(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110402152 B
(45)授权公告日 2024.03.19

(21)申请号 201880017053.0
(22)申请日 2018.01.09
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110402152 A
(43)申请公布日 2019.11.01
(30)优先权数据
62/443,822 2017.01.09 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2018/050031 2018.01.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/127927 EN 2018.07.12
(73)专利权人 艾博森斯有限公司
地址 以色列配塔提克瓦

(72)发明人 伊兰·齐夫
约瑟夫·杜布罗夫斯基
哈吉特·格林贝格

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 王永伟
(51)Int.Cl.
A61K 47/55(2006.01)
C07J 1/00(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件
US 2016/0106855 A1,2016.04.21

审查员 毛骥

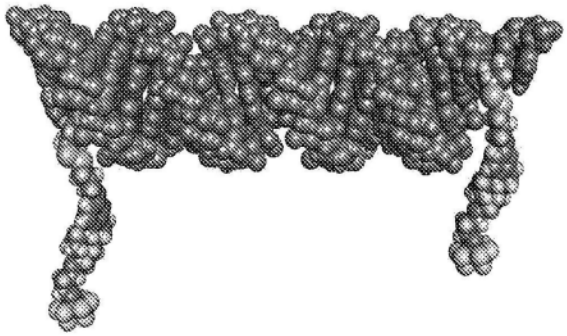
权利要求书5页 说明书27页 附图4页

(54)发明名称

用于分子的跨膜递送的化合物和方法

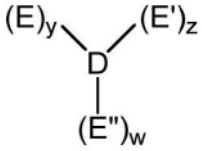
(57)摘要

提供了用于将药物并且特别是基因药物诸如siRNA或反义寡核苷酸(ASO)递送穿过生物膜的系统。该系统包括:由膜内部电场供能的跨膜递送部分;以及氧化还原敏感的二硫化物部分,该二硫化物部分被设计成在细胞质中还原,从而释放货物药物以在其靶位点发挥其药物作用。



CN 110402152 B

1.一种缀合物,具有式(I)中列出的结构:



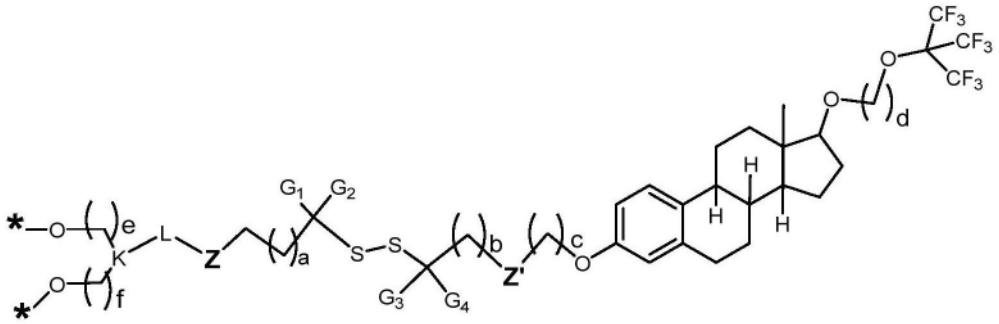
式(I)

包括由式(I)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐,其中:

D是待穿过生物膜递送的寡核苷酸;

y、z和w各自是独立地选自0、1、2、3、4、5或6的整数,其中每当所述整数是0时,这意味着相应的E部分不存在;y、z或w中的至少一个不同于0;

E、E'或E"可以是相同的或不同的,各自独立地具有通式(II)中列出的结构:



(式 II)

包括由式(II)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐,其中:

G_1、G_2、G_3和G_4各自独立地选自由以下组成的组:氢、甲基或乙基;至少两个G基团是氢;

Z和Z'各自独立地选自由以下组成的组:不存在;$-CH_2-$;-NH-;-N(R')-;$-C(H_2)(CH_2)_n[N(R'')]-$;$-N(R')-C(O)-C(H_2)(CH_2)_n[N(R'')]-$;其中R'、R"中的每个独立地选自由以下组成的组:氢、C_1烷基、C_2烷基、C_3烷基、C_4烷基;或C_1烷基胺、C_2烷基胺、C_3烷基胺、C_4烷基胺,其中所述胺是伯胺、仲胺或叔胺;n代表0、1、2、3、4的整数;其中n=0意指不存在;Z或Z'中的至少一个是胺;

L是连接基,选自不存在;-O-;或L是一条或两条烃链,各自包含1个-4个碳原子,任选地被羟基基团或胺基团取代;或其任何组合;

K选自-CH-和-N-;

a是选自由0、1、2、3和4组成的组的整数;

b是选自由0、1、2、3和4组成的组的整数;

c是选自由1、2、3和4组成的组的整数;

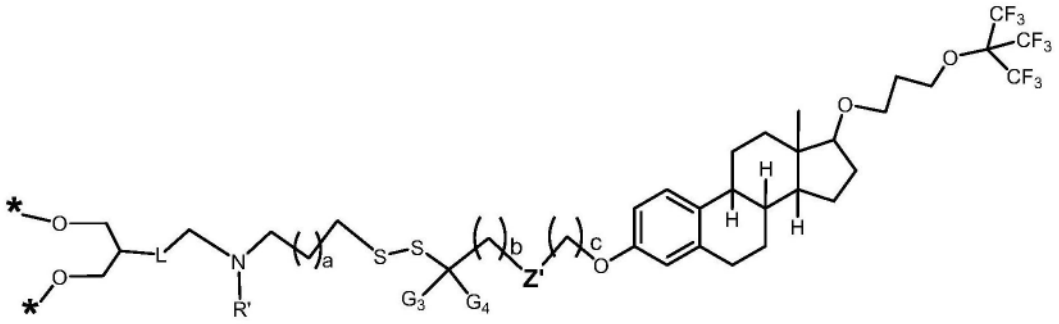
d是选自由2、3和4组成的组的整数;

e、f各自是独立地选自由0、1、2和3组成的组的整数;

*选自由以下组成的组:氢;到D的连接点;到醇的保护基团的连接点;到磷酸酯基团、硫酸酯基团或羧基基团的连接点;其中E、E'或E"中的至少一个在5`末端或3`末端连接至D;并且E、E'或E"中的至少一个在内部位置连接至D。

2.根据权利要求1所述的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(III)中列出的结

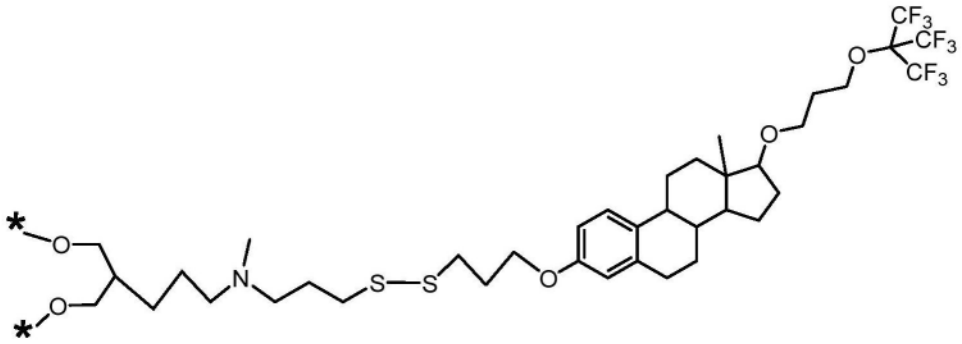
构：



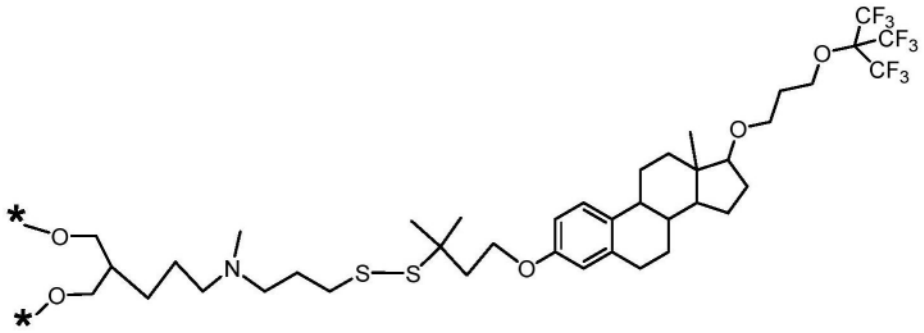
(式 III)

包括由式(III)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐，其中Z'、R'、L、G_3、G_4、a、b、c和*各自如式(II)中所定义。

3.根据权利要求2所述的缀合物，其中E、E'或E"中的至少一个具有式(IV)或式(IVa)中列出的结构：



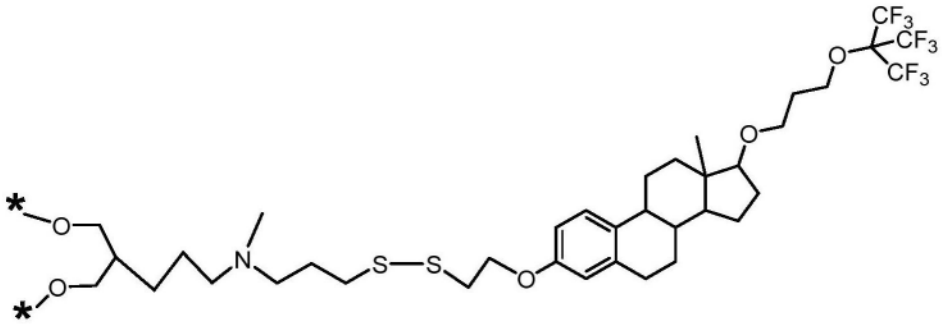
(式 IV)



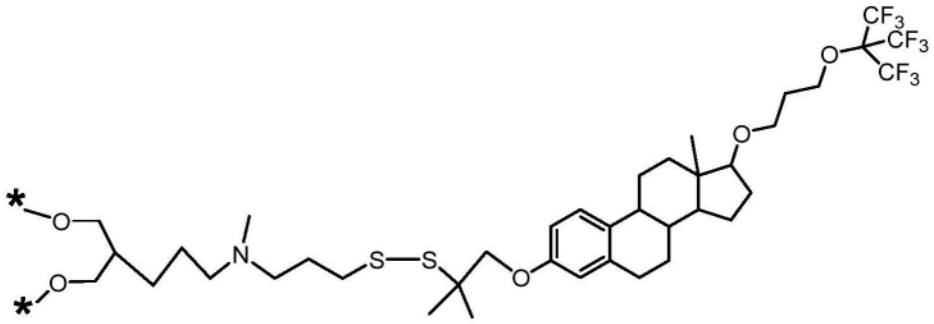
(式 IVa)

包括由式(IV)和式(IVa)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐。

4.根据权利要求2所述的缀合物，其中E、E'或E"中的至少一个具有式(V)或式(Va)中列出的结构：



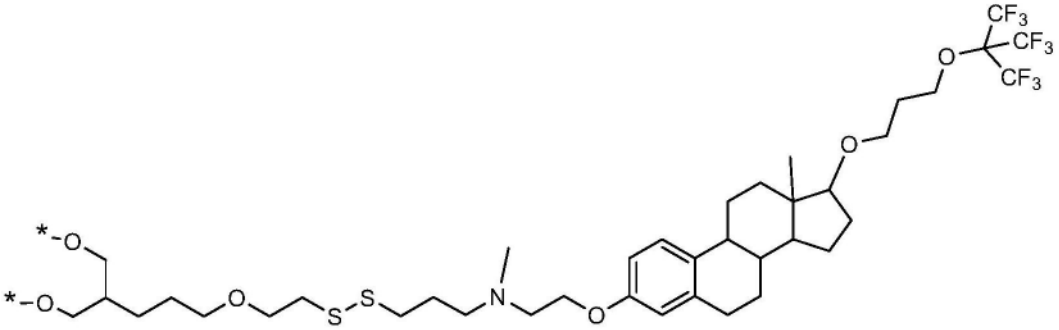
(式 V)



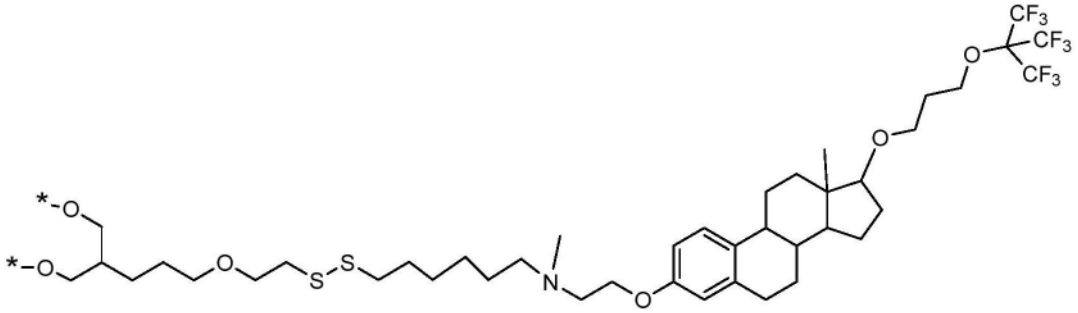
(式 Va)

包括由式(V)或式(Va)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐。

5.根据权利要求1所述的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(VII)或式(VIIa)中列出的结构:



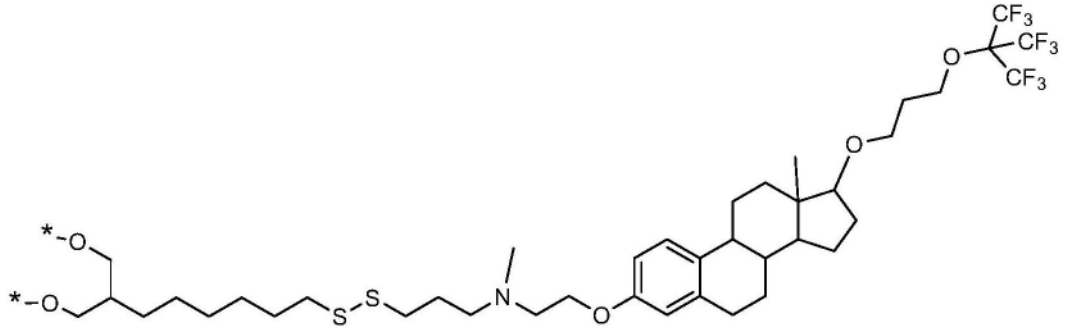
(式 VII)



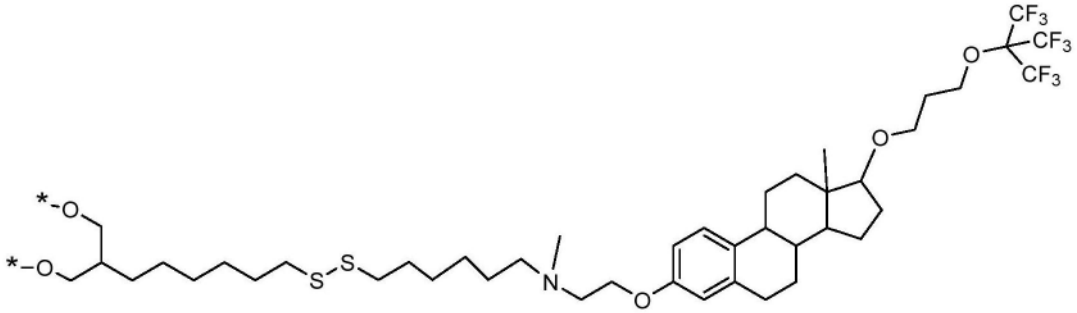
(式 VIIa)

包括由式(VII)或式(VIIa)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐。

6.根据权利要求1所述的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(VIII)或式(VIIIa)中列出的结构:



(式 VIII)



(式 VIIIa)

包括由式(VIII)或式(VIIIa)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐。

7.根据权利要求1所述的缀合物,其中L表示-O-或不存在。

8.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述寡核苷酸选自由siRNA和ASO组成的组。

9.一种药物组合物,包含根据权利要求1所述的缀合物以及药学上可接受的盐或载体。

10.根据权利要求9所述的药物组合物用于制备用于将寡核苷酸递送至生物细胞中的药物的用途,其中所述细胞在培养物中、或在活体动物或人类受试者中;其中所述递送包括使所述生物细胞与所述药物组合物接触。

11.根据权利要求9所述的药物组合物用于制备用于治疗对其有需要的受试者的医学紊乱的药物的用途。

12.根据权利要求9所述的药物组合物用于制备用于将寡核苷酸递送穿过对其有需要的受试者的生物屏障的药物的用途,其中所述生物屏障选自血脑屏障、血眼屏障或血胎屏障;并且其中所述递送包括向所述受试者施用所述药物组合物。

13.一种前体分子,包括根据权利要求1所述的E、E'或E"部分,以及在*处结合至所述E、E'或E"部分的化学部分,其中所述化学部分注定在寡核苷酸合成条件下所述前体分子与所述D缀合过程中被去除。

14.根据权利要求13所述的前体分子,其中注定被去除的各化学部分选自二甲氧基三苯甲基双-(4-甲氧基苯基)苯基甲基](DMT)和氨基磷酸酯。

15.一种缀合物,包含siRNA双链体,所述siRNA双链体在其各个5'或3'末端处并且还在所述siRNA双链体中的内部位置处连接至根据权利要求1所述的根据式(II)、式(III)、式

(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VIIa)、式(VIII)和式(VIIIa)中任一项的E、E’或E”部分。

用于分子的跨膜递送的化合物和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于将分子和大分子递送穿过生物膜至细胞中的化合物、递送系统和方法,注定在体外和体内使用;尤其是在临床环境中使用。

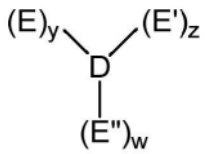
背景技术

[0002] 近年来的重大科学进步中的一项是人类基因组作图的完成,这为药物疗法提供了许多新的靶。这些靶中有许多是细胞内的,并且需要通过大分子药物诸如遗传物质或蛋白质来处理。在该领域中特别有趣的是最近发现的使用小干扰RNA(siRNA)通过RNA干扰来沉默特定基因的表达的能力。RNA干扰基于短(≈19个-27个碱基对)双链RNA序列(命名为siRNA)的使用,能够与细胞生物系统[尤其是Dicer蛋白复合物,其裂解较长的双链RNA以提供siRNA;以及RNA诱导的沉默复合物(RISC)]配合起作用,以抑制翻译并且标记降解特异性mRNA序列,从而抑制在翻译阶段的基因表达。反义寡核苷酸(ASO),为未修饰的或化学修饰的DNA分子的短序列(通常为13个-25个核苷酸),与特定的信使RNA(mRNA)互补,已经被用于抑制特定的疾病相关的靶蛋白的表达和阻断特定的疾病相关的靶蛋白的产生。旨在靶向新的细胞内靶的其他大分子药物是蛋白质药物。然而,尽管这样的医疗护理方法存在巨大的潜在益处,但由于寡核苷酸的相对大且高电荷的结构,将这样的大分子递送至细胞中仍然是重大的挑战。例如,siRNA具有13kDa的平均分子量,并且其携带40个-50个带负电荷的磷酸酯基团。实际上,寡核苷酸的跨膜递送需要克服非常大的能量屏障。因此,对用于在体外和体内两者将大分子药物递送穿过生物膜的新的工具存在未满足的需求。

发明内容

[0003] 本发明聚焦于缀合物及其前体,所述缀合物及其前体包括连接至新的分子递送系统的大分子药物诸如siRNA。这种新的系统特别有利于基因药物诸如siRNA或反义寡核苷酸(ASO)递送穿过生物屏障诸如磷脂细胞膜。这种新的递送系统包括由膜内部电场供能的跨膜递送部分;以及氧化还原敏感的二硫化物部分,该二硫化物部分被设计成在细胞质中还原从而释放货物药物(cargo drug)以在其靶位点发挥其药物作用。它在存在或不存在血浆蛋白质的情况下都工作。

[0004] 在本发明的实施方案中,提供了具有式(I)中列出的结构的缀合物:

[0005] 

式(I)

[0006] 包括由式(I)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物,其中:

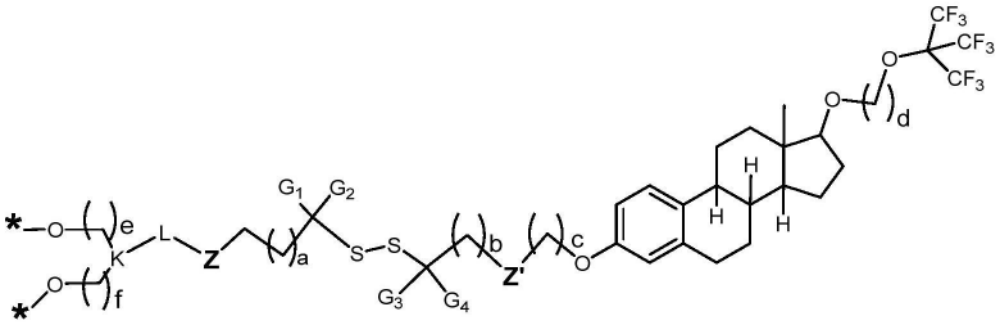
[0007] D是待穿过生物膜递送的药物,选自由以下组成的组:小分子药物、肽、蛋白质以及

天然的或修饰的单链或双链的DNA或RNA、siRNA或ASO；

[0008] y、z和w各自是独立地选自0、1、2、3、4、5或6的整数，其中每当该整数是0时，这意味着相应的E部分不存在；y、z或w中的至少一个不同于0；

[0009] E、E’或E”可以是相同的或不同的，各自独立地具有通式(II)中列出的结构：

[0010]



[0011] **(式 II)**

[0012] 包括由式(II)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物，以及所述盐的溶剂化物和水合物，其中：

[0013] G_1、G_2、G_3和G_4各自独立地选自由以下组成的组：氢、甲基或乙基；至少两个G基团是氢；

[0014] Z和Z’各自独立地选自由以下组成的组：不存在；$-CH_2-$；-NH-；-N(R’)-；-C(H)$(CH_2)_n$[N(R″)(R’″)]-；-N(R’)-C(O)-C(H)$(CH_2)_n$[N(R″)(R’″)]-；其中R’、R″和R″’中的每个独立地选自由以下组成的组：氢、C_1烷基、C_2烷基、C_3烷基、C_4烷基；或C_1烷基胺、C_2烷基胺、C_3烷基胺、C_4烷基胺，其中胺是伯胺、仲胺或叔胺；n代表0、1、2、3、4的整数；其中n＝0意指不存在；Z或Z’中的至少一个是胺；

[0015] L是连接基，选自不存在；醚；酰胺；酯；碳酸酯；氨基甲酸酯基团；一条或两条烃链，各自包含1个-4个碳原子，任选地被羟基基团或胺基团取代；或其任何组合；

[0016] K选自不存在、-CH-和-N-；

[0017] a是选自由0、1、2、3和4组成的组的整数；

[0018] b是选自由0、1、2、3和4组成的组的整数；

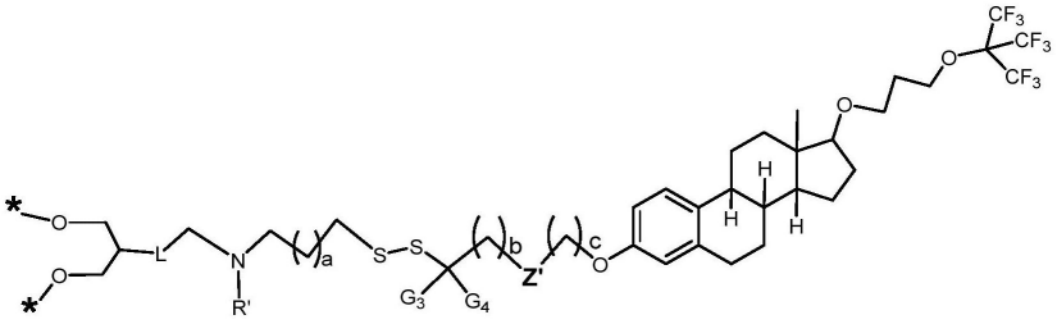
[0019] c是选自由1、2、3和4组成的组的整数；

[0020] d是选自由2、3和4组成的组的整数；

[0021] e、f各自是独立地选自由0、1、2和3组成的组的整数；

[0022] *选自由以下组成的组：氢；到D的连接点；到醇的保护基团的连接点；到磷酸酯基团、硫酸酯基团或羧基基团的连接点；以及到固体支撑体的连接点。

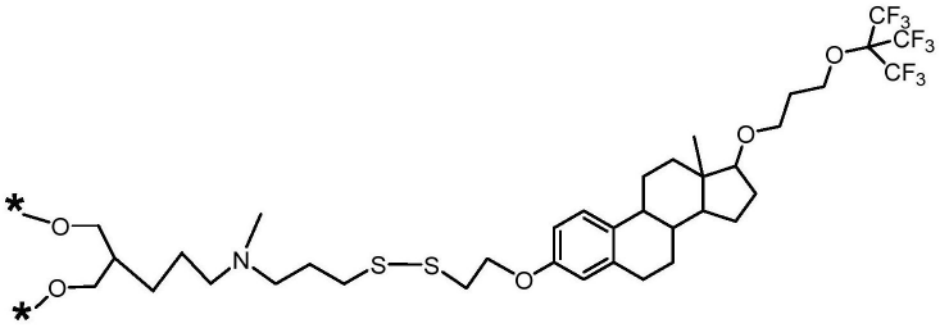
[0023] 在另一个实施方案中，提供了根据式(I)的缀合物，其中E、E’或E”中的至少一个具有式(III)中列出的结构：

[0024] 

(式 III)

[0025] 包括由式(III)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物,其中Z'、R'、L、G_3、G_4、a、b、c和*各自如式(II)中所定义。

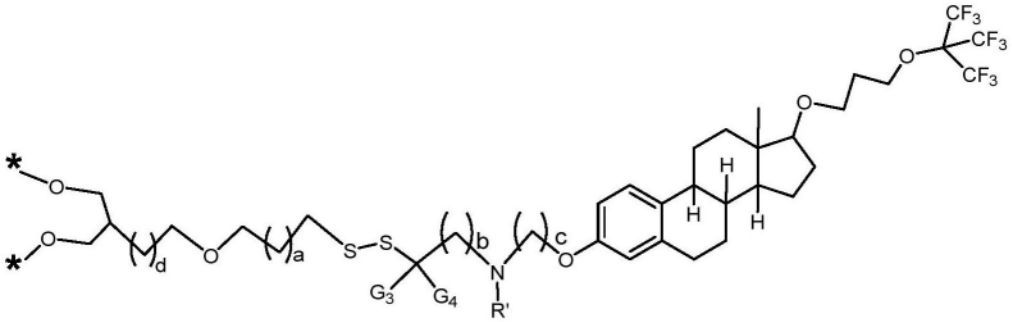
[0026] 在另一个实施方案中,提供了根据式(I)的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(V)中列出的结构:

[0027] 

(式 V)

[0028] 包括由式(V)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物。

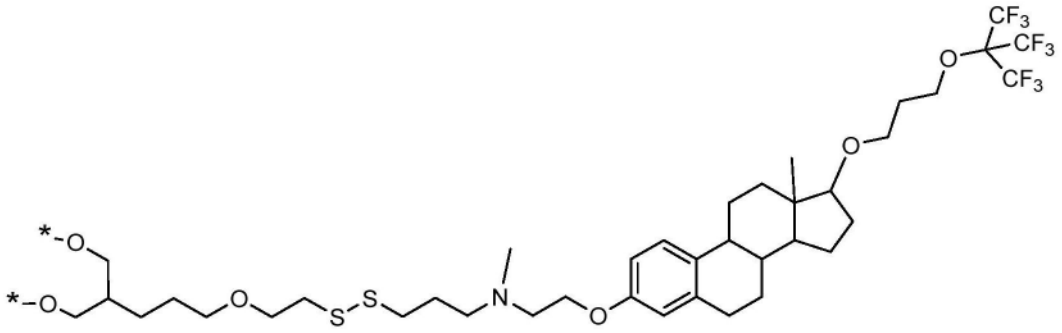
[0029] 在仍另一个实施方案中,本发明提供了根据式(I)的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(VI)中列出的结构:

[0030] 

(式 VI)

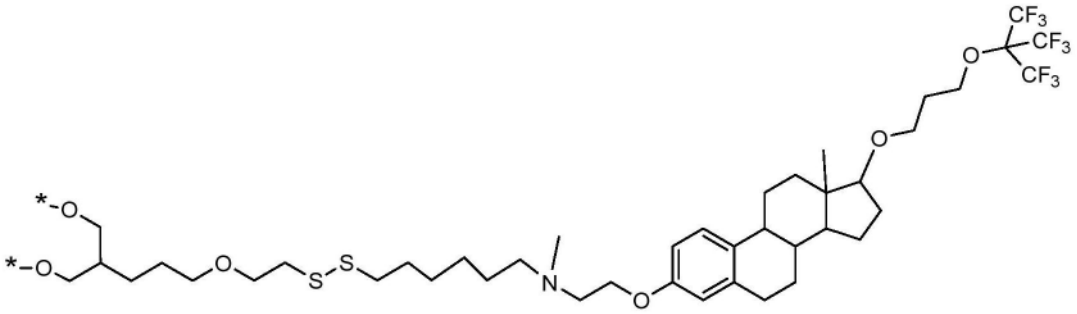
[0031] 包括由式(VI)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物。其中R'、G_3、G_4、a、b、c、d和*各自如式(II)中所定义。

[0032] 在更具体的实施方案中,提供了根据式(I)的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(VII)或式(VIIa)中列出的结构:



(式 VII)

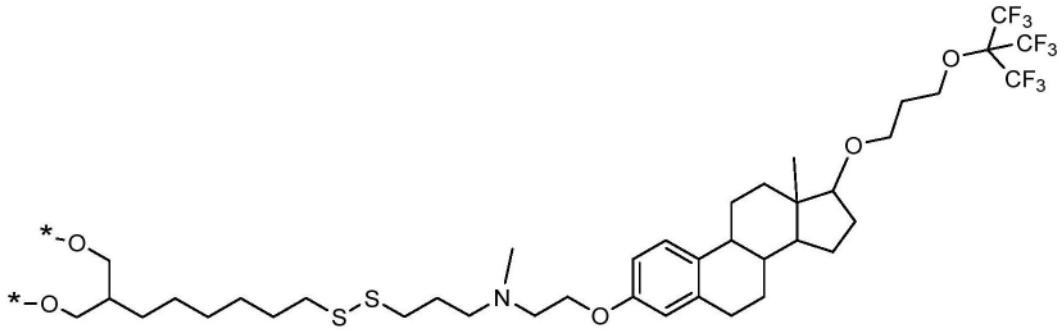
[0033]



(式 VIIa)

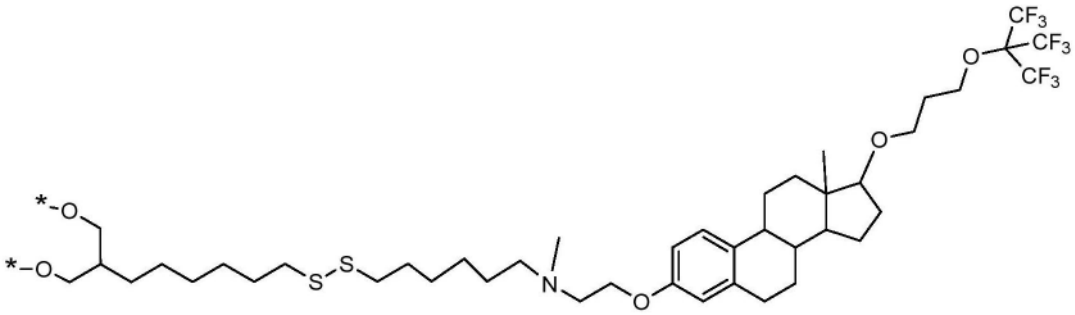
[0034] 包括由式(VII)或式(VIIa)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物。根据式(VII)的E部分被命名为Apo-Si-K-93-A。

[0035] 在另一个实施方案中,本发明提供了根据式(I)的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(VIII)或式(VIIIa)中列出的结构:



(式 VIII)

[0036]



(式 VIIIa)

[0037] 包括由式(VIII)或式(VIIIa)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物。根据式(VIIIa)的E部分被命名为Apo-Si-K-63-A。

[0038] 本发明的一些实施方案涉及用于在体外或体内将药物递送穿过生物膜至细胞中的方法,该方法包括使细胞与如本文描述的缀合物接触。

[0039] 另一个实施方案涉及用于治疗有需要的患者中的医学紊乱的方法;该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的药物组合物,该药物组合物包含如本文描述的缀合物。

[0040] 本发明的另一个实施方案涉及用于在医疗实践,例如,在人类医学或兽医学中使用的如本文描述的缀合物。

[0041] 本发明的另一个实施方案涉及式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中列出的部分E、E'或E"中的一种或更多种和药物用于制备用于治疗有相应需要的患者中的医学紊乱的如本文描述的缀合物的用途。本发明的另一个实施方案涉及如本文描述的缀合物在制备用于治疗有相应需要的患者中的医学紊乱的药物中的用途。在本发明的一些实施方案中,医学紊乱是癌症。在其他实施方案中,缀合物将具有抗感染性质,并且因此对治疗感染性疾病诸如细菌感染或病毒感染将是有用的。

附图说明

[0042] 图1a、图1b和图1c展示了如下:图(1a)示出了本发明的缀合物,该缀合物包括两个E部分,各自位于siRNA双链体的链的5'末端;图(1b)示出了与膜相互作用后的缀合物,其中siRNA平行于膜表面,处于诱导外部膜小叶的应变和结构扰动的位置;图(1c)示出了由于应变和结构扰动由缀合物诱导的胞吞。箭头例示了胞吞小泡。

[0043] 图2a、图2b、图2c和图2d例示了本发明的siRNA缀合物的结构,该siRNA缀合物包括三个E部分。图(2a)示出了在细胞外空间的完整的缀合物;图(2b)展示了在还原条件下在细胞质内E部分的裂解;图(2c)展示了RNA双链体的裂解,生成21/23-核苷酸双链体,从而也去除了指导链(Guide)的残余部分;图(2d)展示了通过解旋酶去除过客链(passenger strand),以及E部分的残余的两个残端(stump),留下指导链,准备完整地递送至RISC复合物中。

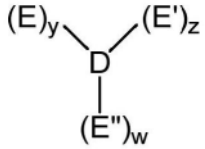
[0044] 图3展示了在本发明的缀合物与10% BSA孵育后,蛋白质结合的级分和无蛋白质的级分(箭头)。蛋白酶K(PK)的处理回收了所有蛋白质结合的缀合物。

[0045] 图4展示了在与还原型谷胱甘肽孵育后(1mM持续2小时),本发明的缀合物的还原裂解(箭头)。

具体实施方式

[0046] 本发明聚焦于缀合物及其前体,所述缀合物及其前体包括连接至分子递送系统的大分子药物,诸如但不限于寡核苷酸,在一些实施方案中,寡核苷酸可以是siRNA,所述分子递送系统被设计用于将药物递送穿过生物膜和生物屏障。这种新的递送系统包括由膜内部电场供能的跨膜递送部分以及氧化还原敏感的二硫化物部分,该二硫化物部分被设计成在细胞质中还原,从而释放货物药物以在其靶位点发挥其药物作用。它在存在或不存在血浆蛋白质的情况下都工作。

[0047] 在本发明的实施方案中,提供了具有式(I)中列出的结构的缀合物:

[0048] 

式(I)

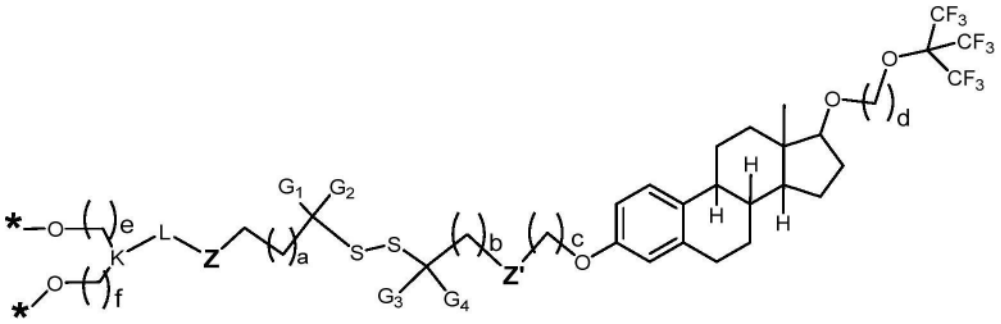
[0049] 包括由式(I)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物,其中:

[0050] D是待穿过生物膜递送的药物,选自由以下组成的组:小分子药物、肽、蛋白质、以及天然的或修饰的单链或双链的DNA或RNA、siRNA或ASO;

[0051] y、z和w各自是独立地选自0、1、2、3、4、5或6的整数,其中每当该整数是0时,这意味着相应的E部分不存在;y、z或w中的至少一个不同于0;

[0052] E、E'或E"可以是相同的或不同的,各自独立地具有通式(II)中列出的结构:

[0053]



(式 II)

[0054] 包括由式(II)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物,其中:

[0055] G_1、G_2、G_3和G_4各自独立地选自由以下组成的组:氢、甲基或乙基;至少两个G基团是氢;

[0056] Z和Z'各自独立地选自由以下组成的组:不存在;-CH_2-;-NH-;-N(R')-;-C(H)$(CH_2)_n$[N(R″)(R'″)]-;-N(R')-C(O)-C(H)$(CH_2)_n$[N(R″)(R'″)]-;其中R'、R″和R'″中的每个独立地选自由以下组成的组:氢、C_1烷基、C_2烷基、C_3烷基、C_4烷基;或C_1烷基胺、C_2烷基胺、C_3烷基胺、C_4烷基胺,其中胺是伯胺、仲胺或叔胺;n代表0、1、2、3、4的整数;其中n=0意指不存在;Z或Z'中的至少一个是胺;

[0057] L是连接基,选自不存在;醚;酰胺;酯;碳酸酯;氨基甲酸酯基团;一条或两条烃链,各自包含1个-4个碳原子,任选地被羟基基团或胺基团取代;或其任何组合;

[0058] K选自不存在、-CH-和-N-;

[0059] a是选自由0、1、2、3和4组成的组的整数;

[0060] b是选自由0、1、2、3和4组成的组的整数;

[0061] c是选自由1、2、3和4组成的组的整数;

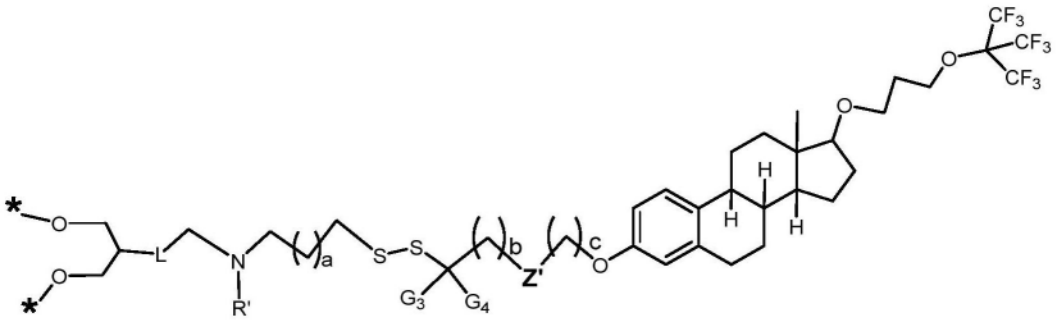
[0062] d是选自由2、3和4组成的组的整数;

[0063] e、f各自是独立地选自由0、1、2和3组成的组的整数;

[0064] *选自由以下组成的组:氢;到D的连接点;到醇的保护基团的连接点;到磷酸酯基团、硫酸酯基团或羧基基团的连接点;以及到固体支撑体的连接点。

[0065] 在另一个实施方案中,提供了根据式(I)的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(III)中列出的结构:

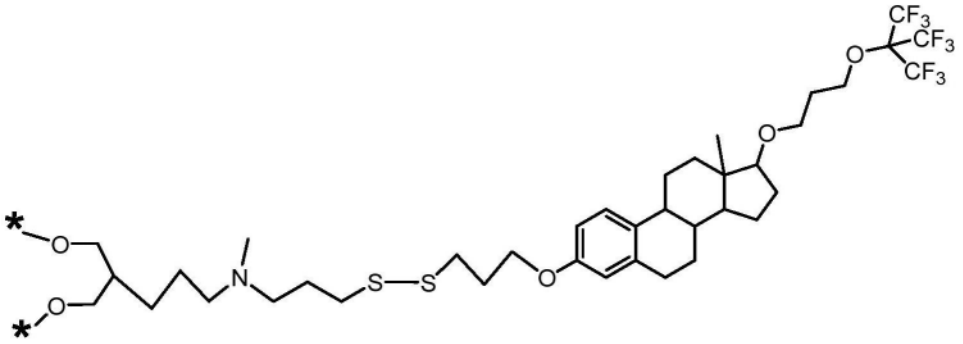
[0066]



[0067] (式 III)

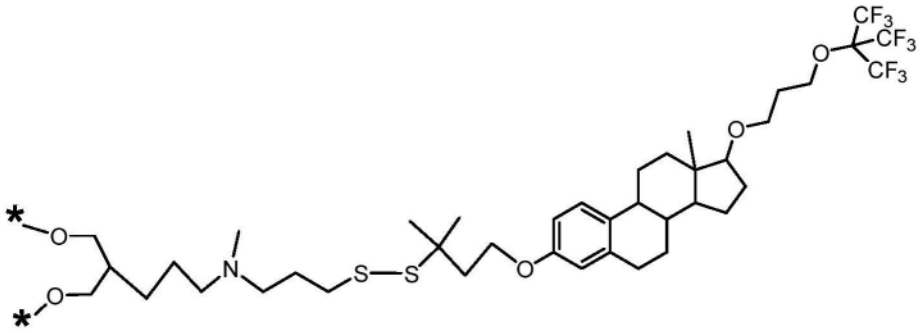
[0068] 包括由式(III)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物,其中Z'、R'、L、G_3、G_4、a、b、c和*各自如式(II)中所定义。

[0069] 在另一个实施方案中,提供了根据式(I)的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(IV)或式(IVa)中列出的结构:



(式 IV)

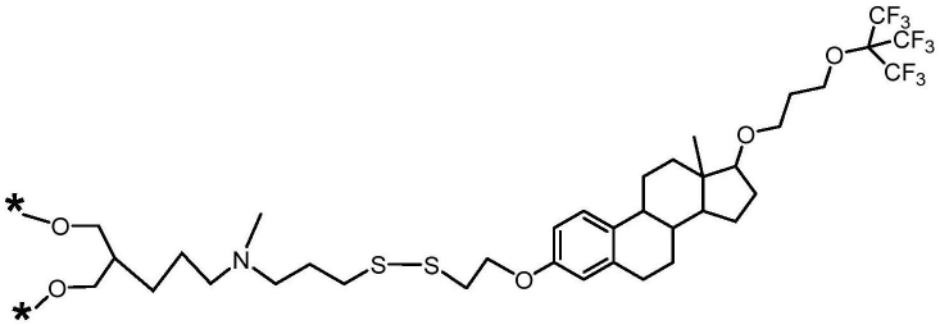
[0070]



(式 IVa)

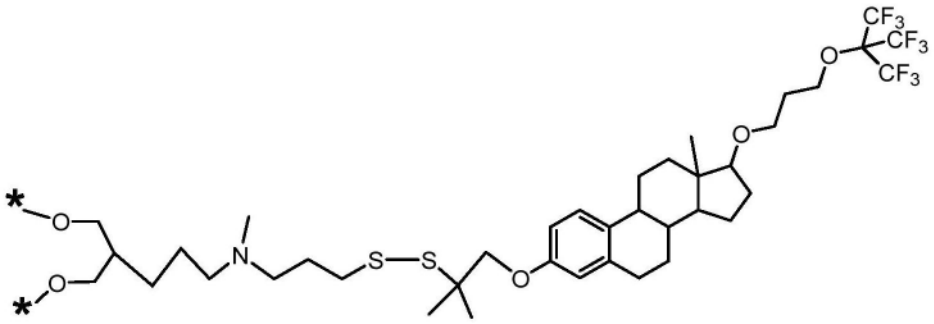
[0071] 包括由式(IV)和式(IVa)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物。

[0072] 在另一个实施方案中,提供了根据式(I)的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(V)或式(Va)中列出的结构:



(式 V)

[0073]

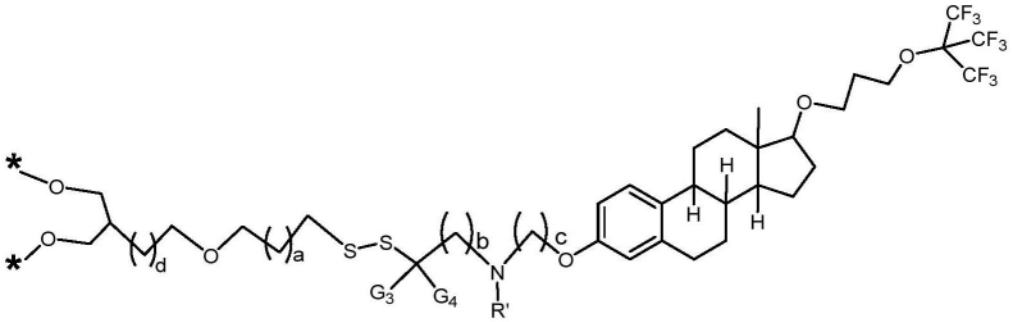


(式 Va)

[0074] 包括由式(V)或式(Va)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物。

[0075] 在仍另一个实施方案中,本发明提供了根据式(I)的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(VI)中列出的结构:

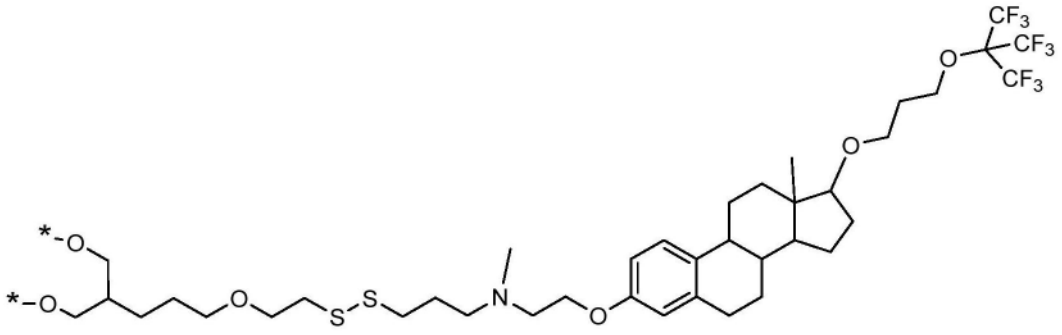
[0076]



(式 VI)

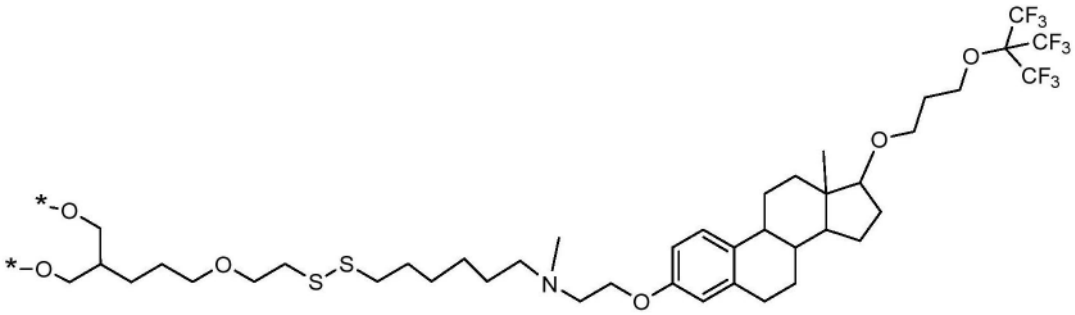
[0077] 包括由式(VI)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物。其中R'、G_3、G_4、a、b、c、d和*各自如式(II)中所定义。

[0078] 在更具体的实施方案中,提供了根据式(I)的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(VII)或式(VIIa)中列出的结构:



(式 VII)

[0079]

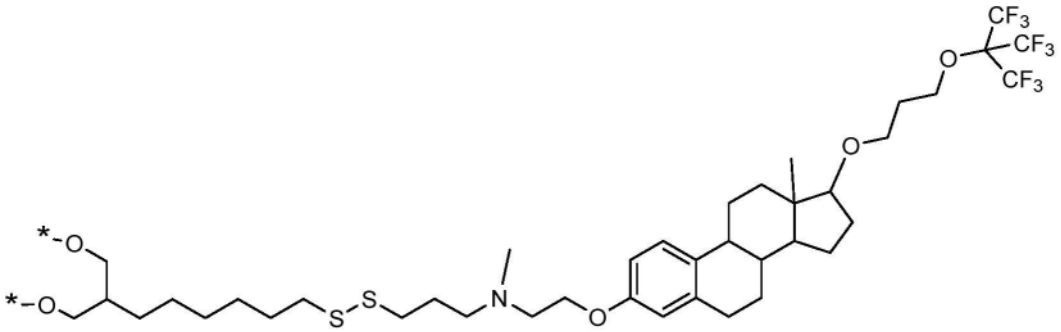


(式 VIIa)

[0080] 包括由式(VII)或式(VIIa)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物。根据式(VII)的E部分被命名为Apo-Si-K-93-A。

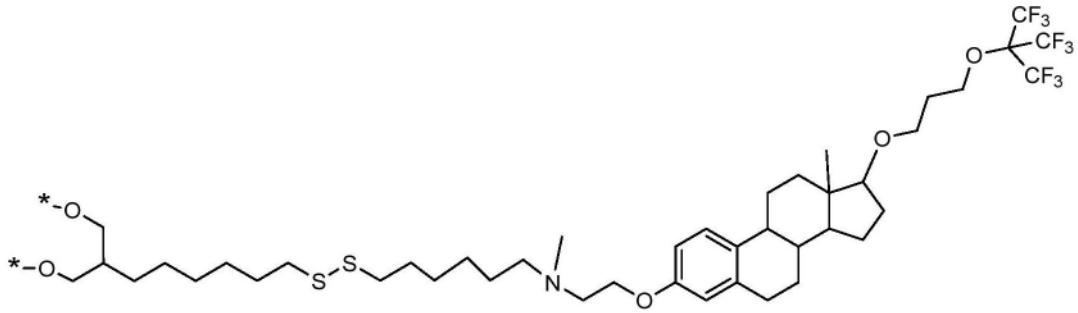
[0081] 在另一个实施方案中,本发明提供了根据式(I)的缀合物,其中E、E'或E"中的至少一个具有式(VIII)或式(VIIIa)中列出的结构:

[0082]



(式 VIII)

[0083]



(式 VIIIa)

[0084] 包括由式(VIII)或式(VIIIa)中列出的结构表示的化合物的药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物和金属螯合物,以及所述盐的溶剂化物和水合物。根据式(VIIIa)的E部分被命名为Apo-Si-K-63-A。

[0085] 待通过本发明的缀合物递送的药物(即,部分D)可以是小分子药物或大分子,诸如肽、蛋白质或寡核苷酸(例如,单链或双链的RNA或DNA)。在本发明的实施方案中,待递送的大分子包括用于基因沉默的RNA链,即,siRNA(小干扰RNA)、微RNA(miRNA)或被设计成用作反义寡核苷酸(ASO)的DNA序列。

[0086] 本发明的实施方案涉及新的缀合物,所述缀合物包括用于药物穿过生物膜进入细胞质或药物通过生物屏障的递送系统,所述生物屏障诸如血脑屏障(BBB)、血眼屏障(BOB)或血胎屏障(胎盘血屏障)。

[0087] 在本发明的上下文中,术语“醇的保护基团”指的是附接至羟基基团,以便在某些化学反应期间“掩蔽”羟基基团,并且在之后有可能去除的如本领域已知的化学基团。这样的保护基团的实例是乙酰基(Ac)、苯甲酰基(Bz)、苄基(Bn)、β-甲氧基乙氧基甲基醚(MEM)、二甲氧基三苯甲基、[双-(4-甲氧基苯基)苯基甲基](DMT)、甲氧基甲基醚(MOM)、甲氧基三苯甲基[(4-甲氧基苯基)二苯基甲基](MMT)、对甲氧基苄基醚(PMB)、新戊酰基(Piv)、四氢吡喃基(THP)、四氢呋喃(THF)、三苯甲基(三苯基甲基,Tr)、甲硅烷基醚[例如,三甲基甲硅烷基(TMS)醚、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)醚、三异丙基甲硅烷基氧基甲基(TOM)醚和三异丙基甲硅烷基(TIPS)醚]、乙氧基乙基醚(EE)、亚磷酰胺、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)。

[0088] 在本发明的上下文中,术语“前体”涉及附接至化学基团的本发明的E、E’或E”,所述化学基团在缀合物的合成期间注定被去除或修饰。这样的去除或修饰可以在合成的不同阶段发生;例如但不限于,在将所述E、E’或E”部分附接至大分子药物诸如寡核苷酸药物期间。

[0089] 本发明的实施方案还涉及根据本发明的缀合物用于治疗有相应需要的受试者中的医学紊乱的用途,所述缀合物包括治疗有用的药物,诸如蛋白质或寡核苷酸(例如,siRNA或ASO)。医学紊乱可以是但不限于退行性紊乱,癌症、创伤性损伤、毒性损伤或缺血性损伤、感染或免疫介导的紊乱;其中特定的蛋白质在疾病病因学或发病机制中起作用,并且其中通过siRNA或反义机制调节相应基因的表达、或通过治疗性蛋白质诸如通过抗体或通过蛋白质替代疗法调节相应蛋白质的活性,可以在抑制疾病相关的过程或在治疗疾病的潜在原因中具有有益效果。

[0090] 例如,根据本发明的实施方案的缀合物可以用作反义疗法或siRNA疗法,其是医学

治疗的形式,该形式包括施用单链或双链的核酸链(DNA、RNA或化学类似物),所述核酸链结合至编码特定蛋白质的DNA序列或结合至相应的信使RNA(mRNA),通过该信使RNA发生向蛋白质的翻译。该治疗可以起作用以抑制相应基因的表达,从而防止可能在疾病的病因学或发病机制中起作用的相应的疾病相关的蛋白质的产生。可选择地,本发明的缀合物可以包括治疗性蛋白质或蛋白质/核酸复合物,诸如Cas9蛋白。

[0091] 在本发明的上下文中,术语“药物(drug)”或“药物(medicament)”涉及这样的化学物质,当被施用至患有疾病的患者时,该化学物质能够对患者发挥有益效果。有益效果可以是症状的改善,或在疾病过程中起作用的剂或物质的抵消效果。药物可以包括被施用以抑制基因表达的小分子或大分子,诸如蛋白质或单链或双链的RNA或DNA。尤其是,药物可以包括siRNA或ASO。在一些实施方案中,药物旨在治疗退行性紊乱、癌症、缺血性损伤、感染性损伤、毒性损伤或免疫介导的紊乱。

[0092] 根据本发明的术语“生物膜”指的是与生物系统相关的任何磷脂膜。这样的磷脂膜的实例是细胞的质膜、细胞内膜或生物屏障,诸如血脑屏障(BBB)、血眼屏障(BOB)或血胎盘屏障。

[0093] 本发明的实施方案提供了药物组合物,该药物组合物包含本文描述的缀合物和药学上可接受的载体或盐。根据一些实施方案,本发明的缀合物和药物组合物可以在体内、在临床环境中使用。

[0094] 本发明的其他实施方案包括本发明的缀合物、或包含本发明的缀合物的药物组合物,用于在治疗有相应需要的患者中的医学紊乱中使用。本发明的另外的实施方案包括本发明的缀合物在制备用于治疗有相应需要的患者中的医学紊乱的药物组合物中的用途。在一些实施方案中,医学紊乱是癌症。

[0095] 根据本发明的实施方案的缀合物在改善siRNA、ASO、治疗性蛋白质诸如抗体通过细胞膜或通过生物屏障诸如血脑屏障(BBB)的递送,从而改善大分子药物在一个或更多个方面的性能,诸如例如功效、毒性或药代动力学中可以是有利的。

[0096] 本发明的缀合物被设计成相比于其他药物递送系统是有利的重要方面可以涉及优化的有利的对白蛋白的结合亲和力,在一方面,这能够延长在体内的停留时间,同时提供遍及全身的广泛的分布,并且赋予免受血浆裂解酶降解的保护;而在另一方面,能够使缀合物与白蛋白有效分离,以用于优先结合至磷脂细胞膜,随后递送穿过膜至细胞中。

[0097] 本发明的缀合物被设计成相对于其他药物递送系统是有利的另一个重要方面可以涉及它们包括氧化还原敏感的部分,即,二硫化物基团,氧化还原敏感的部分提供了细胞质中构建体的选择性裂解,释放大分子药物,以在其靶位点发挥其药理学作用。

[0098] 在本发明的实施方案中,药物是选自由siRNA、ASO或治疗性蛋白质组成的组的大分子。

[0099] 在本发明的实施方案中,提供了药物组合物,该药物组合物包含本发明的缀合物和药学上可接受的盐或载体,所述缀合物具有式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项列出的结构。

[0100] 在本发明的实施方案中,提供了用于将药物递送至生物细胞中的方法,其中所述细胞在培养物中、或在活体动物中、或在人类受试者中;该方法包括使细胞与本发明的缀合物接触。

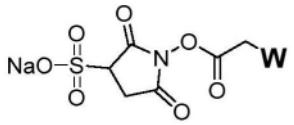
[0101] 在本发明的实施方案中,提供了方法,其中生物膜选自由细胞膜和生物屏障组成的组,其中所述生物屏障选自血脑屏障、血眼屏障或血胎屏障。

[0102] 在本发明的实施方案中,提供了缀合物,其中E、E'或E"各自独立地具有附接至药物的式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项列出的结构。

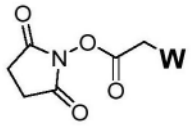
[0103] 如上文提及的,本发明的范围还包括被称为"前体"的分子。在本发明的上下文中,"前体"是这样的分子,该分子包括连接至化学基团的根据式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项的部分E、E'或E"中的任一种,所述化学基团在缀合物的合成期间注定被去除或修饰,即,在将D部分附接至E、E'或E"部分的阶段中被去除或修饰。这样的化学基团的实例是亚磷酰胺、叠氮化物、乙炔、[二甲氧基三苯甲基双-(4-甲氧基苯基)苯基甲基](DMT)或N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基团。

[0104] 在本发明的更具体的实施方案中,其中D是寡核苷酸药物(例如siRNA),本发明提供了前体,其中在E、E'或E"与D缀合期间注定被去除或修饰的化学部分包括亚磷酰胺和/或DMT。

[0105] 又另一种前体用于将E、E'或E"附接至作为蛋白质药物的D。在所述前体中,E、E'或E"部分被连接至以下结构A或B中的一个:

[0106] 

A



B

[0107] 其中W选自根据式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项的E、E'或E"。所述前体旨在经由其N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)部分结合至蛋白质的赖氨酸侧链的胺基团。

[0108] 本发明的实施方案还可以包括药物组合物,该药物组合物包含根据式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项的缀合物,以及药学上可接受的盐或载体。

[0109] 本发明还包括用于在体外或体内特异性抑制基因表达的方法。在一个实施方案中,该方法可以包括使用根据式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项的缀合物、或相应的药物组合物,其中D是被设计成沉默特定基因的表达的siRNA或ASO。在一些实施方案中,基因编码在疾病的病因学或发病机制中具有作用的致病蛋白质。在一些实施方案中,D是治疗性蛋白质。

[0110] 在本发明的实施方案中,提供了缀合物,该缀合物包括siRNA,该siRNA在其各个末端处连接至根据式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项的E、E'或E"部分。

[0111] 在本发明的另一个实施方案中,提供了缀合物,该缀合物包括siRNA,该siRNA在其各个末端处并且还在siRNA双链体中的内部位置处连接至根据式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项的E、E'或E"部分。

[0112] 在本发明的又另一个实施方案中,提供了用于在磷脂膜的外部小叶中诱导应变和焦点结构扰动的方法;所述方法包括使本发明的缀合物与磷脂膜相互作用,其中缀合物包含siRNA双链体,该siRNA双链体在其各个末端处并且可能还在siRNA双链体中的内部位置处连接至各自具有根据式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项的结构的E、E'或E"部分(即,总共2个-3个部分)。

[0113] 由于本发明的缀合物的该结构,siRNA平行于膜表面接近膜,其中E、E'或E"部分朝向膜芯、垂直于膜表面定向(在图1a、图1b和图1c中展示)。高度带负电荷的siRNA与膜表面的产生的接近由此诱导磷脂膜的外部小叶的应变和焦点结构扰动。这样的外部膜应变和结构扰动的诱导可以是有用的,尤其是,对于胞吞的开始,或对于携带siRNA的缀合物从一个膜小叶到另一个膜小叶的通过(翻转(flip-flop))的诱导。两个过程对于siRNA的跨膜递送的开始和/或传播可能是高度有用的。所述磷脂膜可以是任何磷脂膜,包括但不限于在体外或体内的脂质体或细胞膜。

[0114] 根据本发明的实施方案的缀合物可以被用于治疗医学紊乱。本发明的实施方案包括用于医学治疗的方法,该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的药物组合物,该药物组合物包含根据式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项的缀合物;其中D是对治疗相应的医学紊乱有用的药物。

[0115] 在一个实施方案中,该方法用于用siRNA或ASO进行的基因治疗,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的药物组合物,该药物组合物包含根据式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项的本发明的缀合物;其中D是在抑制在特定患者的疾病中起作用的基因的表达中有用的siRNA、ASO或治疗性蛋白质。

[0116] 在本发明的另一个实施方案中,本发明包括用于通过治疗性蛋白质对疾病进行医学治疗的方法,其中D是待穿过生物磷脂膜递送至细胞中或通过生物屏障诸如血脑屏障递送的蛋白质。所述细胞在体外细胞培养物中、或在活体动物或人类受试者体内。在一些实施方案中,细胞是赘生性细胞。在一些实施方案中,赘生性细胞是肿瘤细胞。在一些实施方案中,赘生性细胞是转移中的细胞。细胞可以是真核细胞、被致癌剂转染的真核细胞、人类细胞、作为癌前细胞的细胞或其任何组合。细胞可以在体外,即,在细胞培养物中,离体的,或在体内,即在活体动物或人类受试者中。

[0117] 在本发明的又另一个实施方案中,D是作为替代疗法被施用的蛋白质,例如,替代突变的、功能障碍的蛋白质,从而满足生理需求。在另一个实施方案中,D是在基因调节中具有作用的蛋白质,尤其包括在DNA或RNA编辑(添加、破坏或改变特定基因的序列)中具有作用的蛋白质。在一个实施方案中,所述蛋白质可以是CRISPR(成簇的规律间隔的短回文重复)相关的蛋白质的成员。具体地,所述蛋白质可以是或可以包括可能装载有其指导寡核苷酸序列的Cas9蛋白(CRISPR相关蛋白9)、RNA指导的DNA核酸酶或其类似物。

[0118] 在本发明的实施方案中的一个中,描述了用于基因治疗医学紊乱的方法,其中所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的药物组合物,该药物组合物包含根据式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或

式(VIIIa)中任一项的缀合物;其中D是与适当的指导寡核苷酸一起施用的CRISPR蛋白,诸如Cas9,从而实现将装载有相应的指导寡核苷酸的蛋白质递送至细胞中,在细胞中CRISPR蛋白可以发挥其基因组编辑活性。在此上下文中,指导寡核苷酸是这样的RNA或DNA的序列,其将Cas9蛋白指导至DNA上的特定基因座(位置),以便在该位点诱导双链DNA裂解,从而能够修复遗传物质中的局部缺陷。在Cas9的情况下,指导寡核苷酸是短的RNA的区段,该短的RNA的区片段的序列与靶DNA基因座的序列互补。

[0119] 因此,根据本发明的实施方案的缀合物和相应的药物组合物以及相应的方法可以是有益的,尤其是,在选自除其他以外,癌症、毒性损伤、缺血性疾病、感染性疾病、蛋白质储存疾病、创伤、免疫介导的疾病或退行性疾病的医学紊乱的治疗中可以是有益的。

[0120] 因此,本发明的实施方案是用于治疗医学紊乱的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的药物组合物,该药物组合物包含根据式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中任一项的缀合物,其中D是对治疗所述医学紊乱有用的药物。

[0121] 根据一些实施方案,医学紊乱是癌症。如本文使用的,术语“癌症”指的是显现致癌细胞的典型特征的细胞的存在,致癌细胞的典型特征诸如不受控制的增殖、专门化功能的损失、永生、显著的转移潜能、抗凋亡活性的显著增加、快速生长和增殖速率或某些特征形态和细胞标志物。通常,癌细胞呈肿瘤的形式,在动物中局部存在,或作为独立的细胞例如白血病细胞在血流中循环。

[0122] 在神经紊乱的领域中,根据本发明的实施方案的缀合物尤其在治疗神经退行性紊乱中可以是有用的,所述神经退行性紊乱诸如阿尔茨海默病、运动神经元病、帕金森病、亨廷顿病、多发性硬化和克-雅病。

[0123] 在感染性紊乱的领域中,根据本发明的实施方案的缀合物尤其对于将抗生素或抗病毒剂递送至相应的细菌或病毒病原体中可以是有用的。因此,本发明的缀合物可以具有抗感染性质,因此对治疗感染性疾病诸如细菌感染或病毒感染是有用的。

[0124] 在其他实施方案中,本发明涉及使用本发明的化合物以增强化学化合物递送穿过磷脂膜至细胞中。取决于附接的化学化合物和期望的适应症,这样的递送可以具有各种有用的用途。例如,在植物中,这样的递送可以有助于改善作物质量和数量;尤其通过改善植物的遗传,或通过根除各种昆虫、细菌或真菌。

[0125] 这样的递送对将抗生素或抗病毒剂递送至相应的细菌或病毒病原体也可以是有用的。因此,本发明的缀合物可以具有抗感染性质,因此对治疗感染性疾病诸如细菌感染或病毒感染是有用的。因此,本发明的实施方案是连接至抗病毒药物或抗细菌药物的E、E’或E”。这样的药物尤其可以是遗传序列,旨在与感染因子的遗传物质相互作用,从而干扰其复制或代谢,并且影响其存活。

[0126] 本发明的缀合物,经由它们递送穿过生物膜的性质,对治疗多种医学紊乱也可以是有用的,所述医学紊乱诸如由缺血性损伤、毒性损伤、创伤性损伤诱导的紊乱,或发病机制的遗传病因学的医学紊乱。

[0127] 实施例

[0128] 现在将描述一些实施例,以便进一步说明本发明,并且以便表明本发明的实施方案可以如何在实践中实施。

[0129] 实施例1:用于合成根据本发明的实施方案的缀合物的一般方法,其中D部分是寡核苷酸:

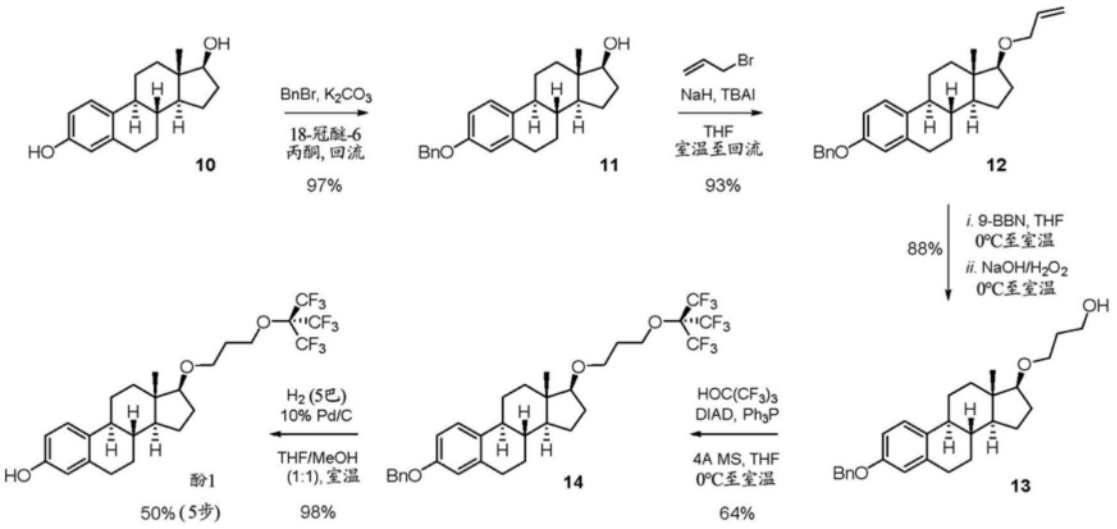
[0130] 首先,基于基因在疾病病因学或发病机制中的作用来选择待沉默的基因。然后,基于本领域已知的生物信息学方法,设计并确定待掺入缀合物中的核苷酸序列(对于RISC底物通常是19个-21个碱基对的双链RNA,或对于Dicer底物通常是25个-29个碱基对的双链RNA)。

[0131] 合成以3'至5'的方向进行。使用亚磷酰胺结构单元应用固相合成,该亚磷酰胺结构单元衍生自保护的2'-脱氧核苷(dA、dC、dG和T)、核糖核苷(A、C、G和U)或化学修饰的核苷例如LNA(锁核酸)或BNA(桥接核酸)。结构单元以由期望的siRNA的序列确定的顺序依次偶联至生长的寡核苷酸链。

[0132] 在构建寡核苷酸后,添加一种或更多种本发明的E类型作为寡核苷酸的结构单元的一部分。首先,E部分以如上文描述的其前体形式添加。本发明的化合物的主要优点是它们提供了如式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(Va)、式(VI)、式(VII)、式(VIIa)、式(VIII)或式(VIIIa)中描述的均匀的连接部分,用于将E、E'或E"部分连接至寡核苷酸的5`末端、寡核苷酸的3`末端或沿着寡核苷酸的内部位置。尤其是,这样的前体部分可以包括本领域已知的羟基的任何保护基团、亚磷酰胺、叠氮化物、乙炔、[二甲氧基三苯甲基双-(4-甲氧基苯基)苯基甲基](DMT)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基团。在链的组装完成后,将产物从固体支撑体释放到溶液中,脱保护并且收集。然后通过高效液相色谱法(HPLC)分离期望的缀合物,以获得高纯度的期望的缀合的寡核苷酸。在siRNA的情况下,互补的RNA链中的每一条被单独地合成,并且然后两条链的退火在如本领域已知的标准条件下进行,以产生期望的双链siRNA。

[0133] 实施例2:用于合成甾醇1:本发明的E部分的通用结构单元的方法:起始材料全氟叔丁醇是商业可得的。合成从雌二醇开始,并且根据方案1进行:

[0134]



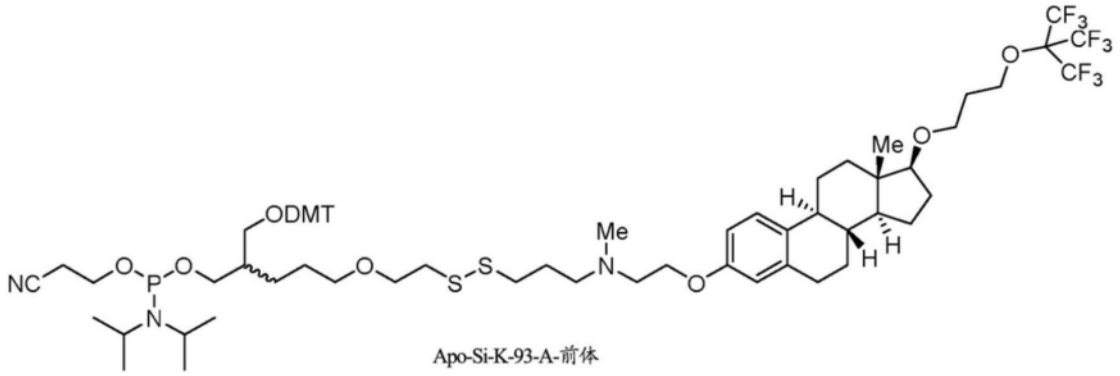
[0135] 方案1:

[0136] 雌二醇被苄基基团保护以提供化合物11。醇11(25.6g)在优化的反应条件下的烯丙基化(烯丙基溴、NaH、催化剂四正丁基溴化铵(TBAI)、四氢呋喃(THF),回流,16h)提供了作为白色固体的烯丙基醚12(21.85g,77%)(通过在庚烷和MeOH中连续研磨纯化)。用9-硼双环[3.3.1]壬烷(9-BBN)对末端烯烃(21.8g)进行的区域选择性硼氢化,在标准的氧化后

处理(NaOH/H_2O_2)后,提供了醇13。醇13(13.6g)与过量的全氟叔丁醇在优化的反应条件[偶氮二羧酸二异丙酯(DIAD)、PPh_3、4A分子筛(MS)、THF、室温、16h]下的Mitsunobu反应提供了期望的醚14。化合物14使用THF和2,2,2-三氟乙醇的混合物(1:1)作为溶剂(5巴,Parr反应器)经受催化氢化(10% Pd/C,室温)以提供(在约18h之后)作为灰白色固体的酚1。

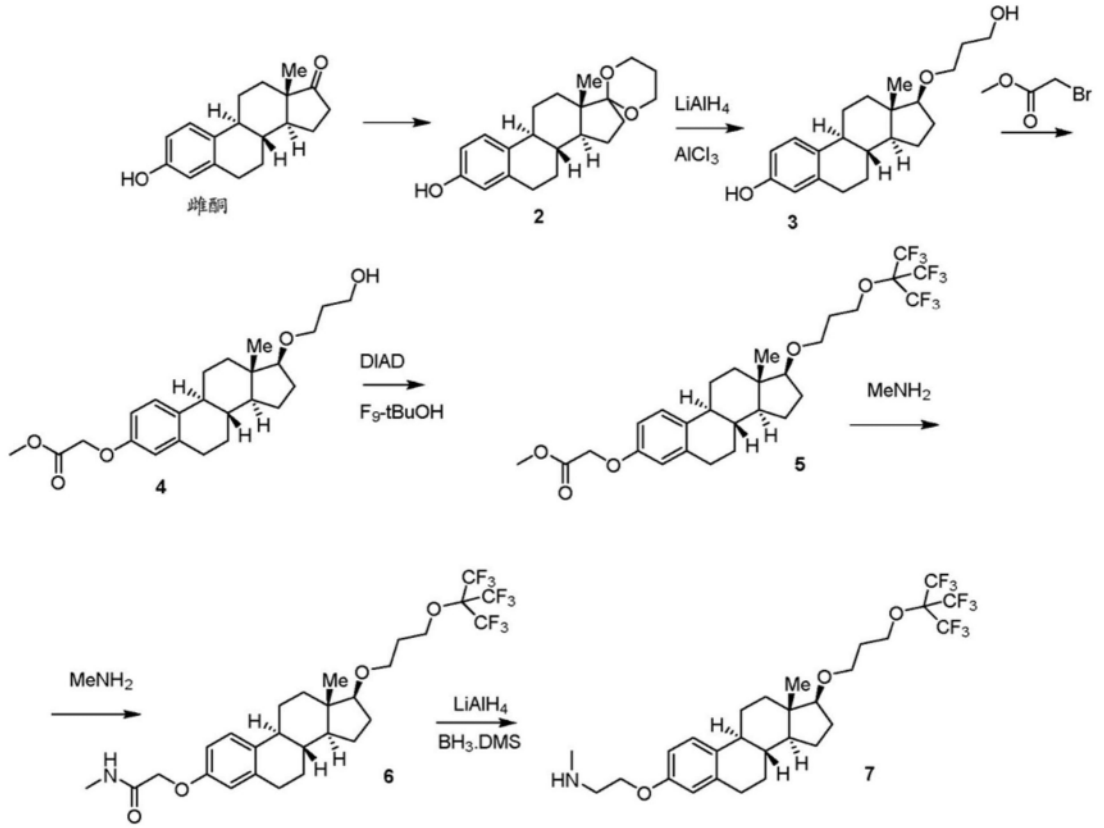
[0137] 实施例3:用于合成Apo-Si-K-93-A-前体的方法:

[0138]



[0139] 胺7的合成:

[0140]

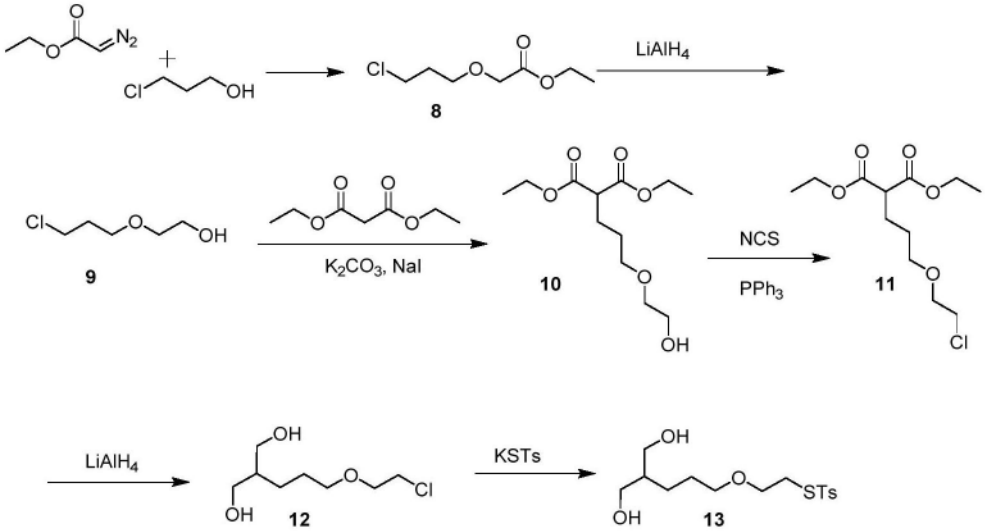


[0141] 方案1.胺7的合成。

[0142] 雌酮用丙二醇和原甲酸三甲酯处理以提供化合物2。用$LiAlH_4$和$AlCl_3$处理提供了开环产物3。将酚用溴乙酸甲酯烷基化,并且获得化合物4。使用Mitsunobu条件引入全氟叔丁醇部分(化合物5)。将化合物5用甲胺处理,以提供酰胺6。使用BH_3.DMS对酰胺进行还原提供了胺7。

[0143] 硫代甲苯磺酸酯13的合成:

[0144]

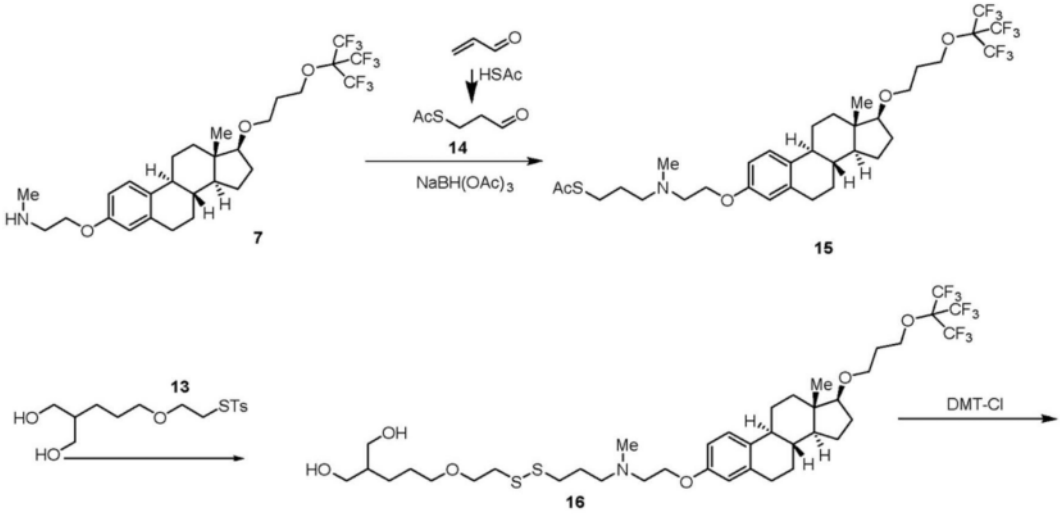


[0145] 方案2.硫代甲苯磺酸酯13的合成。

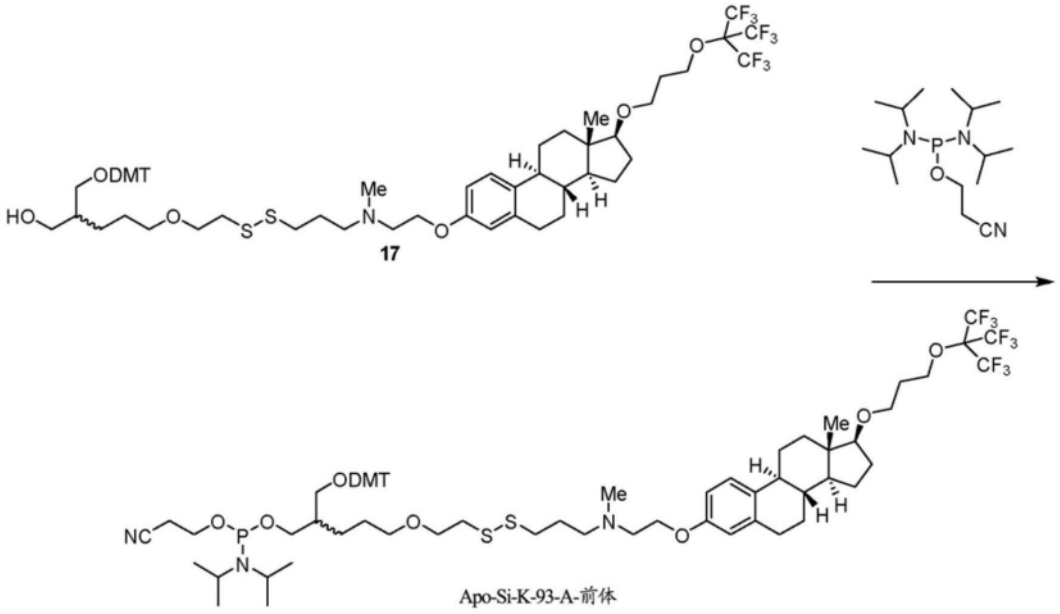
[0146] 硫代甲苯磺酸酯13的合成起始于重氮乙酸乙酯与3-氯丙-1-醇的偶联以提供醚8。随后的酯的还原提供了醇9。将丙二酸二乙酯用氯化物9烷基化,以获得化合物10。然后使用NCS和PPh_3将醇氯化,以提供氯化物11。使用$LiAlH_4$还原酯的提供了二醇12。最后,氯化物被硫代甲苯磺酸钾取代,以提供期望的结构单元硫代甲苯磺酸酯13。

[0147] Apo-Si-K-93-A的合成

[0148] 合成根据以下合成方案进行:



[0149]



[0150] 方案3.Apo-Si-K-93-A-前体的合成

[0151] 将胺7用1-溴-3-氯丙烷烷基化,但我们发现这些条件导致相当差的收率。然而,当我们用丙烯醛衍生的硫代醛14进行还原胺化时,获得了明显更好的收率,并且还从整个合成中去除了硫代乙酸酯交换的必要性。丙烯醛在碱的存在下用硫代乙酸处理,以提供良好的转化。使用快速色谱法以55％收率分离期望的材料。随后与醛14的还原胺化以59％收率给出了化合物15。

[0152] 将在甲醇中的甲醇钠添加至硫代乙酸酯15和硫代甲苯磺酸酯13的溶液中,这从15中去除了乙酸酯,允许产生的硫醇与13反应以形成期望的不对称的二硫化物(16)。化合物16与DMT-Cl反应以提供单保护的二醇17。与合适的亚磷酰胺剂的反应提供了Apo-Si-K-93-A。酸不稳定的亚磷酰胺产物的纯化使用快速色谱法用已经用Et_3N预处理的二氧化硅来完成。最终制备了4×220mg。

[0153] 实验部分

[0154] (8R,9S,13S,14S)-13-甲基-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-十氢螺[环戊[a]菲-

17,2'-[1,3]二噁烷]-3-醇(2)

[0155] 向在甲苯(300mL)中的雌酮(67.9克,0.251mol)的悬浮液中添加1,3-丙二醇(70mL)和原甲酸三甲酯(100mL)。将悬浮液用pTsOH(1克,5mmol)处理,并且加温至60℃持续16h。在冷却至室温之后,添加三乙胺(10mL)和水(100mL),并且继续搅拌持续30min。将相分离,并且将有机相用水(2×100mL)和盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥并且浓缩。将粗材料溶解在甲苯(150mL)中,并且通过缓慢添加庚烷(750mL)进一步稀释,引起白色沉淀的形成。将固体过滤出并且在真空中干燥。将化合物2(71.1克,217mmol)以86%收率分离为白色固体。

[0156] (8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-羟基丙氧基)-13-甲基-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-十氢-6H-环戊[a]菲-3-醇(3)

[0157] 在0℃,向在THF(1.5L)中的化合物2(71.4克,217mmol)的溶液中小心地添加$LiAlH_4$(10克,263mmol)和$AlCl_3$(116克,872mmol)。允许放热反应在0℃搅拌另外30min,然后将固体加温至50℃,同时机械搅拌(使用旋转蒸发器(rotavap))持续3h。将混合物冷却至0℃,并且逐滴添加饱和氯化铵水溶液(150mL)。将混合物搅拌持续另外30min,然后经短路径的二氧化硅过滤,将固体用乙酸乙酯洗涤。收集有机层并且用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥并且浓缩。粗材料(89.2)主要是化合物3,但纯化在下一步骤之后进行。

[0158] 2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-羟基丙氧基)-13-甲基-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-十氢-6H-环戊[a]菲-3-基)氧基)乙酸甲酯(4)

[0159] 将粗材料3(89.4克)溶解在丙酮(1.25L)和MeOH(0.2L)中,并且用碳酸钾(60克,435mmol)和溴乙酸甲酯(50mL,435mmol)处理。将悬浮液加温至60℃,并且继续搅拌持续16h。基于TLC,所有酚部分已经被烷基化。将混合物冷却至室温并且过滤。将滤液浓缩并且使用快速色谱法进一步纯化(洗脱剂,在庚烷中的20%至30%的EtOAc,去除所有杂质,100% EtOAc用于获得期望的材料)。

[0160] 化合物4(56.7克,140.3mmol)以65%收率分离为黄色油状物。

[0161] 2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-六氟-2-(三氟甲基)丙-2-基)氧基)丙氧基)-13-甲基-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-十氢-6H-环戊[a]菲-3-基)氧基)乙酸甲酯(5)

[0162] 向在THF(1L)中的化合物4(56.7克,140.3mmol)的溶液中添加三苯基膦(55.4克,211mmol)、九氟叔丁醇(30mL)和偶氮二羧酸二叔丁酯(38.5克,167mmol)。当TLC示出完全转化时,将混合物搅拌持续30min。添加庚烷(500mL),并且将混合物部分地浓缩至~500mL。添加更多的庚烷(1L),并且将混合物在室温搅拌过夜。沉淀物已经形成并且被过滤出,将滤液浓缩以提供作为黄色糖浆的化合物5,尽管被痕量的DBAD和三苯基膦污染。

[0163] 2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-六氟-2-(三氟甲基)丙-2-基)氧基)丙氧基)-13-甲基-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-十氢-6H-环戊[a]菲-3-基)氧基)-N-甲基乙酰胺(6)

[0164] 将化合物5的粗糖浆用MeOH(250mL)稀释,并且添加40%甲胺水溶液(350mL)。当TLC示出完全转化时,将白色沉淀物搅拌持续1h。添加水(1L),并且将固体过滤出。将残余物用水洗涤,并且吸收到二氯甲烷(1L)中。将有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥并且浓缩。使用约7cm的二氧化硅以及用在庚烷中的15% EtOAc的初始洗脱来进行进一步的纯化。当从柱中去除所有杂质时,将化合物6用100% EtOAc洗脱。化合物6(82.0克,132mmol)以94%收率

分离为白色固体,尽管仍然存在痕量的三苯基氧化膦(triphenylphosphoxide)。

[0165] 2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-六氟-2-(三氟甲基)丙-2-基)氧基)丙氧基)-13-甲基-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-十氢-6H-环戊[a]菲-3-基)氧基)-N-甲基乙-1-胺(7)。

[0166] 在65℃,向在THF(500mL)中的化合物6(56.0克,90.5mmol)的溶液中逐滴添加BH_3.DMS(56mL,590mmol)。继续回流持续另外5h,然后将混合物冷却至室温。将混合物小心地溶解在MeOH(300mL)中,并且添加在HCl(50mL)中的4M二噁烷。将溶液回流持续30min,然后冷却至室温并且浓缩。将混合物溶解在MeOH(300mL)中并且回流持续30min。在冷却和浓缩之后,将糖浆吸收到CH_2Cl_2(1L)中并且用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤(2×)。将有机层经Na_2SO_4干燥并且浓缩。化合物7(50.0克,82.6mmol)以91%收率分离为缓慢固化的澄清油状物。具有痕量的三苯基氧化膦的杂质分布类似于化合物6。

[0167] 硫代甲苯磺酸酯13的合成:2-(3-氯丙氧基)乙酸乙酯(8)

[0168] 在0℃,向在CH_2Cl_2(250mL)中的3-氯丙-1-醇(20mL,239mmol)的溶液中添加重氮乙酸乙酯(25mL,239mmol)。然后添加BF_3.OEt_2(0.30mL,2.39mmol,0.01当量),之后去除冰浴并且将混合物加温至37℃,并在该温度搅拌,直至气体产生停止(2小时)。将混合物用H_2O(250mL)和盐水(250mL)洗涤,经Na_2SO_4干燥,并且浓缩以提供作为黄色油状物的醚8(44g,240mmol,定量)。

[0169] 2-(3-氯丙氧基)乙-1-醇(9)

[0170] 向在Et_2O(750mL)中的$LiAlH_4$(12g,316mmol)的冰冷的悬浮液中缓慢添加酯8(57g,316mmol)的溶液,并且将产生的混合物在室温搅拌过夜。反应通过在0℃缓慢添加KOH(20%水溶液51mL)猝灭。将混合物在室温搅拌持续30分钟,之后经硅藻土过滤。将滤液经Na_2SO_4干燥并且浓缩以提供作为澄清油状物的醇9(33g,240mmol,76%)。

[0171] 2-(3-(2-羟基乙氧基)丙基)丙二酸二乙酯(10)

[0172] 向在DMF(500mL)中的丙二酸二乙酯(25mL,166mmol)和醇9(23g,166mL)的溶液中添加K_2CO_3(34g,249mmol)和NaI(25g,166mmol),并且将产生的混合物在90℃搅拌持续64小时。添加H_2O(1.5L),并且将混合物用EtOAc(3×500mL)提取。将合并的有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥并且浓缩。粗材料使用柱色谱法(EtOAc:庚烷1:1)纯化,以提供作为澄清淡黄色油状物的产物10(17g,65mmol,39%)。

[0173] 2-(3-(2-氯乙氧基)丙基)丙二酸二乙酯(11)

[0174] 向在CH_2Cl_2(500mL)中的醇10(17g,65mmol)的溶液中添加PPh_3(26g,98mmol)和N-氯琥珀酰亚胺(11g,78mmol),并且将产生的混合物在室温搅拌过夜。添加庚烷(300mL),并且将混合物部分地浓缩。将形成的固体过滤出,并且将滤液浓缩。粗材料使用柱色谱法(在庚烷中的20%EtOAc)纯化,以提供作为澄清油状物的氯化物11(14g,49mmol,75%)。

[0175] 2-(3-(2-氯乙氧基)丙基)丙-1,3-二醇(12)

[0176] 向在Et_2O(500mL)中的$LiAlH_4$(7.3g,192mmol)的冰冷的悬浮液中缓慢添加二乙基酯11(27g,96mmol)的溶液,并且将产生的混合物在室温搅拌过夜。反应通过在0℃缓慢添加KOH(20%水溶液31mL)猝灭。将混合物在室温搅拌持续30分钟,之后经硅藻土过滤。将滤液经Na_2SO_4干燥并且浓缩,以提供作为澄清油状物的二醇12(14g,73mmol,76%)。

[0177] S-(2-((5-羟基-4-(羟甲基)戊基)氧基)乙基)4-甲基苯-硫代磺酸酯(13)

[0178] 向二醇12(14g,73mmol)的溶液中添加硫代甲苯磺酸钾(25g,110mmol)和TBAI(2.7g,7.3mmol),并且将产生的混合物在80℃搅拌持续64h。将混合物浓缩,并且粗材料使用柱色谱法(在庚烷中的40%丙酮)纯化,以提供作为黄色油状物的硫代甲苯磺酸酯13(5.0g,14mmol,20%)。

[0179] Apo-Si-K-93-A的合成

[0180] S-(3-氧代丙基)硫代乙酸酯(14)

[0181] 向在二氯甲烷(250mL)中的丙烯醛(11克,196mmol)的溶液中添加三乙胺(6.9mL,49mmol)和硫代乙酸(13.8mL,195mmol)。将混合物在室温搅拌过夜,然后浓缩。使用快速色谱法(在庚烷中的15% EtOAc)的进一步纯化以55%收率提供了作为棕色油状物的化合物14(14.4克,109mmol)。

[0182] S-(6-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-六氟-2-(三氟甲基)丙-2-基)氧基)丙氧基)-13-甲基-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-十氢-6H-环戊[a]菲-3-基)氧基)乙基)(甲基)氨基)己基)硫代乙酸酯(15)

[0183] 向在1,2-二氯乙烷(500mL)中的7(20.6克,34mmol)的溶液中添加乙酸(8.2mL,136mmol)、醛14(5.4克,41mmol),并且在1min之后添加三乙酰氧基硼氢化钠(30克,141mmol)。将混合物在室温搅拌持续2h,然后添加二氯甲烷,并且将混合物用1M NaOH、水和盐水洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥并且浓缩。使用快速色谱法(梯度为在庚烷中的15%至25%丙酮和0.1% Et_3N)的进一步纯化提供了以59%收率分离为澄清油状物的化合物15(14.4克,20mmol)。

[0184] 2-(3-(2-((3-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-六氟-2-(三氟甲基)丙-2-基)氧基)丙氧基)-13-甲基-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-十氢-6H-环戊[a]菲-3-基)氧基)乙基)(甲基)氨基)丙基)二硫烷基)乙氧基)丙基)丙-1,3-二醇(16)

[0185] 将在CH_2Cl_2(200mL)和甲醇(20mL)中的硫代乙酸酯15(1.9g,2.6mmol)和硫代甲苯磺酸酯13(1.8g,5.1mmol,2当量)的溶液用在MeOH(1.42mL,7.7mmol,3当量)中的5.4M NaOMe处理。将混合物在室温搅拌过夜。将混合物用$NaHCO_3$(200mL)和盐水(200mL)洗涤,经硫酸钠干燥,并且浓缩。使用快速色谱法(在庚烷中的30%丙酮+1% Et_3N)的进一步纯化提供了作为淡黄色油状物的化合物16(1.2g,1.4mmol,53%)。

[0186] 2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-(2-((3-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-六氟-2-(三氟甲基)丙-2-基)氧基)丙氧基)-13-甲基-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-十氢-6H-环戊[a]菲-3-基)氧基)乙基)(甲基)氨基)丙基)二硫烷基)乙氧基)戊-1-醇(17)

[0187] 向16(1.2g,1.4mmol)的溶液中添加Et_3N(0.14mL,1.4mmol,1当量)和DMAP(16mg,0.14mmol,0.1当量)。向产生的混合物添加DMT-Cl(0.47g,1.4mmol,1当量)。将产生的黄色混合物在室温搅拌过夜,之后将其浓缩。通过柱色谱法(在庚烷中的20%丙酮和1%Et_3N)的纯化提供了作为澄清淡黄色油状物的单保护的醇17(1.0g,0.87mmol,63%)。

[0188] 2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-(2-((3-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-六氟-2-(三氟甲基)丙-2-基)氧基)丙氧基)-13-甲基-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-十氢-6H-环戊[a]菲-3-基)氧基)乙基)(甲基)氨基)丙基)二硫烷基)乙氧基)戊基(2-氰基乙基)二异丙基亚磷酰胺(Apo-Si-K-93-A)。

[0189] 向在二氯甲烷(40mL)中的单保护的二醇17(1.0g,0.87mmol)的溶液中添加2-氰基乙基N,N,N′,N′-四异丙基亚磷二酰胺(0.4mL,1.25mmol,1.3当量)和在二氯甲烷中的0.5M的N-甲基吗啉和0.25M三氟乙酸的溶液(2.5mL,相对于亚磷酰胺剂,1当量的N-甲基吗啉)。将淡黄色溶液在室温搅拌持续2h。TLC指示不完全的转化,因此添加另外的0.2mL的2-氰基乙基N,N,N′,N′-四异丙基亚磷二酰胺。在1h之后,将混合物用饱和碳酸氢钠水溶液猝灭并且搅拌持续另外10分钟。将有机层分离,经硫酸钠干燥并且浓缩。使用快速色谱法(在庚烷中的15%丙酮和1% Et_3N)的进一步纯化提供了作为无色油状物的化合物Apo-Si-K-93-A(880mg,0.64mmol,74%)。

[0190] 实施例4:本发明的E部分在寡核苷酸链中的内部位置的连接模式:

[0191] 首先,E部分呈其前体形式,其中它的两个羟基基团被DMT[二甲氧基三苯甲基双-(4-甲氧基苯基)苯基甲基]和亚磷酰胺分别保护。通常,寡核苷酸的合成通过在3'至5'方向顺序添加保护的核苷酸来进行。亚磷酰胺被用于连接寡核苷酸链的5'末端的羟基基团;然后去除DMT,并且将相应的羟基基团连接至亚磷酰胺部分,该亚磷酰胺部分附接在待掺入链中的下一个核苷酸的3'-羟基处。在完成siRNA的有义(过客)链和指导(反义)链两者的合成后,发生退火程序,如本领域已知的,以提供本发明的最终的RNA双链体缀合物。为了优化siRNA的性能,在内部位置的E部分被连接至有义(过客)链,因为该链在RISC复合物中被去除,从而能够使指导(反义)链以不间断的方式在RISC基因沉默装置中起作用。

[0192] 实施例5:细胞质中的E部分的氧化还原介导的脱离和去除,以释放货物药物(例如,siRNA):

[0193] 虽然本发明的E、E'或E"部分对于siRNA缀合物的跨膜通过是必须的,但一旦缀合物到达细胞质后,去除这些部分并且将它们从身体排出是需要的。在货物药物是siRNA的情况下,这可能有益于避免siRNA与基因沉默蛋白复合物(Dicer和RISC)的相互作用中的空间干扰。此外,货物药物与E部分的这样的脱离将使细胞磷脂膜上的缀合物的负担最小化,从而从安全性的角度来看可能是有利的。为了此目的,本发明的所有E部分包括二硫化物部分。在氧化条件下,诸如在细胞外环境中占优势的那些条件下,二硫化物部分显现出稳定性,因此在其体内全身施用时,能够使缀合物在体内分布,并且穿过细胞磷脂膜进入细胞。相比之下,细胞质是高度还原性的环境,主要是由于它的高的谷胱甘肽浓度,这显现出约4个数量级的细胞质/细胞外空间浓度梯度。由于细胞质中的这些显著的还原条件,E部分的二硫化物基团在细胞质环境中经历还原。因此,存在货物药物(例如,siRNA)的释放,以在细胞质中的其靶位点(例如,在用于基因沉默的Dicer或RISC蛋白复合物)处发挥其药理学活性。同时,具有甾醇骨架的本发明的E部分经由胆汁和/或尿液直接地或在代谢(例如,肝中的细胞色素-P-450介导的代谢)后从身体排出,类似于其他基于甾醇的分子(例如,雌激素)。

[0194] 实施例6:本发明的包括三个各自具有式(IVa)中列出的结构的E部分的siRNA缀合物的示例性结构,以及siRNA缀合物的相应的作用模式。

[0195] 缀合物在图2a、图2b、图2c和图2d中描述。最初,缀合物处于氧化条件下,并且因此它包括二硫化物部分。例示了Dicer底物,其中RNA链是25个核苷酸和27个核苷酸的长度。较长的链(指导、反义链)在其3'末端具有2个核苷酸突出端,这对它与酶的结合是必需的。此外,有义(过客)链在其5'末端具有游离的磷酸酯,以便占据由带正电荷的氨基酸铺成的酶

中相应的结合袋。两个E部分被连接至过客链:一个在它的5'末端,并且第二个在链的约中间。第三个E部分被连接至指导链的5'末端。最初,缀合物具有细胞外空间的氧化条件特征,并且因此保留了E部分的二硫化物基团。在进入细胞质后,由于环境的还原条件,二硫键被还原,并且E部分从RNA裂解,从身体排出,每个E部分留下小的残余残端(图2b)。然后Dicer酶裂解RNA双链体,产生21/23-核苷酸长的双链体,从而也去除了指导链上的残端(图2c)。然后RNA双链体准备进入细胞质RNA诱导的沉默蛋白复合物(RISC)。首先酶解旋酶发挥过客链(包括附接至过客链的两个残余残端)的去除的作用。因此(图2d),将指导链完整地递送至RISC复合物中,以与编码靶蛋白的mRNA相互作用,从而导致其降解,并且由此诱导期望的基因沉默。

[0196] 实施例7:Apo-Si-K-93-A的生物性能:

[0197] Apo-Si-K-93-A的生物性能在以下方面进行了评估,这些方面对于包括该E部分的缀合物在临床环境中在体内预期的使用都是重要的。对于这些实验,使用两种siRNA双链体,每种是被设计成沉默EGFP基因的Dicer底物。在双链体的一种中,Apo-Si-K-93-A部分被附接至每条RNA链的5'末端(该双链体被命名为K-93-A)。在第二种双链体中,Apo-Si-K-93-A部分被附接在每条RNA链的5'末端,而第三Apo-Si-K-93-A部分被附接在沿着过客(指导)链在第14个核苷酸位点处的内部位置。该双链体因此被命名为K-93-A-del-14。这些构建体各自的核苷酸序列如下:

[0198] 1.K-93-A构建体:

[0199] 有义:5'-phos/iApo-Si-K93-A/mAmCrCmCrUmGrArArG rUrUmCrAmUrCmUrG mCrArC rCrArCmCG rUrCrA。

[0200] 反义:/5'-phos/iApo-SiK-93-A/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrUrG mGrGmUmCmA。

[0201] 2.K-93-A-del-14:

[0202] 有义:/5phos/iApo-Si-K-93-A/mAmCrCmCrUmGrArArGrUrUmCrA/iApo-SiK93-A/rCmUrG mCrArCrCrArCmCG。

[0203] 反义:/5phos/iApo-Si-K-93-A/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrUrUrCrArG mGrGmUmCmA。r意指核糖;m意指甲基化。

[0204] 然后两种缀合物经受以下评估:

[0205] 1.与白蛋白孵育后的无蛋白质的级分:

[0206] 为了在施用至血液后发挥作用,具有结合至血液蛋白质的级分和通过细胞外空间自由迁移至细胞中的游离级分两者的药物是有价值的。为了检查Apo-Si-K-93-A的该方面,使用凝胶电泳:将20皮摩尔的RNA样品稀释在Tris缓冲液ph=7.4中,并且添加牛血清白蛋白(BSA)至2mg/ml的最终浓度。将所有样品在25℃孵育过夜。然后将这些RNA样品装载在12%天然的聚丙烯酰胺凝胶上,并且在电场中以5V/cm迁移持续1小时(bio-rad mini protean)。对照样品包括稀释在水中而不是稀释在BSA中的RNA样品,并且反应混合物用蛋白酶K(Sigma)在37℃处理持续2小时,旨在经由白蛋白的蛋白水解来释放蛋白质结合的缀合物。Apo-Si-S1,一种与白蛋白强烈结合的Apo-Si缀合物,被用作阳性对照。

[0207] 2.在与还原型谷胱甘肽孵育后,Apo-Si-K-93的二硫化物部分的裂解:

[0208] Apo-Si-K-93-A的设计的特点之一是在Apo-Si-K-93-A部分中掺入二硫化物基团,

目的在于在细胞质中占优势的还原条件下经历选择性裂解,从而释放货物基因药物以与细胞质基因沉默复合物相互作用:Dicer和RISC。为了证明Apo-Si-K-93-A的该特征,将20皮摩尔的RNA样品稀释在补充有1mM的谷胱甘肽(Sigma)的30mM Tris缓冲液ph＝7.4中。将所有样品在37℃孵育持续2小时。将对照样品在水中稀释。然后将RNA样品装载在12％天然的聚丙烯酰胺凝胶上,并且在电场中以5V/cm迁移持续1小时(bio-rad mini protean)。

[0209] 3.递送至细胞中和体外基因沉默:

[0210] 使从Cell Biolabs获得的HeLa-EGFP细胞系在补充有10％ FBS(Gibco)、100U/ml青霉素、100mg/ml链霉素(Biological Industries,Israel)和10μg/ml杀稻瘟素的Dulbecco改良的Eagle培养基(Gibco)中生长。将细胞维持在37℃具有5％ CO2潮湿空气的培养箱中。在转染前一天,将细胞(40,000个细胞/孔)与具有不补充抗生素的完全培养基铺板在24孔黑色板玻璃底部。在接下来的一天,将细胞暴露于MNM-缀合物;600nM的缀合物与10％ BSA孵育持续72小时;或者在无血清条件下与10nM、40nM和150nM的缀合物孵育持续24小时,随后添加完全血清孵育持续另外48小时。因此,在转染后72小时测量蛋白质下调,此时抽吸培养基,并且用HBSS洗涤细胞。EGFP荧光强度通过infinite M200-Pro多模读取器(Tecan)定量,激发波长488nm,发射波长535nm。

[0211] 结果:

[0212] 图3展示了与BSA孵育后的无蛋白质级分。与完全与BSA相互作用的Apo-Si-S1相反,K-93-A和K-93-A-del-14仅示出了与BSA的微小的相互作用并且揭示了在K-93-A-del-14(Apo93-del-14)中,主要的游离级分(有趣地)没有由于额外的K-93-A部分的存在而显著消除(箭头)。蛋白酶K(PK)的处理回收了所有蛋白质结合的Apo-Si-S1,并且还释放了在K-93-A缀合物和K-93-A-del-14缀合物两者中与BSA附接的K-93-A的少量级分。

[0213] 图4展示了K-93-A缀合物和K-93-A-del-14缀合物两者与还原型谷胱甘肽的孵育(1mM持续2小时)导致K-93-A缀合物和K-93-A-del-14缀合物两者的有力的裂解(箭头)。重要地,第三E部分的附接没有减缓还原反应。反应发生在对还原剂相对温和的暴露条件下(1mM,2小时)。这些阳性结果与观察到的基因沉默的效果一致:与相同的EGFP siRNA序列附接的K-93-A和K-93-A-del-14,在无血清条件和血清+条件两者下,以剂量依赖性方式诱导EGFP表达的显著敲低。在有血清(10％ BSA)的情况下,600nM的K-93-A诱导EGFP基因的24.1±5.0％下调,而第三内部E部分的添加与观察到的基因沉默显著增强至50.3％±5.0％相关。在无血清条件下也观察到有效的基因沉默,其中在与10nM、40nM和150nM的缀合物孵育后,K-93-A分别诱导63.5％、79.3％和86.3％的基因沉默。K-93-A-del-14在用10nM、40nM和150nM处理时分别诱导50.3％、76.6％和84.7％的基因沉默。

[0214] 结论:

[0215] 如在体外HeLa细胞中评估的,Apo-Si-K-93-A显现出良好的性能特征,这使其值得作为siRNA穿过生物膜进入细胞的递送工具来继续开发。这种E部分显现出在与白蛋白孵育后大的游离级分、在与活细胞的细胞质内的生理水平相对应的谷胱甘肽水平上二硫化物部分的有力的还原和裂解,最终在存在和不存在血浆蛋白质的情况下有效基因沉默。重要地,Apo-Si-K-93-A在其活性方面显现出协同性,如通过三个部分的附接所反映的,发现三个部分的附接相对于两个部分的附接在基因沉默的期望的诱导方面明显优越。;

[0216] 实施例8:Apo-Si-K-63-A的生物性能:

[0217] 使用两种siRNA双链体,每种是被设计成沉默EGFP基因的Dicer底物。在双链体中的一种中,Apo-Si-K-63-A部分被附接至每条RNA链的5'末端。该双链体被命名为K-63-A。在第二种双链体中,Apo-Si-K-63-A部分被附接在每条RNA链的5'末端,而第三Apo-Si-K-63-A部分被附接在沿着过客(指导)链在第14个核苷酸位点处的内部位置。该双链体因此被命名为K-63-A-del-14。这些构建体各自的核苷酸序列如下:

[0218] 1.K-63-A构建体:

[0219] 有义:5'-phos/iApo-Si-K63-A/mAmCrCmCrUmGrArArG rUrUmCrAmUrCmUrG mCrArC rCrArCmCG rUrCrA

[0220] 反义:/5'-phos/iApo-SiK-63-A/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrUrGmGrGmUmCmA

[0221] 2.K-63-A-del-14构建体:

[0222] 有义:/5phos/iApo-Si-K-63-A/mAmCrCmCrUmGrArArGrUrUmCrA/iApo-SiK63-A/rCmUrG mCrArCrCrArCmCG

[0223] 反义:/5phos/iApo-Si-K-63-A/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrUrUrCrArG mGrGmUmCmA

[0224] 研究目的:

[0225] 评估两种构建体在沉默EGFP基因的表达方面的性能:

[0226] 方法:

[0227] HeLa-GFP细胞系从Cell Biolabs获得。使细胞在补充有10% FBS(Gibco)、100U/ml青霉素、100mg/ml链霉素(Biological Industries,Israel)和10μg/ml杀稻瘟素的Dulbecco改良的Eagle培养基(Gibco)中生长。将细胞维持在37℃具有5% CO2潮湿空气的培养箱中。在转染前一天,将细胞(40,000个细胞/孔)铺板在24孔黑色板玻璃底部。在接下来的一天,在10%血清的存在下,将细胞暴露于K-63-A或K-63-A-del-14。对于无血清转染,抽吸出培养基,并且用Hank平衡盐溶液(HBSS)洗涤细胞,并且然后用无血清Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific)替代培养基持续24小时,随后添加血清孵育持续另外48小时。转染后72小时测量蛋白质表达的下调。为了此目的,抽吸出培养基,并且用HBSS洗涤细胞。EGFP荧光强度通过infinite M200-Pro多模读取器(Tecan)定量,激发波长488nm,发射波长535nm。

[0228] 结果:

[0229] 携带两个E部分的K-63-A和携带三个E部分的K-63-A-del-14都诱导EGFP表达的有效敲低。

[0230] 在血清的存在下,600nM的K-63-A将EGFP表达降低至77.6%±1.3(平均值±SD)。在K-63-A-del-14的情况下观察到更强的效果,其中600nM将EGFP表达降低至60.2%±1.0。

[0231] 在无血清的条件下,通过本发明的缀合物诱导了有力的EGFP敲低:当细胞暴露于10nM、40nM和150nM时,K-63-A将EGFP表达分别降低至75.6%±2.6%、44.1%±0.05%和23.7%±0.62%。当细胞暴露于10nM、40nM和150nM时,K-63-A-del-14将EGFP表达分别降低至83.2%±4.0%、51.4%±0.07%和18.9%±1.3%。

[0232] 结论:

[0233] K-63-A是用于将大分子siRNA递送穿过磷脂膜的有效部分。安装额外的K-63-A部

分显现出在跨膜递送过程中的协同性和协同作用。

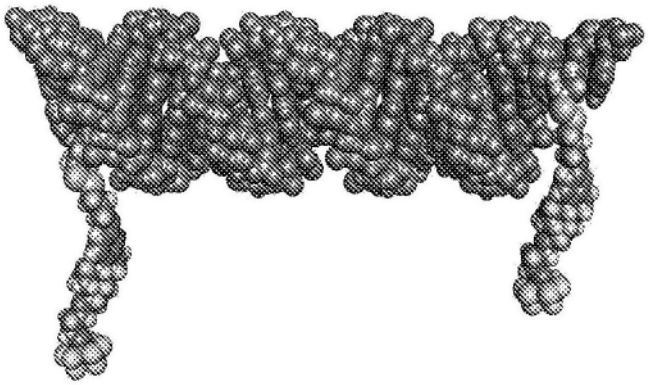


图1a

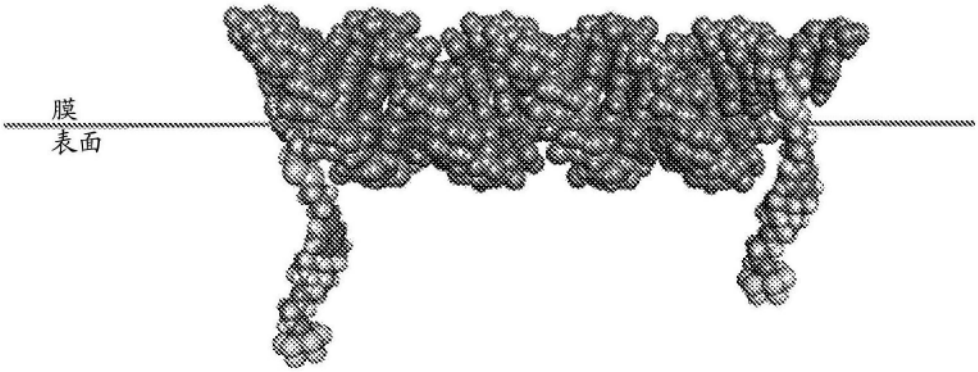


图1b

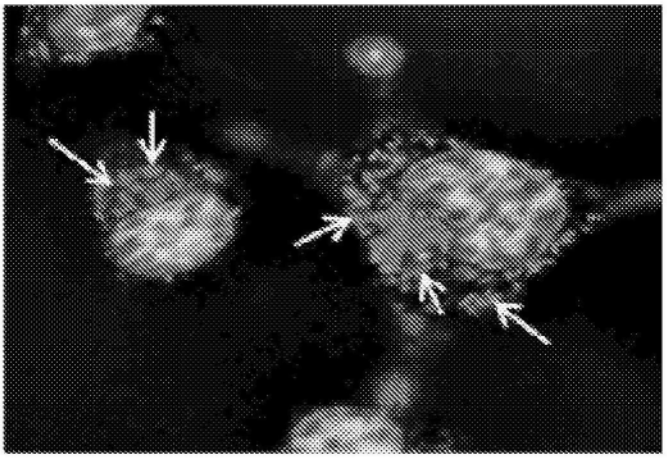


图1c

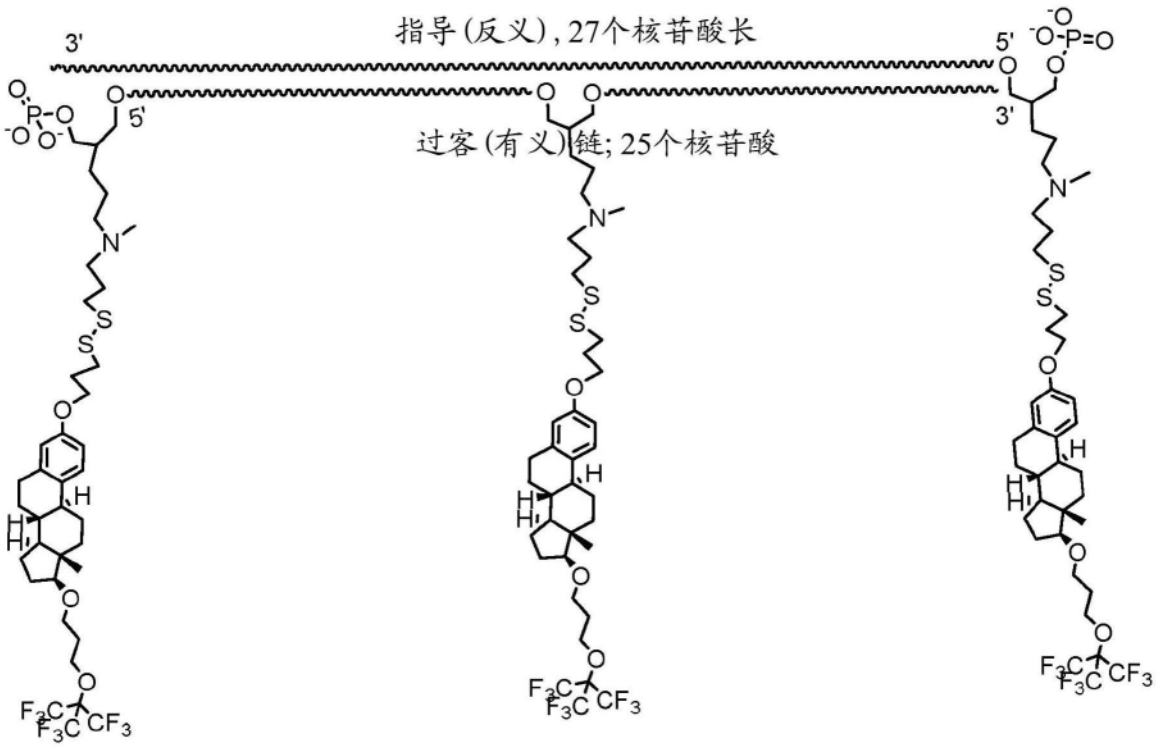

指导(反义),27个核苷酸长
3'
5'
过客(有义)链;25个核苷酸
5'
3'

图2a

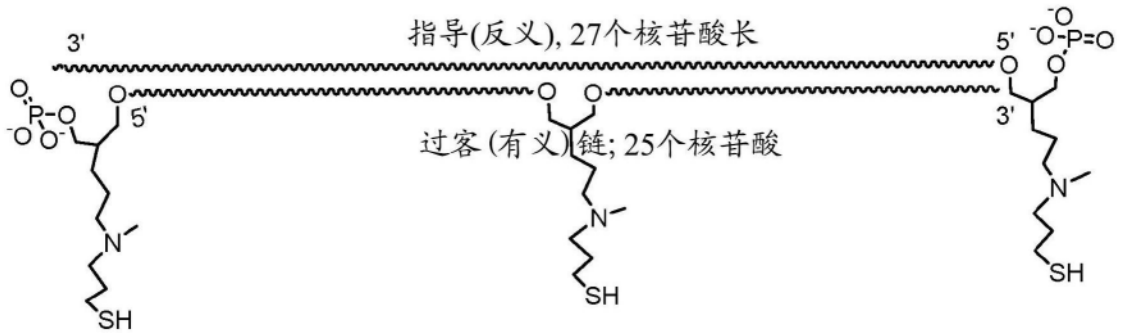

指导(反义),27个核苷酸长
3'
5'
过客(有义)链;25个核苷酸
5'
3'

图2b

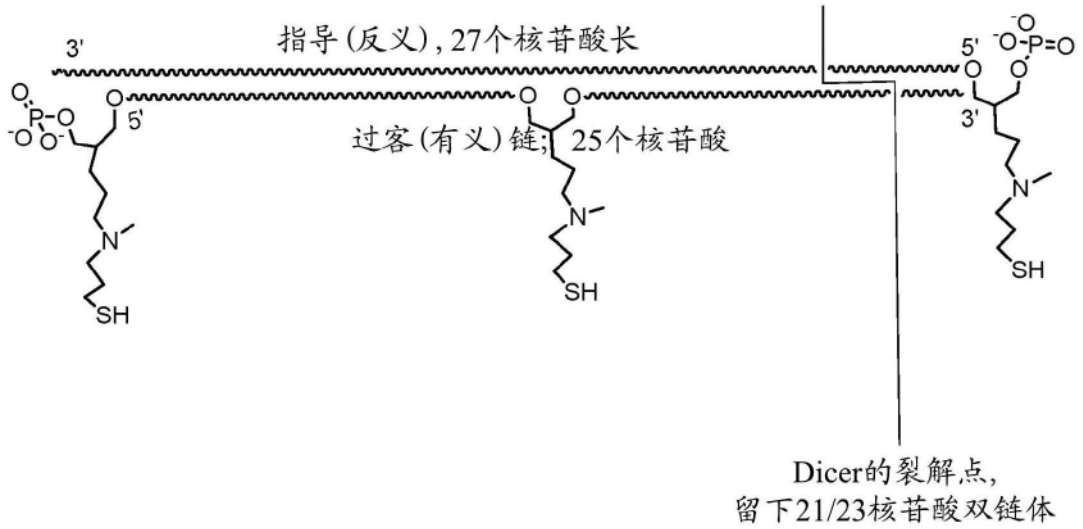

3'
指导(反义),27个核苷酸长
5'
过客(有义)链;25个核苷酸
3'
5'
SH
N
Dicer的裂解点,
留下21/23核苷酸双链体

图2c

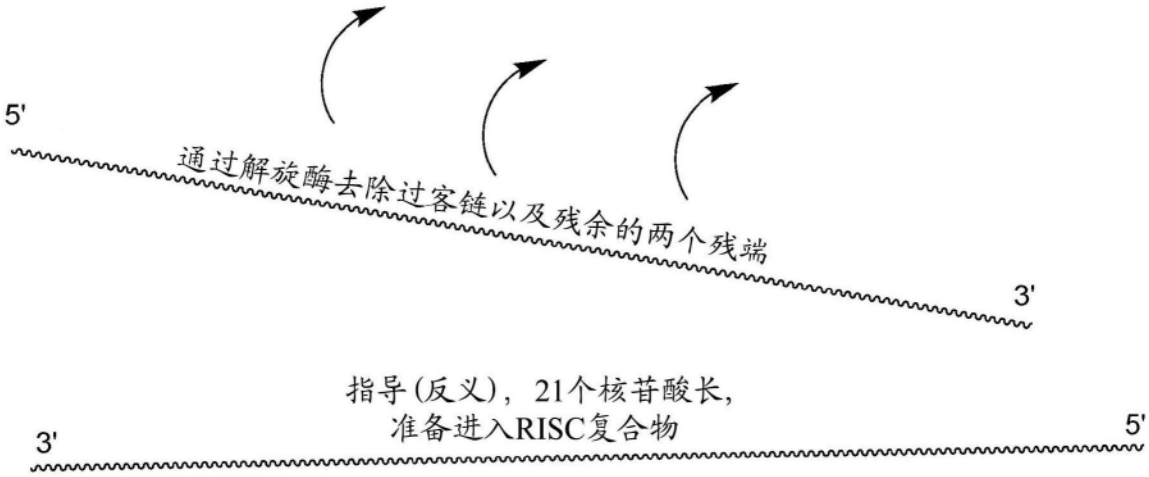

5'
通过解旋酶去除过客链以及残余的两个残端
3'
指导(反义),21个核苷酸长,
准备进入RISC复合物
3'
5'

图2d

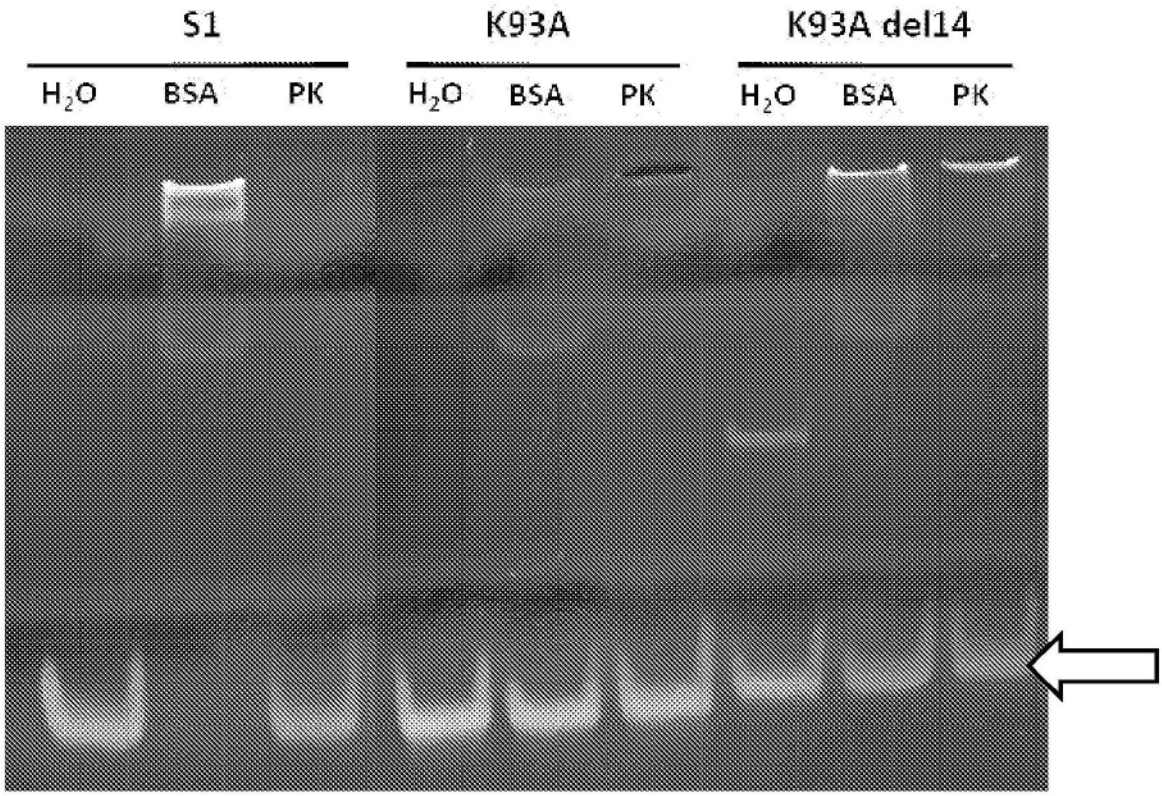

S1
K93A
K93A del14
H_2O
BSA
PK
H_2O
BSA
PK
H_2O
BSA
PK

图3

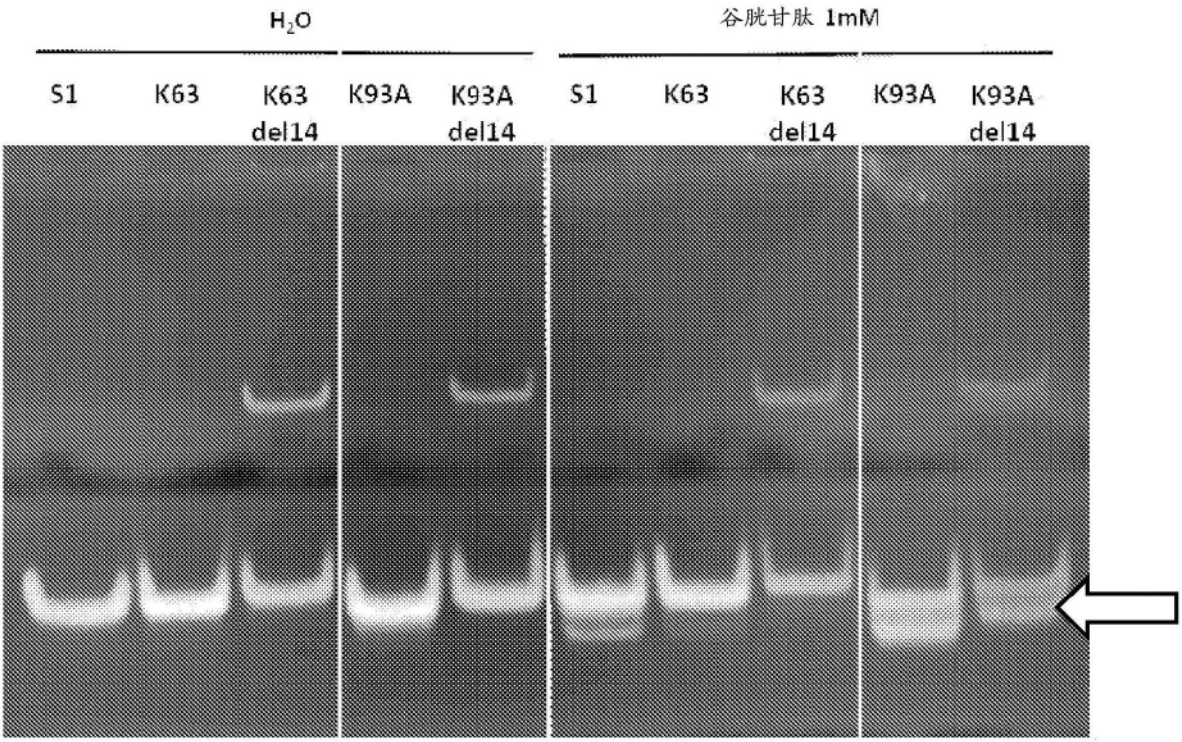

H_2O
谷胱甘肽 1mM
S1
K63
K63 del14
K93A
K93A del14
S1
K63
K63 del14
K93A
K93A del14

图4