



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110248665 A

(43)申请公布日 2019.09.17

(21)申请号 201880010283.4

K.K.H.纽曼 P.哈德威格

(22)申请日 2018.02.06

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(30)优先权数据

代理人 张文辉

62/455,231 2017.02.06 US

(51)Int.Cl.

62/522,363 2017.06.20 US

A61K 31/7105(2006.01)

62/561,853 2017.09.22 US

A61K 31/712(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/713(2006.01)

2019.08.05

A61K 48/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C07H 21/02(2006.01)

PCT/US2018/017062 2018.02.06

C07H 21/04(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/145086 EN 2018.08.09

(71)申请人 MPEG LA有限责任公司

权利要求书5页 说明书91页

地址 美国马里兰州

序列表28页 附图50页

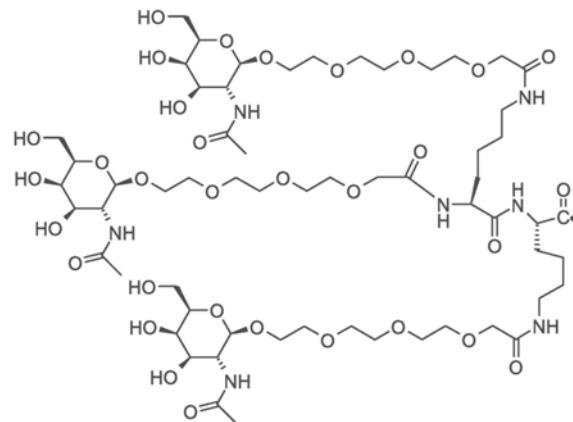
(72)发明人 J.M.布朗 H-P.沃恩洛彻

(54)发明名称

具有降低的肾清除的多聚体寡核苷酸

(57)摘要

本发明涉及将具有通过接头连接的单体亚单元的多聚体寡核苷酸施用于受试者的方法。所述多聚体寡核苷酸具有至少约45kD的分子量和其他特性,使得其由于肾小球滤过而产生的清除降低。本发明还涉及此类多聚体寡核苷酸以及合成此类多聚体寡核苷酸的方法。



1. 一种将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,所述方法包括将有效量的所述多聚体寡核苷酸施用于所述受试者,所述多聚体寡核苷酸包含亚单元-----,其中:

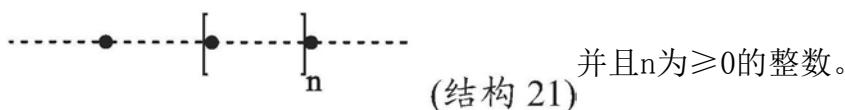
所述亚单元-----中的每一个独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,并且所述亚单元-----中的每一个通过共价接头●连接至另一个亚单元;

所述多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小;并且

所述多聚体寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述多聚体寡核苷酸中包含的所述亚单元的数目为m,m为整数,所述整数被选择为允许所述多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小。

3. 如权利要求1和权利要求2中任一项所述的方法,其中所述多聚体寡核苷酸包含结构21:



4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述亚单元是单链寡核苷酸。

5. 如权利要求3所述的方法,其中n≥1。

6. 如权利要求1-3和权利要求5中任一项所述的方法,其中所述亚单元是双链寡核苷酸。

7. 如权利要求3所述的方法,其中:

当n=0时,所述多聚体寡核苷酸的由于肾小球滤过而产生的清除相对于所述多聚体寡核苷酸的单体亚单元-----和/或二聚体亚单元-----的清除降低;并且

当n≥1时,所述多聚体寡核苷酸的由于肾小球滤过而产生的清除相对于所述多聚体寡核苷酸的单体亚单元-----、二聚体亚单元-----和/或三聚体亚单元-----的清除降低。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述由于肾小球滤过而产生的清除的降低使得所述多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期增加。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述由于肾小球滤过而产生的清除的降低是通过测量在将所述多聚体寡核苷酸施用于所述受试者之后所述多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期来确定。

10. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述由于肾小球滤过而产生的清除的降低是通过测量所述多聚体寡核苷酸的血清浓度减少至预定值所需的时间来确定。

11. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述由于肾小球滤过而产生的清除的降低是通过测量在将所述多聚体寡核苷酸施用于所述受试者之后所述多聚体寡核苷酸在预定时间的血清浓度来确定。

12. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述由于肾小球滤过而产生的清除的降低是通过测量描绘将所述多聚体寡核苷酸施用于所述受试者之后,所述多聚体寡核苷酸的血清浓度随时间推移的图形的曲线下面积来确定。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述由于肾小球滤过而产生的清除的

降低使得所述多聚体寡核苷酸的体内生物利用率增加。

14. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述由于肾小球滤过而产生的清除的降低使所述多聚体寡核苷酸的体内细胞摄取增加。

15. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述由于肾小球滤过而产生的清除的降低使得所述多聚体寡核苷酸的体内治疗指数/比率增加。

16. 一种包含亚单元-----的多聚体寡核苷酸,其中:

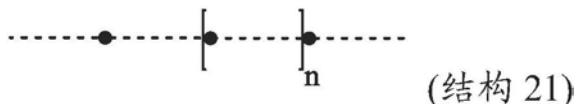
所述亚单元-----中的每一个独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,并且所述亚单元-----中的每一个均通过共价接头·连接至另一个亚单元;

所述多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小;并且

所述多聚体寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

17. 如权利要求16所述的多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸中包含的所述亚单元的数目为m,m为整数,所述整数被选择为允许所述多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小。

18. 如权利要求16和权利要求17中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其包含结构21:



其中所述亚单元-----中的至少一个包含单链,所述共价接头·中的一个连接至所述单链的3'末端并且所述共价接头中的另一个连接至所述单链的5'末端,并且n为 ≥ 0 的整数。

19. 如权利要求16-18中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元-----的长度为15-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。

20. 如权利要求18所述的多聚体寡核苷酸,其中n ≥ 1 且n ≤ 17 。

21. 如权利要求18和权利要求20中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中n ≥ 1 且n ≤ 5 。

22. 如权利要求18、权利要求20和权利要求21中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中n为1、2、3、4或5。

23. 如权利要求18所述的多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为双链RNA且n ≥ 1 。

24. 如权利要求16-22中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为单链寡核苷酸。

25. 如权利要求16-22中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为双链寡核苷酸。

26. 如权利要求16-22中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中所述亚单元包含单链寡核苷酸和双链寡核苷酸的组合。

27. 如权利要求16-22和权利要求24-26中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为RNA、DNA,或人工的或非天然的核酸类似物。

28. 如权利要求16-27中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸还包含一个或多个靶向配体。

29. 如权利要求16-28中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中所述亚单元中的至少一个是靶向配体。

30. 如权利要求28和权利要求29中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中所述靶向配体是适体。

31. 如权利要求16-22和权利要求24-30中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为RNA。

32. 如权利要求16-31中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为siRNA、saRNA或miRNA。

33. 如权利要求16-23、权利要求25和权利要求28-32中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元是双链siRNA,并且所述共价接头中的每一个连接所述siRNA的有义链。

34. 如权利要求16-33中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中所述共价接头·中的一个或多个包括可切割的共价接头。

35. 如权利要求34所述的多聚体寡核苷酸,其中所述可切割的共价接头含有可酸切割的键、可还原剂切割的键、可生物切割的键或可酶切割的键。

36. 如权利要求34和权利要求35中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中所述可切割的共价接头在细胞内条件下是可切割的。

37. 如权利要求18-36中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中每个共价接头·是相同的。

38. 如权利要求18-36中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中所述共价接头·包含两个或更多个不同的共价接头。

39. 如权利要求16-38中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中每个共价接头·连接两个单体亚单元-----。

40. 如权利要求16-38中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中至少一个共价接头·连接三个或更多个单体亚单元-----。

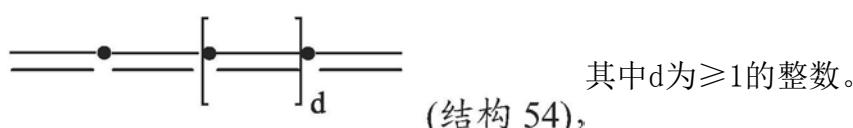
41. 如权利要求16-40中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸包括基本上相同的亚单元-----的同源多聚体。

42. 如权利要求16-40中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸包括两个或更多个实质上不同的亚单元-----的异源多聚体。

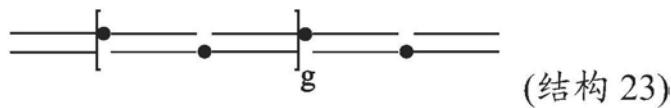
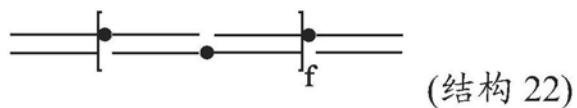
43. 如权利要求16-42中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸的纯度为至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

44. 如权利要求18所述的多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,并且其中n为 ≥ 1 的整数。

45. 如权利要求18所述的多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,其中n为 ≥ 1 的整数,并且其中每个共价接头·在同一个链上:

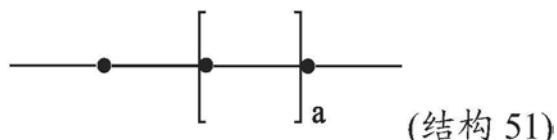


46. 如权利要求17所述的多聚体寡核苷酸,其包含结构22或结构23:



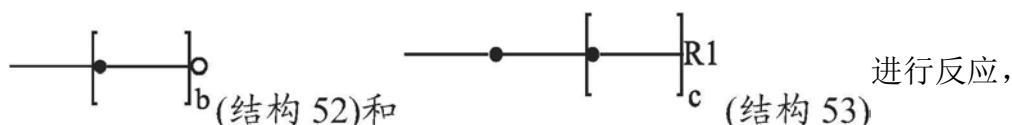
其中每个——为双链寡核苷酸,每个·为连接相邻的双链寡核苷酸的共价接头,f为 ≥ 1 的整数,且g为 ≥ 0 的整数。

47. 一种合成包含结构51的多聚体寡核苷酸的方法:

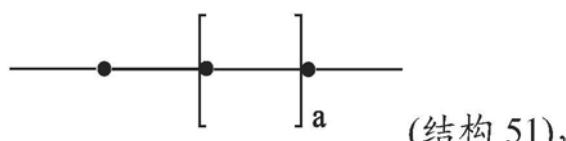


其中每个——为单链寡核苷酸,每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头,并且a为 ≥ 1 的整数,所述方法包括以下步骤:

(i) 使

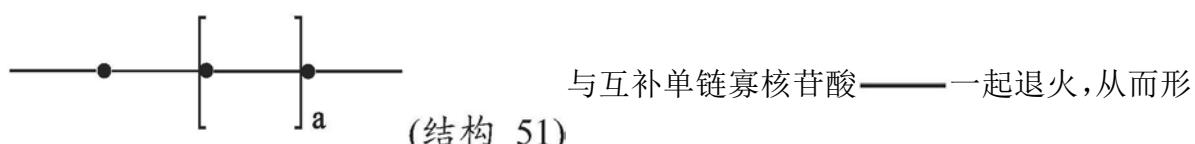


从而形成结构51:

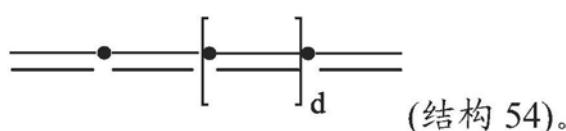


其中○为连接部分,R1为能够与连接部分○反应的化学基团,b和c各自独立地为 ≥ 0 的整数,b和c二者不能同时为零,并且 $b+c=a$,以及

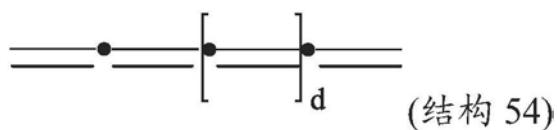
(ii) 任选地使结构51:



成结构54:

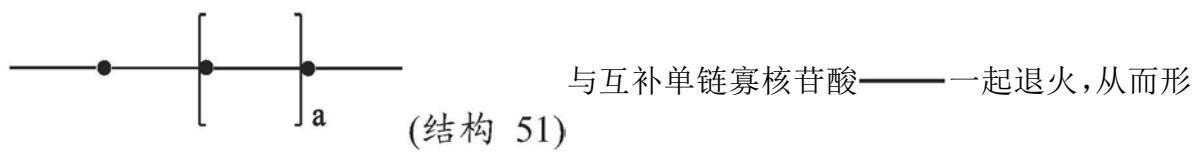


48. 一种合成包含结构54的多聚体寡核苷酸的方法:

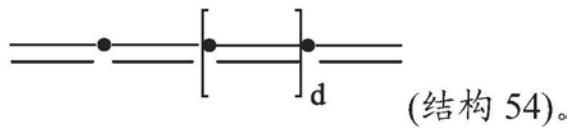


其中每个——为单链寡核苷酸,每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头,并且a ≥ 1 ,所述方法包括以下步骤:

(i) 使结构51:



成结构54:



具有降低的肾清除的多聚体寡核苷酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年2月6日提交的美国临时申请号62/455,231、2017年6月20日提交的美国临时申请号62/522,363和2017年9月22日提交的美国临时申请号62/561,853的权益,这些临时申请的公开内容以引用方式整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已通过ASCII格式进行电子提交并且据此以引用方式整体并入的序列表。在2018年2月5日创建的所述ASCII副本被命名为116244_604_Sequence_Listing.txt,大小为24,828字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及具有改善的药效动力学和/或药代动力学的多聚体寡核苷酸,以及将此类多聚体寡核苷酸施用于受试者的方法。例如,本发明的多聚体寡核苷酸可以具有至少约45kD的分子量和/或引起它们的肾清除降低的其他特性。

背景技术

[0006] 寡核苷酸目前是一类明确确立的具有多种应用(例如,RNA干扰或RNAi)并且正处于临床试验中的治疗剂。然而,很多因素仍然会限制寡核苷酸治疗剂,例如寡核苷酸向靶细胞的递送以及随后寡核苷酸向靶细胞中的内化。

[0007] 在解决这些递送和内化限制的尝试中,多方已经研究了脂质纳米粒子(LNP,例如脂质球状体,包括用于中和寡核苷酸的负电荷并促进靶细胞结合和内化的带正电荷的脂质)。虽然LNP可以在一些情况下促进递送和内化,但是它们具有较大的缺点,例如较差的靶向和毒性,从而产生狭窄的治疗窗口。

[0008] 至少部分地由于LNP的限制,还研究了靶向特定细胞表面受体的配体。一种这样的配体(N-乙酰半乳糖胺(Ga1NAc))的使用已成为寡核苷酸向肝细胞递送的精选的方法。然而,虽然Ga1NAc-缀合物的毒理学特征可以优于LNP,但是递送并不是那么有效。该限制使得需要增加剂量,通常增加一个数量级或更多。由于毒性、副作用和/或成本,可能不希望增加剂量。

[0009] 因此,这些和其他现有技术方法不能完全解决寡核苷酸递送的问题和限制。因此,仍然需要改善的寡核苷酸组合物。

发明内容

[0010] 本发明涉及将寡核苷酸以多聚体寡核苷酸的形式施用于受试者的方法,所述多聚体寡核苷酸具有通过共价接头连接的寡核苷酸的单体亚单元。本发明的多聚体寡核苷酸具有至少约45kD的分子量,并且被构造为使得其由于肾小球滤过而产生的清除降低。本发明还涉及多聚体寡核苷酸以及合成多聚体寡核苷酸的方法。例如,鉴于典型的siRNA(例如,双链单体)可具有约15kD的分子量和相对较低的循环半衰期(例如,具有类似于尿素或葡萄糖

的肾小球滤过率),根据本发明的寡核苷酸多聚体可以具有至少约45kD的分子量,并且具有相对较高的循环半衰期(例如,具有较低的由于肾小球滤过率而产生的清除率)。根据本发明的多聚体的改善的和有利的性质可以用增加的体内循环半衰期来描述。它们也可以用增加的体内活性来描述。

[0011] 当与靶向配体组合时,多元缀合物(也称为“多聚体寡核苷酸”或“多聚体”)也可以递送比单体等同物更高的每个配体/受体结合事件的有效负载。本发明还涉及新的合成中间体以及合成多元缀合物寡核苷酸的方法。本发明还涉及使用多元缀合物寡核苷酸例如来减少基因表达、生物学研究、治疗或预防医学病症和/或产生新的或改变的表型的方法。

[0012] 在各个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,所述方法包括将有效量的多聚体寡核苷酸施用于受试者,所述多聚体寡核苷酸包含亚单元-----,其中:

[0013] 所述亚单元-----中的每一个独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,并且所述亚单元-----中的每一个通过共价接头·连接至另一个亚单元;

[0014] 所述多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小;并且

[0015] 所述多聚体寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

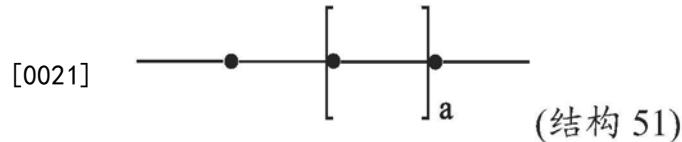
[0016] 在各个方面,本发明提供包含亚单元-----的多聚体寡核苷酸,其中:

[0017] 所述亚单元-----中的每一个独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,并且所述亚单元-----中的每一个通过共价接头·连接至另一个亚单元;

[0018] 所述多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小;并且

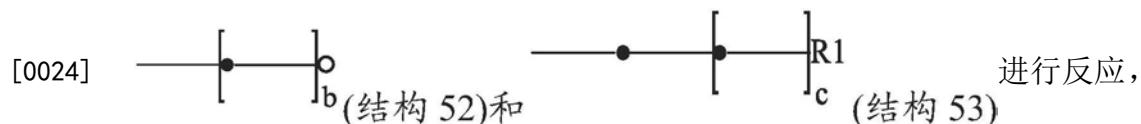
[0019] 所述多聚体寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

[0020] 在各个方面,本发明提供合成包含结构51的多聚体寡核苷酸的方法:

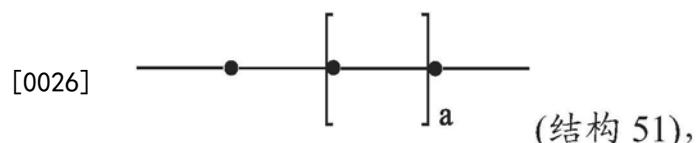


[0022] 其中每个——为单链寡核苷酸,每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头,并且a为 ≥ 1 的整数,所述方法包括以下步骤:

[0023] (i) 使

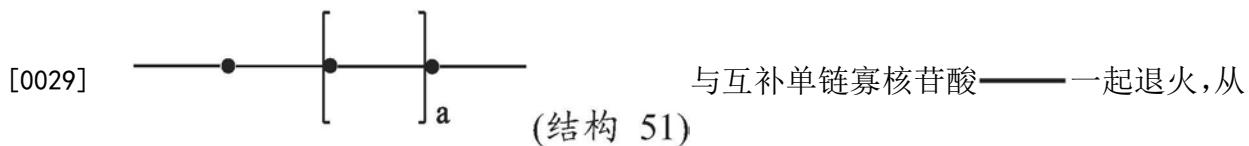


[0025] 从而形成结构51:

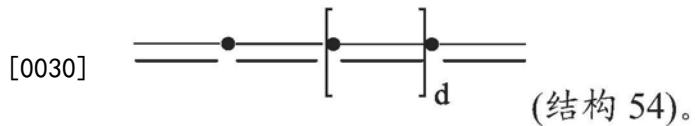


[0027] 其中○为连接部分,R1为能够与连接部分○反应的化学基团,b和c各自独立地为 ≥ 0 的整数,b和c二者不能同时为零,并且 $b+c=a$,以及

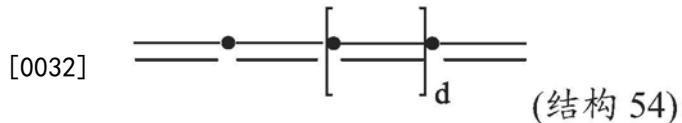
[0028] (ii) 任选地使结构51:



而形成结构54:

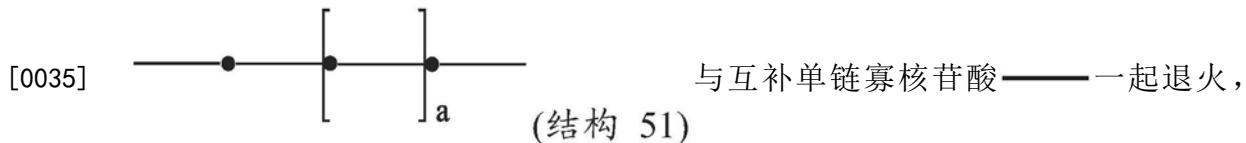


[0031] 在各个方面, 本发明提供合成包含结构54的多聚体寡核苷酸的方法:

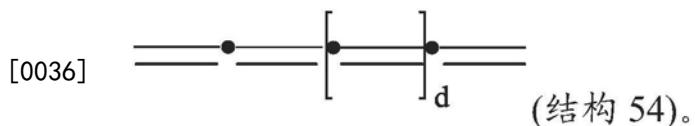


[0033] 其中每个——为单链寡核苷酸, 每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头, 并且 $a \geq 1$, 所述方法包括以下步骤:

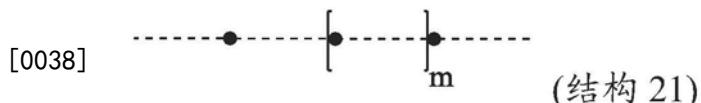
[0034] (i) 使结构51:



从而形成结构54:



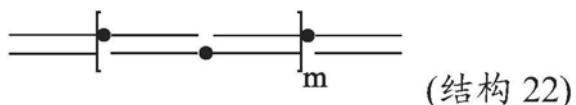
[0037] 在各个方面, 本发明提供包含结构21的多聚体寡核苷酸:



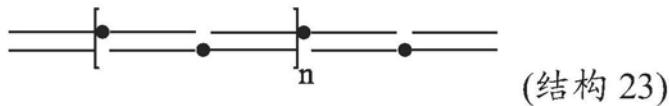
[0039] 其中每个-----为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸, 每个·为连接相邻的寡核苷酸的共价接头, m 为 ≥ 0 的整数, 并且

[0040] 其中所述多聚体寡核苷酸具有被构造为减少体内肾小球滤过的分子大小和/或分子量。

[0041] 在各个方面, 本发明提供包含结构22或结构23的多聚体寡核苷酸:



[0042]



[0043] 其中每个——为双链寡核苷酸, 每个·为连接相邻的寡核苷酸的单链的共价接头, 并且 $m \geq 1$ 的整数且 $n \geq 0$ 的整数, 并且其中所述多聚体寡核苷酸具有被构造为减少

体内肾小球滤过的分子大小和/或分子量。

[0044] 在各个方面,本发明提供多种如上文所述的多聚体寡核苷酸,其中基本上所有的多聚体寡核苷酸都具有被构造为降低体内肾小球滤过的分子大小和/或分子量。

[0045] 在各个方面,本发明提供多种如上文所述的多聚体寡核苷酸,其中基本上所有的多聚体寡核苷酸都具有预定的m值或n值。

[0046] 在各个方面,本发明提供多种如本文所述的多聚体寡核苷酸,其中基本上所有的多聚体寡核苷酸都是具有相同的m值或n值的定义的多聚体(例如,多元缀合物)。

[0047] 在各个方面,本发明提供多种如本文所述的多聚体寡核苷酸,其中基本上所有的多聚体寡核苷酸都是定义的四聚体($m=1$)(例如,四元缀合物)。

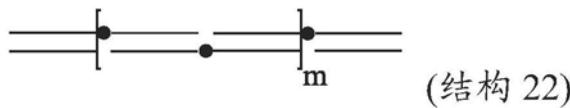
[0048] 在各个方面,本发明提供多种如本文所述的多聚体寡核苷酸,其中基本上所有的多聚体寡核苷酸都是定义的五聚体(例如,五元缀合物)或更长的多聚体($m>1$ 或 $n\geq 1$)。

[0049] 在各个方面,本发明提供包含本发明的多聚体寡核苷酸和药学上可接受的赋形剂的组合物。

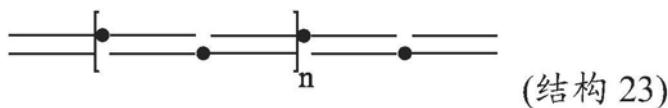
[0050] 在各个方面,本发明提供用于减少基因表达的方法,其包括将有效量的本发明的多聚体寡核苷酸或包含本发明的多聚体寡核苷酸的组合物施用于有需要的受试者。

[0051] 在各个方面,本发明提供用于治疗受试者的方法,其包括将有效量的本发明的多聚体寡核苷酸或包含本发明的多聚体寡核苷酸的组合物施用于有需要的受试者。

[0052] 在各个方面,本发明提供合成包含结构22或结构23的多聚体寡核苷酸的方法:



[0053]



[0054] 其中每个 为双链寡核苷酸,每个 为连接相邻的寡核苷酸的单链的共价接头,并且m为 ≥ 1 的整数且n为 ≥ 0 的整数,所述方法包括以下步骤:

[0055] (i) 使第一单链寡核苷酸 和包含连接部分 的第二互补单链寡核苷酸一起退火,从而形成 ;

[0056] (ii) 使 和第三单链寡核苷酸 进行反应,其中R₁为能够与连接部分 反应的化学基团,从而形成 ;

[0057] (iii) 使 和包含连接部分 的第四互补单链寡核苷酸一起退火,从而形成 ;

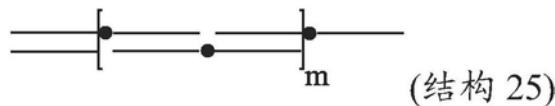
[0058] (iv) 使 和第五单链寡核苷酸 进行反应,从而形成

[0059] (v) 使 和包含连接部分 的第六互补单链寡核苷酸一起退火,从而形成 ;

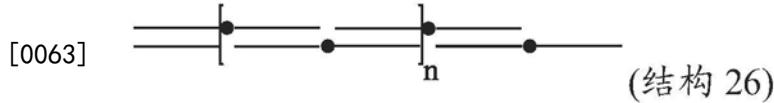
[0060] (vi) 使 和第七单链寡核苷酸 进行反应,从而形成



[0061] (vii) 任选地使 (a) 包含连接部分 ——○ 的一种或多种另外的单链寡核苷酸和 (b) 一种或多种单链寡核苷酸 ——R₁ 一起退火, 从而形成



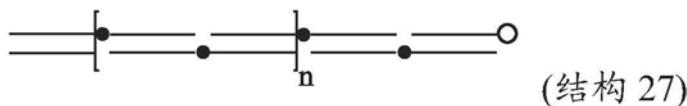
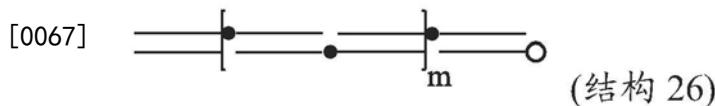
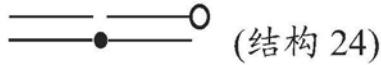
[0062] 其中 m 为 ≥2 的整数或



[0064] 其中 n 为 ≥1 的整数; 并且

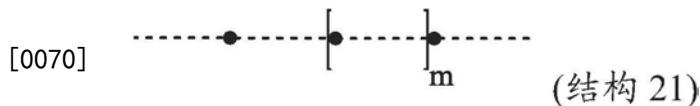
[0065] (viii) 使最终互补单链寡核苷酸 —— 与结构 24、结构 25 或结构 26 一起退火, 从而形成包含结构 22 或结构 23 的多聚体寡核苷酸。

[0066] 本发明还提供包含结构 24、结构 25、结构 26 或结构 27 的多聚体寡核苷酸:



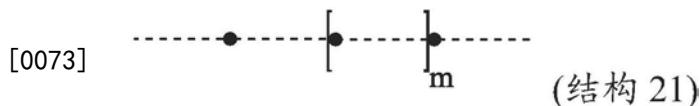
[0068] 其中每个 —— 为双链寡核苷酸, 每个 · 为连接相邻的单链寡核苷酸的单链的共价接头, 每个 ○ 为连接部分; 并且 m 为 ≥1 的整数且 n 为 ≥1 的整数。

[0069] 在各个方面, 本发明提供包含结构 21 的多聚体寡核苷酸:



[0071] 其中每个单体亚单元 ----- 独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸, m 为 ≥1 的整数, 每个 · 为连接相邻的单体亚单元 ----- 的共价接头, 并且单体亚单元 ----- 中的至少一个包含单链, 所述共价接头 · 中的一个连接至所述单链的 3' 末端并且所述共价接头中的另一个连接至所述单链的 5' 末端。

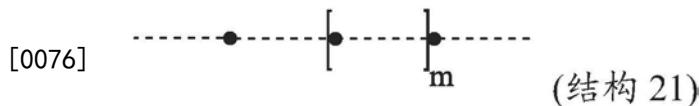
[0072] 在各个方面, 本发明提供包含结构 21 的多聚体寡核苷酸:



[0074] 其中每个单体亚单元 ----- 独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸, 每个 · 为连接相邻的单体亚单元 ----- 的共价接头, 并且 m 为 ≥0 的整数, 所述整数被选择为 (a) 相对于单个单体亚单元 ----- 的体内循环半衰期而言, 增加多聚体寡核苷酸的体内循环半

衰期和/或 (b) 相对于单个单体亚单元-----的体内活性而言,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

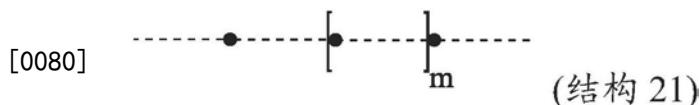
[0075] 一种包含结构21的多聚体寡核苷酸:



[0077] 其中每个单体亚单元-----独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,每个•为连接相邻的单体亚单元-----的共价接头,m为 ≥ 0 的整数,并且

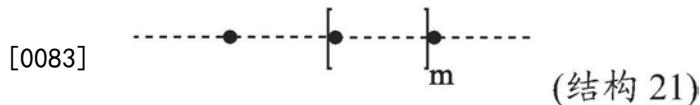
[0078] 其中所述多聚体寡核苷酸具有一定的分子大小和/或分子量,所述分子大小和/或分子量被构造为(a)相对于单个单体亚单元-----的体内循环半衰期,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元-----的体内活性,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

[0079] 一种用于增加一种或多种寡核苷酸的体内循环半衰期和/或体内活性的方法,所述方法包括将所述一种或多种寡核苷酸以包含结构21的多聚体寡核苷酸的形式施用于受试者:



[0081] 其中每个单体亚单元-----独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,每个•为连接相邻的单体亚单元-----的共价接头,并且m为 ≥ 0 的整数,所述整数被选择为(a)相对于单个单体亚单元-----的体内循环半衰期而言,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元-----的体内活性而言,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

[0082] 一种用于增加一种或多种寡核苷酸的体内循环半衰期和/或体内活性的方法,所述方法包括将所述一种或多种寡核苷酸以包含结构21的多聚体寡核苷酸的形式施用于受试者:



[0084] 其中每个单体亚单元-----独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,每个•为连接相邻的单体亚单元-----的共价接头,m为 ≥ 0 的整数,并且

[0085] 其中所述多聚体寡核苷酸具有一定的分子大小和/或分子量,所述分子大小和/或分子量被构造为(a)相对于单个单体亚单元-----的体内循环半衰期,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元-----的体内活性,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

[0086] 在各个方面,本发明提供包含如本文所述的多聚体寡核苷酸和药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0087] 在各个方面,本发明提供用于减少基因表达的方法,其包括将有效量的如本文所述的多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者。

[0088] 在各个方面,本发明提供用于治疗受试者的方法,其包括将有效量的多聚体寡核

昔酸施用于有需要的受试者。

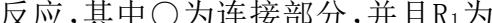
[0089] 在各个方面,本发明提供包含m个单体亚单元-----的多聚体寡核苷酸,其中所述单体亚单元-----中的每一个独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,所述单体亚单元-----中的每一个通过共价接头·连接至另一个单体亚单元,并且m为≥3的整数,所述整数被选择为(a)相对于单个单体亚单元-----的体内循环半衰期,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元-----的体内活性,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

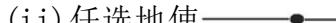
[0090] 在各个方面,本发明提供包含m个单体亚单元-----的多聚体寡核苷酸,其中所述单体亚单元-----中的每一个独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,所述单体亚单元-----中的每一个通过共价接头·连接至另一个单体亚单元,m为≥3的整数,并且所述多聚体寡核苷酸具有一定的分子大小和/或分子量,所述分子大小和/或分子量被构造为(a)相对于单个单体亚单元-----的体内循环半衰期,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元-----的体内活性,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

[0091] 在各个方面,本发明提供合成包含结构34的多聚体寡核苷酸的方法:

[0092]  (结构 34)

[0093] 其中每个——为单链寡核苷酸,并且每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头,所述方法包括以下步骤:

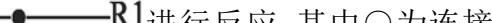
[0094] (i) 使和R1进行反应,其中○为连接部分,并且R1为能够与连接部分○反应的化学基团,从而形成 (结构 34),以及

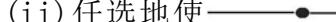
[0095] (ii) 任选地使与互补单链寡核苷酸一起退火,从而形成 (结构 28)。

[0096] 在各个方面,本发明提供合成包含结构35的多聚体寡核苷酸的方法:

[0097]  (结构 35)

[0098] 其中每个——为单链寡核苷酸,并且每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头,所述方法包括以下步骤:

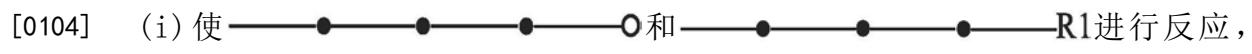
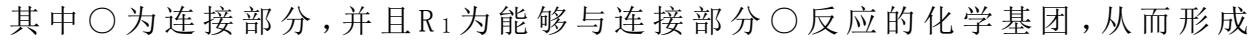
[0099] (i) 使和R1进行反应,其中○为连接部分,并且R1为能够与连接部分○反应的化学基团,从而形成 (结构 35),以及

[0100] (ii) 任选地使与互补单链寡核苷酸一起退火,从而形成 (结构 36)。

[0101] 在各个方面,本发明提供合成包含结构37的多聚体寡核苷酸的方法:

[0102]  (结构 37)

[0103] 其中每个——为单链寡核苷酸,并且每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头,所述方法包括以下步骤:

[0104] (i) 使  和  R₁ 进行反应, 其中 ○ 为连接部分, 并且 R₁ 为能够与连接部分 ○ 反应的化学基团, 从而形成  (结构 37), 以及

[0105] (ii) 任选地使  (结构 37) 与互补单链寡核苷酸一起退火, 从而形成  (结构 38)。

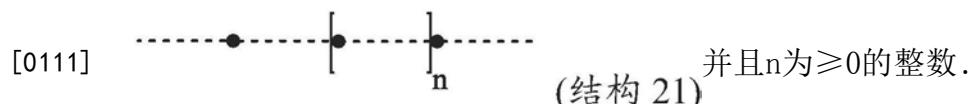
[0106] 本领域的技术人员将认识到, 本发明的这些和其他方面可以与本文描述的一个或多个合适的特征组合。

[0107] 在各种实施方案中, 本发明的多聚体寡核苷酸, 例如包含结构 21 的那些多聚体寡核苷酸, 具有至少约 40kD、41kD、42kD、43kD、44kD、45kD、46kD、47kD、48kD、49kD、50kD、51kD、52kD、53kD、54kD、55kD、56kD、57kD、58kD、59kD、60kD、61kD、62kD、63kD、64kD 或 65kD 的分子量。

[0108] 在各种实施方案中, 本发明的多聚体寡核苷酸, 包括包含结构 21 的那些多聚体寡核苷酸, 具有至少约 40kD-45kD、45kD-50kD、50kD-55kD、55kD-60kD、60kD-65kD、65kD-70kD 或 70kD-75kD 的分子量。

[0109] 在一个方面, 本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法, 其中所述多聚体寡核苷酸中包含的亚单元的数目为 m, m 为整数, 所述整数被选择为允许多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小。在各个方面, m 为例如 (i) ≥ 2 ; (ii) ≥ 3 ; (iii) ≥ 4 ; (iv) ≥ 4 且 ≤ 17 ; (v) ≥ 4 且 ≤ 8 ; 或 (vi) 4、5、6、7 或 8。

[0110] 在一个方面, 本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法, 其中所述多聚体寡核苷酸包含结构 21:

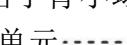
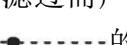


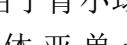
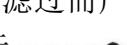
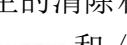
[0112] 在一个方面, 本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法, 其中所述亚单元为单链寡核苷酸。

[0113] 在一个方面, 本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法, 其中 n ≥ 1 。

[0114] 在一个方面, 本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法, 其中所述亚单元为双链寡核苷酸。

[0115] 在一个方面, 本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法, 其中:

[0116] 当 n=0 时, 多聚体寡核苷酸的由于肾小球滤过而产生的清除相对于多聚体寡核苷酸的单体亚单元  和/或二聚体亚单元  的清除降低; 并且

[0117] 当 n ≥ 1 时, 多聚体寡核苷酸的由于肾小球滤过而产生的清除相对于多聚体寡核苷酸的单体亚单元  、二聚体亚单元  和/或三聚体亚单元  的清除降低。

[0118] 在一个方面, 本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法, 其中

由于肾小球滤过而产生的降低的清除引起多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期增加。

[0119] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除通过测量将多聚体寡核苷酸施用于受试者之后多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期来确定。

[0120] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除通过测量多聚体寡核苷酸的血清浓度减少至预定值所需的时间来确定。

[0121] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除通过测量在将多聚体寡核苷酸施用于受试者之后多聚体寡核苷酸在预定时间的血清浓度来确定。

[0122] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除通过测量描绘将多聚体寡核苷酸施用于受试者之后多聚体寡核苷酸的血清浓度随时间推移的图形的曲线下面积来确定。

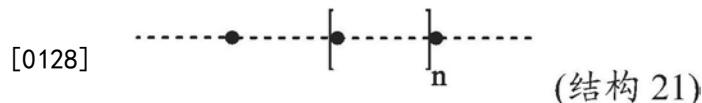
[0123] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除使多聚体寡核苷酸的体内生物利用率增加。

[0124] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除使多聚体寡核苷酸的体内细胞摄取增加。

[0125] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除使多聚体寡核苷酸的体内治疗指数/比率增加。

[0126] 在一个方面,本发明提供包含亚单元-----的多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸中包含的亚单元的数目为 m , m 为整数,所述整数被选择为允许多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小。在各个方面, m 为例如(i) ≥ 2 ; (ii) ≥ 3 ; (iii) ≥ 4 ; (iv) ≥ 4 且 ≤ 17 ; (v) ≥ 4 且 ≤ 8 ; 或(vi) 4、5、6、7或8。

[0127] 在一个方面,本发明提供包含结构21的多聚体寡核苷酸:



[0129] 其中所述亚单元-----中的至少一个包含单链,所述共价接头•中的一个连接至所述单链的3'末端并且所述共价接头中的另一个连接至所述单链的5'末端,并且 $n \geq 0$ 的整数。

[0130] 在一个方面,本发明提供包含亚单元-----的多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元-----的长度为15-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。

[0131] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中 $n \geq 1$ 且 $n \leq 17$ 。

[0132] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中 $n \geq 1$ 且 $n \leq 5$ 。

[0133] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中 n 为例如1、2、3、4或5。

[0134] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为双链RNA且 $n \geq 1$ 。

[0135] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为单链寡核苷酸。

[0136] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为双链寡核苷酸。

[0137] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述亚单元包含单链寡核苷酸和

双链寡核苷酸的组合。

[0138] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为RNA、DNA或人工的或非天然的核酸类似物。

[0139] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸还包含一个或多个靶向配体。

[0140] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述亚单元中的至少一个为靶向配体。

[0141] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中靶向配体为适体。

[0142] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为RNA。

[0143] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为siRNA、saRNA或miRNA。

[0144] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为双链siRNA,并且共价接头中的每一个连接siRNA的有义链。

[0145] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中共价接头·中的一个或多个包括可切割的共价接头。

[0146] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述可切割的共价接头含有可酸切割的键、可还原剂切割的键、可生物切割的键或可酶切割的键。

[0147] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述可切割的共价接头在细胞内条件下是可切割的。

[0148] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个共价接头·是相同的。

[0149] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中共价接头·包括两个或更多个不同的共价接头。

[0150] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个共价接头·连接两个单体亚单元-----。

[0151] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中至少一个共价接头·连接三个或更多个单体亚单元-----。

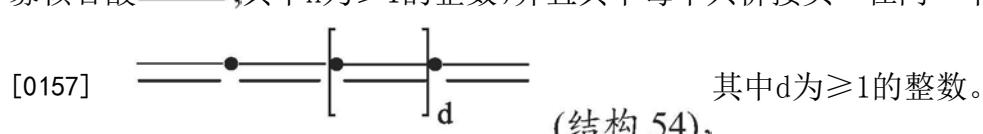
[0152] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸包括基本上相同的亚单元-----的同源多聚体。

[0153] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸包括两个或更多个实质上不同的亚单元-----的异源多聚体。

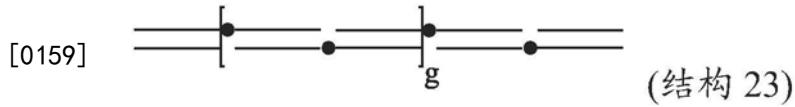
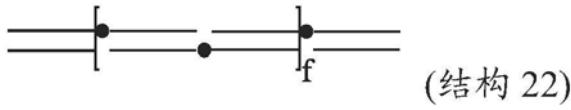
[0154] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸的纯度为至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0155] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,并且其中n为≥1的整数。

[0156] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,其中n为≥1的整数,并且其中每个共价接头·在同一个链上:



[0158] 在一个方面,本发明提供包含结构22或结构23的多聚体寡核苷酸:



[0160] 其中每个——为双链寡核苷酸,每个·为连接相邻的双链寡核苷酸的共价接头,f为≥1的整数,且g为≥0的整数。

[0161] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中减少的肾小球滤过是相对于多聚体寡核苷酸的单体、二聚体和/或三聚体寡核苷酸亚单元的肾小球滤过率而言的。

[0162] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中减少的肾小球滤过使多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期增加。

[0163] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中减少的肾小球滤过使多聚体寡核苷酸的体内生物利用率增加。

[0164] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中减少的肾小球滤过使多聚体寡核苷酸的体内细胞摄取增加。

[0165] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中减少的肾小球滤过使多聚体寡核苷酸的体内治疗指数/比率增加。

[0166] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个寡核苷酸-----为单链寡核苷酸。

[0167] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个寡核苷酸-----为双链寡核苷酸。

[0168] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中寡核苷酸-----包含单链寡核苷酸和双链寡核苷酸的组合。

[0169] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其包括基本上相同的寡核苷酸的同源多聚体。

[0170] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中基本上相同的寡核苷酸各自包含体内靶向相同分子靶标的siRNA。

[0171] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其包括具有两个或更多个实质上不同的寡核苷酸的异源多聚体。

[0172] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中实质上不同的寡核苷酸各自包含体内靶向不同的分子靶标的siRNA。

[0173] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸不包含PEG。

[0174] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其还包含靶向配体。

[0175] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中靶向配体缀合至寡核苷酸。

[0176] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中靶向配体通过寡核苷酸的3'末端或5'末端缀合至寡核苷酸。

[0177] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个共价接头·是相同的。

[0178] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其包含两个或更多个不同的共价接

头•。

[0179] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中•中的一个或多个包括可切割的共价接头。

[0180] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中化合物的纯度为至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0181] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个寡核苷酸为RNA、DNA,或包括人工的或非天然的核酸类似物。

[0182] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中至少一个寡核苷酸为siRNA。

[0183] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个寡核苷酸的长度为15-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。

[0184] 在一个方面,本发明提供合成多聚体寡核苷酸的方法,其还包括使靶向配体缀合至包含结构22或结构23的多聚体寡核苷酸的步骤。

[0185] 在一个方面,本发明提供合成多聚体寡核苷酸的方法,其还包括使靶向配体缀合至第一单链寡核苷酸——的步骤。

[0186] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中m为例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

[0187] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述单体亚单元-----中的每一个包含siRNA,并且共价接头中的每一个连接siRNA的有义链。

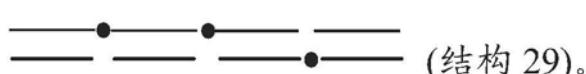
[0188] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中共价接头•中的每一个连接两个单体亚单元-----。

[0189] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中共价接头•中的至少一个连接三个或更多个单体亚单元-----。

[0190] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸——,并且其中m为1:



[0191]

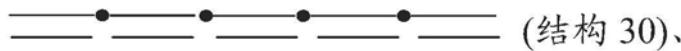


[0192] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸——,其中m为1,并且其中每个共价接头•在同一个链上:

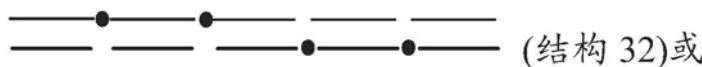
[0193]



[0194] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸——,并且其中m为2:



[0195]



[0196] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,并且其中m为2,并且其中每个共价接头•在同一个链上:

[0197]

(结构 33)。

[0198] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,并且其中m为3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

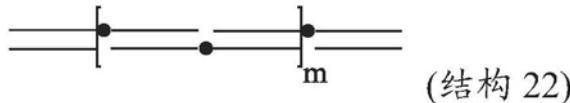
[0199] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,其中m为3、4、5、6、7、8、9、10、11或12,并且其中每个共价接头•在同一个链上。

[0200] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,并且其中m≥13。

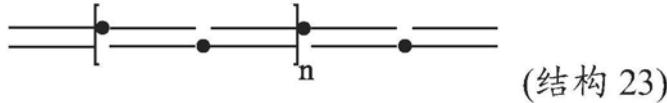
[0201] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,其中m≥13,并且其中每个共价接头•在同一个链上。

[0202] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中m为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

[0203] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中结构21为结构22或结构23:



[0204]



[0205] 其中每个____为双链寡核苷酸,每个•为连接相邻的双链寡核苷酸的共价接头,m为≥1的整数且n为≥0的整数。

[0206] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中结构21不是与PCT/US2016/037685中公开的任何结构相同的和/或基本上相同的结构。

[0207] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中体内循环半衰期增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、500或1,000倍。

[0208] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中体内循环半衰期增加约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0209] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中体内活性的增加以 t_{max} 时体内活性的比率量度。

[0210] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中体内活性增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、500或1,000倍。

[0211] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中每个寡核苷酸-----为单链寡核苷酸。

[0212] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中每个寡核苷酸-----为双链寡核苷酸。

[0213] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中寡核苷酸-----包含单链寡核苷酸和双链寡核苷酸的组合。

[0214] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,所述多聚体寡核苷酸包含基本上相同的寡核苷酸的同源多聚体。

[0215] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中基本上相同的寡核苷酸为:

[0216] (a) 体内靶向相同分子靶标的siRNA;

[0217] (b) 体内靶向相同的分子靶标的miRNA;

[0218] (c) 体内靶向相同的分子靶标的反义RNA;或

[0219] (d) 体内靶向相同分子靶标的siRNA、miRNA和/或反义RNA的组合。

[0220] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,所述多聚体寡核苷酸包含具有两种或更多种实质上不同的寡核苷酸的异源多聚体。

[0221] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中实质上不同的寡核苷酸为:

[0222] (a) 体内靶向不同的分子靶标的siRNA;

[0223] (b) 体内靶向不同的分子靶标的miRNA;

[0224] (c) 体内靶向不同的分子靶标的反义RNA;或

[0225] (d) 体内靶向不同的分子靶标的siRNA、miRNA和/或反义RNA的组合。

[0226] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中所述多聚体寡核苷酸不包含:PEG、聚醚化合物和/或除寡核苷酸之外的聚合物。

[0227] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中所述多聚体寡核苷酸不配制在纳米粒子(NP)中或更具体地在脂质纳米粒子(LNP)中。

[0228] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中所述多聚体寡核苷酸基本上由结构21和任选的靶向配体组成。

[0229] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中所述多聚体寡核苷酸还包含靶向配体。

- [0230] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中靶向配体缀合至寡核苷酸。
- [0231] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中靶向配体通过寡核苷酸的3'末端或5'末端缀合至寡核苷酸。
- [0232] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中每个共价接头·是相同的。
- [0233] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,所述多聚体寡核苷酸包含两个或更多个不同的共价接头·。
- [0234] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法,其中·中的一个或多个包含可切割的共价接头。
- [0235] 在一个方面,本发明提供包含直链结构的多聚体寡核苷酸,其中共价接头·中的每一个连接两个单体亚单元-----。
- [0236] 在一个方面,本发明提供包含支链结构的多聚体寡核苷酸,其中共价接头·中的至少一个连接三个或更多个单体亚单元-----。
- [0237] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个单体亚单元-----独立地为单链寡核苷酸——。
- [0238] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中:
- [0239] m 为1——●——●——●——(结构 34);
- [0240] m 为2——●——●——●——●——(结构 39);
- [0241] m 为3——●——●——●——●——●——(结构 35);
- [0242] m 为4——●——●——●——●——●——●——(结构 40);或
- [0243] m 为5——●——●——●——●——●——●——●——(结构 37)。
- [0244] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中 m 为6、7、8、9、10、11或12。
- [0245] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中 m 为 ≥ 13 的整数。
- [0246] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中至少一个单链寡核苷酸——为反义寡核苷酸。
- [0247] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个单链寡核苷酸——独立地为反义寡核苷酸。
- [0248] 当参考附图和以下描述时,本发明技术的这些和其他优点将显而易见。

附图说明

- [0249] 图1A展示了三触角N-乙酰半乳糖胺配体的化学结构。
- [0250] 图1B展示了二硫代-双-马来酰亚胺基乙烷的化学结构。
- [0251] 图2展示了5' -GalNAc-FVII规范对照,结合实施例9对其进行讨论。
- [0252] 图3展示了GalNAc-同源二聚体缀合物(XD-06330),结合实施例10对其进行讨论。
- [0253] 图4展示了GalNAc-同源二聚体缀合物(XD-06360)的合成的示意图,结合实施例11对其进行讨论。
- [0254] 图5展示了GalNAc-同源二聚体缀合物(XD-06329)的合成的示意图,结合实施例12对其进行讨论。

[0255] 图6展示了示出小鼠血清中的FVII活性的数据(通过FVII同源二聚体GalNAc缀合物敲低),结合实施例13对其进行讨论。

[0256] 图7A和图7B和图7C展示了示出小鼠血清中的FVII活性的数据(通过针对GalNAc含量归一化的FVII同源二聚体GalNAc缀合物敲低),结合实施例13对其进行讨论。

[0257] 图8展示了独立地靶向FVII、ApoB和TTR的规范GalNAc-siRNA,结合实施例14对其进行讨论。

[0258] 图9展示了GalNAc-异源二聚体缀合物(XD-06726),结合实施例15对其进行讨论。图例:在该实施例中,“基因A”是siFVII;“基因B”是siApoB;并且“基因C”是siTTR。

[0259] 图10展示了用于GalNAc-缀合的异源二聚体(XD-06726)的合成策略的示意图,结合实施例15对其进行讨论。图例:在该实施例中,“基因A”是siFVII;“基因B”是siApoB;并且“基因C”是siTTR。

[0260] 图11展示了GalNAc-异源二聚体缀合物(XD-06727),结合实施例16对其进行讨论。图例:在该实施例中,“基因A”是siFVII;“基因B”是siApoB;并且“基因C”是siTTR。

[0261] 图12展示了用于GalNAc-缀合的异源二聚体(XD-06727)的合成策略的示意图,结合实施例16对其进行讨论。图例:在该实施例中,“基因A”是siFVII;“基因B”是siApoB;并且“基因C”是siTTR。

[0262] 图13展示了针对将X20336添加到X20366的HPLC分析的数据,结合实施例16对其进行讨论。

[0263] 图14展示了针对将X19580进一步添加到X20336和X20366的反应产物的HPLC分析的数据,结合实施例16对其进行讨论。

[0264] 图15展示了针对将X18795(5'-siFVII反义-3')进一步添加到X20336、X20366和X19580以生成XD-06727的反应产物的HPLC分析的数据,结合实施例16对其进行讨论。

[0265] 图16A和图16B展示了针对血清样品中的TTR蛋白水平的数据(通过ELISA测量),结合实施例18对其进行讨论。

[0266] 图17A和图17B展示了针对血清样品中的FVII酶活性的数据,结合实施例18对其进行讨论。

[0267] 图18A和图18B展示了针对血清样品中的ApoB蛋白水平的数据(通过ELISA测量),结合实施例18对其进行讨论。

[0268] 图19A和图19B展示了肝脏数据中的靶标敲低,结合实施例18对其进行讨论。

[0269] 图20展示了GalNAc-异源四聚体缀合物(XD-07140),结合实施例19对其进行讨论。图例:在该实施例中,“基因A”是siFVII;“基因B”是siApoB;并且“基因C”是siTTR。

[0270] 图21展示了GalNAc-异源四聚体缀合物(XD-07140)的合成的示意图,结合实施例19对其进行讨论。图例:在该实施例中,“基因A”是siFVII;“基因B”是siApoB;并且“基因C”是siTTR。

[0271] 图22展示了GalNAc-siFVII-siApoB-siTTR-siFVII四聚体(XD-07140)的HPLC结果,结合实施例19对其进行讨论。

[0272] 图23展示了说明用于合成同源六聚体的步骤的示意图,结合实施例23对其进行讨论。

[0273] 图24A和图24B展示了示出ssRNA X30835的收率和纯度的RP-HPLC结果,结合实施

例24对其进行讨论。

[0274] 图24C和图24D展示了示出ssRNA X30837的收率和纯度的RP-HPLC结果,结合实施例24对其进行讨论。

[0275] 图24E展示了针对X30838的RP-HPLC结果,结合实施例24对其进行讨论。

[0276] 图24F展示了针对X30838、X18795和XD-09795的RP-HPLC结果,结合实施例24对其进行讨论。

[0277] 图25展示了示出在注射XD-09795或XD-09794之后的不同时间点小鼠中的FVII反义RNA的血清浓度的数据,结合实施例25对其进行讨论。

[0278] 图26A-J展示了示出在注射XD-09795或XD-09794之后的不同时间点小鼠中的各种细胞因子的血清水平的数据,结合实施例26对其进行讨论。

[0279] 图27A展示了针对FVII siRNA的单体的合成策略的示意图,结合实施例28对其进行讨论。

[0280] 图27B展示了针对XD-09794的RP-HPLC结果,结合实施例28对其进行讨论。

[0281] 图28A展示了针对FVII siRNA的同源二聚体的合成策略的示意图,结合实施例29对其进行讨论。

[0282] 图28B展示了针对XD-10635的RP-HPLC结果,结合实施例29对其进行讨论。

[0283] 图29A展示了针对FVII siRNA的同源三聚体的合成策略的示意图,结合实施例30对其进行讨论。

[0284] 图29B展示了针对XD-10636的RP-HPLC结果,结合实施例30对其进行讨论。

[0285] 图30A展示了针对FVII siRNA的同源四聚体的合成策略的示意图,结合实施例31对其进行讨论。

[0286] 图30B展示了针对XD-10637的RP-HPLC结果,结合实施例31对其进行讨论。

[0287] 图31A展示了针对FVII siRNA的同源五聚体的合成策略的示意图,结合实施例32对其进行讨论。

[0288] 图31B展示了针对XD-10638的RP-HPLC结果,结合实施例32对其进行讨论。

[0289] 图32A展示了针对FVII siRNA的同源六聚体的合成策略的示意图,结合实施例33对其进行讨论。

[0290] 图32B展示了针对XD-10639的RP-HPLC结果,结合实施例33对其进行讨论。

[0291] 图33A展示了针对经由单体DTME缀合物的FVII siRNA的同源六聚体的合成策略的示意图,结合实施例34对其进行讨论。

[0292] 图33B展示了针对XD-09795的RP-HPLC结果,结合实施例34对其进行讨论。

[0293] 图34A展示了针对经由单体DTME缀合物的FVII siRNA的同源七聚体的合成策略的示意图,结合实施例35对其进行讨论。

[0294] 图34B展示了针对XD-10640的RP-HPLC结果,结合实施例35对其进行讨论。

[0295] 图35A展示了针对经由单体DTME缀合物的FVII siRNA的同源八聚体的合成策略的示意图,结合实施例36对其进行讨论。

[0296] 图35B展示了针对XD-10641的RP-HPLC结果,结合实施例36对其进行讨论。

[0297] 图36A展示了针对各种FVII siRNA多聚体的血清中的FVII siRNA水平随时间推移的平滑线散布图,结合实施例37对其进行讨论。

[0298] 图36B展示了针对各种FVII siRNA多聚体的血清中的FVII siRNA水平随时间推移的直线标记散布图,结合实施例37对其进行讨论。

[0299] 图37A-D展示了在施用各自的寡核苷酸之后的不同时间点针对FVII siRNA多聚体的血清中的FVII siRNA水平的柱状图,结合实施例37对其进行讨论。

[0300] 图38A展示了针对FVII多聚体的血清中的FVII siRNA暴露水平(曲线下面积)的柱状图,结合实施例37对其进行讨论。

[0301] 图38B展示了归一化为单体的针对FVII多聚体的血清中的总FVII siRNA水平(曲线下面积)的柱状图,结合实施例37对其进行讨论。

[0302] 图39展示了多聚体达到与单体在5分钟时的FVII siRNA血清浓度相同的FVII siRNA血清浓度所需的时间的柱状图,结合实施例38对其进行讨论。

[0303] 图40表示针对同源四聚体siRNA的合成策略的示意图,结合实施例20对其进行讨论。

[0304] 图41表示针对在交替链上具有键合的同源四聚体siRNA的合成策略的示意图,结合实施例20对其进行讨论。

[0305] 虽然本发明包括许多不同形式的实施方案,但是在附图中示出并且将在本文中详细描述若干具体实施方案,并且具有以下理解:本公开被认为是技术原理的示例,并且不旨在将本发明限制于所示的实施方案。

具体实施方式

[0306] 本发明涉及将具有通过共价接头连接的单体亚单元的多聚体寡核苷酸施用于受试者的方法。所述多聚体寡核苷酸可以具有至少约45kD的分子量,以使得多聚体寡核苷酸的由于肾小球滤过而产生的清除降低。本发明还涉及多聚体寡核苷酸以及合成多聚体寡核苷酸的方法。例如,鉴于典型的siRNA(例如,双链单体)可以具有约15kD的分子量和相对较低的循环半衰期(例如,具有类似于尿素或葡萄糖的肾小球滤过率),根据本发明的寡核苷酸多聚体可以具有至少约45kD的分子量,并且具有相对较高的循环半衰期(例如,具有较低的由于肾小球滤过率而产生的清除)。根据本发明的多聚体的改善的和有利的性质可以用增加的体内循环半衰期来描述。它们也可以用增加的体内活性来描述。

[0307] 当与靶向配体组合时,多元缀合物也可以递送比单体等同物更高的每个配体/受体结合事件的有效负载。本发明还涉及新的合成中间体以及合成多元缀合物寡核苷酸的方法。本发明还涉及使用多元缀合物寡核苷酸例如来减少基因表达、生物学研究、治疗或预防医学病症和/或产生新的或改变的表型的方法。

[0308] 将多聚体寡核苷酸施用于受试者的方法

[0309] 在各个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,所述方法包括将有效量的多聚体寡核苷酸施用于受试者,所述多聚体寡核苷酸包含亚单元-----,其中:

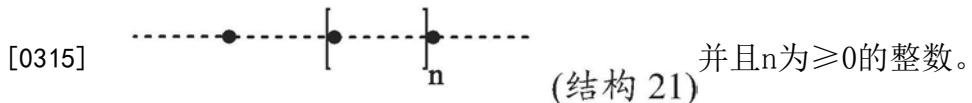
[0310] 所述亚单元-----中的每一个独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,并且所述亚单元-----中的每一个通过共价接头·连接至另一个亚单元;

[0311] 所述多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小;并且

[0312] 所述多聚体寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

[0313] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中所述多聚体寡核苷酸中包含的亚单元的数目为m,m为整数,所述整数被选择为允许多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小。在各个方面,m为(i) ≥ 2 ; (ii) ≥ 3 ; (iii) ≥ 4 ; (iv) ≥ 4 且 ≤ 17 ; (v) ≥ 4 且 ≤ 8 ;或(vi) 4、5、6、7或8。

[0314] 在一个方面,本发明提供一种将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中所述多聚体寡核苷酸包含结构21:



[0316] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中所述亚单元为单链寡核苷酸。

[0317] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中n ≥ 1 。

[0318] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中所述亚单元为双链寡核苷酸。

[0319] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中:

[0320] 当n=0时,多聚体寡核苷酸的由于肾小球滤过而产生的清除相对于多聚体寡核苷酸的单体亚单元-----和/或二聚体亚单元-----的清除降低;并且

[0321] 当n ≥ 1 时,多聚体寡核苷酸的由于肾小球滤过而产生的清除相对于多聚体寡核苷酸的单体亚单元-----、二聚体亚单元-----和/或三聚体亚单元-----的清除降低。

[0322] 测量多聚体寡核苷酸的降低的清除的方法

[0323] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除引起多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期增加。

[0324] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除通过测量将多聚体寡核苷酸施用于受试者之后多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期来确定。

[0325] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除通过测量多聚体寡核苷酸的血清浓度减少至预定值所需的时间来确定。预定值可以为所施用的剂量的90%、80%、70%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%。

[0326] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除通过测量在将多聚体寡核苷酸施用于受试者之后多聚体寡核苷酸在预定时间的血清浓度来确定。

[0327] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除通过测量描绘将多聚体寡核苷酸施用于受试者之后多聚体寡核苷酸的血清浓度随时间推移的图形的曲线下面积来确定。

[0328] 施用于受试者的多聚体寡核苷酸的降低的清除的影响

[0329] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除使多聚体寡核苷酸的体内生物利用率增加。

[0330] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除使多聚体寡核苷酸的体内细胞摄取增加。

[0331] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中由于肾小球滤过而产生的降低的清除使多聚体寡核苷酸的体内治疗指数/比率增加。

[0332] 在一个方面,本发明提供一种将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中所测量的参数具有关于单体、二聚体、三聚体和更多数量的多聚体寡核苷酸中的亚单元数目的S形关系,例如如图37A-图37D所示。

[0333] 在一个方面,本发明提供一种将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中针对多聚体寡核苷酸及其从单体亚单元开始的亚单元中的每一个的所测量的参数在被绘制图线时定义S形曲线,例如如图38A-图38B所示。

[0334] 多聚体寡核苷酸

[0335] 在各个方面,本发明提供包含亚单元-----的多聚体寡核苷酸,其中:

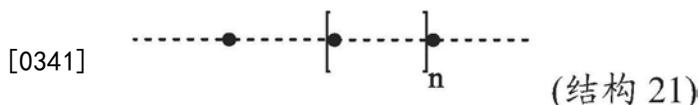
[0336] 所述亚单元-----中的每一个独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,并且所述亚单元-----中的每一个通过共价接头·连接至另一个亚单元;

[0337] 所述多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小;并且

[0338] 所述多聚体寡核苷酸的分子量为至少约45kD。

[0339] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸中包含的亚单元的数目为m,m为整数,所述整数被选择为允许多聚体寡核苷酸具有被构造为降低其由于肾小球滤过而产生的清除的分子量和/或分子大小。在各个方面,m为(i) ≥ 2 ; (ii) ≥ 3 ; (iii) ≥ 4 ; (iv) ≥ 4 且 ≤ 17 ; (v) ≥ 4 且 ≤ 8 ;或(vi) 4、5、6、7或8。

[0340] 根据权利要求16和权利要求17中任一项所述的多聚体寡核苷酸,其包含结构21:



[0342] 其中所述亚单元-----中的至少一个包含单链,所述共价接头·中的一个连接至所述单链的3'末端并且所述共价接头中的另一个连接至所述单链的5'末端,并且n为 ≥ 0 的整数。

[0343] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元-----的长度为15-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。

[0344] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中n ≥ 1 且n ≤ 17 。

[0345] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中n ≥ 1 且n ≤ 5 。

[0346] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中n为1、2、3、4或5。

[0347] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为双链RNA且n ≥ 1 。

[0348] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为单链寡核苷酸。

[0349] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为双链寡核苷酸。

[0350] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述亚单元包含单链寡核苷酸和双链寡核苷酸的组合。

[0351] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为RNA、DNA或人工的或非天然的核酸类似物。

[0352] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为RNA。

[0353] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为siRNA、saRNA或miRNA。

[0354] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元为双链siRNA,并且共价接头中的每一个连接siRNA的有义链。

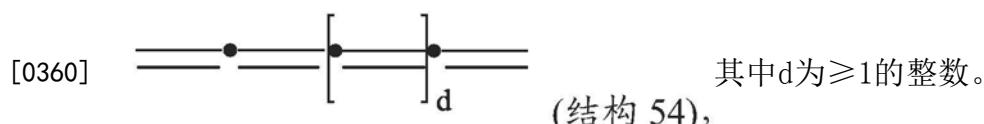
[0355] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸包括基本上相同的亚单元-----的同源多聚体。

[0356] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸包括两个或更多个实质上不同的亚单元-----的异源多聚体。

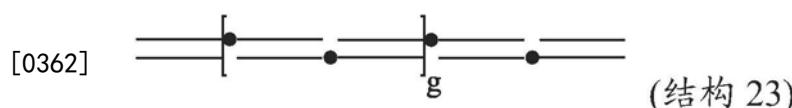
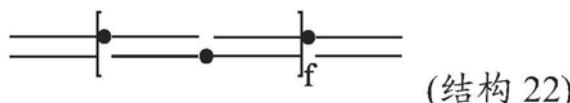
[0357] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸的纯度为至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0358] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,并且其中n为 ≥ 1 的整数。

[0359] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,其中n为 ≥ 1 的整数,并且其中每个共价接头•在同一个链上:



[0361] 在一个方面,本发明提供包含结构22或结构23的多聚体寡核苷酸:



[0363] 其中每个____为双链寡核苷酸,每个•为连接相邻的双链寡核苷酸的共价接头,f为 ≥ 1 的整数,且g为 ≥ 0 的整数。

[0364] 在一个方面,本发明提供多种多聚体寡核苷酸,其中基本上所有的多聚体寡核苷酸都具有预定的n值和/或预定的分子量。

[0365] 靶向配体和适体

[0366] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述多聚体寡核苷酸还包含一个或多个靶向配体。

[0367] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述亚单元中的至少一个为靶向配体。

[0368] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中靶向配体为适体。

[0369] 接头

[0370] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中共价接头·中的一个或多个包括可切割的共价接头,并且包括例如如实施例20、实施例22B和实施例27中所讨论的核苷酸接头。核苷酸接头是含有一个或多个核苷酸的接头,并且可以选择该接头以使其不实现任何其他指定的功能。

[0371] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述可切割的共价接头含有可酸切割的键、可还原剂切割的键、可生物切割的键或可酶切割的键。

[0372] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中所述可切割的共价接头在细胞内条件下是可切割的。

[0373] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个共价接头·是相同的。

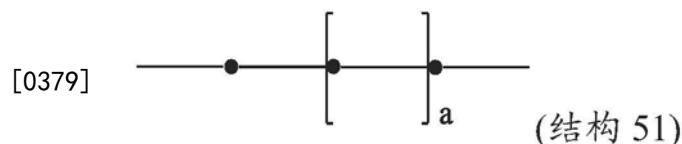
[0374] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中共价接头·包括两个或更多个不同的共价接头。

[0375] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中每个共价接头·连接两个单体亚单元-----。

[0376] 在一个方面,本发明提供多聚体寡核苷酸,其中至少一个共价接头·连接三个或更多个单体亚单元-----。

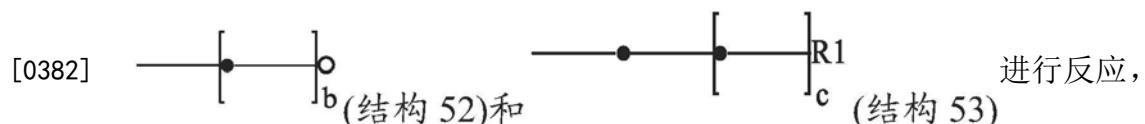
[0377] 多聚体寡核苷酸的合成方法

[0378] 在各个方面,本发明提供合成包含结构51的多聚体寡核苷酸的方法:

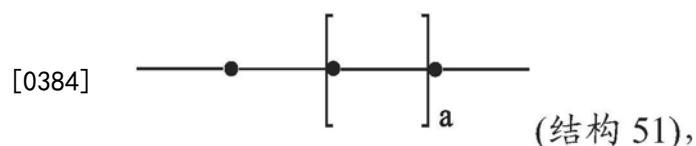


[0380] 其中每个——为单链寡核苷酸,每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头,并且a为 ≥ 1 的整数,所述方法包括以下步骤:

[0381] (i) 使

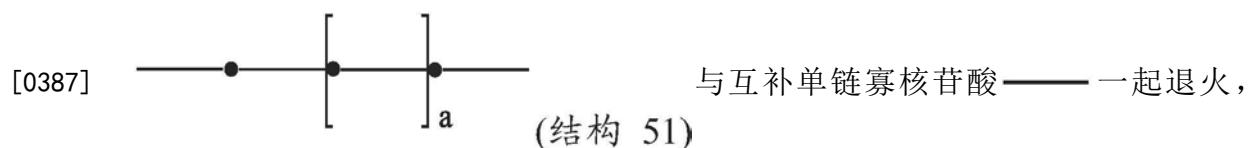


[0383] 从而形成结构51:

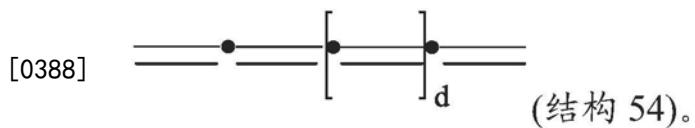


[0385] 其中○为连接部分,R1为能够与连接部分○反应的化学基团,b和c各自独立地为 ≥ 0 的整数,b和c二者不能同时为零,并且 $b+c=a$,以及

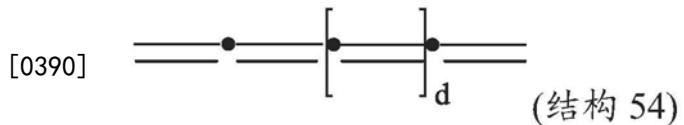
[0386] (ii) 任选地使结构51:



从而形成结构54:

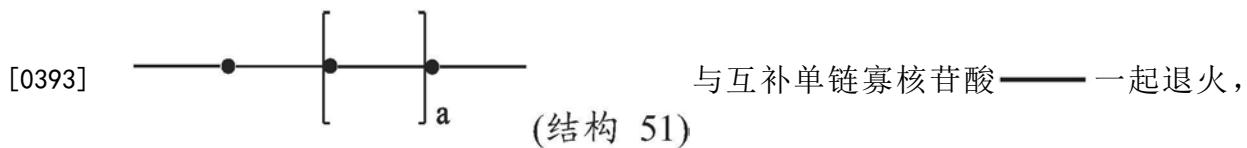


[0389] 在各个方面,本发明提供合成包含结构54的多聚体寡核苷酸的方法:

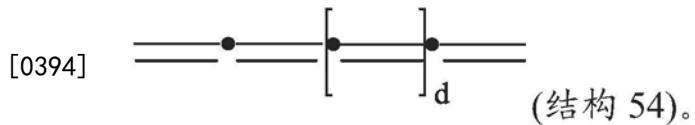


[0391] 其中每个——为单链寡核苷酸,每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头,并且a≥1,所述方法包括以下步骤:

[0392] (i) 使结构51:



从而形成结构54:



[0395] 受试者

[0396] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中所述受试者是啮齿动物,例如小鼠或大鼠。

[0397] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中所述受试者是灵长类动物,例如人。

[0398] 小鼠肾小球滤过率(GFR)可以为约0.15-0.25ml/min。人GFR可以为约1.8ml/min/kg (Mahmood I: (1998) Interspecies scaling of renally secreted drugs. Life Sci 63:2365-2371)。

[0399] 小鼠可以具有约1.46ml血液。所以,小鼠中血液总体积的肾小球滤过时间可以为约7.3分钟(1.46/0.2)。人可以具有约5升血液且体重为约70kg。因此,人中血液总体积的肾小球滤过时间可以为39.7分钟[5000/126(1.8*70)]。

[0400] 本领域的普通技术人员将认识到,至少由于上述原因,不同的物种可以具有不同的由于肾小球滤过而产生的清除。本领域的普通技术人员可以推断,人和小鼠之间由于肾小球滤过而产生的清除的倍数比率可以为约1:5或1:6。换句话说,人对某些物质(例如,特定寡核苷酸)的清除可以比小鼠慢5-6倍。

[0401] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中测量将多聚体寡核苷酸施用于受试者之后30分钟和120分钟之间的体内循环半衰期。

[0402] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中所述预定时间为将多聚体寡核苷酸施用于受试者之后30分钟和120分钟之间。

[0403] 在一个方面,本发明提供将多聚体寡核苷酸施用于有需要的受试者的方法,其中根据将多聚体寡核苷酸施用于受试者之后x分钟和y分钟之间的多聚体寡核苷酸的血清浓度来计算曲线下面积。在一些实施方案中,x可以为1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、10分

钟、20分钟、30分钟、40分钟、50分钟、60分钟、75分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟或300分钟，y可以为90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟、360分钟、420分钟、480分钟、540分钟、600分钟、720分钟、840分钟、960分钟、1080分钟、1200分钟、1320分钟、1440分钟或1600分钟。例如，时间范围可以为30-120分钟、1-1600分钟或300-600分钟。

[0404] 在一个方面，本发明提供多聚体寡核苷酸或用于增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期的方法，其中所述多聚体寡核苷酸不配制在纳米粒子 (NP) 或脂质纳米粒子 (LNP) 中。

[0405] 本发明还涉及具有改善的药效动力学和/或药代动力学的多元缀合物寡核苷酸。例如，多元缀合物寡核苷酸(例如，包含3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个或更多个siRNA的多聚体寡核苷酸)可以具有相对于单个单体亚单元的增加的体内循环半衰期和/或增加的体内活性。当缀合至靶向配体时，多元缀合物也可以递送比单体等同物更高的每个配体/受体结合事件的寡核苷酸有效负载。本发明还涉及新的合成中间体以及合成多元缀合物寡核苷酸的方法。本发明还涉及使用多元缀合物寡核苷酸例如来减少基因表达、生物学研究、治疗或预防医学病症和/或产生新的或改变的表型的方法。

[0406] 下文将继而讨论论本发明的各种特征。

[0407] 核酸

[0408] 在各种实施方案中，核酸或寡核苷酸为RNA、DNA，或包括人工的或非天然的核酸类似物。在各种实施方案中，核酸或寡核苷酸是单链的。在各种实施方案中，核酸或寡核苷酸是双链的(例如，反向平行双链)。

[0409] 在各种实施方案中，核酸或寡核苷酸是RNA，例如反义RNA (aRNA)、CRISPR RNA (crRNA)、长非编码RNA (lncRNA)、微RNA (miRNA)、piwi相互作用RNA (piwi-interacting RNA, piRNA)、小干扰RNA (siRNA)、信使RNA (mRNA)、短发夹RNA (shRNA)、小激活RNA (saRNA) 或核酶。

[0410] 在一个实施方案中，RNA是siRNA。例如，每个双链寡核苷酸是siRNA和/或具有15-30个碱基对的长度。

[0411] 在各种实施方案中，核酸或寡核苷酸是适体。

[0412] siRNA(小干扰RNA)是由19-22个核酸组成的短双链RNA，其靶向核苷酸序列与siRNA的有义链相同的基因的mRNA(信使RNA)，以便通过分解靶基因来抑制基因的表达 (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. 和 Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-8)。

[0413] 可用于本发明的方法的另一类核酸是miRNA。miRNA是在转录后基因调控中发挥关键作用的非编码RNA。miRNA可以调控所有哺乳动物蛋白质编码基因中的30%的表达。已经发现了由双链RNA加上另外的小非编码RNA产生的特异性和有效基因沉默 (RNAi) (Canver, M. C. 等人, *Nature* (2015))。前体miRNA是长度为~70个核苷酸且具有2个核苷酸的3' -突出端的短茎环，所述短茎环被输出成成熟的19-25个核苷酸的双链体。具有较低的碱基配对稳定性的miRNA链(引导链)可以加入到RNA诱导的沉默复合物 (RISC) 上。过客引导链可以发挥功能，但是通常被降解。成熟miRNA将RISC栓系至主要存在于3' 非翻译区 (UTR) 内的靶mRNA中的部分互补的序列基序，并且诱导转录后基因沉默 (Bartel, D. P. *Cell*, 136:215-233 (2009); Saj, A. & Lai, E. C. *Curr Opin Genet Dev*, 21:504-510 (2011))。例如美国专利号8,

765,709中描述了miRNA模拟物。

[0414] 在一些实施方案中, RNA可以是短发夹RNA (shRNA), 例如如美国专利号8,202,846和8,383,599中所述。

[0415] 在一些实施方案中, RNA可以是CRISPR RNA (crRNA), 例如V型的CRISPR阵列可以被加工成长度为42-44个核苷酸的短成熟crRNA, 其中每个成熟crRNA以19个核苷酸的直接重复序列开始, 然后是23-25个核苷酸的间隔区序列。或者, II型系统中的成熟crRNA可以以20-24个核苷酸的间隔区序列开始, 然后是约22个核苷酸的直接重复序列。例如美国专利号8,771,945, Jinek等人, *Science*, 337 (6096) : 816-821 (2012) 和国际专利申请公开号W02013/176772中描述了CRISPR系统。

[0416] 在各种实施方案中, 核酸或寡核苷酸的长度为15-30、17-27、19-26、20-25、40-50、40-150、100-300、1000-2000或最多10000个核苷酸。

[0417] 在各种实施方案中, 寡核苷酸是双链的且互补的。互补性可以是100%互补的, 或小于100%互补的, 但是寡核苷酸在相关条件(例如, 生理学相关条件)下杂交且保持为双链的。例如, 双链寡核苷酸可以是至少约80%、85%、90%或95%互补的。

[0418] 在一些实施方案中, RNA是长非编码RNA (lncRNA), lncRNA是大型的、不同类别的不编码蛋白质(或缺乏>100个氨基酸的开放阅读框)的已转录的RNA分子, 其长度超过200个核苷酸。lncRNA被认为涵盖人中近30,000种不同的转录物, 因此lncRNA转录物占非编码转录物组的主要部分(参见例如Derrien等人, *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNA: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. *Genome Res*, 22 (9) : 1775-89 (2012))。

[0419] 在另外其他实施方案中, RNA是信使RNA (mRNA)。例如国际专利申请公开号W02013/151736中描述了mRNA及其作为用于蛋白质的体内产生的递送方法的应用。

[0420] 在其他实施方案中, RNA可以是小激活RNA (saRNA) (例如, 如Chappell等人, *Nature Chemical Biology*, 11: 214-220 (2015) 中所述) 或核酶 (Doherty等人, *Ann Rev Biophys Biomol Struct*, 30: 457-475 (2001))。

[0421] 在一些实施方案中, 核酸或寡核苷酸是DNA, 例如反义DNA (aDNA) (例如, 安塔够妙 (antagomir) 或反义缺口聚体 (gapmer)。例如Subramanian等人, *Nucleic Acids Res*, 43 (19) : 9123-9132 (2015) 和国际专利申请公开号W0 2013/040429中描述了aDNA (包括缺口聚体和多聚体) 的实例。例如美国专利号7,232,806中描述了安塔够妙的实例。

[0422] 在各种实施方案中, 寡核苷酸具有特异性序列, 例如本文公开的序列中的任一者。

[0423] 以下实施例中提供了用于寡核苷酸合成的通用程序。可以适用于本发明的其他方法是本领域已知的。

[0424] 核酸的修饰

[0425] 在各种实施方案中, 核酸或寡核苷酸还包含化学修饰。化学修饰可以包括经修饰的核苷、经修饰的主链、经修饰的糖或经修饰的末端。

[0426] 含磷键包括但不限于硫代磷酸根、手性硫代磷酸根、二硫代磷酸根、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基膦酸根(包括3' 亚烷基膦酸根和手性膦酸根)、亚膦酸根、氨基磷酸根(包括3' -氨基氨基磷酸根和氨基烷基氨基磷酸根)、硫羰基氨基磷酸根、硫羰基烷基膦酸根、硫羰基烷基磷酸三酯以及具有正常的3' -5' 键的硼烷磷酸根、这些硼烷磷酸根

的2' -5' 连接类似物、和具有反极性的那些硼烷磷酸根(其中相邻的核昔单元对是从3' -5' 到5' -3' 或从2' -5' 到5' -2' 连接)。

[0427] 本发明的多元缀合物中包含的寡核昔酸可以使用本领域已知的各种策略来修饰,以产生多种影响,包括例如改善的体外和体内效力和稳定性。这些策略包括:人工核酸,例如2' -0-甲基-取代的RNA;2' -氟-2' 脱氧RNA、肽核酸(PNA);吗啉;锁核酸(LNA);解锁核酸(UNA);桥联核酸(BNA);二醇核酸(GNA);和苏糖核酸(TNA);或更一般而言,核酸类似物,例如双环和三环核昔类似物,这些核昔类似物在结构上类似于天然存在的RNA和DNA,但是在天然存在的分子的磷酸主链、糖或核碱基部分中的一者或更多者中具有改变。通常,类似物核碱基赋予尤其是不同的碱基配对和碱基堆积性质。实例包括通用碱基,这些通用碱基可以与全部四个规范碱基配对。磷酸-糖主链类似物的实例包括PNA。Braasch等人, *Biochemistry*, 41 (14) : 4503-4510 (2002) 以及美国专利号5,539,082;5,714,331;5,719,262;和5,034,506中描述了基于吗啉的寡聚体化合物。

[0428] 在本文描述的制造方法中,通过在末端用化学官能团取代来修饰一些寡核昔酸。取代可以在寡核昔酸的3' 末端或5' 末端进行,并且优选地在单体的有义链和反义链二者的3' 末端进行,但并不总是限于此。化学官能团可以包括例如巯基基团(-SH)、羧基基团(-COOH)、胺基基团(-NH₂)、羟基基团(-OH)、甲酰基基团(-CHO)、羰基基团(-CO-)、醚基团(-O-)、酯基团(-COO-)、硝基基团(-NO₂)、叠氮基团(-N₃)或磺酸基团(-SO₃H)。

[0429] 另外地或替代地,本发明的多元缀合物中包含的寡核昔酸可以被修饰为另外包括核碱基(在本领域中通常简称为“碱基”)修饰或取代。经修饰的核碱基包括仅偶尔或短暂停存在于天然核酸中的核碱基,例如次黄嘌呤、6-甲基腺嘌呤、5-甲基嘧啶(尤其是5-甲基胞嘧啶(也称为5-甲基-2' 脱氧胞嘧啶,并且通常在本领域中称为5-Me-C)、5-羟甲基胞嘧啶(HMC)、糖基HMC和龙胆二糖基HMC),以及合成核碱基,例如2-氨基腺嘌呤、2-(甲基氨基)腺嘌呤、2-(咪唑基烷基)腺嘌呤、2-(氨基烷基氨基)腺嘌呤或其他杂取代的烷基腺嘌呤、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟基甲基尿嘧啶、8-氮杂鸟嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤、N6 (6-氨基己基) 腺嘌呤和2,6-二氨基嘌呤。Kornberg, A., *DNA Replication*, W.H. Freeman&Co., San Francisco, 第75-77页 (1980); Gebeyehu等人, *Nucl. Acids Res*, 15: 4513 (1997)。还可以包括本领域已知的“通用”碱基,例如肌苷。5-Me-C取代已经显示出使核酸双链体稳定性增加0.6-1.2°C。(Sanghvi, Y.S., 载于Crooke, S.T. 和Lebleu, B. 编, *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 第276-278页 (1993)) 并且是碱基取代的方面。经修饰的核碱基可以包括其他合成和天然核碱基,诸如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代尤其是5-溴、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤(7-methylguanine) 和7-甲基腺嘌呤、8-氮鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤和7-脱氮杂腺嘌呤以及3-脱氮杂鸟嘌呤和3-脱氮杂腺嘌呤。核酸末端的羟基基团(-OH) 可以被诸如巯基基团(-SH)、羧基基团(-COOH) 或胺基团(-NH₂) 的官能团取代。取代可以在3' 末端或5' 末端进行。

[0430] 接头

[0431] 在本发明的各个方面和实施方案中,寡核苷酸是共价连接的。接头可以是可切割的(例如,在细胞内条件下可切割的,以促进寡核苷酸递送和/或作用)或不可切割的。虽然在下文和实施例中在接头的语境中使用亲核体-亲电体化学进行了一般描述,但是其他化学和构型也是可能的。并且,如普通技术人员所理解,各种接头(包括它们的组成、合成和用途)是本领域已知的,并且可以适用于本发明。

[0432] 在各种实施方案中,共价接头可以包括亲核基团和亲电基团的反应产物。例如,共价接头可以包括硫醇和马来酰亚胺、硫醇和乙烯砜、硫醇和吡啶基二硫化物、硫醇和碘乙酰胺、硫醇和丙烯酸根、叠氮化物和炔或者胺和羧基基团的反应产物。如本文所述的,这些基团中的一个基团连接至寡核苷酸(例如,在3'末端或5'末端硫醇(-SH)官能化),而另一个基团则涵盖在最终连接两个寡核苷酸(例如,DTME中的马来酰亚胺)的第二分子(例如,连接剂)之内。

[0433] 在各种实施方案中,共价接头可以包括未修饰的二核苷酸键或者硫醇和马来酰亚胺的反应产物。

[0434] 在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸的两个或更多个接头可以包括两种正交类型的可生物切割的键。在一个优选的实施方案中,两种正交的可生物切割的键可以包括未修饰的二核苷酸以及硫醇和马来酰亚胺的反应产物。

[0435] 在各种实施方案中,核酸或寡核苷酸经由磷酸二酯或硫代磷酸二酯连接至接头(例如,结构1中的R1为磷酸二酯或硫代磷酸二酯)。在各种实施方案中,核酸或寡核苷酸经由C1-8烷基、C2-8烯基、C2-8炔基、杂环基、芳基和杂芳基、支链烷基、芳基、卤代芳基和/或其他基于碳的连接物连接至接头。在各种实施方案中,核酸或寡核苷酸经由C2-C10烷基、C3-C6烷基或C6烷基连接至接头(例如,结构1中的R2为C2-C10烷基、C3-C6烷基或C6烷基)。在一个优选的实施方案中,核酸或寡核苷酸经由C6烷基连接至接头。或者,这些部分(例如,结构1中的R1和/或R2)是任选的,直接键合是可能的。

[0436] 在各种实施方案中,核酸或寡核苷酸经由硫醇和马来酰亚胺基团的反应产物连接至接头。(例如,结构1中的A为硫醇和马来酰亚胺基团的反应产物)。利用这种化学性质的优选的连接剂包括DTME(二硫代双马来酰亚胺基乙烷)、BM(PEG)2(1,8-双(马来酰亚胺基)二乙二醇)、BM(PEG)3(1,11-双马来酰亚胺基-三乙二醇)、BM0E(双马来酰亚胺基乙烷)、BMH(双马来酰亚胺基己烷)或BMB(1,4-双马来酰亚胺基丁烷)。

[0437] 同样,实施例是说明性的和非限制性的。在各种实施方案中,寡核苷酸可以经由官能性末端取代直接连接在一起,或通过连接剂间接连接在一起。在各种实施方案中,寡核苷酸可以直接结合至接头(例如,结构1的R1和R2不存在)。这种键合可以例如通过使用3'-硫代核苷来实现,3'-硫代核苷可以根据本领域的普通技术人员来制备。参见例如,Sun等人“Synthesis of 3'-thioribonucleosides and their incorporation into oligoribonucleotides via phosphoramidite chemistry”RNA.1997年11月;3(11):1352-63。在各种实施方案中,连接剂可以是非离子亲水性聚合物,诸如聚乙二醇(PEG)、聚乙烯基吡咯烷酮和聚噁唑啉,或疏水性聚合物,诸如PLGA和PLA。

[0438] 用作共价键的中介物的聚合物连接剂可以是非离子亲水性聚合物,包括PEG、Pluronic、聚乙烯基吡咯烷酮、聚噁唑啉或它们的共聚物;或一种或多种可生物切割的聚酯

聚合物,包括聚-L-乳酸、聚-D-乳酸、聚-D,L-乳酸、聚-羟乙酸、聚-D-乳酸-羟乙酸共聚物、聚-L-乳酸-羟乙酸共聚物、聚-D,L-乳酸-羟乙酸共聚物、聚己内酯、聚戊内酯、聚羟基丁酸酯、聚羟基戊酸酯或它们的共聚物,但并不总是限于此。

[0439] 连接剂可以具有100-10,000道尔顿的分子量。这种连接剂的实例包括二硫代-双-马来酰亚胺基乙烷(DTME)、1,8-双-马来酰亚胺基二乙二醇(BM(PEG)2)、三-(2-马来酰亚胺基乙基)-胺(TMEA)、三琥珀酰亚胺基氨基三乙酸酯(TSAT)、3-臂-聚(乙二醇)(3-臂PEG)、马来酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、乙烯砜、碘乙酰基、硝基苯基叠氮化物、异氰酸根、吡啶基二硫化物、酰肼和羟基苯基叠氮化物。

[0440] 本文可以使用具有可切割的键(诸如被胞质溶胶的化学环境切割的还原键)的连接剂或具有不可切割的键的连接剂。例如,本发明的前述方面的连接剂可以具有不可切割的键,诸如酰胺键或氨基甲酸酯键。或者,本发明的前述方面的连接剂可以具有可切割的键,诸如可酸切割的键(例如,酯、腙或缩醛的共价键)、可还原剂切割的键(例如,二硫键)、可生物切割的键或可酶切割的键。在一个实施方案中,可切割的共价接头在细胞内条件下是可切割的。另外,可用于药物修饰的任何连接剂可以无限制地用于本发明的前述方面。

[0441] 此外,官能团和连接剂的组合可以包括:(a)当官能团是氨基和硫醇时,连接剂可以是3-(2-吡啶基二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯或6-([3(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸琥珀酰亚胺酯;(b)当官能团是氨基时,连接剂可以是3,3'二硫代二丙酸二-(N-琥珀酰亚胺基酯)、二硫代-双(乙基1H-咪唑-1-甲酸酯)或二硫代-双(乙基1H-咪唑-1-甲酸酯);(c)当官能团是氨基和炔时,连接剂可以是3-[2-(对叠氮基水杨酰胺基)乙基]-1,3'-二硫代]丙酸碘基-N-琥珀酰亚胺酯;并且(d)当官能团y是硫醇时,连接剂是二硫代-双-马来酰亚胺基乙烷(DTME);1,8-双-马来酰亚胺基二乙二醇(BM(PEG)2);或二硫代双(碘基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)。

[0442] 在制备化合物的前述方法中,可以包括活化官能团的另外步骤。可以用于活化官能团的化合物包括但不限于1-乙基-3,3-二甲基氨基丙基碳二亚胺、咪唑、N-羟基琥珀酰亚胺、二氯己基碳二亚胺、N-β-马来酰亚胺基丙酸、N-β-马来酰亚胺基丙基琥珀酰亚胺酯或3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀酰亚胺酯。

[0443] 单体中间体化合物

[0444] 在各个方面,本发明提供偶联至共价接头的寡核苷酸,所述寡核苷酸可以用于例如具有预定大小和组成的定义的多元缀合物寡核苷酸的合成。

[0445] 在一个方面,本发明提供根据结构1的化合物:

[0446] X-R1-R2-A-R3-B(结构1)

[0447] 其中:

[0448] X为通过其3'末端或5'末端键合至R1的核酸;

[0449] R1为磷酸的衍生物、硫代磷酸的衍生物、硫酸根、酰胺、二醇,或者不存在;

[0450] R2为C2-C10烷基、烷氧基或芳基基团,或者不存在;

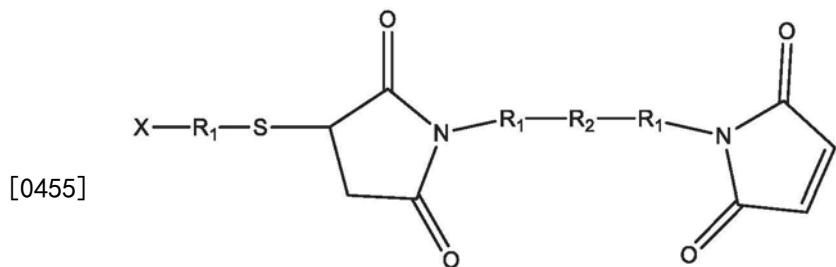
[0451] A为亲核体和亲电体的反应产物;

[0452] R3为C2-C10烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫基基团、醚、硫醚、硫代丙酸根或二硫化物;并且

[0453] B为亲核体或亲电体(例如,硫醇、马来酰亚胺、乙烯砜、吡啶基二硫化物、碘乙酰

胺、丙烯酸根、叠氮化物、炔、胺或羧基基团)。

[0454] 在一个方面,本发明提供根据结构2的化合物:



(结构 2)

[0456] 其中:

[0457] X为在其3'末端或5'末端经由磷酸根或其衍生物或硫代磷酸根或其衍生物键合至R1的核酸;

[0458] 每个R1独立地为C2-C10烷基、烷氧基或芳基基团;并且

[0459] R2为硫代丙酸根或二硫化物基团。

[0460] 在一个方面,本发明提供根据结构3的化合物:

[0461] X-R1-R2-A-R3-B (结构3)

[0462] 其中:

[0463] X为通过其3'末端或5'末端键合至R1的核酸;

[0464] R1为磷酸的衍生物(诸如磷酸根、磷酸二酯、磷酸三酯、膦酸根、氨基磷酸根等等)、硫代磷酸的衍生物(诸如硫代磷酸根、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、硫代氨基磷酸根等等)、硫酸根、酰胺、二醇,或者不存在;

[0465] R2为C2-C10烷基、烷氧基或芳基基团,或者不存在;

[0466] A为第一反应性部分和第二反应性部分的反应产物;

[0467] R3为C2-C10烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫基基团、醚、硫醚、硫代丙酸根或二硫化物;并且

[0468] B为第三反应性部分。

[0469] 在各个方面,本发明还提供用于合成偶联至共价接头的寡核苷酸的方法。

[0470] 在一个方面,本发明提供用于合成根据结构1的化合物(或适用于合成根据结构2或结构3的化合物)的方法,所述方法包括:

[0471] 使官能化的核酸X-R1-R2-A'和共价接头A"-R3-B在X-R1-R2-A'的和化学计量过量的A"-R3-B的稀溶液中进行反应,其中A'和A"包含亲核体和亲电体,从而形成化合物X-R1-R2-A-R3-B (结构1),其中:

[0472] X为通过其3'末端或5'末端键合至R1的核酸;

[0473] R1为磷酸二酯、硫代磷酸二酯、硫酸根、酰胺、二醇,或者不存在;

[0474] R2为C2-C10烷基、烷氧基或芳基基团,或者不存在;

[0475] A为亲核体和亲电体的反应产物;

[0476] R3为C2-C10烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫基基团、醚、硫醚、硫代丙酸根或二硫化物;并且

[0477] B为亲核体或亲电体(例如,硫醇、马来酰亚胺、乙烯砜、吡啶基二硫化物、碘乙酰胺、丙烯酸根、叠氮化物、炔、胺或羧基基团)。

[0478] 所述方法还可以包括通过(i)在核酸的固相合成期间使用亚磷酰胺寡聚化化学性质引入硫醇或(ii)在固相合成期间还原所引入的二硫化物来合成官能化的核酸X-R1-R2-A'的步骤,其中A'包含硫醇(-SH)。

[0479] 在各种实施方案中,用于合成结构1的化合物的方法还包括合成结构2的化合物。

[0480] 偶联至共价接头的寡核苷酸可以包括本文(包括实施例中)所述的特征中的任何一者或更多者。例如,化合物可以包括本文所述的核酸(具有或不具有修饰)、靶向配体和/或接头中的任何一者或更多者,或者概述、描述或实施例中所示的任何特定结构或化学性质。实施例1提供用于生成硫醇封端的寡核苷酸的示例性方法。实施例2提供用于制备偶联至接头的寡核苷酸的示例性方法。

[0481] 在各种实施方案中,用于合成结构1、结构2或结构3的化合物的方法在基本上有利于形成结构1、结构2或结构3以及基本上防止X的二聚化的条件下进行。所述条件可以提高反应的收率(例如,提高产物的纯度)。

[0482] 在各种实施方案中,用于合成结构1、结构2或结构3的化合物的方法,使官能化的核酸X-R1-R2-A'和共价接头A"-R3-B进行反应的步骤在小于约1mM、500μM、250μM、100μM或50μM的X-R1-R2-A'浓度下进行。或者,X-R1-R2-A'浓度可以为约1mM、500μM、250μM、100μM或50μM。

[0483] 在各种实施方案中,用于合成结构1、结构2或结构3的化合物的方法,使官能化的核酸X-R1-R2-A'和共价接头A"-R3-B进行反应的步骤使用至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50或100倍摩尔过量的A"-R3-B进行。或者,A"-R3-B的摩尔过量可以为约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50或100倍。

[0484] 在各种实施方案中,用于合成结构1、结构2或结构3的化合物的方法,使官能化的核酸X-R1-R2-A'和共价接头A"-R3-B进行反应的步骤在小于约7、6、5或4的pH下进行。或者,pH可以为约7、6、5或4。

[0485] 在各种实施方案中,用于合成结构1、结构2或结构3的化合物的方法,使官能化的核酸X-R1-R2-A'和共价接头A"-R3-B进行反应的步骤在包含水和水可混溶的有机助溶剂的溶液中进行。水可混溶的有机助溶剂可以包括DMF(二甲基甲酰胺)、NMP(N-甲基-2-吡咯烷酮)、DMSO(二甲基亚砜)或乙腈。水可混溶的有机助溶剂可以占溶液的约10%、15%、20%、25%、30%、40%或50%体积(v/v)。

[0486] 在各种实施方案中,化合物是分离的或基本上纯的。例如,化合物的纯度可以为至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一个实施方案中,化合物的纯度为约85%-95%。同样,用于合成根据本发明的化合物和组合物的方法可以产生纯度为至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的产物。在一个实施方案中,产物的纯度为约85%-95%。制备物的纯度可以大于或等于50%;优选地纯度大于或等于75%;更优选地纯度大于或等于85%;以及另外更优选地,纯度大于或等于95%。

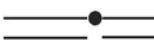
[0487] 如本文所用,术语约根据其通常和普通含义大约使用。例如,“约X”涵盖大约所述的X值,包括在X值或与X大约相等和具有与X基本上相同的性质的量的测量误差之内的类似量。

[0488] 如本文所用,分离的包括与其他不需要的物质分离的化合物。分离的化合物可以以基本上纯的状态合成或与粗反应混合物的其他组分分离,不同的是可以保留一些量的杂质,包括残留量的粗反应混合物的其他组分。类似地,纯的或基本上纯的意指充分不含杂质以允许其预期用途(例如,在药物制剂中或作为用于后续化学反应的材料)。纯度为X%意指通过相关测量确定化合物为总组合物的X%,所述测量可以例如通过分析方法(诸如HPLC)进行。

[0489] 二聚体化合物和中间体

[0490] 在各个方面,本发明提供二聚体定义的多元缀合物寡核苷酸。这些化合物包括同源二聚体(例如,两种基本上相同的(例如体内靶向相同的基因)寡核苷酸)和异源二聚体(例如,两种实质上不同的(例如不同的序列或体内靶向不同的基因)寡核苷酸)。

[0491] 在一个方面,本发明提供根据结构4的分离的化合物:

[0492]  (结构 4)

[0493] 其中:

[0494] 每个为被设计为在体内与相同的分子靶标反应的双链寡核苷酸,并且

[0495] • 为在相邻的单链寡核苷酸的单链的3'末端或5'末端连接所述单链,并且具有结构-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-的共价接头,其中:

[0496] 每个R1为磷酸的衍生物(诸如磷酸根、磷酸二酯、磷酸三酯、膦酸根、氨基磷酸根等等)、硫代磷酸的衍生物(诸如硫代磷酸根、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、硫代氨基磷酸根等等)、

[0497] 硫酸根、酰胺、二醇,或者不存在;

[0498] 每个R2独立地为C2-C10烷基、烷氧基或芳基基团,或者不存在;

[0499] 每个A独立地为亲核体和亲电体的反应产物,并且

[0500] R3为C2-C10烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫基基团、醚、硫醚、硫代丙酸根或二硫化物。

[0501] 在一个方面,本发明提供根据结构5的分离的化合物:

[0502]  (结构 5)

[0503] 其中:

[0504]  为第一单链寡核苷酸

[0505]  为具有与第一单链寡核苷酸不同的序列的第二单链寡核苷酸,并且

[0506] • 为在相邻的单链寡核苷酸的单链的3'末端或5'末端连接所述单链,并且具有结构-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-的共价接头,其中:

[0507] 每个R1为磷酸的衍生物(诸如磷酸根、磷酸二酯、磷酸三酯、膦酸根、氨基磷酸根等等)、硫代磷酸的衍生物(诸如硫代磷酸根、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、硫代氨基磷酸根等等)、

[0508] 硫酸根、酰胺、二醇,或者不存在;

[0509] 每个R2独立地为C2-C10烷基、烷氧基或芳基基团,或者不存在;

[0510] 每个A独立地为硫醇和马来酰亚胺、硫醇和乙烯砜、硫醇和吡啶基二硫化物、硫醇和碘乙酰胺、硫醇和丙烯酸根、叠氮化物和炔或胺和羧基基团的反应产物,并且

[0511] R3为C2-C10烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫基基团、醚、硫醚、硫代丙酸根或二硫化物。

[0512] 在一个方面,本发明提供根据结构6的分离的化合物:

[0513]  (结构 6)

[0514] 其中:

[0515]  为第一双链寡核苷酸

[0516]  为具有与第一双链寡核苷酸不同的序列的第二双链寡核苷酸,并且

[0517] • 为在相邻的单链寡核苷酸的单链的3'末端或5'末端连接所述单链,并且具有结构-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-的共价接头,其中:

[0518] 每个R1为磷酸的衍生物(诸如磷酸根、磷酸二酯、磷酸三酯、膦酸根、氨基磷酸根等等)、硫代磷酸的衍生物(诸如硫代磷酸根、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、硫代氨基磷酸根等等)、硫酸根、酰胺、二醇,或者不存在;

[0519] 每个R2独立地为C2-C10烷基、烷氧基或芳基基团,或者不存在;

[0520] 每个A独立地为硫醇和马来酰亚胺、硫醇和乙烯砜、硫醇和吡啶基二硫化物、硫醇和碘乙酰胺、硫醇和丙烯酸根、叠氮化物和炔或胺和羧基基团的反应产物,并且

[0521] R3为C2-C10烷基、烷氧基、芳基、烷基二硫基基团、醚、硫醚、硫代丙酸根或二硫化物。

[0522] 在一个方面,本发明提供根据结构11的分离的化合物:

[0523]  (结构 11)

[0524] 其中:

[0525]  为双链寡核苷酸,

[0526]  为单链寡核苷酸,并且

[0527] • 为连接相邻的单链寡核苷酸的单链的共价接头。

[0528] 在各个方面,本发明提供用于合成二聚体定义的多元缀合物寡核苷酸的方法。

[0529] 在一个方面,本发明提供用于合成结构5的化合物的方法:

[0530]  (结构 5)

[0531] 其中  为第一单链寡核苷酸,  为具有与第一单链寡核苷酸不同的序列的第二单链寡核苷酸,并且 • 为在相邻的单链寡核苷酸的单链的3'末端或5'末端连接所述单链的共价接头,所述方法包括以下步骤:

[0532] (i) 使第一单链寡核苷酸  R₁ 与双官能连接部分○进行反应,其中R1为能够在产生单取代产物  O 的条件下与○反应的化学基团;

[0533] (ii) 使  O 与第二单链寡核苷酸  R₂ 反应,其中R2为能够与○反应的化学基团,从而形成  。

[0534] 所述方法还可以包括使互补的  和  一起退火以生成结构6的步骤:

[0535]  (结构 6)。

[0536] 在一个方面,本发明提供用于合成结构4的分离的化合物的方法:

[0537]  (结构 4)

[0538] 其中每个 — 为双链寡核苷酸,并且 \bullet 为在相邻的单链寡核苷酸的单链的3'末端或5'末端连接所述单链的共价接头,所述方法包括以下步骤:

[0539] (i) 使第一单链寡核苷酸 —R_1 与双官能连接部分 ○ 进行反应,其中R1为能够与 ○ 反应的化学基团,从而形成单取代产物 $\text{—}\bullet\text{○}$;

[0540] (ii) 使 $\text{—}\bullet\text{○}$ 与第二单链寡核苷酸 —R_2 进行反应,其中R2为能够与 ○ 反应的化学基团,从而形成单链二聚体 $\text{—}\bullet\text{—}\bullet\text{—}$;

[0541] (iii) 使单链寡核苷酸同时或依次退火,从而形成 $\text{—}\bullet\text{—}\bullet\text{—}$ 。

[0542] 在一个方面,本发明提供用于合成结构4的分离的化合物的方法:

$\text{—}\bullet\text{—}$ (结构4),其中每个 — 为双链寡核苷酸,并且 \bullet 为在相邻的单链寡核苷酸的单链的3'末端或5'末端连接所述单链的共价接头,所述方法包括以下步骤:

[0543] (i) 通过以下方式形成 $\text{—}\bullet\text{—}$:

[0544] (a) 使第一单链寡核苷酸 — 和第二单链寡核苷酸 —R_1 一起退火,从而形成 —R_1 ,并且使 —R_1 与第三单链寡核苷酸 —R_2 反应,其中R1和R2为能够直接或间接进行反应以形成共价接头 \bullet 的化学部分,从而形成 $\text{—}\bullet\text{—}$;或者

[0545] (b) 使第二单链寡核苷酸 —R_1 和第三单链寡核苷酸 —R_2 进行反应,从而形成 $\text{—}\bullet\text{—}$,并且使第一单链寡核苷酸 — 和 $\text{—}\bullet\text{—}$ 一起退火,从而形成 $\text{—}\bullet\text{—}$;

[0546] (ii) 使 $\text{—}\bullet\text{—}$ 和第四单链寡核苷酸 — 一起退火,从而形成 $\text{—}\bullet\text{—}$ 。

[0547] 所述方法可以适用于例如通过省略步骤(ii)来合成根据 $\text{—}\bullet\text{—}$ (结构11)的分离的化合物。

[0548] 在一个方面,本发明提供用于合成结构4的分离的化合物的方法: $\text{—}\bullet\text{—}$ (结构4),其中每个 — 为双链寡核苷酸,并且 \bullet 为在相邻的单链寡核苷酸的单链的3'末端或5'末端连接所述单链的共价接头,所述方法包括以下步骤:

[0549] (a) 使第一单链寡核苷酸 — 和第二单链寡核苷酸 —R_1 一起退火,从而形成 —R_1 ;

[0550] (b) 使第三单链寡核苷酸 —R_2 和第四单链寡核苷酸 — 一起退火,从而形成 —R_2 ;

[0551] (c) 使 —R_1 和 —R_2 进行反应,其中R1和R2为能够直接或间接进行反应以形成共价接头 \bullet 化学部分,从而形成 $\text{—}\bullet\text{—}$ 。

[0552] 与根据本发明的其他化合物和组合物一样,二聚体化合物和中间体可以包括本文(包括实施例中)所述的特征中的任何一者或更多者。例如,化合物可以包括本文所述的核酸(具有或不具有修饰)、靶向配体和/或接头中的任何一者或更多者,或者概述、描述或实施例中所示的任何特定结构或化学性质。

[0553] 实施例3提供用于制备二聚化寡核苷酸的示例性方法,实施例4提供用于使单链寡

核苷酸退火以形成双链寡核苷酸的示例性方法。实施例7提供用于制备可用于上述合成的各种寡核苷酸前体的示例性方法。实施例8提供用于制备也可用于上述合成的各种寡核苷酸多聚体的示例性方法。

[0554] 实施例9和实施例10中提供了异源二聚体的实例。

[0555] 实施例12至实施例15中提供了同源二聚体的实例。

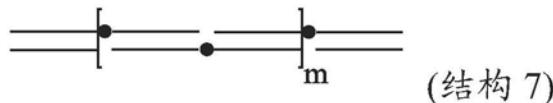
[0556] 在各种实施方案中, R1、R2和双官能连接部分○可以形成如本文所述和所示的共价接头•。例如, 在各种实施方案中, R1和R2可以各自独立地包含反应性部分, 例如亲电体或亲核体。在一个实施方案中, R1和R2可以各自独立地选自硫醇、马来酰亚胺、乙烯砜、吡啶基二硫化物、碘乙酰胺、丙烯酸根、叠氮化物、炔、胺和羧基基团。在各种实施方案中, 双官能连接部分○包含可以根据上述步骤(i)和步骤(ii)依次反应的两个反应性部分, 例如可以与R1和R2中的亲电体/亲核体反应的第二亲电体/第二亲核体。双官能连接部分○的实例包括但不限于DTME、BM(PEG)2、BM(PEG)3、BMOE、BMH或BMB。

[0557] 本发明的这些以及所有其他合成方法还可以包括将靶向配体添加至分子的步骤。实施例6提供用于添加靶向配体(例如, Ga1Nac)的示例性方法。用于添加靶向配体的另外方法是本领域已知的, 并且可以适合由本领域的技术人员用于本发明。

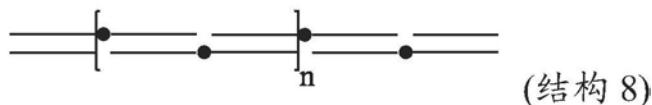
[0558] 多聚体($n > 2$)化合物和中间体

[0559] 在各个方面, 本发明提供多聚体($n > 2$)定义的多元缀合物寡核苷酸, 包括定义的三元缀合物和定义的四元缀合物。

[0560] 在一个方面, 本发明提供根据结构7或结构8的化合物:



[0561]



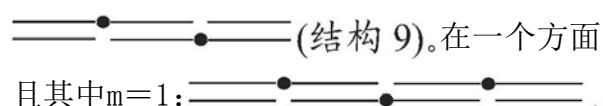
[0562] 其中:

[0563] 每个____为双链寡核苷酸,

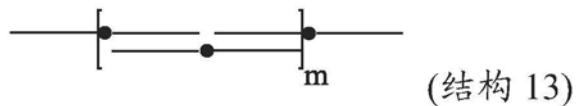
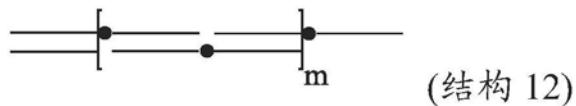
[0564] 每个•为连接相邻的单链寡核苷酸的单链的共价接头, 并且

[0565] m为≥1的整数且n为≥0的整数。

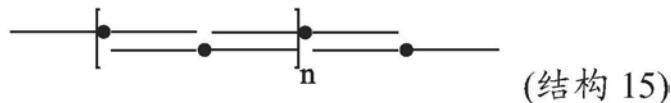
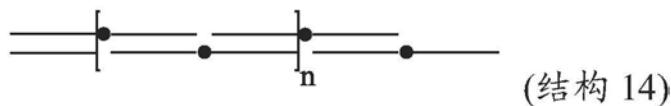
[0566] 在一个方面, 本发明提供根据结构9的化合物, 并且其中n=0:



[0567] 在一个方面, 本发明提供根据结构12、结构13、结构14或结构15的化合物:



[0568]



[0569] 其中：

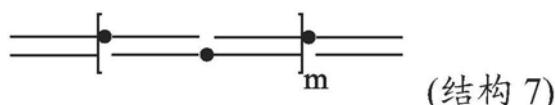
[0570] 每个——为双链寡核苷酸，

[0571] 每个——为单链寡核苷酸，

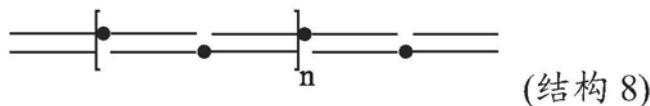
[0572] 每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的单链的共价接头，并且m为≥1的整数且n为≥0的整数。

[0573] 在各个方面，本发明提供用于合成多聚体(n>2)定义的多元缀合物寡核苷酸(包括定义的三元缀合物和定义的四元缀合物)的方法。

[0574] 在一个方面，本发明提供用于合成根据结构7或结构8的化合物的方法：



[0575]

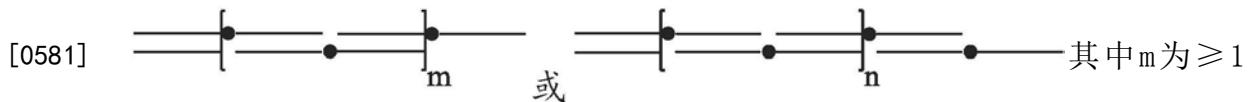


[0576] 其中：每个——为双链寡核苷酸，每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的单链的共价接头，并且m为≥1的整数且n为≥0的整数，所述方法包括以下步骤：

[0577] (i) 通过以下方式形成——·——：

[0578] (a) 使第一单链寡核苷酸——和第二单链寡核苷酸——R₁一起退火，从而形成——R₁，并且使——R₁与第三单链寡核苷酸——R₂反应，其中R₁和R₂为能够直接或间接进行反应以形成共价接头·的化学部分，从而形成——·——；或者[0579] (b) 使第二单链寡核苷酸——R₁和第三单链寡核苷酸——R₂进行反应，从而形成——·——，并且使第一单链寡核苷酸——和——·——一起退火，从而形成——·——；

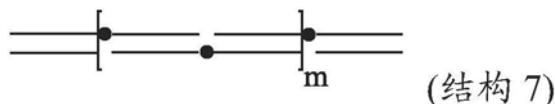
[0580] (ii) 使——·——和第二单链二聚体——·——一起退火，从而形成——·——，并且任选地，使一种或多种另外的单链二聚体——·——退火至——·——，从而形成



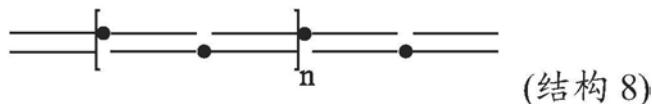
的整数且 n 为 ≥ 0 的整数；并且

[0582] (iii) 使第四单链寡核苷酸——退火至步骤 (ii) 的产物，从而形成结构 7 或结构 8。

[0583] 在一个方面，本发明提供用于合成根据结构 7 或结构 8 的化合物的方法：



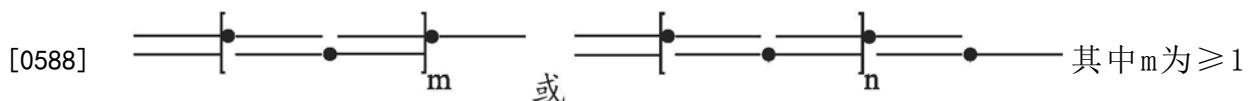
[0584]



[0585] 其中：每个——为双链寡核苷酸，每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的单链的共价接头，并且 m 为 ≥ 1 的整数且 n 为 ≥ 0 的整数，所述方法包括以下步骤：

[0586] (i) 使第一单链寡核苷酸——和第一单链二聚体——·——一起退火，从而形成——·——；

[0587] (ii) 使——·——和第二单链二聚体——·——一起退火，从而形成——·——，并且任选地，使一种或多种另外的单链二聚体——·——退火至——·——，从而形成



的整数且 n 为 ≥ 0 的整数；并且

[0589] (iii) 使第二单链寡核苷酸——退火至步骤 (ii) 的产物，从而形成结构 7 或结构 8。

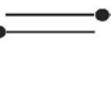
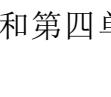
[0590] 在一个方面，本发明提供用于合成结构 9 的化合物的方法：
——·——·——(结构 9)，其中每个——为双链寡核苷酸，每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的单链的共价接头，所述方法包括以下步骤：

[0591] (i) 通过以下方式形成——·——：

[0592] (a) 使第一单链寡核苷酸——和第二单链寡核苷酸—— R_1 一起退火，从而形成—— R_1 ，并且使—— R_1 与第三单链寡核苷酸—— R_2 反应，其中 R_1 和 R_2 为能够直接或间接进行反应以形成共价接头·的化学部分，从而形成——·——；或者

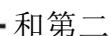
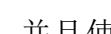
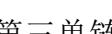
[0593] (b) 使第二单链寡核苷酸—— R_1 和第三单链寡核苷酸—— R_2 进行反应，从而形成——·——，并且使第一单链寡核苷酸——和——·——一起退火，从而形成——·——；

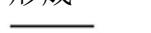
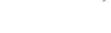
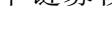
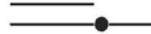
[0594] (ii) 使——·——和单链二聚体——·——一起退火，从而形成——·——；并且

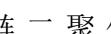
[0595] (iii) 使  和第四单链寡核苷酸  一起退火, 从而形成 .

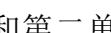
[0596] 在一个方面, 本发明提供用于合成结构 10 的化合物的方法:  (结构 10), 其中每个  为双链寡核苷酸, 每个  为连接相邻的单链寡核苷酸的单链的共价接头, 所述方法包括以下步骤:

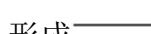
[0597] (i) 通过以下方式形成 :

[0598] (a) 使第一单链寡核苷酸  和第二单链寡核苷酸  一起退火, 从而形成  , 并且使  与第三单链寡核苷酸  反应, 其中 R1 和 R2 为能够直接或间接进行反应以形成共价接头  的化学部分, 从而形成  ; 或者

[0599] (b) 使第二单链寡核苷酸  和第三单链寡核苷酸  进行反应, 从而形成  , 并且使第一单链寡核苷酸  和  一起退火, 从而形成  ;

[0600] (ii) 使  和单链二聚体  一起退火, 从而形成  ;

[0601] (iii) 使  和第二单链二聚体  一起退火, 从而形成  ; 并且

[0602] (iv) 使  和第四单链寡核苷酸  一起退火, 从而形成 .

[0603] 与根据本发明的其他化合物和组合物一样, 二聚体化合物和中间体可以包括本文(包括实施例中)所述的特征中的任何一者或者。例如, 化合物可以包括本文所述的核酸(具有或不具有修饰)、靶向配体和/或接头中的任何一者或者, 或者概述、描述或实施例中所示的任何特定结构或化学性质。

[0604] 实施例 7 提供用于制备可用于上述合成的各种寡核苷酸前体的示例性方法。实施例 8 提供用于制备也可用于上述合成的各种寡核苷酸多聚体的示例性方法。

[0605] 在各种实施方案中, R1、R2 和双官能连接部分 0 可以形成如本文所述和所示的共价接头  。例如, 在各种实施方案中, R1 和 R2 可以各自独立地包含反应性部分, 例如亲电体或亲核体。在一个实施方案中, R1 和 R2 可以各自独立地选自硫醇、马来酰亚胺、乙烯砜、吡啶基二硫化物、碘乙酰胺、丙烯酸根、叠氮化物、炔、胺和羧基基团。在各种实施方案中, 双官能连接部分 0 包含可以根据上述步骤 (i) 和步骤 (ii) 依次反应的两个反应性部分, 例如可以与 R1 和 R2 中的亲电体/亲核体反应的第二亲电体/第二亲核体。双官能连接部分 0 的实例包括但不限于 DTME、BM(PEG)2、BM(PEG)3、BMOE、BMH 或 BMB。

[0606] 在包含两个或更多个共价接头  (例如, 在结构 7 至结构 16 中) 的各种实施方案中, 接头都是相同的。或者, 所述化合物或组合物可以包含两个或更多个不同的共价接头 .

[0607] 在各种实施方案中, 每个  可以独立地包含两个有义寡核苷酸或两个反义寡核苷酸。例如, 就 siRNA 而言,  可以包含两条活性链或两条过客链。

[0608] 在各种实施方案中, 每个  可以独立地包含一个有义寡核苷酸和一个反义寡核苷酸。例如, 就 siRNA 而言,  可以包含一条活性链和一条过客链。

[0609] 在各种实施方案中,所述化合物或组合物包含基本上相同的双链寡核苷酸的同源多聚体。基本上相同的双链寡核苷酸可以各自包含体内靶向相同分子靶标的siRNA。

[0610] 在各种实施方案中,所述化合物或组合物包含两个或更多个实质上不同的双链寡核苷酸的异源多聚体。实质上不同的双链寡核苷酸可以各自包含靶向不同的基因的siRNA。

[0611] 在各种实施方案中,化合物包含结构9,并且n=0:

 (结构 9)。所述化合物还可以包含靶向配体。所述化合物还可以包含2个或3个实质上不同的双链寡核苷酸 , 每个双链寡核苷酸包含体内靶向不同的分子靶标的siRNA。所述化合物还可以包含靶向配体,一个  包含靶向因子VII的第一siRNA引导链和杂交至引导链的第一过客链,一个  包含靶向载脂蛋白B的第二siRNA引导链和杂交至第二引导链的第二过客链,并且一个  包含靶向TTR的第三siRNA引导链和杂交至第三引导链的第三过客链。靶向配体可以包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

[0612] 实施例17、实施例18和实施例20中提供了三聚体的实例。

[0613] 在各种实施方案中,化合物包含结构10,并且m=1:

 (结构 10)。所述化合物还可以包含靶向配体。所述化合物还可以包含2个、3个、或4个实质上不同的双链寡核苷酸 , 每个双链寡核苷酸包含体内靶向不同的分子靶标的siRNA。所述化合物还可以包含靶向配体,一个  包含靶向因子VII的第一siRNA引导链和杂交至引导链的第一过客链,一个  包含靶向载脂蛋白B的第二siRNA引导链和杂交至第二引导链的第二过客链,并且一个  包含靶向TTR的第三siRNA引导链和杂交至第三引导链的第三过客链。靶向配体可以包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

[0614] 实施例21中提供了四聚体的实例。

[0615] 在各种实施方案中,每个双链寡核苷酸(例如 , 例如结构4中的)包含靶向因子VII的siRNA引导链和杂交至引导链的过客链。

[0616] 在各种实施方案中(例如,在结构4中),所述化合物还包含靶向配体,每个双链寡核苷酸(例如, )包含siRNA引导链和杂交至引导链的过客链,并且化合物的纯度为至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0617] 在各种实施方案中,至少一个双链寡核苷酸(例如 , 例如结构6中的)包含靶向因子VII的第一siRNA引导链和杂交至引导链的第一过客链,并且至少一个双链寡核苷酸(例如 , 例如结构6中的)包含靶向载脂蛋白B的第二siRNA引导链和第二过客链杂交的第二引导链。

[0618] 具有增加的体内循环半衰期和/或活性的寡核苷酸

[0619] 本发明提供具有增加的体内循环半衰期和/或活性的多聚体寡核苷酸,以及包含所述多聚体寡核苷酸的组合物以及它们的合成和使用方法。

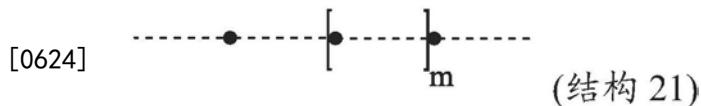
[0620] 在各个方面,本发明提供包含结构21的多聚体寡核苷酸:

[0621]  (结构 21)

[0622] 其中每个单体亚单元-----独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,m为≥1的

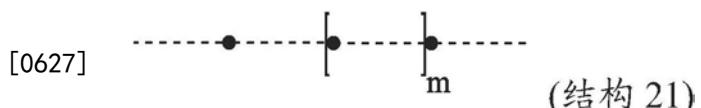
整数,每个•为连接相邻的单体亚单元-----的共价接头,并且单体亚单元-----中的至少一个包含单链,所述共价接头•中的一个连接至所述单链的3'末端并且所述共价接头中的另一个连接至所述单链的5'末端。

[0623] 在各个方面,本发明提供包含结构21的多聚体寡核苷酸:



[0625] 其中每个单体亚单元-----独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,每个•为连接相邻的单体亚单元-----的共价接头,并且m为 ≥ 0 的整数,所述整数被选择为(a)相对于单个单体亚单元-----的体内循环半衰期而言,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元-----的体内活性而言,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

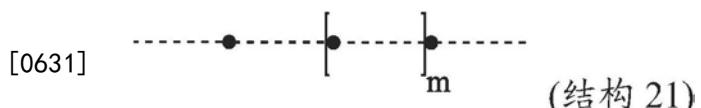
[0626] 在各个方面,本发明提供包含结构21的多聚体寡核苷酸:



[0628] 其中每个单体亚单元-----独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,每个•为连接相邻的单体亚单元-----的共价接头,m为 ≥ 0 的整数,并且

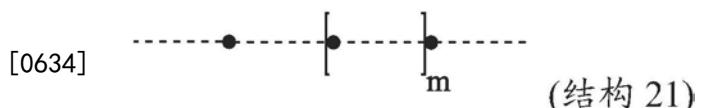
[0629] 其中所述多聚体寡核苷酸具有一定的分子大小和/或分子量,所述分子大小和/或分子量被构造为(a)相对于单个单体亚单元-----的体内循环半衰期,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元-----的体内活性,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

[0630] 在各个方面,本发明提供用于增加一种或多种寡核苷酸体内循环半衰期和/或体内活性的方法,所述方法包括将一种或多种寡核苷酸以包含结构21的多聚体寡核苷酸的形式施用于受试者:



[0632] 其中每个单体亚单元-----独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,每个•为连接相邻的单体亚单元-----的共价接头,并且m为 ≥ 0 的整数,所述整数被选择为(a)相对于单个单体亚单元-----的体内循环半衰期而言,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元-----的体内活性而言,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

[0633] 在各个方面,本发明提供用于增加一种或多种寡核苷酸体内循环半衰期和/或体内活性的方法,所述方法包括将一种或多种寡核苷酸以包含结构21的多聚体寡核苷酸的形式施用于受试者:



[0635] 其中每个单体亚单元-----独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,每个•为连接相邻的单体亚单元-----的共价接头,m为 ≥ 0 的整数,并且

[0636] 其中所述多聚体寡核苷酸具有一定的分子大小和/或分子量,所述分子大小和/或分子量被构造为(a)相对于单个单体亚单元-----的体内循环半衰期,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元-----的体内活性,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

[0637] 在各个方面,本发明提供包含m个单体亚单元-----的多聚体寡核苷酸,其中所述单体亚单元-----中的每一个独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,所述单体亚单元-----中的每一个通过共价接头·连接至另一个单体亚单元,并且m为≥3的整数,所述整数被选择为(a)相对于单个单体亚单元-----的体内循环半衰期,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元-----的体内活性,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

[0638] 在各个方面,本发明提供包含m个单体亚单元-----的多聚体寡核苷酸,其中所述单体亚单元-----中的每一个独立地为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸,所述单体亚单元-----中的每一个通过共价接头·连接至另一个单体亚单元,m为≥3的整数,并且所述多聚体寡核苷酸具有一定的分子大小和/或分子量,所述分子大小和/或分子量被构造为(a)相对于单个单体亚单元-----的体内循环半衰期,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元-----的体内活性,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。

[0639] 在各种实施方案中,增加是相对于多聚体寡核苷酸的单体亚单元的循环半衰期和/或活性而言的。在以下寡核苷酸摄取和清除部分中和实施例25和实施例37中进一步详细讨论循环半衰期(及其与其他性质(诸如肾小球滤过率)的关系)。在各种实施方案中,体内循环半衰期增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、500或1,000倍。体内循环半衰期可以增加至少2倍。体内循环半衰期可以增加至少10倍。在各种实施方案中,体内活性增加以 t_{max} 时体内活性的比率量度。在各种实施方案中,体内活性增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、500或1,000倍。体内活性可以增加至少2倍。体内活性可以增加至少10倍。在一个实施方案中,增加是在小鼠中。在一个实施方案中,增加是在人体中。

[0640] 在各种实施方案中,m为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

[0641] 在各种实施方案中,m为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

[0642] 在各种实施方案中,单体亚单元-----中的每一个包含siRNA,并且共价接头中的每一个连接siRNA的有义链。

[0643] 在各种实施方案中,共价接头·中的每一个连接两个单体亚单元-----。

[0644] 在各种实施方案中,共价接头·中的至少一个连接三个或更多个单体亚单元-----。

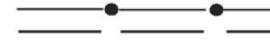
[0645] 在各种实施方案中,每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸——,并且m为1:



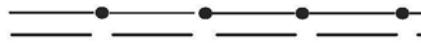
[0646]

(结构 29)。

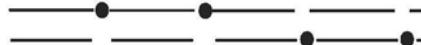
[0647] 在各种实施方案中,每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____, m 为1,并且每个共价接头•在同一个链上:

[0648]  (结构 28)。

[0649] 在各种实施方案中,每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,并且 m 为2:

 (结构 30)、

 (结构 31)、

[0650]  (结构 32)或

 (结构 33)。

[0651] 在各种实施方案中,每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____, m 为2,并且每个共价接头•在同一个链上:

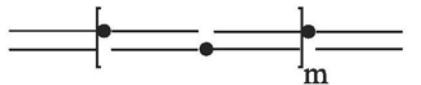
[0652]  (结构 33)。

[0653] 在各种实施方案中,每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,并且 m 为3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。

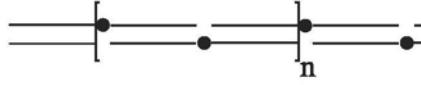
[0654] 在各种实施方案中,每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____, m 为3、4、5、6、7、8、9、10、11或12,并且每个共价接头•在同一个链上。

[0655] 在各种实施方案中,每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____,并且 $m \geq 13$ 。

[0656] 在各种实施方案中,每个单体亚单元-----独立地为双链寡核苷酸_____, $m \geq 13$,并且每个共价接头•在同一个链上。在各种实施方案中,结构21为结构22或结构23:

 (结构 22)

[0657]

 (结构 23)

[0658] 其中每个____为双链寡核苷酸,每个•为连接相邻的双链寡核苷酸的共价接头, m 为 ≥ 1 的整数且 n 为 ≥ 0 的整数。

[0659] 在各种实施方案中,结构21不是PCT/US2016/037685中公开的结构。

[0660] 在各种实施方案中,每个寡核苷酸-----为单链寡核苷酸。

[0661] 在各种实施方案中,每个寡核苷酸-----为双链寡核苷酸。

[0662] 在各种实施方案中,寡核苷酸-----包含单链寡核苷酸和双链寡核苷酸的组合。

[0663] 在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸包含其中共价接头•中的每一个连接两个单体亚单元-----的直链结构。

[0664] 在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸包含其中共价接头·中的至少一个连接三个或更多个单体亚单元-----的支链结构。例如,结构 21 可以是



结构 41。

[0665] 在各种实施方案中,每个单体亚单元-----独立地为单链寡核苷酸——。在一些这样的实施方案中,m为1



(结 构 34) ;

m为2



(结 构 39) ;

m为3



(结 构 35) ;

m为4



(结 构 40) ;

或m为5



(结 构 37)。

在一些这样的实施方案中,m为6、7、8、9、10、11或12。在一些这样的实施方案中,m为≥13的整数。在一个这样的实施方案中,至少一个单链寡核苷酸——为反义寡核苷酸。在一个这样的实施方案中,每个单链寡核苷酸——独立地为反义寡核苷酸。

[0666] 在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸包括基本上相同的寡核苷酸的同源多聚体。基本上相同的寡核苷酸可以是体内靶向相同分子靶标的siRNA。基本上相同的寡核苷酸可以是体内靶向相同的分子靶标的miRNA。基本上相同的寡核苷酸可以是体内靶向相同的分子靶标的反义RNA。基本上相同的寡核苷酸可以是体内靶向相同分子靶标的siRNA、miRNA 和/或反义RNA的组合。

[0667] 在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸包括具有两个或更多个实质上不同的寡核苷酸的异源多聚体。实质上不同的寡核苷酸可以是体内靶向不同的分子靶标的siRNA。实质上不同的寡核苷酸可以是体内靶向不同的分子靶标的miRNA。实质上不同的寡核苷酸可以是体内靶向不同的分子靶标的反义RNA。实质上不同的寡核苷酸可以是体内靶向不同的分子靶标的siRNA、miRNA 和/或反义RNA的组合。

[0668] 聚合物接头(诸如聚乙二醇(PEG))已用于尝试增加某些药物的循环半衰期。这些方法可能具有缺点,包括“稀释”治疗剂(例如,每单位质量的活性剂较少)。本发明可以区别于这些方法。例如,在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸不包含PEG。在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸不包含聚醚化合物。在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸不包含除寡核苷酸之外的聚合物。

[0669] 纳米粒子(NP)(诸如脂质纳米粒子(LNP))已用于尝试增加某些药物的循环半衰期。这些方法可能具有缺点,包括增加的毒性(例如,来自阳离子脂质)。本发明可以区别于这些方法。例如,在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸不配制在NP或LNP中。

[0670] 硫代磷酸根基团已用于尝试增加某些药物的循环半衰期。这些方法可能具有缺点,包括较低的活性(例如,由于寡核苷酸/血浆蛋白质聚集)。本发明可以区别于这些方法。例如,在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸不包含硫代磷酸根。

[0671] 在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸还包含靶向配体。在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸基本上由结构21和任选的靶向配体组成。多聚体寡核苷酸可以使用本文讨论的任

何靶向配体(参见例如,以下靶向配体部分)。在各种实施方案中,靶向配体缀合至寡核苷酸,例如靶向配体可以通过寡核苷酸的3'末端或5'末端缀合至寡核苷酸。

[0672] 多聚体寡核苷酸可以使用本文讨论的任何接头(参见例如,以下接头部分)。在各种实施方案中,每个共价接头·是相同的。在各种实施方案中,多聚体寡核苷酸包含两个或更多个不同的共价接头·。在各种实施方案中,·中的一者或者包括可切割的共价接头。在一些情况下,可切割接头可以是特别有利的。例如,在细胞靶向和进入之后,细胞内切割可以将单个多聚体寡核苷酸转化为多个具有生物学活性的寡核苷酸(例如,单个siRNA构建体可以递送四个或更多个活性siRNA),从而增加效力并减少不期望的副作用。

[0673] 在各种实施方案中,·中的一者或者包括核苷酸接头(例如可切割核苷酸接头,诸如UUU)。或者,在一些实施方案中,多聚体寡核苷酸明确地排除核苷酸接头。

[0674] 在各种实施方案中,化合物是分离的或基本上纯的。例如,化合物的纯度可以为至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一个实施方案中,化合物的纯度为约85%-95%。同样,用于合成根据本发明的化合物和组合物的方法可以产生纯度为至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的产物。在一个实施方案中,产物的纯度为约85%-95%。制备物的纯度可以大于或等于50%;优选地纯度大于或等于75%;更优选地纯度大于或等于85%;以及另外更优选地,纯度大于或等于95%。

[0675] 在各种实施方案中,每个寡核苷酸为RNA、DNA,或包括人工的或非天然的核酸类似物。在各种实施方案中,至少一种寡核苷酸是siRNA、miRNA或反义寡核苷酸。例如,在以上核酸部分中讨论了各种其他可能的寡核苷酸和置换。

[0676] 在各种实施方案中,每个寡核苷酸的长度为15-30、17-27、19-26或20-25个核苷酸。在各种实施方案中,核酸或寡核苷酸的长度为15-30、17-27、19-26、20-25、40-50、40-150、100-300、1000-2000或最多10000个核苷酸。

[0677] 在各种实施方案中,包含结构21的多聚体寡核苷酸具有至少约40kD、41kD、42kD、43kD、44kD、45kD、46kD、47kD、48kD、49kD、50kD、51kD、52kD、53kD、54kD、55kD、56kD、57kD、58kD、59kD、60kD、61kD、62kD、63kD、64kD或65kD的分子量。在各种实施方案中,包含结构21的多聚体寡核苷酸具有至少约40kD-45kD、45kD-50kD、50kD-55kD、55kD-60kD、60kD-65kD、65kD-70kD或70kD-75kD的分子量。分子量可以包括共价结合至多聚体寡核苷酸的所有物质,诸如靶向配体和接头。

[0678] 尽管包含结构21的多聚体寡核苷酸可以通过各种方法(例如,本文所述的用于制备四聚体或更多元的多聚体的那些方法)合成,但是某些结果可能需要特定的方法。例如,以下方法(以及实施例22中所示的那些方法)被设计为有效产生在同一个链上具有每个共价接头·的多聚体。

[0679] 例如,在一个方面,本发明提供合成包含结构34的多聚体寡核苷酸的方法:

[0680]  (结构 34)

[0681] 其中每个——为单链寡核苷酸,并且每个·为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头,所述方法包括以下步骤:

[0682] (i) 使 和 R₁进行反应,其中0为连接部分,并且R₁为能够与连接部分0反应的化学基团,从而形成 (结构 34),以及

[0683] (ii) 任选地使  (结构 34) 与互补单链寡核苷酸一起退火, 从而形成  (结构 28)。

[0684] 例如, 在一个方面, 本发明提供合成包含结构 35 的多聚体寡核苷酸的方法:

[0685]  (结构 35)

[0686] 其中每个  为单链寡核苷酸, 并且每个  为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头, 所述方法包括以下步骤:

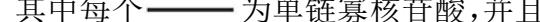
[0687] (i) 使  和  进行反应, 其中 0 为连接部分, 并且 R₁ 为能够与连接部分 0 反应的化学基团, 从而形成

 (结构 35), 以及

[0688] (ii) 任选地使  与互补单链寡核苷酸一起退火, 从而形成  (结构 36)。

[0689] 例如, 在一个方面, 本发明提供合成包含结构 37 的多聚体寡核苷酸的方法:

[0690]  (结构 37)

[0691] 其中每个  为单链寡核苷酸, 并且每个  为连接相邻的单链寡核苷酸的共价接头, 所述方法包括以下步骤:

[0692] (i) 使  和  进行反应, 其中 0 为连接部分, 并且 R₁ 为能够与连接部分 0 反应的化学基团, 从而形成

 (结构 37), 以及

[0693] (ii) 任选地使  与互补单链寡核苷酸一起退火, 从而形成

 (结构 38)。

[0694] 本发明还提供用于合成单链多聚体寡核苷酸的方法, 例如其中 m 为 2  (结构 39); m 为

4  (结构 40); m 为 6、7、8、9、10、11 或 12; 或 m ≥ 13 (参见以下实施例 22)。

[0695] 所述多聚体化合物可以包括本文公开的特征中的任何一者或更多者。例如, 化合物可以包括本文所述的核酸(具有或不具有修饰)、靶向配体和/或接头中的任何一者或更多者, 或者概述、描述或实施例中所示的任何特定结构或化学性质。同样, 化合物可以以概述、描述或实施例中所示的组合物(例如, 用于实验或医学用途)制备。以下药物组合物部分提供了说明性实例。

[0696] 寡核苷酸摄取和清除

[0697] 血流中药物的生物利用率为表征为靶细胞摄取与肾清除之间的平衡。从实际的角度来看, 体内循环半衰期和/或体内活性是肾清除/肾小球滤过的良好替代指标, 因为它们可以容易地定量和测量, 并且因为它们的改善(例如, 增加)可与改善的药效动力学和/或药代动力学相关联。

[0698] 血液中治疗剂(诸如寡核苷酸(ONT))的摄取率是很多因子的函数,它可以表示为:摄取率= $f \{ (ONT \text{ 浓度}) \times (\text{血流速率}) \times (\text{受体拷贝数/细胞}) \times (\text{细胞数}) \times (\text{平衡解离常数} K_d) \times (\text{内化率}) \}$ 。对于给定的配体/受体对,拷贝数、KD、细胞数和内化率将是常数。这可以解释为什么GalNAc配体系统对肝细胞如此有效-该配体系统靶向以高拷贝数存在的ASGP受体。一些ASGP/GalNAc变体的KD在纳摩尔范围内,并且内化率非常高。

[0699] 然而,有效靶向还取决于ONT浓度,ONT浓度由于从血流的清除而随时间推移迅速降低。治疗剂的清除可以表示为:清除= $f \{ (\text{血流速率}) \times (\text{肾滤过率}) \times (\text{其他清除机制}) \}$ 。在时间t获得的ONT浓度可以表示为: (ONT浓度) $t = f \{ (\text{初始浓度}) - (\text{清除} \times t) \}$ 。

[0700] 在人体中,清除主要是由于肾脏中的肾小球滤过所致。通常,小于约45kD的分子具有约30分钟的半衰期。在小鼠中,清除甚至更快,循环半衰期为约5分钟。不希望受任何特定理论的束缚,据信本发明可以使用特别构造的多聚体寡核苷酸(例如,特定的组成、大小、分子量等)来减少肾小球滤过,从而导致较低的清除,在给定时间t在循环中产生更高浓度的ONT(例如,增加的血清半衰期、更高的总摄取率和更高的活性)。

[0701] 同样,不希望受任何特定理论的束缚,实际肾小球滤过率可以是难以直接测量的。例如,通过肾小球毛细血管的化合物很容易被细胞(诸如肾小管上皮细胞)吸收,这可以保留化合物(如siRNA)很长的时间(参见例如,Henry, S.P.等人;Toxicology, 301, 13-20 (2012) 和van de Water, F.M等人;Drug metabolism and Disposition, 34, No 8, 1393-1397 (2006))。此外,吸收的化合物可以代谢为分解产物,然后在尿液中分泌。因此,在特定时间点的治疗剂(诸如siRNA)的浓度(例如,在尿液中)可以不一定代表肾小球滤过率。然而,血清半衰期(它与肾小球滤过相关,并且可直接测量)可以被认为是肾小球滤过的合适替代指标。

[0702] 下表示出了增加组分的循环半衰期($t_{1/2}$)可对在时间t获得的组分浓度具有显著影响:

[0703]

t (min) :	0	30	60	90	120	150	180	210	240
30min $t_{1/2}$	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.4
60min $t_{1/2}$	100		50		25		12.5		6.25
90min $t_{1/2}$	100			50			25		
120min $t_{1/2}$	100				50				25

[0704] 值以在时间t的%初始剂量展示。

[0705] 因此,增加组分的半衰期2倍会使其残留浓度在2小时增加4倍。半衰期增加四倍会使残留浓度得到甚至更显著的改善-在2小时和4小时分别为增加八倍和大于六十倍。

[0706] 典型的siRNA(例如,双链单体)具有约15kD的分子量。根据本发明的siRNA四聚体可以具有约60kD的分子量。不希望受任何特定理论的束缚,据信此类多聚体(四聚体、五聚体等)可以被构造为具有产生减少的体内肾小球滤过的分子大小和/或分子量。此类多聚体将具有增加的循环半衰期。因此,相对于单个单体亚单元的体内循环半衰期和/或体内活性,根据本发明的多聚体可以被构造为具有增加的体内循环半衰期和/或增加的体内活性。此外,如果由合适的靶向配体指导,则多聚体(例如,四聚体)将比单体等同物递送更多(例如,四)倍的每个配体/受体结合事件的有效负载。结合起来,这些效果可以引起治疗剂的生

物利用率和摄取率的显著增加。在其中给定配体/受体对的拷贝数、KD、靶细胞数和内化率的一些组合是次优的情况下,这可以是特别有利的。

[0707] 因此,多聚体寡核苷酸具有一定的结构,所述结构被选择为(a)相对于单个单体亚单元的体内循环半衰期,增加多聚体寡核苷酸的体内循环半衰期和/或(b)相对于单个单体亚单元的体内活性,增加多聚体寡核苷酸的体内活性。例如,多聚体寡核苷酸可以具有被构造用于该目的的分子大小和/或分子量。

[0708] 药物组合物

[0709] 在各个方面,本发明提供药物组合物,所述药物组合物包括上文所述的化合物或组合物中的任何一种或多种。如本文所用,药物组合物包括可用于预防、诊断、缓解、治疗或治愈疾病的除食物之外的物质的组合物。类似地,根据本发明的各种化合物或组合物应理解为包括用作药物和/或用于制造药物的实施方案。

[0710] 药物组合物可以包含根据本发明的化合物或组合物以及药学上可接受的赋形剂。如本文所用,赋形剂可以是与活性成分一起配制的天然或合成物质。出于长期稳定化、增加体积(例如,增量剂、填充剂或稀释剂)或赋予最终剂型中的活性成分治疗增强作用(诸如促进药物吸收、减少粘度或增加溶解度)的目的,可以将赋形剂包括在内。赋形剂也可以用于制造和分配,例如有助于处理活性成分和/或有助于体外稳定性(例如,通过防止变性或聚集)。如本领域的技术人员所理解,适当的赋形剂选择可取决于多种因素,包括施用途径、剂型和一种或多种活性成分。

[0711] 寡核苷酸可以局部或全身递送,并且本发明的药物组合物可以相应地变化。例如,施用不必限于任何特定的递送系统,并且可以包括但不限于肠胃外施用(包括皮下注射、静脉内注射、髓内注射、关节内注射、肌肉内注射或腹膜内注射)、直肠施用、外敷施用、经皮施用或口服施用。向个体的施用可以如下进行:以单剂量或重复施用方式,并且以多种生理学上可接受的盐形式中的任一种,和/或使用可接受的药物载剂和/或添加剂作为药物组合物的一部分。生理学上可接受的制剂和标准药物制剂技术、剂量和赋形剂是本领域的技术人员熟知的(参见例如,Physicians' Desk Reference(PDR®) 2005,第59版,Medical Economics Company,2004;和Remington:The Science and Practice of Pharmacy, Gennado等人编,第21版,Lippincott,Williams&Wilkins,2005)。

[0712] 药物组合物可以包含有效量的根据本发明的化合物或组合物。如本文所用,有效量可以是引起实现特定所述目的的浓度或量,或者更多量意指足以引起变化(例如与安慰剂相比)的量。在有效量是治疗有效量的情况下,它可以是例如足以用于治疗用途的量,和足以预防、诊断、缓解、治疗或治愈疾病的量。有效量可以通过本领域已知的方法来确定。有效量可以凭经验,例如通过人体临床试验来确定。还可以使用本领域已知的转换因子从一种动物(例如,小鼠、大鼠、猴、猪、狗)推导出用于另一种动物(例如,人)的有效量。参见例如,Freireich等人,Cancer Chemother Reports 50 (4):219-244 (1966)。

[0713] 递送媒介物和靶向配体

[0714] 在各个方面,本发明提供配制在递送媒介物中的上文所述的化合物或组合物中的任何一种或多种。例如,递送媒介物可以是脂质纳米粒子(LNP)、外来体、微囊泡或病毒载体。类似地,在各个方面,本发明提供上文所述的并且还包含靶向配体的化合物或组合物中的任何一种或多种。例如,靶向配体包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、胆固醇、生育酚、叶酸、

2-[3-(1,3-二羧基丙基)-脲基]戊二酸(DUPA)或茴香酰胺。靶向配体可以例如通过核酸的3'末端或5'末端结合(例如,直接结合)至核酸。在一些实施方案中,两个靶向配体缀合至寡核苷酸,其中一个配体通过寡核苷酸的3'末端缀合,另一个配体通过寡核苷酸的5'末端缀合。一个或多个靶向配体可以缀合至寡核苷酸的有义链或反义链,或有义链和反义链二者。以下讨论了可以适用于本发明的另外的实例。

[0715] 如本领域的技术人员所理解,无论生物学靶标或作用机制如何,治疗性寡核苷酸必须克服一系列生理学障碍以进入生物体(例如需要疗法的动物(诸如人))中的靶细胞。例如,治疗性寡核苷酸通常必须避免血流中的清除,进入靶细胞类型,然后进入细胞质,所有这些都不会引起不期望免疫应答。该过程通常被认为是低效的,例如95%或更多的体内进入胞内体的siRNA可以在溶酶体中降解或被排出细胞而不影响任何基因沉默。

[0716] 为了克服这些障碍,科学家设计了许多药物递送媒介物。除小分子药物、蛋白质药物和其他治疗性分子之外,这些媒介物还用于递送治疗性RNA。已经从多种材料(如糖、脂质、脂质样材料、蛋白质、聚合物、肽、金属、水凝胶、缀合物和肽)制备了药物递送媒介物。许多药物递送媒介物包括来自这些组的组合的方面,例如一些药物递送媒介物可以组合糖和脂质。在一些其他实例中,药物可以直接隐藏在“细胞样”材料(意指模拟细胞)中,而在其他情况下,药物可以放入细胞本身之中或之上。药物递送媒介物可以被设计为响应于刺激(诸如pH变化、生物分子浓度、磁场和热)而释放药物。

[0717] 许多工作集中于将寡核苷酸(诸如siRNA)递送至肝脏。在过去十年中,将siRNA体内有效递送至肝细胞所需的剂量已减少超过10,000倍-虽然2006年报告的递送媒介物可以需要超过10mg/kg siRNA来靶向蛋白质产生,而目前靶向蛋白质产生的新递送媒介物在全身注射0.001mg/kg siRNA之后可以减少。寡核苷酸递送效率的增加可以至少部分归因于递送媒介物的发展。

[0718] 另一个重要的进展是增加了对辅助组分影响递送方式的理解。辅助组分可以包括添加至主要药物递送系统的化学结构。通常,辅助组分可以改善颗粒稳定性或向特定器官的递送。例如,纳米粒子可以由脂质制成,但是由这些脂质纳米粒子介导的递送可以受到亲水性聚合物和/或疏水性分子的存在影响。一种影响纳米粒子递送的重要亲水性聚合物是聚(乙二醇)。其他亲水性聚合物包括非离子表面活性剂。影响纳米粒子递送的疏水性分子包括胆固醇、1-2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1-2-二-0-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)等等。

[0719] 还使用靶向配体或缀合物系统设计了药物递送系统。例如,寡核苷酸可以缀合至胆固醇、糖、肽和其他核酸,以促进向肝细胞和/或其他细胞类型的递送。此类缀合物系统可以通过与特定受体的结合来促进向特定细胞类型的递送。

[0720] 本领域的技术人员将会理解,已知的递送媒介物和靶向配体通常可以适用于根据本发明的用途。递送媒介物和靶向配体的实例,及其用途可见于:Sahay, G. 等人, Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol*, 31:653-658 (2013); Wittrup, A. 等人, Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol* (2015); Whitehead, K.A., Langer, R. & Anderson, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature reviews. Drug Discovery*, 8:129-138

(2009); Kanasty, R., Dorkin, J.R., Vegas, A. & Anderson, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials*, 12: 967–977 (2013); Tibbitt, M.W., Dahlman, J.E. & Langer, R. Emerging Frontiers in Drug Delivery. *J Am Chem Soc*, 138: 704–717 (2016); Akinc, A. 等人, Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 1357–1364 (2010); Nair, J.K. 等人, Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc*, 136: 16958–16961 (2014); Ostergaard, M.E. 等人, Efficient Synthesis and Biological Evaluation of 5'-GalNAc Conjugated Antisense Oligonucleotides. *Bioconjugate chemistry* (2015); Sehgal, A. 等人, An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nature Medicine*, 21: 492–497 (2015); Semple, S.C. 等人, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*, 28: 172–176 (2010); Maier, M.A. 等人, Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21: 1570–1578 (2013); Love, K.T. 等人, Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. *Proc Nat Acad USA*, 107: 1864–1869 (2010); Akinc, A. 等人, A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol*, 26: 561–569 (2008); Eguchi, A. 等人, Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nat Biotechnol*, 27: 567–571 (2009); Zuckerman, J.E. 等人, Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proc Nat Acad USA*, 111: 11449–11454 (2014); Zuckerman, J.E. & Davis, M.E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14: 843–856 (2015); Hao, J. 等人, Rapid Synthesis of a Lipocationic Polyester Library via Ring-Opening Polymerization of Functional Valerolactones for Efficacious siRNA Delivery. *J Am Chem Soc*, 29: 9206–9209 (2015); Siegwart, D.J. 等人, Combinatorial synthesis of chemically diverse core-shell nanoparticles for intracellular delivery. *Proc Nat Acad USA*, 108: 12996–13001 (2011); Dahlman, J.E. 等人, In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nat Nano* 9, 648–655 (2014); Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkami, A.R. & Rudzinski, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 70, 1–20 (2001); Kim, H.J. 等人, Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano*, 8: 8979–8991 (2014); Krebs, M.D., Jeon, O. & Alsberg, E. Localized and sustained delivery of silencing RNA from

macroscopic biopolymer hydrogels. *J Am Chem Soc* 131, 9204–9206 (2009) ; Zimmermann, T.S. 等人, RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441:111–114 (2006) ; Dong, Y. 等人, Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates. *Proc Nat Acad USA*, 111:3955–3960 (2014) ; Zhang, Y. 等人, Lipid-modified aminoglycoside derivatives for in vivo siRNA delivery. *Advanced Materials*, 25:4641–4645 (2013) ; Molinaro, R. 等人, Biomimetic proteolipid vesicles for targeting inflamed tissues. *Nat Mater* (2016) ; Hu, C.M. 等人, Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature*, 526:118–121 (2015) ; Cheng, R., Meng, F., Deng, C., Klok, H.-A. & Zhong, Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials*, 34:3647–3657 (2013) ; Qiu, Y. & Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 增刊, 49–60 (2012) ; Mui, B.L. 等人, Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e139 (2013) ; Draz, M.S. 等人, Nanoparticle-Mediated Systemic Delivery of siRNA for Treatment of Cancers and Viral Infections. *Theranostics*, 4:872–892 (2014) ; Otsuka, H., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55:403–419 (2003) ; Kauffman, K.J. 等人, Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Letters*, 15: 7300–7306 (2015) ; Zhang, S., Zhao, B., Jiang, H., Wang, B. & Ma, B. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release* 123, 1–10 (2007) ; Illum, L. & Davis, S.S. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxyamer 338). *FEBS Letters*, 167:79–82 (1984) ; Felgner, P.L. 等人, Improved Cationic Lipid Formulations for In vivo Gene Therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 772:126–139 (1995) ; Meade, B.R. & Dowdy, S.F. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59:134–140 (2007) ; Endoh, T. & Ohtsuki, T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61:704–709 (2009) ; 以及 Lee, H. 等人, Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nat Nano*, 7:389–393 (2012) 。

[0721] 在各种实施方案中,本发明的化合物和组合物可以缀合至其他化学或生物学部分(包括例如,生物学活性部分)或与其一起递送。生物学活性部分是具有生物学效应(优选地可测量的生物学效应)的任何分子或作用剂。化学或生物学部分包括例如蛋白质、肽、氨基酸、核酸(包括例如所有类型的DNA、RNA、RNA和DNA适体、反义寡核苷酸和反义miRNA抑制剂)、靶向配体、碳水化合物、多糖、脂质、有机化合物和无机化学化合物。

[0722] 如本文所用,术语靶向配体可以包括这样的部分,所述部分可被设计成在纳米粒子的表面上可触及或作为递送缀合物(例如,多元缀合物寡核苷酸、多聚体寡核苷酸)的一部分,以例如通过使细胞受体能够附着纳米粒子或递送缀合物而将纳米粒子或递送缀合物的有效负载递送至特定靶标,诸如特定身体组织或细胞类型。合适的靶向配体的实例包括但不限于细胞特异性肽或蛋白质(例如,转铁蛋白和单克隆抗体)、适体、细胞生长因子、维生素(例如,叶酸)、单糖(例如,半乳糖和甘露糖)、多糖、精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)和来源于N-乙酰半乳糖胺(GalNac)的脱唾液酸糖蛋白受体配体。可以使用本领域已知的许多技术,诸如经由共价键(诸如二硫键、酰胺键或酯键),或经由非共价键(诸如生物素-链霉亲和素或金属-配体复合物)将配体掺入前述的本发明的化合物中。

[0723] 本发明范围内的另外的生物学活性部分是任何已知的基因编辑材料,包括例如涉及CRISPR/Cas系统、TALEN和锌指核酸酶(ZFN)的寡核苷酸、多肽和蛋白质的材料。

[0724] 在各种实施方案中,本发明的化合物和组合物可以包封在载剂材料中,以形成用于细胞内递送的纳米粒子。已知的载剂材料包括阳离子聚合物、脂质或肽或它们的化学类似物。Jeong等人, BIOCONJUGATE CHEM., 第20卷, 第1期, 第5-14页 (2009)。阳离子脂质的实例包括二油基磷脂酰乙醇胺、胆固醇二油基磷脂酰胆碱、N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、1,2-二油酰氧基-3-(三甲基铵)丙烷(DOTAP)、1,2-二油酰基-3-(4'-三甲基-铵)丁酰基-sn-甘油(DOTB)、1,2-二酰基-3-二甲基铵-丙烷(DAP)、1,2-二酰基-3-三甲基铵-丙烷(TAP)、1,2-二酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱、3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰基]胆固醇(DC-胆固醇)、二甲基二-十八烷基溴化铵(DDAB)以及它们的共聚物。阳离子聚合物的实例包括聚乙烯亚胺、聚胺、聚乙烯胺、聚(烷基胺盐酸盐)、聚酰胺-胺树状大分子、二乙氨基乙基-葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、几丁质、壳聚糖和聚甲基丙烯酸(2-二甲基氨基)乙酯。在一个实施方案中,载剂含有一种或多种酰化胺,与其他已知的载剂材料相比,所述酰化胺的性质可以更好地适用于在体内使用。

[0725] 在一个实施方案中,载剂是阳离子肽,例如KALA(阳离子融合肽)、聚赖氨酸、聚谷氨酸或鱼精蛋白。在一个实施方案中,载剂是阳离子脂质,例如二油基磷脂酰乙醇胺或胆固醇二油基磷脂酰胆碱。在一个实施方案中,载剂是阳离子聚合物,例如聚乙烯亚胺、聚胺或聚乙烯胺。

[0726] 在各种实施方案中,本发明的化合物和组合物可以包封在外来体中。外来体是生物流体(包括血液、尿液和细胞培养物的培养基)中存在的直径在30nm和100nm之间的细胞衍生的囊泡。根据本领域的技术人员,外来体(包括合成外来体和外来体模拟物)可以适用于药物递送。参见例如“*A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles—endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy*”*Biochim Biophys Acta*.1846(1):75-87(2014);“*Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges*”*Acta Pharmaceutica Sinica B*,2016年3月8日在线发表(出版中);以及“*Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems*”*International Journal of Nanomedicine*,7:1525-1541(2012)。

[0727] 在各种实施方案中,本发明的化合物和组合物可以包封在微囊泡中。微囊泡(有时称为循环微囊泡或微粒)是从几乎所有细胞类型脱落的范围在100nm至1000nm之内的原生

质膜的片段,它不同于称为外来体的较小的细胞内产生的胞外囊泡。微囊泡在细胞间通讯中发挥作用,并且可以在细胞之间转运mRNA、miRNA和蛋白质。根据本领域的技术人员,微囊泡(包括合成微囊泡和微囊泡模拟物)可以适用于药物递送。参见例如“Microvesicle-and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells”Journal of Controlled Release,220:727-737 (2015);“Therapeutic Uses of Exosomes”J Circ Biomark,1:0 (2013)。

[0728] 在各种实施方案中,可以使用病毒载体递送本发明的化合物和组合物。病毒载体是分子生物学家通常用于将遗传物质递送至细胞中的工具。该过程可以在活体内(体内)或在细胞培养中(体外)进行。根据本领域的技术人员,病毒载体可以适用于药物递送。参见例如“Viruses as nanomaterials for drug delivery”Methods Mol Biol,26:207-21 (2011);“Viral and nonviral delivery systems for gene delivery”Adv Biomed Res, 1:27 (2012);以及“Biological Gene Delivery Vehicles:Beyond Viral Vectors”Molecular Therapy,17 (5):767-777 (2009)。

[0729] 用于LNP配制和表征的通用程序提供于以下实施例中,LNP配制和其他体外和体内测试的工作实例也如此。其他方法是本领域已知的,并且可以适合由普通技术人员用于本发明。

[0730] 治疗或减少基因表达的方法

[0731] 在各个方面,本发明提供用于使用多元缀合物寡核苷酸,例如用于医学治疗、研究,或用于在动物和植物中产生新的或改变的表型的方法。

[0732] 在一个方面,本发明提供用于治疗受试者的方法,其包括将有效量的根据本发明的化合物或组合物施用于有需要的受试者。在这样的治疗实施方案中,寡核苷酸将是治疗性寡核苷酸,例如siRNA或miRNA。

[0733] 在这种和其他实施方案中,本发明的组合物和化合物可以以药物组合物的形式、在递送媒介物中施用,或偶联至靶向配体。

[0734] 在一个方面,本发明提供用于沉默或减少基因表达的方法,其包括将有效量的根据本发明的化合物或组合物施用于有需要的受试者。在这样的治疗实施方案中,寡核苷酸将是使基因表达沉默或减少的寡核苷酸,例如siRNA或反义寡核苷酸。

[0735] 类似地,本发明提供用于使两个或更多个基因的表达沉默或减少的方法,其包括将有效量的根据本发明的化合物或组合物施用于有需要的受试者,其中所述化合物或组合物包含靶向两个或更多个基因的寡核苷酸。所述化合物或组合物可以包含靶向两个、三个、四个或更多个基因的寡核苷酸。

[0736] 在一个方面,本发明提供用于每个靶向配体结合事件将两种或更多种寡核苷酸递送至细胞的方法,其包括将有效量的根据本发明的化合物或组合物施用于有需要的受试者,其中所述化合物或组合物包含靶向配体。

[0737] 在一个方面,本发明提供用于将预定化学计量比率的两种或更多种寡核苷酸递送至细胞的方法,其包括将有效量的根据本发明的化合物或组合物施用于有需要的受试者,其中所述化合物或组合物包含预定化学计量比率的两种或更多种寡核苷酸。

[0738] 如本文所用,受试者包括经受治疗或施用的细胞或生物体。受试者可以是动物,例如哺乳动物(诸如实验动物(小鼠、猴)或兽医患者),或灵长类动物(诸如人)。需要治疗或施

用的受试者可以包括但不限于患有疾病的受试者(例如,可以使用本发明的化合物和组合物治疗的受试者)或患有病症的受试者(例如可以使用本发明的化合物和组合物处理的受试者,例如待沉默或待使表达减少的一个或多个基因)。

[0739] 用于测量基因敲低和动物实验的通用程序提供于以下实施例中,其他体外和体内测试的工作实例也如此。其他方法是本领域已知的,并且可以适合由普通技术人员用于本发明。

[0740] 以下实施例是说明性的和非限制性的。在阅读本公开后,技术的许多变化对于本领域的技术人员将是显而易见的。所以,不应结合实施例来确定,而应结合所附权利要求及其等同物的全部范围来确定技术的范围。

[0741] 实施例

[0742] 通用程序1:单链寡核苷酸合成

[0743] 使用亚磷酰胺化学性质,在ABI 394和3900合成仪(Applied Biosystems)上以10 μ mol的规模,或在Oligopilot 10合成仪上以28 μ mol的规模装配寡核糖核苷酸。固相支持物是负载有2' -脱氧胸昔的聚苯乙烯(Glen Research, Sterling, Virginia, USA),或可控孔度玻璃(CPG, 520 \AA , 负载为75 μ mol/g, 得自Prime Synthesis, Aston, PA, USA)。辅助合成试剂DNA-、2' -0-甲基RNA-和2' -脱氧-2' -氟-RNA亚磷酰胺得自SAFC ProLigo (Hamburg, Germany)。具体而言,使用2' -0-甲基-尿昔(2' -OMe-U)、4-N-乙酰基-2' -0-甲基-胞昔(2' -OMe-C^{Ac})、6-N-苯甲酰基-2' -0-甲基-腺昔(2' -OMe-A^{bz})和2-N-异丁基鸟昔(2' -OMe-G^{iBu})的5' -0-(4,4' -二甲氧基三苯甲基)-3' -0-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺单体被来构建寡聚体序列。采用携带与2' -OMe RNA结构单元相同的核碱基保护基团的对应的亚磷酰胺来引入2' -氟修饰。采用5-乙硫基-1H-四唑(ETT, 0.5M溶于乙腈)作为活化剂,所有亚磷酰胺(70mM溶于乙腈)的偶联时间为3min。使用50mM溶于吡啶和乙腈的1:1(v/v)混合物的3-((二甲基氨基-亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮(DDTT, AM Chemicals, Oceanside, California, USA)来引入硫代磷酸键。

[0744] 在固相合成完成(包括除去DMT基团(“无DMT合成”))时,从固相支持物切下寡核苷酸,并根据公开的方法使用由甲胺水溶液(41%)和浓氨水(32%)组成的1:1混合物在25°C下脱保护3小时(Wincott, F. 等人:Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes.Nucleic Acids Res,23:2677-2684(1995))。

[0745] 随后,使用填充有Source Q15(GE Healthcare)的柱和AKTA Explorer系统(GE Healthcare)通过阴离子交换HPLC来纯化粗寡聚体。缓冲液A为溶于20%乙腈水溶液的10mM高氯酸钠、20mM Tris、1mM EDTA pH7.4(Fluka, Buchs, Switzerland),缓冲液B与缓冲液A相同,但含有500mM高氯酸钠。采用32倍柱体积(CV)内22% B至42% B的梯度。记录280nm处的UV迹线。合并适当的级分并用3M NaOAc pH=5.2和70%乙醇沉淀。通过离心收集沉淀物。或者,使用Sephadex HiPrep柱(GE Healthcare)根据制造商的推荐步骤进行脱盐。

[0746] 在水中复原寡核苷酸,并通过电喷雾电离质谱法(ESI-MS)来确认寡核苷酸的特性(identity)。通过分析型阴离子交换HPLC来评估纯度。

[0747] 通用程序2:脂质纳米粒子制剂

[0748] 1,2-二硬脂酰基-3-磷脂酰胆碱(DSPC)购自Avanti Polar Lipids(Alabaster, Alabama, USA)。 α -[3'-(1,2-二豆蔻酰基-3-丙烷氧基)-甲酰胺-丙基]- ω -甲氧基-聚氧乙

烯(PEG-c-DOMG)得自NOF(Bouwelven, Belgium)。胆固醇购自Sigma-Aldrich(Taufkirchen, Germany)。

[0749] 在专利文献中公开了专利性氨基脂质KL22和KL52(Constien等人,“Novel Lipids and Compositions for Intracellular Delivery of Biologically Active Compounds”US 2012/0295832 A1)。以50mM的浓度溶于乙醇来制备KL52和KL22脂质、DSPC、胆固醇以及PEG-c-DOMG的储液并储存在-20°C下。将脂质组合以得到各种摩尔比(参见以下个别实施例)并用乙醇稀释至25mM的最终脂质浓度。在50mM柠檬酸钠缓冲液(pH3)中稀释以10mg/mL的浓度溶于H₂O的siRNA储液。在以下实施例中, KL22和KL52有时分别地称为XL 7和XL 10。

[0750] 将脂质溶液与siRNA溶液以7:1的总脂质:siRNA重量比组合来制备脂质纳米粒子(LNP)制剂。将脂质乙醇溶液迅速注射到siRNA水溶液中得到含有33%乙醇的悬浮液。借助于注射泵(Harvard Pump 33双注射泵Harvard Apparatus Holliston, MA)来注射溶液。

[0751] 随后, 使用Slide-A-Lyzer盒(Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL)以及10kD的MWCO(RC膜), 以200倍初产物的体积针对磷酸盐缓冲盐水(PBS) pH7.4透析制剂2次, 从而除去乙醇并实现缓冲液交换。第一次透析在室温下进行3小时, 然后在4°C下将制剂透析过夜。通过0.2μm无菌过滤器(Sarstedt, Nümbrecht, Germany)将所得的纳米粒子悬浮液过滤至玻璃小瓶中并用卷边盖密封。

[0752] 通用程序3:LNP表征

[0753] 使用Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)分别在1×PBS和15mM PBS中确定制剂的粒度和ζ电势。

[0754] 通过紫外-可见光谱来测量脂质体制剂中的siRNA浓度。简而言之, 将100μL溶于1×PBS的稀释制剂添加到900μL甲醇和氯仿的4:1(v/v)混合物中。在混合之后, 在DU 800分光光度计(Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)上记录在230nm和330nm之间的溶液的吸收光谱。基于制剂中所用的siRNA的消光系数以及260nm波长下的吸光度和330nm波长下的基线值之间的差异来计算脂质体制剂中的siRNA浓度。

[0755] 通过Quant-iTTM RiboGreen[®] RNA测定法(Invitrogen Corporation Carlsbad, CA)来评价siRNA被纳米粒子的包封。简而言之, 在TE缓冲液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA pH7.5)中将样品稀释至大约5μg/mL的浓度。将50μL稀释样品转移至聚苯乙烯96孔板中, 然后添加50μL TE缓冲液或50μL 2% Triton X-100溶液。在37°C的温度下温育平板15分钟。在TE缓冲液中1:100稀释RiboGreen试剂, 将100μL该溶液添加至每个孔中。使用荧光读板仪(Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA)以~480nm的激发波长和~520nm的发射波长来测量荧光强度。从每个样品的荧光值中减去试剂空白对照的荧光值, 并通过用完整样品(不添加Triton X-100)的荧光强度除以破坏的样品(添加Triton X-100而导致)的荧光值来确定游离的siRNA的百分比。

[0756] 通用程序4:动物实验

[0757] 将小鼠品系C57BL/6N用于所有体内实验。动物得自Charles River(Sulzfeld, Germany), 在实验时在6周龄和8周龄之间。通过向尾静脉输注200μL来注射静脉内施用的LNP制剂。以100-200μL的体积注射皮下施用的化合物。在注射前一天(“采血前”)和注射后指定时间的实验期间通过颌下静脉采血来收集血液。用血清分离管(Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)分离血清并保持冷冻直到分析。在化合物施用之后7天, 通过CO₂

吸入麻醉小鼠并通过颈脱位法杀死小鼠。通过心脏穿刺收集血液并且如上文所述分离血清。收获用于mRNA定量的组织，并立即在液氮中快速冷冻。

[0758] 通用程序5:基因敲低的测量

[0759] 使用以下步骤实现血清蛋白质水平的确定:使用显色酶活性测定法BIOPHEN FVII (#221304, Hyphen BioMed, MariaEnzersdorf, Austria) 按照制造商的推荐步骤来分析因子VII。在分析之前将小鼠血清以1:3000稀释。使用Victor 3多标记计数器(Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) 来测量405nm下比色显色的吸光度。

[0760] 通过ELISA来测量血清中的ApoB蛋白(CloudClone Corp./Hoelzel Diagnostics, Cologne, Germany, #SEC003Mu)。根据制造商的说明处理小鼠血清的1:5000稀释物，并使用Victor 3多标记计数器(Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) 来测量450nm下的吸光度。

[0761] 通过ELISA来测量血清中的运甲状腺素蛋白(TTR, 也称为前白蛋白)(#KA2070, Novus Biologicals, /Biotechne, Wiesbaden, Germany)。根据制造商的说明处理小鼠血清的1:4000稀释物，并使用Victor 3多标记计数器(Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) 来测量450nm下的吸光度。

[0762] 对于mRNA水平的定量, 将冷冻组织块(30-50mg) 转移至冷却的1.5mL反应管中。添加含有3,3 μ L/ml蛋白酶K(50 μ g/ μ L) (Epicenter Biotechnologies, Madison, USA) 的1mL裂解混合物(Epicenter Biotechnologies, Madison, USA) , 通过使用超声波仪(HD2070, Bandelin, Berlin, Germany) 超声处理几秒钟来裂解组织, 并且在热混合仪(Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Germany) 中在65°C下用蛋白酶K消化30min。将裂解物储存在-80°C下直到分析。对于mRNA分析, 使裂解物解冻, 并且使用QuantiGene 1.0 (FVII、ApoB 和GAPDH) 或Quantigene 2.0 (TTR) 支链DNA (bDNA) 测定试剂盒(Panomics, Fremont, Calif., USA, Cat-No: QG0004) 根据制造商的推荐步骤来定量mRNA水平。作为测定读数, 在Victor 2 Light发光计数器(Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) 中以相对光单位(RLU) 测量化学发光信号。用对应的mRNA的信号除以来自相同裂解物的GAPDH mRNA的信号。将值报告为归一化成GAPDH的mRNA表达。

[0763] 附加的通用程序1:单链寡核苷酸合成

[0764] 使用亚磷酰胺化学性质, 在ABI 394和3900合成仪(Applied Biosystems) 上以10 μ mol的规模, 或在Oligopilot 10合成仪上以28 μ mol的规模装配寡核糖核苷酸。固相支持物是负载有2' -脱氧胸苷的聚苯乙烯(Glen Research, Sterling, Virginia, USA) , 或可控孔度玻璃(CPG, 520 \AA , 负载为75 μ mol/g, 得自Prime Synthesis, Aston, PA, USA)。辅助合成试剂DNA-、2' -0-甲基RNA-和2' -脱氧-2' -氟-RNA亚磷酰胺得自SAFC Proligo (Hamburg, Germany)。具体而言, 使用2' -0-甲基-尿苷(2' -OMe-U)、4-N-乙酰基-2' -0-甲基-胞苷(2' -OMe-CAc)、6-N-苯甲酰基-2' -0-甲基-腺苷(2' -OMe-Abz) 和2-N-异丁基鸟苷(2' -OMe-GiBu) 的5' -0-(4,4' -二甲氧基三苯甲基)-3' -0-(2-氰乙基-N,N-二异丙基) 亚磷酰胺单体来构建寡聚体序列。采用携带与2' -OMe RNA结构单元相同的核碱基保护基团的对应的亚磷酰胺来引入2' -氟修饰。采用5-乙硫基-1H-四唑(ETT, 0.5M溶于乙腈) 作为活化剂, 所有亚磷酰胺(70mM溶于乙腈) 的偶联时间为3min。使用50mM溶于吡啶和乙腈的1:1 (v/v) 混合物的3-((二甲基氨基-亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮(DDTT, AM Chemicals, Oceanside, California, USA) 来引入硫代磷酸键。

[0765] 在固相合成完成(包括除去DMT基团(“无DMT合成”))时,从固相支持物切下寡核苷酸,并根据公开的方法使用由甲胺水溶液(41%)和浓氨水(32%)组成的1:1混合物在25℃下脱保护3小时(Wincott,F.等人:Synthesis,deprotection,analysis and purification of RNA and ribozymes.Nucleic Acids Res,23:2677-2684(1995))。

[0766] 随后,使用填充有Source Q15(GE Healthcare)的柱和AKTA Explorer系统(GE Healthcare)通过阴离子交换HPLC来纯化粗寡聚体。缓冲液A为溶于20%乙腈水溶液的10mM高氯酸钠、20mM Tris、1mM EDTA pH7.4(Fluka,Buchs,Switzerland),缓冲液B与缓冲液A相同,但含有500mM高氯酸钠。采用32倍柱体积(CV)内22% B至42% B的梯度。记录280nm处的UV迹线。合并适当的级分并用3M NaOAc pH=5.2和70%乙醇沉淀。通过离心收集沉淀物。或者,使用Sephadex HiPrep柱(GE Healthcare)根据制造商的推荐步骤进行脱盐。

[0767] 在水中复原寡核苷酸,并通过电喷雾电离质谱法(ESI-MS)来确认寡核苷酸的特性。通过分析型阴离子交换HPLC来评估纯度。

[0768] 采用TFA保护的己基氨基接头亚磷酰胺(Sigma-Aldrich,SAFC,Hamburg,Germany)来引入5'-氨基己基接头。使用固定在CPG(Prime Synthesis,Aston,PA,USA)上的苯二甲酰亚氨基保护的己基氨基接头来引入3'-己基氨基接头。如上所述进行脱保护和纯化。

[0769] 附加的通用程序2:硫醇封端的siRNA的产生

[0770] 通过1-0-二甲氧基三苯甲基-己基-二硫化物、1'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺接头(NucleoSyn,Olivet Cedex,France)来引入3'-末端或5'-末端硫醇基团。在如上所述脱保护和纯化之后,使用溶于三乙基碳酸氢铵缓冲液(TEABc,0.1M,pH8.5,Sigma,#90360)的二硫苏糖醇(DTT)(0.1M DTT储液(Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Munich,Germany),#646563)来减少每个含有二硫化物的寡聚体。将寡核苷酸溶解于TEABc缓冲液(100mM,pH8.5)中,以得到1mM溶液。为了实现二硫化物还原,将50-100倍摩尔DTT过量添加到寡核苷酸溶液中。通过在得自Thermo Fisher的Dionex DNA Pac 200柱(4×250mm)上进行分析型AEX HPLC来监测还原的过程。还原的物料(即对应的硫醇(C6SH))在起始物料之前洗脱。在反应完成之后,使用来自GE Healthcare的HiPrep柱并使用水作为洗脱液通过分子排阻色谱来除去过量的试剂。随后,使用3M NaOAc(pH5.2)和乙醇来沉淀寡核苷酸并储存在-20℃下。

[0771] 附加的通用程序3:用于使单链RNA(ssRNA)退火以形成双链RNA(dsRNA)的通用程序

[0772] 通过混合相对于有义链稍过量的一条或多条所需的互补反义链,并且在20mM/NaCl/4mM磷酸钠pH6.8缓冲液中退火,从而由RNA单链产生dsRNA。使用来自GE Healthcare的Superdex 75柱(10×300mm)通过非变性分子排阻HPLC来确认成功形成双链体。将样品冷冻储存直到使用。

[0773] 在本文所述的序列中,大写字母“A”、“C”、“G”和“U”代表RNA核苷酸。小写字母“c”、“g”、“a”和“u”代表2'-0-甲基修饰的核苷酸;“s”代表硫代磷酸根;并且“dT”代表脱氧胸苷残基。后接“f”的大写字母A、C、G、U表示2'-氟核苷酸。“(SHC6)”代表硫代己基接头。“(DTME)”代表可切割同源双官能交联剂二硫代双马来酰亚胺基乙烷,“C6NH2”和“C6NH”可互换使用,代表氨基己基接头。“C6SSC6”代表二己基二硫化物接头。“InvdT”意指倒置的胸苷。

[0774] 附加的通用程序4:通过连续退火来产生多聚体siRNA的通用程序

[0775] 在水中通过分步退火进行多聚体siRNA的制备,并分步添加互补链。不需要加热/冷却溶液。在每次添加之后,除去退火溶液的等份试样,并使用分析型RP HPLC在非变性条件(native condition) (20°C) 下监测双链体形成。基于最近邻法计算的单条单链的消光系数来计算组合等摩尔量的互补单链所需的量。如果分析型RP HPLC迹线显示出过量的单链,则添加额外量的对应的互补链,以推动双链体形成(“双链体滴定”)。

[0776] 使用配备有平衡至20°C的XBride C18 Oligo BEH (2.5μm; 2.1×50mm, Waters) 柱的Dionex Ultimate 3000 HPLC系统来监测双链体滴定。诊断性波长为260nm。缓冲液A为含有1%甲醇的100mM六氟异丙醇(HFIP)、16.3mM三乙胺(TEA)。缓冲液B具有相同的组成,不同的是MeOH为95%。在30分钟内以250μL/min的流速施加5%至70%缓冲液B的梯度。独立地运行两条互补链以确立保留时间。然后分析含有双链体溶液的等份试样,并与组成性单链的保留时间相比较。在双链体溶液显示出大量单链的情况下,将对应的互补链添加到双链体溶液中。

[0777] 实施例1:硫醇封端的siRNA的产生

[0778] 在必要时,通过1-O-二甲氧基三苯甲基-己基-二硫化物、1'-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺接头(NucleoSyn, Olivet Cedex, France) 来引入3' -末端或5' -末端硫醇基团。在固相合成完成并最终除去DMT基团(“无DMT合成”)时,从固相支持物切下寡核苷酸,并使用由甲胺水溶液(41%) 和浓氨水(32%) 组成的1:1混合物在10°C下脱保护6小时。其后,在AKTA Explorer系统(GE Healthcare, Freiburg, Germany) 上通过阴离子交换高效液相色谱(HPLC) 来纯化粗寡核苷酸。通过添加乙醇并在冰箱中过夜储存来沉淀纯化的(C₆SSC₆) -寡核苷酸。通过离心收集沉淀物。在水中复原寡核苷酸,并通过电喷雾电离质谱法(ESI-MS) 来确认寡核苷酸的特性。通过分析型阴离子交换和RP HPLC来评估纯度。

[0779] 然后使用100mM DL-二硫苏糖醇(DTT) 溶液来减少每个含有二硫化物的寡聚体。用三乙基碳酸氢铵缓冲液(TEABc, 1M, pH8.5, Sigma, #90360) 和水稀释1.0M DTT储液(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany, #646563), 以得到100mM各自溶于DTT和TEABc的溶液。将寡核苷酸溶解于TEABc缓冲液(100mM, pH8.5) 中, 以得到1mM溶液。为了实现二硫化物还原, 将50-100倍摩尔DTT过量添加到寡核苷酸溶液中。通过在得自Thermo Fisher的Dionex DNA Pac 200柱(4×250mm) 上进行分析型AEX HPLC来监测还原的过程。还原的物料(即对应的硫醇(C₆SH)) 在起始物料之前洗脱。在反应完成之后, 使用来自GE Healthcare的HiPrep柱并使用水作为洗脱液通过分子排阻色谱来除去过量的试剂。随后, 使用3M NaOAc(pH5.2) 和乙醇来沉淀寡核苷酸并储存在-20°C下。

[0780] 实施例2:用于制备单体DTME寡聚体的通用程序

[0781] 将硫醇修饰的寡核苷酸溶解于含有25%乙腈的300mM NaOAc(pH5.2) 中, 以得到200D/mL溶液。将40当量的二硫代双马来酰亚胺基乙烷(DTME, Thermo Fisher, #22335) 溶解于乙腈中, 以得到15.6mM溶液。将DTME溶液添加到含有寡核苷酸的溶液中, 并且在热混合仪(Eppendorf, Hamburg, Germany) 上于25°C下搅拌。使用Dionex DNA Pac 200柱(4×250mm) 通过分析型AEX HPLC来监测反应的过程。根据所需的纯度水平, 使用HiPrep柱(GE Healthcare) 通过分子排阻HPLC来除去过量的DTME, 或使用填充有Source 15Q树脂(从GE Healthcare商购获得) 的柱通过制备性AEX HPLC来纯化粗反应混合物。

[0782] 实施例3:用于经由DTME官能团制备二聚体的通用程序

[0783] 使根据实施例2中的程序制备的DTME修饰的寡核苷酸与另一种具有硫醇接头的寡核苷酸反应。该反应可以在单链序列上或在反应参与者之一的互补寡核苷酸的预先退火之后进行。因此,如果需要,使DTME修饰的寡核苷酸与硫醇修饰的寡核苷酸直接反应,或者与其互补链一起退火并使所得的双链体与硫醇修饰的寡核苷酸反应。或者,使硫醇修饰的寡核苷酸与其互补链一起退火,并使该双链体与DTME修饰的单链反应。在所有情况下,反应均在存在300mM NaOAc (pH5.2)的情况下在水溶液中进行。

[0784] 实施例4:用于使单链RNA (ssRNA) 退火以形成双链RNA (dsRNA) 的通用程序

[0785] 通过混合等摩尔量的互补有义链和反义链,并且在20mM NaCl/4mM磷酸钠pH6.8缓冲液中退火,从而由RNA单链产生dsRNA。使用来自GE Healthcare的Superdex 75柱(10×300mm)通过非变性分子排阻HPLC来确认成功形成双链体。将样品冷冻储存直到使用。

[0786] 实施例5:用于制备3' -或5' -NH₂衍生化的寡核苷酸的通用程序

[0787] 使用 ÄKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 和可控孔度玻璃 (CPG) 作为固相支持物 (Prime Synthesis, Aston, PA, USA) 以 140μmol 的规模在固相上通过标准亚磷酰胺化学来产生在有义链的5' -末端具有C-6-氨基接头的RNA。采用对应的2' -OMe-亚磷酰胺、2' -F-甲基亚磷酰胺来产生含有2' -O-甲基和2' -F核苷酸的寡聚体。采用TFA保护的己基氨基接头亚磷酰胺 (Sigma-Aldrich, SAFC, Hamburg, Germany) 在有义链的5' -末端引入5' -氨基己基接头。在3' -位置需要己基氨基接头的情况下,使用固定在CPG (Prime Synthesis, Aston, PA, USA) 上的苯二甲酰亚氨基保护的己基氨基接头。使用41% 甲胺水溶液和浓氨水的混合物 (1:1 v/v) 来完成切割和脱保护,使用阴离子交换HPLC和填充有 Source 15Q树脂 (得自GE Healthcare) 的柱 (2.5×18cm) 来纯化粗寡核苷酸。

[0788] 实施例6:用于GalNAc配体缀合的通用方法

[0789] 如Hadwiger等人专利申请US2012/0157509 A1所概述来制备三价GalNAc配体。使用NHS化学根据以下程序来活化对应的羧酸衍生物:

[0790] 将3GalNAc-COOH (90μmol, 206mg) 溶解于2.06mL DMF中。在0℃下向该溶液中添加N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 14.3mg, 99μmol, 1.1eq.) 和二异丙基碳二亚胺 (DIC, 18.29μL, 1.05eq., 94μmol)。在环境温度下搅拌该溶液过夜。通过TLC (DCM:MeOH=9:1) 来监测反应的完成。

[0791] 将具有氨基己基接头的前体寡核苷酸溶解于碳酸钠缓冲液 (pH9.6) :DMSO 2:3 v/v 中,以得到4.4mM溶液。向该溶液添加NHS活化的GalNAc溶液 (1.25eq, 116μL) 的等份试样。在25℃下振荡1小时之后,添加NHS活化的GalNAc的另一等份试样 (116μL)。一旦RP HPLC分析显示出至少超过85%的缀合材料,则通过添加乙醇并在冰箱中过夜储存来沉淀粗缀合物。通过离心收集沉淀物。将沉淀物溶解于1mL浓氨水中并在室温下搅拌4小时,以从GalNAc糖残基除去O-乙酸根。在通过RP HPLC ESI MS确认定量除去O-乙酸根之后,用100mM三乙基乙酸铵 (TEAA) 稀释材料,使用XBridge Prep C18 (5μm, 10×50mm, Waters) 柱在60℃下在 ÄKTA explorer HPLC系统上通过RP HPLC来纯化粗反应混合物。溶剂A为100mM TEAA水溶液,溶剂B为100mM溶于95% CAN的TEAA,这两种溶剂均借助于缓冲液预热器加热至60℃。采用在60min内5%至25% B的梯度,流速为3.5mL/min。观察260nm和280nm下化合物的洗脱。收

集1.0mL体积的级分，并通过分析型RP HPLC/ESI-MS来分析。将含有纯度超过85%的靶标缀合物的级分组合。通过ESI/MS来确认正确的分子量。

[0792] 实施例7:寡核苷酸前体

[0793] 使用以上实施例中描述的方法来制备以下单链单体、二聚体和GalNAc标记的单体和二聚体：

[0794] 表1:寡核苷酸前体-单链(“X”)

SEQ ID NO:	ID	FVII 有义链(5'-3')
[0795]	1 X18791	(C ₆ SSC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(C ₆ NH ₂)
	2 X18792	(C ₆ SSC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(C ₆ NH)(GalNAc ₃)
	3 X18793	(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(C ₆ NH)(GalNAc ₃)
	4 X18794	(C ₆ SSC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)
	5 X19569	(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)
	6 X19574	(DTME)(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)
ID		FVII 反义链(5'-3')
[0796]	7 X18796	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C ₆ SSC ₆)dT
	8 X18797	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C ₆ SH)
	9 X18798	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C ₆ SH)(DTME)
	ID	ApoB 有义链(5'-3')
	10 X19577	(C ₆ SSC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAf(invdT)
	11 X19578	(SHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAf(invdT)
	12 X19579	(DTME)(SHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAf(invdT)

[0797] 表2:寡核苷酸单链有义和反义对;以及退火之后获得的双链体(“XD-”)

双链体 ID	SEQ ID NO:	单链 ID	序列(5'-3')	靶标/链
[0798]	XD-003 76	13 X01162	GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfAC fdTsdT	FVIIIs
		14 X00549	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfd TsdT	FVIIas
XD-000 30	16	X00116	GcAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT	FVIIIs
	17	X00117	UGAGUUGGcACGCCUUUGCdTsdT	FVIIas
XD-010 78	19	X02943	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	ApoBs
	20	X02944	uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCccscsU	ApoBas
XD-001 94	22	X00539	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT	LUCs
	23	X00540	UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT	LUCas

[0799] 表3:衍生化的寡核苷酸单链有义和反义对;以及退火之后获得的双链体。

双链体 ID	SEQ ID NO:	单链 ID	序列(5'-3')	靶标
[0800]	XD-06328	25	X18790 (GalNAc3)(NHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaA fcUfcAf(invdT)	FVII
		26	X18795 UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
[0800]	XD-06728	28	X20124 (GalNAc3)(NHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaA fuCfgAf(invdT)	ApoB
		29	X19583 UfsCfgAfuUfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgusu	
[0800]	XD-06386	31	X20216 (GalNAc3)(NHC ₆)sAfsasCfaGfuGfuUfCfUfu GfcUfcUfaUfaAf(invdT)	TTR
		32	X19584 usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	
[0800]		34	X19571 gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(C ₆ NH)(GalNAc3)	FVII
	XD-05961	35	X18788 gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	FVII
[0801]		26	X18795 UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	

[0802] 表4:通过DTME连接的单链寡核苷酸二聚体

SEQ ID NO:	ID	序列(5'-3')	靶标 / 链
[0803]	37 & 125	X15049 GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA(SHC ₆)(DTME)GG AUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT(SHC ₆)	ApoB s/F7s
	38 & 126	X12714 GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT(SH C ₆)(DTME)GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfd TsdT(SHC ₆)	
[0803]	39 & 127	X19575 (SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(C ₆ NH)(GalNAc ₃)(DTME)(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcC faAfcUfcAf(invdT)	F7s/F 7s
	40 & 128	X19819 UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C ₆ SH)(DT ME)UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu(C ₆ SH)	
	41 & 129	X20336 (SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(C ₆ NH)(GalNAc ₃)(DTME)(SHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfg AfaAfuCfgAf(invdT)	F7s/A poBs

[0804] 表5:单链DTME二聚体和对应的单体;以及退火之后获得的双链体

双链体 ID	SEQ ID	单链 ID	序列(5'-3')	靶标/链
[0805]	XD-05311	37 & 130	X15049 GGAUCuuAuAuuuGAUCCAsA(S HC6)(DTME)GGAUfCfAUfCfUfCf AAGUfCfUfUfACfdTsdT(SHC6)	ApoBs-F VIIIs
		14	X00549 5'-GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAU fCfCfdTsdT-3' +	FVIIas
		20	X02944 5'-uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcs csU-3'	ApoBas
[0805]	XD-05312	38 & 131	X12714 GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfU fACfdTsdT(SHC6)(DTME)GUfAA GACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsd T(SHC6)	FVIIIs-FV IIas
		13	X01162 5'-GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfU fUfACfdTsdT-3'	FVIIIs
		14	X00549 5'-GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAU fCfCfdTsdT-3'	FVIIas

[0806] 表6: 化学合成的二硫化物连接的二聚体和三聚体

SEQ ID	单链 ID	序列(5'-3')	靶标/链
[0808]	44 & 132	X20366 usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfusu su(C ₆ SSC ₆)UfsCfgAfuUfuCfuCfuCfcAfa AfuAfgusu	TTRas/ApoBas
	45 & 133	X22413 AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfa Af(invdT)(C ₆ SSC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfc CfaAfcUfcAf(invdT)	FVIIIs/TTRs
	46 & 134 & 135	X20256 (SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcA f(invdT)(C ₆ NH)(GalNAc3)(SPDP)(NHC 6)cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAf(inv dT)(C ₆ SSC ₆)AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuG fcUfcUfaUfaAf(invdT)	FVIIIs/ApoBs/T TRs
	47 & 136	X20366 usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfusu su(C ₆ SSC ₆)UfsCfgAfuUfuCfuCfuCfcAfa AfuAfgusu	TTRas/ApoBas
	48 & 137	X22413 AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfa Af(invdT)(C ₆ SSC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfc CfaAfcUfcAf(invdT)	FVIIIs/TTRs

[0809] 图例:在上表1-表6的序列部分(以及后面的那些部分)中:大写字母“A”、“C”、“G”和“U”代表RNA核苷酸。小写字母“c”、“g”、“a”和“u”代表2'-0-甲基修饰的核苷酸;“s”代表硫代磷酸根;并且“dT”代表脱氧胸苷残基。后接“f”的大写字母A、C、G、U表示2'-氟核苷酸。“(SHC6)”代表硫代己基接头。“(DTME)”代表可切割同源双官能交联剂二硫代双马来酰亚胺基乙烷,它的结构如图1B所示。“(BMPEG2)”代表不可切割的同源双官能交联剂1,8-双马来

酰亚胺基-二乙二醇。“C6NH2”和“C6NH”可互换使用,代表氨基己基接头。“C6SSC6”代表二己基二硫化物接头。“GalNAc3”和“GalNAc”可互换使用,代表三触角N-乙酰半乳糖胺配体,它的化学结构如图1A所示。“SPDP”代表琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯与具有氨基接头的RNA的反应的反应产物。“InvdT”意指倒置的胸苷。

[0810] 在图表的靶标/链部分中:“F7”或“FVII”表示靶向因子VII转录物(mRNA)的siRNA序列。“ApoB”表示靶向载脂蛋白B转录物的siRNA序列。“TTR”表示靶向运甲状腺素蛋白转录物的siRNA序列。有义链以“s”表示;反义链以“as”表示。

[0811] 实施例8:通过连续退火产生二聚体、三聚体和四聚体siRNA的通用程序

[0812] 对于二聚体、三聚体和四聚体siRNA的制备,进行分步退火程序。在水中进行退火,并分步添加互补链。不需要加热/冷却溶液。在每次添加之后,除去退火溶液的等份试样,并使用分析型RP HPLC在非变性条件(20°C)下监测双链体形成。基于最近邻法计算的单条单链的消光系数来计算组合等摩尔量的互补单链所需的量。如果分析型RP HPLC迹线显示出过量的单链,则添加额外量的对应的互补链,以推动双链体形成(“双链体滴定”)。

[0813] 使用配备有平衡至20°C的XBride C18 Oligo BEH(2.5μm; 2.1×50mm, Waters)柱的Dionex Ultimate 3000 HPLC系统来监测双链体滴定。诊断性波长为260nm。缓冲液A为含有1%甲醇的100mM六氟异丙醇(HFIP)、16.3mM三乙胺(TEA)。缓冲液B具有相同的组成,不同的是MeOH为95%。在30分钟内以250μL/min的流速施加5%至70%缓冲液B的梯度。独立地运行两条互补链以确立保留时间。然后分析含有双链体溶液的等份试样,并与组成性单链的保留时间相比较。在双链体溶液显示出大量单链的情况下,将对应的互补链添加到双链体溶液中。

[0814] 实施例9:5'-GalNAc-FVII规范对照(XD-06328)的制备

[0815] 使用实施例4中所述的方法通过使ssRNA链X18790和X18795一起退火来制备5'-GalNAc-FVII规范对照(XD-06328)(参见图2)。如HPLC分析所确定获得91.6%纯度的产物。

[0816] 实施例10:具有连接3'反义链和缀合至有义链的外部3'末端的GalNAc的可切割接头的3'-GalNAc-FVII-DTME-FVII同源二聚体(XD-06330)的制备

[0817] 根据实施例8中所述的双链体滴定法通过将单链二聚体X19819分步与X18788和X19571组合来制备靶向FVII的GalNAc-缀合的同源二聚体siRNA XD-06330(图3)(10mg, 323nmol)。通过HPLC分析确定分离的材料为基本上纯的。

[0818] 表8:用于GalNAc-FVII-DTME-FVII同源二聚体(XD-06330)的合成的寡聚体的化学计量

SEQ ID NO:	ID	靶标	E (L/mol* cm)	Nmol/OD	MW (游离酸)	MW 钠盐	所需 OD
40	X19819	FVIIas-FVIIas	389000	2.57	14405.6	15372.9	174
36	X18788	FVIIas	193000	5.18	6545.3	6962.9	62.3
34	X19571	FVIIas	193000	5.18	8161.0	8600.6	62.3
49	XD-06330				29111.9	30936.4	

[0820] 实施例11:具有连接5'有义链和缀合至有义链的外部3'末端的GalNAc的可切割接头的3'-GalNAc-FVII-DTME-FVII同源二聚体(XD-06360)的制备

[0821] 通过使用图4中所述的合成策略和实施例8中所述的方法分步组合单链来制备靶向FVII的GalNAc-缀合的同源二聚体siRNA XD-06360 (11mg, 323nmol)。

[0822] 所有反应性步骤均产生高质量材料,其中分别通过离子交换和反相色谱确定寡聚体X19575的纯度为91.7%和93.4%,并且如非变性反相HPLC所确定寡聚体XD-06360是分离的,纯度为86.8%。用于合成的各种寡聚体的化学计量如表9所示。

[0823] 表9:用于GalNAc-FVII-FVII同源二聚体(XD-06360)的合成的寡聚体的化学计量

SEQ ID NO:	ID	靶标	E (L/mol* cm)	Nmol/ OD	MW (游离酸)	MW 钠盐	所需 OD
[0824]	39	X19575	FVII _s -FVII _s	384800	2.60	15413.1	16314.4
	26	X18795	FVII _{as}	194800	5.13	6849.4×2	7289.1×2
[0825]	50	XD-06360			29111.9	30892.6	

[0826] 实施例12:具有连接3'反义链和缀合至有义链的内部5'末端的GalNAc的可切割接头的5' -GalNAc-FVII-DTME-FVII同源二聚体(XD-06329)的制备

[0827] 如图5中所述通过使1150nmol X18788和1150nmol X18798退火来制备靶向FVII的GalNAc-缀合的同源二聚体siRNA XD-06329。各条链的OD的总和为4500D,并且由于增色性,组合的溶液(即双链体)具有3940D (3940D=1150nmol双链体)。使该DTME修饰的双链体与1150nmol X18797 (3' -SH修饰的FVII反义) (2240D) 反应。在HPLC纯化之后,3640D“半-二聚体”siRNA是分离的。然后使“半-二聚体”FVII siRNA (10mg, 323nmol, 1740D) 与5' GalNAc-FVII有义(X18790) (323nmol, 62.30D) 一起退火,以生成最终产物XD-06329。

[0828] 实施例13:确定FVII同源二聚体GalNAc缀合物(XD-06329、XD-06330和XD-06360)的体内FVII基因敲低。

[0829] 在如上文所述的动物实验(通用程序:动物实验)中测试针对因子VII靶向的同源二聚体GalNAc-缀合的siRNA的三种不同的变体(XD-06329、XD-06330和XD-06360)和单体GalNAc-缀合的FVII-siRNA(XD-06328)的体内功效。对于处理组,组大小为n=4只小鼠,对于盐水对照,组大小为n=5只小鼠。所有化合物均在0.2mL的体积中以不同的剂量(25mg/kg或50mg/kg)皮下注射。在处理前1天和处理后1天、3天和7天收集血液,并分析FVII酶活性。结果如图6所示。

[0830] 基于每单位重量的敲低,同源二聚体GalNAc-缀合物(XD-06329、XD-06330和XD-06360)的沉默活性、作用起效和效力相当于单体规范对照(XD-06328)。未观察到毒性的体征(例如,体重减轻、异常行为)。然而,在归一化GalNAc含量的数据时,同源二聚体GalNAc缀合物在FVII敲低时均比GalNAc单体更有效,从而证明每个配体/受体结合事件的siRNA摄取更高效。这些结果如图7A和图7B所示。

[0831] 图7A.将每个时间点的因子VII血清值归一化为注射有1×PBS的对照小鼠。从左到右每个数据点的条柱分别对应于盐水、XD-06328、XD-06329、XD-06330和XD-06360。

[0832] 图7B.将每个时间点的因子VII血清值归一化为每个单个组的预采血值。从左到右每个数据点的条柱分别对应于盐水、XD-06328、XD-06329、XD-06330和XD-06360。

[0833] 实施例14:独立地靶向FVII(XD-06328)、ApoB(XD-06728)和TTR(XD-06386)的规范

GalNAc-siRNA的制备。

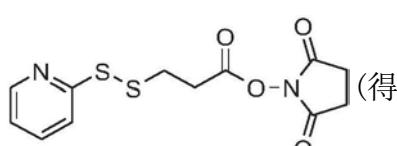
[0834] 通过固相合成独立地制备独立靶向FVII (XD-06328)、ApoB (XD-06728) 和TTR (XD-06386) 的三种规范siRNA (参见图8)。分别用5' -己基胺接头来制备三条有义链(分别为X18790、X20124、X20216)。在寡核苷酸的切割和脱保护以及粗材料的HPLC纯化之后, 使用NHS化学实现全乙酰化GalNAc簇与每个寡核苷酸的缀合。由氨水介导通过皂化除去O-乙酸根。通过上文提供的标准程序来合成互补反义链(分别为X18795、X19583和X19584), 然后退火至GalNAc缀合的单链, 以生成靶向FVII (XD-06328)、ApoB (XD-06728) 和TTR (XD-06386) 的siRNA, 纯度分别为99.7%、93.1% 和93.8%。

[0835] 表10:GalNAc-siRNA缀合物

双链体 ID	SEQ ID NO:	ssRNA	序列 5'-3'	
[0836]	XD-06328	X18790 138	(GalNAc3)(NHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGf cCfaAfcUfcAf(invdT)	FVII
		139	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcu su	
	XD-06728	140	(GalNAc3)(NHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgA fgAfaAfuCfgAf(invdT)	ApoB
		141	UfsCfgAfuUfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgu su	
	XD-06386	142	(GalNAc3)(NHC ₆)sAfsasCfaGfuGfuU fCfUfuGfcUfcUfaAfaAf(invdT)	TTR
[0837]	143	X19584	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUf ususu	

[0838] 实施例15:在有义链上具有可切割的键的GalNAc-FVII-ApoB-TTR三聚体 (XD-06726) 的制备

[0839] 如图10中所述, 使用固相和溶液相的杂交策略来合成缀合至GalNAc的靶向FVII、ApoB和TTR的异源二聚体(参见图9)。

[0840] 使用对应的商购获得的TFA保护亚磷酰胺 (SAFC Proligo, Hamburg, Germany) 通过5' -末端上的氨基己基接头使用固相化学来制备二聚体X19581。从固相支持物切下序列, 根据上文概述的条件进行脱保护和纯化。为了装设另外的二硫化物接头, 使寡核苷酸的5' -氨基己基接头与SPDP (3-(2-吡啶基二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯)  (得

自Sigma (#P3415)) 反应。将928nmol (4000D) 寡核苷酸溶解于含有20%二甲基甲酰胺 (DMF) 的4.7mL 100mM TEAB pH8.5中。向该溶液添加溶于100μL DMF的1.4mg (4.6μmol, 5eq) SPDP溶液。一旦分析型RP HPLC显示出消耗起始物料, 则在C18 XBridge柱 (10×50mm) (购自Waters) 上纯化粗反应混合物。在ÄKTA explorer HPLC系统上进行RP纯化。溶剂A为100mM TEAA水溶液, 溶剂B为100mM溶于95%ACN的TEAA。借助缓冲液预热器将溶剂加热至60°C, 并使柱保持在相同温度的烘箱中。采用在45min内0%至35% B的梯度, 流速为4mL/min。观察260nm和280nm下化合物的洗脱。收集1.5mL体积的级分, 并通过分析型RP HPLC/ESI-MS来分

析。将合适的级分组合,在添加乙醇和3M NaOAc (pH5.2)之后在-20℃下沉淀寡核苷酸X19582。通过RP-HPLC ESI-MS来确认特性。

[0841] 为了制备单链三聚体,将上述寡核苷酸X19582 (255nmol) 溶解于1.3mL水中。向该溶液添加306nmol (1.2eq) 硫醇修饰的寡核苷酸X18793。反应混合物包含200mM TEAA和20% 乙腈。在反应过程后进行RP HPLC。一旦消耗起始物料,使用与前一段中所述相同的条件来纯化反应混合物,不同的是梯度在45min内从0% B至30% B运行。

[0842] 获得高纯度的单链异源二聚体X20256 (含有siFVII、siApoB和siTTR的连接的有义链)。X20256的序列如表11所示。

[0843] 表11:单链异源三聚体

SEQ NO:	ID	ID	序列	靶标/链
[0844] 52 & 144 & 145	X20256		(SHC ₆)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(C ₆ NH)(GalNAc ₃)(SPDP)(NHC ₆)cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAf(invdT)(C ₆ SSC ₆)AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf(invdT)	FVIIIs/ApoBs/TTRs

[0845] 注意:原则上,上述序列可以通过单一固相合成来获得。在这种情况下,SPDP和C₆NH₂被C₆SSC₆亚磷酰胺替代。然而,由于整个构建体的序列长度,这种合成将是具有挑战性的。

[0846] 其后,根据实施例8中所述的双链体滴定法通过将反义单链分步依次添加至有义链异源三聚体中间体(X20256)来制备7mg (150nmol) 同时靶向FVII、ApoB和TTR的异源三聚体双链体构建体(XD-06726)。通过HPLC获得7mg基本上纯的材料。

[0847] 表12:用于GalNAc-FVII-ApoB-TTR三聚体(XD-06726)的合成的寡聚体的化学计量。

SEQ NO:	ID	ID	靶标	E (L/mol*cm)	Nmol/OD	MW (游离酸)	MW 钠盐	所需OD
[0848] 52 & 144 & 145	X20256		FVIIIs-ApoBs-TTRs	623900	1.60	22690.8	24075.7	94
29	X19583		ApoBas	206500	4.84	6762.4	7202.1	31
32	X19584		TTRas	240400	4.16	7596.1	8079.7	36
26	X18795		FVIIas	194800	5.13	6849.4	7289.1	29
53	XD-06726					43898.7	46646.6	

[0849] 实施例16:在交替的有义链和反义链上具有可切割的键的GalNAc-FVII-ApoB-TTR三聚体(XD-06727)的制备。

[0850] 使用实施例8中所述的方法通过分步组合图12中所述的单链来制备高纯度的9mg (192nmol) 同时靶向FVII、ApoB和TTR的三聚体siRNA XD-06727 (参见图11)。

[0851] 表13A:用于GalNAc-siFVII-siApoB-siTTR三聚体(XD-06727)的合成的寡聚体的化学计量

SEQ ID NO:	ID	靶标	E (L/mol* cm)	1 OD	MW (游离酸)	MW 钠盐	所需 OD	
[0852]	42	X20336	FVIIIs-A poBs	404300	2.47nmol	15440.1	16341.4	78
	49	X20366	ApoBas-TTRas	446700	2.24nmol	14748.9	15716.1	86
		X19580	TTRs	220300	4.54nmol	7105.6	7567.2	42
	26	X18795	FVIIas	194800	5.13nmol	6849.4	7289.1	37
	54	XD-06727				44144	46913.8	

[0853] 产生异源二聚体(XD-06727)的合成是高效的。在该实施例中,在每个步骤实现几乎100%的反应物转化率。参见图13、图14和图15。

[0854] 实施例17:单独靶向FVII、ApoB和TTR的合并siRNA的LNP制剂的制备

[0855] 靶向FVII (XD-00030)、ApoB (XD-01078) 和TTR (XD-06729) 的单体siRNA配制在脂质纳米粒子中,并使用通用程序:脂质纳米粒子制剂和通用程序:LNP表征中所述的方法来表征。脂质组合物为XL10:DSPE:胆固醇:PEG-DOMG/50:10:38.5:1.5摩尔%。实现88%包封,并且所得的粒子的粒度为83nm且 ζ 电势为2.2mV,PDI为0.04。

[0856] 表13B:靶向TTR的单体siRNA (XD-06729)

	dsRNA ID	ssRNA ID	SEQ ID NO:	序列	靶标/链
[0857]	XD-06729	X21072	154	cAGuGuucuuGcucuAuAAd TsdT	TTRs
[0858]		X21073	155	UuAuAGAGcAAGAACAC UGdTsdT	TTRas

[0859] 实施例18:对GalNAc-缀合的异源三聚体siRNA的mRNA敲低的评估

[0860] 为了确定异源三聚体GalNAc-缀合的siRNA (靶向FVII、ApoB和TTR) 的体内功效,如上文所述(通用程序:动物实验)使用对于处理组n=4只小鼠的组大小以及对于盐水对照n=5只小鼠的组大小来进行动物实验。以50mg/kg (对于三聚体) 和17mg/kg (对于每个单体缀合物) 的总RNA浓度皮下注射 (0.1mL体积) 异源三聚体XD-06726和XD-06727以及3种单体GalNAc-缀合的siRNA (靶向FVII的XD-06328;靶向TTR的XD-06386和靶向ApoB的XD-06728) 的合并库。为了进行比较,以每种siRNA 0.5mg/kg静脉内注射针对相同的靶标 (FVII (XD-00030)、ApoB (XD-01078) 和TTR (XD-06729)) 的LNP-配制的siRNA (NPA-741-1) 的合并库。在处理前1天和处理后1天、3天和7天如上文所述(通用程序:动物实验)收集血液,并且根据通用程序:基因敲低的测量来测量FVII、ApoB和TTR的血清水平。结果如图16A和图16B、图17A和图17B以及图18A和图18B所示。在注射后第7天测量肝脏裂解物中的mRNA水平(图19A和图19B)。

[0861] 组A中的一只动物 (XD-06726) 未显示出对TTR血清水平的任何影响。两个TTR蛋白图形中的第一个显示出省略了无反应动物的值的数据。

[0862] 为了进行比较,第二个FVII图形省略了来自显示出较差TTR反应的动物的值。

[0863] 在一个组的动物之内和在盐水对照的不同时间点之间,ApoB血清水平显示出高度变化。

[0864] 还根据上述通用程序:基因敲低的测量使用来自肝脏组织的mRNA的bDNA测定法来测量全部三个基因的敲低。靶基因水平归一化为管家GAPDH。

[0865] 实施例19:GalNAc-FVII-ApoB-TTR-FVII四聚体(XD-07140)的制备

[0866] 如图21中所述并且根据实施例8中所述的双链体滴定法通过分步组合单链来制备12.4nmol同时靶向FVII、ApoB和TTR的四聚体siRNA XD-07140(参见图20)。HPLC分析显示,获得高纯度的产物。

[0867] 表14:用于GalNAc-FVII-ApoB-TTR-FVII四聚体(XD-07140)的合成的寡聚体的化学计量

SEQ ID NO:	ID	靶标	E (L/mol* cm)	1 OD	MW (游离酸)	MW 钠盐	所需 OD
[0868]	42	X20336	FVIIIs-A poBs	404300	2.47nmol	15440.1	16341.4
	49	X20366	ApoBas- TTRas	446700	2.24nmol	14748.9	15716.1
	45	X22413	TTRs-F VIIIs	412100	2.52nmol	14041.3	14964.5
	26	X18795	FVIIas	194800	5.13nmol	6849.4×2	7289.1×2
	55	XD-07140				57929.1	61600.2

[0869] 实施例20:同源四聚体的合成

[0870] 根据本发明的多聚体寡核苷酸可以通过本文公开的任何方法来合成。以下提供了用于同源四聚体的两种示例性方法。这些实施例可以容易地适用于合成更长的多聚体(例如,五聚体、六聚体等)。

[0871] 如图40所示,可以通过在合成仪上制备有义链的四聚体(每个有义链经由可切割接头来连接),其后添加靶向配体并使反义链退火来合成在单链上具有键合的同源四聚体siRNA。有义链的可切割接头可以是二硫化物(如图所示)或其他不稳定的键(例如,未经化学修饰的核酸序列,诸如UUU/尿苷-尿苷-尿苷)。

[0872] 图40所示的方案的变化可以包括使用替代性接头、连接反义链和使有义链退火、合成更长的多聚体,或者在达到基于机器的合成的技术限制的情况下,合成一种或多种多聚体,然后使用一个或多个溶液相化学反应将所述多聚体连接在一起(例如,根据方案1合成两种四聚体,一种使用配体,另一种不使用配体,根据情况,使用官能团来修饰一条或多条链以促进连接,然后在添加或不添加连接部分(例如,DTME)的情况下,经由共价键的形成将两种四聚体连接在一起)。

[0873] 或者,如图41所示可以使用交替链上的键合来装配同源四聚体。

[0874] 在图41中,“-SH”代表巯基基团,“Ma1”代表DTME,“-CL-”代表可切割接头。图41所示的方案的变化可以包括使用替代性接头和合成更长的多聚体。

[0875] 实施例21:配体缀合物的合成

[0876] 图41所示的配体缀合物可以如下所述合成:

[0877] 合成单体的有义链和反义链二者的3' -巯基衍生物:



(结构 61) (结构 62)

[0879] 将每个衍生物的多个部分转化为对应的单马来酰亚胺衍生物：



(结构 63) (结构 64)

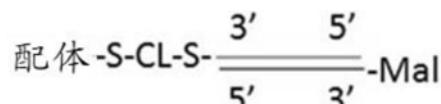
[0881] 然后用所选的靶向配体的巯基衍生物处理这样获得的有义链马来酰亚胺衍生物的一部分：



[0882]

(结构 65)

[0883] 然后添加稍微摩尔过量的反义马来酰亚胺衍生物，并且通过制备性色谱来分离所期望的配体-ds-siRNA-马来酰亚胺产物：



[0884]

(结构 66)

[0885] 然后按图41中概述的顺序添加稍微摩尔过量的同源四聚体的有义和反义组分中的每种，如果需要，通过制备性色谱来纯化每个步骤的产物。

[0886] 实施例22:多聚体寡核苷酸的合成

[0887] 根据本发明的多聚体寡核苷酸可以通过本文公开的或本领域适用的任何方法来合成。下文提供了用于同源多聚体的示例性方法，但是本发明的合成也可以容易地适用于合成异源多聚体。

[0888] 这些实施例也可以适用于合成不同长度的多聚体。例如，可以使用基本上相同的合成和连接化学来组合四聚体和单体(或三聚体和二聚体)，从而产生五聚体。同样，可以组合四聚体和三聚体，从而产生七聚体等。可以使用互补连接化学(例如，点击化学)来装配更长的多聚体。

[0889] 实施例22A:经由预合成的同源二聚体来合成siRNA的同源四聚体

[0890] 步骤1:合成有义链同源二聚体，其中两条有义链通过可核酸酶切割的寡核苷酸(NA)连接，并使用氨基官能团和二硫化物部分封端。

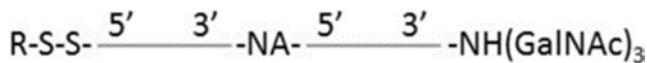


[0891]

(结构 67)

[0892] 如上文通用程序:单链寡核苷酸合成部分中所概述合成单个链(对于该步骤和其他步骤)。用于寡核苷酸链合成、连接和化学修饰的其他方法可以适用于本领域。

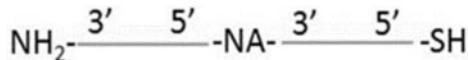
[0893] 步骤2:然后通过与酰基活化的三触角GalNAc配体反应来将三触角GalNAc配体添加至有义链同源二聚体的一部分的末端氨基官能团。



[0894]

(结构 68)

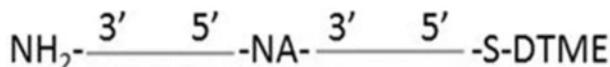
[0895] 步骤3:用摩尔过量的二硫苏糖醇处理有义链同源二聚体的其余部分,以切割二硫化物基团,从而生成硫醇封端的有义链同源二聚体。



[0896]

(结构 69)

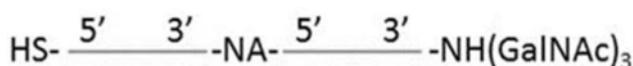
[0897] 步骤4:根据用于制备异源多聚体的程序用二硫代双马来酰亚胺基乙烷(DTME)来单衍生化该材料(参见上文)。



[0898]

(结构 70)

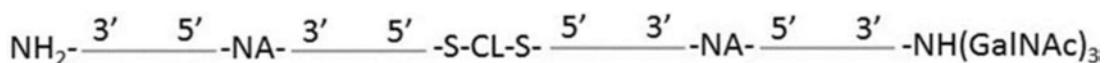
[0899] 步骤5:还通过用摩尔过量的二硫苏糖醇处理来切割GalNAc衍生化的同源二聚体的二硫化物基团。



[0900]

(结构 71)

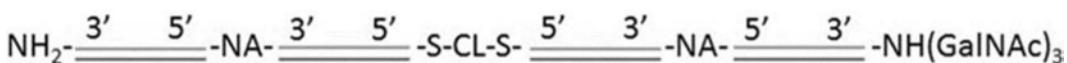
[0901] 步骤6:然后通过末端硫醇基团的反应将GalNAc封端的二聚体连接至单体DTME衍生化二聚体,以生成单链同源四聚体。“-S-CL-S-”代表DTME中的可切割的二硫化物基团,例如可切割接头(CL)。



[0902]

(结构 72)

[0903] 步骤7:然后将该材料与4分子当量的反义单体一起退火,以生成所期望的双链同源四聚体(该退火步骤是任选的,并且可以省略,例如制备单链多聚体(诸如反义寡核苷酸))。

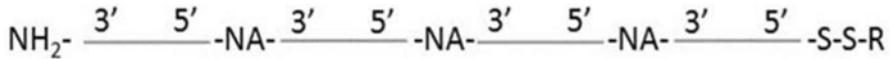


[0904]

(结构 73)

[0905] 实施例22B:经由预合成的同源二聚体和同源四聚体来合成siRNA的同源六聚体

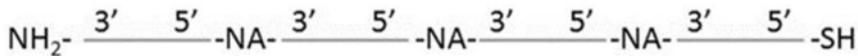
[0906] 步骤1:合成有义链同源四聚体,其中四条有义链通过可核酸酶切割的寡核苷酸连接,并使用氨基官能团和二硫化物部分封端。



[0907]

(结构 74)

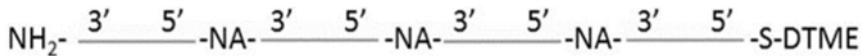
[0908] 步骤2:用摩尔过量的二硫苏糖醇处理该材料,以切割二硫化物基团。



[0909]

(结构 75)

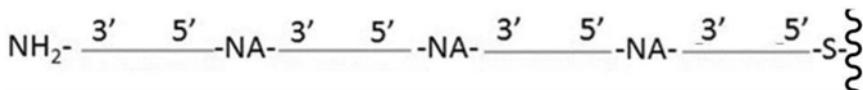
[0910] 步骤3:根据用于制备异源多聚体的程序用二硫代双马来酰亚胺基乙烷(DTME)来单衍生化该材料(参见上文)。



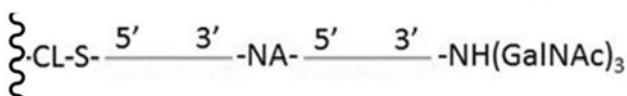
[0911]

(结构 76)

[0912] 步骤4:将该材料与硫醇封端的GalNAc二聚体反应,以生成单链同源六聚体。



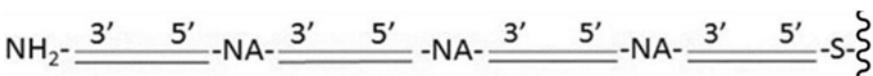
[0913]



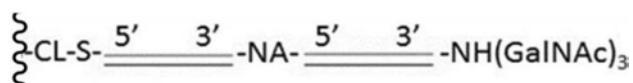
(结构 77)

[0914] 注意:在结构77、结构78、结构81、结构82、结构89和结构91中,单个邻接的结构被符号 S 分为两个部分。

[0915] 步骤5:然后将该材料与6分子当量的反义单体一起退火,以生成所期望的双链同源六聚体(该退火步骤是任选的,并且可以省略,例如制备单链多聚体(诸如反义寡核苷酸))。



[0916]

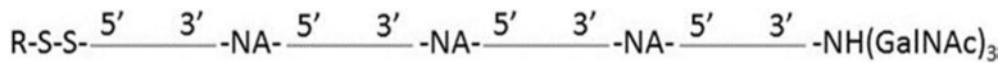


[0917]

(结构 78)

[0918] 实施例22C:经由预合成的同源四聚体来合成siRNA的同源八聚体

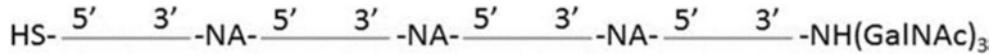
[0919] 步骤1:通过与酰基活化的三触角GalNAc配体反应来将以上合成的氨基末端的同源四聚体的一个部分转化为对应的GalNAc衍生物。



[0920]

(结构 79)

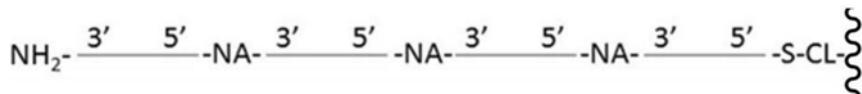
[0921] 步骤2: 用摩尔过量的二硫苏糖醇处理该材料, 以切割二硫化物基团。



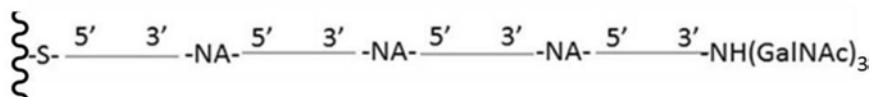
[0922]

(结构 80)

[0923] 步骤3: 将该材料与单体DTME衍生化的四聚体反应, 以生成末端GalNAc衍生化的单链八聚体。

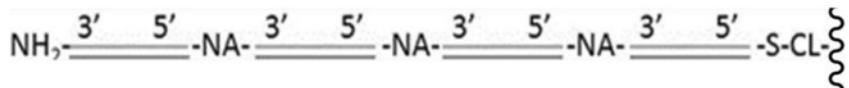


[0924]

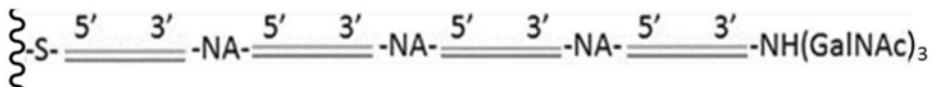


(结构 81)

[0925] 步骤4: 然后将该材料与8分子当量的反义单体一起退火, 以生成所期望的双链同源八聚体(该退火步骤是任选的, 并且可以省略, 例如制备单链多聚体(诸如反义寡核苷酸))。



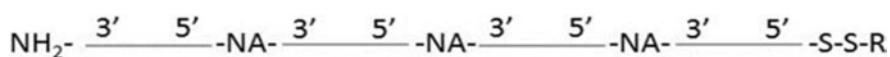
[0926]



(结构 82)

[0927] 实施例22D: 使用硫醇/马来酰亚胺和叠氮/乙炔(“点击”)接头的组合经由预合成的同源四聚体来合成反义寡核苷酸的同源十二聚体

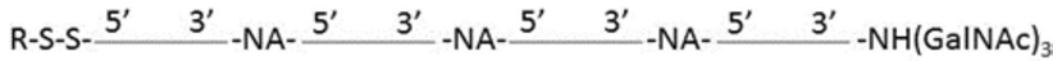
[0928] 步骤1: 合成含有3个可核酸酶切割的寡核苷酸接头和末端二硫化物和氨基基团的反义寡核苷酸的同源四聚体。



[0929]

(结构 83)

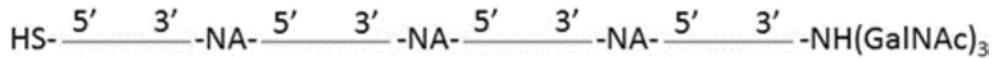
[0930] 步骤2: 通过与酰基活化的三触角GalNAc配体反应来将该材料转化为对应的GalNAc衍生物。



[0931]

(结构 84)

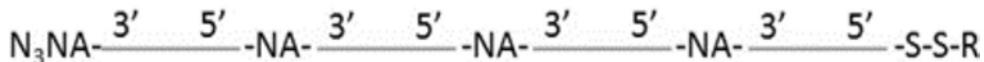
[0932] 步骤3:用摩尔过量的二硫苏糖醇处理该材料,以切割二硫化物基团



[0933]

(结构 85)

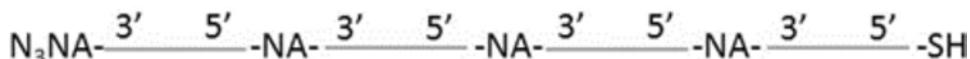
[0934] 步骤4:单独地,合成含有3个可核酸酶切割的寡核苷酸接头和末端二硫化物和叠氮基团的反义寡核苷酸的同源四聚体。



[0935]

(结构 86)

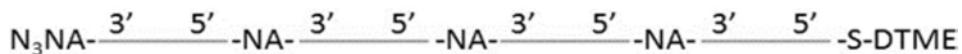
[0936] 步骤5:用摩尔过量的二硫苏糖醇处理该材料,以切割二硫化物基团



[0937]

(结构 87)

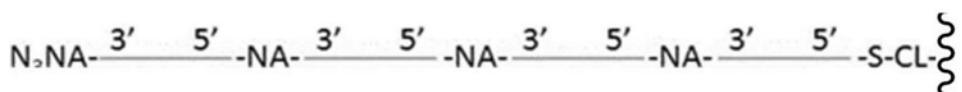
[0938] 步骤6:根据用于制备siRNA异源多聚体的程序用二硫代双马来酰亚胺基乙烷(DTME)来单衍生化该材料(参见上文)。



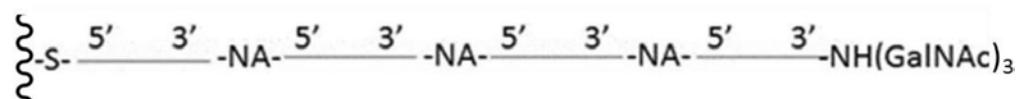
[0939]

(结构 88)

[0940] 步骤7: 将该材料与硫醇封端的GalNAc衍生化的四聚体反应, 以生成末端GalNAc衍生化的单链反义八聚体。



Page 14



(结构 89)

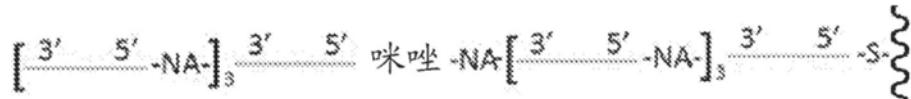
[0942] 步骤8:单独地,合成含有3个可核酸酶切割的寡核苷酸接头和末端乙炔基团的反义寡核苷酸的第三同源四聚体。后者可以是未衍生化的或立体张力的衍生物,诸如二苯并环辛炔(DBCO,Glen Research,VA,USA)

(示例合成仪)

[0943] $R-\overset{3'}{N}A-\overset{5'}{N}A-\overset{3'}{N}A-\overset{5'}{N}A-\overset{3'}{N}A-\overset{5'}{N}A-\overset{3'}{N}A-\overset{5'}{N}A-\text{乙炔}$

(结构 90)

[0944] 步骤9:然后将该材料与步骤7中制备的叠氮封端的八聚体反应,以生成所期望的反义同源十二聚体。如果四聚体上的末端乙炔是未衍生化的,则需要金属盐催化剂(诸如氯化铜1)来实现连接。相比之下,如果末端乙炔是DBCO,则偶联反应将是自发的。



(结构 91)

[0946] 所述方法或使用替代连接化学的方法也可以用于制备其他长度的多聚体(例如,九聚体、十聚体、十一聚体、十三聚体、十四聚体、十五聚体...寡核苷酸)。此类多聚体可以通过使单链多聚体与互补寡核苷酸一起退火来形成双链。

[0947] 实施例23:同源六聚体siRNA的合成

[0948] 构建含有两种正交型可生物切割的键的FVII siRNA的同源六聚体,所述可生物切割的键为i)容易在合成仪上引入的未经修饰的二核苷酸键,和ii)合成功后引入的硫醇/马来酰亚胺衍生物。如图23中所展示,通过组合二聚体(X30835)和同源四聚体(X30837)来装配FVII同源六聚体(XD-09795)。二聚体和同源四聚体均经由标准技术使用每个末端的氨基和二硫化物基团在固相支持物上合成。在解封和纯化之后,将二聚体和同源四聚体经由硫醇/马来酰亚胺反应连接在一起,并与反义链X18795一起退火,以得到FVII同源六聚体(XD-09795)。

[0949] 单链二聚体X30835、单链同源四聚体X30837、生成的单链同源六聚体X30838以及双链六聚体XD-09795和双链单体XD-09794的序列如表15所示。

[0950] 表15:实施例23中的寡核苷酸的序列

双链体-ID	SEQ ID NO:	ss-ID	序列(5'-3')
	146	X30835	(DTME)(SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(NH2C6)
[0951]	147	X30837	(SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(NH2C6)
	XD09794	148	(NH2C6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)
		26	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu
	XD09795	146 & 147	[(DTME)(SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(i nvdT)(NH2C6)] (SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAf cUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcU fcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc Af(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(NH2C6)
		26	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu

[0952] 实施例24:同源六聚体siRNA的合成中的纯度和收率

[0953] 实施例23中所述的合成步骤产生高收率和纯度的中间体产物、二聚体(X30835)、同源四聚体(X30837)和同源六聚体(X30878)以及生成的dsRNA同源六聚体(XD-09795),分别如图24A-图24B、图24C-图24D、图24E和图24F中的HPLC迹线数据所展示。

[0954] 实施例25:同源六聚体siRNA和对应的单体之间的体内循环半衰期的比较

[0955] 在小鼠中确定FVII同源六聚体XD-09795和对应的FVII单体XD-09794的血清半衰期。简而言之,经由静脉内(IV)推注将同源六聚体或对应的单体施用于3个队列的4只C57/BL6N雌性小鼠(每个队列的小鼠为大约11周龄)。对于FVII单体和FVII六聚体,剂量为20mg/kg,在静脉内推注之后5分钟、30分钟、60分钟和120分钟采集血液样品。在各个时间点通过与反义链互补的荧光PNA探针来确定FVII反义的浓度,结果如图25所示。

[0956] 如图25所示,在5分钟后仅大约10%的所施用的FVII单体保留在循环中,在30分钟后所有FVII单体基本上消失。相比之下,在5分钟后几乎所有所施用的FVII六聚体保留在循环中,在30分钟后保留三分之一的初始剂量。数据显示,六聚体的体内循环半衰期是单体的大约30倍。

[0957] 实施例26:确定在t=5分钟、30分钟、60分钟和120分钟使用MSD U-Plex平台采集的血液样品中细胞因子的水平

[0958] 为了评估对六聚体的任何不利毒理学反应,使用MSD U-Plex平台进行血液样品中细胞因子水平的分析。在各个时间点分析来自单体XD-09794和同源六聚体XD-09795处理的队列的血液样品的细胞因子水平。测定十种细胞因子(IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p70、KC-GRO、TNF- α 和GM-CSF)的血清水平,如图26A-J所示。在所测定的十种细胞因子中,4种细胞因子的血清水平在单体和六聚体之间无变化,在其余6种细胞因子中,血清水平几乎相同。

- [0959] 实施例27:同源多聚体的合成
- [0960] 使用以下序列通过以上方法来制备针对FVII mRNA的siRNA的同源多聚体:
- [0961] FVII有义:5 'gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf (invdT) -3 '(SEQ ID NO:35)
- [0962] FVII反义:5 'UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcus-3 '(SEQ ID NO:26) ,
- [0963] 如下所示经由可被核酸内切酶切割的接头dCdA和可还原剂切割的接头DTME连接:
- [0964] 表16A:实施例28-实施例36中的寡核苷酸

序列 ID	构型/链
X18789	单体有义
X18795	单体反义
XD-09794	ds 单体
X30833	二聚体有义
X18795	单体反义
XD-10635	ds 二聚体
X34003	三聚体有义
X18795	单体反义
XD-10636	ds 三聚体
X30836	四聚体有义
X18795	单体反义
XD-10637	ds 四聚体
X-34004	五聚体有义
X18795	单体反义
XD-10638	ds 五聚体
X34005	六聚体有义
X18795	单体反义
XD-10639	ds 六聚体
X30837	四聚体有义硫醇
X30834	二聚体有义硫醇
X30835	二聚体有义-S-DTME
X30838	六聚体有义
X18795	单体反义
XD-09795	ds 六聚体
X34006	五聚体有义硫醇
X30834	二聚体有义硫醇
X30835	二聚体有义-S-DTME
X34009	七聚体有义
X18795	单体反义
XD-10640	ds 七聚体
X34007	六聚体有义硫醇
X30834	二聚体有义硫醇
X30835	二聚体有义-S-DTME
X34010	八聚体有义
X18795	单体反义

[0965]

序列 ID	构型/链
XD-10641	ds 八聚体

[0966]

表16B: FVII siRNA同源多聚体XD-10635、XD-10636、XD-06386、XD-10635

双链体 ID	SEQ ID NO:	单链 ID	序列(5'-3')	构型
[0968]	XD-10635	149	X30833 (C6SSC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)C6NH2)	二聚体
		26	X18795 UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
XD-10636	150	X34003	(C6SSC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(C6NH2)	三聚体
		26	X18795 UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
XD-06386	151	X30836	(C6SSC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)(C6NH2)	四聚体
		26	X18795 UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
XD-10635	152	X34004	(C6SSC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)C6NH2)	五聚体
		26	X18795 UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	
XD-06728	153	X34005	(C6SSC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)dCdAgcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)C6NH2)	六聚体
		26	X18795 UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfcusu	

[0969] 实施例28:FVII单体XD-09794的合成

[0970] 如图27A和图27B所示合成和纯化在有义链上的5' -末端具有氨基官能团的FVII siRNA的单体有义链X18789。收率,48.3mg,6.694mmol,18.6%。同样合成对应的反义链X18795,以获得46.3mg,6.35mmol,31.9%。然后使5.35mg(747.3nmol)有义链和5.45mg(747.3nmol)反义链一起退火,以生成10.8mg(747.4nmol)对应的双链FVII单体(XD-09794)。

[0971] 实施例29:FVII二聚体XD-10635的合成

[0972] 如图28A和图28B所示合成和纯化分别在3' -末端和5' -末端具有氨基和二硫化物基团并且含有dCdA可切割接头的FVII siRNA X30833的同源二聚体有义链。收率,35.8mg,

6.694mmol, 18.6%。

[0973] 然后使5.51mg (362.6nmol) 有义链X30833和5.29mg (725.2nmol) 反义链X18795一起退火, 以生成10.8mg (362.6nmol) 对应的双链FVII同源二聚体 (XD-10635)。

[0974] 实施例30:FVII三聚体XD-10636的合成

[0975] 如图29A和图29B所示合成和纯化分别在3' -末端和5' -末端具有氨基和二硫化物基团并且含有两个dCdA可切割接头的FVII siRNA X34003的同源三聚体有义链。收率, 19.6mg (857.9nmol, 19.3%)。

[0976] 然后使5.16mg (225.5nmol) 有义链X34003和4.93mg (676.5nmol) 反义链X18795一起退火, 以生成10.1mg (225.5nmol) 对应的双链FVII同源三聚体 (XD-10636)。

[0977] 实施例31:FVII四聚体XD-10637的合成

[0978] 如图30A和图30B所示合成和纯化分别在3' -末端和5' -末端具有氨基和二硫化物基团并且含有三个dCdA可切割接头的FVII siRNA X30836的同源四聚体有义链。收率, 53.1mg (1734.5nmol, 13%)。

[0979] 然后使5.53mg (180.8nmol) 有义链X30836和5.27mg (723.2nmol) 反义链X18795一起退火, 以生成10.8mg (180.8nmol) 对应的双链FVII同源四聚体 (XD-10637)。

[0980] 实施例32:FVII五聚体XD-10638的合成

[0981] 如图31A和图31B所示合成和纯化分别在3' -末端和5' -末端具有氨基和二硫化物基团并且含有四个dCdA可切割接头的FVII siRNA X34004的同源五聚体有义链。收率, 35.9mg (938nmol, 10.6%)。

[0982] 然后使5.53mg (144.5nmol) 有义链X34004和5.27mg (723.2nmol) 反义链X18795一起退火, 以生成10.8mg (144.5nmol) 对应的双链FVII同源五聚体 (XD-10638)。

[0983] 实施例33:FVII六聚体XD-10639的合成

[0984] 如图32A和图32B所示合成和纯化分别在3' -末端和5' -末端具有氨基和二硫化物基团并且含有五个dCdA可切割接头的FVII siRNA X34005的同源六聚体有义链。收率, 21.4mg (466.1nmol, 5.3%)。

[0985] 然后使5.15mg (144.5nmol) 有义链X34005和4.89mg (723.2nmol) 反义链X18795一起退火, 以生成10.04mg (111.9nmol) 对应的双链FVII同源六聚体 (XD-10639)。

[0986] 实施例34:FVII六聚体XD-09795的合成

[0987] 如图33A-图33B所示, 经由实施例28和实施例30中制备的FVII siRNA X30833的同源二聚体有义链和FVII siRNA X30836的同源四聚体有义链合成和纯化在两个3' 末端具有氨基基团并且含有四个dCdA可切割接头和一个可还原剂切割的DTME接头的FVII siRNA X30838的同源六聚体有义链。使用DTT从X30833和X30836切下二硫化物基团, 以得到对应的5-硫醇衍生物X30834和X30837, 收率分别为97.6%和91.9%。然后使用上文所述的程序, 将14.9mg (986.7nmol) X30834转化为10.6mg (700.5nmol, 71.0%) 对应的单体DTME衍生物X30835, 将X30835与一当量的X30837反应, 以得到4.2mg (90.7nmol, 64%) 单链同源六聚体X30838。然后使3.8mg (83nmol) 有义链X30838和3.7mg (502nmol, 6摩尔当量) 反义链X18795一起退火, 以生成7.5mg (83.7nmol) 对应的双链FVII同源六聚体 (XD-09795)。

[0988] 实施例35:FVII七聚体XD-10640的合成

[0989] 如图34A-图34B所示, 经由FVII siRNA X30833的同源二聚体有义链和FVII siRNA

X34004的同源五聚体有义链合成和纯化在两个3'末端具有氨基基团并且含有五个dCdA可切割接头的FVII siRNA X34009的同源七聚体有义链。使用DTT从X30833和X34004切下二硫化物基团,以分别得到对应的5-硫醇衍生物X30834 (28.3mg, 1877.9nmol, 86.7%) 和X34006 (21.8mg, 572.2nmol)。然后使用上文所述的程序,将X30834转化为对应的单体DTME衍生物X30835 (22.6mg, 1465.2nmol, 78.1%)。将8.8mg (572.2nmol) X30835与X34006 (21.8mg, 572.2nmol) 反应,以得到单链同源七聚体X34009 (8.96mg, 167.3nmol, 29.2%)。然后使5.53mg (103.3nmol) 有义链X34009和5.27mg (723.1nmol) 反义链X18795一起退火,以生成10.8mg (103.3nmol) 对应的双链FVII同源七聚体(XD-10640)。

[0990] 实施例36:FVII八聚体XD-10641的合成

[0991] 如图35A-图35B所示,经由FVII siRNA X30833的同源二聚体有义链和FVII siRNA X34005的同源六聚体有义链合成和纯化在两个3'末端具有氨基基团并且含有六个dCdA可切割接头的FVII siRNA X34010的同源八聚体有义链。使用DTT从X34005切下二硫化物基团,以得到对应的5-硫醇衍生物X34007 (11.5mg, 251nmol, 99.7%),将X34007与此前获得的单体DTME同源二聚体衍生物X30835 (3.85mg, 250.2nmol) 反应,以得到单链同源八聚体X34010 (5.2mg, 85.0nmol, 34.0%)。然后使4.92mg (80.33nmol) 的有义链X34010和4.68mg (642.4nmol) 反义链X18795一起退火,以生成9.6mg (80.3nmol) 对应的双链FVII同源八聚体(XD-10641)。

[0992] 实施例37:动物实验

[0993] 通过经由尾静脉将测试材料以1ng/ml溶于x1 PBS的浓度静脉内推注至3个队列的4只C57/BL6N雌性小鼠(每个队列的小鼠为大约11周龄)来确定同源多聚体XD-10635、XD-10636、XD-10637、XD-10638、XD-10639、XD-10640和XD-10641以及对应的单体XD-09794的血清半衰期。对于FVII单体和FVII多聚体,剂量为20mg/kg,在5分钟、30分钟、60分钟、120分钟和360分钟采集血液样品。用蛋白酶K消化血清样品,并使特异性互补的Atto425-肽核酸荧光探针与反义链杂交。允许通过后续的AEX-HPLC分析从代谢物中区分完整的反义链,从而产生方法的高特异性。下表17仅显示完整母体化合物的值,并且在图36A和图36B中分别展示为针对FVII多聚体的血清中的FVII siRNA水平随时间推移的平滑线散布图和直线标记散布图。

[0994] 表17:随时间推移的针对FVII同源多聚体的血清中的FVII siRNA水平。

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
盐水	1ng/mL	S1	25	0mg/kg	F	7 天	BLOQ
盐水	1ng/mL	S2	25	0mg/kg	F	7 天	BLOQ
盐水	1ng/mL	S3	25	0mg/kg	F	7 天	BLOQ
盐水	1ng/mL	S4	25	0mg/kg	F	7 天	BLOQ
						平均值	BLOQ
						SD	n.a.
单体 XD-09794	1ng/mL	A1	1	20mg/kg	F	5min	30,988.3

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
单体 XD-09794	1ng/mL	A2	1	20mg/kg	F	5min	32,628.0
单体 XD-09794	1ng/mL	A3	1	20mg/kg	F	5min	37,508.9
单体 XD-09794	1ng/mL	A4	1	20mg/kg	F	5min	35,858.3
						平均值	34,245.9
						SD	2,970.8
单体 XD-09794	1ng/mL	A5	2	20mg/kg	F	30min	3,107.0
单体 XD-09794	1ng/mL	A6	2	20mg/kg	F	30min	3,520.2
单体 XD-09794	1ng/mL	A7	2	20mg/kg	F	30min	3,371.1
单体 XD-09794	1ng/mL	A8	2	20mg/kg	F	30min	2,664.5
						平均值	3,165.7
						SD	375.3
单体 XD-09794	1ng/mL	A1	1	20mg/kg	F	1h	1,339.8
单体 XD-09794	1ng/mL	A2	1	20mg/kg	F	1h	953.0
单体 XD-09794	1ng/mL	A3	1	20mg/kg	F	1h	1,435.8
单体 XD-09794	1ng/mL	A4	1	20mg/kg	F	1h	1,730.9
						平均值	1,364.9
						SD	321.1
单体 XD-09794	1ng/mL	A5	2	20mg/kg	F	2h	598.8
单体 XD-09794	1ng/mL	A6	2	20mg/kg	F	2h	202.7
单体 XD-09794	1ng/mL	A7	2	20mg/kg	F	2h	302.5
单体 XD-09794	1ng/mL	A8	2	20mg/kg	F	2h	124.6
						平均值	307.2
						SD	207.6
单体 XD-09794	1ng/mL	A9	3	20mg/kg	F	6h	4.2
单体 XD-09794	1ng/mL	A10	3	20mg/kg	F	6h	4.0
单体 XD-09794	1ng/mL	A11	3	20mg/kg	F	6h	3.5

[0996]

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
单体 XD-09794	1ng/mL	A12	3	20mg/kg	F	6h	14.5
						平均值	6.6
						SD	5.3
单体 XD-09794	1ng/mL	A9	3	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
单体 XD-09794	1ng/mL	A10	3	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
单体 XD-09794	1ng/mL	A11	3	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
单体 XD-09794	1ng/mL	A12	3	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
						平均值	BLOQ
						SD	n.a.
						SD	
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B1	4	20mg/kg	F	5min	82,272.1
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B2	4	20mg/kg	F	5min	90,574.4
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B3	4	20mg/kg	F	5min	94,213.6
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B4	4	20mg/kg	F	5min	92,612.6
						平均值	89,918.2
						SD	5,310.5
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B5	5	20mg/kg	F	30min	6,107.7
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B6	5	20mg/kg	F	30min	5,204.0
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B7	5	20mg/kg	F	30min	7,221.8
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B8	5	20mg/kg	F	30min	6,677.9
						平均值	6,302.9
						SD	862.3
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B1	4	20mg/kg	F	1h	2,114.2
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B2	4	20mg/kg	F	1h	2,911.0
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B3	4	20mg/kg	F	1h	2,722.5
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B4	4	20mg/kg	F	1h	2,092.7
						平均值	2,460.1

[0997]

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
						SD	419.0
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B5	5	20mg/kg	F	2h	558.0
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B6	5	20mg/kg	F	2h	348.9
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B7	5	20mg/kg	F	2h	2,718.7
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B8	5	20mg/kg	F	2h	549.0
						平均值	1,043.7
						SD	1,120.9
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B9	6	20mg/kg	F	6h	16.9
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B10	6	20mg/kg	F	6h	19.6
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B11	6	20mg/kg	F	6h	30.3
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B12	6	20mg/kg	F	6h	1,273.8
						平均值	335.2
						SD	625.8
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B9	6	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B10	6	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B11	6	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
二聚体 XD-10635	1ng/mL	B12	6	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
						平均值	BLOQ
						SD	n.a.
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C1	7	20mg/kg	F	5min	144,194.8
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C2	7	20mg/kg	F	5min	172,691.1
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C3	7	20mg/kg	F	5min	155,857.5
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C4	7	20mg/kg	F	5min	147,988.0
						平均值	155,182.9
						SD	12,642.5
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C5	8	20mg/kg	F	30min	15,887.3
三聚体	1ng/mL	C6	8	20mg/kg	F	30min	16,202.8

[0998]

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
XD-10636							
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C7	8	20mg/kg	F	30min	17,932.3
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C8	8	20mg/kg	F	30min	17,537.3
						平均值	16,889.9
						SD	997.2
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C1	7	20mg/kg	F	1h	6,276.1
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C2	7	20mg/kg	F	1h	3,939.7
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C3	7	20mg/kg	F	1h	4,018.8
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C4	7	20mg/kg	F	1h	4,884.4
						平均值	4,779.8
						SD	1,085.5
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C5	8	20mg/kg	F	2h	102.7
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C6	8	20mg/kg	F	2h	197.9
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C7	8	20mg/kg	F	2h	1,680.9
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C8	8	20mg/kg	F	2h	469.5
						平均值	612.8
						SD	728.9
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C9	9	20mg/kg	F	6h	32.7
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C10	9	20mg/kg	F	6h	8.0
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C11	9	20mg/kg	F	6h	27.5
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C12	9	20mg/kg	F	6h	12.1
						平均值	20.1
						SD	11.9
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C9	9	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C10	9	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
三聚体 XD-10636	1ng/mL	C11	9	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
三聚体	1ng/mL	C12	9	20mg/kg	F	7 天	BLOQ

[0999]

[1000]

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
XD-10636							
						平均值	BLOQ
						SD	n.a.
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D1	10	20mg/kg	F	5min	174,506.7
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D2	10	20mg/kg	F	5min	184,149.5
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D3	10	20mg/kg	F	5min	180,077.0
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D4	10	20mg/kg	F	5min	204,796.1
						平均值	185,882.3
						SD	13,214.1
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D5	11	20mg/kg	F	30min	89,104.1
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D6	11	20mg/kg	F	30min	88,408.8
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D7	11	20mg/kg	F	30min	79,389.4
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D8	11	20mg/kg	F	30min	83,820.0
						平均值	85,180.6
						SD	4,516.8
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D1	10	20mg/kg	F	1h	25,278.6
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D2	10	20mg/kg	F	1h	24,494.1
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D3	10	20mg/kg	F	1h	23,070.4
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D4	10	20mg/kg	F	1h	31,567.0
						平均值	26,102.5
						SD	3,755.9
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D5	11	20mg/kg	F	2h	9,191.5
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D6	11	20mg/kg	F	2h	8,969.4
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D7	11	20mg/kg	F	2h	5,059.5
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D8	11	20mg/kg	F	2h	14,666.2
						平均值	9,471.7
						SD	3,948.9
四聚体	1ng/mL	D9	12	20mg/kg	F	6h	15.4

[1001]

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
XD-10637							
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D10	12	20mg/kg	F	6h	254.3
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D11	12	20mg/kg	F	6h	58.3
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D12	12	20mg/kg	F	6h	17.5
						平均值	86.4
						SD	113.7
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D9	12	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D10	12	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D11	12	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
四聚体 XD-10637	1ng/mL	D12	12	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
						平均值	BLOQ
						SD	n.a.
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E1	13	20mg/kg	F	5min	201,669.6
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E2	13	20mg/kg	F	5min	214,525.8
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E3	13	20mg/kg	F	5min	247,544.7
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E4	13	20mg/kg	F	5min	207,872.5
						平均值	217,903.2
						SD	20,446.4
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E5	14	20mg/kg	F	30min	112,318.2
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E6	14	20mg/kg	F	30min	110,786.0
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E7	14	20mg/kg	F	30min	94,714.7
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E8	14	20mg/kg	F	30min	47,610.6
						平均值	91,357.4
						SD	30,231.8
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E1	13	20mg/kg	F	1h	48,800.2
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E2	13	20mg/kg	F	1h	46,770.8
五聚体	1ng/mL	E3	13	20mg/kg	F	1h	57,711.0

[1002]

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
XD-10638							
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E4	13	20mg/kg	F	1h	42,458.4
						平均值	48,935.1
						SD	6,420.4
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E5	14	20mg/kg	F	2h	19,806.0
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E6	14	20mg/kg	F	2h	20,633.6
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E7	14	20mg/kg	F	2h	18,214.2
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E8	14	20mg/kg	F	2h	27,970.4
						平均值	21,656.1
						SD	4,327.6
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E9	15	20mg/kg	F	6h	16.4
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E10	15	20mg/kg	F	6h	15.7
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E11	15	20mg/kg	F	6h	14.2
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E12	15	20mg/kg	F	6h	49.4
						平均值	23.9
						SD	17.0
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E9	15	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E10	15	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E11	15	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
五聚体 XD-10638	1ng/mL	E12	15	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
						平均值	BLOQ
						SD	n.a.
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F1	16	20mg/kg	F	5min	221,882.0
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F2	16	20mg/kg	F	5min	227,901.1
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F3	16	20mg/kg	F	5min	230,969.3
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F4	16	20mg/kg	F	5min	229,232.9
						平均值	227,496.3

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
						SD	3,948.1
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F5	17	20mg/kg	F	30min	125,871.8
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F6	17	20mg/kg	F	30min	145,598.8
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F7	17	20mg/kg	F	30min	76,775.7
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F8	17	20mg/kg	F	30min	107,085.3
						平均值	113,832.9
						SD	29,284.7
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F1	16	20mg/kg	F	1h	69,114.9
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F2	16	20mg/kg	F	1h	76,580.8
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F3	16	20mg/kg	F	1h	68,920.5
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F4	16	20mg/kg	F	1h	78,412.0
						平均值	73,257.1
						SD	4,952.6
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F5	17	20mg/kg	F	2h	25,963.0
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F6	17	20mg/kg	F	2h	33,380.4
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F7	17	20mg/kg	F	2h	19,372.0
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F8	17	20mg/kg	F	2h	31,798.1
						平均值	27,628.4
						SD	6,361.7
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F9	18	20mg/kg	F	6h	52.7
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F10	18	20mg/kg	F	6h	33.1
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F11	18	20mg/kg	F	6h	69.4
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F12	18	20mg/kg	F	6h	47.3
						平均值	50.6
						SD	15.0
六聚体 XD-10639	1ng/mL	F9	18	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
六聚体	1ng/mL	F10	18	20mg/kg	F	7 天	BLOQ

[1003]

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
XD-10639							
六聚体	1ng/mL	F11	18	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
XD-10639							
六聚体	1ng/mL	F12	18	20mg/kg	F	7 天	3.4
XD-10639							
						平均值	BLOQ
						SD	n.a.
七聚体	1ng/mL	G1	19	20mg/kg	F	5min	189,155.8
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G2	19	20mg/kg	F	5min	203,092.8
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G3	19	20mg/kg	F	5min	227,234.0
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G4	19	20mg/kg	F	5min	266,250.0
XD-10640							
						平均值	221,433.2
						SD	33,765.8
七聚体	1ng/mL	G5	20	20mg/kg	F	30min	123,590.6
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G6	20	20mg/kg	F	30min	119,556.1
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G7	20	20mg/kg	F	30min	120,686.6
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G8	20	20mg/kg	F	30min	142,606.4
XD-10640							
						平均值	126,609.9
						SD	10,798.9
七聚体	1ng/mL	G1	19	20mg/kg	F	1h	73,022.3
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G2	19	20mg/kg	F	1h	58,856.0
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G3	19	20mg/kg	F	1h	64,204.3
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G4	19	20mg/kg	F	1h	74,596.0
XD-10640							
						平均值	67,669.7
						SD	7,445.7
七聚体	1ng/mL	G5	20	20mg/kg	F	2h	13,907.3
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G6	20	20mg/kg	F	2h	12,667.2
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G7	20	20mg/kg	F	2h	17,123.0
XD-10640							
七聚体	1ng/mL	G8	20	20mg/kg	F	2h	24,537.2

[1004]

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
XD-10640							
						平均值	17,058.7
						SD	5,327.6
七聚体 XD-10640	1ng/mL	G9	21	20mg/kg	F	6h	45.5
七聚体 XD-10640	1ng/mL	G10	21	20mg/kg	F	6h	151.3
七聚体 XD-10640	1ng/mL	G11	21	20mg/kg	F	6h	56.1
七聚体 XD-10640	1ng/mL	G12	21	20mg/kg	F	6h	58.7
						平均值	77.9
						SD	49.3
七聚体 XD-10640	1ng/mL	G9	21	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
七聚体 XD-10640	1ng/mL	G10	21	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
七聚体 XD-10640	1ng/mL	G11	21	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
七聚体 XD-10640	1ng/mL	G12	21	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
						平均值	BLOQ
						SD	n.a.
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H1	22	20mg/kg	F	5min	203,428.1
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H2	22	20mg/kg	F	5min	231,234.5
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H3	22	20mg/kg	F	5min	243,057.5
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H4	22	20mg/kg	F	5min	246,973.6
						平均值	231,173.4
						SD	19,669.6
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H5	23	20mg/kg	F	30min	152,545.2
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H6	23	20mg/kg	F	30min	116,917.0
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H7	23	20mg/kg	F	30min	127,392.7
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H8	23	20mg/kg	F	30min	119,659.9
						平均值	129,128.7
						SD	16,228.9
八聚体	1ng/mL	H1	22	20mg/kg	F	1h	59,270.6

[1005]

分析物 ID	LLOQ	动物 ID	组	剂量水平	性别	时间点	[FVII] ng/mL
XD-10641							
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H2	22	20mg/kg	F	1h	67,819.6
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H3	22	20mg/kg	F	1h	74,942.8
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H4	22	20mg/kg	F	1h	75,228.9
						平均值	69,315.5
						SD	7,522.7
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H5	23	20mg/kg	F	2h	37,353.7
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H6	23	20mg/kg	F	2h	16,390.7
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H7	23	20mg/kg	F	2h	27,527.3
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H8	23	20mg/kg	F	2h	20,359.7
						平均值	25,407.9
						SD	9,201.2
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H9	24	20mg/kg	F	6h	81.2
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H10	24	20mg/kg	F	6h	76.9
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H11	24	20mg/kg	F	6h	162.5
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H12	24	20mg/kg	F	6h	138.5
						平均值	114.8
						SD	42.4
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H9	24	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H10	24	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H11	24	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
八聚体 XD-10641	1ng/mL	H12	24	20mg/kg	F	7 天	BLOQ
						平均值	BLOQ
						SD	n.a.

[1006] [1007] 图37A、图37B、图37C和图37D示出了分别在5分钟、30分钟、60分钟和120分钟时针对FVII多聚体的血清中的FVII siRNA水平的柱状图图形。

[1008] 图38A和图38B示出了针对FVII多聚体的血清中的总FVII siRNA水平,所述总FVII siRNA水平以曲线下面积表示,单位为ng*min/mL,并归一化为单体AUC值。

[1009] 表18:FVII siRNA单体和多聚体的曲线下面积值。

	单体	二聚体	三聚体	四聚体	五聚体	六聚体	七聚体	八聚体
[1010]	5 34,245.0	82272	155182	185882	217903	227496	221433	231173
	30 3,165.0	6302	16889	85180	91357	133832	126609	129128
	60 1,364.0	2460	4779	26102	48935	73257	67669	69315
	120 307.0	1043	612	9471	21656	27268	17058	25407
	360 6.6	625	20	86	23.9	50.6	77	115
	总 AUC (min*ng/mL)	621727	1604630	2713490	7271583	10689448	13420917	11862813
	AUC, 归一化为单体	1.0	2.6	4.4	11.7	17.2	21.6	21.5

[1011] 根据以下方程式使用非线性单相衰减从FVII浓度数据计算多聚体的血清半衰期:

$$Y = (Y_0 - \text{平台期}) * \exp(-k*x) + \text{平台期}$$

[1013] 其中Y为时间X时的浓度,并且半衰期是2/k的自然对数。关于初始和最终条件的4种不同假设适用如下:

[1014] 1:未作出关于数据的假设

[1015] 2:所有siRNA以相同的初始浓度注射(即,对于所有siRNA, t=0时的浓度是相同的)。

[1016] 3:在t=无穷大时,所有siRNA浓度均衰减至0。

[1017] 4:所有siRNA以相同的初始浓度注射(即,对于所有siRNA, t=0时的浓度是相同的),并且在t=无穷大时,所有siRNA浓度均衰减至0。

[1018] 表19:FVII siRNA同源多聚体的计算的血清半衰期。

	单体	二聚体	三聚体	四聚体	五聚体	六聚体	七聚体	八聚体
[1019]	半衰期, 未作出假设(min)	7.10	6.10	7.63	20.82	20.65	29.1	31.66
	半衰期, 所有样品处于平台期直到0(min)	7.37	6.59	7.93	21.23	23.38	31.50	31.62
	半衰期, 所有样品以相同的初始值=231173开始	1.80	3.61	8.39	19.29	24.21	33.65	35.07
	半衰期, 所有样品以相同的初始值=123173开始, 并且处于平台期直到0(min)	1.81	3.68	8.45	19.88	25.83	34.72	34.39

[1020] 实施例38:FVII siRNA同源多聚体达到与单体在5分钟时相同的FVII siRNA浓度

所需的时间计算。

[1021] 因为单体的FVII浓度已经显著小于在第一样品时间(5分钟)时注射的50%，所以还使用以下方程式计算多聚体的血清FVII水平等于单体在5分钟时的血清FVII水平所需的时间：

$$[1022] Y = (Y_0 - \text{平台期}) * \exp(-k*x) + \text{平台期}$$

[1023] 其中平台期被设定为单体在5分钟时的浓度(34,245ng/ml)，并且如图39所示。

[1024] 进行以下计算以确定FVII siRNA同源多聚体达到单体在5分钟时的FVII siRNA的浓度所需的时间(单位为分钟)：

$$[1025] Y = (Y_0 - \text{平台期}) * \exp(-k*x) + \text{平台期}, \text{其中 } x \text{ 为时间(单位为分钟)}$$

$$[1026] 34245 = (231173 - 0) * e^{-kx} + 0, \text{其中 } x \text{ 为分钟数}$$

$$[1027] 34245 = 231173 * e^{-kx}$$

$$[1028] 0.14813453 = e^{-kx}$$

$$[1029] \ln(0.14813453) = kx$$

$$[1030] -1.909625779 = kx$$

[1031] 表20:FVII siRNA同源多聚体达到单体在5分钟时的FVII siRNA的浓度所需的时间。

[1032]

	单体	二聚体	三聚体	四聚体	五聚体	六聚体	七聚体	八聚体
不同构建体的k值	0.3819	0.1882	0.08203	0.03487	0.02683	0.01996	0.02015	0.019
时间(min)	5.0	10.1	23.3	54.8	71.2	95.7	94.8	100.5

序列表

<110> MPEG LA有限责任公司 (MPEG LA, LLC)

<120> 具有降低的肾清除的多聚体寡核苷酸

<130> 116244-604

<140>

<141>

<150> 62/561,853

<151> 2017-09-22

<150> 62/522,363

<151> 2017-06-20

<150> 62/455,231

<151> 2017-02-06

<160> 155

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 1

gcaaaggcggu gccaacucat 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 2

gcaaaggcggu gccaacucat 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 3
gcaaaggcgu gccaacucat 20
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 4
gcaaaggcgu gccaacucat 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 5
gcaaaggcgu gccaacucat 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 6

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 7

ugaguuggca cgccuuugcu ut 22

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 8

ugaguuggca cgccuuugcu u 21

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 9

ugaguuggca cgccuuugcu u 21

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 10
cuauuuggag agaaaaucgat 20
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 11
cuauuuggag agaaaaucgat 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 12
cuauuuggag agaaaaucgat 20
<210> 13
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 13

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 14

guaagacuug agaaugaucct t 21

<210> 15

<400> 15

000

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 16

gcaaaggcggu gccaacucat t 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 17

ugaguuggca cgccuuugct t 21

<210> 18

<400> 18

000

<210> 19

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 19

ggaauuuau auuugaucca a 21

<210> 20

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 20

uuggaucaaa uauaagauuc ccu 23

<210> 21

<400> 21

000

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 22

cuuacgcuga guacuucgat t 21

〈210〉 23

〈211〉 21

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 23

ucgaaguacu cagcguagt t 21

〈210〉 24

〈400〉 24

000

〈210〉 25

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 25

gcaaaggcgu gccaacucat 20

〈210〉 26

〈211〉 21

〈212〉 RNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 26

ugaguguaggca cgccuuugcu u 21

<210> 27

<400> 27

000

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 28

cuauuuggag agaaaucgat 20

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 29

ucgauuuucuc uccaaauagu u 21

<210> 30

<400> 30

000

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 31

aacaguguuc uugcucuaua at 22

<210> 32

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 32

uuauaugagca agaacacugu uuu 23

<210> 33

<400> 33

000

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 34

gcaaaggcggu gccaacucat 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 35

gcaaaggcggu gccaacucat 20

<210> 36
<400> 36
000
<210> 37
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 37
ggaaucuuau auuugaucca a 21
<210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 38
ggaucaucuc aagucuuact t 21
<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 39
gcaaaggcggu gccaacucat 20
<210> 40
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 40

ugaguuggca cgccuuugcu u 21

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 41

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 42

<400> 42

000

<210> 43

<400> 43

000

<210> 44

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 44

uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 45

aacaguguuc uugcucuaua at 22

〈210〉 46

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 46

gcaaaggcgu gccaacucat 20

〈210〉 47

〈211〉 23

〈212〉 RNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 47

uuauagagca agaacacugu uuu 23

〈210〉 48

〈211〉 22

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 48

aacaguguuc uugcucuaua at 22

<210> 49
<400> 49
000
<210> 50
<400> 50
000
<210> 51
<400> 51
000
<210> 52
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 52
gcaaaggcg gccaacucat 20
<210> 53
<400> 53
000
<210> 54
<400> 54
000
<210> 55
<400> 55
000
<210> 56
<400> 56
000
<210> 57
<400> 57
000
<210> 58
<400> 58
000

<210> 59

<400> 59

000

<210> 60

<400> 60

000

<210> 61

<400> 61

000

<210> 62

<400> 62

000

<210> 63

<400> 63

000

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<400> 65

000

<210> 66

<400> 66

000

<210> 67

<400> 67

000

<210> 68

<400> 68

000

<210> 69

<400> 69

000

<210> 70

<400> 70

000

<210> 71

<400> 71

000

<210> 72

<400> 72

000

<210> 73

<400> 73

000

<210> 74

<400> 74

000

<210> 75

<400> 75

000

<210> 76

<400> 76

000

<210> 77

<400> 77

000

<210> 78

<400> 78

000

<210> 79

<400> 79

000

<210> 80

<400> 80

000

<210> 81

<400> 81

000

<210> 82

<400> 82

000

<210> 83

<400> 83

000

<210> 84

<400> 84

000

<210> 85

<400> 85

000

<210> 86

<400> 86

000

<210> 87

<400> 87

000

<210> 88

<400> 88

000

<210> 89

<400> 89

000

<210> 90

<400> 90

000

<210> 91

<400> 91

000

<210> 92

<400> 92

000

<210> 93

<400> 93

000

<210> 94

<400> 94

000

<210> 95

<400> 95

000

<210> 96

<400> 96

000

<210> 97

<400> 97

000

<210> 98

<400> 98

000

<210> 99

<400> 99

000

<210> 100

<400> 100

000

<210> 101

<400> 101

000

<210> 102

<400> 102

000

<210> 103

<400> 103

000

<210> 104

<400> 104

000

<210> 105

<400> 105

000

<210> 106

<400> 106

000

<210> 107

<400> 107

000

<210> 108

<400> 108

000

<210> 109

<400> 109

000

<210> 110

<400> 110

000

<210> 111

<400> 111

000

<210> 112

<400> 112

000

<210> 113

<400> 113

000

<210> 114

<400> 114

000

<210> 115

<400> 115

000

<210> 116

<400> 116

000

<210> 117

<400> 117

000

<210> 118

<400> 118

000

<210> 119

<400> 119

000

<210> 120

<400> 120

000

<210> 121

<400> 121

000

<210> 122

<400> 122

000

<210> 123

<400> 123

000

<210> 124
<400> 124
000
<210> 125
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 125
ggaucaucuc aagucuuact t 21
<210> 126
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 126
guaagacuug agaugaucct t 21
<210> 127
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 127
gcaaaggcggu gccaacucat 20

<210> 128
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 128
ugaguuggca cgccuuugcu u 21
<210> 129
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 129
cuauuuggag agaaaaucgat 20
<210> 130
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 130
ggaucaucuc aagucuuact t 21
<210> 131
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 131

guaagacuug agaugaucct t 21

〈210〉 132

〈211〉 21

〈212〉 RNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 132

ucgauuucuc uccaaauagu u 21

〈210〉 133

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 133

gcaaaggcgu gccaacucat 20

〈210〉 134

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 134

cuauuuggag agaaaucgat 20

<210> 135
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 135
aacaguguuc uugcucuaua at 22
<210> 136
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 136
ucgauuuucuc uccaaauagu u 21
<210> 137
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 137
gcaaaggcgu gccaacucat 20
<210> 138
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 138

gcaaaggcggu gccaacucat 20

〈210〉 139

〈211〉 21

〈212〉 RNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 139

ugaguuggca cgccuuugcu u 21

〈210〉 140

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 140

cuauuuggag agaaaucgat 20

〈210〉 141

〈211〉 21

〈212〉 RNA

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 141

ucgauuuucuc uccaaauagu u 21

〈210〉 142

〈211〉 22

〈212〉 DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 142

aacaguguuc uugcucuaua at 22

<210> 143

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 143

uuauagagca agaacacugu uuu 23

<210> 144

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

<400> 144

cuauuuggag agaaaucgat 20

<210> 145

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<220>

<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 145

aacaguguuc uugcucuaua at 22

〈210〉 146

〈211〉 42

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列 (Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 146

gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc at 42

〈210〉 147

〈211〉 86

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列 (Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 147

gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc atcagcaaag gcgugccaac 60

ucatcagcaa aggcgugcca acucat 86

〈210〉 148

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列 (Artificial Sequence)

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

〈220〉

〈223〉 组合的DNA/RNA分子的描述:合成

寡核苷酸

〈400〉 148

gcaaaggcgu gccaacucat 20
<210> 149
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 149
gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc at 42
<210> 150
<211> 64
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 150
gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc atcagcaaag gcgugccaac 60
ucat 64
<210> 151
<211> 86
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 151
gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc atcagcaaag gcgugccaac 60
ucatcagcaa aggcgugcca acucat 86

<210> 152
<211> 108
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 152
gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc atcagcaaag gcgugccaac 60
ucatcagcaa aggcgugcca acucatcagc aaaggcgugc caacucat 108
<210> 153
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 153
gcaaaggcgu gccaacucat cagcaaaggc gugccaacuc atcagcaaag gcgugccaac 60
ucatcagcaa aggcgugcca acucatcagc aaaggcgugc caacucatca gcaaaggcgu 120
gccaacucat 130
<210> 154
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 154
caguguucuu gcucuauaat t 21

<210> 155
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<220>
<223> 组合的DNA/RNA分子的描述:合成
寡核苷酸
<400> 155
uuauagagca agaacacugt t 21

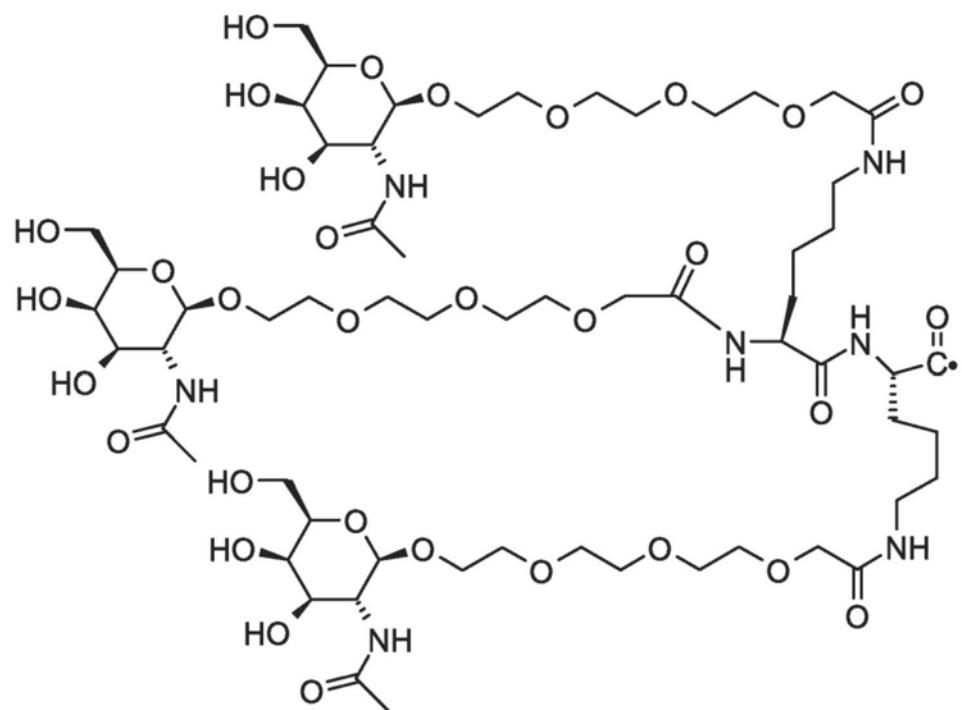


图1A

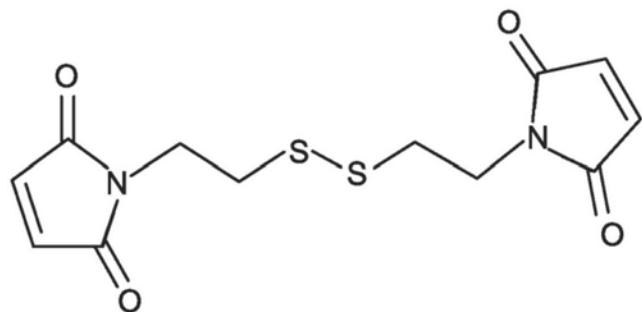


图1B

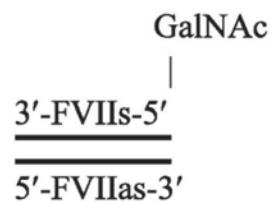


图2

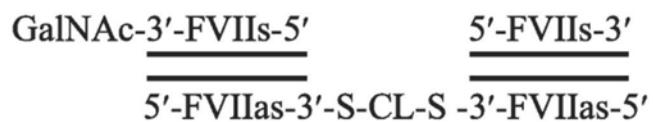


图3

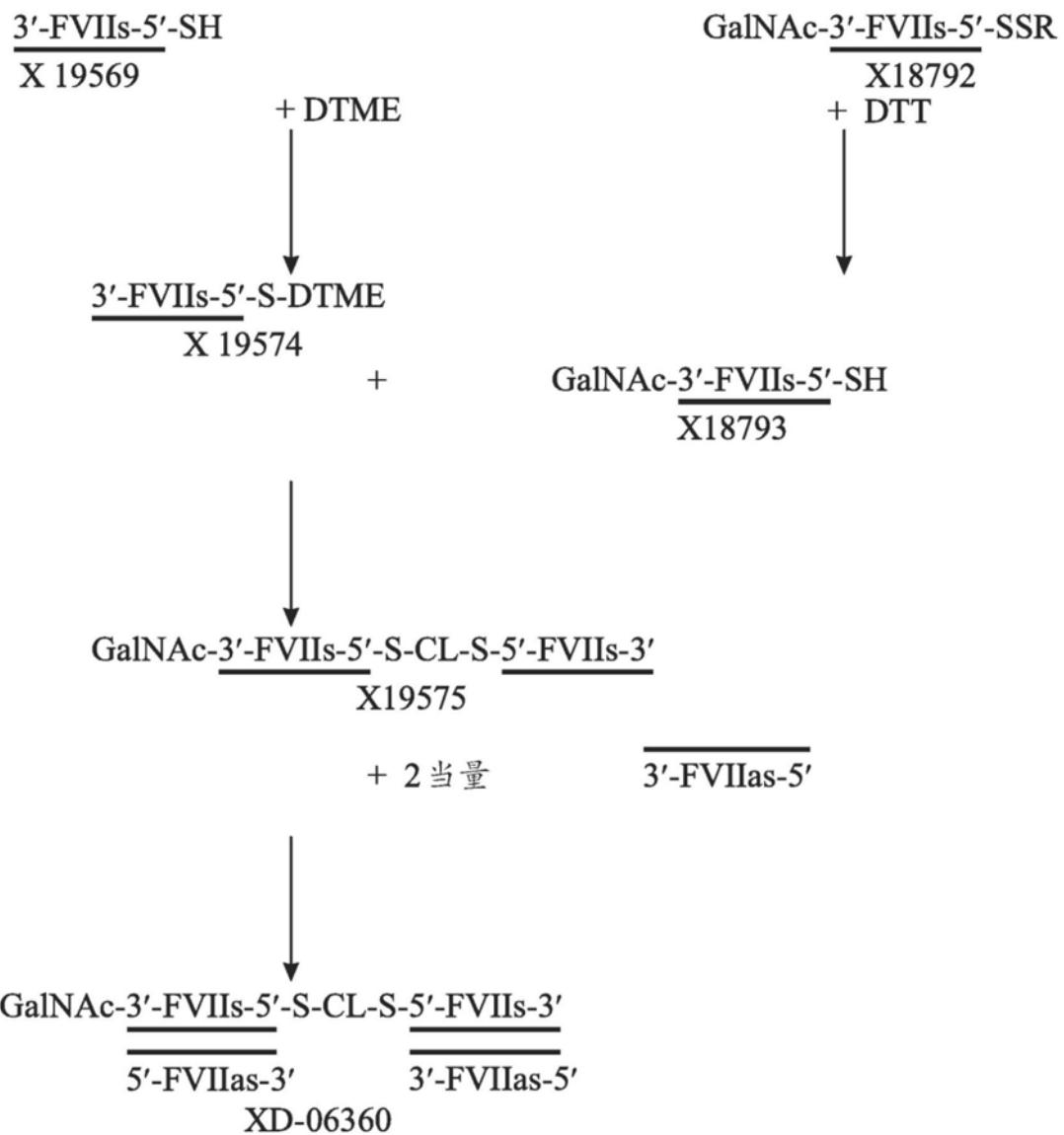


图4

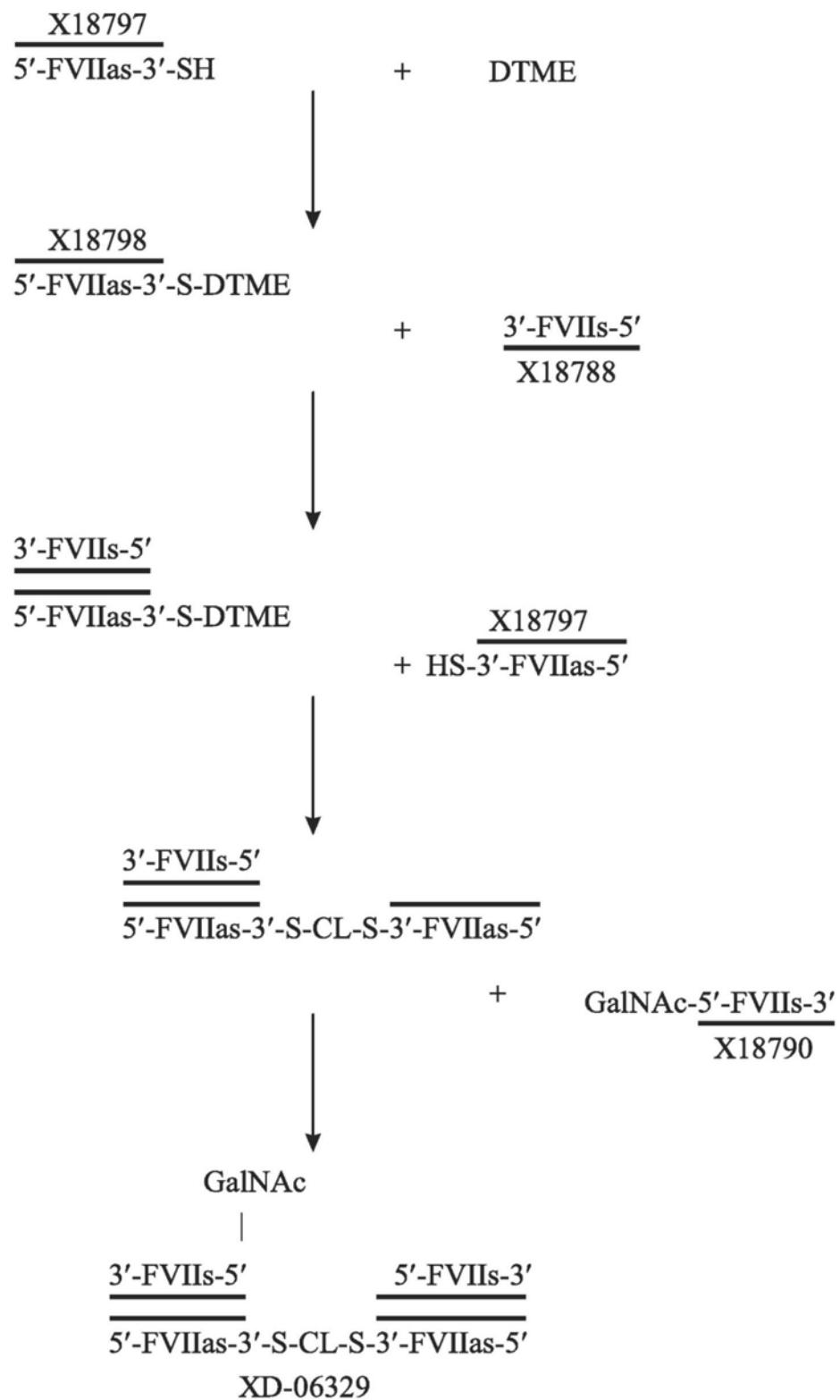


图5

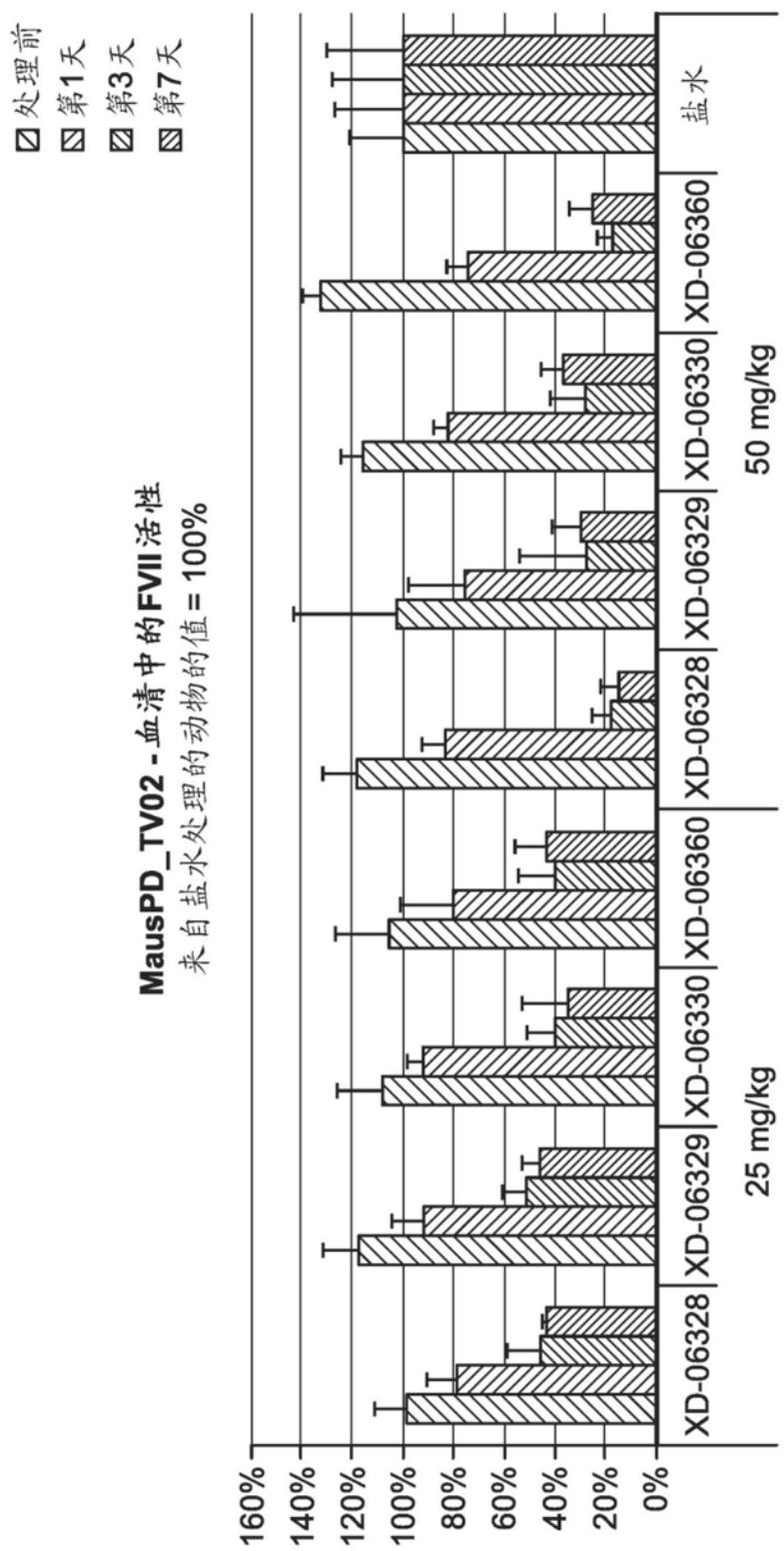


图6

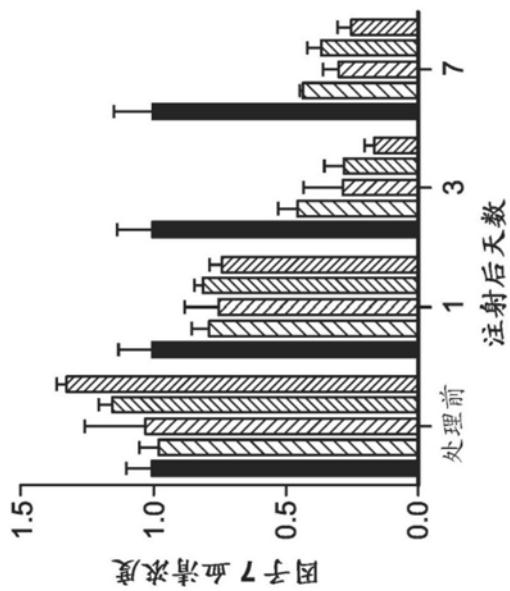


图 7A

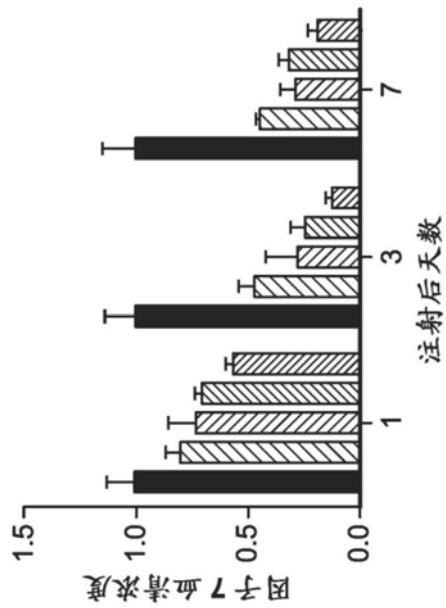


图 7B

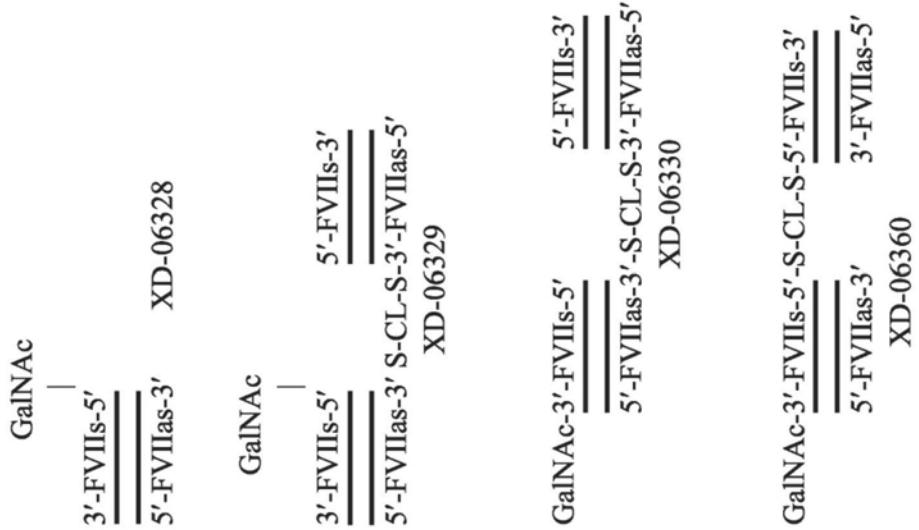


图7C

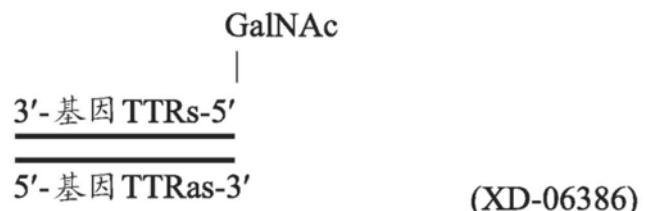
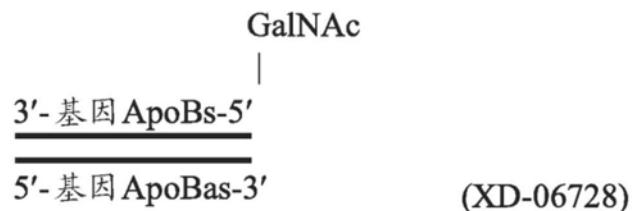
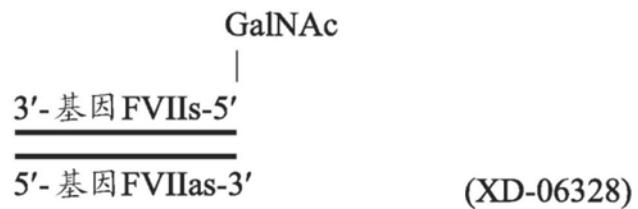


图8

GalNAc-3'-基因 As-5'-S-CL-S-5'-基因 Bs-3'-S-S-5'-基因 Cs-3'
5'-基因 Aas-3' 3'-基因 Bas-5' 3'-基因 Cas-5'

图9

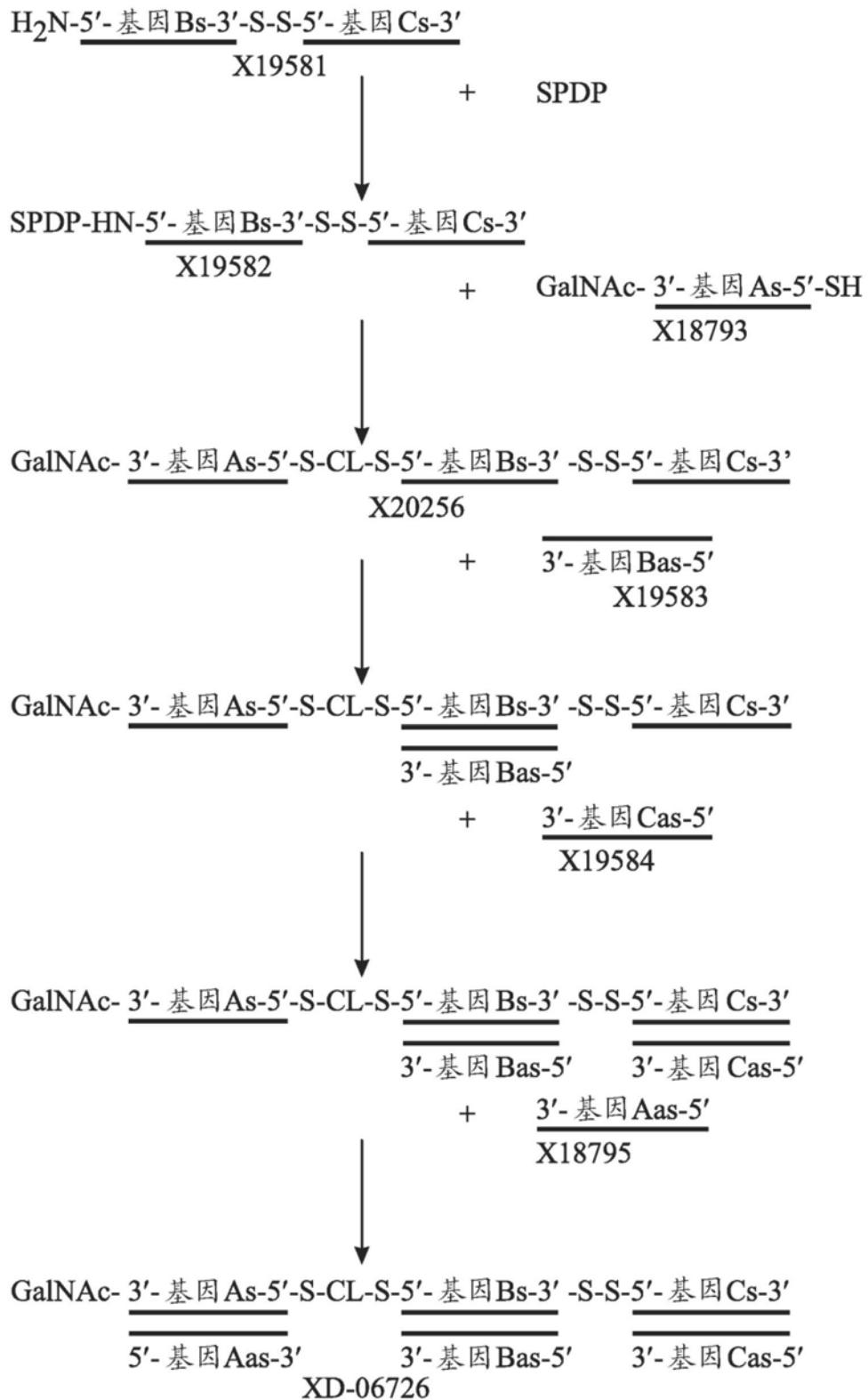


图10

$$\begin{array}{c}
 \text{GalNAc-} \underline{\text{3'-基因 As-5'-S-CL-S-5'}} \text{-基因 Bs-3'} \quad \underline{\text{5'-基因 Cs-3'}} \\
 \underline{\text{5'-基因 Aas-3'}} \quad \underline{\text{3'-基因 Bas-5'-S-S-3'}} \text{-基因 Cas-5'}
 \end{array}$$

图11

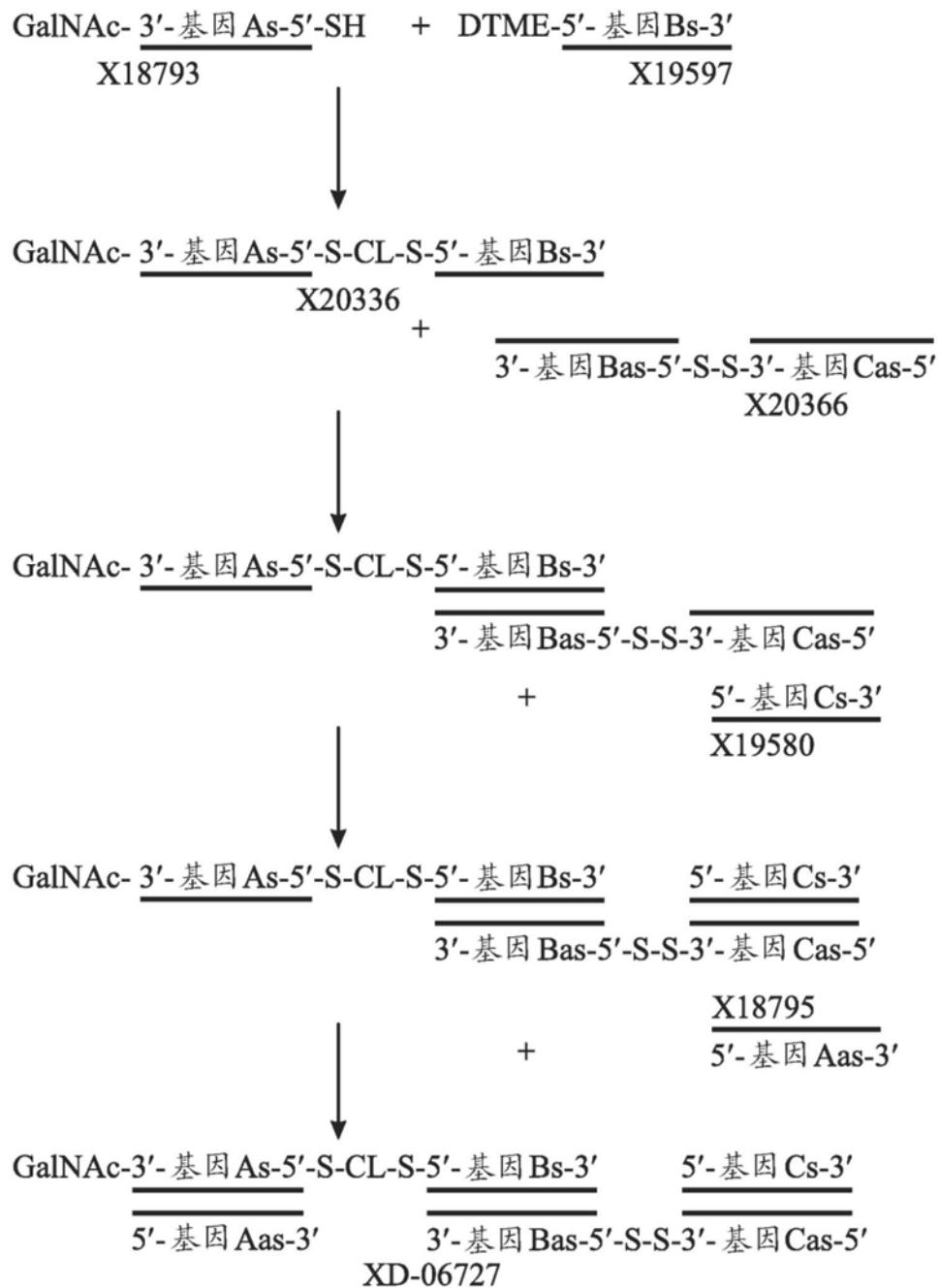


图12

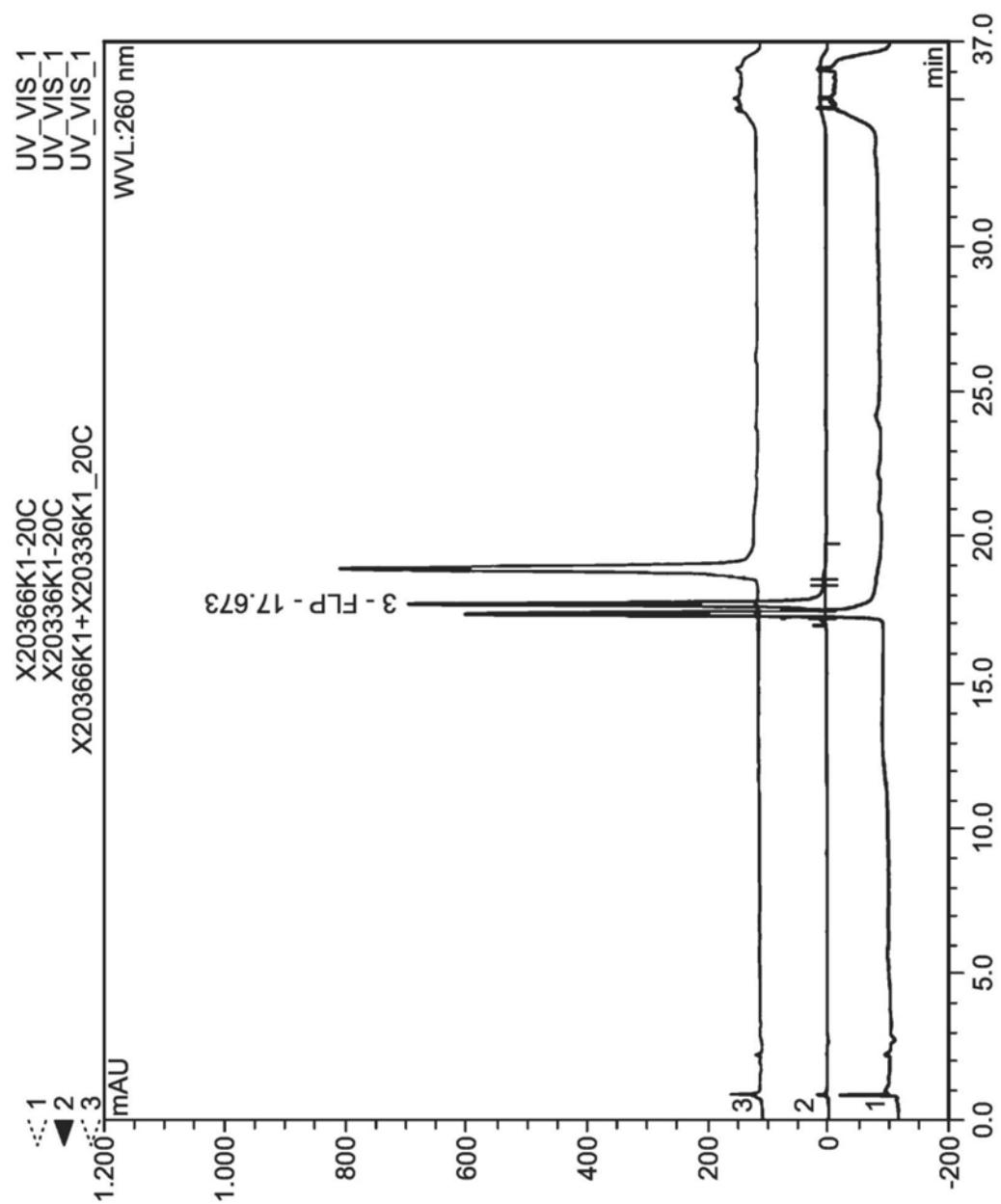


图13

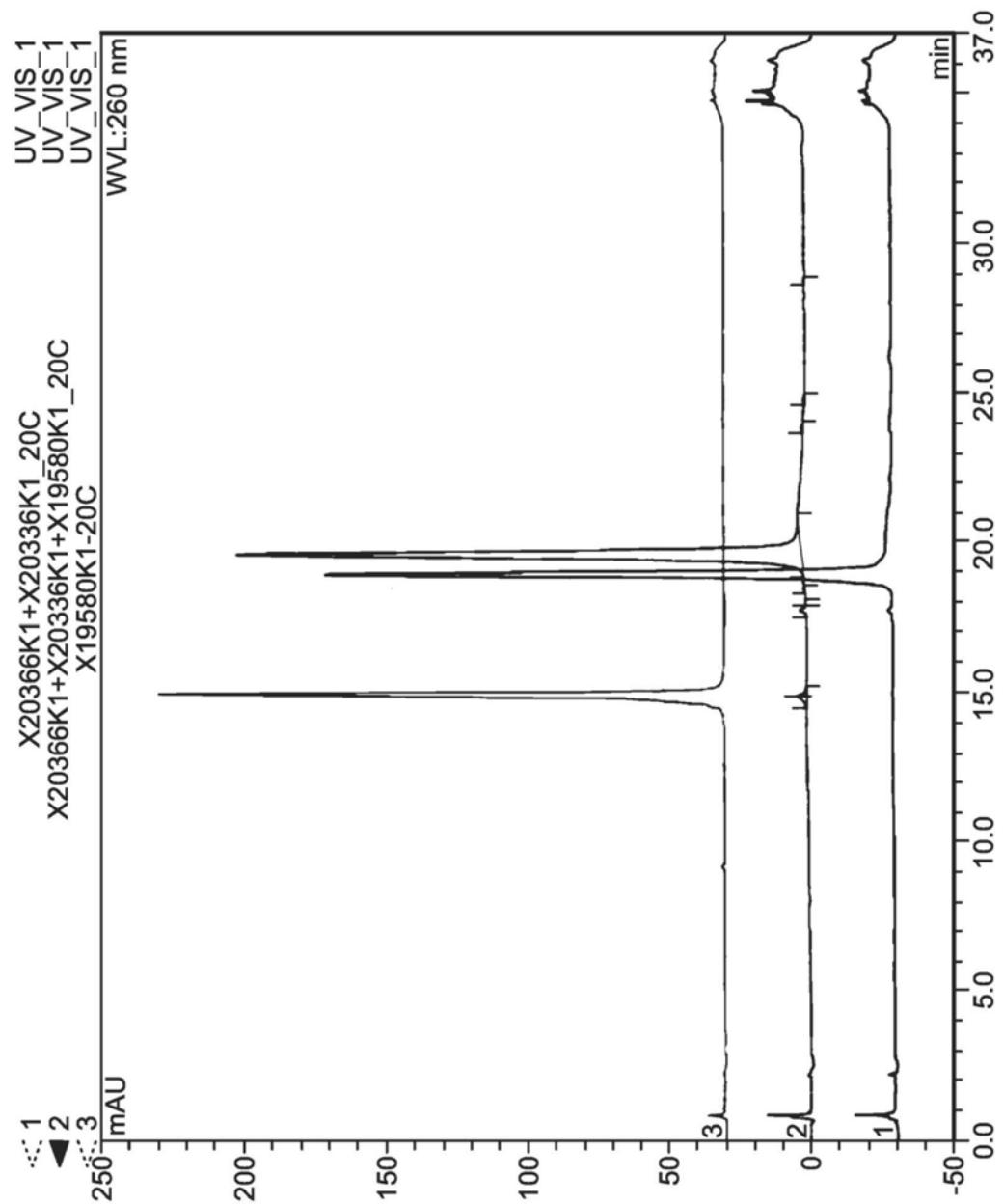


图14

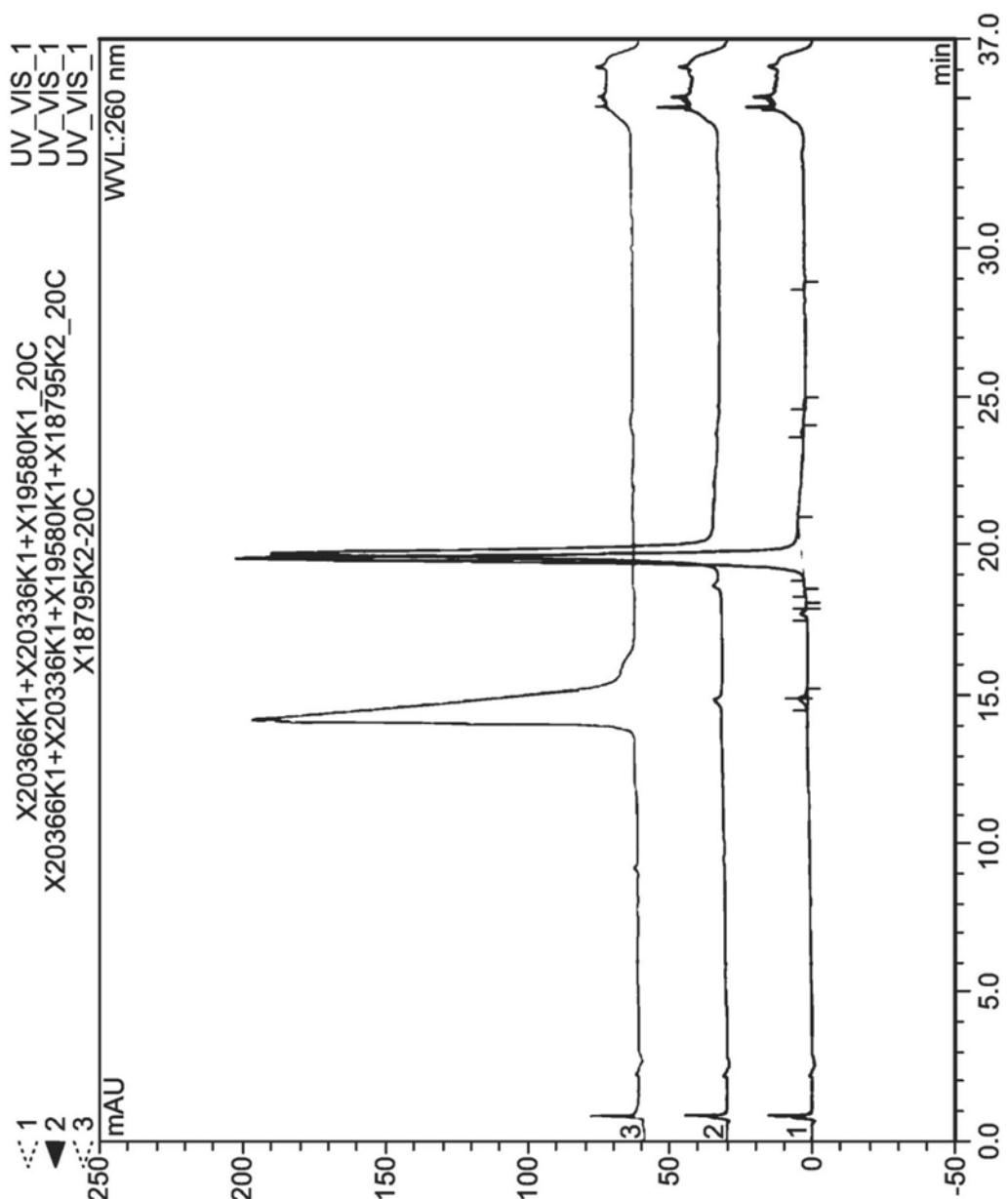


图15

血清中的TTR蛋白水平
已省略动物A3

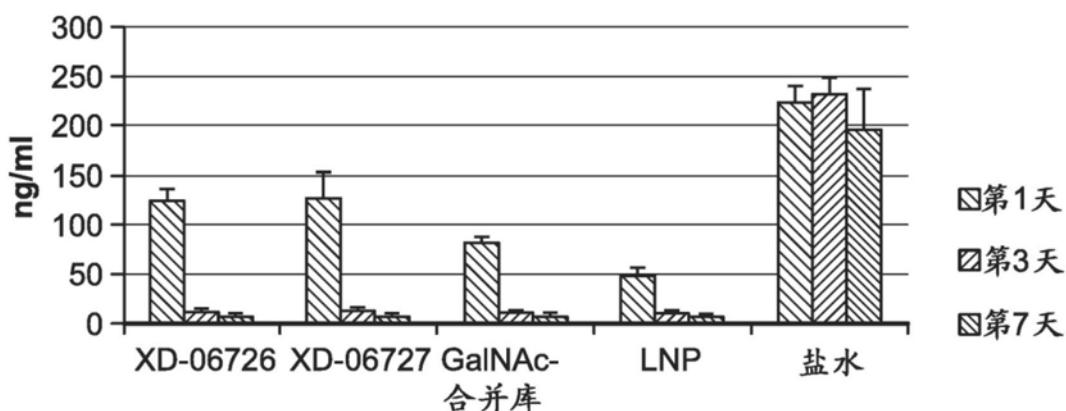


图16A

血清中的TTR蛋白水平

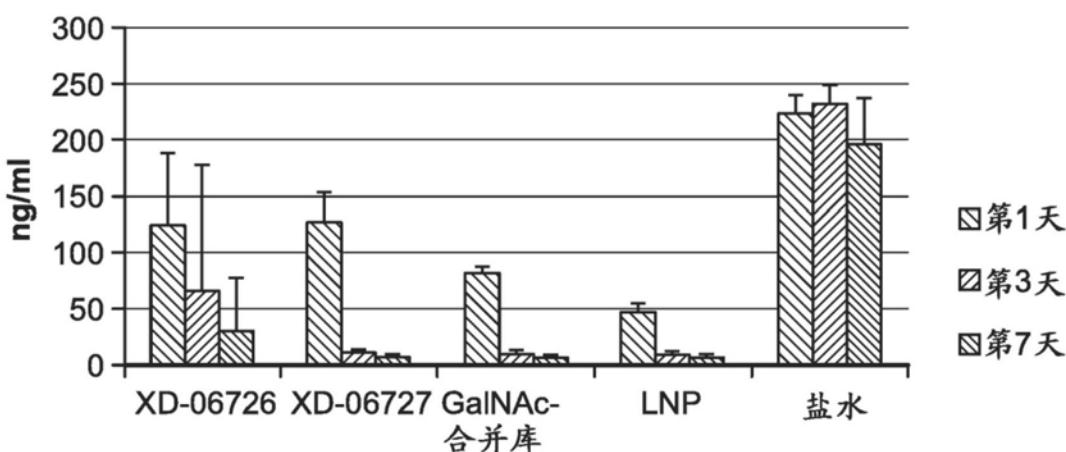


图16B

血清中的 FVII 活性
来自盐水处理的动物的值 = 100%

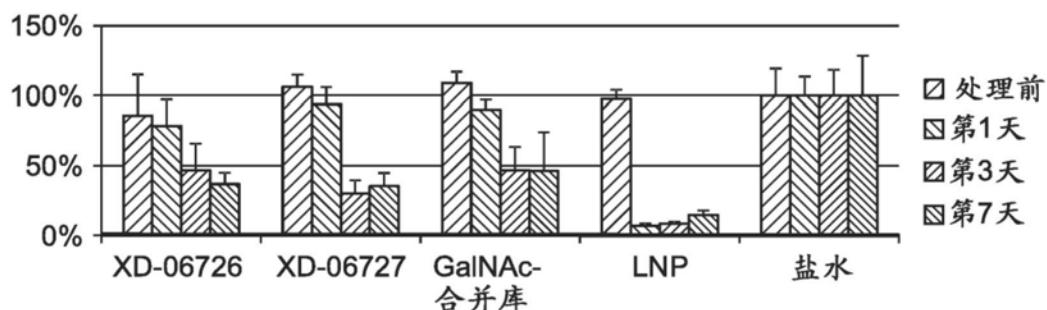


图17A

血清中的 FVII 活性
来自盐水处理的动物的值 = 100%
已省略动物 A3

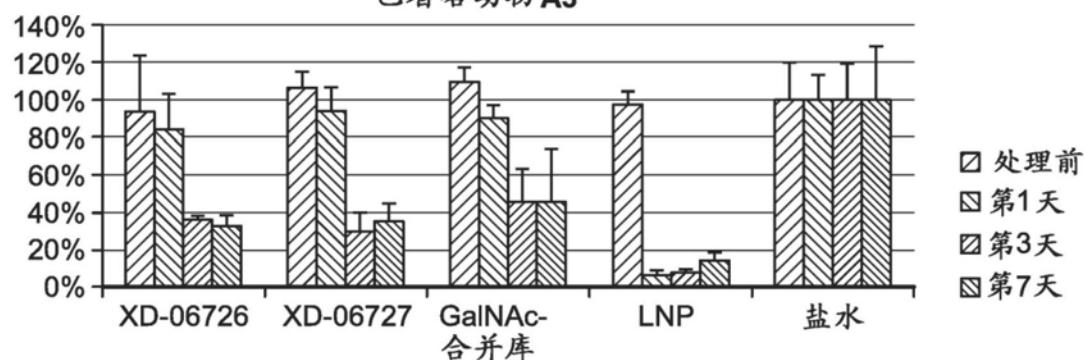


图17B

血清中的 ApoB 蛋白水平

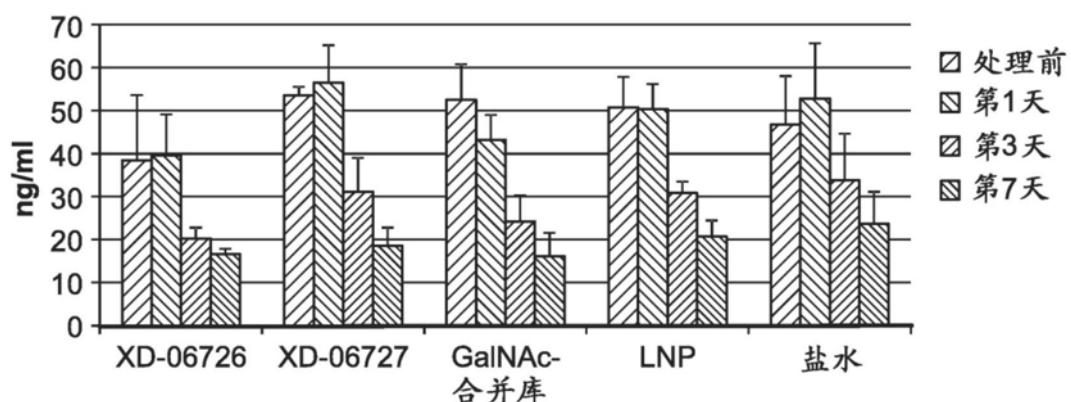


图18A

血清中的 ApoB 蛋白水平
来自盐水处理的动物的值 = 100%

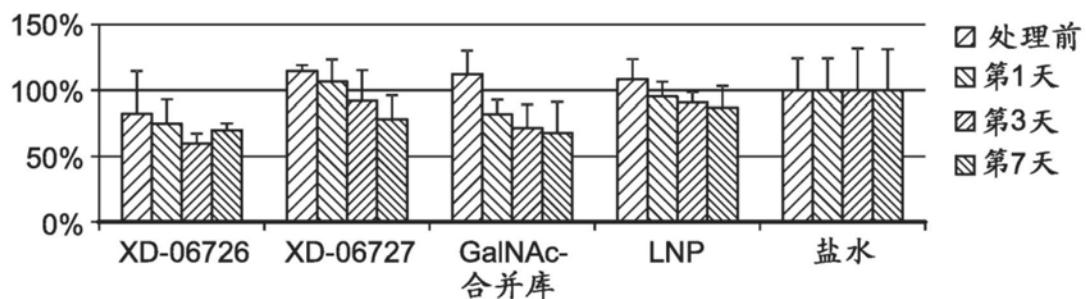


图18B

肝组织中的 mRNA 水平
来自盐水处理的动物的值 = 1

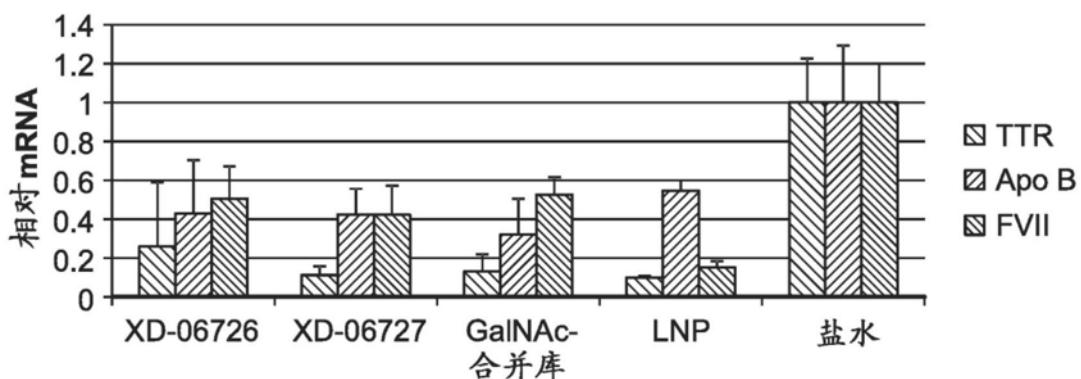


图19A

肝组织中的 mRNA 水平
来自盐水处理的动物的值 = 1
已省略动物 A3

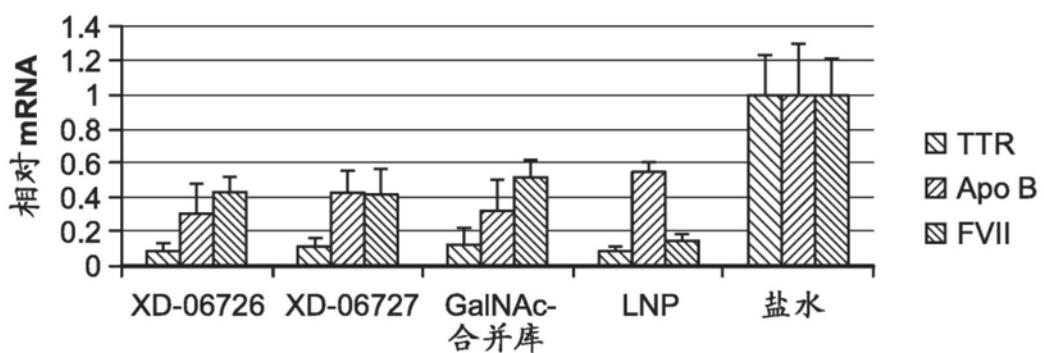


图19B



图20

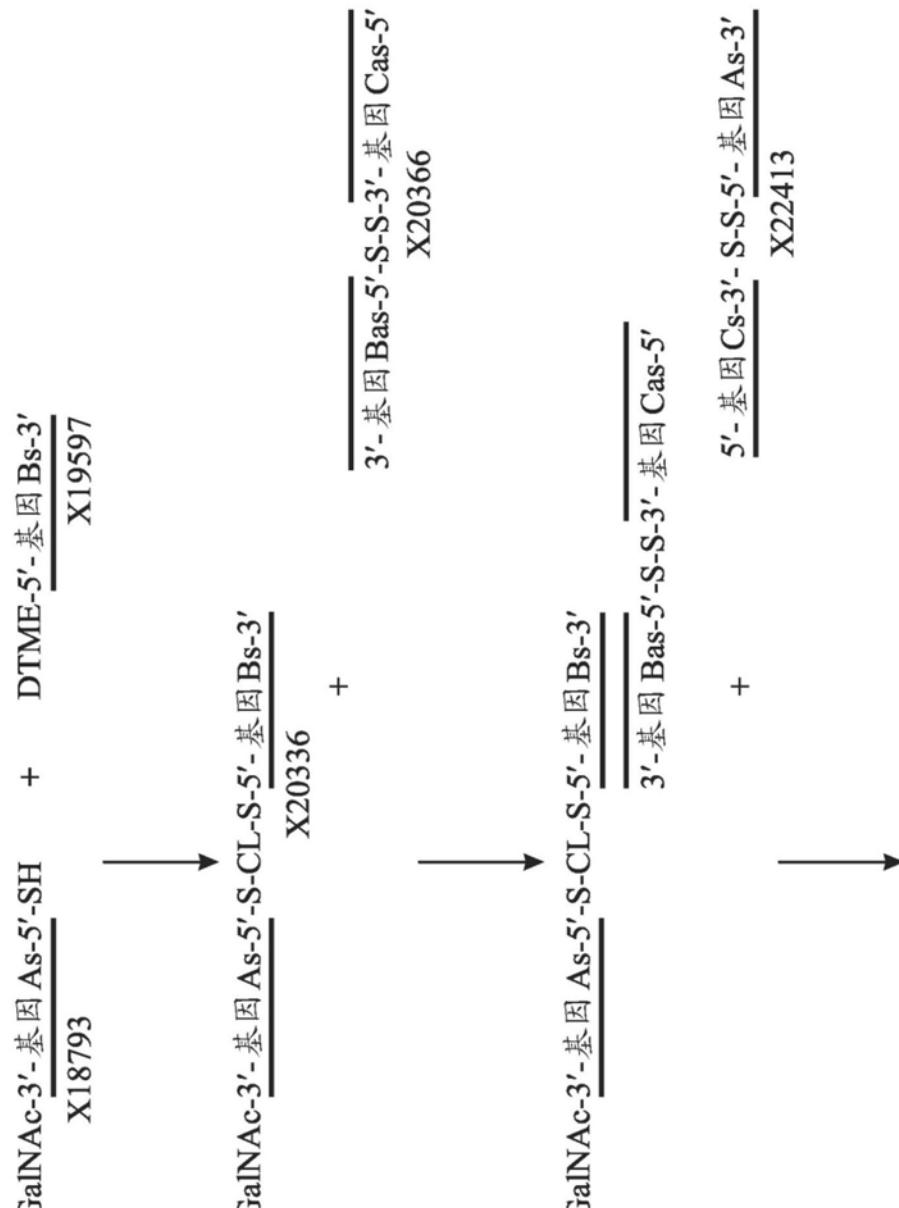


图21

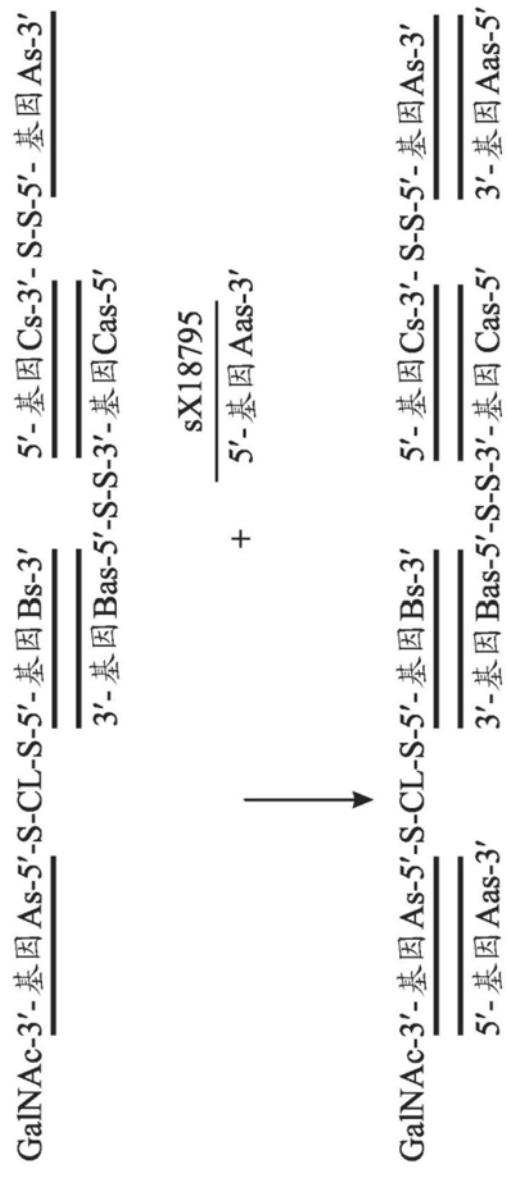


图21 (续)

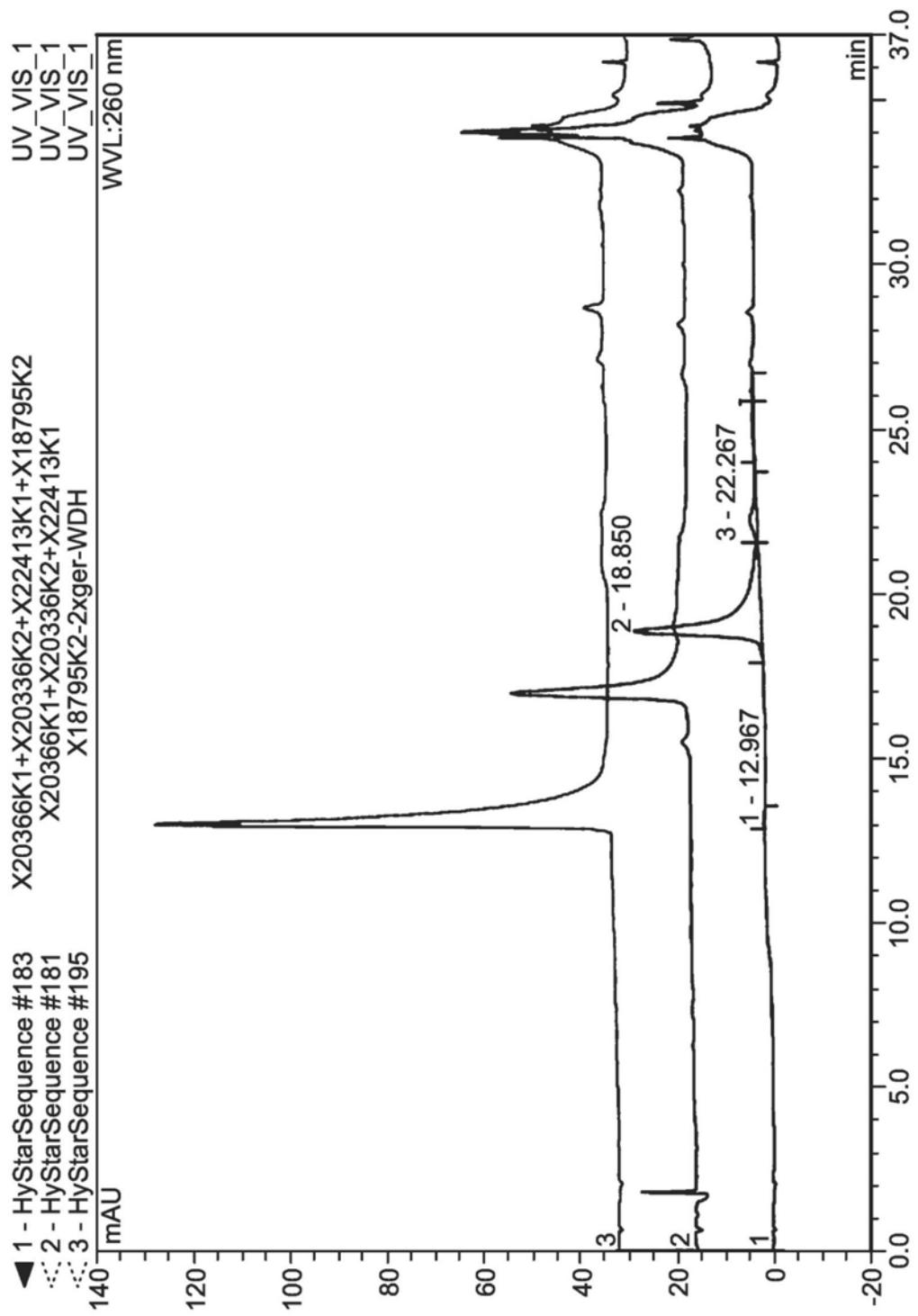


图22

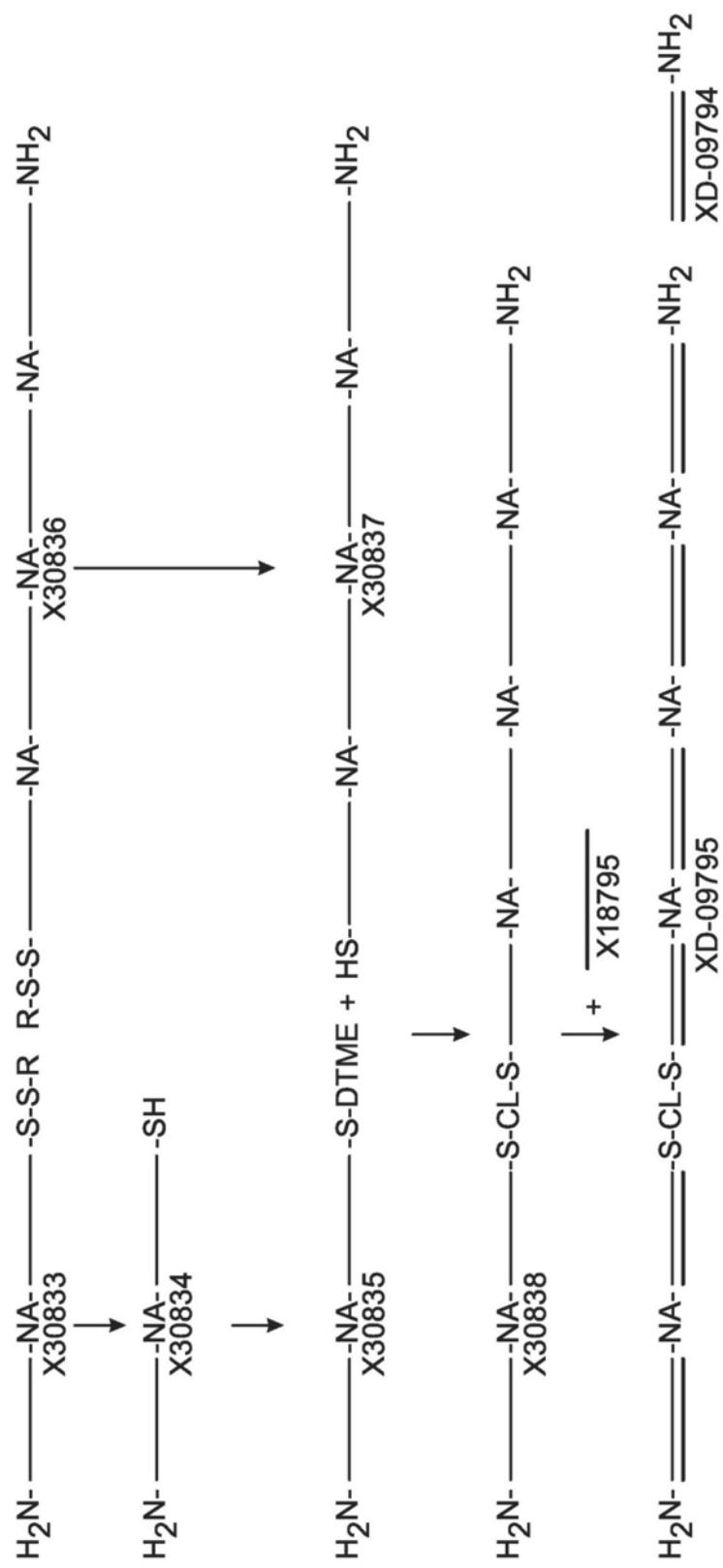


图23

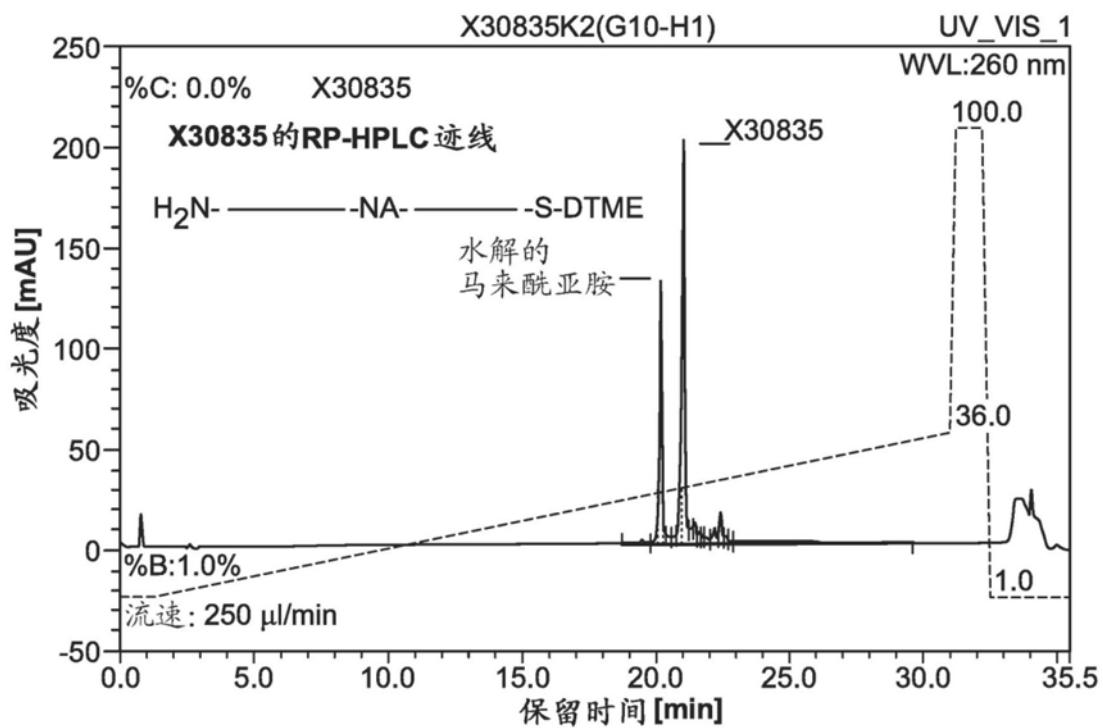


图24A

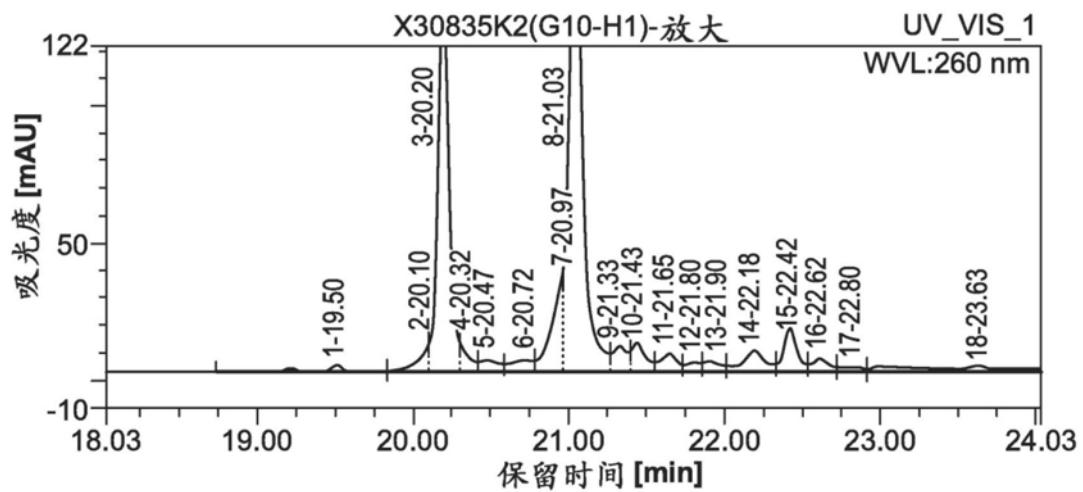


图24B

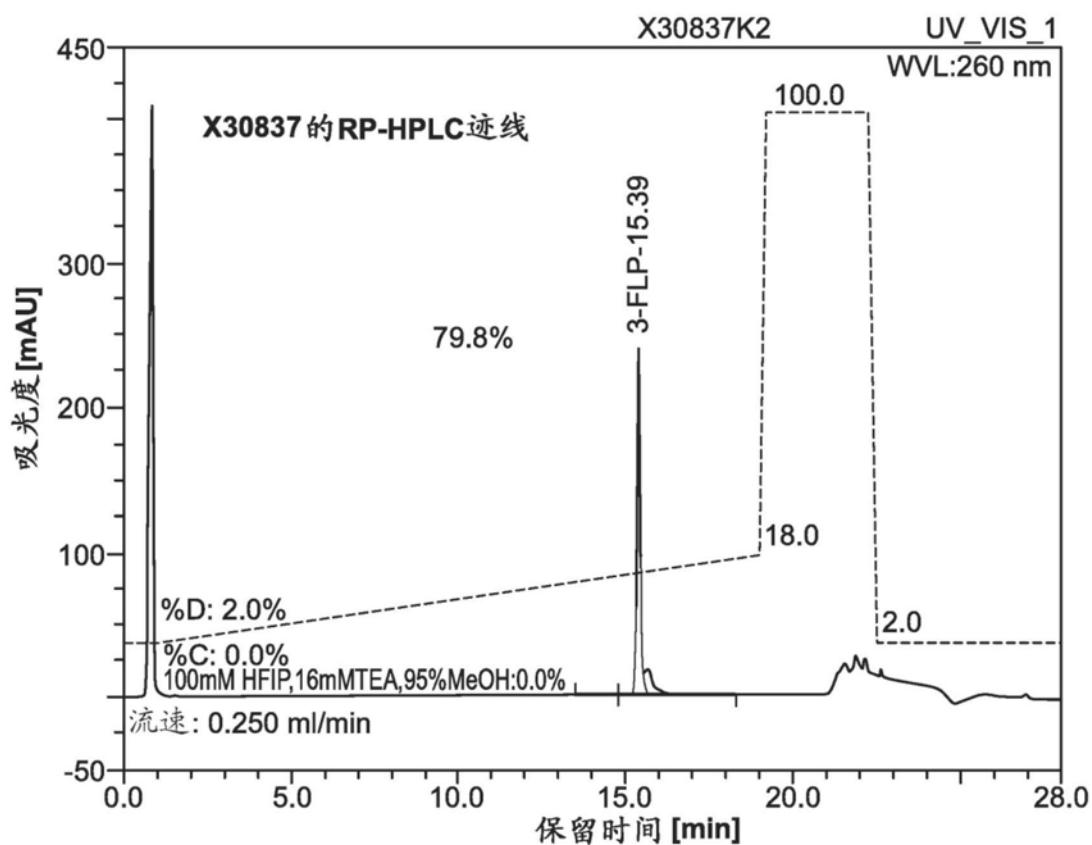


图24C

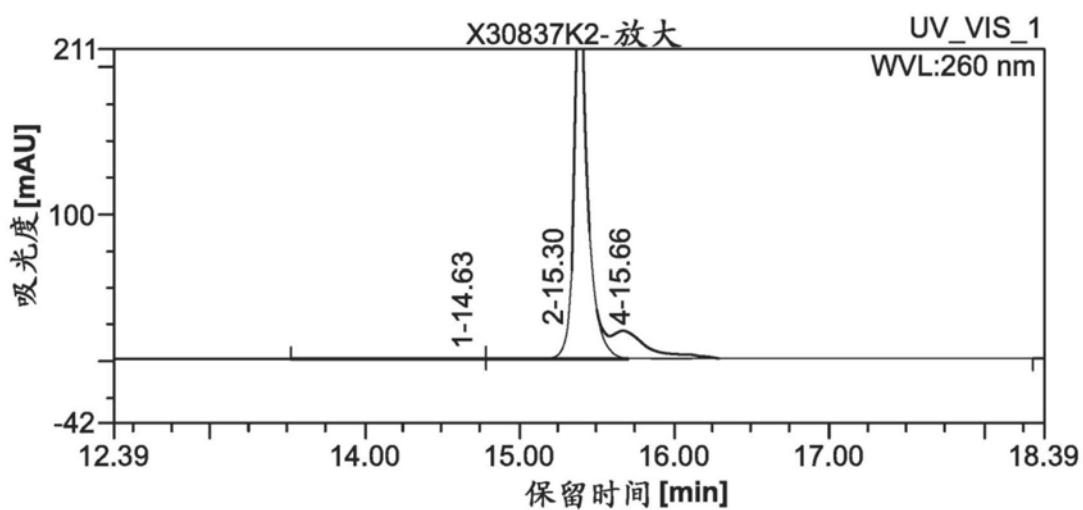


图24D

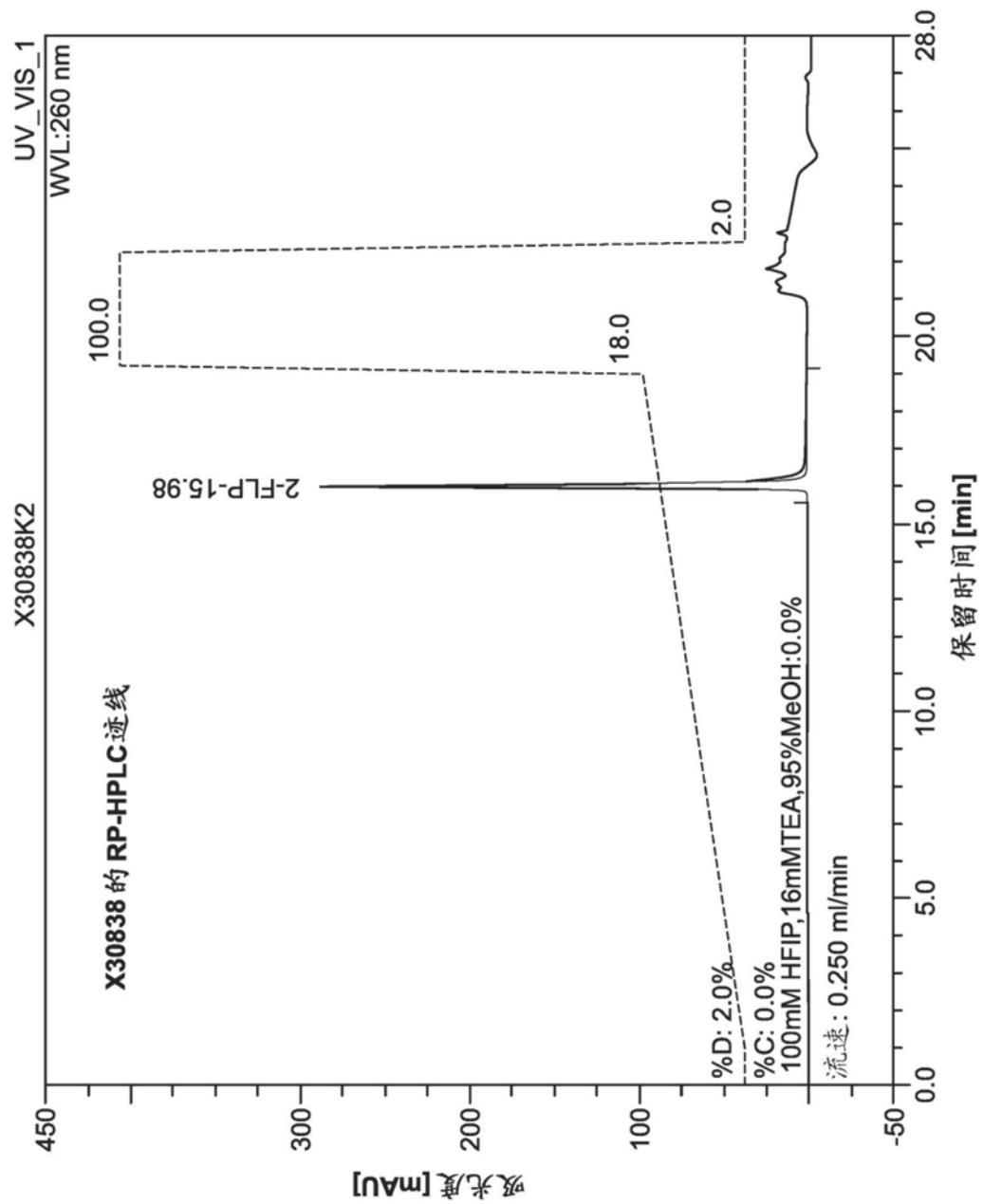
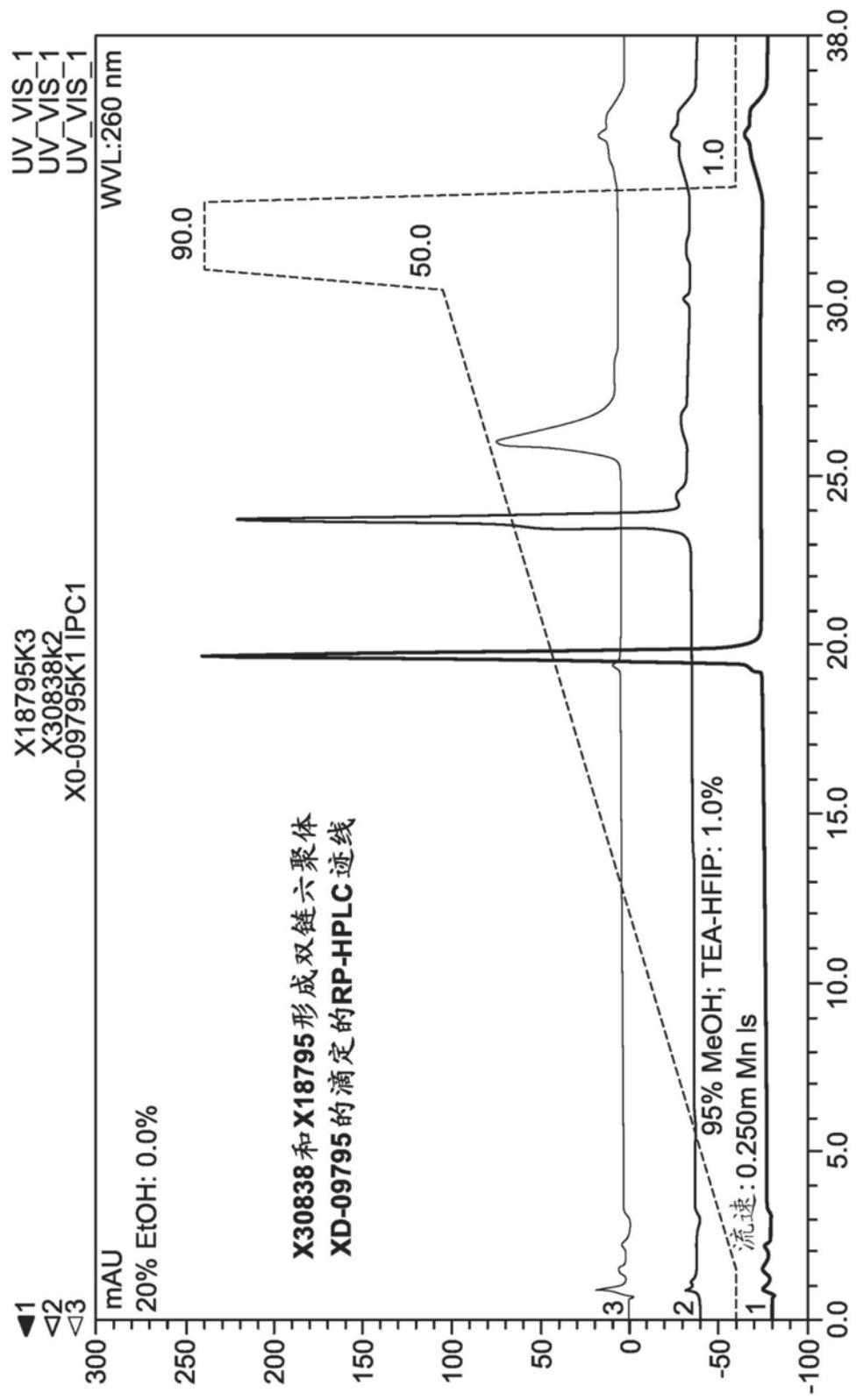


图24E



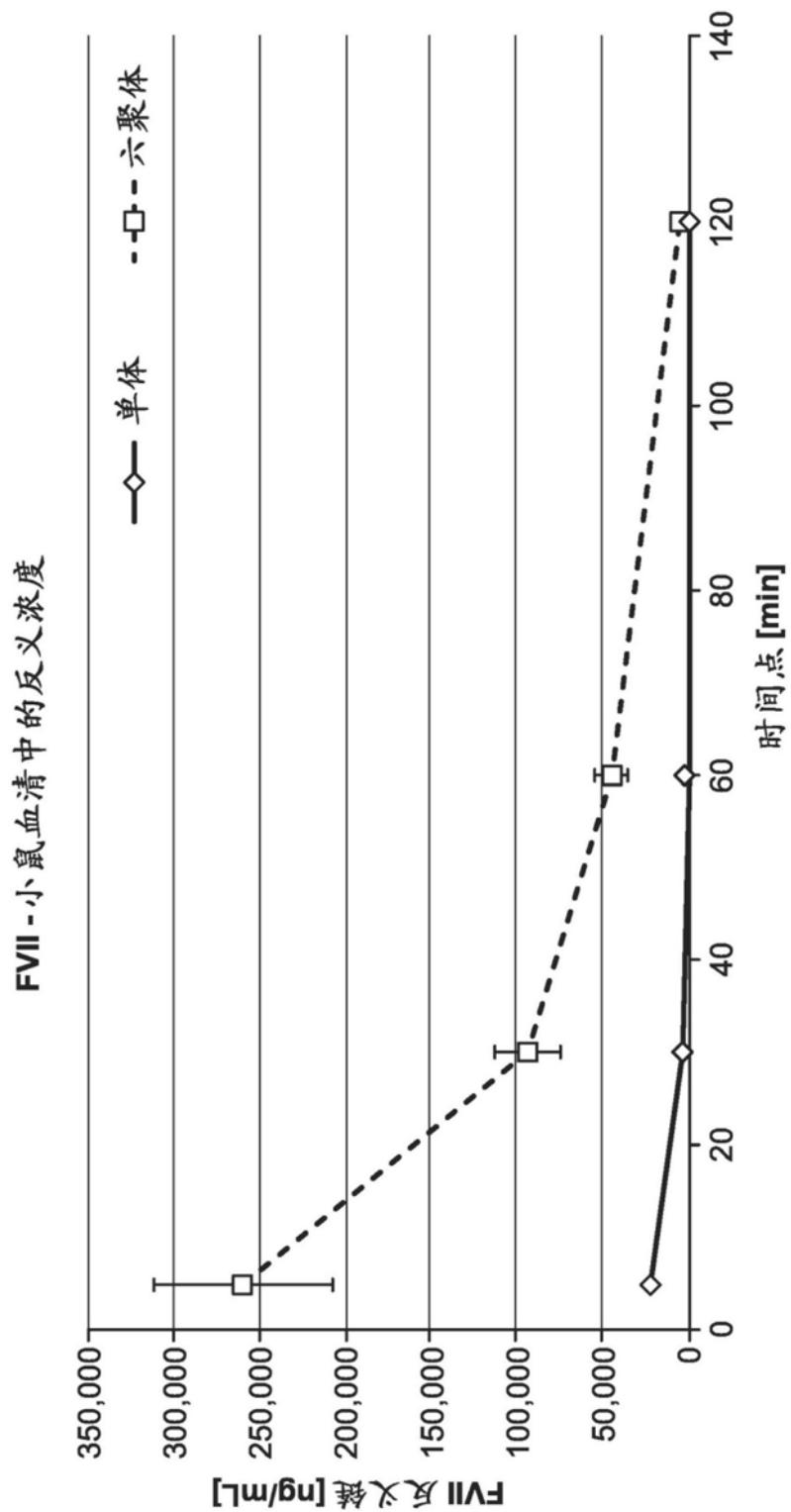


图25

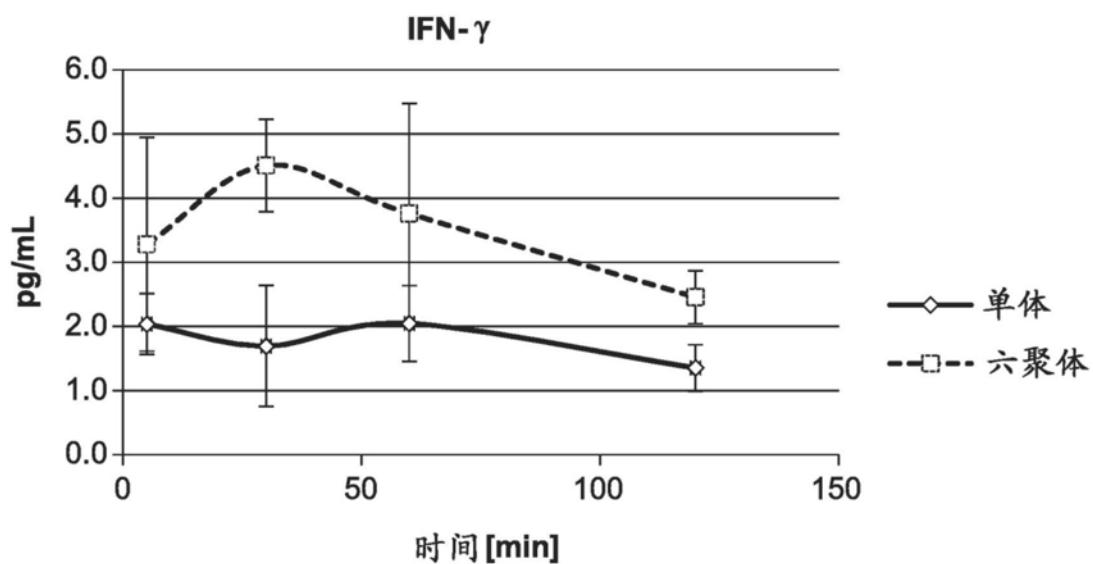


图26A

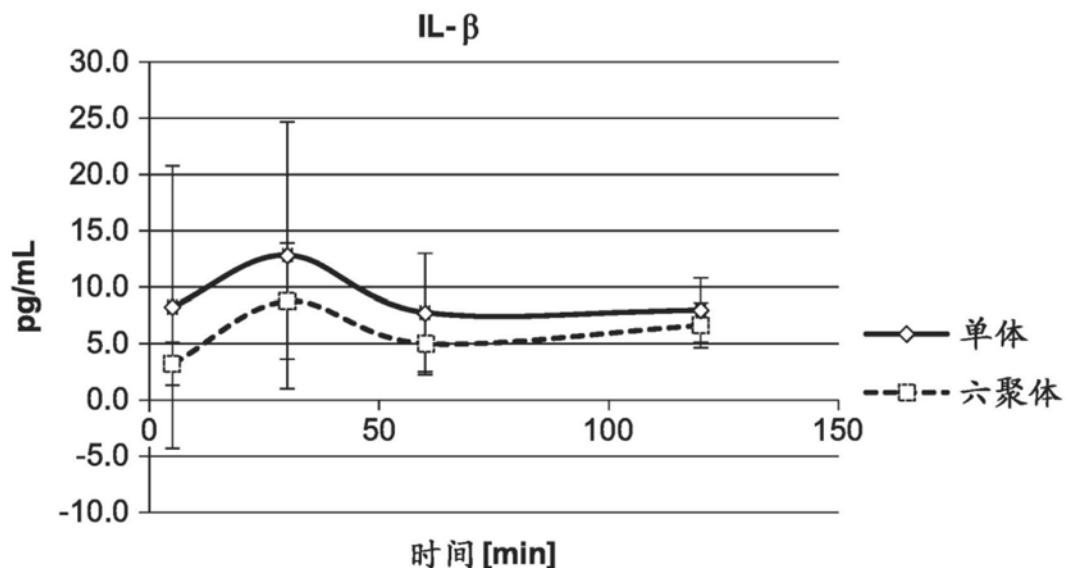


图26B

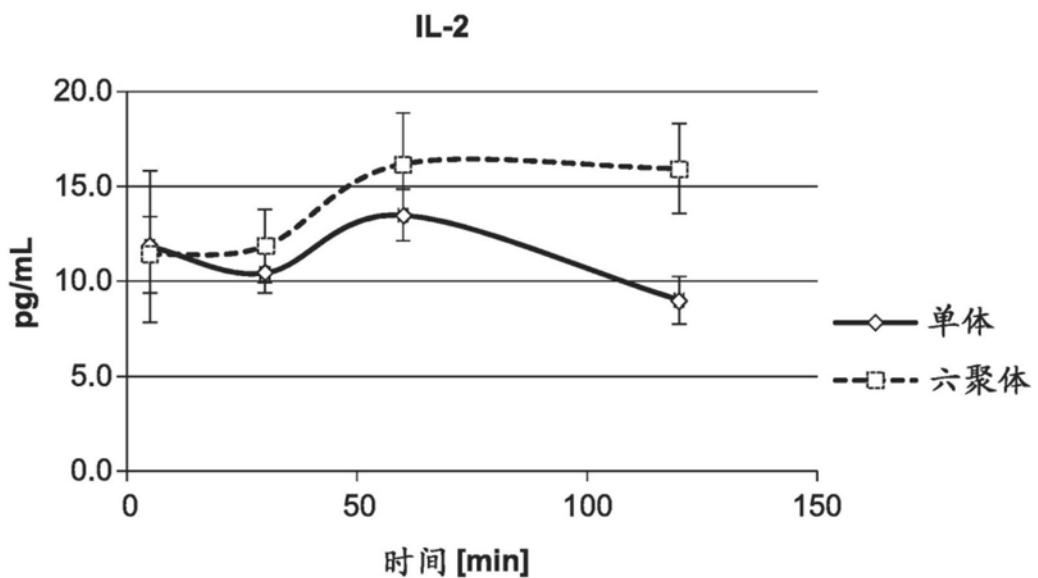


图26C

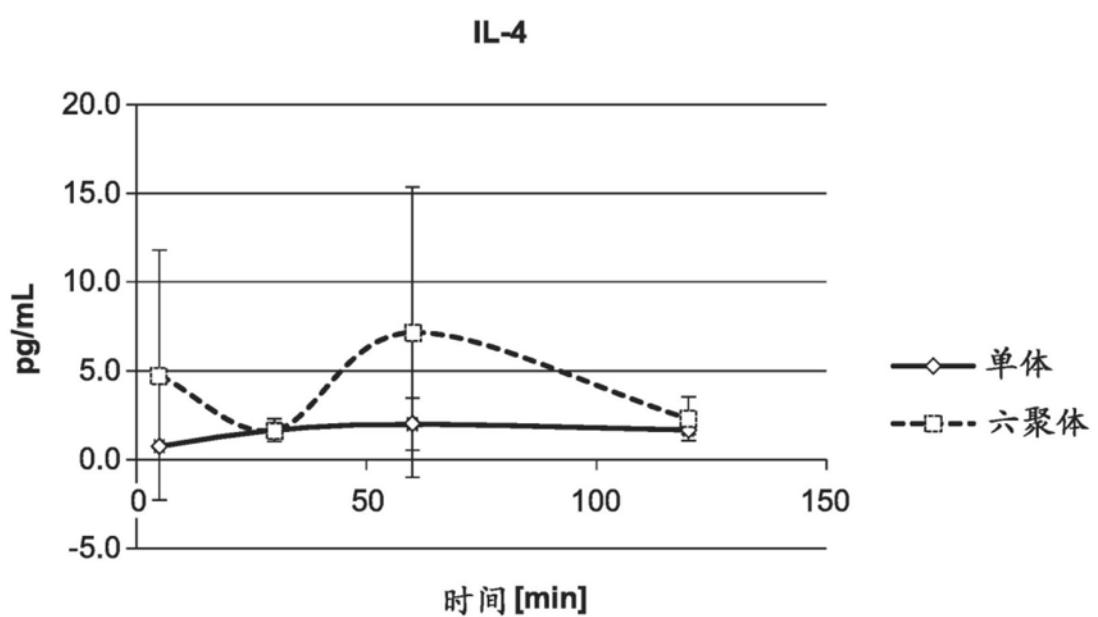


图26D

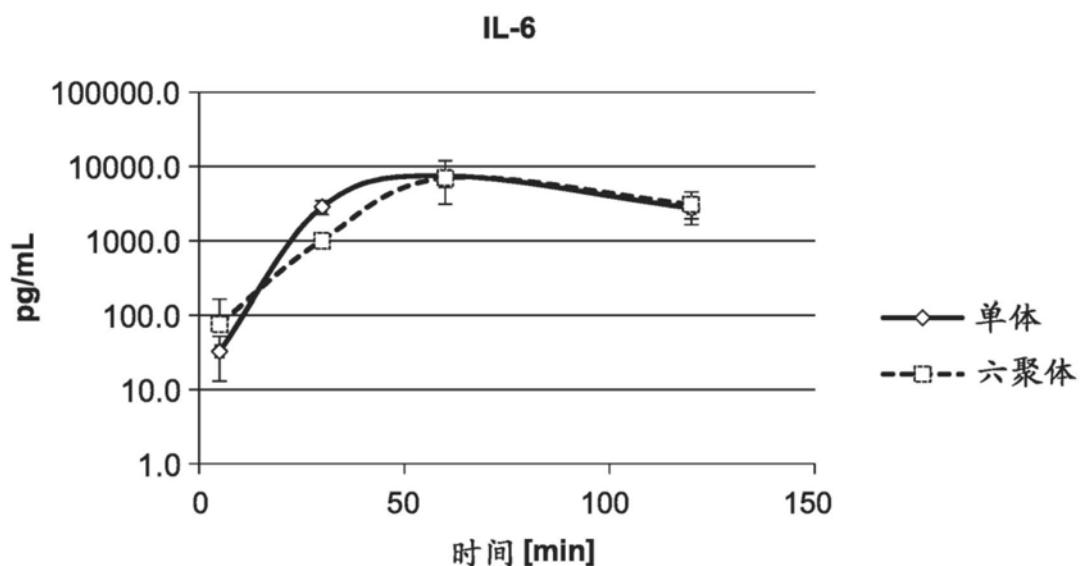


图26E

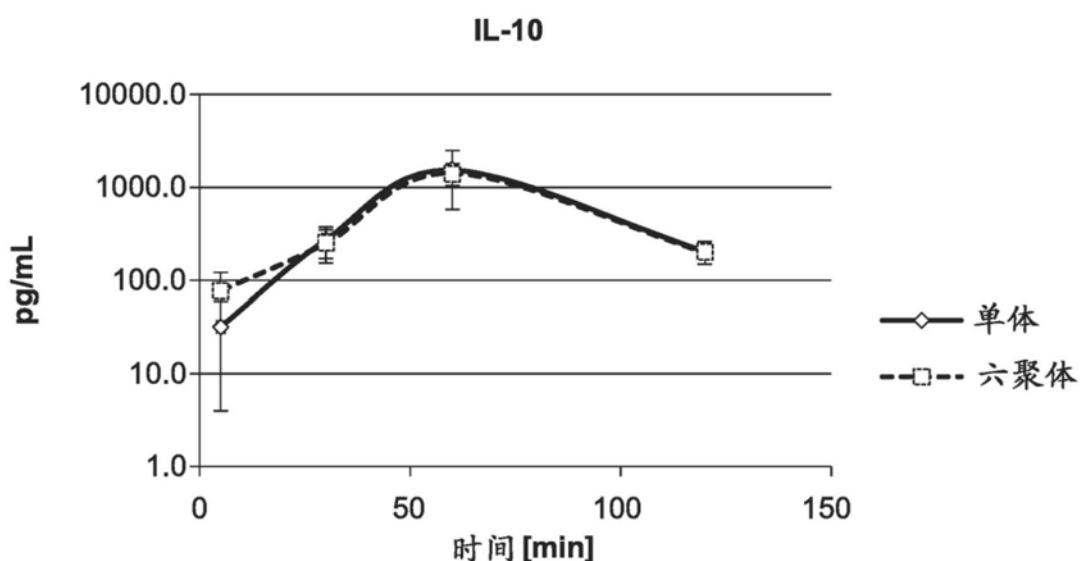


图26F

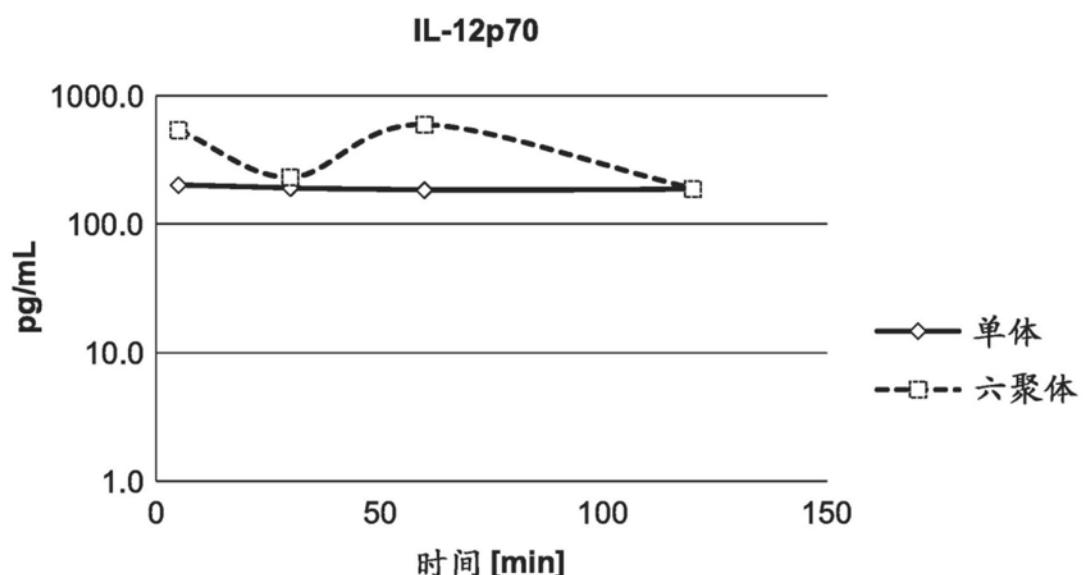


图26G

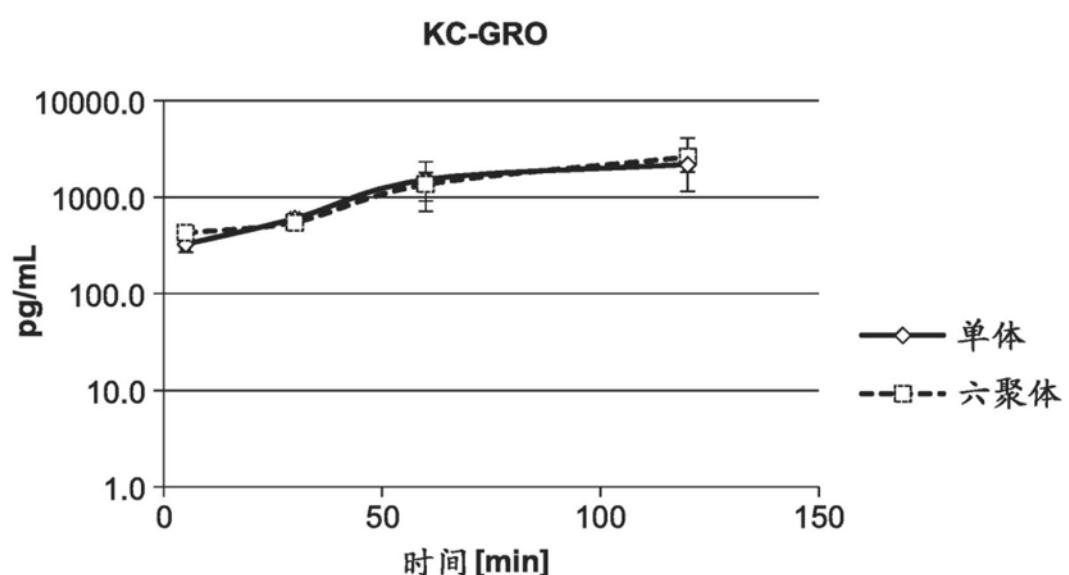


图26H

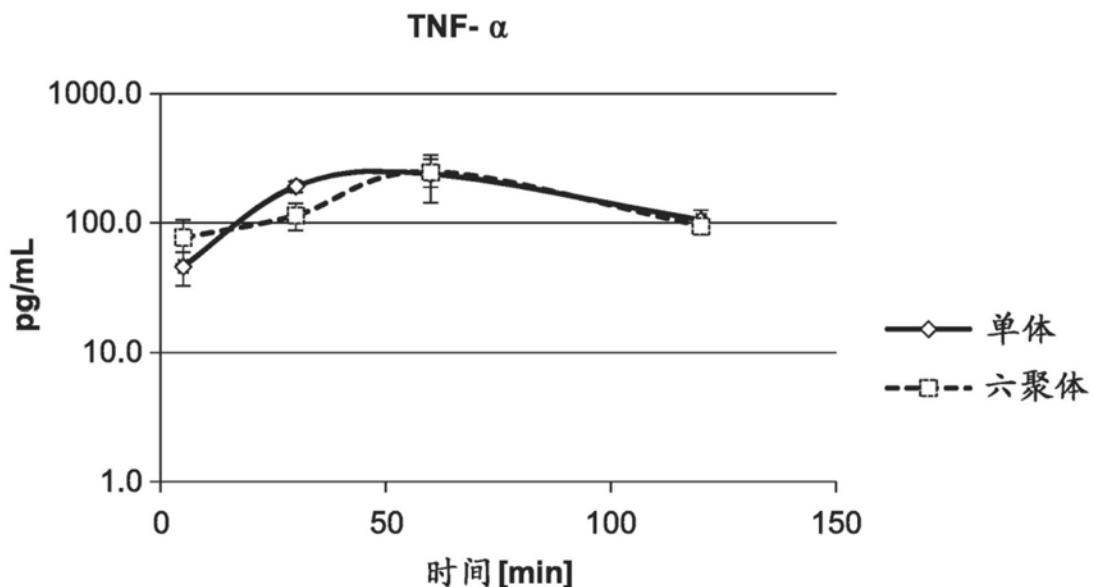


图26I

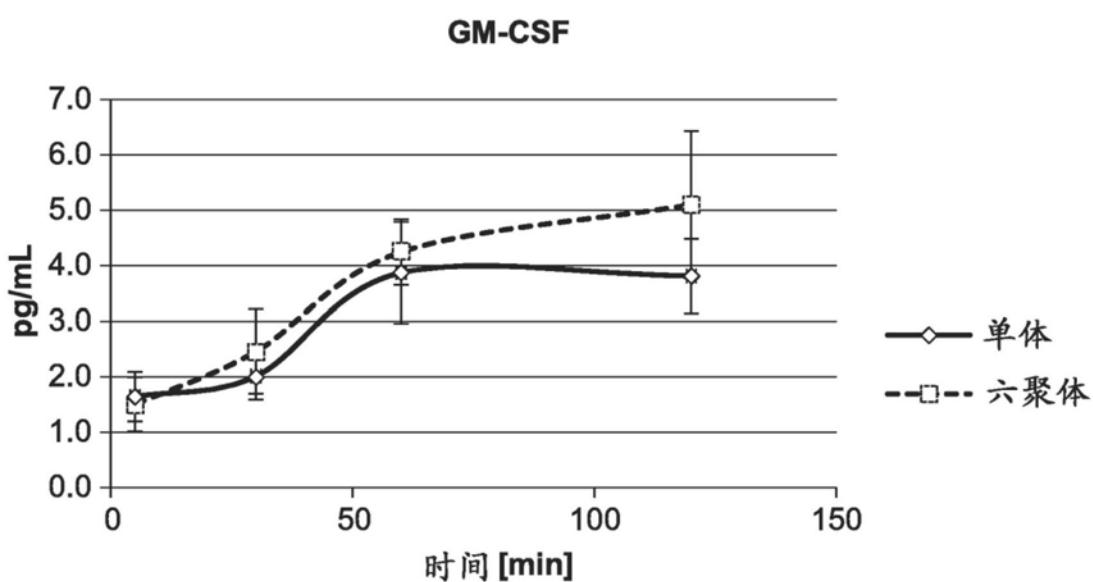


图26J

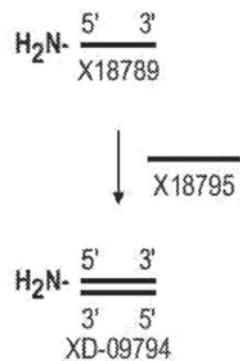


图27A

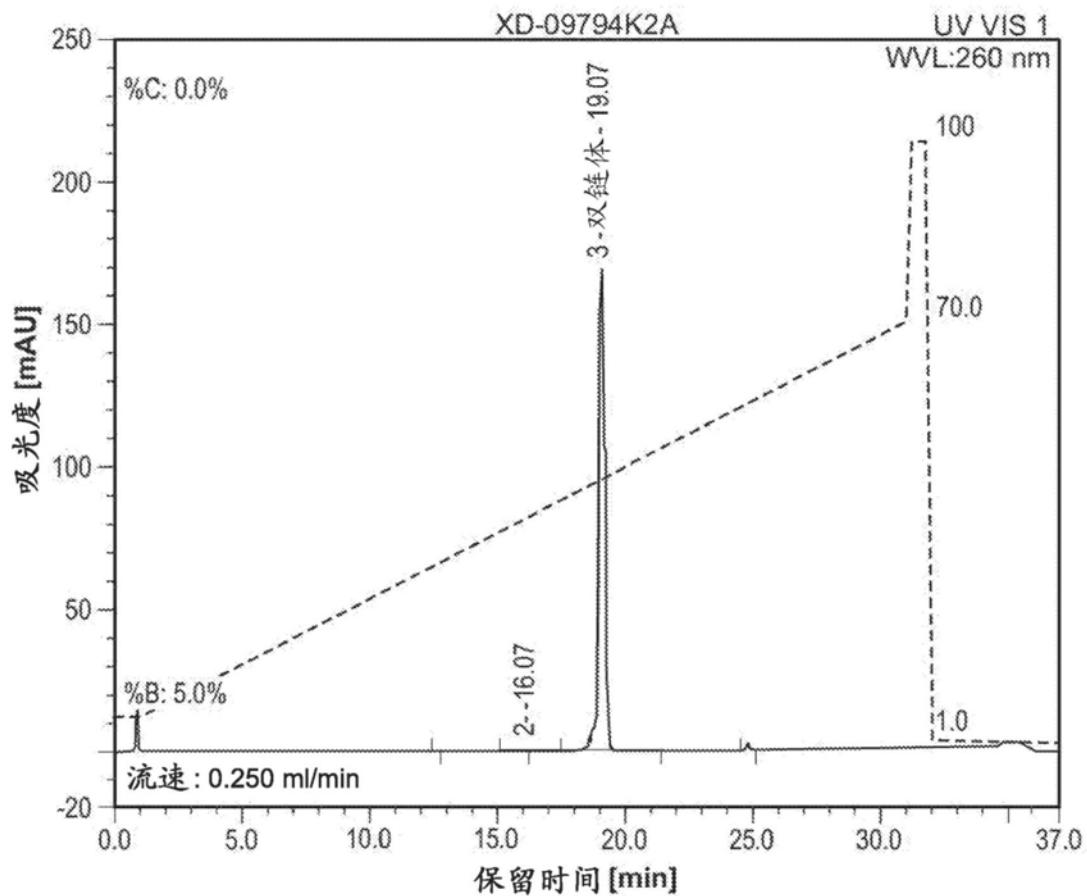


图27B

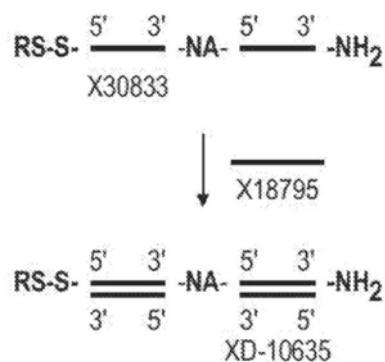


图28A

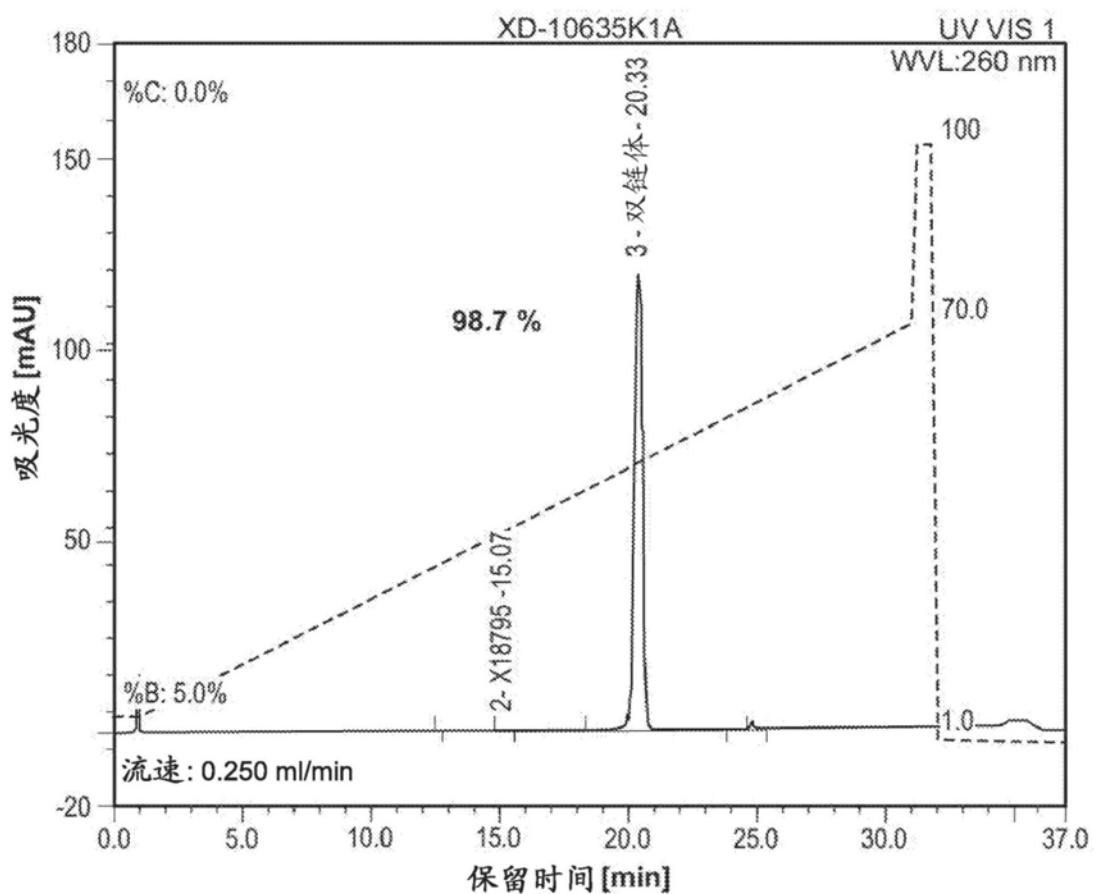


图28B

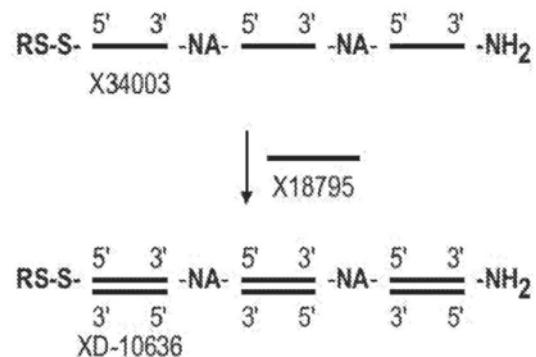


图29A

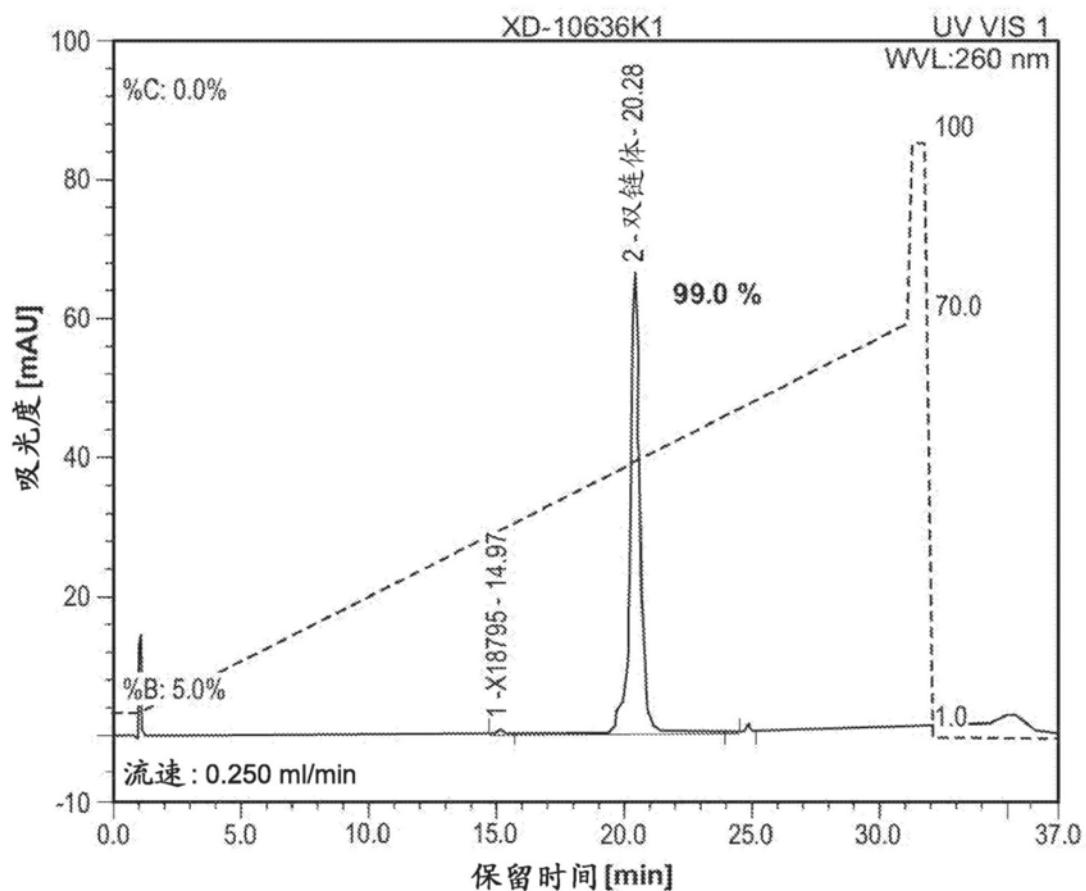


图29B

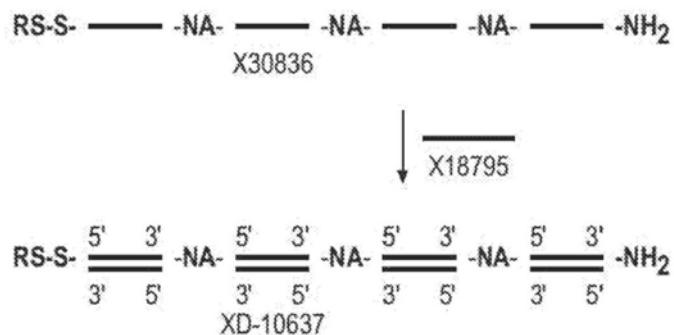


图30A

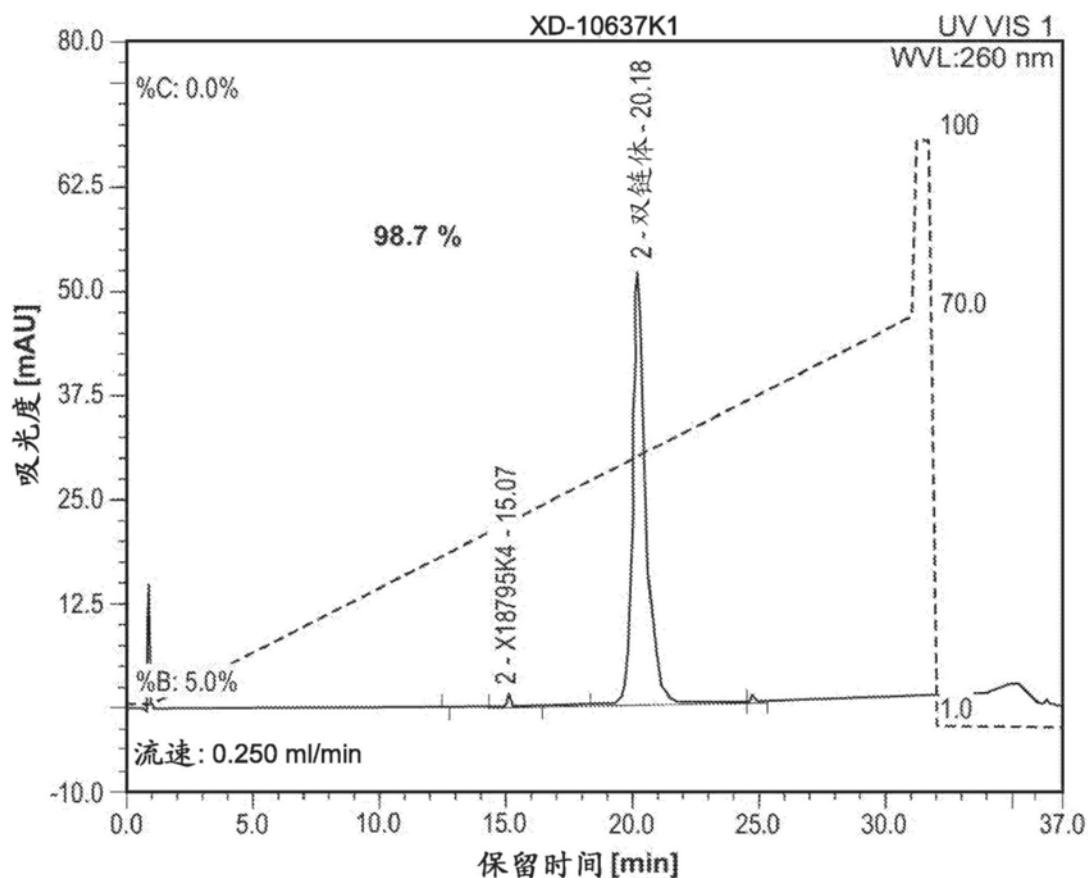


图30B

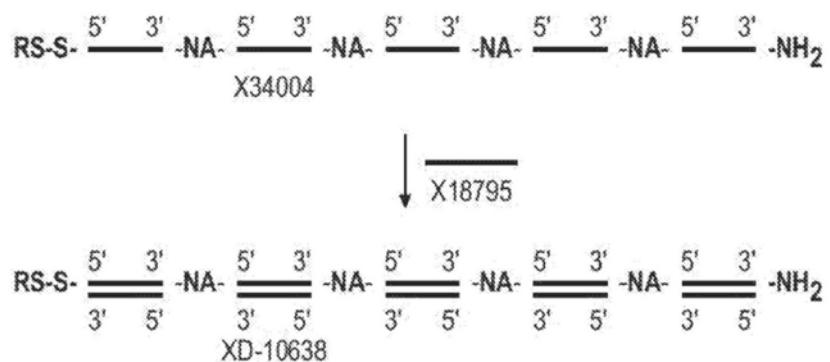


图31A

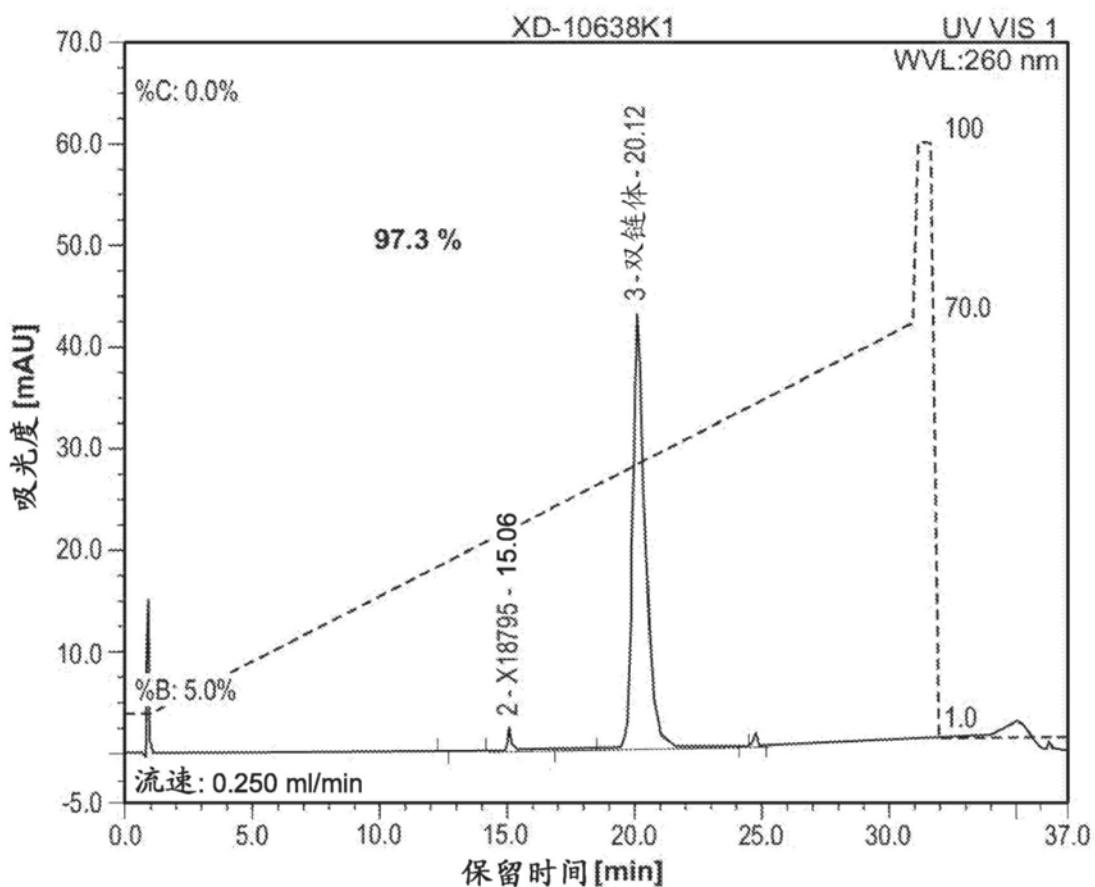


图31B

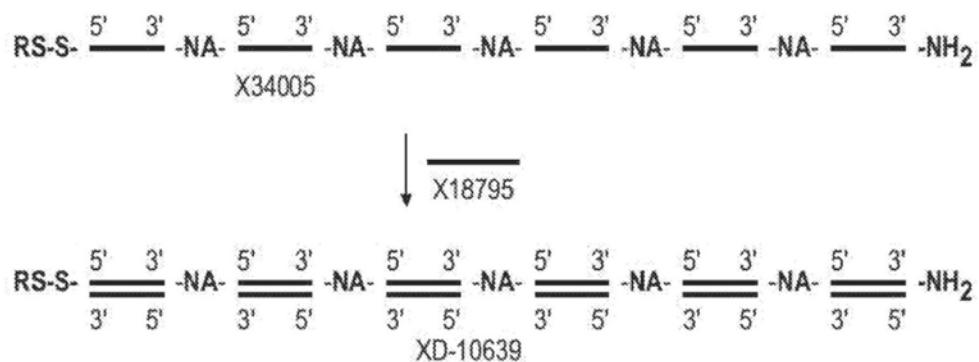


图32A

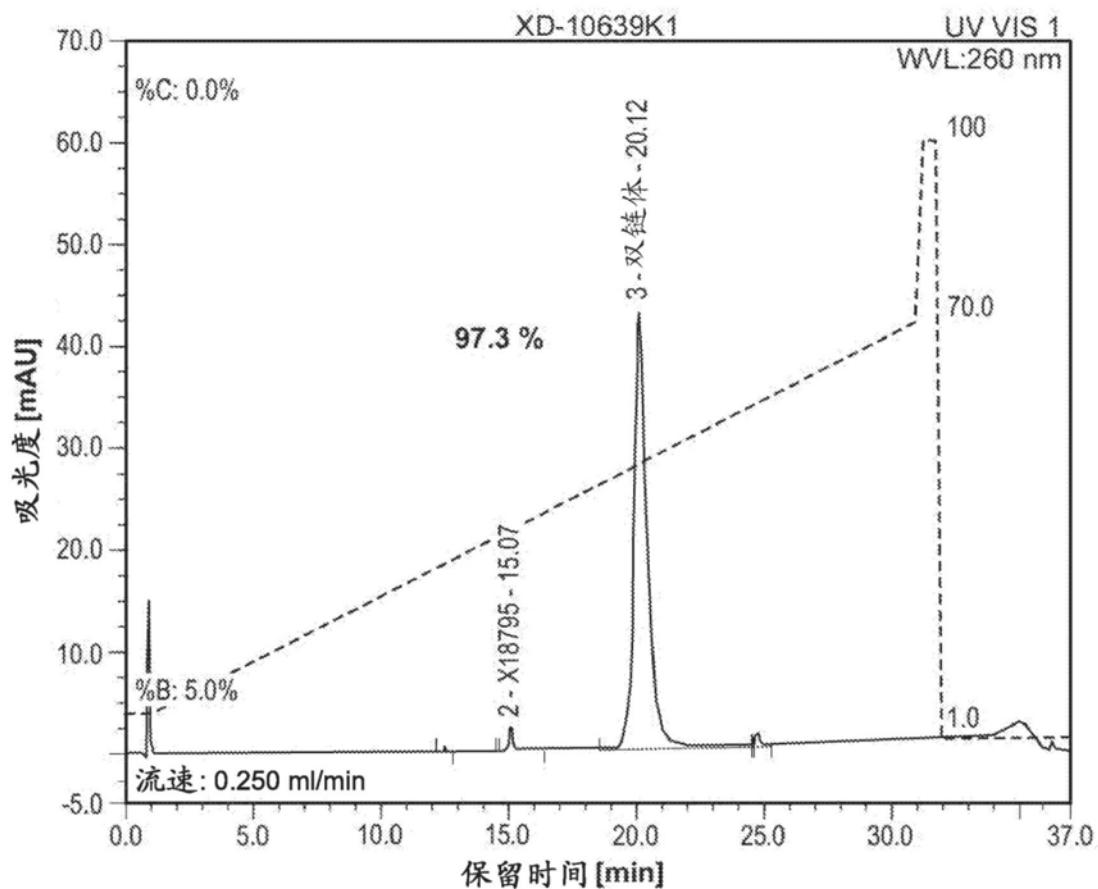


图32B

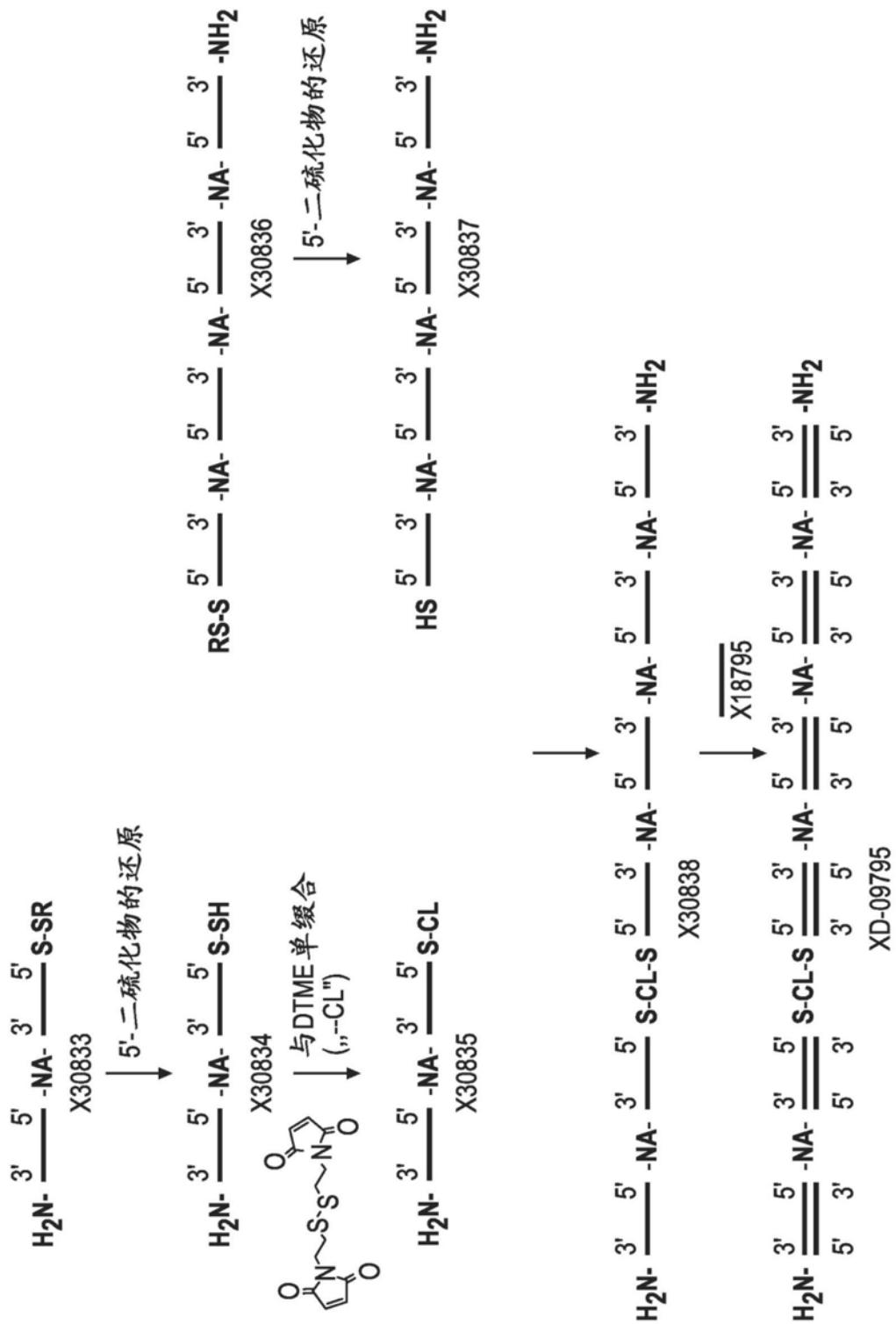


图33A

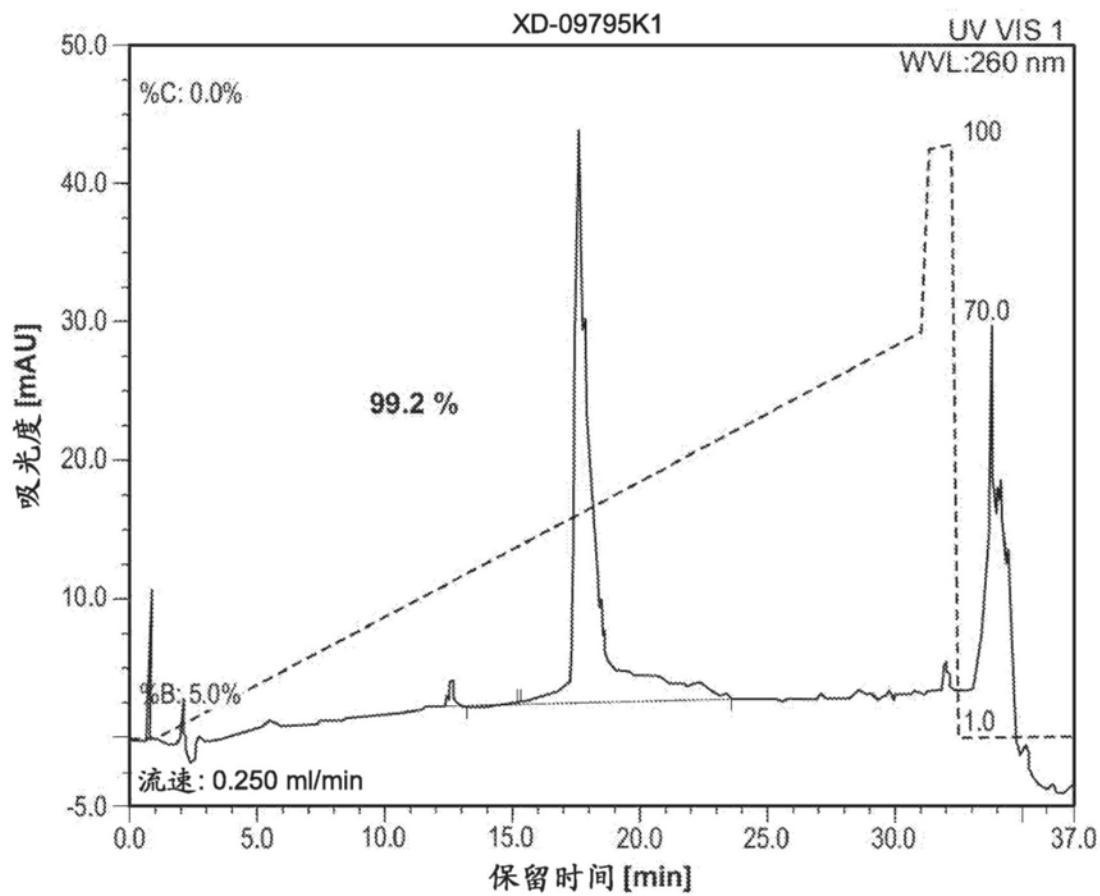
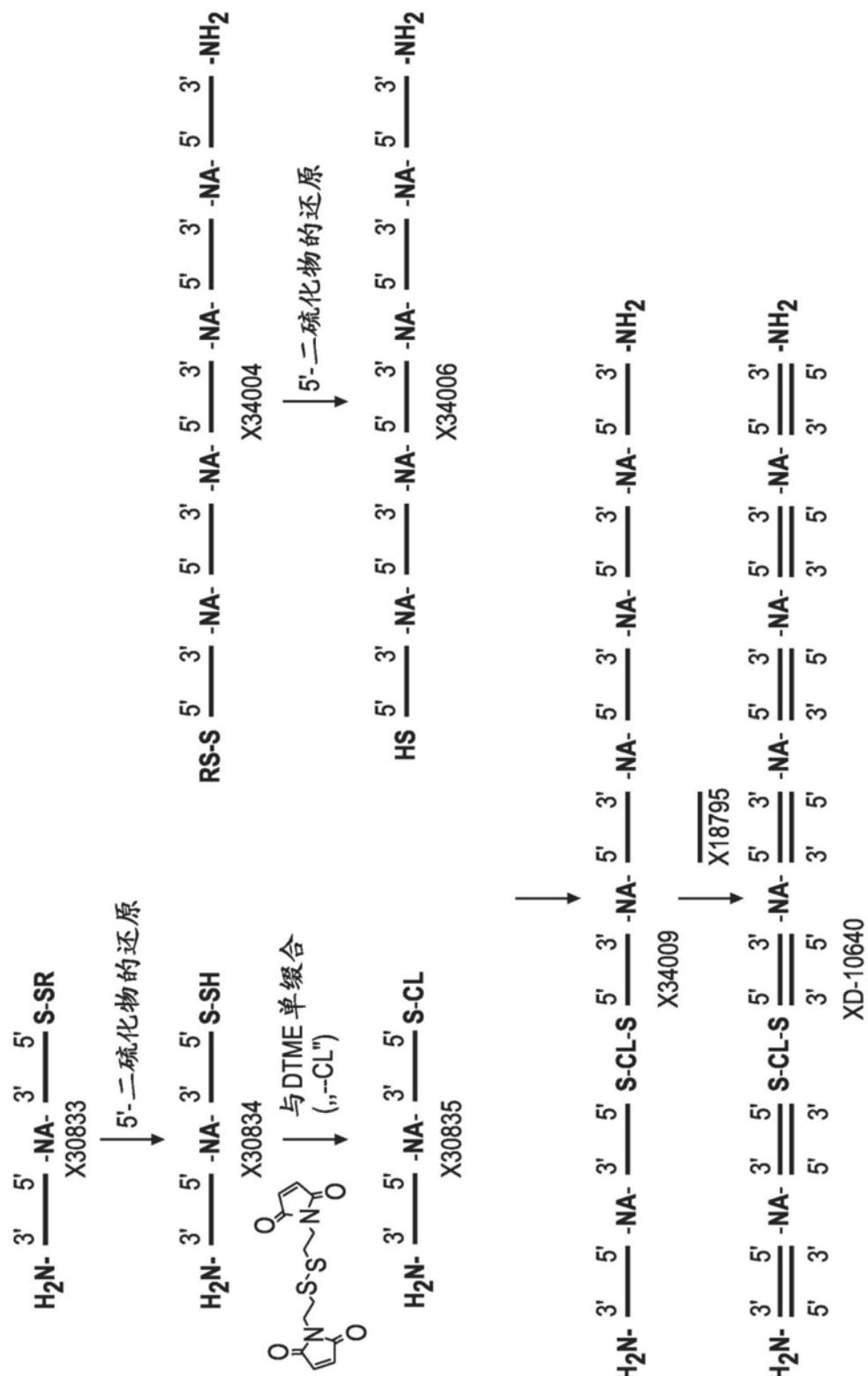


图33B



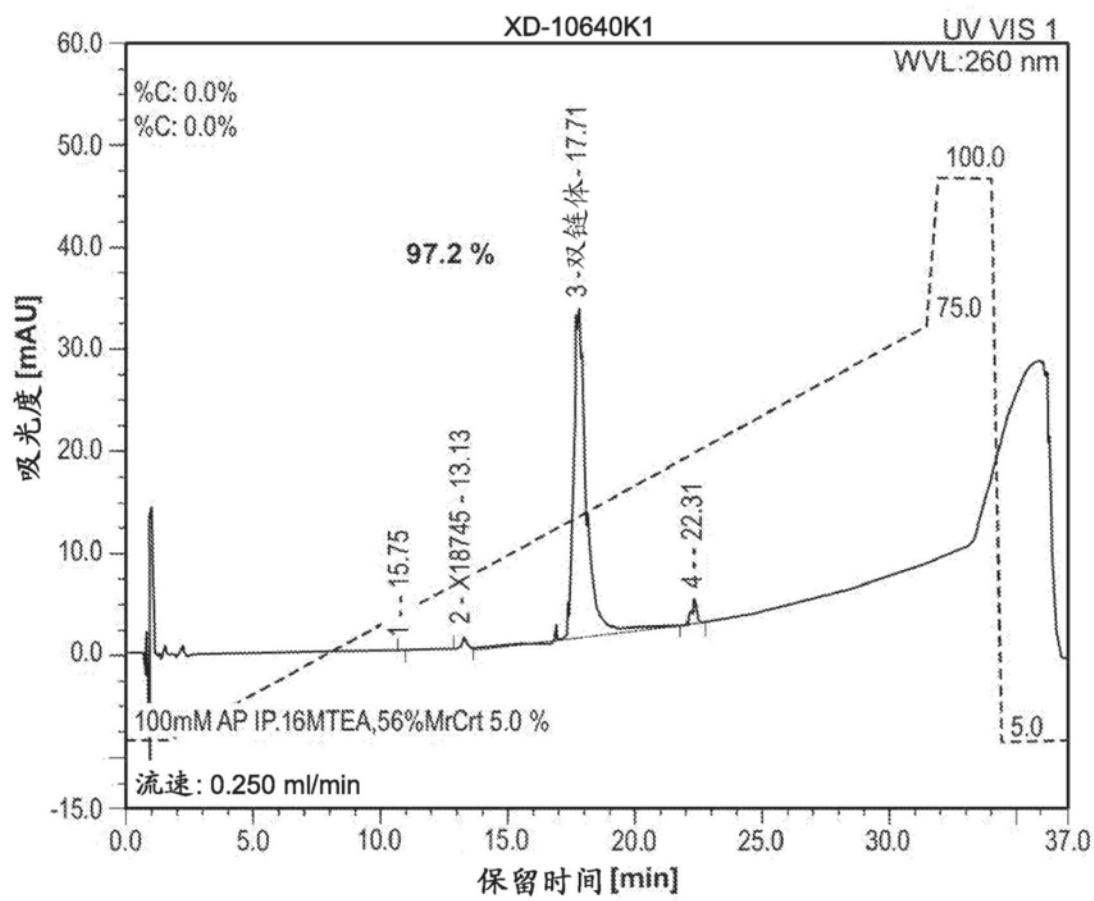


图34B

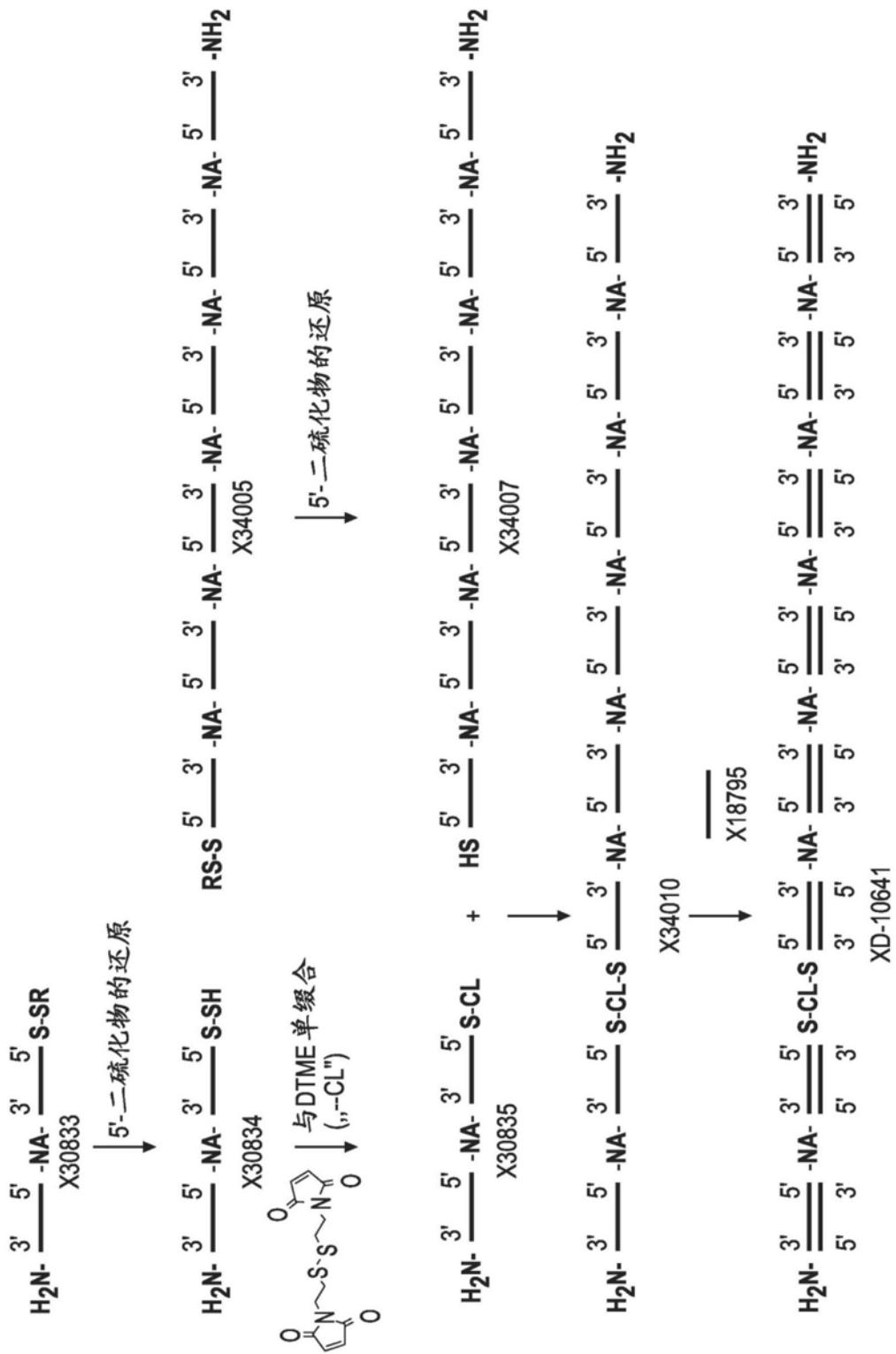


图35A

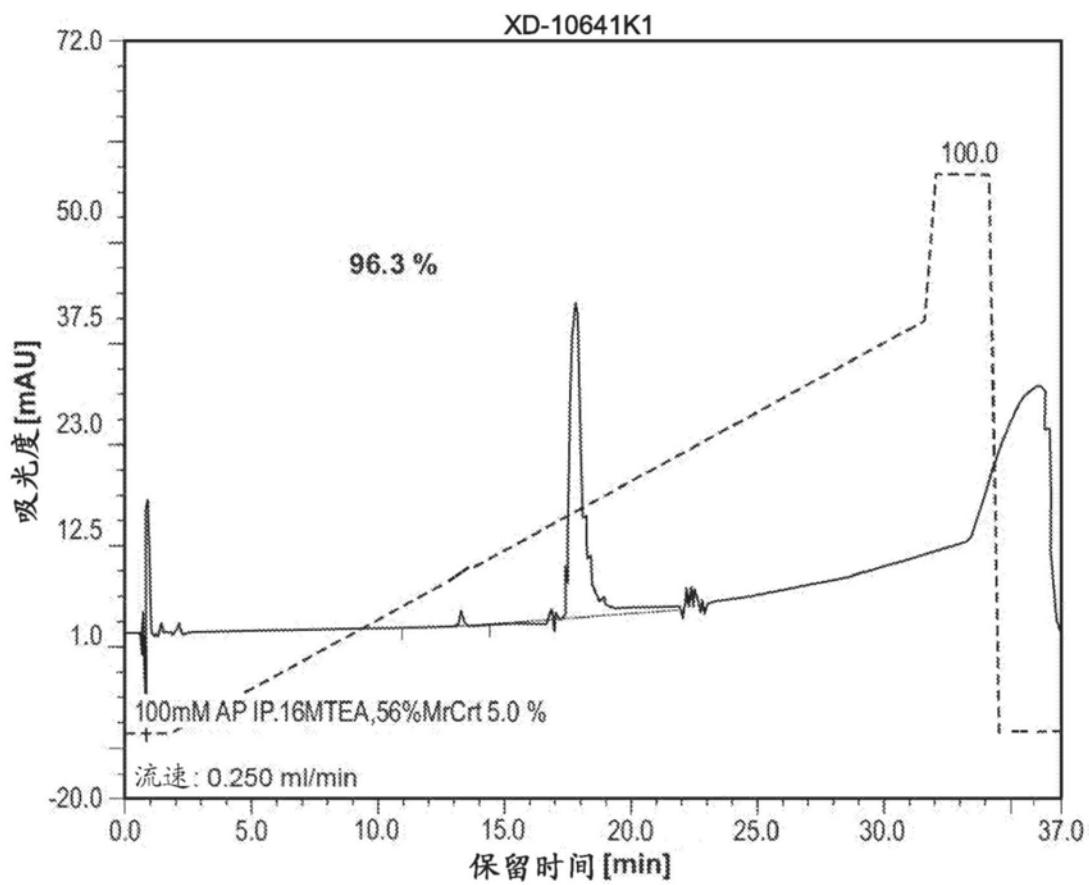


图35B

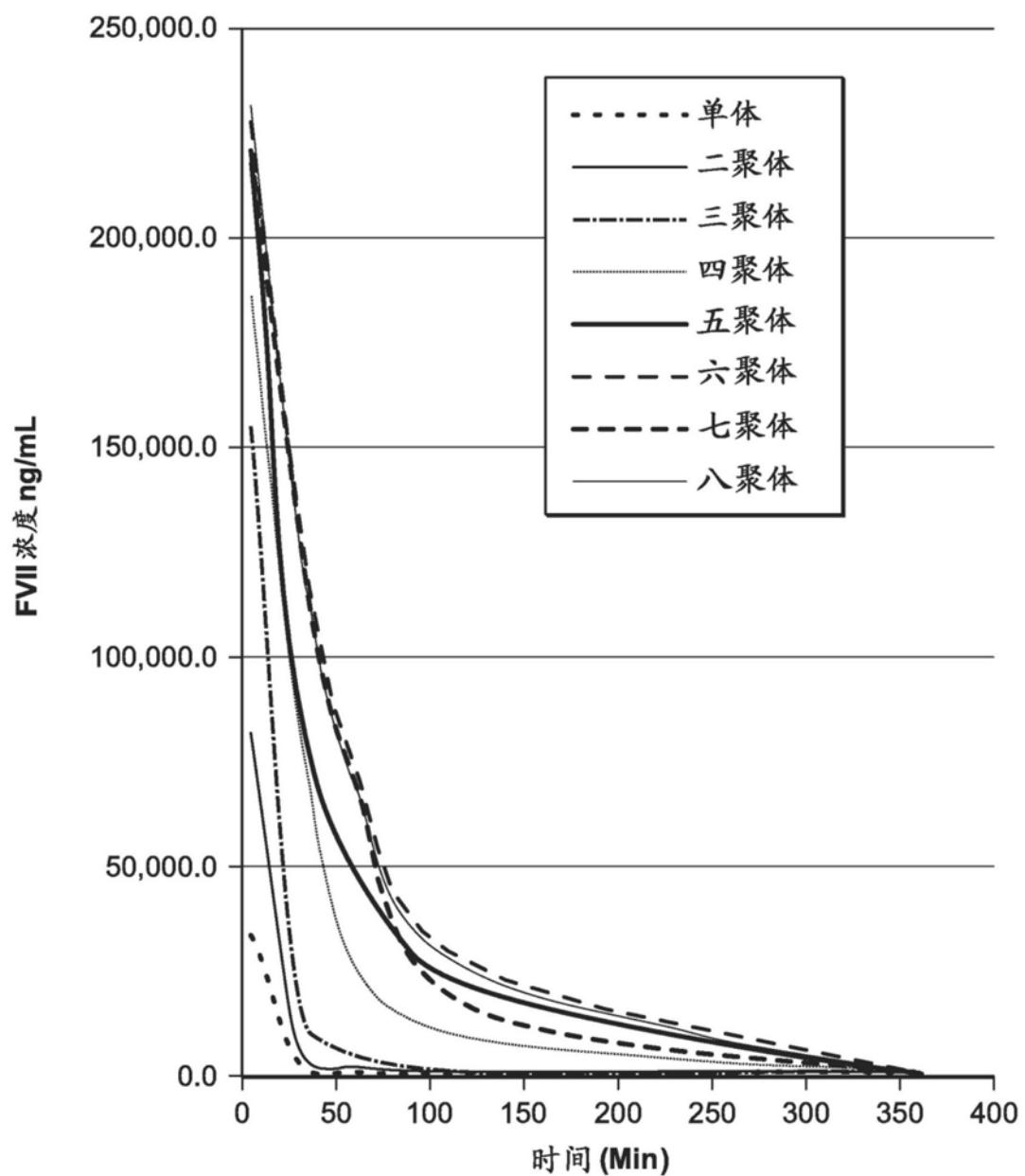


图36A

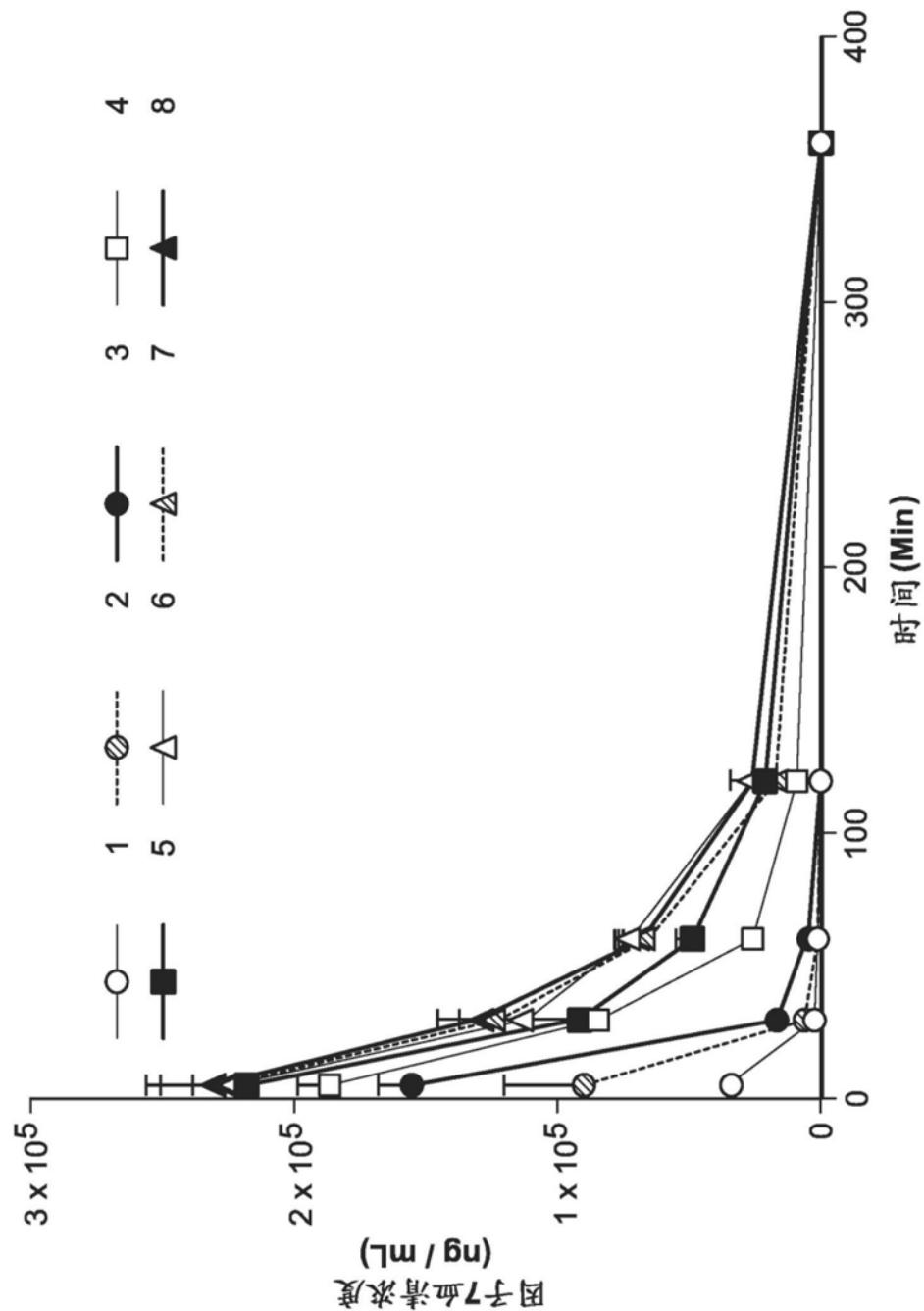


图36B

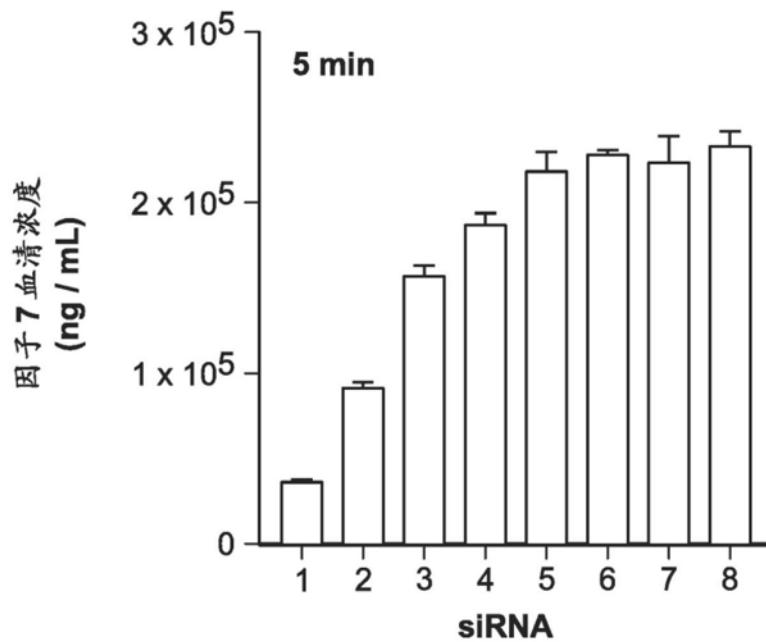


图37A

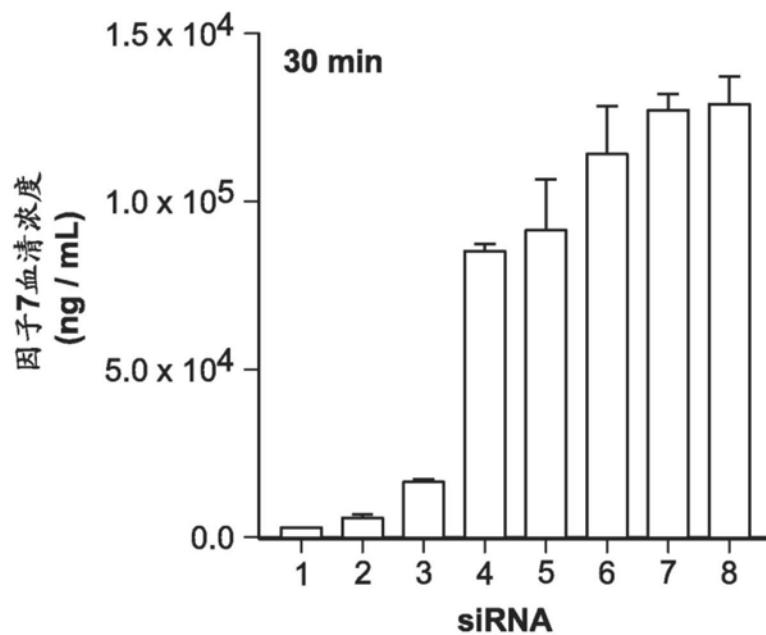


图37B

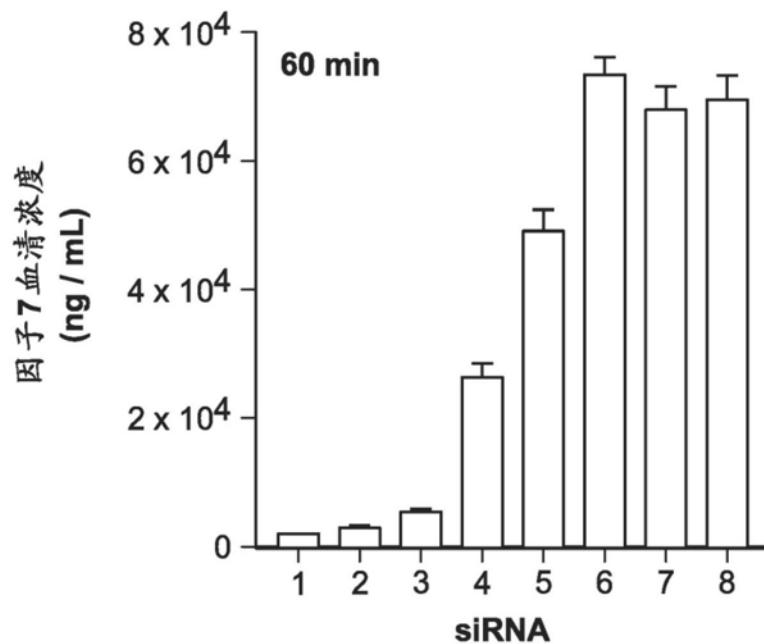


图37C

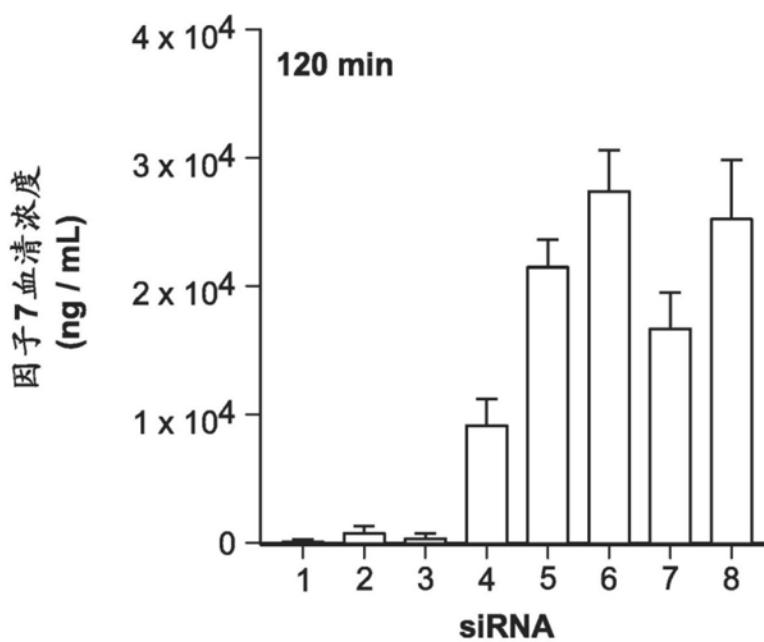


图37D

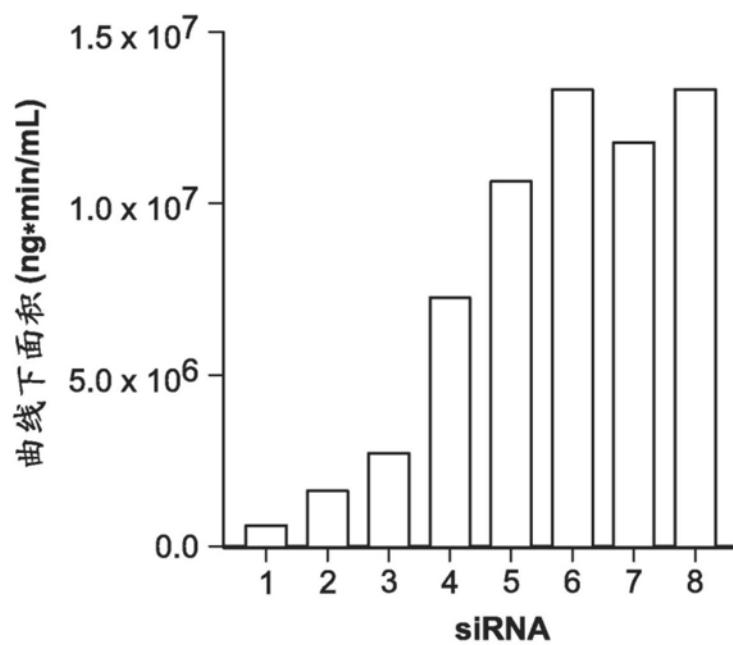


图38A

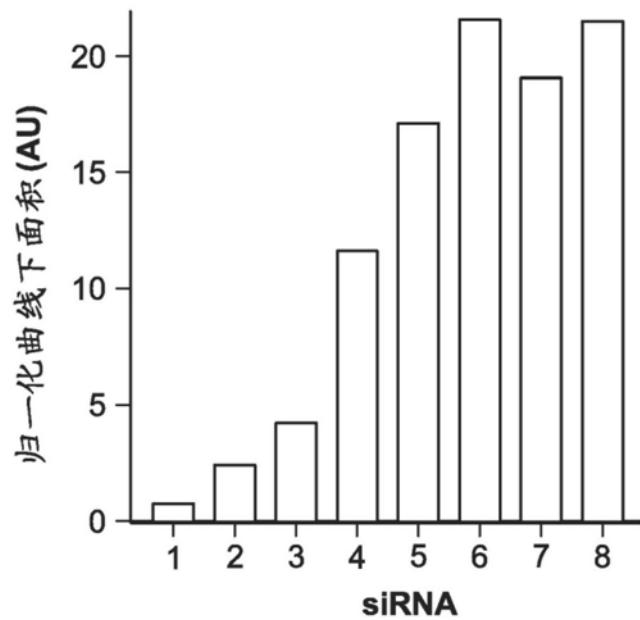


图38B

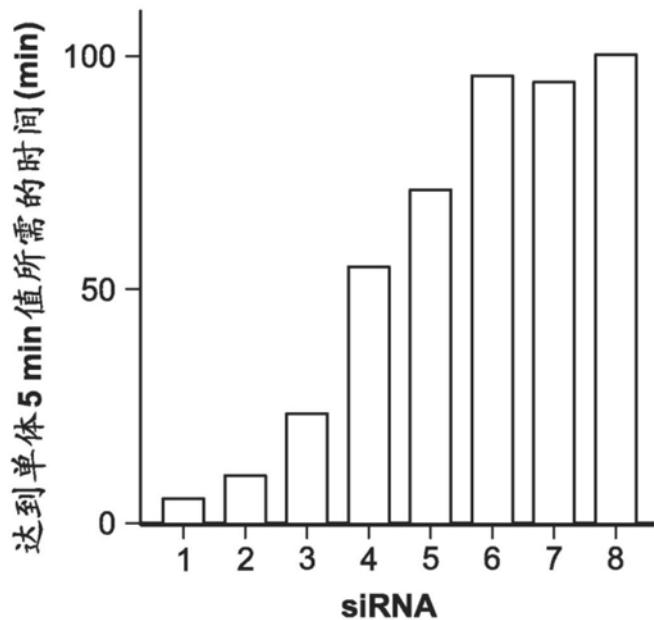


图39

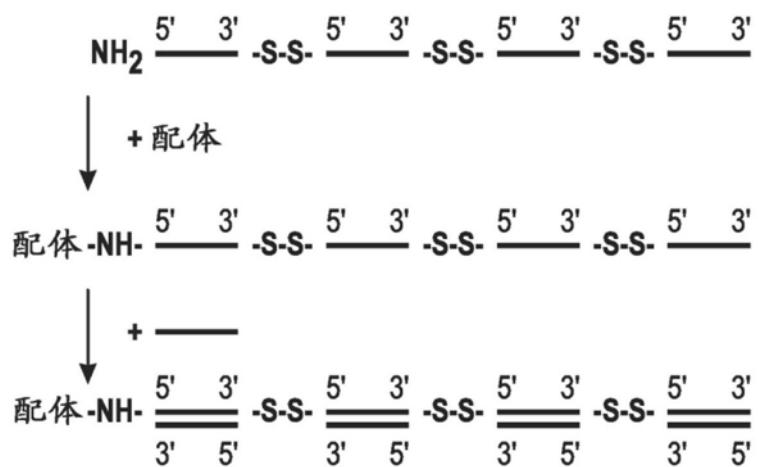


图40

配体-SH

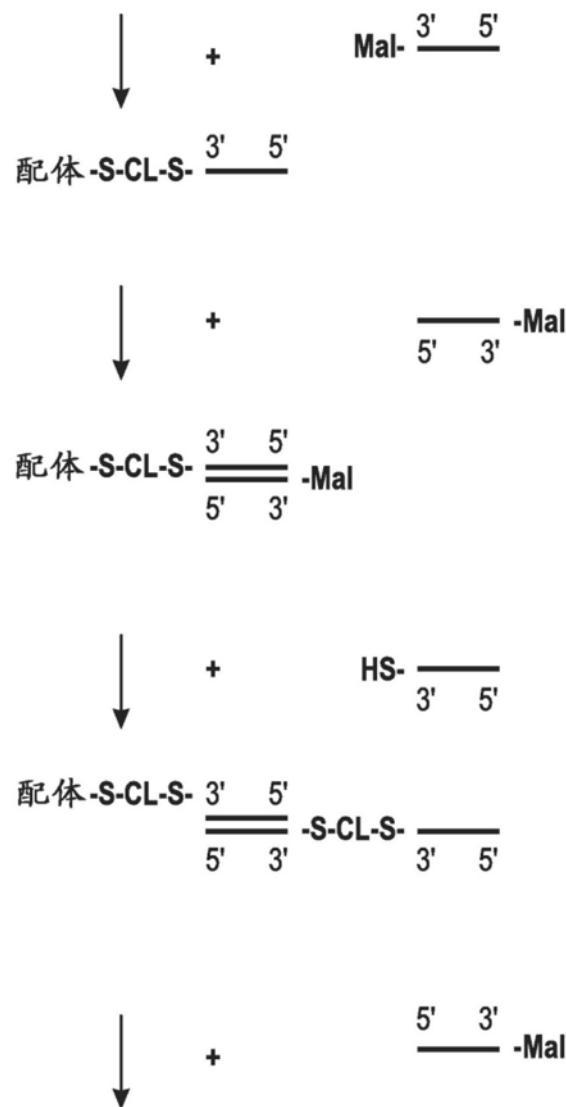


图41

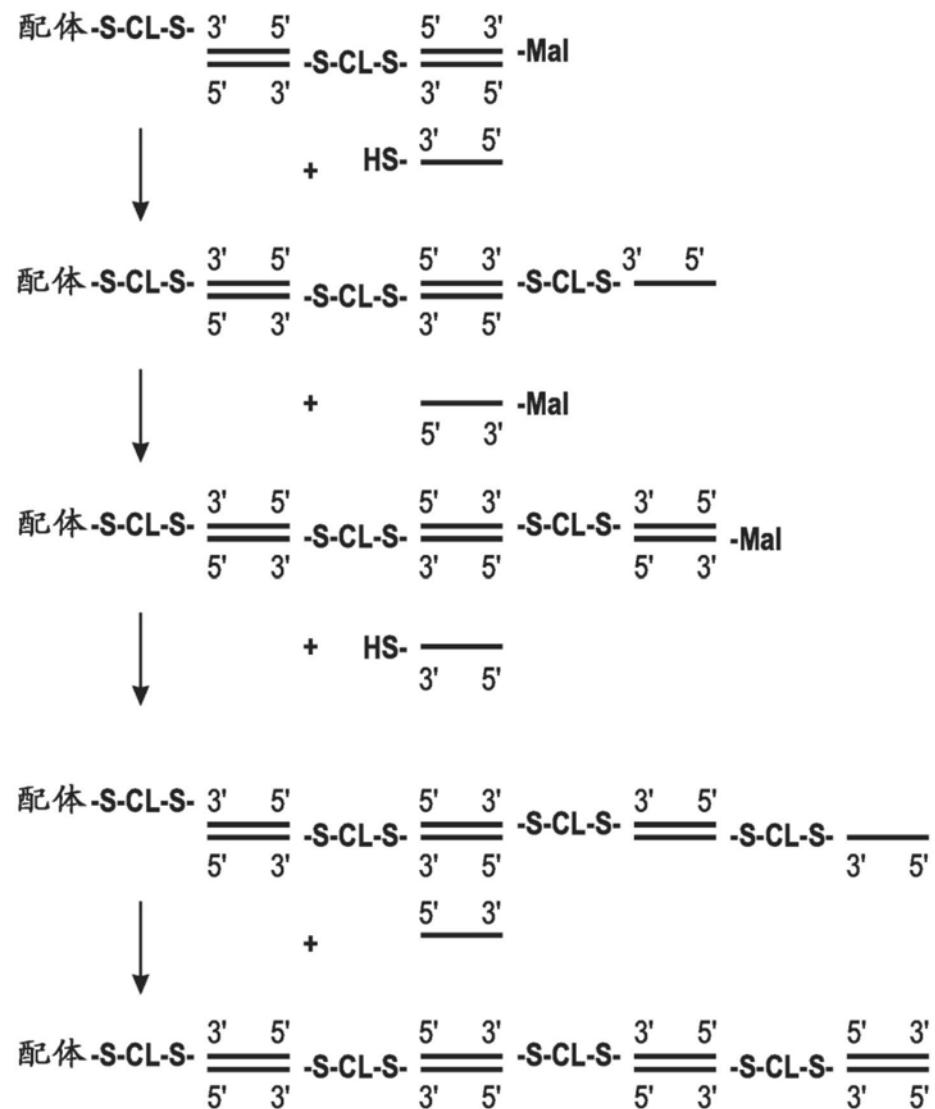


图41 (续)