(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116600817 A
(43)申请公布日 2023.08.15

(21)申请号 202180061336.7
(22)申请日 2021.07.16
(30)优先权数据
63/052,811 2020.07.16 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.01.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/041946 2021.07.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/016043 EN 2022.01.20
(71)申请人 马萨诸塞大学
地址 美国马萨诸塞州波士顿市灯塔街一号31楼
(72)发明人 阿纳斯塔西娅·科沃罗娃
安娜贝尔·比斯坎斯
(74)专利代理机构 北京恒律知识产权代理有限公司 11416
专利代理师 王术娜
(51)Int.Cl.
A61K 31/713(2006.01)

权利要求书5页 说明书35页 附图11页

(54)发明名称

用于组织特异性递送的缀合寡核苷酸

(57)摘要

本文提供了缀合寡核苷酸,其特征在于高效和特定的组织分布以及增强的体内沉默功效。

CN 116600817 A

1.一种增加双链(ds)RNA在靶器官或组织中的体内靶RNA沉默功效的方法,所述dsRNA包含反义链和有义链,其中:

(1)所述反义链包含至少16个连续的核苷酸、5'端、3'端,并且与靶标具有互补性;

(2)所述有义链包含至少15个连续的核苷酸、5'端、3'端,并且与靶标具有同源性;

(3)所述反义链的一部分与所述有义链的一部分互补;

(4)所述有义链3'端通过可切割接头与疏水部分缀合;和

(5)所述dsRNA包含至少一个单链核苷酸突出端,

其中所述dsRNA包含相对于缺乏可切割接头的dsRNA的在靶器官或组织中的增加的体内靶RNA沉默功效。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述dsRNA包含2个核苷酸至5个核苷酸的单链核苷酸突出端。

3.如权利要求1或2中任一项所述的方法,其中所述dsRNA包含2个核苷酸的单链核苷酸突出端。

4.如权利要求1或2中任一项所述的方法,其中所述dsRNA包含5个核苷酸的单链核苷酸突出端。

5.如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中突出端存在于反义3'端。

6.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述反义链包含约15个核苷酸至25个核苷酸的长度。

7.如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述有义链包含约15个核苷酸至25个核苷酸的长度。

8.如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述反义链为20个核苷酸的长度。

9.如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述反义链为21个核苷酸的长度。

10.如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述反义链为22个核苷酸的长度。

11.如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述有义链为15个核苷酸的长度。

12.如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述有义链为16个核苷酸的长度。

13.如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述有义链为18个核苷酸的长度。

14.如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述有义链为20个核苷酸的长度。

15.如权利要求1-14中任一项所述的方法,其包括15个碱基对至20个碱基对的双链区域。

16.如权利要求1-15中任一项所述的方法,其包括15个碱基对的双链区域。

17.如权利要求1-15中任一项所述的方法,其包括16个碱基对的双链区域。

18.如权利要求1-15中任一项所述的方法,其包括18个碱基对的双链区域。

19.如权利要求1-15中任一项所述的方法,其包括20个碱基对的双链区域。

20.如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述反义链3'端位置1-2至1-7处的所述核苷酸经由硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

21.如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述有义链3'端位置1-2处的所述核苷酸经由硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

22.如权利要求1-21中任一项所述的方法,其中所述反义链5'端位置1-2处的所述核苷酸经由硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

23.如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述有义链5'端位置1-2处的所述核苷酸经由硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。

24.如权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述dsRNA包含约6个至约17个硫代磷酸酯核苷酸间键。

25.如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述dsRNA包含约8个至约13个硫代磷酸酯核苷酸间键。

26.如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中所述可切割接头包括磷酸二酯键、二硫键、酸不稳定键或光可切割键。

27.如权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述可切割接头包括具有磷酸二酯核苷酸间键的dTdT二核苷酸。

28.如权利要求27所述的方法,其中所述酸不稳定键包括β-硫代丙酸酯键或羧基二甲基马来酸酐(CDM)键。

29.如权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述疏水部分选自由以下组成的组:脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂和核苷类似物、内源性大麻素和维生素。

30.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述疏水部分对低密度脂蛋白和/或中密度脂蛋白具有亲和力。

31.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述疏水部分是具有少于三个双键的饱和或不饱和部分。

32.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述疏水部分对高密度脂蛋白具有亲和力。

33.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述疏水部分是具有三个或更多个双键的多饱和部分。

34.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述疏水部分是选自由胆固醇和石胆酸(LCA)组成的组的类固醇。

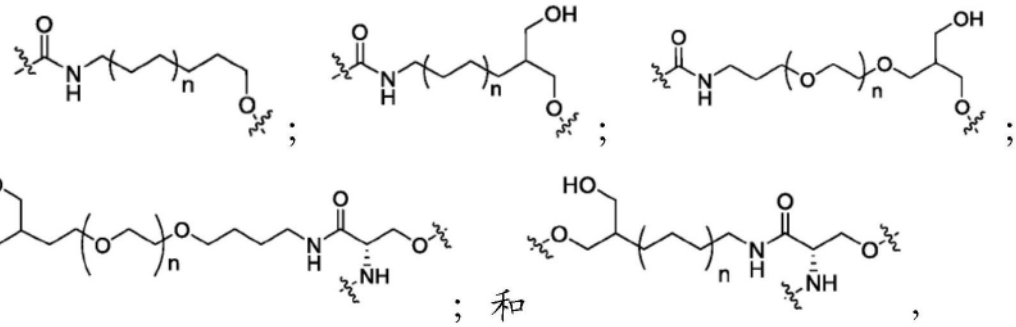
35.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述疏水部分是选自由二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)和二十二碳酸(DCA)组成的组的脂肪酸。

36.如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述疏水部分是选自由胆碱、维生素A、维生素E、及其衍生物或代谢物组成的组的维生素。

37.如权利要求36所述的方法,其中所述维生素选自由视黄酸和琥珀酸α-生育酚组成的组。

38.如权利要求1-37中任一项所述的方法,其中所述可切割接头还包括额外的二价或三价接头。

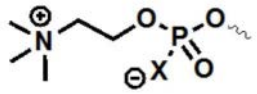
39.如权利要求38所述的方法,其中所述二价或三价接头选自由以下组成的组:



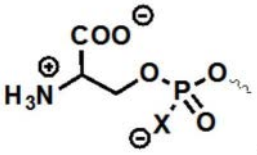
其中n为1、2、3、4或5。

40.如权利要求38或39所述的方法，其中当所述接头为三价接头时，所述接头进一步连接磷酸二酯或磷酸二酯衍生物。

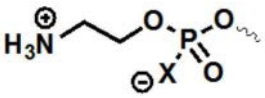
41.如权利要求40所述的方法，其中所述磷酸二酯或磷酸二酯衍生物选自由以下组成的组：



(Zc1);

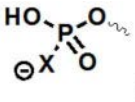


(Zc2);



;以及

(Zc3)



(Zc4)

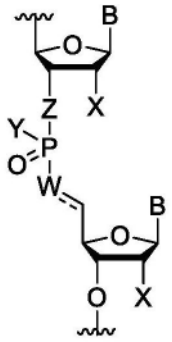
其中X是O、S或BH_3。

42.如权利要求1-41中任一项所述的方法，其中所述dsRNA包含至少一种修饰的核苷酸。

43.如权利要求42所述的方法，其中所述修饰的核苷酸包括2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定的核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核

苷酸或其混合物。

44.如权利要求1-43中任一项所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含至少一种式I的经修饰的核苷酸间键:



(I);

其中:

B为碱基配对部分;

W选自由O、OCH2、OCH、CH2和CH组成的组;

X选自由卤代基、羟基和C1-6烷氧基组成的组;

Y选自由O-、OH、OR、NH-、NH2、S-和SH组成的组;

Z选自由O和CH2组成的组;

R是保护基;并且

═══是任选的双键。

45.如权利要求1-44中任一项所述的方法,其中所述dsRNA包含至少80%的化学修饰的核苷酸。

46.如权利要求1-45中任一项所述的方法,其中所述dsRNA是完全化学修饰的。

47.如权利要求1-46中任一项所述的方法,其中所述dsRNA包含至少70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

48.如权利要求1-47中任一项所述的方法,其中所述反义链包含至少70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

49.如权利要求48所述的方法,其中所述反义链包含约70%至90%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

50.如权利要求1-49中任一项所述的方法,其中所述有义链包含至少65%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

51.如权利要求50所述的方法,其中所述有义链包含100%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

52.如权利要求1-51中任一项所述的方法,其中所述反义链包含5'磷酸酯、5'-烷基膦酸酯、5'亚烷基膦酸酯或5'烯基膦酸酯。

53.如权利要求52所述的方法,其中所述反义链包含5'乙烯基膦酸酯。

54.如权利要求1-53中任一项所述的方法,其中所述反义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸。

55.如权利要求1-54中任一项所述的方法,其中所述反义链5'端位置2和14处的所述核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸。

56.如权利要求1-55中任一项所述的方法,其中所述靶器官或组织选自由肾、脾、肺、心脏、骨骼肌、肾上腺和脂肪组成的组。

57.如权利要求1-56中任一项所述的方法,其中:

(1)所述疏水部分是DCA;

(2)所述可切割接头是dTdT二核苷酸;和

(3)所述靶器官或组织是心脏和骨骼肌中的一者或两者。

58.如权利要求1-56中任一项所述的方法,其中向受试者施用所述dsRNA。

59.如权利要求58所述的方法,其中皮下执行所述施用。

60.如权利要求58所述的方法,其中静脉内执行所述施用。

用于组织特异性递送的缀合寡核苷酸

相关申请

本申请要求2020年7月16日提交的美国临时专利申请序列号63/052,811的优先权,所述申请的全部公开内容特此以引用方式并入本文。

关于联邦政府赞助研究的声明

本发明是在由美国国家卫生研究院(National Institutes of Health)颁发的HD086111、GM131839和OD020012号拨款下借助政府资助进行的。政府享有本发明中的某些权利。

技术领域

本公开涉及新型疏水缀合的寡核苷酸。寡核苷酸缀合物被设计为实现出乎意料的高功效、摄取和组织分布。

背景技术

RNA干扰代表了一种用于抑制基因功能的简单且有效的工具。然而,RNA干扰作为一般治疗策略的前景取决于将小RNA递送至体内多种组织的能力。目前,小治疗性RNA只可以有效地递送到肝脏。仍然需要自我递送的双链RNA,其特征在于高效的RISC进入、最小的免疫响应和脱靶效应、无制剂情况下的高效细胞摄取、以及高效和特异性的组织分布。

发明内容

在一方面,本文公开一种增加双链(ds)RNA在靶器官或组织中的体内靶RNA沉默功效的方法,所述dsRNA包含反义链和有义链,其中(1)反义链包含至少16个连续核苷酸、5'端、3'端,并且与靶标具有互补性;(2)有义链包含至少15个连续核苷酸、5'端、3'端,并且与靶标具有同源性;(3)反义链的一部分与有义链的一部分互补;(4)有义链3'端通过可切割接头与疏水部分缀合;和(5)dsRNA包含至少一个单链核苷酸突出端,其中所述dsRNA包含相对于缺乏可切割接头的dsRNA的在靶器官或组织中的增加的体内靶RNA沉默功效。

在一个实施方案中,dsRNA包含2个核苷酸至5个核苷酸的单链核苷酸突出端(例如,2个核苷酸、3个核苷酸、4个核苷酸或5个核苷酸的单链突出端)。在一个实施方案中,dsRNA包含2个核苷酸的单链核苷酸突出端。在一个实施方案中,dsRNA包含5个核苷酸的单链核苷酸突出端。

在一个实施方案中,突出端存在于反义3'端。

在一个实施方案中,反义链包含约15个核苷酸至25个核苷酸的长度。

在一个实施方案中,有义链包含约15个核苷酸至25个核苷酸的长度。

在一个实施方案中,反义链的长度为20个核苷酸。在一个实施方案中,反义链的长度为21个核苷酸。在一个实施方案中,反义链的长度为22个核苷酸。

在一个实施方案中,有义链的长度为15个核苷酸。在一个实施方案中,有义链的长度为16个核苷酸。在一个实施方案中,有义链的长度为18个核苷酸。在一个实施方案中,有

义链的长度为20个核苷酸。

在一个实施方案中,dsRNA包含15个碱基对至20个碱基对的双链区。

在一个实施方案中,dsRNA包含15个碱基对的双链区。在一个实施方案中,dsRNA包含16个碱基对的双链区。在一个实施方案中,dsRNA包含18个碱基对的双链区。在一个实施方案中,dsRNA包含20个碱基对的双链区。

在一个实施方案中,反义链3'端位置1-2至1-7处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。在一个实施方案中,有义链3'端位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。在一个实施方案中,反义链5'端位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。在一个实施方案中,有义链5'端位置1-2处的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键相互连接。在一个实施方案中,dsRNA包含约6个至约17个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一个实施方案中,dsRNA包含约8个至约13个硫代磷酸酯核苷酸间键。

在一个实施方案中,可切割接头包括磷酸二酯键、二硫键、酸不稳定键或光可切割键。

在一个实施方案中,可切割接头包括具有磷酸二酯核苷酸间键的dTdT二核苷酸。在一个实施方案中,酸不稳定键包括β-硫代丙酸酯键或羧基二甲基马来酸酐(CDM)键。

在一个实施方案中,疏水部分选自由以下组成的组:脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂和核苷类似物、内源性大麻素和维生素。

在一个实施方案中,疏水部分对低密度脂蛋白和/或中密度脂蛋白具有亲和力。在一个实施方案中,疏水部分是具有少于三个双键的饱和或不饱和部分。在一个实施方案中,疏水部分对高密度脂蛋白具有亲和力。在一个实施方案中,疏水部分是具有三个或更多个双键的多饱和部分。

在一个实施方案中,疏水部分是选自由胆固醇和石胆酸(LCA)组成的组的类固醇。

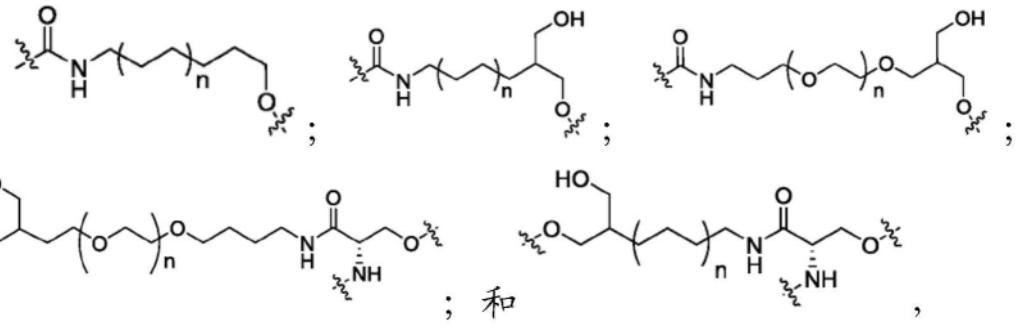
在一个实施方案中,疏水部分是选自由二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)和二十二碳酸(DCA)组成的组的脂肪酸。

在一个实施方案中,疏水部分是选自由胆碱、维生素A、维生素E、其衍生物或代谢物组成的组的维生素。

在一个实施方案中,维生素选自由视黄酸和琥珀酸α-生育酚组成的组。

在一个实施方案中,可切割接头还包括额外的二价或三价接头。

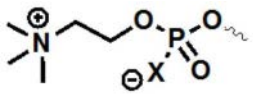
在一个实施方案中,二价或三价接头选自由以下组成的组:



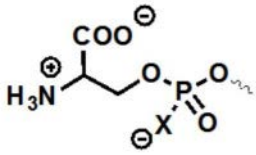
其中n为1、2、3、4或5。

在一个实施方案中,当接头是三价接头时,接头进一步连接磷酸二酯或磷酸二酯衍生物。

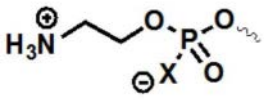
在一个实施方案中，磷酸二酯或磷酸二酯衍生物选自由以下组成的组：



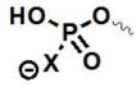
；(Zc1)；



；(Zc2)；



；和(Zc3)



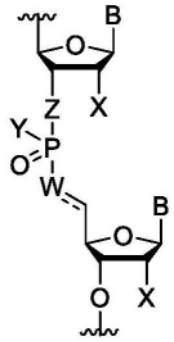
；(Zc4)

其中X是O、S或BH_3。

在一个实施方案中，dsRNA包含至少一种修饰的核苷酸。

在一个实施方案中，修饰的核苷酸包括2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、锁定的核苷酸、脱碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸或其混合物。

在一个实施方案中，dsRNA包含至少一种式I的修饰的核苷酸间键：



(I)；

其中：

B为碱基配对部分；

W选自由O、OCH2、OCH、CH2和CH组成的组；

X选自由卤代基、羟基和C1-6烷氧基组成的组；

Y选自由O-、OH、OR、NH-、NH2、S-和SH组成的组；

Z选自由O和CH2组成的组；

R是保护基；并且

═是任选的双键。

在一个实施方案中,dsRNA包含至少80%化学修饰的核苷酸。

在一个实施方案中,dsRNA为完全化学修饰的。

在一个实施方案中,dsRNA包含至少70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

在一个实施方案中,反义链包含至少70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

在一个实施方案中,反义链包含约70%至90%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

在一个实施方案中,有义链包含至少约65%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

在一个实施方案中,有义链包含100%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

在一个实施方案中,反义链包含5'磷酸酯、5'-烷基膦酸酯、5'亚烷基膦酸酯或5'烯基膦酸酯。

在一个实施方案中,反义链包含5'乙烯基膦酸酯。

在一个实施方案中,反义链包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸。

在一个实施方案中,反义链5'端位置2和14处的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸。

在一个实施方案中,靶器官或组织选自由肾、脾、肺、心脏、骨骼肌、肾上腺和脂肪组成的组。

在dsRNA的一个实施方案中,(1)疏水部分是DCA;(2)可切割接头是dTdT二核苷酸;并且(3)靶器官或组织是心脏和骨骼肌中的一者或两者。

在一个实施方案中,向受试者施用dsRNA。

在一个实施方案中,皮下执行施用。

在一个实施方案中,静脉内执行施用。

附图说明

图1示出了siRNA化学结构、硫代磷酸酯(PS)含量和接头化学的变化的示意图,以评价这三个主要特征对组织分布和体内功效的影响。

图2描绘了结果,所述结果证明了siRNA结构和PS修饰的突出端的存在对组织分布和积累曲线的影响。(A)siRNA化学结构的示意图,其用于评价硫代磷酸酯突出端长度对siRNA肝外分布和功效的影响。(B)条形图,其示出了DCA缀合的、靶向Htt(顶部)或Ppib(底部)mRNA的siRNA在肝、肾、脾、肺、心脏、肌肉和脂肪中的积累。通过PNA杂交测定单次皮下注射DCA-siRNA(20mg/kg;n=每组5-6只小鼠±SD)一周后,测量siRNA积累。数据分析:t-检验(*P<0.05)。(C)条形图,其示出了不对称或常规siRNA与靶向Htt(左)或Ppib(右)mRNA的平末端siRNA的组织积累比。

图3描绘了结果,所述结果证明了5-nt或2-nt PS修饰的突出端的存在对DCA缀合的siRNA的肝外活性的影响。皮下注射不对称(A)、常规(B)或平末端(C)DCA缀合的靶向Htt(左图)或Ppib(右图)mRNA的siRNA后(n=每组5-6只小鼠,20mg/kg),肝、肾、脾、肺、心脏、肾上腺、肌肉和脂肪中的百分比沉默。使用QuantiGene®(Affymetrix)测量mRNA水平,归一化成管家基因Hprt(次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶)并且表示为PBS对照的百分比(平均值±SD)。数据分析:使用Dunnett检验进行单向ANOVA以进行多重比较(****P<

0.0001,***P<0.001,**P<0.01,*P<0.1)。(D)热图,其表明了SC注射DCA缀合的、靶向Htt或Ppib mRNA的siRNA之后(n=每组5-6只小鼠,20mg/kg),观察到的各个组织中不对称(5-nt突出端)、常规(2-nt突出端)和平末端(0-nt突出端)siRNA支架的沉默之间的统计学上显著的差异的程度。数据分析:t-检验。突出端的存在而不是它的长度对观察到的活性增强有深远的影响。

图4描绘了结果,所述结果证明了siRNA结构对组织积累和功效影响的影响。(A)图表,其将靶向Htt和Ppib的不对称、常规和平末端siRNA的siRNA组织分布和组织中的功效相关联。(B)图表,其示出了所有组织的不对称(左图)或常规(右图)到平末端siRNA的mRNA水平表达的差异。所有分析的组织和两个基因靶标都绘制在同一张图表中。负差异表明与平末端化合物相比,不对称或常规siRNA更好地诱导沉默。

图5描绘了结果,所述结果证明了在含有突出端的结构的背景中,PS含量的增加对组织积累的影响。(A)siRNA支架和PS含量变化的示意图。(B)条形图,其示出了高PS和低PS的、DCA缀合的、靶向Htt(顶部)或Ppib(底部)mRNA的siRNA在肝、肾、脾、肺、心脏、肌肉和脂肪中的积累。通过PNA杂交测定单次皮下注射DCA-siRNA(20mg/kg,n=每组5-6只小鼠±SD)一周后,测量siRNA积累。数据分析:t-检验(***P<0.001,**P<0.01,*P<0.1)。(C)图表,其示出了靶向Htt(左)或Ppib(右)mRNA的高PS(13PS)siRNA与低PS(8PS)siRNA的组织积累比。图8示出了DCA缀合的hsiRNA的固相合成。

图6描绘了结果,所述结果证明了PS含量的增加对影响组织中的siRNA功能性功效的影响。皮下注射高PS和低PS后,肝、肾、脾、肺、心脏、肾上腺、肌肉和脂肪中的百分比沉默。靶向Htt(左图)或Ppib(右图)mRNA的(A)常规siRNA或(B)平末端siRNA(n=每组5-6只小鼠,20mg/kg)。使用QuantiGene®(Affymetrix)测量mRNA水平,归一化成管家基因Hprt(次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶)并且表示为PBS(磷酸缓冲盐水)对照的百分比(平均值±SD)。数据分析:t-检验(****P<0.0001,***P<0.001,**P<0.01,*P<0.1)。

图7描绘了结果,所述结果证明了高PS含量对siRNA功效的影响。(A)图表,其将靶向Htt(上图)和Ppib(下图)的常规高PS和低PS siRNA和平末端高PS和低PS siRNA的siRNA组织分布和组织中的功效相关联。(B)图表,其示出了对应于低PS含量变体的常规高PS(左图)或平末端高PS(右图)的mRNA水平表达之间的差异。所有分析的组织和两个基因靶标都绘制在同一张图表中。正差异表明与高PS化合物相比,低PS siRNA更好地诱导沉默。

图8描绘了结果,所述结果证明了缀合物和siRNA之间的可切割接头的存在对siRNA组织分布和积累曲线的影响。(A)评价dT-PO与稳定碳(St)接头对分布的影响的siRNA化学结构的示意图。(B)条形图,其示出了具有dT-PO或稳定碳(St)接头的不对称(上)、常规(中)或平末端(底)DCA缀合的siRNA在肝、肾、脾、肺、心脏、肌肉和脂肪中的链积累。通过PNA杂交测定单次皮下注射DCA-siRNA(20mg/kg,n=每组5-6只小鼠±SD)一周后,测量siRNA积累。数据分析:t-检验(*P<0.1)。(C)条形图,其示出了不对称、常规和平末端dT-PO连接的siRNA与对应变体St连接的siRNA的组织积累比。

图9描绘了结果,所述结果证明了可切割接头的存在对多个组织中的DCA缀合的siRNA沉默的影响。将具有dT-PO或稳定碳(St)接头的不对称DCA缀合的siRNA皮下注射到FVB/N小鼠中(20mg/kg,n=每组6只)之后,肝、肾、脾、肺、心脏、肾上腺、肌肉和脂肪中的Htt(顶图)和Ppib(底图)的百分比沉默。注射后一周,收集组织,并且使用QuantiGene®

(Affymetrix)测量mRNA水平,归一化成管家基因Hprt(次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶)并且表示为PBS对照的百分比(平均值±SD)。数据分析:t-检验(****P<0.0001,***P<0.001,**P<0.01,*P<0.1)。

图10描绘了结果,所述结果证明了接头化学对组织积累和功效的影响。(A)图表,其将靶向Htt和Ppib的具有dT-PO接头和稳定碳(St)接头的不对称siRNA的siRNA组织分布和组织中的功效相关联。(B)图表,其示出了具有dT-PO接头的化合物与具有稳定碳(St)接头的siRNA的mRNA水平表达之间的差异。所有分析的组织和两个基因靶标都绘制在同一张图表中。负差异表明与DCA稳定碳(St)连接的化合物相比,DCA dT-PO连接的siRNA诱导更好的沉默。

图11描绘了用于增强肝外沉默的脂质缀合的siRNA的优化设计示意图。

具体实施方式

本公开涉及完全稳定且完全有活性的缀合寡核苷酸。为了确定驱动寡核苷酸(例如,双链(ds)RNA)、组织分布和细胞摄取的化学和生物学性质,将这些寡核苷酸(例如,dsRNA)与疏水部分DCA缀合。优化了若干个dsRNA性质,包括反义单链尾长、总硫代磷酸酯(PS)核苷酸间键修饰和缀合物接头的化学成熟度(可切割或稳定)。优化的dsRNA缀合物包含2个至5个核苷酸的单链尾、大约6个至18个总PS修饰和1个可切割接头。令人惊奇地发现,使用可切割接头增强了缀合dsRNA的沉默功效而不牺牲组织/器官积累。所得缀合dsRNA可以选择性地递送至多个组织,包括脂肪组织、骨骼肌、脾、肺、肾上腺、心脏、肝脏和肾脏。

本文所述的组合物促进寡核苷酸(例如,代谢稳定的siRNA)的简单、高效、无毒递送,并且促进体内多个组织中治疗靶标的有效沉默。本文提供了一种用于靶向其他组织的化学平台,所述平台在肝中匹配GalNAc缀合物的性能和临床影响。筛选并鉴定了若干种生物活性类固醇、内源性大麻素样、生物活性脂质缀合物和基于维生素的缀合物。这些化合物在若干种组织中显示出前所未有的分布、神经元摄取、功效和缺乏毒性,所述组织包括胸腺、膀胱、肠、皮肤、骨髓、胎盘、脂肪组织、肌肉、脾、胰腺、肺、输卵管、肾上腺、心脏、肝和肾。

在某些方面,本发明的寡核苷酸缀合物通过涉及以下的过程进行鉴定:(1)提供完全代谢稳定的支架(没有残留的RNA);(2)选择生物学上已知在细胞内内化的化合物,并鉴定允许高效组织分布的疏水性范围;(3)将这些疏水化合物与代谢稳定的siRNA缀合;(4)在体内筛选分布、功效和毒性。最佳疏水性范围的发现定义了预期有效的化学支架范围。发现低疏水性(皮质醇样)不足以确保良好的组织保留,而过多的疏水性(例如,胆固醇)最大限度地减少了从注射部位的分布。

定义

除非本文另有定义,否则本文使用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。如果存在任何潜在的歧义,本文提供的定义优先于任何字典或外部定义。除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。术语“包括(including)”以及其他形式诸如“包括(includes)”和“包括(included)”的使用不是限制性的。

为了可以更容易地理解本发明,首先定义某些术语。

术语“核苷”是指具有与核糖或脱氧核糖共价连接的嘌呤或嘧啶碱基的分子。示例

性核苷包括腺苷、鸟苷、胞苷、尿苷和胸苷。其他示例性核苷包括肌苷、1-甲基肌苷、假尿苷、5,6-二氢尿苷、核胸苷、2N-甲基鸟苷和N2,N2-二甲基鸟苷(也称为“稀有”核苷)。术语“核苷酸”是指具有以酯键连接至糖部分的一个或多个磷酸基团的核苷。示例性核苷酸包括核苷一磷酸、二磷酸和三磷酸。术语“多核苷酸”和“核酸分子”在本文中可互换使用,是指通过5’和3’碳原子之间的磷酸二酯或硫代磷酸酯键连接在一起的核苷酸聚合物。

术语“RNA”或“RNA分子”或“核糖核酸分子”是指核糖核苷酸(例如,2、3、4、5、10、15、20、25、30或更多个核糖核苷酸)的聚合物。术语“DNA”或“DNA分子”或“脱氧核糖核酸分子”是指脱氧核糖核苷酸的聚合物。DNA和RNA可以自然合成(例如,分别通过DNA复制或DNA转录)。RNA可以进行转录后修饰。DNA和RNA也可以化学合成。DNA和RNA可以是单链的(即,分别为ssRNA和ssDNA)或多链的(例如,双链,即分别为dsRNA和dsDNA)。“mRNA”或“信使RNA”是指定一条或多条多肽链的氨基酸序列的单链RNA。在蛋白质合成过程中,当核糖体与mRNA结合时,该信息被翻译。

如本文所用,术语“小干扰RNA”(“siRNA”)(在本领域中也称为“短干扰RNA”)是指包含约10-50个核苷酸(或核苷酸类似物)的RNA(或RNA类似物),它能够指导或介导RNA干扰。在某些实施方案中,siRNA包含约15-30个核苷酸或核苷酸类似物,或约16-25个核苷酸(或核苷酸类似物),或约18-23个核苷酸(或核苷酸类似物),或约19-22个核苷酸(或核苷酸类似物)(例如,19、20、21或22个核苷酸或核苷酸类似物)。术语“短”siRNA是指包含约21个核苷酸(或核苷酸类似物),例如19、20、21或22个核苷酸的siRNA。术语“长”siRNA是指包含约24-25个核苷酸,例如23、24、25或26个核苷酸的siRNA。在一些情况下,短siRNA可以包括少于19个核苷酸,例如16、17或18个核苷酸,只要较短的siRNA保留介导RNAi的能力。同样,在一些情况下,长siRNA可以包括超过26个核苷酸,只要在没有进一步加工(例如酶促加工)至短siRNA的情况下,更长的siRNA保留介导RNAi的能力。

术语“核苷酸类似物”或“改变的核苷酸”或“修饰的核苷酸”是指非标准核苷酸,包括非天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。示例性核苷酸类似物在任何位置被修饰以改变核苷酸的某些化学性质,但仍保留核苷酸类似物执行其预期功能的能力。可以衍生的核苷酸位置的实例包括:5位,例如5-(2-氨基)丙基尿苷、5-溴尿苷、5-丙炔尿苷、5-丙烯基尿苷等;6位,例如6-(2-氨基)丙基尿苷;和腺苷和/或鸟苷的8位,例如8-溴鸟苷、8-氯鸟苷、8-氟鸟苷等。核苷酸类似物还包括脱氮核苷酸,例如7-脱氮腺苷;O-和N-修饰的(例如,烷基化的,例如,N6-甲基腺苷,或如本领域中已知的)核苷酸;和其他杂环修饰的核苷酸类似物,例如Herdewijn,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.,2000Aug.10(4):297-310中描述的那些。

核苷酸类似物还可以包含对核苷酸糖部分的修饰。例如,2’OH-基团可以被选自H、OR、R、F、Cl、Br、I、SH、SR、NH_2、NHR、NR_2或COOR的基团取代,其中R是取代或未取代的C_1-C_6烷基、烯基、炔基、芳基等。其他可能修饰包括美国专利第5,858,988和6,291,438号描述的那些。

也可以修饰核苷酸的磷酸基团,例如,通过用硫(例如,硫代磷酸酯)取代磷酸基团的氧中的一个或多个,或通过进行允许核苷酸执行其预期功能的其他取代,诸如在例如Eckstein,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.2000年4月10(2):117-21,Rusckowski等人Antisense Nucleic Acid Drug Dev.2000年10月10(5):333-45,Stein,Antisense

Nucleic Acid Drug Dev.2001年10月11(5):317-25,Vorobjev等人Antisense Nucleic Acid Drug Dev.2001年4月11(2):77-85和美国专利号5,684,143中所描述。某些上文提及的修饰(例如磷酸根基团修饰)降低例如包含所述类似物的多核苷酸在体内或体外的水解速率。

术语“寡核苷酸”是指核苷酸和/或核苷酸类似物的短聚合物。

术语“RNA类似物”是指与相应的未改变或未修饰的RNA相比具有至少一个改变或修饰的核苷酸,但保留与相应的未改变或未修饰的RNA相同或相似的性质或功能的多核苷酸(例如,化学合成的多核苷酸)。如上所述,寡核苷酸可以通过键连接,与具有磷酸二酯键的RNA分子相比,这导致RNA类似物的水解速率较低。例如,类似物的核苷酸可以包含亚甲基二醇、乙二醇、氧甲硫基、氧乙硫基、氧羰基氧基、磷酰二胺、磷酰胺、和/或硫代磷酸酯键。一些RNA类似物包括糖和/或骨架修饰的核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸。此类改变或修饰可进一步包括添加非核苷酸材料,例如添加至RNA的末端或内部(在RNA的一个或多个核苷酸处)。RNA类似物只需要与天然RNA足够相似,以至于它具有介导RNA干扰的能力。

如本文所用,术语“RNA干扰”(“RNAi”)是指RNA的选择性细胞内降解。RNAi在细胞中自然发生以去除外源RNA(例如病毒RNA)。天然RNAi通过从游离dsRNA上切割下来的片段进行,这些片段将降解机制引导至其他类似的RNA序列。或者,RNAi可以由人工启动,例如,使靶基因的表达沉默。

具有“与靶mRNA序列充分互补以指导靶特异性RNA干扰(RNAi)”的链的RNAi剂,例如RNA沉默剂,是指该链具有足以通过RNAi机制或过程触发靶mRNA破坏的序列。

本文中使用的术语“分离RNA”(例如“分离siRNA”或“分离siRNA前体”)表示基本上没有通过重组技术产生时的其它细胞物质、或培养介质,或基本上没有化学合成时的化学前体或其它化合物的RNA分子。

如本文所用,术语“RNA沉默”是指由RNA分子介导的一组序列特异性调控机制(例如RNA干扰(RNAi)、转录基因沉默(TGS)、转录后基因沉默(PTGS)、压制、共抑制、和翻译抑制),导致相应蛋白质编码基因表达的抑制或“沉默”。已经在许多类型的生物体中观察到RNA沉默,包括植物、动物和真菌。

术语“体外”具有其本领域公认的含义,例如,涉及纯化的试剂或提取物,例如细胞提取物。术语“体内”也具有其本领域公认的含义,例如,涉及活细胞,例如永生化细胞、原代细胞、细胞系、和/或生物体内的细胞。

如本文所用,术语“靶基因”是其表达将被基本上抑制或“沉默”的基因。类似地,“靶RNA”是可以被本公开的双链RNA靶向用于抑制的基因产物。这种沉默可以通过RNA沉默来实现,例如通过切割靶基因的mRNA或靶基因的翻译抑制。术语“非靶基因”是其表达基本上不会被沉默的基因。在一个实施方案中,靶基因和非靶基因的多核苷酸序列(例如,由靶基因和非靶基因编码的mRNA)可以相差一个或多个核苷酸。在另一个实施方案中,靶基因和非靶基因可以因一种或多种多态性(例如,单核苷酸多态性或SNP)而不同。在另一个实施方案中,靶基因和非靶基因可以共享小于100%的序列同一性。在另一个实施方案中,非靶基因可以是靶基因的同源物(例如直向同源物或旁系同源物)。

如本文所用,术语RNA沉默剂(例如,siRNA或RNA沉默剂)的“反义链”是指与靶向用于沉默的基因的mRNA的约10-50个核苷酸(例如,约15-30、16-25、18-23或19-22个核苷酸)

的部分基本上互补的链。反义链或第一链具有与所需靶mRNA序列充分互补以指导靶特异性沉默的序列，例如足以触发RNAi机制或过程(RNAi干扰)破坏所需靶mRNA的互补性或足以触发所需靶mRNA的翻译抑制的互补性。

RNA沉默剂例如siRNA或RNA沉默剂的术语“有义链”或“第二链”是指与反义链或第一链互补的链。反义和有义链也可以称为第一或第二链，第一或第二链与靶序列具有互补性，相应的第二或第一链与所述第一或第二链具有互补性。miRNA双链体中间体或siRNA样双链体包括与靶向沉默基因的mRNA的约10-50个核苷酸的部分具有足够互补性的miRNA链和具有足够互补性以与miRNA形成双链体的miRNA*链。

如本文所用，术语“引导链”是指RNA沉默剂的链，例如siRNA双链体或siRNA序列的反义链，其进入RISC复合物并指导靶mRNA的切割。

如本文所用，如反义链5’端中的“5’端”是指在反义链5’末端的5’末端核苷酸，例如1个至约5个核苷酸之间。如本文所用，如反义链3’端中的“3’端”是指与互补反义链的5’端的核苷酸互补的区域，例如，1个至约5个核苷酸之间的区域。

如本文所用，术语“碱基对”是指寡核苷酸双链体(例如，由RNA沉默剂的链和靶mRNA序列形成的双链体)的相对链上的成对核苷酸(或核苷酸类似物)之间的相互作用，主要是由于所述核苷酸(或核苷酸类似物)之间的氢键、范德华相互作用等。如本文所用，术语“键强度”或“碱基对强度”是指碱基对的强度。

具有增强稳定性的RNA沉默剂

本申请的RNA沉默剂(例如，双链RNA)可以被修饰以提高在血清或细胞培养生长培养基中的稳定性。为了增强稳定性，可以稳定3’-残基以防止降解，例如，可以选择它们使得它们由嘌呤核苷酸(诸如腺苷或鸟苷核苷酸)组成。或者，用修饰的类似物取代嘧啶核苷酸，例如用2’-脱氧胸苷取代尿苷是可以接受的，并且不影响RNA干扰的效率。

在一方面，本申请的特征在于包括第一和第二链的RNA沉默剂，其中第二链和/或第一链通过用修饰的核苷酸取代内部核苷酸来修饰，使得与相应的未修饰的RNA沉默剂相比，增强了体内稳定性。如本文所定义，“内部”核苷酸是指存在于除核酸分子、多核苷酸或寡核苷酸的5’端或3’端之外的任何位置的核苷酸。内部核苷酸可以在单链分子内或在双链体或双链分子的链内。在一个实施方案中，有义链和/或反义链通过替换至少一个内部核苷酸来修饰。在另一个实施方案中，有义链和/或反义链通过至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个内部核苷酸的取代来修饰。在另一个实施方案中，有义链和/或反义链通过至少取代5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或更多的内部核苷酸来修饰。在又一个实施方案中，有义链和/或反义链通过替换所有内部核苷酸而被修饰。

在一方面，本申请的特征在于至少80％化学修饰的RNA沉默剂。在某些实施方案中，RNA沉默剂可以被完全化学修饰，即100％的核苷酸被化学修饰。另一方面，本申请的特征在于包含至少80％化学修饰的2’-OH核糖基团的RNA沉默剂。在某些实施方案中，RNA沉默剂包含约80％、85％、90％、95％、或100％化学修饰的2’-OH核糖基团。

在某些实施方案中，RNA沉默剂可以包含至少一种修饰的核苷酸类似物。核苷酸类似物可以位于靶特异性沉默活性(例如，RNAi介导活性或翻译抑制活性)基本上不受影响的

位置，例如，在siRNA分子的5'-末端和/或3'-末端的区域中。此外，可以通过掺入修饰的核苷酸类似物来稳定末端。

示例性核苷酸类似物包括糖和/或骨架修饰的核糖核苷酸(即包括对磷酸糖骨架的修饰)。例如，可以修饰天然RNA的磷酸二酯键以包括氮或硫杂原子中的至少一种。在示例性的骨架修饰的核糖核苷酸中，连接到相邻核糖核苷酸的磷酸酯基团被修饰的基团(例如硫代磷酸酯基团)替代。在示例性的糖修饰的核糖核苷酸中，2′-OH-基团可被选自H、OR、R、卤代基、SH、SR、NH_2、NHR、NR_2或CN的基团代替，其中R为C_1-C_6烷基、烯基或炔基并且卤代基为F、Cl、Br或I。

在某些实施方案中，修饰是2'-氟、2'-氨基和/或2'-硫修饰。修饰包括2'-氟-胞苷、2'-氟-尿苷、2'-氟-腺苷、2'-氟-鸟苷、2'-氨基-胞苷、2'-氨基-尿苷、2'-氨基-腺苷、2'-氨基鸟苷、2,6-二氨基嘌呤、4-硫代尿苷，和/或5-氨基烯丙基尿苷。在某个实施方案中，2'-氟核糖核苷酸是每个尿苷和胞苷。其他示例性修饰包括5-溴-尿苷、5-碘-尿苷、5-甲基-胞苷、核糖-胸苷、2-氨基嘌呤、2'-氨基-丁酰基-苤-尿苷、5-氟-胞苷和5-氟尿苷。2'-脱氧核苷酸和2'-Ome核苷酸也可用于本方面的修饰的RNA-沉默剂部分。额外的修饰的残基包括脱氧无碱基、肌苷、N3-甲基-尿苷、N6,N6-二甲基-腺苷、假尿苷、嘌呤核糖核苷和利巴韦林(ribavirin)。在某个实施方案中，2'部分是甲基，使得连接部分是2'-O-甲基寡核苷酸。

在某个实施方案中，本申请的RNA沉默剂包含锁核酸(LNA)。LNA包含抗核酸酶活性(高度稳定)并具有对mRNA的单核苷酸区分的糖修饰核苷酸(Elmen等人，Nucleic Acids Res.,(2005),33(1):439-447;Braasch等人(2003)Biochemistry 42:7967-7975,Petersen等人(2003)Trends Biotechnol 21:74-81)。这些分子具有2'-O,4'-C-乙烯桥连的核酸，并具有可能的修饰，例如2'-脱氧-2"-氟尿苷。此外，LNA通过将糖部分限制在3'-内构象中来增加寡核苷酸的特异性，从而预先组织核苷酸以进行碱基配对，并将寡核苷酸的解链温度提高多达10℃/碱基。

在另一个示例性实施方案中，本申请的RNA沉默剂包括肽核酸(PNA)。PNA包含修饰的核苷酸，其中核苷酸的糖磷酸部分被中性2-氨基乙基甘氨酸部分取代，所述部分能够形成聚酰胺骨架，所述聚酰胺骨架对核酸酶消化具有高度抗性，并赋予分子更高的结合特异性(Nielsen等人，Science,(2001),254:1497--1500)。

还考虑了核碱基修饰的核糖核苷酸，即含有至少一种非天然存在的核碱基而不是天然存在的核碱基的核糖核苷酸。可以修饰碱基以阻断腺苷脱氨酶的活性。示例性修饰的核碱基包括但不限于5-位修饰的尿苷和/或胞苷，例如5-(2-氨基)丙基尿苷、5-溴尿苷；在8位修饰的腺苷和/或鸟苷，例如8-溴鸟苷；脱氮核苷酸，例如7-脱氮-腺苷；O-和N-烷基化核苷酸，例如N6-甲基腺苷是合适的。应当注意，上述修饰可以组合。

在其他实施方案中，可以使用交联来改变RNA沉默剂的药代动力学，例如，增加体内的半衰期。因此，本申请包括具有两条互补核酸链的RNA沉默剂，其中两条链是交联的。本申请还包括与另一部分(例如非核酸部分，诸如肽)、有机化合物(例如染料)或类似物缀合或未缀合(例如，在其3'末端处)的RNA沉默剂。与相应的siRNA相比，以这种方式修饰siRNA衍生物可以改善所得siRNA衍生物的细胞吸收或增强细胞靶向活性，可用于追踪细胞中的siRNA衍生物，或与相应的siRNA相比，提高siRNA衍生物的稳定性。

其他示例性修饰包括：(a)2'修饰，例如在有义链或反义链上，但尤其是在有义链

上提供2'OMe部分,或在3'突出端中提供2'OMe部分,例如在3'末端(3'末端是指在分子的3'原子或在最3'部分,例如,如上下文所指示的最3'P或2'位置);(b)修饰磷酸骨架中的骨架,例如用S替换O,例如在U或A或两者上,特别是在反义链上提供硫代磷酸酯修饰;例如,将O替换为S;(c)用C5氨基接头替换U;(d)用G替换A(在一些实施方案中,序列变化可以位于有义链上而不是反义链上);和(d)在2'、6'、7'或8'位置进行修饰。示例性实施方案是其中这些修饰中的一种或多种存在于有义链但不存在于反义链上的那些,或其中反义链具有较少此类修饰的实施方案。其他示例性修饰包括在3'突出端,例如在3'末端使用甲基化P;2'修饰(例如提供2'OMe部分)和主链的修饰,例如用S替换O,例如提供硫代磷酸酯修饰,或在3'突出端,例如在3'末端使用甲基化P的组合;用3'烷基修饰;在3'突出端,例如在3'末端用脱碱基吡咯烷酮进行修饰;用萘普生(naproxen)、布洛芬(ibuprofen)或其他抑制3'末端降解的部分进行修饰。

重度修饰的RNA沉默剂

在某些实施方案中,RNA沉默剂包含至少80%的化学修饰核苷酸。在某些实施方案中,RNA沉默剂被完全化学修饰,即100%的核苷酸被化学修饰。

在某些实施方案中,RNA沉默剂富含2'-O-甲基,即包含大于50%的2'-O-甲基含量。在某些实施方案中,RNA沉默剂包含至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%2'-O-甲基核苷酸含量。在某些实施方案中,RNA沉默剂包含至少约70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,RNA沉默剂包含约70%与约90%之间的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,RNA沉默剂是包含反义链和有义链的dsRNA。在某些实施方案中,反义链包含至少约70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,反义链包含约70%与约90%之间的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,有义链包含至少约70%的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,有义链包含约70%与约90%之间的2'-O-甲基核苷酸修饰。在某些实施方案中,有义链包含100%的2'-O-甲基核苷酸修饰。

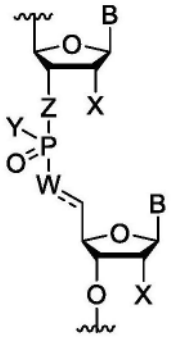
U.S.S.N.16/550,076(2019年8月23日提交)和U.S.S.N.62/891,185(2019年8月23日提交)中进一步描述了富含2'-O-甲基的RNA沉默剂和特定的化学修饰模式,每一个都以引用的方式并入本文。

核苷酸间键修饰

在某些实施方案中,至少一个核苷酸间键、亚基间键或核苷酸骨架在RNA沉默剂中被修饰。在某些实施方案中,RNA沉默剂中的所有核苷酸间键都被修饰。在某些实施方案中,修饰的核苷酸间键包含硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,RNA沉默剂包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,RNA沉默剂包含4-16个硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,RNA沉默剂包含8-13个硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,RNA沉默剂是包含反义链和有义链的dsRNA,反义链和有义链各自包含5'端和3'端。在某些实施方案中,有义链5'端的位置1和2的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键连接到相邻的核糖核苷酸。在某些实施方案中,有义链3'端的位置1和2的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键连接到相邻的核糖核苷酸。在某些实施方案中,反义链5'端的位置1和2的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键连接到相邻的核糖核苷酸。在某些实施方案中,反义链3'端的位置1-2至1-8的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键连接到相邻的核糖核苷酸。在某些实施方案中,反义链3'端的位

置1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7或1-8的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键连接到相邻的核糖核苷酸。在某些实施方案中，反义链3'端的位置1-2至1-7的核苷酸通过硫代磷酸酯核苷酸间键连接到相邻的核糖核苷酸。

在一方面，本公开提供了一种与靶互补的修饰的寡核苷酸，所述寡核苷酸具有5'端、3'端，其中所述寡核苷酸包含有义链和反义链，以及至少一个修饰的式(I)亚基间键：



(I)；

其中：

B为碱基配对部分；

W选自由O、OCH_2、OCH、CH_2和CH组成的组；

X选自由卤代基、羟基和C_{1-6}烷氧基组成的组；

Y选自由O^-、OH、OR、NH^-、NH_2、S^-和SH组成的组；

Z选自由O和CH_2组成的组；

R是保护基；并且

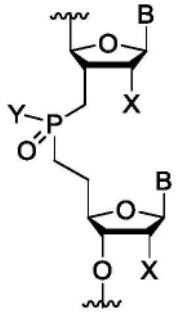
---是任选的双键。

在式(I)的一个实施方案中，当W为CH时，---为双键。

在式(I)的一个实施方案中，当W选自由O、OCH_2、OCH、CH_2组成的组时，---为单键。

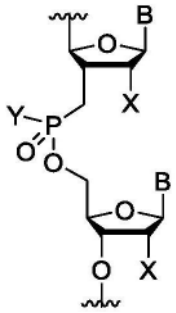
在式(I)的一个实施方案中，当Y是O^-时，Z或W不是O。

在式(I)的一个实施方案中，Z是CH_2并且W是CH_2。在另一个实施方案中，式(I)的修饰的亚基间键是式(II)的修饰的亚基间键：



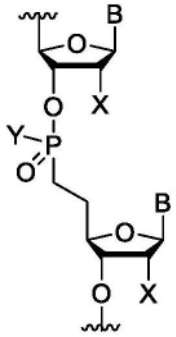
(II)。

在式(I)的一个实施方案中，Z是CH_2并且W是O。在另一个实施方案中，其中式(I)的修饰的亚基间键是式(III)的修饰的亚基间键：



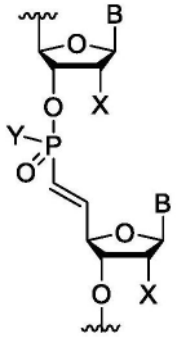
(III)。

在式(I)的一个实施方案中,Z是O并且W是CH_2。在另一个实施方案中,式(I)的修饰的亚基间键是式(IV)的修饰的亚基间键:



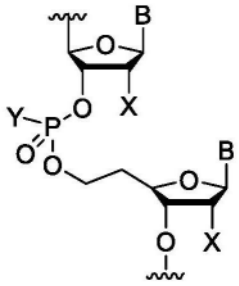
(IV)。

在式(I)的一个实施方案中,Z是O并且W是CH。在另一个实施方案中,式(I)的修饰的亚基间键是式V的修饰的亚基间键:



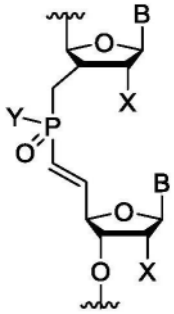
(V)。

在式(I)的一个实施方案中,Z是O并且W是OCH_2。在另一个实施方案中,式(I)的修饰的亚基间键是式VI的修饰的亚基间键:



(VI)。

在式(I)的一个实施方案中，Z是CH_2并且W是CH。在另一个实施方案中，式(I)的修饰的亚基间键是式VII的修饰的亚基间键：

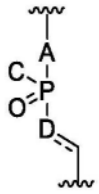


(VII)。

在式(I)的一个实施方案中，碱基配对部分B选自由腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶组成的组。

在一个实施方案中，将修饰的寡核苷酸并入与靶互补的siRNA中，所述修饰的siRNA具有5'端、3'端，其中siRNA包含有义链和反义链，以及式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)或式(VII)中的任意一种或多种的至少一个修饰的亚基间键。

在一个实施方案中，将修饰的寡核苷酸并入siRNA，所述修饰的siRNA具有5'端、3'端，其与靶标互补并包含有义和反义链，其中所述siRNA包含至少一个式VIII的修饰的亚基间键：



(VIII);

其中：

D选自由O、OCH_2、OCH、CH2和CH组成的组；

C选自由O^-、OH、OR^1、NH^-、NH_2、S^-和SH组成的组；

A选自由O和CH_2组成的组；

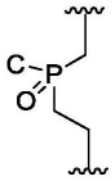
R^1是保护基；

---是任选的双键;并且

亚基间桥接两个任选修饰的核苷。

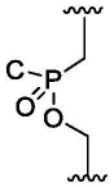
在一个实施方案中,当C是O^-时,A或D不是O。

在一个实施方案中,D是CH_2。在另一个实施方案中,式VIII的修饰的亚基间键是式(IX)的修饰的亚基间键:



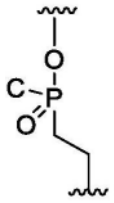
(IX)。

在一个实施方案中,D是O。在另一个实施方案中,式VIII的修饰的亚基间键是式(X)的修饰的亚基间键:



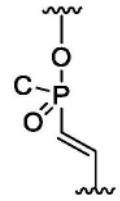
(X)。

在一个实施方案中,D是CH_2。在另一个实施方案中,式(VIII)的修饰的亚基间键是式(XI)的修饰的亚基间键:



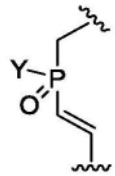
(XI)。

在一个实施方案中,D是CH。在另一个实施方案中,式VIII的修饰的亚基间键是式(XII)的修饰的亚基间键:



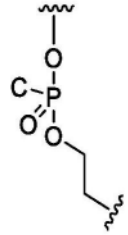
(XII)。

在另一个实施方案中,式(VII)的修饰的亚基间键是式(XIV)的修饰的亚基间键:



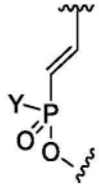
(XIV)。

在一个实施方案中,D是OCH_2。在另一个实施方案中,式(VII)的修饰的亚基间键是式(XIII)的修饰的亚基间键:



(XIII)。

在另一个实施方案中,式(VII)的修饰的亚基间键是式(XXa)的修饰的亚基间键:



(XXa)。

在修饰的siRNA键的一个实施方案中,每个任选修饰的核苷在每次出现时独立地选自由腺苷、鸟苷、胞苷和尿苷组成的组。

在式(I)的某些示例性实施方案中,W是O。在另一个实施方案中,W是CH_2。在又一个实施方案中,W是CH。

在式(I)的某些示例性实施方案中,X是OH。在另一个实施方案中,X是OCH_3。在又一个实施方案中,X是卤代基。

在式(I)的某个实施方案中,修饰的siRNA不包含2'-氟取代基。

在式(I)的一个实施方案中,Y为O^-。在另一个实施方案中,Y是OH。在又一个实施方案中,Y是OR。在又一个实施方案中,Y是NH^-。在一个实施方案中,Y为NH_2。在另一个实施方案中,Y是S^-。在又一个实施方案中,Y是SH。

在式(I)的一个实施方案中,Z是O。在另一个实施方案中,Z是CH_2。

在一个实施方案中,修饰的亚基间键插入反义链的位置1-2。在另一个实施方案中,修饰的亚基间键插入反义链的位置6-7。在又一个实施方案中,修饰的亚基间键插入反义链的位置10-11。在另一个实施方案中,修饰的亚基间键插入反义链的位置19-20。在一个实施方案中,修饰的亚基间键插入反义链的位置5-6和18-19。

在式(VIII)的修饰的siRNA键的一个示例性实施方案中,C是O^-。在另一个实施方

案中,C是OH。在另一个实施方案中,C是OR^1。在另一个实施方案中,C是NH^-。在一个实施方案中,C是NH_2。在另一个实施方案中,C是S^-。在又一个实施方案中,C是SH。

在式(VIII)的修饰的siRNA键的一个示例性实施方案中,A是O。在另一个实施方案中,A是CH_2。在又一个实施方案中,C是OR^1。在另一个实施方案中,C是NH^-。在一个实施方案中,C是NH_2。在另一个实施方案中,C是S^-。在又一个实施方案中,C是SH。

在式(VIII)的修饰的siRNA键的某个实施方案中,任选修饰的核苷是腺苷。在式(VIII)的修饰的siRNA键的另一个实施方案中,任选修饰的核苷是鸟苷。在式(VIII)的修饰的siRNA键的另一个实施方案中,任选修饰的核苷是胞苷。在式(VIII)的修饰的siRNA键的另一个实施方案中,任选修饰的核苷是尿苷。

在修饰的siRNA键的一个实施方案中,其中该键插入反义链的位置1-2。在另一个实施方案中,该键插入反义链的位置6-7。在又一个实施方案中,该键插入反义链的位置10-11。在另一个实施方案中,该键插入反义链的位置19-20。在一个实施方案中,该键插入反义链的位置5-6和18-19。

在式(I)的某些实施方案中,碱基配对部分B是腺嘌呤。在式(I)的某些实施方案中,碱基配对部分B是鸟嘌呤。在式(I)的某些实施方案中,碱基配对部分B是胞嘧啶。在式(I)的某些实施方案中,碱基配对部分B是尿嘧啶。

在式(I)的一个实施方案中,W是O。在式(I)的一个实施方案中,W是CH_2。在式(I)的一个实施方案中,W是CH。

在式(I)的一个实施方案中,X是OH。在式(I)的一个实施方案中,X是OCH_3。在式(I)的一个实施方案中,X为卤代基。

在式(I)的示例性实施方案中,修饰的寡核苷酸不包含2'-氟取代基。

在式(I)的一个实施方案中,Y为O^-。在式(I)的一个实施方案中,Y为OH。在式(I)的一个实施方案中,Y为OR。在式(I)的一个实施方案中,Y为NH^-。在式(I)的一个实施方案中,Y为NH_2。在式(I)的一个实施方案中,Y为S^-。在式(I)的一个实施方案中,Y为SH。

在式(I)的一个实施方案中,Z为O。在式(I)的一个实施方案中,Z为CH_2。

在式(I)的一个实施方案中,该键插入反义链的1-2位。在式(I)的另一个实施方案中,该键插入反义链的6-7位。在式(I)的另一个实施方案中,该键插入反义链的10-11位。在式(I)的另一个实施方案中,该键插入反义链的19-20位。在式(I)的一个实施方案中,该键插入反义链的5-6和18-19位。

U.S.S.N.62/824,136(2019年3月26日提交)、U.S.S.N.62/826,454(2019年3月29日提交)和U.S.S.N.62/864,792(2019年6月21日提交)中进一步描述了修饰的亚基间键,每一篇都以引用方式并入本文。

缀合功能部分

在其他实施方案中,可以用一种或多种功能部分修饰RNA沉默剂。功能部分是赋予RNA沉默剂一种或多种额外活性的分子。在某些实施方案中,功能性部分增强靶细胞(例如神经元细胞)的细胞摄取。因此,本发明还包括与另一部分(例如非核酸部分,诸如肽)、有机化合物(例如染料)或类似物缀合或未缀合(例如,在其5'末端和/或3'末端处)的RNA沉默剂。缀合可以通过本领域已知的方法完成,例如使用以下方法:Lambert等人,Drug Deliv.Rev.:47(1),99-112(2001)(描述了加载到聚氰基丙烯酸烷基酯(PACA)纳米颗粒上

的核酸);Fattal等人,J.Control Release 53(1-3):137-43(1998)(描述与纳米颗粒结合的核酸);Schwab等人,Ann.Oncol.5增刊4:55-8(1994)(描述了与嵌入剂、疏水基团、聚阳离子或PACA纳米颗粒连接的核酸);和Godard等人,Eur.J.Biochem.232(2):404-10(1995)(描述了与纳米颗粒连接的核酸)。

在某个实施方案中,功能部分为疏水部分。在某个实施方案中,疏水部分选自由以下组成的组:脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂和核苷类似物、内源性大麻素和维生素。在某个实施方案中,类固醇选自由胆固醇和石胆酸(LCA)组成的组。在某个实施方案中,脂肪酸选自由二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)和二十二碳酸(DCA)组成的组。在某个实施方案中,维生素选自由胆碱、维生素A、维生素E及其衍生物或代谢物组成的组。在某个实施方案中,维生素选自由视黄酸和琥珀酸α-生育酚组成的组。

在某个实施方案中,本发明的RNA沉默剂与亲脂部分缀合。在一个实施方案中,亲脂部分是包括阳离子基团的配体。在另一个实施方案中,亲脂部分连接至siRNA的一条或两条链。在一个示例性实施方案中,亲脂部分连接到siRNA有义链的一端。在另一个示例性实施方案中,亲脂部分连接到有义链的3'端。在某些实施方案中,亲脂部分选自由以下组成的组:胆固醇、维生素E、维生素K、维生素A、叶酸、阳离子染料(例如Cy3)。在一个示例性实施方案中,亲脂部分是胆固醇。其他亲脂性部分包括胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆酸、二甲氧基三苯甲基或吩噁嗪。

在某些实施方案中,功能部分可包含一种或多种配体,其与RNA沉默剂连接以提高稳定性、与靶核酸的杂交热力学、靶向特定组织或细胞类型、或细胞渗透性,例如通过内吞作用依赖性或无关的机制。配体和相关修饰也可以增加序列特异性,从而减少异位靶向。栓系配体可包括一种或多种可用作嵌入剂的修饰碱基或糖。这些可以位于内部区域,例如在RNA沉默剂/靶双链体的凸起中。嵌入剂可以是芳族化合物,例如多环芳族化合物或杂环芳族化合物。多环嵌入剂可以具有堆叠能力,并且可以包括具有2、3或4个稠环的系统。本文所述的通用碱基可以包含在配体上。在一个实施方案中,配体可以包括一个切割基团,其有助于通过切割靶核酸来抑制靶基因。切割基团可以是例如博来霉素(例如博来霉素-A5、博来霉素-A2或博来霉素-B2)、芘、菲咯啉(例如O-菲咯啉)、聚胺、三肽(例如lys-tyr-lys三肽),或金属离子螯合基团。金属离子螯合基团可以包括例如Lu(III)或EU(III)大环络合物、Zn(II)2,9-二甲基菲咯啉衍生物、Cu(II)三联吡啶或吖啶,它们可以促进游离金属离子(如Lu(III))在凸起部位选择性切割靶RNA。在一些实施方案中,肽配体可以与RNA沉默剂连接以促进靶RNA的切割,例如在凸起区域。例如,1,8-二甲基-1,3,6,8,10,13-六氮杂环十四烷(cyclam)可以与肽(例如通过氨基酸衍生物)缀合以促进靶RNA切割。栓系配体可以是氨基糖苷配体,其可以使RNA沉默剂具有改进的杂交特性或改进的序列特异性。示例性氨基糖苷类包括糖基化聚赖氨酸、半乳糖基化聚赖氨酸、新霉素B、妥布霉素、卡那霉素A和氨基糖苷类的吖啶缀合物,例如新-N-吖啶、新-S-吖啶、新-C-吖啶、Tobra-N-吖啶和KanaA-N-吖啶。使用吖啶类似物可以增加序列特异性。例如,与DNA相比,新霉素B对RNA的亲和力高,但序列特异性低。吖啶类似物新-5-吖啶对HIV Rev响应元件(RRE)的亲和力增加。在一些实施方案中,氨基糖苷配体的胍类似物(胍基糖苷)被栓系至RNA沉默剂。在胍基糖苷中,氨基酸上的

胺基被胍基交换。胍类似物的附接可以增强RNA沉默剂的细胞渗透性。栓系配体可以是聚精氨酸肽、类肽或拟肽，其可以增强寡核苷酸试剂的细胞摄取。

示例性的配体通过插入的系链直接或间接地与配体缀合的载体偶合。在某些实施方案中，偶合是通过共价键进行的。在某些实施方案中，配体通过插入的系链连接至载体。在某些实施方案中，配体改变其所掺入的RNA沉默剂的分布、靶向或寿命。在某些实施方案中，例如与没有这种配体的物种相比，配体提供对选定靶标的增强的亲和力，例如分子、细胞或细胞类型、隔室，例如细胞或器官隔室、组织、器官或身体区域。

示例性配体可以改善转运、杂交和特异性性质，并且还可以改善所得天然或修饰的RNA沉默剂或包含本文所述单体和/或天然或修饰的核糖核苷酸的任何组合的聚合物分子的核酸酶抗性。配体一般可以包括治疗性修饰剂，例如用于增强摄取；诊断化合物或报告基团，例如，用于监测分布；交联剂；核酸酶抗性赋予部分；和天然或不寻常的核碱基。一般实例包括亲脂性物质、脂质、类固醇(例如，乌发醇、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元)、萜烯(例如，三萜，例如菝葜皂苷元、无羁萜、表无羁萜醇衍生的石胆酸)、维生素(例如，叶酸、维生素A、生物素、吡哆醛)、碳水化合物、蛋白质、蛋白质结合剂、整合素靶向分子、聚阳离子、肽、多胺和肽模拟物。配体可以包括天然存在的物质(例如，人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白)；碳水化合物(例如，葡聚糖、支链淀粉、甲壳素、壳聚糖、菊粉、环糊精或透明质酸)；氨基酸或脂质。配体也可以是重组或合成分子，例如合成聚合物，例如合成聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括聚氨基酸是聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪。多胺的实例包括：聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、多胺、假肽-多胺、拟肽多胺、树枝状多胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、多胺的季盐或α螺旋肽。

配体还可以包括结合特定细胞类型如肾细胞的靶向基团，例如细胞或组织靶向剂，例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质，例如抗体。靶向基团可以是促甲状腺素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺(GalNAc)或其衍生物、N-乙酰基-葡糖胺、多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、二膦酸盐、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸、维生素B12、生物素或RGD肽或RGD肽模拟物。配体的其他实例包括染料、嵌入剂(例如吖啶和取代的吖啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德克萨斯卟啉(texaphyrin)、Sapphyrin)、多环芳烃(例如吩嗪、二氢吩嗪、菲咯啉、芘)、lys-tyr-lys三肽、氨基糖苷类、胍氨基糖苷、人工核酸内切酶(例如EDTA)、亲脂性分子例如胆固醇(及其硫代类似物)、胆酸、胆烷酸、石胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、甘油(例如，酯(例如，单、双或三脂肪酸酯，例如，C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}、C_{14}、C_{15}、C_{16}、C_{17}、C_{18}、C_{19}或C_{20}脂肪酸)及其醚类，例如C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}、C_{14}、C_{15}、C_{16}、C_{17}、C_{18}、C_{19}或C_{20}烷基；例如，1,3-双-O(十六烷基)甘油、1,3-双-O(十八烷基)甘油)、香叶氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、硬脂酸(例如，二硬脂酸甘油酯)、油酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰)石胆酸、O3-(油酰)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩恶嗪)和肽缀合物(例如，触足肽、Tat肽)、烷化剂、磷酸盐、氨基、巯基、PEG(例如，PEG-40K)、MPEG、[MPEG]2、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射性标记的

标记、酶、半抗原(例如生物素),转运/吸收促进剂(如阿司匹林、萘普生、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶(如咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吖啶-咪唑缀合物、四氮杂大环的Eu^{3+}络合物)、二硝基苯基、HRP或AP。在某些实施方案中,配体是GalNAc或其衍生物。

配体可以是蛋白质,例如糖蛋白,或肽,例如对共配体具有特定亲和力的分子,或抗体例如与特定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞结合的抗体。配体还可能包括激素和激素受体。它们还可以包括非肽类物质,例如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。配体可以是例如脂多糖、p38MAP激酶的激活剂或NF-kB的激活剂。

配体可以是可以例如通过破坏细胞的细胞骨架,例如通过破坏细胞的微管、微丝、和/或中间丝来增加RNA沉默剂摄取至细胞中的物质,例如药物。所述药物可以是例如分类群、长春新碱、长春碱、细胞松弛素、诺考达唑、japlakinolide、拉春库林A(latrunculin A)、鬼笔环肽、swinholide A、茚满新碱(indanocine)或myoservin。例如,配体可以通过激活炎症响应来增加RNA沉默剂摄取至细胞中。具有这种作用的示例性配体包括肿瘤坏死因子α(TNF□)、白细胞介素1β或γ干扰素。在一方面,配体是脂质或基于脂质的分子。这种脂质或基于脂质的分子可以结合血清蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)。HSA结合配体允许将缀合物分布到靶组织,例如身体的非肾靶组织。例如,靶组织可以是肝脏,包括肝脏的实质细胞。其他可以结合HSA的分子也可以用作配体。例如,可以使用奈普洛辛或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可以(a)增加对缀合物降解的抗性,(b)增加靶向或转运到靶细胞或细胞膜中,和/或(c)可用于调节与血清蛋白例如HSA的结合。基于脂质的配体可用于调节例如控制缀合物与靶组织的结合。例如,与HSA结合更强的脂质或基于脂质的配体将不太可能靶向肾脏,因此不太可能从体内清除。与HSA结合较弱的脂质或基于脂质的配体可用于将缀合物靶向肾脏。在某个实施方案中,基于脂质的配体结合HSA。基于脂质的配体可以以足够的亲和力结合HSA,使得缀合物将分布到非肾组织。然而,预期亲和力不会强到不能逆转HSA-配体结合。在另一个实施方案中,基于脂质的配体弱结合或根本不结合HSA,使得缀合物将分布到肾脏。靶向肾细胞的其他部分也可用于代替或补充基于脂质的配体。

在另一个方面,配体是被靶细胞例如增殖细胞吸收的部分,例如维生素。这些可用于治疗以不希望的细胞增殖为特征的疾病,例如恶性或非恶性类型的细胞,例如癌细胞。示例性维生素包括维生素A、E和K。其他示例性维生素包括B族维生素,例如叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或癌细胞吸收的其他维生素或营养素。还包括HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

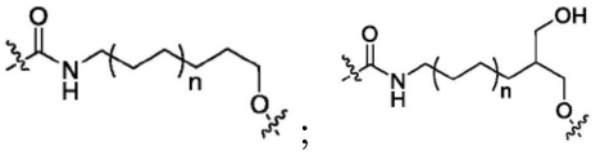
在另一个方面,配体是细胞渗透剂,例如螺旋细胞渗透剂。在某些实施方案中,试剂是两亲性的。示例性试剂是肽,例如tat或触足。如果试剂是肽,它可以被修饰,包括肽模拟物、转化体、非肽或假肽键,以及使用D-氨基酸。螺旋剂可以是α-螺旋剂,其可以具有亲脂相和疏脂相。

配体可以是肽或肽模拟物。肽模拟物(本文也称为寡肽模拟物)是能够折叠成类似于天然肽的确定的三维结构的分子。肽和肽模拟物与寡核苷酸试剂的连接可以影响RNA沉默剂的药代动力学分布,例如通过增强细胞识别和吸收。肽或肽模拟部分可以是约5-50个氨基酸长,例如,约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。肽或肽模拟物可以是例如细胞渗透肽、阳离子肽、两亲肽或疏水肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树状肽、约束肽或交联肽。肽部分可以是L-肽或D-肽。在另一个备选方案中,肽部分可以

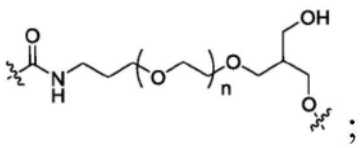
包括疏水膜易位序列(MTS)。肽或肽模拟物可由DNA的随机序列编码，例如从噬菌体展示文库或单珠一化合物(OBOC)组合文库中鉴定的肽(Lam等人，Nature 354:82-84,1991)。在示例性实施方案中，通过掺入的单体单元与RNA沉默剂连接的肽或肽模拟物是细胞靶向肽，例如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分的长度范围可以从约5个氨基酸到约40个氨基酸。肽部分可以具有结构修饰，例如以增加稳定性或直接构象特性。可以使用下面描述的任何结构修改。

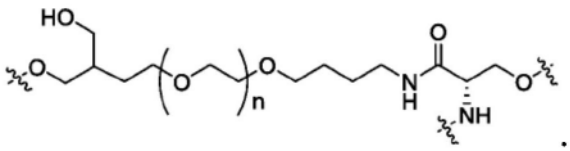
在某些实施方案中，功能部分连接到本发明的RNA沉默剂的5'端和/或3'端。在某些实施方案中，功能部分连接到本发明的RNA沉默剂的反义链的5'端和/或3'端。在某些实施方案中，功能部分连接到本发明的RNA沉默剂的有义链的5'端和/或3'端。在某些实施方案中，功能部分连接到本发明的RNA沉默剂的有义链的3'端。

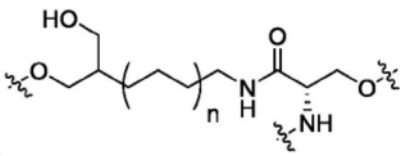
在某些实施方案中，功能部分通过接头与RNA沉默剂连接。在某些实施方案中，功能部分通过接头与反义链和/或有义链连接。在某些实施方案中，功能部分通过接头与有义链的3'端连接。在某些实施方案中，接头包含二价或三价接头。在某些实施方案中，接头包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸二酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、酰胺、氨基甲酸酯、或其组合。在某些实施方案中，二价或三价接头选自：


；

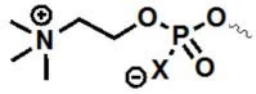
；


；

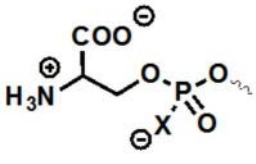

；


其中n为1、2、3、4或5。；或

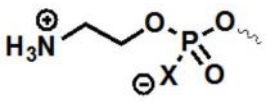
在某些实施方案中，接头还包含磷酸二酯或磷酸二酯衍生物。在某些实施方案中，磷酸二酯或磷酸二酯衍生物选自由以下组成的组：


；

(Zc1);

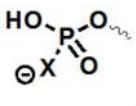

；

(Zc2);



;以及

(Zc3)



;

(Zc4)

其中X是O、S或BH_3。

本公开的各种功能部分以及将它们与RNA沉默剂缀合的方法在WO2017/030973A1和WO2018/031933A2中进一步详细地描述,所述文献以引用方式并入本文。

实施例

材料和方法

寡核苷酸合成

按照标准方案使用MerMade 12合成器合成寡核苷酸。在定制的合成DCA功能化控制孔玻璃(CPG)支持物上以10微摩尔的规模合成DCA缀合的有义链(Biscans等人(2019)Nucleic Acid Res.,47,1082-1096)。在用Unylinker® (ChemGenes,Wilmington,MA,USA)功能化的CPG上以10微摩尔的规模合成反义链。所有亚磷酰胺均制备成0.15 M无水乙腈溶液,并使用0.25 M 5-(苄基硫基)-1H四唑(BTT)的乙腈溶液作为活化剂偶合250秒。使用二氯甲烷中的3%二氯乙酸来去除三苯甲基基团持续80秒。生长的寡核苷酸链上的未反应的5个羟基被四氢呋喃(CAP B)和80:10:10(v/v/v)四氢呋喃:乙酸酐:2,6-二甲基吡啶(CAP A)中的16%N甲基咪唑封端持续15秒。用0.1 M的3-[(二甲基氨基亚甲基)氨基]-3H-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(DDTT)在乙腈中的溶液进行硫化3分钟。用四氢呋喃:吡啶:水(70:20:10,v/v/v)中的0.02M碘执行氧化80秒。

寡核苷酸的脱保护和纯化

在45℃下使用40%的甲胺水溶液将有义链切割并脱保护1小时,或者在室温下使用氨-甲胺(AMA)切割并脱保护2小时。首先使用用于(E)-乙烯基膦酸酯脱保护的溴三甲基硅烷:吡啶(3:2,v/v)在二氯甲烷(5ml)中的溶液将反义链脱保护,然后在45℃下用40%甲胺水溶液切割并脱保护1小时,或者在室温下用AMA切割并脱保护2小时。在真空(Speedvac)下干燥过夜后,将所得寡核苷酸沉淀悬浮在水中并使用Agilent Prostar系统(Agilent,Santa Clara,CA,USA)进行纯化。将有义链在Hamilton HxSil C18柱上以连续的乙酸钠梯度纯化:90%缓冲液A1(50mM的于5%乙腈中的乙酸钠)和10%缓冲液B1(乙腈)至10%缓冲液A1和90%缓冲液B1,流速为30毫升/分钟,在60℃下18分钟。将反义链在离子交换柱(GE Source 15Q培养基)上以连续的高氯酸钠梯度纯化:100%缓冲液A2(10mM的于20%乙腈中的乙酸钠)至60%缓冲液A2和40%缓冲液B2(1M的于20%乙腈中的高氯酸钠),流速为30毫升/分钟,在60℃下30分钟。将纯化的寡核苷酸通过尺寸排阻色谱脱盐,并且通过在Agilent 6530精准质量Q-TOF LC/MS(Agilent technologies,Santa Clara,CA,USA)上进行液相色

谱-质谱联用分析来表征。

将缀合siRNA注射到小鼠中

动物实验根据马萨诸塞大学医学院机构动物护理和使用委员会(University of Massachusetts Medical School Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC,协议编号A-2411)的动物护理伦理批准和指南来执行。六年龄至七周龄的雌性FVB/NJ小鼠(n＝5只/组)皮下注射DCA缀合的siRNA(20mg/kg)、非靶向对照(Ntc)siRNA(20mg/kg)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

肽核酸(PNA)杂交测定

注射后1周,使用肽核酸(PNA)杂交测定来测定组织中siRNA反义链的量,如所述(37,38)。简而言之,将组织(15mg)在含有0.2mg/ml蛋白酶K(Invitrogen)的300μl MasterPure组织裂解溶液(EpiCentre)中裂解。通过添加20μl 3M氯化钾,从裂解物中沉淀出十二烷基硫酸钠,并且通过在5000×g下离心15分钟来沉淀。澄清上清液中的DCA缀合的siRNA与Cy3标记的PNA探针(PNABio,Thousand Oaks,CA,USA)杂交,所述探针与反义链完全互补。通过在DNAPac PA100阴离子交换柱(Thermo Fisher Scientific)上进行HPLC(Agilent,Santa Clara,CA,USA)来分析样品。监测Cy3荧光并且对峰进行积分。使用校准曲线确定最终浓度。

体内mRNA沉默实验

注射后1周,收集组织并且在4℃下在RNAlater(Sigma)中储存过夜。然后使用QuantiGene 2.0测定(Affymetrix)对mRNA进行定量。简而言之,将组织穿孔在含有0.2mg/ml蛋白酶K(Invitrogen)的300μl均质化缓冲液(Affymetrix)中裂解。将稀释的裂解物和探针组(小鼠Htt、小鼠Ppib或小鼠Hprt)添加到bDNA捕获板中,并且如Coles等人(39)所述来放大和检测信号。在Tecan M1000(Tecan,Morrisville,NC,USA)上检测到发光。

统计学分析

使用GraphPad Prism 8.1.2软件(GraphPad Software,Inc.,San Diego,CA,USA)分析数据。对于小鼠中的每个独立实验,将沉默水平归一化至PBS对照组的平均值。使用非参数单向ANOVA和Dunnett检验分析数据以进行多重比较,并计算相对于PBS对照的显著性。T检验用于两组之间的比较。

实施例1:硫代磷酸酯修饰的2个核苷酸或5个核苷酸的突出端对siRNA组织积累和沉默功效的影响。

siRNA化学结构的设计。

多种siRNA结构,包括具有5至7个核碱基突出端的不对称siRNA(15、33-35)、具有两个核碱基突出端的常规siRNA(17、40)、平末端化合物(41)和Dicer底物(42、43),已被证明在体外和体内都有活性。然而,尚未系统地确定这些结构对siRNA的肝外分布和功效的影响。

为了评价siRNA结构对分布和功效的影响,我们选择了三种不同的siRNA支架(图2A)。对于所有化合物,使用具有末端PS键稳定性的交替2-O甲基和2-氟修饰模式(18、21-22)。此外,反义链用5-(E)-乙烯基膦酸酯(E-VP)基团进行修饰,所述基团模拟反义链的5-磷酸根,以促进RISC的识别(23,24)并提供针对磷酸酶和核酸外切酶的稳定性(25、26)。为了支持在多种组织(即,肝、心脏、肺、脂肪、肌肉、肾上腺和脾(13,14))中广泛分布和沉默,

在有义链的3'端处通过两个胸苷(dT-PO接头)(7、44-45)之间的两个磷酸二酯键来连接二十二碳酸(DCA)缀合物。最后,所有三种siRNA变体都具有相同的20碱基反义链化学结构,所述结构含有9个PS修饰。

siRNA支架的唯一变化是有义链的长度,其决定了单链PS突出端的长度。具体来讲,我们使用15碱基的有义链来生成具有5个核苷酸(nt)PS突出端的化合物(不对称siRNA);使用18碱基的有义链来生成2-nt PS突出端(常规siRNA);并且使用20碱基的有义链来生成0-nt PS突出端(平末端siRNA)(图2A)。

siRNA结构对化合物组织积累没有影响。

为了评价siRNA结构对组织分布的影响,小鼠经由单次皮下(SC)注射三种不同的siRNA支架中的一种(20mg/kg)来进行注射。注射后1周,使用PNA杂交测定在组织中测量反义链积累(37、38)。在本研究中,我们将注意力集中在其中先前观察到DCA缀合的siRNA沉默的组织上(13),并因此选择了肝、肾、脾、肺、心脏、肌肉和脂肪。对于所有siRNA支架,两条siRNA序列——亨廷顿(Htt)(46)和亲环蛋白B(Ppib)(47)——用于评价siRNA核碱基组成对分布曲线的相对影响。

我们观察到两条序列之间的初级和次级组织积累曲线没有显著差异(图2B),这表明核碱基组成对DCA介导的组织分布没有重大影响。与未缀合的化合物(13)相反,DCA缀合的siRNA被定量保留(接近注射剂量的100%),并且分布到多种组织中,在肝脏中观察到最高的积累。令人惊讶的是,PS突出端的长度对DCA介导的在肝外组织中的分布没有显著影响(图2B和C),脂肪除外,其中平末端(0-nt突出端)siRNA的积累显著高于(2倍,$P<0.05$)不对称(5-nt突出端)和常规siRNA(2-nt突出端)化合物(图2C)。这些发现表明,组织积累主要由缀合物驱动,且siRNA序列和结构的贡献最小。

siRNA结构显著影响了功效。

为了评价相似水平的组织积累是否转化为对每种siRNA结构相似的沉默功效,对小鼠皮下注射单剂量(n=每组5-6只,20mg/kg)的每种DCA缀合的靶向Htt(46)或Ppib(47)的siRNA变体。两个靶标均已经验证了可用的siRNA序列,并且在多种组织中以不同水平表达(Htt低;Ppib高)。用非靶向对照(Ntc)siRNA或PBS来治疗对照小鼠。注射后1周时,进行肝、肾、脾、肺、心脏、肾上腺、肌肉和脂肪中的Htt、Ppib和Hprt(次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶,一种管家基因)mRNA水平的测量。图3示出了每种化合物在每种组织中的沉默功效(与PBS相比,单向ANOVA)。然后我们确定不同支架之间的沉默是否存在统计学上显著差异,如图3D热图所示。Ntc显示靶基因表达没有显著降低,这表明观察到的沉默是由于序列特异性效应导致的(图3)。总体而言,DCA缀合的siRNA的功能性功效在Htt和Ppib之间是相似的。对于两个靶标,DCA缀合的siRNA能够在肝脏中沉默至多70%,并且在心脏、肾上腺、肌肉和脂肪中沉默至多50-60%。然而,两个测试靶标之间的确切沉默程度略有不同,这可能是由于每种mRNA的细胞类型特异性表达和核保留程度的差异。

所有支架在肝脏中均显示显著的沉默(~50-70%),这可能是由于该组织中的高积累(图3A-C)。令人惊讶的是,尽管所有siRNA支架的肝外积累程度相似(图2B),我们观察到siRNA结构对肝外基因沉默的显著影响。对于平末端结构,脂肪组织中的沉默功效最高(图3C),这与它增强的积累相关(图2B)。然而,平末端siRNA仅在(六个中的)两个其他肝外组织中实现了统计学显著沉默(靶向Htt时,肺和心脏;靶向Ppib时,心脏和肾上腺)(图3C)。

除了脂肪，平末端siRNA在肝外组织中仅表现出36％的最大沉默，远低于非对称(61％最大沉默)和常规(55％最大沉默)siRNA(分别为图3A和B)。事实上，当靶向Htt时，与平末端结构相比，不对称siRNA在六种肝外组织(肾、脾、肺、心脏、肾上腺和肌肉)中表现出显著更好的沉默(沉默增加11-59％)，并且当靶向Ppib时，在五种组织(肾、脾、肺、肾上腺和肌肉)中表现出显著更好的沉默(图4)。在脾、心脏、肾上腺和肌肉中(靶向Htt时)，并且在肾、脾、肾上腺和肌肉中(靶向Ppib时，图4)，常规siRNA实现了比平末端siRNA更大的沉默(沉默增加12-38％)。

不对称siRNA总体上表现出最佳的肝外功效，在所有组织中均观察到沉默(在11％和61％之间变化)(图3A)。常规siRNA表现出略低(但相当可比)的活性，在八个组织中的七个中观察到沉默(在17％和55％之间变化)(图3B)。在四种肝外组织(靶向Htt时)和两种肝外组织(靶向Ppib时，图3D)中，不对称siRNA与常规siRNA相比轻微更有效。当将siRNA组织积累和功效相关联时(图4A)，很明显，在不对称和常规siRNA对比平末端中观察到的沉默增强与积累的变化无关。一般来讲，靶向Ppib的siRNA在所有组织和所有结构中的积累略高于靶向Htt的化合物，但两个靶标之间的功效相对增强保持一致。图4B示出了相对于平末端siRNA，不对称siRNA(左图)和常规siRNA(右图)的沉默对比积累的变化。将所有分析的组织和靶标都绘制在同一图表中。这种可视化工具清楚地示出了(图4B)大多数组织中的含有突出端的化合物的活性总体增加(最多为负50-60％)。

总的来说，这些结果表明，PS突出端的存在(而不是长度)显著增强了活性，这可能是通过影响内化机制和/或内体逃逸的程度进行的。

实施例2：总硫代磷酸酯含量对siRNA组织积累和沉默功效的影响。

在常规siRNA的背景中，PS含量影响siRNA分布曲线。

对于ASO，PS修饰定义了相对肝/肾分布。由于紧密的血清蛋白结合，完全PS ASO优先分布至肝。降低ASO上的PS含量会降低血清结合亲和力，从而将积累转移到肾脏近端上皮细胞，其在清除过程中保留一部分ASO(21、48-49)。为了确定PS修饰的程度是否影响siRNA的肝外分布，在常规(2-nt突出端)和平末端(0-nt突出端)siRNA结构的背景中，我们比较了具有8个末端PS修饰(每个末端处的两个，“低PS”)对比13个PS修饰(“高PS”)的DCA缀合的siRNA的分布曲线(图5A)。在SC注射DCA缀合的、靶向Htt或Ppib的siRNA后1周，在肝、肾、脾、肺、心脏、肌肉和脂肪中测量反义链积累水平(图5B)。

在平末端DCA缀合的siRNA的背景中，PS含量的变化对组织分布曲线的影响最小(图5)。然而，对于传统的siRNA，PS含量的变化显著影响组织积累。具体来讲，低PS化合物在大多数组织中显示出较低的积累——肝约3至3.5倍，肾约1.5至3倍，脾约2至4倍，肺约2倍，心脏和肌肉约0至2倍，并且脂肪约0至3倍(图5C)。这些观察结果可以部分通过常规siRNA中“低PS”突出端与“高PS”突出端相比的较低稳定性来解释。总的来说，这些结果表明，PS修饰可能通过防止siRNA降解和改变清除动力学来促进siRNA在组织中的积累和保留。

高PS含量对siRNA活性有负面影响。

为了评价积累是否与沉默相关，在注射低PS和高PS的靶向Htt和Ppib的平末端和常规siRNA支架后，在组织中测量靶mRNA水平。每种化合物在每种组织中的沉默效率(与PBS相比，单向ANOVA)在图6中示出。令人惊讶的是，尽管观察到高PS的常规siRNA的组织积累增强，但PS含量的增加对活性具有整体负面影响(图6)。对于常规siRNA，高PS化合物在脂肪和

脾中的沉默略有增加(分别为15％和30％)，但仅观察到靶向Htt而不是Ppib的mRNA。相反，在肝中可以观察到PS环境增加对功效的明显负面影响以及与积累的反向相关性(图6A)。尽管高PS化合物的积累增加了大约三倍(高PS siRNA的52-65pmol/mg对比低PS siRNA的14-29pmol/mg，图5)，但是对于Htt，观察到的肝沉默水平从73％降低到47％(P<0.01)，并且对于Ppib，观察到的肝沉默水平从22％降低到11％(P<0.01)(图6A)。当将siRNA组织积累和功效相关联时(图7A)，值得注意的是，对于常规siRNA(粉色和红色圆点，图7A)，即使与低PS siRNA相比，高PS变体在14个组织中的12个中积累更多，但高PS化合物仅在14个组织中的两个中(靶向Htt时的脂肪和脾)诱导统计学上显著更好的沉默(图6A和7B)。总的来说，这些结果表明，PS含量的增加增强了常规siRNA的稳定性以增加组织积累，但对观察到的功能性活性具有显著的负面影响。PS含量增加对沉默的负面影响在平末端siRNA的背景中甚至更加明显。实际上，在八个组织中的五个中，对于两个靶标，低PS平末端siRNA比其高PS对应物诱导更好的沉默(沉默增加17-30％)(图6B)。所述作用在肾上腺中特别明显，其中高PS siRNA诱导最小的沉默至无沉默，而低PS化合物显示出Htt和Ppib表达两者减少大于55％。siRNA组织积累与功效之间的相关性清楚地表明，对于平末端结构(浅紫色和深紫色点，图7A)，PS的数量不显著影响积累水平，但影响活性，其中低PS siRNA(浅紫色点，图7A)比高PS化合物(深紫色点，图7A)诱导的沉默更好。高PS siRNA(图7B，右图)与低PS化合物的靶mRNA水平之间的差异(所有组织和靶标绘制在同一图表中)导致大多数组织中剩余的正mRNA表达(至多+50％)，这表明第PS siRNA比高PS变体更有效。这些结果表明，对于具有相似稳定性和分布的平末端siRNA，大量PS修饰可能改变细胞内的蛋白质结合以影响siRNA运输、内体逃逸和功能性沉默的程度(27-29、50)。

实施例3：缀合物接头化学组成对siRNA组织积累和沉默功效的影响。

多种接头——例如三甘醇(TEG)(15)、二硫化物(51)和碳链(13)——已经用于缀合的siRNA和ASO。此外，已经证明在缀合物和寡核苷酸之间引入可切割的磷酸二酯键改善了胆固醇缀合的ASO的肝沉默(36)。然而，还没有系统评价缀合siRNA接头化学对肝外活性和体内分布的影响。在迄今为止描述的所有实验中(图1-7)，siRNA通过两个胸苷之间的两个磷酸二酯键(dT-PO)连接至DCA缀合物。

磷酸二酯DNA的体内稳定性有限，足以支持初始组织分布，但在细胞摄取后迅速降解(52)。为了评价接头稳定性对DCA-siRNA组织积累的影响，使用可切割的dT-PO接头或稳定碳(St)接头来合成不对称(5-nt突出端)、常规(2-nt突出端)和平末端(0-nt突出端)siRNA(图8A)。

接头的性质对任何siRNA化学结构的组织分布和积累曲线没有显著影响(图8B和C)，这表明dT-PO具有足够的血清稳定性以允许DCA驱动的分布。相比之下，接头的化学组成确实对组织沉默水平产生了深远的影响(图9)。具体来讲，可切割接头的存在显著改善了脾(改善了23％，P<0.001)、心脏(改善了14％，P<0.001)、肾上腺(改善了21％，P<0.001)和脂肪(改善了21％，P<0.1)中的Htt mRNA沉默；并且显著改善了肝(改善了24％，P<0.01)、肾脏(改善了20％，P<0.1)、肺(改善了22％，P<0.1)、心脏(改善了25％，P<0.0001)和脂肪(改善了14％，P<0.1)中的Ppib mRNA沉默(图9)。siRNA组织积累和功效之间的相关性(图10A)清楚地显示，接头的性质(dT-PO对比St)未显著影响siRNA组织分布(x轴，图10A)，但对功效有显著影响(y轴，图10A)。在所有组织中(靶向Ppib时脾除外，其中两种化合物的沉默相似)，

DCA dT-PO连接的siRNA比DCA St连接的化合物诱导更好的两种靶标的沉默。对于大多数组织和两个靶标,DCA dT-PO siRNA与DCA St化合物的靶mRNA水平之间的差异导致剩余的负mRNA表达(至多-30%)(图10B),这表明dT-PO接头的存在增强了siRNA功效。这些结果表明,使用像dT-PO这样的可切割接头促进组织中的沉默。

讨论

寡核苷酸与多种化学实体的缀合允许调节生物利用度、组织暴露,并且在一些情况下允许调节细胞类型特异性递送(7-8、11、53)。最近批准的完全化学稳定的GalNAc siRNA Givosiran证明了缀合siRNA治疗遗传疾病的巨大潜力(54)。虽然三价GalNAc允许特异性递送至肝细胞(1-3、55),但脂质缀合能够功能递送至肝以外的多种组织(13、14)。在影响寡核苷酸生物利用度、组织分布、清除动力学和安全性(10、13-14、37、56-57)的亲脂性缀合物中,我们将DCA鉴定为支持广泛肝外分布的缀合物(13、14)。然而,肝外组织中DCA-siRNA的积累和沉默程度低于肝脏中通常观察到的GalNAc缀合物。事实上,肝脏自然地积累药物,包括siRNA,因为它是具有高血流量和不连续的开窗上皮细胞的初级过滤组织(58),并因此代表了一种独特且非常适合任何药物靶向的组织。为了将化合物递送至其他组织,需要进一步优化缀合siRNA。在此处,我们揭示了siRNA结构、化学组成和缀合之间的相互作用,以及它如何影响有效的肝外沉默。此类发现将为使用这些类别的分子用于未来的治疗应用铺平道路。PS修饰的寡核苷酸在体外增强蛋白质结合和细胞摄取(28、30);并因此是定义寡核苷酸药代动力学/动力学的主要因素(21、48、59)。然而,其中添加PS修饰的结构背景(例如,单链对比双链;缀合物的性质)的影响可影响PS诱导的蛋白质相互作用(60)。在DCA缀合物的背景中,我们发现在不对称和常规siRNA中(分别)存在5-nt或2-ntPS突出端对组织积累曲线没有可测量的影响。这可能是因为高度疏水性部分DCA与血清蛋白的结合如此紧密(14),以致于PS的相对贡献变得不那么显著(9-10、13-14、57)。尽管对整体组织积累没有影响,但PS修饰的单链区域的存在确实影响了活性。不对称siRNA(5-nt突出端)在所有测试的组织(16个中的16个)中诱导统计学上显著的沉默,而具有相同引导链的平末端siRNA仅在50%的组织中有活性。结构变异(不对称对比平末端)对体外选定序列活性的影响最小(15),但此处提供的数据仅限于两个靶标。因此,有可能其他靶序列——即,被选择为在平末端结构中发挥最佳的那些——可能会产生不同的结果。此外,突出端的存在可能会增强PAZ结构域相互作用和RISC加载(61-63);然而,由于所述两种化学结构具有非常相似的体外活性(15),这种解释不太可能。因为所述结构表现出几乎相同的组织积累,所以观察到的功能差异更有可能是由于PS尾部对细胞内定位(28)、运输(29)和内体逃逸程度的影响,这可能是寡核苷酸活性的速率限制步骤(58)。有趣的是,突出端的长度对活性的影响较小,与2-nt突出端siRNA相比,5-nt突出端仅在约30%的组织中诱导略微更好的沉默。两种siRNA中的单链PS区域可能足以模拟ASO的行为;并因此,两者改变运输并且支持高效沉默(32-35)。总的来说,积累水平和功能功效之间存在脱节(先前在多种不同脂质缀合的siRNA中观察到(13)),这表明siRNA结构背景和缀合物实体都有助于细胞内行为和累积效应活性。除了结构背景之外,寡核苷酸上的PS修饰的程度也会影响它们对稳定性(64)、血清蛋白结合(21、31、48-49)、细胞受体结合(65)、细胞运输(28)和核定位(27-29)的影响。PS含量对ASO的分布和功效产生的影响是众所周知的,但对缀合siRNA的肝外分布的影响则不太清楚。在此处,我们发现PS含量降低会减弱不对称和常规siRNA的组织积累——这可能是由于单链

突出端的稳定性降低。平末端化合物的积累不受影响,因为这些化合物(无PS突出端)仅依赖缀合物来定义组织积累。令人惊讶的是,PS含量的增加对所有结构背景的沉默产生了负面影响,特别是对于平末端化合物。具有高PS含量的siRNA可能结合得太紧或与细胞内的多种蛋白质结合,这可能会改变运输、内体逃逸并减少可用于RISC加载的一部分化合物(28-29、50)。确切的机制需要进一步研究,但我们的结果表明,不必要地增加PS含量可能是有害的。因此,优化磷酸二酯和硫代磷酸酯(PO/PS)含量之间的特定平衡对于脂质缀合的siRNA在肝外组织中实现最大沉默至关重要。事实上,已经进行了三环DNA ASO(在杜氏肌营养不良症(Duchenne Muscular Dystrophy)模型中)(66)和中枢神经系统中的寡核苷酸的PO/PS含量优化,并且所述优化现在是实现最佳疗效、稳定性、安全性的广泛使用策略(67)。另一种用于改善肝外基因沉默的策略是用其他化学实体替换PS部分,所述化学实体稳定siRNA,减少细胞蛋白结合,并且保持被RISC识别和诱导RNAi的能力。

到目前为止,接头化学对缀合siRNA的体内功效的相对贡献在很大程度上是未知的,部分是因为接头通常被认为是化学结构的惰性部分。然而,我们的发现证明了,在DCA-siRNA的背景中,可切割接头(dT-PO)的使用对沉默程度具有深远影响。我们先前发现dT-PO是可切割接头的最简单的合成变体,并且与单-dT和rU接头相比,具有最佳的稳定性范围(未发表的数据)。事实上,dT-PO(可切割)和稳定碳(不可切割)-接头DCA siRNA显示出相似的组织积累曲线,这证实了dT-PO在化合物清除的早期阶段期间在血清中足够稳定。然而,dT-PO显著增加了在若干种组织中的活性,这可能是由于它在细胞内切割以增强siRNA内体逃逸。已经观察到用于抑制肝中的siRNA活性的胆固醇缀合的ASO(活性增加约35%)(36)和GalNAc-ASO(Reversir)的可切割接头对内体逃逸和功效的积极影响(68)。尽管其他临床GalNAc化合物(诸如Inclisiran)不具有可切割接头并且具有高活性,但在脂质缀合的siRNA的背景中,使用可切割接头可能具有更高的功能意义。例如,在经由内吞作用内化后(30),脂质缀合物可能特别容易变成膜结合的,从而限制siRNA胞质溶胶的释放。可切割接头可能有助于解决这个问题。总体而言,dT-PO容易合成,不需要特殊前体,无毒且可生物降解;然而,进一步的工作应该更系统地评价不同的接头化学对siRNA体内活性的影响。

尽管我们的研究结果强调了优化化学结构的重要性,但siRNA上还有许多其他修饰可能会影响肝外功效。例如,我们使用交替的2-O-甲基和2-氟化学修饰模式(首先由Allerson等人描述)以实现缀合物介导的siRNA体内递送(18)。虽然这种修饰模式总体上非常有效,但Crooke等人证明了ASO中的2-氟修饰增加了细胞内的蛋白质结合,从而导致沉默减少和ASO毒性增加(69、70)。因此,额外优化这种修饰模式可能会深远地影响siRNA效力和体内作用的持续时间(17);并因此,应当考虑增强肝外沉默。目前,正在进行进一步的研究,以评价此处描述的替代2-O-甲基和2-氟化合物的优化设计是否适用于更多富含2-OMe的siRNA。

总之,我们的数据清楚地证明了,寡核苷酸化学支架和结构是优化siRNA肝外活性的主要考虑因素。改变结构不对称性(例如,5-nt或2-nt突出端对比平末端)和接头化学(可切割对比不可切割)的工程化策略可以用于微调肾、脾、心脏、肺、肌肉和肾上腺中的siRNA活性而不影响组织分布。此外,仔细平衡PS对比PO含量的工程化策略可以用于优化siRNA稳定性,而不影响组织中的功能性功效。总体而言,具有突出端、可切割接头和最小PS含量的siRNA设计(图11)应该支持增强的肝外沉默。我们的发现将指导未来设计具有最佳治疗曲

线的缀合siRNA。

参考文献

1.Rajeev,K.G.,Nair,J.K.,Jayaraman,M.,Charisse,K.,Taneja,N.,O'Shea,J.,Willoughby,J.L.S.,Yucius,K.,Nguyen,T.,Shulga-Morskaya,S.et al.(2015)Hepatocyte-specific delivery of siRNAs conjugated to novel non-nucleosidic trivalent N-Acetylgalactosamine elicits robustgene silencing in vivo.Chembiochem,16,903-908.

2.Matsuda,S.,Keiser,K.,Nair,J.K.,Charisse.K.,Manoharan,R.M.,Kretschmer,P.,Peng,C.G.,Kel'in,A.V.,Kandasamy,P.,Willoughby,J.L.S.et al.(2015)siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-Acetylgalactosamine linked through nucleosides elicit robust gene silencing in vivo in hepatocytes.ACS Chem.Biol.,10,1181-1187.

3.Prakash,TP.,Graham,MJ.,Yu,J.,Carty,R.,Low,A.,Chappell,A.,Schmidt,K.,Zhao,C.,Aghajan,M.,Murray.H.F.et al.(2014)Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice.Nucleic Acid Res.,42,8796-8807.

4.Fitzgerald,K.,White,S,Borodovsky,A.,Bettencourt,B.R.,Strahs,A.,Clausen,V.,Wijngaard,P.,Horton,J.D.,Taubel,J.,Brooks,A.et al.(2017)A highly durable RNAi therapeutic inhibitor of PCSK9.N.Engl.J.Med.,376,41-51.

5.Ray,K.K.,Wright,R.S.,Kallend,D.,Koenig,W.,Leiter,L.A.,Raal,F.J.,Bisch,J.A.,Richardson,T.,Jaros,M,Wijngaard,P.L.J.et al.(2020)Two Phase 3 trials of Inclisiran in patients with elevated LDL cholesterol.N.Engl.J.Med.,382,1507-1519.

[0198] 6.Raal,F.J.,Kallend,D.,Ray,K.K.,Tumer,T.,Koenig,W.,Wright,R.S.,Wijngaard,P.L.J.,Curcio,D.,Jaros,MJ.,Leiter,L.A.et al.(2020)Inclisiran for the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia.N.Engl.J.Med.,382,1520-1530.

7.Soutschek,J.,Akinc,A,Bramlage,B.,Charisse,K.,Constien,R.,Donoghue,M.,Elbashir,S.,Geick,A.,Hadwiger,P.,Harborth,J.et al.(2004)Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs.Nature,432,173-178.

8.Osbom,M.F.and Khvorova,A(2018)Improving siRNA delivery In vivo through lipid conjugation.Nucleic Acid Ther.,28,128-136.

9.Wolfrum,C.,Shi,S.,Jayaprakash,KN.,Jayaraman,M,Wang,G.,Pandey,R.K,Rajeev,K.G.,Nakayama,T.,Charrise,K.,Ndungo,E.M.et al.(2007)Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs.Nat.Biotechnol.,25,1149-1157.

10.Prakash,T.P.,Mullick,A.E.,Lee,r.G.,Yu,J.,Yeh,S.T.,Low,A,Chappell,A.E.,Østergaard,M.E.,Murray,S.,Gaus,H.J.et al.(2019)Fatty acid conjugation

enhances potency of antisense oligonucleotides in muscle.Nucleic Acid Res., 47,6029-6044.

11.Nishina,K.,Unno,T.,Uno,Y.,Kubodera,T.,Kanouchi,T.,Mizusawa,H.and Yokota,T.(2008)Efficient in vivo delivery of siRNA to the Lliver by conjugation of α-tocopherol.Mol.Ther.,16,734-740.

12.Khan,T.,Weber,H.,DiMuzio,J.,Matter,A.,Dogdas,B.,Shah,T., Thankappan,A.,Disa,J.,Jadhav.V.,Lubbers,L.et al.(2016)Silencing myostatin using cholesterol-conj ugated siRNAs induces muscle growth.Mol.Ther.Nucleic Acids,5,e342.

13.Biscans,A,Coles,A.,Haraszti,R.,Echeverria,D.,Hassler,M.,Osborn, M.and Khvorova,A.(2019)Diverse lipid conjugates for functional extra-hepatic siRNA delivery in vivo.Nuicleic Acid Res.,47,1082-1096.

14.Osbom,M.,Coles,A.,Biscans,A.,Haraszti,R.,Roux,L.,Davis,S.,Ly,S., Echeverria,D.,Hassler,M,Godinho,B.et al.(2019)Hydrophobicity drives the systemic distribution of lipid-conjugated siRNAs via lipid transport pathways.Nucleic Acid Res.,47,1070-1081.

15.Hassler,M.R.,Turanov,A.A.,Alterman,J.F.,Haraszti,R.A.,Coles,A.H., Osbom,M.F.,Echeverria,D.,Nikan,M.,Salomon,W.E.,Roux,L.et al.(2018)Comparison of partially and fully chemically-modified siRNA in conjugate-mediated delivery in vivo.Nucleic Acids Res.,46,2185-2196.

16.Nair,J.K.,Attarwala,H.,Sehgal,A.,Wang,Q.,Aluri,K.,Zhang,X.,Gao,M., Liu,J.,Indrakanti,R.,Schofield,S.et al.(2017)Impact of enhanced metabolic stability on pharmacokinetics and pharmacodynamics of GalNAc-siRNA conjugates.Nucleic Acids Res.,45,10969-10977.

17.Foster,D.J.,Brown,C.R.,Shaikh,S.,Trapp,C.,Schlegel,M.K.,Qian,K., Sehgal,A.,Rajeev,K.G,Jadhav,V.,Manoharan,M.et al.(2018)Advanced siRNA designs further improve in vivo performance of GalNAc-siRNA conjugates.Mol.Ther.,26, 708-717.

18.Allerson,C.R.,Sioufi,N.,Jarres,R.,Prakash,T.P.,Naik,N.,Berdeja,A., Wanders,L.,Griffey,R.H.,Swayze,E.E and Bhat,B.(2005)Fully 2-modified oligonucleotide duplexes with improved in vitro potency and stability compared to unmodified small inteffering RNA.J.Med.Chem.,48,901-904.

19.Nallagatla,S.R and Bevilacqua,P.C.(2008)Nucleoside modifications modulate activation of the protein kinase PKR in an RNA structure-specific manner.RNA,14,1201-1213.

20.Jackson,AL.,Burchard,J.,Leake,D.,Reynolds,A.,Schelter,J.,Guo,J., Johnson,J.M.,Lim,L.,Karpilow,J.,Nichols,K et al.(2006)Position-specific chemical modification of siRN As reduces“off-target”transcript silencing.RVA, 12,1197-1205.

21.Geary,R.S.,Norris,D.,Yu,R.and Bennett,C.F.(2015)Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides.Adv.Drug.Deliv .Rev.,87,46-51.

22.Eckstein,F.(2002)Developments in RNA chemistry,a personal view.Biochimie,84,841-848.

23.Ma,J.B.,Yuan,YR.,Meister,G.,Pei,Y.,Tuschl,T.and Patel,D.J.(2005) Structural basis for 5-end-specific recognition of guide RNA by the A.fulgidus Piwi protein.Nature,434,666-670.

24.Frank,F.,Sonenberg,N.and Nagar,B.(2010)Structural basis for 5-nucleotide base-specific recognition ofguide RNA by human AGO2.Nature,465, 818-822.

25.Haraszti,R.A.,Roux,L.,Coles,A.H.,Turanov,AA,Alterman,J.F., Echeverria,D.,Godinho,B.M,Aronin,N.and Khvorova,A(2017)5-Vinylphosphonate improves tissue accumulation and efficacy of conjugated siRNAs in vivo.Nucleic AcMs Res.,45,7581-7592.

26.Parmar,R.,Willoughby,J.L.S.,Liu,J.,Foster,D.J.,Brigham,B.,Theile, C.S.,Charisse,K.,Akinc,A.,Guidry,E.,Pei,Y.et al.(2016)5-(E)-Vinylphosphonate: a stable phosphate mimic can improve the RNAi activity of siRNA-GalNAc conjugates.Chembiochem,17,987-989.

27.Shen,W.,De Hoyos,C.,Migawa,M.,Vickers,T.,Sun,H.,Low,A,Bell,T., Rahdar,M.,Mukhopadhyay,S.,Hart,C.et al.(2019)Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index.Nat.Biotechnol.,37,640-650.

28.Crooke,S.T.,Wang,S.,Vickers,T.A.,Shen,W.and Liang,X.-H.(2017) Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides.Nat.Biotechn ol.,35,230-237.

29.Liang,X.H.,Sun,H.,Shen,W.and Crooke,S.T.(2015)Identification and characterization of intracellular proteins that bind oligonucleotides with phosphorothioate linkages.Nucleic Acid Res.,43,2927-2945.

30.Ly,S.,Navaroli,D.M.,Didiot,M.C.,Cardia,J.,Pandarinathan,L., Alterman,J.F.,Fogarty,K,Standley,C.,Lifshitz,L.M.,Bellve,KD.et al.(2017) Visualization of self-delivering hydrophobically modified siRNA cellular internalization.Nucleic Acids Res.,45,15-25.

31.Brown,D.A.,Kang,S.H.,Gryaznov,S.M.,DeDionisio,L.,Heidenreich,O., Sullivan,S.,Xu,X.and Nerenberg,M.I.(1994)Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding.J.Biol.Chem.,269,26801-26805.

32.Chu,C.-Y.and Rana,T.M.(2008)Potent RNAi by short RNA triggers.RNA, 14,1714-1719.

33.Sun,X.,Rogoff,H.A.and Li,C.J.(2008)Asymmetric RNA duplexes mediate RNA interference in mammalian cells.Nat.Biotechnol.,26,1379-1382.

34.Chang,C.,Yoo,J.W.,Hong,S.W.,Lee,S.E.,Kang,H.S.,Sun,X.,Rogoff,H.A,Ban,C,Kim,S.,Li,C.J.et al.(2009)Asymmetric shorter-duplex siRNA structures trigger efficient gene silencing with reduced nonspecific effects.Mol.Ther.,17,725-732.

35.Byrne,M.,Tzekov,R.,Wang,Y.,Rodgers,A.,Cardia,J.,Ford,G.,Holton,K.,Pandafinathan,L.,Lapierre,J.,Stanney,W.et al.(2013)Novel hydrophobically modified asymmetric RNAi Compounds(sd-rxRNA)demonstrate robust efficacy in the eye.J Ocul.Pharmacol.Ther.,29,855-864.

36.Wada,S.,Yasuhara,H.,Wada,F.,Sawamura,M.,Waki,R.,Yamamoto,T.,Harada-Shib and Obik,S.(2016)Evaluation of the effects of chemically different linkers on hepatic accumulations,cell tropism and gene silencing ability of cholesterol-conjugated antisense oligonucleotides.J.Control Release,226,57-65.

37.Godinho,B.M.D.C.,Gilbert,J.W.,Haraszti,R.A.,Coles,AH.,Biscans,A.,Roux,L.,Nikan,M.,Echeverria,D.,Hassler,M.and Khvorova,A(2017)Pharmacokinetic profiling of conjugated therapeutic oligonucleotides:a high-throughput method based upon serial blood microsampling coupled to Peptide Nucleic Acid hybridization assay.Nucleic Acid Ther.,27,323-334.

38.Roehl,I.,Schuster,M and Seiffert,S.(2011)Oligonucleotide detection method.US Patent US20110201006A1,1-9.

39.Coles,AH.,Osbom,M.F.,Alterman,J.F.,Turanov,AA,Godinho,B.M.,Kennington,L.,Chase,K.,Aronin,N.and Khvorova,A.(2016)A high-throughput method for direct detection of therapeutic oligonucleotide-induced gene silencing in vivo.Nucleic Acid Ther.,26,86-92.

40.Elbashir,S.M.,Lendeckel,W.and Tuschl,T.(2001)RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs.Genes Dev.,15,188-200.

41.Czaudema,F.,Fechtner,M.,Dames,S,Ayg..un,H,Klippel,A.,Pronk,G.J.,Giese,K.and Kaufmann,J.(2003)Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells.Nucleic Acid Res.,31,2705-2716.

42.Kubo,T.,Zhelev,Z.,Ohba,H.and Bakalova,R.(2007)Modified 27-nt dsRNAs with dramatically enhanced stability in serum and long-term RNAi activity.Oligonucleotides,17,445-464.

43.Amarzguioui,M.and Rossi,J.J.(2008)Principles of Dicer substrate(D-siRNA)design and function.Methods Mol.Biol.,442,3-10.

44.Morrissey,D.V.,Blanchard,K.,Shaw,L.,Jensen,K.,Lockridge,J.A.,Dickinson,B.,McSwiggen,J.A.,Vargeese,C.,Bowman,K.,Shaffer,C.S.et al.(2005)

Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication.Hepatology,41,1349-1356.

45.Harbort,J.,Elbashir,S.M.,Vandenburgh,K.,H.,M.,Scaringe,S.A.,Weber,K.and Tuschl,T.(2003)Sequence,chemical,and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. Antisense Nucl.Acid Drug Dev.,13,83-105.

46.Alterman,J.F.,Hall,L.M.,Coles,AH.,Hassler,M.R.,Didiot,M.-C.,Chase,K.,Abraham,Sottosanti,E.,Johnson,E.,Sapp,E.et al.(2015)Hydrophobically modified siRNAs silence Huntingtin mRNA in primary neurons and mouse brain.Mol.Ther.Nucleic Acids,4,e266.

47.Reynolds,A,Leake,D.,Boese,Q.,Scafinge,S.,Marshall,W.S.and Khvorova,A(2004)Rational siRNA design for RNA interference.Nat.Biotechnol.,22,326-330.

48.Oberbauer,R.,Schreiner,G.F.and Meyer,T.W.(1995)Renal uptake of an 18-mer phosphorothioate oligonucleotide.Kidney Int.,48,1226-1232.

49.Geary,R.S.(2009)Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism.Expert Opin.Drug Metab.Toxicol.,5,381-391.

50.Vickers,T.A.and Crooke,S.T.(2016)Development of a quantitative BRET affinity assay for nucleic acid-protein interactions.PLoS One,11,e0161930.

51.Ammala,C.,Drury,W.,Knerr,L.,Ahlstedt,I.,Stillemark-Billton,P.,Wennberg-Huldt,C.,Andersson,E.,Valeur,E.,Jansson-Lofmark,R.,Janz′en,D.et al.(2018)Targeted delivery of antisense oligonucleotides to pancreatic B-cells.Sci.Adv.,4,eaat3386.

52.Wickstrom,E.(1986)Oligodeoxynucleotide stability in subcellular extracts and culture media.J.Biochem.Biophys.Methods,13,97-102.

53.Turanov,A.A,Lo,A.,Hassler,M.R.,Makris,A.,Ashar-Patel,A.,Alterman,J.F.,Coles,AH.,Haraszti,R.A.,Roux,L.,Godinho,B.M.D.C.et al.(2018)RNAi modulation of placental sFLT1 for the treatment of preeclampsia.Nat.Biotechnol.,361164-1173

54.Akinc,A,Maier,M.,Manoharan,M.,Fitzgerald,K.,Jayaraman,M.,Barros,S.,Ansell,S.,Du,X.,Hope,M.J.,Madden,T.D.et al.(2019)The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs.Nat.Nanotechnol.,14,1084-1087.

55.Setten,R.L.,Rossi,J.J.and Han,S.P.(2019)The current state and future directions of RNAi-based therapeutics.Nat.Rev.Drug Discov.,18,421-446.

56.Biscans,A.,Coles,A..Echeverria,D.and Khvorova,A.(2019)The valency of fatty acid conjugates impacts siRNA pharmacokinetics,distribution,and efficacy in vivo.J.Control.Release,302,116-125.

57.Chappell,A.E.,Gaus,H.J.,Berdeja,A,Gupta,R.,Jo,M,Prakash,T.P.,Oestergaard,M.,Swayze,E.E.and Seth,P.P.(2020)Mechanisms of palmitic acid-conjugated antisense oligonucleotide distribution in mice.Nucleic Acid Res.,48,4382-4395.

58.Dowdy,S.F.(2017)Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics.Nat.Biotechnol.,35,222-229.

59.Behlke,M.A.(2008)Chemical modification of siRNAs for in vivo use.Oligonucleotides,18,305-320.

60.Gaus,H.J.,Gupta,R.,Chappell,A.E.,Østergaard,M.E.,Swayze,E.E.and Seth,P.P.(2019)Characterization of the interactions of chemically-modified therapeutic nucleic acids with plasma proteins using a fluorescence polarization assay.Nucleic Acid Res.,47,1110-1122.

61.Egli,M.and Manoharan,M.(2019)Re-engineering RNA molecules into therapeutic agents.Acc.Chem.Res.,52,1036-1047.

62.Alagia,A.,Jorge,A.F.,Avi～n′o,A.,Cova,T.F.G.G.,Crehuet,R.,Grijalvo,S.,Pais,A.A.C.C.and Eritja,R.(2018)Exploring PAZ/3-overhang interaction to improve siRNA specificity.A combined experimental and modeling study.Chem.Sci.,9,2074-2086.

63.Ma,J.B.,Ye,K.and Patel,D.J.(2004)Structural basis foroverhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain.Nature,429,318-322.

64.Stein,C.A,Subasinghe,C.,Shinozuka,K.and Cohen,J.S.(1988)Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides.Nucleic Acid Res.,16,3209-3221.

65.Miller,CM.,Tanowitz,M.,Donner,A.J.,Prakash,T.P.,Swayze,E.E.,Harris,E.N.and Seth,P.P.(2018)Receptor-Mediated uptake of phosphorothioate antisense oligonucleotides in different cell types of the liver.Nucleic Acid Ther.,28,119-127.

66.Echevarr′ia,L.,Aupy,P.,Relizani,K.,Bestetti,T.,Gfiffith,G.,Blandel,F.,Komisarski,M.,Haeberli,A.,Svinartchouk,F.,Garcia,L.et al.(2019)Phosphorothioate content in Tricyclo-DNA antisense oligonucleotides in a duchenne muscular dystrophy mouse model.Nucleic Acid Ther.,29,148-160.

67.Schoch,KM and Miller,TM(2017)Antisense oligonucleotides:Translation from mouse models to human neurodegenerative diseases.Neuron,94,1056-1070.

68.Zlatev,I.,Castoreno,A.,Brown,C.R.,Qin,J.,Waldron,S.,Schlegel,M.K.,Degaonkar,R.,Shulga-Morskaya,S.,Xu,H.,Gupta,S.et al.(2018)Reversal of siRNA-mediated gene silencing in vivo.Nat.Biotechnol.,36,509-511.

69.Shen,W.,De Hoyos,C.,Sun,H.,Vickers,T.,Liang,X.and Crooke,S.(2018)

Acute hepatotoxicity of 2 fluoro-modified 5-10-5 gapmer phosphorothioate oligonucleotides in mice correlates xvith intracellular protein binding and the loss of DBHS proteins.Nucleic Acid Res.,46,2204-2217.

70.Shen,W.,Liang,X.H.,Sun,H.and Crooke,S.T.(2015)2-Fluoro-modified phosphorothioate oligonucleotide can cause rapid degradation of P54nrb and PSF.Nucleic AcidRes.,43,4569-4578.

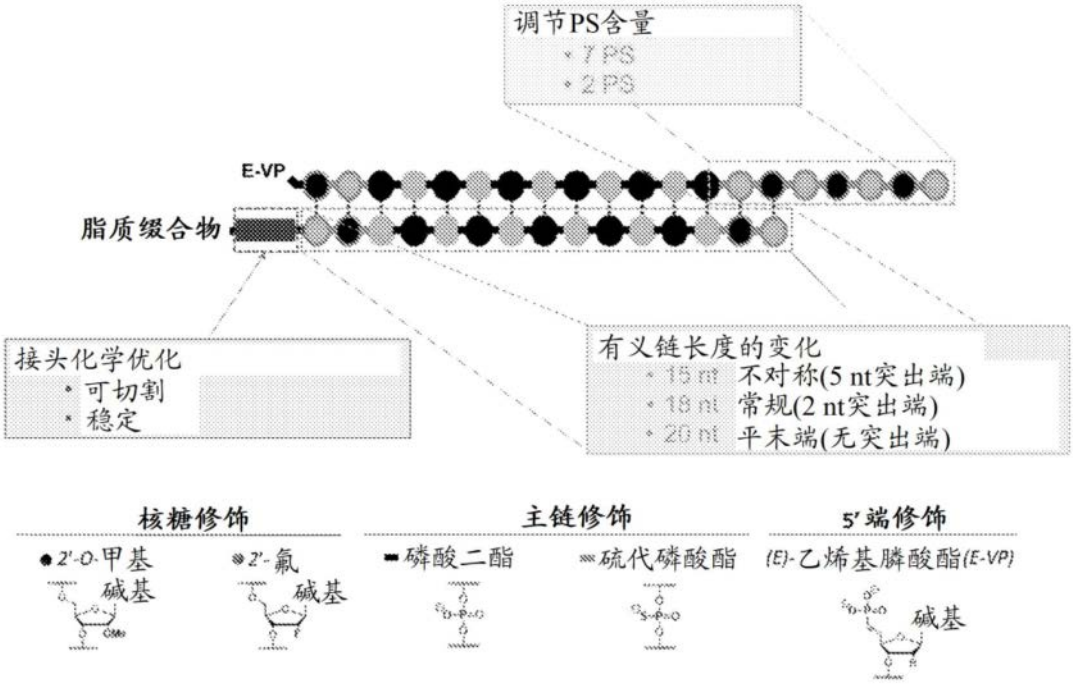

调节PS含量
• 7 PS
• 2 PS
E-VP
脂质缀合物
接头化学优化
• 可切割
• 稳定
有义链长度的变化
• 15 nt 不对称(5 nt突出端)
• 18 nt 常规(2 nt突出端)
• 20 nt 平末端(无突出端)
核糖修饰
2'-O-甲基
碱基
2'-氟
碱基
主链修饰
磷酸二酯
硫代磷酸酯
5'端修饰
(E)-乙烯基膦酸酯(E-VP)
碱基

图1

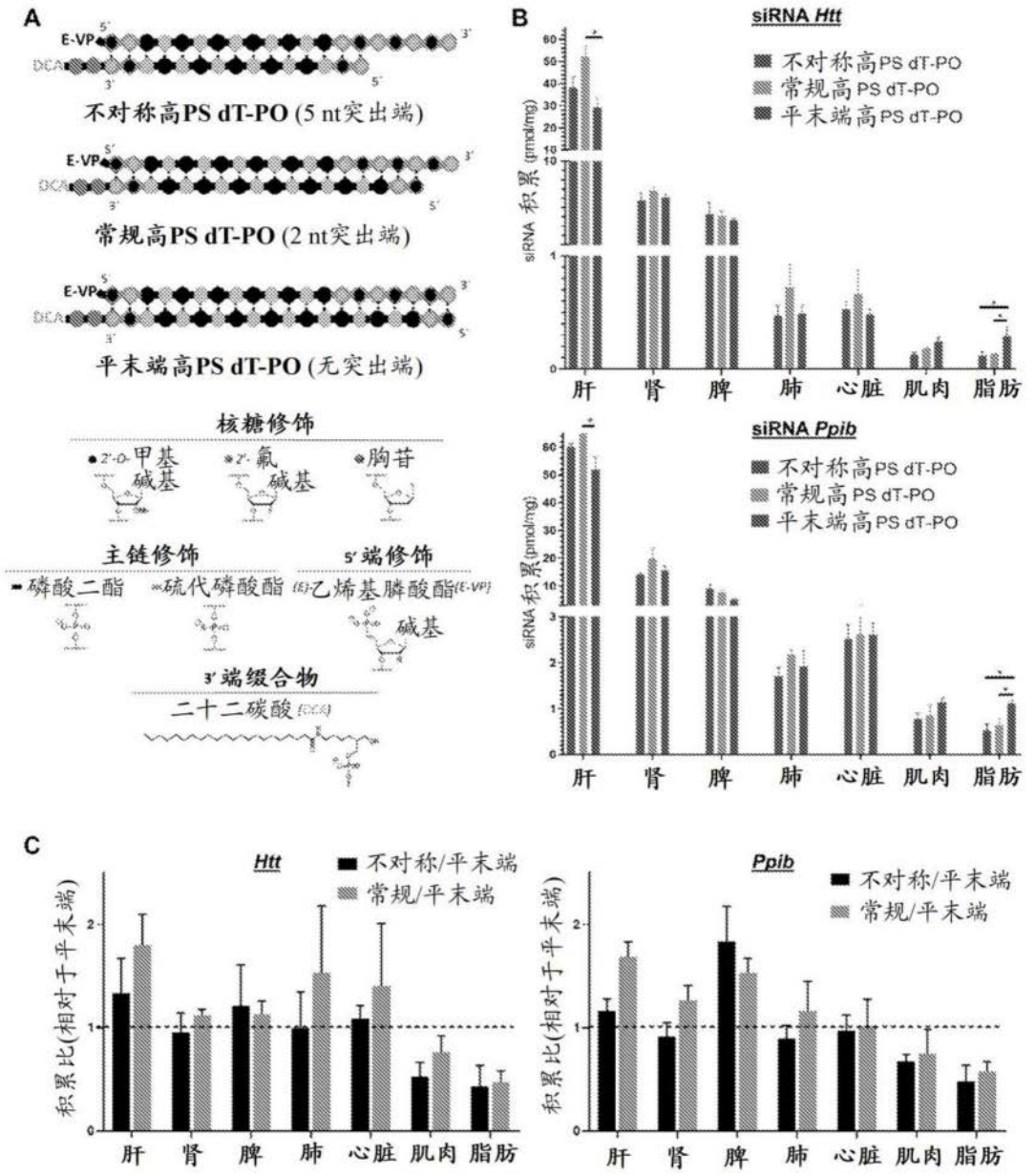

A
E-VP
DCA
不对称高PS dT-PO (5 nt突出端)
常规高PS dT-PO (2 nt突出端)
平末端高PS dT-PO (无突出端)
核糖修饰
2'-O 甲基 碱基
2'- 氟 碱基
胸苷
主链修饰
磷酸二酯
硫代磷酸酯
5'端修饰
(E)-乙烯基膦酸酯(E-VP)
碱基
3'端缀合物
二十二碳酸(DCA)
B
siRNA Htt
不对称高PS dT-PO
常规高PS dT-PO
平末端高PS dT-PO
siRNA 积累 (pmol/mg)
肝 肾 脾 肺 心脏 肌肉 脂肪
siRNA Ppib
C
Htt
不对称/平末端
常规/平末端
积累比(相对于平末端)
Ppib

图2

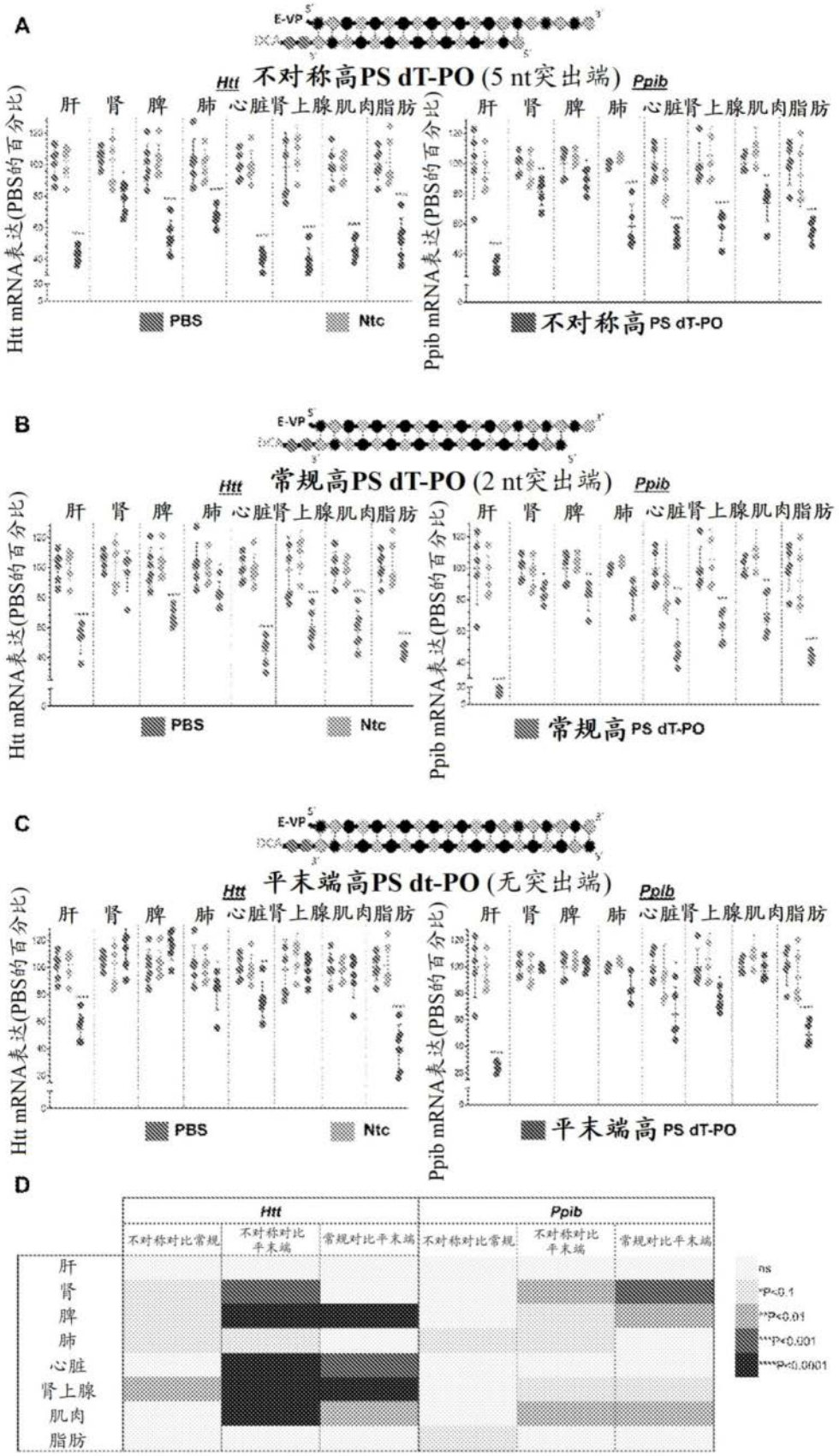

A
E-VP
Htt 不对称高PS dT-PO (5 nt突出端) Ppib
肝 肾 脾 肺 心脏 肾上腺 肌肉 脂肪
Htt mRNA表达(PBS的百分比)
Ppib mRNA表达(PBS的百分比)
PBS
Ntc
不对称高 PS dT-PO
B
Htt 常规高PS dT-PO (2 nt突出端) Ppib
常规高 PS dT-PO
C
Htt 平末端高PS dt-PO (无突出端) Ppib
平末端高 PS dT-PO
D
Htt
Ppib
不对称对比常规
不对称对比平末端
常规对比平末端
肝
肾
脾
肺
心脏
肾上腺
肌肉
脂肪
ns
*P<0.1
**P<0.01
***P<0.001
****P<0.0001

图3

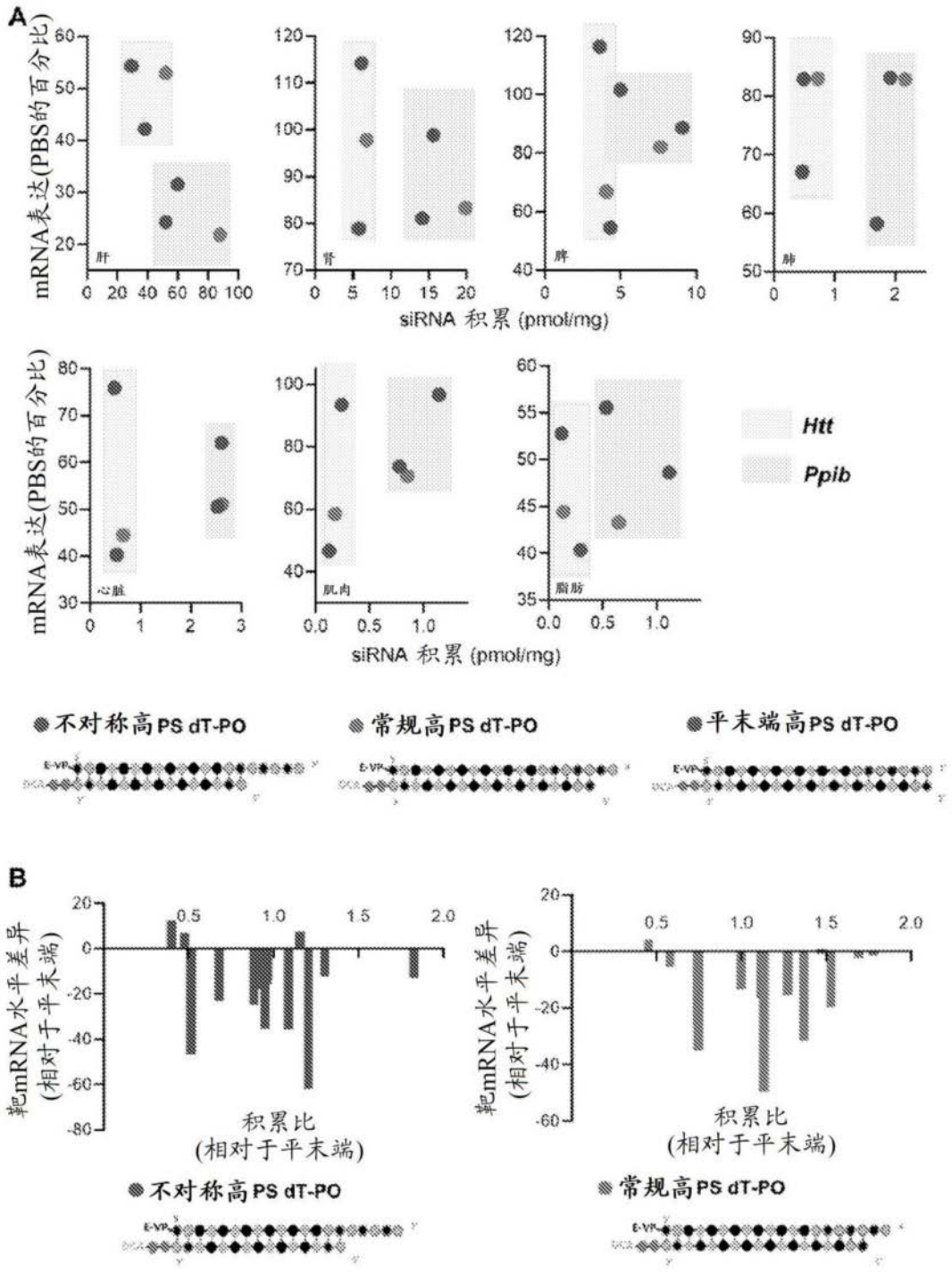

A
mRNA表达(PBS的百分比)
肝
肾
脾
肺
siRNA 积累 (pmol/mg)
心脏
肌肉
脂肪
Htt
Ppib
不对称高PS dT-PO
常规高PS dT-PO
平末端高PS dT-PO
B
靶mRNA水平差异
(相对于平末端)
积累比
(相对于平末端)
不对称高PS dT-PO
常规高PS dT-PO

图4

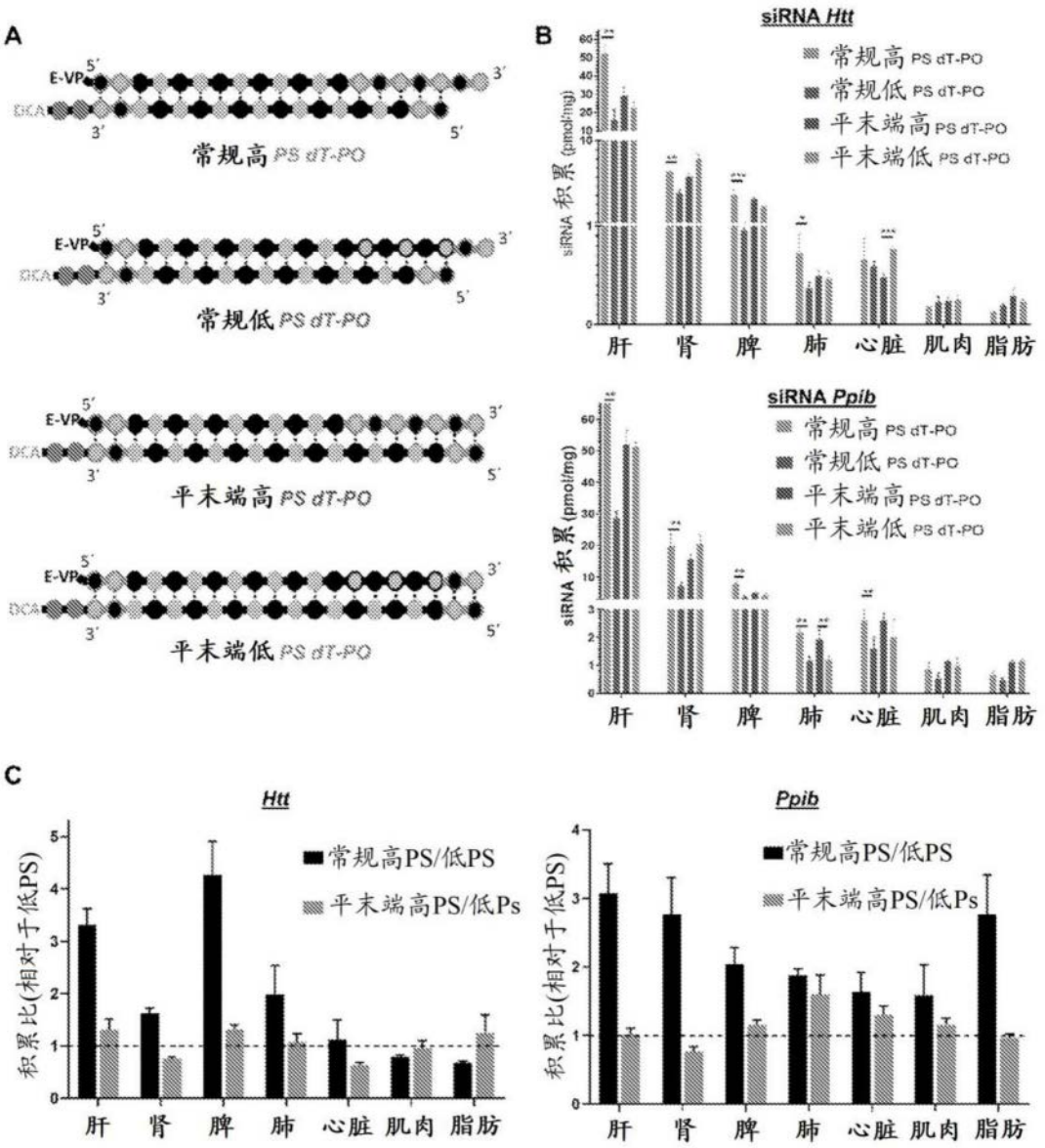

A
E-VP
DCA
5′
3′
常规高 PS dT-PO
常规低 PS dT-PO
平末端高 PS dT-PO
平末端低 PS dT-PO
B
siRNA Htt
siRNA Ppib
siRNA 积累 (pmol/mg)
常规高 PS dT-PO
常规低 PS dT-PO
平末端高 PS dT-PO
平末端低 PS dT-PO
肝 肾 脾 肺 心脏 肌肉 脂肪
C
Htt
Ppib
积累比(相对于低PS)
常规高PS/低PS
平末端高PS/低Ps
肝 肾 脾 肺 心脏 肌肉 脂肪

图5

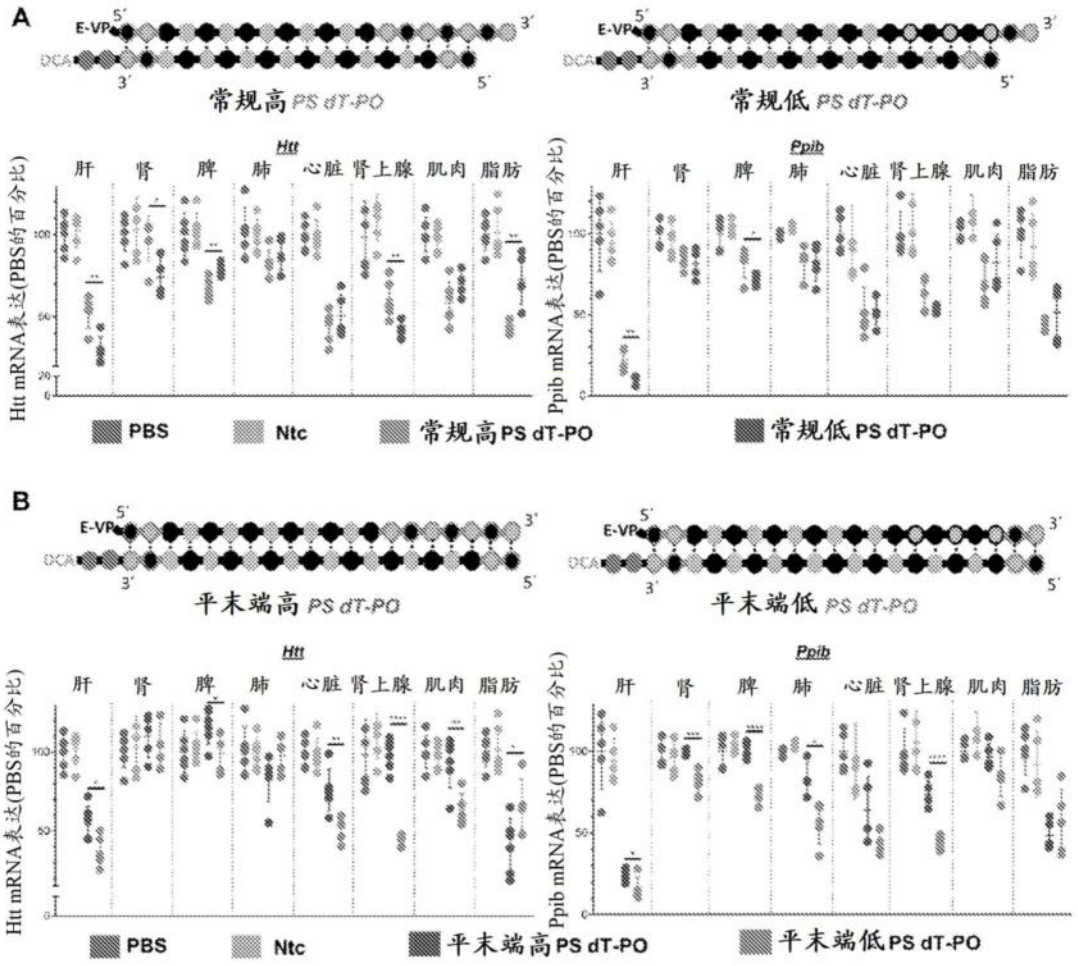

A
E-VP
DCA
5′
3′
常规高 PS dT-PO
常规低 PS dT-PO
Htt
Ppib
肝 肾 脾 肺 心脏 肾上腺 肌肉 脂肪
Htt mRNA表达(PBS的百分比)
Ppib mRNA表达(PBS的百分比)
PBS
Ntc
常规高PS dT-PO
常规低PS dT-PO
B
平末端高 PS dT-PO
平末端低 PS dT-PO
平末端高PS dT-PO
平末端低PS dT-PO

图6

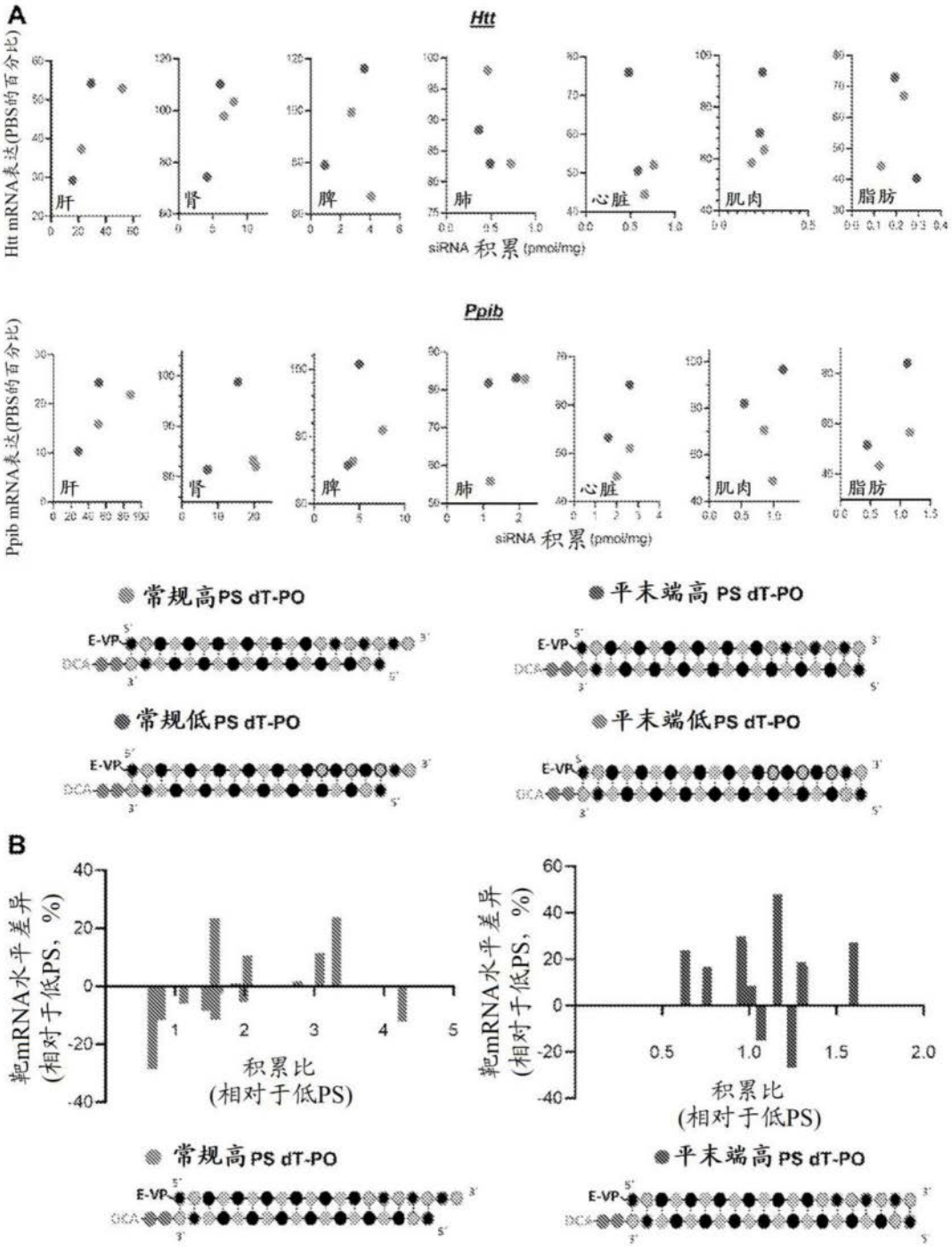

A
Htt
Htt mRNA表达(PBS的百分比)
肝
肾
脾
肺
心脏
肌肉
脂肪
siRNA 积累 (pmol/mg)
Ppib
Ppib mRNA表达(PBS的百分比)
肝
肾
脾
肺
心脏
肌肉
脂肪
siRNA 积累 (pmol/mg)
常规高PS dT-PO
平末端高 PS dT-PO
常规低PS dT-PO
平末端低PS dT-PO
E-VP
DCA
B
靶mRNA水平差异 (相对于低PS，%)
积累比 (相对于低PS)
靶mRNA水平差异 (相对于低PS，%)
积累比 (相对于低PS)
常规高PS dT-PO
平末端高 PS dT-PO

图7

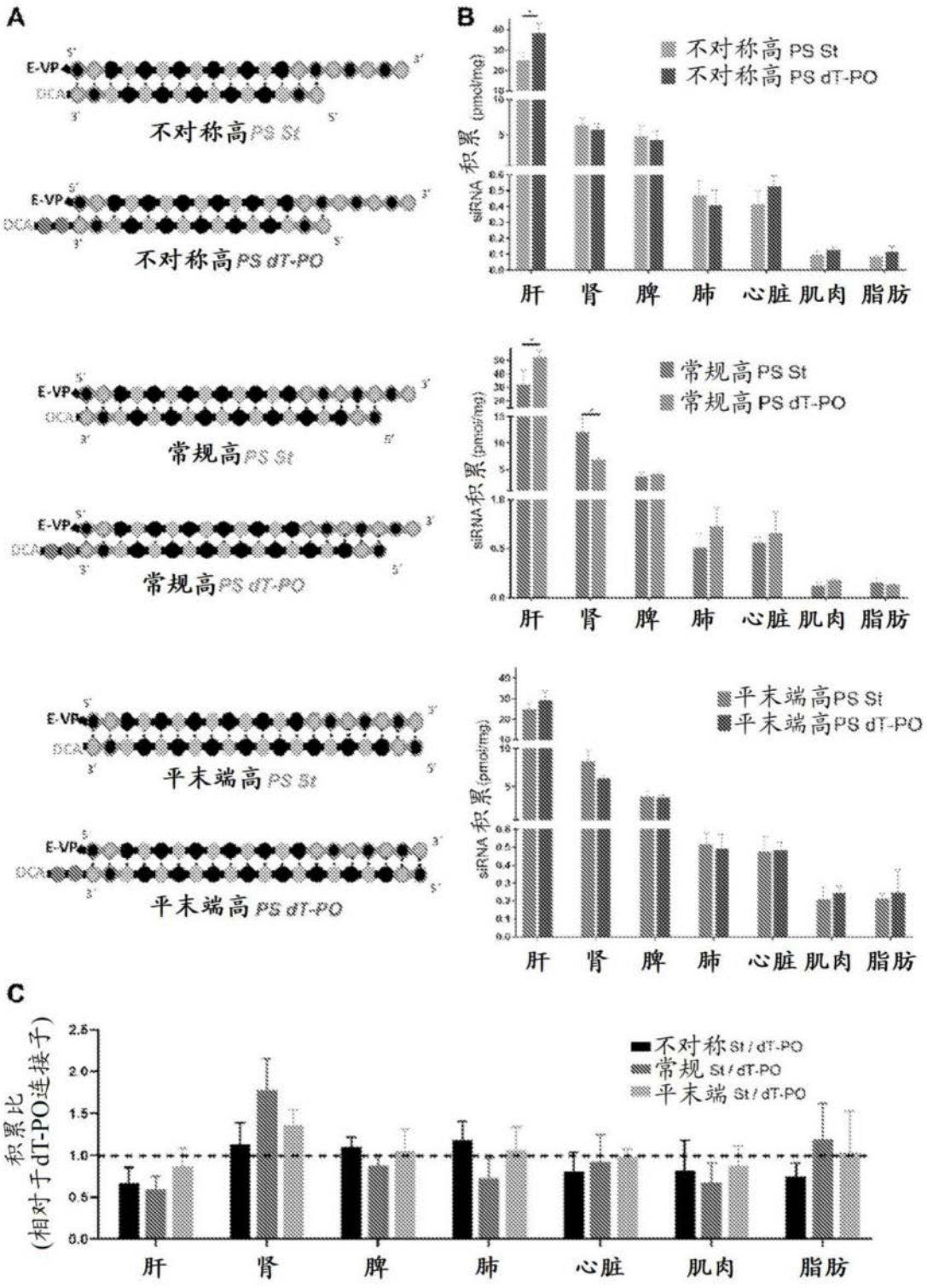

A
E-VP
DCA
不对称高PS St
不对称高PS dT-PO
常规高PS St
常规高PS dT-PO
平末端高PS St
平末端高PS dT-PO
B
不对称高 PS St
不对称高 PS dT-PO
常规高PS St
常规高PS dT-PO
平末端高PS St
平末端高PS dT-PO
siRNA 积累 (pmol/mg)
肝 肾 脾 肺 心脏 肌肉 脂肪
C
积累比
(相对于dT-PO连接子)
不对称St / dT-PO
常规 St / dT-PO
平末端 St / dT-PO
肝 肾 脾 肺 心脏 肌肉 脂肪

图8

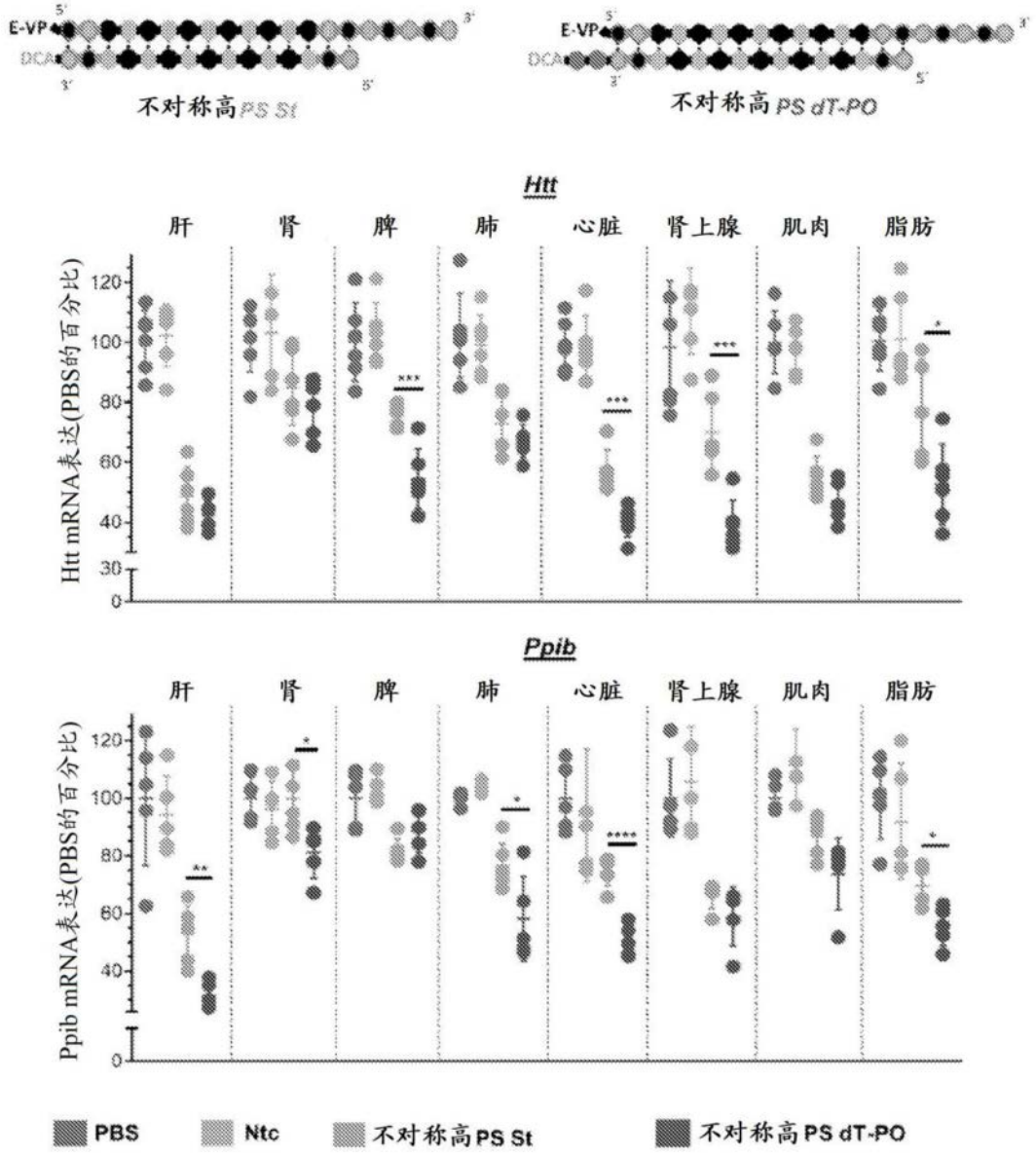

E-VP
DCA
不对称高PS St
不对称高PS dT-PO
Htt
肝
肾
脾
肺
心脏
肾上腺
肌肉
脂肪
Htt mRNA表达(PBS的百分比)
Ppib
Ppib mRNA表达(PBS的百分比)
PBS
Ntc
不对称高PS St
不对称高PS dT-PO

图9

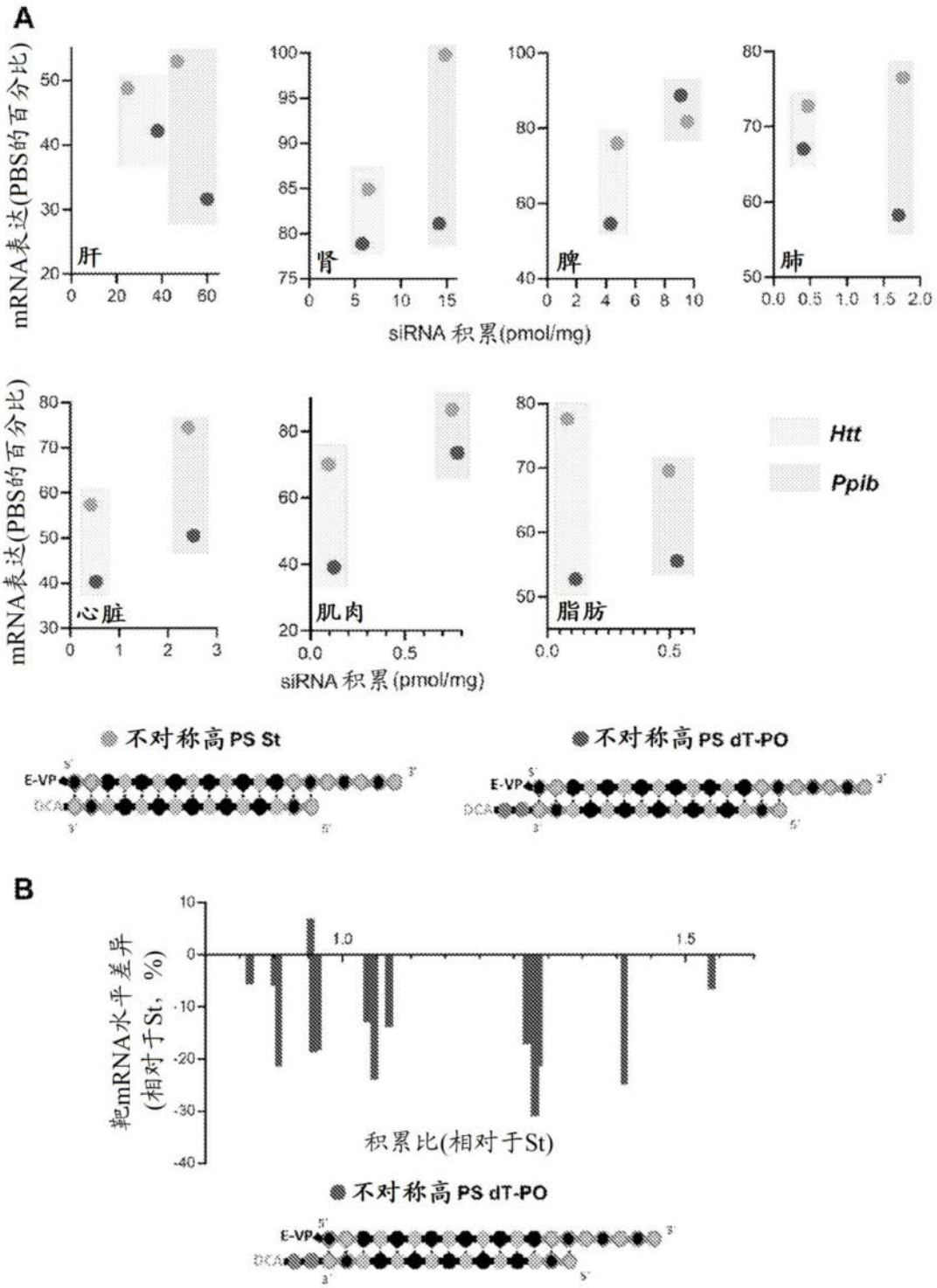

A
mRNA表达(PBS的百分比)
肝
肾
脾
肺
siRNA 积累(pmol/mg)
心脏
肌肉
脂肪
Htt
Ppib
不对称高 PS St
不对称高 PS dT-PO
E-VP
B
靶mRNA水平差异
(相对于St，%)
积累比(相对于St)
不对称高 PS dT-PO
E-VP

图10

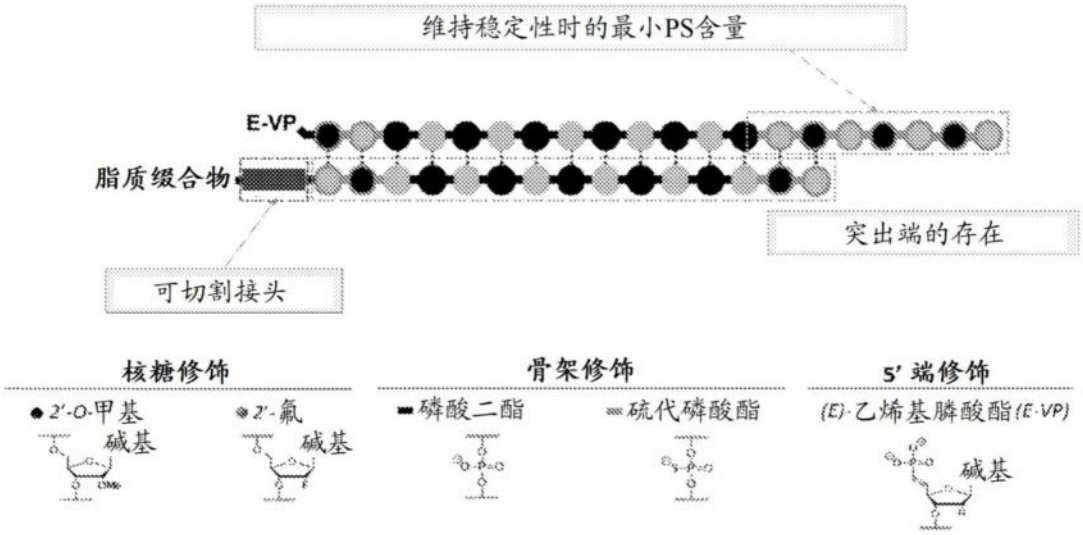

维持稳定性时的最小PS含量
E-VP
脂质缀合物
突出端的存在
可切割接头
核糖修饰
2'-O-甲基
碱基
2'-氟
碱基
骨架修饰
磷酸二酯
硫代磷酸酯
5' 端修饰
(E)-乙烯基膦酸酯(E-VP)
碱基

图11