(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109890207 B
(45)授权公告日 2022.05.27

(21)申请号 201780065632.8

(22)申请日 2017.08.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109890207 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(30)优先权数据
62/378635 2016.08.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.04.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/048239 2017.08.23

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/039364 EN 2018.03.01

(73)专利权人 迪克纳制药公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 W.王 V.克里什默西

(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 童春媛 万雪松

(51)Int.Cl.
A01N 43/04(2006.01)
A61K 31/712(2006.01)
A61K 9/107(2006.01)

(56)对比文件
WO 2015069932 A1,2015.05.14
WO 2015188197 A2,2015.12.10
WO 2015032968 A1,2015.03.12
US 9376700 B2,2016.06.28
US 6265558 B1,2001.07.24
William H. Sawyer等."Distances between DNA and ATP Binding Sites in the TyrR -DNA Complex".《Biochemistry》.2000,第39卷(第19期),第5655、图2.
Yosuke Ochi等."Gene silencing by 2″-O-methyldithiomethyl-modified siRNA,a prodrug-type siRNA responsive to reducing environment".《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》.2016,第26卷

审查员 李杨军

权利要求书13页 说明书74页 附图8页

(54)发明名称

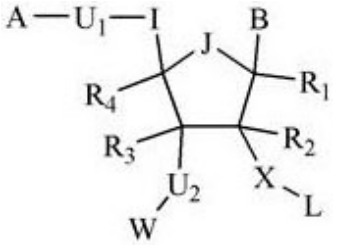
包含可逆修饰的寡核苷酸的组合物及其用途

(57)摘要

本文公开谷胱甘肽敏感性寡核苷酸及其使用方法。可以用谷胱甘肽敏感性部分修饰任何感兴趣的寡核苷酸,包括用于体内递送的寡核苷酸,例如核酸抑制剂分子。通常,谷胱甘肽敏感性部分用于可逆地修饰寡核苷酸中的一个或多个核苷酸中的糖部分的2'-碳,尽管其他碳位置也可用谷胱甘肽敏感性部分修饰。还公开谷胱甘肽敏感性核苷酸和核苷单体,包括谷胱甘肽敏感性核苷亚磷酰胺,其可用于例如标准寡核苷酸合成方法。另外,不具有亚磷酰胺的谷胱甘肽敏感性核苷酸和核苷单体可以在治疗上使用,例如作为抗病毒剂。

CN 109890207 B

1.一种谷胱甘肽敏感性寡核苷酸,其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由式I表示的核苷酸:



I

其中X是O、S、Se或NR′,其中R′选自氢、卤素、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基或具有3-14个碳原子的杂环;

其中R_1、R_2、R_3和R_4各自独立地选自氢、卤素、OH、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基或其中R_1、R_2、R_3和R_4中的两个一起形成5-8元环,其中所述环任选地含有杂原子;

其中J是O、S、NR′、CR′R″,其中R′和R″中的每一个独立地选自氢、卤素、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基或选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基;

其中B选自氢、天然核碱基、修饰核碱基或通用核碱基;

其中U_2是不存在的或选自O、S、NR′或CR′R″,其中R′和R″各自独立地是氢、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环或环烷基;

其中W是氢、磷酸酯基团、将至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团、卤素、OR′、SR′、NR′R″、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、环烷基、具有3-14个碳原子的杂环,其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环或一起形成杂环;

其中I是不存在的或选自O、S、NR′、CR′R″,其中R′和R″各自独立地是氢、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环和环烷基;

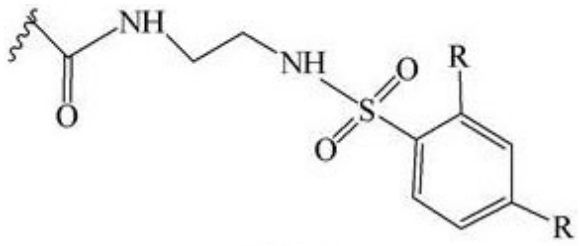
其中U_1是不存在的、氢、将至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团或选自O、S、NR′或CR′R″,其中R′和R″各自独立地是氢、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环和环烷基,且其中U_1或W中的至少一个是将所述至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团,条件是如果U_1是核苷酸间连接基团,则A是不存在的;

其中I和U_1可以组合以形成CR′-CR″烷基、CR′-CR″烯基、CR′-CR″炔基、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫

代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环或一起形成环烷基或杂环；

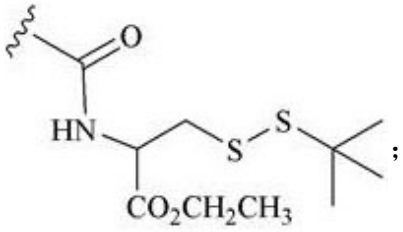
其中A是不存在的、氢、磷酸酯基团、磷酸酯模拟物或氨基磷酸酯；和

其中L是由下式表示的谷胱甘肽敏感性部分：

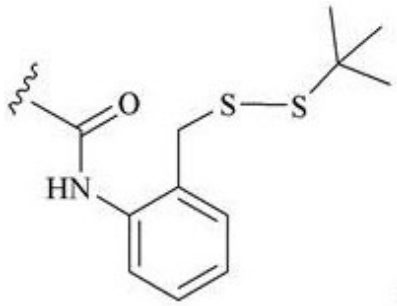


IVb(ii)

其中R选自氢、CH_3、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、环烷基或具有3-14个碳原子的杂环或R是任选地经由间隔基连接的靶向配体；

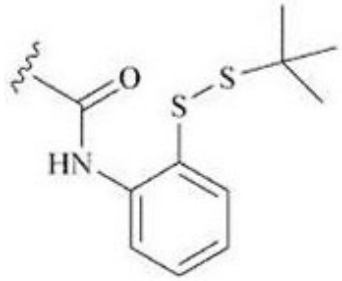


IVd(i)



或

IVe(ii)



。

IVe(ix)

2.根据权利要求1的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述寡核苷酸是包含第一链和第二链的双链寡核苷酸。

3.根据权利要求2的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述双链寡核苷酸是双链RNAi抑

制剂分子且所述第一链包含正义链且所述第二链包含反义链。

4.根据权利要求3的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述双链RNAi抑制剂分子包含15至45个核苷酸的正义链和反义链之间的互补区域。

5.根据权利要求4的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述正义链和反义链之间的互补区域是20至30，21至26，19至24，或19至21个核苷酸。

6.根据权利要求3-5中任一项的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述至少一个由式I表示的核苷酸位于反义链上。

7.根据权利要求3-5中任一项的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述至少一个由式I表示的核苷酸位于正义链上。

8.根据权利要求7的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述至少一个由式I表示的核苷酸位于反义链的核苷酸位置1。

9.根据权利要求7的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述至少一个由式I表示的核苷酸位于反义链的核苷酸位置14。

10.根据权利要求3-5和8-9中任一项的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述至少一个由式I表示的核苷酸位于在或邻近所述正义链的Ago2裂解位点的核苷酸位置。

11.根据权利要求3-5和8-9中任一项的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述双链RNAi抑制剂分子含有四环。

12.根据权利要求1的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述寡核苷酸是单链寡核苷酸。

13.根据权利要求12的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述单链寡核苷酸是单链RNAi抑制剂分子。

14.根据权利要求12的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述单链寡核苷酸是常规反义寡核苷酸、核酶、微小RNA、antagomir或适体。

15.根据权利要求13或14的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述单链RNAi抑制剂分子是14-50，16-30，18-22，或20-22个核苷酸长。

16.根据权利要求1的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸含有1-5个由式I表示的核苷酸。

17.根据权利要求1的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的每一个核苷酸是被修饰的，且其中每一个未被谷胱甘肽敏感性部分修饰的核苷酸以不可逆修饰修饰。

18.根据权利要求1的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，进一步包含递送剂，其中所述递送剂促进谷胱甘肽敏感性寡核苷酸跨细胞外膜的转运。

19.根据权利要求18的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述递送剂选自碳水化合物、肽、脂质、维生素和抗体。

20.根据权利要求18的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述递送剂选自N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、甘露糖-6-磷酸酯、半乳糖、寡糖、多糖、胆固醇、聚乙二醇、叶酸、维生素A、维生素E、石胆酸和阳离子脂质。

21.根据权利要求1的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸是裸谷胱甘肽敏感性寡核苷酸。

22.根据权利要求1的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸是

成簇规则间隔的短回文重复序列“CRISPR”核酸序列，其具有：具有能够与细胞中的靶序列杂交的第一部分的crRNA序列和/或与crRNA序列的第二部分杂交以形成引导序列的tracrRNA序列。

23.根据权利要求22的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述引导序列是嵌合引导序列，且其中crRNA序列与tracrRNA序列融合。

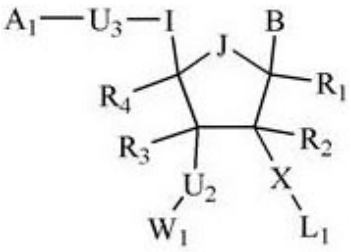
24.一种药物组合物，其包含根据前述权利要求中任一项的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸和药学上可接受的载体。

25.一种药物组合物，其包含根据权利要求2-21中任一项的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸和药学上可接受的载体。

26.权利要求25的药物组合物用于制备用于一种降低受试者中靶基因的表达的方法的药物中的用途，其中所述方法包括以足以降低靶基因的表达的量向有此需要的受试者施用权利要求25的所述组合物。

27.根据 权利要求26的用途，其中所述施用包括全身施用。

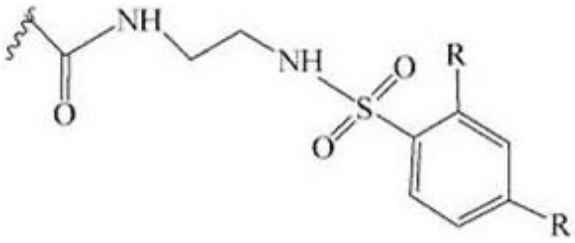
28.一种核苷亚磷酰胺，其中所述核苷亚磷酰胺由式VIII表示：



VIII

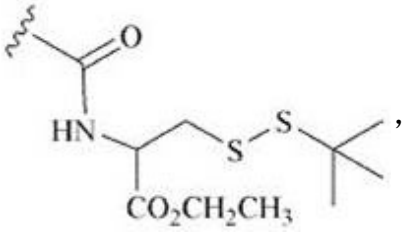
其中L_1是由下式表示的谷胱甘肽敏感性部分

式IVb(ii)

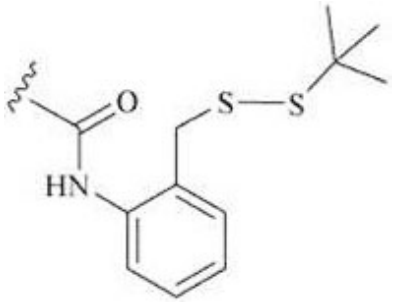


其中R选自氢、CH_3、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、环烷基或具有3-14个碳原子的杂环或R是任选地经由间隔基连接的靶向配体，

式IVd(i)

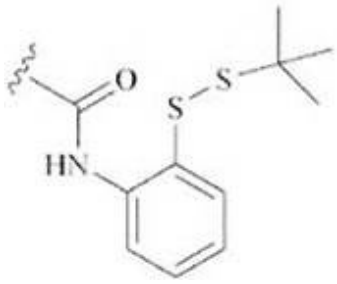


式IVe(ii)



,或

式IVe(ix)



;

其中A_1是不存在的、氢、磷酸酯基团、磷酸酯模拟物、氨基磷酸酯、保护基团或固体载体；

其中W_1是亚磷酰胺、保护基团、固体载体、氢、卤素、OR′、SR′、NR′R″、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、环烷基、具有3-14个碳原子的杂环，其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环或一起形成杂环；

其中U_3是氢或选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环和环烷基；

其中至少A_1是亚磷酰胺且U_3是O或至少W_1是亚磷酰胺且U_2是O；

其中X是O、S、Se或NR′，其中R′选自氢、卤素、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基或具有3-14个碳原子的杂环；

其中R_1、R_2、R_3和R_4各自独立地选自氢、卤素、OH、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基或其中R_1、R_2、R_3和R_4中的两个一起形成5-8元环，其中所述环任选地含有杂原子；

其中J是O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″中的每一个独立地选自氢、卤素、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基或选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基；

其中B选自氢、具有2-10个碳原子的脂族、天然核碱基、修饰核碱基或通用核碱基；

其中U_2是不存在的或选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环或环烷基；

其中I是不存在的或选自O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、

硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环和环烷基；和

其中I和U_3可以组合以形成CR′-CR″烷基、CR′-CR″烯基、CR′-CR″炔基、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环或一起形成环烷基或杂环。

29.根据 权利要求28的核苷亚磷酰胺，其中J是O；B是天然核碱基；U_2是O；I是CH_2；W_1是亚磷酰胺；A_1是保护基团、氢或固体载体；和U_3是O。

30.根据 权利要求29的核苷亚磷酰胺，其中X是O且R_1、R_2、R_3和R_4是氢。

31.根据 权利要求28的核苷亚磷酰胺，其中J是O；B是天然核碱基；U_2是O；I是CH_2；W_1是保护基团、氢或固体载体；A_1是亚磷酰胺，且U_3是O。

32.根据 权利要求31的核苷亚磷酰胺，其中X是O且R_1、R_2、R_3和R_4是氢。

33.根据 权利要求28的核苷亚磷酰胺，其中所述亚磷酰胺具有式—P(OR^x)—N(R^y)$_2$，其中R^x选自任选地取代的甲基、2-氰基乙基和苄基，其中每个R^y选自任选地取代的乙基和异丙基。

34.一种用于制备谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的方法，包括：

(a) 经由共价连接将核苷连接到固体载体；

(b) 将根据权利要求28-33中任一项的核苷亚磷酰胺偶联到步骤(a)的核苷上的羟基以在其间形成磷核苷连接，其中所述固体载体上的任何未偶联的核苷用封端试剂封端；

(c) 用氧化试剂氧化所述磷核苷连接；和

(d) 迭代地用一个或多个后续的根据权利要求28-33中任一项的核苷亚磷酰胺或不含有谷胱甘肽敏感性部分的一个或多个后续的核苷亚磷酰胺重复步骤(b)至(d)，以形成谷胱甘肽敏感性寡核苷酸；和

(f) 从所述固体载体任选地除去所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸。

35.根据权利要求34的方法，其中所述谷胱甘肽敏感性部分包含二硫桥或磺酰基。

36.通过权利要求35的方法制备的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸。

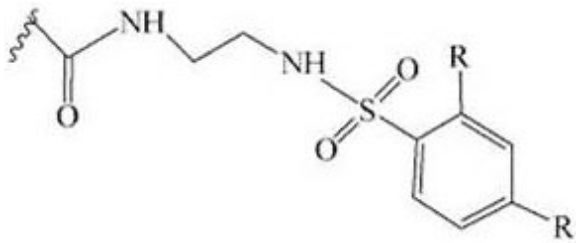
37.一种谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸，

其中所述谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸包含谷胱甘肽敏感性部分；

其中所述谷胱甘肽敏感性部分与氧原子结合，所述氧原子与所述核苷酸或核苷的糖部分的2′-碳共价结合；和

其中所述谷胱甘肽敏感性部分由下式表示

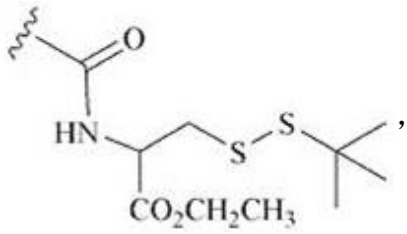
式IVb(ii)



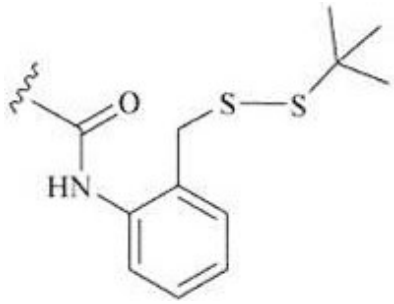
其中R选自氢、CH_3、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳

基、环烷基或具有3-14个碳原子的杂环或R是任选地经由间隔基连接的靶向配体，

式IVd(i)

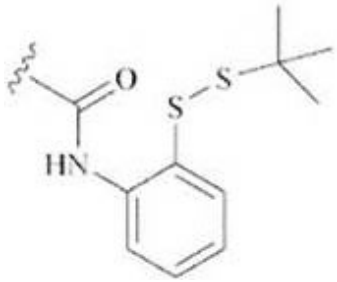


式IVe(ii)



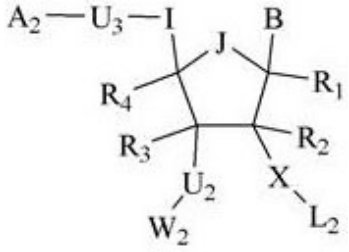
，或

式IVe(ix)



。

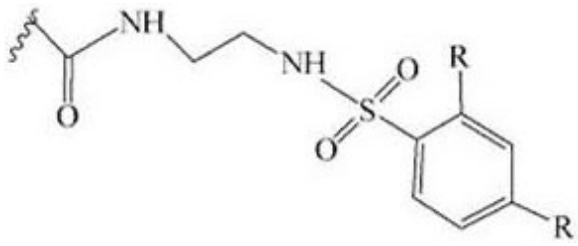
38.一种谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸，其中所述谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸由式XI表示：



XI

其中L_2是由下式表示的谷胱甘肽敏感性部分

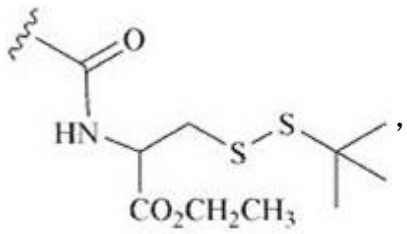
式IVb(ii)



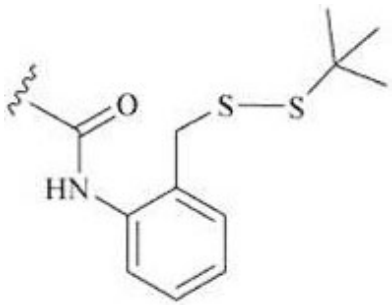
其中R选自氢、CH_3、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、

呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、环烷基或具有3-14个碳原子的杂环或R是任选地经由间隔基连接的靶向配体，

式IVd(i)

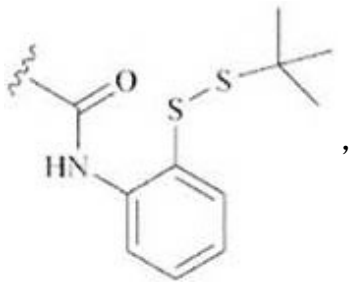


式IVe(ii)



，或

式IVe(ix)



或如果A_2或W_2之一是由式IVb(ii)、IVd(i)、IVe(ii)或IVe(ix)表示的谷胱甘肽敏感性部分，则L_2不存在；

其中如果L_2是谷胱甘肽敏感性部分，则X是O、S、Se或NR′，其中R′选自氢、卤素、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基或具有3-14个碳原子的杂环，或如果L_2是不存在的，则X是H、OH、SH、NH_2、卤素、任选地取代的烷氧基、任选地取代的烷基、任选地取代的烯基、任选地取代的炔基、任选地取代的烷硫基、任选地取代的烷基氨基或二烷基氨基，其中烷基、烯基和炔基中的一个或多个亚甲基可以被O、S、S(O)、SO_2、N(R′)、C(O)、N(R′)C(O)O、OC(O)N(R′)任选地取代的具有5-19个碳原子的芳基、任选地取代的选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、任选地取代的具有3-14个碳原子的杂环基或任选地取代的环烷基、O、S、Se或NHR′中的一个或多个中断，其中R′选自氢、卤素、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基或具有3-14个碳原子的杂环；

其中R_1、R_2、R_3和R_4各自独立地选自氢、卤素、OH、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基或其中R_1、R_2、R_3和R_4中的两个一起形成5-8元环，其中所述环任选地含有杂原子；

其中J是O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″中的每一个独立地选自氢、卤素、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基或选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基；

其中B选自氢、天然核碱基、修饰核碱基或通用核碱基；

其中U_2是不存在的或选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环或环烷基；

其中W_2是由式IVb(ii)、IVd(i)、IVe(ii)或IVe(ix)表示的谷胱甘肽敏感性部分、氢、卤素、OR′、SR′、NR′R″、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、环烷基，具有3-14个碳原子的杂环，其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环或一起形成杂环；

其中I是不存在的或选自O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环和环烷基；

其中U_3是氢，或选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环和环烷基；

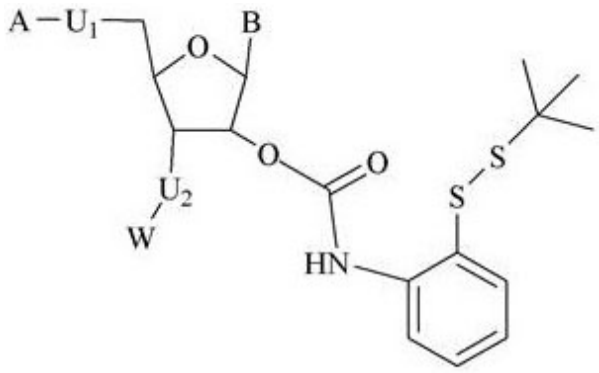
其中I和U_3可以组合以形成CR′-CR″烷基、CR′-CR″烯基、CR′-CR″炔基、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环或一起形成环烷基或杂环；和

其中A_2是不存在的、氢、磷酸酯基团、磷酸酯模拟物、氨基磷酸酯、或由式IVb(ii)、IVd(i)、IVe(ii)或IVe(ix)表示的谷胱甘肽敏感性部分。

39.根据 权利要求38的谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸，其中J是O；X是O；L_2是由式IVb(ii)、IVd(i)、IVe(ii)或IVe(ix)表示的谷胱甘肽敏感性部分；W_2是氢、卤素、OR′、SR′、NR′R″、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、环烷基、具有3-14个碳原子的杂环，其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、具有3-14个碳原子的杂环或一起形成杂环；和A_2是不存在的、氢、磷酸酯基团、磷酸酯模拟物或亚磷酰胺。

40.根据 权利要求39的谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸，其中R_1、R_2、R_3和R_4是氢；U_2是氧；W_2是氢；I是CH_2；U_3是O；和A_2是氢或磷酸酯基团。

41.一种谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸：



VIIe(ix)

其中A是不存在的、氢、磷酸酯基团或磷酸酯模拟物；

其中U_1是O或将所述至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团；

其中B是天然核碱基；

其中U_2是O；

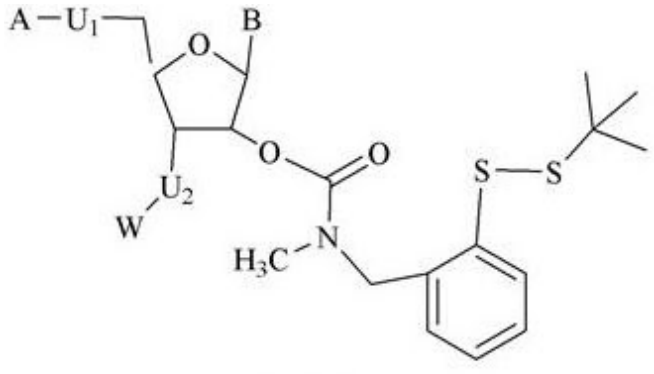
其中W是氢或将所述至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团，其中U_1或W中的至少一个是将所述至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到寡核苷酸的核苷酸间连接基团，条件是如果U_1是核苷酸间连接基团，则A是不存在的；和

其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸是包含正义链和反义链的双链RNAi抑制剂分子。

42.根据 权利要求41的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中A是氢且W是将所述至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到寡核苷酸的核苷酸间连接基团，且其中所述至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸位于反义链的核苷酸位置1。

43.根据 权利要求41的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中A是不存在的；W是将所述至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到第一寡核苷酸的核苷酸间连接基团；和U_1是将所述至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到第二寡核苷酸的核苷酸间连接基团；和其中所述至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸位于反义链的核苷酸位置14。

44.一种谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由式VIIe(xi)表示的核苷酸：



VIIe(xi)

其中A是不存在的、氢、磷酸酯基团或磷酸酯模拟物；

其中U_1是O或将所述至少一个由式VIIe(xi)表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团；

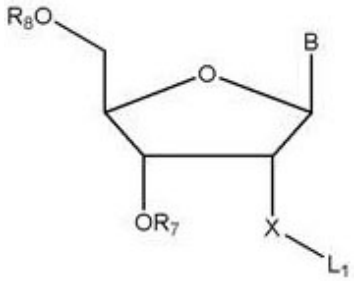
其中B是天然核碱基；

其中U_2是O；

其中W是氢或将所述至少一个由式VIIe(xi)表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团，其中U_1或W中的至少一个是将所述至少一个由式VIIe(xi)表示的核苷酸连接到寡核苷酸的核苷酸间连接基团，条件是如果U_1是核苷酸间连接基团，则A是不存在的；和

其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸是包含正义链和反义链的双链RNAi抑制剂分子。

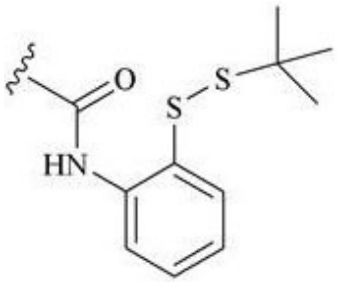
45.一种核苷亚磷酰胺，其中所述核苷亚磷酰胺由式X表示：



X

其中R_8是H或保护基团；R_7是亚磷酰胺；B是天然核碱基；和X是O；和

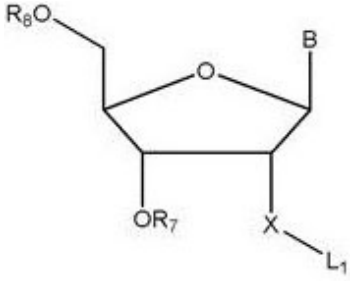
其中L_1由式IVe(ix)表示：



。

IVe(ix)

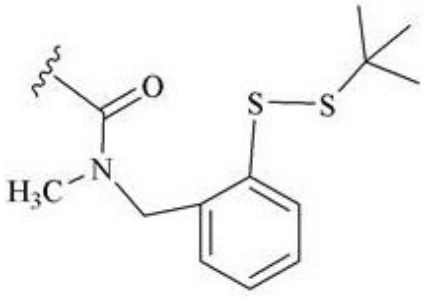
46.一种核苷亚磷酰胺，其中所述核苷亚磷酰胺由式X表示：



X

其中R_8是H或保护基团；R_7是亚磷酰胺；B是天然核碱基；和X是O；和

其中L_1由式IVe(xi)表示：

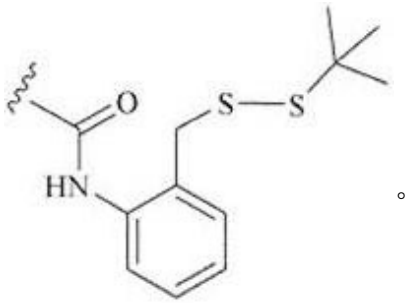


。

IVe(xi)

47.根据 权利要求45或46的核苷亚磷酰胺，其中所述亚磷酰胺具有式—P(OR^{x})—N(R^{y})$_{2}$，其中R^{x}选自任选地取代的甲基、2-氰基乙基和苄基，其中R^{y}中的每一个选自任选地取代的乙基和异丙基。

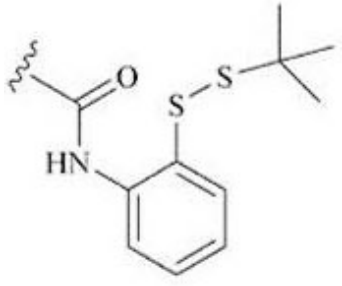
48.一种寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包含至少一个具有与氧原子共价结合的谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸，所述氧原子与所述至少一个具有谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸的糖部分的2'-碳共价结合，其中所述谷胱甘肽敏感性部分由式IVe(ii)表示：



。

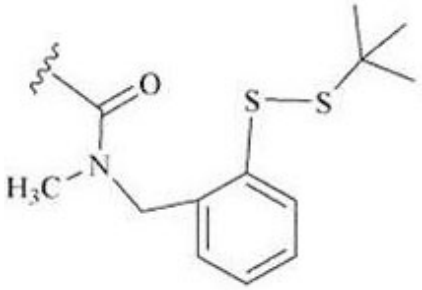
IVe(ii)

49.一种寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包含至少一个具有与氧原子共价结合的谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸，所述氧原子与所述至少一个具有谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸的糖部分的2'-碳共价结合，其中所述谷胱甘肽敏感性部分由式IVe(ix)或IVe(xi)表示：



,或

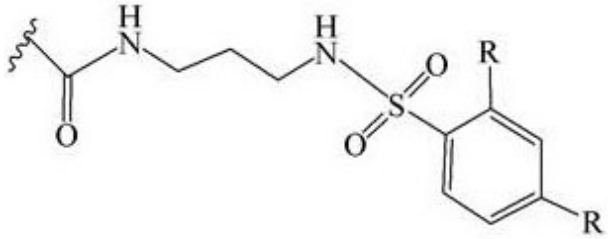
IVe(ix)



。

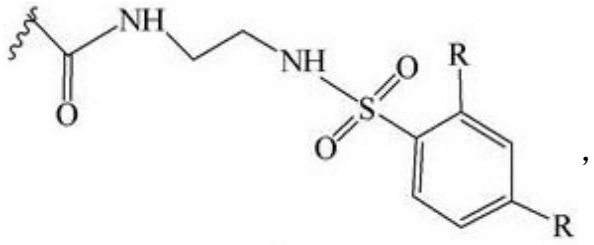
IVe(xi)

50.一种寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含至少一个具有与氧原子共价结合的谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸,所述氧原子与所述至少一个具有谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸的糖部分的2'-碳共价结合,其中所述谷胱甘肽敏感性部分由式IVb(i)或IVb(ii)表示:



,或

IVb(i)

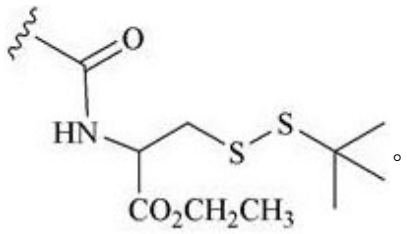


,

IVb(ii)

其中R选自氢、CH_3、具有2-10个碳原子的脂族、具有5-19个碳原子的芳基、选自吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、硫代苯基、噻吩基、喹啉基、吲哚基和噻唑基的杂芳基、环烷基或具有3-14个碳原子的杂环或R是任选地经由间隔基连接的靶向配体。

51.一种寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含至少一个具有与氧原子共价结合的谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸,所述氧原子与所述至少一个具有谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸的糖部分的2'-碳共价结合,其中所述谷胱甘肽敏感性部分由式IVd(i)表示:



。

IVd(i)

包含可逆修饰的寡核苷酸的组合物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年8月23日提交的美国临时专利申请号62/378,635的权益,且依赖于其提交日期,其全部公开内容通过引用并入本文。

[0003] 背景

[0004] 寡核苷酸在分子生物学中具有多种用途,包括例如用作探针、引物或接头。寡核苷酸也可以在治疗上用于例如编辑基因组DNA序列(例如,成簇规则间隔的短回文重复序列"CRISPR"),使用基因治疗技术恢复缺陷或缺失的基因,或用作核酸抑制剂分子以通过各种机制调节细胞内RNA水平。小干扰RNA("siRNA")、反义寡核苷酸、核酶、微小RNA(miRNA)、antagomirs和适体(aptamer)都是核酸分子的实例,这些核酸分子在癌症、病毒感染和遗传障碍的治疗方面已经证明早期希望。核苷和核苷酸类似物也通常在治疗上使用,特别地作为抗病毒剂或抗癌剂。

[0005] 与其他药物一样,治疗性寡核苷酸尤其需要生物系统中的稳定性和在预期作用位点的足够效力。体内环境对治疗性寡核苷酸的稳定性提出挑战,这是由于这些分子在它们通过身体并进入靶细胞的细胞溶质中时经历的条件。例如,寡核苷酸易被血清中的核酸酶包括3'-外切核酸酶降解。参见Behlke, M.A., Oligonucleotides, 2008, 18:305-320。因此,具有单链3'-突出端(overhang)的核酸抑制剂分子,例如本领域已知的和本文所述的某些经典21-mer siRNA和其他siRNA设计,可特别易被这种3'-外切核酸酶降解。Behlke, M.A., Oligonucleotides, 2008,18:305-320。此外,RNase A样活性与血清中siRNA的降解有关。

[0006] 此外,即使寡核苷酸得以通过血清的环境并进入感兴趣的靶细胞,它仍可能暴露到损害寡核苷酸的稳定性的酶或条件(例如pH)。例如,pH依赖性核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶存在于细胞的囊泡例如溶酶体、内体和融合的内体/溶酶体囊泡中。

[0007] 多年来,为了保护治疗性寡核苷酸免受这些环境条件损害,已经采用不同的方法。解决与核酸抑制剂分子的体内施用相关的问题的主要方法是向核酸分子中的一个或多个核苷酸引入某些不可逆的共价化学修饰。多年来已经报道许多类型的不可逆核苷酸化学修饰。参见例如,Bramsen等人, Nucleic Acids Res.,2009, 37:2867-2881。这种不可逆的化学修饰通常涉及核苷酸的糖部分的改变。

[0008] 通常,核苷酸的糖部分的2'-碳(C2')已被不可逆修饰,因为2'-羟基(2'-OH)基团使核糖核苷酸对某些核糖核酸酶更易感。例如,许多基团已经将糖部分的2'位置从羟基修饰为2'-氟(2'-F)或2'-O-甲基(2'-OMe),且这种变化有效地增加RNA寡核苷酸的核酸酶抗性。参见Behlke, M.A., Oligonucleotides, 2008,18:305-320。

[0009] 寡核苷酸的5'-端是通常以不可逆方式修饰的另一个位置。在核酸抑制剂分子的5'-端的典型不可逆修饰包括氨基磷酸酯或模拟磷酸酯基团的静电和空间性质的化学部分("磷酸酯模拟物")。参见Prakash等人, 2015,43(6):2993-3011。通常,这些5'-磷酸酯模拟物含有磷酸酶抗性连接。

[0010] 还可以不可逆修饰寡核苷酸的主链。例如,硫代磷酸酯(PS)主链修饰用硫原子替

代非桥接氧原子且可以将血浆中寡核苷酸的半衰期从数分钟延长至数天。参见Shen等人Nucleic Acids Res., 2015,43:4569-4578;Eckstein, F. Nucleic Acid Thera., 2014,24(6):374-387。

[0011] 通常希望用多于一种类型的不可逆修饰不可逆地修饰同一核酸抑制剂分子中的一个或多个核苷酸位置。例如,通常用多个2′-F、2′-OMe和硫代磷酸酯修饰来修饰siRNA分子。参见Podbevsek等人, Nucleic Acid Res., 2010,38(20):7298-7307。

[0012] 虽然这些不可逆修饰可能有助于改善核酸的稳定性和/或保护其免受血清或细胞中的酶损害,取决于被修饰的核苷酸的位置和/或修饰的数目,这些不可逆修饰也可以降低核酸抑制剂分子的效力或活性,一旦该分子到达细胞的细胞溶质。参见Behlke, M.A., Oligonucleotides, 2008,18:305-320。此外,因为这些修饰在细胞内条件下是不可逆的,它们在核酸抑制剂分子在细胞的细胞溶质中发挥其生物活性之前不会从核酸抑制剂分子中除去。如果不可逆修饰导致效力或活性降低,它们可能限制含有它们的核酸抑制剂分子的治疗功效。

[0013] 虽然研究和药物开发努力已集中于不可逆修饰以保护核酸抑制剂分子,还有较小规模的含有可逆的化学修饰的寡核苷酸的报道,且该化学修饰可以在寡核苷酸进入细胞后除去。可逆修饰可以例如通过细胞内酶的作用或通过细胞内的化学条件(例如通过由细胞内谷胱甘肽还原)除去。通常,核酸分子已经用环状二硫醚(disulfide)部分化学修饰以掩蔽由核苷酸间二磷酸酯连接产生的负电荷,并改善细胞摄取和核酸酶抗性。参见最初转让给Traversa Therapeutics, Inc.(“Traversa”)的美国公开申请号2011/0294869,转让给Solstice Biologics, Ltd.(“Solstice”)的PCT公开号WO 2015/188197,Meade等人,Nature Biotechnology, 2014,32:1256-1263(“Meade”),转让给Merck Sharp & Dohme Corp的PCT公开号WO 2014/088920。这种核苷酸间二磷酸连接的可逆修饰被设计成通过细胞溶质(例如谷胱甘肽)的还原环境在细胞内裂解。较早的实例包括中和性磷酸三酯修饰,据报道其可在细胞内裂解(Dellinger等人 J. Am. Chem. Soc. 2003,125:940-950)。

[0014] 本领域中较少致力于可逆地修饰核苷酸的糖部分中的其他位置,例如2’-碳(也称为C2’)。C2’已使用对酶促裂解(Lavergne等人, J. Org. Chem., 2011,76:5719-5731)和光刺激裂解(Johnsson等人, Bioorganic & Med. Chem. Letters, 2011,21:3721-25)敏感的修饰可逆地修饰。最近,将可逆的二硫醚修饰应用到在2’碳的RNA分子。更具体地,设计特定的2’-O-甲基二硫代甲基(2′-O MDTM) RNA,其具有可被谷胱甘肽细胞内裂解的二硫桥,且在体外显示能够抑制外源添加的荧光素酶基因在分离的A549细胞中的表达。参见Ochi等人, Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, 2016,26:845-848。然而,Ochi的作者发现含有2’-O-MDTM基团的核苷亚磷酰胺与标准寡核苷酸固相合成不相容。参见Ochi 2016;还参见Ochi等人, Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem., 2015,(62):4.63.1-4.63.20。因此,Ochi必须使用合成后方法来合成它们的2’-O-MDTM修饰的RNA分子。参见Ochi 2016;还参见Biscans等人, Org. Biomol. Chem., 2016,14:7010-17,承认Ochi的合成后方法来制备2’-O-MDTM修饰的RNA分子是避免含有2’-O-MDTM基团的核苷亚磷酰胺中二硫键的不稳定性的方式,并提出用于制备含有各种2’-烷基二硫代甲基基团的RNA的备选合成后方法。

[0015] 尽管本领域已经取得进步以改善寡核苷酸的稳定性和/或保护它们免受血清或细

胞中的酶损害，本领域仍然需要核酸分子的可逆修饰的改进的策略，特别是与标准的亚磷酰胺寡核苷酸合成相容的可逆修饰。

[0016] 概述

[0017] 本申请公开各种新的谷胱甘肽敏感性、可逆修饰的核苷酸和核苷，其可以掺入任何感兴趣的寡核苷酸，包括核酸抑制剂分子，例如siRNA、反义寡核苷酸、微小RNA、核酶、antagomirs和适体。它们还可以掺入其他寡核苷酸，例如，成簇规则间隔的短回文重复序列(CRISPR)核酸，用于基因治疗的核酸，用于DNA编辑的核酸，探针，或易被核酸酶和/或恶劣的环境条件(例如，pH)降解的任何其他寡核苷酸，包括要在体内施用的其他寡核苷酸。

[0018] 本发明的谷胱甘肽敏感性可逆修饰也可用于可逆地修饰核苷酸和核苷单体，包括可用于例如标准寡核苷酸合成方法的谷胱甘肽敏感性核苷亚磷酰胺。另外，不具有亚磷酰胺的谷胱甘肽敏感性核苷酸和核苷单体可以在治疗上使用，例如作为抗病毒剂。

[0019] 通常，谷胱甘肽敏感性部分用于可逆地修饰核苷酸中的糖部分的2'-碳，尽管其他碳位置也可用谷胱甘肽敏感性部分修饰。可以将一个或多个谷胱甘肽敏感性核苷酸掺入寡核苷酸中，以帮助在寡核苷酸将暴露到核酸酶和其他恶劣的环境条件(如pH)的体内施用期间(例如，运送通过血液和/或细胞的溶酶体/内体区室)保护寡核苷酸。当可逆修饰的寡核苷酸释放到细胞溶质中时，细胞内条件(包括高水平的谷胱甘肽)导致谷胱甘肽敏感性部分从寡核苷酸中除去。在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分的除去在2'-碳位置产生羟基，其是该位置处核糖核苷酸的天然取代基(参见，例如，实施例3中的方案7)。

[0020] 根据本申请的教导，使用可逆的谷胱甘肽敏感性部分，与使用不可逆化学修饰可获得的选项相比，可以将空间上更大的化学基团引入感兴趣的寡核苷酸中。这是因为这些较大的化学基团要在细胞溶质中被除去，且因此不会干扰细胞的细胞溶质内寡核苷酸的生物活性。结果，可以操纵这些较大的化学基团以赋予核苷酸或寡核苷酸各种优点，例如核酸酶抗性、亲脂性、电荷、热稳定性、特异性和降低的免疫原性。在一些实施方案中，可以操纵谷胱甘肽敏感性部分的结构以改变其释放的动力学。

[0021] 此外，本发明的可逆修饰的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸可以使用常规的固相合成来合成。因此，这些可逆修饰的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸易于制备且适用于治疗应用。另外，因为核酸可以使用常规的固相合成来合成，谷胱甘肽敏感性核苷酸可以根据所需效果掺入寡核苷酸中选定位置处的核酸分子中。在寡核苷酸(例如核酸抑制剂分子)的特定位置掺入谷胱甘肽敏感性部分可以影响该寡核苷酸的性质。例如，谷胱甘肽敏感性部分可以在核酸抑制剂分子的核苷酸位置1(即5'-末端核苷酸)掺入，与具有在核苷酸位置1的2'-F的分子相比，其增加分子的稳定性。

[0022] 用该技术，现在可以容易地合成治疗上有用的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，其具有在一个或多个感兴趣的核苷酸位置掺入的谷胱甘肽敏感性部分。因此，在一个方面，本文所述的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸可用作药物并与药学上可接受的赋形剂一起配制为药物组合物并用于例如编辑基因组DNA或调节靶基因的表达和治疗有此需要的患者。

[0023] 在某些方面，本公开涉及含有一个或多个可逆修饰的核苷酸的寡核苷酸，其中可逆修饰的核苷酸包含与糖环(或其类似物)的2'-碳连接的谷胱甘肽敏感性部分。在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分由如本文所述的式II、III或IV或其任何子属表示，所述子属包括例如式IIa，IIIa，IIIa(i)，IIIb，和IIIb(i)；式IVa，IVb，IVc，IVd，或IVe；式IVa(i)，

IVb(i)，IVb(ii)，IVc(i)，或IVd(i)；或式IVe(i)，IVe(ii)，IVe(iii)，IVe(iv)，IVe(v)，IVe(vi)，IVe(vii)，IVe(viii)，IVe(ix)，IVe(x)，或IVe(xi)。在其中寡核苷酸含有多于一个可逆修饰的核苷酸的实施方案中，每个可逆修饰的核苷酸可包含相同的谷胱甘肽敏感性部分或至少一个可逆修饰的核苷酸可含有与寡核苷酸的其他可逆修饰的核苷酸中的至少一个谷胱甘肽敏感性部分不同的谷胱甘肽敏感性部分。在某些实施方案中，寡核苷酸的每个可逆修饰的核苷酸包含不同的谷胱甘肽敏感性部分。

[0024] 在某些方面，本公开涉及药物组合物，其包含药学上可接受的载体和治疗有效量的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个核苷酸，所述核苷酸包含与糖部分(或其类似物)的2'-碳连接的谷胱甘肽敏感性部分。

[0025] 在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个如本文所述的由式I表示的核苷酸，其中L是选自如本文所述的式II、III或IV或如本文所述的其任何子属的谷胱甘肽敏感性部分，所述子属包括例如式IIa，IIIa，IIIa(i)，IIIb，和IIIb(i)；式IVa，IVb，IVc，IVd，或IVe；式IVa(i)，IVb(i)，IVb(ii)，IVc(i)，或IVd(i)；或式IVe(i)，IVe(ii)，IVe(iii)，IVe(iv)，IVe(v)，IVe(vi)，IVe(vii)，IVe(viii)，IVe(ix)，IVe(x)，或IVe(xi)。

[0026] 在谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的某些实施方案中，L由如本文所述的式II表示，其中Y是O；其中Z是NR'，其中R'是氢或被取代或未被取代的脂族；和其中V是C且任选地其中X_2和X_3独立地选自氢、卤素、硝基或氨基。

[0027] 在某些实施方案中，L由如本文所述的式IIa表示。

[0028] 在谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的某些实施方案中，L由如本文所述的式III表示，其中Y是O、S或NH；其中Z_1是N或CH；其中Y是C；和任选地，其中M_1和M_2是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基或与P_1至Q_1一起形成5-8元环，其中所述环是被取代或未被取代的环烷基。

[0029] 在某些实施方案中，L由如本文所述的式IIIa表示，其中Y是O、S或NH；且Z_1是N或CR'，其中R'选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环。在一个实施方案中，Y是O且Z_1是N(参见式IIIa(i))。

[0030] 在某些实施方案中，L由如本文所述的式IIIb表示，其中Y是O、S或NH；Z_1是N或CR'，其中R'选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环；且T_a和T_b各自独立地不存在或选自CH_3、被取代或被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或任选经由间隔基连接到硫原子的配体。在一个实施方案中，L由如本文所述的式IIIb(i)表示。

[0031] 在谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的某些实施方案中，L由如本文所述的式IV表示，其中Y是O、S或NH；其中Z是NH或NCH_3；其中V是C；其中G是CH_2且E不存在或G不存在且E是CH_2；和任选地，其中M_3和M_4独立地是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基或一起形成5-8元环，其中所述环是被取代或未被取代的环烷基。

[0032] 在某些实施方案中，L由如本文所述的式IVa表示，其中Y是O、S、NH；其中Z是O、S或NH，其中R_5、R_6和R_7各自独立地选自O酰基、NHR′、NR′、CR′R″，其中R'和R″各自独立地选自氢，卤素，CH_2，CH，被取代的脂族或未被取代的脂族，芳基，杂芳基，杂环基，或可以一起形成杂环；且其中T是分支或未分支的C_2-C_6烷基或任选经由间隔基连接到硫原子的配体。在一个实

施方案中,L由如本文所述的式IVa(i)表示。

[0033] 在某些实施方案中,L由式IVb表示,其中Y是O、S、NH;Z是O、S或NH;V是C;M_3和M_4是氢;K是CH或被取代或未被取代的脂族;E是NH或NR',其中R'是被取代或未被取代的脂族;n是0-5;T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选经由间隔基连接到硫原子的配体。在某些实施方案中,L由如本文所述的式IVb(i)或IVb(ii)表示,其中R选自氢、CH_3、被取代或未被取代的脂族、芳基、杂芳基、环烷基或杂环或R是任选经由间隔基连接的靶向配体。

[0034] 在某些实施方案中,L由如本文所述的式IVc表示,其中Y是O、S、NH;Z选自O、S或NR',其中R'选自氢、卤素、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环;V是C;M_3和M_4一起形成5-8元环,其中所述环是被取代或未被取代的环烷基,任选被杂原子取代;K是分支或未分支的被取代或未被取代的C_2-C_6烷基;n是0-5;T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选经由间隔基连接的配体;其中R选自氢、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基或被取代或未被取代的杂环或R是任选经由间隔基连接的靶向配体。在一个实施方案中,L由如本文所述的式IVc(i)表示,其中R选自氢、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基或被取代或未被取代的杂环或R是任选经由间隔基连接的靶向配体。

[0035] 在某些实施方案中,L由如本文所述的式IVd表示,其中Y是O、S、NH;Z选自O、S、NH或NCH_3;T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由间隔基连接到硫原子的配体;和R选自氢、CH_3或被取代或未被取代的C_2-C_6烷基。在一个实施方案中,L由如本文所述的式IVd(i)表示。

[0036] 在谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的某些实施方案中,L由如本文所述的式IVe表示,其中Y是O、S、NH;Z选自O、S或NR′,其中R′选自氢、卤素、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环;V是C或SO;G和E可以各自独立地不存在,或选自CH_2、CHR′、CR′R″、NH、NR′,其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或R′和R″一起形成杂环;K是C或CH;n是0-5;T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由间隔基连接的配体;其中R选自氢、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基或被取代或未被取代的杂环或R是任选地经由间隔基连接的靶向配体。在某些实施方案中,Z是NH或NCH_3且G和E中的一个或两个是不存在的、CH_2、或CR′R″、NH、NR′,其中R′和R″各自独立地选自氢或被取代或未被取代的脂族。在某些实施方案中,L由如本文所述的式IVe(i),IVe(ii),IVe(iii),IVe(iv),IVe(v),IVe(vi),IVe(vii),IVe(viii),IVe(ix),IVe(x),或IVe(xi)表示,其中R选自氢、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基或被取代或未被取代的杂环或R是任选地经由间隔基连接的靶向配体。

[0037] 在某些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由式VIIe(ix)表

示的核苷酸，其中A是不存在的，氢，磷酸酯基团，或磷酸酯模拟物；其中U_1是O或将至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团；其中B是天然核碱基；其中U_2是O；其中W是氢或将至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团，其中U_1或W中的至少一个是将至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到寡核苷酸的核苷酸间连接基团，条件是如果U_1是核苷酸间连接基团，则A是不存在的；和其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸是包含正义链和反义链的双链RNAi抑制剂分子。

[0038] 在某些实施方案中，A是氢且W是将至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到寡核苷酸的核苷酸间连接基团，和至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸位于反义链的核苷酸位置1。

[0039] 在某些实施方案中，A是不存在的；W是将至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到第一寡核苷酸的核苷酸间连接基团；和U_1是将至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸连接到第二寡核苷酸的核苷酸间连接基团；和至少一个由式VIIe(ix)表示的核苷酸位于反义链的核苷酸位置14。

[0040] 在某些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由式VIIe(xi)表示的核苷酸，其中A是不存在的，氢，磷酸酯基团，或磷酸酯模拟物；其中U_1是O或将至少一个由式VIIe(xi)表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团；其中B是天然核碱基；其中U_2是O；其中W是氢或将至少一个由式VIIe(xi)表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团，其中U_1或W中的至少一个是将至少一个由式VIIe(xi)表示的核苷酸连接到寡核苷酸的核苷酸间连接基团，条件是如果U_1是核苷酸间连接基团，则A是不存在的；和其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸是包含正义链和反义链的双链RNAi抑制剂分子。

[0041] 在某些实施方案中，所述核苷酸间连接基团含有磷原子。

[0042] 在某些实施方案中，所述寡核苷酸是包含第一链和第二链的双链寡核苷酸。

[0043] 在某些实施方案中，所述双链寡核苷酸是双链RNAi抑制剂分子且第一链包含正义链且第二链包含反义链。在某些实施方案中，所述双链RNAi抑制剂分子包含约15-45，20-30，21-26，19-24，或19-21个核苷酸的正义链和反义链之间的互补区域。

[0044] 在某些实施方案中，所述至少一个由式I表示的核苷酸位于反义链上。在某些实施方案中，所述至少一个由式I表示的核苷酸位于正义链上。

[0045] 在某些实施方案中，所述至少一个由式I表示的核苷酸位于反义链的核苷酸位置1。在某些实施方案中，所述至少一个由式I表示的核苷酸位于反义链的核苷酸位置14。在某些实施方案中，所述至少一个由式I表示的核苷酸位于在或邻近正义链的Ago2裂解位点的一个或多个核苷酸位置。在某些实施方案中，所述至少一个由式I表示的核苷酸位于Ago2裂解位点的紧邻5′或3′的一个、两个或三个核苷酸处。在某些实施方案中，所述至少一个由式I表示的核苷酸位于Ago2裂解位点的两侧，例如，在Ago2裂解位点的紧邻5′的一个或多个核苷酸处和在Ago2裂解位点的紧邻3′的一个或多个核苷酸处。

[0046] 在某些实施方案中，所述双链RNAi抑制剂分子含有四环(tetraloop)。

[0047] 在某些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸是单链寡核苷酸。在某些实施方案中，所述单链寡核苷酸是单链RNAi抑制剂分子。在某些实施方案中，所述单链寡核苷酸

是常规反义寡核苷酸，核酶，微小RNA，antagomir，或适体。在某些实施方案中，所述单链RNAi抑制剂分子为约14-50，16-30，18-22，或20-22个核苷酸长。

[0048] 在某些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸含有1-5个由式I表示的核苷酸。在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的每一个核苷酸是被修饰的且其中未被谷胱甘肽敏感性部分修饰的每一个核苷酸以不可逆修饰修饰。

[0049] 在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸还包含递送剂，其中所述递送剂促进谷胱甘肽敏感性寡核苷酸跨细胞外膜的转运。在某些实施方案中，递送剂选自碳水化合物，肽，脂质，维生素和抗体。在某些实施方案中，递送剂选自N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)，甘露糖-6-磷酸酯，半乳糖，寡糖，多糖，胆固醇，聚乙二醇，叶酸，维生素A，维生素E，石胆酸和阳离子脂质。

[0050] 在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含在脂质纳米颗粒中。在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸是裸谷胱甘肽敏感性寡核苷酸。

[0051] 在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个核苷酸，其具有与氧原子结合的谷胱甘肽敏感性部分，所述氧原子与核苷酸的糖部分的2'-碳共价结合，其中所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸使用具有谷胱甘肽敏感性部分的核苷亚磷酰胺通过基于亚磷酰胺的寡核苷酸合成方法制备。

[0052] 在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸是具有能够与细胞中的靶序列杂交的第一部分的crRNA序列和/或与crRNA序列的第二部分杂交以形成引导序列的tracrRNA序列的成簇规则间隔的短回文重复序列“CRISPR”核酸序列。在某些实施方案中，引导序列是嵌合引导序列，其中crRNA序列与tracrRNA序列融合。

[0053] 在某些方面，本公开涉及包含如本文所述的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸和药学上可接受的赋形剂的药物组合物，以及其使用方法。在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个谷胱甘肽敏感性核苷酸，其中所述至少一个谷胱甘肽敏感性核苷酸包含在核糖或其类似物的2'-碳处的羟基被谷胱甘肽敏感性部分取代。在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸是双链RNAi抑制剂分子。在某些方面，本公开涉及降低受试者中的靶基因的表达的方法，包括将包含谷胱甘肽敏感性双链RNAi抑制剂分子的药物组合物以足以减少靶基因的表达的量施用到有此需要的受试者。在某些实施方案中，施用包括全身施用。

[0054] 在某些方面，本公开涉及包含亚磷酰胺和谷胱甘肽敏感性部分的核苷，其中所述核苷与基于亚磷酰胺的寡核苷酸合成相容。在某些实施方案中，亚磷酰胺结合到核苷的糖部分的5′-或3′-碳，且谷胱甘肽敏感性部分与共价结合到核苷的糖部分的2′-碳的氧原子结合。在核苷亚磷酰胺的某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分由式II、式III或式IV或其任何子属表示，包括式IIa，IIIa，IIIb，IIIa(i)，IIIb(i)，IVa，IVb，IVc，IVd，IVe，IVa(i)，IVb(i)，IVb(ii)，IVc(i)，IVd(i)，IVe(i)，IVe(ii)，IVe(iii)，IVe(iv)，IVe(v)，IVe(vi)，IVe(vii)，IVe(viii)，IVe(ix)，IVe(x)，或IVe(xi)，如本文所述。

[0055] 在某些方面，本公开涉及谷胱甘肽敏感性核苷亚磷酰胺，其中所述核苷亚磷酰胺由如本文所述的式VIII表示。在某些实施方案中，所述核苷亚磷酰胺由式IX表示。在某些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分(L_1)包含二硫桥或磺酰基。

[0056] 在某些实施方案中，所述核苷亚磷酰胺由式VIII表示，其中J是O；B是天然核碱基；U_2是O；I是CH_2；W_1是亚磷酰胺；A_1是保护基团、氢或固体载体；和U_3是O且任选地，其中X是O且

R_1、R_2、R_3和R_4是氢。

[0057] 在某些实施方案中，所述核苷亚磷酰胺由式VIII表示，其中J是O；B是天然核碱基；U_2是O；I是CH_2；W_1是保护基团、氢或固体载体；A_1是亚磷酰胺，且U_3是O且任选地，其中X是O且R_1、R_2、R_3和R_4是氢。

[0058] 在某些实施方案中，所述核苷亚磷酰胺由式X表示，其中R_8是H或保护基团；R_7是亚磷酰胺；B是天然核碱基；X是O；和其中L_1由式IVe(ix)表示。

[0059] 在某些实施方案中，所述核苷亚磷酰胺由式X表示，其中R_8是H或保护基团；R_7是亚磷酰胺；B是天然核碱基；和X是O；和其中L_1由式IVe(xi)表示。

[0060] 在某些实施方案中，所述亚磷酰胺具有式—P(OR^x)—N(R^y)$_2$，其中R^{x}选自任选地取代的甲基、2-氰基乙基和苄基，其中R^{y}中的每一个选自任选地取代的乙基和异丙基。

[0061] 在某些方面，本公开涉及用于制备谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的方法，包括：(a) 经由共价连接将核苷连接到固体载体；(b) 将如本文所述的谷胱甘肽敏感性核苷亚磷酰胺偶联到步骤(a)的核苷上的羟基以在其间形成磷核苷连接，其中所述固体载体上的任何未偶联的核苷用封端试剂封端；(c) 用氧化试剂氧化所述磷核苷连接；和(d) 迭代地用如本文所述的一个或多个后续的谷胱甘肽敏感性核苷亚磷酰胺或不含有谷胱甘肽敏感性部分的一个或多个后续的核苷亚磷酰胺重复步骤(b)至(d)，以形成谷胱甘肽敏感性寡核苷酸；和(f) 从所述固体载体任选地除去所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸。在另一方面，本公开涉及通过所述方法制备的寡核苷酸。在某些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分包含二硫桥或磺酰基，包括，例如，通过如本文所述的式II、III或IV或其任何子属表示的谷胱甘肽敏感性部分，包括式IIa，IIIa，IIIb，IIIa(i)，IIIb(i)，IVa，IVb，IVc，IVd，IVe，IVa(i)，IVb(i)，IVb(ii)，IVc(i)，IVd(i)，IVe(i)，IVe(ii)，IVe(iii)，IVe(iv)，IVe(v)，IVe(vi)，IVe(vii)，IVe(viii)，IVe(ix)，IVe(x)，或IVe(xi)，如本文所述。在某些方面，本公开涉及谷胱甘肽敏感性核苷或不含有亚磷酰胺的核苷酸，其中所述谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸包含结合到氧原子的谷胱甘肽敏感性部分，所述氧原子共价结合到所述核苷酸或核苷的糖部分的2′-碳；和其中所述谷胱甘肽敏感性部分由如本文所述的式II，式III，或式IV，或其任何子属表示。

[0062] 在某些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸由如本文所述的式XI表示。在某些实施方案中，J是O；X是O；L_2是由式II、III或IV表示的谷胱甘肽敏感性部分；W_2是氢、卤素、OR′、SR′、NR′R″、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环，其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基、杂芳基、杂环或一起形成杂环；和A_2是不存在的、氢、磷酸酯基团、磷酸酯模拟物或氨基磷酸酯；和任选地其中R_1、R_2、R_3和R_4是氢；U_2是氧；W_2是氢；I是CH_2；U_3是O；和A_2是氢或磷酸酯基团。

[0063] 附图简述

[0064] 图1A-1B描绘实施例中描述的四种代表性双链RNAi抑制剂分子的实例：对照化合物A和对照化合物B(图1A)和测试化合物1和测试化合物2(图1B)。测试化合物1和2分别在根据本公开的双链RNAi抑制剂分子的引导链的核苷酸位置1(“引导位置1”)和14(“引导位置14”)的2’-碳处含有指示的谷胱甘肽敏感性部分。除了分别在测试化合物1和2的引导链的核苷酸位置1和14的谷胱甘肽敏感性核苷酸外，测试化合物1和2中的剩余核苷酸用2’-F或

2'-OMe不可逆地修饰。除了引导链的位置1和14的核苷酸外，对照化合物A和B与测试化合物1和2相同。对照化合物A和B在引导链的核苷酸位置1("引导位置1")含有2'-F。对照化合物A与对照化合物B不同，因为它在引导链的5'-末端核苷酸的5'-碳上含有天然磷酸酯(5′-PO_4^{2-})，而对照化合物B在引导链的5'-末端核苷酸的5'-碳上含有游离羟基(5'-OH)。对照化合物A和B的引导链含有相同的核苷酸序列，且因此识别与测试化合物1和2相同的靶mRNA序列。

[0065] 图2描绘如实施例3中所述，在与谷胱甘肽一起温育后，根据本公开的在2'-碳上具有谷胱甘肽敏感性部分的可逆修饰的尿苷的尿苷释放速率。

[0066] 图3描绘如实施例3中所述，在与谷胱甘肽一起温育后测试化合物2的消失速率。

[0067] 图4描绘测试化合物1与对照化合物(化合物A和化合物B)相比的效力(包括IC_{50})，如通过在将化合物转染到鼠肝细胞中后48小时靶mRNA的敲低所测量，如实施例4中所述。

[0068] 图5描绘测试化合物1在猴肝细胞中的效力(包括IC_{50})，如通过在转染后24小时靶mRNA的敲低所测量，如实施例4中所述。

[0069] 图6描绘如实施例5中所述，与对照PBS注射相比，如通过体内施用测试化合物1后的靶mRNA敲低和作用持续时间测量的小鼠中的效力。

[0070] 图7描绘如实施例5中所述，与对照PBS注射相比，如通过体内施用测试化合物2后的靶mRNA敲低和作用持续时间测量的小鼠中的效力。

[0071] 详述

[0072] 定义

[0073] 为了更容易理解本公开，首先在下面定义某些术语。可以通过说明书阐述以下术语和其他术语的附加定义。如果下面列出的术语的定义与通过引用并入的申请或专利中的定义不一致，则应当使用本申请中阐述的定义来理解该术语的含义。

[0074] 如在本说明书和所附权利要求中所使用的，单数形式"一"，"一个"和"该"包括复数对象，除非上下文另有明确说明。因此，例如，对"一种方法"的提及包括一种或多种方法，和/或本文所述和/或在阅读本公开等时对本领域技术人员将变得显而易见的类型的步骤。

[0075] 酰基：如本文所用，术语"酰基"是指烷基羰基，环烷基羰基和芳基羰基部分。

[0076] 脂族基团：如本文所用，术语"脂族基团"是指饱和和不饱和的、直链(即，未分支)或分支的烃，其任选地被一个或多个官能团取代。术语"被取代的脂族"是指带有取代基的脂族部分。

[0077] 烷氧基：如本文所用，术语"烷氧基"是指通过氧原子与分子部分连接的烷基。

[0078] 烯基：如本文所用，术语"烯基"是指具有至少一个碳-碳双键且具有约2至约20个碳原子范围的直链或支链烃基。"被取代的烯基"是指进一步带有一个或多个取代基的烯基。如本文所用，"低级烯基"是指具有2至约6个碳原子的烯基部分。

[0079] 烷基：如本文所用，术语"烷基"是指具有1至约20个碳原子的直链或支链烃基。无论何时在本文中出现，数值范围，例如"C_1-C_6烷基"是指烷基可包含仅1个碳原子，2个碳原子，3个碳原子等，直至并包括6个碳原子，尽管术语"烷基"还包括其中未指定碳原子的数值范围的情况。例如，术语"烷基"可以指C_1-C_{10}之间的子范围(例如，C_1-C_6)。"被取代的烷基"是指带有取代基的烷基部分。如本文所用，"低级烷基"是指具有1至约6个碳原子的烷基部分。

[0080] 烷基氨基：如本文所用，术语"烷基氨基"是指带有胺官能团的烷基基团。烷基氨基

可以是被取代或未被取代的。

[0081] 炔基:如本文所用,“炔基”是指具有至少一个碳-碳三键且具有约2至约20个碳原子范围的直链或支链烃基。“被取代的炔基”是指进一步带有一个或多个取代基的炔基。如本文所用,“低级炔基”是指具有约2至约6个碳原子的炔基部分。

[0082] 大约:如本文所用,当应用到一个或多个感兴趣的值时,术语“大约”或“约”是指与所叙述的参考值类似的值。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”是指在所叙述的参考值的任一方向(大于或小于)中落入25%,20%,19%,18%,17%,16%,15%,14%,13%,12%,11%,10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%,1%或更少内的值范围,除非另有说明或从上下文中另外显而易见(除了这种数字会超过可能值的100%时)。

[0083] 适体:如本文所用,术语“适体”是指对特定靶标具有结合亲和力的寡核苷酸,所述靶标包括核酸,蛋白质,特定全细胞或特定组织。适体可以使用本领域已知的方法获得,例如,通过从大的随机核酸序列库中体外选择。Lee等人, Nucleic Acid Res., 2004,32:D95-D100。

[0084] Antagomir:如本文所用,术语“antagomir″是指对特定靶标具有结合亲和力的寡核苷酸,所述靶标包括外源RNAi抑制剂分子或天然miRNA的引导链(Krutzfeldt等人Nature 2005,438(7068):685-689)。

[0085] 反义链:双链RNAi抑制剂分子包含两个寡核苷酸链:反义链和正义链。反义链或其区域与靶核酸的相应区域部分、基本上或完全互补。另外,双链RNAi抑制剂分子的反义链或其区域与双链RNAi抑制剂分子的正义链或其区域部分、基本上或完全互补。在某些实施方案中,反义链还可含有与靶核酸序列非互补的核苷酸。非互补核苷酸可以在互补序列的任一侧上,或可以在互补序列的两侧上。在某些实施方案中,当反义链或其区域与正义链或其区域部分或基本上互补时,非互补核苷酸可位于一个或多个互补区域之间(例如,一个或多个错配)。双链RNAi抑制剂分子的反义链也称为引导链。

[0086] 芳族基团:如本文所用的术语“芳族基团”是指具有含有4n+2π电子的离域π电子系统的平面环,其中n是整数。芳族环可以由五个,六个,七个,八个,九个或多于九个原子形成。术语“芳族”旨在包括碳环芳基(例如苯基)和杂环芳基(或“杂芳基”或“杂芳族”)基团(例如吡啶)。该术语包括单环或稠环多环,即共有相邻碳原子对的环。“被取代的芳族”是指进一步带有一个或多个取代基的芳族基团。

[0087] 芳脂族:如本文所用,术语“芳脂族”、“芳基脂族”或“芳族脂族”可互换使用且是指含有一个或多个芳族部分和一个或多个脂族部分的化合物。

[0088] 芳基:如本文所用,术语“芳基”是指具有5至19个碳原子的芳族单环或多环基团。“被取代的芳基”是指进一步带有一个或多个取代基的芳基。

[0089] 羧基:如本文所用,“羧基(carboxylic)”、“羧基(carboxy)”或“羧基(carboxyl)”通常是指基团C(O)OH。

[0090] 经典RNA抑制剂分子:如本文所用,术语“经典RNA抑制剂分子”是指两个核酸链,每个长21个核苷酸,具有长19个碱基对以形成双链核酸的互补的中心区域和在每个3’-端的两个核苷酸突出端。

[0091] 互补:如本文所用,术语“互补”是指两个核苷酸之间的结构关系(例如,在两个相对的核酸上或在单个核酸链的相对区域上),其允许两个核苷酸彼此形成碱基对。例如,与

相对核酸的嘧啶核苷酸互补的一种核酸的嘌呤核苷酸可通过彼此形成氢键而碱基配对在一起。在一些实施方案中，互补核苷酸可以以Watson-Crick方式或以允许形成稳定双链体的任何其他方式碱基配对。“完全互补”或100%互补是指其中第一寡核苷酸链或第一寡核苷酸链的区段的每个核苷酸单体可与第二寡核苷酸链或第二条寡核苷酸链的区段的每个核苷酸单体形成碱基对的情况。小于100%的互补是指其中两个寡核苷酸链(或两个寡核苷酸链的两个区段)的一些但非全部核苷酸单体可彼此形成碱基对的情况。“基本上互补”是指两个寡核苷酸链(或两个寡核苷酸链的区段)表现出彼此90%或更高的互补。“充分互补”是指靶mRNA和核酸抑制剂分子之间的互补，使得通过靶mRNA编码的蛋白质的量减少。

[0092] 互补链：如本文所用，术语“互补链”是指与另一链部分、基本上或完全互补的双链核酸抑制剂分子的链。

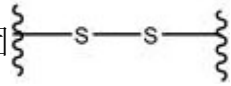
[0093] 常规反义寡核苷酸：如本文所用，术语“常规反义寡核苷酸”是指通过以下机制之一抑制靶基因的表达的单链寡核苷酸：(1)空间位阻，例如反义寡核苷酸通过直接干扰例如基因的转录、pre-mRNA的剪接和mRNA的翻译来干扰参与基因表达和/或编码蛋白质产生的事件序列中的一些步骤；(2)通过RNase H诱导酶促消化靶基因的RNA转录物；(3)通过RNase L诱导酶促消化靶基因的RNA转录物；(4)通过RNase P诱导酶促消化靶基因的RNA转录物；(5)通过双链RNase诱导酶促消化靶基因的RNA转录物；和(6)在同一反义寡核苷酸中组合的空间位阻和酶促消化活性的诱导。常规反义寡核苷酸不具有像RNAi抑制剂分子的RNAi作用机制。RNAi抑制剂分子可以几种方式区别于常规反义寡核苷酸，包括需要Ago2，其与RNAi反义链结合，使得反义链将Ago2蛋白导向预期的靶标和需要Ago2使靶标沉默所需之处。

[0094] CRISPR RNA：成簇规则间隔的短回文重复序列(“CRISPR”)是一种参与防御入侵噬菌体和质粒的微生物核酸酶系统。Wright等人，Cell，2016,164:29-44。该原核系统已经适用于编辑真核细胞基因组中感兴趣的靶核酸序列。Cong等人，Science，2013,339:819-23;Mali等人，Science，2013,339:823-26;Woo Cho等人，Nat. Biotechnology，2013,31(3):230-232。如本文所用，术语“CRISPR RNA”是指包含“CRISPR”RNA(crRNA)部分和/或反式激活crRNA(tracrRNA)部分的核酸，其中CRISPR部分具有与靶核酸部分、基本上或完全互补的第一序列和与tracrRNA部分充分互补的第二序列(也称为示踪物配对序列)，使得示踪物配对序列和tracrRNA部分杂交以形成引导RNA。引导RNA与内切核酸酶(例如Cas内切核酸酶(例如Cas9))形成复合物，并引导核酸酶介导靶核酸的裂解。在某些实施方案中，crRNA部分与tracrRNA部分融合以形成嵌合引导RNA。Jinek等人，Science，2012,337:816-21。在某些实施方案中，crRNA部分的第一序列包含约16至约24个核苷酸，优选约20个核苷酸，其与靶核酸杂交。在某些实施方案中，引导RNA为约10-500个核苷酸。在其他实施方案中，引导RNA为约20-100个核苷酸。

[0095] 环烷基：如本文所用，术语“环烷基”是指含有3至12个碳，例如3至8个碳，和例如3至6个碳的环状(即含环)烃基。“被取代的环烷基”是指进一步带有一个或多个取代基的环烷基。

[0096] 递送剂：如本文所用，术语“递送剂”是指与寡核苷酸复合或结合且介导其进入细胞的转染剂或配体。该术语包括例如阳离子脂质体，其具有与寡核苷酸的负电荷结合的净正电荷。该术语还包括如本文所述的缀合物，例如GalNAc和胆固醇，其可以共价连接到寡核苷酸以引导递送至某些组织。本文还描述其他特定的合适递送剂。

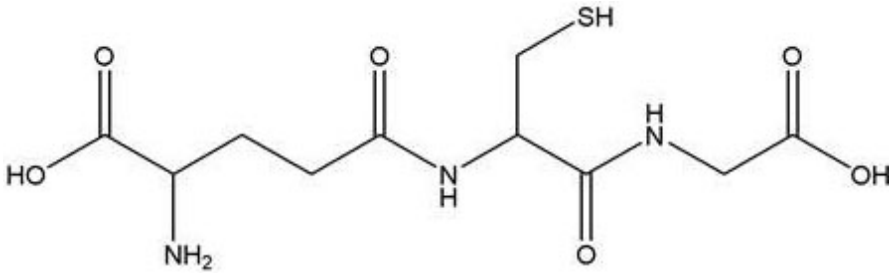
[0097] 脱氧核糖核苷酸:如本文所用,术语“脱氧核糖核苷酸”是指天然或修饰的核苷酸,其在糖部分的2'位置具有氢基团。

[0098] 二硫醚:如本文所用,术语“二硫醚”是指含有基团的化学化合物。通常,每个硫原子与烃基共价结合。在某些实施方案中,至少一个硫原子与除烃之外的基团共价结合。该连接也称为SS键或二硫桥。

[0099] 双链体:如本文所用,关于核酸(例如,寡核苷酸)的术语“双链体”是指通过两个反向平行核苷酸序列的互补碱基配对形成的双螺旋结构。

[0100] 赋形剂:如本文所用,术语“赋形剂”是指可以包含在组合物中的非治疗剂,例如以提供或有助于所需的稠度或稳定作用。

[0101] 谷胱甘肽:如本文所用,术语“谷胱甘肽”(GSH)是指具有下式XIII结构的三肽。GSH以约1-10mM的浓度存在于细胞中。GSH还原谷胱甘肽敏感性键,包括二硫键。在此过程中,谷胱甘肽转化为其氧化形式,谷胱甘肽二硫醚(GSSG)。一旦被氧化,谷胱甘肽可以通过谷胱甘肽还原酶,使用NADPH作为电子供体还原回来。

[0102]  (XIII)

[0103] 谷胱甘肽敏感性化合物或谷胱甘肽敏感性部分:如本文所用,术语“谷胱甘肽敏感性化合物”或“谷胱甘肽敏感性部分”可互换使用且指含有至少一个谷胱甘肽敏感性键(例如二硫桥或磺酰基团)的任何化学化合物(例如,寡核苷酸,核苷酸或核苷)或部分。如本文所用,“谷胱甘肽敏感性寡核苷酸”是含有至少一个含有谷胱甘肽敏感性键的核苷酸的寡核苷酸。

[0104] 半衰期:如本文所用,术语“血清半衰期”、“血浆半衰期”和“囊泡半衰期”是指由此在特定条件下例如在血清、血浆的存在下或内体或溶酶体囊泡中降解或除去一半量的分子(例如可逆修饰的寡核苷酸)的时间量。

[0105] 卤代:如本文所用,术语“卤代”和“卤素”是可互换的且是指选自氟、氯、溴和碘的原子。

[0106] 卤代烷基:如本文所用,术语“卤代烷基”是指具有一个或多个与其连接的卤素原子的烷基,且通过氯甲基,溴乙基,三氟甲基等的基团例示。

[0107] 杂芳基:如本文所用,术语“杂芳基”是指含有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子的芳族环系统。杂芳基环可与一个或多个杂芳基环、芳族或非芳族烃环或杂环烷基环稠合或以其他方式连接。

[0108] 杂环:如本文所用,术语“杂环”或“杂环基”是指含有一个或多个作为环结构的一部分的杂原子(例如,N,O,S等)且具有3至14个碳原子的非芳族环状(即含环)基团。“被取代的杂环基”或“被取代的杂环”是指进一步带有一个或多个取代基的杂环基团。

[0109] IC_{50}:如本文所用,术语“IC_{50}”是指定量测量,其指示需要多少特定药物或其他物

质(抑制剂)来抑制给定的生物过程(例如mRNA的表达)减半。

[0110] 核苷酸间连接基团:如本文所用,术语“核苷酸间连接基团”或“核苷酸间连接”是指能够共价连接两个核苷部分的化学基团。通常,该化学基团是含磷酸基团或亚磷酸基团的含磷连接基团。磷酸连接基团意在包括磷酸二酯连接,二硫代磷酸酯连接,硫代磷酸酯连接,磷酸三酯连接,硫代烷基膦酸酯(thionoalkylphosphonate)连接,硫代烷基磷酸三酯连接,亚磷酰胺连接,膦酸酯连接和/或硼烷磷酸酯(boranophosphate)连接。许多含磷连接在本领域中是公知的,例如如在美国专利号3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,194,599;5,565,555;5,527,899;5,721,218;5,672,697和5,625,050中公开。在其他实施方案中,寡核苷酸含有一个或多个不含有磷原子的核苷酸间连接基团,例如短链烷基或环烷基核苷酸间连接,混合的杂原子和烷基或环烷基核苷酸间连接,或一个或多个短链杂原子或杂环核苷酸间连接,包括但不限于具有以下主链的那些:硅氧烷主链;硫醚、亚砜和砜主链;富马酰基(formacetyl)和硫代富马酰基主链;亚甲基富马酰基和硫代富马酰基主链;核乙酰基(riboacetyl)主链;含有烯烃的主链;氨基磺酸酯主链;亚甲基亚氨基和亚甲基肼基主链;磺酸酯和磺酰胺主链;和酰胺主链。非含磷连接在本领域中是公知的,例如如在美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,264,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,610,289;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;5,792,608;5,646,269和5,677,439中所公开。

[0111] 环(loop):如本文所用,术语“环”是指由核酸的单链形成的结构,其中在特定单链核苷酸区域侧翼的互补区域以互补区域之间的单链核苷酸区域被从双链体形成或Watson-Crick碱基配对排除的方式杂交。环是任何长度的单链核苷酸区域。环的实例包括存在于诸如发夹和四环的结构中的未配对的核苷酸。

[0112] 微小RNA:如本文所用,术语“微小RNA”“成熟微小RNA”“miRNA”和“miR”是可互换的且是指在植物和动物的基因组中编码的非编码RNA分子。通常,成熟微小RNA的长度为约18-25个核苷酸。在某些情况下,高度保守的内源表达的微小RNA通过与特定mRNA的3’-非翻译区(3’-UTR)结合来调节基因的表达。某些成熟微小RNA似乎来自长的内源性初级微小RNA转录物(也称为pre-微小RNAs,pri-微小RNAs,pri-mirs,pri-miRs或pri-pre-微小RNAs),其长度通常为数百个核苷酸(Lee,等人, EMBO J., 2002, 21(17), 4663-4670)。

[0113] 修饰的核苷:如本文所用,术语“修饰的核苷”是指含有一个或多个修饰的或通用的核碱基或修饰的糖的核苷。修饰的或通用的核碱基(在本文中也称为碱基类似物)通常位于核苷糖部分的1’-位且是指在1’-位的除腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶外的核碱基。在某些实施方案中,修饰的或通用的核碱基是含氮碱基。在某些实施方案中,修饰核碱基不含氮原子。参见例如,美国公开专利申请号20080274462。在某些实施方案中,修饰的核苷酸不含核碱基(无碱基)。修饰的糖(本文也称为糖类似物)包括修饰的脱氧核糖或核糖部分,例如,其中修饰发生在糖的2’-,3’-,4’-或5’-碳位置。修饰的糖还可以包括非天然的备选碳结构,例如在以下中存在的那些:锁定核酸(“LNA”)(参见,例如,Koshkin等人

(1998), Tetrahedron, 54,3607-3630);桥接核酸("BNA")(参见,例如,美国专利号7,427,672和Mitsuoka等人(2009), Nucleic Acids Res., 37(4):1225-38)和解锁核酸("UNA")(参见,例如,Snead等人(2013), Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2,e103(doi: 10.1038/mtna.2013.36))。本文描述在本公开的上下文中合适的修饰的或通用的核碱基或修饰的糖。

[0114] 修饰的核苷酸:如本文所用,术语"修饰的核苷酸"是指含有一个或多个修饰的或通用的核碱基、修饰的糖或修饰的磷酸酯基团的核苷酸。修饰的或通用的核碱基(在本文中也称为碱基类似物)通常位于核苷糖部分的1'-位且是指在1'-位的除腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶外的核碱基。在某些实施方案中,修饰的或通用的核碱基是含氮碱基。在某些实施方案中,修饰的核碱基不含氮原子。参见例如美国公开专利申请号20080274462。在某些实施方案中,修饰的核苷酸不含核碱基(无碱基)。修饰的糖(本文也称为糖类似物)包括修饰的脱氧核糖或核糖部分,例如,其中修饰发生在糖的2'-,3'-,4'-或5'-碳位置。修饰的糖还可以包括非天然的备选碳结构,例如在以下中存在的那些:锁定核酸("LNA")(参见,例如,Koshkin等人(1998), Tetrahedron, 54,3607-3630)、桥接核酸("BNA")(参见,例如,美国专利号7,427,672和Mitsuoka等人(2009), Nucleic Acids Res., 37(4):1225-38)和解锁核酸("UNA")(参见,例如,Snead等人(2013), Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2,e103(doi: 10.1038/mtna.2013.36))。修饰的磷酸酯基团是指天然核苷酸中不存在的磷酸酯基团的修饰且包括如本文所述的非天然存在的磷酸酯模拟物,包括包含磷原子的磷酸酯模拟物和不包含磷酸酯的阴离子磷酸酯模拟物(例如乙酸酯)。修饰的磷酸酯基团还包括非天然存在的核苷酸间连接基团,包括含磷的核苷酸间连接基团和非含磷的连接基团二者,如本文所述。本文描述在本公开的上下文中合适的修饰的或通用的核碱基、修饰的糖或修饰的磷酸酯。

[0115] 裸谷胱甘肽敏感性寡核苷酸:如本文所用,术语"裸谷胱甘肽敏感性寡核苷酸"是指如本文所述的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸,其不配制在保护性脂质纳米颗粒或其他保护性制剂中且因此当体内施用时暴露到血液和内体/溶酶体区室中。

[0116] 天然核苷:如本文所用,术语"天然核苷"是指与糖(例如,脱氧核糖或核糖或其类似物) N-糖苷连接的杂环含氮碱基。天然杂环含氮碱基包括腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,尿嘧啶和胸腺嘧啶。

[0117] 天然核苷酸:如本文所用,术语"天然核苷酸"是指与糖(例如核糖或脱氧核糖或其类似物) N-糖苷连接的杂环含氮碱基,所述糖与磷酸酯基团连接。天然杂环含氮碱基包括腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,尿嘧啶和胸腺嘧啶。

[0118] 核酸抑制剂分子:如本文所用,术语"核酸抑制剂分子"是指降低或消除靶基因的表达的寡核苷酸分子,其中寡核苷酸分子含有特异性靶向靶基因mRNA中的序列的区域。通常,核酸抑制剂分子的靶向区域包含与靶基因mRNA上的序列充分互补的序列,以引导核酸抑制剂分子对指定靶基因的作用。核酸抑制剂分子可包括核糖核苷酸,脱氧核糖核苷酸和/或修饰的核苷酸。

[0119] 核苷:如本文所用,术语"核苷"是指天然核苷酸或修饰的核苷。

[0120] 核苷酸:如本文所用,术语"核苷酸"是指天然核苷酸或修饰的核苷酸。

[0121] 核苷酸位置:如本文所用,术语"核苷酸位置"是指如从在5'-末端的核苷酸计数的

寡核苷酸中的核苷酸的位置。

[0122] 寡核苷酸:如本文所用,如本文所用的术语“寡核苷酸”是指2至2500个核苷酸范围的聚合形式的核苷酸。寡核苷酸可以是单链或双链的。在某些实施方案中,寡核苷酸具有500-1500个核苷酸,通常,例如,其中寡核苷酸用于基因治疗。在某些实施方案中,寡核苷酸是单链或双链的且具有7-100个核苷酸。在另一个实施方案中,寡核苷酸是单链或双链的且具有15-50个核苷酸,通常,例如,其中寡核苷酸是核酸抑制剂分子。在又一个实施方案中,寡核苷酸是单链或双链的且具有19-40或19-25个核苷酸,通常,例如,其中寡核苷酸是双链核酸抑制剂分子且形成至少18-26个碱基对的双链体。在其他实施方案中,寡核苷酸是单链的且具有15-25个核苷酸,通常,例如,其中寡核苷酸核苷酸是单链RNAi抑制剂分子。通常,寡核苷酸含有一个或多个含磷的核苷酸间连接基团,如本文所述。在其他实施方案中,核苷酸间连接基团是如本文所述的非含磷的连接。

[0123] 突出端:如本文所用,术语“突出端”是指双链核酸抑制剂分子的任一链的任一端的末端非碱基配对核苷酸。在某些实施方案中,突出端来自延伸超出互补链末端的一个链或区域,第一链或区域与互补链形成双链体。能够通过碱基对的氢键形成双链体的两个寡核苷酸区域中的一个或两个可具有延伸超出被两个多核苷酸或区域共享的互补的3’-和/或5’-端的5’和/或3’-端。延伸超出双链体的3’-和/或5’-端的单链区域称为突出端。

[0124] 药物组合物:如本文所用,术语“药物组合物”包含药理学有效量的即时可逆修饰的寡核苷酸或其他生物活性剂和药学上可接受的赋形剂。如本文所用,“药理学有效量”“治疗有效量”或“有效量”是指有效产生预期的药理学、治疗或预防结果的本公开的可逆修饰的寡核苷酸或其他活性剂的量。

[0125] 药学上可接受的赋形剂:如本文所用,术语“药学上可接受的赋形剂”是指赋形剂是适合用于人和/或动物使用而没有过度不良副作用(例如毒性,刺激和过敏反应)的与合理的利益/风险比相称的赋形剂。

[0126] 磷酸酯模拟物:如本文所用,术语“磷酸酯模拟物”是指模拟磷酸酯基团的静电和空间性质的化学部分。通常,磷酸酯类似物代替通常易于酶促除去的5’-磷酸酯位于寡核苷酸的5’末端核苷酸处。在一些实施方案中,这些5’-磷酸酯模拟物含有磷酸酶抗性连接。合适的磷酸酯模拟物包括5’-膦酸酯,如5’-亚甲基膦酸酯(5’-MP)和5’-(E)-乙烯基膦酸酯(5’-VP)和与寡核苷酸的5’-末端核苷酸的糖部分(例如,核糖或脱氧核糖或其类似物)的4’-碳结合的4’-磷酸酯类似物,例如4’-氧甲基膦酸酯,4’-硫代甲基膦酸酯或4’-氨基甲基膦酸酯,如美国临时申请号62/393,401中所述,其通过引用整体并入本文。已经为寡核苷酸的5’-端开发的其他修饰(参见,例如,美国专利号8,927,513; Prakash等人 Nucleic Acids Res., 2015,43(6):2993-3011; WO 2011/133871)。

[0127] 亚磷酰胺:如本文所用,术语“亚磷酰胺”是指含有三价磷衍生物的氮。本文描述合适的亚磷酰胺的实例。

[0128] 效力:如本文所用,“效力”是指必须在体内或体外施用以获得针对细胞中预期靶标的特定水平的活性的寡核苷酸或其他药物的量。例如,以1mg/kg的剂量在受试者中抑制其靶标表达90%的寡核苷酸具有比以100mg/kg的剂量在受试者中抑制其靶标表达90%的寡核苷酸更大的效力。

[0129] 保护基团:如本文所用,术语“保护基团”在常规化学意义上用作在所需反应的某

些条件下可逆地使官能团不反应的基团。在所需反应后，可以除去保护基团以使保护的官能团脱保护。所有保护基团应在不降解大比例的被 合成分子的条件下可除去。

[0130] 核糖核苷酸：如本文所用，术语“核糖核苷酸”是指天然或修饰的核苷酸，其在糖部分的2’-位具有羟基。

[0131] 核酶：如本文所用，术语“核酶”是指特异性识别和裂解不同靶核酸序列(其可以是DNA或RNA)的催化核酸分子。每种核酶具有催化组分(也称为“催化域”)和由两个结合域组成的靶序列结合组分，在催化域的每侧一个。

[0132] RNAi抑制剂分子：如本文所用，术语“RNAi抑制剂分子”是指：(a) 具有正义链(过客)和反义链(引导)的双链核酸抑制剂分子(“dsRNAi抑制剂分子”)，其中反义链或反义链的一部分被Argonaute 2(Ago2)内切核酸酶用于裂解靶mRNA；或(b) 具有单一反义链的单链核酸抑制剂分子(“ssRNAi抑制剂分子”)，其中反义链(或该反义链的一部分)被Ago2内切核酸酶用于裂解靶mRNA。

[0133] 正义链：双链RNAi抑制剂分子包含两个寡核苷酸链：反义链和正义链。正义链或其区域与双链RNAi抑制剂分子的反义链或其区域部分、基本上或完全互补。在某些实施方案中，正义链还可含有与反义链非互补的核苷酸。非互补核苷酸可以在互补序列的任一侧，或可以在互补序列的两侧。在某些实施方案中，当正义链或其区域与反义链或其区域部分或基本上互补时，非互补核苷酸可位于一个或多个互补区域之间(例如，一个或多个错配)。正义链也称为过客链(Passenger strand)。

[0134] 固体载体：如本文所用，“固体载体”是指化学化合物如寡核苷酸可连接到的非液体且非气体物质。该术语包括多种材料，包括但不限于凝胶，树脂，珠，塑料，玻璃，硅，金属和纤维素。

[0135] 间隔基：如本文所用，术语“间隔基”是指将配体偶联到寡核苷酸、核苷酸或核苷的分子。间隔基包括但不限于-$(CH_2)_n$-，-$(CH_2)_n$N-，-$CH_2)_n$O-，-$(CH_2)_n$S-，O$(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$(例如，n=3或6)，碳水化合物，肽，酰胺，羧基，胺，氧胺，氧亚胺，硫醚，二硫醚，硫脲，磺酰胺，吗啉代或生物素。

[0136] 取代基或被取代的：本文所用的术语“取代基”或“被取代的”是指用取代基基团置换给定结构中的氢基团。当任何给定结构中的多于一个位置可以被多于一个取代基取代时，除非另有说明，取代基在每个位置可以相同或不同。如本文所用，术语“被取代的”预期包括与有机化合物相容的所有允许的取代基。允许的取代基包括有机化合物的无环和环状，分支和未分支，碳环和杂环，芳族和非芳族取代基。本公开不旨在以任何方式受有机化合物的允许取代基限制。

[0137] 磺酰基：如本文所用，术语“磺酰基”是指含有二价基团-SO_2-的化学化合物。在某些实施方案中，硫原子与两个碳原子和两个氧原子共价结合。在其他实施方案中，硫原子与碳原子、氮原子和两个氧原子共价结合。

[0138] 全身施用：如本文所用，术语“全身施用”是指血流中的药物的体内全身吸收或积累，随后分布在整个身体中。

[0139] 靶位点：如本文所用，术语“靶位点”，“靶序列”，“靶核酸”，“靶区域”，“靶基因”可互换使用且是指“靶向”的RNA或DNA序列，例如，用于由RNAi分子介导的裂解，所述RNAi分子在其引导/反义区域内含有与该靶序列部分、基本上或完全或充分互补的序列。

[0140] 四环(tetraloop):如本文所用,术语“四环”是指形成稳定二级结构的环(单链区域),其有助于相邻Watson-Crick杂交核苷酸的稳定性。不受理论限制,四环可以通过堆叠相互作用稳定相邻的Watson-Crick碱基对。此外,四环中核苷酸之间的相互作用包括但不限于非Watson-Crick碱基配对、堆积相互作用、氢键和接触相互作用(Cheong等人, Nature, 1990,346(6285):680-2;Heus and Pardi, Science, 1991,253(5016):191-4)。四环赋予相邻双链体的熔化温度(Tm)的增加,其高于由随机碱基组成的简单模型环序列的预期Tm。例如,四环可以向包含长度为至少2个碱基对的双链体的发夹赋予在10mM NaHPO4中的至少50℃,至少55℃,至少56℃,至少58℃,至少60℃,至少65℃或至少75℃的熔化温度。四环可含有核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、修饰的核苷酸及其组合。在某些实施方案中,四环由四个核苷酸组成。在某些实施方案中,四环由五个核苷酸组成。

[0141] RNA四环的实例包括四环的UNCG家族(例如UUCG)、四环的GNRA家族(例如GAAA)和CUUG四环(Woese等人, PNAS, 1990,87(21):8467-71;Antao等人, Nucleic Acids Res., 1991,19(21):5901-5)。DNA四环的实例包括四环的d(GNNA)家族(例如d(GTTA)),四环的d(GNRA)家族,四环的d(GNAB)家族,四环的d(CNNG)家族,和四环的d(TNCG)家族(例如,d(TTCG))。(Nakano等人 Biochemistry, 2002,41(48):14281-14292. Shinji等人, Nippon Kagakkai Koen Yokoshu, 2000,78(2):731)。

[0142] I. 导言

[0143] 本申请提供各种新的谷胱甘肽敏感性核苷酸和核苷,其可以掺入到任何感兴趣的寡核苷酸,包括但不限于核酸抑制剂分子例如dsRNAi、反义、miRNA和ssRNAi剂,以及提供使用谷胱甘肽敏感性核酸抑制剂分子来调节靶基因的表达和治疗有此需要的患者的方法。根据本申请的公开内容可以用一个或多个谷胱甘肽敏感性部分可逆修饰的其他寡核苷酸包括但不限于成簇规则间隔的短回文重复序列(CRISPR)核酸,用于基因治疗的核酸,用于DNA编辑的核酸,和探针。

[0144] 可逆修饰的寡核苷酸包含一个或多个具有谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸,通常在糖部分的2'-碳处。寡核苷酸中的一个或多个谷胱甘肽敏感性核苷酸有助于在运送通过血液和细胞的溶酶体/内体区室期间稳定寡核苷酸并保护寡核苷酸免受体内施用期间遇到的核酸酶和其他环境条件(例如pH)损害。与用于保护治疗性寡核苷酸的不可逆方法不同,当寡核苷酸到达细胞的细胞溶质的还原性环境时,从寡核苷酸中除去本文公开的可逆的谷胱甘肽敏感性修饰。在某些实施方案中,在2'-碳除去谷胱甘肽敏感性部分在2'-碳留下羟基,其是在该位置的核糖核苷酸的天然取代基。结果,当它们到达细胞的细胞溶质时,可逆修饰的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸可以进行其预期的生物活动,而没有来自可逆的谷胱甘肽敏感性部分(在细胞溶质中被除去)的任何干扰。本申请中公开的可逆的谷胱甘肽敏感性修饰表示合成寡核苷酸的强有力的新工具,其可用于代替不可逆修饰或与不可逆修饰组合以产生在细胞的细胞溶质内具有增强的生物活性的稳定寡核苷酸。

[0145] 此外,本文公开的谷胱甘肽敏感性核苷亚磷酰胺与常规固相合成相容。因此,可以使用常规的基于亚磷酰胺的合成方法合成本发明的可逆修饰的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸。使用该合成方法,可以选择将谷胱甘肽敏感性核苷酸掺入寡核苷酸中的核苷酸位置。由于可能需要修饰寡核苷酸中的特定核苷酸位置,该发现促进在感兴趣的特定核苷酸位置具有可逆修饰的寡核苷酸的合理设计。

[0146] 本申请还提供可用作治疗剂(例如抗病毒剂或抗癌剂)的谷胱甘肽敏感性核苷酸和核苷。

[0147] II．谷胱甘肽敏感性寡核苷酸

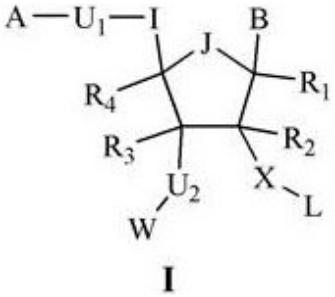
[0148] 本公开的一个方面涉及包含至少一个谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸。通常，谷胱甘肽敏感性部分与核苷酸的糖部分例如脱氧核糖或核糖(或其类似物)连接。通常，谷胱甘肽敏感性部分位于脱氧核糖或核糖(或其类似物)的2'-碳。在一些实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分位于核糖或脱氧核糖(或其类似物)的5'-碳，特别是当修饰的核苷酸是寡核苷酸的5'-末端核苷酸时。在其他实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分位于核糖或脱氧核糖(或其类似物)的3'-碳，特别是当修饰的核苷酸是寡核苷酸的3'-末端核苷酸时。

[0149] 在一些实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分包含磺酰基。在其他实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分包含二硫桥。

[0150] 在某些实施方案中，寡核苷酸包含至少一个核苷酸，其具有与氧原子共价结合的谷胱甘肽敏感性部分，所述氧原子与核苷酸的糖部分(例如核糖)的2'-碳共价结合。在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分由式II、III或IV表示。在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分由式IIa，IIIa，IIIb，IIIa(i)，IIIb(i)，IVa，IVb，IVc，IVd，IVe，IVa(i)，IVb(i)，IVb(ii)，IVc(i)，IVd(i)，IVe(i)，IVe(ii)，IVe(iii)，IVe(iv)，IVe(v)，IVe(vi)，IVe(vii)，IVe(viii)，IVe(ix)，IVe(x)，或IVe(xi)表示。

[0151] 1．式I

[0152] 在一个实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由式I表示的核苷酸：

[0153] 

I

[0154] 其中X是O、S、Se或NR′，其中R′选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基、被取代或未被取代的杂芳基或被取代或未被取代的杂环；

[0155] 其中R_1、R_2、R_3和R_4各自独立地选自氢、卤素、OH、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基，或其中R_1、R_2、R_3和R_4中的两个一起形成5-8元环，其中所述环任选地含有杂原子；

[0156] 其中J是O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″中的每一个独立地选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基或杂芳基；

[0157] 其中B选自氢、天然核碱基、修饰核碱基或通用核碱基；

[0158] 其中U_2是不存在的或选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或被取代或未被取代的环烷基；

[0159] 其中W是氢、磷酸酯基团、将至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团、卤素、OR′、SR′、NR′R″、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环，其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基、杂芳基、杂环

或一起形成杂环；

[0160] 其中I是不存在的或选自O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环和被取代或未被取代的环烷基；

[0161] 其中U_1是不存在的、氢、将至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团、或选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环和被取代或未被取代的环烷基，且其中U_1或W中的至少一个是将至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团，条件是如果U_1是核苷酸间连接基团，则A是不存在的；

[0162] 其中I和U_1可以组合以形成CR′-CR″烷基、CR′-CR″烯基、CR′-CR″炔基、被取代或未被取代的脂族、芳基、杂芳基、杂环或一起形成环烷基或杂环；

[0163] 其中A是不存在的、氢、磷酸酯基团、磷酸酯模拟物或氨基磷酸酯；和

[0164] 其中L是选自如下所述的式II、III或IV的谷胱甘肽敏感性部分。

[0165] 在某些实施方案中，X是O。

[0166] 在某些实施方案中，R_1、R_2、R_3和R_4是氢。

[0167] 在某些实施方案中，J是O。

[0168] 在某些实施方案中，B是天然核碱基。

[0169] 在某些实施方案中，U_2是不存在的或O。

[0170] 在某些实施方案中，W是氢，磷酸酯基团，将至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团。通常，W是将至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团。

[0171] 在某些实施方案中，I是CH_2。

[0172] 在某些实施方案中，U_1是氢或将至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团。通常，U_1是将至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团且A是不存在的。

[0173] 在某些实施方案中，A是不存在的、磷酸酯基团或磷酸酯模拟物。在一些实施方案中，所述磷酸酯基团是单磷酸酯、二磷酸酯或三磷酸酯。在一些实施方案中，所述磷酸酯模拟物是乙烯基膦酸酯，5′-亚甲基膦酸酯，或4′-氧基甲基膦酸酯。

[0174] 在某些实施方案中，A是氢且U_1是O。

[0175] 在某些实施方案中，X是O，R_1、R_2、R_3和R_4是氢，且J是O。在某些实施方案中，X是O；R_1、R_2、R_3和R_4是氢；J是O；B是天然核碱基；U_2是不存在的或O；A是不存在的；I是CH_2；W是氢，磷酸酯基团，或将至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团；和U_1是氢或将至少一个由式I表示的核苷酸与核苷酸或寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团，其中U_1或W中的至少一个是至少一个由式I表示的核苷酸与寡核苷酸连接的核苷酸间连接基团。

[0176] 在某些实施方案中，含有至少一个式I的核苷酸的寡核苷酸具有2-2500个核苷酸。在某些实施方案中，式I的寡核苷酸具有500-1500个核苷酸。在某些实施方案中，含有至少一个式I的核苷酸的寡核苷酸具有7-100个核苷酸。在另一个实施方案中，含有至少一个式I

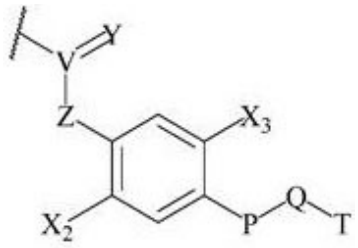
的核苷酸的寡核苷酸具有15-50个核苷酸。在又一个实施方案中，含有至少一个式I的核苷酸的寡核苷酸具有19-25个核苷酸。

[0177] 在某些实施方案中，含有至少一个式I的核苷酸的寡核苷酸是核酸抑制剂分子，如在整个申请中进一步详细地讨论。在其他实施方案中，含有至少一个式I的核苷酸的寡核苷酸是CRISPR核酸，用于基因治疗的核酸，用于DNA编辑的核酸，探针，或易于被核酸酶和/或恶劣的环境条件(例如，pH)降解的任何其他寡核苷酸，包括要在体内施用的其他寡核苷酸。

[0178] 在某些实施方案中，所述核酸抑制剂分子中的至少一个核苷酸的糖部分的环结构是被修饰的，且包括例如锁定核酸(“LNA”)结构、桥接核酸(“BNA”)结构和解锁核酸(“UNA”)结构，如前文讨论。

[0179] a. 谷胱甘肽敏感性部分-式II

[0180] 如上讨论，所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由式I表示的核苷酸，其中所述谷胱甘肽敏感性部分选自式II、III或IV。在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由如下式II表示：

[0181] 

II

[0182] 其中Y是O、S、Se或NR′，其中R′选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环；

[0183] 其中Z选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环，或R′和R″一起形成杂环；

[0184] 其中V是C或SO；

[0185] 其中X_2和X_3独立地选自氢、卤素、硝基、氨基、酰基、被取代或未被取代的脂族、OR_{10}、COR_{10}、CO_2R_{10}、NQ_1Q_2；其中R_{10}独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被羟基或烷氧基取代的脂族、芳基脂族、被羟基或烷氧基取代的芳基或被烷氧基取代的杂环基；

[0186] 其中P和Q一起形成二硫桥或磺酰基；和

[0187] 其中T是被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由间隔基连接到P或Q的配体。

[0188] 在某些实施方案中，所述二硫桥或所述磺酰基在细胞溶质中通过谷胱甘肽在至少约7.5的pH下可裂解。

[0189] 在一些实施方案中，Y是O、S或NH。通常，Y是O。

[0190] 在一些实施方案中，Z是O、S或NR′。通常，Z是NH。

[0191] 在一些实施方案中，V是SO。通常，V是C。

[0192] 在一些实施方案中，X_2和X_3独立地选自氢、卤素、硝基、氨基或酰基或C_3-C_6分支或未分支的烷基。通常，X_2和X_3独立地选自氢、卤素、硝基或氨基。

[0193] 通常,P和Q一起形成二硫键。

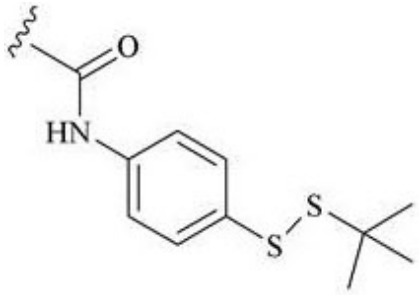
[0194] 在一些实施方案中,T是C_3-C_6分支或未分支的烷基或T是任选地经由间隔基连接到P或Q的配体。通常,T是C_4分支烷基。

[0195] 在某些实施方案中,具有式II的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有2-2500个核苷酸。在某些实施方案中,具有式II的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有500-1500个核苷酸。在某些实施方案中,具有式II的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有7-100个核苷酸。在另一个实施方案中,具有式II的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有15-50个核苷酸。在又一个实施方案中,具有式II的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有19-25个核苷酸。

[0196] 在某些实施方案中,具有式II的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸是核酸抑制剂分子,如在整个申请中进一步详细地讨论。在其他实施方案中,具有式II的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸是CRISPR核酸,用于基因治疗的核酸,用于DNA编辑的核酸,探针,或易于被核酸酶和/或恶劣的环境条件(例如,pH)降解的任何其他寡核苷酸,包括要在体内施用的其他寡核苷酸。

[0197] i.式IIa

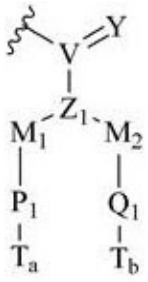
[0198] 在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分由下式表示:

[0199] 

IIa

[0200] b.谷胱甘肽敏感性部分-式III

[0201] 在包含至少一个由式I表示的核苷酸的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的其他实施方案中,谷胱甘肽敏感性部分由如下式III表示:

[0202] 

III

[0203] 其中Y是O、S、Se或NR′,其中R′选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或被取代或未被取代的杂环;

[0204] 其中Z_1是N或CR′,其中R′选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环;

[0205] 其中V是C或SO;

[0206] 其中M_1和M_2各自独立地选自被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳族、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基；

[0207] 其中P_1和Q_1一起形成二硫桥或磺酰基或其中P_1和Q_1各自独立地是二硫桥或磺酰基；

[0208] 其中当P_1和Q_1形成二硫桥时，M_1、M_2、P_1和Q_1可以形成4-9元环，其中所述环可以是被取代或未被取代的芳族、被取代或未被取代的环烷基，其中所述芳族或环烷基环可以任选地含有杂原子；和

[0209] 其中T_a和T_b各自独立地是不存在的或选自CH_3、被取代或被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或任选地经由任何间隔基连接到P_1或Q_1的配体。

[0210] 在一些实施方案中，M_1、M_2、P_1和Q_1一起形成含有被烷氧基取代的芳基脂族、被烷氧基取代的杂芳基或被烷氧基取代的杂环基的5-8元环。

[0211] 在一些实施方案中，Y是O、S或NH。通常，Y是O。

[0212] 在一些实施方案中，Z_1是N或CH。通常，Z_1是N。

[0213] 在一些实施方案中，V是SO。通常，V是C。

[0214] 在一些实施方案中，M_1和M_2各自独立地选自被取代或未被取代的脂族；或M_1、M_2、P_1和Q_1一起形成4-9元环，其中所述环是被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环。通常，M_1和M_2是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基或与P_1和Q_1一起形成5-8元环，其中所述环是被取代或未被取代的环烷基。

[0215] 在一些实施方案中，P_1和Q_1一起形成二硫桥或磺酰基。通常，P_1和Q_1一起形成二硫桥。在一些实施方案中，二硫桥或磺酰基在细胞溶质中通过谷胱甘肽在至少约7.5的pH下可裂解。

[0216] 在一些实施方案中，T_a和T_b是不存在的或各自独立地是不存在的或选自CH_3、分支或未分支的C_3-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或任选地经由任何间隔基连接到P_1或Q_1的配体。通常，T_a和T_b是不存在的、支链的C_3-C_6烷基或经由任何间隔基连接到P_1或Q_1的配体。

[0217] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由式III表示，其中Y是O、S或NH；Z_1是N；V是C；M_1和M_2各自独立地选自被取代或未被取代的脂族，被取代或未被取代的芳族，被取代或未被取代的杂芳基；或M_1、M_2、P_1和Q_1一起形成4-9元环，其中所述环是被取代或未被取代的芳族、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环或被取代或未被取代的杂芳基；P_1和Q_1一起形成二硫桥；和T_a和T_b是不存在的或任选地经由任何间隔基连接到P_1或Q_1的配体。

[0218] 通常，所述谷胱甘肽敏感性部分由式III表示，其中Y是O、S或NH；Z_1是N；V是C；M_1、M_2、P_1和Q_1一起形成5-8元环，其中所述环是被取代或未被取代的芳族环或被取代或未被取代的环烷基，其中所述芳族环或环烷基可以任选地含有任何杂原子；P_1和Q_1一起形成二硫桥；和T_a和T_b是不存在的或任选地经由任何间隔基连接到P_1或Q_1的配体。

[0219] 更通常，所述谷胱甘肽敏感性部分由式III表示，其中Y是O、S或NH；Z_1是N；V是C；M_1、M_2、P_1和Q_1一起形成7元环，其中所述环是被取代或未被取代的环烷基；P_1和Q_1一起形成二硫桥；和T_a和T_b是不存在的。

[0220] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由式III表示，其中Y是O、S或NH；Z_1是N；V是C；M_1和M_2各自独立地选自被取代或未被取代的脂族，被取代或未被取代的芳族，被取代或未被取代的杂芳基；P_1和Q_1各自独立地是二硫桥；和T_a和T_b选自CH_3、被取代或被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或任选地经由任何间隔基连接到P_1或Q_1的配体。

[0221] 更通常，所述谷胱甘肽敏感性部分由式III表示，其中Y是O、S或NH；Z_1是N；V是C；M_1和M_2是被取代或未被取代的脂族；P_1和Q_1各自独立地是二硫桥；和T_a和T_b各自独立地选自CH_3、被取代或被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或任选地经由任何间隔基连接到P_1或Q_1的配体。

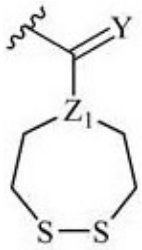
[0222] 还甚至更通常，所述谷胱甘肽敏感性部分由式III表示，其中Y是O、S或NH；Z_1是N；V是C；M_1和M_2是被取代或未被取代的脂族；P_1和Q_1各自独立地是二硫桥；和T_a和T_b各自独立地是不存在的或选自CH_3、分支或未分支的C_3-C_6烷基或任选地经由任何间隔基连接到P_1或Q_1的配体。

[0223] 在某些实施方案中，具有式III的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有2-2500个核苷酸。在某些实施方案中，具有式III的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有500-1500个核苷酸。在某些实施方案中，具有式III的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有7-100个核苷酸。在另一个实施方案中，具有式III的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有15-50个核苷酸。在又一个实施方案中，具有式III的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有19-25个核苷酸。

[0224] 在某些实施方案中，具有式III的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸是核酸抑制剂分子，如在整个申请中进一步详细地讨论。在其他实施方案中，具有式III的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸是CRISPR核酸，用于基因治疗的核酸，用于DNA编辑的核酸，探针，或易于被核酸酶和/或恶劣环境条件(例如，pH)降解的任何其他寡核苷酸，包括要在体内施用的其他寡核苷酸。

[0225] i.式IIIa

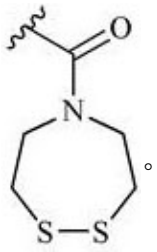
[0226] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由下式表示：

[0227] 

IIIa

[0228] 其中Y是O、S或NH；Z_1是N或CR′，其中R′选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环。

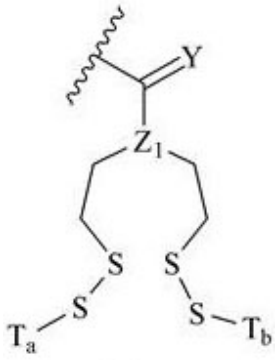
[0229] 更通常，所述谷胱甘肽敏感性部分由下式表示：

[0230] 。

IIIa(i)

[0231] ii.式IIIb

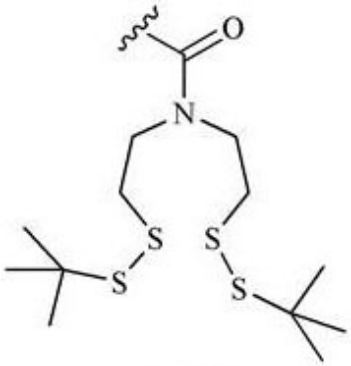
[0232] 在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分由下式表示:

[0233] 

IIIb

[0234] 其中Y是O、S或NH;Z_1是N或CR′,其中R′选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环;和T_a和T_b各自独立地是不存在的或选自CH_3、被取代或被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或任选地经由任何间隔基连接到硫原子的配体。

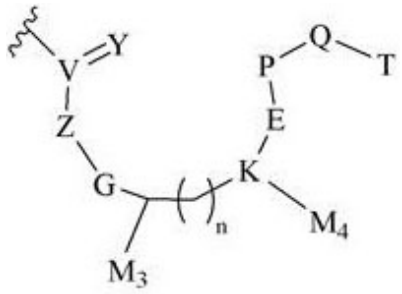
[0235] 更通常,所述谷胱甘肽敏感性部分由下式表示:

[0236] 

IIIb(i)

[0237] c.谷胱甘肽敏感性部分-式IV

[0238] 在包含至少一个由式I表示的核苷酸的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的另外其他实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分由如下式IV表示:

[0239] 

IV

[0240] 其中Y是O、S、Se或NR′，其中R′选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环；

[0241] 其中Z选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环，或R′和R″一起形成杂环；

[0242] 其中V是C或SO；

[0243] 其中G和E可以各自独立地不存在，或选自CH_2、CHR′、CR′R″、NH或NR′，其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或R′和R″一起形成杂环；

[0244] 其中M_3和M_4可以一起形成4-9元环，其中所述环可以是被取代或未被取代的芳族、被取代或未被取代的环烷基，其中所述芳族或环烷基环可以任选地含有杂原子，或M_3和M_4各自独立地选自氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳族、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基或COOR，其中R选自氢，CH_3，或被取代或未被取代的脂族；

[0245] 其中K是C、CH或被取代或未被取代的脂族；

[0246] 其中n是0 - 5；

[0247] 其中P和Q一起形成二硫桥或磺酰基；和

[0248] 其中T是被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T可以是任选地经由任何间隔基连接到P或Q的配体。

[0249] 在一些实施方案中，Y是O、S或NH。通常，Y是O。

[0250] 在一些实施方案中，Z是O、S、NH、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地选自氢，CH_3，或被取代或未被取代的脂族。在某些实施方案中，Z是NH或N-CH_3

[0251] 在一些实施方案中，V是SO。通常，V是C。

[0252] 在一些实施方案中，M_3和M_4各自独立地选自氢或被取代或未被取代的脂族，例如C_2-C_6烷基；或M_3和M_4一起形成4-9元环，其中所述环是被取代或未被取代的环烷基或被取代或未被取代的杂环。通常，M_3和M_4独立地是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基或一起形成5-8元环，其中所述环是被取代或未被取代的环烷基。

[0253] 在一些实施方案中，G是不存在的、CH_2或CHR′，其中R′是被取代或未被取代的脂族。通常，G是不存在的或CH_2。

[0254] 在一些实施方案中，E是不存在的，NH，NR′，CH_2，或CHR′，其中R′是被取代或未被取代的脂族。通常，E是不存在的，NH，或CH_2。

[0255] 在一些实施方案中，G和E不存在。

[0256] 在一些实施方案中,K是C,或CH。通常,K是CH。

[0257] 在一些实施方案中,n是0。

[0258] 在一些实施方案中,P和Q一起形成二硫桥或磺酰基。通常,P和Q一起形成二硫桥。在一些实施方案中,二硫桥或磺酰基在细胞溶质中通过谷胱甘肽在至少约7.5的pH下可裂解。

[0259] 在一些实施方案中,T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由任何间隔基连接到P或Q的配体。通常,T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基或任选地经由任何间隔基连接到P或Q的配体。

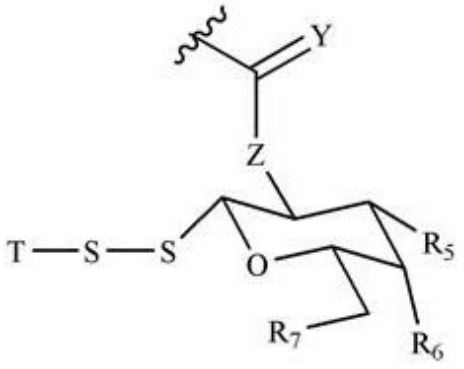
[0260] 在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分由式IV表示,其中Y是O、S、NH;其中Z是O,S,NH,或NCH_3;V是C;G是CH_2且E是不存在的,或G是不存在的且E是CH_2;M_3和M_4一起形成5-8元环,其中所述环是被杂原子取代的环烷基或未被取代的环烷基,或M_3和M_4各自独立地是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基;K是CH;n是0;P和Q一起形成二硫桥;T是CH_3、被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由任何间隔基连接到P或Q的配体。

[0261] 在某些实施方案中,具有式IV的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有2-2500个核苷酸。在某些实施方案中,具有式IV的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有500-1500个核苷酸。在某些实施方案中,具有式IV的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有7-100个核苷酸。在另一个实施方案中,具有式IV的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有15-50个核苷酸。在又一个实施方案中,具有式IV的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸具有19-25个核苷酸。

[0262] 在某些实施方案中,具有式IV的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸是核酸抑制剂分子,如在整个申请中进一步详细地讨论。在其他实施方案中,具有式IV的谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸是CRISPR核酸,用于基因治疗的核酸,用于DNA编辑的核酸,探针,或易于被核酸酶和/或恶劣环境条件(例如,pH)降解的任何其他寡核苷酸,包括要在体内施用的其他寡核苷酸。

[0263] i.式IVa

[0264] 在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分可以通过下式表示:

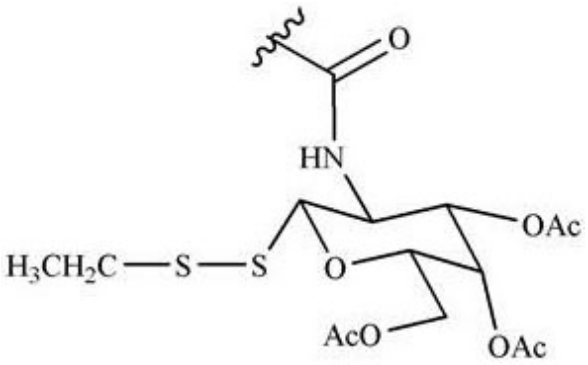
[0265] 

IVa

[0266] 其中Y是O、S、NH;其中Z是O、S或NH,其中R_5、R_6和R_7各自独立地选自O酰基、NHR′、NR′或CR′R″,其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、被取代的脂族或未被取代的脂族、芳基、杂芳基、杂环基,或可以一起形成杂环;和;

[0267] 其中T是分支或未分支的C_2-C_6烷基或任选地经由任何间隔基连接到硫原子的配体。

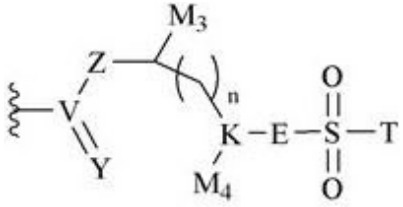
[0268] 例如,所述谷胱甘肽敏感性部分可以通过下式表示:

[0269] 

IVa(i)

[0270] ii.式IVb

[0271] 在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分可以通过下式表示:

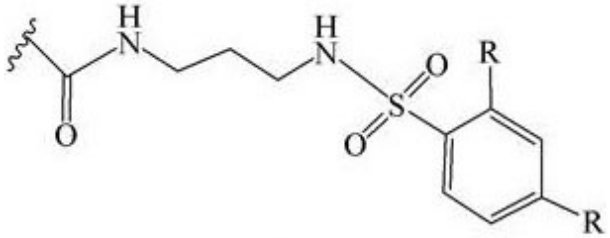
[0272] 

IVb

[0273] 其中Y是O、S、NH;Z是O、S或NH;V是C;M_3和M_4是氢;K是CH或被取代或未被取代的脂族;E是NH或NR′,其中R′是被取代或未被取代的脂族;n是0-5;T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由任何间隔基连接的配体。

[0274] 在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分由式IVb表示,其中Y是O,Z是NH;V是C;M_3和M_4是氢;K是CH;E是NH;n是1;P和Q一起形成磺酰基;和T是被取代的芳基。

[0275] 例如,所述谷胱甘肽敏感性部分可以通过下式表示:

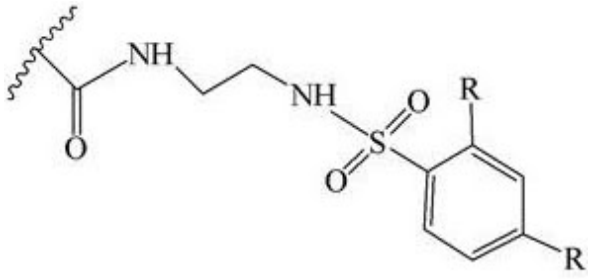
[0276] 

IVb(i)

[0277] 其中R选自氢,CH_3,NO_2,被取代或未被取代的脂族,芳基,杂芳基,环烷基或杂环或R是任选地经由任何间隔基连接的靶向配体。

[0278] 在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分由式IVb表示,其中Y是O,Z是NH;V是C;M_3和M_4是氢;K是CH;E是NH;n是0;P和Q一起形成磺酰基;和T是被取代的芳基。

[0279] 例如,所述谷胱甘肽敏感性部分可以通过下式表示:

[0280] 

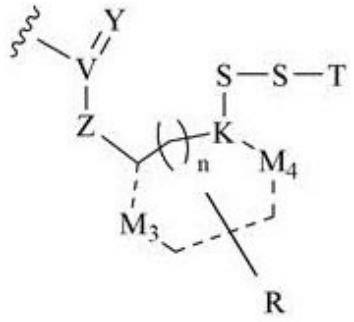
IVb(ii)

[0281] 其中R选自氢，CH_3，NO_2，被取代或未被取代的脂族，芳基，杂芳基，环烷基或杂环或R是任选地经由任何间隔基连接的靶向配体。在某些实施方案中，R是氢。

[0282] iii. 式IVc

[0283] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由式IV表示，其中Y是O、S、NH；Z选自O、S或NR′，其中R′选自氢、卤素、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环；G和E不存在；V是C；M_3和M_4一起形成5-8元环，其中所述环是被取代或未被取代的环烷基，任选地被杂原子取代；K是CH；n是0-5；P和Q一起形成二硫桥；T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由任何间隔基连接的配体。通常，Y是O且Z是NH或NCH_3。

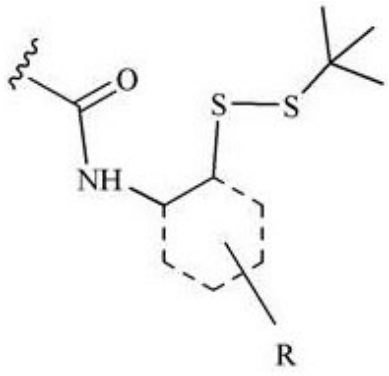
[0284] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由下式表示：

[0285] 

IVc

[0286] 其中Y是O、S、NH；Z选自O、S或NR′，其中R′选自氢、卤素、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环；V是C；M_3和M_4一起形成5-8元环，其中所述环是被取代或未被取代的环烷基，任选地被杂原子取代；K是分支或未分支的被取代或未被取代的C_2-C_6烷基；n是0或1；T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由任何间隔基连接的配体；其中R选自氢、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基或被取代或未被取代的杂环或R是任选地经由任何间隔基连接的靶向配体。通常，Y是O且Z是NH或NCH_3。

[0287] 例如，所述谷胱甘肽敏感性部分可以通过下式表示：

[0288] 

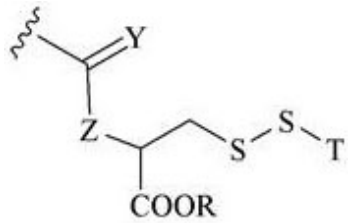
IVc(i)

[0289] 其中R选自氢、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基或被取代或未被取代的杂环或R是任选地经由任何间隔基连接的靶向配体。

[0290] iv.式IVd

[0291] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由式IV表示，其中Y是O、S、NH；其中Z选自O、S或NR′，其中R′选自氢、卤素、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环；V是C；G和E不存在；M_3是COOR，其中R选自氢、CH_3或被取代或未被取代的C_2-C_6烷基；M_4是氢；K是CH；n是0；P和Q一起形成二硫桥；T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由任何间隔基连接到P或Q的配体。通常，Y是O且Z是NH或NCH_3。

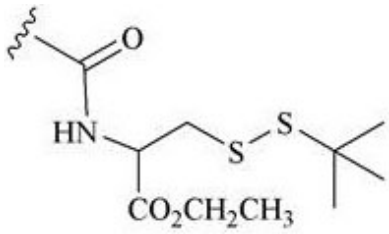
[0292] 在一个实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由下式表示：

[0293] 

IVd

[0294] 其中Y是O、S、NH；Z是O、S、NH或NCH_3；T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由任何间隔基连接的配体；和R选自氢、CH_3或被取代或未被取代的C_2-C_6烷基。

[0295] 例如，所述谷胱甘肽敏感性部分可以通过下式表示：

[0296] 

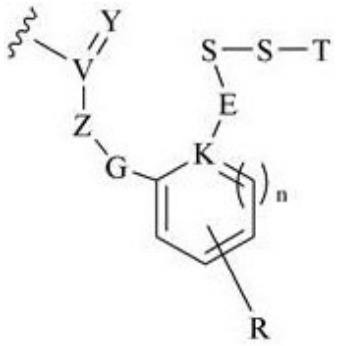
IVd(i)

[0297] v.式IVe

[0298] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由式IV表示，其中Y是O、S、NH；Z选自

O、S或NR′，其中R′选自氢、卤素、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环；V是C或SO；n是0；M_3和M_4一起形成4-9元环，其中所述环是被取代或未被取代的芳基；K是C，CH，N，NH，或分支或未分支的被取代或未被取代的C_2-C_6烷基；T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由任何间隔基连接的配体。通常，Y是O且Z是NH或NCH_3。

[0299] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由下式表示：

[0300] 

IVe

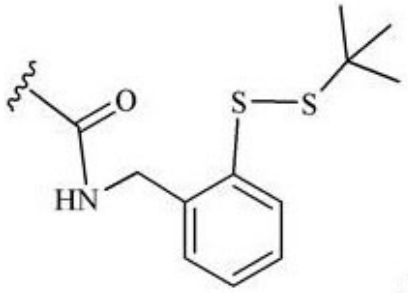
[0301] 其中Y是O、S、NH；Z选自O、S或NR′，其中R′选自氢、卤素、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环；V是C或SO；G和E可以各自独立地不存在，或选自CH_2、CHR′、CR′R″、NH、NR′，其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或R′和R″一起形成杂环；K是C或CH；n是0-5；T是被取代或未被取代的C_2-C_6烷基、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基或T是任选地经由任何间隔基连接的配体；和其中R选自氢、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基或被取代或未被取代的杂环或R是任选地经由任何间隔基连接的靶向配体。

[0302] 在某些实施方案中，Z是NR′，其中R′是氢，CH_3，或被取代或未被取代的脂族。通常，Z是NH或NCH_3。在某些实施方案中，Z是S。

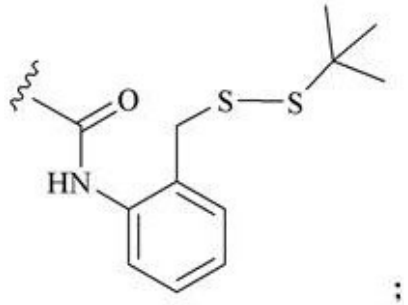
[0303] 在某些实施方案中，Y是O、S或NH且V是C。在一个实施方案中，V是SO且Y是O。

[0304] 在某些实施方案中，G和E中的一个或两个是不存在的、CH_2或CR′R″，其中R′和R″独立地选自氢或被取代或未被取代的脂族。在某些实施方案中，G和E都不存在，或G是CH_2且E是不存在的，或G是不存在的且E是CH_2或支化烷基。

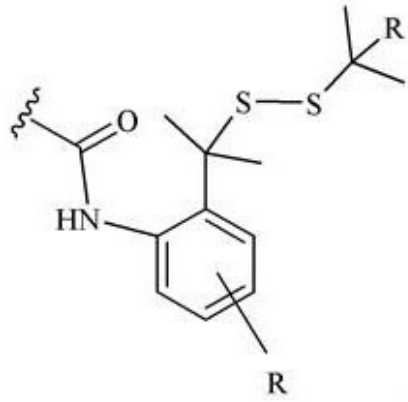
[0305] 例如，所述谷胱甘肽敏感性部分可以通过下式之一表示：

[0306] 

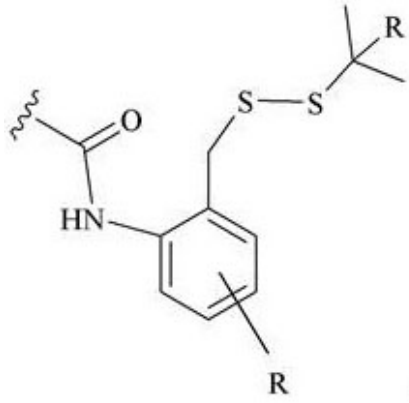
IVe(i)

[0307] 

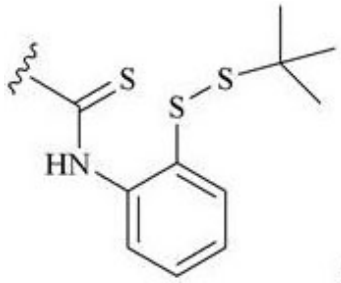
IVe(ii)

[0308] 

IVe(iii)

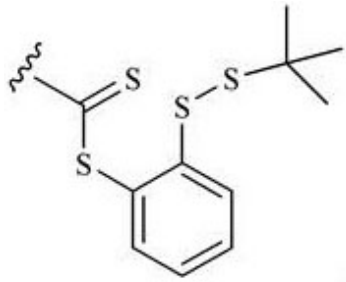
[0309] 

IVe(iv)

[0310] 

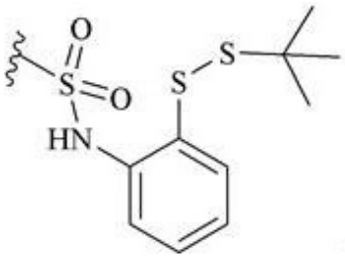
;

IVe(v)

[0311] 

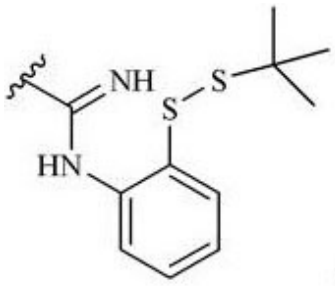
;

IVe(vi)

[0312] 

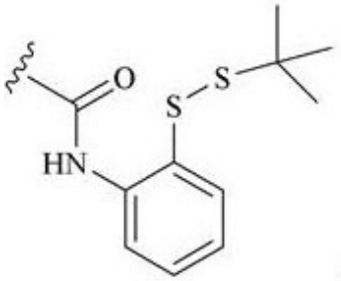
;

IVe(vii)

[0313] 

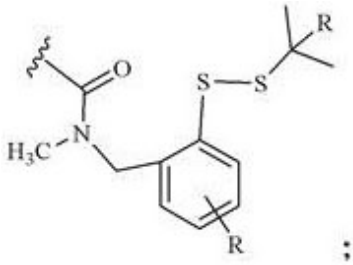
;

IVe(viii)

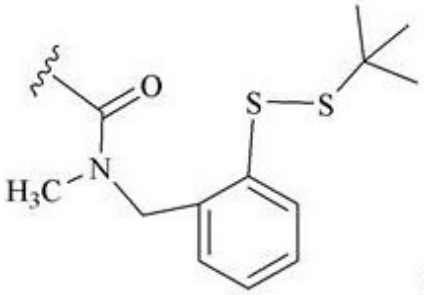
[0314] 

;

IVe(ix)

[0315]  ；或

IVe(x)

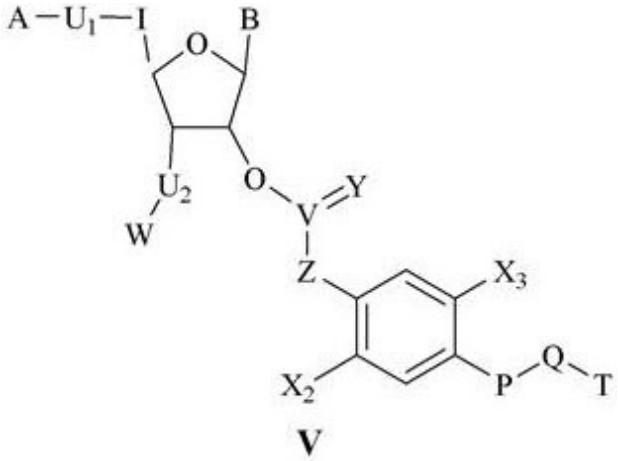
[0316]  ；

IVe(xi)

[0317] 其中R选自氢、CH_3、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基或被取代或未被取代的杂环或R是任选地经由任何间隔基连接的靶向配体。

[0318] 2．式V(具有式II谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸)

[0319] 在其他实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由如下式V表示的核苷酸：

[0320] 

V

[0321] 其中A、U_1、I、B、W和U_2如式I中所述；和

[0322] 其中Y、V、Z、X_2、X_3、P、Q和T如式II中所述。

[0323] 在某些实施方案中，U_1是不存在的，氧，或将至少一个由式V表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团，或氢；U_2是不存在的或O；和W是氢，磷酸酯基团，或将至少一个由式V表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团，条件是U_1或W中的至少一个是将至少一个由式V表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团，条件是如果U_1是核苷酸间连接基团，则A是不存在的。

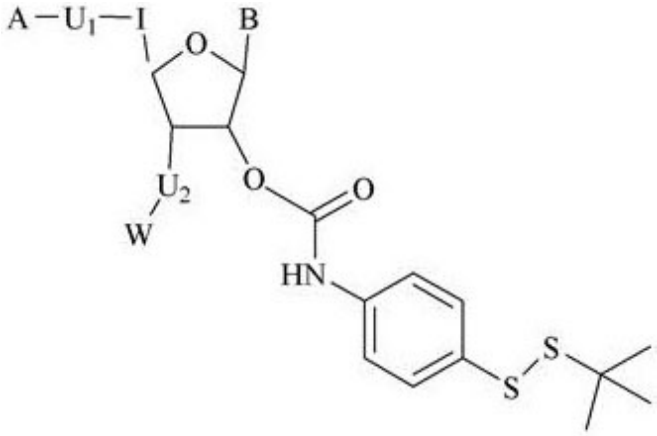
[0324] 在某些实施方案中，I是CH_2。在某些实施方案中，B是天然核碱基。在某些实施方案

中，I是CH_2且B是天然核碱基。

[0325] 在某些实施方案中，A是氢、磷酸酯基团或磷酸酯模拟物。在某些实施方案中，A是氢且U_1是氧。在某些实施方案中，A是氢，U_1是氧，且I是CH_2。

[0326] a．式Va

[0327] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

[0328] 

Va

[0329] 其中A、U_1、U_2、I、W和B是如上对式V所述的。

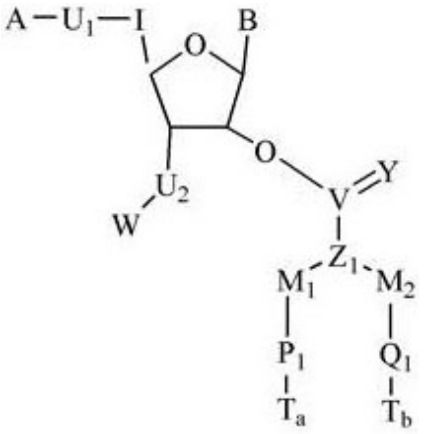
[0330] 在某些实施方案中，含有至少一个式V的核苷酸的寡核苷酸具有2-2500个核苷酸。在某些实施方案中，含有至少一个式V的核苷酸的寡核苷酸具有500-1500个核苷酸。在某些实施方案中，含有至少一个式V的核苷酸的寡核苷酸具有7-100个核苷酸。在另一个实施方案中，含有至少一个式V的核苷酸的寡核苷酸具有15-50个核苷酸。在又一个实施方案中，含有至少一个式V的核苷酸的寡核苷酸具有19-25个核苷酸。

[0331] 在某些实施方案中，含有至少一个式V的核苷酸的寡核苷酸是核酸抑制剂分子，如在整个申请中进一步详细地讨论。在其他实施方案中，含有至少一个式V的核苷酸的寡核苷酸是CRISPR核酸，用于基因治疗的核酸，用于DNA编辑的核酸，探针，或易于被核酸酶和/或恶劣环境条件(例如，pH)降解的任何其他寡核苷酸，包括要在体内施用的其他寡核苷酸。

[0332] 3．式VI(具有式III谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸)

[0333] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由如下式VI表示的核苷酸：

[0334]



VI

[0335] 其中A、U_1、I、B、W和U_2如式I中所述;和

[0336] 其中Y、V、Z_1、M_1、M_2、P_1、Q_1、T_a和T_b如式III中所述。

[0337] 在某些实施方案中,U_1是不存在的,氧,或将至少一个由式VI表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团,或氢;U_2是不存在的或O;和W是氢,磷酸酯基团,或将至少一个由式VI表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团,条件是U_1或W中的至少一个是将至少一个由式VI表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团,条件是如果U_1是核苷酸间连接基团,则A是不存在的。

[0338] 在某些实施方案中,I是CH_2。在某些实施方案中,B是天然核碱基。在某些实施方案中,I是CH_2且B是天然核碱基。

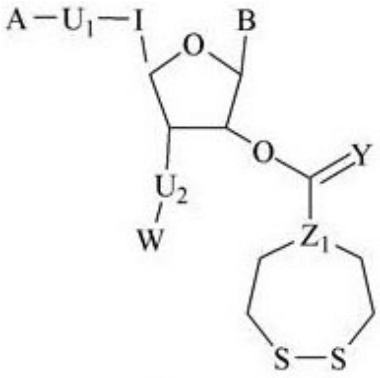
[0339] 在某些实施方案中,A是氢、磷酸酯基团或磷酸酯模拟物。在某些实施方案中,A是氢且U_1是氧。在某些实施方案中,A是氢,U_1是氧,且I是CH_2。

[0340] 在某些实施方案中,含有至少一个式VI的核苷酸的寡核苷酸具有2-2500个核苷酸。在某些实施方案中,含有至少一个式VI的核苷酸的寡核苷酸具有500-1500个核苷酸。在某些实施方案中,含有至少一个式VI的核苷酸的寡核苷酸具有7-100个核苷酸。在另一个实施方案中,含有至少一个式VI的核苷酸的寡核苷酸具有15-50个核苷酸。在又一个实施方案中,含有至少一个式VI的核苷酸的寡核苷酸具有19-25个核苷酸。

[0341] 在某些实施方案中,含有至少一个式VI的核苷酸的寡核苷酸是核酸抑制剂分子,如在整个申请中进一步详细地讨论。在其他实施方案中,含有至少一个式VI的核苷酸的寡核苷酸是CRISPR核酸,用于基因治疗的核酸,用于DNA编辑的核酸,探针,或易于被核酸酶和/或恶劣环境条件(例如,pH)降解的任何其他寡核苷酸,包括要在体内施用的其他寡核苷酸。

[0342] a. 式VIa

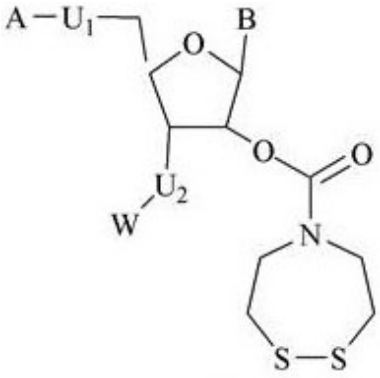
[0343] 在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸:

[0344] 

VIa

[0345] 其中A、U_1、U_2、W、I和B是如上对式VI所述的且Y和Z_1是如上对式IIIa所述的。

[0346] 更通常，本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

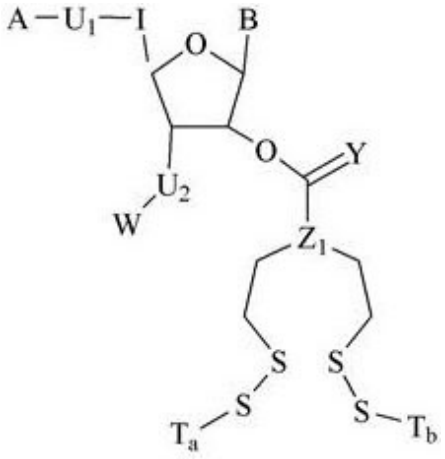
[0347] 

VIa(i)

[0348] 其中A、U_1、U_2、W和B是如上对式VI所述的。

[0349] b.式VIb

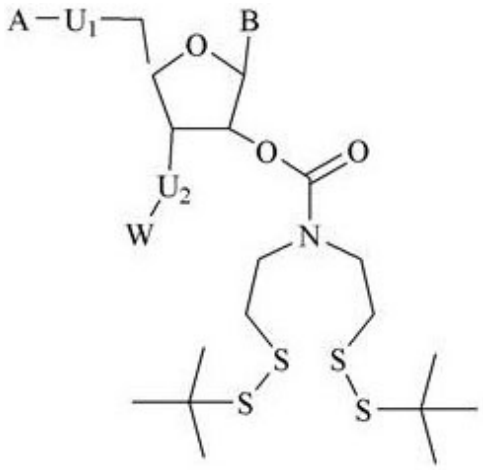
[0350] 在一些实施方案中，本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

[0351] 

VIb

[0352] 其中A、U_1、U_2、W、I和B是如上对式VI所述的，且其中Y、Z_1和T_a和T_b是如上对式IIIb所述的。

[0353] 更通常，本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

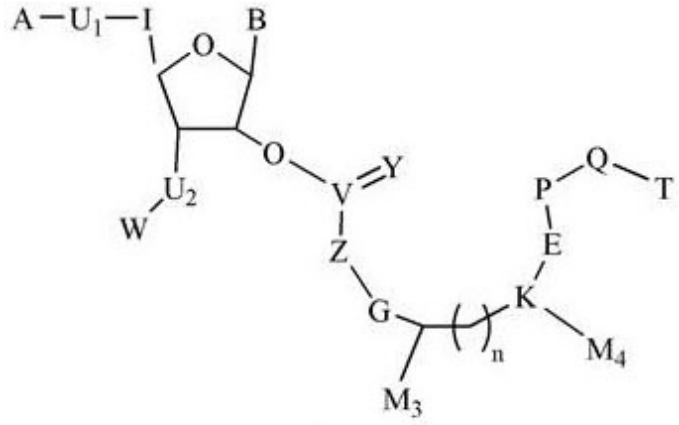
[0354] 

VIb(i)

[0355] 其中A、U_1、U_2、W和B是如上对式VI所述的。

[0356] 4．式VII(具有式IV谷胱甘肽敏感性部分的寡核苷酸)

[0357] 在一些实施方案中，本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由如下式VII表示的核苷酸：

[0358] 

VII

[0359] 其中A、U_1、I、B、W和U_2如式I中所述；和

[0360] 其中Y、Z、V、K、G、E、n、M_3、M_4、P、Q和T是如上在式IV中所述的。

[0361] 在某些实施方案中，U_1是不存在的，氧，或将至少一个由式VII表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团，或氢；U_2是不存在的或O；和W是氢，磷酸酯基团，或将至少一个由式VII表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团，条件是U_1或W中的至少一个是将至少一个由式VII表示的核苷酸连接到核苷酸或寡核苷酸的核苷酸间连接基团，条件是如果U_1是核苷酸间连接基团，则A是不存在的。

[0362] 在某些实施方案中，I是CH_2。在某些实施方案中，B是天然核碱基。在某些实施方案中，I是CH_2且B是天然核碱基。

[0363] 在某些实施方案中，A是氢、磷酸酯基团或磷酸酯模拟物。在某些实施方案中，A是氢且U_1是氧。在某些实施方案中，A是氢，U_1是氧，且I是CH_2。

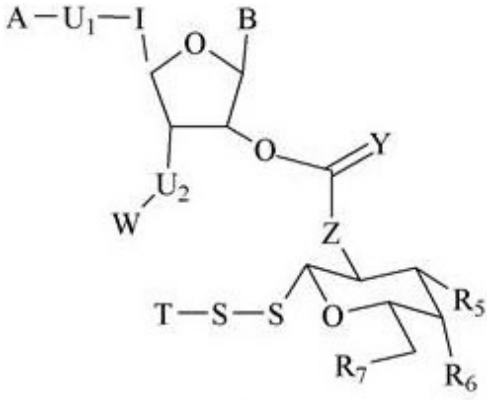
[0364] 在某些实施方案中，含有至少一个式VII的核苷酸的寡核苷酸具有2-2500个核苷酸。在某些实施方案中，含有至少一个式VII的核苷酸的寡核苷酸具有500-1500个核苷酸。

在某些实施方案中，含有至少一个式VII的核苷酸的寡核苷酸具有7-100个核苷酸。在另一个实施方案中，含有至少一个式VII的核苷酸的寡核苷酸具有15-50个核苷酸。在又一个实施方案中，含有至少一个式VII的核苷酸的寡核苷酸具有19-25个核苷酸。

[0365] 在某些实施方案中，含有至少一个式VII的核苷酸的寡核苷酸是核酸抑制剂分子，如在整个申请中进一步详细地讨论。在其他实施方案中，含有至少一个式VII的核苷酸的寡核苷酸是CRISPR核酸，用于基因治疗的核酸，用于DNA编辑的核酸，探针，或易于被核酸酶和/或恶劣环境条件(例如，pH)降解的任何其他寡核苷酸，包括要在体内施用的其他寡核苷酸。

[0366] a．式VIIa

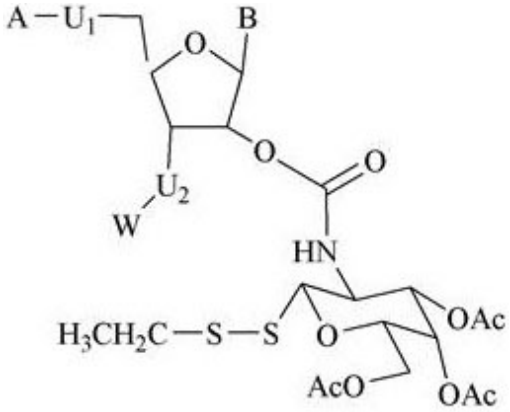
[0367] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性修饰的寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

[0368] 

VIIa

[0369] 其中A、U_1、U_2、W、I和B是如上对式VII所述的；和其中Y、Z、R_5、R_6和R_7、和T是如上在式Iva中所述的。在某些实施方案中，B是天然核碱基。

[0370] 更通常，本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

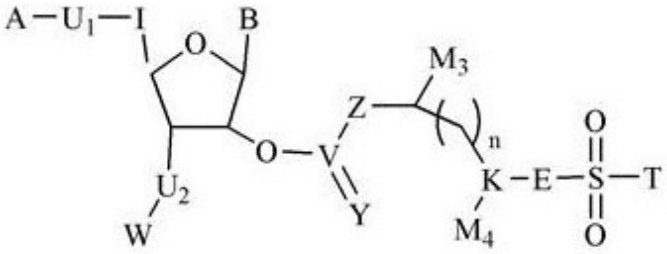
[0371] 

VIIa(i)

[0372] 其中A、U_1、U_2、W和B是如上对式VII所述的。

[0373] b．式VIIb

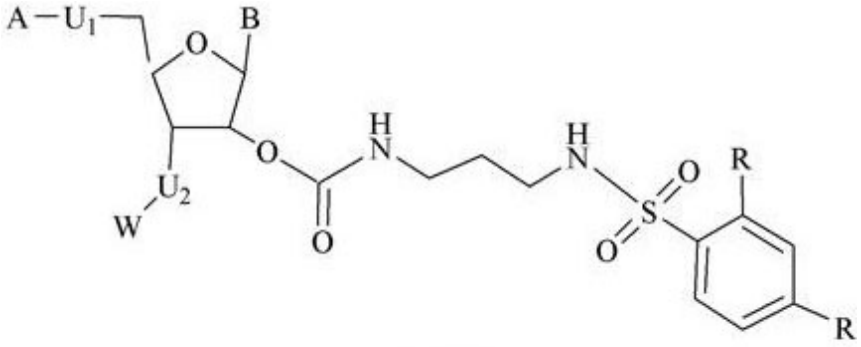
[0374] 在一些实施方案中，本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

[0375] 

VIIb

[0376] 其中A、U_1、U_2、W、I和B是如上对式VII所述的；和其中Y、V、Z、K、E、M_3、M_4、n和T是如上对式IVb所述的。在某些实施方案中，B是天然核碱基。

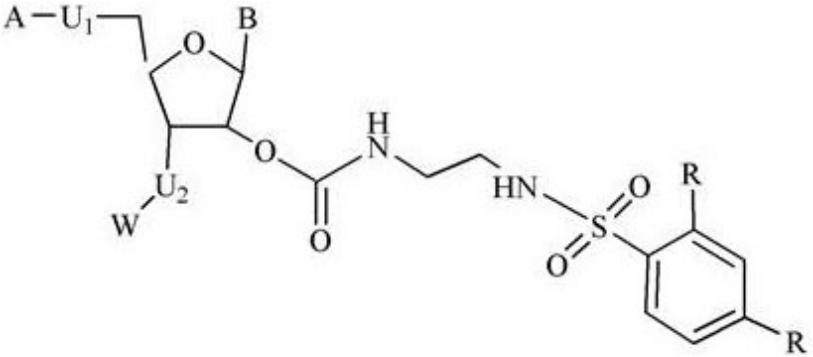
[0377] 在一些实施方案中，本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

[0378] 

VIIb(i)

[0379] 其中A、U_1、U_2、W和B是如上对式VII所述的；和其中R是如在式IVb(i)中所述的。

[0380] 在一些实施方案中，本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

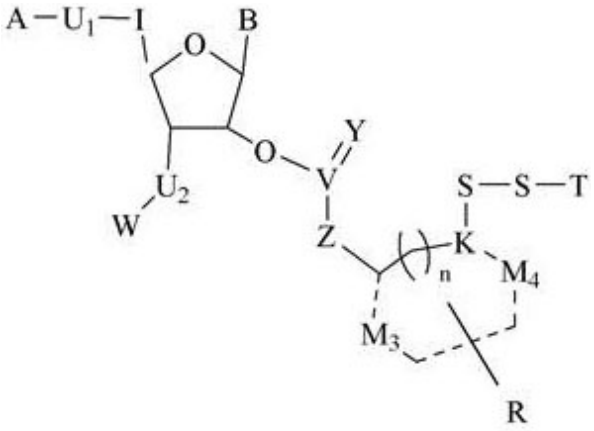
[0381] 

VIIb(ii)

[0382] 其中A、U_1、U_2、W和B是如上对式VII所述的；和其中R是如在式IVb(ii)中所述的。

[0383] c. 式VIIc

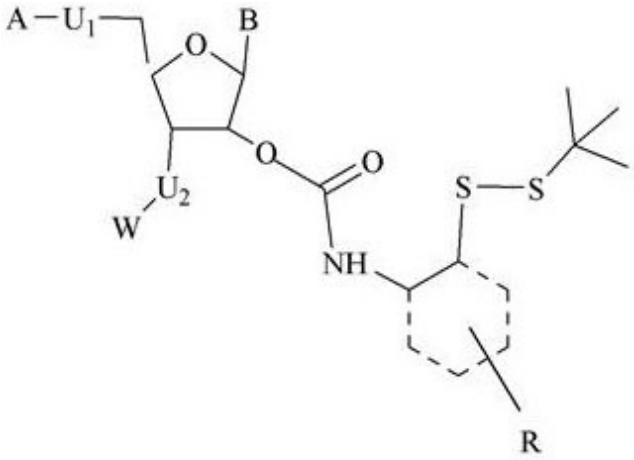
[0384] 在一些实施方案中，本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

[0385] 

VIIc

[0386] 其中A、U_1、U_2、W、I和B是如上对式VII所述的；和其中Y、Z、V、K、n、T和R是如上对式IVc所述的。在某些实施方案中，B是天然核碱基。

[0387] 更通常，本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

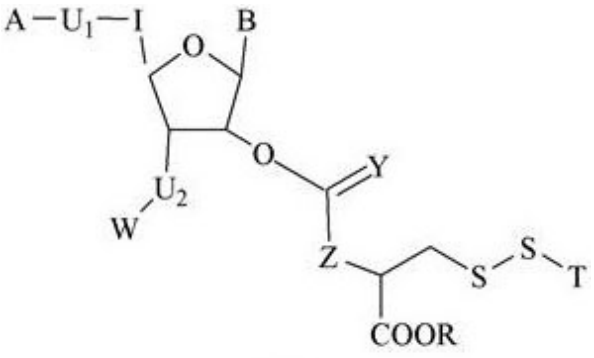
[0388] 

VIIc(i)

[0389] 其中A、U_1、U_2、W和B是如上对式VII所述的；和其中R是如在式IVc(i)中所述的。

[0390] d. 式VIId

[0391] 在一些实施方案中，本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸：

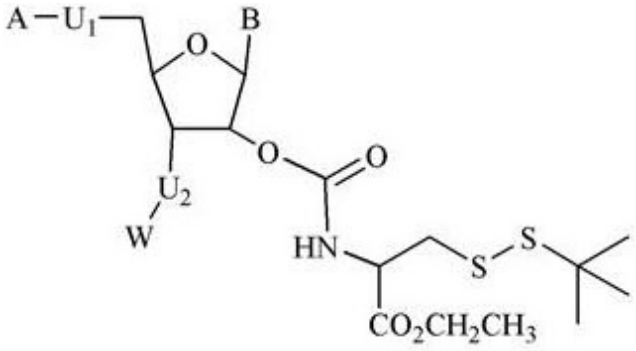
[0392] 

VIId

[0393] 其中A、U_1、U_2、W、I和B是如上对式VII所述的；和其中Y、Z、R和T如上对式IVd所述的。

在某些实施方案中,B是天然核碱基。

[0394] 更通常,本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸:

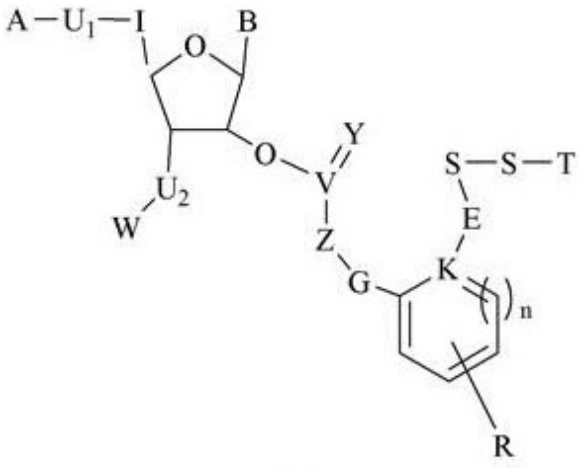
[0395] 

VIId(i)

[0396] 其中A、U_1、U_2、W和B是如上对式VII所述的。

[0397] e. 式VIIe

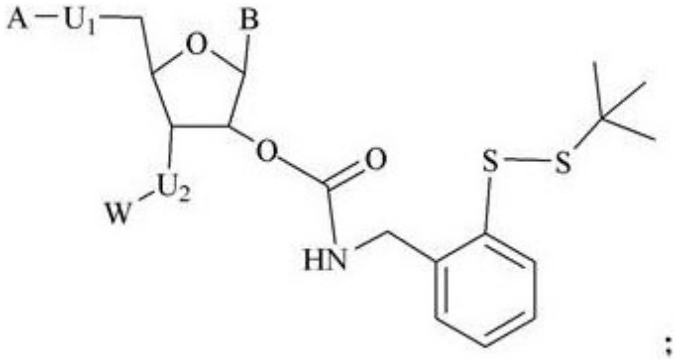
[0398] 在一些实施方案中,本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个由下式表示的核苷酸:

[0399] 

VIIe

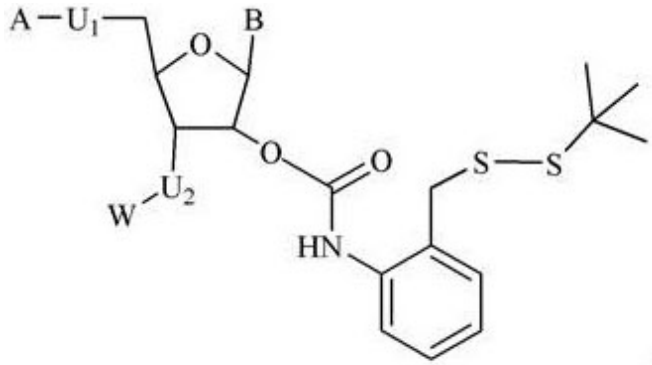
[0400] 其中A、U_1、U_2、W、I、和B是如上对式VII所述的和其中V、Y、Z、G、E、T、K、n、R、和T是如上对式IVe所述的。在某些实施方案中,B是天然核碱基。

[0401] 更通常,本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸包含至少一个选自下式之一的核苷酸:

[0402] 

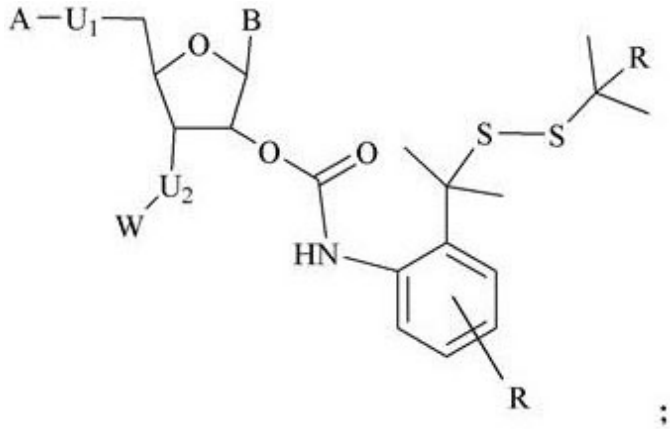
;

VIIe(i)

[0403] 

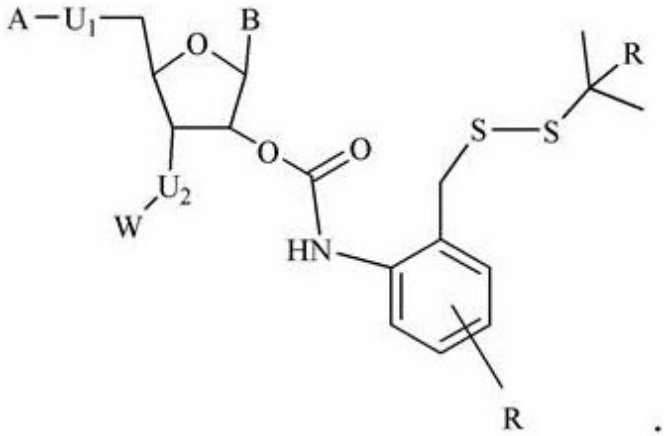
;

VIIe(ii)

[0404] 

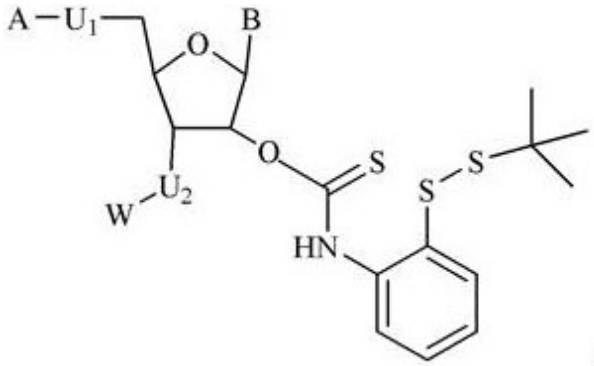
;

VIIe(iii)

[0405] 

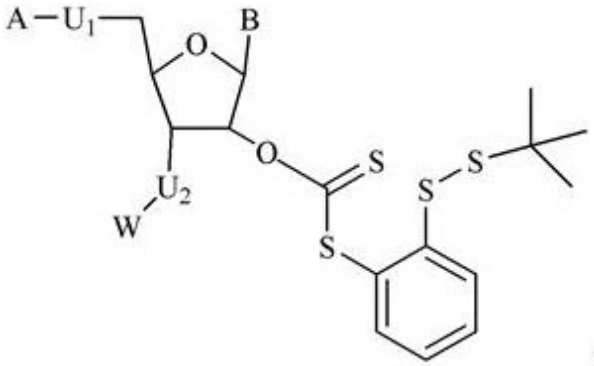
;

VIIe(iv)

[0406] 

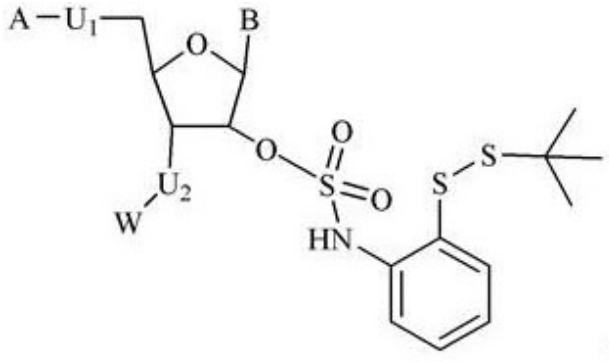
;

VIIe(v)

[0407] 

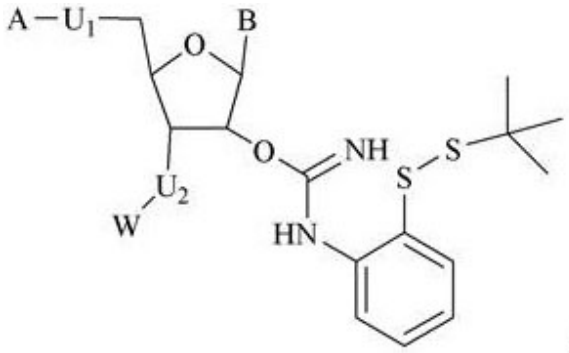
;

VIIe(vi)

[0408] 

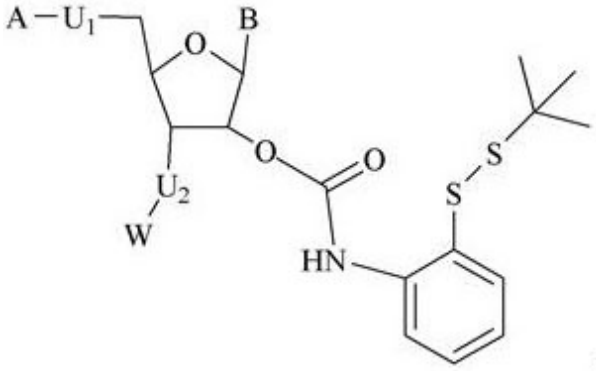
;

VIIe(vii)

[0409] 

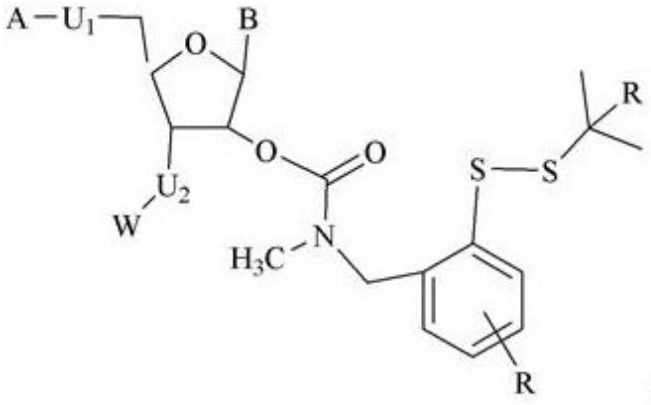
;

VIIe(viii)

[0410] 

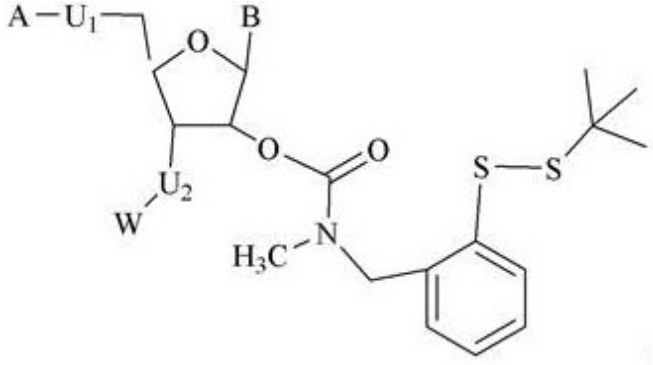
;

VIIe(ix)

[0411] 

；或

VIIe(x)

[0412] 

;

VIIe(xi)

[0413] 其中A、U_1、U_2、W和B是如上对式VII所述的;和

[0414] 其中R选自氢,CH_3,被取代或被取代的脂族,芳基,杂芳基,环烷基或杂环或R是任选地经由任何间隔基连接的靶向配体。

[0415] A.谷胱甘肽敏感性的核酸抑制剂分子

[0416] 在某些实施方案中,将谷胱甘肽敏感性部分掺入核酸抑制剂分子中。各种寡核苷酸结构已经用作核酸抑制剂分子,包括单链和双链寡核苷酸,且可以修饰这些各种寡核苷酸中的任何一种以包括如本文所述的一个或多个谷胱甘肽敏感性核苷酸。

[0417] 在某些实施方案中,核酸抑制剂分子是包含正义(或过客)链和反义(或引导链)的双链RNAi抑制剂分子。各种双链RNAi抑制剂分子结构是本领域已知的。例如,关于RNAi抑制剂分子的早期工作集中在双链核酸分子上,每个链具有19-25个核苷酸的大小以及至少一个1至5个核苷酸的3'-突出端(参见,例如,美国专利号8,372,968)。随后,开发了由Dicer酶在体内加工成活性RNAi抑制剂分子的较长的双链RNAi抑制剂分子(参见,例如,美国专利号8,883,996)。后来的工作开发了延伸的双链核酸抑制剂分子,其中至少一个链的至少一端延伸超出分子的双链靶向区域,包括其中链之一包含热力学稳定的四环结构的结构(参见例如,美国专利号8,513,207,美国专利号8,927,705,WO 2010/033225,和WO 2016/100401,对于它们的这些双链核酸抑制剂分子的公开内容,它们通过引用并入本文)。那些结构包括单链延伸(在分子的一侧或两侧)和双链延伸。

[0418] 在dsRNAi抑制剂分子的一些实施方案中,正义和反义链为15-66,25-40,或19-25个核苷酸范围。在一些实施方案中,正义链为18-66个核苷酸长。在某些实施方案中,正义链为18-25个核苷酸长。在某些实施方案中,正义链为18,19,20,21,22,23,或24个核苷酸长。在那些实施方案中的某些中,正义链为25-45个核苷酸长。在某些实施方案中,正义链为30-40个核苷酸长。在某些实施方案中,正义链为36,37,38,39,或40个核苷酸长。在某些实施方案中,正义链为25-30个核苷酸长。在那些实施方案中的某些中,正义链为25,26,或27个核苷酸长。

[0419] 在dsRNAi抑制剂分子的一些实施方案中,反义链为18至66个核苷酸长。通常,反义链包含与靶基因mRNA中的序列充分互补的序列,以引导核酸抑制剂分子对靶基因的作用。在某些实施方案中,反义链包含与靶基因mRNA中包含的序列完全互补的序列,其中完全互补序列为18-40个核苷酸长。在那些实施方案中的某些中,反义链为20-50个核苷酸长。在某些实施方案中,反义链为20-30个核苷酸长。在某些实施方案中,反义链为21,22,23,24,25,26,27,或28个核苷酸长。在某些实施方案中,反义链为35-40个核苷酸长。在那些实施方案中的某些中,反义链为36,37,38或39个核苷酸长。

[0420] 在dsRNAi抑制剂分子的一些实施方案中,正义和反义链形成15-50个碱基对的双链体结构。在某些实施方案中,双链体区域是15-30个碱基对长,例如19-30,更通常18-26,例如19-23,且在某些情形中19-21个碱基对长。在某些实施方案中,所述双链区域是19,20,21,22,23,24,25,或26个碱基对长。

[0421] 在一些实施方案中,所述dsRNAi抑制剂分子可以进一步包含一个或多个单链核苷酸突出端。通常,所述dsRNAi抑制剂分子具有1-10,1-4,或1-2个核苷酸的单链突出端。所述单链突出端是通常位于正义链的3′-端和/或反义链的3′-端。在某些实施方案中,1-10,1-4,或1-2个核苷酸的单链突出端位于反义链的5′-端。在某些实施方案中, 1-10,1-4,或1-2

个核苷酸的单链突出端位于正义链的5′-端。在某些实施方案中,1-2个核苷酸的单链突出端位于反义链的3′-端。在某些实施方案中,10个核苷酸的单链突出端位于反义链的5′-端。在某些实施方案中,所述dsRNA抑制剂分子具有平端,通常在反义链的5′-端。

[0422] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子包含正义和反义链以及19-21个核苷酸之间的双链体区域,其中所述正义链为19-21个核苷酸长且所述反义链为21-23个核苷酸长,且在其3'-末端包含具有1-2个核苷酸的单链突出端。

[0423] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子具有21个核苷酸长的反义链和21个核苷酸长的正义链,其中在分子的右侧有两个核苷酸3'-过客链突出端(正义链的3'-端/反义链的5'-端)和分子左侧有两个核苷酸3'-引导链突出端(正义链的5'-端/反义链的3'-端)。在这样的分子中,存在19个碱基对的双链体区域。

[0424] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子具有23个核苷酸长的反义链和21个核苷酸长的正义链,其中在分子的右侧有平端(正义链的3'-端/反义链的5'-端)和分子的左侧有两个核苷酸的3'-引导链突出端(正义链的5'-端/反义链的3'-端)。在这样的分子中,存在21个碱基对的双链体区域。

[0425] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子包含正义链和反义链以及18-34个核苷酸之间的双链体区域,其中正义链为25-34个核苷酸长且反义链为26-38个核苷酸长且包含在其3'末端的1-5个单链核苷酸。在某些实施方案中,正义链是26个核苷酸,反义链是38个核苷酸且在其3'末端具有2个核苷酸的单链突出端,且在其5'-末端具有10个核苷酸的单链突出端,且正义链和反义链形成26个核苷酸的双链体区域。在某些实施方案中,正义链是25个核苷酸,反义链是27个核苷酸且在其3'末端具有2个核苷酸的单链突出端,且正义链和反义链形成25个核苷酸的双链体区域。

[0426] 在一些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子包括茎(stem)和环。通常,dsRNAi抑制剂分子的过客链的3'-末端区域或5'-末端区域形成单链茎和环结构。

[0427] 在一些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子含有茎和四环。在其中dsRNAi抑制剂分子含有茎和四环的实施方案中,过客链含有茎和四环且长度范围为20-66个核苷酸。通常,引导链和过客链是分开的链,各自具有5'和3'端,其不形成连续的寡核苷酸(有时称为“带缺口的”结构)。

[0428] 在那些实施方案中的某些中,引导链为15至40个核苷酸长。在某些实施方案中,含有茎和四环的过客链的延伸部分位于链的3'-端。在某些其他实施方案中,含有茎和四环的过客链的延伸部分位于链的5'-端。

[0429] 在某些实施方案中,含有茎和四环的dsRNAi抑制剂分子的过客链为34至40个核苷酸长,且dsRNAi抑制剂分子的引导链含有20至24个核苷酸,其中过客链和引导链形成18-24个核苷酸的双链体区域。

[0430] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子包含:(a)含有茎和四环且为36个核苷酸长的过客链,其中自5'-端的前20个核苷酸与引导链互补,且随后的16个核苷酸形成茎和四环;和(b)为22个核苷酸长且在其3'端具有两个核苷酸的单链突出端的引导链,其中引导链和过客链是不形成连续寡核苷酸的分开的链(参见例如图1A和1B)。

[0431] 在某些实施方案中,所述核酸抑制剂分子包括一个或多个脱氧核糖核苷酸。通常,所述核酸抑制剂分子含有少于5个脱氧核糖核苷酸。在某些实施方案中,所述核酸抑制剂分

子包括一个或多个核糖核苷酸。在某些实施方案中，核酸抑制剂分子的所有核苷酸是核糖核苷酸。

[0432] 在一些实施方案中，双链核酸抑制剂分子(例如，dsRNAi抑制剂分子)的所述至少一个谷胱甘肽敏感性核苷酸位于过客链上。在另一个实施方案中，所述至少一个谷胱甘肽敏感性核苷酸位于引导链上。在一些实施方案中，所述至少一个谷胱甘肽敏感性核苷酸位于双链体区域中。在一些实施方案中，所述至少一个谷胱甘肽敏感性核苷酸位于突出端区域中。

[0433] 在某些实施方案中，核酸抑制剂分子是单链核酸抑制剂分子，其包含至少一个具有谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸，如本文所述。单链核酸抑制剂分子是本领域已知的。例如，最近的努力已经证明ssRNAi抑制剂分子的活性(参见，例如，Matsui等人, Molecular Therapy, 2016,24(5):946-55。且，反义分子已经数十年用来减少特定靶基因的表达。Pelechano和Steinmetz, Nature Review Genetics, 2013,14:880-93。已针对一系列靶标开发了关于这些结构的共同主题的许多变体。单链核酸抑制剂分子包括，例如，常规反义寡核苷酸，微小RNA，核酶，适体，antagomirs和ssRNAi抑制剂分子，所有这些都是本领域已知的。

[0434] 在某些实施方案中，核酸抑制剂分子是具有14-50，16-30或15-25个核苷酸的ssRNAi抑制剂分子。在其他实施方案中，ssRNAi抑制剂分子具有18-22或20-22个核苷酸。在某些实施方案中，ssRNAi抑制剂分子具有20个核苷酸。在其他实施方案中，ssRNAi抑制剂分子具有22个核苷酸。在某些实施方案中，核酸抑制剂分子是抑制外源RNAi抑制剂分子或天然miRNA的单链寡核苷酸。

[0435] 在某些实施方案中，核酸抑制剂分子是具有8-80，14-50，16-30，12-25，12-22，14-20，18-22，或20-22个核苷酸的单链反义寡核苷酸。在某些实施方案中，单链反义寡核苷酸具有18-22个，例如18-20个核苷酸。

[0436] 在某些实施方案中，反义寡核苷酸或其的一部分与靶核酸或其特定部分完全互补。在某些实施方案中，反义寡核苷酸或其的一部分与靶核酸的至少12，13，14，15，16，17，18，19，20或更多个连续核苷酸互补。在某些实施方案中，反义寡核苷酸相对于靶核酸或其的一部分含有不超过5，4，3，2或1个非互补核苷酸。可以减少反义寡核苷酸的长度和/或引入错配碱基而不消除活性。

[0437] 如本文所述，一个或多个核苷酸的糖部分可以用谷胱甘肽敏感性部分修饰，通常在糖部分的2'-碳。通常，核酸抑制剂分子的一个或两个核苷酸用谷胱甘肽敏感性部分可逆地修饰。在某些实施方案中，核酸抑制剂分子的多于两个核苷酸，例如三个，四个，五个核苷酸或更多个，用谷胱甘肽敏感性部分可逆地修饰。在某些实施方案中，大多数核苷酸用谷胱甘肽敏感性部分可逆地修饰。在某些实施方案中，寡核苷酸的所有或基本上所有核苷酸含有谷胱甘肽敏感性部分。

[0438] 在某些实施方案中，dsRNAi抑制剂分子的过客链含有一个或多个用谷胱甘肽敏感性部分可逆修饰的核苷酸。在某些实施方案中，dsRNAi抑制剂分子的引导链含有一个或多个用谷胱甘肽敏感性部分可逆修饰的核苷酸。在某些实施方案中，dsRNAi抑制剂分子的引导链和过客链各自含有一个或多个用谷胱甘肽敏感性部分可逆修饰的核苷酸。

[0439] 在一些实施方案中，核酸抑制剂分子中的至少一个谷胱甘肽敏感性部分的存在减

少例如由血清中的核酸酶和/或细胞内(例如囊泡(例如内体囊泡、溶酶体囊泡和/或融合的内体/溶酶体囊泡)内)的核酸酶引起的寡核苷酸的降解。例如,将谷胱甘肽敏感性部分置于核酸抑制剂分子的5'-或3'-末端核苷酸处可以防止由核酸酶降解。另外,某些双链核酸抑制剂分子在过客链或引导链或二者上含有单链突出端区域,其更易受核酸酶降解的影响。修饰该单链突出端区域可以保护这种双链核酸抑制剂分子免于由 核酸酶降解。

[0440] 在一些实施方案中,至少一个谷胱甘肽敏感性部分位于单链核酸抑制剂分子的5'-末端核苷酸或双链核酸抑制剂分子的引导链或过客链的5'-末端核苷酸。在某些实施方案中,谷胱甘肽敏感性部分位于5'-末端核苷酸的5'-碳。在其他实施方案中,谷胱甘肽敏感性部分位于5'-末端核苷酸的2'-碳。在双链核酸抑制剂分子的某些实施方案中,位于过客或引导链的5'-末端核苷酸的谷胱甘肽敏感性部分在突出端区域中。

[0441] 在一些实施方案中,所述至少一个谷胱甘肽敏感性部分位于单链核酸抑制剂分子的3'-末端核苷酸或双链核酸抑制剂分子的引导链或过客链的3'-末端核苷酸。在某些实施方案中,谷胱甘肽敏感性部分位于3'-末端核苷酸的3'-碳。在其他实施方案中,谷胱甘肽敏感性部分位于3'-末端核苷酸的2'-碳。在双链核酸抑制剂分子的某些实施方案中,位于过客或引导链的3'-末端核苷酸的谷胱甘肽敏感性部分在突出端区域中。

[0442] RNAi抑制剂分子的核苷酸位置2和位置14的不可逆化学修饰,例如在糖的2'-碳的修饰,通常不能很好地耐受。不希望受任何理论束缚,这些核苷酸位置可能对空间体积敏感。在一些实施方案中,至少一个谷胱甘肽敏感性部分位于单链核酸抑制剂分子的核苷酸位置2或双链核酸抑制剂分子的引导链的位置2。在一些实施方案中,至少一个谷胱甘肽敏感性部分位于单链核酸抑制剂分子的核苷酸位置14或双链核酸抑制剂分子的引导链的位置14。

[0443] 在一些实施方案中,至少一个谷胱甘肽敏感性部分在位于dsRNAi抑制剂分子的过客链的Ago2裂解位点处或附近的一个或多个核苷酸上。通常,Ago2在与引导链的核苷酸位置10和11(如从引导链的5'-端测量)相对的两个核苷酸之间的磷酸二酯键处裂解过客链。因此,例如,如果引导链具有22个核苷酸和2个碱基对突出端(或20个核苷酸且没有突出端),则Ago2应在过客链的核苷酸位置10和11之间裂解。如果引导链具有21个核苷酸和2个碱基对突出端(或19个核苷酸且没有突出端),则Ago2应在过客链的核苷酸位置9和10之间裂解。在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子在一个、两个或三个紧邻Ago2裂解位点的5'的核苷酸上含有谷胱甘肽敏感性部分。在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子在一个、两个或三个紧邻Ago2裂解位点的3'的核苷酸上含有谷胱甘肽敏感性部分。在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子在Ago2裂解位点的两侧上含有谷胱甘肽敏感性部分,包括例如在一个、两个或三个紧邻Ago2裂解位点的5'的核苷酸上,且在一个、两个或三个紧邻Ago2裂解位点的3'的核苷酸上。

[0444] B. 谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的其他修饰

[0445] 用如本文所述的可逆性谷胱甘肽敏感性部分修饰的寡核苷酸可以使用例如本领域已知的其他核苷酸修饰(包括本文所述的不可逆修饰)在一个或多个核苷酸上进一步修饰。通常,修饰感兴趣的寡核苷酸的多个核苷酸亚单位以改善该分子的各种特征,例如对核酸酶的抗性或降低的免疫原性。参见,例如,Bramsen等人(2009), Nucleic Acids Res., 37:2867-2881。许多核苷酸修饰已用于寡核苷酸领域,特别是核酸抑制剂分子。可以对核苷

酸的任何部分进行这种不可逆修饰，所述部分包括糖部分、磷酸二酯连接和核碱基。核苷酸修饰的典型实例包括但不限于2′-F，2′-O-甲基（“2′-OMe”或“2′-OCH_3”），2′-O-甲氧基乙基（“2′-MOE”或“2′-$OCH_2CH_2OCH_3$”）和5’-甲基胞嘧啶。不可逆修饰可以发生在核苷酸的其他部分，例如5’-碳，如本文所述。

[0446] 在某些实施方案中，糖部分的环结构被修饰，包括但不限于锁定核酸（“LNA”）结构，桥连核酸（“BNA”）结构，和解锁核酸（“UNA”）结构，如前讨论。

[0447] 修饰的核碱基包括在1’-位置的除腺嘌呤，鸟嘌呤，胞嘧啶，胸腺嘧啶和尿嘧啶外的核碱基，如本领域已知的和如本文所述。修饰的核碱基的典型实例是5’-甲基胞嘧啶。

[0448] RNA和DNA的天然存在的核苷酸间连接是3’至5’磷酸二酯连接。修饰的磷酸二酯连接包括非天然存在的核苷酸间连接基团，包括含有磷原子的核苷酸间连接和不含磷原子的核苷酸间连接，如本领域已知的和本文所述。通常，寡核苷酸含有一个或多个含磷的核苷酸间连接基团，如本文所述。在其他实施方案中，核酸抑制剂分子的一个或多个核苷酸间连接基团是非含磷连接，如本文所述。在某些实施方案中，寡核苷酸含有一个或多个含磷的核苷酸间连接基团和一个或多个非含磷的核苷酸间连接基团。

[0449] 谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的5’-端可包括天然取代基，例如羟基或磷酸酯基团。在某些实施方案中，羟基与谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的5’-末端连接。在某些实施方案中，磷酸酯基团连接到谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的5’-末端。通常，在寡核苷酸合成之前将磷酸酯添加到单体中。在其他实施方案中，在将本公开的寡核苷酸引入细胞溶质中后，例如通过细胞溶质Clp1激酶，天然完成5’-磷酸化。在一些实施方案中，5’-末端磷酸酯是磷酸酯基团，例如5′-单磷酸酯[$(HO)_2(O)P-O-5'$]，5′-二磷酸酯[$(HO)_2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$]或5′-三磷酸酯[$(HO)_2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$]。

[0450] 谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的5’-端也可以被修饰。例如，在一些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的5’-端连接到氨基磷酸酯[$(HO)_2(O)P-NH-5'$，$(HO)(NH_2)(O)P-O-5'$]。在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的5’-末端端连接到磷酸酯模拟物。合适的磷酸酯模拟物包括5’-膦酸酯，例如5’-亚甲基膦酸酯(5’-MP)和5’-(E)-乙烯基膦酸酯(5’-VP)。Lima等人，Cell，2012，150-883-94；WO2014/130607。其他合适的磷酸酯模拟物包括与寡核苷酸的5’-末端核苷酸的糖部分(例如，核糖或脱氧核糖或其类似物)的4’-碳结合的4’-磷酸酯类似物，如美国临时申请号62/393,401中所述，其通过引用整体并入本文。例如，在一些实施方案中，核酸抑制剂分子的5’-端与氧甲基膦酸酯连接，其中氧甲基的氧原子与糖部分或其类似物的4’-碳结合。在某些实施方案中，4’-氧甲基膦酸酯由式式-O-CH_2-PO(OH)$_2$或-O-CH_2-PO(OR)$_2$表示，其中R独立地选自H，CH_3，烷基，或保护基团。在某些实施方案中，烷基是CH_2CH_3。更通常，R独立地选自H，CH_3或CH_2CH_3。在其他实施方案中，磷酸酯类似物是硫代甲基膦酸酯或氨基甲基膦酸酯，其中硫代甲基的硫原子或氨基甲基的氮原子与糖部分或其类似物的4’-碳结合。

[0451] 在某些实施方案中，寡核苷酸被完全修饰，其中完全修饰的寡核苷酸的每个核苷酸用不可逆修饰或如本文所述的可逆的谷胱甘肽敏感性部分修饰。在某些实施方案中，修饰寡核苷酸的每个核苷酸，其中未用谷胱甘肽敏感性部分修饰的每个核苷酸用不可逆修饰进行修饰。在某些实施方案中，寡核苷酸含有核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸，且寡核苷酸中的每个核糖核苷酸用不可逆修饰或如本文所述的可逆的谷胱甘肽敏感性部分修饰。在某些

实施方案中，寡核苷酸的基本上所有核苷酸都被修饰。在某些实施方案中，寡核苷酸的超过一半的核苷酸被修饰。在某些实施方案中，寡核苷酸的超过一半的核苷酸含有不可逆修饰。在某些实施方案中，寡核苷酸的少于一半的核苷酸被修饰。在某些实施方案中，寡核苷酸的少于一半的核苷酸含有不可逆修饰。在某些实施方案中，寡核苷酸不含除所述一个或多个谷胱甘肽敏感性核苷酸外的任何修饰。修饰可以在寡核苷酸链上的基团中发生，或不同的被修饰的核苷酸可以散布。

[0452] 在一些实施方案中，不可逆化学修饰位于与含有谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸相同的核苷酸上。在其他实施方案中，不可逆化学修饰位于不含谷胱甘肽敏感性部分的一个或多个核苷酸上。

[0453] 在一些实施方案中，单链核酸抑制剂分子中或双链核酸抑制剂分子的引导链或过客链中的所有核苷酸用不可逆的化学修饰进行修饰，除了一个核苷酸用如本文所述的谷胱甘肽敏感性部分可逆修饰。在其他实施方案中，单链核酸抑制剂分子或双链核酸抑制剂分子的引导链或过客链中的至少一个，例如至少两个，三个，四个，五个，六个，七个，八个，九个或10个核苷酸用谷胱甘肽敏感性部分可逆修饰，且单链核酸抑制剂分子或双链核酸抑制剂分子的引导链或过客中的至少一个，例如至少两个，三个，四个，五个，六个，七个，八个，九个或10个核苷酸用不可逆的化学修饰进行化学修饰。在一些实施方案中，单链核酸抑制剂分子的所有核苷酸或双链核酸抑制剂分子的引导链或过客链含有至少一个如本文所述的谷胱甘肽敏感性部分或至少一个不可逆修饰。

[0454] 在核酸抑制剂分子的某些实施方案中，每个核苷酸在2'-碳被修饰。在核酸抑制剂分子(或其正义链和/或反义链)的某些实施方案中，未被谷胱甘肽敏感性部分修饰的每个核苷酸用2'-F，2'-O-Me，和/或2'-MOE修饰。在核酸抑制剂分子的某些实施方案中，修饰一个至每个磷原子，且在2'-碳处修饰一个至每个核糖核苷酸。

[0455] III. 谷胱甘肽敏感性单体(核苷和核苷酸)

[0456] 本公开的一个方面涉及包含谷胱甘肽敏感性部分的可逆修饰的核苷或核苷酸，谷胱甘肽敏感性部分包括可用于标准寡核苷酸合成方法的谷胱甘肽敏感性核苷亚磷酰胺和具有治疗效用的不具有亚磷酰胺基团的谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸，例如作为抗病毒剂。通常，可逆修饰包括在核苷或核苷酸的糖部分例如脱氧核糖或核糖(或其类似物)的谷胱甘肽敏感性部分。通常，核苷或核苷酸中的谷胱甘肽敏感性部分位于脱氧核糖或核糖(或其类似物)的2'-碳。在其他实施方案中，核苷或核苷酸中的谷胱甘肽敏感性部分位于核糖或脱氧核糖(或其类似物)的5'-碳。在另外的其他实施方案中，核苷或核苷酸中的谷胱甘肽敏感性部分位于核糖或脱氧核糖(或其类似物)的3'-碳。

[0457] 在一些实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分包含磺酰基。在其他实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分包含二硫桥。

[0458] A. 谷胱甘肽敏感性核苷亚磷酰胺

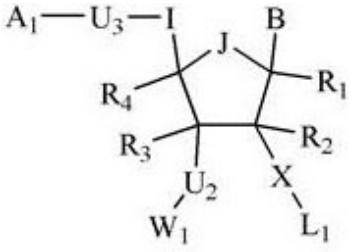
[0459] 该申请公开用谷胱甘肽敏感性部分可逆修饰且与亚磷酰胺寡核苷酸合成方法相容的核苷。因此，在另一方面，本公开涉及包含谷胱甘肽敏感性部分的可逆修饰的核苷亚磷酰胺和使用这些谷胱甘肽敏感性核苷亚磷酰胺合成寡核苷酸的方法。

[0460] 在某些实施方案中，核苷包含亚磷酰胺和谷胱甘肽敏感性部分，其中核苷与亚磷酰胺寡核苷酸合成方法相容。通常，亚磷酰胺与核苷的糖部分的5'-或3'-碳结合且谷胱甘

肽敏感性部分与氧原子结合，所述氧原子与核苷的糖部分(例如，核糖)的2'-碳共价结合。在一些实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分由如前所述的式II表示。在某些实施方案中，式II是如本文所述的式IIa。在其他实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分由如前所述的式III表示。在一些实施方案中，式III选自如前所述的式IIIa或IIIb。在一些实施方案中，式III选自如前所述的式IIIa(i)或IIIb(i)。在另外的其他实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分由如前所述的式IV表示。在一些实施方案中，式IV选自如前所述的式IVa，IVb，IVc，IVd或IVe。在一些实施方案中，式IV选自如前所述的式IVa(i)，IVb(i)，IVb(ii)，IVc(i)，或IVd(i)。在一些实施方案中，式IVe选自如前所述的式IVe(i)，IVe(ii)，IVe(iii)，IVe(iv)，IVe(v)，IVe(vi)，IVe(vii)，IVe(viii)，IVe(ix)，IVe(x)，或IVe(xi)。

[0461] 1. 式VIII

[0462] 在一些实施方案中，所述核苷亚磷酰胺由下式表示：

[0463] 

VIII

[0464] 其中L_1是谷胱甘肽敏感性部分；

[0465] 其中A_1是不存在的、氢、磷酸酯基团、磷酸酯模拟物、氨基磷酸酯、亚磷酰胺、保护基团、或固体载体；

[0466] 其中W_1是亚磷酰胺、保护基团、固体载体、氢、卤素、OR′、SR′、NR′R″、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基、被取代或未被取代的杂环，其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基、杂芳基、杂环或一起形成杂环；

[0467] 其中U_3是氢或选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环和被取代或未被取代的环烷基；

[0468] 其中至少A_1是亚磷酰胺且U_3是O或至少W_1是亚磷酰胺且U_2是O；

[0469] 其中X是O、S、Se或NR′，其中R′选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基、被取代或未被取代的杂芳基或被取代或未被取代的杂环；

[0470] 其中R_1、R_2、R_3和R_4各自独立地选自氢，卤素，OH，C_1-C_6烷基，C_1-C_6卤代烷基或其中R_1、R_2、R_3和R_4中的两个一起形成5-8元环，其中所述环任选地含有杂原子；

[0471] 其中J是O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″中的每一个独立地选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基或杂芳基；

[0472] 其中B选自氢、被取代或未被取代的脂族、天然核碱基、修饰核碱基或通用核碱基；

[0473] 其中U_2是不存在的或选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或被取代或未被取代的环烷基；

[0474] 其中I是不存在的或选自O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环和被取代或未被取代的环烷基；和

[0475] 其中I和U_3可以组合以形成CR′-CR″烷基、CR′-CR″烯基、CR′-CR″炔基、被取代或未被取代的脂族、芳基、杂芳基、杂环或一起形成环烷基或杂环。

[0476] 通常，所述谷胱甘肽敏感性部分(L_1)包含二硫桥或磺酰基。在某些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分包含二硫桥。在其他实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分包含磺酰基。

[0477] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分(L_1)由如前所述的式II，式III，或式IV表示。

[0478] 在某些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分(L_1)由如前所述的式IIa表示。

[0479] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分(L_1)由如前所述的式IIIa或IIIb表示。

[0480] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分(L_1)由如前所述的式IIIa(i)或IIIb(i)表示。

[0481] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分(L_1)由如前所述的式IVa，IVb，IVc，IVd，或IVe表示。

[0482] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分(L_1)由如前所述的式IVa(i)，IVb(i)，IVb(ii)，IVc(i)，或IVd(i)表示。

[0483] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分(L_1)由如前所述的式IVe (i)，IVe(ii)，IVe(iii)，IVe(iv)，IVe(v)，IVe(vi)，IVe(vii)，IVe(viii)，IVe(ix)，IVe(x)，或IVe(xi)表示。

[0484] 在某些实施方案中，X是O。

[0485] 在某些实施方案中，R_1、R_2、R_3和R_4是氢。

[0486] 在某些实施方案中，J是O。

[0487] 在某些实施方案中，B是天然核碱基。

[0488] 在某些实施方案中，U_2是O。

[0489] 在某些实施方案中，W_1是亚磷酰胺，保护基团，或氢。

[0490] 在某些实施方案中，A_1是亚磷酰胺，保护基团，或氢。

[0491] 在某些实施方案中，W_1是亚磷酰胺且A_1是保护基团。

[0492] 在某些实施方案中，W_1是保护基团且A_1是亚磷酰胺。

[0493] 在某些实施方案中，I是CH_2。

[0494] 在某些实施方案中，U_3是O。

[0495] 在某些实施方案中，X是O，R_1、R_2、R_3和R_4是氢，且J是O。

[0496] 在某些实施方案中，X是O；R_1、R_2、R_3和R_4是氢；J是O；B是天然核碱基；U_2是O；I是CH_2；W_1是亚磷酰胺，A_1是保护基团，且U_3是O。

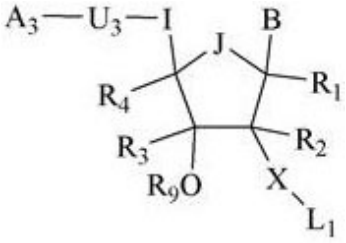
[0497] 在某些实施方案中，X是O；R_1、R_2、R_3和R_4是氢；J是O；B是天然核碱基；U_2是O；I是CH_2；W_1是保护基团，A_1是亚磷酰胺，且U_3是O。

[0498] 在某些实施方案中，所述亚磷酰胺具有式—P(OR^x)—N(R^y)$_2$，其中R^{x}选自任选地取

代的甲基、2-氰基乙基和苄基，其中R^y中的每一个选自任选地取代的乙基和异丙基。在某些实施方案中，R^X是2-氰基乙基且R^y是异丙基。

[0499] 2.式IX

[0500] 在某些实施方案中，所述核苷亚磷酰胺由下式表示：

[0501] 

IX

[0502] 其中L_1是谷胱甘肽敏感性部分；

[0503] 其中R_9是亚磷酰胺；

[0504] 其中X是O、S、Se或NR′，其中R′选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基、被取代或未被取代的杂芳基或被取代或未被取代的杂环；

[0505] 其中R_1、R_2、R_3和R_4各自独立地选自氢，卤素，OH，C_1-C_6烷基，C_1-C_6卤代烷基或其中R_1、R_2、R_3和R_4中的两个一起形成5-8元环，其中所述环任选地含有杂原子；

[0506] 其中J是O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″中的每一个独立地选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基或杂芳基；

[0507] 其中B是氢、天然核碱基、修饰核碱基或通用核碱基；

[0508] 其中I是不存在的或选自O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环和被取代或未被取代的环烷基；

[0509] 其中U_3是氢或选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环和被取代或未被取代的环烷基；

[0510] 其中I和U_3可以组合以形成CR′-CR″烷基、CR′-CR″烯基、CR′-CR″炔基、被取代或未被取代的脂族、芳基、杂芳基、杂环或一起形成环烷基或杂环；和

[0511] 其中A_3是不存在的、氢、磷酸酯基团、磷酸酯模拟物、氨基磷酸酯、保护基团或固体载体。

[0512] 通常，L_1包含二硫桥或磺酰基。在某些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分包含二硫桥。在其他实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分包含磺酰基。

[0513] 在一些实施方案中，L_1由如前所述的式II表示。在一些实施方案中，L_1由如前所述的式IIa表示。

[0514] 在其他实施方案中，L_1由如前所述的式III表示。在一些实施方案中，式III选自如前所述的式IIIa，IIIa(i)，IIIb，或IIIb(i)。

[0515] 在另外其他实施方案中，L_1由如前所述的式IV表示。在一些实施方案中，式IV选自如前所述的式IVa，IVb，IVc，IVd，或IVe。在一些实施方案中，式IV选自如前所述的式IVa(i)，IVb(i)，IVb(ii)，IVc(i)，或IVd(i)。在一些实施方案中，式IVe选自如前所述的式IVe(i)，IVe(ii)，IVe(iii)，IVe(iv)，IVe(v)，IVe(vi)，IVe(vii)，IVe(viii)，IVe(ix)，IVe

(x)，或IVe(xi)。

[0516] 在某些实施方案中，X是O。

[0517] 在某些实施方案中，R_1、R_2、R_3和R_4是氢。

[0518] 在某些实施方案中，J是O。

[0519] 在某些实施方案中，B是天然核碱基。

[0520] 在某些实施方案中，A_3是保护基团或氢。

[0521] 在某些实施方案中，I是CH_2。

[0522] 在某些实施方案中，U_3是O。

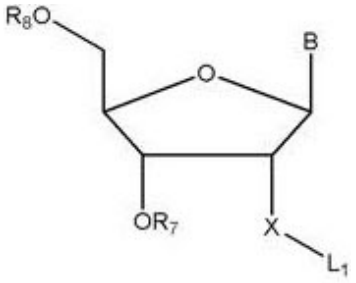
[0523] 在某些实施方案中，X是O，R_1、R_2、R_3和R_4是氢，且J是O。

[0524] 在某些实施方案中，X是O；R_1、R_2、R_3和R_4是氢；J是O；B是天然核碱基；I是CH_2；A_3是保护基团，且U_3是O。

[0525] 在某些实施方案中，所述亚磷酰胺具有式—P(OR^x)—N(R^y)$_2$，其中R^{x}选自任选地取代的甲基、2-氰基乙基和苄基，其中R^{y}中的每一个选自任选地取代的乙基和异丙基。在某些实施方案中，R^{X}是2-氰基乙基且R^{y}是异丙基。

[0526] 3．式X

[0527] 在某些实施方案中，所述核苷亚磷酰胺由下式表示：

[0528] 

X

[0529] L_1是谷胱甘肽敏感性部分；

[0530] R_8是H，保护基团，固体载体，或亚磷酰胺；

[0531] R_7是H，保护基团，固体载体，或亚磷酰胺；

[0532] 其中如果R_8是亚磷酰胺，则R_7是H、固体载体或保护基团，或如果R_8是H、固体载体或保护基团，则R_7是亚磷酰胺；

[0533] 其中B是天然核碱基、修饰核碱基或通用核碱基；和

[0534] 其中X是O、S、Se、NR′，其中R′可以选自氢，卤素，脂族或被取代的脂族，芳基，被取代或未被取代的杂芳基，被取代或未被取代的杂环基。

[0535] 通常，L_1包含二硫桥或磺酰基。在某些实施方案中，L_1包含二硫桥。在其他实施方案中，L_1包含磺酰基。

[0536] 在一些实施方案中，L_1由如前所述的式II表示。在一些实施方案中，L_1由如前所述的式IIa表示。

[0537] 在其他实施方案中，L_1由如前所述的式III表示。在一些实施方案中，式III选自如前所述的式IIIa，IIIa(i)，IIIb，或IIIb(i)。

[0538] 在另外其他实施方案中，L_1由如前所述的式IV表示。在一些实施方案中，式IV选自如前所述的式IVa，IVb，IVc，IVd，或IVe。在一些实施方案中，式IV选自如前所述的式IVa

(i),IVb(i),IVb(ii),IVc(i),或IVd(i)。在一些实施方案中,式IVe选自如前所述的式IVe(i),IVe(ii),IVe(iii),IVe(iv),IVe(v),IVe(vi),IVe(vii),IVe(viii),IVe(ix),IVe(x),或IVe(xi)。

[0539] 在某些实施方案中,X是O。

[0540] 在某些实施方案中,B是天然核碱基。

[0541] 在某些实施方案中,所述亚磷酰胺具有式—P(OR^x)—N(R^y)$_2$,其中R^{x}选自任选地取代的甲基、2-氰基乙基和苄基,其中R^{y}中的每一个选自任选地取代的乙基和异丙基。在某些实施方案中,R^{X}是2-氰基乙基且R^{y}是异丙基。

[0542] 在某些实施方案中,R$_8$是具有式—P(OR^x)—N(R^y)$_2$的亚磷酰胺且R$_9$是H或保护基团。

[0543] 在某些实施方案中,R$_9$是具有式—P(OR^x)—N(R^y)$_2$的亚磷酰胺且R$_8$是H或保护基团。

[0544] 在某些实施方案中,X是O;B是天然核碱基;R$_8$是保护基团,和R$_9$是具有式—P(OR^x)—N(R^y)$_2$的亚磷酰胺。

[0545] 在某些实施方案中,X是O;B是天然核碱基;R$_8$是具有式—P(OR^x)—N(R^y)$_2$的亚磷酰胺且R$_9$是保护基团。在某些实施方案中,R^{X}是2-氰基乙基且R^{y}是异丙基。

[0546] B.不具有亚磷酰胺的谷胱甘肽敏感性核苷和核苷酸

[0547] 在一些实施方案中,所述可逆修饰的谷胱甘肽敏感性单体(核苷或核苷酸或其类似物)不含有在糖部分的3′-碳或5′-碳的亚磷酰胺基团。这种谷胱甘肽敏感性单体可以用作治疗剂,例如用作具有抗病毒活性的核苷或核苷酸类似物。通常,所述可逆修饰包含在核苷酸或核苷(或其类似物)的糖部分例如脱氧核糖或核糖(或其类似物)的谷胱甘肽敏感性部分。通常,所述谷胱甘肽敏感性部分位于脱氧核糖或核糖(或其类似物)的2′-碳。在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分位于核糖或脱氧核糖(或其类似物)的5′-碳。在其他实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分位于核糖或脱氧核糖(或其类似物)的3′-碳。

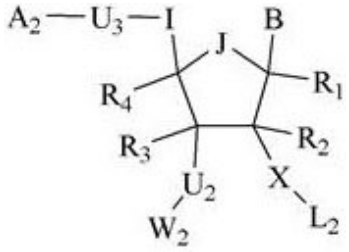
[0548] 在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分包含磺酰基。在其他实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分包含二硫桥。

[0549] 在某些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性单体包含与氧原子结合的谷胱甘肽敏感性部分,所述氧原子共价结合到单体的糖部分(例如,核糖)的2′-碳。在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分由如前所述的式II表示。在某些实施方案中,式II是如本文所述的式IIa。在其他实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性部分由如前所述的式III表示。在一些实施方案中,式III选自如前所述的式IIIa,IIIa(i),IIIb,或IIIb(i)。在另外其他实施方案中,谷胱甘肽敏感性部分由如前所述的式IV表示。在一些实施方案中,式IV选自如前所述的式IVa,IVb,IVc,IVd,或IVe。在一些实施方案中,式IV选自如前所述的式IVa(i),IVb(i),IVb(ii),IVc(i),或IVd(i)。在一些实施方案中,式IVe选自如前所述的式IVe(i),IVe(ii),IVe(iii),IVe(iv),IVe(v),IVe(vi),IVe(vii),IVe(viii),IVe(ix),IVe(x),或IVe(xi)。

[0550] 在某些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性单体(核苷或核苷酸或其类似物)配制在包含治疗有效量的谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸(或其类似物)和药物载体的药物组合物中,如下进一步详细地描述。

[0551] 1.式XI

[0552] 在一些实施方案中,所述谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸由下式表示:

[0553] 

XI

[0554] 其中L_2是由式II、III或IV表示的谷胱甘肽敏感性部分，或如果A_2或W_2之一是谷胱甘肽敏感性部分则不存在；

[0555] 其中如果L_2是谷胱甘肽敏感性部分，则X是O、S、Se或NR′，其中R′选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基、被取代或未被取代的杂芳基或被取代或未被取代的杂环，或如果L_2是不存在的，则X是H，OH，SH，NH_2，卤素，任选地取代的烷氧基，任选地取代的烷基，任选地取代的烯基，任选地取代的炔基，任选地取代的烷硫基，任选地取代的烷基氨基或二烷基氨基，其中烷基、烯基和炔基中的一个或多个亚甲基可以被O、S、S(O)、SO_2、N(R′)、C(O)、N(R′)C(O)O、OC(O)N(R′)任选地取代的芳基、任选地取代的杂芳基、任选地取代的杂环基或任选地取代的环烷基、O、S、Se或NHR′中的一个或多个中断，其中R′选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基、被取代或未被取代的杂芳基或被取代或未被取代的杂环；

[0556] 其中R_1、R_2、R_3和R_4各自独立地选自氢，卤素，OH，C_1-C_6烷基，C_1-C_6卤代烷基，或其中R_1、R_2、R_3和R_4中的两个一起形成5-8元环，其中所述环任选地含有杂原子；

[0557] 其中J是O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″中的每一个独立地选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基或杂芳基；

[0558] 其中B选自氢、天然核碱基、修饰核碱基或通用核碱基；

[0559] 其中U_2是不存在的或选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环或被取代或未被取代的环烷基；

[0560] 其中W_2是由式II、III或IV表示的谷胱甘肽敏感性部分、氢、卤素、OR′、SR′、NR′R″、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的环烷基，被取代或未被取代的杂环，其中R′和R″各自独立地选自氢、卤素、被取代或未被取代的脂族、芳基、杂芳基、杂环或一起形成杂环；

[0561] 其中I是不存在的或选自O、S、NR′、CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环和被取代或未被取代的环烷基；

[0562] 其中U_3是氢或选自O、S、NR′或CR′R″，其中R′和R″各自独立地是氢、被取代或未被取代的脂族、被取代或未被取代的芳基、被取代或未被取代的杂芳基、被取代或未被取代的杂环和被取代或未被取代的环烷基；

[0563] 其中I和U_3可以组合以形成CR′-CR″烷基、CR′-CR″烯基、CR′-CR″炔基、被取代或未被取代的脂族、芳基、杂芳基、杂环或一起形成环烷基或杂环；和

[0564] 其中A_2是不存在的、氢、磷酸酯基团、磷酸酯模拟物、氨基磷酸酯，或由式II、III或IV表示的谷胱甘肽敏感性部分。

[0565] 在一些实施方案中，A_2是由式II、III或IV表示的谷胱甘肽敏感性部分。在一些实施方案中，W_2是由式II、III或IV表示的谷胱甘肽敏感性部分。在一些实施方案中，L_2是由式II、III或IV表示的谷胱甘肽敏感性部分且A_2和W_2都不是由式II、III或IV表示的谷胱甘肽敏感性部分。

[0566] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由如前所述的式II表示。在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由如前所述的式IIa表示。

[0567] 在其他实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性部分由如前所述的式III表示。在一些实施方案中，式III选自如前所述的式IIIa，IIIa(i)，IIIb，或IIIb(i)。在另外其他实施方案中，谷胱甘肽敏感性部分由如前所述的式IV表示。在一些实施方案中，式IV选自如前所述的式IVa，IVb，IVc，IVd，或IVe。在一些实施方案中，式IV选自如前所述的式IVa(i)，IVb(i)，IVb(ii)，IVc(i)，或IVd(i)。在一些实施方案中，式IVe选自如前所述的式IVe(i)，IVe(ii)，IVe(iii)，IVe(iv)，IVe(v)，IVe(vi)，IVe(vii)，IVe(viii)，IVe(ix)，IVe(x)，或IV(xi)。

[0568] 在某些实施方案中，X是O。

[0569] 在某些实施方案中，R_1、R_2、R_3和R_4是氢。

[0570] 在某些实施方案中，J是O。

[0571] 在某些实施方案中，B是天然核碱基。

[0572] 在某些实施方案中，U_2是O。

[0573] 在某些实施方案中，W_2是氢。

[0574] 在某些实施方案中，U_3是O。

[0575] 在某些实施方案中，I是CH_2。

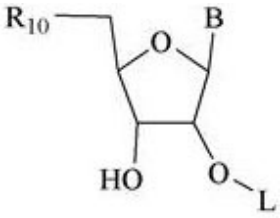
[0576] 在某些实施方案中，A_2是氢或磷酸酯基团。

[0577] 在某些实施方案中，X是O，R_1、R_2、R_3和R_4是氢，且J是O。

[0578] 在某些实施方案中，X是O；R_1、R_2、R_3和R_4是氢；J是O；B是天然核碱基；U_2是O；I是CH_2；W_2是氢，U_3是O；和A_2是氢或磷酸酯基团。

[0579] 2．式XII

[0580] 在一些实施方案中，所述谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸单体由下式表示：

[0581] 

XII

[0582] 其中R_{10}是羟基，磷酸酯模拟物，或磷酸酯基团；

[0583] 其中L选自式II、III或IV，如上所述；和

[0584] 其中B是氢、天然核碱基、修饰核碱基或通用核碱基。

[0585] 在一些实施方案中，L由如前所述的式II表示。在一些实施方案中，L由如前所述的式IIa表示。

[0586] 在其他实施方案中，L由如前所述的式III表示。在一些实施方案中，式III选自如前所述的式IIIa，IIIa(i)，IIIb，或IIIb(i)。

[0587] 在另外其他实施方案中,L由如前所述的式IV表示。在一些实施方案中,式IV选自如前所述的式IVa,IVb,IVc,IVd,或IVe。在一些实施方案中,式IV选自如前所述的式IVa(i),IVb(i),IVb(ii),IVc(i),或IVd(i)。在一些实施方案中,式IVe选自如前所述的式IVe(i),IVe(ii),IVe(iii),IVe(iv),IVe(v),IVe(vi),IVe(vii),IVe(viii),IVe(ix),IVe(x),或IVe(xi)。

[0588] C.保护基团

[0589] 在谷胱甘肽敏感性核苷酸或核苷的一些实施方案中,保护基团与B即天然、修饰或通用核碱基连接。用于B的合适保护基团包括乙酰基,二氟乙酰基,三氟乙酰基,异丁酰基,苯甲酰基,9-芴基甲氧基羰基,苯氧基乙酰基,二甲基甲脒,二丁基甲脒和N,N-二苯基氨基甲酸酯。

[0590] 在一些实施方案中,保护基团与上述核苷中的羟基连接,特别是对于核苷亚磷酰胺。用于上述核苷的羟基的合适保护基团包括与固相寡核苷酸合成相容的任何保护基团,包括但不限于二甲氧基三苯甲基、单甲氧基三苯甲基和/或三苯甲基基团。典型的实例是4,4'-二甲氧基三苯基甲基(DMTr)基团,其可以在酸性条件下(例如在二氯乙酸(DCA),三氯乙酸(TCA),三氟乙酸(TFA)或乙酸的存在下)容易地裂解。

[0591] 其他典型的羟基保护基团包括三烷基甲硅烷基,例如叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)。TBDMS基团在合成周期期间用于除去DMT基团的酸性条件下是稳定的,但可以在RNA寡聚物的裂解和脱保护后通过多种方法除去,例如用氟化四丁基铵(TBAF)的四氢呋喃(THF)溶液或用三乙胺氢氟酸盐。其他典型的羟基保护基团包括叔丁基二苯基甲硅烷基醚(TBDPS),其可以例如用氟化铵除去。

[0592] IV.核碱基

[0593] 在上述谷胱甘肽敏感性寡核苷酸、核苷酸和核苷中,B表示天然核碱基、修饰核碱基或通用核碱基。

[0594] 合适的天然核碱基包括嘌呤和嘧啶碱基,例如腺嘌呤(A),胸腺嘧啶(T),胞嘧啶(C),鸟嘌呤(G)或尿嘧啶(U)。

[0595] 合适的修饰核碱基包括二氨基嘌呤及其衍生物,烷基化嘌呤或嘧啶,酰化嘌呤或嘧啶,巯基化(thiolated)嘌呤或嘧啶等。

[0596] 其他合适的修饰核碱基包括嘌呤和嘧啶的类似物。合适的类似物包括但不限于1-甲基腺嘌呤,2-甲基腺嘌呤,N6-甲基腺嘌呤,N6-异戊基腺嘌呤,2-甲硫基-N6-异戊基腺嘌呤,N,N-二甲基腺嘌呤,8-溴腺嘌呤,2-硫胞嘧啶,3-甲基胞嘧啶,5-甲基胞嘧啶,5-乙基胞嘧啶,4-乙酰基胞嘧啶,1-甲基鸟嘌呤,2-甲基鸟嘌呤,7-甲基鸟嘌呤,2,2-二甲基鸟嘌呤,8-溴鸟嘌呤,8-氯鸟嘌呤,8-氨基鸟嘌呤,8-甲基鸟嘌呤,8-硫鸟嘌呤,5-氟尿嘧啶,5-溴尿嘧啶,5-氯尿嘧啶,5-碘尿嘧啶,5-乙基尿嘧啶,5-丙基尿嘧啶,5-甲氧基尿嘧啶,5-羟基甲基尿嘧啶,5-(羧基羟甲基)尿嘧啶,5-(甲基氨基甲基)尿嘧啶,5-(羧甲基氨基甲基)-尿嘧啶,2-硫尿嘧啶,5-甲基-2-硫尿嘧啶,5-(2-溴乙烯基)尿嘧啶,尿嘧啶-5-羟基乙酸,尿嘧啶-5-羟基乙酸甲酯,假尿嘧啶,1-甲基假尿嘧啶,queosine,次黄嘌呤,黄嘌呤,2-氨基嘌呤,6-羟氨基嘌呤,硝基吡咯基,硝基吲哚基和二氟甲苯基,6-硫嘌呤和2,6-二氨基嘌呤硝基吡咯基,硝基吲哚基和二氟甲苯基。

[0597] 通常,核碱基含有含氮碱基。在某些实施方案中,核碱基不含氮原子。参见例如,美

国公开专利申请号20080274462。

[0598] 通用核碱基是指可以与通常在天然存在的核酸中发现的多于一个碱基配对、且因此可以在双链体中取代这种天然存在的碱基的碱基。碱基不需要能够与每种天然存在的碱基配对。例如，某些碱基仅与嘌呤或选择性地与嘌呤配对，或仅与嘧啶或选择性与嘧啶配对。通用核碱基可以经由Watson-Crick或非Watson-Crick相互作用(例如，Hoogsteen相互作用)形成氢键而碱基配对。代表性的通用核碱基包括肌苷及其衍生物。

[0599] V. 式I-XII中的其他取代基

[0600] 在式I-XII中，适当时，合适的脂族基团通常含有约2至约10个碳原子，更通常约2至约6个碳原子，例如约2至约5个碳原子。

[0601] 在式I-XII中，适当时，合适的烷基基团通常含有约1至约10个碳原子，更通常约2至约6个碳原子，例如约2至约5个碳原子。

[0602] 在式I-XII中，适当时，合适的烷氧基基团包括甲氧基，乙氧基，丙氧基，异丙氧基，正丁氧基，叔丁氧基，新戊氧基和正己氧基等。

[0603] 在式I-XII中，适当时，合适的环烷基包括环丙基，环丁基，环戊基，环己基，环庚基等。

[0604] 在式I-XII中，适当时，合适的杂原子包括氧、硫和氮。代表性的杂环包括吡咯烷基，吡唑啉基，吡唑烷基，咪唑啉基，咪唑烷基，哌啶基，哌嗪基，噁唑烷基，异噁唑烷基，吗啉基，噻唑烷基，异噻唑烷基和四氢呋喃基。代表性的杂芳基包括呋喃基，噻吩基，吡啶基，吡咯基，N-低级烷基吡咯并，嘧啶基，吡嗪基，咪唑基。

[0605] 在式I-XII中，适当时，合适的烯基基团包括乙烯基，烯丙基和2-甲基-3-庚烯，且合适的炔基基团包括丙炔和3-己炔。

[0606] 在式I-XII中，适当时，合适的芳基基团包括苯基，萘基等，而合适的杂芳基基团包括吡啶基，呋喃基，咪唑基，苯并咪唑基，嘧啶基，硫代苯基(thiophenyl)或噻吩基(thienyl)，喹啉基，吲哚基，噻唑基等。

[0607] 在式I-XII中，适当时，合适的烷基氨基包括-$CH_2CH_2CH_2NH$-或CH_2CH_2NH-。

[0608] VI. 合成寡核苷酸的方法

[0609] 如上所讨论，本申请公开包含谷胱甘肽敏感性部分的核苷，其与标准的基于亚磷酰胺的寡核苷酸合成方法相容。

[0610] 本申请中描述的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸可以使用本领域已知的多种合成方法制备，包括标准亚磷酰胺方法。任何亚磷酰胺合成方法可用于合成本发明的谷胱甘肽敏感性寡核苷酸。在某些实施方案中，亚磷酰胺在固相合成方法中用以产生反应性中间体亚磷酸酯化合物，其随后使用已知方法氧化以产生谷胱甘肽敏感性寡核苷酸，通常具有磷酸二酯或硫代磷酸酯核苷酸间连接。本公开的寡核苷酸合成可以使用本领域已知的方法在任一方向上进行:5'至3'或3'至5'。

[0611] 因此，在另一方面，本公开涉及使用谷胱甘肽敏感性核苷亚磷酰胺合成寡核苷酸的方法，例如上文讨论且例如由式VIII，IX或X表示的那些核苷亚磷酰胺。通常，谷胱甘肽敏感性部分位于核糖或脱氧核糖(或其类似物)的2'-碳，且包含磺酰基或二硫桥，包括例如由式II，III和IV表示的谷胱甘肽敏感性部分。在某些实施方案中，用于合成寡核苷酸的方法包括:(a)经由共价连接将核苷连接到固体载体；(b)将核苷亚磷酰胺与步骤(a)的核苷上的

反应性羟基偶联以在其间形成核苷酸间键，其中所述固体载体上的任何未偶联的核苷用封端试剂封端；(c)用氧化剂氧化所述核苷酸间键；和(d)迭代地用后续的核苷亚磷酰胺重复步骤(b)至(c)以形成寡核苷酸，其中至少步骤(a)的核苷、步骤(b)的核苷亚磷酰胺或步骤(d)的至少一个后续的核苷亚磷酰胺包含如本文所述的谷胱甘肽敏感性部分。通常，重复偶联、封端/氧化步骤和任选的脱保护步骤，直至寡核苷酸达到所需的长度和/或序列，然后将其从固体载体裂解。

[0612] 在某些方面，寡核苷酸包含至少一个具有谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸，且通过使用包含至少一个谷胱甘肽敏感性部分的核苷亚磷酰胺的基于亚磷酰胺的寡核苷酸合成方法制备。在某些实施方案中，寡核苷酸通过包括以下步骤的方法制备：(a)经由共价连接将核苷连接到固体载体；(b)将核苷亚磷酰胺与步骤(a)的核苷上的反应性羟基偶联以在其间形成核苷酸间键，其中所述固体载体上的任何未偶联的核苷用封端试剂封端；(c)用氧化剂氧化所述核苷酸间键；(d)迭代地用后续的核苷亚磷酰胺重复步骤(b)至(c)以形成寡核苷酸；和(e)任选地从固体载体裂解寡核苷酸，其中至少步骤(a)的核苷、步骤(b)的核苷亚磷酰胺或步骤(d)的至少一个后续的核苷亚磷酰胺包含谷胱甘肽敏感性部分。

[0613] VII. 药物组合物

[0614] 本公开提供药物组合物，其包含谷胱甘肽敏感性寡核苷酸或谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸，和药学上可接受的赋形剂。

[0615] 在一些实施方案中，药物组合物包含药学上可接受的赋形剂和治疗有效量的核酸抑制剂分子，其中所述核酸抑制剂分子包含至少一个包含谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸，如本文所述。如其他地方所述，谷胱甘肽敏感性部分通常位于核苷酸的糖部分的2'-碳，且通常包含磺酰基或二硫桥，包括例如由如前所述的式II、III或IV表示的谷胱甘肽敏感性部分。

[0616] 在一些实施方案中，药物组合物包含药学上可接受的赋形剂和治疗有效量的核酸抑制剂分子，其中所述核酸抑制剂分子包含至少一个由如前所述的式I，V，VI或VII表示的谷胱甘肽敏感性核苷酸。

[0617] 在其他实施方案中，药物组合物包含药学上可接受的赋形剂和治疗有效量的谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸，如例如通过如前所述的式XI和XII所示。

[0618] A. 药学上可接受的赋形剂

[0619] 可用于本公开的药学上可接受的赋形剂是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第15版(1975)描述适用于一种或多种治疗组合物的药物递送的组合物和制剂。可用作药学上可接受的赋形剂的材料的一些实例包括：糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；麦芽；明胶；赋形剂，如可可脂和栓剂蜡；油，如花生油，棉籽油，红花油，芝麻油，橄榄油，玉米油和大豆油；缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；(等渗盐水；林格氏溶液)；乙醇；pH缓冲溶液；多元醇，例如甘油，丙二醇，聚乙二醇等；和药物制剂中使用的其他无毒相容物质。

[0620] B. 剂型

[0621] 药物组合物可以与常规赋形剂一起配制用于任何预期的施用途径，其可以根据常规实践选择。

[0622] 在一个实施方案中，药物组合物含有谷胱甘肽敏感性寡核苷酸或谷胱甘肽敏感性核苷酸或核苷，如本文所述，且适用于肠胃外施用。通常，含有寡核苷酸的本公开的药物组合物以液体形式配制用于肠胃外施用，例如通过皮下，肌肉内，静脉内或硬膜外注射。适用于胃肠外施用的剂型通常包括一种或多种用于肠胃外施用的合适媒介，包括例如无菌水溶液，盐水，低分子量醇如丙二醇，聚乙二醇，植物油，明胶，脂肪酸酯例如油酸乙酯等。肠胃外制剂可含有糖，醇，抗氧化剂，缓冲剂，抑菌剂，使制剂与预期的接受者的血液等渗的溶质，或悬浮剂或增稠剂。例如，通过使用表面活性剂可以保持适当的流动性。液体制剂可以冻干并储存以便在用无菌可注射溶液重构后的在后使用。

[0623] 在另一个实施方案中，药物组合物含有谷胱甘肽敏感性寡核苷酸或谷胱甘肽敏感性核苷酸或核苷，如本文所述，且适合口服施用。通常，含有核苷酸或核苷的本公开的药物组合物被配制用于口服施用。用于口服施用的合适药物组合物可以是胶囊，片剂，丸剂，锭剂，扁囊剂，糖衣丸，粉末，颗粒等形式。

[0624] 药物组合物还可以配制用于其他施用途径，包括使用熟知的技术局部或透皮施用，直肠或阴道施用，眼部施用，鼻腔施用，口腔施用或舌下施用。

[0625] C.递送剂

[0626] 谷胱甘肽敏感性核酸抑制剂分子、核苷酸或核苷可以与其他分子、分子结构或化合物的混合物混合、包封、缀合或以其他方式缔合，其他分子、分子结构或化合物的混合物包括例如脂质体和脂质，例如美国专利号6,815,432,6,586,410,6,858,225,7,811,602,7,244,448和8,158,601中公开的那些；聚合物材料，例如美国专利号6,835,393,7,374,778,7,737,108,7,718,193,8,137,695和美国公开专利申请号2011/0143434,2011/0129921,2011/0123636,2011/0143435,2011/0142951,2012/0021514,2011/0281934,2011/0286957和2008/0152661中公开的那些；衣壳，capsoids，或用于辅助摄取、分布或吸收的受体靶向分子。

[0627] 在某些实施方案中，将谷胱甘肽敏感性核酸抑制剂分子、核苷酸或核苷配制在脂质纳米颗粒(LNP)中。脂质-核酸纳米颗粒通常在将脂质与核酸混合以形成复合物时自发形成。取决于所需的粒度分布，所得纳米颗粒混合物可任选地通过聚碳酸酯膜(例如，100nm截止)挤出，使用例如热桶(thermobarrel)挤出机，例如LIPEX®挤出机(Northern Lipids, Inc)。为了制备用于治疗用途的脂质纳米颗粒，可能需要除去用于形成纳米颗粒和/或交换缓冲液的溶剂(例如乙醇)，这可以通过例如透析或切向流过滤来完成。制备含有核酸干扰分子的脂质纳米颗粒的方法是本领域已知的，如例如在美国公开专利申请号2015/0374842和2014/0107178中公开的。

[0628] 在某些实施方案中，LNP包含脂质核心，其包含阳离子脂质和聚乙二醇化脂质。LNP可进一步包含一种或多种包膜脂质，例如阳离子脂质，结构或中性脂质，甾醇，聚乙二醇化脂质，或其混合物。

[0629] 在某些实施方案中，本发明的寡核苷酸与配体共价缀合，所述配体引导寡核苷酸向感兴趣组织的递送。已经探索许多这样的配体。参见，例如，Winkler, Ther. Deliv., 4(7): 791-809(2013)。例如，本发明的寡核苷酸可以与多个糖配体部分(例如，N-乙酰半乳糖胺(GalNAc))缀合以引导寡核苷酸摄取到肝脏中。参见，例如，WO 2016/100401。可以使用的其他配体包括但不限于甘露糖-6-磷酸酯，胆固醇，叶酸(盐/酯)，转铁蛋白和半乳糖(对

于其他特定的示例性配体,参见例如WO2012/089352)。通常,当寡核苷酸与配体缀合时,寡核苷酸作为裸寡核苷酸施用,其中寡核苷酸也不配制在LNP或其他保护性覆层中。在某些实施方案中,裸寡核苷酸含有至少一个具有谷胱甘肽敏感性部分的核苷酸,裸寡核苷酸的剩余核苷酸的糖部分的2'-位置通常用2'-F或2'-OMe修饰。

[0630] 这些药物组合物可以通过常规灭菌技术灭菌,或可以无菌过滤。所得水溶液可以包装以原样使用,或冻干,冻干制剂在施用前与无菌水性载体组合。制剂的pH通常将为3至11,更优选为5至9或6至8,且最优选为7至8,例如7至7.5。固体形式的药物组合物可以包装在多个单剂量单位(各自含有固定量的上述一种或多种试剂)中,例如在片剂或胶囊的密封包装中。固体形式的药物组合物也可以灵活的量包装在容器中,例如在设计用于可局部施加的乳膏或软膏的可挤压管中。

[0631] 本公开的药物组合物用于治疗用途。因此,本公开的一个方面提供药物组合物,其可以用于通过向所述受试者施用有效量的本公开的药物组合物治疗受试者,包括但不限于患有疾病或病症的人。

[0632] 在某些实施方案中,本公开的特点在于治疗有效量的如本文所述的药物组合物用于制造治疗有此需要的患者的药剂的用途。

[0633] VIII. 施用/治疗方法

[0634] 本文所述的药物组合物通常口服或胃肠外施用。含有本发明的谷胱甘肽敏感性核酸抑制剂分子的药物组合物通常静脉内或皮下施用。含有本发明的谷胱甘肽敏感性核苷酸或核苷的药物组合物通常口服施用。然而,本文公开的药物组合物还可以通过本领域已知的任何方法施用,包括例如口腔,舌下,直肠,阴道,尿道内,局部,眼内,鼻内和/或耳内,其施用可包括片剂,胶囊,颗粒,水性悬浮液,凝胶,喷雾剂,栓剂,油膏(salves),软膏等。

[0635] 在某些实施方案中,本文公开的药物组合物可用于治疗或预防有此需要的患者中与病毒感染相关的症状。一个实施方案涉及治疗病毒感染的方法,包括向受试者施用药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的如本文所述的谷胱甘肽敏感性核酸抑制剂分子、核苷酸或核苷。在某些实施方案中,药物组合物包含谷胱甘肽敏感性核苷或核苷酸,如例如通过如前所述的式XI和XII表示。这种病毒感染的非限制性实例包括HCV,HBV,HPV,HSV或HIV感染。

[0636] 在某些实施方案中,本文公开的药物组合物可用于治疗或预防在有此需要的患者中与癌症相关的症状。一个实施方案涉及治疗癌症的方法,其包括向受试者施用包含治疗有效量的如本文所述的谷胱甘肽敏感性核酸抑制剂分子的药物组合物。这种癌症的非限制性实例包括胆道癌,膀胱癌,移行细胞癌,尿路上皮癌,脑癌,神经胶质瘤,星形细胞瘤,乳腺癌,化生性癌,宫颈癌,宫颈鳞状细胞癌,直肠癌,结肠直肠癌,结肠癌,遗传性非息肉病性结直肠癌,结直肠腺癌,胃肠道间质瘤(GISTs),子宫内膜癌,子宫内膜间质肉瘤,食道癌,食管鳞状细胞癌,食管腺癌,眼黑素瘤,葡萄膜黑色素瘤,胆囊癌,胆囊腺癌,肾细胞癌,透明细胞肾细胞癌,移行细胞癌,尿路上皮癌,wilms肿瘤,白血病,急性淋巴细胞白血病(ALL),急性髓性白血病(AML),慢性淋巴细胞白血病(CLL),慢性髓性白血病(CML),慢性单核细胞白血病(CMML),肝癌,肝恶瘤,肝细胞瘤,肝细胞癌,胆管癌,肝母细胞癌,肺癌,非小细胞肺癌(NSCLC),间皮瘤,B细胞淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,套细胞淋巴瘤,T细胞淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,前体T淋巴母细胞淋巴瘤/白血病,外周T细胞淋巴瘤,多发性

骨髓瘤，鼻咽癌(NPC)，神经母细胞瘤，口咽癌，口腔鳞状细胞癌，骨肉瘤，卵巢癌，胰腺癌，胰腺导管腺癌，假乳头状肿瘤，腺泡细胞癌，前列腺癌，前列腺腺癌，皮肤癌，黑色素瘤，恶性黑素瘤，皮肤黑色素瘤，小肠癌，胃癌(stomach cancer)，胃癌(gastric carcinoma)，胃肠道间质瘤(GIST)，子宫癌或子宫肉瘤。通常，本公开的特点在于通过施用治疗有效量的如本文所述的药物组合物来治疗肝癌、肝恶瘤、肝细胞瘤、肝细胞癌、胆管癌和肝母细胞瘤的方法。

[0637] 在某些实施方案中，本文公开的药物组合物可用于治疗或预防与增殖性、炎性、自身免疫性、神经病学、眼部、呼吸、代谢、皮肤病学、听觉、肝脏、肾脏或感染性疾病相关的症状。一个实施方案涉及治疗增殖性、炎性、自身免疫性、神经病学、眼部、呼吸、代谢、皮肤病学、听觉、肝脏、肾脏或感染性疾病的方法，包括向受试者施用包含治疗有效量的如本文所述的谷胱甘肽敏感性核酸抑制剂分子的药物组合物。通常，疾病或病症是肝脏的疾病。

[0638] 在一些实施方案中，本公开提供用于降低受试者中靶基因的表达的方法，包括以足以降低靶基因的表达的量向有此需要的受试者施用药物组合物，其中所述药物组合物包含如本文所述的谷胱甘肽敏感性核酸抑制剂分子和也如本文所述的药学上可接受的赋形剂。

[0639] 在一些实施方案中，谷胱甘肽敏感性核酸抑制剂分子是如本文所述的RNAi抑制剂分子，包括ssRNAi抑制剂分子或dsRNAi抑制剂分子。

[0640] 靶基因可以是来自任何哺乳动物的靶基因，例如人靶基因。根据本方法可以使任何基因沉默。示例性靶基因包括但不限于因子VII，Eg5，PCSK9，TPX2，apoB，SAA，TTR，HBV，HCV，RSV，PDGF β基因，Erb-B基因，Src基因，CRK基因，GRB2基因，RAS基因，MEKK基因，JNK基因，RAF基因，Erk1/2基因，PCNA(p21)基因，MYB基因，JUN基因，FOS基因，BCL-2基因，细胞周期蛋白D基因，VEGF基因，EGFR基因，细胞周期蛋白A基因，细胞周期蛋白E基因，WNT-1基因，β-连环蛋白基因，c-MET基因，PKC基因，NFKB基因，STAT3基因，存活素基因，Her2/Neu基因，拓扑异构酶I基因，拓扑异构酶II α基因，p73基因，p21(WAF1/CIP1)基因，p27(KIP1)基因，PPM1D基因，RAS基因，小窝蛋白I基因，MIB I基因，MTAI基因，M68基因，肿瘤抑制基因突变，p53肿瘤抑制基因，LDHA，及其组合。

[0641] 在一些实施方案中，谷胱甘肽敏感性核酸抑制剂分子沉默靶基因，且因此可用于治疗患有以靶基因的不希望的表达为特征的障碍或有其风险的受试者。例如，在一些实施方案中，本发明的谷胱甘肽敏感性核酸抑制剂分子沉默β-连环蛋白基因，且因此可用于治疗患有以不希望的β-连环蛋白表达为特征的障碍(例如腺癌或肝细胞癌)或有其风险的受试者。

[0642] 在某些实施方案中，药物组合物经由全身施用(例如经由静脉内或皮下施用)递送至受试者或生物体中的相关组织或细胞(例如肝脏)。在其他实施方案中，药物组合物经由局部施用或全身施用递送。在某些实施方案中，药物组合物经由局部施用递送至相关组织或细胞，例如肺细胞和组织，例如经由肺部递送。

[0643] 本文公开的化合物的治疗有效量可取决于施用途径和患者的身体特征，例如受试者的尺寸和体重，疾病进展或渗透的程度，受试者的年龄、健康和性别。如本文所用，治疗有效量是指有效预防、缓解或改善所治疗的受试者的疾病或病症症状的化合物的量。

[0644] 在某些实施方案中，谷胱甘肽敏感性寡核苷酸、核苷酸或核苷以20微克至10毫克/千克体重接受者每天，100微克至5毫克/千克，0.25毫克至2.0毫克/千克，或0.5至2.0毫克/

千克的剂量施用。

[0645] 本公开的药物组合物可以每天或间歇施用。例如,间歇施用本公开的化合物可以每周一至六天,每月一至六天,每周一次,每隔一周一次,每月一次,每隔一个月一次,或每年一次或两次或分为多个每年、每月、每周或每日剂量施用。在一些实施方案中,间歇服药可以表示以周期施用(例如每天施用一天、一周或连续两周至八周,然后是不施用至多一周、至多一个月、至多两个月、至多三个月或至多六个月或更长的休息期)或它可以表示间隔几天、几周、几个月或几年施用。

[0646] 在本发明的任何治疗方法中,化合物可以作为单一疗法单独或与本领域已知的另外的疗法组合施用到受试者。

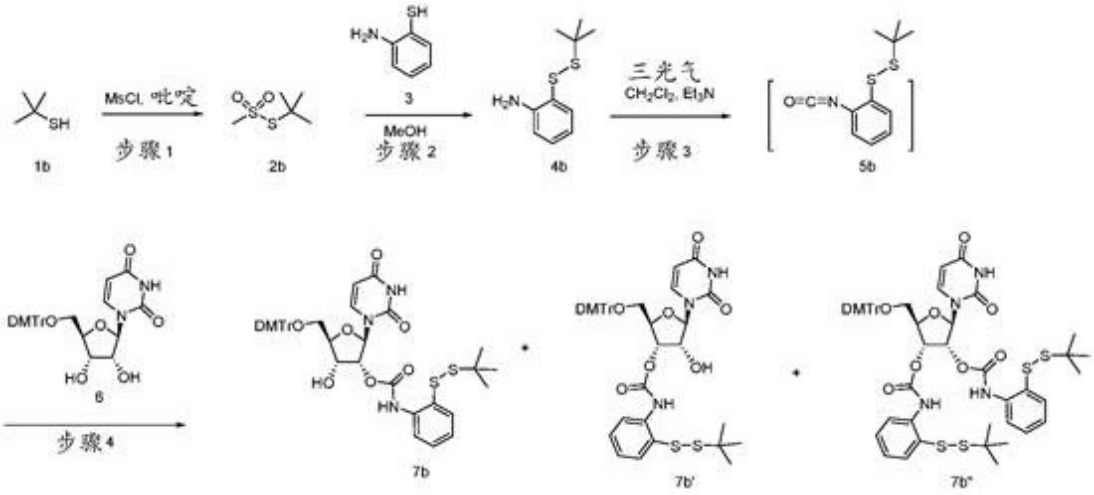
实施例

[0647] 实施例1. 谷胱甘肽敏感性化合物的合成

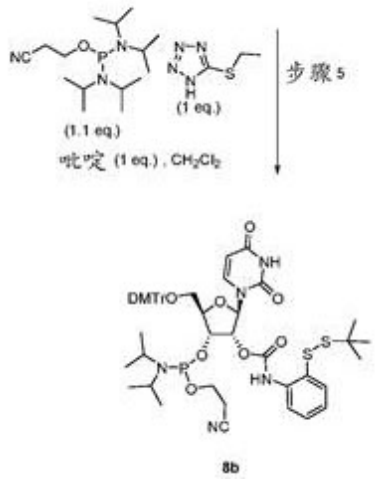
[0648] 除非另有说明,否则所有非水解反应均在购自Sigma-Aldrich Corporation(St. Louis,MO)的干燥溶剂中进行。高效液相色谱(HPLC),除amidite外,在其他方面相同的条件下使用Agilent ZORBAX® Eclipse Plus(Agilent Technologies Company, Santa Clara, CA) C18, 21 x 50毫米(mm),1.8微米柱,100 x 4.6 mm, 2.7微米柱用作为修饰剂的甲酸铵(3毫摩尔)在60°C下进行。在220纳米(nm)下记录UV迹线并使用Agilent Technologies 6140 四极杆LC/MS质谱仪以正离子模式和负离子模式二者获得质谱。使用预填充柱(Teledyne Isco, Inc., Lincoln, NE)在Teledyne Isco COMBIFLASH® Rf上通过梯度色谱进行制备纯化。NMR光谱在Varian UNITY® 600、500或400光谱仪, Varian, Inc.(Palo Alto, CA)上记录。

[0649] 化合物8b

[0650] 下面的方案1描述包含二硫桥的谷胱甘肽敏感性化合物的合成:(2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-(((2 氰基乙基)(二异丙基氨基)膦基)氧基)-2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)四氢呋喃-3-基 (2-(叔丁基二硫烷基)苯基)氨基甲酸酯(化合物8b)。化合物8b的谷胱甘肽敏感性部分被式IVe涵盖,且更具体地由式IVe(ix)表示。为了证明制备该化合物的可行性,合成具有8个核苷酸的简单模型寡聚体。根据以下方案中所示的程序合成关键中间体亚磷酰胺8b。简言之,将市售可得的叔丁基硫醇转化为活化的硫代磺酸酯2b,随后使其与2-氨基苯硫酚反应以获得二硫醚化合物4b。接着用三光气处理4b化合物生成异氰酸酯中间体5b。在没有在先分离的情况下,异氰酸酯5b化合物与5'-二甲氧基三苯甲基(DMtr)-保护的尿苷原位反应以获得2',3'-保护的氨基甲酸酯的混合物。我们在色谱纯化期间观察到氨基甲酸酯从2'-位置向3'-位置迁移。为避免这种不希望的迁移,在硅胶纯化期间使用1%吡啶溶液。在分离不需要的异构体后,化合物7b经受亚磷酰化条件,如通常用于合成的亚磷酰胺的条件。化合物8b然后通过硅胶柱色谱纯化,如在纯化含标准氰乙基的亚磷酰胺期间常用的。化合物8b表现出与标准亚磷酰胺化合物类似的生理化学行为,包括稳定性。



[0651]



[0652] 方案1。

[0653] 甲烷硫代磺酸S-叔丁基酯(2b)的合成

[0654] 向叔丁基硫醇(1b)(20克(g)),0.22摩尔(mol),1当量(equiv.)醛(Ald.))在干吡啶(100mL,无水Ald.)中的溶液中滴加甲磺酰氯(17.1毫升(mL),0.22mol,Ald.)。反应在室温下搅拌并通过薄层色谱(TLC)监测:己烷:EtOAc = 6:1;用磷钼酸(PMA)可视化,延迟因子(Rf)= 0.44。在过夜后,反应完成且反应用Et_2O稀释,然后用4N HCl酸化。将水相用Et_2O萃取,分离并经无水Na_2SO_4干燥。在用旋转蒸发器(旋蒸)浓缩后,粗产物通过ISCO色谱(ISCO REDISEP®(Teledyne Isco, Inc), 330 g)纯化且用0%至100%EtOAc的己烷溶液洗脱(通过UV监测:254 nm, 280 nm)。合并所需的级分并蒸发以得到2b的无色油(20g,53%);质子核磁共振(1H NMR)(300兆赫(MHz),氯仿-d(CDCl3)光谱如下:3.33(s,3H),1.58(s,9H))。

[0655] 2-(叔丁基二硫烷基)苯胺(4b)的合成

[0656] 向邻氨基苯硫醇(3)(12.8mL,0.12mol,1当量 Acros)在MeOH(200mL,无水Ald.)中的溶液加入甲烷硫代磺酸S-叔丁基酯2b(20g,0.12mol,1当量)并将反应在室温下在N_2下搅拌。反应通过TLC & 质谱(MS)监测:己烷:EtOAc = 6:1;用PMA可视化,Rf = 0.68;MS大气压化学电离(APCI) [M+1]: 214.0(100%)。在2h后,反应完成并通过旋蒸浓缩。粗产物通过ISCO色谱(ISCO REDISEP®, 330 g)纯化且用0%至100%EtOAc的己烷溶液洗脱(通过UV监测:254nm,280nm)。合并所需的级分并蒸发以得到4b的无色油(25g,98%)。1H NMR(300 MHz,

CDCl3)光谱如下:7.50(dd, J = 7.68, 1.38 Hz, 1H), 7.09(td, J = 7.41, 1.38 Hz, 1H), 6.67(m, 2H), 1.34(s, 9H)。MS:(APCI+) M+1 = 214.0。

[0657] 1-(叔丁基)-2-(2-异氰酰基苯基)二硫烷(5b)的合成

[0658] 在0℃冰水浴下,向2-(叔丁基二硫烷基)苯胺(4b)(10g,46.8mmol,1当量)在CH_2Cl_2(500mL,无水Ald.)中的溶液中加入三光气(13.9g,46.8mmol,1当量,Acros),然后加入Et_3N(65.3mL,0.46mol,10当量,无水Ald.)且反应在0℃搅拌1h。反应通过旋蒸(水浴:室温)浓缩,并将获得的粗固体直接用于下一步骤。

[0659] (2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基 (2-(叔丁基二硫烷基)苯基)氨基甲酸酯(7b)的合成

[0660] 在0℃冰水浴下,向粗1-(叔丁基)-2-(2-异氰酰基苯基)二硫烷(5b)(粗品,2当量)在CH_2Cl_2(500mL,无水Ald.)中的溶液加入1-((2R,3R,4S,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮6(13g,23.78mmol,1当量,carbosynth)并将反应搅拌1.5h,使0℃至室温。反应通过TLC监测,己烷:EtOAc = 1:2;用PMA可视化。TLC显示产物7b(Rf = 0.38)以及7b'(区域异构体,Rf = 0.19)和7b''(二氨基甲酸酯,Rf = 0.61)。在1.5h后,反应被浓缩并与EtOAc(100mL)混合且过滤不溶性盐。将滤液用EtOAc(500mL)稀释,用饱和$NaHCO_3$、H_2O、盐水洗涤,并经无水Na_2SO_4干燥。在通过旋蒸浓缩后,将粗产物加载到预平衡的硅胶柱上,并通过ISCO色谱(ISCO REDISEP®, 120 g,用0.5%吡啶/己烷预平衡)[1]纯化,并用己烷中的0%至100%EtOAc洗脱(通过UV监测:254nm,280nm)。合并所需的级分并蒸发以得到2.6g 7b(14%)的无色泡沫,纯度94%(HPLC)。1H NMR (300 MHz, DMSO-d6)光谱如下:11.42(s, 1H), 9.38(s, 1H), 7.72(m, 2H), 7.24 - 7.38(m, 13H), 6.88 - 6.91(m, 4H), 6.01(d, J = 4.95 Hz, 1H), 5.70(d, J = 5.79 Hz, 1H), 5.37(dd, J = 7.95, 2.19 Hz, 1H), 5.30(t, J = 3.09 Hz, 1H), 4.41(dd, J = 11.01, 5.49 Hz, 1H), 3.73(s, 6H), 3.21 - 3.30(m, 2H), 1.21(s, 9H)。MS:(APCI-) M-1 = 784.2。

[0661] (步骤5):(2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-(((2-氰基乙基)(二异丙基氨基)膦基)氧基)-2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)四氢呋喃-3-基 (2-(叔丁基二硫烷基)苯基)氨基甲酸酯(8b)的合成

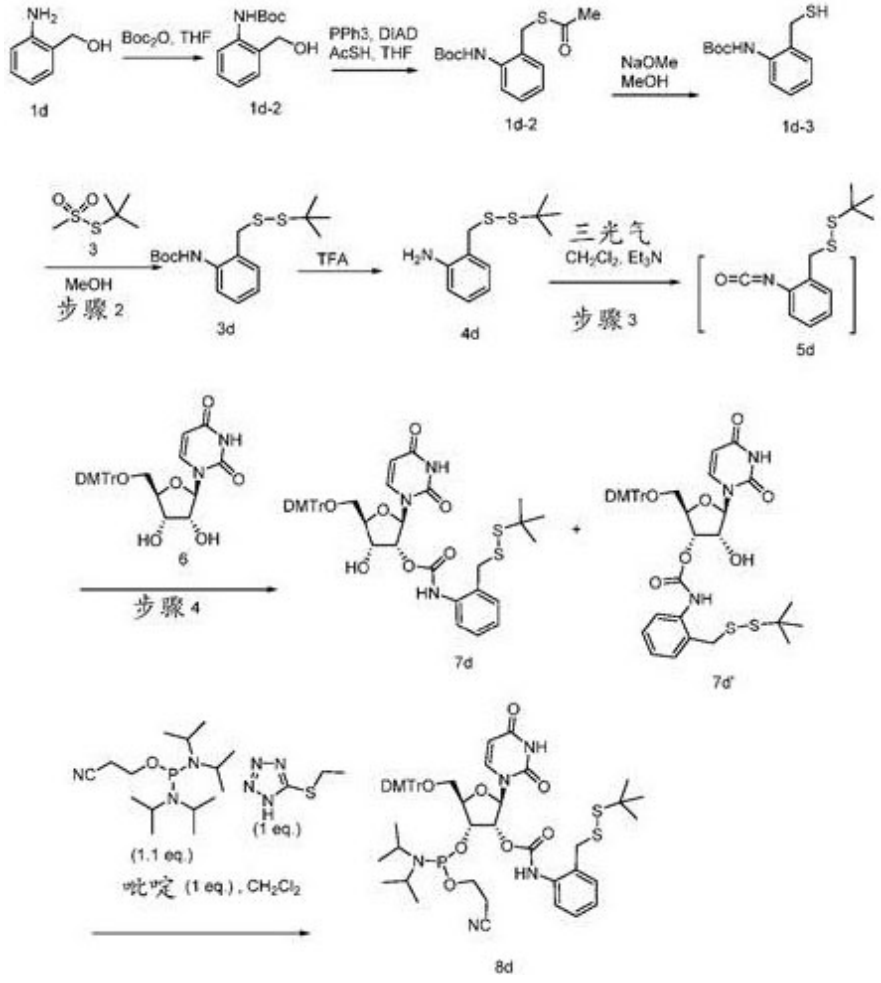
[0662] 在室温下在N_2下向(2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基 (2-(叔丁基二硫烷基)苯基)氨基甲酸酯(7b)(1.6g,2.03mmol,1当量)在CH_2Cl_2(40mL,无水Ald.)中的溶液中加入吡啶(0.16 mL,2.03 mmol,1当量,无水Ald.)和5-(乙硫基)-1H-四唑(265mg,2.03mmol,1当量,Ald.)。然后加入O-氰乙基-N,N,N′,N′-四异丙基亚磷酰二胺 (674.9mg, 2.23 mmol, 1.1当量, ChemGenes Corporation, Wilmington, MA)。反应在室温下搅拌并通过TLC监测:己烷:EtOAc = 1:2;用PMA可视化,Rf = 0.51。在2h后,反应完成且反应用CH_2Cl_2(400mL)稀释且用饱和(sat.)$NaHCO_3$、H_2O、盐水洗涤并经无水Na_2SO_4干燥。在通过旋蒸浓缩后,将粗产物加载到预平衡的硅胶柱上,并通过ISCO色谱(ISCO REDISEP®, 40 g,用1.0%Et_3N的己烷溶液预平衡)纯化,并用0%至100%EtOAc的己烷溶液(1%Et_3N)洗脱(通过UV监测:254nm,280nm)。合并所需的级分并蒸发以得到1.6g 8b(77%)的无色泡沫,纯度97%(HPLC)。1H NMR

(300 MHz, DMSO-d6)光谱如下:11.47(s, 1H), 9.45(m, 1H), 7.74(m, 2H), 7.25 - 7.38(m, 13H), 6.87 - 6.90(m, 4H), 6.02(m, 1H), 5.40 - 5.49(m, 2H), 4.62(m, 1H), 4.21(m, 1H), 3.73(s, 6H), 3.48 - 3.65(m, 4H), 3.32(m, 1H), 2.73(m, 1H), 2.62(t, J = 6.3 Hz, 1H), 1.19(s, 9H), 0.94 - 1.12(m, 12H)。31P NMR(161 MHz, DMSO-d6) 150.44, 150.08. MS:(APCI-) M-1 = 984.4。

[0663] 化合物8d

[0664] 下面的方案3描述如下的包含二硫桥的谷胱甘肽敏感性化合物的合成:(2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-(((2-氰基乙氧基)(二异丙基氨基)膦基)氧基)-2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)四氢呋喃-3-基 (2-((叔丁基二硫烷基)甲基)苯基)氨基甲酸酯(化合物8d)。化合物8d的谷胱甘肽敏感性部分被式IVe涵盖且更具体地由式IVe(ii)表示。通过按照对合成8b所述的类似程序合成核苷亚磷酰胺8d。简言之,用Boc基团瞬时保护市售可得的2-氨基苯甲醇以得到1d-2。在硫代乙酸存在下,1d-2的Mitsunobu反应得到硫酯中间体1d-2。用NaOMe/MeOH选择性水解硫酯,然后用甲烷硫代磺酸S-叔丁基酯处理,得到化合物3d。在用三氟乙酸(TFA)进行Boc脱保护后,将4d转化为异氰酸酯中间体5d,且“原位”与5'-二甲氧基三苯基甲基(DMTr)保护的尿苷反应以得到2'-和3'-保护的氨基甲酸酯7d和7d'的混合物。在柱色谱分离后,7d的亚磷酰化得到作为无色泡沫的所需的亚磷酰胺8d,产率50%。

[0665]



[0666] 方案3。

[0667] (步骤1):(2-(羟基甲基)苯基)氨基甲酸叔丁基酯(1d-1)的合成

[0668] 向(2-氨基苯基)甲醇(1d) (10 g, 81.2 mmol, 1当量 Ald.)在四氢呋喃(THF)(200mL,无水Ald.)中的溶液中加入Boc_2O(18.6 g, 85.2 mmol, 1.1当量 AK scientific)。反应在室温下搅拌并通过TLC监测:己烷:EtOAc = 6:1,用PMA可视化,Rf = 0.2。在过夜后,反应完成,且反应用EtOAc(500mL)稀释,用饱和$NaHCO_3$、H_2O、盐水洗涤,且经无水Na_2SO_4干燥。在通过旋蒸浓缩后,粗产物通过ISCO色谱(ISCO REDISEP®, 220 g)纯化,并用0%至100%EtOAc的己烷溶液洗脱(通过UV监测:254nm,280nm)。合并所需的级分并蒸发以得到15g 1d-1(82%)的无色泡沫。1H NMR(300 MHz, CDCl3)光谱如下:7.90(d, J = 7.98 Hz, 1H), 7.61(s, 1H), 7.30(t, J = 7.68 Hz, 1H), 7.16(d, J = 7.41 Hz, 1H), 7.00(t, J = 7.41 Hz, 1H), 4.68(s, 2H), 1.51(s, 9H)。

[0669] (步骤2):S-2-((叔丁氧基羰基)氨基)苄基硫代乙酸酯(1d-2)的合成

[0670] 在0℃下向Ph_3P(23.6 g, 90.3 mmol, 2.1当量 Ald.)在THF(300mL)中的溶液加入偶氮二甲酸二异丙酯(DIAD)(17.7 mL, 90.3 mmol, 2.1当量 Ald.)且将混合物搅拌30min。将(2-(羟甲基)苯基)氨基甲酸叔丁酯(1d-1) (9.6g,43mmol,1当量)和硫代乙酸(6.3 mL, 90.3 mmol, 2.1当量 Ald.)在THF(100mL)中的混合物滴加到上述反应混合物中。搅拌反应,使其温热至室温,并通过TLC监测:己烷:EtOAc = 6:1,用PMA可视化,Rf = 0.47。在过夜后,将混合物用EtOAc(500mL)稀释,用饱和$NaHCO_3$、H_2O、盐水洗涤并经无水Na_2SO_4干燥。在通过旋蒸浓缩后,粗产物通过ISCO色谱(ISCO REDISEP®, 220 g)纯化,并用0%至100%EtOAc的己烷溶液洗脱(通过UV监测:254nm,280nm)。合并所需的级分并蒸发以得到10g 1d-2(88%)的无色泡沫。1H NMR(300 MHz, DMSO-d6)光谱如下:8.64(s, 1H), 7.19 - 7.30(m, 3H), 7.05(t, J = 7.41 Hz, 1H), 4.10(s, 2H), 2.28(s, 3H), 1.41(s, 9H)。

[0671] (步骤3):(2-(巯基甲基)苯基)氨基甲酸叔丁酯(1d-3)的合成

[0672] 向S-2-((叔丁氧基羰基)氨基)苄基硫代乙酸酯(1d-2) (11.8g,41.9mmol,1当量)在MeOH(200mL)中的溶液加入NaOMe(2.2 g, 41.9 mmol, 1当量 Ald.)且在室温下搅拌反应并通过TLC监测:己烷:EtOAc = 6:1,用PMA可视化,Rf = 0.5。在2h后,反应完成且用1N HCl酸化至pH~6,然后通过旋蒸浓缩。将粗产物溶解在EtOAc(500mL)中,用H_2O、盐水洗涤并经无水Na_2SO_4干燥。在浓缩后,将粗产物1d-3直接用于下一步骤。

[0673] (步骤4):2-((叔丁基二硫烷基)甲基)苯胺(3d)的合成

[0674] 向(2-(巯基甲基)苯基)氨基甲酸叔丁基酯(1d-3) (10g,41.9mmol,1当量)在MeOH(200mL,无水Ald.)中的溶液加入甲烷硫代磺酸S-叔丁基酯2b(9.2g,54.5mmol,1.3当量),然后加入Et_3N(17.5 mL, 125.8 mmol, 3当量 Ald, 无水)。将反应在室温下在N_2下搅拌并通过TLC监测:己烷:EtOAc = 6:1,用PMA可视化,Rf = 0.6。在2h后,反应完成并通过旋蒸浓缩。粗产物通过ISCO色谱(ISCO REDISEP®, 80 g)纯化且用0%至100%EtOAc的己烷溶液洗脱(通过UV监测:254nm,280nm)。合并所需的级分并蒸发以得到3d的白色固体(5.8g,42%)。1H NMR(300 MHz, DMSO-d6)光谱如下:8.62(s, 1H), 7.19 - 7.30(m, 3H), 7.05(t, J = 7.41 Hz, 1H), 4.02(s, 2H), 1.41(s, 9H), 1.21(s, 9H)。

[0675] (步骤5):2-((叔丁基二硫烷基)甲基)苯胺(4d)的合成

[0676] 将2-((叔丁基二硫烷基)甲基)苯胺(3d) (3g,9.16mmol,1当量)加入到TFA/CH_2Cl_2(15mL/45mL)的混合物溶液中,且反应在室温下搅拌2h。通过旋蒸(水浴:室温)浓缩反应,并

将获得的粗产物4d直接用于下一步骤。

[0677] (步骤6):1-(叔丁基)-2-(2-异氰酰基苄基)二硫烷(5d)的合成

[0678] 在0℃冰水浴下,向2-((叔丁基二硫烷基)甲基)苯胺(4d)(粗品,2g,8.8mmol,1当量)在CH_2Cl_2(100mL,无水Ald.)中的溶液加入三光气(2.6g,8.8mmol,1当量,Acros),然后加入Et_3N(12.3mL,0.09mol,10当量,无水Ald.),并将反应在0℃下搅拌1h。通过旋蒸(水浴:室温)浓缩反应,并将获得的粗固体5d直接用于下一步骤。

[0679] (步骤7):(2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基 (2-((叔丁基二硫烷基)甲基)苯基)氨基甲酸酯(7d)的合成

[0680] 在0℃冰水浴下,向粗品1-(叔丁基)-2-(2-异氰酰基苄基)二硫烷(5d)(粗品,2当量)在CH_2Cl_2(100mL,无水Ald.)中的溶液加入1-((2R,3R,4S,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮6(2.4 g, 4.39 mmol,1当量, carbosynth)并搅拌反应,使0℃至室温。通过TLC监测反应,已烷:EtOAc = 1:4,用PMA可视化。TLC显示产物7d(Rf = 0.35)以及7d'(区域异构体,Rf = 0.18)和7d″(二氨基甲酸酯,Rf = 0.71)。在过夜后,浓缩反应并与EtOAc(100mL)混合且过滤不溶性盐。将滤液用EtOAc(500mL)稀释,用饱和$NaHCO_3$、H_2O、盐水洗涤并经无水Na_2SO_4干燥。在通过旋蒸浓缩后,将粗产物加载到预平衡的硅胶柱上,并通过ISCO色谱(ISCO REDISEP®, 80 g,用0.5%吡啶/己烷预平衡)[1]纯化,并用0%至100%EtOAc己烷溶液洗脱(通过UV监测:254nm,280nm)。合并所需的级分并蒸发以得到7d(10%)的无色泡沫339mg,纯度79.3%(HPLC)[2,3]。1H NMR(300 MHz, DMSO-d6)光谱如下:11.45(s, 1H), 9.27(s, 1H), 7.73(d, J = 8.25 Hz, 1H), 7.23 - 7.40(m, 13H), 6.88 - 6.96(m, 4H), 6.04(d, J = 4.65 Hz, 1H), 5.72(d, J = 5.49 Hz, 1H), 5.38(d, J = 7.98 Hz, 1H), 5.26(t, J = 5.22 Hz, 1H), 4.45(dd, J = 10.44, 5.22 Hz, 1H), 4.05(m, 1H), 3.72(s, 6H), 3.32(m, 1H), 3.26(m, 1H), 1.21(s, 9H)。

[0681] (步骤8):(2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-(((2-氰基乙氧基)(二异丙基氨基)膦基)氧基)-2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)四氢呋喃-3-基 (2-((叔丁基二硫烷基)甲基)苯基)氨基甲酸酯(8d)的合成

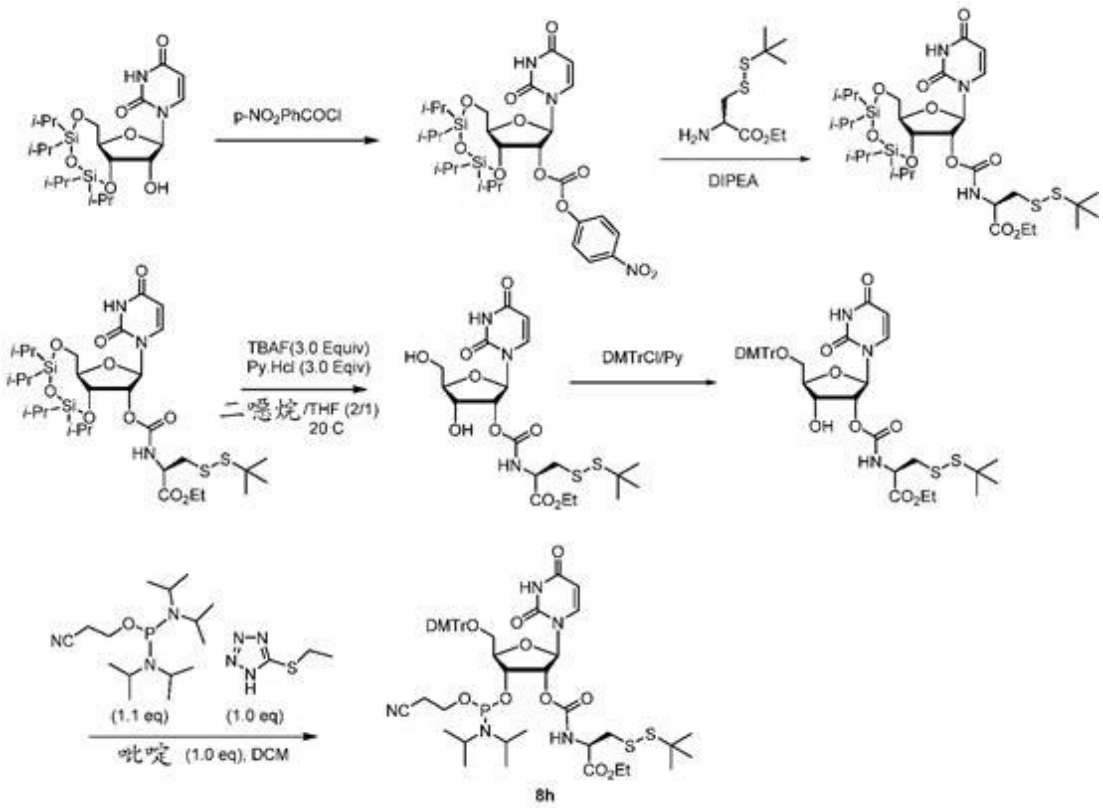
[0682] 在室温下在N_2[1]下向(2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-羟基四氢呋喃-3-基 (2-((叔丁基二硫烷基)甲基)苯基)氨基甲酸酯(7d)(239mg,0.30mmol,1当量)在CH_2Cl_2(10mL,无水Ald.)中的溶液加入吡啶(0.02 mL, 0.30 mmol, 1当量, 无水Ald.)和5-(乙硫基)-1H-四唑(38.9 mg, 0.30 mmol, 1当量, Combi-Blocks)。然后加入O-氰乙基-N,N,N′,N′-四异丙基亚磷酰二胺(99.1 mg, 0.33 mmol, 1.1当量, ChemGenes Corporation)。反应在室温下搅拌并通过TLC监测:已烷:EtOAc = 1:4,用PMA可视化,Rf = 0.69。在6h后,反应显示预期产物作为主要斑点且反应用CH_2Cl_2(200mL)稀释并用饱和$NaHCO_3$、H_2O、盐水洗涤并经无水Na_2SO_4干燥。在通过旋蒸浓缩后,将粗产物加载到预平衡的硅胶柱上并通过ISCO色谱纯化((ISCO REDISEP®, 24 g,用1.0% Et_3N的己烷溶液预平衡),并用0%至100%EtOAc的己烷溶液(1%Et_3N)洗脱(通过UV监测:254nm,280nm)。合并所需的级分并蒸发以得到8d(50%)的无色泡沫151mg,纯度94.4%(HPLC)[2]。1H NMR (300 MHz, DMSO-d6)光谱如下:11.49(s, 1H), 9.41(m, 1H),

7.71(m, 1H), 7.13 - 7.40(m, 14H), 6.87 - 6.90(m, 4H), 6.05(m, 1H), 5.41 - 5.45(m, 2H), 4.68(m, 1H), 4.25(m, 1H), 4.08(m, 1H), 3.98(m, 1H), 3.72(s, 6H), 3.52 - 3.65(m, 4H), 3.34(m, 1H), 2.63(m, 1H), 2.53(m, 1H), 1.21(s, 9H), 0.96 - 1.12(m, 12H)。31P NMR(161 MHz, DMSO-d6) 150.45, 150.34. MS:(APCI-) M-1 = 999.4。

[0683] 化合物8h

[0684] 以下方案4描述如下包含二硫醚的谷胱甘肽敏感性化合物(化合物8h)的合成:N-((((2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-(((2-氰基乙氧基)(二异丙基氨基)磷烷基)氧基)-2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)四氢呋喃-3-基)氧基)羰基)-S-(叔丁基硫基)-L-半胱氨酸乙基酯。化合物8h的谷胱甘肽敏感性部分被式IVd涵盖且更具体地由式IVd(i)表示。

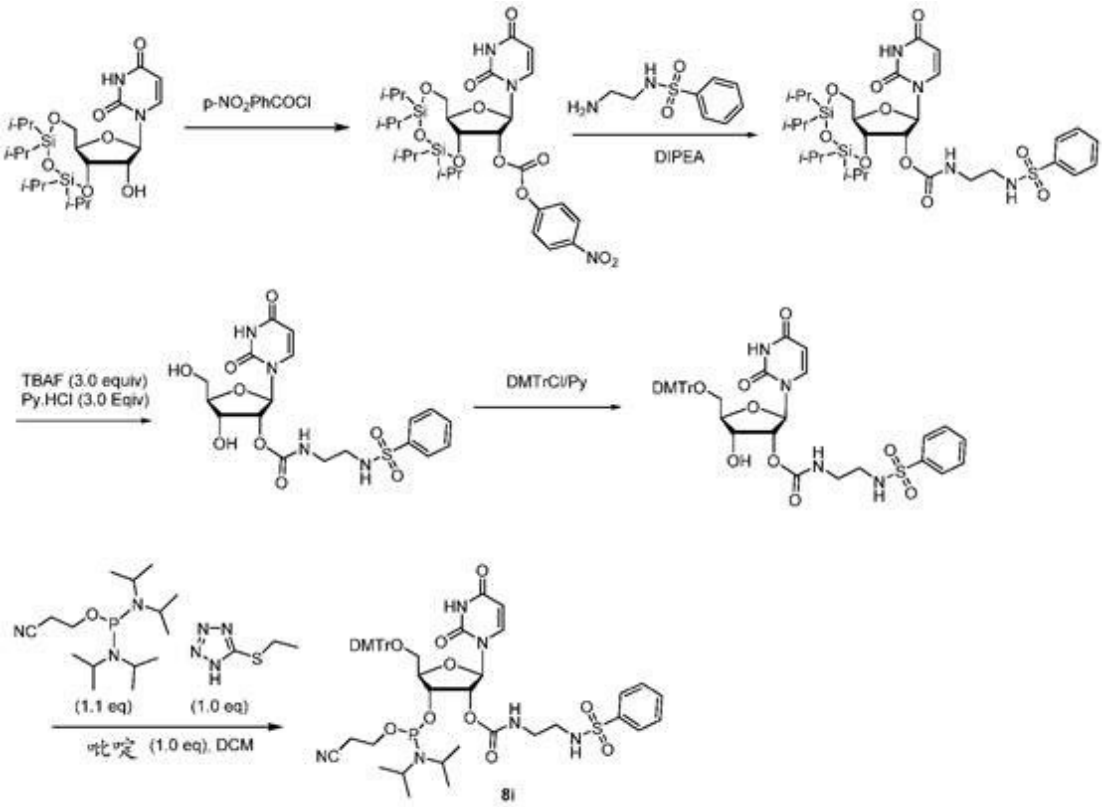
[0685]



[0686] 方案4。

[0687] 化合物8i

[0688] 以下方案5描绘如下包含砜的谷胱甘肽敏感性化合物(化合物8i)的合成:(2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-(((2-氰基乙氧基)(二异丙基氨基)磷烷基)氧基)-2-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)四氢呋喃-3-基 (2-(苯基磺酰氨基)乙基)氨基甲酸酯。化合物8i的谷胱甘肽敏感性部分被式IVb涵盖且更具体地由式IVb(ii)表示,其中R是氢。

[0689] 

[0690] 方案5。

[0691] 实施例2．谷胱甘肽敏感性寡核苷酸的合成

[0692] 寡核苷酸在商业寡核苷酸(oligo)合成仪上合成。测试化合物1和2(图1B)使用2'-修饰的核苷亚磷酰胺,即2'-F和2'-OMe修饰的核苷亚磷酰胺和2'-谷胱甘肽敏感性核苷亚磷酰胺合成。测试化合物1和2含有一个在2'-碳上具有可逆的谷胱甘肽敏感性修饰的核苷酸,而剩余的核苷酸含有不可逆的2'-F或2'-OMe修饰。

[0693] 寡核苷酸合成在固体载体上以3'至5'方向进行。采用标准寡核苷酸合成方案。用5-乙硫基-1H-四唑(ETT)作为活化剂,偶联时间为300秒。碘溶液用于亚磷酸三酯氧化。合成的寡核苷酸用浓氨水在55℃下处理10小时。在除去悬浮液中的氨后,通过过滤除去CPG。在加入乙酸三乙铵(TEAA)后,粗寡核苷酸通过强阴离子交换高效液相色谱(SAX-HPLC)分析和纯化。汇聚所得的寡核苷酸溶液并浓缩,并用水脱盐。最后,将寡核苷酸冻干成粉末。

[0694] 针对两种测试化合物中的每一种合成寡核苷酸引导链。一个引导链具有位于核苷酸位置1(即5'-末端核苷酸)的单个2'-谷胱甘肽敏感性核苷。另一个引导链具有位于核苷酸位置14的单个2'-谷胱甘肽敏感性核苷。两个引导链含有与靶mRNA序列互补的相同核苷酸序列。因此,除了2'-谷胱甘肽敏感性核苷部分的核苷酸位置外,测试化合物1和2的两个寡核苷酸引导链是相同的。

[0695] 然后重复上述过程以制备互补的寡核苷酸过客链,其不含有谷胱甘肽敏感性部分。通过经由间隔基将亚磷酰胺与聚乙二醇-GalNAc配体缀合,进一步修饰过客链。使用本领域已知的方法(参见例如WO 2016/100401),经由点击化学将GalNAc封端的聚乙二醇与过客链中的四环结构的4个核苷酸的2'-碳缀合。

[0696] 通过以1:1的摩尔比混合两个互补链(引导和过客)中的每一条来形成双链体,以获得两种dsRNAi抑制剂分子:测试化合物1和测试化合物2。见图1B。测试化合物1含有在核

苷酸位置1具有2'-谷胱甘肽敏感性部分的22碱基对的引导链和不具有任何谷胱甘肽敏感性部分的36碱基对过客链,其中过客链在四环中含有四个核苷酸,各自与聚乙二醇-GalNAc配体缀合(参见图1B)。测试化合物1在引导链的5'-端的5'-碳上也具有游离羟基(5'-OH)。除了引导链的核苷酸位置1处的谷胱甘肽敏感性核苷酸外,测试化合物1中的剩余核苷酸用2'-F或2'-OMe不可逆修饰。

[0697] 测试化合物2含有在核苷酸位置14具有2'-谷胱甘肽敏感性部分的22-碱基对引导链和不具有任何谷胱甘肽敏感性部分的36-碱基对过客链,其中过客链在四环中含有四个核苷酸,各自与聚乙二醇-GalNAc配体缀合(参见图1B)。除了引导链的核苷酸位置14处的谷胱甘肽敏感性核苷酸外,测试化合物2中剩余的核苷酸用2'-F或2'-OMe不可逆修饰。

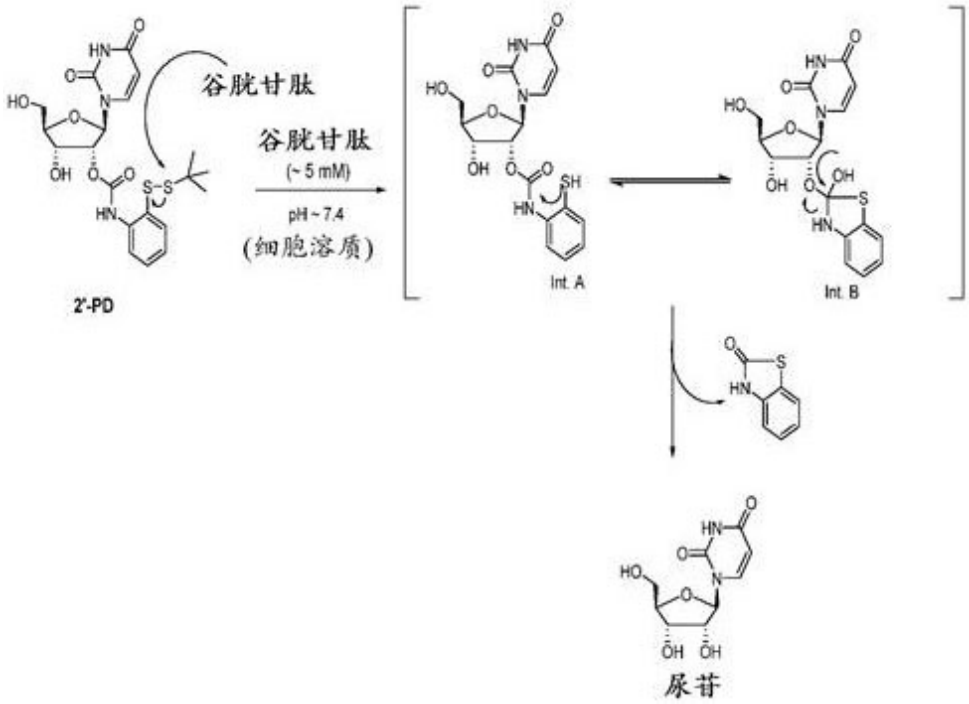
[0698] 据报道,在双链RNAi抑制剂分子的核苷酸位置14,大体积的2'-修饰的核苷通常不能很好地耐受(Zheng等人, FASEB Journal, 2013, 27(2):1-10),且小的官能部分,例如2'-F或2'-OMe,优选用于修饰位置14的核苷。在测试化合物2中,在位置14的大体积2'-谷胱甘肽敏感性部分被细胞溶质中的谷胱甘肽裂解以在2'-碳上产生小得多的羟基,这也恰好是在该碳位置的核糖核苷酸的天然取代基。因此,预期测试化合物2将几乎没有RNA抑制活性,除非谷胱甘肽敏感性部分从测试化合物2释放。因此,测试化合物2提供体内除去谷胱甘肽敏感性部分的测试。

[0699] 还如上所述制备两种对照双链RNAi抑制剂分子(对照化合物A和对照化合物B),不同之处在于对照化合物中没有核苷酸包含谷胱甘肽敏感性部分。参见图1A。对照化合物中的所有核苷酸均以与测试化合物相同的模式用2'-F或2'-OMe不可逆修饰(除了用谷胱甘肽敏感性部分修饰的位置外)。对照化合物A合成为在引导链的5'-末端核苷酸的5'-碳上具有天然磷酸酯(5′-PO_4^{2-}),而对照化合物B在引导链的5'-末端核苷酸的5'-碳上含有游离羟基(5'-OH)。对照化合物A和B的引导链含有相同的核苷酸序列,且因此识别与测试化合物1和2相同的靶mRNA序列。

[0700] 实施例3. 2'-可逆修饰的核苷和寡核苷酸的释放动力学

[0701] 制备在2'-碳上含有谷胱甘肽敏感性部分的可逆修饰的核苷(尿苷),如下面方案7中所示。通过将修饰的核苷溶解在pH7.5的含有500倍过量谷胱甘肽(5mM谷胱甘肽)的PBS缓冲液中进行2'-谷胱甘肽敏感性尿苷的释放研究。通过RP-HPLC监测二硫醚释放研究的进展。RP-HPLC显示对应于中间体物类"int. A"和"int. B"的两个新峰,其在下面的方案7中描述。将中间体物类缓慢转化为所需的尿苷和苯并噻唑酮释放产物,如下面的方案7所示。

[0702] 如下面的方案7所示,2'-谷胱甘肽敏感性尿苷的释放机制通过两步反应进行。第一步是在暴露到谷胱甘肽后的二硫醚交换反应,这是快速的,并导致在30-60分钟内完全转化为谷胱甘肽加合物。最初的二硫醚裂解产生两个中间体"int. A"和"int. B"。第二步是经由O->S酰基转移反应快速分子内环化以从核苷释放苯并噻唑酮,在核苷的2'-位置留下羟基。苯并噻唑酮形成的反应动力学数据支持尿苷形成的双相分布(profile)。环化和释放苯并噻唑酮(产生游离尿苷)的半衰期(t ½)为约4小时。见图2。

[0703] 

[0704] 方案7。

[0705] 还测定谷胱甘肽敏感性寡核苷酸(即测试化合物2)的释放速率,如图3所示,其显示测试化合物2剩余的百分比的时间进程。在pH 7.5下将500当量的谷胱甘肽(21mg)加入到在10mM磷酸酯缓冲液(体积10mL)中的测试化合物2(1mg)中。通过RP-HPLC监测测试化合物2消失的速率。如图3中显而易见的是,该反应是双相的。环化和从测试化合物2中释放谷胱甘肽敏感性部分的半衰期($t_{1/2}$)为约6.5小时(约400分钟)。见图3。

[0706] 实施例4. 测试化合物1的体外效力

[0707] 鼠肝细胞

[0708] 在体外测试测试化合物1敲低靶mRNA表达的能力。如上所述,测试寡核苷酸和对照寡核苷酸识别相同的靶序列。使用LIPOFECTAMINE® RNAiMax(Thermo Fisher Scientific Inc., Rockville, MD)在96孔板中按照制造商的方案将测试化合物1和对照化合物A和B反转染到鼠肝细胞中。测试和对照寡核苷酸的最终浓度范围为1000pM至0.06pM。将12000个细胞/孔加入到板中。将板在37℃下温育48小时。在48小时结束时,通过每孔加入30μl ISCRIPT™溶解缓冲液溶解细胞。将22μl溶解产物转移到新鲜板中,并按照制造商的方案用于制备cDNA。用在55℃下标准化为人SFR69基因(hSFRS9-F569(HEX))的靶序列进行定量PCR。使用GraphPad Prism(GraphPad Software Inc., La Jolla, CA)绘制图并计算IC_{50}值。

[0709] 图4描绘48小时后不同浓度的测试化合物1在脂质转染测定中的效力。对照化合物A(在引导链的5'-末端核苷酸具有5'-天然磷酸酯)具有约8.7pM的IC_{50},而对照化合物B(在引导链的5'-末端核苷酸具有5'-羟基)在降低靶mRNA表达方面效果较差,IC_{50}为约24.5pM。对于测试化合物1,IC_{50}为约13.5pM。测试化合物1的该IC_{50}值与对照化合物A更可比,表明测试化合物1的引导链的5'-末端核苷酸处的5'-羟基被细胞溶质中的激酶磷酸化。预计在细胞溶质中测试化合物1的引导链的核苷酸位置1处的2'-碳处的谷胱甘肽敏感性部分的释放使得5'-羟基更易于激酶磷酸化,这继而会促进引导链的Ago2-介导RISC加载用于靶mRNA敲

低。

[0710] 猴肝细胞

[0711] 从Life Technologies Corporation(Carlsbad, CA)获得原代猴肝细胞,并解冻和按照制造商的方案在CORNING® BIOCOAT™ 96孔板中铺板。在铺板4-6h后,每孔用90μl Williams E温育培养基替换培养基。从浓度1μM开始连续稀释测试化合物1至12.8pM(5倍减少)。在不存在LIPOFECTAMINE®(Thermo Fisher Scientfic, Inc.)的情况下将10μl测试化合物1加入到各孔中。将板在37℃下温育,并在24小时时测试RNA靶的敲低。在24小时结束时,使用SV96总RNA隔离系统(Promega, Madison, WI)按照制造商的方案提取和纯化靶RNA。使用高容量cDNA反转录试剂盒(Applied Biosystems Corporation)制备cDNA。定量PCR在60℃下进行,靶序列标准化为智人肽基脯氨酰异构酶B PPIB。使用GraphPad Prism软件(GraphPad Software Inc.)绘制图并计算IC_{50}值。图5显示在不存在任何脂质转染剂的情况下,递送至原代猴肝细胞的不同浓度的测试化合物1在24小时时的效力。测试化合物1在24小时时具有1.6nM的IC_{50}。

[0712] 实施例5. 测试化合物1和2的体内效力和作用持续时间

[0713] 将测试化合物1和测试化合物2在PBS中稀释至1mg/kg工作溶液。在PBS稀释的同一天,CD-1雌性小鼠用单个1mg/kg剂量的测试化合物1、测试化合物2或对照PBS溶液皮下注射。服药后(3,10,21和28天)动物在CO_2中安乐死后通过心脏穿刺放血。移除肝脏的左内侧叶且移除1-4mm的穿孔并置于干冰上的96孔板中。在收集所有样品后,制备RNA和cDNA用于定量PCR(qPCR)。所有样品一式三份制备并使用CFX384 TOUCH™实时PCR检测系统(BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA)进行qPCR。然后将所有样品标准化为PBS处理的对照动物,并使用GraphPad Prism软件进行印迹。

[0714] 图6描绘测试化合物1的体内持续时间研究。以1mg/kg皮下注射测试化合物1导致在第3天超过50%的靶RNA敲低。在第10天观察到增加的靶RNA敲低水平,表明谷胱甘肽敏感性部分的缓慢释放以产生寡核苷酸底物,其更易于激酶磷酸化和随后的Ago-2介导RISC加载用于靶基因敲低。这些结果表明,在dsRNAi抑制剂分子的引导链的位置1将谷胱甘肽敏感性部分与核苷的2'-碳缀合可以在运送至细胞的细胞溶质期间稳定dsRNAi抑制剂分子并促进在细胞溶质中有效敲低靶RNA,其中在谷胱甘肽存在下除去寡核苷酸的谷胱甘肽敏感性部分。

[0715] 图7描绘测试化合物2的体内持续时间研究。如上所述,测试化合物2在引导链的核苷酸位置14的2'-碳用谷胱甘肽敏感性部分修饰(参见图1B),这是通常不能容忍在2'-碳的大体积修饰的核苷酸位置。因此,预期测试化合物2将几乎没有至没有RNA敲低效应,除非从测试化合物2释放大体积的谷胱甘肽敏感性部分。如图7中所示,以1mg/kg皮下注射的测试化合物2导致到第10天靶RNA的约50%敲低,表明细胞溶质中谷胱甘肽敏感性部分在体内缓慢释放以产生天然的2'-OH代替在引导链的核苷酸位置14处的可逆的谷胱甘肽敏感性部分。

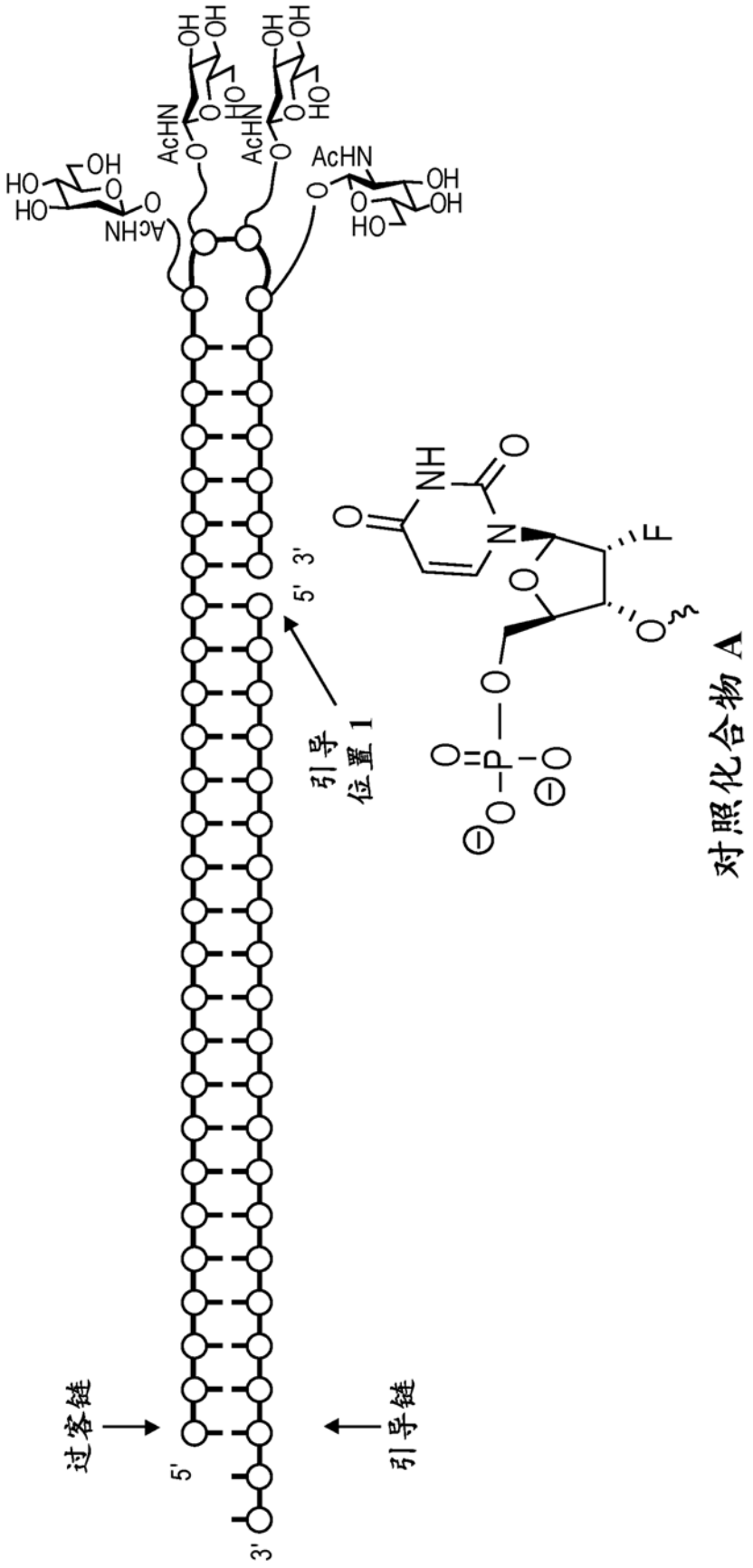


图 1A

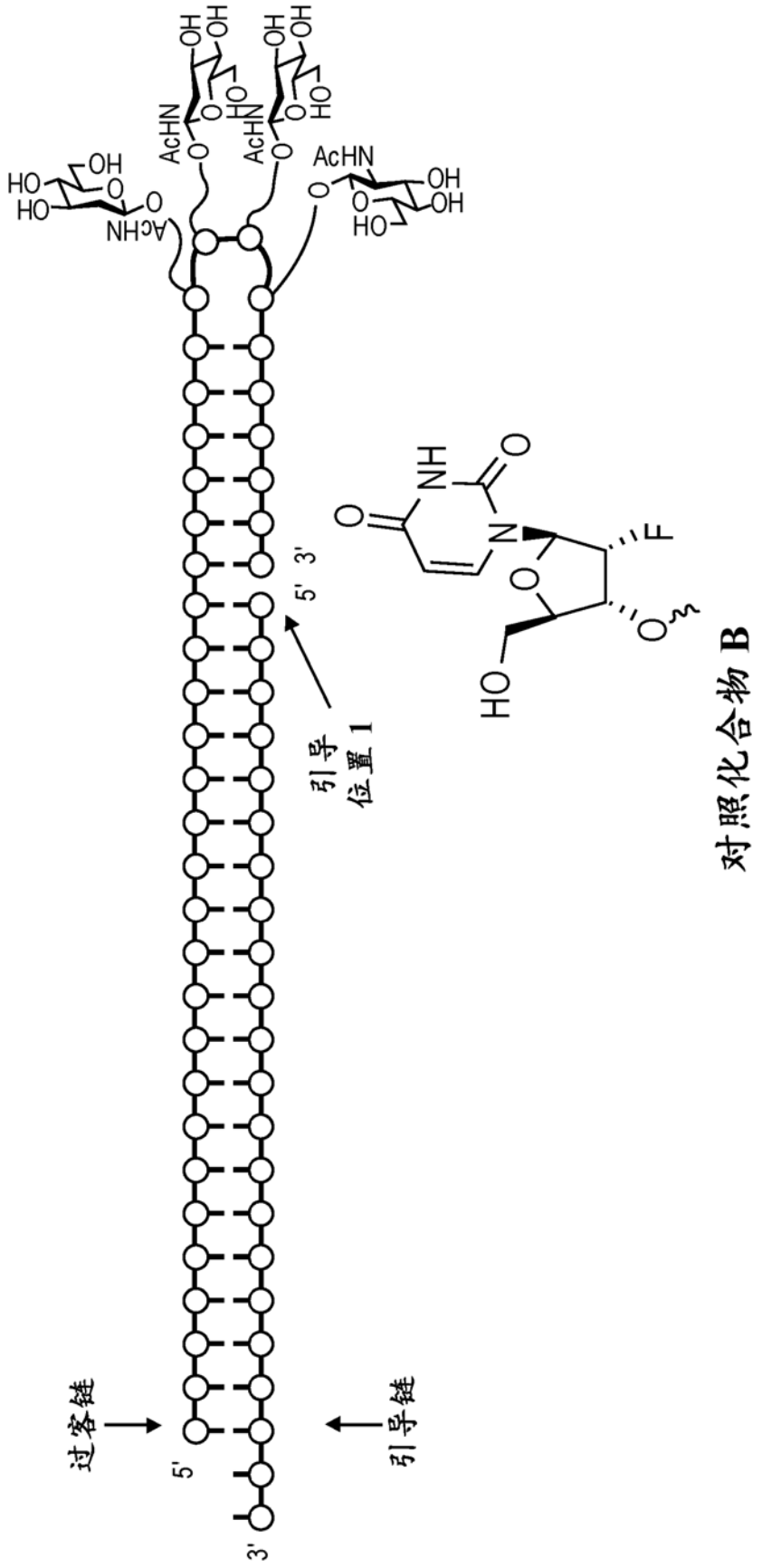


图 1A (续)

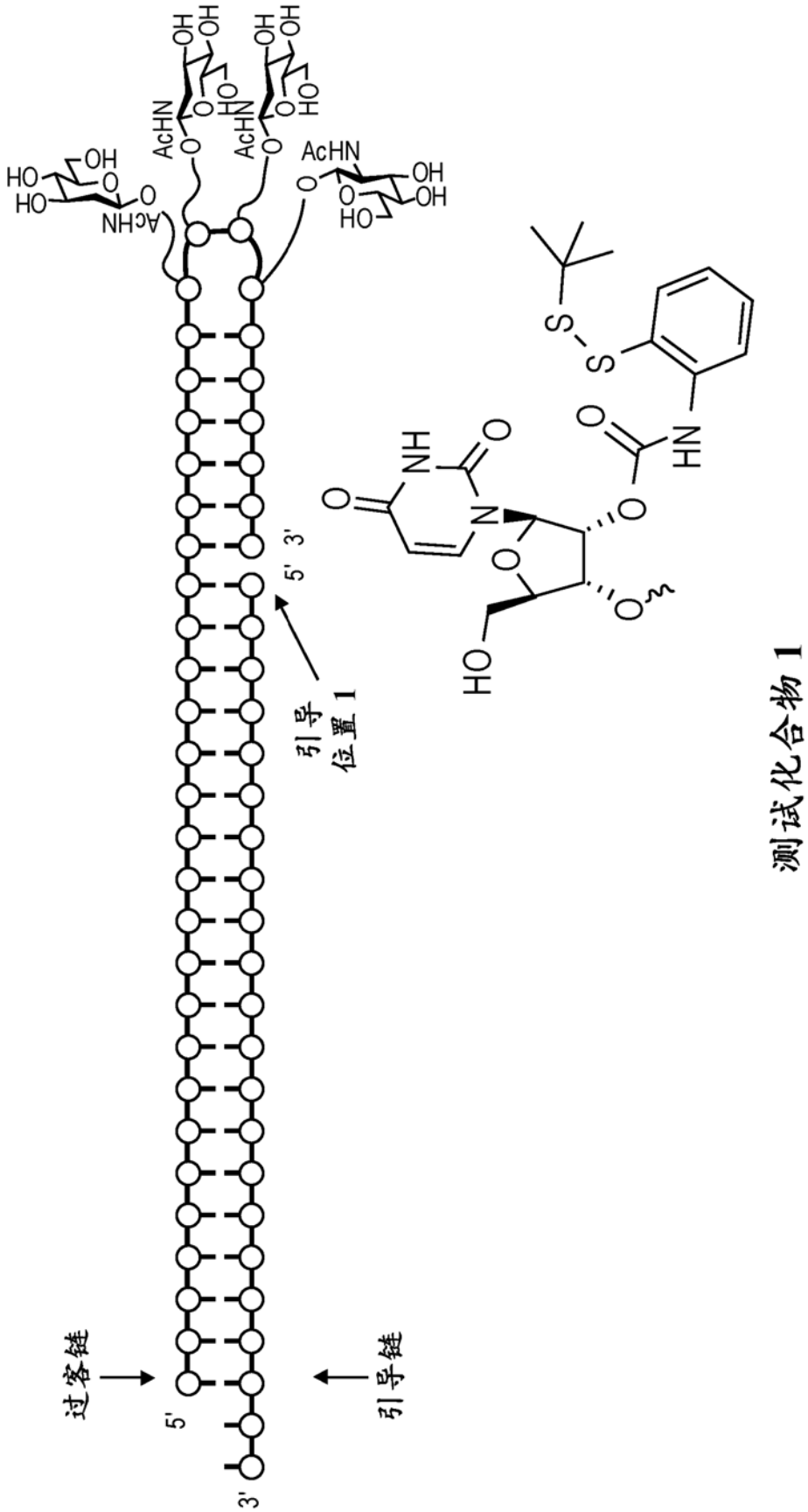


图 1B

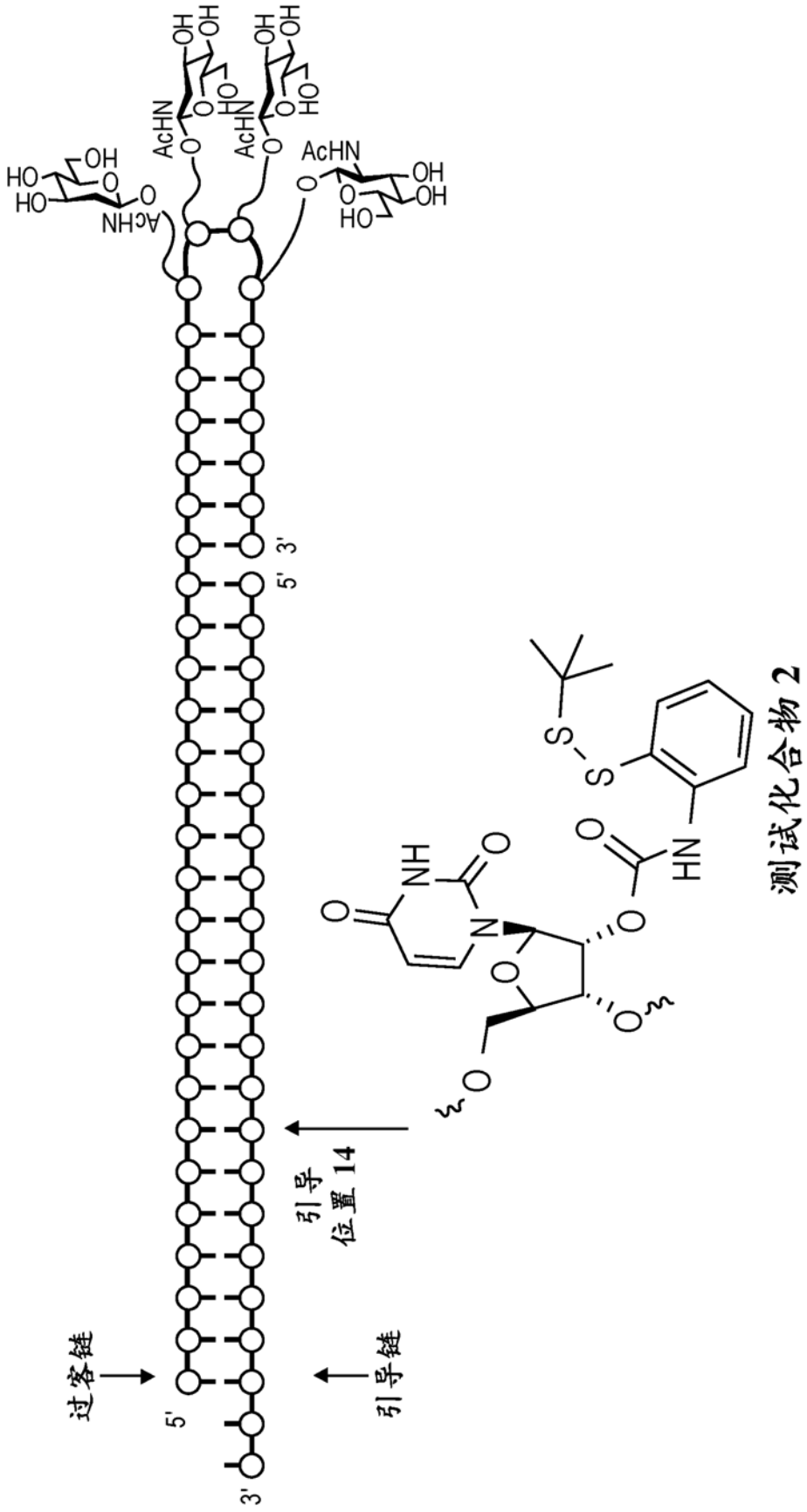


图 1B (续)

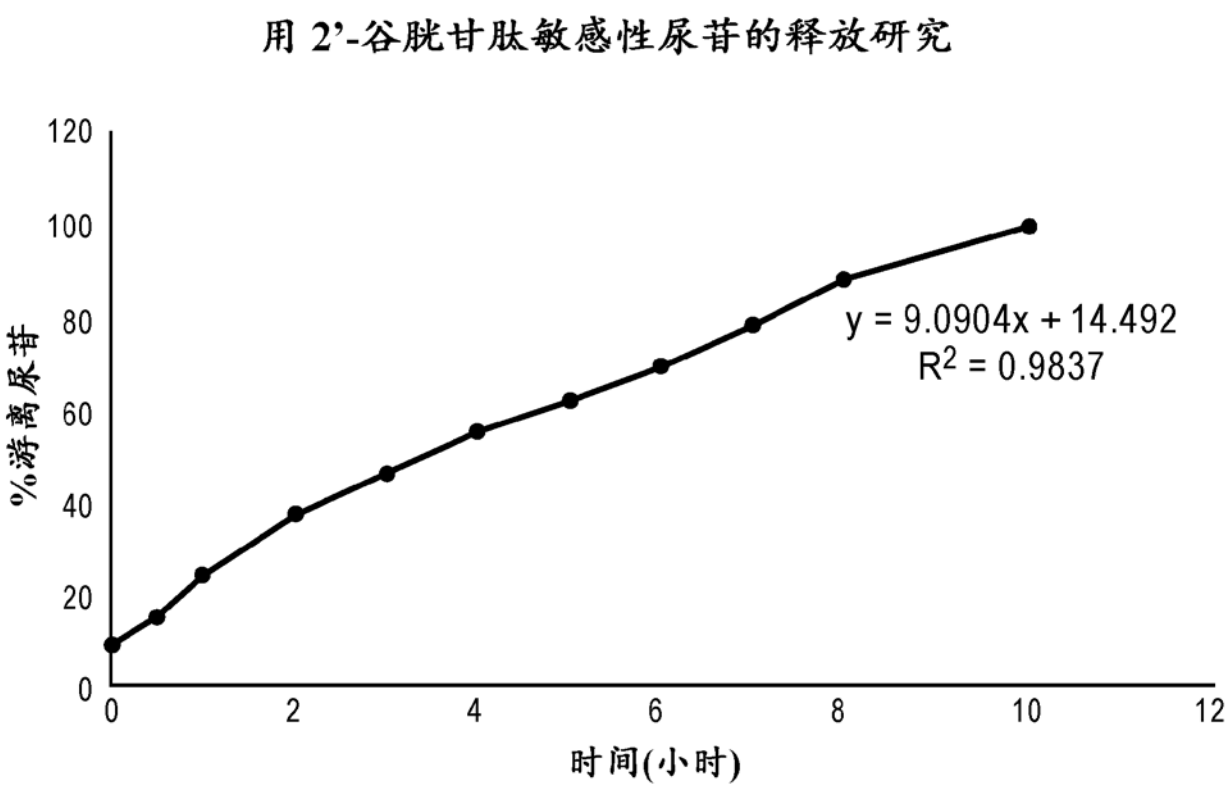

用 2'-谷胱甘肽敏感性尿苷的释放研究
%游离尿苷
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
时间(小时)
y = 9.0904x + 14.492
R2 = 0.9837

图 2

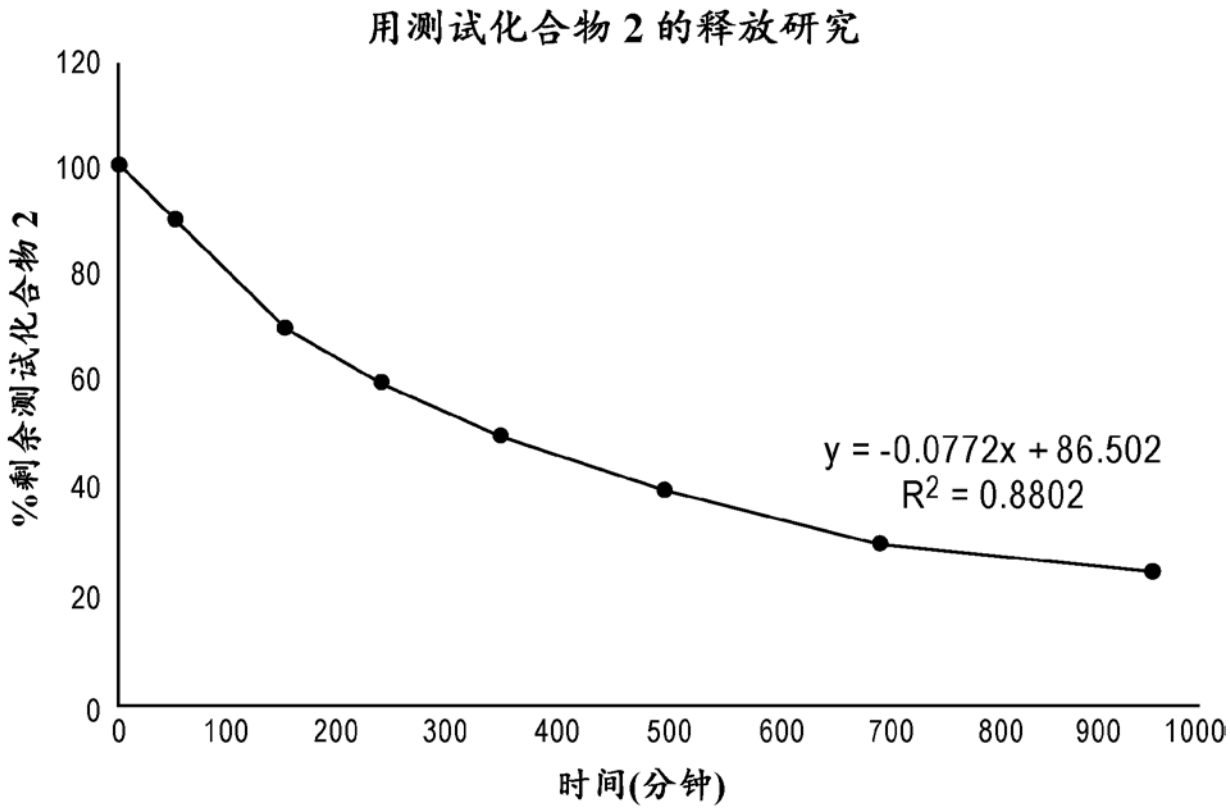

用测试化合物 2 的释放研究
%剩余测试化合物 2
120
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
时间(分钟)
y = -0.0772x + 86.502
R2 = 0.8802

图 3

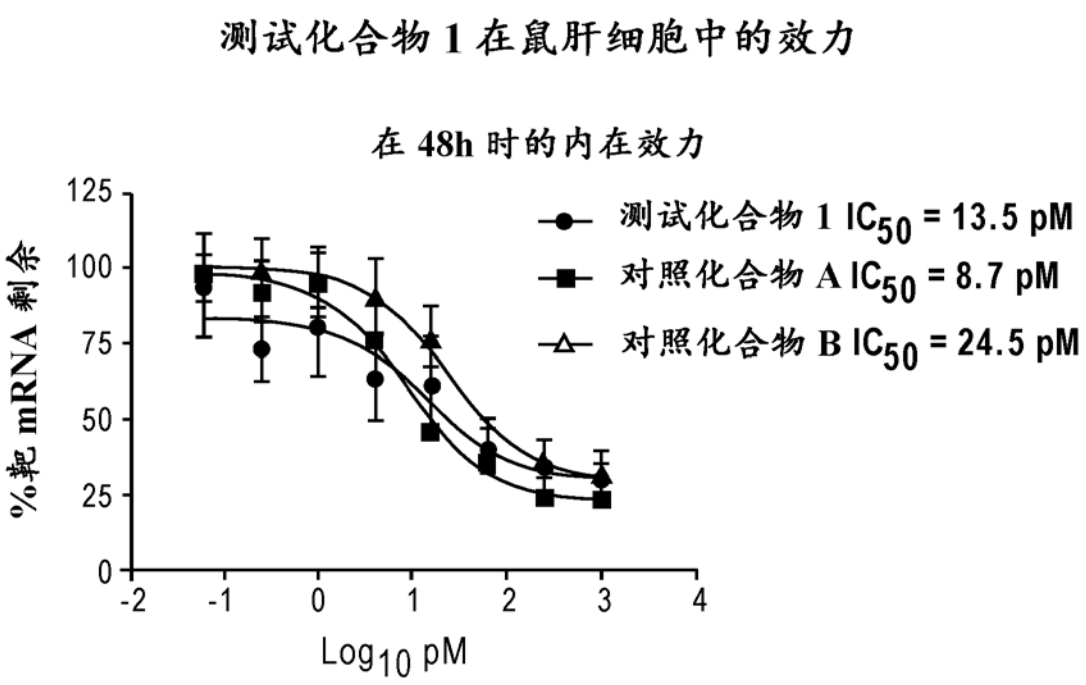

测试化合物 1 在鼠肝细胞中的效力
在 48h 时的内在效力
%靶 mRNA 剩余
125
100
75
50
25
0
-2
-1
0
1
2
3
4
Log10 pM
测试化合物 1 IC50 = 13.5 pM
对照化合物 A IC50 = 8.7 pM
对照化合物 B IC50 = 24.5 pM

图 4

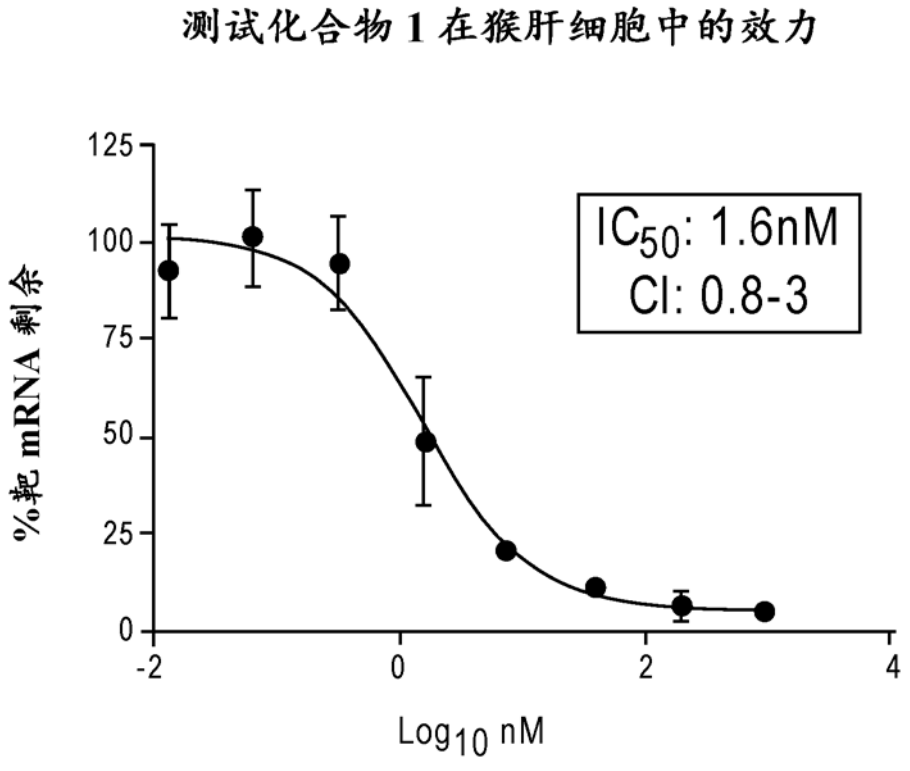

测试化合物 1 在猴肝细胞中的效力
%靶 mRNA 剩余
125
100
75
50
25
0
-2
0
2
4
Log10 nM
IC50: 1.6nM
CI: 0.8-3

图 5

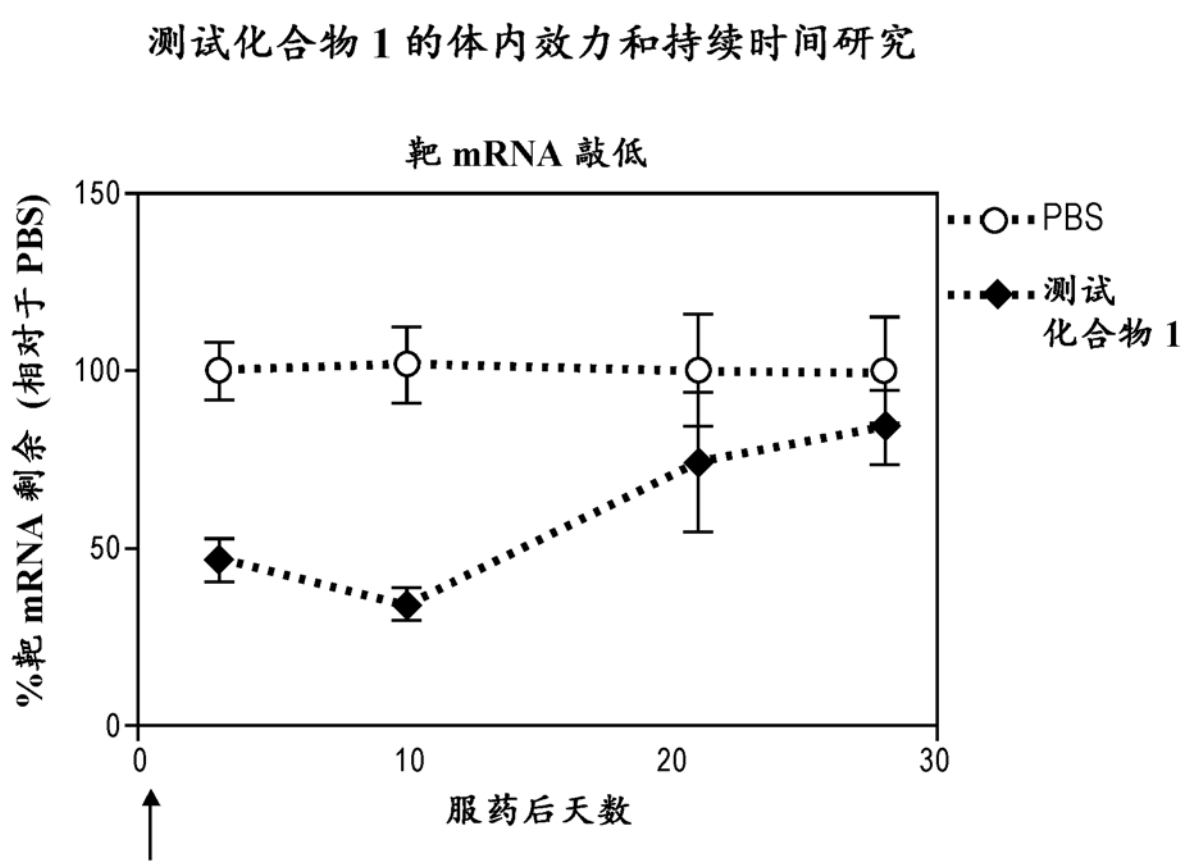

测试化合物 1 的体内效力和持续时间研究
靶 mRNA 敲低
%靶 mRNA 剩余 (相对于 PBS)
150
100
50
0
0
10
20
30
服药后天数
PBS
测试
化合物 1

图 6

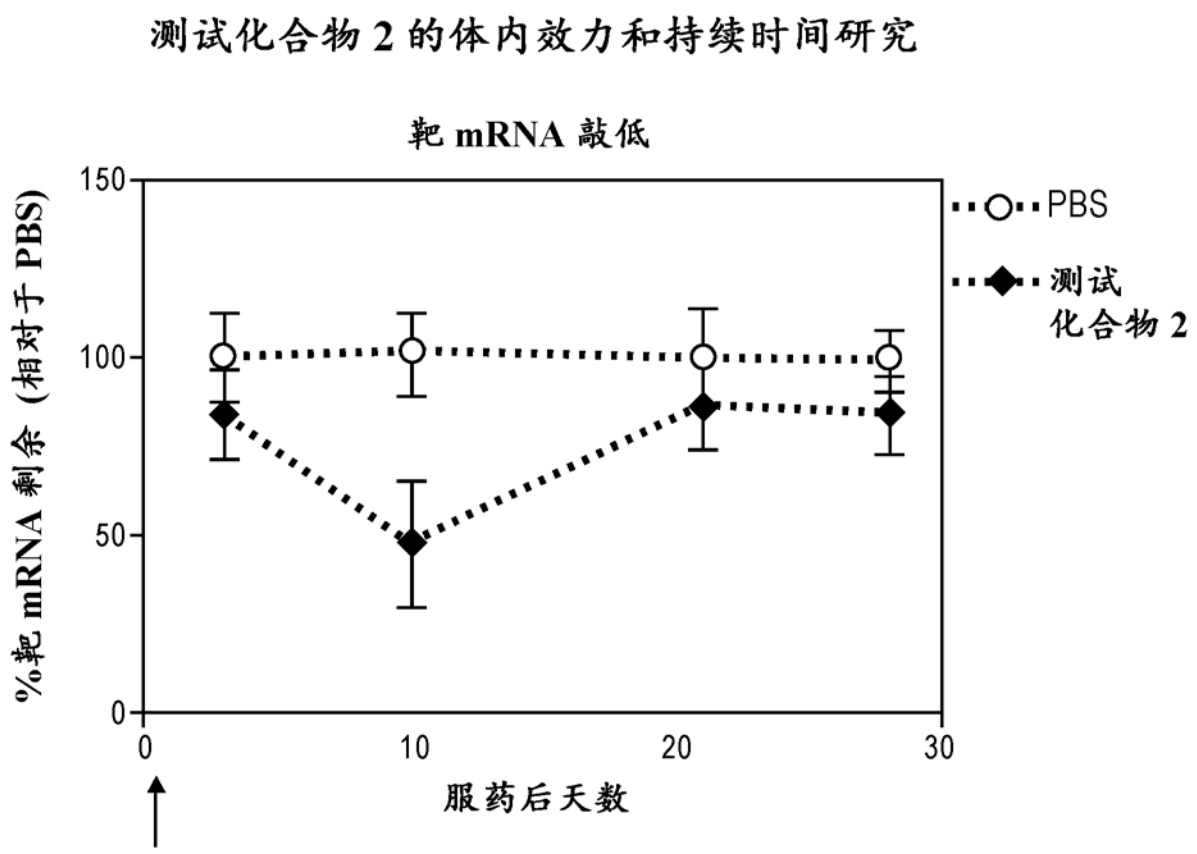

测试化合物 2 的体内效力和持续时间研究
靶 mRNA 敲低
%靶 mRNA 剩余 (相对于 PBS)
150
100
50
0
0
10
20
30
服药后天数
PBS
测试
化合物 2

图 7