(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118267396 A
(43)申请公布日 2024.07.02

(21)申请号 202410353218.9
(22)申请日 2018.10.04
(30)优先权数据
62/568,238 2017.10.04 US
(62)分案原申请数据
201880074360.2 2018.10.04
(71)申请人 艾维迪提生物科学公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 安德鲁·约翰·吉尔
文卡塔·拉马纳·多帕拉普迪
乔尔·丹尼尔·阿里亚斯
大卫·世-豪·朱
迈克尔·卡拉米安·科克伦
罗伯·伯克 菲利普·科瓦奇
巴尔博拉·马勒科娃
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 徐爱文 武晶晶
(51)Int.Cl.
A61K 31/713(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)
A61K 47/60(2017.01)
A61K 47/64(2017.01)
A61P 35/00(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)
C07K 16/18(2006.01)
C07H 19/067(2006.01)
C07H 1/00(2006.01)
C07F 9/6512(2006.01)

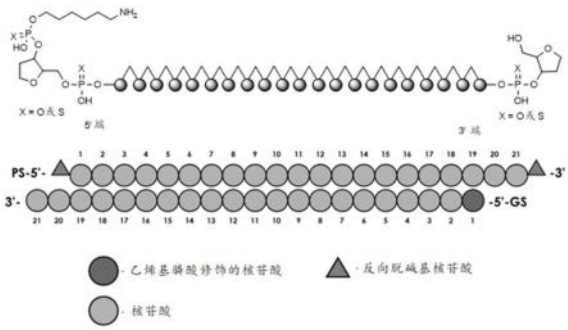
权利要求书8页 说明书170页 附图8页

(54)发明名称

核酸-多肽组合物及其用途

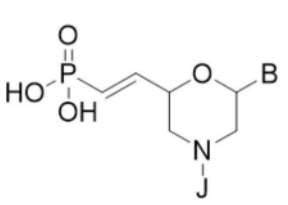
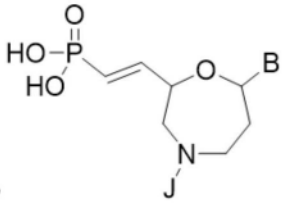
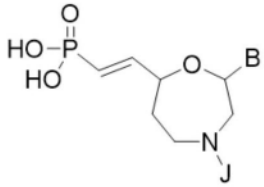
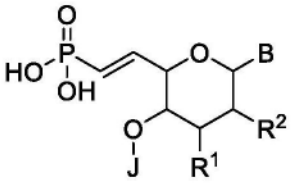
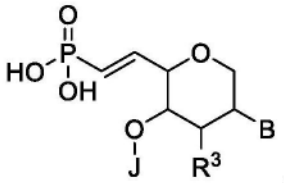
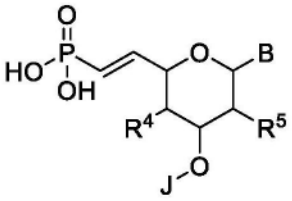
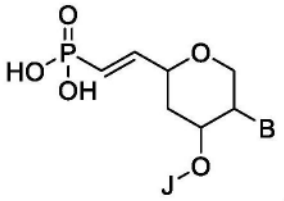
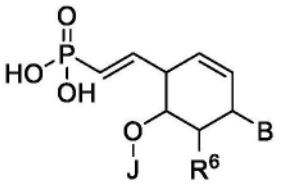
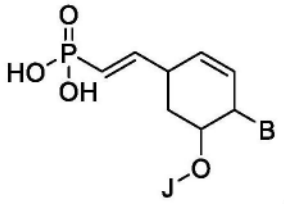
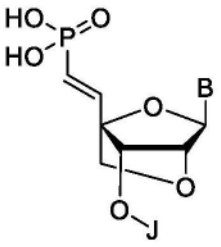
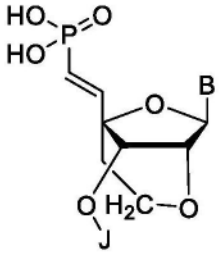
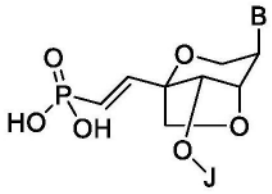
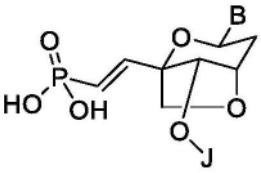
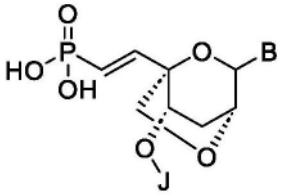
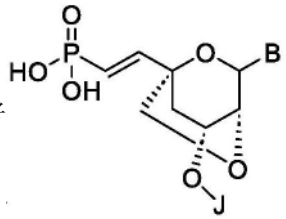
(57)摘要

本文公开了包含缀合至修饰的多核酸分子和聚合物的结合部分的组合物和药物制剂。本文描述的还包括利用包含缀合至多核酸分子和聚合物的结合部分的组合物或药物制剂治疗癌症的方法。



CN 118267396 A

1.包含结合部分和多核苷酸的多核苷酸缀合物,其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸,并且其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

或者

;

其中B为杂环碱基部分;

R^1、R^2、R^3、R^4、R^5和R^6独立地选自氢、卤素、烷基、烷氧基或氨基烷基;并且

J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

2.根据权利要求1所述的多核苷酸缀合物,其中所述多核苷酸进一步包含至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分。

3.根据权利要求1所述的多核苷酸缀合物,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非

天然核苷酸位于所述多核苷酸的5’末端。

4.根据权利要求2所述的多核苷酸缀合物,其中所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、二氨基磷酸酯连接、甲基膦酸酯连接或酰胺连接。

5.根据权利要求2所述的多核苷酸缀合物,其中所述至少一个反向脱碱基部分是至少一个末端。

6.根据权利要求1所述的多核苷酸缀合物,其中所述多核苷酸为单链多核酸分子。

7.根据权利要求1所述的多核苷酸缀合物,其中所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交以形成双链多核酸分子的第二多核苷酸。

8.根据权利要求7所述的多核苷酸缀合物,其中所述第二多核苷酸包含至少一个修饰。

9.根据权利要求7所述的多核苷酸缀合物,其中所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸为RNA分子。

10.根据权利要求7所述的多核苷酸缀合物,其中所述第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的核酸序列。

11.根据权利要求1所述的多核苷酸缀合物,其中所述结合部分和多核苷酸通过键、C_1-C_6烷基、同双官能团或异双官能团连接体偶联,任选地缀合至C_1-C_6烷基。

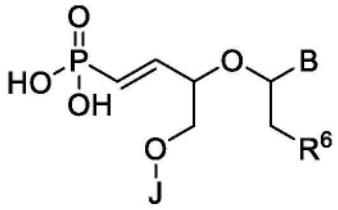
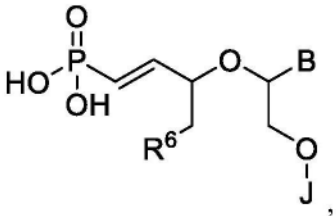
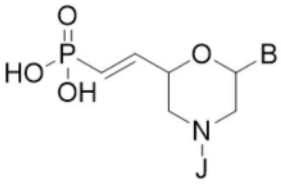
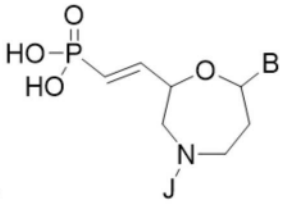
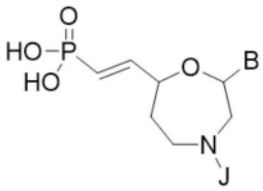
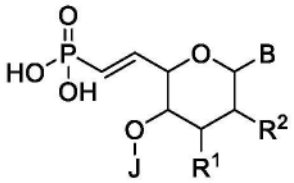
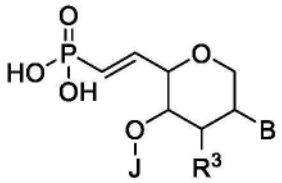
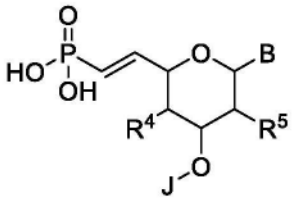
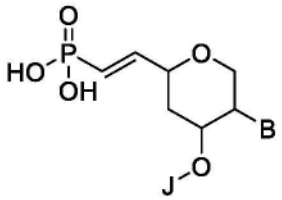
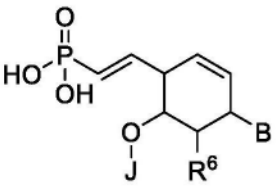
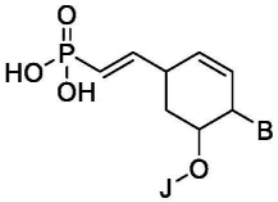
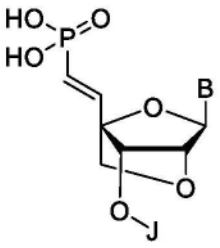
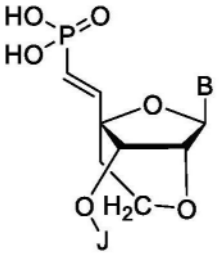
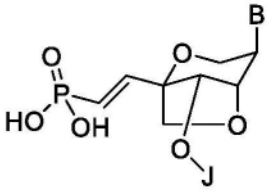
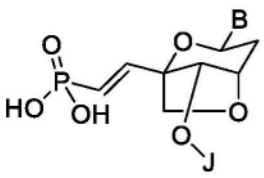
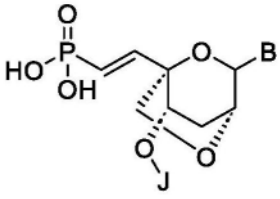
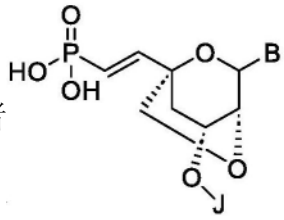
12.根据权利要求1所述的多核苷酸缀合物,其中所述结合部分包括抗体或其抗原结合片段。

13.根据权利要求12所述的多核苷酸缀合物,其中所述抗体或其抗原结合片段为抗转铁蛋白抗体或其抗原结合片段。

14.根据权利要求13所述的多核苷酸缀合物,其中所述抗转铁蛋白抗体或其抗原结合片段为人抗转铁蛋白抗体或其抗原结合片段。

15.根据权利要求12所述的多核苷酸缀合物,其中所述抗体或抗原结合片段包括人源化抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、单克隆抗体或其抗原结合片段、单价Fab’、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或骆驼科科抗体或其抗原结合片段。

16.多核苷酸,其包含至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸;并且其中所述至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

或者

;

其中B为杂环碱基部分;

R^1、R^2、R^3、R^4、R^5和R^6独立地选自氢、卤素、烷基、烷氧基或氨基烷基;并且

J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

17.根据权利要求16所述的多核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然

核苷酸位于所述多核苷酸的5'-末端或3'-末端。

18.根据权利要求16所述的多核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的核苷酸间连接处。

19.根据权利要求16所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸进一步包含至少一个修饰的核苷酸间连接,或至少一个反向脱碱基部分。

20.式(II)的多核苷酸缀合物,其中所述多核苷酸缀合物包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸:

$(A\text{-}X\text{-}B\text{-}Y\text{-}C_c)\text{-}L\text{-}D$

式II

其中:

A为结合部分;

B为多核苷酸;

C为聚合物;

X为键或第一连接体;

Y为键或第二连接体;

L为键或第三连接体;

D为内体溶解部分;且

c为0至1的整数;并且

D缀合在A、B或C上的任何地方。

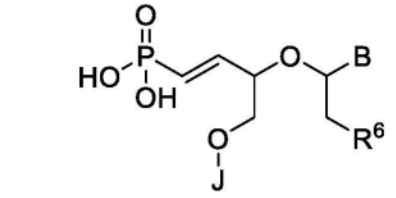
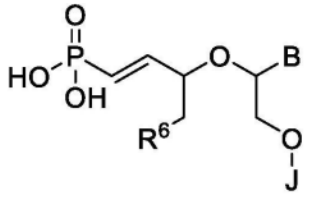
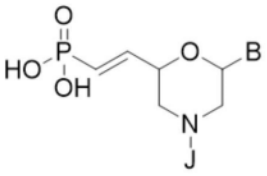
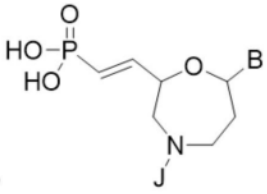
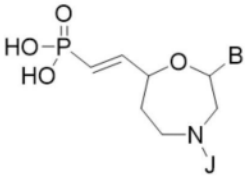
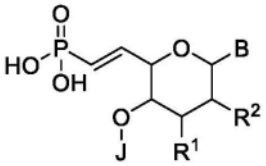
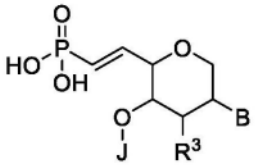
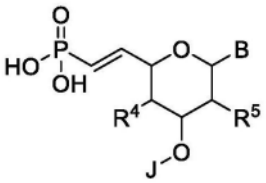
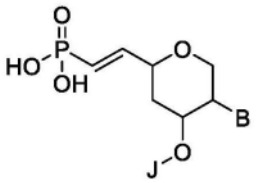
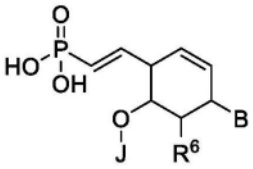
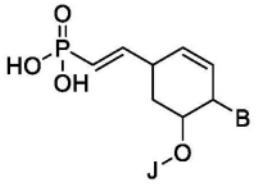
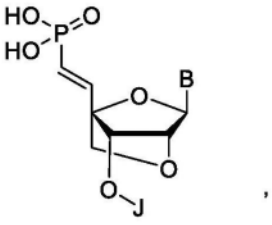
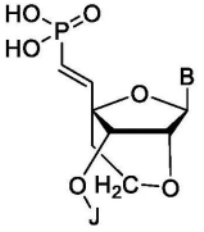
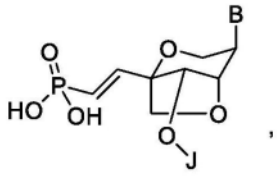
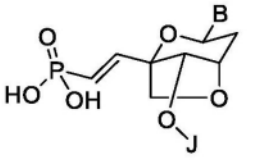
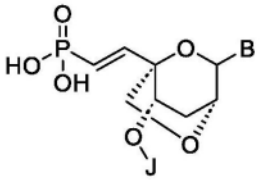
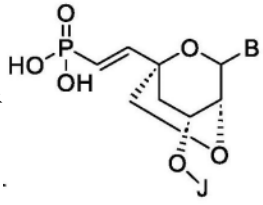
21.根据权利要求20所述的多核苷酸缀合物,其中所述多核苷酸进一步包含至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分。

22.根据权利要求20所述的多核苷酸缀合物,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的5'末端或3'-末端。

23.根据权利要求20所述的多核苷酸缀合物,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的核苷酸间连接处。

24.根据权利要求20所述的多核苷酸缀合物,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸在2'-位进一步被修饰,其中所述2'-修饰选自2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-脱氧、2-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、2-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)。

25.根据权利要求20所述的多核苷酸缀合物,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

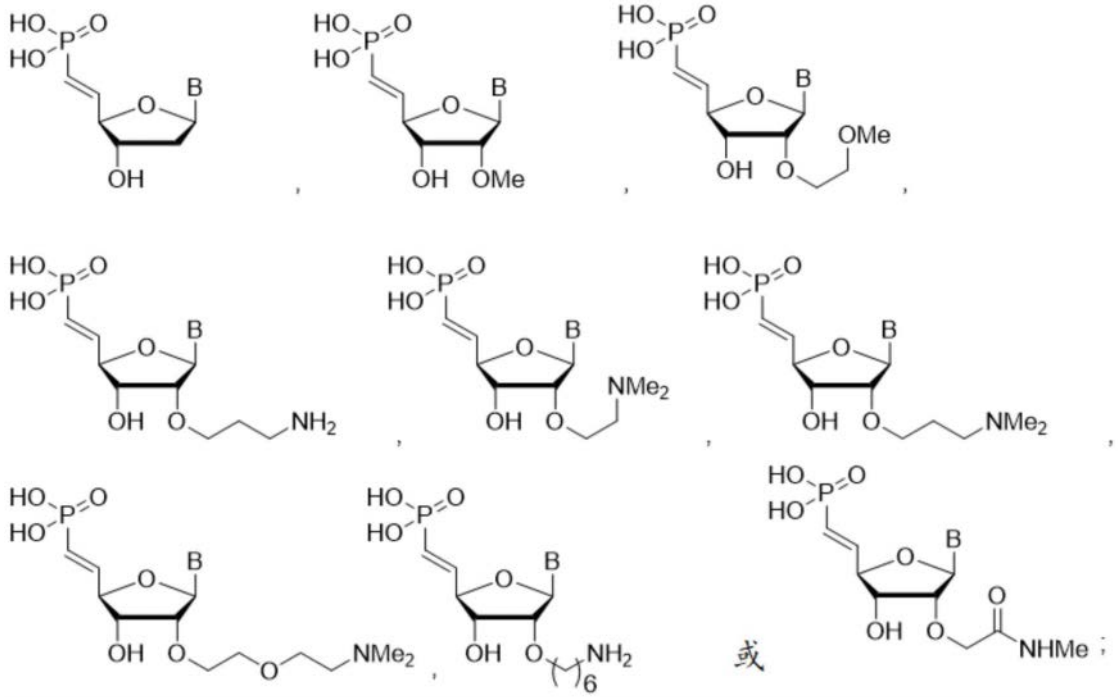

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,
或者

;

其中B为杂环碱基部分;

R^1、R^2、R^3、R^4、R^5和R^6独立地选自氢、卤素、烷基、烷氧基或氨基烷基;并且

J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

26.根据权利要求20所述的多核苷酸缀合物,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

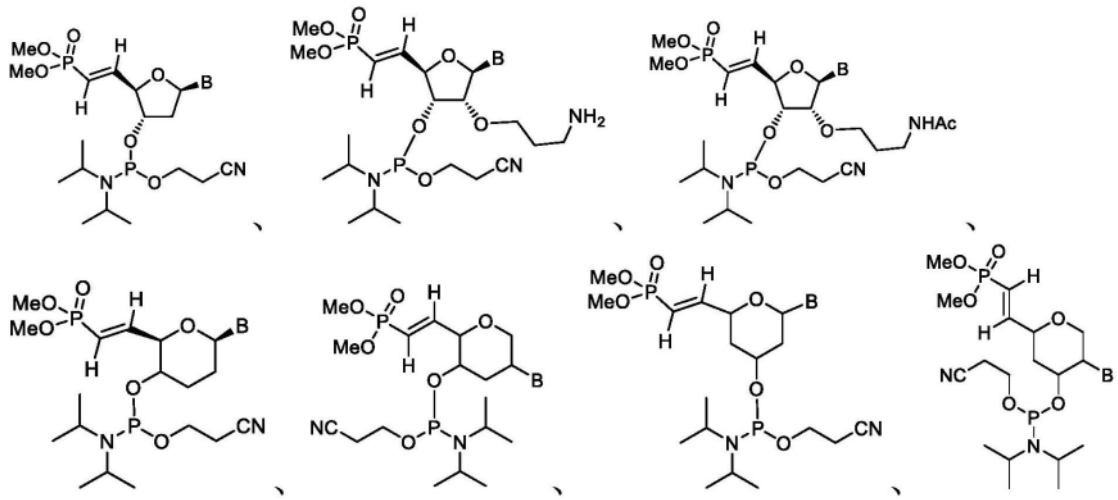


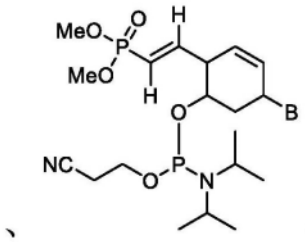
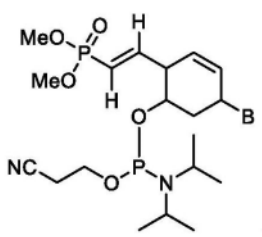
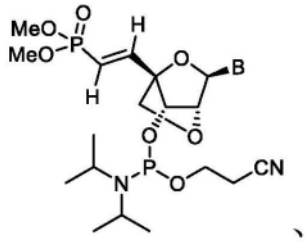
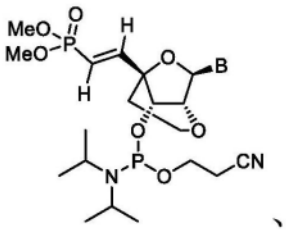
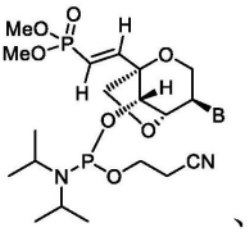
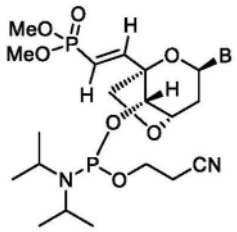
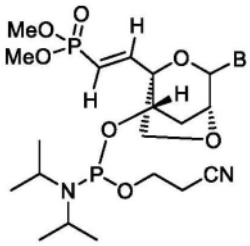
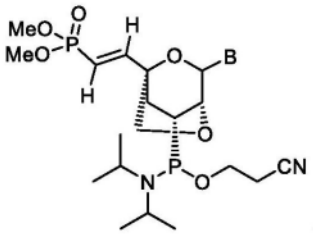
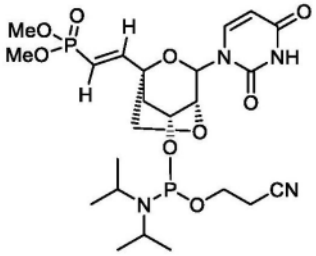
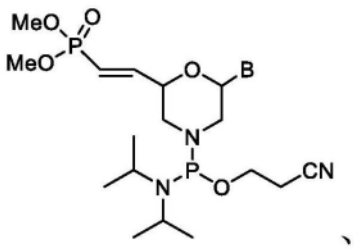
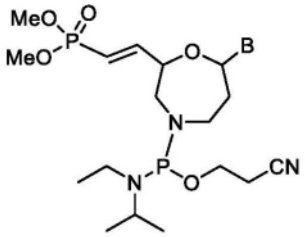
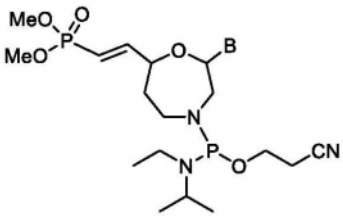
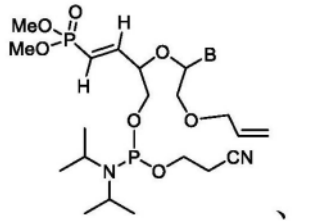
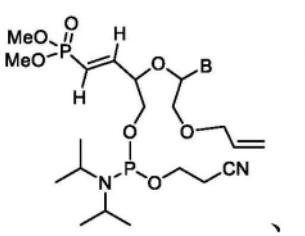
其中B为杂环碱基部分。

27.根据权利要求21所述的多核苷酸缀合物,其中所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、二氨基磷酸酯连接、甲基膦酸酯连接或酰胺连接。

28.根据权利要求20所述的多核苷酸缀合物,其中所述至少一个反向脱碱基部分是至少一个末端。

29.一种选自下组的适合于合成多核苷酸缀合物的化合物:



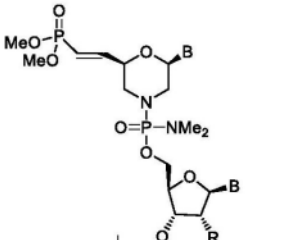

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

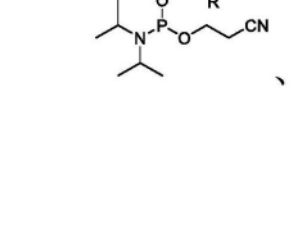
、

、

、

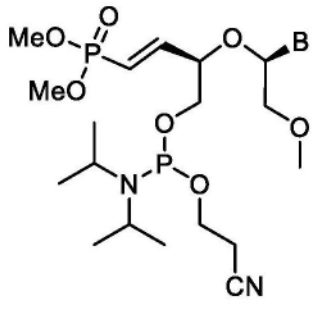
、

、

、

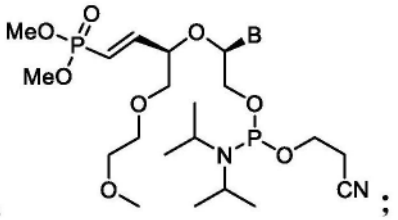
、

、

、

、



或



；

其中B为杂环碱基部分。

核酸-多肽组合物及其用途

[0001] 本申请是申请日为2018年10月04日、申请号为201880074360.2、发明名称为“核酸-多肽组合物及其用途”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2018年10月04日、申请号为PCT/US2018/054444)的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求于2017年10月4日提交的第62/568,238号美国临时专利申请的权益,该临时申请通过引用整体并入本文。

背景技术

[0004] 通过RNA诱导的基因沉默进行的基因抑制提供了几种控制水平:转录失活、小干扰RNA(siRNA)诱导的mRNA降解和siRNA诱导的转录弱化。在一些情况下,RNA干扰(RNAi)对多细胞分裂提供持久的影响。因此,RNAi代表了可用于药物靶标验证、基因功能分析、途径分析和疾病治疗的可行方法。

发明内容

[0005] 在某些实施方案中,本文公开了包含缀合至多核酸分子和聚合物的结合部分的组合物和药物制剂。在一些实施方案中,本文描述的还包括利用包含缀合至多核酸分子和聚合物的结合部分的组合物或药物制剂治疗疾病或病况(例如,癌症)的方法。

[0006] 在某些实施方案中,本文公开了式(I)的分子:

[0007] A-X-B-Y-C

[0008] 式I

[0009] 其中,

[0010] A为结合部分;

[0011] B为多核苷酸;

[0012] C为聚合物;

[0013] X为键或第一连接体;且

[0014] Y为键或第二连接体;并且

[0015] 其中所述多核苷酸包含至少一个5’-乙烯基膦酸(5’-

[0016] vinylphosphonate)修饰的核苷酸。

[0017] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含单链。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含两条或更多条链。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交以形成双链多核酸分子的第二多核苷酸。在一些实施方案中,所述第二多核苷酸包含至少一个修饰。

[0018] 在一些实施方案中,所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸为RNA分子。在一些实施方案中,所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸为siRNA分子。

[0019] 在一些实施方案中,所述第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242具有至少60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、

98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述第一多核苷酸由选自SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242的序列组成。

[0020] 在一些实施方案中,所述第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242具有至少60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述第二多核苷酸由选自SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242的序列组成。

[0021] 在一些实施方案中,X和Y独立地为键或非聚合连接体基团。在一些实施方案中,X为键。在一些实施方案中,X为C_1-C_6烷基。在一些实施方案中,Y为C_1-C_6烷基。在一些实施方案中,X为同双官能连接体或异双官能连接体,其任选地缀合至C_1-C_6烷基。在一些实施方案中,Y为同双官能连接体或异双官能连接体。

[0022] 在一些实施方案中,所述结合部分是抗体或其结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其结合片段是抗EGFR抗体或其结合片段。

[0023] 在一些实施方案中,C为聚乙二醇。在一些实施方案中,C具有约5000Da的分子量。

[0024] 在一些实施方案中,A-X缀合至B的5'端且Y-C缀合至B的3'端。在一些实施方案中,Y-C缀合至B的5'端且A-X缀合至B的3'端。在一些实施方案中,A-X、Y-C或其组合缀合至核苷酸间连接基团。

[0025] 在一些实施方案中,所述分子进一步包含D。在一些实施方案中,D缀合至C或缀合至A。

[0026] 在一些实施方案中,D根据式(II)缀合至式(I)的分子:

[0027] $(A\text{-}X\text{-}B\text{-}Y\text{-}C_n)\text{-}L\text{-}D$

[0028] 式II

[0029] 其中,

[0030] A为结合部分;

[0031] B为多核苷酸;

[0032] C为聚合物;

[0033] X为键或第一连接体;

[0034] Y为键或第二连接体;

[0035] L为键或第三连接体;

[0036] D为内体溶解(endosomolytic)部分;且

[0037] n为0至1的整数;并且

[0038] 其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸;并且D缀合在A、B或C上的任何地方。

[0039] 在一些实施方案中,D为INF7或蜂毒肽。

[0040] 在一些实施方案中,D为内体溶解聚合物。

[0041] 在一些实施方案中,L为C_1-C_6烷基。在一些实施方案中,L为同双官能连接体或异双官能连接体。

[0042] 在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少第二结合部分A。在一些实施方案中,所述至少第二结合部分A缀合至A、缀合至B或缀合至C。在一些实施方案中,所述至少第二结合部分A是胆固醇。

[0043] 在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少另外的多核苷酸B。在一些实施方案中,所述至少另外的多核苷酸B缀合至A、缀合至B或缀合至C。

[0044] 在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少另外的聚合物C。在一些实施方案中,所述至少另外的聚合物C缀合至A、缀合至B或缀合至C。

[0045] 在某些实施方案中,本文公开了式(I)的分子:A-X-B-Y-C式(I),其中A为抗体或其结合片段;B为多核苷酸;C为聚合物;X为键或第一非聚合连接体;且Y为键或第二连接体;其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸;并且其中A和C不连接至B的同一末端。在一些实施方案中,所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接或二硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,所述至少一个反向脱碱基部分在至少一个末端处。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含单链。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交以形成双链多核酸分子的第二多核苷酸。在一些实施方案中,所述第二多核苷酸包含至少一个修饰。在一些实施方案中,所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸为RNA分子。在一些实施方案中,所述第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Y为非聚合连接体基团。在一些实施方案中,X为键。在一些实施方案中,X为C_1-C_6烷基。在一些实施方案中,Y为C_1-C_6烷基。在一些实施方案中,X为同双官能连接体或异双官能连接体,其任选地缀合至C_1-C_6烷基。在一些实施方案中,Y为同双官能连接体或异双官能连接体。在一些实施方案中,所述抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。在一些实施方案中,C为聚乙二醇。在一些实施方案中,C具有约1000Da、2000Da或5000Da的分子量。在一些实施方案中,A-X缀合至B的5'端且Y-C缀合至B的3'端。在一些实施方案中,Y-C缀合至B的5'端且A-X缀合至B的3'端。在一些实施方案中,所述分子进一步包含D。在一些实施方案中,D缀合至C或缀合至A。在一些实施方案中,D根据式(II)缀合至式(I)的分子:(A-X-B-Y-C_c)-L-D(式II),其中A为抗体或其结合片段;B为多核苷酸;C为聚合物;X为键或第一非聚合连接体;Y为键或第二连接体;L为键或第三连接体;D为内体溶解部分;且c为0至1的整数;其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分;其中A和C不连接至B的同一末端;并且其中D缀合在A或C上的任何地方或缀合至B的末端。在一些实施方案中,D为INF7或蜂毒肽。在一些实施方案中,D为内体溶解聚合物。在一些实施方案中,L为C_1-C_6烷基。在一些实施方案中,L为同双官能连接体或异双官能连接体。在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少第二结合部分。在一些实施方案中,所述至少第二结合部分缀合至A、缀合至B或缀合至C。在一些实施方案中,所述至少第二结合部分是胆固醇。在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少另外的多核苷酸B。在一些实施方案中,所述至少另外的多核苷酸B缀合

至A、缀合至B或缀合至C。在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少另外的聚合物C。在一些实施方案中,所述至少另外的聚合物C缀合至A、缀合至B或缀合至C。

[0046] 在某些实施方案中,本文公开了包含以上描述的分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制为纳米颗粒制剂。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制用于肠胃外、口服、鼻内、颊部、直肠或透皮给药。

[0047] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有需要的患者的疾病或病症的方法,其包括向所述患者施用包含上述分子的组合物。在一些实施方案中,所述疾病或病症为癌症。在一些实施方案中,所述癌症为实体瘤。在一些实施方案中,所述癌症为血液系统恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述癌症包括KRAS相关癌症、EGFR相关癌症、AR相关癌症、β-联蛋白(catenin)相关癌症、PIK3C相关癌症或MYC相关癌症。在一些实施方案中,所述癌症包括膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、多形性胶质母细胞瘤、头颈癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌或甲状腺癌。在一些实施方案中,所述癌症包括急性髓样白血病、CLL、DLBCL或多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,所述方法为免疫肿瘤学疗法。

[0048] 在某些实施方案中,本文公开了抑制患者原代细胞中的靶基因表达的方法,其包括将上述分子施用于所述原代细胞。在一些实施方案中,所述方法为体内方法。在一些实施方案中,所述患者为人。

[0049] 在某些实施方案中,本文公开了包含上述分子的免疫肿瘤学疗法,其用于治疗有需要的患者的疾病或病症。

[0050] 在某些实施方案中,本文公开了包含上述分子的试剂盒。

附图说明

[0051] 图1A显示了如分子生物学实施例10中所述,具有19个互补性碱基和3’二核苷酸突出端的21聚体双链体的结构的卡通表示。

[0052] 图1B显示了如分子生物学实施例10中所述,具有19个互补性碱基和一个3’二核苷酸突出端的平端双链体的结构的卡通表示。

[0053] 图2显示了如分子生物学实施例11中所述,对于用HPRT siRNA转染HCT,Log(siRNA,以nM为单位)相对于相对HPRT mRNA(%)的图。

[0054] 图3显示了如分子生物学实施例12中所述,对于用MSTN siRNA转染SJCRH30,Log(siRNA,以nM为单位)相对于相对MSTN mRNA水平(相对于未处理的对照的%)的图。

[0055] 图4显示了如分子生物学实施例13中所述,在静脉内施用抗体siRNA缀合物后,在腓肠肌中的体内MSTN和HPRT mRNA下调。

[0056] 图5显示了如分子生物学实施例14中所述,在静脉内施用抗体siRNA缀合物后,在(A)腓肠肌、(B)四头肌和(C)心肌中的体内MSTN mRNA下调。

[0057] 图6显示了如分子生物学实施例15中所述,在静脉内施用抗体siRNA缀合物后,在(A)腓肠肌和(B)肝脏中的体内HPRT mRNA下调。

[0058] 图7显示了如分子生物学实施例16中所述的浓度(nM)相对于%SSB mRNA的图。

[0059] 图8显示了如分子生物学实施例17中所述,对于SJCRH30转染,siRNA浓度(nM)相对于相对MSTN(图8A)和SSB(图8B)mRNA表达的图。

[0060] 图9显示了如分子生物学实施例18中所述,siRNA浓度(nM)相对于相对MSTN(图8A)

和SSB(图8B)mRNA表达的图。

具体实施方式

[0061] 核酸(例如,RNAi)疗法是具有高选择性和特异性的靶向疗法。然而,在一些情况下,核酸疗法也受到细胞内摄取不良、血液稳定性有限和非特异性免疫刺激的阻碍。为了解决这些问题,探索了核酸组合物的各种修饰,例如,用于更好稳定和/或降低毒性的新型连接体,用于提高靶标特异性和/或靶标递送的结合部分的优化,以及用于提高稳定性和/或降低脱靶效应的核酸聚合物修饰。

[0062] 在一些实施方案中,构成核酸组合物的不同组分的排列或顺序进一步影响细胞内摄取、稳定性、毒性、功效和/或非特异性免疫刺激。例如,如果核酸组分包括结合部分、聚合物和多核酸分子(或多核苷酸),则该结合部分、聚合物和/或多核酸分子(或多核苷酸)的顺序或排列(例如,结合部分-多核酸分子-聚合物、结合部分-聚合物-多核酸分子或聚合物-结合部分-多核酸分子)进一步影响细胞内摄取、稳定性、毒性、功效和/或非特异性免疫刺激。

[0063] 在一些实施方案中,本文描述的包括一种分子,其中核酸组分的排列影响细胞内摄取、稳定性、毒性、功效和/或非特异性免疫刺激的那些分子。在一些情况下,该分子包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分。在一些实施方案中,该分子包括根据式(I)的分子:A-X-B-Y-C;其中A为结合部分,B为包含至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸的多核苷酸,C为聚合物,X为键或第一连接体,且Y为键或第二连接体。在一些情况下,该多核苷酸包含至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸。在一些情况下,式(I)的分子进一步包含D——内体溶解部分。

[0064] 在一些实施方案中,包含如本文所述排列的与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的分子增强细胞内摄取、稳定性和/或功效。在一些情况下,包含如本文所述排列的与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的分子降低毒性和/或非特异性免疫刺激。在一些情况下,该分子包括根据式(I)的分子:A-X-B-Y-C;其中A为结合部分,B为包含至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸的多核苷酸,C为聚合物,X为键或第一连接体,且Y为键或第二连接体。在一些情况下,该多核苷酸包含至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸。在一些情况下,式(I)的分子进一步包含D——内体溶解部分。

[0065] 在一些实施方案中,本文所述的分子进一步用于治疗疾病或病症。在一些情况下,用于治疗疾病或病症的分子是根据式(I)的分子:A-X-B-Y-C;其中A为结合部分,B为包含至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸的多核苷酸,C为聚合物,X为键或第一连接体,且Y为键或第二连接体。在一些情况下,该多核苷酸包含至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸。在一些情况下,式(I)的分子进一步包含D——内体溶解部分。

[0066] 在一些实施方案中,本文所述的分子还用于抑制有需要的患者的原代细胞中靶基因的表达。在这样的情况下,用于此类用途的分子是根据式(I)的分子:A-X-B-Y-C;其中A为结合部分,B为包含至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸的多核苷酸,C为聚合物,X为键或第一连接体,且Y为键或第二连接体。在一些情况下,该多核苷酸包含至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分。在一些情况下,式(I)的分子进一步包含D——内体溶解部分。

[0067] 在一些实施方案中,本文所述的分子另外用作免疫肿瘤学疗法,用于治疗疾病或病症。在一些情况下,该分子是根据式(I)的分子:A-X-B-Y-C;其中A为结合部分,B为包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸的多核苷酸,C为聚合物,X为键或第一连接体,且Y为键或第二连接体。在一些情况下,该多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分。在一些情况下,在一些情况下,式(I)的分子进一步包含D——内体溶解部分。

[0068] 在另外的实施方案中,本文描述的包括一种试剂盒,其包含一种或多种本文所述的分子。

[0069] 治疗性分子平台

[0070] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包含与包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸的多核酸分子和聚合物缀合的结合部分。在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)包括根据式(I)的分子:

[0071] A-X-B-Y-C

[0072] 式I

[0073] 其中,

[0074] A为结合部分;

[0075] B为多核苷酸;

[0076] C为聚合物;

[0077] X为键或第一连接体;且

[0078] Y为键或第二连接体;并且

[0079] 其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸。

[0080] 在一些情况下,式(I)的分子进一步包含D——内体溶解部分。

[0081] 在一些实施方案中,至少一个A和/或至少一个C缀合至B的5'末端、B的3'末端、B上的内部位点或其任意组合。在一些情况下,至少一个A缀合在B的一个末端,而至少一个C缀合在B的相对末端。在一些情况下,至少一个A缀合在B的一个末端,而至少一个C缀合在B上的内部位点。

[0082] 在一些情况下,A和C不缀合或连接至B的同一末端。在一些情况下,A在B的第一末端连接或缀合至B。在一些情况下,C在B的第二末端连接或缀合至B,并且B的第二末端与第一末端不同。在一些情况下,A在B的5'末端连接或缀合至B,而C在B的3'末端连接或缀合至B。在其他情况下,A在B的3'末端连接或缀合至B,而C在B的5'末端连接或缀合至B。

[0083] 在一些实施方案中,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,C为聚合物。在一些情况下,A和C不缀合或连接至B的同一末端。在一些情况下,A在B的第一末端缀合或连接至B。在一些情况下,C在B的第二末端缀合或连接至B,并且B的第二末端与第一末端不同。在一些情况下,A在B的5'末端缀合或连接至B,而C在B的3'末端缀合或连接至B。在其他情况下,A在B的3'末端缀合或连接至B,而C在B的5'末端缀合或连接至B。在一些情况下,连接A与B的X为键或非聚合连接体。在一些情况下,X为非肽连接体(或不包含氨基酸残基的连接体)。在一些情况下,连接B与C的Y为键或第二连接体。在一些情况下,X将A连接至B的5'末端,并且Y将C连接至B的3'末端。在其他情况下,X将A连接至B的3'末端,并且Y将C连接至B的5'末端。

[0084] 在一些实施方案中,X-B缀合或连接至A的N-末端、C-末端、恒定区、铰链区或Fc区。

在一些情况下,X-B缀合或连接至A的N-末端。在一些情况下,X-B缀合或连接至A的C-末端。在一些情况下,X-B缀合或连接至A的铰链区。在一些情况下,X-B缀合或连接至A的恒定区。在一些情况下,X-B缀合或连接至A的Fc区。

[0085] 在一些情况下,至少一个B和/或至少一个C以及可选的至少一个D缀合至第一个A。在一些情况下,所述至少一个B缀合至第一个A的末端(例如,5'末端或3'末端),或者经由内部位点缀合至第一个A。在一些情况下,至少一个C直接缀合至第一个A,或者经由两个或更多个B间接缀合。如果经由两个或更多个B间接缀合,则两个或更多个C缀合在B上与第一个A相同的末端、与第一个A相对的末端或在内部位点独立缀合。在一些情况下,至少一个另外的A进一步缀合至第一个A、B或C。在另外的情况下,至少一个D任选地直接或间接缀合至第一个A、至少一个B或至少一个C。如果直接缀合至第一个A,则至少一个D也任选地缀合到至少一个B以形成A-D-B缀合物,或者任选地缀合到至少一个B和至少一个C以形成A-D-B-C缀合物。在一些情况下,至少一个另外的A与第一个A不同。

[0086] 在一些情况下,两个或更多个B和/或两个或更多个C缀合至第一个A。在一些情况下,所述两个或更多个B缀合至第一个A的末端(例如,5'末端或3'末端)或经由内部位点缀合至第一个A。在一些情况下,两个或更多个C直接缀合至第一个A,或者经由两个或更多个B间接缀合。如果经由两个或更多个B间接缀合,则两个或更多个C缀合在B上与第一个A相同的末端、与第一个A相对的末端或在内部位点独立缀合。在一些情况下,至少一个另外的A进一步缀合至第一个A、两个或更多个B或者两个或更多个C。在另外的情况下,至少一个D任选地直接或间接缀合至第一个A、两个或更多个B或者两个或更多个C。如果间接缀合至第一个A,则至少一个D通过两个或更多个B、通过两个或更多个C缀合至第一个A,通过B-C取向缀合以形成A-B-C-D型缀合物,或者通过C-B取向缀合以形成A-C-B-D型缀合物。在一些情况下,所述至少一个另外的A与第一个A不同。在一些情况下,所述两个或更多个B不同。在其他情况下,所述两个或更多个B相同。在一些情况下,所述两个或更多个C不同。在其他情况下,所述两个或更多个C相同。在另外的情况下,所述两个或更多个D不同。在另外的情况下,所述两个或更多个D相同。

[0087] 在其他情况下,两个或更多个B和/或两个或更多个D、可选的两个或更多个C缀合至第一个A。在一些情况下,所述两个或更多个B缀合至第一个A的末端(例如,5'末端或3'末端),或者经由内部位点缀合至第一个A。在一些情况下,所述两个或更多个D直接缀合至第一个A,或者经由两个或更多个B间接缀合。如果经由两个或更多个B间接缀合,则两个或更多个D缀合在B上与第一个A相同的末端、与第一个A相对的末端或在内部位点独立缀合。在一些情况下,至少一个另外的A进一步缀合至第一个A、两个或更多个B或者两个或更多个D。在另外的情况下,两个或更多个C任选地直接或间接缀合至第一个A、两个或更多个B或者两个或更多个D。在一些情况下,所述至少一个另外的A与第一个A不同。在一些情况下,所述两个或更多个B不同。在其他情况下,所述两个或更多个B相同。在一些情况下,所述两个或更多个C不同。在其他情况下,所述两个或更多个C相同。在另外的情况下,所述两个或更多个D不同。在另外的情况下,所述两个或更多个D相同。

[0088] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(II)的分子:

[0089] $(A\text{-}X\text{-}B\text{-}Y\text{-}C_c)\text{-}L\text{-}D$

[0090] 式II

[0091] 其中,

[0092] A为结合部分;

[0093] B为多核苷酸;

[0094] C为聚合物;

[0095] X为键或第一连接体;

[0096] Y为键或第二连接体;

[0097] L为键或第三连接体;

[0098] D为内体溶解部分;且

[0099] c为0至1的整数;并且

[0100] 其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸;且D缀合在A、B或C上的任何地方。

[0101] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(III)的分子:

[0102] A_a-X-B_b-Y-C_c-L-D_n

[0103] 式III

[0104] 其中,

[0105] A为结合部分;

[0106] B为多核苷酸;

[0107] C为聚合物;

[0108] D为内体溶解部分;

[0109] X为键或第一连接体;

[0110] Y为键或第二连接体;

[0111] L为键或第三连接体;

[0112] a和b独立地为1-3的整数;

[0113] c为0至3的整数;且

[0114] n为0至1的整数0;并且

[0115] 其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸;A缀合在B、C或D上的任何地方;B缀合在A、C或D上的任何地方;C缀合在A、B或D上的任何地方;并且D缀合在A、B或C上的任何地方。

[0116] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(IIIa)的分子:A-X-B-L-D-Y-C。

[0117] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(IIIb)的分子:A_a-X-B_b-L-D_n。

[0118] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(IV)的分子:

[0119] A-X-$(B_b$-Y-C_c-L-$D_n)_m$

[0120] 其中,

[0121] A为结合部分;

[0122] B为多核苷酸;

[0123] C为聚合物;

[0124] D为内体溶解部分;

[0125] X为键或第一连接体;

[0126] Y为键或第二连接体;

[0127] L为键或第三连接体;

[0128] a和b独立地为1-3的整数;

[0129] c为0至3的整数;

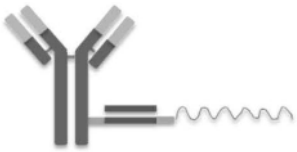
[0130] n为0至1的整数0;且

[0131] m为1-3的整数;并且

[0132] 其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸;C缀合在B或D上的任何地方;并且D缀合在B或C上的任何地方。

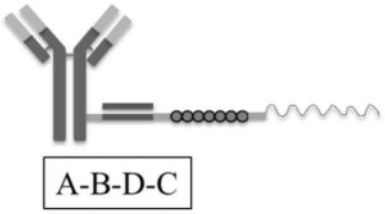
[0133] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(IVa)的分子:$A-X-(B_b-L-D_n-Y-C_c)_m$。

[0134] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



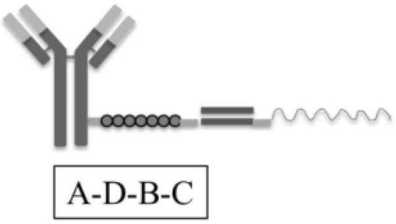
。

[0135] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



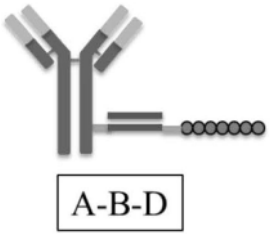
。

[0136] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



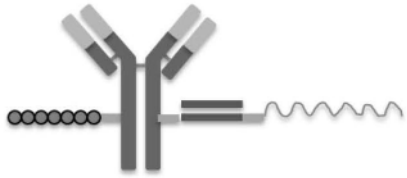
。

[0137] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



。

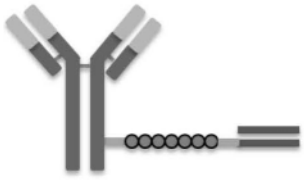
[0138] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



D-A-B-C

。

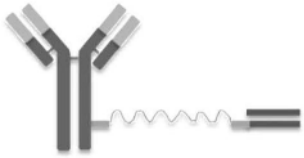
[0139] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



A-D-B

。

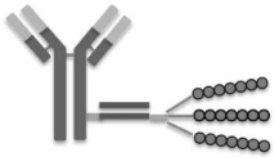
[0140] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



A-C-B

。

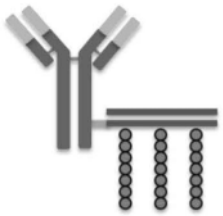
[0141] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



$A\text{-}B\text{-}(D)_n$

。

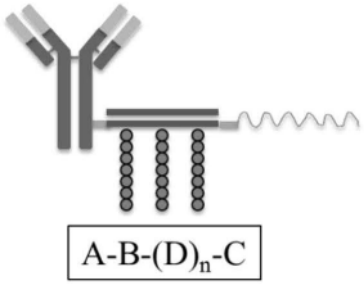
[0142] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



$A\text{-}B\text{-}(D)_n$

。

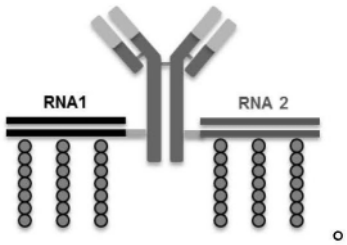
[0143] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



[0144] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



[0145] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



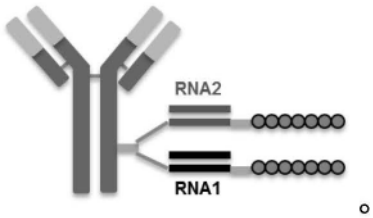
[0146] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



[0147] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



[0148] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:

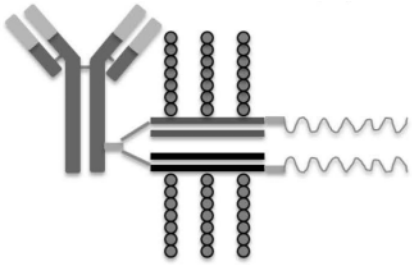


[0149] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



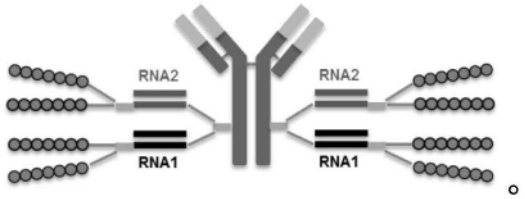
。

[0150] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



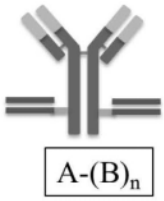
。

[0151] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



。

[0152] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)是如下所示的分子:



。

[0153] 如上所示的  仅用于表示目的,并且包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。

[0154] 多核酸分子靶标

[0155] 在一些实施方案中,多核酸分子B是与癌基因上的靶区域杂交的多核酸分子(或多核苷酸)。在一些情况下,癌基因进一步分类为几个类别:生长因子或促分裂原、受体酪氨酸激酶、细胞质酪氨酸激酶、细胞质丝氨酸/苏氨酸激酶、调节性GTP酶和转录因子。示例性的生长因子包括c-Sis。示例性的受体酪氨酸激酶包括表皮生长因子受体(EGFR)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)和HER2/neu。示例性的细胞质酪氨酸激酶包括Src家族酪氨酸激酶、Syk-ZAP-70家族酪氨酸激酶、BTK家族酪氨酸激酶和CML中的Abl基因。示例性的细胞质丝氨酸/苏氨酸激酶包括Raf激酶和细胞周期蛋白依赖性激酶。示例性的调节性GTP酶包括Ras家族蛋白质,如KRAS。示例性的转录因子包括MYC基因。在一些情况下,本文所述的癌基因包括选自以下的癌基因:生长因子或促分裂原、受体酪氨酸激酶、细胞质酪氨酸激酶、细胞质丝氨酸/苏氨酸激酶、调节性GTP酶或转录因子。在一些实施方案中,所述多核酸分子是与癌基因的靶区域杂交的多核酸分子,该癌基因选自生长因子

或促分裂原、受体酪氨酸激酶、细胞质酪氨酸激酶、细胞质丝氨酸/苏氨酸激酶、调节性GTP酶或转录因子。

[0156] 在一些实施方案中,本文所述的癌基因包括Abl、AKT-2、ALK、AML1(或RUNX1)、AR、AXL、BCL-2、3、6、BRAF、c-MYC、EGFR、ErbB-2(Her2、Neu)、Fms、FOS、GLI1、HPRT1、IL-3、INTS2、JUN、KIT、KS3、K-sam、LBC(AKAP13)、LCK、LMO1、LMO2、LYL1、MAS1、MDM2、MET、MLL(KMT2A)、MOS、MYB、MYH11/CBFB、NOTCH1(TAN1)、NTRK1(TRK)、OST(SLC51B)、PAX5、PIM1、PRAD-1、RAF、RAR/PML、HRAS、KRAS、NRAS、REL/NRG、RET、ROS、SKI、SRC、TIAM1或TSC2。在一些实施方案中,所述多核酸分子是与Abl、AKT-2、ALK、AML1(或RUNX1)、AR、AXL、BCL-2、3、6、BRAF、c-MYC、EGFR、ErbB-2(Her2、Neu)、Fms、FOS、GLI1、HPRT1、IL-3、INTS2、JUN、KIT、KS3、K-sam、LBC(AKAP13)、LCK、LMO1、LMO2、LYL1、MAS1、MDM2、MET、MLL(KMT2A)、MOS、MYB、MYH11/CBFB、NOTCH1(TAN1)、NTRK1(TRK)、OST(SLC51B)、PAX5、PIM1、PRAD-1、RAF、RAR/PML、HRAS、KRAS、NRAS、REL/NRG、RET、ROS、SKI、SRC、TIAM1或TSC2的靶区域杂交的多核酸分子。

[0157] 在一些实施方案中,本文所述的癌基因包括KRAS、EGFR、AR、HPRT1、CNNTB1(β-联蛋白)或β-联蛋白相关基因。在一些实施方案中,多核酸分子B是与KRAS、EGFR、AR、HPRT1、CNNTB1(β-联蛋白)或β-联蛋白相关基因的靶区域杂交的多核酸分子。在一些实施方案中,多核酸分子B是与KRAS的靶区域杂交的多核酸分子。在一些实施方案中,多核酸分子B是与EGFR的靶区域杂交的多核酸分子。在一些实施方案中,多核酸分子B是与AR的靶区域杂交的多核酸分子。在一些实施方案中,多核酸分子B是与CNNTB1(β-联蛋白)的靶区域杂交的多核酸分子。在一些实施方案中,多核酸分子B是与CNNTB1(β-联蛋白)相关基因的靶区域杂交的多核酸分子。在一些情况下,β-联蛋白相关基因包括PIK3CA、PIK3CB和Myc。在一些情况下,多核酸分子B是与HPRT1的靶区域杂交的多核酸分子。

[0158] 靶向Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)的多核酸分子

[0159] Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(也称为GTP酶KRas、V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物或KRAS)参与调节细胞分裂。K-Ras蛋白是属于Ras超家族的GTP酶。在一些情况下,K-Ras调节细胞周期进程,以及在不同环境触发因素(例如,细胞应激、紫外线、热休克或电离辐射)下诱导生长停滞、凋亡和复制性衰老。在一些情况下,野生型KRAS基因已显示在不同类型的癌症的肿瘤进展期间经常丢失,而KRAS基因的突变与癌症发展有关。在一些情况下,KRAS扩增也涉及癌症发展(参见,例如,Valtorta等人"KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy,"Int.J.Cancer 133:1259-1266(2013))。在这样的情况下,该癌症属于难治性癌症,其中患者已经获得对特定抑制剂或抑制剂类别的耐药性。

[0160] 在一些实施方案中,所述KRAS基因是野生型或包含突变。在一些情况下,KRAS mRNA是野生型或包含突变。在一些情况下,所述多核酸分子是与野生型KRASDNA或RNA的靶区域杂交的多核酸分子。在一些情况下,所述多核酸分子是与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的KRASDNA或RNA的靶区域杂交的多核酸分子。

[0161] 在一些实施方案中,KRASDNA或RNA包含一个或多个突变。在一些实施方案中,KRASDNA或RNA在外显子1中的密码子12或13处包含一个或多个突变。在一些情况下,KRASDNA或RNA在密码子61、63、117、119或146处包含一个或多个突变。在一些情况下,KRASDNA或RNA在对应于KRAS多肽的氨基酸残基12、13、18、19、20、22、24、26、36、59、61、63、64、

68、110、116、117、119、146、147、158、164、176或其组合的位置处包含一个或多个突变。在一些实施方案中,KRASDNA或RNA在对应于选自KRAS多肽的G12V、G12D、G12C、G12A、G12S、G12F、G13C、G13D、G13V、A18D、L19F、T20R、Q22K、I24N、N26K、I36L、I36M、A59G、A59E、Q61K、Q61H、Q61L、Q61R、E63K、Y64D、Y64N、R68S、P110S、K117N、C118S、A146T、A146P、A146V、K147N、T158A、R164Q、K176Q或其组合的氨基酸残基的位置处包含一个或多个突变。

[0162] 在一些实施方案中,所述多核酸分子与包含一个或多个突变的KRASDNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在外显子1中的密码子12或13处包含一个或多个突变的KRASDNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在密码子61、63、117、119或146处包含一个或多个突变的KRASDNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于KRAS多肽的氨基酸残基12、13、18、19、20、22、24、26、36、59、61、63、64、68、110、116、117、119、146、147、158、164、176或其组合的位置处包含一个或多个突变的KRASDNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与包含对应于选自KRAS多肽的G12V、G12D、G12C、G12A、G12S、G12F、G13C、G13D、G13V、A18D、L19F、T20R、Q22K、I24N、N26K、I36L、I36M、A59G、A59E、Q61K、Q61H、Q61L、Q61R、E63K、Y64D、Y64N、R68S、P110S、K117N、C118S、A146T、A146P、A146V、K147N、T158A、R164Q、K176Q或其组合的氨基酸残基的一个或多个突变的KRASDNA或RNA的靶区域杂交。

[0163] 靶向表皮生长因子受体(EGFR)的多核酸分子

[0164] 表皮生长因子受体(EGFR、ErbB-1或HER1)是跨膜酪氨酸激酶受体和ErbB受体家族的成员,其还包括HER2/c-neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)和Her4(ErbB-4)。在一些情况下,EGFR突变驱动RAS/RAF/MAPK、PI3K/AKT和/或JAK/STAT途径的下游激活,从而导致有丝分裂、细胞增殖和抑制凋亡。此外,野生型EGFR基因的扩增与癌症如胶质母细胞瘤和非小细胞肺癌的发展有关(Talasila等人,“EGFR Wild-type Amplification and Activation Promote Invasion and Development of Glioblastoma Independent of Angiogenesis,”Acta Neuropathol.125(5):683-698(2013);Bell等人.,“Epidermal Growth Factor Receptor突变s and Gene Amplification in Non-Small-Cell Lung Cancer:Molecular Analysis of the IDEAL/INTACT Gefitinib Trials,”J.Clinical Oncology 23(31):8081-8092(2005))。

[0165] 在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA是野生型EGFR或包含突变的EGFR。在一些情况下,EGFR是野生型EGFR。在一些情况下,EGFR DNA或RNA包含突变。在一些情况下,所述多核酸分子与野生型EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些情况下,所述多核酸分子与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0166] 在一些情况下,EGFR DNA或RNA包含一个或多个突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一个或多个突变。在一些情况下,所述一个或多个外显子包括外显子18、外显子19、外显子20、外显子21或外显子22。在一些情况下,EGFR DNA或RNA在外显子18、外显子19、外显子20、外显子21、外显子22或其组合中包含一个或多个突变。

[0167] 在一些情况下,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基34、38、45、62、63、77、78、108、114、120、140、148、149、160、177、178、189、191、198、220、222、223、229、237、240、244、252、254、255、256、263、270、273、276、282、288、289、301、303、304、309、314、326、

331、354、363、373、337、380、384、393、427、428、437、441、447、465、475、515、526、527、531、536、541、546、571、588、589、596、596、598、602、614、620、628、636、641、645、651、671、689、694、700、709、712、714、715、716、719、720、721、731、733、739-744、742、746-750、746-752、746、747、747-749、747-751、747-753、751、752、754、752-759、750、761-762、761、763、765、767-768、767-769、768、769、769-770、770-771、772、773-774、773、774、774-775、776、779、783、784、786、790、792、794、798、803、805、807、810、826、827、831、832、833、835、837、838、839、842、843、847、850、851、853、854、856、858、861、863、894、917、967、1006、1019、1042、1100、1129、1141、1153、1164、1167或其组合的位置处包含一个或多个突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基747、761、790、854、858或其组合的位置处包含一个或多个突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基761、790、858或其组合的位置处包含一个或多个突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基747的位置处包含突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基761的位置处包含突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基790的位置处包含突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基854的位置处包含突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基858的位置处包含突变。

[0168] 在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA包含选自EGFR多肽的T34M、L38V、E45Q、L62R、G63R、G63K、S77F、F78L、R108K、R108G、E114K、A120P、L140V、V148M、R149W、E160K、S177P、M178I、K189T、D191N、S198R、S220P、R222L、R222C、S223Y、S229C、A237Y、C240Y、R244G、R252C、R252P、F254I、R255(无义突变)、D256Y、T263P、Y270C、T273A、Q276(无义)、E282K、G288(移码)、A289D、A289V、A289T、A289N、A289D、V301(缺失)、D303H、H304Y、R309Q、D314N、C326R、G331R、T354M、T363I、P373Q、R337S、S380(移码)、T384S、D393Y、R427L、G428S、S437Y、V441I、S447Y、G465R、I475V、C515S、C526S、R527L、R531(无义)、V536M、L541I、P546Q、C571S、G588S、P589L、P596L、P596S、P596R、P596L、G598V、G598A、E602G、G614D、C620Y、C620W、C628Y、C628F、C636Y、T638M、P641H、S645C、V651M、R671C、V689M、P694S、N700D、E709A、E709K、E709Q、E709K、F712L、K714N、I715S、K716R、G719A、G719C、G719D、G719S、S720C、S720F、G721V、W731Stop、P733L、K739-I744(插入)、V742I、V742A、E746-A750(缺失)、E746K、L747S、L747-E749(缺失)、L747-T751(缺失)、L747-P753(缺失)、G746-S752(缺失)、T751I、S752Y、K754(缺失)、S752-I759(缺失)、A750P、D761-E762(例如,残基EAFQ插入(SEQ ID NO:2110))、D761N、D761Y、A763V、V765A、A767-S768(例如,残基TLA插入)、A767-V769(例如,残基ASV插入)、S768I、S768T、V769L、V769M、V769-D770(例如,残基Y插入)、770-771(例如,残基GL插入)、770-771(例如,残基G插入)、770-771(例如,残基CV插入)、770-771(例如,残基SVD插入)、P772R、773-774(例如,残基NPH插入)、H773R、H773L、V774M、774-775(例如,残基HV插入)、R776H、R776C、G779F、T783A、T784F、T854A、V786L、T790M、L792P、P794H、L798F、R803W、H805R、D807H、G810S、N826S、Y827(无义)、R831H、R832C、R832H、L833F、L833V、H835L、D837V、L838M、L838P、A839V、N842H、V843L、T847K、T847I、H850N、V851A、I853T、F856L、L858R、L858M、L861Q、L861R、G863D、Q894L、G917A、E967A、D1006Y、P1019L、S1042N、R1100S、H1129Y、T1141S、S1153I、Q1164R、L1167M或其组合的一个或多个突变。

[0169] 在一些情况下,所述多核酸分子与包含一个或多个突变的EGFR DNA或RNA的靶区

域杂交。在一些实施方案中,所述多核酸分子与在外显子18、外显子19、外显子20、外显子21、外显子22或其组合中包含一个或多个突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0170] 在一些实施方案中,所述多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基34、38、45、62、63、77、78、108、114、120、140、148、149、160、177、178、189、191、198、220、222、223、229、237、240、244、252、254、255、256、263、270、273、276、282、288、289、301、303、304、309、314、326、331、354、363、373、337、380、384、393、427、428、437、441、447、465、475、515、526、527、531、536、541、546、571、588、589、596、596、598、602、614、620、628、636、641、645、651、671、689、694、700、709、712、714、715、716、719、720、721、731、733、739-744、742、746-750、746-752、746、747、747-749、747-751、747-753、751、752、754、752-759、750、761-762、761、763、765、767-768、767-769、768、769、769-770、770-771、772、773-774、773、774、774-775、776、779、783、784、786、790、792、794、798、803、805、807、810、826、827、831、832、833、835、837、838、839、842、843、847、850、851、853、854、856、858、861、863、894、917、967、1006、1019、1042、1100、1129、1141、1153、1164、1167或其组合的位置处包含一个或多个突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基747、761、790、854、858或其组合的位置处包含一个或多个突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基761、790、858或其组合的位置处包含一个或多个突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基747的位置处包含突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基761的位置处包含突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基790的位置处包含突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基854的位置处包含突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基858的位置处包含突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0171] 在一些实施方案中,所述多核酸分子与包含选自EGFR多肽的T34M、L38V、E45Q、L62R、G63R、G63K、S77F、F78L、R108K、R108G、E114K、A120P、L140V、V148M、R149W、E160K、S177P、M178I、K189T、D191N、S198R、S220P、R222L、R222C、S223Y、S229C、A237Y、C240Y、R244G、R252C、R252P、F254I、R255(无义突变)、D256Y、T263P、Y270C、T273A、Q276(无义)、E282K、G288(移码)、A289D、A289V、A289T、A289N、A289D、V301(缺失)、D303H、H304Y、R309Q、D314N、C326R、G331R、T354M、T363I、P373Q、R337S、S380(移码)、T384S、D393Y、R427L、G428S、S437Y、V441I、S447Y、G465R、I475V、C515S、C526S、R527L、R531(无义)、V536M、L541I、P546Q、C571S、G588S、P589L、P596L、P596S、P596R、P596L、G598V、G598A、E602G、G614D、C620Y、C620W、C628Y、C628F、C636Y、T638M、P641H、S645C、V651M、R671C、V689M、P694S、N700D、E709A、E709K、E709Q、E709K、F712L、K714N、I715S、K716R、G719A、G719C、G719D、G719S、S720C、S720F、G721V、W731Stop、P733L、K739-I744(插入)、V742I、V742A、E746-A750(缺失)、E746K、L747S、L747-E749(缺失)、L747-T751(缺失)、L747-P753(缺失)、G746-S752(缺失)、T751I、S752Y、K754(缺失)、S752-I759(缺失)、A750P、D761-E762(例如,残基EAFQ插入(SEQ ID NO:2110))、D761N、D761Y、A763V、V765A、A767-S768(例如,残基TLA插入)、A767-V769(例如,残基ASV插入)、S768I、S768T、V769L、V769M、V769-D770(例如,残基Y插入)、770-771(例

如,残基GL插入)、770-771(例如,残基G插入)、770-771(例如,残基CV插入)、770-771(例如,残基SVD插入)、P772R、773-774(例如,残基NPH插入)、H773R、H773L、V774M、774-775(例如,残基HV插入)、R776H、R776C、G779F、T783A、T784F、T854A、V786L、T790M、L792P、P794H、L798F、R803W、H805R、D807H、G810S、N826S、Y827(无义)、R831H、R832C、R832H、L833F、L833V、H835L、D837V、L838M、L838P、A839V、N842H、V843L、T847K、T847I、H850N、V851A、I853T、F856L、L858R、L858M、L861Q、L861R、G863D、Q894L、G917A、E967A、D1006Y、P1019L、S1042N、R1100S、H1129Y、T1141S、S1153I、Q1164R、L1167M或其组合的一个或多个突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与包含选自EGFR多肽的L747S、D761Y、T790M、T854A、L858R或其组合的一个或多个突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与包含选自EGFR多肽的D761Y、T790M、L858R或其组合的一个或多个突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与包含EGFR多肽的突变L747S的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与包含EGFR多肽的突变D761Y的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与包含EGFR多肽的突变T790M的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与包含EGFR多肽的突变T854A的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与包含EGFR多肽的突变L858R的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0172] 靶向雄激素受体(AR)的多核酸分子

[0173] 雄激素受体(AR)(也称为NR3C4,核受体亚家族3,组C,基因4)属于核受体超家族的类固醇激素组及其相关成员:雌激素受体(ER)、糖皮质激素受体(GR)、孕酮受体(PR)和盐皮质激素受体(MR)。雄激素或类固醇激素通过雄激素受体调节蛋白质合成和组织重塑。AR蛋白是配体诱导的锌指转录因子,其调节靶基因表达。AR基因中突变的存在已经在几种类型的癌症(例如,前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌或食管癌)中观察到,并且在一些情况下,与转移性进展相关。

[0174] 在一些实施方案中,AR DNA或RNA是野生型的或者包含一个或多个突变和/或剪接变体。在一些情况下,AR DNA或RNA包含一个或多个突变。在一些情况下,AR DNA或RNA包含选自包括但不限于AR1/2/2b、ARV2、ARV3、ARV4、AR1/2/3/2b、ARV5、ARV6、ARV7、ARV9、ARV10、ARV11、ARV12、ARV13、ARV14、ARV15、ARV16和ARV(v567es)的AR剪接变体的一个或多个剪接变体。在一些情况下,所述多核酸分子与包含突变(例如,置换、缺失或添加)或剪接变体的AR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0175] 在一些实施方案中,AR DNA或RNA包含一个或多个突变。在一些实施方案中,AR DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一个或多个突变。在一些情况下,所述一个或多个外显子包括外显子1、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7或外显子8。在一些实施方案中,AR DNA或RNA在外显子1、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7、外显子8或其组合内包含一个或多个突变。在一些情况下,AR DNA或RNA在对应于AR多肽的氨基酸残基2、14、16、29、45、54、57、64、106、112、176、180、184、194、198、204、214、221、222、233、243、252、255、266、269、287、288、334、335、340、363、368、369、390、403、443、491、505、513、524、524、528、533、547、548、564、567、568、574、547、559、568、571、573、575、576、577、578、579、580、581、582、585、586、587、596、597、599、601、604、607、608、609、610、611、615、616、617、619、622、629、630、638、645、647、653、662、664、670、671、672、674、677、

681、682、683、684、687、688、689、690、695、700、701、702、703、705、706、707、708、710、711、712、715、717、720、721、722、723、724、725、726、727、728、730、732、733、737、739、741、742、743、744、745、746、748、749、750、751、752、754、755、756、757、758、759、762、763、764、765、766、767、768、771、772、774、777、779、786、795、780、782、784、787、788、790、791、793、794、798、802、803、804、806、807、812、813、814、819、820、821、824、827、828、830、831、834、840、841、842、846、854、855、856、863、864、866、869、870、871、874、875、877、879、880、881、886、888、889、891、892、895、896、897、898、902、903、904、907、909、910、911、913、916、919或其组合的位置处包含一个或多个突变。在一些实施方案中,AR DNA或RNA在对应于选自AR多肽的E2K、P14Q、K16N、V29M、S45T、L54S、L57Q、Q64R、Y106C、Q112H、S176S、K180R、L184P、Q194R、E198G、G204S、G214R、K221N、N222D、D233K、S243L、A252V、L255P、M266T、P269S、A287D、E288K、S334P、S335T、P340L、Y363N、L368V、A369P、P390R、P390S、P390L、A403V、Q443R、G491S、G505D、P513S、G524D、G524S、D528G、P533S、L547F、P548S、D564Y、S567F、G568W、L574P、L547F、C559Y、G568W、G568V、Y571C、Y571H、A573D、T575A、C576R、C576F、G577R、S578T、C579Y、C579F、K580R、V581F、F582Y、F582S、R585K、A586V、A587S、A596T、A596S、S597G、S597I、N599Y、C601F、D604Y、R607Q、R608K、K609N、D610T、C611Y、R615H、R615P、R615G、R616C、L616R、L616P、R617P、C619Y、A622V、R629W、R629Q、K630T、L638M、A645D、S647N、E653K、S662(无义)、I664N、Q670L、Q670R、P671H、I672T、L674P、L677P、E681L、P682T、G683A、V684I、V684A、A687V、G688Q、H689P、D690V、D695N、D695V、D695H、L700M、L701P、L701I、H701H、S702A、S703G、N705S、N705Y、E706(无义)、L707R、G708A、R710T、Q711E、L712F、V715M、K717Q、K720E、A721T、L722F、P723S、G724S、G724D、G724N、F725L、R726L、N727K、L728S、L728I、V730M、D732N、D732Y、D732E、Q733H、I737T、Y739D、W741R、M742V、M742I、G743R、G743V、L744F、M745T、V746M、A748D、A748V、A748T、M749V、M749I、G750S、G750D、W751R、R752Q、F754V、F754L、T755A、N756S、N756D、V757A、N758T、S759F、S759P、L762F、Y763H、Y763C、F764L、A765T、A765V、P766A、P766S、D767E、L768P、L768M、N771H、E772G、E772A、R774H、R774C、K777T、R779W、R786Q、G795V、M780I、S782N、C784Y、M787V、R788S、L790F、S791P、E793D、F794S、Q798E、Q802R、G803L、F804L、C806Y、M807V、M807R、M807I、L812P、F813V、S814N、N819Q、G820A、L821V、Q824L、Q824R、F827L、F827V、D828H、L830V、L830P、R831Q、R831L、Y834C、R840C、R840H、I841S、I842T、R846G、R854K、R855C、R855H、F856L、L863R、D864N、D864E、D864G、V866L、V866M、V866E、I869M、A870G、A870V、R871G、H874Y、H874R、Q875K、T877S、T877A、D879T、D879G、L880Q、L881V、M886V、S888L、V889M、F891L、P892L、M895T、A896T、E897D、I898T、Q902R、V903M、P904S、P904H、L907F、G909R、G909E、K910R、V911L、P913S、F916L、Q919R或其组合的氨基酸残基的位置处包含一个或多个突变。

[0176] 在一些实施方案中,所述多核酸分子与包含一个或多个突变的AR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与一个或多个AR剪接变体杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与包含一个或多个包括但不限于AR1/2/2b、ARV2、ARV3、ARV4、AR1/2/3/2b、ARV5、ARV6、ARV7、ARV9、ARV10、ARV11、ARV12、ARV13、ARV14、ARV15、ARV16和ARV(v567es)的AR剪接变体的AR DNA或RNA杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在外显子1、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7、外显子8或其组合内包含一个或多个突变

的AR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于AR多肽的氨基酸残基2、14、16、29、45、54、57、64、106、112、176、180、184、194、198、204、214、221、222、233、243、252、255、266、269、287、288、334、335、340、363、368、369、390、403、443、491、505、513、524、524、528、533、547、548、564、567、568、574、547、559、568、571、573、575、576、577、578、579、580、581、582、585、586、587、596、597、599、601、604、607、608、609、610、611、615、616、617、619、622、629、630、638、645、647、653、662、664、670、671、672、674、677、681、682、683、684、687、688、689、690、695、700、701、702、703、705、706、707、708、710、711、712、715、717、720、721、722、723、724、725、726、727、728、730、732、733、737、739、741、742、743、744、745、746、748、749、750、751、752、754、755、756、757、758、759、762、763、764、765、766、767、768、771、772、774、777、779、786、795、780、782、784、787、788、790、791、793、794、798、802、803、804、806、807、812、813、814、819、820、821、824、827、828、830、831、834、840、841、842、846、854、855、856、863、864、866、869、870、871、874、875、877、879、880、881、886、888、889、891、892、895、896、897、898、902、903、904、907、909、910、911、913、916、919或其组合的位置处包含一个或多个突变的AR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与包含选自AR多肽的E2K、P14Q、K16N、V29M、S45T、L54S、L57Q、Q64R、Y106C、Q112H、S176S、K180R、L184P、Q194R、E198G、G204S、G214R、K221N、N222D、D233K、S243L、A252V、L255P、M266T、P269S、A287D、E288K、S334P、S335T、P340L、Y363N、L368V、A369P、P390R、P390S、P390L、A403V、Q443R、G491S、G505D、P513S、G524D、G524S、D528G、P533S、L547F、P548S、D564Y、S567F、G568W、L574P、L547F、C559Y、G568W、G568V、Y571C、Y571H、A573D、T575A、C576R、C576F、G577R、S578T、C579Y、C579F、K580R、V581F、F582Y、F582S、R585K、A586V、A587S、A596T、A596S、S597G、S597I、N599Y、C601F、D604Y、R607Q、R608K、K609N、D610T、C611Y、R615H、R615P、R615G、R616C、L616R、L616P、R617P、C619Y、A622V、R629W、R629Q、K630T、L638M、A645D、S647N、E653K、S662(无义)、I664N、Q670L、Q670R、P671H、I672T、L674P、L677P、E681L、P682T、G683A、V684I、V684A、A687V、G688Q、H689P、D690V、D695N、D695V、D695H、L700M、L701P、L701I、H701H、S702A、S703G、N705S、N705Y、E706(无义)、L707R、G708A、R710T、Q711E、L712F、V715M、K717Q、K720E、A721T、L722F、P723S、G724S、G724D、G724N、F725L、R726L、N727K、L728S、L728I、V730M、D732N、D732Y、D732E、Q733H、I737T、Y739D、W741R、M742V、M742I、G743R、G743V、L744F、M745T、V746M、A748D、A748V、A748T、M749V、M749I、G750S、G750D、W751R、R752Q、F754V、F754L、T755A、N756S、N756D、V757A、N758T、S759F、S759P、L762F、Y763H、Y763C、F764L、A765T、A765V、P766A、P766S、D767E、L768P、L768M、N771H、E772G、E772A、R774H、R774C、K777T、R779W、R786Q、G795V、M780I、S782N、C784Y、M787V、R788S、L790F、S791P、E793D、F794S、Q798E、Q802R、G803L、F804L、C806Y、M807V、M807R、M807I、L812P、F813V、S814N、N819Q、G820A、L821V、Q824L、Q824R、F827L、F827V、D828H、L830V、L830P、R831Q、R831L、Y834C、R840C、R840H、I841S、I842T、R846G、R854K、R855C、R855H、F856L、L863R、D864N、D864E、D864G、V866L、V866M、V866E、I869M、A870G、A870V、R871G、H874Y、H874R、Q875K、T877S、T877A、D879T、D879G、L880Q、L881V、M886V、S888L、V889M、F891L、P892L、M895T、A896T、E897D、I898T、Q902R、V903M、P904S、P904H、L907F、G909R、G909E、K910R、V911L、P913S、F916L、Q919R或其组合的一个或多个突变的AR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0177] 靶向β-联蛋白和β-联蛋白相关基因的多核酸分子

[0178] 联蛋白β-1(也称为CTNNB1、β-联蛋白或beta-联蛋白)是联蛋白家族的成员。在人类中,其由CTNNB1基因编码,并以其双重功能——细胞间粘附和基因转录而闻名。β-联蛋白是基于钙粘着蛋白的粘附接界的整体结构组分,并且调节细胞生长和细胞之间的粘附并锚定肌动蛋白细胞骨架。在一些情况下,β-联蛋白负责传递接触抑制信号,该信号在上皮片完成时立即使细胞停止分裂。β-联蛋白也是Wnt信号传导途径的关键细胞核效应物。在一些情况下,β-联蛋白的结构性质和信号传导性质的不平衡导致疾病以及与恶性肿瘤如癌症相关的生长失调。例如,β-联蛋白的过表达与癌症如胃癌相关(Suriano等人,"Beta-catenin (CTNNB1)gene amplification:a new mechanism of protein overexpression in cancer,"Genes Chromosomes Cancer 42(3):238-246(2005))。在一些情况下,CTNNB1基因中的突变与癌症发展(例如,结肠癌、黑素瘤、肝细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、髓母细胞瘤、毛母质瘤或前列腺癌)相关,并且在一些情况下,与转移性进展相关。在另外的情况下,CTNNB1基因中的突变导致β-联蛋白在没有任何外部刺激的情况下易位至细胞核,并持续驱动其靶基因的转录。在一些情况下,β-联蛋白将受影响细胞先前的上皮表型改变成侵袭性的间充质样类型的潜力有助于转移形成。

[0179] 在一些实施方案中,CTNNB1基因是野生型CTNNB1或者包含一个或多个突变的CTNNB1。在一些情况下,CTNNB1是野生型CTNNB1。在一些情况下,CTNNB1是包含一个或多个突变的CTNNB1。在一些情况下,所述多核酸分子是与野生型CTNNB1的靶区域杂交的多核酸分子。在一些情况下,所述多核酸分子是与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的CTNNB1的靶区域杂交的多核酸分子。

[0180] 在一些实施方案中,CTNNB1 DNA或RNA包含一个或多个突变。在一些实施方案中,CTNNB1 DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一个或多个突变。在一些情况下,所述一个或多个外显子包括外显子3。在一些情况下,CTNNB1 DNA或RNA在密码子32、33、34、37、41、45、183、245、287或其组合处包含一个或多个突变。在一些情况下,CTNNB1 DNA或RNA在对应于CTNNB1多肽的氨基酸残基25、31、32、33、34、35、36、37、41、45、140、162、170、199、213、215、257、303、322、334、354、367、373、383、387、402、426、453、474、486、515、517、535、553、555、582、587、619、623、641、646、688、703、710、712、714、724、738、777或其组合的位置处包含一个或多个突变。在一些情况下,CTNNB1 DNA或RNA在对应于选自CTNNB1多肽的W25(无义突变)、L31M、D32A、D32N、D32Y、D32G、D32H、S33C、S33Y、S33F、S33P、G34R、G34E、G34V、I35S、H36Y、S37F、S37P、S37C、S37A、T41N、T41A、T41I、S45Y、S45F、S45C、I140T、D162E、K170M、V199I、C213F、A215T、T257I、I303M、Q322K、E334K、K354T、G367V、P373S、W383G、N387K、L402F、N426D、R453L、R453Q、R474(无义突变)、R486C、R515Q、L517F、R535(无义突变)、R535Q、M553V、G555A、R582Q、R587Q、C619Y、Q623E、T641(移码)、S646F、M688T、Q703H、R710H、D712N、P714R、Y724H、E738K、F777S或其组合的氨基酸残基的位置处包含一个或多个突变。

[0181] 在一些实施方案中,所述多核酸分子与包含一个或多个突变的CTNNB1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在外显子3内包含一个或多个突变的CTNNB1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在密码子32、33、34、37、41、45、183、245、287或其组合处包含一个或多个突变的CTNNB1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于CTNNB1多肽的氨基酸残基25、31、32、33、

34、35、36、37、41、45、140、162、170、199、213、215、257、303、322、334、354、367、373、383、387、402、426、453、474、486、515、517、535、553、555、582、587、619、623、641、646、688、703、710、712、714、724、738、777或其组合的位置处包含一个或多个突变的CTNNB1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些情况下,该多核酸分子与包含选自CTNNB1多肽的W25(无义突变)、L31M、D32A、D32N、D32Y、D32G、D32H、S33C、S33Y、S33F、S33P、G34R、G34E、G34V、I35S、H36Y、S37F、S37P、S37C、S37A、T41N、T41A、T41I、S45Y、S45F、S45C、I140T、D162E、K170M、V199I、C213F、A215T、T257I、I303M、Q322K、E334K、K354T、G367V、P373S、W383G、N387K、L402F、N426D、R453L、R453Q、R474(无义突变)、R486C、R515Q、L517F、R535(无义突变)、R535Q、M553V、G555A、R582Q、R587Q、C619Y、Q623E、T641(移码)、S646F、M688T、Q703H、R710H、D712N、P714R、Y724H、E738K、F777S或其组合的一个或多个突变的CTNNB1 DNA或RNA的靶区域杂交。

[0182] 在一些实施方案中,β-联蛋白相关基因进一步包括PIK3CA、PIK3CB和MYC。在一些实施方案中,β-联蛋白相关基因进一步包括PIK3CA DNA或RNA。PIK3CA(磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶,催化亚基α或p110α蛋白)是I类PI 3-激酶催化亚基,其使用ATP使磷脂酰肌醇发生磷酸化。在一些实施方案中,PIK3CA基因是野生型PIK3CA或者包含一个或多个突变的PIK3CA。在一些情况下,PIK3CA DNA或RNA是野生型PIK3CA。在一些情况下,PIK3CA DNA或RNA包含一个或多个突变。在一些情况下,所述多核酸分子与野生型PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交。在一些情况下,所述多核酸分子与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交。

[0183] 在一些实施方案中,PIK3CA DNA或RNA包含一个或多个突变。在一些实施方案中,PIK3CA DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一个或多个突变。在一些情况下,PIK3CA DNA或RNA在外显子9和/或20内包含一个或多个突变。在一些情况下,PIK3CA DNA或RNA在对应于PIK3CA多肽的氨基酸残基1、4、10-16、11-18、11、12、38、39、65、72、75、79、81、83、88、90、93、102、103、103-104、103-106、104、105-108、106、106-107、106-108、107、108、109-112、110、111、113、115、137、170、258、272、279、320、328、335、342、344、345、350、357、359、363、364、365、366、378、398、401、417、420、447-455、449、449-457、451、453、454、455、455-460、463-465、471、495、522、538、539、542、545、546、547、576、604、614、617、629、643、663、682、725、726、777、791、818、866、901、909、939、951、958、970、971、975、992、1004、1007、1016、1017、1021、1025、1029、1037、1040、1043、1044、1045、1047、1048、1049、1052、1065、1069或其组合的位置处包含一个或多个突变。在一些实施方案中,PIK3CA DNA或RNA在对应于选自PIK3CA多肽的M1V、R4(无义突变)、L10-M16(缺失)、W11-P18(缺失)、W11L、G12D、R38L、R38H、R38C、R38S、E39K、E39G、E65K、S72G、Q75E、R79M、E81K、E81(缺失)、F83Y、R88Q、C90Y、C90G、R93Q、R93W、I102(缺失)、E103G、E103-P104(缺失)、E103-G106(缺失)、P104L、V105-R108(缺失)、G106V、G106-N107(缺失)、G106-R108(缺失)、G106R、N107S、R108L、R108H、E109-I112(缺失)、E110(缺失)、K111E、K111R、K111N、K111(缺失)、L113(缺失)、R115L、Q137L、N170S、D258N、Y272(无义突变)、L279I、G320V、W328S、R335G、T342S、V344G、V344M、V344A、N345K、N345I、N345T、D350N、D350G、R357Q、G359R、G363A、G364R、E365K、E365V、P366R、C378R、C378Y、R398H、R401Q、E417K、C420R、C420G、P447-L455(缺失)、P449L、P449-N457(缺失)、G451R、G451V、E453K、E453Q、E453D、D454Y、L455(移码插入)、L455-G460(缺失)、G463-N465(缺失)、P471L、P471A、H495L、H495Y、E522A、D538N、P539R、E542K、E542V、E542G、E542Q、

E542A、E545K、E545A、E545G、E545Q、E545D、Q546K、Q546R、Q546P、E547D、S576Y、C604R、F614I、A617W、S629C、Q643H、I663S、Q682(缺失)、D725N、W726K、R777M、E791Q、R818C、L866W、C901F、F909L、D939G、R951C、Q958R、E970K、C971R、R975S、R992P、M1004I、G1007R、F1016C、D1017H、Y1021H、Y1021C、T1025A、T1025S、D1029H、E1037K、M1040V、M1043V、M1043I、N1044K、N1044Y、D1045V、H1047R、H1047L、H1047Y、H1047Q、H1048R、G1049R、T1052K、H1065L、1069W(无终止突变)或其组合的氨基酸残基的位置处包含一个或多个突变。

[0184] 在一些实施方案中,所述多核酸分子与包含一个或多个突变的PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在外显子内包含一个或多个突变的PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在外显子9或外显子20内包含一个或多个突变的PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于PIK3CA多肽的氨基酸残基1、4、10-16、11-18、11、12、38、39、65、72、75、79、81、83、88、90、93、102、103、103-104、103-106、104、105-108、106、106-107、106-108、107、108、109-112、110、111、113、115、137、170、258、272、279、320、328、335、342、344、345、350、357、359、363、364、365、366、378、398、401、417、420、447-455、449、449-457、451、453、454、455、455-460、463-465、471、495、522、538、539、542、545、546、547、576、604、614、617、629、643、663、682、725、726、777、791、818、866、901、909、939、951、958、970、971、975、992、1004、1007、1016、1017、1021、1025、1029、1037、1040、1043、1044、1045、1047、1048、1049、1052、1065、1069或其组合的位置处包含一个或多个突变的PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子是与在对应于选自PIK3CB多肽的M1V、R4(无义突变)、L10-M16(缺失)、W11-P18(缺失)、W11L、G12D、R38L、R38H、R38C、R38S、E39K、E39G、E65K、S72G、Q75E、R79M、E81K、E81(缺失)、F83Y、R88Q、C90Y、C90G、R93Q、R93W、I102(缺失)、E103G、E103-P104(缺失)、E103-G106(缺失)、P104L、V105-R108(缺失)、G106V、G106-N107(缺失)、G106-R108(缺失)、G106R、N107S、R108L、R108H、E109-I112(缺失)、E110(缺失)、K111E、K111R、K111N、K111(缺失)、L113(缺失)、R115L、Q137L、N170S、D258N、Y272(无义突变)、L279I、G320V、W328S、R335G、T342S、V344G、V344M、V344A、N345K、N345I、N345T、D350N、D350G、R357Q、G359R、G363A、G364R、E365K、E365V、P366R、C378R、C378Y、R398H、R401Q、E417K、C420R、C420G、P447-L455(缺失)、P449L、P449-N457(缺失)、G451R、G451V、E453K、E453Q、E453D、D454Y、L455(移码插入)、L455-G460(缺失)、G463-N465(缺失)、P471L、P471A、H495L、H495Y、E522A、D538N、P539R、E542K、E542V、E542G、E542Q、E542A、E545K、E545A、E545G、E545Q、E545D、Q546K、Q546R、Q546P、E547D、S576Y、C604R、F614I、A617W、S629C、Q643H、I663S、Q682(缺失)、D725N、W726K、R777M、E791Q、R818C、L866W、C901F、F909L、D939G、R951C、Q958R、E970K、C971R、R975S、R992P、M1004I、G1007R、F1016C、D1017H、Y1021H、Y1021C、T1025A、T1025S、D1029H、E1037K、M1040V、M1043V、M1043I、N1044K、N1044Y、D1045V、H1047R、H1047L、H1047Y、H1047Q、H1048R、G1049R、T1052K、H1065L、1069W(无终止突变)或其组合的氨基酸残基的位置处包含一个或多个突变的PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交的多核酸分子。

[0185] 在一些实施方案中,β-联蛋白相关基因进一步包括PIK3CB。在一些实施方案中,PIK3CB基因是野生型的或者包含一个或多个突变。在一些情况下,PIK3CB DNA或RNA是野生型PIK3CB DNA或RNA。在一些情况下,PIK3CB DNA或RNA包含一个或多个突变。在一些情况下,所述多核酸分子与野生型PIK3CB DNA或RNA的靶区域杂交。在一些情况下,所述多核酸

分子与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的PIK3CB DNA或RNA的靶区域杂交。

[0186] 在一些实施方案中,PIK3CB DNA或RNA包含一个或多个突变。在一些实施方案中,PIK3CB DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一个或多个突变。在一些情况下,PIK3CB DNA或RNA在对应于PIK3CB多肽的氨基酸残基18、19、21、28、50、61、68、103、135、140、167、252、270、290、301、304、321、369、417、442、470、497、507、512、540、551、552、554、562、567、593、595、619、628、668、768、805、824、830、887、967、992、1005、1020、1036、1046、1047、1048、1049、1051、1055、1067或其组合的位置处包含一个或多个突变。在一些情况下,PIK3CB DNA或RNA在对应于选自PIK3CB多肽的W18(无义突变)、A19V、D21H、G28S、A50P、K61T、M68I、R103K、H135N、L140S、S167C、G252W、R270W、K290N、E301V、I304R、R321Q、V369I、T417M、N442K、E470K、E497D、P507S、I512M、E540(无义突变)、C551R、E552K、E554K、R562(无义突变)、E567D、A593V、L595P、V619A、R628(无义突变)、R668W、L768F、K805E、D824E、A830T、E887(无义突变)、V967A、I992T、A1005V、D1020H、E1036K、D1046N、E1047K、A1048V、L1049R、E1051K、T1055A、D1067V、D1067A或其组合的氨基酸残基的位置处包含一个或多个突变。

[0187] 在一些实施方案中,所述多核酸分子与包含一个或多个突变的PIK3CB DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在外显子内包含一个或多个突变的PIK3CB DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于PIK3CB多肽的氨基酸残基18、19、21、28、50、61、68、103、135、140、167、252、270、290、301、304、321、369、417、442、470、497、507、512、540、551、552、554、562、567、593、595、619、628、668、768、805、824、830、887、967、992、1005、1020、1036、1046、1047、1048、1049、1051、1055、1067或其组合的位置处包含一个或多个突变的PIK3CB DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于选自PIK3CB多肽的W18(无义突变)、A19V、D21H、G28S、A50P、K61T、M68I、R103K、H135N、L140S、S167C、G252W、R270W、K290N、E301V、I304R、R321Q、V369I、T417M、N442K、E470K、E497D、P507S、I512M、E540(无义突变)、C551R、E552K、E554K、R562(无义突变)、E567D、A593V、L595P、V619A、R628(无义突变)、R668W、L768F、K805E、D824E、A830T、E887(无义突变)、V967A、I992T、A1005V、D1020H、E1036K、D1046N、E1047K、A1048V、L1049R、E1051K、T1055A、D1067V、D1067A或其组合的氨基酸残基的位置处包含一个或多个突变的PIK3CB DNA或RNA的靶区域杂交。

[0188] 在一些实施方案中,β-联蛋白相关基因进一步包括MYC。在一些实施方案中,MYC基因是野生型MYC或者包含一个或多个突变的MYC。在一些情况下,MYC是野生型MYC DNA或RNA。在一些情况下,MYC DNA或RNA包含一个或多个突变。在一些情况下,所述多核酸分子与野生型MYC DNA或RNA的靶区域杂交。在一些情况下,所述多核酸分子是与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的MYC DNA或RNA的靶区域杂交的多核酸分子。

[0189] 在一些实施方案中,MYC DNA或RNA包含一个或多个突变。在一些实施方案中,MYC DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一个或多个突变。在一些情况下,MYC DNA或RNA在外显子2或外显子3内包含一个或多个突变。在一些情况下,MYC DNA或RNA在对应于氨基酸残基2、7、17、20、32、44、58、59、76、115、138、141、145、146、169、175、188、200、202、203、248、251、298、321、340、369、373、374、389、395、404、419、431、439或其组合的位置处包含一个或多个突变。在一些实施方案中,MYC DNA或RNA在对应于选自MYC多肽的P2L、F7L、D17N、Q20E、Y32N、A44V、A44T、T58I、P59L、A76V、F115L、F138S、A141S、V145I、S146L、S169C、S175N、

C188F、N200S、S202N、S203T、T248S、D251E、S298Y、Q321E、V340D、V369D、T373K、H374R、F389L、Q395H、K404N、L419M、E431K、R439Q或其组合的氨基酸残基的位置处包含一个或多个突变。

[0190] 在一些实施方案中,所述多核酸分子与包含一个或多个突变的MYC DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在外显子内包含一个或多个突变的MYC DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在外显子2或外显子3内包含一个或多个突变的MYC DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于MYC多肽的氨基酸残基2、7、17、20、32、44、58、59、76、115、138、141、145、146、169、175、188、200、202、203、248、251、298、321、340、369、373、374、389、395、404、419、431、439或其组合的位置处包含一个或多个突变的MYC DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于选自MYC多肽的P2L、F7L、D17N、Q20E、Y32N、A44V、A44T、T58I、P59L、A76V、F115L、F138S、A141S、V145I、S146L、S169C、S175N、C188F、N200S、S202N、S203T、T248S、D251E、S298Y、Q321E、V340D、V369D、T373K、H374R、F389L、Q395H、K404N、L419M、E431K、R439Q或其组合的位置处包含一个或多个突变的MYC DNA或RNA的靶区域杂交。

[0191] 靶向次黄嘌呤转磷酸核糖基酶1(HPRT1)的多核酸分子

[0192] 次黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HGPRT)是一种转移酶,其催化次黄嘌呤转化为肌苷一磷酸以及鸟嘌呤转化为鸟苷一磷酸。HGPRT由次黄嘌呤转磷酸核糖基酶1(HPRT1)基因编码。

[0193] 在一些实施方案中,HPRT1 DNA或RNA是野生型的或者包含一个或多个突变。在一些情况下,HPRT1 DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一个或多个突变。在一些情况下,所述一个或多个外显子包括外显子2、外显子3、外显子4、外显子6、外显子8或外显子9。在一些情况下,HPRT1 DNA或RNA在对应于HPRT1多肽的氨基酸残基35、48、56、74、87、129、154、162、195、200、210或其组合的位置处包含一个或多个突变。在一些实施方案中,所述多核酸分子与包含选自HPRT1多肽的V35M、R48H、E56D、F74L、R87I、N129(剪接位点突变)、N154H、S162(剪接位点突变)、Y195C、Y195N、R200M、E210K或其组合的一个或多个突变的HPRT1 DNA或RNA的靶区域杂交。

[0194] 在一些实施方案中,所述多核酸分子与包含一个或多个突变的HPRT1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在外显子2、外显子3、外显子4、外显子6、外显子8或外显子9内包含一个或多个突变的HPRT1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与在对应于HPRT1多肽的氨基酸残基35、48、56、74、87、129、154、162、195、200、210或其组合的位置处包含一个或多个突变的HPRT1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与包含选自HPRT1多肽的V35M、R48H、E56D、F74L、R87I、N129(剪接位点突变)、N154H、S162(剪接位点突变)、Y195C、Y195N、R200M、E210K或其组合的一个或多个突变的HPRT1 DNA或RNA的靶区域杂交。

[0195] 多核酸分子序列

[0196] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与表1、3、5、6或7中示出的靶序列杂交的序列。在一些情况下,该多核酸分子为B。在一些情况下,多核酸分子B包含与表1中示出的靶序列(KRAS靶序列)杂交的序列。在一些情况下,多核酸分子B包含与表3中示出的靶序列(EGFR靶序列)杂交的序列。在一些情况下,多核酸分子B包含与表5中示出的靶序列(AR靶序

列)杂交的序列。在一些情况下,多核酸分子B包含与表6中示出的靶序列(β-联蛋白靶序列)杂交的序列。在另外的情况下,多核酸分子B包含与表7中示出的靶序列(PIK3CA和PIK3CB靶序列)杂交的序列。

[0197] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含与表2中列出的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少50%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少60%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少70%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少75%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少85%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少96%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少97%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子由SEQ ID NO:16-45组成。

[0198] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-45具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-45具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第一多核苷酸和与SEQ ID NO:16-45具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第二多核苷酸。

[0199] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含与表4中列出的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少50%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少60%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少70%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少75%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ

ID NO:422-1173具有至少80％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少85％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少90％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少95％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少96％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少97％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少98％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少99％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子由SEQ ID NO:422-1173组成。

[0200] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些情况下,第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些情况下,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:422-1173具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的第一多核苷酸和与SEQ ID NO:422-1173具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的第二多核苷酸。

[0201] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含与表8中列出的序列具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少50％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少60％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少70％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少75％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少80％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少85％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少90％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少95％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少96％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少97％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少98％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少99％序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子由SEQ ID NO:1195-1214组成。

[0202] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些情

况下,第二多核苷酸包含的序列互补于与SEQ ID NO:1195-1214具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:1195-1214具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第一多核苷酸,和与SEQ ID NO:1195-1214具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第二多核苷酸。

[0203] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含与表9中列出的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少50%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少60%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少70%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少75%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少85%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少96%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少97%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子由SEQ ID NO:1215-1242组成。

[0204] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:1215-1242具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第一多核苷酸和与SEQ ID NO:1215-1242具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第二多核苷酸。

[0205] 多核酸分子

[0206] 在一些实施方案中,本文所述的多核酸分子包含RNA或DNA。在一些情况下,该多核酸分子包含RNA。在一些情况下,RNA包含短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、双链RNA(dsRNA)、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)或核内不均一RNA(hnRNA)。在一些情况下,RNA包含shRNA。在一些情况下,RNA包含miRNA。在一些情况下,RNA包含dsRNA。在一些情况下,RNA包含tRNA。在一些情况下,RNA包含rRNA。在一些情况下,RNA包含hnRNA。

在一些情况下,RNA包含siRNA。在一些情况下,该多核酸分子包含siRNA。在一些情况下,B包含siRNA。

[0207] 在一些实施方案中,所述多核酸分子的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10至约30、约15至约30、约18至约25、约18至约24、约19至约23或约20至约22个核苷酸。

[0208] 在一些实施方案中,所述多核酸分子的长度为约50个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约45个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约40个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约35个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约30个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约25个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约20个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约19个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约18个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约17个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约16个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约15个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约14个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约13个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约12个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约11个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约45个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约40个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约35个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约30个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约25个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约20个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约15个至约25个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约15个至约30个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约12个至约30个核苷酸。

[0209] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含第一多核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子包含第二多核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸为有义链或过客链。在一些情况下,第二多核苷酸为反义链或指导链。

[0210] 在一些实施方案中,所述多核酸分子为第一多核苷酸。在一些实施方案中,第一多核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10至约30、约15至约30、约18至约25、约18至约24、约19至约23、约19至约30、约19至约25、约19至约24、约19至约23或约20至约22个核苷酸。

[0211] 在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约50个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约45个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约40个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约35个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约30个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约25个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约20个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约19个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约18个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约17个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约16个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约15个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约14个核苷酸。在一些情

况下,第一多核苷酸的长度为约13个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约12个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约11个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约45个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约40个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约35个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约30个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约25个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约20个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约15个至约25个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约15个至约30个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约12个至约30个核苷酸。

[0212] 在一些实施方案中,所述多核酸分子为第二多核苷酸。在一些实施方案中,第二多核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10至约30、约15至约30、约18至约25、约18至约24、约19至约23或约20至约22个核苷酸。

[0213] 在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约50个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约45个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约40个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约35个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约30个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约25个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约20个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约19个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约18个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约17个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约16个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约15个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约14个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约13个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约12个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约11个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约45个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约40个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约35个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约30个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约25个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约20个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约15个至约25个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约15个至约30个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约12个至约30个核苷酸。

[0214] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子进一步包含平端、突出端或其组合。在一些情况下,该平端为5’平端、3’平端或两者。在一些情况下,该突出端为5’突出端、3’突出端或两者。在一些情况下,该突出端包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含1、2、3、4、5或6个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含1、2、3或4个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含1个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含2个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含3个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含4个非碱基配对核苷酸。

[0215] 在一些实施方案中,所述多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少50%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少60%互补。在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少70%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少80%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少90%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少95%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少99%互补。在一些情况下,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列100%互补。

[0216] 在一些实施方案中,所述多核酸分子的序列与本文所述的靶序列具有5个或更少的错配。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列具有4个或更少的错配。在一些情况下,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列可具有3个或更少的错配。在一些情况下,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列可具有2个或更少的错配。在一些情况下,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列可具有1个或更少的错配。

[0217] 在一些实施方案中,与本文所述的靶序列杂交的多核酸分子的特异性是该多核酸分子与靶序列的95%、98%、99%、99.5%或100%序列互补性。在一些情况下,该杂交是高度严格的杂交条件。

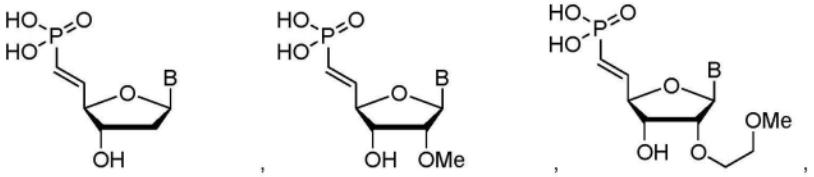
[0218] 在一些实施方案中,所述多核酸分子与本文所述的靶序列的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少8个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少9个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少10个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少11个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少12个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少13个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少14个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少15个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少16个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少17个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少18个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少19个连续碱基杂交。在一些实施方案中,该多核酸分子与本文所述的靶序列的至少20个连续碱基杂交。

[0219] 在一些实施方案中,所述多核酸分子具有降低的脱靶效应。在一些情况下,“脱靶”或“脱靶效应”是指其中针对给定靶标的多核酸聚合物通过直接或间接地与另一mRNA序列、DNA序列或者细胞蛋白质或其他部分相互作用而引起非预期效应的任何情况。在一些情况下,当由于其他转录物与多核酸分子的有义链和/或反义链之间的部分同源性或互补性而导致其他转录物同时降解时,发生“脱靶效应”。

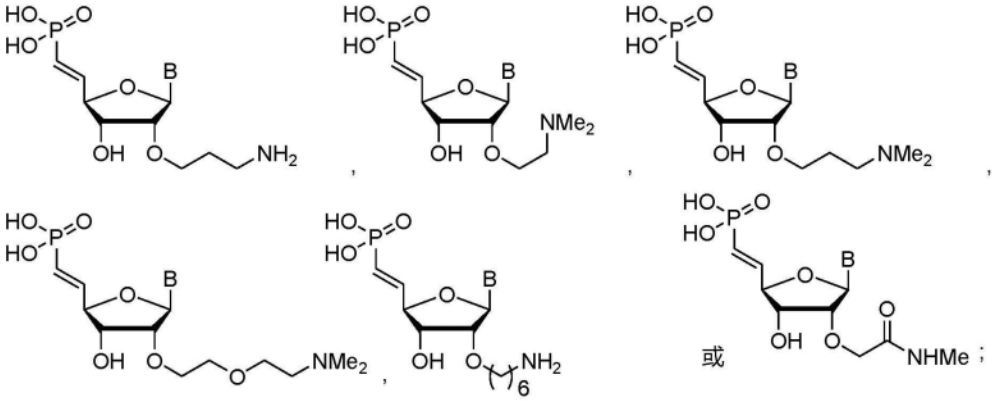
[0220] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含天然、合成或人工核苷酸类似物或碱基。在一些情况下,该多核酸分子包含DNA、RNA和/或核苷酸类似物的组合。在一些情况下,该合成或人工核苷酸类似物或碱基在核糖部分、磷酸部分、核苷部分或其组合中的一种或多种

处包含修饰。

[0221] 在一些实施方案中,上述核苷酸类似物或人工核苷酸碱基包含在核糖部分的5'羟基处具有修饰的5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸核酸。在一些实施方案中,该5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸选自以下提供的核苷酸。



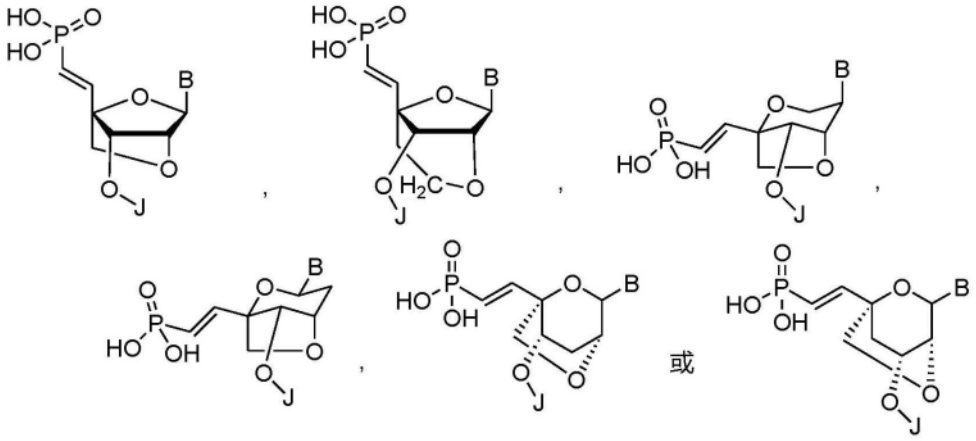
[0222]



[0223] 在一些情况下,2'羟基处的修饰是2'-O-氨基丙基修饰,其中包含丙基连接体的延伸的胺基团将胺基团与2'氧结合。在一些情况下,这种修饰通过每个糖从胺基团引入一个正电荷来中和寡核苷酸分子的磷酸衍生的总负电荷,并且由于其两性离子性质而改善了细胞摄取性质。

[0224] 在一些情况下,5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸在锁定或桥接的核糖修饰(例如,锁定核酸或LNA)中的2'羟基处被进一步修饰,其中结合在2'碳上的氧分子通过亚甲基连接至4'碳,从而形成2'-C、4'-C-氧基-亚甲基连接的双环核糖核苷酸单体。5'-乙烯基膦酸修饰的LNA的化学结构的示例性表示如下所示,其中J为核苷酸间连接。

[0225]

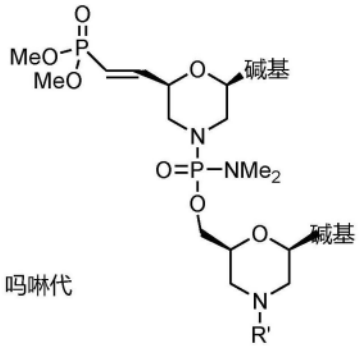


[0226] LNA(锁定核酸)

[0227] 在一些实施方案中,2'羟基处的另外的修饰包括2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)。

[0228] 在一些实施方案中,核苷酸类似物包含修饰的碱基,诸如但不限于5-丙炔基尿苷、5-丙炔基胞苷、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、N,N,-二甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-丙基鸟嘌呤、2-氨基腺嘌呤、1-甲基肌苷、3-甲基尿苷、5-甲基胞苷、5-甲基尿苷和其他在5位置处具有修饰的核苷酸、5-(2-氨基)丙基尿苷、5-卤代胞苷、5-卤代尿苷、4-乙酰基胞苷、1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、3-甲基胞苷、6-甲基尿苷、2-甲基尿苷、7-甲基尿苷、2,2-二甲基尿苷、5-甲基氨基乙基尿苷、5-甲基氧基尿苷、脱氮核苷酸(如7-脱氮-腺苷、6-偶氮尿苷、6-偶氮胞苷或6-偶氮胸苷)、5-甲基-2-硫尿苷、其他硫代碱基(如2-硫代尿苷、4-硫代尿苷和2-硫代胞苷)、二氢尿苷、假尿苷、辫苷、古嘌苷、萘基和取代的萘基、任何O-烷基化和N-烷基化嘌呤和嘧啶(如N6-甲基腺苷、5-甲基羰基甲基尿苷、尿苷5-羟乙酸、吡啶-4-酮或吡啶-2-酮)、苯基和修饰的苯基如氨基酚或2,4,6-三甲氧基苯、充当G夹(clamp)核苷酸的修饰的胞嘧啶、8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-取代的尿嘧啶和胸腺嘧啶、氮杂嘧啶、羧基羟烷基核苷酸、羧基烷基氨基烷基核苷酸以及烷基羰基烷基化核苷酸。5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸还包括在糖部分被修饰的核苷酸,以及具有非核糖基的糖或其类似物的5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸。例如,在一些情况下,糖部分是或基于甘露糖、阿拉伯糖、吡喃葡萄糖、吡喃半乳糖、4’-硫代核糖和其他糖、杂环或碳环。术语核苷酸还包含本领域已知的通用碱基。例如,通用碱基包括但不限于3-硝基吡咯、5-硝基吲哚或水粉蕈素。

[0229] 在一些实施方案中,5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸类似物进一步包含吗啉代、肽核酸(PNA)、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸、2’-氟代N3-P5’-亚磷酰胺或1’,5’-失水己糖醇核酸(HNA)。吗啉代或二氨基磷酸酯吗啉代寡核苷酸(PMO)包括其结构模拟天然核酸结构但偏离正常的糖和磷酸酯结构的合成分子。在一些情况下,五元核糖环被含有四个碳、一个氮和一个氧的六元吗啉代环取代。在一些情况下,核糖单体通过二氨基磷酸酯基团而不是磷酸酯基团连接。在这样的情况下,骨架改变去除所有正电荷和负电荷,使得吗啉代中性分子能够穿过细胞膜而无需借助细胞递送剂,诸如带电荷的寡核苷酸所使用的细胞递送剂。5’-乙烯基膦酸修饰的吗啉代寡核苷酸的非限制性实例如下所示。

[0230] 

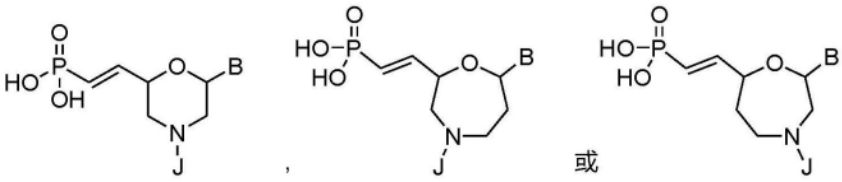
[0231] 在一些实施方案中,以上描述的5’-乙烯基膦酸修饰的吗啉代或PMO是包含正电荷或阳离子电荷的PMO。在一些情况下,该PMO是FMOplus(Sarepta)。FMOplus是指包含任何数目的(1-哌嗪子基)亚膦酰亚基氧基、(1-(4-(ω-胍基-链烷酰基))-哌嗪子基)亚膦酰亚基氧基连接的二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(例如,如在PCT公开WO2008/036127中描述的那些)。在一些情况下,该PMO是美国专利7943762中描述的PMO。

[0232] 在一些实施方案中,以上描述的吗啉代或PMO是PMO-X(Sarepta)。在一些情况下,PMO-X是指包含至少一个连接或至少一个所公开的末端修饰的二氨基磷酸酯吗啉代寡聚

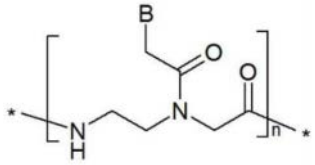
物,如PCT公开WO2011/150408和美国公开2012/0065169中描述的那些。

[0233] 在一些实施方案中,以上描述的吗啉代或PMO是如美国公开2014/0296321的表5中描述的PMO。

[0234] 5'-乙烯基膦酸修饰的核酸的化学结构的示例性表示如下所示,其中J为核苷酸间连接。

[0235] 

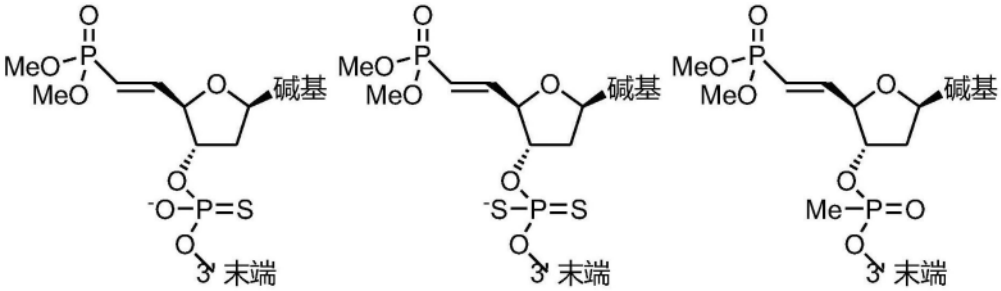
[0236] 在一些实施方案中,肽核酸(PNA)不含糖环或磷酸酯连接,并且碱基通过寡聚甘氨酸样分子连接并适当间隔,因此消除了骨架电荷。

[0237] 

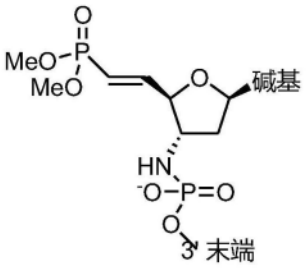
PNA

[0238] 在一些实施方案中,5'-乙烯基膦酸修饰的寡核苷酸的一个或多个修饰任选地在核苷酸间连接处发生。在一些情况下,修饰的核苷酸间连接包括但不限于硫代磷酸酯;二硫代磷酸酯;甲基膦酸酯;5'-亚烷基膦酸酯;5'-甲基膦酸酯;3'-亚烷基膦酸酯;三氟化硼;3'-5'连接或2'-5'连接的硼烷磷酸酯和硒基磷酸酯;磷酸三酯;硫羰基烷基磷酸三酯;氢膦酸酯键;烷基膦酸酯;烷基硫代磷酸酯;芳基硫代磷酸酯;硒化磷酸酯(phosphoroselenoate);二硒化磷酸酯;次膦酸酯;氨基磷酸酯;3'-烷基氨基磷酸酯;氨基烷基氨基磷酸酯;硫羰基氨基磷酸酯;哌嗪磷酸酯;苯胺硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate);苯胺磷酸酯(phosphoranilidate);酮;砜;磺胺;碳酸酯;氨基甲酸酯;亚甲基肼(methylenehydrazo);亚甲基二甲基亚肼(methylenedimethylhydrazo);formacetal;硫代甲缩醛;肟;亚甲基亚胺;亚甲基甲基亚胺;硫代酰胺;具有核糖乙酰基的连接;氨乙基甘氨酸;甲硅烷基或硅氧烷连接;具有或不具有杂原子的烷基或环烷基连接,例如,1至10个饱和或不饱和的和/或取代的和/或含有杂原子的碳;具有吗啉代结构、酰胺或聚酰胺的连接,其中碱基直接或间接地连接到骨架的氮杂氮;及其组合。

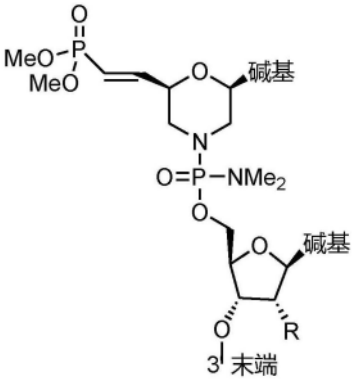
[0239] 在一些情况下,所述修饰是甲基或硫醇修饰,如甲基膦酸酯或硫醇膦酸酯修饰。示例性的硫醇膦酸酯核苷酸(左)、二硫代磷酸酯(中)和甲基膦酸酯核苷酸(右)如下所示。

[0240] 

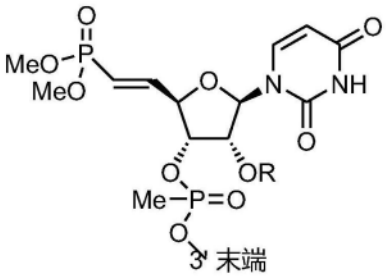
[0241] 在一些情况下,5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸包括但不限于如下所示的亚磷酰胺:

[0242] 

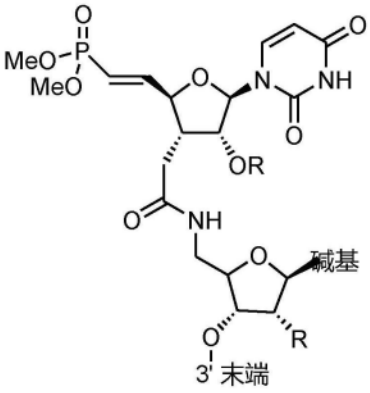
[0243] 在一些情况下,修饰的核苷酸间连接是二氨基磷酸酯连接。与吗啉代体系的二氨基磷酸酯连接的非限制性实例如下所示。

[0244] 

[0245] 在一些情况下,修饰的核苷酸间连接是甲基膦酸酯连接。甲基膦酸酯连接的非限制性实例如下所示。

[0246] 

[0247] 在一些情况下,修饰的核苷酸间连接是酰胺连接。酰胺连接的非限制性实例如下所示。

[0248] 

[0249] 在一些情况下,5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸包括但不限于以下所示的修饰的核酸。

[0250] 在一些实施方案中,一个或多个修饰包括修饰的磷酸骨架,其中该修饰产生中性或不带电荷的骨架。在一些情况下,磷酸骨架通过烷基化来修饰,以产生不带电荷的或中性

的磷酸骨架。如本文所用的,烷基化包括甲基化、乙基化和丙基化。在一些情况下,如本文在烷基化的上下文中所使用的,烷基是指含有1-6个碳原子的直链或支链饱和烃基。在一些情况下,示例性烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、己基、异己基、1,1-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基和2-乙基丁基。在一些情况下,修饰的磷酸酯是如美国专利9481905所述的磷酸基团。

[0251] 在一些实施方案中,另外的修饰的磷酸骨架包含甲基膦酸酯、乙基膦酸酯、甲基硫代膦酸酯或甲氧基膦酸酯。在一些情况下,修饰的磷酸酯是甲基膦酸酯。在一些情况下,修饰的磷酸酯是乙基膦酸酯。在一些情况下,修饰的磷酸酯是甲基硫代膦酸酯。在一些情况下,修饰的磷酸酯是甲氧基膦酸酯。

[0252] 在一些实施方案中,一个或多个修饰进一步任选地包括核糖部分、磷酸骨架和核苷的修饰,或者3’或5’末端处的核苷酸类似物的修饰。例如,3’末端任选地包含3’阳离子基团,或用3’-3’连接在3’末端处反转核苷。在另一替代方案中,3’末端任选地与氨基烷基缀合,例如3’C5-氨基烷基dT。在另一替代方案中,3’末端任选地与脱碱基位点缀合,例如与脱嘌呤或脱嘧啶位点缀合。

[0253] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含一个或多个本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,5’-乙烯基膦酸修饰的多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个本文所述的人工5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸类似物。在一些实施方案中,该人工5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸类似物包含2’-O-甲基、2’-O-甲氧基乙基(2’-O-MOE)、2’-O-氨基丙基、2’-脱氧、T-脱氧-2’-氟代、2’-O-氨基丙基(2’-O-AP)、2’-O-二甲基氨基乙基(2’-O-DMAOE)、2’-O-二甲基氨基丙基(2’-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2’-O-DMAEOE)或2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA)修饰、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸、2’-氟代N3-P5’-亚磷酰胺或其组合。在一些情况下,该5’-乙烯基膦酸修饰的多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个人工核苷酸类似物,该人工核苷酸类似物选自2’-O-甲基、2’-O-甲氧基乙基(2’-O-MOE)、2’-O-氨基丙基、2’-脱氧、T-脱氧-2’-氟代、2’-O-氨基丙基(2’-O-AP)、2’-O-二甲基氨基乙基(2’-O-DMAOE)、2’-O-二甲基氨基丙基(2’-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2’-O-DMAEOE)或2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA)修饰、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸、2’-氟代N3-P5’-亚磷酰胺或其组合。在一些情况下,该5’-乙烯基膦酸修饰的多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个2’-O-甲基修饰的核苷酸。在一些情况下,该5’-乙烯基膦酸修饰的多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个2’-O-甲氧基乙基(2’-O-MOE)修饰的核苷酸。在一些情况下,该5’-乙烯基膦酸修饰的多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个硫醇膦酸酯核苷酸。

[0254] 在一些实施方案中,所述5’-乙烯基膦酸修饰的多核酸分子包含至少约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22个或更多个修饰。在一些情况下,该多核酸分子是SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242的多核酸分子。

[0255] 在一些情况下,所述5’-乙烯基膦酸修饰的多核酸分子包含至少约1、约2、约3、约

4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22个或更多个修饰的核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子是SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242的多核酸分子。

[0256] 在一些情况下,所述5'-乙烯基膦酸修饰的多核酸分子包含至少以下之一:约5%至约100%的修饰、约10%至约100%的修饰、约20%至约100%的修饰、约30%至约100%的修饰、约40%至约100%的修饰、约50%至约100%的修饰、约60%至约100%的修饰、约70%至约100%的修饰、约80%至约100%的修饰和约90%至约100%的修饰。在一些情况下,该多核酸分子是SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242的多核酸分子。

[0257] 在一些情况下,约5%至约100%的所述5'-乙烯基膦酸修饰的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的SEQ ID NO:16-45的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的SEQ ID NO:422-1173的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的SEQ ID NO:1195-1214的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的SEQ ID NO:1215-1242的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该人工核苷酸类似物包括2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺或其组合。

[0258] 在一些情况下,与天然多核酸分子相比,本文所述的一种或多种人工5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸类似物对核酸酶具有抗性,该核酸酶例如是核糖核酸酶如RNA酶H、脱氧核糖核酸酶如DNA酶或者外切核酸酶如5'-3'外切核酸酶和3'-5'外切核酸酶。在一些情况下,包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺或其组合的人工核苷酸类似物对核酸酶具有抗性,该核酸酶例如是核糖核酸酶如RNA酶H、脱氧核糖核酸酶如DNA酶或者外切核酸酶如5'-3'外切核酸酶和3'-5'外切核酸酶。在一些情况下,2'-O-甲基修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、

5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2’O-甲氧基乙基(2’-O-MOE)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2’-O-氨基丙基修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2’-脱氧修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,T-脱氧-2’-氟代修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2’-O-氨基丙基(2’-O-AP)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2’-O-二甲基氨基乙基(2’-O-DMAOE)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2’-O-二甲基氨基丙基(2’-O-DMAP)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2’-O-DMAEOE)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,LNA修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,ENA修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,HNA修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。吗啉代可以是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,PNA修饰的多核酸分子对核酸酶具有抗性(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,甲基膦酸酯核苷酸修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,硫醇膦酸酯核苷酸修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,包含2’-氟代N3-P5’-亚磷酰胺的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5’-3’外切核酸酶或3’-5’外切核酸酶抗性)。在一些情况下,本文所述的5’缀合物抑制5’-3’核酸外切切割。在一些情况下,本文所述的3’缀合物抑制3’-5’核酸外切切割。

[0259] 在一些实施方案中,相对于等同的天然多核酸分子,本文所述的一种或多种人工5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸类似物对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。相对于等同的天然多核酸分子,包含2’-O-甲基、2’-O-甲氧基乙基(2’-O-MOE)、2’-O-氨基丙基、2’-脱氧、T-脱氧-2’-氟代、2’-O-氨基丙基(2’-O-AP)、2’-O-二甲基氨基乙基(2’-O-DMAOE)、2’-O-二甲基氨基丙基(2’-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2’-O-DMAEOE)或2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA)修饰、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸或2’-氟代N3-P5’-亚磷酰胺的一种或多种人工核苷酸类似物对其mRNA靶标可具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2’-O-甲基修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2’-O-甲氧基乙基(2’-O-MOE)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2’-O-氨基丙基修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具

有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-脱氧修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,T-脱氧-2'-氟代修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,LNA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,ENA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,PNA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,HNA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,吗啉代修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,甲基膦酸酯核苷酸修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,硫醇膦酸酯核苷酸修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,包含2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,增加的亲和力用较低的Kd、较高的解链温度(Tm)或其组合说明。

[0260] 在一些实施方案中,本文所述的5'-乙烯基膦酸修饰的多核酸分子是手性纯的(或立体纯的)多核酸分子,或是包含单一对映体的多核酸分子。在一些情况下,多核酸分子包含L-核苷酸。在一些情况下,多核酸分子包含D-核苷酸。在一些情况下,多核酸分子组合物包含少于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的其镜像对映体。在一些情况下,多核酸分子组合物包含少于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的外消旋混合物。在一些情况下,多核酸分子是在美国专利公开2014/194610和2015/211006以及PCT公开WO2015107425中描述的多核酸分子。

[0261] 在一些实施方案中,进一步修饰本文所述的多核酸分子以包含适体缀合部分。在一些情况下,该适体缀合部分是DNA适体缀合部分。在一些情况下,该适体缀合部分是Alphamer(Centauri Therapeutics),其包含识别特定细胞表面靶标的适体部分和呈现特定表位以供连接至循环抗体的部分。在一些情况下,进一步修饰本文所述的多核酸分子以包含如美国专利8,604,184、8,591,910和7,850,975中所述的适体缀合部分。

[0262] 在另外的实施方案中,修饰本文所述的多核酸分子以增加其稳定性。在一些实施方案中,该多核酸分子为RNA(例如,siRNA),该多核酸分子被修饰以提高其稳定性。在一些情况下,通过一个或多个上述修饰来修饰多核酸分子以增加其稳定性。在一些情况下,在2'羟基位置处修饰多核酸分子,诸如通过2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-

O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰,或者通过锁定或桥连核糖构象(例如,LNA或ENA)修饰多核酸分子。在一些情况下,多核酸分子被2'-O-甲基和/或2'-O-甲氧基乙基核糖修饰。在一些情况下,多核酸分子还包含吗啉代、PNA、HNA、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸和/或2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺以增加其稳定性。在一些情况下,多核酸分子是手性纯的(或立体纯的)多核酸分子。在一些情况下,修饰手性纯的(或立体纯的)多核酸分子以增加其稳定性。为了增加递送稳定性而对RNA的合适的修饰对于技术人员将会是显而易见的。

[0263] 在一些实施方案中,本文所述的多核酸分子具有RNAi活性,其调节由上文描述的基因编码的RNA的表达。在一些情况下,本文所述的多核酸分子是下调基因表达的双链siRNA分子,其中该双链siRNA分子的一条链包含与该基因的核苷酸序列或由该基因编码的RNA或其部分互补的核苷酸序列,并且其中该双链siRNA分子的第二条链包含与该基因的核苷酸序列或由该基因编码的RNA或其部分基本相似的核苷酸序列。在一些情况下,本文所述的多核酸分子是下调基因的表达的双链siRNA分子,其中该siRNA分子的每条链包含约15至25、18至24或19至约23个核苷酸,并且其中每条链包含与另一条链的核苷酸互补的至少约14、17或19个核苷酸。在一些情况下,本文所述的多核酸分子是下调基因的表达的双链siRNA分子,其中该siRNA分子的每条链包含约19个至约23个核苷酸,并且其中每条链包含与另一条链的核苷酸互补的至少约19个核苷酸。在一些情况下,该基因是KRAS、EGFR、AR、HPRT1、CNNTB1(β-联蛋白)或β-联蛋白相关基因。

[0264] 在一些实施方案中,使用本领域已知的程序,使用化学合成和/或酶促连接反应构建本文所述的多核酸分子。例如,使用天然存在的核苷酸或各种修饰的核苷酸以化学方式合成多核酸分子,该修饰的核苷酸被设计用于增加分子的生物稳定性或者增加多核酸分子与靶核酸之间形成的双链体的物理稳定性。示例性方法包括在美国专利5,142,047、5,185,444、5,889,136、6,008,400和6,111,086、PCT公开WO2009099942或欧洲公开1579015中描述的那些方法。另外的示例性方法包括在以下文献中描述的那些方法:Griffey等人,"2'-O-aminopropyl ribonucleotides:a zwitterionic modification that enhances the exonuclease resistance and biological activity of antisense oligonucleotides,"J.Med.Chem.39(26):5100-5109(1997));Obika等人"Synthesis of 2′-O,4′-C-methyleneuridine and-cytidine.Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3,-endo sugar puckering".Tetrahedron Letters 38(50):8735(1997);Koizumi,M."ENA oligonucleotides as therapeutics".Current opinion in molecular therapeutics8(2):144-149(2006);和Abramova等人,"Novel oligonucleotide analogues based on morpholino nucleoside subunits-antisense technologies:new chemical possibilities,"Indian Journal of Chemistry 48B:1721-1726(2009)。或者,使用表达载体以生物学方式产生多核酸分子,其中多核酸分子已经以反义方向(即,从插入的多核酸分子转录的RNA将会与感兴趣的靶多核酸分子呈反义方向)亚克隆到该表达载体中。

[0265] 一个实施方案提供了式(I)的分子:

[0266] A-X-B-Y-C

[0267] 式I

[0268] 其中,

[0269] A为结合部分;

[0270] B为多核苷酸;

[0271] C为聚合物;

[0272] X为键或第一非聚合连接体;且

[0273] Y为键或第二连接体;

[0274] 其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸;并且

[0275] 其中A和C不连接至B的同一末端。

[0276] 另一个实施方案提供了式(I)的分子,其中所述多核苷酸进一步包含至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分;

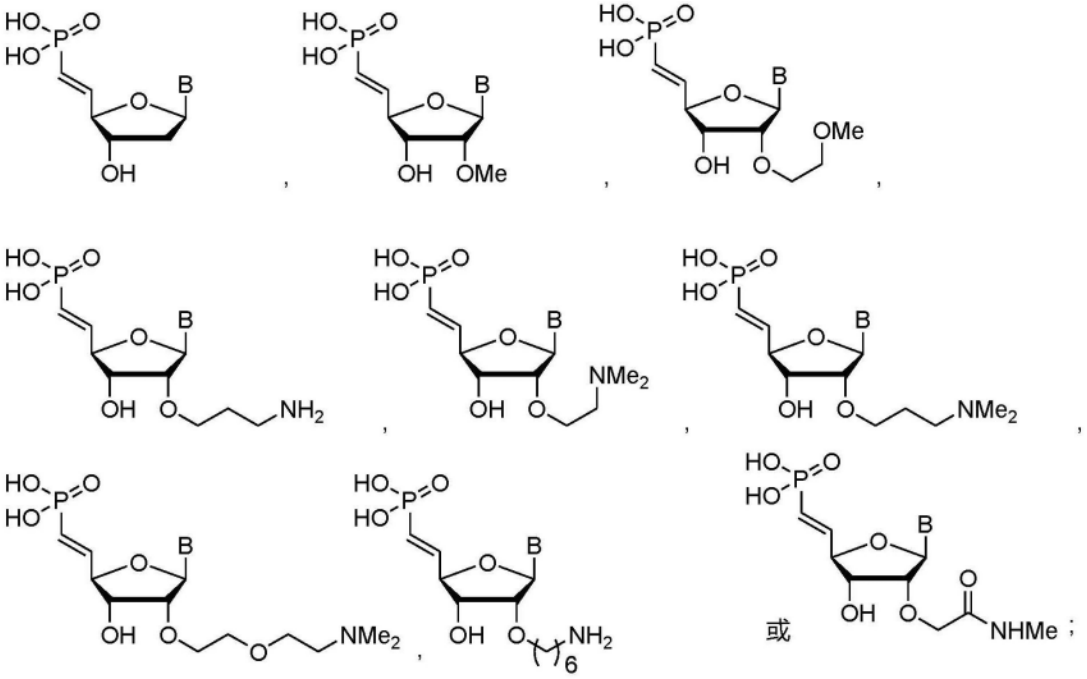
[0277] 另一个实施方案提供了式(I)的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的5'末端。

[0278] 另一个实施方案提供了式(I)的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的核苷酸间连接处。

[0279] 另一个实施方案提供了式(I)的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸在2'-位进一步被修饰。

[0280] 另一个实施方案提供了式(I)的分子,其中所述2'-修饰选自2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。

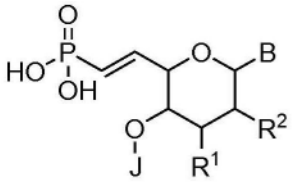
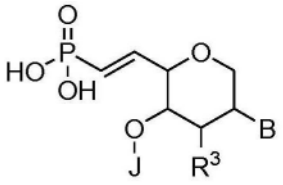
[0281] 另一个实施方案提供了式(I)的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0282] 

[0283] 其中B为杂环碱基部分。

[0284] 另一个实施方案提供了式(I)的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非

天然核苷酸选自：

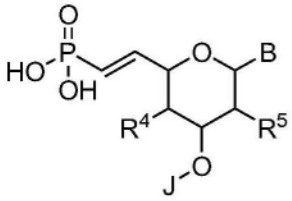
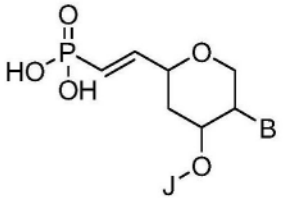
[0285]  或 ；

[0286] 其中B为杂环碱基部分；

[0287] R^1、R^2和R^3独立地选自氢、卤素、烷基或烷氧基；且

[0288] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0289] 另一个实施方案提供了式(I)的分子，其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自：

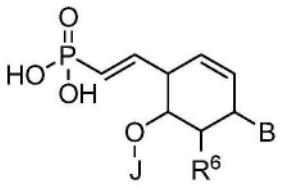
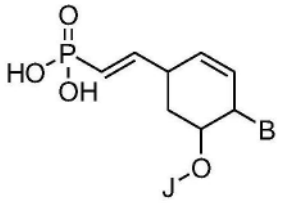
[0290]  或 ；

[0291] 其中B为杂环碱基部分；

[0292] R^4和R^5独立地选自氢、卤素、烷基或烷氧基；且

[0293] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0294] 另一个实施方案提供了式(I)的分子，其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自：

[0295]  或 ；

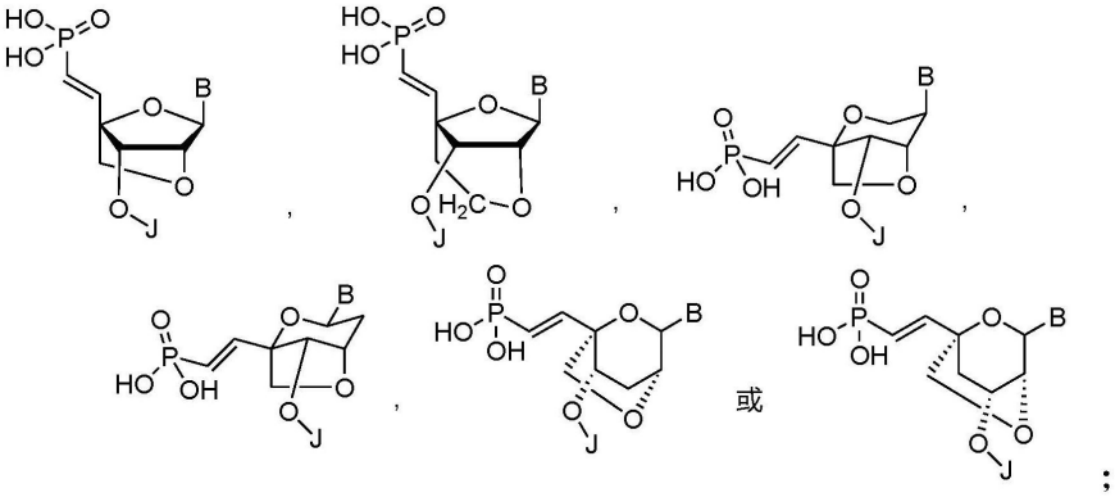
[0296] 其中B为杂环碱基部分；

[0297] R^6选自氢、卤素、烷基或烷氧基；且

[0298] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0299] 另一个实施方案提供了式(I)的分子，其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自锁定核酸(LNA)或乙烯基(ethylene)核酸(ENA)。

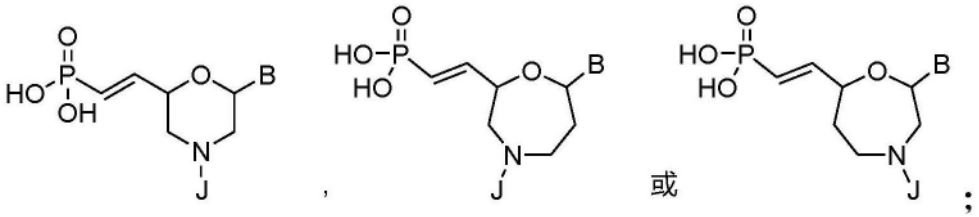
[0300] 另一个实施方案提供了式(I)的分子，其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自：

[0301] 

[0302] 其中B为杂环碱基部分;且

[0303] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

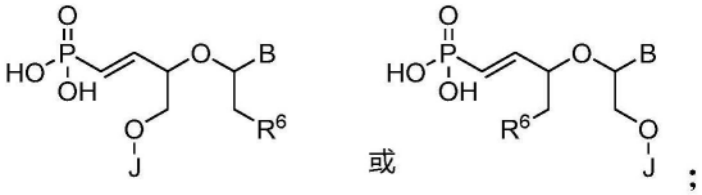
[0304] 另一个实施方案提供了式(I)的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0305] 

[0306] 其中B为杂环碱基部分;且

[0307] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0308] 另一个实施方案提供了式(I)的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸是:

[0309] 

[0310] 其中B为杂环碱基部分;

[0311] R^6选自氢、卤素、烷基或烷氧基;且

[0312] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0313] 另一个实施方案提供了式(I)的分子,其中所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、二氨基磷酸酯连接、甲基膦酸酯连接或酰胺连接。

[0314] 另一个实施方案提供了式(I)的分子,其中所述至少一个反向脱碱基部分是至少一个末端。

[0315] 一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸。

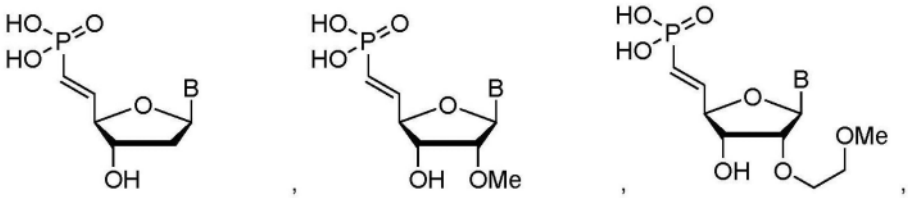
[0316] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸进一步包含至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分;

[0317] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的5'末端。

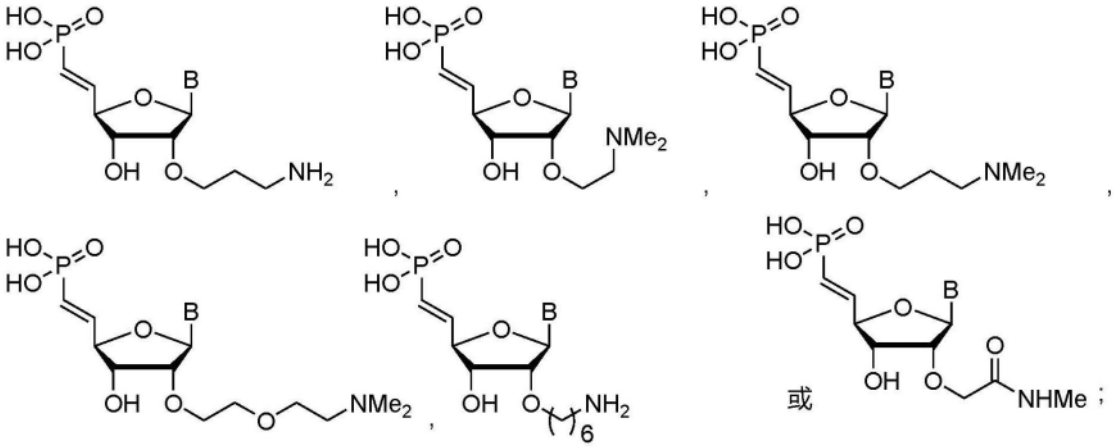
[0318] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的核苷酸间连接处。

[0319] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸在2'-位进一步被修饰。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述2'-修饰选自2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。

[0320] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:



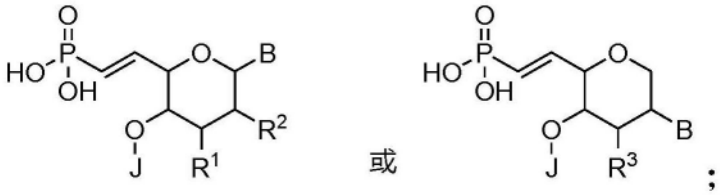
[0321]



[0322] 其中B为杂环碱基部分。

[0323] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0324]



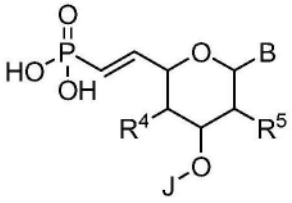
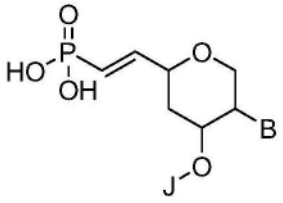
[0325] 其中B为杂环碱基部分;

[0326] R^1、R^2和R^3独立地选自氢、卤素、烷基或烷氧基;且

[0327] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0328] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修

饰的非天然核苷酸选自：

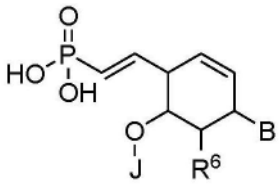
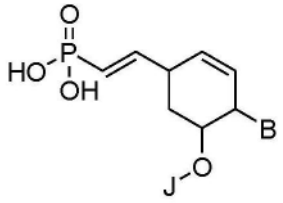
[0329]  或 ；

[0330] 其中B为杂环碱基部分；

[0331] R^4和R^5独立地选自氢、卤素、烷基或烷氧基；且

[0332] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0333] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸，其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自：

[0334]  或 ；

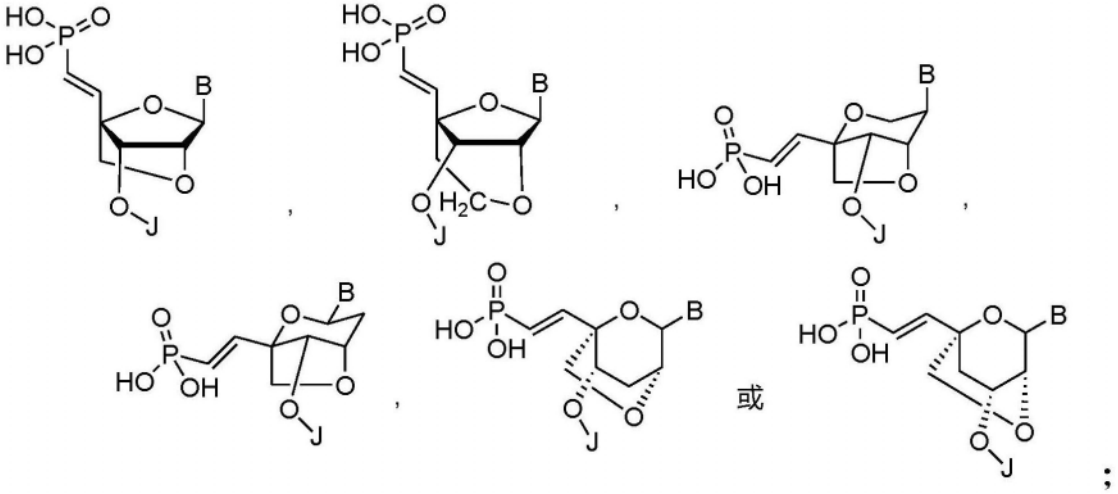
[0335] 其中B为杂环碱基部分；

[0336] R^6选自氢、卤素、烷基或烷氧基；且

[0337] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0338] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸，其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自锁定核酸(LNA)或乙烯基核酸(ENA)。

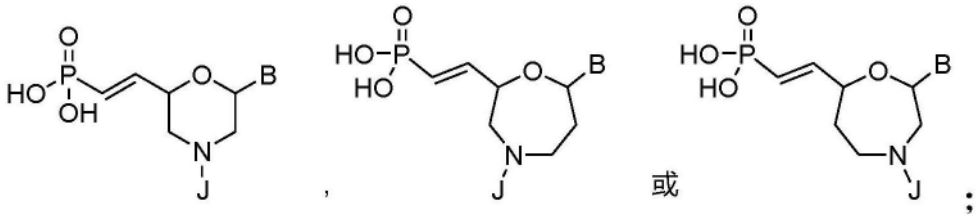
[0339] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸，其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自：

[0340] ；

[0341] 其中B为杂环碱基部分；且

[0342] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

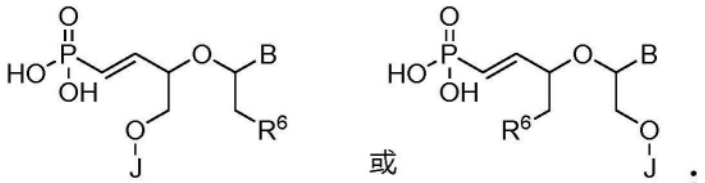
[0343] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸，其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自：

[0344] 

[0345] 其中B为杂环碱基部分;且

[0346] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0347] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸是:

[0348] 

[0349] 其中B为杂环碱基部分;

[0350] R^6选自氢、卤素、烷基或烷氧基;且

[0351] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0352] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、二氨基磷酸酯连接、甲基膦酸酯连接或酰胺连接。

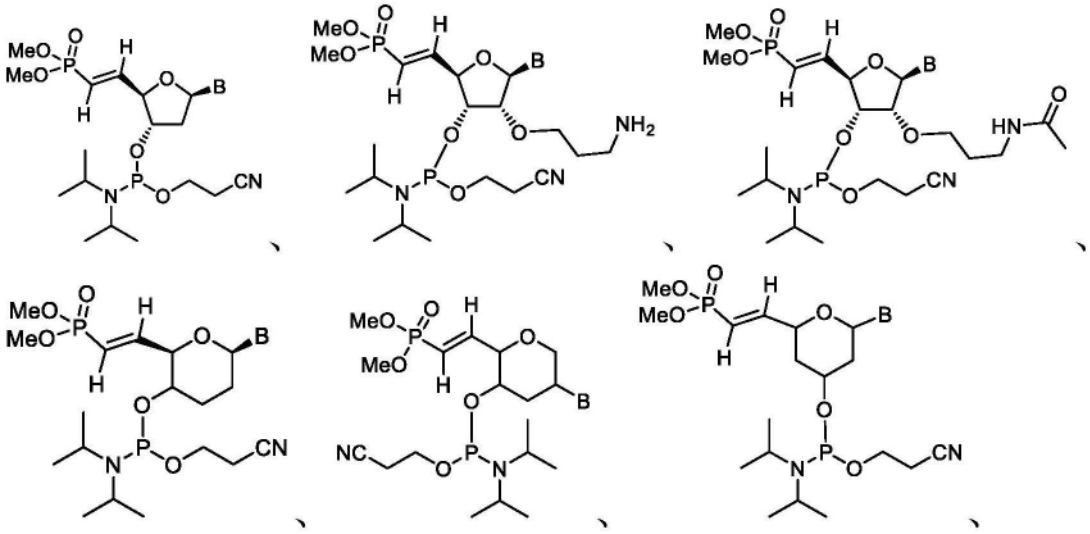
[0353] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中所述至少一个反向脱碱基部分是至少一个末端。

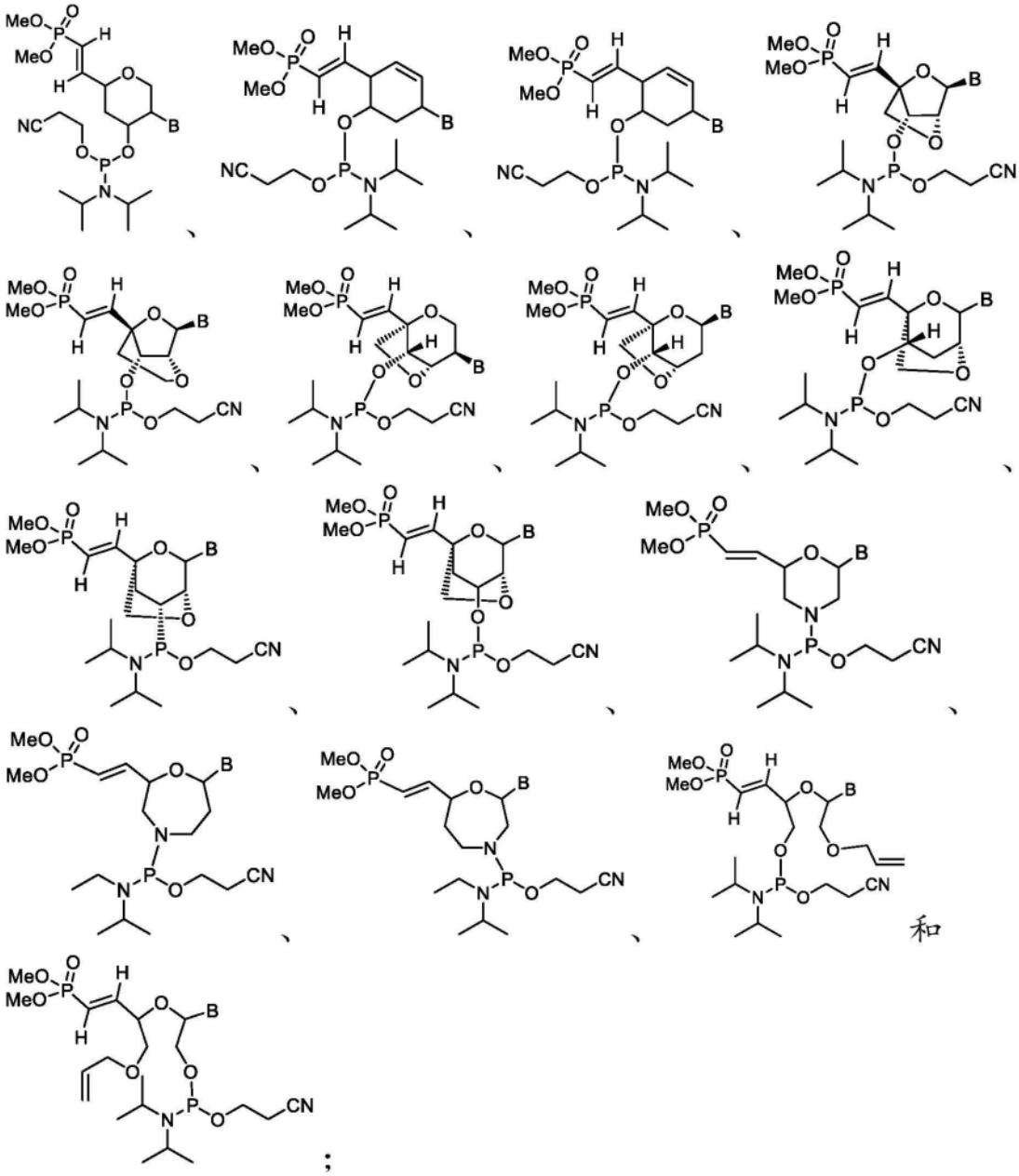
[0354] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸是单链的。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸是双链的。

[0355] 另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为2至约100个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为2至约90个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为2至约80个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为2至约70个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为2至约60个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为2至约50个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为2至约40个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为2至约30个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为2至约20个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为2至约10个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为8至约30个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为10至约30个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为14至约30个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为18至约30个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为22至约30个残基。另一个实施方案提供了式(II)的寡核苷酸,其中该寡核苷酸的长度为26至约30个残基。

[0356] 一个实施方案提供了适合于合成选自下组的寡核苷酸的化合物：

[0357]



[0358] 

[0359] 其中B为杂环碱基部分。

[0360] 缀合化学

[0361] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合至结合部分。在一些情况下,该结合部分包括氨基酸、肽、多肽、蛋白质、抗体、抗原、毒素、激素、脂质、核苷酸、核苷、糖、碳水化合物、聚合物如聚乙二醇和聚丙二醇,以及所有这些物质类别的类似物或衍生物。结合部分的其他实例还包括类固醇如胆固醇、磷脂、二酰基甘油和三酰基甘油、脂肪酸、烃(例如,饱和的、不饱和的或含有取代基)、酶底物、生物素、洋地黄毒苷和多糖。在一些情况下,该结合部分是抗体或其结合片段。在一些情况下,多核酸分子进一步缀合至聚合物和可选的内体溶解部分。

[0362] 在一些实施方案中,所述多核酸分子通过化学连接过程缀合至结合部分。在一些情况下,该多核酸分子通过天然连接缀合至结合部分。在一些情况下,该缀合如下所述:Dawson等人."Synthesis of proteins by native chemical ligation,"Science 1994,266,776-779;Dawson等人."Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation

through the Use of Thiol Additives,"J.Am.Chem.Soc.1997,119,4325-4329;Hackeng等人."Protein synthesis by native chemical ligation:Expanded scope by using straightforward methodology.,"Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1999,96,10068-10073;或Wu等人."Building complex glycopeptides:Development of acysteine-free native chemical ligation protocol,"Angew.Chem.Int.Ed.2006,45,4116-4125。在一些情况下,该缀合如美国专利8,936,910所述。在一些实施方案中,该多核酸分子经由天然连接化学法位点特异性或非特异性地缀合至结合部分。

[0363] 在一些情况下,所述多核酸分子通过利用"无痕"偶联技术(Philochem)的定点方法缀合至结合部分。在一些情况下,该"无痕"偶联技术利用结合部分上的N-末端1,2-氨基硫醇基团,其随后与含有醛基团的多核酸分子缀合(参见Casi等人,"Site-specific traceless coupling of potent cytotoxic drugs to recombinant antibodies for pharmacodelivery,"JACS134(13):5887-5892(2012))。

[0364] 在一些情况下,所述多核酸分子通过利用并入结合部分中的非天然氨基酸的定点方法缀合至结合部分。在一些情况下,该非天然氨基酸包括对乙酰基苯丙氨酸(pAcPhe)。在一些情况下,pAcPhe的酮基团选择性地与衍生自烷氧基-胺的缀合部分偶联以形成肟键(参见Axup等人,"Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids,"PNAS109(40):16101-16106(2012))。

[0365] 在一些情况下,所述多核酸分子通过利用酶催化过程的定点方法缀合至结合部分。在一些情况下,该定点方法利用SMARTag™技术(Redwood)。在一些情况下,SMARTag™技术包括通过甲酰甘氨酸生成酶(FGE)在醛标签的存在下通过氧化过程从半胱氨酸生成甲酰甘氨酸(FGly)残基,随后经由肼基-Pictet-Spengler(HIPS)连接将FGly缀合至烷基肼官能化多核酸分子(参见Wu等人,"Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag,"PNAS106(9):3000-3005(2009);Agarwal等人,"A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification,"PNAS 110(1):46-51(2013))。

[0366] 在一些情况下,酶催化过程包含微生物转谷氨酰胺酶(mTG)。在一些情况下,所述多核酸分子利用微生物转谷氨酰胺催化的过程缀合至结合部分。在一些情况下,mTG催化识别序列内谷氨酰胺的酰胺侧链与官能化多核酸分子的伯胺之间的共价键形成。在一些情况下,mTG由茂源链霉菌(Streptomyces mobarensis)产生(参见Strop等人,"Location matters:site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates,"Chemistry and Biology 20(2)161-167(2013))。

[0367] 在一些情况下,所述多核酸分子通过如PCT公开WO2014/140317中描述的方法缀合至结合部分,该方法利用序列特异性转肽酶。

[0368] 在一些情况下,所述多核酸分子通过如美国专利公开2015/0105539和2015/0105540中描述的方法缀合至结合部分。

[0369] 结合部分

[0370] 在一些实施方案中,结合部分A是多肽。在一些情况下,该多肽是抗体或其片段。在一些情况下,该片段是结合片段。在一些情况下,该抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价

Fab'、二价Fab_2、$F(ab)'_3$片段、单链可变片段(scFv)、双scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体、纳米抗体、三抗体、四抗体、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单结构域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段,或者它们的化学修饰的衍生物。

[0371] 在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,A为人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab_2、$F(ab)'_3$片段、单链可变片段(scFv)、双scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体、纳米抗体、三抗体、四抗体、二硫键稳定的Fv蛋白("dsFv")、单结构域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段,或者它们的化学修饰的衍生物。在一些情况下,A为人源化抗体或其结合片段。在一些情况下,A为鼠抗体或其结合片段。在一些情况下,A为嵌合抗体或其结合片段。在一些情况下,A为单克隆抗体或其结合片段。在一些情况下,A为单价Fab'。在一些情况下,A为二价Fab_2。在一些情况下,A为单链可变片段(scFv)。

[0372] 在一些实施方案中,结合部分A是双特异性抗体或其结合片段。在一些情况下,该双特异性抗体是三官能抗体或双特异性微抗体。在一些情况下,该双特异性抗体是三官能抗体。在一些情况下,该三官能抗体是全长单克隆抗体,其包含针对两种不同抗原的结合位点。示例性的三官能抗体包括卡妥索单抗(其靶向EpCAM和CD3;Fresenius Biotech/Trion Pharma)、ertumaxomab(靶向HER2/neu/CD3;Fresenius Biotech/Trion Pharma)、lymphomun FBTA05(靶向CD20/CD3;Fresenius Biotech/Trion Pharma)、RG7221(RO5520985;靶向Angiopoietin 2/VEGF;Roche)、RG7597(靶向Her1/Her3;Genentech/Roche)、MM141(靶向IGF1R/Her3;Merrimack)、ABT122(靶向TNFα/IL17;Abbvie)、ABT981(靶向IL1α/IL1β;Abbott)、LY3164530(靶向Her1/cMET;Eli Lilly)和TRBS07(Ektomab;靶向GD2/CD3;Trion Research Gmbh)。另外的示例性三官能抗体包括来自F-star Biotechnology Ltd的mAb^2。在一些情况下,A为双特异性三官能抗体。在一些实施方案中,A为选自以下的双特异性三官能抗体:卡妥索单抗(其靶向EpCAM和CD3;Fresenius Biotech/Trion Pharma)、ertumaxomab(靶向HER2/neu/CD3;Fresenius Biotech/Trion Pharma)、lymphomun FBTA05(靶向CD20/CD3;Fresenius Biotech/Trion Pharma)、RG7221(RO5520985;靶向Angiopoietin 2/VEGF;Roche)、RG7597(靶向Her1/Her3;Genentech/Roche)、MM141(靶向IGF1R/Her3;Merrimack)、ABT122(靶向TNFα/IL17;Abbvie)、ABT981(靶向IL1α/IL1β;Abbott)、LY3164530(靶向Her1/cMET;Eli Lilly)、TRBS07(Ektomab;靶向GD2/CD3;Trion Research Gmbh)和来自F-star Biotechnology Ltd的mAb^2。

[0373] 在一些情况下,所述双特异性抗体是双特异性微抗体。在一些情况下,该双特异性微抗体包括二价Fab_2、$F(ab)'_3$片段、双scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体、三抗体、四抗体或双特异性T细胞接合物(BiTE)。在一些实施方案中,该双特异性T细胞接合物是包含两个单链可变片段(scFv)的融合蛋白,其中这两个scFv靶向两种不同抗原的表位。示例性的双特异性微抗体包括但不限于DART(双亲和力重新靶向平台;MacroGenics)、兰妥莫单抗(MT103或AMG103;其靶向CD19/CD3;Micromet)、MT111(靶向CEA/CD3;Micromet/Amegen)、MT112(BAY2010112;靶向PSMA/CD3;Micromet/Bayer)、MT110(AMG 110;靶向EPCAM/CD3;Amgen/Micromet)、MGD006(靶向CD123/CD3;MacroGenics)、MGD007(靶向GPA33/CD3;MacroGenics)、BI1034020(靶向β-淀粉样蛋白上的两个不同表位;Ablynx)、ALX0761(靶向IL17A/IL17F;Ablynx)、TF2(靶向CEA/hepten;Immunomedics)、IL-17/IL-34二Ab(BMS)、

AFM13(靶向CD30/CD16;Affimed)、AFM11(靶向CD19/CD3;Affimed)和结构域抗体(dAb,来自Domantis/GSK)。

[0374] 在一些实施方案中,结合部分A是双特异性微抗体。在一些情况下,A为双特异性Fab_2。在一些情况下,A为双特异性F(ab)'$_3$片段。在一些情况下,A为双特异性双scFv。在一些情况下,A为双特异性$(scFv)_2$。在一些实施方案中,A为双特异性双抗体。在一些实施方案中,A为双特异性微抗体。在一些实施方案中,A为双特异性三抗体。在其他实施方案中,A为双特异性四抗体。在其他实施方案中,A为双特异性T细胞接合物(BiTE)。在另外的实施方案中,A为双特异性微抗体,其选自:DART(双亲和力重新靶向平台;MacroGenics)、兰妥莫单抗(MT103或AMG103;其靶向CD19/CD3;Micromet)、MT111(靶向CEA/CD3;Micromet/Amegen)、MT112(BAY2010112;靶向PSMA/CD3;Micromet/Bayer)、MT110(AMG 110;靶向EPCAM/CD3;Amgen/Micromet)、MGD006(靶向CD123/CD3;MacroGenics)、MGD007(靶向GPA33/CD3;MacroGenics)、BI1034020(靶向β-淀粉样蛋白上的两个不同表位;Ablynx)、ALX0761(靶向IL17A/IL17F;Ablynx)、TF2(靶向CEA/hepten;Immunomedics)、IL-17/IL-34二Ab(BMS)、AFM13(靶向CD30/CD16;Affimed)、AFM11(靶向CD19/CD3;Affimed)和结构域抗体(dAb,来自Domantis/GSK)。

[0375] 在一些实施方案中,结合部分A是三特异性抗体。在一些情况下,该三特异性抗体包括F(ab)'$_3$片段或三抗体。在一些情况下,A为三特异性F(ab)'$_3$片段。在一些情况下,A为三抗体。在一些实施方案中,A为三特异性抗体,如Dimas等人,"Development of a trispecific antibody designed to simultaneously and efficiently target three different antigens on tumor cells,"Mol.Pharmaceutics,12(9):3490-3501(2015)所述。

[0376] 在一些实施方案中,结合部分A是识别细胞表面蛋白质的抗体或其结合片段。在一些情况下,该细胞表面蛋白质是由癌细胞表达的抗原。示例性的癌抗原包括但不限于甲胎蛋白、ASLG659、B7-H3、BAFF-R、短小蛋白聚糖、CA125(MUC16)、CA15-3、CA19-9、癌胚抗原(CEA)、CA242、CRIPTO(CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、畸胎瘤衍生生长因子)、CTLA-4、CXCR5、E16(LAT1、SLC7A5)、FcRH2(IFGP4、IRTA4、SPAP1A(包含SH2结构域的磷酸酶锚定蛋白1a)、SPAP1B、SPAP1C)、表皮生长因子、ETBR、Fc受体样蛋白1(FCRH1)、GEDA、HLA-DOB(MHC II类分子的β亚基(Ia抗原)、人绒毛膜促性腺激素、ICOS、IL-2受体、IL20Rα、免疫球蛋白超家族受体易位相关2(IRTA2)、L6、Lewis Y、Lewis X、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE 4、MART1、间皮素、MDP、MPF(SMR、MSLN)、MCP1(CCL2)、巨噬细胞抑制因子(MIF)、MPG、MSG783、粘蛋白、MUC1-KLH、Napi3b(SLC34A2)、柄蛋白-4、Neu癌基因产物、NCA、胎盘碱性磷酸酶、前列腺特异性膜抗原(PMSA)、前列腺酸性磷酸酶、PSCA hlg、p97、嘌呤能受体P2X配体门控离子通道5(P2X5)、LY64(淋巴细胞抗原64(RP105)、gp100、P21、前列腺的六跨膜上皮抗原(STEAP1)、STEAP2、Sema 5b、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TrpM4(BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B,瞬时受体电位阳离子通道,亚家族M,成员4)等。

[0377] 在一些情况下,细胞表面蛋白质包括分化簇(CD)细胞表面标志物。示例性的CD细胞表面标志物包括但不限于CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD15s、CD16、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、

CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD45RO、CD45RA、CD45RB、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CDw60、CD61、CD62E、CD62L(L-选择蛋白)、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD79(例如,CD79a、CD79b)、CD90、CD95(Fas)、CD103、CD104、CD125(IL5RA)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD152(CTLA-4)、CD221、CD274、CD279(PD-1)、CD319(SLAMF7)、CD326(EpCAM)等。

[0378] 在一些情况下,结合部分A是识别癌抗原的抗体或其结合片段。在一些情况下,结合部分A是识别以下癌抗原的抗体或其结合片段:甲胎蛋白、ASLG659、B7-H3、BAFF-R、短小蛋白聚糖、CA125(MUC16)、CA15-3、CA19-9、癌胚抗原(CEA)、CA242、CRIPTO(CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、畸胎瘤衍生生长因子)、CTLA-4、CXCR5、E16(LAT1、SLC7A5)、FcRH2(IFGP4、IRTA4、SPAP1A(包含SH2结构域的磷酸酶锚定蛋白1a)、SPAP1B、SPAP1C)、表皮生长因子、ETBR、Fc受体样蛋白1(FCRH1)、GEDA、HLA-DOB(MHC II类分子的β亚基(Ia抗原)、人绒毛膜促性腺激素、ICOS、IL-2受体、IL20Rα、免疫球蛋白超家族受体易位相关2(IRTA2)、L6、Lewis Y、Lewis X、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE 4、MART1、间皮素、MCP1(CCL2)、MDP、巨噬细胞抑制因子(MIF)、MPF(SMR、MSLN)、MPG、MSG783、粘蛋白、MUC1-KLH、Napi3b(SLC34A2)、柄蛋白-4、Neu癌基因产物、NCA、胎盘碱性磷酸酶、前列腺特异性膜抗原(PMSA)、前列腺酸性磷酸酶、PSCA hlg、p97、嘌呤能受体P2X配体门控离子通道5(P2X5)、LY64(淋巴细胞抗原64(RP105)、gp100、P21、前列腺的六跨膜上皮抗原(STEAP1)、STEAP2、Sema 5b、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TrpM4(BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B,瞬时受体电位阳离子通道,亚家族M,成员4)或其组合。

[0379] 在一些情况下,结合部分A是识别CD细胞表面标志物的抗体或其结合片段。在一些情况下,结合部分A是识别CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD15s、CD16、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD45RO、CD45RA、CD45RB、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CDw60、CD61、CD62E、CD62L(L-选择蛋白)、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD79(例如,CD79a、CD79b)、CD90、CD95(Fas)、CD103、CD104、CD125(IL5RA)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD152(CTLA-4)、CD221、CD274、CD279(PD-1)、CD319(SLAMF7)、CD326(EpCAM)或其组合的抗体或其结合片段。

[0380] 在一些实施方案中,所述抗体或其结合片段包括扎芦木单抗(HuMax-EFGr,Genmab)、阿巴伏单抗(Menarini)、abituzumab(Merck)、adecatumumab(MT201)、培化阿珠单抗、阿仑珠单抗(Campath®,MabCampath或Campath-1H;Leukosite)、AlloMune(BioTransplant)、amatuximab(Morphotek,Inc.)、抗VEGF(Genetech)、马安莫单抗、阿泊珠单抗(hu1D10)、ascrinvacumab(Pfizer Inc.)、atezolizumab(MPDL3280A;Genentech/Roche)、B43.13(OvaRex,AltaRex Corporation)、巴利昔单抗(Simulect®,Novartis)、贝利木单抗(Benlysta®,GlaxoSmithKline)、贝伐珠单抗(Avastin®,Genentech)、兰妥莫单抗(Blincyto,AMG103;Amgen)、BEC2(ImGlone Systems Inc.)、carlumab(Janssen

Biotech)、卡妥索单抗(Removab,Trion Pharma)、CEAcide(Immunomedics)、西妥昔单抗(Erbitux®,ImClone)、泊西他珠单抗(VB6-845)、西妥木单抗(IMC-A12,ImClone Systems Inc.)、可那木单抗(AMG 655,Amgen)、达西珠单抗(SGN-40,huS2C6;Seattle Genetics, Inc.)、达雷木单抗(Darzalex®,Janssen Biotech)、地莫单抗、drozitumab(Genentech)、durvalumab(MedImmune)、dusigitumab(MedImmune)、依决洛单抗(MAb17-1A,Panorex, Glaxo Wellcome)、依洛珠单抗(Empliciti™,Bristol-Myers Squibb)、emibetuzumab(Eli Lilly)、enavatuzumab(Facet Biotech Corp.)、enfortumab vedotin(Seattle Genetics, Inc.)、enoblituzumab(MGA271,MacroGenics,Inc.)、ensituxumab(Neogenix Oncology, Inc.)、依帕珠单抗(LymphoCide,Immunomedics,Inc.)、厄马索单抗(Rexomun®,Trion Pharma)、伊瑞西珠(Abegrin,MedImmune)、法利珠单抗(MORAb-003,Morphotek,Inc)、FBTA05(Lymphomun,Trion Pharma)、ficlatuzumab(AVEO Pharmaceuticals)、芬妥木单抗(CP-751871,Pfizer)、flanvotumab(ImClone Systems)、夫苏木单抗(GC1008,Aanofi-Aventis)、futuximab、glaximab、ganitumab(Amgen)、吉瑞昔单抗(Rencarex® ,Wilex AG)、IMAB362(Claudiximab,Ganymed Pharmaceuticals AG)、imalumab(Baxalta)、IMC-1C11(ImClone Systems)、IMC-C225(Imclone Systems Inc.)、imgatuzumab(Genentech/Roche)、英妥木单抗(Centocor,Inc.)、伊匹木单抗(Yervoy®,Bristol-Myers Squibb)、伊妥木单抗(Medarex,Inc.)、isatuximab(SAR650984,Sanofi-Aventis)、拉贝珠单抗(CEA-CIDE,Immunomedics)、来沙木单抗(ETR2-ST01,Cambridge Antibody Technology)、林妥珠单抗(SGN-33,Seattle Genetics)、鲁卡木单抗(Novartis)、鲁昔单抗、马帕木单抗(HGS-ETR1,Human Genome Sciences)、马妥珠单抗(EMD 72000,Merck)、米拉珠单抗(hLL1, Immunomedics,Inc.)、米妥莫单抗(BEC-2,ImClone Systems)、narnatumab(ImClone Systems)、奈昔木单抗(Portrazza™,Eli Lilly)、nesvacumab(Regeneron Pharmaceuticals)、尼妥珠单抗(h-R3、BIOMAb EGFR、TheraCIM、Theraloc或CIMAher; Biotech Pharmaceutical Co.)、纳武单抗(Opdivo®,Bristol-Myers Squibb)、obinutuzumab(Gazyva或Gazyvaro;Hoffmann-La Roche)、ocaratuzumab(AME-133v, LY2469298;Mentrik Biotech,LLC)、奥法木单抗(Arzerra®,Genmab)、onartuzumab (Genentech)、Ontuxizumab(Morphotek,Inc.)、奥戈伏单抗(OvaRex®,AltaRex Corp.)、otlertuzumab(Emergent BioSolutions)、帕尼单抗(ABX-EGF,Amgen)、pankomab (Glycotope GMBH)、parsatuzumab(Genentech)、patritumab、派姆单抗(Keytruda®, Merck)、pemtumomab(Theragyn,Antisoma)、帕妥珠单抗(Perjeta,Genentech)、pidilizumab(CT-011,Medivation)、polatuzumab vedotin(Genentech/Roche)、普立木单抗、雷妥莫单抗(Vaxira®,Recombio)、雷莫芦单抗(Cyramza®,ImClone Systems Inc.)、利妥昔单抗(Rituxan®,Genentech)、罗妥木单抗(Schering-Plough)、Seribantumab(Sanofi/Merrimack Pharmaceuticals,Inc.)、西罗珠单抗、司妥昔单抗(Sylvant™,Janssen Biotech)、Smart MI95(Protein Design Labs,Inc.)、Smart ID10 (Protein Design Labs,Inc.)、tabalumab(LY2127399,Eli Lilly)、帕他莫单抗、替妥莫单

抗、替妥木单抗(Roche)、tetulomab、TGN1412(CD28-SuperMAB或TAB08)、替加珠单抗(CD-1008,Daiichi Sankyo)、托西莫单抗、曲妥珠单抗(Herceptin®)、曲美木单抗(CP-672,206;Pfizer)、西莫白介素单抗(EMD Pharmaceuticals)、ublituximab、urelumab(BMS-663513,Bristol-Myers Squibb)、伏洛昔单抗(M200,Biogen Idec)、zatuximab等。

[0381] 在一些实施方案中,结合部分A包括扎芦木单抗(HuMax-EFGr,Genmab)、阿巴伏单抗(Menarini)、abituzumab(Merck)、adecatumumab(MT201)、培化阿珠单抗、阿仑珠单抗(Campath®,MabCampath或Campath-1H;Leukosite)、AlloMune(BioTransplant)、amatuximab(Morphotek,Inc.)、抗VEGF(Genetech)、马安莫单抗、阿泊珠单抗(hu1D10)、ascrinvacumab(Pfizer Inc.)、atezolizumab(MPDL3280A;Genentech/Roche)、B43.13(OvaRex,AltaRex Corporation)、巴利昔单抗(Simulect®,Novartis)、贝利木单抗(Benlysta®,GlaxoSmithKline)、贝伐珠单抗(Avastin®,Genentech)、兰妥莫单抗(Blincyto,AMG103;Amgen)、BEC2(ImGlone Systems Inc.)、carlumab(Janssen Biotech)、卡妥索单抗(Removab,Trion Pharma)、CEAcide(Immunomedics)、西妥昔单抗(Erbitux®,ImClone)、泊西他珠单抗(VB6-845)、西妥木单抗(IMC-A12,ImClone Systems Inc.)、可那木单抗(AMG 655,Amgen)、达西珠单抗(SGN-40,huS2C6;Seattle Genetics,Inc.)、达雷木单抗(Darzalex®,Janssen Biotech)、地莫单抗、drozitumab(Genentech)、durvalumab(MedImmune)、dusigitumab(MedImmune)、依决洛单抗(MAb17-1A,Panorex,Glaxo Wellcome)、依洛珠单抗(Empliciti™,Bristol-Myers Squibb)、emibetuzumab(Eli Lilly)、enavatuzumab(Facet Biotech Corp.)、enfortumab vedotin(Seattle Genetics,Inc.)、enoblituzumab(MGA271,MacroGenics,Inc.)、ensituxumab(Neogenix Oncology,Inc.)、依帕珠单抗(LymphoCide,Immunomedics,Inc.)、厄马索单抗(Rexomun®,Trion Pharma)、伊瑞西珠(Abegrin,MedImmune)、法利珠单抗(MORAb-003,Morphotek,Inc)、FBTA05(Lymphomun,Trion Pharma)、ficlatuzumab(AVEO Pharmaceuticals)、芬妥木单抗(CP-751871,Pfizer)、flanvotumab(ImClone Systems)、夫苏木单抗(GC1008,Aanofi-Aventis)、futuximab、glaximab、ganitumab(Amgen)、吉瑞昔单抗(Rencarex®,Wilex AG)、IMAB362(Claudiximab,Ganymed Pharmaceuticals AG)、imalumab(Baxalta)、IMC-1C11(ImClone Systems)、IMC-C225(Imclone Systems Inc.)、imgatuzumab(Genentech/Roche)、英妥木单抗(Centocor,Inc.)、伊匹木单抗(Yervoy®,Bristol-Myers Squibb)、伊妥木单抗(Medarex,Inc.)、isatuximab(SAR650984,Sanofi-Aventis)、拉贝珠单抗(CEA-CIDE,Immunomedics)、来沙木单抗(ETR2-ST01,Cambridge Antibody Technology)、林妥珠单抗(SGN-33,Seattle Genetics)、鲁卡木单抗(Novartis)、鲁昔单抗、马帕木单抗(HGS-ETR1,Human Genome Sciences)、马妥珠单抗(EMD 72000,Merck)、米拉珠单抗(hLL1,Immunomedics,Inc.)、米妥莫单抗(BEC-2,ImClone Systems)、narnatumab(ImClone Systems)、奈昔木单抗(Portrazza™,Eli Lilly)、nesvacumab(Regeneron Pharmaceuticals)、尼妥珠单抗(h-R3、BIOMAb EGFR、TheraCIM、Theraloc或CIMAher;Biotech Pharmaceutical Co.)、纳武单抗(Opdivo®,Bristol-Myers Squibb)、

obinutuzumab(Gazyva或Gazyvaro;Hoffmann-La Roche)、ocaratuzumab(AME-133v,LY2469298;Mentrik Biotech,LLC)、奥法木单抗(Arzerra®,Genmab)、onartuzumab(Genentech)、Ontuxizumab(Morphotek,Inc.)、奥戈伏单抗(OvaRex®,AltaRex Corp.)、otlertuzumab(Emergent BioSolutions)、帕尼单抗(ABX-EGF,Amgen)、pankomab(Glycotope GMBH)、parsatuzumab(Genentech)、patritumab、派姆单抗(Keytruda®,Merck)、pemtumomab(Theragyn,Antisoma)、帕妥珠单抗(Perjeta,Genentech)、pidilizumab(CT-011,Medivation)、polatuzumab vedotin(Genentech/Roche)、普立木单抗、雷妥莫单抗(Vaxira®,Recombio)、雷莫芦单抗(Cyramza®,ImClone Systems Inc.)、利妥昔单抗(Rituxan®,Genentech)、罗妥木单抗(Schering-Plough)、Seribantumab(Sanofi/Merrimack Pharmaceuticals,Inc.)、西罗珠单抗、司妥昔单抗(Sylvant™,Janssen Biotech)、Smart MI95(Protein Design Labs,Inc.)、Smart ID10(Protein Design Labs,Inc.)、tabalumab(LY2127399,Eli Lilly)、帕他莫单抗、替妥莫单抗、替妥木单抗(Roche)、tetulomab、TGN1412(CD28-SuperMAB或TAB08)、替加珠单抗(CD-1008,Daiichi Sankyo)、托西莫单抗、曲妥珠单抗(Herceptin®)、曲美木单抗(CP-672,206;Pfizer)、西莫白介素单抗(EMD Pharmaceuticals)、ublituximab、urelumab(BMS-663513,Bristol-Myers Squibb)、伏洛昔单抗(M200,Biogen Idec)或zatuximab。在一些实施方案中,结合部分A为扎芦木单抗(HuMax-EFGr,来自Genmab)。

[0382] 在一些实施方案中,结合部分A根据式(I)缀合至多核酸分子(B)和聚合物(C),以及任选地根据本文所述的式(II)缀合至内体溶解部分(D)。在一些情况下,该多核酸分子包含与表2、4、8或9中列出的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,该多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,该多核酸分子包含选自SEQ ID NO:16-45、422-1173、1195-1214或1215-1242的序列。在一些情况下,聚合物C包含聚环氧烷(例如,聚乙二醇)。在一些实施方案中,内体溶解部分D包含INF7或蜂毒肽,或其各自的衍生物。

[0383] 在一些实施方案中,结合部分A缀合至多核酸分子(B)和聚合物(C),以及可选的内体溶解部分(D)。在一些情况下,结合部分A是抗体或其结合片段。

[0384] 在一些实施方案中,结合部分A非特异性地缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A经由赖氨酸残基或半胱氨酸残基以非位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A经由赖氨酸残基以非位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A经由半胱氨酸残基以非位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A是抗体或其结合片段。

[0385] 在一些实施方案中,结合部分A以位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A通过赖氨酸残基、半胱氨酸残基、在5'末端、3'末端、非天然氨基酸或者酶修饰或酶催化的残基经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A通过赖氨酸残基经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A

通过半胱氨酸残基经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A在5'末端经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A在3'末端经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A通过非天然氨基酸经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A通过酶修饰或酶催化的残基经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A是抗体或其结合片段。

[0386] 在一些实施方案中,结合部分A(例如,抗体或其结合片段)的一个或多个区域缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A的一个或多个区域包含结合部分A的N-末端、C-末端、在恒定区中、在铰链区处或Fc区。在一些情况下,多核酸分子(B)缀合至结合部分A的N-末端(例如,抗体或其结合片段的N-末端)。在一些情况下,多核酸分子(B)缀合至结合部分A的C-末端(例如,抗体或其结合片段的N-末端)。在一些情况下,多核酸分子(B)缀合至结合部分A的恒定区(例如,抗体或其结合片段的恒定区)。在一些情况下,多核酸分子(B)缀合至结合部分A的铰链区(例如,抗体或其结合片段的铰链区)。在一些情况下,多核酸分子(B)缀合至结合部分A的Fc区(例如,抗体或其结合片段的Fc区)。

[0387] 在一些实施方案中,一个或多个多核酸分子(B)缀合至结合部分A。在一些情况下,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16个或更多个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约1个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约2个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约3个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约4个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约5个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约6个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约7个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约8个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约9个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约10个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约11个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约12个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约13个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约14个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约15个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约16个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,所述一个或多个多核酸分子是相同的。在其他情况下,所述一个或多个多核酸分子是不同的。在一些情况下,结合部分A是抗体或其结合片段。

[0388] 在一些实施方案中,缀合至结合部分A(例如,抗体或其结合片段)的多核酸分子(B)的数目形成比值。在一些情况下,该比值被称为DAR(药物-抗体)比,其中如本文提及的药物为多核酸分子(B)。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约1或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约2或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约3或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约4或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约5或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约6或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约7或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约8或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约9或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约10或更大。在一些情况下,

多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约11或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约12或更大。

[0389] 在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A(例如,抗体或其结合片段)的DAR比为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约1。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约2。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约3。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约4。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约5。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约6。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约7。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约8。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约9。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约10。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约11。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约12。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约13。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约14。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约15。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约16。

[0390] 在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为1。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为2。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为4。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为6。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为8。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为12。

[0391] 在一些实施方案中,使用本领域已知的常规技术进一步修饰抗体或其结合片段,例如,通过单独或组合地使用氨基酸缺失、插入、置换、添加和/或通过重组和/或本领域已知的其他任何修饰(例如,翻译后和化学修饰,如糖基化和磷酸化)。在一些情况下,该修饰进一步包括用于调节与Fc受体的相互作用的修饰。在一些情况下,所述一个或多个修饰包括例如国际公开WO97/34631中描述的那些修饰,该文献公开了参与Fc域与FcRn受体之间的相互作用的氨基酸残基。在抗体或其结合片段的氨基酸序列的核酸序列中引入此类修饰的方法是本领域技术人员公知的。

[0392] 在一些情况下,抗体结合片段进一步包括其衍生物,并且包括含有至少一个CDR的多肽序列。

[0393] 在一些情况下,如本文所用的术语“单链”意指双特异性单链构建体的第一和第二结构域共价连接,优选地为单个核酸分子可编码的共线氨基酸序列的形式。

[0394] 在一些情况下,双特异性单链抗体构建体涉及包含两个抗体衍生的结合域的构建体。在这样的实施方案中,双特异性单链抗体构建体是串联双scFv或双抗体。在一些情况下,scFv含有通过连接体肽连接的VH和VL域。在一些情况下,连接体的长度和序列足以确保第一和第二结构域中的每一个可以彼此独立地保留其差异结合特异性。

[0395] 在一些实施方案中,与本文所用的结合或相互作用定义至少两个抗原相互作用位点彼此的结合/相互作用。在一些情况下,抗原相互作用位点定义多肽的基序,其显示出与特定抗原或特定抗原组的特异性相互作用的能力。在一些情况下,结合/相互作用也被理解

为定义特异性识别。在这样的情况下,特异性识别是指抗体或其结合片段能够与每个靶分子的至少两个氨基酸特异性地相互作用和/或结合。例如,特异性识别涉及抗体分子的特异性,或其辨别靶分子的特定区域的能力。在另外的情况下,抗原相互作用位点与其特定抗原的特异性相互作用导致信号起始,例如,由于诱导抗原构象的改变、抗原的寡聚化等。在进一步的实施方案中,结合的实例是"匙-锁原理"的特异性。因此,在一些情况下,抗原相互作用位点和抗原的氨基酸序列中的特定基序由于其一级、二级或三级结构以及所述结构的二级修饰而彼此结合。在这样的情况下,抗原相互作用位点与其特定抗原的特异性相互作用也导致位点与抗原的简单结合。

[0396] 在一些情况下,特异性相互作用进一步指抗体或其结合片段的交叉反应性降低或脱靶效应降低。例如,与感兴趣的多肽/蛋白质结合但不与或基本上不与其他任何多肽结合的抗体或其结合片段被认为对感兴趣的多肽/蛋白质具有特异性。抗原相互作用位点与特定抗原的特异性相互作用的实例包括配体对其受体的特异性,例如抗原决定簇(表位)与抗体的抗原结合位点的相互作用。

[0397] 另外的结合部分

[0398] 在一些实施方案中,所述结合部分是血浆蛋白质。在一些情况下,该血浆蛋白质包括白蛋白。在一些情况下,结合部分A是白蛋白。在一些情况下,白蛋白通过本文所述的一种或多种缀合化学法缀合至多核酸分子。在一些情况下,白蛋白通过天然连接化学法缀合至多核酸分子。在一些情况下,白蛋白通过赖氨酸缀合而缀合至多核酸分子。

[0399] 在一些情况下,所述结合部分是类固醇。示例性的类固醇包括胆固醇、磷脂、二酰基甘油和三酰基甘油、脂肪酸,饱和的、不饱和的、包含取代的烃,或其组合。在一些情况下,该类固醇是胆固醇。在一些情况下,该结合部分是胆固醇。在一些情况下,胆固醇通过本文所述的一种或多种缀合化学法缀合至多核酸分子。在一些情况下,胆固醇通过天然连接化学法缀合至多核酸分子上。在一些情况下,胆固醇通过赖氨酸缀合而缀合至多核酸分子。

[0400] 在一些情况下,所述结合部分是聚合物,包括但不限于与细胞上的特定表面标志物结合的多核酸分子适体。在这种情况下,该结合部分是这样的多核酸,其不与靶基因或mRNA杂交,而是类似于与细胞表面标志物的其特定表位结合的抗体,能够选择性地与细胞表面标志物结合。

[0401] 在一些情况下,所述结合部分是肽。在一些情况下,该肽具有约1至约3kDa。在一些情况下,该肽具有约1.2至约2.8kDa、约1.5至约2.5kDa或约1.5至约2kDa。在一些情况下,该肽是双环肽。在一些情况下,该双环肽是受约束的双环肽。在一些情况下,该结合部分是双环肽(例如,来自Bicycle Therapeutics的双环化合物)。

[0402] 在另外的情况下,所述结合部分是小分子。在一些情况下,该小分子是募集抗体的小分子。在一些情况下,该募集抗体的小分子包含靶标结合末端和抗体结合末端,其中靶标结合末端能够识别细胞表面受体并与之相互作用。例如,在一些情况下,包含谷氨酸脲化合物的靶标结合末端使得能够与PSMA相互作用,从而增强与表达PSMA的细胞(例如,癌细胞)的抗体相互作用。在一些情况下,结合部分是Zhang等人,"A remote arene-binding site on prostate specific membrane antigen revealed by antibody-recruiting small molecules,"J Am Chem Soc.132(36):12711-12716(2010);或McEnaney等人,"Antibody-recruiting molecules:an emerging paradigm for engaging immune function in

treating human disease,"ACS Chem Biol.7(7):1139-1151(2012)中描述的小分子。

[0403] 抗体或其结合片段的产生

[0404] 在一些实施方案中,使用本领域已知可用于合成多肽(例如,抗体)的任何方法产生本文所述的多肽(例如,抗体及其结合片段),特别是通过化学合成或通过重组表达,并且优选地通过重组表达技术产生。

[0405] 在一些情况下,重组地表达抗体或其结合片段,并且由化学合成的寡核苷酸装配编码该抗体或其结合片段的核酸(例如,如Kutmeier等人,1994,BioTechniques 17:242所述),该方法包括合成含有编码抗体的序列部分的重叠寡核苷酸,退火并连接这些寡核苷酸,然后通过PCR扩增所连接的寡核苷酸。

[0406] 或者,任选地通过使用可与序列的3'和5'端杂交的合成引物的PCR扩增,或者通过使用对特定基因序列具有特异性的寡核苷酸探针的克隆,从合适的来源(例如,抗体cDNA文库,或由表达免疫球蛋白的任何组织或细胞生成的cDNA文库)生成编码抗体的核酸分子。

[0407] 在一些情况下,任选地通过对动物如兔进行免疫来生成多克隆抗体,或者更优选地,通过生成单克隆抗体,来生成抗体或其结合片段,例如,如Kohler和Milstein(1975,Nature 256:495-497)所述,或者如Kozbor等人(1983,Immunology Today 4:72)或Cole等人(1985,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,pp.77-96)所述。或者,任选地通过针对结合特定抗原的Fab片段的克隆筛查Fab表达文库(例如,如Huse等人,1989,Science 246:1275-1281所述),或通过筛查抗体文库(参见,例如,Clackson等人,1991,Nature 352:624;Hane等人,1997Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:4937),来获得至少编码抗体的Fab部分的克隆。

[0408] 在一些实施方案中,使用被开发用于通过将来自具有适当抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与来自具有适当生物活性的人抗体分子的基因剪接而产生"嵌合抗体"的技术(Morrison等人,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.81:851-855;Neuberger等人,1984,Nature 312:604-608;Takeda等人,1985,Nature 314:452-454)。嵌合抗体是其中不同部分来源于不同动物物种的分子,例如具有衍生自鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体,例如人源化抗体。

[0409] 在一些实施方案中,针对产生单链抗体所描述的技术(美国专利4,694,778;Bird,1988,Science 242:423-42;Huston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;和Ward等人,1989,Nature 334:544-54)适于产生单链抗体。通过经由氨基酸桥连接Fv区的重链和轻链片段产生单链多肽来形成单链抗体。还任选地使用在大肠杆菌(E.coli)中装配功能性Fv片段的技术(Skerra等人,1988,Science 242:1038-1041)。

[0410] 在一些实施方案中,通过常规技术(例如,电穿孔、脂质体转染和磷酸钙沉淀)将包含抗体的核苷酸序列的表达载体或抗体的核苷酸序列转移至宿主细胞,然后通过常规技术培养转染的细胞以产生抗体。在具体实施方案中,抗体的表达受组成型、诱导型或组织特异性启动子调节。

[0411] 在一些实施方案中,利用多种宿主表达载体系统表达本文所述的抗体或其结合片段。此类宿主表达系统代表通过其产生抗体的编码序列并随后进行纯化的载体,而且也代表当用适当的核苷酸编码序列转化或转染时原位表达抗体或其结合片段的细胞。这些包括但不限于用含有抗体或其结合片段编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载

体转化的微生物如细菌(例如,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(B.subtilis));用含有抗体或其结合片段编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,毕赤酵母(Saccharomyces Pichia));用含有抗体或其结合片段编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒(CaMV)和烟草花叶病毒(TMV))感染或用含有抗体或其结合片段编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统;或者带有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS、CHO、BH、293、293T、3T3细胞),所述重组表达构建体含有源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)。

[0412] 对于重组蛋白的长期高产量生产,优选稳定表达。在一些情况下,任选地对稳定表达抗体的细胞系进行工程化。不使用含有病毒复制起点的表达载体,而是用通过适当的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)和选择性标记控制的DNA转化宿主细胞。在引入外源DNA后,使工程化细胞在富集培养基中生长1-2天,然后切换到选择性培养基。重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性,并允许细胞将质粒稳定整合到其染色体中,并生长形成灶点(focus),然后将该灶点克隆并扩充成细胞系。该方法可有利地用来对表达抗体或其结合片段的细胞系进行工程化。

[0413] 在一些情况下,使用多种选择系统,包括但不限于分别在tk-、hgprt-或aprt-细胞中使用的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,1977,Cell 11:223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(Szybalska&Szybalski,192,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:202)和腺嘌呤转磷酸核糖基酶(Lowy等人,1980,Cell 22:817)基因。此外,使用抗代谢物抗性作为选择以下基因的基础:dhfr,其赋予对氨甲蝶呤的抗性(Wigler等人,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:357;O'Hare等人,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan&Berg,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072);neo,其赋予对氨基糖苷类G-418的抗性(Clinical Pharmacy 12:488-505;Wu和Wu,1991,Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev,1993,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596;Mulligan,1993,Science 260:926-932;以及Morgan和Anderson,1993,Ann.Rev.Biochem.62:191-217;May,1993,TIB TECH 11(5):155-215);以及hygro,赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人,1984,Gene 30:147)。重组DNA技术领域中公知的可使用的方法描述于Ausubel等人(编著),1993,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY;Kriegler,1990,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY;以及第12和13章,Dracopoli等人(编著),1994,Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY.;Colberre-Garapin等人,1981,J.Mol.Biol.150:1。

[0414] 在一些情况下,通过载体扩增来增加抗体的表达水平(综述参见Bebbington和Hentschel,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,第3卷(Academic Press,New York,1987))。当表达抗体的载体系统中的标记可扩增时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体的核苷酸序列相关,因此抗体的产生也将增加(Crouse等人,1983,Mol.Cell Biol.3:257)。

[0415] 在一些情况下,使用本领域已知的用于纯化抗体的任何方法,例如,通过色谱法

(例如,离子交换色谱法、亲和色谱法,特别是针对蛋白A后的特定抗原的亲和色谱法,以及大小柱色谱法)、离心、差异溶解度,或通过用于纯化蛋白质的其他任何标准技术。

[0416] 聚合物缀合部分

[0417] 在一些实施方案中,聚合物部分C进一步缀合至本文所述的多核酸分子、本文所述的结合部分或其组合。在一些情况下,聚合物部分C缀合至多核酸分子。在一些情况下,聚合物部分C缀合至结合部分。在其他情况下,聚合物部分C缀合至多核酸分子结合部分分子。在另外的情况下,聚合物部分C缀合,并且如治疗性分子平台部分所讨论的。

[0418] 在一些情况下,聚合物部分C是天然或合成聚合物,其由支链或非支链单体的长链和/或二维或三维的单体交联网络组成。在一些情况下,聚合物部分C包括多糖、木质素、橡胶或聚环氧烷(例如,聚乙二醇)。在一些情况下,至少一个聚合物部分C包括但不限于α-、ω-二羟基聚乙二醇、可生物降解的基于内酯的聚合物,例如聚丙烯酸、聚乳酸(PLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚丙烯、聚苯乙烯、聚烯烃、聚酰胺、聚氰基丙烯酸酯、聚酰亚胺、聚对苯二甲酸乙二酯(PET、PETG)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(PETE)、聚丁二醇(PTG)或聚氨酯及其混合物。如本文所用的,混合物是指在同一化合物内以及在嵌段共聚物中使用不同聚合物。在一些情况下,嵌段共聚物是其中至少一部分聚合物由另一聚合物的单体构成的聚合物。在一些情况下,聚合物部分C包括聚环氧烷。在一些情况下,聚合物部分C包括PEG。在一些情况下,聚合物部分C包括聚乙烯酰亚胺(PEI)或羟乙基淀粉(HES)。

[0419] 在一些情况下,C为PEG部分。在一些情况下,该PEG部分在多核酸分子的5'末端缀合,而结合部分在多核酸分子的3'末端缀合。在一些情况下,该PEG部分在多核酸分子的3'末端缀合,而结合部分在多核酸分子的5'末端缀合。在一些情况下,该PEG部分缀合至多核酸分子的内部位点。在一些情况下,该PEG部分、结合部分或其组合缀合至多核酸分子的内部位点。在一些情况下,该缀合是直接缀合。在一些情况下,该缀合经由天然连接进行。

[0420] 在一些实施方案中,聚环氧烷(例如,PEG)是多分散或单分散化合物。在一些情况下,多分散材料包含不同分子量的材料的分散分布,其特征在于平均重量(重均)大小和分散性。在一些情况下,单分散PEG包含一种大小的分子。在一些实施方案中,C为多分散或单分散的聚环氧烷(例如,PEG),并且指示的分子量表示聚环氧烷(例如,PEG)分子的分子量的平均值。

[0421] 在一些实施方案中,聚环氧烷(例如,PEG)的分子量为约200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000或100,000Da。

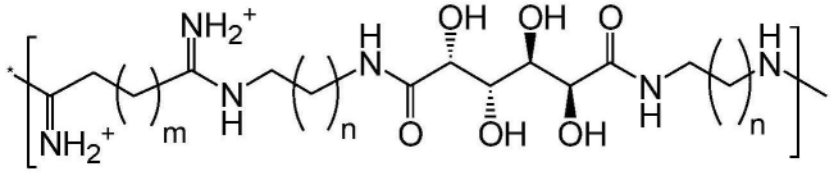
[0422] 在一些实施方案中,C为聚环氧烷(例如,PEG),并且具有约200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000或100,000Da的分子量。在一些实施方案中,C为PEG,并且具有约200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、

3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000或100,000Da的分子量。在一些情况下,C的分子量为约200Da。在一些情况下,C的分子量为约300Da。在一些情况下,C的分子量为约400Da。在一些情况下,C的分子量为约500Da。在一些情况下,C的分子量为约600Da。在一些情况下,C的分子量为约700Da。在一些情况下,C的分子量为约800Da。在一些情况下,C的分子量为约900Da。在一些情况下,C的分子量为约1000Da。在一些情况下,C的分子量为约1100Da。在一些情况下,C的分子量为约1200Da。在一些情况下,C的分子量为约1300Da。在一些情况下,C的分子量为约1400Da。在一些情况下,C的分子量为约1450Da。在一些情况下,C的分子量为约1500Da。在一些情况下,C的分子量为约1600Da。在一些情况下,C的分子量为约1700Da。在一些情况下,C的分子量为约1800Da。在一些情况下,C的分子量为约1900Da。在一些情况下,C的分子量为约2000Da。在一些情况下,C的分子量为约2100Da。在一些情况下,C的分子量为约2200Da。在一些情况下,C的分子量为约2300Da。在一些情况下,C的分子量为约2400Da。在一些情况下,C的分子量为约2500Da。在一些情况下,C的分子量为约2600Da。在一些情况下,C的分子量为约2700Da。在一些情况下,C的分子量为约2800Da。在一些情况下,C的分子量为约2900Da。在一些情况下,C的分子量为约3000Da。在一些情况下,C的分子量为约3250Da。在一些情况下,C的分子量为约3350Da。在一些情况下,C的分子量为约3500Da。在一些情况下,C的分子量为约3750Da。在一些情况下,C的分子量为约4000Da。在一些情况下,C的分子量为约4250Da。在一些情况下,C的分子量为约4500Da。在一些情况下,C的分子量为约4600Da。在一些情况下,C的分子量为约4750Da。在一些情况下,C的分子量为约5000Da。在一些情况下,C的分子量为约5500Da。在一些情况下,C的分子量为约6000Da。在一些情况下,C的分子量为约6500Da。在一些情况下,C的分子量为约7000Da。在一些情况下,C的分子量为约7500Da。在一些情况下,C的分子量为约8000Da。在一些情况下,C的分子量为约10,000Da。在一些情况下,C的分子量为约12,000Da。在一些情况下,C的分子量为约20,000Da。在一些情况下,C的分子量为约35,000Da。在一些情况下,C的分子量为约40,000Da。在一些情况下,C的分子量为约50,000Da。在一些情况下,C的分子量为约60,000Da。在一些情况下,C的分子量为约100,000Da。

[0423] 在一些实施方案中,聚环氧烷(例如PEG)是离散的PEG,其中该离散的PEG是包含超过一个重复环氧乙烷单元的聚合PEG。在一些情况下,离散的PEG(dPEG)包含2至60、2至50或2至48个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约2个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约3个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约4个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约5个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约6个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约7个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约8个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约9个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约10个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约11个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约12个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约13个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约14个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含

约15个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约16个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约17个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约18个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约19个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约20个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约22个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约24个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约26个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约28个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约30个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约35个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约40个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约42个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约48个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约50个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,以逐步的方式由纯的(例如,约95%、98%、99%或99.5%)起始材料将dPEG合成为单分子量化合物。在一些情况下,dPEG具有特定的分子量,而不是平均分子量。在一些情况下,本文所述的dPEG是来自Quanta Biodesign,LMD的dPEG。

[0424] 在一些实施方案中,聚合物部分C包含基于阳离子粘酸的聚合物(cMAP)。在一些情况下,cMPA包含至少一个重复亚单位的一个或多个亚单位,并且该亚单位结构表示为式(III):

[0425] 

式 III

[0426] 其中m在每次出现时独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,优选4-6或5;并且n在每次出现时独立地为1、2、3、4或5。在一些实施方案中,m和n为例如约10。

[0427] 在一些情况下,cMAP进一步缀合至PEG部分,生成cMAP-PEG共聚物、mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物或cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。在一些情况下,PEG部分的范围为约500Da至约50,000Da。在一些情况下,PEG部分的范围为约500Da至约1000Da、大于1000Da至约5000Da、大于5000Da至约10,000Da、大于10,000至约25,000Da、大于25,000Da至约50,000Da,或这些范围中的两个或更多个的任意组合。

[0428] 在一些情况下,聚合物部分C是cMAP-PEG共聚物、mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物或cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。在一些情况下,聚合物部分C是cMAP-PEG共聚物。在其他情况下,聚合物部分C是mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物。在另外的情况下,聚合物部分C是cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。

[0429] 在一些实施方案中,聚合物部分C缀合至多核酸分子、结合部分和可选的内体溶解部分。

[0430] 内体溶解部分

[0431] 在一些实施方案中,式(I)——A-X-B-Y-C——的分子进一步包含另外的缀合部分。在一些情况下,该另外的缀合部分是内体溶解部分。在一些情况下,该内体溶解部分是细胞区室释放组分,诸如能够从本领域已知的任何细胞区室释放的化合物,该细胞区室例

如是内体、溶酶体、内质网(ER)、高尔基体、微管、过氧化物酶体或细胞内的其他囊泡体。在一些情况下,该内体溶解部分包含内体溶解多肽、内体溶解聚合物、内体溶解脂质或内体溶解小分子。在一些情况下,该内体溶解部分包含内体溶解多肽。在其他情况下,该内体溶解部分包含内体溶解聚合物。

[0432] 内体溶解多肽

[0433] 在一些实施方案中,式(I)——A-X-B-Y-C——的分子进一步与内体溶解多肽缀合。在一些情况下,该内体溶解多肽是pH依赖性膜活性肽。在一些情况下,该内体溶解多肽是两亲性多肽。在另外的情况下,该内体溶解多肽是拟肽。在一些情况下,该内体溶解多肽包含INF、蜂毒肽、meucin或其各自的衍生物。在一些情况下,该内体溶解多肽包含INF或其衍生物。在其他情况下,该内体溶解多肽包含蜂毒肽或其衍生物。在另外的情况下,该内体溶解多肽包含meucin或其衍生物。

[0434] 在一些情况下,INF7为24个残基的多肽,其序列包含CGIFGEIEELIEEGLENLIDWGNA(SEQ ID NO:1243)或GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC(SEQ ID NO:1244)。在一些情况下,INF7或其衍生物包含以下序列:GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYGSGSCG(SEQ ID NO:1245)、GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG-(PEG)6-NH2(SEQ ID NO:1246)或GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG-SGSC-K(GalNAc)2(SEQ ID NO:1247)。

[0435] 在一些情况下,蜂毒肽是26个残基的多肽,其序列包含CLIGAILKVLATGLPTLISWIKNKRKQ(SEQ ID NO:1248)或GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ(SEQ ID NO:1249)。在一些情况下,蜂毒肽包含如美国专利8,501,930中描述的多肽序列。

[0436] 在一些情况下,meucin是来源于蝎子条斑钳蝎(Mesobuthus eupeus)的毒腺的抗微生物肽(AMP)。在一些情况下,meucin包括meucin-13和meucin-18,meucin-13的序列包含IFGAIAGLLKNIF-NH_2(SEQ ID NO:1250),meucin-18的序列包含FFGHLFKLATKIIPSLFQ(SEQ ID NO:1251)。

[0437] 在一些情况下,内体溶解多肽包括其序列与INF7或其衍生物、蜂毒肽或其衍生物或者meucin或其衍生物具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包括INF7或其衍生物、蜂毒肽或其衍生物或者meucin或其衍生物。

[0438] 在一些情况下,内体溶解部分是INF7或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1243-1247具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1243具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1244-1247具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:1243。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:1244-1247。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:1243组成。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:1244-1247组成。

[0439] 在一些情况下,内体溶解部分是蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1248或1249具有至少至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、

85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1248具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1249具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:1248。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:1249。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:1248组成。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:1249组成。

[0440] 在一些情况下,内体溶解部分是meucin或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1250或1251具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1250具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1251具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:1250。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:1251。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:1250组成。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:1251组成。

[0441] 在一些情况下,内体溶解部分包含如表10所示的序列。

[0442] 表10.

[0443]

名称	来源	氨基酸序列	SEQ ID NO:	类型
Pep-1	来自猿猴病毒40大抗原的NLS和HIV的逆转录酶	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	1252	一级 两亲性
pVEC	VE-钙粘着蛋白	LLIILRRRRIRKQAHAHSK	1253	一级 两亲性
VT5	合成肽	DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD	1254	β-折叠 两亲性
C105Y	1-抗胰蛋白酶	CSIPPEVKFNKPFVYLI	1255	-
穿膜肽	甘丙肽和肥大脱粒肽	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	1256	一级 两亲性
TP10	甘丙肽和肥大脱粒肽	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	1257	一级 两亲性
MPG	来自HIV gp41和SV40 T抗原的NLS的融合序列的疏水结构域	GALFLGFLGAAGSTMGA	1258	β-折叠 两亲性
gH625	I 型 HSV 的糖蛋白 gH	HGLASTLTRWAHYNALIRAF	1259	二级 两亲性 α-螺旋
CADY	PPTG1 肽	GLWRALWRLLRSLWRLLWRA	1260	二级 两亲性 α-

[0444]

				螺旋
GALA	合成肽	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA	1261	二级两亲性 α-螺旋
INF	流感 HA2 融合肽	GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC	1262	二级两亲性 α-螺旋/ pH 依赖性膜活性肽
HA2E5-TAT	流感病毒 X31 株融合肽的流感 HA2 亚单位	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG	1263	二级两亲性 α-螺旋/ pH 依赖性膜活性肽
HA2-penetratin	流感病毒 X31 株融合肽的流感 HA2 亚单位	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGRQIKIWFQNRRMKWKK-amide	1264	pH 依赖性膜活性肽
HA-K4	流感病毒 X31 株融合肽的流感 HA2 亚单位	GLFGAIAGFIENGWEGMIDG-SSKKKK	1265	pH 依赖性膜活性肽
HA2E4	流感病毒 X31 株融合肽的流感 HA2 亚单位	GLFEAIAGFIENGWEGMIDGGGYC	1266	pH 依赖性膜活性肽
H5WYG	HA2 类似物	GLFHAIAHFIHGGWHGLIHGWYG	1267	pH 依赖性膜活性肽
GALA-INF3-(PEG)6-NH	INF3 融合肽	GLFEAIEGFIENGWEGLAEALAEALEALAA-(PEG)6-NH2	1268	pH 依赖性膜活性肽
CM18-TAT11	抗菌肽-A-蜂毒肽 2-12（CM_{18}）融合肽	KWKLFKKIGAVLKVLTTG-YGRKKRRQRRR	1269	pH 依赖性膜活性肽

[0445] 在一些情况下,内体溶解部分包含Bak BH3多肽,后者通过拮抗抑制剂靶标如Bcl-2和/或Bcl-x_L诱导凋亡。在一些情况下,内体溶解部分包含Albarran等人,“Efficient intracellular delivery of a pro-apoptotic peptide with a pH-responsive carrier,”Reactive&Functional Polymers 71:261-265(2011)描述的Bak BH3多肽。

[0446] 在一些情况下,内体溶解部分包含PCT公开WO2013/166155或WO2015/069587中描述的多肽(例如,细胞穿透多肽)。

[0447] 内体溶解聚合物

[0448] 在一些实施方案中,式(I)——A-X-B-Y-C——的分子进一步与内体溶解聚合物缀合。如本文所用的,内体溶解聚合物包括直链、支链的网络、星形、梳形或梯形聚合物。在一些情况下,内体溶解聚合物是包含两种或更多种不同类型的单体的均聚物或共聚物。在一些情况下,内体溶解聚合物是聚阳离子聚合物。在其他情况下,内体溶解聚合物是聚阴离子聚合物。

[0449] 在一些情况下,聚阳离子聚合物包含带正电荷、为电荷中性或带负电荷的单体单元,并且净电荷为正。在其他情况下,聚阳离子聚合物包含含有两个或更多个正电荷的非聚合分子。示例性阳离子聚合物包括但不限于聚(L-赖氨酸)(PLL)、聚(L-精氨酸)(PLA)、聚乙烯亚胺(PEI)、聚[α-(4-氨基丁基)-L-乙醇酸](PAGA)、甲基丙烯酸2-(二甲基氨基)乙酯(DMAEMA)或甲基丙烯酸N,N-二乙基氨基乙酯(DEAEMA)。

[0450] 在一些情况下,聚阴离子聚合物包含带正电荷、为电荷中性或带负电荷的单体单元,并且净电荷为负。在其他情况下,聚阴离子聚合物包含含有两个或更多个负电荷的非聚合分子。示例性的阴离子聚合物包括聚(丙烯酸烷基酯)(例如,聚(丙烯酸丙酯)(PPAA))或聚(N-异丙基丙烯酰胺)(NIPAM)。另外的实例包括PP75——在Khormaee等人,"Edosomolytic anionic polymer for the cytoplasmic delivery of siRNAs in localized in vivo applications,"Advanced Functional Materials 23:565-574(2013)中描述的L-苯丙氨酸-聚(L-赖氨酸异邻苯二甲酰胺)聚合物。

[0451] 在一些实施方案中,本文所述的内体溶解聚合物是pH响应性内体溶解聚合物。pH响应性聚合物包括根据环境的pH而增大(溶胀)或塌缩的聚合物。聚丙烯酸和壳聚糖是pH响应性聚合物的实例。

[0452] 在一些情况下,本文描述的内体溶解部分是膜破坏性聚合物。在一些情况下,该膜破坏性聚合物包括阳离子聚合物、中性或疏水性聚合物或阴离子聚合物。在一些情况下,该膜破坏性聚合物是亲水性聚合物。

[0453] 在一些情况下,本文描述的内体溶解部分是pH响应性膜破坏性聚合物。示例性的pH响应性膜破坏性聚合物包括聚(烷基丙烯酸)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)(NIPAM)共聚物、琥珀酰化聚(缩水甘油)和聚(β-苹果酸)聚合物。

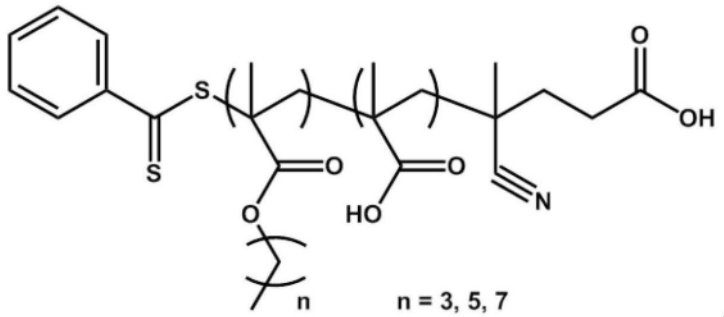
[0454] 在一些情况下,聚(烷基丙烯酸)包括聚(丙基丙烯酸)(polyPAA)、聚(甲基丙烯酸)(PMAA)、聚(乙基丙烯酸)(PEAA)和聚(丙基丙烯酸)(PPAA)。在一些情况下,聚(烷基丙烯酸)包括Jones等人,Biochemistry Journal 372:65-75(2003)中描述的聚(烷基丙烯酸)。

[0455] 在一些实施方案中,pH响应性膜破坏性聚合物包括聚(丙烯酸丁酯-共-甲基丙烯酸)。(参见Bulmus等人,Journal of Controlled Release 93:105-120(2003);和Yessine等人,Biochimica et Biophysica Acta 1613:28-38(2003))。

[0456] 在一些实施方案中,pH响应性膜破坏性聚合物包括聚(苯乙烯-马来酸酐)交替聚合物。(参见Henry等人,Biomacromolecules 7:2407-2414(2006))。

[0457] 一些实施方案中,pH响应性膜破坏性聚合物包括吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物,如聚(MAA-共-PDSA)、聚(EAA-共-PDSA)、聚(PAA-共-PDSA)、聚(MAA-共-BA-共-PDSA)、聚(EAA-共-BA-共-PDSA)或聚(PAA-共-BA-共-PDSA)聚合物。(参见El-Sayed等人,"Rational design of composition and activity correlations for pH-responsive and glutathione-reactive polymer therapeutics,"Journal of Controlled Release104:417-427(2005);或Flanary等人,"Antigen delivery with poly(propylacrylic acid)conjugation enhanced MHC-1presentation and T-cell activation,"Bioconjugate Chem.20:241-248(2009))。

[0458] 在一些实施方案中,pH响应性膜破坏性聚合物包括包含以下基本结构的溶解性聚合物:

[0459] 

[0460] 在一些情况下,本文所述的内体溶解部分进一步缀合至另外的缀合物,例如聚合物(例如,PEG)或修饰的聚合物(例如,胆固醇修饰的聚合物)。

[0461] 在一些情况下,所述另外的缀合物包括去污剂(例如,Triton X-100)。在一些情况下,本文所述的内体溶解部分包含与去污剂(例如,Triton X-100)缀合的聚合物(例如,聚(酰胺基胺))。在一些情况下,本文所述的内体溶解部分包含聚(酰胺基胺)-Triton X-100缀合物(Duncan等人,"A polymer-Triton X-100conjugate capable of pH-dependent red blood cell lysis:a model system illustrating the possibility of drug delivery within acidic intracellular compartments,"Journal of Drug Targeting 2:341-347(1994))。

[0462] 内体溶解脂质

[0463] 在一些实施方案中,所述内体溶解部分是脂质(例如,促融合脂质)。在一些实施方案中,式(I)——A-X-B-Y-C——的分子进一步与内体溶解脂质(例如,促融合脂质)缀合。示例性促融合脂质包括1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-醇(Di-Lin)、N-甲基(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊环-4-基)甲胺(DLin-k-DMA)和N-甲基-2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊环-4-基)乙胺(XTC)。

[0464] 在一些情况下,内体溶解部分是PCT公开WO09/126,933中描述的脂质(例如,促融合脂质)。

[0465] 内体溶解小分子

[0466] 在一些实施方案中,所述内体溶解部分是小分子。在一些实施方案中,式(I)——A-X-B-Y-C——的分子进一步与内体溶解小分子缀合。适合作为内体溶解部分的示例性小分子包括但不限于奎宁、氯喹、羟基氯喹、氨酚喹(carnoquine)、阿莫吡喹、伯氨喹、甲氟喹、nivaquine、卤泛群、醌亚胺或其组合。在一些情况下,喹啉内体溶解部分包括但不限于7-氯-4-(4-二乙基氨基-1-甲基丁基-氨基)喹啉(氯喹);7-氯-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基-氨基)喹啉(羟基氯喹);7-氟-4-(4-二乙基氨基-1-甲基丁基-氨基)喹啉;4-(4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(4-二乙基-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉(脱甲基氯喹);7-氟-4-(4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉);4-(4-二乙基-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-二乙基-氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-二乙基-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲

基丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;4-(4-乙基-(2-羟基-乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基-)喹啉;7-羟基-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;磷酸羟基氯喹;7-氯-4-(4-乙基-(2-羟基乙基-1)-氨基-1-丁基氨基)喹啉(脱甲基羟基氯喹);7-氟-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;8-[(4-氨基戊基)氨基-6-甲氧基喹啉二盐酸盐;1-乙酰基-1,2,3,4-四氢喹啉;8-[(4-氨基戊基)氨基]-6-甲氧基喹啉二盐酸盐;1-丁酰基-1,2,3,4-四氢喹啉;3-氯-4-(4-羟基-α,α'-双(2-甲基-1-吡咯烷基)-2,5-二甲苯氨基喹啉,4-[(4-二乙基-氨基)-1-甲基丁基-氨基]-6-甲氧基喹啉;3-氟-4-(4-羟基-α,α'-双(2-甲基-1-吡咯烷基)-2,5-二甲苯氨基喹啉,4-[(4-二乙基氨基)-1-甲基丁基-氨基]-6-甲氧基喹啉;4-(4-羟基-α,α'-双(2-甲基-1-吡咯烷基)-2,5-二甲苯氨基喹啉;4-[(4-二乙基氨基)-1-甲基丁基-氨基]-6-甲氧基喹啉;3,4-二氢-1-(2H)-喹啉羧基醛;1,1′-五亚甲基二喹啉鎓二碘化物;8-羟基喹啉硫酸盐及其氨基、醛、羧基、羟基、卤素、酮基、巯基和乙烯基衍生物或类似物。在一些情况下,内体溶解部分是Naisbitt等人(1997,J Pharmacol Exp Therapy 280:884-893)和美国专利5,736,557中描述的小分子。

[0467] 式(I)分子-内体溶解部分缀合物

[0468] 在一些实施方案中,一个或多个内体溶解部分缀合至包含至少一个结合部分、至少一个多核苷酸、至少一个聚合物或其任意组合的分子。在一些情况下,该内体溶解部分根据式(II)缀合:

[0469] $(A-X-B-Y-C_c)-L-D$

[0470] 式II

[0471] 其中,

[0472] A为结合部分;

[0473] B为多核苷酸;

[0474] C为聚合物;

[0475] X为键或第一连接体;

[0476] Y为键或第二连接体;

[0477] L为键或第三连接体;

[0478] D为内体溶解部分;且

[0479] c为0至1的整数;并且

[0480] 其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸;并且D缀合在A、B或C上的任何地方。

[0481] 在一些实施方案中,A和C不连接至B的同一末端。

[0482] 在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些情况下,所述至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯基核酸(ENA)。在一些情况下,所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接或二硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交以形成双链多核酸分子的第二多核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸包含至少一个修饰。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为RNA分子。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为siRNA分子。在一些实施方案中,X、Y和L独立地为键或非聚合连接体基团。在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,该抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。在一些情况下,C为聚乙二醇。

[0483] 在一些情况下,所述内体溶解部分包含多肽、聚合物、脂质或小分子。在一些情况下,该内体溶解部分是内体溶解多肽。在一些情况下,该内体溶解部分是内体溶解聚合物。在其他情况下,该内体溶解部分是内体溶解脂质。在另外的情况下,该内体溶解部分是内体溶解小分子。

[0484] 在一些情况下,所述内体溶解部分是INF7或其衍生物。在一些情况下,该内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1243具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,该内体溶解部分包含SEQ ID NO:1243。在一些情况下,该内体溶解部分由SEQ ID NO:1243组成。

[0485] 在一些情况下,所述内体溶解部分是蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,该内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1248具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,该内体溶解部分包含SEQ ID NO:1248。在一些情况下,该内体溶解部分由SEQ ID NO:1248组成。

[0486] 在一些情况下,所述内体溶解部分是如表10中所示的序列。

[0487] 在另外的情况下,所述内体溶解部分是内体溶解聚合物,例如pH响应性内体溶解聚合物、膜破坏性聚合物、聚阳离子聚合物、聚阴离子聚合物、pH响应性膜破坏性聚合物或其组合。在另外的情况下,该内体溶解部分包括聚(烷基丙烯酸)聚合物、聚(丙烯酸丁酯-共-甲基丙烯酸)聚合物、聚(苯乙烯-马来酸酐)交替聚合物、吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物、聚合物-PEG缀合物、聚合物-去污剂缀合物或其组合。

[0488] 在一些实施方案中,所述内体溶解部分缀合物为式(IIa):

[0489] D-L-A-X-B-Y-C_c

[0490] 式IIa

[0491] 其中,

[0492] A为结合部分;

[0493] B为多核苷酸;

[0494] C为聚合物;

[0495] X为键或第一连接体;

[0496] Y为键或第二连接体;

[0497] L为键或第三连接体;

[0498] D为内体溶解部分;且

[0499] c为整数1;并且

[0500] 其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸。

[0501] 在一些实施方案中,A和C不连接至B的同一末端。

[0502] 在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些情况下,所述至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯基核酸(ENA)。在一些情况下,所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接或二硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交以形成双链多核酸分子的第二多核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸包含至少一个修饰。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为RNA分子。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为siRNA分子。在一些实施方案中,X、Y和L独立地为键或非聚合连接体基团。在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,该抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。在一些情况下,C为聚乙二醇。

[0503] 在一些情况下,所述内体溶解部分包含多肽、聚合物、脂质或小分子。在一些情况下,该内体溶解部分是内体溶解多肽。在一些情况下,该内体溶解部分是内体溶解聚合物。在其他情况下,该内体溶解部分是内体溶解脂质。在另外的情况下,该内体溶解部分是内体溶解小分子。

[0504] 在一些情况下,所述内体溶解部分是INF7或其衍生物。在一些情况下,该内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1243具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,该内体溶解部分包含SEQ ID NO:1243。在一些情况下,该内体溶解部分由SEQ ID NO:1243组成。

[0505] 在一些情况下,所述内体溶解部分是蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,该内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1248具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,该内体溶解部分包含SEQ ID NO:1248。在一些情况下,该内体溶解部分由SEQ ID NO:1248组成。

[0506] 在一些情况下,所述内体溶解部分是如表10中所示的序列。

[0507] 在另外的情况下,所述内体溶解部分为内体溶解聚合物,例如pH响应性内体溶解聚合物、膜破坏性聚合物、聚阳离子聚合物、聚阴离子聚合物、pH响应性膜破坏性聚合物或其组合。在另外的情况下,该内体溶解部分包括聚(烷基丙烯酸)聚合物、聚(丙烯酸丁酯-共-甲基丙烯酸)聚合物、聚(苯乙烯-马来酸酐)交替聚合物、吡啶基二硫化物丙烯酸酯

(PDSA)聚合物、聚合物-PEG缀合物、聚合物-去污剂缀合物或其组合。

[0508] 在一些情况下,所述内体溶解部分缀合物为式(IIb):

[0509] A-X-B-L-D

[0510] 式IIb

[0511] 其中,

[0512] A为结合部分;

[0513] B为多核苷酸;

[0514] X为键或第一连接体;

[0515] L为键或第三连接体;且

[0516] D为内体溶解部分;并且

[0517] 其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸。

[0518] 在一些实施方案中,A和C不连接至B的同一末端。

[0519] 在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些情况下,所述至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯基核酸(ENA)。在一些情况下,所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接或二硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交以形成双链多核酸分子的第二多核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸包含至少一个修饰。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为RNA分子。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为siRNA分子。在一些实施方案中,X和L独立地为键或非聚合连接体基团。在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,该抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。在一些情况下,C为聚乙二醇。

[0520] 在一些情况下,所述内体溶解部分包含多肽、聚合物、脂质或小分子。在一些情况下,该内体溶解部分是内体溶解多肽。在一些情况下,该内体溶解部分是内体溶解聚合物。在其他情况下,该内体溶解部分是内体溶解脂质。在另外的情况下,该内体溶解部分是内体溶解小分子。

[0521] 在一些情况下,所述内体溶解部分是INF7或其衍生物。在一些情况下,该内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1243具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,该内体溶解部分包含SEQ ID NO:1243。在一些情况下,该内体溶解部分由SEQ ID NO:1243组成。

[0522] 在一些情况下,所述内体溶解部分是蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,该内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1248具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,该内体溶解部分包含SEQ ID NO:1248。在一些情况下,该内体溶解部分由SEQ ID NO:1248组成。

[0523] 在一些情况下,所述内体溶解部分是如表10中所示的序列。

[0524] 在另外的情况下,所述内体溶解部分为内体溶解聚合物,例如pH响应性内体溶解聚合物、膜破坏性聚合物、聚阳离子聚合物、聚阴离子聚合物、pH响应性膜破坏性聚合物或其组合。在另外的情况下,该内体溶解部分包括聚(烷基丙烯酸)聚合物、聚(丙烯酸丁酯-共-甲基丙烯酸)聚合物、聚(苯乙烯-马来酸酐)交替聚合物、吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物、聚合物-PEG缀合物、聚合物-去污剂缀合物或其组合。

[0525] 在一些情况下,所述内体溶解部分缀合物为式(IIc):

[0526] $A\text{-}X\text{-}B\text{-}Y\text{-}C_c\text{-}L\text{-}D$

[0527] 式IIc

[0528] 其中,

[0529] A为结合部分;

[0530] B为多核苷酸;

[0531] C为聚合物;

[0532] X为键或第一连接体;

[0533] Y为键或第二连接体;

[0534] L为键或第三连接体;

[0535] D为内体溶解部分;且

[0536] c为整数1;并且

[0537] 其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的核苷酸。

[0538] 在一些实施方案中,A和C不连接至B的同一末端。

[0539] 在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些情况下,所述至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯基核酸(ENA)。在一些情况下,所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接或二硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交以形成双链多核酸分子的第二多核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸包含至少一个修饰。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为RNA分子。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为siRNA分子。在一些实施方案中,X、Y和L独立地为键或非聚合连接体基团。在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,该抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。在一些情况下,C为聚乙二醇。

[0540] 在一些情况下,所述内体溶解部分包含多肽、聚合物、脂质或小分子。在一些情况下,该内体溶解部分是内体溶解多肽。在一些情况下,该内体溶解部分是内体溶解聚合物。在其他情况下,该内体溶解部分是内体溶解脂质。在另外的情况下,该内体溶解部分是内体溶解小分子。

[0541] 在一些情况下,该内体溶解部分是INF7或其衍生物。在一些情况下,该内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1243具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、

95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,该内体溶解部分包含SEQ ID NO:1243。在一些情况下,该内体溶解部分由SEQ ID NO:1243组成。

[0542] 在一些情况下,所述内体溶解部分是蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,该内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1248具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,该内体溶解部分包含SEQ ID NO:1248。在一些情况下,该内体溶解部分由SEQ ID NO:1248组成。

[0543] 在一些情况下,所述内体溶解部分是如表10中所示的序列。

[0544] 在另外的情况下,所述内体溶解部分为内体溶解聚合物,例如pH响应性内体溶解聚合物、膜破坏性聚合物、聚阳离子聚合物、聚阴离子聚合物、pH响应性膜破坏性聚合物或其组合。在另外的情况下,该内体溶解部分包括聚(烷基丙烯酸)聚合物、聚(丙烯酸丁酯-共-甲基丙烯酸)聚合物、聚(苯乙烯-马来酸酐)交替聚合物、吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物、聚合物-PEG缀合物、聚合物-去污剂缀合物或其组合。

[0545] 在一些情况下,所述内体溶解部分缀合物为式(IId):

[0546] $A\text{-}L\text{-}D\text{-}X\text{-}B\text{-}Y\text{-}C_c$

[0547] 式IId

[0548] 其中,

[0549] A为结合部分;

[0550] B为多核苷酸;

[0551] C为聚合物;

[0552] X为键或第一连接体;

[0553] Y为键或第二连接体;

[0554] L为键或第三连接体;

[0555] D为内体溶解部分;且

[0556] c为整数1;并且

[0557] 其中所述多核苷酸包含至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的核苷酸。

[0558] 在一些实施方案中,A和C不连接至B的同一末端。

[0559] 在一些实施方案中,所述至少一个2’修饰的核苷酸包含2’-O-甲基、2’-O-甲氧基乙基(2’-O-MOE)、2’-O-氨基丙基、2’-脱氧、T-脱氧-2’-氟代、2’-O-氨基丙基(2’-O-AP)、2’-O-二甲基氨基乙基(2’-O-DMAOE)、2’-O-二甲基氨基丙基(2’-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2’-O-DMAEOE)或2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些情况下,所述至少一个2’修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯基核酸(ENA)。在一些情况下,所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接或二硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交以形成双链多核酸分子的第二多核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸包含至少一个修饰。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为RNA分子。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为siRNA分子。在一些实施方案中,X、Y和L独立地为键或非聚合连接体基团。在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,该抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab’、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。在

一些情况下,C为聚乙二醇。

[0560] 在一些情况下,所述内体溶解部分包含多肽、聚合物、脂质或小分子。在一些情况下,该内体溶解部分是内体溶解多肽。在一些情况下,该内体溶解部分是内体溶解聚合物。在其他情况下,该内体溶解部分是内体溶解脂质。在另外的情况下,该内体溶解部分是内体溶解小分子。

[0561] 在一些情况下,该内体溶解部分是INF7或其衍生物。在一些情况下,该内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1243具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,该内体溶解部分包含SEQ ID NO:1243。在一些情况下,该内体溶解部分由SEQ ID NO:1243组成。

[0562] 在一些情况下,所述内体溶解部分是蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,该内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1248具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,该内体溶解部分包含SEQ ID NO:1248。在一些情况下,该内体溶解部分由SEQ ID NO:1248组成。

[0563] 在一些情况下,所述内体溶解部分是如表10中所示的序列。

[0564] 在另外的情况下,所述内体溶解部分为内体溶解聚合物,例如pH响应性内体溶解聚合物、膜破坏性聚合物、聚阳离子聚合物、聚阴离子聚合物、pH响应性膜破坏性聚合物或其组合。在另外的情况下,该内体溶解部分包括聚(烷基丙烯酸)聚合物、聚(丙烯酸丁酯-共-甲基丙烯酸)聚合物、聚(苯乙烯-马来酸酐)交替聚合物、吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物、聚合物-PEG缀合物、聚合物-去污剂缀合物或其组合。

[0565] 连接体

[0566] 在一些实施方案中,本文所述的连接体是可切割连接体或不可切割连接体。在一些情况下,该连接体是可切割连接体。在一些情况下,该连接体是酸可切割的连接体。在一些情况下,该连接体是不可切割连接体。在一些情况下,该连接体包括C_1-C_6烷基(例如,C_5、C_4、C_3、C_2或C_1烷基)。在一些情况下,该连接体包括同双官能交联体、异双官能交联体等。在一些情况下,该连接体是无痕连接体(或零长度连接体)。在一些情况下,该连接体是非聚合连接体。在一些情况下,该连接体非肽连接体或不含氨基酸残基的连接体。

[0567] 在一些情况下,所述连接体包括同双官能连接体。示例性的同双官能连接体包括但不限于Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3′3′-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯(磺基DST)、双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)乙二醇酯(EGS)、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯(DSG)、N,N′-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)、二甲基己二酰亚胺酯(DMA)、二甲基庚二酰亚胺酯(DMP)、二甲基辛二酰亚胺酯(DMS)、二甲基-3,3′-二硫代双丙酰亚胺酯(DTBP)、1,4-二-3′-(2′-吡啶基二硫代)丙酰胺基)丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺己烷(BMH)、含芳基卤的化合物(DFDNB)如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4′-二氟-3,3′-二硝基苯基砜(DFDNPS)、双-[β-(4-叠氮基水杨基氨基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻甲苯胺、3,3′-二甲基联苯胺、联苯胺、α,α′-对二氨基联苯、二碘-对二甲苯磺酸、N,N′-亚乙基-双(碘乙酰胺)或N,N′-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。

[0568] 在一些实施方案中,所述连接体包括异双官能连接体。示例性的异双官能连接体

包括但不限于胺反应性和巯基交联体,诸如N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代)甲苯酰胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBs)、间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBs)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)琥珀酰亚胺酯(GMBs)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBs)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基)氨基)己酸酯(sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((碘磺基琥珀酰亚胺)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘磺基琥珀酰亚胺)氨基)甲基)环己烷-1-甲酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-((((4-碘磺基琥珀酰亚胺)氨基)甲基)环己烷-1-羰基)氨基)己酸酯(sIACX)、对-硝基苯基碘乙酸酯(NPIA);羰基反应性和巯基反应性交联体,诸如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼-8(M_2C_2H)、3-(2-吡啶基二硫代)丙酰基酰肼(PDPH);胺反应性和光反应性交联体,诸如N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基水杨基酰胺基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(ρ-叠氮基水杨基酰胺基)乙基-1,3′-二硫丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4′-叠氮基-2′-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4′-叠氮基-2′-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰基氧琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间-叠氮基-邻-硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3′-二硫代丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基)1,3′-二硫代丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3′-二硫代丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(ρ-叠氮基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3′-二硫代丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酸酯(磺基-sAMCA)、ρ-硝基苯基重氮基丙酮酸酯(ρNPDP)、ρ-硝基苯基-2-重氮基-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP);巯基反应性和光反应性交联体,诸如1-(ρ-叠氮基水杨基酰胺基)-4-(碘乙酰胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(ρ-叠氮基水杨基酰胺基)丁基]-3′-(2′-吡啶基二硫代)丙酰胺(APDP)、二苯甲酮-4-碘乙酰胺、二苯甲酮-4-马来酰亚胺;羰基反应性和光反应性交联体,诸如ρ-叠氮基苯甲酰基酰肼(ABH);羧酸酯反应性和光反应性交联体,诸如4-(ρ-叠氮基水杨基酰胺基)丁胺(AsBA);以及精氨酸反应性和光反应性交联体,诸如ρ-叠氮基苯基乙二醛(APG)。

[0569] 在一些情况下,所述连接体包含反应性官能团。在一些情况下,该反应性官能团包含对结合部分上存在的亲电子基团具有反应性的亲核基团。示例性的亲电子基团包括羰基,如醛、酮、羧酸、酯、酰胺、烯酮、酰卤或酸酐。在一些实施方案中,该反应性官能团是醛。

示例性的亲核基团包括酰肼、肟、氨基、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯和芳基肼。

[0570] 在一些实施方案中,所述连接体包含马来酰亚胺基团。在一些情况下,马来酰亚胺基团也被称为马来酰亚胺间隔基。在一些情况下,该马来酰亚胺基团进一步包含己酸,形成马来酰亚胺己酰基(mc)。在一些情况下,该连接体包含马来酰亚胺己酰基(mc)。在一些情况下,该连接体是马来酰亚胺己酰基(mc)。在其他情况下,该马来酰亚胺基团包括马来酰亚胺甲基,例如如上所述的琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。

[0571] 在一些实施方案中,所述马来酰亚胺基团是自稳定的马来酰亚胺。在一些情况下,自稳定的马来酰亚胺利用二氨基丙酸(DPR)并入邻近马来酰亚胺的碱性氨基,以提供硫代琥珀酰亚胺环水解的分子内催化,从而阻止马来酰亚胺发生通过逆迈克尔反应的消除反应。在一些情况下,自稳定的马来酰亚胺是Lyon等人,"Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates,"Nat.Biotechnol.32(10):1059-1062(2014)描述的马来酰亚胺基团。在一些情况下,所述连接体包含自稳定的马来酰亚胺。在一些情况下,所述连接体是自稳定的马来酰亚胺。

[0572] 在一些实施方案中,所述连接体包含肽部分。在一些情况下,该肽部分包含至少2、3、4、5、6、7、8个或更多个氨基酸残基。在一些情况下,该肽部分是可切割的肽部分(例如,酶促或化学地)。在一些情况下,该肽部分是不可切割的肽部分。在一些情况下,该肽部分包含Val-Cit(缬氨酸-瓜氨酸)、Gly-Gly-Phe-Gly(SEQ ID NO:2111)、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:2112)或Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:2113)。在一些情况下,所述连接体包含肽部分,诸如:Val-Cit(缬氨酸-瓜氨酸)、Gly-Gly-Phe-Gly(SEQ ID NO:2111)、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:2112)或Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:2113)。在一些情况下,所述连接体包含Val-Cit。在一些情况下,所述连接体是Val-Cit。

[0573] 在一些实施方案中,所述连接体包含苯甲酸基团或其衍生物。在一些情况下,该苯甲酸基团或其衍生物包含对氨基苯甲酸(PABA)。在一些情况下,该苯甲酸基团或其衍生物包含γ-氨基丁酸(GABA)。

[0574] 在一些实施方案中,所述连接体包含任意组合的马来酰亚胺基团、肽部分和/或苯甲酸基团中的一种或多种。在一些实施方案中,所述连接体包含马来酰亚胺基团、肽部分和/或苯甲酸基团的组合。在一些情况下,该马来酰亚胺基团是马来酰亚胺己酰基(mc)。在一些情况下,该肽基团是val-cit。在一些情况下,该苯甲酸基团是PABA。在一些情况下,所述连接体包含mc-val-cit基团。在一些情况下,所述连接体包含val-cit-PABA基团。在另外的情况下,所述连接体包含mc-val-cit-PABA基团。

[0575] 在一些实施方案中,所述连接体是自牺牲连接体或自消除连接体。在一些情况下,所述连接体是自牺牲连接体。在其他情况下,所述连接体是自消除连接体(例如,环化自消除连接体)。在一些情况下,所述连接体包括美国专利9,089,614或PCT公开WO2015038426中描述的连接体。

[0576] 在一些实施方案中,所述连接体是树枝型连接体。在一些情况下,该树枝型连接体包含支化的多官能连接体部分。在一些情况下,该树枝型连接体用来增加多核苷酸B与结合部分A的摩尔比。在一些情况下,该树枝型连接体包含PAMAM树枝状高分子。

[0577] 在一些实施方案中,所述连接体是无痕连接体或者在切割后不会给结合部分A、多核苷酸B、聚合物C或内体溶解部分D留下连接体部分(例如,原子或连接体基团)的连接体。示例性的无痕连接体包括但不限于锗连接体、硅连接体、硫连接体、硒连接体、氮连接体、磷连接体、硼连接体、铬连接体或苯肼连接体。在一些情况下,所述连接体是如Hejesen等人,"A traceless aryl-triazene linker for DNA-directed chemistry,"Org Biomol Chem 11(15):2493-2497(2013)描述的无痕芳基-三氮烯连接体。在一些情况下,所述连接体是Blaney等人,"Traceless solid-phase organic synthesis,"Chem.Rev.102:2607-2024(2002)描述的无痕连接体。在一些情况下,连接体是美国专利6,821,783中描述的无痕连接体。

[0578] 在一些情况下,所述连接体包含在连接体与缀合部分(例如,本文所述的A、B、C或D)之间的键合位点处发挥立体位阻作用的官能团。在一些情况下,该立体位阻是二硫键周围的立体位阻。表现出立体位阻的示例性连接体包括异双官能连接体,如以上描述的异双官能连接体。在一些情况下,表现出立体位阻的连接体包括SMCC和SPDB。

[0579] 在一些情况下,所述连接体是酸可切割的连接体。在一些情况下,该酸可切割的连接体包含易于水解切割的腙键。在一些情况下,该酸可切割的连接体包含硫代马来酰胺酸连接体。在一些情况下,该酸可切割的连接体是如Castaneda等人,"Acid-cleavable thiomaleamic acid linker for homogeneous antibody-drug conjugation," Chem.Commun.49:8187-8189(2013)中描述的硫代马来酰胺酸连接体。

[0580] 在一些情况下,所述连接体是以下文献中描述的连接体:美国专利6,884,869;7,498,298;8,288,352;8,609,105;或8,697,688;美国专利公开2014/0127239;2013/028919;2014/286970;2013/0309256;2015/037360;或2014/0294851;或者PCT公开WO2015057699;WO2014080251;WO2014197854;WO2014145090;或WO2014177042。

[0581] 在一些实施方案中,X、Y和L独立地为键或连接体。在一些情况下,X、Y和L独立地为键。在一些情况下,X、Y和L独立地为连接体。

[0582] 在一些情况下,X为键或连接体。在一些情况下,X为键。在一些情况下,X为连接体。在一些情况下,该连接体为C_1-C_6烷基。在一些情况下,X为C_1-C_6烷基,例如,C_5、C_4、C_3、C_2或C_1烷基。在一些情况下,该C_1-C_6烷基是未取代的C_1-C_6烷基。如在连接体的语境中,特别是在X的语境中所使用的,烷基意指含有最多六个碳原子的饱和直链或支链烃基团。在一些情况下,X为非聚合连接体。在一些情况下,X包括以上所述的同双官能连接体或异双官能连接体。在一些情况下,X包括异双官能连接体。在一些情况下,X包括sMCC。在其他情况下,X包括任选地缀合至C_1-C_6烷基的异双官能连接体。在其他情况下,X包括任选地缀合至C_1-C_6烷基的sMCC。在另外的情况下,X不包括上文描述的同双官能连接体或异双官能连接体。

[0583] 在一些情况下,Y为键或连接体。在一些情况下,Y为键。在其他情况下,Y为连接体。在一些实施方案中,Y为C_1-C_6烷基。在一些情况下,Y为以上所述的同双官能连接体或异双官能连接体。在一些情况下,Y为以上所述的同双官能连接体。在一些情况下,Y为以上所述的异双官能连接体。在一些情况下,Y包含马来酰亚胺基团,诸如上述马来酰亚胺基已酰基

(mc)或自稳定的马来酰亚胺基团。在一些情况下,Y包含肽部分,如Val-Cit。在一些情况下,Y包含苯甲酸基团,如PABA。在另外的情况下,Y包含马来酰亚胺基团、肽部分和/或苯甲酸基团的组合。在另外的情况下,Y包含mc基团。在另外的情况下,Y包含mc-val-cit基团。在另外的情况下,Y包含val-cit-PABA基团。在另外的情况下,Y包含mc-val-cit-PABA基团。

[0584] 在一些情况下,L为键或连接体。在一些情况下,L为键。在其他情况下,L为连接体。在一些实施方案中,L为C_1-C_6烷基。在一些情况下,L为以上所述的同双官能连接体或异双官能连接体。在一些情况下,L为以上所述的同双官能连接体。在一些情况下,L为以上所述的异双官能连接体。在一些情况下,L包含马来酰亚胺基团,诸如上述马来酰亚胺己酰基(mc)或自稳定的马来酰亚胺基团。在一些情况下,L包含肽部分,如Val-Cit。在一些情况下,L包含苯甲酸基团,如PABA。在另外的情况下,L包含马来酰亚胺基团、肽部分和/或苯甲酸基团的组合。在另外的情况下,L包含mc基团。在另外的情况下,L包含mc-val-cit基团。在另外的情况下,L包含val-cit-PABA基团。在另外的情况下,L包含mc-val-cit-PABA基团。

[0585] 使用方法

[0586] 在一些实施方案中,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗疾病或病症。在一些情况下,该疾病或病症为癌症。在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂用作治疗疾病或病症的免疫疗法。在一些情况下,该免疫疗法为免疫肿瘤学疗法。

[0587] 癌症

[0588] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂用于治疗癌症。在一些情况下,该癌症为实体瘤。在一些情况下,该癌症为血液系统恶性肿瘤。在一些情况下,该癌症为复发性或难治性癌症,或者转移性癌症。在一些情况下,该实体瘤为复发性或难治性实体瘤,或者转移性实体瘤。在一些情况下,该血液系统恶性肿瘤为复发性或难治性血液系统恶性肿瘤,或者转移性血液系统恶性肿瘤。

[0589] 在一些实施方案中,所述癌症为实体瘤。示例性的实体瘤包括但不限于肛门癌、阑尾癌、胆道癌(即胆管癌)、膀胱癌、脑肿瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、原发性不明癌症(CUP)、食管癌、眼癌、输卵管癌、胃肠癌、肾癌、肝癌、肺癌、髓母细胞瘤、黑素瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁腺疾病、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、直肠癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、喉癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌或外阴癌。

[0590] 在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗实体瘤。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗肛门癌、阑尾癌、胆道癌(即胆管癌)、膀胱癌、脑肿瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、原发性不明癌症(CUP)、食管癌、眼癌、输卵管癌、胃肠癌、肾癌、肝癌、肺癌、髓母细胞瘤、黑素瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁腺疾病、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、直肠癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、喉癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌或外阴癌。在一些情况下,该实体瘤为复发性或难治性实体瘤,或者转移性实体瘤。

[0591] 在一些情况下,所述癌症为血液系统恶性肿瘤。在一些情况下,该血液系统恶性肿瘤为白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤。在一些情况下,该血液系统恶性肿瘤包括慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、高风险CLL、非CLL/SLL淋巴瘤、幼淋巴细胞白血病(PLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细

胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高恶性B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞性骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿。

[0592] 在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗血液系统恶性肿瘤。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤。在一些情况下,该血液系统恶性肿瘤包括慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、高风险CLL、非CLL/SLL淋巴瘤、幼淋巴细胞白血病(PLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高恶性B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿。在一些情况下,该血液系统恶性肿瘤为复发性或难治性血液系统恶性肿瘤,或者转移性血液系统恶性肿瘤。

[0593] 在一些情况下,所述癌症为KRAS相关癌症、EGFR相关癌症、AR相关癌症、HPRT1相关癌症或β-联蛋白相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗KRAS相关癌症、EGFR相关癌症、AR相关癌症、HPRT1相关癌症或β-联蛋白相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗KRAS相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗EGFR相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗AR相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗HPRT1相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗β-联蛋白相关癌症。在一些情况下,该癌症为实体瘤。在一些情况下,该癌症为血液系统恶性肿瘤。在一些情况下,该实体瘤为复发性或难治性实体瘤,或者转移性实体瘤。在一些情况下,该血液系统恶性肿瘤为复发性或难治性血液系统恶性肿瘤,或者转移性血液系统恶性肿瘤。在一些情况下,该癌症包括膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、多形性胶质母细胞瘤、头颈癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、急性髓样白血病、CLL、DLBCL或多发性骨髓瘤。在一些情况下,该β-联蛋白相关癌症进一步包括PIK3C相关癌症和/或MYC相关癌症。

[0594] 免疫疗法

[0595] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂用作治疗疾病或病症的免疫疗法。在一些情况下,该免疫疗法为免疫肿瘤学疗法。在一些情况下,该免疫-肿瘤学疗法被分类为主动、被动或组合(主动和被动)方法。例如,在主动免疫肿瘤学治疗方法中,肿瘤相关抗原(TAA)被呈递给免疫系统以触发对呈递这些TAA的癌细胞的攻击。在一些情况下,主动免疫肿瘤学治疗方法包括肿瘤靶向剂和/或免疫靶向剂(例如,检查点抑制剂,如单克隆抗

体)和/或疫苗,如原位疫苗接种和/或基于细胞或非基于细胞(例如,基于树突细胞、基于肿瘤细胞、抗原、抗独特型、DNA或基于载体)的疫苗。在一些情况下,基于细胞的疫苗是使用从患者自身的免疫系统获得的活化免疫细胞产生的疫苗,其随后由患者自身的癌症激活。在一些情况下,主动免疫肿瘤学疗法进一步被细分为非特异性主动免疫疗法和特异性主动免疫疗法。在一些情况下,非特异性主动免疫疗法利用细胞因子和/或其他细胞信号传导组分来诱导全身性免疫系统应答。在一些情况下,特异性主动免疫疗法利用特异性TAA来引发免疫应答。

[0596] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂用作治疗疾病或病症(例如,癌症)的主动免疫肿瘤学治疗方法。在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂包含肿瘤靶向剂。在一些情况下,肿瘤靶向剂包含在结合部分A中。在其他情况下,肿瘤靶向剂是与式(I)分子联合使用的另外的药剂。在一些情况下,肿瘤靶向剂是肿瘤定向的多肽(例如,肿瘤定向的抗体)。在一些情况下,肿瘤靶向剂是肿瘤定向的抗体,其通过诸如直接杀伤(例如,信号传导诱导的凋亡)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)等机制发挥其抗肿瘤活性。在另外的情况下,肿瘤靶向剂引发适应性免疫应答,诱导抗肿瘤T细胞。

[0597] 在一些实施方案中,结合部分A是肿瘤定向的多肽(例如,肿瘤定向的抗体)。在一些情况下,结合部分A是肿瘤定向的抗体,其通过诸如直接杀伤(例如,信号传导诱导的凋亡)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)等机制发挥其抗肿瘤活性。在另外的情况下,结合部分A引发适应性免疫应答,诱导抗肿瘤T细胞。

[0598] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂包含免疫靶向剂。在一些情况下,免疫靶向剂包含在结合部分A中。在其他情况下,免疫靶向剂是与式(I)分子联合使用的另外的药剂。在一些情况下,免疫靶向剂包括细胞因子、检查点抑制剂或其组合。

[0599] 在一些实施方案中,所述免疫靶向剂是检查点抑制剂。在一些情况下,免疫检查点分子是存在于CD4和/或CD8 T细胞的细胞表面上的分子。示例性的免疫检查点分子包括但不限于程序性死亡配体1(PD-L1,也称为B7-H1、CD274)、程序性死亡1(PD-1)、CTLA-4、B7H1、B7H4、OX-40、CD137、CD40、2B4、IDO1、IDO2、VISTA、CD27、CD28、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、CD80、CD86、PDL2、B7H3、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2aR、MARCO(具有胶原结构的巨噬细胞受体)、PS(磷酯酰丝氨酸)、ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)、HAVCR2、CD276、VTCN1、CD70和CD160。

[0600] 在一些情况下,免疫检查点抑制剂是指调节或抑制免疫检查点分子活性的任何分子。在一些情况下,免疫检查点抑制剂包括抗体、抗体衍生物(例如,Fab片段、scFv、微抗体、双抗体)、反义寡核苷酸、siRNA、适体或肽。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂为程序性死亡配体1(PD-L1,也称为B7-H1、CD274)、程序性死亡1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137,CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO(具有胶原结构的巨噬细胞受体)、PS(磷酯酰丝氨酸)、OX-40、SLAM、TIGHT、VISTA、VTCN1或其任意组合的抑制剂。

[0601] 在一些实施方案中,示例性的检查点抑制剂包括:

[0602] PD-L1抑制剂,如Genentech的MPDL3280A(RG7446)、来自BioXcell的抗小鼠PD-L1

抗体克隆10F.9G2(目录号BE0101)、来自Bristol-Meyer's Squibb的抗PD-L1单克隆抗体MDX-1105(BMS-936559)和BMS-935559、MSB0010718C、小鼠抗PD-L1克隆29E.2A3和AstraZeneca的MEDI4736;

[0603] PD-L2抑制剂,如GlaxoSmithKline的AMP-224(Amplimmune)和rHIgM12B7;

[0604] PD-1抑制剂,如来自BioXcell的抗小鼠PD-1抗体克隆J43(目录号BE0033-2)、来自BioXcell的抗小鼠PD-1抗体克隆RMP1-14(目录号BE0146)、小鼠抗PD-1抗体克隆EH12、Merck的MK-3475抗小鼠PD-1抗体(Keytruda、派姆单抗、lambrolizumab)、AnaptysBio的被称为ANB011的抗PD-1抗体、抗体MDX-1 106(ONO-4538)、Bristol-Myers Squibb的人IgG4单克隆抗体纳武单抗(Opdivo®,BMS-936558,MDX1106)、AstraZeneca的AMP-514和AMP-224和来自CureTech Ltd的Pidilizumab(CT-011);

[0605] CTLA-4抑制剂,如Bristol Meyers Squibb的抗CTLA-4抗体伊匹木单抗(也称为Yervoy®,MDX-010、BMS-734016和MDX-101)、抗CTLA4抗体、来自Millipore的克隆9H10、Pfizer的tremelimumab(CP-675,206,ticilimumab)和来自Abcam的抗CTLA4抗体克隆BNI3;

[0606] LAG3抑制剂,如来自eBioscience的抗Lag-3抗体克隆eBioC9B7W(C9B7W)、来自LifeSpan Biosciences的抗Lag3抗体LS-B2237、来自Immutep的IMP321(ImmuFact)、抗Lag3抗体BMS-986016和LAG-3嵌合抗体A9H12;

[0607] B7-H3抑制剂,如MGA271;

[0608] KIR抑制剂,如Lirilumab(IPH2101);

[0609] CD137(41BB)抑制剂,如urelumab(BMS-663513,Bristol-Myers Squibb)、PF-05082566(抗-4-1BB,PF-2566,Pfizer)或XmAb-5592(Xencor);

[0610] PS抑制剂,如Bavituximab;

[0611] 以及诸如针对TIM3、CD52、CD30、CD20、CD33、CD27、OX40(CD134)、GITR、ICOS、BTLA(CD272)、CD160、2B4、LAIR1、TIGHT、LIGHT、DR3、CD226、CD2或SLAM的抗体或其片段(如单克隆抗体、人抗体、人源化或嵌合抗体)、RNAi分子或小分子等抑制剂。

[0612] 在一些实施方案中,包含免疫检查点抑制剂的结合部分A用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,结合部分A为包含免疫检查点抑制剂的双特异性抗体或其结合片段。在一些情况下,包含程序性死亡配体1(PD-L1,也称为B7-H1、CD274)、程序性死亡1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137,CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO(具有胶原结构的巨噬细胞受体)、PS(磷酯酰丝氨酸)、OX-40、SLAM、TIGHT、VISTA、VTCN1或其任意组合的抑制剂的结合部分A用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0613] 在一些实施方案中,式(I)的分子与免疫检查点抑制剂联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,该免疫检查点抑制剂包括程序性死亡配体1(PD-L1,也称为B7-H1、CD274)、程序性死亡1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137,CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO(具有胶原结构的巨噬细胞受体)、PS(磷酯酰丝氨酸)、OX-40、SLAM、

TIGHT、VISTA、VTCN1或其任意组合的抑制剂。在一些情况下,式(I)的分子与伊匹木单抗、tremelimumab、纳武单抗、pemrolizumab、pidilizumab、MPDL3280A、MEDI4736、MSB0010718C、MK-3475或BMS-936559联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0614] 在一些实施方案中,所述免疫靶向剂是细胞因子。在一些情况下,细胞因子进一步被分组为趋化因子、干扰素、白介素和肿瘤坏死因子。在一些实施方案中,趋化因子发挥化学引诱物的作用以引导细胞迁移,并且分为四个亚家族:CXC、CC、CX3C和XC。示例性的趋化因子包括来自以下的趋化因子:CC亚家族:CCL1、CCL2(MCP-1)、CCL3、CCL4、CCL5(RANTES)、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9(或CCL10)、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27和CCL28;CXC亚家族:CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16和CXCL17;XC亚家族:XCL1和CL2;以及CX3C亚家族CX3CL1。

[0615] 干扰素(IFN)包括I型干扰素(例如,IFN-α、IFN-β、IFN-ε、IFN-κ和IFN-ω)、II型干扰素(例如,IFN-γ)和III型干扰素。在一些实施方案中,IFN-α进一步分类为约13种亚型,其包括IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNA8、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA16、IFNA17和IFNA21。

[0616] 白介素由白细胞或白血球表达,并促进T淋巴细胞和B淋巴细胞以及造血细胞的发育和分化。示例性的白介素包括IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8(CXCL8)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-35和IL-36。

[0617] 肿瘤坏死因子(TNF)是一组调节凋亡的细胞因子。在一些情况下,TNF家族内有大约19个成员,包括但不限于TNFα、淋巴毒素-α(LT-α)、淋巴毒素-β(LT-β)、T细胞抗原gp39(CD40L)、CD27L、CD30L、FASL、4-1BBL、OX40L和TNF相关凋亡诱导配体(TRAIL)。

[0618] 在一些实施方案中,式(I)的分子与细胞因子联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与趋化因子联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与干扰素联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与白介素联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与肿瘤坏死因子联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与IL-1β、IL-2、IL-7、IL-8、IL-15、MCP-1(CCL2)、MIP-1α、RANTES、MCP-3、MIP5、CCL19、CCL21、CXCL2、CXCL9、CXCL10或CXCL11联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0619] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂包含疫苗。在一些情况下,该疫苗为原位疫苗接种。在一些情况下,该疫苗为基于细胞的疫苗。在一些情况下,该疫苗为非基于细胞的疫苗。在一些情况下,式(I)的分子与基于树突细胞的疫苗联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与基于肿瘤细胞的疫苗联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与抗原疫苗联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与抗独特型疫苗联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与DNA疫苗联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与基于载体的疫苗联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0620] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂用作治疗疾病或病症(例如,癌

症)的被动免疫肿瘤学治疗方法。在一些情况下,被动方法利用过继免疫系统组分如外源产生的T细胞、自然杀伤(NK)T细胞和/或嵌合抗原受体(CAR)T细胞来攻击癌细胞。

[0621] 在一些实施方案中,式(I)的分子与基于T细胞的治疗剂联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,基于T细胞的治疗剂是识别上述一种或多种CD细胞表面标志物的活化T细胞剂。在一些情况下,基于T细胞的治疗剂包括识别CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD27、CD28、CD80、CD134、CD137、CD152、CD154、CD160、CD200R、CD223、CD226、CD244、CD258、CD267、CD272、CD274、CD278、CD279或CD357中的一种或多种的活化T细胞剂。在一些情况下,式(I)的分子与识别CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD27、CD28、CD80、CD134、CD137、CD152、CD154、CD160、CD200R、CD223、CD226、CD244、CD258、CD267、CD272、CD274、CD278、CD279或CD357中的一种或多种的活化T细胞剂联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0622] 在一些实施方案中,式(I)的分子与基于自然杀伤(NK)T细胞的治疗剂联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,基于NK的治疗剂是识别上述一种或多种CD细胞表面标志物的活化NK剂。在一些情况下,基于NK的治疗剂是识别CD2、CD11a、CD11b、CD16、CD56、CD58、CD62L、CD85j、CD158a/b、CD158c、CD158e/f/k、CD158h/j、CD159a、CD162、CD226、CD314、CD335、CD337、CD244或CD319中的一种或多种的活化NK剂。在一些情况下,式(I)的分子与识别CD2、CD11a、CD11b、CD16、CD56、CD58、CD62L、CD85j、CD158a/b、CD158c、CD158e/f/k、CD158h/j、CD159a、CD162、CD226、CD314、CD335、CD337、CD244或CD319中的一种或多种的活化NK剂联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0623] 在一些实施方案中,式(I)的分子与基于CAR-T细胞的治疗剂联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0624] 在一些实施方案中,式(I)的分子与使内体膜不稳定(或破坏内体-溶酶体膜运输)的另外的药剂联合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,所述另外的药剂包括抗有丝分裂剂。示例性的抗有丝分裂剂包括但不限于紫杉烷类,如紫杉醇和多西他赛;长春花生物碱类,如长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨;卡巴他赛;秋水仙碱;艾日布林;雌莫司汀;依托泊苷;伊沙匹隆;鬼臼毒素;替尼泊苷;或灰黄霉素。在一些情况下,所述另外的药剂包括紫杉醇、多西他赛、长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、卡巴他赛、秋水仙碱、艾日布林、雌莫司汀、依托泊苷、伊沙匹隆、鬼臼毒素、替尼泊苷或灰黄霉素。在一些情况下,所述另外的药剂包括泰素(taxol)。在一些情况下,所述另外的药剂包括紫杉醇。在一些情况下,所述另外的药剂包括依托泊苷。在其他情况下,所述另外的药剂包括维生素K3。

[0625] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂作为联合方法(包括主动和被动方法)用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0626] 药物制剂

[0627] 在一些实施方案中,本文所述的药物制剂通过多种给药途径施用于受试者,该给药途径包括但不限于肠胃外(例如,静脉内、皮下、肌肉内)、口服、鼻内、颊部、直肠或透皮给药途径。在一些情况下,本文所述的药物组合物被配制用于肠胃外(例如,静脉内、皮下、肌肉内)给药。在其他情况下,本文所述的药物组合物被配制用于口服给药。在其他情况下,本文所述的药物组合物被配制用于鼻内给药。

[0628] 在一些实施方案中,所述药物制剂包括但不限于水性液体分散体、自乳化分散体、固溶体、脂质体分散体、气雾剂、固体剂型、粉末、立即释放制剂、控制释放制剂、快速熔化制

剂、片剂、胶囊、丸剂、延迟释放制剂、延长释放制剂、脉冲释放制剂、多颗粒制剂(例如,纳米颗粒制剂)以及立即和控制释放混合型制剂。

[0629] 在一些情况下,所述药物制剂包括多颗粒制剂。在一些情况下,所述药物制剂包括纳米颗粒制剂。在一些情况下,纳米颗粒包含cMAP、环糊精或脂质。在一些情况下,纳米颗粒包括固体脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、自乳化纳米颗粒、脂质体、微乳液或胶束溶液。另外的示例性纳米颗粒包括但不限于顺磁性纳米颗粒、超顺磁性纳米颗粒、金属纳米颗粒、富勒烯样材料、无机纳米管、树枝状高分子(诸如具有共价连接的金属螯合物)、纳米纤维、纳米角、纳米洋葱、纳米棒、纳米绳和量子点。在一些情况下、纳米颗粒是金属纳米颗粒,例如钪、钛、钒、铬、锰、铁、钴、镍、铜、锌、钇、锆、铌、钼、钌、铑、钯、银、镉、铪、钽、钨、铼、锇、铱、铂、金、钆、铝、镓、铟、锡、钕、铅、铋、镁、钙、锶、钡、锂、钠、钾、硼、硅、磷、锗、砷、锑及其组合、合金或氧化物的纳米颗粒。

[0630] 在一些情况下,纳米颗粒包含核或者核和壳,如在核-壳纳米颗粒中。

[0631] 在一些情况下,纳米颗粒进一步涂覆有用于附接功能元件的分子(例如,与本文所述的多核酸分子或结合部分中的一种或多种)。在一些情况下,涂层包含硫酸软骨素、硫酸葡聚糖、羧甲基葡聚糖、藻酸、果胶、角叉菜聚糖、岩藻多糖、琼脂胶、紫菜聚糖、刺梧桐胶、结冷胶、黄原胶、透明质酸、葡糖胺、半乳糖胺、壳多糖(或壳聚糖)、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、溶菌酶、细胞色素C、核糖核酸酶、胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、α-胰凝乳蛋白酶、聚赖氨酸、聚精氨酸、组蛋白、鱼精蛋白、卵清蛋白、糊精或环糊精。在一些情况下,纳米颗粒包括石墨烯涂覆的纳米颗粒。

[0632] 在一些情况下,纳米颗粒具有小于约500nm、400nm、300nm、200nm或100nm的至少一个维度。

[0633] 在一些情况下,纳米颗粒制剂包含顺磁性纳米颗粒、超顺磁性纳米颗粒、金属纳米颗粒、富勒烯样材料、无机纳米管、树枝状高分子(诸如具有共价连接的金属螯合物)、纳米纤维、纳米角、纳米洋葱、纳米棒、纳米绳或量子点。在一些情况下,本文所述的多核酸分子或结合部分直接或间接地缀合至纳米颗粒。在一些情况下,至少1、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100个或更多个本文所述的多核酸分子或结合部分直接或间接地缀合至纳米颗粒。

[0634] 在一些实施方案中,所述药物制剂包含基于与本文公开的组合物的相容性以及所需剂型的释放谱性质而选择的载体或载体材料。示例性的载体材料包括,例如,粘合剂、悬浮剂、崩解剂、填充剂、表面活性剂、增溶剂、稳定剂、润滑剂、润湿剂、稀释剂等。药学上相容的载体材料包括但不限于阿拉伯胶、明胶、胶体二氧化硅、甘油磷酸钙、乳酸钙、麦芽糖糊精、甘油、硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、胆固醇、胆固醇酯、酪蛋白酸钠、大豆卵磷脂、牛磺胆酸、磷脂酰胆碱、氯化钠、磷酸三钙、磷酸氢二钾、纤维素和纤维素缀合物、糖硬脂酰乳酸钠、角叉菜胶、甘油单酯、甘油二酯、预胶化淀粉等。参见,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第十九版(Easton,Pa.:Mack Publishing Company,1995);Hoover,John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pennsylvania 1975;Liberman,H.A.和Lachman,L.编著,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,New York,N.Y.,1980;以及Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第七版(Lippincott Williams&Wilkins1999)。

[0635] 在一些情况下,所述药物制剂进一步包含pH调节剂或缓冲剂,其包括酸,如乙酸、硼酸、柠檬酸、乳酸、磷酸和盐酸;碱,如氢氧化钠、磷酸钠、硼酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、乳酸钠和三羟甲基氨基甲烷;和缓冲液,如柠檬酸盐/右旋糖、碳酸氢钠和氯化铵。这样的酸、碱和缓冲液以将组合物的pH维持在可接受范围内所需的量包含在内。

[0636] 在一些情况下,所述药物制剂包含使组合物的重量摩尔渗透压浓度处于可接受范围内所需的量的一种或多种盐。这样的盐包括具有钠、钾或铵阳离子以及氯离子、柠檬酸根、抗坏血酸根、硼酸根、磷酸根、碳酸氢根、硫酸根、硫代硫酸根或亚硫酸氢根阴离子的那些盐;合适的盐包括氯化钠、氯化钾、硫代硫酸钠、亚硫酸氢钠和硫酸铵。

[0637] 在一些情况下,所述药物制剂进一步包含用来稳定化合物的稀释剂,因为它们可提供更稳定的环境。本领域中利用溶解在缓冲溶液(其也可提供pH控制或维持)中的盐作为稀释剂,包括但不限于磷酸盐缓冲盐水溶液。在某些情况下,稀释剂增加组合物的体积,以便于压缩或者产生用于均匀掺合以供胶囊填充的足够体积。这类化合物可包括例如乳糖、淀粉、甘露醇、山梨醇、右旋糖、微晶纤维素如Avicel®;磷酸氢钙、磷酸二钙二水合物;磷酸三钙、磷酸钙;无水乳糖、喷雾干燥的乳糖;预胶化淀粉、可压缩糖,如Di-Pac®(Amstar);甘露醇、羟丙基甲基纤维素、乙酸硬脂酸羟丙基甲基纤维素、基于蔗糖的稀释剂、糖果糖;一碱式硫酸钙一水合物、硫酸钙二水合物;乳酸钙三水合物、葡萄糖结合剂(dextrate);水解谷物固体、直链淀粉;粉状纤维素、碳酸钙;甘氨酸、高岭土;甘露醇、氯化钠;肌醇、膨润土等。

[0638] 在一些情况下,所述药物制剂包含崩解剂以便于物质的分解或崩解。术语“崩解”包括当与胃肠液接触时剂型的溶解和分散。崩解剂的实例包括淀粉,例如天然淀粉如玉米淀粉或马铃薯淀粉,预胶化淀粉如National 1551或Amijel®,或羟基乙酸淀粉钠如Promogel®或Explotab®,纤维素如木制品,甲基结晶纤维素,例如Avicel®、Avicel® PH101、Avicel®PH102、Avicel®PH105、Elcema®P100、Emcocel®、Vivacel®、Ming Tia®和Solka-Floc®,甲基纤维素,交联羧甲纤维素,或交联纤维素如交联羧甲基纤维素钠(Ac-Di-Sol®)、交联羧甲基纤维素或交联的交联羧甲纤维素,交联淀粉如羟基乙酸淀粉钠,交联聚合物如聚维酮、交联聚乙烯吡咯烷酮,藻酸盐如藻酸或藻酸的盐如藻酸钠,粘土如Veegum®HV(硅酸镁铝),树胶如琼脂、瓜尔胶、刺槐豆胶、刺梧桐胶、果胶或黄蓍胶,羟基乙酸淀粉钠,膨润土,天然海绵,表面活性剂,树脂如阳离子交换树脂,柑橘浆,十二烷基硫酸钠,十二烷基硫酸钠与淀粉的组合,等等。

[0639] 在一些情况下,所述药物制剂包含填充剂,如乳糖、碳酸钙、磷酸钙、磷酸氢钙、硫酸钙、微晶纤维素、纤维素粉末、右旋糖、葡萄糖结合剂、葡聚糖、淀粉、预胶化淀粉、蔗糖、木糖醇、乳糖醇、甘露醇、山梨醇、氯化钠、聚乙二醇等。

[0640] 润滑剂和助流剂也任选地包含在本文所述的药物制剂中,用于预防、减少或抑制材料的粘附或摩擦。示例性的润滑剂包括例如硬脂酸,氢氧化钙,滑石,硬脂酰富马酸钠,烃如矿物油,或氢化植物油如氢化大豆油(Sterotex®),高级脂肪酸及其碱金属和碱土金属盐,如铝、钙、镁、锌盐,硬脂酸,硬脂酸钠,甘油,滑石,蜡,Stearowet®,硼酸,苯甲酸钠,乙酸钠,氯化钠,亮氨酸,聚乙二醇(例如,PEG-4000)或甲氧基聚乙二醇如Carbowax™,油酸钠,

苯甲酸钠,山萮酸甘油酯,聚乙二醇,十二烷基硫酸镁或十二烷基硫酸钠,胶体二氧化硅如SyloidTM,Cab-O-Sil®,淀粉如玉米淀粉,硅油,表面活性剂,等等。

[0641] 增塑剂包括用来软化微胶囊化材料或膜涂层以使其更不易碎的化合物。合适的增塑剂包括例如聚乙二醇如PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1450、PEG 3350和PEG 800、硬脂酸、丙二醇、油酸、三乙基纤维素和三醋精。增塑剂也可用作分散剂或润湿剂。

[0642] 增溶剂包括诸如三醋精、柠檬酸三乙酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、维生素E TPGS、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、N-羟乙基吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基环糊精、乙醇、正丁醇、异丙醇、胆固醇、胆汁盐、聚乙二醇200-600、四氢呋喃聚乙二醇醚(glycofurol)、二乙二醇单乙基醚(transcutol)、丙二醇、二甲基异山梨醇等化合物。

[0643] 稳定剂包括诸如任何抗氧化剂、缓冲液、酸、防腐剂等化合物。

[0644] 悬浮剂包括诸如聚乙烯吡咯烷酮如聚乙烯吡咯烷酮K12、聚乙烯吡咯烷酮K17、聚乙烯吡咯烷酮K25或聚乙烯吡咯烷酮K30、乙烯基吡咯烷酮/乙酸乙烯酯共聚物(S630)、聚乙二醇(例如,聚乙二醇可具有约300至约6000,或约3350至约4000,或约7000至约5400的分子量)、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙酸硬脂酸羟甲基纤维素、聚山梨醇酯-80、羟乙基纤维素、藻酸钠、树胶如黄蓍胶和阿拉伯胶、瓜尔胶、黄原胶(包括黄原树胶)、糖、纤维素如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、聚山梨醇酯-80、藻酸钠、聚乙氧基化失水山梨醇单月桂酸酯、聚乙氧基化失水山梨醇单月桂酸酯、聚维酮等化合物。

[0645] 表面活性剂包括诸如十二烷基硫酸钠、多库酯钠、吐温60或80、三醋精、维生素E TPGS、失水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯、聚山梨醇酯、泊洛沙姆(polaxomer)、胆汁盐、单硬脂酸甘油酯、环氧乙烷和环氧丙烷的共聚物如Pluronic®(BASF)等化合物。另外的表面活性剂包括聚氧乙烯脂肪酸甘油酯和植物油,例如聚氧乙烯(60)氢化蓖麻油;以及聚氧乙烯烷基醚和烷基苯基醚,例如辛苯昔醇(octoxynol)10、辛苯昔醇40。有时,包含表面活性剂以增强物理稳定性或用于其他目的。

[0646] 粘度增强剂包括例如甲基纤维素、黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙酸硬脂酸羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、卡波姆、聚乙烯醇、藻酸盐、阿拉伯胶、壳聚糖及其组合。

[0647] 润湿剂包括诸如油酸、单硬脂酸甘油酯、失水山梨醇单油酸酯、失水山梨醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺、聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯、多库酯钠、油酸钠、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、三醋精、吐温80、维生素E TPGS、铵盐等化合物。

[0648] 治疗方案

[0649] 在一些实施方案中,施用本文所述的药物组合物用于治疗应用。在一些实施方案中,该药物组合物每天一次、每天两次、每天三次或更多次施用。该药物组合物每日、每天一次、每隔一天、每周五天、每周一次、每隔一周、每月两周、每月三周、每月一次、每月两次、每月三次或更多次施用。该药物组合物施用至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、18个月、2年、3年或更久。

[0650] 在一些实施方案中,一种或多种药物组合物同时、依次或间隔一段时间施用。在一

些实施方案中,一种或多种药物组合物同时施用。在一些情况下,一种或多种药物组合物依次施用。在另外的情况下,一种或多种药物组合物间隔一段时间施用(例如,第一药物组合物的第一次施用在第一天,然后在施用至少第二药物组合物之前间隔至少1、2、3、4、5天或更多天)。

[0651] 在一些实施方案中,两种或更多种不同的药物组合物共同施用。在一些情况下,两种或更多种不同的药物组合物同时共同施用。在一些情况下,两种或更多种不同的药物组合物依次共同施用,而在施用之间没有时间间隔。在其他情况下,两种或更多种不同的药物组合物依次共同施用,在施用之间间隔约0.5小时、1小时、2小时、3小时、12小时、1天、2天或更久。

[0652] 在患者的状况确实得到改善的情况下,根据医生的判断,继续给予组合物的施用;或者,将所施用的组合物的剂量暂时减少或暂时暂停某一时间长度(即"休药期")。在一些情况下,休药期的长度在2天与1年之间不等,仅举例而言,包括2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天或365天。休药期期间的剂量减少为10%-100%,仅举例而言,包括10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0653] 一旦患者的病况出现改善,如有必要,施用维持剂量。随后,根据症状的变化,任选地将给药剂量或频率或两者降低至该疾病、病症或病况的改善得以保持的水平。

[0654] 在一些实施方案中,对应于这样的量的给定药剂的量根据诸如具体化合物、疾病严重程度、需要治疗的受试者或宿主的特征(例如,体重)等因素而变化,然而其仍然根据与该实例有关的具体情况以本领域已知的方式常规地确定,该具体情况包括例如所施用的具体药剂、给药途径以及所治疗的受试者或宿主。在一些情况下,所需的剂量方便地以单剂量或以分剂量呈现,该分剂量同时(或在短时间段内)施用或以适当的间隔施用,例如每天2、3、4个或更多个亚剂量。

[0655] 前述范围仅为提示性的,因为关于个体治疗方案的变量的数量巨大,并且相距这些推荐值的相当大的偏差并不罕见。这样的剂量根据多个变量而改变,这些变量不限于所用化合物的活性、待治疗的疾病或病况、给药方式、受试个体的需求、所治疗的疾病或病况的严重程度以及执业医师的判断。

[0656] 在一些实施方案中,此类治疗方案的毒性和治疗功效通过在细胞培养物或实验动物中的标准药学程序来确定,包括但不限于LD50(对群体的50%致死的剂量)和ED50(对群体的50%在治疗上有效的剂量)的确定。毒性效果与治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且表示为LD50与ED50之比。优选表现出高治疗指数的化合物。使用从细胞培养试验和动物研究获得的数据来制定用于人类的剂量范围。此类化合物的剂量优选处于包含ED50且具有最小毒性的循环浓度范围内。根据所用的剂型和所用的给药途径,剂量在该范围内变化。

[0657] 试剂盒/制品

[0658] 在某些实施方案中,本文公开了与本文所述的一种或多种组合物和方法一起使用的试剂盒和制品。这样的试剂盒包括载具、包装或被区室化为接纳一个或多个容器如小瓶、管等的容器,每个容器包含将在本文所述的方法中使用的一个单独要素。合适的容器包括,例如,瓶、小瓶、注射器和试管。在一个实施方案中,容器由诸如玻璃或塑料等各种材料形

成。

[0659] 本文提供的制品含有包装材料。药物包装材料的实例包括但不限于泡罩包装、瓶、管、袋、容器、瓶以及适于所选制剂及预期的给药和治疗方式的任何包装材料。

[0660] 例如,所述容器包含如本文公开的任选地缀合至内体溶解部分D的式(I)——A-X-B-Y-C——的分子。这样的试剂盒任选地包含关于其在本文所述方法中的使用的标识性描述或标签或说明。

[0661] 试剂盒通常包括列出内容物的标签和/或使用说明书,以及具有使用说明的包装插页。通常也将会包括一套说明书。

[0662] 在一个实施方案中,标签处于容器上或与容器相关联。在一个实施方案中,当构成标签的字母、数字或其他字符附着、模制或蚀刻在容器本身上时,标签处于容器上;当标签存在于也容纳容器的接纳器或载具内(例如作为包装插页)时,标签与容器相关联。在一个实施方案中,标签用来指示内容物将用于具体治疗应用。标签也指示关于内容物诸如在本文所述方法中的使用的指导。

[0663] 在某些实施方案中,药物组合物在含有一个或多个单位剂型的包装或分配器装置中提供,该单位剂型含有本文提供的化合物。例如,该包装包含金属或塑料箔,如泡罩包装。在一个实施方案中,该包装或分配器装置伴随有给药说明书。在一个实施方案中,该包装或分配器还伴随有由监管药物制造、使用或销售的政府机构所规定形式的、与容器相关联的公告,该公告反映出该机构已批准该药物形式用于人类或兽医给药。这样的公告例如是由美国食品和药品管理局批准用于处方药的标记或已批准的产品插页。在一个实施方案中,还制备含有在相容性药物载体中配制的本文提供的化合物的组合物,将该组合物置于适当的容器中,并标出用于治疗所指示的病况。

[0664] 某些术语

[0665] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与所请求保护的主题所属领域的技术人员所一般理解的含义相同的含义。应当理解,前面的一般描述和以下详细描述均仅为示例性和说明性的,并非限制任何所请求保护的主题。在本申请中,除非另有具体说明,否则单数的使用包括复数。必须指出,如在本说明书和所附权利要求书中使用的,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物。在本申请中,除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括”以及其他形式如“包含”、“含有”和“具有”的使用是非限制性的。

[0666] 如本文所用的,范围和量可表示为“约”特定值或范围。“约”还包括准确量。因此,“约5μL”意指“约5μL”,并且还指“5μL”。通常,术语“约”包括预期在实验误差内的量。

[0667] 本文使用的章节标题仅用于组织结构的目的,而不应理解为限制所描述的主题。

[0668] 如本文所用的,术语“个体”、“受试者”和“患者”意指任何哺乳动物。在一些实施方案中,该哺乳动物为人。在一些实施方案中,该哺乳动物为非人类。这些术语均不要求或不限于以医疗保健工作者(例如,医生、注册护士、执业护士、医师助理、护理员或临终关怀工作者)的监督(例如,持续或间歇性)为特征的情况。

[0669] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式:

[0670] 1.式(I)的分子:

[0671] A-X-B-Y-C

[0672] 式I

[0673] 其中,

[0674] A为结合部分;

[0675] B为多核苷酸;

[0676] C为聚合物;

[0677] X为键或第一非聚合连接体;且

[0678] Y为键或第二连接体;

[0679] 其中所述多核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸;并且

[0680] 其中A和C不连接至B的同一末端。

[0681] 2.根据实施方式1所述的分子,其中所述多核苷酸进一步包含至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分。

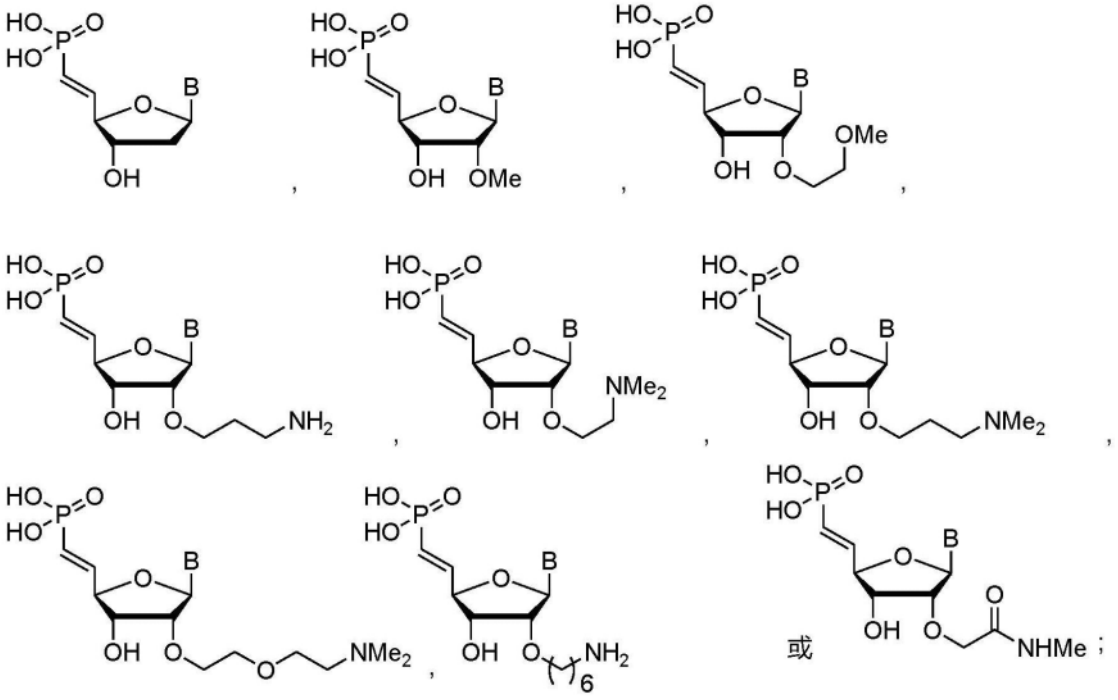
[0682] 3.根据实施方式1或2所述的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的5'末端。

[0683] 4.根据实施方式1或2所述的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的核苷酸间连接处。

[0684] 5.根据实施方式1或2所述的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸在2'-位进一步被修饰。

[0685] 6.根据实施方式5所述的分子,其中所述2'-修饰选自2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)、2'乙氧基乙基(2'-O-EOE)、2′-O-(2-N-甲基氨基甲酰基乙基)、PEG1或PEG2修饰的核苷酸。

[0686] 7.根据实施方式5所述的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0687] 

[0688] 其中B为杂环碱基部分。

[0689] 8.根据实施方式5所述的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

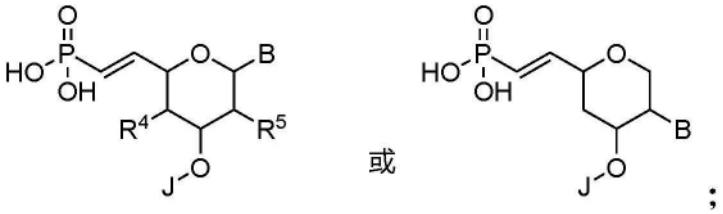
[0690]  ;

[0691] 其中B为杂环碱基部分;

[0692] R^1、R^2和R^3独立地选自氢、卤素、烷基、烷氧基或氨基烷基;且

[0693] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0694] 9.根据实施方式1或2所述的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

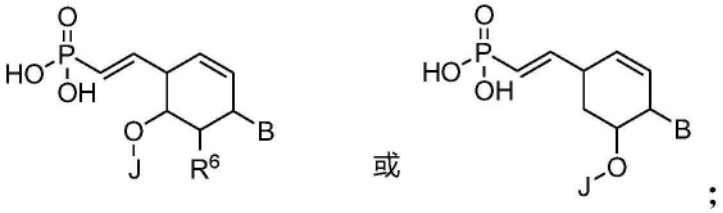
[0695]  ;

[0696] 其中B为杂环碱基部分;

[0697] R^4和R^5独立地选自氢、卤素、烷基、烷氧基或氨基烷基;且

[0698] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0699] 10.根据实施方式1或2所述的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0700]  ;

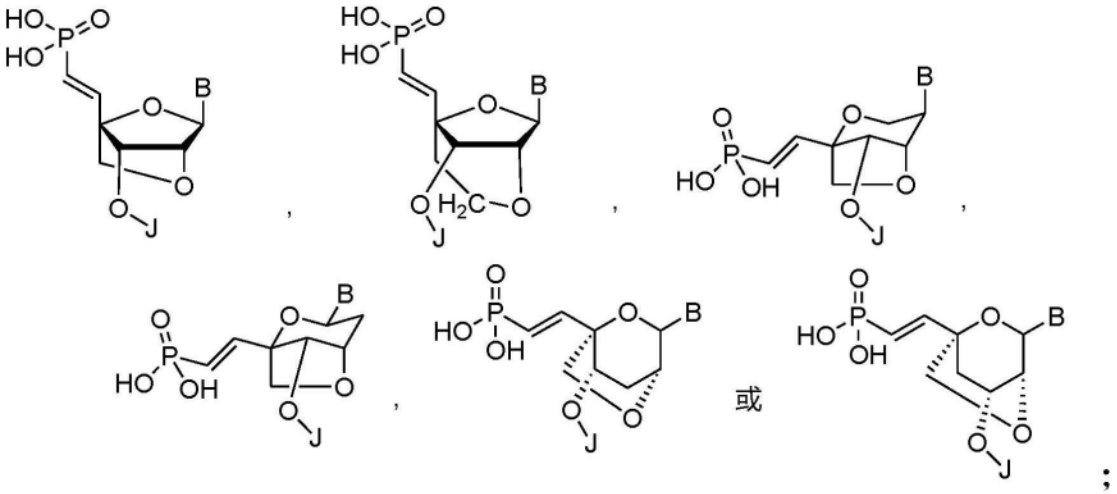
[0701] 其中B为杂环碱基部分;

[0702] R^6选自氢、卤素、烷基、烷氧基或氨基烷基;且

[0703] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0704] 11.根据实施方式1或2所述的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自锁定核酸(LNA)或乙烯基核酸(ENA)。

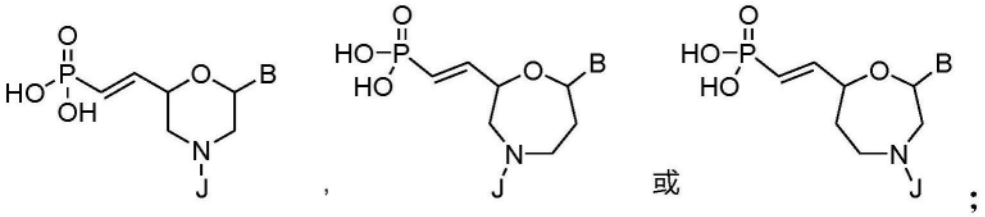
[0705] 12.根据实施方式1或2所述的分子,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0706] 

[0707] 其中B为杂环碱基部分;且

[0708] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

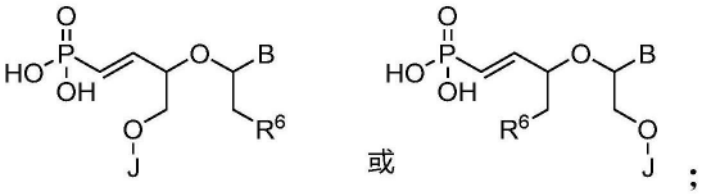
[0709] 13.根据实施方式1或2所述的分子,其中所述至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0710] 

[0711] 其中B为杂环碱基部分;且

[0712] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0713] 14.根据实施方式1或2所述的分子,其中所述至少一个5’-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸为:

[0714] 

[0715] 其中B为杂环碱基部分;

[0716] R^6选自氢、卤素、烷基、烷氧基或氨基烷基;且

[0717] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0718] 15.根据实施方式1所述的分子,其中所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、二氨基磷酸酯连接、甲基膦酸酯连接或酰胺连接。

[0719] 16.根据实施方式2所述的分子,其中所述至少一个反向脱碱基部分是至少一个末端。

[0720] 17.根据实施方式1所述的分子,其中所述多核苷酸包含单链。

[0721] 18.根据实施方式1所述的分子,其中所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交以形成双链多核酸分子的第二多核苷酸。

[0722] 19.根据实施方式18所述的分子,其中所述第二多核苷酸包含至少一个修饰。

[0723] 20.根据实施方式18所述的分子,其中所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸为RNA分子。

[0724] 21.根据实施方式18所述的分子,其中所述第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0725] 22.根据实施方式18所述的分子,其中所述第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0726] 23.根据实施方式1所述的分子,其中X和Y独立地为键。

[0727] 24.根据实施方式1所述的分子,其中X和Y独立地为C_1-C_6烷基。

[0728] 25.根据实施方式1所述的分子,其中X为同双官能连接体或异双官能连接体,其任选地缀合至C_1-C_6烷基。

[0729] 26.根据实施方式1所述的分子,其中Y为同双官能连接体或异双官能连接体。

[0730] 27.根据实施方式1所述的分子,其中所述结合部分包含人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。

[0731] 28.根据实施方式1所述的分子,其中所述结合部分包含肽或小分子。

[0732] 29.根据实施方式1所述的分子,其中C为聚乙二醇。

[0733] 30.根据实施方式17所述的分子,其中C具有约1000Da、2000Da或5000Da的分子量。

[0734] 31.根据实施方式1所述的分子,其中A-X缀合至B的5'端;且Y-C缀合至B的3'端,或者Y-C缀合至B的5'端;且A-X缀合至B的3'端。

[0735] 32.根据实施方式1所述的分子,其进一步包含D,其中D为内体溶解部分。

[0736] 33.式(II)的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包含至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸。

[0737] 34.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸进一步包含至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分。

[0738] 35.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的5'末端。

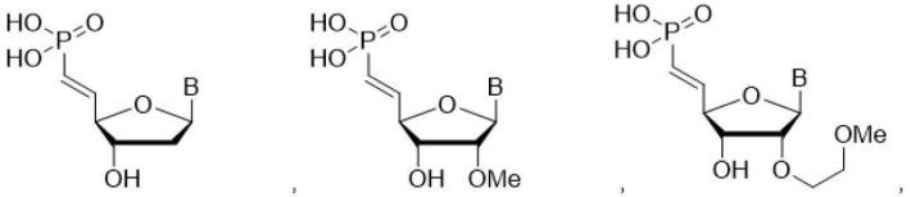
[0739] 36.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的3'末端。

[0740] 37.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸不位于所述多核苷酸的3'或5'末端。

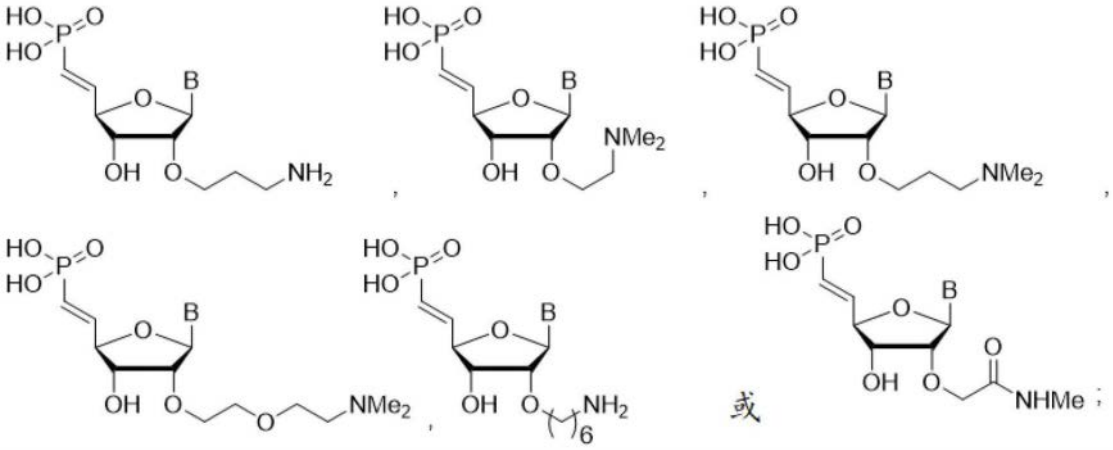
[0741] 38.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸位于所述多核苷酸的核苷酸间连接处。

[0742] 39.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸在2'-位进一步被修饰,其中所述2'-修饰选自2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。

[0743] 40.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:



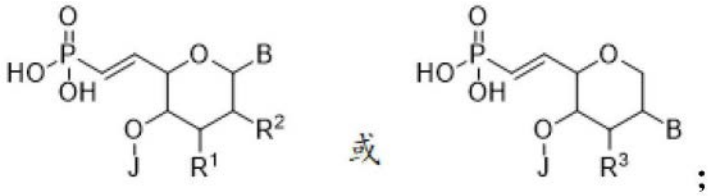
[0744]



[0745] 其中B为杂环碱基部分。

[0746] 41.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0747]



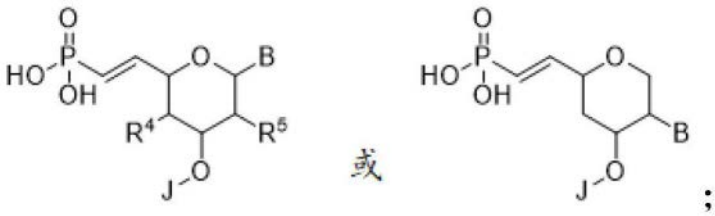
[0748] 其中B为杂环碱基部分;

[0749] R^1、R^2和R^3独立地选自氢、卤素、烷基、烷氧基或氨基烷基;且

[0750] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0751] 42.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0752]

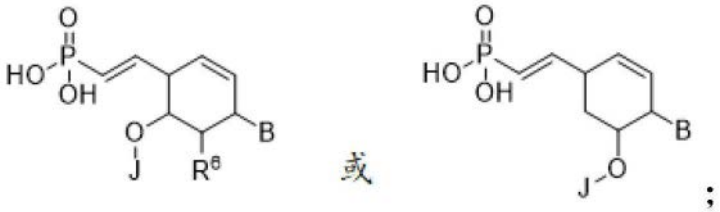


[0753] 其中B为杂环碱基部分;

[0754] R^4和R^5独立地选自氢、卤素、烷基、烷氧基或氨基烷基;且

[0755] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0756] 43.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0757] 

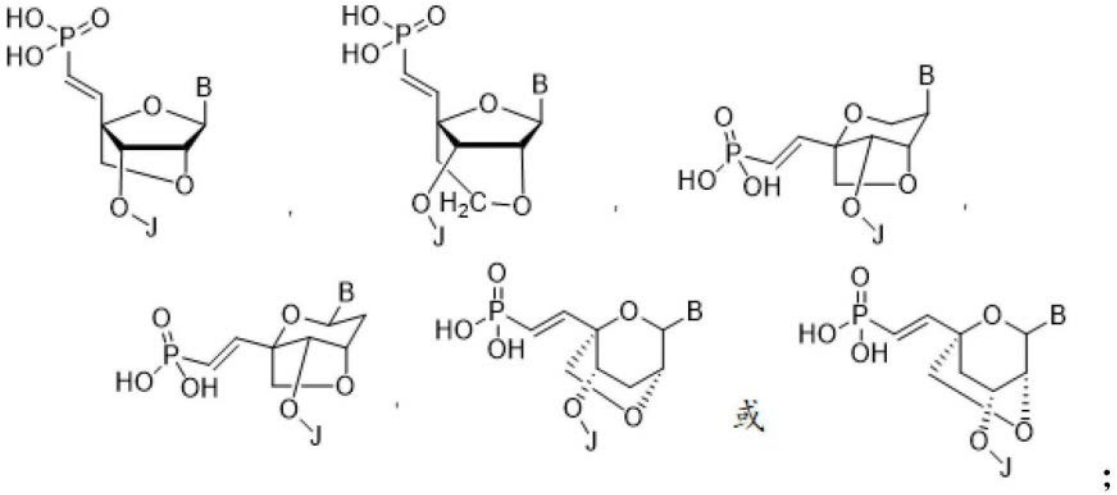
[0758] 其中B为杂环碱基部分;

[0759] R^6选自氢、卤素、烷基、烷氧基或氨基烷基;且

[0760] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0761] 44.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自锁定核酸(LNA)或乙烯基核酸(ENA)。

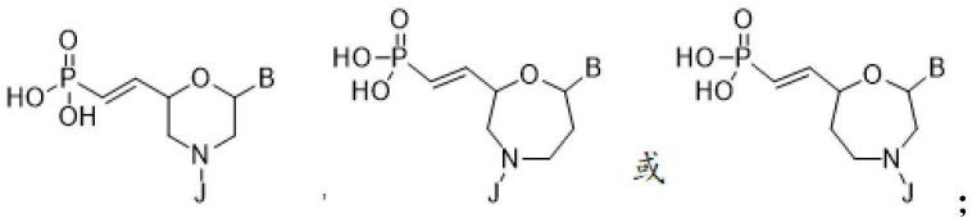
[0762] 45.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0763] 

[0764] 其中B为杂环碱基部分;且

[0765] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

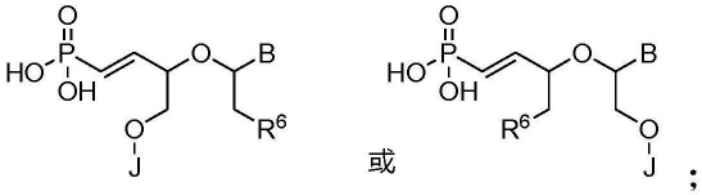
[0766] 46.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸选自:

[0767] 

[0768] 其中B为杂环碱基部分;且

[0769] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0770] 47.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述至少一个5'-乙烯基膦酸修饰的非天然核苷酸为:

[0771] 

[0772] 其中B为杂环碱基部分；

[0773] R^6选自氢、卤素、烷基、烷氧基或氨基烷基；且

[0774] J为连接至所述多核苷酸的相邻核苷酸上的核苷酸间连接基团。

[0775] 48.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接、二硫代磷酸酯连接、二氨基磷酸酯连接、甲基膦酸酯连接或酰胺连接。

[0776] 49.根据实施方式34所述的寡核苷酸，其中所述至少一个反向脱碱基部分存在于至少一个末端上。

[0777] 50.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸是单链的。

[0778] 51.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸是双链的。

[0779] 52.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为2至约100个残基。

[0780] 53.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为2至约90个残基。

[0781] 54.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为2至约80个残基。

[0782] 55.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为2至约70个残基。

[0783] 56.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为2至约60个残基。

[0784] 57.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为2至约50个残基。

[0785] 58.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为2至约40个残基。

[0786] 59.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为2至约30个残基。

[0787] 60.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为2至约20个残基。

[0788] 61.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为2至约10个残基。

[0789] 62.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为8至约30个残基。

[0790] 63.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为10至约30个残基。

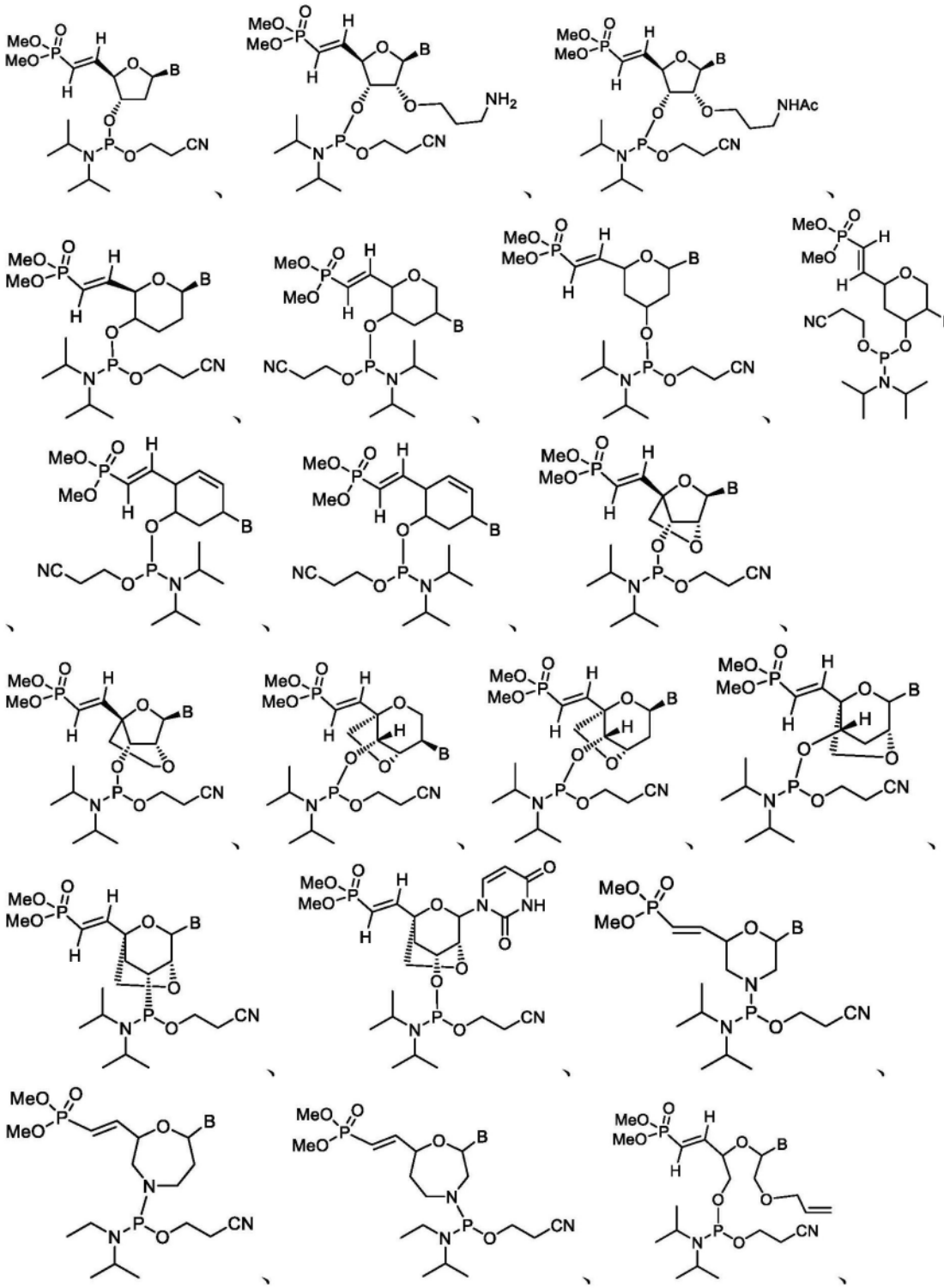
[0791] 64.根据实施方式33所述的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸的长度为14至约30个残基。

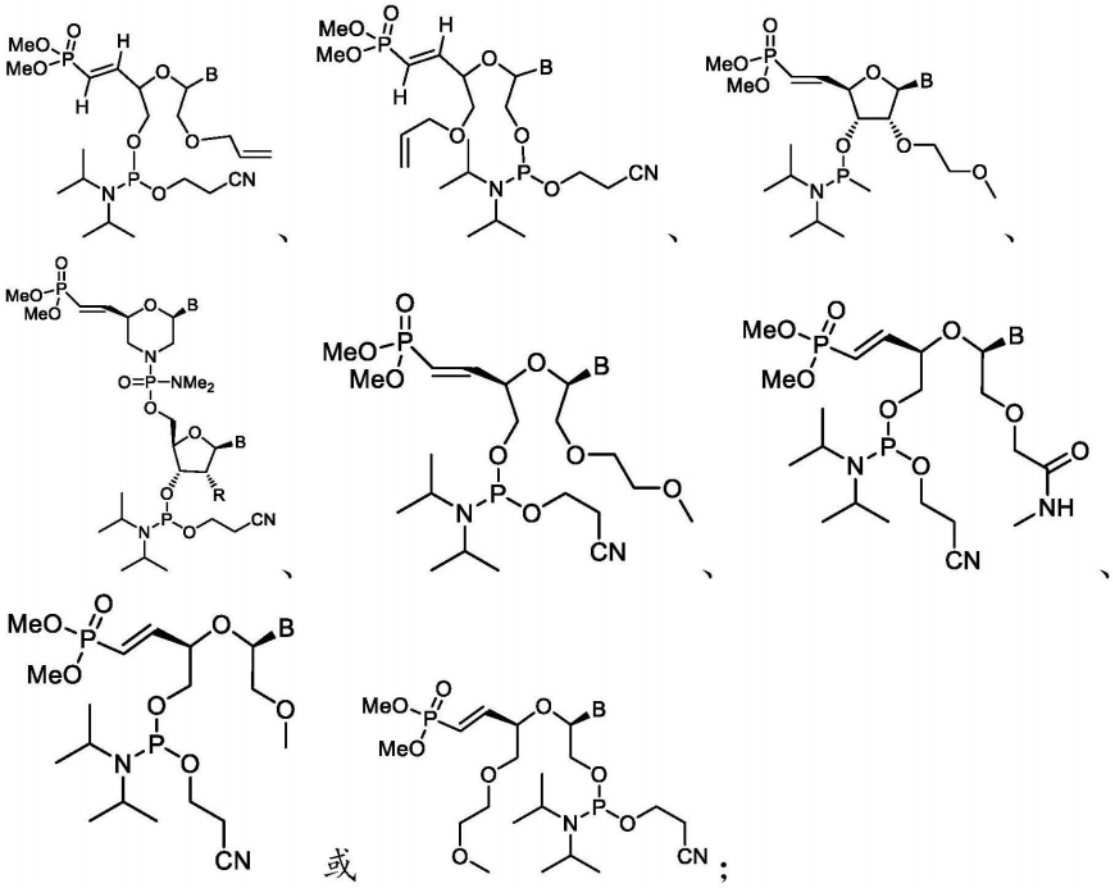
[0792] 65.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的长度为18至约30个残基。

[0793] 66.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的长度为22至约30个残基。

[0794] 67.根据实施方式33所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的长度为26至约30个残基。

[0795] 68.一种适合于合成选自下组的寡核苷酸的化合物:

[0796] 

[0797] 

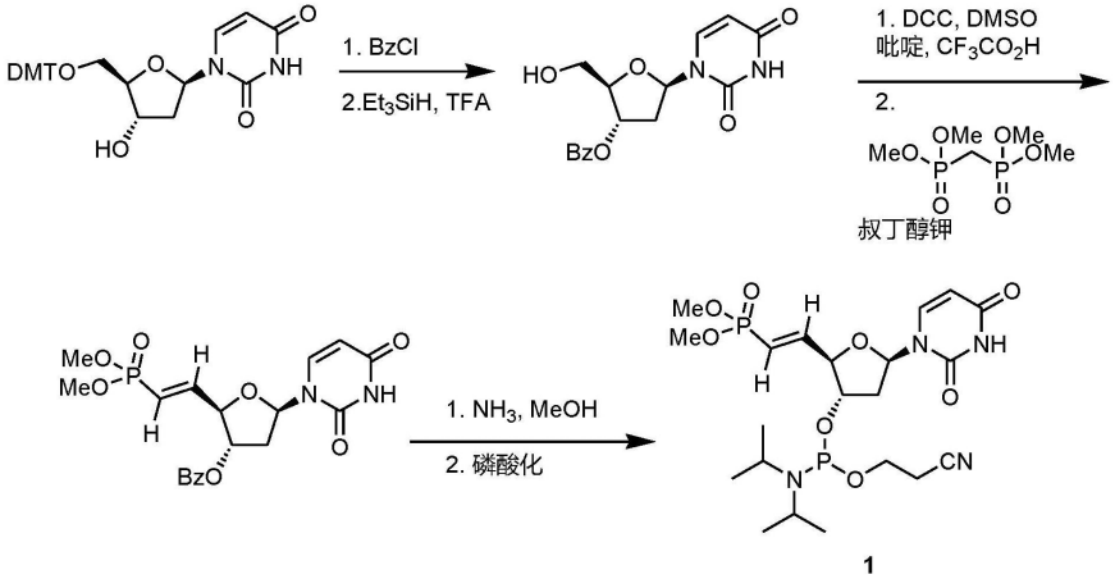
[0798] 其中B为杂环碱基部分。

[0799] 实施例

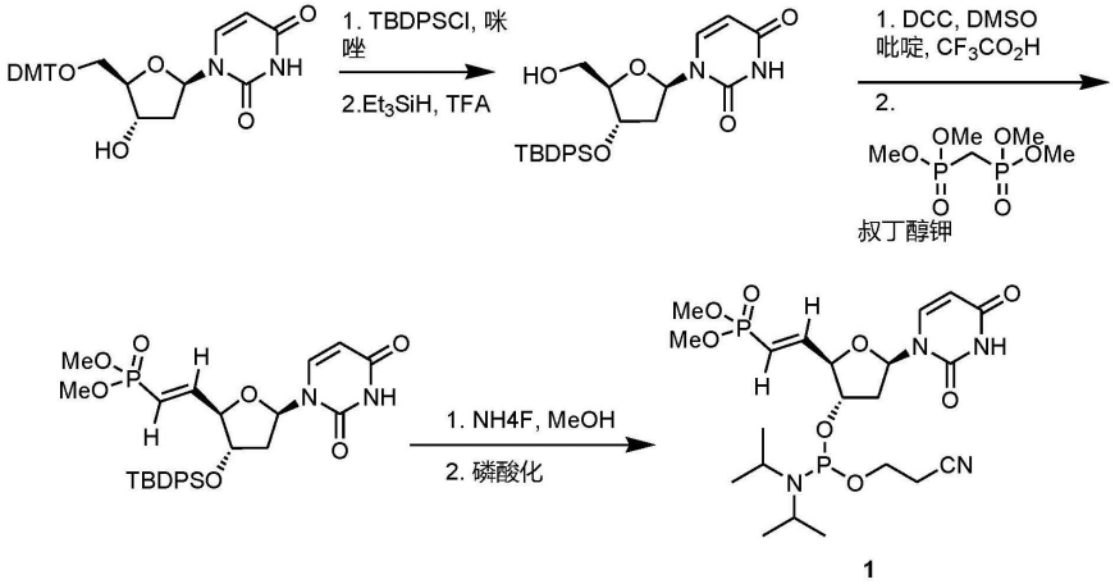
[0800] 提供这些实施例仅仅是为了说明目的,并非限制本文提供的权利要求的范围。

[0801] 化学合成实施例

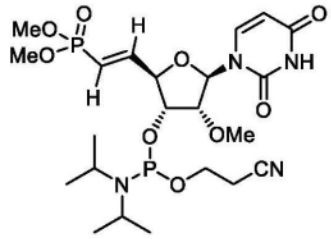
[0802] 实施例1.化合物1-3和5-8的制备



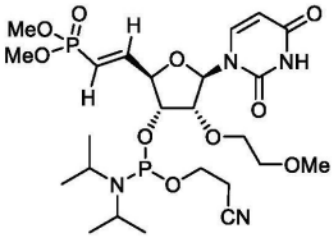
[0803] 或者如下



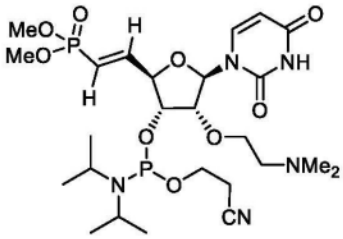
[0804] 化合物2、3和5-8按照实施例1中示出的程序制备。



2

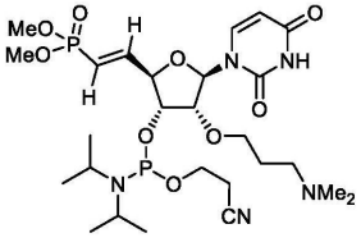


3

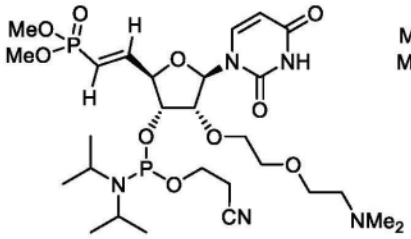


5

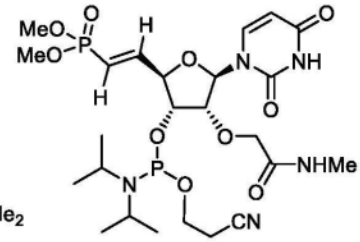
[0805]



6

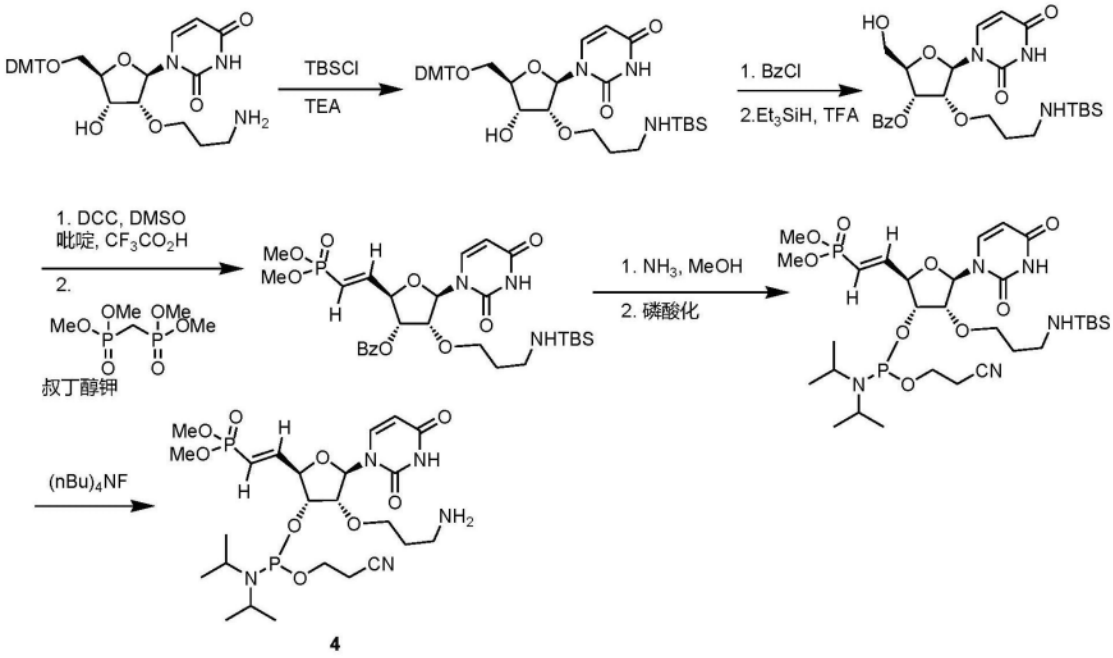


7



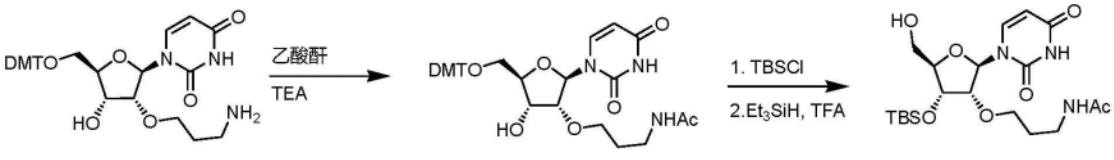
8

[0806] 实施例2.化合物4的制备

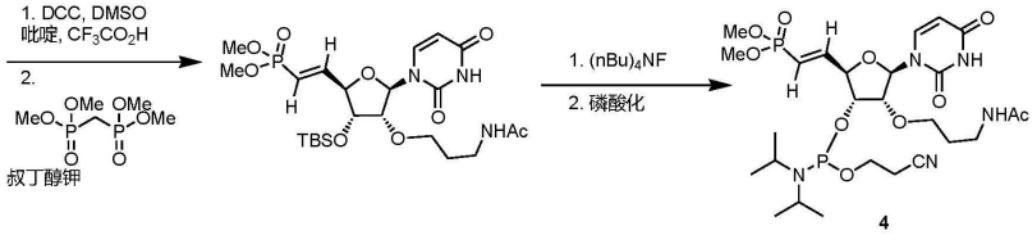


4

[0807] 或者如下：

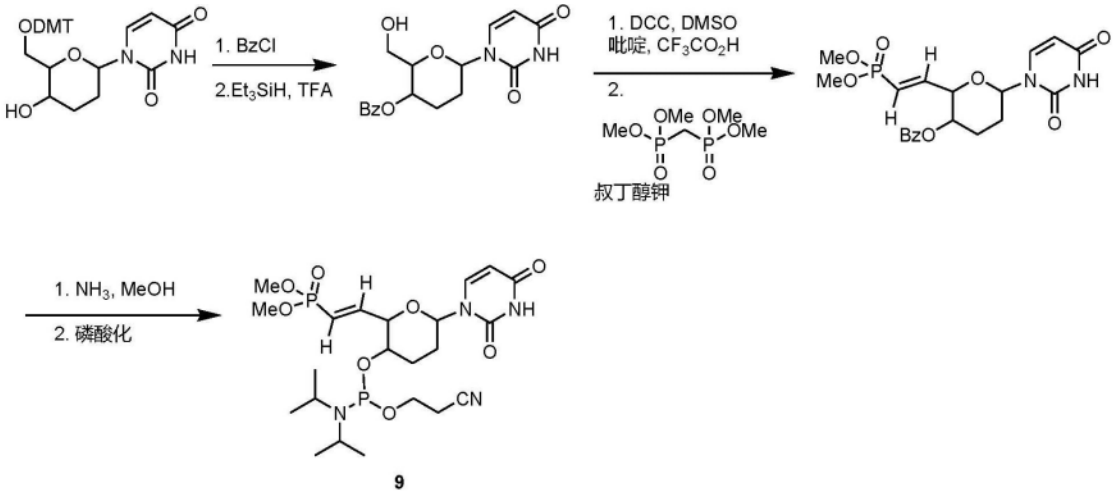


[0808]

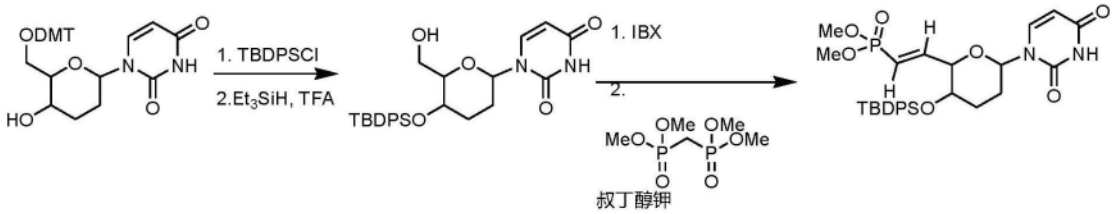


4

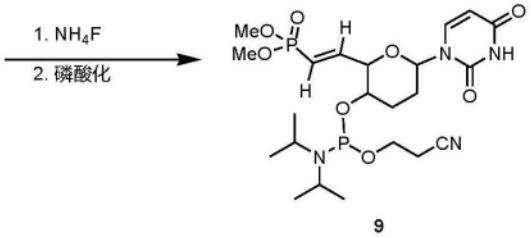
[0809] 实施例3.化合物9的制备



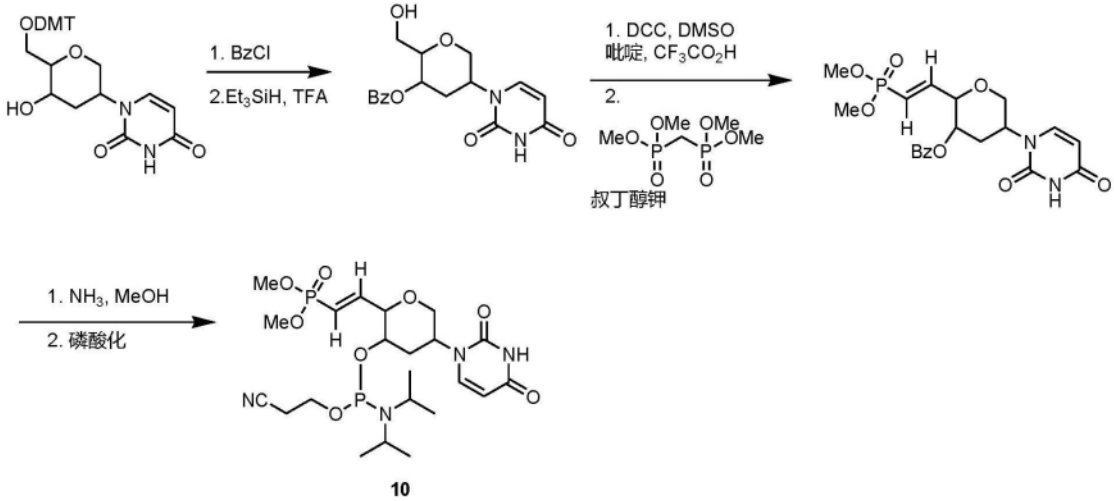
[0810] 或者如下：



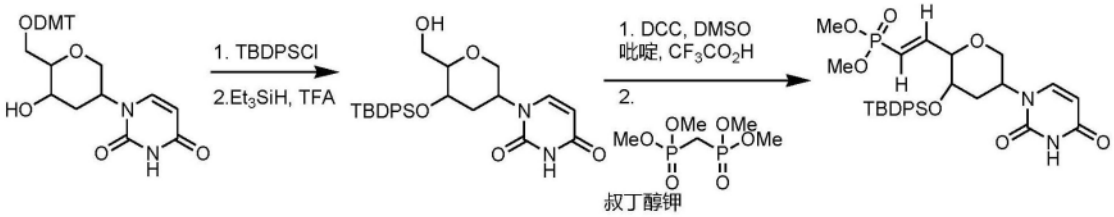
[0811]



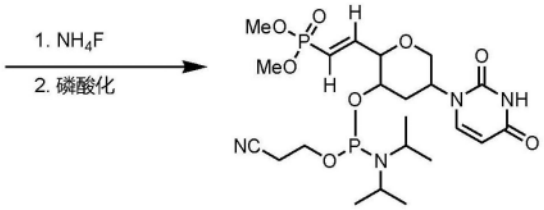
[0812] 实施例4.化合物10的制备



[0813] 或者如下：

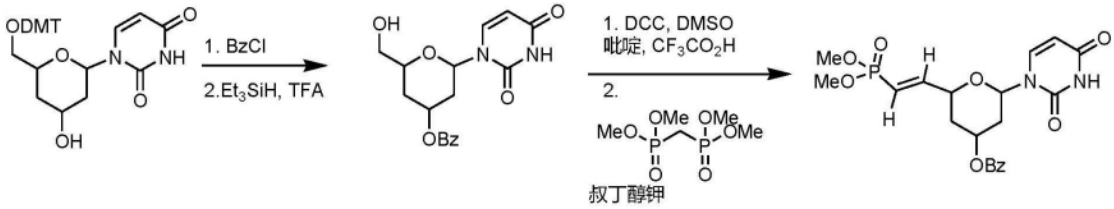


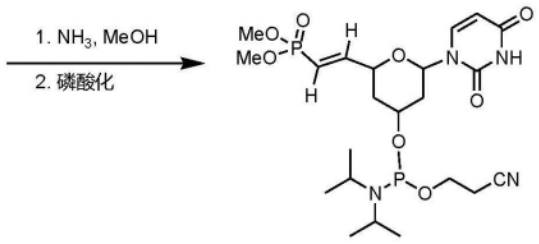
[0814]



10

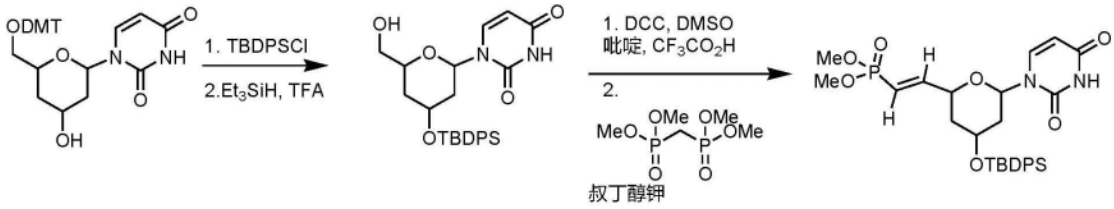
[0815] 实施例5.化合物11的制备



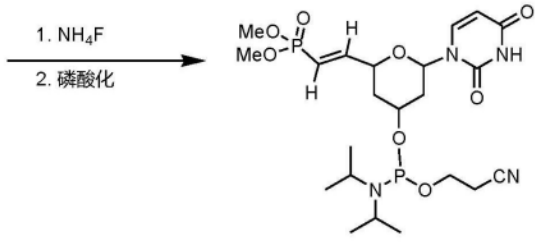


11

[0816] 或者如下：

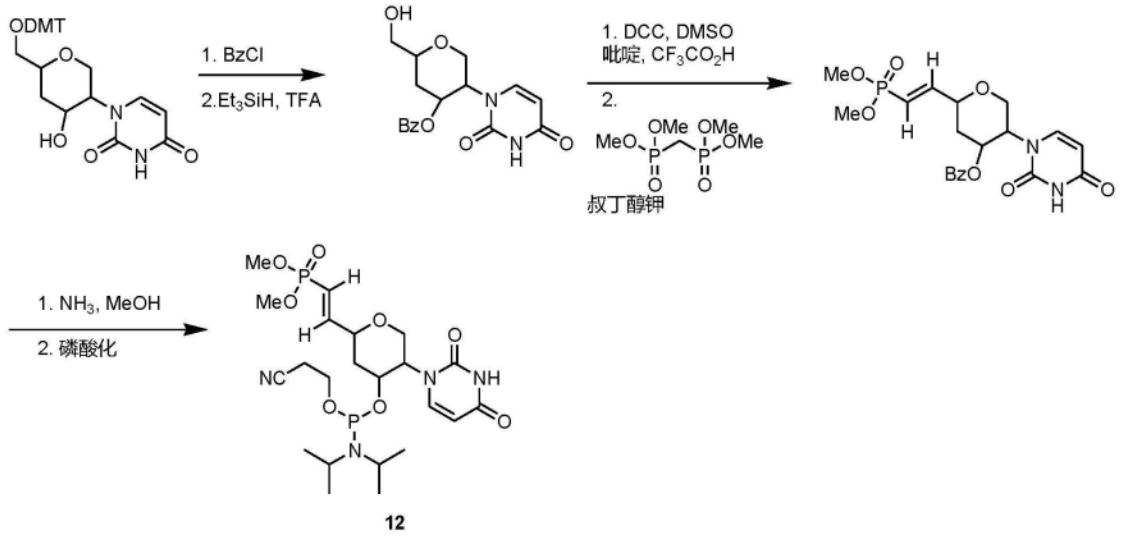


[0817]

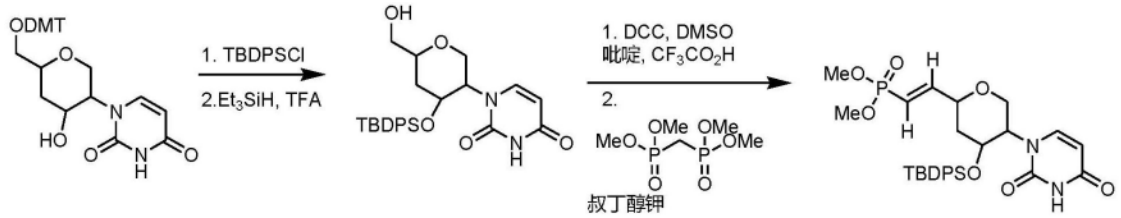


11

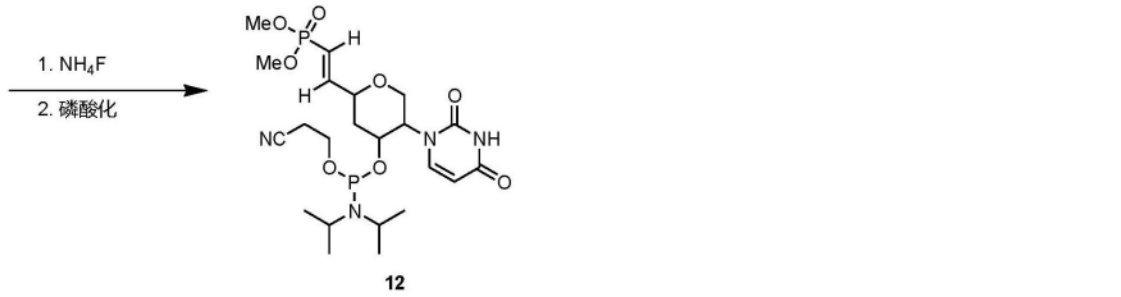
[0818] 实施例6.化合物12的制备



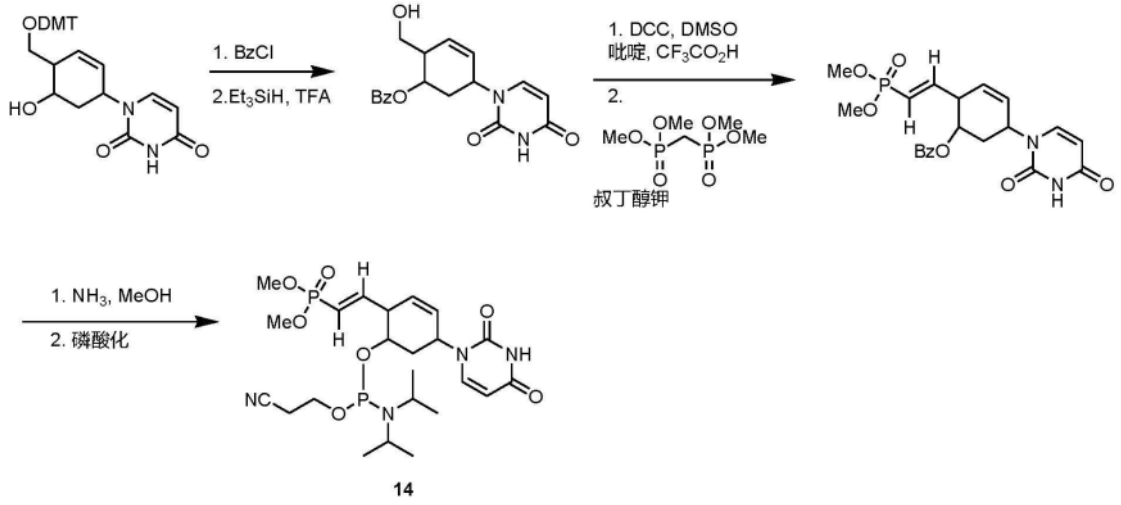
[0819] 或者如下：



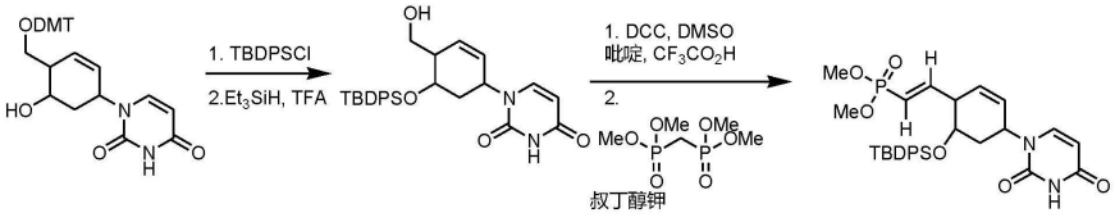
[0820]



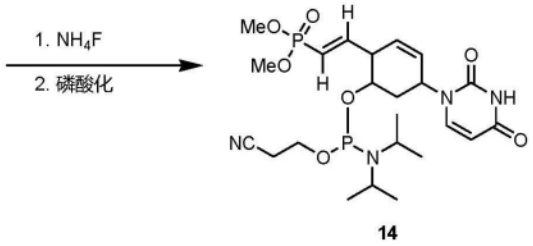
[0821] 实施例7.化合物14的制备



[0822] 或者如下：

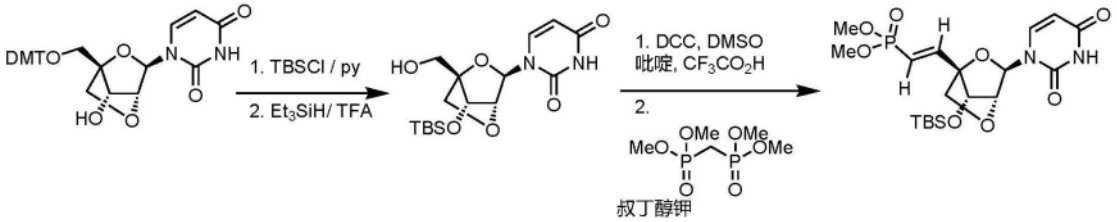


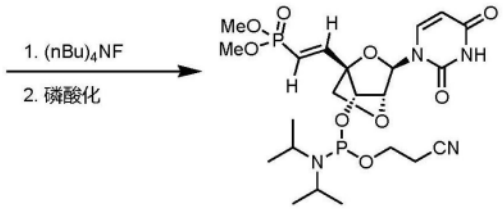
[0823]



14

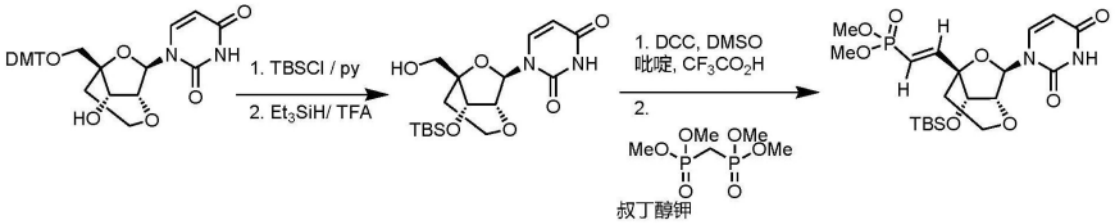
[0824] 实施例8.化合物15的制备



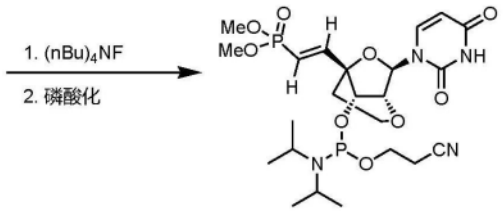


15

[0825] 实施例9.化合物16的制备

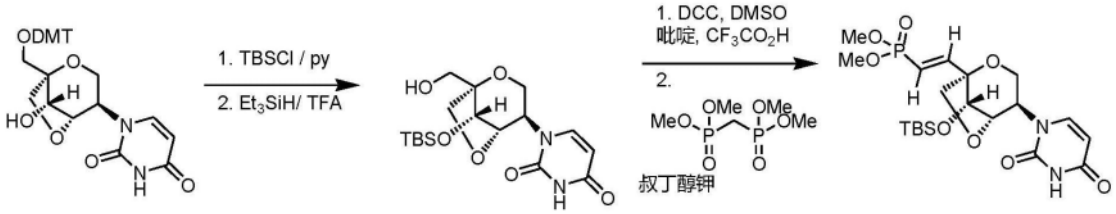


[0826]

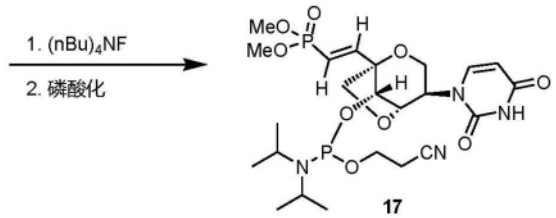


16

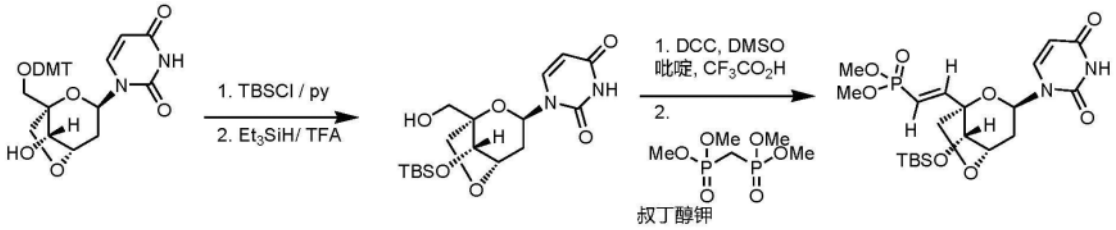
[0827] 实施例10.化合物17的制备



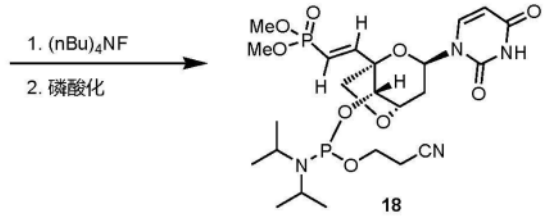
[0828]



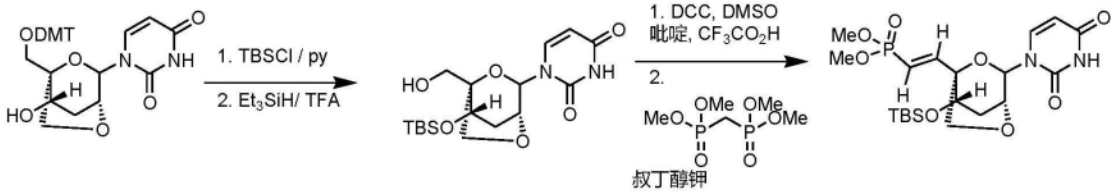
[0829] 实施例11.化合物18的制备



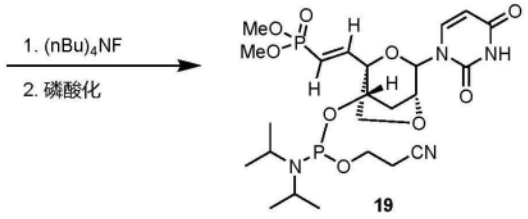
[0830]



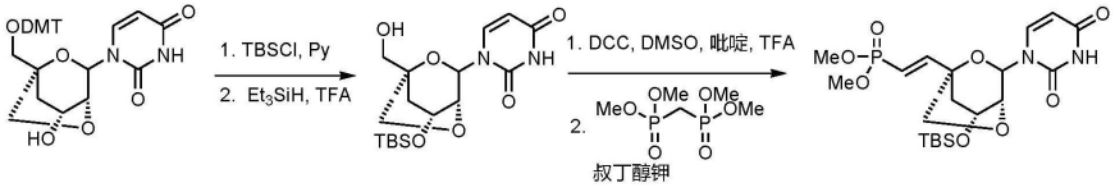
[0831] 实施例12.化合物19的制备



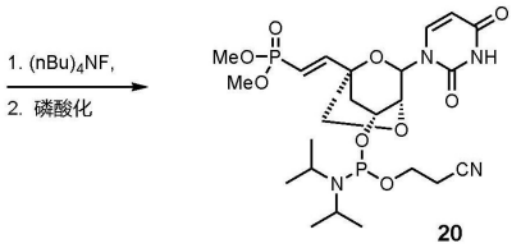
[0832]



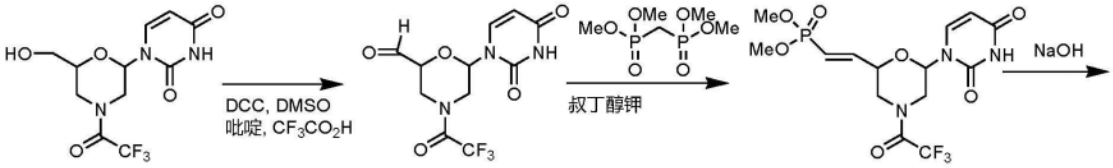
[0833] 实施例13.化合物20的制备



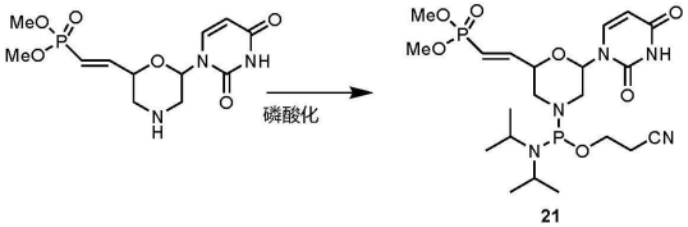
[0834]



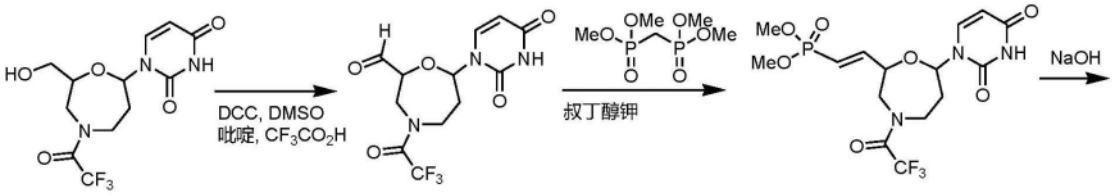
[0835] 实施例14.化合物21的制备



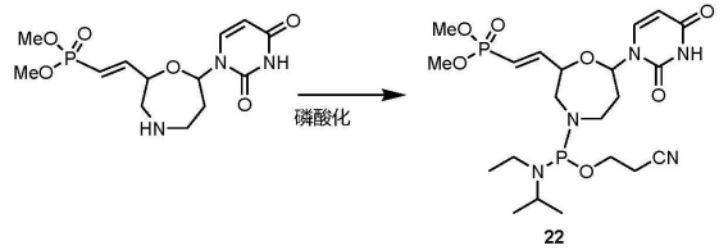
[0836]



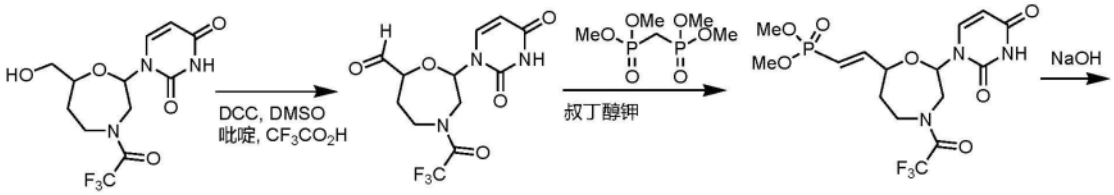
[0837] 实施例15.化合物22的制备



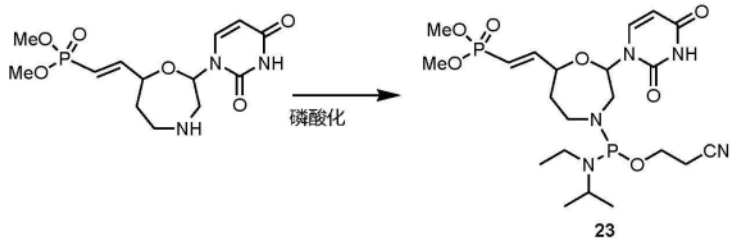
[0838]



[0839] 实施例16.化合物23的制备



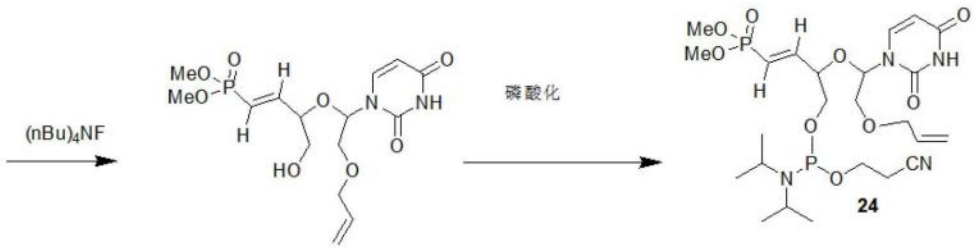
[0840]



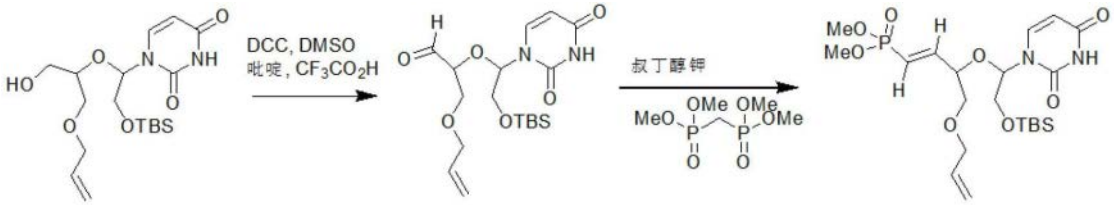
[0841] 实施例17.化合物24的制备



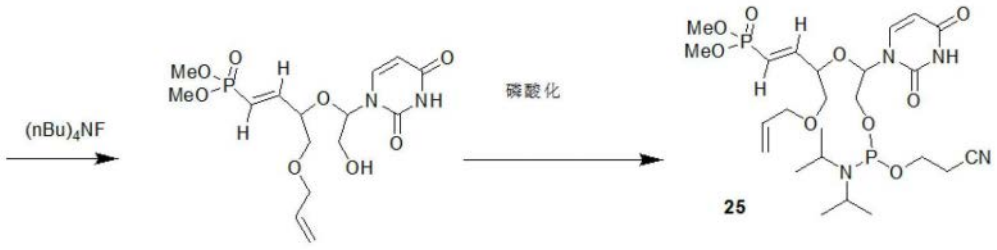
[0842]



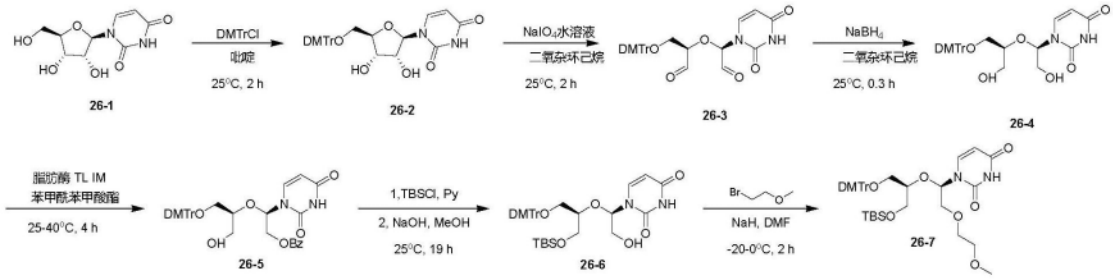
[0843] 实施例18.化合物25的制备



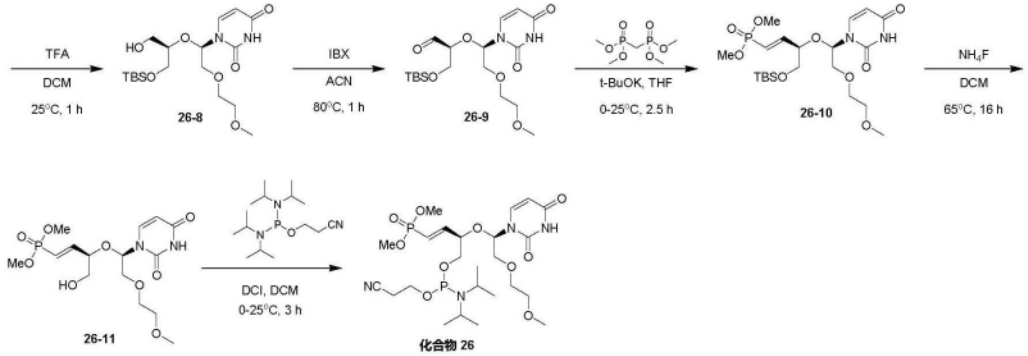
[0844]



[0845] 实施例19.化合物26的制备



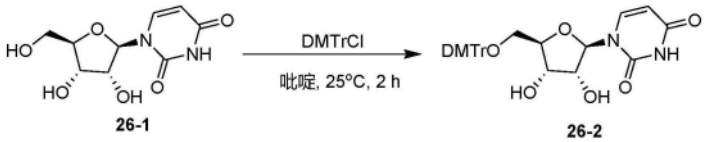
[0846]



[0847] 用于制备化合物26的合成程序

[0848] 化合物26-2

[0849]

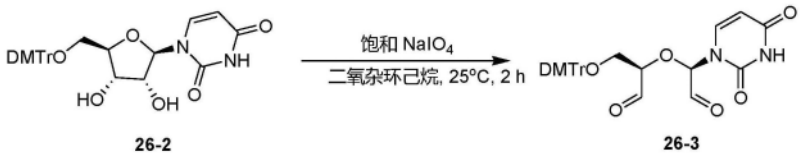


[0850] 向化合物26-1(500g,2.05mol,1.00eq)在吡啶(Py)(3500mL)中的溶液中加入DMTrCl(763g,2.25mol,1.10eq)。将混合物在25℃下搅拌2h。TLC(DCM/MeOH＝10/1,化合物26-2:R_f＝0.60)指示化合物26-1完全消耗。将反应混合物用DCM(5.00L)稀释,并用$NaHCO_3$(2.00L x 2)洗涤。合并的有机层用盐水(2.00L)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤,并减压浓缩,得到残余物。通过柱色谱法(SiO_2,石油醚/乙酸乙酯/TEA＝50/1/0.5%至0/1/0.5%)纯化残余物。获得呈白色固体的化合物26-2(700g,56.3%产率,90.0%纯度)。

[0851] ^{1}H NMR:400MHz,DMSO-d_6 δppm 11.35(s,1H),7.72(d,J＝8.0Hz,1H),7.36-7.41(m,2H),7.32(t,J＝7.6Hz,2H),7.20-7.28(m,5H),6.90(d,J＝8.6Hz,4H),5.48(d,J＝4.8Hz,1H),5.31(d,J＝8.0Hz,1H),5.14(d,J＝5.6Hz,1H),4.09(q,J＝5.4Hz,2H),3.92-3.99(m,1H),3.70-3.78(m,6H),3.18-3.30(m,2H)。

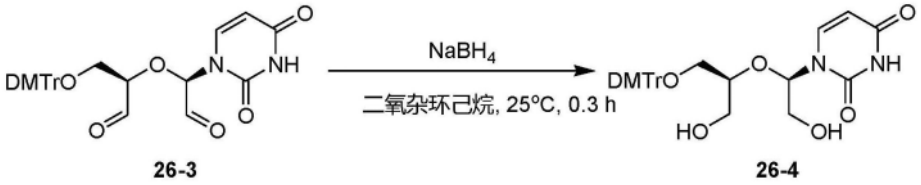
[0852] 化合物26-3

[0853]



[0854] 向化合物26-2(250g,457mmol,1.00eq)在二氧杂环己烷(2500mL)中的溶液中加入饱和$NaIO_4$(103g,484mmol,4.85mL,1.06eq)溶液。将混合物在25℃下搅拌2h。TLC(DCM/MeOH＝10/1,化合物26-3:R_f＝0.49)指示化合物26-2完全消耗。将反应混合物过滤。获得呈无色油的粗产物化合物26-3(250g),其用于下一步而无需进一步纯化。

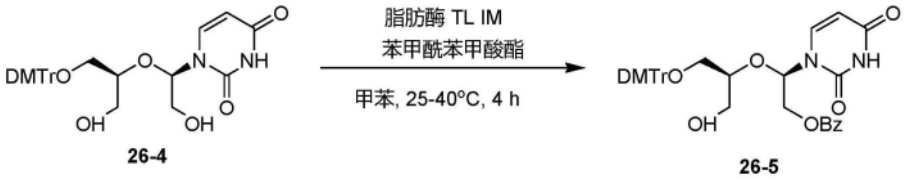
[0855] 化合物26-4

[0856] 

[0857] 向化合物26-3(250g,459mmol,1.00eq)在二氧杂环己烷(3000mL)中的溶液中加入$NaBH_4$(17.3g,459mmol,1.00eq)。将混合物在25℃下搅拌0.3h。TLC(DCM/MeOH=10/1,化合物26-4:R_f=0.41)指示化合物26-3完全消耗。将反应混合物用丙酮猝灭,用20%乙酸中和,并浓缩,在减压下得到残余物。将残余物用DCM(2.00L)稀释,用H_2O(2.00L)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。该产物用于下一步而无需进一步纯化。获得呈无色油的化合物26-4(250g)。

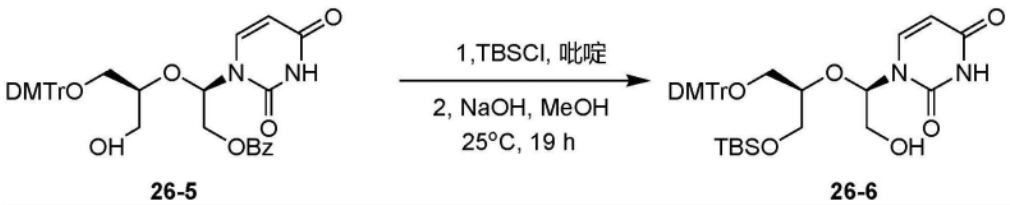
[0858] ^1H NMR:400MHz,DMSO-d_6δppm 11.35(s,1H),7.65(d,J=8.0Hz,1H),7.28-7.33(m,4H),7.17-7.21(m,5H),6.86(d,J=8.0Hz,4H),5.83(t,J=6.4Hz,1H),5.53(d,J=8.0Hz,1H),5.13(t,J=8.0Hz,1H),4.75(t,J=5.2Hz,1H),3.76(s,6H),3.68-3.73(m,1H),3.60-3.64(m,2H),3.42(t,J=5.2Hz,2H),2.96-3.02(m,2H)

[0859] 化合物26-5

[0860] 

[0861] 在25℃下,向化合物26-4(50.0g,91.1mmol,1.00eq)在甲苯(2500mL)中的溶液中加入苯甲酰苯甲酸酯(30.9g,136mmol,25.7mL,1.50eq)和脂肪酶TL IM(30.0g,29.2mmol)。将混合物在40℃下搅拌4h。TLC(DCM/MeOH=20/1,化合物26-5:R_f=0.58)指示化合物26-4完全消耗。将反应混合物过滤,通过添加甲醇(250mL)猝灭,减压浓缩,得到残余物,通过柱色谱法(SiO_2,石油醚/乙酸乙酯/TEA=10/1/0.5%至1/2/0.5%)纯化该残余物。获得呈白色固体的化合物26-5(37.5g,63.0%产率)。

[0862] 化合物26-6

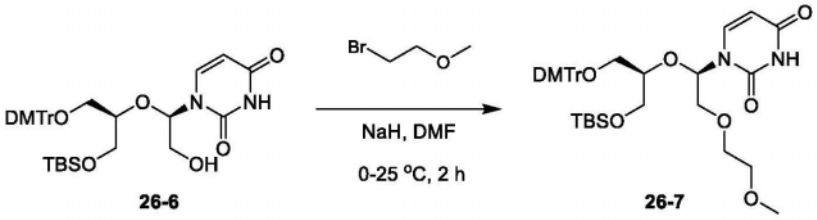
[0863] 

[0864] 在低于25℃下,向化合物26-5(340g,520mmol,1.00eq)在吡啶(Py)(1700mL)中的溶液中加入TBSCl(157g,1.04mol,127mL,2.00eq)。将混合物在25℃下搅拌19h。TLC(DCM/MeOH=20/1,化合物26-6:R_f=0.37)指示化合物26-5完全消耗。向反应混合物中加水(340mL)。将含有核苷的所得混合物溶解于MeOH(1.00L)中,然后在0℃下逐滴加入在MeOH中的NaOH(1.00L,pH=10),然后在0℃下搅拌2.5h。将混合物减压浓缩,得到残余物。向混合物中加入饱和NH_4Cl水溶液(1.00L),将其搅拌10min。加水(1.00L),并将混合物用DCM(1.00L)萃取,经Na_2SO_4干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物,将其通过柱色谱法(SiO_2,石油醚/乙酸

乙酯/TEA＝10/1/0.5％至0/1/0.5％)纯化。获得呈白色固体的化合物26-6(250g,339mmol,65.2％产率,90.0％纯度)。

[0865] ^{1}H NMR:400MHz,DMSO-d_6δppm 11.35(s,1H),7.65(d,J＝8.0Hz,1H),7.24-7.33(m,4H),7.14-7.22(m,5H),6.82-6.88(m,4H),5.83(t,J＝5.8Hz,1H),5.47-5.57(m,1H),5.11(t,J＝5.8Hz,1H),3.72(d,J＝0.8Hz,6H),3.57-3.67(m,4H),3.46-3.55(m,1H),2.94-3.00(m,2H),0.72-0.78(m,9H),-0.04(d,J＝8.2Hz,5H)

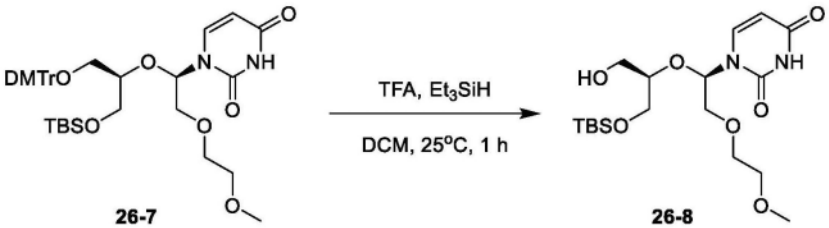
[0866] 化合物26-7

[0867] 

[0868] 在-20℃下,向化合物26-6(50.0g,75.4mmol,1.00eq)在DMF(500mL)中的溶液中加入NaH(9.96g,248.mmol,1.81uL,60％纯度,3.30eq),并在-20℃下搅拌0.5h。然后向反应中加入烷氧基溴化物(15.7g,113.mmol,10.6mL,1.50eq)。将混合物在0℃下搅拌1.5h。TLC(石油醚/乙酸乙酯＝1/2,化合物7:R_f＝0.43)指示化合物26-6完全消耗。通过在25℃下加入NH_4Cl(1.00L x 2)猝灭反应混合物,然后用乙酸乙酯(500mL)稀释并用水(500mL)洗涤。合并的有机层用盐水(500mL)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。通过柱色谱法(SiO_2,石油醚/乙酸乙酯/TEA＝10/1/0.5％至0/1/0.5％)纯化残余物。获得呈无色油的化合物26-7(34.0g,47.1mmol,62.5％产率)。

[0869] ^{1}H NMR:400MHz DMSO-d_6δppm 11.40(d,J＝1.8Hz,1H),7.68(d,J＝8.2Hz,1H),7.24-7.33(m,5H),7.14-7.22(m,5H),6.81-6.88(m,4H),5.96-6.02(m,1H),5.55(dd,J＝8.0,2.0Hz,1H),3.73(d,J＝0.8Hz,6H),3.70(dd,J＝6.0.,2.2Hz,2H),3.62-3.66(m,2H),3.53-3.57(m,2H),3.50-3.53(m,1H),3.38-3.42(m,2H),3.20-3.22(m,3H),2.94-3.00(m,2H),0.72-0.82(m,9H),-0.04(d,J＝7.4Hz,5H)

[0870] 化合物26-8

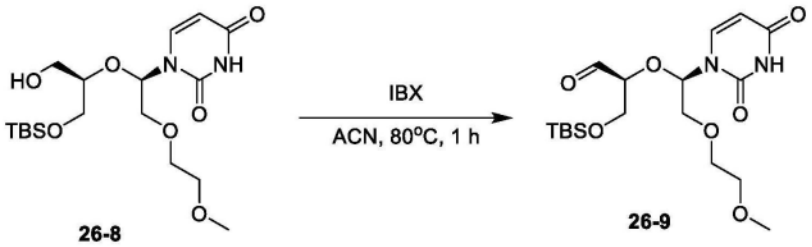
[0871] 

[0872] 向化合物26-7(46.8g,64.9mmol,1.00eq)在DCM(468mL)中的溶液中加入TFA(43.1g,378mmol,28.0mL,5.83eq)和Et_3SiH(15.1g,129mmol,20.7mL,2.00eq)。将混合物在25℃下搅拌1hr。TLC(石油醚/乙酸乙酯＝0/1,化合物26-8:R_f＝0.43)指示化合物26-7完全消耗。将反应混合物用DCM(500mL)稀释并用H_2O(500mL)洗涤。合并的有机层用$NaHCO_3$(500mL x 3)和盐水(500mL)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。通过柱色谱法(SiO_2,石油醚/乙酸乙酯＝10/1至0/1)纯化残余物。获得呈无色油的化合物26-8(17.0g,36.5mmol,56.3％产率,90.0％纯度)。

[0873] ^{1}H NMR:400MHz,DMSO-d_6δppm 11.87(s,1H),8.17(d,J＝8.2Hz,1H),7.75-7.87(m,

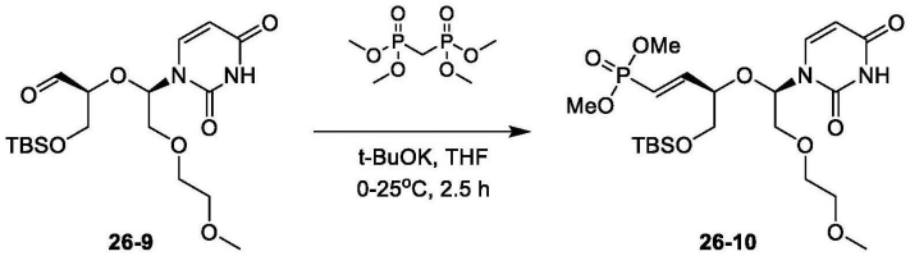
4H),7.63-7.74(m,5H),7.36(dd,J=9.0,2.6Hz,4H),6.34(t,J=5.8Hz,1H),6.05(d,J=8.0Hz,1H),5.62(t,J=5.8Hz,1H),4.24(s,6H),4.09-4.20(m,4H),4.02(d,J=4.6Hz,1H),3.83(s,1H),2.95-3.09(m,4H),1.28(s,9H),0.48(d,J=8.2Hz,6H)。

[0874] 化合物26-9

[0875] 

[0876] 向化合物26-8(17.0g,40.6mmol,1.00eq)在ACN(170mL)中的溶液中加入IBX(17.1g,60.9mmol,1.50eq)。将混合物在80℃下搅拌1hr。LC-MS显示化合物26-8完全消耗。将反应混合物过滤并减压浓缩,得到残余物。获得呈无色油的粗产物化合物26-9(17.0g,粗品),其用于下一步而无需进一步纯化。

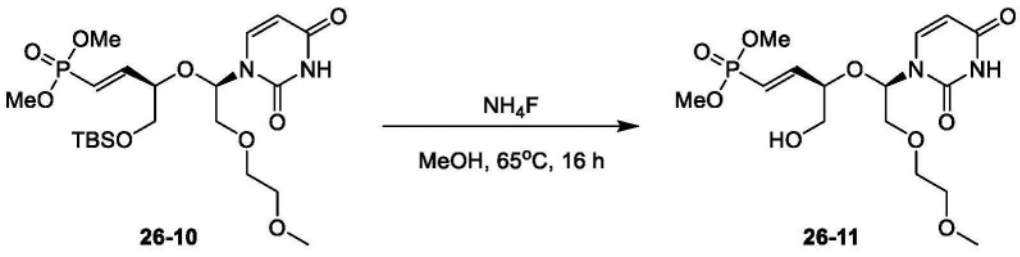
[0877] 化合物26-10

[0878] 

[0879] 在0℃下,向化合物亚甲基二膦酸四甲酯(15.1g,65.3mmol,1.60eq)在THF(100mL)中的溶液中逐滴加入t-BuOK(6.87g,61.2mmol,1.50eq),并将混合物在25℃下搅拌0.5hr。然后将混合物逐滴加入含化合物26-9(17.0g,40.8mmol,1.00eq)的THF(70.0mL)中,并在0℃下搅拌1h,使之达到25℃,并在25℃下搅拌1h。TLC(石油醚/乙酸乙酯=0/1,化合物10:R_f=0.07)指示化合物26-9完全消耗。通过加入NH_4Cl(500mL)猝灭反应混合物,然后用乙酸乙酯(200mL)稀释并萃取。合并的有机层用盐水(200mL)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。通过柱色谱法(SiO_2,石油醚/乙酸乙酯=10/1至0/1)纯化残余物。获得呈白色固体的化合物26-10(11.4g,16.3mmol,40.1%产率,75.0%纯度)。

[0880] ^1H NMR:400MHz,$CDCl_3$δppm 9.19(s,1H),7.43(d,J=8.16Hz,1H),6.51-6.67(m,1H),6.13(t,J=4.78Hz,1H),5.82-5.95(m,1H),5.72(dd,J=8.04,1.88Hz,1H),4.20(s,1H),3.63-3.78(m,12H),3.45-3.54(m,2H),3.31-3.37(m,3H),0.82-0.94(m,9H),0.00-0.10(m,6H)。

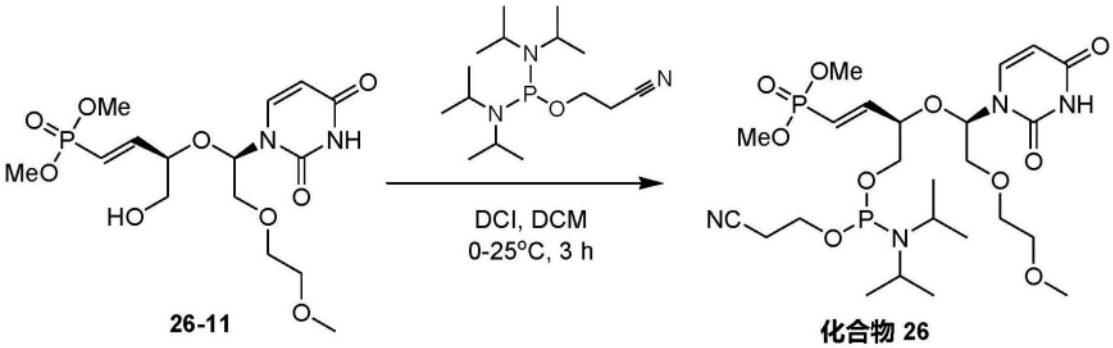
[0881] 化合物26-11

[0882] 

[0883] 向化合物26-10(11.4g,21.mmol,1.00eq)在甲醇(114mL)中的溶液中加入NH_4F(6.46g,174mmol,8.00eq)。将混合物在65℃下搅拌16h。TLC(DCM/MeOH＝20/1,化合物10:R_f＝0.28)指示化合物26-10完全消耗。将反应混合物减压浓缩,得到残余物。通过柱色谱法(SiO_2,乙酸乙酯/MeOH＝100/1至10/1)纯化残余物。获得呈无色油的化合物26-11(5.90g,13.0mmol,59.6%产率,90.0%纯度)。

[0884] ^1H NMR:400MHz DMSO-d_6,δppm 11.29(s,1H)7.74(d,J＝8.0Hz,1H)6.42-6.62(m,1H)5.90-5.98(m,2H)5.62(dd,J＝8.0,1.2Hz,1H)5.01(t,J＝5.6Hz,1H)4.18(d,J＝1.6Hz,1H)4.10(q,J＝5.2Hz,1H)3.70-3.76(m,2H)3.50-3.58(m,8H)3.43-3.49(m,1H)3.36-3.41(m,2H)3.21(s,3H)3.17(d,J＝5.2Hz,2H)1.91(s,1H)

[0885] 化合物26

[0886] 

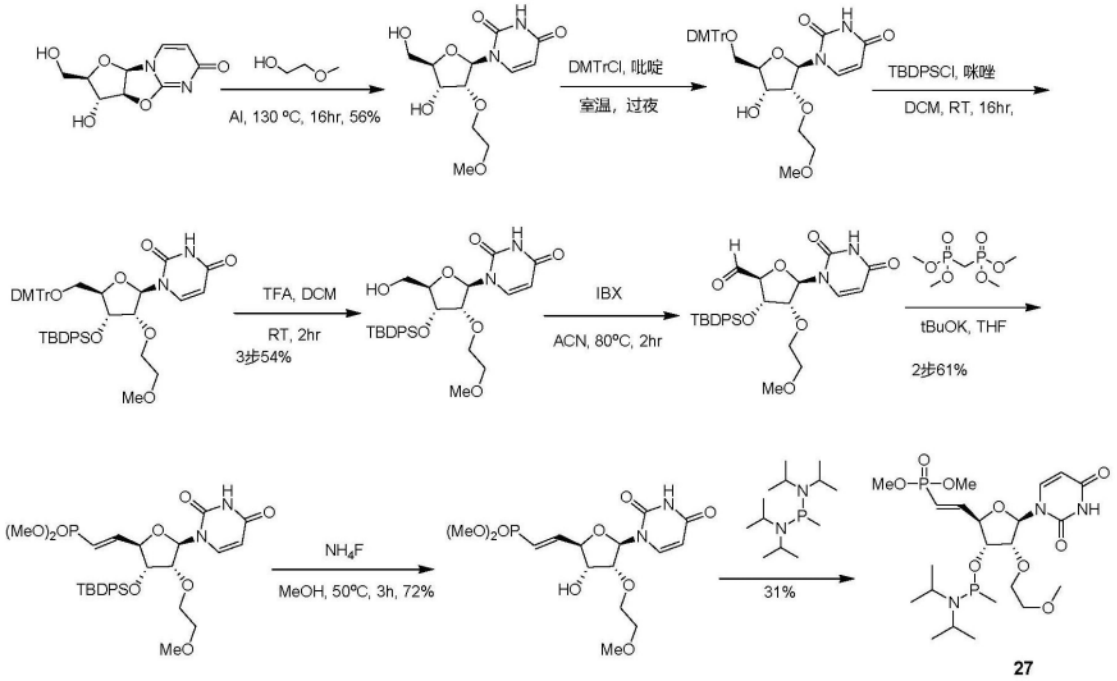
[0887] 在0℃下,向化合物26-11(4.90g,12.0mmol,1.00eq)在DCM(49.0mL)中的溶液中加入DCI(2.27g,19.2mmol,1.60eq)和N,N,N',N-四异丙基二氨基磷酸2-氰基乙酯(6.51g,21.6mmol,6.86mL,1.80eq)。将混合物在25℃下搅拌3hr。TLC(DCM/MeOH＝10/1,化合物26:R_f＝0.58)指示化合物26-11完全消耗。将反应混合物用DCM(50.0mL)稀释,并用$NaHCO_3$水溶液(50.0mL x 2)洗涤。合并的有机层用盐水(50.0mL)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并减压浓缩,得到残余物。通过柱色谱法(SiO_2,石油醚/乙酸乙酯/TEA＝100/1/0.5%至0/1/0.5%)纯化残余物。获得呈无色油的化合物26(5.40g,8.52mmol,70.9%产率,96.0%纯度)。

[0888] ^{31}P解耦^1H NMR:(400MHz,CD_3CN):δ7.42-7.45(dd,J＝8Hz,1H),δ6.42-6.47(dd,J＝17.2Hz,1H),5.97-5.84(m,2H),5.54-5.52(d,J＝8Hz,1H),4.27-4.23(m,1H),3.75-3.50(br,12H),3.36-3.30(br,2H),3.18(s,3H),2.60-2.57(m,2H),1.10-1.09(d,12H)

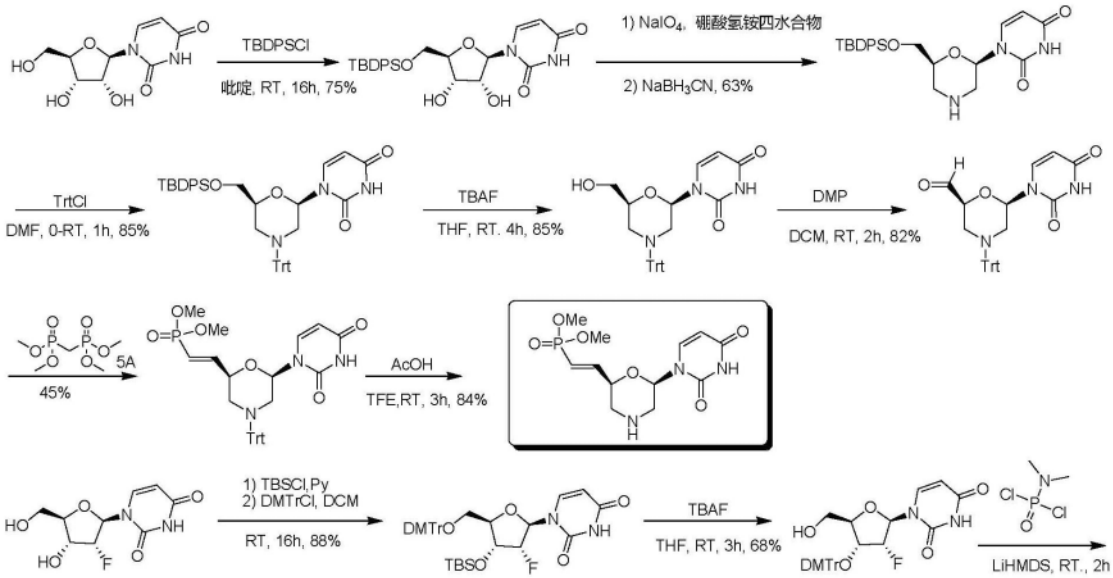
[0889] ^{31}P NMR(400MHz,CD_3CN)δ148.6,148.4,19.24,19.22

[0890] 针对$C_{24}H_{42}N_4O_{10}P_2$计算的MS(ESI)$(M-H)^-$ m/z＝607.2,实测607.2

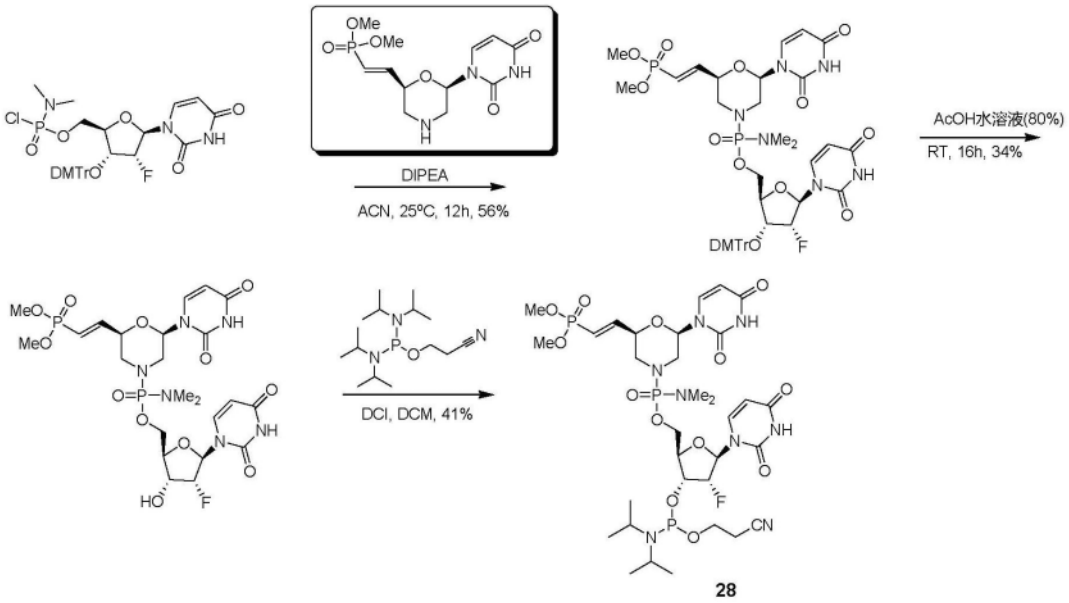
[0891] 实施例20.化合物27的制备

[0892] 

[0893] 实施例21.化合物28的制备

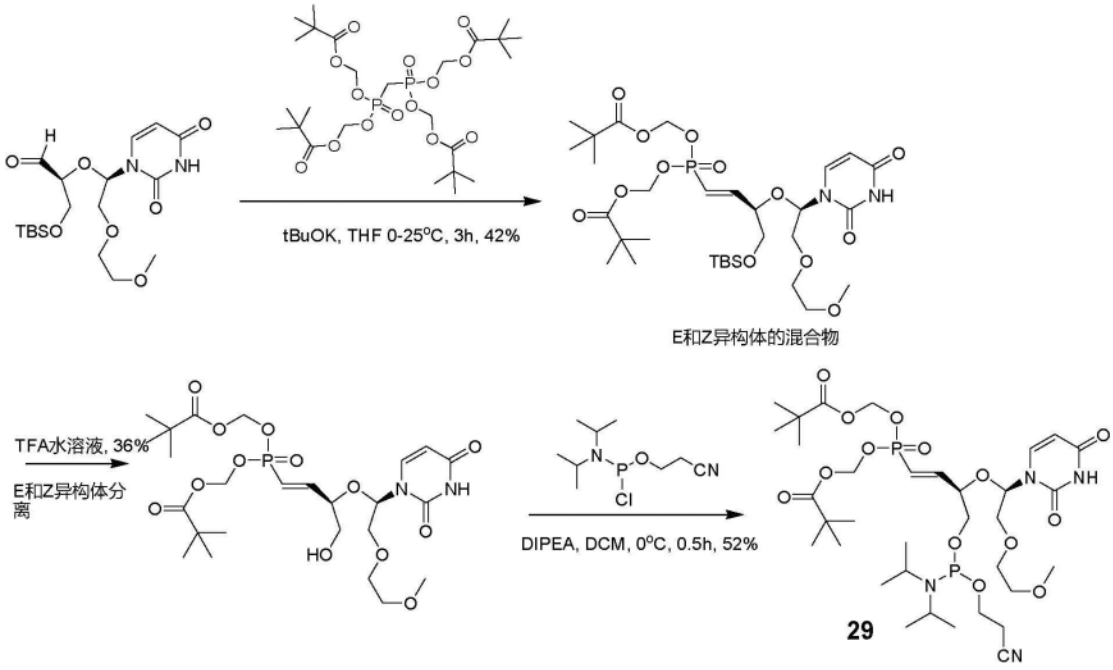


[0894]

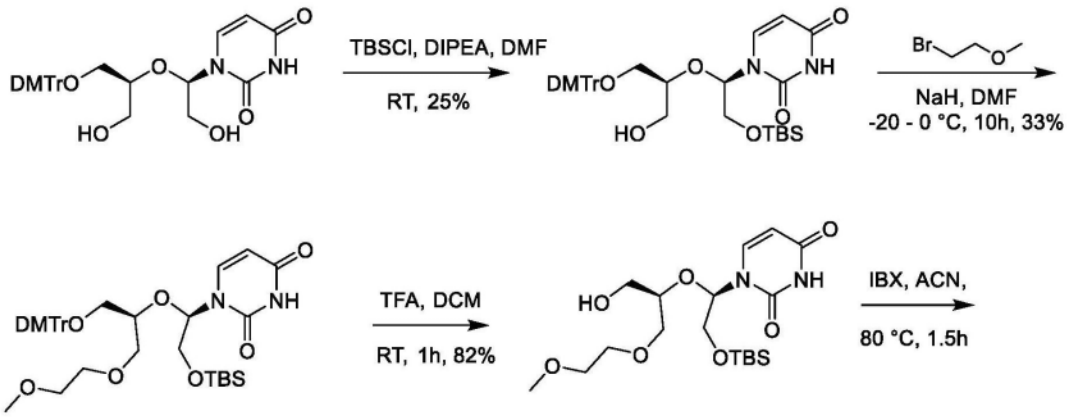


[0895] 实施例22.化合物29的制备

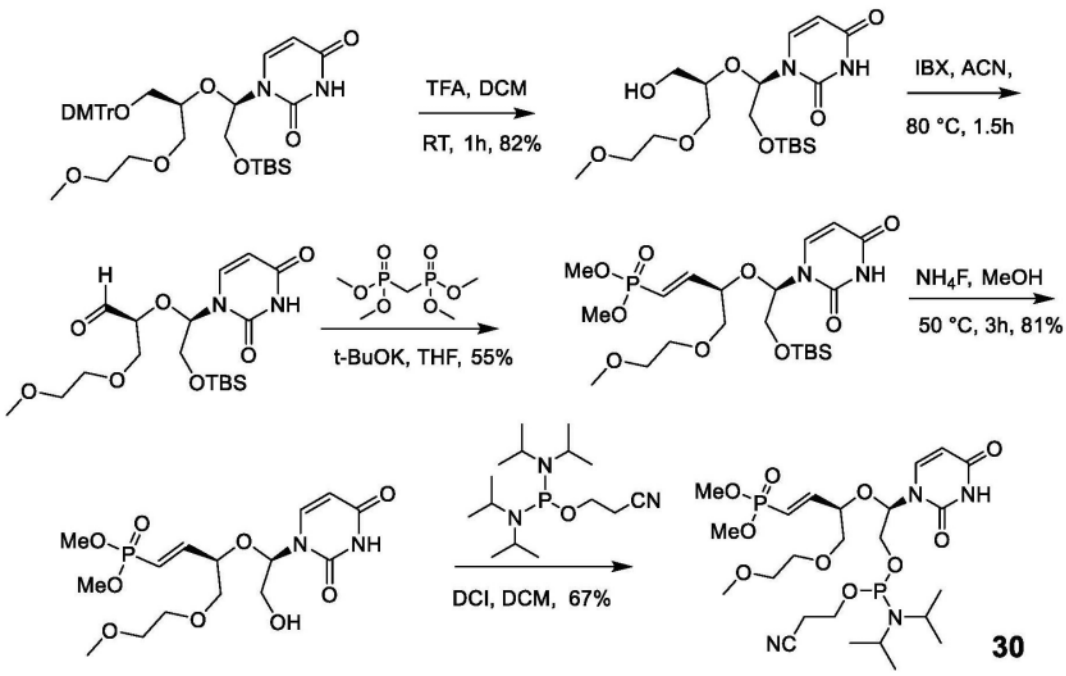
[0896]



[0897] 实施例23.化合物30的制备

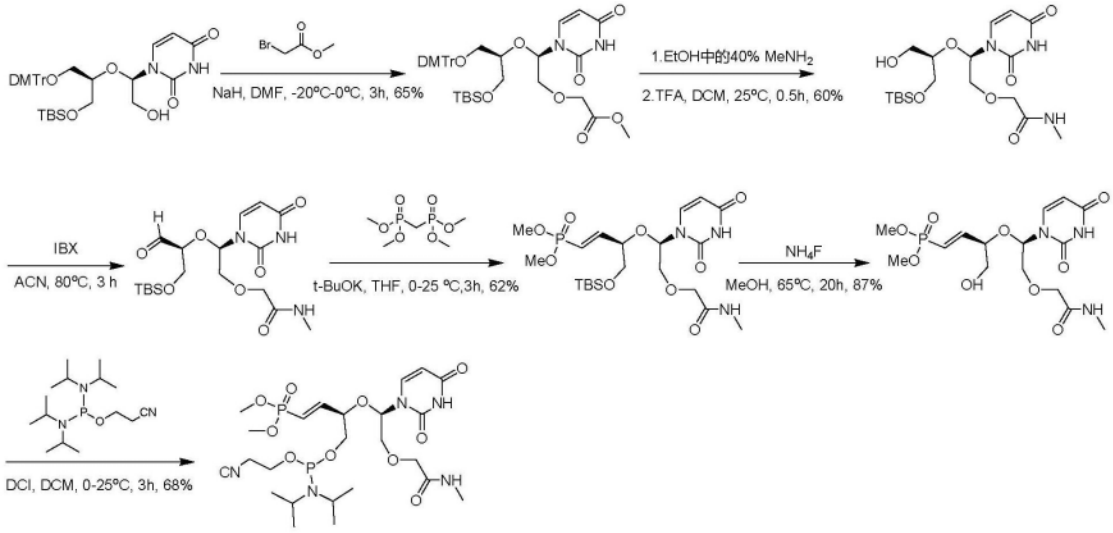


[0898]



[0899] 实施例24.化合物31的制备

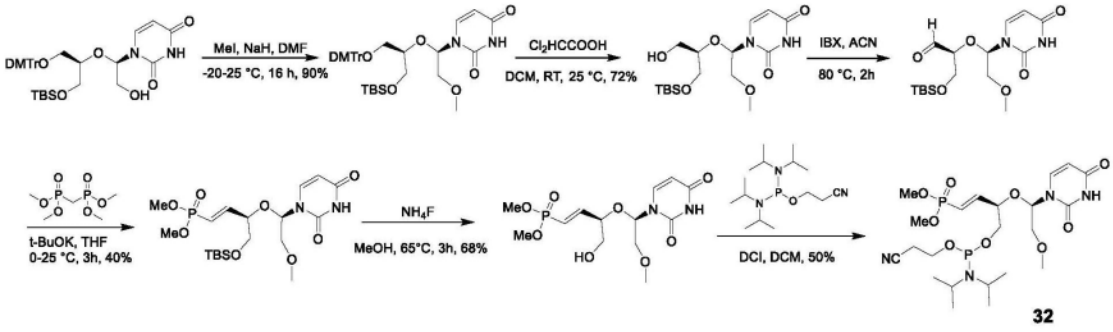
[0900]



31

[0901] 实施例25.化合物32的制备

[0902]

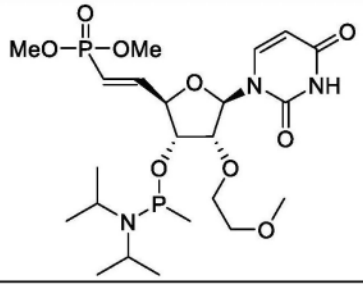


32

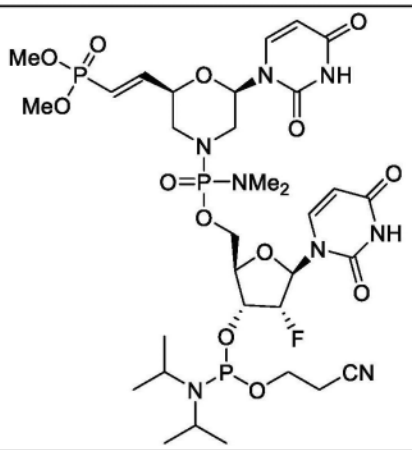
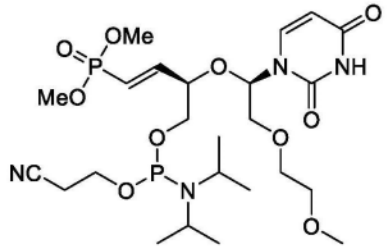
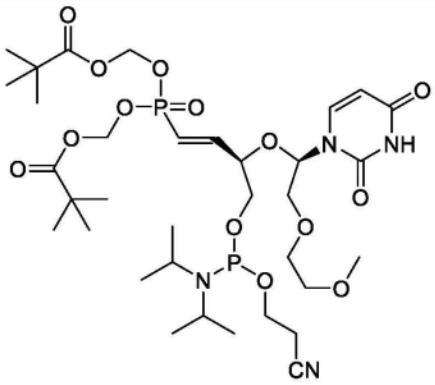
[0903] 实施例26.分析数据

[0904] 本文所述各种化合物的^{31}P解耦^{1}H NMR、^{31}P NMR和MS(ESI)数据在以下示出：

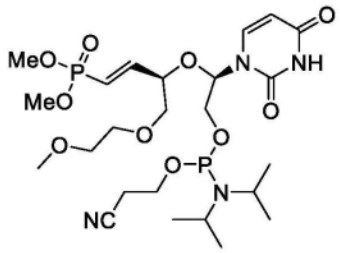
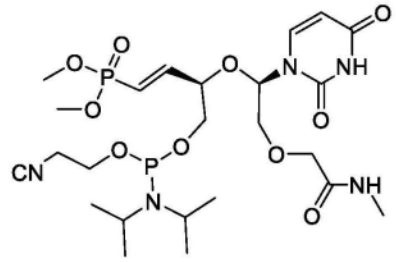
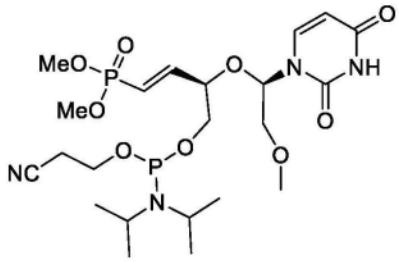
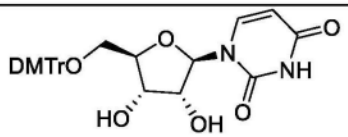
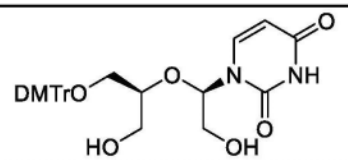
[0905]

化学结构	分析(NMR 和 MS)数据
	^{31}P 解耦 ^{1}H NMR (400MHz, CD_3CN): δ 7.39-7.35(dd,J =7.6Hz,1H), δ6.77(m,1H), 6.0(m,1H), 5.82-5.78 (dd,J=3.6,14Hz,1H), 5.66-5.63(dd, J=4, 8Hz,1H), 4.52-4.46(m,1H), 4.16-4.01(m, 2H), 3.73-3.47(br,12 H), 3.28(s,3H), 1.26(d,J=6.4Hz,3H), 1.18-1.16(d,J=6.4Hz, 6H), 1.09-

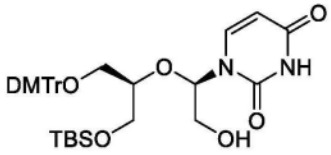
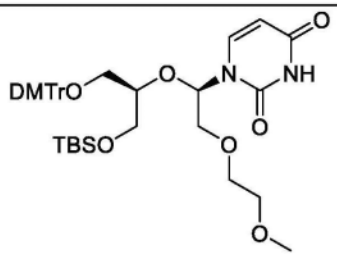
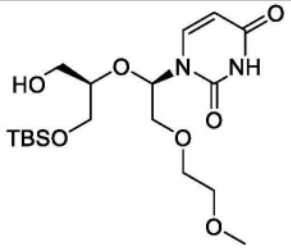
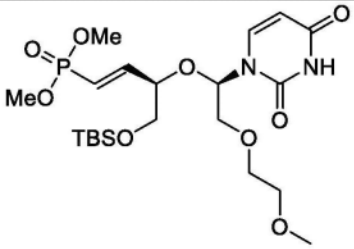
[0906]

	1.08(d,J=6.4Hz,6H) ^{31}P NMR (400 MHz, CD_3CN) δ125.7, 125.5, 19.09, 18.95 针对 $C_{24}H_{42}N_4O_{10}P_2$ 计算的 MS (ESI) (M+H)+ m/z = 652.2，实测 652.2
	^{31}P 解耦 ^{1}H NMR (400MHz, CD_3CN): δ7.70-7.61(m,1H), δ7.55-7.48(m, 1H), 7.08-6.73(br, 1H), 6.01(br, 1H), 5.69(br, 4H), 5.3 (m, 1H), 4.78-4.49(m, 2H), 4.11(br, 3H), 3.90-3.48(br,14H), 2.83-2.59(Br,10H), 1.35-1.20(m,12H) ^{31}P NMR (400 MHz, CD_3CN) δ150.75, 150.71, 150.05, 149.99, 20.54, 20.44, 15.39, 15.29 针对 $C_{32}H_{50}FN_8O_{13}P_3$ 计算的 MS (ESI) (M-H)$^-$ m/z = 865.2，实测 865.2
	^{31}P 解耦 ^{1}H NMR (400MHz, CD_3CN): δ 7.42-7.45(dd, J =8Hz,1H), δ 6.42-6.47(dd, J=17.2 Hz, 1H), 5.97-5.84(m, 2H), 5.54-5.52(d, J=8Hz, 1H), 4.27-4.23(m, 1H), 3.75-3.50(br, 12 H), 3.36-3.30(br, 2H), 3.18(s, 3H), 2.60-2.57(m, 2H), 1.10-1.09(d, 12H) ^{31}P NMR (400 MHz, CD_3CN) δ148.6, 148.4, 19.24, 19.22 针对 $C_{24}H_{42}N_4O_{10}P_2$ 计算的 MS (ESI) (M-H)$^-$ m/z = 607.2，实测 607.2
	^{31}P 解耦 ^{1}H NMR (400MHz, CD_3CN): δ 7.55 (dd, J =8Hz,1H), δ 6.58-6.69 (m, J=17.2 Hz, 1H), 6.11-6.02 (m, 2H), 5.66-5.47 (m, 5H), 4.36-4.38 (m, 1H), 3.88-3.60 (m, 9 H), 3.46-3.44 (br, 2H), 3.29 (s, 3H), 2.69 (dt, J=1.6Hz, 6Hz, 2H), 1.20 (m, 30H) ^{31}P NMR (400 MHz, CD_3CN) δ148.69, 148.49, 16.79 针对 $C_{34}H_{58}N_4O_{14}P_2$ 计算的 MS (ESI) (M-H)$^-$ m/z = 807.3，实测 807.3

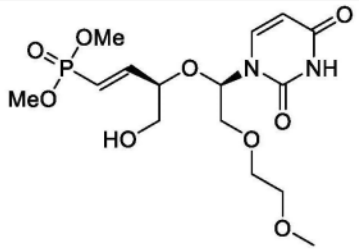
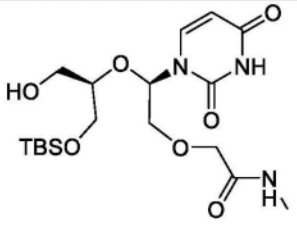
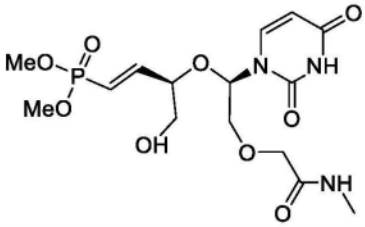
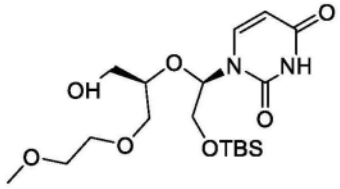
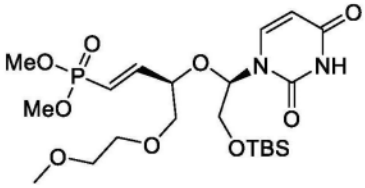
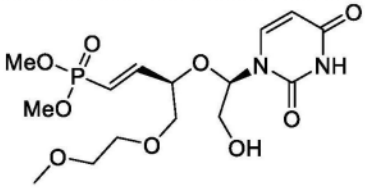
[0907]

	^{31}P 解耦 ^{1}H NMR (400MHz, CD_3CN): δ 7.55-7.52(dd, J =8Hz,1H), δ 6.58-6.52(dd, J=17.2 Hz, 1H), 6.08-5.94(m, 2H), 5.67-5.64(d, J=8Hz, 1H), 4.39-4.35(m, 1H), 3.95-3.79(br, 4 H),3.75-3.58 (br, 12H), 3.57-3.49(br, 2H), 3.33(br, 3H), 2.68-2.65(t, 2H), 1.18-1.13(m, 12H) ^{31}P NMR (400 MHz, CD_3CN) δ149.05, 148.82, 19.41, 19.38 针对 $C_{24}H_{42}N_4O_{10}P_2$ 计算的 MS (ESI) $(M-H)^-$ m/z = 607.2，实测 607.2
	^{1}H NMR (400MHz, CD_3CN): δ7.55 (d, J=8Hz,1H), 6.83 (br, 1H) δ6.57 (ddd, J=5.2, 17.2, 39.2 Hz, 1H), 6.12-5.95 (m, 2H), 5.68(d, J=8Hz, 1H), 4.4 (br, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.88-3.52 (br, 14H), 2.35-2.68 (br, 5H), 1.20 (d, J=6.8Hz, 12H) ^{31}P NMR (400 MHz, CD_3CN) δ148.6, 148.4, 19.28 针对化学式 $C_{24}H_{41}N_5O_{10}P_2$ 计算的 MS (ESI) $(M-H)^-$ m/z = 620.2，实测 620.2
	^{1}H NMR (400MHz, CD_3CN): δ9.02, (br,1H), δ7.51 (d, J=8Hz,1H), 6.53 (br, 1H) δ6.06 (br, 2H), 5.68(d, J=8Hz, 1H), 4.37 (m,1H), 3.87-3.7 (m, 4H), 3.69-3.63 (m, 10H), 3.35 (s, 3H), 2.70 (m, 2H), 1.22 (m, 12H) ^{31}P NMR (400 MHz, CD_3CN) δ148.7, 148.4, 19.19, 19.15 针对化学式 $C_{22}H_{38}N_4O_9P_2$ 计算的 MS (ESI) $(M-H)^-$ m/z = 563.2，实测 563.2
	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO-d_6 δ ppm 11.35 (s, 1 H), 7.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.36-7.41 (m, 2H), 7.32 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.20-7.28 (m, 5H), 6.90 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 5.48 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.31 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.14 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.09 (q, J = 5.4 Hz, 2H), 3.92-3.99 (m, 1H), 3.70-3.78 (m, 6H), 3.18-3.30 (m, 2H)。
	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO-d_6 δ ppm 11.35 (s, 1H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.28-7.33 (m, 4H), 7.17-7.21 (m, 5H), 6.86 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 5.83 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 5.53

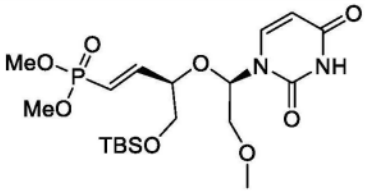
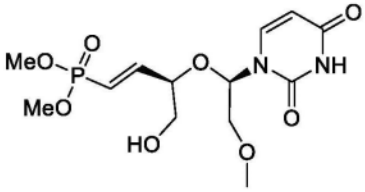
[0908]

	(d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.13 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.75 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.76 (s, 6H), 3.68-3.73 (m, 1H), 3.60-3.64 (m, 2H), 3.42 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.96-3.02 (m, 2H)
	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO-*d*$_6$ δ ppm 11.35 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.24-7.33 (m, 4H), 7.14-7.22 (m, 5H), 6.82-6.88 (m, 4H), 5.83 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.47-5.57 (m, 1H), 5.11 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.72 (d, *J* = 0.8 Hz, 6H), 3.57-3.67 (m, 4H), 3.46-3.55 (m, 1H), 2.94-3.00 (m, 2H), 0.72-0.78 (m, 9H), -0.04 (d, *J* = 8.2 Hz, 5H)
	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO-*d*$_6$ δ ppm 11.40 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.24-7.33 (m, 5H), 7.14-7.22 (m, 5H), 6.81-6.88 (m, 4H), 5.96-6.02 (m, 1H), 5.55 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 3.73 (d, *J* = 0.8 Hz, 6H), 3.70 (dd, *J* = 6.0., 2.2 Hz, 2H), 3.62-3.66 (m, 2H), 3.53-3.57 (m, 2H), 3.50-3.53 (m, 1H), 3.38-3.42 (m, 2H), 3.20-3.22 (m, 3H), 2.94-3.00 (m, 2H), 0.72-0.82 (m, 9H), -0.04 (d, *J* = 7.4 Hz, 5H)
	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO-*d*$_6$ δ ppm 11.87 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.75-7.87 (m, 4H), 7.63-7.74 (m, 5H), 7.36 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 4H), 6.34 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.62 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.24 (s, 6H), 4.09-4.20 (m, 4H), 4.02 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.83 (s, 1H), 2.95-3.09 (m, 4H), 1.28 (s, 9H), 0.48 (d, *J* = 8.2 Hz, 6H)。
	^{1}H NMR: 400 MHz, $CDCl_3$ δ ppm 9.19 (s, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.16 Hz, 1H), 6.51-6.67 (m, 1H), 6.13 (t, *J* = 4.78 Hz, 1H), 5.82-5.95 (m, 1H), 5.72 (dd, *J* = 8.04, 1.88 Hz, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.63-3.78 (m, 12H), 3.45-3.54 (m, 2H), 3.31-3.37 (m, 3H), 0.82-0.94 (m, 9H), 0.00-0.10 (m, 6H)。

[0909]

	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO-d_6 δ ppm 11.29 (s, 1H) 7.74 (d, J = 8.0 Hz, 1H) 6.42-6.62 (m, 1H) 5.90-5.98 (m, 2H) 5.62 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H) 5.01 (t, J = 5.6 Hz, 1H) 4.18 (d, J = 1.6 Hz, 1H) 4.10 (q, J = 5.2 Hz, 1H) 3.70-3.76 (m, 2H) 3.50-3.58 (m, 8H) 3.43-3.49 (m, 1H) 3.36-3.41 (m, 2H) 3.21 (s, 3H) 3.17 (d, J = 5.2 Hz, 2H) 1.91 (s, 1H)
	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO-d_6 δ 11.30 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.61 (br d, J = 4.3 Hz, 1H), 6.03 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.61 (dd, J = 2.0, 8.0 Hz, 1H), 4.66 (br s, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.73-3.57 (m, 4H), 3.49-3.43 (m, 1H), 3.34-3.25 (m, 2H), 2.60 (d, J = 4.8 Hz, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.05 (s, 6H)
	^{1}HNMR: 400 MHz CD_3CN δ 7.52 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.98 (br s, 1H), 6.61-6.47 (m, 1H), 6.06-5.86 (m, 2H), 5.65 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.28-4.20 (m, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.80-3.51 (m, 10H), 2.73-2.67 (m, 4H) ^{31}PNMR: 162 MHz CD_3CN, δ 19.71 (s, 1P)
	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO d6 11.23 (s, 1H), 7.63 (d, J = 8.02 Hz, 1H), 5.85 (dd, J = 6.56, 4.98 Hz, 1H), 5.60 (dd, J = 7.92, 1.66 Hz, 1H), 4.65 (t, J = 5.58 Hz, 1H), 3.63-3.84 (m, 2H), 3.40-3.60 (m, 7H), 3.26 (s, 3H), 0.81 (s, 9H), 0.01 (d, J = 6.66 Hz, 5H)。
	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO d6 7.72 (d, J = 8.22 Hz, 1H), 6.38-6.61 (m, 1H), 5.76-6.09 (m, 2H), 5.61 (dd, J = 8.02, 2.16 Hz, 1H), 4.29-4.43 (m, 1H), 3.66-3.92 (m, 2H), 3.41-3.63 (m, 12H), 3.17-3.26 (m, 3H), 0.73-0.87 (m, 10H), 0.01 (d, J = 7.04 Hz, 7H)。
	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO d6 11.26 (d, J = 1.52 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 8.04 Hz, 1H), 6.43-6.58 (m, 1H), 5.88-6.06 (m, 1H), 5.75-5.85 (m, 1H), 5.61 (dd, J = 7.96, 2.08 Hz, 1H), 5.14 (t, J = 6.02 Hz, 1H), 4.34 (br d, J = 1.52 Hz, 1H), 3.42-3.70 (m, 14H), 3.26 (s, 3H)

[0910]

	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO-d_6 11.31 (s, 1H), 7.72-7.77 (m, 1H), 6.45-6.56 (m, 1H), 5.91-6.03 (m, 2H), 5.62 (dd, J = 8.40, 2.40 Hz, 1 H), 4.24 (br s, 1H), 3.72-3.76 (m, 1 H), 3.61-3.69 (m, 3H), 3.52-3.59 (m, 6 H), 3.26 (s, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.06 (d, J = 1.60 Hz, 6H)。 ^{31}P NMR: 162 MHz, DMSO-d_6 19.93 (s, 1P)
	^{1}H NMR: 400 MHz, DMSO-d_6 11.31 (s, 1H), 7.74 (d, J = 8.00 Hz, 1H), 6.47-6.58 (m, 1H), 5.87-5.99 (m, 2H), 5.63 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.10-4.19 (m, 2H), 3.66 (d, J = 6.00 Hz, 2H), 3.56 (dd, J = 11.2, 4.40 Hz, 6H), 3.43-3.48 (m, 1H), 3.28 (s, 3H), 3.17-3.18 (m, 2H)。 ^{31}P NMR: 162 MHz, DMSO-d_6 20.04 (s, 1P)。

[0911] 分子生物学实施例

[0912] 实施例1.序列

[0913] 表1、3、5、6和7示出了本文所述的靶序列。表2、4、8和9示出了本文所述的多核酸分子序列。

[0914] 表1.KRAS靶序列

[0915]

Id #	NM_033360.2 中的序列位置	NM_033360.2 中的靶位点	SEQ ID NO:
182	182-200	AAAUGACUGAAUAUAAACUUGUG	1
183	183-201	AAUGACUGAAUAUAAACUUGUGG	2
197	197-215	AACUUGUGGUAGUUGGAGCUGGU	3
224	224-242	UAGGCAAGAGUGCCUUGACGAUA	4
226	226-244	GGCAAGAGUGCCUUGACGAUACA	5
227	227-245	GCAAGAGUGCCUUGACGAUACAG	6
228	228-246	CAAGAGUGCCUUGACGAUACAGC	7
232	232-250	AGUGCCUUGACGAUACAGCUAAU	8
233	233-251	GUGCCUUGACGAUACAGCUAAUU	9
236	236-254	CCUUGACGAUACAGCUAAUUCAG	10
237	237-255	CUUGACGAUACAGCUAAUUCAGA	11
245	245-263	UACAGCUAAUUCAGAAUCAUUUU	12
266	266-284	UUGUGGACGAAUAUGAUCCAACA	13
269	269-287	UGGACGAAUAUGAUCCAACAAUA	14

[0916]

270	270-288	GGACGAAUAUGAUCCAACAAUAG	15

[0917] 表2.KRAS siRNA序列

[0918]

Id #	NM_033360.2 中的序列位置	有义链序列(5′-3′)	SEQ ID NO:	反义链序列(5′-3′)	SEQ ID NO:
182	182-200	AUGACUGAAUAUAAACUUGTT	16	CAAGUUUAUAUUCAGUCAUTT	17
183	183-201	UGACUGAAUAUAAACUUGUTT	18	ACAAGUUUAUAUUCAGUCATT	19
197	197-215	CUUGUGGUAGUUGGAGCUGTT	20	CAGCUCCAACUACCACAAGTT	21
224	224-242	GGCAAGAGUGCCUUGACGATT	22	UCGUCAAGGCACUCUUGCCTT	23
226	226-244	CAAGAGUGCCUUGACGAUATT	24	UAUCGUCAAGGCACUCUUGTT	25
227	227-245	AAGAGUGCCUUGACGAUACTT	26	GUAUCGUCAAGGCACUCUUTT	27
228	228-246	AGAGUGCCUUGACGAUACATT	28	UGUAUCGUCAAGGCACUCUTT	29
232	232-250	UGCCUUGACGAUACAGCUATT	30	UAGCUGUAUCGUCAAGGCATT	31
233	233-251	GCCUUGACGAUACAGCUAATT	32	UUAGCUGUAUCGUCAAGGCTT	33
236	236-254	UUGACGAUACAGCUAAUUCTT	34	GAAUUAGCUGUAUCGUCAATT	35
237	237-255	UGACGAUACAGCUAAUUCATT	36	UGAAUUAGCUGUAUCGUCATT	37
245	245-263	CAGCUAAUUCAGAAUCAUUTT	38	AAUGAUUCUGAAUUAGCUGTT	39
266	266-284	GUGGACGAAUAUGAUCCAATT	40	UUGGAUCAUAUUCGUCCACTT	41
269	269-287	GACGAAUAUGAUCCAACAATT	42	UUGUUGGAUCAUAUUCGUCTT	43
270	270-288	ACGAAUAUGAUCCAACAAUTT	44	AUUGUUGGAUCAUAUUCGUTT	45

[0919] 表3.EGFR靶序列

[0920]

hs Id #	NM_005228.3 中的 19 聚体位置	NM_005228.3 中的总 23 聚体靶位点的序列	SEQ ID NO:
68	68-86	GGCGGCCGGAGUCCCGAGCUAGC	46
71	71-89	GGCCGGAGUCCCGAGCUAGCCCC	47
72	72-90	GCCGGAGUCCCGAGCUAGCCCCG	48
73	73-91	CCGGAGUCCCGAGCUAGCCCCGG	49
74	74-92	CGGAGUCCCGAGCUAGCCCCGGC	50
75	75-93	GGAGUCCCGAGCUAGCCCCGGCG	51

	76	76-94	GAGUCCCGAGCUAGCCCCGGCGG	52
	78	78-96	GUCCCGAGCUAGCCCCGGCGGCC	53
	114	114-132	CCGGACGACAGGCCACCUCGUCG	54
	115	115-133	CGGACGACAGGCCACCUCGUCGG	55
	116	116-134	GGACGACAGGCCACCUCGUCGGC	56
	117	117-135	GACGACAGGCCACCUCGUCGGCG	57
	118	118-136	ACGACAGGCCACCUCGUCGGCGU	58
	120	120-138	GACAGGCCACCUCGUCGGCGUCC	59
	121	121-139	ACAGGCCACCUCGUCGGCGUCCG	60
	122	122-140	CAGGCCACCUCGUCGGCGUCCGC	61
	123	123-141	AGGCCACCUCGUCGGCGUCCGCC	62
	124	124-142	GGCCACCUCGUCGGCGUCCGCCC	63
	125	125-143	GCCACCUCGUCGGCGUCCGCCCG	64
	126	126-144	CCACCUCGUCGGCGUCCGCCCGA	65
	127	127-145	CACCUCGUCGGCGUCCGCCCGAG	66
	128	128-146	ACCUCGUCGGCGUCCGCCCGAGU	67
	129	129-147	CCUCGUCGGCGUCCGCCCGAGUC	68
	130	130-148	CUCGUCGGCGUCCGCCCGAGUCC	69
	131	131-149	UCGUCGGCGUCCGCCCGAGUCCC	70
	132	132-150	CGUCGGCGUCCGCCCGAGUCCCC	71
	135	135-153	CGGCGUCCGCCCGAGUCCCCGCC	72
	136	136-154	GGCGUCCGCCCGAGUCCCCGCCU	73
	141	141-159	CCGCCCGAGUCCCCGCCUCGCCG	74
	164	164-182	CCAACGCCACAACCACCGCGCAC	75
[0921]	165	165-183	CAACGCCACAACCACCGCGCACG	76
	166	166-184	AACGCCACAACCACCGCGCACGG	77
	168	168-186	CGCCACAACCACCGCGCACGGCC	78
	169	169-187	GCCACAACCACCGCGCACGGCCC	79
	170	170-188	CCACAACCACCGCGCACGGCCCC	80
	247	247-265	CGAUGCGACCCUCCGGGACGGCC	81
	248	248-266	GAUGCGACCCUCCGGGACGGCCG	82
	249	249-267	AUGCGACCCUCCGGGACGGCCGG	83
	251	251-269	GCGACCCUCCGGGACGGCCGGGG	84
	252	252-270	CGACCCUCCGGGACGGCCGGGGC	85
	254	254-272	ACCCUCCGGGACGGCCGGGGCAG	86
	329	329-347	AAAGAAAGUUUGCCAAGGCACGA	87
	330	330-348	AAGAAAGUUUGCCAAGGCACGAG	88
	332	332-350	GAAAGUUUGCCAAGGCACGAGUA	89
	333	333-351	AAAGUUUGCCAAGGCACGAGUAA	90
	334	334-352	AAGUUUGCCAAGGCACGAGUAAC	91
	335	335-353	AGUUUGCCAAGGCACGAGUAACA	92
	336	336-354	GUUUGCCAAGGCACGAGUAACAA	93
	337	337-355	UUUGCCAAGGCACGAGUAACAAG	94
	338	338-356	UUGCCAAGGCACGAGUAACAAGC	95
	361	361-379	UCACGCAGUUGGGCACUUUUGAA	96
	362	362-380	CACGCAGUUGGGCACUUUUGAAG	97
	363	363-381	ACGCAGUUGGGCACUUUUGAAGA	98
	364	364-382	CGCAGUUGGGCACUUUUGAAGAU	99
	365	365-383	GCAGUUGGGCACUUUUGAAGAUC	100

	366	366-384	CAGUUGGGCACUUUUGAAGAUCA	101
	367	367-385	AGUUGGGCACUUUUGAAGAUCAU	102
	368	368-386	GUUGGGCACUUUUGAAGAUCAUU	103
	369	369-387	UUGGGCACUUUUGAAGAUCAUUU	104
	377	377-395	UUUUGAAGAUCAUUUUCUCAGCC	105
	379	379-397	UUGAAGAUCAUUUUCUCAGCCUC	106
	380	380-398	UGAAGAUCAUUUUCUCAGCCUCC	107
	385	385-403	AUCAUUUUCUCAGCCUCCAGAGG	108
	394	394-412	UCAGCCUCCAGAGGAUGUUCAAU	109
	396	396-414	AGCCUCCAGAGGAUGUUCAAUAA	110
	397	397-415	GCCUCCAGAGGAUGUUCAAUAAC	111
	401	401-419	CCAGAGGAUGUUCAAUAACUGUG	112
	403	403-421	AGAGGAUGUUCAAUAACUGUGAG	113
	407	407-425	GAUGUUCAAUAACUGUGAGGUGG	114
	409	409-427	UGUUCAAUAACUGUGAGGUGGUC	115
	410	410-428	GUUCAAUAACUGUGAGGUGGUCC	116
	411	411-429	UUCAAUAACUGUGAGGUGGUCCU	117
	412	412-430	UCAAUAACUGUGAGGUGGUCCUU	118
	413	413-431	CAAUAACUGUGAGGUGGUCCUUG	119
	414	414-432	AAUAACUGUGAGGUGGUCCUUGG	120
	416	416-434	UAACUGUGAGGUGGUCCUUGGGA	121
	418	418-436	ACUGUGAGGUGGUCCUUGGGAAU	122
	419	419-437	CUGUGAGGUGGUCCUUGGGAAUU	123
	425	425-443	GGUGGUCCUUGGGAAUUUGGAAA	124
[0922]	431	431-449	CCUUGGGAAUUUGGAAAUUACCU	125
	432	432-450	CUUGGGAAUUUGGAAAUUACCUA	126
	433	433-451	UUGGGAAUUUGGAAAUUACCUAU	127
	434	434-452	UGGGAAUUUGGAAAUUACCUAUG	128
	458	458-476	GCAGAGGAAUUAUGAUCUUUCCU	129
	459	459-477	CAGAGGAAUUAUGAUCUUUCCUU	130
	463	463-481	GGAAUUAUGAUCUUUCCUUCUUA	131
	464	464-482	GAAUUAUGAUCUUUCCUUCUUAA	132
	466	466-484	AUUAUGAUCUUUCCUUCUUAAAG	133
	468	468-486	UAUGAUCUUUCCUUCUUAAAGAC	134
	471	471-489	GAUCUUUCCUUCUUAAAGACCAU	135
	476	476-494	UUCCUUCUUAAAGACCAUCCAGG	136
	477	477-495	UCCUUCUUAAAGACCAUCCAGGA	137
	479	479-497	CUUCUUAAAGACCAUCCAGGAGG	138
	481	481-499	UCUUAAAGACCAUCCAGGAGGUG	139
	482	482-500	CUUAAAGACCAUCCAGGAGGUGG	140
	492	492-510	AUCCAGGAGGUGGCUGGUUAUGU	141
	493	493-511	UCCAGGAGGUGGCUGGUUAUGUC	142
	494	494-512	CCAGGAGGUGGCUGGUUAUGUCC	143
	495	495-513	CAGGAGGUGGCUGGUUAUGUCCU	144
	496	496-514	AGGAGGUGGCUGGUUAUGUCCUC	145
	497	497-515	GGAGGUGGCUGGUUAUGUCCUCA	146
	499	499-517	AGGUGGCUGGUUAUGUCCUCAUU	147
	520	520-538	UUGCCCUCAACACAGUGGAGCGA	148
	542	542-560	AAUUCCUUUGGAAAACCUGCAGA	149

[0923]

543	543-561	AUUCCUUUGGAAAACCUGCAGAU	150
550	550-568	UGGAAAACCUGCAGAUCAUCAGA	151
551	551-569	GGAAAACCUGCAGAUCAUCAGAG	152
553	553-571	AAAACCUGCAGAUCAUCAGAGGA	153
556	556-574	ACCUGCAGAUCAUCAGAGGAAAU	154
586	586-604	ACGAAAAUUCCUAUGCCUUAGCA	155
587	587-605	CGAAAAUUCCUAUGCCUUAGCAG	156
589	589-607	AAAAUUCCUAUGCCUUAGCAGUC	157
592	592-610	AUUCCUAUGCCUUAGCAGUCUUA	158
593	593-611	UUCCUAUGCCUUAGCAGUCUUAU	159
594	594-612	UCCUAUGCCUUAGCAGUCUUAUC	160
596	596-614	CUAUGCCUUAGCAGUCUUAUCUA	161
597	597-615	UAUGCCUUAGCAGUCUUAUCUAA	162
598	598-616	AUGCCUUAGCAGUCUUAUCUAAC	163
599	599-617	UGCCUUAGCAGUCUUAUCUAACU	164
600	600-618	GCCUUAGCAGUCUUAUCUAACUA	165
601	601-619	CCUUAGCAGUCUUAUCUAACUAU	166
602	602-620	CUUAGCAGUCUUAUCUAACUAUG	167
603	603-621	UUAGCAGUCUUAUCUAACUAUGA	168
604	604-622	UAGCAGUCUUAUCUAACUAUGAU	169
605	605-623	AGCAGUCUUAUCUAACUAUGAUG	170
608	608-626	AGUCUUAUCUAACUAUGAUGCAA	171
609	609-627	GUCUUAUCUAACUAUGAUGCAAA	172
610	610-628	UCUUAUCUAACUAUGAUGCAAAU	173
611	611-629	CUUAUCUAACUAUGAUGCAAAUA	174
612	612-630	UUAUCUAACUAUGAUGCAAAUAA	175
613	613-631	UAUCUAACUAUGAUGCAAAUAAA	176
614	614-632	AUCUAACUAUGAUGCAAAUAAAA	177
616	616-634	CUAACUAUGAUGCAAAUAAAACC	178
622	622-640	AUGAUGCAAAUAAAACCGGACUG	179
623	623-641	UGAUGCAAAUAAAACCGGACUGA	180
624	624-642	GAUGCAAAUAAAACCGGACUGAA	181
626	626-644	UGCAAAUAAAACCGGACUGAAGG	182
627	627-645	GCAAAUAAAACCGGACUGAAGGA	183
628	628-646	CAAAUAAAACCGGACUGAAGGAG	184
630	630-648	AAUAAAACCGGACUGAAGGAGCU	185
631	631-649	AUAAAACCGGACUGAAGGAGCUG	186
632	632-650	UAAAACCGGACUGAAGGAGCUGC	187
633	633-651	AAAACCGGACUGAAGGAGCUGCC	188
644	644-662	GAAGGAGCUGCCCAUGAGAAAUU	189
665	665-683	UUUACAGGAAAUCCUGCAUGGCG	190
668	668-686	ACAGGAAAUCCUGCAUGGCGCCG	191
669	669-687	CAGGAAAUCCUGCAUGGCGCCGU	192
670	670-688	AGGAAAUCCUGCAUGGCGCCGUG	193
671	671-689	GGAAAUCCUGCAUGGCGCCGUGC	194
672	672-690	GAAAUCCUGCAUGGCGCCGUGCG	195
674	674-692	AAUCCUGCAUGGCGCCGUGCGGU	196
676	676-694	UCCUGCAUGGCGCCGUGCGGUUC	197
677	677-695	CCUGCAUGGCGCCGUGCGGUUCA	198

[0924]

678	678-696	CUGCAUGGCGCCGUGCGGUUCAG	199
680	680-698	GCAUGGCGCCGUGCGGUUCAGCA	200
681	681-699	CAUGGCGCCGUGCGGUUCAGCAA	201
682	682-700	AUGGCGCCGUGCGGUUCAGCAAC	202
683	683-701	UGGCGCCGUGCGGUUCAGCAACA	203
684	684-702	GGCGCCGUGCGGUUCAGCAACAA	204
685	685-703	GCGCCGUGCGGUUCAGCAACAAC	205
686	686-704	CGCCGUGCGGUUCAGCAACAACC	206
688	688-706	CCGUGCGGUUCAGCAACAACCCU	207
690	690-708	GUGCGGUUCAGCAACAACCCUGC	208
692	692-710	GCGGUUCAGCAACAACCCUGCCC	209
698	698-716	CAGCAACAACCCUGCCCUGUGCA	210
700	700-718	GCAACAACCCUGCCCUGUGCAAC	211
719	719-737	CAACGUGGAGAGCAUCCAGUGGC	212
720	720-738	AACGUGGAGAGCAUCCAGUGGCG	213
721	721-739	ACGUGGAGAGCAUCCAGUGGCGG	214
724	724-742	UGGAGAGCAUCCAGUGGCGGGAC	215
725	725-743	GGAGAGCAUCCAGUGGCGGGACA	216
726	726-744	GAGAGCAUCCAGUGGCGGGACAU	217
733	733-751	UCCAGUGGCGGGACAUAGUCAGC	218
734	734-752	CCAGUGGCGGGACAUAGUCAGCA	219
736	736-754	AGUGGCGGGACAUAGUCAGCAGU	220
737	737-755	GUGGCGGGACAUAGUCAGCAGUG	221
763	763-781	UUCUCAGCAACAUGUCGAUGGAC	222
765	765-783	CUCAGCAACAUGUCGAUGGACUU	223
766	766-784	UCAGCAACAUGUCGAUGGACUUC	224
767	767-785	CAGCAACAUGUCGAUGGACUUCC	225
769	769-787	GCAACAUGUCGAUGGACUUCCAG	226
770	770-788	CAACAUGUCGAUGGACUUCCAGA	227
771	771-789	AACAUGUCGAUGGACUUCCAGAA	228
772	772-790	ACAUGUCGAUGGACUUCCAGAAC	229
775	775-793	UGUCGAUGGACUUCCAGAACCAC	230
789	789-807	CAGAACCACCUGGGCAGCUGCCA	231
798	798-816	CUGGGCAGCUGCCAAAAGUGUGA	232
800	800-818	GGGCAGCUGCCAAAAGUGUGAUC	233
805	805-823	GCUGCCAAAAGUGUGAUCCAAGC	234
806	806-824	CUGCCAAAAGUGUGAUCCAAGCU	235
807	807-825	UGCCAAAAGUGUGAUCCAAGCUG	236
810	810-828	CAAAAGUGUGAUCCAAGCUGUCC	237
814	814-832	AGUGUGAUCCAAGCUGUCCCAAU	238
815	815-833	GUGUGAUCCAAGCUGUCCCAAUG	239
817	817-835	GUGAUCCAAGCUGUCCCAAUGGG	240
818	818-836	UGAUCCAAGCUGUCCCAAUGGGA	241
819	819-837	GAUCCAAGCUGUCCCAAUGGGAG	242
820	820-838	AUCCAAGCUGUCCCAAUGGGAGC	243
821	821-839	UCCAAGCUGUCCCAAUGGGAGCU	244
823	823-841	CAAGCUGUCCCAAUGGGAGCUGC	245
826	826-844	GCUGUCCCAAUGGGAGCUGCUGG	246
847	847-865	GGGGUGCAGGAGAGGAGAACUGC	247

	871	871-889	AGAAACUGACCAAAAUCAUCUGU	248
	872	872-890	GAAACUGACCAAAAUCAUCUGUG	249
	873	873-891	AAACUGACCAAAAUCAUCUGUGC	250
	877	877-895	UGACCAAAAUCAUCUGUGCCCAG	251
	878	878-896	GACCAAAAUCAUCUGUGCCCAGC	252
	881	881-899	CAAAAUCAUCUGUGCCCAGCAGU	253
	890	890-908	CUGUGCCCAGCAGUGCUCCGGGC	254
	892	892-910	GUGCCCAGCAGUGCUCCGGGCGC	255
	929	929-947	CCCCAGUGACUGCUGCCACAACC	256
	930	930-948	CCCAGUGACUGCUGCCACAACCA	257
	979	979-997	GGGAGAGCGACUGCCUGGUCUGC	258
	980	980-998	GGAGAGCGACUGCCUGGUCUGCC	259
	981	981-999	GAGAGCGACUGCCUGGUCUGCCG	260
	982	982-1000	AGAGCGACUGCCUGGUCUGCCGC	261
	983	983-1001	GAGCGACUGCCUGGUCUGCCGCA	262
	984	984-1002	AGCGACUGCCUGGUCUGCCGCAA	263
	989	989-1007	CUGCCUGGUCUGCCGCAAAUUCC	264
	990	990-1008	UGCCUGGUCUGCCGCAAAUUCCG	265
	991	991-1009	GCCUGGUCUGCCGCAAAUUCCGA	266
	992	992-1010	CCUGGUCUGCCGCAAAUUCCGAG	267
	994	994-1012	UGGUCUGCCGCAAAUUCCGAGAC	268
	995	995-1013	GGUCUGCCGCAAAUUCCGAGACG	269
	996	996-1014	GUCUGCCGCAAAUUCCGAGACGA	270
	997	997-1015	UCUGCCGCAAAUUCCGAGACGAA	271
[0925]	999	999-1017	UGCCGCAAAUUCCGAGACGAAGC	272
	1004	1004-1022	CAAAUUCCGAGACGAAGCCACGU	273
	1005	1005-1023	AAAUUCCGAGACGAAGCCACGUG	274
	1006	1006-1024	AAUUCCGAGACGAAGCCACGUGC	275
	1007	1007-1025	AUUCCGAGACGAAGCCACGUGCA	276
	1008	1008-1026	UUCCGAGACGAAGCCACGUGCAA	277
	1010	1010-1028	CCGAGACGAAGCCACGUGCAAGG	278
	1013	1013-1031	AGACGAAGCCACGUGCAAGGACA	279
	1014	1014-1032	GACGAAGCCACGUGCAAGGACAC	280
	1015	1015-1033	ACGAAGCCACGUGCAAGGACACC	281
	1016	1016-1034	CGAAGCCACGUGCAAGGACACCU	282
	1040	1040-1058	CCCCCCACUCAUGCUCUACAACC	283
	1042	1042-1060	CCCCACUCAUGCUCUACAACCCC	284
	1044	1044-1062	CCACUCAUGCUCUACAACCCCAC	285
	1047	1047-1065	CUCAUGCUCUACAACCCCACCAC	286
	1071	1071-1089	UACCAGAUGGAUGUGAACCCCGA	287
	1073	1073-1091	CCAGAUGGAUGUGAACCCCGAGG	288
	1074	1074-1092	CAGAUGGAUGUGAACCCCGAGGG	289
	1075	1075-1093	AGAUGGAUGUGAACCCCGAGGGC	290
	1077	1077-1095	AUGGAUGUGAACCCCGAGGGCAA	291
	1078	1078-1096	UGGAUGUGAACCCCGAGGGCAAA	292
	1080	1080-1098	GAUGUGAACCCCGAGGGCAAAUA	293
	1084	1084-1102	UGAACCCCGAGGGCAAAUACAGC	294
	1085	1085-1103	GAACCCCGAGGGCAAAUACAGCU	295
	1087	1087-1105	ACCCCGAGGGCAAAUACAGCUUU	296

	1088	1088-1106	CCCCGAGGGCAAAUACAGCUUUG	297
	1089	1089-1107	CCCGAGGGCAAAUACAGCUUUGG	298
	1096	1096-1114	GCAAAUACAGCUUUGGUGCCACC	299
	1097	1097-1115	CAAAUACAGCUUUGGUGCCACCU	300
	1098	1098-1116	AAAUACAGCUUUGGUGCCACCUG	301
	1104	1104-1122	AGCUUUGGUGCCACCUGCGUGAA	302
	1106	1106-1124	CUUUGGUGCCACCUGCGUGAAGA	303
	1112	1112-1130	UGCCACCUGCGUGAAGAAGUGUC	304
	1116	1116-1134	ACCUGCGUGAAGAAGUGUCCCCG	305
	1117	1117-1135	CCUGCGUGAAGAAGUGUCCCCGU	306
	1118	1118-1136	CUGCGUGAAGAAGUGUCCCCGUA	307
	1119	1119-1137	UGCGUGAAGAAGUGUCCCCGUAA	308
	1120	1120-1138	GCGUGAAGAAGUGUCCCCGUAAU	309
	1121	1121-1139	CGUGAAGAAGUGUCCCCGUAAUU	310
	1122	1122-1140	GUGAAGAAGUGUCCCCGUAAUUA	311
	1123	1123-1141	UGAAGAAGUGUCCCCGUAAUUAU	312
	1124	1124-1142	GAAGAAGUGUCCCCGUAAUUAUG	313
	1125	1125-1143	AAGAAGUGUCCCCGUAAUUAUGU	314
	1126	1126-1144	AGAAGUGUCCCCGUAAUUAUGUG	315
	1127	1127-1145	GAAGUGUCCCCGUAAUUAUGUGG	316
	1128	1128-1146	AAGUGUCCCCGUAAUUAUGUGGU	317
	1129	1129-1147	AGUGUCCCCGUAAUUAUGUGGUG	318
	1130	1130-1148	GUGUCCCCGUAAUUAUGUGGUGA	319
	1132	1132-1150	GUCCCCGUAAUUAUGUGGUGACA	320
[0926]	1134	1134-1152	CCCCGUAAUUAUGUGGUGACAGA	321
	1136	1136-1154	CCGUAAUUAUGUGGUGACAGAUC	322
	1137	1137-1155	CGUAAUUAUGUGGUGACAGAUCA	323
	1138	1138-1156	GUAAUUAUGUGGUGACAGAUCAC	324
	1139	1139-1157	UAAUUAUGUGGUGACAGAUCACG	325
	1140	1140-1158	AAUUAUGUGGUGACAGAUCACGG	326
	1142	1142-1160	UUAUGUGGUGACAGAUCACGGCU	327
	1145	1145-1163	UGUGGUGACAGAUCACGGCUCGU	328
	1147	1147-1165	UGGUGACAGAUCACGGCUCGUGC	329
	1148	1148-1166	GGUGACAGAUCACGGCUCGUGCG	330
	1149	1149-1167	GUGACAGAUCACGGCUCGUGCGU	331
	1150	1150-1168	UGACAGAUCACGGCUCGUGCGUC	332
	1151	1151-1169	GACAGAUCACGGCUCGUGCGUCC	333
	1152	1152-1170	ACAGAUCACGGCUCGUGCGUCCG	334
	1153	1153-1171	CAGAUCACGGCUCGUGCGUCCGA	335
	1154	1154-1172	AGAUCACGGCUCGUGCGUCCGAG	336
	1155	1155-1173	GAUCACGGCUCGUGCGUCCGAGC	337
	1156	1156-1174	AUCACGGCUCGUGCGUCCGAGCC	338
	1157	1157-1175	UCACGGCUCGUGCGUCCGAGCCU	339
	1160	1160-1178	CGGCUCGUGCGUCCGAGCCUGUG	340
	1200	1200-1218	AUGGAGGAAGACGGCGUCCGCAA	341
	1201	1201-1219	UGGAGGAAGACGGCGUCCGCAAG	342
	1203	1203-1221	GAGGAAGACGGCGUCCGCAAGUG	343
	1204	1204-1222	AGGAAGACGGCGUCCGCAAGUGU	344
	1205	1205-1223	GGAAGACGGCGUCCGCAAGUGUA	345

[0927]

1207	1207-1225	AAGACGGCGUCCGCAAGUGUAAG	346
1208	1208-1226	AGACGGCGUCCGCAAGUGUAAGA	347
1211	1211-1229	CGGCGUCCGCAAGUGUAAGAAGU	348
1212	1212-1230	GGCGUCCGCAAGUGUAAGAAGUG	349
1213	1213-1231	GCGUCCGCAAGUGUAAGAAGUGC	350
1214	1214-1232	CGUCCGCAAGUGUAAGAAGUGCG	351
1215	1215-1233	GUCCGCAAGUGUAAGAAGUGCGA	352
1216	1216-1234	UCCGCAAGUGUAAGAAGUGCGAA	353
1217	1217-1235	CCGCAAGUGUAAGAAGUGCGAAG	354
1219	1219-1237	GCAAGUGUAAGAAGUGCGAAGGG	355
1220	1220-1238	CAAGUGUAAGAAGUGCGAAGGGC	356
1221	1221-1239	AAGUGUAAGAAGUGCGAAGGGCC	357
1222	1222-1240	AGUGUAAGAAGUGCGAAGGGCCU	358
1223	1223-1241	GUGUAAGAAGUGCGAAGGGCCUU	359
1224	1224-1242	UGUAAGAAGUGCGAAGGGCCUUG	360
1225	1225-1243	GUAAGAAGUGCGAAGGGCCUUGC	361
1226	1226-1244	UAAGAAGUGCGAAGGGCCUUGCC	362
1229	1229-1247	GAAGUGCGAAGGGCCUUGCCGCA	363
1230	1230-1248	AAGUGCGAAGGGCCUUGCCGCAA	364
1231	1231-1249	AGUGCGAAGGGCCUUGCCGCAAA	365
1232	1232-1250	GUGCGAAGGGCCUUGCCGCAAAG	366
1233	1233-1251	UGCGAAGGGCCUUGCCGCAAAGU	367
1235	1235-1253	CGAAGGGCCUUGCCGCAAAGUGU	368
1236	1236-1254	GAAGGGCCUUGCCGCAAAGUGUG	369
1237	1237-1255	AAGGGCCUUGCCGCAAAGUGUGU	370
1238	1238-1256	AGGGCCUUGCCGCAAAGUGUGUA	371
1239	1239-1257	GGGCCUUGCCGCAAAGUGUGUAA	372
1241	1241-1259	GCCUUGCCGCAAAGUGUGUAACG	373
1261	1261-1279	ACGGAAUAGGUAUUGGUGAAUUU	374
1262	1262-1280	CGGAAUAGGUAUUGGUGAAUUUA	375
1263	1263-1281	GGAAUAGGUAUUGGUGAAUUUAA	376
1264	1264-1282	GAAUAGGUAUUGGUGAAUUUAAA	377
1266	1266-1284	AUAGGUAUUGGUGAAUUUAAAGA	378
1267	1267-1285	UAGGUAUUGGUGAAUUUAAAGAC	379
1289	1289-1307	CUCACUCUCCAUAAAUGCUACGA	380
1313	1313-1331	UAUUAAACACUUCAAAAACUGCA	381
1320	1320-1338	CACUUCAAAAACUGCACCUCCAU	382
1321	1321-1339	ACUUCAAAAACUGCACCUCCAUC	383
1322	1322-1340	CUUCAAAAACUGCACCUCCAUCA	384
1323	1323-1341	UUCAAAAACUGCACCUCCAUCAG	385
1324	1324-1342	UCAAAAACUGCACCUCCAUCAGU	386
1328	1328-1346	AAACUGCACCUCCAUCAGUGGCG	387
1332	1332-1350	UGCACCUCCAUCAGUGGCGAUCU	388
1333	1333-1351	GCACCUCCAUCAGUGGCGAUCUC	389
1335	1335-1353	ACCUCCAUCAGUGGCGAUCUCCA	390
1338	1338-1356	UCCAUCAGUGGCGAUCUCCACAU	391
1344	1344-1362	AGUGGCGAUCUCCACAUCCUGCC	392
1345	1345-1363	GUGGCGAUCUCCACAUCCUGCCG	393
1346	1346-1364	UGGCGAUCUCCACAUCCUGCCGG	394

1347	1347-1365	GGCGAUCUCCACAUCCUGCCGGU	395
1348	1348-1366	GCGAUCUCCACAUCCUGCCGGUG	396
1353	1353-1371	CUCCACAUCCUGCCGGUGGCAUU	397
1354	1354-1372	UCCACAUCCUGCCGGUGGCAUUU	398
1355	1355-1373	CCACAUCCUGCCGGUGGCAUUUA	399
1357	1357-1375	ACAUCCUGCCGGUGGCAUUUAGG	400
1360	1360-1378	UCCUGCCGGUGGCAUUUAGGGGU	401
1361	1361-1379	CCUGCCGGUGGCAUUUAGGGGUG	402
1362	1362-1380	CUGCCGGUGGCAUUUAGGGGUGA	403
1363	1363-1381	UGCCGGUGGCAUUUAGGGGUGAC	404
1366	1366-1384	CGGUGGCAUUUAGGGGUGACUCC	405
1369	1369-1387	UGGCAUUUAGGGGUGACUCCUUC	406
1370	1370-1388	GGCAUUUAGGGGUGACUCCUUCA	407
[0928] 1371	1371-1389	GCAUUUAGGGGUGACUCCUUCAC	408
1372	1372-1390	CAUUUAGGGGUGACUCCUUCACA	409
1373	1373-1391	AUUUAGGGGUGACUCCUUCACAC	410
1374	1374-1392	UUUAGGGGUGACUCCUUCACACA	411
1404	1404-1422	CCUCUGGAUCCACAGGAACUGGA	412
1408	1408-1426	UGGAUCCACAGGAACUGGAUAUU	413
1409	1409-1427	GGAUCCACAGGAACUGGAUAUUC	414
1411	1411-1429	AUCCACAGGAACUGGAUAUUCUG	415
1412	1412-1430	UCCACAGGAACUGGAUAUUCUGA	416
1419	1419-1437	GAACUGGAUAUUCUGAAAACCGU	417
1426	1426-1444	AUAUUCUGAAAACCGUAAAGGAA	418
1427	1427-1445	UAUUCUGAAAACCGUAAAGGAAA	419
1430	1430-1448	UCUGAAAACCGUAAAGGAAAUCA	420
1431	1431-1449	CUGAAAACCGUAAAGGAAAUCAC	421

[0929] 表4.EGFR siRNA序列

[0930]

hs Id #	NM_005228.3 中的序列位置	有义链序列 (5′-3′)	SEQ ID NO:	反义链序列(5′-3′)	SEQ ID NO:
68	68-86	CGGCCGGAGUCCCGAGCUATT	422	UAGCUCGGGACUCCGGCCGTT	423
71	71-89	CCGGAGUCCCGAGCUAGCCTT	424	GGCUAGCUCGGGACUCCGGTT	425
72	72-90	CGGAGUCCCGAGCUAGCCCTT	426	GGGCUAGCUCGGGACUCCGTT	427
73	73-91	GGAGUCCCGAGCUAGCCCCTT	428	GGGGCUAGCUCGGGACUCCTT	429
74	74-92	GAGUCCCGAGCUAGCCCCGTT	430	CGGGGCUAGCUCGGGACUCTT	431
75	75-93	AGUCCCGAGCUAGCCCCGGTT	432	CCGGGGCUAGCUCGGGACUTT	433
76	76-94	GUCCCGAGCUAGCCCCGGCTT	434	GCCGGGGCUAGCUCGGGACTT	435
78	78-96	CCCGAGCUAGCCCCG	436	CCGCCGGGGCUAGCU	437

[0931]

		GCGGTT		CGGGTT	
114	114-132	GGACGACAGGCCACC UCGUTT	438	ACGAGGUGGCCUGU CGUCCTT	439
115	115-133	GACGACAGGCCACCU CGUCTT	440	GACGAGGUGGCCUG UCGUCTT	441
116	116-134	ACGACAGGCCACCUC GUCGTT	442	CGACGAGGUGGCCU GUCGUTT	443
117	117-135	CGACAGGCCACCUCG UCGGTT	444	CCGACGAGGUGGCCU GUCGTT	445
118	118-136	GACAGGCCACCUCGU CGGCTT	446	GCCGACGAGGUGGCC UGUCTT	447
120	120-138	CAGGCCACCUCGUCG GCGUTT	448	ACGCCGACGAGGUG GCCUGTT	449
121	121-139	AGGCCACCUCGUCGG CGUCTT	450	GACGCCGACGAGGU GGCCUTT	451
122	122-140	GGCCACCUCGUCGGC GUCCTT	452	GGACGCCGACGAGG UGGCCTT	453
123	123-141	GCCACCUCGUCGGCG UCCGTT	454	CGGACGCCGACGAGG UGGCTT	455
124	124-142	CCACCUCGUCGGCGU CCGCTT	456	GCGGACGCCGACGAG GUGGTT	457
125	125-143	CACCUCGUCGGCGUC CGCCTT	458	GGCGGACGCCGACGA GGUGTT	459
126	126-144	ACCUCGUCGGCGUCC GCCCTT	460	GGGCGGACGCCGACG AGGUTT	461
127	127-145	CCUCGUCGGCGUCCG CCCGTT	462	CGGGCGGACGCCGAC GAGGTT	463
128	128-146	CUCGUCGGCGUCCGC CCGATT	464	UCGGGCGGACGCCGA CGAGTT	465
129	129-147	UCGUCGGCGUCCGCC CGAGTT	466	CUCGGGCGGACGCCG ACGATT	467
130	130-148	CGUCGGCGUCCGCCC GAGUTT	468	ACUCGGGCGGACGCC GACGTT	469
131	131-149	GUCGGCGUCCGCCCG AGUCTT	470	GACUCGGGCGGACGC CGACTT	471
132	132-150	UCGGCGUCCGCCCGA GUCCTT	472	GGACUCGGGCGGAC GCCGATT	473
135	135-153	GCGUCCGCCCGAGUC CCCGTT	474	CGGGGACUCGGGCG GACGCTT	475
136	136-154	CGUCCGCCCGAGUCCC CGCTT	476	GCGGGGACUCGGGC GGACGTT	477
141	141-159	GCCCGAGUCCCCGCCU CGCTT	478	GCGAGGCGGGGACU CGGGCTT	479
164	164-182	AACGCCACAACCACC GCGCTT	480	GCGCGGUGGUUGUG GCGUUTT	481
165	165-183	ACGCCACAACCACCGC GCATT	482	UGCGCGGUGGUUGU GGCGUTT	483
166	166-184	CGCCACAACCACCGCG CACTT	484	GUGCGCGGUGGUUG UGGCGTT	485

[0932]

168	168-186	CCACAACCACCGCGCACGGTT	486	CCGUGCGCGGUGGUUGUGGTT	487
169	169-187	CACAACCACCGCGCACGGCTT	488	GCCGUGCGCGGUGGUUGUGTT	489
170	170-188	ACAACCACCGCGCACGGCCTT	490	GGCCGUGCGCGGUGGUUGUTT	491
247	247-265	AUGCGACCCUCCGGGACGGTT	492	CCGUCCCGGAGGGUCGCAUTT	493
248	248-266	UGCGACCCUCCGGGACGGCTT	494	GCCGUCCCGGAGGGUCGCATT	495
249	249-267	GCGACCCUCCGGGACGGCCTT	496	GGCCGUCCCGGAGGGUCGCTT	497
251	251-269	GACCCUCCGGGACGGCCGGTT	498	CCGGCCGUCCCGGAGGGUCTT	499
252	252-270	ACCCUCCGGGACGGCCGGGTT	500	CCCGGCCGUCCCGGAGGGUTT	501
254	254-272	CCUCCGGGACGGCCGGGCTT	502	GCCCCGGCCGUCCCGGAGGTT	503
329	329-347	AGAAAGUUUGCCAAGGCACTT	504	GUGCCUUGGCAAACUUUCUTT	505
330	330-348	GAAAGUUUGCCAAGGCACGTT	506	CGUGCCUUGGCAAACUUUCTT	507
332	332-350	AAGUUUGCCAAGGCACGAGTT	508	CUCGUGCCUUGGCAAACUUTT	509
333	333-351	AGUUUGCCAAGGCACGAGUTT	510	ACUCGUGCCUUGGCAAACUTT	511
334	334-352	GUUUGCCAAGGCACGAGUATT	512	UACUCGUGCCUUGGCAAACTT	513
335	335-353	UUUGCCAAGGCACGAGUAATT	514	UUACUCGUGCCUUGGCAAATT	515
336	336-354	UUGCCAAGGCACGAGUAACTT	516	GUUACUCGUGCCUUGGCAATT	517
337	337-355	UGCCAAGGCACGAGUAACATT	518	UGUUACUCGUGCCUUGGCATT	519
338	338-356	GCCAAGGCACGAGUAACAATT	520	UUGUUACUCGUGCCUUGGCTT	521
361	361-379	ACGCAGUUGGGCACUUUUGTT	522	CAAAAGUGCCCAACUGCGUTT	523
362	362-380	CGCAGUUGGGCACUUUUGATT	524	UCAAAAGUGCCCAACUGCGTT	525
363	363-381	GCAGUUGGGCACUUUUGAATT	526	UUCAAAAGUGCCCAACUGCTT	527
364	364-382	CAGUUGGGCACUUUUGAAGTT	528	CUUCAAAAGUGCCCAACUGTT	529
365	365-383	AGUUGGGCACUUUUGAAGATT	530	UCUUCAAAAGUGCCCAACUTT	531
366	366-384	GUUGGGCACUUUUGAAGAUTT	532	AUCUUCAAAAGUGCCCAACTT	533
367	367-385	UUGGGCACUUUUGAA	534	GAUCUUCAAAAGUG	535

[0933]

		GAUCTT		CCCAATT	
368	368-386	UGGGCACUUUUGAAG AUCATT	536	UGAUCUUCAAAAGU GCCCATT	537
369	369-387	GGGCACUUUUGAAGA UCAUTT	538	AUGAUCUUCAAAAG UGCCCTT	539
377	377-395	UUGAAGAUCAUUUUC UCAGTT	540	CUGAGAAAAUGAUC UUCAATT	541
379	379-397	GAAGAUCAUUUUCUC AGCCTT	542	GGCUGAGAAAAUGA UCUUCTT	543
380	380-398	AAGAUCAUUUUCUCA GCCUTT	544	AGGCUGAGAAAAUG AUCUUTT	545
385	385-403	CAUUUUCUCAGCCUC CAGATT	546	UCUGGAGGCUGAGA AAAUGTT	547
394	394-412	AGCCUCCAGAGGAUG UUCATT	548	UGAACAUCCUCUGG AGGCUTT	549
396	396-414	CCUCCAGAGGAUGUU CAAUTT	550	AUUGAACAUCCUCU GGAGGTT	551
397	397-415	CUCCAGAGGAUGUUC AAUATT	552	UAUUGAACAUCCUC UGGAGTT	553
401	401-419	AGAGGAUGUUCAAUA ACUGTT	554	CAGUUAUUGAACAU CCUCUTT	555
403	403-421	AGGAUGUUCAAUAAC UGUGTT	556	CACAGUUAUUGAAC AUCCUTT	557
407	407-425	UGUUCAAUAACUGUG AGGUTT	558	ACCUCACAGUUAUU GAACATT	559
409	409-427	UUCAAUAACUGUGAG GUGGTT	560	CCACCUCACAGUUAU UGAATT	561
410	410-428	UCAAUAACUGUGAGG UGGUTT	562	ACCACCUCACAGUUA UUGATT	563
411	411-429	CAAUAACUGUGAGGU GGUCTT	564	GACCACCUCACAGUU AUUGTT	565
412	412-430	AAUAACUGUGAGGUG GUCCTT	566	GGACCACCUCACAGU UAUUTT	567
413	413-431	AUAACUGUGAGGUGG UCCUTT	568	AGGACCACCUCACAG UUAUTT	569
414	414-432	UAACUGUGAGGUGGU CCUUTT	570	AAGGACCACCUCACA GUUATT	571
416	416-434	ACUGUGAGGUGGUCC UUGGTT	572	CCAAGGACCACCUCA CAGUTT	573
418	418-436	UGUGAGGUGGUCCUU GGGATT	574	UCCCAAGGACCACCU CACATT	575
419	419-437	GUGAGGUGGUCCUUG GGAATT	576	UUCCCAAGGACCACC UCACTT	577
425	425-443	UGGUCCUUGGGAAUU UGGATT	578	UCCAAAUUCCCAAGG ACCATT	579
431	431-449	UUGGGAAUUUGGAAA UUACTT	580	GUAAUUUCCAAAUU CCCAATT	581
432	432-450	UGGGAAUUUGGAAAU UACCTT	582	GGUAAUUUCCAAAU UCCCATT	583

[0934]

433	433-451	GGGAAUUUGGAAAUUACCUTT	584	AGGUAAUUUCCAAAUUCCCTT	585
434	434-452	GGAAUUUGGAAAUUACCUATT	586	UAGGUAAUUUCCAAAUUCCTT	587
458	458-476	AGAGGAAUUAUGAUCUUUCTT	588	GAAAGAUCAUAAUUCCUCUTT	589
459	459-477	GAGGAAUUAUGAUCUUUCCTT	590	GGAAAGAUCAUAAUUCCUCTT	591
463	463-481	AAUUAUGAUCUUUCCUUCUTT	592	AGAAGGAAAGAUCAUAAUUTT	593
464	464-482	AUUAUGAUCUUUCCUUCUUTT	594	AAGAAGGAAAGAUCAUAAUTT	595
466	466-484	UAUGAUCUUUCCUUCUUAATT	596	UUAAGAAGGAAAGAUCAUATT	597
468	468-486	UGAUCUUUCCUUCUUAAAGTT	598	CUUUAAGAAGGAAAGAUCATT	599
471	471-489	UCUUUCCUUCUUAAAGACCTT	600	GGUCUUUAAGAAGGAAAGATT	601
476	476-494	CCUUCUUAAAGACCAUCCATT	602	UGGAUGGUCUUUAAGAAGGTT	603
477	477-495	CUUCUUAAAGACCAUCCAGTT	604	CUGGAUGGUCUUUAAGAAGTT	605
479	479-497	UCUUAAAGACCAUCCAGGATT	606	UCCUGGAUGGUCUUUAAGATT	607
481	481-499	UUAAAGACCAUCCAGGAGGTT	608	CCUCCUGGAUGGUCUUUAATT	609
482	482-500	UAAAGACCAUCCAGGAGGUTT	610	ACCUCCUGGAUGGUCUUUATT	611
492	492-510	CCAGGAGGUGGCUGGUUAUTT	612	AUAACCAGCCACCUCCUGGTT	613
493	493-511	CAGGAGGUGGCUGGUUAUGTT	614	CAUAACCAGCCACCUCCUGTT	615
494	494-512	AGGAGGUGGCUGGUUAUGUTT	616	ACAUAACCAGCCACCUCCUTT	617
495	495-513	GGAGGUGGCUGGUUAUGUCTT	618	GACAUAACCAGCCACCUCCTT	619
496	496-514	GAGGUGGCUGGUUAUGUCCTT	620	GGACAUAACCAGCCACCUCTT	621
497	497-515	AGGUGGCUGGUUAUGUCCUTT	622	AGGACAUAACCAGCCACCUTT	623
499	499-517	GUGGCUGGUUAUGUCCUCATT	624	UGAGGACAUAACCAGCCACTT	625
520	520-538	GCCCUCAACACAGUGGAGCTT	626	GCUCCACUGUGUUGAGGGCTT	627
542	542-560	UUCCUUUGGAAAACCUGCATT	628	UGCAGGUUUUCCAAAGGAATT	629
543	543-561	UCCUUUGGAAAACCUGCAGTT	630	CUGCAGGUUUUCCAAAGGATT	631
550	550-568	GAAAACCUGCAGAUC	632	UGAUGAUCUGCAGG	633

[0935]

		AUCATT		UUUUCTT	
551	551-569	AAAACCUGCAGAUCAUCAGTT	634	CUGAUGAUCUGCAGGUUUUTT	635
553	553-571	AACCUGCAGAUCAUCAGAGTT	636	CUCUGAUGAUCUGCAGGUUTT	637
556	556-574	CUGCAGAUCAUCAGAGGAATT	638	UUCCUCUGAUGAUCUGCAGTT	639
586	586-604	GAAAAUUCCUAUGCCUUAGTT	640	CUAAGGCAUAGGAAUUUUCTT	641
587	587-605	AAAAUUCCUAUGCCUUAGCTT	642	GCUAAGGCAUAGGAAUUUUTT	643
589	589-607	AAUUCCUAUGCCUUAGCAGTT	644	CUGCUAAGGCAUAGGAAUUTT	645
592	592-610	UCCUAUGCCUUAGCAGUCUTT	646	AGACUGCUAAGGCAUAGGATT	647
593	593-611	CCUAUGCCUUAGCAGUCUUTT	648	AAGACUGCUAAGGCAUAGGTT	649
594	594-612	CUAUGCCUUAGCAGUCUUATT	650	UAAGACUGCUAAGGCAUAGTT	651
596	596-614	AUGCCUUAGCAGUCUUAUCTT	652	GAUAAGACUGCUAAGGCAUTT	653
597	597-615	UGCCUUAGCAGUCUUAUCUTT	654	AGAUAAGACUGCUAAGGCATT	655
598	598-616	GCCUUAGCAGUCUUAUCUATT	656	UAGAUAAGACUGCUAAGGCTT	657
599	599-617	CCUUAGCAGUCUUAUCUAATT	658	UUAGAUAAGACUGCUAAGGTT	659
600	600-618	CUUAGCAGUCUUAUCUAACTT	660	GUUAGAUAAGACUGCUAAGTT	661
601	601-619	UUAGCAGUCUUAUCUAACUTT	662	AGUUAGAUAAGACUGCUAATT	663
602	602-620	UAGCAGUCUUAUCUAACUATT	664	UAGUUAGAUAAGACUGCUATT	665
603	603-621	AGCAGUCUUAUCUAACUAUTT	666	AUAGUUAGAUAAGACUGCUTT	667
604	604-622	GCAGUCUUAUCUAACUAUGTT	668	CAUAGUUAGAUAAGACUGCTT	669
605	605-623	CAGUCUUAUCUAACUAUGATT	670	UCAUAGUUAGAUAAGACUGTT	671
608	608-626	UCUUAUCUAACUAUGAUGCTT	672	GCAUCAUAGUUAGAUAAGATT	673
609	609-627	CUUAUCUAACUAUGAUGCATT	674	UGCAUCAUAGUUAGAUAAGTT	675
610	610-628	UUAUCUAACUAUGAUGCAATT	676	UUGCAUCAUAGUUAGAUAATT	677
611	611-629	UAUCUAACUAUGAUGCAAATT	678	UUUGCAUCAUAGUUAGAUATT	679
612	612-630	AUCUAACUAUGAUGCAAAUTT	680	AUUUGCAUCAUAGUUAGAUTT	681

[0936]

613	613-631	UCUAACUAUGAUGCAAAUATT	682	UAUUUGCAUCAUAGUUAGATT	683
614	614-632	CUAACUAUGAUGCAAAUAATT	684	UUAUUUGCAUCAUAGUUAGTT	685
616	616-634	AACUAUGAUGCAAAUAAAATT	686	UUUUAUUUGCAUCAUAGUUTT	687
622	622-640	GAUGCAAAUAAAACCGGACTT	688	GUCCGGUUUUAUUUGCAUCTT	689
623	623-641	AUGCAAAUAAAACCGGACUTT	690	AGUCCGGUUUUAUUUGCAUTT	691
624	624-642	UGCAAAUAAAACCGGACUGTT	692	CAGUCCGGUUUUAUUUGCATT	693
626	626-644	CAAAUAAAACCGGACUGAATT	694	UUCAGUCCGGUUUUAUUUGTT	695
627	627-645	AAAUAAAACCGGACUGAAGTT	696	CUUCAGUCCGGUUUUAUUUTT	697
628	628-646	AAUAAAACCGGACUGAAGGTT	698	CCUUCAGUCCGGUUUUAUUTT	699
630	630-648	UAAAACCGGACUGAAGGAGTT	700	CUCCUUCAGUCCGGUUUUATT	701
631	631-649	AAAACCGGACUGAAGGAGCTT	702	GCUCCUUCAGUCCGGUUUUTT	703
632	632-650	AAACCGGACUGAAGGAGCUTT	704	AGCUCCUUCAGUCCGGUUUTT	705
633	633-651	AACCGGACUGAAGGAGCUGTT	706	CAGCUCCUUCAGUCCGGUUTT	707
644	644-662	AGGAGCUGCCCAUGAGAAATT	708	UUUCUCAUGGGCAGCUCCUTT	709
665	665-683	UACAGGAAAUCCUGCAUGGTT	710	CCAUGCAGGAUUUCCUGUATT	711
668	668-686	AGGAAAUCCUGCAUGGCGCTT	712	GCGCCAUGCAGGAUUUCCUTT	713
669	669-687	GGAAAUCCUGCAUGGCGCCTT	714	GGCGCCAUGCAGGAUUUCCTT	715
670	670-688	GAAAUCCUGCAUGGCGCCGTT	716	CGGCGCCAUGCAGGAUUUCTT	717
671	671-689	AAAUCCUGCAUGGCGCCGUTT	718	ACGGCGCCAUGCAGGAUUUTT	719
672	672-690	AAUCCUGCAUGGCGCCGUGTT	720	CACGGCGCCAUGCAGGAUUTT	721
674	674-692	UCCUGCAUGGCGCCGUGCGTT	722	CGCACGGCGCCAUGCAGGATT	723
676	676-694	CUGCAUGGCGCCGUGCGGUTT	724	ACCGCACGGCGCCAUGCAGTT	725
677	677-695	UGCAUGGCGCCGUGCGGUUTT	726	AACCGCACGGCGCCAUGCATT	727
678	678-696	GCAUGGCGCCGUGCGGUUCTT	728	GAACCGCACGGCGCCAUGCTT	729
680	680-698	AUGGCGCCGUGCGGU	730	CUGAACCGCACGGCG	731

		UCAGTT		CCAUTT	
681	681-699	UGGCGCCGUGCGGUUCAGCTT	732	GCUGAACCGCACGGCGCCATT	733
682	682-700	GGCGCCGUGCGGUUCAGCATT	734	UGCUGAACCGCACGGCGCCTT	735
683	683-701	GCGCCGUGCGGUUCAGCAATT	736	UUGCUGAACCGCACGGCGCTT	737
684	684-702	CGCCGUGCGGUUCAGCAACTT	738	GUUGCUGAACCGCACGGCGTT	739
685	685-703	GCCGUGCGGUUCAGCAACATT	740	UGUUGCUGAACCGCACGGCTT	741
686	686-704	CCGUGCGGUUCAGCAACAATT	742	UUGUUGCUGAACCGCACGGTT	743
688	688-706	GUGCGGUUCAGCAACAACCTT	744	GGUUGUUGCUGAACCGCACTT	745
690	690-708	GCGGUUCAGCAACAACCCUTT	746	AGGGUUGUUGCUGAACCGCTT	747
692	692-710	GGUUCAGCAACAACCCUGCTT	748	GCAGGGUUGUUGCUGAACCTT	749
698	698-716	GCAACAACCCUGCCCUGUGTT	750	CACAGGGCAGGGUUGUUGCTT	751
700	700-718	AACAACCCUGCCCUGUGCATT	752	UGCACAGGGCAGGGUUGUUTT	753
719	719-737	ACGUGGAGAGCAUCCAGUGTT	754	CACUGGAUGCUCUCCACGUTT	755
720	720-738	CGUGGAGAGCAUCCAGUGGTT	756	CCACUGGAUGCUCUCCACGTT	757
721	721-739	GUGGAGAGCAUCCAGUGGCTT	758	GCCACUGGAUGCUCUCCACTT	759
724	724-742	GAGAGCAUCCAGUGGCGGGTT	760	CCCGCCACUGGAUGCUCUCTT	761
725	725-743	AGAGCAUCCAGUGGCGGGATT	762	UCCCGCCACUGGAUGCUCUTT	763
726	726-744	GAGCAUCCAGUGGCGGGACTT	764	GUCCCGCCACUGGAUGCUCTT	765
733	733-751	CAGUGGCGGGACAUAGUCATT	766	UGACUAUGUCCCGCCACUGTT	767
734	734-752	AGUGGCGGGACAUAGUCAGTT	768	CUGACUAUGUCCCGCCACUTT	769
736	736-754	UGGCGGGACAUAGUCAGCATT	770	UGCUGACUAUGUCCCGCCATT	771
737	737-755	GGCGGGACAUAGUCAGCAGTT	772	CUGCUGACUAUGUCCCGCCTT	773
763	763-781	CUCAGCAACAUGUCGAUGGTT	774	CCAUCGACAUGUUGCUGAGTT	775
765	765-783	CAGCAACAUGUCGAUGGACTT	776	GUCCAUCGACAUGUUGCUGTT	777
766	766-784	AGCAACAUGUCGAUGGACUTT	778	AGUCCAUCGACAUGUUGCUTT	779

[0937]

[0938]

767	767-785	GCAACAUGUCGAUGGACUUTT	780	AAGUCCAUCGACAUGUUGCTT	781
769	769-787	AACAUGUCGAUGGACUUCCTT	782	GGAAGUCCAUCGACAUGUUTT	783
770	770-788	ACAUGUCGAUGGACUUCCATT	784	UGGAAGUCCAUCGACAUGUTT	785
771	771-789	CAUGUCGAUGGACUUCCAGTT	786	CUGGAAGUCCAUCGACAUGTT	787
772	772-790	AUGUCGAUGGACUUCCAGATT	788	UCUGGAAGUCCAUCGACAUTT	789
775	775-793	UCGAUGGACUUCCAGAACCTT	790	GGUUCUGGAAGUCCAUCGATT	791
789	789-807	GAACCACCUGGGCAGCUGCTT	792	GCAGCUGCCCAGGUGGUUCTT	793
798	798-816	GGGCAGCUGCCAAAAGUGUTT	794	ACACUUUUGGCAGCUGCCCTT	795
800	800-818	GCAGCUGCCAAAAGUGUGATT	796	UCACACUUUUGGCAGCUGCTT	797
805	805-823	UGCCAAAAGUGUGAUCCAATT	798	UUGGAUCACACUUUUGGCATT	799
806	806-824	GCCAAAAGUGUGAUCCAAGTT	800	CUUGGAUCACACUUUUGGCTT	801
807	807-825	CCAAAAGUGUGAUCCAAGCTT	802	GCUUGGAUCACACUUUUGGTT	803
810	810-828	AAAGUGUGAUCCAAGCUGUTT	804	ACAGCUUGGAUCACACUUUTT	805
814	814-832	UGUGAUCCAAGCUGUCCCATT	806	UGGGACAGCUUGGAUCACATT	807
815	815-833	GUGAUCCAAGCUGUCCCAATT	808	UUGGGACAGCUUGGAUCACTT	809
817	817-835	GAUCCAAGCUGUCCCAAUGTT	810	CAUUGGGACAGCUUGGAUCTT	811
818	818-836	AUCCAAGCUGUCCCAAUGGTT	812	CCAUUGGGACAGCUUGGAUTT	813
819	819-837	UCCAAGCUGUCCCAAUGGGTT	814	CCCAUUGGGACAGCUUGGATT	815
820	820-838	CCAAGCUGUCCCAAUGGGATT	816	UCCCAUUGGGACAGCUUGGTT	817
821	821-839	CAAGCUGUCCCAAUGGGAGTT	818	CUCCCAUUGGGACAGCUUGTT	819
823	823-841	AGCUGUCCCAAUGGGAGCUTT	820	AGCUCCCAUUGGGACAGCUTT	821
826	826-844	UGUCCCAAUGGGAGCUGCUTT	822	AGCAGCUCCCAUUGGGACATT	823
847	847-865	GGUGCAGGAGAGGAGAACUTT	824	AGUUCUCCUCUCCUGCACCTT	825
871	871-889	AAACUGACCAAAAUCAUCUTT	826	AGAUGAUUUUGGUCAGUUUTT	827
872	872-890	AACUGACCAAAAUCA	828	CAGAUGAUUUUGGU	829

[0939]

		UCUGTT		CAGUUTT	
873	873-891	ACUGACCAAAAUCAUCUGUTT	830	ACAGAUGAUUUUGGUCAGUTT	831
877	877-895	ACCAAAAUCAUCUGUGCCCTT	832	GGGCACAGAUGAUUUUGGUTT	833
878	878-896	CCAAAAUCAUCUGUGCCCATT	834	UGGGCACAGAUGAUUUUGGTT	835
881	881-899	AAAUCAUCUGUGCCCAGCATT	836	UGCUGGGCACAGAUGAUUUTT	837
890	890-908	GUGCCCAGCAGUGCUCCGGTT	838	CCGGAGCACUGCUGGGCACTT	839
892	892-910	GCCCAGCAGUGCUCCGGGCTT	840	GCCCGGAGCACUGCUGGGCTT	841
929	929-947	CCAGUGACUGCUGCCACAATT	842	UUGUGGCAGCAGUCACUGGTT	843
930	930-948	CAGUGACUGCUGCCACAACTT	844	GUUGUGGCAGCAGUCACUGTT	845
979	979-997	GAGAGCGACUGCCUGGUCUTT	846	AGACCAGGCAGUCGCUCUCTT	847
980	980-998	AGAGCGACUGCCUGGUCUGTT	848	CAGACCAGGCAGUCGCUCUTT	849
981	981-999	GAGCGACUGCCUGGUCUGCTT	850	GCAGACCAGGCAGUCGCUCTT	851
982	982-1000	AGCGACUGCCUGGUCUGCCTT	852	GGCAGACCAGGCAGUCGCUTT	853
983	983-1001	GCGACUGCCUGGUCUGCCGTT	854	CGGCAGACCAGGCAGUCGCTT	855
984	984-1002	CGACUGCCUGGUCUGCCGCTT	856	GCGGCAGACCAGGCAGUCGTT	857
989	989-1007	GCCUGGUCUGCCGCAAAUUTT	858	AAUUUGCGGCAGACCAGGCTT	859
990	990-1008	CCUGGUCUGCCGCAAAUUCTT	860	GAAUUUGCGGCAGACCAGGTT	861
991	991-1009	CUGGUCUGCCGCAAAUUCCTT	862	GGAAUUUGCGGCAGACCAGTT	863
992	992-1010	UGGUCUGCCGCAAAUUCCGTT	864	CGGAAUUUGCGGCAGACCATT	865
994	994-1012	GUCUGCCGCAAAUUCCGAGTT	866	CUCGGAAUUUGCGGCAGACTT	867
995	995-1013	UCUGCCGCAAAUUCCGAGATT	868	UCUCGGAAUUUGCGGCAGATT	869
996	996-1014	CUGCCGCAAAUUCCGAGACTT	870	GUCUCGGAAUUUGCGGCAGTT	871
997	997-1015	UGCCGCAAAUUCCGAGACGTT	872	CGUCUCGGAAUUUGCGGCATT	873
999	999-1017	CCGCAAAUUCCGAGACGAATT	874	UUCGUCUCGGAAUUUGCGGTT	875
1004	1004-1022	AAUUCCGAGACGAAGCCACTT	876	GUGGCUUCGUCUCGGAAUUTT	877

[0940]

1005	1005-1023	AUUCCGAGACGAAGC CACGTT	878	CGUGGCUUCGUCUCG GAAUTT	879
1006	1006-1024	UUCCGAGACGAAGCC ACGUTT	880	ACGUGGCUUCGUCUC GGAATT	881
1007	1007-1025	UCCGAGACGAAGCCA CGUGTT	882	CACGUGGCUUCGUCU CGGATT	883
1008	1008-1026	CCGAGACGAAGCCAC GUGCTT	884	GCACGUGGCUUCGUC UCGGTT	885
1010	1010-1028	GAGACGAAGCCACGU GCAATT	886	UUGCACGUGGCUUC GUCUCTT	887
1013	1013-1031	ACGAAGCCACGUGCA AGGATT	888	UCCUUGCACGUGGCU UCGUTT	889
1014	1014-1032	CGAAGCCACGUGCAA GGACTT	890	GUCCUUGCACGUGGC UUCGTT	891
1015	1015-1033	GAAGCCACGUGCAAG GACATT	892	UGUCCUUGCACGUG GCUUCTT	893
1016	1016-1034	AAGCCACGUGCAAGG ACACTT	894	GUGUCCUUGCACGU GGCUUTT	895
1040	1040-1058	CCCCACUCAUGCUCU ACAATT	896	UUGUAGAGCAUGAG UGGGGTT	897
1042	1042-1060	CCACUCAUGCUCUAC AACCTT	898	GGUUGUAGAGCAUG AGUGGTT	899
1044	1044-1062	ACUCAUGCUCUACAA CCCCTT	900	GGGGUUGUAGAGCA UGAGUTT	901
1047	1047-1065	CAUGCUCUACAACCC CACCTT	902	GGUGGGGUUGUAGA GCAUGTT	903
1071	1071-1089	CCAGAUGGAUGUGAA CCCCTT	904	GGGGUUCACAUCCA UCUGGTT	905
1073	1073-1091	AGAUGGAUGUGAACC CCGATT	906	UCGGGGUUCACAUCC AUCUTT	907
1074	1074-1092	GAUGGAUGUGAACCC CGAGTT	908	CUCGGGGUUCACAUC CAUCTT	909
1075	1075-1093	AUGGAUGUGAACCCC GAGGTT	910	CCUCGGGGUUCACAU CCAUTT	911
1077	1077-1095	GGAUGUGAACCCCGA GGGCTT	912	GCCCUCGGGGUUCAC AUCCTT	913
1078	1078-1096	GAUGUGAACCCCGAG GGCATT	914	UGCCCUCGGGGUUCA CAUCTT	915
1080	1080-1098	UGUGAACCCCGAGGG CAAATT	916	UUUGCCCUCGGGGU UCACATT	917
1084	1084-1102	AACCCCGAGGGCAAA UACATT	918	UGUAUUUGCCCUCG GGGUUTT	919
1085	1085-1103	ACCCCGAGGGCAAAU ACAGTT	920	CUGUAUUUGCCCUCG GGGUTT	921
1087	1087-1105	CCCGAGGGCAAAUAC AGCUTT	922	AGCUGUAUUUGCCC UCGGGTT	923
1088	1088-1106	CCGAGGGCAAAUACA GCUUTT	924	AAGCUGUAUUUGCC CUCGGTT	925
1089	1089-1107	CGAGGGCAAAUACAG	926	AAAGCUGUAUUUGC	927

[0941]

		CUUUTT		CCUCGTT	
1096	1096-1114	AAAUACAGCUUUGGUGCCATT	928	UGGCACCAAAGCUGUAUUUTT	929
1097	1097-1115	AAUACAGCUUUGGUGCCACTT	930	GUGGCACCAAAGCUGUAUUTT	931
1098	1098-1116	AUACAGCUUUGGUGCCACCTT	932	GGUGGCACCAAAGCUGUAUTT	933
1104	1104-1122	CUUUGGUGCCACCUGCGUGTT	934	CACGCAGGUGGCACCAAAGTT	935
1106	1106-1124	UUGGUGCCACCUGCGUGAATT	936	UUCACGCAGGUGGCACCAATT	937
1112	1112-1130	CCACCUGCGUGAAGAAGUGTT	938	CACUUCUUCACGCAGGUGGTT	939
1116	1116-1134	CUGCGUGAAGAAGUGUCCCTT	940	GGGACACUUCUUCACGCAGTT	941
1117	1117-1135	UGCGUGAAGAAGUGUCCCCTT	942	GGGGACACUUCUUCACGCATT	943
1118	1118-1136	GCGUGAAGAAGUGUCCCGTT	944	CGGGGACACUUCUUCACGCTT	945
1119	1119-1137	CGUGAAGAAGUGUCCCCGUTT	946	ACGGGGACACUUCUUCACGTT	947
1120	1120-1138	GUGAAGAAGUGUCCCCGUATT	948	UACGGGGACACUUCUUCACTT	949
1121	1121-1139	UGAAGAAGUGUCCCCGUAATT	950	UUACGGGGACACUUCUUCATT	951
1122	1122-1140	GAAGAAGUGUCCCCGUAAUTT	952	AUUACGGGGACACUUCUUCTT	953
1123	1123-1141	AAGAAGUGUCCCCGUAAUUTT	954	AAUUACGGGGACACUUCUUTT	955
1124	1124-1142	AGAAGUGUCCCCGUAAUUATT	956	UAAUUACGGGGACACUUCUTT	957
1125	1125-1143	GAAGUGUCCCCGUAAUUAUTT	958	AUAAUUACGGGGACACUUCTT	959
1126	1126-1144	AAGUGUCCCCGUAAUUAUGTT	960	CAUAAUUACGGGGACACUUTT	961
1127	1127-1145	AGUGUCCCCGUAAUUAUGUTT	962	ACAUAAUUACGGGGACACUTT	963
1128	1128-1146	GUGUCCCCGUAAUUAUGUGTT	964	CACAUAAUUACGGGGACACTT	965
1129	1129-1147	UGUCCCCGUAAUUAUGUGGTT	966	CCACAUAAUUACGGGGACATT	967
1130	1130-1148	GUCCCCGUAAUUAUGUGGUTT	968	ACCACAUAAUUACGGGGACTT	969
1132	1132-1150	CCCCGUAAUUAUGUGGUGATT	970	UCACCACAUAAUUACGGGGTT	971
1134	1134-1152	CCGUAAUUAUGUGGUGACATT	972	UGUCACCACAUAAUUACGGTT	973
1136	1136-1154	GUAAUUAUGUGGUGACAGATT	974	UCUGUCACCACAUAAUUACTT	975

1137	1137-1155	UAAUUAUGUGGUGACAGAUTT	976	AUCUGUCACCACAUAAUUATT	977
1138	1138-1156	AAUUAUGUGGUGACAGAUCTT	978	GAUCUGUCACCACAUAAUUTT	979
1139	1139-1157	AUUAUGUGGUGACAGAUCATT	980	UGAUCUGUCACCACAUAAUTT	981
1140	1140-1158	UUAUGUGGUGACAGAUCACTT	982	GUGAUCUGUCACCACAUAATT	983
1142	1142-1160	AUGUGGUGACAGAUCACGGTT	984	CCGUGAUCUGUCACCACAUTT	985
1145	1145-1163	UGGUGACAGAUCACGGCUCTT	986	GAGCCGUGAUCUGUCACCATT	987
1147	1147-1165	GUGACAGAUCACGGCUCGUTT	988	ACGAGCCGUGAUCUGUCACTT	989
1148	1148-1166	UGACAGAUCACGGCUCGUGTT	990	CACGAGCCGUGAUCUGUCATT	991
1149	1149-1167	GACAGAUCACGGCUCGUGCTT	992	GCACGAGCCGUGAUCUGUCTT	993
1150	1150-1168	ACAGAUCACGGCUCGUGCGTT	994	CGCACGAGCCGUGAUCUGUTT	995
1151	1151-1169	CAGAUCACGGCUCGUGCGUTT	996	ACGCACGAGCCGUGAUCUGTT	997
1152	1152-1170	AGAUCACGGCUCGUGCGUCTT	998	GACGCACGAGCCGUGAUCUTT	999
1153	1153-1171	GAUCACGGCUCGUGCGUCCTT	1000	GGACGCACGAGCCGUGAUCTT	1001
1154	1154-1172	AUCACGGCUCGUGCGUCCGTT	1002	CGGACGCACGAGCCGUGAUTT	1003
1155	1155-1173	UCACGGCUCGUGCGUCCGATT	1004	UCGGACGCACGAGCCGUGATT	1005
1156	1156-1174	CACGGCUCGUGCGUCCGAGTT	1006	CUCGGACGCACGAGCCGUGTT	1007
1157	1157-1175	ACGGCUCGUGCGUCCGAGCTT	1008	GCUCGGACGCACGAGCCGUTT	1009
1160	1160-1178	GCUCGUGCGUCCGAGCCUGTT	1010	CAGGCUCGGACGCACGAGCTT	1011
1200	1200-1218	GGAGGAAGACGGCGUCCGCTT	1012	GCGGACGCCGUCUUCCUCCTT	1013
1201	1201-1219	GAGGAAGACGGCGUCCGCATT	1014	UGCGGACGCCGUCUUCCUCTT	1015
1203	1203-1221	GGAAGACGGCGUCCGCAAGTT	1016	CUUGCGGACGCCGUCUUCCTT	1017
1204	1204-1222	GAAGACGGCGUCCGCAAGUTT	1018	ACUUGCGGACGCCGUCUUCTT	1019
1205	1205-1223	AAGACGGCGUCCGCAAGUGTT	1020	CACUUGCGGACGCCGUCUUTT	1021
1207	1207-1225	GACGGCGUCCGCAAGUGUATT	1022	UACACUUGCGGACGCCGUCTT	1023
1208	1208-1226	ACGGCGUCCGCAAGU	102	UUACACUUGCGGAC	1025

[0942]

[0943]

		GUAATT	4	GCCGUTT	
1211	1211-1229	GCGUCCGCAAGUGUAAGAATT	1026	UUCUUACACUUGCGGACGCTT	1027
1212	1212-1230	CGUCCGCAAGUGUAAGAAGTT	1028	CUUCUUACACUUGCGGACGTT	1029
1213	1213-1231	GUCCGCAAGUGUAAGAAGUTT	1030	ACUUCUUACACUUGCGGACTT	1031
1214	1214-1232	UCCGCAAGUGUAAGAAGUGTT	1032	CACUUCUUACACUUGCGGATT	1033
1215	1215-1233	CCGCAAGUGUAAGAAGUGCTT	1034	GCACUUCUUACACUUGCGGTT	1035
1216	1216-1234	CGCAAGUGUAAGAAGUGCGTT	1036	CGCACUUCUUACACUUGCGTT	1037
1217	1217-1235	GCAAGUGUAAGAAGUGCGATT	1038	UCGCACUUCUUACACUUGCTT	1039
1219	1219-1237	AAGUGUAAGAAGUGCGAAGTT	1040	CUUCGCACUUCUUACACUUTT	1041
1220	1220-1238	AGUGUAAGAAGUGCGAAGGTT	1042	CCUUCGCACUUCUUACACUTT	1043
1221	1221-1239	GUGUAAGAAGUGCGAAGGGTT	1044	CCCUUCGCACUUCUUACACTT	1045
1222	1222-1240	UGUAAGAAGUGCGAAGGGCTT	1046	GCCCUUCGCACUUCUUACATT	1047
1223	1223-1241	GUAAGAAGUGCGAAGGGCCTT	1048	GGCCCUUCGCACUUCUUACTT	1049
1224	1224-1242	UAAGAAGUGCGAAGGGCCUTT	1050	AGGCCCUUCGCACUUCUUATT	1051
1225	1225-1243	AAGAAGUGCGAAGGGCCUUTT	1052	AAGGCCCUUCGCACUUCUUTT	1053
1226	1226-1244	AGAAGUGCGAAGGGCCUUGTT	1054	CAAGGCCCUUCGCACUUCUTT	1055
1229	1229-1247	AGUGCGAAGGGCCUUGCCGTT	1056	CGGCAAGGCCCUUCGCACUTT	1057
1230	1230-1248	GUGCGAAGGGCCUUGCCGCTT	1058	GCGGCAAGGCCCUUCGCACTT	1059
1231	1231-1249	UGCGAAGGGCCUUGCCGCATT	1060	UGCGGCAAGGCCCUUCGCATT	1061
1232	1232-1250	GCGAAGGGCCUUGCCGCAATT	1062	UUGCGGCAAGGCCCUUCGCTT	1063
1233	1233-1251	CGAAGGGCCUUGCCGCAAATT	1064	UUUGCGGCAAGGCCCUUCGTT	1065
1235	1235-1253	AAGGGCCUUGCCGCAAAGUTT	1066	ACUUUGCGGCAAGGCCCUUTT	1067
1236	1236-1254	AGGGCCUUGCCGCAAAGUGTT	1068	CACUUUGCGGCAAGGCCCUTT	1069
1237	1237-1255	GGGCCUUGCCGCAAAGUGUTT	1070	ACACUUUGCGGCAAGGCCCTT	1071
1238	1238-1256	GGCCUUGCCGCAAAGUGUGTT	1072	CACACUUUGCGGCAAGGCCTT	1073

[0944]

1239	1239-1257	GCCUUGCCGCAAAGUGUGUTT	1074	ACACACUUUGCGGCAAGGCTT	1075
1241	1241-1259	CUUGCCGCAAAGUGUGUAATT	1076	UUACACACUUUGCGGCAAGTT	1077
1261	1261-1279	GGAAUAGGUAUUGGUGAAUTT	1078	AUUCACCAAUACCUAUUCCTT	1079
1262	1262-1280	GAAUAGGUAUUGGUGAAUUTT	1080	AAUUCACCAAUACCUAUUCTT	1081
1263	1263-1281	AAUAGGUAUUGGUGAAUUUTT	1082	AAAUUCACCAAUACCUAUUTT	1083
1264	1264-1282	AUAGGUAUUGGUGAAUUUATT	1084	UAAAUUCACCAAUACCUAUTT	1085
1266	1266-1284	AGGUAUUGGUGAAUUUAAATT	1086	UUUAAAUUCACCAAUACCUTT	1087
1267	1267-1285	GGUAUUGGUGAAUUUAAAGTT	1088	CUUUAAAUUCACCAAUACCTT	1089
1289	1289-1307	CACUCUCCAUAAAUGCUACTT	1090	GUAGCAUUUAUGGAGAGUGTT	1091
1313	1313-1331	UUAAACACUUCAAAAACUGTT	1092	CAGUUUUUGAAGUGUUUAATT	1093
1320	1320-1338	CUUCAAAAACUGCACCUCCTT	1094	GGAGGUGCAGUUUUUGAAGTT	1095
1321	1321-1339	UUCAAAAACUGCACCUCCATT	1096	UGGAGGUGCAGUUUUUGAATT	1097
1322	1322-1340	UCAAAAACUGCACCUCCAUTT	1098	AUGGAGGUGCAGUUUUUGATT	1099
1323	1323-1341	CAAAAACUGCACCUCCAUCTT	1100	GAUGGAGGUGCAGUUUUUGTT	1101
1324	1324-1342	AAAAACUGCACCUCCAUCATT	1102	UGAUGGAGGUGCAGUUUUUTT	1103
1328	1328-1346	ACUGCACCUCCAUCAGUGGTT	1104	CCACUGAUGGAGGUGCAGUTT	1105
1332	1332-1350	CACCUCCAUCAGUGGCGAUTT	1106	AUCGCCACUGAUGGAGGUGTT	1107
1333	1333-1351	ACCUCCAUCAGUGGCGAUCTT	1108	GAUCGCCACUGAUGGAGGUTT	1109
1335	1335-1353	CUCCAUCAGUGGCGAUCUCTT	1110	GAGAUCGCCACUGAUGGAGTT	1111
1338	1338-1356	CAUCAGUGGCGAUCUCCACTT	1112	GUGGAGAUCGCCACUGAUGTT	1113
1344	1344-1362	UGGCGAUCUCCACAUCCUGTT	1114	CAGGAUGUGGAGAUCGCCATT	1115
1345	1345-1363	GGCGAUCUCCACAUCCUGCTT	1116	GCAGGAUGUGGAGAUCGCCTT	1117
1346	1346-1364	GCGAUCUCCACAUCCUGCCTT	1118	GGCAGGAUGUGGAGAUCGCTT	1119
1347	1347-1365	CGAUCUCCACAUCCUGCCGTT	1120	CGGCAGGAUGUGGAGAUCGTT	1121
1348	1348-1366	GAUCUCCACAUCCUG	112	CCGGCAGGAUGUGG	1123

[0945]

		CCGGTT	2	AGAUCTT	
1353	1353-1371	CCACAUCCUGCCGGUGGCATT	1124	UGCCACCGGCAGGAUGUGGTT	1125
1354	1354-1372	CACAUCCUGCCGGUGGCAUTT	1126	AUGCCACCGGCAGGAUGUGTT	1127
1355	1355-1373	ACAUCCUGCCGGUGGCAUUTT	1128	AAUGCCACCGGCAGGAUGUTT	1129
1357	1357-1375	AUCCUGCCGGUGGCAUUUATT	1130	UAAAUGCCACCGGCAGGAUTT	1131
1360	1360-1378	CUGCCGGUGGCAUUUAGGGTT	1132	CCCUAAAUGCCACCGGCAGTT	1133
1361	1361-1379	UGCCGGUGGCAUUUAGGGGTT	1134	CCCCUAAAUGCCACCGGCATT	1135
1362	1362-1380	GCCGGUGGCAUUUAGGGUTT	1136	ACCCCUAAAUGCCACCGGCTT	1137
1363	1363-1381	CCGGUGGCAUUUAGGGGUGTT	1138	CACCCCUAAAUGCCACCGGTT	1139
1366	1366-1384	GUGGCAUUUAGGGGUGACUTT	1140	AGUCACCCCUAAAUGCCACTT	1141
1369	1369-1387	GCAUUUAGGGGUGACUCCUTT	1142	AGGAGUCACCCCUAAAUGCTT	1143
1370	1370-1388	CAUUUAGGGGUGACUCCUUTT	1144	AAGGAGUCACCCCUAAAUGTT	1145
1371	1371-1389	AUUUAGGGGUGACUCCUUCTT	1146	GAAGGAGUCACCCCUAAAUTT	1147
1372	1372-1390	UUUAGGGGUGACUCCUUCATT	1148	UGAAGGAGUCACCCCUAAATT	1149
1373	1373-1391	UUAGGGGUGACUCCUUCACTT	1150	GUGAAGGAGUCACCCCUAATT	1151
1374	1374-1392	UAGGGGUGACUCCUUCACATT	1152	UGUGAAGGAGUCACCCCUATT	1153
1404	1404-1422	UCUGGAUCCACAGGAACUGTT	1154	CAGUUCCUGUGGAUCCAGATT	1155
1408	1408-1426	GAUCCACAGGAACUGGAUATT	1156	UAUCCAGUUCCUGUGGAUCTT	1157
1409	1409-1427	AUCCACAGGAACUGGAUAUTT	1158	AUAUCCAGUUCCUGUGGAUTT	1159
1411	1411-1429	CCACAGGAACUGGAUAUUCTT	1160	GAAUAUCCAGUUCCUGUGGTT	1161
1412	1412-1430	CACAGGAACUGGAUAUUCUTT	1162	AGAAUAUCCAGUUCCUGUGTT	1163
1419	1419-1437	ACUGGAUAUUCUGAAAACCTT	1164	GGUUUUCAGAAUAUCCAGUTT	1165
1426	1426-1444	AUUCUGAAAACCGUAAAGGTT	1166	CCUUUACGGUUUUCAGAAUTT	1167
1427	1427-1445	UUCUGAAAACCGUAAAGGATT	1168	UCCUUUACGGUUUUCAGAATT	1169
1430	1430-1448	UGAAAACCGUAAAGGAAAUTT	1170	AUUUCCUUUACGGUUUUCATT	1171

[0946]

1431	1431-1449	GAAAACCGUAAAGGAAAUCTT	1172	GAUUUCCUUUACGGUUUUCTT	1173

[0947] 表5.AR靶序列

[0948]

ID	代码	靶序列	SEQ ID NO:	NM_000044.3	外显子	物种
XD-01817K1	**17**	**CAAAGGUUCUCUGCUAGACGACA**	**1174**	**1987-2005**	**1**	**h**
XD-01827K1	**27**	**UCUGGGUGUCACUAUGGAGCUCU**	**1175**	**2819-2837**	**2**	**h**
XD-01828K1	**28**	**CUGGGUGUCACUAUGGAGCUCUC**	**1176**	**2820-2838**	**2**	**h**
XD-01829K1	**29**	**GGGUGUCACUAUGGAGCUCUCAC**	**1177**	**2822-2840**	**2**	**h**
XD-01821K1	21	UACUACAACUUUCCACUGGCUCU	1178	2207-2225	1	h
XD-01825K1	25	AAGCUUCUGGGUGUCACUAUGGA	1179	2814-2832	2	h,m
XD-01826K1	26	CUUCUGGGUGUCACUAUGGAGCU	1180	2817-2835	2	h

[0949] 表6.β-联蛋白靶序列

[0950]

R#	通用名	基因	靶序列			
R-1146	1797mfm	CTNNB1	CUGUUGGAUUGAUUCGAAAUU	SEQ ID NO: 1181	UUUCGAAUCAAUCCAACAGUU	SEQ ID NO: 1182
R-1147	1870mfm	CTNNB1	ACGACUAGUUCAGUUGCUUUU	SEQ ID NO: 1183	AAGCAACUGAACUAGUCGUUU	SEQ ID NO: 1184

[0951] 表7.PIK3CA*和PIK3CB*靶序列

[0952]

基因符号	基因ID	名称	靶序列(97-聚体)	SEQ ID NO:
PIK3CA	5290	PIK3CA_1746	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGCTCAAAGCAATTTCTACATAGTGAAGCCACAGATGTATGTAGAAATTGCTTTGAGCTGTTGCCTACTGCCTCGGA	1185
PIK3CA	5290	PIK3CA_2328	TGCTGTTGACAGTGAGCGAAAGGATGAAACACAAAAGGTATAGTGAAGCCACAGATGTATACCTTTTGTGTTTCATCCTTCTGCCTACTGCCTCGGA	1186
PIK3CA	5290	PIK3CA_2522	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCATGTCAGAGTTACTGTTTCATAGTGAAGCCACAGATGTATGAAACAGTAACTCTGACATGATGCCTACTGCCTCGGA	1187
PIK3	529	PIK3C	TGCTGTTGACAGTGAGCGCAACTAGTTCATTTCAAA	1188

[0953]

CA	0	A_3555	ATTATAGTGAAGCCACAGATGTATAATTTTGAAATGAACTAGTTTTGCCTACTGCCTCGGA	
PIK3CA	5290	PIK3CA_3484	TGCTGTTGACAGTGAGCGCACAGCAAGAACAGAAATAAAATAGTGAAGCCACAGATGTATTTTATTTCTGTTCTTGCTGTATGCCTACTGCCTCGGA	1189
PIK3CB	5291	PIK3CB_862	TGCTGTTGACAGTGAGCGACAAGATCAAGAAAATGTATGATAGTGAAGCCACAGATGTATCATACATTTTCTTGATCTTGCTGCCTACTGCCTCGGA	1190
PIK3CB	5291	PIK3CB_183	TGCTGTTGACAGTGAGCGCAGCAAGTTCACAATTACCCAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGGGTAATTGTGAACTTGCTTTGCCTACTGCCTCGGA	1191
PIK3CB	5291	PIK3CB_1520	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCCTTCGATAAGATTATTGAATAGTGAAGCCACAGATGTATTCAATAATCTTATCGAAGGGATGCCTACTGCCTCGGA	1192
PIK3CB	5291	PIK3CB_272	TGCTGTTGACAGTGAGCGAGAGCTTGAAGATGAAACACGATAGTGAAGCCACAGATGTATCGTGTTTCATCTTCAAGCTCCTGCCTACTGCCTCGGA	1193
PIK3CB	5291	PIK3CB_948	TGCTGTTGACAGTGAGCGACACCAAAGAAAACACGAATTATAGTGAAGCCACAGATGTATAATTCGTGTTTTCTTTGGTGGTGCCTACTGCCTCGGA	1194

[0954] *物种是智人(Homo sapiens)。

[0955] 表8.PIK3CA和PIK3CB siRNA序列

[0956]

基因符号	基因ID	名称	siRNA 指导	SEQ ID NO:	siRNA 过客	SEQ ID NO:
PIK3CA	5290	PIK3CA_1746	UGUAGAAAUUGCUUUGAGCUGU	1195	AGCUCAAAGCAAUUUCUACAUA	1196
PIK3CA	5290	PIK3CA_2328	UACCUUUUGUGUUUCAUCCUUC	1197	AGGAUGAAACACAAAAGGUAUA	1198
PIK3CA	5290	PIK3CA_2522	UGAAACAGUAACUCUGACAUGA	1199	AUGUCAGAGUUACUGUUUCAUA	1200
PIK3CA	5290	PIK3CA_3555	UAAUUUUGAAAUGAACUAGUUU	1201	ACUAGUUCAUUUCAAAAUUAUA	1202
PIK3CA	5290	PIK3CA_3484	UUUUAUUUCUGUUCUUGCUGUA	1203	CAGCAAGAACAGAAAUAAAAUA	1204
PIK3CB	5291	PIK3CB_862	UCAUACAUUUUCUUGAUCUUGC	1205	AAGAUCAAGAAAAUGUAUGAUA	1206
PIK3CB	5291	PIK3CB_183	UUGGGUAAUUGUGAACUUGCUU	1207	GCAAGUUCACAAUUACCCAAUA	1208
PIK3CB	5291	PIK3CB_1520	UUCAAUAAUCUUAUCGAAGGGA	1209	CCUUCGAUAAGAUUAUUGAAUA	1210
PIK3CB	5291	PIK3CB_272	UCGUGUUUCAUCUUCAAGCUCC	1211	AGCUUGAAGAUGAAACACGAUA	1212
PIK3CB	5291	PIK3CB_948	UAAUUCGUGUUUUCUUUGGUGG	1213	ACCAAAGAAAACACGAAUUAUA	1214

[0957] 表9.另外的多核酸分子序列

[0958]

	碱基起始位置	指导链	SEQ ID NO:	过客链	SEQ ID NO:
EGFR R1246	333	ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU	1215	AGUUUGCCAAGGCACGAGUUU	1216
EGFR R1195	333	ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU	1217	AGUUUGCCAAGGCACGAGUUU	1218
EGFR R1449	333	ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU	1219	AGUUUGCCAAGGCACGAGUUU	1220
KRAS R1450	237	UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU	1221	TGACGAUACAGCUAAUUCAUU	1222
KRAS R1443	237	UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU	1223	UGACGAUACAGCUAAUUCAUU	1224
KRAS R1194	237	UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU	1225	UGACGAUACAGCUAAUUCAUU	1226
CTNNB1 R1442	1248	UAAGUAUAGGUCCUCAUUAUU	1227	UAAUGAGGACCUAUACUUAUU	1228
CTNNB1 R1404	1797	TUUCGAAUCAAUCCAACAGUU	1229	CUGUUGGAUUGAUUCGAAAUU	1230
CTNNB1 R1441	1797	UUUCGAAUCAAUCCAACAGUU	1231	CUGUUGGAUUGAUUCGAAAUU	1232
CTNNB1 R1523	1797	UUUCGAAUCAAUCCAACAGUU	1233	CUGUUGGAUUGAUUCGAAAUU	1234
HPRT R1492	425	AUAAAAUCUACAGUCAUAGUU	1235	CUAUGACUGUAGAUUUUAUUU	1236
HPRT R1526	425	UUAAAAUCUACAGUCAUAGUU	1237	CUAUGACUGUAGAUUUUAAUU	1238
HPRT R1527	425	UUAAAAUCUACAGUCAUAGUU	1239	CUAUGACUGUAGAUUUUAAUU	1240
AR R1245	2822	GAGAGCUCCAUAGUGACACUU	1241	GUGUCACUAUGGAGCUCUCUU	1242

[0959] 实施例2.通用实验方案

[0960] 用于siRNA定量的茎-环qPCR测定

[0961] 将血浆样品直接在TE缓冲液中稀释。使用FastPrep-24组织匀浆器(MP Biomedicals)将50mg组织块在1mL Trizol中匀浆化,然后在TE缓冲液中稀释。通过将siRNA掺加到来自未处理的动物的血浆或匀浆化组织中并然后用TE缓冲液进行系列稀释来产生标准曲线。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems),用25nM序列特异性茎-环RT引物对siRNA的反义链进行逆转录。来自RT步骤的cDNA用于使用TaqMan Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems)用1.5μM正向引物、0.75μM反向引物和0.2μM探针进行实时PCR。在ViiA 7Real-Time PCR System(Life Technologies)中使用标准循环条件进行定量PCR反应。使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[0962] 用于确定mRNA敲减的比较qPCR测定

[0963] 如上所述将组织样品在Trizol中匀浆化。使用RNeasy RNA分离96孔板(Qiagen)分离总RNA,然后用High Capacity RNA to cDNA试剂盒(ThermoFisher)对500ng RNA进行逆

转录。通过用ViiA 7 Real-Time PCR System进行的TaqMan qPCR分析对KRAS、EGFR、CTNNB1和PPIB mRNA进行定量。用于EGFR和CTNNB1的TaqMan引物和探针作为预先验证的基因表达测定从Applied Biosystems购得。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,其中用于PPIB的所有TaqMan引物和探针都作为预先验证的基因表达测定从Applied Biosystems购得。通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因(KRAS、CTNNB1或EGFR)Ct值与PPIB Ct值之间的差值(ΔCt),然后通过取二次差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[0964] 动物

[0965] 所有动物研究均按照机构动物管理和使用委员会(IACUC)的方案在Explora BioLabs进行,遵守USDA动物福利法案中概述的规定以及“实验动物管理和使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)”(国家研究委员会(National Research Council)出版物,第8版,2011年修订)。所有小鼠均获自Charles River Laboratories或Harlan Laboratories。

[0966] H358、HCC827和Hep-3B2 1-7皮下胁腹肿瘤模型

[0967] 对于H358皮下胁腹肿瘤模型,根据以下方法接种肿瘤细胞并建立肿瘤。在细胞注射前一天通过耳标标识雌性NCr nu/nu小鼠。在接种前对小鼠进行称重。H358细胞用10%FBS/RPMI培养基培养,并用0.05%胰蛋白酶和Cell Stripper(MediaTech)收获。将具有基质胶的0.05ml Hank平衡盐溶液(HBSS)(1:1)中的500万个H358细胞皮下(SC)注射到每只小鼠的右上胁腹。从接种后第7天开始,随后每周2次,通过使用数显卡尺的肿瘤体积测量来监测肿瘤生长,直到平均肿瘤体积达到大于100mm^{3}且小于等于300mm^3。一旦肿瘤达到期望的体积(平均100mm^{3}至300mm^3),就将动物随机化,并剔除具有极大或小肿瘤的小鼠。将小鼠按肿瘤体积分到所需的组别并进行随机化。然后如单独的实验中所述地处理小鼠。

[0968] 对于Hep3B正位肝脏肿瘤模型,根据以下方法接种肿瘤细胞并建立肿瘤。在前一天通过耳标标识雌性NCr nu/nu小鼠,用异氟烷将小鼠麻醉。然后将小鼠以仰卧位置于水循环加热垫上以维持体温。在胸骨下方切开小的横切口以暴露肝脏。使用28号针将癌细胞缓慢注射至肝脏的左上叶中。将细胞以30度角注射至肝脏中,使得可以透过肝包膜看到透明的细胞泡。通过在冷PBS中悬浮(0.1-5x10^{6}个细胞)并与稀释的基质胶(在PBS中稀释30倍)混合来制备Hep 3B2.1 7细胞。接种30-50ul细胞/基质胶。注射后,将一小块无菌纱布置于注射部位上,并施加轻微压力1分钟以防止出血。然后用6-0丝缝线闭合腹部。在肿瘤细胞植入后,将动物保持在温笼中,观察1-2小时,然后在从麻醉中完全恢复后返回动物室。在肿瘤植入后7-10天,将动物随机化、分到所需的组别,然后如在单独的实验中所述地进行处理。

[0969] LNCap皮下胁腹肿瘤模型

[0970] 使LNCaP细胞(ATCC®CRL-1740™)在补充有非必需氨基酸和丙酮酸钠的RPMI+10%FBS中生长至约80%汇合。将细胞与基质胶1:1混合,并将5-7*10^{6}个细胞皮下注射至雄性SCID小鼠(6-8周)中。肿瘤通常在3-5周内发展至100-350mm^{3}的大小。将荷有该范围内的肿瘤的动物随机化,并通过尾静脉注射来用ASC处理。对于PD研究,在注射后96小时处死动物并收获器官碎片、称重并在液氮中冷冻。对于RNA分离,将器官样品在Trizol中匀浆化,并使用Qiagen RNeasy 96Plus试剂盒按照制造商的说明制备RNA。用分光光度法确定RNA浓度。通过逆转录将RNA转化为cDNA,并使用ΔΔCT方法和经验证的Taqman测定(Thermofisher)通过qPCR对特定靶标的表达进行定量。将样品相对于PPIB的表达水平进行标准化。

[0971] 肽合成

[0972] 使用标准Fmoc化学法在固相上合成肽。两种肽都在N-末端具有半胱氨酸,经切割的肽通过HPLC进行纯化并通过质谱法进行确认。INF7肽如SEQ ID NO:2055所示。蜂毒肽如SEQ ID NO:2060所示。

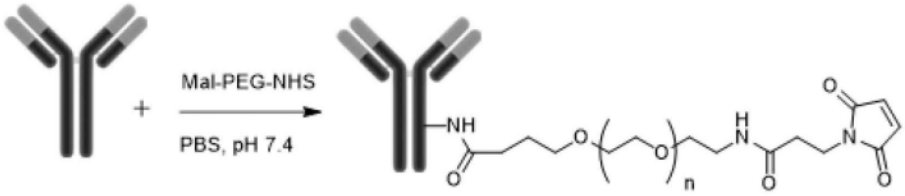
[0973] 抗EGFR抗体

[0974] 抗EGFR抗体是针对人表皮生长因子受体(EGFR)的完全人IgG1κ单克隆抗体。其在中国仓鼠卵巢细胞系DJT33中产生,该细胞系是通过用携带来源于产生人抗EGFR抗体的杂交瘤细胞系(2F8)的抗体基因的GS载体转染而从CHO细胞系CHO-K1SV衍生的。抗EGFR抗体的制备使用标准哺乳动物细胞培养和纯化技术。

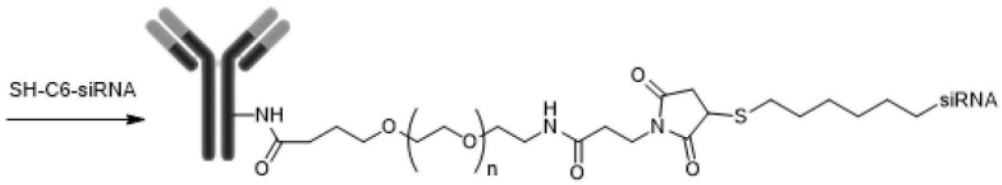
[0975] 不含聚糖的抗EGFR抗体的理论分子量(MW)为146.6kDa。如通过质谱法确定的,该抗体的主要糖基化同种型的实验MW为149kDa。使用还原条件SDS-PAGE,发现轻链的MW约为25kDa,重链的MW约为50kDa。重链通过两个链间二硫键彼此连接,并且一条轻链通过单个链间二硫键连接至每条重链。轻链具有两个链内二硫键,重链具有四个链内二硫键。该抗体在重链的Asn305处被聚糖进行N-连接的糖基化,该聚糖由N-乙酰基-葡糖胺、甘露糖、岩藻糖和半乳糖组成。存在的主要聚糖是含有零个或一个末端半乳糖残基的岩藻糖基化双触角结构。

[0976] 已经使用成像毛细管IEF、琼脂糖IEF和分析型阳离子交换HPLC研究了IgG1κ抗体的带电荷的同种型模式。发现了多个带电荷的同种型,其中主要的同种型具有约8.7的等电点。

[0977] 抗EGFR抗体的主要作用机制是对A431癌细胞中EGF诱导的EGFR磷酸化进行浓度依赖性抑制。另外,在临床前细胞体外研究中已经观察到在低抗体浓度下诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。实施例3:抗体-PEG-EGFR缀合物和抗体-EGFR缀合物的合成、纯化和分析



[0978]



缀合方案-1

[0979] 步骤1:抗体与马来酰亚胺-PEG-NHS缀合,随后与SH-EGFR缀合

[0980] 用1X磷酸盐缓冲液(pH 7.4)对抗EGFR抗体(EGFR-Ab)进行缓冲液交换,并使其浓度达到5mg/ml。向该溶液中加入2当量的SMCC连接体或马来酰亚胺-PEGxkDa-NHS(x=1、5、10、20),并在室温下旋转4小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和PBS pH 7.4通过旋

转过滤除去未反应的马来酰亚胺-PEG。收集抗体-PEG-Mal缀合物并转移到反应容器中。将SH-C6-EGFR(2当量)在室温下加入到PBS中的抗体-PEG-马来酰亚胺中并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱法分析反应混合物,可以看到缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

[0981] 步骤2:纯化

[0982] 使用阴离子交换色谱方法1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗反应混合物。将含有抗体-PEG-EGFR缀合物的级分合并,浓缩,并用pH7.4的PBS进行缓冲液交换。抗体siRNA与SMCC连接体、PEG1kDa、PEG5kDa和PEG10kDa的缀合物基于siRNA加样进行分离。

[0983] 步骤3:纯化的缀合物的分析

[0984] 通过质谱法或SDS-PAGE表征所分离的缀合物。使用阴离子交换色谱方法2或阴离子交换色谱方法3通过分析型FIPLC评估缀合物的纯度。

[0985] 阴离子交换色谱方法1

[0986] 1.柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13um

[0987] 2.溶剂A:20mM TRIS缓冲液,pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS,1.5M NaCl,pH 8.0;流速:6.0ml/min

[0988] 3.梯度:

a.	%A	%B	柱体积
b.	100	0	1.00
c.	60	40	18.00

[0989]

d.	40	60	2.00
e.	40	60	5.00
f.	0	100	2.00
g.	100	0	2.00

[0990] 阴离子交换色谱方法2

[0991] 1.柱:Thermo Scientific,ProPac™ SAX-10,Bio LC™,4X250mm

[0992] 2.溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,1.5M NaCl;流速:1.0ml/min

[0993] 3.梯度:

a.	时间	%A	%B
b.	0.0	90	10
c.	3.00	90	10

[0994]

d.	11.00	40	60
e.	13.00	40	60
f.	15.00	90	10
g.	20.00	90	10

[0995] 阴离子交换色谱方法3

[0996] 1.柱:Thermo Scientific,ProPacTM SAX-10,Bio LCTM,4X 250mm

[0997] 2.溶剂A:80％10mM TRIS pH 8,20％乙醇;溶剂B:80％10mM TRIS pH 8,20％乙醇,1.5M NaCl

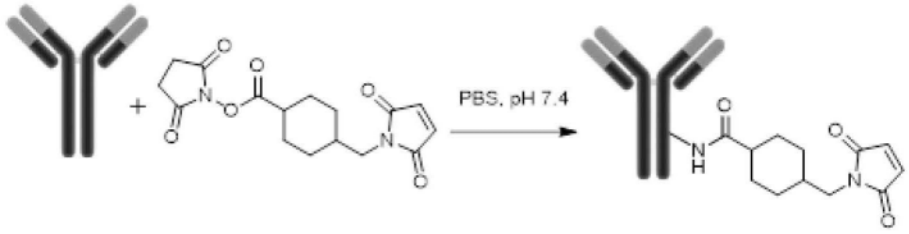
[0998] 3.流速:0.75ml/min

[0999] 4.梯度:

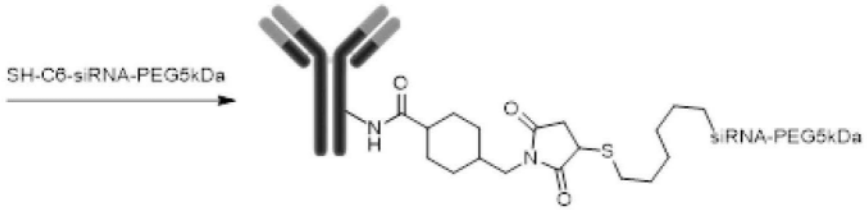
a.	时间	%A	%B
b.	0.0	90	10
c.	3.00	90	10
d.	11.00	40	60
e.	23.00	40	60
f.	25.00	90	10
g.	30.00	90	10

[1000]

[1001] 实施例4:抗体-siRNA-PEG缀合物的合成、纯化和分析



[1002]



缀合方案-2

[1003] 步骤1:抗体与SMCC连接体缀合,随后与SH-KRAS-PEG5kDa缀合

[1004] 用1X磷酸盐缓冲液(pH 7.4)对抗EGFR抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到5mg/ml。向该溶液中加入2当量的SMCC连接体(4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯),并在室温下旋转4小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS缓冲液通过旋转过滤来除去未反应的SMCC连接体。收集截留物,并在室温下添加2当量的SH-C6-KRAS-PEG5kDa并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱法分析反应混合物。

[1005] 步骤2:纯化

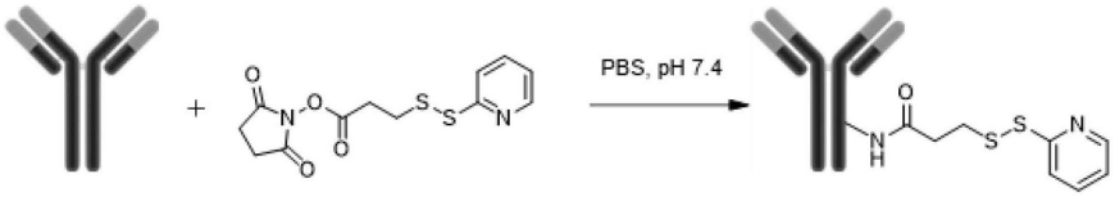
[1006] 使用阴离子交换色谱方法1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗反应混合物。将含有抗体-KRAS-PEG缀合物的级分合并,浓缩,并用pH7.4的PBS进行缓冲液交换。

[1007] 步骤3:纯化的缀合物的分析

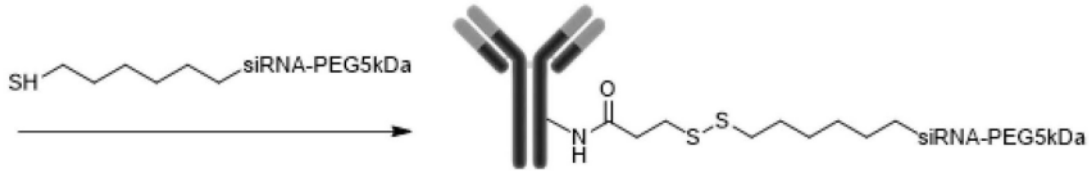
[1008] 通过质谱法或SDS-PAGE表征分离的缀合物。使用阴离子交换色谱方法3,通过分析

型HPLC评估缀合物的纯度(如实施例1中所述)。

[1009] 实施例5:抗体-S-S-siRNA-PEG缀合物的合成、纯化和分析



[1010]



缀合方案-3

[1011] 步骤1:抗体与SPDP连接体缀合,随后与SH-siRNA-PEG5kDa缀合

[1012] 用1X磷酸盐缓冲液(pH 7.4)对抗EGFR抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到5mg/ml。向该溶液中加入2当量的SPDP连接体(3-(2-吡啶基二硫基)丙酸琥珀酰亚胺酯),并在室温下旋转4小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS缓冲液通过旋转过滤来除去未反应的SPDP连接体。收集截留物,并在室温下添加2当量的SH-C6-siRNA-PEG5kDa并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱法分析反应混合物,并且确定缀合物以及未反应的抗体。

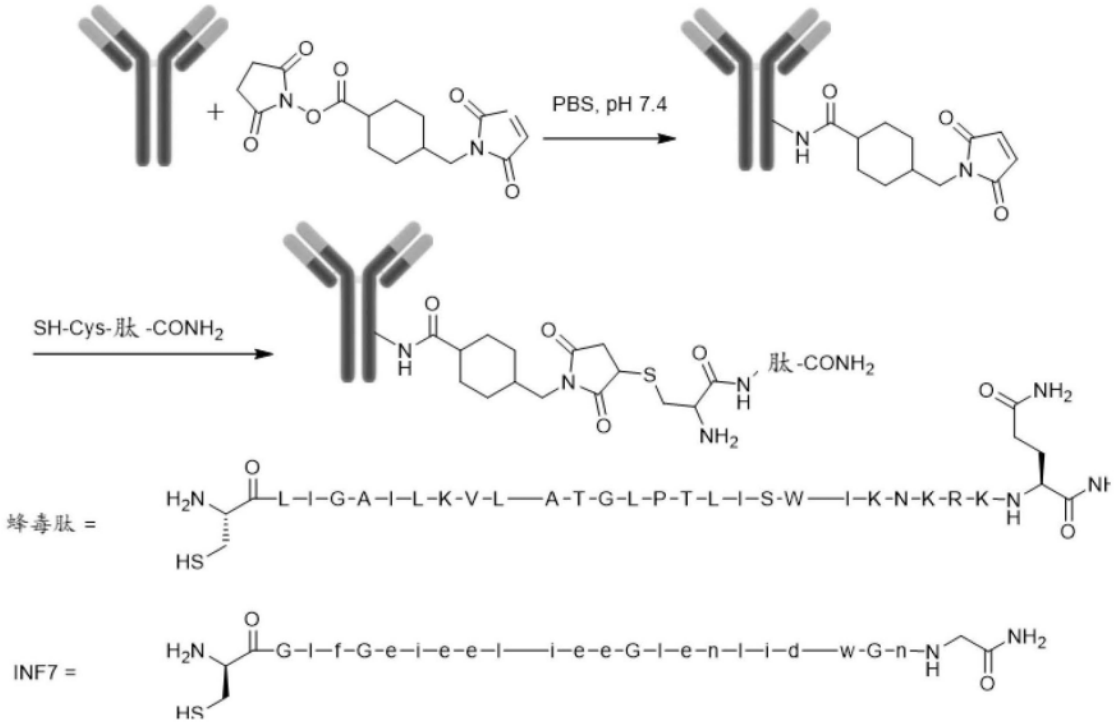
[1013] 步骤2:纯化

[1014] 使用阴离子交换色谱方法1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗反应混合物。将含有抗体-PEG-siRNA缀合物的级分合并,浓缩,并用pH7.4的PBS进行缓冲液交换。

[1015] 步骤3:纯化的缀合物的分析

[1016] 通过质谱法或SDS-PAGE表征分离的缀合物。使用阴离子交换色谱方法2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[1017] 实施例6:抗体-SMCC-内体逃避肽缀合物的合成、纯化和分析

[1018] 

缀合方案-4

[1019] 步骤1:抗体与SMCC连接体或马来酰亚胺-PEG-NHS缀合,随后与SH-Cys-肽-$CONH_2$缀合

[1020] 用1X磷酸盐缓冲液(pH 7.4)对抗EGFR抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入3当量的SMCC连接体(4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯)或马来酰亚胺-PEG1kDa-NHS,并在室温下旋转1.5小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS缓冲液(对于蜂毒肽缀合物,25mM MES pH=6.1)通过旋转过滤来除去未反应的SMCC连接体或PEG连接体。收集截留物,并在室温下添加3当量的SH-Cys-肽-$CONH_2$并旋转过夜。然后通过HIC色谱法或阳离子交换色谱法对反应混合物进行纯化,以分离抗EGFR抗体-肽或抗EGFR抗体-PEG1k-肽。

[1021] 步骤2:纯化

[1022] 使用疏水相互作用色谱(HIC)方法1或阳离子交换色谱方法1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗反应混合物。将含有抗体-肽缀合物的级分合并,浓缩,并用pH 7.4的PBS(对于蜂毒肽,10mM乙酸盐pH=6.0)进行缓冲液交换。

[1023] 步骤3:纯化的缀合物的分析

[1024] 通过质谱法或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用HIC方法2或阳离子交换色谱方法2,通过分析型HPLC评估纯度和肽负载。

[1025] 阳离子交换色谱方法1

[1026] 1.柱:GE Healthcare HiPrep SP HP 16/10

[1027] 2.溶剂A:50mM MES pH=6.0;溶剂B:50mM MES+0.5M NaClpH=6.0;流速:2.0ml/min

[1028] 3.梯度:

[1029]

a.	%A	%B	柱体积
b.	100	0	0.1
c.	100	0	冲洗循环（Flush loop）12ml
d.	100	0	2.5
e.	0	100	15
f.	0	100	5
g.	100	0	0.5
h.	100	0	5

[1030] 阳离子交换色谱方法2

[1031] 1.柱:Thermo Scientific,MAbPac™ SCX-10,Bio LC™,4X 250mm(产品#074625)

[1032] 2.溶剂A:20mM MES pH＝5.5;溶剂B:20mM MES+0.3M NaCl pH＝5.5;流速:0.5ml/min

[1033] 3.梯度:

[1034]

a.	时间	%A	%B
b.	0.0	100	0
c.	5	100	0
d.	50	0	100
e.	80	0	100
f.	85	100	0
g.	90	100	0

[1035] 疏水相互作用色谱方法1(HIC方法1)

[1036] 1.柱:GE Healthcare Butyl Sepharose High Performance(17-5432-02)200ml

[1037] 2.溶剂A:50mM磷酸钠+0.8M硫酸铵(pH＝7.0);溶剂B:80％50mM磷酸钠(pH＝7.0),20％ IPA;流速:3.0ml/min

[1038] 3.梯度:

[1039]

a.	%A	%B	柱体积
b.	100	0	0.1
c.	0	100	3
d.	0	100	1.35
e.	100	0	0.1
f.	100	0	0.5

[1040] 疏水相互作用色谱方法2(HIC方法2)

[1041] 1.柱:Tosoh Bioscience TSKgel Butyl-NPR 4.6mm ID x 10cm 2.5μm

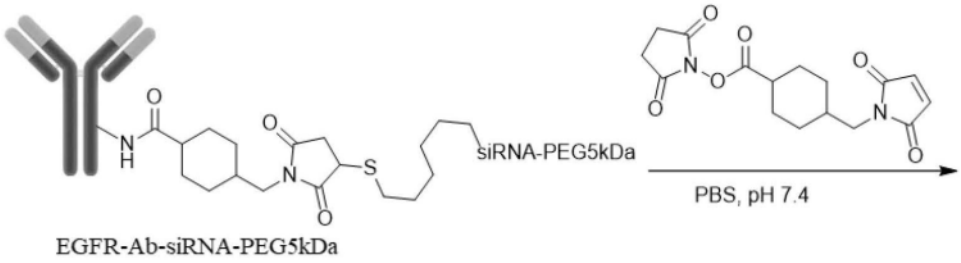
[1042] 2.溶剂A:100mM磷酸钠+1.8M硫酸铵(pH＝7.0);溶剂B:80％100mM磷酸钠(pH＝7.0),20％ IPA;流速:0.5ml/min

[1043] 3.梯度:

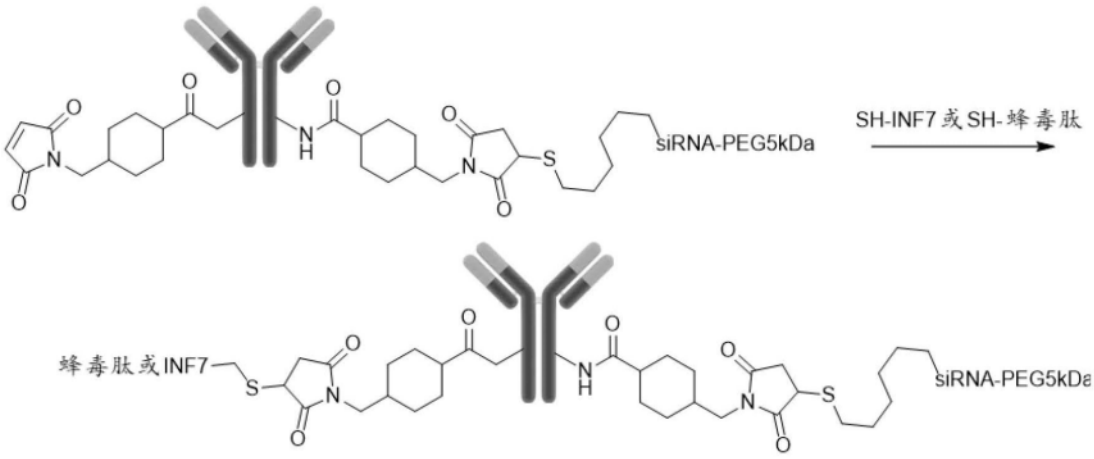
[1044]

a. 时间	%A	%B
b. 0	100	0
c. 3	50	50
d. 21	0	100
e. 23	0	100
f. 25	100	0

[1045] 实施例7:EEP-抗体-siRNA-PEG缀合物的合成、纯化和分析



[1046]



缀合方案-5

[1047] 步骤1:缀合PEG24连接体,随后SH-Cys-肽-$CONH_2$缀合至EGFR-Ab-siRNA-PEG

[1048] 将siRNA负载为1的EGFR-Ab-siRNA-PEG缀合物与4当量的PEG1k连接体(4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯)在pH7.4的PBS中缀合,并在室温下旋转1.5小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS缓冲液通过旋转过滤除去未反应的PEG1k连接体。收集截留物,并在室温下添加4当量的SH-Cys-肽-$CONH_2$并旋转过夜。

[1049] 步骤2:纯化

[1050] 然后通过使用pH 7.4的PBS缓冲液和50kDa Amicon旋转过滤器重复旋转过滤来纯化反应混合物,直至如通过HPLC监测的,未反应的肽已被去除。产物含有具有缀合至抗体骨架的0、1、2、3或更多个肽的缀合物的混合物。

[1051] 步骤3:纯化的缀合物的分析

[1052] 通过质谱法或SDS-PAGE表征分离的缀合物。使用HIC方法2或阳离子交换色谱方法2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度和肽负载。

[1053] 实施例8.肿瘤PK/PD研究

[1054] 向胁腹皮下荷有H358肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠给予0.5mg/kg(基于siRNA)的EGFR抗体-siRNA-EEP缀合物。使用多种EEP(内体溶解部分)来确定展现出最佳内体逃逸的肽序列,从而导致相对于对照的靶基因的最佳敲减。

[1055] 实施例9.ABC缀合物与纳米颗粒的制剂

[1056] 使用环糊精聚合物(10kDa)和过量的未缀合的siRNA(ED 40-60nm,PDI 0.1-0.2)将示例性ABC缀合物包装到自组装纳米颗粒中。在这些颗粒中,示例性ABC缀合物保持其与抗体靶标相互作用的能力。通过包装siRNA的修饰来调节颗粒在体内循环中的稳定性和靶标结合能力。

[1057] 纳米颗粒形成

[1058] 制备最终siRNA浓度为1.6mg/mL的纳米颗粒。首先将含有比例为1:20的CY5-siRNA的siRNA在水中稀释至2x终浓度。将环糊精聚合物(CDP)稀释至2倍终浓度,这是在中性pH的10mM磷酸盐缓冲液中获得3:1的氮磷比(N:P)所必需的。将CDP快速添加至siRNA,并通过移液进一步混合。在给药或分析之前将颗粒孵育至少15分钟。

[1059] 体外EGFR结合

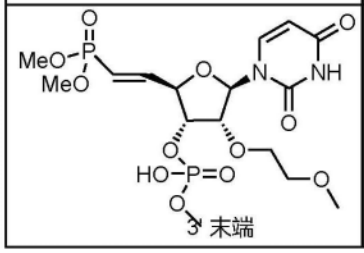
[1060] 将含有各种量的示例性ABC缀合物的纳米颗粒在胎牛血清中稀释到10nM终浓度,并与负载有150nM纯化的EGFR-Fc蛋白(Sino Biological)的蛋白G Dynabead(Thermofisher)一起在室温下孵育1小时。用含有0.01%吐温20和0.05% BSA的PBS洗涤珠子两次,然后用含有0.01%吐温20和100ug/ml肝素的水破坏与珠子结合的纳米颗粒。使用TECAN Infinite M200 Pro(激发635nm;发射675nm),通过荧光确定输入、未结合的级分、洗涤物和珠子洗脱物中包含的CY5-siRNA的量。

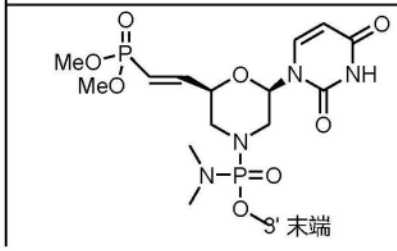
[1061] 实施例10.siRNA合成

[1062] 使用标准亚磷酰胺化学法在固相上完全组装所有siRNA单链,并使用HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。

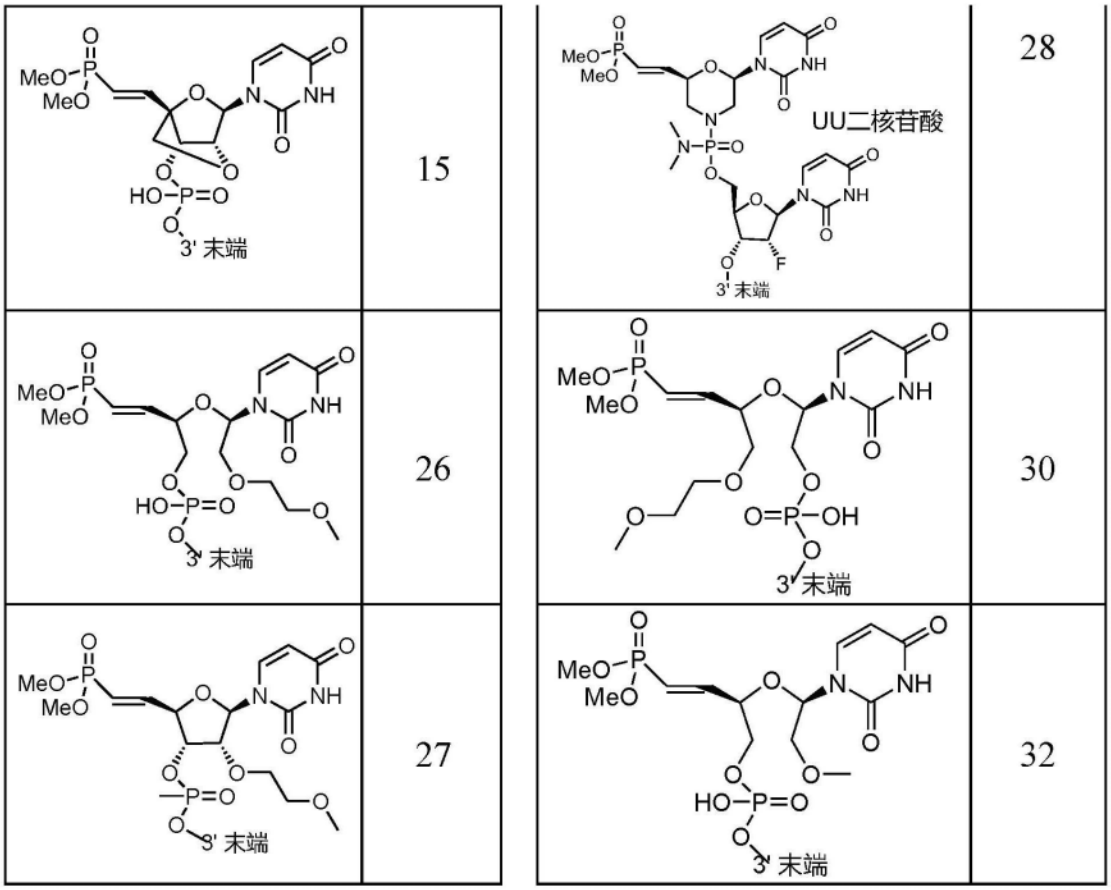
[1063] 下表中显示了在实施例11-15中使用的乙烯基膦酸修饰的核苷酸(化合物3、15、26、27和28)

[1064]

结构	化合物#
	3

结构	化合物#
	

[1065]



[1066] 为了比较的目的,使用化合物3作为标准品。

[1067] 将化合物15、26、27、28、30和32并入到单独的指导链上。

[1068] 在固相合成过程中,化合物28以二核苷酸的形式并入到过客链的5’端。

[1069] 所有siRNA过客链均在5’端包含C6-NH_2缀合柄。

[1070] 对于具有19个互补性碱基和3’二核苷酸突出端的21聚体双链体,缀合柄经由反向脱碱基磷酸二酯连接至siRNA过客链(见图1A)。

[1071] 对于具有19个互补性碱基和一个3’二核苷酸突出端的平端双链体,缀合柄经由末端碱基上的磷酸二酯连接至siRNA过客链(见图1B)。

[1072] 对纯化的单链进行双链体化,以获得双链siRNA。

[1073] 实施例11.乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构在HCT116细胞中的体外活性

[1074] siRNA设计和合成:针对小鼠HPRT设计了21聚体HPRT指导链。指导/反义链的序列(5’至3’)为UUAAAAUCUACAGUCAUAGUU。

[1075] 制备了并入乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构的三种形式(化合物3、15和27)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的ORNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。如图1B所述,对纯化的单链进行双链体化,以获得双链siRNA。

[1076] 体外研究:将不同的siRNA以终浓度100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、0.001nM和0.0001nM转染到人结直肠癌HCT116细胞中。siRNA用可商购获得的转染试剂Lipofectamine RNAiMAX(Life Technologies)按照制造商的“正向转染”说明来配制。转染前24小时,将细胞一式三份接种在24孔组织培养板上,每孔50000个细胞。转染后48小时,用PBS洗涤细胞,

并用TRIzol®试剂(Life Technologies)收获。使用Direct-zol-96RNA试剂盒(Zymo Research),按照制造商的说明分离RNA。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(Applied Biosystems),按照制造商的说明将10μl RNA逆转录为cDNA。使用TaqMan®Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems),用HPRT特异性和PPIB特异性TaqMan基因表达探针(Thermo Fisher)通过qPCR评价cDNA样品。在每个样品内将HPRT值相对于PPIB基因表达进行归一化。HPRT下调的定量使用标准$2^{-\Delta\Delta Ct}$法来进行。所有实验均一式三份进行。

[1077] 图2显示了剂量响应曲线,其证明在体外转染双链体后,HPRT siRNA指导链上的新型乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构能够加载到RISC中,并介导靶HPRT基因的序列特异性下调。类似物(化合物15和27)的活性与标准的乙烯基膦酸修饰的核苷酸(化合物3)相当。

[1078] 实施例12.乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构在横纹肌肉瘤细胞中的体外活性

[1079] siRNA设计和合成:针对人MSTN设计了21聚体肌生成抑制蛋白(myostatin,MSTN)指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUU。制备了并入不同结构的五种形式(化合物3、15、26、27和28)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。如图1A所述,对纯化的单链进行双链体化,以获得双链siRNA。

[1080] 体外研究:在转染的人横纹肌肉瘤细胞(SJCRH30,ATCC CRL-2061)中评价siRNA的活性。使细胞在补充有10%热灭活的FBS(Gibco)和10mM FIEPES和1mM丙酮酸钠的RPMI-1640中生长。对于siRNA转染,将细胞以20,000个细胞/孔的密度接种在24孔板上并使用Lipofectamine RNAiMAX(Life Technologies)按照制造商的"正向转染"说明以各种浓度的siRNA(终浓度为0.0001-100nM)进行转染。转染后72小时,用PBS洗涤细胞,并用300μl/孔的TRIzol®试剂(Life Technologies)收获。使用Direct-zol-96RNA试剂盒(Zymo Research),按照制造商的说明分离RNA。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(Applied Biosystems),按照制造商的说明将10μlRNA逆转录为cDNA。使用TaqMan®Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems)和ΔΔCt法,用MSTN特异性和PPIB特异性TaqMan基因表达探针(Thermo Fisher)通过qPCR评价cDNA样品。各个实验一式两份或一式三份进行。

[1081] 下表显示了类似物(化合物15、26、27和28)的半数最大抑制浓度,以及相对于标准的乙烯基膦酸修饰的核苷酸(化合物3)达到的最大敲减。

[1082]

GS的5'端上的化合物	3	28	26	15	27
IC50(pM)	74.0	55.7	86.5	80.3	16.2
最大KD(相对于未处理的对照的%)	87.77	86.51	84.61	85.47	87.24

[1083] 图3显示了剂量响应曲线,其证明在体外转染双链体后,MSTN siRNA指导链上的新型乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构能够加载到RISC中,并介导靶MSTN基因的序列特异性下调。类似物(化合物15、26、27和28)的活性与标准的乙烯基膦酸修饰的核苷酸(化合物3)相当。

[1084] 实施例13.2017-PK-407-WT:siRNA的体内转铁蛋白mAb缀合物递送

[1085] 对于第1-4组,针对小鼠HPRT设计了21聚体HPRT指导链。指导/反义链的序列(5’至3’)为UUAAAAUCUACAGUCAUAGUU。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。如上所述对纯化的单链进行双链体化,以获得双链siRNA。指导链采用化合物3乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。过客链经由反向脱碱基磷酸二酯键在5’端上具有缀合柄,见图1A。

[1086] 对于第5-8组,针对小鼠HPRT设计了21聚体HPRT指导链。指导/反义链的序列(5’至3’)为UUAAAAUCUACAGUCAUAGUU。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以获得双链siRNA。指导链采用化合物15乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。过客链经由末端碱基上的磷酸二酯键在5’端上具有缀合柄,见图1B。

[1087] 对于第9-12组,针对小鼠HPRT设计了21聚体HPRT指导链。指导/反义链的序列(5’至3’)为UUAAAAUCUACAGUCAUAGUU。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以获得双链siRNA。指导链采用化合物27乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。过客链经由末端碱基上的磷酸二酯键在5’端上具有缀合柄,见图1B。

[1088] 对于第13-16组,针对人MSTN设计了21聚体MSTN指导链。指导/反义链的序列(5’至3’)为UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUU。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以获得双链siRNA。指导链采用化合物28乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。过客链经由反向脱碱基磷酸二酯键在5’端上具有缀合柄,见图1A。

[1089] 对于第17-20组,针对人MSTN设计了21聚体MSTN指导链。指导/反义链的序列(5’至3’)为UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUU。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以获得双链siRNA。指导链采用化合物3乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。过客链经由反向脱碱基磷酸二酯键在5’端上具有缀合柄,见图1A。

[1090] 使用双马来酰亚胺(BisMal)连接体的抗体siRNA缀合物合成

[1091] 步骤1:使用TCEP还原抗体

[1092] 用含有1mM DTPA的25mM硼酸盐缓冲液(pH 8)对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入在相同硼酸盐缓冲液中的4当量TCEP,并在37℃下孵育2小时。在室温下,将所得反应混合物与BisMal-siRNA(1.25当量)在pH 6.0的10mM乙酸盐缓冲液中的溶液合并,并在4℃下保持过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。将反应混合物用10EQ的N-乙基马来酰亚胺(在DMSO中为10mg/mL)处理,以对任何剩余的游离半胱氨酸残基进行加帽。

[1093] 步骤2:纯化

[1094] 使用阴离子交换色谱(SAX)方法1,通过AKTA Pure FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR2抗体-siRNA缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

[1095] 阴离子交换色谱(SAX)方法1

[1096] 1.柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13um

[1097] 2.溶剂A:20mM TRIS缓冲液,pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS,1.5M NaCl,pH 8.0;流速:6.0ml/min

[1098] 3.梯度:

[1099]

	%A	%B	柱体积
a.			
b.	100	0	1
c.	81	19	0.5
d.	50	50	13
e.	40	60	0.5
f.	0	100	0.5
g.	100	0	2

[1100] 阴离子交换色谱(SAX)方法2

[1101] 1.柱:Thermo Scientific,ProPac™ SAX-10,Bio LC™,4X 250mm

[1102] 2.溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,1.5M NaCl;流速:0.75ml/min

[1103] 3.梯度:

[1104]

	时间	%A	%B
a.			
b.	0.0	90	10
c.	3.00	90	10
d.	11.00	40	60
e.	14.00	40	60
f.	15.00	20	80
g.	16.00	90	10
h.	20.00	90	10

[1105] 步骤3:纯化的缀合物的分析

[1106] 使用阴离子交换色谱方法2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[1107]

缀合物	SAX保留时间 (min)	%纯度 (根据峰面积)
TfR-mAb--化合物3-HPRT DAR 1	9.41	99
TfR-mAb-化合物15-HPRT DAR 1	8.83	99
TfR-mAb-化合物27-HPRT DAR 1	8.54	99
TfR-mAb-化合物28-MSTN DAR 1	8.96	99
TfR-mAb-化合物3-MSTN DAR 1	9.39	99

[1108] 体内研究

[1109] 在体内实验(野生型CD-1小鼠)中,评估了缀合物介导骨骼肌中肌生成抑制蛋白(MSTN)和HPRT的mRNA下调的能力。通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量,参见下表。168小时后,收获腓肠肌(gastroc)组织,并在液氮中骤冻。使用比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值(ΔCt),然后通过取二次差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[1110]

组	测试物	N	siRNA剂量 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	收获时间 (h)
1	TfR1-mAb-化合物3-HPRT DAR1	4	3	**5.0**	168
2	TfR1-mAb-化合物3-HPRT DAR1	4	1	**5.0**	168
3	TfR1-mAb-化合物3-HPRT DAR1	4	0.3	**5.0**	168
4	TfR1-mAb-化合物3-HPRT DAR1	4	0.1	**5.0**	168
5	TfR1-mAb-化合物15-HPRT DAR1	4	3.0	**5.0**	168
6	TfR1-mAb-化合物15-HPRT DAR1	4	1	**5.0**	168
7	TfR1-mAb-化合物15-HPRT DAR1	4	0.3	**5.0**	168
8	TfR1-mAb-化合物15-HPRT DAR1	4	0.1	**5.0**	168
9	TfR1-mAb-化合物27-HPRT DAR1	4	0.5	**5.0**	168

[1111]

10	TfR1-mAb-化合物 27-HPRT DAR1	4	0.5	**5.0**	168
11	TfR1-mAb-化合物 27-HPRT DAR1	4	0.5	**5.0**	168
12	TfR1-mAb-化合物 27-HPRT DAR1	4	0.5	**5.0**	168
13	TfR1-mAb-化合物 28-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
14	TfR1-mAb-化合物 28-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
15	TfR1-mAb-化合物 28-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
16	TfR1-mAb-化合物 28-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
17	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
18	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
19	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
20	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
21	PBS 对照	5		**5.0**	168

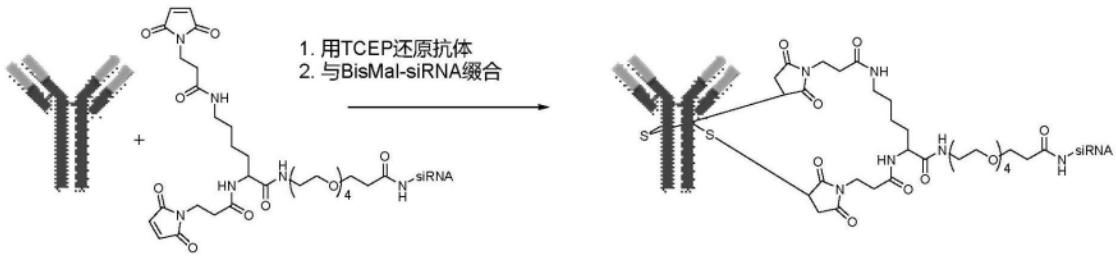
[1112] 图4显示,当与靶向转铁蛋白受体的抗TfR mAb缀合时,siRNA指导链上的乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构在腓肠肌中显示出其靶基因的剂量依赖性下调。类似物的活性与标准的乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构相当。

[1113] 实施例14. 2017-PK-421-WT:siRNA的体内转铁蛋白mAb缀合物递送

[1114] 对于第1-12组,针对人/小鼠MSTN设计了21聚体MSTN指导链。指导/反义链的序列(5’至3’)为UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUU。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以获得双链siRNA。产生了三个在5’端具有三种不同乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构的指导链(化合物3、15和26)。过客链经由磷酸二酯-反向脱碱基连接在5’端上具有缀合柄。

[1115] 如下所述合成抗TfR1 mAb-MSTN DAR1缀合物:

[1116]



[1117] 步骤1:使用TCEP还原抗体

[1118] 用含有1mM DTPA的25mM硼酸盐缓冲液(pH 8)对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入在相同硼酸盐缓冲液中的4当量TCEP,并在37℃下孵育2小时。在室温下,将所得反应混合物与BisMal-siRNA(1.25当量)在10mM乙酸盐缓冲液(pH6)中的溶液合并,并在4℃下保持过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。将反应混合物用10EQ的N-乙基马来酰亚胺(在DMSO中为10mg/mL)处理,以对任何剩余的游离半胱氨酸残基进行加帽。

[1119] 步骤2:纯化

[1120] 使用阴离子交换色谱(SAX)方法1,通过AKTA Pure FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR2抗体-siRNA缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

[1121] 阴离子交换色谱(SAX)方法1。

[1122] 1.柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13um

[1123] 2.溶剂A:20mM TRIS缓冲液,pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS,1.5M NaCl,pH 8.0;流速:6.0ml/min

[1124] 3.梯度:

[1125]

a.	%A	%B	柱体积
b.	100	0	1
c.	81	19	0.5
d.	50	50	13
e.	40	60	0.5
f.	0	100	0.5
g.	100	0	2

[1126] 阴离子交换色谱(SAX)方法2

[1127] 1.柱:Thermo Scientific,ProPac™ SAX-10,Bio LC™,4X 250mm

[1128] 2.溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,1.5M NaCl;流速:0.75ml/min

[1129] 3.梯度:

[1130]

a.	时间	%A	%B
b.	0.0	90	10
c.	3.00	90	10
d.	11.00	40	60
e.	14.00	40	60
f.	15.00	20	80
g.	16.00	90	10
h.	20.00	90	10

[1131] 步骤3:纯化的缀合物的分析

[1132] 使用阴离子交换色谱方法2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[1133]

缀合物	SAX保留时间 (min)	%纯度 (根据峰面积)
TfR-化合物3-MSTN.mff3s DAR 1	8.99	99
TfR-化合物15-MSTN DAR 1	9.12	99
TfR-化合物26-MSTN DAR 1	9.09	99

[1134] 体内研究

[1135] 在体内实验(野生型CD-1小鼠)中,评估了缀合物介导骨骼肌中肌生成抑制蛋白(MSTN)的mRNA下调的能力。通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量,如下表所示。168小时后,收获腓肠肌(gastroc)、四头肌(quad)和心肌组织,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值(ΔCt),然后通过取二次差值(Δ ΔCt)将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[1136]

组	测试物	N	siRNA剂量(mg/kg)	剂量体积(mL/kg)	收获时间(h)
1	TfR1-mAb-化合物 26-MSTN DAR1	4	3	**5.0**	168
2	TfR1-mAb-化合物 26-MSTN DAR1	4	1	**5.0**	168
3	TfR1-mAb-化合物 26-MSTN DAR1	4	0.3	**5.0**	168
4	TfR1-mAb-化合物 26-MSTN DAR1	4	0.1	**5.0**	168
5	TfR1-mAb-化合物 15-MSTN DAR1	4	3.0	**5.0**	168
6	TfR1-mAb-化合物 15-MSTN DAR1	4	1	**5.0**	168
7	TfR1-mAb-化合物 15-MSTN DAR1	4	0.3	**5.0**	168
8	TfR1-mAb-化合物 15-MSTN DAR1	4	0.1	**5.0**	168
9	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
10	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
11	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
12	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	**5.0**	168
13	PBS 对照	5		**5.0**	168

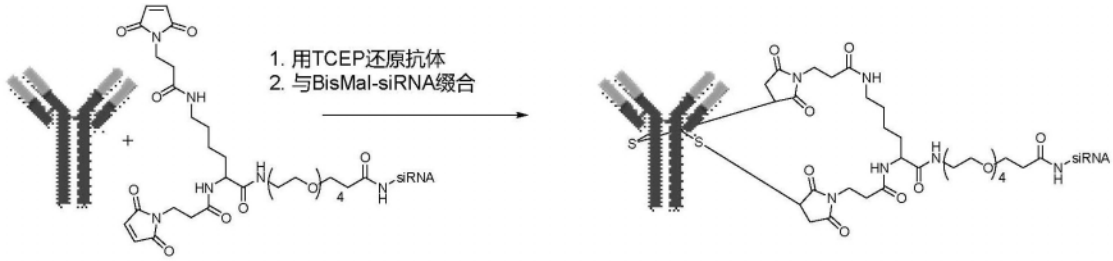
[1137] 图5证明了使用在指导链的5'端含有不同乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构的抗体siRNA缀合物,在腓肠肌、四头肌和心肌中的MSTN mRNA下调。类似物的活性与标准的乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构相当。

[1138] 实施例15.2017-PK-422-WT:siRNA的体内转铁蛋白mAb缀合物递送

[1139] 对于第1-4组和第9-12组,针对小鼠HPRT设计了21聚体HPRT指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAAAAUCUACAGUCAUAGUU。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以获得双链siRNA。产生的指导链在5'端具有化合物3乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。过客链经由硫代磷酸酯-反向脱碱基磷酸二酯键在5'端上具有缀合柄,见图1A。

[1140] 对于第5-8和13-16组,针对小鼠HPRT设计了21聚体HPRT指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAAAAUCUACAGUCAUAGUU。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以获得双链siRNA。产生的指导链在5'端具有化合物26乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。过客链经由末端硫代磷酸酯在5'端上具有缀合柄,见图1B。

[1141] 如下所述合成抗TfR1 mAb-HPRT DAR1缀合物:

[1142] 

[1143] 步骤1:用TCEP还原抗体

[1144] 用含有1mM DTPA的25mM硼酸盐缓冲液(pH 8)对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入在相同硼酸盐缓冲液中的4当量TCEP,并在37℃下孵育2小时。在室温下,将所得反应混合物与BisMal-siRNA(1.25当量)在10mM乙酸盐缓冲液(pH6)中的溶液合并,并在4℃下保持过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。将反应混合物用10EQ的N-乙基马来酰亚胺(在DMSO中为10mg/mL)处理,以对任何剩余的游离半胱氨酸残基进行加帽。

[1145] 步骤2:纯化

[1146] 使用阴离子交换色谱(SAX)方法1,通过AKTA Pure FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR2抗体-siRNA缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

[1147] 阴离子交换色谱(SAX)方法1。

[1148] 1.柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13um

[1149] 2.溶剂A:20mM TRIS缓冲液,pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS,1.5M NaCl,pH 8.0;流速:6.0ml/min

[1150] 3.梯度:

[1151]

	%A	%B	柱体积
a.	%A	%B	柱体积
b.	100	0	1
c.	81	19	0.5
d.	50	50	13
e.	40	60	0.5
f.	0	100	0.5
g.	100	0	2

[1152] 阴离子交换色谱(SAX)方法2

[1153] 1.柱:Thermo Scientific,ProPac™ SAX-10,Bio LC™,4X 250mm

[1154] 2.溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,1.5M NaCl;流速:0.75ml/min

[1155] 3.梯度:

[1156]

a. 时间	%A	%B
b. 0.0	90	10
c. 3.00	90	10
d. 11.00	40	60
e. 14.00	40	60
f. 15.00	20	80
g. 16.00	90	10
h. 20.00	90	10

[1157] 步骤3:纯化的缀合物的分析

[1158] 使用阴离子交换色谱方法2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[1159]

缀合物	SAX保留时间 (min)	%纯度 (根据峰面积)
TfR-化合物3-HPRT DAR 1	9.14	99
TfR-化合物26-HPRT DAR 1	8.54	99
ASGR-化合物3-HPRT DAR 1	9.3	99
ASGR-化合物26-MSTN DAR 1	8.62	99

[1160] 体内研究

[1161] 在体内实验(野生型CD-1小鼠)中,评估了缀合物介导肌肉和肝脏中HPRT的mRNA下调的能力。通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量,如下表所示。168小时后,收获腓肠肌(gastroc)和肝脏组织,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值(ΔCt),然后通过取二次差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[1162]

组	测试物	N	siRNA剂量 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	收获时间 (h)
1	TfR1-mAb-化合物3-HPRT DAR1	4	1	5.0	168
2	TfR1-mAb-化合物3-HPRT DAR1	4	0.3	5.0	168
3	TfR1-mAb-化合物3-HPRT DAR1	4	0.1	5.0	168
4	TfR1-mAb-化合物3-HPRT DAR1	4	0.03	5.0	168
5	TfR1-mAb-化合物26-HPRT DAR1	4	1	5.0	168
6	TfR1-mAb-化合物26-HPRT DAR1	4	0.3	5.0	168
7	TfR1-mAb-化合物26-HPRT DAR1	4	0.1	5.0	168
8	TfR1-mAb-化合物26-HPRT DAR1	4	0.03	5.0	168

[1163]

9	ASGR-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	1	5.0	168
10	ASGR-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	0.3	5.0	168
11	ASGR-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	0.1	5.0	168
12	ASGR-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	0.03	5.0	168
13	ASGR-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	1	5.0	168
14	ASGR-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	0.3	5.0	168
15	ASGR-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	0.1	5.0	168
16	ASGR-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	0.03	5.0	168
17	PBS 对照	5		5.0	168

[1164] 图6证明了在对小鼠静脉内施用后,siRNA指导链上的修饰的乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构能够介导小鼠肝脏和腓肠肌中HPRT靶基因的剂量依赖性下调。当与靶向肌肉上转铁蛋白受体的抗TfR mAb缀合时,siRNA能够介导肌肉中的HPRT下调。当与靶向肝脏肝细胞上ASGR受体的抗ASGR mAb缀合时,siRNA能够介导肝脏中的HPRT下调。

[1165] 实施例16.乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构在HCT116细胞中的体外活性

[1166] siRNA设计和合成:针对小鼠SSB设计了21聚体SSB指导链。指导/反义链的序列(5’至3’)为UUACAUUAAAGUCUGUUGUUU。制备了并入乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构的三种形式(化合物3、30和32)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用亚酰胺(amidites)并入乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到以上描述的双链siRNA。

[1167] 体外研究:将不同的siRNA以终浓度100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、0.001nM和0.0001nM转染到人结直肠癌HCT116细胞中。siRNA用可商购获得的转染试剂Lipofectamine RNAiMAX(Life Technologies)按照制造商的“正向转染”说明来配制。转染前24小时,将细胞一式三份接种在24孔组织培养板上,每孔50000个细胞。转染后48小时,用PBS洗涤细胞,并用TRIzol®试剂(Life Technologies)收获。使用Direct-zol-96RNA试剂盒(Zymo Research),按照制造商的说明分离RNA。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(Applied Biosystems),按照制造商的说明将10μl RNA逆转录为cDNA。使用TaqMan®Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems),用HPRT特异性和PPIB特异性TaqMan基因表达探针(Thermo Fisher)通过qPCR评价cDNA样品。在每个样品内将HPRT值相对于PPIB基因表达进行归一化。HPRT下调的定量使用标准$2^{-\Delta\Delta Ct}$法来进行。所有实验均一式三份进行。

[1168] EC_{50}值如下:

[1169]

样品	EC50(pM)
化合物3-SSB	4.00
化合物30-SSB	0.44
化合物32-SSB	1.46

[1170] 图7显示了剂量响应曲线,其证明在体外转染双链体后,SSB siRNA指导链5’端的新型乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构能够加载到RISC中,并介导靶SSB基因的序列特异性下调。类似物(化合物30和32)的活性与标准的乙烯基膦酸修饰的核苷酸(化合物3)相当。

[1171] 实施例17.乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构在横纹肌肉瘤细胞中的体外活性

[1172] siRNA设计和合成:针对小鼠和人MSTN设计了21聚体肌生成抑制蛋白(MSTN)指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUU。制备了并入不同结构的四种形式(化合物3、26、30和32)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并使用HPLC进行纯化。使用如上所述的亚酰胺并入乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到如上所述的双链siRNA。

[1173] 另外,针对小鼠SSB设计了21聚体SSB指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UUACAUUAAAGUCUGUUGUUU。制备了具有不同乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构的三种形式(化合物3、30和32)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用如本文所述的亚酰胺并入乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到如上所述的双链siRNA。

[1174] 体外研究:在转染的人横纹肌肉瘤细胞(SJCRH30,ATCC CRL-2061)中评价siRNA的活性。使细胞在补充有10%热灭活的FBS(Gibco)和10mM FIEPES和1mM丙酮酸钠的RPMI-1640中生长。对于siRNA转染,将细胞以20,000个细胞/孔的密度接种在24孔板上,并使用Lipofectamine RNAiMAX(Life Technologies)按照制造商的"正向转染"说明以各种浓度的siRNA(终浓度为0.0001-100nM)进行转染。转染后72小时,用PBS洗涤细胞,并用300μl/孔的TRIzol®试剂(Life Technologies)收获。使用Direct-zol-96RNA试剂盒(Zymo Research),按照制造商的说明分离RNA。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(Applied Biosystems),按照制造商的说明将10μlRNA逆转录为cDNA。使用TaqMan®Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems)和ΔΔCt法,用MSTN特异性和PPIB特异性TaqMan基因表达探针(Thermo Fisher)通过qPCR评价cDNA样品。各个实验一式两份或一式三份进行。

[1175] 图8A显示了剂量响应曲线,其证明在体外转染双链体后,MSTN siRNA指导链上的新型乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构能够加载到RISC中,并介导靶MSTN基因的序列特异性下调。类似物(化合物26、30和32)的活性与标准的乙烯基膦酸修饰的核苷酸(化合物3)相当。

[1176] 图8B显示了剂量响应曲线,其证明在体外转染双链体后,SSB siRNA指导链上的新型乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构能够加载到RISC中,并介导靶SSB基因的序列特异性下调。类似物(30和32)的活性与标准的乙烯基膦酸修饰的核苷酸(化合物3)相当。

[1177] 实施例18.乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构在表面健康的人来源的无限增殖化骨骼肌成肌细胞(MB)中的体外活性

[1178] siRNA设计和合成:针对小鼠和人MSTN设计了21聚体肌生成抑制蛋白(MSTN)指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUU。制备了并入不同乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构的四种形式(化合物3、26、30和32)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并使用HPLC进行纯化。使用本文所述的亚酰胺并入乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到如上所述的双链siRNA。

[1179] 另外,针对小鼠SSB设计了21聚体SSB指导链。指导/反义链的序列(5’至3’)为UUACAUUAAAGUCUGUUGUUU。制备了并入不同乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构的三种形式(化合物3、30和32)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用本文所述的亚酰胺并入乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到如上所述的双链siRNA。

[1180] 体外研究:在来源于表面健康者的无限增殖化骨骼肌成肌细胞(MB)(获自Denis Furling,Institut de Myologie,France)中评价siRNA的活性。使MB细胞在完全骨骼肌细胞生长培养基(PromoCell)中生长。转染前24小时,将细胞一式三份接种在96孔组织培养板上,每孔4000个(MB)细胞。将siRNA以终浓度50nM、5.5556nM、0.6173nM、0.0686nM、0.0076nM、0.0008nM和0.0001nM转染到细胞中。siRNA用可商购获得的转染试剂Lipofectamine RNAiMAX(Life Technologies)按照制造商的“正向转染”方案说明来配制。转染后48小时,用PBS洗涤细胞,并用TRIzol®试剂(Life Technologies)收获。使用Direct-zol-96RNA试剂盒(Zymo Research),按照制造商的说明分离RNA。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(Applied Biosystems),按照制造商的说明将10μl RNA逆转录为cDNA。使用TaqMan®Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems),用SSB特异性、MSTN特异性和PPIB特异性TaqMan基因表达探针(Thermo Fisher)通过qPCR评价cDNA样品。在每个样品内将MSTN表达值相对于PPIB基因表达进行归一化。SSB和MSTN下调的定量使用标准2-ΔΔCt法来进行。所有实验均一式三份进行。

[1181] 图9A显示了剂量响应曲线,其证明在体外转染双链体后,MSTN siRNA指导链上的新型乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构能够加载到RISC中,并介导靶MSTN基因的序列特异性下调。类似物(化合物26、30和32)的活性与标准的乙烯基膦酸修饰的核苷酸(化合物3)相当。

[1182] 图9B显示了剂量响应曲线,其证明在体外转染双链体后,SSB siRNA指导链上的新型乙烯基膦酸修饰的核苷酸结构能够加载到RISC中,并介导靶SSB基因的序列特异性下调。类似物(30和32)的活性与标准的乙烯基膦酸修饰的核苷酸(化合物3)相当。

[1183] 尽管已经在本文中示出并描述了本公开的优选实施方案,但是对于本领域技术人员明显的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本公开内容的情况下,本领域技术人员现将会想到许多变化、改变和替代。应当理解,在本公开的实践中可以采用本文所述的本公开的实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本公开的范围,由此涵盖这些权利要求的范围内的方法和结构及其等同物。

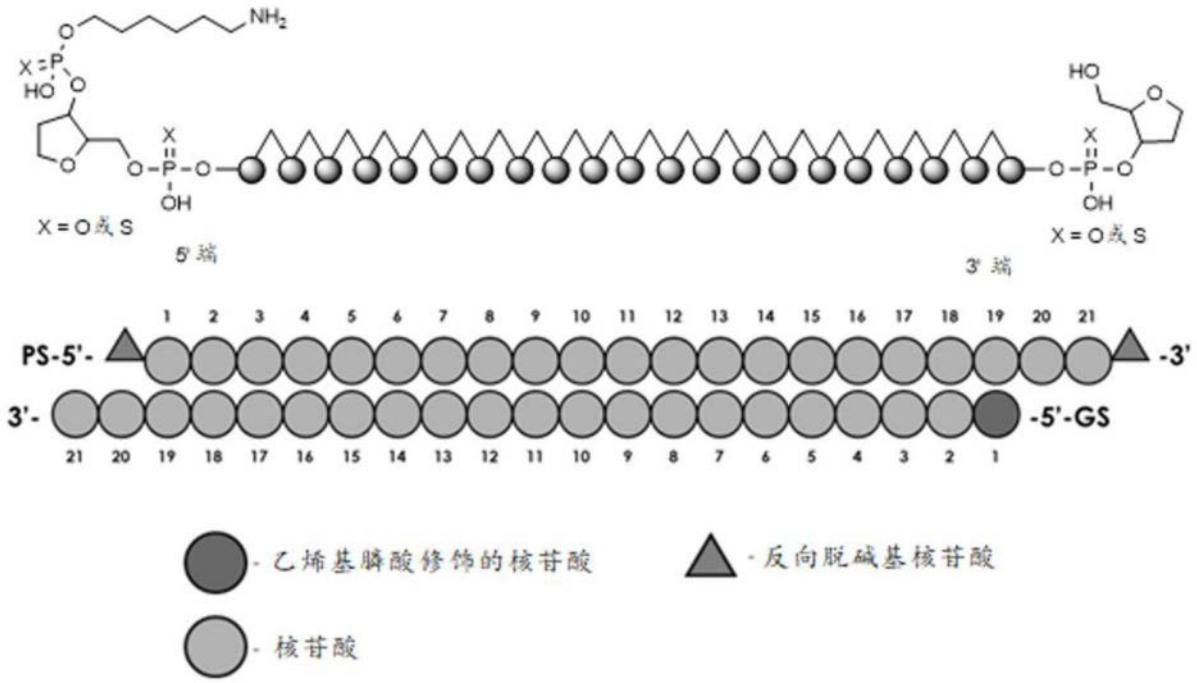

NH2
X = O或 S
5' 端
3' 端
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
PS-5'-
-3'
3'-
-5'-GS
21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
乙烯基膦酸修饰的核苷酸
反向脱碱基核苷酸
核苷酸

图1A

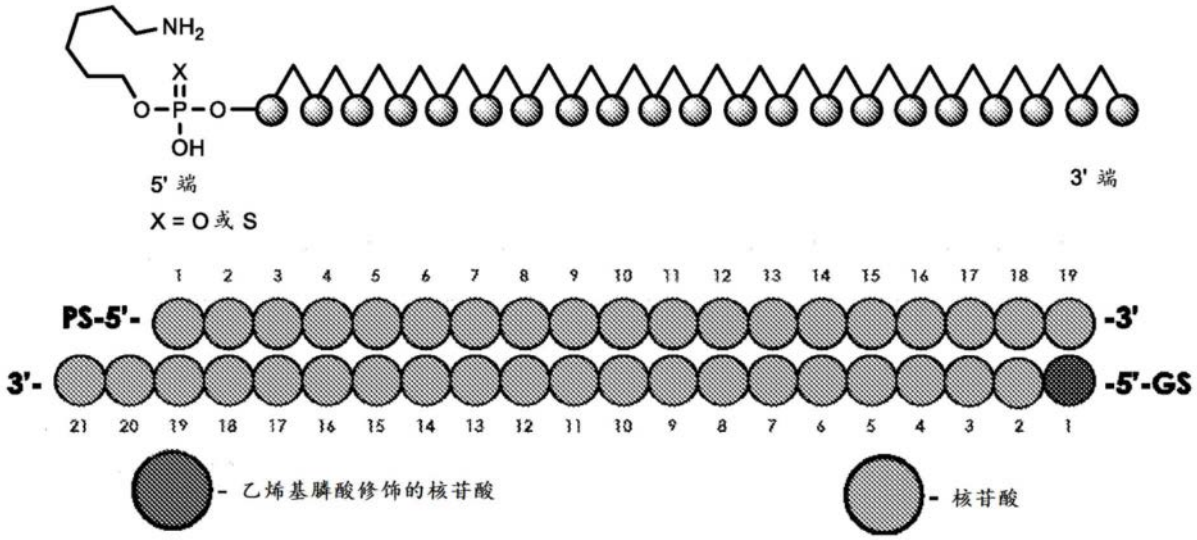

NH2
5' 端
X = O或 S
3' 端
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
PS-5'-
-3'
3'-
-5'-GS
21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
乙烯基膦酸修饰的核苷酸
核苷酸

图1B

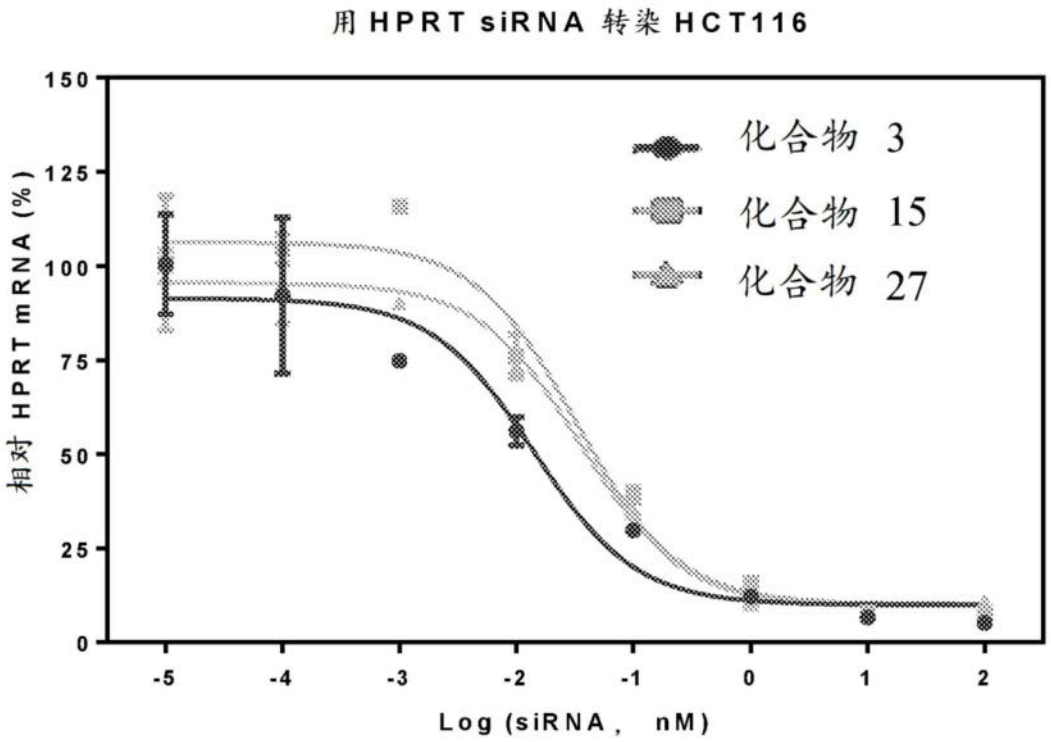

用 HPRT siRNA 转染 HCT116
相对 HPRT mRNA (%)
150
125
100
75
50
25
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log (siRNA , nM)
化合物 3
化合物 15
化合物 27

图2

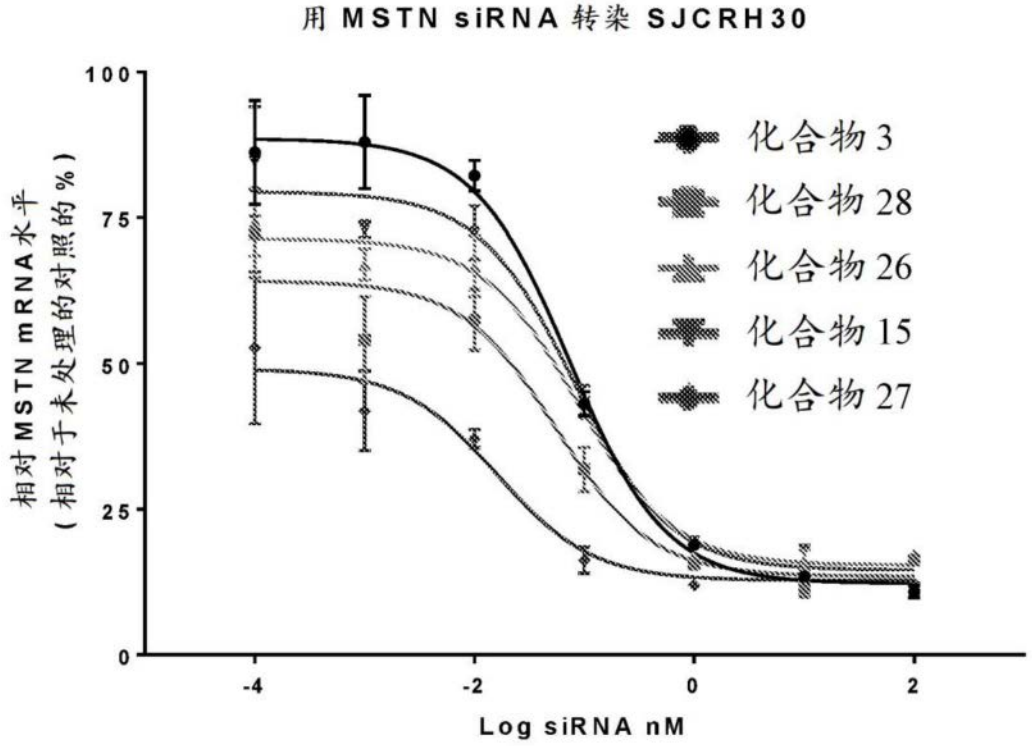

用 MSTN siRNA 转染 SJCRH30
相对MSTN mRNA水平
(相对于未处理的对照的%)
100
75
50
25
0
-4
-2
0
2
Log siRNA nM
化合物3
化合物28
化合物26
化合物15
化合物27

图3

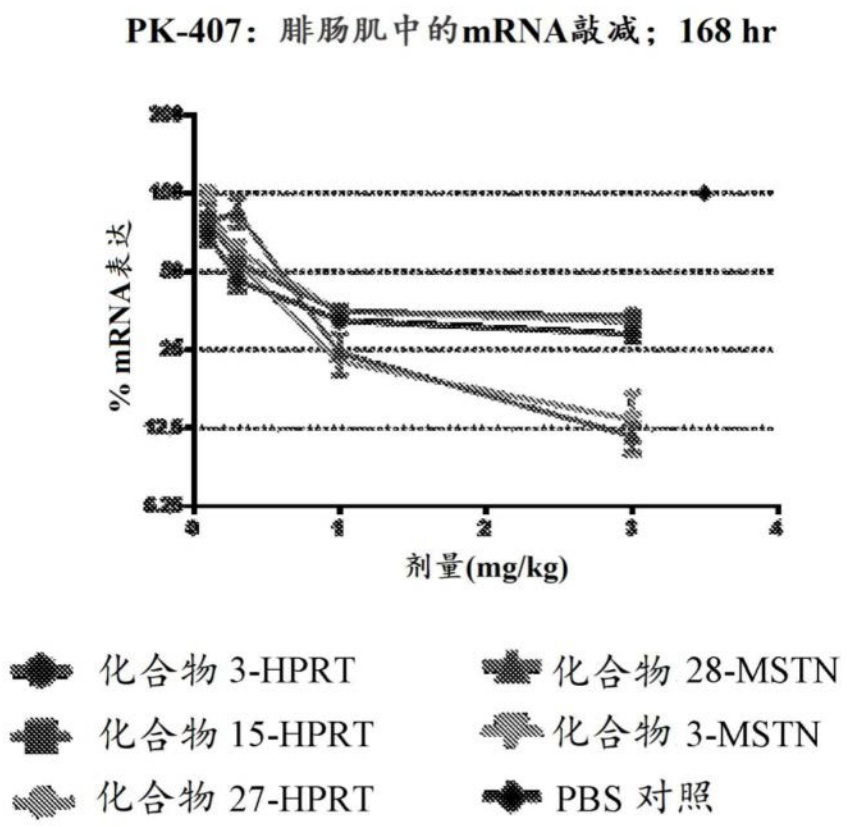

PK-407：腓肠肌中的mRNA敲减；168 hr
% mRNA表达
剂量(mg/kg)
化合物 3-HPRT
化合物 15-HPRT
化合物 27-HPRT
化合物 28-MSTN
化合物 3-MSTN
PBS 对照

图4

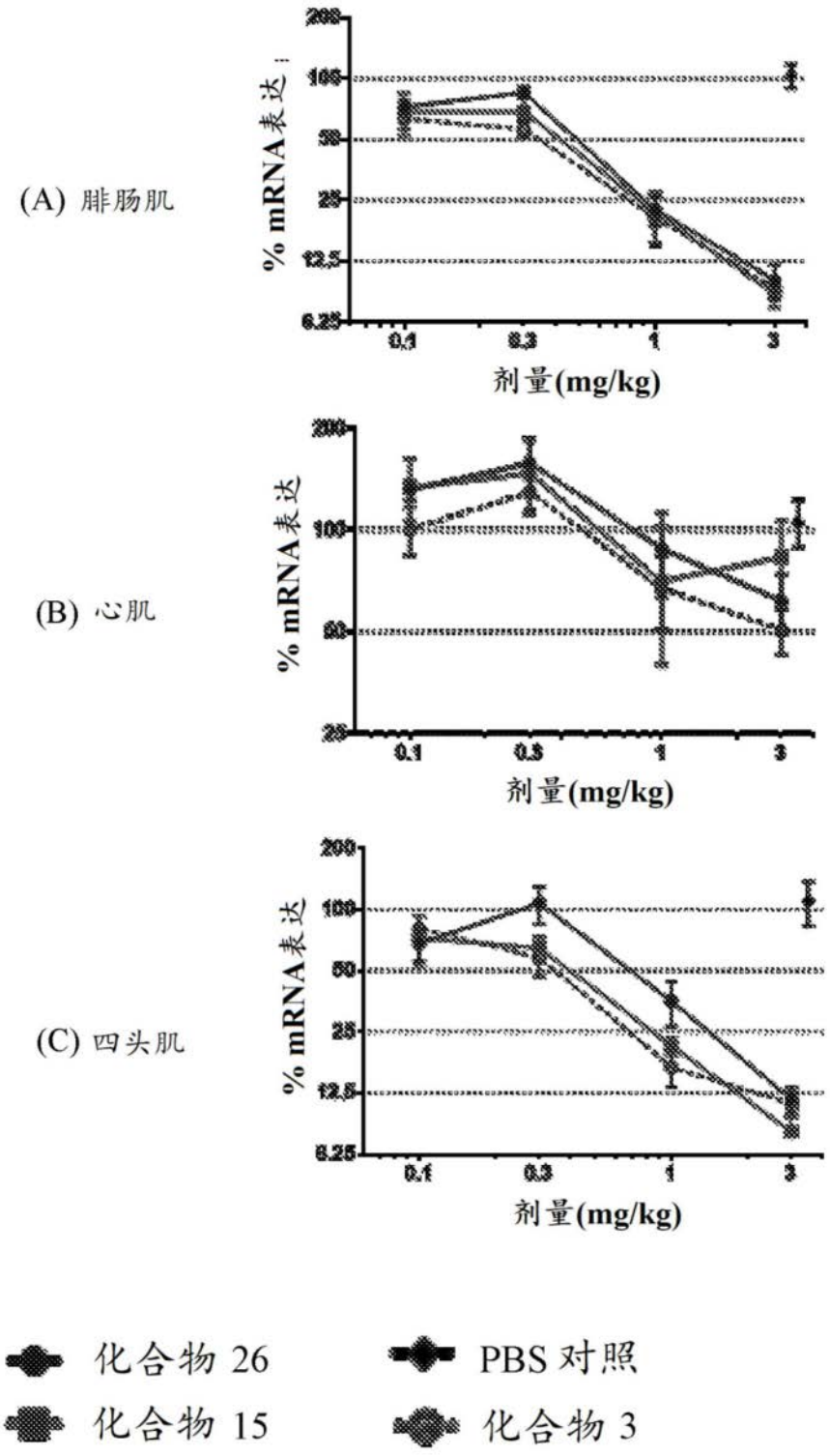

(A) 腓肠肌
% mRNA表达
剂量(mg/kg)
(B) 心肌
% mRNA表达
剂量(mg/kg)
(C) 四头肌
% mRNA表达
剂量(mg/kg)
化合物 26
PBS 对照
化合物 15
化合物 3

图5

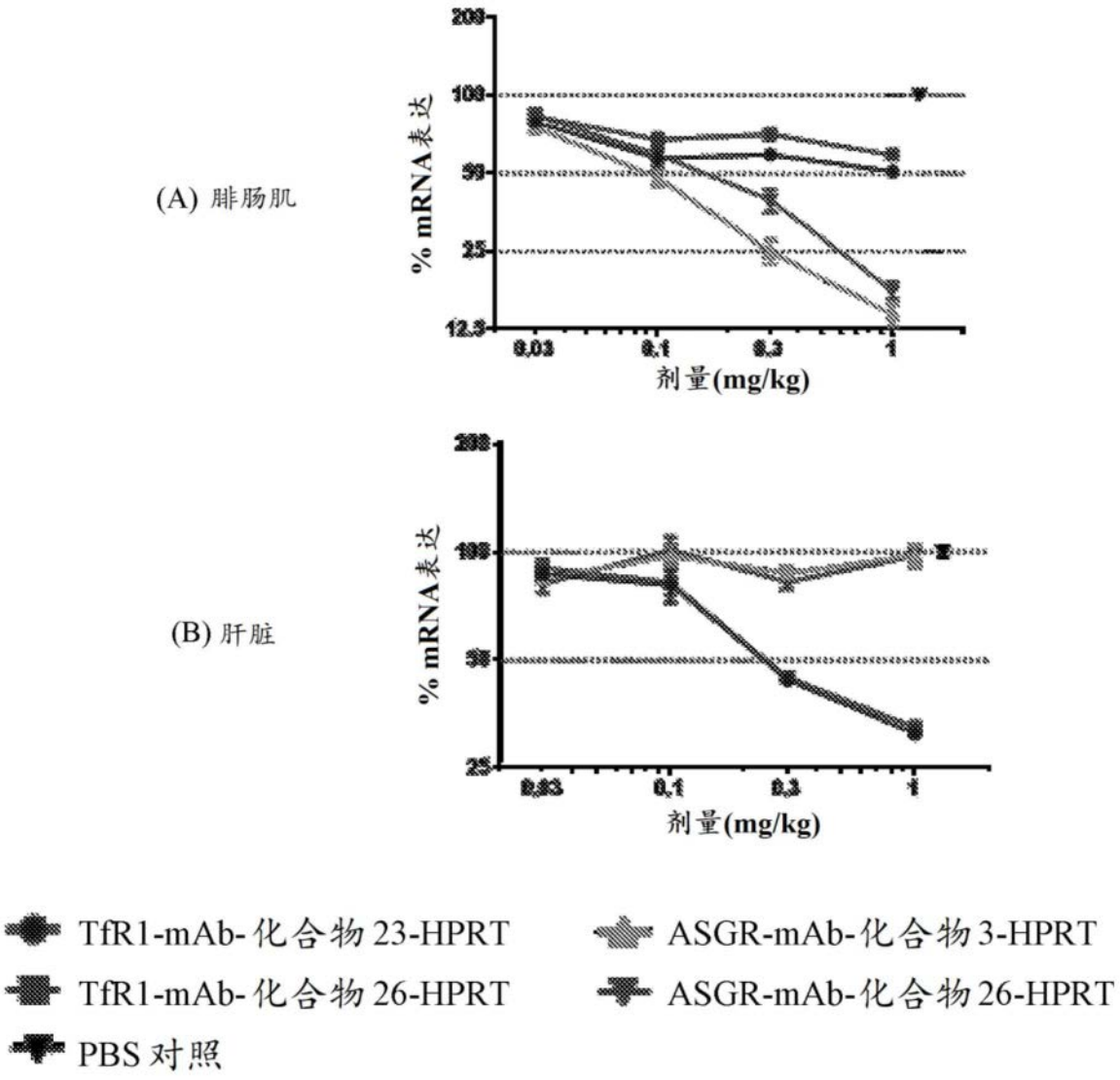

(A) 腓肠肌
% mRNA表达
剂量(mg/kg)
(B) 肝脏
% mRNA表达
剂量(mg/kg)
TfR1-mAb-化合物23-HPRT
ASGR-mAb-化合物3-HPRT
TfR1-mAb-化合物26-HPRT
ASGR-mAb-化合物26-HPRT
PBS对照

图6

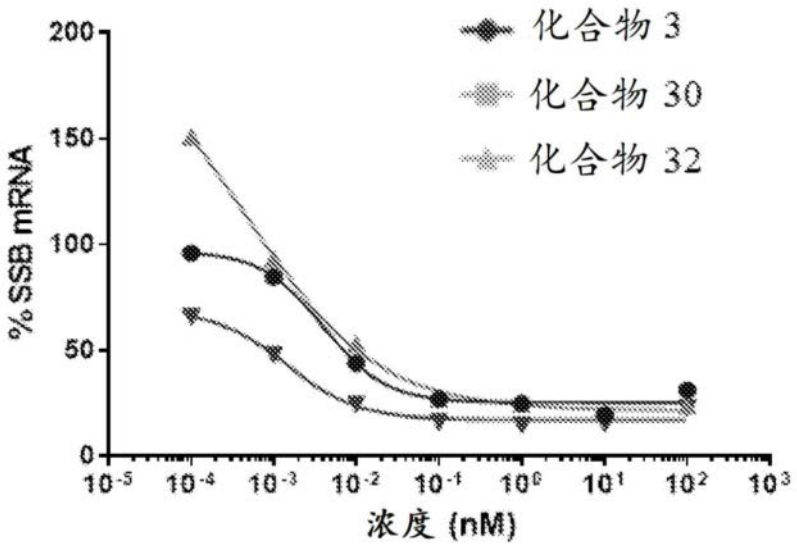
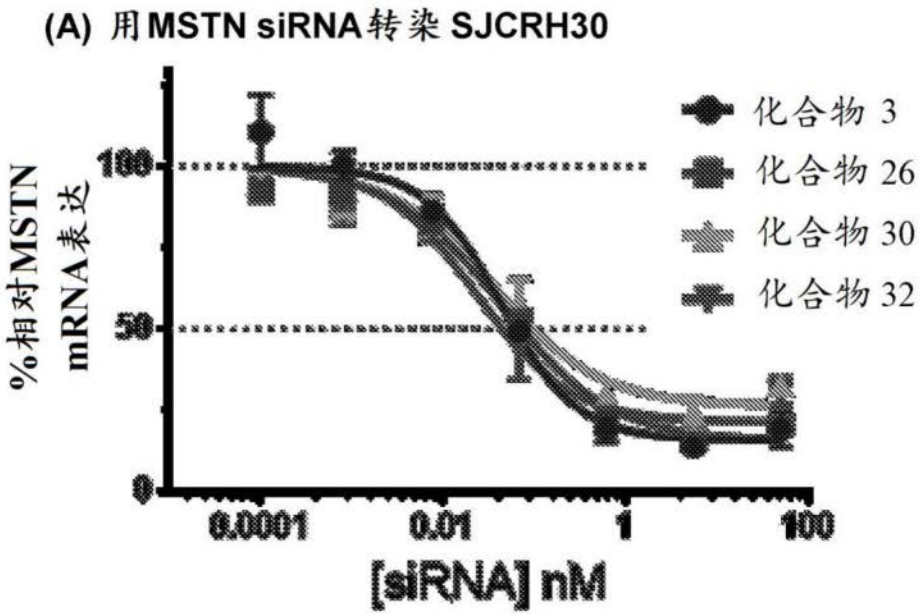

化合物 3
化合物 30
化合物 32
% SSB mRNA
200
150
100
50
0
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
浓度 (nM)

图7


(A) 用MSTN siRNA转染 SJCRH30
%相对MSTN mRNA表达
100
50
0
0.0001
0.01
1
100
[siRNA] nM
化合物 3
化合物 26
化合物 30
化合物 32

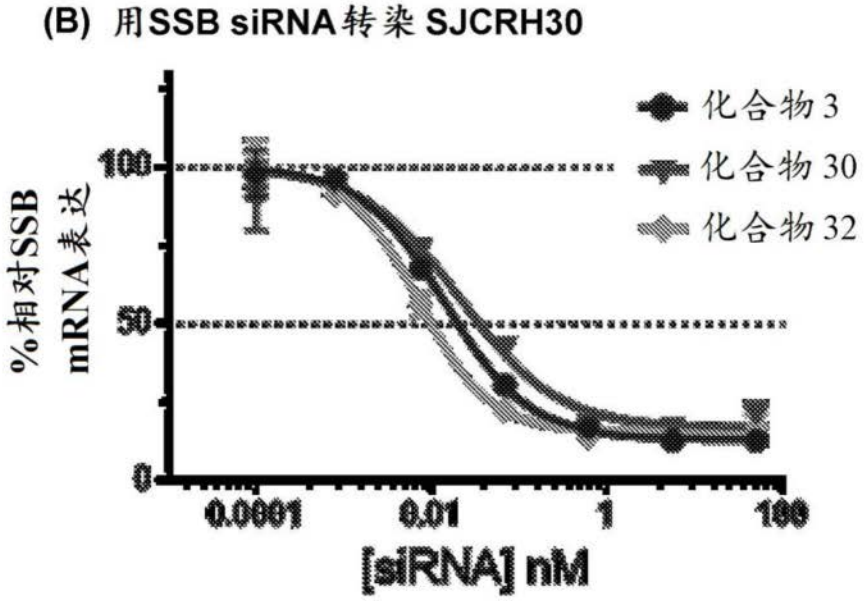

(B) 用SSB siRNA转染 SJCRH30
%相对SSB mRNA表达
100
50
0
0.0001
0.01
1
100
[siRNA] nM
化合物 3
化合物 30
化合物 32

图8

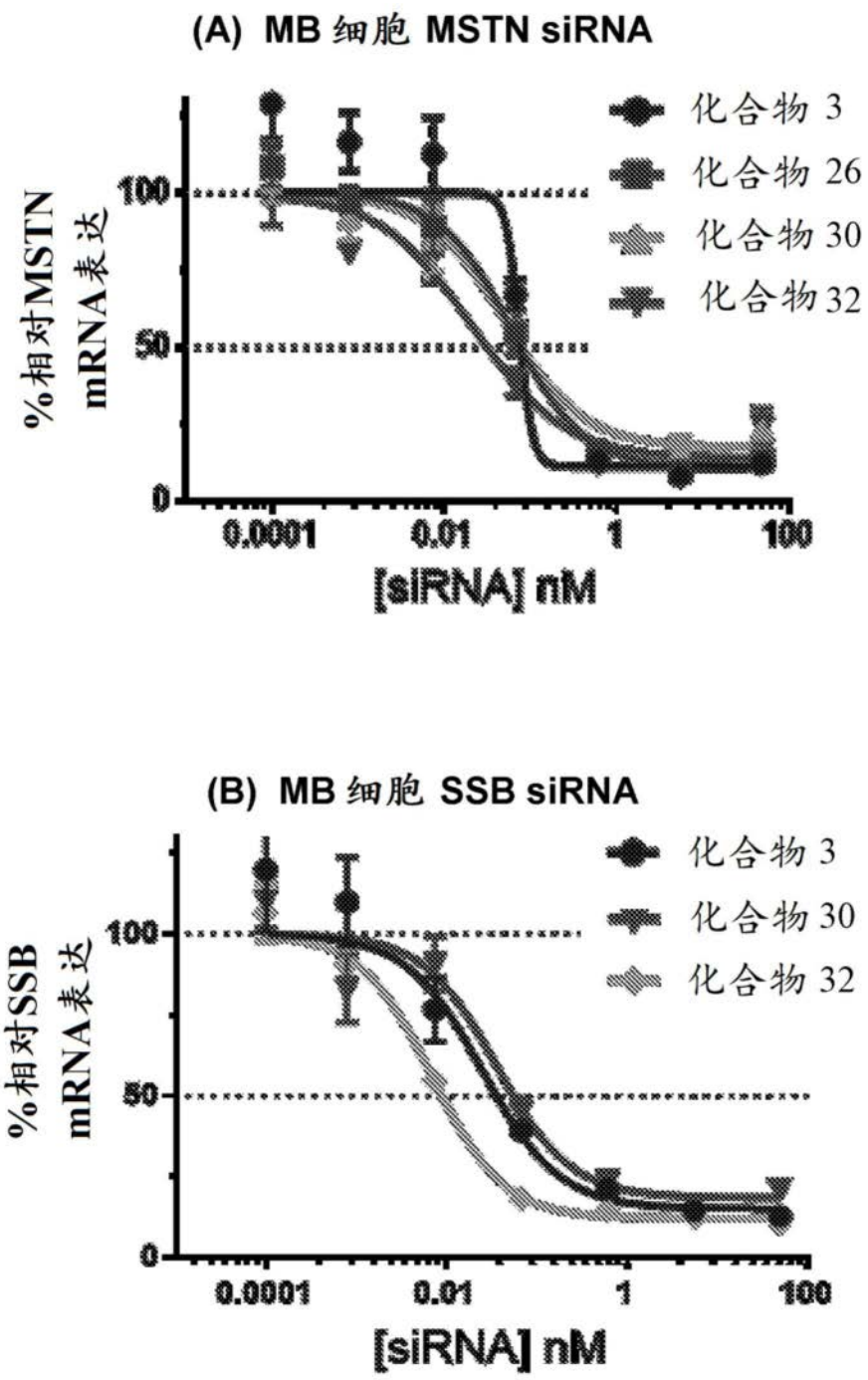

(A) MB 细胞 MSTN siRNA
%相对MSTN mRNA表达
100
50
0
0.0001
0.01
1
100
[siRNA] nM
化合物 3
化合物 26
化合物 30
化合物 32
(B) MB 细胞 SSB siRNA
%相对SSB mRNA表达
100
50
0
0.0001
0.01
1
100
[siRNA] nM
化合物 3
化合物 30
化合物 32

图9