(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119213006 A
(43)申请公布日 2024.12.27

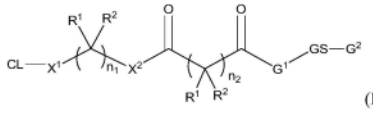
(21)申请号 202380040661.4
(22)申请日 2023.04.26
(30)优先权数据
63/335,174 2022.04.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.15
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/019940 2023.04.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/212027 EN 2023.11.02
(71)申请人 康涅狄格大学
地址 美国
(72)发明人 拉曼·巴哈尔 维卡斯·库马尔 阿尼克特·瓦哈内
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 韩晓帆
(51)Int.Cl.
C07H 21/02(2006.01)
A61K 31/712(2006.01)

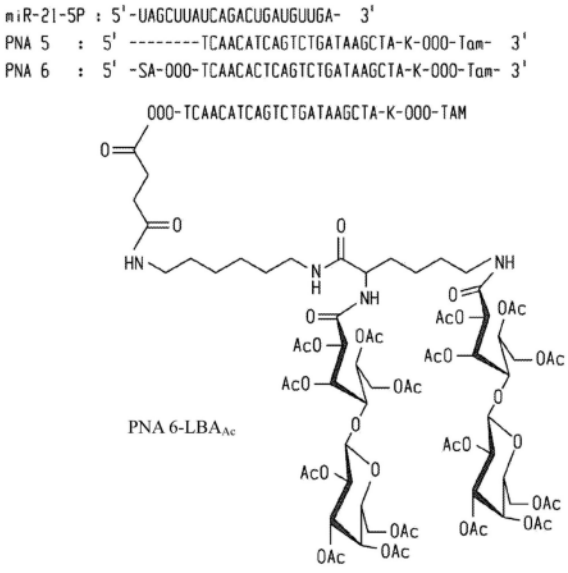
权利要求书5页 说明书19页 附图35页

(54)发明名称

用于增强肝脏和肾脏特异性靶向的遗传序列-糖缀合物

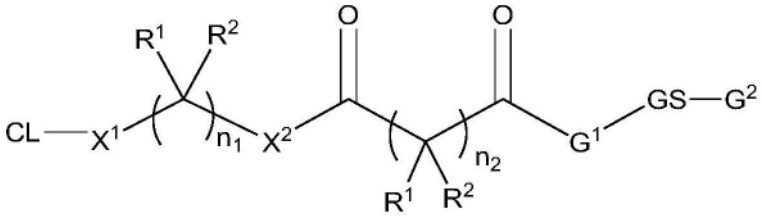
(57)摘要

公开了一种具有式(I)的遗传序列-糖缀合物：
(I)
其中GS是遗传序列，优选地肽核酸或寡核苷酸，诸如mRNA序列、siRNA序列或DNA序列，任选地其中每个遗传序列是天然的或经修饰的，并且变量如本文所述。还公开了该遗传序列-糖缀合物的用途，包括作为靶向包括人在内的哺乳动物的肝脏和肾脏的RNA治疗剂。



CN 119213006 A

1.一种具有下式的遗传序列-糖缀合物：



其中

GS是遗传序列，优选地肽核酸或寡核苷酸，诸如mRNA序列、siRNA序列或DNA序列，任选地其中每个遗传序列是天然的或经修饰的，例如包括γ-丝氨酸修饰的γ肽核酸、丙氨酸γ肽核酸、夹钳G修饰的肽核酸、锁核酸(LNA)、硫代磷酸酯(PS)、磷二酰胺吗啉代寡聚体(PMO)、2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-氟(2'F)、5'-甲基胞嘧啶或它们的组合，所述遗传序列具有3'末端和5'末端，

R_1和R_2各自独立地是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基，X^1是O、NR^3、C＝O或$C(R^3)_2$，其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基，

X^2是O、NR^3或$C(R^3)_2$，其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基，

G^1是将PNA连接至所述缀合物的直接键或基团，

G^2是H或功能部分，

CL是包含衍生自单糖、二糖、三糖或四糖的2至16个糖残基的糖配体，优选地其中CL包含衍生自单糖或二糖的糖残基，

任选地其中所述糖配体在其羟基基团或氨基基团上被C_2至C_{15}酰基基团完全酰化或部分酰化，优选地其中所述糖配体在其羟基基团或氨基基团上被完全乙酰化或部分乙酰化，

n^1为1至20，并且

n^2为0至20。

2.根据权利要求1所述的缀合物，其中所述遗传序列包含含有经化学修饰的核苷酸的PNA、mRNA或siRNA，例如锁核酸(LNA)、硫代磷酸酯(PS)、磷二酰胺吗啉代寡聚体(PMO)、2'-O-甲基(2'-O-Me)、G-夹钳、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、siRNA、2'-氟(2'F)、5'-甲基胞嘧啶或它们的组合。

3.根据权利要求1所述的缀合物，其中所述遗传序列有效地靶向肝细胞上的脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)，或者其中所述PNA有效地靶向肾脏细胞。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的缀合物，所述缀合物用于调节靶基因、靶mRNA、微RNA或非编码RNA。

5.根据权利要求4所述的缀合物，其中所述靶基因或RNA是PKD1、PKD2、β-连环蛋白、谷氨酰胺合成酶、c-Myc、TTR、因子VII、Eg5、PCSK9、AAT、TPX2、apoB、SAA、RSV、PDGF、miR-122、miR-223、miR-21、miR-155、miR-132、miR-125b、miR-146a、miR-181、let-7、miR-34a、miR-805、miR-690、miR-134、miR-494、miR-202-5p或miR-192。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的缀合物，其中G^1具有1至20个碳原子，或者其中G^1是将所述PNA连接至所述缀合物的功能部分，例如其中G^1是聚乙二醇、聚丙二醇或聚乙二醇-丙二醇的残基，诸如三氧代-短聚乙二醇(PEG)链的残基。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的缀合物，其中G^2具有1至20个碳原子，或者其中G^2

是将所述PNA连接至所述缀合物的功能部分，例如其中G^2是聚乙二醇、聚丙二醇或聚乙二醇-丙二醇的残基，诸如三氧代-miniPEG链。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的缀合物，其中所述糖配体还包含用于附接至X^1的接头。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的缀合物，其中所述糖残基是完全酰化或部分酰化的糖残基，其中所述酰基基团具有2至15个碳原子，例如完全乙酰化或部分乙酰化的糖残基。

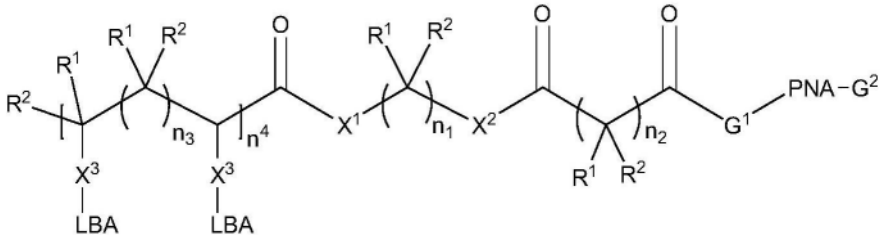
10.根据权利要求1至9中任一项所述的缀合物，其中所述缀合物上的功能部分还包含用于附接至kielin、托伐普坦、尼达尼布、紫杉醇、博莱霉素、环孢菌素、顺铂、罗米地辛、多柔比星、多西他赛、柔红霉素、长春新碱、氨甲蝶呤、环磷酰胺、维奈托克、羟基脲、巯嘌呤、泼尼松龙、阿糖胞苷或吡非尼酮的接头。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的缀合物，所述缀合物用于调节靶基因、mRNA、微RNA、非编码RNA、DNA、激素、细胞蛋白质或酶。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的缀合物，其中所述靶基因或RNA是PKD1、PKD2、GPX1、GPX4、CYP11B2、ERCC4、ERCC2、GSTO1、GSTO2、UMOD、MGP、GLO1、SLC7A9、SHROOM3、VEGFA、APOL1、MYH9、miR-21、miR-17、MiR-10、miR-192、miR-216a和miR-217、miR-192、miR-377、miR-200c、miR-141、miR-205和miR-192。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的缀合物，其中所述糖残基衍生自N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、半乳糖、乳糖酸或它们的乙酰化的酯，优选地其中所述糖残基是N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、半乳糖或乳糖酸的完全乙酰化或部分乙酰化的产物。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的缀合物，所述缀合物具有下式



其中

LBA是乳糖酸残基，

X^1是NR^3、O或$C(R^3)_2$，其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基，

每个X^3独立地是O、NR^3或$C(R^3)_2$，其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基，

n_3为0至20，并且

n_4为1至8。

15.根据权利要求13所述的缀合物，其中

G^1是将所述PNA连接至所述缀合物的基团，

R^1和R^2各自是H，

X^1、X^2和X^3各自是NH，并且

$n_1=6$，$n_2=2$且$n_3=4$。

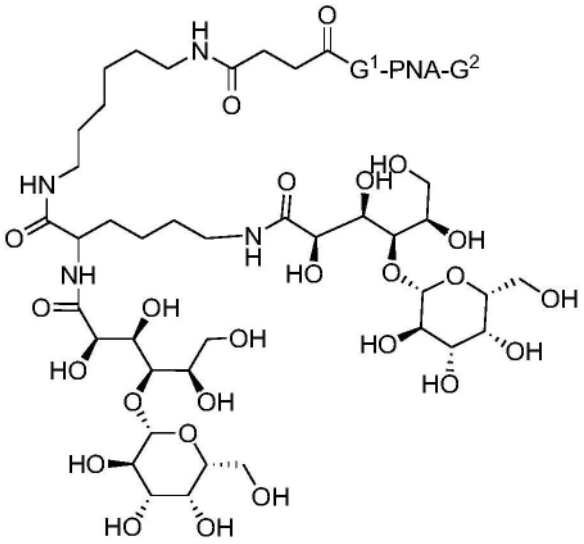
16.根据权利要求13所述的缀合物，其中

R^1和R^2各自是H，

n_3=4,并且

所述PNA在所述5'末端处连接至所述缀合物。

17.根据权利要求13所述的缀合物,所述缀合物具有下式:

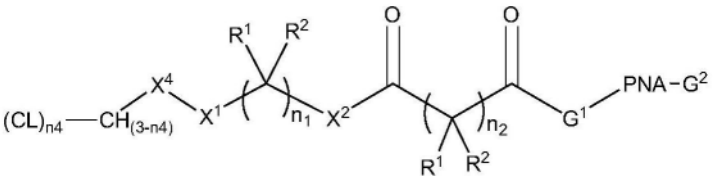


,

优选地其中G^1是将所述PNA连接至所述缀合物的功能部分,并且G^2是功能部分。

18.根据权利要求13至16中任一项所述的缀合物,其中所述乳糖酸残基被具有2至15个碳原子的酰基基团完全酰化或部分酰化,优选地其中所述乳糖酸残基被完全乙酰化或部分乙酰化。

19.根据权利要求1至12中任一项所述的缀合物,所述缀合物具有下式



其中

X^1是C=O或$C(R^3)_2$,其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基,

X^4是O、NR^3或$C(R^3)_2$,其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基,

CL是通过具有1至30个原子的接头链连接至CH的糖残基,所述接头链包含含有酰胺基团、酯基团或醚基团的取代的或未取代的C_1至C_{12}烷基或C_6至C_{12}芳基,并且

n_4为2或3。

20.根据权利要求18所述的缀合物,其中所述糖残基是完全酰化或部分酰化的糖残基,其中所述酰基基团具有2至15个碳原子,例如完全乙酰化或部分乙酰化的糖残基。

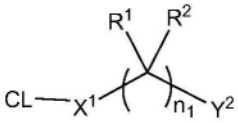
21.根据权利要求19所述的缀合物,其中所述糖残基衍生自N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)或者衍生自完全酰化或部分酰化的乙酰半乳糖胺。

22.根据权利要求1至20中任一项所述的缀合物,所述缀合物与用于器官特异性递送的聚合物、脂质、蛋白质或其他药物赋形剂一起配制。

23.一种将遗传序列与糖配体缀合以提供根据权利要求1至12中任一项所述的遗传序列-糖缀合物的方法,其中X^2是O或NR^3,所述方法包括:

使所述遗传序列官能化以提供游离的-COOH官能团;以及

在经修饰的遗传序列的所述游离的-COOH官能团和下式的化合物的Y^2之间形成键



其中Y^2是-NHR^3或-OH。

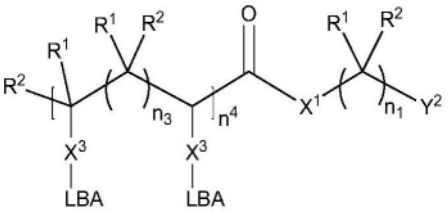
24.根据权利要求23所述的方法,其中所述缀合通过溶液相合成、固相合成或它们的组合来进行。

25.根据权利要求22或权利要求23所述的方法,所述方法还包括在使所述遗传序列官能化之前用G^1的前体、G^2的前体或它们的组合来修饰所述遗传序列。

26.一种将遗传序列与乳糖酸-主链配体缀合以提供根据权利要求13至17中任一项所述的遗传序列-乳糖酸缀合物的方法,其中X^1和X^2各自独立地是O或NR^3,所述方法包括:

使所述遗传序列官能化以提供游离的-COOH官能团;以及

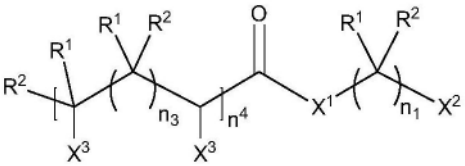
在经修饰的遗传序列的所述游离的-COOH官能团和下式的Y^2之间形成键



其中Y^2是-NHR^3或-OH。

27.根据权利要求25所述的方法,所述方法还包括:

使乳糖酸与下式的主链反应



其中

X^3是-OH或NHR^3,并且

X^2是受保护的O或受保护的NHR^3。

28.一种用于降低受试者的健康病症所涉及的靶向RNA的表达的方法,所述方法包括:

在体内或离体地向所述受试者的细胞提供根据权利要求1至20中任一项所述的遗传序列-乳糖酸缀合物,其中所述缀合物的PNA与所述靶向RNA的结合降低所述靶向RNA的表达。

29.根据权利要求27所述的方法,其中所述靶向RNA是微RNA。

30.一种用于对受试者的健康病症进行DNA靶向和基因编辑的方法,所述方法包括:

在体内或离体地向所述受试者的细胞提供根据权利要求1至20中任一项所述的遗传序列-糖缀合物,其中靶向所述细胞的所述缀合物的DNA调节基因的表达。

31.根据权利要求27或权利要求28所述的方法,靶向肝脏细胞或肾脏细胞以调节有需要的受试者的细胞核酸功能的表达,包括向所述受试者施用根据权利要求1至20中任一项所述的遗传序列-糖缀合物。

32.根据权利要求27至29中任一项所述的方法,其中所述细胞是癌细胞。

33.根据权利要求1至32中任一项所述的方法,其中所述PNA包含肾脏特异性微RNA,即miR-21。

34.根据权利要求31所述的方法,所述方法用于治疗肾纤维化和多囊性肾病。

35.一种药物组合物,所述药物组合物包含药物赋形剂和根据权利要求1至20中任一项所述的缀合物。

用于增强肝脏和肾脏特异性靶向的遗传序列-糖缀合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年4月26日提交的美国临时申请63/335,174号的优先权和权益,该美国临时申请的全部内容整体并入本文。

背景技术

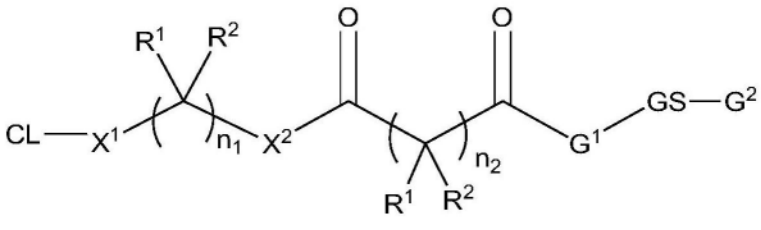
[0003] 本专利申请涉及遗传序列-糖缀合物,例如肽核酸-糖缀合物,该缀合物的制备方法,包含该缀合物的组合物,以及该缀合物的用途。该缀合物尤其可用于改善肝脏细胞和肾脏细胞的靶向。

[0004] 肝脏和肾脏是参与关键身体功能的重要器官,这些关键身体功能包括代谢、解毒、排泄、蛋白质和脂质的合成、细胞因子和生长因子的分泌以及免疫反应/炎症反应。诸如肝炎、酒精性肝脏疾病或非酒精性肝脏疾病、肝细胞癌、肝静脉闭塞病以及肝纤维化和肝硬化的肝脏病症是最常见的肝脏疾病。据估计,有超过1/7的美国成年人或者有约3700万美国成年人患有慢性肾脏疾病CKD。肾纤维化是慢性肾脏疾病的最终表现。其他肾脏疾病包括癌症、IgA肾病、膜性肾病和急性肾损伤。

[0005] 许多治疗剂被递送至不期望它们发挥作用的身体组织,这可能导致不期望的或有害的副作用。因此,需要将治疗性分子(例如遗传序列和活性剂,诸如药物、基因或蛋白质)安全且有效地递送至它们在身体中的靶部位(包括肝脏和肾脏)。这些未满足的需求和长期未解决的问题通过下文描述的新型组合物和方法得到解决。

发明内容

[0006] 公开了一种具有下式的遗传序列-糖缀合物:

[0007] 

(I)

[0008] 其中GS是遗传序列,优选地肽核酸或寡核苷酸,诸如mRNA序列、siRNA序列或DNA序列,任选地其中每个遗传序列是天然的或经修饰的,例如包括γ-丝氨酸修饰的γ肽核酸、丙氨酸γ肽核酸、夹钳G修饰的肽核酸、锁核酸(LNA)、硫代磷酸酯(PS)、磷二酰胺吗啉代寡聚体(phosphorodiamidate morpholino,PMO)、2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-氟(2'F)、5'-甲基胞嘧啶或它们的组合,该遗传序列具有3'末端和5'末端,R_1和R_2各自独立地是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基,X^1是O、NR^3、C=O或$C(R^3)_2$,其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基,X^2是O、NR^3或$C(R^3)_2$,其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基,G^1是将PNA连接至所述缀合物的直接键或基团,G^2是H或功能部分,CL是包含衍生自单糖、二糖、三糖或四糖的2至16个糖残基的糖配体,优选地其中CL包含衍生自单糖或二糖的糖残基,任选地其中该糖配体在其羟基基团或氨基基团上被C_2至C_{15}酰基基团完全

酰化或部分酰化,优选地其中该糖配体在其羟基基团或氨基基团上被完全乙酰化或部分乙酰化,n^1为1至20,并且n^2为0至20。

[0009] 描述了用于产生遗传序列-糖缀合物,尤其是PNA-糖缀合物的方法。

[0010] 药物组合物包含遗传序列-糖缀合物,尤其是PNA-糖缀合物,以及药物赋形剂。

[0011] 描述了遗传序列-糖缀合物,尤其是PNA-糖缀合物的使用方法。

[0012] 用于降低受试者的健康病症所涉及的靶向RNA的表达的方法包括:在体内或离体地向所述受试者的细胞提供如本文所述的遗传序列-乳糖酸缀合物,其中该缀合物的PNA与所述靶向RNA的结合降低该靶向RNA的表达,尤其是在所述靶向RNA是微RNA的情况下。

[0013] 用于对受试者的健康病症进行DNA靶向和基因编辑的方法包括:在体内或离体地向该受试者的细胞提供根据权利要求1至20中任一项所述的遗传序列-糖缀合物,其中靶向该细胞的缀合物的DNA调节基因的表达。

附图说明

[0014] 以下附图是示例性实施方案,这些附图的提供是为了说明本公开。附图并非旨在将根据本公开制备的组合物、方法或制品限制于本文所述的材料、条件或过程参数。

[0015] 图1A示出了附接有乳糖酸(LBA)的接头配体和靶向miR-122的肽核酸的设计和合成。具体而言,(A)是赖氨酸接头(1-4)的合成方案以及LBA与赖氨酸接头(5-8)的缀合的示意图。(B)显示了DNA和常规PNA单元的化学结构。(C)显示了成熟miR-122-5p(顶部)和种子区(下划线)的核苷酸序列。靶向种子和全长miR-122的PNA低聚物(下部)。PNA 1和PNA 2被设计为靶向种子区,而PNA 3和PNA 4可以结合至全长miR-122。PNA2和PNA 4在5'末端处含有用于与LBA-赖氨酸缀合物进行缀合的琥珀酸(SA)。赖氨酸(K)被添加至PNA的3'末端,随后荧光探针5-羧基四甲基罗丹明(TAM)被添加至每个PNA。"OOO"表示三氧代-miniPEG接头。

[0016] 图2示出了PNA 4与LBA和tGalNAc的缀合以及它们的质量控制评估。具体而言,(A)显示了PNA 4(14)与LBA(8-16)的溶液相缀合。(B)显示了PNA 4(14)与tGalNAc(13-18)的溶液相缀合。(C)是配体缀合的PNA、PNA4-LBA和PNA4-tGalNAc的MALDI-MS。缀合物的计算质量和观察质量标绘于各自的质谱图上。插图显示了指定缀合物的反相-高效液相色谱法(RP-HPLC)迹线。

[0017] 图3示出了PNA缀合的配体的生物物理学靶标结合评估的结果。(A)显示了在低盐生理条件下短PNA和全长PNA以及与miR-122的靶DNA序列的缀合物的归一化的热解链曲线。(B)显示了在低盐生理条件下以1:2的DNA:PNA比率进行的凝胶迁移结合测定。使用SYBR Gold染色法对DNA和PNA-DNA异源双链(阻滞带)进行显影。

[0018] 图4示出了全长PNA缀合物(PNA 3和PNA 4)的体内生物分布研究的结果。(A)显示了在10mg/kg皮下施用后在不同时间点对从用全长PNA和配体缀合物处理的C57BL6/J小鼠收获的器官进行的IVIS成像。(B)显示了直方图,该直方图描绘了在不同时间点通过流式细胞术分析的来自皮下施用后的C57BL6/J小鼠的肝细胞中全长PNA和配体缀合物的吸收。(C)显示了在皮下施用后1h的来自C57BL6/J小鼠的肝脏冷冻切片的共聚焦显微图像。蓝色表示细胞核,红色表示TAMRA。(D)显示了在皮下施用后在不同时间点用全长PNA和配体缀合物处理的C57BL6/J小鼠的肝脏中TAMRA荧光的平均发光效率。结果以n=3的平均值表示,以标准误差平均值作为误差棒。

[0019] 图5示出了抗种子PNA缀合物(PNA 1和PNA 2)的体内生物分布研究。(A)显示了在5mg/kg皮下施用后在不同时间点对从用抗种子PNA和配体缀合物处理的C57BL6/J小鼠收获的器官进行的IVIS成像。(B)显示了直方图,该直方图描绘了在0.5h和24h通过流式细胞术分析的来自皮下施用后的C57BL6/J小鼠的肝细胞中抗种子PNA和配体缀合物的吸收。(C)显示了在皮下施用后在不同时间点用抗种子PNA和配体缀合物处理的C57BL6/J小鼠的肝脏中TAMRA荧光的平均发光效率。(D)显示了流式细胞术点图,该点图描绘了在皮下施用后在1h后来自C57BL6/J小鼠的肝细胞中抗种子PNA和配体缀合物的肝细胞吸收。BV786通道表示用针对ASGPR受体的ASGPR抗体进行染色的肝细胞。FITC通道表示用针对肝细胞的HNF4α抗体进行染色的肝细胞。TAMRA通道表示PNA。

[0020] 图6示出了(A)在全长PNA和配体缀合物的皮下施用后C57BL6/J小鼠的肝细胞中的miR-122、ALDOA和BCKDK(miR-122的下游靶标)的相对表达水平。结果以n=6的平均值表示,以标准误差平均值作为误差棒。使用t检验进行统计分析。*p<0.05,**p<0.01。(B)显示了在全长PNA和配体缀合物的皮下施用后C57BL6/J小鼠的肝细胞中的AldoA蛋白和Bckdk蛋白(miR-122下游靶标)的代表性蛋白质印迹。结果以n=2表示。(C)示出了在全长PNA和配体缀合物的皮下施用后C57BL6/J小鼠的肝细胞中的ALDOA和BCKDK(miR-122的下游靶标)的相对蛋白质水平。结果以n≥3的平均值表示,以标准误差平均值作为误差棒。在GraphPad Prism软件上使用非参数单因素ANOVA来分析统计学显著性。对于多重比较,进行未校正的Dunn检验。相对于指定处理组的显著性水平*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。

[0021] 图7示出了(A)在功效研究结束时来自用全长PNA和配体缀合物皮下处理的C57BL6/J小鼠的肝脏、肾脏和脾脏的H&E染色。(B)显示了在功效研究结束时用全长PNA和配体缀合物皮下处理的C57BL6/J小鼠中的细胞因子组评价。(C)展示了在针对不同处理组的功效研究期间C57BL6/J小鼠的平均体重。结果以n=6的平均值表示,以标准误差平均值作为误差棒。(D)显示了在针对不同处理组的功效研究结束时在C57BL6/J小鼠中进行的血液化学分析,该分析包括天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、丙氨酸转氨酶(ALT)、白蛋白、球蛋白、总胆红素、肌酸酐、血尿素氮(BUN)、肌酸磷酸激酶(CPK)和电解质(诸如磷离子、钙离子、钠离子、钾离子、镁离子、氯离子)以及血浆葡萄糖。结果以n≥3的平均值表示,以标准误差平均值作为误差棒。

[0022] 图8示出了5mg/kg皮下剂量下的PNA 2-LBA_{Ac}在C57B16/J小鼠中的生物分布。(A)显示了对从PNA 1、PNA 2-LBAAc和盐水处理的对照小鼠收获的器官进行的IVIS成像。(B)显示了C57BL6/J小鼠的肾脏中TAMRA荧光的平均发光效率。结果以n≥2的平均值表示,以标准误差平均值作为误差棒。(C)显示了直方图,该直方图描绘了在24h和72h通过流式细胞术分析的来自皮下施用后的C57BL6/J小鼠的肾脏细胞中PNA和乙酰化的配体缀合物的吸收。(D)显示了在皮下施用后24h来自C57BL6/J小鼠的肾脏冷冻切片的共聚焦显微图像。蓝色表示细胞核。红色表示TAMRA。

[0023] 图9示出,LBA_{Ac}配体将22聚体长的PNA序列有效递送至肾脏。(A)显示了miR-21和抗miR-21PNA以及它们的配体缀合物的核苷酸序列。PNA 6在5'末端处含有用于与LBA-赖氨酸缀合物进行缀合的琥珀酸(SA)。赖氨酸(K)被添加至PNA的3'末端,随后荧光探针5-羧基四甲基罗丹明(TAM)被添加至每个PNA。OOO表示三氧代-miniPEG接头。(B)显示了在1.5mg/kg皮下施用后在4h和24h时间点对从用PNA和配体缀合物处理的C57BL6/J小鼠收获的器官进

行的IVIS成像。(C)显示了直方图,该直方图描绘了在4h和24h通过流式细胞术分析的来自皮下施用后的C57BL6/J小鼠的肾脏细胞中PNA和乙酰化的配体缀合物的吸收。(D)显示了C57BL6/J小鼠的肾脏中TAMRA荧光的平均发光效率。结果以n＝2的平均值表示,以标准误差平均值作为误差棒。

具体实施方式

[0024] 本文描述了用于将缀合物靶向递送至哺乳动物(尤其是人)中的特定器官,更具体而言递送至哺乳动物(诸如人)的肝脏和肾脏的遗传序列-糖缀合物。在一个方面,遗传序列-糖缀合物是肽核酸(PNA)-糖缀合物(PNAC)。具体而言,缀合物是包含糖配体和遗传序列的分子,该糖配体通过接头主链与遗传序列共价连接,该接头主链与糖配体和遗传序列两者共价键合。可以选择靶向肝脏或肾脏的糖配体。优选地,缀合物选择性地结合至细胞上的特定受体,以将遗传序列或其他治疗剂递送至携带该受体的细胞。

[0025] 本文所用的缀合物包含具有3'末端和5'末端的遗传序列(GS),该遗传序列可以是PNA或寡核苷酸,诸如mRNA序列、siRNA序列或DNA序列。每个遗传序列可以是天然的或任选地经修饰的(例如具有一定的核苷酸顺序或通过修饰),如γ-丝氨酸修饰的γ肽核酸、丙氨酸γ肽核酸、夹钳G修饰的肽核酸、锁核酸(LNA)、硫代磷酸酯(PS)、磷二酰胺吗啉代寡聚体(PMO)、2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-氟(2'F)、5'-甲基胞嘧啶或它们的组合。在一个方面,遗传序列是PNA。PNA可以如下文所述进行修饰。

[0026] 在一个方面,缀合物携带1至8个、或1至5个、或2至5个、或2至4个糖残基(配体)。选择靶向肝脏或肾脏,优选地选择性地靶向肝脏和肾脏的糖配体的数量和类型。例如,可以选择靶向在细胞上表达的脱唾液酸糖蛋白受体(ASPGR)的糖配体。ASGPR是C-型凝集素,主要在肝细胞的窦状表面上表达。在一个方面,缀合物携带1至8个、或1至5个、或2至5个、或2至4个靶向肝脏细胞和肾脏细胞上的ASPGR的半乳糖配体。在一个方面,缀合物携带1至8个、或1至5个、或2至5个、或2至4个靶向肝脏细胞和肾脏细胞上的ASPGR的半乳糖胺(GalNAc)配体。在另一个方面,缀合物携带1至8个、或1至5个、或2至5个、或2至4个、或2至3个靶向肝脏细胞和肾脏细胞上的ASPGR的乳糖酸配体。

[0027] 缀合物的糖配体可以在其羟基基团或氨基基团上被C2至C15酰基基团完全酰化或部分酰化。例如,糖配体可以在羟基基团或氨基基团上被完全乙酰化或部分乙酰化。糖配体的乙酰化可以使用乙酰化试剂(诸如乙酸酐、乙酰氯、混合酸酐)、酸与偶联剂(诸如DCC等试剂)以及碱(诸如三乙胺、吡啶、DIEA、DMAP等等,或者本领域使用的有机碱、无机碱或聚合物碱)来进行。在一个方面,糖配体是完全酰化或部分酰化(优选地乙酰化,优选地完全乙酰化)的GalNAc残基。另选地,糖配体是完全酰化或部分酰化(优选地乙酰化,优选地完全乙酰化)的乳糖酸残基。

[0028] 糖配体可以通过如式I所示的主链接头来共价附接至遗传序列。可以使用多种主链,但是主链通常含有至少两个官能团,例如至少两个氨基基团,其中一个或多个用于与糖配体反应,一个或多个用于与遗传序列反应。氨基基团可以如本领域已知和如实施例中所述选择性地被保护。主链可以包含改变性质(诸如溶解度)的部分。例如,赖氨酸残基和精氨酸残基可以存在于主链中。

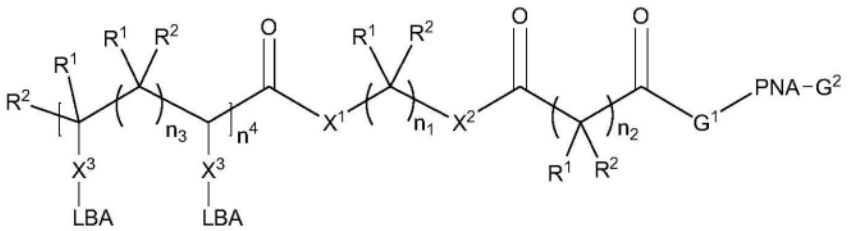
[0029] 在如式I所示的一个方面,基团G^1或基团G^2可以任选地存在。G^1可以是从主链到遗

传序列的接头,例如具有1至20个碳原子以及任选地一个或多个反应性基团(诸如羟基、羧基、硫代基或氨基)的接头。在另一个方面,G^1或G^2可以是功能部分。功能部分G^1、功能部分G^2可以为缀合物提供结构特征,该结构特征可以赋予所期望的功能,诸如与结合性配体的硬脂酸分离,增强缀合物的亲水性或疏水性,促进缀合物的吸收,促进缀合物在体内的分布,或者在药物化学和药物设计方面有利的其他功能。功能部分可以连接在主链和遗传序列之间或者连接在遗传序列的末端处,或者这两者兼而有之。在一个方面中,功能部分G^1、功能部分G^2是例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚乙二醇-丙二醇的残基。在一个方面,G^1或G^2,或它们两者可以是聚乙二醇(PEG)基团。PEG基团可以含有可在游离的羟基、氨基、醚或类似的功能部分处终止的1至25个乙二醇残基(-OCH_2CH_2O-)。该PEG基团任选地键合至配体、缀合物的主链或结构。

[0030] 在另一个方面,功能部分可以包括治疗剂。例如,kielin、托伐普坦(tolvaptan)、尼达尼布(nintedanib)、紫杉醇(paclitaxel)、博莱霉素(bleomycin)、环孢菌素(cyclosporin)、顺铂(cisplatin)、罗米地辛(romidepsin)、多柔比星(doxorubicin)、多西他赛(docetaxel)、柔红霉素(danunorubicin)、长春新碱(vincristine)、氨甲蝶呤(methotrexate)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、维奈托克(venetoclax)、羟基脲(hydroxyurea)、巯嘌呤(mercaptopurine)、泼尼松龙(prednisolone)、阿糖胞苷(cytarabine)或吡非尼酮(pirfenidone)。其他治疗剂可见于Royal Society of Chemistry公布的印刷版和联机版Merck Index(网址:https://www.rsc.org/merck-index)。例如,G^1可以是在主链和遗传序列之间的接头,并且包括与其共价结合的治疗剂。另选地,或另外地,基团G^2可以是直接或通过接头共价结合至遗传序列的治疗剂。虽然在式I中未显示,但是也可以使用类似于连接糖残基的连接键将功能部分(诸如治疗剂)连接至主链。

[0031] 在一个方面,缀合物是遗传序列-乳糖酸缀合物。乳糖酸(LBA)是由葡萄糖酸和半乳糖形成的二糖。在一些实施方案中,乳糖酸被衍生化为缀合物的一部分。式Ia的PNA-乳糖酸缀合物

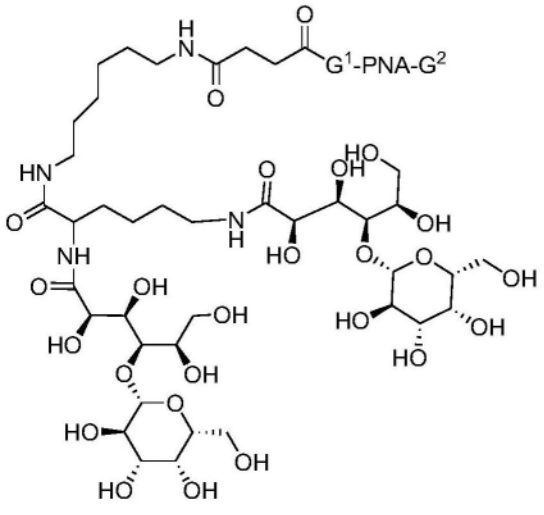
[0032]



(Ia)

[0033] 其中LBA是乳糖酸残基,X^1是NR^3、O或$C(R^3)_2$,其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基,每个X^3独立地是O、NR^3或$C(R^3)_2$,其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基,n_3为0至20,并且n_4为1至8。优选地,G^1是将PNA连接至缀合物的基团,R^1和R^2各自是H,X^1、X^2和X^3各自是NH,并且$n_1=6$,$n_2=2$且$n_3=4$。在一个方面,R^1和R^2各自是H,$n_3=4$,并且PNA在5'末端处连接至缀合物。

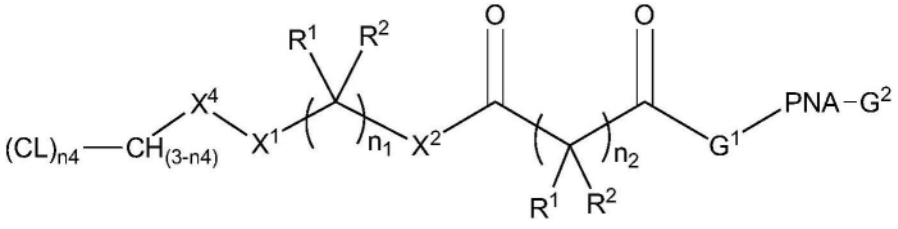
[0034] 例如,PNA-乳糖酸缀合物可以具有式Ia-1

[0035] 

(Ia-1)

[0036] 其中G^1和G^2如上文所定义,优选地其中G^1是将PNA连接至缀合物的功能部分,并且G^2是功能部分。任选地,在式Ia和式Ia-1中的任一者中,羟基基团可以被具有2至15个碳原子或2至8个碳原子的酰基基团完全酰化或部分酰化,优选地乙酰化,更优选地如上文所述完全乙酰化。

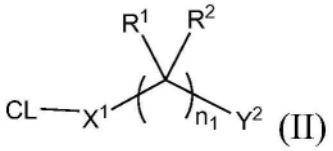
[0037] 在另一个方面,缀合物可以具有式Ib

[0038] 

(Ib)

[0039] 其中X^1是C=O或$C(R^3)_2$,其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基,X^4是O、NR^3或$C(R^3)_2$,其中R^3是H或者取代的或未取代的C_1至C_6烷基,CL是通过具有1至30个原子的接头链连接至CH的糖残基,该接头链包含含有酰胺基团、酯基团或醚基团的取代的或未取代的C_1至C_{12}烷基或C_6至C_{12}芳基,并且n_4为2或3。式Ib中的糖残基可以衍生自N-乙酰半乳糖胺,并且可以是完全酰化或部分酰化的糖残基,其中酰基基团具有2至15个碳原子或2至8个碳原子,例如完全乙酰化或部分乙酰化的糖残基,诸如完全乙酰化的糖残基。

[0040] 描述了将遗传序列与糖配体缀合以提供遗传序列-糖缀合物的方法。该方法包括使遗传序列官能化以提供游离的-COOH官能团;以及在经修饰的遗传序列的游离的-COOH官能团和式II的化合物的Y^2之间形成键

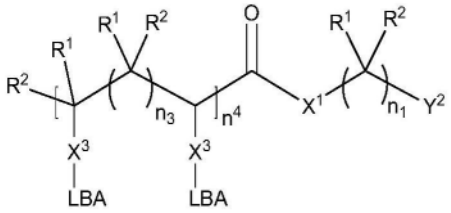
[0041] 

(II)

[0042] 其中Y^2是$-NHR^3$或-OH。该方法可以通过溶液相合成或固相合成或它们的组合来进行。遗传序列,例如PNA,可以通过本领域已知的溶液相合成或固相合成或它们的组合来获得。该遗传序列可以如下文所述进行修饰。此外,该方法还可以包括在使遗传序列官能化之前用G^1的前体、G^2的前体或它们的组合来修饰遗传序列。

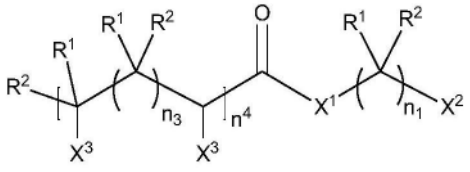
[0043] 在一个方面,将遗传序列与乳糖酸-主链配体缀合以提供遗传序列-乳糖酸缀合物

的方法包括使遗传序列官能化以提供游离的-COOH官能团;以及在经修饰的遗传序列的游离的-COOH官能团和式III的Y^2之间形成键

[0044] 

(III)

[0045] 其中Y^2是-NHR^3或-OH。此外,遗传序列优选地是PNA。在一个方面,该方法可以进一步包括使乳糖酸与式IV的主链反应

[0046] 

(IV)

[0047] 其中X^3是-OH或NHR^3,并且X^2是受保护的O或受保护的NHR^3。

[0048] 在一个方面,如实施例中所述以及如图1和图2中所示,乳糖酸残基可以通过其α氨基基团和ε氨基基团偶联至包含赖氨酸残基的主链。继而赖氨酸羧基基团偶联至烷基二胺上的氨基基团,而另一个氨基基团则偶联至与肽核酸连接的琥珀酰COOH基团。在其他方面,烷基二胺可以被烷二醇取代以形成具有酯键的主链。另选地,5'末端处的琥珀酸可以被取代的或未取代的C至C_{20}二羧酸替代。PNA在5'末端处被功能部分(例如三氧代-miniPEG间隔基和琥珀酸)修饰,以在裂解后提供游离的-COOH官能团。这样修饰的一些PNA可商购获得。然后游离的COOH基团可以与配体主链上的氨基基团、羟基基团、烷基卤或其他合适的官能团(例如乳糖酸或GalNAc)反应。

[0049] 尤其是当使用GalNAc时,GalNAc可以通过携带有烷基醚残基、酰胺残基、酯残基的基团连接至主链,以提供糖配体。这些配体中的一些可商购获得或者可以使用本领域的普通技术人员熟悉的化学合成方法来合成。化学合成的一般方法尤其可见于"Comprehensive Organic Transformations:A Guide to Functional Group Preparations,"Richard C.Larock,Wiley-VCH:1999和"March's Advanced Organic Chemistry:Reactions,Mechanisms andStructure",Jerry March和Michael Smith,John Wiley&Sons Inc.:2001。当然,其他糖残基可以类似地通过携带有烷基醚残基、酰胺残基或酯残基的基团(例如链)连接至主链,以形成配体。

[0050] 还描述了缀合物的使用方法。例如,缀合物可以用于治疗肝脏和肾脏中的癌症。在一个方面,缀合物可以用于治疗肾纤维化。在另一个方面,缀合物可以用于治疗肾癌。在另一个方面,缀合物可以用于治疗肾脏疾病。制剂可以直接施用于受试者以进行体内基因治疗。

[0051] 缀合物,尤其是PNAC,可以用作RNA治疗剂。具体而言,缀合物,尤其是PNAC,可以靶向微RNA(miRNA)序列。缀合物可以用于在转录后水平上控制基因表达。miRNA通过调节信使RNA(mRNA)稳定性和翻译来控制基因表达,从而在维持生理过程方面发挥关键作用。使用缀合物来靶向细胞中的RNA,诸如mRNA或miRNA,就mRNA而言可以在翻译阶段抑制RNA的表达,

以及/或者通过下调或上调miRNA的表达及其对其靶基因的下游效应来影响基因表达。缀合物可以用于控制导致若干致命性疾病的miRNA的异常表达。缀合物可以用于治疗癌症,其中非典型miRNA水平导致包括分化、增殖和细胞凋亡在内的过程发生改变。在一个优选的实施方案中,缀合物被用于治疗肝脏和肾脏中的癌症。在一个方面,缀合物可以用于治疗肾纤维化。在一个方面,缀合物可以用于治疗肾癌。在一个方面,缀合物可以用于治疗肾脏疾病。

[0052] 因此,在一个方面,用于降低受试者的健康病症所涉及的靶向RNA的表达的方法包括在体内或离体地向该受试者的细胞提供如本文所述的遗传序列-乳糖酸缀合物,其中该缀合物的PNA与该靶向RNA的结合降低该靶向RNA的表达,具体而言,该靶向RNA是微RNA。在一个方面,RNA治疗剂被用于靶向肝脏细胞或肾脏细胞或它们的组合,以调节有需要的受试者的细胞核酸功能的表达,该细胞尤其是癌细胞,包括肝癌细胞或肾癌细胞或它们的组合。在一个方面,PNA包括肾脏特异性微RNA,更具体而言miR-21。治疗的病状(需求)可以是肾纤维化和多囊性肾病。

[0053] 在另一个方面,用于对受试者的健康病症进行DNA靶向和基因编辑的方法包括:在体内或离体地向该受试者的细胞提供根据权利要求1至20中任一项所述的遗传序列-糖缀合物,其中靶向该细胞的缀合物的DNA调节基因的表达。

[0054] 遗传序列-糖缀合物可以用于离体或体内治疗有需要的受试者。该方法通常包括使细胞与有效量的缀合物(任选地与增效剂组合)离体或体内接触,以递送治疗剂,从而例如改变RNA的表达。在一个方面,该方法包括使靶细胞群与有效量的缀合物接触,以改变RNA的表达,从而实现治疗结果。

[0055] 遗传序列-糖缀合物通常以制剂提供,该制剂包含有效量的缀合物和用于器官特异性递送的聚合物、脂质、蛋白质或其他药物赋形剂。药学上可接受的载剂(在本领域中也称为赋形剂),其中选择适合于施用模式的制剂。药学上可接受的载剂通过所施用的特定缀合物以及通过用于施用缀合物的特定方法来部分确定。例如,制剂可以在合适的药物载剂中外部施用、局部施用或全身施用。因此,存在多种适用于缀合物的制剂。E.W.Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences,第15版(Mark Publishing Company,1975)公开了典型的载剂和制备方法。例如,制剂可以包含药学上可接受的载剂(诸如盐)、载剂、缓冲剂、乳化剂、稀释剂、赋形剂、螯合剂、填充剂、干燥剂、抗氧化剂、抗微生物剂、防腐剂、结合剂、填充剂、二氧化硅、增溶剂或稳定剂。缀合物还可以包封于由可生物降解的或不可生物降解的聚合物或蛋白质或脂质体形成的合适的生物相容性微胶囊、微粒、纳米颗粒或微球中以靶向细胞。颗粒能够控制释放活性剂。颗粒可以是微粒和/或纳米颗粒。颗粒可以包含一种或多种聚合物。聚合物中的一种或多种可以是合成聚合物。一种或多种颗粒可以通过例如单乳液技术或双乳液技术或纳米沉淀来形成。此类系统是本领域的技术人员熟知的,并且可以被优化以用于与适当的核酸一起使用。

[0056] 适合于肠胃外施用(例如,通过关节内(在关节中)、静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内和皮下途径施用)的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射溶液,该水性和非水性等渗无菌注射溶液可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂以及使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;以及水性和非水性无菌悬浮液、溶液或乳液,该水性和非水性无菌悬浮液、溶液或乳液可以包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、分散剂、稳定剂和防腐剂。用于注射的制剂可以单位剂型存在于例如安瓿瓶或多剂量容器中,任选地添加有防腐剂。缀合物可以采取诸如无菌水溶液或

非水溶液、悬浮液和乳液的形式,这些形式在某些方面可以与受试者的血液等渗。非水溶剂的示例是聚丙二醇、聚乙二醇、植物油(诸如橄榄油、芝麻油、椰油、花生油、落花生油)矿物油、注射用有机酯(诸如油酸乙酯)或者不挥发性油(包括合成的甘油单酯或甘油二酯)。水性载剂包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒介物包括氯化钠溶液、1,3-丁二醇、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发性油。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂,以及电解质补充剂(诸如基于林格氏葡萄糖的那些)。还可以存在防腐剂和其他添加剂,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体。此外,无菌不挥发性油通常被用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以采用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸(诸如油酸)可以用于制备注射剂。本领域的技术人员可以在不借助过度实验的情况下容易地确定用于制备和配制缀合物的各种参数。

[0057] 缀合物,单独或与其他合适的组分组合,也可以制备成通过吸入施用的气溶胶制剂(即,它们可以是“雾化的”)。气溶胶制剂可以放置于可接受的加压推进剂(诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气和空气)中。对于吸入施用,使用合适的推进剂,从加压包装或雾化器中以气溶胶喷雾形式递送化合物。

[0058] 有效量或治疗有效量的缀合物可以是足以治疗、抑制或减轻疾病或病症的一种或多种症状,或者提供所期望的药理学和/或生理学效果(例如,减少、抑制或逆转疾病或病症的潜在病理生理学机制中的一种或多种)的剂量。精确的剂量将根据多种因素而变化,这些因素诸如制剂和受试者依赖性变量(例如,年龄、免疫系统健康、临床症状等)。

[0059] 缀合物,尤其是包含缀合物的制剂,可以施用于靶细胞或者与靶细胞接触,每天一次、每天两次或每天三次;每周一次、每周二次、每周三次、每周四次、每周五次、每周六次、每周七次,每个月一次、每个月二次、每个月三次、每个月四次、每个月五次、每个月六次、每个月七次或每个月八次。例如,在一些实施方案中,组合物每两天施用一次或每三天施用一次,或者平均约每周施用约2次至约4次。

[0060] 实施例

[0061] 本公开通过以下实施例进行说明,这些实施例不旨在限制权利要求。

[0062] 除非另外指明,否则材料和试剂得自Sigma-Aldrich或Thermo FisherScientific并以原始样品使用。tGalNAc配体购自Sussex Research,Ottawa,Canada。

[0063] 实施例1.PNA-糖缀合物的合成

[0064] PNA-LBA缀合物如图1A以及图2A和图2B所示合成。

[0065] 1,6-二氨基己烷-赖氨酸主链:

[0066] 1,6-二氨基己烷-赖氨酸主链通过酰胺偶联反应来合成(图1A)。通过在DMF溶剂中使用HBTU和DIEA将FMOC受保护的赖氨酸与6-氨基Boc受保护的1,6-二氨基己烷进行偶联开始合成。然后使用20%的哌啶在DMF中的溶液对赖氨酸上的两个FMOC基团进行脱保护,以释放赖氨酸上的α氨基基团和ε氨基基团,从而提供用于偶联至两个乳糖酸分子的主链。

[0067] 糖配体:LBA主链配体

[0068] 在图1A所示的第二步骤中,主链用LBA进行官能化。首先通过在甲醇中与催化量的TFA一起回流将LBA转化为内酯形式,然后将溶液用DIPEA碱化,以使内酯形式发生反应得到主链。在反应后,使LBA上的羟基基团发生乙酰化以进行纯化。反应产物的身份通过质谱以及通过^{1}H和^{13}C NMR波谱来确认。

[0069] 官能化的肽核酸:

[0070] 靶向miR-122的PNA低聚物(图1C)通过实施已知的和标准的BOC脱保护和合成方案在MBHA树脂固体支持物上进行合成。靶向miR-122的种子区和完整序列的短(8聚体)和全长(22聚体)PNA使用常规PNA单体来合成。

[0071] 使用标准方法将赖氨酸添加至PNA的3'末端。对于溶液相缀合,然后将PNA寡聚物在3'末端处用三氧代-miniPEG™间隔基进行修饰(使用11-(boc-氨基)-3,6,9-三氧杂十一烷酸),并且在5'末端处用琥珀酸进行修饰,以在裂解后产生游离的-COOH官能团。使用0.2M的PNA单体/赖氨酸/三氧代-miniPEG/琥珀酸/TAMRA在NMP中的溶液、0.52M的DIEA在DMF中的溶液和在0.39M的HBTU在DMF中的溶液来进行固相合成。通过三氧代-miniPEG间隔基将TAMRA荧光染料偶联在PNA的3'末端上,以进行细胞吸收和生物分布研究。此前报道了在MBHA树脂上合成PNA的这些材料和方法的详细程序(Malik,Shipra,Frank J.Slack,and Raman Bahal."Formulation of PLGA nanoparticles containing short cationic peptide nucleicacids."MethodsX 7(2020).101115)。

[0072] 糖-PNA缀合物:

[0073] 如图2A所示,将官能化的PNA(PNA 4)通过5'末端处的琥珀酸偶联至LBA主链配体的氨基基团。使用HATU作为偶联剂,并使用DIEA作为碱,在DMF/DMSO溶剂混合物中进行反应。将所得的在LBA的羟基基团上携带有乙酰基保护的酰胺使用甲醇钠在甲醇中的溶液进行处理,以获得PNA 4-LBA缀合物。

[0074] 如图2B所示,使用HATU作为偶联剂,由DIEA进行催化,在DMF/DMSO溶剂中,通过将在5'末端处具有游离的-COOH的含有三氧代-miniPEG间隔基和琥珀酸的官能化的PNA与GalNAc连接的主链的氨基基团反应来类似地制备GalNAc-PNA 4缀合物。

[0075] 出于质量控制目的,在每个步骤记录糖配体缀合的PNA的HPLC纯度谱图和MALDI质谱图(图2C)。通过MALDI-MS来分析PNA、PNA4-LBA和PNA4-tGalNAc产物,结果表明产物已形成。还通过反相HPLC来分析产物,如图2C中的插图所示。

[0076] 实施例2.体外结合研究

[0077] PNA链上的修饰不应妨碍其靶标结合。为了解决通过缀合修饰PNA链是否会阻碍靶标结合的问题,通过凝胶迁移测定和热解链曲线分析来评价PNA及其糖-PNA缀合物对它们的靶标的亲和力。

[0078] 凝胶迁移测定:

[0079] 将PNA与靶DNA以2:1(PNA:DNA)的比率在37℃下温育过夜,然后在8%聚丙烯酰胺凝胶上评估样品的分离。PNA 1、PNA 2-LBA和PNA2-tGalNAc显示出有限的靶标结合,这是由于它们被设计成靶向miR-122的种子区的较短的序列(图3B)。全长PNA和缀合物显示出与靶DNA完全结合,如通过它们的阻滞带所示(图3B)。由于糖配体缀合后PNA的分子量增加,凝胶图像还显示出PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc条带的更多阻滞。解链曲线分析证实了这些结果,其中观察到糖配体缀合的PNA-DNA二聚体的解链温度升高(图3A)。

[0080] 实施例3.C57BL/6J小鼠中的生物分布研究

[0081] PNA和配体-PNA缀合物的生物分布

[0082] 在C57BL/6J小鼠中进行单次125μM、10ml/kg皮下剂量后的24h生物分布研究。所有PNA均用荧光TAMRA(罗丹明染料)探针进行标记。在IVIS成像仪上对三只小鼠各自在0.5h、

1h、2h、4h、8h和24h的TAMRA荧光进行成像,并对小鼠实施安乐死以收获主要内部器官。记录不同器官(包括肝脏、肺脏、心脏、肾脏和脾脏)的荧光图像以观察相对生物分布(图4A和图5A)。在皮下施用之后,全长PNA(PNA 3)在肝脏中显示出最小浓度,仅长达1h。从初始时间点开始,肾脏中的大部分PNA 3表明其通过肾脏排泄快速消除。PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc两者均能非常有效地靶向肝脏,并且在肝脏中均匀分布长达24h(图4A)。绘制分离的肝脏的时间依赖性PNA-TAMRA荧光曲线,并将该曲线用于计算肝脏中PNA的相对量(图4D)。使用GraphPad Prism软件来计算时间-肝脏荧光的曲线下面积(AUC)。总之,PNA缀合物的AUC0-24倍数变化显著高于PNA 3。PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc的AUC0-24倍数变化分别为20.34±2.53(p**)和25.88±4.52(p**)。PNA 4-tGalNAc在肝脏中显示出初始高浓度,但是AUC0-24的变化与PNA 4-LBA相比不显著。然后,在使肝脏组织通过细胞过滤器随后进行RBC裂解后,进行肝细胞的FACS分析。FACS数据再次证实了PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc的肝脏靶向和保留相当(图4B)。另外,在早期时间点在IVIS图像中观察到的荧光差异在FACS分析中并不同样显著。然后,对1h肝脏样品进行冷冻切片,以对来自组织的TAMRA荧光进行成像。荧光图像证实了肝脏切片中PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc的均匀分布(图4C)。

[0083] 抗种子配体-PNA缀合物的生物分布:

[0084] 与全长PNA(PNA 3)类似的是,还观察到未缀合的短PNA 1在施用的1h后被肾脏消除,从而减少了肝脏积聚(图5A)。PNA 2-LBA和PNA2-tGalNAc两者均将PNA递送至肝脏。两种缀合物在肝脏中积聚长达24h,在一小时具有最大浓度;然而,浓度随时间推移显著下降(图5A)。在整个研究中,PNA 2-tGalNAc产生比PNA 2-LBA更高的肝脏积聚。使用GraphPad Prism软件来计算肝脏荧光的AUC,结果显示PNA-2tGalNAc显著高于PNA 1和PNA 2-LBA(图5C)。PNA 2-LBA和PNA 2-tGalNAc的AUC分别是未缀合的PNA 1的9(p*)倍和28(p****)倍。PNA 2-tGalNAc的高肝脏积聚可归因于两个关键因素:一个因素是乳糖酸中tGalNAc的ASGPR亲和力高于半乳糖,并且另一个因素是PNA从身体内快速消除。显然,对于较短的PNA,似乎较高的tGalNAc的ASGPR亲和力决定了肝脏吸收和消除。在0.5h的器官分布也表明,PNA 2-LBA在肾脏中的浓度高于PNA 2-tGalNAc(图5A)。

[0085] 通过流式细胞分析证实了这些观察结果(图5B)。表示PNA在肝细胞中的浓度的直方图显示,在0.5h PNA 2-LBA和PNA 2-tGalNAc具有良好重叠,但是PNA 2-tGalNAc仍然显示出更高的荧光强度。缀合的PNA显示出延长的肝脏保留,即使肝脏样品中的miR-122水平没有显著改变。

[0086] 通过LBA-PNA和tGalNAc-PNA缀合物进行的肝细胞靶向:

[0087] 在使用HepG2细胞进行的体外研究中,据发现,LBA和tGalNAc配体显示出ASGPR介导的细胞吸收。这些结果在小鼠的体内处理后得到证实。在皮下施用PNA和糖配体-PNA缀合物1h后,对小鼠肝脏进行原位灌注和消化。使用胶原酶介导的肝脏消化来分离肝细胞,并且使用Percoll梯度来富集所得的肝细胞悬浮液中的肝细胞。将所得的肝细胞级分用ASGPR和HNF-4α(肝细胞特异性标志物)荧光抗体进行染色,并通过流式细胞术进行分析。象限2表示PNA的TAMRA荧光,双阳性象限3表示含有PNA的肝细胞。PNA 2-LBA和PNA 2-tGalNAc两者的Q3/Q2比率高于PNA 1证实了糖配体-PNA缀合物在肝细胞中优先积聚(图5D)。

[0088] 实施例5.功效研究

[0089] miR-122表达对肝脏具有特异性,并且该表达占肝细胞miRNA库的60%至70%。在

健康肝脏中,该表达在胆固醇和脂肪酸代谢中发挥着决定性作用。在生物分布研究中,据发现,LBA和tGalNAc两者均显示出极好的PNA的肝脏靶向递送。从上文所述的凝胶迁移和解链曲线分析可以发现,糖配体存在于PNA的5'末端上不影响其靶标结合能力。评价这些发现的体内功效和安全性是本研究的首要目标。在来自生物分布研究的肝脏样品中测试miR-122的水平,并且发现在4h、8h和24h用PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc能极好地敲低miR-122水平。PNA 3也显示出一定程度的miR-122敲低。但是miR-122的下游靶标(ALDOA、BCKDK、GYS1、NDRG3和CUX-1)的水平没有显著变化(数据未提供)。24h时间或/和单剂量的PNA不足以敲低肝脏中高表达的miR-122的下游靶标。由于短PNA在靶部位处的弱结合,短PNA和缀合物未显示出miR-122的显著敲低。

[0090] 在多剂量研究中进行PNA 3、PNA 4-LBA、PNA 4-tGalNAc的功效比较,其中盐水处理组被作为对照。对于功效评价,通过RT-PCR和蛋白质印迹分析来测量肝脏样品中的miR-122及其下游靶标的水平。与PNA 3相比,PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc两者均显示出高达75%的miR-122的显著敲低(p**)(图6A)。下游靶标ALDOA、BCKDK、GYS1、NDRG3和CUX-1的mRNA表达分析显示,PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc处理的mRNA水平显著增加(≥p*)(图6A)。然后,在PNA 4-LBA处理(p*)和PNA 4-tGalNAc处理之后,对AldoA和Bckdk蛋白进行的蛋白印迹分析证实了蛋白质上调(图6B和图6C)。PNA 3处理未未示出下游靶标水平的显著变化。由于miR-122是胆固醇和脂肪酸代谢的关键调节物,我们比较了胆固醇和甘油三酯的血浆水平。PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc组的血浆胆固醇和甘油三酯水平低于PNA 3处理组和盐水处理组。在PNA 4-LBA处理(p*)后,胆固醇和甘油三酯水平显著较低。PNA 4-LBA处理组和PNA 4-tGalNAc处理组显示出较低的血浆葡萄糖水平,但是差异不具有统计学显著性(图7E)。此外,对于PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc,肝脏重量变化(体重的百分比)也显著更小,这与肝脏中的脂肪储存减少有关。总之,所有生理参数的变化不大,但是考虑到健康小鼠的处理持续时间较短,这些发现是有意义的,并且证实了靶向递送至肝脏后PNA的功效。

[0091] 实施例6.安全性研究

[0092] 在C57BL/6J小鼠中对PNA 3、PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc进行安全性评估。对于三个5mg/kg剂量后的安全性评估,对小鼠体重和重要器官重量、组织病理学分析(通过H&E染色进行)(肝脏、肾脏和脾脏)、CBC分析、综合血液化学以及一组细胞因子的电解质水平和血浆水平进行评价。对肝脏、肾脏和脾脏组织切片进行的H&E染色未显示出任何显著的处理组之间的组织学差异(图7A)。未观察到研究期间不同处理组之间小鼠体重的显著差异(图7C)。同样,在器官(肝脏、肾脏、脾脏、心脏和肺)收获期间,我们未发现任何明显的毒性迹象。除了在PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc处理组中肝脏重量减少之外,器官重量(体重的百分比%)没有显著变化。因为肝脏是脂肪储存器官,因此所观察到的由于miR-122敲低而产生的脂肪积聚减少可以是对本发明上下文的一种可能的解释。细胞因子水平升高是寡核苷酸处理所触发的任何免疫反应的主要指标。在最后剂量的24h收集血液,用于通过基于Luminex的测定来估算细胞因子TNFα、IL-12p70、MCP-1、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17A、IL-3、MIP-1α、MIP-1β、IL-25的血浆水平。未发现细胞因子发生上调,并且在盐水、PNA 3、PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc处理中,细胞因子水平没有显著差异(图7B)。我们的样品中的细胞因子的固有水平低于试剂盒的校准范围。CBC分析(包括RBC、WBC、血小板和血红蛋白(数据未示出))(图7D)和综合血液化学分析(包括天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸

酯酶(ALP)、丙氨酸转氨酶(ALT)、白蛋白、球蛋白、总胆红素、肌酸酐、血尿素氮(BUN)、肌酸磷酸激酶(CPK)和电解质)未显示出任何不同处理组之间的显著差异(图7E)。电解质包括磷离子、钙离子、钠离子、钾离子、镁离子和氯离子。总之,评价得出以下结论:PNA 4-LBA和PNA 4-tGalNAc的测试剂量方案是高度安全和有效的。

[0093] 实施例7.短PNA的肾脏靶向递送

[0094] 在LBA配体的功能增强研究期间,乙酰化的LBA配体(LBAAc)显示出靶向肾脏的良好潜力。根据我们在C57BL/6J小鼠(5mg/kg,皮下)中进行的生物分布研究,发现PNA 2-LBAAc分布主要局限于肾脏。最初,在1h,PNA 1和PNA 2-LBAAc两者主要分布于肾脏中,并且在一定程度上分布于肝脏中(图8)。通常,裸的/未配制的PNA表现出快速肾脏消除,并且我们发现短PNA(PNA 1)在肾脏中在30分钟时具有最大荧光强度,这表示其消除峰时间。与PNA-1相比,PNA 2-LBAAc在初始分布期后显示出在肾脏中具有最大积聚(图8A)。确定在不同时间点(1h、4h、24h、48h和72h)来自肾脏的TAMRA标记的PNA的平均发光效率,以进行定量分析(图8B)。有趣的是,在48h肾脏中的PNA 2-LBAAc浓度与PNA 1的消除期(1h)浓度相当。这些发现证明了PNA 2-LBAAc在肾脏中的靶向和积聚。

[0095] 通过流式细胞术分析确认PNA 2-LBAAc缀合物在肾脏中的分布:

[0096] 使来自24h和72h的肾脏样品通过40μm过滤器,然后进行RBC裂解,用4%PFA来固定肾脏细胞悬浮液并在流式细胞仪上进行分析。显示肾脏细胞中的TAMRA荧光信号的直方图证实了IVIS发现,该发现展示出与PNA-1相比,PNA 2-LBAAc在肾脏中具有更高的保留,时间长达72h(图8C)。IVIS和流式细胞术分析两者均证实了LBAAc配体对PNA的肾脏靶向递送。然后对肾脏切片进行成像,以观察PNA在肾脏中的分布。对来自24h肾脏样品的10μm厚切片进行固定、透化并用DAPI进行细胞核显影染色。在荧光成像中,观察到PNA 2-LBAAc在肾脏中均匀分布(图8D)。TAMRA信号强度表明PNA 2-LBAAc具有较高的肾小管积聚。

[0097] 全长(22聚体)PNA的肾脏靶向递送:

[0098] miR-21是肾脏特异性微RNA,据发现其在肾纤维化中发生上调,并且是用于纤维化治疗的经证实的靶标。设计并合成了全长(22聚体)PNA低聚物,即靶向miR-21的PNA 5、PNA 6和LBAAc缀合物(PNA 6-LBAAc)(图9A)。如图2A所述,PNA 6与LBAAc缀合。

[0099] 1.5mg/kg的低皮下剂量(短PNA 1和PNA 2的摩尔当量的1/10)下的PNA 5和PNA 6-LBAAc在C57BL/6J小鼠中的生物分布评价:选择较低剂量的生物分布来进行肾脏靶向的LBA_{Ac}的综合验证。根据IVIS成像,PNA5和PNA 6-LBAAc两者的TAMRA荧光信号仅限于肾脏(图9B)。在4h,PNA和缀合物两者均显示出在肾脏中相似的分布,并且它们的平均荧光强度是相当的。在24h,肾脏中的PNA 6-LBAAc浓度增加,而PNA 5则消失。总之,当与未缀合的PNA 5相比时,在24h观察到PNA 6-LBAAc的肾脏保留增加4倍。(图9D)。结果通过肾脏细胞的流式细胞术分析来确认。将RBC裂解后获得的肾脏细胞用4%PFA来固定并分析TAMRA荧光。表示来自4h和24h样品的TAMRA荧光的直方图证实了肾脏细胞中PNA 5的消除和PNA 6-LBAAc的积聚(图9C)。总之,PNA 5遵循PNA的常规药代动力学并且快速消除而没有任何组织分布。而PNA 6-LBAAc由于缀合物的疏水性增加而显示出较慢的生物分布。PNA 6-LBAAc的肾脏积聚的Tmax可能>4h。决定性的是,与针对PNA 5的4h时间点相比,在24h肾脏中PNA 6-LBAAc的更高浓度证实了LBA_{Ac}配体的肾脏靶向和潜力。

[0100] 论文Dhuri K,Bechtold C,Quijano E,Pham H,Gupta A,Vikram A,BahalR.

“Antisense Oligonucleotides:An Emerging area in Drug Discovery andDevelopment.”Journal of Clinical Medicine,2020以引用的方式整体并入本文。

[0101] 本文使用以下缩写。

[0102]

缩写	术语
FMOC	芴基甲氧基羰基
HBTU	苯并三唑四甲基脲鎓六氟磷酸盐
DIEA	N,N-二异丙基乙胺

[0103]

tGalNAc	三 N-乙酰半乳糖胺
LBA	乳糖酸
PNA	肽核酸
ALDOA	醛缩酶 A
BCKDK	支链酮酸脱氢酶激酶
GYS1	糖原[淀粉]合酶
NDRG3	N-Myc 下游调控基因 3 蛋白
CUX-1	同源异型结构域蛋白的基因
三氧代-miniPEG 间隔基	三氧代-短聚乙二醇间隔基
GalNAc	N-乙酰半乳糖胺
ASGPR	脱唾液酸糖蛋白受体
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
TFA	三氟乙酸
NMR 波谱法	核磁共振波谱法
miRNA	微 RNA
MBHA	4-甲基二苯甲胺树脂
BOC	叔丁氧羰基
TAMRA	5-羧基四甲基罗丹明
HPLC	高效液相色谱法
HATU	氮杂苯并三唑四甲基脲鎓六氟磷酸盐
DMF	二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砜
NaOMe	甲醇钠
MALDI	基质辅助激光解吸/电离
siRNA	短干扰 RNA 或沉默 RNA
SYBR Gold	用于核酸检测的染料
DNA	脱氧核糖核酸
ADMET	吸收、分布、代谢和排泄-毒性
FACS	荧光激活细胞分选
RBC 裂解	红细胞（RBC）裂解
IVIS	非侵入性体内成像
HNF4α	肝细胞核因子 4α
ANOVA	方差分析
CBC	全血细胞计数
H&E 染色	苏木精和伊红染色
TNFα	肿瘤坏死因子
IL-12p70	白介素-12p70
MCP-1	单核细胞趋化蛋白-1
IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10	白介素
MIP-1α、MIP-1β	巨噬细胞炎性蛋白

[0104] 本专利申请中的术语具有以下定义。

[0105] 如本文所用,组合物、方法和制品可替代地包括本文公开的任何适当的组分或步骤,由其组成或基本上由其组成。组合物、方法和制品可以另外或替代地被配制为不含或基本上不含任何步骤、组分、材料、成分、佐剂或物质,换句话说,这些步骤、组分、材料、成分、佐剂或物质对于实现组合物、方法和制品的功能或目标不是必需的。除非上下文另外明确指明,否则单数形式"一个"、"一种"和"所述"包括复数指代物。除非上下文另外明确指明,否则"或"意指"和/或"。"任选的"或"任选地"意指随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生,并且该描述包括事件发生的情况和事件不发生的情况。

[0106] 除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本公开所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。

[0107] 如本文所用,术语"烃基"和"烃"是指包含碳和氢的取代基,任选地具有1至3个杂原子,该杂原子例如氧、氮、卤素、硅、硫或它们的组合;"烷基"是指直链或支链饱和一价烃基团;"亚烷基"是指直链或支链饱和二价烃基团;"次烷基"是指直链或支链饱和二价烃基团,其中两个价键在单个共同碳原子上;"烯基"是指具有通过碳-碳双键连接的至少两个碳的直链或支链一价烃基团;"环烷基"是指具有至少三个碳原子的非芳族一价单环或多环烃基团,"环烯基"是指具有至少三个碳原子且具有至少一个不饱和度的非芳族环状二价烃基团;"芳基"是指在一个或多个芳族环中仅含有碳的芳族一价基团;"亚芳基"是指在一个或多个芳族环中仅含有碳的芳族二价基团;"烷基芳基"是指被如上文所定义的烷基基团取代的芳基基团,其中4-甲基苯基是示例性烷基芳基基团;"芳基烷基"是指被如上文所定义的芳基基团取代的烷基基团,其中苄基是示例性芳基烷基基团;"酰基"是指通过羰基碳桥(-C(=O)-)附接的具有指定数目碳原子的如上文所定义的烷基基团;"烷氧基"是指通过氧桥(-O-)附接的具有指定数目碳原子的如上文所定义的烷基基团;以及"芳氧基"是指通过氧桥(-O-)附接的具有指定数目碳原子的如上文所定义的芳基基团。

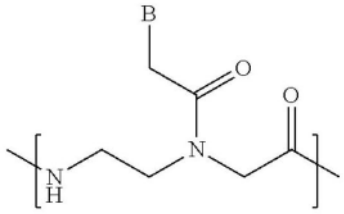
[0108] 除非另外指明,否则前述多个基团中的每一个可以是未取代的或取代的,前提条件是取代不会显著不利地影响化合物的合成、稳定性或使用。如本文所用,术语"取代的"意指指定原子或基团上的至少一个氢被另一个基团替代,前提条件是不超过指定原子的正常化合价。当取代基是氧代基(即,=O)时,则原子上的两个氢被替代。取代基或变量的组合是允许的,前提条件是取代不会显著不利地影响化合物的合成或使用。可以存在于"取代的"位置上的示例性基团包括但不限于氰基;羟基;硝基;叠氮基;烷酰基(诸如C_{2-6}烷酰基基团,诸如酰基);羧酰胺基;C_{1-6}或C_{1-3}烷基、环烷基、烯基和炔基(包括具有至少一个不饱和键以及2至8个或2至6个碳原子的基团);C_{1-6}或C_{1-3}烷氧基;C_{6-10}芳氧基,诸如苯氧基;C_{1-6}烷硫基;C_{1-6}或C_{1-3}烷基亚磺酰基;C_{1-6}或C_{1-3}烷基磺酰基;氨基二(C_{1-6}或C_{1-3})烷基;具有至少一个芳族环的C_{6-12}芳基(例如,苯基、联苯基、萘基等等,每个环是取代的或未取代的芳族环);具有1至3个单独的环或稠环以及6至18个环碳原子的C_{7-19}芳基烷基;或者具有1至3个单独的环或稠环以及6至18个环碳原子的芳基烷氧基,其中苄氧基是示例性芳基烷氧基。基团的指定数目碳原子不包括任何取代基。

[0109] 如本文所用,肽核酸(PNA)是人工合成的聚合物,其中主链包含通过肽键连接的重复的N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元。各种嘌呤碱基和嘧啶碱基通过亚甲基桥(-CH2-)连接至主链,并且通过羰基基团(-(C=O)-)连接至主链上的氮,如图1所示。按照惯例,PNA以N-末

端向上(或在左侧)和C-末端向下(或在右侧)表示,如在肽中那样。PNA不是形式意义上的肽或核酸,而是它们两者的杂合体。

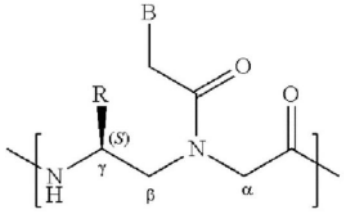
[0110] 在一些方面,形成PNA低聚物的PNA单体在聚酰胺主链(γ PNA)的γ位被修饰,如下文所示(其中"B"是核碱基,并且"R"是在γ位的取代)。

[0111]



PNA

[0112]



手性γPNA

[0113] 在γ位的取代产生手性并且为PNA低聚物提供螺旋预组织,从而产生显著增加的对靶RNA的结合亲和力。根据在γ位的特定取代(上述手性γ PNA中的"R"基团)的化学性质,可以赋予其他有利的性质。γ PNA的合成在美国专利10,221,216号中有所描述,该专利关于γ PNA和γ PNA的合成方法的公开内容以引用的方式并入本文。

[0114] γ被其他侧链取代的示例包括丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸以及它们的衍生物。"它们的衍生物"在本文中被定义为共价附接至这些氨基酸侧链的化学部分,例如,共价附接至丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸和精氨酸的侧链的化学部分。

[0115] 在一个方面,形成PNA/RNA/PNA三链的PNA低聚物是γ tcPNA或具有尾部夹钳的γ PNA。

[0116] 基本PNA结构的化学修饰是已知的,并且可以使用该化学修饰。例如,氟修饰的PNA、环戊基修饰的PNA、mini-PEG修饰的PNA、胍鎓修饰的PNA、吡咯烷基修饰的PNA和2-氨基吡啶修饰的PNA是本领域已知的,并且可以选择这些化学修饰来制备PNA低聚物,以改善细胞渗透性或增加RNA结合亲和力。含有mini-PEG的γ-PNA及其合成方法在美国专利10,793,605号中有所描述,

[0117] PNA低聚物还可以包含其他带正电荷的部分,从而增加PNA的溶解度,增加细胞渗透性和/或增加PNA对靶RNA的亲和力。常用的带正电荷的部分包括氨基酸赖氨酸和精氨酸,但是其他带正电荷的部分也可以是有用的。赖氨酸残基和精氨酸残基可以被添加至tcPNA接头,或者可以被添加至PNA低聚物链的羧基或N-末端。

[0118] 对PNA的示例性修饰包括但不限于掺入带电荷的氨基酸残基,诸如在低聚物的末端或内部掺入赖氨酸;在主链、羧基亚甲基桥和核碱基中纳入极性基团;在手性PNA的原始N-(2-氨基乙基)甘氨酸主链上携带取代基;用带负电荷的支架来替代原始氨基乙基甘氨酰

主链骨架;将高分子量聚乙二醇(PEG)缀合至多个末端中的一者;使PNA与RNA融合产生嵌合低聚物,重新设计主链构造,使PNA与DNA或RNA缀合。这些修饰改善了溶解度,但是通常会导致结合亲和力和/或序列特异性降低。

[0119] γ-PNA修饰包括丝氨酸修饰、赖氨酸修饰、谷氨酸修饰或丙氨酸修饰。尤其是当PNA被丝氨酸γ修饰时,基于结合亲和力,与常规全长PNA相比,γPNA可更有效地靶向RNA。

[0120] DNA、RNA和OMe-RNA的硫代磷酸酯类似物用硫替代氧作为与磷键合的多种非桥接配体中的一种。

[0121] 吗啉代寡聚体(morpholino),也称为吗啉代低聚物和磷二酰胺吗啉代低聚物(PMO),是在分子生物学中用于修饰基因表达的一类低聚物。其分子结构含有附接至通过磷二酰胺基团连接的亚甲基吗啉环的主链的DNA碱基。吗啉代寡聚体阻断其他分子与核糖核酸(RNA)的碱基配对表面的小(约25个碱基)特异性序列的接近。吗啉代寡聚体通过敲低基因功能而用作反向遗传学的研究工具。

[0122] 锁核酸是其中核糖环被2'-氧和4'-碳之间的亚甲基键约束的RNA衍生物。这种构象限制增加了互补序列的结合亲和力,并且提供了控制基因表达和优化微阵列的化学方法。

[0123] 2'-O-甲基化是RNA的核苷修饰,其中甲基基团被添加至核苷的核糖部分的2'羟基,以产生甲氧基基团。2'-O-甲基化的核苷主要存在于核糖体RNA和小核RNA中,并且存在于核糖体和剪接体的功能必需区中。

[0124] 正如RNA的2'-OMe核苷修饰,2'-O-甲氧基乙基-RNA(2'-MOE)主链提供了增强的双链稳定性、显著的核酸酶耐受性。

[0125] 2'-氟(2'-F)是具有高RNA结合亲和力和对核酸酶降解的耐受性的有效的RNA类似物。

[0126] 5'-甲基胞嘧啶是DNA碱基胞嘧啶(C)的甲基化形式,它调节基因转录并具有若干其他生物学作用。[1]当胞嘧啶被甲基化时,DNA维持相同的序列,但是甲基化的基因的表达可以被改变。

[0127] G-夹钳杂环修饰,是通过形成附加的氢键而夹到鸟嘌呤上的胞嘧啶类似物,被合理地设计为增强寡核苷酸/RNA杂合体亲和力。含有内部连接的胍鎓部分(GPNA)的PNA可被哺乳动物细胞容易地吸收,并且以高亲和力和序列特异性结合至DNA和RNA。

[0128] 保护基团是使有机分子中的反应性官能团发生转化以使其不发生针对结构中的另一个官能团的反应的官能团。保护基团以各种形式广泛用于有机合成中。保护和脱保护的需要以及适当的保护基团的选择可以由本领域的技术人员容易地确定。保护基团的化学性质可见于例如Greene,等人,ProtectiveGroups in Organic Synthesis,第4版,Wiley&Sons,2007。本文所述的保护基团的调整以及形成和裂解方法可以根据各种取代基的需要进行调整。

[0129] 残基被用于描述整合以构成较大分子(诸如缀合物)的任何部分。例如,赖氨酸残基是指作为通过赖氨酸羧基基团共价键合至烷基二胺(通过酰胺官能团)并且通过α氨基基团和ε氨基基团共价键合至乳糖酸分子(通过酰胺键)的缀合物的一部分的赖氨酸氨基酸结构,如本文附图所示。残基也可以称为部分。

[0130] 如本文所用RNA包括提供不同功能的不同类型的RNA,包括信使RNA、转运RNA、核糖

体RNA和微RNA。微RNA(miRNA)参与基因表达。miRNA是mRNA的非编码区,它被认为在促进或抑制基因表达方面是重要的。这些可以涉及约25个核苷酸的小序列。

[0131] 碱基序列是由一系列五个不同的字母的集合表示的碱基串,这些字母表示在DNA(使用GACT)分子或RNA(GACU)分子内形成等位基因的核苷酸的顺序。按照惯例,序列通常以从5'末端到3'末端呈现。对于DNA,使用正义链。因为核酸通常是直链(非支链)聚合物,所以指定序列相当于定义整个分子的共价结构。

[0132] 基因表达是将编码信息的基因转化为细胞中存在并发挥作用的结构的过程。所表达的基因包括被转录为mRNA然后被翻译为蛋白质的那些基因以及被转录为RNA但不被翻译为蛋白质的那些基因(例如,转运RNA和核糖体RNA)。miRNA是mRNA的非编码区,它被认为在促进或抑制基因表达方面是重要的。

[0133] 下文是本领域已知的一些基因名称和微RNA的简要描述。其他信息可见于网站https://www.genecards.org/,这些信息以引用的方式并入本文。

[0134] PKD1基因是多囊蛋白1、瞬时受体电势通道相互作用或多囊性肾病1。PKD2基因是多囊蛋白2、瞬时受体电势阳离子通道或多囊性肾病2,β-连环蛋白用于连环蛋白β1和连接斑珠蛋白,谷氨酰胺合成酶用于lengsin蛋白(具有谷氨酰胺合成酶结构域的晶状体蛋白),

[0135] c-Myc用于MYC结合蛋白,TTR用于甲状腺素运载蛋白,也称为前白蛋白、淀粉样变性I型、腕管综合征1、因子VII凝血因子VII或凝血因子VII(血清凝血酶原转变加速因子),Eg5用于神经元素,PCSK9用于前蛋白转化酶枯草溶菌素/kexin 9型,AAT用于细胞凋亡拮抗转录因子,TPX2用于TPX2微管成核因子,apoB用于载脂蛋白B,SAA用于血清淀粉样蛋白A1簇、RSV,PDGF用于血小板源性生长因子亚基A,miR-122用于微RNA 122,miR-223用于微RNA 223,miR-21是最早发现的微RNA之一,并且定位于17号染色体上的液泡膜蛋白1(VMP1)基因座内。它通过多个基因靶标参与赘生物和非赘生物病理过程。miR-21的三个主要靶标是磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)、原肌球蛋白1(TPM1)和程序性细胞死亡4(PDCD4),miR-155是人体中的微RNA。MiR-155在涉及恶性生长、病毒感染和心血管疾病进展的各种生理和病理过程中发挥作用。

[0136] miR-132是靶标已有所描述的微RNA,该靶标包括神经发育、突触传递、炎症和血管生成的介质。

[0137] miR-125b是涉及调节NF-κB、p53、PI3K/Akt/mTOR、ErbB2、Wnt和其他信号传导途径,从而控制细胞增殖、分化、代谢、细胞凋亡、药物抗性和肿瘤免疫的微RNA。

[0138] miR-146a是微RNA,其靶基因被认为涉及调节神经疾病的病理生理学过程,尤其是神经炎性反应。它被认为在神经疾病的进展期间在神经炎症中发挥关键作用。

[0139] miR-181(微RNA前体)是小非编码RNA分子,它被转录为约70个核苷酸的前体,随后被RNA酶-III型酶Dicer加工,以产生约22个核苷酸的成熟产物。它们通过抑制靶信使RNA的翻译和/或诱导靶信使RNA的降解来靶向和调节蛋白质表达。最近研究显示,这类新基因在恶性转化中发挥核心作用。miRNA在很多肿瘤中发生下调,因此表现出作为肿瘤抑制基因发挥功能。成熟产物miR-181a、miR-181b、miR-181c或miR-181d被认为通过与靶mRNA互补而在转录后水平上发挥调控作用。

[0140] let-7致死-7(let-7)基因作为关键发育调节物首先在线虫中被发现,并且已成为前两种已知的微RNA中的一种(另一种是lin-4)。let-7成员的表达受到MYC与其启动子的结

合的控制。已经证明,Let-7是人类细胞中RAS表达的直接调节物。很多报道显示,let-7的表达水平通常较低,并且在很多癌症中let-7的染色体簇通常发生缺失。Let-7在更为分化的肿瘤中以更高水平表达,这些肿瘤也具有更低水平的活化癌基因(诸如RAS和HMGA2)。因此,let-7的表达水平可以是与分化阶段相关的若干癌症的预后标志物。

[0141] miR-34a是已经检测到在多种癌症中失调的微RNA,并且也是展示由肿瘤抑制基因p53直接调节的第一个miRNA。已知miR-34家族可抑制肿瘤发生。miR-34家族的表达依赖于内源性表达或模拟转染。

[0142] 据报道,miR-805是在LPS处理的巨噬细胞中下调的微RNA。miR-690(微RNA)在M2极化的骨髓源性巨噬细胞外泌体中高度表达,并且据报道在体内和体外均作为胰岛素敏化剂发挥功能。

[0143] miR-134是大脑特异性微RNA;据报道,它特异性地定位于海马神经元中,并且可以通过与LIMK1mRNA的反义配对来间接调节突触发育。在人类大脑中,SIRT1被认为通过miR-134来介导CREB蛋白,赋予微RNA在高级脑功能(诸如记忆形成)中的作用。

[0144] 多囊性肾病(PKD)是一种遗传性病症,其中囊肿簇主要在肾脏内发展,导致肾脏扩大并随时间推移而丧失功能。囊肿是含有流体的非癌性圆形囊。囊肿大小不同,并且它们可以生长得非常大。囊肿过多或囊肿过大可能会损害肾脏。

[0145] 所有引用的专利、专利申请和其他参考文献均以引用的方式整体并入本文。然而,如果本专利申请中的术语与并入的参考文献中的术语相矛盾或冲突,则来自本专利申请的术语优先于来自并入的参考文献的冲突术语。

[0146] 虽然已经出于说明的目的阐述了典型的方面,但是前述描述不应当被认为是对本文的范围的限制。因此,在不脱离本文的精神和范围的情况下,本领域的技术人员可以进行各种修改、改编和替代。

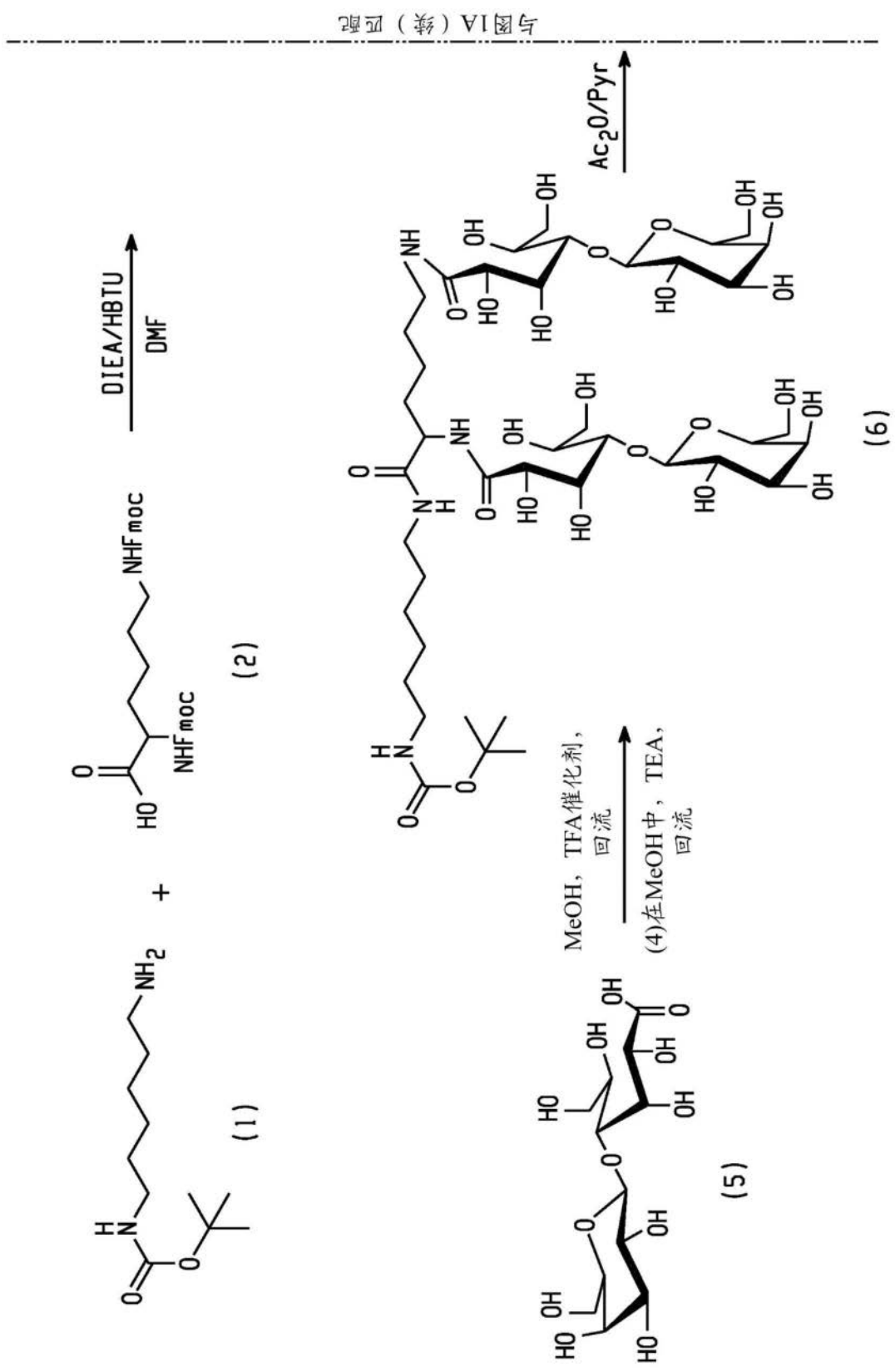

与图1A（续）匹配
DIEA/HBTU
DMF
NHFmoc
NHFmoc
HO
(2)
(1)
+
MeOH，TFA催化剂，
回流
(4)在MeOH中，TEA，
回流
(5)
Ac2O/Pyr
(6)

图1A

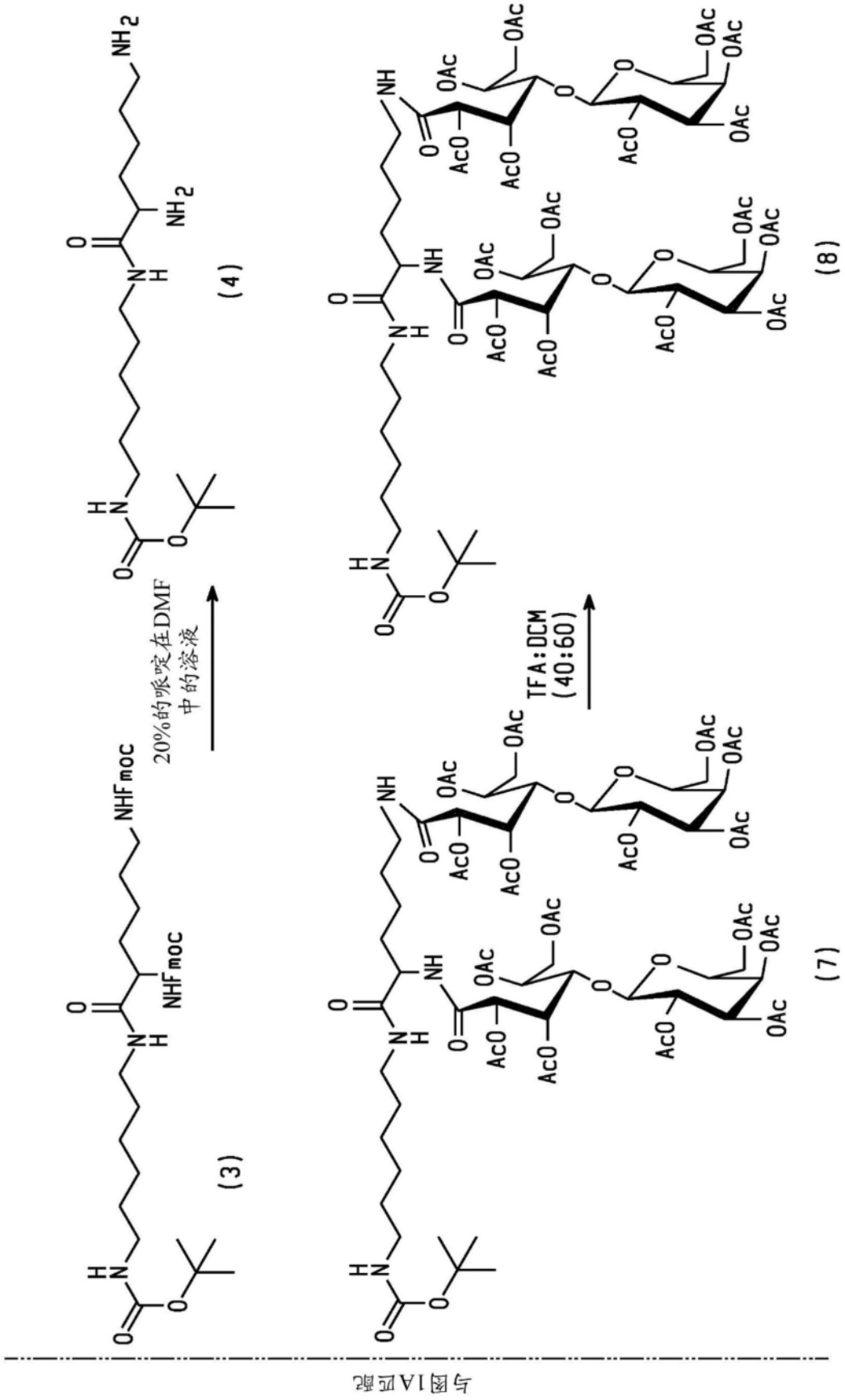
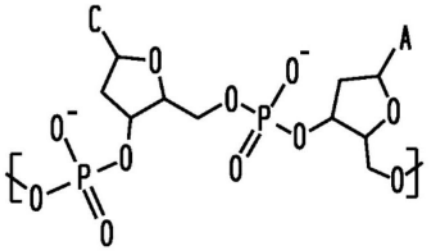
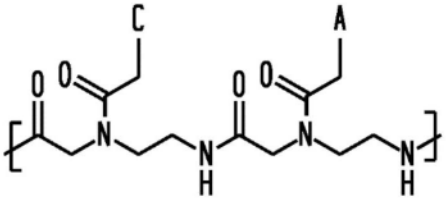


图1A(续)



DNA



PNA

图1B

miR-122-5p: 5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3'

种子区

PNA 1 : 5'----------ACACTCCA-K-OOO-TAM-3'

PNA 2 : 5'-SA-OOO----------ACACTCCA-K-OOO-TAM-3'

PNA 3 : 5'--------CAAACACCATTGTCACACTCCA-K-OOO-TAM-3'

PNA 4 : 5'-SA-OOO-CAAACACCATTGTCACACTCCA-K-OOO-TAM-3'

图1C

与图4A（续）匹配

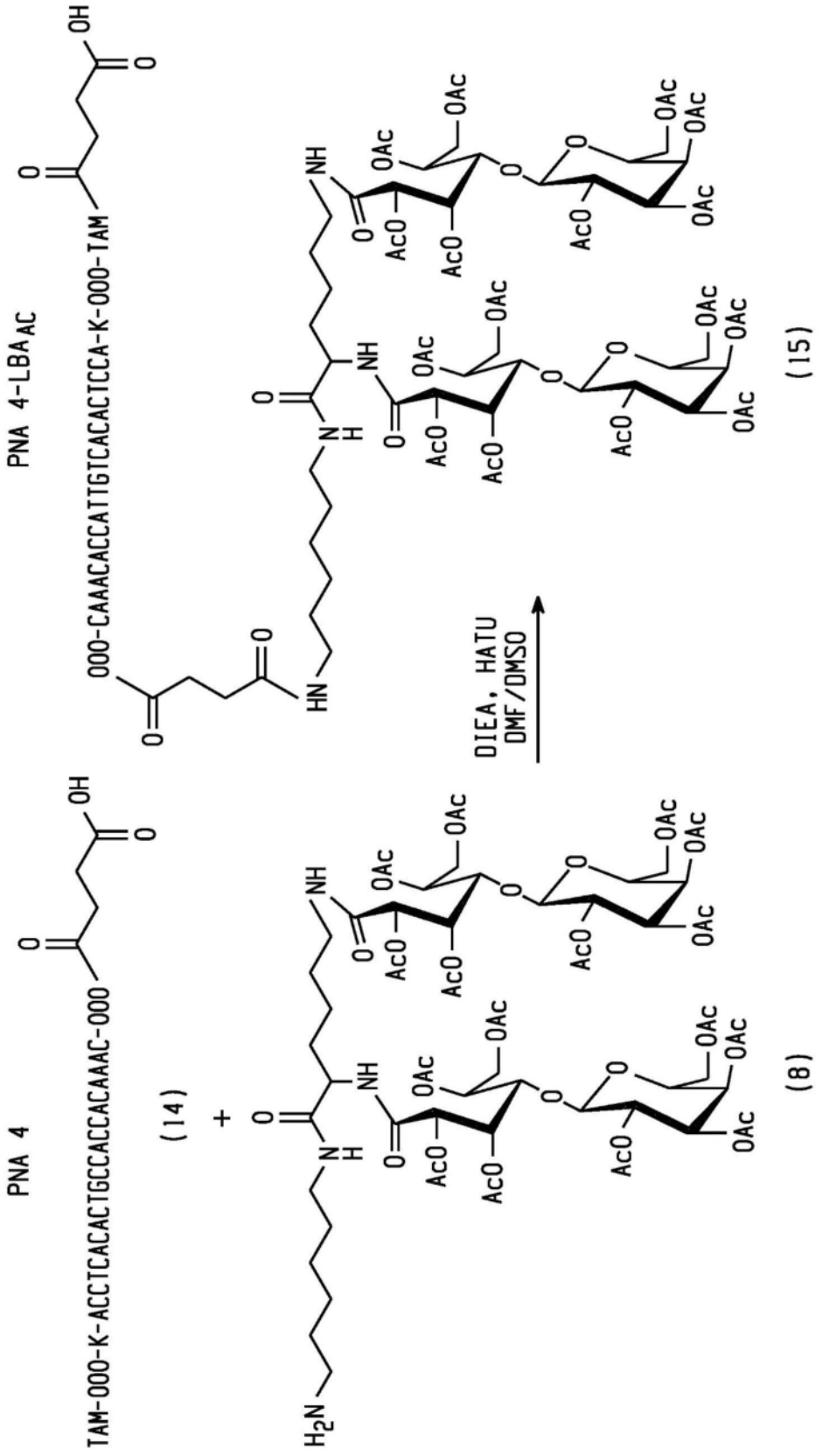

PNA 4-LBA AC
000-CAAACACCATTGTCACACTCCA-K-000-TAM
PNA 4
TAM-000-K-ACCTCACACTGCCACCACAAAC-000
(14)
(15)
(8)
DIEA, HATU
DMF/DMSO

图4A

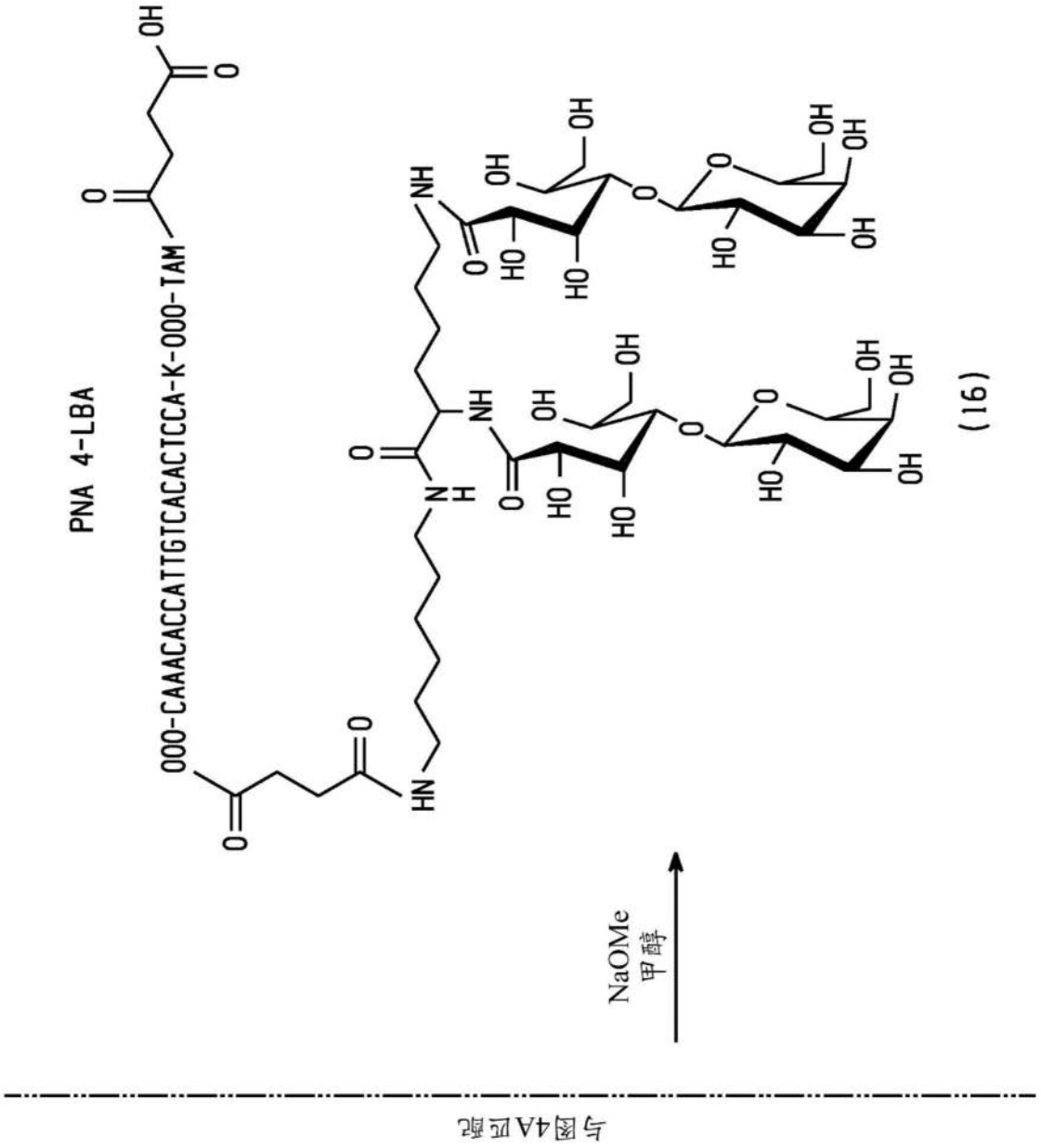

PNA 4-LBA
OOO-CAAACACCATTGTCACACTCCA-K-OOO-TAM
NaOMe
甲醇
(16)
与图4A匹配

图4A(续)

与图2B（续）匹配

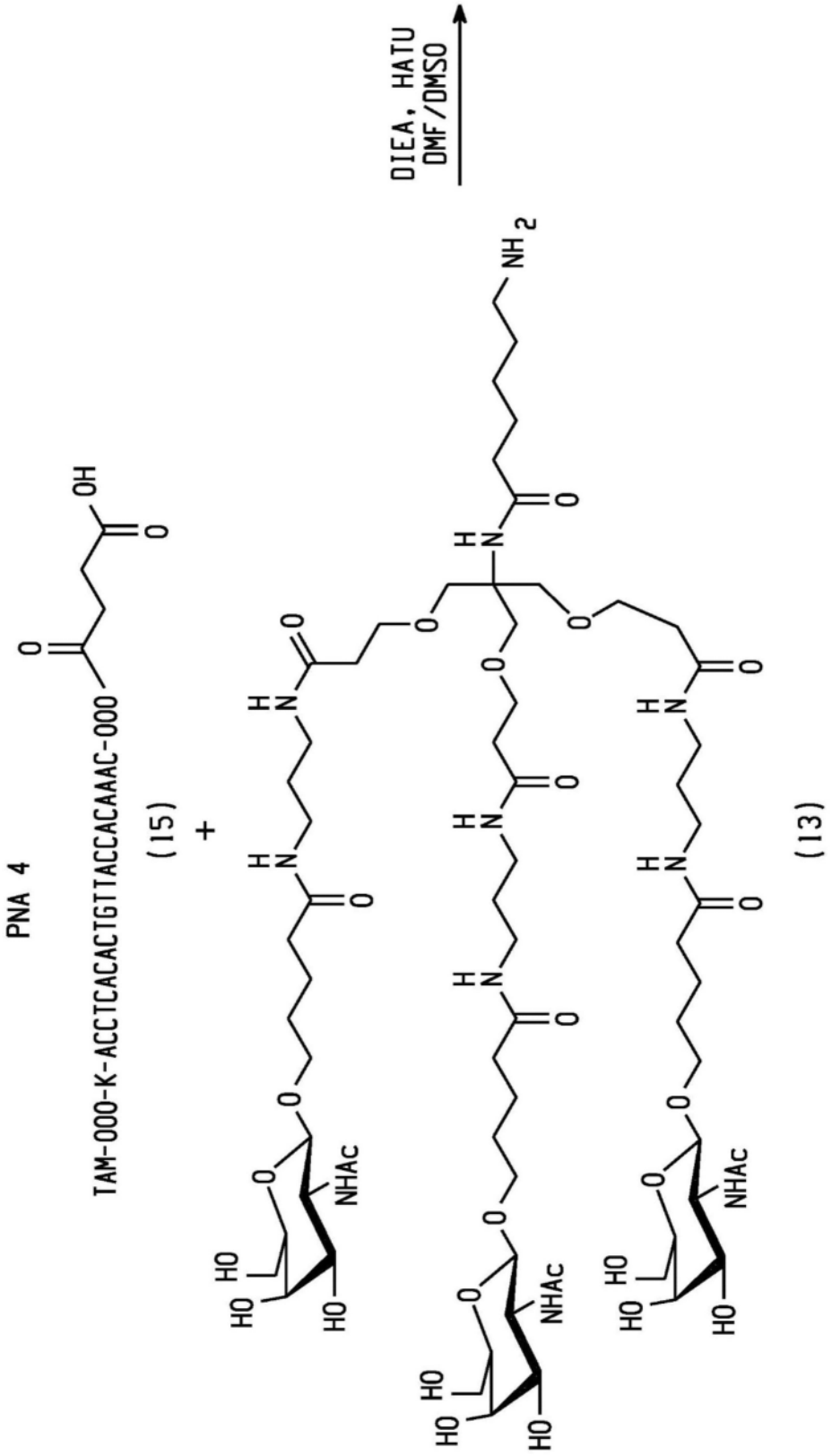

DIEA, HATU
DMF/DMSO
PNA 4
TAM-OOO-K-ACCTCACACTGTTACCACAAAC-OOO
(15)
+
(13)
NHAc
HO
OH
NH2

图2B

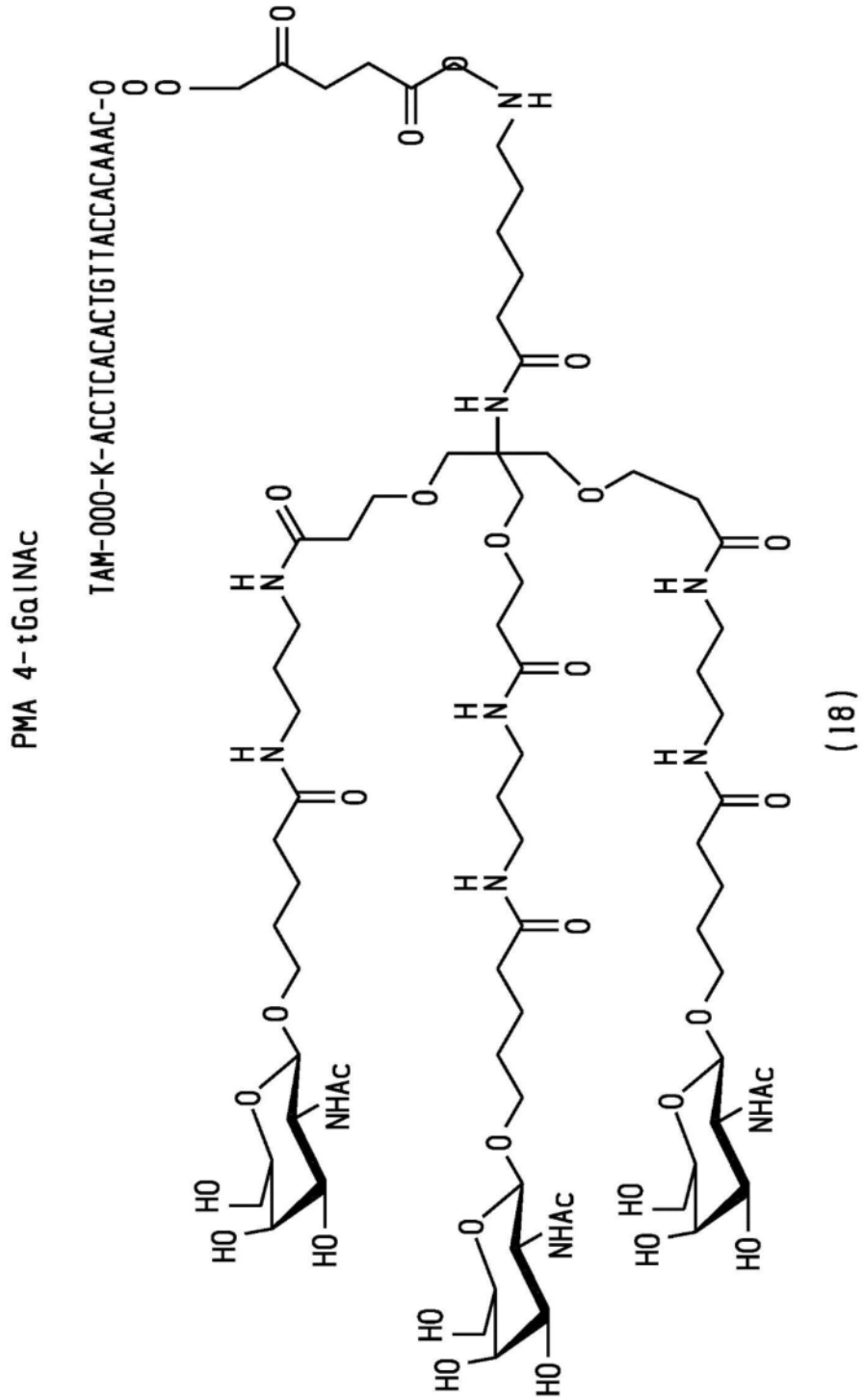


图2B(续)

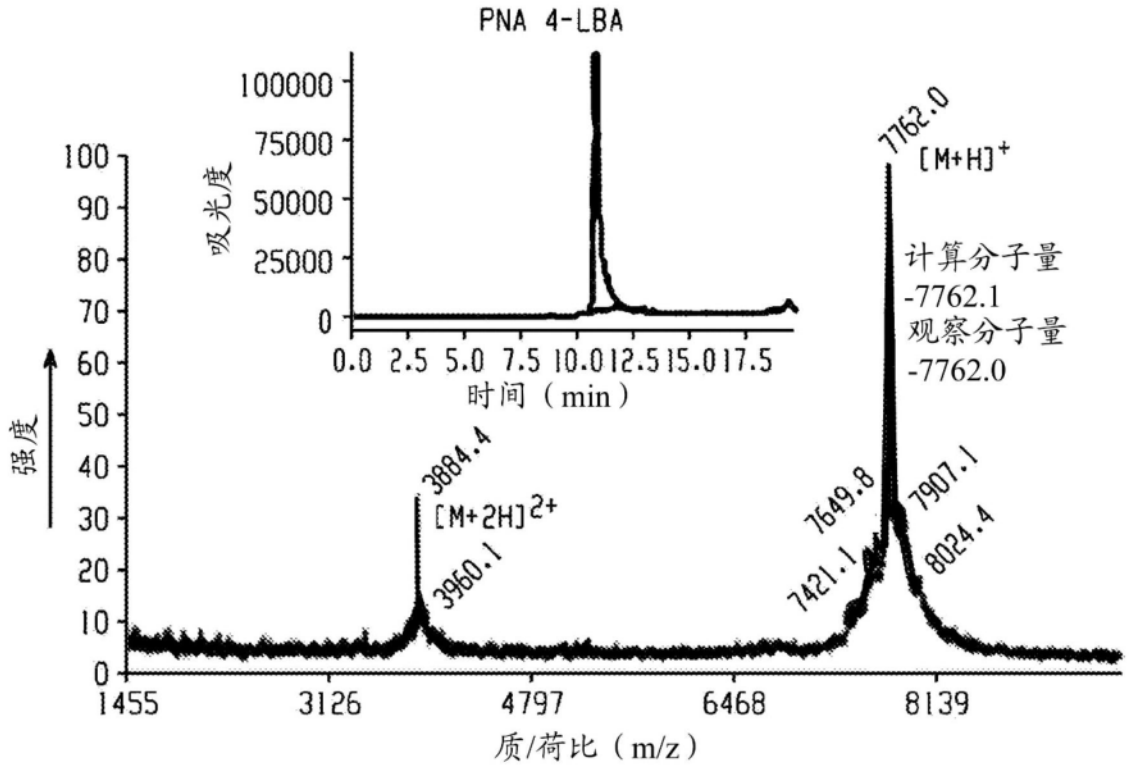

PNA 4-LBA
吸光度
时间（min）
强度
质/荷比（m/z）
7762.0
[M+H]+
计算分子量
-7762.1
观察分子量
-7762.0
3884.4
[M+2H]2+
3960.1
7649.8
7421.1
7907.1
8024.4

图2C1

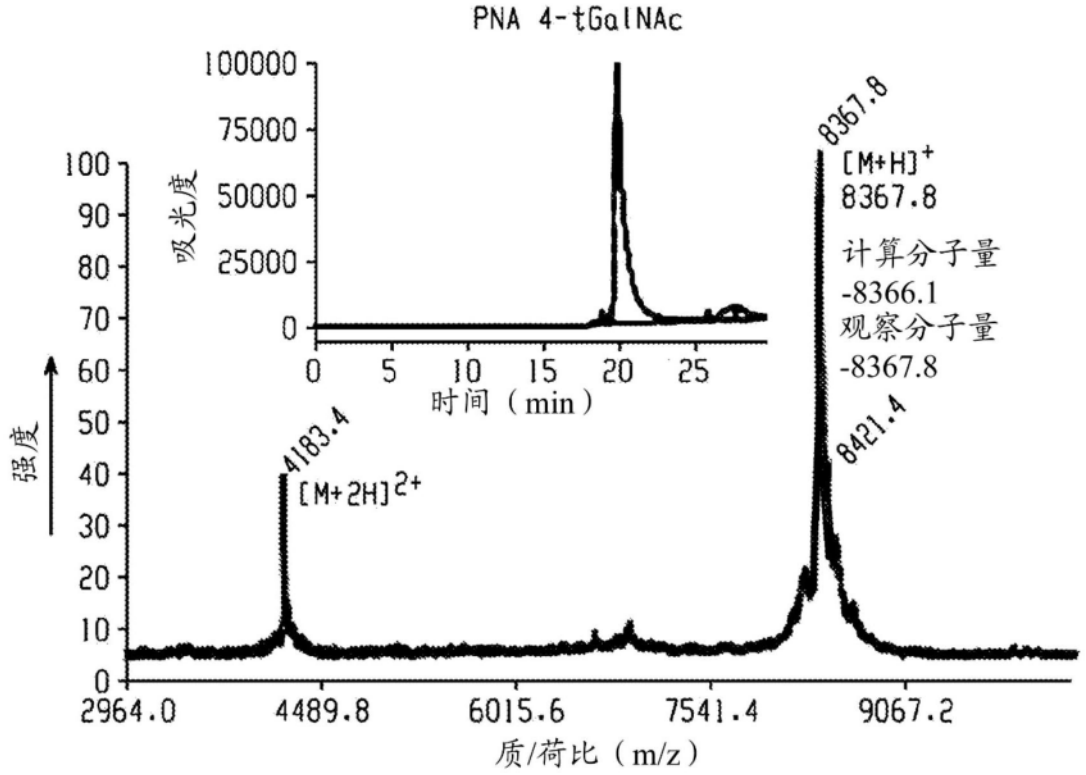

PNA 4-tGalNAc
吸光度
时间（min）
强度
质/荷比（m/z）
8367.8
[M+H]+
8367.8
计算分子量
-8366.1
观察分子量
-8367.8
4183.4
[M+2H]2+
8421.4

图2C2

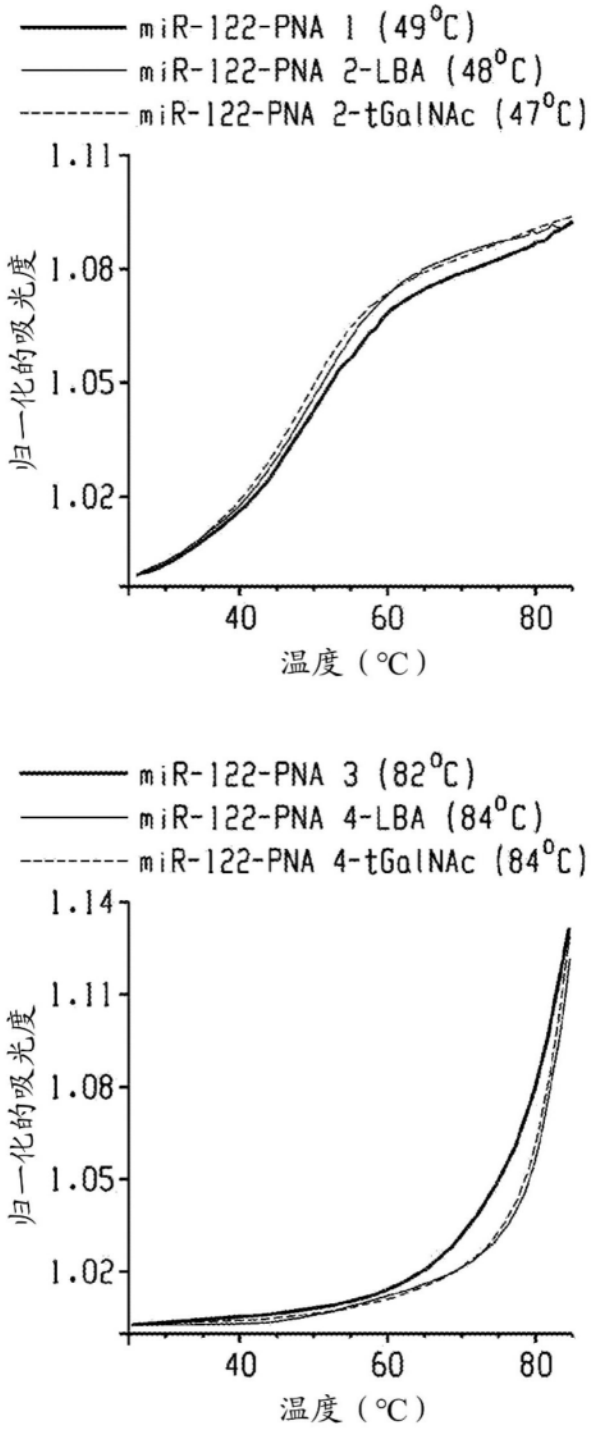

miR-122-PNA 1 (49°C)
miR-122-PNA 2-LBA (48°C)
miR-122-PNA 2-tGalNAc (47°C)
1.11
1.08
1.05
1.02
归一化的吸光度
40
60
80
温度（℃）
miR-122-PNA 3 (82°C)
miR-122-PNA 4-LBA (84°C)
miR-122-PNA 4-tGalNAc (84°C)
1.14
1.11
1.08
1.05
1.02
归一化的吸光度
40
60
80
温度（℃）

图3A

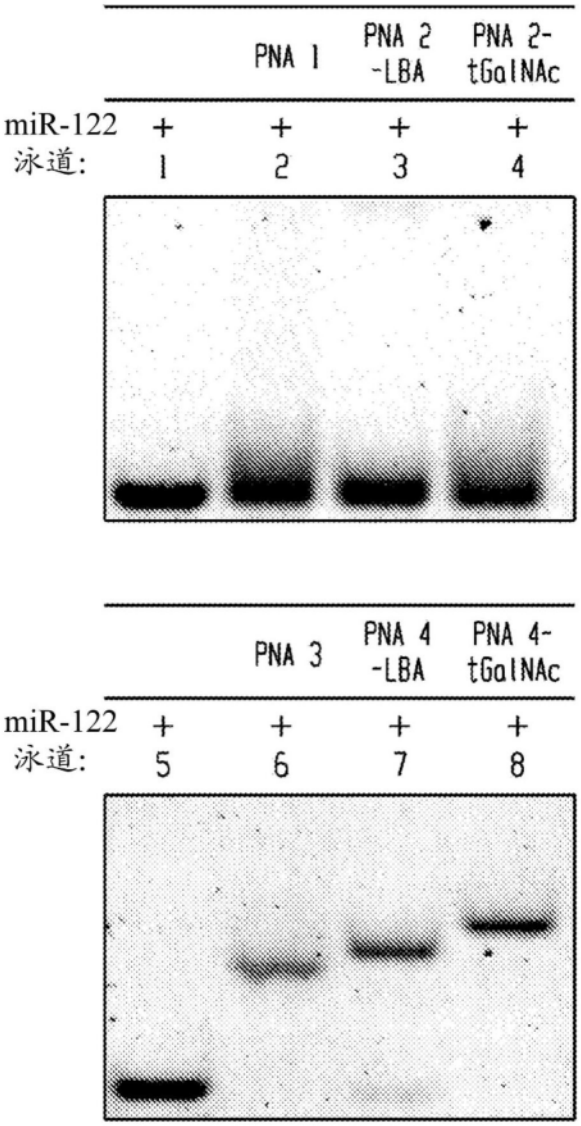

PNA 1
PNA 2 -LBA
PNA 2- tGalNAc
miR-122 + + + +
泳道: 1 2 3 4
PNA 3
PNA 4 -LBA
PNA 4- tGalNAc
miR-122 + + + +
泳道: 5 6 7 8

图3B

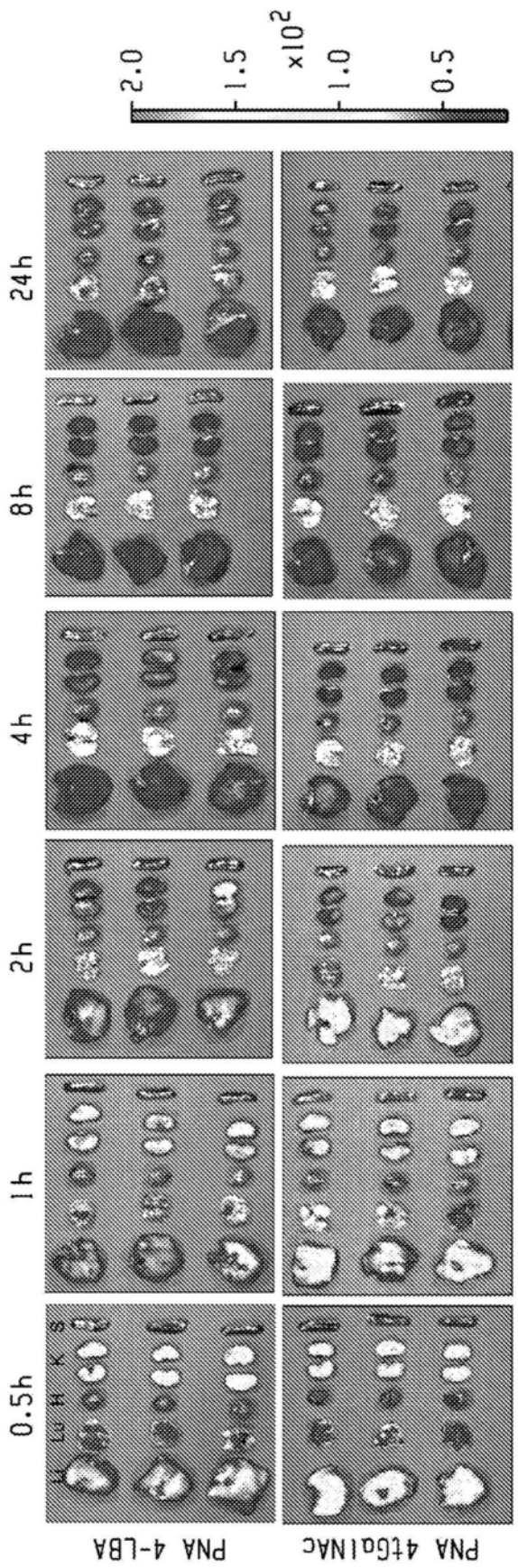


图4A

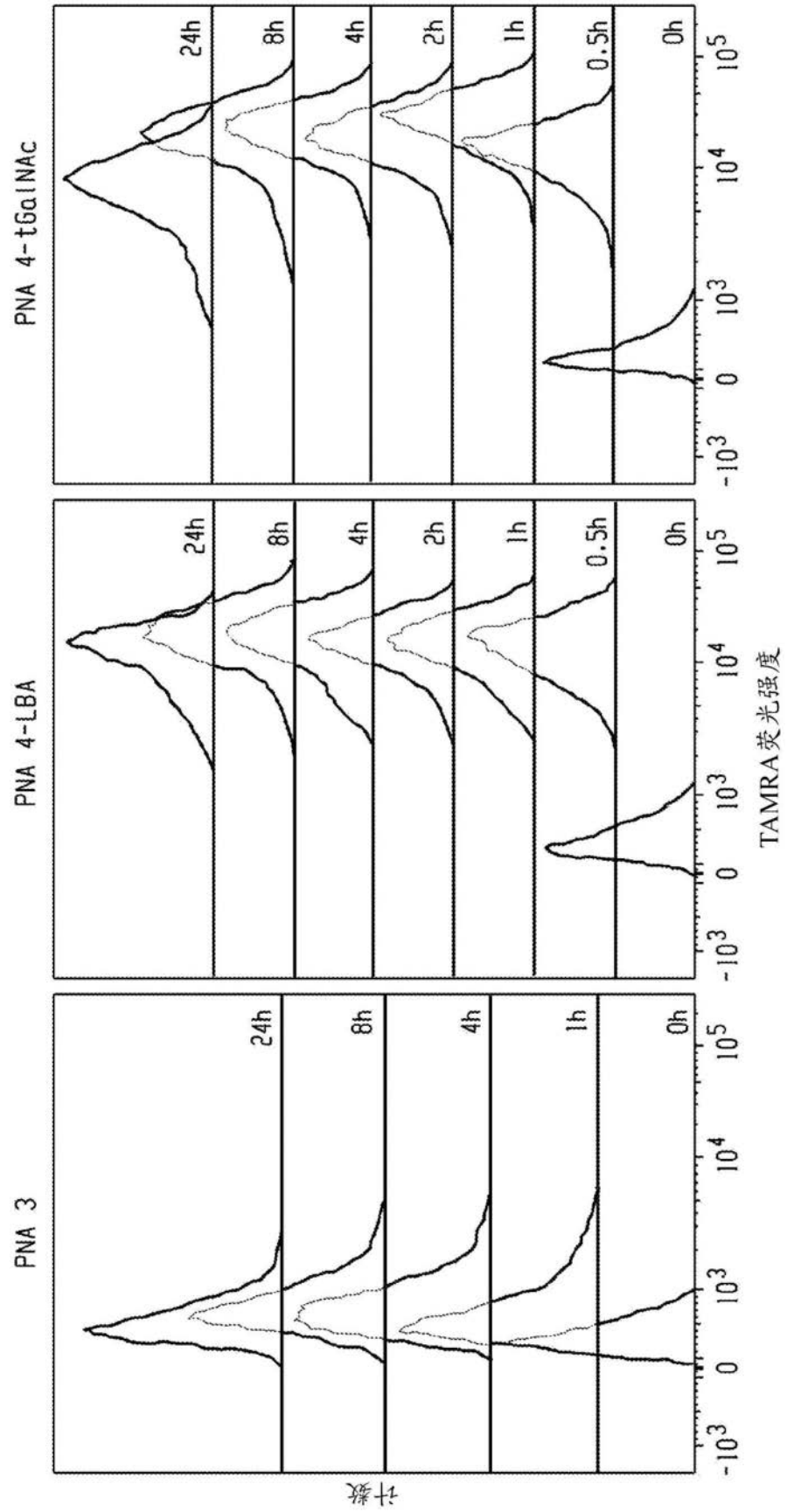

PNA 4-tGalNAc
PNA 4-LBA
PNA 3
24h
8h
4h
2h
1h
0.5h
0h
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
计数
TAMRA荧光强度

图4B

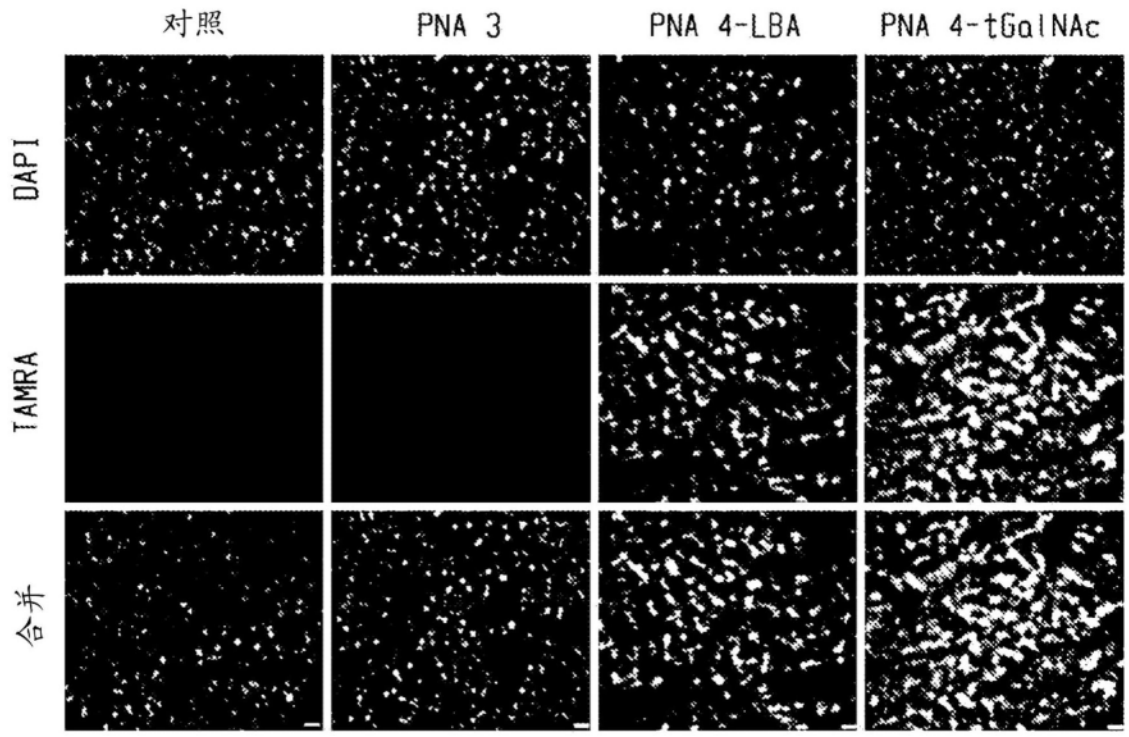

对照
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc
DAPI
TAMRA
合并

图4C

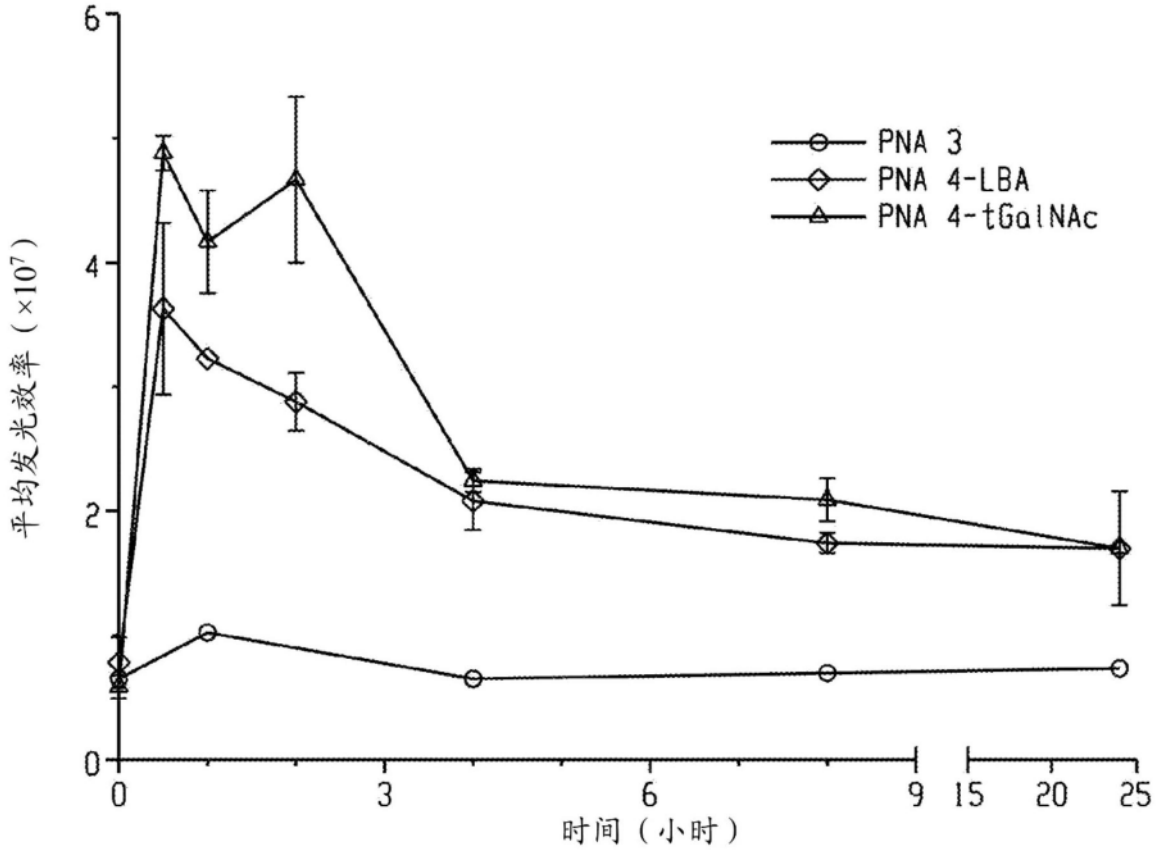

PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc
平均发光效率（×10⁷）
时间（小时）
0
2
4
6
0
3
6
9
15
20
25

图4D

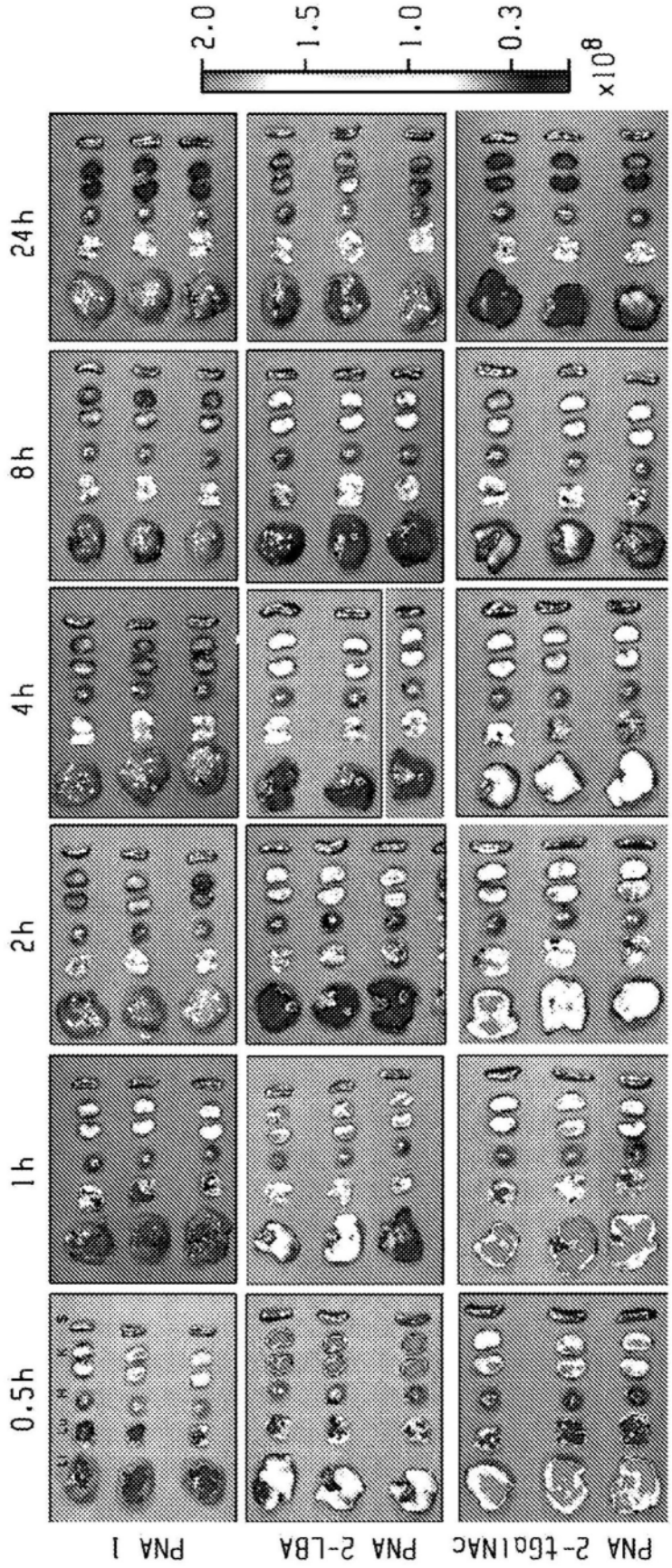


图5A

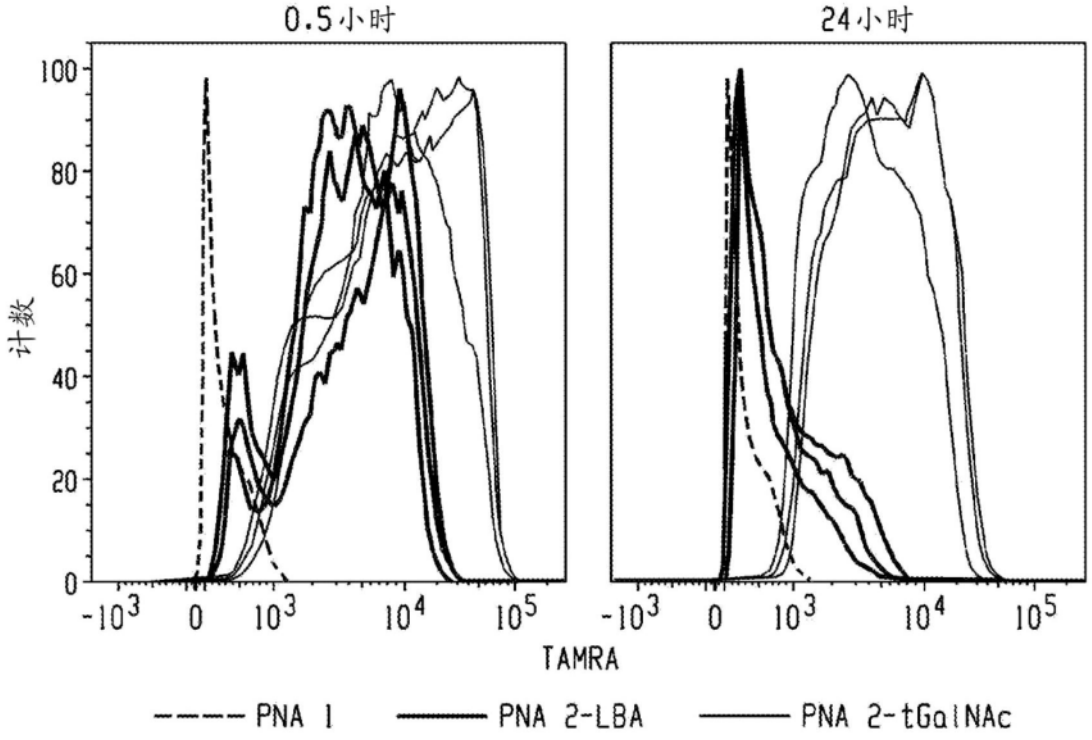

0.5小时
24小时
计数
TAMRA
PNA 1
PNA 2-LBA
PNA 2-tGalNAc

图5B

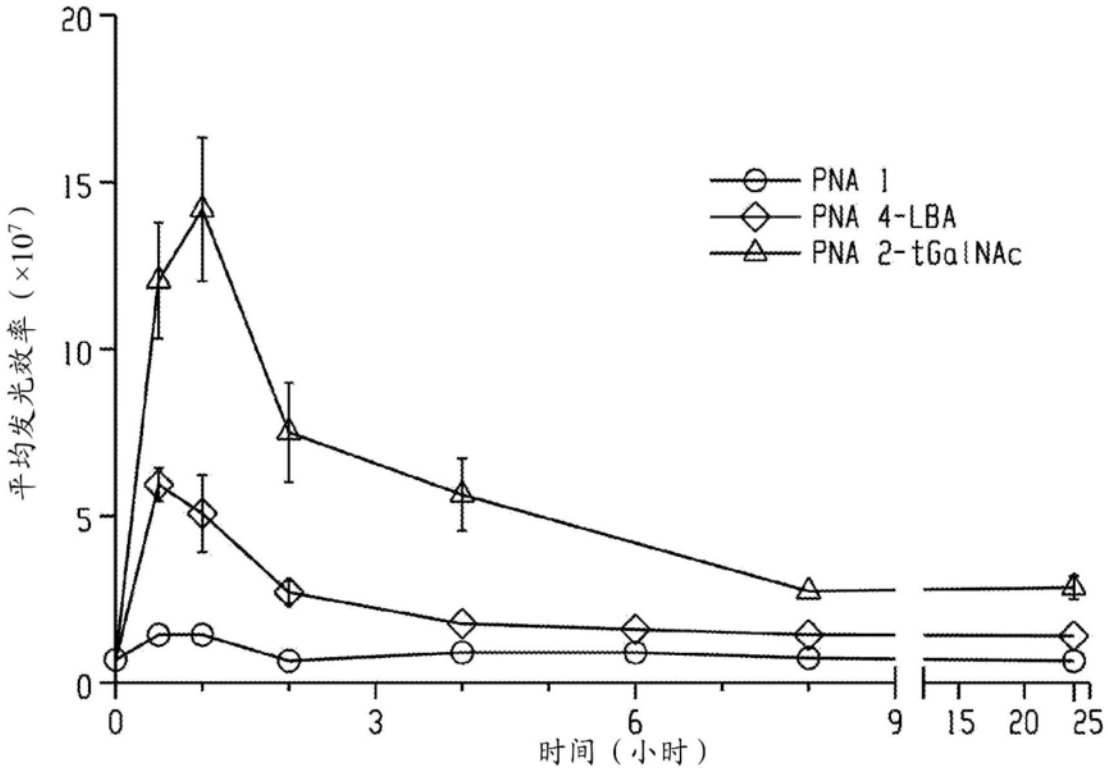

平均发光效率（×10⁷）
时间（小时）
PNA 1
PNA 4-LBA
PNA 2-tGalNAc

图5C

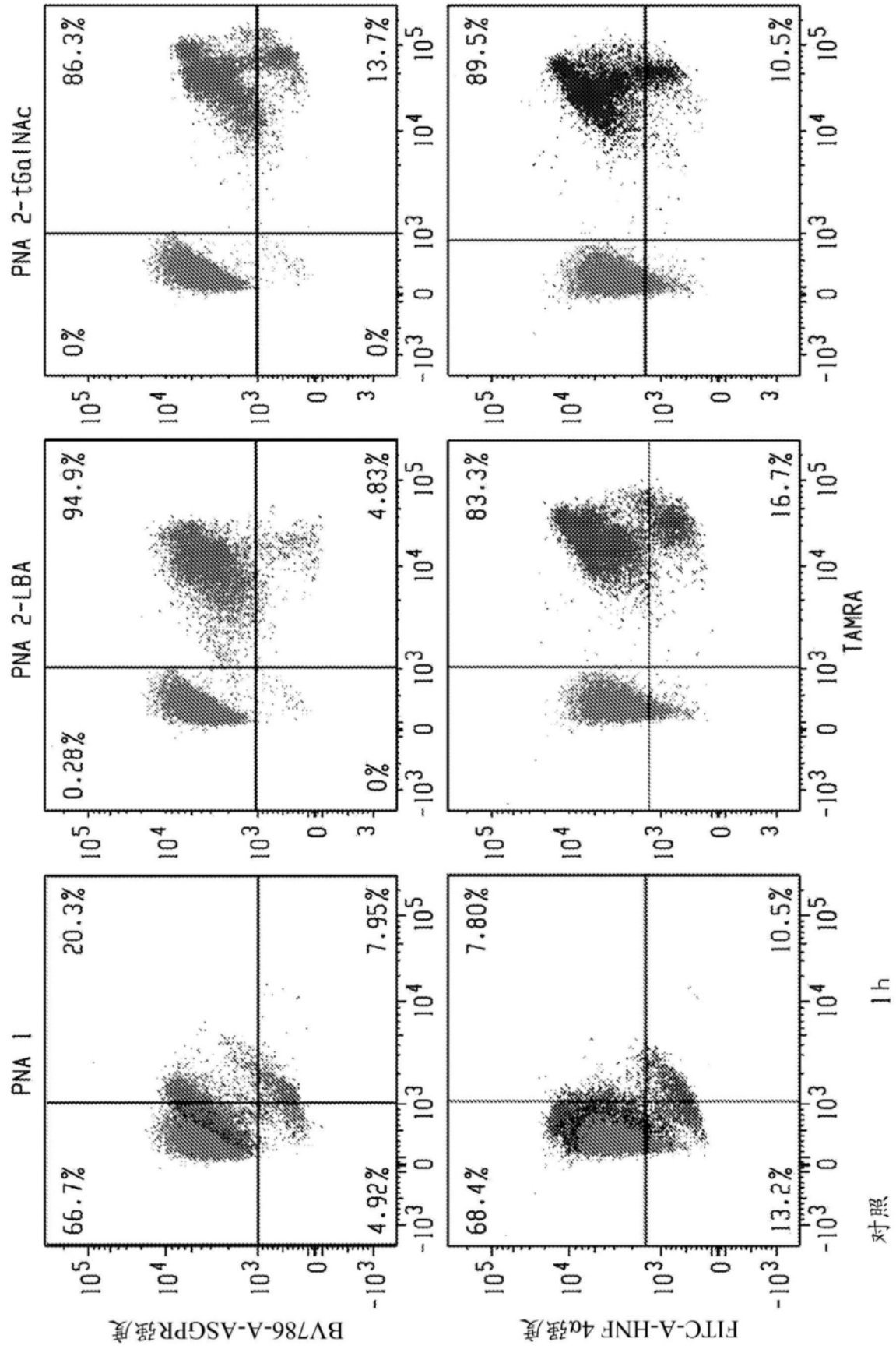

PNA 1
PNA 2-LBA
PNA 2-tGalNAc
对照
1h
66.7%
20.3%
4.92%
7.95%
0.28%
94.9%
0%
4.83%
0%
86.3%
0%
13.7%
68.4%
7.80%
13.2%
10.5%
83.3%
16.7%
89.5%
10.5%
BV786-A-ASGPR强度
FITC-A-HNF 4α强度
TAMRA

图5D

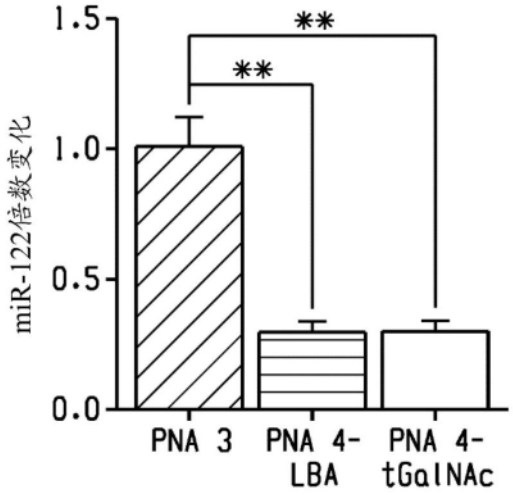

1.5
1.0
0.5
0.0
miR-122倍数变化
**
**
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图6A1

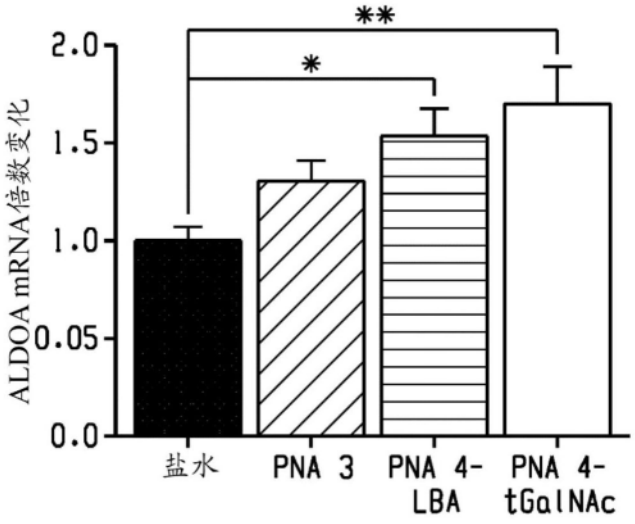

2.0
1.5
1.0
0.05
0.0
ALDOA mRNA倍数变化
**
*
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图6A2

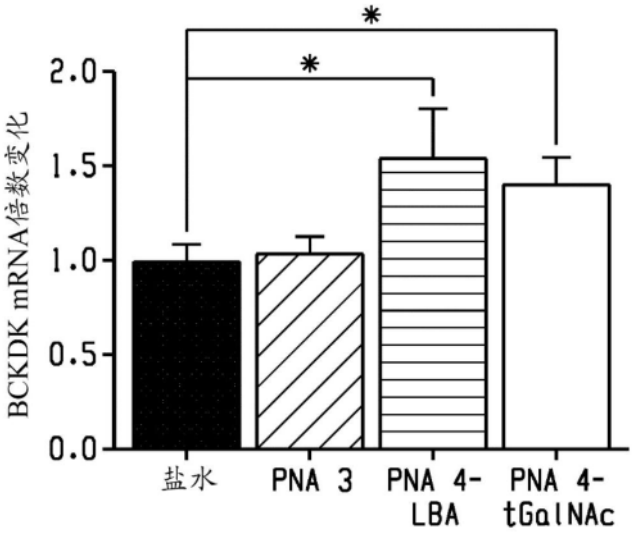

BCKDK mRNA倍数变化
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图6A3

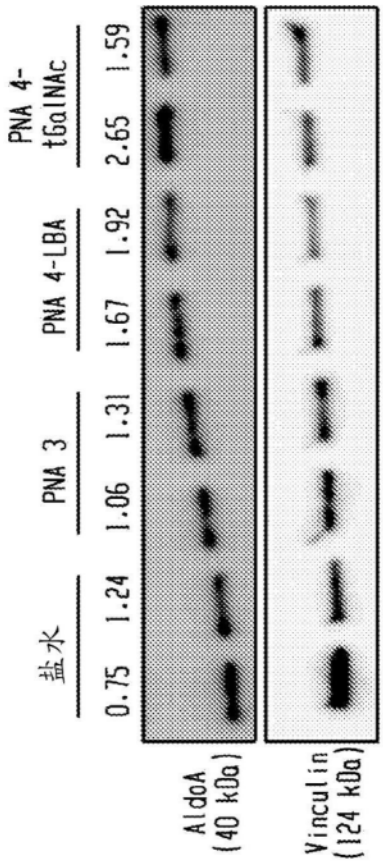

盐水
0.75
1.24
PNA 3
1.06
1.31
PNA 4-LBA
1.67
1.92
PNA 4-tGalNAc
2.65
1.59
Aldoa (40 kDa)
Vinculin (124 kDa)

图6B1

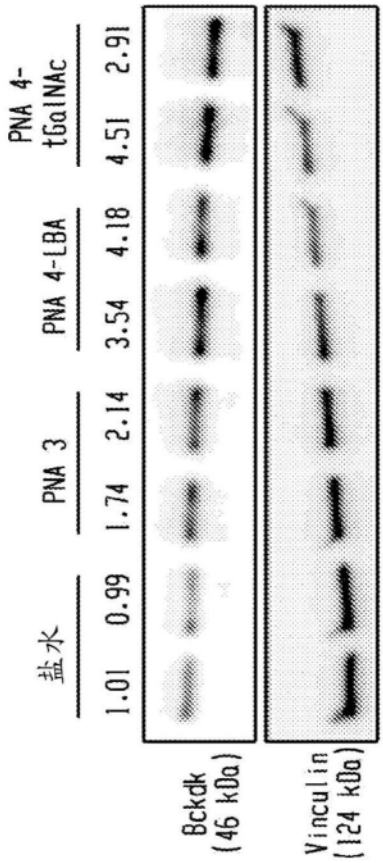

盐水
1.01
0.99
PNA 3
1.74
2.14
PNA 4-LBA
3.54
4.18
PNA 4-tGalNAc
4.51
2.91
Bckdk (46 kDa)
Vinculin (124 kDa)

图6B2

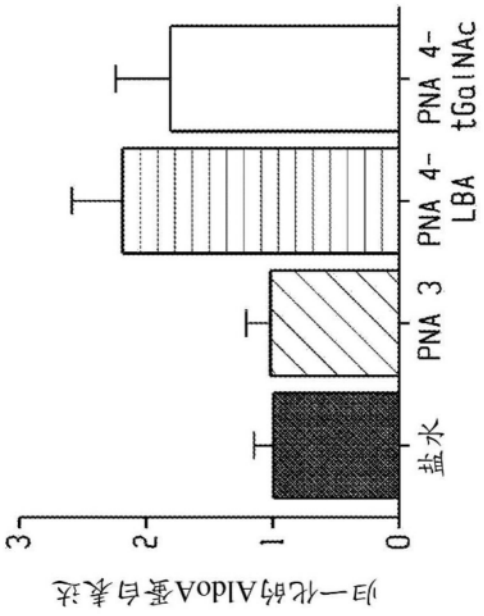

归一化的AldoA蛋白表达
0
1
2
3
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图6C1

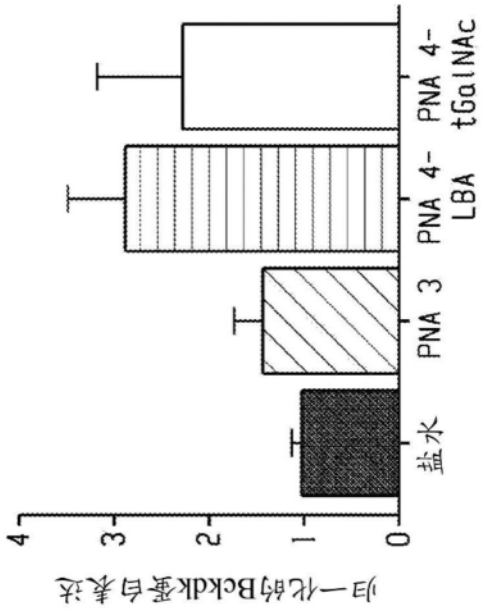

归一化的Bckdk蛋白表达
0
1
2
3
4
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图6C2

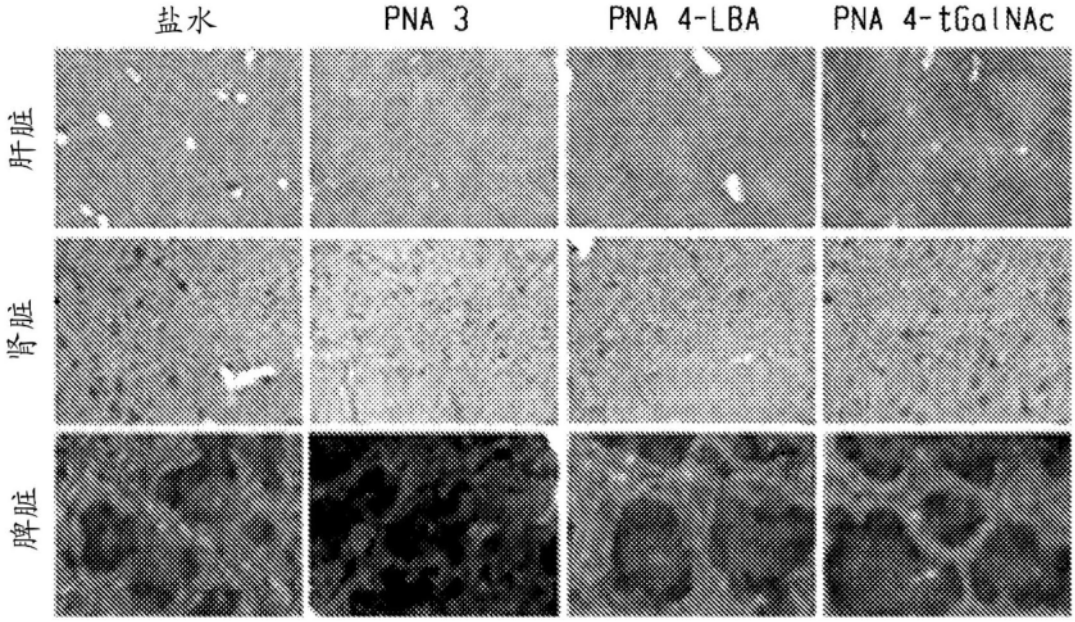

盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc
肝脏
肾脏
脾脏

图7A

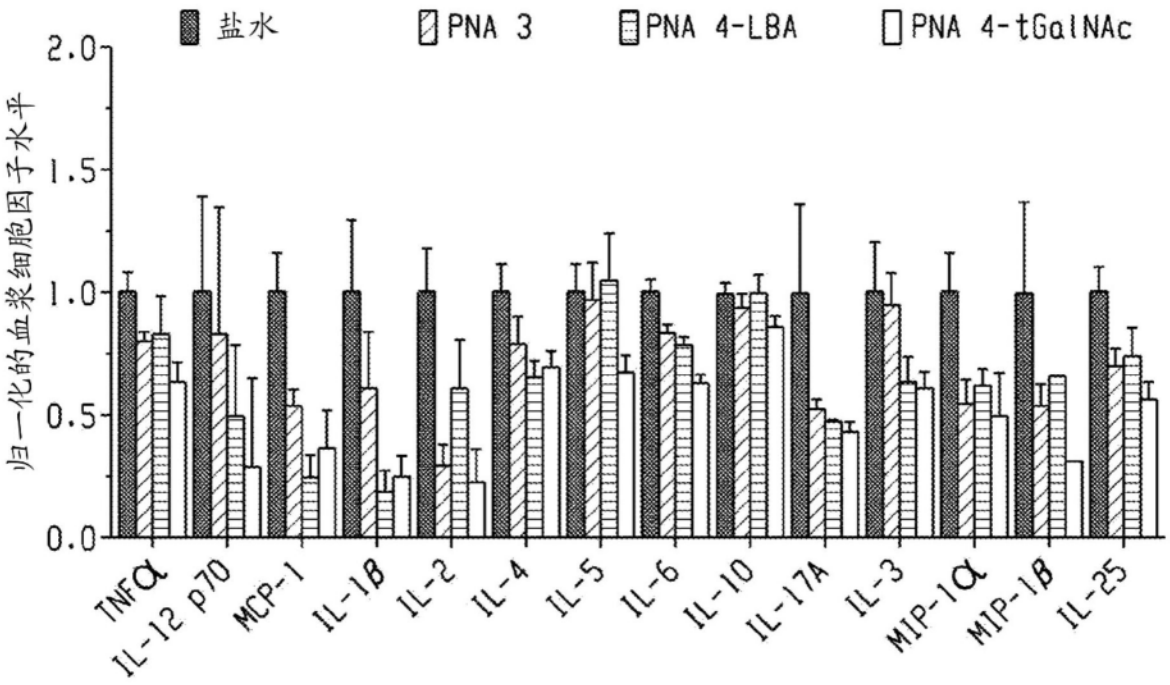

盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc
归一化的血浆细胞因子水平
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
TNFα
IL-12 p70
MCP-1
IL-1β
IL-2
IL-4
IL-5
IL-6
IL-10
IL-17A
IL-3
MIP-1α
MIP-1β
IL-25

图7B

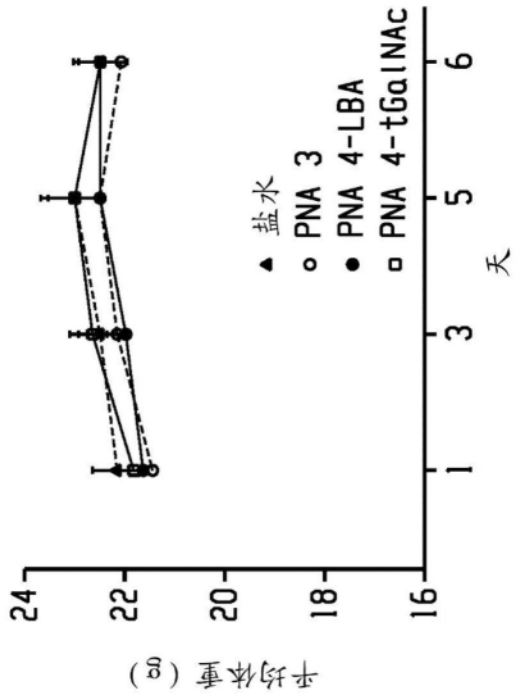

盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc
天
1
3
5
6
16
18
20
22
24
平均体重 (g)

图7C

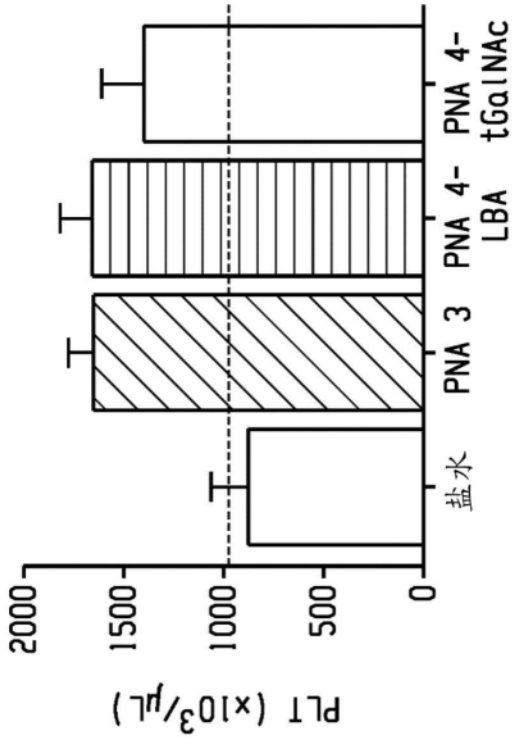

PLT (x10³/μL)
2000
1500
1000
500
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7D1

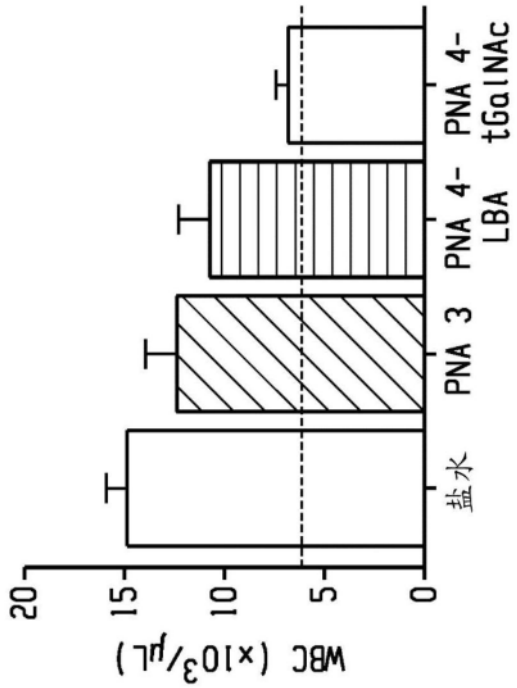

WBC (x10³/μL)
20
15
10
5
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7D2

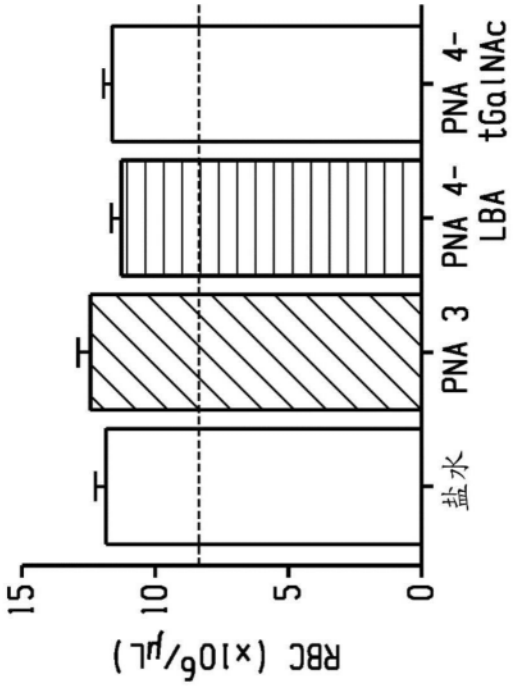

RBC (×10⁶/μL)
15
10
5
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7D3

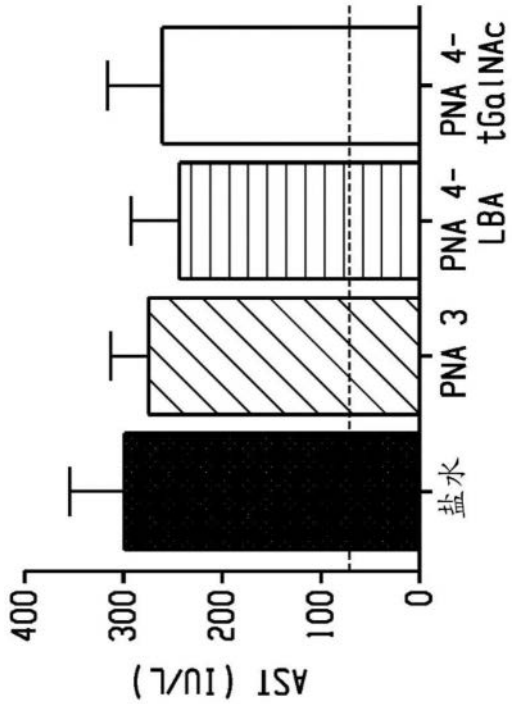

AST (IU/L)
400
300
200
100
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E1

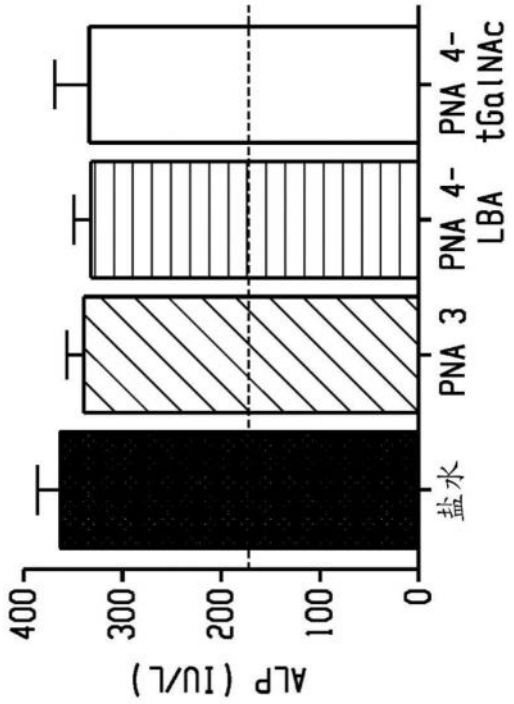

ALP (IU/L)
400
300
200
100
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E2

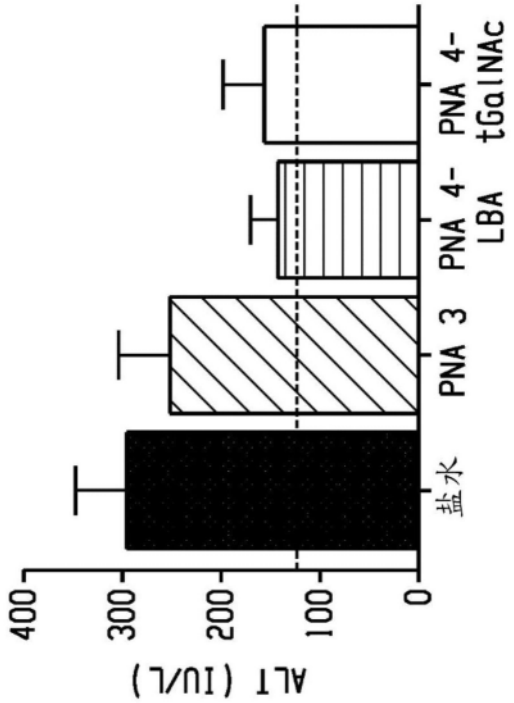

ALT (IU/L)
400
300
200
100
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E3

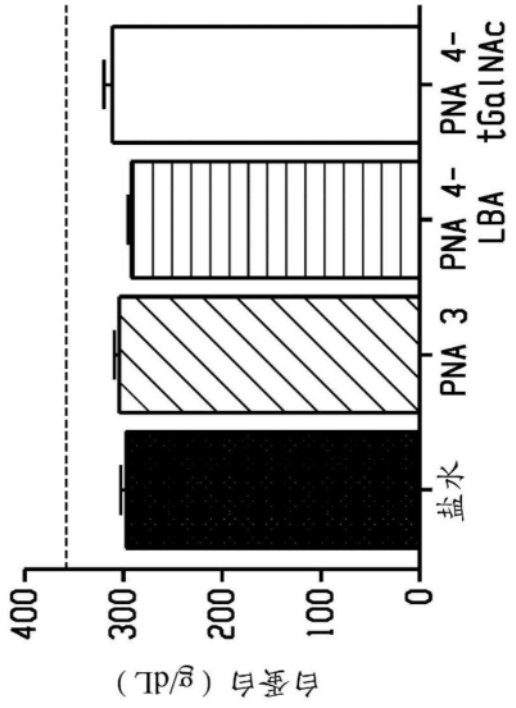

白蛋白 (g/dL)
400
300
200
100
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E4

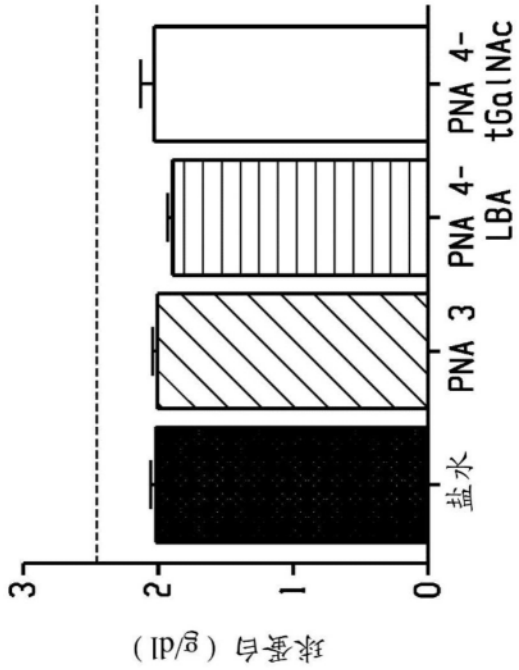

球蛋白 (g/dl)
3
2
1
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E5

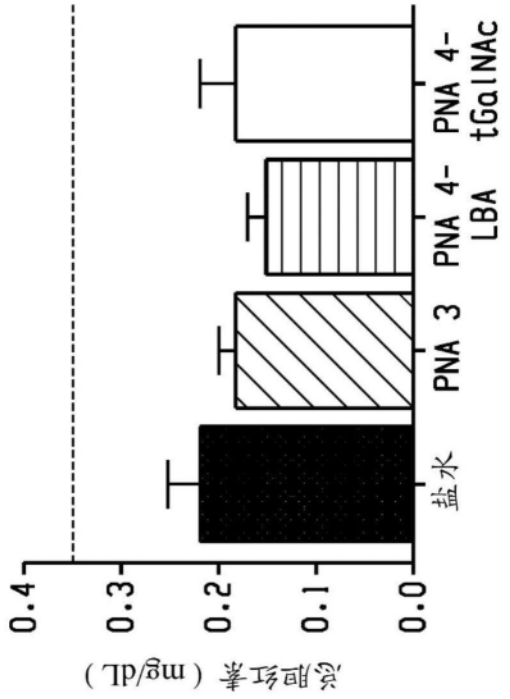

总胆红素 (mg/dL)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E6

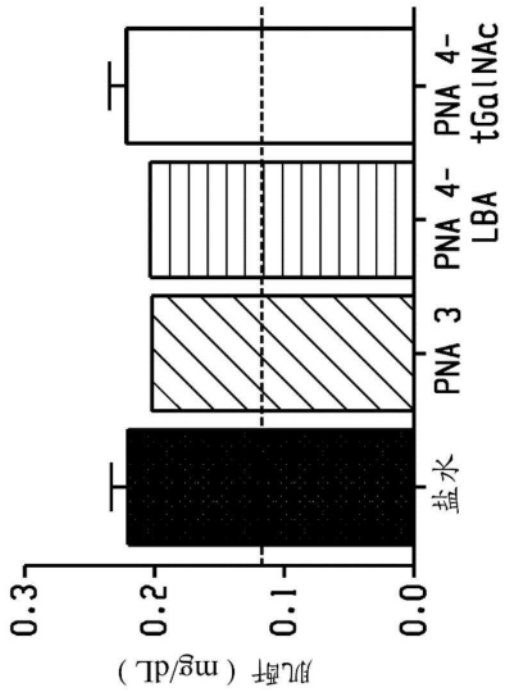

肌酐 (mg/dL)
0.0
0.1
0.2
0.3
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E7

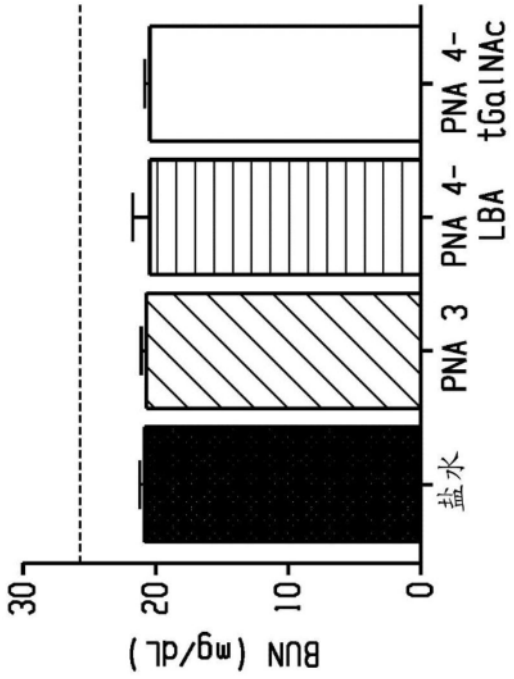

BUN (mg/dL)
0
10
20
30
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E8

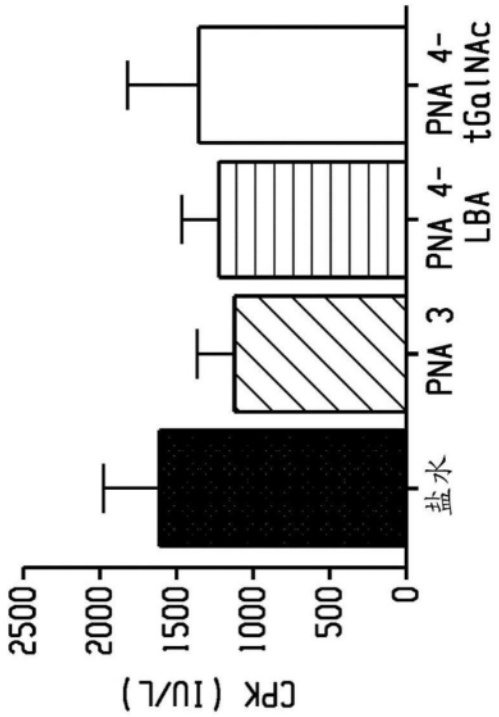

CPK (IU/L)
0
500
1000
1500
2000
2500
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E9

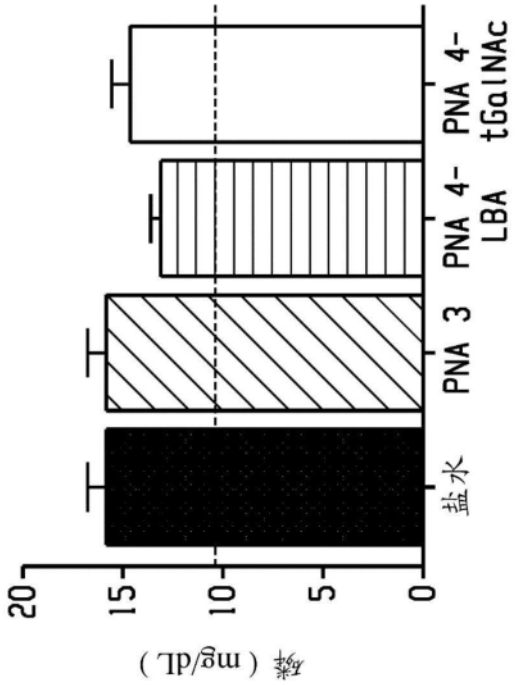

磷 (mg/dL)
20
15
10
5
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E10

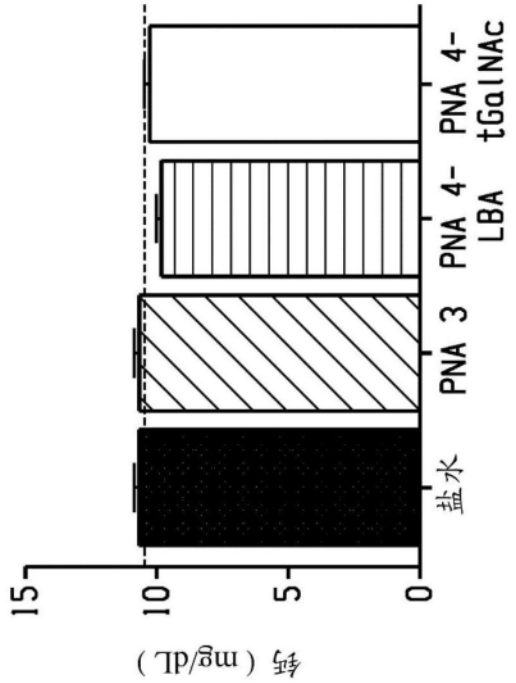

钙 (mg/dL)
15
10
5
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E11

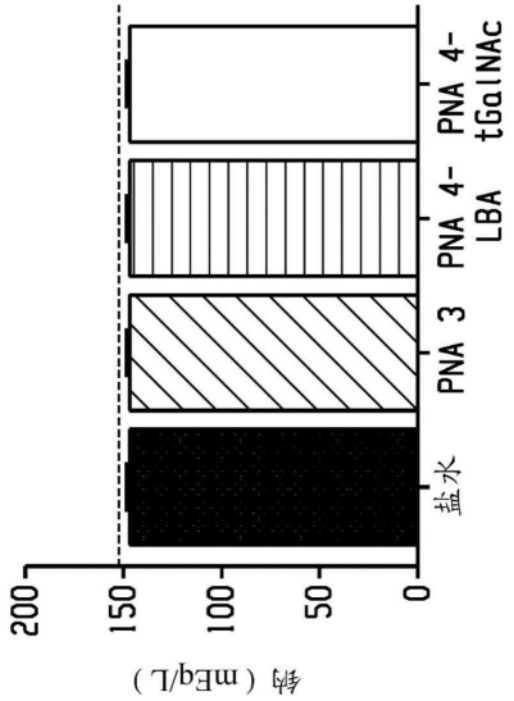

钠（mEq/L）
200
150
100
50
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E12

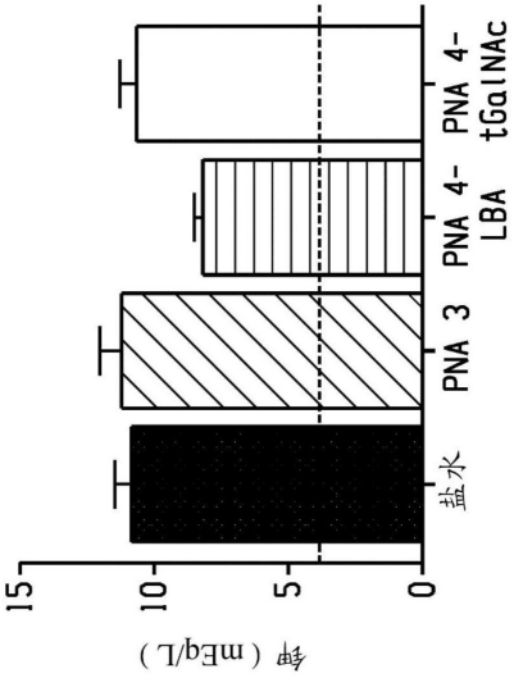

钾（mEq/L）
15
10
5
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E13

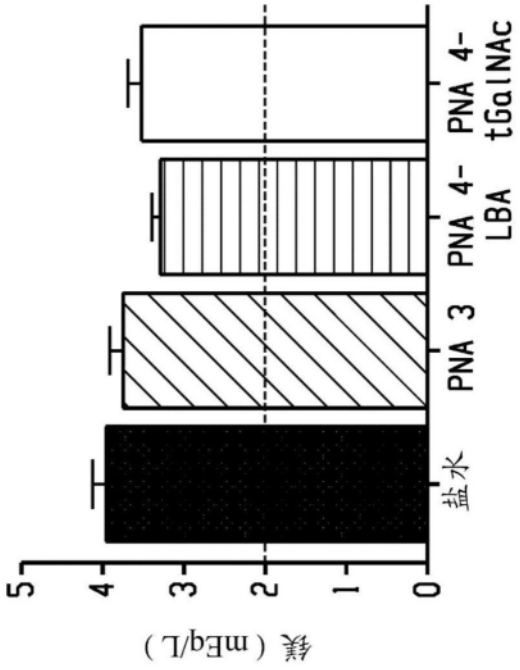

镁 (mEq/L)
0
1
2
3
4
5
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E14

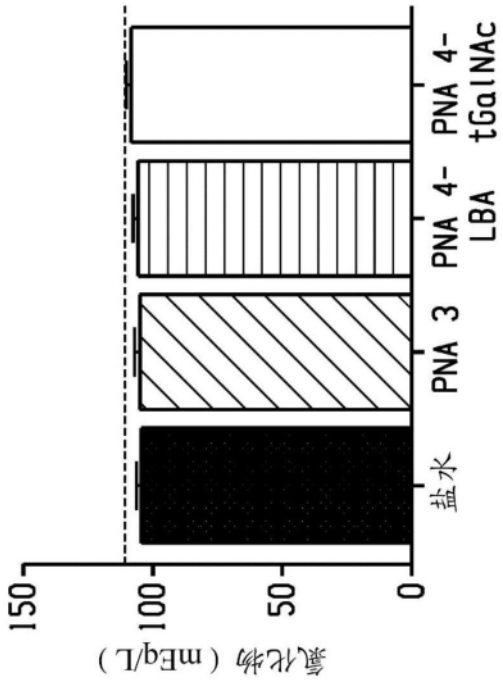

氯化物 (mEq/L)
0
50
100
150
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E15

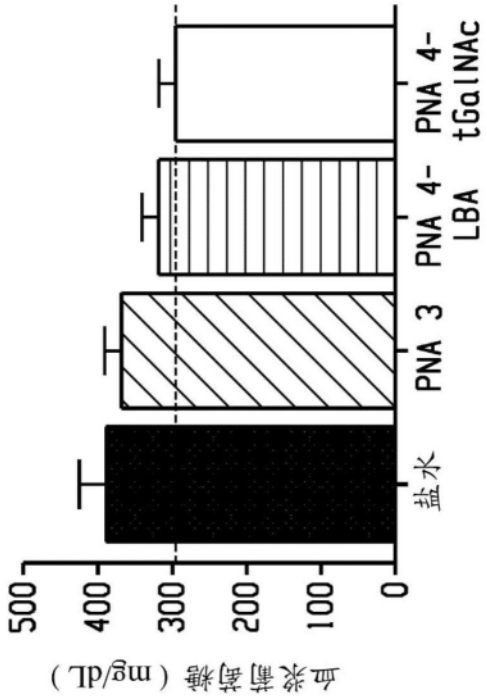

血浆葡萄糖（mg/dL）
500
400
300
200
100
0
盐水
PNA 3
PNA 4-LBA
PNA 4-tGalNAc

图7E16

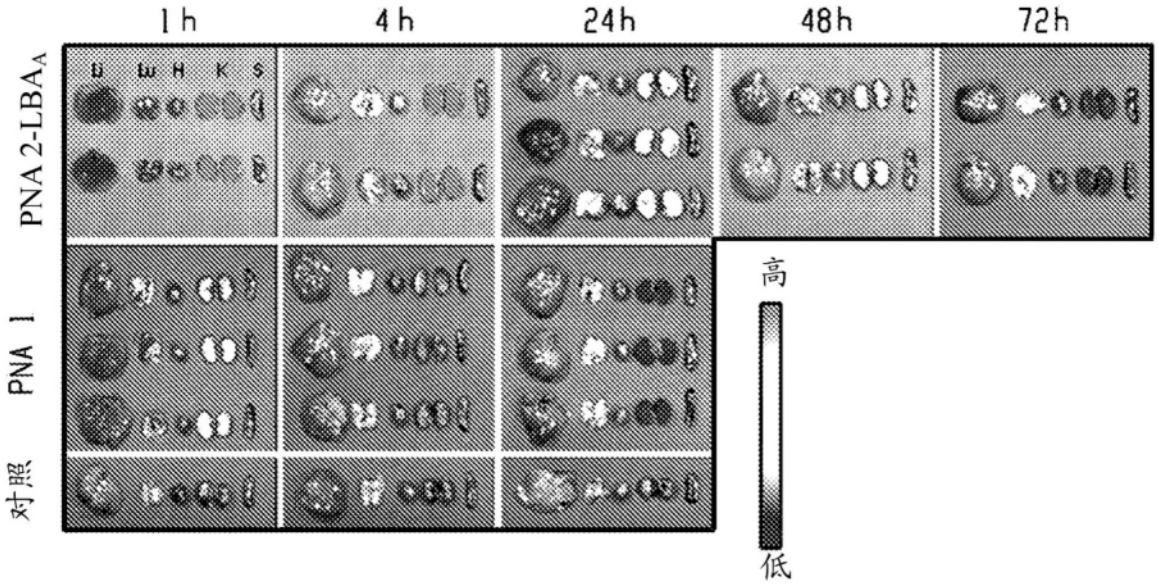

1h
4h
24h
48h
72h
PNA 2-LBA
E
H
K
S
PNA 1
对照
高
低

图8A

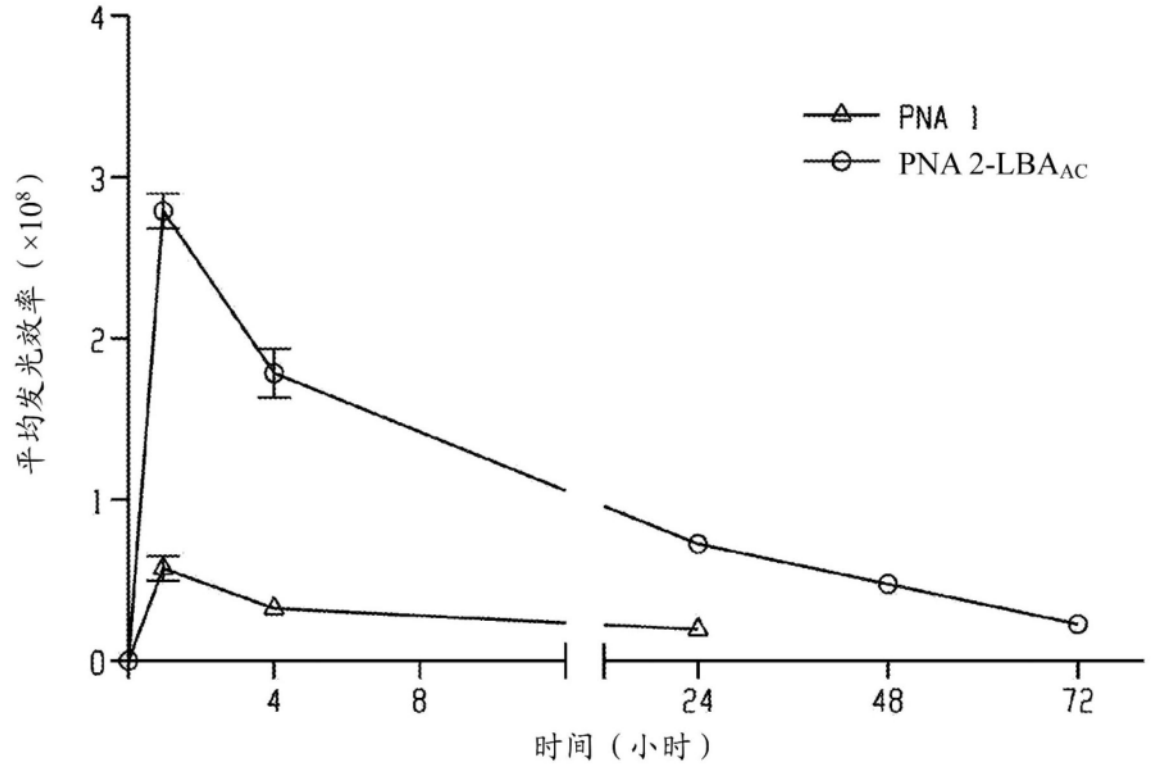

PNA 1
PNA 2-LBA$_{AC}$
平均发光效率（×10^8）
时间（小时）
0
1
2
3
4
4
8
24
48
72

图8B

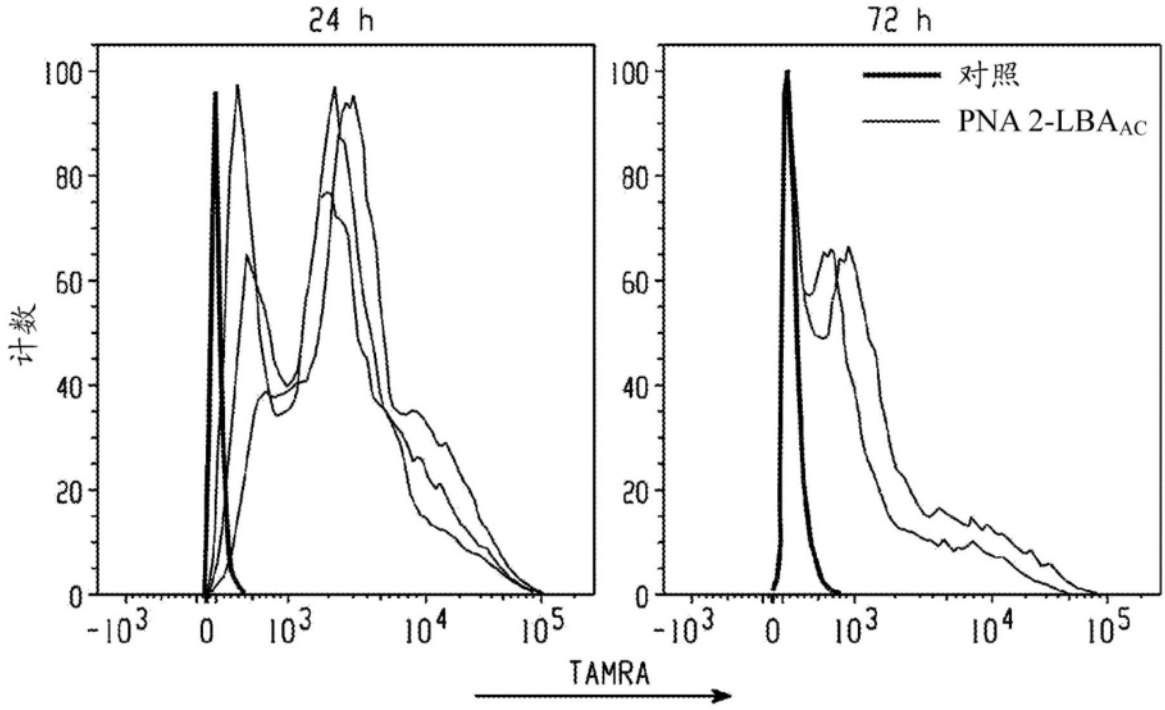

24 h
72 h
对照
PNA 2-LBA$_{AC}$
计数
TAMRA
0
20
40
60
80
100
-10^3
0
10^3
10^4
10^5

图8C

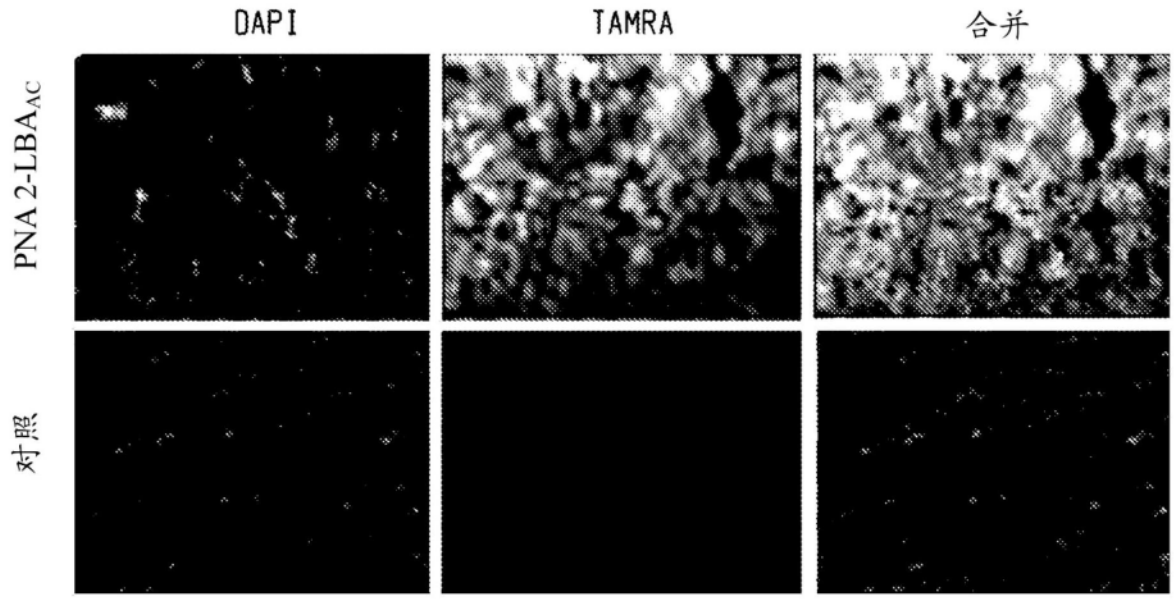


图8D

miR-21-5P : 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA- 3'
PNA 5 : 5' --------TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-K-OOO-Tam- 3'
PNA 6 : 5' -SA-OOO-TCAACACTCAGTCTGATAAGCTA-K-OOO-Tam- 3'

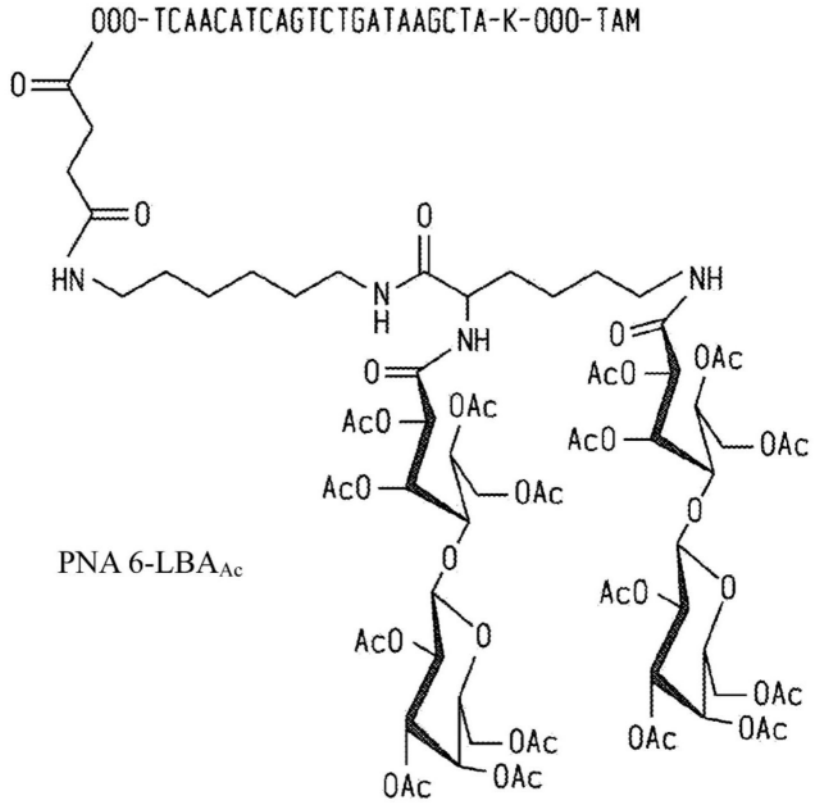


图9A

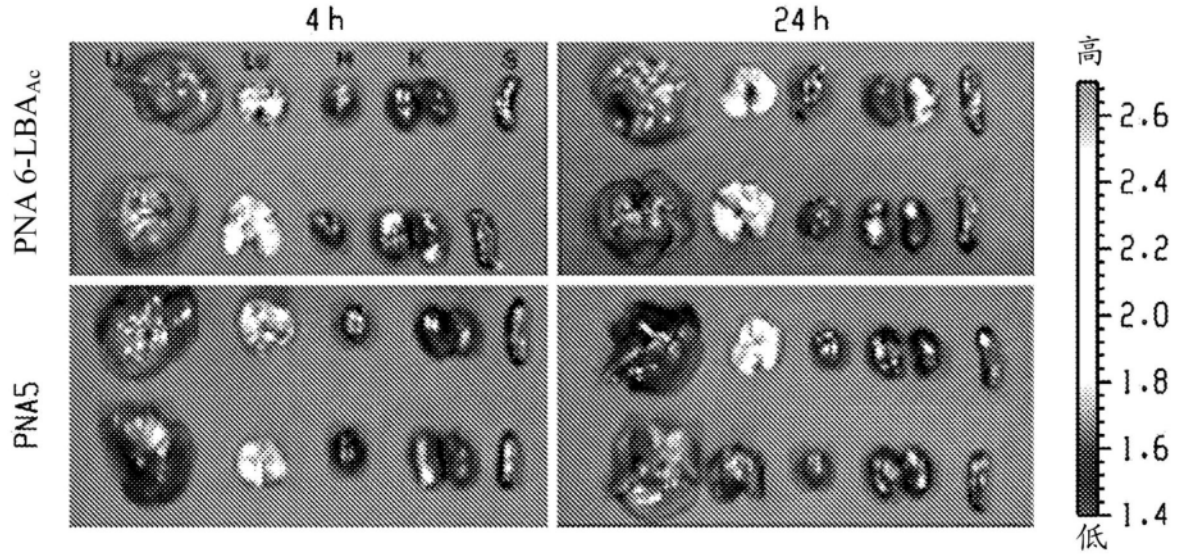

4 h
24 h
PNA 6-LBA$_{Ac}$
PNA5
高
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
低

图9B

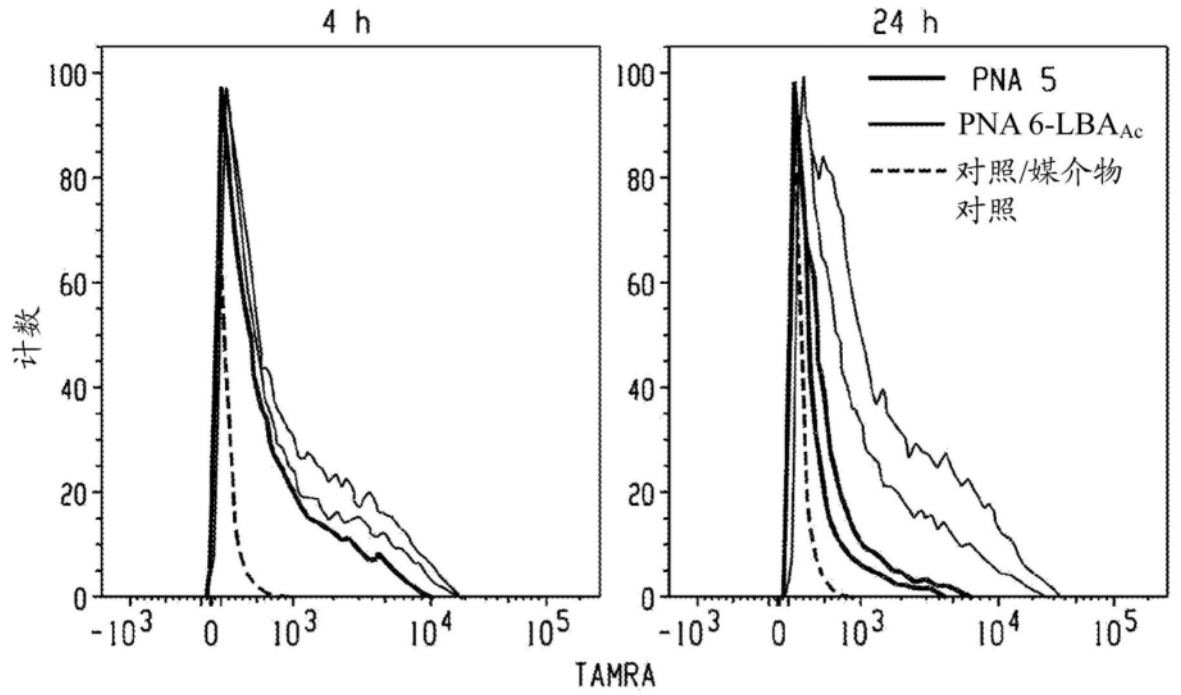

4 h
24 h
计数
100
80
60
40
20
0
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
TAMRA
PNA 5
PNA 6-LBA$_{Ac}$
对照/媒介物
对照

图9C

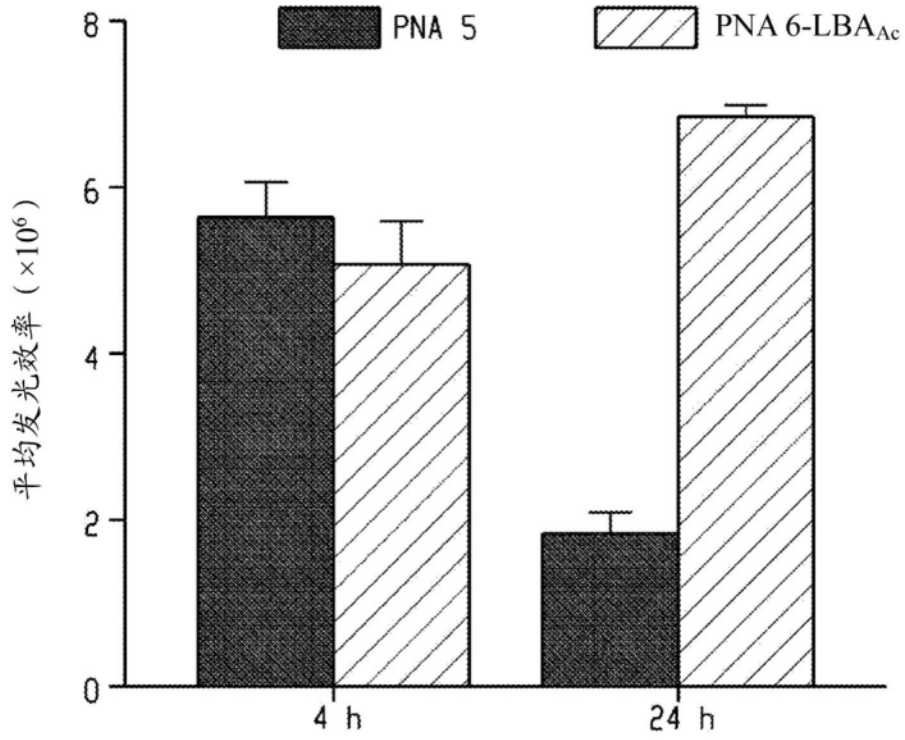


图9D