



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110636865 A

(43)申请公布日 2019.12.31

(21)申请号 201880026265.5

M·P·汤普森 P·A·伯廷

(22)申请日 2018.03.21

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30)优先权数据

62/475,185 2017.03.22 US

代理人 李敏春 郑霞

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.21

(51)Int.Cl.

A61K 47/54(2017.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 47/42(2017.01)

A61K 9/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/023578 2018.03.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/175592 EN 2018.09.27

(71)申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

申请人 维拜尔控股股份有限公司

(72)发明人 亚历山大·罗洛夫

N·C·詹内斯基 C·E·考尔曼

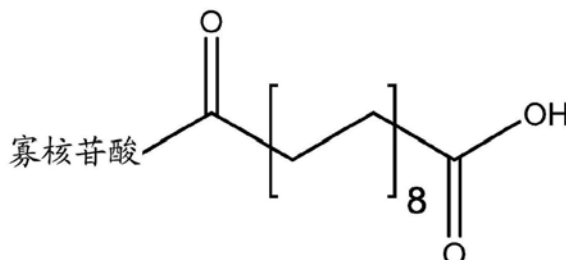
权利要求书3页 说明书21页 附图4页

(54)发明名称

修饰的寡核苷酸及其治疗用途

(57)摘要

本公开内容总体上提供了可用于治疗各种疾病(包括癌症)的基于核苷酸的化合物。在一些方面中,本公开内容提供了被化学修饰为包括工程化的脂肪酸残基的寡核苷酸,例如,以帮助改善这样的化合物的半衰期或者帮助细胞渗透(例如,渗透到肿瘤细胞中)。在一些方面中,本公开内容提供了包含这样的修饰的核苷酸和蛋白质诸如白蛋白或其模拟物的组合物。本公开内容提供了化合物和组合物的各种用途。



1. 一种式 (I) 的化合物



其中:

$A^1$  是有机基团; 或者  $A^1$  是亲水性基团或氢原子;

$A^2$  是寡核苷酸部分;

$X^1$  是疏水性基团; 以及

$X^2$  是直接键、有机基团、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N=$ 、 $=N-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-N=N(H)-$ 、 $-N(H)-N=N-$ 、 $-N(OH)-$ 、或  $-N(=O)-$ 。

2. 如权利要求1所述的化合物, 其中  $A^1$  是羧酸基团、羧酸根阴离子、或羧酸酯。

3. 如权利要求2所述的化合物, 其中  $A^1$  是羧酸基团。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的化合物, 其中所述寡核苷酸部分包含从2个至200个核苷酸单元、或从3个至150个核苷酸单元、或从4个至100个核苷酸单元、或从5个至50个核苷酸单元、或从6个至40个核苷酸单元。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的化合物, 其中所述寡核苷酸部分经由磷酸酯部分或硫代磷酸酯部分与  $X^2$  缀合。

6. 如权利要求4或5所述的化合物, 其中所述核苷酸单元包含核糖部分或脱氧核糖部分。

7. 如权利要求4至6中任一项所述的化合物, 其中所述核苷酸单元各自包含选自由以下组成的组的含氮碱基部分: 腺嘌呤部分、胞嘧啶部分、鸟嘌呤部分、胸腺嘧啶部分和尿嘧啶部分。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的化合物, 其中所述寡核苷酸部分是 HA1、HA2、HA3、HA4, 或者相关的或不相关的 siRNA 序列、微RNA 模拟序列或反义序列, 以及前述中的任一种的药学上可接受的盐。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的化合物, 其中  $X^1$  是任选地被取代的  $C_{12-22}$  亚烷基。

10. 如权利要求9所述的化合物, 其中  $X^1$  是  $C_{12-22}$  亚烷基基团。

11. 如权利要求10所述的化合物, 其中  $X^1$  是  $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{16}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{20}-$ 、或  $-(CH_2)_{22}-$ 。

12. 如权利要求11所述的化合物, 其中  $X^1$  是  $-(CH_2)_{16}-$ 。

13. 如权利要求12所述的化合物, 其中  $X^2$  是  $-C(O)-O-Z^1-NH-$ 、 $-C(O)-O-Z^1-O-$ 、或  $-C(O)-O-Z^1-S-$ , 其中  $Z^1$  是任选地被  $-OH$  取代一次或更多次的  $C_{1-6}$  亚烷基基团。

14. 如权利要求13所述的化合物, 其中  $Z^1$  是亚乙基或  $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。

15. 一种药物组合物, 包含:

如权利要求1至14中任一项所述的化合物; 以及

蛋白质, 其中所述蛋白质是人血清白蛋白或其序列与人血清白蛋白的序列至少50%等同的蛋白质。

16. 如权利要求15所述的药物组合物, 其中所述蛋白质是人血清白蛋白。

17. 如权利要求15或16所述的药物组合物, 还包含载体。

18. 如权利要求17所述的药物组合物, 其中所述载体包含水。

19. 如权利要求18所述的药物组合物, 其中所述化合物和所述蛋白质以至少  $10^2 M^{-1}$ 、或

至少 $10^3\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^4\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^5\text{M}^{-1}$ 的结合常数( $K_b$ )彼此非共价地缔合。

20. 如权利要求17至19中任一项所述的药物组合物,其中所述化合物和所述蛋白质被所述载体溶剂化。

21. 如权利要求17至20中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物包含一种或更多种如权利要求1至16中任一项所述的化合物以及一种或更多种蛋白质,其中所述组合物中按重量计至少90%、或按重量计至少95%、或按重量计至少97%、或按重量计至少99%的所述化合物以至少 $10^2\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^3\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^4\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^5\text{M}^{-1}$ 的结合常数( $K_b$ )与蛋白质结合。

22. 如权利要求21所述的药物组合物,其中所述组合物中至少按重量计至少90%、或按重量计至少95%、或按重量计至少97%、或按重量计至少99%的蛋白质结合的颗粒具有如通过动态光散射所测量的不大于5nm或不大于4nm的半径。

23. 如权利要求17至22中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物适合于肠胃外施用至哺乳动物,例如人。

24. 如权利要求17至22中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物适合于静脉内施用至哺乳动物,例如人。

25. 一种药物组合物,包含:

化合物,所述化合物包含寡核苷酸部分和蛋白质结合部分;

蛋白质,其中所述蛋白质是人血清白蛋白或其序列与人血清白蛋白的序列至少50%等同的蛋白质;以及

载体,所述载体包含水;

其中所述化合物和所述蛋白质以至少 $10^2\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^3\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^4\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^5\text{M}^{-1}$ 的结合常数( $K_b$ )彼此非共价地缔合;并且

其中所述化合物和所述蛋白质被所述载体溶剂化。

26. 如权利要求25所述的药物组合物,其中所述化合物是如权利要求1至16中任一项所述的化合物。

27. 如权利要求25或26所述的药物组合物,其中所述蛋白质是人血清白蛋白。

28. 如权利要求25至27中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物包含一种或更多种如权利要求1至16中任一项所述的化合物以及一种或更多种蛋白质,其中所述组合物中按重量计至少90%、或按重量计至少95%、或按重量计至少97%、或按重量计至少99%的所述化合物以至少 $10^2\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^3\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^4\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^5\text{M}^{-1}$ 的结合常数( $K_b$ )与蛋白质结合。

29. 如权利要求28所述的药物组合物,其中所述组合物中至少按重量计至少90%、或按重量计至少95%、或按重量计至少97%、或按重量计至少99%的蛋白质结合的颗粒具有如通过动态光散射所测量的不大于5nm或不大于4nm的半径。

30. 如权利要求25至29中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物适合于肠胃外施用至哺乳动物,例如人。

31. 如权利要求25至29中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物适合于静脉内施用至哺乳动物,例如人。

32. 一种治疗癌症的方法,包括:

向受试者施用如权利要求1至14中任一项所述的化合物或如权利要求15至31中任一项所述的组合物。

33. 如权利要求32所述的方法,还包括向受试者施用免疫治疗剂。

34. 如权利要求33所述的方法,其中向所述受试者施用所述免疫治疗剂与向所述受试者施用如权利要求1至14中任一项所述的化合物或如权利要求15至31中任一项所述的组合物同时进行,或者在向所述受试者施用如权利要求1至14中任一项所述的化合物或如权利要求15至31中任一项所述的组合物之前或之后不超过三天内进行。

35. 一种诱导癌细胞的凋亡的方法,包括:

使所述癌细胞与如权利要求1至14中任一项所述的化合物或如权利要求15至31中任一项所述的组合物接触。

36. 一种抑制癌性肿瘤的增殖的方法,包括:

使所述癌性肿瘤与如权利要求1至14中任一项所述的化合物或如权利要求15至31中任一项所述的组合物接触。

37. 如权利要求1至14中任一项所述的化合物或如权利要求15至31中任一项所述的组合物作为药剂的用途。

38. 如权利要求1至14中任一项所述的化合物或如权利要求15至31中任一项所述的组合物用于治疗癌症的用途。

39. 如权利要求1至14中任一项所述的化合物在制造药剂中的用途。

40. 如权利要求1至14中任一项所述的化合物在制造用于治疗癌症的药剂中的用途。

## 修饰的寡核苷酸及其治疗用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年3月22日提交的美国临时申请号62/475,185的优先权的权益,该临时申请特此通过引用以其整体并入,如同在本文中阐述一样。

### 技术领域

[0003] 本公开内容总体上提供了可用于治疗各种疾病(包括癌症)的基于核苷酸的化合物。在一些方面中,本公开内容提供了被化学修饰以包括工程化的脂肪酸残基的寡核苷酸,例如,以帮助改善这样的化合物的半衰期或帮助细胞渗透(例如,渗透到肿瘤细胞中)。在一些方面中,本公开内容提供了包含这样的修饰的核苷酸和蛋白质诸如白蛋白或其模拟物的组合物。本公开内容提供了化合物和组合物的各种用途。

[0004] 相关技术的描述

[0005] 寡核苷酸(ON)代表一类为治疗各种疾病提供巨大的可能性的化合物。大多数ON通过某种反义机制操作,并且因此通常被指向某种RNA物质。实例包括但不限于gapmer、空间嵌段ON、antagomir、小干扰RNA(siRNA)、微RNA模拟物和剪接转换ON。在理论意义上,这样的化合物可以用于治疗其病因已知与特定基因相关的任何紊乱。这样的疾病包括各种癌症、糖尿病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、杜兴氏肌营养不良、脊髓性肌萎缩、哮喘和关节炎。目前,若干种ON药物已经收到来自美国食品和药物管理局的批准:福米韦生(fomivirsen),用于治疗巨细胞病毒视网膜炎;米泊美生(mipomersen),用于治疗纯合子家族性高胆固醇血症;etelipirsen,用于治疗杜兴氏肌营养不良;以及诺西那生钠(nusinersen),用于治疗脊髓性肌萎缩。

[0006] ON药物的有效递送和靶向继续构成问题。例如,福米韦生是核苷酸单元之间的合成多核苷酸硫代磷酸酯键,以便防止施用后被核酸酶降解。但是这样的修饰带来它们自己的问题,因为这样的化合物不容易被代谢成身体习惯于处理的化合物。此外,与各种蛋白质的非特异性结合是个问题。其他药物,诸如米泊美生,由于脱靶副作用的风险而含有黑盒警告(black-box warning)。并且,许多这样的化合物在开发中保持停滞,因为不存在将它们递送至靶组织的有效手段。因此,虽然ON为治疗大量的疾病提供了很大的前景,但这一希望还远未被实现。

[0007] 因此,对开发递送ON的改善方法存在持续需求,以便抵抗快速分解,减少脱靶副作用,和/或靶向受疾病状态或状况影响的特定组织。

[0008] 概述

[0009] 本公开内容提供了修饰的ON化合物和相关的组合物,该修饰的ON化合物和相关的组合物可以提供以下中的一种或更多种:施用后的改善的半衰期、减少的来自脱靶活性的副作用以及增强的对患病组织的靶向性。在一些实施方案中,化合物是ON的前药,使得前药允许ON向患病组织诸如向哺乳动物中的实体癌肿瘤的改善的递送。本公开内容还提供了那些化合物和组合物用于治疗各种疾病(包括癌症)的方法和用途。

[0010] 在第一方面中,本公开内容提供了式(I)的化合物:

[0011]  $A^1-X^1-X^2-A^2$  (I)

[0012] 其中： $A^1$ 是有机基团，或者是亲水性基团或氢原子； $A^2$ 是寡核苷酸部分； $X^1$ 是疏水性基团；以及 $X^2$ 是直接键、有机基团或选自以下组成的组的杂原子基团： $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N=$ 、 $=N-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-N=N-N(H)-$ 、 $-N(H)-N=N-$ 、 $-N(OH)-$ 或 $-N(=O)-$ 。在一些实施方案中， $A^1$ 是亲水性基团，诸如羧酸基团( $-COOH$ )；或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中，疏水性基团是任选地被取代的 $C_{12-22}$ 亚烷基基团。在一些实施方案中， $X^2$ 是 $-O-$ 、 $-NH-$ 、或有机基团诸如 $-NH-Z^1-O-C(O)-$ 或 $-O-Z^1-O-C(O)-$ ，其中 $Z^1$ 是任选地被 $-OH$ 取代一次或更多次的 $C_{1-6}$ 亚烷基基团。

[0013] 在第二方面中，本公开内容提供了组合物(例如，药物组合物)，其包含：第一方面的任何实施方案的化合物；以及蛋白质。在一些实施方案中，蛋白质是白蛋白或白蛋白模拟物。

[0014] 在第三方面中，本公开内容提供了组合物(例如，药物组合物)，其包含：第一方面的任何实施方案的化合物；蛋白质，其中所述蛋白质是白蛋白或白蛋白模拟物；以及载体，该载体包含水；其中所述化合物和蛋白质彼此非共价地缔合；并且其中所述化合物和蛋白质被载体溶剂化。

[0015] 在第四方面中，本公开内容提供了治疗癌症的方法，该方法包括向受试者施用任何前述方面的任何实施方案的化合物或组合物。在其一些另外的实施方案中，本公开内容提供了治疗癌症的方法，该方法包括向受试者施用一种或更多种免疫治疗剂。

[0016] 在第五方面中，本公开内容提供了诱导癌细胞的凋亡的方法，该方法包括使癌细胞与第一方面至第三方面中任一方面的任何实施方案的化合物或组合物接触。在其一些另外的实施方案中，本公开内容提供了诱导癌细胞的凋亡的方法，该方法包括使癌细胞与一种或更多种免疫治疗剂接触。

[0017] 在第六方面中，本公开内容提供了用于抑制癌性肿瘤的生长的方法，该方法包括使癌性肿瘤与第一方面的任何实施方案的化合物接触。在其一些另外的实施方案中，本公开内容提供了抑制癌性肿瘤的生长的方法，该方法包括使癌性肿瘤与一种或更多种免疫治疗剂接触。

[0018] 在第七方面中，本公开内容提供了第一方面至第三方面中任一方面的任何实施方案的化合物或组合物作为药剂的用途。

[0019] 在第八方面中，本公开内容提供了第一方面至第三方面中任一方面的任何实施方案的化合物或组合物用于治疗癌症的用途。在其一些另外的实施方案中，本公开内容提供了包括与一种或更多种免疫治疗剂组合使用的用途。

[0020] 在第九方面中，本公开内容提供了第一方面至第三方面中任一方面的任何实施方案的化合物或组合物在制造药剂中的用途。

[0021] 在第十方面中，本公开内容提供了第一方面至第三方面中任一方面的任何实施方案的化合物或组合物在制造用于治疗癌症的药剂中的用途。

[0022] 在第十一方面中，本公开内容提供了制备第一方面和第二方面的化合物以及第三方面和第四方面的组合物的方法。

[0023] 在附图、详细描述、权利要求和摘要中提供了另外的方面和实施方案。

[0024] 附图简述

[0025] 提供以下附图用于说明本文所公开的化合物、组合物、方法和用途的各种实施方案的目的。提供附图仅用于说明性目的,并且不意图描述任何优选的化合物或组合物或任何优选的方法或用途,或者不意图充当对要求保护的发明的范围的任何限制的来源。

[0026] 图1示出了式(I)的化合物的非限制性实例,其中化合物包含寡核苷酸部分,其被修饰为包含长链二元酸部分。

[0027] 图2示出了式(I)的非限制性化合物的纯化形式的(a)分析型HPLC迹线(trace)(顶部)和(b)MALDI-TOF质谱(底部)。

[0028] 图3示出了式(I)的非限制性化合物的纯化形式的(a)分析型HPLC迹线(顶部)和(b)MALDI-TOF质谱(底部)。

[0029] 图4示出了式(I)的非限制性化合物的纯化形式的(a)分析型HPLC迹线(左)和(b)MALDI-TOF质谱(右)。

[0030] 详细描述

[0031] 以下描述叙述了本文所公开的本发明的各个方面和实施方案。没有特定的实施方案意图限定本发明的范围。更确切地说,实施方案提供了被包括在要求保护的发明的范围内的各种组合物和方法的非限制性实例。该描述将从本领域普通技术人员的角度来阅读。因此,本领域普通技术人员熟知的信息不一定被包括。

[0032] 定义

[0033] 除非本文另外提供,否则以下术语和措辞具有下文指出的含义。本公开内容可以采用本文没有明确定义的其他术语和措辞。这样的其他术语和措辞应该具有它们对于本领域普通技术人员来说在本公开内容的上下文中将拥有的含义。在一些情况下,术语或措辞可以以单数或复数来定义。在这样的情况下,应当理解,除非另外明确相反指明,否则以单数的任何术语可以包括其复数对应物,并且反之亦然。

[0034] 如本文中所使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指代物,除非上下文另外清楚地指明。例如,提及的“取代基”涵盖单个取代基以及两个或更多个取代基等。

[0035] 如本文中所使用的,“例如(for example)”、“例如(for instance)”、“诸如(such as)”或“包含(including)”意指引入进一步澄清更一般的主题的实例。除非另外明确地指明,否则这样的实例仅作为用于理解本公开内容中示出的实施方案的辅助被提供,并且不意指以任何方式进行限制。这些措辞也不指示对所公开的实施方案的任何种类的偏好。

[0036] 如本文中所使用的,“烃”指的是包含碳和氢的有机基团,该有机基团可以是饱和的或不饱和的,并且可以包括芳香族基团。术语“烷基”指的是单价或多价(例如,二价或更高价)的烃部分。在一些情况下,二价烃基基团被称为“亚烷基”基团。

[0037] 如本文中所使用的,“烷基”指的是具有1个至30个碳原子的直链或支链饱和烃,其可以任选地被取代,如本文进一步描述的,其中允许多种取代度。如本文所使用的“烷基”的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、异丁基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、正戊基、新戊基、正己基和2-乙基己基。在一些情况下,“烷基”基团可以是二价的,在这种情况下,该基团可以可选择地被称为“亚烷基”基团。此外,在一些情况下,烷基基团或亚烷基基团中的一个或更多个碳原子可以被杂原子(例如,在可行的情况下,选自氮、氧或硫,包括N-氧化物、硫氧化物、二氧化硫和羰基基团)替换,并且分别被称为“杂烷基”基团或“亚杂烷

基”基团。非限制性实例包括“氧烷基 (oxyalkyl)”基团或“氧亚烷基 (oxyalkylene)”基团，该“氧烷基 (oxyalkyl)”基团或“氧亚烷基 (oxyalkylene)”基团指的是其中烷基基团或亚烷基基团中的碳原子被氧替换的基团。氧烷基基团或氧亚烷基基团的非限制性实例包括含有羰基基团的烷基链或亚烷基链、以及烷氧基化物 (alkoxylate)、聚亚烷基氧化物 (polyalkylene oxide) 等。

[0038] 任何基团或化合物中的碳原子的数目可以由术语表示。因此，“C<sub>z</sub>”指的是具有z个碳原子的基团或化合物，并且“C<sub>x-y</sub>”指的是包含从x个至y个 (包括端点) 碳原子的基团或化合物。例如，“C<sub>1-6</sub>烷基”表示具有从1个至6个碳原子的烷基基团，并且例如包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、异丁基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、正戊基、新戊基和正己基。相同的逻辑适用于下文定义的其他类型的官能团。

[0039] 如本文中所使用的，“烯基”指的是具有2个至30个碳原子并且具有一个或更多个碳-碳双键的直链或支链非芳香族烃，其可以任选地被取代，如本文进一步描述的，其中允许多种取代度。如本文中所使用的“烯基”的实例包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、2-丁烯基和3-丁烯基。在一些情况下，“烯基”基团可以是二价的，在这种情况下，该基团可以可选择地被称为“亚烯基”基团。此外，在一些情况下，烯基基团或亚烯基基团中的一个或更多个碳原子可以被杂原子 (例如，在可行的情况下，选自氮、氧或硫，包括N-氧化物、硫氧化物、二氧化硫和羰基基团) 替换，并且分别被称为“杂烯基”基团或“亚杂烯基”基团。

[0040] 如本文中所使用的，“环烷基”指的是具有3个至20个碳原子的脂肪族饱和的或不饱和的烃环体系，其可以任选地被取代，如本文进一步描述的，其中允许多种取代度。在一些实施方案中，该术语仅指的是饱和的烃环体系，如本文进一步描述的被取代。如本文所使用的“环烷基”的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环己烯基、环庚基、环辛基、金刚烷基等。在一些情况下，“环烷基”基团可以是二价的，在这种情况下，该基团可以可选择地被称为“亚环烷基”基团。环烷基基团和亚环烷基基团在本文也可以被称为“碳环”。此外，在一些情况下，环烷基基团或亚环烷基基团中的一个或更多个碳原子可以被杂原子 (例如，在可行的情况下，独立地选自氮、氧、硅或硫，包括N-氧化物、硫氧化物、二氧化硫) 替换，并且分别被称为“杂环基”基团或“亚杂环基”基团。术语“杂环 (heterocyclicring)”也可以与这些术语中的任一个可互换地使用。在一些实施方案中，环烷基基团和杂环基基团是完全饱和的。在一些其他实施方案中，环烷基基团和杂环基基团可以包含一个或更多个碳-碳双键。

[0041] 如本文中所使用的，“卤素”、“卤素原子”或“卤代 (halo)”指的是氟原子、氯原子、溴原子或碘原子。在一些实施方案中，这些术语指的是氟原子或氯原子。

[0042] 如本文中所使用的，术语“有机基团”、“有机部分”或“有机残基”指的是具有至少一个碳原子的单价或多价官能团，其任选地包含选自以下组成的组的一个或更多个另外的原子：氢原子、卤素原子、氮原子、氧原子、磷原子和硫原子，并且其不包括共价地结合的金属原子或半金属原子。在一些实施方案中，这些术语可以包括有机基团的金属盐，诸如有机阴离子的碱金属盐或碱土金属盐。

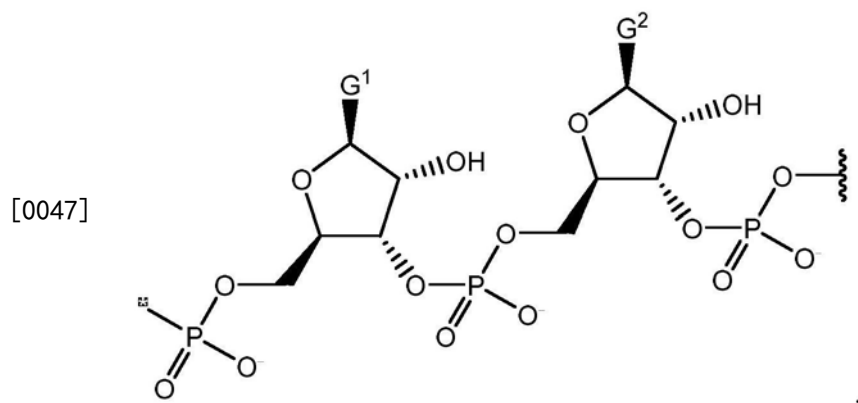
[0043] 如本文中所使用的，术语“药效团 (pharmacophore)”指的是一类有机官能团。标准药效团是疏水性药效团、氢键供体药效团、氢键受体药效团、正可电离药效团和负可电离药效团。化合物中有机官能团的分类根据本领域中已知的标准分类系统进行。



[0044] 如本文中所使用的,术语“疏水性基团”、“疏水性部分”或“疏水性残基”指的是基本上由疏水性药效团组成的有机基团。在一些实施方案中,这些术语指的是由疏水性药效团组成的有机基团。

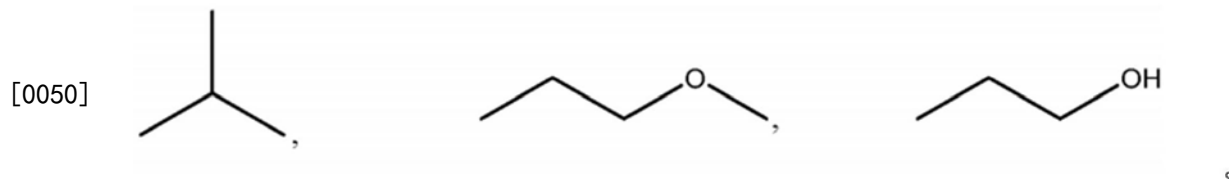
[0045] 如本文中所使用的,术语“亲水性基团”、“亲水性部分”或“亲水性残基”指的是包含一种药效团的有机基团,所述药效团选自自由以下组成的组:氢键供体、氢键受体、负可电离基团或正可电离基团。在一些实施方案中,这些术语指的是基本上由药效团组成的有机基团,所述药效团选自自由以下组成的组:氢键供体、氢键受体、负可电离基团或正可电离基团。

[0046] 如本文中所使用的,术语“寡核苷酸部分”指的是包含连接在一起的两个或更多个核苷酸单元(一般地,从2个至200个核苷酸单元、或从4个至100个核苷酸单元、或从5个至50个核苷酸单元)的部分。这样的“寡核苷酸部分”的非限制性实例是下式的部分:

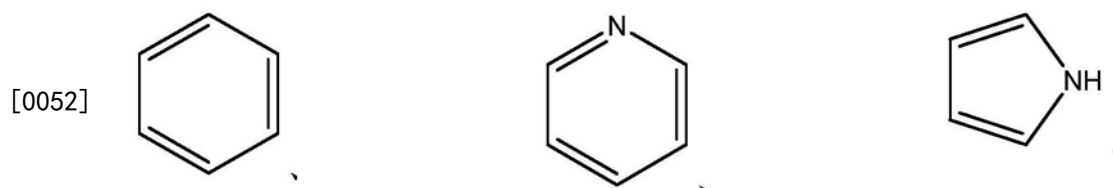


[0048] 其中 $G^1$ 和 $G^2$ 是碱基部分,例如基于嘌呤的部分和基于嘧啶的部分,包括腺嘌呤部分、鸟嘌呤部分、胞嘧啶部分、胸腺嘧啶部分和尿嘧啶部分,并且其中垂直的波浪线指示核苷酸单元和磷酸二酯键继续向右。应注意,术语“寡核苷酸部分”不限于用于制备这样的化合物或部分的任何特定程序。

[0049] 在本文中使用了绘制化学结构的各种方法。在一些情况下,键线结构方法用于描绘化学化合物或化学部分。在线结构方法中,线表示化学键,并且碳原子没有被明确地示出(但是由线的交点暗示)。氢原子也没有被明确地示出,除了在其中它们被附接至杂原子的情况之外。然而,杂原子被明确地示出。因此,使用该方法,下文示出的结构用于2-甲基丙烷、1-甲氧基丙烷和1-丙醇:



[0051] 在该方法中,芳香族环通常仅由贡献共振结构之一表示。因此,以下结构用于苯、吡啶和吡咯:



[0053] 如本文中所使用的,“蛋白质结合部分”是在25℃在水中以至少 $100\text{M}^{-1}$ 的结合常数( $K_b$ )非共价地结合至蛋白质上的一个或更多个位点的部分。

[0054] 如本文中所使用的,“氨基酸”指的是具有结构 $\text{H}_2\text{N}-\text{R}^x-\text{COOH}$ 的化合物,其中 $\text{R}^x$ 是有机基团,并且其中 $\text{NH}_2$ 可以任选地与 $\text{R}^x$ 组合(例如,如在脯氨酸的情况下)。该术语包括任何已知的氨基酸,包括但不限于 $\alpha$ 氨基酸、 $\beta$ 氨基酸、 $\gamma$ 氨基酸、 $\delta$ 氨基酸等。在一些实施方案中,该术语可以指的是 $\alpha$ 氨基酸。

[0055] 如本文中所使用的,“羟基酸”指的是具有结构 $\text{HO}-\text{R}^y-\text{COOH}$ 的化合物,其中 $\text{R}^y$ 是有机基团。非限制性实例包括乙醇酸、乳酸和己内酯。

[0056] 如本文中所使用的,“烷醇胺(alkanol amine)”指的是具有结构 $\text{HO}-\text{R}^z-\text{NH}_2$ 的化合物,其中 $\text{R}^z$ 是任选地被取代的亚烷基基团。非限制性实例包括乙醇胺。

[0057] 如本文中所使用的,“施用(administer)”或“施用(administering)”意指引入,诸如向受试者引入化合物或组合物。该术语不限于任何特定的递送模式,并且可以包括例如皮下递送、静脉内递送、肌内递送、脑池内递送、通过输注技术的递送、透皮递送、口服递送、鼻递送、和直肠递送。此外,取决于递送的模式,施用可以由各种个体进行,所述个体包括例如保健专业人员(例如,医师、护士等)、药剂师或受试者(即,自我施用)。

[0058] 如本文中所使用的,“治疗(treat)”或“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”可以指的是以下中的一种或更多种:延迟疾病、紊乱或状况的进展;控制疾病、紊乱或状况;改善疾病、紊乱或状况的一种或更多种症状特性;或者延迟疾病、紊乱或状况或其特性症状的复发,这取决于疾病、紊乱或状况及其特性症状的性质。

[0059] 如本文中所使用的,“受试者”指的是任何哺乳动物,诸如但不限于人、马、牛、绵羊、猪、小鼠、大鼠、狗、猫、以及灵长类动物诸如黑猩猩、大猩猩和恒河猴。在一些实施方案中,“受试者”是人。在一些这样的实施方案中,“受试者”是呈现出疾病、紊乱或状况的一种或更多种症状特性的人。术语“受试者”不要求一个人具有关于医院、诊所或研究机构的任何特定状态(例如,作为入院患者(admitted patient)、研究参与者等)。

[0060] 如本文中所使用的,术语“化合物”包括游离酸、游离碱以及它们的盐。

[0061] 如本文中所使用的,术语“药物组合物”用于表示可以以包含常规无毒载体、稀释剂、佐剂、媒介物等的单位剂量制剂,例如口服地、局部地、肠胃外地、通过吸入喷雾或直肠地被施用至哺乳动物宿主的组合物。如本文所使用的术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉内注射、肌内注射、脑池内注射或通过输注技术。

[0062] 在本公开内容的范围内还包括由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐的个体对映异构体,以及其任何全部或部分地外消旋混合物。本公开内容还涵盖由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐的个体对映异构体,以及与其中一个或更多个立体中心被反转的其非对映异构体的混合物。除非另外陈述,否则本文描绘的结构还意指包括仅在一个或更多个同位素富集的原子的存在方面不同的化合物。例如,具有本结构的化合物,除了通过氘或氚替换氢原子或者通过 $^{13}\text{C}$ -富集的碳或 $^{14}\text{C}$ -富集的碳替换碳原子之外,在本公开内容的范围内。

[0063] 如本文中所使用的,“混合”或“混合的”或“混合物”广义上指的是两种或更多种组合物的任何组合。两种或更多种组合物不需要具有相同的物理状态;因此,固体可以与液体“混合”,例如以形成浆料、悬浮液或溶液。此外,这些术语不要求任何程度的组成的同质性

或均匀性。这样地,这样的“混合物”可以是均相的或非均相的,或者可以是均匀的或非均匀的。此外,这些术语不要求使用任何特定的设备来进行混合,诸如工业混合器。

[0064] 如本文中所使用的,“任选地”意指随后描述的事件可能发生或可能不发生。在一些实施方案中,任选的事件不发生。在一些其他实施方案中,任选的事件确实发生一次或更多次。

[0065] 如本文中所使用的,“被取代的”指的是用所指定的一个取代基或更多个取代基取代指定部分的一个或更多个氢原子,除非另外陈述,否则允许多种取代度,条件是取代导致稳定的或化学上可行的化合物。稳定的化合物或化学上可行的化合物是这样的化合物,其中当在从约-80℃至约+40℃的温度,在没有水分或其他化学反应条件的情况下保持持续至少一周时,化学结构基本上不被改变。如本文中所使用的,措辞“被一个或更多个……取代”或“取代一次或更多次……”指的是取代基的数目,该取代基的数目基于可用的键合位点的数目等于从一至最大可能的取代基的数目,条件是满足上述稳定性和化学可行性的条件。

[0066] 如本文中所使用的,“包含(comprise)”或“包含(comprises)”或“包含(comprising)”或“包括(comprised of)”指的是开放的组,这意指该组除了明确列举的那些之外还可以包括另外的成员。例如,措辞“包含A”意指A必须存在,但其他成员也可以存在。术语“包括(include)”、“具有(have)”和“包括(composed of)”及其语法变体具有相同的含义。相反,“由……组成(consist of)”或“由……组成(consists of)”或“由……组成(consisting of)”指的是封闭的组。例如,措辞“由A组成”意指存在A并且仅存在A。如本文中所使用的,措辞“基本上由……组成(consist essentially of)”、“基本上由……组成(consists essentially of)”和“基本上由……组成(consisting essentially of)”指的是开放的组,但是其仅包括将不实质上影响所要求保护的主题的的基本特性的另外的未指定的成员。

[0067] 如本文中所使用的,“或”应被给予其最广泛的合理解释,并且不应限于非此即彼(either/or)的构造。因此,措辞“包含A或B”意指A可以存在而不是B,或者B存在而不是A,或者A和B都存在。此外,例如,如果A定义了可以具有多个成员的类别,例如A<sub>1</sub>和A<sub>2</sub>,则该类别的一个或更多个成员可以同时存在。

[0068] 如本文中所使用的,所表示的各种官能团将被理解为在具有连字符或破折号(-)或与星号(\*)组合使用的破折号的官能团处具有附接点。换言之,在-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>或\*-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>的情况下,将理解,附接点是最左边处的CH<sub>2</sub>基团。如果在没有星号或破折号的情况下列举了基团,则附接点由所列举的基团的简单且普通的含义来指示。

[0069] 如本文中所使用的,多原子二价物质应从左到右读取。例如,如果说明书或权利要求列举了A-D-E并且D被定义为-OC(O)-,则其中D被替换的所得到的基团是:A-OC(O)-E而不是A-C(O)O-E。

[0070] 其他术语在本描述的其他部分中被定义,即使不被包括在本小节中。

[0071] 修饰的寡核苷酸

[0072] 在至少一个方面中,本公开内容提供了式(I)的化合物:

[0073]  $A^1-X^1-X^2-A^2$  (I)

[0074] 其中:A<sup>1</sup>是亲水性基团或氢原子,或者是有机基团;A<sup>2</sup>是寡核苷酸部分;X<sup>1</sup>是疏水性

基团;并且 $X^2$ 是直接键、有机基团、或选自由以下组成的组的基团: $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N=$ 、 $=N-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-N=N-N(H)-$ 、 $-N(H)-N=N-$ 、 $-N(OH)-$ 、或 $-N(=O)-$ 。

[0075] 在一些实施方案中, $A^1$ 是有机基团。 $A^1$ 可以包含任何合适数目的碳原子。在一些实施方案中,例如, $A^1$ 包含从1个至100个碳原子、或从1个至50个碳原子、或从1个至25个碳原子、或从1个至10个碳原子、或从1个至6个碳原子。 $A^1$ 还可以包含一个或更多个杂原子,诸如氮、氧、硫或磷。

[0076] 在根据任何前述实施方案的一些实施方案中, $A^1$ 是亲水性基团或部分。亲水性基团的非限制性实例包括但不限于羧酸部分、酯部分、酰胺部分、脲部分、胺部分、醚部分、醇部分、硫醚部分、硫醇部分、酮部分、醛部分、硫酸酯部分、硫代硫酸酯部分、亚硫酸酯部分、硫代亚硫酸酯部分、磷酸酯部分、膦酸酯部分、次膦酸酯部分、亚磷酸酯部分、硼酸酯(borate)部分、或硼酸酯(boronate)部分。

[0077] 在任何以上提及的实施方案的一些实施方案中, $A^1$ 选自由以下组成的组:羧酸基团( $-COOH$ )、羧酸根阴离子( $-COO^-$ )、或羧酸酯( $-COOR^a$ ,其中 $R^a$ 是有机基团,诸如烷基基团或烷氧基化物基团)。在一些这样的实施方案中, $A^1$ 是羧酸基团。在一些这样的实施方案中, $A^1$ 是羧酸酯基团。

[0078] 在任何以上提及的实施方案的一些其他实施方案中, $A^1$ 是氢原子。在任何以上提及的实施方案的一些其他实施方案中, $A^1$ 是羟基( $-OH$ )基团。

[0079] 在任何以上提及的实施方案中, $X^1$ 可以是具有任何合适数目的碳原子的疏水性基团。在一些实施方案中,例如, $X^1$ 包含从1个至100个碳原子、或从1个至50个碳原子、或从1个至25个碳原子。

[0080] 在任何以上提及的实施方案的一些实施方案中, $X^1$ 是任选地被取代的 $C_{8-30}$ 亚烷基。在一些另外的实施方案中, $X^1$ 是任选地被取代的 $C_{12-22}$ 亚烷基。在一些另外的实施方案中, $X^1$ 是 $C_{12-22}$ 亚烷基。在一些另外的实施方案中, $X^1$ 是 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{16}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{20}-$ 、或 $-(CH_2)_{22}-$ 。在一些其他实施方案中, $X^1$ 是 $-(CH_2)_{16}-$ 。在一些另外的实施方案中, $X^1$ 是 $C_{12-22}$ 亚烯基。在一些另外的这样的实施方案中, $X^1$ 是 $-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-$ 。

[0081] 在任何以上提及的实施方案的一些另外的实施方案中, $X^1$ 是任选地被取代的 $C_{12-22}$ 亚烷基。在一些这样的实施方案中, $X^1$ 是 $C_{12-22}$ 亚烷基。在一些另外的这样的实施方案中, $X^1$ 是 $C_{14-22}$ 亚烷基。在一些另外的这样的实施方案中, $X^1$ 是 $C_{16-22}$ 亚烷基。在任何以上提及的实施方案的一些实施方案中, $X^1$ 是 $C_{12-22}$ 亚烷基,其中 $A^1$ 和 $X^2$ (或者,如果 $X^2$ 是直接键,则 $A^2$ )彼此分离至少6个、或至少8个、或至少10个、或至少12个、或至少14个碳原子。在一些另外的这样的实施方案中, $X^1$ 是 $C_{14-22}$ 亚烷基,其中 $A^1$ 和 $X^2$ (或者,如果 $X^2$ 是直接键,则 $A^2$ )彼此分离至少6个、或至少8个、或至少10个、或至少12个、或至少14个碳原子。在一些另外的这样的实施方案中, $X^1$ 是 $C_{16-22}$ 亚烷基,其中 $A^1$ 和 $X^2$ (或者,如果 $X^2$ 是直接键,则 $A^2$ )彼此分离至少6个、或至少8个、或至少10个、或至少12个、或至少14个碳原子。在任何以上提及的实施方案的一些另外的实施方案中, $X^1$ 是 $C_{12-22}$ 直链亚烷基、或 $C_{14-22}$ 直链亚烷基、或 $C_{16-22}$ 直链亚烷基。在任何以上提及的实施方案的一些另外的实施方案中, $X^1$ 是 $C_{12-22}$ 直链亚烯基、或 $C_{14-22}$ 直链亚烯基、或 $C_{16-22}$ 直链亚烯基。

[0082] 在任何以上提及的实施方案的一些实施方案中, $X^2$ 是直接键。在任何以上提及的实施方案的一些其他实施方案中, $X^2$ 是有机基团。在一些实施方案中, $X^2$ 是亲水性基团。在一

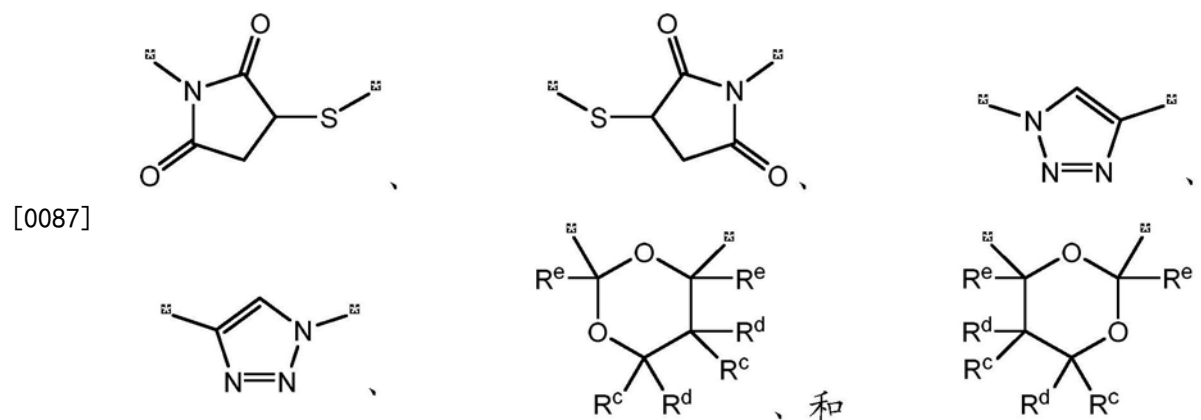
些实施方案中,  $X^2$  是亚杂烷基基团。

[0083] 在其中  $X^2$  是有机基团的任何以上提及的实施方案中,  $X^2$  可以包含任何合适数目的碳原子。例如, 在一些实施方案中,  $X^2$  包含从 1 个至 100 个碳原子、或从 1 个至 50 个碳原子、或从 1 个至 25 个碳原子、或从 1 个至 10 个碳原子、或从 1 个至 6 个碳原子。

[0084] 在其中  $X^2$  是亚杂烷基基团的任何以上提及的实施方案中,  $X^2$  可以包含任何合适数目的碳原子。例如, 在一些实施方案中,  $X^2$  包含从 1 个至 100 个碳原子、或从 1 个至 50 个碳原子、或从 1 个至 25 个碳原子、或从 1 个至 10 个碳原子、或从 1 个至 6 个碳原子。

[0085] 在一些以上提及的实施方案中,  $X^2$  可以包含某些基团。 $X^2$  可以包含的这样的基团的一些非限制性实例是聚亚烷基氧化物基团, 诸如聚乙二醇 (PEG) 和各种多肽链。

[0086] 在一些实施方案中,  $X^2$  是选自由以下组成的组的有机基团:  $-C(=O)-$ 、 $-C\equiv C-$ 、 $-C(H)=C(H)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-O-C(=O)-O-$ 、 $-C(=N-NH_2)-$ 、 $-C(=N-R^b)-$  (其中  $R^b$  是氢原子或烷基基团)、 $-C(=N-OH)-$ 、 $-NH-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=S)-NH-$ 、 $-NH-C(=S)-O-$ 、 $-O-C(=S)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-S-$ 、 $-S-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=S)-S-$ 、 $-S-C(=S)-NH-$ , 以及下文示出的环状结构:



[0088] 其中  $R^c$ 、 $R^d$  和  $R^e$  在每次出现时独立地是氢原子或  $C_{1-10}$  烷基。在一些另外的实施方案中,  $X^2$  是  $-C(=O)-$ 。

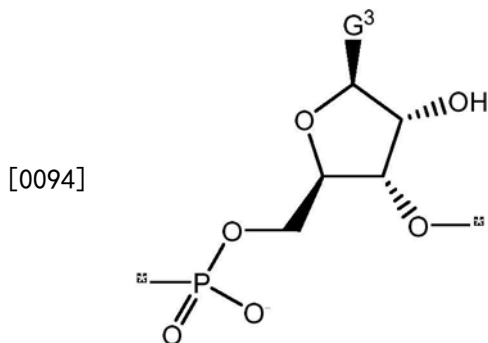
[0089] 在一些实施方案中,  $X^2$  是选自由以下组成的组的基团:  $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N=$ 、 $=N-$ 、 $-N(H)-$ 、 $-N=N-N(H)-$ 、 $-N(H)-N=N-$ 、 $-N(OH)-$ 、以及  $-N(O)-$ 。

[0090] 在一些实施方案中,  $X^2$  包含选自由  $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-S-$  组成的组的一个或更多个部分; 一个或更多个由亚烷基二醇形成的部分; 一个或更多个由烷醇胺形成的单元; 一个或更多个由氨基酸形成的单元; 以及一个或更多个由羟基酸形成的单元。因此, 在一些实施方案中,  $X^2$  包含一个或更多个由亚烷基二醇形成的部分, 诸如具有 1 个至 25 个乙二醇单元的短的聚(乙二醇)链。在一些实施方案中,  $X^2$  包含一个或更多个由氨基酸形成的部分, 诸如具有 1 个至 25 个氨基酸单元的寡肽链。在一些实施方案中,  $X^2$  包含一个或更多个由羟基酸形成的部分, 诸如由乙醇酸、乳酸或己内酯形成的部分。在一些实施方案中,  $X^2$  包含具有 1 个至 25 个乙二醇单元的聚(乙二醇)链和具有 1 个至 25 个氨基酸单元的寡肽以及任选地一个或更多个由羟基酸形成的单元的组合。在一些实施方案中,  $X^2$  是  $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ , 或有机基团, 诸如  $-C(O)-O-Z^1-NH-$ 、 $-C(O)-O-Z^1-O-$ 、 $-C(O)-O-Z^1-S-$ , 其中  $Z^1$  是任选地被  $-OH$  取代一次或更多次的  $C_{1-6}$  亚烷基基团。在一些这样的实施方案中,  $Z^1$  是亚乙基。在一些这样的实施方案中,  $Z^1$  是  $-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 。

[0091] 在任何以上实施方案中,  $X^2$  的选择将取决于它通过其与寡核苷酸部分连接的官能团的类型, 以便避免制备化学上不稳定的或不可能的化合物。本领域技术人员将能够选择导致化学上稳定的化合物的  $X^2$  和  $A^2$  的组合, 该化学上稳定的化合物是其中化学结构当在从约  $-80^\circ\text{C}$  至约  $+40^\circ\text{C}$  的温度, 在没有水分或其他化学反应条件的情况下保持持续至少一周时基本上不被改变的化合物。

[0092] 在以上实施方案中, 根据上文阐述的定义,  $A^2$  可以是任何合适的寡核苷酸部分。这样的寡核苷酸部分可以包含任何合适数目的核苷酸单元。在一些实施方案中, 寡核苷酸部分包含从 2 个至 200 个核苷酸单元、或从 3 个至 150 个核苷酸单元、或从 4 个至 100 个核苷酸单元、或从 5 个至 50 个核苷酸单元、或从 6 个至 40 个核苷酸单元。

[0093] 如本文中所使用的, 术语“核苷酸单元”指的是由基于磷酸酯的部分、环状羟基取代的醚部分和含氮碱基形成的部分。一般来说, 基于磷酸酯的部分和含氮碱基从环状羟基取代的醚的环状醚基团的不同位置上形成取代基, 并且在寡核苷酸部分中, 该部分的骨架包含由基于磷酸酯的部分和环状羟基取代的醚部分形成的交替基团。下式的部分表示这样的核苷酸单元的非限制性实例, 其中  $G^3$  是由含氮碱基形成的部分, 诸如腺嘌呤部分、胞嘧啶部分、鸟嘌呤部分、胸腺嘧啶部分或尿嘧啶部分:

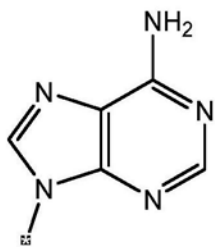


[0095] 在任何以上提及的实施方案的一些实施方案中, 基于磷酸酯的部分是磷酸酯部分, 诸如以上示出的。在一些实施方案中, 一个或更多个氧原子可以被硫替换以形成硫代磷酸酯部分。这样的硫代磷酸酯部分的实例包括诸如  $-P(=S)(O^-)-O-$  的部分。在一些其他实施方案中, 磷酸酯的阴离子氧原子被有机基团诸如烷基基团或烷基氧基基团替换。

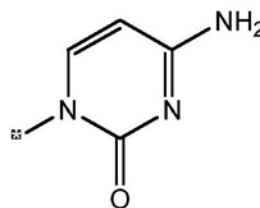
[0096] 在任何以上提及的实施方案的一些实施方案中, 环状羟基取代的醚部分是环状核糖部分 (例如, 诸如以上示出的) 或 2-脱氧核糖部分 (其中核糖上的 2' 位置未被取代)。在两种情况下, 1' 位置处的  $-OH$  基团被含氮碱基部分替换。在一些实施方案中, 环状羟基取代的醚部分是核糖部分, 其中 2' 位置处的羟基基团被有机基团诸如甲氧基基团、甲氧基乙氧基基团或氨基乙氧基基团替换。在一些实施方案中, 环状羟基取代的醚部分是核糖部分, 其中 2' 位置处的羟基基团被卤素原子诸如氟替换。在一些实施方案中, 特别是在某个核苷酸单元是寡核苷酸链中的末端单元的情况下, 2' 位置处的羟基基团被含氮碱基诸如胸腺嘧啶替换。在一些这样的实施方案中, 末端核苷酸的核糖或脱氧核糖的 3' 位置是羟基基团。在其中环状羟基取代的醚部分是核糖部分、脱氧核糖部分或前述任一种的衍生物的实施方案中, 寡核苷酸通常通过经由 5' 位置和 3' 位置连接形成, 如上文所示出的。在一些这样的实施方案中,  $-X^2-X^1-A^1$  部分缀合至最靠近 5' 位置 (例如, 经由基于磷酸酯的部分)。

[0097] 在一些实施方案中, 含氮碱基部分选自由以下组成的组: 腺嘌呤部分、鸟嘌呤部

分、胞嘧啶部分、胸腺嘧啶部分和尿嘧啶部分。在一些其他实施方案中,含氮碱基也可以选自前述的某些模拟物,诸如二氢尿嘧啶。腺嘌呤部分和鸟嘌呤部分通常经由咪唑环上的N-H基团连接至核糖或脱氧核糖部分。含氮碱基部分的实例在下文和下一页上示出。

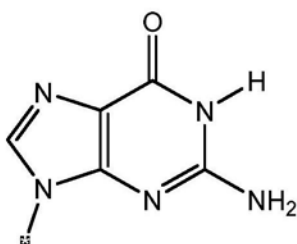


腺嘌呤部分

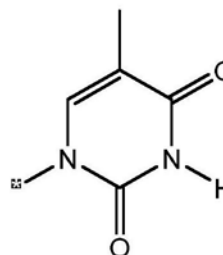


胞嘧啶部分

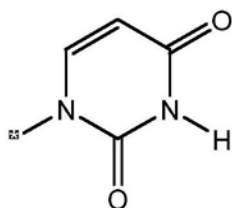
[0098]



鸟嘌呤部分



胸腺嘧啶部分



尿嘧啶部分

[0099] 根据任何以上提及的实施方案的寡核苷酸部分可以是单链的或双链的。在双链的实施方案中,互补的寡核苷酸经由氢键和/或 $\pi$ -堆积与寡核苷酸部分非共价地结合。在这样的实施方案中, $-X^2-X^1-A^1$ 部分与两条链中的一条(例如,信使链(passenger chain))缀合,该链经由碱基对之间的氢键和/或 $\pi$ -堆积与另一条链(例如,引导链)非共价地结合。

[0100]  $-X^2-X^1-A^1$ 的选择可以取决于与寡核苷酸部分连接的性质。

[0101] 在其中 $-X^2-X^1-A^1$ 连接至C(=O)基团或连接至P(=O)基团或连接至P(=S)基团的实施方案中,如通常当与寡核苷酸部分连接时的情况, $-X^2-X^1-A^1$ 则选自由以下组成的组:  
 $-O-(CH_2)_{n2}-C(=O)-OH$ ;  $-NH-(CH_2)_{n2}-C(=O)-OH$ ;  $-NH-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C(=O)-(CH_2)_{n1}-C(=O)-OH$ ;  $-O-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C(=O)-(CH_2)_{n1}-C(=O)-OH$ ;  $-NH-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C(=O)-(CH_2)_{n1}-C(=O)-OCH_3$ ;  $-O-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C(=O)-(CH_2)_{n1}-C(=O)-OCH_3$ ;  $-NH-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C(=O)-(CH_2)_{n1}-CH_3$ ;  $-O-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C(=O)-(CH_2)_{n1}-CH_3$ ;  $-NH-(C_{1-6}\text{亚烷基})-C(=O)-O-[ (CH_2)_{2-0} ]_{n3} (CH_2)_{n2}-C(=O)-OH$ ; 以及  $-O-(C_{1-6}\text{亚烷基})-C(=O)-O-[ (CH_2)_{2-0} ]_{n3} (CH_2)_{n2}-C(=O)-OH$ ; 其中 $n1$ 是12至24的整数, $n2$ 是从13至25的整数,并且 $n3$ 是从1至25的整数。在一些另外的这样的实施方案中, $-X^2-X^1-A^1$ 选自由以下组成的组:  
 $-O-(CH_2)_{n2}-C(=O)-OH$ ;  $-NH-(CH_2)_{n2}-C(=O)-OH$ ;  $-NH-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C(=O)-(CH_2)_{n1}-C(=O)-OH$ ;  $-O-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C$

$(=O)-(CH_2)_{n1}-C(=O)-OH$ ;  $-NH-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C(=O)-(CH_2)_{n1}-C(=O)-OCH_3$ ; 以及  $-O-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C(=O)-(CH_2)_{n1}-C(=O)-OCH_3$ 。在一些另外的这样的实施方案中,  $-X^2-X^1-A^1$  选自由以下组成的组:  $-O-(CH_2)_{n2}-C(=O)-OH$ ;  $-NH-(CH_2)_{n2}-C(=O)-OH$ ;  $-NH-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C(=O)-(CH_2)_{n1}-C(=O)-OH$ ; 以及  $-O-(C_{1-6}\text{亚烷基})-O-C(=O)-(CH_2)_{n1}-C(=O)-OH$ 。在任何以上提及的实施方案的一些实施方案中,  $n1$  是从 14 至 22 或从 16 至 20 的整数。在任何以上提及的实施方案的一些实施方案中,  $n2$  是从 15 至 23 或从 17 至 21 的整数。在任何以上提及的实施方案的一些实施方案中,  $n3$  是从 1 至 15、或从 1 至 10、或从 1 至 6 的整数。在一些这样的实施方案中,  $-X^2-X^1-A^1$  是  $-O-(CH_2)_{n3}-OH$ , 其中  $n3$  是从 14 至 26 的整数、或从 16 至 24 的整数、或从 18 至 22 的整数。

[0102] 在任何以上实施方案中描述的化合物也可以作为药学上可接受的盐存在。术语“药学上可接受的盐”指的是化合物的盐, 该化合物的盐不是生物学上或以其他方式不合意的, 并且通常通过使游离碱与合适的有机酸或无机酸反应或通过使酸与合适的有机碱或无机碱反应来制备。代表性的盐包括以下盐: 乙酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、酒石酸氢盐、硼酸盐、溴化物、乙二胺四乙酸钙 (calcium edetate)、右旋樟脑磺酸盐 (camsylate)、碳酸盐、氯化物、克拉维酸盐 (clavulanate)、柠檬酸盐、二盐酸盐、乙二胺四乙酸盐、乙二磺酸盐 (edisylate)、依托酸盐 (estolate)、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、乙醇酰阿散酸盐 (glycollylarsanilate)、己基间苯二酚盐 (hexylresorcinate)、海巴明 (hydrabamine)、氢溴酸盐、盐酸盐、羟基萘酸盐、碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖醛酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基溴化物、甲基硝酸盐、甲基硫酸盐、马来酸单钾 (monopotassium maleate)、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、N-甲基葡萄糖胺、草酸盐、双羟萘酸盐 (pamoate) (恩波酸盐 (embonate))、棕榈酸盐、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、钾盐、水杨酸盐、钠盐、硬脂酸盐、碱式乙酸盐、琥珀酸盐、单宁酸盐、酒石酸盐、茶氯酸盐 (teoclolate)、甲苯磺酸盐、三乙碘化物、三甲基铵盐和戊酸盐。当存在酸性取代基诸如  $-COOH$  时, 可以形成铵盐、吗啉鎓盐、钠盐、钾盐、钡盐、钙盐等, 用于作为剂型使用。当存在碱性基团诸如氨基基团或碱性杂芳基基团诸如吡啶基时, 可以形成酸性盐, 诸如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐、三氟乙酸盐、三氯乙酸盐、乙酸盐、草酸盐、马来酸盐、丙酮酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、扁桃酸盐、苯甲酸盐、肉桂酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苦味酸盐等。

[0103] 上文的化合物可以通过标准合成方法诸如在以下中示出的那些合成方法来制备: Sudhir Agrawal, *Protocols for Oligonucleotides and Analogs-Synthesis and Properties* (Methods in Molecular Biology, 第20卷, 1993, Springer-Verlag New York, LLC); Piet Herdewijn, *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications* (Methods in Molecular Biology, 第288卷, 2005, 第1版, Humana Press); 以及 John Goodchild, *Therapeutic Oligonucleotides: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, 第764卷, 2011, 第1版, Humana Press, Springer Science+Business Media, LLC)。下文在实例中示出具体的非限制性实例。

[0104] 表3(下文)示出了本公开内容所预期的化合物的各种实例。表3涉及  $A^2$ -部分与  $-X^2-X^1-A^1$  的各种组合, 其一起形成本公开内容的化合物。表1示出了关于  $A^2$ -部分的说明性实例部分, 其中  $A^2$  可以是所示的部分或者也可以是其药学上可接受的盐。表2示出了关于  $-X^2-X^1-$



A<sup>1</sup>的说明性实例部分。表3示出了来自表1和表2的部分的非限制性说明性组合,它们可以一起形成本公开内容的化合物。表3中公开的化合物可以通过类似于实例中所述的那些的方法,以及通过本领域普通技术人员已知的常见的合成方法来制备。制备这样的化合物的合适方法在以下中示出:Sudhir Agrawal, Protocols for Oligonucleotides and Analogs-Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology, 第20卷, 1993, Springer-Verlag New York, LLC); Piet Herdewijn, Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology, 第288卷, 2005, 第1版, Humana Press); 以及 John Goodchild, Therapeutic Oligonucleotides: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 第764卷, 2011, 第1版, Humana Press, Springer Science+Business Media, LLC)。

[0105] 表1

	<u>A<sup>2</sup>-部分</u>
[0106]	HA1 抗存活素 siRNA (存活素是各种癌症中的过表达基因): 信使链: 5'-GGACCACCGCAUCUCUACAdTdT-3' 引导链: 5'-UGUAGAGAUGCGGUGGUCCdTdT-3' 或其任何荧光团/发色团标记的版本、或其任何荧光团/发色团标记的或未标记的版本, 所述版本包含将修饰诸如例如硫代磷酸酯、2'-氟-核糖、2'-O-甲基-核糖以及其他稳定化
	HA2 微 RNA-122 模拟物(miR-122 在肝细胞癌中被抑制): 5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3' 或其任何荧光团/发色团标记的版本、或其任何荧光团/发色团标记的或未标记的版本, 所述版本包含将修饰诸如例如硫代磷酸酯、2'-氟-核糖、2'-O-甲基-核糖以及其他稳定化
	HA3 抗 $\beta 1$ 整联蛋白亚基 siRNA (整联蛋白是至关重要的细胞外基质受体, 其已经被示出当被敲除时抑制肝细胞癌的生长(参见 Bogorad 等人, Nat. Commun. 2014, 5, 3869)): 信使链: 5'-AGAUGAGGUUUAUUUGAAAdTdT-3' 引导链: 5'-UUCAAAUUGAACCUCUACUCdTdT-3' 或其任何荧光团/发色团标记的版本、或其任何荧光团/发色团标记的或未标记的版本, 所述版本包含将修饰诸如例如硫代磷酸酯、2'-氟-核糖、2'-O-甲基-核糖以及其他稳定化
	HA4 抗- $\alpha v$ 整联蛋白亚基 siRNA (整联蛋白是至关重要的细胞外基质受体, 其已经被示出在被敲除时抑制肝细胞癌的生长(参见 Bogorad 等人, Nat. Commun. 2014, 5, 3869)): 信使链: 5'-GCUUGAAAGAUCUAAUUCAdTdT-3' 引导链: 5'-UGAUUAUGAUCUUUCAAGCdTdT-3' 或其任何荧光团/发色团标记的版本、或其任何荧光团/发色团标记的或未标记的版本, 所述版本包含将修饰诸如例如硫代磷酸酯、2'-氟-核糖、2'-O-甲基-核糖以及其他稳定化
[0107]	<u>A<sup>2</sup>-部分</u>
	核糖以及其他稳定化

[0108] 表2

[0109]

	<u><math>-X^2-X^1-A^1</math>部分</u>
HB1	$-O-(CH_2)_{15}-C(=O)-OH$
HB1	$-O-(CH_2)_{17}-C(=O)-OH$
HB3	$-O-(CH_2)_{19}-C(=O)-OH$
HB4	$-O-(CH_2)_8-CH=CH-(CH_2)_7-C(=O)-OH$
	<u><math>-X^2-X^1-A^1</math>部分</u>
HB5	$-NH-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_{14}-C(=O)-OH$
HB6	$-NH-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_{16}-C(=O)-OH$
HB7	$-NH-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_{18}-C(=O)-OH$
HB8	$-NH-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-C(=O)-OH$
HB9	$-O-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_{14}-C(=O)-OH$
HB10	$-O-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_{16}-C(=O)-OH$
HB11	$-O-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_{18}-C(=O)-OH$
HB12	$-O-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-C(=O)-OH$
HB13	$-NH-CH_2-C(=O)-O-[(CH_2)_2-O]_6C(=O)-(CH_2)_{14}-C(=O)-OH$
HB14	$-NH-CH_2-C(=O)-O-[(CH_2)_2-O]_6C(=O)-(CH_2)_{16}-C(=O)-OH$
HB15	$-NH-CH_2-C(=O)-O-[(CH_2)_2-O]_6C(=O)-(CH_2)_{18}-C(=O)-OH$
HB16	$-NH-CH_2-C(=O)-O-[(CH_2)_2-O]_6C(=O)-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-C(=O)-OH$
HB17	$-NH-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_{14}-C(=O)-O-CH_3$
HB18	$-NH-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_{16}-C(=O)-O-CH_3$
HB19	$-NH-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_{18}-C(=O)-O-CH_3$
HB20	$-NH-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-C(=O)-O-CH_3$

[0110] 表3

[0111]

<u>化合物编号</u>	<u>A<sup>2</sup>-部分</u>	<u>-X<sup>2</sup>-X<sup>1</sup>-A<sup>1</sup>部分</u>
1-20	HA1	分别为HB1, HB2, HB3, HB4, HB5, HB6, HB7, HB8, HB9, HB10, HB11, HB12, HB13, HB14, HB15, HB16, HB17, HB18, HB19, HB20
21-40	HA2	分别为HB1, HB2, HB3, HB4, HB5, HB6, HB7, HB8, HB9, HB10, HB11, HB12, HB13, HB14, HB15, HB16, HB17, HB18, HB19, HB20
41-60	HA3	分别为HB1, HB2, HB3, HB4, HB5, HB6, HB7, HB8, HB9, HB10, HB11, HB12, HB13, HB14, HB15, HB16, HB17, HB18, HB19, HB20
61-80	HA4	分别为HB1, HB2, HB3, HB4, HB5, HB6, HB7, HB8, HB9, HB10, HB11, HB12, HB13, HB14, HB15, HB16, HB17, HB18, HB19, HB20

[0112] 药物组合物

[0113] 在某些方面,任何前述实施方案的化合物可以以任何合适的方式被配制成药物组合物。一般来说,作为用于治疗癌症的化合物,这样的药物制剂是适合于肠胃外施用诸如静脉内施用或动脉内施用的水性制剂。

[0114] 在至少一个方面中,本公开内容提供了药物组合物,该药物组合物包含一种或更多种式(I)的化合物(根据任何前述实施方案)和蛋白质。在一些实施方案中,蛋白质是白蛋白或白蛋白模拟物。在一些这样的实施方案中,蛋白质是人血清白蛋白(HSA)或其模拟物,即其序列与HSA的序列至少50%等同、或与HSA的序列至少60%等同、或与HSA的序列至少70%等同、或与HSA的序列至少80%等同、或与HSA的序列至少90%等同、或与HSA的序列至少95%等同、与HSA的序列至少97%等同、与HSA的序列至少99%等同的蛋白质。在一些实施方案中,蛋白质是人血清白蛋白。

[0115] 在任何前述实施方案的某些实施方案中,药物组合物还包括载体,诸如液体载体。在一些实施方案中,载体包括水。例如,在一些这样的实施方案中,水构成基于药物组合物中液体材料的总体积的按体积计至少50%、或按体积计至少60%、或按体积计至少70%、或按体积计至少80%、或按体积计至少90%。载体还可以包含其他液体成分,诸如通常被包含在用于肠胃外施用的水性药物制剂中的液体成分。

[0116] 在具有水性载体的某些实施方案中,式(I)的化合物与药物制剂中的蛋白质非共价地结合。在一些实施方案中,式(I)的化合物和蛋白质(例如,人血清白蛋白)在25℃在水性组合物中以至少 $10^2\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^3\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^4\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^5\text{M}^{-1}$ 的结合常数( $K_b$ )彼此非共价地缔合。

[0117] 在具有水性载体的一些实施方案中,式(I)的化合物和蛋白质被载体溶剂化。在一些这样的实施方案中,组合物中按重量计至少90%、或按重量计至少95%、或按重量计至少97%、或按重量计至少98%、或按重量计至少99%的式(I)的化合物在25℃在水性组合物中以至少 $10^2\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^3\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^4\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^5\text{M}^{-1}$ 的结合常数( $K_b$ )与蛋白质非共价地结合。在一些另外的这样的实施方案中,组合物基本上不含附聚物(agglomerate)或纳米颗粒。例如,在任何以上提及的实施方案的一些实施方案中,水性组合物中按重量计不超过

5%、或按重量计不超过4%、或按重量计不超过3%、或按重量计不超过2%、或按重量计不超过1%的蛋白质-化合物(即,蛋白质和一种或更多种式(I)的化合物之间的非共价地结合的缀合物)具有大于7nm的半径、或大于5nm的半径、或大于4nm的半径,如通过动态光散射所测量的。

[0118] 式(I)的化合物可以与制剂中的蛋白质具有任何合适的摩尔比。例如,在任何前述实施方案的一些实施方案中,式(I)的化合物与蛋白质的摩尔比在从1:10至20:1、或从1:5至15:1、或从1:2至10:1的范围内。在任何前述实施方案的一些实施方案中,式(I)的化合物与蛋白质的摩尔比率为约1:1,或为约2:1,或为约3:1,或为约4:1,或为约5:1,或为约6:1,或为约7:1,其中术语“约”在这种情况下意指 $\pm 0.5:1$ ,使得“约5:1”指的是从4.5:1至5.5:1的范围。

[0119] 在至少一个方面中,本公开内容提供了药物组合物,该药物组合物包含:化合物,该化合物包含寡核苷酸部分和蛋白质结合部分;蛋白质,其中该蛋白质是白蛋白或白蛋白模拟物;以及载体,该载体包含水。

[0120] 在一些实施方案中,蛋白质是人血清白蛋白(HSA)或其模拟物,即其序列与HSA的序列至少50%等同、或与HSA的序列至少60%等同、或与HSA的序列至少70%等同、或与HSA的序列至少80%等同、或与HSA的序列至少90%等同、或与HSA的序列至少95%等同、与HSA的序列至少97%等同、与HSA的序列至少99%等同的蛋白质。在一些实施方案中,蛋白质是人血清白蛋白。

[0121] 如上文所提到的,在一些实施方案中,载体包含水。例如,在一些这样的实施方案中,水构成基于药物组合物中液体材料的总体积的按体积计至少50%、或按体积计至少60%、或按体积计至少70%、或按体积计至少80%、或按体积计至少90%。载体还可以包含其他液体成分,诸如通常被包含在用于肠胃外施用的水性药物制剂中的液体成分。

[0122] 在某些实施方案中,化合物与药物制剂中的蛋白质非共价地结合。在一些实施方案中,化合物和蛋白质(例如,人血清白蛋白)在25℃在水性组合物中以至少 $10^2\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^3\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^4\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^5\text{M}^{-1}$ 的结合常数( $K_b$ )彼此非共价地缔合。

[0123] 在具有水性载体的一些实施方案中,化合物和蛋白质被载体溶剂化。在一些这样的实施方案中,组合物中按重量计至少90%、或按重量计至少95%、或按重量计至少97%、或按重量计至少98%、或按重量计至少99%的式(I)的化合物在25℃在水性组合物中以至少 $10^2\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^3\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^4\text{M}^{-1}$ 、或至少 $10^5\text{M}^{-1}$ 的结合常数( $K_b$ )与蛋白质非共价地结合。在一些另外的这样的实施方案中,组合物基本上不含附聚物或纳米颗粒。例如,在任何以上提及的实施方案的一些实施方案中,水性组合物中按重量计不超过5%、或按重量计不超过4%、或按重量计不超过3%、或按重量计不超过2%、或按重量计不超过1%的蛋白质-化合物(即,蛋白质和一种或更多种式(I)的化合物之间的非共价地结合的缀合物)具有大于7nm的半径、或大于5nm的半径、或大于4nm的半径,如通过动态光散射所测量的。

[0124] 式(I)的化合物可以与制剂中的蛋白质具有任何合适的摩尔比。例如,在任何前述实施方案的一些实施方案中,式(I)的化合物与蛋白质的摩尔比在从1:10至20:1、或从1:5至15:1、或从1:2至10:1的范围内。在任何前述实施方案的一些实施方案中,式(I)的化合物与蛋白质的摩尔比率为约1:1,或为约2:1,或为约3:1,或为约4:1,或为约5:1,或为约6:1,或为约7:1,其中术语“约”在这种情况下意指 $\pm 0.5:1$ ,使得“约5:1”指的是从4.5:1至5.5:1

的范围。

[0125] 任何前述方面和实施方案的药物组合物也可以包括某些另外的成分,诸如在用于肠胃外施用的药物组合物中常用的那些成分。

#### [0126] 方法和用途

[0127] 任何前述实施方案的化合物或组合物可用于治疗癌症和相关的紊乱。因此,这些化合物和组合物可以用于施用至患有或已经患有癌性肿瘤的受试者。

[0128] 因此,在某些方面中,本公开内容提供了治疗癌症的方法,该方法包括向受试者施用任何前述方面和实施方案的化合物或组合物。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者是需要这样的治疗的受试者,例如需要这样的治疗的人。

[0129] 在一些方面中,本公开内容提供了诱导癌细胞的凋亡的方法,该方法包括使癌细胞与任何前述方面和实施方案的化合物或组合物接触。

[0130] 在一些方面中,本公开内容提供了抑制癌性肿瘤的增殖的方法,该方法包括使癌性肿瘤与任何前述方面和实施方案的化合物或组合物接触。

[0131] 在一些方面中,本公开内容提供了任何前述方面和实施方案的化合物或组合物作为药剂的用途。

[0132] 在一些方面中,本公开内容提供了任何前述方面和实施方案的化合物或组合物用于治疗癌症的用途。

[0133] 在一些方面中,本公开内容提供了任何前述方面和实施方案的化合物在制造药剂中的用途。

[0134] 在一些方面中,本公开内容提供了任何前述方面和实施方案的化合物在制造用于治疗癌症的药剂中的用途。

#### [0135] 组合疗法

[0136] 任何前述实施方案的化合物或组合物当与免疫治疗剂诸如检查点抑制剂、toll样受体调节剂和各种抗体联合使用时是有用的,所述抗体包括但不限于阿仑单抗(alemtuzumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)、伊匹单抗(ipilimumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)和利妥昔单抗(rituximab)。

### 实施例

[0137] 以下实施例示出了本文所公开的化合物、组合物和方法的某些说明性实施方案。这些实施例不应被视为以任何方式进行限制。这些实施例也不应被视为表达任何优选的实施方案,或指示任何用于进一步研究的方向。

[0138] 这些实施例可以使用某些常见化学品的缩写。以下缩写指的是所指示的化合物。

[0139] DMF = 二甲基甲酰胺

[0140] DCM = 二氯甲烷

[0141] NMR = 核磁共振

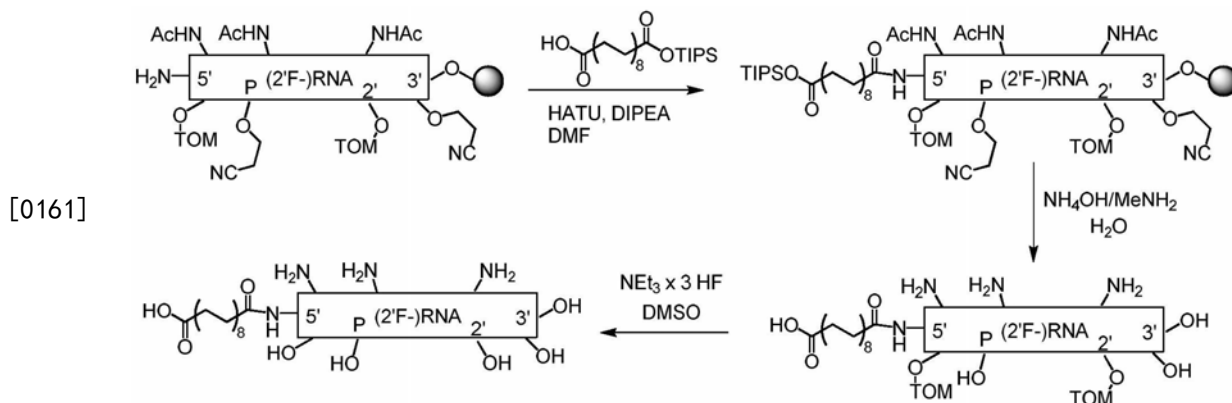
[0142] HPLC = 高效液相色谱法

[0143] RP-HPLC = 反相高效液相色谱法

[0144] LRMS = 液相色谱法/低分辨率质谱法

- [0145] HRMS =液相色谱法/高分辨率质谱法
- [0146] Tips =三异丙基甲硅烷基
- [0147] DMAP =4-(二甲基氨基)吡啶
- [0148] EDC =1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺
- [0149] THF =四氢呋喃
- [0150] DiPea =N,N-二异丙基乙胺
- [0151] HATU =1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并-[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸酯
- [0152] DCC =N,N'-二环己基碳二亚胺
- [0153] HSA =人血清白蛋白
- [0154] 实施例1-寡核苷酸实施例
- [0155] 寡核苷酸的固相合成
- [0156] 寡核苷酸在ABI 394 DNA/RNA合成仪(Applied Biosystems)上在合成柱中被合成,该合成柱装载有携带第一5'-Dmt-保护的核苷酸的1 $\mu$ moleCPG(1000 Å孔径,Glen Research)。所有氰乙基亚磷酰胺(CEPA)均购自Glen Research:用于DNA核苷酸的Dmt-dT-CEPA(10-1030),用于RNA核苷酸的Dmt-A<sup>Ac</sup>-TOM-CEPA(10-3004)、Dmt-G<sup>Ac</sup>-TOM-CEPA,以及用于2' F-RNA核苷酸的Dmt-2' F-C<sup>Ac</sup>-CEPA(10-3415)和Dmt-2' F-U-CEPA(10-3430)(2' F-嘧啶的存在通过寡核苷酸序列中的上标<sup>F</sup>来指示)。5'-氨基修饰剂-5(10-1905)用于在信使链上安装末端胺。3'-荧光素标记的序列在3'-荧光素-dT-CPG(20-2056)上被合成。4,5-二氰基咪唑(DCC)和5-(苄硫基)-1H-四唑(BTT)分别被用作用于合成DNA和RNA/2' F-RNA的活化剂。封端用乙腈中的THF/吡啶/乙酸酐(Cap Mix A)和THF中的16%1-甲基咪唑(Cap Mix B)进行。在每个循环中,磷通过用在THF/吡啶/水中的0.02 M碘处理被氧化。所有5'-三苯甲基保护基团都用在DCM中的3%三氯乙酸裂解。偶联循环包括以下步骤:脱三苯甲基化、偶联、封端和氧化。脱三苯甲基化时间为60 s,对于DNA和5'-氨基修饰剂,偶联时间为30 s,并且对于RNA/2' F-RNA,偶联时间为180 s。封端进行持续5 s,氧化进行持续15 s。所有洗涤和试剂输送步骤均按照仪器的默认合成循环中的规定进行。十八烷二酸(ODDA)与胺修饰的核酸的5'-末端的缀合
- [0157] 在偶联之前,5'-氨基修饰剂的末端Mmt保护基团通过用在DCM中的3%三氯乙酸冲洗支撑物结合的完全保护的核酸被裂解,直到Mmt阳离子的黄色不再通过肉眼可观察到(约3-4.5 min)。用DCM和乙腈洗涤支撑物,并且在氩气流下短暂干燥。残余溶剂在干燥器中除去。
- [0158] 与小分子缀合:将在无水DMF中的10当量的ODDA-单-三异丙基甲硅烷基酯(ODDA-TIPS)、9当量HATU和30当量DIPEA的溶液预活化持续5min,并且随后添加至携带5'-氨基修饰的核酸序列的干燥的支撑物中。将合成柱摇动持续2h,用NMP和DCM洗涤支撑物并且在真空中干燥。偶联反应用新鲜活化的ODDA-TIPS重复一次(2h)。用NMP和DCM充分地洗涤支撑物以冲洗掉未反应的羧酸并且在真空中干燥。将支撑物储存在干燥器中,直到缀合物被裂解和脱保护。
- [0159] 从固体支撑物中释放和核酸缀合物的脱保护
- [0160] CPG结合的寡核苷酸的释放和核碱基的脱保护以及氰乙基保护基团的除去通过将

支撑物浸没在AMA (30%氢氧化铵, 40%含水甲胺, 1:1, v:v) 中进行。如果在序列中存在新戊酰基保护的荧光素染料, 则在添加等体积的40%含水甲胺之前, 首先在室温用30%氢氧化铵处理支撑物持续1h以除去新戊酰基保护基团。将含有固体支撑物的AMA溶液在室温孵育持续2h以完成脱保护。在离心之后, 除去上清液, 并且用 $4 \times 200\mu\text{L}$ 水洗涤支撑物。将合并的溶液在双氮流下干燥 (如果在序列中存在2' F-RNA核苷酸, 则应该避免加热)。为了除去2' TOM保护基团, 将残余物重新溶解在115 $\mu\text{L}$ 无水DMSO (5min 65°C) 中, 并且添加60 $\mu\text{L}$ 的无水三乙胺。添加75 $\mu\text{L}$ 三乙胺氢氟化物复合物 ( $\text{NEt}_3 \times 3\text{HF}$ ), 并且将溶液在65°C孵育持续2.5h。之后, 将溶液在冷冻器中短暂冷却, 并且添加25 $\mu\text{L}$ 的3M乙酸钠。将寡核苷酸用1mL的丁醇沉淀, 并且在-20°C孵育持续30min。将悬浮液离心持续10min (12000rcf), 并且除去上清液。沉淀物用 $2 \times 750\mu\text{L}$ 乙醇洗涤, 并且通过真空离心短暂干燥。将粗寡核苷酸溶解在水中, 并且通过分析型HPLC分析, 并通过半制备型HPLC纯化。含有级分的产物通过真空离心被减少至 $\leq 10\text{mL}$ , 并且寡核苷酸使用 Sep-Pak<sup>®</sup> C-18盒 (Waters) 脱盐。用10mL乙腈洗涤盒, 并且用10mL水平衡。装载寡核苷酸, 用10mL水洗涤, 用约6mL水:乙腈 (1:1, v:v) 洗脱, 在减压下干燥, 并且重新溶解在水中。经由UV-vis光谱确定浓度, 并且通过分析型HPLC和MALDI-TOF-MS验证产物的身份 (identity) 和纯度。将样品等分, 并且储存在-20°C。合成方案在下文示出。



[0162] 高效液相色谱法 (HPLC)

[0163] 寡核苷酸样品的HPLC在Hitachi Elite LaChrom仪器上在55°C进行, 该仪器配备有phenomenex<sup>®</sup> clarity 5u Oligo-RP柱 (对于半制备型HPLC为 $250 \times 10.00\text{mm}$ 或对于分析型HPLC为 $150 \times 4.60\text{mm}$ , 5微米)。在260nm处测量吸光度。使用溶剂A (90% 50mM含水乙酸三乙基铵 (pH 7.0)、10%甲醇) 和B (甲醇) 以线性梯度洗脱样品 (梯度I: 在60min内0%B→80%B, 流速:  $4\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 梯度II: 在60min内0%B→70%B, 流速:  $4\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 梯度III: 在60min内0%B→40%B, 流速:  $4\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 梯度IV: 在60min内0%B→25%B, 流速:  $4\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 梯度V: 在50min内0%B→80%B, 流速:  $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 梯度VI: 在50min内0%B→70%B, 流速:  $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 梯度VII: 在50min内0%B→40%B, 流速:  $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 梯度VIII: 在50min内0%B→30%B, 流速:  $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )。

[0164] 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法 (MALDI-TOF-MS)

[0165] 质谱在Bruker Biflex IV MALDI-TOF仪器上的UCSD化学和生物化学分子质谱设施 (UCSD Chemistry&Biochemistry Molecular Mass Spectrometry Facility) 中以负模式被记录。2', 4', 6'-三羟基苯乙酮一水合物 (THAP) 和3-羟基吡啶甲酸 (3-HPA) 的混合物被用作基质。3-HPA基质通过以下来制备: 将25mg 3-HPA溶解在500 $\mu\text{L}$ 水/乙腈 (1:1, v:v) 中, 并

且用45 $\mu$ L的100mg $\cdot$ ml<sup>-1</sup>含水柠檬酸氢二铵稀释454 $\mu$ L的该溶液。THAP基质通过以下来制备：将15mg的THAP溶解在150 $\mu$ L乙腈(饱和溶液,通过声处理辅助溶剂化)中,并且用100 $\mu$ L的23mg $\cdot$ ml<sup>-1</sup>含水柠檬酸氢二铵(通过用231 $\mu$ L水稀释69 $\mu$ L 100mg $\cdot$ ml<sup>-1</sup>含水柠檬酸氢二铵获得)稀释100 $\mu$ L的该溶液。在MALDI-MS分析之前,寡核苷酸样品使用ZipTip C18移液管吸头(Merck Millipore)脱盐。在寡核苷酸通过抽吸和释放浓缩的储备溶液(10-20 $\times$ 10 $\mu$ L)被吸附至ZipTip之前,ZipTip用水/乙腈(1:1,v:v,5 $\times$ 10 $\mu$ L)洗涤并且用0.1M TEAA缓冲液(5 $\times$ 10 $\mu$ L)平衡。结合的寡核苷酸通过用0.1M TEAA缓冲液(5 $\times$ 10 $\mu$ L)洗涤被转移到铵盐中,通过用水(7 $\times$ 10 $\mu$ L)洗涤脱盐,并且最后释放到2.5 $\mu$ L THAP基质中。将该溶液点(1 $\mu$ L)在预结晶的3-HPA基质(1 $\mu$ L)的顶部上。用包括两种购买的寡核苷酸的标准品校准该仪器,该两种购买的寡核苷酸点在同一靶板上。数值以质荷比(m/z)给出。

[0166] 核酸缀合物的合成和表征

[0167] 具有3'-荧光素标记的存活素siRNA ODDA缀合的信使链:

[0168]  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{OPo}_2\text{H}-\text{GGAC}^{\text{F}}\text{C}^{\text{F}}\text{AC}^{\text{F}}\text{C}^{\text{F}}\text{GC}^{\text{F}}\text{AU}^{\text{F}}\text{C}^{\text{F}}\text{U}^{\text{F}}\text{C}^{\text{F}}\text{U}^{\text{F}}\text{AC}^{\text{F}}\text{AdTdT}^{\text{F}}$   
AM-3' (1)

[0169] 化合物1遵循用于核酸的固相合成的一般方案在1 $\mu$ mol dT<sup>FAM</sup>负载的GPC上被合成,并且经由制备型HPLC被纯化。

[0170] 收率:OD<sub>495nm</sub>=5.2,69nmol,7%。

[0171]  $\epsilon_{495\text{nm}}=75000\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $M_w=7585.0\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

[0172] 分析型HPLC:梯度VI。

[0173] MALDI-TOF-MS (m/z):  $[\text{M}-\text{H}^+]^-$ :7581.3(计算值:7584.0),  $[\text{M}-2\text{H}^+]^{2-}$ :3785.9(计算值:3791.5)。

[0174] 图2示出了纯化的化合物的(a)分析型HPLC迹线(顶部)和(b)MALDI-TOF质谱(底部)。

[0175] 存活素siRNA ODDA缀合的信使链:

[0176]  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{OPo}_2\text{H}-\text{GGAC}^{\text{F}}\text{C}^{\text{F}}\text{AC}^{\text{F}}\text{C}^{\text{F}}\text{GC}^{\text{F}}\text{AU}^{\text{F}}\text{C}^{\text{F}}\text{U}^{\text{F}}\text{C}^{\text{F}}\text{U}^{\text{F}}\text{AC}^{\text{F}}\text{AdTdT}-$   
3' (2)

[0177] 化合物2遵循用于核酸的固相合成的一般方案在1 $\mu$ mol dT负载的CPG上被合成。珠被分成两半,并且ODDA-TIPS根据一般方案被偶联。2经由制备型HPLC被纯化。

[0178] 收率:OD<sub>260nm</sub>=10.2,44nmol,9%。

[0179]  $\epsilon_{260\text{nm}}=232178\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $M_w=7073.5\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

[0180] 分析型HPLC:梯度VI。

[0181] MALDI-TOF-MS (m/z):  $[\text{M}-\text{H}^+]^-$ :7070.6(计算值:7072.5),  $[\text{M}-2\text{H}^+]^{2-}$ :3531.4(计算值:3535.8)。

[0182] 图3示出了纯化的化合物的(a)分析型HPLC迹线(顶部)和(b)MALDI-TOF质谱(底部)。

[0183] 存活素siRNA 5'-羟基化引导链:

[0184] 5'-U<sup>F</sup>GU<sup>F</sup>AGAGAU<sup>F</sup>GC<sup>F</sup>GGU<sup>F</sup>GGU<sup>F</sup>C<sup>F</sup>C<sup>F</sup>dTdT-3' (3)

[0185] 3遵循用于核酸的固相合成的一般方案在1 $\mu$ mol dT负载的CPG上被合成。珠子被分成两半。3经由制备型HPLC被纯化为5'-OH RNA。



[0186] 收率:  $OD_{260nm}=16.0, 64nmol, 6\%$ 。

[0187]  $\epsilon_{260nm}=249575L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}, M_w=6758.0g \cdot mol^{-1}$ 。

[0188] 分析型HPLC: 梯度VII。

[0189] MALDI-TOF-MS ( $m/z$ ):  $[M-H^+]^-$ : 6755.8 (计算值: 6757.0),  $[M-2H^+]^{2-}$ : 3374.9 (计算值: 3378.0)。

[0190] 图4示出了纯化的化合物的 (a) 分析型HPLC迹线 (左) 和 (b) MALDI-TOF质谱 (右)。

[0191] ODDA-RNA-HSA复合物的形成

[0192] 将单链RNA或双链RNA溶解至含有新鲜构成的HSA (600 $\mu$ M最终浓度) 的PBS缓冲液 (1x最终浓度) 中的期望的浓度 (用于凝胶位移测定: 10 $\mu$ M, 用于循环时间研究: 75 $\mu$ M)。将溶液在室温孵育过夜, 以确保平衡。

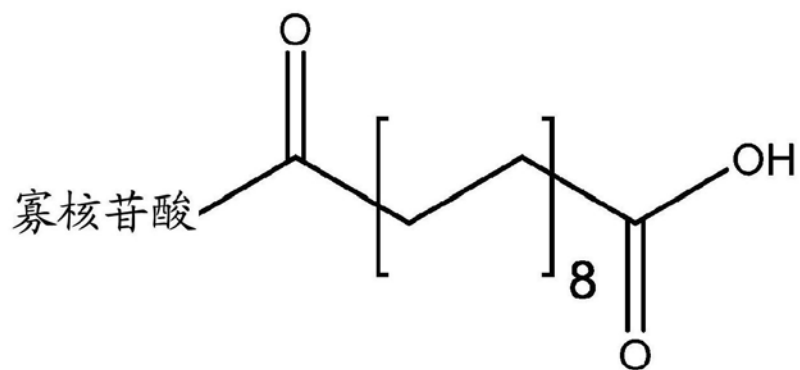
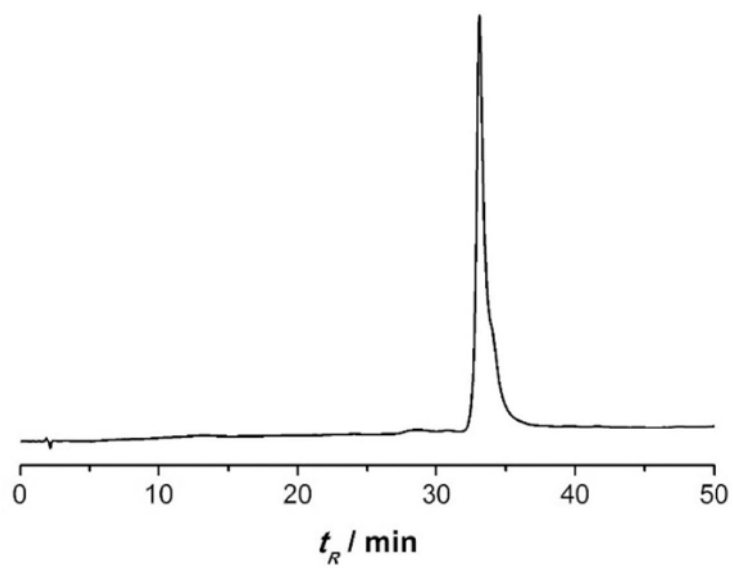


图1

(a)



(b)

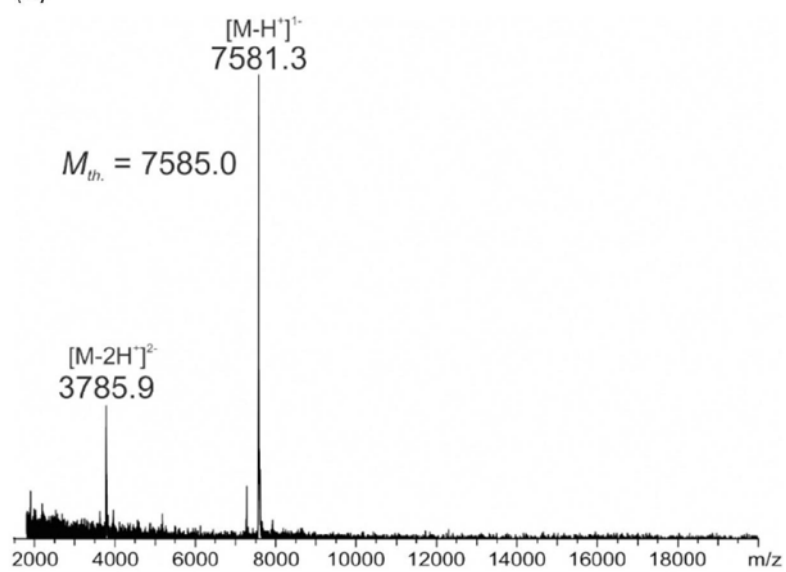


图2

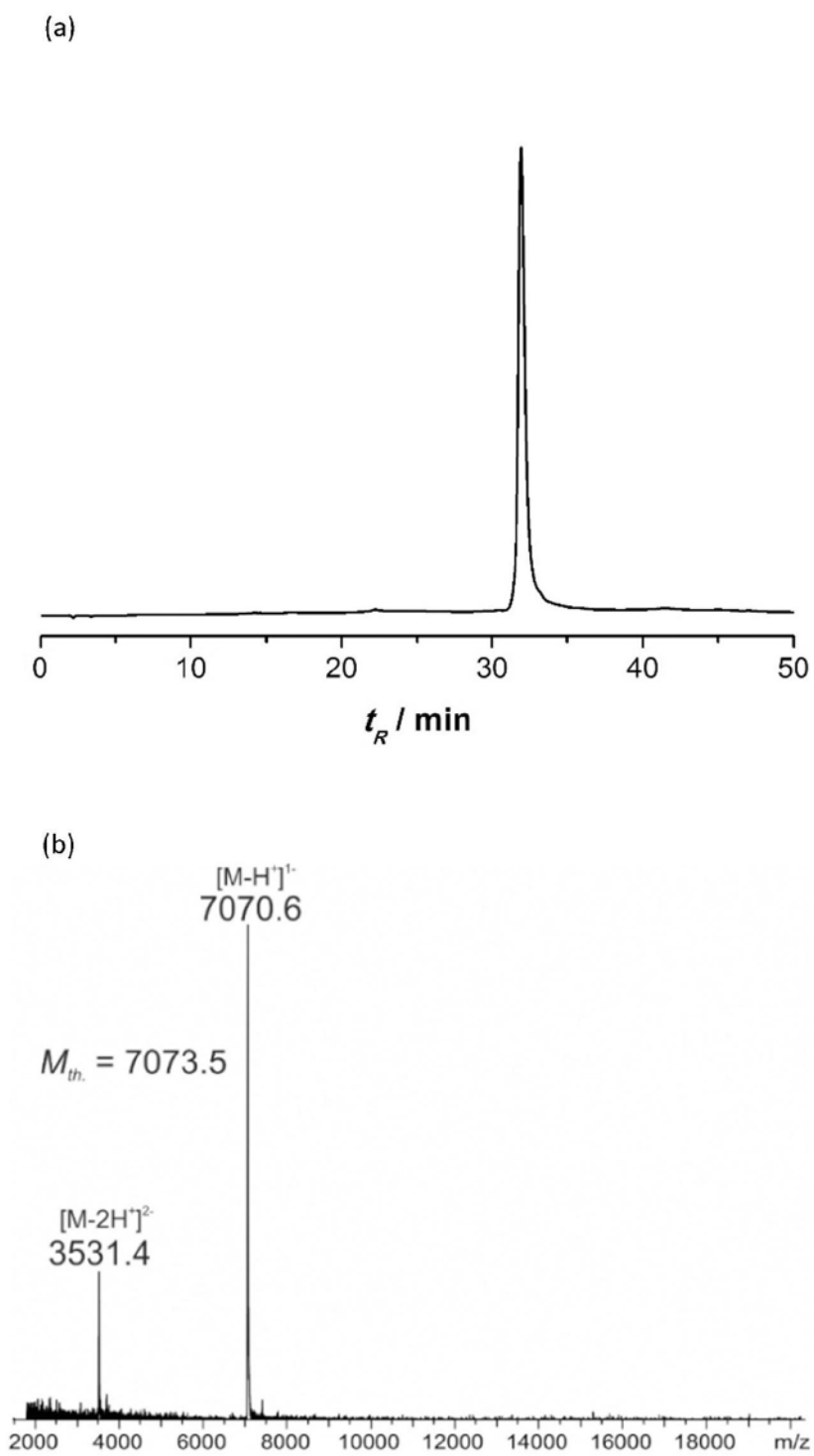


图3

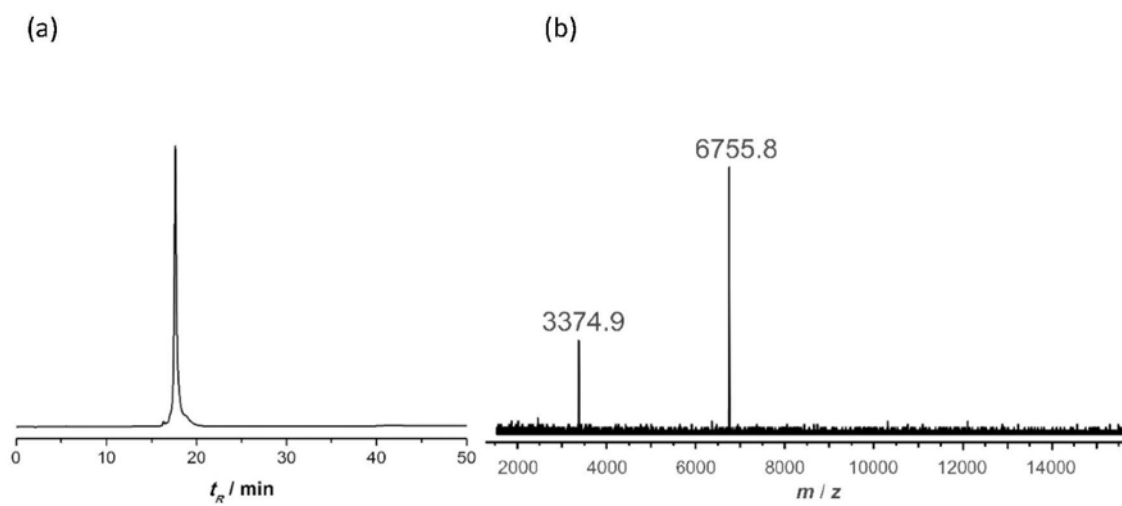


图4