



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105960265 A

(43)申请公布日 2016.09.21

(21)申请号 201480074839.8

(22)申请日 2014.12.04

(30)优先权数据

61/911,991 2013.12.04 US

61/911,993 2013.12.04 US

62/049,299 2014.09.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.08.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/068654 2014.12.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/085113 EN 2015.06.11

(71)申请人 阿克赛医药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 格拉尔德·考文贝赫

帕梅拉·A·帕夫科

林恩·利伯蒂娜

卡伦·G·布洛克

詹姆斯·卡迪亚

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 彭鲲鹏 郑斌

(51)Int.Cl.

A61P 17/02(2006.01)

权利要求书4页 说明书74页

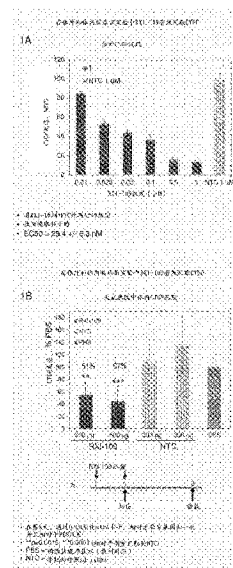
序列表8页 附图16页

(54)发明名称

利用经化学修饰的寡核苷酸处理伤口愈合的方法

(57)摘要

本发明涉及具有改进的组织 and 细胞摄取特性的RNAi构建体,以及在皮肤和纤维化应用中使用这些化合物的方法。本发明的一些方面提供了用于预防性处理伤口以减少瘢痕形成的核酸分子。在本文中,证明了预防性给予的特定核酸分子RXI-109(靶向结缔组织生长因子(CTGF))减少了伤口愈合期间的瘢痕形成。



1. 一种减少伤口愈合期间的瘢痕形成的方法,其包括向人对象施用治疗有效量的用于减少瘢痕形成的核酸分子,其中所述核酸分子在受伤前72小时至受伤后24小时之间施用。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述核酸是经化学修饰的寡核苷酸。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述瘢痕形成是皮肤瘢痕形成。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述瘢痕形成是眼瘢痕形成。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述核酸分子针对编码选自以下蛋白质的基因:转化生长因子 β (TGF β 1,TGF β 2)、骨桥蛋白、结缔组织生长因子(CTGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、低氧诱导因子-1 α (HIF1 α)、胶原蛋白I和/或III、脯氨酰4-羟化酶(P4H)、前胶原C-蛋白酶(PCP)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、整联蛋白、间隙连接蛋白、组胺H1受体、组织型转谷氨酰胺酶、哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)、HoxB13、VEGF、IL-6、SMAD蛋白、核糖体蛋白S6激酶(RSP6)和环加氧酶-2(COX-2)。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述核酸分子针对CTGF。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述核酸分子是单链核酸分子。

8. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述核酸分子是双链核酸分子。

9. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述核酸分子通过RNAi作用机制工作。

10. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述核酸分子是RXI-109,其包含有意义链序列:G.mC.A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU.A*mG*mA.TEG-Ch1(SEQ ID NO:1)和反义链序列:P.mU.fC.fU.A.G.mA.A.mA.G.G.fU.G.mC*A*A*A*mC*A*U(SEQ ID NO:2)。

11. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述核酸分子是针对CTGF的siRNA。

12. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述核酸分子是针对CTGF的反义寡核苷酸(ASO)。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述治疗有效量为每厘米伤口0.5mg至20mg。

14. 根据权利要求1至3或5至13中任一项所述的方法,其中所述核酸分子在配制成用于向皮肤递送的组合物中。

15. 根据权利要求1至3或5至13中任一项所述的方法,其中所述核酸分子在配制成用于表面递送的组合物中。

16. 根据权利要求1至3或5至13中任一项所述的方法,其中所述核酸分子在配制成用于皮内注射的组合物中。

17. 根据权利要求1至2或4至13中任一项所述的方法,其中所述核酸分子在配制成用于向眼递送的组合物中。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述核酸分子在配制成用于表面递送的组合物中。

19. 根据权利要求17所述的方法,其中所述核酸分子在配制成用于玻璃体内注射或视网膜下注射的组合物中。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其还包括至少第二核酸分子,其中所述第二核酸分子与所述核酸分子针对不同基因。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述核酸分子由核苷酸构成,并且

至少30%的核苷酸是经化学修饰的。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述核酸分子具有至少一个经修饰骨架连接,并且至少2个骨架连接包含硫代磷酸酯连接。

23. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述核酸分子由核苷酸构成,并且至少一个核苷酸包含选自OMe、2'MOE(甲氧基)和2'氟代的2'化学修饰。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的方法,其还包括在受伤后24小时以后施用至少第二剂量的所述核酸分子。

25. 根据权利要求1至23中任一项所述的方法,其还包括在受伤后24小时以后再施用至少两个剂量的所述核酸分子。

26. 根据权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述伤口包括皮肤移植。

27. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法,其中将所述核酸分子施用到移植物供者部位。

28. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法,其中将所述核酸分子施用到移植物接受者部位。

29. 一种减少伤口愈合期间的瘢痕形成的方法,其包括向人对象施用治疗有效量的用于减少瘢痕形成的核酸分子,其中所述核酸分子在受伤后7天至30天之间施用。

30. 根据权利要求29所述的方法,其还包括1至5个额外剂量。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中每周施用所述额外剂量。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中每两周施用所述额外剂量。

33. 根据权利要求30所述的方法,其中每月施用所述额外剂量。

34. 根据权利要求30所述的方法,其中以每周、每两周和/或每月的任意组合施用所述额外剂量。

35. 根据权利要求1至12或14至34中任一项所述的方法,其中所述治疗有效量为每厘米伤口0.1mg至20mg。

36. 根据权利要求29至35中任一项所述的方法,其中所述核酸分子针对编码选自以下蛋白质的基因:转化生长因子 β (TGF β 1, TGF β 2)、骨桥蛋白、结缔组织生长因子(CTGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、低氧诱导因子-1 α (HIF1 α)、胶原蛋白I和/或III、脯氨酰4-羟化酶(P4H)、前胶原C-蛋白酶(PCP)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、整联蛋白、间隙连接蛋白、组胺H1受体、组织型转谷氨酰胺酶、哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)、HoxB13、VEGF、IL-6、SMAD蛋白、核糖体蛋白S6激酶(RSP6)和环加氧酶-2(COX-2)。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述核酸分子针对CTGF。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述核酸分子是RXI-109,其包含有义链序列G.mC.A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU.A*mG*mA.TEG-Ch1(SEQ ID NO:1)和反义链序列P.mU.fC.fU.A.G.mA.A.mA.G.G.fU.G.mC*A*A*A*mC*A*U(SEO ID NO:2)。

39. 一种减少瘢痕疙瘩切除后的瘢痕形成的方法,其包括向人对象施用治疗有效量的用于减少瘢痕形成的核酸分子,其中所述核酸分子在切除前72小时至切除后24小时之间施用。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述核酸是经化学修饰的寡核苷酸。

41. 根据权利要求39或40所述的方法,其中所述核酸分子针对编码选自以下的蛋白质

的基因:转化生长因子 β (TGF β 1,TGF β 2)、骨桥蛋白、结缔组织生长因子(CTGF)、血小板衍生长因子(PDGF)、低氧诱导因子-1 α (HIF1 α)、胶原蛋白I和/或III、脯氨酰4-羟化酶(P4H)、前胶原C-蛋白酶(PCP)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、整联蛋白、间隙连接蛋白、组胺H1受体、组织型转谷氨酰胺酶、哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)、HoxB13、VEGF、IL-6、SMAD蛋白、核糖体蛋白S6激酶(RSP6)和环加氧酶-2(COX-2)。

42.根据权利要求39至41中任一项所述的方法,其中所述核酸分子针对CTGF。

43.根据权利要求39至42中任一项所述的方法,其中所述核酸分子是单链核酸分子。

44.根据权利要求39至42中任一项所述的方法,其中所述核酸分子是双链核酸分子。

45.根据权利要求39至44中任一项所述的方法,其中所述核酸分子通过RNAi作用机制工作。

46.根据权利要求39至45中任一项所述的方法,其中所述核酸分子是RXI-109,其包含有义链序列:G.mC.A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU.A*mG*mA.TEG-Ch1(SEQ ID NO:1)和反义链序列:P.mU.fC.fU.A.G.mA.A.mA.G.G.fU.G.mC*A*A*A*mC*A*U(SEQ ID NO:2)。

47.根据权利要求39至42中任一项所述的方法,其中所述核酸分子是针对CTGF的siRNA。

48.根据权利要求39至42中任一项所述的方法,其中所述核酸分子是针对CTGF的反义寡核苷酸(ASO)。

49.根据权利要求39至48中任一项所述的方法,其中所述治疗有效量为每厘米瘢痕0.1至20mg。

50.根据权利要求39至49中任一项所述的方法,其中所述核酸分子在配制成用于向皮肤递送的组合物中。

51.根据权利要求39至49中任一项所述的方法,其中所述核酸分子在配制成用于表面递送的组合物中。

52.根据权利要求39至49中任一项所述的方法,其中所述核酸分子在配制成用于皮内注射的组合物中。

53.根据权利要求39至52中任一项所述的方法,其还包括至少第二核酸分子,其中所述第二核酸分子与所述核酸分子针对不同基因。

54.根据权利要求39至53中任一项所述的方法,其中所述核酸分子由核苷酸构成,并且至少30%的核苷酸是经化学修饰的。

55.根据权利要求39至54中任一项所述的方法,其中所述核酸分子具有至少一个经修饰骨架连接,并且至少2个骨架连接包含硫代磷酸酯连接。

56.根据权利要求39至55中任一项所述的方法,其中所述核酸分子由核苷酸构成,并且至少一个核苷酸包含选自OMe、2'MOE(甲氧基)和2'氟代的2'化学修饰。

57.根据权利要求39至56中任一项所述的方法,其还包括在第一剂量后施用至少一个额外剂量。

58.根据权利要求56所述的方法,其还包括施用多个额外剂量。

59.根据权利要求57或58所述的方法,其中在所述第一剂量后每隔一天施用所述额外剂量。

60.根据权利要求57或58所述的方法,其中在所述第一剂量后每周两次施用所述额外

剂量。

61. 根据权利要求57或58所述的方法,其中在所述第一剂量后每周施用所述额外剂量。

62. 根据权利要求57或58所述的方法,其中在所述第一剂量后每两周施用所述额外剂量。

63. 根据权利要求57或58所述的方法,其中在所述第一剂量后每三周施用所述额外剂量。

64. 根据权利要求57或58所述的方法,其中在所述第一剂量后每月施用所述额外剂量。

65. 根据权利要求57或58所述的方法,其中以每天、每周两次、每周、每两周、每三周和/或每月的任意组合施用所述额外剂量。

66. 根据权利要求57或58所述的方法,其中施用加强剂量。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中每月或每两个月施用所述加强剂量。

利用经化学修饰的寡核苷酸处理伤口愈合的方法

[0001] 相关领域

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119(e)要求2013年12月4日提交的题为“METHODS FOR EARLY TREATMENT OF WOUND HEALING UTILIZING CHEMICALLY MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES”的美国临时申请序列No.US 61/911,991,2013年12月4日提交的题为“METHODS FOR ACCELERATING WOUND HEALING UTILIZING CHEMICALLY MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES”的美国临时申请序列No.61/911,993,以及2014年9月11日提交的题为“METHODS FOR TREATMENT OF WOUND HEALING UTILIZING CHEMICALLY MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES”美国临时申请序列No.62/049,299的权益,其各自的全部内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及减少伤口愈合期间的纤维化。本发明更具体地涉及具有改进的体内递送特性的核酸分子及其用于减少皮肤瘢痕形成的用途。

背景技术

[0004] 互补性寡核苷酸序列是有前景的治疗剂以及阐明基因功能的有用研究工具。然而,现有技术的寡核苷酸分子具有可能阻碍其临床开发的多个问题,并且在体内使用这样的组合物时,经常难以取得预期的对基因表达(包括蛋白质合成)的有效抑制。

[0005] 一个主要问题是将这些化合物递送至细胞和组织。常规19-29个碱基长的双链RNAi化合物形成约1.5乘10-15nm大小的高度带负电荷的刚性螺旋。这种棒状分子无法通过细胞膜,导致体外和体内二者情况下具有非常有限的效力。因此,所有常规RNAi化合物需要一些类型的递送载剂以促进其组织分布和细胞摄取。这被认为是RNAi技术的主要限制。

[0006] 之前已经尝试对寡核苷酸进行化学修饰以改善其细胞摄取特性。一种这样的修饰是将胆固醇分子连接到寡核苷酸。Letsinger等在1989年首次报道了这种方法。随后,ISIS Pharmaceuticals, Inc.(Carlsbad, CA)报道了将胆固醇分子连接到寡核苷酸的更加先进的技术(Manoharan, 1992)。

[0007] 随着九十年代末siRNA的发现,在这些分子上尝试了类似方式的修饰以增强其递送特性。文献中出现了将胆固醇分子缀合到稍微修饰的(Soutschek, 2004)和大量修饰的(Wolfrum, 200)siRNA上。Yamada等, 2008也报道了改进的接头化学物质的使用,其进一步改善了胆固醇介导的siRNA摄取。尽管有这些努力,但是在生物流体的存在下,这些类型化合物的摄取似乎受到抑制,导致体内基因沉默中非常有限的效力,限制了这些化合物在临床环境中的适用性。

发明内容

[0008] 本发明的一些方面提供了用于预防性处理伤口以减少瘢痕形成的核酸分子。在本文中,证明了预防性给予的特定核酸分子RXI-109(靶向结缔组织生长因子(CTGF))减少了

伤口愈合期间的瘢痕形成。

[0009] 本发明的每种限制都可以涵盖本发明的多个实施方案。因此,预期涉及任何一个元素或元素的组合的本发明的每种限制都包含在本发明的各个方面中。本发明的应用不限于在下文的说明书中给出的或在附图中示出的组件之布置和构造的细节。本发明可以是其他实施方案并且以多种方式实践或实施。

[0010] 本发明的一些方面包括减少伤口愈合期间的瘢痕形成的方法,其包括向人对象施用治疗有效量的用于减少瘢痕形成的核酸分子,其中所述核酸分子在受伤前72小时至受伤后24小时之间施用。

[0011] 在一些实施方案中,核酸是经化学修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,瘢痕形成是皮肤瘢痕形成。在另一些实施方案中,瘢痕形成是眼瘢痕形成。

[0012] 在一些实施方案中,所述核酸分子针对编码选自以下的蛋白质的基因:转化生长因子 β (TGF β 1,TGF β 2)、骨桥蛋白、结缔组织生长因子(CTGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、低氧诱导因子-1 α (Hypoxia inducible factor-1 α ,HIF1 α)、胶原蛋白I和/或III、脯氨酰4-羟化酶(P4H)、前胶原C-蛋白酶(PCP)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、整联蛋白(Integrin)、间隙连接蛋白(Connexin)、组胺H1受体、组织型转谷氨酰胺酶、哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)、HoxB13、VEGF、IL-6、SMAD蛋白、核糖体蛋白S6激酶(RSP6)和环加氧酶-2(COX-2)。

[0013] 在某些实施方案中,核酸分子针对CTGF。

[0014] 在一些实施方案中,核酸分子是单链核酸分子。在另一些实施方案中,核酸分子是双链核酸分子。在某些实施方案中,核酸分子通过RNAi作用机制工作。

[0015] 在一些实施方案中,核酸分子是RXI-109,其包含有义链序列:G.mC.A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU.A*mG*mA.TEG-Ch1(SEQ ID NO:1)和反义链序列:P.mU.fC.fU.A.G.mA.A.mA.G.G.fU.G.mC*A*A*A*mC*A*U(SEQ ID NO:2)。

[0016] 在一些实施方案中,核酸分子是针对CTGF的siRNA。在某些实施方案中,核酸分子是针对CTGF的反义寡核苷酸(ASO)。

[0017] 在一些实施方案中,治疗有效量为每厘米伤口0.5mg至20mg。

[0018] 在一些实施方案中,核酸分子在配制用于向皮肤递送的组合物中。在某些实施方案中,核酸分子在配制用于表面递送的组合物中。在一些实施方案中,核酸分子在配制用于皮内注射的组合物中。在一些实施方案中,核酸分子在配制用于向眼递送的组合物中。在一些实施方案中,核酸分子在配制用于向眼表面递送的组合物中。在某些实施方案中,核酸分子在配制用于玻璃体内注射或视网膜下注射的组合物中。

[0019] 在一些实施方案中,方法还包括至少第二核酸分子,其中所述第二核酸分子与所述核酸分子针对不同基因。

[0020] 在一些实施方案中,核酸分子由核苷酸构成,并且至少30%的核苷酸是化学修饰的。

[0021] 在一些实施方案中,核酸分子具有至少一个经修饰骨架连接(linkage),并且至少2个骨架连接包含硫代磷酸酯连接。

[0022] 在一些实施方案中,核酸分子由核苷酸构成,并且至少一个核苷酸包含选自OMe、2'MOE(甲氧基)和2'氟代的2'化学修饰。

[0023] 在一些实施方案中,方法还包括在受伤后24小时以后施用至少第二剂量的所述核酸分子。在一些实施方案中,方法还包括在受伤后24小时以后再施用至少两个剂量的所述核酸分子。在一些实施方案中,伤口包括皮肤移植。

[0024] 在一些实施方案中,将所述核酸分子施用到移植物供者部位。在一些实施方案中,将所述核酸分子施用到移植物接受者部位。

[0025] 本发明的一些方法涉及减少伤口愈合期间的瘢痕形成的方法,其包括向人对象施用治疗有效量的用于减少瘢痕形成的核酸分子,其中所述核酸分子在受伤后7至30天之间施用。

[0026] 在一些实施方案中,方法还包括1至5个额外剂量。在一些实施方案中,每周施用额外剂量。在一些实施方案中,每两周施用额外剂量。在一些实施方案中,每月施用额外剂量。在一些实施方案中,以每周、每两周和/或每月的任意组合施用额外剂量。在一些实施方案中,治疗有效量为每厘米伤口0.1mg至20mg。

[0027] 在一些实施方案中,核酸分子针对编码选自以下的蛋白质的基因:转化生长因子 β (TGF β 1,TGF β 2)、骨桥蛋白、结缔组织生长因子(CTGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、低氧诱导因子-1 α (HIF1 α)、胶原蛋白I和/或III、脯氨酰4-羟化酶(P4H)、前胶原C-蛋白酶(PCP)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、整联蛋白、间隙连接蛋白、组胺H1受体、组织型转谷氨酰胺酶、哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)、HoxB13、VEGF、IL-6、SMAD蛋白、核糖体蛋白S6激酶(RSP6)和环加氧酶-2(COX-2)。

[0028] 在一些实施方案中,核酸分子针对CTGF。在一些实施方案中,核酸分子是RXI-109,其包含有义链序列G.mC.A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU.A*mG*mA.TEG-Ch1(SEQ ID NO:1)和反义链序列P.mU.fC.fU.A.G.mA.A.mA.G.G.fU.G.mC*A*A*A*mC*A*U(SEQ ID NO:2)。

[0029] 本发明的另一些方面涉及在瘢痕疙瘩切除后减少瘢痕形成的方法,其包括向人对象施用治疗有效量的用于减少瘢痕形成的核酸分子,其中所述核酸分子在切除前72小时至切除后24小时之间施用。

[0030] 在一些实施方案中,所述核酸是经化学修饰的寡核苷酸。在一些实施方案中,所述核酸分子针对编码选自以下的蛋白质的基因:转化生长因子 β (TGF β 1,TGF β 2)、骨桥蛋白、结缔组织生长因子(CTGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、低氧诱导因子-1 α (HIF1 α)、胶原蛋白I和/或III、脯氨酰4-羟化酶(P4H)、前胶原C-蛋白酶(PCP)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、整联蛋白、间隙连接蛋白、组胺H1受体、组织型转谷氨酰胺酶、哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)、HoxB13、VEGF、IL-6、SMAD蛋白、核糖体蛋白S6激酶(RSP6)和环加氧酶-2(COX-2)。

[0031] 在一些实施方案中,核酸分子针对CTGF。在一些实施方案中,核酸分子是单链核酸分子。在一些实施方案中,核酸分子是双链核酸分子。在某些实施方案中,核酸分子通过RNAi作用机制工作。

[0032] 在一些实施方案中,核酸分子是RXI-109,其包含有义链序列:G.mC.A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU.A*mG*mA.TEG-Ch1(SEQ ID NO:1)和反义链序列:P.mU.fC.fU.A.G.mA.A.mA.G.G.fU.G.mC*A*A*A*mC*A*U(SEQ ID NO:2)。

[0033] 在一些实施方案中,核酸分子是针对CTGF的siRNA。在一些实施方案中,核酸分子是针对CTGF的反义寡核苷酸(ASO)。在一些实施方案中,治疗有效量为每厘米瘢痕0.1mg至

20mg。

[0034] 在一些实施方案中,核酸分子在配制成用于向皮肤递送的组合物中。在一些实施方案中,核酸分子在配制成用于表面递送的组合物中。在一些实施方案中,核酸分子在配制成用于皮内注射的组合物中。

[0035] 在一些实施方案中,方法还包括施用至少第二核酸分子,其中所述第二核酸分子与所述核酸分子针对不同基因。在一些实施方案中,核酸分子由核苷酸组成,并且至少30%的核苷酸是经化学修饰的。在一些实施方案中,核酸分子具有至少一个经修饰骨架连接,并且至少2个骨架连接包含硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,核酸分子由核苷酸构成,并且至少一个核苷酸包含选自OMe、2'MOE(甲氧基)和2'氟代的2'化学修饰。

[0036] 在一些实施方案中,方法还包括在第一剂量后施用至少一个额外剂量。在一些实施方案中,递送多个额外剂量。在一些实施方案中,在第一剂量后每隔一天施用额外剂量。在一些实施方案中,在第一剂量后每周两次施用额外剂量。在一些实施方案中,在第一剂量后每周施用额外剂量。在一些实施方案中,在第一剂量后每两周施用额外剂量。在一些实施方案中,在第一剂量后每三周施用额外剂量。在一些实施方案中,在第一剂量后每月施用额外剂量。在一些实施方案中,以每天、每周两次、每周、每两周、每三周和/或每月的任意组合施用额外剂量。在一些实施方案中,施用加强剂量。在一些实施方案中,每月或每两个月施用加强剂量。

[0037] 在一些方面,本发明是用于加速受伤后的伤口愈合速率的方法,其通过向人对象施用治疗有效量的针对编码结缔组织生长因子(CTGF)的基因的siRNA,以加速受伤后的伤口愈合速率。

[0038] 在另一些方面,本发明是用于加速受伤后的伤口愈合速率的方法,其通过向人对象施用治疗有效量的针对编码结缔组织生长因子(CTGF)的基因的核酸分子,以加速受伤后的伤口愈合速率,其中所述核酸分子在受伤前72小时至受伤后48小时之间施用。

[0039] 在另一些方面,本发明是用于加速受伤后的伤口愈合速率的方法,其通过向对象施用治疗有效量的针对编码结缔组织生长因子(CTGF)的基因的核酸分子,以加速受伤后的伤口愈合速率,其中所述核酸分子在受伤前和受伤后施用。

[0040] 另一些方面提供了用于加速受伤后的伤口愈合速率的方法。所述方法包括向人对象施用治疗有效量的核酸分子,用于加速受伤后的伤口愈合速率,其中所述核酸分子在受伤前72小时至受伤后48小时之间施用。

[0041] 在一些实施方案中,核酸是经化学修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,瘢痕形成是皮肤瘢痕形成。在另一些实施方案中,瘢痕形成是眼瘢痕形成。

[0042] 在一些实施方案中,所述核酸分子针对编码选自以下的蛋白质的基因:转化生长因子 β (TGF β 1,TGF β 2)、骨桥蛋白、结缔组织生长因子(CTGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、低氧诱导因子-1 α (HIF1 α)、胶原蛋白I和/或III、脯氨酰4-羟化酶(P4H)、前胶原C-蛋白酶(PCP)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、基质金属蛋白酶9(MMP9)、整联蛋白、间隙连接蛋白、组胺H1受体、组织型转谷氨酰胺酶、哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)、HoxB13、VEGF、IL-6、SMAD蛋白、核糖体蛋白S6激酶(RSP6)和环加氧酶-2(COX-2)。

[0043] 在某些实施方案中,核酸分子针对CTGF。

[0044] 在一些实施方案中,核酸分子是单链核酸分子。在另一些实施方案中,核酸分子是

双链核酸分子。在某些实施方案中,核酸分子通过RNAi作用机制工作。

[0045] 在一些实施方案中,核酸分子是RXI-109,其包含有义链序列:G.mC.A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU.A*mG*mA.TEG-Ch1和反义链序列:P.mU.fC.fU.A.G.mA.A.mA.G.G.fU.G.mC*A*A*A*mC*A*U。在一些实施方案中,核酸分子是针对CTGF的siRNA。在某些实施方案中,核酸分子是针对CTGF的反义寡核苷酸(ASO)。

[0046] 在一些实施方案中,治疗有效量为每厘米伤口0.5mg至20mg。

[0047] 在一些实施方案中,核酸分子在配制成为用于向皮肤递送的组合物中。在某些实施方案中,核酸分子在配制成为用于表面递送的组合物中。在一些实施方案中,核酸分子在配制成为用于皮内注射的组合物中。在一些实施方案中,核酸分子在配制成为用于向眼递送的组合物中。在一些实施方案中,核酸分子在配制成为用于向眼表面递送的组合物中。在某些实施方案中,核酸分子在配制成为用于玻璃体内注射或视网膜下注射的组合物中。

[0048] 在一些实施方案中,方法还包括施用至少第二核酸分子,其中所述第二核酸分子与所述核酸分子针对不同基因。

[0049] 在另一些实施方案中,核酸分子由核苷酸构成,并且至少30%的核苷酸是经化学修饰的。在某些实施方案中,核酸分子具有至少一个经修饰骨架连接,并且至少2个骨架连接包含硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,核酸分子由核苷酸构成,并且至少一个核苷酸包含选自OMe、2'MOE(甲氧基)和2'氟代的2'化学修饰。

[0050] 在某些实施方案中,方法还包括在受伤后48小时以后施用至少第二剂量的所述核酸分子。在一些实施方案中,方法包括在受伤后48小时以后再施用至少两个剂量的所述核酸分子。在一些实施方案中,伤口包括皮肤移植。

[0051] 在一些实施方案中,将所述核酸分子施用到移植物供者部位。在一些实施方案中,将所述核酸分子施用到移植物接受者部位。

[0052] 附图简述

[0053] 附图并未旨在按比例绘制。在附图中,各图中描绘的每个相同或几乎相同的组件由相同的数字表示。为了清楚起见,并非每个图中都标示出每个组件。在附图中:

[0054] 图1示出了利用RXI-109的体内和体外研究。图1A证明了RXI-109的体外效力。图1B证明两次皮内注射RXI-109后体内(大鼠皮肤)的CTGF沉默。

[0055] 图2证明在啮齿类动物模型中CTGF沉默不延迟并且可以促进早期伤口愈合。图2A描绘了大伤口愈合研究的概要,其包括在大鼠中预防性给药。图2B证明了三次皮内注射RXI-109后体内(大鼠皮肤)的CTGF沉默。图2C证明了在大鼠皮肤中施用RXI-109不延迟早期伤口闭合,如通过测量伤口确定的。图2D证明了在大鼠皮肤中施用RXI-109并不延迟早期伤口闭合,如通过百分比再上皮化(re-epithalization)的组织学测量确定的。

[0056] 图3描绘了RXI-109I期临床试验的概况。

[0057] 图4描绘了1期临床试验RXI-109-1201的切口(incision)布局的概况。根据每位对象的预定随机模式,对象接受RXI-109或安慰剂的单次皮内注射。一半的部位用RXI-109处理,一半用安慰剂处理。

[0058] 图5描绘了切口后84天来自RXI-109-1201之伤口面积的初步盲组织学数据。在组织学数据上描绘了切口部位的图像。在受伤后84天从对象采集正常皮肤样品和经处理皮肤样品的活检样品(biopsy)用于组织学评估。确定每份样品的伤口(wound)面积和CTGF水平。

[0059] 图6描绘了在切口后84天,来自较低切口部位()(每个部位三个切片)的伤口面积总和的初步盲组织学数据。在受伤后84天从对象采集正常皮肤样品和经处理皮肤样品的活检样品用于组织学评估。确定每份样品的伤口面积和CTGF水平。

[0060] 图7描绘了切口后84天,来自CTGF染色和 α -SMA染色的RXI-109-1201之伤口区域的初步盲组织学数据(20 $\times$ 放大率)。在受伤后84天从对象采集正常皮肤样品和经处理皮肤样品的活检样品用于组织学评估。确定每份样品的伤口面积和CTGF水平。

[0061] 图8描绘了1期临床试验RXI-109-1201的切口布局的概况。根据每位对象的预定随机模式,对象在两周中接受RXI-109或安慰剂的三次皮内注射。一半部位用RXI-109处理,一半用安慰剂处理。

[0062] 图9描绘了来自1期试验RXI-109-1202的切口后18天(第三和最后剂量后3天)对象切口部位的图像。示出的数据是盲的,代码未解开。

[0063] 图10描绘了来自1期试验RXI-109-1202的每个切口部位的切口后18天(第三次和最后的剂量后3天)对象切口部位的图像以及相应的相关CTGF mRNA水平。示出的数据是盲的,代码未解开。在受伤后18天从对象采集正常皮肤样品和经处理皮肤样品的活检样品用于评估CTGFmRNA水平。使用qPCR(taqman Probes ABI)确定CTGF和管家mRNA水平。

[0064] 图11描绘了RXI-109 2期临床试验:研究RXI-109-1301的概况。研究RXI-109-1301由以下组成:多中心、前瞻性、随机化、双盲、对象内对照的2a期研究以评估RXI-109对健康成人中由于之前手术导致的下腹部横向肥厚性瘢痕上的瘢痕修复手术之结果的效力和安全性。评估多种参数,包括相对于载剂的安全性和副作用,以及相对于载剂的摄影比较。

[0065] 图12描绘了2期临床试验RXI-109-1301的修复的瘢痕段布局的概况。根据每位对象的预定随机模式(保持修复的瘢痕段的中段不被处理),对象在2周内接受RXI-109或安慰剂的三次皮内注射。修复的瘢痕段的一部分(R或L)用RXI-109处理,而另一部分(R或L)用安慰剂处理。

[0066] 图13描绘了由盲评价者对摄影进行的1个月的期中分析(interim analysis)。要求评估者(a)选择是一侧(左或右)看起来更好,还是没有差异,(b)提供从0(细线瘢痕)至10(可能的最差瘢痕)的VAS评分。

[0067] 图14描绘了由盲评价者对摄影进行的1个月的中期分析。

[0068] 图15描绘了组1对象的手术前和修复后1个月的瘢痕段的摄影。

[0069] 图16描绘了组2对象的手术前和修复后1个月的瘢痕段的摄影。

[0070] 发明详述

[0071] 本发明的一些方面涉及参与基因沉默的方法和组合物。本发明至少部分地基于以下意外发现:向皮肤施用sd-rxRNA分子,例如通过皮内注射或皮下施用,导致皮肤中基因表达的有效沉默。本发明的另一些方面至少部分地基于以下意外发现:可以通过在受伤前72小时至受伤后24小时之间向对象施用治疗有效量的核酸分子来减少对象中的瘢痕形成。sd-rxRNA表示在处理受损皮肤中具有显著潜力的一类新的治疗性RNAi分子。

[0072] 本文使用的“核酸分子”包括但不限于:sd-rxRNA、rxRNAori、寡核苷酸、ASO、siRNA、shRNA、miRNA、ncRNA、cp-lasiRNA、aiRNA、BMT-101、RXI-109、EXC-001、单链核酸分子、双链核酸分子、RNA和DNA。在一些实施方案中,核酸分子是经化学修饰核酸分子,例如经化学修饰的寡核苷酸。

[0073] 本文使用的“伤口”包括但不限于损伤、创伤、手术、受损皮肤和烧伤。

[0074] sd-rxRNA分子

[0075] 本发明的一些方面涉及sd-rxRNA分子。如本文使用的,“sd-rxRNA”或“sd-rxRNA分子”是指自递送RNA分子,例如通过引用并入的以下文献中描述的那些:2009年9月22日提交的题为“REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS”的PCT公开No.WO2010/033247(申请No.PCT/US2009/005247),2014年8月5日授权的题为“Reduced Size Self-Delivering RNAi Compounds”的美国专利No.8,796,443,2009年9月22日提交的题为“RNA INTERFERENCE IN SKIN INDICATIONS”的PCT申请PCT/US2009/005246,以及2014年3月4日授权的题为“RNA Interference in Skin Indications”的美国专利No.8,644,189。简单地说,sd-rxRNA(也称为sd-rxRNA^{nano})是分离的不对称双链核酸分子,其包含最小长度为16个核苷酸的引导链(guide strand)和长度为8-18个核苷酸的随从链(passenger strand),其中所述双链核酸分子具有双链区和单链区,单链区长度为4-12个核苷酸,并且具有至少三个核苷酸骨架修饰。在一些优选实施方案中,双链核酸分子具有一个平端,或者包含一个或两个核苷酸突出端。可以通过化学修饰,并且在一些情况下,通过连接疏水缀合物对sd-rxRNA分子进行优化。

[0076] 在一些实施方案中,sd-rxRNA包含分离的双链核酸分子,所述双链核酸分子包含引导链和随从链,其中分子双链区的长度为8-15个核苷酸,其中引导链包含长度为4-12个核苷酸的单链区,其中引导链的单链区包含3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个硫代磷酸酯修饰,并且其中双链核酸的至少40%核苷酸是经修饰的。

[0077] 本发明的多核苷酸在本文是指本发明的分离的双链或双链体核酸、寡核苷酸或多核苷酸、纳米分子、纳米RNA、sd-rxRNA^{nano}、sd-rxRNA或RNA分子。

[0078] 与常规siRNA相比,sd-rxRNA有效得多地被细胞摄取。这些分子在沉默靶基因表达方面非常有效,并且相对于之前描述的RNAi分子提供了显著的优点,包括在血清存在下的高活性、有效的自递送、与多种接头的相容性、以及与毒性有关的化学修饰的存在降低或完全不存在。

[0079] 与单链多核苷酸相比,双链体多核苷酸传统上难以递送到细胞,因为其具有刚性结构和大量负电荷,这使得膜转移变得困难。但是,sd-rxRNA虽然是部分双链的,但是被认为在体内是单链的,因此能够有效递送穿过细胞膜。结果,本发明的多核苷酸在许多情况下能够自递送。因此,本发明的多核苷酸可以以类似于常规RNAi剂的方式配制,或者其可以单独递送到细胞或对象(或者与非递送类型的载体一起)并且允许自递送。在本发明的一个实施方案中,提供了自递送不对称双链RNA分子,其中分子的一部分与常规RNA双链体类似,分子的第二部分是单链。

[0080] 在一些方面,本发明的寡核苷酸具有不对称结构的组合,包括5个核苷酸或更长的双链区和单链区,特定的化学修饰模式,并且与亲脂性或疏水性分子缀合。这一类RNAi样化合物具有优秀的体外和体内效力。认为刚性双链体区尺寸的减小与应用于单链区的硫代磷酸酯修饰的组合导致了所观察到的优秀效力。

[0081] 本发明至少部分地基于以下意外发现:通过多种方法,包括皮内注射和皮下施用,sd-rxRNA分子在体内有效地递送到了皮肤。另外,sd-rxRNA分子有效介导其靶向的皮肤区域中的基因沉默。

[0082] 以下文献中表明了向皮肤有效施用sd-rxRNA并且使基因表达沉默的方法:2014年3月4日授权的题为“RNA INTERFERENCE IN SKIN INDICATIONS”的美国专利No.8,664,189, 2013年4月4日提交的题为“RNA INTERFERENCE IN DERMAL AND FIBROTIC INDICATIONS”美国专利申请No.US2014/0113950, 2009年9月22日提交的题为“RNA INTERFERENCE IN SKIN INDICATIONS”的PCT公开No.WO 2010/033246, 以及2011年3月24日提交的题为“RNAINTERFERENCE IN DERMAL AND FIBROTIC INDICATIONS”的PCT公开No.WO2011/119887。每一个上述专利和公开均通过引用整体并入本文。

[0083] 例如,美国专利公开No.US2014/0113950中的图42证明在两次皮内注射RXI-109(靶向CTGF的sd-rxRNA)之后体内(大鼠皮肤)皮内注射RXI-109后的CTGF沉默。示出的数据来自使用大鼠皮肤中切割伤口模型的研究。在两次皮内注射RXI-109后,相对于非靶向对照,CTGF的沉默持续至少5天。CTGF mRNA的降低是剂量依赖性的,与剂量匹配的非靶向对照相比,300 μ g和600 μ g分别降低51%和67%。方法:在第1天和第3天,通过皮内注射向大鼠背部四个部位中的每一个施用RXI-109或非靶向对照(NTC)(每200 μ L注射剂中300或600 μ g)。第二次剂量(第3天)后约30分钟,在每个注射部位制造4mm切割伤口。在第8天收获包含伤口部位和周围组织的最终活检样品(terminal biopsy sample)。分离RNA并且通过qPCR进行基因表达分析。将数据相对于TATA框结合蛋白(TBP)管家基因的水平归一化,并且相对于设为1.0的PBS载剂对照作图。误差线表示单个活检样品之间的标准差。RXI-109处理组相对于剂量匹配的非靶向对照组的P值为600 μ g时** $p < 0.001$, 300 μ g时* $p < 0.01$ 。

[0084] 应理解的是,本文公开的sd-rxRNA分子可以以与美国专利公开No.US2014/0113950中公开的sd-rxRN分子相同的方式施用到皮肤,所述专利通过引用整体并入。

[0085] 本发明的一些方面涉及使用基于细胞的筛选来鉴定潜在的sd-rxRNA分子,例如靶向包括SPPI、CTFG、PTGS2、TGFB1和TGFB2之基因子集的潜在的sd-rxRNA分子。在一些实施方案中,选择靶基因并且应用算法来识别所述基因中的最佳靶序列。例如,可以选择一个基因的许多序列。在一些情况下,对于第一轮测试,鉴定的序列作为RNAi化合物产生。例如,对于第一轮筛选,基于最佳预测序列的RNAi化合物最初可以作为rxRNAori(“ori”)序列产生。在鉴定了潜在的RNAi化合物后,其可以作为sd-rxRNA分子产生。

[0086] 根据本发明配制的dsRNA还包括rxRNAori。rxRNAori是指描述在通过引用并入本文的以下专利描述的一类RNA分子:2009年2月11日提交的题为“MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF”的PCT公开No.WO2009/102427(申请No.PCT/US2009/000852),以及2011年2月17日提交的题为“Modified RNAi Polynucleotides and Uses Thereof”的美国专利公开No.US 2011-0039914。

[0087] 在一些实施方案中,rxRNAori分子包含用于抑制靶基因表达的长度为12-35个核苷酸的双链RNA(dsRNA)构建体,其包含:具有5'端和3'端的有义链,其中所述有义链被2'-修饰的核糖高度修饰,其中有义链中央部分的3-6个核苷酸未被2'-修饰的核糖修饰,以及具有5'端和3'端的反义链,所述反义链与所述有义链以及靶基因的mRNA杂交,其中所述dsRNA以序列依赖性方式抑制靶基因的表达。

[0088] rxRNAori可以包含本文中描述的任何修饰。在一些实施方案中,rxRNAori中至少30%的核苷酸是经修饰的。例如,rxRNAori中至少30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、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%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的核苷酸是经修饰的。在一些实施方案中，sd-RNAori中的100%的核苷酸是经修饰的。在一些实施方案中，仅rxRNAori的随从链包含修饰。

[0089] 在一些实施方案中，本发明的RNAi化合物包含不对称化合物，所述不对称化合物包含双链体区域(有效RISC进入所需的8-15个碱基长度)和长度为4-12个核苷酸的单链区；具有13或14个核苷酸的双链体。在一些实施方案中，6或7个核苷酸的单链区是优选的。新RNAi化合物的单链区还包含2-12个硫代磷酸酯核苷酸间连接(称为硫代磷酸酯修饰)。在一些实施方案中，6-8个硫代磷酸酯核苷酸间连接是优选的。另外，本发明的RNAi化合物还包含独特的化学修饰模式，其提供稳定性并且与RISC进入相容。这些元件的组合导致对于体外和体内递送RNAi试剂非常有用的意料之外的特性。

[0090] 提供稳定性并且与RISC进入相容的化学修饰模式包含对有义或随从链以及反义或引导链的修饰。例如，随从链可以被任何赋予稳定性并且不干扰活性的化学实体修饰。这样的修饰包括2'核糖修饰(0-甲基、2'F、2脱氧等)和骨架修饰，例如硫代磷酸酯修饰。随从链中优选的化学修饰模式包括随从链内C和U核苷酸的0甲基修饰，或者替代地随从链可以完全是0甲基修饰的。

[0091] 引导链例如也可以被任何赋予稳定性并且不干扰RISC进入的化学修饰所修饰。引导链中优选的化学修饰模式包括，大部分C和U核苷酸是2'F修饰的，并且5'端被磷酸化。引导链中的另一种优选的化学修饰模式包括第11-18位中C/U和第1位的2'0甲基修饰以及5'端化学磷酸化。引导链中的另一种优选的化学修饰模式包括第11-18位中C/U和第1位的2'0甲基修饰和5'端化学磷酸化，以及第2-10位中C/U的2'F修饰。在一些实施方案中，引导链和/或随从链包含至少一个5-甲基C或U修饰。

[0092] 在一些实施方案中，sd-rxRNA中至少30%的核苷酸是经修饰的。例如，sd-rxRNA中至少30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、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%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的核苷酸是经修饰的。在一些实施方案中，sd-rxRNA中100%的核苷酸是经修饰的。

[0093] 本发明寡核苷酸的上述化学修饰模式是良好耐受的并且实际上改善了不对称RNAi化合物的效力。

[0094] 当一起用在多核苷酸中时，RNAi的修饰的组合可以导致实现RNAi最佳的被动摄取效力。消除任何所述要素(引导链稳定性、硫代磷酸酯延伸、有义链稳定性和疏水缀合物)或增加尺寸在一些情况下导致次优的效力，在一些情况下导致完全失去效力。元件的组合导致在被动递送到细胞如HeLa细胞后完全活化的化合物的开发。

[0095] 下文给出的实施例中的数据证明了本发明寡核苷酸在体外和体内二者情况下的高效力。

[0096] 在一些情况下，可以通过使用新化学物质类型改善化合物的疏水性来新一步改进

sd-rxRNA。例如,一种化学物质涉及使用疏水碱基修饰。任何位置的任何碱基都可以修饰,只要修饰导致碱基的分配系数增加即可。修饰化学物质的优选位置是嘧啶的4位和5位。这些位置的主要优点是:(a)易于合成,(b)不干扰碱基配对以及RISC复合物装载和靶标识别所必须的A型螺旋的形成。使用其中存在多个脱氧尿嘧啶而不干扰总体化合物效力的sd-rxRNA化合物形式。另外,通过优化疏水物缀合物的结构,可以获得组织分布和细胞摄取中大的改进。在一些优选实施方案中,固醇的结构被修饰以改变(增加/减少)C17连接链。这种类型的修饰导致细胞摄取的显著提高和体内组织摄取特性的显著改善。

[0097] 本发明的一些方面涉及双链核糖核酸分子(dsRNA),例如sd-rxRNA和rxRNAori。与本发明有关的dsRNA可以包含有义链和反义链,其中反义链与以下序列中的至少12个连续核苷酸互补,所述序列选自通过引用并入的来自PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950的表2、5、6、9、11、12、13、14、15、16、17和23中的序列。例如,反义链可以与以下序列中的至少12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个连续核苷酸互补,或者可以与以下序列中的25个核苷酸互补,所述序列选自通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中并入的表2、5、6、9、11、12、13、14、15、16、17和23中的序列。

[0098] 与本发明有关的dsRNA可以包含有义链和反义链,其中有义链和/或反义链包含以下序列的至少12个连续核苷酸,所述序列选自通过引用并入的来自PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950的表1至27中的序列。例如,有义链和/或反义链包含以下序列的至少12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个连续核苷酸,或者可以包含以下序列的25个核苷酸,所述序列选自通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950并入的表1-27中的序列。

[0099] 本发明的一些方面涉及针对CTGF的dsRNA。例如,针对CTGF的dsRNA的反义链可以与以下序列的至少12个连续核苷酸互补,所述序列选自通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950并入的表11、12和15中的序列。针对CTGF的dsRNA的有义链和/或反义链可以包含以下序列的至少12个连续核苷酸,所述序列选自通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950并入的表10、11、12、15、20和24中的序列。

[0100] 在一些实施方案中,有义链包含选自以下之序列的至少12个连续核苷酸:通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950并入的SEQ ID NO: 2463、3429、2443、3445、2459、3493、2465、3475和3469。在某些实施方案中,有义链包含选自以下的序列或由其组成:通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950并入的SEQ ID NO: 2463、3429、2443、3445、2459、3493、2465、3475和3469。

[0101] 在一些实施方案中,反义链包含选自以下的序列的至少12个连续连续核苷酸:通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950并入的SEQ ID NO: 2464、3430、4203、3446、2460、3494、2466、3476和3470。在某些实施方案中,反义链包含选自以下的序列或由其组成:通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950并入的SEQ ID NO: 2464、3430、4203、3446、2460、3494、2466、3476和3470。

[0102] 在一个优选实施方案中,有义链包含(GCACCUUUCUAGA)(SEQ ID NO:3),反义链包含(UCUAGAAAGGUGCAAACAU)(SEQ ID NO:4),其分别通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO 2463和2464并入。根据本文所述的修饰,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4序列可以以多种方式修饰。SEQ ID NO:3的优选修饰模式以(G.mC.A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU.A*mG*mA.TEG-Ch1)(SEQ ID NO:1)描述,其通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO:3429并入。SEQ ID NO:4的优选修饰模式以(P.mU.fC.fU.A.G.mA.A.mA.G.G.fU.G.mC*A*A*A*mC*A*U)(SEQ ID NO:2)描述,其通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO:3430并入。由有义链(G.mC.A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU.A*mG*mA.TEG-Ch1)(SEQ ID NO:1)和反义链(P.mU.fC.fU.A.G.mA.A.mA.G.G.fU.G.mC*A*A*A*mC*A*U)(SEQ ID NO:2)组成的sd-rxRNA也称为RXi-109,如通过引用并入的PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中所述。TEG-Ch1是指具有TEG接头的胆固醇;m指2'OMe;f指2'氟;*指硫代磷酸酯连接;以及.是指磷酸二酯连接;P表示磷酸化。

[0103] 在另一个优选实施方案中,有义链包含(UUGACCUUUCUAA)(SEQ ID NO:5),反义链包含(UUAGAAAGGUGCAAACAAGG)(SEQ ID NO:6),分别通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO 2443和4203并入。根据本文所述的修饰,SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6序列可以以多种方式修饰。SEQ ID NO:5的优选修饰模式以(mU.mU.G.mC.A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU*mA*mA.TEG-Ch1)(SEQ ID NO:7)描述,其通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO:3445并入。SEQ ID NO:6的优选修饰模式以(P.mU.fU.A.G.A.mA.A.G.G.fU.G.fC.mA.mA*mA*fC*mA*mA*mG*G.)(SEQ ID NO:8)描述,其通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO:3446并入。

[0104] 在另一个优选实施方案中,有义链包含(GUGACCAAAAGUA)(SEQ ID NO:9),反义链包含(UACUUUUGGUCACACUCUC)(SEQ ID NO:10),其分别通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO 2459和2460并入。根据本文所述的修饰,SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10序列可以以多种方式修饰。SEQ ID NO:9的优选修饰模式以(G.mU.G.A.mC.mC.A.A.A.A.G*mU*mA.TEG-Ch1)(SEQ ID NO:11)描述,其通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO:3493并入。SEQ ID NO:10的优选修饰模式以(P.mU.A.fC.fU.fU.fU.fU.G.G.fU.mC.A.mC*A*mC*mU*mC*mU*C.)(SEQ ID NO:12)描述,其通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO:3494并入。

[0105] 在另一个优选实施方案中,有义链包含(CCUUUCUAGUUGA)(SEQ ID NO:13),反义链(UCAACUAGAAAGGUGCAAA)(SEQ ID NO:14),其分别通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO:2465和2466并入。根据本文所述的修饰,SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的序列可以以多种方式修饰。SEQ ID NO:13的优选修饰模式以(mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU.A.G.mU.mU*mG*mA.TEG-Ch1)(SEQ ID NO:15)描述,其通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO:3469并入。SEQ ID NO:14的优选修饰模式以(P.mU.fC.A.A.fC.fU.A.G.A.mA.A.G.G*fU*mG*

fC*mA*mA*A.)(SEQ ID NO:16)描述,其通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO:3470并入。

[0106] 在另一个优选实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:1 (G.mC.A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU.A*mG*mA.TEG-Ch1),反义链包含SEQ ID NO:17 (P.mU.fC.fU.A.G.mA.A.mA.G.G.fU.G.fC*mA*mA*mA*fC*mA*U.),其分别通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887和美国专利公开No.US2014/0113950中的SEQ ID NO 3475和3476并入。

[0107] 针对CTGF的rxRNAori的一个优选实施方案包含以下序列的至少12个连续核苷酸,所述序列选自通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887并入的SEQ ID NO:1835、1847、1848和1849。在一些实施方案中,rxRNAori的有义链包含通过引用从PCT公开No.WO 2011/119887中并入的SEQ ID NO:1835、1847、1848或1849,或者由所述序列组成。

[0108] 本发明的一些方面涉及组合物,所述组合物包含dsRNA,例如sd-rxRNA和rxRNAori。在一些实施方案中,组合物包含针对不同基因的两种或更多种dsRNA。

[0109] 在一些实施方案中,核酸分子是siRNA。“RNAi”是文献中对术语“RNA干扰”的缩写,其通常是指通过添加具有与靶基因互补之序列的双链RNA分子来干扰细胞中靶基因表达的细胞过程。小干扰RNA(siRNA)化合物通常是包含引导链和随从链的双链RNA双链体。通常siRNA的双链体长度为13至30个碱基对。双链体可以是平端、包含突出端、或者是天然不对称的(例如,包含单链区)。siRNA的化学修饰是常见的,以增强siRNA稳定性、降低免疫刺激以及增加细胞渗透性质。

[0110] 文献中还描述了单链siRNA

[0111] 在一些实施方案中,核酸分子是反义寡核苷酸(ASO)。ASO是单链化合物,通常为7至25个核苷酸长,并且装饰有稳定化修饰。通常ASO(也称为缺口体(gapmer))的长度为约20个核苷酸,包含在5'和3'端上的末端封闭基团(2'氧甲氧基)和中间的DNA。另外,ASO通常为完全硫代磷酸化的。

[0112] 本发明的应用不限于在下文的描述中给出的或附图中示出的结构细节和元件布置。本发明可以是其他实施方案并且以各种方式实践或实施。另外,本文使用的词组和术语是为了描述的目的而不应解释为限制。本文中使用“包括”、“包含”或“具有”、“含有”、“包含(involve)”意指涵盖后面列出的项目及其等同物以及额外的项目。

[0113] 因此,本发明的一些方面涉及包含引导(反义)链和随从(有义)链的分离的双链核酸分子。本文使用的术语“双链”是指一种或更多种核酸分子,其中至少一部分核单体(nucleomonomer)是互补的并且氢键形成双链区。在一些实施方案中,引导链的长度为16至29个核苷酸长。在某些实施方案中,引导链为16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个核苷酸长。引导链对靶基因具有互补性。引导链和靶基因之间的互补性可存在于引导链的任意部分上。本文使用的互补可以是完全互补或不完全互补,只要引导链与其介导RNAi的靶标足够互补即可。在一些实施方案中,互补是指引导链和靶标之间小于25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%的错配。完全互补是指100%互补性。因此,本发明具有能够耐受序列变异的优点,由于基因突变、株系多态性或进化趋异,所述序列变异是可以预期的。例如,还发现相对于靶序列具有插入、缺失和单点突变的siRNA序列对于抑制有效。另外,并非siRNA的所有部分对于靶标识别具有相同贡献。siRNA中央的错配是最严重

的,并且基本上消除了靶RNA切割。参考反义链的中央上游或切割位点上游的错配可以耐受,但是显著降低靶RNA切割。参考反义链中央或切割位点下游的错配,优选位于反义链3'端附近,例如,距离反义链3'端1、2、3、4、5或6个核苷酸的错配是可以耐受的,并且仅稍微降低靶RNA切割。

[0114] 尽管不希望受到任何特定理论的限制,在一些实施方案中,引导链长度为至少16个核苷酸并且将Argonaute蛋白锚定在RISC中。在一些实施方案中,当引导链装载入RISC时,其具有限定的种子区(seed region),靶mRNA切割发生在引导链10至11位的对面。在一些实施方案中,引导链的5'端被磷酸化或能够被磷酸化。本文所述核酸分子可以称为最小触发RNA。

[0115] 在一些实施方案中,随从链的长度为8-15个核苷酸长。在某些实施方案中,随从链为8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸长。随从链与引导链有互补性。随从链与引导链之间的互补性可以存在于随从链或引导链的任意部分。在一些实施方案中,在分子双链区内引导链和随从链之间具有100%的互补性。

[0116] 本发明的一些方面涉及具有最小双链区的双链核酸分子。在一些实施方案中,分子的双链区为8-15个核苷酸长。在某些实施方案中,分子的双链区为8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸长。在某些实施方案中,双链区为13或14个核苷酸长。引导链和随从链之间可以有100%的互补性,或者引导链和随从链之间可以有一个或更多个错配。在一些实施方案中,在双链分子的一端,分子是平端或具有一个核苷酸的突出端。在一些实施方案中,分子的单链区为4至12个核苷酸长。例如,单链区可以为4、5、6、7、8、9、10、11或12个核苷酸长。但是,在某些实施方案中,单链区也可以小于4或大于12个核苷酸长。在某些实施方案中,单链区为6个核苷酸长。

[0117] 与本发明有关的RNAi构建体的热力学稳定性(ΔG)可以小于-13kcal/mol。在一些实施方案中,热力学稳定性(ΔG)小于-20kcal/mol。在一些实施方案中,当(ΔG)小于-21kcal/mol时,效力有损失。在一些实施方案中,大于-13kcal/mol的(ΔG)值与本发明的一些方面兼容。不希望受到任何理论的约束,在一些实施方案中,具有相对较高(ΔG)值的分子可在相对较高浓度下变得有活性,而具有相对较低(ΔG)值的分子可在相对较低浓度下变得有活性。在一些实施方案中,(ΔG)值可大于-9kcal/mol。由与本发明有关的包含最小双链区的RNAi构建体介导的基因沉默效果是出乎意料的,因为已经具有证明几乎相同的设计但是较低热力学稳定性的分子是无活性的(Rana等,2004)。

[0118] 不希望受到任何理论的约束,本文描述的结果表明8-10bp的dsRNA或dsDNA的段(stretch)将在结构上被RISC之辅因子或RISC的蛋白质组分识别。另外,化合物的触发需要自由能,所述化合物可以被蛋白质组分感测和/或足够稳定以与这样的组分相互作用,从而使得其可以装载到Argonaute蛋白中。如果存在最佳热力学并且具有优选地至少8个核苷酸的双链部分,双链体将被识别并且装载到RNAi机器中。

[0119] 在一些实施方案中,通过使用LNA碱基来增加热力学稳定性。在一些实施方案中,引入另外的化学修饰。化学修饰的数种非限制性实例包括:5'磷酸酯、2'-O-甲基、2'-O-乙基、2'-氟、胸腺嘧啶核糖核苷(ribothymidine)、C-5丙炔基-dC(pdC)和C-5丙炔基-dU(pdU);C-5丙炔基-C(pC)和C-5丙炔基-U(pU);5-甲基C、5-甲基U、5-甲基dC、5-甲基dU甲氧基、(2,6-二氨基嘌呤),5'-二甲氧基三苯甲基-N4-乙基-2'-脱氧胞苷和MGB(小沟结合物)。

应理解的是,相同分子中可以组合多于一种化学修饰。

[0120] 优化与本发明有关的分子以提高效力和/或降低毒性。例如,在一些方面,引导链和/或随从链的核苷酸长度,和/或引导链和/或随从链中硫代磷酸酯修饰的数目可影响RNA分子的效力,而在一些方面,将2'-氟(2'F)修饰替换成2'-O-甲基(2'OMe)修饰可影响分子的毒性。特别地,预期减少分子的2'F含量降低分子的毒性。实施例部分给出了其中消除了2'F修饰的分子,由于预期的毒性降低,提供了超过之前描述的RNAi化合物的优点。另外,RNA分子中硫代磷酸酯修饰的数目可影响细胞对分子的摄取,例如,细胞被动摄取分子的效率。本文所述分子的优选实施方案不具有2'F修饰并且还以在细胞摄取和组织渗透性方面相等的效率为特征。这样的分子相对于现有技术(例如Acce11和Wolfrum描述的用广泛使用的2'F大量修饰的分子)表现出显著改进。

[0121] 在一些实施方案中,引导链的长度为约18-19个核苷酸并且具有约2至14个磷酸酯修饰。例如,引导链可以含有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或多于14个磷酸酯修饰的核苷酸。引导链可以含有一个或更多个赋予提高的稳定性而不干扰RISC进入的修饰。磷酸酯修饰的核苷酸,例如硫代磷酸酯修饰的核苷酸可以在引导链的3'端、5'端或遍布引导链。在一些实施方案中,引导链3'末端的10个核苷酸含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个硫代磷酸酯修饰的核苷酸。引导链还可以含有2'F和/或2'OMe修饰,其可以位于整个分子中。在一些实施方案中,引导链1位的核苷酸(引导链最5'位置的核苷酸)是2'OMe修饰的和/或磷酸化的。引导链内的C和U核苷酸可以是2'F修饰的。例如,19nt引导链的2至10位(或者不同长度的引导链的相应位置)的C和U核苷酸可以是2'F修饰的。引导链中的C和U核苷酸还可以是2'OMe修饰的。例如,19nt引导链的11至18位(或者不同长度的引导链的相应位置)的C和U核苷酸可以是2'OMe修饰的。在一些实施方案中,引导链最3'端的核苷酸是未修饰的。在某些实施方案中,引导链中的大部分C和U是2'F修饰的,并且引导链5'端是磷酸化的。在另一些实施方案中,1位以及11至18位的C或U是2'OMe修饰的,并且引导链的5'端是磷酸化的。在另一些实施方案中,1位以及11至18位的C或U是2'OMe修饰的,并且引导链的5'端是磷酸化的,并且2至10位的C或U是2'F修饰的。

[0122] 在一些方面,最佳随从链的长度为约11至14个核苷酸。随从链可以含有赋予提高的稳定性的修饰。随从链中的一个或更多个核苷酸可以是2'OMe修饰的。在一些实施方案中,随从链中的一个或更多个C和/或U核苷酸是2'OMe修饰的,或者随从链中的所有C和U核苷酸是2'OMe修饰的。在某些实施方案中,随从链中的所有核苷酸是2'OMe修饰的。随从链中的一个或更多个核苷酸也可以是磷酸酯修饰的,例如硫代磷酸酯修饰的。随从链还可以含有2'核糖、2'氟和2脱氧修饰或者上述修饰的任意组合。如实施例中证明的,引导链和随从链二者上的化学修饰模式是良好耐受的,并且本文示出化学修饰的组合导致提高的RNA分子的效力和自递送。

[0123] 本发明的一些方面涉及RNAi构建体,与之前用于RNAi的分子相比,其具有相对于双链区延长的单链区。可以对该分子的单链区进行修饰以促进细胞摄取或基因沉默。在一些实施方案中,单链区的硫代磷酸酯修饰影响细胞摄取和/或基因沉默。引导链的硫代磷酸酯修饰的区域可以包含在分子的单链区和双链区二者中的核苷酸。在一些实施方案中,单链区包含2-12个硫代磷酸酯修饰。例如,单链区可以包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个硫代磷酸酯修饰。在一些情况下,单链区包含6-8个硫代磷酸酯修饰。

[0124] 还对与本发明有关的分子进行优化用于细胞摄取。在本文所述的RNA分子中,引导链和/或随从链可以连接至缀合物。在某些实施方案中,缀合物是疏水的。疏水缀合物可以是分配系数大于10的小分子。缀合物可以是固醇型分子,例如胆固醇,或者聚碳链与C17连接的延长长度的分子,缀合物的存在可以在具有或不具有脂质转染试剂的情况下影响细胞摄取RNA分子的能力。缀合物可以通过疏水接头连接至随从链或引导链。在一些实施方案中,疏水接头的长度为5至12C,和/或是基于羟基吡咯烷的。在一些实施方案中,疏水缀合物连接至随从链,并且随从链和/或引导链的CU残基是经修饰的。在一些实施方案中,随从链和/或引导链的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的CU残基是经修饰的。在一些方面,与本发明有关的分子是自递送(sd)的。本文使用的“自递送”是指分子不需要额外递送载体如转染试剂而被递送到细胞中的能力。

[0125] 本发明的一些方面涉及选择用于RNAi的分子。可以选择具有8-15个核苷酸之双链区的分子来用于RNAi。在一些实施方案中,基于分子的热力学稳定性(ΔG)选择分子。在一些实施方案中,选择(ΔG)小于-13kcal/mol的分子。例如, (ΔG)值可以为-13、-14、-15、-16、-17、-18、-19、-21、-22或者小于-22kcal/mol。在另一些实施方案中, (ΔG)值可以大于-13kcal/mol。例如, (ΔG)值可以为-12、-11、-10、-9、-8、-7或者大于-7kcal/mol。应理解的是,可以使用本领域中已知的任何方法计算 ΔG 。在一些实施方案中,使用Mfold计算 ΔG ,其可以从Mfold网站(<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>)获得。用于计算 ΔG 的方法描述在通过引用并入的以下文献中:Zuker,M.(2003)*Nucleic Acids Res.*, 31(13):3406-15;Mathews,D.H.,Sabina,J.,Zuker,M.和Turner,D.H.(1999)*J.Mol.Biol.*288:911-940;Mathews,D.H.,Disney,M.D.,Childs,J.L.,Schroeder,S.J.,Zuker,M.和Turner,D.H.(2004)*Proc.Natl.Acad.Sci.*101:7287-7292;Duan,S.,Mathews,D.H.和Turner,D.H.(2006)*Biochemistry* 45:9819-9832;Wuchty,S.,Fontana,W.,Hofacker,I.L.和Schuster,P.(1999)*Biopolymers* 49:145-165。

[0126] 在某些实施方案中,多核苷酸含有5'和/或3'端的突出端。多核苷酸一端的核苷酸突出端的数目和/或序列可以与多核苷酸另一端的相同或不同。在某些实施方案中,一个或更多个突出端核苷酸可以包含化学修饰,例如硫代磷酸酯修饰或2'-OMe修饰。

[0127] 在某些实施方案中,多核苷酸是未经修饰的。在另一些实施方案中,至少一个核苷酸是经修饰的。在另一些实施方案中,修饰包括在从引导链5'端开始的第二个核苷酸上的2'-H或2'-修饰核糖。“第二个核苷酸”定义为从多核苷酸的5'-端开始的第二个核苷酸。

[0128] 本文使用的“2'-修饰核糖”包括不具有2'-OH基团的那些核糖。“2'-修饰核糖”不包括2'-脱氧核糖(发现于未经修饰的典型DNA核苷酸中)。例如,2'-修饰核糖可以是2'-O-烷基核苷酸、2'-脱氧-2'-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸或其组合。

[0129] 在某些实施方案中,2'-修饰核苷酸是嘧啶核苷酸(例如,C/U)。2'-O-烷基核苷酸的示例包括2'-O-甲基核苷酸或2'-O-烯丙基核苷酸。

[0130] 在某些实施方案中,本发明的具有上文提到的5'端修饰的sd-rxRNA多核苷酸与不具有特定5'端修饰的类似构建体相比时表现出显著(例如,至少约25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或更多)更低的“脱靶”基因沉默,因此极大改进了RNAi试剂或治疗的整体特异性。

[0131] 本文使用的“脱靶”基因沉默是指由于例如反义(引导)序列和非预期靶mRNA序列

之间的假序列同源性而导致的非预期的基因沉默。

[0132] 根据本发明的这个方面,某些引导链修饰进一步提高核酸酶稳定性,和/或具有较低干扰素诱导,而不显著降低RNAi活性(或者完全不降低RNAi活性)。

[0133] 在一些实施方案中,其中RNAi构建体包含发夹,5'茎序列可以在多核苷酸5'端的第二个核苷酸上包含2'-修饰核糖,例如2'-O-甲基修饰的核苷酸,并且在一些实施方案中,没有其他经修饰核苷酸。具有这样修饰的发夹结构与在所述位置不具有2'-O-甲基修饰的类似构建体相比可以具有增强的靶特异性或降低的脱靶沉默。

[0134] 特定的5'-茎序列和3'-茎序列修饰的某些组合可以导致进一步的意料之外的优点,如通过增强的抑制靶基因表达的能力、增强的血清稳定性和/或提高的靶特异性等部分证明的。

[0135] 在某些实施方案中,引导链在引导链5'端的第二个核苷酸处包含2'-O-甲基修饰核苷酸,并且没有其他经修饰的核苷酸。

[0136] 在另一些方面,本发明的sd-rxRNA结构通过微小RNA机制介导序列依赖性基因沉默。本文使用的术语“微小RNA”(“miRNA”)在本领域中也称为“小时序RNA”(“small temporal RNA,stRNA”),其是指遗传编码的(例如,被病毒、哺乳动物或植物基因组)并且能够指导或介导RNA沉默的小(10-50个核苷酸)RNA。“miRNA病症”是指以miRNA的异常表达或活性为特征的疾病或病症。

[0137] 微小RNA参与下调小鼠、虫和哺乳动物中的关键途径(例如发育和癌症)中的靶基因。借助微小RNA机制的基因沉默通过miRNA和其靶信使RNA(mRNA)之特异性的但是不完全的碱基配对实现。多种机制可用于微小RNA介导的靶mRNA表达的下调。

[0138] miRNA是约22个核苷酸的非编码RNA,其可以在植物和动物发育的过程中在转录后或翻译水平调节基因表达。miRNA的一个普遍特征是其全部从被称为前miRNA的约70个核苷酸的前体RNA茎-环上切离,可能是通过Dicer(III型RNA酶)或其同源物切离。天然存在的miRNA在体内由内源基因表达,并且通过Dicer或其他RNA酶由发夹或茎-环前体(前miRNA或pri-miRNA)加工。miRNA在体内可以短暂地以双链的双链体存在,但是仅一条链被RISC复合物吸收以指导基因沉默。

[0139] 在一些实施方案中,描述了在细胞摄取和抑制miRNA活性中有效的sd-rxRNA化合物形式。基本上,化合物类似于RISC进入形式,但是大链化学修饰模式被优化以阻断切割并且充当有效的RISC作用抑制剂。例如,化合物可以完全或大部分是O甲基修饰的,并且具有前述PS含量。对于这些化合物类型,5'磷酸化不是必要的。双链区的存在是优选的,因为其促进细胞摄取和有效的RISC装载。

[0140] 另一种使用小RNA作为序列特异性调节剂的途径是RNA干扰(RNAi)途径,其是进化保守的,响应于细胞中双链RNA(dsRNA)的存在。dsRNA被Dicer切割成约20个碱基对(bp)的小干扰RNA(siRNA)双链体。这些小RNA装配成被称为RNA诱导的沉默复合物(RISC)的多蛋白效应子复合物。然后siRNA指导具有完全互补性的靶mRNA的切割。

[0141] siRNA途径和miRNA途径共享生物发生、蛋白质复合物和功能的一些方面。本发明的单链多核苷酸可以模拟siRNA机制中的dsRNA,或者miRNA机制中的微小RNA。

[0142] 在某些实施方案中,与具有相同序列的未经修饰的RNAi构建体相比,经修饰RNAi构建体在血清和/或脑脊髓液中可具有提高的稳定性。

[0143] 在某些实施方案中,在原代细胞,例如哺乳动物原代细胞(包括来自人、小鼠和其他啮齿类动物以及其他非人哺乳动物的原代细胞)中,RNAi构建体的结构不诱导干扰素响应。在某些实施方案中,RNAi构建体还可用于抑制无脊椎生物体中靶基因的表达式。

[0144] 为了进一步提高本发明构建体的体内稳定性,可以通过保护基封闭发夹结构的3'端。例如,可以使用保护基团如反向核苷酸、反向无碱基(abasic)部分或氨基末端修饰的核苷酸。反向核苷酸可以包含反向脱氧核苷酸。反向无碱基部分可以包含反向脱氧无碱基部分,例如3',3'-连接的或5',5'-连接的脱氧无碱基部分。

[0145] 本发明的RNAi构建体能够抑制靶基因编码的任何靶蛋白的合成。本发明包括抑制体外或体内细胞中靶基因表达的方法。因此,本发明的RNAi构建体可用于治疗患有以过表达靶基因为特征的疾病的患者。

[0146] 靶基因可以是细胞内源的或者外源的(例如,通过病毒或使用重组DNA技术引入细胞中)。这样的方法可以包括以足以抑制靶基因表达的量将RNA引入到细胞中。例如,这样的RNA分子可以具有与靶基因的核苷酸序列互补的引导链,使得组合物抑制靶基因的表达。

[0147] 本发明还涉及表达本发明发夹构建体的载体,以及包含这样的载体或本发明发夹构建体的细胞。细胞可以是体内的或培养的哺乳动物细胞,例如人细胞。

[0148] 本发明还涉及包含本发明RNAi构建体和可药用载体或稀释剂的组合物。

[0149] 本发明的另一个方面提供了抑制哺乳动物细胞中靶基因的表达的方法,其包括使哺乳动物细胞与任何本发明RNAi构建体接触。

[0150] 所述方法可以在体外、离体或体内进行,例如在培养的哺乳动物细胞,如培养的人细胞中进行。

[0151] 可以在递送试剂如脂质(例如,阳离子脂质)或脂质体的存在下接触靶细胞(例如,哺乳动物细胞)。

[0152] 本发明的另一个方面提供了抑制哺乳动物细胞中靶基因的表达的方法,其包括使哺乳动物细胞与表达本发明RNAi构建体的载体接触。

[0153] 在本发明的一个方面,提供了更长的双链体多核苷酸,其包含:大小为约16至约30个核苷酸的第一多核苷酸;大小为约26至约46个核苷酸的第二多核苷酸,其中第一多核苷酸(反义链)与第二多核苷酸(有义链)和靶基因二者互补,其中两个多核苷酸形成双链体,其中第一多核苷酸包含长度大于6个碱基的单链区,并且被交替化学修饰模式修饰,和/或包含有助于细胞递送的缀合物部分。在该实施方案中,随从链的约40%至约90%核苷酸、引导链的约40%至约90%核苷酸、以及第一多核苷酸的单链区的约40%至约90%核苷酸是化学修饰的核苷酸。

[0154] 在一个实施方案中,多核苷酸双链体中化学修饰的核苷酸可以是本领域已知的任何化学修饰的核苷酸,例如上文详细讨论的那些。在一个特定实施方案中,化学修饰的核苷酸选自2'F修饰的核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸和2'脱氧核苷酸。在另一个特定实施方案中,化学修饰的核苷酸由核苷酸碱基的“疏水修饰”造成。在另一个特定实施方案中,化学修饰的核苷酸是硫代磷酸酯。在另一个特定实施方案中,化学修饰的核苷酸是硫代磷酸酯、2'-O-甲基、2'脱氧、疏水修饰和硫代磷酸酯的组合。因为这些修饰类型是指核糖环、骨架和核苷酸的修饰,所以可能的是一些修饰的核苷酸具有所有三种修饰类型的组合。

[0155] 在另一个实施方案中,化学修饰在双链体的多个区域是不同的。在一个具体实施

方案中,第一多核苷酸(随从链)在多个位置具有大量不同的化学修饰。对于这种多核苷酸,至多90%的核苷酸可以是化学修饰的和/或具有引入的错配。在另一个实施方案中,第一或第二多核苷酸的化学修饰包括但不限于尿嘧啶和胞嘧啶的5'位修饰(4-吡啶基、2-吡啶基、咪唑基、苯基(C₆H₅OH);色氨酸基(C₈H₆N)CH₂CH(NH₂)CO)、异丁基、丁基、氢基苄基;苯基;萘基等),其中化学修饰可以改变核苷酸的碱基配对能力。对于引导链,本发明这个方面的重要特征在于化学修饰相对于反义链序列的5'端的位置。例如,引导链5'端的化学磷酸化通常有利于效力。有义链种子区(相对于5'端的2位至7位)中的O-甲基修饰通常不能良好耐受,而2'F和脱氧良好耐受。引导链的中部和引导链的3'端更容忍所施加的化学修饰。引导链的3'端不耐受脱氧修饰。

[0156] 本发明这个方面的独特特征包括在碱基上使用疏水修饰。在一个实施方案中,疏水修饰优选地位于引导链的5'端附近,在另一些实施方案中,其位于引导链中部,在另一些实施方案中,其位于引导链的3'端,而在另一些实施方案中,其分布在多核苷酸的整个长度上。相同类型的模式适用于双链体的随从链。

[0157] 分子的其他部分是单链区。预期单链区为6至40个核苷酸。

[0158] 在一个实施方案中,第一多核苷酸的单链区包含选自以下的修饰:40%至90%的疏水碱基修饰,40%-90%的硫代磷酸酯,40%-90%的核糖部分的修饰,以及前述修饰的任意组合。

[0159] 由于大量修饰的多核苷酸可以改变引导链(第一多核苷酸)装载入RISC复合物的效率,因此在一个实施方案中,双链体多核苷酸包含引导链(第一多核苷酸)上核苷酸9、11、12、13或14与有义链(第二多核苷酸)上对侧的核苷酸之间的错配,以促进有效的引导链装载。

[0160] 以下部分中描述了本发明更详细的方面。

[0161] 双链体特征

[0162] 本发明的双链寡核苷酸可以通过两个分开的互补核酸链形成。双链体形成可以发生在含靶基因之细胞的内部或外部。

[0163] 本文使用的术语“双链体”包含与互补序列通过氢键键合的双链核酸分子区域。本发明的双链寡核苷酸可以包含相对于靶基因有义的核苷酸序列和相对于靶基因反义的互补序列。对应于靶基因序列的有义和反义核苷酸序列,例如相同或充分相同以实现靶基因序列的靶基因抑制(例如,约至少约98%相同、96%相同、94%、90%相同、85%相同或80%相同)。

[0164] 在某些实施方案中,本发明的双链寡核苷酸在其整个长度上是双链的,即,在分子的任一端没有突出的单链序列,即,是平端。在另一些实施方案中,独立核酸分子可以具有不同长度。换句话说,本发明的双链寡核苷酸在其整个长度上不是双链。例如,当使用两个分开的核酸分子时,一个分子(例如包含反义序列的第一分子)可以比与其杂交的第二分子更长(使分子的一部分为单链)。同样地,当使用单个核酸分子时,分子在任一端的一部分可以保持单链。

[0165] 在一个实施方案中,本发明的双链寡核苷酸包含错配和/或环或凸起(bulge),但是在寡核苷酸的至少约70%的长度上是双链。在另一个实施方案中,本发明的双链寡核苷酸在寡核苷酸的至少约80%的长度上是双链。在另一个实施方案中,本发明的双链寡核苷酸

酸在寡核苷酸的至少约90%至95%的长度上是双链。在另一个实施方案中,本发明的双链寡核苷酸在寡核苷酸的至少约96%至98%的长度上是双链。在另一个实施方案中,本发明的双链寡核苷酸包含至少或至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个错配。

[0166] 修饰

[0167] 本发明的核苷酸可以在多个位置修饰,包括在糖部分、磷酸二酯连接和/或碱基处。

[0168] 在一些实施方案中,核苷的碱基部分可以是经修饰的。例如,可以在嘧啶环的2、3、4、5和/或6位修饰嘧啶碱基。在一些实施方案中,胞嘧啶的环外胺基可以是经修饰的。嘌呤碱基也可以是经修饰的。例如,可以在1、2、3、6、7或8位修饰嘌呤碱基。在一些实施方案中,腺嘌呤的环外胺基可以是经修饰的。在一些情况下,碱基部分的环中的氮原子可以被另外的原子如碳取代。碱基部分的修饰可以是任何合适的修饰。修饰的实例是本领域普通技术人员已知的。在一些实施方案中,碱基修饰包括烷基化的嘌呤或嘧啶、酰基化的嘌呤或嘧啶、或者其他杂环。

[0169] 在一些实施方案中,嘧啶可以在5位修饰。例如,嘧啶的5位可以被烷基、炔基、烯基、酰基或者其取代衍生物修饰。在另一些实例中,嘧啶的5位可以被羟基或烷氧基或其取代衍生物修饰。另外,嘧啶的N⁴位可以烷基化。在另一些实施方案中,嘧啶5-6键可以是饱和的,嘧啶环中的氮原子可以被碳原子取代,和/或O²和O⁴原子可以被硫原子取代。应理解的是,其他修饰也是可能的。

[0170] 在另一些实施方案中,嘌呤的N⁷位和/或N²和/或N³位可以被烷基或其取代衍生物修饰。在另一些实例中,第三个环可以与嘌呤双环体系稠合,和/或嘌呤环体系中的氮原子可以被碳原子取代。应理解的是,其他修饰也是可能的。

[0171] 在5位被修饰的嘧啶的非限制性实例公开在美国专利5591843、美国专利7,205,297、美国专利6,432,963和美国专利6,020,483中;在N⁴位被修饰的嘧啶的非限制性实例公开在美国专利5,580,731中;8位被修饰的嘌呤的非限制性实例公开在美国专利6,355,787和美国专利5,580,972中;在N⁶位被修饰的嘌呤的非限制性实例公开在美国专利4,853,386、美国专利5,789,416和美国专利7,041,824中;以及在2位被修饰的嘌呤的非限制性实例公开在美国专利4,201,860和美国专利5,587,469中,其全部通过引用并入本文。

[0172] 经修饰碱基的非限制性实例包括N⁴,N⁴-桥亚乙基胞嘧啶、7-脱氮黄苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代-N⁶-甲基腺嘌呤、4-乙酰基胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N⁶-异戊烯基-腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N⁶-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N⁶-异戊烯基腺嘌呤、假尿嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、2-硫胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。在一些实施方案中,碱基部分可以是嘌呤或嘧啶以外的杂环碱基。杂环碱基可以任选地修饰和/或取代。

[0173] 糖部分包括天然未修饰的糖,例如单糖(例如,戊糖,如核糖、脱氧核糖),经修饰的糖和糖类似物。通常,核单体,特别是糖部分的可能的修饰包括例如将一个或多个羟基替换成卤素、杂原子、脂族基团,或者将羟基官能化为醚、胺、硫醇等。

[0174] 经修饰核单体的一个特别有用的基团是2'-O-甲基核苷酸。这样的2'-O-甲基核苷酸可以称为“甲基化的”，相应核苷酸可以由未甲基化核苷酸制备然后烷基化，或者直接由甲基化核苷酸试剂制备。经修饰核单体可与未经修饰核单体组合使用。例如，本发明寡核苷酸可以包含甲基化和未甲基化核单体二者。

[0175] 一些示例性经修饰核单体包括糖或骨架被修饰的核糖核苷酸。经修饰核糖核苷酸可以包含非天然存在的碱基(代替天然存在的碱基)，例如在5'-位被修饰的尿苷或胞苷，例如5'-(2-氨基)丙基尿苷和5'-溴尿苷；在8位被修饰的腺苷和鸟苷，例如8-溴鸟苷；脱氮核苷酸，例如7-脱氮-腺苷；以及N-烷基化核苷酸，例如N6-甲基腺苷。另外，糖被修饰的核糖核苷酸可将2'-OH基团替换成H、烷氧基(或OR)、R或烷基、卤素、SH、SR、氨基(例如NH₂、NHR、NR₂)或CN基团，其中R是低级烷基、烯基或炔基。

[0176] 经修饰核糖核苷酸还可以将与相邻核糖核苷酸连接的磷酸二酯基团替换成经修饰基团，例如硫代磷酸酯基团。更普遍地，多种核苷酸修饰可以组合。

[0177] 尽管反义(引导)链可以与靶基因(或多个靶基因)的至少一部分基本上相同，但是至少对于碱基配对特性来说，序列不必完全相同才可用于例如抑制靶基因表型的表达。通常，更高同源性可用于弥补较短反义基因的使用。在一些情况下，反义链通常与靶基因基本相同(尽管是在反义方向)。

[0178] 在希望最小化细胞应激响应的情况下，使用2'-O-甲基修饰的RNA也可能是有益的。具有2'-O-甲基核单体的RNA可能不被认为是识别未经修饰RNA的细胞机器识别。2'-O-甲基化或部分2'-O-甲基化的RNA的使用可以避免对于双链核酸的干扰素响应，同时保持靶RNA抑制。这可用于例如在诱导干扰素响应的短RNAi(例如，siRNA)序列和可能诱导干扰素响应的更长RNAi序列二者中避免干扰素或其他细胞应激响应。

[0179] 总体上，经修饰糖可以包括D-核糖、2'-O-烷基(包括2'-O-甲基和2'-O-乙基)，即2'-烷氧基、2'-氨基、2'-S-烷基、2'-卤素(包括2'-氟)、2'-甲氧基乙氧基、2'-烯丙氧基(-OCH₂CH=CH₂)、2'-炔丙基、2'-丙基、乙炔基、乙烯基、丙烯基和氰基等。在一个实施方案中，糖部分可以是己糖并且如描述的并入到寡核苷酸中(Augustyns, K., 等, Nucl. Acids. Res. 18:4711(1992))。示例性核单体可见于例如美国专利No. 5,849,902,其通过引用并入本文。

[0180] 下文更加详细地描述了特定官能团和化学术语的定义。为了本发明的目的，化学元素是根据元素周期表, CAS版, Handbook of Chemistry and Physics, 第75版, 内封面鉴定, 特定官能团如本文中所述一般定义。另外, 有机化学的一般原则以及特定官能部分和反应性描述在Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999中, 其整个内容通过引用并入本文。

[0181] 本发明的某些化合物可以以特定几何或立体化学形式存在。本发明预期所有这样的化学物(包括顺式和反式异构体, R-和S-对映体、非对映体、(D)-异构体、(L)-异构体、其外消旋混合物及其其他混合物)落入本发明范围内。取代基如烷基中可以存在额外的不对称碳原子。所有这样的异构体及其混合物预期包括在本发明内。

[0182] 可以根据本发明使用包含多种异构体比例中的任一种的异构混合物。例如, 在仅两种异构体组合的情况下, 包含50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、95:5、96:4、97:3、98:2、99:1或100:0异构体比例的混合物均被本发明所预期。本领域技术人员将容易理解, 预期到

类似比例用于更复杂的异构体混合物。

[0183] 例如,如果期望本发明化合物的特定对映体,可以通过不对称合成或者利用手性助剂衍生(derivation)来制备,其中将所得非对映体混合物分离并且切割辅助基团以提供纯的期望的对映体。或者,在分子包含碱性官能团如氢基,或者酸性官能团如羧基情况下,利用合适的光学活性酸或碱形成非对映体盐,然后通过本领域周知的分级结晶或色谱手段拆分如此形成的非对映体,随后回收纯对映体。

[0184] 在某些实施方案中,本发明寡核苷酸包含3'和5'末端(环形寡核苷酸除外)。在一个实施方案中,寡核苷酸的3'和5'末端可以基本上被保护免受核酸酶影响,例如通过3'或5'连接的修饰(例如,美国专利No.5,849,902和WO 98/13526)。例如,可以通过纳入“阻断基团”使寡核苷酸有抗性。本文使用的术语“阻断基团”是指可连接到寡核苷酸或核单体作为保护基或用于合成的耦合基团的取代基(例如,除了OH基团)(例如,FITC、丙基(CH₂-CH₂-CH₃)、乙二醇基(-O-CH₂-CH₂-O-)、磷酸根(PO₃²⁻)、磷酸氢根(hydrogen phosphonate)或亚磷酰胺)。“阻断基团”还包括保护寡核苷酸的5'和3'末端的“末端阻断基团”或“外切酶阻断基团”,包括经修饰的核苷酸和非核苷酸外切酶抗性结构。

[0185] 示例性末端阻断基团(end-blocking group)包括帽结构(例如,7-甲基鸟苷帽)、反向核单体,例如具有3'-3'或5'-5'端反向(参见,例如Ortiagao等.1992.Antisense Res.Dev.2:129)、甲基磷酸酯、亚磷酰胺、非核苷酸基团(例如,非核苷酸接头、氨基接头、缀合物)等。3'末端核单体可以包含经修饰糖部分。3'末端核单体包含3'-O,其可以任选地被阻止寡核苷酸之3'-外切酶降解的阻断基团取代。例如,3'-羟基可以通过3'→3'核苷酸间连接与核苷酸酯化。例如,烷氧基基团可以是甲氧基、乙氧基或异丙氧基,优选乙氧基。任选地,3'末端的3'→3'连接的核苷酸可以通过替代连接来连接。为了降低核酸酶降解,最5'的3'→5'连接可以是经修饰的连接,例如硫代磷酸酯或P-烷氧基磷酸三酯连接。优选地,两个最5'的3'→5'连接是经修饰连接。任选地,5'末端羟基部分可以用含磷的部分酯化,例如磷酸酯、硫代磷酸酯或P-乙氧基磷酸酯。

[0186] 本领域普通技术人员将理解,本文所述合成方法使用多种保护基。本文使用的术语“保护基”意指特定官能部分(例如O、S或N)被临时阻断,以使得反应可以选择性发生在多官能化合物的另外的反应位点。在某些实施方案中,保护基以良好产率选择性反应,以得到对于预计的反应稳定的经保护物质;保护基应可通过不攻击其他官能团的容易获得的、优选无毒的试剂以良好产率选择性地移除;保护基形成容易分离的衍生物(更优选地不产生新立体中心);并且保护基具有最小的额外官能性,以避免另外的反应位点。如本文详细描述,可以使用氧、硫、氮和碳保护基。羟基保护基包括甲基、甲氧基甲基(methoxymethyl,MOM)、甲硫基甲基(methylthiomethyl,MTM)、叔丁硫基甲基、(苯基二甲基甲硅烷基)甲氧基甲基((phenyldimethylsilyl)methoxymethyl,SMOM)、苄氧基甲基(benzyloxymethyl,BOM)、对甲氧基苄氧基甲基(p-methoxybenzyloxymethyl,PMBM)、(4-甲氧基苯氧基)甲基((4-methoxyphenoxy)methyl,p-AOM)、愈创木酚甲基(guaiacolmethyl,GUM)、叔丁氧基甲基、4-戊烯氧基甲基(4-pentenylloxymethyl,POM)、甲硅烷氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(2-methoxyethoxymethyl,MEM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、双(2-氯乙氧基)甲基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基(2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl,SEMOR)、四氢吡喃基(tetrahydropyranyl,THP)、3-溴四氢吡喃基、四氢硫代吡喃基、1-甲氧基环己基、4-

甲氧基四氢吡喃基(4-methoxytetrahydropyranyl,MTHP)、4-甲氧基四氢硫代吡喃基、4-甲氧基四氢硫代吡喃基S,S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基(1-[(2-chloro-4-methyl)phenyl]-4-methoxypiperidin-4-yl,CTMP)、1,4-二噻烷-2-基、四氢呋喃基、四氢硫代呋喃基、2,3,3a,4,5,6,7,7a-八氢-7,8,8-三甲基-4,7-桥亚甲基苯并呋喃-2-基、1-乙氧基乙基、1-(2-氯乙氧基)乙基、1-甲基-1-甲氧基乙基、1-甲基-1-苄氧基乙基、1-甲基-1-苄氧基-2-氟乙基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、2-(苯基氢硒基)乙基、叔丁基、烯丙基、对氯苯基、对甲氧基苯基、2,4-二硝基苯基、苄基、对甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基、邻硝基苄基、对硝基苄基、对卤代苄基、2,6-二氯苄基、对氰基苄基、对苯基苄基、2-吡啶甲基、4-吡啶甲基、3-甲基-2-吡啶甲基N-氧、二苯基甲基、p,p'-二硝基二苯甲基、5-二苯并环庚基、三苯基甲基、 α -萘基二苯基甲基、对甲氧基苯基二苯基甲基、二(对甲氧基苯基)苯基甲基、三(对甲氧基苯基)甲基、4-(4'-溴苯甲酰甲基氧基苯基)二苯基甲基、4,4',4''-三(4,5-二氯苯二甲酰亚氨基苯基)甲基、4,4',4''-三(乙酰丙酰基(levulinoyl)氧基苯基)甲基、4,4',4''-三(苯甲酰基氧基苯基)甲基、3-(咪唑-1-基)双(4',4''-二甲氧基苯基)甲基、1,1-双(4-甲氧基苯基)-1'-萘基甲基、9-蒎基、9-(9-苯基)吨基、9-(9-苯基-10-氧代)蒎基、1,3-苯并二噻吩(thiolan)-2-基、S,S-二氧苯并异噻唑基、三甲基甲硅烷基(trimethylsilyl,TMS)、三乙基甲硅烷基(triethylsilyl,TES)、三异丙基甲硅烷基(triisopropylsilyl,TIPS)、二甲基异丙基甲硅烷基(dimethylisopropylsilyl,IPDMS)、二乙基异丙基甲硅烷基(diethylisopropylsilyl,DEIPS)、二甲基己基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基(t-butylldimethylsilyl,TBDMS)、叔丁基二苯基甲硅烷基(t-butylldiphenylsilyl,TBDPS)、三苄基甲硅烷基、三-对二甲苯基甲硅烷基、三苯基甲硅烷基、二苯基甲基甲硅烷基(diphenylmethylsilyl,DPMS)、叔丁基甲氧基苯基甲硅烷基(t-butylmethoxyphenylsilyl,TBMPS)、甲酸酯、苯甲酰基甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苄氧基乙酸酯、对氯苯氧基乙酸酯、3-苯基丙酸酯、4-氧戊酸酯(乙酰丙酸酯)、4,4-(乙二硫基)戊酸酯(乙酰丙酰基二硫缩醛)、新戊酸酯、adamantoate、巴豆酸酯、4-甲氧基巴豆酸酯、苯甲酸酯、对苯基苯甲酸酯、2,4,6-三甲基苯甲酸酯(mesitoate)、烷基甲基碳酸酯、9-芴基甲基碳酸酯(9-fluorenylmethyl carbonate,Fmoc)、烷基乙基碳酸酯、烷基2,2,2-三氯乙基碳酸酯(alkyl2,2,2-trichloroethyl carbonate,Troc)、2-(三甲基甲硅烷基)乙基碳酸酯(2-(trimethylsilyl)ethyl carbonate,TMSEC)、2-(苯基磺酸基)乙基碳酸酯(2-(phenylsulfonyl)ethyl carbonate,Psec)、2-(三苯基磷鎓基)乙基碳酸酯(2-(triphenylphosphonio)ethyl carbonate,Peoc)、烷基异丁基碳酸酯、烷基乙烯基碳酸酯、烷基烯丙基碳酸酯、烷基对硝基苯基碳酸酯、烷基苄基碳酸酯、烷基对甲氧基苄基碳酸酯、烷基3,4-二甲氧基苄基碳酸酯、烷基邻硝基苄基碳酸酯、烷基对硝基苄基碳酸酯、烷基S-苄基硫代碳酸酯、4-乙氧基-1-萘基碳酸酯、甲基二硫代碳酸酯、2-碘代苯甲酸酯、4-叠氮基丁酸酯、4-硝基-4-甲基戊酸酯、邻-(二溴甲基)苯甲酸酯、2-甲酰基苯磺酸酯、2-(甲基硫甲氧基)乙基、4-(甲硫基甲氧基)丁酸酯、2-(甲硫基甲氧基甲基)苯甲酸酯、2,6-二氯-4-甲基苯氧基乙酸酯、2,6-二氯-4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯氧基乙酸酯、2,4-双(1,1-二甲基丙基)苯氧基乙酸酯、氯二苯基乙酸酯、异丁酸酯、单琥珀酸酯、(E)-2-甲基-2-丁烯酸酯、邻-(甲氧基羰基)苯甲酸酯、 α -萘甲酸酯、硝酸酯、烷基N,N,N',N'-四甲基二氨基磷酸酯、烷基N-苯

基氨基甲酸酯、硼酸酯、二甲基硫磷基、烷基2,4-二硝基苯基次磺酸酯、硫酸酯、甲磺酸酯(mesylate)、苄基磺酸酯和甲苯磺酸酯(tosylate, Ts)。为了保护1,2-或1,3-二醇,保护基包括亚甲基缩醛、亚乙基缩醛、1-叔丁基亚乙基缩酮、1-苯基亚乙基缩酮、(4-甲氧基苯基)亚乙基缩醛、2,2,2-三氯亚甲基缩醛、丙酮化合物、亚环戊基缩酮、亚环己基缩酮、亚环庚基缩酮、亚苄基缩醛、对甲氧基亚苄基缩醛、2,4-二甲氧基亚苄基缩酮、3,4-二甲氧基亚苄基缩醛、2-硝基亚苄基缩醛、甲氧基亚甲基缩醛、乙氧基亚甲基缩醛、二甲氧基亚甲基原酸酯、1-甲氧基亚乙基原酸酯、1-乙氧基亚乙基原酸酯、1,2-二甲氧基亚乙基原酸酯、 α -甲氧基亚苄基原酸酯、1-(N,N-二甲基氨基)亚乙基衍生物、 α -(N,N'-二甲基氨基)亚苄基衍生物、2-氧杂亚环戊基原酸酯、二叔丁基亚甲硅烷基(di-*t*-butylsilylene group, DTBS)、1,3-(1,1,3,3-四异丙基二硅亚烷基)衍生物(1,3-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxanylidene)derivative, TIPDS)、四叔丁氧基二硅氧烷-1,3-亚二基衍生物(tetra-*t*-butoxydisiloxane-1,3-diylidene derivative, TBDS)、环状碳酸酯、环状硼酸酯、硼酸乙酯和硼酸苯酯。氨基保护基包括氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、9-苄基甲基氨基甲酸酯(9-fluorenylmethyl carbamate, Fmoc)、9-(2-磺基)苄基甲基氨基甲酸酯、9-(2,7-二溴)苄基甲基氨基甲酸酯、2,7-二叔丁基-[9-(10,10-二氧化-10,10,10,10-四氢噻吨基)]甲基氨基甲酸酯(2,7-di-*t*-butyl-[9-(10,10-dioxo-10,10,10,10-tetrahydrothioxanthyl)]methyl carbamate, DBD-Tmoc)、4-甲氧基苯甲酰甲基氨基甲酸酯(4-methoxyphenacyl carbamate, Phenoc)、2,2,2-三氯乙基氨基甲酸酯(2-trimethylsilylethyl carbamate, Troc)、2-三甲基甲硅烷基乙基氨基甲酸酯(2-trimethylsilylethyl carbamate, Teoc)、2-苯基乙基氨基甲酸酯(2-phenylethyl carbamate, hZ)、1-(1-金刚烷基)-1-甲基乙基氨基甲酸酯(1-(1-adamantyl)-1-methylethyl carbamate, Adpoc)、1,1-二甲基-2-卤代乙基氨基甲酸酯、1,1-二甲基-2,2-二溴乙基氨基甲酸酯(1,1-dimethyl-2,2-dibromoethyl carbamate, DB-*t*-BOC)、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙基氨基甲酸酯(1,1-dimethyl-2,2,2-trichloroethyl carbamate, TCBoc)、1-甲基-1-(4-联苯基)乙基氨基甲酸酯(1-methyl-1-(4-biphenyl)ethyl carbamate, Bpoc)、1-(3,5-二叔丁基苯基)-1-甲基乙基氨基甲酸酯(1-(3,5-di-*t*-butylphenyl)-1-methylethyl carbamate, *t*-Bumeoc)、2-(2'-和4'-吡啶基)乙基氨基甲酸酯(2-(2'-and 4'-pyridyl)ethyl carbamate, Pyoc)、2-(N,N-二环己基甲酰胺)乙基氨基甲酸酯、叔丁基氨基甲酸酯(*t*-butyl carbamate, BOC)、1-金刚烷基氨基甲酸酯(1-adamantyl carbamate, Adoc)、乙烯基氨基甲酰酯(vinyl carbamate, Voc)、烯丙基氨基甲酸酯(allyl carbamate, Alloc)、1-异丙基烯丙基氨基甲酸酯(1-isopropylallyl carbamate, Ipaoc)、肉桂基氨基甲酸酯(cinnamyl carbamate, Coc)、4-硝基肉桂基氨基甲酸酯(4-nitrocinnamyl carbamate, Noc)、8-喹啉基氨基甲酸酯、N-羟基哌啶基氨基甲酸酯、烷基二硫基氨基甲酸酯、苄基氨基甲酸酯(benzyl carbamate, Cbz)、对甲氧基苄基氨基甲酸酯(*p*-methoxybenzyl carbamate, Moz)、对硝基苄基氨基甲酸酯、对溴苄基氨基甲酸酯、对氯苄基氨基甲酸酯、2,4-二氯苄基氨基甲酸酯、4-甲基亚磺酰基苄基氨基甲酸酯(4-methylsulfinylbenzyl carbamate, Msz)、9-蒎基甲基氨基甲酸酯、二苯基甲基氨基甲酸酯、2-甲硫基乙基氨基甲酸酯、2-甲基磺酰基乙基氨基甲酸酯、2-(对甲苯磺酰基)乙基氨基甲酸酯、[2-(1,3-二thianyl)]甲基氨基甲酸酯([2-(1,3-dithianyl)]methyl carbamate,

Dmoc)、4-甲硫基苄基氨基甲酸酯(4-methylthiophenyl carbamate,Mtpc)、2,4-二甲硫基苄基氨基甲酸酯(2,4-dimethylthiophenyl carbamate,Bmpc)、2-膦基乙基氨基甲酸酯(2-phosphonioethyl carbamate,Peoc)、2-三苯基膦基异丙基氨基甲酸酯(2-triphenylphosphonioisopropyl carbamate,Ppoc)、1,1-二甲基-2-氰基乙基氨基甲酸酯、间氯-对-酰氧基苄基氨基甲酸酯、对-(二羟基硼烷基)苄基氨基甲酸酯、5-苯并异噁唑基(benzisoxazolyl)甲基氨基甲酸酯、2-(三氟甲基)-6-色酮基甲基氨基甲酸酯(2-(trifluoromethyl)-6-chromonylmethyl carbamate,Tcroc)、间硝基苄基氨基甲酸酯、3,5-二甲氧基苄基氨基甲酸酯、邻硝基苄基氨基甲酸酯、3,4-二甲氧基-6-硝基苄基氨基甲酸酯、苄基(邻硝基苄基)甲基氨基甲酸酯、吩噻嗪基-(10)-羰基衍生物、N'-对甲苯磺酰基氨基羰基衍生物、N'-苄基氨基硫代羰基衍生物、叔戊基氨基甲酸酯、S-苄基硫代氨基甲酸酯、对氰基苄基氨基甲酸酯、环丁基氨基甲酸酯、环己基氨基甲酸酯、环戊基氨基甲酸酯、环丙基甲基氨基甲酸酯、对癸氧基苄基氨基甲酸酯、2,2-二甲氧基羰基乙烯基氨基甲酸酯、邻-(N,N-二甲基甲酰胺基)苄基氨基甲酸酯、1,1-二甲基-3-(N,N-二甲基甲酰胺基)丙基氨基甲酸酯、1,1-二甲基丙炔基氨基甲酸酯、二(2-吡啶基)甲基氨基甲酸酯、2-呋喃基甲基氨基甲酸酯、2-碘乙基氨基甲酸酯、异茨烷基(borynl)氨基甲酸酯、异丁基氨基甲酸酯、异烟酰基氨基甲酸酯、对-(p'-甲氧基苄基偶氮)苄基氨基甲酸酯、1-甲基环丁基氨基甲酸酯、1-甲基环己基氨基甲酸酯、1-甲基-1-环丙基甲基氨基甲酸酯、1-甲基-1-(3,5-二甲氧基苄基)乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-(对苄基偶氮苄基)乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-苄基乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-(4-吡啶基)乙基氨基甲酸酯、苄基氨基甲酸酯、对-(苄基偶氮)苄基氨基甲酸酯、2,4,6-三叔丁基苄基氨基甲酸酯、4-(三甲基铵)苄基氨基甲酸酯、2,4,6-三甲基苄基氨基甲酸酯、甲酰胺、乙酰胺、氯乙酰胺、三氯乙酰胺、三氟乙酰胺、苄基乙酰胺、3-苄基丙酰胺、吡啶酰胺、3-吡啶基甲酰胺、N-苄甲酰基苄基丙酰胺衍生物、苄甲酰胺、对苄基苄甲酰胺、邻硝基苄基乙酰胺、邻硝基苄氧基乙酰胺、乙酰乙酰胺、(N'-二硫代苄氧基羰基氨基)乙酰胺、3-(对羟基苄基)丙酰胺、3-(邻硝基苄基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻硝基苄氧基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻苄基偶氮苄氧基)丙酰胺、4-氯丁酰胺、3-甲基-3-硝基丁酰胺、邻硝基肉桂酰胺、N-乙酰基甲硫氨酸衍生物、邻硝基苄甲酰胺、邻-(苄甲酰氧基甲基)苄甲酰胺、4,5-二苄基-3-唑啉-2-酮、N-邻苯二甲酰亚胺、N-二硫杂琥珀酰亚胺(N-dithiasuccinimide,Dts)、N-2,3-二苄基马来酰亚胺、N-2,5-二甲基吡咯、N-1,1,4,4-四甲基二甲硅烷基氮杂环戊烷加合物(N-1,1,4,4-tetramethyldisilylazacyclopentane adduct,STABASE)、5-取代的1,3-二甲基-1,3,5-三氮杂环己-2-酮、5-取代的1,3-二苄基-1,3,5-三氮杂环己-2-酮、1-取代的3,5-二硝基-4-吡啶酮、N-甲胺、N-丙烯胺、N-[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲胺(N-[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methylamine,SEM)、N-3-乙酰氧基丙胺、N-(1-异丙基-4-硝基-2-氧代-3-吡咯啉(pyroolin)-3-基)胺、季铵盐、N-苄胺、N-二(4-甲氧基苄基)甲胺、N-5-二苄并环庚胺、N-三苯基甲胺(N-triphenylmethylamine,Tr)、N-[(4-甲氧基苄基)二苄基甲基]胺(N-[(4-methoxyphenyl)diphenylmethyl]amine,MMTr)、N-9-苄基苄基胺(N-9-phenylfluorenylaminePhF)、N-2,7-二氯-9-苄基亚甲基胺、N-二茂铁基甲胺(N-ferrocenylmethylaminoFcm)、N-2-吡啶甲基氨基N'-氧化物、N-1,1-二甲硫基亚甲基胺、N-亚苄基胺、N-对甲氧基亚苄基胺、N-二苄基亚甲基胺、N-[(2-吡啶基)苄基]亚甲基胺、N-

(N',N'-二甲基氨基亚甲基)胺、N,N'-异亚丙基二胺、N-对硝基亚苄基胺、N-亚水杨基胺、N-5-氯亚水杨基胺、N-(5-氯-2-羟基苯基)苯基亚甲基胺、N-亚环己基胺、N-(5,5-二甲基-3-氧代-1-环己烯基)胺、N-硼烷衍生物、N-二苯基硼酸衍生物、N-[苯基(五烷基铬或钨)羰基]胺、N-铜螯合物、N-锌螯合物、N-硝胺、N-亚硝胺、胺N-氧化物、二苯基次膦酰胺(diphenylphosphinamide,Dpp)、二甲基硫代次膦酰胺(dimethylthiophosphinamide,Mpt)、二苯基硫代次膦酰胺(diphenylthiophosphinamide,Ppt)、二烷基氨基磷酸酯(dialkyl phosphoramidate)、二苄基氨基磷酸酯、二苄基氨基磷酸酯、苯亚磺酰胺(benzenesulfenamide)、邻硝基苯亚磺酰胺(o-nitrobenzenesulfenamide,Nps)、2,4-二硝基苯亚磺酰胺、五氯苯亚磺酰胺、2-硝基-4-甲氧基苯亚磺酰胺、三苯基甲基亚磺酰胺、3-硝基吡啶亚磺酰胺(3-nitropyridinesulfenamide,Npys)、对甲苯磺酰胺(p-toluenesulfonamide,Ts)、苯磺酰胺、2,3,6,-三甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(2,3,6,-trimethyl-4-methoxybenzenesulfonamide,Mtr)、2,4,6-三甲氧基苯磺酰胺(2,4,6-trimethoxybenzenesulfonamide,Mtb)、2,6-二甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(2,6-dimethyl-4-methoxybenzenesulfonamide,Pme)、2,3,5,6-四甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(2,3,5,6-tetramethyl-4-methoxybenzenesulfonamide,Mte)、4-甲氧基苯磺酰胺(4-methoxybenzenesulfonamide,Mbs)、2,4,6-三甲基苯磺酰胺(2,4,6-trimethylbenzenesulfonamide,Mts)、2,6-二甲氧基-4-甲基苯磺酰胺(2,6-dimethoxy-4-methylbenzenesulfonamide,iMds)、2,2,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰胺(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonamide,Pmc)、甲磺酰胺(methanesulfonamide,Ms)、 β -三甲基甲硅烷基乙磺酰胺(β -trimethylsilylethanesulfonamide,SES)、9-蒎磺酰胺、4-(4',8'-二甲氧基萘基甲基)苯磺酰胺(4-(4',8'-dimethoxynaphthylmethyl)benzenesulfonamide,DNMBs)、苄基磺酰胺、三氟甲磺酰胺和苯甲酰甲基磺酰胺。本文详细描述了示例性的保护基。但是,应理解的是,本发明并未旨在限于这些保护基,相反,使用上述标准可以容易鉴定多种另外的等效保护基并且用于本发明的方法。另外,多种保护基描述在Protective Groups in Organic Synthesis、第三版.Greene,T.W.和Wuts,P.G.编辑,John Wiley&Sons,New York:1999中,其整个内容通过引用整体并入本。

[0187] 应理解的是,本文所述化合物可以被任何数目的取代基或官能部分取代。通常,无论前面是否有术语“任选地”的术语“取代”以及在本发明式中所含的取代基,是指将给定结构中的氢基团替换成指定取代基的基团。当任意给定结构中超过一个位置可以被选自特定组的超过一个取代基取代时,每个位置的取代基可以是相同的或不同的。本文使用的术语“取代”预期包括有机化合物的所有可能的取代基。广义来讲,允许的取代基包括有化合物的无环和环形的、支链和无支链的碳环和杂环、芳族和非芳族取代基。杂原子如氮可以具有氢取代基和/或任何可能的本文所述的满足杂原子化合价的有机化合物取代基。此外,本发明并未旨在以任何方式限制有机化合物的可能的取代基。本发明预期的取代基和变量的组合优选地是导致形成可用于治疗例如感染性疾病或增殖性疾病的稳定化合物的那些。本文使用的术语“稳定”优选地是指化合物具有充分稳定性以允许制备,并且化合物的完整性保持充分的一段时间以便检测,以及优选地充分的一段时间以用于本发明详细描述的目的。

[0188] 本文使用的术语“脂族(aliphatic)”包括饱和和不饱和的直链(即,无支链)、支链、无环、环形或多环脂族烃,其任选地被一个或更多个功能团取代。本领域普通技术人员将理

解,“脂族”在本文中旨在包括但不限于烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基和环炔基部分。因此,本文使用的术语“烷基”包括直链、支链和环形烷基。类似约定适用于其他通用术语,例如“烯基”、“炔基”等。另外,本发明使用的术语“烷基”、“烯基”、“炔基”等涵盖经取代的和未经取代的基团。在某些实施方案中,本文使用的“低级烷基”是指具有1-6个碳原子的那些烷基(环形、无环、经取代的、未经取代的、支链或无支链的)。

[0189] 在某些实施方案中,本发明中使用的烷基、烯基和炔基含有1-20个脂族碳原子。在某些另外的实施方案中,本发明中使用的烷基、烯基和炔基含有1-10个脂族碳原子。在另一些实施方案中,本发明中使用的烷基、烯基和炔基含有1-8个脂族碳原子。在又一些实施方案中,本发明中使用的烷基、烯基和炔基含有1-6个脂族碳原子。在另一些实施方案中,本发明中使用的烷基、烯基和炔基包含1-4个碳原子。因此,示例性脂族基团包括但不限于例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、环丙基、 $-\text{CH}_2$ -环丙基、乙烯基、烯丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、环丁基、 $-\text{CH}_2$ -环丁基、正戊基、仲戊基、异戊基、叔戊基、环戊基、 $-\text{CH}_2$ -环戊基、正己基、仲己基、环己基、 $-\text{CH}_2$ -环己基部分等,再一次,其可以具有一个或更多个取代基。烯基包括但不限于例如乙烯基、丙烯基、丁烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基等。示例性炔基把包括但不限于乙炔基、2-丙炔基(炔丙基)、1-丙炔基等。

[0190] 本发明化合物的上述脂族(及其他)部分的取代基的一些实例包括但不限于:脂族、杂脂族、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基、烷氧基、芳氧基、杂烷氧基、杂芳氧基、烷硫基、芳硫基、杂烷硫基、杂芳硫基、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}_x$ 、 $-\text{CO}_2(\text{R}_x)$ 、 $-\text{CON}(\text{R}_x)_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}_x$ 、 $-\text{OCO}_2\text{R}_x$ 、 $-\text{OCON}(\text{R}_x)_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}_x)_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}_x$ 、 $-\text{NR}_x(\text{CO})\text{R}_x$,其中每次出现的 R_x 独立地包括但不限于脂族、杂脂族、芳基、杂芳基、芳基烷基或杂芳基烷基,其中上文以及本文中所述脂族、杂脂族、芳基烷基或杂芳基烷基取代基中的任一种可以是经取代或未经取代的、支链或无支链的、环形或无环的,并且其中上文以及本文中所述芳基或杂芳基取代基中的任一种可以是经取代的或未经取代的。一般适用的取代基的额外实例通过本文的具体实施方案说明。

[0191] 本文使用的术语“杂脂族(heteroaliphatic)”是指含有一个或更多个例如替代碳原子的氧、硫、氮、磷或硅原子的脂族部分。杂脂族部分可以是支链、无支链、环形或无环的,并且包括饱和和不饱和杂环,例如吗啉基、吡咯烷基等。在某些实施方案中,杂脂族部分通过将其上面的一个或更多个氢原子独立地替换成一个或更多个部分而被取代,所述一个或更多个部分包括但不限于:脂族、杂脂族、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基、烷氧基、芳氧基、杂烷氧基、杂芳氧基、烷硫基、芳硫基、杂烷硫基、杂芳硫基、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CHCl}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}_x$ 、 $-\text{CO}_2(\text{R}_x)$ 、 $-\text{CON}(\text{R}_x)_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}_x$ 、 $-\text{OCO}_2\text{R}_x$ 、 $-\text{OCON}(\text{R}_x)_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}_x)_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}_x$ 、 $-\text{NR}_x(\text{CO})\text{R}_x$,其中每次出现的 R_x 独立地包括但不限于脂族、杂脂族、芳基、杂芳基、芳基烷基或杂芳基烷基,其中上文以及本文中所述脂族、杂脂族、芳基烷基或杂芳基烷基取代基中的任一种可以是经取代或未经取代的、支链或无支链的、环形或无环的,并且其中上文以及本文中所述芳基或杂芳基取代基中的任一种可以是经取代的或未经取代的。一般适用的取代基的额外实例通过本文描述的具体实施方案说明。

[0192] 本文使用的术语“卤代”和“卤素”是指选自氟、氯、溴和碘的原子。

[0193] 术语“烷基”包括饱和的脂族基团,包括直链烷基(例如,甲基、乙基、丙基、丁基、戊

基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基等)、支链烷基(异丙基、叔丁基、异丁基等)、环烷基(脂环族)基团(环丙基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基)、烷基取代的环烷基以及环烷基取代的烷基。在某些实施方案中,直链或支链烷基在其骨架中具有6或更少个碳原子(例如,直链为C₁-C₆,支链为C₃-C₆),更优选地4个或更少个。同样地,优选的环烷基在其环结构中具有3-8个碳原子,更优选的在环结构中具有5或6个碳原子。术语C₁-C₆包括含有1至6个碳原子的烷基。

[0194] 另外,除非另有说明,否则术语烷基包括“未经取代烷基”和“经取代烷基”,后者是指具有独立选择的取代基的烷基部分,所述取代基替代烃骨架的一个或更多个碳原子上的氢。这样的取代基可以包括例如烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷硫基羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸根合(phosphonato)、次膦酸根合(phosphinato)、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰胺基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、硫基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸根合(sulfonato)、氨磺酰基、磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或者芳族或杂芳族部分。环烷基可以进一步被例如本上述取代基取代。“烷基芳基”或“芳基烷基”部分是芳基取代的烷基(例如,苯甲基(苄基))。术语“烷基”还包含天然和非天然氨基酸的侧链。术语“正烷基”意指直链(即,无分枝)未经取代的烷基。

[0195] 术语“烯基”包括在长度和可能的取代方面与上述烷基类似但是包含至少一个双键的不饱和脂族基团。例如,术语“烯基”包括直链烯基(例如,乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基、癸烯基等)、支链烯基、环烯基(脂环族)基团(环丙烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基、环辛烯基)、烷基或烯基取代的环烯基、以及环烷基或环烯基取代的炔基。在某些实施方案中,直链或支链烯基在其骨架中具有6个或更少的碳原子(即,直链为C₂-C₆、支链为C₃-C₆)。同样地,环烯基在其环结构中可以具有3-8个碳原子,更优选地在环结构中具有5或6个碳。术语C₂-C₆包括含有2至6个碳原子的烯基。

[0196] 另外,除非另有说明,术语烯基包括“未经取代的烯基”和“经取代的烯基”,后者是指具有独立选择的取代基的烯基部分,所述取代基替代烃骨架的一个或更多个碳原子上的氢。这样的取代基可以包括例如烷基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷硫基羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸根合、次膦酸根合、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰胺基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、硫基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸根合、氨磺酰基、磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或者芳族或杂芳族部分。

[0197] 术语“炔基”包括在长度和可能的取代方面与上述烷基类似但是含有至少一个三键的不饱和脂族基团。例如,术语“炔基”包括直链炔基(例如,乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基、辛炔基、壬炔基、癸炔基等)、支链炔基、以及环烷基或环烯基取代的炔基。在某些实施方案中,直链或支链炔基在其骨架中具有6个或更少的碳原子(即,直链为C₂-C₆、支链为C₃-C₆)。术语C₂-C₆包括含有2至6个碳原子的炔基。

[0198] 另外,除非另有说明,术语烯基包括“未经取代的炔基”和“经取代的炔基”,后者是指具有独立选择的取代基的炔基部分,所述取代基替代烃骨架的一个或更多个碳原子上的氢。这样的取代基可以包括例如烷基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷硫基羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸根合、次膦酸根合、氰基、氨基(包括烷基烷基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰胺基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸根合、氨磺酰基、磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或者芳族或杂芳族部分。

[0199] 除非另外说明碳的数目,否则本文使用的“低级烷基”意指上文定义烷基,但是在其骨架结构中具有1至5个碳原子。“低级烯基”和“低级炔基”的链长为例如2-5个碳原子。

[0200] 术语“烷氧基”包括与氧原子共价连接的经取代和未经取代的烷基、烯基和炔基。烷氧基的实例包括甲氧基、乙氧基、异丙氧基、丙氧基、丁氧基和戊氧基。经取代的烷氧基的实例包括卤代烷氧基。烷氧基可以被独立选择的基团取代,例如烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷硫基羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸根合、次膦酸根合、氰基、氨基(包括烷基烷基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰胺基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸根合、氨磺酰基、磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或者芳族或杂芳族部分。卤素取代的烷氧基的实例包括但不限于氟甲氧基、二氟甲氧基、三氟甲氧基、氯甲氧基、二氯甲氧基、三氯甲氧基等。

[0201] 术语“疏水修饰”包括以下形式的碱基修饰,其中(1)碱基的整体疏水性显著增加,(2)碱基依然能够形成接近常规的沃森-克里克相互作用。碱基修饰的一些实例包括但不限于5-位尿苷和胞苷修饰,如苯基、4-吡啶基、2-吡啶基、吡啶基和异丁基、苯基(C₆H₅OH);色氨酸基(C₈H₆N)CH₂CH(NH₂)CO)、异丁基、丁基、氨基苄基;苯基;萘基,为了本发明的目的,术语“突出端”是指一个链或区域延伸超过与第一链或区域形成双链体之互补链末端而得到的末端非碱基配对核苷酸。能够通过氢键形成双链体的一个或更多个多核苷酸可以具有突出端。突出端的长度通常不超过5个碱基。

[0202] 术语“杂原子”包括碳或氢以外任何元素的原子。优选的杂原子是氮、氧、硫和磷。

[0203] 术语“氢氧基”或“羟基”包括具有-OH或-O-(具有合适的抗衡离子)的基团。

[0204] 术语“卤素”包括氟、溴、氯、碘等。术语“全卤化”通常是指其中所有氢被卤素原子取代的部分。

[0205] 术语“经取代”包括独立选择的取代基,所述取代基可以位于所述部分上并且允许分子执行其预期功能。取代基的实例包括烷基、烯基、炔基、芳基、(CR' R'')₀₋₃NR' R''、(CR' R'')₀₋₃CN、NO₂、卤素、(CR' R'')₀₋₃C(卤素)₃、(CR' R'')₀₋₃CH(卤素)₂、(CR' R'')₀₋₃CH₂(卤素)、(CR' R'')₀₋₃CONR' R''、(CR' R'')₀₋₃S(O)₁₋₂NR' R''、(CR' R'')₀₋₃CHO、(CR' R'')₀₋₃O(CR' R'')₀₋₃H、(CR' R'')₀₋₃S(O)₀₋₂R'、(CR' R'')₀₋₃O(CR' R'')₀₋₃H、(CR' R'')₀₋₃COR'、(CR' R'')₀₋₃CO₂R' 或(CR' R'')₀₋₃OR' 基团;其中每个R'和R''各自独立地为氢、C₁-C₅烷基、C₂-C₅烯基、C₂-C₅炔基或芳基,或者R'和R''一起

为亚苄基或 $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ 基团。

[0206] 术语“胺”或“氨基”包括其中氮原子与至少一个碳或杂原子共价结合的化合物或部分。术语“烷基氨基”包括其中氮与至少一个额外的烷基结合的基团和化合物。术语“二烷基氨基”包括其中氮原子与至少两个额外的烷基结合的基团。

[0207] 术语“醚”包括含有与两个不同碳原子或杂原子结合的氧的化合物或部分。例如，术语“烷氧基烷基”是指与氧原子共价结合的烷基、烯基或炔基，所述氧与另一个烷基共价结合。

[0208] 术语“多核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”、“核酸分子”、“核酸序列”和“寡核苷酸”是指两个或更多个核苷酸的聚合物。多核苷酸可以是DNA、RNA或其衍生物或经修饰形式。多核苷酸可以是单链或双链。多核苷酸可以例如在碱基部分、糖部分或磷酸酯骨架上修饰以改善分子的稳定性、其杂交参数等。多核苷酸可以包含经修饰碱基部分，所述经修饰碱基部分选自包括但不限于以下的组：5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰基胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基腺苷(queosine)、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基腺苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、wybutoxosine、假尿嘧啶、腺苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。多核苷酸可以包含经修饰糖部分(例如,2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、2'-O-甲基胞苷、阿拉伯糖和己糖)和/或经修饰磷酸酯部分(例如,硫代磷酸酯和5'-N-亚磷酰胺连接)。核苷酸序列通常携带遗传信息,包括细胞机器用于产生蛋白质和酶的信息。这些术语包括双链和单链基因组和cDNA、RNA、任何合成和遗传操作的多核苷酸以及有义和反义多核苷酸。这包括单链和双链分子,即DNA-DNA、DNA-RNA和RNA-RNA杂交体,以及通过碱基与氨基酸骨架缀合形成的“蛋白质核酸”“PNA”。

[0209] 术语“碱基”包括已知的嘌呤和嘧啶杂环碱基、脱氮嘌呤及其类似物(包括杂环取代的类似物,例如氨基乙氧基吩噻嗪)、衍生物(例如,1-烷基-、1-烯基-、杂芳族-和1-炔基衍生物)和互变异构体。嘌呤的实例包括腺嘌呤、鸟嘌呤、肌苷、二氨基嘌呤和黄嘌呤,及其类似物(例如,8-氧代-N⁶-甲基腺嘌呤或7-二氮杂黄嘌呤)和衍生物。嘧啶包括例如胸腺嘧啶、尿嘧啶和胞嘧啶,及其类似物(例如,5-甲基胞嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5-(1-丙炔基)尿嘧啶、5-(1-丙炔基)胞嘧啶和4,4-桥亚乙基胞嘧啶)。合适的碱基的其他实例包括非嘌呤基和非嘧啶碱基,例如2-氨基吡啶和三嗪类。

[0210] 在一个优选实施方案中,本发明的寡核苷酸的核单体是RNA核苷酸。在另一个优选实施方案中,本发明的寡核苷酸的核单体是经修饰RNA核苷酸。因此,寡核苷酸包含经修饰RNA核苷酸。

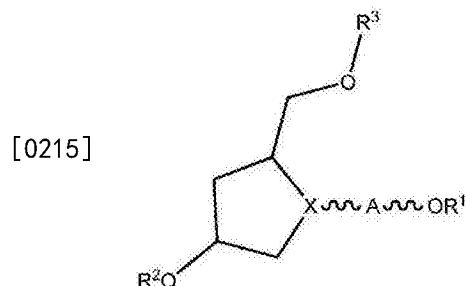
[0211] 术语“核苷”包含与糖部分、优选核糖或脱氧核糖共价连接的碱基。优选核苷的实例包括核糖核苷和脱氧核糖核苷。核苷还包括与氨基酸或氨基酸类似物连接的碱基,所述氨基酸或氨基酸类似物可以包含游离羧基、游离氨基或保护基。合适的保护基是本领域中

周知的(参见P.G.M.Wuts和T.W.Greene,“Protective Groups in Organic Synthesis”,第2版,Wiley-Interscience,New York,1999)。

[0212] 术语“核苷酸”包括进一步包含磷酸基团(phosphate group)或磷酸类似物的核苷。

[0213] 核酸分子可以与疏水部分缔合用于将分子靶向和/或递送至细胞。在某些实施方案中,疏水部分通过接头与核酸分子缔合。在某些实施方案中,缔合通过非共价相互作用。在另一些实施方案中,缔合通过共价键。本领域已知的任何接头可用于使核酸与疏水部分缔合。本领域中已知的接头描述在公开的国际PCT申请WO 92/03464、WO 95/23162、WO 2008/021157、WO 2009/021157、WO 2009/134487、WO 2009/126933、美国专利申请公开2005/0107325、美国专利5,414,077、美国专利5,419,966、美国专利5,512,667、美国专利5,646,126和美国专利5,652,359中,其通过引用并入本文。接头可以从简单至共价键合到多原子(multi-atom)接头。接头可以是环形的或无环的。接头可以是任选经取代的。在某些实施方案中,接头能够从核酸切掉。在某些实施方案中,接头能够在生理条件下杂交。在某些实施方案中,接头能够通过酶(例如酯酶或磷酸二酯酶)切掉。在某些实施方案中,接头包含用于将核酸与疏水部分分隔开的间隔元件。间隔元件可以包含1至30个碳或杂原子。在某些实施方案中,接头和/或间隔元件包含可质子化官能团。这样的可质子化官能团可以促进核酸分子的内体逃逸(endosomal escape)。可质子化官能团还可能有助于核酸向细胞递送,例如中和分子的全部电荷。在另一些实施方案中,接头和/或间隔元件是生物学惰性的(即,不影响所得核酸分子的生物学活性或功能)。

[0214] 在某些实施方案中,具有接头和疏水部分的核酸分子是本文所述的式。在某些实施方案中,核酸分子是下式:



[0216] 其中

[0217] X 是N或CH;

[0218] A 是键;经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的脂族;或者经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的杂脂族;

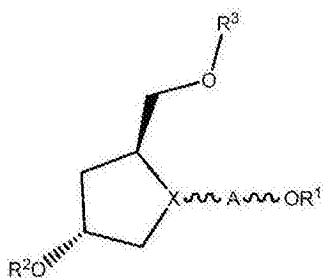
[0219] R^1 是疏水部分;

[0220] R^2 是氢;氧保护基;环形或无环的、经取代或未经取代的、支链或无支链的脂族;环形或无环的、经取代或未经取代的、支链或无支链的杂脂族;经取代或未经取代的、支链或无支链的芳基;经取代或未经取代的、支链或无支链的芳基;经取代或未经取代的、支链或无支链的杂芳基;并且

[0221] R^3 是核酸。

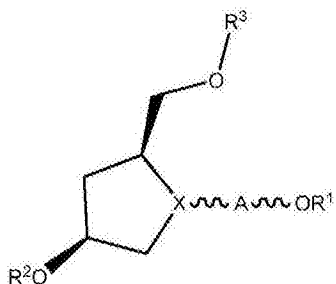
[0222] 在某些实施方案中,分子是下式:

[0223]



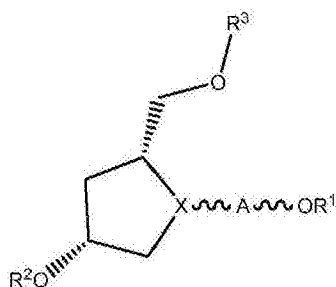
[0224] 在某些实施方案中,分子是下式:

[0225]



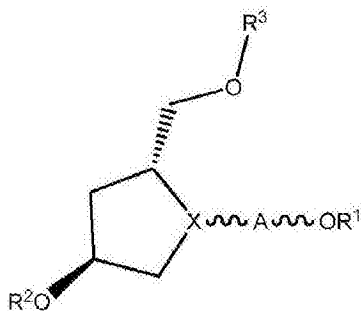
[0226] 在某些实施方案中,分子是下式:

[0227]



[0228] 在某些实施方案中,分子是下式:

[0229]

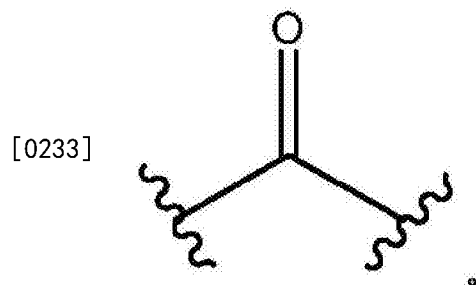


[0230] 在某些实施方案中,X是N。在某些实施方案中,X是CH。

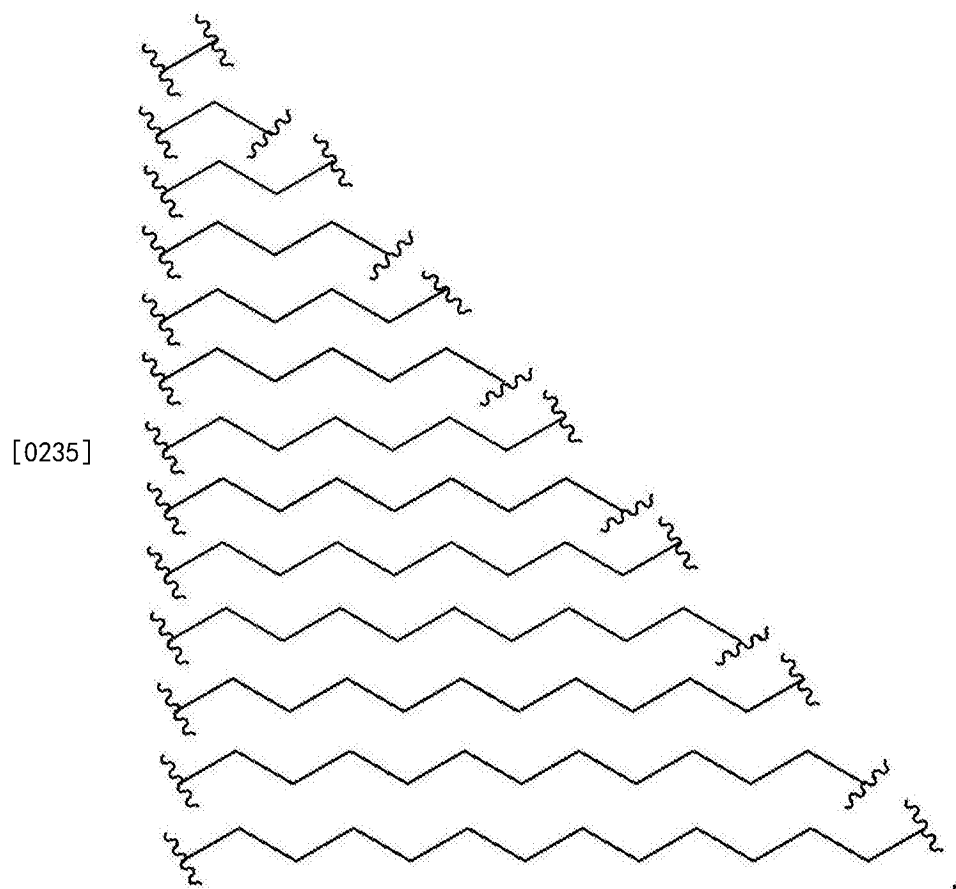
[0231] 在某些实施方案中,A是键。在某些实施方案中,A是经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的脂族。在某些实施方案中,A是无环的、经取代或未经取代的、支链或无支链的脂族。在某些实施方案中,A是无环的、经取代的、支链或无支链的脂族。在某些实施方案中,A是无环的、经取代的、无支链的脂族。在某些实施方案中,A是无环的、经取代、无支链的烷基。在某些实施方案中,A是无环的、经取代、无支链的C₁₋₂₀烷基。在某些实施方案中,A是无环的、经取代的、无支链的C₁₋₁₂烷基。在某些实施方案中,A是无环的、经取代的、无支链的C₁₋₁₀烷基。在某些实施方案中,A是无环的、经取代的、无支链的C₁₋₈烷基。在某些实施方案中,A是无环的、经取代的、无支链的C₁₋₆烷基。在某些实施方案中,A是经取代或未经

取代的、环形或无环的、支链或无支链的杂脂族。在某些实施方案中,A是无环的、经取代或未经取代的、支链或无支链的杂脂族。在某些实施方案中,A是无环的、经取代的、支链或无支链的杂脂族。在某些实施方案中,A是无环的、经取代的、无支链的杂脂族。

[0232] 在某些实施方案中,A是下式:

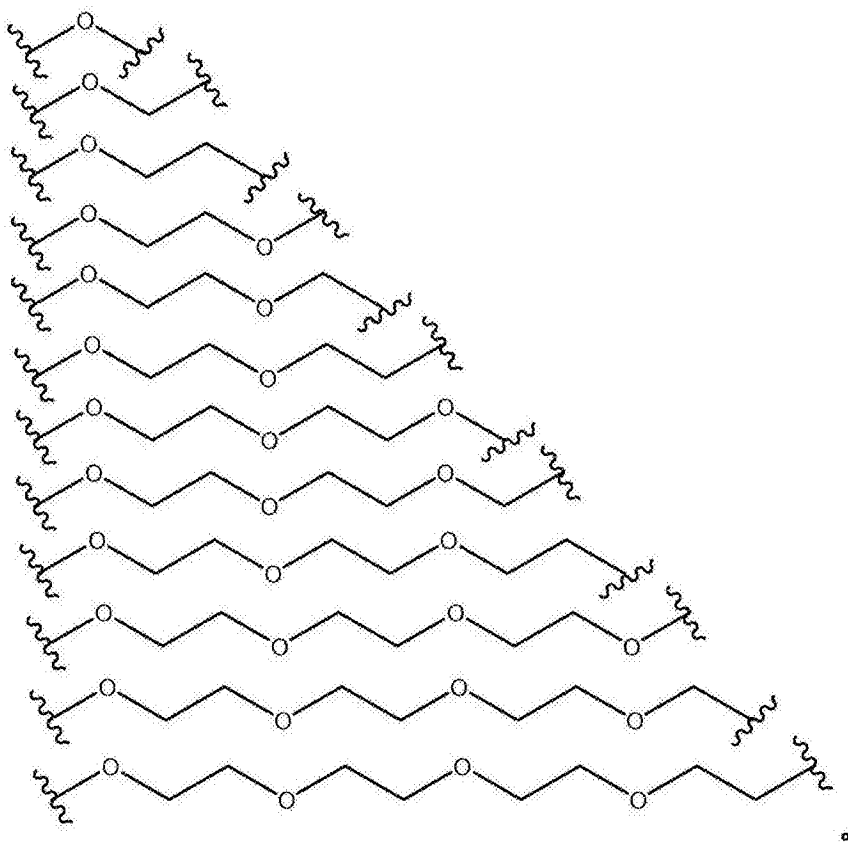


[0234] 在某些实施方案中,A是下式之一:



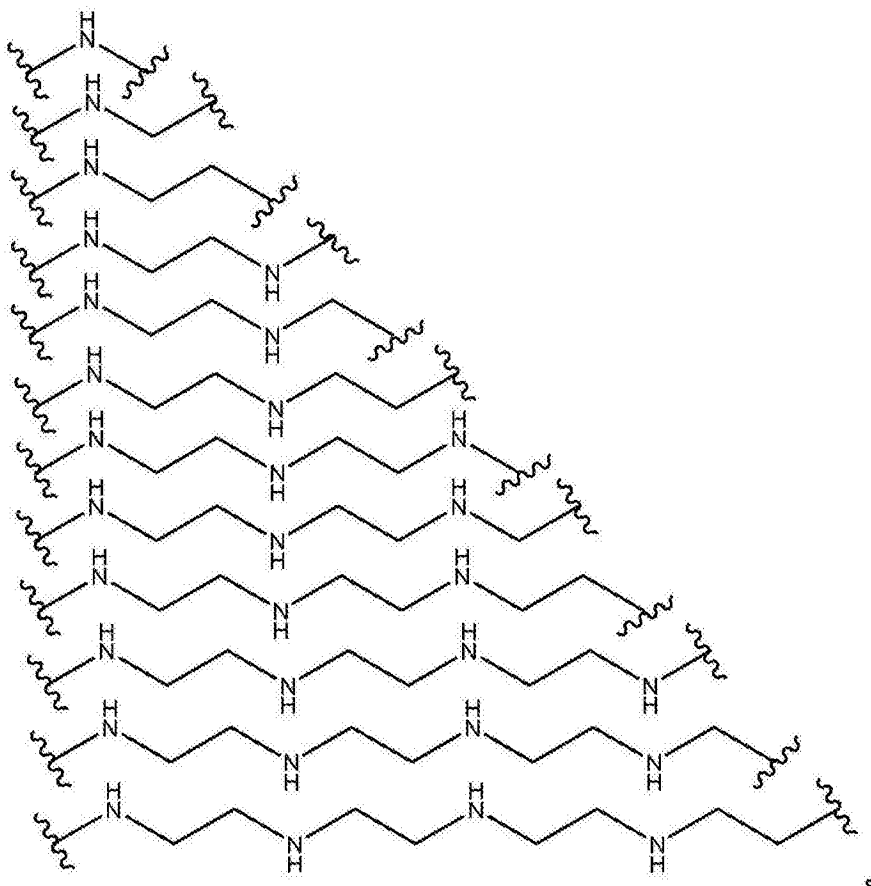
[0236] 在某些实施方案中,A是下式之一:

[0237]

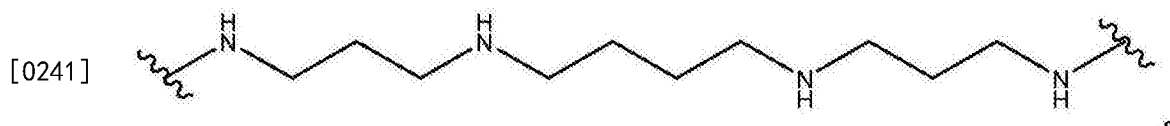


[0238] 在某些实施方案中,A是下式之一:

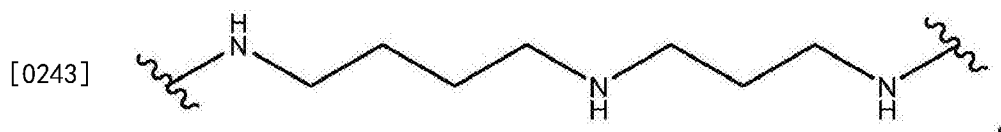
[0239]



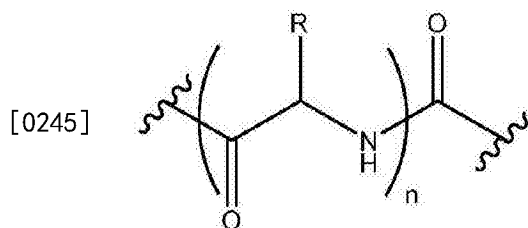
[0240] 在某些实施方案中,A是下式:



[0242] 在某些实施方案中,A是下式:



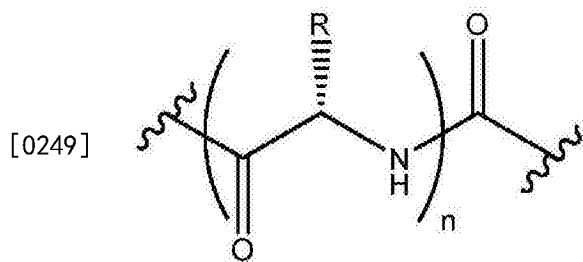
[0244] 在某些实施方案中,A是下式:



[0246] 其中

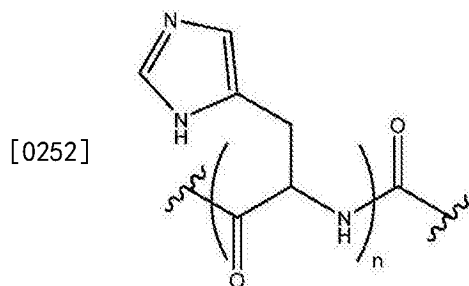
[0247] 每次出现的R独立地为天然或非天然氨基酸的侧链;并且

[0248] n是1至20的整数并且包括1和20。在某些实施方案中,A是下式:



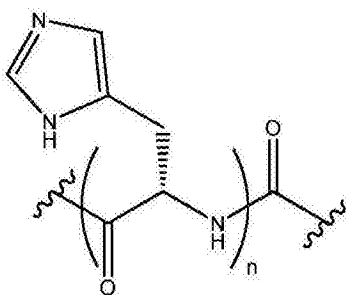
[0250] 在某些实施方案中,每次出现的R独立地为天然氨基酸的侧链。在某些实施方案中,n是1至15的整数并且包括1和15。在某些实施方案中,n是1至10的整数并且包括1和10。在某些实施方案中,n是1至5的整数并且包括1和5。

[0251] 在某些实施方案中,A是下式:



[0253] 其中n是1至20的整数并且包括1和20。在某些实施方案中,A是下式:

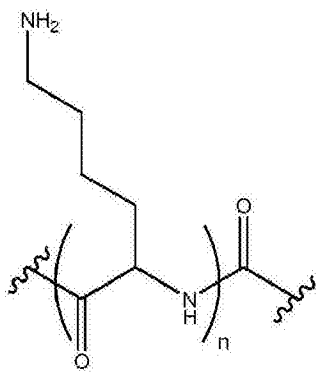
[0254]



[0255] 在某些实施方案中, n 是 1 至 15 的整数并且包括 1 和 15。在某些实施方案中, n 是 1 至 10 的整数并且包括 1 和 10。在某些实施方案中, n 是 1 至 5 的整数并且包括 1 和 5。

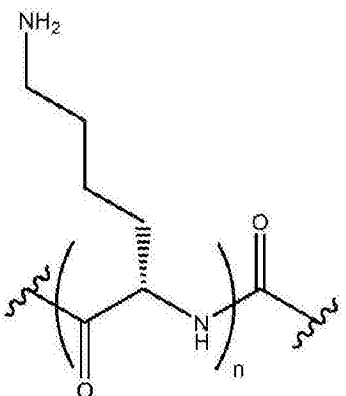
[0256] 在某些实施方案中, A 是下式:

[0257]



[0258] 其中 n 是 1 至 20 的整数并且包括 1 和 20。在某些实施方案中, A 是下式:

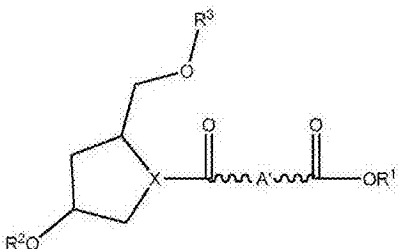
[0259]



[0260] 在某些实施方案中, n 是 1 至 15 的整数并且包括 1 和 15。在某些实施方案中, n 是 1 至 10 的整数并且包括 1 和 10。在某些实施方案中, n 是 1 至 5 的整数并且包括 1 和 5。

[0261] 在某些实施方案中, 分子是下式:

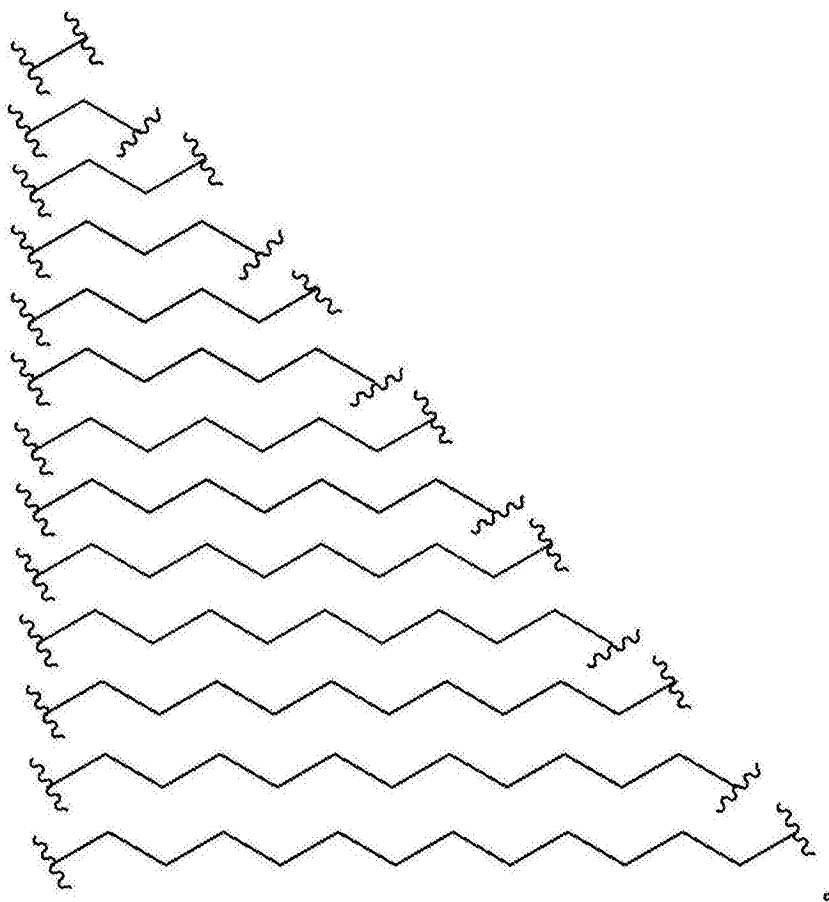
[0262]



[0263] 其中 X 、 R^1 、 R^2 和 R^3 如本文所定义; 并且

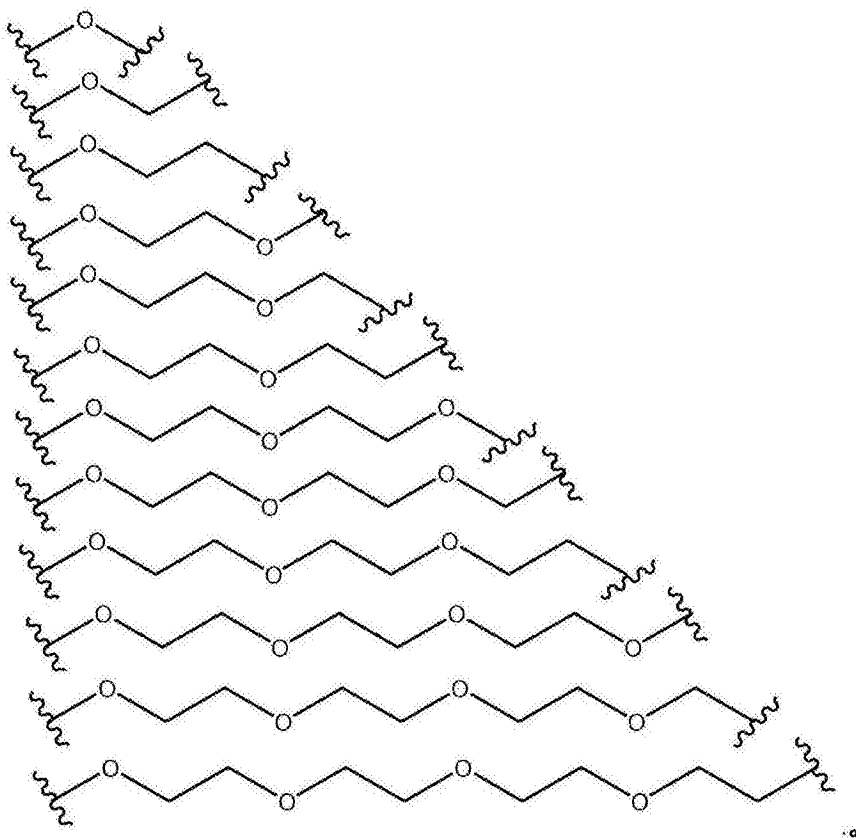
[0264] A' 是经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的脂族; 或者经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的杂脂族。

[0265] 在某些实施方案中, A' 是下式之一:



[0266]

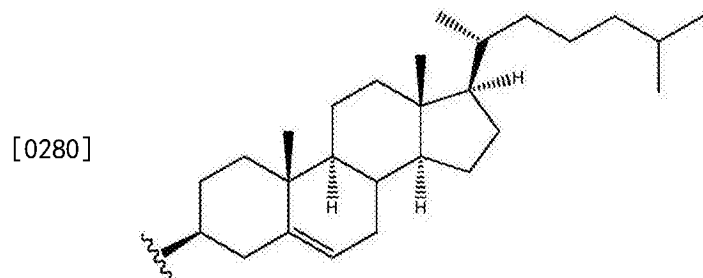
[0267] 在某些实施方案中, A 是下式之一:



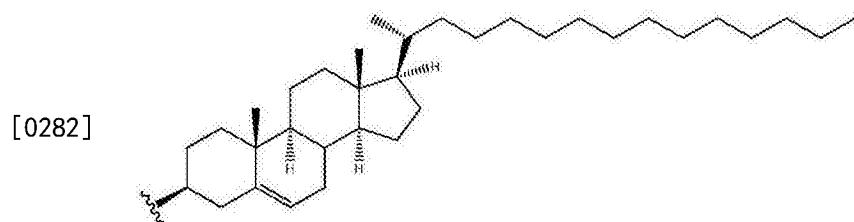
[0268]

[0278] 其中 R^A 是经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的脂族；或者经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的杂脂族。

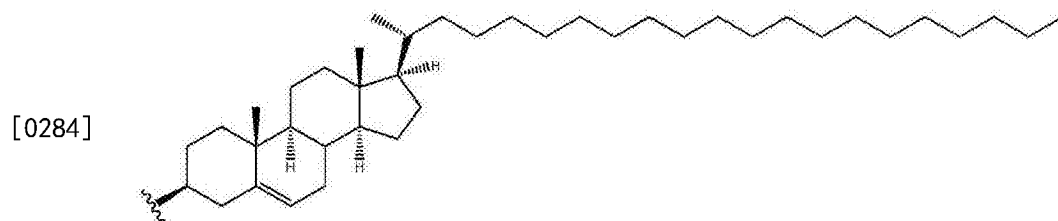
[0279] 在某些实施方案中， R^1 是下式：



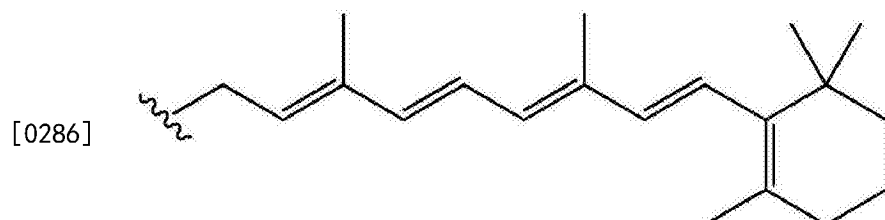
[0281] 在某些实施方案中， R^1 是下式：



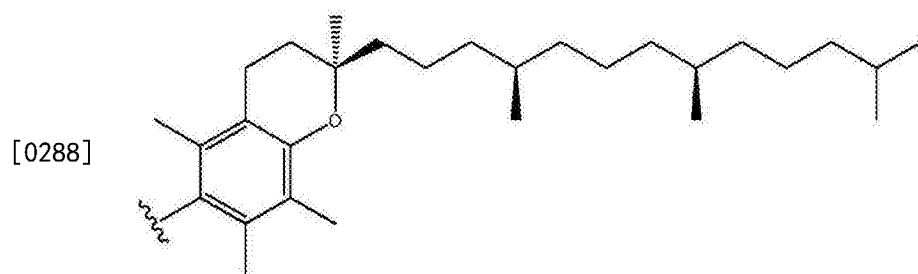
[0283] 在某些实施方案中， R^1 是下式：



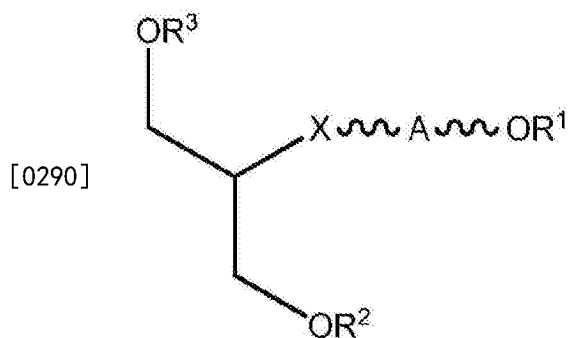
[0285] 在某些实施方案中， R^1 是下式：



[0287] 在某些实施方案中， R^1 是下式：



[0289] 在某些实施方案中，核酸分子是下式：



[0291] 其中

[0292] X是N或CH;

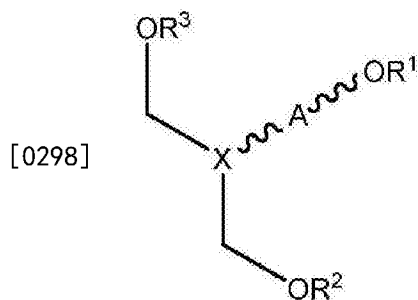
[0293] A是键;经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的脂族;或者经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的杂脂族;

[0294] R¹是疏水部分;

[0295] R²是氢;氧保护基;环形或无环的、经取代或未经取代的、支链或无支链的脂族;环形或无环的、经取代或未经取代的、支链或无支链的杂脂族;经取代或未经取代的、支链或无支链的芳基;经取代或未经取代的、支链或无支链的芳基;经取代或未经取代的、支链或无支链的杂芳基;并且

[0296] R³是核酸。

[0297] 在某些实施方案中,核酸分子是下式:



[0299] 其中

[0300] X是N或CH;

[0301] A是键;经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的脂族;或者经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的杂脂族;

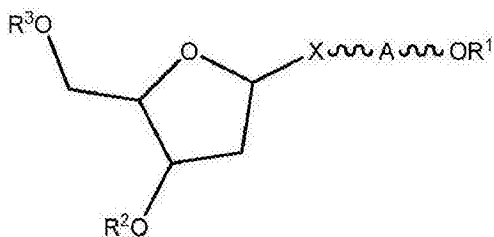
[0302] R¹是疏水部分;

[0303] R²是氢;氧保护基;环形或无环的、经取代或未经取代的、支链或无支链的脂族;环形或无环的、经取代或未经取代的、支链或无支链的杂脂族;经取代或未经取代的、支链或无支链的芳基;经取代或未经取代的、支链或无支链的芳基;经取代或未经取代的、支链或无支链的杂芳基;并且

[0304] R³是核酸。

[0305] 在某些实施方案中,核酸分子是下式:

[0306]



[0307] 其中

[0308] X是N或CH;

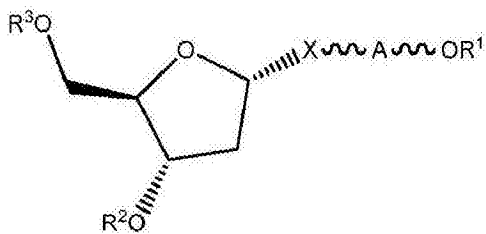
[0309] A是键;经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的脂族;或者经取代或未经取代的、环形或无环的、支链或无支链的杂脂族;

[0310] R¹是疏水部分;

[0311] R²是氢;氧保护基;环形或无环的、经取代或未经取代的、支链或无支链的脂族;环形或无环的、经取代或未经取代的、支链或无支链的杂脂族;经取代或未经取代的、支链或无支链的芳基;经取代或未经取代的、支链或无支链的芳基;经取代或未经取代的、支链或无支链的杂芳基;并且

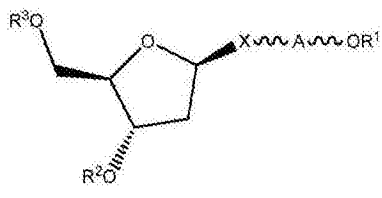
[0312] R³是核酸。在某些实施方案中,核酸分子是下式:

[0313]



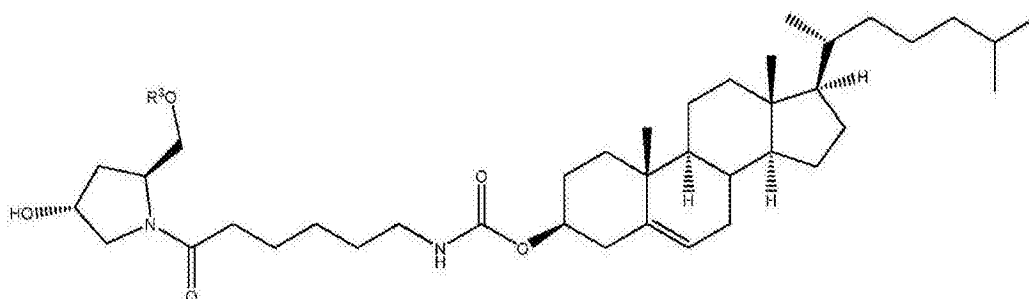
[0314] 在某些实施方案中,核酸分子是下式:

[0315]



[0316] 在某些实施方案中,核酸分子是下式:

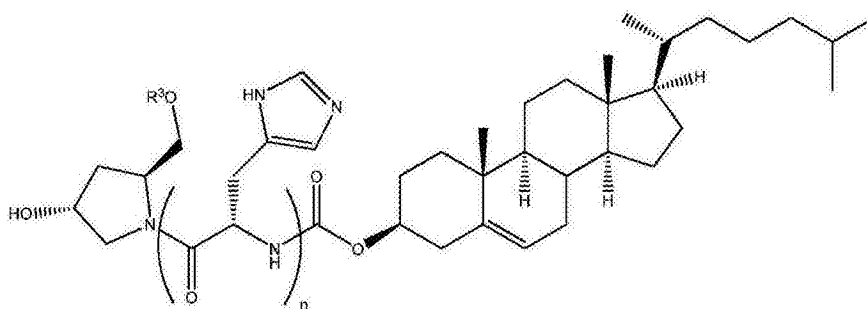
[0317]



[0318] 其中R³是核酸。

[0319] 在某些实施方案中,核酸分子是下式:

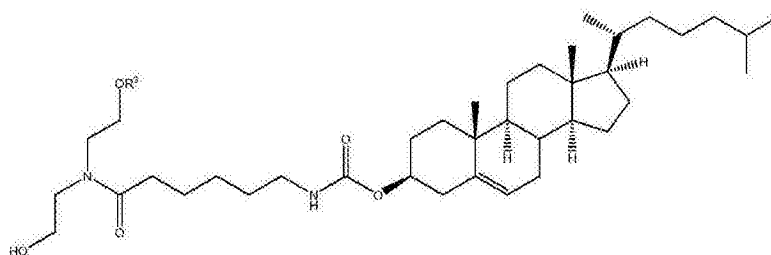
[0320]

[0321] 其中R³是核酸, 并且

[0322] n是1至20的整数并且包括1和20。

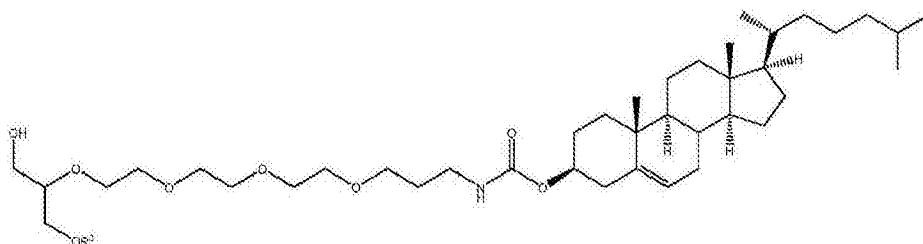
[0323] 在某些实施方案中, 核酸分子是下式:

[0324]



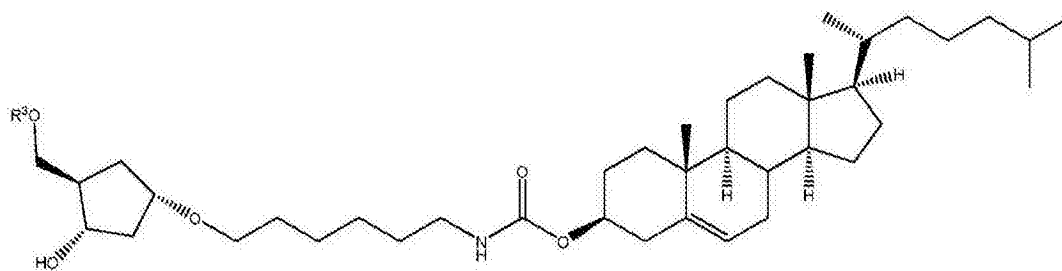
[0325] 在某些实施方案中, 核酸分子是下式:

[0326]



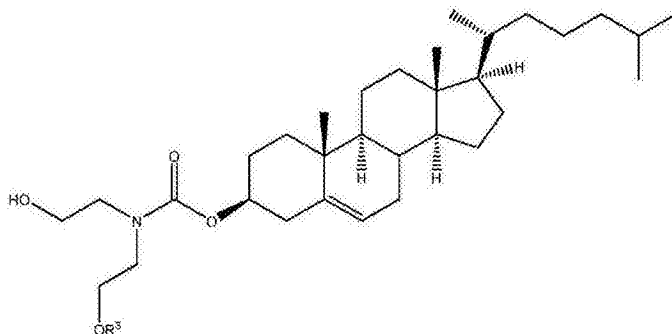
[0327] 在某些实施方案中, 核酸分子是下式:

[0328]

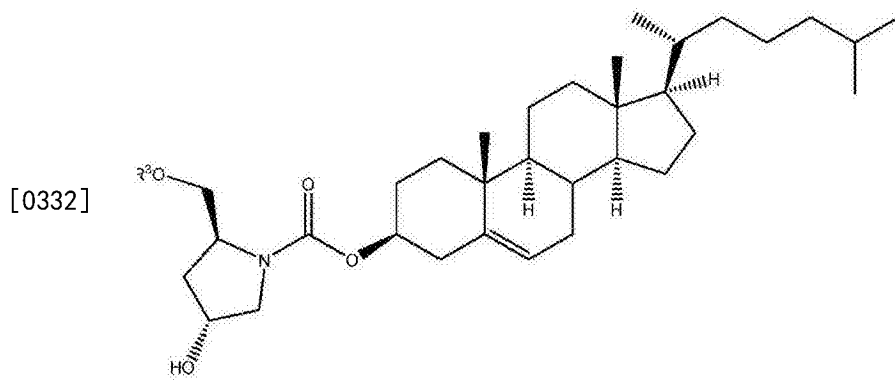


[0329] 在某些实施方案中, 核酸分子是下式:

[0330]



[0331] 在某些实施方案中, 核酸分子是下式:



[0333] 本文使用的术语“连接(linkage)”包括共价偶连相邻核单体的天然存在的未经修饰的磷酸二酯部分($-O-(PO^2-)-O-$)。本文使用的术语“替代连接(substitute linkage)”包括共价偶连相邻核单体的天然磷酸二酯基团的任何类似物或衍生物。替代连接包括磷酸二酯类似物,例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯,和P-乙氧基磷酸二酯、P-乙氧基磷酸二酯、P-烷氧基磷酸三酯、甲基磷酸酯以及不含磷的(nonphosphorus containing)连接,例如缩醛和酰胺。这样的替代连接是本领域中已知的(例如,Bjergarde等.1991.Nucleic Acids Res.19:5843;Caruthers等.1991.Nucleosides Nucleotides.10:47)。在某些实施方案中,优选不可水解连接,例如硫氮磷酸酯连接。

[0334] 在某些实施方案中,本发明寡核苷酸包含疏水修饰的核苷酸或“疏水修饰”。本文使用的“疏水修饰”是指经修饰以使得如下的碱基:(1)碱基的整体疏水性显著增加,和/或(2)碱基依然能够形成接近常规的沃森-克里克相互作用。碱基修饰的多种非限制性实例包括5位尿苷和胞苷修饰,如苯基、4-吡啶基、2-吡啶基、吡啶基和异丁基、苯基(C₆H₅OH);色氨酸基(C₈H₆N)CH₂CH(NH₂)CO)、异丁基、丁基、氨基苄基;苯基;和萘基。

[0335] 可以连接在sd-rxRNA的末端(3'或5'末端)、环区域或任何其他部分的另外类型的缀合物可包括固醇、固醇型分子、肽、小分子、蛋白质等。在一些实施方案中,sd-rxRNA可以含有超过一种缀合物(化学性质相同或不同)。在一些实施方案中,缀合物是胆固醇。

[0336] 提高靶基因特异性或者减少脱靶沉默效果的另外方法是在对应于引导序列的第二个5'端核苷酸的位置引入2'修饰(例如,2'-O甲基修饰)。这允许将这种2'修饰定位在Dicer抗性发夹结构的中,从而能够设计具有较小或无脱靶沉默的更好的RNAi构建体。

[0337] 在一个实施方案中,本发明的发夹多核苷酸可以包含为DNA的一个核酸部分和为RNA的一个核酸部分。本发明的反义(引导)序列可以是包含RNA样区域和DNA样区域的“嵌合寡核苷酸”。

[0338] 专用语“RNA酶H激活区域”包括能够募集RNA酶H以切割寡核苷酸所结合的靶RNA链的寡核苷酸(例如,嵌合寡核苷酸)区域。通常,RNA酶激活区域包含DNA或DNA样核单体的最小核心(至少约3至5、通常约3至12、更通常约5至12、以及更优选约5至10个连续核单体)(参见,例如美国专利No.5,849,902)。优选地,RNA酶激活区域包含约9个连续的含脱氧核糖的核单体。

[0339] 专用语“非激活区域”包括不能募集或激活RNA酶H的反义序列(例如,嵌合寡核苷酸)区域。本发明的寡核苷酸区域包含至少一个非激活区域。在一个实施方案中,非激活区域对于核酸酶可以是稳定的,或者可以通过与靶标互补并同待与寡核苷酸键合的靶核酸分子形成氢键来提供靶标特异性。

[0340] 在一个实施方案中,连续多核苷酸的至少一部分通过替代连接(例如,硫代磷酸酯连接)连接。

[0341] 在某些实施方案中,引导链(2'-修饰的或未修饰的)以外的大部分或全部核苷酸通过硫代磷酸酯连接。由于对于血清蛋白质的更高亲和力,这样的构建体倾向于具有改善的药代动力学。一旦引导链装载入RISC,多核苷酸的非引导序列部分中的硫代磷酸酯连接通常不干扰引导链活性。

[0342] 本发明的反义(引导)序列可以包含“吗啉代寡核苷酸”。吗啉代寡核苷酸是非离子的并且通过不依赖于RNA酶H的机制起作用。吗啉代寡核苷酸的四种遗传碱基(腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和胸腺嘧啶/尿嘧啶)中的每一种与6元吗啉环连接。吗啉代寡核苷酸通过将4种不同类型亚基经例如非离子的二氨基磷酸盐亚基间连接连结来制备。吗啉代寡核苷酸具有许多优点,包括:完全抗核酸酶(Antisense&Nucl. Acid Drug Dev.1996.6:267);可预测的靶向(Biochemica Biophysica Acta.1999.1489:141);细胞中的可靠活性(Antisense&Nucl. Acid Drug Dev.1997.7:63);优异序列特异性(Antisense&Nucl. Acid Drug Dev.1997.7:151);最小非反义活性(Biochemica Biophysica Acta.1999.1489:141);以及简单的渗透或刮擦递送(Antisense&Nucl. Acid Drug Dev.1997.7:291)。吗啉代寡核苷酸还由于其在高剂量时无毒性而成为优选的。关于吗啉代寡核苷酸的制备的讨论可见于Antisense&Nucl. Acid Drug Dev.1997.7:187。

[0343] 基于本文描述的数据,认为本文所述的化学修饰有利于单链多核苷酸装载入RISC。已经表明单链多核苷酸在装载入RISC中时有活性并且诱导基因沉默。但是与双链体多核苷酸比较时,单链多核苷酸的活性水平似乎低2至4个数量级。

[0344] 本发明提供了对化学修饰模式的描述,其可以(a)显著提高单链多核苷酸的稳定性,(b)促进多核苷酸有效装载入RISC复合物,以及(c)提高细胞对单链核苷酸的摄取。图5提供了化学修饰模式的一些非限制性实例,其可有益于在细胞内实现单链多核苷酸的效力。化学修饰模式可以包括核糖、骨架、疏水核苷和缀合物类型之修饰的组合。另外,在一些实施方案中,单多核苷酸的5'端可以是化学磷酸化的。

[0345] 在另一些实施方案中,本发明提供了对化学修饰模式的描述,其改善RISC抑制多核苷酸的功能。已经表明单链多核苷酸通过底物竞争机制抑制预装载的RISC复合物的活性。对于这些类型的分子(通常称为拮抗剂),活性通常需要高浓度,并且体内递送不是非常有效。本发明提供了对化学修饰模式的描述,其可以(a)显著提高单链多核苷酸的稳定性,(b)促进作为底物的多核苷酸被RISC有效识别,和/或(c)提高细胞对单链核苷酸的摄取。化学修饰模式可以包括核糖、骨架、疏水核苷和缀合物类型之修饰的组合。

[0346] 本发明提供的修饰适用于所有多核苷酸。这包括单链RISC进入多核苷酸、单链RISC抑制多核苷酸、可变长度(15-40bp)的常规双链体多核苷酸、不对称双链多核苷酸等。多核苷酸可以以多种化学修饰模式修饰,包括5'端、核糖、骨架和疏水核苷修饰。

[0347] 合成

[0348] 本发明的寡核苷酸可以通过本领域中已知的任何方法合成,例如使用酶促合成和/或化学合成。寡核苷酸可以在体外(例如,使用酶促合成和化学合成)或体内(使用本领域公知的重组DNA技术)合成。

[0349] 在一个优选实施方案中,将化合合成用于经修饰的多核苷酸。线性寡核苷酸的化

学合成是本领域中公知的,可以通过溶液相或固相技术实现。优选地,通过固相方法合成。可以使用多种不同合成方法中的任一种制备寡核苷酸,包括亚磷酰胺、亚磷酸三酯、H-磷酸酯和磷酸三酯方法,通常通过自动合成方法。

[0350] 寡核苷酸合成方案是本领域中公知的,可以见于例如:美国专利No.5,830,653;WO 98/13526;Stec等.1984.J.Am.Chem.Soc.106:6077;Stec等.1985.J.Org.Chem.50:3908;Stec等.J.Chromatog.1985.326:263;LaPlanche等.1986.Nucl.Acids.1986.14:9081;Fasman G.D.,1989.Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology.1989.CRC Press,Boca Raton,Fla.;Lamone.1993.Biochem.Soc.Trans.21:1;美国专利No.5,013,830;美国专利No.5,214,135;美国专利No.5,525,719;Kawasaki等.1993.J.Med.Chem.36:831;WO 92/03568;美国专利No.5,276,019;和美国专利No.5,264,423。

[0351] 所选择的合成方法可取决于期望的寡核苷酸长度,并且这样的选择在本领域一般技术人员能力之内。例如,亚磷酰胺和亚磷酸三酯方法可以产生具有175或更多个核苷酸的寡核苷酸,而H-磷酸酯方法很好的用于小于100个核苷酸的寡核苷酸。如果向寡核苷酸中并入经修饰碱基,特别是如果使用经修饰磷酸二酯连接,则根据需要按照已知流程改变合成流程。在这一点上,Uhlmann等.(1990,Chemical Reviews 90:543-584)提供了用于制备具有经修饰碱基和经修饰磷酸二酯连接的寡核苷酸的参考和概括流程。用于制备寡核苷酸的其他示例性方法在Souveaux.1994.“Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis”;Agrawal.Methods in Molecular Biology 26:1中教导。示例性合成方法还在“Oligonucleotide Synthesis-A Practical Approach”(Gait,M.J.IRL Press at Oxford University Press.1984)中教导。另外,限定序列的线性寡核苷酸,包括具有经修饰核苷酸的一些序列,可以从多种商业来源容易获得。

[0352] 寡核苷酸可以通过聚丙烯酰胺凝胶电泳,或者通过任何数目的色谱方法(包括凝胶色谱和高压液相色谱)来纯化。为了确认核苷酸序列,尤其是未经修饰的核苷酸序列,可以通过任意已知方法对寡核苷酸进行DNA测序,包括Maxam和Gilbert测序、Sanger测序、毛细管电泳测序、漂移斑点测序方法(wandering spot sequencing procedure)或者通过使用与Hybond纸结合的寡核苷酸的选择性化学降解。还可以通过激光解吸质谱或快原子轰击来分析短寡核苷酸的序列(McNeal,等.,1982,J.Am.Chem.Soc.104:976;Viari,等.,1987,Biomed.Environ.Mass Spectrom.14:83;Grotjahn等.,1982,Nuc.Acids.10:4671)。测序方法也适用于RNA寡核苷酸。

[0353] 可以通过毛细管电泳测试寡核苷酸,并使用例如Bergot和Egan.1992.J.Chrom.599:35的方法通过变性强阳离子HPLC(SAX-HPLC)来确认合成的寡核苷酸的质量。

[0354] 其他示例性合成技术是本领域中公知的(参见,例如,Sambrook等.,Molecular Cloning:a Laboratory Manual,Second Edition(1989);DNA Cloning,第I和II卷(DN Glover Ed.1985);Oligonucleotide Synthesis(M J Gait Ed,1984;Nucleic Acid Hybridisation(B D Hames and S J Higginseds.1984);A Practical Guide to Molecular Cloning(1984);或者Methods in Enzymology系列(Academic Press,Inc.))。

[0355] 在某些实施方案中,本发明RNAi构建体或者其至少一部分转录自编码本发明构建

体的表达载体。任何本领域认识的载体都可用于该目的。转录的RNAi构建体可以被分离和纯化,之后进行期望的修饰(例如,将未经修饰的有义链替换成经修饰的有义链,等等)。

[0356] 递送/载体

[0357] 细胞对寡核苷酸的摄取

[0358] 寡核苷酸和寡核苷酸组合物接触(即,使接触,在本文中也称为施用或递送到)一个/种或更多个/种细胞或细胞裂解物并且被其摄取。术语“细胞”包括原核细胞和真核细胞,优选脊椎动物细胞,更优选哺乳动物细胞。在一个优选实施方案中,使本发明的寡核苷酸组合物接触人细胞。

[0359] 本发明的寡核苷酸组合物可以在体外(例如在试管或培养皿中)(并且可以引入或不引入对象)或者在体内(例如在对象如哺乳动物对象中)接触细胞。细胞通过内吞作用以低的速度摄取寡核苷酸,但是内吞的寡核苷酸通常被隔绝并且不能用于例如与靶核酸分子杂交。在一个实施方案中,可以通过电穿孔或磷酸钙沉淀促进细胞摄取。但是,这些方法仅可用于体外或离体实施方案,不方便并且在一些情况下与细胞毒性有关。

[0360] 在另一个实施方案中,可以通过合适的本领域认可的方法增强寡核苷酸向细胞的递送,包括磷酸钙、DMSO、甘油或右旋糖酐、电穿孔,或者通过例如使用阳离子、阴离子或中性脂质组合物或者脂质体使用本领域中已知方法的转染(参见,例如WO 90/14074;WO 91/16024;WO 91/17424;美国专利No.4,897,355;Bergan等.1993.Nucleic Acids Research.21:3567)。寡核苷酸的增强的递送也可以使用载体(参见,例如Shi, Y.2003.Trends Genet 2003Jan.19:9;Reichhart J M等.Genesis.2002.34(1-2):1604,Yu等.2002.Proc.Natl.Acad Sci.USA 99:6047;Sui等.2002.Proc.Natl.Acad Sci.USA 99:5515)、病毒、多胺或聚阳离子缀合物,使用化合物例如多赖氨酸、鱼精蛋白或Ni,N12-双(乙基)精胺(参见,例如参见,例如Bartzatt,R.等.1989.Biotechnol.Appl.Biochem.11:133;Wagner E.等.1992.Proc.Natl.Acad.Sci.88:4255)来介导。

[0361] 在某些实施方案中,本发明的sd-rxRNA可以使用多种含 β -葡聚糖的颗粒来递送,所述颗粒被称为GeRP(封装有葡聚糖的负载RNA的颗粒),描述在通过引用并入的2010年3月4日提交的题为“Formulations and Methods for Targeted Delivery to Phagocyte Cells.”的美国临时申请No.61/310,611中。这样的颗粒还描述在通过引用并入的美国专利公开US 2005/0281781 A1和US 2010/0040656,2014年4月26日授权的题为Phagocytic Cell Delivery of RNAi的美国专利No.8,815,818,以及PCT公开WO 2006/007372和WO 2007/050643中。sd-rxRNA分子可以是疏水修饰的并且任选地可以与脂质和/或两亲性肽缔合。在某些实施方案中, β -葡聚糖颗粒来源于酵母。在某些实施方案中,有效负载捕获分子是聚合物,例如分子量为至少约1000Da、10,000Da、50,000Da、100kDa、500kDa等的那些。优选的聚合物包括(但不限于)阳离子聚合物、壳聚糖或PEI(聚乙烯亚胺)等。

[0362] 葡聚糖颗粒可以来源于真菌细胞壁(如酵母细胞壁)的不溶性组分。在一些实施方案中,酵母是Baker酵母。酵母来源的葡聚糖分子可以包含 β -(1,3)-葡聚糖、 β -(1,6)-葡聚糖、甘露聚糖和几丁质中的一种或更多种。在一些实施方案中,葡聚糖颗粒包含中空酵母细胞壁,从而使颗粒保持类似细胞的三维结构,其中其可以络合(complex)或封装分子如RNA分子。与使用酵母细胞壁颗粒有关的一些优点是组分的可用性、其可生物降解性质及其靶向吞噬细胞的能力。

[0363] 在一些实施方案中,葡聚糖颗粒可以通过从细胞壁中提取不可溶组分来制备,例如通过用1M NaOH/pH 4.0H₂O提取Baker酵母(Fleischmann's),然后洗涤并且干燥。制备酵母细胞壁颗粒的方法在通过引用并入的以下文献中讨论:美国专利4,810,646、4,992,540、5,082,936、5,028,703、5,032,401、5,322,841、5,401,727、5,504,079、5,607,677、5,968,811、6,242,594、6,444,448、6,476,003,US专利公开2003/0216346、2004/0014715和2010/0040656,以及PCT公开申请W002/12348。

[0364] 用于制备葡聚糖颗粒的方案还描述在通过引用并入的以下文献中:Soto和Ostroff(2008),“Characterization of multilayered nanoparticles encapsulated in yeast cell wall particles for DNA delivery.”*Bioconjug Chem* 19(4):840-8;Soto和Ostroff(2007),“Oral Macrophage Mediated Gene Delivery System,”*Nanotech*,第2卷,第5章(“Drug Delivery”),第378-381页;以及Li等.(2007),“Yeast glucan particles activate murine resident macrophages to secrete proinflammatory cytokines via MyD88-and Syk kinase-dependent pathways.”*Clinical Immunology* 124(2):170-181。

[0365] 包含葡聚糖的颗粒,例如酵母细胞壁颗粒还可以从商业获得。多个非限制性实例包括:Nutricell MOS 55,来自Biorigin(Sao Paulo,Brazil)、SAF-Mannan(SAF Agri, Minneapolis,Minn.)、Nutrex(Sensient Technologies,Milwaukee,Wis.),碱提取的颗粒,例如Nutricepts(Nutricepts Inc.,Burnsville,Minn.)和ASA Biotech生产的那些,来自Biopolymer Engineering的酸提取的WGP颗粒,以及有机溶剂提取颗粒,例如来自Alpha-beta Technology,Inc.(Worcester,Mass.)的AdjuvaxTM以及来自Novogen(Stamford, Conn.)的微粒葡聚糖。

[0366] 根据生产和/或提取方法,葡聚糖颗粒,例如酵母细胞壁颗粒可以具有不同的纯度水平。在一些情况下,将颗粒碱提取、酸提取或有机溶剂提取以移除细胞内组分和/或细胞壁的外甘露糖蛋白层。这样的方案可以产生葡聚糖(w/w)含量为50%-90%的颗粒。在一些情况下,可优选的是较低纯度的颗粒,意味着较低葡聚糖w/w含量,而在另一些实施方案中,可优选较高纯度的颗粒,意味着较高葡聚糖w/w含量。

[0367] 葡聚糖颗粒,例如酵母细胞壁颗粒,可以具有天然脂质含量。例如,颗粒可以含有1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%或大于20%w/w的脂质。在实施例部分,测试了两个葡聚糖颗粒批次的效力:YGP SAF和YGP SAF+L(含有天然脂质)。在一些情况下,天然脂质的存在可有助于RNA分子的络合(complexation)或捕获。

[0368] 含葡聚糖的颗粒的直径通常为约2-4微米,但是直径小于2微米或大于4微米的颗粒也适用于本发明的一些方面。

[0369] 待递送的RNA分子络合或“捕获”在葡聚糖颗粒的壳内。可以对颗粒的壳或RNA组分标记以用于可视化,例如通过引用并入的Soto and Ostroff(2008)*Bioconjug Chem* 19: 840中描述的。下面将进一步讨论负载GeRP的方法。

[0370] 用于摄取寡核苷酸的最佳方案取决于多种因素,最关键的是所使用的细胞的类型。对于摄取来说重要的其他因素包括但不限于寡核苷酸的性质和浓度、细胞的汇合、细胞所处的培养类型(例如悬浮培养或平板)以及细胞生长的培养基的类型。

[0371] 包封剂

[0372] 包封剂将寡核苷酸捕获到囊泡中。在本发明的另一个实施方案中,如本领域技术人员理解的,寡核苷酸可以与载体或载剂(例如脂质体或胶束)缔合,但是可以使用其他载体。脂质体是由脂双层制备的具有类似于生物膜的结构囊泡。这样的载体可用于促进细胞摄取或寡核苷酸靶向,或者改善寡核苷酸药代动力学或毒物学特性。

[0373] 例如,本发明的寡核苷酸也可以封装在脂质体、药物组合物中施用,其中活性成分包含在(分散在或以不同方式存在于)由粘附在脂质层上的水性同心层组成的小体(corpuscles)中。根据溶解性,寡核苷酸可以存在于水性层或脂质层中,或者存在于通常被称为脂质体悬液的地方。疏水层(通常但不排他地)包含:磷脂,例如卵磷脂和鞘磷脂,甾族化合物,例如胆固醇,或多或少的离子表面活性剂,例如二乙酰基磷酸酯、十八胺或磷脂酸,或者其他疏水性物质。脂质体的直径通常为约15nm至约5微米。

[0374] 使用脂质体作为药物递送载剂提供了多种优点。脂质体提高细胞内稳定性、提高摄取效率并且改善生物活性。脂质体是由脂质组成的中空球状囊泡,所述脂质以类似于构成细胞膜的那些脂质的方式排列。其具有用于截留水溶性化合物的内部水性空间,直径大小为0.05微米至数微米。多个研究已经表明,脂质体可以向细胞递送核酸并且核酸保持生物活性。例如,最初被设计为研究工具的脂质递送载剂,例如Lipofectin或LIPOFECTAMINE™ 2000可以向细胞递送完整核酸分子。

[0375] 使用脂质体的具体优点包括以下:其为非毒性的并且在组成上生物可降解;其表现出长的循环半衰期;并且识别分子可以容易地连接到其表面以用于靶向组织。最后,无论是在液体悬液还是在冻干产品中,制备基于脂质体之药物的成本效益已经证明了这种技术组作为可接受的药物递送系统的可行性。

[0376] 在一些方面,与本发明有关的制剂可以选择一类天然存在的或化学合成或修饰的饱和和不饱和脂肪酸残基。脂肪酸可以以甘油三酯、甘油二酯或独立脂肪酸的形式存在。在另一个实施方案中,可以使用充分确认的目前在药理学中使用的用于肠外营养药物的脂肪酸和/或脂肪乳剂的混合物。

[0377] 基于脂质体的制剂广泛用于寡核苷酸递送。但是,大部分市售脂质或脂质体制剂包含至少一种带正电荷的脂质(阳离子脂质)。这种带正电荷的脂质的存在被认为是获得高寡核苷酸负载度和增强脂质体融合特性所必需的。已经进行和公开了多种方法来鉴定最佳的带正电荷的脂质化学物质。但是,含有阳离子脂质的市售脂质体制剂以高的毒性水平为特征。体内有限的治疗指数已经揭示,在比实现RNA沉默所需浓度稍高的浓度下,含有带正电荷脂质的脂质体制剂与毒性有关(即,肝酶升高)。

[0378] 与本发明有关的核酸可以疏水修饰并且可以包含在中性纳米运载体中。中性纳米运载体的进一步描述在通过引用并入的2009年9月22日提交的题为“Neutral Nanotransporters”的PCT申请PCT/US2009/005251,以及2011年9月29日提交的题为“Neutral Nanotransporters”的美国专利公开No.US2011/0237522中。这样的颗粒能够量化并入不带电荷的脂质混合物中的寡核苷酸。这种中性纳米运载体中没有毒性水平的阳离子脂质是重要特征。

[0379] 如PCT/US2009/005251中证明的,寡核苷酸可以有效并入不含阳离子脂质的脂质混合物中,并且这样的组合物可以以功能性方式向细胞有效递送治疗性寡核苷酸。例如,当脂质混合物由磷脂酰胆碱碱性脂肪酸和固醇如胆固醇构成时,观察到高的活性水平。例如,

中性脂肪酸的一种优选制剂由至少20%DOPC或DSPC和至少20%固醇如胆固醇构成。发现即使低至1:5的脂质寡核苷酸比对于寡核苷酸在不带电荷的制剂中的完全封装也是足够的。

[0380] 中性纳米运载体组合物能够将寡核苷酸有效负载到中性脂肪制剂中。这些组合物包含以一定方式修饰的寡核苷酸,以使得分子的疏水性升高(例如,将疏水性分子连接(共价或非共价)到寡核苷酸末端或非末端核苷酸、碱基、糖或骨架上的疏水性分子上),经修饰寡核苷酸与中性脂肪制剂(例如,含有至少25%胆固醇和25%DOPC或其类似物)混合。货物分子,例如另外的脂质,也可以包含在组合物中。这种组合物(其中制剂的一部分被构建在寡核苷酸本身中)能够将寡核苷酸有效封装到中性脂质颗粒中。

[0381] 在一些方面,在疏水寡核苷酸与优选制剂络合后,可以形成大小为50至140nm的稳定颗粒。有趣的是需提到,制剂本身通常不形成小颗粒,而是形成团聚体,其在添加经疏水修饰的寡核苷酸后转化成稳定的50-120nm颗粒。

[0382] 本发明的中性纳米运载体组合物包含经疏水修饰的多核苷酸、中性脂肪混合物和任选的货物分子。本文使用的“经疏水修饰的多核苷酸”是具有至少一个修饰的本发明的多核苷酸(即, sd-rxRNA),所述修饰使多核苷酸比修饰前的多核苷酸疏水性更高。可以通过向多核苷酸连接(共价或非共价)疏水分子来实现修饰。在一些情况下,疏水分子是或包含亲脂性基团。

[0383] 术语“亲脂性基团”意指对于脂质的亲和力比其对于水的亲和力更高的基团。亲脂性基团的实例包括但不限于:胆固醇、胆甾烯基或经修饰的胆甾烯基残基、金刚烷(adamantine)、双氢睾酮(dihydrotestosterone)、长链烷基、长链烯基、长链炔基、油烯基-石胆酸(olely-lithocholic)、胆烯基(cholenic)、油酰基-胆烯基、棕榈基、十七基、肉豆蔻基、胆汁酸、胆酸或牛黄胆酸、脱氧胆酸盐、油烯基石胆酸、油酰基胆烯酸、糖脂、磷脂、鞘脂、类异戊二烯、例如甾族化合物、维生素,例如微生物E、饱和或不饱和脂肪酸,脂肪酸酯如甘油三酯,苾、卟啉、Texaphyrine、金刚烷(adamantane)、吡啶、生物素、香豆素、荧光素、罗丹明、Texas-Red、洋地黄毒苷、二甲氧基三苯甲基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、花青染料(例如, Cy3或Cy5)、Hoechst 33258染料、补骨脂素或布洛芬。胆固醇部分可以是还原的(例如,在胆甾烷中)或可以是取代的(例如,通过卤素)。一个分子中不同亲脂性基团的组合也是可能的。

[0384] 疏水分子可以连接在多核苷酸的多个位置。如上所述的,疏水分子可以连接至寡核苷酸的末端残基,例如多核苷酸的3'端或5'端。或者,其可以连接至多核苷酸的内部核苷酸或支链上的核苷酸。疏水分子可以连接至例如核苷酸的2'位置。疏水分子也可以连接至多核苷酸的核苷酸的杂环碱基、糖或骨架。

[0385] 疏水分子可以通过接头部分连接至多核苷酸。任选地,接头部分是非核苷酸接头部分。非核苷酸接头是例如无碱基残基(dSpacer);寡聚乙二醇(oligoethyleneglycol),例如三乙二醇(间隔物9)或六乙二醇(间隔物18);或烷烃二醇,例如丁二醇。间隔单元优选地通过磷酸二酯或硫代磷酸酯键连接。接头单元可以在分子中仅出现一次,或者可以并入多次,例如通过磷酸二酯、硫代磷酸酯、甲基磷酸酯或酰胺连接。

[0386] 通常缀合方案涉及合成在序列的一个或更多个位置具有氨基接头的多核苷酸,但是接头不是必须的。然后使用合适的偶联剂或活化剂使氨基与缀合的分子反应。缀合反应可以在多核苷酸依然结合在固相支持物上或者在溶液相中切割多核苷酸后进行。通常通过

HPLC纯化经修饰多核苷酸导致纯材料。

[0387] 在一些实施方案中,疏水分子是固醇型缀合物、植物固醇(PhytoSterol)缀合物、胆固醇缀合物、具有改变的侧链长度的固醇型缀合物、脂肪酸缀合物、任何其他疏水基团缀合物、和/或内部核苷的疏水修饰,其提供足够的疏水性以并入胶束。

[0388] 对于本发明目的,术语“固醇”或甾族化合物醇是指在A环的3位具有羟基的甾族化合物亚类。其为通过HMG-CoA还原酶途径由乙酰辅酶A合成的两亲性脂质。整体分子是相当平的。A环上的羟基部分是极性的。脂族链的其余部分是非极性的。通常,固醇被认为在位置17具有8碳链。

[0389] 为了本发明目的,术语“固醇型分子”是指在结构上与固醇类似的甾族化合物醇。主要差异是环的结构和位置21连接的侧链中碳的数目。

[0390] 为了本发明目的,术语“植物固醇”(也称为植物甾醇)是植物中天然存在的一类甾族化合物醇(植物化学物质)。有超过200种不同的已知植物固醇。

[0391] 为了本发明目的,术语“固醇侧链”是指连接在固醇型分子的位置17处的侧链的化学组成。在标准定义中,固醇限于在位置17携带8碳链的4环结构。在本发明中,描述了具有比常规更长和更短侧链的固醇型分子。侧链可以是分枝的或者包含双骨架。

[0392] 因此,可用于本发明的固醇例如包括胆固醇,以及其中位置17连接有2-7个碳或大于9个碳之侧链的独特固醇。在一个具体实施方案中,聚碳尾的长度为5至9个碳不等。这样的缀合物可以具有显著更好的体内效力,特别是向肝脏递送。与和常规胆固醇缀合的寡核苷酸相比,预期这些分子类型以低5至9倍的浓度工作。

[0393] 或者,多核苷酸可以与作为疏水分子的蛋白质、肽或带正电荷的化学物质结合。蛋白质可以选自鱼精蛋白、dsRNA结合结构域和富含精氨酸的肽。示例性的带正电荷的化学物质包括精氨、亚精胺、尸胺和腐胺。

[0394] 在另一个实施方案中,当疏水分子缀合物与多核苷酸的最佳化学修饰模式(如本文详细描述)的组合时,其可以表现出甚至更高的效力,所述化学修饰包括但不限于疏水修饰、硫代磷酸酯修饰和2'核糖修饰。

[0395] 在另一个实施方案中,固醇型分子可以是天然存在的植物固醇。聚碳链的长度可以大于9,并且可以是直链、支链和/或含有双键。在向多种组织递送多核苷酸时,一些含有植物固醇的多核苷酸缀合物可显著更有效且更有活性。一些植物固醇可表现出组织偏向性,因此用作向特定组织特异性递送RNAi的方法。

[0396] 将疏水修饰多核苷酸与天然脂肪混合物混合以形成胶束。天然脂肪酸混合物是在生理pH下或生理pH附近为净中性或稍微带净负电荷的脂肪混合物,其可以与疏水修饰的多核苷酸形成胶束。为了本发明目的,术语“胶束”是指由不带电荷的脂肪酸和磷脂的混合物形成的小纳米颗粒。中性脂肪混合物可以包含阳离子脂质,只要其以不引起毒性的量存在即可。在一些优选实施方案中,中性脂肪混合物不含阳离子脂质。不含阳离子脂质的混合物是其中小于1%、并且优选0%的总脂质为阳离子脂质的混合物。术语“阳离子脂质”包括在生理pH下或生理pH附近具有净正电荷的脂质和合成脂质。术语“阴离子脂质”包括在生理pH下或生理pH附近具有净负电荷的脂质和合成脂质。

[0397] 中性脂肪通过强的但是非共价吸引力(例如,静电力、范德华力、 π -堆叠等相互作用)与本发明寡核苷酸结合。

[0398] 中性脂肪混合物可以包含选自一类天然存在的或者化学合成或修饰的饱和和不饱和脂肪酸残基的制剂。脂肪酸可以以甘油三酯、甘油二酯或独立脂肪酸的形式存在。在另一个实施方案中,可以使用充分确认的当前在药理学中用于肠外营养的脂肪酸和/或脂肪乳剂的混合物。

[0399] 天然脂肪混合物优选为胆碱基脂肪酸和固醇的混合物。胆碱基脂肪酸包括例如合成磷酸胆碱衍生物,例如DDPC、DLPC、DMPC、DPPC、DSPC、DOPC、POPC和DEPC。DOPC(化学物质注册号4235-95-4)是二油酰基磷脂酰胆碱(也称为二反油酰基磷脂酰胆碱(dielaidoylphosphatidylcholine)、二油酰基-PC、二油酰基磷酸胆碱、二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、二油烯基磷脂酰胆碱)。DSPC(化学品注册号816-94-4)是二硬脂酰基磷脂酰胆碱(也称为1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)。

[0400] 中性脂肪混合物中的固醇可以是例如胆固醇。中性脂肪混合物可以完全由胆碱基脂肪酸和固醇组成,或者其可以任选地包含货物分子。例如,中性脂肪混合物可以具有至少20%或25%脂肪酸和20%或25%固醇。

[0401] 为了本发明目的,术语“脂肪酸”涉及脂肪酸的常规描述。其可以作为独立实体或者以甘油二酯和甘油三酯的形式存在。为了本发明目的,术语“脂肪乳剂”是指向不能在其饮食中获得足够脂肪的对象皮下施用的安全的脂肪制剂。其为大豆油(或其他天然存在油)和卵磷脂的乳剂。脂肪乳剂被用于一些不溶性麻醉剂的制剂。在本公开中,脂肪乳剂可以是市售制剂(例如Intralipid、Liposyn、Nutrilipid)、经修饰的市售制剂的一部分,其中其富含特定脂肪酸,或者是脂肪酸和磷脂的完全从头配制的组合。

[0402] 在一个实施方案中,使待与本发明寡核苷酸组合物接触的细胞与包含寡核苷酸的混合物和包含脂质(例如上文所述脂质或脂质组合物)的混合物接触约12小时至约24小时。在另一个实施方案中,使待与寡核苷酸组合物接触的细胞与包含寡核苷酸的混合物和包含脂质(例如上文所述脂质或脂质组合物)的混合物接触约1天至约5天。在一个实施方案中,使细胞与包含脂质和寡核苷酸的混合物接触约3天至长至约30天。在另一个实施方案中,使包含脂质的混合物保持与细胞接触至少约5天至约20天。在另一个实施方案中,使包含脂质的混合物与细胞保持接触至少约7天至约15天。

[0403] 制剂的50%-60%可以是任意其他脂质或分子。这样的脂质或分子在本文中称作货物脂质或货物分子。货物分子包括但不限于intralipid、小分子、融合肽或脂质或者可以添加以改变细胞摄取、内体释放或组织分布特性的其他小分子。耐受货物分子的能力对于调节这些颗粒的特性很重要,如果期望这样的特性的话。例如,一些组织特异性代谢物的存在可以彻底改变组织分布谱。例如,富含不同饱和度的较短或较长脂肪链的Intralipid型制剂的使用影响这些制剂类型的组织分布谱(及其负载)。

[0404] 根据本发明有用的货物脂质的一个实例是融合脂质(fusogenic lipid)。例如,两性离子型脂质DOPE(化学物质注册号4004-5-1,1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)是优选的货物脂质。

[0405] Intralipid可以由以下组分组成:1 000mL包含:纯化大豆油90g,纯化卵磷脂12g,无水甘油22g,注射用水适量加至1 000mL。用氢氧化钠将pH调节至约8的pH。能量含量/L:4.6MJ(190kcal)。重量摩尔渗透压浓度(约):300mOsm/kg水。在另一个实施方案中,脂肪乳剂是Liposyn,其包含注射用水中的5%红花油、5%大豆油、作为乳化剂添加的至多1.2%卵

磷脂,以及2.5%甘油。其还可以包含氢氧化钠用于pH调节。pH 8.0(6.0-9.0)。Liposyn的重量摩尔渗透压浓度为276m Osmol/升(实际)。

[0406] 货物脂质的身份、量和比例的不同影响这些化合物的细胞摄取和组织分布特性。例如,脂质尾的长度和饱和度水平将影响肝、肺、脂肪和心肌细胞中的差异摄取。添加特定的疏水分子如维生素或不同形式的固醇可有利于分布到参与特定化合物之代谢的特定组织。在不同寡核苷酸浓度形成络合物,浓度越高越有利于有效的络合物形成。

[0407] 在另一个实施方案中,脂肪乳剂基于脂质的混合物。这样的脂质可以包括天然化合物、化学合成化合物、纯化的脂肪酸或者任意其他脂质。在另一个实施方案中,脂肪乳剂组合物是完全人造的。在一个特定实施方案中,脂肪乳剂是大于70%亚油酸。在另一个特定实施方案中,脂肪乳剂的至少1%是心磷脂。亚油酸(LA)是不饱和的 ω -6脂肪酸。其为由具有18碳的链和两个顺式双键的羧酸制造的无色流体。

[0408] 在本发明的另一个实施方案中,脂肪乳剂的组成的改变被用于改变经疏水修饰的多核苷酸的组织分布。这种方法提供了多核苷酸向特定组织的特异性递送(图12)。

[0409] 在另一个实施方案中,使用包含超过70%的亚油酸(C₁₈H₃₂O₂)和/或心磷脂的货物分子之脂肪乳剂向心肌特异性递送RNAi。

[0410] 脂肪乳剂(例如intralipid)之前已经用作一些非水溶性药物的递送制剂(例如,Propofol,重构为Diprivan)。本发明的独特特征包括(a)将经修饰多核苷酸与疏水化合物组合的理念,因此其可以并入到脂肪胶束中,以及(b)将其与脂肪乳剂混合以提供可逆载体。在注射到血流中后,胶束通常与血清蛋白质(包括白蛋白、HDL、LDL等)结合。这种结合是可逆的并且最终脂肪被细胞吸收。然后将作为胶束的一部分并入的多核苷酸递送到细胞表面,在这之后,可以通过不同机制发生细胞摄取,包括但不限于固醇型递送。

[0411] 络合剂(Complexing Agent)

[0412] 络合剂与本发明寡核苷酸通过强的非共价吸引力(例如,静电力、范德华力、 π -堆叠等相互作用)结合。在一个实施方案中,本发明的寡核苷酸可以与络合剂络合以增加寡核苷酸的细胞摄取。络合剂的实例包括阳离子脂质。阳离子脂质可用于向细胞递送寡核苷酸。但是,如上文讨论的,不含阳离子脂质的制剂在一些实施方案中是优选的。

[0413] 术语“阳离子脂质”包括具有极性和非极性结构域的脂质和合成脂质,其能够在生理pH下或附近带正电荷,与聚阴离子(如核酸)结合并且促进向细胞递送核酸。通常,阳离子脂质包括饱和和不饱和烷基醚和脂环族醚以及胺、酰胺的酯,或其衍生物。阳离子脂质的直链和支链烷基和烯基可以包含例如1至约25个碳原子。优选的直链或支链烷基或烯基具有6个或更多个碳原子。脂环族基团包括胆固醇和其他甾族化合物基团。阳离子脂质可以利用多种抗衡离子(阴离子)制备,包括例如Cl⁻、Br⁻、I⁻、F⁻、乙酸根、三氟乙酸根、硫酸根、亚硝酸根和硝酸根。

[0414] 阳离子脂质的实例包括聚乙烯亚胺、聚酰胺基胺(polyamidoamine, PAMAM)星放射状树枝状分子、Lipofectin(DOTMA和DOPE的组合)、Lipofectase、LIPOFECTAMINETM(例如,LIPOFECTAMINETM2000)、DOPE、Cytofectin(Gilead Sciences, Foster City, Calif.)和Eufectins(JBL, San Luis Obispo, Calif.)。示例性阳离子脂质体可以由N-[1-(2,3-二油酰氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(N-[1-(2,3-dioleoloxo)-propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride, DOTMA)、N-[1-(2,3-二油酰氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基胺

硫酸甲酯(N-[1-(2,3-dioleoloxo)-propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate, DOTAP)、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbamoyl]cholesterol, DC-Chol)、2,3,-二油酰氧基-N-[2(精胺羧酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸盐(2,3,-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propa naminium trifluoroacetate, DOSPA)、1,2-二肉豆蔻酰基氧基丙基-3-二甲基-羟乙基溴化铵;和二甲基双十八烷基溴化铵(dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB)。发现例如阳离子脂质N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基三甲基氯化铵(DOTMA)使硫代磷酸酯寡核苷酸的反义效果增加1000倍(Vlassov等., 1994, Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。寡核苷酸还可与例如聚(L-赖氨酸)或抗生素络合,并且这种混合物包含或不包含脂质,例如甾醇基(steryl)-聚(L-赖氨酸)。

[0415] 阳离子脂质已经在本领域中用于向细胞递送寡核苷酸(参见,例如美国专利No.5,855,910;5,851,548;5,830,430;5,780,053;5,767,099;Lewis等. 1996.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:3176;Hope等. 1998.Molecular Membrane Biology15:1)。可用于促进本发明寡核苷酸摄取的其他脂质组合物可以结合权利要求的方法使用。除了上文列出的那些外,其他脂质组合物也是本领域中已知的,并且包括例如以下中教导的那些:美国专利No.4,235,871;美国专利No.4,501,728;4,837,028;4,737,323。

[0416] 在一个实施方案中,脂质组合物还可以包含如病毒蛋白质的物质(agent)以增强脂质介导的寡核苷酸转染(Kamata,等., 1994.Nucl.Acids.Res.22:536)。在另一个实施方案中,使作为包含寡核苷酸、肽和脂质的组合物的一部分的寡核苷酸与细胞接触,如例如美国专利5,736,392中教导的。已经描述了血清抗性的经改良脂质(Lewis,等., 1996.Proc.Natl.Acad.Sci.93:3176)。阳离子脂质和其他络合剂用于增加通过内吞作用进入细胞的寡核苷酸的数目。

[0417] 在另一个实施方案中,N取代的甘氨酸寡核苷酸(拟肽)可用于优化寡核苷酸的摄取。拟肽已经被用于产生用于转染的阳离子脂质样化合物(Murphy,等., 1998.Proc.Natl.Acad.Sci.95:1517)。拟肽可以使用标准方法合成(例如,Zuckermann, R.N.,等. 1992.J.Am.Chem.Soc.114:10646;Zuckermann, R.N.,等. 1992.Int.J.Peptide Protein Res.40:497)。阳离子脂质和拟肽的组合(liptoid)也可用于优化目标寡核苷酸的摄取(Hunag,等., 1998.Chemistry and Biology.5:345)。Liptoid可以通过制作拟肽寡核苷酸并且将氨基末端亚单体通过其氨基与脂质偶联来合成(Hunag,等., 1998.Chemistry and Biology.5:345)。

[0418] 本领域中已知带正电荷的氨基酸可用于产生高活性阳离子脂质(Lewis等. 1996.Proc.Natl.Acad.Sci.US.A.93:3176)。在一个实施方案中,用于递送本发明寡核苷酸的组合物包含与亲脂性部分连接的若干精氨酸、赖氨酸、组氨酸或鸟氨酸残基(参见,例如美国专利No.5,777,153)。

[0419] 在另一个实施方案中,用于递送本发明寡核苷酸的组合物包含具有约1至约4个碱性残基的肽。这些碱性残基可以负载在例如肽的氨基末端、C末端或内部区域。本领域中定义了具有类似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷极性侧链(例如,甘氨酸(也可以认

为是非极性的)、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸), β -分枝侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。除了碱性氨基酸以外,肽的大部分或全部其他残基可以选自非碱性氨基酸,例如除赖氨酸、精氨酸或组氨酸以外的氨基酸。优选地,主要使用具有长中性侧链的中性氨基酸。

[0420] 在一个实施方案中,用于递送本发明寡核苷酸的组合物包含具有一个或更多个 γ 羧基谷氨酸残基或 γ -Gla残基的天然或合成多肽。这些 γ 羧基谷氨酸残基能够使多肽彼此结合并且与膜表面结合。换言之,具有一系列 γ -Gla的多肽可用作通用递送形式,其帮助RNAi构建体粘附在RNAi构建体将接触的无论什么样的膜上。这可以至少减慢RNAi构建体从血流中的清除,并且增加其到达靶标的机会。

[0421] γ 羧基谷氨酸残基可以存在于天然蛋白质中(例如,凝血酶原具有10个 γ -Gla残基)。或者,可以使用例如维生素K依赖性羧化酶通过羧化将其引入到纯化的、重组产生的或化学合成的多肽中。 γ 羧基谷氨酸残基可以是连续的或不连续,多肽中这样的 γ 羧基谷氨酸残基的总数和位置可以调节/微调以取得不同的多肽“粘性”水平。

[0422] 在一个实施方案中,使待与本发明寡核苷酸组合物接触的细胞与包含寡核苷酸的混合物和包含脂质(例如上文所述脂质或脂质组合物的一种)的混合物接触约12小时至约24小时。在另一个实施方案中,使待与寡核苷酸组合物接触的细胞与包含寡核苷酸的混合物和包含脂质(例如上文所述脂质或脂质组合物的一种)的混合物接触约1天至约5天。在一个实施方案中,使细胞与包含脂质和寡核苷酸的混合物接触约3天至长至约30天。在另一个实施方案中,使包含脂质的混合物与细胞保持接触至少约5天至约20天。在另一个实施方案中,使包含脂质的混合物与细胞保持接触至少约7天至约15天。

[0423] 例如,在一个实施方案中,在脂质(如细胞转染剂CS或GSV(购自Glen Research; Sterling, Va.)、GS3815、GS2888)的存在下,使寡核苷酸组合物可以与细胞接触本文所述的延长的孵育时间。

[0424] 在一个实施方案中,用包含脂质和寡核苷酸组合物的混合物孵育细胞不降低细胞的存活力。优选地,在转染期后,细胞基本是活的。在一个实施方案中,在转染后,至少约70%至至少约100%的细胞是活的。在另一个实施方案中,至少约80%至至少约95%的细胞是活的。在另一个实施方案中,至少约85%至至少约90%的细胞是活的。

[0425] 在一个实施方案中,通过连接向细胞中转运寡核苷酸的肽序列(在本文中称为“转运肽”)来对寡核苷酸进行修饰。在一个实施方案中,组合物包含与编码蛋白质的靶核酸分子互补的并且与转运肽共价连接的寡核苷酸。

[0426] 专用语“转运肽”包含有利于向细胞中转运寡核苷酸的氨基酸序列。有利于向细胞中转运其连接的部分的示例性肽是本领域中已知的,包括例如HIV TAT转录因子、乳铁蛋白、疱疹VP22蛋白和成纤维细胞生长因子2(Pooga等.1998.Nature Biotechnology.16:857;and Derossi等.1998.Trends in Cell Biology.8:84;Elliott and O'Hare.1997.Cell 88:223)。

[0427] 可以使用已知技术将寡核苷酸连接至转运肽,例如(Prochiantz, A.1996.Curr.Opin.Neurobiol.6:629;Derossi等.1998.Trends Cell Biol.8:84;Troy等

.1996.J.Neurosci.16:253),Vives等.1997.J.Biol.Chem.272:16010)。例如,在一个实施方案中,具有活性巯基的寡核苷酸通过该巯基与转运肽上存在的半胱氨酸(例如,触角足同源结构域的第二和第三螺旋之间的 β 转角中存在的半胱氨酸,如在例如Derossi等.1998.Trends Cell Biol.8:84;Prochiantz.1996.Current Opinion in Neurobiol.6:629;Allinquant等.1995.J Cell Biol.128:919中教导的)连接。在另一个实施方案中,Boc-Cys-(Npys)OH基团可以与转运肽连接作为最后的(N-末端)氨基酸,具有SH基团的寡核苷酸可以与肽偶连(Troy等.1996.J.Neurosci.16:253)。

[0428] 在一个实施方案中,连接基团可以与核单体连接,转运肽可以与接头共价连接。在一个实施方案中,接头可以作为转运肽的连接位点并且可以提供针对核酸酶的稳定性。合适的接头的实例包括经取代的或未经取代的 C_1 - C_{20} 烷基链、 C_2 - C_{20} 烯基链、 C_2 - C_{20} 炔基链、肽和杂原子(例如,S、O、NH等)。其他示例性接头包括双官能交联剂,例如磺基琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺基苯基)-丁酸酯(SMPB)(参见,例如Smith等.Biochem J1991.276:417-2)。

[0429] 在一个实施方案中,本发明的寡核苷酸作为分子缀合物合成,所述分子缀合物使用受体介导的内吞机制将基因递送到细胞中(参见,例如Bunnell等.1992.Somatic Cell and Molecular Genetics.18:559,以及其中引用的参考文献)。

[0430] 靶向剂

[0431] 可以通过将寡核苷酸靶向细胞受体来改善寡核苷酸的递送。靶向部分可以与寡核苷酸缀合或者连接至与寡核苷酸连接的载体基团(即,聚(L-赖氨酸)或脂质体)。这种方法很好地适用于表现出特定的受体介导的内吞作用的细胞。

[0432] 例如,与游离寡核苷酸相比,表达甘露糖-6-磷酸特异性受体的细胞对与6-磷酸甘露糖化蛋白质缀合的寡核苷酸的内化有效20倍。还可以使用可生物降解的接头将寡核苷酸与细胞受体的配体偶连。在另一个实例中,递送构建体是甘露糖基化链霉亲和素,其与生物素化寡核苷酸形成紧密络合物。发现甘露糖基化链霉亲和素使生物素化寡核苷酸的内化提高20倍(Vlassov等.1994.Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。

[0433] 另外,特定配体可以与基于聚赖氨酸的递送系统的聚赖氨酸组分缀合。例如,运铁蛋白-聚赖氨酸、腺病毒-聚赖氨酸和流感病毒血凝素HA-2N末端融合肽-聚赖氨酸缀合物极大地增强了真核细胞中受体介导的DNA递送。肺泡巨噬细胞中已经利用与聚(L-赖氨酸)缀合的甘露糖基化糖蛋白来增强寡核苷酸的细胞摄取。Liang等.1999.Pharmazie54:559-566。

[0434] 由于恶性细胞对于必需营养成分如叶酸和运铁蛋白的需求增加,这些营养成分可用于将寡核苷酸靶向癌细胞。例如,当叶酸与聚(L-赖氨酸)连接时,在早幼粒细胞白血病(HL-60)细胞和人黑素瘤(M-14)细胞中发现了增强的寡核苷酸摄取。Ginobbi等.1997.Anticancer Res.17:29。在另一个实例中,包被有马来酰化牛血清白蛋白、叶酸或铁原卟啉IX的脂质体在小鼠巨噬细胞、KB细胞和2.2.15人肝癌细胞中表型出增强的寡核苷酸细胞摄取。Liang等.1999.Pharmazie 54:559-566。

[0435] 脂质体天然积累在肝、脾和网状内皮系统中(所谓的被动靶向)。通过使脂质体与多种配体(如抗体)和蛋白A偶连,其可以主动靶向特定细胞群。例如,用H-2K特异性抗体预处理具有蛋白A的脂质体,所述抗体靶向L细胞上表达的小鼠主要组织相容性复合物编码的H-2K蛋白。(Vlassov等.1994.Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。

[0436] RNAi试剂的另外的体外和/或体内递送是本领域中已知的,并且可用于递送本发明的RNAi构建体。参见,例如美国专利申请公开20080152661、20080112916、20080107694、20080038296、20070231392、20060240093、20060178327、20060008910、20050265957、20050064595、20050042227、20050037496、20050026286、20040162235、20040072785、20040063654、20030157030、WO 2008/036825、W004/065601和AU2004206255B2,仅列出一些(均通过引用并入)。

[0437] 施用

[0438] 寡核苷酸的最佳施用或递送过程可以根据期望的结果和/或被治疗对象改变。本文使用的“施用”是指使细胞与寡核苷酸接触,并且可以在体外或体内进行。可以调节寡核苷酸的剂量以最佳地减少由靶核酸分子翻译的蛋白质的表达,例如通过RNA稳定性的读出或通过治疗响应测量的,而不需要过多试验。

[0439] 例如,可以测量核酸靶标编码的蛋白质的表达以确定给药方案是否需要相应调整。另外,可以使用本领域中公认的技术测量细胞中或由细胞产生的RNA或蛋白质水平的提高或降低。通过确定转录是否已经降低,可以确定寡核苷酸在诱导靶RNA切割中是否有效。

[0440] 任何上述寡核苷酸组合物可以单独使用或者与可药用载体一起使用。本文使用的“可药用载体”包括合适的溶剂、分散介质、包衣料、抗菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。用于药物活性物质的这样的介质和试剂的使用是本领域中公知的。任何常规介质或试剂可用于治疗组合物,除非其与活性成分不相容。辅助活性成分(supplementary active ingredient)也可以并入到组合物中。

[0441] 寡核苷酸可以并入到脂质体或用聚乙二醇修饰的脂质体中或者与阳离子脂质混合以用于胃肠外施用。向脂质体中并入额外的物质(例如对特定靶细胞上存在的膜蛋白有反应性的抗体)可以有助于将寡核苷酸靶向至特定细胞类型。

[0442] 对于体内应用,本发明制剂可以以适合于所选施用途径(例如肠胃外、经口或腹膜内)的多种形式向患者施用。胃肠外施用是优选的,其包括通过以下途径施用:静脉内;肌肉内;间隙内(interstitially);动脉内;皮下;眼内;滑膜内;经上皮(trans epithelial),包括经皮(transdermal);通过吸入的经肺部;眼部;舌下和颊;表面,包括眼部;皮肤;眼;直肠;和通过吹入法的鼻吸入。在一些优选实施方案中,sd-rxRNA分子通过皮内注射或皮下施用。

[0443] 用于胃肠外施用的药物制剂包括水溶性或水分散性形式的活性化合物的水溶液。另外,可以施用作为合适的油性注射混悬剂的活性化合物的混悬剂。合适的亲脂性溶剂或载剂包括脂肪油,例如芝麻油,或合成脂肪酸酯,例如油酸乙酯或甘油三酯。水性注射混悬剂可以包含提高混悬剂的粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或右旋糖酐,任选地,混悬剂还可以包含稳定剂。本发明的寡核苷酸可以配制在液体溶液中,优选的在生理相容性缓冲液(例如Hank溶液或Ringer溶液)中。另外,寡核苷酸可以配制成固体形式,并且在临使用前再溶解或悬浮。冻干形式也包括在本发明内。

[0444] 用于表面施用的药物制剂包括经皮贴剂、软膏剂、洗剂、乳膏剂、凝胶剂、滴剂、喷雾剂、栓剂、液体和散剂。另外,常规药物载体、水性、粉末或油性基质或者增稠剂可用于表面施用的药物制剂。

[0445] 用于经口施用的药物制剂包括散剂或颗粒剂、水或非水性介质中的混悬剂或溶液

剂、胶囊剂、囊剂(sachet)或片剂。另外,增稠剂、矫味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可用于经口施用的药物制剂。

[0446] 对于经粘膜或经皮施用,适合于待渗透之屏障的渗透剂用于制剂。这样的渗透剂是本领域中已知的,并且例如对于经粘膜施用,包括胆盐和梭链孢酸衍生物,以及洗涤剂。经粘膜施用可以通过鼻用喷雾剂或使用栓剂。对于经口施用,将寡核苷酸配制成常规经口施用形式,例如胶囊剂、片剂和补药(tonic)。对于表面施用,本发明的寡核苷酸配制成本领域中已知的软膏剂、油膏(salve)、凝胶剂或乳膏剂。

[0447] 可以选择药物递送载剂,例如用于体外施用、用于全身施用或用于表面施用。这些载剂可以设计成作为缓释储库或将其内容物直接递送到靶细胞。使用一些直接递送药物载剂的优点是每次摄取递送多个分子。已经表明这样的载剂提高药物的循环半衰期,否则的话所述药物将会被迅速从血流中清除。落入该分类中的这样的专用药物递送载剂的一些实例是脂质体、水凝胶、环糊精、生物可降解的纳米胶囊和生物粘附微球。

[0448] 所述寡核苷酸可以向对象系统性施用。系统性吸收是指药物进入血流然后分布在整个身体中。导致系统性吸收的施用途径包括:静脉内、皮下、腹膜内和鼻内。这些施用途径中的每一种均向可接近的疾病细胞递送寡核苷酸。在皮下施用后,治疗剂流入局部淋巴结并且通过淋巴网络进入循环。已经表明进入循环的速率是分子量或大小的函数。脂质体或其他药物载体的使用使寡核苷酸定位于淋巴结。可以修饰寡核苷酸以扩散到细胞中,或者脂质体可以直接参与将未经修饰或经修饰寡核苷酸递送到细胞中。

[0449] 所选择的递送方法将导致进入细胞中。在一些实施方案中,优选的递送方法包括脂质体(10-400nm)、水凝胶、控释聚合物和其他药学上适用的载剂,以及显微注射或电穿孔(用于离体处理)。

[0450] 本发明药物制剂可以制备和配制为乳剂。乳剂通常是一种液体以直径通常超过0.1 μ m的小滴的形式分散在另一种液体中的非均相体系。本发明乳剂可以包含赋形剂,例如乳化剂、稳定剂、染料、脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、润湿剂、亲水胶体、防腐剂,并且抗氧化剂也可根据需要存在乳剂中。这些赋形剂可以在水相、油相中作为溶液存在或者自身作为独立相。

[0451] 可用在本发明的乳剂制剂中的天然存在的乳化剂的实例包括羊毛脂、蜂蜡、磷脂、卵磷脂和阿拉伯胶。细碎固体也用作良好乳化剂,尤其是与表面活性剂组合以及在粘性制剂中。可用作乳化剂的细碎固体的实例包括极性无机固体,例如重金属氢氧化物,不膨胀黏土,例如膨润土、硅镁土(attapulgite)、锂蒙脱石(hectorite)、高岭土、蒙脱石(montrnorillonite)、胶体状硅酸铝和胶体状硅酸镁铝、色素和非极性固体,例如碳或三硬脂酸甘油酯。

[0452] 可以包含在乳剂制剂中的防腐剂的实例包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、季铵盐、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸的脂和硼酸。可以包含在乳剂制剂中的抗氧化剂的实例包括自由基清除剂,例如生育酚、没食子酸烷基酯、丁基羟基苯甲醚、丁基羟基甲苯或还原剂,例如抗坏血酸和焦亚硫酸钠,以及抗氧化剂增效剂,例如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0453] 在一个实施方案中,寡核苷酸组合物配制成微乳剂。微乳剂是水、油和两亲分子的体系,其为单一光学各向同性的且热力学稳定的液体溶液。通常微乳剂通过首先使油分散在表面活性剂水溶液中,然后加入足量的第四种组分以形成透明体系来制备,所述第四种

组分一般为中等链长度的醇。

[0454] 可用于制备微乳剂表面活性剂包括但不限于离子表面活性剂、非离子表面活性剂、Brij96、聚氧乙烯油烯基醚、聚甘油脂肪酸酯、四甘油单月桂酸酯(ML310)、四甘油单油酸酯(MO310),六甘油单油酸酯(P0310),六甘油五油酸酯(P0500)、十甘油单癸酸酯(MCA750)、十甘油单油酸酯(M0750),十甘油倍半油酸酯(S0750),十甘油十油酸酯(DA0750),其单独或与助表面活性剂组合。由于表面活性剂分子之间产生的空隙,共表面活性剂(通常为短链醇,例如乙醇、1-丙醇和1-丁醇)用于通过渗入表面活性剂膜并随后产生无序膜来提高界面流动性。

[0455] 但是,可以不使用助表面活性剂来制备微乳剂,并且不含醇的自乳化微乳剂体系是本领域中已知的。水相通常是但不限于水,药物、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、聚乙二醇和乙二醇的衍生物的水溶液。油相可以包含但不限于材料如Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯,中链(C₈-C₁₂)单甘油酯、二甘油酯和三甘油酯,聚氧乙烯化甘油基脂肪酸酯、脂肪醇、聚乙二醇甘油酯(polyglycolized glyceride)、饱和聚乙二醇C₈-C₁₀甘油酯、植物油和硅油(silicone oil)。

[0456] 从药物增溶和增强药物吸收的角度来看,微乳剂特别让人感兴趣。已经提出用基于脂质的微乳剂(油/水和水/油二者)来增强药物的经口生物利用度。

[0457] 微乳剂提供了改善的药物增溶、保护药物免于酶促水解、由于表面活性剂诱导的膜流动性和渗透性的改变导致的可能的药物吸收增强、易于制备、易于通过固体剂型经口施用、改善的临床效力和降低的毒性(Constantinides等.,Pharmaceutical Research, 1994,11:1385;Ho等.,J.Pharm.Sci.,1996,85:138-143)。在化妆品和药物应用二者中,微乳剂在活性组分的经皮递送中也有效。预期本发明的微乳剂组合物和制剂将有利于改善从胃肠道系统性吸收寡核苷酸,以及改善胃肠道、阴道、口腔和其他施用区域中寡核苷酸的局部细胞摄取。

[0458] 在一个实施方案中,本发明使用多种渗透增强剂(penetration enhancer)来实现核酸,特别是寡核苷酸向动物皮肤的有效递送。如果用渗透增强剂处理待穿过的膜,即使非亲脂性药物也能够穿过细胞膜。除了提高非亲脂性药物穿过细胞膜的扩散外,渗透促进剂还起到增强亲脂性药物的渗透性的作用。

[0459] 可用于本发明的五类渗透增强剂包括:表面活性剂、脂肪酸、胆盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂。可用于增强所施用的寡核苷酸之渗透的其他试剂包括:二醇,例如乙二醇和丙二醇;吡咯,例如2-15吡咯;氮酮(azone)和萜烯,例如柠檬烯和薄荷酮。

[0460] 寡核苷酸(尤其是在液体制剂中时)也可以通过用阳离子脂质制剂涂覆医学装置(例如,导管,例如血管成形术球囊导管)来施用。可以通过例如将医学装置浸渍在脂质制剂或脂质制剂和合适溶剂的混合物中来实现涂覆,所述合适的溶剂例如水基缓冲液、水溶剂、乙醇、二氯甲烷、氯仿等。将一定量制剂自然粘附到装置的表面,随后根据情况向对象施用所述装置。或者,脂质制剂的冻干混合物可以特别地结合于装置的表面。这样的结合技术描述在例如K.Ishihara等.,Journal of Biomedical Materials Research,第27卷,第1309-1314页(1993)中,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0461] 对于本领域技术人员将显而易见的是,待施用的有用剂量和特定的施用方式将根据以下因素变化,例如细胞类型,或者对于体内使用而言:年龄、体重和待治疗的特定动物

及其区域;所使用的特定寡核苷酸和递送方法;预期的治疗或诊断用途;制剂的形式,例如混悬剂、乳剂、胶束或脂质体。通常,以较低水平施用剂量,并且提高剂量直到实现期望效果。当使用脂质递送寡核苷酸时,施用的脂质化合物的量可以不同,并且通常取决于施用的寡核苷酸药剂的量。例如,脂质化合物与寡核苷酸药剂的重量比优选为约1:1至约15:1,更优选的重量比为约5:1至约10:1。通常,施用的阳离子脂质化合物的量为约0.1毫克(mg)至约1克(g)不等。按照一般指导,通常每千克患者体重施用约0.1mg至约10mg的特定寡核苷酸药剂,以及约1mg至约100mg的脂质组合物,但是更高或更低的量也可以使用。

[0462] 向对象施用的或者与细胞接触适合于药学施用的生物学相容形式的本发明药剂。“适合于施用的生物学相容形式”意指以寡核苷酸的治疗效果超过任何毒性效果的形式施用寡核苷酸。在一个实施方案中,可以向对象施用寡核苷酸。对象的实例包括哺乳动物,例如人和其他灵长类动物;牛、猪、马和农场(农业)动物;狗、猫和其他家养宠物;小鼠、大鼠和转基因的非人动物。

[0463] 有效量的本发明寡核苷酸的施用定义为在取得预期结果必需的剂量和时间段方面有效的量。例如,寡核苷酸的有效量可以根据以下因素变化,例如细胞类型,所使用的寡核苷酸,以及用于体内使用的个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及寡核苷酸在个体中引起期望应答的能力。细胞内寡核苷酸的治疗水平的确立取决于摄取速率和流出或降解。降解度的降低延长了寡核苷酸的细胞内半衰期。因此,化学修饰的寡核苷酸(例如具有磷酸酯骨架修饰)可能需要不同的给药。

[0464] 寡核苷酸的精确剂量和施用的剂量数目取决于实验和临床试验产生的数据。多种因素如预期效果、递送载剂、疾病指征和施用途径将影响剂量。本领域技术人员可以容易地确定剂量并且配成本发明的药物组合物。优选地,治疗的持续时间将延长至少贯穿疾病症状的进程。

[0465] 可以调节给药方案以提供最佳治疗响应。例如,寡核苷酸可以重复施用,例如根据治疗情况的紧急状态的指示每天施用多个剂量或者按比例降低剂量。无论寡核苷酸是向细胞还是向对象施用,本领域技术人员将能够容易地确定本发明寡核苷酸的合适剂量和施用方案。

[0466] 可以通过测试给药方案来优化例如通过皮内注射或皮下递送的sd-rxRNA施用。在一些实施方案中,单次施用是足够的。为了进一步延长所施用sd-rxRNA的效果,如本领域技术人员熟悉的,可以在缓释制剂或装置中施用sd-rxRNA。sd-rxRNA化合物的疏水性质可以使得能够使用多种聚合物,其中的一些与常规寡核苷酸递送不相容。

[0467] 在另一些实施方案中,多次施用sd-rxRNA。在一些情况下,其如下施用:每天、每周两次、每周、每两周、每三周、每月、每两个月、每三个月、每四个月、每五个月、每六个月或者比每六个月更低的频率。在一些情况下,其每天、每周、每月和/或每年多次施用。例如,其可以每1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时或超过12小时施用。其可以每天施用1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次或超过10次。

[0468] 在一些实施方案中,在受伤前72小时和受伤后24小时之间施用核酸分子。例如,在受伤前约72小时、71小时、70小时、69小时、68小时、67小时、66小时、65小时、64小时、63小时、62小时、61小时、60小时、59小时、58小时、57小时、56小时、55小时、54小时、53小时、52小时、51小时、50小时、49小时、48小时、47小时、46小时、45小时、44小时、43小时、42小时、41小

时、40小时、39小时、38小时、37小时、36小时、35小时、34小时、33小时、32小时、31小时、30小时、29小时、28小时、27小时、26小时、25小时、24小时、23小时、22小时、21小时、20小时、19小时、18小时、17小时、16小时、15小时、14小时、13小时、12小时、11小时、10小时、9小时、8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时、2小时、1小时或少于1小时施用sd-rxRNA。在另一些实施方案中,在受伤后约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、6小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时或多于24小时施用sd-核酸分子。

[0469] 在另一些实施方案中,施用或治疗是延迟的。例如,在受伤后48小时或更久施用sd-核酸分子。在一些实施方案中,在受伤后48小时(2天)、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天或多于30天施用sd-核酸分子。在一些实施方案中,在受伤后48小时至30天之间施用sd-核酸分子。在一些实施方案中,在受伤后7天至30天之间施用sd-核酸分子。

[0470] 在一些实施方案中,本发明的一个出乎意料的方面与延迟处理或施用sd-rxRNA分子实现的有利的皮肤愈合有关。在一些实施方案中,延迟施用sd-核酸分子(例如在受伤后至少48小时或至少7天)比受伤后立即施用sd-核酸分子更有效。

[0471] 本发明的一些方面涉及向对象施用sd-rxRNA分子。在一些情况下,对象是患者,施用sd-rxRNA分子涉及在医生办公室施用sd-rxRNA分子。

[0472] 在一些实施方案中,同时施用多于一种sd-rxRNA分子。例如,可以施用包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10种不同sd-rxRNA分子的组合物。在某些实施方案中,组合物包含2或3种不同sd-rxRNA分子。当组合物包含超过一种sd-rxRNA时,组合物中的sd-rxRNA分子可以针对相同基因或不同基因。

[0473] 在一些实施方案中,在破坏或伤害皮肤的事件(例如手术)之前8天内施用sd-rxRNA。例如,可以在破坏或伤害皮肤的事件之前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10天施用sd-rxRNA。

[0474] 在另一些实施方案中,施用或治疗是延迟的。例如,在破坏或伤害皮肤的事件(例如手术)之后48小时或更久施用sd-核酸分子。在一些实施方案中,在破坏或伤害皮肤的事件(例如手术)后48小时(2天)、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天或大于30天施用sd-核酸分子。在一些实施方案中,在破坏或伤害皮肤的事件(例如手术)后48小时至30天之间施用sd-核酸分子。在一些实施方案中,在破坏或伤害皮肤的事件(例如手术)后7天至30天之间施用sd-核酸分子。

[0475] 在一些情况下,通过皮下施用递送的sd-rxRNA的有效量为至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、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、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或大于100mg/kg,包括任何中间值。

[0476] 在一些情况下,通过皮内注射递送的sd-rxRNA的有效量为至少约1、5、10、15、20、

25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或大于950 μ g,包括任何中间值。

[0477] 在一些实施方案中,施用的sd-rxRNA的剂量为0.1至20mg/厘米。例如,在一些实施方案中,剂量为约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或大于20mg/厘米。

[0478] 在一些实施方案中,在初始剂量后施用一个或更多个额外剂量的sd-rxRNA。例如,在一些实施方案中,在初始剂量后施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或多于20个额外剂量。在一些实施方案中,施用1-5个额外剂量。如本领域技术人员将理解的,额外剂量可以在治疗有效的任何时间框架内施用。在一些实施方案中,额外剂量每周施用约2次。在另一些实施方案中,额外剂量约每周施用。在另一些实施方案中,额外剂量约每两周施用。在另一些实施方案中,额外剂量约每个月施用。在一些实施方案中,额外剂量不以规则间隔施用,例如不同额外剂量之间具有不同时间长度。例如,在一些实施方案中,额外剂量以每周、每两周和每个月给药的组合施用。

[0479] 通过本文所述方法施用的sd-rxRNA分子有效靶向皮肤中的所有细胞类型。

[0480] 引入核酸的物理方法包括注射包含核酸的溶液,用核酸覆盖的颗粒轰击,将细胞或组织浸润在核酸的溶液中,或者在核酸的存在下对细胞膜进行电穿孔。包装在病毒颗粒中的病毒构建体可以实现将表达构建体有效引入到细胞中和转录表达构建体编码之核酸二者。可以使用本领域已知向细胞引入核酸的其他方法,例如脂质介导的载体转运、化学物质介导的转运,例如磷酸钙等。因此,核酸可以与执行以下一种或更多种活动的组分一起引入:增强细胞对核酸的摄取、抑制单链退火、使单链稳定或增强靶基因抑制的其他方式。

[0481] 核酸可以直接引入到细胞中(即,细胞内);或者在细胞外引入内腔、组织间隙空间、生物体的循环系统、经口引入,或者可以通过在含有核酸的溶液中洗浴细胞或生物体来引入。血管或血管外循环、血液或淋巴系统以及脑脊髓液是可以引入核酸的部位。

[0482] 具有靶基因的细胞可以来源于或包含在任何生物体中。生物体可以是植物、动物、原生生物、细菌、病毒或真菌。植物可以是单子叶植物、双子叶植物或裸子植物;动物可以是脊椎动物或无脊椎动物。优选的微生物是用于农业或工业的那些,以及对于植物或动物有致病性的那些。

[0483] 或者,可以使用本领域认可的技术将载体如编码本发明siRNA的转基因工程化到宿主细胞或转基因动物中。

[0484] 本发明药剂(或者编码其的载体或转基因)的另一个优选用途是在真核细胞或真核非人生物体中进行功能分析,优选哺乳动物细胞或生物体,最优选人细胞,例如诸如HeLa或293的细胞系,或啮齿动物,例如大鼠和小鼠。通过施用与靶mRNA序列充分互补的合适致敏剂(priming agent)/RNAi剂以指导靶特异性RNA干扰,可以在例如细胞培养物或靶生物体中的靶细胞中获得特异性敲除或敲减表型。

[0485] 因此,本发明的另一个主题是表现出靶基因特异性敲除或敲减表型的真核细胞或真核非人生物体,其包括至少一种内源靶基因的完全或至少部分缺陷的表达,其中用包含编码RNAi剂的DNA的至少一种载体转染所述细胞或生物体,所述RNAi剂能够抑制该靶基因的表达。应注意的是,由于RNAi剂的特异性,本发明允许多种不同内源基因的靶特异性敲除或敲减。

[0486] 细胞或非人生物体的,尤其是人细胞或非人哺乳动物的基因特异性敲除或敲减表型可用于程序的分析,例如复杂生理过程的功能和/或表型分析,例如基因表达谱和/或蛋白质组分析。优选地,使用基于寡核苷酸的芯片通过高通量方法进行分析。

[0487] 寡核苷酸稳定性的测定

[0488] 在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸是稳定化的,即,基本上抵抗内切酶和外切酶降解。与相应寡核苷酸相比,当寡核苷酸对于内源细胞核酸酶攻击的抗性高至少约3倍时,其定义为基本上抵抗核酸酶,当其抗性高至少约6倍时,定义为高度核酸酶抗性。这可以通过以下证明:使用本领域中已知技术示出本发明寡核苷酸基本上抵抗核酸酶。

[0489] 可以证明基本上稳定的一种方法是表明本发明寡核苷酸在递送到细胞时具有功能,例如,其降低了靶核酸分子的转录或翻译,例如通过测量蛋白质水平或通过测量mRNA的切割。可以在转染后约24小时进行测量靶RNA的稳定性的测定(例如,使用本领域中已知的Northern印迹技术, RNA酶保护测定,或QC-PCR测定)。或者,可以测量靶蛋白的水平。优选地,除了测试目标RNA或蛋白质水平外,还将测量对照(非靶基因)的RNA或蛋白质水平(例如,肌动蛋白,或者优选地具有与靶标类似的序列的对照)作为特异性对照。可以使用本领域认可的技术进行RNA或蛋白质测量。优选地,在转染后约16-24小时进行测量(M.Y.Chiang,等.1991.J Biol Chem.266:18162-71;T.Fisher,等.1993.Nucleic Acids Research.21 3857)。

[0490] 可以使用本领域中已知的技术,例如通过检测基因转录或蛋白质合成的抑制来测量本发明的寡核苷酸组合物抑制蛋白质合成的能力。例如,可以进行核酸酶S1作图。在另一个实例中,Northern印记分析可用于测量编码特定蛋白质的RNA的存在。例如,可以在氯化铯垫上制备总RNA(参见,例如Ausebel等.,1987.Current Protocols in Molecular Biology(Greene&Wiley,New York))。可以使用RNA和探针进行Northern印迹(参见,例如,同上)。在另一个实施方案中,可以例如使用PCR测量靶蛋白产生的特定mRNA的水平。在另一个实例中,Western印迹可用于测量存在的靶蛋白的量。在另一个实施方案中,可以检测受蛋白质的量影响的表型。用于进行Western印迹的技术是本领域中周知的,参见例如,Chen等.J.Biol.Chem.271:28259。

[0491] 在另一个实例中,可以将靶基因启动子序列与报告基因连接,并且可以监测报告基因转录(例如,如下文更详细描述)。或者,可以通过将靶核酸分子的一部分与报告基因融合以使得报告基因转录来鉴定不靶向启动子的寡核苷酸组合物。通过在寡核苷酸组合物的存在下监测报告基因的表达的变化,可以确定寡核苷酸组合物在抑制报告基因表达中的有效性。例如,在一个实施方案中,有效的寡核苷酸组合物将降低报告基因的表达。

[0492] “报告基因”是表达可检测基因产物的核酸,所述可检测基因产物可以是RNA或蛋白质。mRNA表达的检测可以通过Northern印迹实现,蛋白质的检测可以通过用对蛋白质特异性的抗体染色实现。优选的报告基因产生容易检测的产物。报告基因可以与调控DNA序列可操作地连接,以使得报告基因产物的检测提供调控序列之转录活性的量度。在一些优选实施方案中,通过与产物有关的固有活性来检测报告基因的基因产物。例如,报告基因可编码基因产物,所述基因产物通过酶促活性产生基于颜色、荧光或发光的可检测信号。报告基因的实例包括但不限于编码氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶、 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶的那些。

[0493] 本领域技术人员将容易辨识适合于本发明使用的多种报告基因。这些包括但不限于氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶、人生长激素(hGH)和 β -半乳糖苷酶。这样的报告基因的实例可以见于F.A.Ausubel等.,Eds.,*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, New York, (1989)。可以使用任何编码可检测产物(例如具有可检测酶促活性或者可以引起针对其的特异性抗体的任何产物)的基因作为本发明方法中的报告基因。

[0494] 一种报告基因系统是萤火虫荧光素酶报告系统(Gould, S.J., and Subramani, S.1988.*Anal. Biochem.*, 7:404-408, 通过引用并入本文)。荧光素酶测定是迅速和灵敏的。在这种测定中,制备受试细胞的裂解物并且将其与ATP和底物荧光素组合。编码的酶荧光素酶催化底物的迅速的ATP依赖性氧化,以产生发光产物。测量总光输出并且其在广泛范围的酶浓度内与存在的荧光素酶的量成比例。

[0495] CAT是另一种常用的报告基因系统;这种系统的主要优点是其为已经广泛验证并且广泛接受作为启动子活性的量度(Gorman C.M., Moffat, L.F. 和 Howard, B.H.1982.*Mol. Cell. Biol.*, 2:1044-1051)。在这种系统中,用CAT表达载体转染受试细胞并且在初始转染的2-3天内用候选物质孵育。然后,制备细胞提取物。将提取物用乙酰CoA和放射性氯霉素孵育。孵育后,通过薄层色谱将乙酰化氯霉素与非乙酰化形式分离。在这种测定中,乙酰化程度反映了具有特定启动子的CAT基因活性。

[0496] 另一种合适的报告基因系统基于hGH的免疫学检测。这种系统也是迅速的并且容易使用(Selden, R., Burke-Howie, K. Rowe, M.E., Goodman, H.M. 和 Moore, D.D. (1986), *Mol. Cell, Biol.*, 6:3173-3179, 通过引用并入本文)。hGH系统的优点在于在培养基中而不是在细胞提取物中测定表达的hGH多肽。因此,这种系统不需要破坏受试细胞。将理解的是,这种报告基因系统的原理不限于hGH,还适合于使用可获得或可制备的对其具有可接受特异性之抗体的任何多肽。

[0497] 在一个实施方案中,测量本发明双链寡核苷酸的核酸酶稳定性并且与对照比较,所述对照例如本领域中通常使用的RNAi分子(例如,长度小于25个核苷酸并且包含2核苷酸碱基突出端的双链体寡核苷酸)或者具有平末端的未经修饰的RNA双链体。

[0498] 使用本发明siRNA实现的靶RNA切割反应是高序列特异性的。可以通过本领域中已知的序列比较和比对算法确定序列同一性。为了确定两个核酸序列(或者两个氨基酸序列)的百分比同一性,对序列进行用于最佳比较目的的比对(例如,可以在第一序列或第二序列中引入缺口用于最佳比对)。优选地,用于比较序列的局部比对算法的非限制性实例是Karlin和Altschul(1990)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68的算法, Karlin和Altschul(1993)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-77中改进。这样的算法并入在了Altschul, 等.(1990)*J. Mol. Biol.* 215:403-10的BLAST程序(版本2.0)中。优选的在siRNA和靶基因的一部分之间有大于90%的序列同一性,例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%的序列同一性。或者,siRNA可以在功能上限定为能够与靶基因转录物的一部分杂交的核苷酸序列(或者寡核苷酸序列)。用于多核苷酸杂交的严格条件的实例由以下中提供: Sambrook, J., E.F. Fritsch和T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 第9章和第11章, 以及*Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F.M.Ausubel等编辑, John Wiley&Sons, Inc., 2.10和6.3-6.4部分, 其通过引用并入本文。

[0499] 治疗用途

[0500] 通过抑制基因表达,本发明的寡核苷酸组合物可用于治疗涉及蛋白质表达的任何疾病。可以通过寡核苷酸组合物治疗的疾病的实例(仅用于说明)包括:癌症、视网膜病、自身免疫病、炎性疾病(即,ICAM-1相关病症、银屑病、溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis)、克罗恩病)、病毒性疾病(即,HIV、丙型肝炎)、miRNA病症和心血管疾病。

[0501] 在一个实施方案中,体外用寡核苷酸处理细胞可用于从对象移出的细胞的离体治疗(例如,用于治疗白血病或病毒感染)或者用于处理不来源于对象但是待向对象施用的细胞(例如,以消除待移植到对象中的细胞上移植抗原的表达)。此外,细胞的体外处理可用于非治疗环境,例如评估基因功能,研究基因调控和蛋白质合成,或者用于评估设计成用于调节基因表达或蛋白质合成之寡核苷酸导致的改善。细胞的体内处理可用于期望抑制蛋白质表达的某些临床环境。已经报道了反义治疗适合的多种医学病症(参见,例如美国专利No.5,830,653)以及呼吸道合胞病毒感染(WO 95/22,553)、流感病毒(WO 94/23,028)和恶性肿瘤(WO 94/08,003)。反义序列的临床应用的其他实例综述在例如Glaser.1996.Genetic EngineeringNews 16:1中。寡核苷酸切割的示例性靶标包括例如蛋白激酶Ca、ICAM-1、c-raf激酶、p53、c-myc和发现于慢性髓细胞性白血病中的bcr/abl融合基因。

[0502] 本发明核酸可用于具有RNAi途径的任何动物中的基于RNAi的治疗,例如人、非人灵长类动物、非人哺乳动物、非人脊椎动物、啮齿动物(小鼠、大鼠、仓鼠、兔等)、家畜动物、宠物(猫、狗等)、非洲蟾蜍属、鱼、昆虫(果蝇(Drosophila)等)和虫(线虫(C.elegans))等。

[0503] 本发明提供了预防对象中与异常或有害的靶基因表达或活性有关的疾病或病症的方法,其通过向对象施用治疗剂(例如,RNAi剂或者编码其的载体或转基因)来实现。如何合适,首先用致敏剂处理对象,以使得更好的响应随后的RNAi治疗。可以通过例如本文所述的诊断或预后测定中的任一种或组合鉴定处于由异常或有害的靶基因表达或活性造成或促成的疾病的风险之下的对象。预防性药剂的施用可以发生在以靶基因异常为特征的症状表现之前,以预防疾病或病患,或者延迟其发展。根据靶基因异常的类型,例如,靶基因、靶基因激动剂或靶基因拮抗剂可用于治疗所述对象。

[0504] 在另一个方面,本发明涉及用于治疗目的的调节靶基因表达、蛋白质表达或活性的方法。因此,在一个示例性实施方案中,本发明的调节方法涉及使能够表达靶基因的细胞与对靶基因或蛋白质有特异性(例如,对于由所述基因编码或指示所述蛋白质的氨基酸序列的mRNA有特异性)的本发明的治疗剂接触,以调节靶蛋白的表达或者一种或更多种活性。这些调节方法可以在体外(例如,用药剂培养细胞)、体内(例如,向对象施用药剂)或离体进行。通常,首先用致敏剂处理对象,以使得更好地响应随后的RNAi治疗。因此,本发明提供了治疗受以靶基因多肽或核酸分子的异常或有害的表达或活性为特征的疾病或病患影响的个体的方法。在靶基因异常地不受调控和/或其中降低靶基因活性可能具有有益效果的情况下,靶基因活性的抑制是期望的。

[0505] 可以向个体施用本发明的治疗剂以治疗(预防性或治疗性)与异常或有害的靶基因活性有关的病患。可以设想药物基因组学(即,个体基因型与个体对外来化合物或药物的响应之间的关系的研究)与这样的治疗一起组合。通过改变药理学活性物质的剂量和血液浓度之间的关系,治疗剂代谢的差异可导致严重的毒性或者治疗失败。因此,医生或临床医生

可能考虑使用在相关药物基因组学中获得的知识来确定是否施用治疗剂以及修正利用治疗剂的治疗的剂量和/或治疗方案。由于受影响人中改变的药物分布(drug disposition)和异常的作用,药物基因组学处理响应于药物的临床上显著的遗传变异。参见例如 Eichelbaum, M. 等.(1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23(10-11):983-985 和 Linder, M. W. 等.(1997) Clin. Chem. 43(2):254-266。

[0506] 皮肤适应症中的RNAi

[0507] 在一些实施方案中,可以施用本文所述的核酸分子或者包含核酸分子的组合物以预处理、处理或预防受损皮肤。本文使用的“受损皮肤”是指表现出不同于正常皮肤的特征的皮肤。受损的皮肤的发生可能与皮肤病学的病症有关。皮肤病学的病症的多个非限制性实例包括酒渣鼻、寻常痤疮、脂溢性皮炎、口周皮炎、痤疮样皮疹、短暂性皮肤棘层松懈的皮肤病和粟粒性坏死性痤疮。在一些情况下,受损皮肤可能包括伤口和/或瘢痕组织。在一些情况下,与本发明有关的方法和组合物可用于促进伤口愈合,预防、减少或抑制瘢痕形成,和/或促进伤口的上皮再形成(re-epithelialisation)。

[0508] 可以在对象的皮肤受损之前用与本发明有关的分子预防性预处理或处理所述对象。本文使用的“预处理”或“预防性处理”是指在皮肤受损之前向皮肤施用核酸。例如,可以在皮肤受损前15分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、24小时、48小时、3天、4天、5天、6天、7天、8天或大于8天预处理对象。在另一些实施方案中,可以在皮肤临受损之前和/或在皮肤受损的同时和/或在皮肤受损后用与本发明有关的分子处理对象。在一些实施方案中,皮肤因医学手术受损,例如外科手术,包括选择性手术。在某些实施方案中,可以将方法和组合物施用到被认为处于受损风险之下的皮肤区域。将理解,本领域技术人员能够仅使用常规试验优化施用的时间安排。

[0509] 在一些方面,可以应用与本发明有关的方法以促进受损皮肤的愈合。施用可以发生在受损皮肤愈合前的任何时间,即使受损皮肤已经部分愈合。施用的时间安排可能取决于数种因素,包括受损皮肤的性质、受损皮肤中损伤的程度,以及受损区域的大小。在一些实施方案中,施用可以在皮肤受损后立即进行,或者在皮肤受损后30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时、12小时、24小时、48小时或大于48小时进行。

[0510] 在一些实施方案中,施用在皮肤受损后48小时(2天)、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天或大于30天进行。在一些实施方案中,施用在皮肤受损后48小时至30天之间进行。在一些实施方案中,施用在皮肤受损后7天至30天之间进行。

[0511] 本发明的方法和组合物可以根据需要施用一次或更多次。例如,在一些实施方案中,组合物可以每天施用或每天施用两次。在一些情况下,组合物可以在受损皮肤形成之前和之后都施用。

[0512] 与本发明有关的组合物可以通过合适的途径施用。在一些实施方案中,施用局部地发生在受损皮肤区域。例如,可以通过皮内注射施用组合物。用于皮内注射的组合物可以包含可注射溶液。在一些实施方案中,皮内注射可以在受损皮肤区域周围或者皮肤可能受损的部位进行。在一些实施方案中,组合物也可以以表面形式施用,例如乳膏剂或软膏剂。在一些实施方案中,本文所述组合物的施用包括初始处理或预处理受损皮肤的部分,而在另一些实施方案中,这样的组合物的施用包括受损皮肤区域的随访护理。

[0513] 待施用的组合物或药物的合适的量可以取决于许多不同因素,并且可以由本领域技术人员通过常规实验确定。可考虑的数种非限制性因素包括药剂的生物活性和生物利用度,药剂的性质,施用方式,半衰期,以及待治疗对象的特征。

[0514] 在一些方面,与本发明有关的核酸分子也可用于治疗和/或预防纤维变性疾病,包括肺纤维化、肝硬化、硬皮病和肾小球肾炎、肺纤维化、肝纤维化、皮肤纤维化、肌肉纤维化、放射性纤维化、肾纤维化、肥厚性玻璃体视网膜病变、再狭窄和子宫纤维化。

[0515] 在一些实施方案中,本文所述核酸分子的治疗有效量可以是足以预防受损皮肤形成和/或改善受损皮肤的状态和/或治疗或预防纤维变性疾病的量。在一些实施方案中,受损皮肤状态的改善可以对应于促进伤口愈合和/或抑制瘢痕形成和/或促进上皮再生。在一些情况下,可以由例如医生或临床医生确定预防受损皮肤形成和/或改善受损皮肤的状态的程度。

[0516] 在一些情况下,可以参考皮肤表现的特性来测量与本发明有关的核酸分子预防受损皮肤形成和/或改善受损皮肤的状态的能力。在一些情况下,这些特性可以包括与可比较时间点的对照皮肤相比受损皮肤的上皮形成速率和/或面积之大小的降低。

[0517] 本文使用的预防受损皮肤形成(例如在外科手术之前)和/或改善受损皮肤的状态(例如,在外科手术之后)可以包括与对照样品中发生的愈合速率相比受损皮肤中愈合速率的任何提高。在一些情况下,可以相对于在可比较时间点处理的皮肤和对照皮肤中取得的上皮再形成速率的比较,或者处理的受损皮肤的相对面积和对照的受损皮肤面积的比较来评估受损皮肤的状态。在一些情况下,预防受损皮肤形成或促进受损皮肤愈合的分子可以是这样的分子,其在施用后,导致在可比较的时间点与对照相比受损皮肤区域表现出提高的上皮再形成速率和/或减小的受损皮肤大小。在一些实施方案中,受损皮肤愈合导致愈合速率比对照中发生的速率大5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0518] 在一些方面,待通过与本发明有关的方法和组合物治疗的对象可以是经历、正在经历或者已经经历了医疗手术(如外科手术)的对象。在一些实施方案中,对象可能易于出现缺陷的、延迟的或以其他方式受损的上皮再形成,例如老年人中的皮肤创伤。伤口愈合与延迟的或以其他方式受损的上皮再形成有关的病症或疾病的非限制性实例包括患有糖尿病的患者、复方用药的患者、绝经后的妇女、易感于压力损伤(pressure injurie)的患者、患有静脉疾病的患者、临床上肥胖的患者、接受化学疗法的患者、接受放射疗法的患者、接受甾族化合物治疗的患者以及免疫受损患者。在一些情况下,缺陷的上皮再形成反应可导致伤口部位的感染,以及慢性伤口如溃疡的形成。

[0519] 在一些实施方案中,与本发明有关的方法可以促进慢性伤口(如溃疡)中受损皮肤的上皮再形成,并且还可以抑制与伤口愈合有关的瘢痕形成。在另一些实施方案中,与本发明有关的方法应用于预防或治疗患者中急性伤口中的受损皮肤,所述患者易导致受损伤口愈合发展成慢性伤口。在另一些方面,与本发明有关的方法应用于促进受损皮肤的加速愈合,同时用于在一般临床环境中阻止、减少或抑制瘢痕形成。在一些方面,这可能涉及处理手术切口,并且应用这样的方法可以导致阻止、减少或抑制瘢痕形成,否则的话将在这样的愈合中发生瘢痕形成。这样的治疗可导致瘢痕不那么明显并且表现出更正常的皮肤结构的再生。在另一些实施方案中,处理的受损皮肤不是手术切口引起的受损皮肤。可以对受损皮

肤进行持续护理并且持续施用药物以促进上皮再形成和愈合。

[0520] 在一些方面,与本发明有关的方法可用于处理与移植手术有关的受损皮肤。这可以包括处理移植物供者部位和/或移植物接受者部位。在一些实施方案中,移植物包括皮肤、人造皮肤或皮肤替代物。与本发明有关的方法也可用于促进上皮再生。如本文使用的,促进上皮再生包括与对照处理的或未处理的上皮中发生的再生相比上皮再生速率的任何增加。在一些情况下,可以使用本领域中已知的合适的上皮再生模型将获得的上皮再生速率与对照处理的或未处理的上皮中发生的上皮再生速率相比较。促进上皮再生可用于在上皮再形成响应受损、被抑制、被阻碍或以其他方式缺陷的情况下诱导有效的上皮再形成。还可以实现促进上皮再生以加快具有上皮损伤的患者中缺陷或正常上皮再形成反应的速率。

[0521] 其中上皮再形成反应可以是缺陷的一些情况包括病症如天疱疮、黑-黑病(家族性良性天疱疮)、中毒性表皮坏死松解症(TEN)/Lyell综合征、大疱性表皮松解、皮肤利什曼病和光化性角化病。肺的缺陷性上皮再形成可能与特发性肺纤维化(IPF)或间质性肺病有关。眼的缺陷性上皮再形成可能与病症如部分角膜缘(limbal)干细胞缺陷或角膜糜烂有关。胃肠道或结肠的缺陷性上皮再形成可能与病症如慢性肛裂(肛门开裂)、溃疡性结肠炎或克罗恩病以及其他炎性肠病有关。

[0522] 在一些方面,与本发明有关的方法用于预防、减少或以其他方式抑制与瘢痕形成有关的受损皮肤。这种方法可以应用在体内的任何部位和任何组织或器官,包括皮肤、眼、神经、肌腱、韧带、肌肉和口腔(包括唇和腭),以及内部器官(例如,肝、心脏、脑、腹腔、盆腔、胸腔、肠和生殖组织)。在皮肤中,治疗可以改变胶原纤维的形态和组织结构,并且可导致产生较不易看到且与周围组织混合的瘢痕。本文是使用的预防、减少或抑制瘢痕形成包括与对照处理和未处理伤口中发生的瘢痕形成水平相比瘢痕形成的任何程度的预防、减少或抑制。

[0523] 例如可以参考微观和/或宏观特征评估和/或测量受损皮肤,例如与真皮瘢痕形成有关的受损皮肤的预防、减少或抑制。宏观特征可以包括皮肤的颜色、高度、表面纹理和硬度。在一些情况下,当处理后皮肤的颜色、高度、表面纹理和硬度与未处理对照相比更加接近类似于正常皮肤时,可以证明预防、减少或抑制了受损皮肤。受损皮肤的微观评估可涉及检查受损皮肤的特征如细胞外基质(ECM)纤维的厚度和/或方向和/或组成以及细胞构成。在一些情况下,当处理后受损皮肤的细胞外基质(ECM)纤维的厚度和/或方向和域组成以及细胞构成与未处理对照相比更加接近类似于正常皮肤时,可以证明预防、减少或抑制了受损皮肤。

[0524] 在一些方面,与本发明有关的方法用于化美容目的,至少部分地有助于改善受损皮肤的美容外观。在一些实施方案中,与本发明有关的方法可用于预防、减少或抑制受损皮肤,例如覆盖身体关节之伤口的瘢痕形成。在另一些实施方案中,对于具有提高的形成可收缩疤之风险的伤口和/或位于高皮肤张力的部位的伤口,与本发明有关的方法可用于促进加速的伤口愈合和/或于预防、减少或抑制伤口的瘢痕形成。

[0525] 在一些实施方案中,在病理性瘢痕形成(例如肥厚性瘢痕和瘢痕疙瘩,其可比正常瘢痕具有更显著的有害影响)的风险增加的情况下,与本发明有关的方法可用于促进受损皮肤的愈合。在一些实施方案中,本文所述用于促进受损皮肤加速愈合和/或预防、减少或抑制瘢痕形成的方法用于病理性瘢痕的手术修复产生的受损皮肤。

[0526] 瘢痕疙瘩是不复原的特别具有侵略性的真皮瘢痕形式。瘢痕疙瘩的瘢痕是凸起的、不规则形状的、颜色为粉红至暗红色,并且特征为延伸到原始伤口的边界以外。瘢痕疙瘩通常一触即痛或疼痛并且可能强烈发痒。尽管瘢痕疙瘩在较深肤色个体中更流行并且经常是家族出现的,但是瘢痕疙瘩也可能出现在所有皮肤类型的人群中。目前的治疗并不令人满意,包括皮质甾族化合物注射、冷冻疗法、皮肤针刺、压力或硅胶敷料、激光或放射治疗以及手术切除。由于瘢痕疙瘩形成在炎症或损伤部位,瘢痕疙瘩治疗或切除可能导致甚至更大的瘢痕疙瘩。

[0527] CTGF表达在皮肤/组织损伤后升高,并且在随后的伤口愈合期间存在。但是,过度伤口愈合(Shi-Wen 2008)和过量瘢痕组织的沉积导致肥厚性瘢痕和瘢痕疙瘩。由于在瘢痕疙瘩(Shi Wen 2008),尤其是在生长边缘(Igarashi等.(1996)J. Investigative Dermatology, 第106卷, 第4期1996年4月, 第729-733页;参见例如图5,通过引用并入本文)中存在提高的和延长的CTGF表达,降低瘢痕疙瘩切除部位的CTGF可以导致降低的瘢痕疙瘩复发。单独手术移除瘢痕疙瘩是不够的,经常导致瘢痕疙瘩复发(40-100%),在一些情况下,导致更大的瘢痕疙瘩复发(Al-Attar2006)。

[0528] 考虑到瘢痕疙瘩中提高的和延长的CTGF表达,在一些实施方案中,需要更激进的给药方案以降低CTGF水平。直到切除前72小时的瘢痕疙瘩的预防性处理可有利于降低待切除的瘢痕疙瘩前缘中升高的CTGF水平。在瘢痕疙瘩切除后,可以如下给予RXI-109以降低瘢痕疙瘩的复发,例如每天,每两天,每周两次,每周,每两周,每三周,每月或前述方案的任意组合。

[0529] 本发明的一些方面可应用于烧伤造成的受损皮肤。响应于烧伤的愈合可以导致不利的瘢痕形成,包括形成肥厚性瘢痕。与本文有关的方法可用于治疗所有涉及上皮层破坏的损伤,例如其中上皮层被破坏的皮肤损伤。上皮组织损伤的其他非限制性实例包括涉及呼吸道上皮细胞、消化道上皮细胞或者包围内部组织或器官的上皮细胞的损伤。

[0530] RNAi治疗肝纤维化

[0531] 在一些实施方案中,与本发明有关的方法用于治疗肝纤维化。肝纤维化是大部分类型的慢性肝病中发生的细胞外基质蛋白(包括胶原蛋白)的过量积累。瘢痕形成过程代表了肝脏对于损伤的响应。晚期肝纤维化导致肝硬化、肝功能衰竭和门静脉高压,并且经常需要肝移植。与皮肤和其他器官通过胶原蛋白和其他基质成分的沉积修复伤口的方式一样,肝脏通和新胶原蛋白的沉积修饰损伤。骨髓来源的活化的肝星状细胞、门成纤维细胞(portal fibroblast)和肌成纤维细胞被认为是受损伤的肝脏中主要的产生胶原蛋白的细胞。这些细胞通过纤维发生(fibrogenic)细胞因子如TGF- β 1、血管紧张素II和瘦素激活。在一些实施方案中,本文提供的方法旨在抑制纤维发生细胞的积累和/或阻止细胞外基质蛋白的沉积。在一些实施方案中,RNAi分子(包括sd-rxRNA和rxRNAori)可设计为靶向CTGF、TGF- β 1、血管紧张素II和/或瘦素。在一些实施方案中,RNAi分子(包括sd-rxRNA和rxRNAori)可设计为靶向表1-25中所列的那些基因。

[0532] 小梁切除术失败

[0533] 小梁切除术是一种外科手术,其被设计成产生穿过虹膜的通道或泡(bleb)以允许从眼睛前面排出过量流体,导致降低的眼内压(IOP),眼内压是青光眼相关的视力丧失的风险因素。小梁切除术失败的最常见原因是瘢痕组织堵塞泡。在某些实施方案中,sd-rxRNA用

于预防小梁切除术引起的瘢痕组织形成。在一些实施方案中, sd-rxRNA靶向间隙连接蛋白43。在另一些实施方案中, sd-rxRNA靶向prolyl 4-羟化酶。在另一些实施方案中, sd-rxRNA靶向前胶原C-蛋白酶。

[0534] 靶基因

[0535] 应理解的是, 基于本文设计和公开的RNAi分子, 本领域技术人员能够根据环境和预期用途设计这样的RNAi分子以靶向多种不同基因。为了预处理、处理或预防受损皮肤和/或促进伤口愈合和/或预防、减少或抑制瘢痕形成, 本领域技术人员将理解, 可以至少部分地基于已知或预测的基因功能和/或已知或预测的基因表达模式鉴定多种合适的靶基因。可以由RNAi分子靶向以用于预处理、处理或预防受损皮肤和/或促进伤口愈合和/或预防、减少或抑制瘢痕形成的基因的数个非限制性实例包括编码以下蛋白质的基因: 转化生长因子 β (TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3)、骨桥蛋白(SPP1)、结缔组织生长因子C(CTGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、低氧诱导因子-1 α (HIF1 α)、胶原蛋白I和/或III、脯氨酰4-羟化酶(P4H)、前胶原C蛋白酶(PCP)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、基质金属蛋白酶9(MMP 9)、整联蛋白、间隙连接蛋白、组胺H1受体、组织型转谷氨酰胺酶、哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)、HoxB13、VEGF、IL-6、SMAD蛋白、核糖体蛋白S6激酶(RSP6)、环加氧酶-2(COX-2/PTGS2)、大麻素受体(CB1, CB2)和/或miR29b。

[0536] 转化生长因子 β 蛋白在哺乳动物中存在三种同种型(TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3), 是属于生长因子超家族的分泌蛋白, 参与调节许多细胞过程, 包括增殖、迁移、凋亡、附着、分化、炎症、免疫抑制和细胞外蛋白的表达。这些蛋白质由多种细胞类型产生, 包括上皮细胞、内皮细胞、造血细胞、神经元细胞和结缔组织细胞。提供人TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号分别为BT007245、BC096235和X14149。在TGF β 家族中, TGF β 1和TGF β 2而非TGF β 3代表了合适的靶标。TGF β 变体比例的改变将有利于更高的伤口愈合并且将阻止过量瘢痕形成。

[0537] 骨桥蛋白(OPN)也称为分泌型磷蛋白1(Secreted phosphoprotein, SPP1)、骨涎蛋白1(Bone Sialoprotein, BSP-1)和早期T淋巴细胞活化剂(early T-lymphocyte activation, ETA-1), 是与羟基磷灰石结合的分泌型糖蛋白。OPN参与多种生物过程, 包括骨重塑、免疫功能、趋化性、细胞活化和凋亡。骨桥蛋白由多种细胞类型产生, 包括内耳、脑、肾脏、蜕膜(deciduum)和胎盘中的成纤维细胞、前成骨细胞、成骨细胞、骨细胞、成牙本质细胞、骨髓细胞、肥大软骨细胞、树突细胞、巨噬细胞、平滑肌、骨骼肌成肌细胞、内皮细胞和骨外(非骨)细胞。提供人成骨桥蛋白的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号为NM_000582.2和X13694。

[0538] 结缔组织生长因子(CTGF)也称为肥大软骨细胞特异性蛋白24, 是参与伤口愈合和硬皮病的分泌型肝素结合蛋白。结缔组织生长因子在许多细胞类型中有活性, 包括成纤维细胞、肌成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞。提供人CTGF的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号为NM_001901.2和M92934。

[0539] 血小板衍生生长因子(PDGF)家族的蛋白质(包括数种同种型)是分泌型丝裂素。因为PDGF蛋白在受伤后由血小板释放, 其(至少部分地)参与伤口愈合。

[0540] 提供人PDGF基因和蛋白质的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号包括X03795(PDGFA)、X02811(PDGFB)、AF091434(PDGFC)、AB033832(PDGFD)。

[0541] 低氧诱导因子-1 α (HIF1 α)是参与细胞对于低氧的反应的转录因子。HIF1 α 参与细胞过程如胚胎血管形成、肿瘤血管发生和缺血性疾病的病理生理学。提供人HIF1 α 的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是U22431。

[0542] 胶原蛋白是最丰富的哺乳动物蛋白,发现于组织如皮肤、肌腱、血管、韧带、器官和骨中。胶原蛋白I蛋白质(例如COL1A1和COL1A2)在伤口愈合期间的瘢痕组织中检出,并且在皮肤中表达。胶原蛋白III蛋白质(包括COL3A1)在伤口中的结缔组织(肉芽组织)中检出,并且也在皮肤中表达。提供人胶原蛋白的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号包括Z74615(COL1A1)、J03464(COL1A2)和X14420(COL3A1)。

[0543] 脯氨酰4-羟化酶(P4H)参与胶原蛋白的产生和氧感测。提供人P4H的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是AY198406。

[0544] 前胶原C-蛋白酶(PCP)是另一种靶标。

[0545] 基质金属蛋白酶2(MMP 2)、基质金属蛋白酶9(MMP 9)属于metzincin金属蛋白酶超家族,并且是锌依赖性肽内切酶。这些蛋白质参与多种细胞过程,包括组织修复。提供人MMP蛋白的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是M55593(MMP2)和J05070(MMP9)。

[0546] 整联蛋白是参与细胞和胞外基质之间的相互作用和通讯的蛋白质家族。脊椎动物包含多种整联蛋白,包括 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_L\beta_2$ 、 $\alpha_M\beta_2$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 。

[0547] 间隙连接蛋白是形成间隙连接的脊椎动物跨膜蛋白家族。间隙连接蛋白的数个实例(在括号内附有基因名)包括Cx23(GJE1)、Cx25(GJB7)、Cx26(GJB2)、Cx29(GJE1)、Cx30(GJB6)、Cx30.2(GJC3)、Cx30.3(GJB4)、Cx31(GJB3)、Cx31.1(GJB5)、Cx31.9(GJC1/GJD3)、Cx32(GJB1)、Cx33(GJA6)、Cx36(GJD2/GJA9)、Cx37(GJA4)、Cx39(GJD4)、Cx40(GJA5)、Cx40.1(GJD4)、Cx43(GJA1)、Cx45(GJC1/GJA7)、Cx46(GJA3)、Cx47(GJC2/GJA12)、Cx50(GJA8)、Cx59(GJA10)和Cx62(GJA10)。

[0548] 组胺H1受体(HRH1)是参与磷脂酶C和磷脂酰肌醇(PIP2)信号途径的代谢型G蛋白偶联受体。提供人HRH1的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是Z34897。

[0549] 组织型转谷氨酰胺酶也称为蛋白质-谷氨酰胺 γ -谷氨酰转移酶2参与蛋白质交联,并且参与生物过程如凋亡、细胞分化和基质稳定化。提供人组织型转谷氨酰胺酶的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是M55153。

[0550] 哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)也称为丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶mTOR和FK506结合蛋白12-雷帕霉素相关蛋白1(FRAP1),参与调解细胞生长和生存、细胞运动、转录和翻译提供人mTOR的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是L34075。

[0551] HoxB13属于同源盒蛋白家族,与功能如皮肤再生和胎儿皮肤发育有关。提供人HoxB13的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是U57052。

[0552] 血管内皮生长因子(VEGF)蛋白是与酪氨酸激酶受体结合的生长因子,参与多种疾病,例如癌症、年龄相关性黄斑变性、类风湿性关节炎和糖尿病视网膜病变。该蛋白质家族的成员包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C和VEGF-D。提供人VEGF的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是M32977(VEGF-A)、U43368(VEGF-B)、X94216(VEGF-C)和D89630(VEGF-D)。

[0553] 白细胞介素-6(IL-6)是参与刺激针对组织损伤的免疫应答的细胞因子。提供人IL-6的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是X04430。

[0554] SMAD蛋白(SMAD1-7,9)是参与调解TGF β 信号传导的转录因子家族。提供人SMAD蛋白的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是U59912(SMAD1)、U59911(SMAD2)、U68019(SMAD3)、U44378(SMAD4)、U59913(SMAD5)、U59914(SMAD6)、AF015261(SMAD7)和BC011559(SMAD9)。

[0555] 核糖体蛋白S6激酶(RSK6)代表了参与转录因子CREB的活化的丝氨酸/苏氨酸激酶家族。提供人核糖体蛋白S6激酶 α -6的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是AF184965。

[0556] 环加氧酶-2(COX-2),也称为前列腺素G/H合酶2(PTGS2),参与脂质代谢和前列腺素类(prostanoid)的生物合成,并且涉及到了炎症疾病如类风湿性关节炎。提供人COX-2的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是AY462100。

[0557] 大麻素受体目前有两种已知亚型CB1和CB2,是G蛋白偶联受体超家族下的一类细胞膜受体。CB1受体主要在脑中表达,但是也在肺、肝脏和肾中表达,而CB2受体主要在免疫系统和造血细胞中表达。提供人CB1的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号是NM_001160226、NM_001160258、NM_001160259、NM_001160260、NM_016083和NM_033181。

[0558] miR29b(或miR-29b)是微小RNA(miRNA),其为短(20-24nt)的非编码RNA,通过影响mRNA的稳定性和翻译二者参与多细胞生物体中基因表达的转录后调节。miRNA由RNA聚合酶II转录,作为加帽的和多腺苷酸化的初级转录物(pri-miRNA)的一部分,所述初级转录物可以是蛋白质编码的或非编码的。由Drosha核糖核酸酶III酶切割初级转录物以产生约70-nt的颈环前体miRNA(pre-miRNA),其被细胞质Dicer核糖核酸酶进一步切割以产生成熟miRNA和反义miRNA星(miRNA*)产物。成熟miRNA并入到RNA诱导的沉默复合物(RISC)中,其通过与miRNA之间的不完全碱基配对识别靶mRNA,并通常导致靶mRNA的转录抑制和不稳定。miR29b的典型miRBase登录号是MI0000105(网址:mirbase.org/cgi-bin/mirna-entry.pl?acc=MI0000105)。

[0559] 在一些实施方案中,sd-rxRNA靶向间隙连接蛋白43(CX43)。这种基因是间隙连接蛋白基因家族的成员。编码的蛋白质是间隙连接的组分,间隙连接由提供低分子量物质从细胞到细胞扩散的途径的细胞间通道的阵列构成。编码的蛋白质是心脏中的间隙连接的主要蛋白质,心脏中的间隙连接被认为在心脏的同步收缩和胚胎发育中具有重要作用。相关无内含子假基因已经作图在染色体5上。这种基因的突变与眼齿指发育不良(oculodentodigital dysplasia)和心脏畸形有关。提供人CX43基因和蛋白的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号包括NM_000165和NP_000156。

[0560] 在另一些实施方案中,sd-rxRNA靶向脯氨酰4-羟化酶(P4HMT)。这种基因的产物属于脯氨酰4-羟化酶家族。这种蛋白质是参与常氧下降解低氧诱导转录因子的脯氨酰羟化酶。其在低氧适应中具有作用,并且可能与细胞氧感测有关。替代地,已经鉴定了编码不同同种型的剪接变体。提供人P4HMT基因和蛋白的DNA和蛋白质序列信息的典型Genbank登录号包括NM_177938、NP_808807、NM_177939和NP_808808。

[0561] 在某些实施方案中,sd-rxRNA靶向前胶原C-蛋白酶。

[0562] 还通过以下实施例进一步说明了本发明,所述实施例绝不应解释为进一步的限制。贯穿本申请引用的所有参考文献(包括文献参考、授权的专利、公开的专利申请和共同待决的专利申请)的全部内容明确地通过引用并入本文。

实施例

[0563] 实施例1:在体外和体内临床前实验中RXI-109有效沉默CTGF

[0564] 图1A证明了RXI-109的体外效力。在A549(人腺癌肺泡基底上皮)细胞中测试RXI-109的活性(10,000个细胞/孔,96孔板)。在无血清培养基(Accell siRNA递送培养基, ThermoFisher)中,用不同浓度的RXI-109或非靶向对照(#21803)处理A549细胞。测试浓度为1、0.5、0.1、0.05、0.025和0.01 μ M。非靶向对照sd-rxRNA(#21803)与RXI-109具有相同的结构,并且在两条链中均包含类似的稳定化修饰。施用后48小时,裂解细胞,并且使用基因特异性探针(Affymetrix)根据制造商方案通过Quantigene branched DNA测定确定mRNA水平。数值归一化至管家基因(PPIB)并且相对于非靶向对照作图。误差条(error bar)表示三份生物重复的平均值的标准差。

[0565] 图1B证明两次皮内注射RXI-109后体内(大鼠皮肤)中的CTGF沉默。

[0566] 示出的数据来自使用大鼠皮肤的切割伤口模型的研究。在两次皮内注射RXI-109后,对比于非靶向对照,CTGF的沉默维持至少5天。CTGF mRNA的减少是剂量依赖性的;与剂量匹配的非靶向对照相比,300 μ g和600 μ g分别降低51%和67%。方法:在第1天和第3天,通过皮内注射向大鼠背部四个部位中的每一个施用RXI-109或非靶向对照(NTC)(每200 μ L注射剂中300 μ g或600 μ g)。第二剂量(第3天)后约30分钟,在每个注射部位制造4mm切割伤口。在第8天收获包含伤口部位和周围组织的最终活检样品。分离RNA并且通过qPCR进行基因表达分析。数据归一化至TATA盒结合蛋白(TBP)管家基因的水平,并且相对于设为1.0的PBS载剂对照作图。每一个条表示来自12个活检样品(3只大鼠,每只大鼠4个处理部位)的平均数据。误差条表示单个活检样品之间的标准差。RXI-109处理组对比于剂量匹配的非靶向对照组的p值为:600 μ g时** $p < 0.001$,300 μ g时* $p < 0.01$ 。

[0567] 实施例2:CTGF沉默在啮齿类动物模型中不延迟并且可以促进早期伤口愈合

[0568] 图2证明CTGF沉默在啮齿类动物模型中不延迟并且可以促进早期伤口愈合。图2A描绘了大伤口愈合研究的概况,其包括在大鼠中预防性给药:方法:使4个包括12只大鼠的组各自在背部上的两个部位中的每处接受600 μ g RXI-109的200 μ L皮内注射。48小时后,大鼠在每个部位接受第二次注射,然后在注射后15分钟制造4mm的切割伤口。在受伤后第5天处死四只大鼠。在受伤后7天,其余大鼠接受额外200 μ L剂量的RXI-109,其分成4 $\times$ 50 μ L注射在伤口周围。在受伤后第9天和第15天每组处死4只大鼠。在整个研究中,每天评估未麻醉动物的伤口宽度和视觉严重程度。在处死时,收获伤口部位,切成两半,一半固定在锌固定剂中,之后用进行石蜡封闭。切出不连续切片并且用Masson三色染色,进行伤口宽度、伤口面积、上皮再形成和肉芽组织成熟的组织学评估。每个一分为二样品的剩余一半在RNAlater溶液中储存24小时,之后骤冷在-80 $^{\circ}$ C并且运输到RXi Pharmaceuticals Corporation用于通过qPCR进行基因表达分析。分离RNA并且通过qPCR进行基因表达分析。

[0569] 图2B证明了三皮内注射RXI-109后体内(大鼠皮肤)的CTGF沉默。在两次皮内注射RXI-109后,对比于非靶向对照,CTGF的沉默维持至少5天。与PBS对照相比,300 μ g时CTGF mRNA减少53%。

[0570] 分离RNA并且通过qPCR进行基因表达分析。数据归一化至Sfrs11管家基因并且相对于设为1.0的PBS载剂对照作图。每一个条表示来自8个活检样品(4只大鼠,每只大鼠2个

处理部位)的平均数据。误差条表示单个活检样品之间的标准误差。RXI-109处理组对比于PBS的p值为300 μ g剂量 $p < 0.0003$ 。

[0571] 图2C证明了在大鼠皮肤中施用RXI-109不延迟早期伤口闭合,如通过测量伤口确定的。RXI-109不延迟早期伤口闭合,如通过伤口宽度测量确定的。图2A中给出了研究设计和方法。在受伤前2天、受伤时和受伤后7天,通过皮内注射施用RXI-109。在第6至9天,RXI-109处理的伤口的宽度比PBS对照处理的伤口更小(在第6、7和8天,对比于NTC,600 μ g剂量RXI-109分别为 $p = 0.002$ 、 0.0008 、 0.002)。

[0572] 图2D证明了在大鼠皮肤中施用RXI-109不延迟早期伤口闭合,如通过百分比上皮再形成的组织学测量确定的。RXI-109不延迟早期伤口闭合,如通过百分比上皮再形成的组织学测量确定的。图2A中给出了研究设计和方法。在受伤前2天、受伤时和受伤后7天,通过皮内注射施用RXI-109。组织学百分比上皮再形成测量表明,在受伤后5天,RXI-109处理的伤口的上皮再形成程度大于PBS处理的伤口(对比于PBS, $p = 0.004$)。在受伤后15天,所有伤口完全上皮再形成。

[0573] 实施例3:RXI-109 1期临床试验

[0574] 图3描绘了RXI-109 1期临床试验——研究1201和1202的概况。研究1201由以下组成:用于处理切口瘢痕的RXI-109的1期单中心、随机化、单剂量、双盲、递增剂量的对象内对照的研究。研究1202由以下组成:用于处理切口瘢痕的RXI-109的1期单中心、随机化、多剂量、双盲、递增剂量的对象内对照的研究。评估多个参数,包括:对比于载剂的安全性和副作用评估,对比于载剂的摄影比较,对比于载剂的瘢痕部位的组织学比较,以及局部皮内注射后的药代动力学参数。

[0575] 实施例4:RXI-109-1201:腹部切口布局,初步盲组织学数据和盲数据

[0576] 图4描绘了1期临床试验RXI-109-1201的切口布局的概况。根据每位对象的预定随机模式,对象接受RXI-109或安慰剂的单次皮内注射。半数部位用RXI-109处理,半数用安慰剂处理。

[0577] 对象(15位对象(5组,每组3位志愿对象))在其腹部的两个部位接受RXI-109的ID(皮内)注射,并且在另两个部位接受安慰剂(PBS)的ID注射。次日,在这些部位制造小切口以模拟外科手术。对于2个2cm切口中的每一个测试的5个剂量水平为1、2.5、5、7.5和10mg/注射,每位对象的总剂量分别为2、5、10、15和20mg。施用后84天,采集切口部位的活检样品用于组织学分析。

[0578] RXI-109-1201给药方案:在受伤前1天处理对象。

[0579] 图5描绘了切口后84天来自RXI-109-1201的伤口区域的初步盲组织学数据。在组织学数据上描绘了切口部位的图像。在受伤后84天从对象采集正常皮肤样品和经处理皮肤样品的活检样品用于组织学评估。确定每份样品的伤口面积和CTGF水平。

[0580] 图6描绘了在切口后84天,来自较低切口部位的每部位三个切片的伤口面积总和的初步盲组织学数据。在受伤后84天从对象采集正常皮肤样品和经处理皮肤样品的活检样品用于组织学评估。确定每份样品的伤口面积和CTGF水平。

[0581] 图7描绘了切口后84天,来自RXI-109-1201的CTGF染色和 α -SMA染色的伤口区域的初步盲组织学数据(20 $\times$ 放大率)。

[0582] 在受伤后84天从对象采集正常皮肤样品和经处理皮肤样品的活检样品用于组织

学评估。确定每份样品的伤口面积和CTGF水平。较小的伤口面积似乎对应于较低CTGF表达水平。

[0583] 实施例5:RXI-109-1202:对象的腹部切口布局以及临床图片和数据

[0584] 图8描绘了1期临床试验RXI-109-1201的切口布局的概况。根据每位对象的预定随机模式,对象在两周中接受RXI-109或安慰剂的三次皮内注射。半数部位用RXI-109处理,半数用安慰剂处理。

[0585] 对象(12位对象(4组,每组3位志愿对象))在其腹部的4个部位处接受RXI-109的ID注射,以及在另外四个部位接受安慰剂(PBS)的ID注射。对象在第1天、第8天和第15天接受总计3次药物施用。在首次施用后30分钟,在这些部位制造小切口以模拟外科手术。对于4个2cm切口中的每一个测试的4个剂量水平为2.5、5、7.5和10mg/注射,每位对象的总剂量分别为每天10、20、30和40mg。受伤后18天和84天,采集切口部位的活检样品用于组织学和mRNA表达分析。

[0586] RXI-109-1202给药方案:以三种情形用药物处理对象:受伤前30分钟,受伤后1周和受伤后2周。

[0587] 图9描绘了来自1期试验RXI-109-1202的切口后18天(第三次和最后的剂量后3天)对象切口部位的图像。示出的数据是盲的,代码未解开。

[0588] 图10描绘了来自1期试验RXI-109-1202的每个切口部位的切口后18天(第三次和最后的剂量后3天)对象切口部位的图像以及相应的相关CTGF mRNA水平。示出的数据是盲的,代码未解开。在受伤后18天从对象采集正常皮肤样品和经处理皮肤样品的活检样品用于评估CTGF mRNA水平。使用qPCR(taqman Probes ABI)确定CTGF和管家mRNA水平。

[0589] 实施例6:RXI-109-1301:腹部修复的瘢痕段布局,摄影的1个月期中分析

[0590] 图11描绘了RXI-109的2期临床试验——研究RXI-109-1301的概况。研究RXI-109-1301由以下组成:多中心、前瞻性、随机化、双盲、对象内对照的2a期研究,基于由先前手术导致的下腹部上横向肥厚性瘢痕上的瘢痕修复手术的结果评估RXI-109的效力和安全性。评估多种参数,包括对比于载剂的安全性和副作用,以及对比于载剂的摄影比较。

[0591] 图12描绘了2期临床试验RXI-109-1301的修复的瘢痕段布局的概况。根据每位对象的预定随机模式(修复的瘢痕段的中段不处理),对象在2周内接受RXI-109或安慰剂的三次皮内注射。修复的瘢痕段的一部分(R或L)用RXI-109处理,而另一部分(R或L)用安慰剂处理。

[0592] 对象(16位对象(2组,每组8位志愿对象))在其修复的瘢痕段的一截(R或L)上接受RXI-109的ID注射,在修复的瘢痕段的另一个部位接受安慰剂(生理盐水)的ID注射。对象在第1天、第8天和第15天(组1)或第14天、第21天和第28天(组2)接受总计3次药物施用。测试的剂量水平为5mg/cm。在修复后1个月、3个月、6个月和9个月采集的经修复之瘢痕段的摄影。

[0593] 图13和14描绘了由盲评估者对摄影进行的1个月期中分析。要求评估者(a)选择看起来更好的一侧(左或右),还是没有差异,(b)提供从0(细线瘢痕)至10(可能的最差瘢痕)的VAS得分。盲评估者的期中分析表明,组2(第14天、第21天和第28天)中的RXI-109处理优于组1(第1天、第14天和第21天)中的RXI-109处理。仅在组2中,通过比较观察(RXI-109处理的瘢痕对比于安慰剂处理的瘢痕)以及通过使用视觉模拟量表评估瘢痕,RXI-109处理的

瘢痕具有统计学优势。

[0594] 图15描绘了组1对象的手术前和修复后1个月的瘢痕段的摄影。

[0595] 图16描绘了组2对象的手术前和修复后1个月的瘢痕段的摄影。

[0596] 等同方案

[0597] 本领域技术人员将意识到或者能够仅使用常规实验确定本文所述本发明的具体实施方案的许多等同方案。这样的等同方案旨在由所附权利要求涵盖。

[0598] 本文公开的所有参考文献(包括专利文件)通过引用整体并入本文。本申请通过引用并入以下文献的全部内容,包括所有附图和说明书的所有部分(包括序列列表或氨基酸核苷酸序列):2011年3月24日提交的题为RNA INTERFERENCE IN DERMAL AND FIBROTIC INDICATIONS的PCT公开No.WO 2011/119887(申请No.PCT/US2011/029867);2009年9月22日提交的题为“REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS”的PCT公开No.WO2010/033247(申请No.PCT/US2009/005247);2009年2月11日提交的题为“MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF”的PCT公开No.WO2009/102427(申请No.PCT/US2009/000852);2013年4月4日提交的题为“RNA INTERFERENCE IN DERMAL AND FIBROTIC INDICATIONS”美国专利申请No.US2014/0113950;2014年8月5日授权的题为“Reduced Size Self-Delivering RNAi Compounds”的美国专利No.8,796,443;2014年3月4日授权的题为“RNA Interference in Skin Indications”的美国专利No.8,644,189;以及2011年2月17日公开的题为“Modified RNAi Polynucleotides and Uses Thereof”的美国专利申请No.US 2011-0039914。

序列表

	<110>	RXi Pharmaceuticals Corporation	
	<120>	利用经化学修饰的寡核苷酸处理伤口愈合的方法	
	<130>	R0659.70022W000	
	<140>	尚未分配	
	<141>	2014-12-04	
	<150>	US 62/049,299	
	<151>	2014-09-11	
	<150>	US 61/911,991	
	<151>	2013-12-04	
	<150>	US 61/911,993	
	<151>	2013-12-04	
	<160>	17	
	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
	<211>	13	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的多核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(2)..(2)	
	<223>	2' OMe修饰的	
[0001]	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(4)..(10)	
	<223>	2' OMe修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(11)..(13)	
	<223>	硫代磷酸酯核苷酸间连接	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(12)..(13)	
	<223>	2' OMe修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(13)..(13)	
	<223>	TEG-Ch1修饰的	
	<400>	1	
		gcacuuuucu aga	13
	<210>	2	
	<211>	19	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的多核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	磷酸化的	

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	2' OMe修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(2)..(3)	
	<223>	2' F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(6)..(6)	
	<223>	2' OMe修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(8)..(8)	
	<223>	2' OMe修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(11)..(11)	
	<223>	2' F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(13)..(13)	
	<223>	2' OMe修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(13)..(19)	
	<223>	硫代磷酸酯核苷酸间连接	
[0002]	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(17)..(17)	
	<223>	2' OMe修饰的	
	<400>	2	
		ucuagaaagg ugcaaacau	19
	<210>	3	
	<211>	13	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的多核苷酸	
	<400>	3	
		gcaccuuucu aga	13
	<210>	4	
	<211>	19	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的多核苷酸	
	<400>	4	
		ucuagaaagg ugcaaacau	19
	<210>	5	
	<211>	14	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的多核苷酸	

	<400> 5 uugcaccuuu cuaa	14
	<210> 6 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的多核苷酸	
	<400> 6 uuagaaaggu gcaaacaagg	20
	<210> 7 <211> 14 <212> RNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的多核苷酸	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(2) <223> 2' OMe修饰的 <220> <221> misc_feature <222> (4)..(4) <223> 2' OMe修饰的	
[0003]	<220> <221> misc_feature <222> (6)..(14) <223> 2' OMe修饰的 <220> <221> misc_feature <222> (12)..(14) <223> 硫代磷酸酯核苷酸间连接 <220> <221> misc_feature <222> (14)..(14) <223> TEG-Chl修饰的	
	<400> 7 uugcaccuuu cuaa	14
	<210> 8 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的多核苷酸	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> 磷酸化的 <220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> 2' OMe修饰的 <220>	

[0004]	<221>	misc_feature	
	<222>	(2)..(2)	
	<223>	2'F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(6)..(6)	
	<223>	2'OMe修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(10)..(10)	
	<223>	2'F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(12)..(12)	
	<223>	2'F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(13)..(15)	
	<223>	2'OMe修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(14)..(20)	
	<223>	硫代磷酸酯核苷酸间连接	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(16)..(16)	
	<223>	2'F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(17)..(19)	
	<223>	2'OMe修饰的	
<400> 8			
uuagaaaggu gcaaacaagg			20
<210> 9			
<211> 13			
<212> RNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的多核苷酸			
<400> 9			
gugacaaaaa gua			13
<210> 10			
<211> 19			
<212> RNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的多核苷酸			
<400> 10			
uacuuuuggu cacacucuc			19
<210> 11			
<211> 13			
<212> RNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的多核苷酸			

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(13)..(13)	
	<223>	TEG-Ch1修饰的	
	<400>	11	
		gugacaaaa gua	13
	<210>	12	
	<211>	19	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的多核苷酸	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	磷酸化的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(1)	
	<223>	2' OMe修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(3)..(7)	
	<223>	2' F修饰的	
	<220>		
[0005]	<221>	misc_feature	
	<222>	(10)..(10)	
	<223>	2' F修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(11)..(11)	
	<223>	2' OMe修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(13)..(13)	
	<223>	2' OMe修饰的	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(13)..(19)	
	<223>	硫代磷酸酯核苷酸间连接	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(15)..(18)	
	<223>	2' OMe修饰的	
	<400>	12	
		uacuuuuggu cacacucuc	19
	<210>	13	
	<211>	13	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的多核苷酸	
	<400>	13	
		ccuuuucuagu uga	13

	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<400> 14	
	ucaacuagaa aggugcaaa	19
	<210> 15	
	<211> 13	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(7)	
	<223> 2' OMe修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10)..(13)	
	<223> 2' OMe修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(13)	
	<223> 硫代磷酸酯核苷酸间连接	
[0006]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(13)	
	<223> TEG-Chl修饰的	
	<400> 15	
	ecuuuuciagu uga	13
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 磷酸化的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 2' OMe修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(2)	
	<223> 2' F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)..(6)	
	<223> 2' F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	

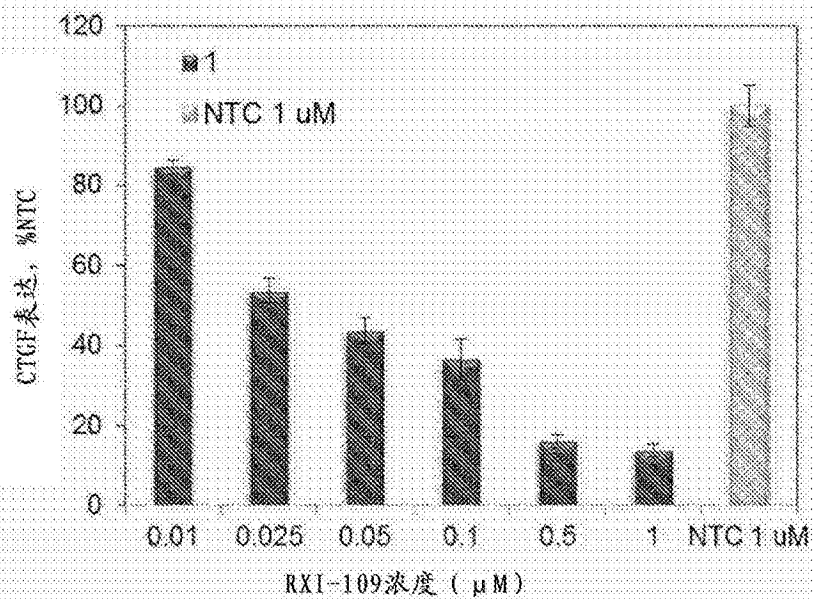
	<222> (10)..(10)	
	<223> 2' OMe修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(14)	
	<223> 2' F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15)..(15)	
	<223> 2' OMe修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16)..(16)	
	<223> 2' F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(19)	
	<223> 硫代磷酸酯核苷酸间连接	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (17)..(18)	
	<223> 2' OMe修饰的	
	<400> 16	
	ucaacuagaa aggugcaaa	19
	<210> 17	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0007]	<220>	
	<223> 合成的多核苷酸	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 磷酸化的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 2' OMe修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(3)	
	<223> 2' F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (6)..(6)	
	<223> 2' OMe修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (8)..(8)	
	<223> 2' OMe修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(11)	
	<223> 2' F修饰的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(13)	
	<223> 2' F修饰的	

	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(13)..(19)
	<223>	硫代磷酸酯核苷酸间连接
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(14)..(16)
	<223>	2' OMe修饰的
[0008]	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(17)..(17)
	<223>	2' F修饰的
	<220>	
	<221>	misc_feature
	<222>	(18)..(18)
	<223>	2' OMe修饰的
	<400>	17
	ucuagaaagg	ugcaaacau
		19

在体外和体内临床前实验中RXI-109有效沉默CTGF

1A

体外CTGF沉默

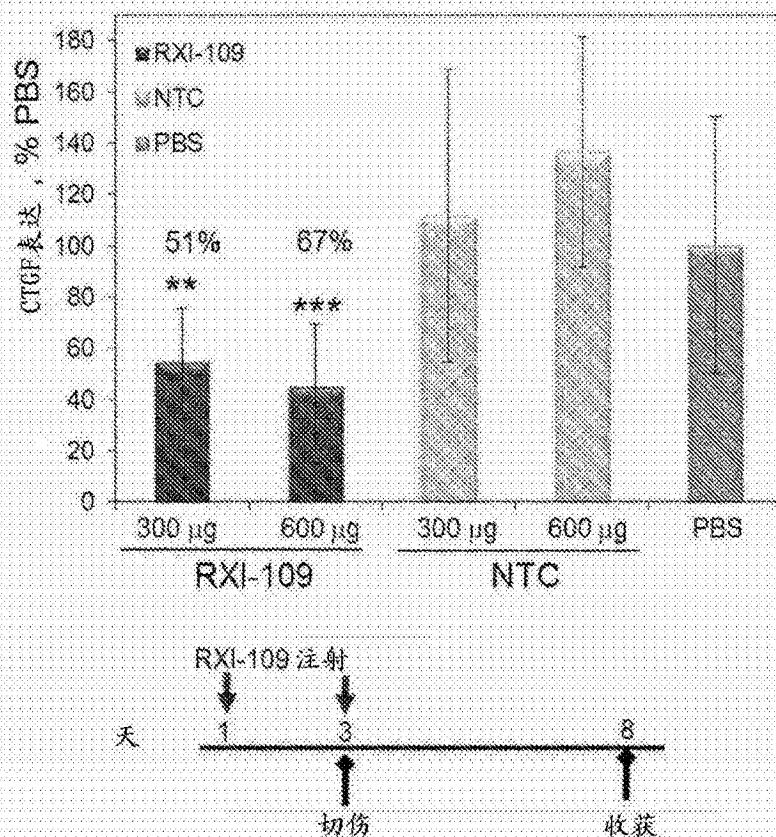


- 用RXI-109和NTC处理A549细胞
- 被动摄取48小时
- $EC_{50} = 29.4 \pm 6.3$ nM

在体外和体内临床前实验中RXI-109有效沉默CTGF

1B

大鼠皮肤中体内CTGF沉默

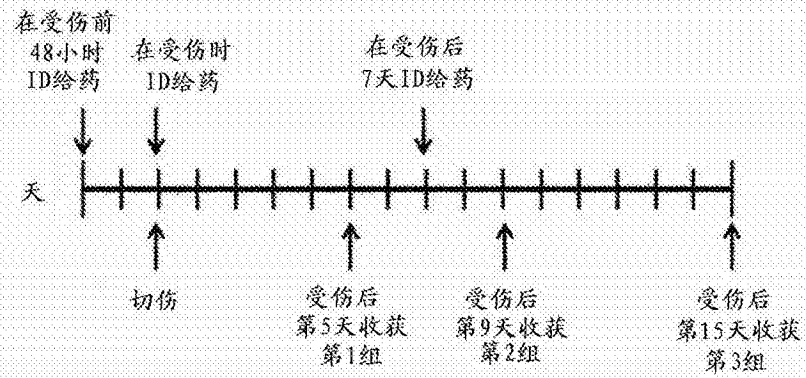


- 在第8天，通过QPCR量化mRNA水平，相对于管家基因归一化并且相对于PBS设置
- ** $p=0.0015$, *** $p=0.0001$ (相对于剂量匹配的NTC)
- PBS = 磷酸盐缓冲盐水 (载剂对照)
- NTC = 非靶向对照sd-rxRNA

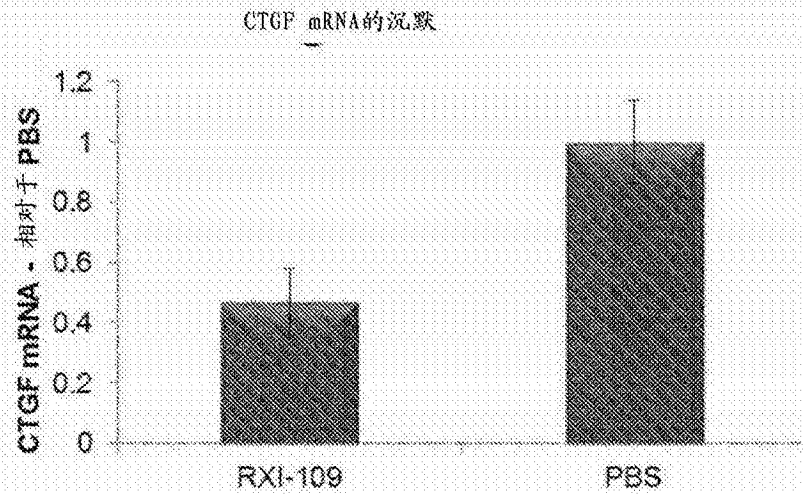
图1

啮齿类动物模型中CTGF沉默不延迟并且可以促进早期伤口愈合

2A



2B



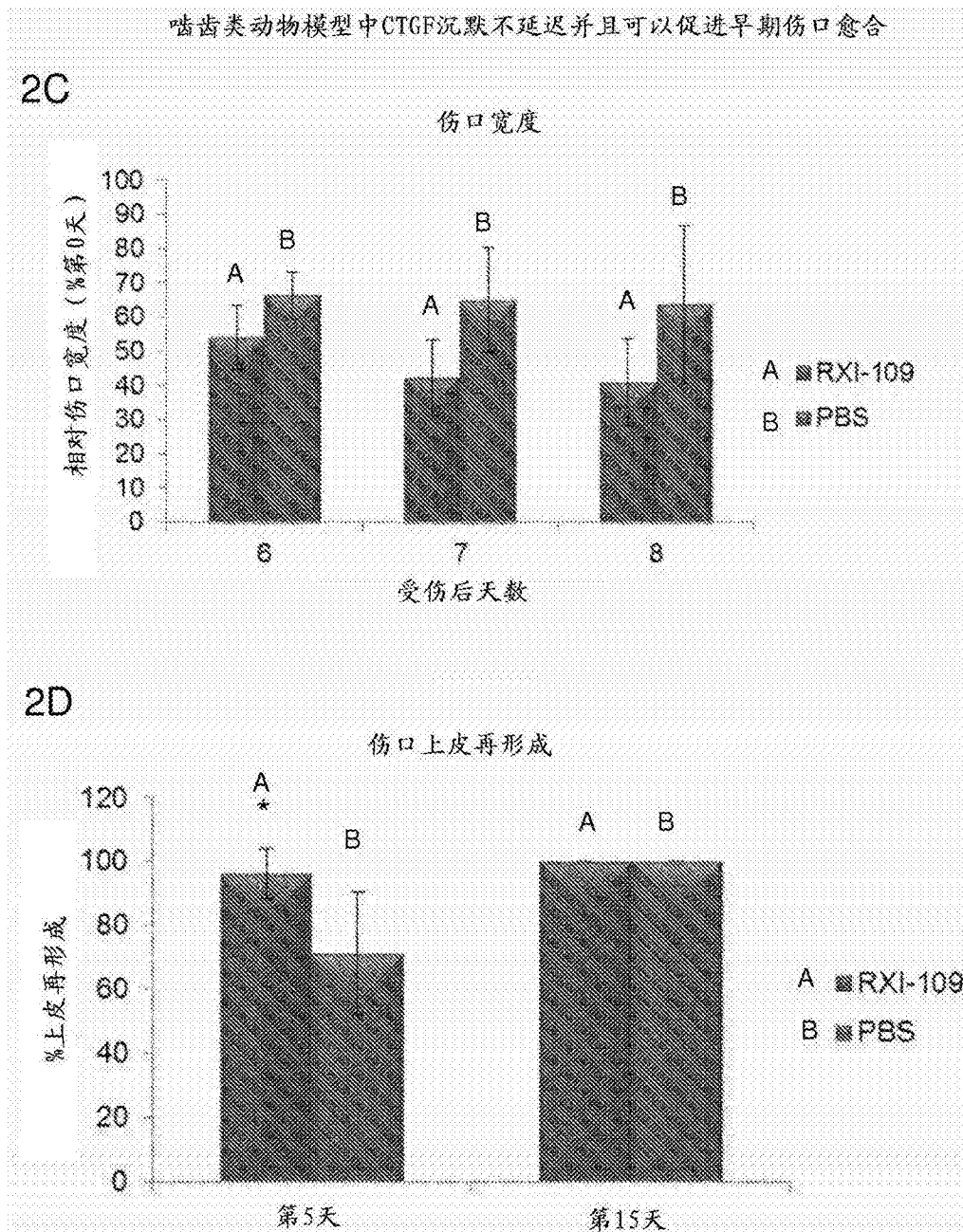


图2

RXI-109 1期临床试验

(1) 研究1201: 用于处理切口瘢痕的RXI-109的1期单中心、
随机化、单剂量、双盲、递增剂量的、对象内受控的研究

(2) 研究1202: 用于处理切口瘢痕的RXI-109的1期单中心、
随机化、多剂量、双盲、递增剂量的、对象内受控的研究

评估的参数:

- 对比于载剂的安全性和副作用评估
- 对比于载剂的摄影比较
- 对比于载剂的瘢痕部位的组织学比较
- 局部皮内注射后的药代动力学参数

图3

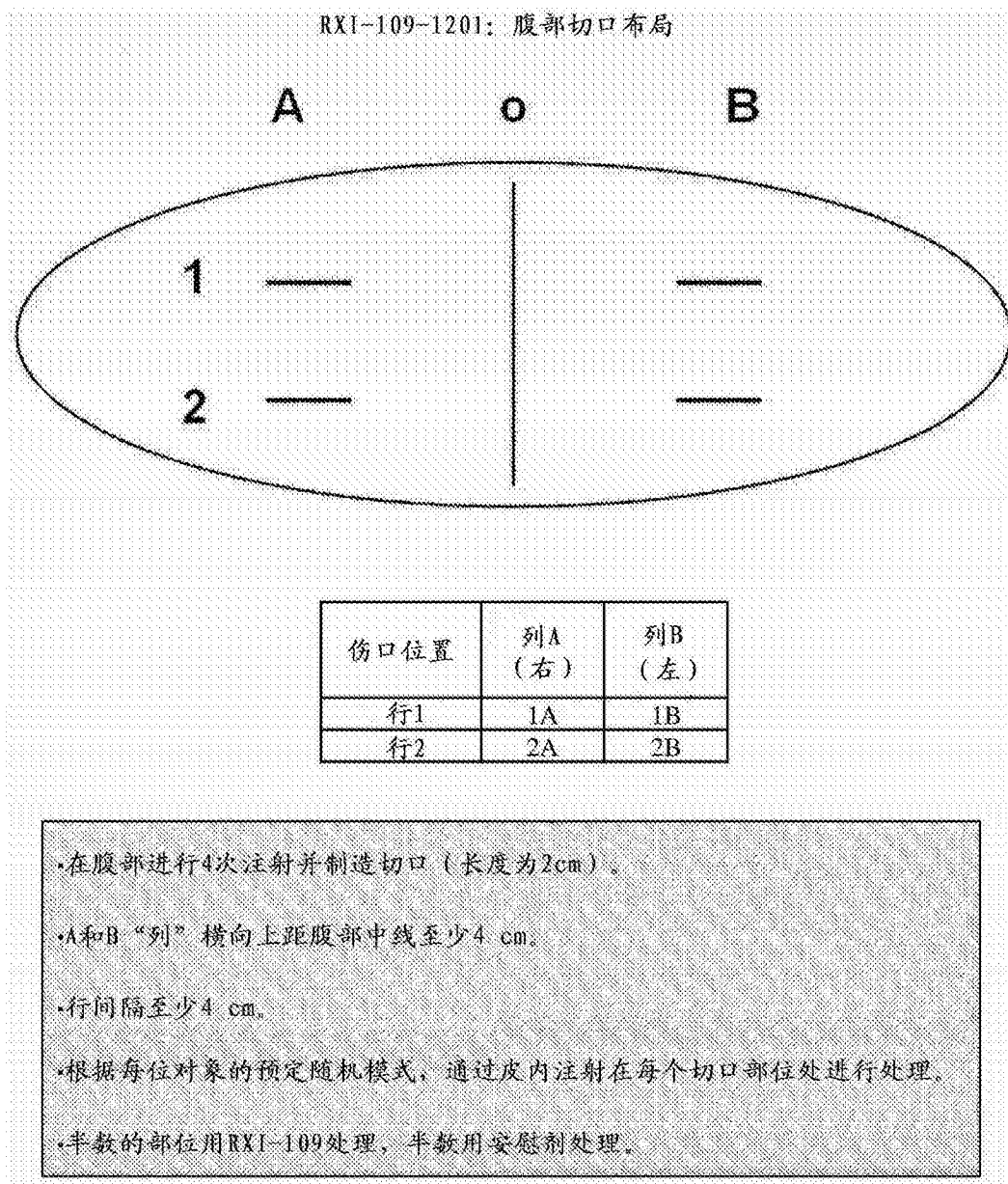


图4

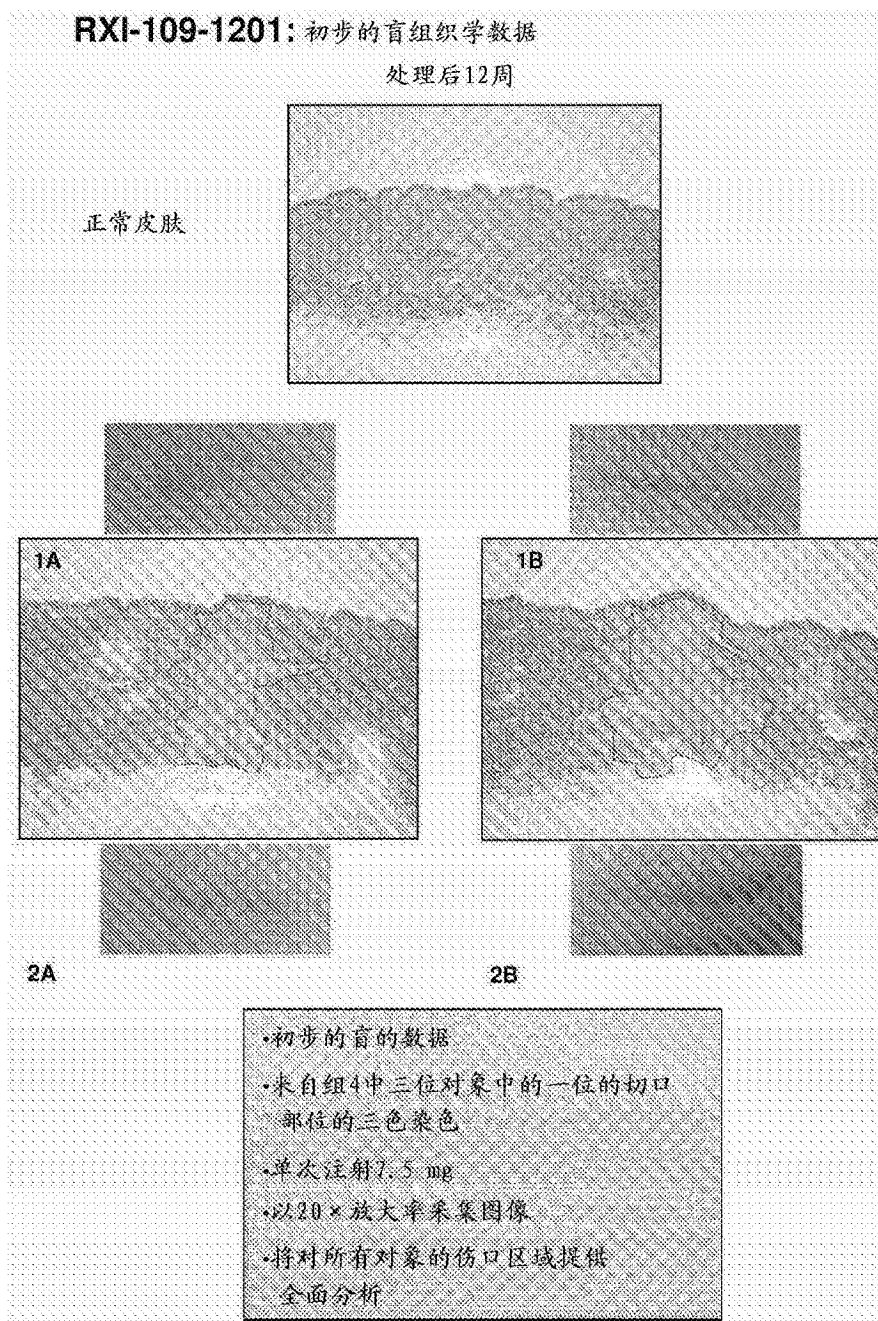


图5

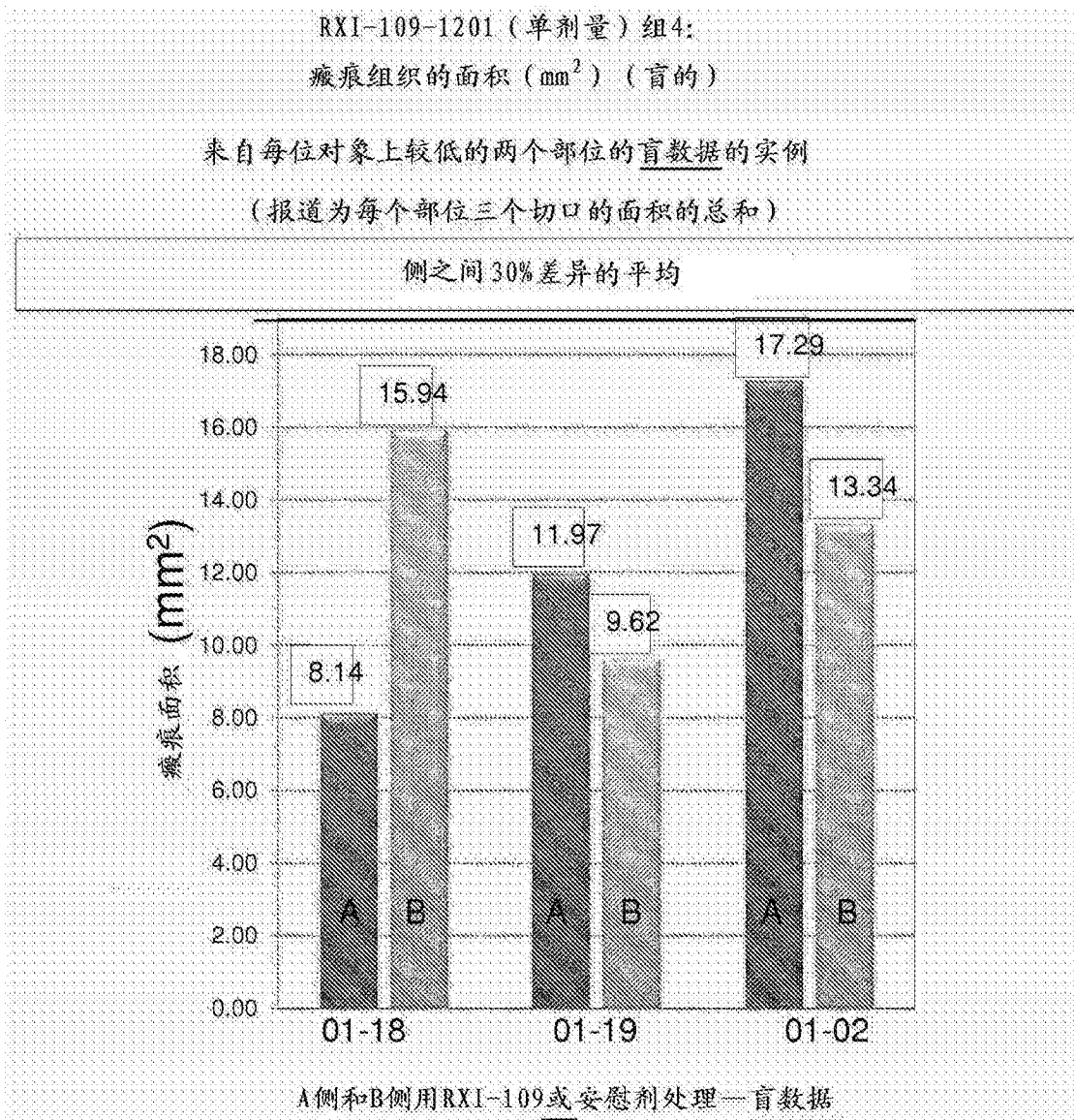


图6

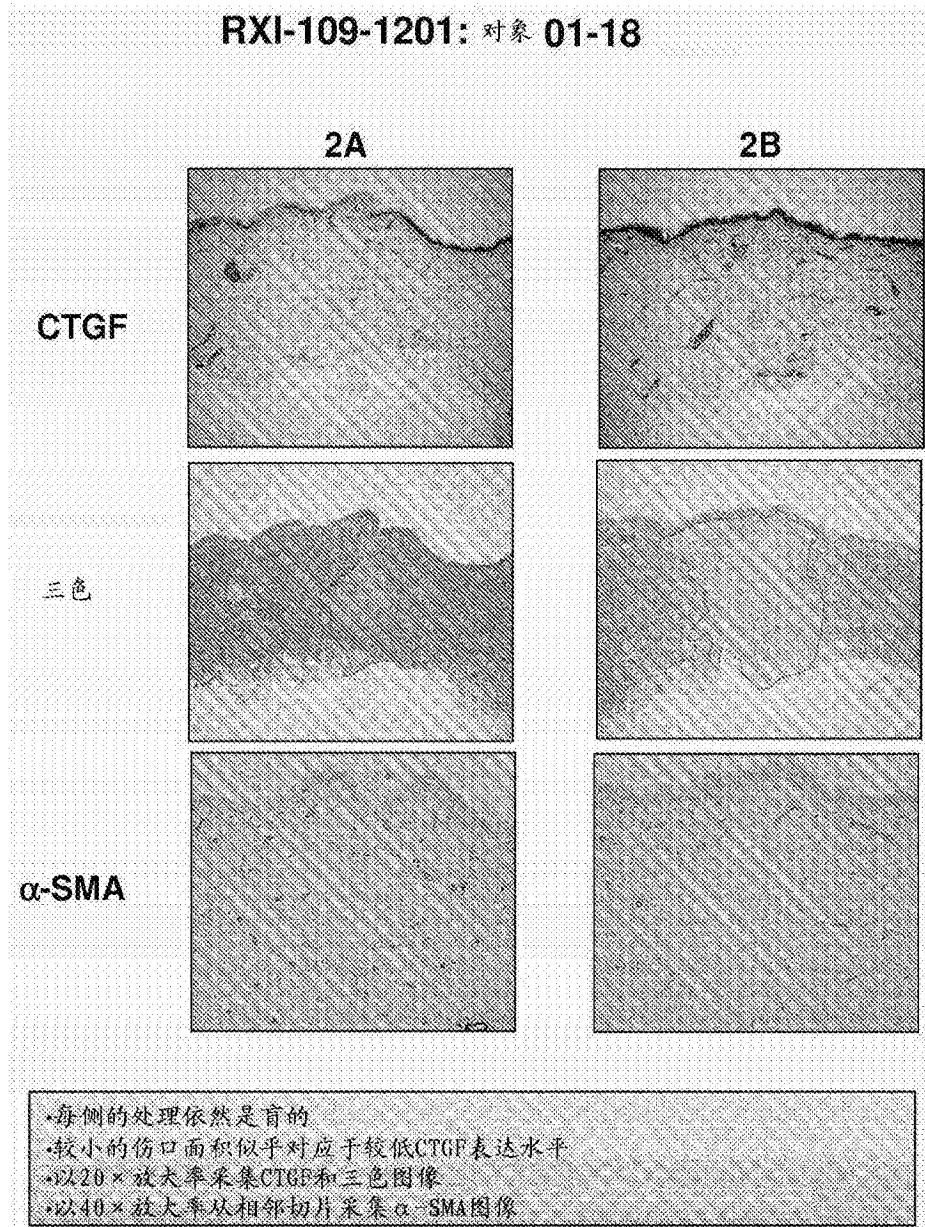
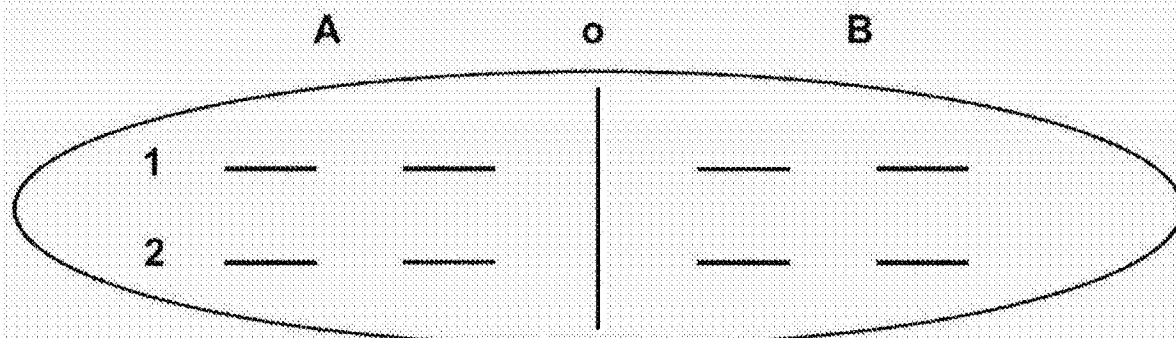


图7

RXI-109-1202: 腹部切口布局

伤口位置	列A (右)	列B (左)
行1	1A	1B
行2	2A	2B

- 在腹部进行8次注射并制造切口（长度为2cm）—每个切口在给定时间段接受3次注射。
- A和B“列”横向上距腹部中线至少4 cm。
- 行间隔至少4 cm。
- 根据每位对象的预定随机模式，通过皮内注射在每个切口部位处进行处理。
- 半数的部位用RXI-109处理，半数用安慰剂处理。

图8

RXI-109-1202: 组2中对象的临床图像 (第三次和最后的剂量后3天)

R和L在腹部的右侧和左侧, 并用RXI-109或安慰剂处理——盲数据——代码未解开

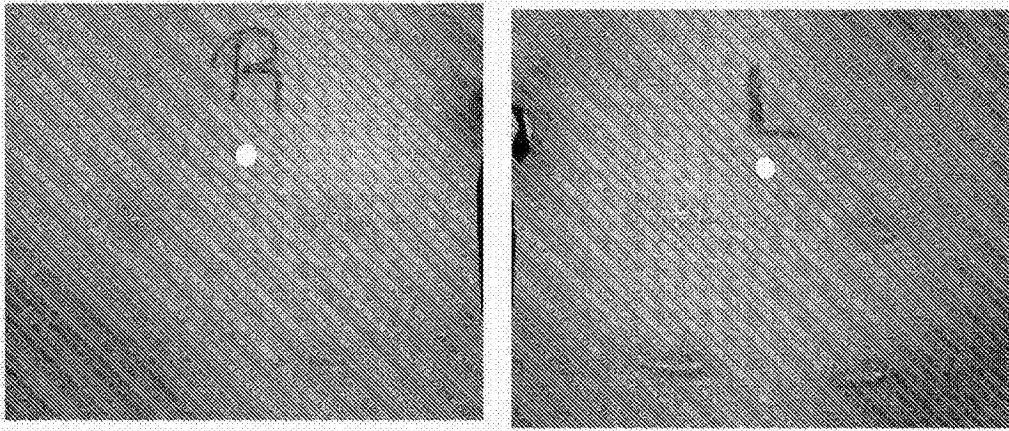


图9

RXI-109-1202: 组1中对象的临床图像和CTGF mRNA水平 (第三次和最后的剂量后3天) 右侧和左侧用RXI-109或安慰剂处理—盲数据—代码未解开

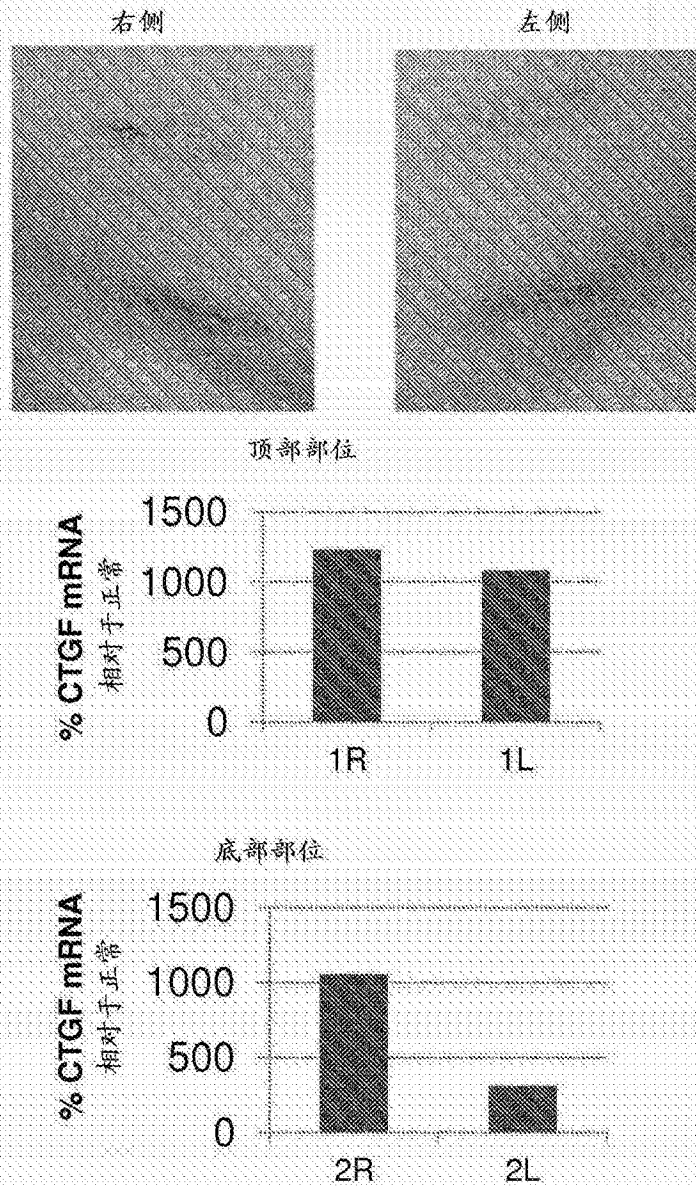


图10

RXI-109 2期临床试验

(1) 研究1301: 多中心、前瞻性、随机化、双盲、对象内受控的2a期研究, 以在健康成人中评估RXI-109对于由先前手术导致的下腹部上横向肥厚性瘢痕上的瘢痕修复手术之结果的效力和安全性。

评估的参数:

- 对比于载剂的安全性和副作用评估
- 对比于载剂的摄影比较

图11

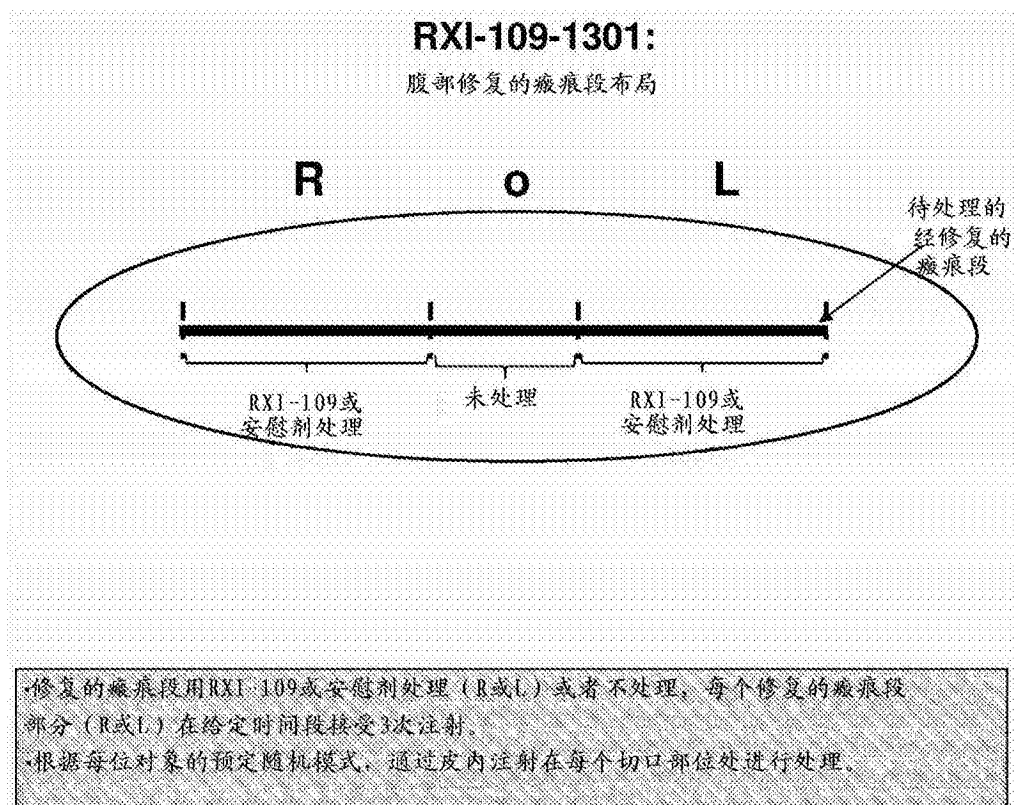


图12

RXI-109-1301

下腹部肥厚性瘢痕

- 在手术后1个月由11位盲的评估者对摄影进行评估
 - (1) 选择是否一侧（左或右）看起来更好，或者没有差异，
 - (2) 提供从0（细线瘢痕）至10（可能的最差瘢痕）的VAS得分
- 组1（早期处理）
 - 86例观察中的15位认为RXI-109更好
- 组2（延迟处理）
 - 88例观察中的52位认为RXI-109更好（ $p < 0.001$ Fisher 双边）

图13

RXI-109-1301

下腹部肥厚性瘢痕

- 在1个月时从0至10的视觉模拟得分分析（得分越小越好）-Mann Whitney U检验-双边
- 组1（在第1天、第8天和第15天处理）
 - RXI-109的中位数得分=2
 - 安慰剂的中位数得分=2
 - 没有显著差异
- 组2（在第14天、第21天和第28天处理）
 - RXI-109的中位数得分=2
 - 安慰剂的中位数得分=2.5
 - 在 $p < 0.05$ 有显著差异

图14

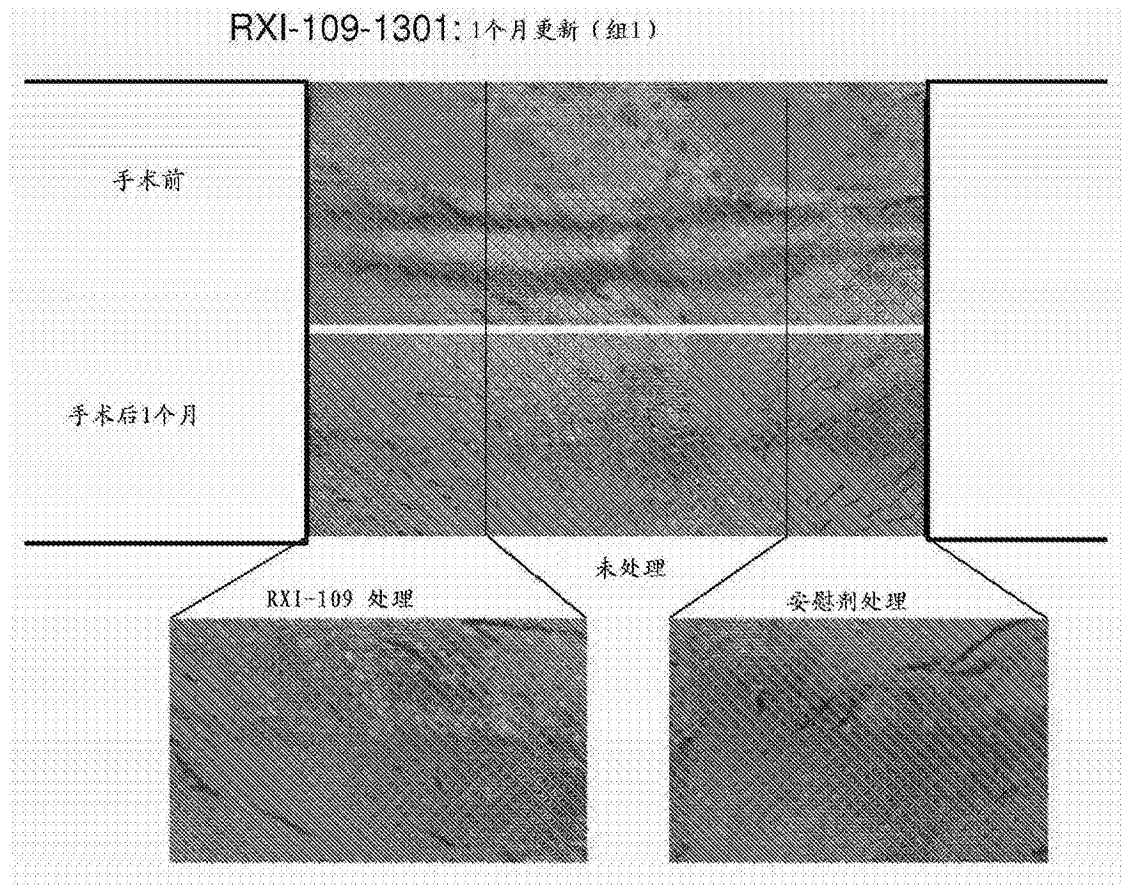


图15

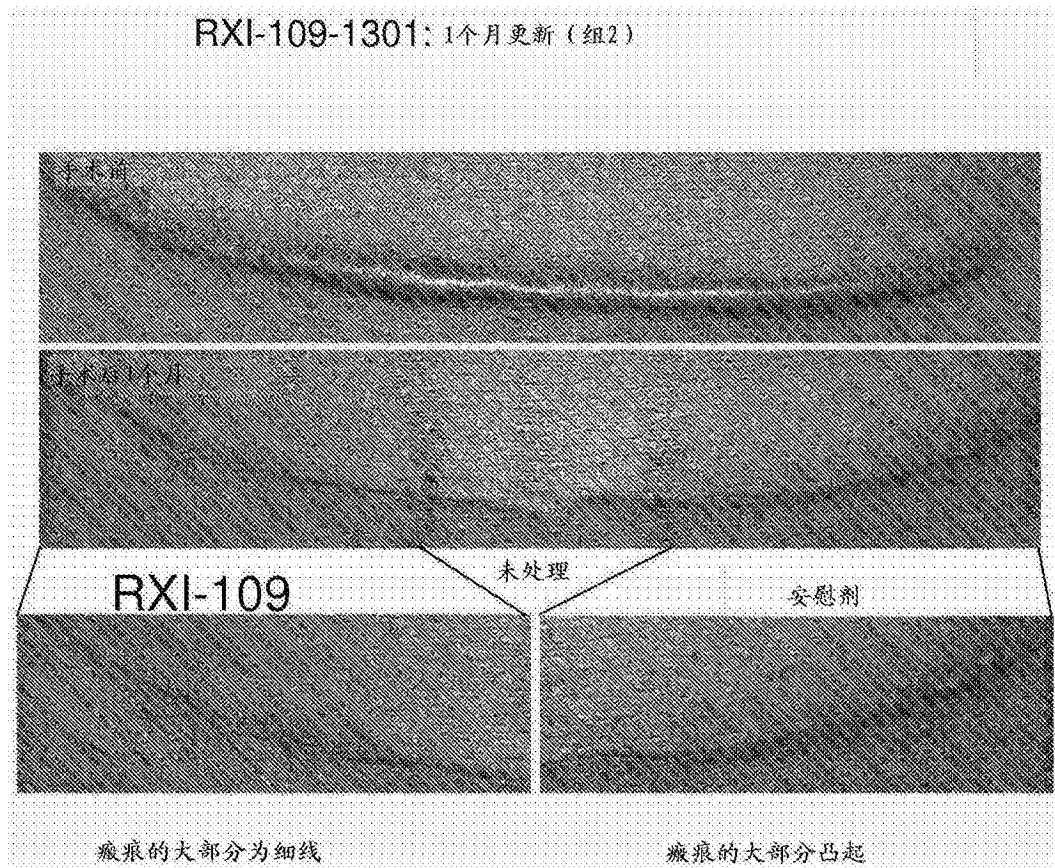


图16