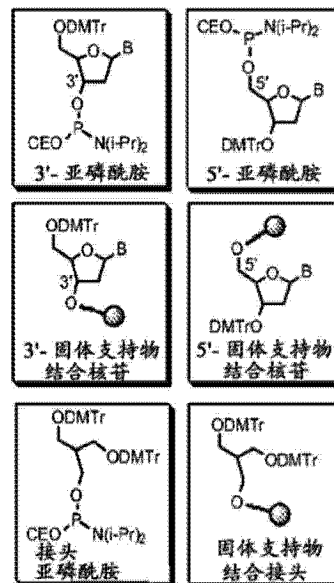
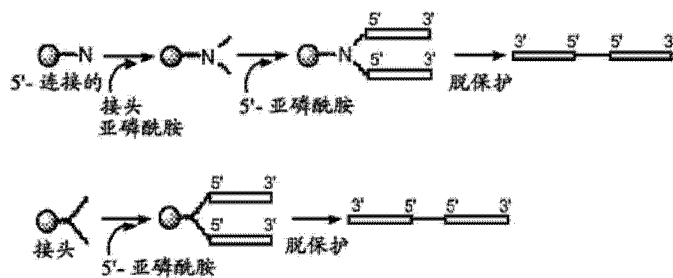


图 1B

TLR9 活性的抑制

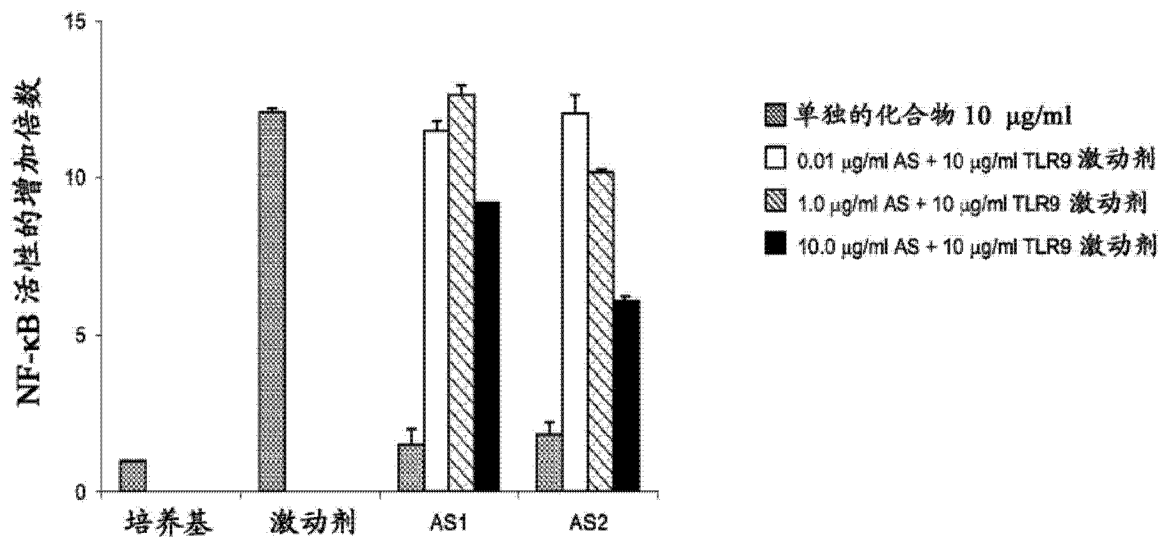


图 2A

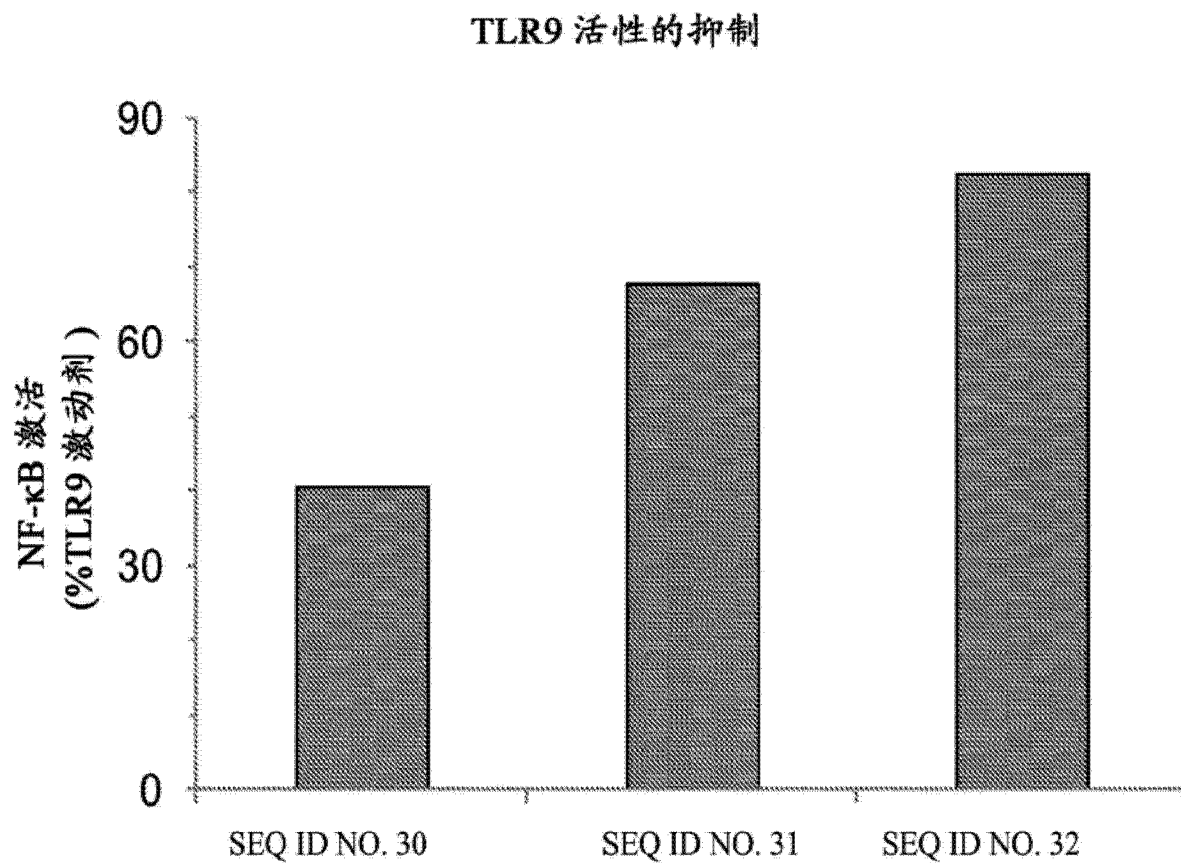


图 2B

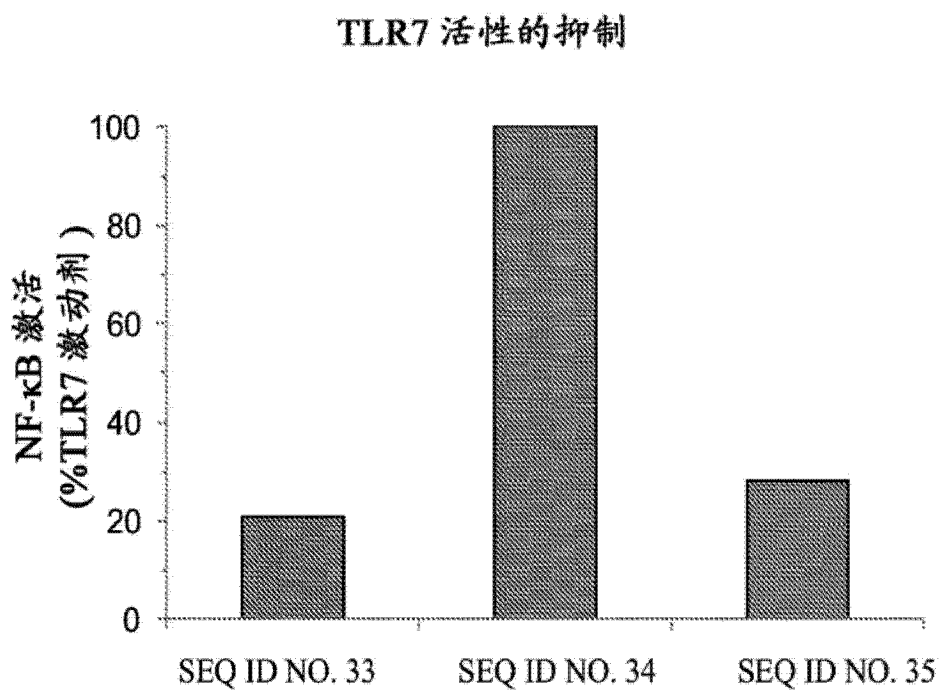


图 2C

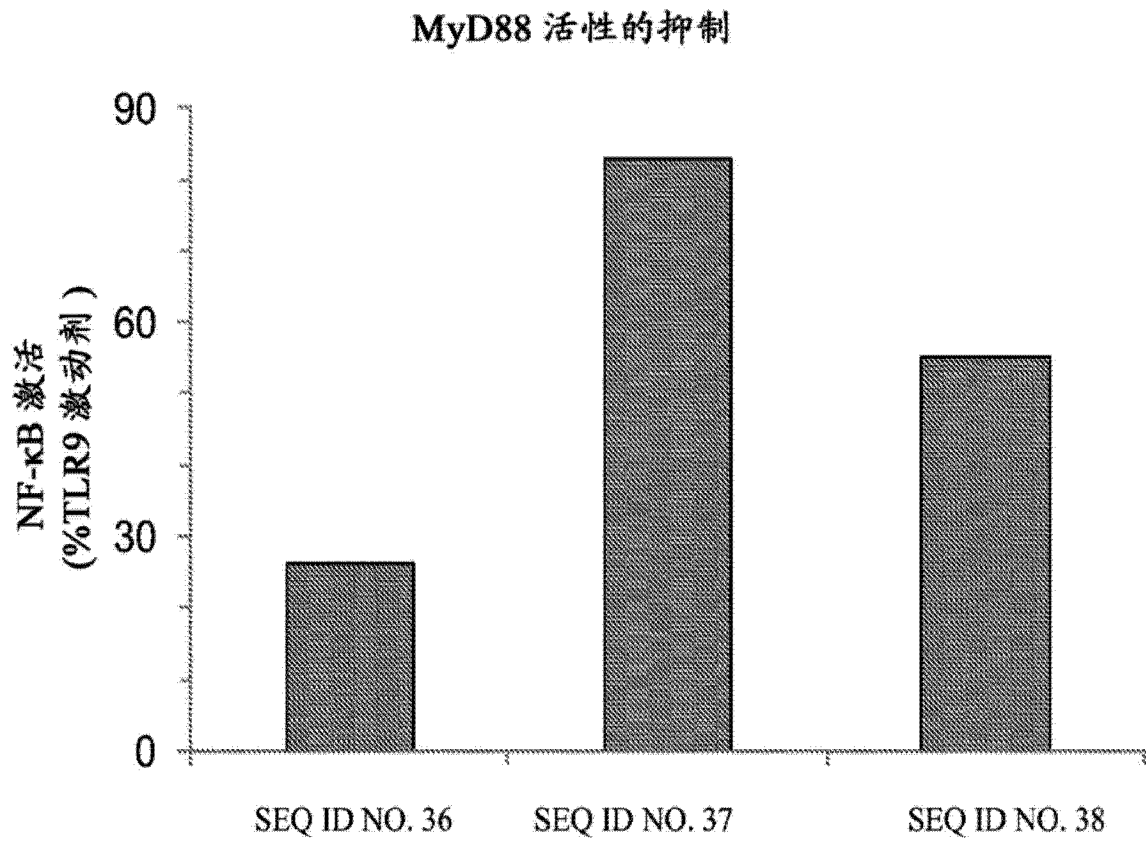


图 2D

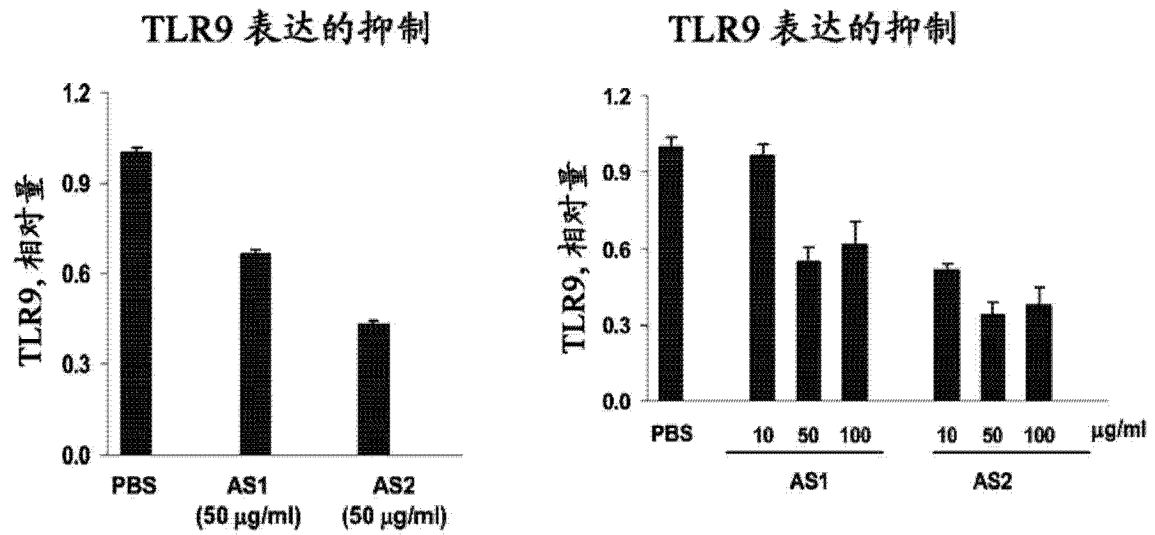


图 3

图 4

TLR9 表达和活性的体内抑制

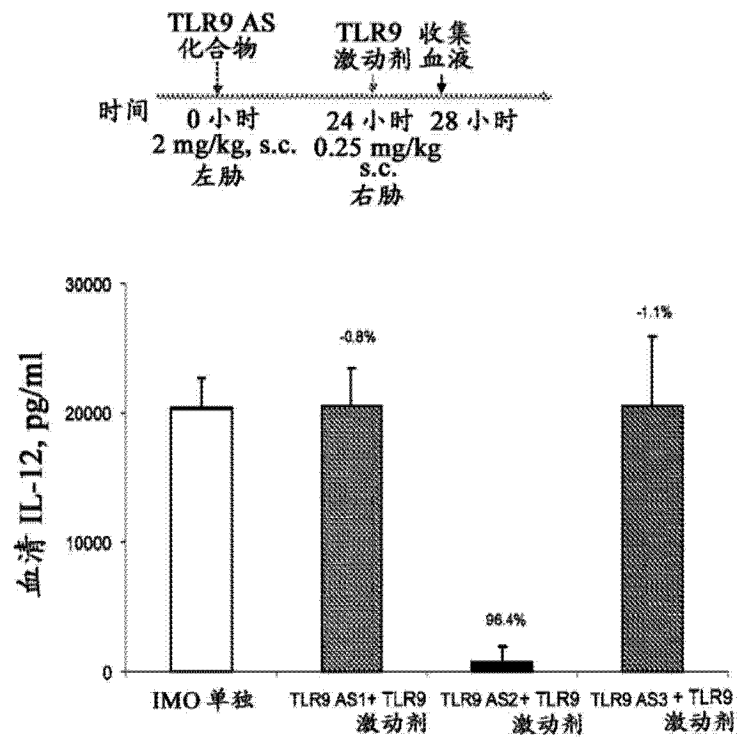


图 5A

TLR9 表达和活性的体内抑制

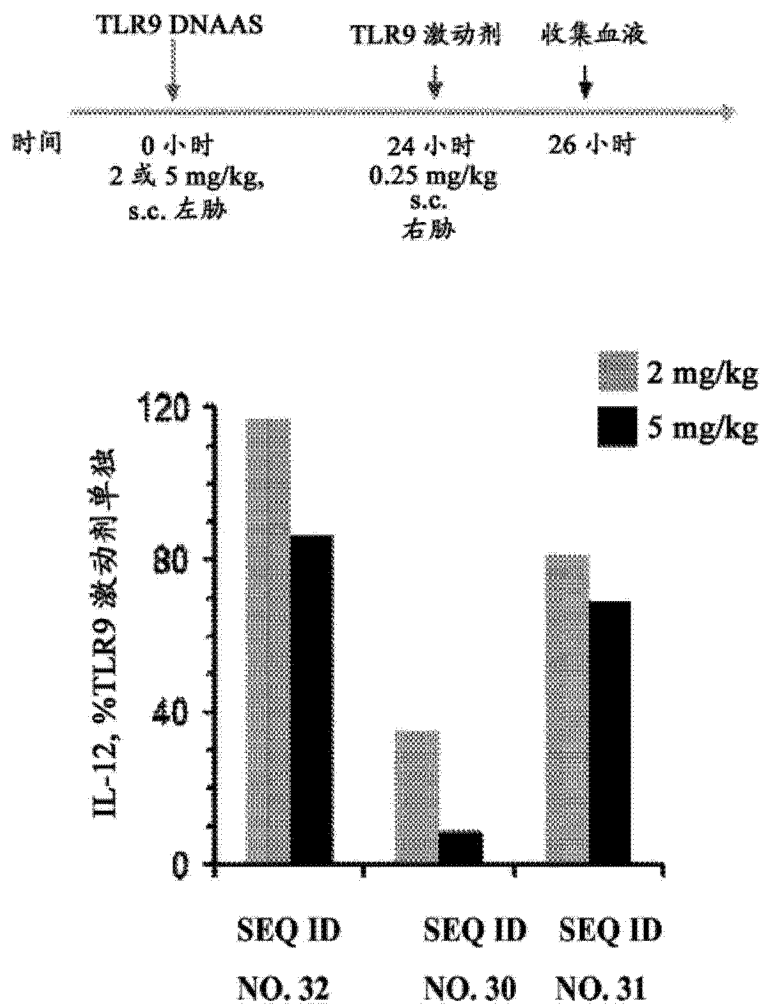


图 5B

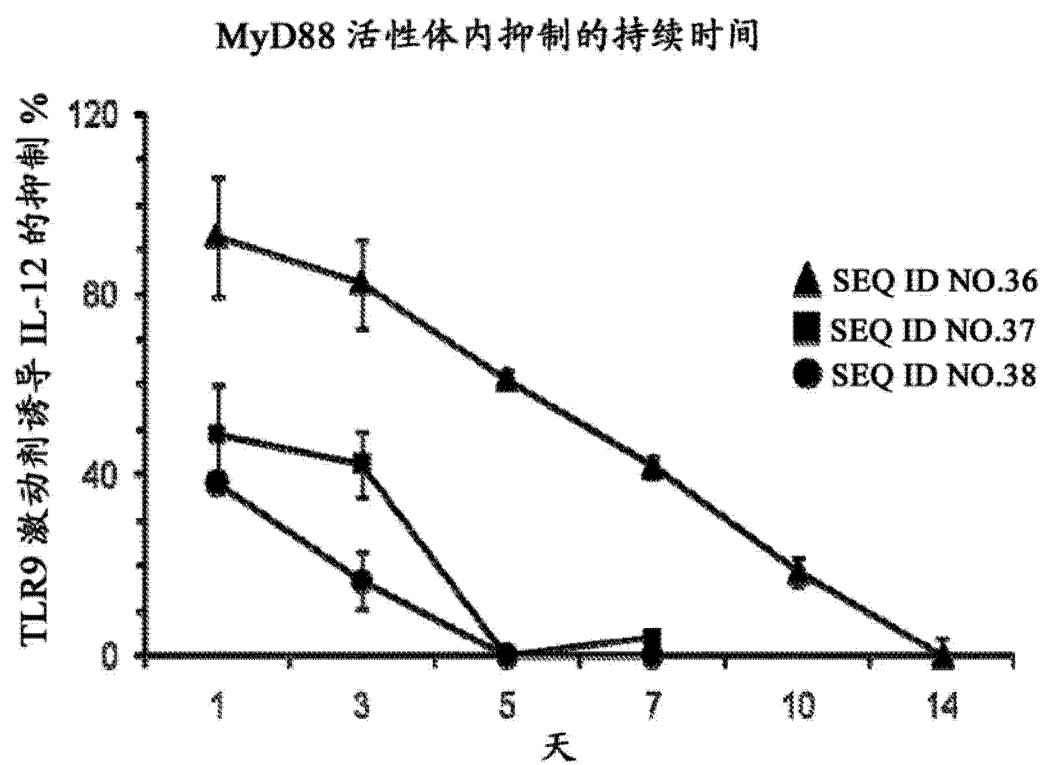


图 5C

TLR9 表达和活性的体内抑制

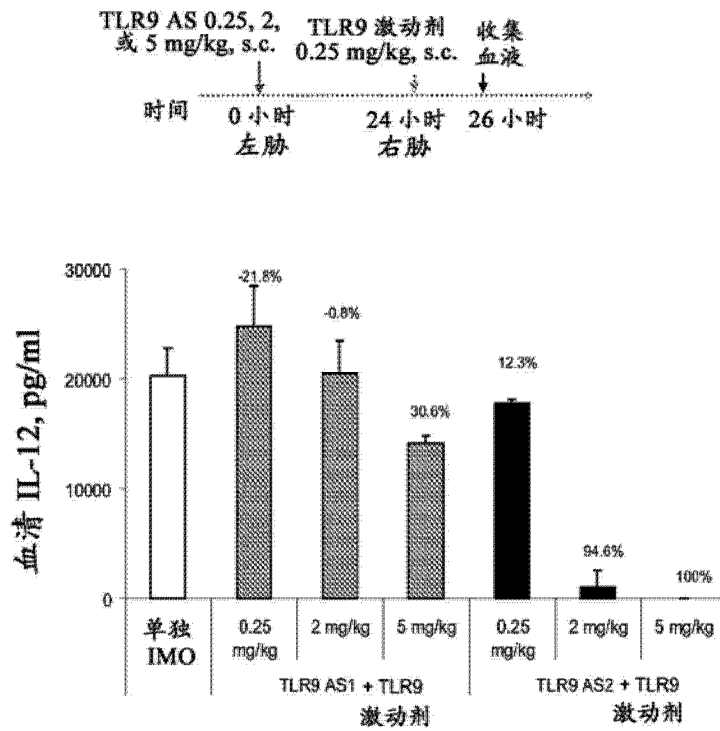


图 6

TLR9 表达和活性的体内抑制

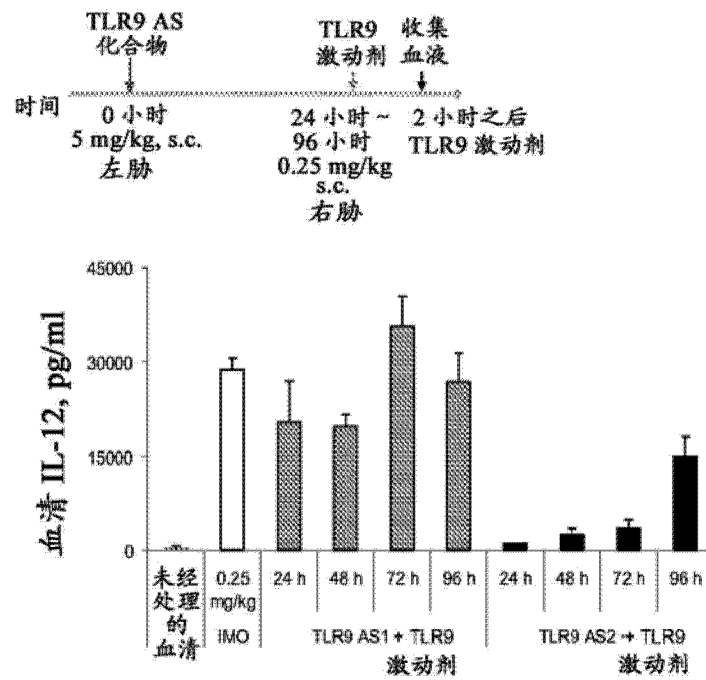


图 7

TLR9 mRNA 表达的抑制

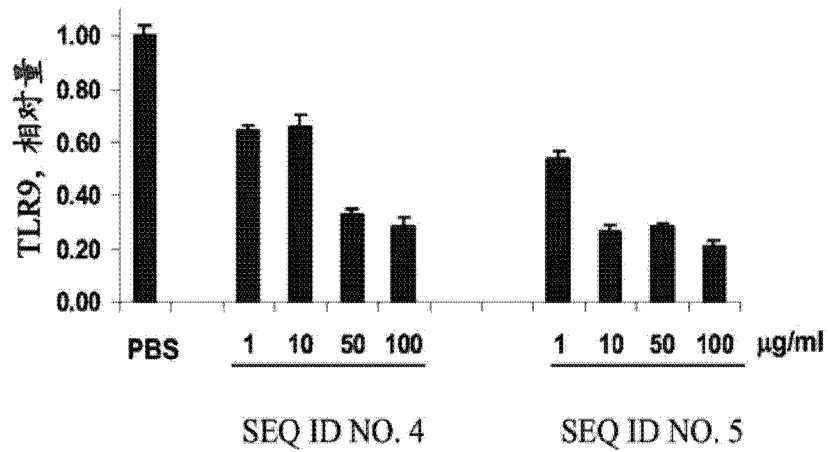


图 8A

TLR9 mRNA 表达的抑制

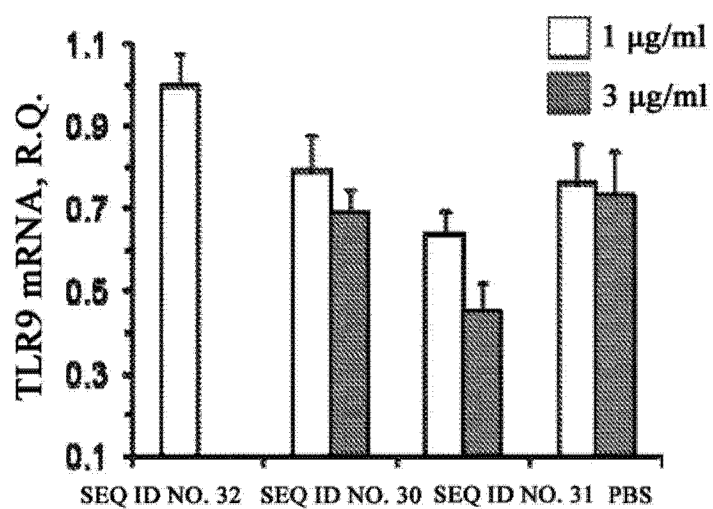


图 8B

TLR9 蛋白表达的抑制

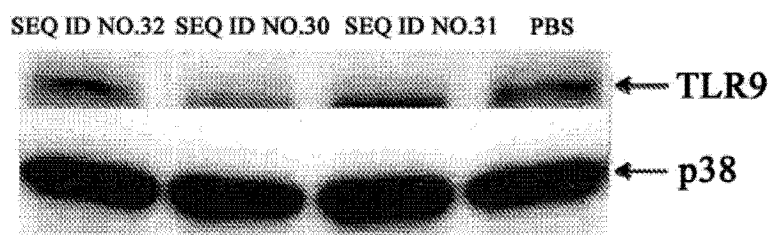


图 8C

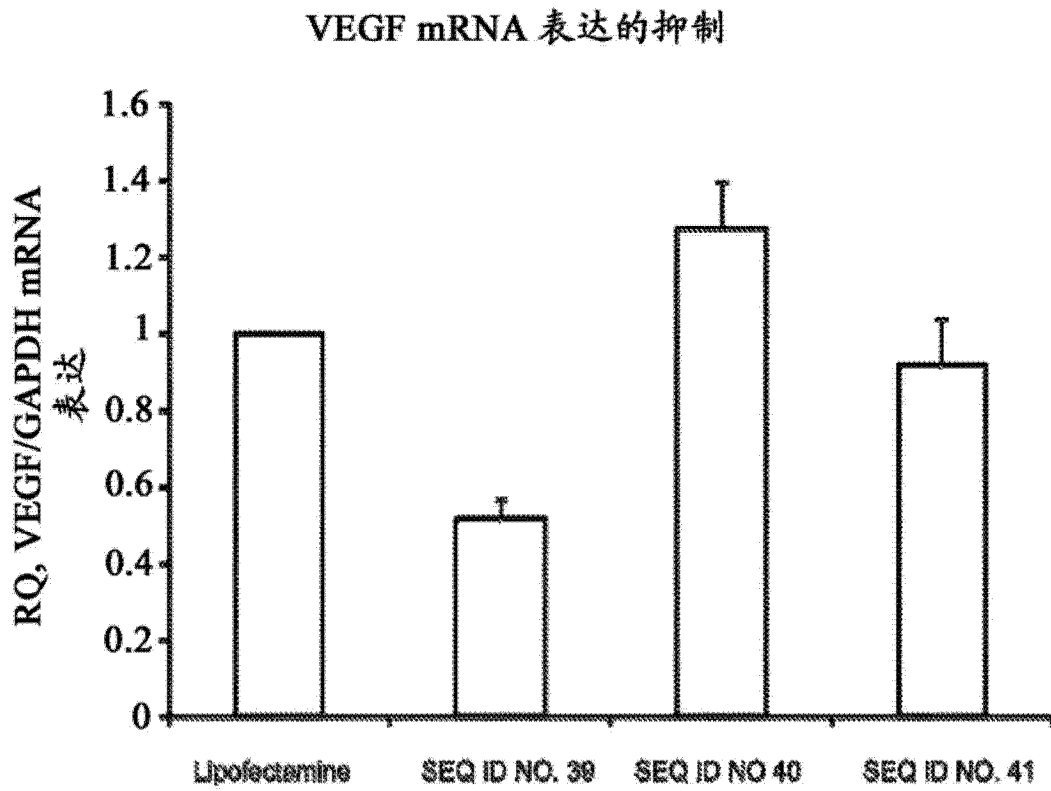


图 8D

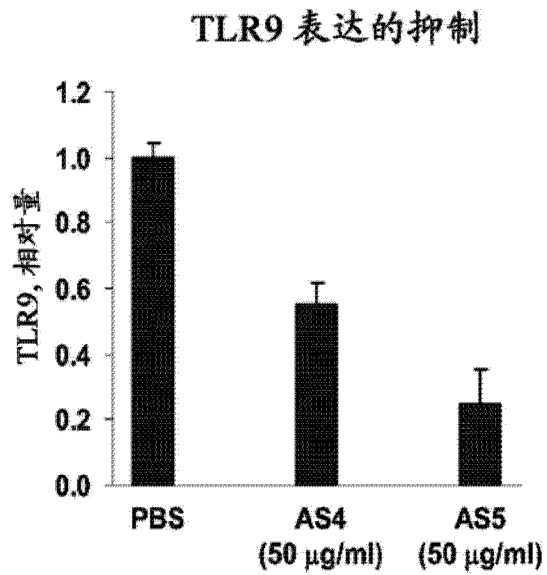


图 9

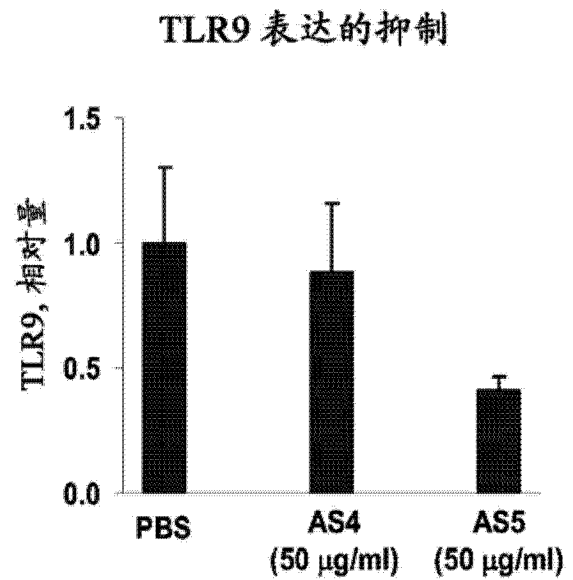


图 10

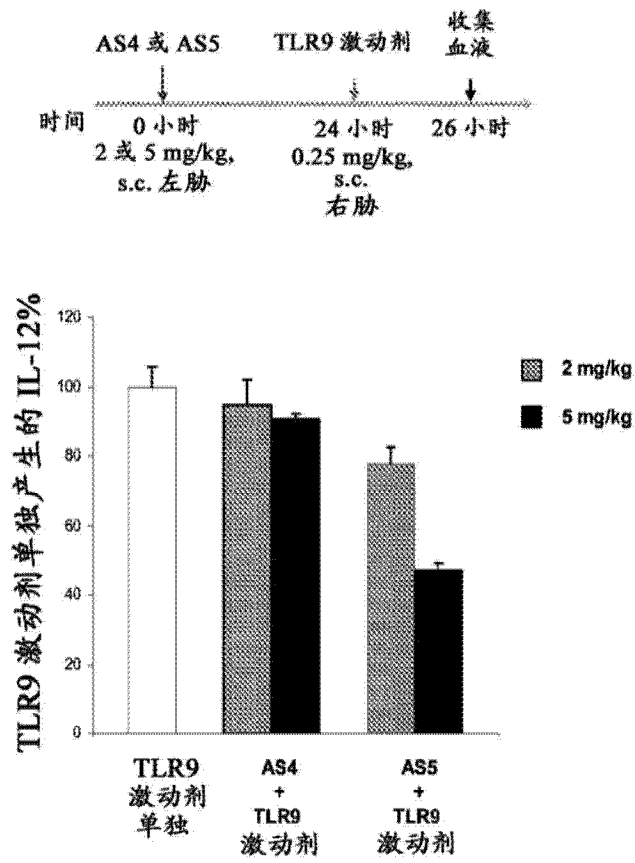


图 11

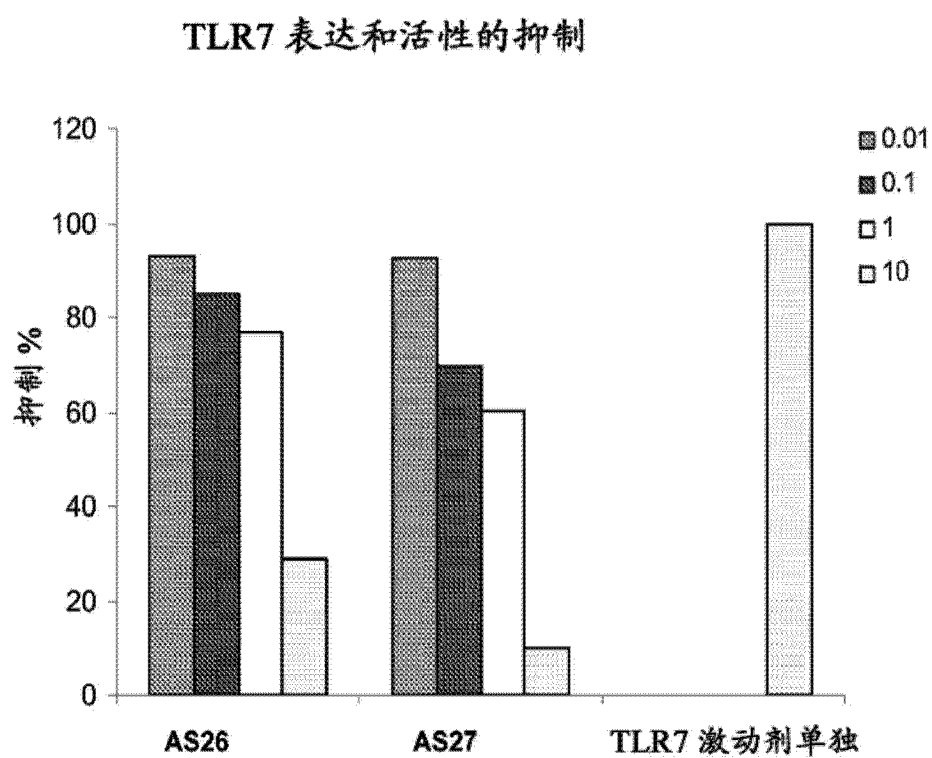


图 12

与反义-介导的基因表达抑制相关的蛋白质选择性地
结合和切割依照本发明的基于寡核苷酸的化合物

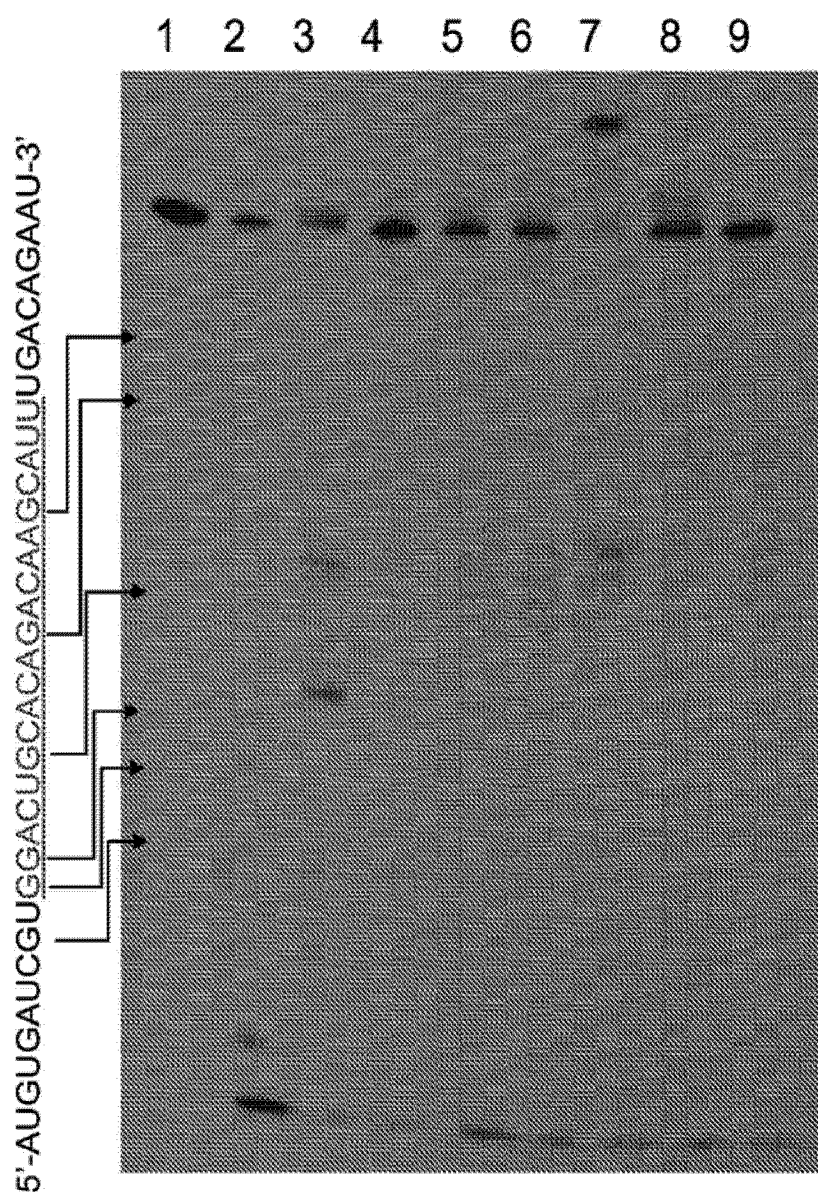


图 13

Abstract

The inventors have examined the means for providing more efficacious gene expression blocking compounds. The inventors have discovered new structural features that surprisingly improve the efficacy of gene expression blocking molecules. These features include the presence of multiple 3' ends and a linker at the 5' ends. Surprisingly, these features improve the efficacy of the gene expression blocking compounds in a manner that decreases the compound's biologic instability. Even more surprisingly, this effect has been found to be applicable to both DNA and RNA oligonucleotide -based compounds and to have application in traditional antisense and RNAi technologies.