



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113994004 A

(43) 申请公布日 2022. 01. 28

(21) 申请号 202080033528.2

(22) 申请日 2020.03.03

(30) 优先权数据

62/813,599 2019.03.04 US

62/824,771 2019.03.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.11.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/020845 2020.03.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/180897 EN 2020.09.10

(71) 申请人 MPEG LA有限责任公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 J.M. 布朗 K.K.H. 纽曼

H-P. 沃恩洛彻 P. 哈德维格

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 易方方

(51) Int.Cl.

C12N 15/115 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/54 (2006.01)

A61K 47/69 (2006.01)

权利要求书23页 说明书108页 附图68页

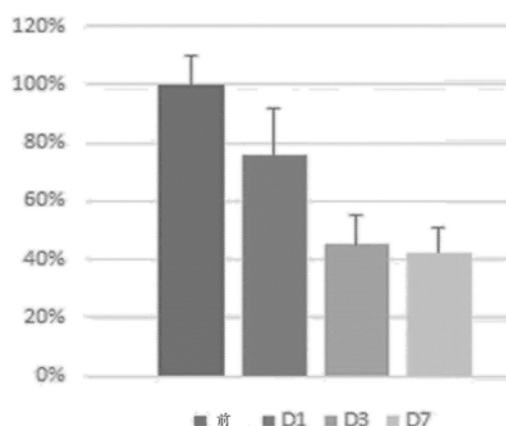
(54) 发明名称

具有增强生物活性的多聚寡核苷酸

(57) 摘要

本公开内容涉及具有通过接头接合的单体亚基的多聚寡核苷酸以及用于向受试者施用多聚寡核苷酸的方法。所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性。本公开内容还涉及此类多聚寡核苷酸以及用于合成此类多聚寡核苷酸的方法。

通过经由IV的具有1 mg/kg当量siTTR的GalNAc 4:1:1异源六聚体对TTR蛋白的最低



1. 包含亚基 • ----- 的多聚寡核苷酸, 其中:

每个亚基 • ----- 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个亚基 • ----- 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性, 增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性; 并且

所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基活性的增加与所述多聚寡核苷酸中的硫代磷酸酯含量无关。

2. 包含亚基 • ----- 的多聚寡核苷酸, 其中:

每个亚基 • ----- 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个亚基 • ----- 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性, 增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性; 并且

所述多聚寡核苷酸内的至少一个亚基是双链寡核苷酸。

3. 包含亚基 • ----- 的多聚寡核苷酸, 其中:

每个亚基 • ----- 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个亚基 • ----- 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性, 增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性; 并且

所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

4. 包含亚基 • ----- 的多聚寡核苷酸, 其中:

每个亚基 • ----- 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个亚基 • ----- 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性, 增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性; 并且

所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

5. 根据权利要求1所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸内的至少一个亚基是双链寡核苷酸。

6. 根据权利要求5所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

7. 根据权利要求6所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

8. 根据权利要求1所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

9. 根据权利要求8所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

10. 根据权利要求1所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

11. 根据权利要求2所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

12. 根据权利要求11所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

13. 根据权利要求3所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

14. 包含亚基 • - - - - - 的多聚寡核苷酸, 其中:

每个亚基 • - - - - - 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个亚基 • - - - - - 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为减少其由于肾小球滤过而导致的清除; 并且

所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD,

其中所述多聚寡核苷酸包含6个或更多个亚基 • - - - - - 的异源多聚体, 其中至少两个亚基 • - - - - - 基本上不同。

15. 包含亚基 • - - - - - 的多聚寡核苷酸, 其中:

每个亚基 • - - - - - 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个亚基 • - - - - - 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸包含5个或更多个亚基 • - - - - -; 并且

其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

16. 包含亚基 • - - - - - 的多聚寡核苷酸, 其形成结构117:

- - - - - • - - - - - • - - - - - • - - - - -, 其中:

每个亚基独立地是单链或双链寡核苷酸;

每个亚基通过共价接头 • 与另一个亚基接合; 并且

其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

17. 包含两个亚基 • - - - - - 的多聚寡核苷酸, 其中:

每个亚基 • - - - - - 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个亚基 • - - - - - 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

化合物的分子量为至少约45kD; 并且

至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

18. 根据权利要求1-13和15-17中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中至少两个亚基 • - - - - - 基本上不同。

19. 根据权利要求18所述的多聚寡核苷酸, 其中所有亚基基本上不同。

20. 根据权利要求1-17中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中至少两个亚基 • - - - - - 基本上相同或相同。

21. 根据权利要求1-13和15-17中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中所有亚基基本上相同或相同。

22. 根据权利要求1-13和15-17中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸包含5、6、7、8、9或10个亚基 • - - - - -。

23. 根据权利要求1-13和15-17中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸包含6个亚基 • - - - - -。

24. 根据权利要求1-17中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中所述多聚寡核苷酸包含7、

8、9或10个亚基 • -----。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中每个亚基 • ----- 的长度独立地为10-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中一个或更多个亚基是双链的。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中一个或更多个亚基是单链的。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中所述亚基包含单链和双链寡核苷酸的组合。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中寡核苷酸内的一个或更多个核苷酸是RNA、DNA或人工或非天然核酸类似物。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中所述亚基中的至少一个是RNA。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中所述亚基中的至少一个是siRNA、saRNA或miRNA。

32. 根据权利要求31所述的多聚寡核苷酸, 其中所述亚基中的至少一个是siRNA。

33. 根据权利要求31所述的多聚寡核苷酸, 其中所述亚基中的至少一个是miRNA。

34. 根据权利要求1-33中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中所述亚基中的至少一个是反义寡核苷酸。

35. 根据权利要求1-34中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中所述亚基中的至少一个是双链siRNA。

36. 根据权利要求35所述的多聚寡核苷酸, 其中两个或更多个siRNA亚基通过附接到所述siRNA的有义链的共价接头接合。

37. 根据权利要求35所述的多聚寡核苷酸, 其中两个或更多个siRNA亚基通过附接到所述siRNA的反义链的共价接头接合。

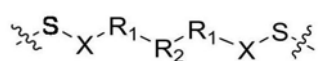
38. 根据权利要求35所述的多聚寡核苷酸, 其中两个或更多个siRNA亚基通过附接到第一siRNA的有义链和第二siRNA的反义链的共价接头接合。

39. 根据权利要求1-38中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中一个或更多个共价接头 • 包含可裂解共价接头。

40. 根据权利要求39所述的多聚寡核苷酸, 其中所述可裂解共价接头包含酸可裂解键、还原剂可裂解键、生物可裂解键或酶可裂解键。

41. 根据权利要求39和40中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中所述可裂解共价接头在细胞内条件下是可裂解的。

42. 根据权利要求1-41中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中至少一个共价接头包含二硫键或式(I)的化合物:



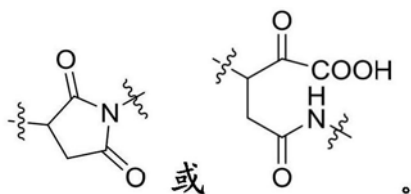
其中:

S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端;

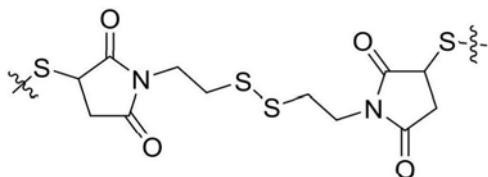
每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基；

R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团；并且

每个X独立地选自：

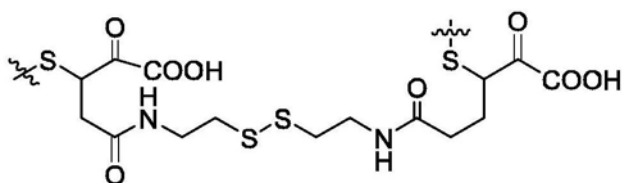


43. 根据权利要求42所述的多聚寡核苷酸，其中所述式(I)的化合物是



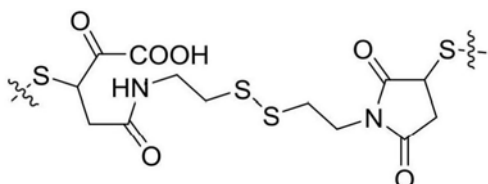
并且其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端。

44. 根据权利要求42所述的多聚寡核苷酸，其中所述式(I)的化合物是



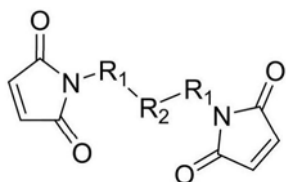
并且其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端。

45. 根据权利要求42所述的多聚寡核苷酸，其中所述式(I)的化合物是



并且其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端。

46. 根据权利要求42-45中任一项所述的多聚寡核苷酸，其中式(I)的共价接头由式(II)的共价连接前体形成：



其中：

每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基；并且

R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

47. 根据权利要求1-46中任一项所述的多聚寡核苷酸，其中一个或多个共价接头 • 包含核苷酸接头。

48. 根据权利要求47所述的多聚寡核苷酸，其中所述核苷酸接头的长度为2-6个核苷

酸。

49. 根据权利要求48所述的多聚寡核苷酸,其中所述核苷酸接头是二核苷酸接头。

50. 根据权利要求1-49中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中每个共价接头 • 相同。

51. 根据权利要求1-49中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中所述共价接头 • 包含两个或更多个不同的共价接头。

52. 根据权利要求1-51中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中至少两个亚基通过第一亚基的3'端与第二亚基的3'端之间的共价接头 • 接合。

53. 根据权利要求1-51中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中至少两个亚基通过第一亚基的3'端与第二亚基的5'端之间的共价接头 • 接合。

54. 根据权利要求1-51中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中至少两个亚基通过第一亚基的5'端与第二亚基的3'端之间的共价接头 • 接合。

55. 根据权利要求1-51中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中至少两个亚基通过第一亚基的5'端与第二亚基的5'端之间的共价接头 • 接合。

56. 根据权利要求1-55中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中所述多聚寡核苷酸还包含一个或更多个靶向配体。

57. 根据权利要求1-55中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中所述亚基中的至少一个是靶向配体。

58. 根据权利要求56和57中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中所述靶向配体是适体。

59. 根据权利要求56所述的多聚寡核苷酸,其中所述靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

60. 根据权利要求56和57中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中所述靶向配体包含免疫刺激剂。

61. 根据权利要求56和57中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中所述靶向配体包含CpG寡核苷酸。

62. 根据权利要求61所述的多聚寡核苷酸,其中所述CpG寡核苷酸包含序列TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:162)。

63. 根据权利要求61所述的多聚寡核苷酸,其中所述CpG寡核苷酸包含序列GGTGCATCGATGCAGGGGG (SEQ ID NO:163)。

64. 根据权利要求1-63中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中所述多聚寡核苷酸是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。

65. 根据权利要求1-64中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白(TTR)mRNA互补的寡核苷酸。

66. 根据权利要求65所述的多聚寡核苷酸,其中相对于与TTR mRNA互补的单体寡核苷酸,与TTR mRNA互补的亚基包含增加的体内活性。

67. 根据权利要求65和66中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中与TTRmRNA互补的寡核苷酸包含UUAUAGAGCAAGAACACUGUUUU (SEQ ID NO:164)。

68. 根据权利要求1-67中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中所述多聚寡核苷酸通过静脉内注射体内施用。

69. 根据权利要求1-13中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中所述多聚寡核苷酸通过静

脉内注射体内施用,并且分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式皮下施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性。

70. 根据权利要求1-13和69中任一项所述的多聚寡核苷酸,其中所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性增加至少2倍。

71. 根据权利要求70所述的多聚寡核苷酸,其中所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性增加至少5倍。

72. 根据权利要求71所述的多聚寡核苷酸,其中所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基以单体形式给药时的体内活性增加至少10倍。

73. 一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基 • - - - - - ,其中:

每个亚基 • - - - - - 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基 • - - - - - 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且

所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的活性的增加与所述多聚寡核苷酸中的硫代磷酸酯含量无关。

74. 一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基 • - - - - - ,其中:

每个亚基 • - - - - - 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基 • - - - - - 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且

所述多聚寡核苷酸内的至少一个亚基是双链寡核苷酸。

75. 一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基 • - - - - - ,其中:

每个亚基 • - - - - - 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基 • - - - - - 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且

所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

76. 一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基 • - - - - - ,其中:

每个亚基 • - - - - - 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基 • - - - - - 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且

所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

77. 根据权利要求73所述的方法,其中所述多聚寡核苷酸内的至少一个亚基是双链寡

核苷酸。

78. 根据权利要求77所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

79. 根据权利要求78所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

80. 根据权利要求73所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

81. 根据权利要求80所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

82. 根据权利要求73所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

83. 根据权利要求74所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

84. 根据权利要求83所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

85. 根据权利要求75所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

86. 一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸, 所述多聚寡核苷酸包含亚基 • - - - - - , 其中:

每个亚基 • - - - - - 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个亚基 • - - - - - 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性, 增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;

其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD; 并且

其中所述多聚寡核苷酸包含6个或更多个亚基 • - - - - - 的异源多聚体, 其中至少两个亚基 • - - - - - 基本上不同。

87. 一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸, 所述多聚寡核苷酸包含亚基 • - - - - - , 其中:

每个亚基 • - - - - - 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个亚基 • - - - - - 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性, 增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;

所述多聚寡核苷酸包含5个或更多个亚基 • - - - - - ; 并且

其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

88. 一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸, 所述多聚寡核苷酸包含亚基 • - - - - - , 其中:

每个亚基 • - - - - - 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个亚基 • - - - - - 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性, 增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;

其中所述多聚寡核苷酸包含结构119:

- - - - - • - - - - - • - - - - - • - - - - - ; 并且

其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

89. 一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸, 所述多聚寡核苷酸包含亚基 • - - - - - , 其中:

每个亚基 • - - - - - 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个亚基 • - - - - - 通过共价接头 • 与另一个亚基接合;

所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;

其中所述多聚寡核苷酸包含两个亚基 • -----;

其中化合物的分子量为至少约45kD;并且

其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

90. 根据权利要求73-89中任一项所述的方法,其中施用包括静脉内注射。

91. 根据权利要求73-88中任一项所述的方法,其中包含在所述多聚寡核苷酸中的亚基的数量为m,m是选择的以使所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的整数。

92. 根据权利要求73-85和87-89中任一项所述的方法,其中至少两个亚基 • -----基本上不同。

93. 根据权利要求92所述的方法,其中所有亚基基本上不同。

94. 根据权利要求73-89中任一项所述的方法,其中至少两个亚基 • -----基本上相同或相同。

95. 根据权利要求73-85和87-89中任一项所述的方法,其中所有亚基 • -----基本上相同或相同。

96. 根据权利要求73-85和87-89中任一项所述的方法,其中所述多聚寡核苷酸包含5、6、7、8、9或10个亚基 • -----。

97. 根据权利要求73-85和87-89中任一项所述的方法,其中所述多聚寡核苷酸包含6个亚基 • -----。

98. 根据权利要求73-89中任一项所述的方法,其中所述多聚寡核苷酸包含7、8、9或10个亚基 • -----。

99. 根据权利要求73-98中任一项所述的方法,其中每个亚基 • -----的长度独立地为10-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。

100. 根据权利要求73-99中任一项所述的方法,其中一个或更多个亚基是双链的。

101. 根据权利要求73-100中任一项所述的方法,其中一个或更多个亚基是单链的。

102. 根据权利要求73-101中任一项所述的方法,其中所述亚基包含单链和双链寡核苷酸的组合。

103. 根据权利要求73-102中任一项所述的方法,其中所述寡核苷酸内的一个或更多个核苷酸是RNA、DNA或人工或非天然核酸类似物。

104. 根据权利要求73-103中任一项所述的方法,其中所述亚基中的至少一个是RNA。

105. 根据权利要求73-104中任一项所述的方法,其中所述亚基中的至少一个是siRNA、saRNA或miRNA。

106. 根据权利要求105所述的方法,其中所述亚基中的至少一个是siRNA。

107. 根据权利要求105所述的方法,其中所述亚基中的至少一个是miRNA。

108. 根据权利要求73-107中任一项所述的方法,其中所述亚基中的至少一个是反义寡核苷酸。

109. 根据权利要求73-108中任一项所述的方法,其中所述亚基中的至少一个是双链

siRNA。

110. 根据权利要求109所述的方法, 其中两个或更多个siRNA亚基通过附接到所述siRNA的有义链的共价接头接合。

111. 根据权利要求109所述的方法, 其中两个或更多个siRNA亚基通过附接到所述siRNA的反义链的共价接头接合。

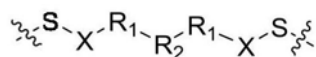
112. 根据权利要求109所述的方法, 其中两个或更多个siRNA亚基通过附接到第一siRNA的有义链和第二siRNA的反义链的共价接头接合。

113. 根据权利要求73-112中任一项所述的方法, 其中一个或更多个共价接头 • 包括可裂解共价接头。

114. 根据权利要求113所述的方法, 其中所述可裂解共价接头包含酸可裂解键、还原剂可裂解键、生物可裂解键或酶可裂解键。

115. 根据权利要求113和114中任一项所述的方法, 其中所述可裂解共价接头在细胞内条件下是可裂解的。

116. 根据权利要求73-115中任一项所述的方法, 其中至少一个共价接头包含二硫键或式(I)的化合物:



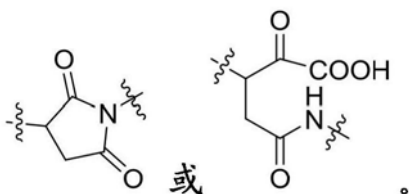
其中:

S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端;

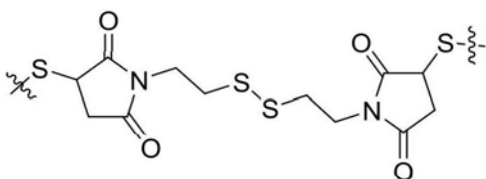
每个 R_1 独立地是 C_2 - C_{10} 烷基、烷氧基或芳基;

R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团; 并且

每个X独立地选自:

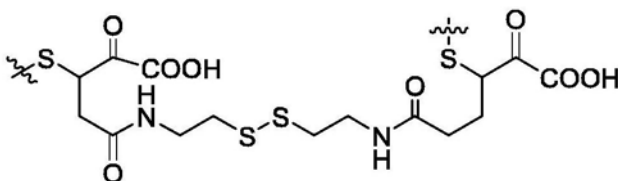


117. 根据权利要求116所述的方法, 其中所述式(I)的化合物是



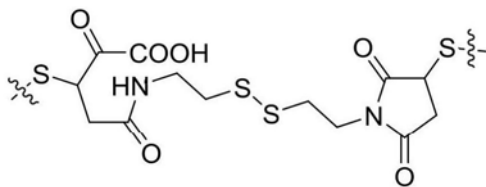
并且其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端。

118. 根据权利要求116所述的方法, 其中所述式(I)的化合物是



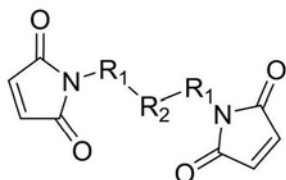
并且其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端。

119. 根据权利要求116所述的方法, 其中所述式 (I) 的化合物是



并且其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端。

120. 根据权利要求116-119中任一项所述的方法, 其中式 (I) 的共价接头由式 (II) 的共价连接前体形成:



其中:

每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基; 并且

R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

121. 根据权利要求73-120中任一项所述的方法, 其中一个或多个共价接头 • 包含核苷酸接头。

122. 根据权利要求121所述的方法, 其中所述核苷酸接头的长度为2-6个核苷酸。

123. 根据权利要求122所述的方法, 其中所述核苷酸接头是二核苷酸接头。

124. 根据权利要求73-123中任一项所述的方法, 其中每个共价接头 • 是相同的。

125. 根据权利要求73-123中任一项所述的方法, 其中所述共价接头 • 包含两个或多个不同的共价接头。

126. 根据权利要求73-125中任一项所述的方法, 其中至少两个亚基通过第一亚基的3' 端与第二亚基的3' 端之间的共价接头 • 接合。

127. 根据权利要求73-125中任一项所述的方法, 其中至少两个亚基通过第一亚基的3' 端与第二亚基的5' 端之间的共价接头 • 接合。

128. 根据权利要求73-125中任一项所述的方法, 其中至少两个亚基通过第一亚基的5' 端与第二亚基的3' 端之间的共价接头 • 接合。

129. 根据权利要求73-125中任一项所述的方法, 其中至少两个亚基通过第一亚基的5' 端与第二亚基的5' 端之间的共价接头 • 接合。

130. 根据权利要求73-129中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸还包含一个或多个靶向配体。

131. 根据权利要求73-129中任一项所述的方法, 其中所述亚基中的至少一个是靶向配体。

132. 根据权利要求130和131中任一项所述的方法, 其中所述靶向配体是适体。

133. 根据权利要求130所述的方法, 其中所述靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc)。

134. 根据权利要求130和131中任一项所述的方法, 其中所述靶向配体包含免疫刺激剂。

135. 根据权利要求130和131中任一项所述的方法, 其中所述靶向配体包含CpG寡核苷酸。

136. 根据权利要求135所述的方法, 其中所述CpG寡核苷酸包含序列TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:162)。

137. 根据权利要求135所述的方法, 其中所述CpG寡核苷酸包含序列GGTGCATCGATGCAGGGGG (SEQ ID NO:163)。

138. 根据权利要求73-137中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。

139. 根据权利要求73-138中任一项所述的方法, 其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

140. 根据权利要求139所述的方法, 其中相对于与TTR mRNA互补的单体寡核苷酸, 与TTR mRNA互补的亚基包含增加的体内活性。

141. 根据权利要求139和140中任一项所述的方法, 其中与TTR mRNA互补的寡核苷酸包含UUAUAGAGCAAGAACACUGUUUU (SEQ ID NO:164)。

142. 根据权利要求73-141中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸通过静脉内注射体内施用。

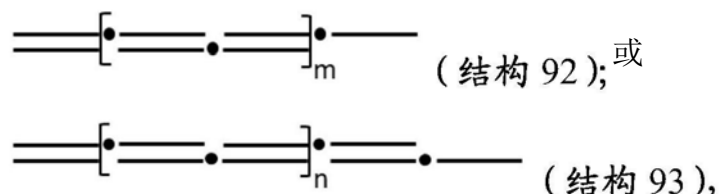
143. 根据权利要求73-85中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸通过静脉内注射体内施用, 并且分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式皮下施用时的体内活性, 增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性。

144. 根据权利要求73-85和143中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性增加至少2倍。

145. 根据权利要求144所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性增加至少5倍。

146. 根据权利要求145所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基以单体形式给药时的体内活性增加至少10倍。

147. 一种用于合成包含结构92或结构93的多聚寡核苷酸的方法:



其中每个——独立地是单链寡核苷酸, 每个——独立地是双链寡核苷酸, 每个•是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 并且m为 ≥ 0 的整数且n为 ≥ 0 的整数, 所述方法包括以下步骤:

(i) 通过以下形成——●——:

(a) 使第一单链寡核苷酸——和第二单链寡核苷酸—— R_1 退火, 从而形成—— R_1 , 并且使—— R_1 与第三单链寡核苷酸—— R_2 反应, 其中 R_1 和 R_2 是能够直接或

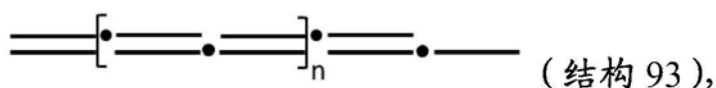
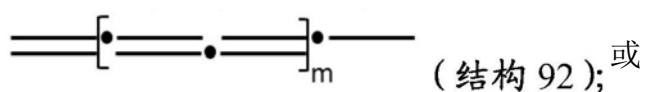
间接反应形成共价接头 $\cdot$ 的化学部分,从而形成 $\text{——}\cdot\text{——}$;或

(b) 使第二单链寡核苷酸 ——R_1 和第三单链寡核苷酸 ——R_2 反应,从而形成异源二聚体 $\text{——}\cdot\text{——}$,并且使第一单链寡核苷酸 —— 和异源二聚体 $\text{——}\cdot\text{——}$ 退火,从而形成 $\text{——}\cdot\text{——}$;

(ii) 任选地使 $\text{——}\cdot\text{——}$ 和单链二聚体 $\text{——}\cdot\text{——}$ 退火,从而形成 $\text{——}\cdot\text{——}$;以及

(iii) 任选地使一个或更多个另外的单链二聚体 $\text{——}\cdot\text{——}$ 退火,从而形成结构92或结构93。

148. 一种用于合成包含结构92或结构93的多聚寡核苷酸的方法:

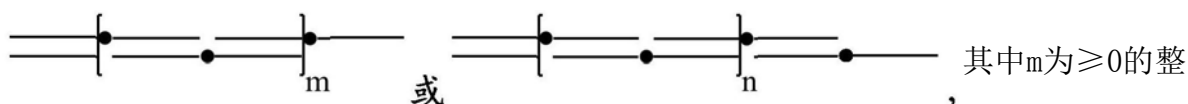


其中每个 —— 独立地是单链寡核苷酸,每个 —— 独立地是双链寡核苷酸,每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头,并且 m 为 ≥ 0 的整数且 n 为 ≥ 0 的整数,所述方法包括:

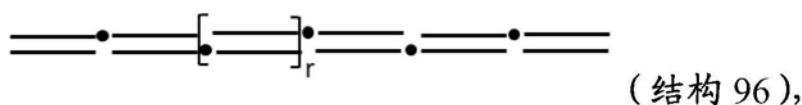
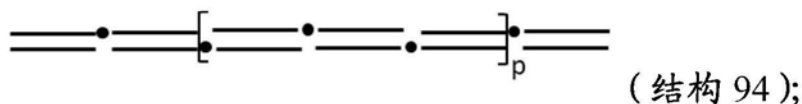
(i) 使第一单链寡核苷酸 —— 和第一单链异源二聚体 $\text{——}\cdot\text{——}$ 退火,从而形成 $\text{——}\cdot\text{——}$;

(ii) 任选地使 $\text{——}\cdot\text{——}$ 和第二单链二聚体 $\text{——}\cdot\text{——}$ 退火,从而形成 $\text{——}\cdot\text{——}$;以及

(iii) 任选地使一个或更多个另外的单链二聚体 $\text{——}\cdot\text{——}$ 与 $\text{——}\cdot\text{——}$ 退火,从而形成



149. 一种用于合成包含以下的多聚寡核苷酸的方法:



其中每个 —— 独立地是单链寡核苷酸,每个 —— 独立地是双链寡核苷酸,每个 $\cdot$ 接

153. 根据权利要求147-152中任一项所述的方法, 其中  和  内的一个或更多个核苷酸是RNA、DNA或人工或非天然核酸类似物。

154. 根据权利要求147-153中任一项所述的方法, 其中  和  中的至少一个是RNA。

155. 根据权利要求147-154中任一项所述的方法, 其中  和  中的至少一个是siRNA、saRNA或miRNA。

156. 根据权利要求155所述的方法, 其中  和  中的至少一个是siRNA。

157. 根据权利要求155所述的方法, 其中  和  中的至少一个是miRNA。

158. 根据权利要求147-153中任一项所述的方法, 其中  和  中的至少一个是反义寡核苷酸。

159. 根据权利要求156所述的方法, 其中两个或更多个siRNA通过附接到siRNA的有义链的共价接头接合。

160. 根据权利要求156所述的方法, 其中两个或更多个siRNA通过附接到siRNA的反义链的共价接头接合。

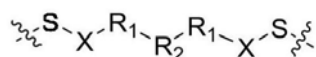
161. 根据权利要求156所述的方法, 其中两个或更多个siRNA通过附接到第一siRNA的有义链和第二siRNA的反义链的共价接头接合。

162. 根据权利要求147-161中任一项所述的方法, 其中一个或更多个共价接头 • 包含可裂解共价接头。

163. 根据权利要求162所述的方法, 其中所述可裂解共价接头包含酸可裂解键、还原剂可裂解键、生物可裂解键或酶可裂解键。

164. 根据权利要求162和163中任一项所述的方法, 其中所述可裂解共价接头在细胞内条件下是可裂解的。

165. 根据权利要求147-164中任一项所述的方法, 其中至少一个共价接头包含二硫键或式(I)的化合物:



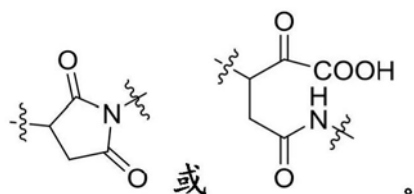
其中:

S通过共价键或通过接头附接到  或  的3' 或5' 末端;

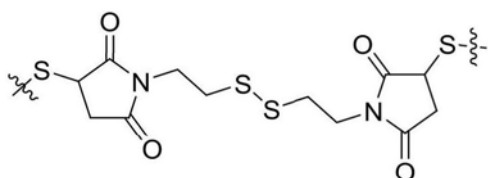
每个R₁独立地是C₂-C₁₀烷基、烷氧基或芳基;

R₂是硫代丙酸酯或二硫化物基团; 并且

每个X独立地选自:

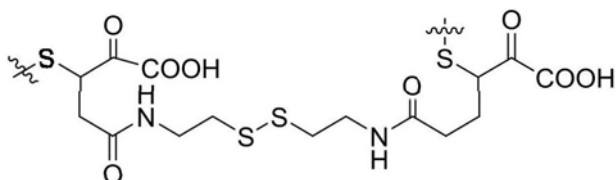


166. 根据权利要求165所述的方法, 其中所述式(I)的化合物是



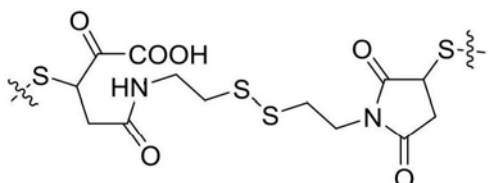
并且其中S通过共价键或通过接头附接到——或=====的3' 或5' 末端。

167. 根据权利要求165所述的方法, 其中所述式 (I) 的化合物是



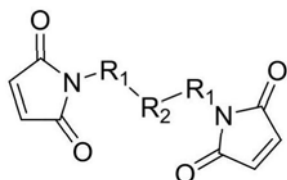
并且其中S通过共价键或通过接头附接到——或=====的3' 或5' 末端。

168. 根据权利要求165所述的方法, 其中所述式 (I) 的化合物是



并且其中S通过共价键或通过接头附接到——或=====的3' 或5' 末端。

169. 根据权利要求164-168中任一项所述的方法, 其中式 (I) 的共价接头由式 (II) 的共价连接前体形成:



其中:

每个 R_1 独立地是 C_2 - C_{10} 烷基、烷氧基或芳基; 并且

R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

170. 根据权利要求147-169中任一项所述的方法, 其中一个或多个共价接头包括核苷酸接头。

171. 根据权利要求170所述的方法, 其中所述核苷酸接头的长度为2-6个核苷酸。

172. 根据权利要求171所述的方法, 其中所述核苷酸接头是二核苷酸接头。

173. 根据权利要求147-172中任一项所述的方法, 其中每个共价接头 • 相同。

174. 根据权利要求147-172中任一项所述的方法, 其中所述共价接头 • 包含两个或多个不同的共价接头。

175. 根据权利要求147-174中任一项所述的方法, 其中两个或多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的3' 端与第二亚基的3' 端之间的共价接头 • 接合。

176. 根据权利要求147-174中任一项所述的方法, 其中两个或多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的3' 端与第二亚基的5' 端之间的共价接头 • 接合。

177. 根据权利要求147-174中任一项所述的方法, 其中两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的5'端与亚基的3'端之间的共价接头·接合。

178. 根据权利要求147-174中任一项所述的方法, 其中两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的5'端与第二亚基的5'端之间的共价接头·接合。

179. 根据权利要求147-174中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸还包含一个或更多个靶向配体。

180. 根据权利要求147-179中任一项所述的方法, 其中所述寡核苷酸亚基中的至少一个是靶向配体。

181. 根据权利要求179和180中任一项所述的方法, 其中所述靶向配体是适体。

182. 根据权利要求147-179中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸的末端与靶向配体缀合。

183. 根据权利要求179所述的方法, 其中所述靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

184. 根据权利要求147-183中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。

185. 根据权利要求147-184中任一项所述的方法, 其中所述寡核苷酸亚基中的至少一个包含与转甲状腺素蛋白(TTR)mRNA互补的寡核苷酸。

186. 根据权利要求185所述的方法, 其中与TTR mRNA互补的寡核苷酸包含UUAUAGAGCAAGAACACUGUUU (SEQ ID NO:164)。

187. 根据权利要求1-72中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中一个或更多个亚基包含一个或更多个硫代磷酸酯修饰。

188. 根据权利要求1-72中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中一个或更多个亚基在5'和/或3'端包含1-3个硫代磷酸酯修饰。

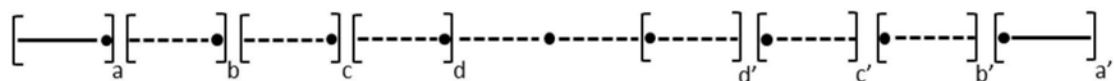
189. 根据权利要求1-72中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中每个亚基包含1-10个硫代磷酸酯修饰。

190. 根据权利要求73-146中任一项所述的方法, 其中一个或更多个亚基包含一个或更多个硫代磷酸酯修饰。

191. 根据权利要求73-146中任一项所述的方法, 其中一个或更多个亚基在5'和/或3'端包含1-3个硫代磷酸酯修饰。

192. 根据权利要求73-146中任一项所述的方法, 其中每个亚基包含1-10个硫代磷酸酯修饰。

193. 一种用于合成包含结构100的多聚寡核苷酸的方法:



(结构100), 其中每个——是单链寡核苷酸, 每个-----独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个·是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 所述方法包括以下步骤:

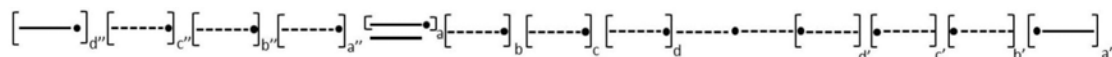
a) 使结构98 $\left[\text{---} \right]_a \left[\text{---} \right]_b \left[\text{---} \right]_c \left[\text{---} \right]_d \text{---} \text{R1}$ (结构98) 与结构99 $\text{R2} \text{---} \left[\text{---} \right]_{d'} \left[\text{---} \right]_{c'} \left[\text{---} \right]_{b'} \left[\text{---} \right]_{a'}$ (结构99) 反应,

其中:

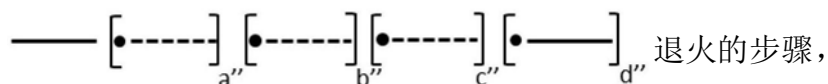
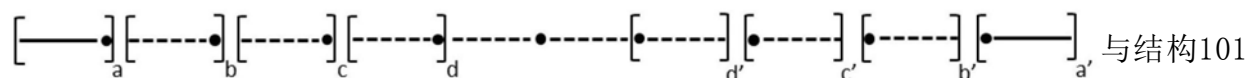
a、a'、b、b'、c、c'、d和d'各自独立地为0或1,并且R1和R2是能够直接或间接反应形成共价接头·的化学部分,从而形成结构100



194.一种用于合成包含结构102的多聚寡核苷酸的方法:

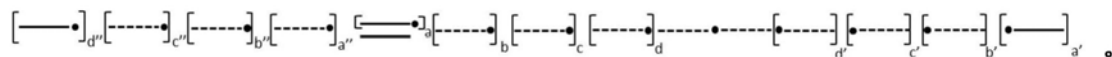


(结构102),其中每个——独立地是单链寡核苷酸,每个====独立地是双链寡核苷酸,每个-----独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个·是接合相邻寡核苷酸的共价接头,所述方法包括使结构100

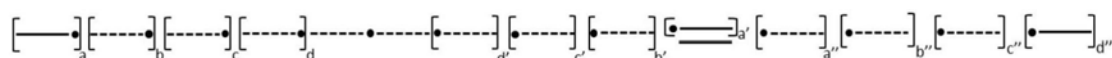


其中:

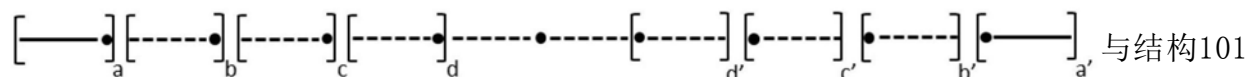
a为1,并且a'、a''、b、b'、b''、c、c'、c''、d、d'和d''各自独立地为0或1,从而形成结构102



195.一种用于合成包含结构103的多聚寡核苷酸的方法:

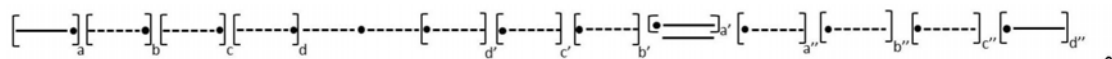


(结构103),其中每个——独立地是单链寡核苷酸,每个====独立地是双链寡核苷酸,每个-----独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个·是接合相邻寡核苷酸的共价接头,所述方法包括使结构100

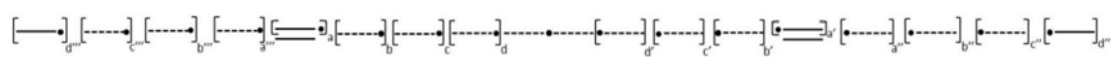


其中:

a'为1,并且a、a''、b、b'、b''、c、c'、c''、d、d'和d''各自独立地为0或1,从而形成结构103



196.一种用于合成包含结构104的多聚寡核苷酸的方法:



(结构104),其中每个——独立地是单链寡核苷酸,每个====独立地是双链寡核苷酸,每个-----独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个·是接合相邻寡核苷酸的共价接头,所述方法包括使结构103

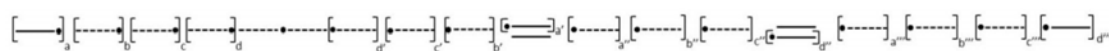
与结构
 105 退火的步骤,

其中:

a和a' 为1,并且a''、a'''、b、b'、b''、b'''、c、c'、c''、c'''、d、d'、d''和d''' 各自独立地为0或1,从而形成结构104



197. 一种用于合成包含结构107的多聚寡核苷酸的方法:

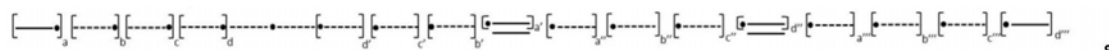


(结构107),其中每个 独立地是单链寡核苷酸,每个 独立地是双链寡核苷酸,每个 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个 是接合相邻寡核苷酸的共价接头,所述方法包括使结构103

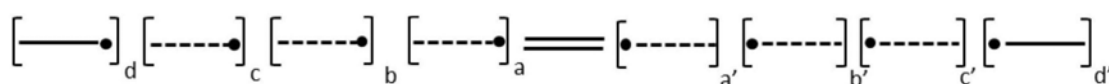
与结构
 105 退火的步骤,

其中:

a和d''为1,并且a'、a''、a'''、b、b'、b''、b'''、c、c'、c''、c'''、d、d'和d''' 各自独立地为0或1,从而形成结构107



198. 一种用于合成包含结构108的多聚寡核苷酸的方法:

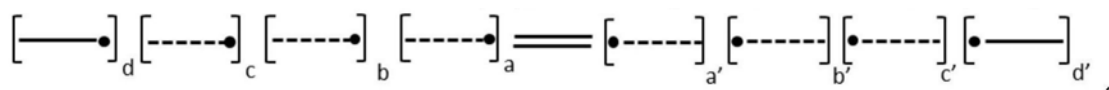


(结构108),其中每个 独立地是单链寡核苷酸,每个 独立地是双链寡核苷酸,每个 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个 是接合相邻寡核苷酸的共价接头,所述方法包括使结构109 [---]_a' [---]_b' [---]_c' [---]_d' 与结构110

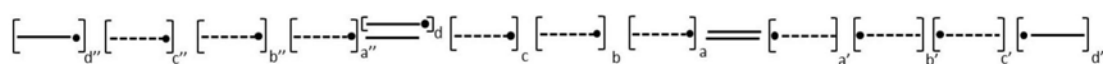
[---]_a [---]_b [---]_c [---]_d 退火的步骤,

其中:

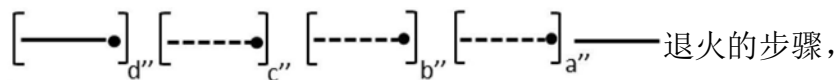
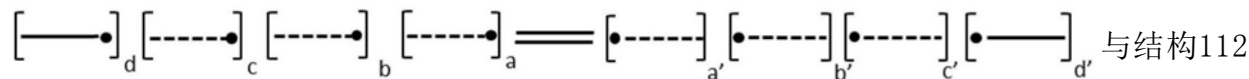
a、a'、b、b'、c、c'、d和d' 各自独立地为0或1,从而形成结构108



199. 一种用于合成包含结构111的多聚寡核苷酸的方法:

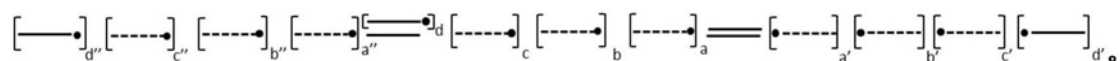


(结构111), 其中每个——独立地是单链寡核苷酸, 每个=====独立地是双链寡核苷酸, 每个-----独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个•是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 所述方法包括使结构108

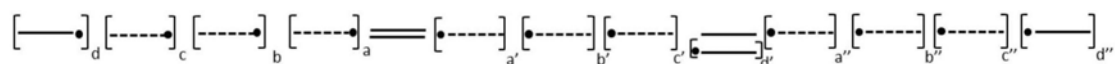


其中:

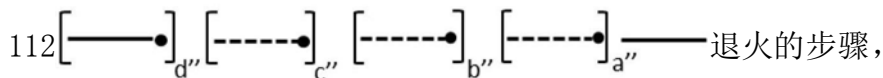
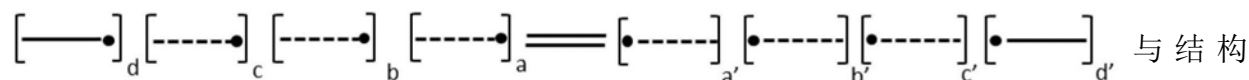
d为1, 并且a、a'、a''、b、b'、b''、c、c'、c''、d'和d''各自独立地为0或1, 从而形成结构111



200. 一种用于合成包含结构113的多聚寡核苷酸的方法:

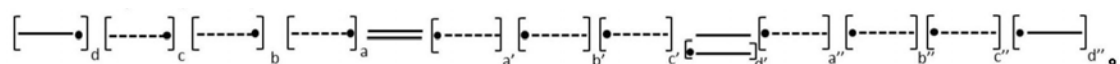


(结构113), 其中每个——独立地是单链寡核苷酸, 每个=====独立地是双链寡核苷酸, 每个-----独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个•是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 所述方法包括使结构108



其中:

d'为1, 并且a、a'、a''、b、b'、b''、c、c'、c''、d和d''各自独立为0或1, 从而形成结构113



201. 根据权利要求193-200中任一项所述的方法, 还包括使一个或多个单链寡核苷酸——与结构100至结构113中的互补单链寡核苷酸——退火, 从而形成双链寡核苷酸=====。

202. 根据权利要求193-201中任一项所述的方法, 其中每个单链寡核苷酸——和每个单链或双链寡核苷酸-----包含0-10个硫代磷酸酯修饰。

203. 根据权利要求193-202中任一项所述的方法, 其中至少一个-----是双链寡核苷酸。

204. 根据权利要求193-203中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸中——和-----的总数为至少4。

205. 根据权利要求193-204中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸为至少约45kD。

206. 根据权利要求193-205中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸选自-----•-----、-----•-----•-----和-----•-----•-----, 其中每个-----基本上相同或不同。

207. 根据权利要求193-205中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸选自-----、-----和-----, 其中每个-----基本上相同。

208. 根据权利要求193-207中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸的末端与靶向配体缀合。

209. 根据权利要求193-208中任一项所述的方法, 其中每个——、——和-----的长度独立地为10-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。

210. 根据权利要求193-209中任一项所述的方法, 其中——、——和-----内的一个或多个核苷酸是RNA、DNA或人工或非天然核酸类似物。

211. 根据权利要求193-210中任一项所述的方法, 其中——、——和-----中的至少一个是RNA。

212. 根据权利要求193-211中任一项所述的方法, 其中——、——和-----中的至少一个是siRNA、saRNA或miRNA。

213. 根据权利要求212所述的方法, 其中——、——和-----中的至少一个是siRNA。

214. 根据权利要求212所述的方法, 其中——、——和-----中的至少一个是miRNA。

215. 根据权利要求193-209中任一项所述的方法, 其中——和-----中的至少一个是反义寡核苷酸。

216. 根据权利要求213所述的方法, 其中两个或多个siRNA通过附接到siRNA的有义链的共价接头接合。

217. 根据权利要求213所述的方法, 其中两个或多个siRNA通过附接到siRNA的反义链的共价接头接合。

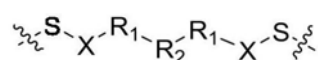
218. 根据权利要求213所述的方法, 其中两个或多个siRNA通过附接到第一siRNA的有义链和第二siRNA的反义链的共价接头接合。

219. 根据权利要求193-218中任一项所述的方法, 其中一个或多个共价接头包含可裂解共价接头。

220. 根据权利要求219所述的方法, 其中所述可裂解共价接头包含酸可裂解键、还原剂可裂解键、生物可裂解键或酶可裂解键。

221. 根据权利要求219和220中任一项所述的方法, 其中所述可裂解共价接头在细胞内条件下是可裂解的。

222. 根据权利要求193-221中任一项所述的方法, 其中至少一个共价接头包含二硫键或式(I)的化合物:



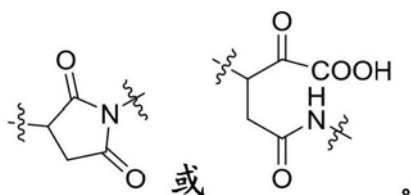
其中:

S通过共价键或通过接头附接到——、 或-----的3' 或5' 末端；

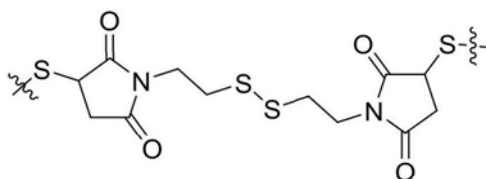
每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基；

R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团；并且

每个X独立地选自：

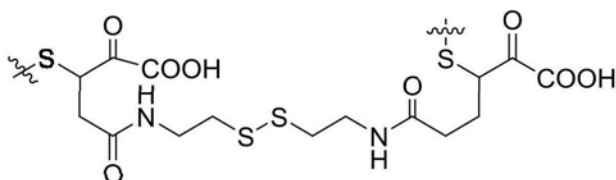


223. 根据权利要求222所述的方法，其中所述式 (I) 的化合物是



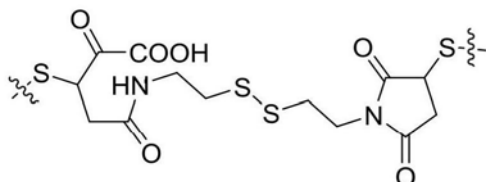
并且其中S通过共价键或通过接头附接到——、 或-----的3' 或5' 末端。

224. 根据权利要求222所述的方法，其中所述式 (I) 的化合物是



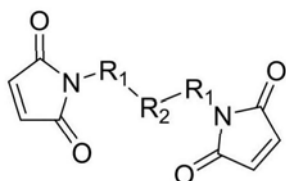
并且其中S通过共价键或通过接头附接到——、 、-----的3' 或5' 末端。

225. 根据权利要求222所述的方法，其中所述式 (I) 的化合物是



并且其中S通过共价键或通过接头附接到——、 、-----的3' 或5' 末端。

226. 根据权利要求193-225中任一项所述的方法，其中式 (I) 的共价接头由式 (II) 的共价连接前体形成：



其中：

每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基；并且

R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

227. 根据权利要求193-226中任一项所述的方法，其中一个或多个共价接头 • 包括核苷酸接头。

228. 根据权利要求227所述的方法, 其中所述核苷酸接头的长度为2-6个核苷酸。

229. 根据权利要求228所述的方法, 其中所述核苷酸接头是二核苷酸接头。

230. 根据权利要求193-229中任一项所述的方法, 其中每个共价接头 • 相同。

231. 根据权利要求193-229中任一项所述的方法, 其中所述共价接头 • 包含两个或更多个不同的共价接头。

232. 根据权利要求193-231中任一项所述的方法, 其中两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的3' 端与第二亚基的3' 端之间的共价接头 • 接合。

233. 根据权利要求193-231中任一项所述的方法, 其中两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的3' 端与第二亚基的5' 端之间的共价接头 • 接合。

234. 根据权利要求193-231中任一项所述的方法, 其中两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的5' 端与亚基的3' 端之间的共价接头 • 接合。

235. 根据权利要求193-231中任一项所述的方法, 其中两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的5' 端与第二亚基的5' 端之间的共价接头 • 接合。

236. 根据权利要求193-235中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸还包含一个或更多个靶向配体。

237. 根据权利要求193-236中任一项所述的方法, 其中所述寡核苷酸亚基中的至少一个是靶向配体。

238. 根据权利要求236和237中任一项所述的方法, 其中所述靶向配体是适体。

239. 根据权利要求193-238中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸的末端与靶向配体缀合。

240. 根据权利要求236所述的方法, 其中所述靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc)。

241. 根据权利要求193-240中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。

242. 根据权利要求193-241中任一项所述的方法, 其中所述寡核苷酸亚基中的至少一个包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

243. 根据权利要求242所述的方法, 其中与TTR mRNA互补的寡核苷酸包含UUAUAGAGCAAGAACACUGUUU (SEQ ID NO:164)。

244. 一种用于合成包含结构114

$\left[\text{-----} \bullet \right]_a \text{-----} \bullet \text{-----} \left[\text{-----} \bullet \right]_b$ (结构114) 的多聚寡核苷酸的方法, 其中每个-----

独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个 • 是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 所述方法包

括使结构115 $\left[\text{-----} \bullet \right]_a \text{-----} R1$ (结构115) 与结构116 $R2 \text{-----} \left[\text{-----} \bullet \right]_b$ (结构116) 反应,

其中:

R1和R2是能够直接或间接反应形成共价接头 • 的化学部分, a和b各自独立地为 ≥ 0 的整数, 条件是a和b的总和为 ≥ 4 , 从而形成结构114

$\left[\text{-----} \bullet \right]_a \text{-----} \bullet \text{-----} \left[\text{-----} \bullet \right]_b$

245. 根据权利要求244所述的方法, 其中结构115和/或结构116还包含一个或更多个靶

向配体。

246. 根据权利要求245所述的方法, 其中所述靶向配体是末端靶向配体。

247. 根据权利要求244-246中任一项所述的方法, 其中a为4、5、6、7、8、9或10的整数。

248. 根据权利要求244-247中任一项所述的方法, 其中b为4、5、6、7、8、9或10的整数。

249. 根据权利要求151、182、208和239中任一项所述的方法, 其中所述多聚寡核苷酸通过共价键缀合。

250. 根据权利要求14所述的多聚寡核苷酸, 其中所述至少两个基本上不同的亚基是靶向体内不同分子靶标的siRNA、miRNA或反义寡核苷酸。

251. 根据权利要求250所述的多聚寡核苷酸, 其中所述至少两个基本上不同的亚基是siRNA。

252. 根据权利要求250所述的多聚寡核苷酸, 其中所述至少两个基本上不同的亚基是miRNA。

253. 根据权利要求250所述的多聚寡核苷酸, 其中所述至少两个基本上不同的亚基是反义寡核苷酸。

254. 根据权利要求250-253中任一项所述的多聚寡核苷酸, 还包含靶向配体。

255. 根据权利要求254所述的多聚寡核苷酸, 其中所述靶向配体包含适体、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、免疫刺激剂或CpG寡核苷酸。

256. 根据权利要求250-255中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中一个或多个共价接头 • 包含可裂解共价接头。

257. 根据权利要求256所述的多聚寡核苷酸, 其中所述可裂解共价接头包含酸可裂解键、还原剂可裂解键、生物可裂解键或酶可裂解键。

258. 根据权利要求256或257所述的多聚寡核苷酸, 其中所述可裂解共价接头包含二硫键。

259. 根据权利要求256-258中任一项所述的多聚寡核苷酸, 其中所述可裂解共价接头在细胞内条件下是可裂解的。

具有增强生物活性的多聚寡核苷酸

相关申请信息

本申请要求于2019年3月4日提交的美国序列号62/813,599和2019年3月27日提交的美国序列号62/824,771的优先权,其都通过引用整体并入本文。

技术领域

本公开内容涉及基于寡核苷酸的疗法。更具体地,本公开内容涉及包含多个亚基的治疗性多聚寡核苷酸,相对于相应的单体,每个亚基在受试者中具有增加的生物活性。

技术背景

寡核苷酸现在是一类已确立的疗法,具有多种应用(例如,RNA干扰或RNAi)和正在进行的临床试验。然而,许多因素仍然限制寡核苷酸疗法,例如将寡核苷酸递送到靶细胞以及随后寡核苷酸以足够量内化到靶细胞中以实现所需治疗效果。

为了尝试解决这些递送和内化限制,许多方面已经研究了脂质纳米颗粒(LNP,例如,包含带正电荷的脂质以中和寡核苷酸的负电荷并且促进靶细胞结合和内化的脂质球体)。虽然在一些情况下,LNP可以促进递送和内化,但是它们存在严重缺点,例如靶向性差和毒性,导致治疗窗口窄。

还已经研究了与靶向特定细胞表面受体的与配体缀合的寡核苷酸。使用一种此种配体,N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)已经成为一种将寡核苷酸递送到肝细胞的选择方法。然而,虽然GalNAc缀合物的毒理学特征可以优于LNP,但是递送效率不高。该限制需要增加的剂量,通常一个数量级或更多。由于毒性、副作用和/或成本,增加的剂量可能是不合需要的。

尽管单个寡核苷酸疗法与传统药物相比是相当大的分子,但是它们仍然足够小以容易通过肾吸收和分泌。这是严重问题,因为到达靶细胞的治疗性物质的量因此减少。

为了使寡核苷酸通过肾的分泌最小化,一种方法是使分子中硫代磷酸酯核苷酸间连接的数量最大化。最初引入硫代磷酸酯基团以减少通过核酸酶的裂解,但是发现促进与蛋白质的结合。因为硫代磷酸酯寡核苷酸对蛋白质的亲和力是长度依赖性的,但是在很大程度上与序列无关(Stein CA等Biochemistry.1993;32:4855-4861),含有大部分的此类基团的寡核苷酸与血液中循环的蛋白质结合,从而增加寡核苷酸的有效分子大小并且降低通过肾的分泌率。然而,使用大量硫代磷酸酯基团有许多缺点。例如,适当长度的硫代磷酸酯寡核苷酸可以阻断生物学相关蛋白质与其天然受体的结合,导致毒副作用(Stein,CA.J Clin Invest.2001Sep 1;108(5):641-644)。因此,促进蛋白质结合是高水平硫代磷酸化的优点,同时是严重缺点。当硫代磷酸酯应用于siRNA时,还观察到毒性增加和基因沉默减少(Lam等,Mol Ther Nucleic Acids,2015,4(9):e252;Chiu等,RNA,2003,9:1034-1048;Amarzguioui等,Nucleic Acids Res,2003,31:589-595;Choung等,Biochem Biophys Res Commun,2006,342:919-927)。

因此,使用高水平的硫代磷酸酯基团来使通过肾滤过从血液流中损失寡核苷酸最小化不适用于siRNA和类似的双链分子,例如miRNA,并且限于反义寡核苷酸集。因此需要一

种方法来增加所有种类的寡核苷酸疗法的生物活性。

发明内容

本公开内容涉及在受试者中增加寡核苷酸疗法的生物活性的组合物和相关方法。本公开内容适用于所有类型的寡核苷酸疗法,包括siRNAs和miRNAs以及反义寡核苷酸,与硫代磷酸酯含量和所产生的蛋白质结合特性无关。

本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中寡核苷酸治疗剂(“亚基”)通过共价接头与相同或不同亚基的许多拷贝连接,并且其中每种药剂的生物活性相对于单独药剂活性增加。在一个实施方案中,生物活性的增加与硫代磷酸酯含量无关。在另一个实施方案中,生物活性的增加与多聚寡核苷酸的总硫代磷酸酯含量无关。在又一个实施方案中,生物活性的增加与多聚寡核苷酸中硫代磷酸酯与核苷酸残基之比无关。在另一些实施方案中,多聚寡核苷酸可以包含一个或更多个双链亚基,或可以总体包含四个或更多个亚基,或分子量可以为至少约45千道尔顿(kD)。根据本公开内容的多聚体的改进特性和有利特性可以在增加的体内活性方面进行描述。与相应单体相比,多聚体中每个亚基的体内生物活性的相对增加可以为2-10和更高;例如,相对增加可以为相应单体的生物活性的2、5、10或更多倍。

本公开内容还涉及新的合成中间体以及用于合成多缀合物寡核苷酸的方法。本公开内容还涉及使用多缀合物寡核苷酸的方法,例如用于减少基因表达、生物学研究、治疗或预防医学病症和/或产生新的或改变的表型。

在一个方面,本公开内容提供了包含亚基·····的多聚寡核苷酸,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基活性的增加与所述多聚寡核苷酸中的硫代磷酸酯含量无关。

在另一个方面,本公开内容提供了包含亚基·····的多聚寡核苷酸,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且所述多聚寡核苷酸内的至少一个亚基是双链寡核苷酸。

在又一个方面,本公开内容提供了包含亚基·····的多聚寡核苷酸,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

在再另一个方面,本公开内容提供了包含亚基·····的多聚寡核苷酸,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸内的至少一个亚基是双链寡核苷酸。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

在另一个方面,本公开内容提供了包含亚基·····的多聚寡核苷酸,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为减少其由于肾小球滤过而导致的清除;并且所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD,其中所述多聚寡核苷酸包含6个或更多个亚基·····的异源多聚体,其中至少两个亚基·····基本上不同。

在又另一个方面,本公开内容提供了包含亚基·····的多聚寡核苷酸,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸包含5个或更多个亚基·····;并且其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白(TTR)mRNA互补的寡核苷酸。

在再另一个方面,本公开内容提供了包含亚基·····的多聚寡核苷酸,其形成结构119:-----●-----●-----●-----,其中:每个亚基独立地是单链或双链寡核苷酸;每个亚基通过共价接头·与另一个亚基接合;并且其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白(TTR)mRNA互补的寡核苷酸。

在另一个方面,本公开内容提供了包含两个亚基·····的多聚寡核苷酸,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;化合物的分子量为至少约45kD;并且至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白(TTR)mRNA互补的寡核苷酸。

在一个实施方案中,至少两个亚基·····基本上不同。

在一个实施方案中,所有亚基基本上不同。

在一个实施方案中,至少两个亚基·····基本上相同或相同。

在一个实施方案中,所有亚基·····基本上相同或相同。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸包含5、6、7、8、9或10个亚基·····。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸包含6个亚基·····。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸包含7、8、9或10个亚基·····。

在一个实施方案中,每个亚基·····的长度独立地为10-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。

在一个实施方案中,一个或更多个亚基是双链的。在一个实施方案中,一个或更多个亚基是单链的。在一个实施方案中,实施亚基包含单链和双链寡核苷酸的组合。

在一个实施方案中,寡核苷酸内的一个或更多个核苷酸是RNA、DNA或人工或非天然核酸类似物。

在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是RNA。

在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是siRNA、saRNA或miRNA。

在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是siRNA。在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是miRNA。在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是反义寡核苷酸。

在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是双链siRNA。

在一个实施方案中,两个或更多个siRNA亚基通过附接到所述siRNA的有义链的共

价接头接合。

在一个实施方案中,两个或更多个siRNA亚基通过附接到所述siRNA的反义链的共价接头接合。

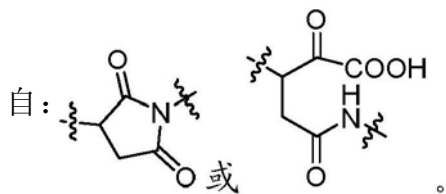
在一个实施方案中,两个或更多个siRNA亚基通过附接到第一siRNA的有义链和第二siRNA的反义链的共价接头接合。

在一个实施方案中,一个或更多个共价接头包含可裂解共价接头。

在一个实施方案中,所述可裂解共价接头包含酸可裂解键、还原剂可裂解键、生物可裂解键或酶可裂解键。

在一个实施方案中,所述可裂解共价接头在细胞内条件下是可裂解的。

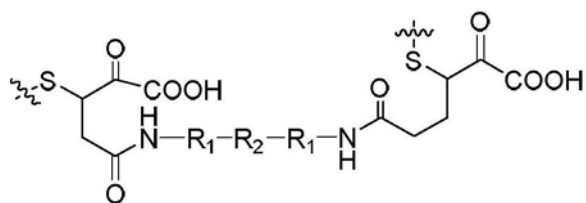
在一个实施方案中,至少一个共价接头包含二硫键或式(I)的化合物
 $\sim S-X-R_1-R_2-R_1-X-S\sim$ 其中:S通过共价键或通过接头附接到亚基的3'或5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基; R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团;并且每个X独立地选自:



在一个实施方案中,其中所述式(I)的化合物是

并且其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3'或5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基; R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是



其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3'或

5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基;并且 R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是

其中S

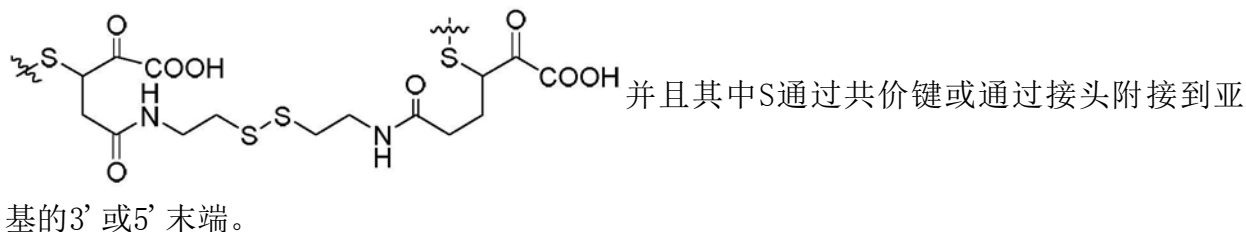
通过共价键或通过接头附接到亚基的3'或5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基;并且 R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是

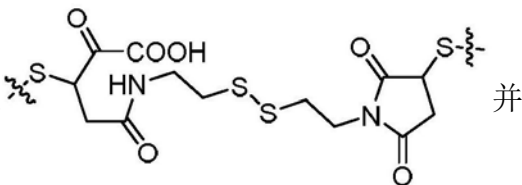
并

且其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端。

在一个实施方案中,所述式 (I) 的化合物是

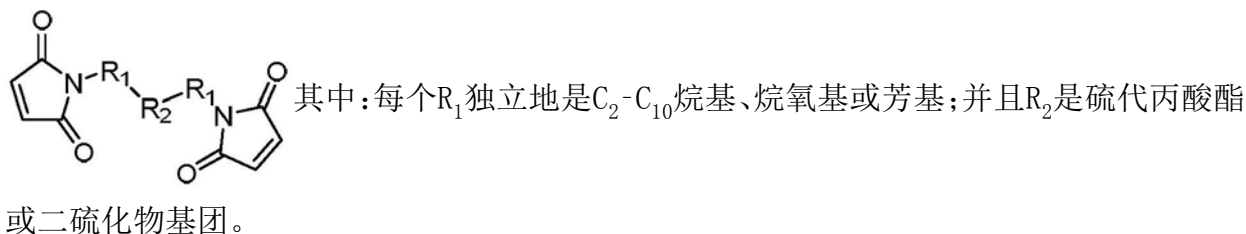


在一个实施方案中,所述式 (I) 的化合物是



且其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端。

在一个实施方案中,式 (I) 的共价接头由式 (II) 的共价连接前体形成:



在一个实施方案中,一个或更多个共价接头 • 包含核苷酸接头。

在一个实施方案中,所述核苷酸接头的长度为2-6个核苷酸。在一个实施方案中,所述核苷酸接头的长度为3、4或5个核苷酸。

在一个实施方案中,所述核苷酸接头是二核苷酸接头。

在一个实施方案中,每个共价接头 • 相同。在一个实施方案中,所述共价接头 • 包含两个或更多个不同的共价接头。

在一个实施方案中,至少两个亚基通过第一亚基的3' 端与第二亚基的3' 端之间的共价接头 • 接合。在一个实施方案中,至少两个亚基通过第一亚基的3' 端与第二亚基的5' 端之间的共价接头 • 接合。在一个实施方案中,至少两个亚基通过第一亚基的5' 端与第二亚基的3' 端之间的共价接头 • 接合。在一个实施方案中,至少两个亚基通过第一亚基的5' 端与第二亚基的5' 端之间的共价接头 • 接合。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸还包含一个或更多个靶向配体。在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸还包含一个或更多个靶向配体。。在一个实施方案中,所述靶向配体是适体。在一个实施方案中,所述靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc)。在一个实施方案中,所述靶向配体包含免疫刺激剂。在一个实施方案中,所述靶向配体包含CpG寡核苷酸。在一个实施方案中,所述CpG寡核苷酸包含序列TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:162)。在一个实施方案中,所述CpG寡核苷酸包含序列GGTGCATCGATGCAGGGGG (SEQ ID NO:163)。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。

在一个实施方案中,至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA 互补的寡核苷酸。

在一个实施方案中,相对于与 TTR mRNA 互补的单体寡核苷酸,与 TTR mRNA 互补的亚基包含增加的体内活性。

在一个实施方案中,与 TTR mRNA 互补的寡核苷酸包含 UUAUAGAGCAAGAACACUGUUUU (SEQ ID NO:164)。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸通过静脉内注射体内施用。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸通过静脉内注射体内施用,并且分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式皮下施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性增加至少2倍。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性增加至少5倍。在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性增加至少10倍。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基·····,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的活性的增加与所述多聚寡核苷酸中的硫代磷酸酯含量无关。

在另一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基·····,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且所述多聚寡核苷酸内的至少一个亚基是双链寡核苷酸。

在又一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基·····,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

在再另一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基·····,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置

为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;并且所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸内的至少一个亚基是双链寡核苷酸。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸包含4个或更多个亚基。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基·····,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;其中所述多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD;并且其中所述多聚寡核苷酸包含6个或更多个亚基·····的异源多聚体,其中至少两个亚基·····基本上不同。

在另一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基·····,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;所述多聚寡核苷酸包含5个或更多个亚基·····;并且其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

在又另一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基·····,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;其中所述多聚寡核苷酸包含结构117: ----- ●----- ●----- ●-----;并且其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

在再另一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,所述多聚寡核苷酸包含亚基·····,其中:每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头·与另一个亚基接合;所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性;其中所述多聚寡核苷酸包含两个亚基·····;其中化合物的分子量为至少约45kD;并且其中至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白 (TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

在一个实施方案中,施用包括静脉内注射。

在一个实施方案中,包含在所述多聚寡核苷酸中的亚基的数量为m,m是选择的以使所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的整数。

在一个实施方案中,至少两个亚基·····基本上不同。

在一个实施方案中,所有亚基基本上不同。

在一个实施方案中,至少两个亚基·····基本上相同或相同。

在一个实施方案中,所有亚基·····基本上相同或相同。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸包含5、6、7、8、9或10个亚基·····。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸包含6个亚基·····。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸包含7、8、9或10个亚基·····。

在一个实施方案中,每个亚基·····的长度独立地为10-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。

在一个实施方案中,一个或更多个亚基是双链的。在一个实施方案中,一个或更多个亚基是单链的。在一个实施方案中,所述亚基包含单链和双链寡核苷酸的组合。

在一个实施方案中,所述寡核苷酸内的一个或更多个核苷酸是RNA、DNA或人工或非天然核酸类似物。

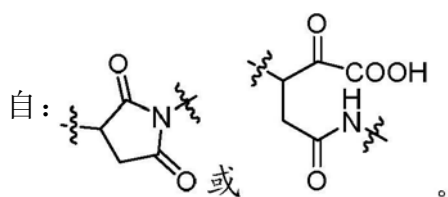
在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是RNA。在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是siRNA、saRNA或miRNA。在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是siRNA。在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是miRNA。在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是反义寡核苷酸。在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是双链siRNA。

在一个实施方案中,两个或更多个siRNA亚基通过附接到所述siRNA的有义链的共价接头接合。在一个实施方案中,两个或更多个siRNA亚基通过附接到所述siRNA的反义链的共价接头接合。在一个实施方案中,两个或更多个siRNA亚基通过附接到第一siRNA的有义链和第二siRNA的反义链的共价接头接合。

在一个实施方案中,一个或更多个共价接头·包括可裂解共价接头。在一个实施方案中,所述可裂解共价接头包含酸可裂解键、还原剂可裂解键、生物可裂解键或酶可裂解键。在一个实施方案中,所述可裂解共价接头在细胞内条件下是可裂解的。

在一个实施方案中,至少一个共价接头包含二硫键或式(I)的化合物:

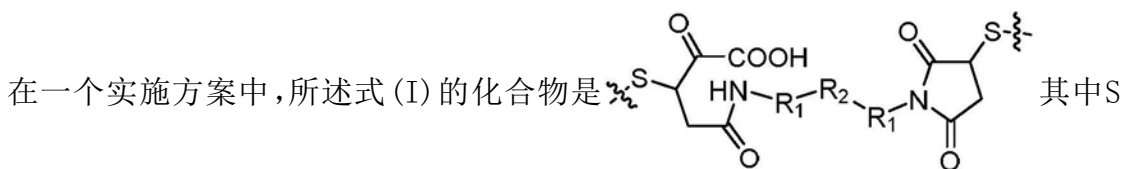
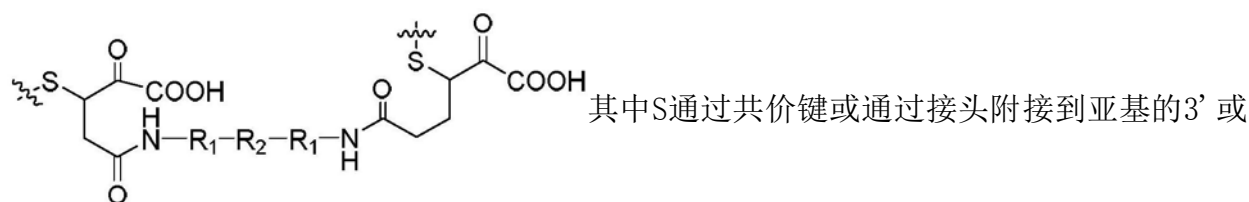
$\sim S-X-R_1-R_2-R_1-X-S \sim$ 其中:S通过共价键或通过接头附接到亚基的3'或5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基; R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团;并且每个X独立地选自:



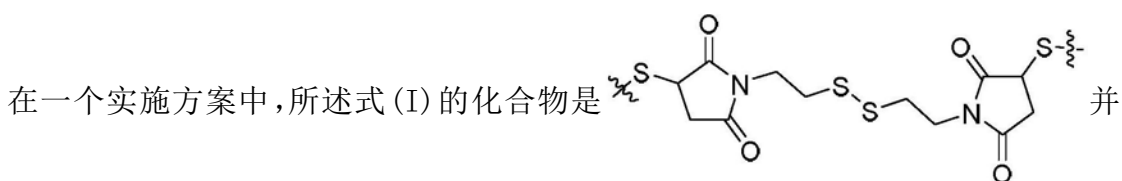
在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是 $\sim S-\text{Cyclopentane-1,3-dione}-R_1-R_2-R_1-\text{Cyclopentane-1,3-dione}-S \sim$ 其中S

通过共价键或通过接头附接到亚基的3'或5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基;并且 R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是

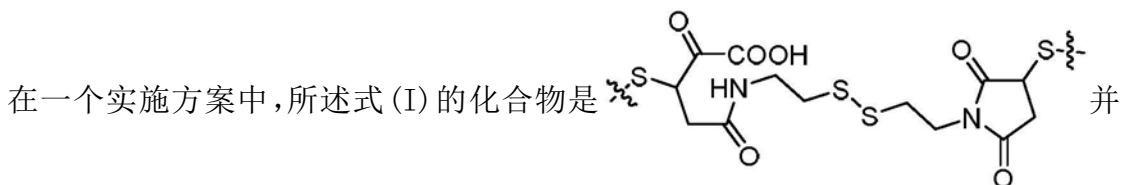
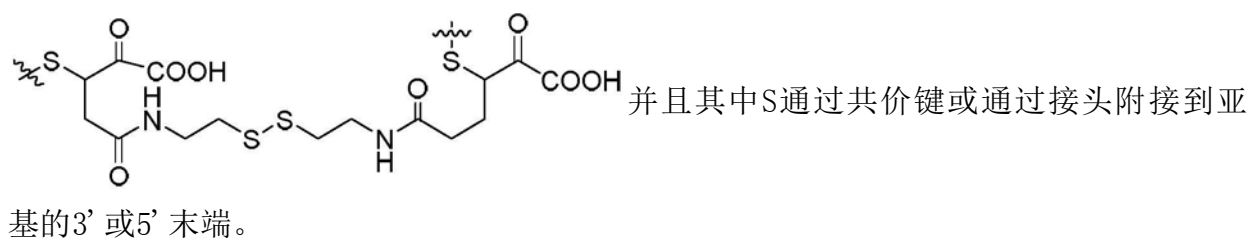


通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端；每个R₁独立地是C₂-C₁₀烷基、烷氧基或芳基；并且R₂是硫代丙酸酯或二硫化物基团。



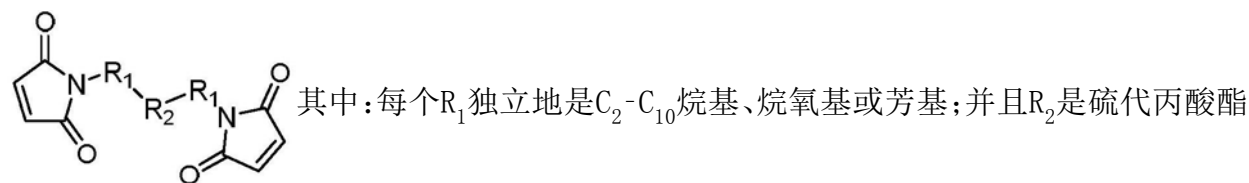
且其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端。

在一个实施方案中，所述式 (I) 的化合物是



且其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3' 或5' 末端。

在一个实施方案中，式 (I) 的共价接头由式 (II) 的共价连接前体形成：



或二硫化物基团。

在一个实施方案中，一个或多个共价接头 • 包含核苷酸接头。

在一个实施方案中，所述核苷酸接头的长度为2-6个核苷酸。在一个实施方案中，所述核苷酸接头的长度为3、4或5个核苷酸。在一个实施方案中，所述核苷酸接头是二核苷酸接头。

在一个实施方案中，每个共价接头 • 相同。在一个实施方案中，所述共价接头 • 包

括两个或更多个不同的共价接头。

在一个实施方案中,至少两个亚基通过第一亚基的3'端与第二亚基的3'端之间的共价接头•接合。在一个实施方案中,至少两个亚基通过第一亚基的3'端与第二亚基的5'端之间的共价接头•接合。在一个实施方案中,至少两个亚基通过第一亚基的5'端与第二亚基的3'端之间的共价接头•接合。在一个实施方案中,至少两个亚基通过第一亚基的5'端与第二亚基的5'端之间的共价接头•接合。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸还包含一个或更多个靶向配体。在一个实施方案中,所述亚基中的至少一个是靶向配体。在一个实施方案中,所述靶向配体是适体。在一个实施方案中,所述靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。在一个实施方案中,所述靶向配体包含免疫刺激剂。在一个实施方案中,所述靶向配体包含CpG寡核苷酸。在一个实施方案中,所述CpG寡核苷酸包含序列TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:162)。在一个实施方案中,所述CpG寡核苷酸包含序列GGTGCATCGATGCAGGGGG (SEQ ID NO:163)。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。

在一个实施方案中,至少一个亚基包含与转甲状腺素蛋白(TTR)mRNA互补的寡核苷酸。

在一个实施方案中,相对于与TTR mRNA互补的单体寡核苷酸,与TTR mRNA互补的亚基包含增加的体内活性。

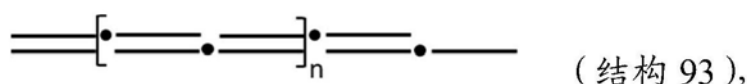
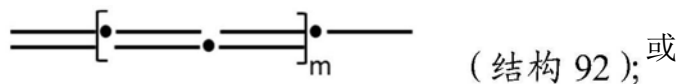
在一个实施方案中,与TTR mRNA互补的寡核苷酸包含UUAUAGAGCAAGAACACUGUUUU (SEQ ID NO:164)。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸通过静脉内注射体内施用。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸通过静脉内注射体内施用,并且所述多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为相对于相同亚基当以单体形式皮下施用时的体内活性,增加所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性增加至少2倍。在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性增加至少5倍。在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸内的一个或更多个亚基的体内活性的增加为相对于相同亚基当以单体形式施用时的体内活性增加至少10倍。

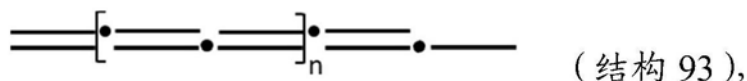
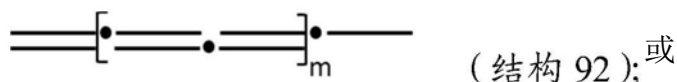
在一个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构92或结构93的多聚寡核苷酸的方法:



其中每个 --- 独立地是单链寡核苷酸,每个 = 独立地是双链寡核苷酸,每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头,并且 m 为 ≥ 0 的整数且 n 为 ≥ 0 的整数,所述方法包括以下步骤:(I)通过以下形成 $\text{---} \cdot \text{---}$: (a)使第一单链寡核苷酸 --- 和第二单链寡

核苷酸—— R_1 退火,从而形成—— R_1 ,并且使—— R_1 与第三单链寡核苷酸—— R_2 反应,其中 R_1 和 R_2 是能够直接或间接反应形成共价接头·的化学部分,从而形成——●——;或(b)使第二单链寡核苷酸—— R_1 和第三单链寡核苷酸—— R_2 反应,从而形成异源二聚体——●——,并且使第一单链寡核苷酸——和异源二聚体——●——退火,从而形成——●——; (II) 任选地使——●——和单链二聚体——●——退火,从而形成——●——;以及(iii)任选地使一个或更多个另外的单链二聚体——●——退火,从而形成结构92或结构93。

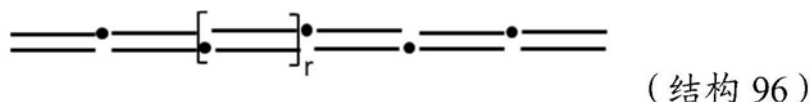
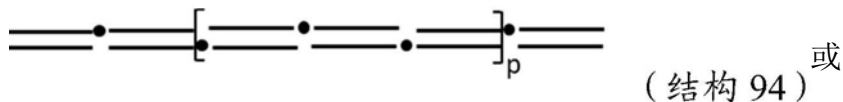
在一个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构92或结构93的多聚寡核苷酸的方法:



其中每个——独立地是单链寡核苷酸,每个——独立地是双链寡核苷酸,每个·是接合相邻寡核苷酸的共价接头,并且 m 为 ≥ 0 的整数且 n 为 ≥ 0 的整数,所述方法包括:
(i) 将第一单链寡核苷酸——和第一单链异源二聚体——●——退火,从而形成——●——; (ii) 任选地使——●——和第二单链二聚体——●——退火,从而形成——●——;以及

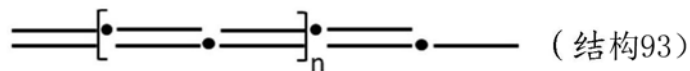
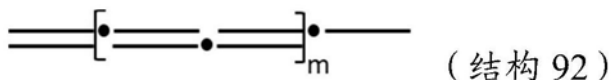
(iii) 任选地使一个或更多个另外的单链二聚体——●——与——●——退火,从而形成——●—— $\left[\text{——} \cdot \text{——} \right]_m \text{——}$ 或
——●—— $\left[\text{——} \cdot \text{——} \right]_n \text{——}$, 其中 m 为 ≥ 0 的整数,且 n 为 ≥ 0 的整数。

在另一个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含以下的多聚寡核苷酸的方法:



其中每个——独立地是单链寡核苷酸,每个——独立地是双链寡核苷酸,每个·接合相邻寡核苷酸的共价接头,并且 p 为 ≥ 0 的整数, q 为 ≥ 0 的整数,且 r 为 ≥ 0 的整数,

所述方法包括：(i) 使结构92和结构93退火：



或(ii)使第一结构92与第二结构92退火；或(iii)使第一结构93和第二结构93退火，从而形成结构94、结构95或结构96，其中m为 ≥ 0 的整数，且n为 ≥ 0 的整数。

在再另一个方面，本公开内容提供了一种用于合成包含结构97的多聚寡核苷酸的方法：



其中每个 ===== 独立地是单链寡核苷酸，每个 ===== 独立地是双链寡核苷酸，并且每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头，所述方法包括以下步骤：(i) 通过以下形成 $\text{=====} \cdot \text{=====}$ ：

(a) 使第一单链寡核苷酸 ===== 和第二单链寡核苷酸 =====R1 退火，从而形成 =====R1 ，使 =====R1 与第三单链寡核苷酸 =====R2 反应，其中R1和R2是能够直接或间接反形成共价接头 $\cdot$ 的化学部分，从而形成 $\text{=====} \cdot \text{=====}$ ，并且使 $\text{=====} \cdot \text{=====}$ 与 $\text{=====} \cdot \text{=====}$ 退火，从而形成 $\text{=====} \cdot \text{=====} \cdot \text{=====}$ ；或(b) 使第二单链寡核苷酸 =====R1 和第三单链寡核苷酸 =====R2 反应，从而形成异源二聚体 $\text{=====} \cdot \text{=====}$ ，使第一单链寡核苷酸 ===== 和异源二聚体 $\text{=====} \cdot \text{=====}$ 退火，从而形成 $\text{=====} \cdot \text{=====}$ ，并且使 $\text{=====} \cdot \text{=====}$ 与 $\text{=====} \cdot \text{=====}$ 退火，从而形成 $\text{=====} \cdot \text{=====} \cdot \text{=====}$ ；(ii) 通过(i) (a) 或(i) (b) 的步骤形成第二 $\text{=====} \cdot \text{=====} \cdot \text{=====}$ ；以及(iii) 通过使 $\text{=====} \cdot \text{=====} \cdot \text{=====}$ 、

===== 和 ===== 退火形成 $\text{=====} \cdot \text{=====} \cdot \text{=====} \cdot \text{=====}$ ，从而形成 $\text{=====} \cdot \text{=====} \cdot \text{=====} \cdot \text{=====}$ 。

在一个实施方案中，所述多聚寡核苷酸的末端与靶向配体缀合。

在一个实施方案中，每个 ===== 和 ===== 的长度独立地为10-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。

在一个实施方案中， ===== 和 ===== 内的一个或多个核苷酸是RNA、DNA或人工或非天然核酸类似物。

在一个实施方案中， ===== 和 ===== 中的至少一个是RNA。

在一个实施方案中， ===== 和 ===== 中的至少一个是siRNA、saRNA或miRNA。在一个实施方案中， ===== 和 ===== 中的至少一个是siRNA。在一个实施方案中， ===== 和 ===== 中的至少一个是miRNA。在一个实施方案中， ===== 和 ===== 中的至少一个是反义寡核苷酸。

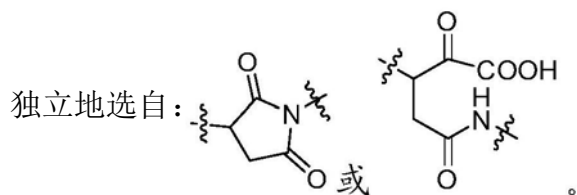
在一个实施方案中，两个或多个siRNA通过附接到siRNA的有义链的共价接头接合。在一个实施方案中，两个或多个siRNA通过附接到siRNA的反义链的共价接头接合。在

一个实施方案中,两个或更多个siRNA通过附接到第一siRNA的有义链和第二siRNA的反义链的共价接头接合。

在一个实施方案中,一个或更多个共价接头包含可裂解共价接头。在一个实施方案中,所述可裂解共价接头包含酸可裂解键、还原剂可裂解键、生物可裂解键或酶可裂解键。在一个实施方案中,所述可裂解共价接头在细胞内条件下是可裂解的。

在一个实施方案中,中至少一个共价接头包含二硫键或式(I)的化合物:

$\sim S-X-R_1-R_2-R_1-X-S \sim$ 其中:S通过共价键或通过接头附接到——或=的3'或5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基; R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团;并且每个X

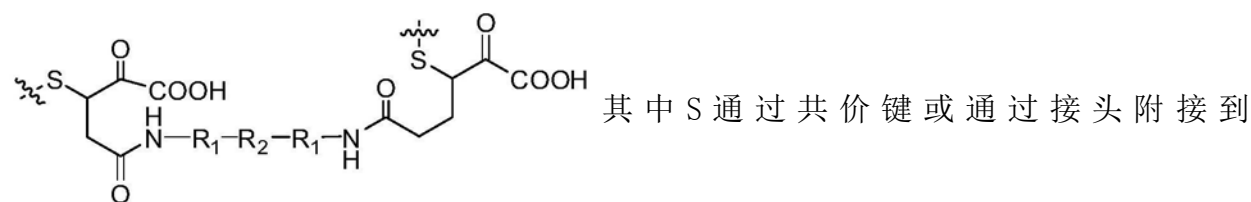


在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是

其中S

通过共价键或通过接头附接到——或=的3'或5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基;并且 R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是



——或=的3'或5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基;并且 R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是

其中S

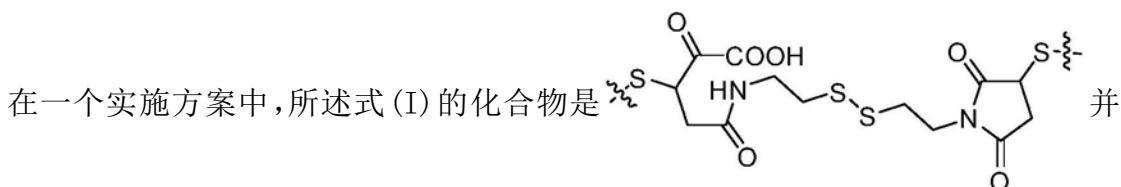
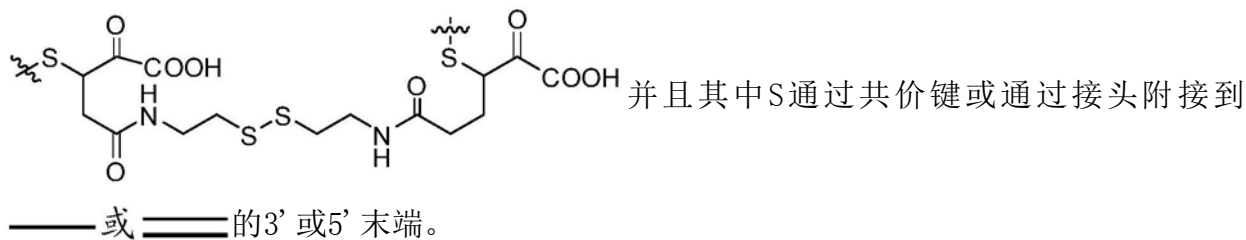
通过共价键或通过接头附接到——或=的3'或5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基;并且 R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是

其

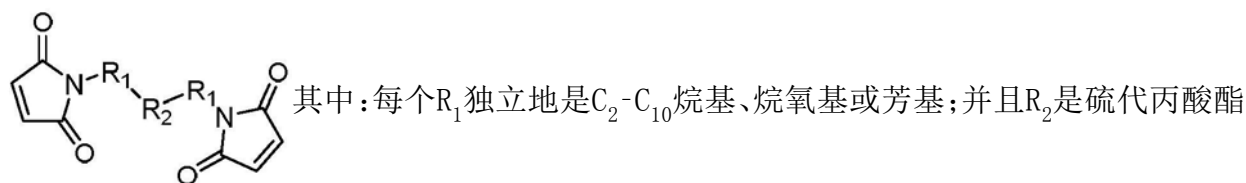
中S通过共价键或通过接头附接到——或=的3'或5'末端。

在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是



且其中S通过共价键或通过接头附接到——或══的3' 或5' 末端。

在一个实施方案中,式(I)的共价接头由式(II)的共价连接前体形成:



或二硫化物基团。

在一个实施方案中,一个或更多个共价接头 • 包括核苷酸接头。在一个实施方案中,所述核苷酸接头的长度为2-6个核苷酸。在一个实施方案中,所述核苷酸接头的长度为3、4或5个核苷酸。在一个实施方案中,所述核苷酸接头是二核苷酸接头。

在一个实施方案中,每个共价接头 • 是相同的。在一个实施方案中,所述共价接头 • 包含两个或更多个不同的共价接头。

在一个实施方案中,两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的3' 端与第二亚基的3' 端之间的共价接头 • 接合。在一个实施方案中,两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的3' 端与第二亚基的5' 端之间的共价接头 • 接合。在一个实施方案中,两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的5' 端与亚基的3' 端之间的共价接头 • 接合。在一个实施方案中,两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的5' 端与第二亚基的5' 端之间的共价接头 • 接合。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸还包含一个或更多个靶向配体。在一个实施方案中,所述寡核苷酸亚基中的至少一个是靶向配体。在一个实施方案中,所述靶向配体是适体。在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸的末端与靶向配体缀合。在一个实施方案中,所述靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。

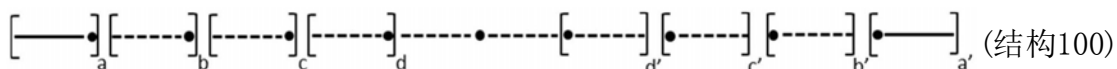
在一个实施方案中,所述寡核苷酸亚基中的至少一个包含与转甲状腺素蛋白(TTR)mRNA互补的寡核苷酸。

在一个实施方案中,与TTR mRNA互补的寡核苷酸包含UUAUAGAGCAAGAACACUGUUUU (SEQ ID NO:164)。

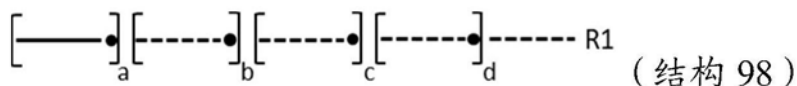
在一个实施方案中,一个或更多个亚基包含一个或更多个硫代磷酸酯修饰。在一

个实施方案中,一个或多个亚基在5' 和/或3' 端包含1-3个硫代磷酸酯修饰。在一个实施方案中,每个亚基包含0-15个硫代磷酸酯修饰、或1-12个硫代磷酸酯修饰或2-8个硫代磷酸酯修饰。

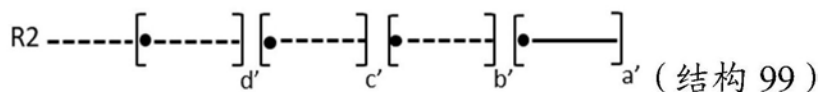
在另一个方面,本公开内容提供了合成包含结构100的多聚寡核苷酸的方法:



其中每个 --- 是单链寡核苷酸,每个 --- 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个 $\bullet$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头,所述方法包括以下步骤:a)使结构98



与结构99



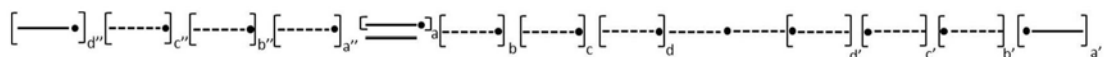
反应,其中:a、a'、b、b'、c、c'、d和d'各自独立地为0或1,并且R1和R2是能够直接或间接反应形成共价接头 $\bullet$ 的化学部分,从而形成结构100



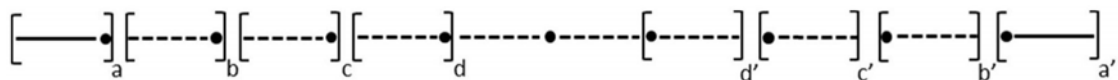
方面,a+a'+b+b'+c+c'+d+d'的总和大于或等于1、大于或等于2、大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9或大于或等于10。

在另一些方面,a+a'+b+b'+c+c'+d+d'的总和为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

在另一个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构102的多聚寡核苷酸的方法:

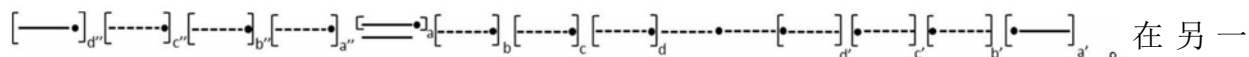


(结构102),其中每个 --- 独立地是单链寡核苷酸,每个 --- 独立地是双链寡核苷酸,每个 --- 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个 $\bullet$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头,所述方法包括使结构100



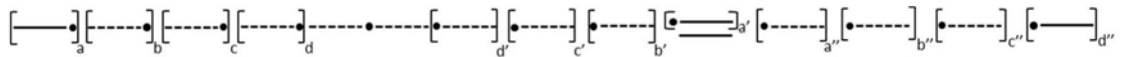
与结构101 $\text{---} \left[\text{---} \right]_{a''} \left[\text{---} \right]_{b''} \left[\text{---} \right]_{c''} \left[\text{---} \right]_{d''}$ 退火的步骤,其中:a为1,并且a'、

a''、b、b'、b''、c、c'、c''、d、d'和d''各自独立地为0或1,从而形成结构102

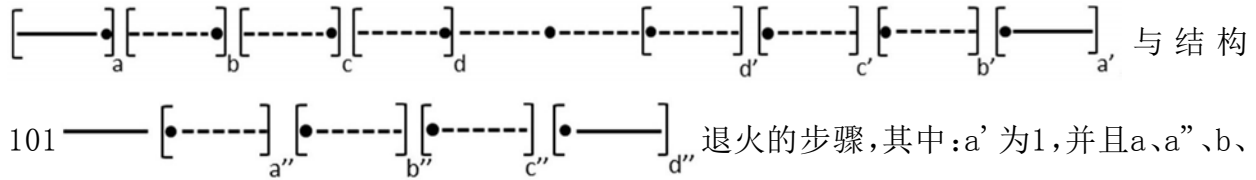


在另一些方面,a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''的总和大于或等于2、大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9或大于或等于10。在另一些方面,a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''的总和为2、3、4、5、6、7、8、9或10。

在另一个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构103的多聚寡核苷酸的方法:



(结构103), 其中每个 --- 独立地是单链寡核苷酸, 每个 = 独立地是双链寡核苷酸, 每个 --- 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 所述方法包括使结构100

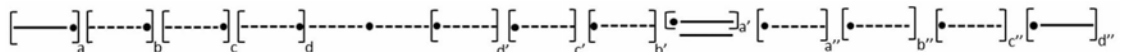


退火的步骤, 其中: a' 为1, 并且 a 、 a'' 、 b 、 b' 、 b'' 、 c 、 c' 、 c'' 、 d 、 d' 和 d'' 各自独立地为0或1, 从而形成结构103 $[\text{---}]_a [\text{---}]_b [\text{---}]_c [\text{---}]_d \cdots [\text{---}]_{d'} [\text{---}]_{c'} [\text{---}]_{b'} [\text{---}]_{a'} [\text{---}]_{a''} [\text{---}]_{b''} [\text{---}]_{c''} [\text{---}]_{d''}$ 。在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和大于或等于2、大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9或大于或等于10。在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和为2、3、4、5、6、7、8、9或10。

在另一个方面, 本公开内容提供了一种用于合成包含结构104的多聚寡核苷酸的方法:

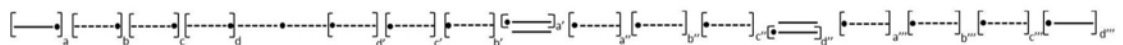


(结构104), 其中每个 --- 独立地是单链寡核苷酸, 每个 = 独立地是双链寡核苷酸, 每个 --- 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 所述方法包括使结构103

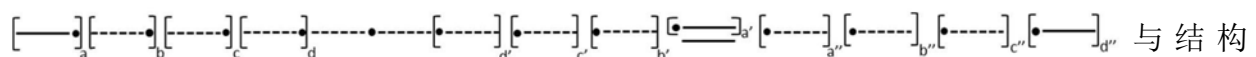


与结构105 $[\text{---}]_{a'''} [\text{---}]_{b'''} [\text{---}]_{c'''} [\text{---}]_{d'''}$ 退火的步骤, 其中: a 和 a' 为1, 并且 a'' 、 a''' 、 b 、 b' 、 b'' 、 b''' 、 c 、 c' 、 c'' 、 c''' 、 d 、 d' 、 d'' 和 d''' 各自独立地为0或1, 从而形成结构104 $[\text{---}]_a [\text{---}]_b [\text{---}]_c [\text{---}]_d \cdots [\text{---}]_{d'} [\text{---}]_{c'} [\text{---}]_{b'} [\text{---}]_{a'} [\text{---}]_{a''} [\text{---}]_{b''} [\text{---}]_{c''} [\text{---}]_{d''}$ 。在另一些方面, $a+a'+a''+a'''+b+b'+b''+b'''+c+c'+c''+c'''+d+d'+d''+d'''$ 的总和大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9或大于或等于10。在另一些方面, $a+a'+a''+a'''+b+b'+b''+b'''+c+c'+c''+c'''+d+d'+d''+d'''$ 的总和为3、4、5、6、7、8、9或10。

在另一个方面, 本公开内容提供了一种用于合成包含结构107的多聚寡核苷酸的方法:

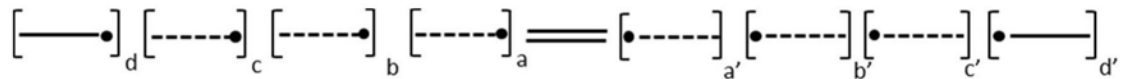


(结构107), 其中每个 --- 独立地是单链寡核苷酸, 每个 = 独立地是双链寡核苷酸, 每个 --- 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 所述方法包括使结构103



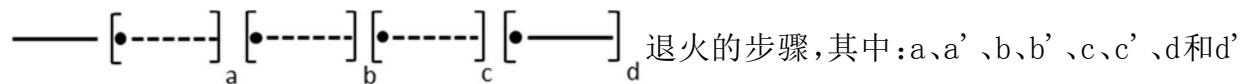
105 $\text{---} [\text{---}]_{a'''} [\text{---}]_{b'''} [\text{---}]_{c'''} [\text{---}]_{d'''}$ 退火的步骤,其中: a' 和 d'' 各自为1,并且 a 、 a'' 、 a''' 、 b 、 b' 、 b'' 、 b''' 、 c 、 c' 、 c'' 、 c''' 、 d 、 d' 和 d''' 各自独立地为0或1,从而形成107 $[\text{---}]_a [\text{---}]_{a'} [\text{---}]_{a''} [\text{---}]_{a'''} [\text{---}]_b [\text{---}]_{b'} [\text{---}]_{b''} [\text{---}]_{b'''} [\text{---}]_c [\text{---}]_{c'} [\text{---}]_{c''} [\text{---}]_{c'''} [\text{---}]_d [\text{---}]_{d'} [\text{---}]_{d''} [\text{---}]_{d'''}$ 。在另一些方面, $a+a'+a''+a''' + b+b'+b''+b''' + c+c'+c''+c''' + d+d'+d''+d'''$ 的总和大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9或大于或等于10。在另一些方面, $a+a'+a''+a''' + b+b'+b''+b''' + c+c'+c''+c''' + d+d'+d''+d'''$ 的总和为3、4、5、6、7、8、9或10。

在另一个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构108的多聚寡核苷酸的方法:

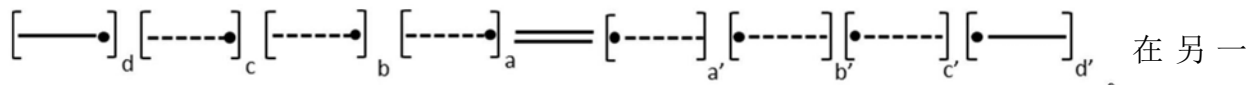


(结构108),其中每个 --- 独立地是单链寡核苷酸,每个 $=$ 独立地是双链寡核苷酸,每个 --- 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头,

所述方法包括使结构109 $\text{---} [\text{---}]_{a'} [\text{---}]_{b'} [\text{---}]_{c'} [\text{---}]_{d'}$ 与结构110

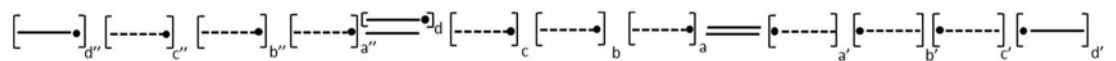


退火的步骤,其中: a 、 a' 、 b 、 b' 、 c 、 c' 、 d 和 d' 各自独立地为0或1,从而形成结构108

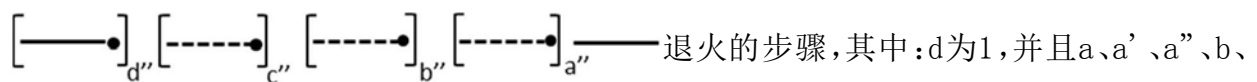
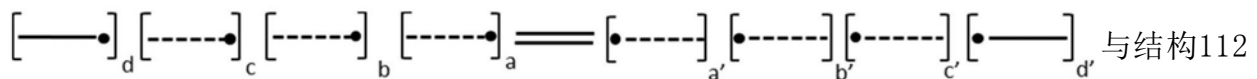


在另一些方面, $a+a'+b+b'+c+c'+d+d'$ 的总和大于或等于1、大于或等于2、大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9、大于或等于10或大于或等于11。在另一些方面, $a+a'+b+b'+c+c'+d+d'$ 的总和为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

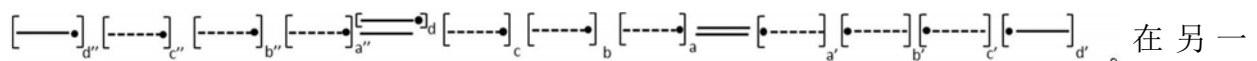
在另一个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构111的多聚寡核苷酸的方法:



(结构111),其中每个 --- 独立地是单链寡核苷酸,每个 $=$ 独立地是双链寡核苷酸,每个 --- 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头,所述方法包括使结构108

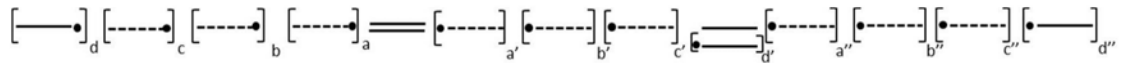


退火的步骤,其中: d 为1,并且 a 、 a' 、 a'' 、 b 、 b' 、 b'' 、 c 、 c' 、 c'' 、 d' 和 d'' 各自独立地为0或1,从而形成结构111

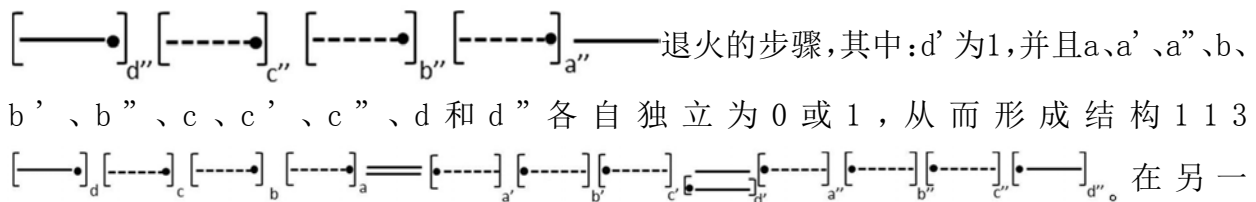
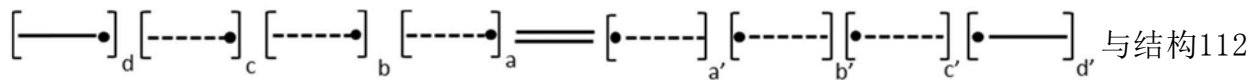


些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和大于或等于2、大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9、大于或等于10或大于或等于11。在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和为2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

在另一个方面, 本公开内容提供了一种用于合成包含结构113的多聚寡核苷酸的方法:

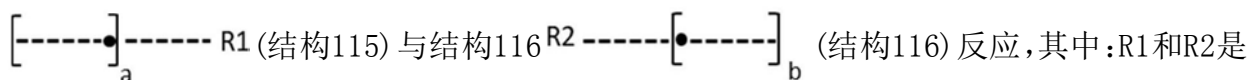


(结构113), 其中每个 --- 独立地是单链寡核苷酸, 每个 = 独立地是双链寡核苷酸, 每个 --- 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 所述方法包括使结构108



在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和大于或等于2、大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9、大于或等于10或大于或等于11。在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和为2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

在另一个方面, 本公开内容提供了一种用于合成包含结构114的多聚寡核苷酸的方法: $[\text{---}]_a \text{---} \cdot \text{---} [\text{---}]_b$ (结构114), 其中每个 --- 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 所述方法包括使结构115



能够直接或间接反应形成共价接头 $\cdot$ 的化学部分, a 和 b 各自独立地为 ≥ 0 的整数, 条件是 a 和 b 的总和为 ≥ 4 , 从而形成结构114 $[\text{---}]_a \text{---} \cdot \text{---} [\text{---}]_b$ 。在另一些方面, a 和 b 的总和大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9或大于或等于10。在另一些方面, a 和 b 的总和为5、6、7、8、9或10。

在一个实施方案中, 所述方法还包括使一个或更多个单链寡核苷酸 --- 与结构100至结构113中的互补单链寡核苷酸 --- 退火, 从而形成双链寡核苷酸 = 。

在一个实施方案中, 每个单链寡核苷酸 = 和每个单链或双链寡核苷酸 --- 包含0-15个硫代磷酸酯修饰或1-12个硫代磷酸酯修饰或2-8个硫代磷酸酯修饰。

在一个实施方案中, 至少一个 --- 是双链寡核苷酸。

在一个实施方案中, 所述多聚寡核苷酸中 --- 和 = 的总数为至少4。

在一个实施方案中, 所述多聚寡核苷酸为至少约45kD。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸为-----●-----、
-----●-----和-----●-----,并且每个-----基本上相同或不
同。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸为,
-----●-----、-----●-----、
-----●-----或
-----●-----,并且每个-----基本上相
同。

在一个实施方案中,所述多聚寡核苷酸的末端与靶向配体缀合。

在一个实施方案中,每个——、══和-----的长度独立地为10-30、17-27、
19-26或20-25个核苷酸。

在一个实施方案中,——、══和-----内的一个或更多个核苷酸是RNA、
DNA或人工或非天然核酸类似物。

在一个实施方案中,——、══和-----中的至少一个是RNA。

在一个实施方案中,——、══和-----中的至少一个siRNA、saRNA或
miRNA。

在一个实施方案中,——、══和-----中的至少一个是siRNA。

在一个实施方案中,——、══和-----中的至少一个是miRNA。

在一个实施方案中,——和-----中的至少一个是反义寡核苷酸。

在一个实施方案中,两个或更多个siRNA通过附接到siRNA的有义链的共价接头接
合。在一个实施方案中,两个或更多个siRNA通过附接到siRNA的反义链的共价接头接合。

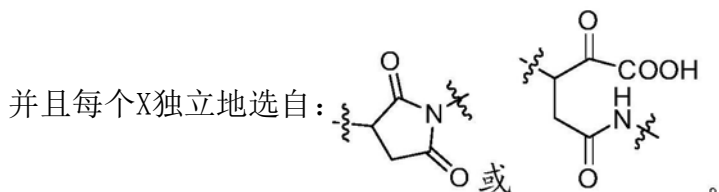
在一个实施方案中,两个或更多个siRNA通过附接到第一siRNA的有义链和第二
siRNA的反义链的共价接头接合。

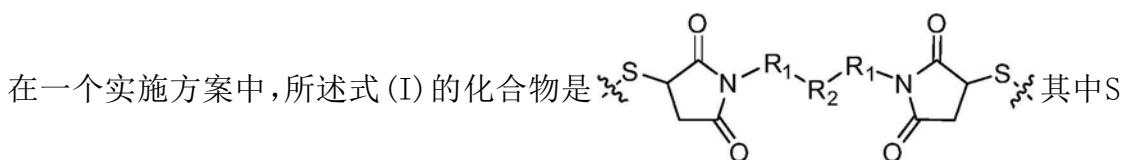
在一个实施方案中,一个或更多个共价接头·包含可裂解共价接头。

在一个实施方案中,所述可裂解共价接头包含酸可裂解键、还原剂可裂解键、生物
可裂解键或酶可裂解键。

在一个实施方案中,所述可裂解共价接头在细胞内条件下是可裂解的。

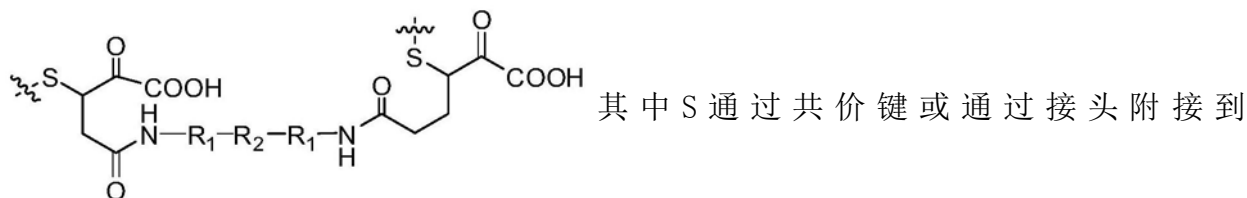
在一个实施方案中,至少一个共价接头包含二硫键或式(I)的化合物:
 $\text{S}-\text{X}-\text{R}_1-\text{R}_2-\text{R}_1-\text{X}-\text{S}$ 其中:S通过共价键或通过接头附接到——、══或-----的
3' 或5' 末端;每个 R_1 独立地是 C_2-C_{10} 烷基、烷氧基或芳基; R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团;



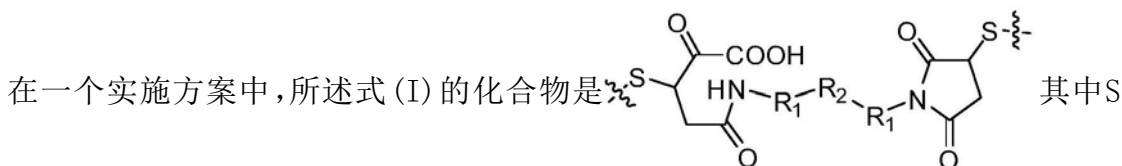


通过共价键或通过接头附接到——、==、-----的3'或5'末端;每个R₁独立地是C₂-C₁₀烷基、烷氧基或芳基;并且R₂是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

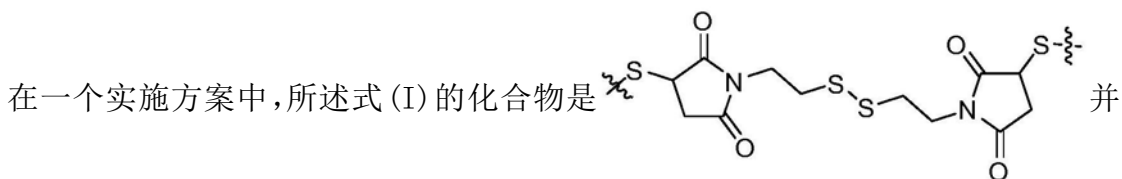
在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是



——、==、-----的3'或5'末端;每个R₁独立地是C₂-C₁₀烷基、烷氧基或芳基;并且R₂是硫代丙酸酯或二硫化物基团。



通过共价键或通过接头附接到——、==、-----的3'或5'末端;每个R₁独立地是C₂-C₁₀烷基、烷氧基或芳基;并且R₂是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

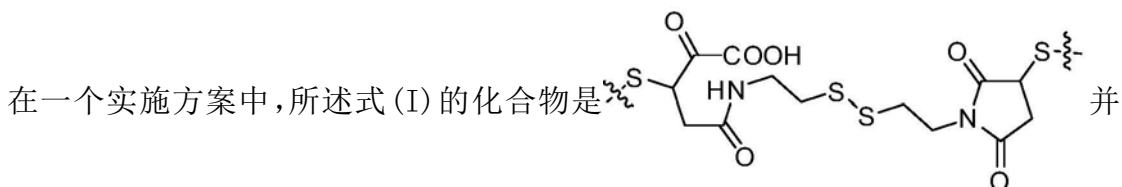


且其中S通过共价键或通过接头附接到——、==、-----的3'或5'末端。

在一个实施方案中,所述式(I)的化合物是

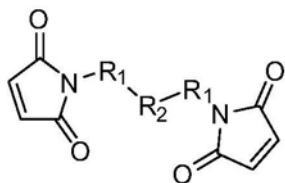


——、==、-----的3'或5'末端。



且其中S通过共价键或通过接头附接到——、==、-----的3'或5'末端。

在一个实施方案中,式(I)的共价接头由式(II)的共价连接前体形成:



其中：每个 R_1 独立地是 C_2 - C_{10} 烷基、烷氧基或芳基；并且 R_2 是硫代丙酸酯

或二硫化物基团。

在一个实施方案中，一个或更多个共价接头包含核苷酸接头。

在一个实施方案中，所述核苷酸接头的长度为2-6个核苷酸。在一个实施方案中，所述核苷酸接头的长度为3、4或5个核苷酸。在一个实施方案中，所述核苷酸接头是二核苷酸接头。

在一个实施方案中，每个共价接头相同。在一个实施方案中，所述共价接头包含两个或更多个不同的共价接头。

在一个实施方案中，两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的3'端与第二亚基的3'端之间的共价接头接合。在一个实施方案中，两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的3'端与第二亚基的3'端之间的共价接头接合。在一个实施方案中，两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的5'端与亚基的3'端之间的共价接头接合。在一个实施方案中，两个或更多个相邻的寡核苷酸亚基通过第一亚基的5'端与第二亚基的5'端之间的共价接头接合。

在一个实施方案中，所述多聚寡核苷酸还包含一个或更多个靶向配体。在一个实施方案中，所述寡核苷酸亚基中的至少一个是靶向配体。

在一个实施方案中，所述靶向配体是适体。在一个实施方案中，所述靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

在一个实施方案中，所述多聚寡核苷酸的末端与靶向配体缀合。

在一个实施方案中，所述多聚寡核苷酸是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。

在一个实施方案中，所述寡核苷酸亚基中的至少一个包含与转甲状腺素蛋白(TTR) mRNA互补的寡核苷酸。

在一个实施方案中，与TTR mRNA互补的寡核苷酸包含UUAUAGACAAGAACACUGUUUU (SEQ ID NO:164)。

当参考附图和以下描述时，本发明技术的这些和其他优点将是显而易见的。

附图说明

图1A呈现了三触角N-乙酰半乳糖胺配体的化学结构。

图1B呈现了二硫代-双马来酰亚胺乙烷的化学结构。

图2呈现了5'-GalNAc-FVII标准对照，其结合实施例9进行讨论。

图3呈现了GalNAc-同源二聚体缀合物(XD-06330)，其结合实施例10进行讨论。

图4呈现了GalNAc-同源二聚体缀合物(XD-06360)的合成示意图，其结合实施例11进行讨论。

图5呈现了GalNAc-同源二聚体缀合物(XD-06329)的合成示意图，其结合实施例12进行讨论。

图6呈现了示出小鼠血清中的FVII活性(通过FVII同源二聚体GalNAc缀合物的敲低)的数据,其结合实施例13进行讨论。

图7A和7B和7C呈现了示出小鼠血清中的FVII活性(通过归一化为GalNAc含量的FVII同源二聚体GalNAc缀合物的敲低)的数据,其结合实施例13进行讨论。

图8呈现了独立靶向FVII、ApoB和TTR的标准GalNAc-siRNA,其结合实施例14进行讨论。

图9呈现了GalNAc-异三聚体缀合物(XD-06726),其结合实施例15进行讨论。关键:在该实施例中,“GeneA”是siFVII;“GeneB”是siApoB;“GeneC”是siTTR。

图10呈现了GalNAc-缀合的异源三聚体(XD-06726)的合成策略的示意图,其结合实施例15进行讨论。关键:在该实施例中,“GeneA”是siFVII;“GeneB”是siApoB;并且“GeneC”是siTTR。

图11呈现了GalNAc-异三聚体缀合物(XD-06727),其结合实施例16进行讨论。关键:在该实施例中,“GeneA”是siFVII;“GeneB”是siApoB;并且“GeneC”是siTTR。

图12呈现了GalNAc-缀合的异源三聚体(XD-06727)的合成策略的示意图,其结合实施例16进行讨论。关键:在该实施例中,“GeneA”是siFVII;“GeneB”是siApoB;并且“GeneC”是siTTR。

图13呈现了将X20336添加到X20366的HPLC分析数据,其结合实施例16进行讨论。

图14呈现了将X19580进一步添加到X20336和X20366的反应产物的HPLC分析的数据,其结合实施例16进行讨论。

图15呈现了将X18795(5'-siFVII反义-3')进一步添加到X20336、X20366和X19580的反应产物以产生XD-06727的HPLC分析的数据,其结合实施例16进行讨论。

图16A和16B呈现了血清样品中TTR蛋白水平的数据(通过ELISA测量),其结合实施例18进行讨论。

图17A和17B呈现了血清样品中FVII酶活性的数据,其结合实施例18进行讨论。

图18A和18B呈现了血清样品中ApoB蛋白水平的数据(通过ELISA测量),其结合实施例18进行讨论。

图19A和19B呈现了肝数据中的靶标敲低,其结合实施例18进行讨论。

图20呈现了GalNAc-异源四聚体缀合物(XD-07140),其结合实施例19进行讨论。关键:在该实施例中,“GeneA”是siFVII;“GeneB”是siApoB;并且“GeneC”是siTTR。

图21呈现了GalNAc-异源四聚体缀合物(XD-07140)的合成示意图,其结合实施例19进行讨论。关键:在该实施例中,“GeneA”是siFVII;“GeneB”是siApoB;并且“GeneC”是siTTR。

图22呈现了GalNAc-siFVII-siApoB-siTTR-siFVII四聚体(XD-07140)的HPLC结果,其结合实施例19进行讨论。

图23呈现了说明合成同源六聚体的步骤的示意图,其结合实施例23进行讨论。

图24A和24B呈现了示出ssRNA X30835的产率和纯度的RP-HPLC结果,其结合实施例24进行讨论。

图24C和24D呈现了示出ssRNA X30837的产率和纯度的RP-HPLC结果,其结合实施例24进行讨论。

图24E呈现了X30838的RP-HPLC结果,其结合实施例24进行讨论。

图24F呈现了X30838、X18795和XD-09795的RP-HPLC结果,其结合实施例24进行讨论。

图25呈现了示出在注射XD-09795或XD-09794后不同时间时小鼠中FVII反义RNA的血清浓度的数据,其结合实施例25进行讨论。

图26A-J呈现了示出在注射XD-09795或XD-09794后不同时间时小鼠中各种细胞因子的血清水平的数据,其结合实施例26进行讨论。

图27A呈现了FVII siRNA单体的合成策略的示意图,其结合实施例28进行讨论。

图27B呈现了XD-09794的RP-HPLC结果,其结合实施例28进行讨论。

图28A呈现了FVII siRNA同源二聚体的合成策略的示意图,其结合实施例29进行讨论。

图28B呈现了XD-10635的RP-HPLC结果,其结合实施例29进行讨论。

图29A呈现了FVII siRNA同源三聚体的合成策略的示意图,其结合实施例30进行讨论。

图29B呈现了XD-10636的RP-HPLC结果,其结合实施例30进行讨论。

图30A呈现了FVII siRNA同源四聚体的合成策略的示意图,其结合实施例31进行讨论。

图30B呈现了XD-10637的RP-HPLC结果,其结合实施例31进行讨论。

图31A呈现了FVII siRNA同源五聚体的合成策略的示意图,其结合实施例32进行讨论。

图31B呈现了XD-10638的RP-HPLC结果,其结合实施例32进行讨论。

图32A呈现了FVII siRNA的同源六聚体的合成策略的示意图,其结合实施例33进行讨论。

[图32B呈现了XD-10639的RP-HPLC结果,其结合实施例33进行讨论。

图33A呈现了通过单-DTME缀合物的FVII siRNA的同源六聚体的合成策略的示意图,其结合实施例34进行讨论。

图33B呈现了XD-09795的RP-HPLC结果,其结合实施例34进行讨论。

图34A呈现了通过单-DTME缀合物的FVII siRNA的同源七聚体的合成策略的示意图,其结合实施例35进行讨论。

图34B呈现了XD-10640的RP-HPLC结果,其结合实施例35进行讨论。

图35A呈现了通过单-DTME缀合物的FVII siRNA的同源八聚体的合成策略的示意图,其结合实施例36进行讨论。

图35B呈现了XD-10641的RP-HPLC结果,其结合实施例36进行讨论。

图36A呈现了各种FVII siRNA多聚体的血清中FVII siRNA水平随时间的平滑线散点图,其结合实施例37进行讨论。

图36B呈现了各种FVII siRNA多聚体的血清中FVII siRNA水平随时间的直标散点图,其结合实施例37进行讨论。

图37A-D呈现了在施用各个寡核苷酸后不同时间时FVII siRNA多聚体的血清中FVII siRNA水平的柱状图,其结合实施例37进行讨论。

图38A呈现了FVII多聚体的血清中FVII siRNA暴露水平(曲线下面积)的条形图,其结合实施例37进行讨论。

图38B呈现了FVII多聚体的归一化为单体的血清中总FVII siRNA水平(曲线下面积)的条形图,其结合实施例37进行讨论。

图39呈现了多聚体达到与单体5分钟时相同的FVII siRNA血清浓度所花费的时间的条形图,其结合实施例38进行讨论。

图40呈现了同源四聚体siRNA的合成策略的示意图,其结合实施例20进行讨论。

图41呈现了在交替链上具有连接的同源四聚体siRNA的合成策略的示意图,其结合实施例20进行讨论。

图42呈现了示出以4:1:1FVII:ApoB:TTR靶向siRNA形式的异源六聚体siRNA的合成策略的示意图。

图43呈现了用于制备FVII靶向有义链的示意图。

图44描绘了FVII靶向有义链X39850的RP-HPLC和MS数据。

图45描绘了FVII靶向有义链X39851的RP-HPLC和MS数据。

图46描绘了FVII靶向反义链X18795的RP-HPLC和MS数据。

图47描绘了通过二硫化物连接与ApoB靶向反义链连接的FVII靶向反义链(并且指定为X39855)的RP-HPLC和MS数据。

图48描绘了X39850和X18795(X39850-X18795)的退火双链体的RP-HPLC数据。

图49描绘了FVII双链体X39850-X18795与FVII靶向有义链X39851(X39850-X18795-X39851)缀合的产物的RP-HPLC数据。

图50描绘了使X39850-X18795-X39851与二聚体FVII/ApoB靶向反义链X39855退火的产物(X39850-X18795-X39851-X39855)的RP-HPLC数据。

图51描绘了通过二硫化物连接与TTR靶向有义链连接的FVII靶向有义链(并且指定为X39852)的RP-HPLC和MS数据。

图52描绘了通过二硫化物连接与TTR靶向反义链连接的FVII靶向反义链(并且指定为X39854)的RP-HPLC和MS数据。

图53描绘了通过二硫化物连接与ApoB靶向有义链连接的FVII靶向有义链(并且指定为X39853)的RP-HPLC和MS数据。

图54描绘了使二聚体有义链X39852与FVII靶向反义链X18795退火的产物(X39852-X18795)的RP-HPLC数据。

图55描绘了使二聚反义链X39854与X39852-X18795退火的产物(X39852-X18795-X39854)的RP-HPLC数据。

图56描绘了使二聚体有义链X39853与X39852-X18795-X39854退火的产物(X39852-X18795-X39854-X39853)的RP-HPLC数据。

图57A描绘了使图56的X39852-X18795-X39854-X39853与图50的X39851-X39855退火形成最终异源六聚体siRNA

(X39850-X18795-X39851-X39855-X39852-X18795-X39854-X39853)产物的RP-HPLC(图57A)和MS(图57B)数据。

图58描绘了通过6mg/kg的4:1:1FVII:ApoB:TTR六聚体(相当于1mg/kg TTR单体)

对TTR蛋白的敲低。

图59说明了二硫化物接头的稳定性的评价。

虽然本公开内容包括许多不同形式的实施方案,但是在附图中示出并且将在本文中详细描述数个具体实施方案,其中应理解,本公开内容被认为是本技术原理的示例并且不旨在将本公开内容限制于所示实施方案。

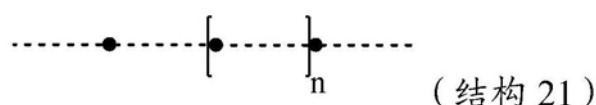
具体实施方案

本文提及的任何专利、专利申请和出版物的公开内容在此通过引用整体并入本申请,以更全面地描述截至本文所述和要求保护的本公开内容之日本领域技术人员已知的现有技术水平。

本公开内容涉及用于向受试者施用具有通过共价接头接合的单体亚基的多聚寡核苷酸的方法。该多聚寡核苷酸的分子量可以为至少约45kD,使得多聚寡核苷酸由于肾小球滤过而导致的清除减少。本公开内容还涉及多聚寡核苷酸以及用于合成该多聚寡核苷酸的方法。例如,典型的siRNA(例如,双链单体)的分子量可以为约15kD并且循环半衰期相对较低(例如,肾小球滤过率与尿素或葡萄糖相似),而根据本公开内容的寡核苷酸多聚体的分子量可以为至少约45kD并且循环半衰期相对较高(例如,由于肾小球滤过率而导致的清除率较低)。根据本公开内容的多聚体的改进特性和有利特性可以在增加的体内循环半衰期方面进行描述。还可以在增加的体内活性或增加的生物活性方面描述它们。增加的生物活性可以由施用多聚寡核苷酸后靶蛋白或mRNA水平降低来表示。增加的生物活性可以根据多聚寡核苷酸的施用途径来观察。例如,与皮下(s.c.)途径相比,当多聚寡核苷酸通过静脉内(i.v.)途径施用时可以观察到增加的生物活性。可以观察到相对于单体寡核苷酸的该增加的生物活性。例如,与通过i.v.途径施用的单体寡核苷酸相比,通过i.v.途径施用的多聚寡核苷酸可以得到更好的生物活性(即,增加的靶蛋白或mRNA减少)。

当与靶向配体组合时,多缀合物还可以比单体等效物在每个配体/受体结合事件中递送更高的有效载荷。本公开内容还涉及新的合成中间体以及用于合成多缀合物寡核苷酸的方法。本公开内容还涉及使用多缀合物寡核苷酸的方法,例如用于减少基因表达、生物学研究、治疗或预防医学病症和/或产生新的或改变的表型。

用于向受试者施用多聚寡核苷酸的方法



并且 $n \geq 0$ 的整数。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中亚基是单链寡核苷酸。

在一个方面,本公开内容提供一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中 $n \geq 1$ 。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中亚基是双链寡核苷酸。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸

的方法,其中:

当 $n=0$ 时,该多聚寡核苷酸由于肾小球滤过而导致的清除相对于多聚寡核苷酸的单体亚基·····和/或二聚亚基·····●·····的清除减少;和

当 $n\geq 1$ 时,多聚寡核苷酸由于肾小球滤过而导致的清除相对于多聚寡核苷酸的单体亚基·····、二聚亚基·····●·····和/或三聚亚基·····●·····●·····的清除减少。

在各个方面,本公开内容提供一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,该方法包括向受试者施用有效量的多聚寡核苷酸,该多聚寡核苷酸包含亚基·····,其中:

每个亚基·····独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基·····通过共价接头●与另一个亚基接合;

该多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为减少其由于肾小球滤过而导致的清除;并且

该多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

在一个方面,本公开内容提供一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中包含在该多聚寡核苷酸中的亚基数量为 m , m 是选择的以使多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为减少其由于肾小球滤过而导致的清除的整数。在各个方面, m 为(i) ≥ 2 ; (ii) ≥ 3 ; (iii) ≥ 4 ; (iv) ≥ 4 且 ≤ 17 ; (v) ≥ 4 且 ≤ 8 ;或(vi) 4、5、6、7或8。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中该多聚寡核苷酸包含结构21:

用于测量多聚寡核苷酸的清除减少的方法

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中由于肾小球滤过而导致的清除减少导致多聚寡核苷酸的体内循环半衰期增加。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中通过测量在向受试者施用多聚寡核苷酸后的多聚寡核苷酸的体内循环半衰期来确定由于肾小球滤过而导致的减少的清除。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中通过测量将多聚寡核苷酸的血清浓度降低到预定值所需的时间来确定由于肾小球滤过而导致的减少的清除。预定值可以为施用剂量的90%、80%、70%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%。

在一个方面,本公开内容提供一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中通过测量在向受试者施用多聚寡核苷酸后的预定时间下的多聚寡核苷酸的血清浓度来确定由于肾小球滤过而导致的减少的清除。

在一个方面,本公开内容提供一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中通过测量表示在向受试者施用多聚寡核苷酸后的多聚寡核苷酸随时间的血清浓度的图表的曲线下面积来确定由于肾小球滤过而导致的减少的清除。

向受试者施用的多聚寡核苷酸的清除减少的影响

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中由于肾小球滤过而导致的清除减少增加了多聚寡核苷酸的体内生物利用度。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中由于肾小球滤过而导致的清除减少增加了多聚寡核苷酸的体内细胞摄取。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中由于肾小球滤过而导致的清除减少增加了多聚寡核苷酸的体内治疗指数/比率。

在一个方面,本公开内容提供一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中测量的参数与单体、二聚、三聚和更高数量的多聚寡核苷酸的亚基数量具有反曲关系,例如,如图37A-37D所示。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法,其中多聚寡核苷酸的测量参数和其以单体亚基开始的每个亚基在绘制时定义了反曲曲线,例如,如图38A-38B所示。

多聚寡核苷酸

在各个方面,本公开内容提供了包含亚基.....的多聚寡核苷酸,其中:

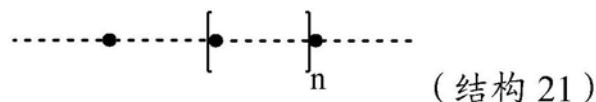
每个亚基.....独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个亚基.....通过共价接头•与另一个亚基接合;

该多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为减少其由于肾小球滤过而导致的清除;并且

该多聚寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中包含在该多聚寡核苷酸中的亚基数量为 m , m 是选择的以使多聚寡核苷酸的分子量和/或大小被配置为减少其由于肾小球滤过而导致的清除的整数。在各个方面, m 为 (i) ≥ 2 ; (ii) ≥ 3 ; (iii) ≥ 4 ; (iv) ≥ 4 且 ≤ 17 ; (v) ≥ 4 且 ≤ 8 ; 或 (vi) 4、5、6、7或8。

根据权利要求16和17中任一项所述的多聚寡核苷酸,其包含结构21:



其中亚基.....中的至少一个包含具有与其3'末端接合的一个共价接头•和与其5'末端接合的另一个共价接头的单链,并且 n 为 ≥ 0 的整数。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个亚基.....的长度为15-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中 $n \geq 1$ 且 $n \leq 17$ 。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中 $n \geq 1$ 且 $n \leq 5$ 。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中 n 为1、2、3、4或5。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个亚基是双链RNA并且 $n \geq 1$ 。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个亚基是单链寡核苷酸。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个亚基是双链寡核苷酸。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中亚基包含单链和双链寡核苷酸的组合。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个亚基是RNA、DNA或人工或

非天然核酸类似物。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个亚基是RNA。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个亚基是siRNA、saRNA或miRNA。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个亚基是双链siRNA并且每个共价接头接合siRNA的有义链。

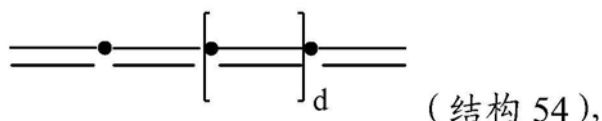
在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中该多聚寡核苷酸包含基本上相同的亚基·····的同源多聚体。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中该多聚寡核苷酸包含两个或更多个基本上不同的亚基·····的异源多聚体。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中该多聚寡核苷酸是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。

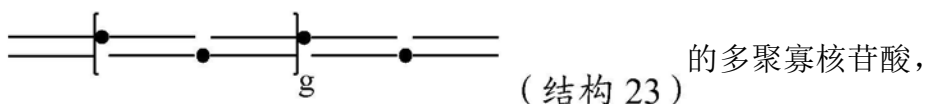
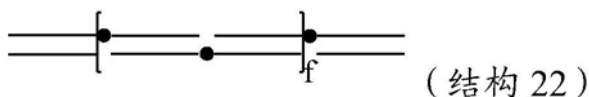
在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个亚基·····独立地是双链寡核苷酸 , 并且其中n为 ≥ 1 的整数。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个亚基·····独立地是双链寡核苷酸 , 其中n为 ≥ 1 的整数,并且其中每个共价接头·在同一链上:



其中d为 ≥ 1 的整数。

在一个方面,本公开内容提供了包含结构22或23:



其中每个  是双链寡核苷酸,每个·是接合相邻双链寡核苷酸的共价接头,f为 ≥ 1 的整数,且g为 ≥ 0 的整数。

在一方面,本公开内容提供了多个多聚寡核苷酸,其中基本上所有的多聚寡核苷酸都具有预定的n值和/或预定的分子量。

靶标配体和适体

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中该多聚寡核苷酸还包含一个或更多个靶向配体。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中亚基中的至少一个是靶向配体。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中该靶向配体是适体。

接头

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中一个或更多个共价接头·包

含可裂解共价接头并且包含核苷酸接头,例如,如实施例20、22B、27和41中所讨论的。核苷酸接头是包含一个或多个核苷酸的接头,并且可以选择核苷酸接头使得它不进行任何其他指定功能。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中该可裂解共价接头包含酸可裂解键、还原剂可裂解键、生物可裂解键或酶可裂解键。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中该可裂解共价接头在细胞内条件下是可裂解的。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个共价接头 • 相同。

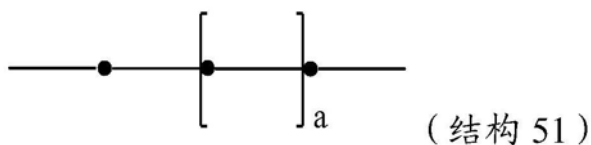
在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中该共价接头 • 包含两个或更多个不同的共价接头。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中每个共价接头 • 接合两个单体亚基·····。

在一个方面,本公开内容提供了多聚寡核苷酸,其中至少一个共价接头 • 接合三个或更多个单体亚基·····。

多聚寡核苷酸的合成方法

在各个方面,本公开内容提供了用于合成包含结构51的多聚寡核苷酸的方法:

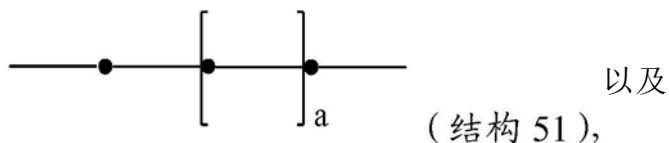


其中每个——是单链寡核苷酸,每个•是接合相邻单链寡核苷酸的共价接头,并且a为 ≥ 1 的整数,该方法包括以下步骤:

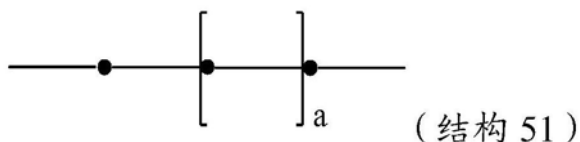
(i) 使



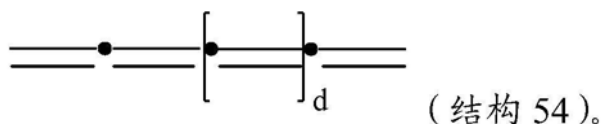
其中O是连接部分,R1是能够与连接部分O反应的化学基团,b和c各自独立地为 ≥ 0 的整数,b和c不能同时为零,并且 $b+c=a$,从而形成结构51:



(ii) 任选地使结构51:

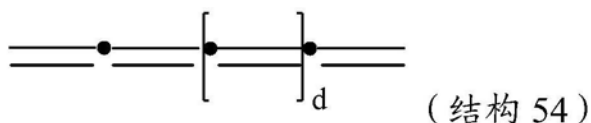


与互补的单链寡核苷酸——退火,从而形成结构54:



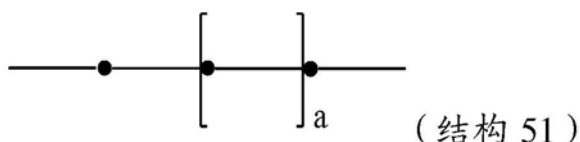
在各个方面, a 大于或等于 2、大于或等于 3、大于或等于 4、大于或等于 5、大于或等于 6、大于或等于 7、大于或等于 8 或大于或等于 9。在各个方面, a 为 2、3、4、5、6、7、8 或 9。

在各个方面, 本公开内容提供了用于合成包含结构 54 的多聚寡核苷酸的方法:

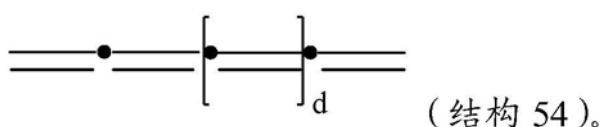


其中每个 —— 是单链寡核苷酸, 每个 $\cdot$ 是接合相邻单链寡核苷酸的共价接头, 并且 $a \geq 1$, 该方法包括以下步骤:

(i) 使结构 51:

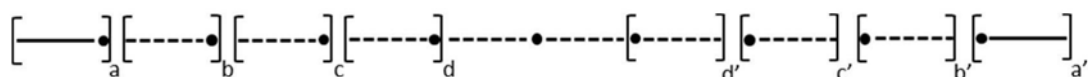


与互补的单链寡核苷酸 —— 退火, 从而形成结构 54:

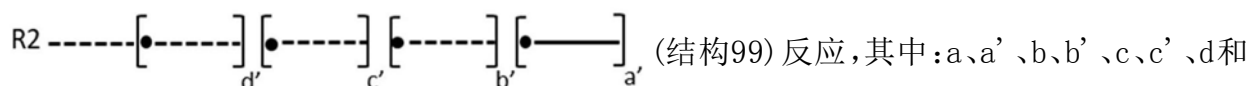
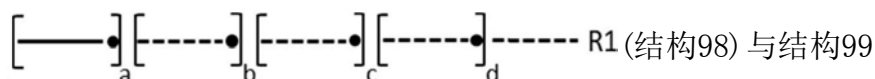


在各个方面, a 大于或等于 2、大于或等于 3、大于或等于 4、大于或等于 5、大于或等于 6、大于或等于 7、大于或等于 8 或大于或等于 9。在各个方面, a 为 2、3、4、5、6、7、8 或 9。

在各个方面, 本公开内容提供了一种用于合成包含结构 100 的多聚寡核苷酸的方法:



(结构 100), 其中每个 —— 是单链寡核苷酸, 每个 ----- 独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 该方法包括以下步骤: a) 使结构 98

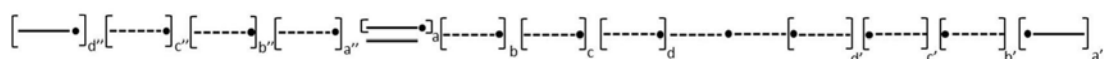


d' 各自独立地为 0 或 1, 并且 R1 和 R2 是能够直接或间接反应形成共价接头 $\cdot$ 的化学部分, 从而形成结构 100

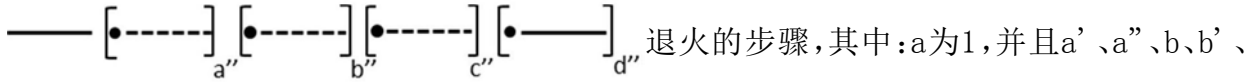
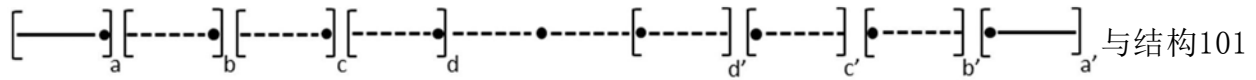


方面, $a+a'+b+b'+c+c'+d+d'$ 的总和大于或等于 1、大于或等于 2、大于或等于 3、大于或等于 4、大于或等于 5、大于或等于 6、大于或等于 7、大于或等于 8、大于或等于 9 或大于或等于 10。在另一些方面, $a+a'+b+b'+c+c'+d+d'$ 的总和为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

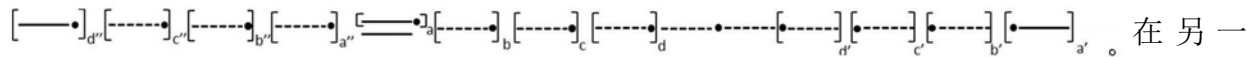
在各个方面, 本公开内容提供了一种用于合成包含结构 102 的多聚寡核苷酸的方法:



(结构102), 其中每个——独立地是单链寡核苷酸, 每个=====独立地是双链寡核苷酸, 每个-----独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个•是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 该方法包括使结构100

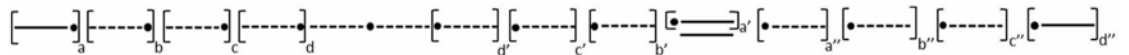


$b'', c, c', c'', d, d' \text{ 和 } d''$ 各自独立地为0或1, 从而形成结构102

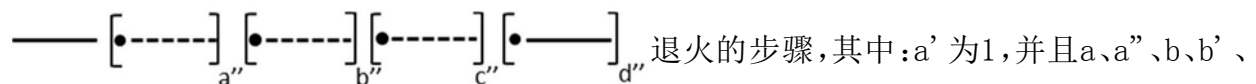
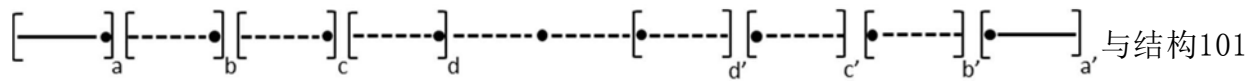


。在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和大于或等于2、大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9或大于或等于10。在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和为2、3、4、5、6、7、8、9或10。

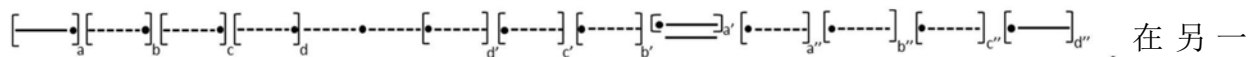
在各个方面, 本公开内容提供了一种用于合成包含结构103的多聚寡核苷酸的方法:



(结构103), 其中每个——独立地是单链寡核苷酸, 每个=====独立地是双链寡核苷酸, 每个-----独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个•是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 该方法包括使结构100

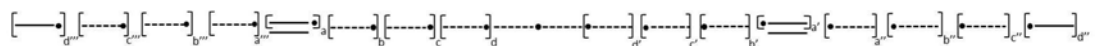


$b'', c, c', c'', d, d' \text{ 和 } d''$ 各自独立地为0或1, 从而形成结构103

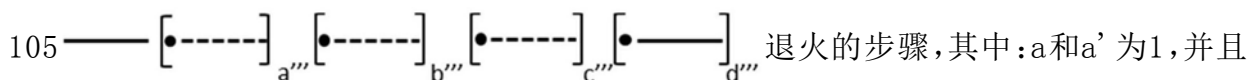
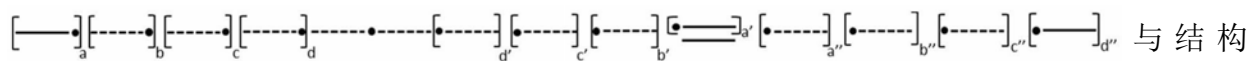


。在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和大于或等于2、大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9或大于或等于10。在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和为2、3、4、5、6、7、8、9或10。

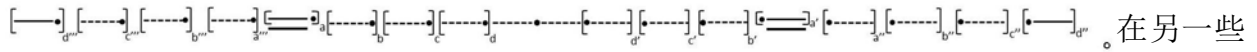
在另一个方面, 本公开内容提供了一种用于合成包含结构104的多聚寡核苷酸的方法:



(结构104), 其中每个——独立地是单链寡核苷酸, 每个=====独立地是双链寡核苷酸, 每个-----独立地是单链或双链寡核苷酸, 并且每个•是接合相邻寡核苷酸的共价接头, 该方法包括使结构103

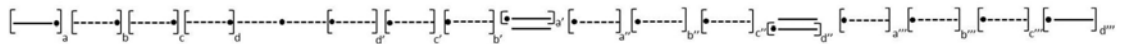


a'' 、 a''' 、 b 、 b' 、 b'' 、 b''' 、 c 、 c' 、 c'' 、 c''' 、 d 、 d' 、 d'' 和 d''' 各自独立地为0或1,从而形成结构104

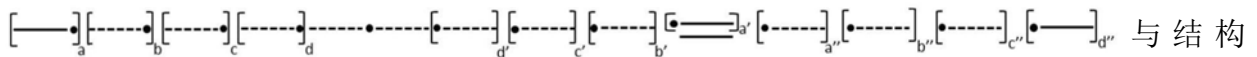


在另一些方面, $a+a'+a''+a''' +b+b'+b''+b''' +c+c'+c''+c''' +d+d'+d''+d'''$ 的总和大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9或大于或等于10。在另一些方面, $a+a'+a''+a''' +b+b'+b''+b''' +c+c'+c''+c''' +d+d'+d''+d'''$ 的总和为3、4、5、6、7、8、9或10。

在各个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构107的多聚寡核苷酸的方法:

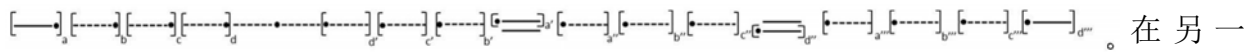


(结构107),其中每个——独立地是单链寡核苷酸,每个=====独立地是双链寡核苷酸,每个-----独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个•是接合相邻寡核苷酸的共价接头,该方法包括使结构103



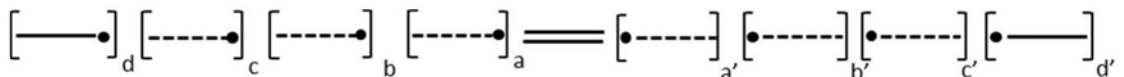
105——[•-----]_{a'''}[•-----]_{b'''}[•-----]_{c'''}[•-----]_{d'''}退火的步骤,其中: a' 和 d'' 各自为1,

并且 a 、 a'' 、 a''' 、 b 、 b' 、 b'' 、 b''' 、 c 、 c' 、 c'' 、 c''' 、 d 、 d' 和 d'' 各自独立地为0或1,从而形成107



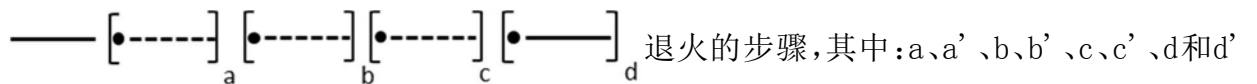
在另一些方面, $a+a'+a''+a''' +b+b'+b''+b''' +c+c'+c''+c''' +d+d'+d''+d'''$ 的总和大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9或大于或等于10。在另一些方面, $a+a'+a''+a''' +b+b'+b''+b''' +c+c'+c''+c''' +d+d'+d''+d'''$ 的总和为3、4、5、6、7、8、9或10。

在各个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构108的多聚寡核苷酸的方法:

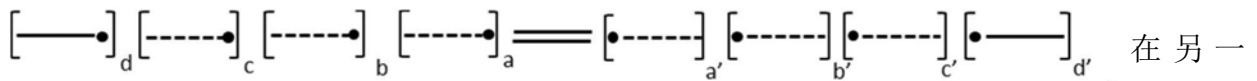


(结构108),其中每个——独立地是单链寡核苷酸,每个=====独立地是双链寡核苷酸,每个-----独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个•是接合相邻寡核苷酸的共价接头,

该方法包括使结构109——[•-----]_{a'}[•-----]_{b'}[•-----]_{c'}[•-----]_{d'}与结构110



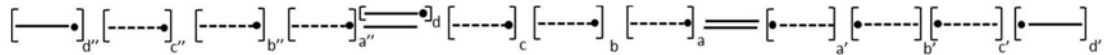
退火的步骤,其中: a 、 a' 、 b 、 b' 、 c 、 c' 、 d 和 d' 各自独立地为0或1,从而形成结构108



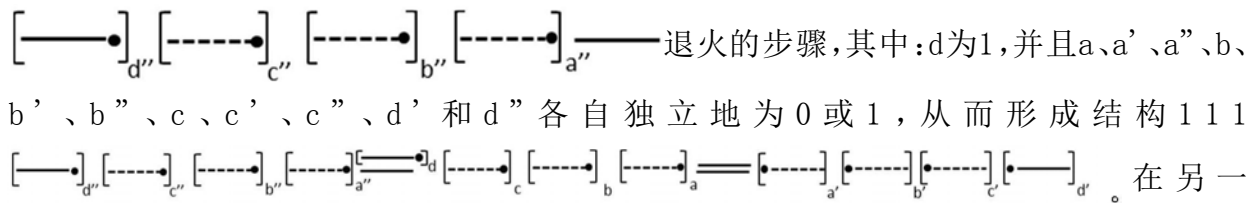
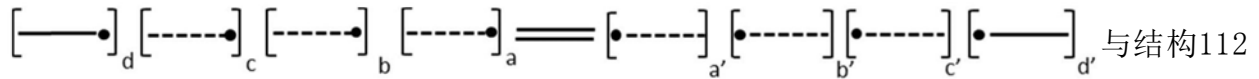
在另一些方面, $a+a'+b+b'+c+c'+d+d'$ 的总和大于或等于1、大于或等于2、大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9、大于或等于10或大于或等于11。在另一些方面, $a+a'+b+b'+c+c'+d+d'$ 的总和为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或

11。

在各个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构111的多聚寡核苷酸的方法:

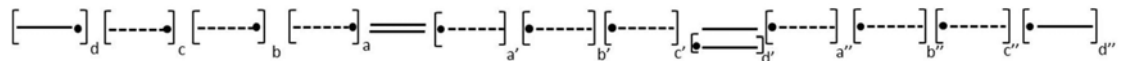


(结构111),其中每个 --- 独立地是单链寡核苷酸,每个 = 独立地是双链寡核苷酸,每个 --- 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头,所述方法包括使结构108

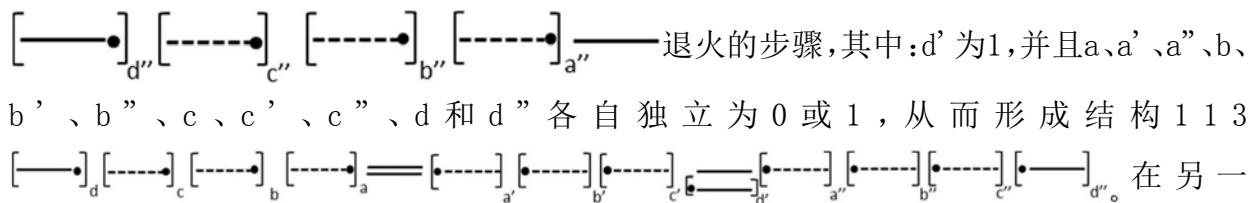
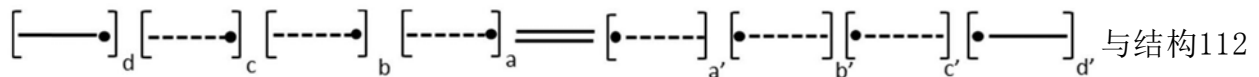


在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和大于或等于2、大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9、大于或等于10或大于或等于11。在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和为2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

在各个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构113的多聚寡核苷酸的方法:



(结构113),其中每个 --- 独立地是单链寡核苷酸,每个 = 独立地是双链寡核苷酸,每个 --- 独立地是单链或双链寡核苷酸,并且每个 $\cdot$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头,该方法包括使结构108



在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和大于或等于2、大于或等于3、大于或等于4、大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9、大于或等于10或大于或等于11。在另一些方面, $a+a'+a''+b+b'+b''+c+c'+c''+d+d'+d''$ 的总和为2、3、4、5、6、7、8、9、10或11。

在一个方面,该方法还包括使一个或更多个单链寡核苷酸 --- 与结构98或结构113中的互补的单链寡核苷酸 --- 退火,从而形成双链寡核苷酸 = 。

在各个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构114的多聚寡核苷酸的方法:

法： $\left[\text{-----} \bullet \right]_a \text{-----} \bullet \text{-----} \left[\text{-----} \bullet \right]_b$ (结构114)，其中每个 $\text{-----} \bullet$ 独立地是单链或双链寡核苷酸，并且每个 $\bullet$ 是接合相邻寡核苷酸的共价接头，该方法包括使结构115 $\left[\text{-----} \bullet \right]_a \text{-----} \text{R1}$ (结构115) 与结构116 $\text{R2} \text{-----} \left[\text{-----} \bullet \right]_b$ (结构116) 反应，其中：R1和R2是能够直接或间接反应形成共价接头 $\bullet$ 的化学部分，a和b各自独立地为 ≥ 0 的整数，条件是a和b的总和为 ≥ 4 ，从而形成结构114 $\left[\text{-----} \bullet \right]_a \text{-----} \bullet \text{-----} \left[\text{-----} \bullet \right]_b$ 。在另一些方面，a和b的总和大于或等于5、大于或等于6、大于或等于7、大于或等于8、大于或等于9或大于或等于10。在另一些方面，a和b的总和为5、6、7、8、9或10。

在一个方面，结构115和/或结构116还包含一个或多个靶向配体。在一个实施方案中，靶向配体是末端靶向配体。

在一个方面，a为4、5、6、7、8、9或10的整数。在另一个方面，b为4、5、6、7、8、9或10的整数。

受试者

在一个方面，本公开内容提供了一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法。受试者的实例包括但不限于哺乳动物，例如灵长目动物、啮齿目动物和农业动物。灵长目动物受试者的实例包括但不限于人、黑猩猩和恒河猴。啮齿目动物受试者的实例包括但不限于小鼠和大鼠。农业动物受试者的实例包括但不限于牛、羊、羊羔、鸡和猪。

小鼠肾小球滤过率(GFR)可以为约0.15-0.25ml/min。人GFR可以为约1.8ml/min/kg (Mahmood I: (1998) Interspecies scaling of renally secreted drugs. Life Sci 63:2365-2371)。

小鼠可以具有约1.46ml的血液。因此，小鼠的总血容量的肾小球滤过时间可以为约7.3分钟(1.46/0.2)。人可以具有约5升的血液，并且体重约70kg。因此，人的总血容量的肾小球滤过时间可以为39.7min[5000/126(1.8*70)]。

本领域普通技术人员将认识到，至少出于上述原因，不同物种可以具有不同的通过肾小球滤过的清除率。本领域普通技术人员可以推断，人与小鼠时间之间的通过肾小球滤过的清除率的比率可以为约1:5或1:6。换句话说，人的某种物质(例如，特定的寡核苷酸)的清除率可以比小鼠的清除率慢5-6倍。

在一个方面，本公开内容提供一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法，其中在向受试者施用多聚寡核苷酸后30至120分钟测量体内循环半衰期。

在一个方面，本公开内容提供一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法，其中预定时间为在向受试者施用多聚寡核苷酸后30至120分钟。

在一个方面，本公开内容提供一种用于向有此需要的受试者施用多聚寡核苷酸的方法，其中基于在向受试者施用多聚寡核苷酸后x至y分钟的多聚寡核苷酸的血清浓度，计算曲线下面积。在一些实施方案中，x可以为1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、75、90、120、180、240或300分钟并且y可以为90、120、180、240、300、360、420、480、540、600、720、840、960、1080、1200、1320、1440或1600分钟。例如，时间范围可以为30-120分钟、1-1600分钟或300-600分钟。

在一个方面，本公开内容提供了多聚寡核苷酸或用于增加该多聚寡核苷酸的体内

循环半衰期的方法,其中该多聚寡核苷酸没有配制在纳米颗粒 (NP) 或脂质纳米颗粒 (LNP) 中。

本公开内容还涉及具有改善的药效学和/或药代动力学的多缀合物寡核苷酸。例如,相对于单个单体亚基的体内循环半衰期和/或体内活性,多缀合物寡核苷酸(例如,包含3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个siRNA的多聚寡核苷酸)可以具有增加的体内循环半衰期和/或增加的体内活性。当与靶向配体缀合时,多缀合物还可以比单体等效物在每个配体/受体结合事件中递送更高的寡核苷酸有效载荷。本公开内容还涉及新的合成中间体以及用于合成多缀合物寡核苷酸的方法。本公开内容还涉及使用多缀合物寡核苷酸的方法,例如用于减少基因表达、生物学研究、治疗或预防医学病症和/或产生新的或改变的表型。

下文依次讨论本公开内容的各个特征。

核酸

在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸是RNA、DNA或包含人工或非天然核酸类似物。在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸是单链的。在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸是双链的(例如,反平行双链)。

在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸是RNA,例如反义RNA (aRNA)、CRISPR RNA (crRNA)、长链非编码RNA (lncRNA)、微小RNA (miRNA)、piwi相互作用RNA (piRNA)、小干扰RNA (siRNA)、信使RNA (mRNA)、短发夹RNA (shRNA)、小分子激活 (saRNA) 或核酶。

在一个实施方案中,RNA是siRNA。例如,每个双链寡核苷酸是siRNA和/或长度为15-30个碱基对。

在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸是适体。

siRNA (小干扰RNA) 是通常由19-22个核酸组成的短双链RNA,其有义链具有与基因的靶标信使RNA (mRNA) 区域的核酸序列相同的核酸序列以通过分解mRNA抑制该基因的表达 (Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. 和 Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-8)。

在本公开内容的方法中有用的另一类核酸是miRNA。MiRNA是非编码RNA,其在转录后基因调控中起关键作用。miRNA可以调节30%的所有哺乳动物蛋白质编码基因的表达。发现了通过双链RNA (RNAi) 的特异性和有效基因沉默,以及另外的小非编码RNA (Canver, M.C. 等, *Nature* (2015))。Pre-miRNA是长度为约70个核苷酸的输出到成熟的19-25个核苷酸双链体中的短茎环,其具有2-核苷酸的3'-突出端。碱基配对稳定性较低的miRNA链(引导链)可以负载到RNA诱导的沉默复合物 (RISC) 上。信使引导链可以起作用,但是通常降解。成熟的miRNA将RISC与主要在3' 非翻译区 (UTR) 内发现的靶mRNA中的部分互补序列基序栓系起来,并且诱导转录后基因沉默 (Bartel, D.P. *Cell*, 136:215-233 (2009); Saj, A. & Lai, E.C. *Curr Opin Genet Dev*, 21:504-510 (2011))。miRNA模拟物例如在美国专利号8,765,709中进行了描述。

在一些实施方案中,RNA可以是短发夹RNA (shRNA),例如,如美国专利号8,202,846和8,383,599中所述。

在一些实施方案中,RNA可以是CRISPR RNA (crRNA),例如,V型的CRISPR阵列可以被加工成长度为42-44个核苷酸的短的成熟crRNA,其中每个成熟的crRNA以19个核苷酸的

同向重复序列开始,随后23-25个核苷酸的间隔序列。可替代地,II型系统中的成熟crRNA可以从20-24个核苷酸的间隔序列开始,随后约22个核苷酸的同向重复序列。CRISPR系统例如在美国专利号8,771,945;Jinek等,Science,337(6096):816-821(2012)和国际专利申请公开号WO 2013/176772中进行了描述。

在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸的长度为15-30、17-27、19-26、20-25、40-50、40-150、100-300、1000-2000或多至10000个核苷酸。

在各个实施方案中,寡核苷酸是双链且互补的。互补性可以是100%互补,或小于100%互补的,其中寡核苷酸仍然杂交并且在相关条件(例如生理相关条件)下保持双链。例如,双链寡核苷酸可以是至少约80%、85%、90%或95%互补的。

在一些实施方案中,RNA是长链非编码RNA(lncRNA)。lncRNA是一大类多样的转录RNA分子,其中超过200个核苷酸的长度不编码蛋白质。lncRNA被认为涵盖人的近30,000种不同的转录物,因此lncRNA转录物占非编码转录组的主要部分(参见,例如,Derrien等,The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs:analysis of their gene structure, evolution, and expression. Genome Res, 22(9):1775-89(2012))。

在又另一些实施方案中,RNA是信使RNA(mRNA)。mRNA及其作为用于体内产生蛋白质的递送方法的应用例如在国际专利申请公开号WO 2013/151736中进行了描述。

在另一些实施方案中,RNA可以是小激活(saRNA)(例如,如Chappell等, Nature Chemical Biology, 11:214-220(2015))或核酶(Doherty等, Ann Rev Biophys Biomo Struct, 30:457-475(2001)中所述)。

在一些实施方案中,核酸或寡核苷酸是DNA,例如反义DNA(aDNA)(例如antagomir)或反义gapmer。aDNA的实例,包括间隙聚体(gapmer)和多聚体,例如在Subramanian等, Nucleic Acids Res, 43(19):9123-9132(2015)和国际专利申请公开号WO 2013/040429中进行了描述。拮抗剂的实例例如在美国专利号7,232,806中进行了描述。

在各个实施方案中,寡核苷酸具有特定序列,例如本文公开的任何一种序列。

用于寡核苷酸合成的一般程序在以下实施例中提供。可适用于本公开内容的其他方法是本领域已知的。

核酸的修饰

在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸还包含化学修饰。化学修饰可以包含经修饰的核苷、经修饰的主链、经修饰的糖或经修饰的末端。

修饰包括含磷的连接,其包括但不限于硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯(包括3'亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'连接的硼酸磷酸酯、这些的2'-5'连接类似物以及具有3'-5'至5'-3'或2'-5'到5'-2'连接的反向相邻核苷单元的那些。

在各个实施方案中,包含在多缀合物中的寡核苷酸可以包含一个或更多个硫代磷酸酯基团。寡核苷酸可以在5'端包含1-3个硫代磷酸酯基团。寡核苷酸可以在3'端包含1-3个硫代磷酸酯基团。寡核苷酸可以在5'端和3'端包含1-3个硫代磷酸酯基团。在各个实施方案中,包含在多缀合物中的每个寡核苷酸可以包含0-15个总硫代磷酸酯基团。在某些实施

方案中,每个寡核苷酸可以包含少于10个、少于9个、少于8个、少于7个、少于6个、少于5个、少于4个或少于3个总硫代磷酸酯基团。在某些实施方案中,相对于具有更多硫代磷酸酯基团的单体形式的相同寡核苷酸,包含在多缀合物中的寡核苷酸可以在具有更少硫代磷酸酯基团的情况下具有增加的体内活性。

可以使用本领域已知的各种策略来修饰包含在本公开内容的多缀合物中的寡核苷酸以产生各种效果,包括例如提高的体外和体内的效力和稳定性。这些策略是:人工核酸,例如2'-O-甲基取代的RNA;2'-氟-2'脱氧RNA,肽核酸(PNA);吗啉;锁核酸(LNA);解锁核酸(UNA);桥接核酸(BNA);乙二醇核酸(GNA);和苏糖核酸(TNA);或更一般地,核酸类似物,例如双环和三环核苷类似物,其在结构上与天然存在的RNA和DNA相似,但是在天然存在的分子的磷酸骨架、糖或核碱基部分中的一个或多个中具有改变。通常,类似物核碱基赋予除了其他之外的不同的碱基配对和碱基堆积特性。实例包括通用碱基,其可以与所有四个标准碱基配对。磷酸-糖骨架类似物的实例包括PNA。基于吗啉代的寡聚化合物在Braasch等,Biochemistry,41(14):4503-4510(2002)和美国专利号5,539,082;5,714,331;5,719,262;和5,034,506中进行了描述。

在本文所述的制造方法中,一些寡核苷酸在末端通过用化学官能团取代来修饰。取代可以在寡核苷酸的3'或5'端进行,并且优选在单体的有义链和反义链的3'端进行,但是不总是限于此。化学官能团可以包括例如巯基(-SH)、羧基(-COOH)、胺基(-NH₂)、羟基(-OH)、甲酰基(-CHO)、羰基(-CO-)、醚基(-O-)、酯基(-COO-)、硝基(-NO₂)、叠氮基(-N₃)或磺酸基(-SO₃H)、炔基(-C≡C-)或烯基(-CH=CH-)。

包含在本公开内容的多缀合物中的寡核苷酸可以被修饰以另外地或可替代地还包含核碱基(在本领域中通常简称为“碱基”)修饰或取代。经修饰的核碱基包括在天然核酸中很少或暂时发现的核碱基,例如次黄嘌呤;6-甲基腺嘌呤;5-Me嘧啶,特别是5-甲基胞嘧啶(也称为5-甲基-2'脱氧胞嘧啶并且在本领域中经常称为5-Me-C)、5-羟甲基胞嘧啶(HMC)、糖基HMC和gentobiosyl HMC;以及合成的核碱基,例如2-氨基腺嘌呤、2-(甲基氨基)腺嘌呤、2-(咪唑基烷基)腺嘌呤、2-(氨基烷基氨基)腺嘌呤或其他杂取代的烷基腺嘌呤、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟甲基尿嘧啶、8-氮鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、N₆(6-氨基己基)腺嘌呤和2,6-二氨基嘌呤。Kornberg,A.,DNA Replication,W.H.Freeman&Co.,San Francisco,第75-77页(1980);Gebeyehu等,Nucl.Acids Res,15:4513(1997)。还可以包括本领域已知的“通用”碱,例如肌苷。5-Me-C取代已显示将核酸双链体稳定性提高0.6-1.2°C。(Sanghvi,Y.S.,in Crooke,S.T.和Lebleu,B.,编辑,Antisense Research and Applications,CRC Press,Boca Raton,第276-278页(1993)并且是碱基取代的方面。经修饰的核碱基可以包括其他合成和天然的核碱基,例如5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物,2-硫尿嘧啶,2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶,6-偶氮尿嘧啶,胞嘧啶和胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代(特别是5-溴、5-三氟甲基)和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基奎宁和7-甲基腺嘌呤,8-氮鸟嘌呤和8-氮腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮杂腺嘌呤,以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮杂腺嘌呤。核酸末端的羟基(-OH)可以被官能团(巯基(-SH)、羧基

(-COOH) 或胺基 (-NH₂) 取代。取代可以在 3' 端或 5' 端进行。

接头

在本公开内容的各个方面和实施方案中,一各或更多个寡核苷酸可以与一个或更多个另外的寡核苷酸或靶向配体缀合。寡核苷酸和靶向配体可以通过本领域已知的任何方式缀合,包括但不限于共价键、离子键、氢键和磁连接 (magnetic linkage)。

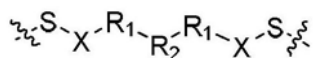
在本公开内容的各个方面和实施方案中,寡核苷酸共价连接。接头可以是可裂解的(例如,在细胞内条件下,以促进寡核苷酸递送和/或作用)或不可裂解的。尽管在下文和实施例中使用亲核试剂-亲电试剂化学物质的接头的上下文中一般地进行描述,但是其他化学物质和构型是可能的。并且如普通技术人员将理解的,各种接头(包括它们的组成、合成和用途)是本领域已知的并且可以适用于本公开内容。

在各个实施方案中,共价接头可以包含亲核基团和亲电基团的反应产物。例如,共价接头可以包含硫醇和马来酰亚胺、硫醇和乙烯基砜、硫醇和吡啶基二硫化物、硫醇和碘乙酰胺、硫醇和丙烯酸酯、叠氮化物和炔或胺和羧基的反应产物。如本文所述,这些基团中的一个连接到寡核苷酸(例如,在 3' 或 5' 端硫醇 (-SH) 官能化),并且另一个基团通过最终连接两个寡核苷酸的第二个分子(例如,连接剂)被包含(例如,DTME 中的马来酰亚胺)。

在各个实施方案中,共价接头可包含未经修饰的二核苷酸键或硫醇和马来酰亚胺的反应产物。

在各个实施方案中,共价接头可以包含长度为 2-6 个核苷酸的核苷酸接头。在各个实施方案中,该核苷酸接头的长度为 3、4 或 5 个核苷酸。

在各个实施方案中,共价接头可以包含二硫键或式 (I) 的化合物:



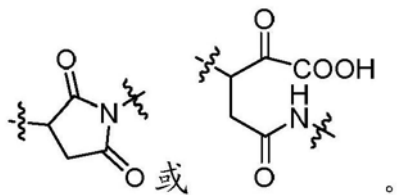
其中:

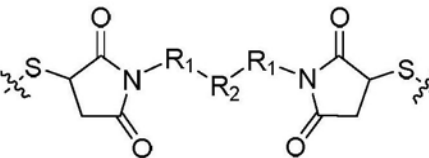
S 通过共价键或通过接头附接到亚基的 3' 或 5' 末端;

每个 R₁ 独立地是 C₂-C₁₀ 烷基、烷氧基或芳基;

R₂ 是硫代丙酸酯或二硫化物基团;并且

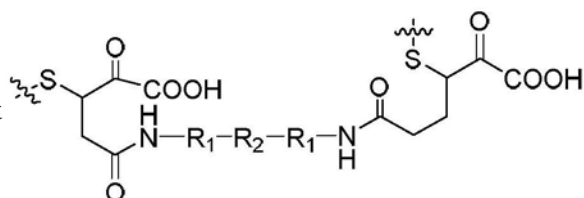
每个 X 独立地选自:



在一个实施方案中,式 (I) 的化合物是  其中 S 通过

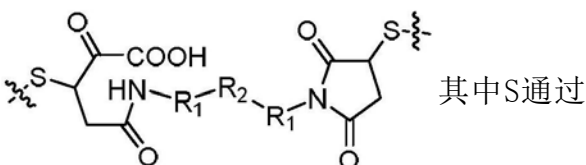
共价键或通过接头附接到亚基的 3' 或 5' 末端;每个 R₁ 独立地是 C₂-C₁₀ 烷基、烷氧基或芳基;并且 R₂ 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

在一个实施方案中,式(I)的化合物是



其中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3'或5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2 - C_{10} 烷基、烷氧基或芳基;并且 R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

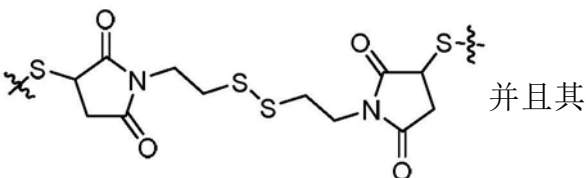
在一个实施方案中,式(I)的化合物是



其中S通过

共价键或通过接头附接到亚基的3'或5'末端;每个 R_1 独立地是 C_2 - C_{10} 烷基、烷氧基或芳基;并且 R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

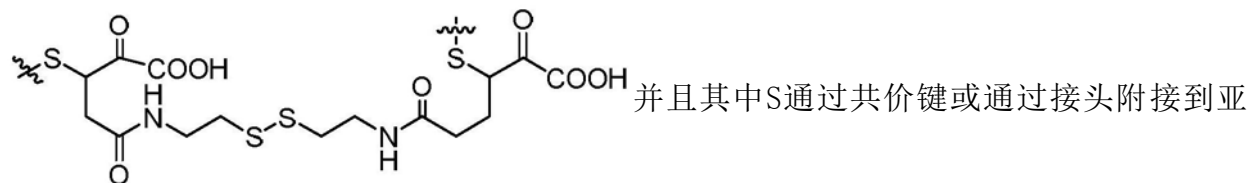
在某些实施方案中,式(I)的化合物是



并且其

中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3'或5'末端。

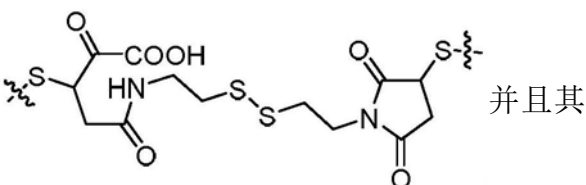
在某些实施方案中,式(I)的化合物是



并且其中S通过共价键或通过接头附接到亚

基的3'或5'末端。

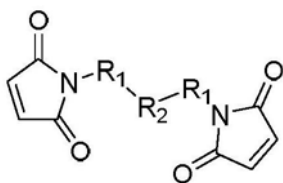
在某些实施方案中,式(I)的化合物是



并且其

中S通过共价键或通过接头附接到亚基的3'或5'末端。

在各个实施方案中,式(I)的共价接头由式(II)的共价连接前体形成:



其中:

每个 R_1 独立地是 C_2 - C_{10} 烷基、烷氧基或芳基;并且

R_2 是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

在各个实施方案中,多聚寡核苷酸的两个或更多个接头可以包含两种正交类型的生物可裂解连接。在一个此种实施方案中,两种正交的生物可裂解连接可以包含未经修饰

的二核苷酸和硫醇和马来酰亚胺的反应产物。

在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸通过磷酸二酯或硫代磷酸二酯(例如,结构1中的R1是磷酸二酯或硫代磷酸二酯)连接到接头。在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸通过C1-8烷基、C2-8烯基、C2-8炔基、杂环基、芳基和杂芳基、支链烷基、芳基、卤代芳基和/或其他碳基连接体连接到接头。在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸通过C2-C10、C3-C6或C6烷基(例如,结构1中的R2是C2-C10、C3-C6或C6烷基)连接到接头。在优选的实施方案中,核酸或寡核苷酸通过C6烷基连接到接头。可替代地,这些部分(例如,结构1中的R1和/或R2)是任选的并且直接连接是可能的。

在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸通过硫醇和马来酰亚胺基团的反应产物连接到接头。(例如,结构1中的A是硫醇和马来酰亚胺基团的反应产物)。优选的利用此种化学物质的连接剂包括DTME(二硫代双马来酰亚胺乙烷)、BM(PEG)2(1,8-双(马来酰亚胺)二甘醇)、BM(PEG)3(1,11-双马来酰亚胺-三乙二醇)、BMOE(双马来酰亚胺乙烷)、BMH(双马来酰亚胺己烷)或BMB(1,4-双马来酰亚胺丁烷)。

同样,实例是说明性的而非限制性的。在各个实施方案中,寡核苷酸可以通过功能性端取代直接连接在一起,或通过连接剂间接连接在一起。在各个实施方案中,寡核苷酸可以与接头直接结合(例如,结构1的R1和R2不存在)。例如,此种键合可以通过使用3'-硫代核苷来实现,其可以根据本领域普通技术人员来制备。参见,例如,Sun等,Sun等“Synthesis of 3'-thioribonucleosides and their incorporation into oligoribonucleotides via phosphoramidite chemistry”RNA.1997Nov;3(11):1352-63。在各个实施方案中,连接剂可以是非离子亲水性聚合物,例如聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮和聚恶唑啉;或疏水性聚合物,例如PLGA和PLA。

用作共价键中介物的聚合物连接剂可以是非离子亲水性聚合物,包括PEG、Pluronic、聚乙烯吡咯烷酮、聚噁唑啉或其共聚物;或一种或更多种可生物裂解的聚酯聚合物,包括聚-L-乳酸、聚-D-乳酸、聚-D,L-乳酸、聚乙醇酸、聚-D-乳酸-共-乙醇酸、聚-L-乳酸-共-乙醇酸、聚-D,L-乳酸-共-乙醇酸、聚己内酯、聚戊内酯、聚羟基丁酸酯、聚羟基戊酸酯或其共聚物,但是不总是限于此。

连接剂的分子量可以为100-10,000道尔顿。此种连接剂的实例包括二硫代-双马来酰亚胺乙烷(DTME)、1,8-双马来酰亚胺二甘醇(BM(PEG)2)、三-(2-马来酰亚胺乙基)-胺(TMEA)、氨基三乙酸三琥珀酰亚胺酯(TSAT)、3-臂-聚(乙二醇)(3-臂PEG)、马来酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、乙烯基砜、碘乙酰基、硝基苯基叠氮化物、异氰酸酯、吡啶基二硫化物、酰肼和羟苯基叠氮化物。

具有可裂解键的连接剂(例如被细胞胞质的化学环境裂解的还原剂键)或具有不可裂解键的连接剂可以在本文中使用。例如,本公开内容的前述方面的连接剂可以具有不可裂解键,例如酰胺键或氨基甲酸酯键。可替代地,本公开内容的前述方面的连接剂可以具有可裂解键,例如酸可裂解键(例如酯、腙或缩醛的共价键)、还原剂可裂解键(例如二硫键)、生物可裂解键或酶可裂解键(例如肽键)。在一个实施方案中,可裂解共价接头在细胞内条件下是可裂解的。另外,任何可用于药物修饰的连接剂可以不受限制地用于本公开内容的前述方面。

此外,官能团和连接剂的组合可以包括:(a)当官能团是氨基和硫醇时,连接剂可

以是琥珀酰亚胺3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯或琥珀酰亚胺6-([3(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸酯；(b) 当官能团是氨基时,连接剂可以是3,3'-二硫代二丙酸二-(N-琥珀酰亚胺酯)、二硫代-双(1H-咪唑-1-羧酸乙酯)或二硫代-双(1H-咪唑-1-羧酸乙酯)；(c) 当官能团是氨基和炔烃时,连接剂可以是磺基-N-琥珀酰亚胺基3-[[2-(对叠氮基水杨酰胺基)乙基]-1,3'-二硫代]丙酸酯；和(d) 在官能团y是硫醇的情况下,连接剂是二硫代-双马来酰亚胺乙烷(DTME)；1,8-双马来酰亚胺二乙二醇(BM(PEG) 2)；或二硫代双(磺基琥珀酰亚胺丙酸酯)(DTSSP)。

在用于制备化合物的前述方法中,可以包括使官能团活化的另外的步骤。可用于使官能团活化的化合物包括但不限于1-乙基-3,3-二甲氨基丙基碳二亚胺、咪唑、N-羟基琥珀酰亚胺、二氯己基碳二亚胺、N-β-马来酰亚胺丙酸、N-β-马来酰亚胺丙基琥珀酰亚胺酯或N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯。

单体中间化合物

在各个方面,本公开内容提供了与共价接头偶联的寡核苷酸,其可用于例如合成具有预定大小和组成的限定多缀合物寡核苷酸。

在一方面,本公开内容提供了根据结构1的化合物:

X-R1-R2-A-R3-B(结构1)

其中:

X是通过其3'或5'末端与R1键合的核酸;

R1是磷酸的衍生物、硫代磷酸的衍生物、硫酸盐、酰胺、二醇,或不存在;

R2是C2-C10烷基、烷氧基或芳基,或不存在;

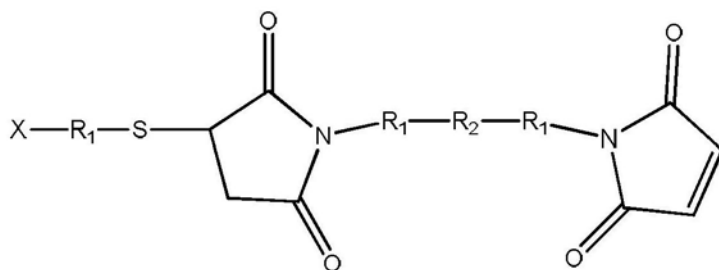
A是亲核试剂和亲电试剂的反应产物;

R3是C2-C10烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫代基、醚、硫醚、硫代丙酸酯或二硫化物;

并且

B是亲核试剂或亲电试剂(例如,硫醇、马来酰亚胺、乙烯基砜、吡啶基二硫化物、碘乙酰胺、丙烯酸酯、叠氮化物、炔、胺或羧基)。

在一方面,本公开内容提供了根据结构2的化合物:



(结构2)

其中:

X是通过磷酸酯或其衍生物或硫代磷酸酯或其衍生物在其3'或5'末端与R1键合的核酸;

每个R1独立地是C2-C10烷基、烷氧基或芳基;并且

R2是硫代丙酸酯或二硫化物基团。

在一方面,本公开内容提供了根据结构3的化合物:

X-R1-R2-A-R3-B (结构3)

其中:

X是通过其3' 或5' 末端与R1键合的核酸;

R1是磷酸的衍生物,例如磷酸酯、磷酸二酯、磷酸三酯、磷酸酯、氨基磷酸酯等;硫代磷酸的衍生物,例如硫代磷酸酯、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、硫代磷酸酯等;硫酸盐;酰胺;二醇;或不存在;

R2是C2-C10烷基、烷氧基或芳基,或不存在;

A是第一反应部分和第二反应部分的反应产物;

R3是C2-C10烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫代基、醚、硫醚、硫代丙酸酯或二硫化物;

并且

B是第三反应部分。

在各个方面,本公开内容还提供了用于合成与共价接头偶联的寡核苷酸的方法。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于合成根据结构1的化合物(或适于合成根据结构2或3的化合物)的方法,该方法包括:

在X-R1-R2-A' 的稀溶液中并且在A''-R3-B化学计量过量的情况下使官能化的核酸X-R1-R2-A' 和共价接头A''-R3-B反应,其中A' 和A'' 包含亲核试剂和亲电试剂,从而形成化合物X-R1-R2-A-R3-B (结构1),其中:

X是通过其3' 或5' 末端与R1键合的核酸;

R1是磷酸二酯、硫代磷酸二酯、硫酸盐、酰胺、乙二醇,或不存在;

R2是C2-C10烷基、烷氧基或芳基,或不存在;

A是亲核试剂和亲电试剂的反应产物;

R3是C2-C10烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫代基、醚、硫醚、硫代丙酸酯或二硫化物;

并且

B是亲核试剂或亲电试剂(例如,硫醇、马来酰亚胺、乙烯基砜、吡啶基二硫化物、碘乙酰胺、丙烯酸酯、叠氮化物、炔、胺或羧基)。

该方法还可以包括合成官能化的核酸X-R1-R2-A' 的步骤,其中A' 包含硫醇(-SH),通过(i)在核酸的固相合成期间使用亚磷酰胺低聚化学物质引入硫醇或(ii)将在固相合成期间引入的二硫化物还原。

在各个实施方案中,用于合成结构1的化合物的方法还包括合成结构2的化合物。

与共价接头偶联的寡核苷酸可以包括本文所述的任一个或更多个特征,包括在实施例中所述的。例如,化合物可以包括本文所述的任一种或更多种核酸(有或没有修饰)、靶向配体和/或接头,或发明内容、说明书或实施例中所示的任何特定结构或化学物质。实施例1提供了用于生成硫醇封端的寡核苷酸的示例方法。实施例2提供了用于制备与接头偶联的寡核苷酸的示例方法。

在各个实施方案中,用于合成结构1、2或3的化合物的方法在基本上有利于形式结构1、2或3并且基本上防止X二聚化的条件下进行。这些条件可以提高反应产率(例如,提高产物的纯度)。

在各个实施方案中,用于合成结构1、2或3的化合物的方法,使官能化的核酸X-R1-R2-A' 和共价接头A''-R3-B反应的步骤在低于约1mM、500μM、250μM、100μM或50μM的X-R1-R2-

A' 浓度下进行。可替代地, X-R1-R2-A' 浓度可以为约1mM、500μM、250μM、100μM或50μM。

在各个实施方案中, 用于合成结构1、2或3的化合物的方法, 使官能化的核酸X-R1-R2-A' 和共价接头A"-R3-B反应的步骤在至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50或100的摩尔过量的A"-R3-B下进行。可替代地, 摩尔过量的A"-R3-B可以为约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50或100。

在各个实施方案中, 用于合成结构1、2或3的化合物的方法, 使官能化的核酸X-R1-R2-A' 和共价接头A"-R3-B反应的步骤在低于约7、6、5或4的pH值下进行。可替代地, pH值可以为约7、6、5或4。

在各个实施方案中, 用于合成结构1、2或3的化合物的方法, 使官能化的核酸X-R1-R2-A' 和共价接头A"-R3-B反应的步骤在包含水和水混溶性有机共溶剂的溶液中进行。水混溶性有机共溶剂可以包括DMF (二甲基甲酰胺)、NMP (N-甲基-2-吡咯烷酮)、DMSO (二甲基亚砷) 或乙腈。水混溶性有机共溶剂可以占溶液的约10%、15%、20%、25%、30%、40%或50% V (v/v)。

在各个实施方案中, 化合物是分离的或基本上纯的。例如, 化合物可以是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。在一个实施方案中, 化合物是约85%-95%纯的。同样, 用于合成根据本公开内容的化合物和组合物的方法可以产生至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的产物。在一个实施方案中, 产物是约85%-95%纯的。制剂可以是大于或等于50%纯的; 优选大于或等于75%纯的; 更优选大于或等于85%纯的; 并且更优选地大于或等于95%纯的。

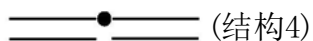
如本文所用, 术语约根据其简单和普通的近似含义来使用。例如, “约X” 大约涵盖所述的值X, 包括在X值的测量误差内的类似量或与X大约相同并且具有与X基本上相同特性的量。

如本文所用, 分离的包括与其他不需要的物质分离的化合物。分离的化合物可以以基本上纯的状态合成或与粗反应混合物的其他组分分离, 除了可以保留一些量的杂质 (包括粗反应混合物的残留量的其他组分) 之外。类似地, 纯的或基本上纯的意指不含杂质足以允许其预期用途 (例如, 在药物制剂中或作为用于随后化学反应的材料)。X%纯的意指通过相关测量, 该化合物占总组合物的X%, 其可以例如通过分析方法例如HPLC。

二聚体化合物和中间体

在各个方面, 本公开内容提供了限定二聚体的多缀合物寡核苷酸。这些化合物包括同源二聚体 (例如, 两个基本上相同的寡核苷酸, 例如在体内靶向相同基因) 和异源二聚体 (例如, 两个基本上不同的寡核苷酸, 例如不同的序列或在体内靶向不同基因)

在一方面, 本公开内容提供了根据结构4的分离的化合物:



其中:

每个——是设计成与体内相同的分子靶标反应的双链寡核苷酸, 并且

- 是在其3' 或5' 末端接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头, 并且具有结构-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-, 其中:

每个R1是磷酸的衍生物, 例如磷酸酯、磷酸二酯、磷酸三酯、磷酸酯、氨基磷酸酯等; 硫代磷酸的衍生物, 例如硫代磷酸酯、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、硫代氨基磷酸酯

等;

硫酸盐;酰胺;乙二醇;或不存在;

每个R₂独立地是C₂-C₁₀烷基、烷氧基或芳基,或不存在;

每个A独立地是亲核试剂和亲电试剂的反应产物,并且

R₃是C₂-C₁₀烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫代基、醚、硫醚、硫代丙酸酯或二硫化物。

在一方面,本公开内容提供了根据结构5的分离的化合物:



其中:

——是第一单链寡核苷酸

~~~~是具有与第一单链寡核苷酸不同的序列的第二单链寡核苷酸,并且

• 是在其3' 或5' 末端接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头,并且具有结构-R1-

R<sub>2</sub>-A-R<sub>3</sub>-A-R<sub>2</sub>-R<sub>1</sub>- 其中:

每个R<sub>1</sub>是磷酸的衍生物,例如磷酸酯、磷酸二酯、磷酸三酯、膦酸酯、氨基磷酸酯等;硫代磷酸的衍生物,例如硫代磷酸酯、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、硫代氨基磷酸酯等;

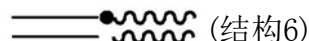
硫酸盐;酰胺;乙二醇;或不存在;

每个R<sub>2</sub>独立地是C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>烷基、烷氧基或芳基,或不存在;

每个A独立地是硫醇和马来酰亚胺、硫醇和乙烯基砷、硫醇和吡啶基二硫化物、硫醇和碘乙酰胺、硫醇和丙烯酸酯、叠氮化物和炔或胺和羧基的反应产物,并且

R<sub>3</sub>是C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫代基、醚、硫醚、硫代丙酸酯或二硫化物。

在一个方面,本公开内容提供了根据结构6的分离的化合物:



其中:

====是第一双链寡核苷酸

~~~~是具有与第一双链寡核苷酸不同的序列的第二双链寡核苷酸,并且

• 是在其3' 或5' 末端接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头,并且具有结构-R1-

R₂-A-R₃-A-R₂-R₁- 其中:

每个R₁是磷酸的衍生物,例如磷酸酯、磷酸二酯、磷酸三酯、膦酸酯、氨基磷酸酯等;硫代磷酸的衍生物,例如硫代磷酸酯、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、硫代氨基磷酸酯等;硫酸盐;酰胺;乙二醇;或不存在;

每个R₂独立地是C₂-C₁₀烷基、烷氧基或芳基,或不存在;

每个A独立地是硫醇和马来酰亚胺、硫醇和乙烯基砷、硫醇和吡啶基二硫化物、硫醇和碘乙酰胺、硫醇和丙烯酸酯、叠氮化物和炔或胺和羧基的反应产物,并且

R₃是C₂-C₁₀烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫代基、醚、硫醚、硫代丙酸酯或二硫化物。

在一个方面,本公开内容提供了根据结构11的分离的化合物:



其中:

====是双链寡核苷酸,

——是单链寡核苷酸,并且

- 是接合相邻单链寡核苷酸单链的共价结构。

在各个方面,本公开内容提供了用于合成限定二聚体的多缀合物寡核苷酸的方法。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于合成结构5的化合物的方法:

——●—— (结构5)

其中——是第一单链寡核苷酸,——是具有与第一单链寡核苷酸不同的序列的第二单链寡核苷酸,并且•是在其3'或5'末端接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头,该方法包括以下步骤:

(i) 使第一单链寡核苷酸—— R_1 与双官能连接部分O反应,其中 R_1 是能够在产生单取代的产物——O的条件下与O反应的化学基团;

(ii) 使——O与第二单链寡核苷酸—— R_2 反应,其中 R_2 是能够与O反应的化学基团,从而形成——●——。

该方法还包括使互补的——和——退火以产生结构6的步骤:

——●—— (结构6)。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于合成结构4的分离的化合物的方法:

——●—— (结构4)

其中每个——是双链寡核苷酸并且•是在其3'或5'末端接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头,该方法包括以下步骤:

(i) 使第一单链寡核苷酸—— R_1 与双官能连接部分O反应,其中 R_1 是能够与O反应的化学基团,从而形成单取代的产物——O;

(ii) 使——O与第二单链寡核苷酸—— R_2 反应,其中 R_2 是能够与O反应的化学基团,从而形成单链二聚体——●——;

(iii) 使单链寡核苷酸同时或依次退火,从而形成——●——。

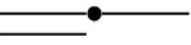
在一个方面,本公开内容提供了一种用于合成结构4的分离的化合物的方法:——●—— (结构4) 其中每个——是双链寡核苷酸并且•是在其3'或5'末端接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头,该方法包括以下步骤:

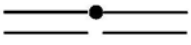
(i) 通过以下形成——●——:

(a) 使第一单链寡核苷酸——和第二单链寡核苷酸—— R_1 退火,从而形成—— R_1 ,并且使—— R_1 与第三单链寡核苷酸—— R_2 反应,其中 R_1 和 R_2 是能够直接或间接反应形成共价接头•的化学部分,从而形成——●——;或

(b) 使第二单链寡核苷酸和第三单链寡核苷酸—— R_2 反应,从而形成——●——,并且使单链寡核苷酸——和——退火,从而形成——●——;

(ii) 使——●——和第四单链寡核苷酸——退火,从而形成——●——。

该方法可以适于合成根据  (结构11) 的分离的化合物,例如通过省略步骤(ii)。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于合成结构4:  (结构4) 的分离的化合物,其中每个  是双链寡核苷酸并且  是在其3' 或5' 末端接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头,该方法包括以下步骤:

(a) 使第一单链寡核苷酸  和第二单链寡核苷酸 -R₁ 退火,从而形成 -R₁;

(b) 使第三单链寡核苷酸 -R₂ 和第四单链寡核苷酸  退火,从而形成 -R₂;

(c) 使 -R₁ 和 -R₂ 反应,其中R1和R2是能够直接或间接反应形成共价接头  的化学部分,从而形成 。

与根据本公开内容的其他化合物和组合物一样,二聚体化合物和中间体可以包括本文所述的任一个或更多个特征,包括实施例中所描述的。例如,化合物可以包含本文所述的任一种或更多种核酸(有或没有修饰)、靶向配体和/或接头,或发明内容、说明书或实施例中所示的任何特定结构或化学物质。

实施例3提供了一种用于制备二聚化寡核苷酸的示例方法,并且实施例4提供了一种用于使单链寡核苷酸退火以形成双链寡核苷酸的示例方法。实施例7提供了一种用于制备可用于以上合成的各种寡核苷酸前体的示例方法。实施例8提供了一种用于制备各种寡核苷酸多聚体的示例方法,这些寡核苷酸多聚体也可用于以上合成。

异源二聚体的实例在实施例9和10中提供。

同源二聚体的实例在实施例12-15中提供。

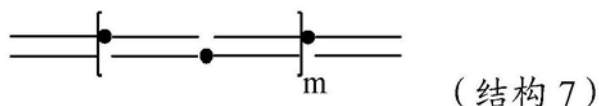
在各个实施方案中,R1、R2和双官能连接部分0可以形成如本文所述和所示的共价接头 。例如,在各个实施方案中,R1和R2可以各自独立地包含反应性部分,例如亲电试剂或亲核试剂。在一个实施方案中,R1和R2可以各自独立地选自硫醇、马来酰亚胺、乙烯基砜、吡啶基二硫化物、碘乙酰胺、丙烯酸酯、叠氮化物、炔、胺和羧基。在各个实施方案中,双官能连接部分0包含可以根据以上步骤(i)和(ii)依次反应的两个反应性部分,例如可以与R1和R2中的亲电试剂/亲核试剂反应的第二亲电试剂/亲核试剂。双官能连接部分0的实例包括但不限于DTME、BM(PEG)2、BM(PEG)3、BMOE、BMH或BMB。

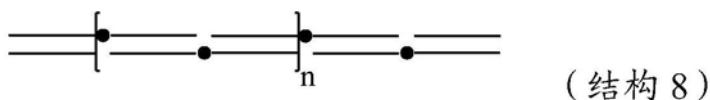
这些以及本公开内容的所有其他合成方法还可以包括向分子添加靶向配体的步骤。实施例6提供了一种用于添加靶向配体(例如,GalNAc)的示例方法。用于添加靶向配体的另外的方法是本领域已知的,并且可以通过本领域技术人员适应本公开内容。

多聚体(n>2)化合物和中间体

在各个方面,本公开内容提供了限定多聚体(n>2)的多缀合物寡核苷酸,包括限定的三缀合物和限定的四缀合物。

在一个方面,本公开内容提供了根据结构7或8的化合物:





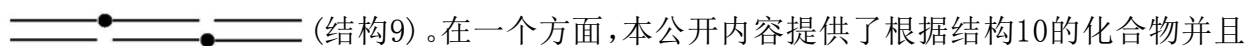
其中:

每个 是双链寡核苷酸,

每个 $\cdot$ 是接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头,并且

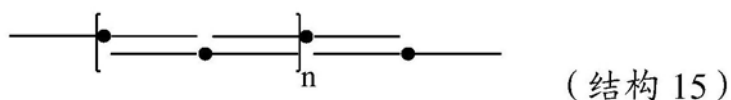
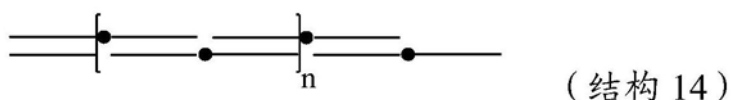
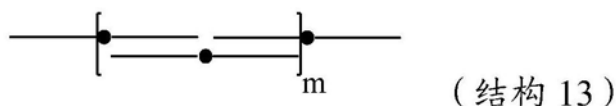
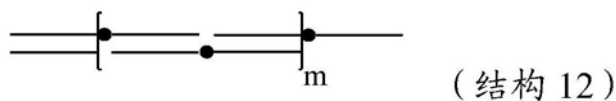
$m \geq 1$ 的整数且 n 为 ≥ 0 的整数。

在一个方面,本公开内容提供了根据结构9的化合物并且其中 $n = 0$:



其中 $m = 1$: (结构10)。

在一个方面,本公开内容提供了根据结构12、13、14或15的化合物:



其中:

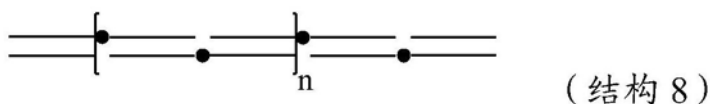
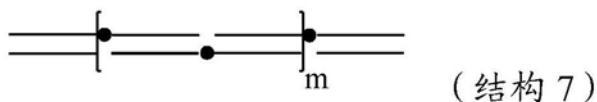
每个 是双链寡核苷酸,

每个 是单链寡核苷酸,

每个 $\cdot$ 是接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头,并且 m 为 ≥ 1 的整数且 n 为 ≥ 0 的整数。

在各个方面,本公开内容提供了用于合成限定多聚体 ($n > 2$) 的多缀合物寡核苷酸 (包括限定的三缀合物和限定的四缀合物) 的方法。

在一个方面,本公开内容提供了一种用于合成根据结构7或8的化合物的方法:



其中:每个 是双链寡核苷酸,每个 $\cdot$ 是接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头,并且 m 为 ≥ 1 的整数且 n 为 ≥ 0 的整数,该方法包括以下步骤:

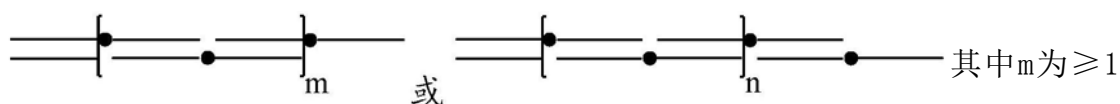
(i) 通过以下形成 $\cdot$:

(a) 使第一单链寡核苷酸 和第二单链寡核苷酸 R_1 退火,从而形成

—— R_1 , 并且使 —— R_1 与第三单链寡核苷酸 —— R_2 反应, 其中 R_1 和 R_2 是能够直接或间接反应形成共价接头 $\cdot$ 的化学部分, 从而形成 —— $\cdot$ ——; 或

(b) 使第二单链寡核苷酸 —— R_1 和第三单链寡核苷酸 —— R_2 反应, 从而形成 —— $\cdot$ ——, 并且使第一单链寡核苷酸 —— 和 —— $\cdot$ —— 退火, 从而形成 —— $\cdot$ ——;

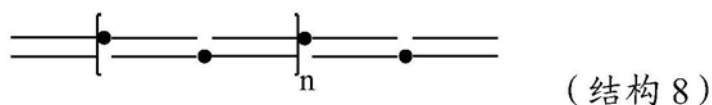
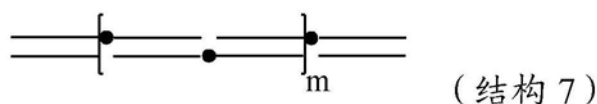
(ii) 使 —— $\cdot$ —— 和第二单链二聚体 —— $\cdot$ —— 退火, 从而形成 —— $\cdot$ —— $\cdot$ —— 并且任选地, 使一个或更多个另外的单链二聚体 —— $\cdot$ —— 与 —— $\cdot$ —— 退火, 从而形成



的整数且 n 为 ≥ 0 的整数; 并且

(iii) 使第四单链寡核苷酸 —— 与步骤 (ii) 的产物退火, 从而形成结构 7 或 8。

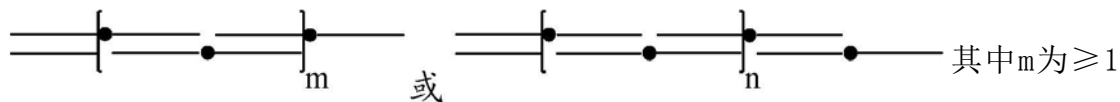
在一个方面, 本公开内容提供了一种用于合成根据结构 7 或 8 的化合物的方法:



其中: 每个 —— 是双链寡核苷酸, 每个 $\cdot$ 是接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头, 并且 m 为 ≥ 1 的整数且 n 为 ≥ 0 的整数, 该方法包括以下步骤:

(i) 使第一单链寡核苷酸 —— 和第一单链二聚体 —— $\cdot$ —— 退火, 从而形成 —— $\cdot$ ——;

(ii) 使 —— $\cdot$ —— 和第二单链二聚体 —— $\cdot$ —— 退火, 从而形成 —— $\cdot$ —— $\cdot$ —— 并且任选地, 使一个或更多个另外的单链二聚体 —— $\cdot$ —— 与 —— $\cdot$ —— 退火从而形成



的整数且 n 为 ≥ 0 的整数; 并且

(iii) 使第二单链寡核苷酸 —— 与步骤 (ii) 的产物的退火, 从而形成结构 7 或 8。

在一个方面, 本公开内容提供了一种用于合成结构 9: —— $\cdot$ —— $\cdot$ —— (结构 9) 的化合物的方法, 其中每个 —— 是双链寡核苷酸, 每个 $\cdot$ 是接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头, 该方法包括以下步骤:

(i) 通过以下形成 —— $\cdot$ ——:

(a) 使第一单链寡核苷酸 —— 和第二单链寡核苷酸 —— R_1 退火, 从而形成

—— R_1 , 并且使 —— R_1 与第三单链寡核苷酸 —— R_2 反应, 其中 R_1 和 R_2 是能够直接或间接反应形成共价接头 $\bullet$ 的化学部分, 从而形成 —— $\bullet$ ——; 或

(b) 使第二单链寡核苷酸 —— R_1 和第三单链寡核苷酸 —— R_2 反应, 从而形成 —— $\bullet$ ——, 并且使第一单链寡核苷酸 —— 和 —— $\bullet$ —— 退火, 从而形成 —— $\bullet$ ——;

(i i) 使 —— $\bullet$ —— 和单链二聚体 —— $\bullet$ —— 退火, 从而形成 —— $\bullet$ ——; 以及

(i i i) 使 —— $\bullet$ —— 和第四单链寡核苷酸 —— 退火, 从而形成 —— $\bullet$ ——。

在一个方面, 本公开内容提供了一种用于合成结构10:

—— $\bullet$ —— $\bullet$ —— (结构10) 的化合物的方法, 其中每个 —— 是双链寡核苷酸, 每个 $\bullet$ 是接合相邻单链寡核苷酸单链的共价接头, 该方法包括以下步骤:

(i) 通过以下形成 —— $\bullet$ ——:

(a) 使第一单链寡核苷酸 —— 和第二单链寡核苷酸 —— R_1 退火, 从而形成 —— R_1 , 并且使 —— R_1 与第三单链寡核苷酸 —— R_2 反应, 其中 R_1 和 R_2 是能够直接或间接反应形成共价接头 $\bullet$ 的化学部分, 从而形成 —— $\bullet$ ——; 或

(b) 使第二单链寡核苷酸 —— R_1 和第三单链寡核苷酸 —— R_2 反应, 从而形成 —— $\bullet$ ——, 并且使第一单链寡核苷酸 —— 和 —— $\bullet$ —— 退火, 从而形成 —— $\bullet$ ——;

(i i) 使 —— $\bullet$ —— 和单链二聚体 —— $\bullet$ —— 退火, 从而形成 —— $\bullet$ ——;

(i i i) 使 —— $\bullet$ —— 和第二单链二聚体 —— $\bullet$ —— 退火, 从而形成 —— $\bullet$ ——; 以及 (i v) 使 —— $\bullet$ —— 和第四单链寡核苷酸 —— 退火, 从而形成 —— $\bullet$ ——。

与根据本公开内容的其他化合物和组合物一样, 二聚体化合物和中间体可以包括本文所述的任一个或更多个特征, 包括实施例中所述的。例如, 化合物可以包含本文所述的任一种或更多种核酸(有或没有修饰)、靶向配体和/或接头, 或发明内容、说明书或实施例中所示的任何特定结构或化学物质。

实施例7提供了一种用于制备可用于以上合成的各种寡核苷酸前体的示例方法。实施例8提供了一种用于制备各种寡核苷酸多聚体的示例方法, 该寡核苷酸多聚体也可用于以上合成。

在各个实施方案中, R_1 、 R_2 和双官能连接部分0可以形成如本文所述和所示的共价接头 $\bullet$ 。例如, 在各个实施方案中, R_1 和 R_2 可以各自独立地包含反应性部分, 例如亲电试剂

或亲核试剂。在一个实施方案中,R1和R2可以各自独立地选自硫醇、马来酰亚胺、乙烯基砜、吡啶基二硫化物、碘乙酰胺、丙烯酸酯、叠氮化物、炔、胺和羧基。在各个实施方案中,双官能连接部分0包含可以根据以上步骤(i)和(ii)依次反应的两个反应性部分,例如可以与R1和R2中的亲电试剂/亲核试剂反应的第二亲电试剂/亲核试剂。双官能连接部分0的实例包括但不限于DTME、BM(PEG)2、BM(PEG)3、BMOE、BMH或BMB。

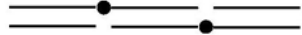
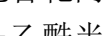
在包含两个或更多个共价接头•的各个实施方案中(例如,在结构7-16中),接头都是相同的。可替代地,该化合物或组合物可以包含两种或更多种不同的共价接头•。

在各个实施方案中,每个可以独立地包含两个有义寡核苷酸或两个反义寡核苷酸。例如,在siRNA的情况下,可以包含两条活性链或两条信使链。

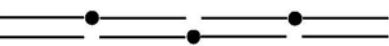
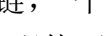
在各个实施方案中,每个可以独立地包含一个有义寡核苷酸和一个反义寡核苷酸。例如,在siRNA的情况下,可以包含一条活性链和一条信使链。

在各个实施方案中,该化合物或组合物包含基本上相同的双链寡核苷酸的同源多聚体。基本上相同的双链寡核苷酸可以各自包含靶向体内相同分子靶标的siRNA。

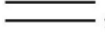
在各个实施方案中,该化合物或组合物包含两种或更多种基本上不同的双链寡核苷酸的异源多聚体。基本上不同的双链寡核苷酸可以各自包含靶向不同基因的siRNA。

在各个实施方案中,该化合物包含结构9并且 $n=0$: (结构9)。该化合物还可以包含靶向配体。该化合物还可以包含2或3个基本上不同的双链寡核苷酸,每个包含靶向体内不同分子靶标的siRNA。该化合物还可以包含靶向配体,一个包含靶向因子VII的第一siRNA引导链和与该引导链杂交的第一信使链,一个包含靶向载脂蛋白B的第二siRNA引导链和与该第二引导链杂交的第二信使链,一个包含靶向TTR的第三siRNA引导链和与该第三引导链杂交的第三信使链。靶向配体可以包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

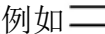
三聚体的实例在实施例17、18和20中提供。

在各个实施方案中,该化合物包含结构10并且 $m=1$: (结构10)。该化合物还可以包含靶向配体。该化合物还可以包含2、3或4个基本上不同的双链寡核苷酸,每个包含靶向体内不同分子靶标的siRNA。该化合物还可以包含靶向配体,一个包含靶向因子VII的第一siRNA引导链和与该引导链杂交的第一信使链,一个包含靶向载脂蛋白B的第二siRNA引导链和与该第二引导链杂交的第二信使链,一个包含靶向TTR的第三siRNA引导链和与该第三引导链杂交的第三信使链。靶向配体可以包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

四聚体的实例在实施例21中提供。

在各个实施方案中,每个双链寡核苷酸(例如,例如结构4中的)包含靶向因子VII的siRNA引导链和与该引导链杂交的信使链。

在各个实施方案中(例如,在结构4中),该化合物还包含靶向配体,每个双链寡核苷酸(例如)包含siRNA引导链和与该引导链杂交的信使链,并且该化合物是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。

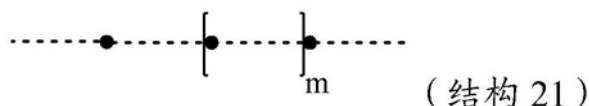
在各个实施方案中,至少一个双链寡核苷酸(例如,例如结构6中的)包含靶向因子VII的第一siRNA引导链和与该引导链杂交的第一信使链,并且至少一个双链寡核苷酸

酸(例如, 例如结构6中的)包含靶向载脂蛋白B的第二siRNA引导链和与该第二引导链杂交的第二信使链。

具有增加的体内循环半衰期和/或活性的寡核苷酸

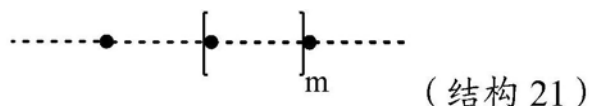
本公开内容提供了具有增加的体内循环半衰期和/或活性的多聚寡核苷酸,以及包含该多聚寡核苷酸的组合物及其合成和使用方法。

在各个方面,本公开内容提供了包含结构21的多聚寡核苷酸:



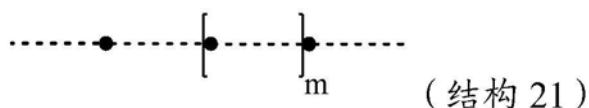
其中每个单体亚基-----独立地是单链或双链寡核苷酸, m 为 ≥ 1 的整数,每个•是接合相邻单体亚基-----的共价接头,并且单体亚基-----中的至少一个包含具有与其3'末端接合的一个共价接头•和与其5'末端接合的另一个共价接头的单链。

在各个方面,本公开内容提供了包含结构21的多聚寡核苷酸:



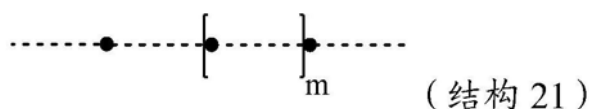
其中每个单体亚基-----独立地是单链或双链寡核苷酸,每个•是接合相邻单体亚基-----的共价接头,并且 m 是选择以下的 ≥ 0 的整数:(a)相对于单个单体亚基-----的体内循环半衰期增加多聚寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚基-----的体内活性增加多聚寡核苷酸的体内活性。

在各个方面,本公开提供了包含结构21的多聚寡核苷酸:



其中每个单体亚基-----独立地是单链或双链寡核苷酸,每个•是接合相邻单体亚基-----的共价接头, m 为 ≥ 0 的整数,并且其中多聚寡核苷酸的分子大小和/或分子量被配置为(a)相对于单个单体亚基-----的体内循环半衰期增加多聚寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚基-----的体内活性增加多聚寡核苷酸的体内活性。

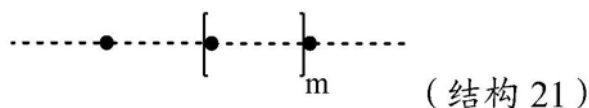
在各个方面,本公开提供了一种用于增加一种或更多种寡核苷酸的体内循环半衰期和/或体内活性的方法,该方法包括向受试者施用包含结构21的呈多聚体寡核苷酸形式的一种或更多种寡核苷酸:



其中每个单体亚基-----独立地是单链或双链寡核苷酸,每个•是接合相邻单体亚基-----的共价接头,并且 m 是选择以下的 ≥ 0 的整数:(a)相对于单个单体亚基-----的体内循环半衰期增加多聚寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚基-----的体内活性增加多聚寡核苷酸的体内活性。

在各个方面,本公开内容提供了一种用于增加一种或更多种寡核苷酸的体内循环半衰期和/或体内活性的方法,该方法包括向受试者施用包含结构21的呈多聚体寡核苷酸

形式的一种或更多种寡核苷酸:



其中每个单体亚基-----独立地是单链或双链寡核苷酸,每个•是接合相邻单体亚基-----的共价接头,m为 ≥ 0 的整数,并且

其中多聚寡核苷酸的分子大小和/或分子量被配置为(a)相对于单个单体亚基-----的体内循环半衰期增加多聚寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚基-----的体内活性增加多聚寡核苷酸的体内活性。

在各个方面,本公开内容提供了包含m个单体亚基-----的多聚寡核苷酸,其中每个单体亚基-----独立地是单链或双链寡核苷酸,每个单体亚基-----通过共价接头•与另一个单体亚基接合,并且m是选择以下的 ≥ 3 的整数:(a)相对于单个单体亚基-----的体内循环半衰期增加多聚寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚基-----的体内活性增加多聚寡核苷酸的体内活性。

在各个方面,本公开内容提供了包含m个单体亚基-----的多聚寡核苷酸,其中每个单体亚基-----独立地是单链或双链寡核苷酸,每个单体亚基-----通过共价接头与另一个单体亚基接合,m为 ≥ 3 的整数,并且多聚寡核苷酸的分子大小和/或分子量被配置为(a)相对于单个单体亚基-----的体内循环半衰期增加多聚寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚基-----的体内活性增加多聚寡核苷酸的体内活性。

在各个实施方案中,增加是相对于多聚寡核苷酸的单体亚基的循环半衰期和/或活性。循环半衰期(及其与其他特性(例如肾小球滤过)的关系)在寡核苷酸摄取和清除部分以及以下实施例25和37中进一步详细讨论。在各个实施方案中,体内循环半衰期可以增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、500或1,000倍。体内循环半衰期可以增加至少2倍。体内循环半衰期可以增加至少10倍。在各个实施方案中,体内活性的增加测量为 t_{max} 时的体内活性。在各个实施方案中,体内活性增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、500或1,000倍。体内活性可以增加至少2倍。体内活性可以增加至少10倍。在一个实施方案中,增加是在小鼠中。在一个实施方案中,增加是在人中。

在各个实施方案中,m为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

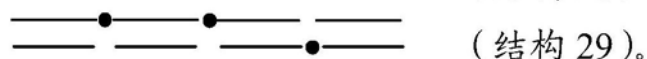
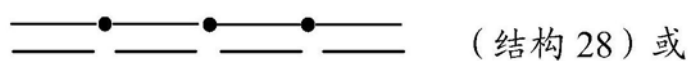
在各个实施方案中,m为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

在各个实施方案中,每个单体亚基-----包含siRNA并且每个共价接头接合siRNA的有义链。

在各个实施方案中,每个共价接头•接合两个单体亚基-----。

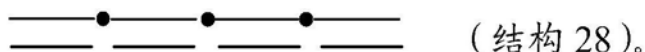
在各个实施方案中,共价接头•中的至少一个接合三个或更多个单体亚基-----。

在各个实施方案中,每个单体亚基-----独立地是双链寡核苷酸=====,并且m为1:

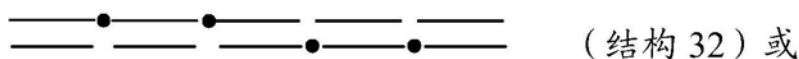
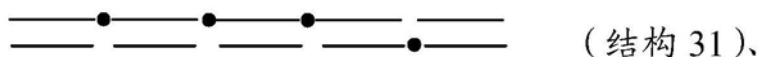


在各个实施方案中,每个单体亚基-----独立地是双链寡核苷酸=====,m为1,并

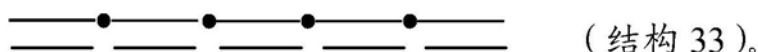
且每个共价接头 • 在同一链上:



在各个实施方案中,每个单体亚基-----独立地是双链寡核苷酸=====,并且m为2:



在各个实施方案中,每个单体亚基-----独立地是双链寡核苷酸=====,并且m为2,并且每个共价接头 • 在同一链上:



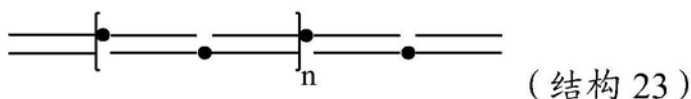
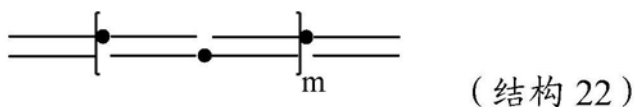
在各个实施方案中,每个单体亚基-----独立地是双链寡核苷酸=====,并且m为3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

在各个实施方案中,每个单体亚基-----独立地是双链寡核苷酸=====,m为3、4、5、6、7、8、9、10、11或12,并且每个共价接头 • 在同一链上。

在各个实施方案中,每个单体亚基-----独立地是双链寡核苷酸=====,并且m为 ≥ 13 。

在各个实施方案中,每个单体亚基-----独立地是双链寡核苷酸=====,m为 ≥ 13 ,并且每个共价接头 • 在同一链上。

在各个实施方案中,结构21是结构22或23:



其中每个=====是双链寡核苷酸,每个 • 是接合相邻双链寡核苷酸的共价接头,m为 ≥ 1 的整数,并且n为 ≥ 0 的整数。

在各个实施方案中,结构21不是PCT/US2016/037685中公开的结构。

在各个实施方案中,每个寡核苷酸-----是单链寡核苷酸。

在各个实施方案中,每个寡核苷酸-----是双链寡核苷酸。

在各个实施方案中,寡核苷酸-----包含单链和双链寡核苷酸的组合。

在各个实施方案中,该多聚寡核苷酸包含线性结构,其中每个共价接头 • 接合两个单体亚基-----。

在各个实施方案中,该多聚寡核苷酸包含支链结构,其中每个共价接头 • 接合三

个或更多个单体亚基-----。例如,结构21可以是-----结构41。

在各个实施方案中,每个单体亚基-----独立地是单链寡核苷酸——。在一些此类所述方案中,m为1——(结构34);m为2——(结构39);m为3——(结构35);m为4——(结构40);或m为5——(结构37)。在一些此类所述方案中,m为6、7、8、9、10、11或12。在一些此类所述方案中,m为 ≥ 13 的整数。在一些此类所述方案中,至少一个单链寡核苷酸——是反义寡核苷酸。在一些此类所述方案中,每个单链寡核苷酸——独立地是反义寡核苷酸。

在各个实施方案中,多聚寡核苷酸包含基本上相同寡核苷酸的同源多聚体。基本上相同的寡核苷酸可以是靶向体内相同分子靶标的siRNA。基本上相同的寡核苷酸可以是靶向体内相同分子靶标的miRNA。基本上相同的寡核苷酸可以是靶向体内相同分子靶标的反义寡核苷酸。基本上相同的寡核苷酸可以是靶向体内相同分子靶标的siRNA、miRNA和/或反义RNA的组合。

在各个实施方案中,多聚寡核苷酸包含两个或更多个基本上不同的寡核苷酸的异源多聚体。基本上不同的寡核苷酸可以是靶向体内不同分子靶标的siRNA。基本上不同的寡核苷酸可以是靶向体内不同分子靶标的miRNA。基本上不同的寡核苷酸可以是靶向体内不同分子靶标的反义寡核苷酸。基本上不同的寡核苷酸可以是靶向体内不同分子靶标的siRNA、miRNA和/或反义RNA的组合。

聚合物接头(例如聚乙二醇(PEG))已经被用于尝试增加某些药物的循环半衰期。此类方法可能具有缺点,包括“稀释”治疗剂(例如,每单位质量的活性剂更少)。本公开内容可以区别于此类方法。例如,在各个实施方案中,多聚寡核苷酸不包含PEG。在各个实施方案中,多聚寡核苷酸不包含聚醚化合物。在各个实施方案中,多聚寡核苷酸不包含除了寡核苷酸之外的聚合物。

纳米颗粒(NP)(例如脂质纳米颗粒(LNP))已经被用于尝试增加某些药物的循环半衰期。此类方法可能具有缺点,包括增加的毒性(例如,来自阳离子脂质)。本公开内容可以区别于此类方法。例如,在各个实施方案中,多聚寡核苷酸没有配制在NP或LNP中。

硫代磷酸酯基团已经被用于尝试增加某些药物的循环半衰期。此类方法可能具有缺点,包括较低的活性(例如,由于寡核苷酸/血浆蛋白聚集)。本公开内容可以区别于此类方法。例如,在各个实施方案中,多聚寡核苷酸不包含硫代磷酸酯。

在各个实施方案中,多聚寡核苷酸还包含一个或更多个靶向配体。在各个实施方案中,多聚寡核苷酸基本上由结构21和任选的靶向配体组成。多聚寡核苷酸可以使用本文讨论的任何靶向配体(参见,例如,以下靶向配体部分)。在各个实施方案中,靶向配体与寡核苷酸亚基和/或相邻寡核苷酸亚基之间的接头缀合。在各个实施方案中,靶向配体可以通过寡核苷酸的3'或5'末端与其缀合。

多聚寡核苷酸可以使用本文中讨论的任何接头(参见,例如以上接头部分)。在各

个实施方案中,每个共价接头 $\bullet$ 是相同的。在各个实施方案中,多聚寡核苷酸包含两个或更多个不同的共价接头 $\bullet$ 。在各个实施方案中,一个或更多个 $\bullet$ 包含可裂解共价接头。在一些情况下,可裂解的接头可以是特别有利的。例如,细胞内裂解可以在细胞靶向和进入后将单个多聚寡核苷酸转化为多个生物活性寡核苷酸(例如,单个siRNA构建体可以递送四个或更多个活性siRNA),从而增加效力并且减少不期望的副作用。

在各个实施方案中,一个或更多个 $\bullet$ 包含核苷酸接头(例如,可裂解核苷酸接头,例如UUU)。可替代地,在一些实施方案中,多聚寡核苷酸明确地排除核苷酸接头。

在各个实施方案中,该化合物是分离的或基本上纯的。例如,该化合物可以是至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。在一个实施方案中,该化合物是约85%-95%纯的。同样,用于合成根据本公开内容的化合物和组合物的方法可以产生至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的产物。在一种实施方案中,产物是约85%-95%纯的。制剂可以大于或等于50%纯;优选地大于或等于75%纯;更优选地大于或等于85%纯;并且仍更优选地大于或等于95%纯。

在各个实施方案中,每个寡核苷酸是RNA、DNA或包含人工或非天然核酸类似物。在各个实施方案中,至少一个寡核苷酸是siRNA、miRNA或反义寡核苷酸。各种其他可能的寡核苷酸和取代在例如上述核酸部分中讨论。

在各个实施方案中,每个寡核苷酸的长度为15-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。在各个实施方案中,核酸或寡核苷酸的长度为15-30、17-27、19-26、20-25、40-50、40-150、100-300、1000-2000或至多10000个核苷酸。

在各个实施方案中,包含结构21的多聚寡核苷酸的分子量为至少约40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64或65kD。在各个实施方案中,包含结构21的多聚寡核苷酸的分子量为至少约40-45、45-50、50-55、55-60、60-65、65-70或70-75kD。分子量可以包括与多聚寡核苷酸缀合的所有物质,例如靶向配体和接头。

虽然包含结构21的多聚寡核苷酸可以通过各种方法(例如,本文所述的用于制备四聚体或更多多聚体的那些)合成,但是某些结果可能需要特定的方法。例如,以下方法(以及实施例22中所示的那些)被设计成有效地产生在同一链上具有每个共价接头 $\bullet$ 的多聚体。

例如,在一方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构34的多聚寡核苷酸的方法:



其中,每个——是单链寡核苷酸并且每个 $\bullet$ 是接合相邻单链寡核苷酸的共价接头,该方法包括以下步骤:

(i) 使——●——○和——●——R1反应,其中○是连接部分并且R1是能够与连接部分○反应的化学基团,从而形成——●——●——●—— (结构34),以及

(ii) 任选地使——●——●——●—— (结构34) 与互补的单链寡核苷酸退火,从而形成——●——●——●—— (结构28)。

例如,在一个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构35的多聚寡核苷酸

的方法:



其中每个——是单链寡核苷酸并且每个·是接合相邻单链寡核苷酸的共价接头,该方法包括以下步骤:

(i) 使——和——R1反应,其中0是连接部分并且R1是能够与连接部分0反应的化学基团,从而形成



(ii) 任选地使——(结构35)与互补的单链寡核苷酸退火,从而形成——(结构36)。

例如,在一个方面,本公开内容提供了一种用于合成包含结构37的多聚寡核苷酸的方法:



其中每个——是单链寡核苷酸并且每个·是接合相邻单链寡核苷酸的共价接头,该方法包括以下步骤:

(i) 使——和——R1反应,其中00是连接部分并且R1是能够与连接部分0反应的化学基团,从而形成——(结构37), 以及

(ii) 任选地使——(结构37)与互补的单链寡核苷酸退火,从而形成



本公开内容还提供了用于合成单链多聚寡核苷酸的方法,例如其中m为2——(结构39); m为4——(结构40); m为6、7、8、9、10、11或12; 或m ≥ 13 (参见以下实施例22)。

多聚化合物可以包括本文公开的任一个或更多个特征。例如,该化合物可以包含本文所述的任一种或更多种核酸(有或没有修饰)、靶向配体和/或接头,或发明内容、说明书或实施例中所示的任何特定结构或化学物质。同样,该化合物可以以发明内容、说明书或实施例中所示的组合物(例如,用于实验或医学用途)中的一种来制备。说明性实例在以下药物组合物部分中提供。

寡核苷酸摄取和清除

血液流中药物的生物利用度可以表征为靶细胞摄取与肾清除之间的平衡。从实践角度来看,体内循环半衰期和/或体内活性是肾清除/肾小球滤过的良好指标,因为它们可以很容易地量化和测量并且因为它们的改善(例如增加)可以与改善的药效学和/或药代动力学有关。

血液中治疗剂(例如寡核苷酸(ONT))的摄取率是许多因素的函数,其可以表示为: 摄取率 = f { (ONT浓度) x (血液流速) X (受体拷贝数/细胞) x (细胞数) x (平衡解离常数 K_D) x (内化率) }。对于给定的配体/受体对,拷贝数、 K_D 、细胞数和内化率是恒定的。这可以解释为什么GalNAc配体系统对肝细胞如此有效——它靶向以高拷贝数存在的ASGP受体。一些

ASGP/GalNAc变体的 K_D 在纳摩尔范围内并且内化率非常高。

然而,有效靶向还取决于ONT浓度,由于从血液流中清除,故该ONT浓度随时间迅速降低。治疗剂的清除率可以表示为:清除率= $f\{(\text{血液流速}) \times (\text{肾滤过率}) \times (\text{其他清除机制})\}$ 。在时间 t 产生的ONT浓度可以表示为:(ONT浓度) $t=f\{(\text{初始浓度}) - (\text{清除率} \times t)\}$ 。

在人中,清除主要是由于肾中的肾小球滤过。通常,小于约45kD的分子的半衰期为约30分钟。在小鼠中,清除率甚至更快,循环半衰期为约5分钟。不希望受任何特定理论的束缚,据信本公开内容可以使用特定配置的多聚寡核苷酸(例如,特定的组成、大小、重量等)减少肾小球滤过,导致较低的清除率,导致在给定的时间 t 时循环中ONT浓度更高(例如,血清半衰期增加、总摄取更高和活性更高)。

同样,不希望受任何特定理论的束缚,实际肾小球滤过率可能难以直接测量。例如,通过肾小球毛细血管的化合物很容易被细胞(例如肾小管上皮细胞)吸收,该细胞可以在很长一段时间内保留如siRNA的化合物(参见,例如,Henry, S.P.等;Toxicology, 301, 13-20 (2012) 和van de Water, F.M等;Drug metabolism and Disposition, 34, 第8期, 1393-1397 (2006)。另外,吸收的化合物可以代谢为分解产物,其然后分泌到尿中。因此,在特定时间点的治疗剂(例如,siRNA)的浓度(例如,在尿中)可能不一定代表肾小球滤过率。然而,血清半衰期与肾小球滤过有关并且可直接测量,可以被认为是肾小球滤过的合适代表。

以下表1示出了增加组分的循环半衰期($t_{1/2}$)可以对时间 t 时组分的所得浓度产生的显著影响:

表1-增加循环半衰期($t_{1/2}$)对时间 t 时的浓度的影响。

| t (min) : | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 210 | 240 |
|------------------|-----|----|----|------|------|------|------|------|------|
| 30min $t_{1/2}$ | 100 | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 0.4 |
| 60min $t_{1/2}$ | 100 | | 50 | | 25 | | 12.5 | | 6.25 |
| 90min $t_{1/2}$ | 100 | | | 50 | | | 25 | | |
| 120min $t_{1/2}$ | 100 | | | | 50 | | | | 25 |

值表示为时间 t 时的初始剂量%。

因此,组分的半衰期增加2倍将其在2小时时的残留浓度增加4倍。半衰期增加4倍导致残留浓度的更显著改善-分别地在2小时8倍和在4小时大于60倍。

典型的siRNA(例如,双链单体)的分子量为约15kD。根据本公开内容的siRNA四聚体的分子量可以为约60kD。不希望受任何特定理论的束缚,据信此类多聚体(四聚体、五聚体等)可以被配置为其分子大小和/或分子量导致减少的体内肾小球滤过。此类多聚体具有增加的循环半衰期。因此,相对于单个单体亚基的体内循环半衰期和/或体内活性,根据本公开内容的多聚体可以被配置为其体内循环半衰期增加和/或体内活性增加。此外,如果由合适的靶向配体引导,则多聚体(例如,四聚体)比单体等效物在每个配体/受体结合事件中递送许多倍(例如,四倍)的有效载荷。组合起来,这些作用可以导致治疗剂的生物利用度和摄取的显著增加。在拷贝数、KD、靶细胞数和给定配体/受体对的内化率的一些组合不是最佳的情况下,这可能是特别有利的。

因此,多聚寡核苷酸具有选择以下的结构:(a)相对于单个单体亚基的半衰期增加多聚寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于个体单体亚基的体内活性增加多聚寡核苷酸的体内活性。例如,为了该目的,可以配置多聚寡核苷酸的分子大小和/或分子量。

药物组合物

在各个方面,本公开内容提供了包含上述任一种或更多种化合物或组合物的药物组合物。如本文所用,药物组合物变化可用于预防、诊断、缓解、治疗或治愈疾病的物质(除了食物)的组合物。类似地,根据本公开内容的各种化合物或组合物应理解为包括用作药物和/或用于制造药物的实施方案。

药物组合物可以包含根据本公开内容的化合物或组合物和药学上可接受的赋形剂。如本文所用,赋形剂可以是与活性成分一起配制的天然或合成物质。为了以下目的,可以包含赋形剂:长期稳定、增加体积(例如填充剂、填料或稀释剂)或赋予最终剂型中的活性成分的治疗增强,例如促进药物吸收、减少粘度或提高溶解度。赋形剂也可用于制造和分配,例如,帮助处理活性成分和/或帮助体外稳定性(例如,通过防止变性或聚集)。本领域技术人员将理解,适当的赋形剂选择可以取决于多种因素,包括施用途、剂型和活性成分。

寡核苷酸可以局部或全身递送,并且本公开内容的药物组合物可以相应地变化。例如,施用不一定限于任何特定的递送系统并且可以包括但不限于肠胃外(包括皮下、静脉内、髓内、关节内、肌内或腹膜内注射)、经直肠、局部、经皮或经口。向个体施用可以以单个剂量或重复施用并且多种生理学上可接受的盐形式中的任一种和/或与作为药物组合物的一部分的可接受的药物载体和/或添加剂一起发生。生理学上可接受的制剂和标准药物配制技术、剂量和赋形剂是本领域技术人员众所周知的(参见,例如Physicians' Desk Reference(PDR®)2005,第59版,Medical Economics Company,2004;和Remington:The Science and Practice of Pharmacy,eds.Gennado等.第21版,Lippincott,Williams&Wilkins,2005)。

药物组合物可以包含有效量的根据本公开内容的化合物或组合物。如本文所用,有效量可以是导致实现特定规定目的浓度或量,或更多的量意指足以引起改变的量,例如与安慰剂相比。当有效量是治疗有效量时,它可以是足以用于治疗用途的量,例如足以预防、诊断、缓解、治疗或治愈疾病的量。有效量可以通过本领域已知的方法确定。有效量可以依经验确定,例如通过人临床试验。还可以使用本领域已知的转换因子从一种动物(例如,小鼠、大鼠、猴、猪、狗)外推有效量以用于另一种动物(例如,人)。参见,例如,Freireich等,Cancer Chemother Reports 50(4):219-244(1966)。

递送载剂和靶向配体

在各个方面,本公开内容提供了配制在递送载剂中的上述任一种或更多种化合物或组合物。例如,递送载剂可以是脂质纳米颗粒(LNP)、外泌体、微囊泡或病毒载体。类似地,在各个方面,本公开内容提供了上述任一种或更多种化合物或组合物并且还包含靶向配体。例如,靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、胆固醇、生育酚、叶酸、2-[3-(1,3-二羧丙基)-脲基]戊二酸(DUPA)、茴香酰胺、磷脂、磷脂酰胆碱、卵磷脂或免疫刺激剂。免疫刺激剂可以是CpG寡核苷酸,例如TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT(SEQ ID NO:162)或GGTGCATCGATGCAGGGGG(SEQ ID NO:163)的CpG寡核苷酸。靶向配体可以使多聚寡核苷酸构建体直接或间接地与核酸结合,例如通过其3'或5'末端与内部核酸残基或构建体内的接头。在一些实施方案中,两个靶向配体与多聚寡核苷酸缀合,其中一个配体通过寡核苷酸的3'末端缀合并且另一个配体通过寡核苷酸的5'末端缀合。一个或更多个靶向配体可以与寡核苷酸的有义链或反义链或有义链和反义链二者缀合。可适于与本公开内容一起使用的另

外的实例以下讨论。

如本领域技术人员将理解的,无论生物靶标或作用机制如何,治疗性寡核苷酸必须克服一系列生理障碍以进入生物体(例如,动物,例如人,需要治疗的)的靶细胞。例如,治疗性寡核苷酸通常必须避免在血液流中清除,进入靶细胞类型,并且然后进入细胞质,所有这些不会引发不期望的免疫反应。该过程通常被认为是低效的,例如,进入体内核内体的95%或更多的siRNA可能在溶酶体中降解或被推出细胞而不影响任何基因沉默。

为了克服这些障碍,科学家已经设计了多种药物递送载剂。除了小分子药物、蛋白质药物和其他治疗分子之外,这些载剂已经用于递送治疗性RNA。药物递送载剂由材料制成,例如糖、脂质、类脂质材料、蛋白质、聚合物、肽、金属、水凝胶、缀合物和肽。许多药物递送载剂并入了这些组的组合的方面,例如,一些药物递送载剂可以组合糖和脂质。在一些其他实施例中,药物可以直接隐藏在旨在模拟细胞的“类细胞”材料中,而在另一些情况下,药物可以放入细胞本身中或置于细胞本身上。药物输送载剂可以被设计为响应刺激(例如pH变化、生物分子浓度、磁场和热量)释放药物。

许多工作集中在将寡核苷酸(例如siRNA)递送到肝。在过去十年中,将siRNA体内有效递送到肝细胞所需的剂量减少了超过10,000倍——而2006年报道的递送载剂可能需要超过10mg/kg siRNA来产生靶蛋白质,在新的递送载剂的情况下,现在靶蛋白质产生可以在全身注射0.001mg/kg siRNA后减少。寡核苷酸递送效率的增加可以至少部分归因于递送载剂的发展。

另一个重要的进步是对辅助组分影响递送的方式的理解增加。辅助组分可以包含添加到主要药物递送系统的化学结构。通常,辅助组分可以提高颗粒稳定性或向特定器官的递送。例如,纳米颗粒可以由脂质制成,但是由这些脂质纳米颗粒介导的递送可能受到亲水聚合物和/或疏水分子的存在的影响。一种影响纳米颗粒递送的重要亲水聚合物是聚(乙二醇)。其他亲水聚合物包括非离子表面活性剂。影响纳米颗粒递送的疏水分子包括胆固醇、1-2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1-2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、1,2-二油酰-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)等。

也已经使用靶向配体或缀合物系统设计了药物递送系统。例如,寡核苷酸可以与胆固醇、糖、肽和其他核酸缀合,以促进递送到肝细胞和/或其他细胞类型中。此类缀合系统可以通过与特定受体结合来促进递送到特定细胞类型中。

本领域技术人员将理解,已知的递送载剂和靶向配体通常可以适于根据本公开内容的用途。递送载剂和靶向配体及其用途的实例可以在以下中找到:Sahay,G.等Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling.Nat Biotechnol,31:653-658(2013);Wittrup,A.等Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown.Nat Biotechnol(2015);Whitehead,K.A.,Langer,R.和Anderson,D.G.Knocking down barriers:advances in siRNA delivery.Nature reviews.Drug Discovery,8:129-138(2009);Kanasty,R.,Dorkin,J.R.,Vegas,A.和Anderson,D.Delivery materials for siRNA therapeutics.Nature Materials,12:967-977(2013);Tibbitt,M.W.,Dahlman,J.E.和Langer,R.Emerging Frontiers in Drug Delivery.JAm Chem Soc,138:704-717(2016);Akinc,A.等Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and

exogenous ligand-based mechanisms. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18,1357-1364 (2010); Nair, J.K. 等 Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc*, 136:16958-16961 (2014); Ostergaard, M.E. 等 Efficient Synthesis and Biological Evaluation of 5'-GalNAc Conjugated Antisense Oligonucleotides. *Bioconjugate chemistry* (2015); Sehgal, A. 等 An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nature Medicine*, 21:492-497 (2015); Semple, S.C. 等 Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*, 28:172-176 (2010); Maier, M.A. 等 Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21:1570-1578 (2013); Love, K.T. 等 Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. *Proc Nat Acad USA*, 107:1864-1869 (2010); Akinc, A. 等 A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol*, 26:561-569 (2008); Eguchi, A. 等 Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nat Biotechnol*, 27:567-571 (2009); Zuckerman, J.E. 等 Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proc Nat Acad USA*, 111:11449-11454 (2014); Zuckerman, J.E. 和 Davis, M.E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14:843-856 (2015); Hao, J. 等 Rapid Synthesis of a Lipocationic Polyester Library via Ring-Opening Polymerization of Functional Valerolactones for Efficacious siRNA Delivery. *J Am Chem Soc*, 29:9206-9209 (2015); Siegwart, D.J. 等 Combinatorial synthesis of chemically diverse core-shell nanoparticles for intracellular delivery. *Proc Nat Acad USA*, 108:12996-13001 (2011); Dahlman, J.E. 等 In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nat Nano* 9, 648-655 (2014); Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. 和 Rudzinski, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 70, 1-20 (2001); Kim, H.J. 等 Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano*, 8:8979-8991 (2014); Krebs, M.D., Jeon, O. 和 Alsberg, E. Localized and sustained delivery of silencing RNA from macroscopic biopolymer hydrogels. *J Am Chem Soc* 131, 9204-9206 (2009); Zimmermann, T.S. 等 RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441:111-114 (2006); Dong, Y. 等 Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates. *Proc Nat Acad USA*, 111:3955-3960 (2014); Zhang, Y.

等Lipid-modified aminoglycoside derivatives for in vivo siRNA delivery. *Advanced Materials*, 25:4641-4645 (2013); Molinaro, R. 等Biomimetic proteolipid vesicles for targeting inflamed tissues. *Nat Mater* (2016); Hu, C.M. 等Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature*, 526:118-121 (2015); Cheng, R., Meng, F., Deng, C., Klok, H.-A. 和Zhong, Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials*, 34:3647-3657 (2013); Qiu, Y. 和Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, Supplement, 49-60 (2012); Mui, B.L. 等Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e139 (2013); Draz, M.S. 等Nanoparticle-Mediated Systemic Delivery of siRNA for Treatment of Cancers and Viral Infections. *Theranostics*, 4:872-892 (2014); Otsuka, H., Nagasaki, Y. 和Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 403-419 (2003); Kauffman, K.J. 等Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Letters*, 15:7300-7306 (2015); Zhang, S., Zhao, B., Jiang, H., Wang, B. 和Ma, B. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release* 123, 1-10 (2007); Illum, L. 和Davis, S.S. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxamer 338). *FEBS Letters*, 167:79-82 (1984); Felgner, P.L. 等Improved Cationic Lipid Formulations for In vivo Gene Therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 772:126-139 (1995); Meade, B.R. 和Dowdy, S.F. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59:134-140 (2007); Endoh, T. 和Ohtsuki, T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61:704-709 (2009); 和Lee, H. 等Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nat Nano*, 7:389-393 (2012)。

在各个实施方案中,本公开内容的化合物和组合物可以与其他化学或生物部分(包括例如生物活性部分)缀合或一起递送。生物活性部分是具有生物效应(优选可测量的生物效应)的任何分子或试剂。化学或生物部分包括例如蛋白质、肽、氨基酸、核酸(包括例如所有类型的DNA、RNA、RNA和DNA适体、反义寡核苷酸和反义miRNA抑制剂)、靶向配体、碳水化合物、多糖、脂质、有机化合物和无机化合物。

如本文所用,术语靶向配体可以包括这样的部分,为了将纳米颗粒或递送缀合物的有效载荷递送到特定靶标(例如特定的身体组织或细胞类型)的目的(例如通过使纳米颗粒或递送缀合物能够与细胞受体附接),其可以在纳米颗粒表面上通过或作为递送缀合物(例如,多缀合物寡核苷酸或多聚寡核苷酸)的一部分。合适的靶向配体的实例包括但不限于细胞特异性肽或蛋白质(例如转铁蛋白和单克隆抗体)、磷脂、磷脂酰胆碱、卵磷脂、适体、

细胞生长因子、维生素(例如叶酸)、单糖(例如,半乳糖和甘露糖)、多糖、精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)和衍生自N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)的无唾液酸糖蛋白受体配体。可以使用本领域已知的多种技术(例如通过共价键,例如二硫键、酰胺键或酯键,或通过非共价键,例如生物素-链霉亲和素或金属-配体复合物)将配体并入本公开内容的前述化合物中。

本公开内容范围内的其他生物活性部分是任何已知的基因编辑材料,包括例如包含在CRISPR/Cas系统、TALES、TALEN和锌指核酸酶(ZFN)中的寡核苷酸、多肽和蛋白质的材料。

在各个实施方案中,本公开内容的化合物和组合物可以包封在载体材料中以形成用于细胞内递送的纳米颗粒。已知的载体材料包括阳离子聚合物、脂质或肽,或其化学类似物。Jeong等,BIOCONJUGATE CHEM.,第20,第1期,第5-14页(2009)。阳离子脂质的实例包括二油酰磷脂酰乙醇胺、胆固醇二油酰磷脂酰胆碱、N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、1,2-二油酰氧基-3-(三甲基氨基)丙烷(DOTAP)、1,2-二油酰-3-(4'-三甲基-氨基)丁酰-sn-甘油(DOTB)、1,2-二酰基-3-二甲基铵-丙烷(DAP)、1,2-二酰基-3-三甲基铵-丙烷(TAP)、1,2-二酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(DC-胆固醇)、二甲基二十八烷基溴化铵(DDAB)及其共聚物。阳离子聚合物的实例包括聚乙烯亚胺、聚胺、聚乙烯胺、聚(烷基胺盐酸盐)、聚酰胺胺树枝状聚合物、二乙氨基乙基-葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、甲壳质、壳聚糖和聚(2-二甲氨基)甲基丙烯酸乙酯。在一个实施方案中,载体包含一种或更多种酰化胺,与其他已知载体材料相比,其特性可能更适用于体内使用。

在一个实施方案中,载体是阳离子肽,例如KALA(阳离子融合肽)、聚赖氨酸、聚谷氨酸或鱼精蛋白。在一个实施方案中,载体是阳离子脂质,例如二油酰磷脂酰乙醇胺或胆固醇二油酰磷脂酰胆碱。在一个实施方案中,载体是阳离子聚合物,例如聚乙烯亚胺、聚胺或聚乙烯胺。

在各个实施方案中,本公开内容的化合物和组合物可以包封在外来体中。外来体是存在于生物体液中(包括血液、尿液和细胞培养物的培养基)的直径为30至100nm的细胞衍生囊泡。根据本领域技术人员,外来体(包括合成外来体和外来体模拟物)可以适用于药物递送。参见,例如,“A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles-endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy”*Biochim Biophys Acta*.1846(1):75-87(2014);“Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes:current perspectives and future challenges”*Acta Pharmaceutica Sinica B*,Available online 8March 2016(In Press);和“Exosome mimetics:a novel class of drug delivery systems”*International Journal of Nanomedicine*,7:1525-1541(2012)。

在各个实施方案中,本公开内容的化合物和组合物可以包封在微囊泡中。微囊泡(有时被称为循环微囊泡或微颗粒)是从几乎所有细胞类型脱落的100nm至1000nm的质膜片段,并且与被称为外来体的较小的细胞内生成的细胞外囊泡不同。微囊泡在细胞间通讯中发挥作用,并且可以在细胞间运输mRNA、miRNA和蛋白质。根据本领域技术人员,微囊泡(包括合成微囊泡和微囊泡模拟物)可以适用于药物递送。参见,例如,“Microvesicle-and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in

autologous prostate cancer cells”*Journal of Controlled Release*,220:727-737 (2015);“Therapeutic Uses of Exosomes”*J Circ Biomark*,1:0(2013)。

在各个实施方案中,本公开内容的化合物和组合物可以使用病毒载体递送。病毒载体是分子生物学家常用的将遗传物质传递到细胞中的工具。该过程可以在活生物体内(体内)或细胞培养(体外)中进行。根据本领域技术人员,病毒载体可以适用于药物递送。参见,例如,“Viruses as nanomaterials for drug delivery”*Methods Mol Biol*,26:207-21(2011);“Viral and nonviral delivery systems for gene delivery”*Adv Biomed Res*,1:27(2012);和“Biological Gene Delivery Vehicles:Beyond Viral Vectors”*Molecular Therapy*,17(5):767-777(2009)。

LNP制剂和表征的一般程序在以下实施例,以及LNP制剂和其他体外和体内试验的工作实施例中提供。其他方法是本领域已知的并且可以被普通技术人员修改以用于本公开内容。

用于治疗或减少基因表达的方法

在各个方面,本公开内容提供了使用多缀合物寡核苷酸的方法,例如用于医学治疗、研究或用于在动物和植物中产生新的或改变的表型。

在一方面,本公开内容提供了一种用于治疗受试者的方法,包括向有此需要的受试者施用有效量的根据本公开内容的化合物或组合物。在此类治疗性实施方案中,寡核苷酸是治疗性寡核苷酸,例如siRNA或miRNA。例如,在一个实施方案中,多聚寡核苷酸包含一种或更多种可用于治疗癌症的治疗性寡核苷酸。

在该实施方案和另一些实施方案中,本公开内容的组合物和化合物可以以药物组合物的形式、在递送载剂中或与靶向配体偶联施用。

在一方面,本公开内容提供了一种用于沉默或减少基因表达的方法,包括向有此需要的受试者施用有效量的根据本公开内容的化合物或组合物。在此类治疗实施方案中,寡核苷酸是沉默或减少基因表达的寡核苷酸,例如siRNA或反义寡核苷酸。

类似地,本公开内容提供了一种用于沉默或减少两种或更多种基因表达的方法,包括向有此需要的受试者施用有效量的根据本公开内容的化合物或组合物,其中该化合物或组合物包含靶向两种或更多种基因的寡核苷酸。该化合物或组合物可以包含靶向两种、三种、四种或更多种基因的寡核苷酸。

在一方面,本公开内容提供了一种用于在每个靶向配体结合事件中将两种或更多种寡核苷酸递送到细胞中的方法,包括向有此需要的受试者施用有效量的根据本公开内容的化合物或组合物,其中该化合物或组合物包含靶向配体。

在一方面,本公开内容提供了一种用于将预定化学计量比的两种或更多种寡核苷酸递送到细胞中的方法,包括向有此需要的受试者施用有效量的根据本公开内容的化合物或组合物,其中该化合物或组合物包含预定化学计量比的两种或更多种寡核苷酸。

如本文所用,受试者包括经受治疗或施用的细胞或生物体。受试者可以是动物,例如哺乳动物(例如实验室动物(小鼠、猴)或兽医患者)或灵长目动物(例如人)。没有限制地,需要治疗或施用的受试者可以包括患有疾病的受试者(例如,可以使用本公开内容的化合物和组合物治疗)或患有病症的受试者(例如,可以使用本公开内容的化合物和组合物来处理,例如一种或更多种要沉默或表达已经减少的基因)。

用于测量基因敲低和动物实验的一般程序在以下实施例,以及其他体外和体内测试的工作实施例中提供。其他方法是本领域已知的并且可以被普通技术人员修改以用于本公开内容。

以下实施例是说明性的而非限制性的。在阅读本公开内容后,该技术的许多变化对本领域技术人员是显而易见的。因此,该技术的范围不应参考实施例来确定,而是应参考所附权利要求书及其全部等效范围来确定。

实施例

一般程序1:单链寡核苷酸合成

使用亚磷酰胺化学物质,在ABI 394和3900合成仪 (Applied Biosystems) 上以10 μ mol规模或在Oligopilot 10合成仪上以28 μ mol规模组装寡核糖核苷酸。固体支持物是负载有2'-脱氧胸苷的聚苯乙烯 (Glen Research, Sterling, Virginia, USA) 或可控孔玻璃 (CPG, 520 $\text{\AA}$, 负载量为75 μ mol/g, 从Prime Synthesis, Aston, PA, USA获得)。辅助合成试剂DNA-, 2'-O-甲基RNA-和2'-脱氧-2'-氟-RNA亚磷酰胺是从SAFC Proligo (Hamburg, Germany) 获得的。具体地,使用2'-O-甲基-尿苷 (2'-OMe-U) 的5'-O- (4,4'-二甲氧基三苯甲基) -3'-O- (2-氰乙基-N,N-二异丙基) 亚磷酰胺单体、4-N-乙酰基-2'-O-甲基-胞苷 (2'-OMe-CAC)、6-N-苯甲酰基-2'-O-甲基-腺苷 (2'-OMe-Abz) 和2-N-异丁酰鸟苷 (2'-OMe-GiBu) 来构建寡聚体序列。使用携带有与2'-OMe RNA构建嵌段相同的核碱基保护基团的相应亚磷酰胺引入2'-氟修饰。使用5-乙硫基-1H-四唑 (ETT, 乙腈中0.5M) 作为活化剂,所有亚磷酰胺 (乙腈中70mM) 的偶联时间为3min。使用1:1 (v/v) 吡啶和乙腈的混合物中的50mM 3- ((二甲基氨基-亚甲基) 氨基) -3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮 (DDTT, AM Chemicals, Oceanside, California, USA) 引入硫代磷酸酯连接。

在完成包括除去DMT基团的固相合成 (“DMT关闭合成”) 后,根据公开的方法,从固相支持物上裂解寡核苷酸并且使用由甲胺水溶液 (41%) 和浓氨水 (32%) 组成的1:1混合物在25 $^{\circ}\text{C}$ 下去保护3小时 (Wincott, F. 等 Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. Nucleic Acids Res, 23:2677-2684 (1995))。

随后,通过阴离子交换HPLC使用填充有Source Q15的柱 (GE Healthcare) 和AKTA Explorer系统 (GE Healthcare) 纯化粗寡聚物。缓冲液A是在20%乙腈水溶液中的10mM高氯酸钠、20mM Tris、1mM EDTA, pH 7.4 (Fluka, Buchs, Switzerland), 并且缓冲液B与缓冲液A相同,含有500mM高氯酸钠。使用32个柱体积 (CV) 内22%B到42%B的梯度。记录了280nm处的UV迹线。合并适当的级分并且使用3M NaOAc (pH=5.2) 和70%乙醇沉淀。通过离心收集沉淀物 (pellet)。可替代地,根据制造商的建议,使用Sephadex HiPrep柱 (GE Healthcare) 进行脱盐。

在水中重构寡核苷酸并且通过电喷雾电离质谱法 (ESI-MS) 确认寡核苷酸的身份。通过分析型阴离子交换HPLC评估纯度。

一般程序2:脂质纳米颗粒制剂

1,2-二硬脂酰基-3-磷脂酰胆碱 (DSPC) 购自Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)。 α -[3'- (1,2-二肉豆蔻酰基-3-丙氧基) -甲酰胺-丙基]- ω -甲氧基-聚氧乙烯 (PEG-c-DMG) 是从NOF (Bouwelven, Belgium) 获得的。胆固醇购自Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)。

专有的氨基脂质KL22和KL52在专利文献中公开 (Constien等“Novel Lipids and Compositions for Intracellular Delivery of Biologically Active Compounds”US 2012/0295832 A1)。在乙醇中制备浓度为50mM的KL52和KL22脂质、DSPC、胆固醇和PEG-c-DOMG的储备溶液,并且在-20℃下储存。将脂质组合以产生各种摩尔比(参见以下各个实施例)并且用乙醇稀释至最终脂质浓度25mM。将在H₂O中浓度为10mg/mL的siRNA储备溶液在50mM柠檬酸钠缓冲液(pH 3)中稀释。在以下实施例中,KL22和KL52有时分别被称为XL 7和XL 10。

通过将脂质溶液与siRNA溶液以7:1的总脂质与siRNA重量比组合制备脂质纳米颗粒(LNP)制剂。将脂质乙醇溶液快速注射到siRNA水溶液中以得到含有33%乙醇的悬浮液。在注射泵(Harvard Pump 33Dual Syringe Pump Harvard Apparatus Holliston,MA)的帮助下注射溶液。

随后,使用具有10kD的MWC0(RC膜)的Slide-A-Lyzer盒(Thermo Fisher Scientific Inc.Rockford,IL)以200倍于初级产物的体积对pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)透析制剂2次以除去乙醇并且实现缓冲液交换。第一次透析在室温下进行3小时,并且然后将制剂在4℃下透析过夜。将所得纳米颗粒悬浮液通过0.2μm无菌过滤器(Sarstedt,Nümbrecht,德国)过滤到玻璃小瓶中并且用卷边封口密封。

一般程序3:LNP表征

分别使用在1X PBS和15mM PBS中的Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd,Malvern,Worcestershire,UK)确定制剂的粒径和zeta电位。

通过UV-vis测量脂质体制剂中的siRNA浓度。简而言之,将在1X PBS中的100μL稀释制剂添加到900μL的4:1(v/v)甲醇和氯仿混合物中。混合后,在DU 800分光光度计(Beckman Coulter,Beckman Coulter,Inc.,Brea,CA)上记录溶液的230nm至330nm的吸收光谱。基于制剂中使用的siRNA的消光系数和260nm波长处的吸光度与330nm波长处的基线值之间的差异计算脂质体制剂中的siRNA浓度。

通过Quant-iT™**RiboGreen**®RNA测定(Invitrogen Corporation Carlsbad,CA)评价纳米颗粒对siRNA的包封。简而言之,将样品在TE缓冲液(10mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH 7.5)中稀释至约5μg/mL的浓度。将50μL稀释样品转移到聚苯乙烯96孔板中,然后添加50μL TE缓冲液或50μL 2%Triton X-100溶液。将板在37℃温度下孵育15分钟。将RiboGreen试剂在TE缓冲液中1:100稀释,向每个孔添加100μL该溶液。使用荧光板读数器(Wallac Victor 1420Multilabel Counter;Perkin Elmer,Waltham,MA)在约480nm的激发波长和约520nm的发射波长下测量荧光强度。从每个样品的荧光值中减去试剂空白的荧光值,并且通过将完整样品(没有添加Triton X-100)的荧光强度除以破碎样品(由添加Triton X-100引起)的荧光值确定游离siRNA的百分比。

一般程序4:动物实验

小鼠品系C57BL/6N用于所有体内实验。动物是从Charles River(Sulzfeld, Germany)获得的,并且在实验时为6至8周龄。静脉内施用的制剂通过将200μL灌注到尾静脉中注射。皮下施用的化合物以100-200μL的体积注射。在注射前一天(“预出血”)和注射后实验期间在指定时间通过下颌下静脉出血收集血液。使用血清分离管(Greiner Bio-One, Frickenhausen,Germany)分离血清并且保持冷冻直至分析。化合物施用后7天,小鼠通过吸

入CO₂麻醉并且通过颈椎脱臼处死。通过心脏穿刺收集血液并且如上所述分离血清。收获用于mRNA量化的组织并且立即在液氮中快速冷冻。

一般程序5:基因敲低的测量

使用以下方法实现血清蛋白水平的确定:按照制造商的建议,使用显色酶活性测定BIOPHEN FVII (#221304,Hyphen BioMed,MariaEnzersdorf,Austria)分析因子VII。分析前1:3000稀释小鼠血清。使用Victor 3多标记计数器(Perkin Elmer,Wiesbaden,Germany)测量405nm处的比色显影的吸光度。

通过ELISA(CloudClone Corp./Hoelzel Diagnostics,Cologne,Germany,#SEC003Mu)测量血清中的ApoB蛋白。根据制造商的说明书处理1:5000稀释的小鼠血清,并且使用Victor 3多标记计数器(Perkin Elmer,Wiesbaden,Germany)测量450nm处的吸光度。

通过ELISA(#KA2070,Novus Biologicals,/Biotechnie,Wiesbaden,Germany)测量血清中的甲状腺素运载蛋白(TTR,也称为前白蛋白)蛋白。根据制造商的说明书处理1:4000稀释的小鼠血清,并且使用Victor 3多标记计数器(Perkin Elmer,Wiesbaden,Germany)测量450nm处的吸光度。

为了量化mRNA水平,将冷冻组织块(30-50mg)转移到冷却的1.5mL反应管中。添加含有3.3μL/ml蛋白酶K(50μg/μL)(Epicenter Biotechnologies,Madison,USA)的1mL裂解混合物(Epicenter Biotechnologies,Madison,USA),并且使用超声仪(HD2070,Bandelin,Berlin,Germany)通过超声处理数秒将组织裂解,并且在65℃下在热混合器(Thermomixer Comfort,Eppendorf,Hamburg,Germany)中使用蛋白酶K消化30min。将裂解物储存在-80℃直至分析。对于mRNA分析,根据制造商的建议,将裂解物解冻并且使用QuantiGene 1.0(FVII、ApoB和GAPDH)或Quantigene 2.0(TTR)分支DNA(bDNA)测定试剂盒(Panomics,Fremont,CA,USA,Cat-No:QG0004)量化mRNA水平。作为测定读出,在Victor 2Light发光计数器(Perkin Elmer,Wiesbaden,Germany)中测量化学发光信号作为相对光单位(RLU)。将相应mRNA的信号除以来自相同裂解物的GAPDH mRNA的信号。值报告为针对GAPDH归一化的mRNA表达。

另外的一般程序1:单链寡核苷酸合成

在ABI 394和3900合成仪(Applied Biosystems)上以10μmol规模或在Oligopilot 10合成仪上以28μmol规模使用亚磷酰胺化学物质组装寡核糖核苷酸。固体支持物是负载有2'-脱氧胸苷的聚苯乙烯(Glen Research,Sterling,Virginia,USA)或可控孔玻璃(CPG, 520Å,负载量为75μmol/g,从Prime Synthesis,Aston,PA,USA获得)。辅助合成试剂DNA-, 2'-O-甲基RNA-和2'-脱氧-2'-氟-RNA亚磷酰胺是从SAFC Proligo(Hamburg,Germany)获得的。具体地,使用2'-O-甲基-尿苷(2'-OMe-U)的5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺单体、4-N-乙酰基-2'-O-甲基-胞苷(2'-OMe-CAC)、6-N-苯甲酰基-2'-O-甲基-腺苷(2'-OMe-Abz)和2-N-异丁酰鸟苷(2'-OMe-GiBu)来构建寡聚体序列。使用携带有与2'-OMe RNA构建嵌段相同的核碱基保护基团的相应亚磷酰胺引入2'-氟修饰。使用5-乙硫基-1H-四唑(ETT,乙腈中0.5M)作为活化剂,所有亚磷酰胺(乙腈中70mM)的偶联时间为3min。使用在1:1(v/v)吡啶和乙腈的混合物中的50mM 3-((二甲基氨基-亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮(DDTT,AM Chemicals,Oceanside,California,USA)引入硫代磷酸酯连接。

在完成包括除去DMT基团的固相合成(“DMT关闭合成”)后,根据公开的方法,从固体支持物上裂解寡核苷酸并且使用由甲胺水溶液(41%)和浓氨水(32%)组成的1:1混合物在25℃下去保护3小时(Wincott, F.等Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. Nucleic Acids Res, 23:2677-2684 (1995))。

随后,通过阴离子交换HPLC使用填充有Source Q15的柱(GE Healthcare)和AKTA Explorer系统(GE Healthcare)纯化粗寡聚物。缓冲液A是在20%乙腈水溶液中的10mM高氯酸钠、20mM Tris、1mM EDTA, pH 7.4 (Fluka, Buchs, Switzerland), 并且缓冲液B与缓冲液A相同, 含有500mM高氯酸钠。使用32个柱体积(CV)内22%B到42%B的梯度。记录了280nm处的UV迹线。合并适当的级分并且使用3M NaOAc (pH=5.2) 和70%乙醇沉淀。通过离心收集沉淀物。可替代地, 根据制造商的建议, 使用Sephadex HiPrep柱(GE Healthcare)进行脱盐。

在水中重构寡核苷酸并且通过电喷雾电离质谱法(ESI-MS)确认寡核苷酸的身份。通过分析型阴离子交换HPLC评估纯度。

使用TFA保护的己基氨基-接头亚磷酰胺(Sigma-Aldrich, SAFC, Hamburg, Germany)引入5'-氨基己基接头。使用固定在CPG上的邻苯二甲酰亚胺保护的己氨基接头(Prime Synthesis, Aston, PA, USA)引入3'-己氨基接头。去保护和纯化如上进行。

另外的一般程序2: 硫醇封端的siRNA的生成

通过1-0-二甲氧基三苯甲基-己基-二硫化物、1'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺接头(NucleoSyn, Olivet Cedex, France)引入3'-或5'-末端硫醇基团。在如上去保护和纯化后, 使用在三乙基碳酸氢铵缓冲液(TEABc, 0.1M, pH 8.5, Sigma, #90360)的二硫苏糖醇(DTT) (0.1M DTT储备溶液(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany, #646563)) 每个还原含有二硫化物的寡聚物。将寡核苷酸溶解在TEABc缓冲液(100mM, pH 8.5)中以产生1mM溶液。为了完成二硫化物还原, 向寡核苷酸溶液中添加50-100倍摩尔的过量DTT。通过从Thermo Fisher获得的Dionex DNA Pac 200柱(4x 250mm)上的分析型AEX HPLC监测还原进展。还原的物质, 即相应的硫醇(C6SH), 在起始物质前洗脱。反应完成后, 通过尺寸排阻色谱法使用来自GE Healthcare的HiPrep柱和水作为洗脱液除去过量的试剂。随后, 使用3MNaOAc (pH 5.2) 和乙醇沉淀寡核苷酸并且在-20℃下储存。

另外的一般程序3: 使单链RNA(ssRNA)退火形成双链RNA(dsRNA)的一般程序

通过将相对于有义链稍微过量的所需互补反义链混合并且在20mM NaCl/4mM磷酸钠pH 6.8缓冲液中退火, 从RNA单链生成dsRNA。通过天然尺寸排阻HPLC使用来自GE Healthcare的Superdex 75柱(10X300 mm)确认成功的双链体形成。样品冷冻储存直至使用。

在本文所述的序列中, 大写字母“A”、“C”、“G”和“U”表示RNA核苷酸。小写字母“c”、“g”、“a”和“u”表示2'-O-甲基修饰的核苷酸; “s”表示硫代磷酸酯; 并且“dT”表示脱氧胸苷残基。大写字母A、C、G、U后跟“f”表示2'-氟核苷酸。“(SHC6)”表示硫代己基接头。“(DTME)”表示可裂解的同型双官能交联剂二硫代双马来酰亚胺乙烷, “C6NH₂”和“C6NH”可互换使用以表示氨基己基接头。“C6SSC6”表示二己基二硫键。“InvdT”意指反向的胸苷。

另外的一般程序4: 通过连续退火生成多聚siRNA的一般程序

通过逐步退火制备多聚siRNA在水中进行并且利用互补链的逐步添加。不需要加热/冷却溶液。每次添加后, 取出退火溶液的等分试样, 并且在天然条件(20℃)下使用分析

型RP HPLC监测双链体的形成。基于通过最近邻法计算的单个单链的消光系数计算结合等摩尔量的互补单链所需的量。如果分析型RP HPLC迹线显示过量的单链,则添加另外量的相应互补链以强制形成双链体(“双链体滴定”)。

使用配备有平衡至20℃的XBride C18 Oligo BEH(2.5μm;2.1x50 mm,Waters)柱的Dionex Ultimate 3000HPLC系统监测双链体滴定。诊断波长为260nm。缓冲液A是100mM六氟异丙醇(HFIP)、含有1%甲醇的16.3mM三乙胺(TEA)。缓冲液B具有相同的组成,除了MeOH为95%之外。应用30分钟内从5%到70%缓冲液B的梯度,流速为250μL/min。两条互补链独立运行以建立保留时间。然后分析含有双链体溶液的等分试样并且与组成单链的保留时间进行比较。在双链体溶液显示大量单链的情况下,向双链体溶液中添加相应的互补链。

实施例1:硫醇封端的siRNA的生成

必要时,通过1-0-二甲氧基三苯甲基-己基-二硫化物、1'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺接头(NucleoSyn,Olivet Cedex,France)引入3'-或5'-末端硫醇基团。在完成固相合成并且最终除去DMT基团(“DMT关闭合成”)后,从固体支持物上裂解寡核苷酸并且使用由甲胺水溶液(41%)和浓氨水(32%)组成的1:1混合物在10℃下去保护6小时。随后,通过阴离子交换高效液相色谱(HPLC)在AKTA Explorer System(GE Healthcare, Freiburg, Germany)上纯化粗寡核苷酸。通过添加乙醇和在冰箱中储存过夜来沉淀纯化的(C6SSC6)-寡核苷酸。通过离心收集沉淀物。在水中重构寡核苷酸并且通过电喷雾电离质谱法(ESI-MS)确认寡核苷酸的身份。通过分析型阴离子交换和RP HPLC评估纯度。

然后使用100mM DL-二硫苏糖醇(DTT)溶液还原每个含有二硫化物的寡聚物。使用三乙基碳酸氢铵缓冲液(TEABc,1M,pH 8.5,Sigma,#90360)和水稀释1.0M DTT储备溶液(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Munich,Germany,#646563),以得到各自在DTT和TEABc中的100mM溶液。将寡核苷酸溶解在TEABc缓冲液(100mM,pH 8.5)中以产生1mM溶液。为了完成二硫化物还原,向寡核苷酸溶液中添加50-100倍摩尔的过量DTT。通过分析型AEX HPLC在从Thermo Fisher获得的Dionex DNA Pac 200柱(4x 250mm)上监测还原进展。还原的物质,即相应的硫醇(C6SH),在起始物质前洗脱。反应完成后,通过尺寸排阻色谱使用来自GE Healthcare的HiPrep柱和水作为洗脱液除去过量的试剂。随后,使用3M NaOAc(pH 5.2)和乙醇沉淀寡核苷酸,并且在-20℃下储存。

实施例2:制备单-DTME寡聚物的一般程序

将经硫醇修饰的寡核苷酸溶解在含有25%乙腈的300mM NaOAc(pH 5.2)中,以得到200D/mL的溶液。将40当量二硫代双马来酰亚胺乙烷(DTME,Thermo Fisher,#22335)溶解在乙腈中以提供15.6mM溶液。将DTME溶液添加到含有寡核苷酸的溶液中,并且在Thermomixer(Eppendorf,Hamburg,Germany)上在25℃下搅拌。通过分析型AEX HPLC使用Dionex DNA Pac200柱(4x 250mm)监测反应进展。根据所需的纯度水平,通过尺寸排阻HPLC使用HiPrep柱(GE Healthcare)除去过量的DTME,或通过制备型AEX HPLC使用可从GE Healthcare商购的填充有Source 15Q树脂的柱纯化粗反应混合物。

实施例3:通过DTME官能团制备二聚体的一般程序

将根据实施例2中的程序制备的经DTME修饰的寡核苷酸与另一种配备有硫醇接头的寡核苷酸反应。该反应可以在单链序列上进行或在反应伙伴之一的互补寡核苷酸预先退火之后进行。因此,如果需要,经DTME修饰的寡核苷酸直接与经硫醇修饰的寡核苷酸反应,

或者与其互补链退火并且所得双链体与经硫醇修饰的寡核苷酸反应。可替代地,经硫醇修饰的寡核苷酸与其互补链退火,并且该双链体与经DTME修饰的单链反应。在所有情况下,反应在300mM NaOAc (pH 5.2)的存在下在水溶液中进行。

实施例4:使单链RNA (ssRNA) 退火形成双链RNA (dsRNA) 的一般程序

通过将等摩尔量的互补有义链和反义链混合并且在20mM NaCl/4mM磷酸钠pH 6.8缓冲液中退火,从RNA单链生成dsRNA。通过天然尺寸排阻HPLC使用来自GE Healthcare的Superdex 75柱(10X300 mm)确认成功的双链体形成。样品冷冻保存直至使用。

实施例5:制备3'-或5'-NH₂衍生的寡核苷酸的一般程序

使用ÄKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 和可控孔玻璃 (CPG) 作为固体支持物 (Prime Synthesis, Aston, PA, USA), 通过140μmol规模的在固相上的标准亚磷酰胺化学物质产生在有义链的5'-端配备有C-6-氨基接头的RNA。使用相应的2'-OMe-亚磷酰胺、2'-F-甲基亚磷酰胺生成含有2'-O-甲基和2'-F核苷酸的寡聚物。使用TFA保护的己氨基接头亚磷酰胺 (Sigma-Aldrich, SAFC, Hamburg, Germany) 引入有义链5'-端的5'-氨基己基接头。如果在3'-位需要己氨基接头的情况下,使用固定在CPG (Prime Synthesis, Aston, PA, USA) 上的邻苯二甲酰亚胺保护的己氨基接头。使用在水中的41%甲胺和浓氨水的混合物(1:1 v/v) 完成裂解和去保护。使用阴离子交换HPLC和从GE Healthcare获得的填充有Source 15Q树脂的柱(2.5X18 cm) 纯化粗寡核苷酸。

实施例6:GalNAc配体缀合的一般方法

如Hadwiger等的专利申请US2012/0157509A1中概述的,制备三价GalNAc配体。根据以下程序使用NHS化学物质活化相应的羧酸衍生物:

将3GalNAc-COOH (90μmol, 206mg) 溶解在2.06mL DMF中。在0°C下向该溶液中添加N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 14.3mg (99μmol, 1.1当量) 和二异丙基碳二亚胺 (DIC, 18.29μL, 1.05当量, 94μmol)。该溶液在环境温度下搅拌过夜。通过TLC (DCM:MeOH=9:1) 监测反应的完成。

将配备有氨基己基接头的前体寡核苷酸溶解在碳酸钠缓冲液 (pH9.6):DMSO 2:3 v/v中,以得到4.4mM溶液。向该溶液中添加NHS活化的GalNAc溶液的等分试样 (1.25当量, 116μL)。在25°C下摇动1小时后,添加NHS活化的GalNAc的另一等分试样 (116μL)。一旦RP HPLC分析显示至少超过85%的缀合物,就通过添加乙醇和在冰箱中储存过夜沉淀粗缀合物。通过离心收集沉淀物。将沉淀物溶解在1mL浓氨水中并且在室温下搅拌4小时以从GalNAc糖残留物中除去O-乙酸盐。在通过RP HPLC ESI MS确认定量除去O-乙酸盐后,将物质用100mM三乙基乙酸铵 (TEAA) 稀释,并且通过RP HPLC使用XBridge Prep C18 (5μm, 10x50mm, 水) 柱在ÄKTA explorer HPLC系统上在60°C下纯化粗反应混合物。溶剂A是100mM TEAA水溶液,溶剂B是在95%CAN中的100mM TEAA,两者均通过缓冲液预热器加热至60°C。使用在60分钟内从5%到25%B的梯度,流速为3.5mL/min。在260nm和280nm处观察到化合物的洗脱。通过分析型RP HPLC/ESI-MS收集体积为1.0mL的级分并且进行分析。组合含有纯度超过85%的靶标缀合物的级分。通过ESI/MS确认正确的分子量。

实施例7:寡核苷酸前体

使用以上实施例中所述的方法,下表2-7描述了制备的单链单体、二聚体和带

GalNAc标签的单体和二聚体：

表2:寡核苷酸前体——单链(“X”)

| SEQ ID NO: | | FVII 有义链 (5'-3') |
|------------|---------|--|
| 1 | X187 91 | (C ₆ SSC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) (C ₆ NH ₂) |
| 2 | X187 92 | (C ₆ SSC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) (C ₆ NH) (GalNAc ₃) |
| 3 | X187 93 | (SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) (C ₆ NH) (GalNAc ₃) |
| 4 | X187 94 | (C ₆ SSC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) |
| 5 | X195 69 | (SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) |
| 6 | X195 74 | (DTME) (SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) |
| | ID | FVII 反义链 (5'-3') |
| 7 | X187 96 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SSC ₆) dT |
| 8 | X187 97 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SH) |
| 9 | X187 98 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SH) (DTME) |
| | ID | ApoB 有义链 (5'-3') |
| 10 | X195 77 | (C ₆ SSC ₆) cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAf (invdT) |
| 11 | X195 78 | (SHC ₆) cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAf (invdT) |
| 12 | X195 79 | (DTME) (SHC ₆) cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAf (invdT) |

表3:寡核苷酸单链有义和反义对;和退火后所得的双链体(“XD-”)

| 双链体 ID | SEQ ID NO: | 单链 ID | 序列 (5'-3') | 靶标/链 |
|----------|------------|--------|--------------------------------------|--------|
| XD-00376 | 13 | X01162 | GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACf dTsdT | FVIIIs |
| | 14 | X00549 | GUfAAGACfUfUfGAGAUFGAUfCfCfdTsdT | FVIIIs |
| XD-00030 | 16 | X00116 | GcAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT | FVIIIs |
| | 17 | X00117 | UGAGUUGGcACGCCUUUGCdTsdT | FVIIIs |
| XD-01078 | 19 | X02943 | GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA | ApoBs |
| | 20 | X02944 | uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCcsU | ApoBas |
| XD-00194 | 22 | X00539 | cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT | LUCs |
| | 23 | X00540 | UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT | LUCas |

表4:衍生的寡核苷酸单链有义和反义对;和退火后所得的双链体

| 双链体 ID | SEQ ID NO: | 单链 ID | 序列 (5'-3') | 靶标 |
|----------|------------|--------|--|------|
| XD-06328 | 25 | X18790 | (GalNAc3) (NHC ₆)
gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT) | FVII |
| | 26 | X18795 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu | |
| XD-06728 | 28 | X20124 | (GalNAc3) (NHC ₆)
cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfGfAf
(invdT) | ApoB |
| | 29 | X19583 | UfsCfGfAfuUfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgusu | |
| XD-06386 | 31 | X20216 | (GalNAc3) (NHC ₆)
sAfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfa
Af (invdT) | TTR |
| | 32 | X19584 | usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfusu
su | |
| | 34 | X19571 | gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT) (C ₆ NH) (GalNAc3) | FVII |

| | | | | |
|--------------|----|--------|---|------|
| | | | | |
| XD-05
961 | 35 | X18788 | gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT) | FVII |
| | 26 | X18795 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu | |

表5:通过DTME连接的单链寡核苷酸二聚体

| SE
Q
ID
NO: | ID | 序列 (5'-3') | 靶标/链 |
|----------------------|------------|--|---------------|
| 37
&
125 | X15
049 | GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA (SHC ₆) (DTME)
GGAUfCfAUfCfuCfAAGUfCfuUfACfdTsdT (SHC ₆) | ApoBs/F
7s |
| 38
&
126 | X12
714 | GGAUfCfAUfCfuCfAAGUfCfuUfACfdTsdT (SHC ₆)
(DTME) GUfAAGACfuUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT
(SHC ₆) | F7s/F7as |
| 39
&
127 | X19
575 | (SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)
(C ₆ NH) (GalNAc ₃) (DTME) (SHC ₆)
gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) | F7s/F7s |
| 40
&
128 | X19
819 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C ₆ SH) (DTME)
UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SH) | F7as/F7a
s |
| 41
&
129 | X20
336 | (SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)
(C ₆ NH) (GalNAc ₃) (DTME) (SHC ₆)
cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfGaf (invdT) | F7s/Apo
Bs |

表6:单链DTME二聚体和相应的单体;和退火后所得的双链体

| 双
链
体
ID | SE
Q
ID | 单链ID | 序列 (5'-3') | 靶标/链 |
|-------------------|----------------|------------|--|-----------------|
| XD
-05
311 | 37
&
130 | X1504
9 | GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA (SHC ₆)
(DTME)
GGAUfCfAUfCfuCfAAGUfCfuUfACfdTsdT
(SHC ₆) | ApoBs-F
VIIs |
| | 14 | X0054
9 | 5'-GUfAAGACfuUfGAGAUfGAUfCfCfdTsd
T-3'+ | FVIIas |
| | 20 | X0294 | 5'-uuGGAUcAAAUuAAGAUUCscsU-3' | ApoBas |

| | | | | |
|----------|----------|--------|--|---------------|
| | | 4 | | |
| XD-05312 | 38 & 131 | X12714 | GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT (SHC6) (DTME)
GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT (SHC6) | FVIIIs-FVIIas |
| | 13 | X01162 | 5'-GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTs dT-3' | FVIIIs |
| | 14 | X00549 | 5'-GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsd T-3' | FVIIas |

表7:化学合成的二硫化物连接的二聚体和三聚体

| SE Q ID | 单链 ID | 序列 (5'-3') | 靶标/链 |
|----------------|--------|---|-------------------|
| 44 & 132 | X20366 | usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu (C6SSC6)
UfsCfgAfuUfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgusu | TTRas/ApoBas |
| 45 & 133 | X22413 | AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf (invdT)
(C6SSC6) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) | FVIIIs/TTRs |
| 46 & 134 & 135 | X20256 | (SHC6) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)
(C6NH) (GalNAc3) (SPDP) (NHC6)
cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAf (invdT) (C6SSC6)
AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf (invdT) | FVIIIs/ApoBs/TTRs |
| 47 & 136 | X20366 | usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu (C ₆ SSC ₆)
UfsCfgAfuUfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgusu | TTRas/ApoBas |
| 48 & 137 | X22413 | AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf (invdT)
(C ₆ SSC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) | FVIIIs/TTRs |

关键:在上表1-6 (以及后面的那些) 的序列部分中:大写字母“A”、“C”、“G”和“U”表示RNA核苷酸。小写字母“c”、“g”、“a”和“u”表示2'-O-甲基修饰的核苷酸;“s”表示硫代磷酸酯;并且“dT”表示脱氧胸苷残基。大写字母A、C、G、U后跟“f”表示2'-氟核苷酸。“(SHC6)”表示硫代己基接头。“(DTME)”表示可裂解的同型双官能交联剂二硫代双马来酰亚胺乙烷,其结构示于图1B中。“(BMPEG2)”表示不可裂解的同型双官能交联剂1,8-双马来酰亚胺-二乙二醇。“C6NH₂”和“C6NH”可互换使用来表示氨基己基接头。“C6SSC6”表示二己基二硫化物接头。“GalNAc3”和“GalNAc”可互换使用来表示三触角N-乙酰半乳糖胺配体,其化学结构示于图1A中。“SPDP”表示琥珀酰亚胺3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯与配备有氨基接头的RNA反应的反应产物。“InvdT”意指反向的胸苷。

在图表的靶标/链部分中:“F7”或“FVII”指示靶向因子VII转录物(mRNA)的siRNA序列。“ApoB”指示靶向载脂蛋白B转录物的siRNA序列。“TTR”指示靶向转甲状腺素蛋白转录物的siRNA序列。有义链指定为“s”;反义链指定为“as”。

实施例8:通过连续退火生成二聚体、三聚体和四聚体siRNA的一般程序

为了制备二聚体、三聚体和四聚体siRNA,进行逐步退火程序。退火在水中进行并且利用互补链的逐步添加。不需要加热/冷却溶液。每次添加后,取出退火溶液的等分试样,并且在天然条件(20℃)下使用分析型RP HPLC监测双链体的形成。基于通过最近邻法计算的单个单链的消光系数计算结合等摩尔量的互补单链所需的量。如果分析型RP HPLC迹线显示过量的单链,则添加另外量的相应互补链以强制形成双链体(“双链体滴定”)。

使用配备有平衡至20℃的XBride C18 Oligo BEH(2.5μm;2.1x50 mm,Waters)柱的Dionex Ultimate 3000HPLC系统监测双链体滴定。诊断波长为260nm。缓冲液A是100mM六氟异丙醇(HFIP)、含有1%甲醇的16.3mM三乙胺(TEA)。缓冲液B具有相同的组成,除了MeOH为95%之外。应用30分钟内从5%到70%缓冲液B的梯度,流速为250μL/min。两条互补链独立运行以建立保留时间。然后分析含有双链体溶液的等分试样并且与组成单链的保留时间进行比较。在双链体溶液显示大量单链的情况下,向双链体溶液中添加相应的互补链。

实施例9:5'-GalNAc-FVII标准对照(XD-06328)的制备

通过实施例4中所述的方法,通过使ssRNA链X18790和X18795退火制备5'-GalNAc-FVII标准对照(XD-06328)(参见图2)。获得纯度为91.6%的产物,如通过HPLC分析确定的。

实施例10:3'-GalNAc-FVII-DTME-FVII同源二聚体(XD-06330)的制备,其中可裂解接头接合3'反义链和与有义链的外部3'端缀合的GalNAc

根据实施例8中所述的双链滴定方法,通过将单链二聚体X19819与X18788和X19571逐步组合制备靶向FVII的GalNAc缀合的同源二聚体siRNA XD-06330(图3)(10mg, 323nmol)。通过HPLC分析,分离的物质基本上是纯的。

表9:GalNAc-FVII-DTME-FVII同源二聚体(XD-06330)合成中使用的寡聚物的化学计量

| SEQ ID NO: | ID | 靶标 | E(L/mol*cm) | Nmol / OD | MW (游离酸) | MW Na 盐 | Req OD |
|------------|----------|---------------|-------------|-----------|----------|---------|--------|
| 40 | X19819 | FVIIas-FVIIas | 389000 | 2.57 | 14405.6 | 15372.9 | 174 |
| 36 | X18788 | FVIIIs | 193000 | 5.18 | 6545.3 | 6962.9 | 62.3 |
| 34 | X19571 | FVIIIs | 193000 | 5.18 | 8161.0 | 8600.6 | 62.3 |
| 49 | XD-06330 | | | | 29111.9 | 30936.4 | |

实施例11:3'-GalNAc-FVII-DTME-FVII同源二聚体(XD-06360)的制备,其中可裂解接头接合5'有义链和与有义链的外部3'端缀合的GalNAc

使用图4中描绘的合成策略和实施例8中所述的方法,通过逐步组合单链制备靶向FVII的GalNAc缀合的同源二聚体siRNA XD-06360(11mg, 323nmol)。

所有反应步骤产生高质量的物质,通过离子交换和反相色谱确定寡聚物X19575分别是91.7%和93.4%纯的,并且如通过非变性反相HPLC确定的,寡聚物XD-06360以86.8%的纯度被分离。合成中使用的各种寡聚物的化学计量示于表10中。

表10:GalNAc-FVII-FVII同源二聚体(XD-06360)合成中使用的寡聚物的化学计量

| SEQ ID NO: | ID | 靶标 | E(L/mol*cm) | Nmol/OD | MW (游离酸) | MW Na 盐 | Req OD |
|------------|----------|-------------------------|---------------|---------|------------|----------|--------|
| 39 | X19575 | FVII _s -FVII | 384800 | 2.60 | 15413.1 | 16314.4 | 137 |
| 26 | X18795 | FVII _{as} | 194800 | 5.13 | 6849.4x2 | 7289.1x2 | 139 |
| 50 | XD-06360 | | | | 29111.9 | 30892.6 | |

实施例12:5'-GalNAc-FVII-DTME-FVII同源二聚体(XD-06329)的制备,其中可裂解接头接合3'反义链和与有义链的内部5'端缀合的GalNAc

如图5中描绘的,通过使1150nmol X18788和1150nmol X18798退火制备靶向FVII的GalNAc-缀合的同源二聚体siRNA XD-06329。单个链的OD总和为4500D,并且组合溶液(即双链体)由于增色性(3940D=1150nmol双链体)具有3940D。将该经DTME修饰的双链体与1150nmol X18797(3'-SH修饰的FVII反义)(2240D)反应。HPLC纯化后,分离出3640D“半二聚体”siRNA。然后使“半二聚体”FVII siRNA(10mg,323nmol,1740D)与5'GalNAc-FVII有义(X18790)(323nmol,62.30D)退火以产生最终产物XD-06329。

实施例13:通过FVII同源二聚体GalNAc缀合物(XD-06329、XD-06330和XD-06360)确定体内FVII基因敲低

如上所述的,在动物实验中(一般程序:动物实验)测试了靶向因子VII的同源二聚体的GalNAc缀合的siRNA的三种不同变体(XD-06329、XD-06330和XD-06360)和单体GalNAc缀合的FVII-siRNA(XD-06328)的体内功效。治疗组的组大小为n=4只小鼠,盐水对照为n=5。所有化合物以0.2mL体积以不同剂量(25mg/kg或50mg/kg)皮下注射。在治疗前1天和治疗后1、3和7天收集血液,并且分析FVII酶活性。结果示于图6中。

在每单位重量基础的敲低上,将同源二聚体GalNAc缀合物(XD-06329、XD-06330和XD-06360)的沉默活性、作用开始和功效与单体、标准对照(XD-06328)相当。没有观察到毒性迹象(例如,体重损失、异常行为)。然而,在对GalNAc含量的数据归一化后,同源二聚体GalNAc缀合物在FVII敲低上比GalNAc单体更有效,从而证明在每个配体/受体结合事件中更高效的siRNA摄取。这些结果示于图7A和7B中。

图7A.每个时间点的因子VII血清值归一化为注射1X PBS的对照小鼠。每个数据点的条从左到右分别对应于盐水、XD-06328、XD-06329、XD-06330和XD-06360。

图7B.每个时间点的因子VII血清值归一化为每个单独组的出血前值。每个数据点的条从左到右分别对应于盐水、XD-06328、XD-06329、XD-06330和XD-06360。

实施例14:独立靶向FVII(XD-06328)、ApoB(XD-06728)和TTR(XD-06386)的标准GalNAc-siRNA的制备

通过固相合成独立制备三种独立靶向FVII(XD-06328)、ApoB(XD-06728)和TTR(XD-06386)的标准siRNA(参见图8)。三种有义链(分别为X18790、X20124、X20216)分别用5'-己胺接头制备。在寡核苷酸的裂解和去保护以及粗物质的HPLC纯化之后,使用NHS化学物质实现过乙酰化的GalNAc簇与每个寡核苷酸的缀合。通过皂化除去O-乙酸盐由氨水介

导。通过以上提供的标准程序合成互补反义链(分别为X18795、X19583和X19584),然后与GalNAc缀合的单链退火以产生靶向FVII(XD-06328)、ApoB(XD-06728)和TTR(XD-06386)的siRNA,纯度分别为99.7%%、93.1%和93.8%。

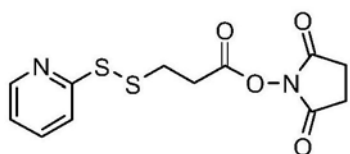
表11:GalNAc-siRNA缀合物

| 双链
体
ID | SEQ
ID
NO: | ssRN
A | 序列 5'-3' | |
|---------------|------------------|------------|---|------|
| XD-06
328 | 138 | X1879
0 | (GalNAc3)(NHC ₆)
gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt) | FVII |
| | 139 | X1879
5 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu | |
| XD-06
728 | 140 | X2012
4 | (GalNAc3)(NHC ₆)
cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfgAf(invdt) | ApoB |
| | 141 | X1958
3 | UfsCfgAfuUfuCfuCfcAfaAfuAfgusu | |
| XD-06 | 142 | X2021 | (GalNAc3)(NHC ₆) | TTR |
| 386 | | 6 | sAfsasCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfaAf
(invdt) | |
| | 143 | X1958
4 | usUfsaUfaGfaGfcAfaAfaAfcUfgUfususu | |

实施例15:在有义链上具有可裂解连接的GalNAc-FVII-ApoB-TTR三聚体的制备(XD-06726)

使用固相和溶液相的混合策略合成靶向FVII、ApoB和TTR的GalNAc缀合的异源三聚体(参见图9),如图10中描绘的。

使用相应的可商购TFA保护的亚磷酰胺(SAFC Proligo,Hamburg,Germany)用在5'-端具有氨基己基接头的固相化学物质制备二聚体X19581。根据以上概述的条件,从固体支持物上裂解序列,去保护并且纯化。为了安装另外的二硫化物接头,使寡核苷酸的5'-氨基己基接头与可从Sigma(#P3415)获得的SPDP(琥珀酰亚胺3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)



反应。将928nmol(4000D)寡核苷酸溶解在含有20%二甲基甲酰胺(DMF)的4.7mL 100mM TEAB(pH 8.5)中。向该溶液中添加在100μL DMF中的1.4mg(4.6μmol, 5当量)SPDP的溶液。一旦分析型RP HPLC显示起始物质消耗,就在购自Waters的C18 XBridge柱(10x 50mm)上纯化粗反应混合物。RP纯化在ÄKTA explorer HPLC系统上进行。溶剂A是100mM TEAA水溶液,并且溶剂B是在95%ACN中的100mM TEAA。通过缓冲液预热器将溶剂加热到60℃,并且将柱保持在相同温度的烘箱中。使用在45分钟内从0%到35%B的梯度,流速为4mL/min。在260nm和280nm处观察到化合物的洗脱。通过分析型RP HPLC/ESI-MS收集体积为1.5mL的级分并且进行分析。组合适当的级分,并且在添加乙醇和3M NaOAc(pH 5.2)后,在-20℃下沉淀寡核苷酸X19582。通过RP-HPLC ESI-MS确认身份。

为了制备单链三聚体,将以上寡核苷酸X19582(255nmol)溶解在1.3mL水中。向该

溶液中添加306nmol (1.2当量)的经硫醇修饰的寡核苷酸X18793。反应混合物含有200mM TEAA和20%乙腈。通过RP HPLC跟踪反应进展。一旦起始物质被消耗,就使用与前段中所述相同的条件纯化反应混合物,不同之处在于梯度为在45分钟内从0%B到30%B。

以高纯度获得单链异源三聚体X20256 (包含连接的有义链siFVII、siApoB和siTTR)。X20256的序列示于表12中。

表12:单链异源三聚体

| SEQ ID NO: | ID | 序列 | 靶标/链 |
|----------------|--------|---|-------------------|
| 52 & 144 & 145 | X20256 | (SHC ₆) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT)
(C ₆ NH)(GalNAc ₃)(SPDP)(NHC ₆)
cuAfuUfuGfgAfgAfaAfuCfgAf (invdT)(C ₆ SSC ₆)
AfsasCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfaAf (invdT) | FVIIIs/ApoBs/TTRs |

注意:原则上以上序列可通过单一固相合成获得。在这种情况下,SPDP和C₆NH₂被C₆SSC₆亚磷酰胺取代。然而,由于整个构建体的序列长度,此种合成具有挑战性。

此后,根据实施例8中所述的双链体滴定法,通过向有义链异源三聚体中间体(X20256)中逐步依次添加反义单链制备同时靶向FVII、ApoB和TTR的异源三聚体双链体构建体(XD-06726),7mg (150nmol)。获得了7mg物质,其通过HPLC基本上是纯的。

表13:GalNAc-FVII-ApoB-TTR三聚体(XD-06726)合成中使用的寡聚物的化学计量

| SEQ ID NO: | ID | 靶标 | E (L/mol*cm) | Nmol/OD | MW (游离酸) | MW Na盐 | Req OD |
|----------------|----------|-------------------|--------------|---------|----------|---------|--------|
| 52 & 144 & 145 | X20256 | FVIIIs-ApoBs-TTRs | 623900 | 1.60 | 22690.8 | 24075.7 | 94 |
| 29 | X19583 | ApoBas | 206500 | 4.84 | 6762.4 | 7202.1 | 31 |
| 32 | X19584 | TTRas | 240400 | 4.16 | 7596.1 | 8079.7 | 36 |
| 26 | X18795 | FVIIIs | 194800 | 5.13 | 6849.4 | 7289.1 | 29 |
| 53 | XD-06726 | | | | 43898.7 | 46646.6 | |

实施例16:在交替的有义链和反义链上具有可裂解连接的GalNAc-FVII-ApoB-TTR三聚体(XD-06727)的制备

使用实施例8中所述的方法,通过如图12中描绘的逐步组合单链以高纯度制备9mg (192nmol)的同时靶向FVII、ApoB和TTR的三聚体siRNA XD-06727 (参见图11)。

表14:GalNAc-siFVII-siApoB-siTTR三聚体(XD-06727)合成中使用的寡聚物的化

学计量

| SEQ ID NO: | ID | 靶标 | E (L/mol*cm) | l OD | MW (游离酸) | MW Na 盐 | Re q OD |
|------------|----------|--------------|----------------|------------|------------|---------|---------|
| 42 | X20336 | FVIIIs-ApoBs | 404300 | 2.47 nmo l | 15440.1 | 16341.4 | 78 |
| 49 | X20366 | ApoBas-TTRas | 446700 | 2.24 nmo l | 14748.9 | 15716.1 | 86 |
| | X19580 | TTRs | 220300 | 4.54 nmo l | 7105.6 | 7567.2 | 42 |
| 26 | X18795 | FVIIIs | 194800 | 5.13 nmo l | 6849.4 | 7289.1 | 37 |
| 54 | XD-06727 | | | | 44144 | 46913.8 | |

产生异源三聚体 (XD-06727) 的合成是高效的。在该实施例中, 每一步实现了反应物的接近100%的转化。参见图13、14和15。

实施例17: 单独靶向FVII、ApoB和TTR的合并siRNA的LNP制剂的制备

使用一般程序: 脂质纳米颗粒制剂和一般程序: LNP表征中所述的方法在脂质纳米颗粒中配制靶向FVII (XD-00030)、ApoB (XD-01078) 和TTR (XD-06729) 的单体siRNA并且进行表征。脂质组成为XL10: DSPC: 胆固醇: PEG-DOMG/50:10:38.5:1.5摩尔百分比。实现了88%包裹, 并且所得颗粒的大小为83nm, 其中zeta电位为2.2mV, PDI为0.04。

表15: 靶向TTR的单体siRNA (XD-06729)

| dsRNA ID | ssRNA ID | SEQ ID NO: | 序列 | 靶标/链 |
|----------|----------|------------|--------------------------|-------|
| XD-06729 | X21072 | 154 | cAGuGuucuuGcucuAuAAdTsdT | TTRs |
| | X21073 | 155 | UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTsdT | TTRas |

实施例18: 通过GalNAc-缀合的异源三聚体siRNA的mRNA敲低的评估

为了确定异源三聚体GalNAc缀合的siRNA (靶向FVII、ApoB和TTR) 的体内功效, 治疗组使用n=4只小鼠的组大小并且盐水对照n=5, 如上文所述 (一般程序: 动物实验) 的进行动物实验。对于三聚体以50mg/kg的总RNA浓度并且对于每种单体缀合物以17mg/kg的总RNA浓度皮下注射 (.1mL体积) 异源三聚体XD-06726和XD-06727以及3种单体GalNAc缀合的siRNA的混合 (靶向FVII的XD-06328; 靶向TTR的XD-06386和靶向ApoB的XD-06728)。为了比较, 以0.5mg/siRNA静脉内注射针对相同靶标 (FVII (XD-00030)、ApoB (XD-01078) 和TTR (XD-06729)) 的LNP-配制的siRNA的混合 (NPA-741-1)。在治疗前1天和治疗后1、3和7天, 如上所述 (一般程序: 动物实验) 的收集血液, 并且根据一般程序: 基因敲低的测量, 测量FVII、ApoB和TTR的血清水平。结果示于图16A和16B、图17A和17B以及图18A和18B中。在注射后第7天测

量肝裂解物中的mRNA水平(图19A和19B)。

A组(XD-06726)中的一只动物没有显示对TTR血清水平的没有任何影响。两个TTR蛋白图中的第一个示出了数据,其中省略了无反应动物的值。

为了比较,已经从第二FVII图中省略了显示较差TTR反应的动物的值。

ApoB血清水平在一组的动物内和盐水对照的不同时间点之间显示出高变化。

还根据一般程序:基因敲低的测量,使用对来自肝组织的mRNA的bDNA测定来测量所有三个基因的敲低。将靶基因水平归一化为管家GAPDH。

实施例19:GalNAc-FVII-ApoB-TTR-FVII四聚体(XD-07140)的制备

通过如图21中描绘的逐步组合单链靶并且根据实施例8中所述的双链体滴定方法制备12.4nmol的同时靶向FVII、ApoB和TTR的四聚体siRNA XD-07140(参见图20)。HPLC分析显示获得了高纯度的产物。

表16:GalNAc-FVII-ApoB-TTR-FVII四聚体(XD-07140)合成中使用的寡聚物的化学计量

| SEQ ID NO: | ID | 靶标 | E (L/mol*cm) | l OD | MW (游离酸) | MW Na 盐 | Req OD |
|------------|----------|--------------|--------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| 42 | X20336 | FVIIIs-ApoBs | 404300 | 2.47 nmol | 15440.1 | 16341.4 | 5 |
| 49 | X20366 | ApoBas-TTRas | 446700 | 2.24 nmol | 14748.9 | 15716.1 | 5.5 |
| 45 | X22413 | TTRs-FVIIIs | 412100 | 2.52 nmol | 14041.3 | 14964.5 | 4.9 |
| 26 | X18795 | FVIIIs | 194800 | 5.13 nmol | 6849.4 x2 | 7289.1 x2 | 4.8 |
| 55 | XD-07140 | | | | 57929.1 | 61600.2 | |

实施例20:同源四聚体的合成

可以通过本文公开的任何方法合成根据本公开内容的多聚寡核苷酸。以下提供了同源四聚体的两个示例方法。这些实施例可以很容易地适于合成更长的多聚体(例如,五聚体、六聚体等)。

可以通过以下合成在单链上具有连接的同源四聚体siRNA:在合成仪上制备有义链的四聚体,每条有义链通过可裂解接头连接,然后添加靶向配体并且使反义链退火,如图40所示。有义链的可裂解接头可以是二硫化物连接(如所示)或其他不稳定连接(例如,未经化学修饰的核酸序列,例如UUU/尿苷-尿苷-尿苷)。

图40中所示的方案的变化可以包括使用替代的接头,连接反义链和使有义链退火,合成更长的多聚体,或者在达到基于机器的合成的技术限制的情况下合成一种或更多种多聚体并然后使用一种或更多种溶液相化学反应将所述多聚体连接在一起(例如,按照

方案1合成两种四聚体,一种具有配体,另一种没有,一条或两条链适当地被官能团修饰以促进连接,并且然后通过形成共价键、添加或不添加连接部分(例如,DTME)将两种四聚体连接在一起)。

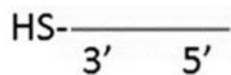
可替代地,同源四聚体可以如图41所示的组装,在交替链上具有连接。

在图41中,“-SH”表示巯基,“Mal”表示DTME,“-CL-”表示可裂解的接头。图41中所示的方案的变化可以包括使用替代的接头和合成更长的多聚体。

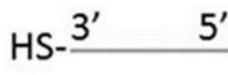
实施例21:配体缀合物的合成

图41中所示的配体缀合物可以如下合成:

合成单体的有义链和反义链的3'-巯基衍生物:

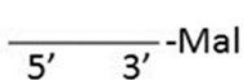


(结构 61)

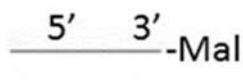


(结构 62)

将每个链的部分被转化为相应的单马来酰亚胺衍生物:



(结构 63)



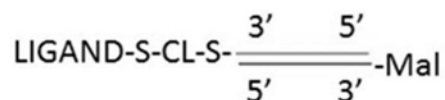
(结构 64)

然后使用所选靶向配体的巯基衍生物处理如此获得的有义链马来酰亚胺衍生物的一部分:



(结构 65)

然后添加稍微摩尔过量的反义马来酰亚胺衍生物,并且通过制备型色谱法分离所需的配体-ds-siRNA-马来酰亚胺产物:



(结构 66)

然后在图41中概述的序列中添加稍微摩尔过量的同源四聚体的每种有义组分和反义组分,每一步的产物在需要时通过制备型色谱法纯化。

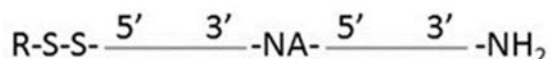
实施例22:多聚寡核苷酸的合成

可以通过本文公开的或从本领域改造的任何方法合成根据本公开内容的多聚寡核苷酸。以下提供了同源多聚体的示例方法,但是本发明的合成也可以容易地适于合成异源多聚体。

这些实施例也可以适于合成不同长度的多聚体。例如,可以使用基本上相同的合成和连接化学物质来组合四聚体和单体(或三聚体和二聚体)以产生五聚体。同样,可以组合四聚体和三聚体以产生七聚体等。可以使用互补连接化学(例如,点击化学)来组装更大的多聚体。

实施例22A:通过预合成的同源二聚体合成siRNA的同源四聚体

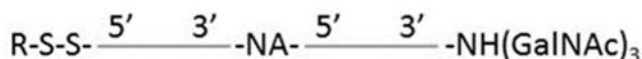
步骤1:合成有义链同源二聚体,其中两条有义链通过核酸酶可裂解的寡核苷酸(NA)连接并且以氨基官能团和二硫化物部分封端。



(结构 67)

单个链(用于该步骤和其他步骤)如以上一般程序:单链寡核苷酸合成部分中概述的合成。用于寡核苷酸链合成、连接和化学修饰的其他方法可以从本领域改造。

步骤2:然后通过与酰基活化的三触角GalNAc配体反应向一部分有义链同二聚体的末端氨基官能团添加三触角GalNAc配体。



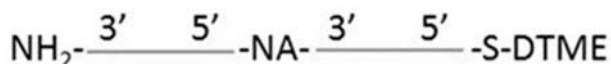
(结构 68)

步骤3:使用摩尔过量的二硫苏糖醇处理剩余的有义链同源二聚体以裂解二硫化物基团以生成硫醇封端的有义链同源二聚体。



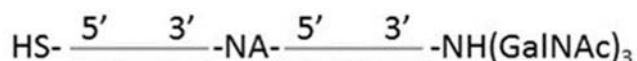
(结构 69)

步骤4:根据用于制备异源多聚体的程序(参见上文),用二硫代双马来酰亚胺乙烷(DTME)使该物质单衍生化。



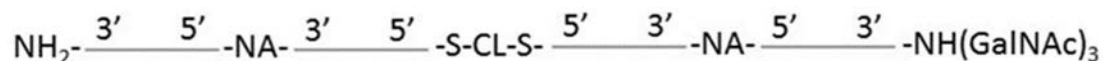
(结构 70)

步骤5:还通过用摩尔过量的二硫代苏糖醇处理裂解GalNAc衍生的同源二聚体的二硫化物基团。



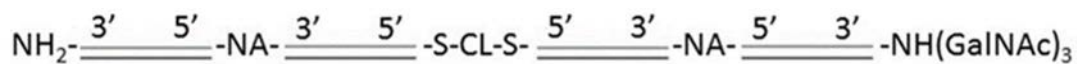
(结构 71)

步骤6:然后通过末端硫醇基团的反应将GalNAc封端的同源二聚体与单-DTME衍生的同源二聚体连接以产生单链同源四聚体。“-S-CL-S-”表示DTME中的可裂解二硫化物基团,例如可裂解接头(CL)。



(结构 72)

步骤7:然后使该物质与4分子当量的反义单体退火以产生所需的双链同源四聚体(该退火步骤是任选的并且可以省略,例如以制备单链多聚体,例如反义寡核苷酸)。



(结构 73)

实施例22B:通过预合成的同源二聚体和同源四聚体合成siRNA的同源六聚体

步骤1:合成有义链同源四聚体,其中四条有义链通过核酸酶可裂解的寡核苷酸连接并且以氨基官能团和二硫化物部分封端。



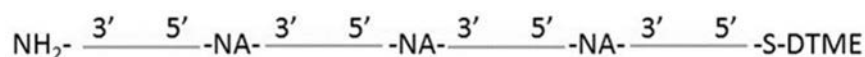
(结构 74)

步骤2:用摩尔过量的二硫代苏糖醇处理该物质以裂解二硫化物基团



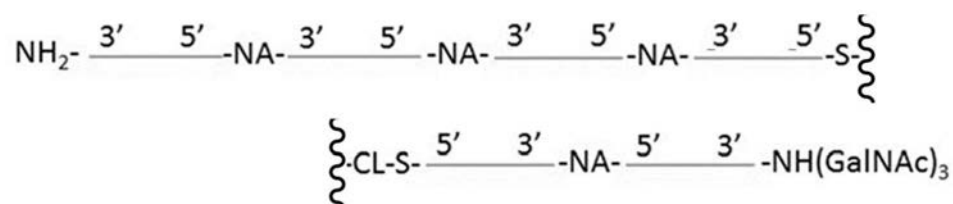
(结构 75)

步骤3:根据用于制备异源多聚体的程序(参见上文),使用二硫代双马来酰亚胺乙烷(DTME)使该物质单衍生化。



(结构 76)

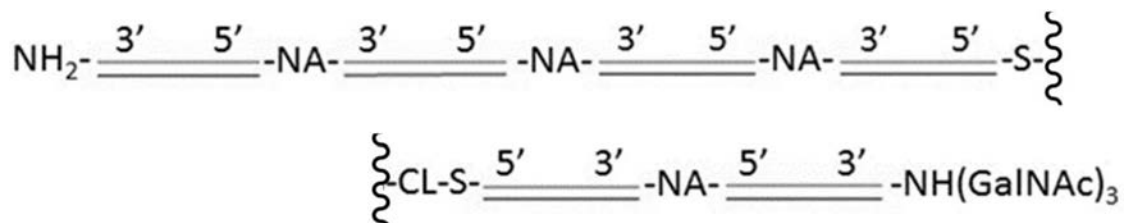
步骤4:使该物质与硫醇封端的GalNAc同源二聚体反应以产生单链同源六聚体。



(结构 77)

注意:在结构77、78、81、82、89和91中,单个连续结构被符号 ζ 分成两部分。

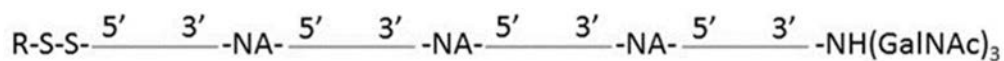
步骤5:然后使该物质与6分子当量的反义单体退火以产生所需的双链同源六聚体(该退火步骤是任选的并且可以省略,例如以制备单链多聚体,例如反义寡核苷酸)。



(结构 78)

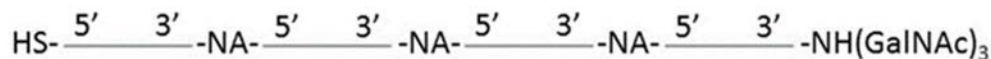
实施例22C:通过预合成的同源四聚体合成siRNA的同源八聚体

步骤1:通过与酰基活化的三触角GalNAc配体反应,将以上合成的氨基末端同源四聚体的一部分转化为相应的GalNAc衍生物。



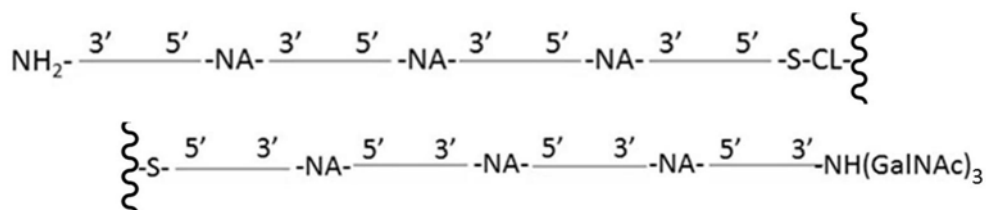
(结构 79)

步骤2:用摩尔过量的二硫代苏糖醇处理该物质以裂解二硫化物基团



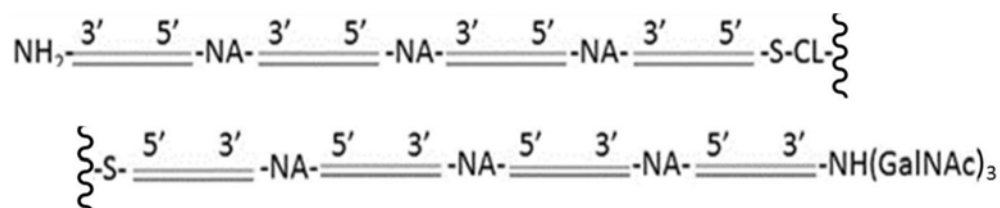
(结构 80)

步骤3:使该物质与单-DTME衍生的四聚体反应以产生末端GalNAc衍生的单链八聚体。



(结构 81)

步骤4:然后使该物质与8分子当量的反义单体退火以产生所需的双链同源八聚体(该退火步骤是任选的并且可以省略,例如以制备单链多聚体,例如反义寡核苷酸)。



(结构 82)

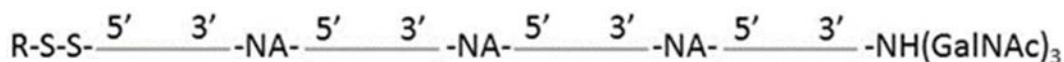
实施例22D:通过预合成的同源四聚体使用硫醇/马来酰亚胺和叠氮化物/乙炔(“点击”)接头的组合合成反义寡核苷酸的同源十二聚体

步骤1:合成反义寡核苷酸的同源四聚体,其包含3个核酸酶可裂解的寡核苷酸接头和末端二硫化物和氨基基团。



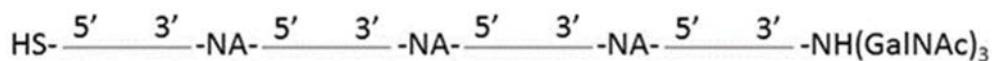
(结构 83)

步骤2:通过与酰基活化的三触角GalNAc配体反应,将该物质转化为相应的GalNAc衍生物。



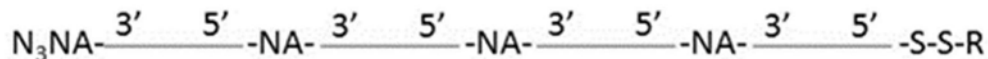
(结构 84)

步骤3:用摩尔过量的二硫代苏糖醇处理该物质以裂解二硫化物基团



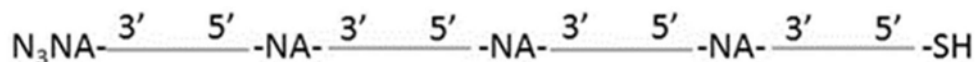
(结构 85)

步骤4:单独地,合成反义寡核苷酸的同源四聚体,其包含3个核酸酶可裂解的寡核苷酸接头和末端二硫化物和叠氮化物基团。



(结构 86)

步骤5:用摩尔过量的二硫代苏糖醇处理该物质以裂解二硫化物基团



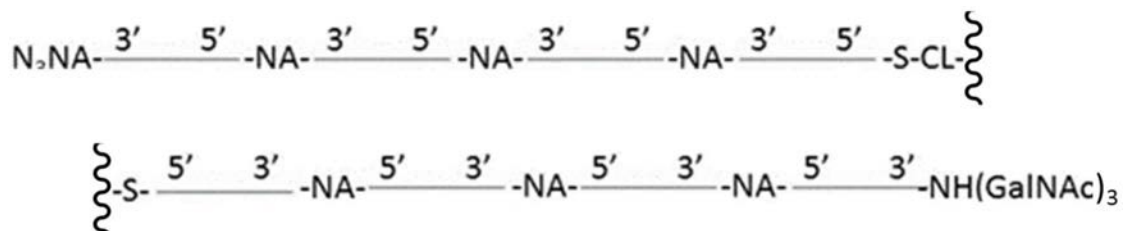
(结构 87)

步骤6:根据用于制备siRNA异源多聚体的程序(参见上文),使用二硫代双马来酰亚胺乙烷(DTME)使对该物质单衍生化。



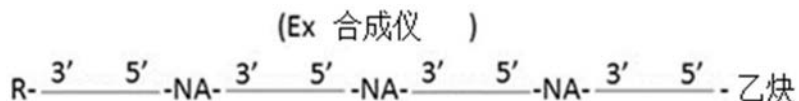
(结构 88)

步骤7:使该物质与硫醇封端的GalNAc衍生的四聚体反应以产生末端GalNAc衍生的单链反义八聚体。



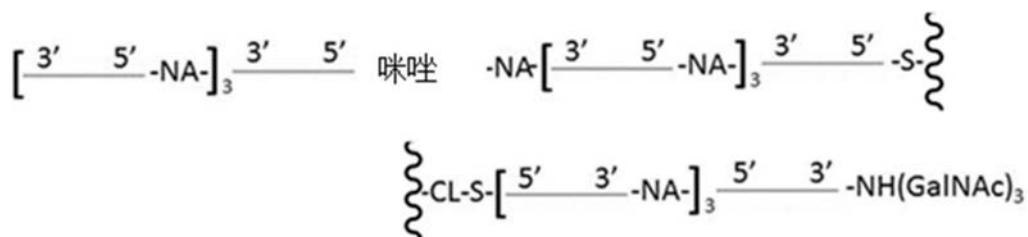
(结构 89)

步骤8:单独地,合成反义寡核苷酸的第三同源四聚体,其包含3个核酸酶可裂解的寡核苷酸接头和末端乙炔基团。后者可以是未衍生化的或空间应变的衍生物,例如二苯并环辛炔(DBCO,Glen Research,VA,USA)



(结构 90)

步骤9:然后使该物质与步骤7中制备的叠氮化物封端的八聚体反应以产生所需的反义同源十二聚体。如果四聚体上的末端乙炔是未衍生化的,则需要金属盐催化剂(例如氯化铜1)来实现连接。相比之下,如果末端乙炔是DBCO,那么偶联反应是自发的。



结构(91)

该方法或使用替代的连接化学的方法也可用于制备其他长度的多聚体(例如,9、10、11、13、14、15、……寡核苷酸)。可以通过使单链多聚体与互补寡核苷酸退火将此种多聚体制成双链。

实施例23:同六聚体siRNA的合成

构建了FVII siRNA的同源六聚体,其包含两种正交类型的生物可裂解连接:i)在合成仪上容易引入的未经修饰的二核苷酸连接,和ii)合成后引入的硫醇/马来酰亚胺衍生物。通过将同源二聚体(X30835)和同源四聚体(X30837)组合来组装FVII同六聚体(XD-09795),如图23所示。同源二聚体和同源四聚体均通过标准技术在固体支持物上合成,每个末端具有氨基和二硫化物基团。解封和纯化后,然后通过硫醇/马来酰亚胺反应将同源二聚体和同源四聚体连接在一起,并且与反义链X18795退火,以得到FVII同源六聚体(XD-09795)。

单链同源二聚体X30835、单链同源四聚体X30837、所得单链同源六聚体X30838以及双链六聚体XD-09795和双链单体XD-09794的序列示于表17中。

表17:实施例12中的寡核苷酸的序列

| 双链体-ID | SEQ ID NO: | ss-ID | 序列(5'-3') |
|----------|------------|--------|--|
| | 146 | X30835 | (DTME)(SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)(NH2C6) |
| | 147 | X30837 | (SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)(NH2C6) |
| XD0 9794 | 148 | X18789 | (NH2C6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT) |
| | 26 | X18795 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu |
| XD0 9795 | 146 & 147 | X30838 | [(DTME)(SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)(NH2C6)](SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)(NH2C6) |
| | 26 | X18795 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu |

实施例24:合成同源六聚体siRNA的纯度和产率

实施例23中所述的合成步骤导致中间产物同源二聚体(X30835)、同源四聚体(X30837)和同源六聚体(X30878)以及所得dsRNA同源六聚体的高产率和纯度(XD-09795),分别如图24A-24B、24C-24D、24E和24F中的HPLC迹线数据所示。

实施例25:同源六聚体siRNA与相应单体之间的体内循环半衰期的比较

在小鼠中确定FVII同源六聚体XD-09795和相应FVII单体XD-09794的血清半衰期。简而言之,通过静脉内(IV)推注将同源六聚体或相应单体施用到3组4只C57/BL6N雌性小鼠中,每集约11周龄。FVII单体和FVII六聚体的剂量均为20mg/kg,并且在IV推注后5、30、60和120分钟抽取血液样品。通过与反义链互补的荧光PNA探针在不同时间点确定FVII反义的浓度,并且结果示于图25中。

如图25所示,5分钟后仅约10%的施用的FVII单体留在循环中,并且30分钟后所有基本上消失。相比之下,几乎所有施用的FVII六聚体在5分钟后留在循环中,而30分钟后留有三分之一的初始剂量。数据显示六聚体的体内循环半衰期比单体大约30倍。

实施例26:使用MSD U-Plex平台确定在t=5、30、60和120分钟时采集的血液样品中细胞因子的水平

为了评估对六聚体的任何不利毒理学反应,使用MSD U-Plex平台进行血液样品中细胞因子水平的分析。分析了来自单体XD-09794和同源六聚体XD-09795处理组的血液样品在不同时间点的细胞因子水平。测定了10种细胞因子(IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p70、KC-GRO、TNF- α 和GM-CSF)的血清水平,并且示于图26A-J中。在测定的10种细胞因子中,在单体与六聚体之间4种细胞因子的血清水平没有变化,剩余6种的血清水平几乎相同。

实施例27:合成同多聚体

使用以下序列通过以上方法制备针对FVII mRNA的siRNA的同源多聚体:

FVII有义:5'-gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)-3'(SEQ ID NO:35)

FVII反义:5'-UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu-3'(SEQ ID NO:26),

通过如下内切核酸酶可裂解的接头dCdA和可还原裂解的接头DTME连接:

表18:实施例28-36中的寡核苷酸

| 序列 ID | 配置/链 |
|----------|--------|
| X18789 | 单体有义 |
| X18795 | 单体反义 |
| XD-09794 | ds 单体 |
| | |
| X30833 | 二聚体有义 |
| X18795 | 单体反义 |
| XD-10635 | ds 二聚体 |
| | |
| X34003 | 三聚体有义 |
| X18795 | 单体反义 |

| 序列 ID | 配置/链 |
|----------|--------------|
| XD-10636 | ds 三聚体 |
| | |
| X30836 | 四聚体有义 |
| X18795 | 单体反义 |
| XD-10637 | ds 四聚体 |
| | |
| X-34004 | 五聚体有义 |
| X18795 | 单体反义 |
| XD-10638 | ds 五聚体 |
| | |
| X34005 | 六聚体有义 |
| X18795 | 单体反义 |
| XD-10639 | ds 六聚体 |
| | |
| X30837 | 四聚体有义硫醇 |
| X30834 | 二聚体有义硫醇 |
| X30835 | 二聚体有义-S-DTME |
| X30838 | 六聚体有义 |
| X18795 | 单体反义 |
| XD-09795 | ds 六聚体 |
| | |
| X34006 | 五聚体有义硫醇 |
| X30834 | 二聚体有义硫醇 |
| X30835 | 二聚体有义-S-DTME |
| X34009 | 七聚体有义 |
| X18795 | 单体反义 |
| XD-10640 | ds 七聚体 |
| | |
| X34007 | 六聚体有义硫醇 |
| X30834 | 二聚体有义硫醇 |
| X30835 | 二聚体有义-S-DTME |
| X34010 | 八聚体有义 |
| X18795 | 单体反义 |
| XD-10641 | ds 八聚体 |

表19:FVII siRNA同源多聚体XD-10635、XD-10636、XD-06386、XD-10635

| 双链
体
ID | SE
Q
ID
NO
: | 单链 ID | 序列 (5'-3') | 配置 |
|---------------|--------------------------|--------|---|-----|
| XD-1
0635 | 2
149 | X30833 | (C6SSC6) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT) C6NH2) | 二聚体 |
| | 26 | X18795 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu | |
| XD-1
0636 | 150 | X34003 | (C6SSC6) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT) (C6NH2) | 三聚体 |
| | 26 | X18795 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu | |
| XD-0
6386 | 151 | X30836 | (C6SSC6) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT) (C6NH2) | 四聚体 |
| | 26 | X18795 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu | |
| XD-1
0635 | 152 | X34004 | (C6SSC6) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT) C6NH2) | 五聚体 |
| | 26 | X18795 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu | |
| XD-0
6728 | 153 | X34005 | (C6SSC6) gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf
(invdT) C6NH2) | 六聚体 |
| | 26 | X18795 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu | |

实施例28:FVII单体XD-09794的合成

合成在有义链的5'-末端具有氨基功能的FVII siRNA的单体有义链X18789并且进行纯化,如图27A和27B所示。产率,48.3mg,6.694mmol,18.6%。同样合成相应的反义链X18795,以产生46.3mg,6.35mmol,31.9%。然后使5.35mg(747.3nmol)的有义链和5.45mg(747.3nmol)的反义链退火以产生10.8mg(747.4nmol)相应的双链FVII单体(XD-09794)。

实施例29:FVII二聚体XD-10635的合成

合成分别在3'-和5'-末端具有氨基和二硫化物基团并且含有dCdA可裂解的接头的同源二聚体有义链FVII siRNA X30833并且进行纯化,如图28A和28B所示。产率,35.8mg, 6.694mmol,18.6%。

然后使5.51mg (362.6nmol)的有义链X30833和5.29mg (725.2nmol)的反义链X18795退火以产生10.8mg (362.6nmol)相应的双链FVII同源二聚体(XD-10635)。

实施例30:FVII三聚体XD-10636的合成

合成分别在3'-和5'-末端具有氨基和二硫化物基团并且含有两个dCdA可裂解的接头的同源三聚体有义链FVII siRNA X34003并且进行纯化,如图29A和29B所示。产率, 19.6mg (857.9nmol,19.3%)。

然后使5.16mg (225.5nmol)的有义链X34003和4.93mg (676.5nmol)的反义链X18795退火以产生10.1mg (225.5nmol)相应的双链FVII同源三聚体(XD-10636)。

实施例31:FVII四聚体XD-10637的合成

合成分别在3'-和5'-末端具有氨基和二硫化物基团并且含有三个dCdA可裂解的接头的同源四聚体有义链FVII siRNA X30836并且进行纯化,如图30A和30B所示。产率, 53.1mg (1734.5nmol,13%)。

然后使5.53mg (180.8nmol)的有义链X30836和5.27mg (723.2nmol)的反义链X18795退火以产生10.8mg (180.8nmol)相应的双链FVII同源四聚体(XD-10637)。

实施例32:FVII五聚体XD-10638的合成

合成分别在3'-和5'-末端具有氨基和二硫化物基团并且含有四个dCdA可裂解的接头的同源五聚体有义链FVII siRNA X34004并且进行纯化,如图31A和31B所示。产率, 35.9mg (938nmol,10.6%)。

然后使5.53mg (144.5nmol)的有义链X34004和5.27mg (723.2nmol)的反义链X18795退火以产生10.8mg (144.5nmol)相应的双链FVII同源五聚体(XD-10638)。

实施例33:FVII六聚体XD-10639的合成

合成在3'-和5'-末端分别具有氨基和二硫化物基团并且含有五个dCdA可裂解的接头的同源六聚体有义链FVII siRNA X34005并且进行纯化,如图32A和32B所示。产率, 21.4mg (466.1nmol,5.3%)。

然后使5.15mg (144.5nmol)的有义链X34005和4.89mg (723.2nmol)的反义链X18795退火以产生10.04mg (111.9nmol)相应的双链FVII同源六聚体(XD-10639)。

实施例34:FVII六聚体XD-09795的合成

如图33A-33B所示,通过实施例28和30中制备的同源二聚体有义链FVII siRNA X30833和同源四聚体有义链FVII siRNA X30836合成在两个3'末端具有氨基并且含有四个dCdA可裂解的接头和一个可还原裂解的DTME接头的同源六聚体有义链FVII siRNA X30838并且进行纯化。使用DTT从X30833和X30836上裂解二硫化物基团,以得到相应的5-硫醇衍生物X30834和X30837,产率分别为97.6%和91.9%。然后使用上述程序将14.9mg (986.7nmol) X30834转化为10.6mg (700.5nmol,71.0%)相应的单-DTME衍生物X30835,使其与1当量的X30837反应以得到4.2mg (90.7nmol,64%)的单链同源六聚体X30838。然后使3.8mg (83nmol)的有义链X30838和3.7mg (502nmol,6摩尔当量)的反义链X18795退火以产生7.5mg

(83.7nmol) 相应的双链FVII同源六聚体 (XD-09795)。

实施例35:FVII七聚体XD-10640的合成

如图34A-34B所示,通过同源二聚体有义链FVII siRNA X30833和同源物聚体有义链FVII siRNA X34004合成在两个3' 末端具有氨基并且含有五个dCdA可裂解的接头的同源七聚体有义链FVII siRNA X34009并且进行纯化。使用DTT从X30833和X34004上裂解二硫化物基团,以分别得到相应的5-硫醇衍生物X30834 (28.3mg,1877.9nmol,86.7%) 和X34006 (21.8mg,572.2nmol)。然后使用上述程序将X30834转化为相应的单-DTME衍生物X30835 (22.6mg,1465.2nmol,78.1%)。使8.8mg (572.2nmol) 的X30835与X34006 (21.8mg,572.2nmol) 反应以得到单链同源七聚体X34009 (8.96mg,167.3nmol,29.2%)。然后使5.53mg (103.3nmol) 的有义链X34009和5.27mg (723.1nmol) 的反义链X18795退火以产生10.8mg (103.3nmol) 相应的双链FVII同源七聚体 (XD-10640)。

实施例36:FVII八聚体XD-10641的合成

如图35A-35B所示,通过同源二聚体有义链FVII siRNA X30833和同源六聚体有义链FVII siRNA X34005合成在两个3' 末端具有氨基并且含有六个dCdA可裂解的接头的FVII siRNA X34010同源八聚体有义链并且进行纯化。使用DTT从X34005上裂解二硫化物基团,以得到相应的5-硫醇衍生物X34007 (11.5mg,251nmol,99.7%),使其与先前获得的单-DTME同源二聚体衍生物X30835 (3.85mg,250.2nmol) 反应以得到单链同源八聚体X34010 (5.2mg,85.0nmol,34.0%)。然后使4.92mg (80.33nmol) 的有义链X34010和4.68mg (642.4nmol) 的反义链X18795退火以产生9.6mg (80.3nmol) 相应的双链FVII同源八聚体 (XD-10641)。

实施例37:动物实验

通过经由尾静脉将浓度为在x1 PBS中的1ng/ml的测试物质iv推注到3组4只C57/BL6N雌性小鼠 (每组的11周龄) 中确定同源多聚体XD-10635、XD-10636、XD-10637、XD-10638、XD-10639、XD-10640和XD-10641以及相应单体XD-09794的血清半衰期。FVII单体和FVII多聚体的剂量均为20mg/kg,并且在5、30、60、120和360分钟时抽取血液样品。使用蛋白酶K消化血清样品,并且将特定的互补Atto425-肽核酸-荧光探针与反义链杂交。随后的AEX-HPLC分析能够从代谢物中区分完整的反义链,导致该方法的高度特异性。仅完整母体化合物的值示于下表17中并且在图36A和36B中分别显示为FVII多聚体的血清中FVII siRNA水平随时间的平滑线散点图和直标散点图。

表20:FVII同源多聚体的随时间的血清中FVII siRNA水平。

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|-------------|---------|-------|----|----------|----|--------|--------------|
| 盐水 | 1 ng/mL | S1 | 25 | 0 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 盐水 | 1 ng/mL | S2 | 25 | 0 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 盐水 | 1 ng/mL | S3 | 25 | 0 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 盐水 | 1 ng/mL | S4 | 25 | 0 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| | | | | | | 平均 | BLOQ |
| | | | | | | SD | n.a. |
| | | | | | | | |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A1 | 1 | 20 mg/kg | F | 5 min | 30,988.3 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A2 | 1 | 20 mg/kg | F | 5 min | 32,628.0 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A3 | 1 | 20 mg/kg | F | 5 min | 37,508.9 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A4 | 1 | 20 mg/kg | F | 5 min | 35,858.3 |
| | | | | | | 平均 | 34,245.9 |
| | | | | | | SD | 2,970.8 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A5 | 2 | 20 mg/kg | F | 30 min | 3,107.0 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A6 | 2 | 20 mg/kg | F | 30 min | 3,520.2 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A7 | 2 | 20 mg/kg | F | 30 min | 3,371.1 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A8 | 2 | 20 mg/kg | F | 30 min | 2,664.5 |
| | | | | | | 平均 | 3,165.7 |
| | | | | | | SD | 375.3 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A1 | 1 | 20 mg/kg | F | 1 h | 1,339.8 |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|-------------|---------|-------|---|----------|----|-----|--------------|
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A2 | 1 | 20 mg/kg | F | 1 h | 953.0 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A3 | 1 | 20 mg/kg | F | 1 h | 1,435.8 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A4 | 1 | 20 mg/kg | F | 1 h | 1,730.9 |
| | | | | | | 平均 | 1,364.9 |
| | | | | | | SD | 321.1 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A5 | 2 | 20 mg/kg | F | 2 h | 598.8 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A6 | 2 | 20 mg/kg | F | 2 h | 202.7 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A7 | 2 | 20 mg/kg | F | 2 h | 302.5 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A8 | 2 | 20 mg/kg | F | 2 h | 124.6 |
| | | | | | | 平均 | 307.2 |
| | | | | | | SD | 207.6 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A9 | 3 | 20 mg/kg | F | 6 h | 4.2 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A10 | 3 | 20 mg/kg | F | 6 h | 4.0 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A11 | 3 | 20 mg/kg | F | 6 h | 3.5 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A12 | 3 | 20 mg/kg | F | 6 h | 14.5 |
| | | | | | | 平均 | 6.6 |
| | | | | | | SD | 5.3 |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A9 | 3 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A10 | 3 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A11 | 3 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 单体 XD-09794 | 1 ng/mL | A12 | 3 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| | | | | | | 平均 | BLOQ |
| | | | | | | SD | n.a. |
| | | | | | | SD | |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|--------------|---------|-------|---|----------|----|--------|--------------|
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B1 | 4 | 20 mg/kg | F | 5 min | 82,272.1 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B2 | 4 | 20 mg/kg | F | 5 min | 90,574.4 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B3 | 4 | 20 mg/kg | F | 5 min | 94,213.6 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B4 | 4 | 20 mg/kg | F | 5 min | 92,612.6 |
| | | | | | | 平均 | 89,918.2 |
| | | | | | | SD | 5,310.5 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B5 | 5 | 20 mg/kg | F | 30 min | 6,107.7 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B6 | 5 | 20 mg/kg | F | 30 min | 5,204.0 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B7 | 5 | 20 mg/kg | F | 30 min | 7,221.8 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B8 | 5 | 20 mg/kg | F | 30 min | 6,677.9 |
| | | | | | | 平均 | 6,302.9 |
| | | | | | | SD | 862.3 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B1 | 4 | 20 mg/kg | F | 1 h | 2,114.2 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B2 | 4 | 20 mg/kg | F | 1 h | 2,911.0 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B3 | 4 | 20 mg/kg | F | 1 h | 2,722.5 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B4 | 4 | 20 mg/kg | F | 1 h | 2,092.7 |
| | | | | | | 平均 | 2,460.1 |
| | | | | | | SD | 419.0 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B5 | 5 | 20 mg/kg | F | 2 h | 558.0 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B6 | 5 | 20 mg/kg | F | 2 h | 348.9 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B7 | 5 | 20 mg/kg | F | 2 h | 2,718.7 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B8 | 5 | 20 mg/kg | F | 2 h | 549.0 |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|--------------|---------|-------|---|----------|----|--------|--------------|
| | | | | | | 平均 | 1,043.7 |
| | | | | | | SD | 1,120.9 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B9 | 6 | 20 mg/kg | F | 6 h | 16.9 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B10 | 6 | 20 mg/kg | F | 6 h | 19.6 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B11 | 6 | 20 mg/kg | F | 6 h | 30.3 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B12 | 6 | 20 mg/kg | F | 6 h | 1,273.8 |
| | | | | | | 平均 | 335.2 |
| | | | | | | SD | 625.8 |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B9 | 6 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B10 | 6 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B11 | 6 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 二聚体 XD-10635 | 1 ng/mL | B12 | 6 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| | | | | | | 平均 | BLOQ |
| | | | | | | SD | n.a. |
| | | | | | | | |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C1 | 7 | 20 mg/kg | F | 5 min | 144,194.8 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C2 | 7 | 20 mg/kg | F | 5 min | 172,691.1 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C3 | 7 | 20 mg/kg | F | 5 min | 155,857.5 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C4 | 7 | 20 mg/kg | F | 5 min | 147,988.0 |
| | | | | | | 平均 | 155,182.9 |
| | | | | | | SD | 12,642.5 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C5 | 8 | 20 mg/kg | F | 30 min | 15,887.3 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C6 | 8 | 20 mg/kg | F | 30 min | 16,202.8 |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|--------------|---------|-------|---|----------|----|--------|--------------|
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C7 | 8 | 20 mg/kg | F | 30 min | 17,932.3 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C8 | 8 | 20 mg/kg | F | 30 min | 17,537.3 |
| | | | | | | 平均 | 16,889.9 |
| | | | | | | SD | 997.2 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C1 | 7 | 20 mg/kg | F | 1 h | 6,276.1 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C2 | 7 | 20 mg/kg | F | 1 h | 3,939.7 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C3 | 7 | 20 mg/kg | F | 1 h | 4,018.8 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C4 | 7 | 20 mg/kg | F | 1 h | 4,884.4 |
| | | | | | | 平均 | 4,779.8 |
| | | | | | | SD | 1,085.5 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C5 | 8 | 20 mg/kg | F | 2 h | 102.7 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C6 | 8 | 20 mg/kg | F | 2 h | 197.9 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C7 | 8 | 20 mg/kg | F | 2 h | 1,680.9 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C8 | 8 | 20 mg/kg | F | 2 h | 469.5 |
| | | | | | | 平均 | 612.8 |
| | | | | | | SD | 728.9 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C9 | 9 | 20 mg/kg | F | 6 h | 32.7 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C10 | 9 | 20 mg/kg | F | 6 h | 8.0 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C11 | 9 | 20 mg/kg | F | 6 h | 27.5 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C12 | 9 | 20 mg/kg | F | 6 h | 12.1 |
| | | | | | | 平均 | 20.1 |
| | | | | | | SD | 11.9 |
| 三聚体 XD-10636 | 1 ng/mL | C9 | 9 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|-----------------|------------|-------|----|-------------|----|--------|---------------|
| 三聚体
XD-10636 | 1
ng/mL | C10 | 9 | 20
mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 三聚体
XD-10636 | 1
ng/mL | C11 | 9 | 20
mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 三聚体
XD-10636 | 1
ng/mL | C12 | 9 | 20
mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| | | | | | | 平均 | BLOQ |
| | | | | | | SD | n.a. |
| | | | | | | | |
| 四聚体
XD-10637 | 1
ng/mL | D1 | 10 | 20
mg/kg | F | 5 min | 174,50
6.7 |
| 四聚体
XD-10637 | 1
ng/mL | D2 | 10 | 20
mg/kg | F | 5 min | 184,14
9.5 |
| 四聚体
XD-10637 | 1
ng/mL | D3 | 10 | 20
mg/kg | F | 5 min | 180,07
7.0 |
| 四聚体
XD-10637 | 1
ng/mL | D4 | 10 | 20
mg/kg | F | 5 min | 204,79
6.1 |
| | | | | | | 平均 | 185,88
2.3 |
| | | | | | | SD | 13,214.
1 |
| 四聚体
XD-10637 | 1
ng/mL | D5 | 11 | 20
mg/kg | F | 30 min | 89,104.
1 |
| 四聚体
XD-10637 | 1
ng/mL | D6 | 11 | 20
mg/kg | F | 30 min | 88,408.
8 |
| 四聚体
XD-10637 | 1
ng/mL | D7 | 11 | 20
mg/kg | F | 30 min | 79,389.
4 |
| 四聚体
XD-10637 | 1
ng/mL | D8 | 11 | 20
mg/kg | F | 30 min | 83,820.
0 |
| | | | | | | 平均 | 85,180.
6 |
| | | | | | | SD | 4,516.8 |
| 四聚体
XD-10637 | 1
ng/mL | D1 | 10 | 20
mg/kg | F | 1 h | 25,278.
6 |
| 四聚体
XD-10637 | 1
ng/mL | D2 | 10 | 20
mg/kg | F | 1 h | 24,494.
1 |
| 四聚体
XD-10637 | 1
ng/mL | D3 | 10 | 20
mg/kg | F | 1 h | 23,070.
4 |
| 四聚体 | 1 | D4 | 10 | 20 | F | 1 h | 31,567. |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|--------------|---------|-------|----|----------|----|-------|--------------|
| XD-10637 | ng/mL | | | mg/kg | | | 0 |
| | | | | | | 平均 | 26,102.5 |
| | | | | | | SD | 3,755.9 |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D5 | 11 | 20 mg/kg | F | 2 h | 9,191.5 |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D6 | 11 | 20 mg/kg | F | 2 h | 8,969.4 |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D7 | 11 | 20 mg/kg | F | 2 h | 5,059.5 |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D8 | 11 | 20 mg/kg | F | 2 h | 14,666.2 |
| | | | | | | 平均 | 9,471.7 |
| | | | | | | SD | 3,948.9 |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D9 | 12 | 20 mg/kg | F | 6 h | 15.4 |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D10 | 12 | 20 mg/kg | F | 6 h | 254.3 |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D11 | 12 | 20 mg/kg | F | 6 h | 58.3 |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D12 | 12 | 20 mg/kg | F | 6 h | 17.5 |
| | | | | | | 平均 | 86.4 |
| | | | | | | SD | 113.7 |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D9 | 12 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D10 | 12 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D11 | 12 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 四聚体 XD-10637 | 1 ng/mL | D12 | 12 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| | | | | | | 平均 | BLOQ |
| | | | | | | SD | n.a. |
| | | | | | | | |
| 五聚体 XD-10638 | 1 ng/mL | E1 | 13 | 20 mg/kg | F | 5 min | 201,669.6 |
| 五聚体 XD-10638 | 1 ng/mL | E2 | 13 | 20 mg/kg | F | 5 min | 214,525.8 |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|-----------------|------------|-------|----|-------------|----|--------|---------------|
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E3 | 13 | 20
mg/kg | F | 5 min | 247,54
4.7 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E4 | 13 | 20
mg/kg | F | 5 min | 207,87
2.5 |
| | | | | | | 平均 | 217,90
3.2 |
| | | | | | | SD | 20,446.
4 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E5 | 14 | 20
mg/kg | F | 30 min | 112,31
8.2 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E6 | 14 | 20
mg/kg | F | 30 min | 110,78
6.0 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E7 | 14 | 20
mg/kg | F | 30 min | 94,714.
7 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E8 | 14 | 20
mg/kg | F | 30 min | 47,610.
6 |
| | | | | | | 平均 | 91,357.
4 |
| | | | | | | SD | 30,231.
8 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E1 | 13 | 20
mg/kg | F | 1 h | 48,800.
2 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E2 | 13 | 20
mg/kg | F | 1 h | 46,770.
8 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E3 | 13 | 20
mg/kg | F | 1 h | 57,711.
0 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E4 | 13 | 20
mg/kg | F | 1 h | 42,458.
4 |
| | | | | | | 平均 | 48,935.
1 |
| | | | | | | SD | 6,420.4 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E5 | 14 | 20
mg/kg | F | 2 h | 19,806.
0 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E6 | 14 | 20
mg/kg | F | 2 h | 20,633.
6 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E7 | 14 | 20
mg/kg | F | 2 h | 18,214.
2 |
| 五聚体
XD-10638 | 1
ng/mL | E8 | 14 | 20
mg/kg | F | 2 h | 27,970.
4 |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|--------------|---------|-------|----|----------|----|--------|--------------|
| | | | | | | 平均 | 21,656.1 |
| | | | | | | SD | 4,327.6 |
| 五聚体 XD-10638 | 1 ng/mL | E9 | 15 | 20 mg/kg | F | 6 h | 16.4 |
| 五聚体 XD-10638 | 1 ng/mL | E10 | 15 | 20 mg/kg | F | 6 h | 15.7 |
| 五聚体 XD-10638 | 1 ng/mL | E11 | 15 | 20 mg/kg | F | 6 h | 14.2 |
| 五聚体 XD-10638 | 1 ng/mL | E12 | 15 | 20 mg/kg | F | 6 h | 49.4 |
| | | | | | | 平均 | 23.9 |
| | | | | | | SD | 17.0 |
| 五聚体 XD-10638 | 1 ng/mL | E9 | 15 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 五聚体 XD-10638 | 1 ng/mL | E10 | 15 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 五聚体 XD-10638 | 1 ng/mL | E11 | 15 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 五聚体 XD-10638 | 1 ng/mL | E12 | 15 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| | | | | | | 平均 | BLOQ |
| | | | | | | SD | n.a. |
| | | | | | | | |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F1 | 16 | 20 mg/kg | F | 5 min | 221,882.0 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F2 | 16 | 20 mg/kg | F | 5 min | 227,901.1 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F3 | 16 | 20 mg/kg | F | 5 min | 230,969.3 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F4 | 16 | 20 mg/kg | F | 5 min | 229,232.9 |
| | | | | | | 平均 | 227,496.3 |
| | | | | | | SD | 3,948.1 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F5 | 17 | 20 mg/kg | F | 30 min | 125,871.8 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F6 | 17 | 20 mg/kg | F | 30 min | 145,598.8 |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|--------------|---------|-------|----|----------|----|--------|--------------|
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F7 | 17 | 20 mg/kg | F | 30 min | 76,775.7 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F8 | 17 | 20 mg/kg | F | 30 min | 107,085.3 |
| | | | | | | 平均 | 113,832.9 |
| | | | | | | SD | 29,284.7 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F1 | 16 | 20 mg/kg | F | 1 h | 69,114.9 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F2 | 16 | 20 mg/kg | F | 1 h | 76,580.8 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F3 | 16 | 20 mg/kg | F | 1 h | 68,920.5 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F4 | 16 | 20 mg/kg | F | 1 h | 78,412.0 |
| | | | | | | 平均 | 73,257.1 |
| | | | | | | SD | 4,952.6 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F5 | 17 | 20 mg/kg | F | 2 h | 25,963.0 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F6 | 17 | 20 mg/kg | F | 2 h | 33,380.4 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F7 | 17 | 20 mg/kg | F | 2 h | 19,372.0 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F8 | 17 | 20 mg/kg | F | 2 h | 31,798.1 |
| | | | | | | 平均 | 27,628.4 |
| | | | | | | SD | 6,361.7 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F9 | 18 | 20 mg/kg | F | 6 h | 52.7 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F10 | 18 | 20 mg/kg | F | 6 h | 33.1 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F11 | 18 | 20 mg/kg | F | 6 h | 69.4 |
| 六聚体 XD-10639 | 1 ng/mL | F12 | 18 | 20 mg/kg | F | 6 h | 47.3 |
| | | | | | | 平均 | 50.6 |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|-----------------|------------|-------|----|-------------|----|--------|---------------|
| | | | | | | SD | 15.0 |
| 六聚体
XD-10639 | 1
ng/mL | F9 | 18 | 20
mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 六聚体
XD-10639 | 1
ng/mL | F10 | 18 | 20
mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 六聚体
XD-10639 | 1
ng/mL | F11 | 18 | 20
mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 六聚体
XD-10639 | 1
ng/mL | F12 | 18 | 20
mg/kg | F | 7 天 | 3.4 |
| | | | | | | 平均 | BLOQ |
| | | | | | | SD | n.a. |
| | | | | | | | |
| 七聚体
XD-10640 | 1
ng/mL | G1 | 19 | 20
mg/kg | F | 5 min | 189,15
5.8 |
| 七聚体
XD-10640 | 1
ng/mL | G2 | 19 | 20
mg/kg | F | 5 min | 203,09
2.8 |
| 七聚体
XD-10640 | 1
ng/mL | G3 | 19 | 20
mg/kg | F | 5 min | 227,23
4.0 |
| 七聚体
XD-10640 | 1
ng/mL | G4 | 19 | 20
mg/kg | F | 5 min | 266,25
0.0 |
| | | | | | | 平均 | 221,43
3.2 |
| | | | | | | SD | 33,765.
8 |
| 七聚体
XD-10640 | 1
ng/mL | G5 | 20 | 20
mg/kg | F | 30 min | 123,59
0.6 |
| 七聚体
XD-10640 | 1
ng/mL | G6 | 20 | 20
mg/kg | F | 30 min | 119,55
6.1 |
| 七聚体
XD-10640 | 1
ng/mL | G7 | 20 | 20
mg/kg | F | 30 min | 120,68
6.6 |
| 七聚体
XD-10640 | 1
ng/mL | G8 | 20 | 20
mg/kg | F | 30 min | 142,60
6.4 |
| | | | | | | 平均 | 126,60
9.9 |
| | | | | | | SD | 10,798.
9 |
| 七聚体
XD-10640 | 1
ng/mL | G1 | 19 | 20
mg/kg | F | 1 h | 73,022.
3 |
| 七聚体 | 1
ng/mL | G2 | 19 | 20
mg/kg | F | 1 h | 58,856.
0 |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|--------------|---------|-------|----|----------|----|-----|--------------|
| XD-10640 | | | | | | | |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G3 | 19 | 20 mg/kg | F | 1 h | 64,204.3 |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G4 | 19 | 20 mg/kg | F | 1 h | 74,596.0 |
| | | | | | | 平均 | 67,669.7 |
| | | | | | | SD | 7,445.7 |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G5 | 20 | 20 mg/kg | F | 2 h | 13,907.3 |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G6 | 20 | 20 mg/kg | F | 2 h | 12,667.2 |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G7 | 20 | 20 mg/kg | F | 2 h | 17,123.0 |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G8 | 20 | 20 mg/kg | F | 2 h | 24,537.2 |
| | | | | | | 平均 | 17,058.7 |
| | | | | | | SD | 5,327.6 |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G9 | 21 | 20 mg/kg | F | 6 h | 45.5 |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G10 | 21 | 20 mg/kg | F | 6 h | 151.3 |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G11 | 21 | 20 mg/kg | F | 6 h | 56.1 |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G12 | 21 | 20 mg/kg | F | 6 h | 58.7 |
| | | | | | | 平均 | 77.9 |
| | | | | | | SD | 49.3 |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G9 | 21 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G10 | 21 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G11 | 21 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 七聚体 XD-10640 | 1 ng/mL | G12 | 21 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| | | | | | | 平均 | BLOQ |
| | | | | | | SD | n.a. |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|--------------|---------|-------|----|----------|----|--------|--------------|
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H1 | 22 | 20 mg/kg | F | 5 min | 203,428.1 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H2 | 22 | 20 mg/kg | F | 5 min | 231,234.5 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H3 | 22 | 20 mg/kg | F | 5 min | 243,057.5 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H4 | 22 | 20 mg/kg | F | 5 min | 246,973.6 |
| | | | | | | 平均 | 231,173.4 |
| | | | | | | SD | 19,669.6 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H5 | 23 | 20 mg/kg | F | 30 min | 152,545.2 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H6 | 23 | 20 mg/kg | F | 30 min | 116,917.0 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H7 | 23 | 20 mg/kg | F | 30 min | 127,392.7 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H8 | 23 | 20 mg/kg | F | 30 min | 119,659.9 |
| | | | | | | 平均 | 129,128.7 |
| | | | | | | SD | 16,228.9 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H1 | 22 | 20 mg/kg | F | 1 h | 59,270.6 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H2 | 22 | 20 mg/kg | F | 1 h | 67,819.6 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H3 | 22 | 20 mg/kg | F | 1 h | 74,942.8 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H4 | 22 | 20 mg/kg | F | 1 h | 75,228.9 |
| | | | | | | 平均 | 69,315.5 |
| | | | | | | SD | 7,522.7 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H5 | 23 | 20 mg/kg | F | 2 h | 37,353.7 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H6 | 23 | 20 mg/kg | F | 2 h | 16,390.7 |

| 分析物 ID | LLOQ | 动物 ID | 组 | 剂量水平 | 性别 | 时间点 | [FVII] ng/mL |
|--------------|---------|-------|----|----------|----|-----|--------------|
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H7 | 23 | 20 mg/kg | F | 2 h | 27,527.3 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H8 | 23 | 20 mg/kg | F | 2 h | 20,359.7 |
| | | | | | | 平均 | 25,407.9 |
| | | | | | | SD | 9,201.2 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H9 | 24 | 20 mg/kg | F | 6 h | 81.2 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H10 | 24 | 20 mg/kg | F | 6 h | 76.9 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H11 | 24 | 20 mg/kg | F | 6 h | 162.5 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H12 | 24 | 20 mg/kg | F | 6 h | 138.5 |
| | | | | | | 平均 | 114.8 |
| | | | | | | SD | 42.4 |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H9 | 24 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H10 | 24 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H11 | 24 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| 八聚体 XD-10641 | 1 ng/mL | H12 | 24 | 20 mg/kg | F | 7 天 | BLOQ |
| | | | | | | 平均 | BLOQ |
| | | | | | | SD | n.a. |

[0724] 图37A、37B、37C和37D分别示出了FVII多聚体在5分钟、30分钟、60分钟和120分钟时血清中FVII siRNA水平的柱状图。

[0725] 图38A和38B示出了FVII多聚体的血清中总FVII siRNA水平,如曲线下面积所表示的,以ng*min/mL表示并且归一化为单体AUC值。

表21:FVII siRNA单体和多聚体的曲线下面积值。

| | 单体 | 二聚体 | 3-聚体 | 4-聚体 | 5-聚体 | 6-聚体 | 7-聚体 | 8-聚体 |
|---|----------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 5 | 34,245.0 | 82272 | 155182 | 185882 | 217903 | 227496 | 221433 | 231173 |

| | 单体 | 二聚体 | 3-聚体 | 4-聚体 | 5-聚体 | 6-聚体 | 7-聚体 | 8-聚体 |
|-------------------------------------|---------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 30 | 3,165.0 | 6302 | 16889 | 85180 | 91357 | 133832 | 126609 | 129128 |
| 60 | 1,364.0 | 2460 | 4779 | 26102 | 48935 | 73257 | 67669 | 69315 |
| 120 | 307.0 | 1043 | 612 | 9471 | 21656 | 27268 | 17058 | 25407 |
| 360 | 6.6 | 625 | 20 | 86 | 23.9 | 50.6 | 77 | 115 |
| 总
AUC
(min
* ng /
mL) | 621727 | 160463
0 | 271349
0 | 727158
3 | 106894
48 | 134209
17 | 118628
13 | 133845
88 |
| AUC,
归一
化为
单体 | 1.0 | 2.6 | 4.4 | 11.7 | 17.2 | 21.6 | 19.1 | 21.5 |

多聚体的血清半衰期是根据以下等式使用非线性单相衰减从FVII浓度数据计算的：

$$Y = (Y_0 - \text{平台}) * \exp(-k * x) + \text{平台}$$

其中Y为X时间的浓度，半衰期为 $2/k$ 的自然对数。应用了关于初始和最终条件的4种不同假设，如下：

- 1: 不对数据做任何假设
- 2: 所有siRNA都以相同的初始浓度注射 (即, 所有的 $t=0$ 时的浓度都相同)。
- 3: 所有siRNA浓度在 $t=$ 无穷大时都衰减到0。
- 4: 所有siRNA都以相同的初始浓度注射 (即, 所有的 $t=0$ 时的浓度都相同), 并且所有siRNA浓度在 $t=$ 无穷大时都衰减到0。

表22: 计算的FVII siRNA同源多聚体的血清半衰期。

| | 单
体 | 二聚
体 | 3-聚
体 | 4-聚
体 | 5-聚
体 | 6-聚
体 | 7-聚
体 | 8-聚
体 |
|---|--------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| $\frac{1}{2}$ 期, 没有假设 (min) | 7.10 | 6.10 | 7.63 | 20.82 | 20.65 | 29.1 | 31.66 | 30.81 |
| $\frac{1}{2}$ 期, 所有样品平台到 0 (min) | 7.37 | 6.59 | 7.93 | 21.23 | 23.38 | 31.50 | 31.62 | 31.92 |
| $\frac{1}{2}$ 期, 所有样品以相同初始值= 231173 开始 | 1.80 | 3.61 | 8.39 | 19.29 | 24.21 | 33.65 | 35.07 | 36.63 |
| $\frac{1}{2}$ 期, 所有样品以相同初始值= 123173 开始并且平台到 0 (min) | 1.81 | 3.68 | 8.45 | 19.88 | 25.83 | 34.72 | 34.39 | 36.49 |

实施例38: 计算FVII siRNA同源多聚体达到与单体在5分钟时相同的FVII siRNA浓度所花费的时间。

因为单体的FVII浓度已经显著低于在第一采样时间(5分钟)时注射的浓度的50%，所以多聚体的血清FVII水平等于单体在5分钟时的血清FVII水平所花费的时间使用以下等式计算：

$$Y = (Y_0 - \text{平台}) * \exp(-k * x) + \text{平台}$$

其中平台设置在单体在5分钟时的浓度(34,245ng/ml)并且示于图39中。

进行以下计算以确定FVII siRNA同源多聚体达到FVII siRNA单体在5分钟时的浓度的时间(以分钟表示)：

$$Y = (Y_0 - \text{平台}) * \exp(-k * x) + \text{平台}, \text{其中} x \text{为以分钟表示的时间}$$

$$34245 = (231173 - 0) * e^{(-kx)} + 0, \text{其中} x \text{为分钟}$$

$$34245 = 231173 * e^{(-kx)}$$

$$0.14813453 = e^{-kx}$$

$$\ln(0.14813453) = -kx$$

$$-1.909625779 = -kx$$

表23:FVII siRNA同源多聚体达到FVII siRNA单体在5分钟时的浓度的计算时间。

| | 单体 | 二聚体 | 3-聚体 | 4-聚体 | 5-聚体 | 6-聚体 | 7-聚体 | 8-聚体 |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 不同构建体的k值 | 0.3819 | 0.1882 | 0.0820 | 0.0348 | 0.0268 | 0.0199 | 0.0201 | 0.019 |
| 时间(min) | 5.0 | 10.1 | 23.3 | 54.8 | 71.2 | 95.7 | 94.8 | 100.5 |

实施例39:GalNAc 4:1:1FVII:ApoB:TTR siRNA异源六聚体的制备

通过图42中所示的反应序列制备GalNAc 4:1:1FVII:ApoB:TTR异源六聚体。根据以上“另外的一般程序1:单链寡核苷酸合成”中的方法在合成仪上制备灰色框中的寡核苷酸,剩余的根据实施例1-6中的程序制备。制备的序列如关键中所示,其中“X”、“x”和“Xf”分别表示核糖核苷酸、2’-O-甲基核糖核苷酸和2’-氟-2’-脱氧核糖核苷酸。“InvdT”表示反向脱氧胸苷残基,“s”表示硫代磷酸酯连接。“(SHC₆)”和“(C₆SSC₆)”分别表示硫代己基和二己基二硫化物接头。“C₆NH₂”和“C₆NH”可互换使用以表示氨基己基接头。“(DTME)”表示二硫代双马来酰亚胺乙烷。具体的siRNA序列在下表24中概述。

表24:实施例39中的寡核苷酸序列

| SEQ ID NO: | ss-ID | 序列 (5'-3') | 靶标 |
|------------|--------|--|---------------------------------------|
| 156 | X39850 | (GalNAc3)(NHC6)
gscsAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfc
UfcAf(inv dT)(SHC6)
(DTME) | 具有5'-端的三价GalNAc簇和3'-硫醇DTME官能团的FVII有义链 |
| 157 | X39851 | (NH2C6)
gscsAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfc
UfcAf(inv dT)(SHC6) | 具有游离5'-氨基和3'-硫醇基团的FVII有义链 |
| 26 | X18795 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuU
fuGfcusu | FVII反义链 |
| 158 | X39855 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuU
fuGfcusu(C6SSC6)
UfsCfgAfuUfuCfuCfcAfaA
fuAfgusu | 通过二硫化物连接与ApoB反义链连接的FVII反义链 |
| 159 | X39852 | gscsAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfc
UfcAf(inv dT)(C6SSC6)
AfsasCfaGfuGfuUfcUfuGfcU
fcUfaUfaAf(inv dT) | 通过二硫化物连接与TTR有义链连接的FVII有义链 |
| 160 | X39854 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuU
fuGfcusu(C6SSC6)
usUfsaUfaGfaGfcAfaAfcAfc
UfgUfususu | 通过二硫化物连接与TTR反义链连接的FVII反义链 |
| 161 | X39853 | gscsAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfc
UfcAf(inv dT)(C6SSC6)
csusAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfu
CfgAf(inv dT) | 通过二硫化物连接与ApoB有义链连接的FVII有义链 |

如上所述,用于生成X39850(GalNAc缀合的FVII有义链)和X39851(具有游离5'-氨基和3'-硫醇基团的FVII有义链)的一般反应方案示于图43中。使用反相HPLC(RP-HPLC)和质谱(MS)来确认X39850、X39851、X18795和X39855的纯度(图44-图47)。

进行逐步退火以获得具有ApoB反义突出端的所需异源二聚体双链体。首先,使GalNAc缀合的FVII有义链X39850与1摩尔当量的反义X18795退火以形成双链体X39850-X18795。RP-HPLC确认双链体纯度为78.2%(图48)。然后将FVII双链体X39850-X18795与FVII有义链X39851缀合,然后进行离子交换纯化以形成X39850-X18795-X39851。RP-HPLC确认双链体纯度为87.0%(图49)。接下来,将1摩尔当量的二聚体反义链X39855添加到X39850-X18795-X39851双链体中以形成X39850-X18795-X39851-X39855。RP-HPLC确认双链体纯度为97.6%(图50)。

然后生成X39852(通过二硫化物连接与TTR有义链连接的FVII有义链)、X39854(通过二硫化物连接与TTR反义链连接的FVII反义链)和X39853(通过二硫化物连接与ApoB有义链连接的FVII有义链)。使用RP-HPLC和MS来确认X39852、X39854和X39853的纯度(图51-53)。

进行逐步退火以获得具有ApoB有义突出端的所需异源三聚体双链体。首先,使二

聚体有义链X39852与1摩尔当量的反义X18795退火以形成双链体X39852-X18795。RP-HPLC确认双链体纯度为99.5% (图54)。接下来,将1摩尔当量的二聚体反义链X39854添加到X39852-X18795双链体中以形成X39852-X18795-X39854。RP-HPLC确认双链体纯度为94.9% (图55)。最后,将1摩尔当量的二聚体有义链X39853添加到X39852-X18795-X39854双链体中,然后进行离子交换纯化以形成X39852-X18795-X39854-X39853。RP-HPLC确认双链体纯度为98.3% (图56)。

通过使等摩尔量的以上双链体中的每一种退火形成最终的GalNAc-缀合的异源六聚体siRNA。RP-HPLC确认双链体纯度为96.7% (图57A) 并且MS确认正确种类的存在 (图57B)。

实施例40:通过4:1:1FVII:ApoB:TTR异源六聚体确定靶标敲低先前已经表明,在静脉内施用包含定向GalNAc的寡核苷酸的单体siRNA出现快速分泌和低生物活性,并且为了避免该损失,必须皮下施用该寡核苷酸 (Subramanian, RR等, Nucleic Acids Research, Vol 43, No 19, 9123-9132, 2015)。本公开内容的特征是本公开内容的多聚体在静脉内施用具有优于皮下施用的相应单体的生物活性。

这如下被证明:根据以上“一般程序4:动物实验”中的方法,将4:1:1FVII:ApoB:TTR异源六聚体以6mg/kg的剂量 (相当于FVII的4mg/kg, ApoB的1mg/kg和TTR的1mg/kg) 静脉内施用到每组5只小鼠的组。在第-1、1、3和7天采集血液样品,并且根据以上“一般程序5:基因敲低的测量”中所述的方法和程序进行分析。

通过皮下和静脉内途径施用的六聚体在不同时间点时对TTR蛋白的敲低示于图58中。

可以看出,通过静脉内施用1mg/kg的TTR的敲低为约60%。这超过了通过皮下施用的1mg/kg单体GalNAc TTR的约50%敲低 (Subramanian, RR等, 同上)。因此,当与皮下递送相同剂量水平的GalNAc缀合的siTTR单体相比,静脉内递送的GalNAc缀合的异源六聚体siRNA内的一个siTTR亚基显示出相同或甚至增加的体内活性。

通过GalNAc 4:1:1六聚体的该有效敲低还通过不同时间点的FVII水平确认。因此,以相当于4mg/kg FVII的剂量静脉内施用GalNAc六聚体提供与通过皮下施用的3mg/kg GalNAc FVII单体所提供的敲低相当或更优的敲低。

实施例41:二硫化物接头稳定性的确定

评价二硫化物接头的稳定性,如图59中总结的。本领域技术人员将理解图59中列举的二聚体包括C₆SSC₆接头,其是通式-(CH₂)_n-S-S-(CH₂)_m-的二硫化物接头的实例,其中n和m均为6。该通式的其他二硫化物接头可以本文其他地方所述的方式使用,其中n和m各自独立地为约2至约8的整数。例如,一个实施方案提供C₃SSC₃二硫化物接头,其中n和m各自为3。可以使用的其他接头包括核碱基可裂解的接头,例如UUU和dTdTdT。本领域技术人员还将理解,如本文所述的接头可用于连接有义链和反义链的组合。

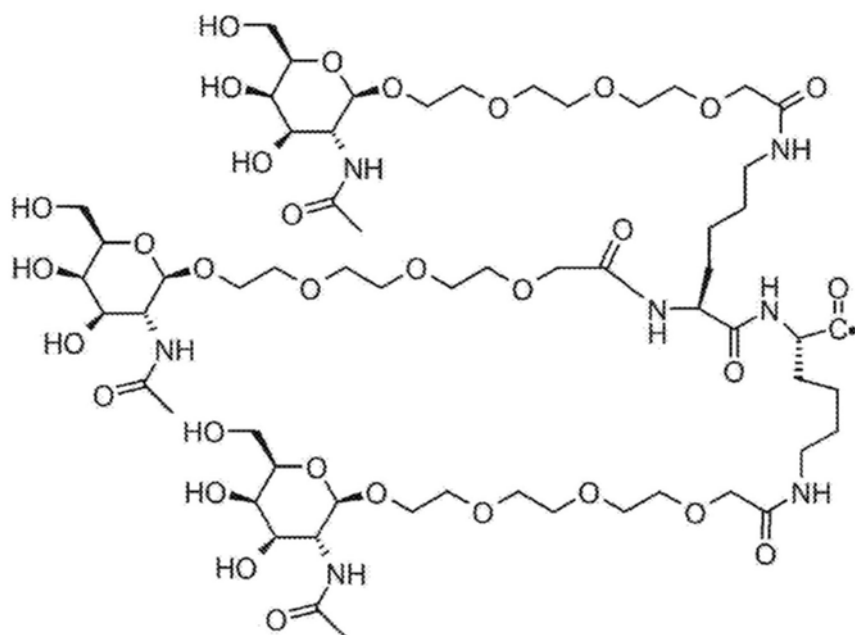


图1A

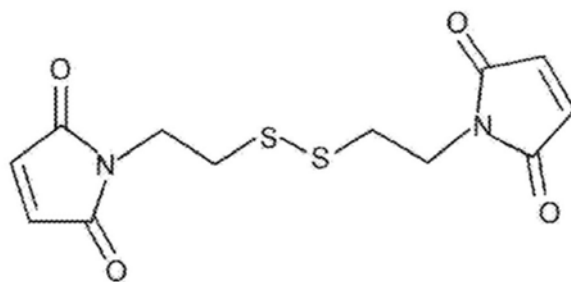


图1B

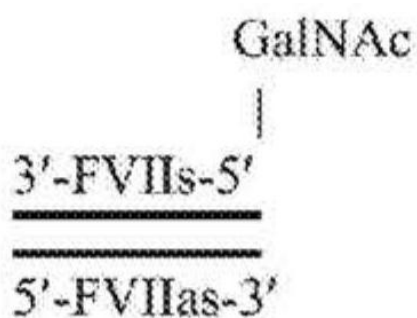


图2

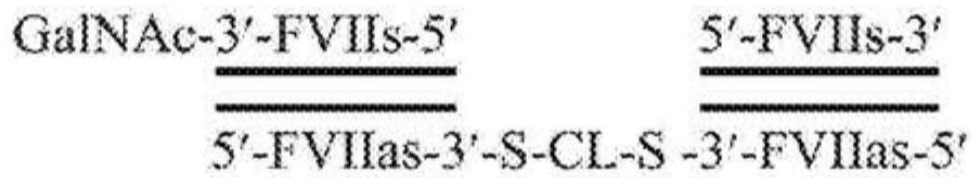


图3

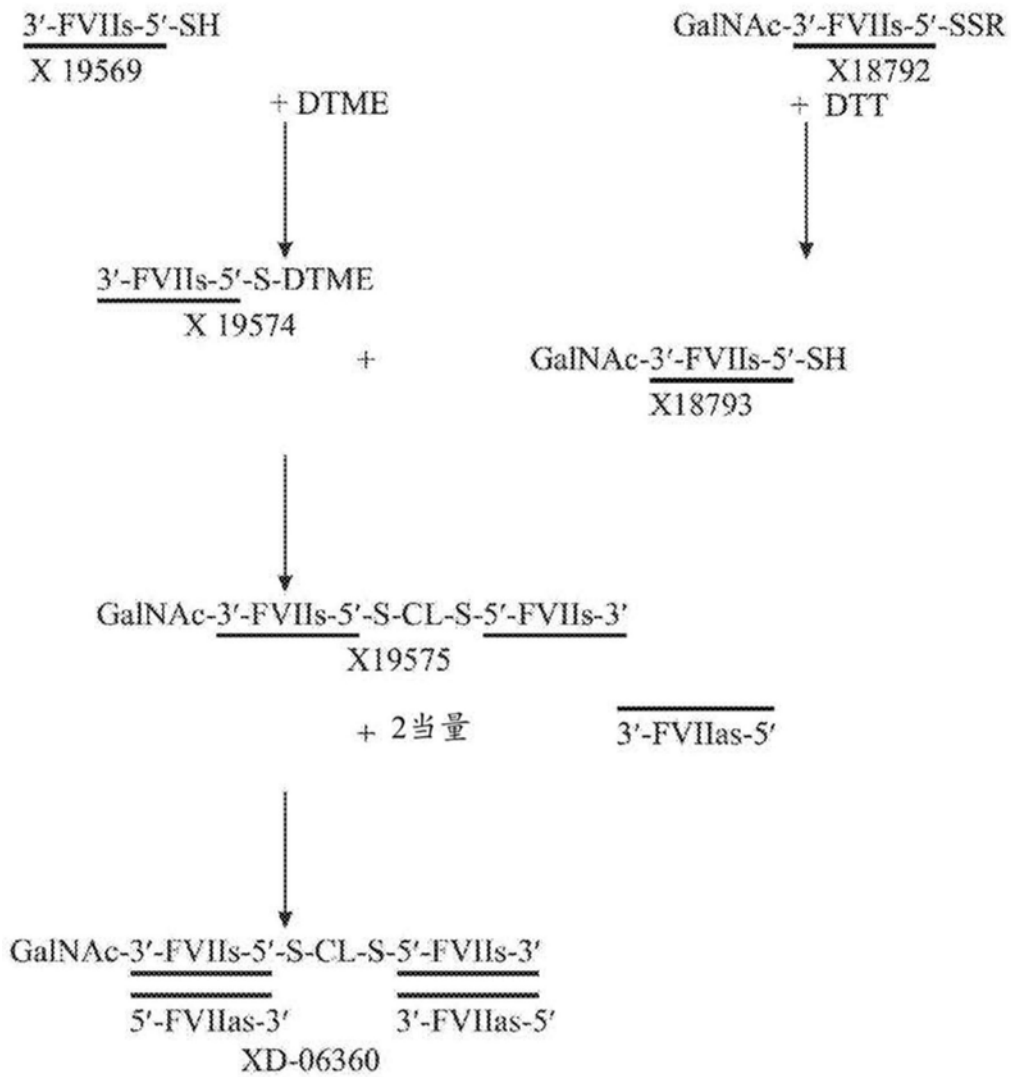


图4

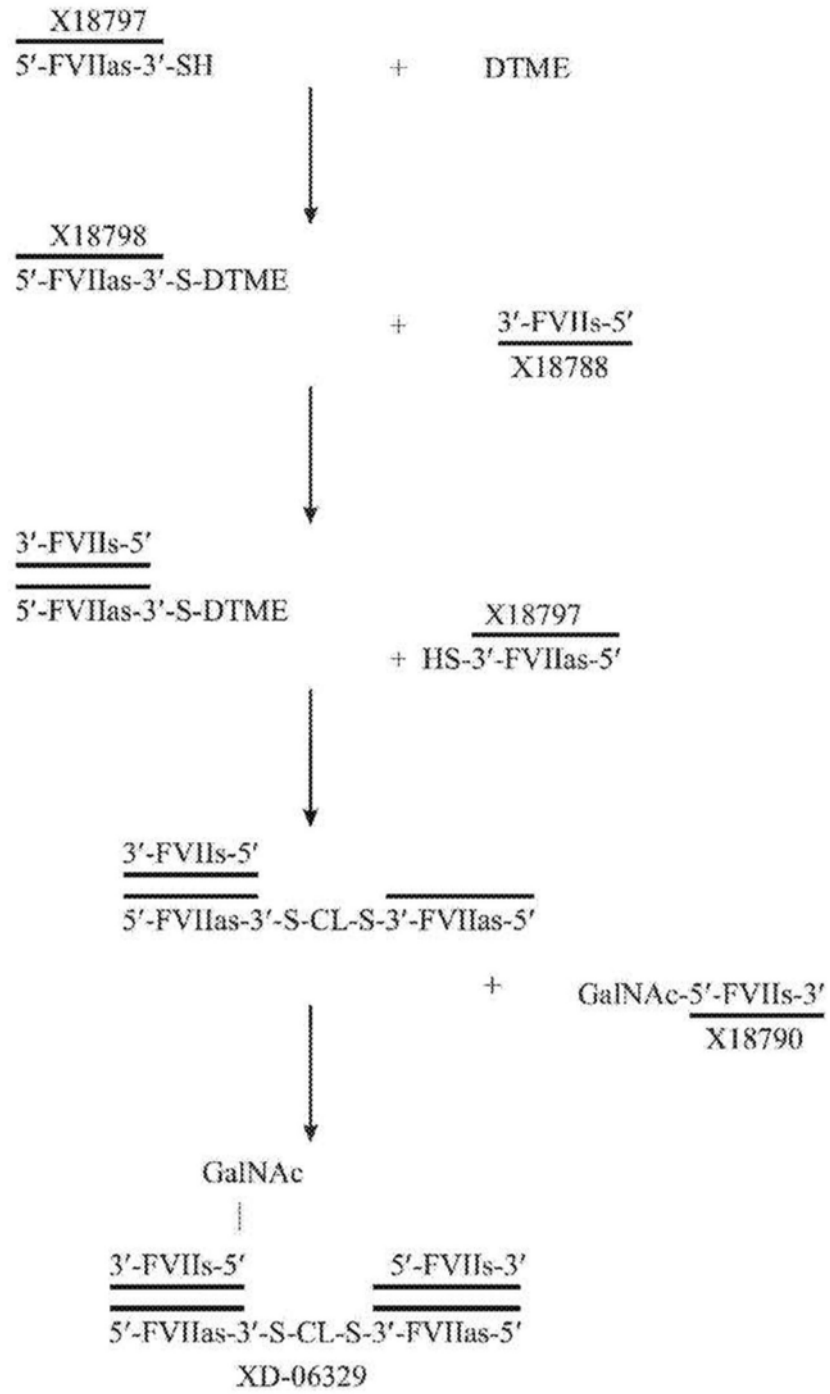


图5

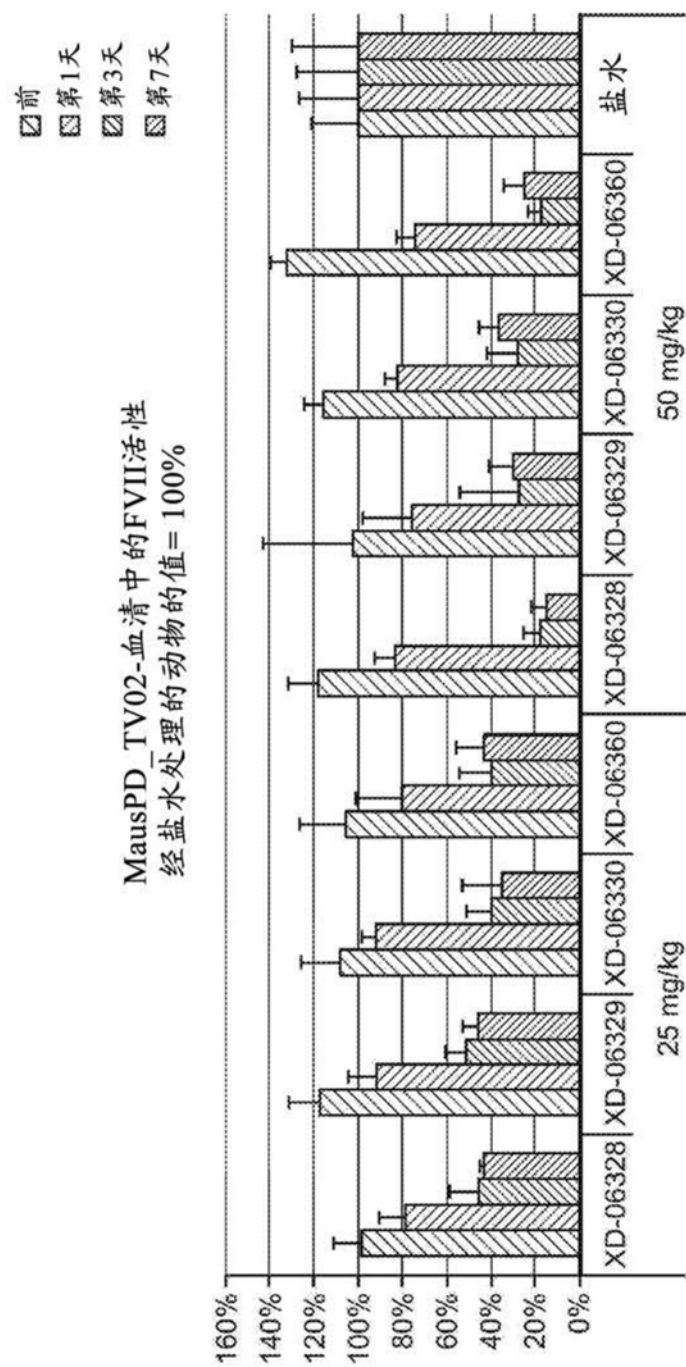


图6

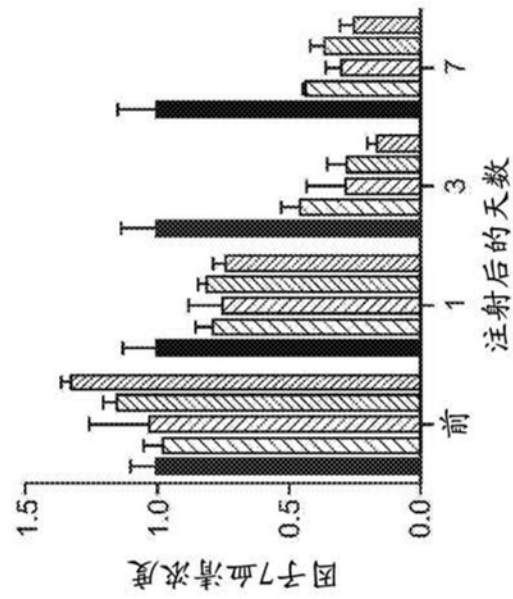


图7A

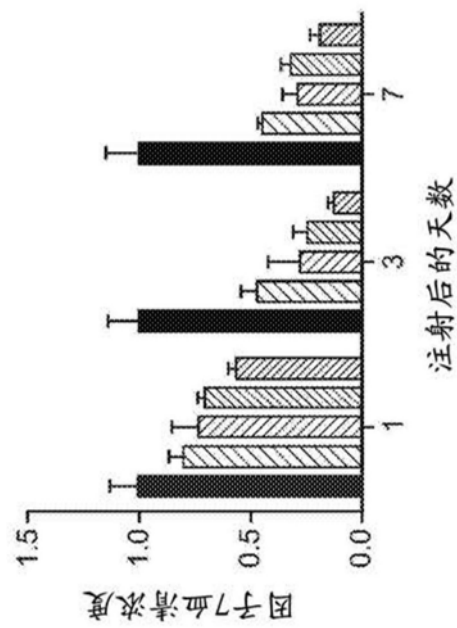


图7B

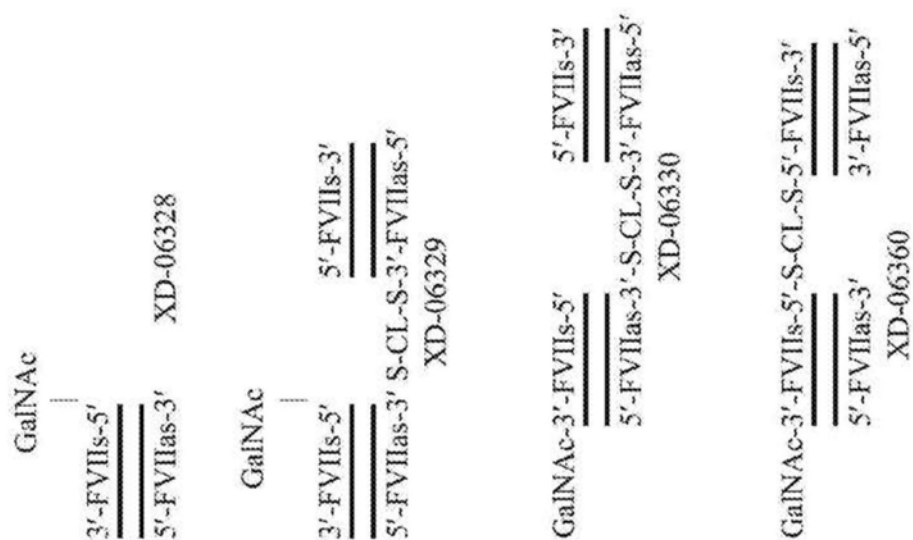


图7C

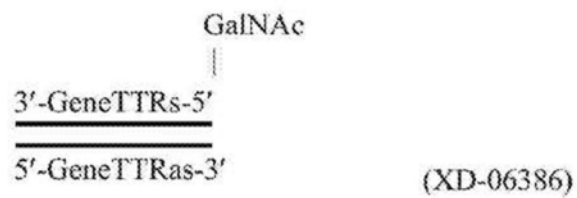
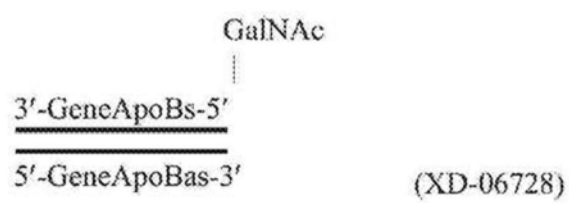
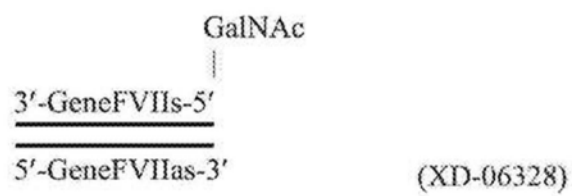


图8

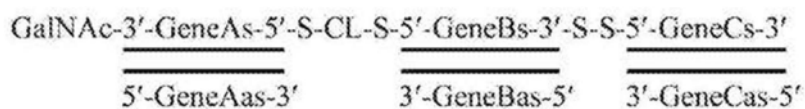


图9

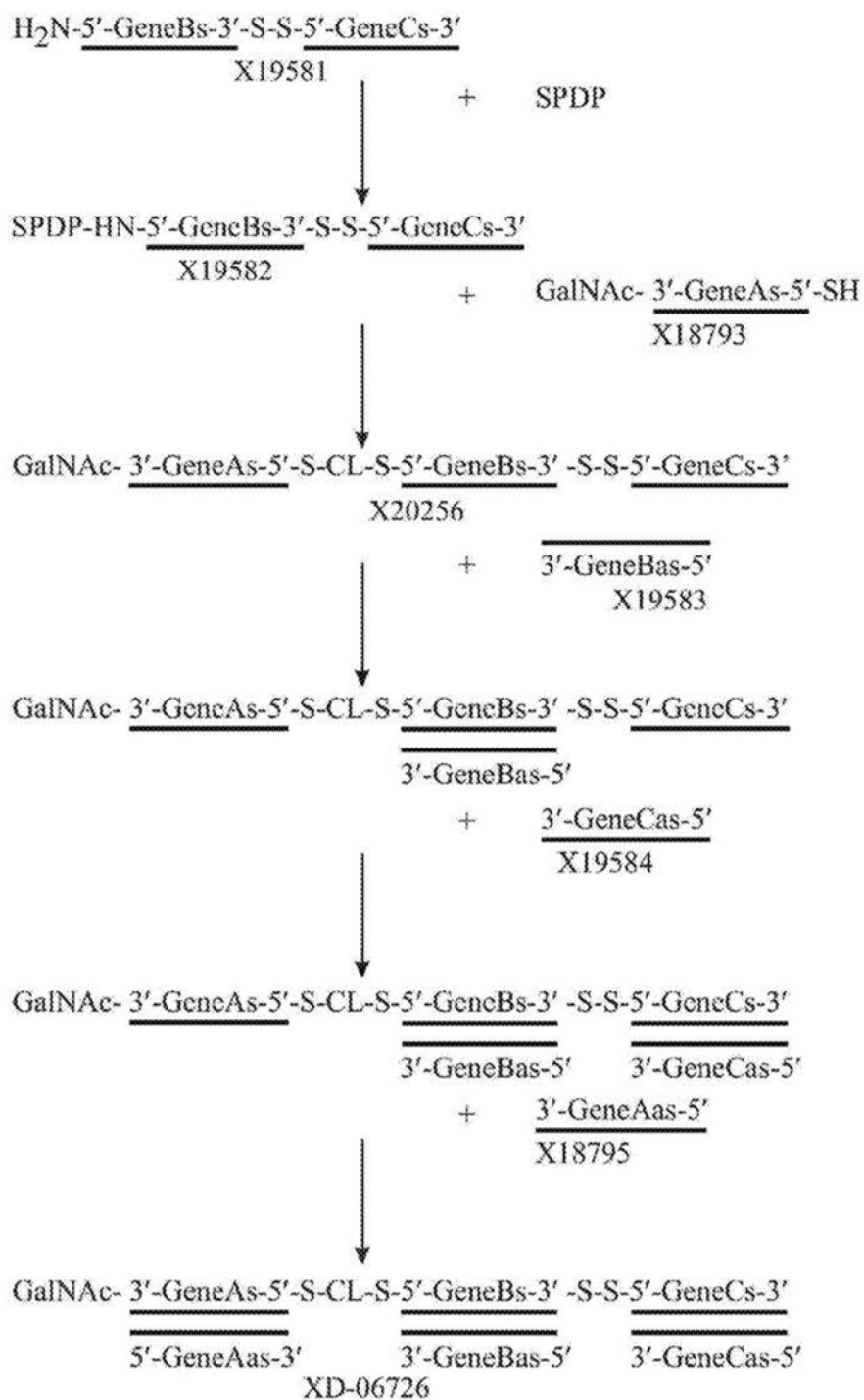


图10

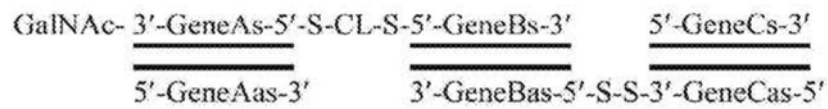


图11

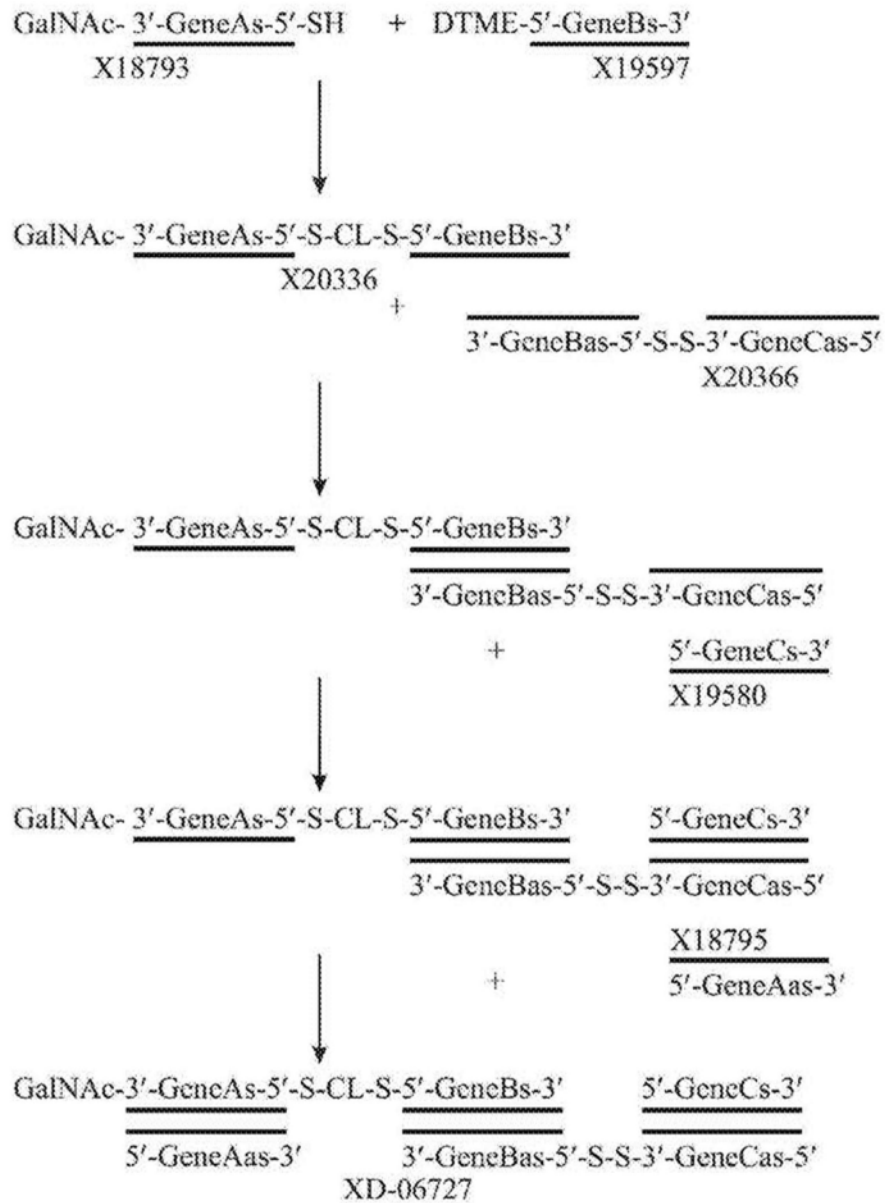


图12

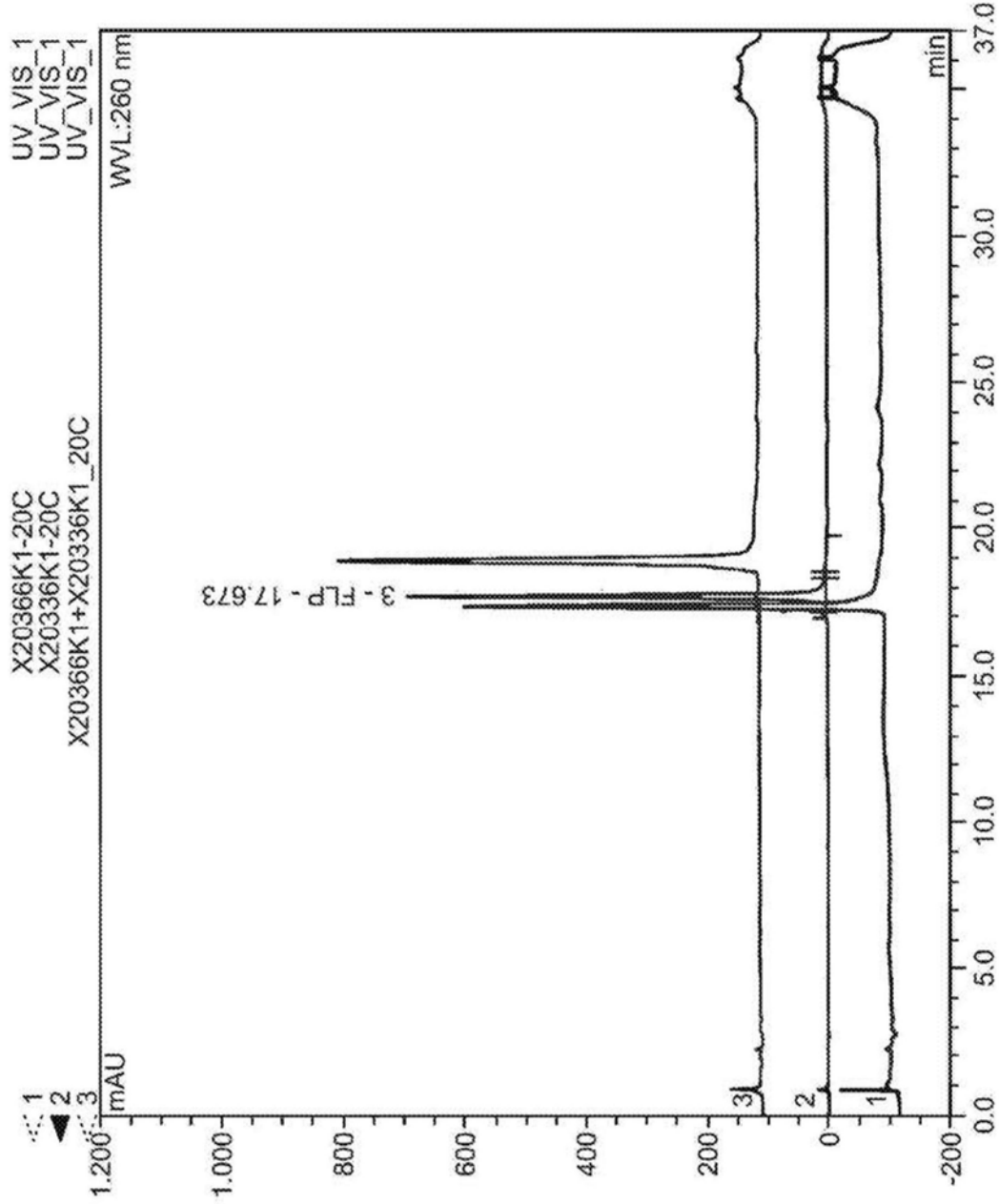


图13

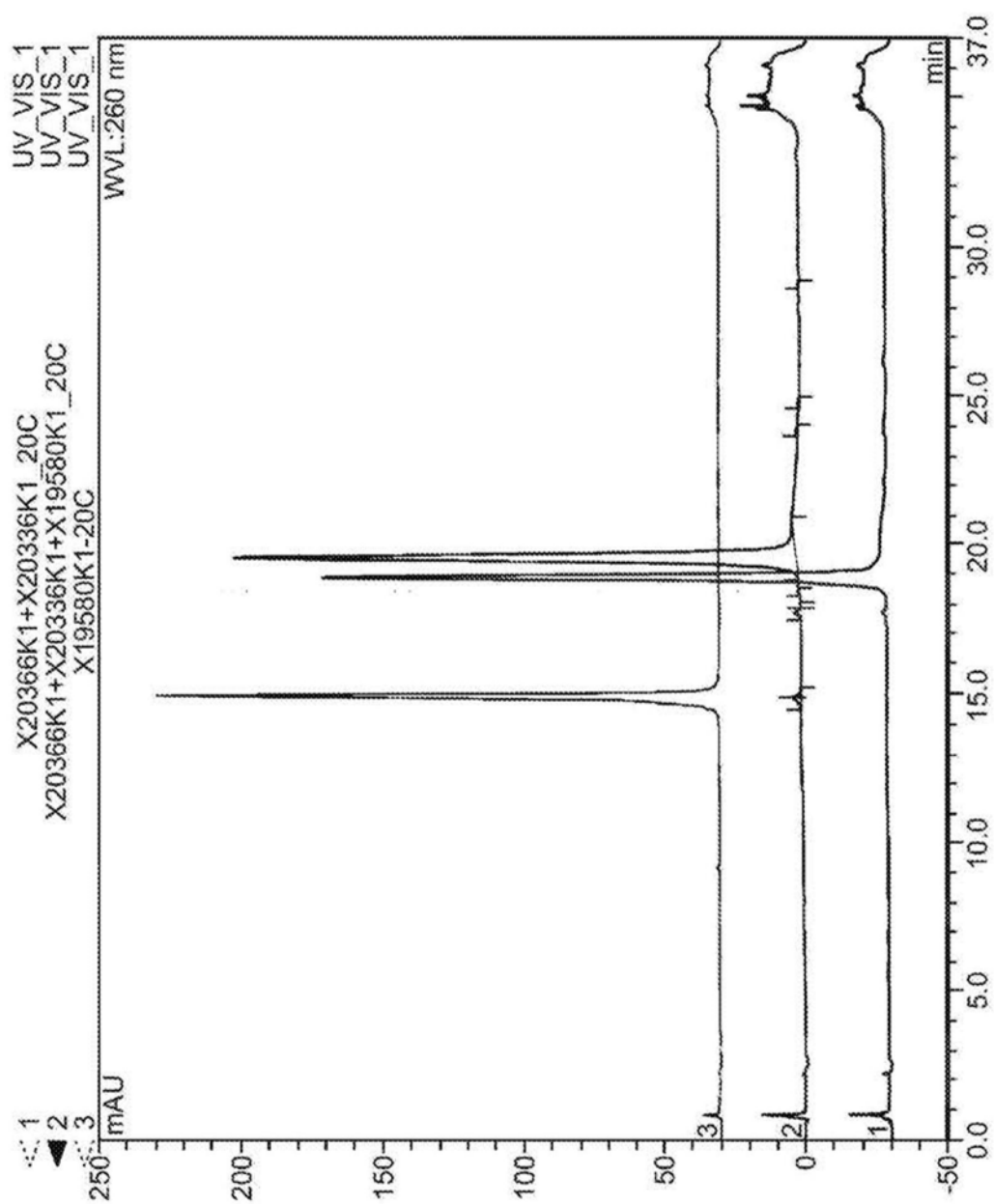


图14

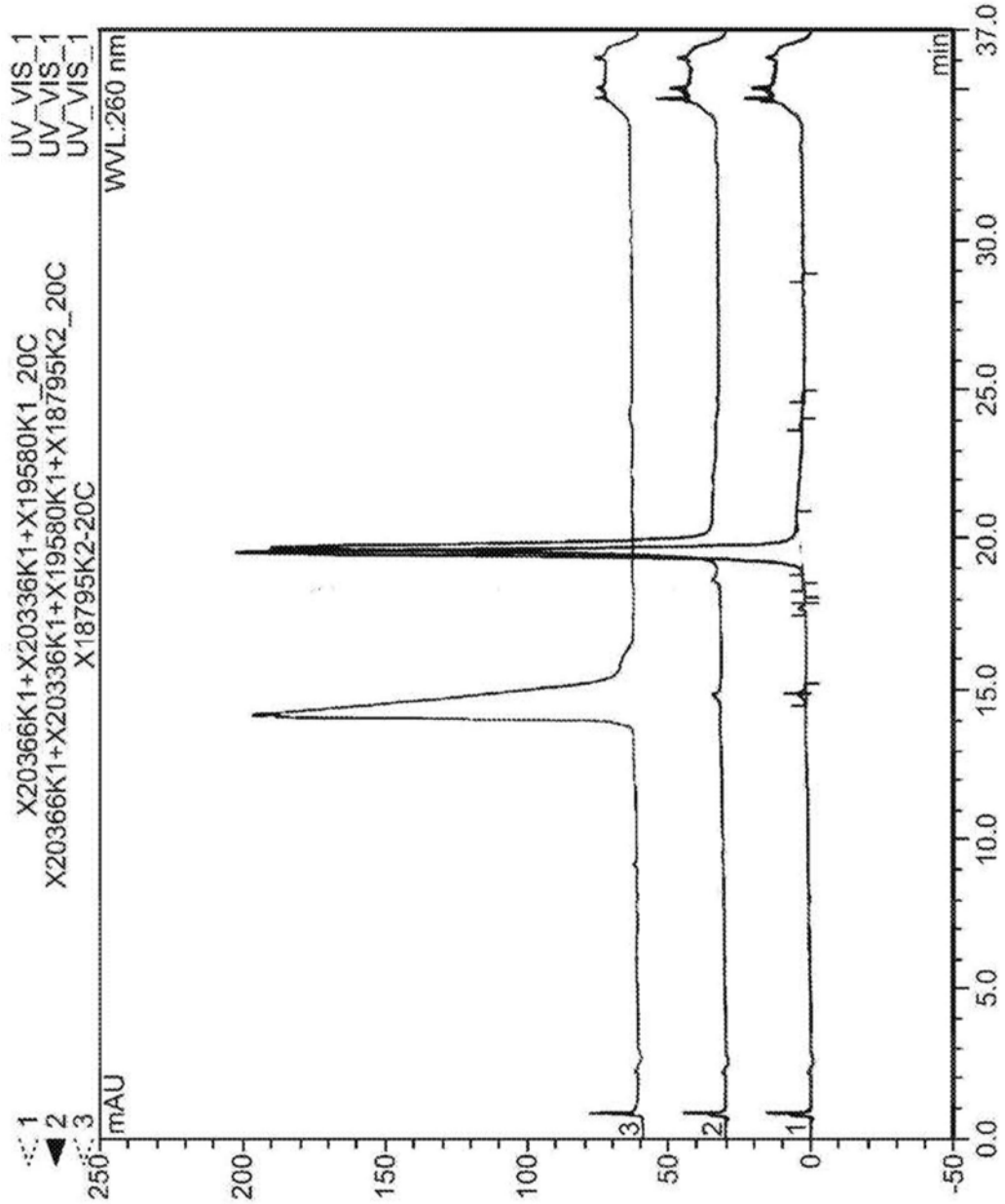


图15

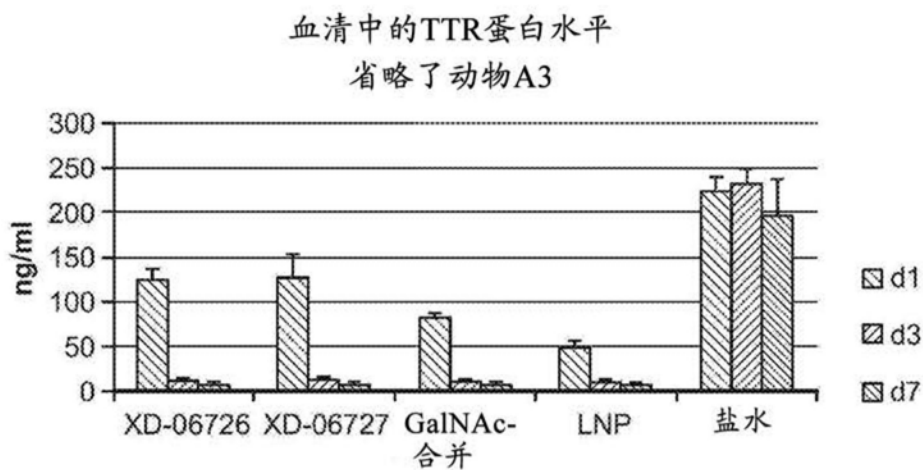


图16A

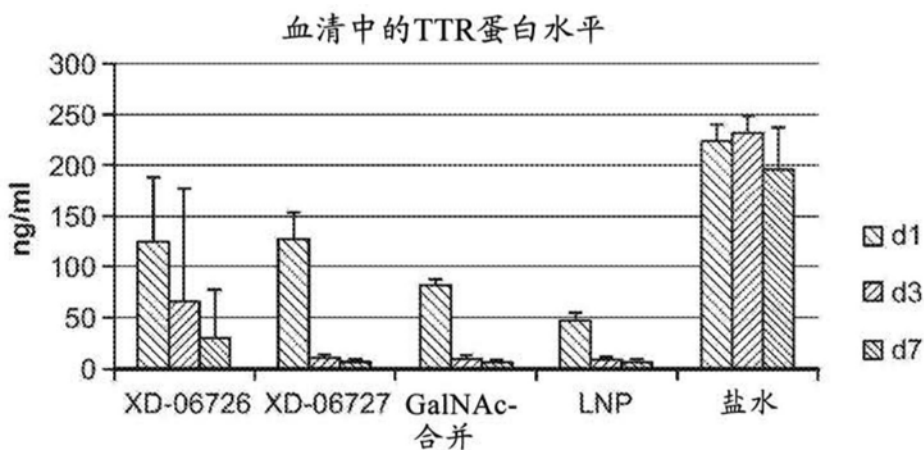


图16B

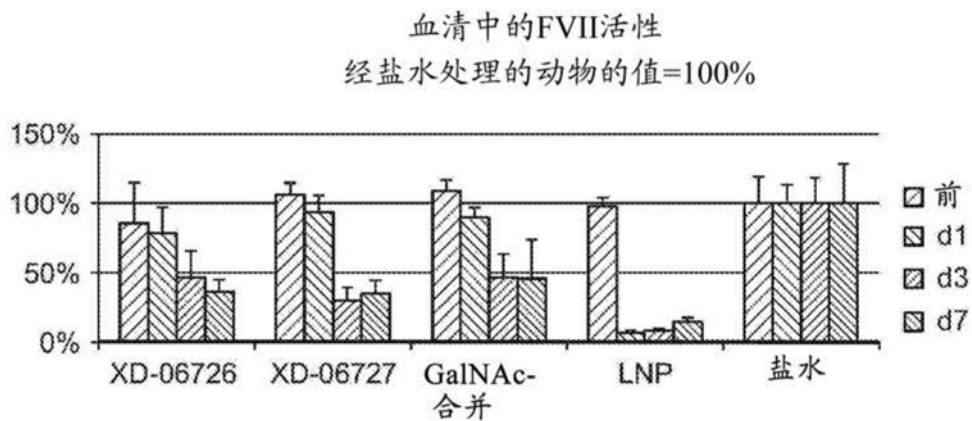


图17A

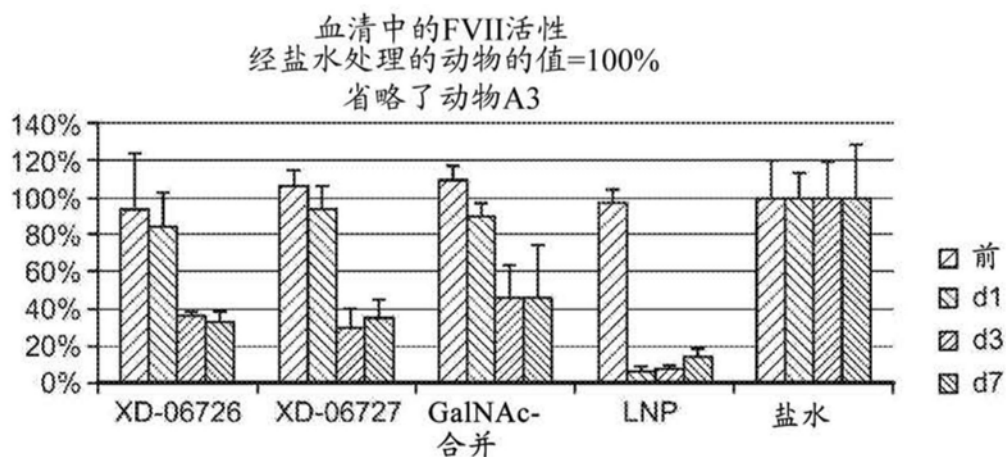


图17B

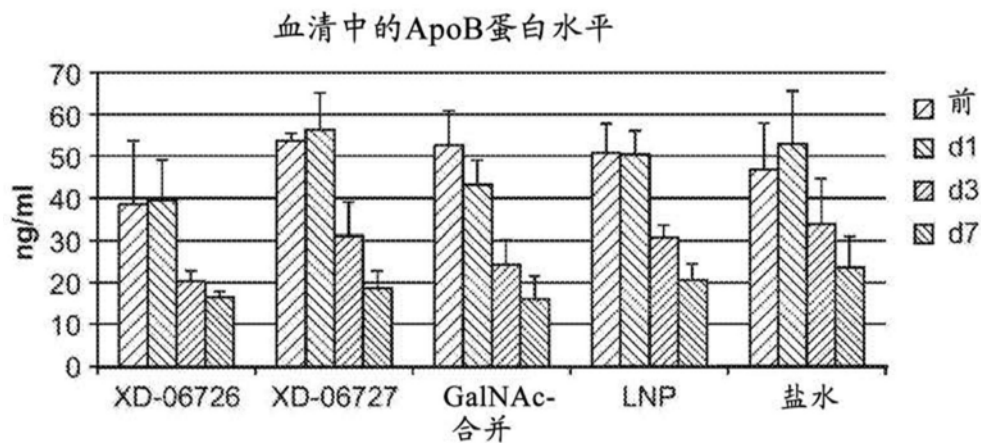


图18A

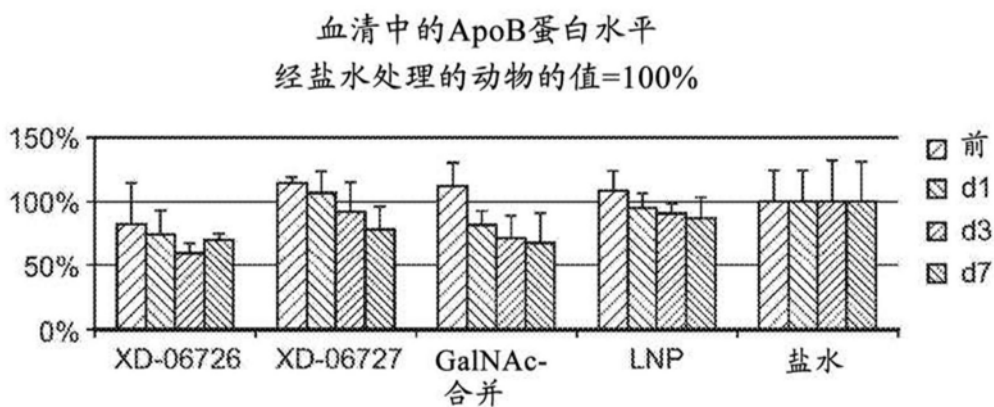


图18B

肝组织中的mRNA水平
经盐水处理的动物的值=1

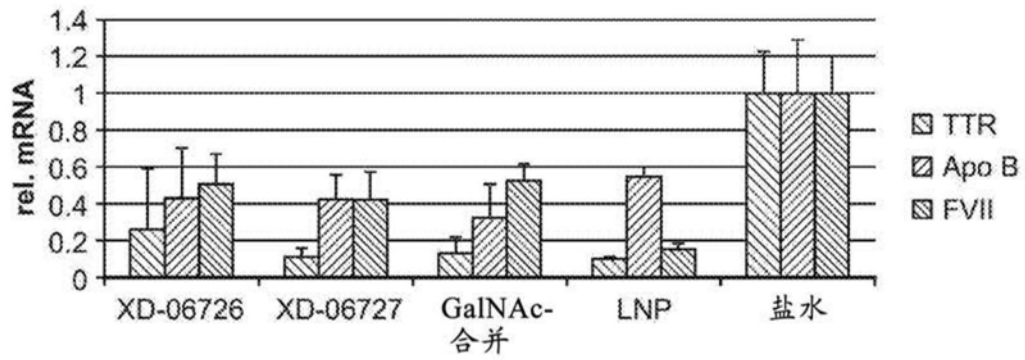


图19A

肝组织中的mRNA水平
经盐水处理的动物的值=1
省略了动物A3

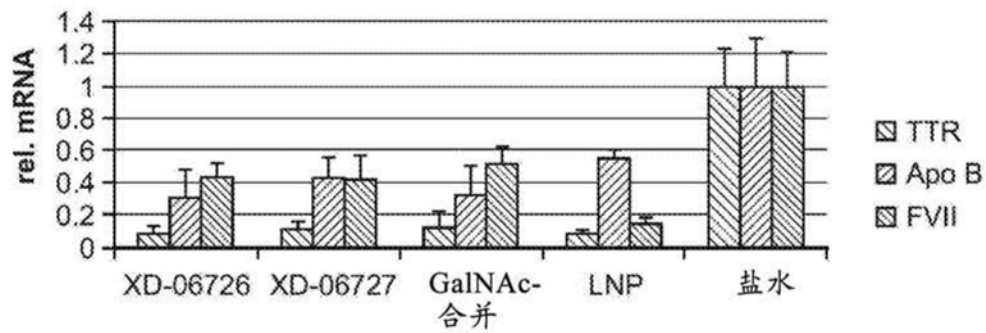


图19B



图20

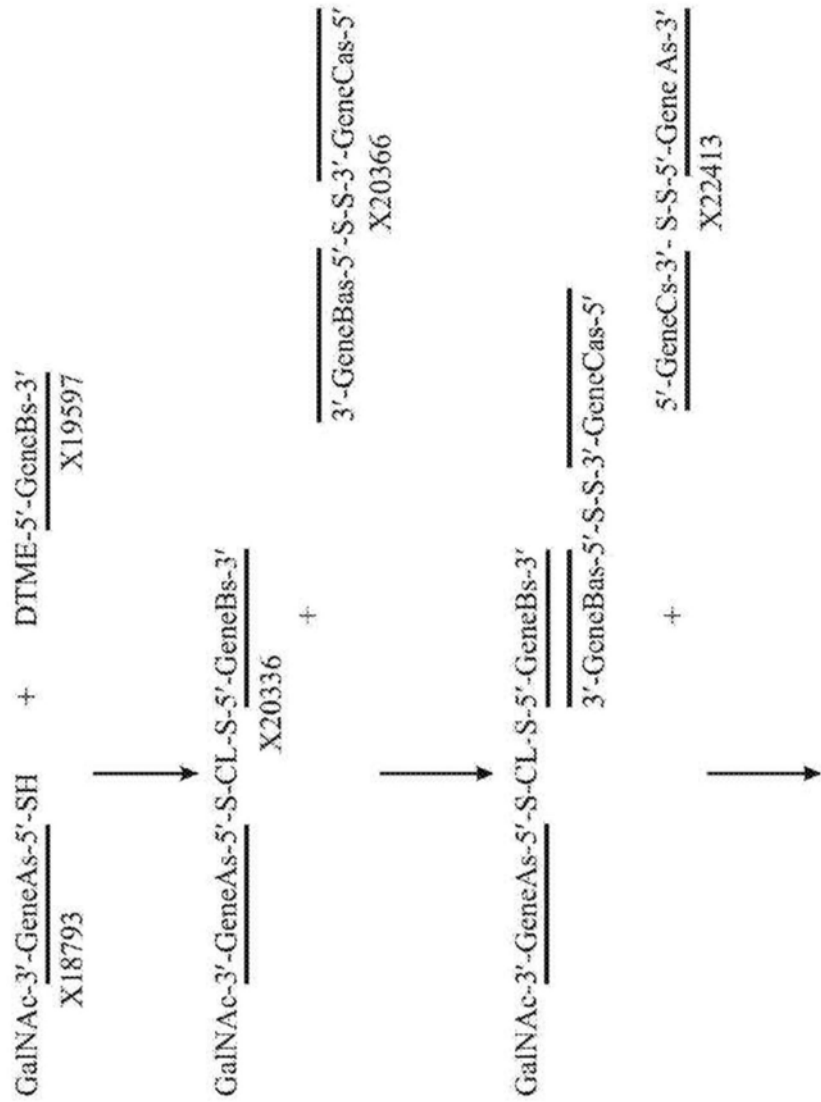


图21

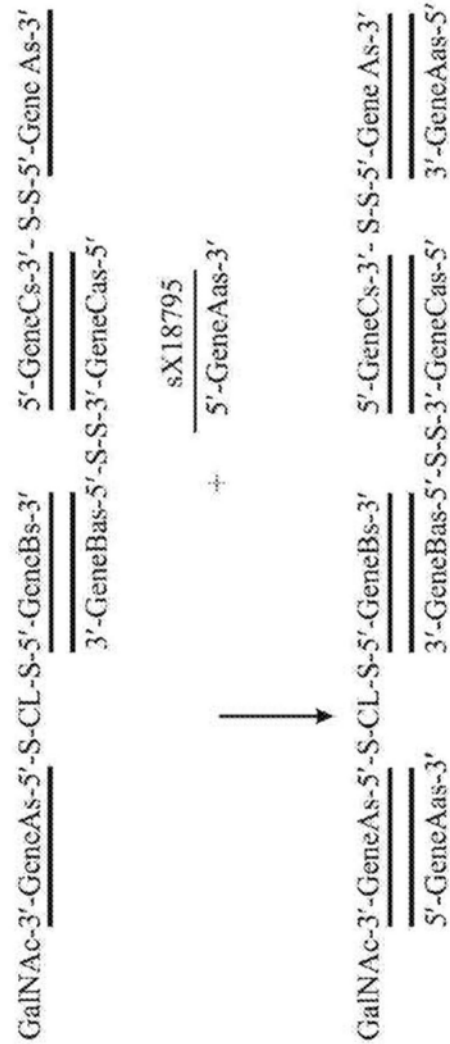


图21 (续)

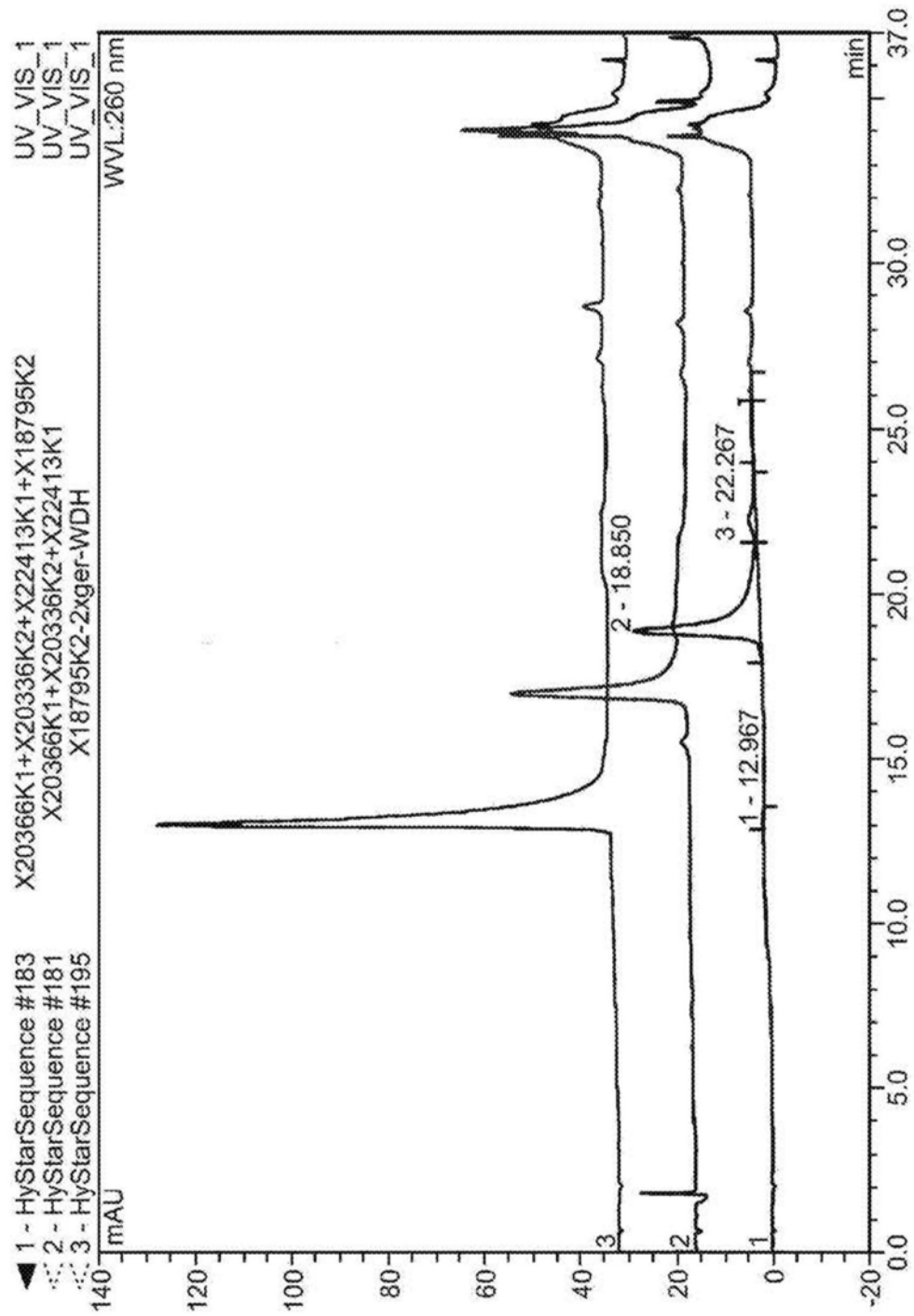


图22

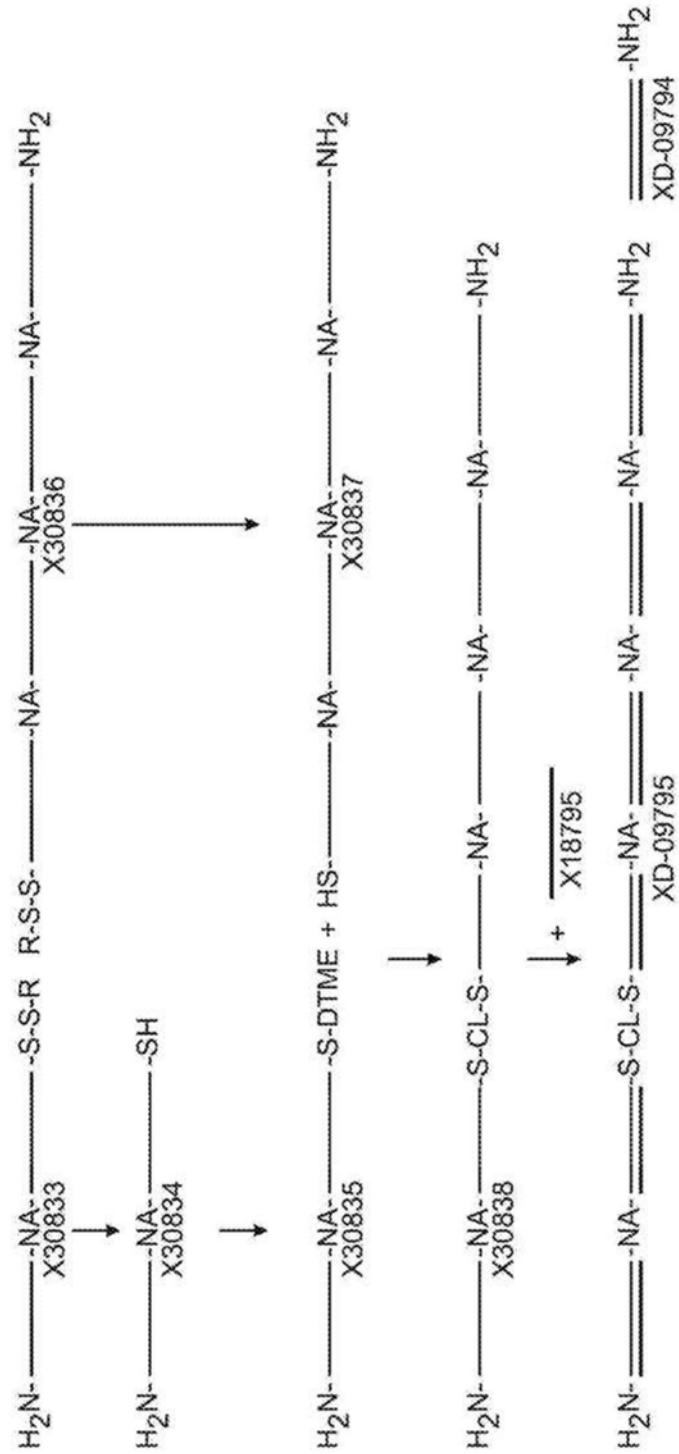


图23

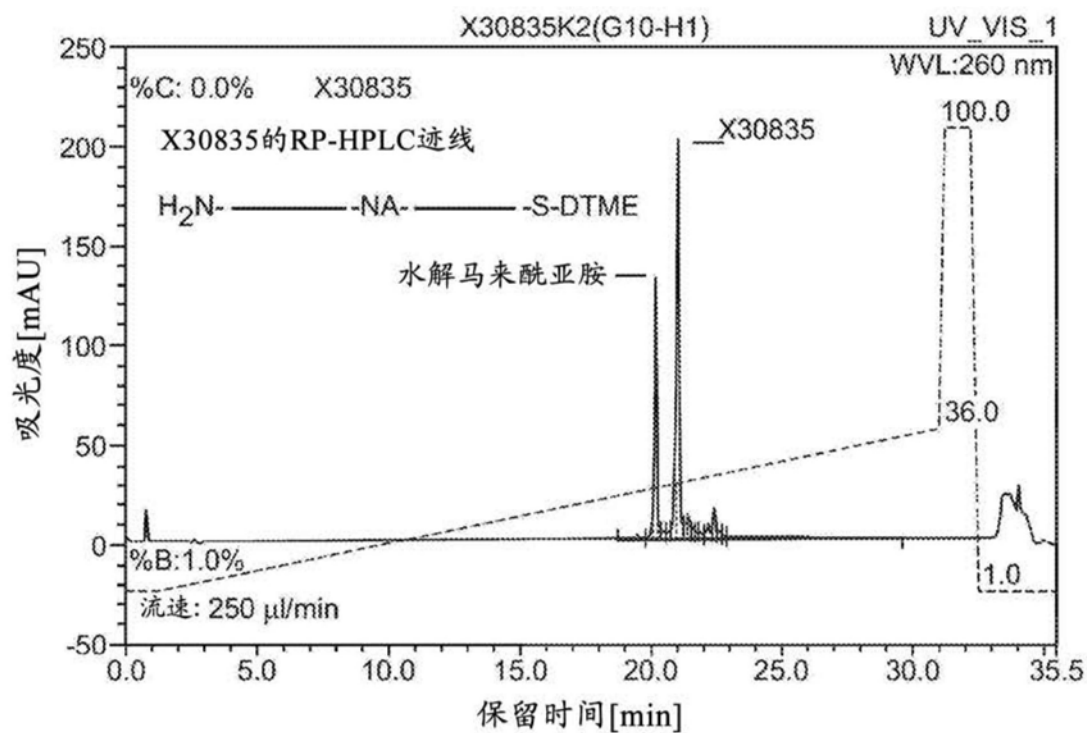


图24A

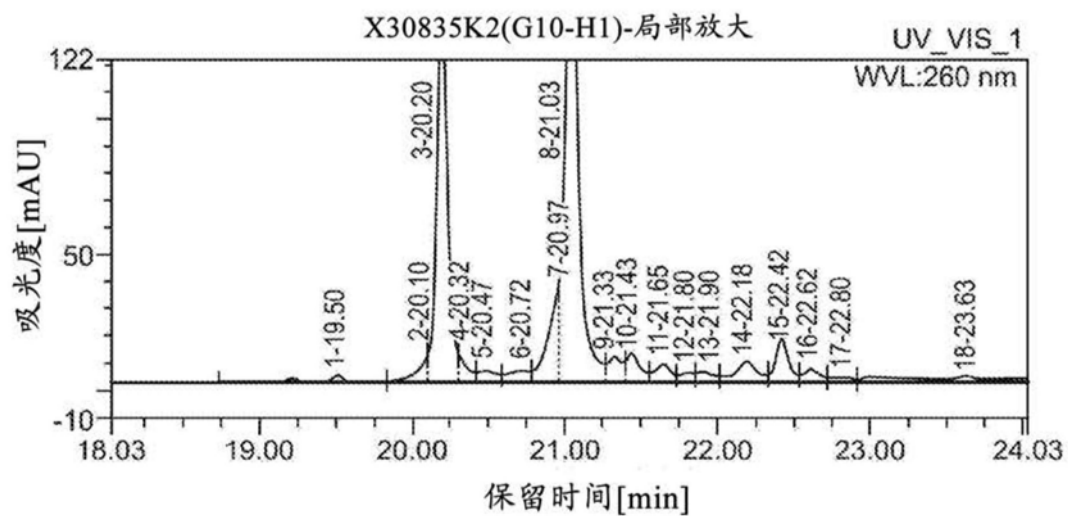


图24B

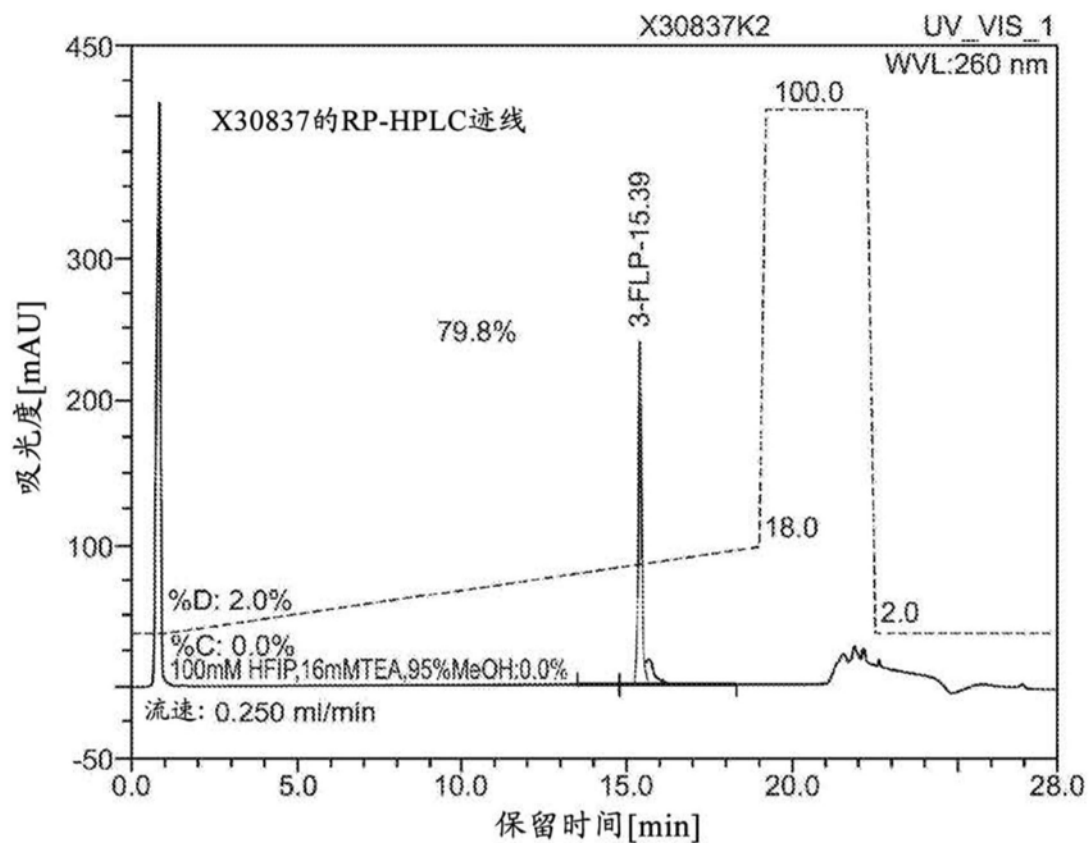


图24C

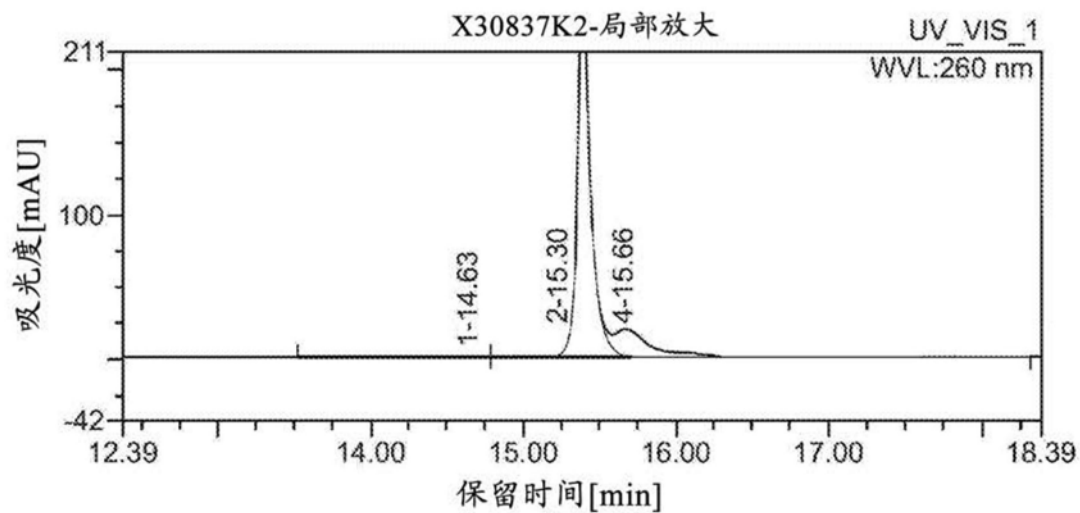


图24D

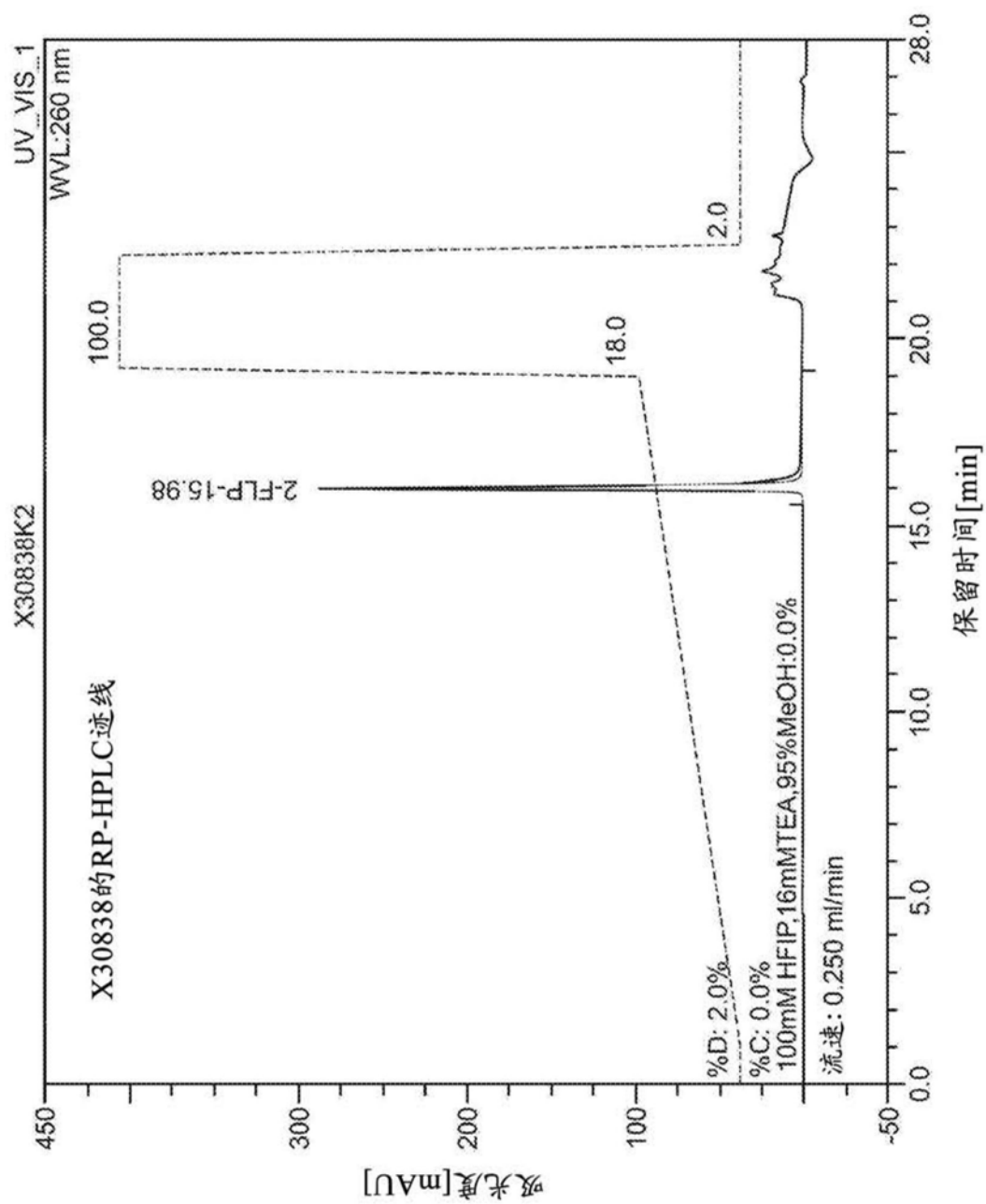


图24E

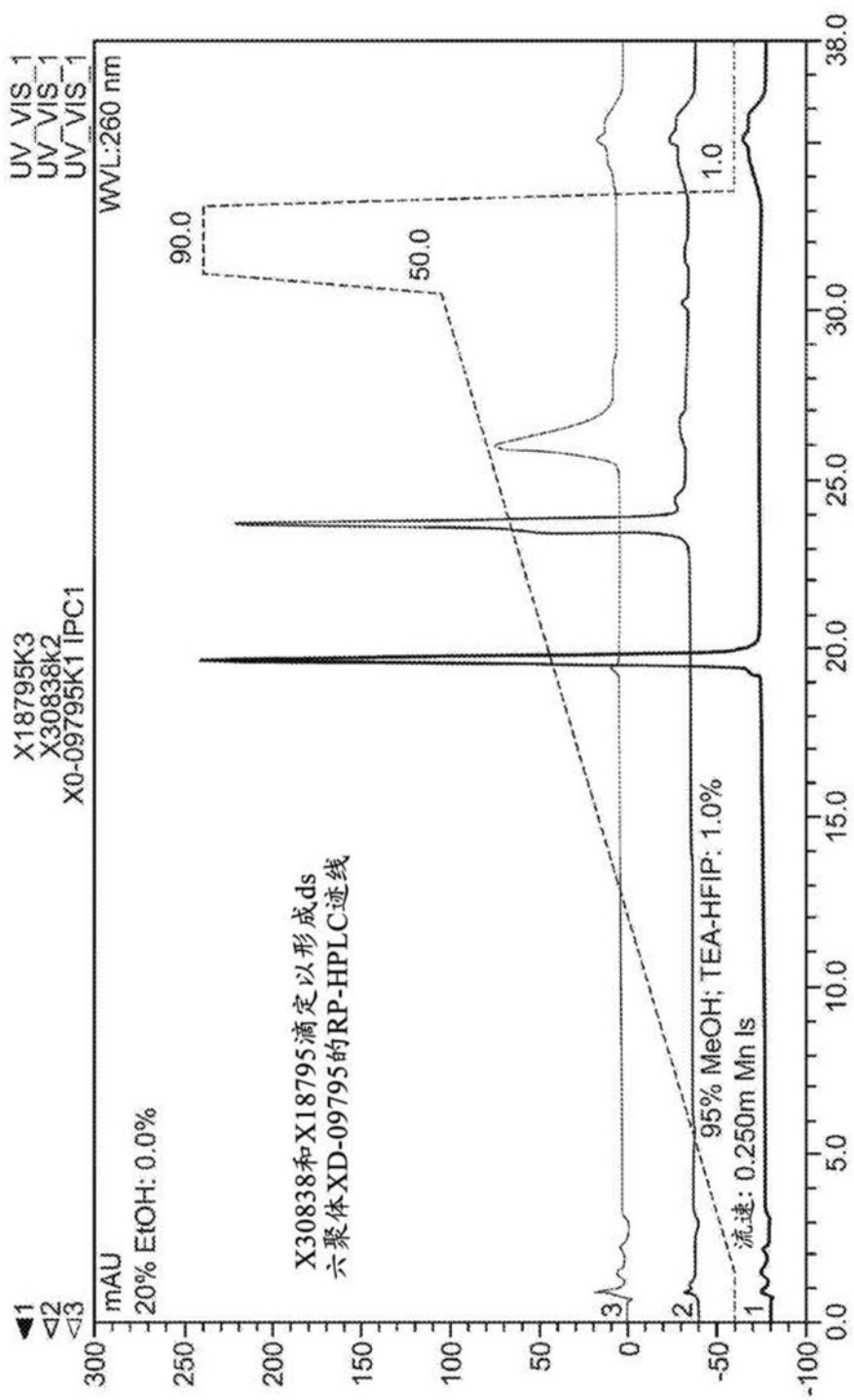


图24F

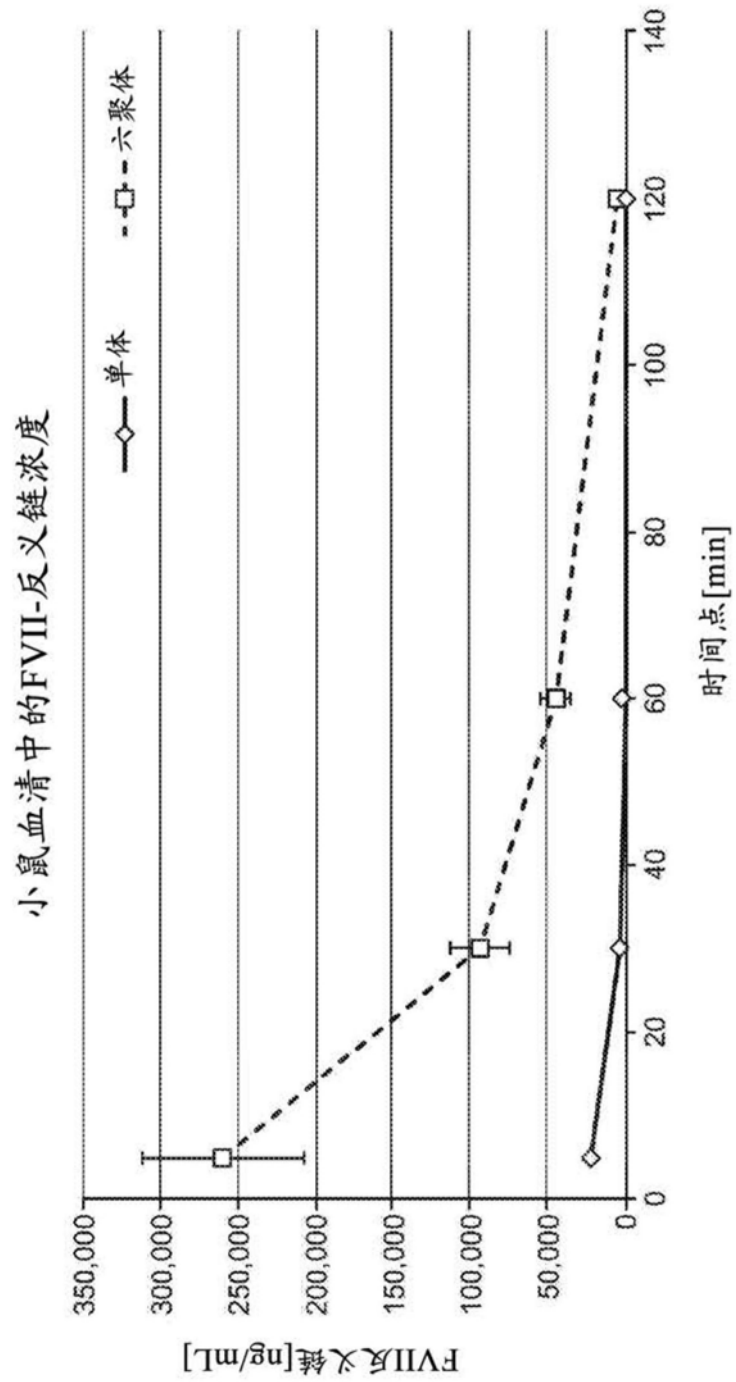


图25

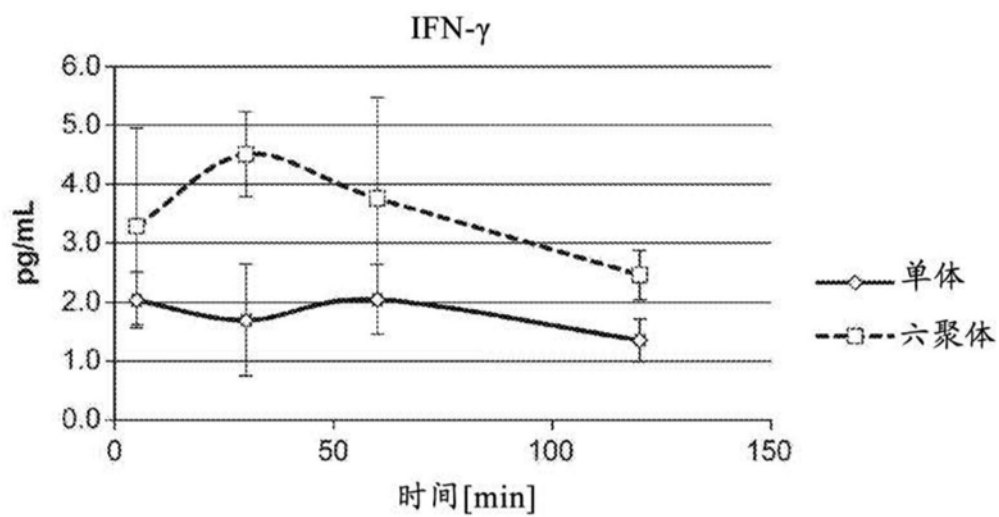


图26A

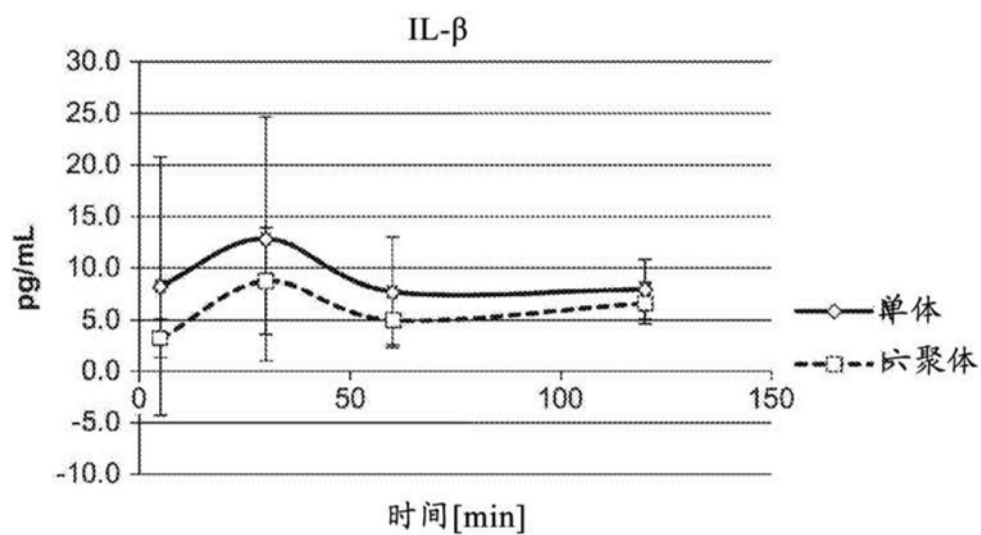


图26B

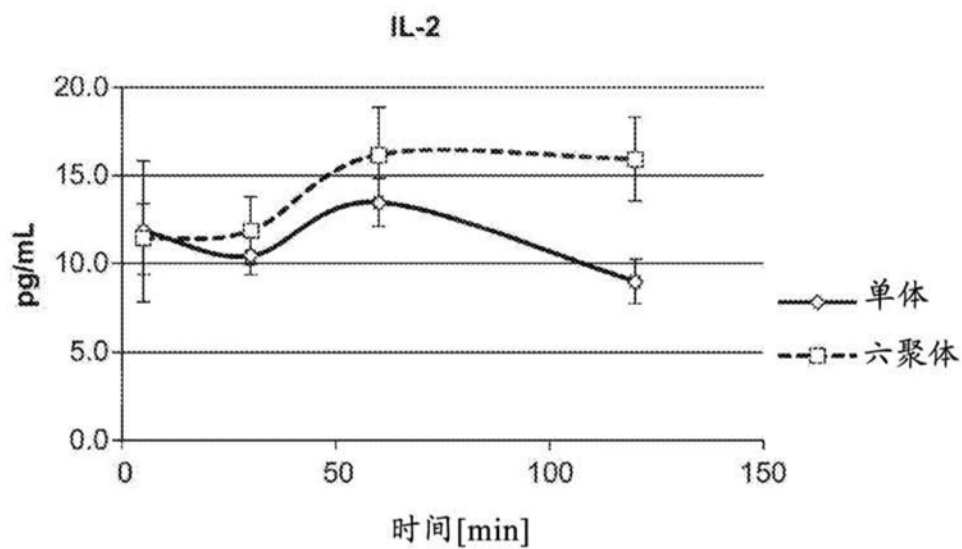


图26C

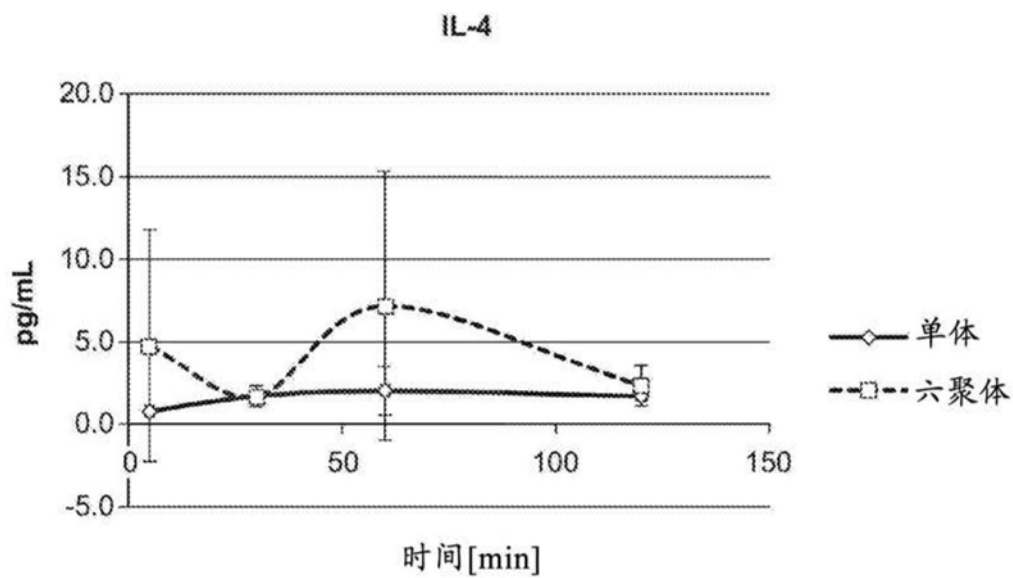


图26D

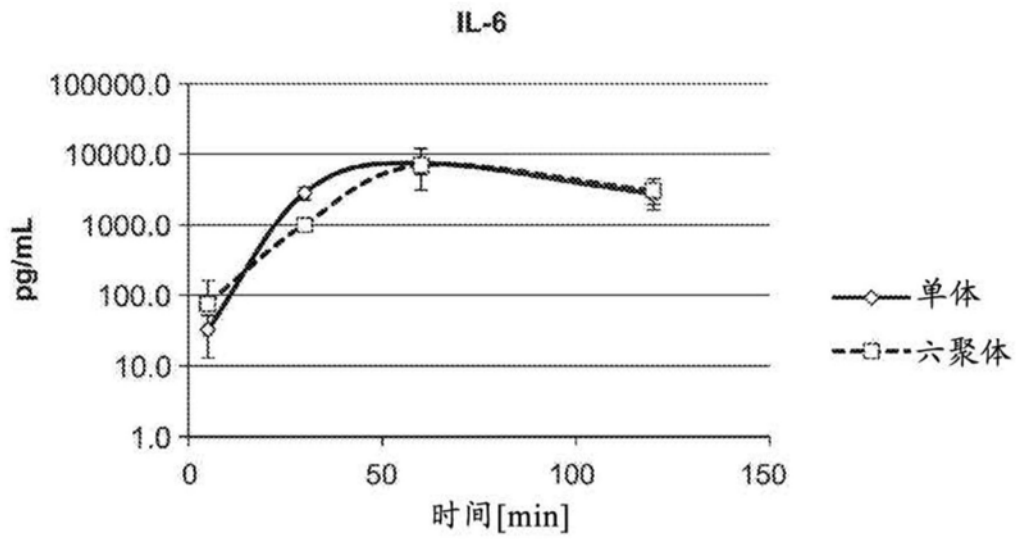


图26E

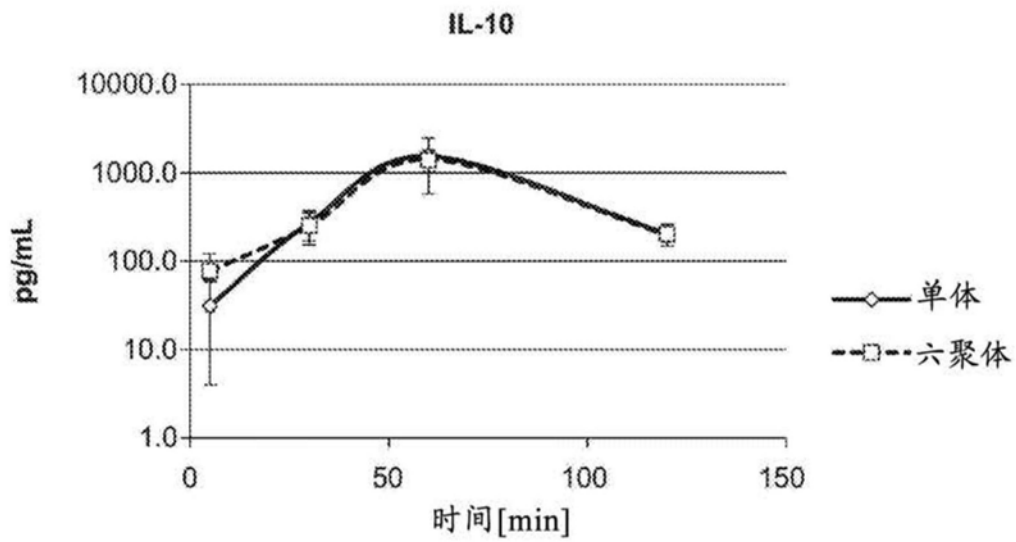


图26F

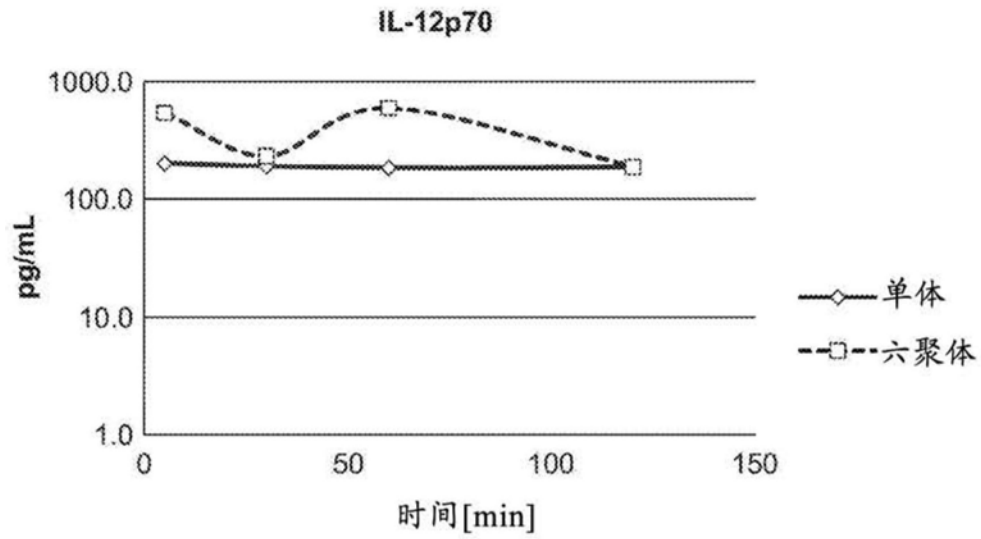


图26G

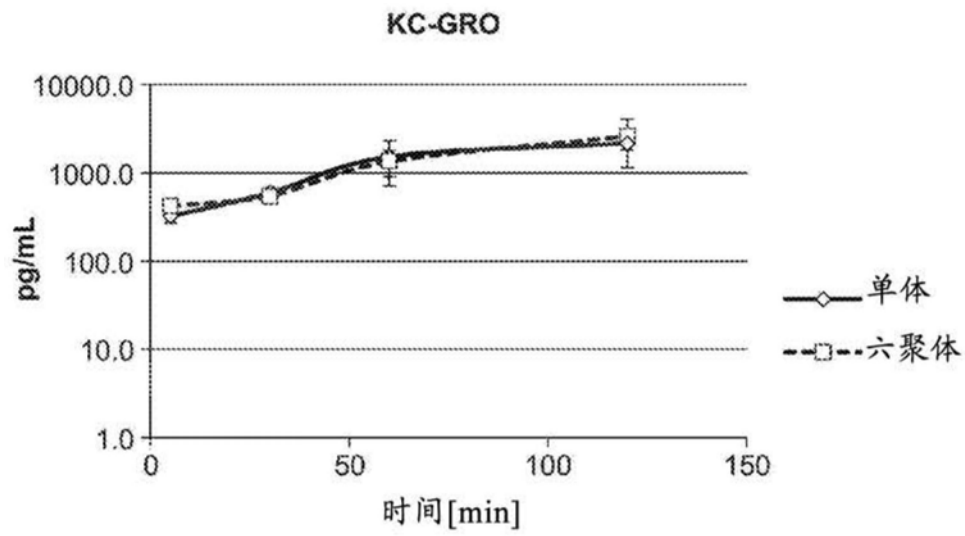


图26H

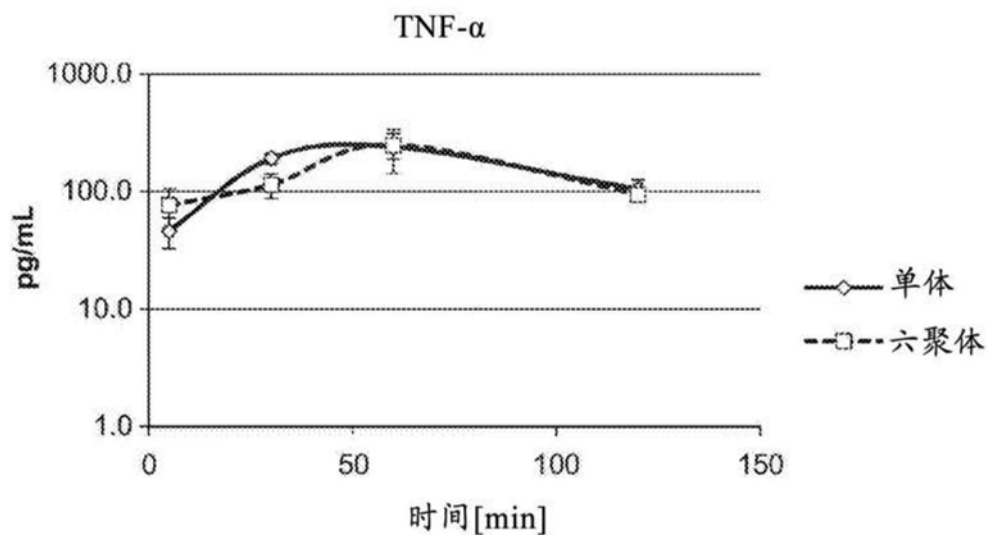


图26I

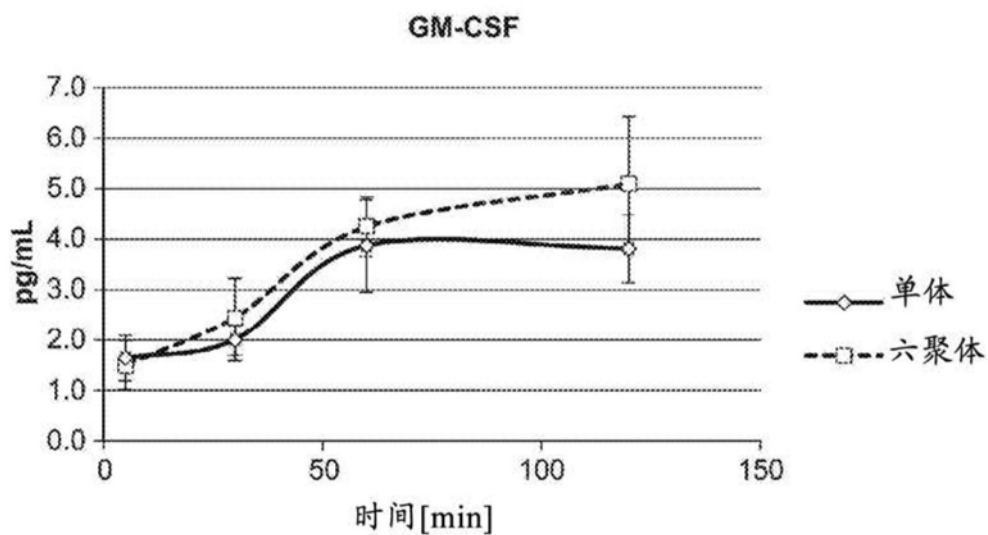


图26J

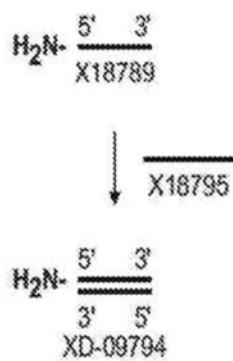


图27A

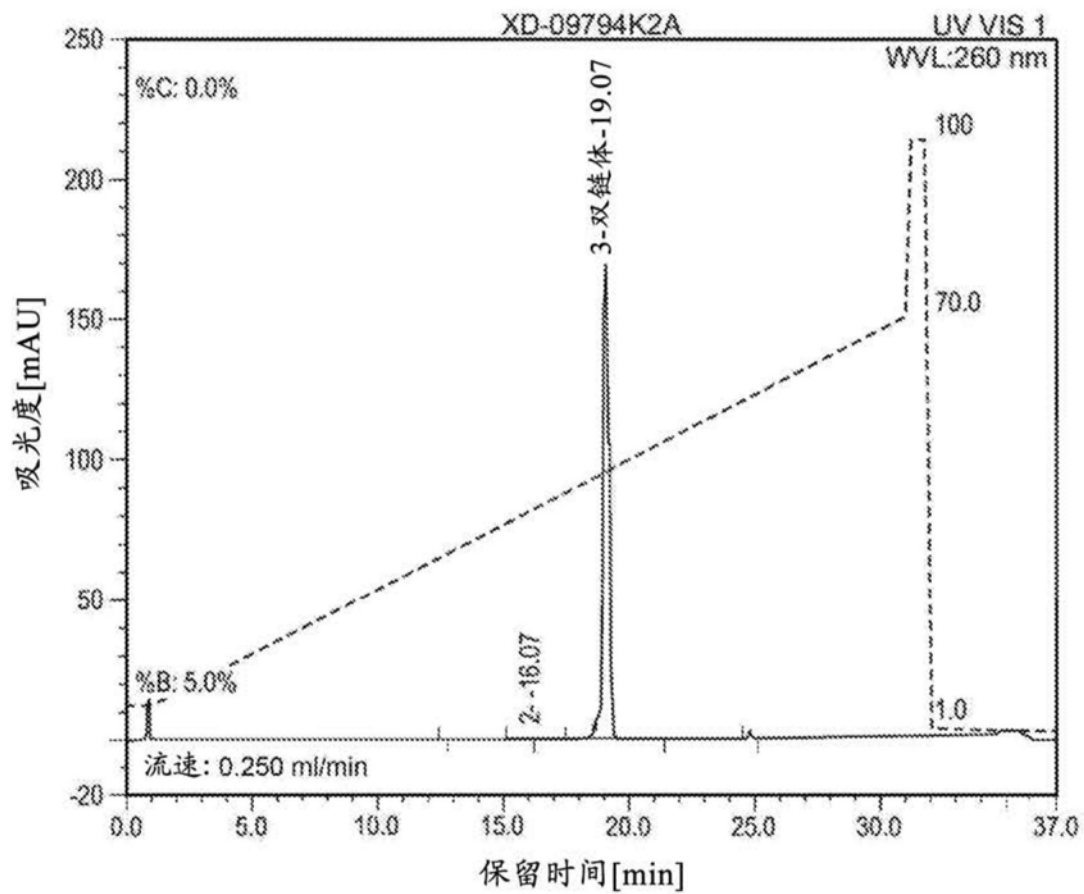


图27B

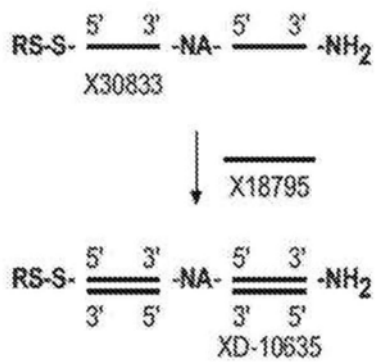


图28A

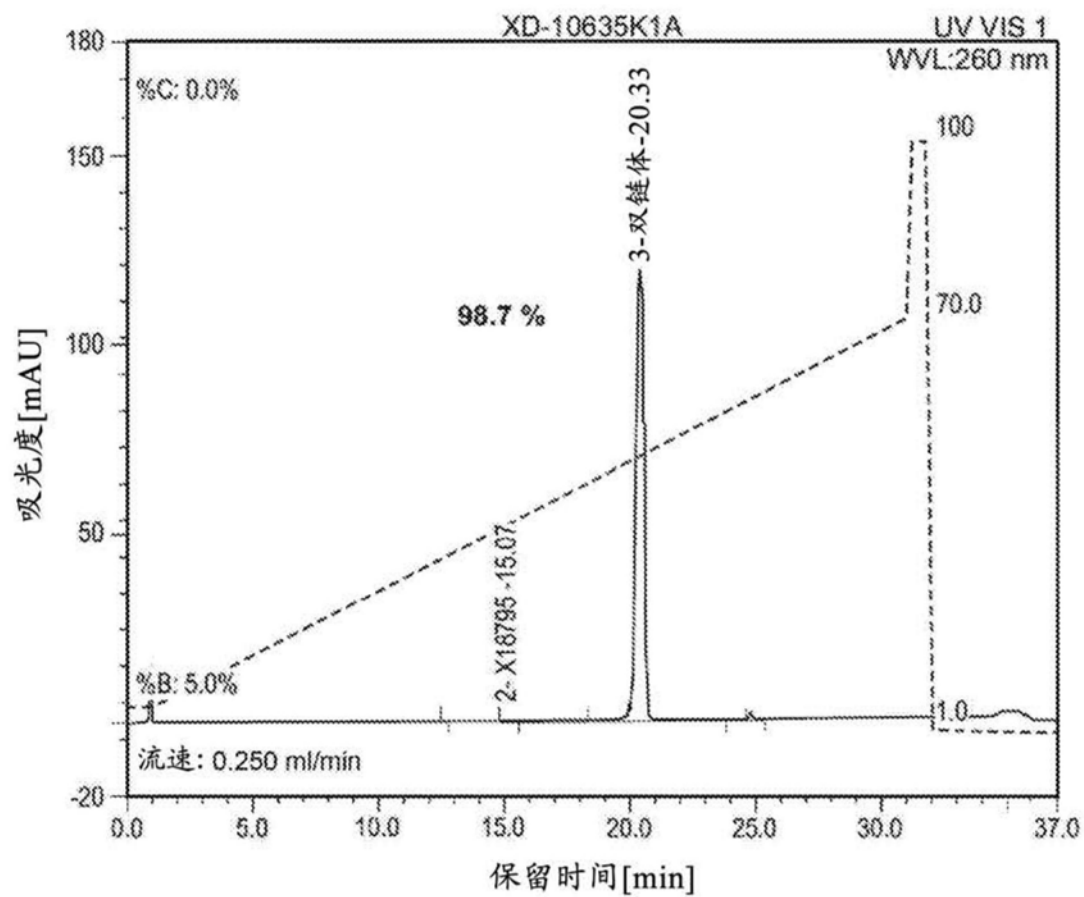


图28B

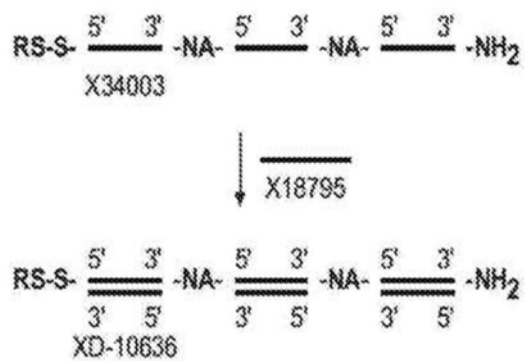


图29A

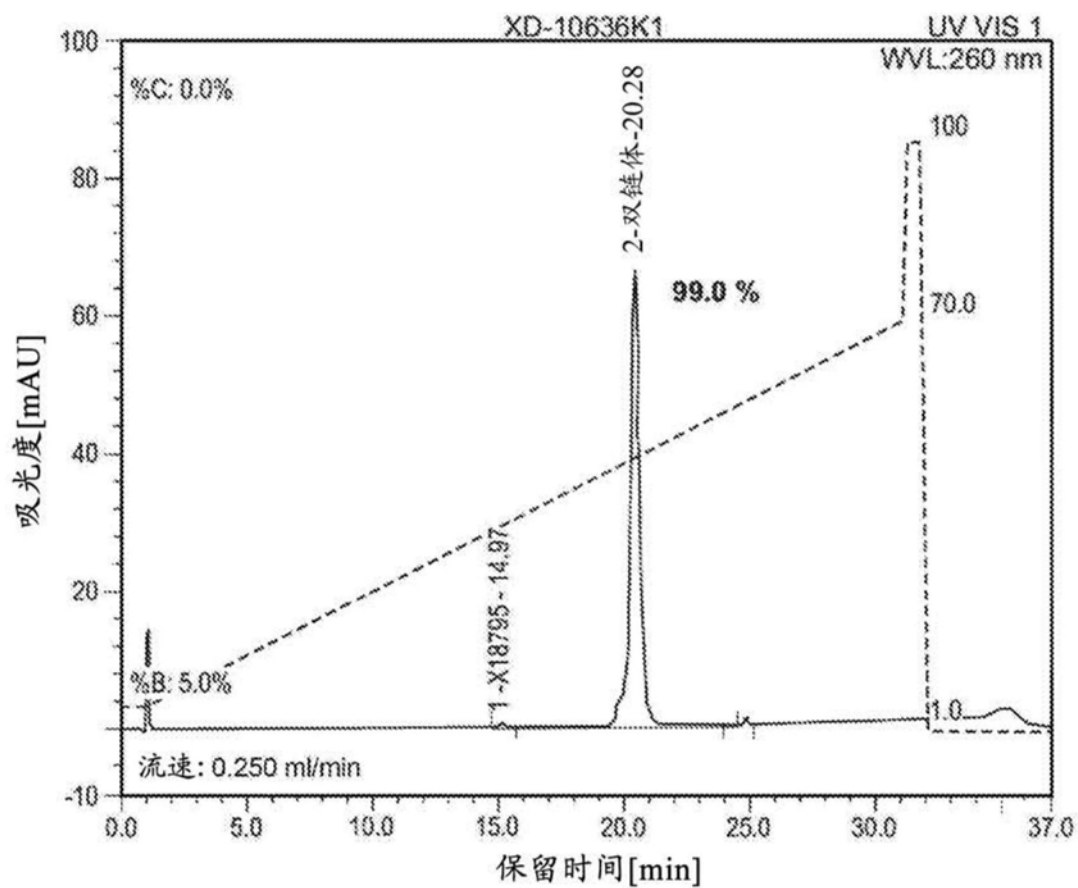


图29B

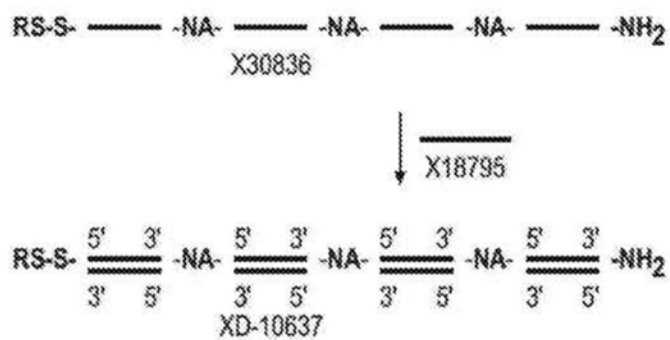


图30A

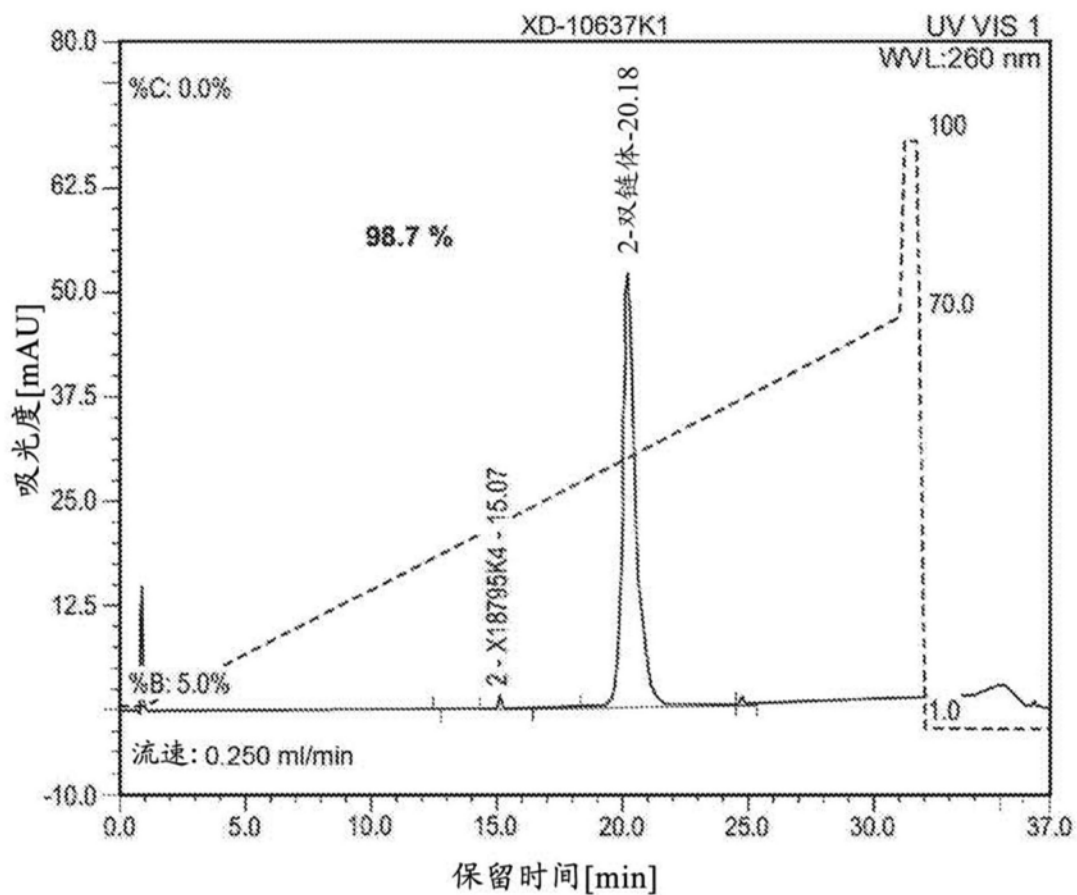


图30B

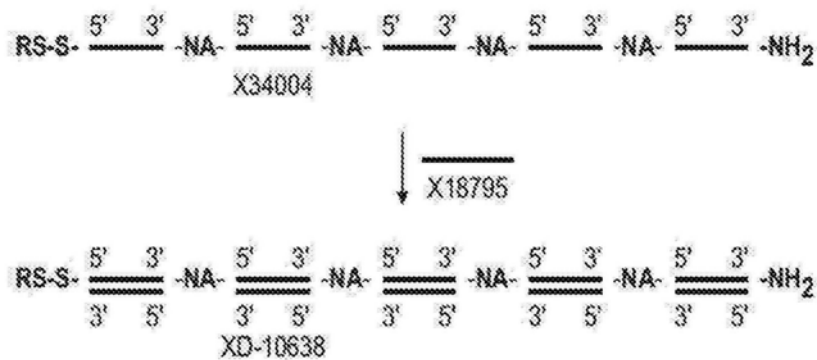


图31A

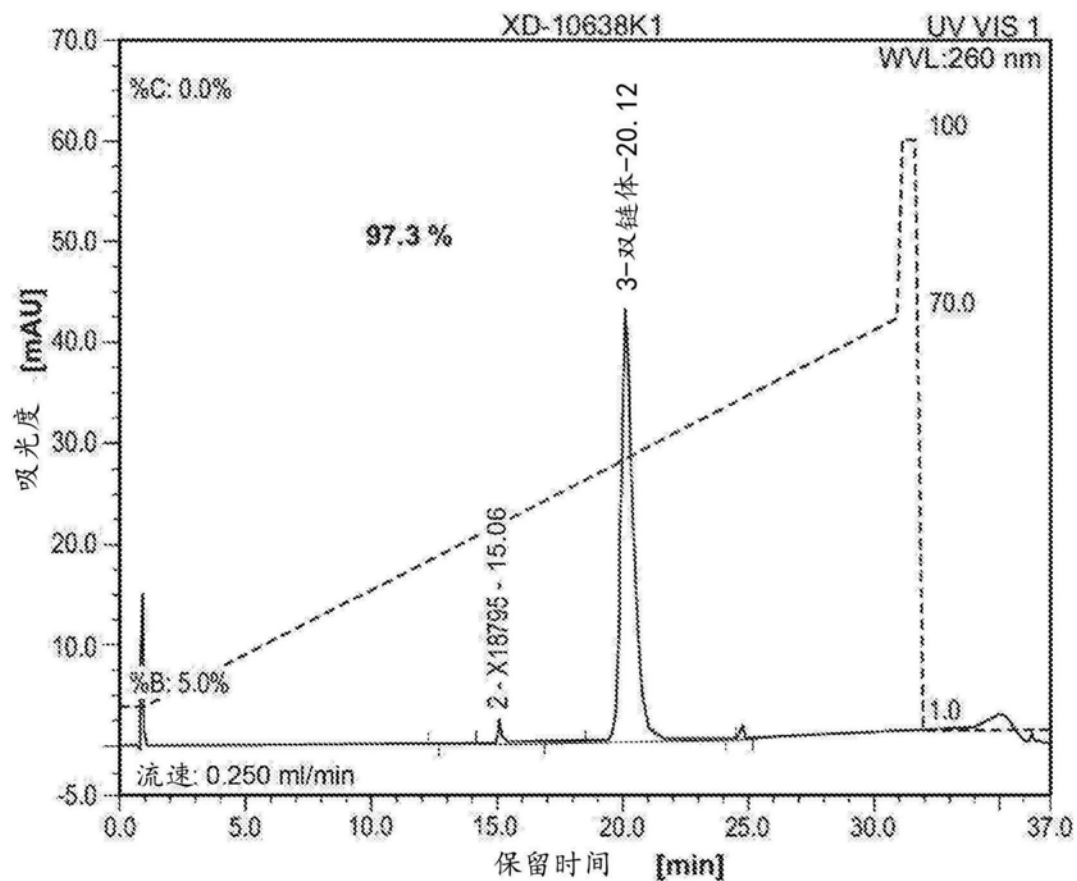


图31B

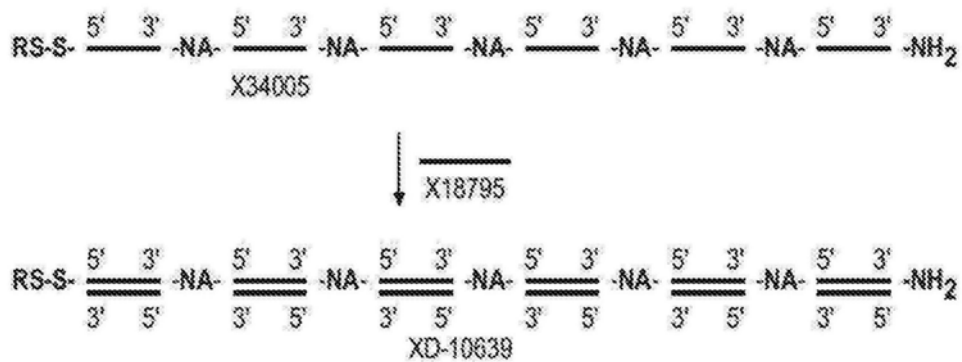


图32A

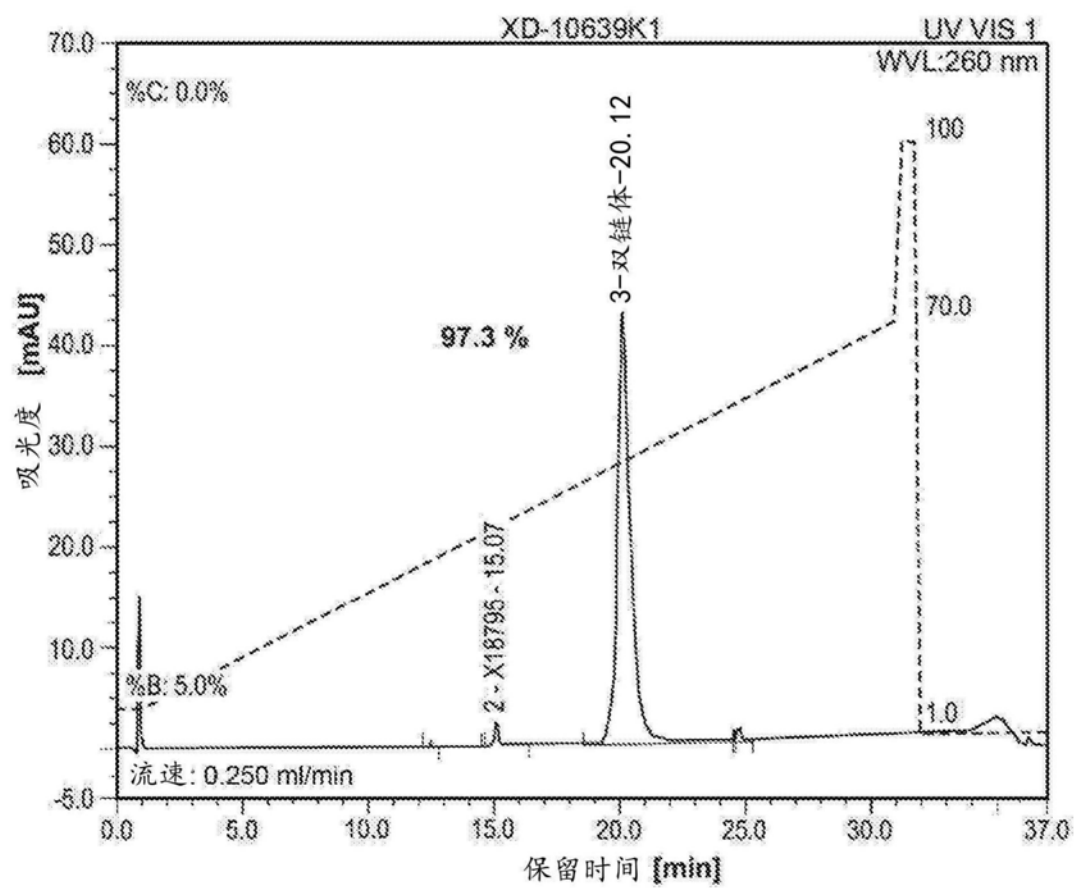


图32B

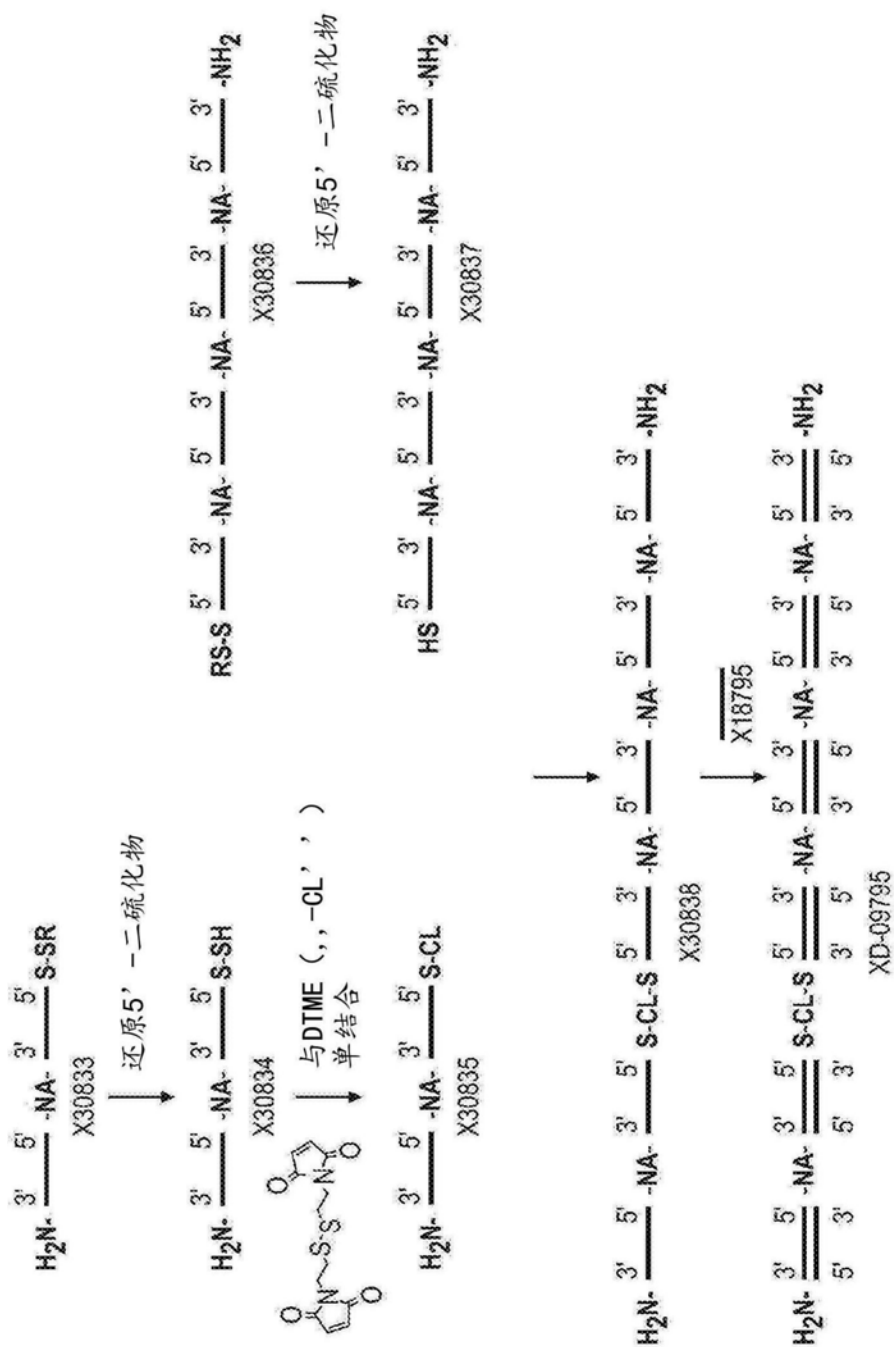


图33A

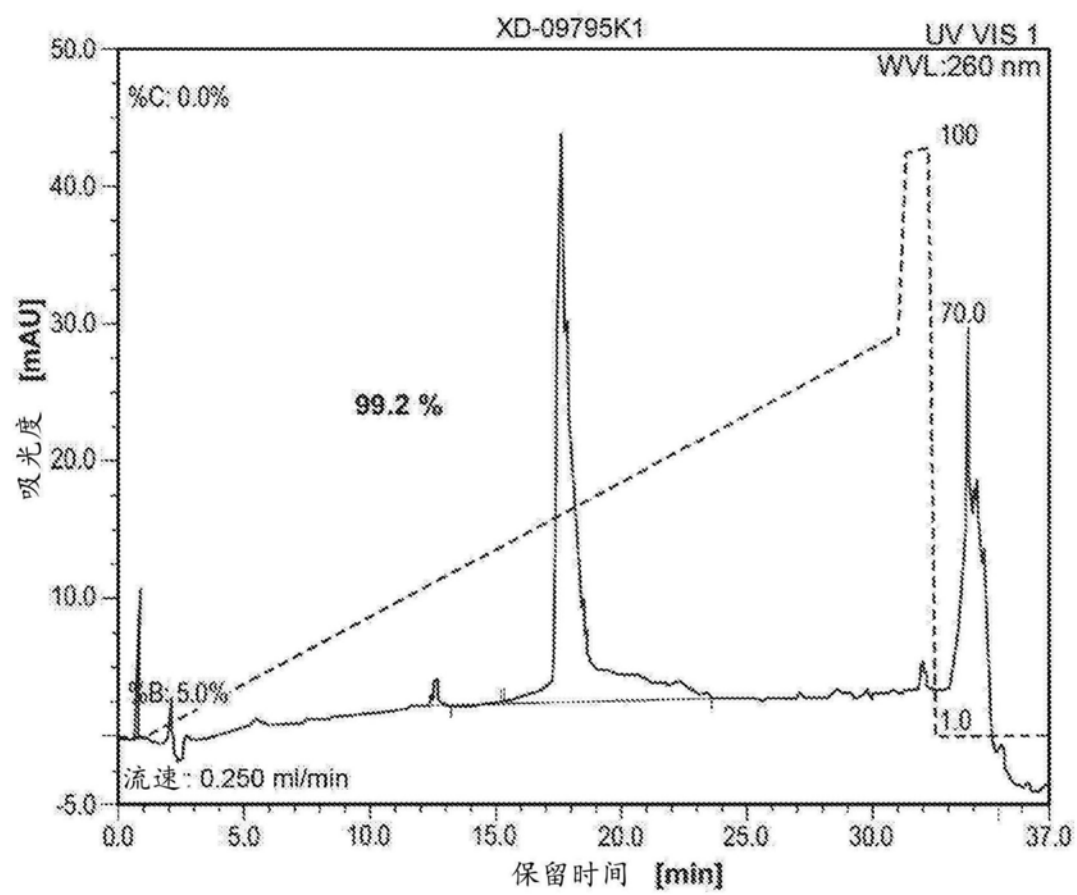


图33B

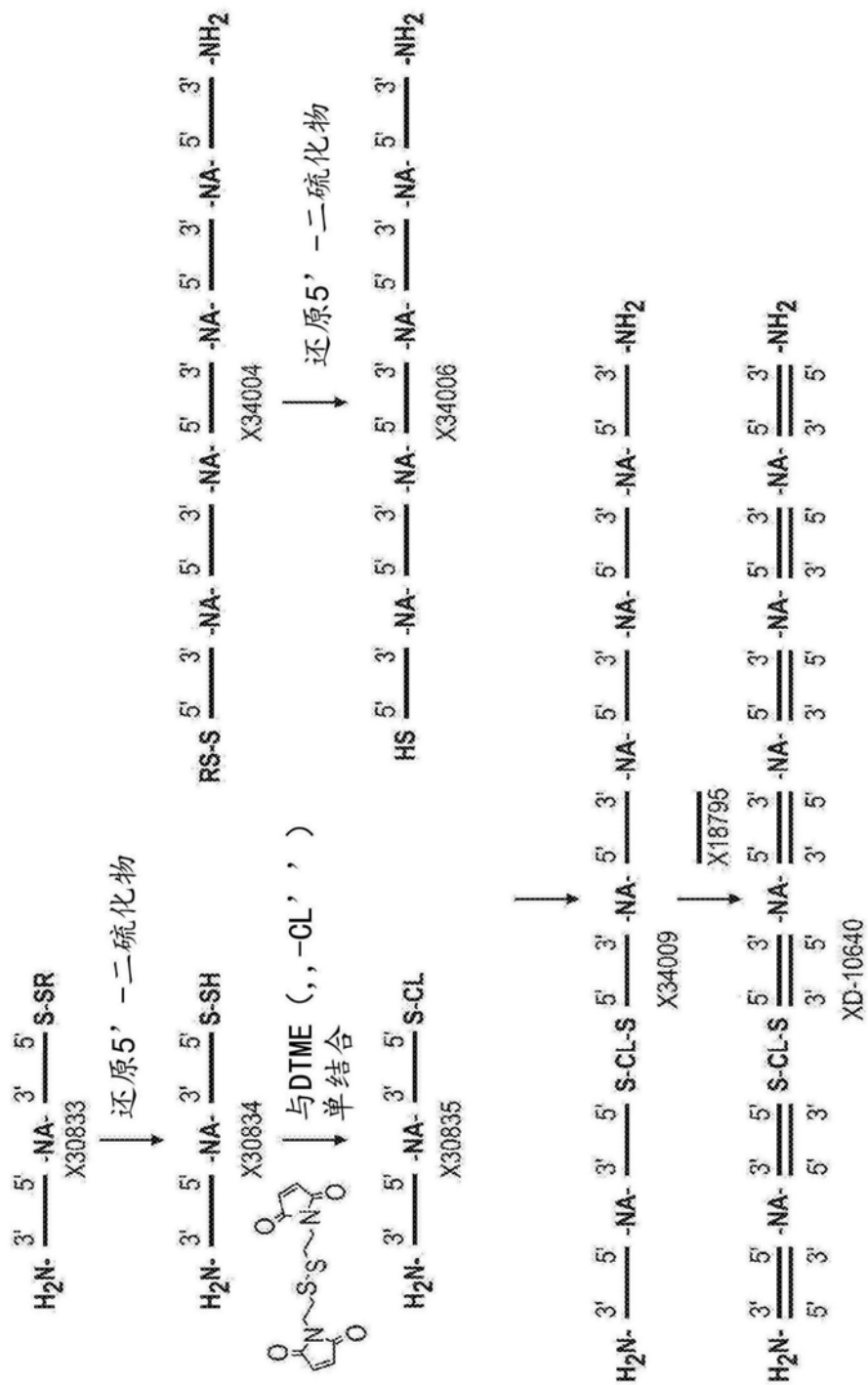


图34A

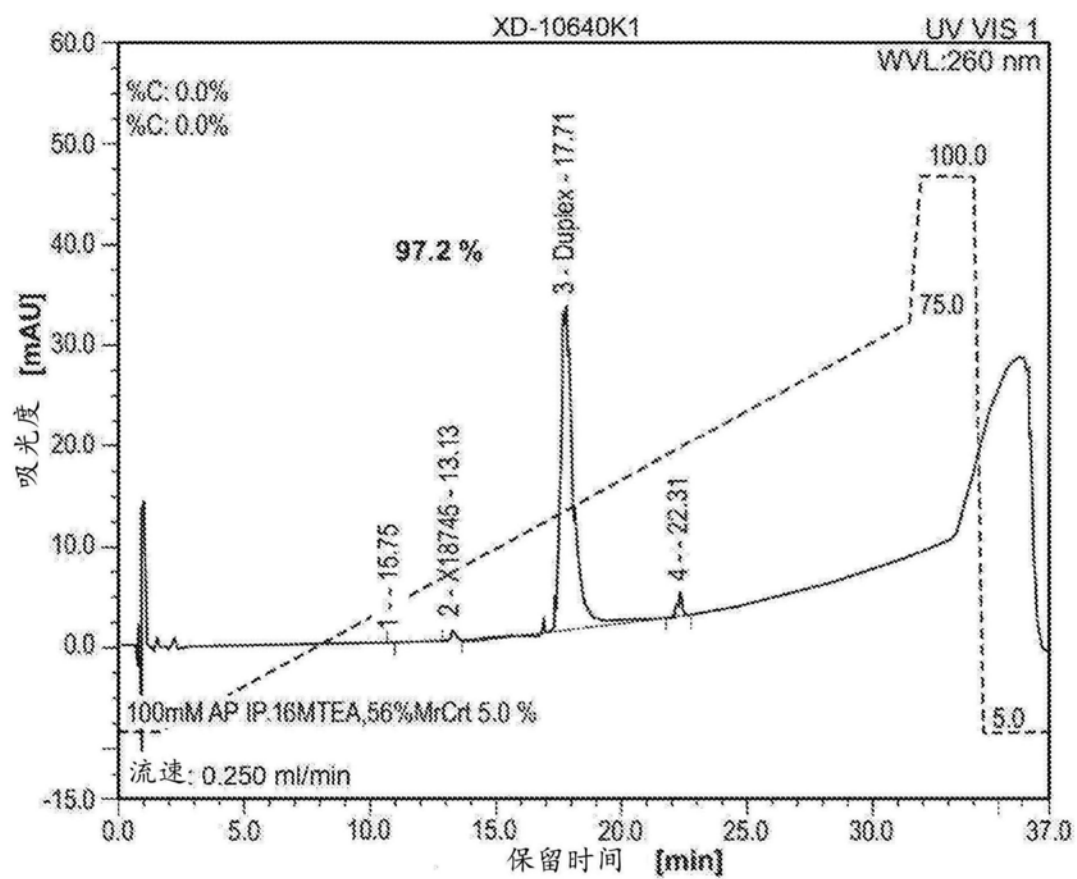


图34B

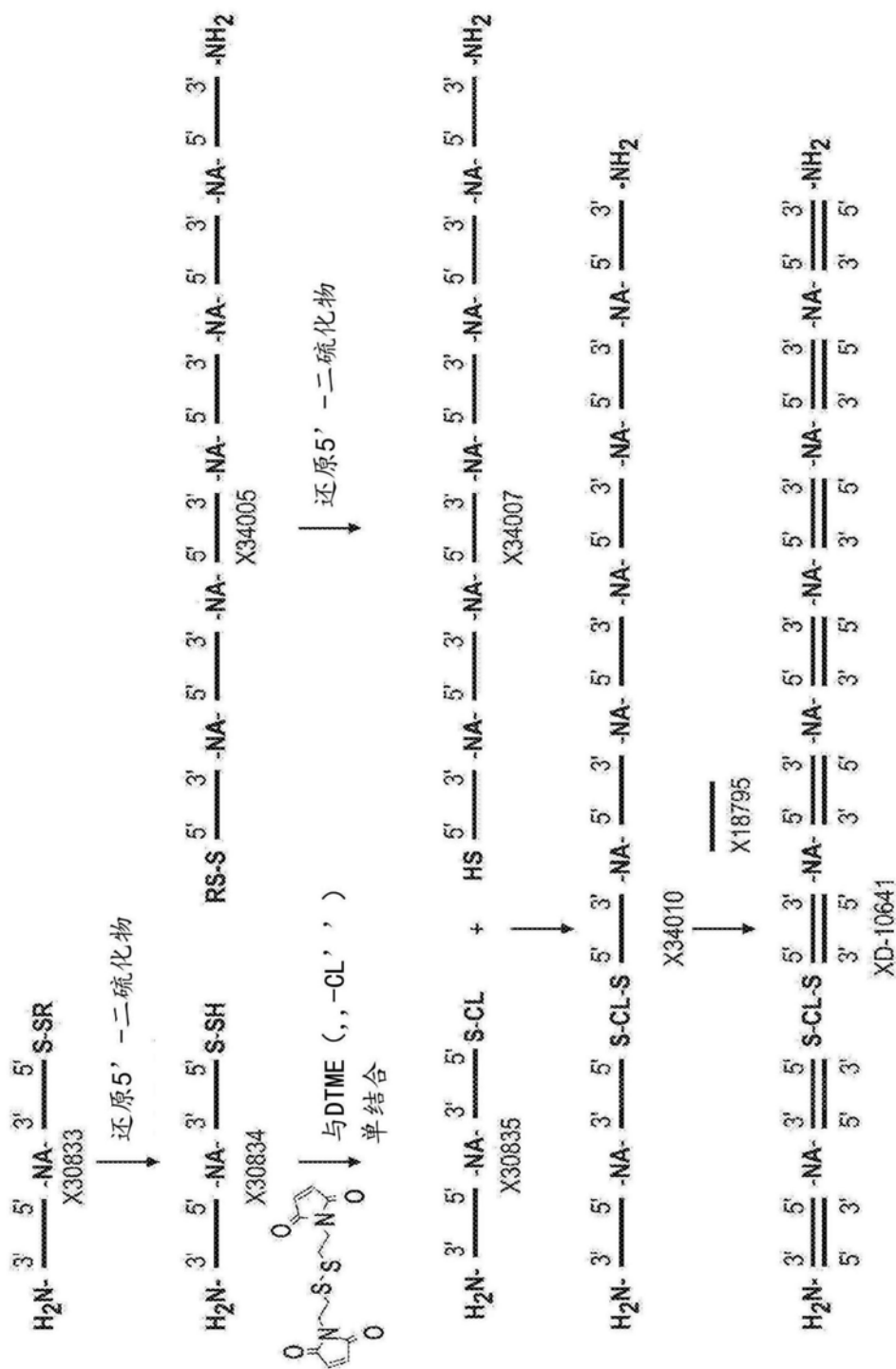


图35A

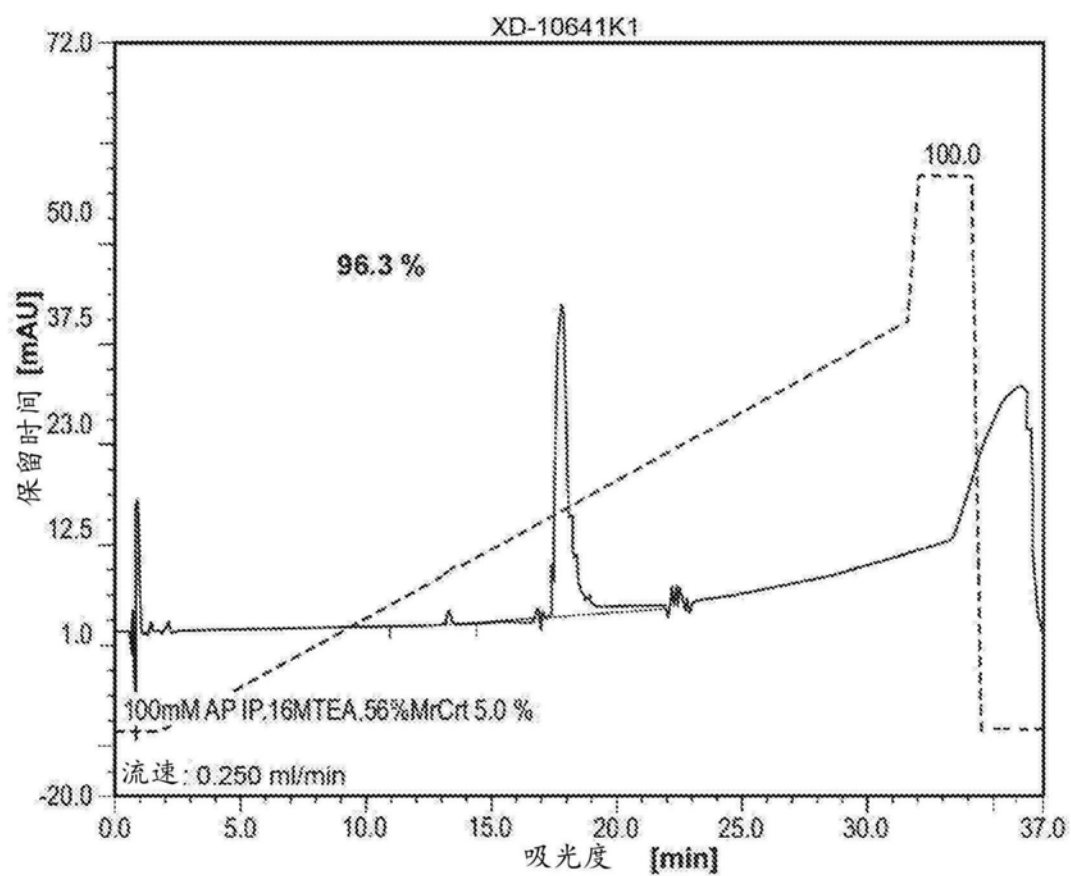


图35B

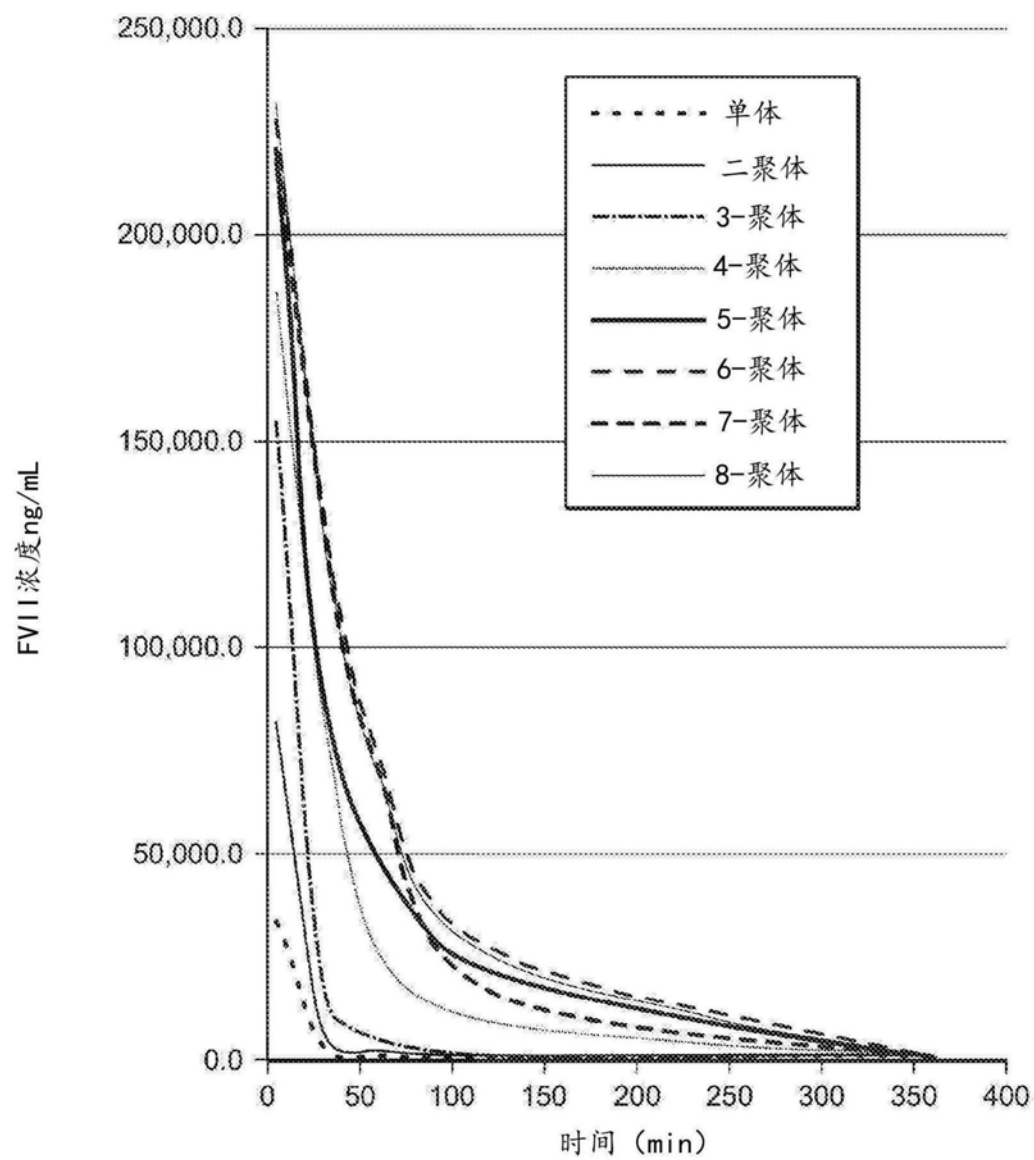


图36A

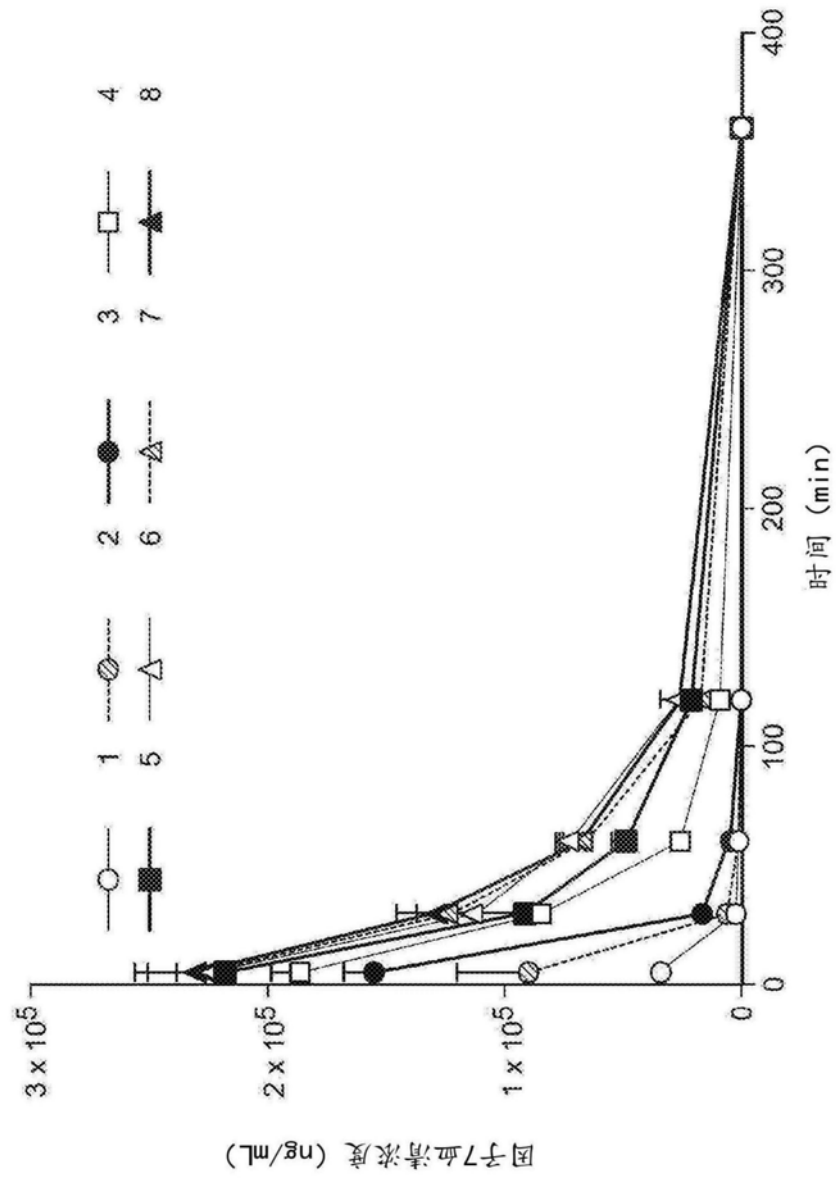


图36B

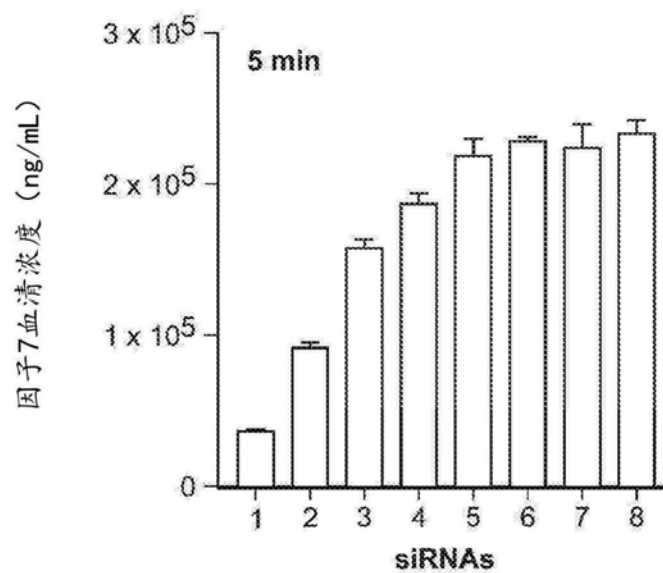


图37A

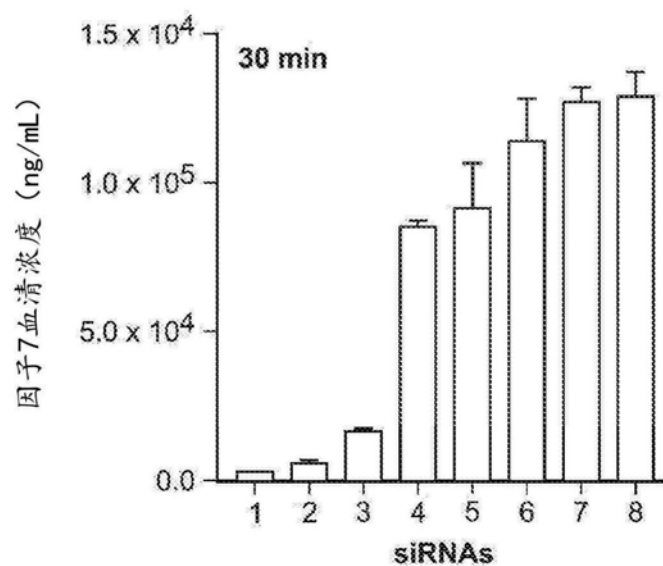


图37B

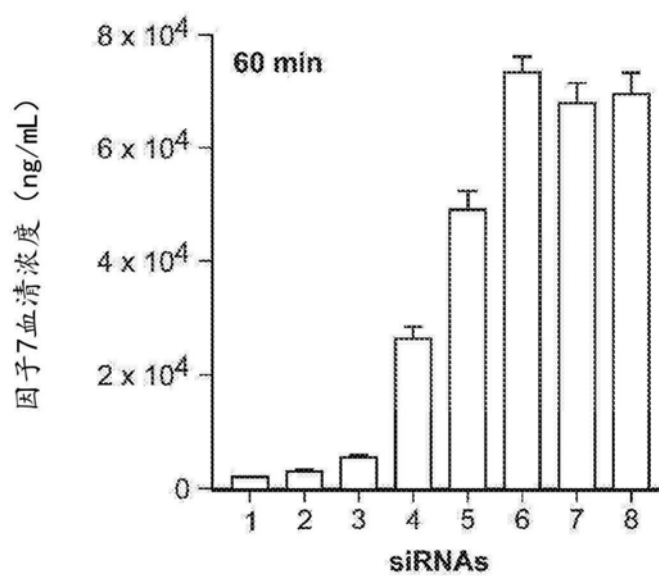


图37C

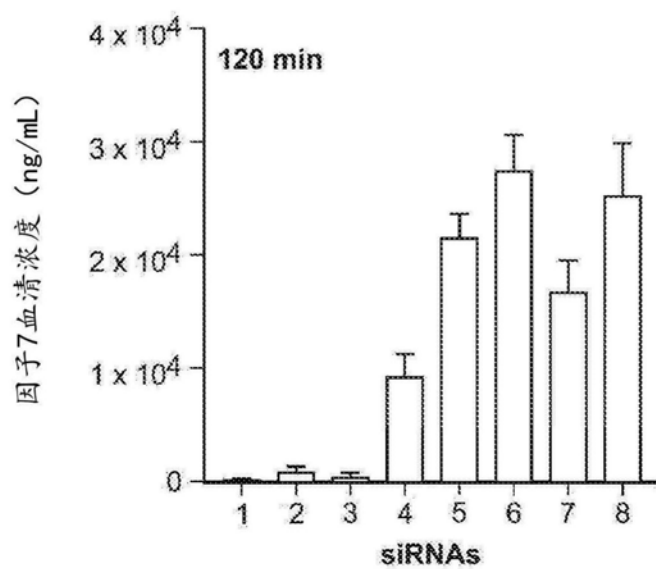


图37D

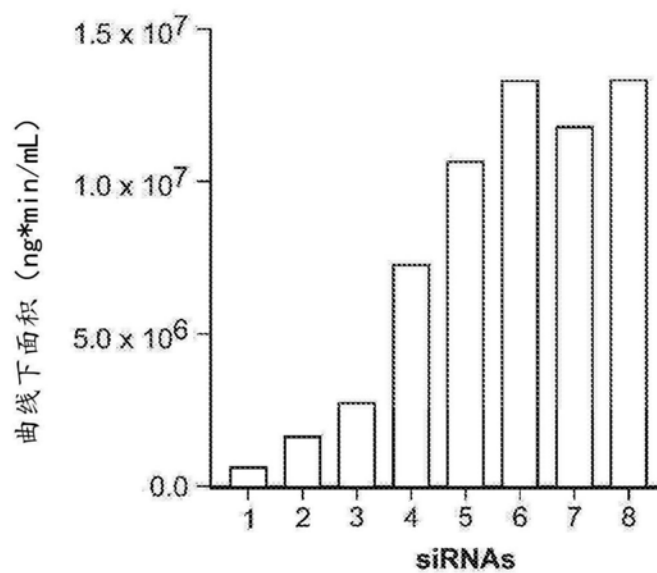


图38A

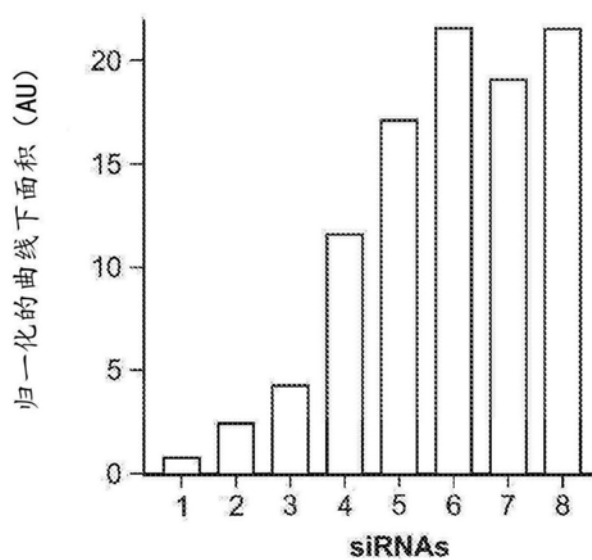


图38B

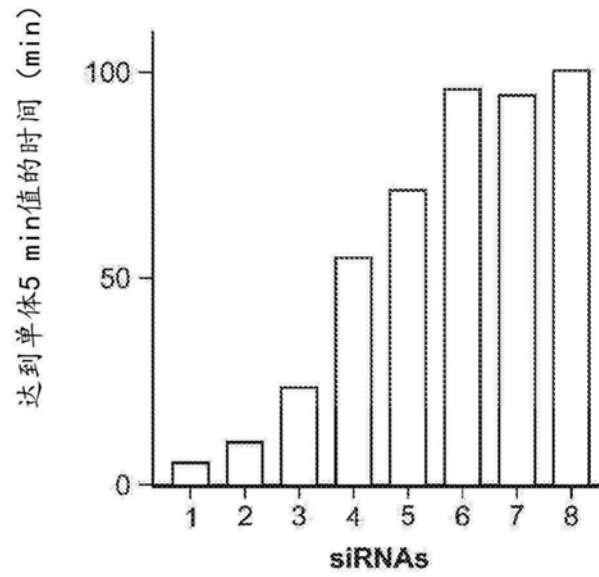


图39

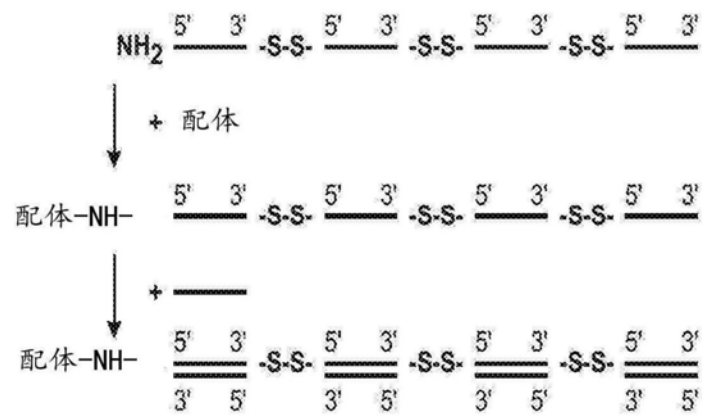


图40

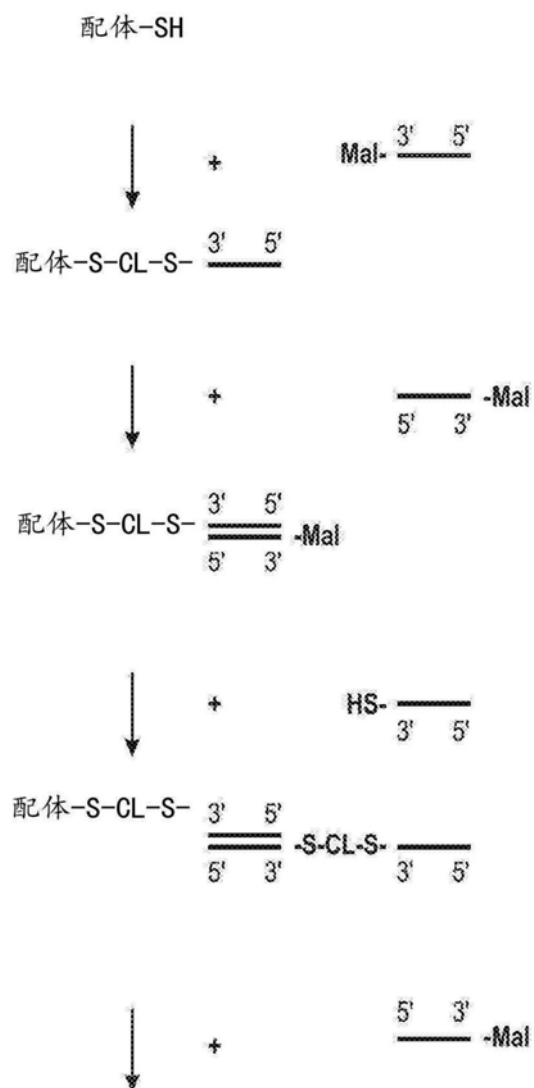


图41

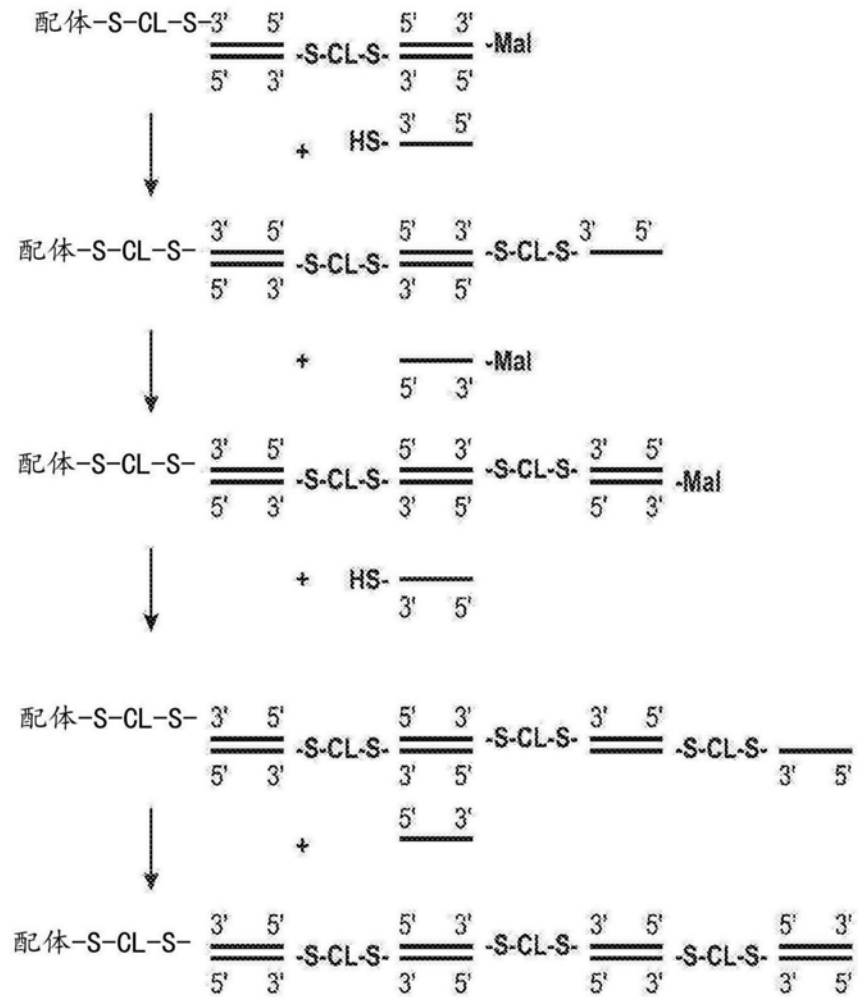


图41 (续)

FVII 有义链的制备
X39850和X39851

- X39850 = 具有5' -端的三价GaINAc簇和3' -硫醇DTME官能团的FVII有义链。
- X39851 = 具有游离5' -氨基和3' -硫醇基团的FVII有义链。

| ssRNA ID | 序列 (5' -3') |
|----------|---|
| X39850 | (GaINAc3)(NHC6) gscsAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT) (SHC6)(DTME) |
| X39851 | (NH2C6) gscsAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(inv dT)(SHC6) |

反应方案:

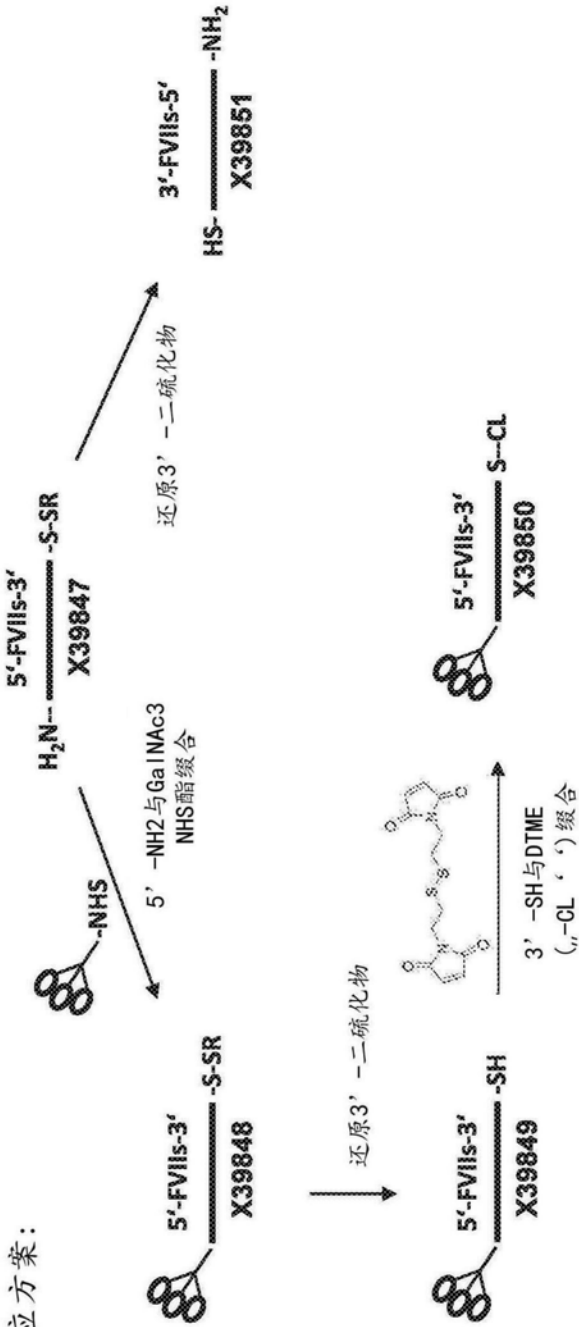


图43

异源六聚体组成的QC数据 (1)

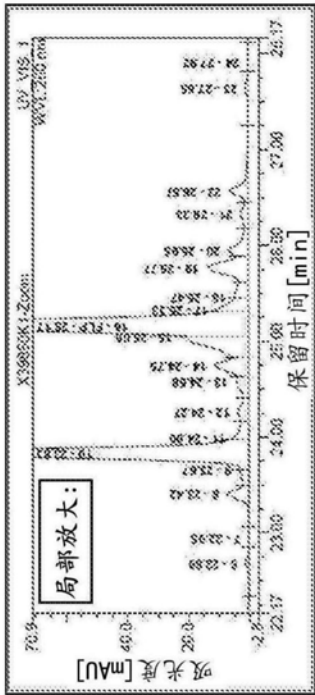
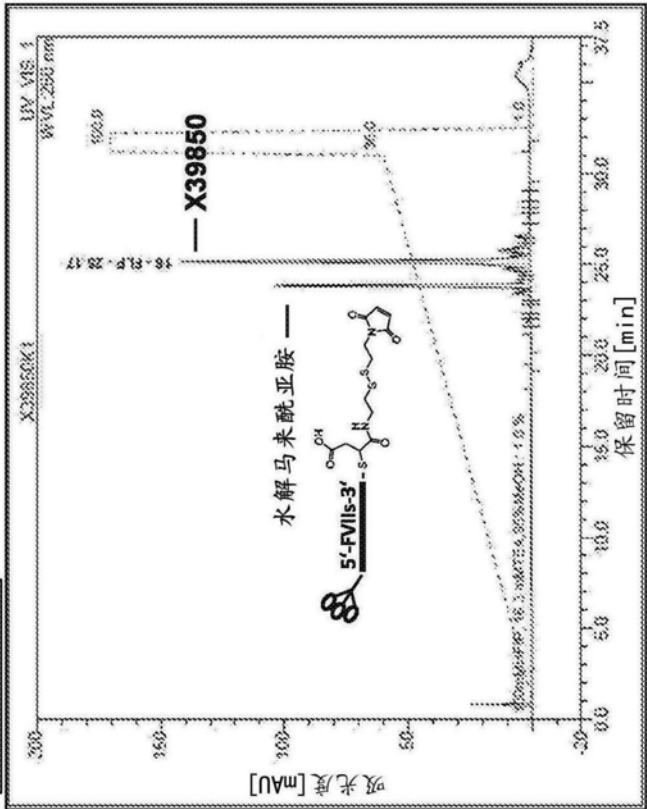
X39850的RP-HPLC-MS分析

- X39850 = 具有5' -端的三价Ga INAc簇和3' -硫醇DTME官能团的FVII I有义链。



| ssRNAID | 序列 (5' -3') |
|---------|--|
| X39850 | (GalNAc3)(NHC6) gscsAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfaAf(invdT) (SHC6)(DTME) |

RP-HPLC:



| ESI-MS: | MW (calcd) | MW (obsd) |
|---------|------------|-----------|
| | 8703.48 | 8700.5534 |

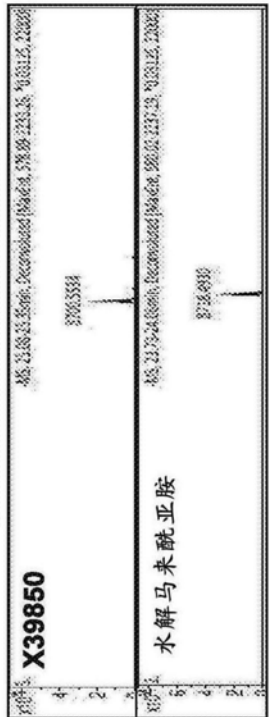


图44

异源六聚体组成的QC数据 (1)

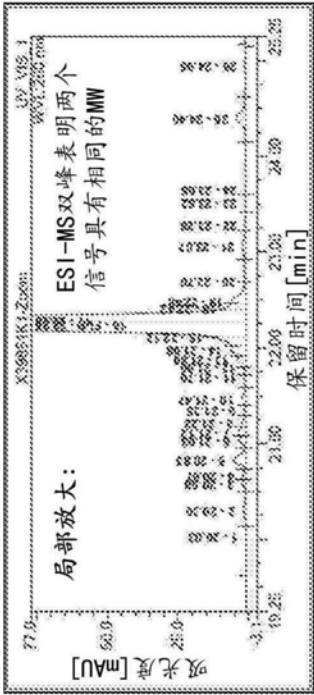
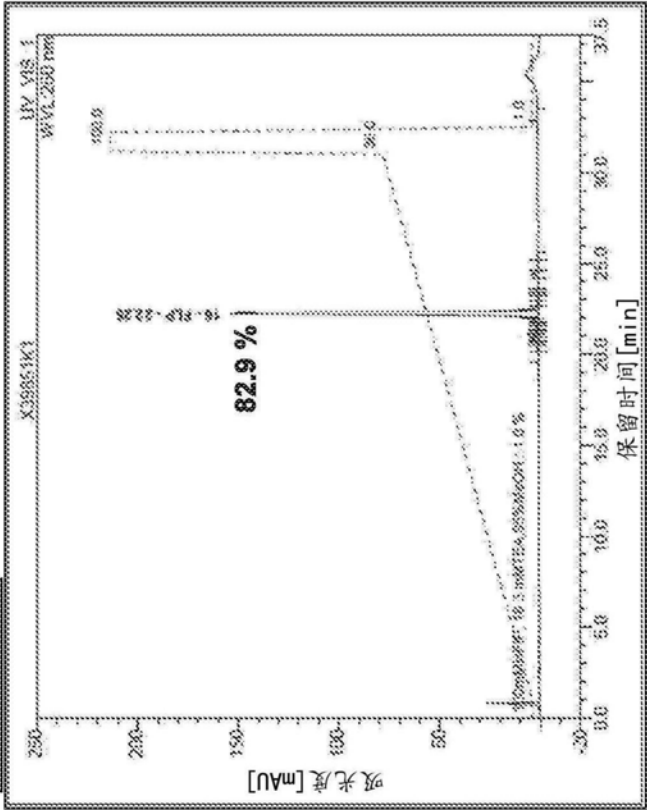
X39851的RP-HPLC-MS分析

• X39851 = 具有游离5' -氨基和3' -硫醇基团的FVII有义链。



| ssRNAID | 序列 (5' -3') |
|---------|--|
| X39851 | (NH2C6) gscsAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT) (SHC6) |

RP-HPLC:



| ESI-MS: | MW (calcd) | MW (obsd) |
|---------|------------|-----------|
| | 6952.59 | 6951.9325 |

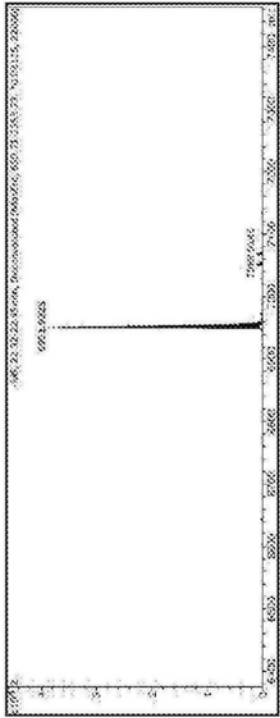


图45

异源六聚体组成的QC数据 (1)

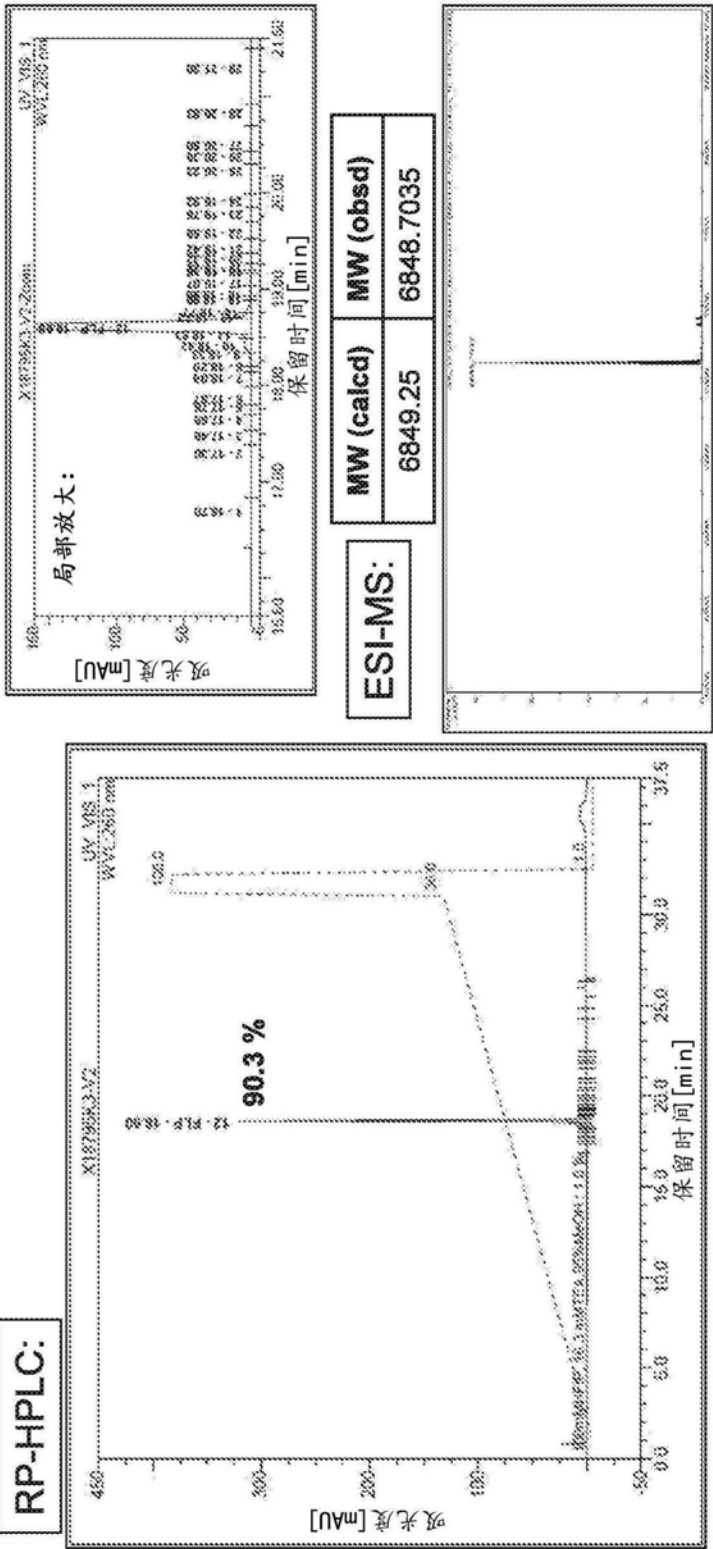
X18795的RP-HPLC-MS分析

• X18795 = FV11反义链。

| ssRNAID | 序列 (5' -3') |
|---------|--------------------------------|
| X18795 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcCfuUfuGfcusu |

5'-FV11as-3'

RP-HPLC:



ESI-MS:

| MW (calcd) | MW (obsd) |
|------------|-----------|
| 6849.25 | 6848.7035 |

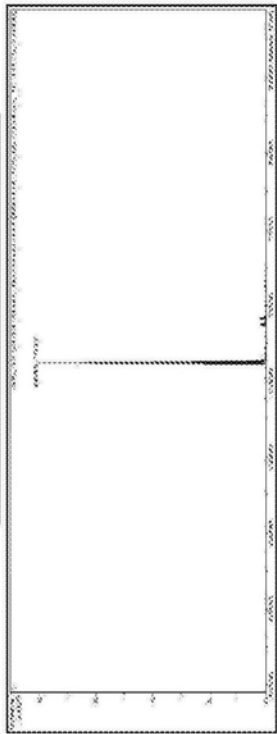


图46

异源六聚体组成的QC数据 (1)

X39855的RP-HPLC-MS分析

• X39855 由通过二硫化物连接与ApoB反义链连接的FVII反义链组成。

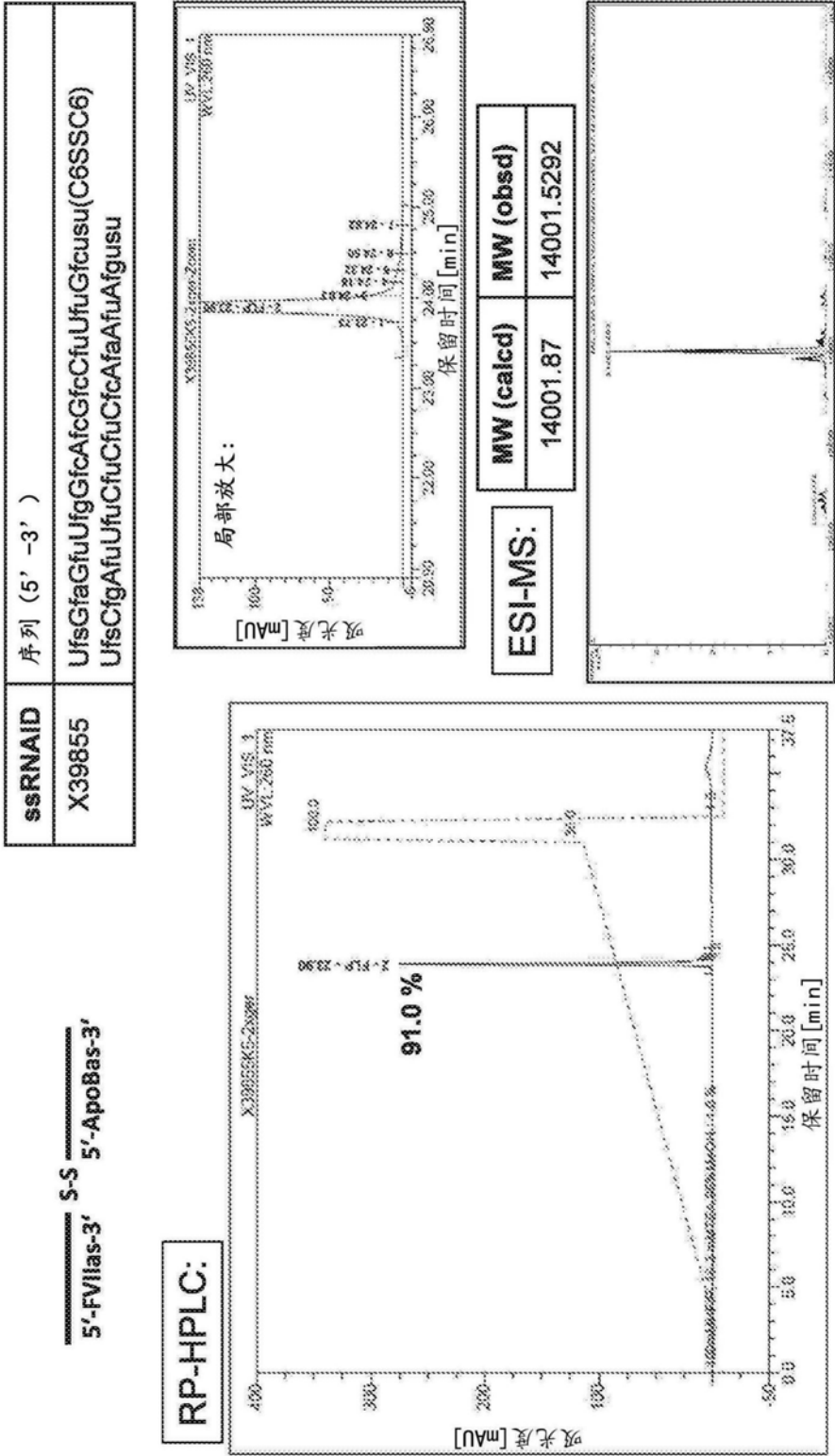


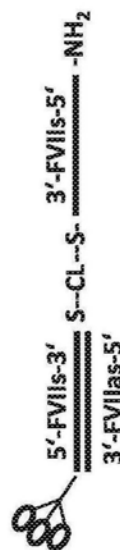
图47

异源二聚体双链体的QC数据

綴合後の天然RP-HPLC

- 进行逐步退火以获得具有ApoB反义突出端的所需异源二聚体双链体。
- 将FVII双链体X39850-X18795与FVII有义链X39851缀合，然后进行IEX纯化。

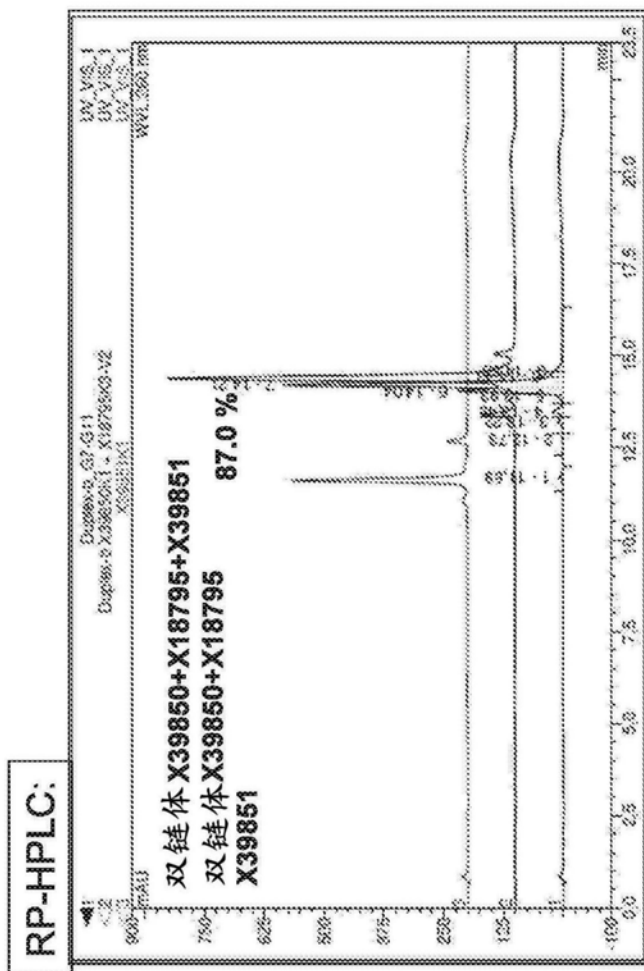
- 将FVI | 双链体X39850-X18795与FVII有义链X39851缀合, 然后进行IEX纯化。



3'-EVIIa-5'

双链体纯度: 87.0%
X39851 过量: 0.8%

X39851 过量 : 0.8 %



异源六聚体组成的QC数据 (2)

X39852的RP-HPLC-MS分析

• X39852 由通过二硫化物连接与TTR有义链连接的FVII有义链组成。

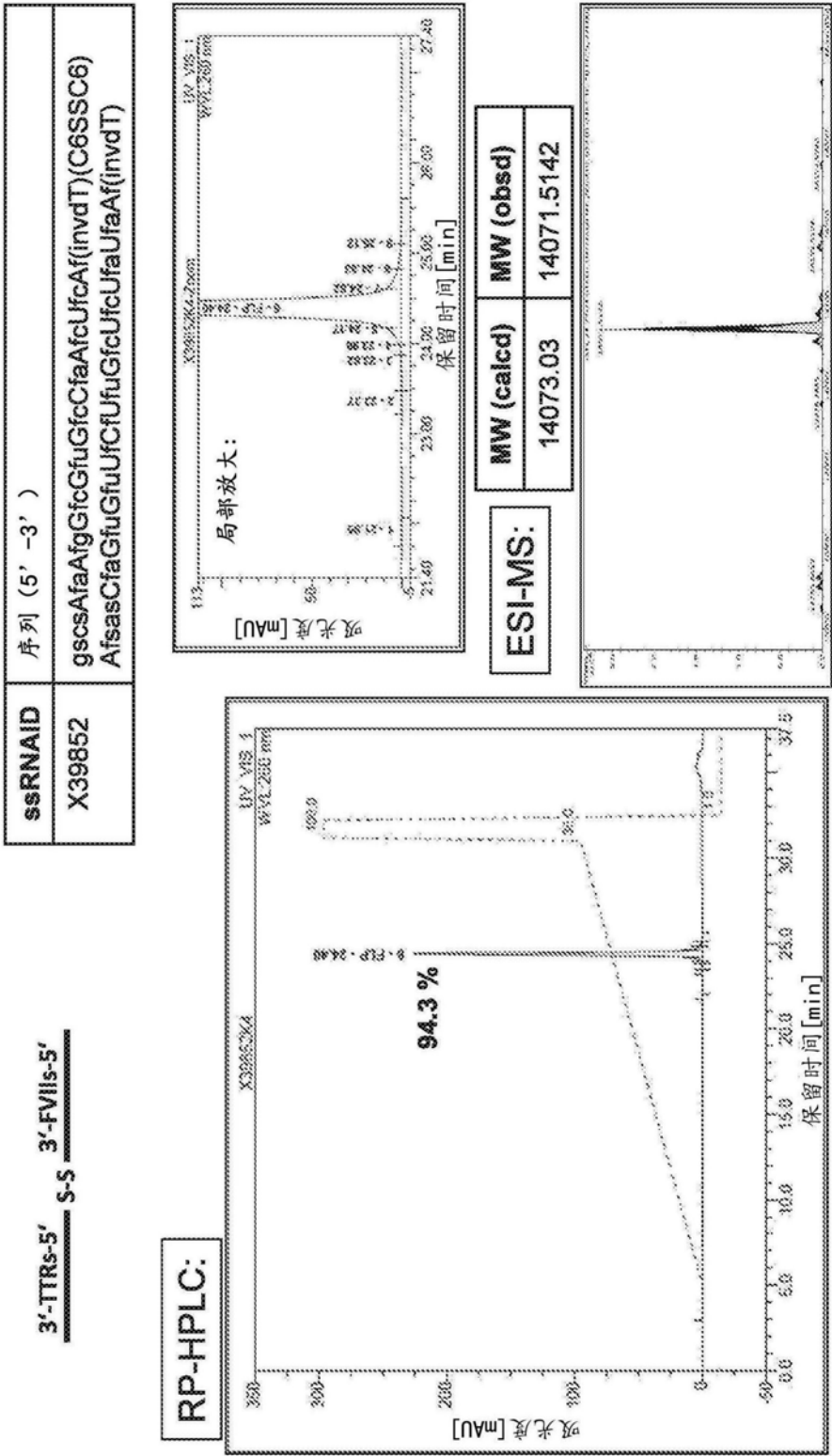


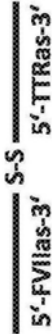
图51

191

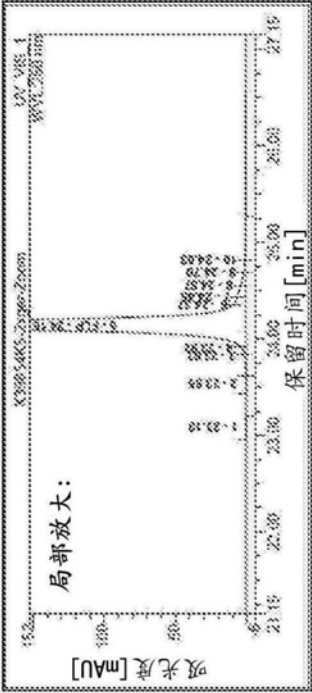
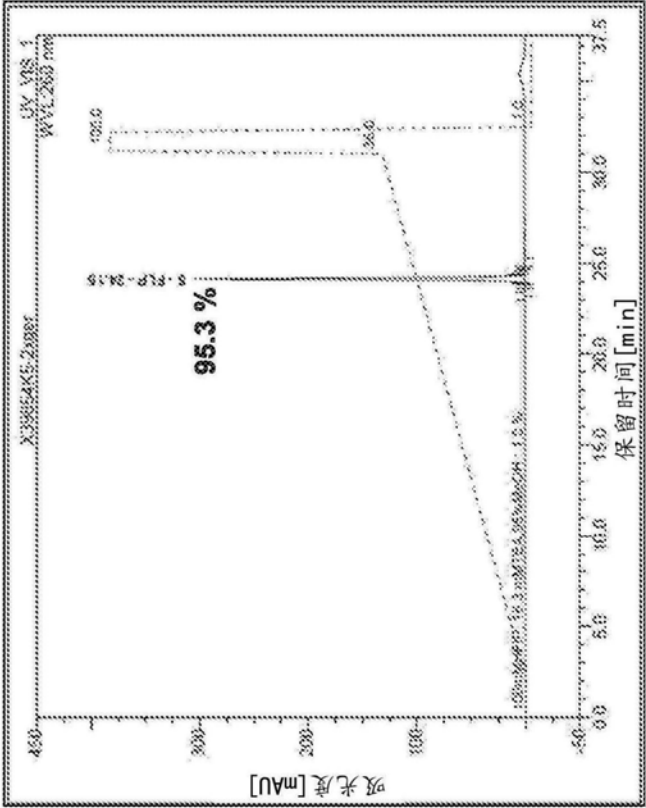
异源六聚体组成的QC数据 (2)
X39854的RP-HPLC-MS分析

• X39854 由通过二硫化物连接与TTR反义链连接的FVII反义链组成。

| ssRNA ID | 序列 (5' -3') |
|----------|---|
| X39854 | UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C6SSC6)
usUfsaUfaGfaGfcAfcAfcAfcUfgUfususu |



RP-HPLC:



| MW (calcd) | MW (obsd) |
|------------|------------|
| 14835.59 | 14834.6257 |

ESI-MS:

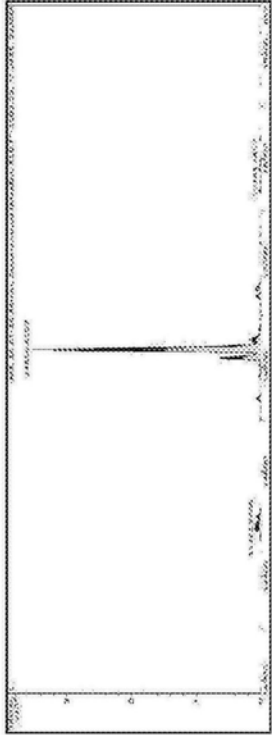


图52

异源六聚体组成的QC数据 (2)

X39853的RP-HPLC-MS分析

• X39853由通过二硫化物连接与ApoB有义链连接的FVII有义链组成。

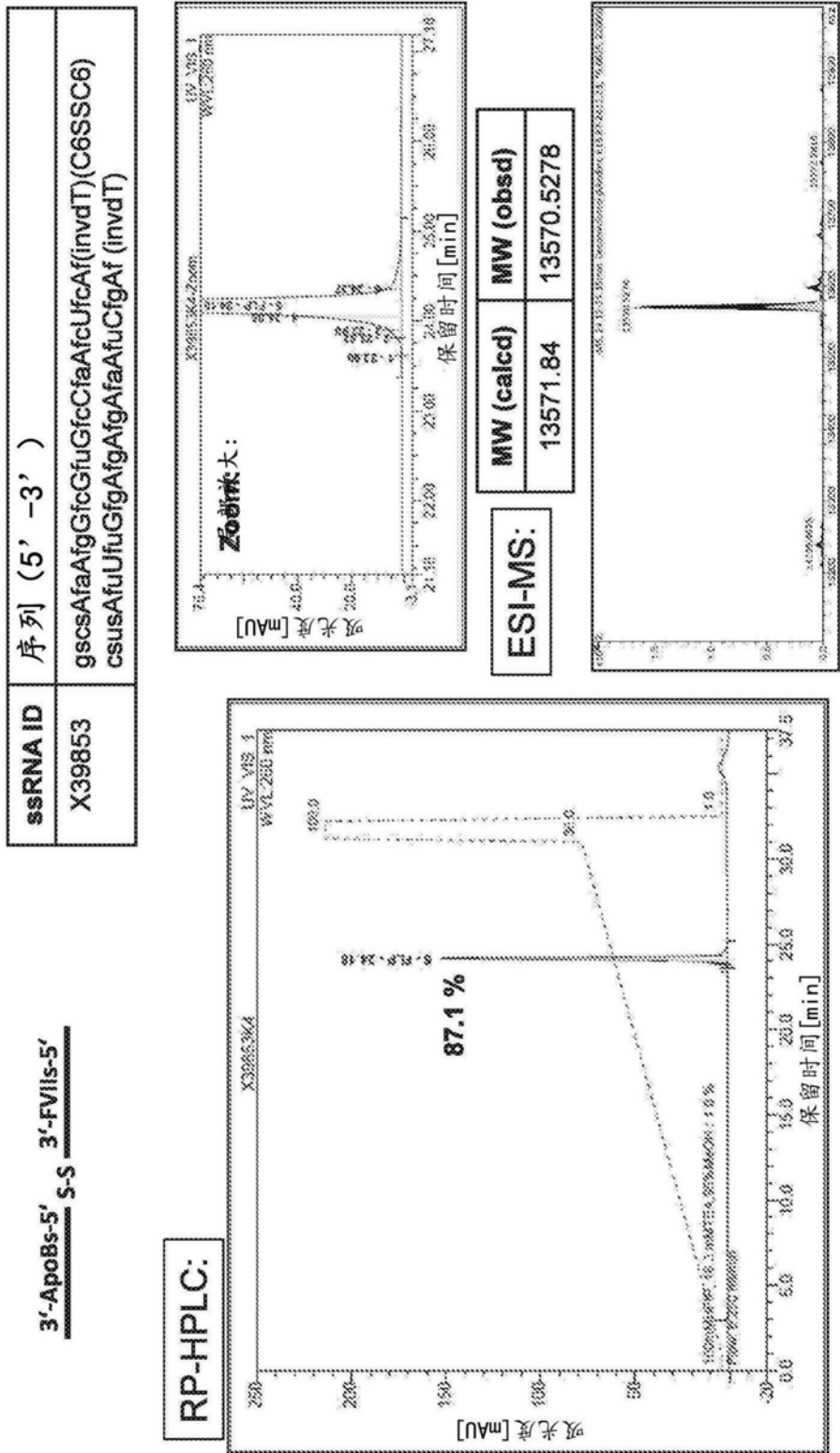
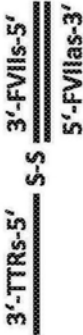


图53

异源三聚体双链体的QC数据
第一次退火的天然RP-HPLC

- 进行逐步退火以获得具有ApoB有义突出端的所需异源二聚体双链体。

- 首先，使二聚体有义链X39852与1摩尔当量的反义X18795退火。



双链体纯度：**99.5 %**
反义链过量：**0.5 %**

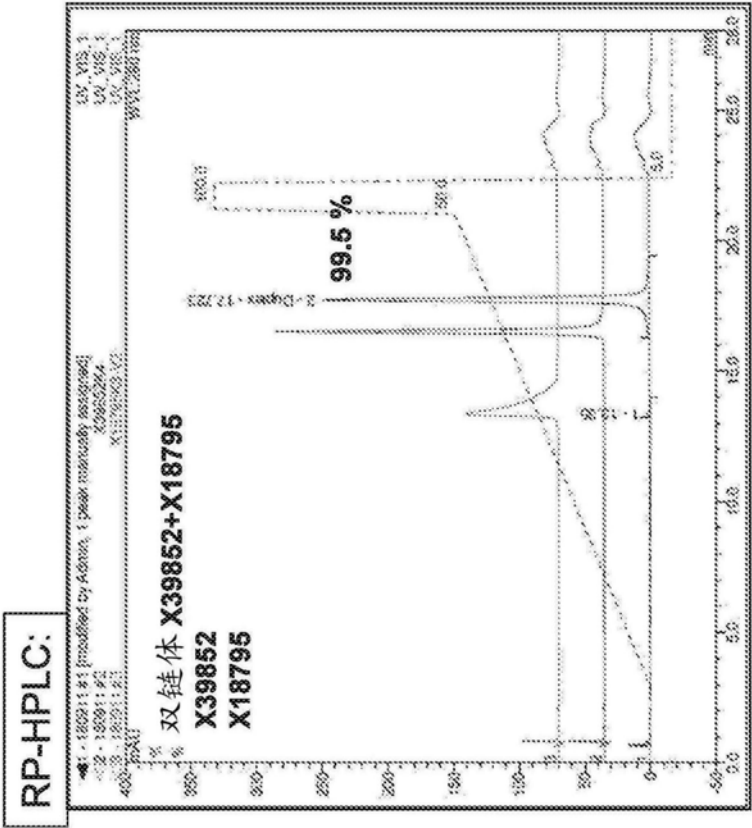
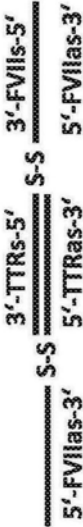


图54

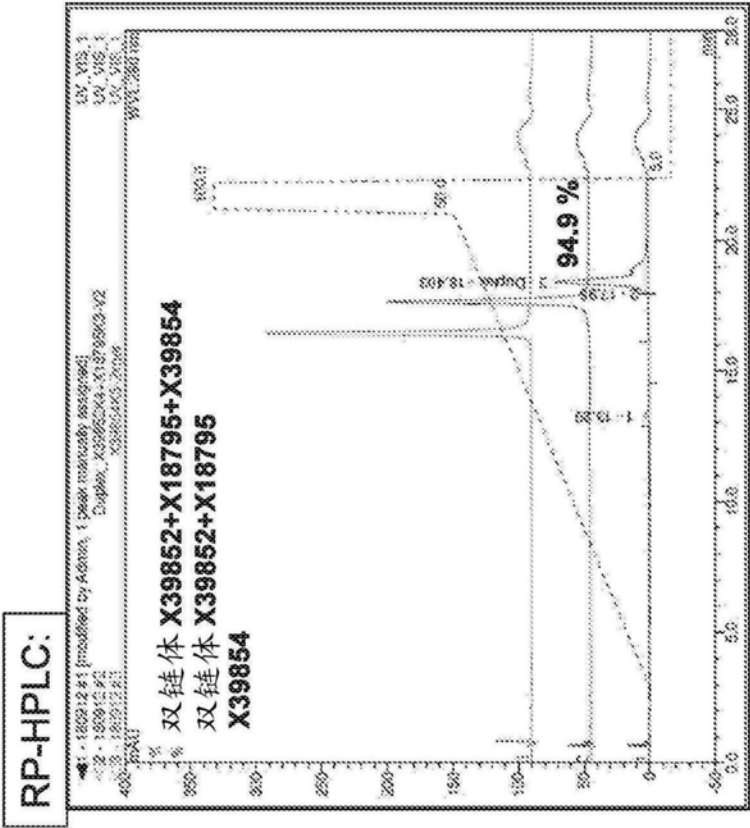
异源三聚体双链体的QC数据
第二次退火的天然RP-HPLC

- 进行逐步退火以获得具有ApoB有义突出端的所需异源二聚体双链体。

- 接下来，将1摩尔当量的二聚体反义链X39854添加到X39852-X18795双链体中。



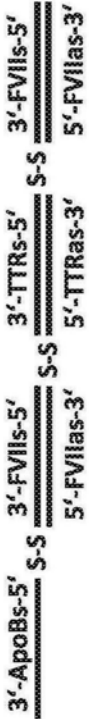
双链体纯度：94.9 %
反义链过量：2.0 %



异源三聚体双链体的QC数据

第三次退火的天然RP-HPLC

- 进行逐步退火以获得具有ApoB有义突出端的所需异源二聚体双链体。
- 最后，将1摩尔当量的二聚体有义链X39853添加到X39852-X18795-X39854双链体中，然后进行IEX纯化。



双链体纯度：98.3 %

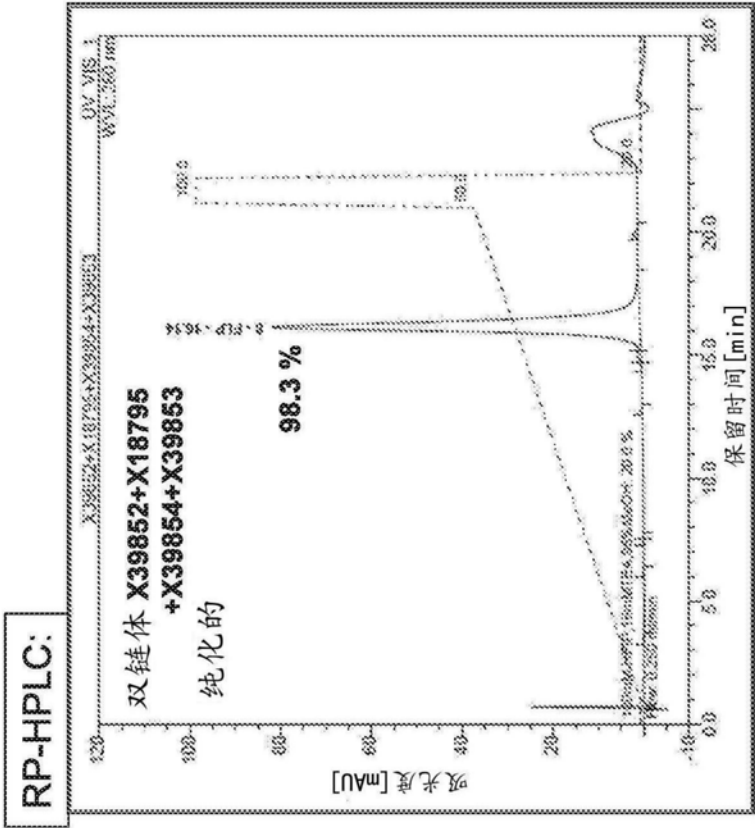
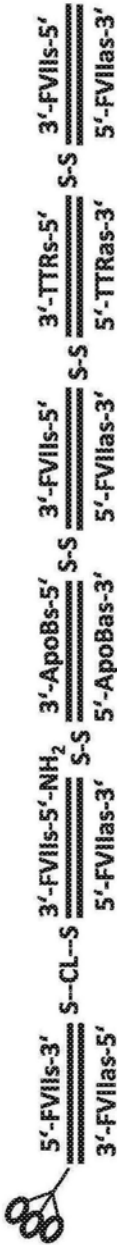


图56

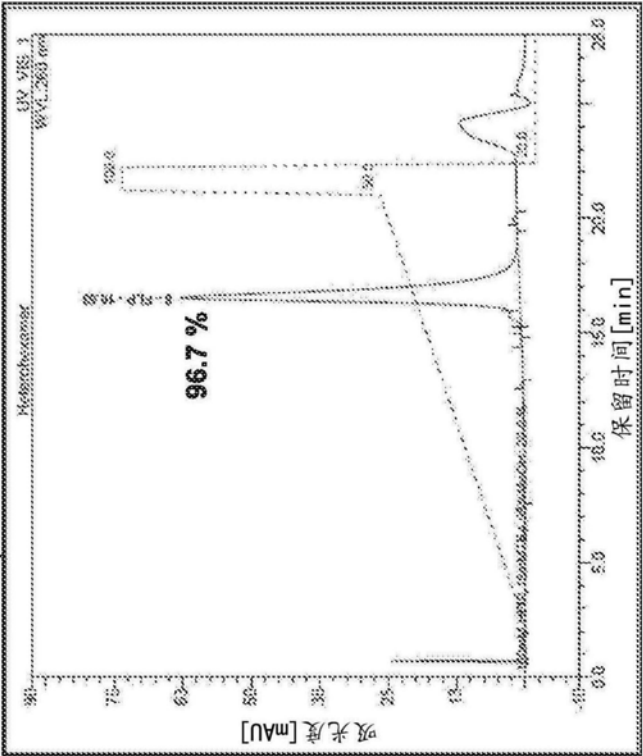
196

异源六聚体双链体的QC数据
最后退火后的天然RP-HPLC

GaINAc缀合的异源六聚体siRNA:



RP-HPLC:



使用等摩尔量的每种双链体进行退火

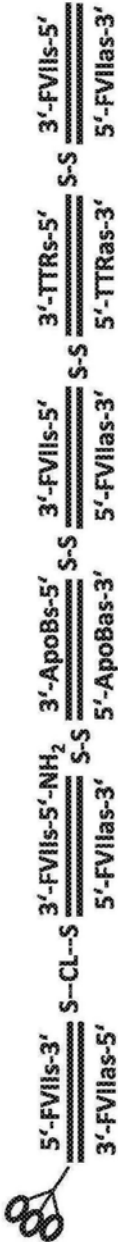
产率: 4.4 mg

双链体纯度: 96.7 %

图57A

异源六聚体双链体的QC数据
ESI-MS光谱

GaINAc缀合的异源六聚体siRNA:



ESI-MS:

| ssRNA ID | MW (calcd) | MW (obsd) |
|---------------|------------|------------|
| X39850-X39851 | 15656.07 | 15651.2871 |
| X18795 | 6849.25 | 6848.2744 |
| X39855 | 14001.87 | 14000.4507 |
| X39852 | 14073.03 | 14070.5658 |
| X39854 | 14835.59 | 14833.5073 |
| X39853 | 13571.84 | 13569.6524 |

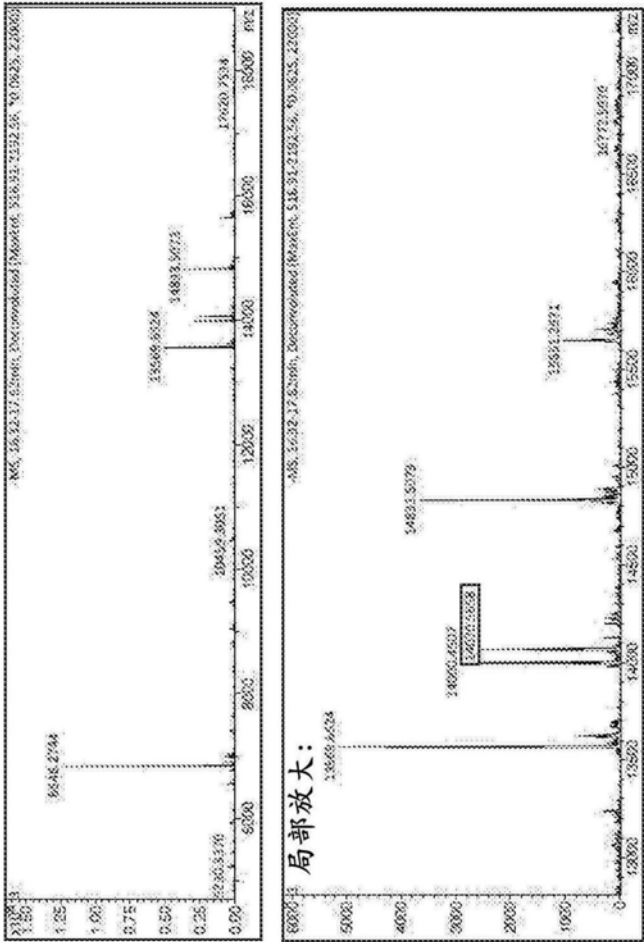


图57B

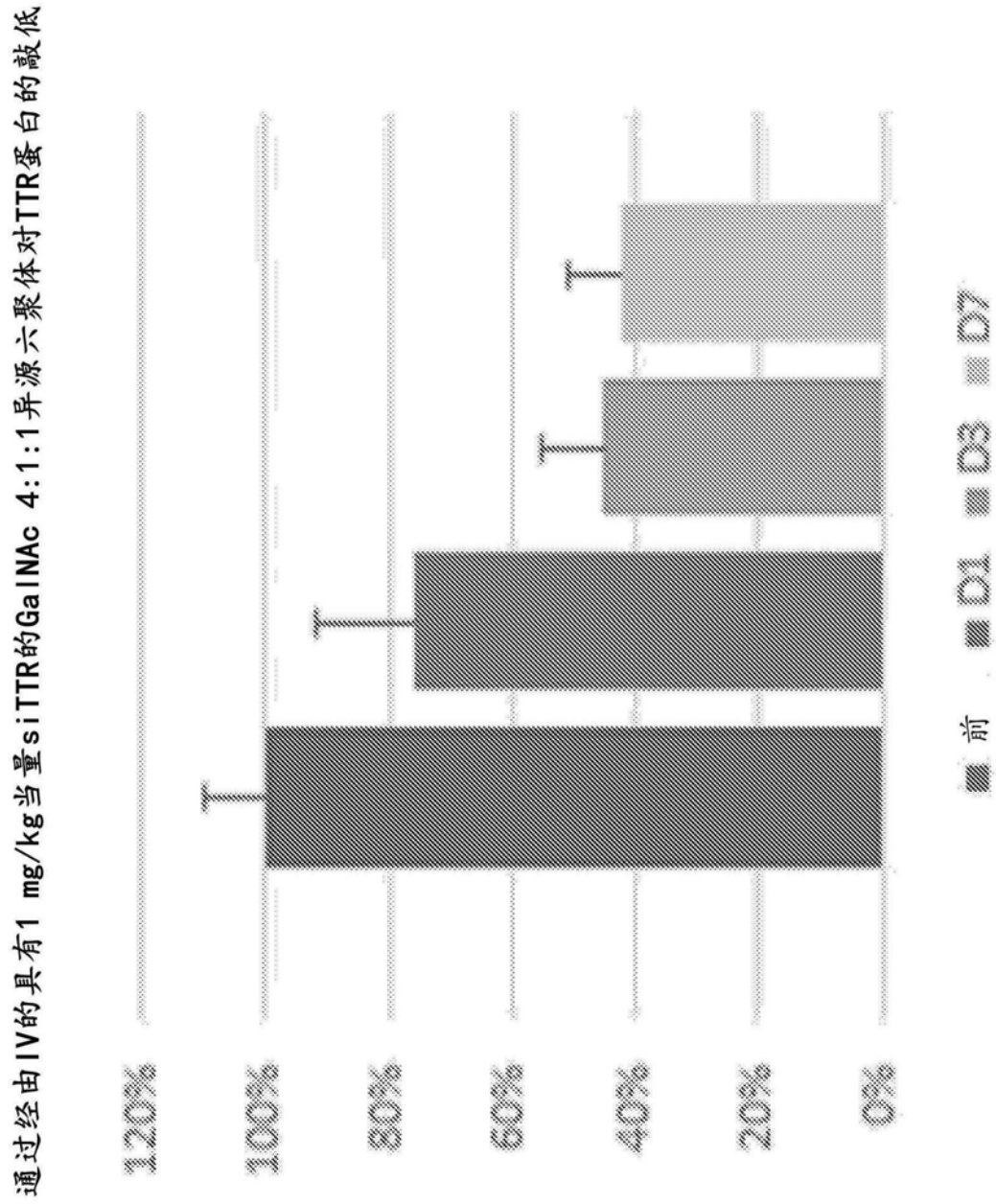


图58

