(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103003288 B
(45)授权公告日 2019.06.21

(21)申请号 201180034599.5

(22)申请日 2011.05.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103003288 A

(43)申请公布日 2013.03.27

(30)优先权数据
61/349,783 2010.05.28 US
61/361,878 2010.07.06 US
61/386,428 2010.09.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.01.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/038459 2011.05.27

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/150408 EN 2011.12.01

(73)专利权人 萨勒普塔医疗公司
地址 美国华盛顿州

(72)发明人 贡纳·J·汉森
亚历山大·查尔斯·鲁道夫
蔡宝忠 周明 德怀特·D·怀勒

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 何可

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
C07H 21/00(2006.01)
C07F 9/22(2006.01)

(56)对比文件
WO 91/09033 A1,1991.06.27,
WO 2007/009094 A2,2007.01.18,
WO 2008/036127 A2,2008.03.27,

审查员 王超

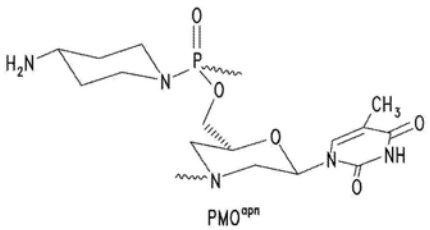
权利要求书10页 说明书97页
序列表16页 附图16页

(54)发明名称

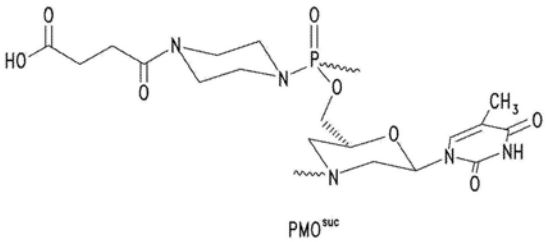
具有修饰的亚基间键和/或端基的寡核苷酸类似物

(57)摘要

本发明涉及包含主链的寡聚物,所述主链包含由亚基间键连接的吗啉环结构序列,所述亚基间键使一个吗啉环结构的3'末端连接于邻近的吗啉环结构的5'末端,其中每个吗啉环结构结合于碱基配对部分,使得寡聚物可以以序列特异性方式与靶核酸结合。公开的化合物可用于治疗其中蛋白表达的抑制或异常mRNA剪接产物的修正产生有益治疗效果的疾病。



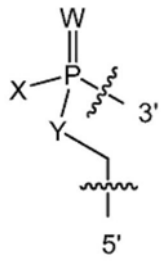
PMO^{apn}



PMO^{suc}

CN 103003288 B

1.包含主链的寡聚物,所述主链包含由亚基间键连接的吗啉环结构序列,所述亚基间键使一个吗啉环结构的3'-末端连接于邻近的吗啉环结构的5'-末端,其中每个吗啉环结构结合于碱基配对部分,使得寡聚物可以以序列特异性方式与靶核酸结合,其中所述亚基间键具有以下一般结构(I)或其盐:



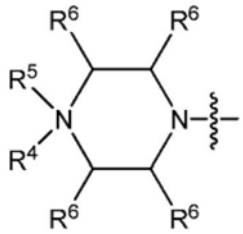
(I)

并且其中每个亚基间键(I)独立地为键(A)或键(B):

其中对于(A)键:

W每次出现时独立地为S或O;

X每次出现时独立地为$-N(CH_3)_2$、$-NR^1R^2$、$-OR^3$、或者,



(II) ;

Y每次出现时独立地为O或$-NR^2$,

R^1每次出现时独立地为氢或甲基;

R^2每次出现时独立地为氢或$-LNR^4R^5R^7$;

R^3每次出现时独立地为氢或C_1-C_6烃基;

R^4每次出现时独立地为氢、甲基、$-C(=NH)NH_2$、-Z-L-NHC(=NH)NH_2或$-[C(O)CHR'NH]_mH$,其中Z为羰基(C(O))或直连键,R'为天然氨基酸的侧链,并且m为1至6;

R^5每次出现时独立地为氢、甲基或电子对;

R^6每次出现时独立地为氢或甲基;

R^7每次出现时独立地为氢、C_1-C_6烃基或C_1-C_6烃氧基烃基;

L为任选的长度高达18个原子的连接基团,其为C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}烃氧基或C_1-C_{12}烃基氨基,或其组合;并且

其中对于(B)键:

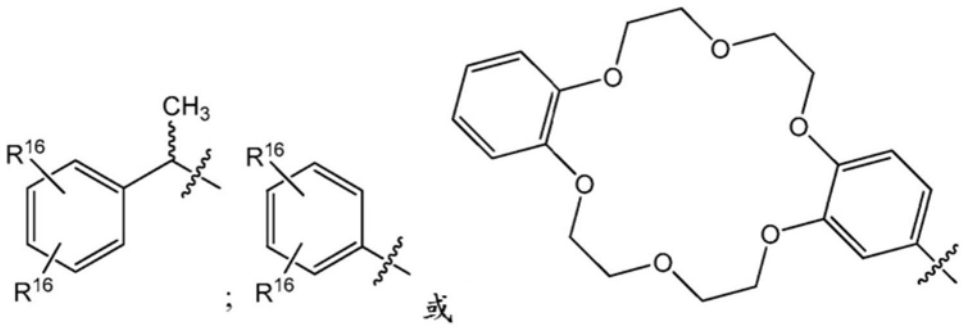
W每次出现时独立地为S或O;

Y每次出现时独立地为O或$-NR^{10}$,

X每次出现时独立地为$-NR^8R^9$或$-OR^3$,其中当X为$-OR^3$时,Y为$-NR^{10}$,并且R^3与R^{10}连接以形成5-7元杂环;以及

R^8每次出现时独立地为氢或C_2-C_{12}烃基；

R^9每次出现时独立地为C_1-C_{12}芳基亚烃基、芳基、



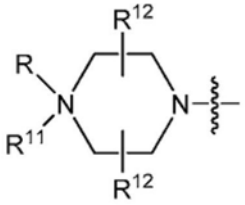
(XIV) (XV) (XVI)

；

其中R^{16}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}烃氧基、-CN、芳基或杂芳基；

R^{10}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基或-LN$R^4R^5R^7$；

或者R^8和R^9可以共同形成5-18元单环或二环的杂环，或者R^8或R^9可以与R^{10}共同形成5-7元杂环，并且其中当X为4-哌嗪基时，X具有以下结构(III)：



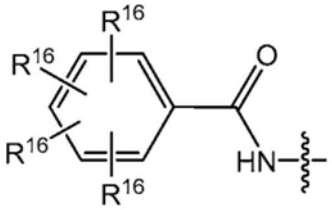
(III)

其中：

R^{11}每次出现时独立地为C_1-C_{12}氨基烃基、C_1-C_{12}烃基羰基、芳基、杂芳基或杂环基；以及

R每次出现时独立地为电子对、氢或C_1-C_{12}烃基；以及

R^{12}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}氨基烃基、-NH_2、-$CONH_2$、-$NR^{13}R^{14}$、-$NR^{13}R^{14}R^{15}$、C_1-C_{12}烃基羰基、氧、-CN、三氟甲基、酰胺基、脒基、脒基C_1-C_{12}烃基、脒基C_1-C_{12}烃基羰基、胍基、三氟甲基胍基、胍基C_1-C_{12}烃基、胍基C_1-C_{12}烃基羰基、胆酸酯基团、脱氧胆酸酯基团、芳基、杂芳基、杂环、-SR^{13}、C_1-C_{12}烃氧基或以下结构(IX)：

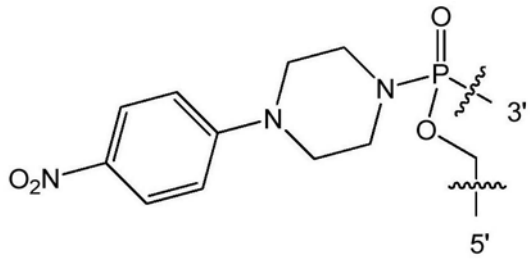


(IX)

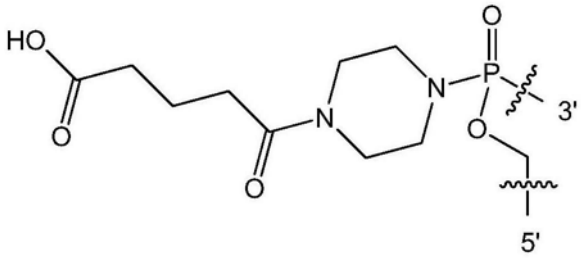
，

其中R^{13}、R^{14}和R^{15}每次出现时独立地为C_1-C_{12}烃基，其中R^{16}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}烃氧基、-CN、芳基或杂芳基；

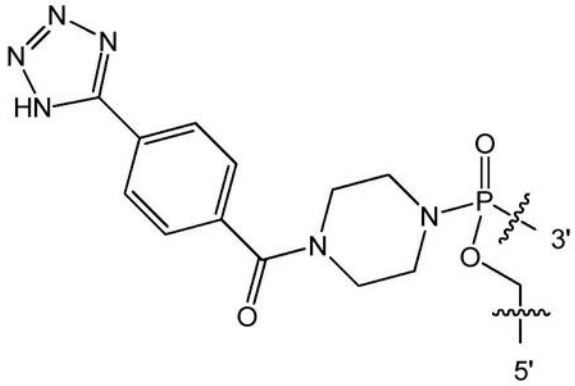
其中所述(B)键进一步包括具有以下结构的键：



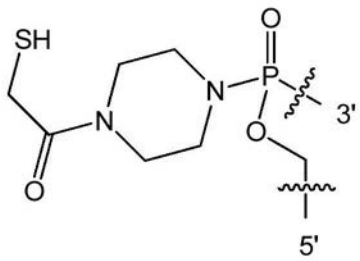
、



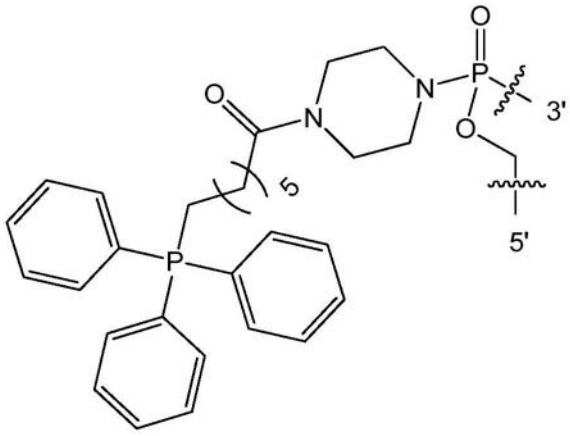
、



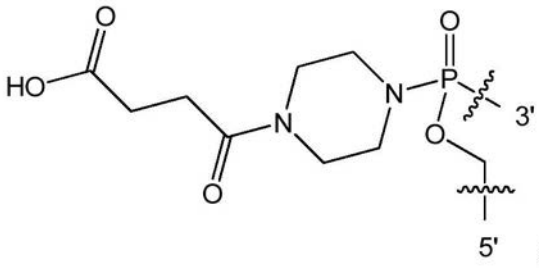
、



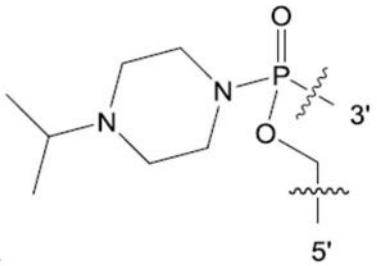
、



、



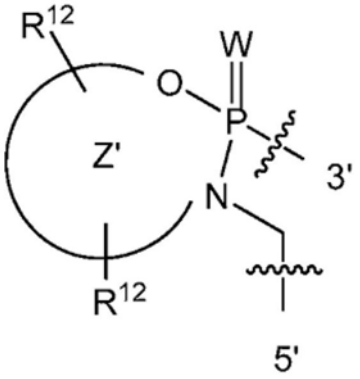
和



；以及

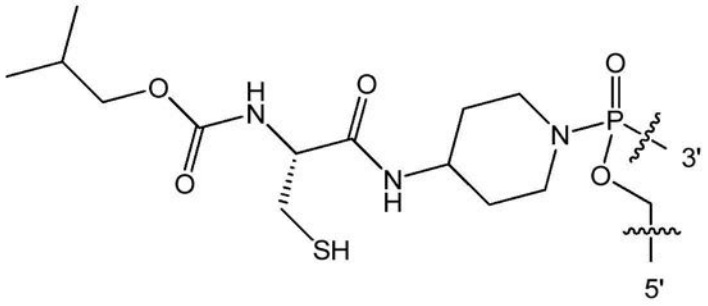
其中至少一个亚基间键为(B)键；其中：

(ii)至少一个(B)键具有以下结构(XII)：

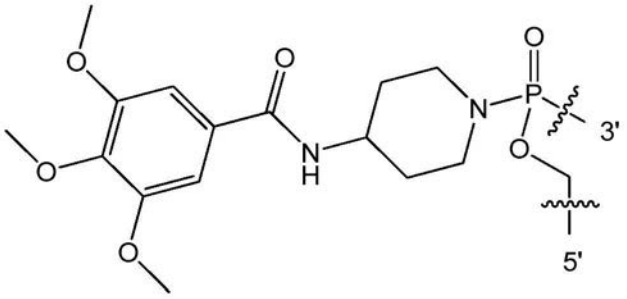


(XII)

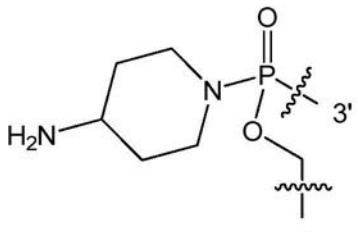
其中Z'表示5-7元杂环;或者(iii)至少一个(B)键具有以下结构之一：



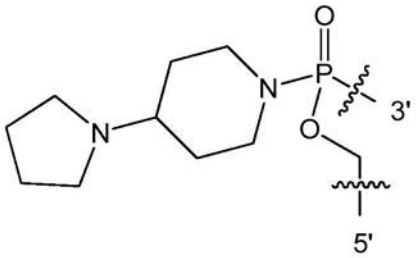
;



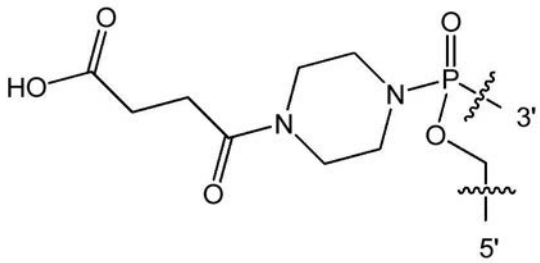
;



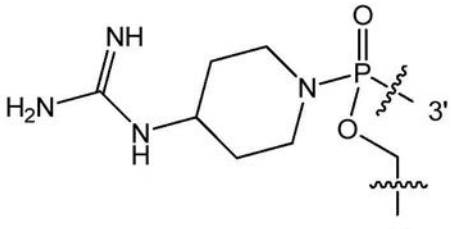
;



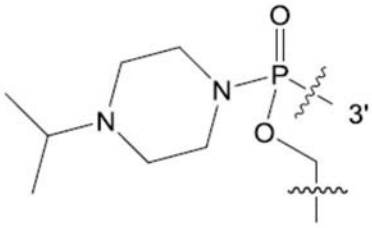
;



;



;或.

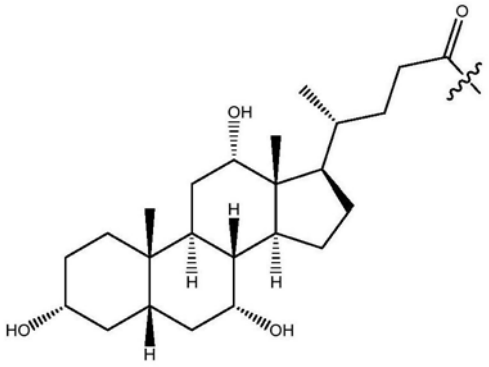


;以及

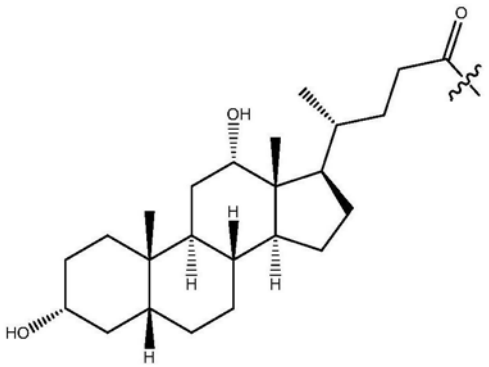
其中当5'方向上的下一个键是其中X是-N(CH3)2的(A)键并且3'方向上的下一个键是其

中X是4-哌嗪基的(A)键时，当R^8和R^9共同形成5-18元单环杂环时所形成的单环杂环(B)键不是6-胍基己酰基哌啶基；

其中胆酸酯基团是



其中脱氧胆酸酯基团是

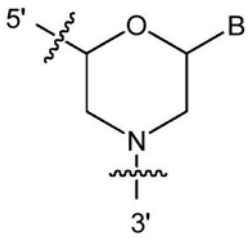


其中所述烃基是直链或支链烃链基团；

其中“杂芳基”指5-至14-元环体系基团，其包含氢原子、1-13个碳原子、1-6个选自氮、氧、磷和硫的杂原子以及至少一个芳环；以及

其中杂环指3-至24-元非芳环基团，其包含2-23个碳原子和1-8个选自氮、氧、磷和硫的杂原子。

2.如权利要求1所述的寡聚物，其中至少一个吗啉环结构具有以下结构(i)：



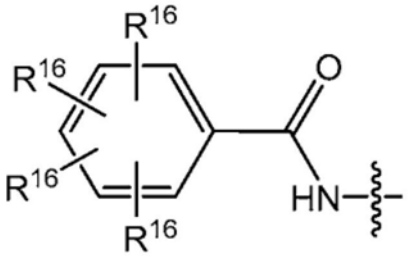
其中B每次出现时独立地为碱基配对部分。

3.如前述权利要求中任一项所述的寡聚物，其中至少一个亚基间键为(A)键。

4.如权利要求1或2所述的寡聚物，其中每次出现(A)键时，X为$-N(CH_3)_2$。

5.如权利要求1或2所述的寡聚物，其中W和Y每次出现时各自为O。

6.如权利要求1所述的寡聚物，其中至少一个R^{12}具有以下结构(IX)：



(IX)

其中R^{16}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}烃氧基、-CN、芳基或杂芳基。

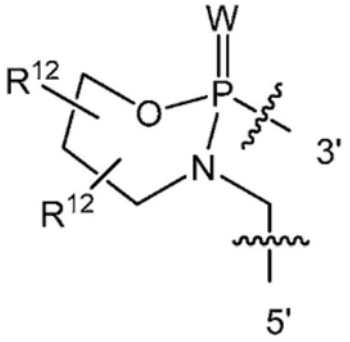
7.如权利要求1所述的寡聚物，其中至少一个R^{12}为$-NH_2$、$-N(CH_3)_2$或$-N^+(CH_3)_3$。

8.如权利要求1所述的寡聚物，其中至少一个R^{12}为吡咯烷基、哌啶基或吗啉基。

9.如权利要求1所述的寡聚物，其中至少一个R^{12}为氧、三氟甲基胍基或-CN。

10.如权利要求1所述的寡聚物，其中R^{12}为哌啶基、嘧啶基、胆酸酯基团或脱氧胆酸酯基团。

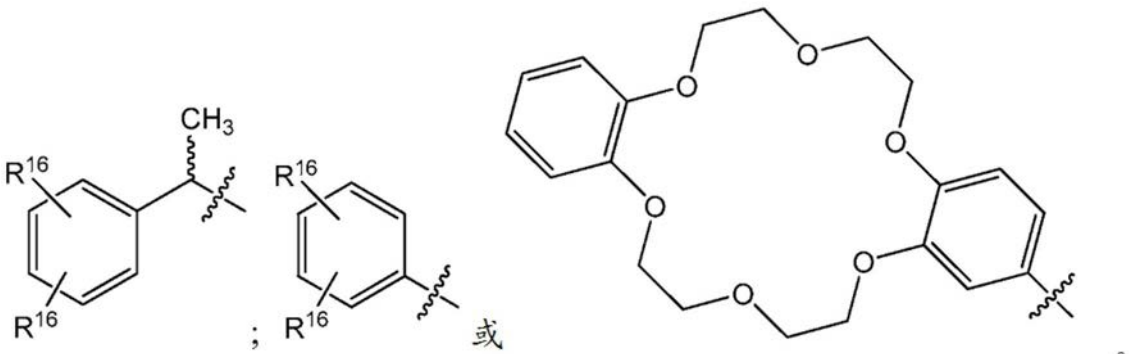
11.如权利要求1所述的寡聚物，其中至少一个(B)键具有以下结构(XIII)：



(XIII)

。

12.如权利要求1所述的寡聚物，其中R^9具有以下结构(XIV)、(XV)或(XVI)之一：



(XIV) (XV) (XVI)

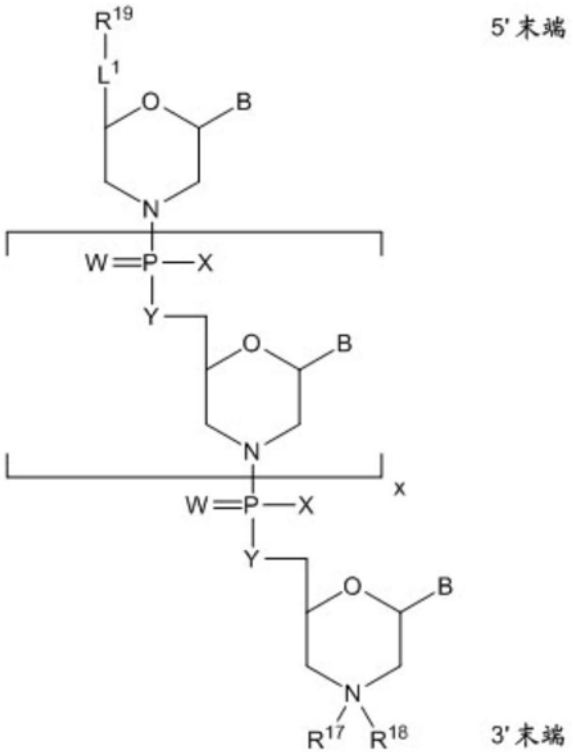
13.如权利要求1或2所述的寡聚物，其中至少5％的亚基间键为(B)键。

14.如权利要求1或2所述的寡聚物，其中10％至50％的亚基间键为(B)键。

15.如权利要求1或2所述的寡聚物，其中每个(B)键每次出现时具有相同结构。

16.如权利要求1或2所述的寡聚物,其中每个Y和每个W为O。

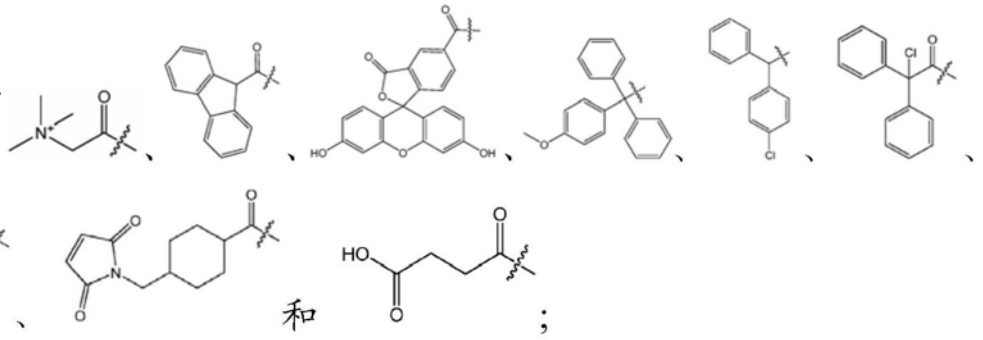
17.如权利要求1或2所述的寡聚物,其中所述寡聚物具有以下结构(XVII)或其盐:



其中:

R^{17}每次出现时独立地为不存在、氢或C_1-C_6烃基;

R^{18}和R^{19}每次出现时独立地为不存在、氢、细胞穿透肽、天然或非天然氨基酸、C_2-C_{30}烃基羰基、-C(=O)OR^{21}或R^{20};

R^{20}每次出现时独立地为胍基、杂环基、C_1-C_{30}烃基、C_3-C_8环烃基;C_6-C_{30}芳基、C_7-C_{30}芳基亚烃基、C_3-C_{30}烃基羰基、C_3-C_8环烃基羰基、C_3-C_8环烃基烃基羰基、C_7-C_{30}芳基羰基、C_7-C_{30}芳基亚烃基羰基、C_2-C_{30}烃氧基羰基、C_3-C_8环烃氧基羰基、C_7-C_{30}芳氧基羰基、C_8-C_{30}芳基亚烃基氧基羰基、-P(=O)(R^{22})$_2$、二苯基磷酰基、三甲氧基苯甲酰基、4-咔唑基苯甲酰基、4-吲唑基酮苯甲酰基、三苯甲基哌啶-4-基、boc-哌啶-4-基、1-羟基-2,2-二苯基乙酰基、-$COCH_2CH_2SSPy$、-$COCH_2SH$、

R^{21}为包含一个或多个氧或羟基部分或其组合的C_1-C_{30}烃基;

每个R^{22}独立地为C^6-C^{12}芳氧基

B为碱基配对部分;

L^1为任选的长度高达18个原子的连接基团,其选自以下的键:C_1-C_{12}烃基、羟基、C_1-C_{12}烃

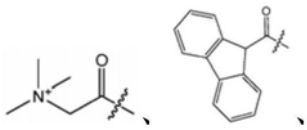
氧基、C_1-C_{12}烃基氨基、酰胺、酯、羰基、氨基甲酸酯、二氨基磷酸酯、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯和磷酸二酯；

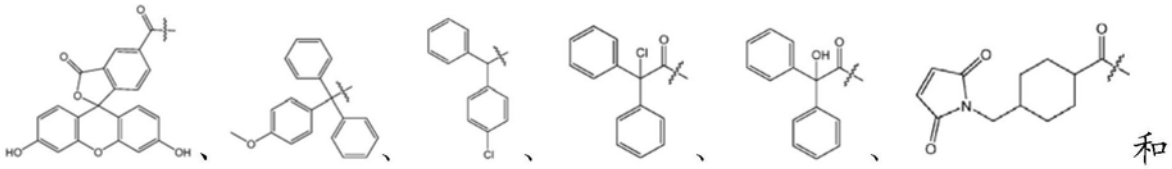
x为0或更大的整数；并且条件是R^{17}和R^{18}不是都不存在；

其中所述环烃基指稳定的、非芳族的、单环或多环碳环。

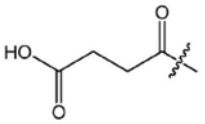
18.如权利要求17所述的寡聚物，其中R^{18}或R^{19}中的至少一个为R^{20}。

19.如权利要求18所述的寡聚物，其中R^{20}为三苯甲基、二苯甲基、三苯基乙酰基、三苯基丙基、二苯基乙酰基、二苯基磷酰基、拢牛儿基、法呢基、异戊二烯基、月桂酰基、三甲氧基苯甲酰基、三苯基丙酰基、1-羟基-2,2-二苯基乙酰基、-$COCH_2CH_2SSPy$、-$COCH_2SH$、4-咔唑基苯甲酰基、4-吲唑基酮苯甲酰基、哌啶-4-基、三苯甲基哌啶-4-基、boc-哌啶-4-基、己炔-6-基、哌嗪-1-基、胍基、





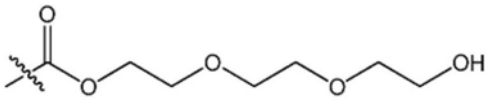
和



。

20.如权利要求17所述的寡聚物，其中R^{20}为三苯甲基或三苯基乙酰基。

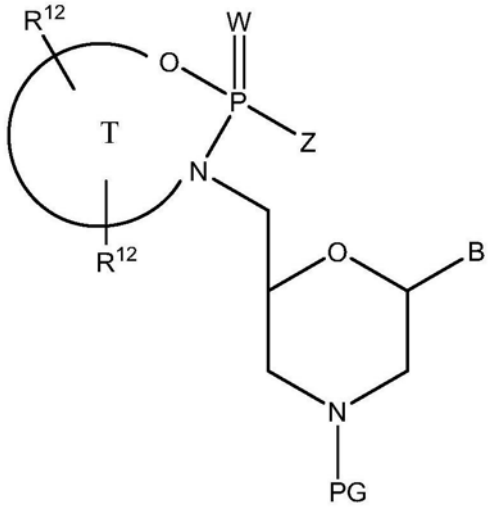
21.如权利要求17所述的寡聚物，其中R^{19}为哌嗪基或



。

22.组合物，其包含前述权利要求中任一项所述寡聚物和药物可接受的媒介物。

23.吗啉代亚基，其中所述吗啉代亚基具有以下结构或其盐：

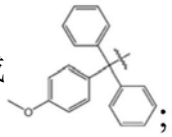


其中：

W独立地为S或O；

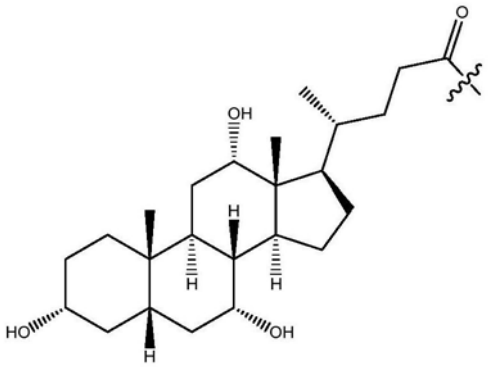
每一R^{12}独立地选自氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}氨基烃基、-NH_2、-$CONH_2$、-$NR^{13}R^{14}$、-$NR^{13}R^{14}R^{15}$、C_1-C_{12}烃基羰基、氧、-CN、三氟甲基、酰胺基、脒基、脒基C_1-C_{12}烃基、脒基C_1-C_{12}烃基羰基、胍基、胍基C_1-C_{12}烃基、胍基C_1-C_{12}烃基羰基、胆酸酯基团、脱氧胆酸酯基团、芳基、杂芳基、杂环、-SR^{13}或C_1-C_{12}烃氧基，其中R^{13}、R^{14}和R^{15}均独立地为C_1-C_{12}烃基；以及

Z为卤素或与固体支持物的键；

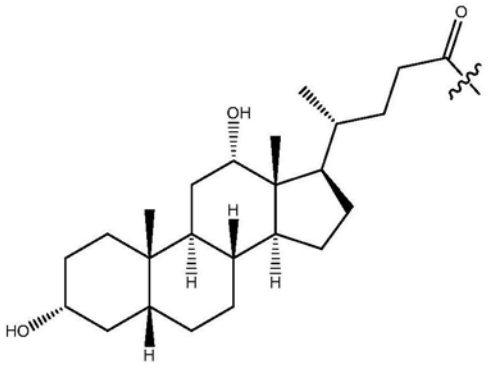
PG为C_7-C_{30}芳基亚烃基或以及；

T表示5-7元杂环；

其中胆酸酯基团是



其中脱氧胆酸酯基团是

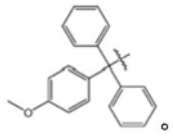


其中“杂芳基”指5-至14-元环体系基团，其包含氢原子、1-13个碳原子、1-6个选自氮、氧、磷和硫的杂原子以及至少一个芳环；以及

其中杂环指3-至24-元非芳环基团，其包含2-23个碳原子和1-8个选自氮、氧、磷和硫的杂原子；以及其中所述烃基是直链或支链烃链基团。

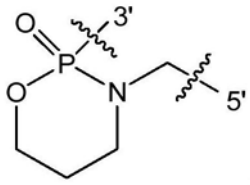
24.如权利要求23所述的吗啉代亚基，其中Z为氯。

25.如权利要求23所述的吗啉代亚基，其中PG为三苯甲基或

。

26.权利要求23所述的吗啉代亚基在制备权利要求1-21中任一项所述的寡聚物中的用途。

27.如权利要求1所述的寡聚物,其中至少一个(B)键为



。

具有修饰的亚基间键和/或端基的寡核苷酸类似物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2010年5月28日提交的美国临时专利申请第61/349,783号、2010年7月6日提交的美国临时专利申请第61/361,878号和2010年9月24日提交的美国临时专利申请第61/386,428号的权益。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以代替纸件的文本形式提供,并据此通过引用的方式并入说明书。含有序列表的文本文件的名称为120178_487PC_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件为19KB,创建于2011年5月27日,并通过电子提交。

背景技术

发明领域

[0005] 本发明通常涉及用作反义化合物的寡核苷酸化合物(寡聚物),更具体地涉及包含修饰的亚基间键和/或端基的寡聚化合物,以及所述寡聚化合物在反义应用中的用途。

[0006] 相关技术的描述

[0007] 反义寡聚物通常被设计为与导致疾病的蛋白的DNA或RNA结合,以阻止这类蛋白的产生。反义疗法的成功实施的要求包括(a)体内稳定性,(b)足够的膜通透性和细胞摄取,和(c)结合亲和性与序列特异性的良好平衡。已经开发多种寡核苷酸类似物,其中天然DNA的磷酸二酯键被耐核酸酶降解的其他键替代(参见,例如Barawkar,D.A.et al.,Proc.Na't'l Acad.Sci.USA95(19):11047-52(1998);Linkletter,B.A.et al,Nucleic Acids Res.29(11):2370-6(2001);Micklefield,J.,Cur,Med,Chem,8(10):1157-79(2001))。还已经制备了具有其他各种主链修饰的反义寡核苷酸(Crooke,S.T.,Antisense Drug Technology:Principles,Strategies,and Applications(反义药物技术:原理、策略与应用),New York,Marcel Dekker(2001);Micklefield,J.,Curr,Med,Chem,8(10):1157-79(2001);Crooke,S.T.,Antisense Drug Technology(反义药物技术),Boca Raton,CRC Press(2008))。此外,已经通过肽结合来修饰寡核苷酸以增强细胞摄取(Moulton,H.M.et al.,Bioconjug Chem15(2):290-9(2004);Nelson,M.H.et al,Bioconjug.Chem.16(4):959-66(2005);Moulton,H.M.et al.,Biochim Biophys Acta(2010))。

[0008] 这类核酸类似物作为反义或抗基因药物的表现已经受限于多种类似物的某些特性。例如,具有带负电荷键的类似物,包括硫代磷酸酯连接的类似物,遭受寡聚物与DNA或RNA靶的负电荷之间的相当大的静电排斥。硫代磷酸酯也表现出与诸如蛋白的其他细胞内组分的非特异性结合。这些性质限制了由天然RNA、天然DNA和带负电的类似物构成的反义寡聚物的疗效(Crooke,S.T.,Antisense Drug Technology:Principles,Strategies,and Applications(反义药物技术:原理、策略与应用),New York,Marcel Dekker(2001);Crooke,S.T.,Antisense Drug Technology(反义药物技术),Boca Raton,CRC Press(2008))。非离子甲基磷酸酯连接的寡核苷酸类似物可以通过被动扩散和/或液相内吞作用

而转运进细胞，但是它们的应用受限于立体异构的复杂性和较差的水溶性(Crooke,S.T., Antisense Drug Technology:Principles,Strategies,and Applications(反义药物技术：原理、策略与应用),New York,Marcel Dekker(2001);Micklefield,J.,Curr,Med,Chem,8(10):1157-79(2001))。

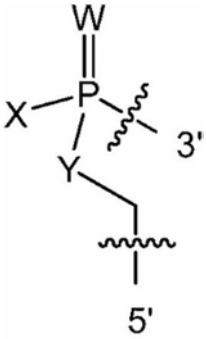
[0009] 多个团体已经报道了带正电的寡核苷酸的合成(Bailey,CP.et al.Nucleic Acids Res.26(21):4860-7(1998);Micklefield,J.,Curr,Med,Chem,8(10):1157-79(2001);Egli,M.et al,Biochemistry44(25):9045-57(2005))。例如，已经报道了通过用非手性胍基取代DNA和RNA中的磷酸酯键而形成的一类胍基连接的核苷(命名为DNG)(Dempcy,R.O.et al,Proc.Nat′l Acad.Sci.USA91(17):7864-8(1994);Dempcy,R.O.etal,Proc.Nat′l Acad.Sci.USA93(9):4326-30(1996);Barawkar,D.A.et al,Proc.Na't′l Acad.Sci.USA95(19):11047-52(1998);Linkletter,B.A.et al,Nucleic Acids Res.29(11):2370-6(2001))。还已经报道了用带正电的甲基化硫脲键连接的寡聚物(Arya,D.P.et al,Proc.Nat′l Acad.Sci USA96(8):4384-9(1999))。已经报道用中性尿素键取代这些键中的某些键以降低这类带正电的寡聚物向非序列特异性结合的倾向(Linkletter,B.A.et al,Bioorg.Med.Chem.8(8):1893-901(2000))。之前已经描述了吗啉代寡聚物，其包含(1-哌嗪基)氧亚膦基氧基和(1-(4-(ω-胍基-酰基))-哌嗪基)氧亚膦基氧基键(参见，例如，WO2008036127)。

[0010] 尽管已经作出显著进步，本领域内仍然需要具有改良的反义或抗基因性能的寡核苷酸类似物。这类改良的反义或抗基因性能包括，对DNA和RNA的更强的亲和性而不损害序列选择性；改善的药物动力学和组织分布；改善的细胞递送以及体内分布的可靠性与可控性。

[0011] 简述

[0012] 本发明的化合物克服了这些问题，并提供相对于本领域内现有反义分子的改善。对诸如吗啉寡核苷酸的寡核苷酸类似物的5'和/或3'末端进行末端部分的亚基间键和/或结合的修饰产生了具有优良性质的反义寡聚物。例如，在某些实施方案中，相对于其他寡核苷酸类似物，公开的寡聚物具有增强的细胞递送、效能和/或组织分布，和/或可以有效地被递送到靶器官。这些优良性质产生有利的治疗指数、降低的临床剂量和更低的商品成本。

[0013] 在一实施方案中，本公开提供了包含主链的寡聚物，所述主链包含由亚基间键连接的吗啉环结构序列，所述亚基间键使一个吗啉环结构的3'末端连接于邻近的吗啉环结构的5'末端，其中每个吗啉环结构结合于碱基配对部分，使得寡聚物可以以序列特异性方式与靶核酸结合，其中所述亚基间键具有以下一般结构(I)或其盐或异构体：

[0014] 

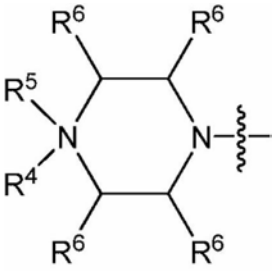
(I)

[0015] 并且其中每个亚基间键(I)独立地为键(A)或键(B)：

[0016] 其中对于键(A)：

[0017] W每次出现时独立地为S或O；

[0018] X每次出现时独立地为$-N(CH_3)_2$、$-NR^1R^2$、$-OR^3$或；

[0019] 

(II)

[0020] Y每次出现时独立地为O或$-NR^2$，

[0021] R^1每次出现时独立地为氢或甲基；

[0022] R^2每次出现时独立地为氢或$-LNR^4R^5R^7$；

[0023] R^3每次出现时独立地为氢或C_1-C_6烃基；

[0024] R^4每次出现时独立地为氢、甲基、$-C(=NH)NH_2$、-Z-L-NHC(=NH)NH_2或$-[C(O)CHR'NH]_mH$，其中Z为羰基(C(O))或直连键(direct bond)，R'为天然氨基酸的侧链或其一个-或两个-碳的同系物，并且m为1至6；

[0025] R^5每次出现时独立地为氢、甲基或电子对；

[0026] R^6每次出现时独立地为氢或甲基；

[0027] R^7每次出现时独立地为氢、C_1-C_6烃基或C_1-C_6烃氧基烃基；

[0028] L为任选的长度高达18个原子的连接基团，其包括烃基、烃氧基或烃基氨基或其组合；以及

[0029] 其中对于键(B)：

[0030] W每次出现时独立地为S或O；

[0031] X每次出现时独立地为$-NR^8R^9$或$-OR^3$；并且

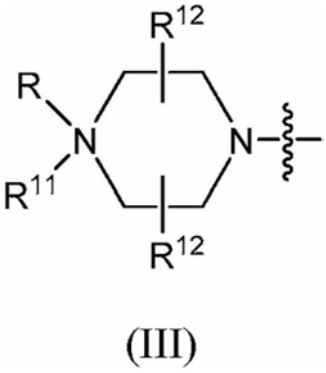
[0032] Y每次出现时独立地为O或$-NR^{10}$，

[0033] R^8每次出现时独立地为氢或C_1-C_{12}烃基；

[0034] R^9每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}芳烃基或芳基；

[0035] R^{10}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基或-LN$R^4R^5R^7$；

[0036] 其中R^8和R^9可以连接以形成5-18元单环或二环杂环，或者R^8、R^9或R^3可以与R^{10}连接以形成5-7元杂环，并且其中当X为4-哌嗪基时，X具有以下结构(III)：

[0037] 

(III)

[0038] 其中：

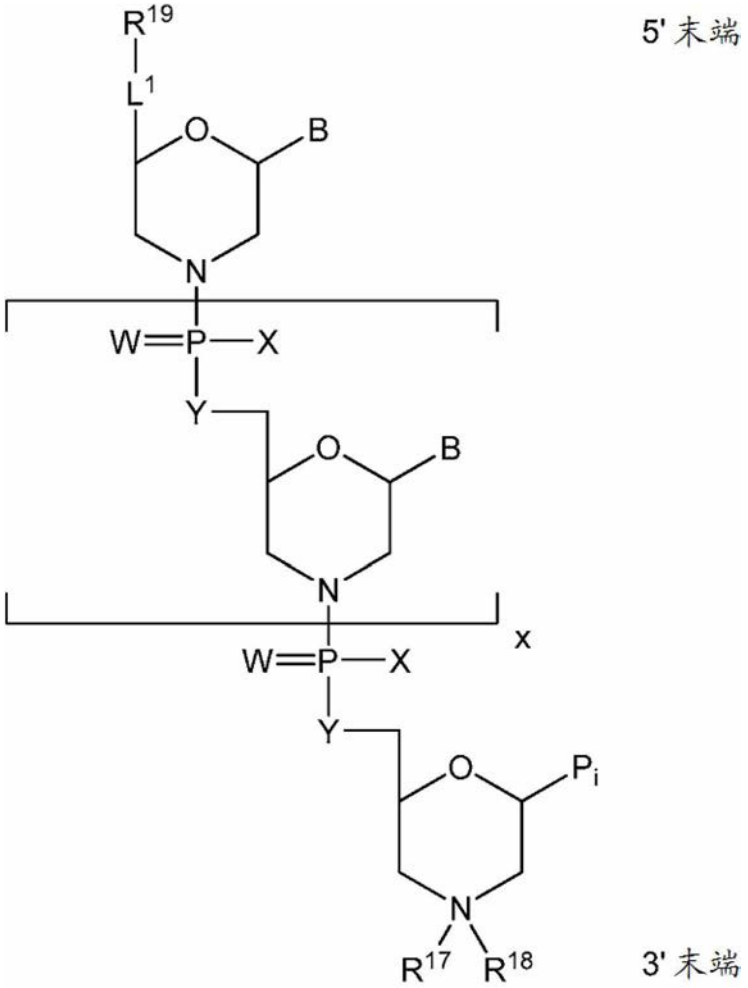
[0039] R^{11}每次出现时独立地为C_2-C_{12}烃基、C_1-C_{12}氨基烃基、C_1-C_{12}烃基羰基、芳基、杂芳基或杂环基；并且

[0040] R每次出现时独立地为电子对、氢或C_1-C_{12}烃基；并且

[0041] R^{12}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}氨基烃基、-NH_2、-$CONH_2$、-$NR^{13}R^{14}$、-$NR^{13}R^{14}R^{15}$、C_1-C_{12}烃基羰基、氧、-CN、三氟甲基、酰胺基、脒基、脒基烃基、脒基烃基羰基、胍基、胍基烃基、胍基烃基羰基、胆酸酯、脱氧胆酸酯、芳基、杂芳基、杂环、-SR^{13}、或C_1-C_{12}烃氧基，其中R^{13}、R^{14}和R^{15}每次出现时独立地为C_1-C_{12}烃基；以及

[0042] 其中至少一个亚基间键为键(B)。

[0043] 在另一实施方案中，本公开提供了包含修饰的端基的寡聚物，例如在一实施方案中，本公开提供了包含主链的寡聚物，所述主链包含有由(A)类型、(B)类型的亚基间键或其组合连接的吗啉环结构序列，其中每个吗啉环结构支持碱基配对部分，使得所述寡聚物化合物可以以序列特异性的方式与靶核酸结合，并且其中所述寡聚物包含3'末端、5'末端，并且具有以下结构(XVII)或其盐或异构体：

[0044] 

(XVII)

[0045] 并且

[0046] 其中对于键(A)：

[0047] W每次出现时独立地为S或O；

[0048] X每次出现时独立地为$-N(CH_3)_2$，$-NR^1R^2$，$-OR^3$或；

[0049] 

(II)

[0050] Y每次出现时独立地为O或$-NR^2$，

[0051] R^1每次出现时独立地为氢或甲基；

[0052] R^2每次出现时独立地为氢或$-LNR^4R^5R^7$；

[0053] R^3每次出现时独立地为氢或C_1-C_6烃基；

[0054] R^4每次出现时独立地为氢、甲基、$-C(=NH)NH_2$、-Z-L-NHC(=NH)NH_2或$-[C(O)CHR'NH]_mH$，其中Z为羰基(C(O))或直连键，R'为天然氨基酸的侧链或其一个-或两个-碳的同系

物，并且m为1至6；

[0055] R^5每次出现时独立地为氢、甲基或电子对；

[0056] R^6每次出现时独立地为氢或甲基；

[0057] R^7每次出现时独立地为氢、C_1-C_6烃基或C_1-C_6烃氧基烃基；

[0058] L为任选的长度高达18个原子的连接基团，其包括烃基、烃氧基或烃基氨基，或其组合；以及

[0059] 其中对于键(B)：

[0060] W每次出现时独立地为S或O；

[0061] X每次出现时独立地为$-NR^8R^9$或$-OR^3$；以及

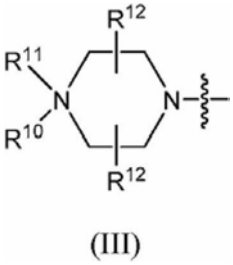
[0062] Y每次出现时独立地为O或$-NR^{10}$，

[0063] R^8每次出现时独立地为氢或C_1-C_{12}烃基；

[0064] R^9每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}芳烃基或芳基；

[0065] R^{10}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基或$-LNR^4R^5R^7$；

[0066] 其中R^8和R^9可以连接以形成5-18元单环或二环杂环，或者R^8、R^9或R^3可以与R^{10}连接以形成5-7元杂环，并且其中当X为4-哌嗪基时，X具有以下结构(III)：

[0067] 

(III)

[0068] 其中：

[0069] R^{10}每次出现时独立地为C_2-C_{12}烃基、C_1-C_{12}氨基烃基、C_1-C_{12}烃基羰基、芳基、杂芳基或杂环基；以及

[0070] R^{11}每次出现时独立地为电子对、氢或C_1-C_{12}烃基；

[0071] R^{12}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}氨基烃基、$-NH_2$、$-CONH_2$、$-NR^{13}R^{14}$、$-NR^{13}R^{14}R^{15}$、C_1-C_{12}烃基羰基、-CN、三氟甲基、酰胺基、脒基、脒基烃基、脒基烃基羰基、胍基、胍基烃基、胍基烃基羰基、胆酸酯、脱氧胆酸酯、芳基、杂芳基、杂环、$-SR^{13}$或C_1-C_{12}烃氧基，其中R^{13}、R^{14}和R^{15}每次出现时独立地为C_1-C_{12}烃基；以及

[0072] R^{17}每次出现时独立地为不存在、氢或C_1-C_6烃基；

[0073] R^{18}和R^{19}每次出现时独立地为不存在、氢、细胞穿透肽、天然的或非天然的氨基酸、C_2-C_{30}烃基羰基、$-C(=O)OR^{21}$或R^{20}；

[0074] R^{20}每次出现时独立地为胍基、杂环基、C_1-C_{30}烃基、C_3-C_8环烃基；C_6-C_{30}芳基、C_7-C_{30}芳烃基、C_3-C_{30}烃基羰基、C_3-C_8环烃基羰基、C_3-C_8环烃基烃基羰基、C_7-C_{30}芳基羰基、C_7-C_{30}芳烃基羰基、C_2-C_{30}烃氧基羰基、C_3-C_8环烃氧基羰基、C_7-C_{30}芳氧基羰基、C_8-C_{30}芳烃氧基羰基或$-P(=O)(R^{22})_2$；

[0075] R^{21}为包含至少一个或多个氧或羟基部分或其组合的C_1-C_{30}烃基；

[0076] 每个R^{22}独立地为C^6-C^{12}芳氧基；

[0077] B为碱基配对部分；

[0078] L^1为任选的长度为高达18个原子的连接基团，其包括选自以下的键：烃基、羟基、烃氧基、烃基氨基、酰胺、酯、二硫基、羰基、氨基甲酸酯、二氨基磷酸酯、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、哌嗪和磷酸二酯。

[0079] x为0或更大的整数；并且

[0080] 其中R^{18}或R^{19}中的至少一个为R^{20}，并且条件是R^{17}和R^{18}都存在。

[0081] 在另一实施方案中，本公开提供了抑制蛋白的产生的方法，所述方法包括将编码所述蛋白的核酸暴露于本公开的寡聚物。

[0082] 在另一实施方案中，本公开涉及治疗个体中疾病的方法，所述方法包括给予治疗有效量的寡聚物。还提供了制备所述寡聚物的方法，以及用于所述寡聚物应用的方法。

[0083] 本发明的这些和其他方面将参照以下的详细描述而显而易见。为此，在本文列出更详细地描述某些背景信息、程序、化合物和/或组合物的多种参考文献，并通过其整体形式各自并入本文作为参考。

[0084] 附图简述

[0085] 图1A示出包含二氨基磷酸酯键的示例性吗啉代寡聚物结构。

[0086] 图1B示出图1A的吗啉代寡聚物，但其中主链键包含一个哌嗪基二氨基磷酸酯键。

[0087] 图1C示出富精氨酸肽和反义寡聚物的结合物。

[0088] 图1D-G示出示例性吗啉基寡核苷酸的重复亚基片段，指定为1D至1G。

[0089] 图2示出与吗啉代-T部分连接的示例性亚基间键。

[0090] 图3是示出制备用于固相合成的连接基团的反应流程。

[0091] 图4示例用于寡聚物合成的固相支持物的制备。

[0092] 图5示出典型寡聚物的外显子跳跃活性。

[0093] 图6是示出mdx小鼠模型中外显子跳跃的柱状图。

[0094] 图7A-7C提供用示例性寡聚物处理转基因eGFP小鼠的结果。

[0095] 图8示出用示例性寡聚物处理的细胞的病毒M2蛋白水平的降低。

[0096] 图9示出用示例性寡聚物处理的小鼠中抗病毒活性和重量减轻。

[0097] 图10提供用示例性寡聚物处理的小鼠的体重数据。

[0098] 图11是与PMO和PMO^+寡聚物相比，来自用示例性寡聚物处理的小鼠的多种组织中eGFP剪解-修正活性数据。

[0099] 图12示出与PMO和PMO^+寡聚物相比，来自用示例性寡聚物处理的小鼠的多种组织中eGFP剪解-修正活性数据的子集。

[0100] 发明详述

[0101] I.定义

[0102] 在下述描述中，陈述了某些具体细节以提供多种实施方案的深入理解。然而，本领域技术人员应明白本发明可以在没有这些细节的情况下而实施。在其他实例中，未将公知结构示出或详细描述以避免使实施方案描述不必要地变得模糊。除非上下文另有需要，整个说明书和权利要求书遵循下述要求，措辞“包含”及其变体，例如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”应被解释为开放式、包含的含义，即，解释为“包括，但不限于”。此外，本文提供的标题仅为了便利，并不说明所要求保护的发明的范围和内涵。

[0103] 整个本说明书对“一实施方案”或“实施方案”的参考是指实施方案中描述的特定

特征、结构或特性包括在至少一个实施方案中。因此，在整个本说明书的多处中均出现的措辞“在一实施方案中”或“在实施方案中”不必全部涉及相同的实施方案。此外，在一个或多个实施方案中，特定特征、结构或特性可以以任何合适的方式组合。此外，在本说明书和附加的权利要求中所用的单数形式“a(一)”、“an(一个)”、“the(该)”包括复数形式，除非内容明显地另有所指。还应注意，术语“或”通常以其包含“和/或”的含义而使用，除非内容明显地另有所指。

[0104] 除非另有所指，本文所用的以下术语具有以下含义：

[0105] “氨基”指-NH_2基。

[0106] “氰基”或“腈”指-CN基。

[0107] “羟基”或“氢氧基”指-OH基。

[0108] “亚氨基”指=NH取代基。

[0109] “胍基”指-NHC(=NH)NH_2取代基。

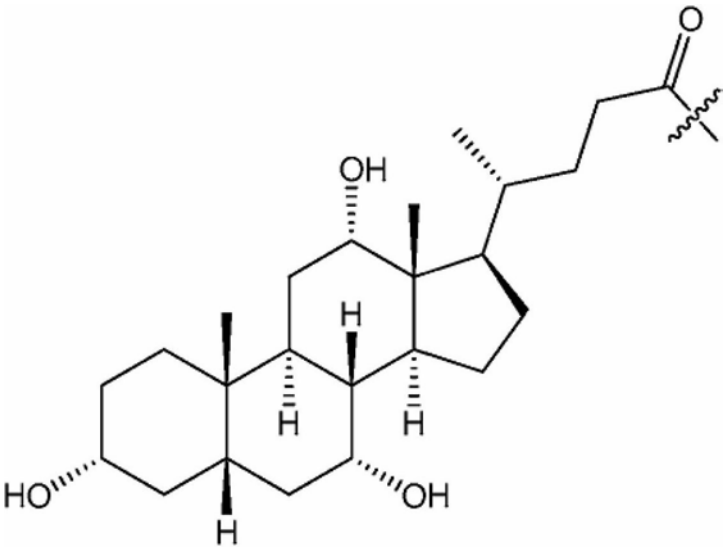
[0110] “脒基”指-C(=NH)NH_2取代基。

[0111] “硝基”指-NO_2基。

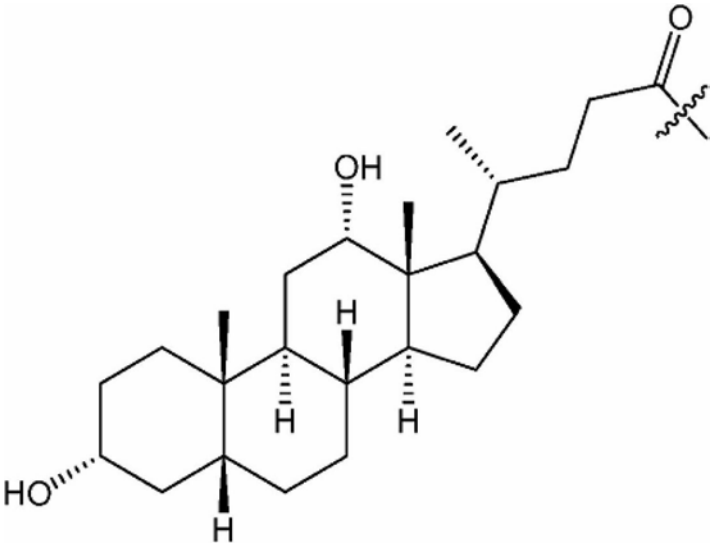
[0112] “氧基”指=O取代基。

[0113] “硫基”指=S取代基。

[0114] “胆酸酯”指以下结构：

[0115] 

[0116] “脱氧胆酸酯”指以下结构：

[0117] 

[0118] “烃基”是指直链或支链烃链基团，其是饱和的或未饱和的(即，包含一个或多个双键和/或叁键)，具有1-30个碳原子，并且通过单键连接到分子的其余部分。包括了包含从1至30的任何数目碳原子的烃基。包含高达30个碳原子的烃基被称作C_1-C_{30}烃基，同样地，例如，包含高达12个碳原子的烃基为C_1-C_{12}烃基。包含其他数目碳原子的烃基(以及本文定义的其他部分)类似地表示。烃基包括但不限于，C_1-C_{30}烃基、C_1-C_{20}烃基、C_1-C_{15}烃基、C_1-C_{10}烃基、C_1-C_8烃基、C_1-C_6烃基、C_1-C_4烃基、C_1-C_3烃基、C_1-C_2烃基、C_2-C_8烃基、C_3-C_8烃基和C_4-C_8烃基。典型的烃基包括但不限于，甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正丁基、异丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)、3-甲基己基、2-甲基己基、乙烯基、丙-1-烯基、丁-1-烯基、戊-1-烯基、戊-1,4-二烯基、乙炔基、丙炔基、丁-2-炔基、丁-3-炔基、戊炔基、己炔基等。除非说明书中具体说明，烃基可以任选地如以下所述取代。

[0119] “亚烃基”或“亚烃基链”指直链或支链二价烃链，其使分子的其余部分与基团连接。亚烃基可以是饱和的或未饱和的(即，包含一个或多个双键和/或叁键)。典型的亚烃基包括但不限于，C_1-C_{12}亚烃基、C_1-C_8亚烃基、C_1-C_6亚烃基、C_1-C_4亚烃基、C_1-C_3亚烃基、C_1-C_2亚烃基、C_1亚烃基。典型的亚烃基包括但不限于，亚甲基、亚乙基、亚丙基、正亚丁基、亚乙烯基、亚丙烯基、正亚丁烯基、亚丙炔基、正亚丁炔基等。亚烃基链通过单键或双键连接到分子的其余部分，并通过单键或双键连接到基团。亚烃基链与分子其余部分的连接点和与基团的连接点可以通过链中的一个碳或任意两个碳。除非说明书中具体说明，亚烃基可以任选地如以下所述取代。

[0120] “烃氧基”指通式-OR_a的基团，其中R_a为如本文所定义的烃基。除非说明书中具体说明，烃氧基可以任选地如以下所述取代。

[0121] “烃氧基烃基”指通式-R_bOR_a的基团，其中R_a为所定义的烃基，并且其中R_b为所定义的亚烃基。除非说明书中具体说明，烃氧基烃基可以任选地如以下所述取代。

[0122] “烃基羰基”指通式-C(=O)R_a的基团，其中R_a为上述所定义的烃基。除非说明书中具体说明，烃基羰基可以任选地如以下所述取代。

[0123] “烃氧基羰基”指通式-C(=O)OR_a的基团，其中R_a为所定义的烃基。除非说明书中具体说明，烃氧基羰基可以任选地如以下所述取代。

[0124] “烃基氨基”指通式-NHR_a或-NR_aR_a的基团，其中每个R_a独立地为上述所定义的烃

基。除非说明书中具体说明，烃基氨基可以任选地如以下所述取代。

[0125] “酰胺基”指通式-N(H)C(=O)R_a的基团，其中R_a为如本文所定义的烃基或芳基。除非说明书中具体说明，酰胺基可以任选地如以下所述取代。

[0126] “脒基烃基”指通式-R_b-C(=NH)NH_2的基团，其中R_b为上述所定义的亚烃基。除非说明书中具体说明，脒基烃基可以任选地如以下所述取代。

[0127] “脒基烃基羰基”指通式-C(=O)-R_b-C(=NH)NH_2的基团，其中R_b为上述所定义的亚烃基。除非说明书中具体说明，脒基烃基羰基可以任选地如以下所述取代。

[0128] “氨基烃基”指通式-R_b-NR_aR_a的基团，其中R_b为上述所定义的亚烃基，并且每个R_a独立地为氢或烃基。

[0129] “硫代烃基”指通式-SR_a的基团，其中R_a为上述所定义的烃基。除非说明书中具体说明，硫代烃基可以任选地被取代。

[0130] “芳基”指从环烃体系衍生的基团，其包含氢、6-30个碳原子和至少一个芳环。芳基可以是单环的、二环的、三环的或四环的环体系，其可以包含稠合的或桥接的环体系。芳基包括但不限于，从环烃体系衍生的芳基：醋蒽烯、苊烯、醋菲烯、蒽、蒽、苯、屈(chrysene)、荧蒽、苭、不对称引达省(as-indacene)、对称引达省(s-indacene)、二氢茚、茚、萘、苉、菲、七曜烯、苝和苯并菲。除非说明书中具体说明，术语“芳基”或前缀“芳-”(例如在“芳烃基”中)意指包括被任选地取代的芳基。

[0131] “芳烃基”指通式-R_b-R_c的基团，其中R_b是上述所定义的亚烃基，并且R_c是一个或多个上述所定义的芳基，例如苄基、二苯甲基、三苯甲基等。除非说明书中具体说明，芳烃基可以任选地被取代。

[0132] “芳基羰基”指通式-C(=O)R_c的基团，其中R_c为一个或多个上述所定义的芳基，例如苯基。除非说明书中具体说明，芳基羰基可以任选地被取代。

[0133] “芳氧基羰基”指通式-C(=O)OR_c的基团，其中R_c为一个或多个上述所定义的芳基，例如苯基。除非说明书中具体说明，芳氧基羰基可以任选地被取代。

[0134] “芳烃基羰基”指通式-C(C=O)R_b-R_c的基团，其中R_b是上述所定义的亚烃基，并且R_c是一个或多个上述所定义的芳基，例如苯基。除非说明书中具体说明，芳烃基羰基可以任选地被取代。

[0135] “芳烃氧基羰基”指通式-C(C=O)OR_b-R_c的基团，其中R_b是上述所定义的亚烃基，并且R_c是一个或多个上述所定义的芳基，例如苯基。除非说明书中具体说明，芳烃氧基羰基可以任选地被取代。

[0136] “芳氧基”指通式-OR_c的基团，其中R_c为一个或多个上述所定义的芳基，例如苯基。除非说明书中具体说明，芳基羰基可以任选地被取代。

[0137] “环烃基”指稳定的、非芳族的、单环或多环碳环，其可包括稠合的或桥接的环体系，可以是饱和的或不饱和的，并通过单键连接到分子的其余部分。典型的环烃基包括，但不限于，具有3-15个碳原子和3-8个碳原子的环烃基，单环环烃基包括，例如，环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。多环基团包括，例如，金刚烷基、降莰基、十氢萘基和7,7-二甲基-二环[2.2.1]庚基。除非说明书中具体说明，环烃基可以任选地被取代。

[0138] “环烃基烃基”指通式-R_bR_d的基团，其中R_b为一个或多个上述所定义的亚烃基，并且R_d为上述所定义的环烃基。除非说明书中具体说明，环烃基烃基可以任选地被取代。

[0139] “环烃基羰基”指通式-C(=O)R_d的基团，其中R_d为上述所定义的环烃基。除非说明书中具体说明，环烃基羰基可以任选地被取代。

[0140] “环烃氧基羰基”指通式-C(=O)OR_d的基团，其中R_d为上述所定义的环烃基。除非说明书中具体说明，环烃氧基羰基可以任选地被取代。

[0141] “稠合”指与现存环结构稠合的本文所述的任意环结构。当稠环是杂环或杂芳环时，成为稠合杂环或稠合杂芳环的一部分的现存环结构上的任意碳原子可以被氮原子替代。

[0142] “胍基烃基”指通式-R_b-NHC(=NH)NH_2的基团，其中R_b为上述所定义的亚烃基。除非说明书中具体说明，胍基烃基可以任选地如以下所述取代。

[0143] “胍基烃基羰基”指通式-C(=O)-R_b-NHC(=NH)NH_2的基团，其中R_b为上述所定义的亚烃基。除非说明书中具体说明，胍基烃基羰基可以任选地如以下所述取代。

[0144] “卤代”或“卤素”指溴、氯、氟或碘。

[0145] “卤代烃基”指被一个或多个卤素基团取代的上述所定义的烃基，例如三氟甲基、二氟甲基、氟甲基、三氯甲基、2,2,2-三氟乙基、1,2-二氯乙基、3-溴-2-氟丙基、1,2-二溴乙基等。除非说明书中具体说明，卤代烃基可以任选地被取代。

[0146] “全卤代”或“全氟代”指其中每个氢原子已经分别被卤原子或氟原子替代的部分。

[0147] “杂环基”、“杂环”或“杂环(heterocyclic ring)”指稳定的3-至24-元非芳环基团，其包含2-23个碳原子和1-8个选自氮、氧、磷和硫的杂原子。除非说明书中具体说明，杂环基团可以是单环、二环、三环或四环的环体系，其可以包括稠合的或桥接的环体系，并且杂环基团中的氮、碳或硫原子可以任选地被氧化；氮原子可以任选地被季铵化；并且杂环基团可以为部分饱和或完全饱和。这类杂环基团的实例包括但不限于，二氧戊环基，噻吩基[1,3]二噻烷基、十氢化异喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚基、2-氧代哌嗪基、2-氧代哌啶基、2-氧代吡咯烷基、噁唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、四氢呋喃基、三噻烷基、四氢吡喃基、硫代吗啉基、硫吗啉基、1-氧-硫代吗啉基、1,1-二氧-硫代吗啉基、12-冠-4、15-冠-5、18-冠-6、21-冠-7、氮杂-18-冠-6、二氮杂-18-冠-6、氮杂-21-冠-7和二氮杂-21-冠-7。除非说明书中具体说明，杂环基可以任选地被取代。

[0148] “杂芳基”指5-至14-元环体系基团，其包含氢原子、1-13个碳原子、1-6个选自氮、氧、磷和硫的杂原子以及至少一个芳环。为本发明目的，杂芳基可以是单环、二环、三环或四环的环体系，其可以包括稠合的或桥接的环体系，并且杂芳基中的氮、碳或硫原子可以任选地被氧化；氮原子可以任选地季铵化。实例包括但不限于，吖庚因基、吖啶基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并吲哚基、苯并间二氧杂环戊烯基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二氧杂环庚二烯基(dioxepinyl)、1,4-苯并二噁烷基、苯并萘并呋喃基、苯并噁唑基、苯并间二氧杂环戊烯基、苯并二噁英基、苯并吡喃基、苯并吡喃酮基、苯并呋喃基、苯并呋喃酮基、苯并噻吩基(benzothienyl)(苯并噻吩基(benzothiophenyl))、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、咔唑基、噌啉基、二苯并呋喃基、二苯并噻吩基、呋喃基、呋喃酮基、异噻唑基、咪唑基、吲唑基、吲哚基、吲唑基、异吲哚基、二氢吲哚基、异二氢吲哚基、异喹啉基、吲哚嗪基、异噁唑基、二氮杂萘基、噁二唑基、2-氧氮杂卓基、噁唑基、环氧乙烷基、1-氧化吡啶基、1-氧化嘧啶基、1-氧化吡嗪基、1-氧

化哒嗪基、1-苯基-1H-吡咯基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基、二氮杂萘基、喋啶基、嘌呤基、吡咯基、吡唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、喹唑啉基、喹喔啉基、喹啉基、奎宁环基、异喹啉基、四氢喹啉基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基和噻吩基(thiophenyl)(即噻吩基(thienyl))。除非说明书中具体说明,杂芳基可以任选地被取代。

[0149] 所有上述基团可以是取代的或未取代的。本文所用的术语"取代的"意指任何上述基团(即,烃基、亚烃基、烃氧基、烃氧基烃基、烃基羰基、烃氧基羰基、烃基氨基、酰胺基、脒基烃基、脒基烃基羰基、氨基烃基、芳基、芳烃基、芳基羰基、芳氧基羰基、芳烃基羰基、芳烃氧基羰基、芳氧基、环烃基、环烃基烃基、环烃基羰基、环烃基烃基羰基、环烃氧基羰基、胍基烃基、胍基烃基羰基、卤代烃基、杂环基和/或杂芳基)可以被进一步官能化,其中至少一个氢原子被非氢原子取代基的键替代。除非说明书中具体指出,取代基可以包括选自以下的一个或多个取代基:氧、$-CO_2H$、$-CONH_2$、腈、硝基、羟基、硫氧基、烃基、亚烃基、烃氧基、烃氧基烃基、烃基羰基、烃氧基羰基、芳基、芳烃基、芳基羰基、芳氧基羰基、芳烃基羰基、芳烃氧基羰基、芳氧基、环烃基、环烃基烃基、环烃基羰基、环烃基烃基羰基、环烃氧基羰基、杂环基、杂芳基、二烃基胺、芳基胺、烃基芳基胺、二芳基胺、N-氧化物、酰亚胺和烯胺;基团中的硅原子,例如三烃基硅基、二烃基芳基硅基、烃基二芳基硅基、三芳基硅基;全氟烃基或全氟烃氧基,例如三氟甲基或三氟甲氧基。"取代的"还意指任意上述基团,其中一个或多个氢原子被杂原子的更高级的键(例如双键或叁键)取代,所述杂原子例如氧基、羰基、羧基和酯基中的氧;以及例如亚胺、肟、腙和腈的基团中的氮。例如,"取代的"包括任意上述基团,其中一个或多个氢原子被$-NR_gC(=O)NR_gR_h$、$-NR_gC(=O)OR_h$、$-NR_gSO_2R_h$、$-OC(=O)NR_gR_h$、$-OR_g$、$-SR_g$、$-SOR_g$、$-SO_2R_g$、$-OSO_2R_g$、$-SO_2OR_g$、$=NSO_2R_g$和$-SO_2NR_gR_h$取代。"取代的"还意指任意上述基团,其中一个或多个氢原子被$-C(=O)R_g$、$-C(=O)OR_g$、$-CH_2SO_2R_g$、$-CH_2SO_2NR_gR_h$、-SH、$-SR_g$或$-SSR_g$取代。在前述内容中,R_g和R_h是相同或不同的,并独立地为氢、烃基、烃氧基、烃基氨基、硫代烃基、芳基、芳烃基、环烃基、环烃基烃基、卤代烃基、杂环基、N-杂环基、杂环基烃基、杂芳基、N-杂芳基和/或杂芳基烃基。此外,每个前述取代基还可以任选地被一个或多个上述取代基取代。另外,任意上述基团可以被取代以包含一个或多个内部氧原子或硫原子。例如,烃基可以被一个或多个内部氧原子取代以形成醚或多聚醚基团。类似地,烃基可以被一个或多个内部硫原子取代以形成硫醚、二硫化物等。酰胺基部分可以被多达2个卤素原子取代,而其他上述基团可以被一个或多个卤素原子取代。除烃基之外,所有其他基团还可以被氨基或单烃基氨基取代。除烃基和烃基羰基之外,所有其他基团还可以被胍基或脒基取代。任意上述基团的任选的取代基还包括芳基磷酰基,例如$-R_aP(Ar)_3$其中R_a为亚烃基并且Ar为芳基部分,例如苯基。

[0150] 术语"反义寡聚物"或"反义化合物"可交换地使用,并指亚基的序列,每个亚基具有在由核糖或其他戊糖或吗啉基组成的主链亚基上携带的碱基,并且其中所述主链基团通过允许化合物中碱基与核酸(通常为RNA)中靶序列通过沃特森-克里克碱基配对而杂化的亚基间键连接,以在靶序列中形成核酸:寡聚物异源双链。寡聚物可以具有与靶序列精确互补的序列或近似互补的序列。这类反义寡聚物被设计用于阻断或抑制包含靶序列的mRNA的翻译,并且被称为"针对"与其杂化的序列。

[0151] "吗啉代寡聚物"或"PMO"指具有支持碱基的主链的聚合物分子,所述碱基可以氢键结合至典型的多核苷酸,其中所述聚合物缺乏戊糖主链部分,并且更具体地缺乏核苷酸

和核苷的典型的通过磷酸二酯键连接的核糖主链，取而代之的是包含环氮，并通过环氮结合。示例性“吗啉代”寡聚物包含通过(硫代)氨基磷酸酯或(硫代)二氨基磷酸酯键(使一个亚基的吗啉基氮连接于邻近亚基的5’环外碳)连接在一起的吗啉代亚基结构，包含嘌呤或嘧啶碱基配对部分的每个亚基通过碱基特异性氢键有效地结合到多核苷酸中的碱基。吗啉代寡聚物(包括反义寡聚物)在例如，美国专利号5,698,685;5,217,866;5,142,047;5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,521,063;5,506,337和未决的美国专利申请12/271,036;12/271,040;以及PCT申请号WO/2009/064471中详述，并且通过引用将其整体全部并入本文。典型的PMO包括其中亚基间键为键(A1)的PMO。

[0152] “PMO+”指二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物，其包含任意数量的前述(1-哌嗪基)氧亚膦基氧基键、(1-(4-(ω-胍基-酰基))-哌嗪基)氧亚膦基氧基键(A2和A3)(参见，例如PCT公开WO/2008/036127，通过引用将其整体并入本文)。

[0153] “PMO-X”指包含至少一个(B)键或至少一个公开的末端修饰的本文公开的二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物。

[0154] “氨基磷酸酯”基团包含具有3个连接的氧原子和1个连接的氮原子的磷，而“二氨基磷酸酯”基团(参见，例如图1D-E)包含具有2个连接的氧原子和2个连接的氮原子的磷。在本文和共同未决的美国专利申请号61/349,783和11/801,885所述的寡聚物的不带电或修饰的亚基间键中，一个氮总是悬挂在主链上。二氨基磷酸酯键中的第二个氮通常为吗啉环结构的环氮。

[0155] “硫代氨基磷酸酯”或“硫代二氨基磷酸酯”键分别是其中一个氧原子、通常为悬挂在主链上的氧被硫替代的氨基磷酸酯键或二氨基磷酸酯键。

[0156] “亚基间键”指连接两个吗啉代亚基的键，例如结构(I)。

[0157] 本文所用的“带电”、“不带电”、“阳离子的”和“阴离子的”指化学部分在近中性pH值(例如约6-8)时的主要状态。例如，所述术语可以指化学部分在生理pH值、即约7.4时的主要状态。

[0158] “低级烷基”指1至6个碳原子的烷基，例如甲基、乙基、正丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、正戊基以及异戊基。在某些实施方案中，“低级烷基”基团具有1至4个碳原子。在其他实施方案中，“低级烷基”基团具有1至2个碳原子，即甲基或乙基。类似地，“低级烯基”指2至6个、优选3或4个碳原子的烯基，例如丙烯基和丁烯基。

[0159] “非干扰”取代基是不会对本文所述的反义寡聚物与其预期靶结合的能力产生不利影响的取代基。这类取代基包括小的和/或相对非极性的基团，例如甲基、乙基、甲氧基、乙氧基或氟。

[0160] 如果寡聚物与靶标在生理状态下杂化，并伴有大于37°C，大于45°C，优选至少50°C，通常60°C-80°C或更高的Tm，那么寡核苷酸或反义寡聚物与靶多核苷酸“特异性杂化”。寡聚物的“Tm”是寡聚物与互补多核苷酸50%杂化的温度。Tm在生理盐水中的标准条件下确定，例如，描述于Miyada et al,Methods Enzymol.154:94-107(1987)。这类杂化可以通过反义寡聚物与靶序列的“近似”或“基本上”的互补，以及精确互补而发生。

[0161] 当两个单链多核苷酸之间以反平行构型发生杂化时，则多核苷酸被描述为与另一多核苷酸“互补”。互补性(一个多核苷酸与另一个多核苷酸互补的程度)可通过按照通常接受的碱基配对原则，根据相反链中预期互相形成氢键的碱基的比例而定量。

[0162] 如果序列为第一序列的多核苷酸与第二多核苷酸序列在生理条件下结合或特异性杂化，则第一序列为第二序列的“反义序列”。

[0163] 术语“靶向序列”为寡核苷酸类似物中与RNA基因组中靶序列互补(还指基本上互补)的序列。类似物化合物的全部序列或仅一部分可以与靶序列互补。例如，在具有20个碱基的类似物中，仅12-14个为靶向序列。通常，类似物中的连续碱基形成靶向序列，或者非连续序列放置在一起(例如从类似物的相反末端)构成跨越靶序列的序列时，形成靶向序列。

[0164] 当反向平行构型中发生杂化时，靶标和靶向序列被描述为互相“互补”。靶向序列可以具有与靶序列“近似”或“基本上”的互补性，并仍为了本文所述方法的目的而发挥作用，即仍是“互补”的。优选地，本文所述方法中使用的寡核苷酸类似物与超过10个核苷酸的靶序列具有至多1个错配，并优选地与超过20个核苷酸的靶序列具有至多1个错配。或者，利用的反义寡聚物与本文指定的示例性靶向序列具有至少90%同源性，并优选地至少95%序列同源性。为了互补结合RNA靶，并如下文讨论的，鸟嘌呤碱基可以与胞嘧啶或尿嘧啶RNA碱基互补。

[0165] “异源双链体”指寡核苷酸类似物和靶RNA的互补部分之间的双链体。“耐核酸酶的异源双链体”指由反义寡聚物与其互补靶标结合而形成的异源双链体，从而使得异源双链体为基本上耐细胞内或细胞外核酸酶的体内降解，诸如核糖核酸酶(RNAseH)，其能够切割双链的RNA/RNA或RNA/DNA复合物。

[0166] 当制剂可以通过机制而不是被动扩散穿过细胞膜进入细胞时，制剂为“被哺乳动物细胞主动摄取”。例如制剂可例如通过“主动转运”而被转运，意即制剂穿过哺乳动物细胞膜的转运，例如通过ATP依赖的转运机制，或通过“易化转运”，意即反义制剂通过下述转运机制而穿过细胞膜，即所述转运机制需要制剂与转运蛋白结合，然后该转运蛋白使结合的制剂穿过膜的通道变得容易。

[0167] 术语“调节表达”和/或“反义活性”指反义寡聚物通过干扰RNA的表达或翻译而增强或更通常地降低给定蛋白的表达的能力。在降低蛋白表达的情况下，反义寡聚物可以直接阻断给定基因的表达，或促进从该基因转录的RNA的加速降解。本文所述的吗啉代寡聚物被认为通过前一机制(空间阻断)而起作用。空间阻断寡聚物的优选的反义靶包括ATG起始密码子区域、剪接位点、紧密邻近剪接位点的区域以及mRNA的5’非翻译区域，尽管已经使用吗啉代寡聚物成功靶向其他区域。

[0168] “氨基酸亚基”优选地指α-氨基酸残基(-CO-CHR-NH-)；其还可以是β-或其他氨基酸残基(例如-CO-CH_2CHR-NH-)，其中R为氨基酸侧链。

[0169] 术语“天然氨基酸”指存在于自然界中发现的蛋白中的氨基酸。术语“非天然氨基酸”指不存在于自然界中发现的蛋白中的那些氨基酸，实例包括β-丙氨酸(β-Ala)和6-氨基己酸(Ahx)。

[0170] “有效量”或“治疗有效量”指给予哺乳动物个体的反义寡聚物的量(作为单独剂量或一系列剂量的一部分)，其通常通过抑制所选靶核酸序列的翻译而有效地产生所需治疗效果。

[0171] 个体(例如哺乳动物，例如人)或细胞的“治疗”是尝试改变个体或细胞的天然进程而使用的任何类型的介入。治疗包括但不限于，给予药物组合物，并且可预防性地进行或继病理学事件的启动或与病因学因子接触之后而进行。

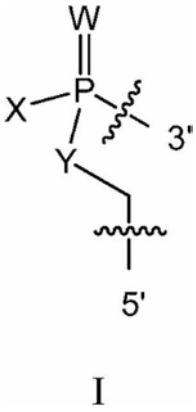
[0172] II.反义寡聚物

[0173] A.具有修饰的亚基间键的寡聚物

[0174] 如上文所述，本公开的一个实施方案涉及包含新的亚基间键的寡聚物。在一些实施方案中，寡聚物具有比相应的未修饰寡聚物更高的针对DNA和RNA的亲和力，并且与具有其他亚基间键的寡聚物相比表现出改善的细胞递送、效能和/或组织分布性质。在一实施方案中，寡聚物包含至少一个上述所定义的(B)型亚基间键。寡聚物还可以包含一个或多个上文所定义的(A)型亚基间键。各种键类型和寡聚物的结构特征和性质在下面讨论中更详细地描述。

[0175] 1.键(A)

[0176] 申请人已经发现可以通过制备具有多种亚基间键的寡聚物来优化反义活性、生物分布和/或其他所需性质的增强。例如，寡聚物可以任选地包含一个或多个(A)型亚基间键，并且在某些实施方案中，寡聚物包含至少一个(A)型键。在一些其他实施方案中，每个(A)型键具有相同的结构。(A)型键可以包括共同拥有的美国专利第7,943,762号所公开的键，通过引用将其整体并入本文。键(A)具有以下结构(I)或其盐或异构体，其中3’和5’分别指吗啉环(即，下文所述结构(i))的3’和5’末端的连接点：

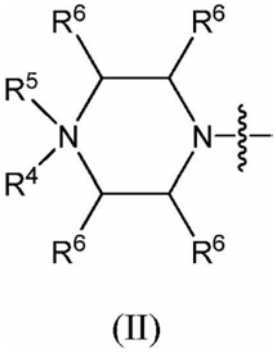
[0177] 

I

[0178] 其中：

[0179] W每次出现时独立地为S或O；

[0180] X每次出现时独立地为$-N(CH_3)_2$，$-NR^1R^2$，$-OR^3$或；

[0181] 

(II)

[0182] Y每次出现时独立地为O或$-NR^2$，

[0183] R^1每次出现时独立地为氢或甲基；

[0184] R^2每次出现时独立地为氢或$-LNR^4R^5R^7$；

[0185] R^3每次出现时独立地为氢或C_1-C_6烃基；

[0186] R^4每次出现时独立地为氢、甲基、$-C(=NH)NH_2$、-Z-L-NHC(=NH)NH_2或-[C(O)CHR’

NH]$_m$H，其中Z为-C(=O)-或直连键，R’为天然氨基酸的侧链或其一个-或两个-碳的同系物，并且m为1至6；

[0187] R^5每次出现时独立地为氢、甲基或电子对；

[0188] R^6每次出现时独立地为氢或甲基；

[0189] R^7每次出现时独立地为氢、C_1-C_6烃基或C_1-C_6烃氧基烃基；以及

[0190] L为任选的长度高达18个原子的连接基团，其包括烃基、烷氧基或烷氨基或者其组合。

[0191] 在一些实例中，寡聚物包含至少1个(A)型键。在一些其他实施方案中，寡聚物包含至少两个连续的(A)型键。在其他实施方案中，寡聚物中至少5%的键为(A)型；例如在一些实施方案中，5%-95%、10%-90%、10%-50%或10%-35%的键可以是(A)型键。在一些具体实施方案中，至少一个(A)型键是-N$(CH_3)_2$。在其他实施方案中，每个(A)型键是-N$(CH_3)_2$。在其他实施方案中，至少一个(A)型键是哌嗪-1-基，例如未取代的哌嗪-1-基(例如，A2或A3)。在其他实施方案中，每个(A)型键是哌嗪-1-基，例如未取代的哌嗪-1-基。

[0192] 在一些实施方案中，W每次出现时独立地为S或O，并且在某些实施方案中W为O。

[0193] 在一些实施方案中，X每次出现时独立地为-N$(CH_3)_2$、-NR^1R^2、-OR^3。在一些实施方案中，X为-N$(CH_3)_2$。在其他方面，X为-NR^1R^2，并且在其他实例中X为-OR^3。

[0194] 在一些实施方案中，R^1每次出现时独立地为氢或甲基。在一些实施方案中，R^1为氢。在其他实施方案中，X为甲基。

[0195] 在一些实施方案中，R^2每次出现时为氢。在一些实施方案中，R^2每次出现时为-L$NR^4R^5R^7$。在一些实施方案中，R^3每次出现时独立地为氢或C_1-C_6烃基。在其他实施方案中，R^3为甲基。在其他实施方案中，R^3为乙基。在一些其他实施方案中，R^3为正丙基或异丙基。在一些其他实施方案中，R^3为C_4烃基。在其他实施方案中，R^3为C_5烃基。在一些实施方案中，R^3为C_6烃基。

[0196] 在某些实施方案中，R^4每次出现时独立地为氢。在其他实施方案中，R^4为甲基。在其他实施方案中，R^4为-C(=NH)NH_2，并且在其他实施方案中，R^4为-Z-L-NHC(=NH)NH_2。在其他实施方案中R^4为-[C(=O)CHR’NH]$_m$H。在一实施方案中Z为-C(=O)-，并且在另一实施方案中Z为直连键。R’为天然氨基酸的侧链。在一些实施方案中，R’为天然氨基酸的侧链的一个-或两个-碳的同系物。

[0197] m为1-6的整数。m可以为1。m可以为2。m可以为3。m可以为4。m可以为5。m可以为6。

[0198] 在一些实施方案中，R^5每次出现时独立地为氢、甲基或电子对。在一些实施方案中，R^5为氢。在其他实施方案中，R^5为甲基。在其他实施方案中，R^5为电子对。

[0199] 在一些实施方案中，R^6每次出现时独立地为氢或甲基。在一些实施方案中，R^6为氢。在其他实施方案中，R^6为甲基。

[0200] 在其他实施方案中，R^7每次出现时独立地为氢、C_1-C_6烃基或C_2-C_6烃氧基烃基。在一些实施方案中，R^7为氢。在其他实施方案中，R^7为C_1-C_6烃基。在其他实施方案中，R^7为C_2-C_6烃氧基烃基。在其他实施方案中，R^7为甲基。在其他实施方案中，R^7为乙基。在其他实施方案中，R^7为正丙基或异丙基。在一些其他实施方案中，R^7为C_4烃基。在一些实施方案中，R^7为C_5烃基。在一些实施方案中，R^7为C_6烃基。在其他实施方案中，R^7为C_2烃氧基烃基。在其他实施方案中，R^7为C_3烃氧基烃基。在其他实施方案中，R^7为C_4烃氧基烃基。在一些实施方案中，R^7为C_5烃

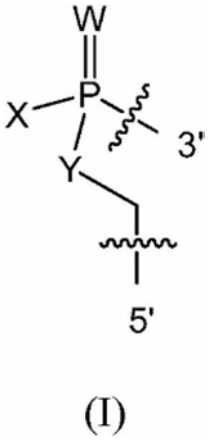
氧基烃基。在其他实施方案中，R^7为C_6烃氧基烃基。

[0201] 如上文所述，连接体基团L在其主链中包含选自烃基(例如-CH_2-CH_2-)、烃氧基(-C-O-C-)以及烃基氨基(例如-CH_2-NH-)的键，条件是L中的端原子(例如邻近羰基或氮的那些)为碳原子。尽管支链键(例如-CH_2-$CHCH_3$-)是可能的，连接子通常为无支链的。在一实施方案中，连接子为碳氢化合物连接基团。此类连接子可具有结构$(CH_2)_n$-，其中n为1-12，优选2-8并且更优选2-6。

[0202] 提供了具有任何数量的(A)型键的寡聚物。在一些实施方案中，寡聚物不包含(A)型键。在某些实施方案中，百分之5、10、20、30、40、50、60、70、80或90的键为(A)键。在选择的实施方案中，百分之10-80、20-80、20-60、20-50、20-40或20-35的键为(A)键。

[0203] 2.键B

[0204] 在一些实施方案中，寡聚物包含至少一个(B)型键。例如，寡聚物可以包含1、2、3、4、5、6或更多个(B)型键。(B)型键可以邻近或散布在整个寡聚物。(B)型键具有以下结构(I)或其盐或异构体：

[0205] 

(I)

[0206] 其中：

[0207] W每次出现时独立地为S或O；

[0208] X每次出现时独立地为-NR^8R^9或-OR^3；并且

[0209] Y每次出现时独立地为O或-NR^{10}，

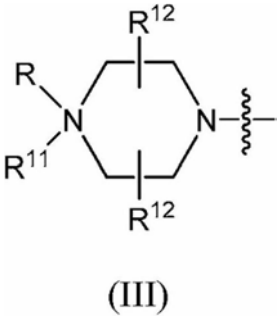
[0210] R^3每次出现时独立地为氢或C_1-C_6烃基；

[0211] R^8每次出现时独立地为氢或C_2-C_{12}烃基；

[0212] R^9每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}芳烃基或芳基；

[0213] R^{10}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烷基或-$LNR^4R^5R^7$；

[0214] 其中R^8和R^9可以连接以形成5-18元单环或二环杂环，或者R^8、R^9或R^3可以与R^{10}连接以形成5-7元杂环，并且其中当X为4-哌嗪基时，X具有以下结构(III)：

[0215] 

(III)

[0216] 其中：

[0217] R^{11}每次出现时独立地为C_2-C_{12}烃基、C_1-C_{12}氨基烃基、C_1-C_{12}烃基羰基、芳基、杂芳基或杂环基；

[0218] R每次出现时独立地为电子对、氢或C_1-C_{12}烃基；以及

[0219] R^{12}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}氨基烃基、-NH_2、-$CONH_2$、-$NR^{13}R^{14}$、-$NR^{13}R^{14}R^{15}$、C_1-C_{12}烃基羰基、氧、-CN、三氟甲基、酰胺基、脒基、脒基烃基、脒基烃基羧基、胍基、胍基烃基、胍基烃基羰基、胆酸酯、脱氧胆酸酯、芳基、杂芳基、杂环基、-SR^{13}、或C_1-C_{12}烃氧基，其中R^{13}、R^{14}和R^{15}每次出现时独立地为C_1-C_{12}烃基。

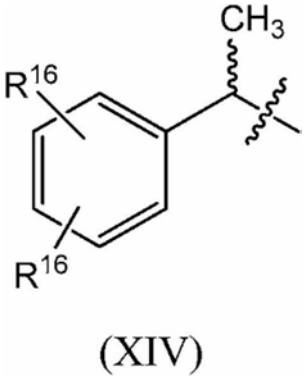
[0220] 在一些实例中，寡聚物包含一个(B)型键。在一些其他实施方案中，寡聚物包含两个(B)型键。在一些其他实施方案中，寡聚物包含三个(B)型键。在一些其他实施方案中，寡聚物包含四个(B)型键。在其他实施方案中，(B)型键是连续的(即，B型键互相邻近)。在其他实施方案中，寡聚物中至少5%的键为(B)型；例如在一些实施方案中，5%-95%、10%-90%、10%-50%或10%-35%的键可以是(B)型键。

[0221] 在其他实施方案中，R^3每次出现时独立地为氢或C_1-C_6烃基。在其他实施方案中，R^3可以为甲基。在一些实施方案中，R^3可以为乙基。在一些其他实施方案中，R^3可以为正丙基或异丙基。在其他实施方案中，R^3可以为C_4烃基。在一些实施方案中，R^3可以为C_5烃基。在一些实施方案中，R^3可以为C_6烃基。

[0222] 在一些实施方案中，R^8每次出现时独立地为氢或C_2-C_{12}烃基。在一些实施方案中，R^8为氢。在其他实施方案中，R^8为乙基。在一些其他实施方案中，R^8为正丙基或异丙基。在一些实施方案中，R^8为C_4烃基。在其他实施方案中，R^8为C_5烃基。在其他实施方案中，R^8为C_6烃基。在一些实施方案中，R^8为C_7烃基。在其他实施方案中，R^8为C_8烃基。在其他实施方案中，R^8为C_9烃基。在其他实施方案中，R^8为C_{10}烃基。在一些其他实施方案中，R^8为C_{11}烃基。在其他实施方案中，R^8为C_{12}烃基。在一些实施方案中，R^8为C_2-C_{12}烃基，并且所述C_2-C_{12}烃基包含一个或多个双键(例如烯烃)、叁键(例如炔烃)或以上二者。在一些实施方案中，R^8为未取代的C_2-C_{12}烃基。

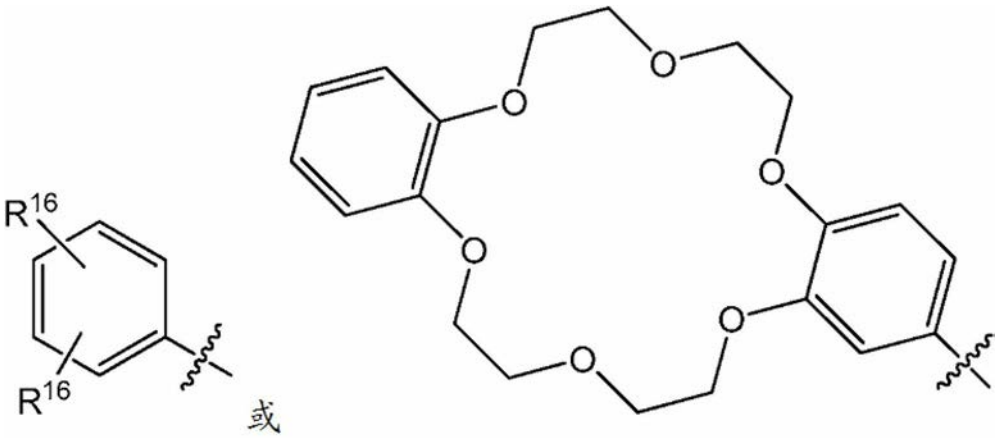
[0223] 在一些实施方案中，R^9每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}芳烃基或芳基。在一些实施方案中，R^9为氢。在其他实施方案中，R^9为C_1-C_{12}烃基。在其他实施方案中，R^9为甲基。在其他实施方案中，R^9为乙基。在一些其他实施方案中，R^9为正丙基或异丙基。在一些实施方案中，R^9为C_4烃基。在一些实施方案中，R^9为C_5烃基。在其他实施方案中，R^9为C_6烃基。在一些其他实施方案中，R^9为C_7烃基。在一些实施方案中，R^9为C_8烃基。在一些实施方案中，R^9为C_9烃基。在一些其他实施方案中，R^9为C_{10}烃基。在一些其他实施方案中，R^9为C_{11}烃基。在其他实施方案中，R^9为C_{12}烃基。

[0224] 在一些其他实施方案中，R^9为C_1-C_{12}芳烃基。例如，在一些实施方案中，R^9为苄基，并且所述苄基可以在苯基环或苄基碳上任选地被取代。在这方面，取代基包括烃基和烃氧基，例如甲基或甲氧基。在一些实施方案中，苄基被甲基在苄基碳上取代。例如，在一些实施方案中，R^9具有以下结构(XIV)：

[0225] 

(XIV)

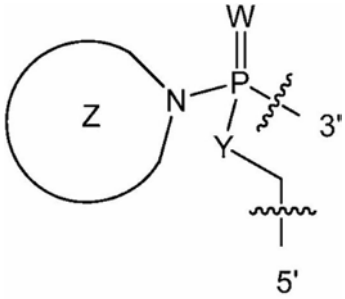
[0226] 在其他实施方案中，R^9为芳基。例如，在一些实施方案中，R^9为苯基，并且所述苯基可以被任选地取代。在这方面，取代基包括烃基和烃氧基，例如甲基或甲氧基。在其他实施方案中，R^9为苯基并且所述苯基包含冠醚部分，例如12-18元冠醚。在一实施方案中，冠醚为18元的并且还可以包含额外的苯基部分。例如，在一实施方案中，R^9具有以下结构(XV)或(XVI)之一：

[0227] 

(XV) (XVI)

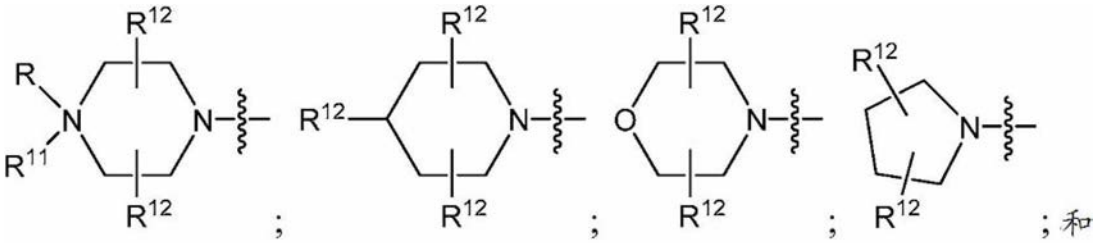
[0228] 在一些实施方案中，R^{10}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基或-LN$R^4R^5R^7$，其中R^4、R^5和R^7为上文(A)键所定义的那样。在其他实施方案中，R^{10}为氢。在其他实施方案中，R^{10}为C_1-C_{12}烃基，并且在其他实施方案中，R^{10}为-LN$R^4R^5R^7$。在一些实施方案中，R^{10}为甲基。在其他实施方案中，R^{10}为乙基。在一些实施方案中，R^{10}为C_3烃基。在一些实施方案中，R^{10}为C_4烃基。在其他实施方案中，R^{10}为C_5烃基。在一些其他实施方案中，R^{10}为C_6烃基。在其他实施方案中，R^{10}为C_7烃基。在其他实施方案中，R^{10}为C_8烃基。在一些实施方案中，R^{10}为C_9烃基。在其他实施方案中，R^{10}为C_{10}烃基。在其他实施方案中，R^{10}为C_{11}烃基。在一些其他实施方案中，R^{10}为C_{12}烃基。

[0229] 在一些实施方案中，R^8和R^9结合形成5-18元单环或二环杂环。在一些实施方案中，所述杂环为5元或6元的单环杂环。例如，在一些实施方案中，(B)键具有以下结构(IV)：

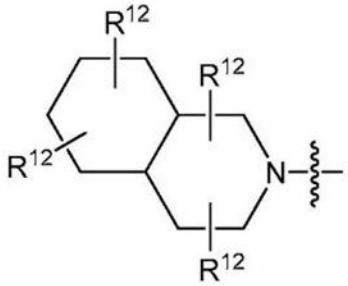
[0230] 

(IV)

[0231] 在其他实施方案中，杂环为双环，例如12元双环杂环。杂环可以为哌嗪基。杂环可以为吗啉基。杂环可以为哌啶基。杂环可以为十氢异喹啉。典型的杂环包括以下：



(III) (V) (VI) (VII)

[0232] 

(VIII)

[0233] 在一些实施方案中，R^{11}每次出现时独立地为C_2-C_{12}烃基、C_1-C_{12}氨基烃基、芳基、杂芳基或杂环基。

[0234] 在一些实施方案中，R^{11}为C_2-C_{12}烃基。在一些实施方案中，R^{11}为乙基。在一些实施方案中，R^{11}为C_3烃基。在其他实施方案中，R^{11}为异丙基。在一些其他实施方案中，R^{11}为C_4烃基。在其他实施方案中，R^{11}为C_5烃基。在一些实施方案中，R^{11}为C_6烃基。在其他实施方案中，R^{11}为C_7烃基。在一些实施方案中，R^{11}为C_8烃基。在其他实施方案中，R^{11}为C_9烃基。在其他实施方案中，R^{11}为C_{10}烃基。在一些其他实施方案中，R^{11}为C_{11}烃基。在一些实施方案中，R^{11}为C_{12}烃基。

[0235] 在其他实施方案中，R^{11}为C_1-C_{12}氨基烃基。在一些实施方案中，R^{11}为甲氨基。在一些实施方案中，R^{11}为乙氨基。在其他实施方案中，R^{11}为C_3氨基烃基。在其他实施方案中，R^{11}为C_4氨基烃基。在一些其他实施方案中，R^{11}为C_5氨基烃基。在其他实施方案中，R^{11}为C_6氨基烃基。在其他实施方案中，R^{11}为C_7氨基烃基。在一些实施方案中，R^{11}为C_8氨基烃基。在其他实施方案中，R^{11}为C_9氨基烃基。在其他实施方案中，R^{11}为C_{10}氨基烃基。在一些其他实施方案

中，R^{11}为C_{11}氨基烃基。在其他实施方案中，R^{11}为C_{12}氨基烃基。

[0236] 在其他实施方案中，R^{11}为C_1-C_{12}烃基羰基。在其他实施方案中，R^{11}为C_1烃基羰基。在其他实施方案中，R^{11}为C_2烃基羰基。在一些实施方案中，R^{11}为C_3烃基羰基。在其他实施方案中，R^{11}为C_4烃基羰基。在一些实施方案中，R^{11}为C_5烃基羰基。在一些其他实施方案中，R^{11}为C_6烃基羰基。在其他实施方案中，R^{11}为C_7烃基羰基。在其他实施方案中，R^{11}为C_8烃基羰基。在一些实施方案中，R^{11}为C_9烃基羰基。在其他实施方案中，R^{11}为C_{10}烃基羰基。在一些其他实施方案中，R^{11}为C_{11}烃基羰基。在一些实施方案中，R^{11}为C_{12}烃基羰基。在其他实施方案中，R^{11}为-C(=O)$(CH_2)_nCO_2H$，其中n为1-6。例如，在一些实施方案中，n为1。在其他实施方案中，n为2。在其他实施方案中，n为3。在一些其他实施方案中，n为4。在其他实施方案中，n为5。在其他实施方案中，n为6。

[0237] 在其他实施方案中，R^{11}为芳基。例如，在一些实施方案中，R^{11}为苯基。在一些实施方案中，苯基被取代，例如被硝基取代。

[0238] 在其他实施方案中，R^{11}为杂芳基。例如，在一些实施方案中，R^{11}为吡啶基。在其他实施方案中，R^{11}为嘧啶基。

[0239] 在其他实施方案中，R^{11}为杂环基。例如，在一些实施方案中，R^{11}为哌啶基，例如哌啶-4-基。

[0240] 在一些实施方案中，R^{11}为乙基、异丙基、哌啶基、嘧啶基、胆酸酯、脱氧胆酸酯或-C(=O)$(CH_2)_nCO_2H$，其中n为1-6。

[0241] 在一些实施方案中，R为电子对。在其他实施方案中，R为氢，并且在其他实施方案中，R为C_1-C_{12}烃基。在一些实施方案中，R为甲基。在一些实施方案中，R为乙基。在其他实施方案中，R为C_3烃基。在其他实施方案中，R为异丙基。在一些其他实施方案中，R为C_4烃基。在其他实施方案中，R为C_5烃基。在一些实施方案中，R为C_6烃基。在其他实施方案中，R为C_7烃基。在其他实施方案中，R为C_8烃基。在其他实施方案中，R为C_9烃基。在一些实施方案中，R为C_{10}烃基。在其他实施方案中，R为C_{11}烃基。在一些实施方案中，R为C_{12}烃基。

[0242] 在一些实施方案中，R^{12}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}氨基烃基、-NH_2、-$CONH_2$、-$NR^{13}R^{14}$、-$NR^{13}R^{14}R^{15}$、氧、-CN、三氟甲基、酰胺基、脒基、脒基烃基、脒基烃基羰基、胍基、胍基烃基、胍基烃基羰基、胆酸酯、脱氧胆酸酯、芳基、杂芳基、杂环、-SR^{13}或C_1-C_{12}烃氧基，其中R^{13}、R^{14}和R^{15}每次出现时独立地为C_1-C_{12}烃基。

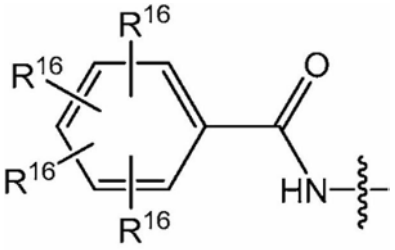
[0243] 在一些实施方案中，R^{12}为氢。在一些实施方案中，R^{12}为C_1-C_{12}烃基。在一些实施方案中，R^{12}为C_1-C_{12}氨基烃基。在一些实施方案中，R^{12}为-NH_2。在一些实施方案中，R^{12}为-$CONH_2$。在一些实施方案中，R^{12}为-$NR^{13}R^{14}$。在一些实施方案中，R^{12}为-$NR^{13}R^{14}R^{15}$。在一些实施方案中，R^{12}为C_1-C_{12}烃基羰基。在一些实施方案中，R^{12}为氧。在一些实施方案中，R^{12}为-CN。在一些实施方案中，R^{12}为三氟甲基。在一些实施方案中，R^{12}为酰胺基。在一些实施方案中，R^{12}为脒基。在一些实施方案中，R^{12}为脒基烃基。在一些实施方案中，R^{12}为脒基烃基羰基。在一些实施方案中，R^{12}为胍基、例如单甲基胍基或二甲基胍基。在一些实施方案中，R^{12}为胍基烃基。在一些实施方案中，R^{12}为脒基烃基羰基。在一些实施方案中，R^{12}为胆酸酯。在一些实施方案中，R^{12}为脱氧胆酸酯。在一些实施方案中，R^{12}为芳基。在一些实施方案中，R^{12}为杂芳基。在一些实施方案中，R^{12}为杂环。在一些实施方案中，R^{12}为-SR^{13}。在一些实施方案中，R^{12}为C_1-C_{12}烃氧基。在一些实施方案中，R^{12}为二甲胺。

[0244] 在其他实施方案中，R^{12}为甲基。在其他实施方案中，R^{12}为乙基。在一些实施方案中，R^{12}为C_3烃基。在一些实施方案中，R^{12}为异丙基。在一些实施方案中，R^{12}为C_4烃基。在其他实施方案中，R^{12}为C_5烃基。在其他实施方案中，R^{12}为C_6烃基。在一些其他实施方案中，R^{12}为C_7烃基。在一些实施方案中，R^{12}为C_8烃基。在其他实施方案中，R^{12}为C_9烃基。在一些实施方案中，R^{12}为C_{10}烃基。在其他实施方案中，R^{12}为C_{11}烃基。在其他实施方案中，R^{12}为C_{12}烃基。在其他实施方案中，烃基部分被一个或多个氧原子取代以形成酯部分，例如甲氧基甲基部分。

[0245] 在一些实施方案中，R^{12}为甲基氨基。在其他实施方案中，R^{12}为乙基氨基。在其他实施方案中，R^{12}为C_3氨基烃基。在一些实施方案中，R^{12}为C_4氨基烃基。在其他实施方案中，R^{12}为C_5氨基烃基。在一些其他实施方案中，R^{12}为C_6氨基烃基。在一些实施方案中，R^{12}为C_7氨基烃基。在一些实施方案中，R^{12}为C_8氨基烃基。在其他实施方案中，R^{12}为C_9氨基烃基。在一些其他实施方案中，R为C_{10}氨基烃基。在其他实施方案中，R^{12}为C_{11}氨基烃基。在其他实施方案中，R^{12}为C_{12}氨基烃基。在一些实施方案中，氨基烃基为二甲基氨基烃基。

[0246] 在其他实施方案中，R^{12}为乙酰基。在一些其他实施方案中，R^{12}为C_2烃基羰基。在一些实施方案中，R^{12}为C_3烃基羰基。在其他实施方案中，R^{12}为C_4烃基羰基。在一些实施方案中，R^{12}为C_5烃基羰基。在其他实施方案中，R^{12}为C_6烃基羰基。在一些其他实施方案中，R^{12}为C_7烃基羰基。在一些实施方案中，R^{12}为C_8烃基羰基。在其他实施方案中，R^{12}为C_9烃基羰基。在一些其他实施方案中，R^{12}为C_{10}烃基羰基。在一些实施方案中，R^{12}为C_{11}烃基羰基。在其他实施方案中，R^{12}为C_{12}烃基羰基。烃基羰基被羧基部分取代，例如烃基羰基被取代以形成琥珀酸部分(即，3-羧基烃基羰基)。在其他实施方案中，烃基羰基被端-SH基团取代。

[0247] 在一些实施方案中，R^{12}为酰胺基。在一些实施方案中，酰胺基包含被进一步取代的烃基部分，例如用-SH、氨基甲酸酯或其组合取代。在其他实施方案中，酰胺基被芳基部分取代，例如苯基。在某些实施方案中，R^{12}可以具有以下机构(IX)：

[0248] 

(IX)

[0249] 其中R^{16}每次出现时独立地为氢、C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}烃氧基、-CN、芳基或杂芳基。

[0250] 在一些实施方案中，R^{12}为甲氧基。在其他实施方案中，R^{12}为乙氧基。在其他实施方案中，R^{12}为C_3烃氧基。在一些实施方案中，R^{12}为C_4烃氧基。在一些实施方案中，R^{12}为C_5烃氧基。在一些其他实施方案中，R^{12}为C_6烃氧基。在其他实施方案中，R^{12}为C_7烃氧基。在一些其他实施方案中，R^{12}为C_8烃氧基。在一些实施方案中，R^{12}为C_9烃氧基。在其他实施方案中，R^{12}为C_{10}烃氧基。在一些实施方案中，R为C_{11}烃氧基。在其他实施方案中，R为C_{12}烃氧基。

[0251] 在某些实施方案中，R^{12}为吡咯烷基，例如吡咯烷-1-基。在其他实施方案中，R^{12}为哌啶基，例如哌啶-1-基或哌啶-4-基。在其他实施方案中，R^{12}为吗啉基，例如吗啉基-4-基。在其他实施方案中，R^{12}为苯基，并且在其他实施方案中，苯基是被取代的，例如被硝基取代。在其他实施方案中，R^{12}为嘧啶基，例如嘧啶-2-基。

[0252] 在其他实施方案中，R^{13}、R^{14}和R^{15}每次出现时独立地为C_1-C_{12}烃基。在一些实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为甲基。在其他实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为乙基。在其他实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为C_3烃基。在其他实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为异丙基。在其他实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为C_4烃基。在一些实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为C_5烃基。在一些其他实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为C_6烃基。在其他实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为C_7烃基。在其他实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为C_8烃基。在其他实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为C_9烃基。在一些实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为C_{10}烃基。在一些实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为C_{11}烃基。在其他实施方案中，R^{13}、R^{14}或R^{15}为C_{12}烃基。

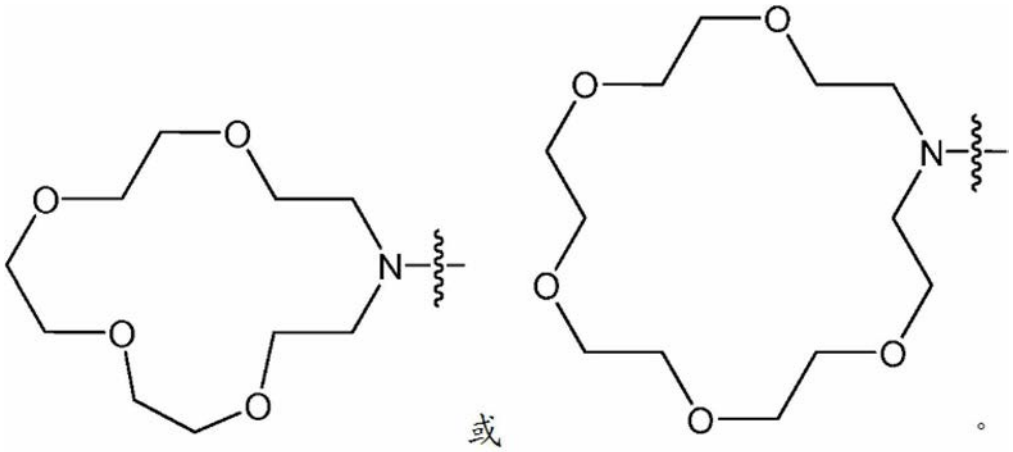
[0253] 如上文所述，在一些实施方案中，R^{12}为被芳基部分取代的酰胺基。在这种情况下，R^{16}每次出现时可以是相同的或不同的。在某些这些实施方案中，R^{16}为氢。在其他实施方案中，R^{16}为-CN。在其他实施方案中，R^{16}为杂芳基，例如四唑基。在某些其他实施方案中，R^{16}为甲氧基。在其他实施方案中，R^{16}为芳基，并且芳基任选地被取代。在这方面，任选的取代基包括：C_1-C_{12}烃基、C_1-C_{12}烃氧基，例如甲氧基；三氟甲氧基；卤素，例如氯；以及三氟甲基。

[0254] 在其他实施方案中，R^{16}为甲基。在其他实施方案中，R^{16}为乙基。在一些实施方案中，R^{16}为C_3烃基。在一些其他实施方案中，R^{16}为异丙基。在其他实施方案中，R^{16}为C_4烃基。在其他实施方案中，R^{16}为C_5烃基。在其他实施方案中，R^{16}为C_6烃基。在一些其他实施方案中，R^{16}为C_7烃基。在一些实施方案中，R^{16}为C_8烃基。在其他实施方案中，R^{16}为C_9烃基。在一些其他实施方案中，R^{16}为C_{10}烃基。在其他实施方案中，R^{16}为C_{11}烃基。在一些其他实施方案中，R^{16}为C_{12}烃基。

[0255] 在一些实施方案中，R^{16}为甲氧基。在一些实施方案中，R^{16}为乙氧基。在其他实施方案中，R^{16}为C_3烃氧基。在一些其他实施方案中，R^{16}为C_4烃氧基。在其他实施方案中，R^{16}为C_5烃氧基。在一些其他实施方案中，R^{16}为C_6烃氧基。在其他实施方案中，R^{16}为C_7烃氧基。在一些其他实施方案中，R^{16}为C_8烃氧基。在其他实施方案中，R^{16}为C_9烃氧基。在一些其他实施方案中，R^{16}为C_{10}烃氧基。在一些实施方案中，R^{16}为C_{11}烃氧基。在一些其他实施方案中，R^{16}为C_{12}烃氧基。

[0256] 在一些其他实施方案中，R^8和R^9结合以形成12-18元冠醚。例如，在一些实施方案中，冠醚为18元的，并且在其他实施方案中，冠醚为15元的。在某些实施方案中，R^8和R^9结合以形成具有以下结构(X)或(XI)之一的杂环：

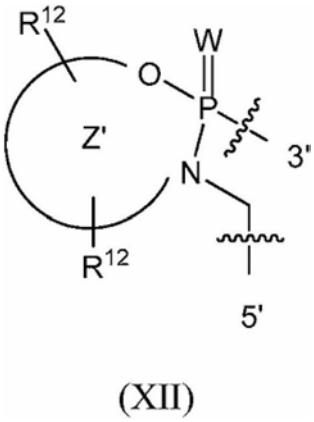
[0257]



(X) (XI)

[0258] 在一些实施方案中，R^8、R^9或R^3与R^{10}结合以形成5-7元杂环。例如，在一些实施方案中，R^3与R^{10}结合以形成5-7元杂环。在一些实施方案中，杂环为5元的。在其他实施方案中，杂环为6元的。在其他实施方案中，杂环为7元的。在一些实施方案中，杂环由以下结构(XII)表示：

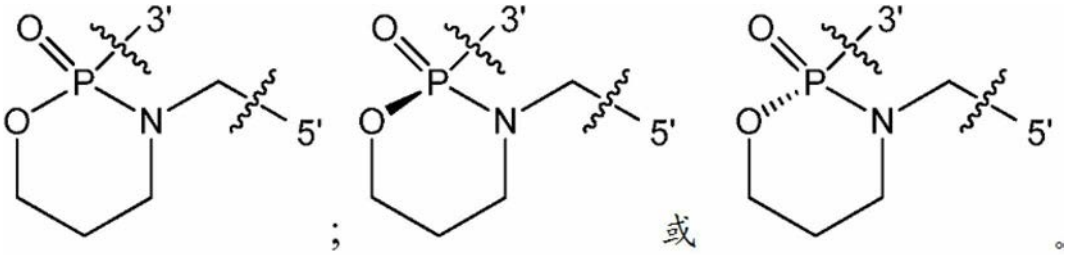
[0259]



(XII)

[0260] 其中Z'表示5-7元杂环。在结构(XI)的某些实施方案中，R^{12}每次出现时为氢。例如，键(B)可以具有以下结构(B1)、(B2)或(B3)之一：

[0261]



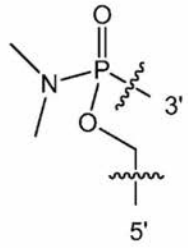
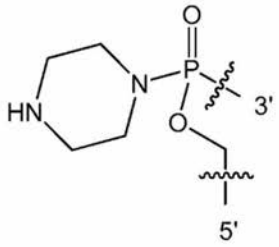
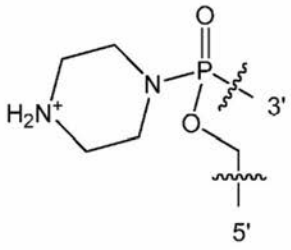
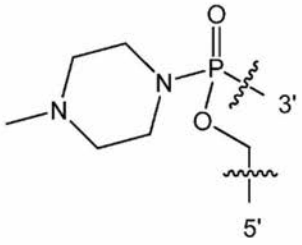
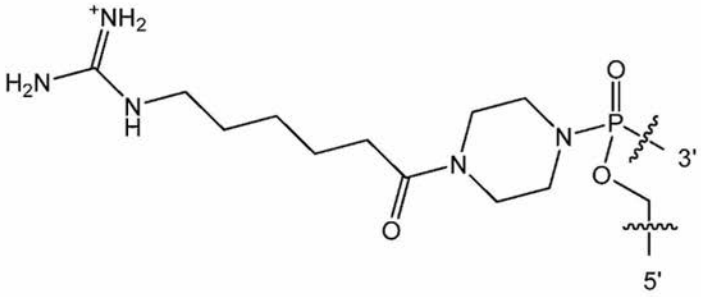
(B1) (B2) (B3)

[0262] 在某些其他实施方案中，R^{12}为C_1-C_{12}烃基羰基或酰胺基，其被芳基磷酰基部分进一步取代，例如被三苯基磷酰基部分取代。具有该结构的键的实例包括B56和B55。

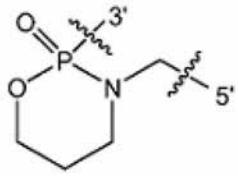
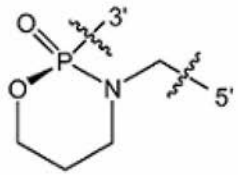
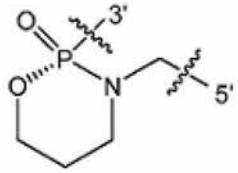
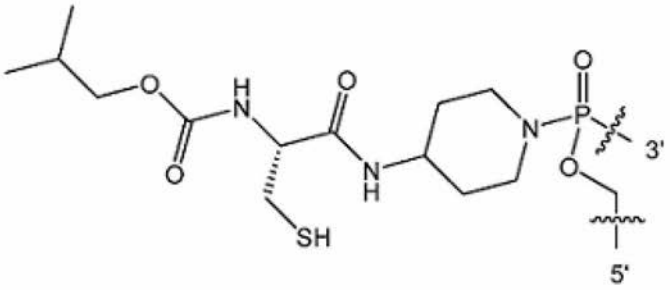
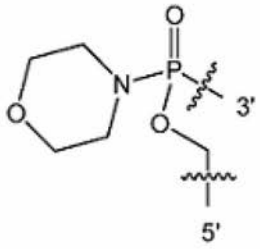
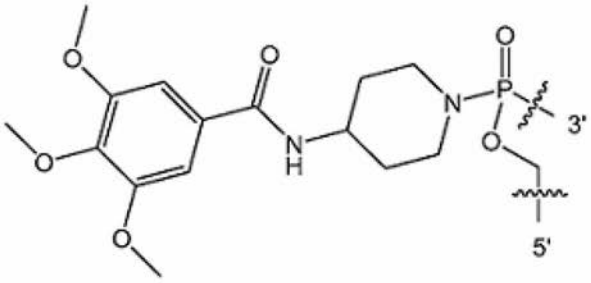
[0263] 在某些实施方案中，键(B)不具有结构A1-A5的任何一种。表1示出典型的(A)型键和(B)型键。

[0264] 表1.典型的亚基间键

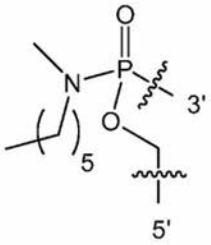
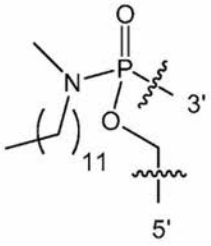
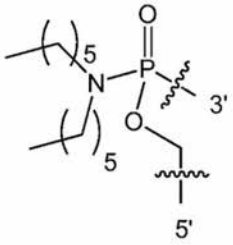
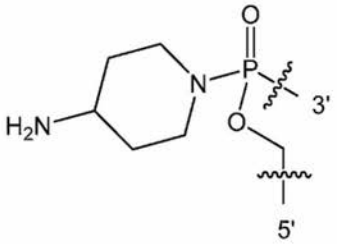
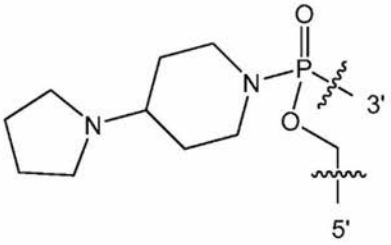
[0265]

No.	名称	结构
A1	PMO	
A2	PMO^{+} (描述了未质子化的形式)	
A3	PMO^{+} (+)	
A4	PMO^{mepip} (m+)	
A5	PMO^{GUX}	

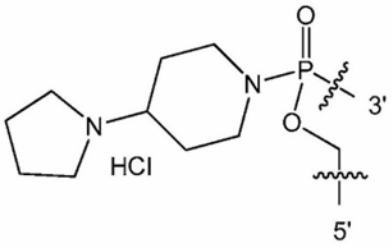
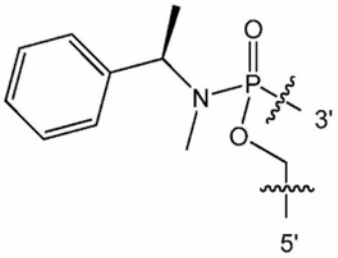
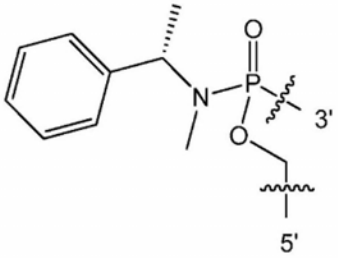
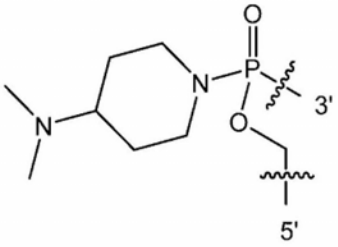
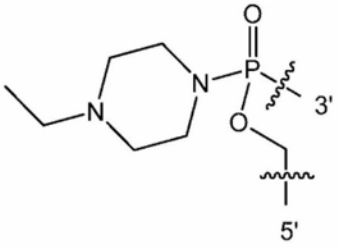
[0266]

No.	名称	结构
B1	PMO^{cp}	
B2	PMO^{cps}	
B3	PMO^{cpr}	
B4	PMO^{Shc}	
B5	$PMO^{吗啉基}$ (m)	
B6	PMO^{tri} (t)	

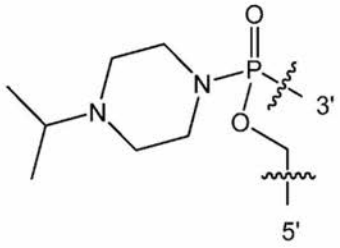
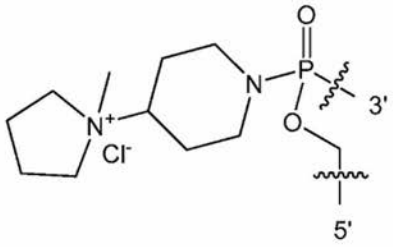
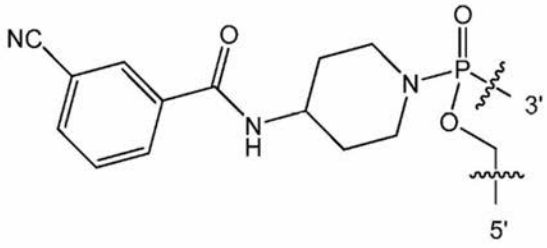
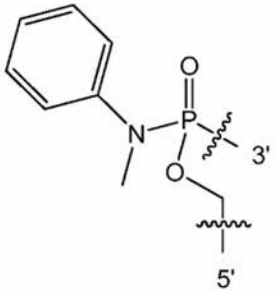
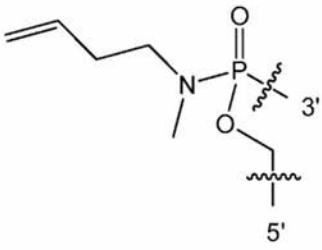
[0267]

No.	名称	结构
B7	PMO^{hex} (h)	
B8	PMO^{dodec}	
B9	PMO^{dihex}	
B10	PMO^{apn} (a)	
B11	PMO^{pyr} (p)	

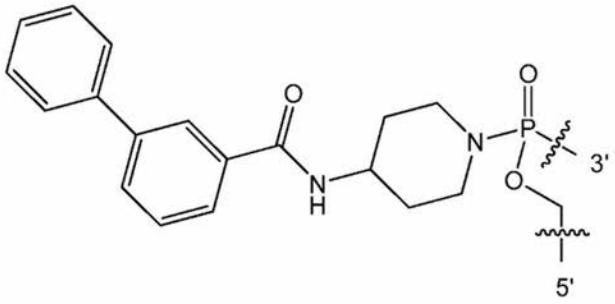
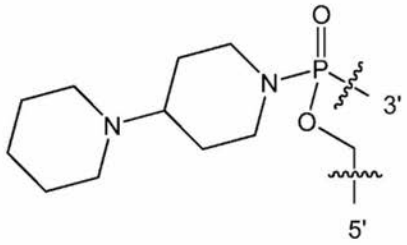
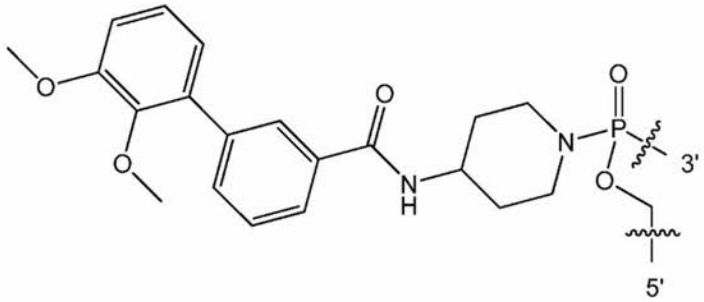
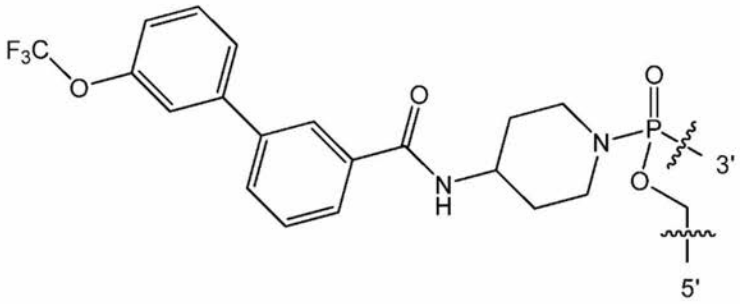
[0268]

No.	名称	结构
B12	PMO^{pyr} (HCl 盐)	
B13	PMO^{rba}	
B14	PMO^{sba}	
B15	$PMO^{dimethylapn}$	
B16	PMO^{etpip}	

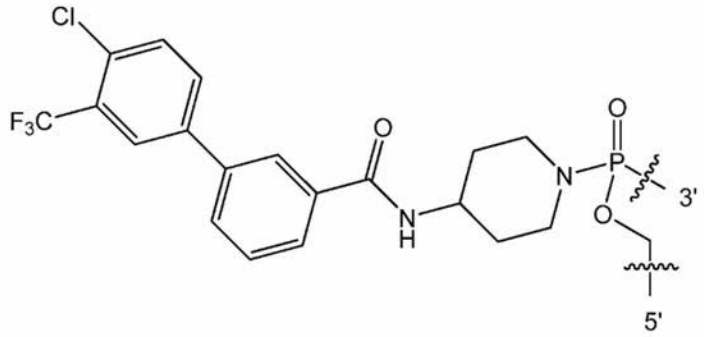
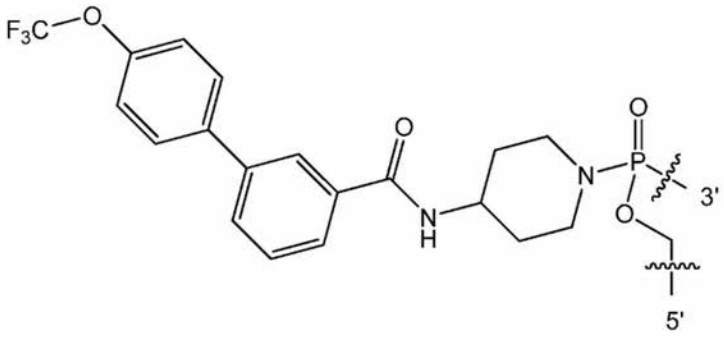
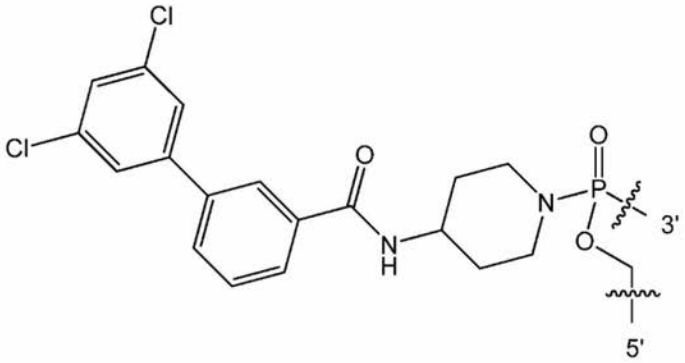
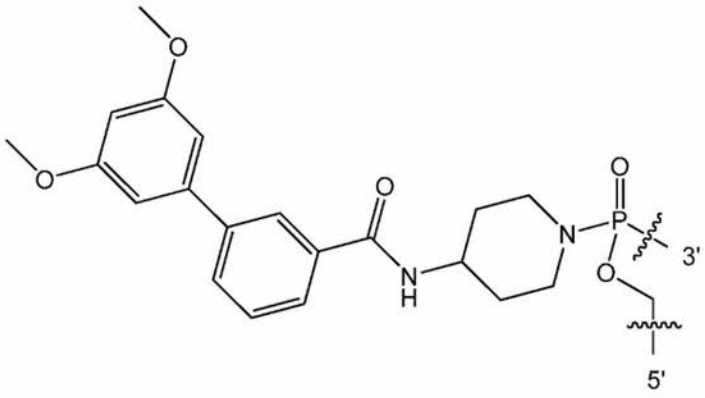
[0269]

No.	名称	结构
B17	PMO^{iprpip}	
B18	PMO^{pyrQMe}	
B19	PMO^{cb}	
B20	PMO^{ma}	
B21	PMO^{bu}	

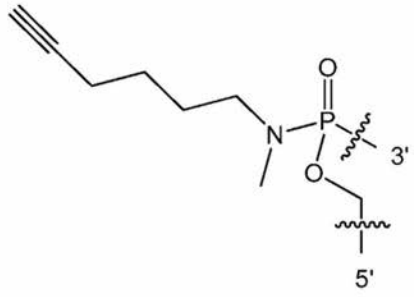
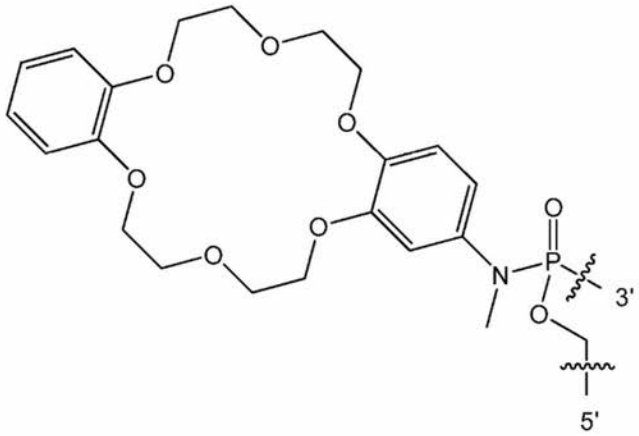
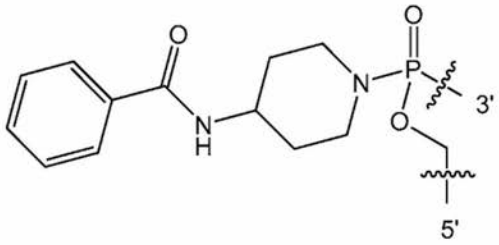
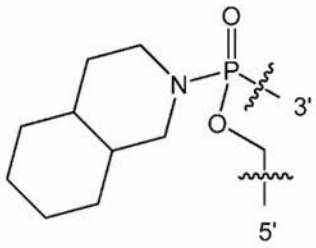
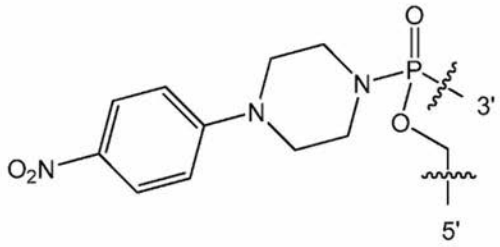
[0270]

No.	名称	结构
B22	PMO^{bi}	
B23	PMO^{pip}	
B24	PMO^{odmb}	
B25	PMO^{tfb}	

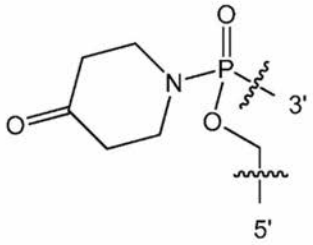
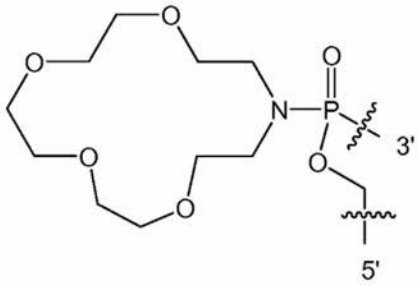
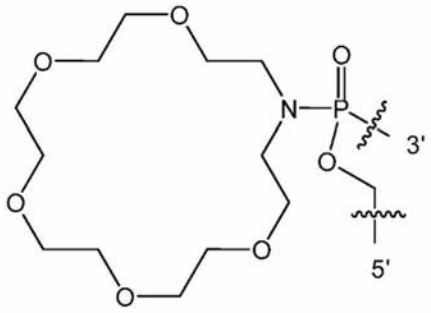
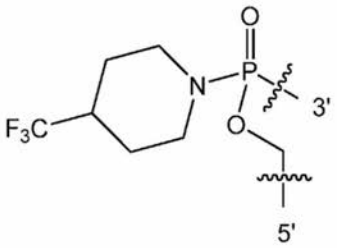
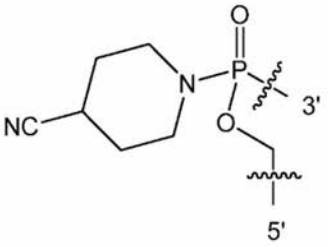
[0271]

No.	名称	结构
B26	PMO^{ctfb}	
B27	PMO^{ptfb}	
B28	PMO^{dcb}	
B29	PMO^{dmb}	

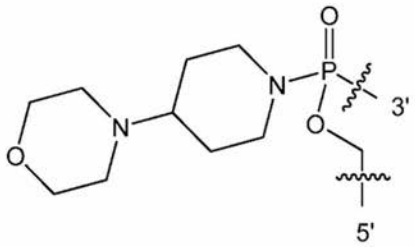
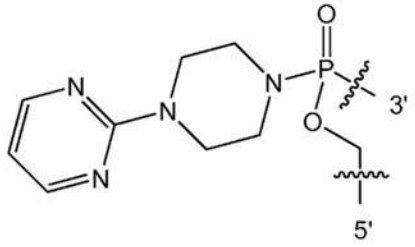
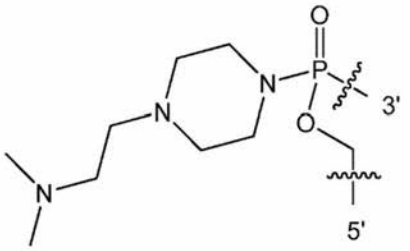
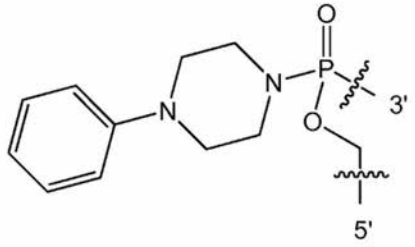
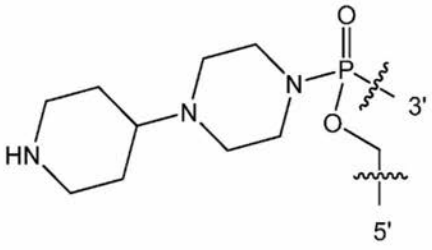
[0272]

No.	名称	结构
B30	PMO^{hy}	
B31	PMO^{6ce}	
B32	PMO^{b}	
B33	PMO^{q}	
B34	PMO^{npp}	

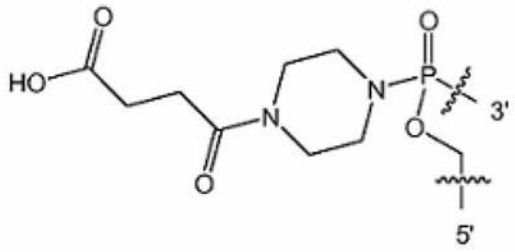
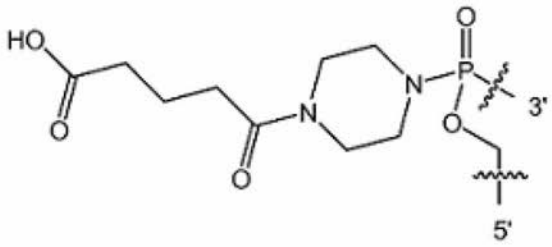
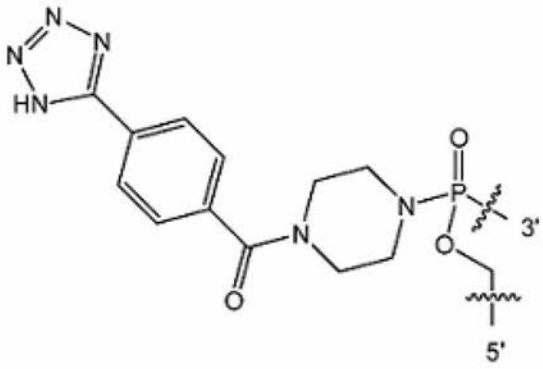
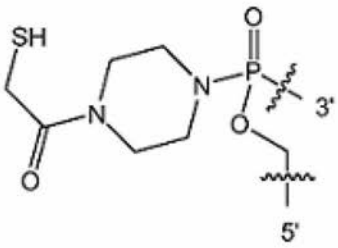
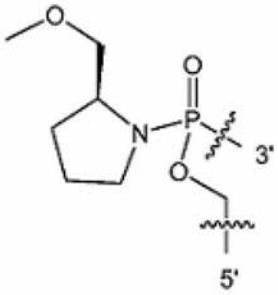
[0273]

No.	名称	结构
B35	PMO^{o}	
B36	PMO^{4ce}	
B37	PMO^{5ce}	
B38	PMO^{f3p}	
B39	PMO^{cyp}	

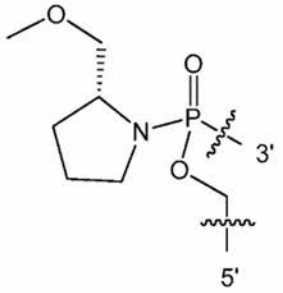
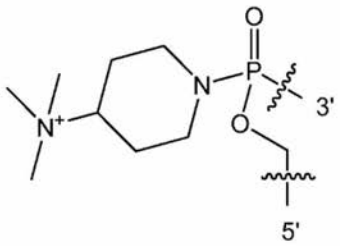
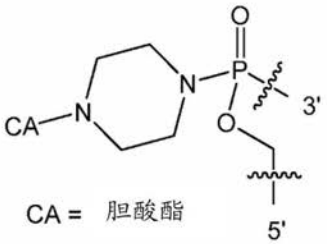
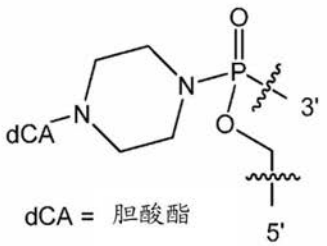
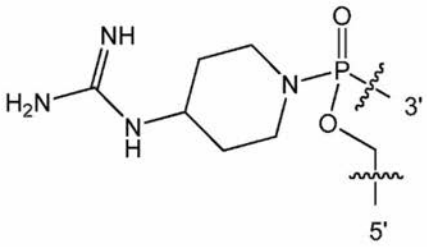
[0274]

No.	名称	结构
B40	PMO^{mop}	
B41	PMO^{pp}	
B42	PMO^{dmepip}	
B43	PMO^{NPpip}	
B44	PMO^{bipip}	

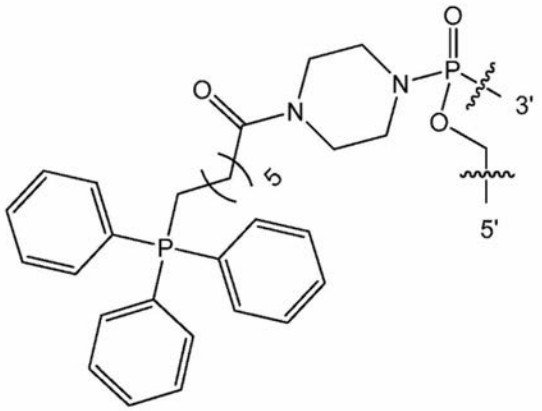
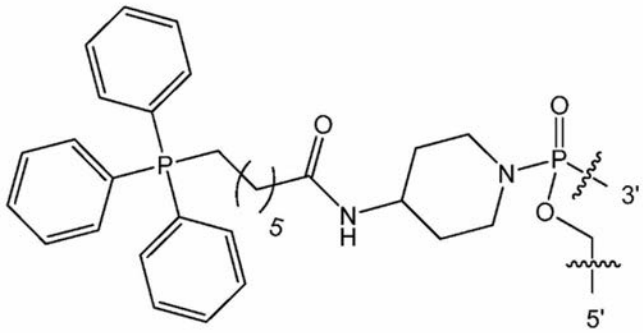
[0275]

No.	名称	结构
B45	PMO^{suc}	
46	$PMO^{戊二酸}$	
B47	PMO^{tet}	
B48	$PMO^{硫醇}$ (SH)	
B49	PMO^{pros}	

[0276]

No.	名称	结构
B50	PMO^{pror}	
B51	PMO^{tme}	
B52	PMO^{ca}	 CA = 胆酸酯
B53	PMO^{dca}	 dCA = 胆酸酯
B54	PMO^{guan} (g)	

[0277]

No.	名称	结构
B55	PMO^{+phos}	
B56	$PMO^{apnphos}$	

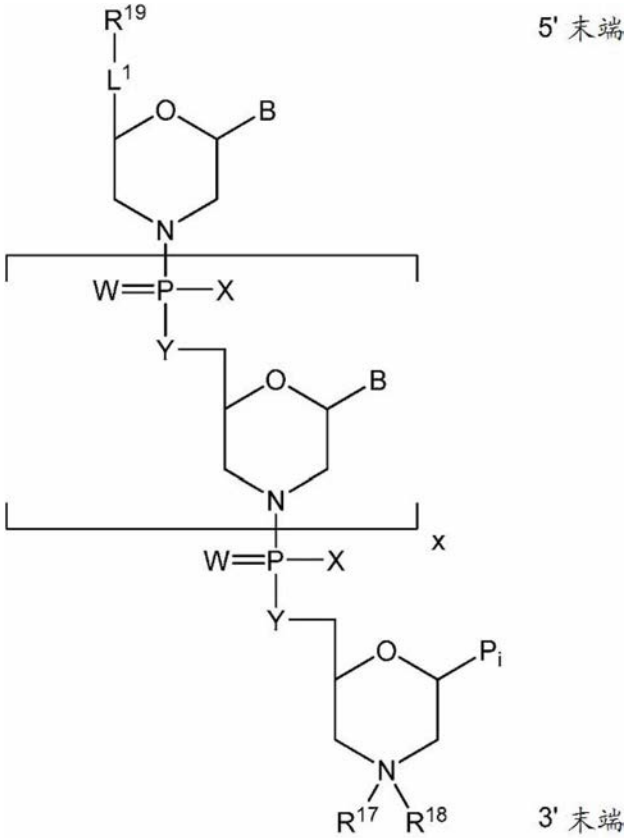
[0278] 在以下序列和讨论中，键的上述名称经常使用。例如，包含PMO^{apn}键的碱基表示为^{apn}B，其中B为碱基。其他键类似地命名。此外，可以使用缩写的命名，例如，可以使用括号中的缩写命名(例如，^{a}B指^{apn}B)。还可以使用其他容易确定的缩写。

[0279] B.具有修饰的端基的寡聚物

[0280] 如上所述，本公开还提供包含修饰的端基的寡聚物。申请人已发现，用多种化学部分修饰寡聚物的3’和/或5’末端对所述寡聚物提供了有益的治疗性质(例如，增强的细胞递送、效能和/或组织分布等)。在多个实施方案中，修饰的端基包含疏水性部分，而在其他实施方案中，修饰的端基包含亲水性部分。修饰的末端基团可以与上文所述的键同时或不同时存在。例如，在一些实施方案中，寡聚物包含一个或多个修饰的端基和(A)型键，例如其中X为$-N(CH_3)_2$的键。在其他实施方案中，寡聚物包含一个或多个修饰的端基和(B)型键，例如其中X为4-氨基哌啶-1-基(即，APN)的键。在其他实施方案中，寡聚物包含一个或多个修饰的端基和(A)型键与(B)型键的混合。例如，寡聚物可以包含一个或多个修饰的端基(例如，三苯甲基或三苯基乙酰基)以及其中X为$-N(CH_3)_2$的键和其中X为4-氨基哌啶-1-基的键。修饰的端基和修饰的键的其他组合也向寡聚物提供了有利的治疗性质。

[0281] 在一实施方案中，包含末端修饰的寡聚物具有以下结构(XVII)或其盐或异构体：

[0282]



(XVII)

[0283] 其中X、W和Y如上文(A)键和(B)键中的任何一个所定义，以及：

[0284] R^{17}每次出现时独立地为不存在、氢或C_1-C_6烃基；

[0285] R^{18}和R^{19}每次出现时独立地为不存在、氢、细胞穿透肽、天然或非天然氨基酸、C_2-C_{30}烃基羰基、-C(=O)OR^{21}或R^{20}；

[0286] R^{20}每次出现时独立地为胍基、杂环基、C_1-C_{30}烃基、C_3-C_8环烃基；C_6-C_{30}芳基、C_7-C_{30}芳烃基、C_3-C_{30}烃基羰基、C_3-C_8环烃基羰基、C_3-C_8环烃基烃基羰基、C_7-C_{30}芳基羰基、C_7-C_{30}芳烃基羰基、C_2-C_{30}烃氧基羰基、C_3-C_8环烃氧基羰基、C_7-C_{30}芳氧基羰基、C_8-C_{30}芳烃氧基羰基或-P(=O)$(R^{22})_2$；

[0287] B为碱基配对部分；

[0288] L^1为任选的长度高达18个原子的连接基团，其包括选自以下的键：烃基、羟基、烃氧基、烃基氨基、酰胺、酯、二硫化物、羰基、氨基甲酸酯、二氨基磷酸酯、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、哌嗪和磷酸二酯；以及

[0289] x为0或更大的整数；并且其中R^{18}或R^{19}中的至少一个为R^{20}；并且

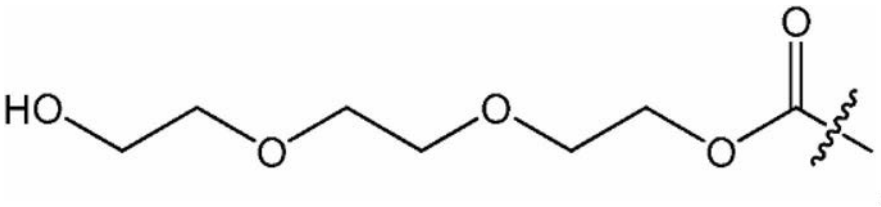
[0290] 其中R^{18}或R^{19}中的至少一个为R^{20}，并且条件是R^{17}和R^{18}都存在。

[0291] 具有修饰的端基的寡聚物可以包含任意数量的(A)型键和(B)型键。例如，寡聚物可以仅包含(A)型键。例如，每个键中的X可以为-N$(CH_3)_2$。或者，寡聚物可以仅包含(B)键。在某些实施方案中，寡聚物包含(A)键和(B)键的混合，例如包含1-4个(B)型键，剩下的键为(A)型。在这种情况下，键包括但不限于，其中对于(B)型而言X为氨基哌啶基的键，以及对于(A)型而言X为二甲基氨基的键。

[0292] 在一些实施方案中，R^{17}不存在。在一些实施方案中，R^{17}为氢。在一些实施方案中，R^{17}为C_1-C_6烃基。在一些实施方案中，R^{17}为甲基。在其他实施方案中，R^{17}为乙基。在一些实施方案中，R^{17}为C_3烃基。在一些其他实施方案中，R^{17}为异丙基。在其他实施方案中，R^{17}为C_4烃基。在其他实施方案中，R^{17}为C_5烃基。在一些其他实施方案中，R^{17}为C_6烃基。

[0293] 在其他实施方案中，R^{18}不存在。在一些实施方案中，R^{18}为氢。在一些实施方案中，R^{18}为下文更详述的细胞穿透肽。在一些实施方案中，R^{18}为天然或非天然氨基酸，例如三甲基甘氨酸。在一些实施方案中，R^{18}为R^{20}。

[0294] 在其他实施方案中，R^{19}不存在。在一些实施方案中，R^{19}为氢。在一些实施方案中，R^{19}为下文更详述的细胞穿透。在一些实施方案中，R^{19}为天然或非天然氨基酸，例如三甲基甘氨酸。在一些实施方案中，R^{19}为$-C(=O)OR^{17}$，例如R^{19}可以具有以下结构：

[0295] 

[0296] 在其他实施方案中，R^{18}或R^{19}为C_2-C_{30}烃基羰基，例如$-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$，其中n为1-6，例如为2。在其他实例中，R^{18}或R^{19}为乙酰基。

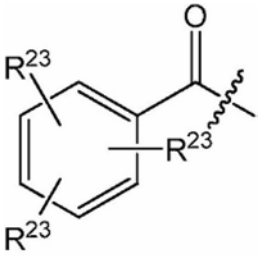
[0297] 在一些实施方案中，R^{20}每次出现时独立地为胍基、杂环基、C_1-C_{30}烃基、C_3-C_8环烃基；C_6-C_{30}芳基、C_7-C_{30}芳烃基、C_3-C_{30}烃基羰基、C_3-C_8环烃基羰基、C_3-C_8环烃基烃基羰基、C_6-C_{30}芳基羰基、C_7-C_{30}芳烃基羰基、C_2-C_{30}烃氧基羰基、C_3-C_8环烃氧基羰基、C_7-C_{30}芳氧基羰基、C_8-C_{30}芳烃氧基羰基、$-C(=O)OR^{21}$或$-P(=O)(R^{22})_2$，其中R^{21}为包含一个或多个氧或羟基部分或其组合的C_1-C_{30}烃基，并且每个R^{22}为C^6-C^{12}芳氧基。

[0298] 在某些其他实施方案中，R^{19}为$-C(=O)OR^{21}$并且R^{18}为氢、胍基、杂环基、C_1-C_{30}烃基、C_3-C_8环烃基；C_6-C_{30}芳基、C_3-C_{30}烃基羰基、C_3-C_8环烃基羰基、C_3-C_8环烃基烃基羰基、C_7-C_{30}芳基羰基、C_7-C_{30}芳烃基羰基、C_2-C_{30}烃氧基羰基、C_3-C_8环烃氧基羰基、C_7-C_{30}芳氧基羰基、C_8-C_{30}芳烃氧基羰基或$-P(=O)(R^{22})_2$，其中每个R^{22}为C^6-C^{12}芳氧基。

[0299] 在其他实施方案中，R^{20}每次出现时独立地为胍基、杂环基、C_1-C_{30}烃基、C_3-C_8环烃基；C_6-C_{30}芳基、C_3-C_{30}烃基羰基、C_3-C_8环烃基羰基、C_3-C_8环烃基烃基羰基、C_7-C_{30}芳基羰基、C_7-C_{30}芳烃基羰基、C_2-C_{30}烃氧基羰基、C_3-C_8环烃氧基羰基、C_7-C_{30}芳氧基羰基、C_8-C_{30}芳烃氧基羰基或$-P(=O)(R^{22})_2$。而在其他实例中，R^{20}每次出现时独立地为胍基、杂环基、C_1-C_{30}烃基、C_3-C_8环烃基；C_6-C_{30}芳基、C_7-C_{30}芳烃基、C_3-C_8环烃基羰基、C_3-C_8环烃基烃基羰基、C_7-C_{30}芳基羰基、C_7-C_{30}芳烃基羰基、C_2-C_{30}烃氧基羰基、C_3-C_8环烃氧基羰基、C_7-C_{30}芳氧基羰基、C_8-C_{30}芳烃氧基羰基或$-P(=O)(R^{22})_2$。

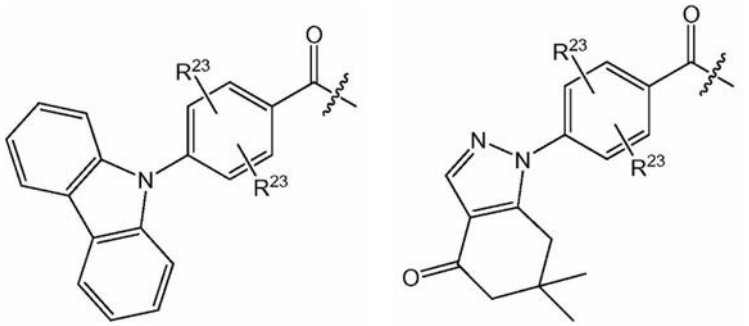
[0300] 在一些实施方案中，R^{20}为胍基，例如单甲基胍基或二甲基胍基。在其他实施方案中，R^{20}为杂环基。例如，在一些实施方案中，R^{20}为哌啶-4-基。在一些实施方案中，哌啶-4-基被三苯甲基或Boc基团取代。在其他实施方案中，R^{20}为C_3-C_8环烃基。在其他实施方案中，R^{20}为C_6-C_{30}芳基。

[0301] 在一些实施方案中，R^{20}为C_7-C_{30}芳基羰基。例如，在一些实施方案中，R^{20}具有以下结构(XVIII)：

[0302] 

(XVIII)

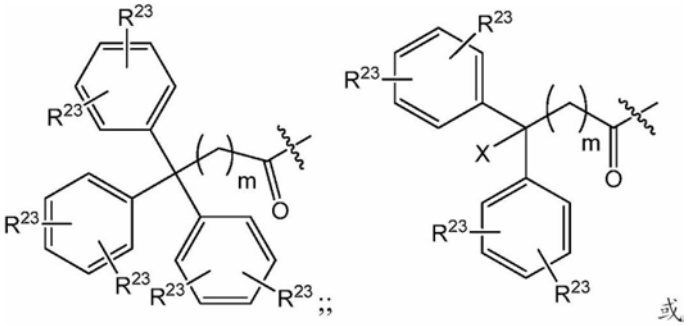
[0303] 其中R^{23}每次出现时独立地为氢、卤素、C_1-C_{30}烃基、C_1-C_{30}烃氧基、C_1-C_{30}烃氧基羰基、C_7-C_{30}芳烃基、芳基、杂芳基、杂环基或杂环烃基，并且其中一个R^{23}可以与另一个R^{23}连接以形成杂环基环。在一些实施方案中，至少一个R^{23}为氢，例如在一些实施方案中，每个R^{23}为氢。在其他实施方案中，至少一个R^{23}为C_1-C_{30}烃氧基，例如在一些实施方案中，每个R^{23}为甲氧基。在其他实施方案中，至少一个R^{23}为杂芳基，例如在一些实施方案中，至少一个R^{23}具有以下结构(XVIIIa)或(XVIIIb)之一：

[0304] 

(XVIIIa) 或 (XVIIIb)。

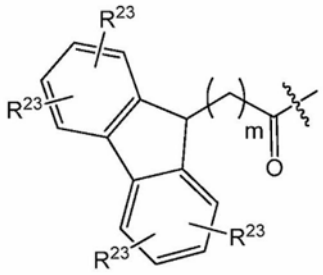
[0305] 在其他实施方案中，一个R^{23}与另一个R^{23}连接以形成杂环基环。例如，在一实施方案中，R^{20}为5-羧基荧光素。

[0306] 在其他实施方案中，R^{20}为C_7-C_{30}芳烃基羰基。例如，在多个实施方案中，R^{20}具有以下结构(XIX)、(XX)或(XXI)之一：

[0307] 

(XIX) (XX)

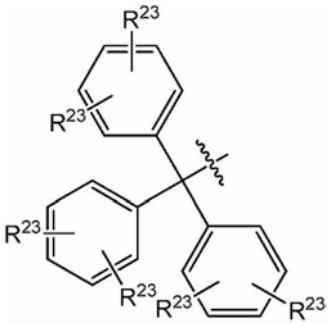
或



(XXI)

[0308] 其中R^{23}每次出现时独立地为氢、卤素、C_1-C_{30}烃基、C_1-C_{30}烃氧基、C_1-C_{30}烃氧基羰基、C_7-C_{30}芳烃基、芳基、杂芳基、杂环基或杂环烃基，其中一个R^{23}可以与另一个R^{23}连接以形成杂环基环，X为-OH或卤素，并且m为0-6的整数。在一些具体实施方案中，m为0。在其他实施方案中，m为1，而在其他实施方案中，m为2。在其他实施方案中，至少一个R^{23}为氢，例如在一些实施方案中，每个R^{23}为氢。在一些实施方案中，X为氢。在其他实施方案中，X为-OH。在其他实施方案中，X为Cl。在其他实施方案中，至少一个R^{23}为C_1-C_{30}烃氧基，例如甲氧基。

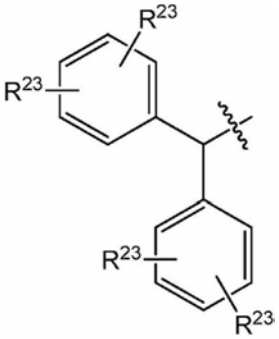
[0309] 在其他实施方案中，R^{20}为C_7-C_{30}芳烃基，例如三苯甲基。在其他实施方案中，R^{20}为甲氧基三苯甲基。在一些实施方案中，R^{20}具有以下结构(XXII)：

[0310] 

(XXII)

[0311] 其中R^{23}每次出现时独立地为氢、卤素、C_1-C_{30}烃基、C_1-C_{30}烃氧基、C_1-C_{30}烃氧基羰基、C_7-C_{30}芳烃基、芳基、杂芳基、杂环基或杂环烃基、并且其中一个R^{23}可以与另一个R^{23}连接以形成杂环基环。例如，在一些实施方案中，每个R^{23}为氢。在其他实施方案中，至少一个R^{23}为C_1-C_{30}烃氧基，例如甲氧基。

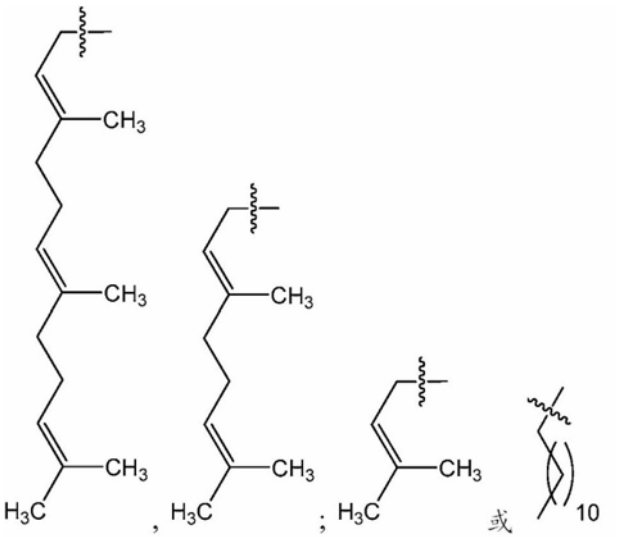
[0312] 在其他实施方案中，R^{20}为C_7-C_{30}芳烃基并且R^{20}具有以下结构(XXIII)：

[0313] 

(XXIII)

[0314] 在一些实施方案中，至少一个R^{23}为卤素，例如氯。在一些其他实施方案中，一个R^{23}为处于对位的氯。

[0315] 在其他实施方案中，R^{20}为C_1-C_{30}烃基。例如，在一些实施方案中，R^{20}为C_4-C_{20}烃基并且任选地包含一个或多个双键。例如，在一些实施方案中，R^{20}为包含叁键的C_{4-10}烃基，例如末端叁键。在一些实施方案中，R^{20}为己炔-6-基。在一些实施方案中，R^{20}具有以下结构(XXIV)、(XXV)、(XXVI)或(XXVII)之一：

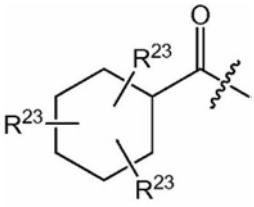
[0316] 

(XXIV) (XXV) (XXVI) (XXVII)

[0317] 在其他实施方案中，R^{20}为C_3-C_{30}烃基羰基，例如C_3-C_{10}烃基羰基。在一些实施方案中，R^{20}为-C(=O)$(CH_2)_p$SH或-C(=O)$(CH_2)_p$SSHet，其中p为1-6的整数，并且Het为杂芳基。例如，p可以为1或p可以为2。在其他实例中Het为吡啶基，例如吡啶-2-基。在其他实施方案中，C_3-C_{30}烃基羰基被另一寡聚物取代，例如在一些实施方案中，寡聚物在3'位包含C_3-C_{30}烃基羰基，所述C_3-C_{30}烃基羰基将该寡聚物与另一寡聚物的3'位连接。这种末端修饰可以包括在本公开的范围内。

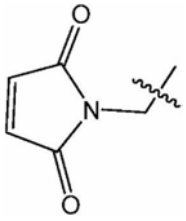
[0318] 在其他实施方案中，R^{20}为被诸如三苯基磷酰基的芳基磷酰基部分进一步取代的C_3-C_{30}烃基羰基。这类R^{20}基团的实例包括表2中的结构33。

[0319] 在其他实例中，R^{20}为C_3-C_8环烃基羰基，例如C_5-C_7烃基羰基。在这些实施方案中，R^{20}具有以下结构(XXVIII)：

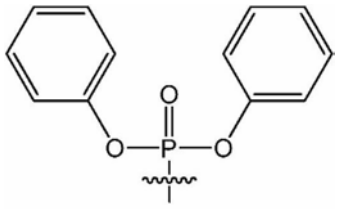
[0320] 

(XXVIII)

[0321] 其中R^{23}每次出现时独立地为氢、卤素、C_1-C_{30}烃基、C_1-C_{30}烃氧基、C_1-C_{30}烃氧基羰基、C_7-C_{30}芳烃基、芳基、杂芳基、杂环基或杂环烃基，并且其中一个R^{23}可以与另一个R^{23}连接以形成杂环基环。在一些实施方案中，R^{23}为杂环基烃基，例如在一些实施方案中，R^{23}具有以下结构：

[0322] 

[0323] 在一些其他实施方案中，R^{20}为C_3-C_8环烃基烃基羰基。在其他实施方案中，R^{20}为C_2-C_{30}烃氧基羰基。在其他实施方案中，R^{20}为C_3-C_8环烃氧基羰基。在其他实施方案中，R^{20}为C_7-C_{30}芳氧基羰基。在其他实施方案中，R^{20}为C_8-C_{30}芳烃氧基羰基。在其他实施方案中，R^{20}为-P(=O)$(R^{22})_2$，其中每个R^{22}为C^6-C^{12}芳氧基，例如在一些实施方案中，R^{20}具有以下结构(C24)：

[0324] 

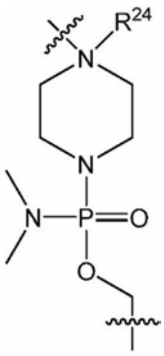
(C24)

[0325] 在其他实施方案中，R^{20}包含一个或多个卤素原子。例如，在一些实施方案中，R^{20}包括任意上述R^{20}部分的全氟类似物。在其他实施方案中，R^{20}为对-三氟甲基苯基、三氟甲基三苯甲基、全氟戊基或五氟苯基。

[0326] 在一些实施方案中，3’末端包含修饰，并且在其他实施方案中5’末端包含修饰。在其他实施方案中，3’和5’末端都包含修饰。因此，在一些实施方案中，R^{18}不存在且R^{19}为R^{20}。在其他实施方案中，R^{19}不存在且R^{18}为R^{20}。在其他实施方案中，R^{18}和R^{19}各自为R^{20}。

[0327] 在一些实施方案中，除了3’或5’修饰，寡聚物包含细胞穿透肽。因此，在一些实施方案中，R^{19}为细胞穿透肽并且R^{18}为R^{20}。在其他实施方案中，R^{18}为细胞穿透肽并且R^{19}为R^{20}。在前述的其它实施方案中，细胞穿透肽为富精氨酸肽。

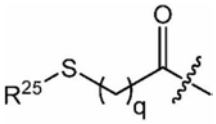
[0328] 在一些实施方案中，连接5’端基(即，R^{19})与寡聚物的连接基团L^1可以存在或不存在。连接基团包含任意数量的官能团和长度，条件是连接基团保留其使5’端基与寡聚物连接的能力，并且条件是连接基团不干扰寡聚物以序列特异性方式结合其靶序列的能力。在一实施方案中，L包括二氨基磷酸酯键和哌嗪键。例如，在一些实施方案中，L具有以下结构(XXIX)：

[0329] 

(XXIX)

[0330] 其中R^{24}为不存在、氢或C_1-C_6烃基。在一些实施方案中，R^{24}不存在。在一些实施方案中，R^{24}为氢。在一些实施方案中，R^{24}为C_1-C_6烃基。在一些实施方案中，R^{24}为甲基。在其他实施方案中，R^{24}为乙基。在其他实施方案中，R^{24}为C_3烃基。在一些其他实施方案中，R^{24}为异丙基。在其他实施方案中，R^{24}为C_4烃基。在一些实施方案中，R^{24}为C_5烃基。在其他实施方案中，R^{24}为C_6烃基。

[0331] 在其他实施方案中，R^{20}为C_3-C_{30}烃基羰基、并且R^{20}具有以下结构(XXX)：

[0332] 

(XXX)

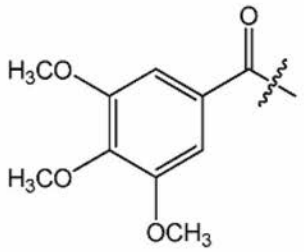
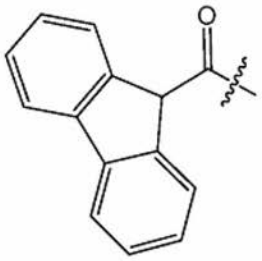
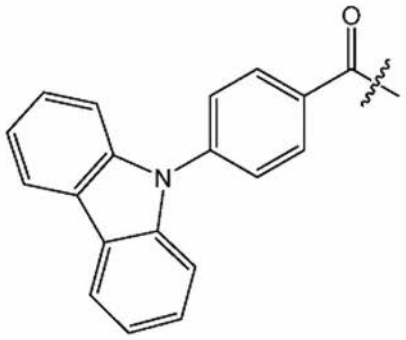
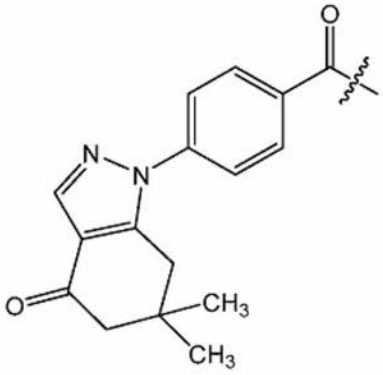
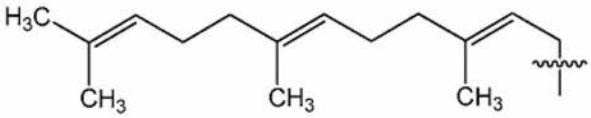
[0333] 其中R^{25}为氢或-SR^{26}，其中R^{26}为氢、C_1-C_{30}烃基、杂环基、芳基或杂芳基、并且q为0至6的整数。

[0334] 在任意上述的其他实施方案，R^{23}每次出现时独立地为氢、卤素、C_1-C_{30}烃基、C_1-C_{30}烃氧基、芳基、杂芳基、杂环基或杂环烃基。

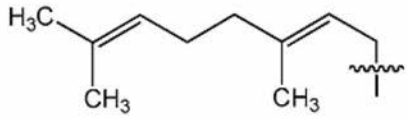
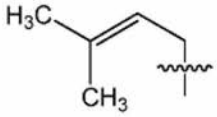
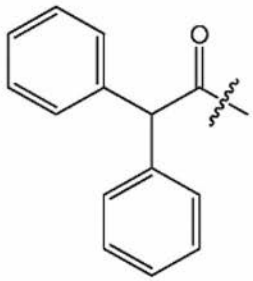
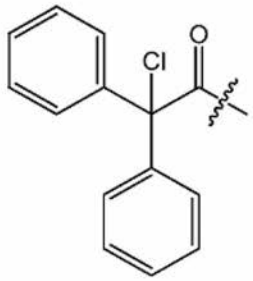
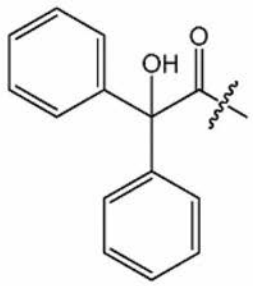
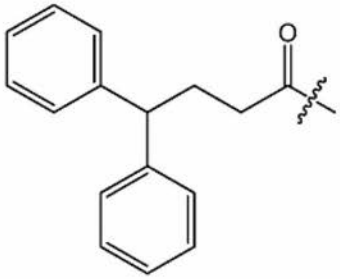
[0335] 在一些其他实施方案中，仅寡聚物的3’末端结合到上述基团之一。在一些其他实施方案中，仅寡聚物的5’末端结合到上述基团之一。在其他实施方案中，3’和5’末端均包含上述基团之一。端基可以选自上述基团中的任一个或表2列出的任意具体基团。

[0336] 表2.典型的端基

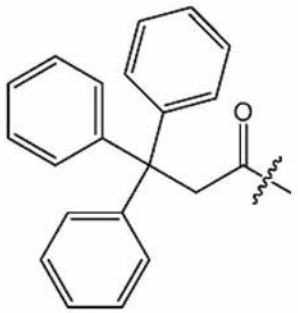
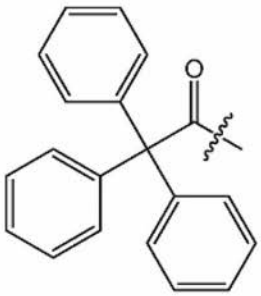
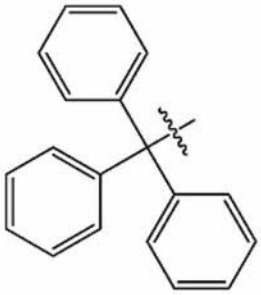
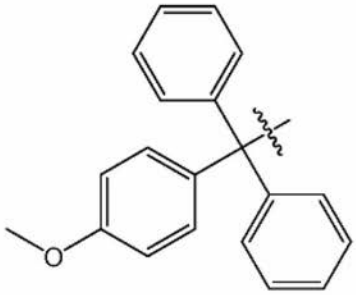
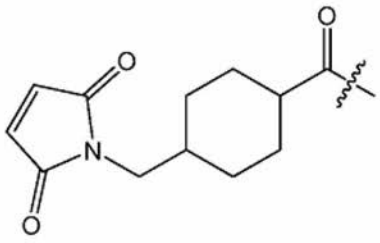
[0337]

No.	名称	结构
C1	三甲氧基苯甲酰基	
C2	9-芴-羧基	
C3	4-咔唑基苯甲酰基	
C4	4-吲唑基酮 苯甲酰基	
C5	法呢基	

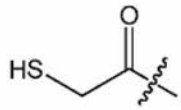
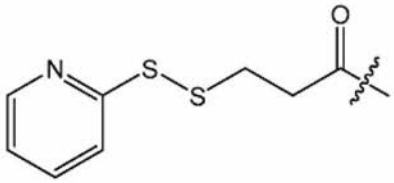
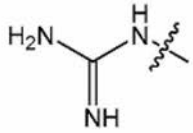
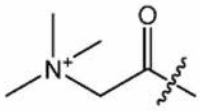
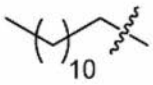
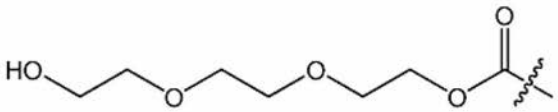
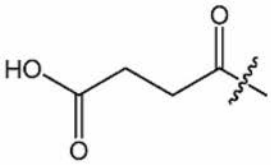
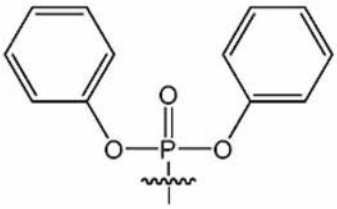
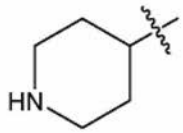
[0338]

No.	名称	结构
C6	拢牛儿基	
C7	异戊二烯基	
C8	二苯基乙酰基	
C9	氯代二苯基乙酰基	
C10	羟基二苯基乙酰基	
C11	三苯基丙酰基	

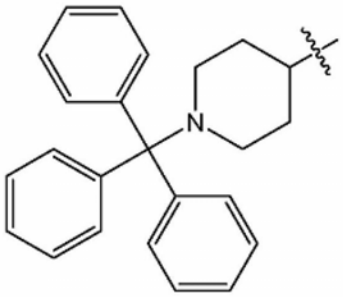
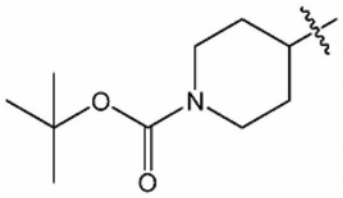
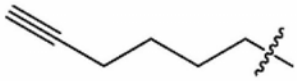
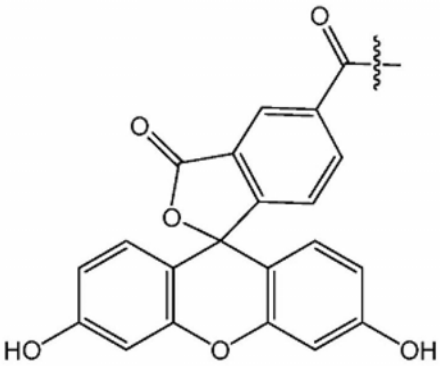
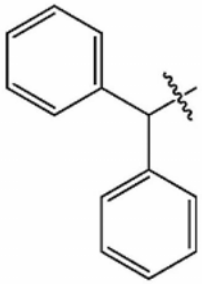
[0339]

No.	名称	结构
C12	三苯基丙基	
C13	三苯基乙酰基	
C14	三苯甲基(Tr)	
C15	甲氧基三苯甲基(MeOTr)	
C16	甲基琥珀酰亚胺基环己酰基	

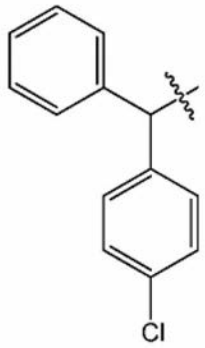
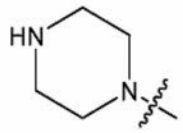
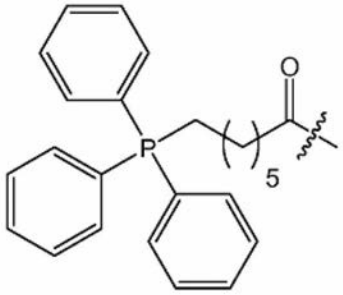
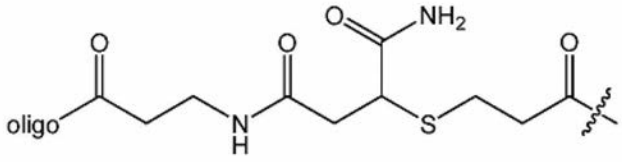
[0340]

No.	名称	结构
C17	巯基乙酰基	
C18	$COCH_2CH_2SSPy$	
C19	胍基	
C20	三甲基甘氨酸	
C21	月桂酰	
C22	三乙烯乙醇酰 (EG3)	
C23	琥珀酸乙酰	
C24	二苯基磷酰基	
C25	哌啶-4-基	

[0341]

No.	名称	结构
C26	三苯甲基哌啶-4-基	
C27	Boc-哌啶-4-基	
C28	己炔-6-基	
C29	5-羧基荧光素	
C30	二苯甲基	

[0342]

No.	名称	结构
C31	对-氯代二苯甲基	
C32	哌嗪基(pip)	
C33	Triphenylphos	
C34	二聚的	 Oligo = 另一个寡聚物

[0343] 1.肽转运蛋白

[0344] 在一些实施方案汇总,个体寡聚物结合到肽转运蛋白部分上,例如细胞穿透肽转运部分,其有效地增强寡聚物转运进细胞中。例如,在一些实施方案中,肽转运蛋白部分为富精氨酸肽。在另一实施方案中,转运部分连接到寡聚物的5'或3'末端,例如图1C中所示。当这类肽结合到任一末端,则相反的末端可用于进一步结合到本文所述的修饰的端基。

[0345] 在前述的一些实施方案中,肽转运部分包含6-16个选自以下的亚基:X'亚基、Y'亚基和Z'亚基,其中

[0346] (a)每个X'亚基独立地表示赖氨酸、精氨酸或精氨酸类似物,所述类似物为包含$R^{33}N=C(NH_2)R^{34}$结构的侧链的阳离子α-氨基酸,其中R^{33}为H或R;R^{34}为R^{35}、NH_2、NHR或NR_{34},其中R^{35}为低级烷基或低级烯基并且还可包括氧或氮;R^{33}与R^{34}可共同形成环;并且侧链经由R^{33}或R^{34}连接至所述氨基酸;

[0347] (b)每个Y'亚基独立地表示中性氨基酸-C(O)-$(CHR)_n$-NH-,其中n为2-7并且每个R独立地为H或甲基;以及

[0348] (c)每个Z'亚基独立地表示具有中性芳烃基侧链的α-氨基酸；

[0349] 其中，所述肽包含由(X'Y'X')$_p$、(X'Y')$_m$和(X'Z'Z')$_p$之一表示的序列，其中p为2-5并且m为2-8。

[0350] 在选择的实施方案中，对每个X'而言，侧链部分为胍基，如在氨基酸亚基精氨酸(Arg)中。在其他实施方案中，每个Y'为-CO-(CH$_2$)$_n$-CHR-NH-，其中n为2-7并且R为H。例如，当n为5并且R为H时，Y'为6-氨基己酸亚基，本文简写为Ahx；当n为2并且R为H时，Y'为β-丙氨酸亚基。

[0351] 在某些实施方案中，该类型的肽包括包含被单个Y'亚基间隔的精氨酸二聚物的那些肽，其中Y'为Ahx。实例包括具有通式(RY'R)$_p$或通式(RRY')$_p$的肽，其中Y'为Ahx。在一实施方案中，Y'为6-氨基己酸亚基，R为精氨酸并且p为4。

[0352] 在其他实施方案中，每个Z'为苯基丙氨酸，并且m为3或4。

[0353] 在一些实施方案中，结合的肽通过连接基团Ahx-B连接到寡聚物末端，其中Ahx为6-氨基己酸亚基并且B为β-丙氨酸亚基。

[0354] 在选择的实施方案中，对于每个X'而言，侧链部分独立地选自：胍基(HN=C(NH$_2$)NH-)、脒基(HN=C(NH$_2$)C-)、2-氨基二氢嘧啶基、2-氨基四氢嘧啶基、2-氨基吡啶基和2-氨基嘧啶酮基，并且其优选选自胍基和脒基。在一实施方案中，侧链部分为胍基，如在氨基酸亚基精氨酸(Arg)中。

[0355] 在一些实施方案中，Y'亚基可为连续的，因为没有X'亚基介于Y'亚基之间，或Y'亚基可单独散布在X'亚基之间。然而，在一些实施方案中，连接亚基可在Y'亚基之间。在一实施方案中，Y'亚基在肽转运蛋白的末端；在其他实施方案中，它们在X'亚基的侧翼。在其他实施方案中，每个Y'为-CO-(CH$_2$)$_n$-CHR-NH-，其中n为2-7并且R为H。例如，当n为5并且R为H时，Y'为6-氨基己酸亚基，本文缩写为Ahx。在选择的该基团的实施方案中，每个X'包含胍基侧链部分，如在精氨酸亚基中。该类型的示例性肽包括包含被单个Y'亚基间隔的精氨酸二聚物的那些肽，其中Y'优选为Ahx。实例包括具有通式(RY'R)$_4$或通式(RRY')$_4$的肽，其中Y'优选为Ahx。在一些实施方案中，核酸类似物连接到末端Y'亚基，优选在C末端处，如图1C所示。在其他实施方案中，连接基团具有结构AhXB，其中Ahx为6-氨基己酸亚基并且B为β-丙氨酸亚基。

[0356] 上文所述的肽转运部分已表明，相对于在结合的转运部分不存在的情况下的寡聚物摄取以及相对于通过缺乏疏水性亚基Y'的结合的转运部分而进行的摄取，极大地增强了结合的寡聚物进入细胞。这类增强的摄取，在化合物到哺乳动物细胞的摄取方面，相对于通过缺乏疏水性亚基Y'的结合的转运部分而进行制剂摄取，可以被至少两倍的增加或在其他实施方案中四倍的增加所证实。在一些实施方案中，相对于未结合的化合物，摄取增强至少20倍，或至少40倍。

[0357] 肽转运部分的其他益处是其预期稳定反义寡聚物和它的靶核酸序列之间的双链体的能力。不希望被理论限制，稳定双链体的该能力可能是由于带正电的转运部分和待负电的核酸之间的静电相互作用。在一些实施方案中，如上文所述，转运蛋白中带电的亚基数目少于14个，或在其他实施方案中为8-11个，因为太高数目的带电亚基可能导致序列特异性的降低。

[0358] 包含连接基团(B或AhxB)的示例性富精氨酸细胞穿透肽转运蛋白在以下表3中给

出：

[0359] 表3.富精氨酸细胞穿透肽转运蛋白

[0360]

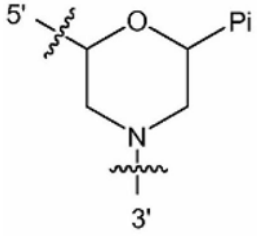
名称(命名)	序列	SEQ ID NO.[a]
rTAT	RRRQRRKKR	56
Tat	RKKRRQRRR	57
R_9F_2	RRRRRRRRRFF	58
$R_5F_2R_4$	RRRRRFFRRRR	59
R_4	RRRR	60
R_5	RRRRR	61
R_6	RRRRRR	62
R_7	RRRRRRR	63
R_8	RRRRRRRR	64
R_9	RRRRRRRRR	65
$(RAhxR)_4$; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	66
$(RAhxR)_5$; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	67
$(RAhxRRBR)_2$; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	68
$(RAR)_4F_2$	RARRARRARRARFFC	69
$(RGR)_4F_2$	RGRRGRRGRRGRFFC	70

[0361] 命名为SEQ ID NO的[a]序列不包括连接基团部分(例如,C、G、Ahx、B、AhxB,其中Ahx和B分别指6-氨基己酸和β-丙氨酸)。

[0362] C.寡聚物的性质

[0363] 如上文所述,本公开涉及包含多个修饰的寡聚物,所述修饰影响寡聚物的所需性质(例如增强的反义活性)。在某些实施方案中,寡聚物包含主链,所述主链包含由亚基间键连接的吗啉环结构序列,所述亚基间键使一个吗啉环结构的3’末端连接于邻近的吗啉环结构的5’末端,其中每个吗啉环结构结合于碱基配对部分,使得寡聚物可以以序列特异性方式与靶核酸结合。吗啉环结构可以具有以下结构(i):

[0364]



(i)

[0365] 其中B每次出现时独立地为碱基配对部分。

[0366] 每个吗啉环结构支持碱基配对部分(Pi)以形成碱基配对部分的序列,其通常设计为与细胞中或被治疗的个体中选择的反义靶标杂化。碱基配对部分可为天然DNA或RNA(例如A、G、C、T或U)或类似物中得到的嘌呤或嘧啶,例如次黄嘌呤(核苷肌苷的碱基组分)或5-甲基胞嘧啶。还可以利用赋予寡聚物改善的结合亲和性的类似物碱基。在这种情况下,示例性类似物包括C5-丙炔基-修饰的嘧啶、9-(氨基乙氧基)吩噁嗪(G型夹)等。

[0367] 如上所述,根据本发明的一方面,寡聚物可被修饰以包括一个或多个(B)键,例如多达约1个/每2个-5个不带电荷的键,通常3-5个/每10个不带电荷的键。某些实施方案还包括一个或多个(B)型键。当高达约一半的主链键为(B)型时,可得到反义活性的优化的改善。

当小数目、例如10-20%的B键时，通常可见一些但并非最大的增强。

[0368] 在一实施方案中，(A)型键和(B)型键沿主链散布。在一些实施方案中，寡聚物沿其整个长度不具有(A)键和(B)键的严格交替形式。寡聚物可以任选地包含上文所述的5’和/或3’修饰。

[0369] 还考虑的是具有(A)键嵌段和(B)键嵌段的寡聚物；例如，(B)键的嵌段还可以位于(A)键的中心嵌段侧面，或反之亦然。在一实施方案中，寡聚物具有大致等长的5’、3’和中心区，并且中心区中的(B)或(A)键的百分比大于约50%，或大于约70%。用于反义应用的寡聚物通常长度范围在约10个至约40个亚基，更优选约15个至25个亚基。例如，具有19至20个亚基(反义寡聚物的有用长度)的本发明寡聚物可以理论上具有2至7个，例如4至6个或3至5个(B)键，剩余的为(A)键。具有14个至15个亚基的寡聚物可以理论上具有2至5个，例如3个或4个(B)键，并且剩余的为(A)键。

[0370] 吗啉代亚基还可以通过如下文进一步描述的非基于磷的亚基间键连接，其中至少一个键为(B)键。

[0371] 还可使用其他的寡核苷酸类似物键，其在它们未修饰的状态中为不带电荷的但是其也可带有侧胺取代基。例如，吗啉环上的5’氮原子可以用于磺酰胺键(或尿素键，其中磷分别被碳或硫替代)。

[0372] 在一些用于反义应用的实施方案中，寡聚物可以与核酸靶序列100%互补，或其可以包含错配，例如以适应变体，只要在寡聚物和核酸靶序列之间形成的异源双链体足够稳定从而耐受细胞核酸酶作用和体内可能发生的其他模式的降解。如果存在错配，则错配对杂化双链体的末端区域比在中部更稳定(less destabilizing)。根据双链体稳定性的公知的原则，允许错配的数目将取决于寡聚物的长度、双链体中G:C碱基对的百分比以及双链体中错配的位置。尽管这样的反义寡聚物不必与核酸靶序列100%互补，其有效地与靶序列稳定且特异性结合，从而调节核酸靶标的生物活性，例如编码的蛋白的表达。

[0373] 寡聚物和靶序列之间形成的双链体的稳定性是结合T_m和双链体对细胞酶切割的易感性的函数。反义化合物关于互补序列RNA的T_m可以通过常规方法测量，例如Hames et al.,Nucleic Acid Hybridization(核酸杂化),IRL Press,1985,pp.107-108所述的那些，或在Miyada C.G.和Wallace R.B.,1987,Oligonucleotide hybridization techniques(寡核苷酸杂交技术),Methods Enzymol.Vol.154pp.94-107.中所述。

[0374] 在一些实施方案中，每个反义寡聚物与互补序列RNA之间的结合T_m高于体温，或在其他实施方案中高于50°C。在其他实施方案中，T_m’为60-80°C或更高。根据公知的原则，可以通过增加双链体中C:G配对碱基的比例和/或通过增加异源双链体的长度(以碱基对计)来增加寡聚物化合物对于互补碱基的RNA混杂物的T_m。同时，出于使细胞摄取最佳化的目的，限制寡聚物的尺寸应是有利的。因此，在20个碱基或更小的长度上显出高T_m(50°C或更高的)的化合物通常优于为高T_m值而需要大于20个碱基的那些化合物。对于一些应用，更长的寡聚物，例如长于20个碱基可能具有某些优势。例如，在某些实施方案中，更长的寡聚物可以在外显子跳跃或剪切调节的用途中得到特别的效用。

[0375] 靶向序列碱基可以为正常的DNA碱基或其类似物，例如能与靶序列RNA碱基沃特森-克里克碱基配对的尿嘧啶和肌苷。

[0376] 当靶核苷酸为尿嘧啶残基时，寡聚物还可以并入鸟嘌呤碱基来代替腺嘌呤。当靶

序列对不同的病毒株变化并且在任何给定的核苷酸残基处的变化是胞嘧啶或尿嘧啶时，这是有用的。通过在变异性位置处的靶向寡聚物中使用鸟嘌呤，可以利用公知的鸟嘌呤与尿嘧啶碱基配对的能力(被称为C/U:G碱基配对)。通过在这些位置并入鸟嘌呤，单个寡聚物可以有效地靶向更广的RNA靶变异性。

[0377] 化合物(例如，寡聚物，亚基间键，端基)可以以不同异构体形式存在，例如结构异构体(例如，互变异构体)。对于立体异构体，化合物可以具有手性中心并且可能以外消旋体、富对映异构体的混合物、单独的对映异构体、混合物或非对映异构体或单独的非对映异构体而存在。所有这样的异构体形式包括在本发明内，包括它们的混合物。化合物还可以具有导致阻转异构体的轴手性。此外，化合物的一些晶体形式可能以多晶型物而存在，这也包括在本发明内。另外，一些化合物还可以与水或其他有机溶剂形成溶剂化物。同样地，这类溶剂化物包括在本发明的范围内。

[0378] 本文所述的寡聚物可以用于抑制蛋白的产生或病毒的复制的方法。因此，在一实施方案中，编码这类蛋白的核酸暴露于本文所述的寡聚物。在前述的其他实施方案中，反义寡聚物包含本文所公开的5’或3’修饰的端基或其组合，并且碱基配对部分B形成在有效抑制蛋白产生的位置与一部分核酸有效杂化的序列。在一实施方案中，该位置为mRNA的ATG起始密码子区域，前mRNA的剪切位点或下文所述的病毒靶序列。

[0379] 在一实施方案中，寡聚物具有对于结合靶序列为高于约50°C的T_m，并且被哺乳动物细胞或细菌细胞摄取。在另一实施方案中，寡聚物可以结合于本文所述的转运部分，例如富精氨酸肽，以促进这样的摄取。在另一实施方案中，本文所述的末端修饰可以起到转运部分的作用以促进哺乳动物和/或细菌细胞的摄取。

[0380] 吗啉代寡聚物的制备和性质在下文和美国专利第5,185,444号以及WO/2009/064471中更详细地描述，将每一个以整体形式并入本文作为参考。

[0381] D.寡聚物的制剂和给药

[0382] 本公开还提供了公开的寡聚物的制剂和递送。因此，在一实施方案中，本公开涉及包含本文所述的寡聚物和药物可接受的媒介物的组合物。

[0383] 反义寡聚物向靶核酸的有效递送是治疗的重要方面。反义寡聚物递送的途径包括但不限于各种全身途径，包括口服和胃肠外途径，如静脉内、皮下、腹膜内和肌肉内，以及吸入、经皮和局部递送。本领域中技术人员可确定适当的途径，视治疗中个体的状态而定。例如，皮肤的病毒感染治疗中，适当的用于反义寡聚物递送的途径为局部递送，而用于病毒性呼吸系统感染的治疗的反义寡聚物的递送为通过吸入递送。寡聚物也可直接递送至病毒感染的部位或血液循环。

[0384] 反义寡聚物可以以任意便捷的生理学可接受的和/或药物可接受的媒介物而给药。这类组合物可以包括本领域技术人员利用的任何各种标准药物可接受的载体。实例包括但不限于，盐水、磷酸盐缓冲液(PBS)、水、乙醇水溶液、乳剂如油/水乳剂或甘油三酯乳剂、片剂和胶囊。合适的生理学可接受的载体的选择因所选择的给药模式而不同。

[0385] 本发明的化合物(例如，寡聚物)通常可以以游离酸或游离碱形式使用。或者，本发明的化合物可以以酸加成盐或碱加成盐的形式使用。本发明的游离氨基化合物的酸加成盐可以通过本领域公知方法而制备，并且可以由有机酸和无机酸形成。合适的有机酸包括马来酸、富马酸、苯甲酸、抗坏血酸、琥珀酸、甲磺酸、乙酸、三氟乙酸、草酸、丙酸、酒石酸、水杨

酸、柠檬酸、葡糖酸、乳酸、扁桃酸、肉桂酸、天冬氨酸、硬脂酸、软脂酸、乙醇酸、谷氨酸和苯磺酸。合适的无机酸包括盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸和硝酸。碱加成盐包括与羧酸根阴离子形成的那些盐，并且包括与有机阳离子和无机阳离子形成的盐，例如选自碱金属和碱土金属(例如，锂、钠、钾、镁、钡和钙)的那些，以及铵离子及其取代的衍生物(例如，二苄基铵、苄基铵、2-羟基乙基铵等)。因此，术语结构(I)的“药物可接受的盐”旨在包括任意和所有可接受的盐形式。

[0386] 此外，前药也包括在本发明的内容中。前药是任意共价连接的载体，当所述前药给予患者时，其体内释放结构(I)的化合物。前药通常通过以当修饰由常规操作而裂解或体内裂解时产生母体化合物的方式修饰官能团来制备。前药包括，例如，本发明的化合物，其中羟基、氨基或巯基与当给予患者时裂解而形成羟基、氨基或巯基的任何基团结合。因此，前药的典型实例包括(但不限于)：结构(I)化合物的醇和胺官能团的乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物。此外，对于羧酸(-COOH)，可以利用酯，例如甲酯、乙酯等。

[0387] 在一些情况下，可应用脂质体以促进细胞对反义寡核苷酸的摄取(例如参见Williams,S.A.,Leukemia10(12):1980-1989,1996;Lappalainen et al.,Antiviral Res.23:119,1994;Uhlmann et al.,antisense oligonucleotides:a new therapeutic principle,Chemical Reviews,Volume90,No.4,pages544-584,1990;Gregoriadis,G.,Chapter14,Liposomes,Drug Carriers in Biology and Medicine,pp.287-341,Academic Press,1979)。水凝胶也可用作媒介物以用于反义寡聚物给药，例如，如WO93/01286所述。可选择地，寡核苷酸可以以微球或微粒形式给药(例如参见Wu,G.Y.and Wu,C.H.,J.Biol.Chem.262:4429-4432,1987)。可选择地，与反义寡聚物复合的充气微泡的使用可增强对靶组织的递送，如美国专利申请第6,245,747号所述。还可以使用缓释组合物。这些可包括有形制品形式的半渗透的聚合物基质，诸如膜剂或微囊剂。

[0388] 在一实施方案中，通过将感染有病毒的细胞与有效抑制该特定病毒的复制的反义制剂接触，从而反义抑制有效地治疗宿主动物的病毒感染。将反义制剂在合适的药物载体中给予被给定的病毒感染的诸如人类或家畜的哺乳动物个体。值得关注的是反义寡核苷酸阻止RNA病毒在宿主中生长。RNA病毒可在数量上降低或以对宿主的正常生长或发育几乎没有或无损害效应的方式而去除。

[0389] 在方法的一方面，个体为人类个体，例如被诊断患有局部的或全身的病毒感染的患者。患者的状态也可指示本发明的反义寡聚物的预防性给药，例如在患者为(1)免疫功能低下的；(2)烧伤；(3)有留置导管；或(4)将接受或最近接受了手术的情况下。在一优选实施方案中，寡聚物为二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物，包含在药物可接受的载体中，并且口服递送。在另一优选的实施方案中，寡聚物为二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物，包含在药物可接受的载体中，并且静脉内递送(i.v)。

[0390] 在方法的另一应用中，个体为家畜动物，例如鸡、火鸡、猪、牛或山羊等，并且治疗为预防性的或治疗性的。本发明还包括家畜和家禽食物组合物，其包含添加有亚治疗量的上文所述类型的抗病毒反义化合物的食粮。在用添加有亚治疗水平的抗病毒剂的食粮喂养家畜和家禽的方法中，还预期的改善为，其中所述食粮添加有亚治疗量的上文所述的抗病毒寡核苷酸组合物。

[0391] 在一实施方案中，反义化合物可以以有效导致血液浓度峰值为至少200-400nM反

义寡聚物的量和方式来给药。通常，给予一种或多种剂量的反义寡聚物，通常以规律的间隔，持续约1-2周的时间段。用于口服给药的优选剂量为约1-1000mg寡聚物/70kg。在一些情况下，可需要大于1000mg寡聚物/患者的剂量。对i.v.给药而言，优选的剂量为约0.5mg-1000mg寡聚物/70kg。反义寡聚物可以以规律的间隔短时间给药，例如通常两周或更少的时间内每天给药。然而，在一些情况下，寡聚物在较长的时间段内间隔地给药。可在给药之后或与给药同时进行抗生素给药或其他治疗处理。如所示，可以基于免疫测定、其他生物化学测试以及治疗中个体的生理学检查的结果调整治疗方案(剂量、频率、途径等)。

[0392] 利用本发明反义寡核苷酸的有效体内治疗方案可根据持续时间、剂量、频率和给药途径，以及治疗中个体的状态而变化(即预防性给药与响应局部的或全身的感染的给药比较)。因此，此类体内疗法将经常要求通过适合于治疗中特定类型病毒感染的试验而监测，以及相应调整剂量或治疗方案，以便实现最佳的治疗结果。可通过疾病和/或感染的一般指标，诸如全血细胞计数(CBC)、核酸检测方法、免疫诊断试验、病毒培养或异源双链体的检测来监测治疗。

[0393] 可从取自给予反义寡聚物之前、期间以及之后的个体的生物学样品(组织、血液、尿液等)检测本发明抗病毒反义寡聚物体内给药在抑制或消除一种或多种类型的RNA病毒生长方面的功效。此类样品的测定包括(1)利用本领域中技术人员已知的程序，例如电泳凝胶流动分析，监测由靶序列和非靶序列所形成的异源双链体的存在或不存在；(2)如通过诸如ELISA或免疫印迹(Western blotting)的标准技术所测定的，监测病毒蛋白产生的量，或(3)测量对病毒滴度的影响，例如通过Spearman-Karber的方法(参见，例如Pari,G.S.et al.,Antimicrob.Agents and Chemotherapy.39(5):1157-1161,1995;Anderson,K.P.et al.,Antimicrob.Agents and Chemotherapy.40:2004-2011,1996;Cottral,G.E.(ed)in:Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology,pp.60-93,1978)。

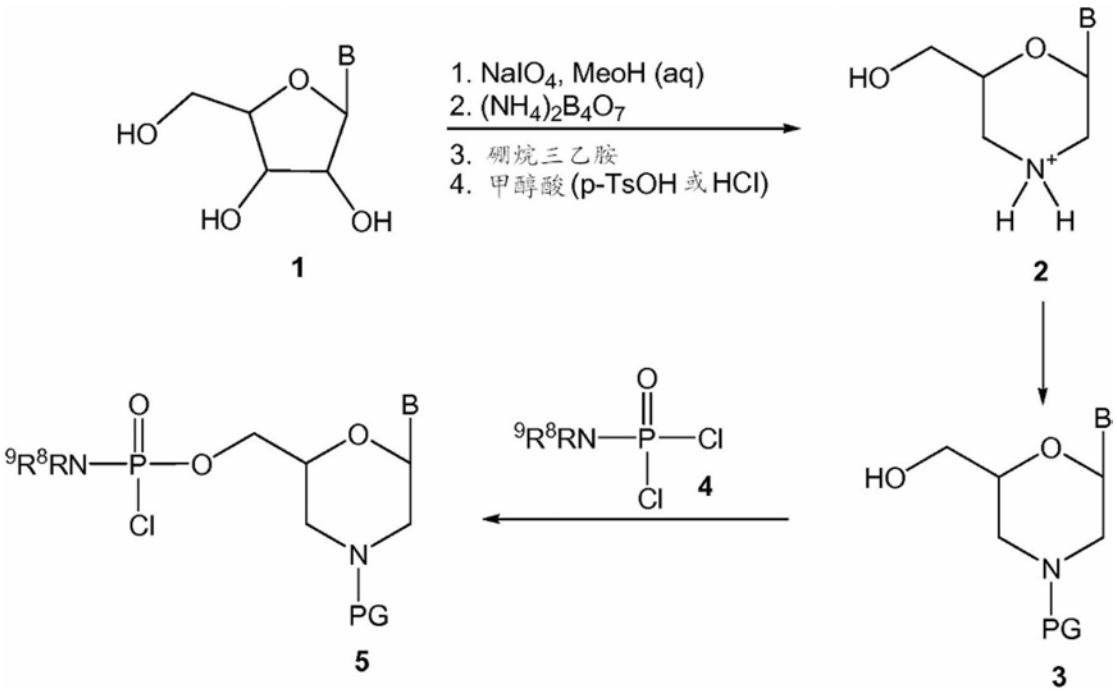
[0394] 在一些实施方案中，寡聚物由哺乳动物细胞主动摄取。在其他实施方案中，寡聚物可以结合到本文所述的转运部分(例如转运肽)，以促进这种摄取。

[0395] E.寡聚物的制备

[0396] 吗啉代亚基、修饰的亚基间键和包含它们的寡聚物可以根据实施例和美国专利第5,185,444和7,943,762号所述的那样而制备，将其整体并入本文作为参考。吗啉代亚基可以根据以下通用反应方案I制备。

[0397] 反应方案1.吗啉代亚基的制备

[0398]



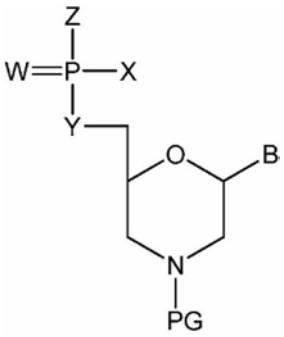
[0399] 参照反应方案1,其中B表示碱基配对部分,并且PG表示保护基团,吗啉代亚基可以从所示的相应的核糖核苷(1)制备。吗啉代亚基(2)可以任选地通过与诸如三苯甲基氯的适当保护基团前体反应来保护。如下文更详述地,3’保护基团通常在固态寡聚物合成过程中移除。碱基配对部分可以合适地保护以用于固态寡聚物合成。对于腺嘌呤和胞嘧啶,合适的保护基团包括苯甲酰基,对于鸟嘌呤,合适的保护基团包括苯乙酰基,并且对于次黄嘌呤(I),合适的保护基团包括新戊酰氧基甲基。新戊酰氧基甲基可以引入到次黄嘌呤杂环碱基的N1位。尽管可以利用未保护的次黄嘌呤亚基,当碱基被保护时活化反应的产率十分出众。其他合适的保护基团包括描述于共同未决的美国申请第12/271,040号公开的那些,将其整体并入本文作为参考。

[0400] 3与活化的磷化合物4的反应导致具有所需键部分的吗啉代亚基(5)。结构4的化合物可以通过本领域技术人员已知的许多方法制备。例如,这类化合物可以通过将相应的胺与氧氯化磷反应来制备。在这种情况下,胺起始材料可以使用本领域内已知的任意方法制备,例如实施例和美国专利第7,943,762号所述的那些方法。尽管以上方案示出了(B)型键(例如,X为-NR^8R^9)的制备,(A)型键(例如,X为二甲基胺)可以以类似的方式制备。

[0401] 结构5的化合物可以在用于制备包含亚基间键的寡聚物的固态自动化寡聚物合成中使用。这类方法是领域内公知的。简而言之,结构5的化合物可以在5’末端修饰以包含与固体支持物的连接基团。例如,化合物5可以通过包含L^1和/或R^{19}的连接基团而连接到固体支持物。示例性方法在图3和4中示出。以这种方式,在寡聚物合成完成并且寡聚物从固体支持物裂解之后,低聚物(oligo)可以包含5’末端修饰。一旦被支持,5的保护基团(例如三苯甲基)被移除,并且游离氨基与结构5的第二化合物的活化的含磷部分反应。重复该顺序直到获得所需长度的低聚物。如果需要5’修饰,则终端5’末端的保护基团可以被移除或保留。可以使用许多方法,或使用碱的示例性处理来裂解与固体支持物的键,从而使低聚物从固体支持物移除。

[0402] 在一实施方案中,本公开提供了用于制备寡聚物的吗啉代亚基,以及相关的方法。

吗啉代亚基具有以下结构(XXXI)，

[0403] 

(XXXI)

[0404] 其中W、X和Y为上文(B)键所定义的，B为碱基配对部分，Z为与固体支持物的键或合适的残余基团，并且PG为保护基团，例如C_7-C_{30}芳烃基。在一些实施方案中，PG为三苯甲基，例如甲氧基三苯甲基。在其他实施方案中，与固体支持物的键包括上文定义的L^2和/或R^{19}。L^2为任选的连接基团，其包括选自以下的键：烃基、羟基、烃氧基、烃基氨基、酰胺、酯、二硫化物、羰基、氨基甲酸酯、二氨基磷酸酯、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、哌嗪和磷酸二酯。L^2的长度没有特殊限定。在一些实施方案中，L^2长度小于60个原子，长度小于50个原子或长度小于40个原子。在一些其他实施方案中，Z为卤素，例如氯。

[0405] 在另一实施方案中，本公开提供了制备任意所公开寡聚物的方法。所述方法包括使用结构(XXXI)的化合物以制备寡聚物。

[0406] 修饰的吗啉代亚基和吗啉代寡聚物的制备在实施例中更详细地描述。包含任意数量的修饰的键的吗啉代寡聚物可以使用本文所述方法、本领域已知和/或在本文作为参考所述的方法而制备。实例中还描述了通过前述(参见，例如PCT公开WO2008036127)制备的PMO+吗啉代寡聚物的整体修饰。

[0407] F.寡聚物的反义活性

[0408] 本公开还提供了抑制蛋白的产生的方法，所述方法包括将编码所述蛋白的核酸暴露于本文公开的寡聚物。因此，如本文所公开的，在一实施方案中，编码这类蛋白的核酸暴露于包含至少一个(B)型键的反义寡聚物，或在其他实施方案中，包含10%-50%的这类修饰的键，其中碱基配对部分Pi形成在有效抑制蛋白产生的位置与一部分核酸有效杂化的序列。寡聚物可以靶向例如mRNA的ATG起始密码子区域，前mRNA的剪切位点或下文所述的病毒靶序列。在另一实施方案中，所述方法包括将编码这类蛋白的核酸暴露于包含至少一个末端修饰(例如，至少一个R^{20}部分)的反义寡聚物。

[0409] 在另一实施方案中，本公开提供了增强具有通过亚基间键连接的吗啉代亚基序列的寡聚物的反义活性的方法，所述亚基间键支持碱基配对部分，所述方法包括修饰本文所述寡聚物以包含至少一个修饰的端基、至少一个(B)型亚基间键或其组合。

[0410] 在一些实施方案中，反义活性的增强可以通过以下证明：

[0411] (i)当反义寡聚物与其靶序列的结合有效地阻断编码的蛋白的翻译起始密码子时，编码的蛋白的表达相对于由相应的未修饰的寡聚物提供的表达降低，或

[0412] (ii)当反义寡聚物与其靶序列的结合有效地阻断当正确剪切时编码所述蛋白的前mRNA中异常剪切位点时，编码的蛋白的表达相对于由相应的未修饰的寡聚物提供的表达增加。适用于测量这些效果的测定在下文描述。在一实施方案中，修饰在本文所述的无细胞

翻译测定、细胞培养中的剪切修正翻译测定或功能动物模型系统的剪切修正增益中提供这种活性。在一实施方案中，活性增加系数为至少2、至少5或至少10。

[0413] 下文描述的是本发明的寡聚物的多种示例性应用，包括抗病毒应用，治疗神经肌肉疾病、细菌感染、炎症和多囊性肾病。这种描述不意图以任何方式限制本发明，而是用于例证通过使用本文所述的包含修饰的亚基间键的寡聚物可以处理的人类和动物疾病的范围。

[0414] G.无细胞测定中的体外活性

[0415] 通过体外和体内的增强的反义活性所证明的，具有部分修饰的键的寡聚物，例如PMO^{apn}(b10)和PMO^{suc}(b45)，对于DNA和RNA比相应的中性化合物具有更高的亲和性。表明本发明的寡聚物当针对多种不同的靶时，相对于完全未修饰的寡聚物提供出众的反义活性。如材料和方法以及实施例27中所述，在第一系列的实验中，制备了靶向MDX小鼠肌营养不良蛋白基因的外显子23的多种未修饰的、修饰的和连接肽的PPMO。顺序如实施例27所示，对于SEQ ID NO:2-5，用“+”指示每个位置处的前述的(1-哌嗪基)氧亚膦基氧基键(如图1B所示)；对于SEQ ID NO:5，用“a”指示4-氨基哌啶基键(结构(b10)；图2)；或用“s”指示4-琥珀酰胺哌嗪基键(结构(b45)；图2)。如实施例27所述，包含本发明的示例性键的PMO寡聚物(例如，PMO^{apn})相对于前述的PMO+化合物更有效。

[0416] 1.靶向ssRNA病毒的茎环二级结构

[0417] 一类示例性的反义抗病毒化合物为本文所述的吗啉代寡聚物，例如包含至少一个(B)型键和/或至少一个末端修饰(例如，至少一个R^{20})或其组合的寡聚物，其具有12-40个亚基序列以及与茎环二级结构相关区域互补的靶向序列，所述茎环二级结构相关区域位于所靶向的病毒的正义RNA链的5’末端40个碱基内。(参见，例如，PCT公开第WO/2006/033933号或美国申请公开第20060269911和2005009291号，将其并入本文作为参考。)

[0418] 该方法包括首先鉴定病毒靶序列，即，感染病毒的正链的5’末端40个碱基内的区域，其序列可以形成内部茎环二级结构。然后通过逐步固相合成构建包含至少一个(B)型键和/或至少一个末端修饰(例如，至少一个R^{20})或其组合的寡聚物，并且在其他实施方案中包含20%至50%的这类修饰的键，并且具有与可以形成内部双链体结构的病毒基因组区域互补的至少12个亚基的靶向序列，其中所述寡聚物可以与病毒靶序列形成由病毒的正义链和寡核苷酸化合物构成的异源双链体结构，并且其特征在于解离T_m为至少45°C，以及这类茎环结构的破坏。

[0419] 可以基于对输入RNA序列的最小游离能量状态的搜索，使用能进行二级结构预测的计算机程序，通过分析5’末端序列、例如5’末端40个碱基来鉴定靶序列。

[0420] 在相关方面，寡聚物可以在抑制哺乳动物宿主细胞中感染RNA病毒的复制的方法中使用，所述RNA病毒具有单链的正义基因组并选自黄病毒科(Flaviviridae)、小核糖核酸病毒科(Picornoviridae)、杯状病毒科(Caliciviridae)、披膜病毒科(Togaviridae)、动脉炎病毒科(Arteriviridae)、冠状病毒科(Coronaviridae)、星状病毒科(Astroviridae)或肝炎病毒科(Hepeviridae)之一。该方法包括向受感染的宿主细胞给予病毒抑制量的本文所述的寡聚物，所述寡聚物具有至少12个亚基的靶向序列，所述靶向序列与可以形成内部茎环二级结构的正链病毒基因组的5’末端40个碱基内的区域互补。当给予宿主细胞时，化合物有效地形成异源双链体结构，其(i)由病毒的正义链和寡核苷酸化合物组成，以及(ii)

特征在于解离Tm为至少45°C和这类茎环二级结构的破坏。化合物可给予病毒感染的或处于病毒感染风险中的哺乳动物个体。

[0421] 靶向登革热和日本脑炎病毒的末端茎环结构的示例性靶向序列在下文分别列举为SEQ ID NO:1和2。

[0422] 靶向ssRNA病毒的末端茎环结构的其他示例性靶向序列也可以见于美国申请第11/801,885号和PCT公开第WO/2008/036127号,将其并入本文作为参考。

[0423] 2.靶向ssRNA病毒的第一开放阅读框

[0424] 第二类示例性反义抗病毒化合物用于抑制具有少于12kb的单链、正义基因组和第一开放阅读框(其编码包含多个功能性蛋白的多蛋白)的小核糖核酸病毒科、杯状病毒科、披膜病毒科、冠状病毒科和黄病毒科的病毒的生长。在具体实施方案中,病毒为来自冠状病毒科的RNA病毒或来自黄病毒科的西尼罗病毒、黄热病病毒或登革热病毒。抑制化合物包括本文所述的反义寡聚物,例如包含至少一个(B)型键和/或至少一个末端修饰(例如,至少一个R^{20})或其组合的寡聚物,其具有与病毒靶序列基本上互补的靶向碱基序列,所述病毒靶序列跨越病毒基因组的第一开放阅读框的AUG起始位点。在方法的一实施方案中,将寡聚物给予感染所述病毒的哺乳动物个体。参见,例如PCT公开第WO/2005/007805号和美国申请公开第2003224353号,将其并入本文作为参考。

[0425] 优选的靶序列是跨越病毒基因组的第一开放阅读框(ORF1)的AUG起始位点的区域。第一ORF通常编码包含非结构蛋白如聚合酶、解旋酶和蛋白酶的多蛋白。"跨越AUG起始位点"意指靶序列包括AUG起始位点一侧的至少3个碱基和另一侧的至少2个碱基(总共至少8个碱基)。优选地,其包含起始位点每侧上的至少4个碱基(总共至少11个碱基)。

[0426] 更通常地,优选的靶位点包括在多个病毒分离物之间保存的靶。其他有利的位点包括IRES(内部核糖体进入位点)、反式激活蛋白结合位点和复制起始位点。通过靶向编码病毒进入和宿主对病毒存在的应答的宿主细胞基因,可以有效地靶向可提供多份冗余基因的复杂且大的病毒基因组。

[0427] 多个病毒基因组序列可从公知来源获得,例如NCBI Genbank数据库。ORF1的AUG起始位点还可以在可信的基因数据库或参考文献中鉴定,或其可以通过在序列中扫描预期ORF1起始位点区域的AUG密码子来发现。

[0428] 4个病毒科中每一个的一般基因组结构在下文给出,然后是对各个科内的所选成员(属、种或株)获得示例性靶序列。

[0429] 3.靶向流感病毒

[0430] 第三类示例性反义抗病毒化合物用于抑制正粘病毒科的病毒的生长,并用于治疗病毒感染。在一实施方案中,宿主细胞与本文所述的寡聚物接触,例如包含至少一个(B)型键和/或至少一个末端修饰(例如,至少一个R^{20})或其组合的寡聚物,或者在其他实施方案中包含20%至50%的这类修饰的键,并且包含与选自以下的靶区域有效杂化的碱基序列:1)负义病毒RNA片段的5'或3'末端25个碱基;2)正义cRNA的5'或3'末端的25个端碱基;3)流感病毒mRNA的AUG起始密码子周边的45个碱基,以及4)经过可变剪接的流感mRNA的剪接供体或受体位点周边的50个碱基。(参见,例如PCT公开第WO/2006/047683号;美国申请公开第20070004661号;和PCT申请第2010/056613号以及美国申请第12/945,081号,将其并入本文作为参考。)

[0431] 使用基于下文表4中列出和实施例29中描述的SEQ ID NO:3的寡聚物,进行支持本发明的实验,并该实验设计为利用具有本发明的修饰的键的PMO靶向甲型流感病毒(H1N1株PR8)的M1/M2片段的实验。

[0432] 表4.包括修饰的亚基间键或端基的流感靶向序列

NG-10-0038	PMOhex	CGG T^{h}TA GAA GAC ^{h}TCA TC^{h}T TT
NG-10-0039	PMOhex	CGG T^{h}TA GAA GAC ^{h}TCA ^{h}TCT ^{h}TT
NG-10-0096	PMOapn	CGG T^{a}TA GAA GAC ^{a}TCA TC^{a}T TT
NG-10-0097	PMOapn	CGG $^{a}T^{a}$TA GAA GAC ^{a}TCA ^{a}TC^{a}T TT
NG-10-0099	PMOpyr	CGG $^{p}T^{p}$TA GAA GAC ^{p}TCA ^{p}TC^{p}T TT
NG-10-0107	PMOthiol	CGG T^{SH}TA GAA GAC ^{SH}TCA TC^{SH}T TT
NG-10-0108	PMOsucc	CGG T^{s}TA GAA GAC ^{s}TCA TC^{s}T TT
NG-10-0111	PMOguan	CGG T^{g}TA GAA GAC ^{g}TCA TC^{g}T TT
NG-10-0141	PMOpyr	CGG T^{p}TA GAA GAC ^{p}TCA TC^{p}T TT
NG-10-0142	PMOpyr	CGG T^{p}TA GAA GAC ^{p}TCA ^{p}TC^{p}T TT
NG-10-0158	PMOglutaric	CGG T^{glu}TA GAA GAC ^{glu}TCA TC^{glu}T TT
NG-10-0159	PMOcyclo-glut	CGG T^{cpglu}TA GAA GAC ^{cpglu}TCA TC^{cpglu}T TT
NG-10-	PMO 胆酸	CGG T^{ca}TA GAA GAC ^{ca}TCA TC^{ca}T TT

[0433]

[0434]

0160		
NG-10-0161	PMOdeoxyCA	CGG T^{dca}TA GAA GAC ^{dca}TCA TC^{dca}T TT
NG-10-0180	PMOapn	TT^{a}T CGA CA^{a}T CGG T^{a}TA GAA GAC ^{a}TCA T
NG-10-0174	PMOm	CGG T^{m}TA GAA GAC ^{m}TCA TC^{m}T TT
NG-10-0222	PMO MeT	CGG T^{Me}TA GAA GAC +TCA TC+T TT
NG-10-0223	PMO FarnT	CGG T^{Farn}TA GAA GAC +TCA TC+T TT
NG-10-0538	PMOapn-三苯甲基	CGG T^{a}TA GAA GAC ^{a}TCA TC^{a}T TT
NG-10-0539	PMOapn-三苯甲基	CGG T^{p}TA GAA GAC ^{p}TCA TC^{p}T TT
NG-10-0015	PMO	CGG TTA GAA GAC TCA TCT TT
NG-11-0170	PMOplus	CGG +TTA GAA GAC +TCA TC+T TT
NG-11-0145	PMOplus-二苯甲基	CGG T+TA GAA GAC +TCA TC+T TT**
NG-11-0148	PMO异丙基Pip	CGG TiprpipTA GAA GAC iprpipTCA TCiprpipT TT
NG-11-0173	PMOpyr	CGG pTTA GAA GAC pTCA TCpT TT
NG-11-0291	三甲基甘氨酸	CGG T*+TA GAA GAC *+TCA TC*+T TT

[0435] **3'-二苯甲基;*+键为PMOplus键的酰化的三甲基甘氨酸;PMOm表示在3-氮位上具有甲基的T碱基。

[0436] 该化合物在治疗哺乳动物的流感病毒感染中特别有用。寡聚物可给予流感病毒感染的或处于流感病毒感染风险中的哺乳动物个体。

[0437] 4.靶向小核糖核酸病毒科的病毒

[0438] 第四类示例性反义抗病毒化合物用于抑制小核糖核酸病毒科的病毒的生长,并用于治疗病毒感染。该化合物在治疗哺乳动物的肠病毒和/或鼻病毒感染中特别有用。在该实施方案中,反义抗病毒化合物包括吗啉代寡聚物,例如包含至少一个(B)型键和/或至少一个末端修饰(例如,至少一个R^{20})或其组合的吗啉代寡聚物,并且具有12-40个亚基的序列,包括具有与病毒RNA序列相关区域互补的靶向序列的至少12个亚基,所述病毒RNA序列位于病毒5'非翻译区的两个32个保守核苷酸区域之一中。(参见,例如PCT公开第WO/2007/030576和WO/2007/030691号;或共同未决且共有的美国申请第11/518,058和11/517,757号,将其并入本文作为参考。)示例性靶序列在下文列为SEQNO:6。

[0439] 5.靶向黄病毒科的病毒

[0440] 第五类示例性反义抗病毒化合物用于在动物细胞中抑制黄病毒的复制。该类的示例性反义寡聚物为包含至少一个(B)型键和/或至少一个末端修饰(例如,至少一个R^{20})或其组合的吗啉代寡聚物,长度为8-40个核苷酸碱基,并具有与病毒正链RNA基因组区域互补的至少8个碱基的序列,所述区域包括至少一部分的正链黄病毒RNA的5'环化序列(5'-CS)或3'-CS序列。非常优选的靶为3'-CS,并且登革热病毒的示例性靶向序列在下文列为SEQ ID NO:7。(参见,例如PCT公开第WO/2005/030800号或共同未决且共有的美国申请第10/913,996号,将其并入本文作为参考。)

[0441] 6.靶向巢病毒科的病毒

[0442] 第六类示例性的反义抗病毒化合物用于在病毒感染的动物细胞中抑制巢病毒(nidovirus)的复制。该类的示例性反义寡聚物为本公开描述的包含至少一个(B)型键和/或至少一个末端修饰(例如,至少一个R^{20})或其组合的吗啉代寡聚物,并且其包含8-25个核苷酸碱基,并具有破坏正链病毒基因组的5'前导区中的转录调节序列(TRS)与负链3'次基因组区之间的碱基配对的序列(参见例如PCT公开第WO/2005/065268号或美国申请公开第20070037763号,将其并入本文作为参考)。

[0443] 7.丝状病毒的靶向

[0444] 在另一实施方案中,本文所述的一种或多种寡聚物可以在抑制宿主细胞中埃博拉病毒或马尔堡病毒的复制的方法中使用,通过将该细胞与本文所述的寡聚物接触,例如包含至少一个(B)型键和/或至少一个末端修饰(例如,至少一个R^{20})或其组合的吗啉代寡聚物,或在其他实施方案中包含20%-50%的这类修饰的键,如下文进一步详述,其具有与靶序列互补的靶向碱基序列,所述靶序列由正链mRNA的AUG起始位点区域内的至少12个连续的碱基组成。

[0445] 丝状病毒基因组为不分节的反义方向的约19,000个碱基的单链RNA。基因组编码来自与vRNA互补的单顺反子mRNA的7种蛋白。

[0446] 靶序列为跨越选择的埃博拉病毒蛋白的AUG起始密码子或仅位于其下游(25个碱基内)或上游(100个碱基内)的正链(有义)RNA序列,或负链病毒RNA的3'末端30个碱基。优选的蛋白靶为病毒聚合酶亚基VP35和VP24,尽管还涉及L、核蛋白NP和VP30。其中,早期蛋白是有利的,例如VP35比更晚表达的L聚合酶更有利。

[0447] 在另一实施方案中,本文所述的一种或多种寡聚物可以在抑制宿主细胞中埃博拉病毒或马尔堡病毒复制的方法中使用,通过将该细胞与本文所述的包含至少一个修饰的亚基间键的寡聚物接触,或在其他实施方案中包含20%至50%的这类修饰的键,并且其具有与靶序列互补的靶向碱基序列,所述靶序列由丝状病毒mRNA序列的正链mRNA的AUG起始位点区域内的至少12个连续碱基组成。(参见,例如PCT公开第WO/2006/050414号或美国专利第7,524,829和7,507,196号,以及美国申请第12/402,455;12/402,461;12/402,464和12/853,180号继续申请,将其并入本文作为参考。)

[0448] 8.沙粒病毒的靶向

[0449] 在另一实施方案中,本文所述的寡聚物可以在抑制哺乳动物细胞中沙粒病毒科物种的病毒感染的方法中使用。在一方面,寡聚物可以用于治疗受所述病毒感染的哺乳动物个体。(参见,例如PCT公开第WO/2007/103529号或美国申请第7,582,615号,将其并入本文

作为参考。)

[0450] 表5是根据旧大陆或新大陆沙粒病毒分类所组织的被本发明寡聚物靶向的示例性靶病毒列表。

[0451] 表5.靶向的沙粒病毒

[0452]

科	属	病毒
沙粒病毒科	沙粒病毒属	旧大陆沙粒病毒
		沙拉病毒(LASV)
		液巴球性泳络从脑膜炎病毒(LCMV)
		Mopeia病毒(MOPV)
		新大陆沙粒病毒
		瓜纳瑞托病毒(GTOV)
		胡宁病毒(JUNV)
		马丘波病毒(MACV)
		皮钦德病毒(PICV)
		皮里陶病毒(PIRV)
		萨比亚病毒(SABV)
		塔卡布病毒(TCRV)
		白水阿罗约病毒(WWAV)

[0453] 沙粒病毒的基因组由命名为S(小)和L(大)的两条单链RNA片段组成。在病毒体中，S片段RNA与L片段RNA的摩尔比约为2:1。多种沙粒病毒的完整S片段RNA序列已经被确认，范围为3,366-3,535个核苷酸。多种沙粒病毒的完整L片段RNA序列也已经被确认，范围为7,102-7,279个核苷酸。S和L RNA片段的3’末端序列在最后19个核苷酸中17个相同。这些末端序列在所有已知的沙粒病毒中保守。每个基因组RNA起始处的5’末端19或20个核苷酸与每个相应的3’末端不完美的互补。由于这种互补性，3’和5’末端被认为是碱基配对的并形成锅柄样结构。

[0454] 在感染的细胞中发生感染病毒体或病毒RNA(vRNA)的复制，以形成反基因链的病毒互补的RNA(vcRNA)链。vRNA和vcRNA均编码互补mRNA;因此，沙粒病毒被分类为双义RNA病毒而不是反义或正义RNA病毒。病毒基因的双义方向在L片段和S片段上。NP和聚合酶基因分别位于S和L vRNA片段的3’端处，并且以常规的反义方式被编码(即，它们通过转录vRNA或基因组互补mRNA来表达)。GPC和Z分别位于S和L vRNA片段的5’末端处，以mRNA有义方式被编码，但没有证据表明它们是从基因组vRNA直接翻译的。这些基因被表达而不是通过来自反基因组(即，vcRNA)的基因组有义mRNA的转录，基因组vRNA的全长互补拷贝用作复制中间体。

[0455] 沙粒病毒科的病毒的示例性靶向序列在下文列为SEQ ID NO:8。

[0456] 9.呼吸道合胞病毒的靶向

[0457] 呼吸道合胞病毒(RVS)是幼儿最重要的呼吸道病原体。RSV引发的下游呼吸道疾病状况，例如毛细支气管炎和肺炎，经常需要对小于1岁龄的儿童进行住院治疗。患有心肺疾病的儿童和那些早产儿特别易于患有源自于这种感染的严重病症。RSV感染也是老年成人

和高危成人的重要疾病，并且其是老年人中病毒性肺炎的第二常见的明确病因(Falsey, Hennessey et al.2005)。世界卫生组织估计RSV在世界范围内每年导致六千四百万例临床感染和十六万例死亡。目前没有可用的预防RSV感染的疫苗。尽管在过去的数十年内，我们对RSV生物学、传染病学、病理生理学和宿主免疫应答方面的理解有了许多重要进步，但关于患有RSV感染的婴儿和儿童的最佳管理仍然存在相当大的争议。三唑核苷是唯一被批准的用于治疗RSV感染的抗病毒药物，但其的使用受限于高危或严重患病的婴儿。三唑核苷的实用性受限于其成本、多变的功效和产生抗性病毒的趋势(Marquardt1995;Prince2001)。公知目前需要其他有效的抗RSV制剂。

[0458] 已知肽结合的PMO(PPMO)可以在组织培养中和体内动物模型系统中有效地抑制RSV(Lai,Stein et al.2008)。在两种人呼吸道细胞系的培养物中测试了两种反义PPMO的抗RSV活性，所述PPMO被设计为靶向包含RSV L mRNA的5'末端区域和反义起始位点区域的序列。它们中的一个(RSV-AUG-2;SEQ ID NO10)使病毒滴度降低了大于2.0log_{10}。用RSV-AUG-2PPMO在RSV接种之前鼻内(i.n.)处理RALB/c小鼠，在感染后(p.i.)第5天产生肺组织中病毒滴度的1.2log_{10}的降低，并在感染后第7天减弱肺炎。这些数据表明RSV-AUG-2提供潜在的抗RSV活性，值得作为潜在的治疗应用的候选者而进一步研究(Lai,Stein et al.2008)。尽管上文所述的RSV-AUG-2PPMO的成功，但出于毒性关注和商品成本考虑，还需要避免在反义抗RSV治疗剂中并入肽结合物。因此，在本发明的另一实施方案中，本文所述的一种或多种寡聚物可以在抑制宿主细胞中RSV复制的方法中使用，通过将该细胞与本文所述的寡聚物接触，例如包含至少一个(B)型键和/或至少一个末端修饰(例如，至少一个R^{20})或其组合的吗啉代寡聚物，或在其他实施方案中10%-50%的这类修饰的键，如下文进一步描述的，其具有与靶序列互补的靶向碱基序列，所述靶序列由来自RSV的mRNA的AUG起始位点区域内的至少12个连续碱基组成。

[0459] RSV的L基因编码病毒RNA依赖性RNA聚合酶复合物的关键组分。设计为针对跨越RSV L基因mRNA的AUG反义起始位点密码子的序列的反义PPMO，以RSV-AUG-2PPMO的形式与来自“基因起始”序列(GS)的序列互补，所述“基因起始“序列存在于LmRNA的5'末端至编码序列中的13个nt。因此，优选的L基因靶向序列与来自下列的任意12个连续碱基互补，即来自L基因mRNA的5'端沿3'方向延伸的40个碱基，或来自向L基因编码序列延伸的22个碱基(在下文表3中示为SEQ ID NO:9)。示例性RSV L基因靶向序列在下文表3中列为SEQ ID NO:10-14。任何本文所述的亚基间修饰可以并入寡聚物以提供增加的反义活性、改善的细胞内递送和/或组织特异性，以用于改善治疗活性。包含本发明的亚基间键的示例性寡聚物在下文表6中列出。

[0460] 表6.RSV靶和靶向序列

[0461]

名称	序列(5'-3')	SEQ ID NO
L靶	GGGACAAAATGGATCCCATTATTAATGGAAATTCTGCTAA	9
RSV-AUG-2	TAATGGGATCCATTTTGTCCC	10
RSV-AUG3	AATAATGGGATCCATTTTGTCCC	11
RSV-AUG4	CATTAATAATGGGATCCATTTTGTCCC	12
RSV-AUG5	GAATTTCCATTAATAATGGGATCCATTTTG	13
RSV-AUG6	CAGAATTTCCATTAATAATGGGATCCATT	14
RSV-AUG3apn*	AATAA^{apn}TGGGA^{apn}TCCA^{apn}TT^{apn}TTG^{apn}TCCC	11
RSV-AUG3guan	AATAA^{guan}TGGGA^{guan}TCCA^{guan}TT^{guan}TTG^{guan}TCCC	11

[0462] 10.神经肌肉疾病

[0463] 在另一实施方案中,提供治疗寡聚物以用于治疗与哺乳动物个体的神经肌肉疾病相关的疾病状态。已证明增强向肌肉组织的转运的示例性亚基间寡聚物修饰包括具有结构b6、b10、b51和b54的亚基间键的那些。在M23D反义寡聚物(SEQ ID NO:16)中包括这类键的反义寡聚物如实施例中所述的那样,在杜兴氏肌营养不良(DMD)的MDX小鼠模型中测试活性。在一些实施方案中使用的包括所述键的示例性寡聚物在表7中列出。在一些实施方案中,治疗化合物可以选自:

[0464] (a)如之前所述,靶向人肌生成抑制蛋白的用于治疗肌肉消耗疾病状况的反义寡聚物,其具有与鉴定为SEQ ID NO:18的人肌生成抑制蛋白mRNA的靶区域中的至少12个连续碱基互补的碱基序列(参见,例如美国专利申请第12/493,140号,将其并入本文作为参考;和PCT公开第WO2006/086667号)。示例性鼠科靶向序列被列为SEQ ID NO:19-20。

[0465] (b)如之前所述,可以在DMD蛋白(肌营养不良蛋白)中产生外显子跳跃以恢复肌营养不良蛋白的部分活性而用于治疗DMD的反义寡聚物,例如具有选自SEQ ID NO:22-35的序列的PMO(参见,例如PCT公开第WO/2010/048586和WO/2006/000057号或美国专利公开第US09/061960号,将所有这些并入本文作为参考)。

[0466] 多种其他神经肌肉疾病可以通过使用本发明的修饰的键和端基而治疗。治疗脊髓性肌肉萎缩症(SMA)和强直性肌营养不良(DM)的示例性化合物在下文讨论。

[0467] SMA是常染色体隐形疾病,由脊索中的α运动神经元的慢性损失引起,并可以影响儿童和成人。降低的存活运动神经元(SMD)的表达是该疾病的原因(Hua,Sahashi et al.2010)。引起SMA的突变位于SMN1基因,而非同源基因SMN2如果从缺乏外显子7的可变剪接形式(δ7SMN2)表达,可以允许通过补偿SMN1的损失而存活。靶向内含子6、外显子7和内含子7的反义化合物已经被证明不同程度地诱导外显子7内含。靶向内含子7的反义化合物是优选的(参见,例如PCT公开第WO/2010/148249、WO/2010/120820、WO/2007/002390号和美国专利第7838657号)。靶向SMN2前mRNA并诱导增强的外显子7内含的示例性反义序列在下文列举为SEQ ID NO:36-38。预期使用本文所述的修饰的键和端基的这些寡聚物序列的所选

修饰相对于本领域内已知的那些具有改善的性质。此外，预期靶向SMN2基因的内含子7并包含本发明特征的任何寡聚物具有诱导外显子7内含的性质并向SMA患者提供治疗益处。1型(DM1)和2型(DM2)强直性肌营养不良是由导致神经肌肉退化的毒性RNA的表达引起的显性遗传性疾病。DM1和DM2分别与转录本强直性肌营养不良蛋白激酶(DMPK)和锌指蛋白9(ZNF9)的3'-UTR和内含子1区域中的长聚CUG和聚CCUG重复有关(参见，例如WO2008/036406)。尽管正常个体具有多达30个CTG重复，但DM1患者携带大量重复，范围为50至数千个。疾病的严重程度和发作的年龄与重复的数目相关。成年发作的患者显示更温和的症状并具有少于100个重复，青少年发作的DM1患者携带多达500个重复，而先天性案例通常具有约上千个CTG重复。包含CUG重复的扩大的转录本形成二级结构，以细胞核聚集点的形式在核中积累，并螯合RNA结合蛋白(RNA-BP)。多种RNA-BP已经与该疾病有牵连，包括盲肌样(MBNL)蛋白和CUG结合蛋白(CUGBP)。MBNL蛋白与果蝇盲肌(Mbl)蛋白是同源的，是光感受器和肌肉分化所必须的。MBNL和CUGBP已被鉴定为DM1中受影响的转录本的拮抗剪接调节剂，例如心肌肌钙蛋白T(cTNT)、胰岛素受体(IR)和肌肉特异性氯通道(CIC-1)。

[0468] 本领域内已知，靶向DMPK基因的扩大的重复的反义寡核苷酸可以移除RNA-BP螯合，并逆转DM1动物模型中的强直性症状(WO2008/036406)。预期包括本发明特征的寡聚物会向DM1和DM2患者提供改善的活性和治疗潜能。上述靶向聚CUG和聚CCUG重复的示例性序列在下文列举为SEQ ID NO:39-55，并进一步描述于美国申请第13/101,942号，将其并入本文作为参考。

[0469] 预期本发明的其他实施方案用于治疗神经肌肉疾病，并包括设计为治疗其他DNA重复不稳定性遗传疾病的寡聚物。这些疾病包括WO2008/018795所描述的亨廷顿病、脊髓小脑性共济失调、X连锁脊髓和延髓肌肉萎缩和10型脊髓小脑共济失调(SCA10)。

[0470] 实施例27描述了使用MDX小鼠(DMD的鼠科模型)的为支持本发明而进行的实验。

[0471] 表7.包括修饰的亚基间键和/或3'和/或5'端团的M23D序列(SEQ ID NO:15)

[0472]

NG	PMO-X修饰	5'	序列	3'
NG-10-0383	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯基乙酰基
NG-10-0325	triphenylphos	OH	GGC CAA ACC FCG GCF TAC CFG AAA T	triphenylphos
NG-10-0272	PMO-法呢基	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	法呢基
NG-10-0102	PMO	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯甲基

[0473]

NG	PMO-X修饰	5′	序列	3′
NG-10-0330	三甲氧基苯甲酰	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三甲氧基苯甲酰
NG-10-0056	PMOplus 5′-*pol*	EG3	GGC C^{+}**A**$^{+}$**A** $^{+}$**A**CC TCG GCT TAC CTG AAA T	H
NG-07-0064	PMO-3′-三苯甲基	H-Pip	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯甲基
NG-10-0382	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯基丙酰基
NG-10-0278	PMOpyr	EG3	GGC CAA ACC pTCG GCpT pTAC CpTG AAA pT	H
NG-10-0210	PMOapn	EG3	GGC C^{a}**A**^{a}**A** ^{a}**A**CC TCG GCT TAC CTG AAA T	H
NG-10-0098	PMOpyr	EG3	GGC CAA ACC ^{P}**T**CG GC^{P}**T** TAC C^{P}**T**G AAA T	H
NG-10-0070	PMOapn	EG3	GGC CAA ACC ^{a}**T**CG GC^{a}**T** TAC C^{a}**T**G AAA ^{a}**T**	H
NG-10-0095	PMOapn	EG3	GGC CAA ACC ^{a}**T**CG GC^{a}**T** ^{a}**T**AC C^{a}**T**G AAA ^{a}**T**	H
NG-10-0317	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	法呢基
NG-	PMO triMe Gly	EG3	GGC CAA ACC FCG GCF TAC CFG AAA F	三甲基甘氨酸

[0474]

NG	PMO-X修饰	5′	序列	3′
10-0477				
NG-10-0133	PMOapn	OH	GGC C^{a}AA ^{a}ACC ^{a}TCG GC^{a}T ^{a}TAC C^{a}TG AAA ^{a}T	H
NG-10-0387	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	2′-OH，二苯基乙酰
NG-10-0104	PMOguan	EG3	GGC CAA ACC ^{g}TCG GC^{g}T TAC C^{g}T G AAA T	Δ^{g}
NG-10-0420	PMOplus 甲基	EG3	GGC CAA ACC ^{m*}TCG GC^{m*}T TAC C^{m*}TG AAA ^{m*}T	三苯甲基
NG-10-0065	PMOtri	EG3	GGC CAA ACC ^{t}TCG GC^{t}T TAC C^{t}T G AAA T	H
NG-10-0607	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	9-芴-羧基
NG-10-0060	PMOcp	EG3	GGC CAA ACC ^{cp}TCG GC^{cp}T TAC C^{cp}T G AAA T	H
NG-10-0162	PMO-$COCH_2SH$	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	$COCH_2SH$
NG-10-0328	二苯基乙酰基	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	二苯基乙酰基
NG-10-	PMOapnPMOtri	OH	GGC C^{a}AA ^{a}ACC ^{t}TCG GC^{t}T ^{t}TAC C^{t}TG AAA ^{t}T	H

[0475]

NG	PMO-X修饰	5′	序列	3′
0134				
NG-10-0386	PMO	DPA	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	5′-二苯基乙炔，3′-三苯甲基
NG-07-0064	PMO-3′-三苯甲基	H-Pip	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯甲基
NG-10-0059	PMOcp	EG3	GGC CAA ACC ^{cp}**T**CG GC^{cp}**T** ^{cp}**T**AC C^{cp}**T** G AAA ^{cp}**T**	H
NG-10-0135	PMOtri	OH	GGC CAA ACC ^{t}**T**CG GC^{t}**T** ^{t}**T**AC C^{t}**T**G AAA ^{t}**T**	H
NG-10-0168	PMOapn PMOcys	OH	GGC CAA ACC ^{a}**T**CG GC^{a}**T** ^{a}**T**AC C^{a}**T**G AAA ^{SHc}**T**	H
NG-10-0113	PMOapnPMOtri	OH	GGC CAA ACC ^{a}**T**CG GC^{t}**T** ^{t}**T**AC C^{a}**T**G AAA ^{a}**T**	H
NG-10-0385	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	二苯基磷酰基
NG-10-0279	PMO	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	拢牛儿基
NG-10-0055	PMOplus *disp*	EG3	GGC C^{+}**A**A $^{+}$**A**CC $^{+}$**T**CG GC^{+}**T** TAC C^{+}**T**G AAA T	H
NG-10-0105	PMOsucc	EG3	GGC CAA ACC ^{a}**T**CG GC^{a}**T** TAC C^{a}**T** G AAA T	Δ^{s}

[0476]

NG	PMO-X修饰	5′	序列	3′
NG-10-0805	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC ^{Etpip}TCG GC^{Etpip}T TAC C^{Etpip}TG AAA ^{Etpip}T	H
NG-10-0811	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC ^{pyrQMe}TCG GC^{pyrQMe}T TAC C^{pyrQMe}TG AAA ^{pyrQMe}T	H
NG-10-0057	PMOplus 3'-*pol*	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC C^{+}TG $^{+}$A^{+}A^{+}A T	H
NG-10-0625	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	5′-羧基荧光素
NG-10-0804	二聚物	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	二聚化的
NG-10-0066	PMOtri	EG3	GGC CAA ACC ^{t}TCG GC^{t}T TAC C^{t}T G AAA ^{t}T	H
NG-10-0280	PMO 二硫化物	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	$COCH_2CH_2SSPy$
NG-10-0212	PMOapn	EG3	GGC C**aAaA** **aA**CC **aT**CG GC**aT** **aTaA**C C**aT**G **aAaAaA** **aT**	H
NG-10-0156	3'-MeOtrityl	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	MeO-Tr
NG-10-0062	PMOhex	EG3	GGC CAA ACC ^{b}TCG GC^{b}T TAC C^{b}T G AAA ^{b}T	H
NG-	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	胍基

[0477]

NG	PMO-X修饰	5′	序列	3′
11-0043				
NG-10-0206	PMOplus	EG3	GGC C+A+A +ACC +TCG GC+T +T+AC C+TG +A+A+A +T	H
NG-10-0383	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯基乙酰基
NG-10-0325	triphenylphos	OH	GGC CAA ACC FCG GCF TAC CFG AAA T	triphenylphos
NG-10-0272	PMO-法呢基	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	法呢基

[0478] *二聚化是指寡聚物通过连接两个单体的3’端的键而二聚化。例如，键可以为-$COCH_2CH_2$-S-CH($CONH_2$)CH_2-CO-$NHCH_2CH_2CO$-或任何其他合适的键。

[0479] 11.抗菌应用

[0480] 在另一实施方案，本发明包括用于治疗哺乳动物宿主的细菌感染的抗菌反义寡聚物。在一些实施方案中，寡聚物包含至少一个(B)型键和/或至少一个末端修饰(例如，至少一个R^{20})或其组合，具有10-20个碱基和至少10个连续碱基的靶向序列，所述连续碱基与用于以下的感染细菌mRNA的靶区域互补：酰基载体蛋白(acpP)、回旋酶A亚基(gyrA)、ftsZ、核糖体蛋白S10(rpsJ)、leuD、mgtC、pirG、pcaA和cmal基因，其中所述靶区域包含细菌mRNA的翻译起始密码子，或翻译起始密码子上游(即，5’)或下游(即，3’)方向20个碱基内的序列，并且其中所述寡聚物与所述mRNA结合以形成异源双链体从而抑制细菌的复制。

[0481] 还包括寡聚物的结合物，其中结合到寡聚物的是在肽的羧基末端连接于寡核苷酸的富精氨酸载体蛋白，并且优选地由肽序列$(RXX)_n$-或$(RXR)_n$表示，其中X为不带电的氨基酸，其选自：丙氨酸、β-丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和6-氨基己酸，并且n=2至4。在示例性实施方案中，载体肽具有序列$(RFF)_n$、$(RFF)_nR$或$(RXR)_n$，其中n=2至4。载体肽可以通过一个或两个氨基酸连接基团在其C末端连接到寡聚物的一端，例如3’或5’端，例如连接基团AhxβAla，其中Ahx为6-氨基己酸并且βAla为β-丙氨酸。当与寡核苷酸3’或5’端结合时，载体肽具有以至少为10的系数，优选为10^2或10^3的系数增强寡核苷酸的抗菌活性的能力，如通过在8小时内体外细菌生长的抑制所测量的。在优选的实施方案中，载体肽具有序列$(RAhxR)_n$-，其中n=4。

[0482] 12.调节核激素受体

[0483] 在另一实施方案中，本发明涉及用于调节来自核激素受体超家族(NHRSF)的核激

素受体(NHR)的表达的组合物和方法，主要通过控制或改变编码受体的前mRNA的剪接。具体NHR的实例包括糖皮质素受体(GR)、黄体酮受体(PR)和雄性激素受体(AR)。在某些实施方案中，本文所述的反义寡核苷酸和制剂导致受体的碱基非依赖形式或其他所选形式的表达增加，并且它们的非活化形式的表达降低。

[0484] 本发明的实施方案包括寡聚物和寡核苷酸类似物，例如包含至少一个(B)型键和/或至少一个末端修饰(例如，至少一个R^{20})或其组合的寡聚物，其与NHR的所选外显子或内含子序列互补，包括“配体结合外显子”和/或NHRSF前mRNA的邻近内含子，以及本文所述的其他NHR结构域。术语“配体结合外显子”指存在于野生型mRNA中，但从初级转录本(“前mRNA”)中移除以产生配体非依赖形式mRNA的外显子。在某些实施方案中，互补性可以基于跨越剪接位点的前mRNA的序列中的序列，其包括但不限于，基于跨越外显子-内含子接合点的序列的互补性。在其他实施方案中，互补性可以单独基于内含子序列。在其他实施方案中，互补性可以单独基于内外显子序列。(参见，例如，美国申请第13/046,356号，将其并入本文作为参考。)

[0485] NHR调节剂可以用于治疗NHR相关疾病，包括与基因的表达产物相关的疾病，所述基因的转录受NHR刺激或抑制。例如，抑制AP-1和/或NF-κB的NHR调节剂可以用于治疗炎性和免疫性疾病和病症，例如骨关节炎、类风湿关节炎、多发性硬化症、哮喘、炎症性肠疾病、移植排斥和移植物抗宿主病，以及本文所描述的和本领域已知的其他疾病。拮抗反式激活的化合物可以用于治疗与糖皮质激素的水平增加有关的代谢性疾病，例如糖尿病、骨质疏松症和青光眼等。此外，激动反式激活的化合物可以用于治疗与糖皮质激素缺乏有关的代谢性疾病，例如阿狄森病等。

[0486] 本发明的实施方案包括调节细胞的细胞核NHR活性或表达的方法，包括将所述细胞与由吗啉代亚基组成的反义寡聚物接触从而调节NHR的活性或表达，所述吗啉代亚基通过使一个亚基的吗啉氮连接于邻近亚基的5’环外碳的含磷的亚基间键而连接，其中所述寡核苷酸包含10-40个碱基和与靶序列互补的至少10个连续碱基的靶向序列，其中所述靶序列为NHR的前mRNA转录本。在某些实施方案中，寡聚物改变前mRNA转录本的剪接并增加NHR变体的表达。在一些实施方案中，寡聚物诱导前mRNA转录本的一个或多个外显子的全部或部分外显子跳跃。在某些实施方案中，一个或多个外显子编码至少一部分的NHR的配体结合域，并且变体是NHR的配体非依赖形式。在某些实施方案中，一个或多个外显子编码至少一部分的NHR的反式激活域，并且变体具有降低的转录激活活性。在某些实施方案中，一个或多个外显子编码至少一部分的NHR的DNA结合域。在某些实施方案中，一个或多个外显子编码至少一部分的NHR的N末端激活域。在某些实施方案中，一个或多个外显子编码至少一部分的NHR的羧基末端域。在具体实施方案中，变体结合NF-KB、AP-1或以上二者，并降低一个或多个其促炎性靶基因的转录。

[0487] 在某些实施方案中，寡聚物激动NHR的反式激活转录活性。在其他实施方案中，寡聚物拮抗NHR的反式激活转录活性。在某些实施方案中，寡聚物激动NHR的转录抑制活性。在其他实施方案中，寡聚物拮抗NHR的转录抑制活性。在具体实施方案中，寡聚物拮抗NHR的反式激活转录活性并且激动NHR的转录抑制活性。(参见，例如美国申请第61/313,652号，将其并入本文作为参考。)

实施例

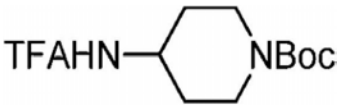
[0488] 除非另有所指，从Sigma-Aldrich-Fluka获得所有化学品。从Carbosynth Limited,UK获得苯甲酰腺苷、苯甲酰胞苷和苯乙酰鸟苷。

[0489] 利用本领域已知的方法以及未决的美国申请第12/271,036和12/271,040号和PCT公开第WO/2009/064471号所述的方法，进行本文所述的PMO、PMO+、PPMO和包含其他键修饰的PMO的合成。

[0490] 基本上如PCT公开第WO/2009/064471号所述的那样来合成具有3’三苯甲基修饰的PMO，除了省略脱三苯甲基步骤。

[0491] 实施例1

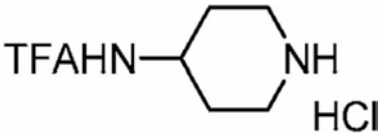
[0492] 4-(2,2,2-三氟乙酰胺基)哌啶-1-羧酸叔丁酯

[0493] 

[0494] 向4-氨基哌啶-1-羧酸叔丁酯(48.7g,0.243mol)和DIPEA(130mL,0.749mol)的DCM(250mL)悬浮液中逐滴加入三氟乙酸乙酯(35.6mL,0.300mol)，同时搅拌。20小时之后，用柠檬酸溶液(200mL×3,10%w/vaq)和碳酸氢钠溶液(200mL×3,conc aq)洗涤溶液，干燥($MgSO_4$)，并经过二氧化硅(24g)过滤。用DCM洗涤二氧化硅，将合并的洗脱液部分地浓缩(100mL)并在下一步骤中直接使用。APCI/MS，计算$C_{12}H_{19}F_3N_2O_3$:296.1,实测:m/z=294.9(M-1)。

[0495] 实施例2

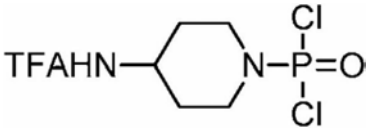
[0496] 2,2,2-三氟-N-(哌啶-4-基)乙酰胺盐酸盐

[0497] 

[0498] 向搅拌的实施例1标题化合物的DMC溶液(100mL)滴加氯化氢(250mL,1.0mol)的1,4-二氧六环(4M)溶液。持续搅拌6小时，然后过滤悬浮液，用二乙醚(500mL)洗涤固体，从而以白色固体形式提供标题化合物(54.2g,96%的产率)。APCI/MS计算$C_7H_{11}F_3N_2O$:196.1,实测:m/z=196.9(M+1)。

[0499] 实施例3

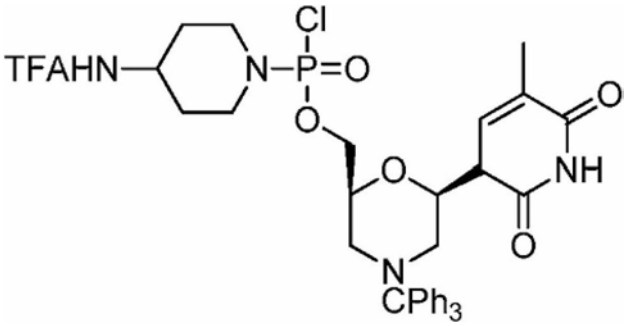
[0500] (4-(2,2,2-三氟乙酰胺基)哌啶-1-基)磷酰二氯

[0501] 

[0502] 向实施例2标题化合物(54.2g,0.233mol)的DCM(250mL)的冷(冰/水浴)悬浮液滴加三氯氧化磷(23.9mL,0.256mol)和DIPEA(121.7mL,0.699mol)，并搅拌。15分钟之后，去除浴，并继续搅拌混合物以便回暖至室温。1小时之后，部分浓缩混合物(100mL)，过滤悬浮液，并用二乙醚洗涤固体，从而以白色固体形式提供标题化合物(43.8g,60%的产率)。部分浓缩洗提液(100mL)，过滤所得悬浮液，并用二乙醚洗涤固体，从而提供额外的标题化合物(6.5g,9%的产率)。ESI/MS计算1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物$C_{17}H_{22}ClF_3N_5O_4P$:483.1,实测:m/z=482.1(M-1)。

[0503] 实施例4

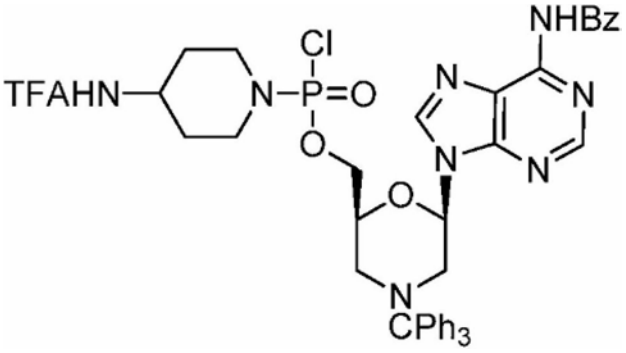
[0504] ((2S,6S)-6-((R)-5-甲基-2,6-二氧-1,2,3,6-四氢吡啶-3-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)甲基(4-(2,2,2-三氟乙酰胺基)哌啶-1-基)氯磷酸酯

[0505] 

[0506] 向实施例3标题化合物(29.2g,93.3mmol)的DCM(100mL)的搅拌的冷(冰/水浴)溶液滴加Mo(Tr)T#(22.6g,46.7mmol)、2,6-二甲基吡啶(21.7mL,187mmol)和4-(二甲基氨基)吡啶(1.14g,9.33mmol)的DCM(100mL)溶液,持续10分钟。使水浴回暖至室温。15小时之后,用柠檬酸溶液(200mL×3,10%w/v aq)洗涤溶液,干燥($MgSO_4$),浓缩并将粗油直接装载在柱上。浓缩色谱分析[SiO_2柱(120g),己烷/EtOAc洗脱液(梯度从1:1至0:1),重复3次]级分,从而以白色固体形式提供标题化合物(27.2g,77%的产率)。ESI/MS计算1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物$C_{46}H_{50}F_3N_8O_8P$:930.3,实测:m/z=929.5(M-1)。

[0507] 实施例5

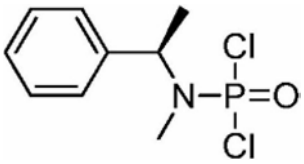
[0508] ((2S,6R)-6-(6-苯甲酰胺基-9H-嘌呤-9-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)甲基(4-(2,2,2-三氟乙酰胺基)哌啶-1-基)氯磷酸酯

[0509] 

[0510] 以与实施例4所述方式类似的方式合成标题化合物,从而以白色固体形式提供标题化合物(15.4g,66%的产率)。ESI/MS计算1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物$C_{53}H_{53}F_3N_{11}O_7P$:1043.4,实测:m/z=1042.5(M-1)。

[0511] 实施例6

[0512] (R)-甲基(1-苯基乙基)磷酰胺二氯

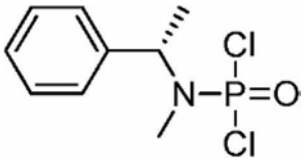
[0513] 

[0514] 向三氯氧化磷(2.83mL,30.3mmol)的DCM(30mL)的冷(冰/水浴)溶液依次滴加2,6-二甲基吡啶(7.06mL,60.6mmol),以及(R)-(+)-N,a-二甲基苄胺(3.73g,27.6mmol)的DCM溶液,同时搅拌。5分钟之后,去除浴,并使反应混合物回暖至室温。1小时之后,用柠檬酸溶液

(50mL×3,10%w/v aq)洗涤反应溶液、干燥($MgSO_4$)、通过SiO_2过滤并浓缩,从而以白色泡沫形式提供标题化合物(3.80g)。ESI/MS计算1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物$C_{19}H_{25}N_4O_4P$:404.2,实测:m/z=403.1(M-1)。

[0515] 实施例7

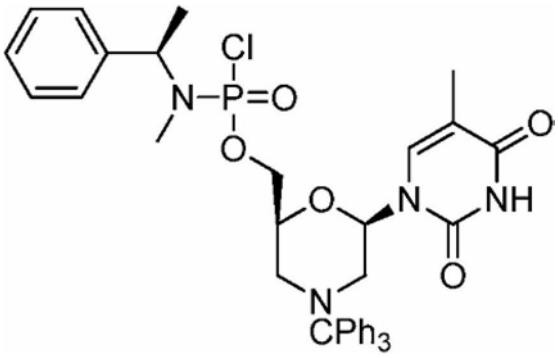
[0516] (S)-甲基(1-苯基乙基)磷酰胺二氯

[0517] 

[0518] 以与实施例6所述方式类似的方式合成标题化合物,从而以白色泡沫形式提供标题化合物(3.95g)。ESI/MS计算1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物$C_{19}H_{25}N_4O_4P$:404.2,实测:m/z=403.1(M-1)。

[0519] 实施例8

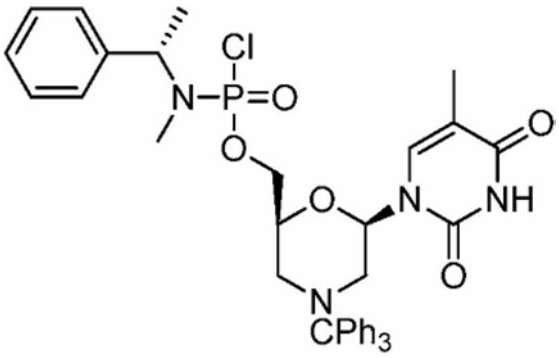
[0520] ((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)甲基甲基((R)-1-苯基乙基)磷酰胺氯

[0521] 

[0522] 以与实施例4所述方式类似的方式合成标题化合物,从而以白色固体形式提供标题氯代磷酰胺酯(4.46g,28%的产率)。ESI/MS计算$C_{38}H_{40}ClN_4O_5P$:698.2,实测:m/z=697.3(M-1)。

[0523] 实施例9

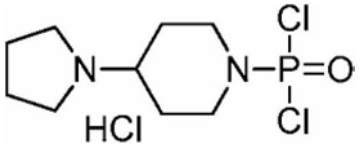
[0524] ((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)甲基甲基((S)-1-苯基乙基)磷酰胺氯

[0525] 

[0526] 以与实施例4所述方式类似的方式合成标题化合物,从而以白色固体形式提供标题氯代磷酰胺酯(4.65g,23%的产率)。ESI/MS计算$C_{38}H_{40}ClN_4O_5P$:698.2,实测:m/z=697.3(M-1)。

[0527] 实施例10

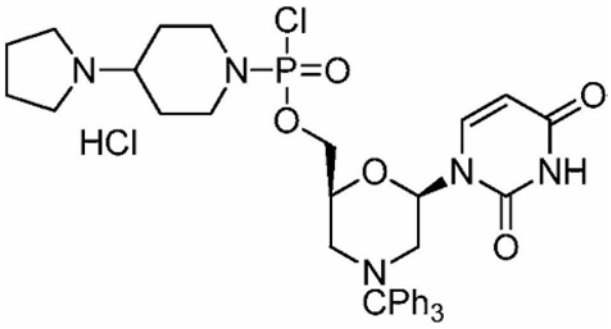
[0528] (4-(吡咯烷-1-基)哌啶-1-基)二氯磷酸酯盐酸盐

[0529] 

[0530] 向三氯氧化磷(5.70mL,55.6mmol)的DCM(30mL)的冷(冰/水浴)溶液加入2,6-二甲基吡啶(19.4mL,167mmol),以及4-(1-吡咯烷基)-哌啶(8.58g,55.6mmol)的DCM(30mL)溶液,并搅拌1小时。过滤悬浮液并用过量二乙醚洗涤固体,从而以白色固体形式提供标题吡咯烷(17.7g,91%的产率)。ESI/MS计算1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物$C_{19}H_{30}N_5O_4P$:423.2,实测:m/z=422.2(M-1)。

[0531] 实施例11

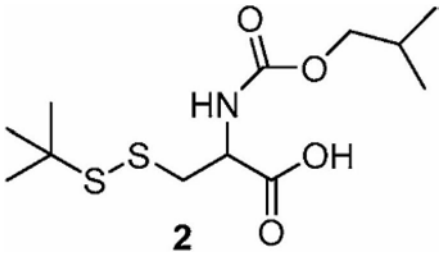
[0532] ((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)甲基(4-(吡咯烷-1-基)哌啶-1-基)氯磷酸酯盐酸盐

[0533] 

[0534] 向二氯代磷酰胺酯8(17.7g,50.6mmol)的DCM(100mL)的搅拌的冷(冰/水浴)溶液滴加Mo(Tr)T#(24.5g,50.6mmol)、2,6-二甲基吡啶(17.7mL,152mmol)和1-甲基咪唑(0.401mL,5.06mmol)的DCM(100mL)溶液,持续10分钟。随着搅拌悬浮液,使浴回暖至室温。6小时之后,将悬浮液倒在二乙醚(1L)上,搅拌15分钟,过滤并用额外的醚洗涤固体,从而提供白色固体(45.4g)。粗产物通过色谱层析[SiO_2柱(120克),DCM/MeOH洗脱液(梯度从1:0至6:4)]纯化,并将合并的级分倒在二乙醚(2.5L)上,搅拌15分钟,过滤并用额外的醚洗涤所得固体,从而以白色固体形式提供标题化合物(23.1g,60%的产率)。ESI/MS计算1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物$C_{48}H_{57}N_8O_7P$:888.4,实测:m/z=887.6(M-1)。

[0535] 实施例12

[0536] 3-(叔丁基二硫烷基)-2-(异丁氧基羰基氨基)丙酸

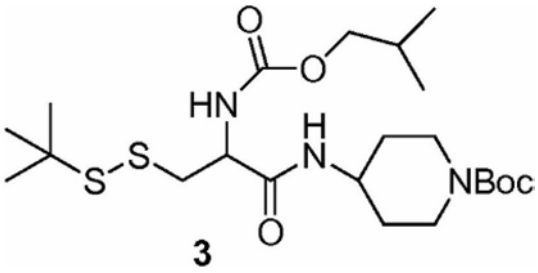
[0537] 

[0538] 向S-叔丁基巯基-L-半胱氨酸(10g,47.8mmol)的CH_3CN(40mL)溶液加入K_2CO_3(16.5g,119.5mmol)的H_2O(20mL)溶液。搅拌15分钟之后,缓慢注入异丁基氯甲酸酯(9.4mL,72mmol)。使反应进行3小时。通过硅藻土(Celite)过滤白色固体,浓缩滤液以去除CH_3CN。残

余物溶解于乙酸乙酯(200mL)，用1N HCl(40mL×3)，盐水(40×1)洗涤，用Na_2SO_4干燥。在色谱分析(5%MeOH/DCM)之后，获得所需产物(2)。

[0539] 实施例13

[0540] 4-(3-(叔丁基二硫烷基)-2-(异丁氧基羰基氨基)丙酰胺基)哌啶-1-羧酸叔丁酯

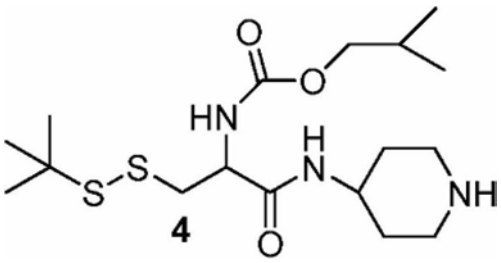
[0541] 

3

[0542] 向酸(来自实施例12的化合物2，6.98g，22.6mmol)的DMF(50mL)溶液加入HATU(8.58g，22.6mmol)。30分钟之后，向混合物加入Hunig碱(4.71mL，27.1mmol)和1-Boc-4-氨基哌啶(5.43g，27.1mmol)。反应在室温下搅拌进行另外的3小时。在高真空下去除DMF，将粗残余物溶解于EtAc(300mL)，用H_2O(50mL×3)洗涤。在ISCO纯化(5%MeOH/DCM)之后，获得最终产物(3)。

[0543] 实施例14

[0544] 3-(叔丁基二硫烷基)-1-氧-1-(哌啶-4-基氨基)丙烷-2-基氨基甲酸异丁酯

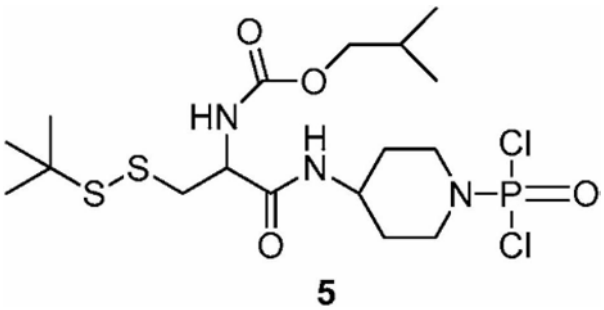
[0545] 

4

[0546] 向实施例13制备的化合物3(7.085g，18.12mmol)加入30mL的4M HCl/二氧六环。在室温下2小时之后，完成反应。HCL盐(4)被用于下一步骤而无需进一步纯化。

[0547] 实施例15

[0548] 3-(叔丁基二硫烷基)-1-(1-(二氯磷酰基)哌啶-4-基氨基)-1-氧代丙烷-2-基氨基甲酸异丁酯

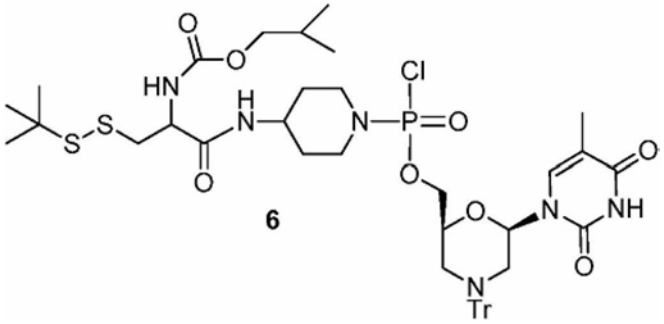
[0549] 

5

[0550] 在氩气下，向-78°C的实施例15制备的化合物4(7.746g，18.12mmol)的DCM(200mL)溶液缓慢注入$POCl_3$(1.69mL，18.12mmol)，然后加入Et_3N(7.58mL，54.36mmol)。在室温下搅拌反应5小时，浓缩以去除过量的碱和溶剂。在ISCO纯化(50%EtAc/己烷)之后，以白色固体形式给出产物(5)。

[0551] 实施例16

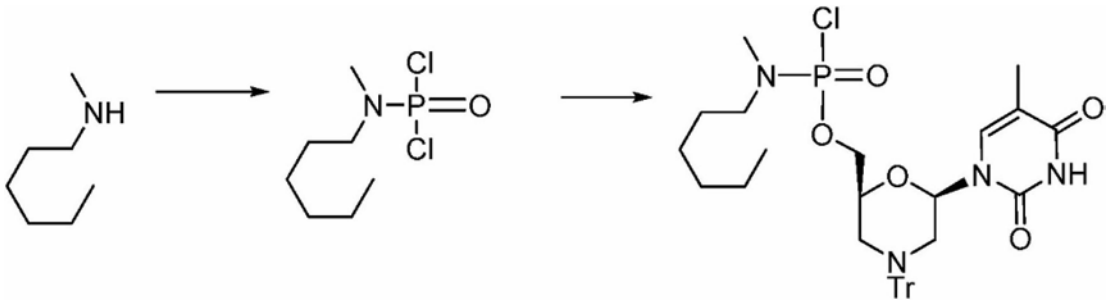
[0552] 3-(叔丁基二硫烷基)-1-(1-(氯(((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)甲氧基)磷酰基)哌啶-4-基氨基)-1-氧代丙烷-2-基氨基甲酸异丁酯

[0553] 

[0554] 在0°C,向1-((2R,6S)-6-(羟基甲基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)-5-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(moT(Tr))(5.576g,10.98mmol)的DCM(100mL)溶液加入二甲基吡啶(1.92mL,16.47mmol)和DMAP(669mg,5.5mmol),然后加入4(6.13g,12.08mmol)。反应在室温下保持搅拌18小时。在ISCO纯化(50%EtAc/己烷)之后,获得所需产物(6)。

[0555] 实施例17

[0556] ((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)甲基己基(甲基)磷酰胺氯

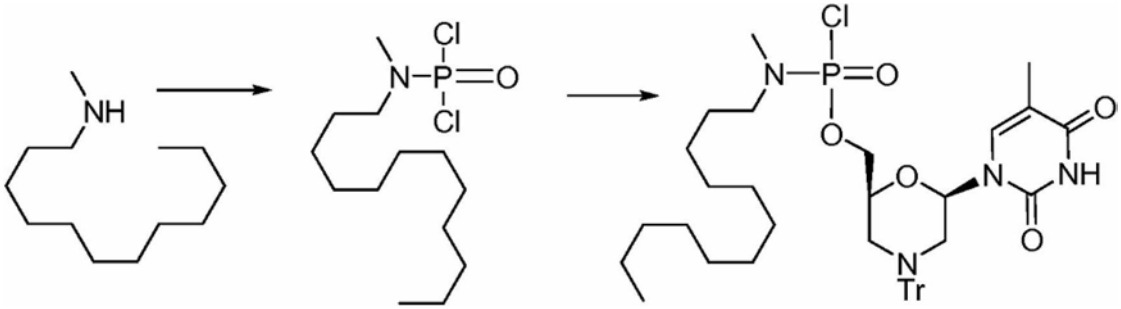
[0557] 

[0558] 在N_2下,将N-羟基1甲胺(4.85mL,32mmol)的DCM(80mL)溶液冷却至-78°C。缓慢添加磷酰氯(2.98mL,32mmol)的DCM(10mL)溶液,然后添加Et_3N(4.46mL,32mmol)的DCM(10mL)溶液。过夜继续搅拌,同时使反应回暖至室温。在ISCO纯化(20%EtAc/己烷)之后,以清澈油状形式给出所需产物(1)。

[0559] 在0°C下,向moT(Tr)(5.10g,10.54mmol)的DCM(100mL)溶液加入二甲基吡啶(3.68mL,31.6mmol)和DMAP(642mg,5.27mmol),然后加入1(4.89g,21.08mmol)。反应在室温下保持搅拌18小时。在ISCO纯化(50%EtOAc/己烷)之后,获得所需产物(2)。

[0560] 实施例18

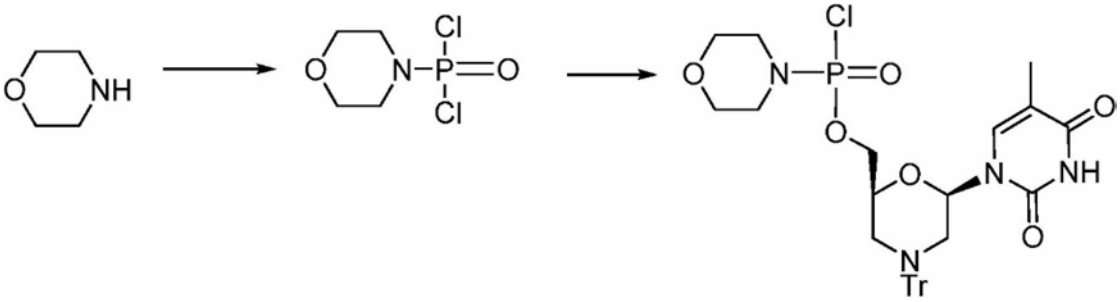
[0561] ((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)甲基十二烷基(甲基)磷酰胺氯

[0562] 

[0563] 根据实施例6和8所述的一般程序制备标题化合物。

[0564] 实施例19

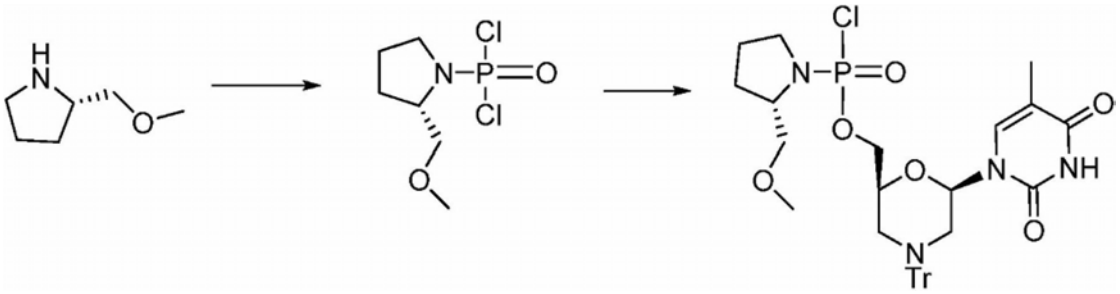
[0565] ((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)甲基吗啉磷酰氯

[0566] 

[0567] 根据实施例6和8所述的一般程序制备标题化合物。

[0568] 实施例20

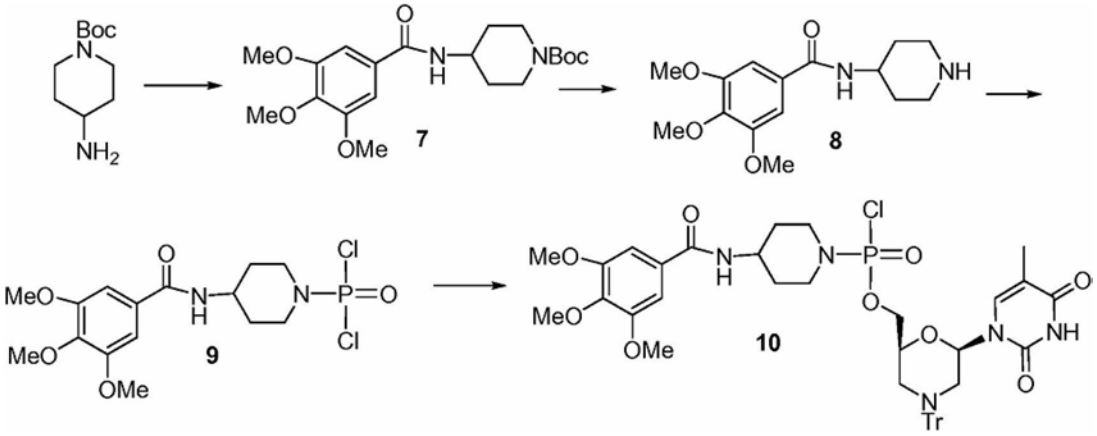
[0569] ((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)甲基(S)-2-(甲氧基甲基)吡咯烷-1-基氯磷酸酯

[0570] 

[0571] 根据实施例6和8所述的一般程序制备标题化合物。

[0572] 实施例21

[0573] ((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基)甲基4-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰胺基)哌啶-1-基氯磷酸酯

[0574] 

[0575] 向1-Boc-4-哌啶(1g,5mmol)的DCM(20mL)溶液加入Hunig碱(1.74mL,10mmol),然后加入3,4,5-三甲氧基苯甲酰氯(1.38g,6mmol)。在室温下进行反应3小时,浓缩以去除溶剂和过量的碱。残余物溶解于EtAc(100mL),用0.05N HCl(3×15mL)、饱和$NaHCO_3$(2×15mL)洗涤,用Na_2SO_4干燥。在ISCO纯化(5%MeOH/DCM)之后,获得产物(1)。

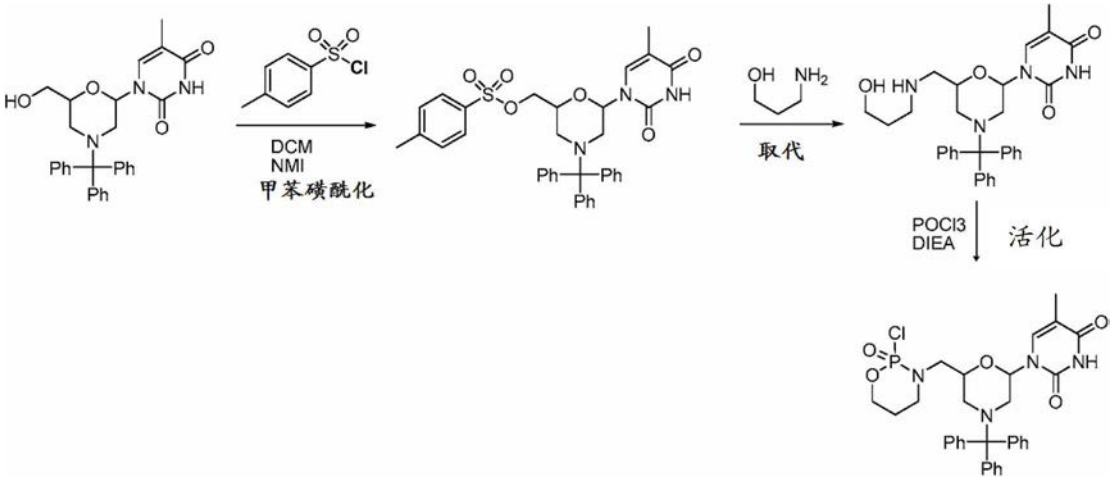
[0576] 向7加入15mL的4N HCl/二氧六环,4小时后终止反应。以白色固体形式获得8。

[0577] 在N_2下,将8(1.23g,4.18mmol)的DCM(20mL)溶液冷却至-78°C。缓慢添加磷酰氯(0.39mL,4.18mmol)的DCM(2mL)溶液,随后添加Et_3N(0.58mL,4.18mmol)的DCM(2mL)溶液。过夜继续搅拌,同时使反应回暖至室温。在ISCO纯化(50%EtAc/己烷)之后,获得所需产物(9)。

[0578] 在0°C向,向moT(Tr)(1.933g,4.0mmol)的DCM(20mL)溶液加入二甲基吡啶(0.93mL,8mmol)和DMAP(49mg,0.4mmol),然后加入9(1.647g,4mmol)。反应在室温下保持搅拌18小时。在ISCO纯化(50%EtAc/己烷)之后,获得所需产物(10)。

[0579] 实施例22

[0580] 包含亚基(^{CP}T)的环磷酰胺的合成

[0581] 

[0582] 将moT亚基(25g)悬浮在DCM(175mL)中,并加入NMI(N-甲基咪唑,5.94g,1.4eq.)以获得清澈溶液。向反应混合物加入甲苯磺酰氯,通过TLC监测反应进程直至完成(约2小时)。通过用0.5M柠檬酸缓冲液(pH=5),然后用盐水洗涤进行水处理。分离有机层并用Na_2SO_4干燥。通过旋转蒸发仪去除溶剂以获得粗产品,其在下一步骤中使用而无需进一步纯化。

[0583] 如上制备的moT甲苯磺酸盐与丙醇胺(1g/10mL)混合。然后将反应混合物置于45°C

的炉中过夜，然后用DCM(10mL)稀释。通过用0.5M柠檬酸缓冲液(pH=5)，然后用盐水洗涤进行水处理。分离有机层并用Na_2SO_4干燥。用旋转蒸发仪去除溶剂以获得粗产物。通过NMR和HPLC分析粗产物，并确定用于下一步骤而不需进一步纯化。

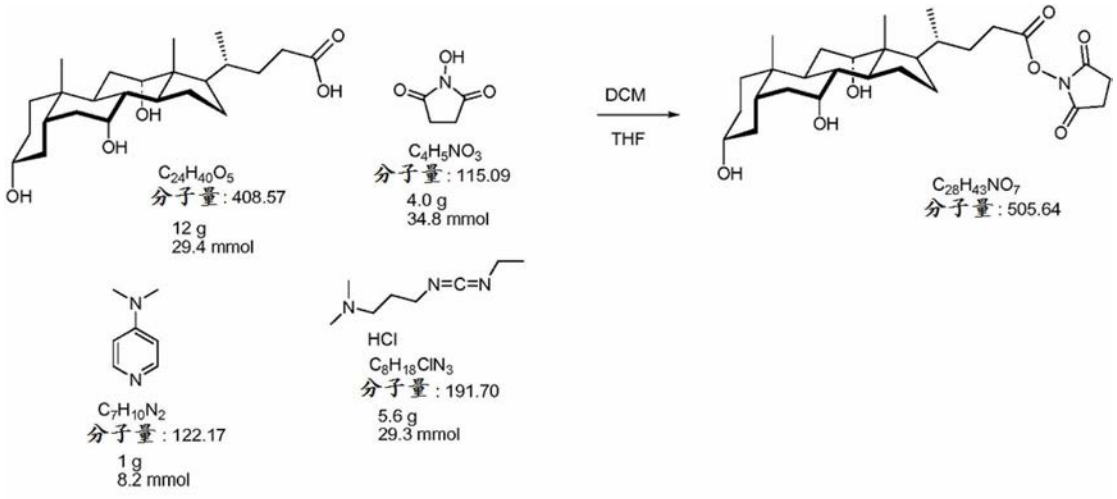
[0584] 粗产物溶于DCM(2.5mL DCM/g，1eq.)并与DIEA(3eq.)混合。用干冰-丙酮冷却该溶液，并滴加$POCl_3$(1.5eq.)。所得混合物在室温下过夜搅拌。通过用0.5M柠檬酸缓冲液(pH=5)，然后用盐水洗涤进行水处理。分离有机层并用Na_2SO_4干燥。用旋转蒸发仪去除溶剂以获得淡黄色固体形式的粗产物。通过硅胶色谱分析来纯化粗产物(粗产物/硅胶=1:5的比，梯度为DCM至50%EA/DCM)，根据TLC分析合并级分。去除溶剂，从而以非对映异构体的混合物形式获得所需产物。通过HPLC(NPP淬灭)和NMR(H-1和P-31)分析纯化的产物。

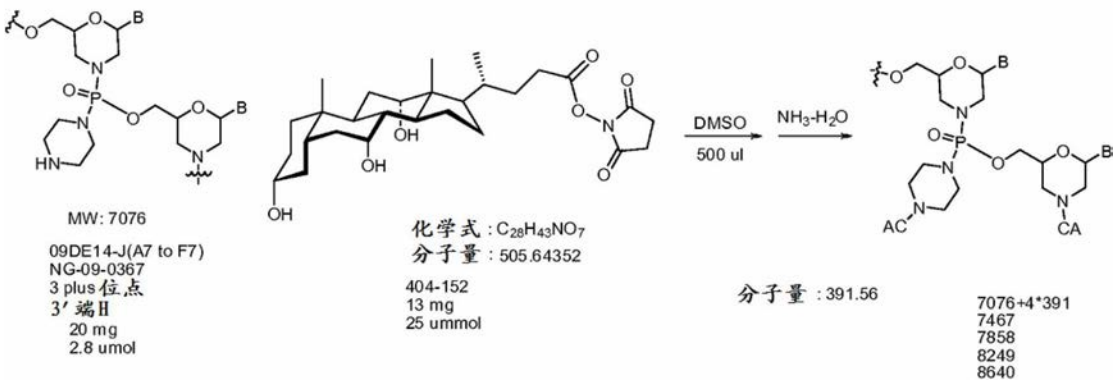
[0585] 根据以下程序分离非对映异构体混合物。混合物(2.6g)溶于DCM中。将该样品加载在RediSepRf柱(80g正常相，由Teledyne Isco制造)上，并用10%EA/DCM至50%EA/DCM洗脱20分钟。收集级分并通过TLC分析。根据TLC分析合并级分，并用旋转蒸发仪在室温去除溶剂。通过P-31NMR和NPP-TFA分析确定合并的级分的非对映异构体比例。如果需要，重复以上程序直到非对映异构体比例达到97%。

[0586] 实施例23

[0587] PMOplus的全胆酸修饰

[0588]





[0589] 根据以下程序制备琥珀酰亚胺活化的胆酸衍生物。胆酸(12g，29.4mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(4.0g，34.8mmol)、EDCI(5.6g，29.3mmol)和DMAP(1g，8.2mmol)装入圆底烧瓶。加入DCM(400mL)和THF(40mL)以溶解。反应混合物在室温下过夜搅拌。然后向反应混合物加

入水(400ml),分离有机层并用水(2×400ml)洗涤,随后用饱和$NaHCO_3$(300ml)和盐水(300ml)洗涤。然后用Na_2SO_4干燥有机层。用旋转蒸发仪去除溶剂以获得白色固体。粗产物溶于氯仿(100ml)并沉淀于庚烷(1000ml)中。通过过滤收集固体,通过HPLC和NMR分析,并无需进一步纯化即可使用。

[0590] 称取适量的PMOplus(20mg,2.8μmol)于小瓶(4mL)中,并溶于DMSO(500μl)中。根据每个修饰两当量的活化酯的比例向反应混合物中加入活化的胆酸酯(13mg,25μmol),然后在室温下过夜搅拌。通过MALDI和HPLC(C-18或SAX)确定反应进展。

[0591] 反应完成之后(通过起始PMOplus的消失而确定),一旦反应完成,则向反应混合物加入1ml浓氨水。然后将反应小瓶置于炉(45°C)中过夜(18小时),然后冷却至室温并用1%的氨水(10ml)稀释。将该样品加载于SPE柱(2cm),然后用1%氨水溶液洗涤小瓶(2×2ml)。用1%氨水(3×6ml)洗涤SPE柱,并用溶于1%氨水的45%乙腈(6ml)洗脱产物。通过UV光密度测量鉴定包含寡聚物的级分。通过冷冻干燥分离产物。通过MALDI和HPLC(C-18和/或SAX)确定纯度和身份。

[0592] 该同一程序适用于脱氧胆酸活化和与PMO^+的结合。

[0593] 实施例24

[0594] PMOplus的全胍基化

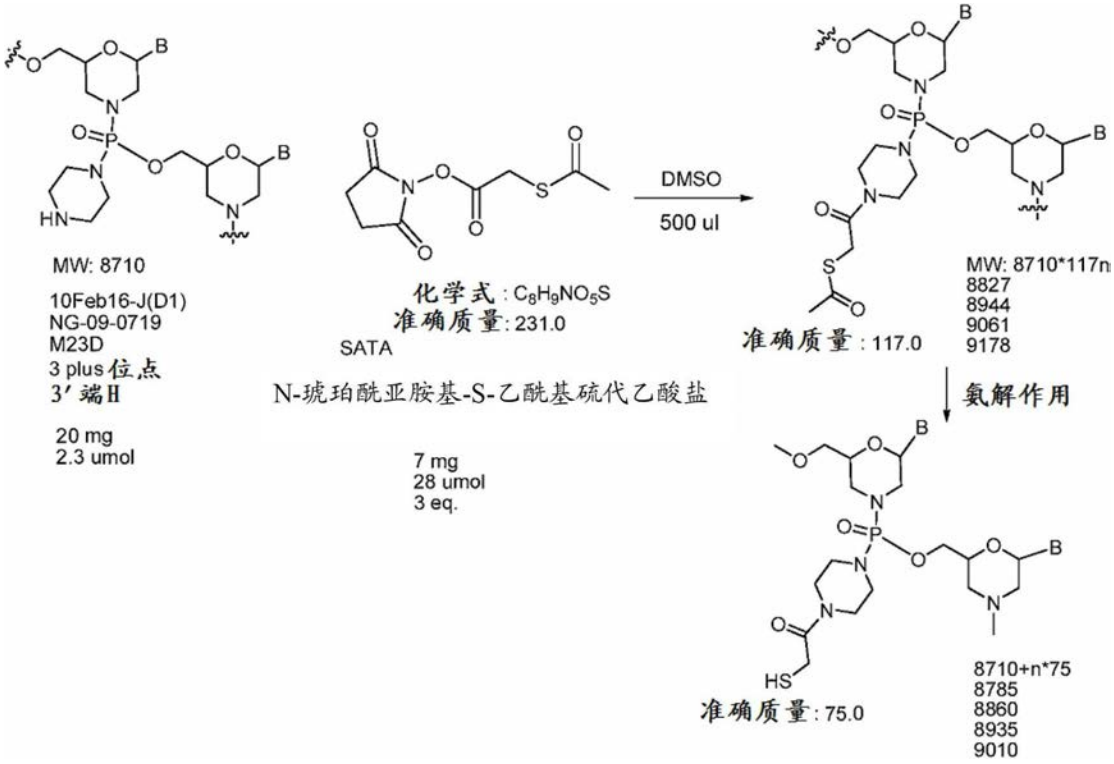
[0595] 称取适量的PMOplus(25mg,2.8μmol)于小瓶(6mL)中,向小瓶加入1H-吡唑-1-甲脒氯化物(15mg,102μmol)和碳酸钾(20mg,0.15mmol)。加入水(500μl),并将反应混合物在室温下过夜搅拌(约18小时)。通过MALDI确定反应完成。

[0596] 一旦完成,用1%氨水(10ml)稀释反应,并加载于SPE柱(2cm)上。用1%氨水溶液洗涤小瓶(2×2ml),并用1%氨水洗涤SPE柱(3×6ml)。用溶于1%氨水的45%乙腈(6ml)洗脱产物。通过UV光密度测量确定包含寡聚物的级分。通过冷冻干燥分离产物。通过MALDI和HPLC(C-18和/或SAX)确定纯度和身份。

[0597] 实施例25

[0598] PMOplus的全巯基乙酰基修饰(M23D)

[0599]



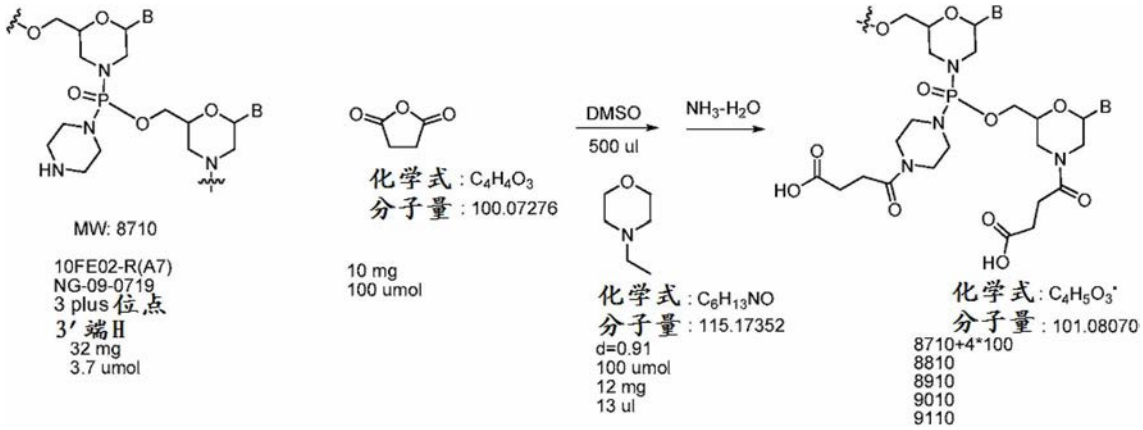
[0600] 称取适量的PMOplus(20mg,2.3μmol)于小瓶(4mL)中,并溶于DMSO(500μl)。向反应混合物加入N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)(7mg,28μmol),并使其室温下过夜搅拌。通过MALDI和HPLC监测反应进程。

[0601] 一旦结束,向反应混合物加入1%氨水,并在室温下搅拌2小时。将该溶液加载于SPE柱(2cm)上,用1%氨水溶液洗涤小瓶(2×2ml)并用1%氨水洗涤SPE柱(3×6ml)。用溶于1%氨水的45%乙腈(6ml)洗脱产物。通过UV光密度测量确定包含寡聚物的级分。通过冷冻干燥分离产物。通过MALDI和HPLC(C-18和/或SAX)确定纯度和身份。

[0602] 实施例26

[0603] PMOplus的全琥珀酸修饰

[0604]

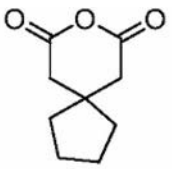


[0605] 称取适量的PMOplus(32mg,3.7μmol)于小瓶(4mL)中,并溶于DMSO(500μl)。向反应混合物加入N-乙基吗啉(12mg,100μmol)和琥珀酸酐(10mg,100μmol),并使其室温下过夜搅拌。通过MALDI和HPLC监测反应进程。

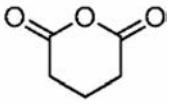
[0606] 一旦结束,向反应混合物加入1%氨水,并在室温下搅拌2小时。将该溶液加载于SPE

柱(2cm)上,用1%氨水溶液洗涤小瓶(2×2ml)并用1%氨水洗涤SPE柱(3×6ml)。用溶于1%氨水的45%乙腈(6ml)洗脱产物。通过UV光密度测量确定包含寡聚物的级分。通过冷冻干燥分离产物。通过MALDI和HPLC(C-18和/或SAX)确定纯度和身份。

[0607] 以上程序还可用于PMOplus的戊二酸(戊二酸酐)和四亚甲基戊二酸(四亚甲基戊二酸酐)修饰。

[0608] 

四亚甲基戊二酸酐



戊二酸酐

[0609] 实施例27

[0610] 用本发明的示例性PMO寡聚物处理MDX小鼠

[0611] MDX小鼠是可接受的和良好表征的杜兴式肌营养不良(DMD)动物模型,其包含肌营养不良蛋白基因的外显子23的突变。已知M23D反义序列(SEQ ID NO:15)诱导外显子23跳跃并恢复功能性肌营养不良蛋白表达。使用M23D PMO+寡聚物(NG-09-0711,NG-10-0055,NG-10-0056)或两种PMO化合物,通过尾部静脉注射向MDX小鼠给药一次(50mg/kg),所述两种PMO化合物包含4-氨基哌啶基键(NG-10-0070,其包含上文所述并在图2中所示的PMO^{apn}键)和4-琥珀酰胺基哌嗪基键(NG-10-0105,其包含上文所述且在图2中所示的PMO^{suc}键)。肽结合的PMO(PPMO)在试验中用作阳性对照(AVI-5225;SEQ ID NO:16)。所有测试的寡聚物具有相同的反义序列,但根据键或肽的类型(对于AVI-5225,参见表8)而变化。注射后1周,处死MDX小鼠并从多个肌肉组织提取RNA。终点PCR用于确定包含外显子23的肌营养不良蛋白mRNA和由于反义诱导的外显子跳跃而缺乏外显子23的肌营养不良蛋白mRNA的相对丰度。外显子23跳跃的百分比为体内反义活性的测量值。图5示出来自处理后1周的四头肌的结果。包含4个阳离子4-氨基哌啶基键的NG-10-0070显示出相对于任何PMO+化合物(NG-10-0055、-0056和-0057)的两倍增加的活性。包含4个阴离子4-琥珀酰胺基哌嗪基键的NG-10-0105化合物与PMO+寡聚物相比活性相当。如所预期地,AVI-5225PPMO(肽结合的)化合物由于细胞穿透递送肽而最有效。媒介物和WT C57(野生型小鼠)处理是阴性对照,并且不表达外显子23跳跃的肌营养不良蛋白mRNA。

[0612] 表8.实施例27的序列

[0613]

名称	序列 (5'至 3')	SEQ ID NO
M23D	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	15
NG-09-0711	GGC CAA ACC +TCG GC+T TAC C+TG AAA +T	N/A
NG-10-0055	GGC C^{+}AA $^{+}$ACC $^{+}$TCG GC^{+}T TAC C^{+}TG AAA T	N/A
NG-10-0056	GGC C^{+}A^{+}A $^{+}$ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	N/A
NG-10-0057	GGC CAA ACC TCG GCT TAC C^{+}TG $^{+}$A^{+}A^{+}A T	N/A
NG-10-0070	GGC CAA ACC ^{apn} TCG GC ^{apn} T TAC C ^{apn} TG AAA ^{apn} T	N/A
NG-10-0105	GGC CAA ACC ^{suc} TCG GC ^{suc} T TAC C ^{suc} TG AAA T	N/A
AVI-5225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	16

[0614] 使用更广范围的M23DPMO内的修饰的亚基间键进行支持本发明的其他实验，并在上文所述的MDX小鼠模型中使用。具有所述键的寡聚物的子集在上文表7中列出。图6示出来自该扩大的筛选的结果，并显示具有最高活性的M23D寡聚物为NG-10-0070、NG-10-0104、NG-10-0095和NG-10-0133，其分别包含键b10、b54、b10和b10(图6中，x轴上的标记对应于化合物ID#的后三个字母)。MDX小鼠接受50mg/kg剂量的单次静脉注射。图6中示出的其他活性化合物是包含末端修饰的M23D PMO，并在上文表6中描述。所有化合物与没有任何亚基间或末端修饰的PMO(SEQ ID NO:15)进行比较。

[0615] 支持本发明的其他实验使用具有亚基间键和末端键的更广范围的化合物。亚基间键修饰在上文表9中示出。使用这些化合物的结果在下文表9中示出。结果按最有效的化合物在表顶端来排序。

[0616] 表9.来自用本发明PMO-X化合物处理的MDX小鼠的四头肌和横膈膜组织中的外显子23跳跃

[0617]

NG #	PMO-X 修饰	剂量	外显子跳跃%	
		mg/kg	四头肌	横膈膜
NG-10-0383	PMO	30	61	20
NG-10-0325	triphenylphos	30	54	46
NG-10-0272	PMO-法呢基	30	48	14
NG-10-0102	PMO	30	44	23
NG-10-0330	三甲氧基苯甲酰基	30	40	7
NG-10-0056	PMOplus 5'-*pol*	23	40	13
NG-07-0064	PMO-3'-三苯甲基	30	37	24
NG-10-0382	PMO	30	36	18
NG-10-0278	PMOpyr	26	35	29
NG-10-0210	PMOapn	31	34	19
NG-10-0098	PMOpyr	30	31	19
NG-10-0070	PMOapn	30	30	10
NG-10-0095	PMOapn	30	30	11
NG-10-0317	PMO	30	30	17
NG-10-0477	PMO triMe Gly	30	28	32
NG-10-0133	PMOapn	30	28	17
NG-10-0387	PMO	30	28	25
NG-10-0104	PMOguan	30	27	14
NG-10-0420	PMOplus 甲基	29	27	25
NG-10-0065	PMOtri	30	26	2
NG-10-0607	PMO-X	30	25	19
NG-10-0060	PMOcp	30	25	6
NG-10-0162	PMO-$COCH_2SH$	30	25	8
NG-10-0328	二苯基乙酰基	30	25	20
NG-10-0134	PMOapnPMOtri	30	23	2
NG-10-0386	PMO	30	22	11
NG-07-0064	PMO-3'-三苯甲基	30	22	23
NG-10-0059	PMOcp	30	22	9
NG-10-0135	PMOtri	30	21	19
NG-10-0168	PMOapn PMOcys	30	21	6

[0618]

NG-10-0113	PMOapnPMOtri	30	20	20
NG-10-0385	PMO	30	20	32
NG-10-0279	PMO	30	19	22
NG-10-0055	PMOplus *disp*	30	17	11
NG-10-0105	PMOsucc	30	16	4
NG-10-0805	PMO-X	30	16	21
NG-10-0811	PMO-X	32	16	6
NG-10-0057	PMOplus 3'-*pol*	30	15	16
NG-10-0625	PMO-X	28	15	11
NG-10-0804	二聚物	35	15	11
NG-10-0066	PMOtri	30	12	1
NG-10-0280	PMO 二硫化物	30	12	14
NG-10-0212	PMOapn	20	11	15
NG-10-0156	3'-MeOtrityl	30	10	22
NG-10-0062	PMOhex	30	9	10
NG-11-0043	PMO-X	30	9	16
NG-10-0206	PMOplus	31	8	10

[0619] 实施例28

[0620] 用本发明的示例性PMO寡聚物处理转基因eGFP小鼠

[0621] 支持本发明的实验使用用于体内反义活性的基于eGFP的测定，并且用于评估包含本发明的修饰的亚基间键的寡聚物。已经描述了其中eGFP-654转基因在整个体内一致地表达的转基因eGFP小鼠模型(Sazani,Gemignani et al.2002)。该模型使用活性的剪接测定，其中本发明的修饰的寡聚物阻断异常剪接并恢复修饰的增强的绿色荧光蛋白(eGFP)前mRNA的正确剪接。在该方法中，每个寡聚物的反义活性直接与eGFP报告蛋白的上调成比例。因此，可以在几乎每个组织中监测同一寡聚物的功能效果。这与靶向那些表达仅限于某些组织或仅在某些组织中为显性相关的基因的寡聚物不同。在eGFP-654小鼠中，前mRNA可在所有组织中容易地检测到，尽管在骨髓、皮肤和脑中发现较小的量。翻译的eGFP的水平与反义寡聚物的效能和它们在作用位点的浓度成比例。从多个组织分离的总RNA的RT-PCR显示eGFP-654转录本在所有受调查的组织中表达。

[0622] 在给药后8天收集来自用5-150mg/kg化合物处理的eGFP-654小鼠(n=6)的组织，并在-80°C冷冻。在即将在GE Typhoon Trio成像之前，解冻组织，用PBS蒙雾(misted)并直接排列在扫描器的玻璃板上。使用488nm激发激光和在板表面具有焦面的520nm BP40发射滤波器进行50微米扫描以收集eGFP荧光。利用ImageQuant分析组织扫描以确定每个组织的平均荧光。来自仅用媒介物处理的3-5只小鼠的组织荧光被平均，以产生每个组织类型的内源性背景荧光测量值。来自化合物处理的小鼠的相应组织的倍数荧光值计算为媒介物组织荧光的分数。图7B-C示出两种PMO在eGFP-654小鼠模型中的组织特异性活性，所述两种PMO包

含分别含有键b54和b11的本发明的示例性亚基间键NG-10-0110和NG-10-0323。所有测试的寡聚物来源于eGFP654序列(SEQ ID NO:17)。为了比较,使用具有相同序列但缺乏任何亚基间修饰的PMO的结果在图7A中示出。NG-10-0110(SEQ ID NO:17)在四头肌中具有高活性且在肝中具有低活性(图7B);而NG-10-0323具有改善的肝活性和肌肉递送(图7C)。

[0623] 支持本发明的其他实例包括使用利用本发明的键和端基修饰的eGFP(SEQ ID NO:17)寡聚物的实验。如图11和12所示,相对于PMO和PMOplus寡聚物,在来自如上文所述处理的小鼠的多个组织中,多种修饰的寡聚物表现出改善的eGFP剪接修正活性。

[0624] 该实例中所述的化合物的具体PMO-X修饰在下文表10中示出。

[0625] 表10.显示键类型的实施例28中使用的序列

[0626]

NG-10-0110	GC^{guan}T AT^{guan}T ACC T^{guan}TA ACC CAG
NG-10-0323	GC^{pyr}T AT^{pyr}T ACC T^{pyr}TA ACC CAG
PMOplus;NG-10-0301	GC+T AT+T ACC +TTA ACC CAG
NG-10-0248	GCaT AaTaT ACC aTaTA ACC CAG
NG-10-0600*	GCaT ATaT ACC TaTA ACC CAG
NG-10-0602**	GCpT ATpT ACC TpTA ACC CAG
NG-10-0389	GCX ATX ACC TXA ACC CAG
NG-10-0247	GCpT ApTpT ACC TpTA ACC CAG
NG-10-0299	GCaT ATaT ACC TaTA ACC CAG
NG-10-0355***	GCaT ATaT ACC TaTA ACC CAG

[0627] *来自NG-10-0299的三甲基甘氨酸酰化的产物;**pT=PMOpyr对来自NG-10-0323的四胺进行甲基化;X=PMOapn;***3' 三苯甲基

[0628] 实施例29

[0629] 用本发明的示例性PMO寡聚物治疗甲型流感病毒感染的细胞

[0630] 制备一系列包含多种修饰的亚基间键的PMO,并用于治疗培养物中的甲型流感病毒感染的细胞。PMO和包含本发明的修饰的亚基间键的PMO都被设计为在AUG起始密码子靶向病毒M1/M2片段,并具有两个碱基序列(SEQ ID NOs:3和4)中的一个。具有本发明的修饰的亚基间键的PMO在表4中列出,并由下文序列表表格中的NG数指示来确定。通过反义靶向M1/M2片段中的多个位点来对甲型流感病毒复制的抑制描述于共有的未决美国申请第12/945,081号,将其以整体形式并入本文作为参考。除了通过靶向于通常的M1/M2AUG起始位点来抑制翻译以外,也可利用本发明化合物,靶向于剪接供体和剪接受体位点。

[0631] 肺泡的小鼠巨噬细胞系(ATCC;AMJ2-C11)在0.1MOI用H1N1(PR8病毒株)感染,并且在感染后1小时添加PPMO。35摄氏度下孵育细胞过夜。然后采集病毒的上清液并用VNAR蛋白酶孵育以释放病毒的RNA。通过定量实时PCR(qRT-PCR)定量HA RNA。洗涤细胞、固定并透化。然后37摄氏度下用单克隆抗体对M1与M2蛋白进行探针探测30分钟。洗涤细胞并且在室温下添加与Alexa646结合的抗鼠的IgG15分钟。然后通过流式细胞术测定M1与M2。为检测M1与M2蛋白水平,M1或M2阳性细胞的百分比与M1或M2的平均荧光强度相乘。然后,每一样品除以未处理的对照,从而产生M1或M2与未处理的混杂对照相比的百分比。

[0632] 图8示出来自用本公开的多种化合物处理的细胞中的病毒M2蛋白水平的降低。上

文所述的流式细胞计数法被用于确定60微摩尔处理之后的相对M2蛋白表达。寡聚物不同程度地抑制M2蛋白的产生，而包含键b1的NG-10-180(SEQ ID NO:3)为最有效的。使用没有任何亚基间修饰的PMO的结果在图8中示出为NG-10-0015(SEQ ID NO:3)，以用于比较。

[0633] 实施例30

[0634] 用本发明的示例性PMO寡聚物体内治疗甲型流感病毒感染的小鼠

[0635] 使用被甲型流感PR8病毒株感染的Balb/c小鼠进行支持本发明的其他实验。在之前用本发明的PMO-X化合物处理后4小时，通过鼻内接种用3.5$TCID_{50}$感染小鼠。在一些试验中，在感染后96小时给予额外剂量的PMO-X。所有剂量由溶于50微升PBS的100微克测试化合物组成，并通过鼻内吹入法给药。每天监测动物的体重，并用作抗病毒药物活性的临床终点。感染后第7天，处死动物并收集肺，以用于利用上文实施例29所述的qRT-PCR方法进行病毒载量测定。

[0636] 利用半对数梯度稀释的肺匀浆，并涂于AMJ-C12巨噬细胞上，从而进行$TCID_{50}$测定。在35摄氏度24小时后，更换培养基，并在35摄氏度再孵育72h。加入50mL的0.5%鸡RBC的PBS溶液，并在4摄氏度孵育1h。读取红血球凝聚模式并使用Reed and Muench方法计算$TCID_{50}$。然后将TCID50值标准化以输入组织重量。

[0637] 如图9所示，H1N1感染之后，PMO-X化合物相对于PMOplus化合物表现出增强的抗病毒活性和降低的体重损失。用H1N1感染Balb/c小鼠(n=4)，并在感染前4小时给予单份100微克剂量的PMO。每天称重小鼠，并从感染前体重确定体重丧失百分比。感染后7天收集肺，并通过$TCID_{50}$测定病毒载量。结果以病毒活性相对于裸PMO的增加倍数来表示。该实验显示了两种PMO-X化合物(NG-10-0097和NG-11-0173;SEQ ID NO:3)相对于未修饰的PMO(NG-10-0015;SEQ ID NO:3)的约50倍增加的抗病毒活性，以及相对于PMOplus化合物(NG-11-0170;SEQ ID NO:3)的约10倍更高的活性。

[0638] 利用体重作为抗病毒活性的临床测量值，图10示出与图9中所述的实验类似的实验。相对于PMOplus化合物(NG-11-0170)，数种PMO-X化合物显示出优越的结果，包括包含琥珀酰键的化合物(NG-10-0108)、包含异丙基哌嗪键的化合物(NG-11-0148)和包含吡咯酮键的化合物(NG-11-0173)，以及用3’末端二苯甲基修饰的PMOplus化合物(NG-11-0145)。

[0639] 实施例31

[0640] 包含修饰的端基的寡核苷酸类似物的制备

[0641] 向包含游离3’端的25-mer PMO(27.7mg,3.226μmol)的DMS(300μL)溶液加入法呢基溴(1.75μl,6.425μmol)和二异丙基乙胺(2.24μL,12.9μmol)。反应混合物在室温下搅拌5小时。用10mL的1%NH_4OH水溶液稀释粗反应混合物，然后加载在2mL的Amberchrome CG300M柱上。然后用3倍柱体积的水洗涤柱，并用6mL的1:1乙腈和水(v/v)洗脱产物。然后冷冻干燥溶液从而以白色固体形式获得标题化合物。

[0642] 实施例32

[0643] 吗啉代寡聚物的制备

[0644] 三苯甲基哌嗪苯基氨基甲酸酯35的制备(参加图3)：向化合物11的二氯甲烷(6mL/g11)的冷悬浮液加入碳酸钾(3.2eq)的水(4mL/g碳酸钾)溶液。向该两相混合物缓慢加入氯甲酸苯酯(1.03eq)的二氯甲烷(2g/g氯甲酸苯酯)溶液。反应混合物回暖至20°C。一旦反应完成(1-2hr)，分离层。将有机层用水洗涤，并用无水碳酸钾干燥。通过从乙腈结晶来分离产

物35。产率=80%。

[0645] 氨基甲酸酯醇36的制备:将氢化钠(1.2eq)悬浮在1-甲基-2-吡咯烷酮(32mL/g的氢化钠)中。向该悬浮液加入三甘醇(10.0eq)和化合物35(1.0eq)。将所得到浆液加热至95°C。一旦反应完成(1-2hr),将该混合物冷却至20°C。向该混合物加入30%二氯甲烷/甲基叔丁醚(v:v)和水。将含有产物的有机层先后用NaOH水溶液、琥珀酸水溶液和饱和氯化钠水溶液洗涤。通过从二氯甲烷/甲基叔丁醚/庚烷中结晶来分离产物36。产率=90%。

[0646] 尾酸(tail acid)37的制备:向化合物36的四氢呋喃(7mL/g36)溶液加入琥珀酸酐(2.0eq)和DMAP(0.5eq)。将混合物加热至50°C。一旦反应完成(5hr),将混合物冷却至20°C并用$NaHCO_3$水溶液调节至pH值为8.5。加入甲基叔丁醚,并将产物萃取入水层。加入二氯甲烷,并用柠檬酸水溶液将混合物调节至pH值为3。用pH=3的柠檬酸盐缓冲液与饱和氯化钠水溶液的混合物来洗涤含有产物的有机层。将该37的二氯甲烷溶液在没有分离的情况下用于制备化合物38。

[0647] 38的制备:向化合物37的溶液加入N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二羧酸酰亚胺(HONB)(1.02eq)、4-二甲基氨基吡啶(DMAP)(0.34eq),然后加入1-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)(1.1eq)。将混合物加热至55°C。一旦反应完成(4-5hr),将混合物冷却至20°C并先后用1:10.2M柠檬酸/盐水和盐水洗涤。二氯甲烷溶液经过将溶剂调换成丙酮然后调换成N,N-二甲基甲酰胺,并且通过从丙酮/N,N-二甲基甲酰胺沉淀而进入饱和氯化钠水溶液,从而分离产物。将粗产物在水中重新打浆数次以除去残余的N,N-二甲基甲酰胺和盐。源于化合物36的38的产率=70%。通过用于固相合成过程中加入亚基的步骤,在NMP中将活化的"尾部"引入到二硫化物锚-树脂上。

[0648] 用于合成吗啉代低聚物的固体载体的制备:在具有粗孔隙率(40-60μm)玻璃粉、顶置式搅拌器和三通Teflon旋塞阀的硅烷化夹套式肽管(jacketed peptide vessel)(定制于ChemGlass,NJ,USA)中进行该步骤,通过玻璃粉或真空萃取使N_2冒出。通过循环水浴实现反应容器中的温度控制。

[0649] 以下步骤中的树脂处理/洗涤步骤由两个基本操作组成:树脂流化和溶剂/溶液萃取。对于树脂流化,调整旋塞阀位置使N_2向上流动通过玻璃粉,并将规定的树脂处理/洗涤液添加至反应器,并使树脂浸透和完全润湿。然后开始混合,并将树脂浆液混合,持续规定的时间。对于溶剂/溶液萃取,停止混合和N_2流,并启动真空泵,然后调整旋塞阀位置以进行树脂处理/洗涤液到废料的排除。除非另有说明,树脂处理/洗涤液的体积为15mL/g树脂。

[0650] 向硅烷化夹套式肽管中的氨基甲基聚苯乙烯树脂(100-200目;约1.0mmol/g N_2取代;75g,1eq,Polymer Labs,UK,part#1464-X799)加入1-甲基-2-吡咯烷酮(NMP;20ml/g树脂),并使树脂膨胀同时混合1-2hr。在排除膨胀的溶剂之后,用二氯甲烷(2×1-2min)、5%二异丙基乙胺的25%异丙醇/二氯甲烷(2×3-4min)和二氯甲烷(2×1-2min)洗涤树脂。在排除最后的洗涤液之后,用二硫化物锚34的1-甲基-2-吡咯烷酮(0.17M;15mL/g树脂,约2.5eq)溶液流化树脂,并在45°C下将树脂/试剂混合物加热60hr。反应一完成,终止加热并排除锚溶液,并且用1-甲基-2-吡咯烷酮(4×3-4min)和二氯甲烷(6×1-2min)洗涤树脂。用10%(v/v)的焦碳酸二乙酯的二氯甲烷(16mL/g;2×5-6min)溶液处理树脂,然后用二氯甲烷(6×1-2min)洗涤。将树脂39(参见图4)在N_2流下干燥1-3hr,然后在真空下干燥至恒定重量(±2%)。产率:初始树脂重量的110%-150%。

[0651] 氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂的载量的确定:通过光谱检测每克树脂的三苯基甲基(三苯甲基)数目,来确定树脂的载量(潜在可用的反应位点的数目)。

[0652] 将已知重量的干燥树脂(25±3mg)转移至硅烷化25ml容量瓶中,并加入约5mL的2%(v/v)三氟乙酸的二氯甲烷溶液。通过轻轻地涡旋将所含物混合,然后静置30min。使用额外的2%(v/v)三氟乙酸的二氯甲烷溶液使体积达到25mL,并且将所含物彻底混合。使用正压分注滴管,将一份等分的含有三苯甲基的溶液(500μL)转移至10mL容量瓶中,并用甲磺酸使体积达到10mL。

[0653] 通过在431.7nm的UV吸收来测量最终溶液中的三苯甲基阳离子含量,并用合适的体积、稀释液、消光系数(ε:41$\mu mol^{-1}cm^{-1}$)和树脂重量,以每克树脂的三苯甲基(μmol/g)来计算树脂载量。将该检测进行三次并计算平均载量。

[0654] 本实施例中的树脂装载过程会提供具有约500μmol/g的载量的树脂。如果在室温下将二硫化物锚并入步骤进行24hr,则获得300-400μmol/g的载量。

[0655] 尾部加载:使用与用于制备氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂相同的方案和体积,能够将尾部(Tail)引入分子。对于结合步骤,使用38(0.2M)的NMP溶液来代替二硫化物锚溶液,该NMP含有4-乙基吗啉(NEM,0.4M)。在45°C下进行2hr后,将树脂39用5%二异丙基乙胺的25%异丙醇/二氯甲烷溶液洗涤两次,并用DCM洗涤一次。向树脂加入苯甲酸酐(0.4M)和NEM(0.4M)的溶液。在25min之后,将反应器夹套冷却至室温,并将树脂用5%二异丙基乙胺的25%异丙醇/二氯甲烷溶液洗涤两次,并且用DCM洗涤八次。将树脂40过滤并在高真空下干燥。将树脂40的载量定义为在尾部加载中所用的初始氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂39的载量。

[0656] 固相合成:吗啉代寡聚物在Gilson AMS-422自动化肽合成仪上在2ml Gilson聚丙烯反应柱(部件号3980270)中制备。随着柱坐落在合成仪上,柱周围放置了具有水流通道的铝块。AMS-422将二选一地添加试剂/洗涤溶液,保持特定的时间并利用真空排空所述柱。

[0657] 对于长度为高达约25个亚基的寡聚物,优选的是填充有近500μmol/g树脂的氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂。对于更大的寡聚物,优选的是填充有300-400μmol/g树脂的氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂。如果需要具有5'尾部的分子,则选择具有相同加载方针的已加载有尾部的树脂。

[0658] 制备以下反应溶液:

[0659] 脱三苯甲基化溶液:10%的氰基乙酸(w/v)的4:1二氯甲烷/乙腈;中和溶液:5%的二异丙基乙胺的3:1二氯甲烷/异丙醇;互补溶液:0.18M(或对于已生长长于20个亚基的寡聚物为0.24M)所需碱基和键类型的活化的吗啉代亚基以及0.4M N乙基吗啉的1,3-二甲基咪唑烷酮溶液。二氯甲烷(DCM)被用作分离不同试剂溶液洗涤的过渡洗涤液。

[0660] 在块(block)设定为42°C的合成仪上,向每个包含30mg氨基甲基聚苯乙烯-二硫化物树脂(或尾树脂)的柱加入2mL的1-甲基-2-吡咯烷酮,并允许位于室温下30分钟。用2mL二氯甲烷洗涤2次之后,利用以下合成循环:

[0661]

步骤	体积	输送	保持时间
脱三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15 秒
脱三苯甲基化	1.5 mL	歧管	15 秒
DCM	1.5 mL	歧管	30 秒
中和	1.5 mL	歧管	30 秒
中和	1.5 mL	歧管	30 秒
中和	1.5 mL	歧管	30 秒
中和	1.5 mL	歧管	30 秒
中和	1.5 mL	歧管	30 秒
中和	1.5 mL	歧管	30 秒

[0662]

步骤	体积	输送	保持时间
DCM	1.5 mL	歧管	30 秒
结合	350 μL-500 μL	注射器	40 分钟
DCM	1.5 mL	歧管	30 秒
中和	1.5 mL	歧管	30 秒
中和	1.5 mL	歧管	30 秒
DCM	1.5 mL	歧管	30 秒
DCM	1.5 mL	歧管	30 秒
DCM	1.5 mL	歧管	30 秒

[0663] 单个寡聚物的序列被编程进合成仪，使得每个柱按适当的顺序接受适当的互补溶液(A、C、G、T、I)。当柱中的寡聚物已经完成其最终亚基的并入时，从块中移除柱并用互补溶液手动地进行最终循环，所述互补溶液由包含0.89M4-乙基吗啉的4-甲氧基三苯基甲基氯(0.32M的DMI溶液)组成。

[0664] 从树脂裂解并移除碱基和主链保护基团：在甲氧基三苯甲基化之后，用2mL 1-甲基-2-吡咯烷酮洗涤树脂8次。加入1mL的由0.1M1,4-二硫苏糖醇(DTT)和0.73M三乙胺的1-甲基-2-吡咯烷酮溶液组成的裂解溶液，将柱加盖，并允许处于室温30分钟。该时间之后，将溶液排入12mL Wheaton小瓶。用300μL裂解溶液洗涤显著皱缩的树脂两次。向该溶液中加入4.0mL浓氨水(储存于-20°C)，将小瓶紧密加盖(用Teflon内衬的螺冒)，并涡旋混合物以混合溶液。将小瓶放置在45°C炉中保持16-24hr以有效裂解碱基和主链保护基团。

[0665] 原始寡聚物分离:从炉中去除装入瓶中的氨解作用溶液并允许冷却至室温。用20mL的0.28%氨水稀释溶液并通过含有Macroprep HQ树脂(BioRad)的2.5×10cm柱。使用盐梯度(A:0.28%氨水和B:1M的氯化钠的0.28%氨水溶液;60分钟中B从0至100%)以洗脱包含峰值的甲氧基三苯甲基。合并混合级分并根据所需产物进一步处理。

[0666] 吗啉代寡聚物的脱甲氧基三苯甲基化:用1M的H_3PO_4处理来自Macroprep纯化过程的合并的级分,以将pH值降低到2.5。在最初的混合之后,样品处于室温4分钟,这时,用2.8%氨水/水将它们中和至pH值为10-11。通过固相萃取(SPE)纯化产物。

[0667] Amberchrome CG-300M(Rohm and Haas;Philadelphia,PA)(3mL)封装入20mL烧结的柱(fritted columns)(BioRad Econo-Pac Chromatography Columns(732-1011)),并用3mL下列物质冲洗树脂:0.28%NH_4OH/80%乙腈;0.5M NaOH/20%乙醇;水;50mM H_3PO_4/80%乙腈;水;0.5NaOH/20%乙醇;水;0.28%NH_4OH。

[0668] 将来自脱甲氧基三苯甲基化的溶液加载在柱上,并用3-6mL的0.28%氨水冲洗树脂3次。将Wheaton小瓶(12mL)置于柱下,并通过2mL的45%乙腈的0.28%氨水溶液进行两次洗涤来洗脱产物。在干冰上冷冻溶液,并将小瓶置于冷冻干燥器以产生蓬松的白色粉末。将样品溶于水中,使用注射器通过0.22微米过滤器(Pall Life Sciences,Acrodisc25mm注射过滤器,具有0.2微米的HT Tuffryn膜)过滤,并在UV分光光度计上测量光密度(OD)以确定当前寡聚物的OD单位,并分装样品用于分析。然后将溶液放置回Wheaton小瓶以用于冷冻干燥。

[0669] 吗啉代寡聚物的分析:MALDI-TOF质谱被用于确定纯化中的级分组分,并且提供用于鉴定寡聚物的证据(分子量)。用3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸(芥子酸)、3,4,5-三羟基苯乙酮(THAP)或α-氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)的溶液作为基质,对样品进行以下稀释。

[0670] 使用Dionex ProPac SCX-10,4×250mm柱(Dionex Corporation;Sunnyvale,CA),利用25mM pH=5乙酸钠25%乙腈(缓冲液A)和25mM pH=5乙酸钠25%乙腈1.5M氯化钾(缓冲液B)(15分钟中梯度为10%至100%的B)或pH=3.5的25mM $KH_2PO_4$25%乙腈(缓冲液A)和pH=3.5的具有1.5M氯化钾的25mM $KH_2PO_4$25%乙腈(缓冲液B)(15分钟中,梯度为0%至35%的B)进行阳离子交换(SCX)HPLC。前一体系用于不具有连接的肽的带正电的寡聚物,而后一体系用于肽结合物。

[0671] 通过阳离子交换色谱纯化吗啉代寡聚物:样品溶于20mM乙酸钠,pH=4.5(缓冲液A)并应用于Source30阳离子交换树脂(GE Healthcare)的柱,并用pH=4.5的0.5M氯化钠的20mM乙酸钠和40%乙腈的溶液(缓冲液B)梯度洗脱。用浓氨水中和含有产物的合并的级分,并应用于Amberehrome SPE柱。如上所述的那样,洗脱、冷冻和冷冻干燥产物。

[0672] 表11.序列表

[0673]

名称	序列 (5’至 3’)	SEQ ID NO
登革热	CGGTCCACGTAGACTAACAACT	1
JEV	GAAGTTCACACAGATAAACTTCT	2
M1/M2AUG.20.22	CGGTTAGAAGACTCATCTTT	3
M1/M2AUG.25.26	TTTCGACATCGGTTAGAAGACTCAT	4
NP-AUG	GAGACGCCATGATGTGGATGTC	5
小核糖核酸病毒	GAAACACGGACACCCAAAGTAGT	6
登革热 3’-CS	TCCCAGCGTCAATATGCTGTTT	7
沙粒病毒	GCCTAGGATCCACGGTGCGC	8
RSV-L 靶	GGGACAAAATGGATCCCATTATTAATGGAAATTCTGCTAA	9
RSV-AUG-2	TAATGGGATCCATTTTGTCCC	10
RSV-AUG3	AATAATGGGATCCATTTTGTCCC	11
RSV-AUG4	CATTAATAATGGGATCCATTTTGTCCC	12
RSV-AUG5	GAATTTCCATTAATAATGGGATCCATTTTG	13
RSV-AUG6	CAGAATTTCCATTAATAATGGGATCCATT	14
M23D	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	15
AVI-5225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	16/79
eGFP654	GCTATTACCTTAACCCAG	17
huMSTN 靶	GAAAAAAGATTATATTGATTTTAAAATC**ATG**CAAAAAC TGCAACTCTGTGTT	18
muMSTN25-104	CATACATTTGCAGTTTTTGCATCAT	19
muMSTN25-183	TCATTTTTAAAAATCAGCACAATCTT	20
muMSTN25-194	CAGTTTTTGCATCATTTTTAAAAATC	21
外显子44-A	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	22
外显子44-B	AAACTGTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	23
外显子44-C	TTGTGTCTTTCTGAGAAACTGTTCA	24
外显子45-A	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA	25
外显子45-B	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	26
外显子45-C	CATTCAATGTTCTGACAACAGTTTGCCGCT	27
外显子50-A	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	28
外显子50-B	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCC	29
外显子50-C	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	30
外显子51-A	ACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAGTTTGG	31
外显子51-B	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG	32
外显子51-C	GAGCAGGTACCTCCAACATCAAGGAA	33
外显子53-A	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	34
外显子53-B	TGTTCTTGTACTTCATCCCACTGATTCTGA	35

[0674]

SMN2-A	CTTTCATAATGCTGGCAG	36
SMN2-B	CATAATGCTGGCAG	37
SMN2-C	GCTGGCAG	38
CAG 9mer	CAG CAG CAG	39
CAG 12mer	CAG CAG CAG CAG	40
CAG 15mer	CAG CAG CAG CAG CAG	41
CAG 18mer	CAG CAG CAG CAG CAG CAG	42
AGC 9mer	AGC AGC AGC	43
AGC 12mer	AGC AGC AGC AGC	44
AGC 15mer	AGC AGC AGC AGC AGC	45
AGC 18mer	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	46
GCA 9mer	GCA GCA GCA	47
GCA 12mer	GCA GCA GCA GCA	48
GCA 15mer	GCA GCA GCA GCA GCA	49
GCA 18mer	GCA GCA GCA GCA GCA GCA	50
AGC 25mer	AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC A	51
CAG 25mer	CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG C	52
CAGG 9mer	CAG GCA GGC	53
CAGG 12mer	CAG GCA GGC AGG	54
CAGG 24mer	CAG GCA GGC AGG CAG GCA GGC AGG	55

富精氨酸细胞穿透肽		
rTAT	RRRQRRKKR	56
Tat	RKKRRQRRR	57
R_9F_2	RRRRRRRRRFF	58
$R_5F_2R_4$	RRRRRFFRRRR	59
R_4	RRRR	60
R_5	RRRRR	61
R_6	RRRRRR	62
R_7	RRRRRRR	63
R_8	RRRRRRRR	64
R_9	RRRRRRRRR	65
$(RAhxR)_4$; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	66
$(RAhxR)_5$; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	67
$(RAhxRRBR)_2$; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	68
$(RAR)_4F_2$	RARRARRARRARFFC	69
$(RGR)_4F_2$	RGRRGRRGRRGRFFC	70

[0675] 能将上述各种实施方案进行组合以提供其它实施方案。将本说明书涉及的和/或申请数据单中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、国外专利、国外专

利申请和非专利公开以其整体并入本文作为参考。若必要，则实施方案的方面可以修改以采用各种专利、申请和公开的概念从而提供其它实施方案。根据上述详细描述，能对实施方案进行这些和其它的改变。一般而言，在下述权利要求中，使用的术语不应解释为将权利要求限制在本说明书和权利要求中公开的具体实施方案，但应解释为包括所有可能的实施方案连同这类权利要求所授权的等同物的所有范围。因此，权利要求不受本公开的限制。

<110> AVI生物制药公司
贡纳· J·汉森;
亚历山大·查尔斯·鲁道夫;
蔡宝忠;
周明;
德怀特·D·怀勒

<120> 具有修饰的亚基间键和/或端基的寡核苷酸类似物

<130> 120178.487PC

<140> PCT
<141> 2011-05-27

<150> US 61/349,783
<151> 2010-05-28

<150> US 61/361,878
<151> 2010-07-06

<150> US 61/386,428
<151> 2010-09-24

<160> 88

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

[0001] <400> 1
cggtccacgt agactaacaa ct 22

<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 2
gaagttcaca cagataaact tct 23

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 3
cggttagaag actcatcttt 20

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 4
tttcgacatc ggttagaaga ctcat 25

<210> 5

<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 5
gagacgccat gatgtggatg tc 22

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 6
gaaacacgga cacccaaagt agt 23

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 7
tcccagcgtc aatatgctgt tt 22

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

[0002] <220>
<223> 反义寡聚物

<400> 8
gcctaggatc cacggtgcgc 20

<210> 9
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 9
gggacaaaat ggatcccatt attaatggaa attctgctaa 40

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 10
taatgggatc cattttgtcc c 21

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 11
aataatggga tccattttgt ccc 23

〈210〉 12
〈211〉 27
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 12
cattaataat gggatccatt ttgtccc 27

〈210〉 13
〈211〉 30
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 13
gaatttccat taataatggg atccattttg 30

〈210〉 14
〈211〉 29
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 14
cagaatttcc attaataatg ggatccatt 29

〈210〉 15
〈211〉 25
〈212〉 DNA
[0003] 〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 15
ggccaaacct cggcttacct gaaat 25

〈210〉 16
〈211〉 25
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 16
ggccaaacct cggcttacct gaaat 25

〈210〉 17
〈211〉 18
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 17
gctattacct taacccag 18

〈210〉 18
〈211〉 52
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

<400> 18
gaaaaaagat tatattgatt ttaaaatcat gcaaaaactg caactctgtg tt 52

<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 19
catacatttg cagtttttgc atcat 25

<210> 20
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 20
tcatttttaa aaatcagcac aatctt 26

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 21
cagtttttgc atcattttta aaaatc 26

[0004]

<210> 22
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 22
gatctgtcaa atcgcctgca ggtaa 25

<210> 23
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 23
aaactgttca gcttctgtta gccac 25

<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 24
ttgtgtcttt ctgagaaact gttca 25

<210> 25
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 反义寡聚物

<400> 25
ctgacaacag tttgccgctg cccaa 25

<210> 26
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 26
ccaatgccat cctggagttc ctgtaa 26

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 27
cattcaatgt tctgacaaca gtttgccgct 30

<210> 28
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 28
cttacaggct ccaatagtgg tcagt 25

[0005]

<210> 29
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 29
ccactcagag ctcagatctt ctaacttcc 29

<210> 30
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 30
gggatccagt atacttacag gctcc 25

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 31
acatcaagga agatggcatt tctagtttgg 30

<210> 32
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 32
ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag 30

〈210〉 33
〈211〉 26
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 33
gagcaggtac ctccaacatc aaggaa 26

〈210〉 34
〈211〉 25
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 34
ctgaaggtgt tcttgtactt catcc 25

〈210〉 35
〈211〉 30
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

[0006] 〈400〉 35
tgttcttgta cttcatccca ctgattctga 30

〈210〉 36
〈211〉 18
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 36
ctttcataat gctggcag 18

〈210〉 37
〈211〉 14
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 37
cataatgctg gcag 14

〈210〉 38
〈211〉 8
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 38
gctggcag 8

〈210〉 39
〈211〉 9

〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 39
cagcagcag 9

〈210〉 40
〈211〉 12
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 40
cagcagcagc ag 12

〈210〉 41
〈211〉 15
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 41
cagcagcagc agcag 15

〈210〉 42
〈211〉 18
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

[0007] 〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 42
cagcagcagc agcagcag 18

〈210〉 43
〈211〉 9
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 43
agcagcagc 9

〈210〉 44
〈211〉 12
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 44
agcagcagca gc 12

〈210〉 45
〈211〉 15
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 45
agcagcagca gcagc 15

〈210〉 46
〈211〉 18
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 46
agcagcagca gcagcagc 18

〈210〉 47
〈211〉 9
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 47
gcagcagca 9

〈210〉 48
〈211〉 12
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 48
gcagcagcag ca 12

〈210〉 49
〈211〉 15
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

[0008]

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 49
gcagcagcag cagca 15

〈210〉 50
〈211〉 18
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 50
gcagcagcag cagcagca 18

〈210〉 51
〈211〉 25
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 51
agcagcagca gcagcagcag cagca 25

〈210〉 52
〈211〉 25
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 反义寡聚物

〈400〉 52

cagcagcagc agcagcagca gcagc 25

<210> 53
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 53
caggcaggc 9

<210> 54
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 54
caggcaggca gg 12

<210> 55
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡聚物

<400> 55
caggcaggca ggcaggcagg cagg 24

<210> 56
<211> 9
[0009] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 56
Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 57
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 58
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe
1 5 10

<210> 59

<210> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 59
Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 60
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 60
Arg Arg Arg Arg
1

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 61
Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

[0010]

<210> 62
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 62
Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 63
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 64
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 65
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 5, 8, 11
<223> Acp

<400> 66
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10

<210> 67
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

[0011]

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 5, 8, 11, 14
<223> Acp

<400> 67
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10 15

<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 8
<223> Acp

<220>
<221> MOD_RES
<222> 5, 11
<223> bAla

<400> 68
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10

<210> 69

<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 69
Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Phe Phe Cys
1 5 10 15

<210> 70
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 70
Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Phe Phe Cys
1 5 10 15

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 71
Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Cys
1 5 10

[0012]

<210> 72
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 72
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Cys
1 5 10

<210> 73
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 3, 6, 9, 12
<223> Acp

<220>
<221> MOD_RES
<222> 13
<223> bAla

<400> 73
Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 74

<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 5, 8, 11, 13
<223> Acp

<220>
<221> MOD_RES
<222> 14
<223> bAla

<400> 74
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 75
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 1, 4, 7, 10, 13
<223> Acp

<220>
<221> MOD_RES
[0013] <222> 14
<223> bAla

<400> 75
Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 76
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 4, 6, 8, 10, 12
<223> Acp

<220>
<221> MOD_RES
<222> 13
<223> bAla

<400> 76
Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 77
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14
<223> Acp

<220>
<221> MOD_RES
<222> 15
<223> bAla

<400> 77
Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 78
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 5, 8, 11, 14, 16
<223> Acp

<220>
<221> MOD_RES
<222> 17
<223> bAla

<400> 78
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa
1 5 10 15
[0014] Xaa

<210> 79
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> 2, 8, 13
<223> Acp

<220>
<221> MOD_RES
<222> 5, 11, 14
<223> bAla

<400> 79
Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 80
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly
1 5

<210> 81
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 81
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 82
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly
1 5

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 83
[0015] Arg Arg Arg Arg Arg Gly Arg Arg Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 84
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 84
Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 85
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 86
Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly
1 5 10

<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> 变体
<222> 2, 8
<223> Xaa = Ala, β-丙氨酸, Val, Leu, Ile, Ser, Gly, Thr, Phe, Trp和6-氨基己酸

<400> 87
[0016] Arg Xaa Arg Arg Gly Gly Arg Xaa Arg Arg Gly Gly
1 5 10

<210> 88
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<220>
<221> 变体
<222> 2, 6, 8, 12
<223> Xaa = Ala, β-丙氨酸, Val, Leu, Ile, Ser, Gly, Thr, Phe, Trp和6-氨基己酸

<400> 88
Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa Gly
1 5 10

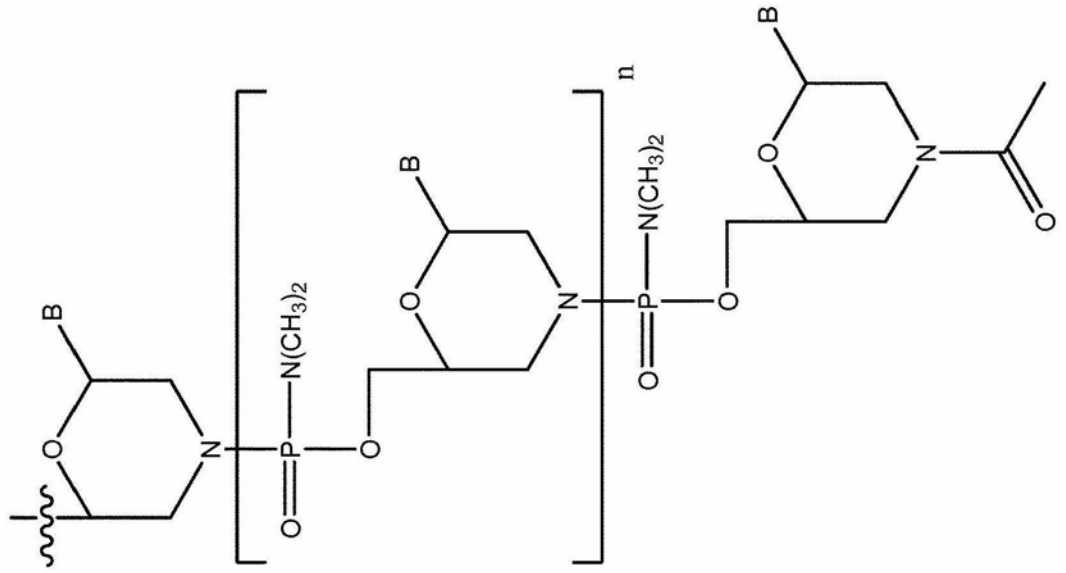


图1A

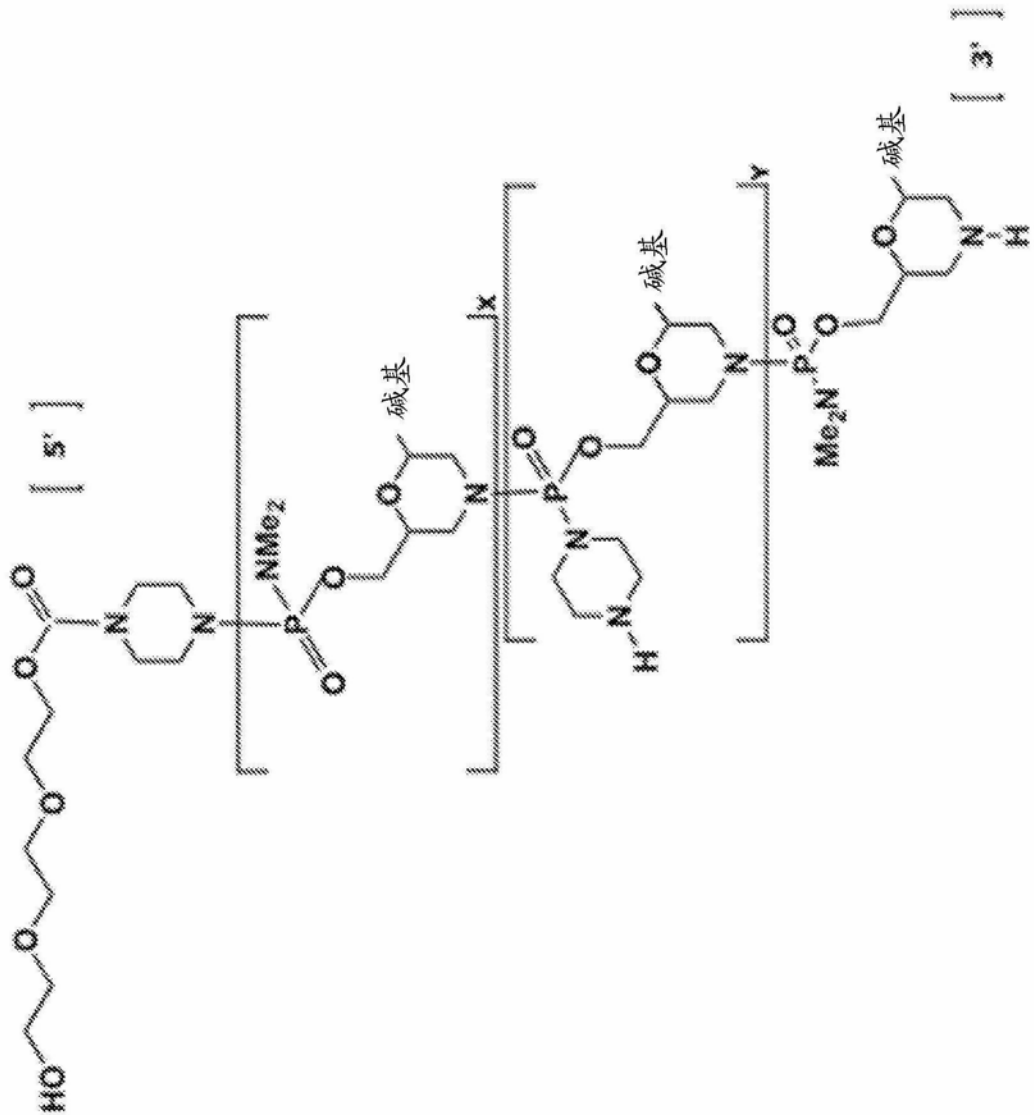


图1B

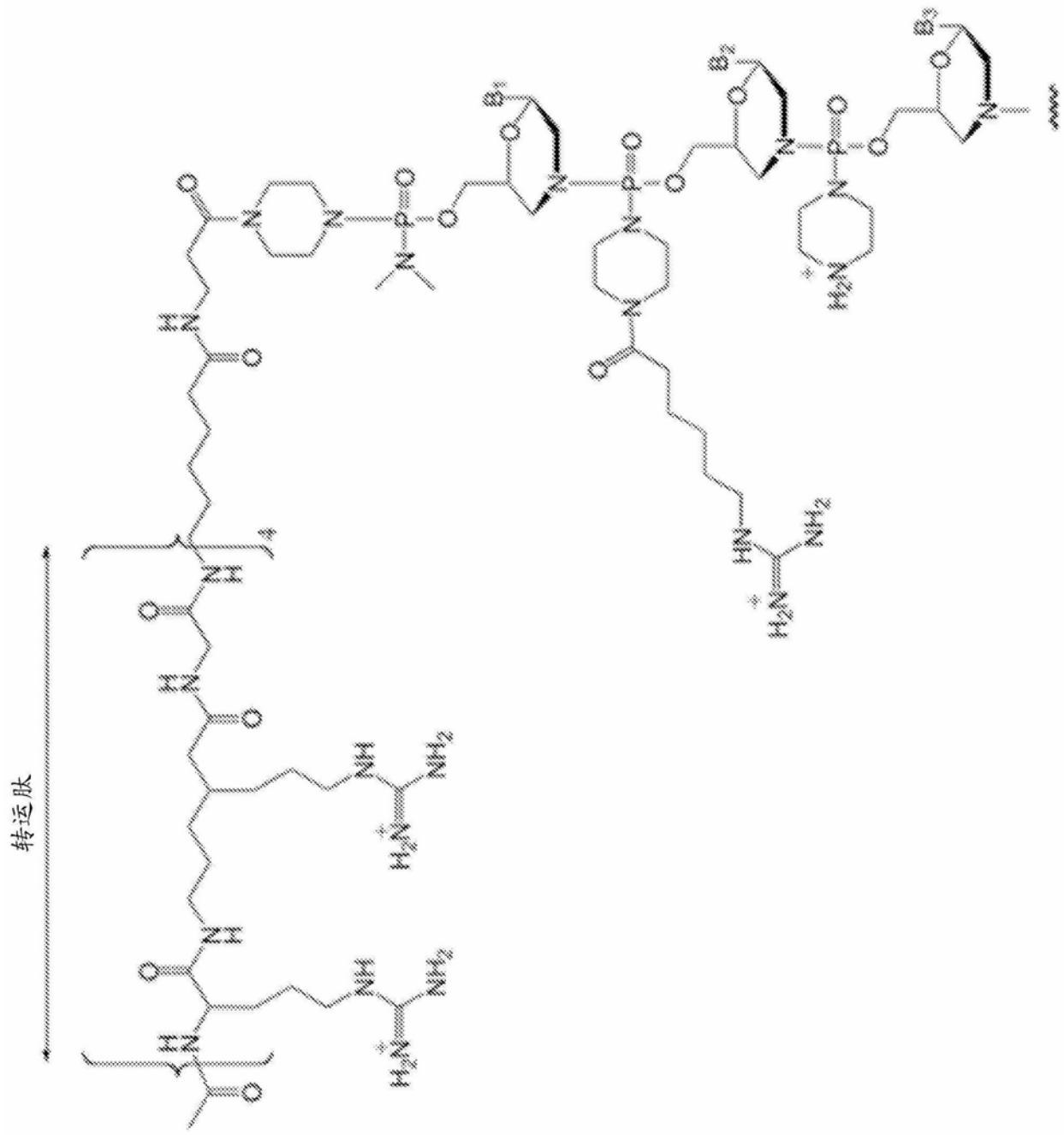


图1C

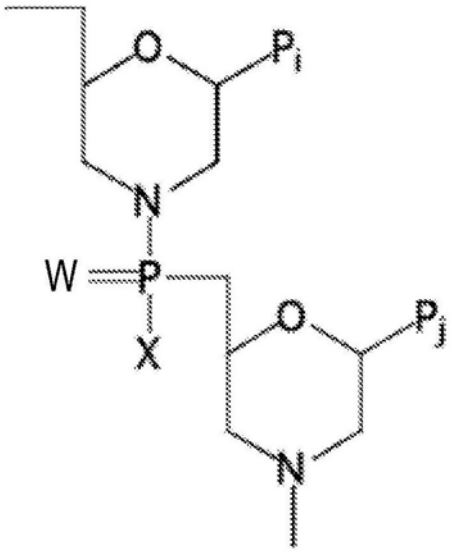


图1D

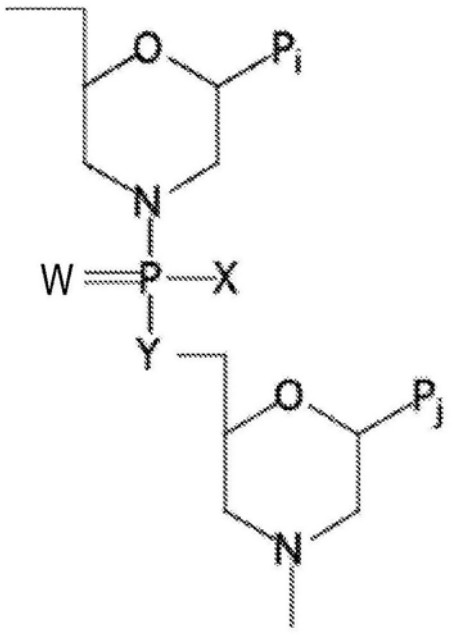


图1E

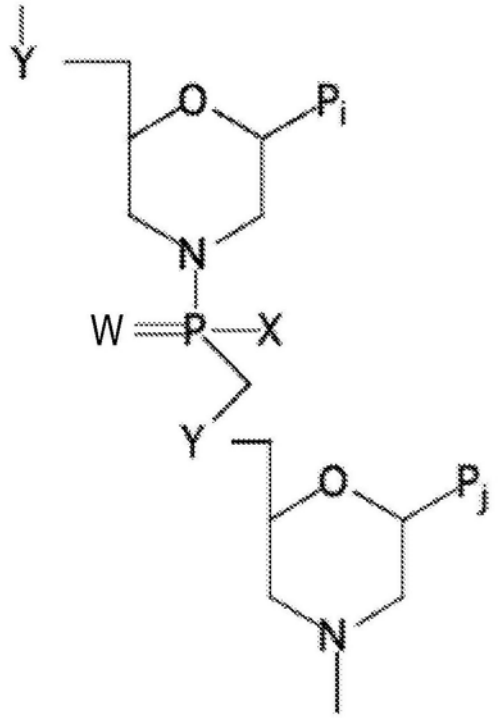


图1F

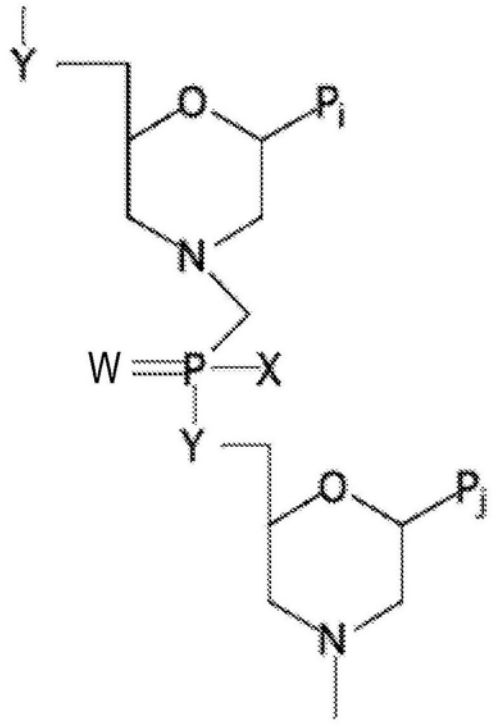


图1G

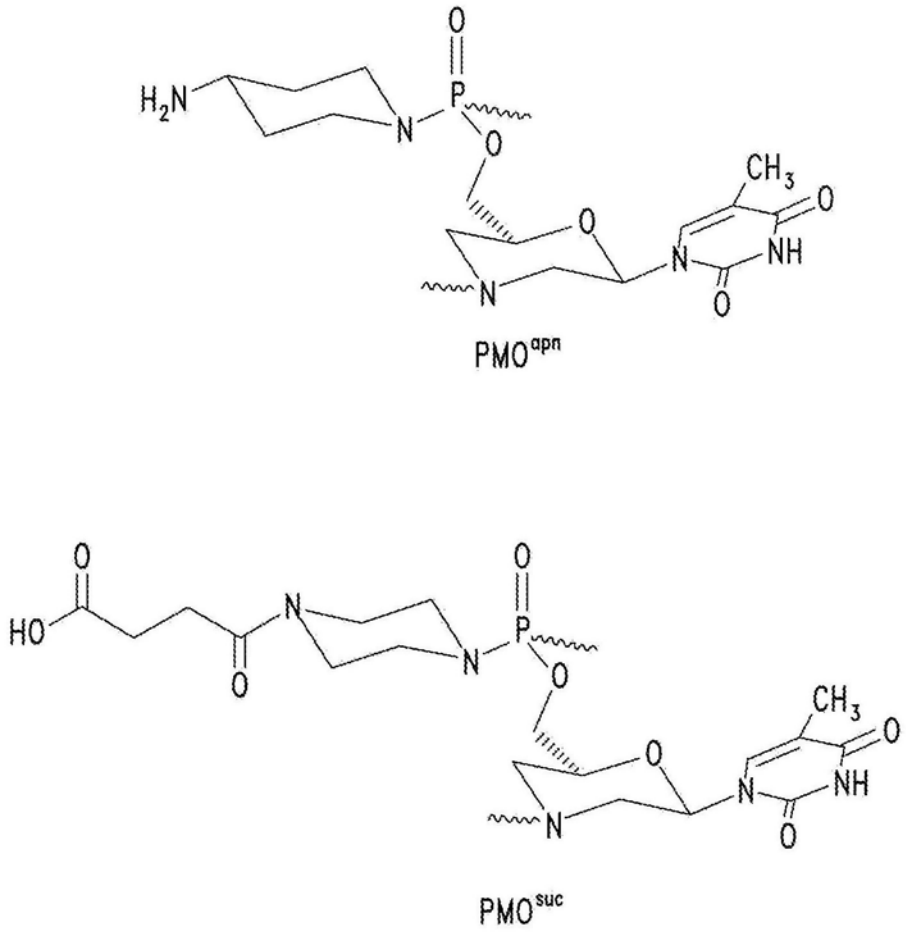


图2

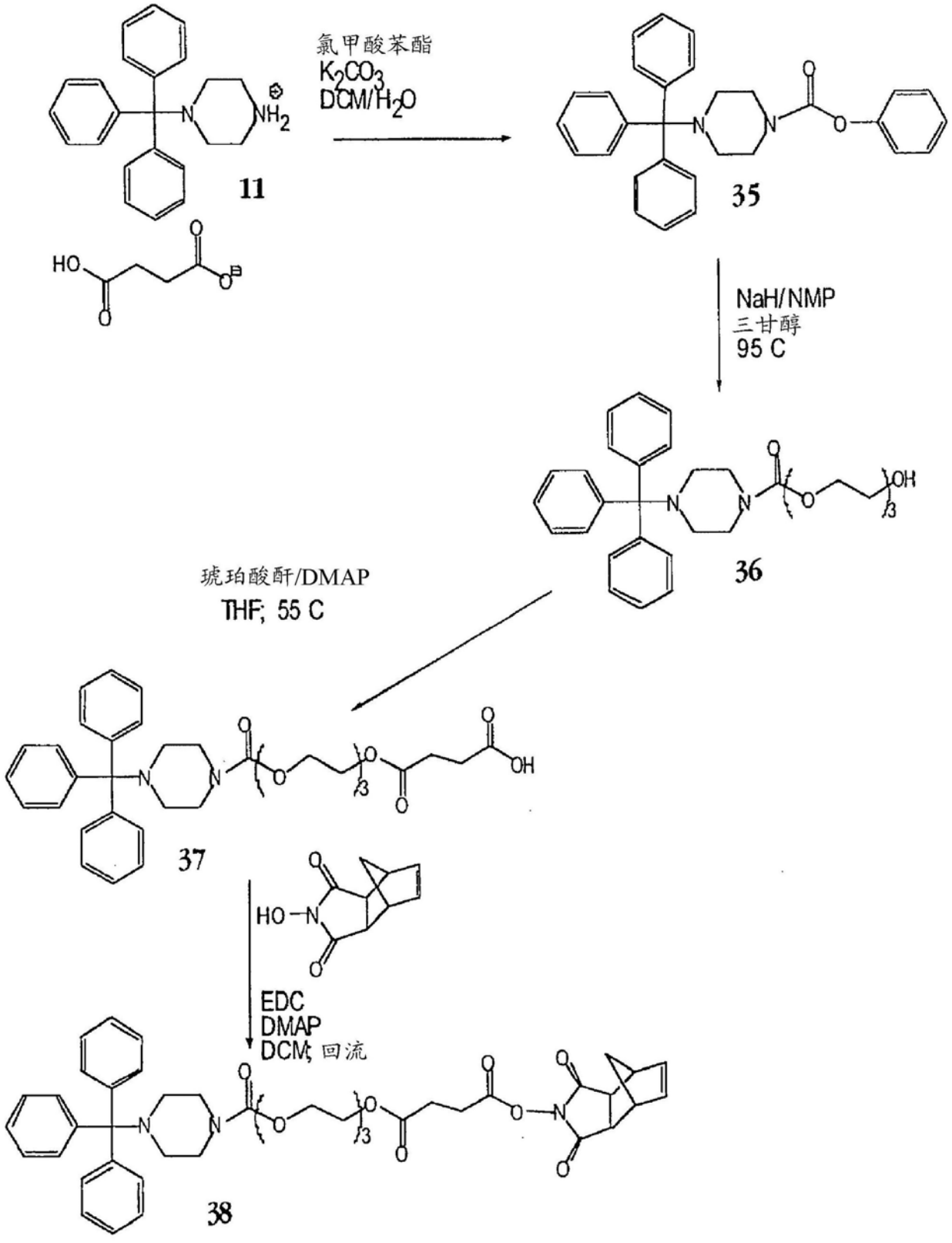

氯甲酸苯酯
K_2CO_3
DCM/H_2O
11
35
NaH/NMP
三甘醇
95 C
36
琥珀酸酐/DMAP
THF; 55 C
37
EDC
DMAP
DCM; 回流
38

图3

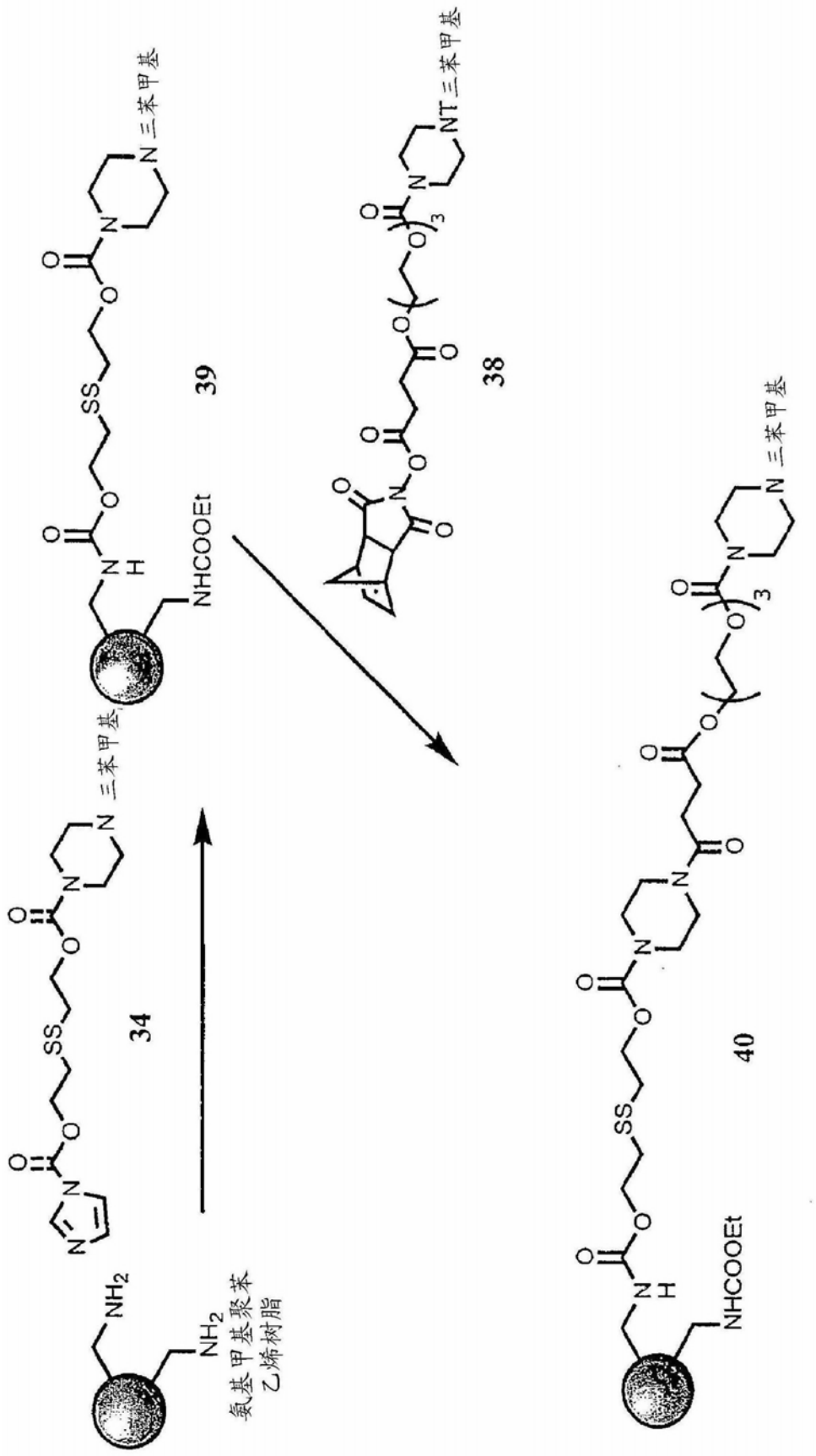

氨基甲基聚苯乙烯树脂
NH2
NH2
三苯甲基
N
34
SS
O
NHCOOEt
39
三苯甲基
N
NT三苯甲基
38
40

图4

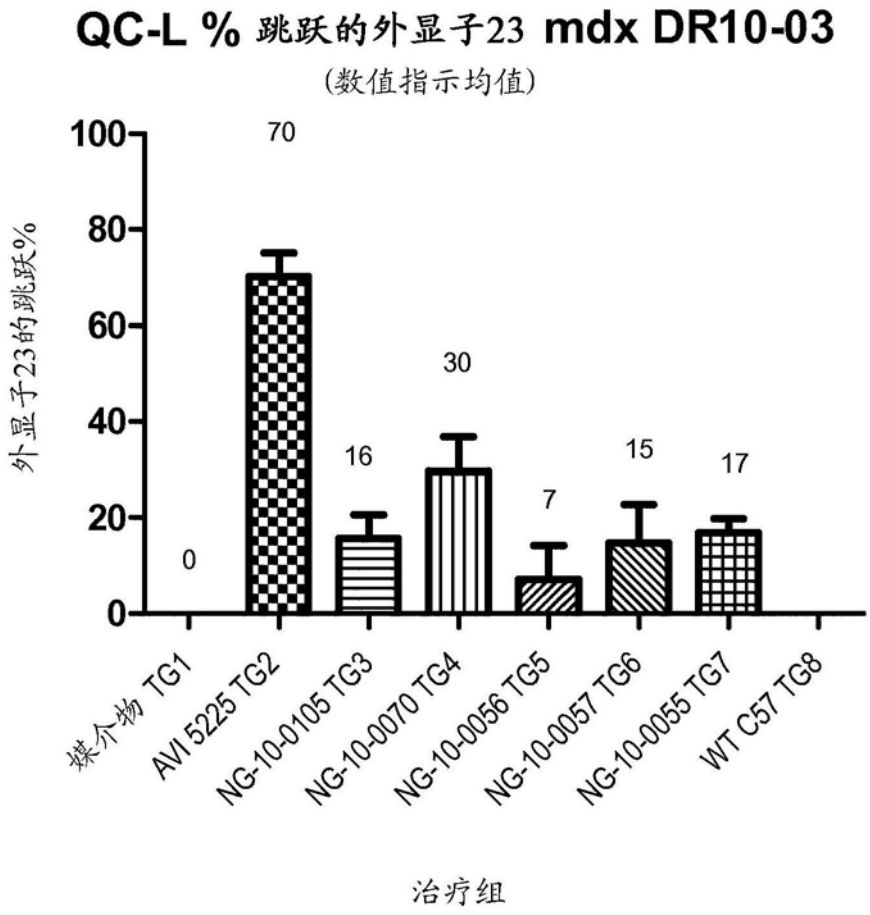

QC-L % 跳跃的外显子23 mdx DR10-03
(数值指示均值)
外显子23的跳跃%
100
80
60
40
20
0
0
70
16
30
7
15
17
媒介物 TG1
AVI 5225 TG2
NG-10-0105 TG3
NG-10-0070 TG4
NG-10-0056 TG5
NG-10-0057 TG6
NG-10-0055 TG7
WT C57 TG8
治疗组

图5

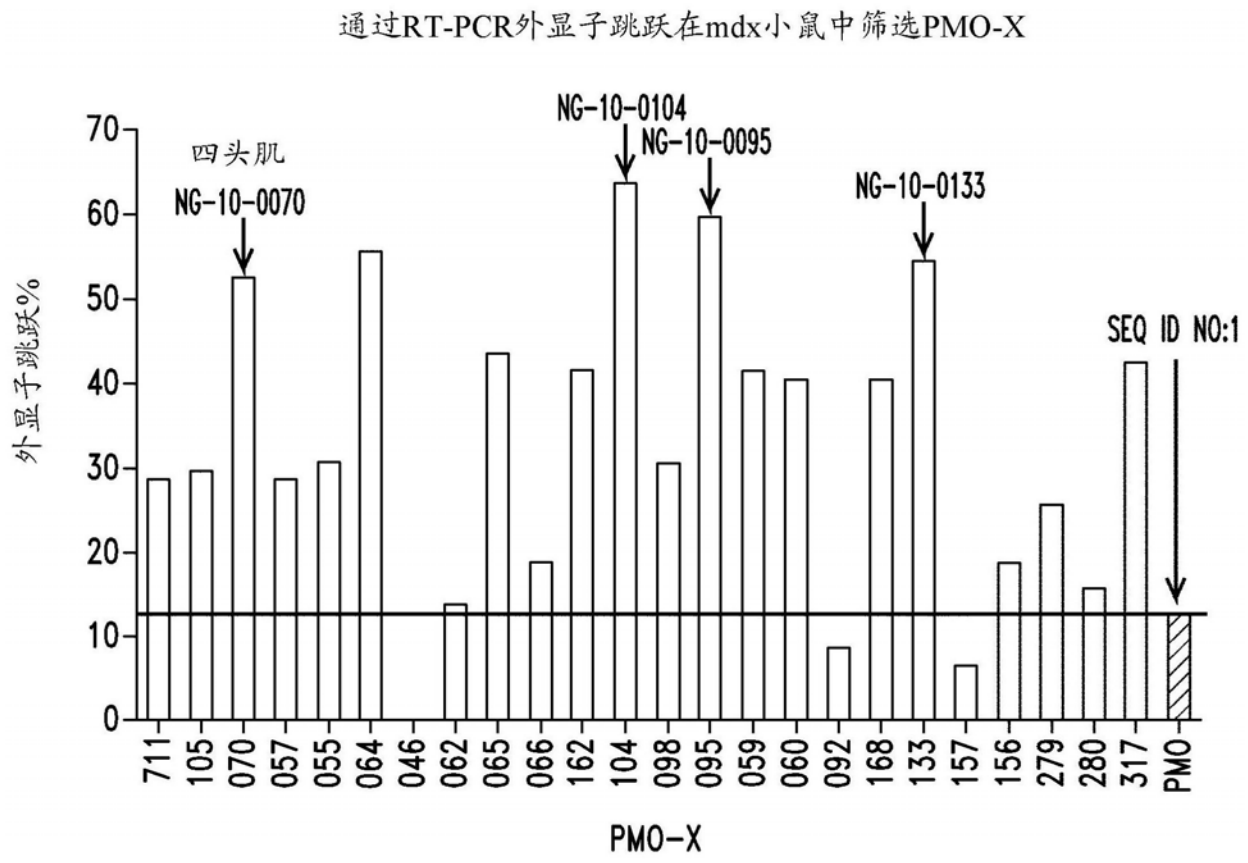

通过RT-PCR外显子跳跃在mdx小鼠中筛选PMO-X
外显子跳跃%
四头肌
NG-10-0070
NG-10-0104
NG-10-0095
NG-10-0133
SEQ ID NO:1
0
10
20
30
40
50
60
70
711
105
070
057
055
064
046
062
065
066
162
104
098
095
059
060
092
168
133
157
156
279
280
317
PMO
PMO-X

图6

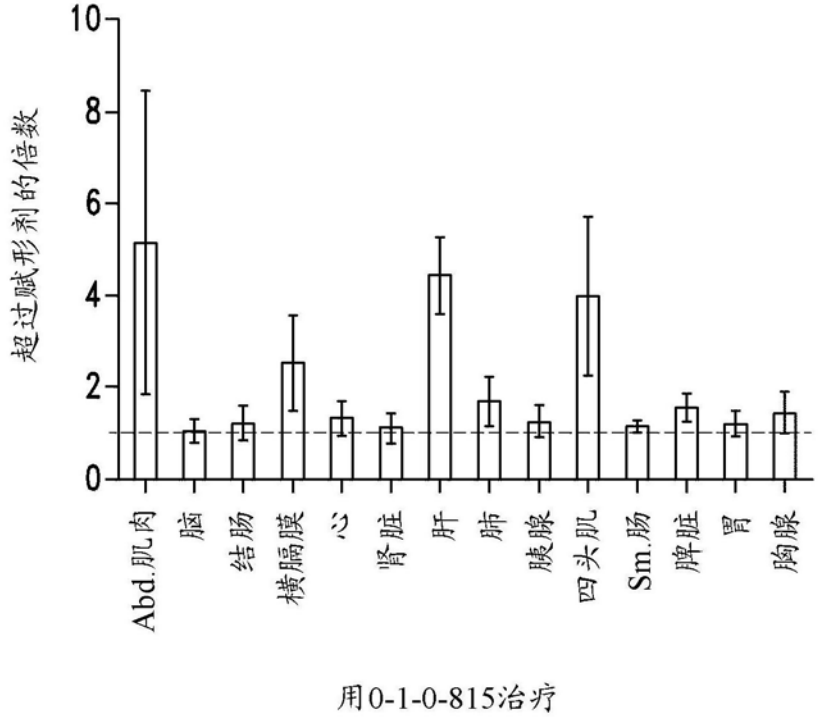
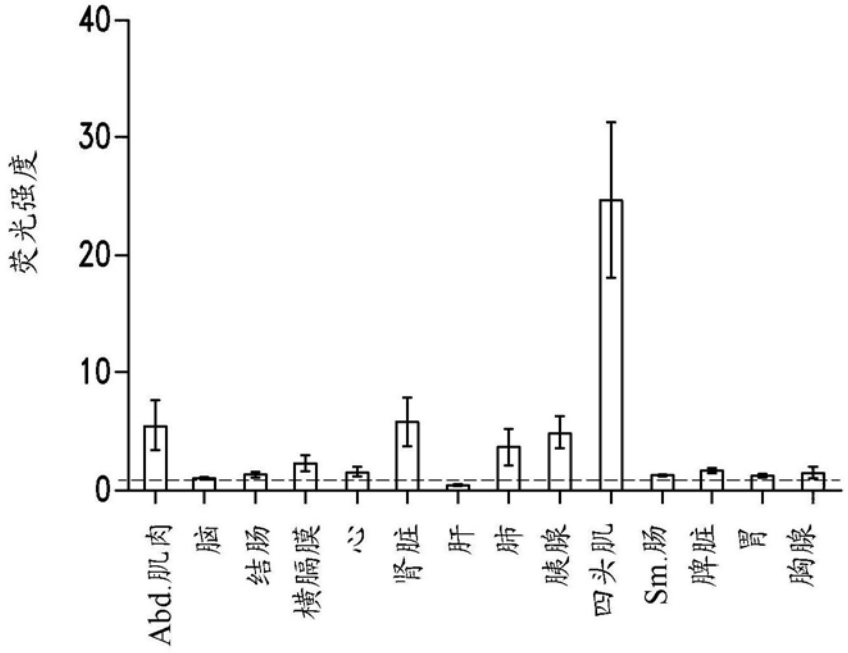
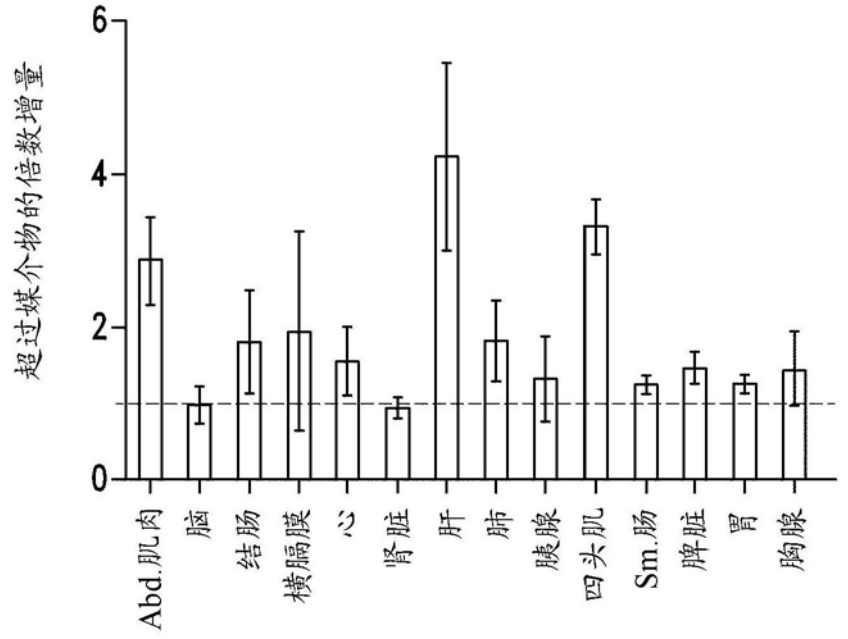

超过赋形剂的倍数
0
2
4
6
8
10
Abd.肌肉
脑
结肠
横膈膜
心
肾脏
肝
肺
胰腺
四头肌
Sm.肠
脾脏
胃
胸腺
用0-1-0-815治疗

图7A



用NG-10-0110治疗

图7B



用NG-10-0323治疗

图7C

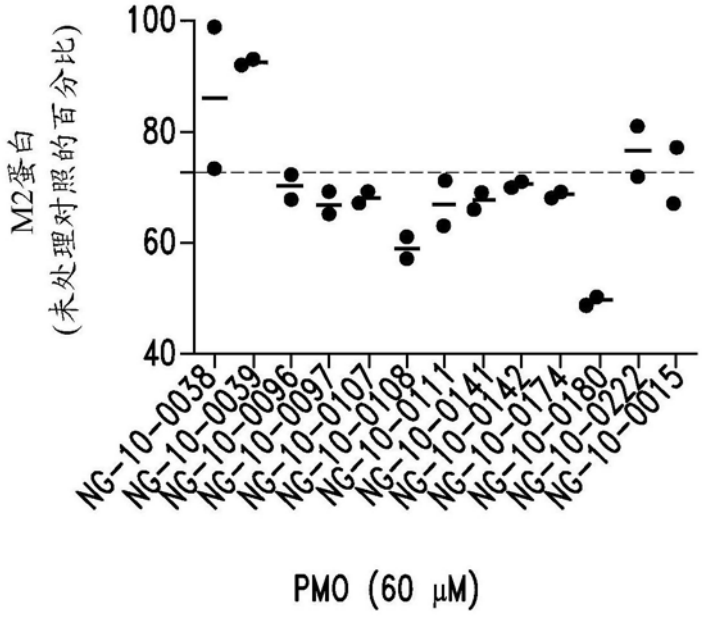

M2蛋白
(未处理对照的百分比)
100
80
60
40
NG-10-0038
NG-10-0039
NG-10-0096
NG-10-0097
NG-10-0107
NG-10-0108
NG-10-0111
NG-10-0141
NG-10-0142
NG-10-0174
NG-10-0180
NG-10-0222
NG-10-0015
PMO (60 μM)

图8

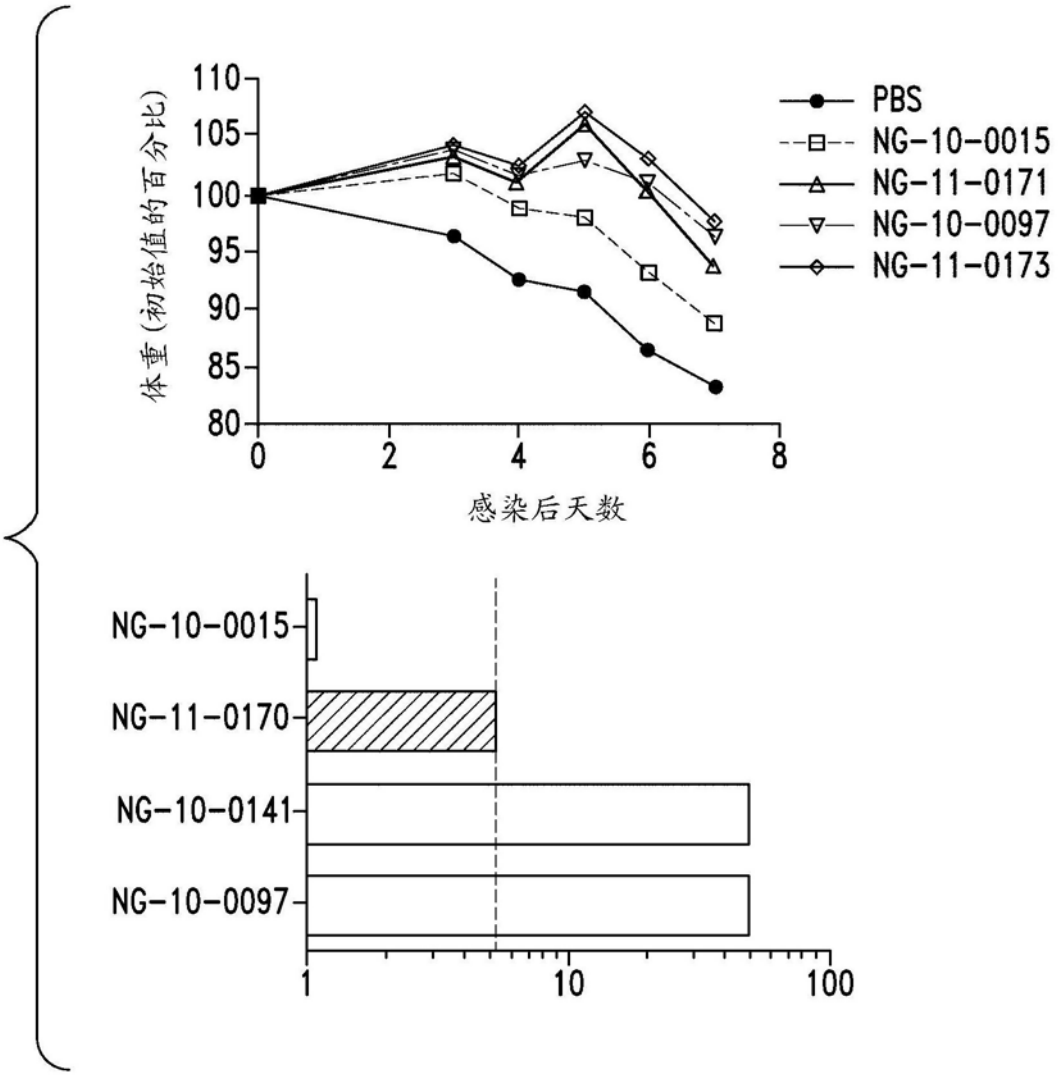

体重(初始值的百分比)
110
105
100
95
90
85
80
0
2
4
6
8
感染后天数
PBS
NG-10-0015
NG-11-0171
NG-10-0097
NG-11-0173
NG-10-0015
NG-11-0170
NG-10-0141
NG-10-0097
1
10
100
抗病毒活性超过未修饰的
PMO的倍数变化

图9

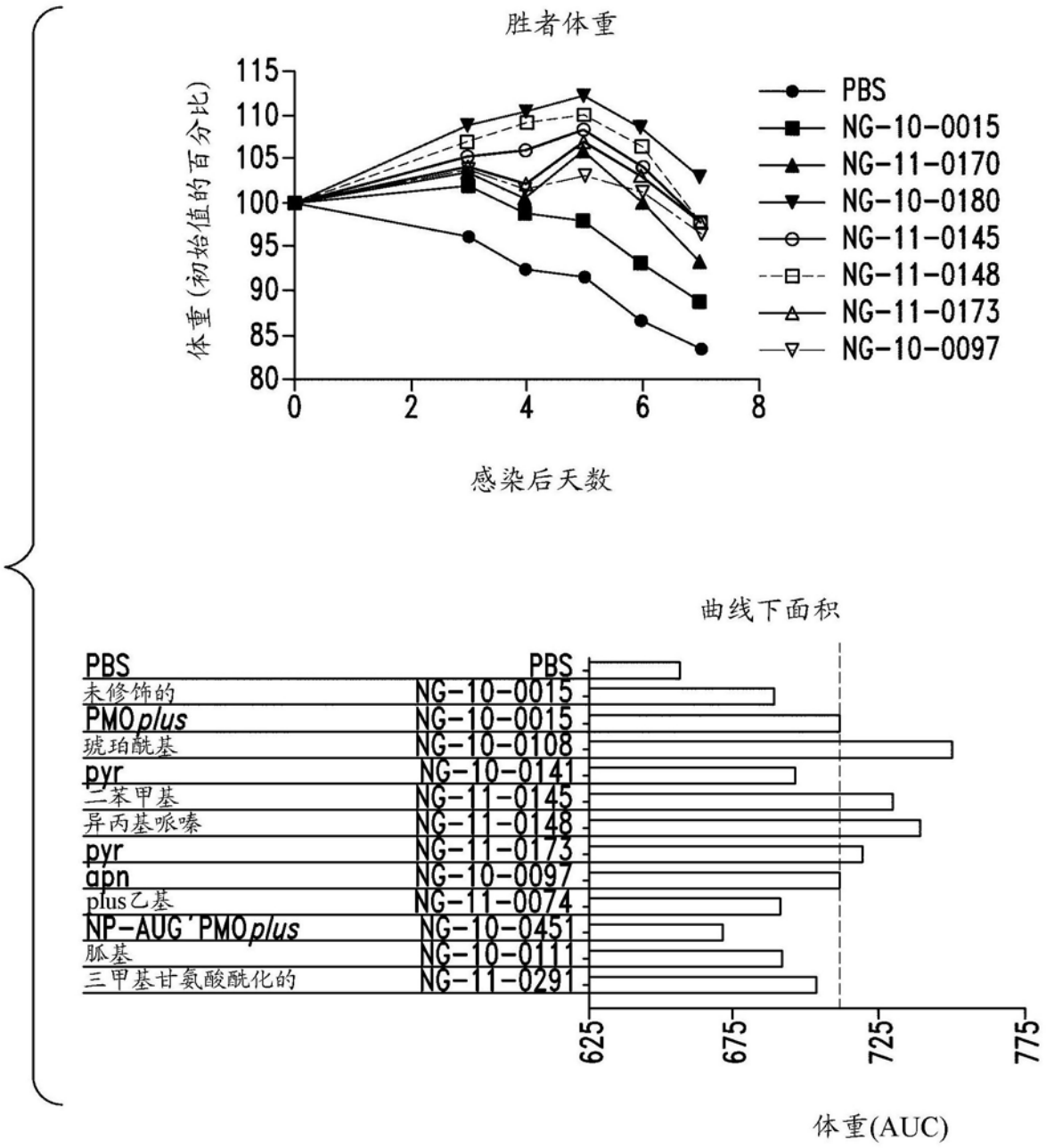

胜者体重
体重(初始值的百分比)
115
110
105
100
95
90
85
80
0
2
4
6
8
感染后天数
PBS
NG-10-0015
NG-11-0170
NG-10-0180
NG-11-0145
NG-11-0148
NG-11-0173
NG-10-0097
曲线下面积
PBS
PBS
未修饰的
NG-10-0015
PMOplus
NG-10-0015
琥珀酰基
NG-10-0108
pyr
NG-10-0141
二苯甲基
NG-11-0145
异丙基哌嗪
NG-11-0148
pyr
NG-11-0173
apn
NG-10-0097
plus乙基
NG-11-0074
NP-AUG'PMOplus
NG-10-0451
胍基
NG-10-0111
三甲基甘氨酸酰化的
NG-11-0291
625
675
725
775
体重(AUC)

图10

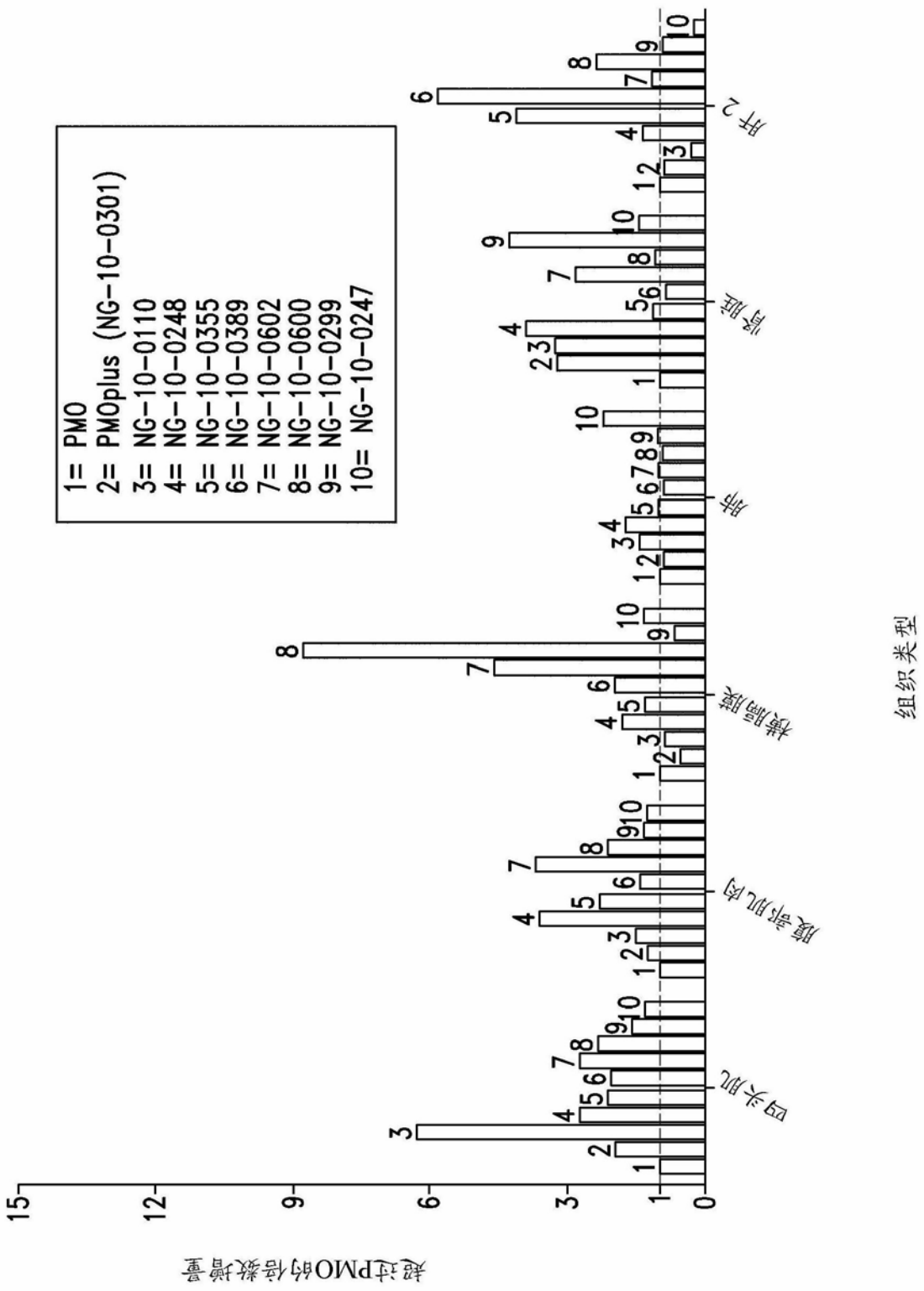

1= PMO
2= PMOplus (NG-10-0301)
3= NG-10-0110
4= NG-10-0248
5= NG-10-0355
6= NG-10-0389
7= NG-10-0602
8= NG-10-0600
9= NG-10-0299
10= NG-10-0247
超过PMO的倍数增量
15
12
9
6
3
1
0
四头肌
腹部肌肉
横膈膜
肺
肾脏
肝2
组织类型

图11

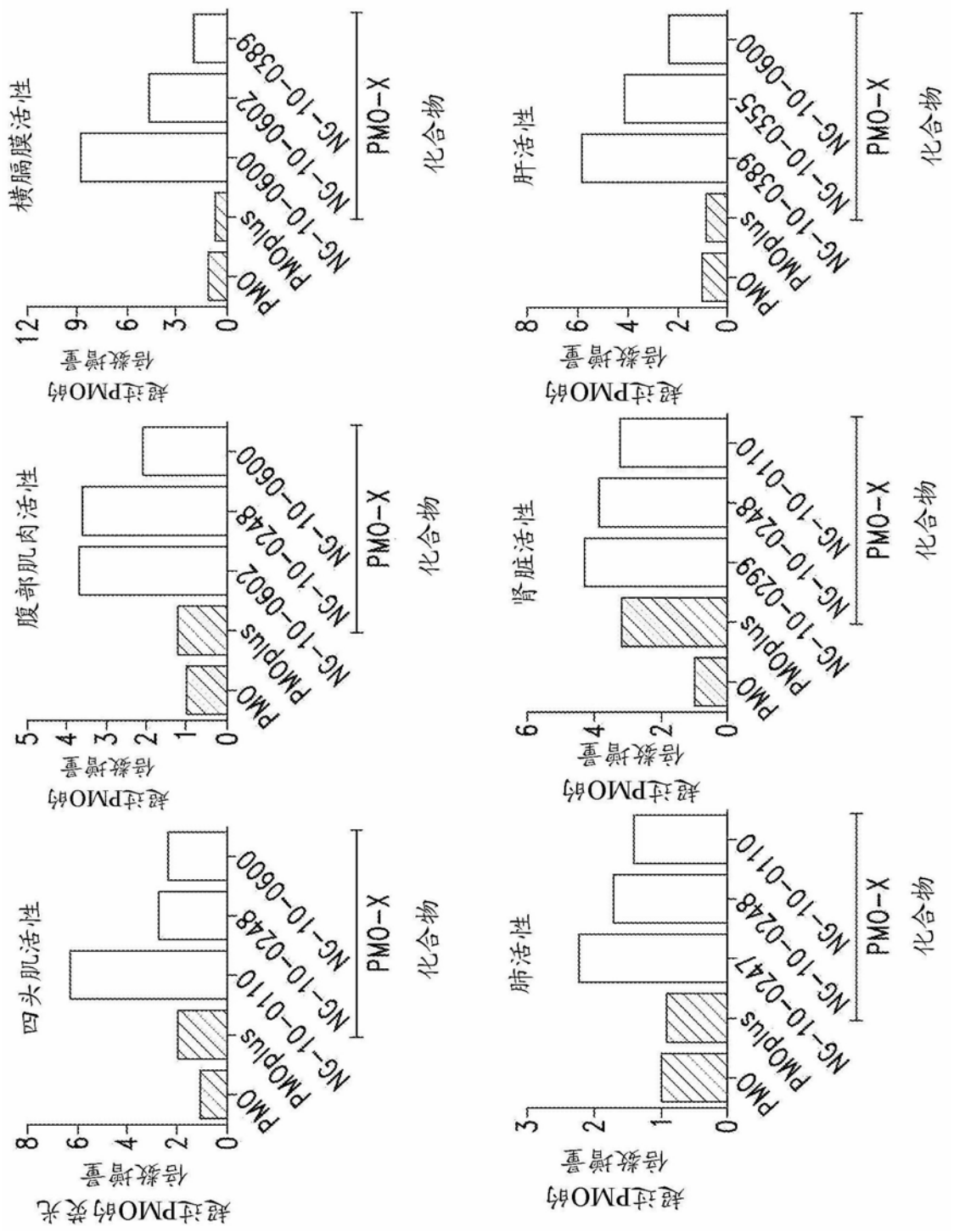

超过PMO的荧光
倍数增量
化合物
PMO-X
PMO
PMOPlus
NG-10-0600
NG-10-0248
NG-10-0110
四头肌活性
超过PMO的
倍数增量
化合物
PMO-X
PMO
PMOPlus
NG-10-0602
NG-10-0248
NG-10-0600
腹部肌肉活性
超过PMO的
倍数增量
化合物
PMO-X
PMO
PMOPlus
NG-10-0602
NG-10-0389
NG-10-0600
横膈膜活性
超过PMO的
倍数增量
化合物
PMO-X
PMO
PMOPlus
NG-10-0247
NG-10-0248
NG-10-0110
肺活性
超过PMO的
倍数增量
化合物
PMO-X
PMO
PMOPlus
NG-10-0299
NG-10-0248
NG-10-0110
肾脏活性
超过PMO的
倍数增量
化合物
PMO-X
PMO
PMOPlus
NG-10-0389
NG-10-0355
NG-10-0600
肝活性
超过PMO的
倍数增量

图12