



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116036117 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 02

(21) 申请号 202211456959.7	A61K 47/56 (2017.01)
(22) 申请日 2017.04.05	A61K 47/54 (2017.01)
(30) 优先权数据 16163939.8 2016.04.05 EP	G12N 15/113 (2010.01)
(62) 分案原申请数据 201780035060.9 2017.04.05	A61P 1/16 (2006.01)
(71) 申请人 赛伦斯治疗有限公司 地址 德国柏林	A61P 43/00 (2006.01)
(72) 发明人 克里斯蒂安·弗劳恩多夫 马克·卡梅伦	A61P 7/04 (2006.01)
(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224 专利代理师 黄爱娇	A61P 29/00 (2006.01)
	A61P 31/12 (2006.01)
	A61P 3/06 (2006.01)
	A61P 9/00 (2006.01)
	A61P 3/04 (2006.01)
	A61P 7/06 (2006.01)
	A61P 3/00 (2006.01)
	A61P 5/08 (2006.01)
(51) Int. Cl. A61K 31/7125 (2006.01)	

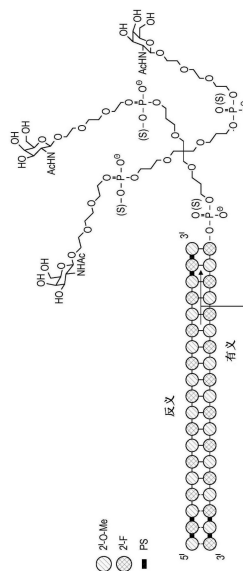
权利要求书8页 说明书52页
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

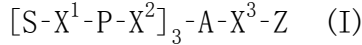
与三价糖缀合物连接的核酸

(57) 摘要

本发明涉及一种化合物,其包含与核酸缀合的经修饰的糖部分。该化合物在医学上可用于RNA干扰治疗或用于研究和诊断目的。特别是,该化合物可用于治疗肝病。



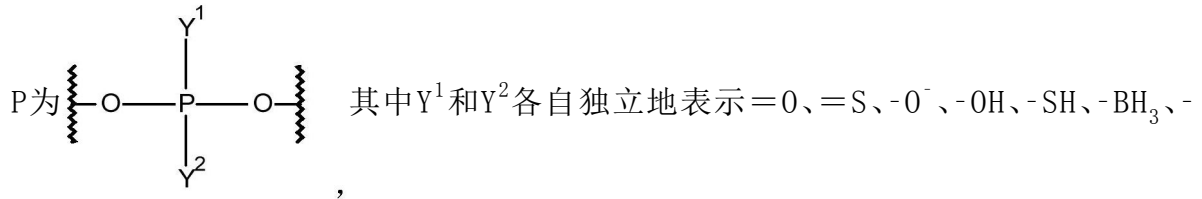
1. 一种具有式(I)的化合物:




其中:

S表示糖;

X¹表示C₃-C₆亚烷基或乙二醇主干(-CH₂-CH₂-O)_m(-CH₂)₂-, 其中,m为1、2或3;



OCH₂CO₂、-OCH₂CO₂R^x、-OCH₂C(S)OR^x和-OR^x, 其中R^x表示C₁-C₆烷基, 并且其中表示与化合物其余部分的连接;

X²为亚烷基或式(-CH₂)_n-O-CH₂-的亚烷基醚, 其中,n=1至6;

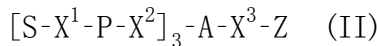
A为分支单元;

X³表示桥接单元;

Z为核酸, 所述核酸包括两条包含核苷酸的链, 能够干扰基因表达;

并且其中, X³和Z之间的键是磷酸酯或硫代磷酸酯。

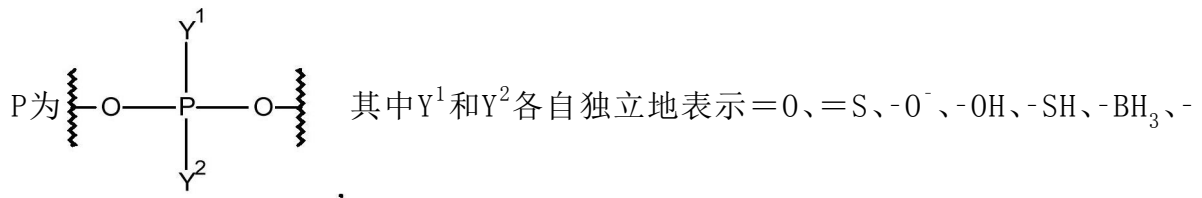
2. 根据权利要求1所述的化合物, 其特征在于, 所述化合物具有式(II):




其中:

S表示糖;

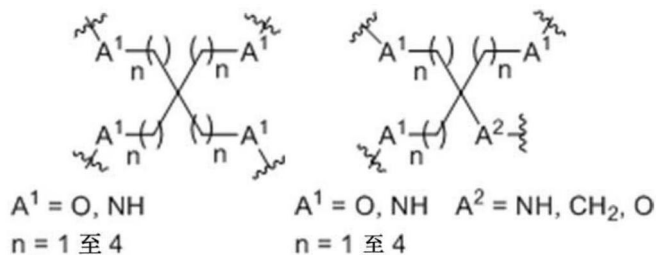
X¹表示C₃-C₆亚烷基或乙二醇主干(-CH₂-CH₂-O)_m(-CH₂)₂-, 其中,m为1、2或3;



OCH₂CO₂、-OCH₂CO₂R^x、-OCH₂C(S)OR^x和-OR^x, 其中R^x表示C₁-C₆烷基, 并且其中表示与化合物其余部分的连接;

X²为C₁-C₈亚烷基;

A是选自以下的分支单元:

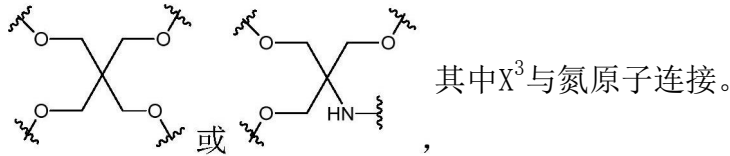


X³为桥接单元;

Z为核酸, 所述核酸包括两条包含核苷酸的链, 能够干扰基因表达;

并且其中, X^3 和Z之间的键是磷酸酯或硫代磷酸酯。

3. 根据权利要求2所述的化合物, 其特征在于, A具有以下结构:

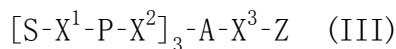


4. 根据权利要求1所述的化合物, 其特征在于, X^3 选自 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基-、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基-、式 $-(C_1-C_{20}$ 亚烷基)-O- $(C_1-C_{20}$ 亚烷基)-的亚烷基醚、 $-C(O)-C_1-C_{20}$ 亚烷基-、 $-C_0-C_4$ 亚烷基(Cy) C_0-C_4 亚烷基-, 其中Cy表示取代或未取代的5或6元亚环烷基、亚芳基、亚杂环基或亚杂芳基环、 $-C_1-C_4$ 亚烷基-NHC(O)- C_1-C_4 亚烷基-、 $-C_1-C_4$ 亚烷基-C(O)NH- C_1-C_4 亚烷基-、 $-C_1-C_4$ 亚烷基-SC(O)- C_1-C_4 亚烷基-、 $-C_1-C_4$ 亚烷基-C(O)S- C_1-C_4 亚烷基-、 $-C_1-C_4$ 亚烷基-OC(O)- C_1-C_4 亚烷基-、 $-C_1-C_4$ 亚烷基-C(O)O- C_1-C_4 亚烷基-和 $-C_1-C_6$ 亚烷基-S-S- C_1-C_6 亚烷基-。

5. 根据权利要求4所述的化合物, 其特征在于, X^3 是式 $-(C_1-C_{20}$ 亚烷基)-O- $(C_1-C_{20}$ 亚烷基)-的亚烷基醚, 任选地, 其中a) X^3 是式 $-(C_1-C_{20}$ 亚烷基)-O- $(C_4-C_{20}$ 亚烷基)-的亚烷基醚, 其中, 所述 $(C_4-C_{20}$ 亚烷基)与Z连接, 或b) X^3 选自由 $-CH_2-OC_3H_6-$ 、 $-CH_2-OC_4H_8-$ 、 $-CH_2-OC_6H_{12}-$ 和 $-CH_2-OC_8H_{16}-$ 组成的组, 尤其选自由 $-CH_2-OC_4H_8-$ 、 $-CH_2-OC_6H_{12}-$ 和 $-CH_2-OC_8H_{16}-$ 组成的组, 其中在每种情况下 $-CH_2-$ 基团与A连接。

6. 根据权利要求2所述的化合物, 其特征在于, X^3 是 C_1-C_{20} 亚烷基, 任选地, 其中 X^3 选自由 $-C_3H_6-$ 、 $-C_4H_8-$ 、 $-C_6H_{12}-$ 和 $-C_8H_{16}-$ 组成的组, 尤其选自由 $-C_4H_8-$ 、 $-C_6H_{12}-$ 和 $-C_8H_{16}-$ 组成的组。

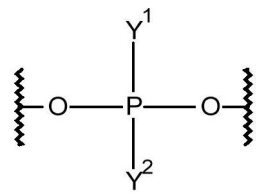
7. 根据权利要求1所述的化合物, 其特征在于, 所述化合物具有式(III):



其中:

S表示糖;

X^1 表示 C_3-C_6 亚烷基或乙二醇主干 $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$, 其中m为1、2或3; P为



其中 Y^1 和 Y^2 各自独立地表示 $=O$ 、 $=S$ 、 $-O^-$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-BH_3$ 、 $-OCH_2CO_2-$ 、

$-OCH_2CO_2R^x$ 、 $-OCH_2C(S)OR^x$ 和 $-OR^x$, 其中 R^x 表示 C_1-C_6 烷基, 并且其中 --- 表示与化合物其余部分的连接;

X^2 为式 $-C_3H_6-O-CH_2-$ 的亚烷基醚;

A为分支单元;

X^3 是选自由以下组成的组中的亚烷基醚: $-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-C_2H_4-$ 、 $-CH_2-O-C_3H_6-$ 、 $-CH_2-O-C_4H_8-$ 、 $-CH_2-O-C_5H_{10}-$ 、 $-CH_2-O-C_6H_{12}-$ 、 $-CH_2-O-C_7H_{14}-$ 和 $-CH_2-O-C_8H_{16}-$, 其中在每种情况下 $-CH_2-$ 基团与A连接,

Z为核酸, 所述核酸包括两条包含核苷酸的链, 能够干扰基因表达;

并且其中 X^3 和Z之间的键是磷酸酯或硫代磷酸酯。

8. 根据权利要求7所述的化合物, 其特征在于, 所述分支单元包含碳, 任选地所述分支

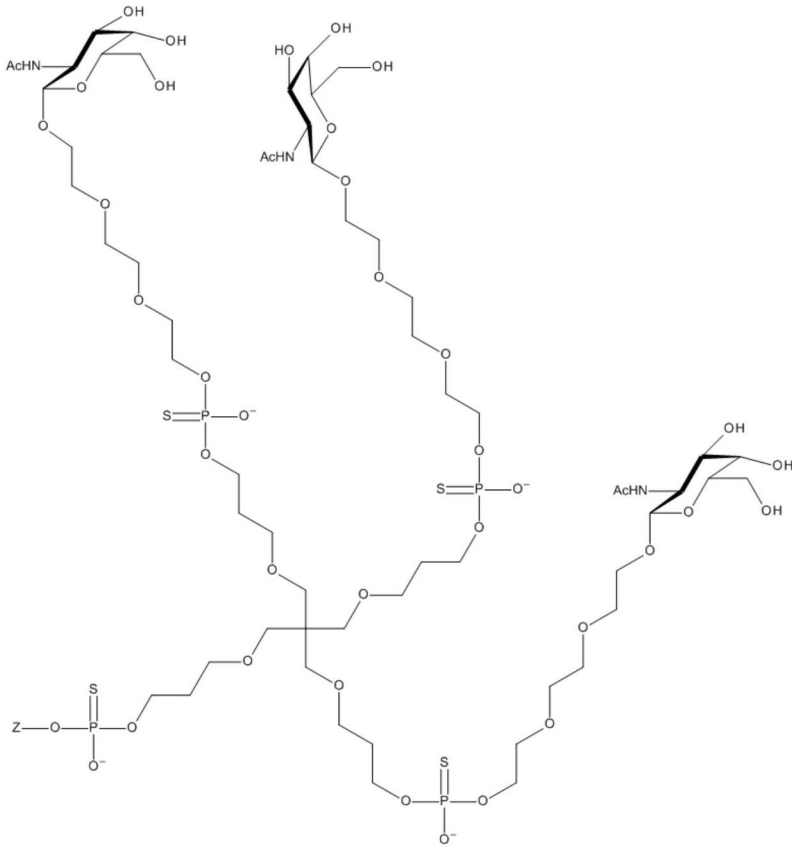
单元是碳原子。

9. 根据权利要求7或8所述的化合物, 其特征在于, X^3 选自由 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_4\text{H}_8-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{10}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{12}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_7\text{H}_{14}-$ 和 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_8\text{H}_{16}-$ 组成的组, 任选地 X^3 选自由 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_4\text{H}_8-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_{12}-$ 和 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_8\text{H}_{16}-$ 组成的组。

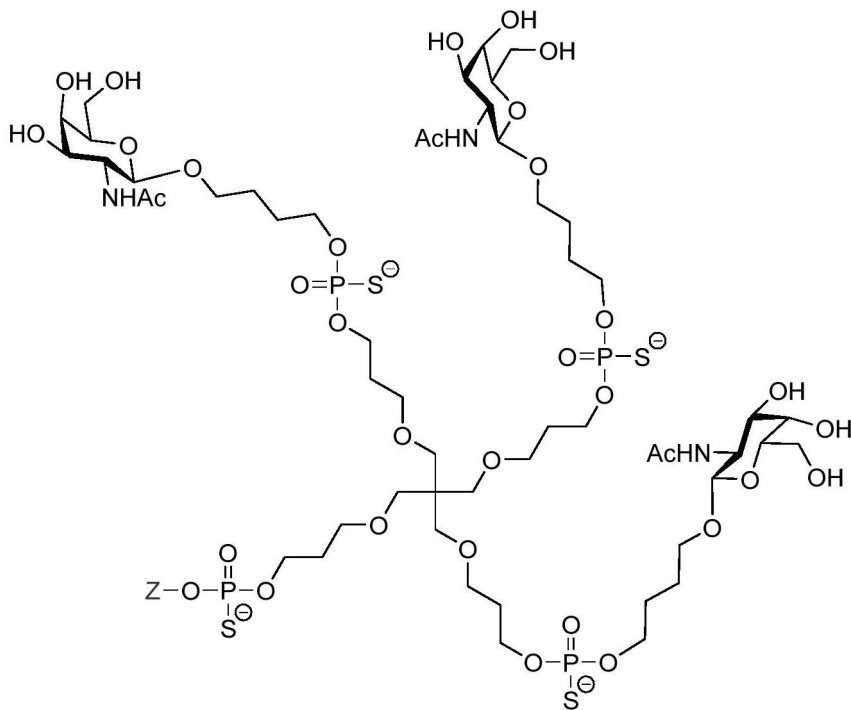
10. 根据前述权利要求中任一项的化合物, 其特征在于, 所述糖选自N-乙酰基半乳糖胺、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、葡糖胺和果糖; 任选地所述糖是N-乙酰基半乳糖胺。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的化合物, 其特征在于, X^1 表示 C_3-C_6 亚烷基。

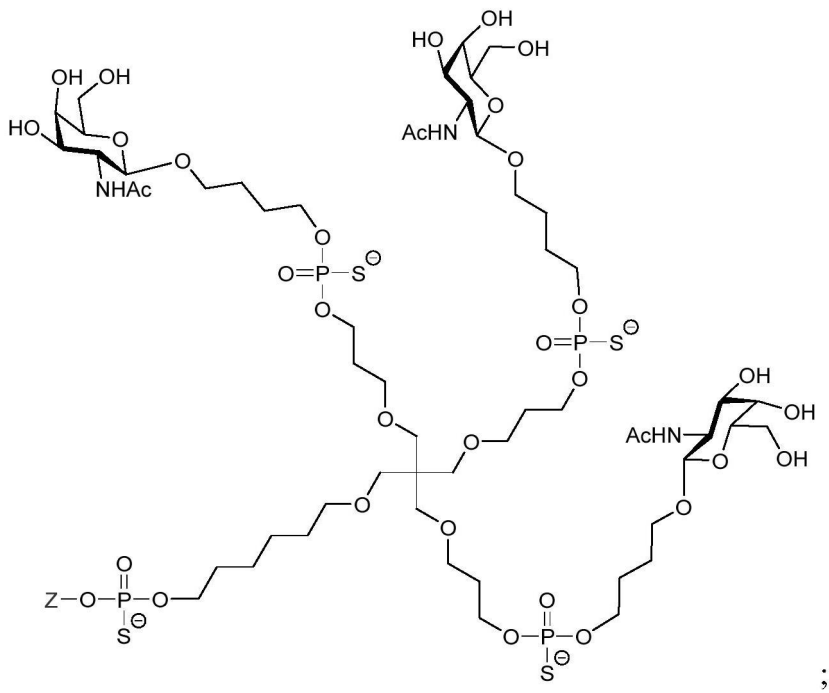
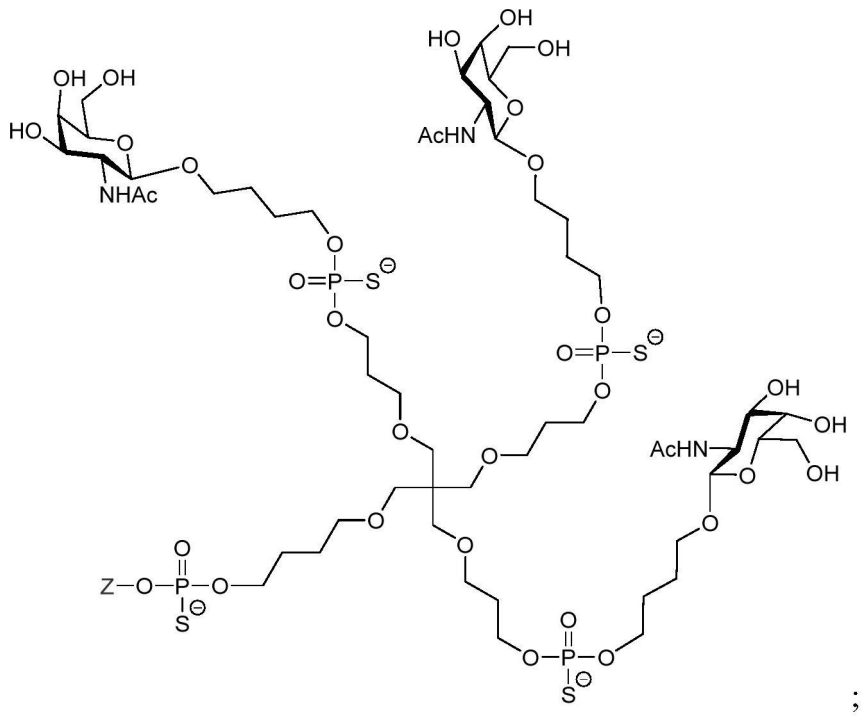
12. 一种选自下式的化合物:

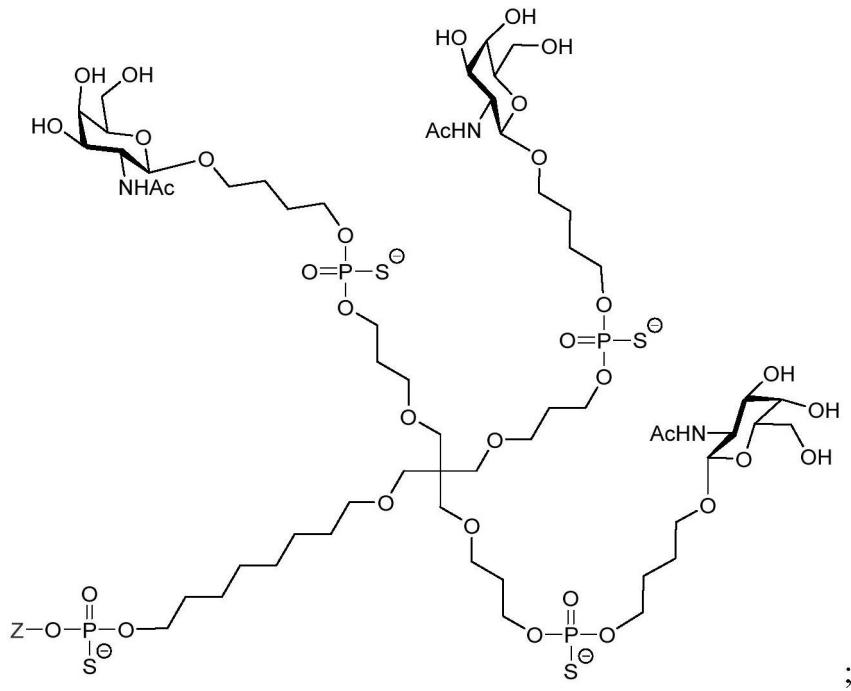


;

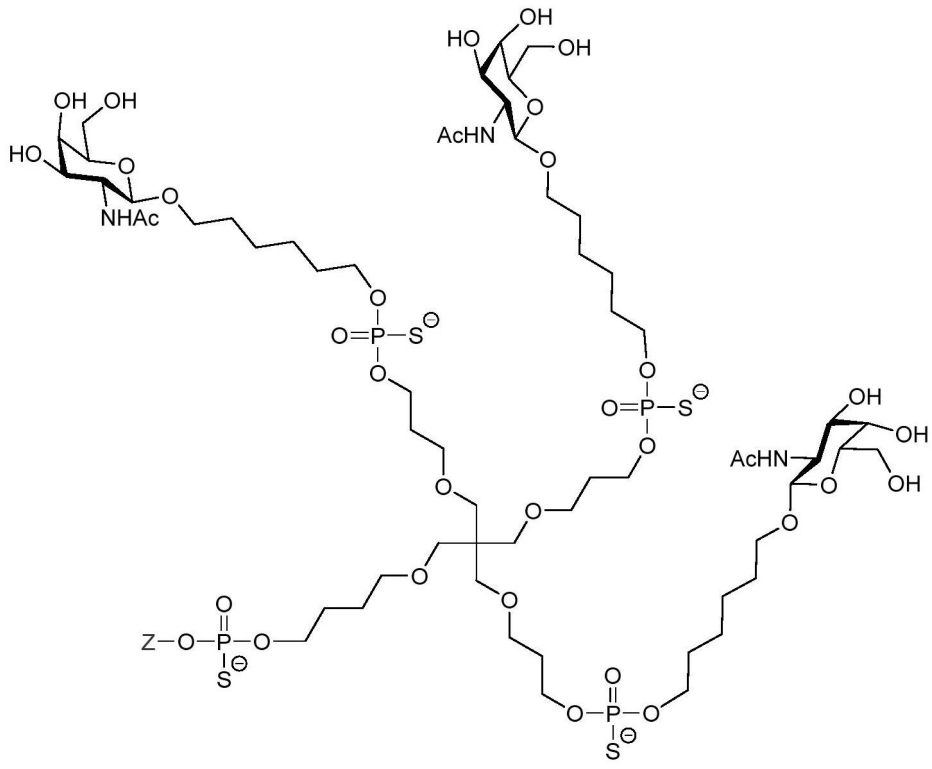


;

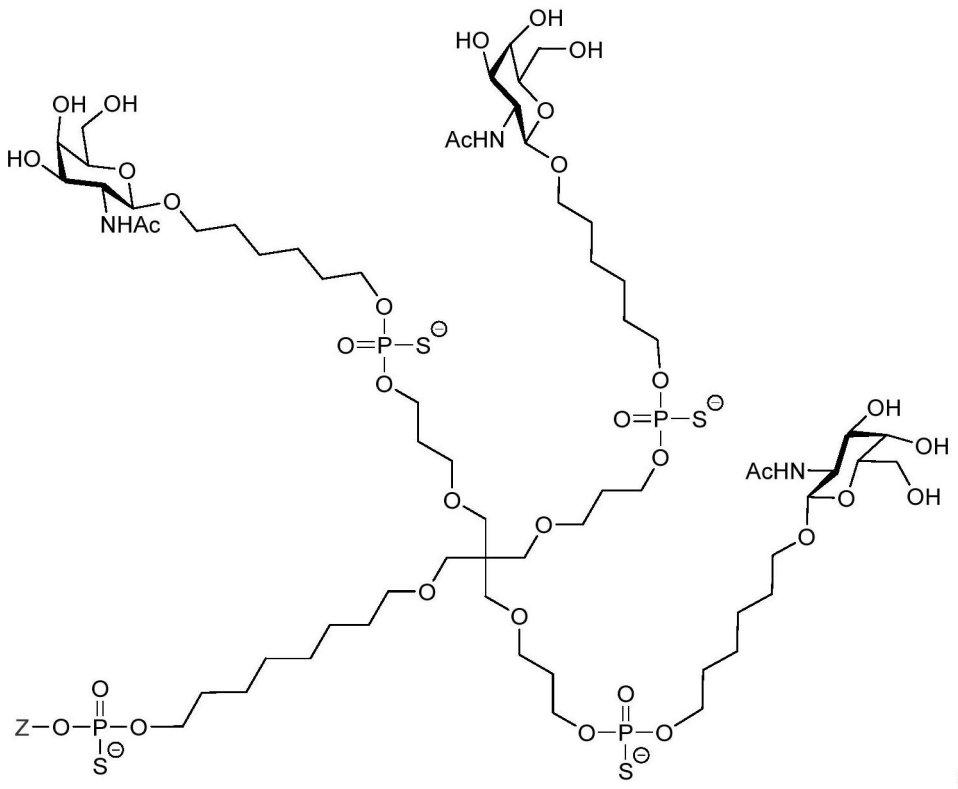
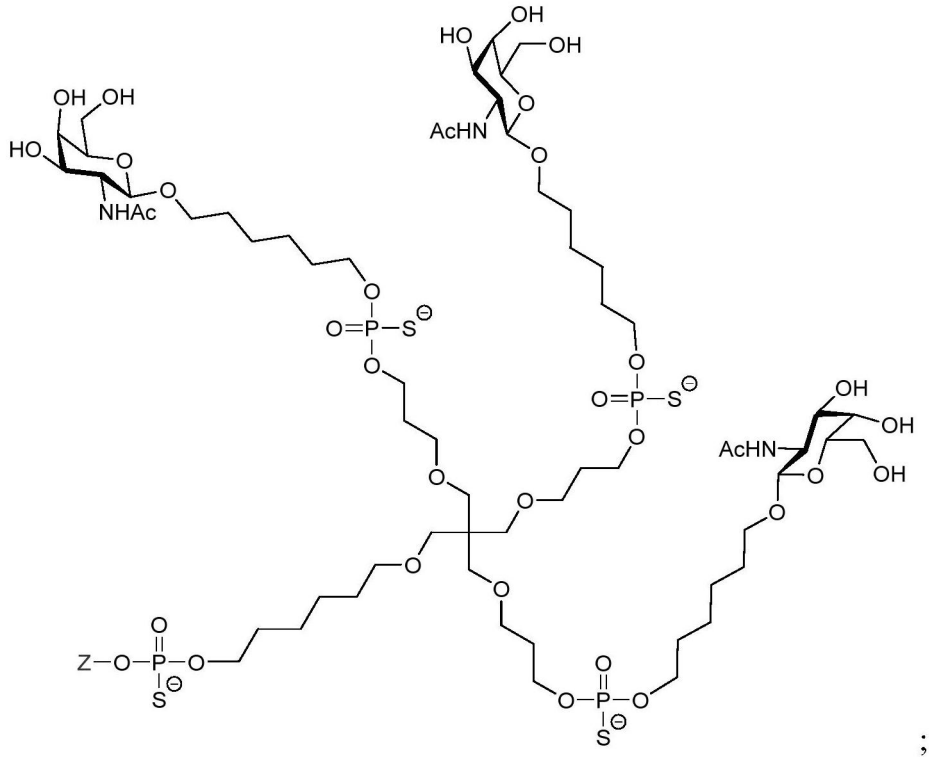




;



;



其中,Z为核酸,所述核酸包括两条包含核苷酸的链,能够干扰基因表达。

13. 根据前述权利要求1-12中任一项所述的化合物,其特征在于,

- a) 所述核酸为siRNA;
- b) 所述核酸包括两条分离的多核苷酸链;

c) 所述核酸的第一链和第二链是自身互补的相同多核苷酸分子的一部分;和/或

d) 所述核酸是经修饰的;任选地,其中修饰选自用核酸或碱基的类似物取代或插入以及对碱、糖或磷酸根部分的化学修饰。

14. 一种组合物,其包含权利要求1至13中任一项所定义的化合物以及合适的运载体或赋形剂。

15. 根据权利要求1至13中任一项所定义的化合物或根据权利要求14所定义的组合物,其特征在于,所述化合物用于医药中。

16. 根据权利要求15所述的化合物或组合物的用途,其特征在于,所述化合物或组合物用于治疗肝病、遗传病、血友病和出血性病症、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、病毒性肝炎、罕见疾病(例如肢端肥大症)、代谢性疾病(例如高胆固醇血症、血脂异常、高甘油三酯血症)、心血管疾病、肥胖症、地中海贫血、肝损伤(例如药物所致肝损伤)、血色素沉着症、酒精性肝病、酒精依赖症、贫血和慢性疾病的贫血。

17. 一种将核酸递送至肝细胞的体外方法,所述方法包括使肝细胞与根据权利要求1至13中任一项所述的化合物接触。

18. 一种制备如权利要求1至13中任一项所述的式(I)、式(II)或式(III)的化合物的处理方法,所述处理方法包括一起添加各组分以形成式(I)、式(II)或式(III)的化合物。

与三价糖缀合物连接的核酸

技术领域

[0001] 本发明涉及新型核酸缀合物化合物。本发明还涉及包含所述缀合物的组合物及其在医学、研究和诊断中的用途。该新型缀合物化合物可用于治疗许多疾病,包括中枢神经系统疾病、炎性疾病、代谢紊乱、基因和遗传疾病、肿瘤、感染性疾病和眼病。

背景技术

[0002] 双链RNA(dsRNA)已显示会阻断基因表达(Fire et al.,1998和Elbashir et al.,2001),并且这被称为RNA干扰或由干扰RNA分子(iRNA)介导的“RNAi”。短dsRNA指导许多生物(包括脊椎动物)中基因特异性的转录后沉默,并为研究基因功能提供了新工具。RNAi 由RNA诱导沉默复合物(RISC)介导,RISC是一种破坏与沉默触发物同源的信使RNA序列特异性的多组分核酸酶。iRNA(干扰RNA)例如siRNA(短干扰RNA)、反义RNA和微小RNA是通过基因沉默(即抑制蛋白质的翻译)来阻止蛋白质形成的寡核苷酸。基因沉默剂对于医学中的治疗应用变得越来越重要。

[0003] 因此,用于将寡核苷酸,特别是双链siRNA有效递送至体内细胞的方法变得越来越重要,并且需要特异性靶向和针对细胞外环境,特别是血清蛋白的实质性保护。实现特异性靶向的一种方法是使靶向部分缀合至iRNA双链体试剂。靶向部分有助于使iRNA双链体试剂靶向所需的靶位点,并且需要针对所需的受体位点来设计合适的靶向部分,以使缀合的分子被细胞摄取(例如通过胞吞作用)。

[0004] 例如,去唾液酸糖蛋白受体(ASGP-R)是高容量受体,其在肝细胞上非常丰富。三角簇糖苷的首次公开之一在美国专利第US 5,885,968号中。具有三个GalNAc配体并包含磷酸酯基团的缀合物是已知的并且描述于Dubber et al.(2003)中。ASGP-R对N-乙酰基-D-半乳糖胺(GalNAc)的亲和力比对D-Gal的亲和力高50倍。

[0005] 表达特异性识别糖基化蛋白质或其他寡糖的末端 β -半乳糖基亚基的凝集素(去唾液酸糖蛋白受体;ASGPR)的肝细胞可以用于(P.H.Weigel et al.,2002)通过半乳糖或半乳糖胺与药物物质的共价偶联使药物靶向于肝脏(S.Ishibashi,et al.1994)。此外,通过重复靶向单元实现的多价效应可以显著提高结合亲和力(E.A.L.Biessen et al.,1995)。

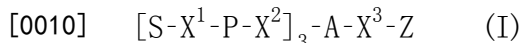
[0006] ASGPR是用于含有末端 β -半乳糖基的糖蛋白的活性内体转运的介质,因此ASGPR非常适合靶向递送必须被递送到细胞中的候选药物,例如siRNA(Akinc et al.)。

[0007] 然而,到目前为止开发的靶向配体并不总是转化为体内环境,并且明显需要更有效的受体特异性配体缀合的iRNA双链体试剂及制备该iRNA双链体试剂以用于寡核苷酸治疗剂、核酸和双链siRNA的体内递送的方法。本发明试图解决这些需求。

发明内容

[0008] 本发明涉及缀合物化合物,其在化合物的糖部分内具有三个糖配体和经修饰的磷酸酯基团。已显示这些缀合物化合物具有改善的体内效力和持续时间。另外,与本领域已知的缀合物相比,该缀合物基团更容易制备。

[0009] 本发明的缀合物化合物具有式I:



[0011] 其中:

[0012] S代表糖;

[0013] X^1 表示 C_3 - C_6 亚烷基或乙二醇主干 $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$,其中m为1、2或3;

[0014] P为经修饰的磷酸酯;

[0015] X^2 为亚烷基或式 $(-CH_2)_n-O-CH_2-$ 的亚烷基醚,其中n=1至6;

[0016] A为分支单元;

[0017] X^3 表示桥接单元;

[0018] Z为核酸;

[0019] 并且其中 X^3 和Z之间的键是磷酸酯或硫代磷酸酯。

[0020] 所述核酸可选自RNAi、siRNA、siNA、反义核酸、核酶、适体和L-RNA适体(spiegelmer)。本发明还涉及包含式I的缀合物化合物的药物组合物。

[0021] 发明的具体描述

[0022] 以下定义和解释是针对包括说明书和权利要求书的整个文件中所使用的术语。

[0023] 除非另有说明,否则以下术语具有以下含义:

[0024] “缀合物”或“缀合物基团”是指与寡核苷酸或寡聚化合物结合的原子或原子的组。通常,缀合物基团改变它们所连接的化合物的一种或多种性质,包括但不限于药效学、药代动力学、结合、吸附、细胞分布、细胞摄取、电荷和/或清除性质。

[0025] “GalNAc”意为N-乙酰基半乳糖胺。

[0026] C_x-C_y 烷基是指具有x至y个碳原子的饱和脂族烃基,其可以是直链的或支链的。例如 C_1-C_6 烷基并且包括 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 和 C_6 。“支链”意为该组中存在至少一个碳分支点。例如,叔丁基和异丙基都是支链基团。 C_1-C_6 烷基的实例包括甲基、乙基、丙基、丁基、2-甲基-1-丙基、2-甲基-2-丙基、2-甲基-1-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-3-丁基、2,2-二甲基-1-丙基、2-甲基-戊基、3-甲基-1-戊基、4-甲基-1-戊基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、2,2-二甲基-1-丁基、3,3-二甲基-1-丁基、2-乙基-1-丁基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基和正己基。这也适用于 C_1-C_6 亚烷基。

[0027] C_x-C_y 烷氧基是指根据上述 C_x-C_y 烷基的定义,具有 $-O-C_x-C_y$ 烷基的基团或基团的一部分。 C_1-C_3 烷氧基含有1至3个碳原子并且包括 C_1 、 C_2 和 C_3 。 C_1-C_3 烷氧基的实例包括甲氧基、乙氧基、丙氧基和异丙氧基。如本文所用的烷氧基也延伸至其中氧原子(例如单个氧原子)位于烷基链内的实施方式,例如 $CH_2CH_2OCH_3$ 或 CH_2OCH_3 。因此,烷氧基可以通过碳与分子的其余部分连接,例如 $-CH_2CH_2OCH_3$,或可供选择地,烷氧基通过氧与分子的其余部分连接,例如 $-OC_{1-3}$ 烷基。在某些情况下,烷氧基可以通过氧与分子的其余部分连接,但烷氧基含有另外的氧原子,例如 $-OCH_2CH_2OCH_3$ 。

[0028] 术语“核酸”是指由单体核苷酸组成的分子。核酸包括核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、单链核酸(ssDNA)、双链核酸(dsDNA)、小干扰核糖核酸(siRNA)和微小RNA(miRNA)。核酸还可以包含单个分子中这些元素的任何组合。

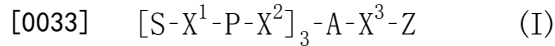
[0029] 术语“治疗(treat/treating/treatment)”可包括预防,并且意为改善症状、减轻症状、暂时或永久消除症状的原因、或防止或减缓指定的病症或状况的症状出现。本发明的

化合物可用于治疗人和非人动物。

[0030] “有效量”或“治疗有效量”或“有效剂量”是指足以引发所需药理学效果或治疗效果的量,从而导致有效地预防或治疗病症。通过将病症症状的发作延迟到医学上显著的程度来证明预防病症。病症的治疗体现为与病症相关的症状减轻或病症症状复发的改善。

[0031] “药物组合物”或“组合物”是指适合给药于个体的物质的混合物。例如,药物组合物可包含一种或多种活性剂和药物运载体,例如无菌水溶液。

[0032] 在第一方面,本发明提供式(I)的化合物:



[0034] 其中:

[0035] S表示糖;

[0036] X^1 表示 C_3-C_6 亚烷基或乙二醇主干 $(-CH_2-CH_2-O)_m(-CH_2)_2-$,其中m为1、2或3;

[0037] P为经修饰的磷酸酯;

[0038] X^2 为亚烷基或式 $(-CH_2)_n-O-CH_2-$ 的亚烷基醚,其中n=1至6;

[0039] A为分支单元;

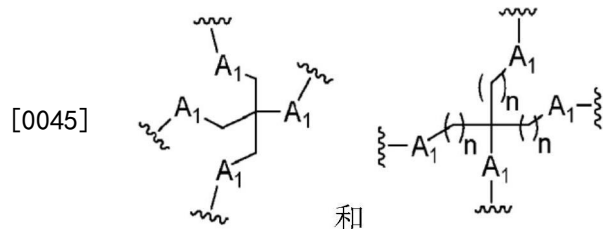
[0040] X^3 表示桥接单元;

[0041] Z为核酸;

[0042] 并且其中 X^3 和Z之间的键是磷酸酯或硫代磷酸酯。

[0043] 在式I中,分支单元“A”分支为三个,以容纳三个糖配体。分支单元与系琐配体和核酸共价连接。分支单元可包含支链脂族基团,该支链脂族基团包括选自烷基、酰胺、二硫化物、聚乙二醇、醚、硫醚和羟氨基的基团。分支单元可包括选自烷基和醚基的基团。

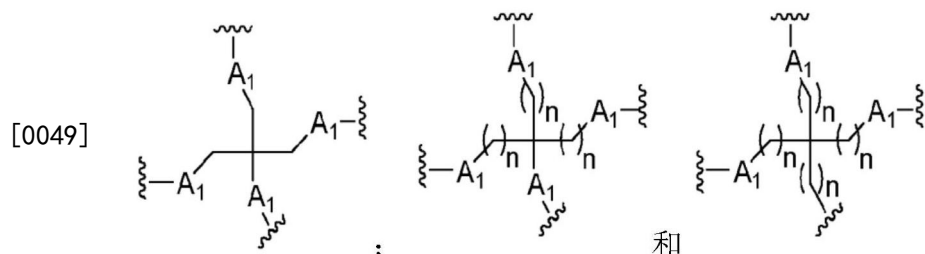
[0044] 分支单元A可具有选自以下的结构:



[0046] 其中每个 A_1 独立地表示O、S、C=O或NH;并且

[0047] 每个n独立地表示1至20的整数。

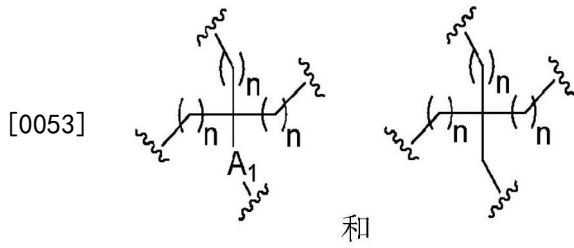
[0048] 所述分支单元可具有选自以下的结构:



[0050] 其中每个 A_1 独立地表示O、S、C=O或NH;并且

[0051] 每个n独立地表示1至20的整数。

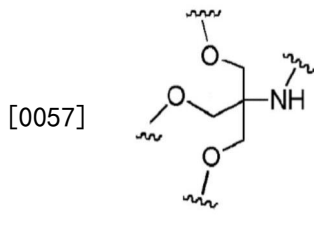
[0052] 所述分支单元可具有选自以下的结构:



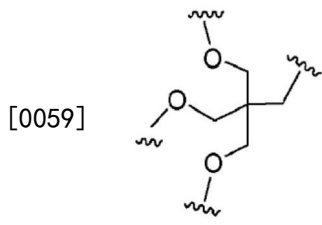
[0054] 其中A₁是O、S、C=O或NH；和

[0055] 每个n独立地表示1至20的整数。

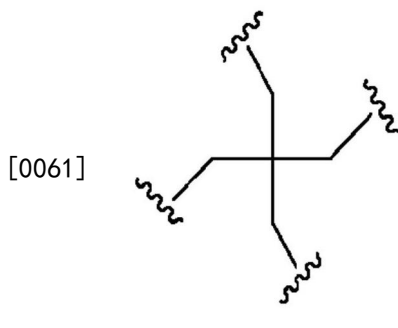
[0056] 所述分支单元可具有以下结构：



[0058] 所述分支单元可具有以下结构：



[0060] 所述分支单元可具有以下结构：



[0062] 任选地，所述分支单元仅由碳原子组成。

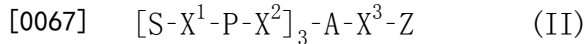
[0063] 式I的化合物的“X³”部分是桥接单元。X³也可称为缀合物接头。桥接单元是直链的并且与所述分支单元和核酸共价结合。

[0064] X³可选自-C₁-C₂₀亚烷基-、-C₂-C₂₀亚烯基-、式-(C₁-C₂₀亚烷基)-O-(C₁-C₂₀亚烷基)-的亚烷基醚、-C(O)-C₁-C₂₀亚烷基-、-C₀-C₄亚烷基(C_y)C₀-C₄亚烷基-，其中C_y表示取代或未取代的5或6元亚环烷基、亚芳基、亚杂环基或亚杂芳基环、-C₁-C₄亚烷基-NHC(O)-C₁-C₄亚烷基-、-C₁-C₄亚烷基-C(O)NH-C₁-C₄亚烷基-、-C₁-C₄亚烷基-SC(O)-C₁-C₄亚烷基-、-C₁-C₄亚烷基-C(O)S-C₁-C₄亚烷基-、-C₁-C₄亚烷基-OC(O)-C₁-C₄亚烷基-、-C₁-C₄亚烷基-C(O)O-C₁-C₄亚烷基-和-C₁-C₆亚烷基-S-S-C₁-C₆亚烷基-。

[0065] X³可以是式-(C₁-C₂₀亚烷基)-O-(C₁-C₂₀亚烷基)-的亚烷基醚。X³可以是式-(C₁-C₂₀亚烷基)-O-(C₄-C₂₀亚烷基)-的亚烷基醚，其中所述(C₄-C₂₀亚烷基)与Z连接。X³可以选自由

-CH₂-OC₃H₆-、-CH₂-OC₄H₈-、-CH₂-OC₆H₁₂-和-CH₂-OC₈H₁₆-组成的组,尤其选自由 -CH₂-OC₄H₈-、-CH₂-OC₆H₁₂-和-CH₂-OC₈H₁₆-组成的组,其中在每种情况下-CH₂-基团与A连接。

[0066] 在第二方面,本发明提供式(II)的化合物:



[0068] 其中:

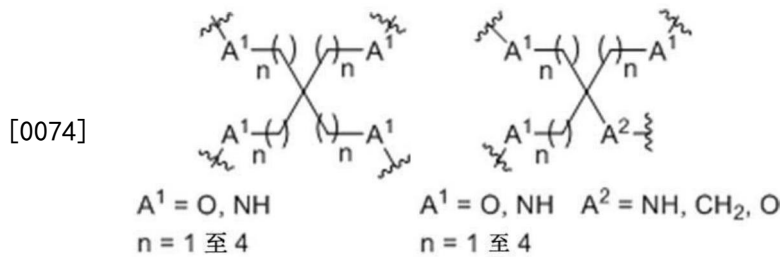
[0069] S表示糖;

[0070] X¹表示C₃-C₆亚烷基或乙二醇主干(-CH₂-CH₂-O)_m(-CH₂)₂-,其中m为1、2或3;

[0071] P为经修饰的磷酸酯;

[0072] X²为C₁-C₈亚烷基;

[0073] A是选自以下的分支单元:

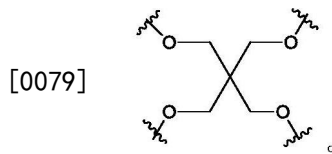


[0075] X³为桥接单元;

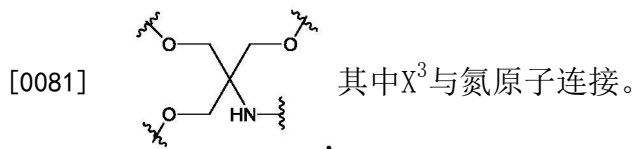
[0076] Z为核酸;

[0077] 并且其中X³和Z之间的键是磷酸酯或硫代磷酸酯。

[0078] 所述分支单元A可以具有以下结构:

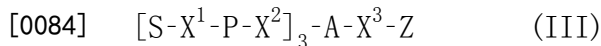


[0080] 所述分支单元A可以具有以下结构:



[0082] X³可以是C₁-C₂₀亚烷基。优选地,X³选自由-C₃H₆-、-C₄H₈-、-C₆H₁₂-和-C₈H₁₆-组成的组,尤其选自由-C₄H₈-、-C₆H₁₂-和-C₈H₁₆-组成的组。

[0083] 在第三方面,本发明提供式(III)的化合物:



[0085] 其中:

[0086] S表示糖;

[0087] X¹表示C₃-C₆亚烷基或乙二醇主干(-CH₂-CH₂-O)_m(-CH₂)₂-,其中m为1、2或3;

[0088] P为经修饰的磷酸酯;

[0089] X²为式-C₃H₆-O-CH₂-的亚烷基醚;

[0090] A为分支单元;

[0091] X³是选自由以下组成的组中的亚烷基醚:-CH₂-O-CH₂-、-CH₂-O-C₂H₄-、-CH₂-O-

$C_3H_6^-$ 、 $-CH_2-O-C_4H_8^-$ 、 $-CH_2-O-C_5H_{10}^-$ 、 $-CH_2-O-C_6H_{12}^-$ 、 $-CH_2-O-C_7H_{14}^-$ 和 $-CH_2-O-C_8H_{16}^-$ ，其中在每种情况下 $-CH_2-$ 基团与A连接，

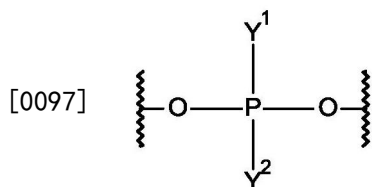
[0092] Z为核酸；

[0093] 并且其中 X^3 和Z之间的键是磷酸酯或硫代磷酸酯。

[0094] 所述分支单元可包含碳。优选地，碳单元是碳。

[0095] X^3 可以选自由 $-CH_2-O-C_4H_8^-$ 、 $-CH_2-O-C_5H_{10}^-$ 、 $-CH_2-O-C_6H_{12}^-$ 、 $-CH_2-O-C_7H_{14}^-$ 和 $-CH_2-O-C_8H_{16}^-$ 组成的组。优选地， X^3 选自由 $-CH_2-O-C_4H_8^-$ 、 $-CH_2-O-C_6H_{12}^-$ 和 $-CH_2-O-C_8H_{16}^-$ 组成的组。

[0096] 对于上述任何方面，P表示经修饰的磷酸酯基团。P可以表示为：



[0098] 其中 Y^1 和 Y^2 各自独立地表示 $=O$ 、 $=S$ 、 $-O^-$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-BH_3$ 、 $-OCH_2CO_2$ 、 $-OCH_2CO_2R^x$ 、 $-OCH_2C(S)OR^x$ 和 $-OR^x$ ，其中 R^x 表示 C_1-C_6 烷基，并且其中 --- 表示与化合物其余部分的连接。

[0099] 例如， Y^1 可以表示 $-OH$ ， Y^2 可以表示 $=O$ 或 $=S$ ；或

[0100] Y^1 可以表示 $-O^-$ ， Y^2 可以表示 $=O$ 或 $=S$ ；

[0101] Y^1 可以表示 $=O$ ， Y^2 可以表示 $-CH_3$ 、 $-SH$ 、 $-OR^x$ 或 $-BH_3$

[0102] Y^1 可以表示 $=S$ ， Y^2 可以表示 $-CH_3$ 、 OR^x 或 $-SH$ 。

[0103] 本领域技术人员将理解，在某些情况下， Y^1 和 Y^2 之间将存在离域。

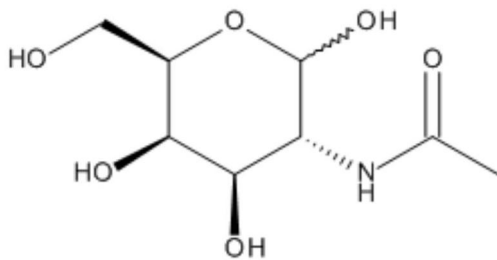
[0104] 优选地，经修饰的磷酸酯基团是硫代磷酸酯基团。硫代磷酸酯基团包括二硫代磷酸酯（即其中 Y^1 表示 $=S$ 且 Y^2 表示 $-S^-$ ）和单硫代磷酸酯（即其中 Y^1 表示 $-O^-$ 且 Y^2 表示 $=S$ ，或其中 Y^1 表示 $=O$ 且 Y^2 表示 $-S^-$ ）。优选地，P是单硫代磷酸酯。发明人已经发现具有替换磷酸酯基团的硫代磷酸酯基团的缀合物具有改善的体内效力和作用持续时间。

[0105] P也可以是磷酸乙酯（即，其中 Y^1 表示 $=O$ 且 Y^2 表示 OCH_2CH_3 ）。

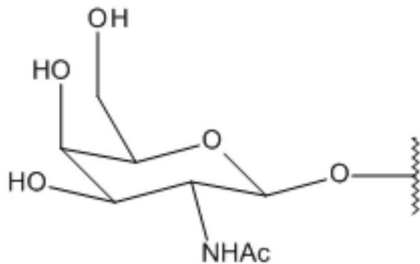
[0106] 可以选择糖（也可以称为配体）以对靶细胞上的至少一种类型的受体具有亲和力。特别地，受体位于哺乳动物肝细胞的表面上，例如肝脏去唾液酸糖蛋白受体（ASGP-R）。

[0107] 对于任何上述方面，糖可选自N-乙酰基半乳糖胺、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、葡糖胺和果糖。优选地，糖是N-乙酰基半乳糖胺（GalNAc）。本发明化合物具有3个配体，每个配体优选为N-乙酰基半乳糖胺。

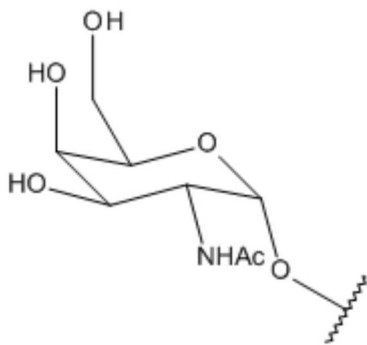
[0108] “GalNAc”是指2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-吡喃半乳糖，在文献中通常称为N-乙酰基半乳糖胺。对“GalNAc”或“N-乙酰基半乳糖胺”的提及包括 β -形式（2-(乙酰氨基)-2-脱氧- β -D-吡喃半乳糖）和 α -形式（2-(乙酰氨基)-2-脱氧- α -D-吡喃半乳糖）。在某些实施方式中， β -形式（2-(乙酰氨基)-2-脱氧- β -D-吡喃半乳糖）和 α -形式（2-(乙酰氨基)-2-脱氧- α -D-吡喃半乳糖）可互换使用。优选地，本发明的化合物包含 β -形式，即2-(乙酰氨基)-2-脱氧- β -D-吡喃半乳糖。



2-(乙酰氨基)-2-脱氧-D-吡喃半乳糖



[0109]

2-(乙酰氨基)-2-脱氧 β -D-吡喃半乳糖2-(乙酰氨基)-2-脱氧 α -D-吡喃半乳糖

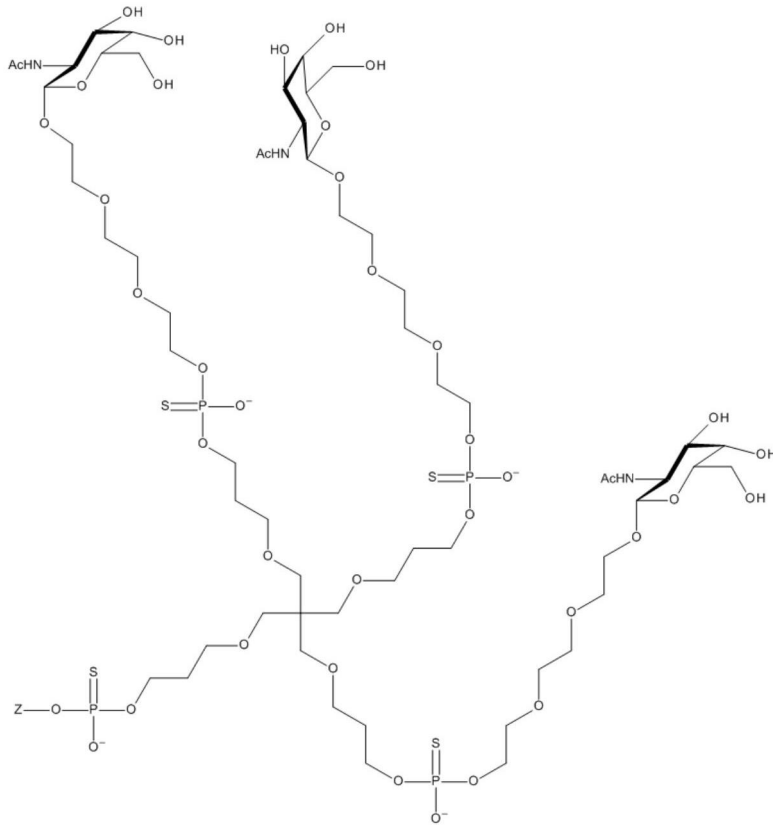
[0110] 本发明化合物的“ X^1 -P- X^2 ”部分也可称为系链或接头。接头包含直链基团并与糖配体和分支单元共价连接。

[0111] 对于上述任何方面， X^1 可以是乙二醇主干 $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m(-\text{CH}_2)_2-$ ，其中m是1、2或3。 X^1 可以是 $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})(-\text{CH}_2)_2-$ 。 X^1 可以是 $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_2(-\text{CH}_2)_2-$ 。 X^1 可以是 $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_3(-\text{CH}_2)_2-$ 。优选地， X^1 是 $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_2(-\text{CH}_2)_2-$ 。可供选择地， X^1 表示 C_3 - C_6 亚烷基。 X^1 可以是亚丙基。 X^1 可以是亚丁基。 X^1 可以是亚戊基。 X^1 可以是亚己基。优选地，烷基是直链亚烷基。特别地， X^1 可以是亚丁基。

[0112] 对于第三方面的化合物， X^2 表示式 $-\text{C}_3\text{H}_6-\text{O}-\text{CH}_2-$ （即 C_3 烷氧基亚甲基）或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ 的亚烷基醚。

[0113] 在第四方面，本发明提供具有以下结构的缀合物化合物：

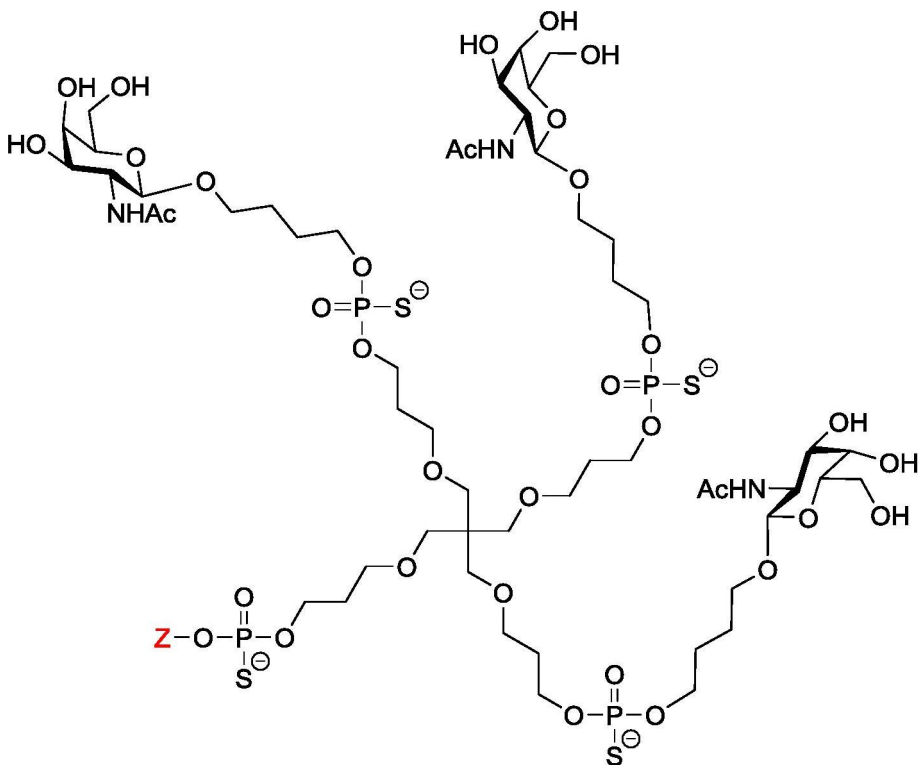
[0114]



[0115] 其中Z为核酸。

[0116] 在第五方面,本发明提供具有以下结构的缀合物化合物:

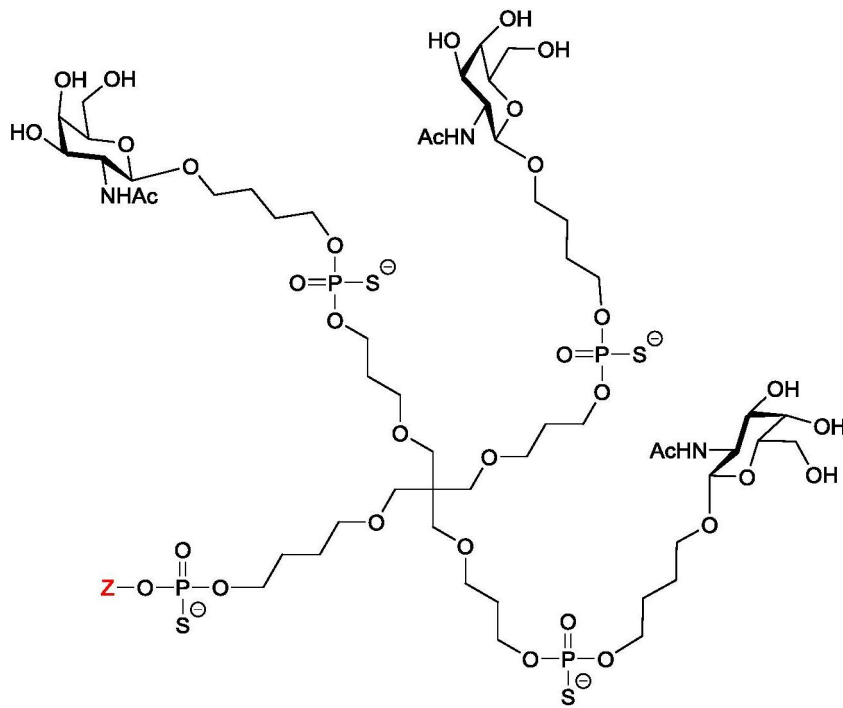
[0117]



[0118] 其中Z为核酸。

[0119] 在第六方面,本发明提供具有以下结构的缀合物化合物:

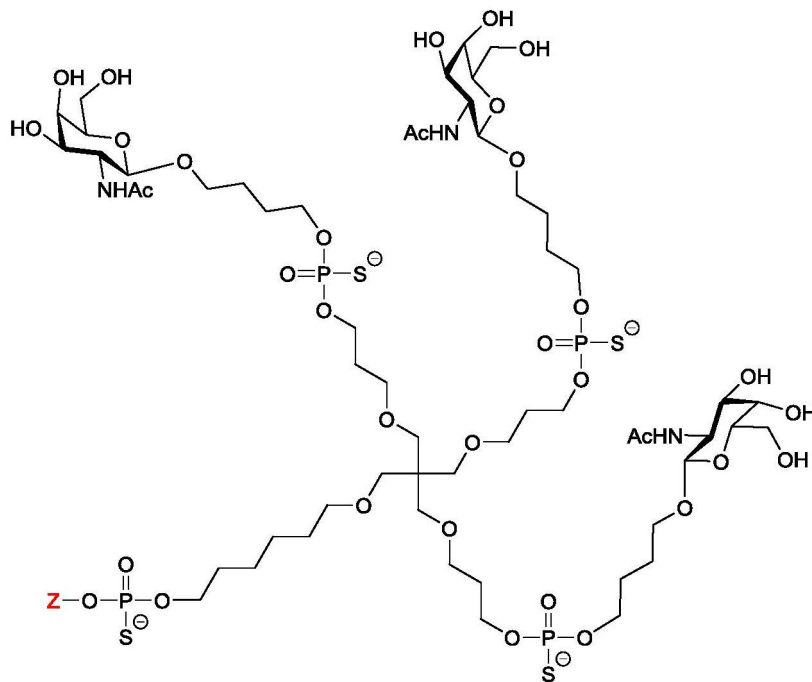
[0120]



[0121] 其中Z为核酸。

[0122] 在第七方面,本发明提供具有以下结构的缀合物化合物:

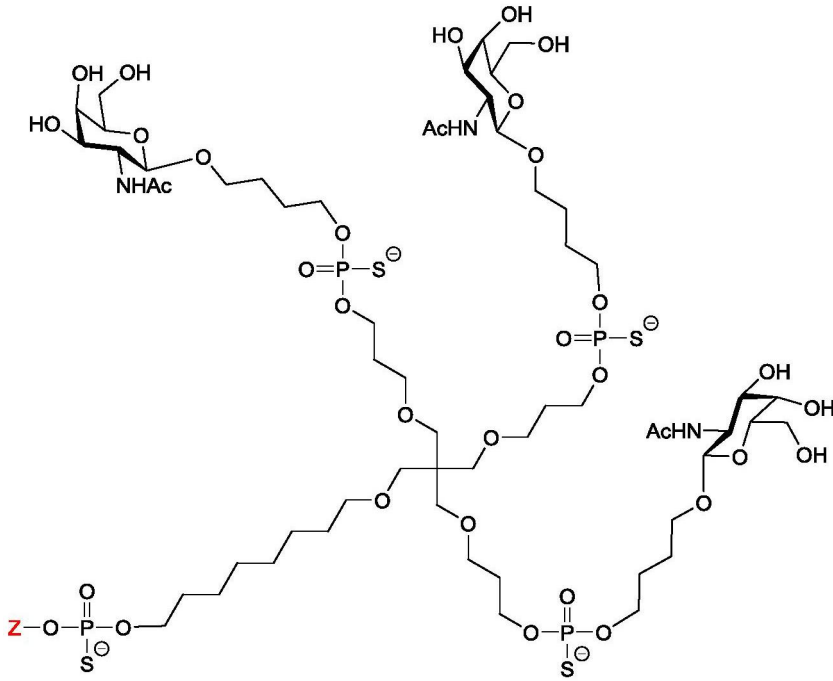
[0123]



[0124] 其中Z为核酸。

[0125] 在第八方面,本发明提供具有以下结构的缀合物化合物:

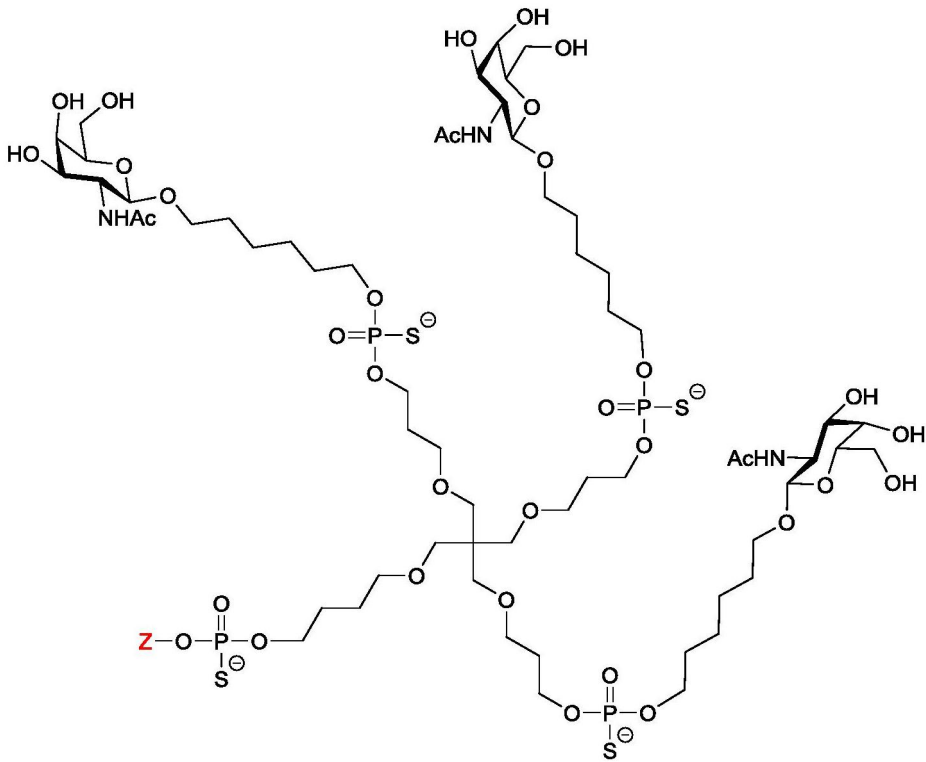
[0126]



[0127] 其中Z为核酸。

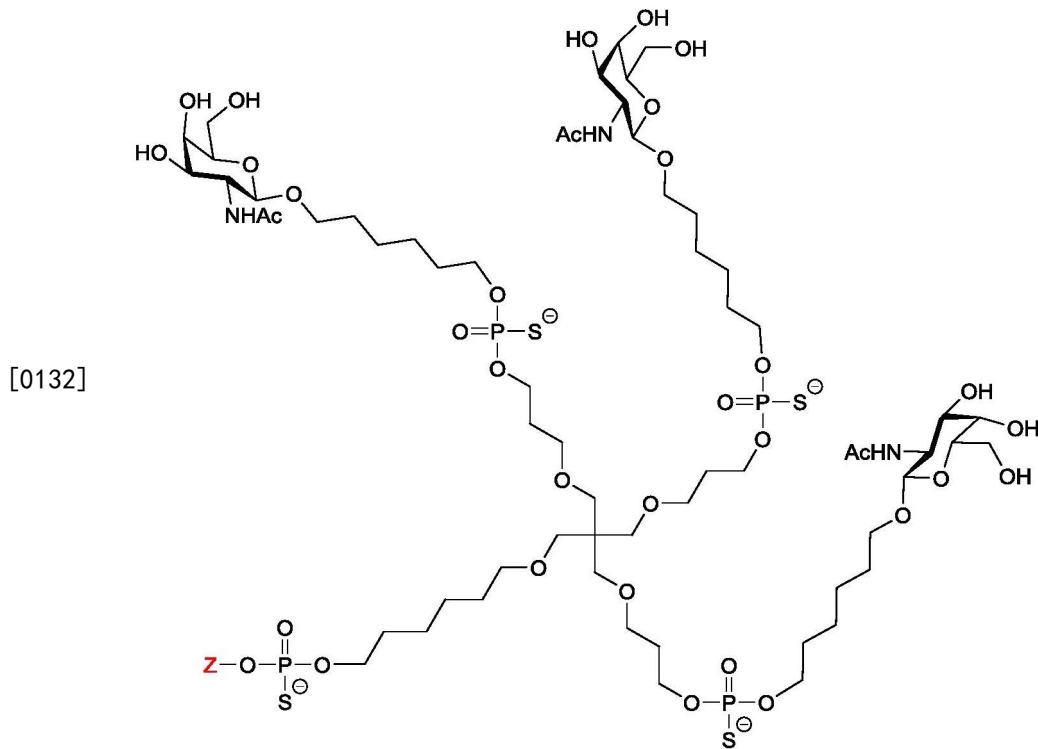
[0128] 在第九方面,本发明提供具有以下结构的缀合物化合物:

[0129]



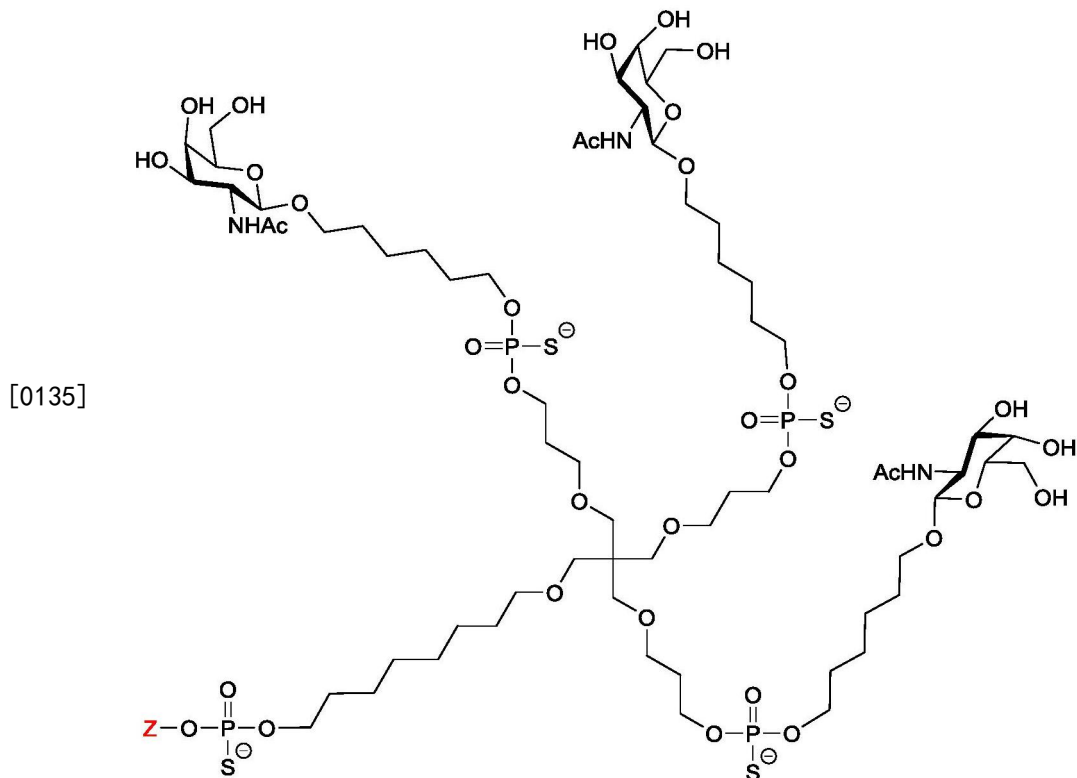
[0130] 其中Z为核酸。

[0131] 在第十方面,本发明提供具有以下结构的缀合物化合物:



[0133] 其中Z为核酸。

[0134] 在第十一方面,本发明提供具有以下结构的缀合物化合物:



[0136] 其中Z为核酸。

[0137] 在本文所述的所有情况中,核酸可选自由DNA、RNA、PNA和LNA组成的组。

[0138] 核酸可以是功能性核酸,其中优选地,该功能性核酸选自由mRNA、微小RNA、shRNA、RNA和DNA的组合、siRNA、siNA、反义核酸、核酶、适体和L-RNA适体组成的组。特别地,核酸可

以是siRNA。

[0139] 核酸可选自RNAi、siRNA、反义核酸、核酶、适体和L-RNA适体。

[0140] 核酸可以为任何长度并且可以具有任何数量的核苷酸以使得它们对RNAi有效。优选地，siRNA的范围为15至30个核苷酸。使用沃森-克里克碱基配对，双链RNA的双链体区可以为15至30个核苷酸碱基对。双链体区可以具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个碱基对。

[0141] 优选地，核酸具有19至23个碱基对。例如，核酸的长度可以是19、20、21、22或23个碱基对。

[0142] 双链iRNA的一端或两端可以是平端。双链iRNA的一条链或两条链的一端或两端可以具有1个或更多个核苷酸突出。突出长度可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸。

[0143] 对于上述任何方面，核酸可以是经修饰的核酸。修饰可选自用核酸或碱基的类似物取代或插入以及碱基、糖或磷酸酯部分的化学修饰。

[0144] 核酸可以：a)在两端是平端；b)一端具有突出而另一端是平端；或c)两端都具有突出。

[0145] 可以修饰第一链和/或第二链的一个或多个核苷酸，以形成经修饰的核苷酸。可以修饰第一链的奇数核苷酸中的一个或多个。通过至少第二修饰，可以修饰第一链的偶数核苷酸中的一个或多个，其中该至少第二修饰与对一个或多个奇数核苷酸的修饰不同。一个或多个经修饰的偶数核苷酸中的至少一个可以与一个或多个经修饰的奇数核苷酸中的至少一个相邻。

[0146] 在本发明的核酸中，可以修饰第一链中的多个奇数核苷酸。通过第二修饰，可以修饰第一链中的多个偶数核苷酸。第一链可以包含通过共同修饰来修饰的相邻核苷酸。第一链还可以包含通过不同的第二修饰来修饰的相邻核苷酸。

[0147] 第二链的奇数核苷酸中的一个或多个可以通过与第一链的奇数核苷酸的修饰不同的修饰来修饰，和/或第二链的偶数核苷酸中的一个或多个可以通过与第一链的奇数核苷酸相同的修饰来修饰。第二链的一个或多个经修饰的偶数核苷酸中的至少一个可以与一个或多个经修饰的奇数核苷酸相邻。第二链的多个奇数核苷酸可以通过共同修饰来修饰，和/或多个偶数核苷酸可以通过与存在于第一链奇数核苷酸上的相同的修饰来修饰。第二链上的多个奇数核苷酸可以通过第二修饰来修饰，其中第二修饰与第一链奇数核苷酸的修饰不同。

[0148] 第二链包含通过共同修饰来修饰的相邻核苷酸，其可以是与第一链的奇数核苷酸的修饰不同的第二修饰。

[0149] 在本发明的核酸中，第一链中的每个奇数核苷酸和第二链中的每个偶数核苷酸可以用共同修饰来进行修饰，并且第一链中的每个偶数核苷酸可以用第二修饰来修饰，并且第二链中的每个奇数核苷酸可以用不同的第二修饰来修饰。

[0150] 本发明的核酸可以使第一链的经修饰的核苷酸相对于第二链的未经修饰或经不同修饰的核苷酸而位移至少一个核苷酸。

[0151] 修饰和/或多种修饰可以各自和单独地选自由3'末端脱氧胸腺嘧啶、2' O甲基、2'脱氧修饰、2'氨基修饰、2'烷基修饰、吗啉基修饰、磷酸酯修饰、5'硫代磷酸酯基团修饰、5'磷酸酯或5'磷酸酯模拟物修饰和胆甾醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团修饰组成的

组,和/或经修饰的核苷酸可以是锁核苷酸(locked nucleotide)、无碱基核苷酸或包含非天然碱基的核苷酸中的任一种。至少一种修饰可以是2'-O-甲基和/或至少一种修饰可以是2'-F。

[0152] 核酸是指包括两条包含核苷酸的链的核酸,其能够干扰基因表达。抑制可以是完全的或部分的,并且导致靶向方式的基因表达的下调。核酸包括两条独立的多核苷酸链:第一链,也可以是引导链;和第二链,也可以是随从链。第一链和第二链可以是自身互补的相同多核苷酸分子的一部分,其“折叠”以形成双链分子。核酸可以是siRNA分子。

[0153] 第一链也可称为反义链。第二链也可称为有义链。

[0154] 核酸可包含核糖核苷酸、经修饰的核糖核苷酸、脱氧核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核苷酸类似物。核酸可以进一步包含由第一链(在本领域中也称为引导链)的全部或一部分和第二链(在本领域中也称为随从链)的全部或一部分形成的双链核酸部分或双链体区。双链体区定义为以在第一链和第二链之间形成的第一碱基对开始并且以在第一链和第二链之间形成的最后一个碱基对结束。

[0155] 双链体区是指两个互补或基本上互补的寡核苷酸中的区域,所述寡核苷酸通过沃森-克里克碱基配对或通过使得互补或基本互补的寡核苷酸链之间的双链体形成的任何其他方式彼此形成碱基对。例如,具有21个核苷酸单元的寡核苷酸链可与另一个21个核苷酸单元的寡核苷酸碱基配对,但每条链上仅19个核苷酸互补或基本上互补,使得“双链体区”由19个碱基对组成。剩余的碱基对可以作为5'和3'突出存在,或作为单链区存在。此外,在双链体区内,不需要100%互补;在双链体区内允许实质上互补。实质上互补是指使得链能够在生物条件下退火的链之间的互补。用于凭经验确定两条链是否能够在生物条件下退火的技术是本领域熟知的。可供选择地,可以合成两条链并在生物条件下一起添加以确定它们是否彼此退火。

[0156] 形成至少一个双链体区的第一链和第二链的部分可以是彼此完全互补并且至少部分互补。

[0157] 根据核酸的长度,在第一链和第二链之间的碱基互补方面,不一定需要完美匹配。然而,第一和第二链必须能够在生理条件下杂交。

[0158] 在至少一个双链体区中,第一链和第二链之间的互补可以由于在任一链中都没有核苷酸错配或添加/缺失的核苷酸而是完美的。可供选择地,互补可能不完美。互补可以是至少70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0159] 第一链和第二链各自可包含互补区,该互补区包含至少15个相差不超过3个核苷酸的连续核苷酸。

[0160] 本文使用的“突出”具有其在本领域中的正常和常规含义,即延伸超出双链核酸中的互补链的末端核苷酸的核酸单链部分。术语“平端”包括,两条链终止于相同位置的双链核酸,而不管末端核苷酸是否是碱基配对的。第一链和第二链的末端核苷酸在平端处可以是碱基配对的。第一链和第二链的末端核苷酸在平端处可以是不配对的。第一链和第二链的末端两个核苷酸在平端处可以是碱基配对的。第一链和第二链的末端两个核苷酸在平端处可以是不配对的。

[0161] 核酸可以在一端具有突出而在另一端具有平端。核酸可以在两端均具有突出。核酸的两端可以均是平端。核酸可以在末端处使第一链的5'端和第二链的3'端平端化,或使

第一链的 3'端和第二链的5'端平端化。

[0162] 核酸可以在3'端或5'端包含突出。核酸可以在第一链上具有3'突出。核酸可以在第二链上具有3'突出。核酸可以在第一链上具有5'突出。核酸可以在第二链上具有5'突出。核酸可以在第一链的5'端和3'端都具有突出。核酸可以在第二链的5'端和3'端都具有突出。核酸可以在第一链上具有5'突出,在第二链上具有3'突出。核酸可以在第一链上具有3'突出,在第二链上具有5'突出。核酸可以在第一链上具有3'突出,在第二链上具有3'突出。核酸可以在第一链上具有5'突出,在第二链上具有5'突出。

[0163] 第二链或第一链的3'端或5'端处的突出的长度可选自1、2、3、4和5个核苷酸。任选地,突出可以由1或2个核苷酸组成,其可以是或不是经修饰的。

[0164] 未经修饰的多核苷酸,特别是核糖核苷酸,可能易于被细胞核酸酶降解,因此,修饰/经修饰的核苷酸可被包括在本发明的核酸中。

[0165] 可以修饰本发明的核酸的第二和/或第一链上的一个或多个核苷酸。

[0166] 本发明的核酸的修饰通常提供克服潜在限制(包括但不限于天然RNA分子固有的体外和体内稳定性和生物利用度)的有力工具。可以通过化学修饰来修饰根据本发明的核酸。经修饰的核酸还可以使诱发人干扰素活性的可能性最小化。修饰可以进一步增强核酸向靶细胞的功能性递送。本发明的经修饰的核酸可包含第一链或第二链中的任一条或两条中的一个或多个经化学修饰的核糖核苷酸。核糖核苷酸可包含碱基、糖或磷酸酯部分的化学修饰。可以通过用核酸或碱基的类似物取代或插入来修饰核糖核苷酸。

[0167] 可以修饰本发明核酸的一个或多个核苷酸。核酸可包含至少一个经修饰的核苷酸。经修饰的核苷酸可以在第一链上。经修饰的核苷酸可以在第二链中。经修饰的核苷酸可以在双链体区中。经修饰的核苷酸可以在双链体区外,即在单链区中。经修饰的核苷酸可以在第一链上,并且可以在双链体区外。经修饰的核苷酸可以在第二链上,并且可以在双链体区外。第一链的3'末端核苷酸可以是经修饰的核苷酸。第二链的3'末端核苷酸可以是经修饰的核苷酸。第一链的5'末端核苷酸可以是经修饰的核苷酸。第二链的5'末端核苷酸可以是经修饰的核苷酸。

[0168] 本发明的核酸可具有1个经修饰的核苷酸或本发明的核酸可具有约2至4个经修饰的核苷酸,或核酸可具有约4至6个经修饰的核苷酸、约6至8个经修饰的核苷酸、约8至10个经修饰的核苷酸、约10至12个经修饰的核苷酸、约12至14个经修饰的核苷酸、约14至16个经修饰的核苷酸、约16至18个经修饰的核苷酸、约18至20个经修饰的核苷酸、约20至22个经修饰的核苷酸、约22至24个经修饰的核苷酸、24至26个经修饰的核苷酸或约26至28个经修饰的核苷酸。在每种情况下,与相同但没有所述经修饰的核苷酸的核酸相比,包含所述经修饰的核苷酸的核酸保留其活性的至少50%。与相同但没有所述经修饰的核苷酸的核酸相比,核酸可以保留其活性的55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%或更高。

[0169] 经修饰的核苷酸可以是嘌呤或嘧啶。至少一半的嘌呤可以是经修饰的。至少一半的嘧啶可以是经修饰的。所有嘌呤可以是经修饰的。所有嘧啶可以是经修饰的。经修饰的核苷酸可以选自由3'末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2' O甲基修饰的核苷酸、2'修饰的核苷酸、2'脱氧修饰的核苷酸、锁核苷酸、无碱基核苷酸、2'氨基修饰的核苷酸、2'烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、磷酸胺酯、包含非天然碱基的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基团的核苷

酸、包含 5' 磷酸酯或 5' 磷酸酯模拟物的核苷酸以及与胆甾醇基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸组成的组。

[0170] 核酸可包含含有经修饰的核苷酸的核苷酸,其中碱基选自 2-氨基腺苷、2,6-二氨基嘌呤、肌苷、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯、3-甲基尿嘧啶、二氢尿苷、萘基、氨基苯、5-烷基胞苷(例如 5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(例如核糖胸核苷)、5-卤代尿苷(例如 5-溴尿苷)、6-氮杂嘧啶、6-烷基嘧啶(例如 6-甲基尿苷)、丙炔、Q-核苷(quesosine)、2-硫尿苷、4-硫尿苷、怀丁苷(wybutosine)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、4-乙酰基胞苷、5-(羧基羟甲基)尿苷、5'-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿苷、 β -D-半乳糖基腺苷、1-甲基腺苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟苷、3-甲基胞苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鸟苷、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿苷、5-甲基氨基甲基尿苷、5-甲基羰基甲基尿苷、5-甲基氧基尿苷(5-methyloxyuridine)、5-甲基-2-硫尿苷、2-甲基-N6-异戊烯基腺苷、 β -D-甘露糖基腺苷、尿苷-5-氧基乙酸和 2-硫代胞苷。

[0171] 本文讨论的核酸包括未经修饰的 RNA 以及已经修饰以例如改善功效的 RNA 以及核苷替代物的聚合物。未经修饰的 RNA 是指其中核酸的组分(即糖、碱基和磷酸酯部分)与天然存在的组分(例如天然存在于人体中的组分)相同或基本相同的分子。本文所用的经修饰的核苷酸是指其中核酸的一种或多种组分(即糖、碱和磷酸酯部分)与天然存在的核酸的一种或多种组分不同的核苷酸。虽然它们被称为经修饰的核苷酸,但它们当然会因为修饰而包括非核苷酸的分子,例如允许链之间杂交的其中核糖磷酸酯骨架被非核糖磷酸酯构建体替换的多核苷酸分子,即经修饰的核苷酸模拟核糖磷酸酯骨架。

[0172] 下文描述的在核酸内发生的许多修饰将在多核苷酸分子内重复,例如碱基或磷酸酯部分的修饰,或磷酸酯部分的非连接 θ 。在一些情况下,修饰将在多核苷酸中的所有可能位置/核苷酸处发生,但在许多情况下不会发生。修饰可以仅在 3' 或 5' 末端位置发生,可以仅在末端区域(例如末端核苷酸上的位置或链的最后 2、3、4、5 或 10 个核苷酸中)发生。修饰可以在双链区域、单链区域或两者中发生。修饰可以仅在本发明的核酸的双链区域中发生,或者可以仅在本发明的核酸的单链区域中发生。在非连接 θ 位置的硫代磷酸酯修饰可以仅在一个或两个末端处发生,可以仅在末端区域(例如在末端核苷酸上的位置或在链的最后 2、3、4 或 5 个核苷酸中)发生,或可以在双链体和/或单链区域中发生,特别是在末端处发生。5' 端或 3' 端可以是磷酸化的。

[0173] 本发明的核酸的稳定性可以通过在突出中包含特定碱基,或在单链突出(例如 5' 或 3' 突出或两者)中包含经修饰的核苷酸。嘌呤核苷酸可包括在突出中。可以修饰 3' 或 5' 突出中的全部或一些碱基。修饰可以包括在核糖的 2' OH 基团上使用修饰、使用脱氧核糖核苷酸代替核糖核苷酸、以及磷酸酯基团中的修饰,例如硫代磷酸酯修饰。突出不需要与靶序列同源。

[0174] 核酸酶可以水解核酸磷酸二酯键。然而,对核酸的化学修饰可以赋予改善的性质,并且可以使寡核糖核苷酸对核酸酶更稳定。

[0175] 如本文所用,经修饰的核酸可包括以下的一种或多种:

[0176] (i) 改变,例如一种或两种非连接磷酸酯氧和/或一种或多种连接磷酸酯氧的替换(是指连接,即便在本发明的核酸的 5' 和 3' 末端处也是如此);

[0177] (ii) 改变,例如核糖成分的替换,例如核糖上的 2' 羟基的替换;

- [0178] (iii) 用“去磷酸”接头替换磷酸酯部分;
- [0179] (iv) 天然存在的碱的修饰或替换
- [0180] (v) 核糖-磷酸酯骨架的替换或修饰;
- [0181] (vi) RNA的3'端或5'端的修饰,例如末端磷酸酯基团的移除、修饰或替换或部分(例如荧光标记部分)与RNA的3'端或5'端的缀合
- [0182] 术语替换、修饰、改变表示与天然存在的分子的差异。
- [0183] 下面更详细地讨论具体的修饰。
- [0184] 经修饰的磷酸酯基团的实例包括硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼烷基磷酸酯、硼酸磷酸酯类、氢磷酸酯、磷酰胺酯、烷基或芳基磷酸酯和磷酸三酯。二硫代磷酸酯具有被硫替换的非连接氧。磷酸酯基团中的一个、每个或两个非连接氧可以独立地是S、Se、B、C、H、N或OR(R是烷基或芳基)中的任一个。
- [0185] 还可以通过用氮(桥接的磷酰胺酯)、硫(桥接的硫代磷酸酯)和碳(桥接的亚甲基磷酸酯)替换连接氧来修饰磷酸酯接头。替换可以在末端氧处进行。用氮替换非连接氧是可能的。
- [0186] 经修饰的核苷酸可包括糖基团的修饰。2'羟基(OH)可以用许多不同的“氧”或“脱氧”取代基修饰或替换。
- [0187] “氧”-2'-羟基修饰的实例包括:烷氧基或芳氧基(OR,例如R=H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖);聚乙二醇(PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$;“锁”核酸(LNA),其中2'羟基例如通过亚甲基桥连接到相同核糖的4'碳上; $O-AMINE$ ($AMINE=NH_2$;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基、乙二胺、聚氨基)和氨基烷氧基, $O(CH_2)_nAMINE$ (例如, $AMINE=NH_2$;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基、乙二胺、聚氨基)。
- [0188] “脱氧”修饰包括氢卤素;氨基(例如, NH_2 ;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基、二杂芳基氨基或氨基酸); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-AMINE$ ($AMINE=NH_2$;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基), $-NHC(O)R$ (R=烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖)、氰基;巯基;烷基硫代烷基;硫代烷氧基;以及烷基、环烷基、芳基、烯基和炔基,其可任选地被例如氨基官能团取代。某些实施方式的其他取代基包括2'-甲氧基乙基、2'- OCH_3 、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基和2'-氟。
- [0189] 糖基团还可包含具有与核糖中相应碳相反的立体化学构型的一个或多个碳。因此,经修饰的核苷酸可含有糖,例如阿拉伯糖。
- [0190] 经修饰的核苷酸还可以包括“无碱基”糖,其在C-I'处缺少核碱基。这些无碱基糖可以进一步包含在一个或多个组成性糖原子处的修饰。
- [0191] 2'修饰可以与一种或多种磷酸接头修饰(例如硫代磷酸酯)组合使用。
- [0192] 磷酸酯基团可以用含有连接子的非磷来替换。
- [0193] 可以替换磷酸酯基团的部分的实例包括硅氧烷、碳酸酯、羧甲基、氨基甲酸酯、酰胺、硫醚、环氧乙烷接头、磺酸酯、磺酰胺、硫代甲缩醛、甲缩醛、肟、亚甲基亚氨基、亚甲基亚氨基、亚甲基肼、亚甲基二甲基肼和亚甲氧基氧基甲基亚氨基。在某些实施方式中,替换可包括亚甲基羰基氨基和亚甲基甲基亚氨基。

[0194] 磷酸酯接头和核糖可以被抗核酸酶的核苷酸替换。

[0195] 实例包括吗啉基、环丁基、吡咯烷和肽核酸(PNA)核苷替代物。在某些实施方式中,可以使用PNA替代物。

[0196] 可以修饰寡核苷酸的3'端和5'端。这种修饰可以在分子的3'端或5'端或两端。该修饰可包括整个末端磷酸酯或磷酸酯基团的一个或多个原子的修饰或替换。例如,寡核苷酸的3'和5'端可以与其他功能性分子实体例如标记部分或保护基团(基于例如硫、硅、硼或酯)缀合,所述标记部分例如荧光团(例如芘、TAMRA、荧光素、Cy3或Cy5染料)。功能性分子实体可以通过磷酸酯基团和/或接头与糖连接。接头的末端原子可连接至或替换磷酸酯基团或糖的C-3'或C-5'、O、N、S或C基团的连接原子。可供选择地,接头可连接至或替换核苷酸替代物(例如,PNA)的末端原子。这些间隔物或接头可包括例如—(CH₂)_n—、—(CH₂)_nN—、—(CH₂)_nO—、—(CH₂)_nS—、O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OH(例如,n=3或6)、无碱基糖、酰胺、羧基、胺、氧基胺(oxyamine)、氧基亚胺(oxyimine)、硫醚、二硫化物、硫脲、磺酰胺或吗啉基、或生物素和荧光素试剂。3'端可以是-OH基团。

[0197] 末端修饰的其他实例包括染料、嵌入剂(例如吡啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德克萨卟啉(texaphyrin)、Sapphyrin)、多环芳烃(例如吩嗪、二氢吩嗪)、人工内切核酸酶(例如EDTA)、亲脂性运载体(例如胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-(十六烷基)甘油、香叶基氧基己基、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)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪,以及肽缀合物(例如触角肽、Tat肽)、烷化剂、磷酸酯、氨基、巯基、PEG(例如PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚氨基、烷基、经取代的烷基、放射性标记的标记物、酶、半抗原(例如生物素)、转运/吸收促进剂(例如、阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成的核糖核酸酶(例如、咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吡啶-咪唑缀合物、四氮杂大环的Eu³⁺络合物)。

[0198] 可以出于包括调节活性或调节抗降解性的多种原因而添加末端修饰。用于调节活性的末端修饰包括用磷酸酯或磷酸酯类似物来修饰5'端。本发明的核酸在第一链或第二链上可以是5'磷酸化的或在5'基本末端包含磷酰基类似物。5'-磷酸酯修饰包括与RISC介导的基因沉默相容的修饰。合适的修饰包括:5'-一磷酸((HO)₂(O)P—O-5');5'-二磷酸((HO)₂(O)P—O—P(HO)(O)—O-5');5'-三磷酸((HO)₂(O)P—O—(HO)(O)P—O—P(HO)(O)—O-5');5'-鸟苷帽(7-甲基化的或非甲基化的)(7m-G-O-5'-(HO)(O)P—O—(HO)(O)P—O—P(HO)(O)—O-5');5'-腺苷帽(Appp)和任何经修饰的或未经修饰的核苷酸帽结构(N—O-5'-(HO)(O)P—O—(HO)(O)P—O—P(HO)(O)—O-5');5'-单硫代磷酸酯(硫代磷酸酯;(HO)₂(S)P—O-5');5'-单二硫代磷酸酯(二硫代磷酸酯;(HO)(HS)(S)P—O-5'),5'-硫代磷酸酯((HO)₂(O)P—S-5');氧/硫替换的单磷酸酯、二磷酸酯和三磷酸酯(例如5'-α-硫代三磷酸酯、5'-γ-硫代三磷酸酯等)、5'-磷酰胺酯((HO)₂(O)P—NH-5'、(HO)(NH₂)(O)P—O-5')、5'-烷基膦酸酯(R=烷基=甲基、乙基、异丙基、丙基等,例如RP(OH)(O)—O-5'-(OH)₂(O)P-5'-CH₂-)、5'-乙烯基膦酸酯、5'-烷基醚膦酸酯(R=烷基醚=甲氧基甲基(MeOCH₂-)、乙氧基甲基等,例如RP(OH)(O)—O-5'-)。

[0199] 本发明的核酸可以在第一和/或第二链的一个或多个末端上包含一个或多个硫代磷酸酯修饰。任选地,第一链的每一端或任一端可包含一个或两个或三个硫代磷酸酯修饰的核苷酸。任选地,第二链的每一端或任一端可包含一个或两个或三个硫代磷酸酯修饰的

核苷酸。任选地,第一链的两端和第二链的5'端可包含两个硫代磷酸酯修饰的核苷酸。硫代磷酸酯修饰的核苷酸是指核苷酸和相邻核苷酸之间的键包含硫代磷酸酯基团而不是标准的磷酸酯基团。

[0200] 末端修饰也可用于监测分布,并且在这种情况下,待添加的基团可包括荧光团,例如荧光素或Alexa染料。末端修饰也可用于增强摄取,对此有用的修饰包括胆固醇。末端修饰也可用于使RNA试剂与另一部分交联。

[0201] 腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶是RNA中最常见的碱基。可以修饰或替换这些碱基以提供具有改善性质的RNA。例如,可以用这些碱基或用合成和天然核碱基(例如肌苷、胸腺嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、nubularine、异鸟苷(isoguanisine)或tubercidine)和上述任一种修饰来制备抗核酸酶的寡核糖核苷酸。可供选择地,可以使用上述任何碱基的取代或经修饰的类似物和“通用碱基”。实例包括2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、5-卤代尿嘧啶、5-(2-氨基丙基)尿嘧啶、5-氨基烯丙基尿嘧啶、8-卤素、氨基、硫代、硫代烷基、羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、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、5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤(包括2-氨基丙基腺嘌呤)、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶、二氢尿嘧啶、3-脱氮杂-5-氮杂胞嘧啶、2-氨基嘌呤、5-烷基尿嘧啶、7-烷基鸟嘌呤、5-烷基胞嘧啶、7-脱氮腺嘌呤、N6,N6-二甲基腺嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、5-氨基烯丙基尿嘧啶、N3-甲基尿嘧啶、取代的1,2,4-三唑、2-吡啶酮、5-硝基吡咯、3-硝基吡咯、5-甲氧基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸、5-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、5-甲氧基羰基甲基-2-硫尿嘧啶、5-甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-氨基-3-羧丙基)尿嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N<4>-乙酰基胞嘧啶、2-硫胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、N6-异戊基腺嘌呤、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、N-甲基鸟嘌呤或O-烷基化碱。

[0202] 如本文所用,术语“非配对核苷酸类似物”是指包含非碱基配对部分的核苷酸类似物,所述非碱基配对部分包括但不限于:6个氨基腺苷(6des amino adenosine, Nebularine)、4-Me-吡咯、3-硝基吡咯、5-硝基吡咯、Ds、Pa、N3-Me ribo U、N3-Me riboT、N3-Me dC、N3-Me-dT、N1-Me-dG、N1-Me-dA、N3-乙基-dC、N3-Me DC。在一些实施方式中,非碱基配对核苷酸类似物是核糖核苷酸。在其他实施方式中,非碱基配对核苷酸类似物是脱氧核糖核苷酸。

[0203] 如本文所用,术语“末端官能团”包括但不限于卤素、醇、胺、羧酸、酯、酰胺、醛、酮、醚基团。

[0204] 某些部分可以与第一链或第二链的5'末端连接,并且包括无碱基核糖部分、无碱基脱氧核糖部分、修饰无碱基核糖和无碱基脱氧核糖部分(包括2'0烷基修饰);反向无碱基核糖和无碱基脱氧核糖部分及其修饰,C6-亚氨基-Pi;包含L-DNA和L-RNA的镜像核苷酸;5' OMe 核苷酸;和核苷酸类似物(包括4',5'-亚甲基核苷酸);1-(β-D-赤式呋喃糖基)核苷酸;4'-硫代核苷酸,碳环核苷酸;5'-氨基-烷基磷酸酯;1,3-二氨基-2-丙基磷酸酯,3-氨基丙基磷酸酯;6-氨基己基磷酸酯;12-氨基十二烷基磷酸酯;羟丙基磷酸酯;1,5-脱水己糖醇核苷酸;α-核苷酸;苏式-戊呋喃糖基核苷酸;非环状3',4'-第二-核苷酸(acyclic 3',4'-

seco nucleotide);3,4-二羟丁基核苷酸;3,5-二羟基戊基核苷酸,5'-5'-反向无碱基部分;1,4-丁二醇磷酸酯;5'-氨基;以及桥接或非桥接的甲基膦酸酯和5'-巯基部分。

[0205] 本发明的核酸可以包括一个或多个反向核苷酸,例如反向胸苷或反向腺嘌呤(例如参见 Takei, et al., 2002. JBC 277(26):23800-06)。

[0206] 如本文所用,关于基因表达的术语“抑制”、“下调”或“减少”是指基因的表达,或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚基的RNA分子或等价RNA分子(例如mRNA)的水平,或一种或多种蛋白质或蛋白质亚基的活性,降低至低于不存在本发明核酸时所观察到的活性;例如,表达可以减少至不存在抑制剂时所观察到的表达的90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%或更低。

[0207] 本发明的核酸可包含无碱基核苷酸。本文所用的术语“无碱基”是指缺少碱基或具有代替1'位处的碱基的其他化学基团的部分,例如3',3'-连接或5',5'-连接的脱氧无碱基核糖衍生物。

[0208] 核酸可以在经修饰的第二和/或第一链上包含一个或多个核苷酸。可以修饰交替的核苷酸,以形成经修饰的核苷酸。

[0209] 如本文所述的交替是指以常规方式一个接一个地发生。换句话说,交替意味着依次重复地发生。例如,如果修饰一个核苷酸,则不修饰下一个连续核苷酸,并修饰再下一个连续核苷酸,以此类推。可以用第一修饰来修饰一个核苷酸,可以用第二修饰来修饰下一个连续核苷酸,并且用第一修饰来修饰随后的连续核苷酸,以此类推,其中第一修饰和第二修饰是不同的。

[0210] 可以修饰本发明核酸的第一链的一个或多个奇数核苷酸,其中第一链从5'到3'编号。本文描述的术语“奇数”是指不被2整除的数字。奇数的示例是1、3、5、7、9、11等。可以修饰本发明核酸的第一链的一个或多个偶数核苷酸,其中第一链从5'到3'编号。本文描述的术语“偶数”表示被2整除的数字。偶数的例子是2、4、6、8、10、12、14等。可以修饰本发明核酸的第二链的一个或多个奇数核苷酸,其中第二链从3'到5'编号。可以修饰本发明核酸的第二链的一个或多个偶数核苷酸,其中第二链从3'到5'编号。

[0211] 可以修饰第一链和/或第二链的一个或多个核苷酸,以形成经修饰的核苷酸。可以修饰第一链的奇数核苷酸中的一个或多个。通过至少第二修饰,可以修饰第一链的偶数核苷酸中的一个或多个,其中该至少第二修饰与对一个或多个奇数核苷酸的修饰不同。一个或多个经修饰的偶数核苷酸中的至少一个可以与一个或多个经修饰的奇数核苷酸中的至少一个相邻。

[0212] 在本发明的核酸中,可以修饰第一链中的多个奇数核苷酸。通过第二修饰,可以修饰第一链中的多个偶数核苷酸。第一链可以包含通过共同修饰来修饰的相邻核苷酸。第一链还可以包含通过不同的第二修饰来修饰的相邻核苷酸。

[0213] 第二链的奇数核苷酸中的一个或多个可以通过与第一链的奇数核苷酸的修饰不同的修饰来修饰,和/或第二链的偶数核苷酸中的一个或多个可以通过与第一链的奇数核苷酸相同的修饰来修饰。第二链的一个或多个经修饰的偶数核苷酸中的至少一个可以与一个或多个经修饰的奇数核苷酸相邻。第二链的多个奇数核苷酸可以通过共同修饰来修饰,和/或多个偶数核苷酸可以通过与存在于第一链奇数核苷酸上的相同的修饰来修饰。第二链上的多个奇数核苷酸可以通过第二修饰来修饰,其中第二修饰与第一链奇数核苷酸的修

饰不同。

[0214] 第二链可以包含通过共同修饰来修饰的相邻核苷酸,其可以是与第一链的奇数核苷酸的修饰不同的第二修饰。

[0215] 在本发明的核酸中,第一链中的每个奇数核苷酸和第二链中的每个偶数核苷酸可以用共同修饰来进行修饰,并且第一链中的每个偶数核苷酸可以用第二修饰来修饰,并且第二链中的每个奇数核苷酸可以用第二修饰来修饰。

[0216] 本发明的核酸可以使第一链的经修饰的核苷酸相对于第二链的未经修饰或经不同修饰的核苷酸而位移至少一个核苷酸。

[0217] 可以修饰第一链中的一个或多个或每个奇数核苷酸,可以修饰第二链中的一个或多个或多个偶数核苷酸。可以通过第二修饰来修饰任一条链或两条链上的一个或多个或多个交替核苷酸。可以修饰第一链中的一个或多个或多个偶数核苷酸,并且可以修饰第二链中的一个或多个或多个偶数核苷酸。可以通过第二修饰来修饰任一条链或两条链上的一个或多个或多个交替核苷酸。可以修饰第一链中的一个或多个或多个奇数核苷酸,并且可以通过共同修饰来修饰第二链中的一个或多个奇数核苷酸。可以通过第二修饰来修饰任一条链或两条链上的一个或多个或多个交替核苷酸。可以修饰第一链中的一个或多个或多个偶数核苷酸,并且可以通过共同修饰来修饰第二链中的一个或多个或多个奇数核苷酸。可以通过第二修饰来修饰任一条链或两条链上的一个或多个或多个交替核苷酸。

[0218] 在第十二方面,本发明提供一种组合物,其包含根据上述任何方面的化合物和合适的运载体或赋形剂。

[0219] 在第十三方面,本发明提供根据第一至第十一方面中任一方面的化合物或根据第十二方面的组合物以用于医药。

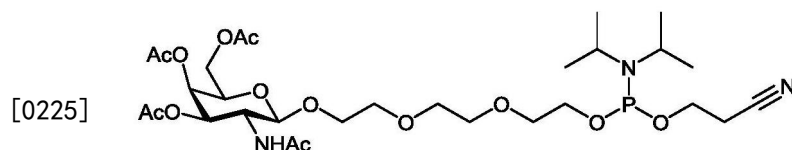
[0220] 该化合物或组合物可用于治疗肝病、遗传病、血友病和出血性病、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、病毒性肝炎、罕见疾病(例如肢端肥大症)、代谢性疾病(例如高胆固醇血症、血脂异常、高甘油三酯血症)、心血管疾病、肥胖症、地中海贫血、肝损伤(例如药物所致肝损伤)、血色素沉着症、酒精性肝病、酒精依赖症、贫血和慢性疾病的贫血。

[0221] 该化合物或组合物可用于治疗肝病、贫血、慢性疾病、地中海贫血;药物所致肝损伤、血色素沉着症和慢性疾病的贫血。

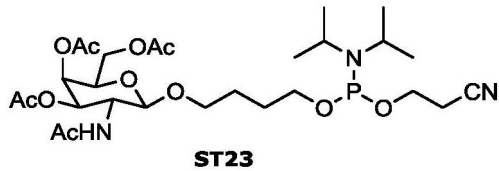
[0222] 在第十四方面,本发明提供将核酸递送至肝细胞的方法,所述方法包括使肝细胞与根据第一至第十一方面中任一方面的化合物接触。

[0223] 在第十五方面,本发明提供制备根据第一至第十一方面中任一方面的式(I)、(II)或(III)的化合物的处理方法,该处理方法包括一起添加各组分以形成化合物式(I)、(II)或(III)的化合物。

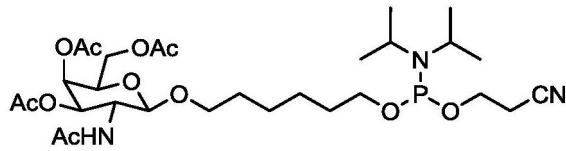
[0224] 在制造方法中可以使用以下结构的组成部分:



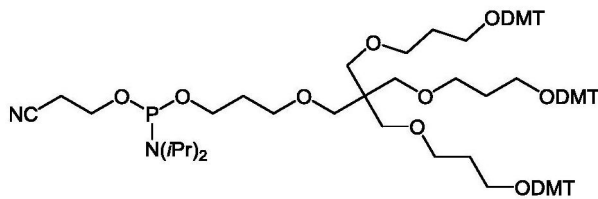
ST21



ST23

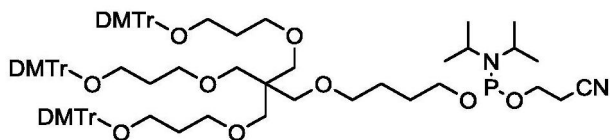


ST31

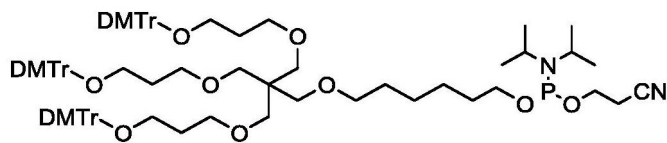


[0226]

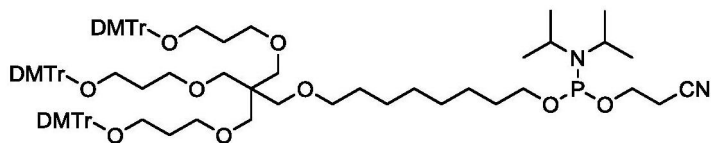
STKS



ST41



ST43



ST45

[0227] 其中DMTr=4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMTr)。

[0228] RNA修饰

[0229] 本发明的siRNA分子的修饰通常提供克服潜在限制(包括但不限于天然RNA分子固有的体外和体内稳定性和生物利用度)的有力工具。可以通过化学修饰来修饰根据本发明的siRNA。修饰的siRNA还可以使激活人干扰素活性的可能性最小化。修饰可以进一步增强siRNA向靶细胞的功能性递送。本发明的经修饰的siRNA可包含反义链或有义链中的任一条或两条中的一个或多个经化学修饰的核糖核苷酸。核糖核苷酸可包含碱基、糖或磷酸酯部分的化学修饰。可以通过用核酸或碱基的类似物取代或插入来修饰核糖核酸。

[0230] 本发明的siRNA的一个或多个核苷酸可包含经修饰的碱基。在一个方面,siRNA包括含有经修饰的碱基的至少一个核苷酸。在一种实施方式中,经修饰的碱基在反义链上。在另一种实施方式中,经修饰的碱基在有义链上。在另一种实施方式中,经修饰的碱基在双链体区中。在另一种实施方式中,经修饰的碱基在双链体区外,即在单链区中。在另一种实施方式中,经修饰的碱基在反义链上,并且在双链体区外。在另一种实施方式中,经修饰的碱基位于有义链上,并且在双链体区外。在另一种实施方式中,反义链的3'末端核苷酸是具有经修饰的碱基的核苷酸。在另一种实施方式中,有义链的3'末端核苷酸是具有经修饰的碱基的核苷酸。在另一种实施方式中,反义链的5'末端核苷酸是具有经修饰的碱基的核苷酸。在另一种实施方式中,有义链的5'末端核苷酸是具有经修饰的碱基的核苷酸。

[0231] 在一种实施方式中,siRNA可具有1个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA可具有约2至4个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约4至6个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约6至8个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约8至10个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约10至12个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约12至14个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约14至16个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约16至18个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约18至20个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约20至22个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约22至24个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约24至26个经修饰的碱基。在另一种实施方式中,siRNA具有约26至28个经修饰的碱基。在每种情况下,与相同但没有所述经修饰的碱基的siRNA相比,包含所述经修饰的碱基的siRNA保留其活性的至少50%。

[0232] 经修饰的碱基可以是嘌呤或嘧啶。在另一种实施方式中,至少一半的嘌呤是经修饰的。在另一种实施方式中,至少一半的嘧啶是经修饰的。在另一种实施方式中,所有嘌呤是经修饰的。在另一种实施方式中,所有嘧啶是经修饰的。在另一种实施方式中,siRNA可包含含有经修饰的碱基的核苷酸,其中所述碱基选自2-氨基腺苷、2,6-二氨基嘌呤、肌苷、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯、3-甲基尿嘧啶、二氢尿苷、茶基、氨基苯、5-烷基胞苷(例如5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(例如核糖胸核苷)、5-卤代尿苷(例如5-溴尿苷)、6-氮杂嘧啶、6-烷基嘧啶(例如6-甲基尿苷)、丙炔、Q-核苷(quesosine)、2-硫尿苷、4-硫尿苷、怀丁苷(wybutosine)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、4-乙酰基胞苷、5-(羧基羟甲基)尿苷、5'-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿苷、 β -D-半乳糖基腺苷、1-甲基腺苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟苷、3-甲基胞苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、N6-甲基腺苷、7-甲基鸟苷、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿苷、5-甲基氨基甲基尿苷、5-甲基羰基甲基尿苷、5-甲基氧基尿苷(5-methyloxyuridine)、5-甲基-2-硫尿苷、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷、 β -D-甘露糖基腺苷、尿苷-5-氧基乙酸和2-硫代胞苷。

[0233] 另一方面,本发明的siRNA包含无碱基核苷酸。本文所用的术语“无碱基”是指缺少碱基或具有代替1'位处的碱基的其他化学基团的部分,例如3',3'-连接或5',5'-连接的脱氧无碱基核糖衍生物。如本文所用,具有经修饰的碱基的核苷酸不包括无碱基核苷酸。在一个方面,siRNA包含至少一个无碱基核苷酸。在一种实施方式中,无碱基核苷酸在反义链上。在另一种实施方式中,无碱基核苷酸在有义链上。在另一种实施方式中,无碱基核苷酸在双链体区中。在另一种实施方式中,无碱基核苷酸在双链体区外。在另一种实施方式中,

无碱基核苷酸在反义链上,并且在双链体区外。在另一种实施方式中,无碱基核苷酸在有义链上并且在双链体区外。在另一种实施方式中,反义链的3'末端核苷酸是无碱基核苷酸。在另一种实施方式中,有义链的3'末端核苷酸是无碱基核苷酸。在另一种实施方式中,反义链的5'末端核苷酸是无碱基核苷酸。在另一种实施方式中,有义链的5'末端核苷酸是无碱基核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA的无碱基核苷酸的数目选自1、2、3、4、5和6。

[0234] 糖部分的修饰

[0235] 另一方面涉及对糖部分的修饰。本发明的siRNA的一个或多个核苷酸可包含经修饰的核糖部分。其中2'-OH被取代的2'-位处的修饰包括选自以下的非限制性实例:烷基、取代的烷基、烷芳基、-芳基烷基、-F、-Cl、-Br、-CN、-CF₃、-OCF₃、-OCN、-O-烷基、-S-烷基、HS-烷基、-O-烯基、-S-烯基、-N-烯基、-SO-烷基、-烷基-OSH、-烷基-OH、-O-烷基-OH、-O-烷基-SH、-S-烷基-OH、-S-烷基-SH、-烷基-S-烷基、-烷基-O-烷基、-ONO₂、-NO₂、-N₃、-NH₂、烷基氨基、二烷基氨基、-氨基烷基、-氨基烷氧基、氨基酸、氨基酰基、-ONH₂、-O-氨基烷基、-O-氨基酸、-O-氨基酰基、杂环烷基、杂环烷芳基、-氨基烷基氨基、-聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、甲氧基乙基(MOE)、烯基和炔基。其中进一步包括2'羟基例如通过亚甲基桥连接到相同核糖的4'碳上的“锁”核酸(LNA)作为本发明的2'修饰。优选的取代基是2'-甲氧基乙基、2'-O-CH₃、2'-O-烯丙基、2'-C-烯丙基和2'-氟。

[0236] 在一种实施方式中,siRNA包含1至5个2'-修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA包含5至10个2'-修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA包含15至20个2'-修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA包含20至25个2'-修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA包含25至30个2'-修饰的核苷酸。

[0237] 在一种实施方式中,siRNA包含1至5个2'-O-CH₃修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA包含5至10个2'-O-CH₃修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA包含15至20个2'-O-CH₃修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA包含20至25个2'-O-CH₃修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA包含25至30个2'-O-CH₃修饰的核苷酸。

[0238] 在一种实施方式中,siRNA双链体区包含1至5个2'-O-CH₃修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA双链体区包含5至10个2'-O-CH₃修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA双链体区包含15至20个2'-O-CH₃修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA双链体区包含20至25个2'-O-CH₃修饰的核苷酸。在另一种实施方式中,siRNA双链体区包含25至30个2'-O-CH₃修饰的核苷酸。

[0239] 在一种实施方式中,siRNA包含长度为19个核苷酸的反义链和长度为19个核苷酸的有义链,其中所述反义链在第1、3、5、7、9、11、13、15、17和19个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述有义链在第2、4、6、8、10、12、14、16和18个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述反义链从5'到3'编号,所述有义链从3'到5'编号。在另一种实施方式中,siRNA包含长度为20个核苷酸的反义链和长度为20个核苷酸的有义链,其中所述反义链在第1、3、5、7、9、11、13、15、17和19个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,并且其中所述有义链在第2、4、6、8、10、12、14、16、18和20个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述反义链从5'到3'编号,所述有义链从3'到5'编号。

[0240] 在另一种实施方式中,siRNA包含长度为21个核苷酸的反义链和长度为21个核苷酸的有义链,其中所述反义链在第1、3、5、7、9、11、13、15、17、19和21个核苷酸处包含2'-O-

CH₃修饰,并且其中所述有义链在第2、4、6、8、10、12、14、16、18和20个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述反义链从5'到3'编号,所述有义链从3'到5'编号。在另一种实施方式中,siRNA包含长度为22个核苷酸的反义链和长度为22个核苷酸的有义链,其中所述反义链在第1、3、5、7、9、11、13、15、17、19和21个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述有义链在第2、4、6、8、10、12、14、16、18、20和22个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述反义链从5'到3'编号,所述有义链从3'到5'编号。在另一种实施方式中,siRNA包含长度为23个核苷酸的反义链和长度为23个核苷酸的有义链,其中所述反义链在第1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21和23个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,并且其中所述有义链在第2、4、6、8、10、12、14、16、18、20和22个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述反义链从5'到3'编号,所述有义链从3'到5'编号。

[0241] 在另一种实施方式中,siRNA包含长度为18至23个核苷酸的反义链以及长度为18至23个核苷酸的有义链,其中所述反义链在第3、5、7、9、11、13、15和17个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述有义链在第4、6、8、10、12、14和16个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述反义链从5'到3'编号,所述有义链从3'到5'编号。在另一种实施方式中,siRNA包含长度为18至23个核苷酸的反义链以及长度为18至23个核苷酸的有义链,其中所述反义链在第5、7、9、11、13和15个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,并且其中所述有义链在第6、8、10、12和14个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述反义链从5'到3'编号,所述有义链从3'到5'编号。在另一种实施方式中,siRNA包含长度为18至23个核苷酸的反义链以及长度为18至23个核苷酸的有义链,其中所述反义链在第7、9、11和13个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,并且其中所述有义链在第8、10和12个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述反义链从5'到3'编号,所述有义链从3'到5'编号。在另一种实施方式中,siRNA包含长度为18至23个核苷酸的反义链以及长度为18至23个核苷酸的有义链,其中所述反义链在第7、9和11个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,并且其中所述有义链在第8、10和12个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述反义链从5'到3'编号,所述有义链从3'到5'编号。在另一种实施方式中,siRNA包含长度为18至23个核苷酸的反义链以及长度为18至23个核苷酸的有义链,其中所述反义链在第7和9个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,并且其中所述有义链在第8和10个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述反义链从5'到3'编号,所述有义链从3'到5'编号。在另一种实施方式中,siRNA包含长度为18至23个核苷酸的反义链以及长度为18至23个核苷酸的有义链,其中所述反义链在第9和11个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,并且其中所述有义链在第8和10个核苷酸处包含2'-O-CH₃修饰,其中所述反义链从5'到3'编号,所述有义链从3'到5'编号。

[0242] 图案

[0243] 在一个方面,反义双链体区包含多个经修饰的核苷酸的基团,在本文中称为“经修饰的基团”,其中每个经修饰的基团由一个或多个经相同修饰的核苷酸组成,其中每个经修饰的基团的一侧或两侧是第二核苷酸基团,所述第二核苷酸基团在本文中称为“侧翼基团”,其中每个所述侧翼基团由未经修饰或以与所述经修饰的基团的核苷酸不同的方式修饰的一个或多个核苷酸组成。在一种实施方式中,反义双链体区中的每个经修饰的基团是相同的,即每个经修饰的基团由相同数量的经相同修饰的核苷酸组成。在另一种实施方式中,每个侧翼基团具有相同数量的核苷酸。在另一种实施方式中,每个侧翼基团是相同的。在另一种实施方式中,反义双链体区中的所述经修饰的基团的核苷酸包含经修饰的碱基。

在另一种实施方式中,所述经修饰的基团的核苷酸包括经修饰的磷酸酯骨架。在另一种实施方式中,所述经修饰的基团的核苷酸包括经修饰的2'位。

[0244] 在另一个方面,有义双链体区包含经修饰的基团的多个基团,其中每个经修饰的基团由一个或多个经相同修饰的核苷酸组成,其中每个经修饰的基团的一侧或两侧是侧翼基团,其中每个所述侧翼基团由未经修饰或以与所述经修饰的基团的核苷酸不同的方式修饰的一个或多个核苷酸组成。在一种实施方式中,有义双链体区中的每个经修饰的基团是相同的。在另一种实施方式中,每个侧翼基团具有相同数量的核苷酸。在另一种实施方式中,每个侧翼基团是相同的。在另一种实施方式中,有义双链体区中的所述经修饰的基团的核苷酸包含经修饰的碱基。在另一种实施方式中,所述经修饰的基团的核苷酸包含经修饰的磷酸酯骨架。在另一种实施方式中,所述经修饰的基团的核苷酸包含经修饰的2'位。

[0245] 在另一个方面,反义双链体区和有义双链体区各自包含多个经修饰的基团,其中每个经修饰的基团由一个或多个经相同修饰的核苷酸组成,其中每个经修饰的基团的一侧或两侧是侧翼基团,其中每个所述侧翼基团由未经修饰或以与所述经修饰的基团的核苷酸不同的方式修饰的一个或多个核苷酸组成。在一种实施方式中,反义双链体区和有义双链体区中的每个经修饰的基团是相同的。在另一种实施方式中,反义双链体区和有义双链体区中的每个侧翼基团各自具有相同数量的核苷酸。在另一种实施方式中,反义双链体区和有义双链体区中的每个侧翼基团是相同的。在另一种实施方式中,反义双链体区和有义双链体区中的所述经修饰的基团的核苷酸各自包含相同的经修饰的基团和相同的侧翼基团。在另一种实施方式中,反义双链体区和有义双链体区中的所述经修饰的基团的核苷酸各自包含经修饰的碱基。在另一种实施方式中,反义双链体区和有义双链体区中的所述经修饰的基团的核苷酸各自包含经修饰的磷酸酯骨架。在另一种实施方式中,反义双链体区和有义双链体区中的所述经修饰的基团的核苷酸各自包含经修饰的2'位。

[0246] 在一个方面,反义链包含多个经修饰的核苷酸基团,在本文中称为“经修饰的基团”,其中每个经修饰的基团由一个或多个经相同修饰的核苷酸组成,其中每个经修饰的基团的一侧或两侧是第二核苷酸基团,所述第二核苷酸基团在本文中称为“侧翼基团”,其中每个所述侧翼基团由未经修饰或以与所述经修饰的基团的核苷酸不同的方式修饰的一个或多个核苷酸组成。在一种实施方式中,反义链中的每个经修饰的基团是相同的,即每个经修饰的基团由相同数量的经相同修饰的核苷酸组成。在另一种实施方式中,每个侧翼基团具有相同数量的核苷酸。在另一种实施方式中,每个侧翼基团是相同的。在另一种实施方式中,反义双链中的所述经修饰的基团的核苷酸包含经修饰的碱基。在另一种实施方式中,所述经修饰的基团的核苷酸包括经修饰的磷酸酯骨架。在另一种实施方式中,所述经修饰的基团的核苷酸包括经修饰的2'位。

[0247] 在另一个方面,有义链包含经修饰基团的多个基团,其中每个经修饰的基团由一个或多个经相同修饰的核苷酸组成,其中每个经修饰的基团的一侧或两侧是侧翼基团,其中每个所述侧翼基团由未经修饰或以与所述经修饰的基团的核苷酸不同的方式修饰的一个或多个核苷酸组成。在一种实施方式中,有义链中的每个经修饰的基团是相同的。在另一种实施方式中,每个侧翼基团具有相同数量的核苷酸。在另一种实施方式中,每个侧翼基团是相同的。在另一种实施方式中,有义链中的所述经修饰的基团的核苷酸包含经修饰的碱基。在另一种实施方式中,所述经修饰的基团的核苷酸包含经修饰的磷酸酯骨架。在另一种

实施方式中,所述经修饰的基团的核苷酸包含经修饰的2'位。

[0248] 在另一个方面,反义链和有义链各自包含多个经修饰的基团,其中每个经修饰的基团由一个或多个经相同修饰的核苷酸组成,其中每个经修饰的基团的一侧或两侧是侧翼基团,其中每个所述侧翼基团由未经修饰或以与所述经修饰的基团的核苷酸不同的方式修饰的一个或多个核苷酸组成。在一种实施方式中,反义链和有义链中的每个经修饰基团是相同的。在另一种实施方式中,反义链和有义链中的每个侧翼基团各自具有相同数量的核苷酸。在另一种实施方式中,反义链和有义链中的每个侧翼基团是相同的。在另一种实施方式中,反义链和有义链中的所述经修饰的基团的核苷酸各自包含相同的经修饰的基团和相同的侧翼基团。在另一种实施方式中,反义链和有义链中的所述经修饰基团的核苷酸各自包含经修饰的碱基。在另一种实施方式中,反义链和有义链中的所述经修饰的基团的核苷酸各自包含经修饰的磷酸酯骨架。在另一种实施方式中,反义链和有义链中的所述经修饰的基团的核苷酸各自包含经修饰的2'位。

[0249] 在另一方面,经修饰的基团和侧翼基团在反义链上形成规则图案。在另一方面,经修饰的基团和侧翼基团在有义链上形成规则图案。在一种实施方式中,经修饰的基团和侧翼基团在反义链和有义链上都形成规则图案。在另一种实施方式中,经修饰的基团和侧翼基团在反义双链体区上形成规则图案。在另一方面,经修饰的基团和侧翼基团在有义双链体区上形成规则图案。在一种实施方式中,经修饰的基团和侧翼基团在反义双链体区和有义双链体区上形成规则图案。

[0250] 在另一方面,图案是空间或位置图案。空间或位置图案是指根据核苷酸在双链部分的核苷酸序列内的位置而修饰该核苷酸。因此,待修饰的核苷酸是嘧啶还是嘌呤无关紧要。相反,经修饰的核苷酸的位置取决于:(a)其在核酸链上的编号位置,其中核苷酸从5'端到3'端编号,并且链的5'末端核苷酸是第一位置(反义链和有义链均由它们各自的5'端核苷酸编号),或(b)经修饰的基团相对于侧翼基团的位置。因此,根据该实施方式,无论待修饰的顺序如何,修饰图案总是相同的。

[0251] 在一种实施方式中,反义链和有义链上的每个经修饰的基团是相同的。在一种实施方式中,反义双链体区和有义双链体区上的每个经修饰的基团是相同的。在另一种实施方式中,反义链和有义链上的每个经修饰的基团和每个侧翼基团是相同的。在一种实施方式中,反义双链体区和有义双链体区上的每个经修饰的基团和每个侧翼基团是相同的。

[0252] 在一种实施方式中,反义链和有义链上的每个经修饰的基团、每个经修饰的基团的位置、每个侧翼基团和每个侧翼基团的位置是相同的。在一种实施方式中,反义双链体区和有义双链体区上的每个经修饰的基团、每个经修饰的基团的位置、每个侧翼基团和每个侧翼基团的位置是相同的。在另一种实施方式中,反义链上的经修饰的基团与有义链上的经修饰的基团互补(反义链和有义链上的经修饰的基团彼此完全对齐)。在另一种实施方式中,经修饰的基团中没有错配,使得反义链上的每个经修饰的基团与有义链上的每个经修饰的基团碱基配对。

[0253] 在另一种实施方式中,有义链上的每个经修饰的基团相对于反义链上的经修饰的基团位移1、2、3、4或5个核苷酸。例如,如果有义链上的每个经修饰的基团位移一个核苷酸或一组核苷酸并且经修饰的基团以反义链上的第一个位置开始,则有义链上的经修饰的基团将从第二个位置开始。在另一种实施方式中,反义链的经修饰的基团不与有义链的经修

饰的基团重叠,即,反义链上经修饰的基团没有核苷酸与有义链上的经修饰的基团的核苷酸碱基配对。

[0254] 在一种实施方式中,当确定经修饰的基团的位置时,不考虑核酸链末端的脱氧核糖核苷酸,即,位置编号以第一核糖核苷酸或经修饰的核糖核苷酸开始。在另一种实施方式中,当确定经修饰的基团的位置时,不考虑核酸链末端的无碱基核苷酸。

[0255] 在一个方面,经修饰的基团包含反义链和有义链中的任一个或两个的5'端核苷酸。在另一种实施方式中,侧翼基团包含反义链和有义链中的任一个或两个的5'端核苷酸。在另一种实施方式中,反义链和有义链中的任一个或两个的5'端核苷酸是未经修饰的。在另一种实施方式中,经修饰的基团包含反义双链体区和有义双链体区中的任一个或两个的最靠近5'的核苷酸。在另一种实施方式中,侧翼基团包含反义双链体区和有义双链体区中的任一个或两个的最靠近5'的核苷酸。在另一种实施方式中,反义双链体区或有义双链体区中的任一个或两个的最靠近5'的核苷酸是未经修饰的。在一种实施方式中,2'位的修饰选自氨基、氟代、甲氧基、烷氧基和C1-C3烷基。在另一种实施方式中,所述修饰可以选自2'-O-甲基、2'-氨基-2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟代、2'-O-甲基、2'-O-烷基和2'-O-(C1-C3-烷基)。在另一种实施方式中,2'位的修饰是2'-O-甲基。

[0256] 另一方面,每个经修饰的基团由一个核苷酸组成,每个侧翼基团由一个核苷酸组成。在一种实施方式中,反义链上的每个经修饰的基团与有义链上的侧翼基团对齐。在另一种实施方式中,对反义链上的每个经修饰的基团与有义链上的经修饰的基团的比对位移一个或多个核苷酸。

[0257] 对磷酸酯骨架的修饰

[0258] 另一方面涉及对磷酸酯骨架的修饰。如未经修饰的核酸中发现的,本发明的siRNA的全部或部分核苷酸可以通过磷酸二酯键连接。然而,本发明的siRNA可包含经修饰的磷酸二酯键。可以修饰反义链或有义链的磷酸二酯键以独立地包括至少一个选自氮和硫的杂原子。在一种实施方式中,将核糖核苷酸连接至相邻核糖核苷酸的磷酸酯基团被经修饰的基团替换。在一种实施方式中,替换磷酸酯基团的经修饰的基团选自硫代磷酸酯、甲基磷酸酯,二硫代磷酸酯或磷酰胺酯基团。

[0259] 在一种实施方式中,反义链的所有核苷酸通过磷酸二酯键连接。在另一种实施方式中,反义双链体区的所有核苷酸通过磷酸二酯键连接。在另一种实施方式中,有义链的所有核苷酸通过磷酸二酯键连接。在另一种实施方式中,有义双链体区的所有核苷酸通过磷酸二酯键连接。在另一种实施方式中,反义链包含的经修饰的磷酸酯基团的数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在另一种实施方式中,反义双链体区包含的经修饰的磷酸酯基团的数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在另一种实施方式中,有义链包含的经修饰的磷酸酯基团的数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在另一种实施方式中,有义双链体区包含的经修饰的磷酸酯基团的数目选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0260] 5'和3'端的修饰

[0261] 本发明的siRNA可以包括核酸分子,该核酸分子在有义链或反义链中的任一个或两个的5'端或3'端处包含一个或多个经修饰的核苷酸、无碱基核苷酸、无环或脱氧核糖核苷酸。在一种实施方式中,有义链和反义链的5'端和3'端核苷酸是未经修饰的。在另一种实施方式中,反义链的5'端核苷酸是经修饰的。在另一种实施方式中,有义链的5'端核苷酸是

经修饰的。在另一种实施方式中，反义链的3'端核苷酸是经修饰的。在另一种实施方式中，有义链的3'端核苷酸是经修饰的。在另一种实施方式中，反义链的5'端核苷酸和有义链的5'端核苷酸是经修饰的。在另一种实施方式中，反义链的3'端核苷酸和有义链的3'端核苷酸是经修饰的。在另一种实施方式中，反义链的5'-端核苷酸和有义链的3'端核苷酸是经修饰的。在另一种实施方式中，反义链的3'端核苷酸和有义链的5'端核苷酸是经修饰的。在另一种实施方式中，反义链的3'端核苷酸和有义链的5'端和3'端核苷酸都是经修饰的。反义链的5'端和3'端核苷酸可以都是经修饰的。在另一种实施方式中，有义链的5'和3'端核苷酸都是经修饰的。

[0262] 反义链的5'端核苷酸可以是磷酸化的。在另一种实施方式中，有义链的5'端核苷酸是磷酸化的。在另一种实施方式中，反义链和有义链的5'端核苷酸是磷酸化的。在另一种实施方式中，反义链的5'端核苷酸是磷酸化的，有义链的5'端核苷酸具有游离羟基(5'-OH)。在另一种实施方式中，反义链的5'端核苷酸是磷酸化的，有义链的5'端核苷酸是经修饰的。在另一种实施方式中，反义链的5'端核苷酸携带5'E乙烯基磷酸酯。

[0263] 对5'端和3'端核苷酸的修饰不限于这些末端核苷酸上的5'和3'位置。对末端核苷酸的修饰的实例包括但不限于生物素、反向(脱氧)脱碱、氨基、氟代、氯代、溴代、CN、CF、甲氧基、咪唑、羧酸酯、硫酸酯、 C_1 - C_{10} 低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基或芳基烷基、 OCF_3 、 OCN 、O-、S-或N-烷基；O-、S-或N-烯基； $SO-CH_3$ ； SO_2CH_3 ； ONO_2 ； NO_2 、 N_3 ；杂环烷基；杂环烷芳基；氨基烷基氨基；聚烷基氨基或取代的甲硅烷基；其中，例如在PCT 专利申请WO 99/54459，欧洲专利EP 0 586 520 B1或EP 0 618 925 B1中所描述，上述文献全部内容并入本文供参考。如本文所用，“烷基”表示 C_1 - C_{12} -烷基，“低级烷基”表示 C_1 至 C_6 -烷基，包括 C_1 -烷基、 C_2 -烷基、 C_3 -烷基、 C_4 -烷基、 C_5 -烷基和 C_6 -烷基。

[0264] 在另一方面，反义链的5'端、有义链的5'端、反义链的3'端或有义链的3'端可以与前药部分共价连接。在一种实施方式中，该部分可以在内体中裂解。在另一种实施方式中，该部分可以在细胞质中裂解。

[0265] 表1呈现了不同种类的末端修饰的实例。

[0266] 表1-末端修饰的实例

	反义链	有义链
1. 5'端	游离 OH	游离 OH
	3'端	游离 OH
2. 5'端	游离 OH	游离 OH
	3'端	末端修饰

[0268]	3. 5'端	游离 OH	游离 OH
	3'端	游离 OH	末端修饰
	4. 5'端	游离 OH	游离 OH
	3'端	末端修饰	游离 OH
	5. 5'端	游离 OH	末端修饰
	3'端	游离 OH	游离 OH
	6. 5'端	游离 OH	末端修饰
	3'端	末端修饰	游离 OH
	7. 5'端	游离 OH	末端修饰
	3'端	游离 OH	末端修饰
	8. 5'端	游离 OH	末端修饰
	3'端	末端修饰	末端修饰

[0269] 在另一种实施方式中,反义链或有义链中的任一个或两个上的末端3'核苷酸或两个末端 3'-核苷酸是2'-脱氧核苷酸。在另一种实施方式中,2'-脱氧核苷酸是2'-脱氧-嘧啶。在另一种实施方式中,2'-脱氧核苷酸是2'脱氧-胸苷。

[0270] shRNA(短发夹环RNA)和连接的siRNA

[0271] 另一方面涉及shRNA和连接的siRNA。反义链和有义链可以彼此共价连接。这种连接可以分别在形成反义链和有义链的任何核苷酸之间发生,并且可以通过共价或非共价键形成。共价键可以通过化合物通过将两条链分别在一个或几个位置分别连接一次或多次来形成,所述化合物优选选自由亚甲基蓝和双官能团组成的组。该双官能团优选选自双(2-氯乙基)胺, N-乙酰基-N'-(对乙醛基苯甲酰基)脒胺,4-硫尿嘧啶和补骨脂素。

[0272] 此外,反义链和有义链可以通过环结构连接。环结构可以由非核酸聚合物如聚乙二醇组成。反义链的5'端可以与有义链的3'端连接,或者反义链的3'端可以与有义链的5'端连接。环可以由核酸、锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)组成,或者环可以由聚合物形成。环的长度可以足以按通过环结构或类似结构能够发生背向折叠的方式共价连接两条链。

[0273] 核糖核酸构建体可以并入合适的载体系统中。优选地,载体包含用于表达RNAi的启动子。启动子可选自本领域已知的任何启动子,例如pol III、U6、H1或7SK。

[0274] 根据本发明的核酸可包含一个或多个硫代磷酸酯核苷酸间键。优选地,硫代磷酸

酯核苷酸间键可以分布在整個核苷酸序列上,并且可以在任何位置以任何数量出现。优选地,核酸可包含1至10个硫代磷酸酯核苷酸间键。优选地,反义链在每端具有至少1个硫代磷酸酯修饰。优选地,反义链在每端具有1至3个硫代磷酸酯修饰。最优选地,反义链在每端具有2个硫代磷酸酯修饰。优选地,有义链在3'端具有至少1个硫代磷酸酯修饰。优选地,有义链在3'端具有1至3个硫代磷酸酯修饰。最优选地,有义链在3'端具有2个硫代磷酸酯修饰。

[0275] 具有突出的siRNA

[0276] 有义链或反义链的3'端或5'端的突出的长度可以选自由1、2、3、4和5个核苷酸组成的组。可供选择地,siRNA分子的两端可以是平端,并且长度可以为16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个连续核苷酸。

[0277] 在一种实施方式中,siRNA分子的一端是平端,并且siRNA分子的双链或双链体部分的长度选自由16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个连续核苷酸组成的组。

[0278] 在一种实施方式中,siRNA分子在任一链的两端具有突出,并且siRNA分子的双链或双链体部分的长度为16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个连续核苷酸。

[0279] 突出可包含至少一个脱氧核糖核苷酸和/或TT二核苷酸。

[0280] 制备本发明的核酸分子

[0281] 本发明的核酸可以使用本领域的常规方法产生,包括化学合成或体外(例如,失控转录)或体内表达核酸。例如,使用固相化学合成或使用表达载体。在一种实施方式中,表达载体可以在靶细胞中产生本发明的核酸。本领域技术人员已知用于合成本文所述核酸分子的方法。

[0282] 用于递送本发明核酸的制剂

[0283] siRNA和缀合的化合物可以通过本领域技术人员已知的多种方法(包括与细胞直接接触(“裸”siRNA))或通过与一种或多种促进靶向或递送入细胞的试剂组合来递送至体外和体内细胞。这些试剂和方法包括脂质复合物、脂质体、离子导入法、水凝胶、环糊精、纳米胶囊、微球和纳米球以及蛋白质载体。核酸/媒介组合可以通过直接注射或通过使用输注泵在体内局部递送。本发明的siRNA和缀合物可通过各种方式,包括静脉内、皮下、肌肉内或皮内注射或吸入体内递送。该分子可用作药剂。优选地,药剂预防、调节发病,治疗或缓解对象的疾病状态的症状。

[0284] 还提供了包含表面经修饰的脂质体的组合物的用途,所述表面经修饰的脂质体含有聚(乙二醇)脂质(经PEG修饰的或长循环脂质体或隐形脂质体)。这些制剂提供了通过防止脂质体或脂质复合物的聚集和融合来增加脂质体或脂质复合物溶液的稳定性方法。该制剂还具有抵抗单核巨噬细胞系统(MPS或RES)的调理作用和清除作用的附加益处,从而能够延长血液循环时间并增强包封药物的组织暴露。这种脂质体已经可以在肿瘤中选择性地积聚,可能是通过在新血管化的靶组织中外渗和捕获而进行。长循环脂质体增强了DNA和RNA的药代动力学和药效学,特别是与已知在MPS组织中积累的常规阳离子脂质体相比(Liu et al., J.Biol.Chem.1995,42,24864-24780;Choi et al.,国际PCT公开第W0 96/10391号;Ansell et al.,国际PCT公开第W0 96/10390号;Holland et al.,国际PCT公开第W0 96/10392号)。长循环脂质体还保护siRNA免遭核酸酶降解。

[0285] 可以将本发明的siRNA缀合物配制成药物组合物。所述药物组合物可单独与其他药剂组合用作药物或诊断剂。例如,本发明的一种或多种siRNA缀合物可以与递送媒介

(例如脂质体)和赋形剂(例如运载体、稀释剂)组合。还可以添加其他试剂,例如防腐剂和稳定剂。用于递送核酸分子的方法是本领域已知的并且在本领域技术人员知识范围内。

[0286] 本发明的siRNA缀合物还可以与其他治疗用化合物组合给药,单独给药或同时给药,例如作为组合单位剂量给药。在一种实施方式中,本发明包括药物组合物,该药物组合物包含在生理学/药理学上可接受的赋形剂(例如稳定剂、防腐剂、稀释剂、缓冲剂等)中的一种或多种根据本发明的siRNA缀合物。

[0287] 剂量

[0288] 本领域技术人员可通过常规实验确定本发明药物和药物组合物的剂量水平。在一种实施方式中,单位剂量可含有约0.01mg/kg体重至约100mg/kg体重的siRNA。可供选择地,剂量可以为10mg/kg体重至25mg/kg体重、或1mg/kg体重至10mg/kg体重、或0.05mg/kg体重至5mg/kg体重、或0.1mg/kg体重至5mg/kg体重、或0.1mg/kg体重至1mg/kg体重、或0.1mg/kg体重至0.5mg/kg体重、或0.5mg/kg体重至1mg/kg体重。

[0289] 药物组合物可以是无菌可注射水性悬浮液或溶液,或者是冻干形式。在一种实施方式中,所述药物组合物可包含冻干的脂质复合物或脂质复合物的水性悬浮剂。脂质复合物优选包含本发明的siRNA。此类脂质复合物可用于将本发明的siRNA递送至体外或体内靶细胞。

[0290] 本发明的药物组合物和药物可以以药学有效剂量给给药于哺乳动物对象。哺乳动物可选自人、狗、猫、马、牛、猪、山羊、绵羊、小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠。

[0291] 递送途径

[0292] 包含双链siRNA的缀合物可通过多种途径递送至对象。示例性途径包括:皮下、静脉内、局部、直肠、肛门、阴道、鼻、肺、眼。

[0293] 缀合物可以并入适合于与药学上可接受的运载体一起给药的药物组合物。如本文所用,术语“药学上可接受的运载体”旨在包括与药物给药相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。这些介质和试剂在药学上的活性物质上的用途是本领域熟知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则考虑将其用于组合物中。补充的活性化合物也可以并入所述组合物中。

[0294] 本发明的组合物可以多种方式给药,这取决于需要局部治疗还是全身治疗以及待治疗的区域。可以局部(包括眼部、阴道、直肠、鼻内、透皮)、口服或肠胃外给药。肠胃外给药包括静脉滴注、皮下、腹膜内或肌内注射、或鞘内或心室内给药。

[0295] 可以选择给药的途径和部位以增强靶向。例如,为了靶向肌肉细胞,肌内注射到感兴趣的肌肉中将是合乎逻辑的选择。通过以气溶胶形式给药iRNA可以靶向肺细胞。可以通过用iRNA涂覆球囊导管并机械引入DNA来靶向血管内皮细胞。

[0296] 本领域技术人员将理解,如上所述的修饰、糖部分的修饰、图案、5'和3'端修饰、突出、制剂、递送、递送的途径和剂量可等同地适用于任何类型的iRNA分子而限于siRNA。

[0297] 根据本发明的第十三方面,提供本发明的化合物或组合物在医药中的用途。根据本发明的GalNAc缀合物可用于治疗肝病、慢性疾病、地中海贫血、药物所致肝损伤、血色素沉着症和贫血或慢性疾病的贫血。

[0298] 在本发明的另一方面中,提供使用根据本发明的缀合物将核酸递送至肝细胞的方法。该方法包括使肝细胞与本发明化合物接触的步骤。该方法可以在体外或体内用于诊断

目的、治疗或研究目的。

附图说明

[0299] 图1提供了与用硫代磷酸酯基团修饰的三糖配体部分缀合的经修饰的双链siRNA的说明。

[0300] 图2是示出小鼠体内效力与小鼠中TTR敲减的体内效力的柱状图。用1mg/kg的单次皮下剂量处理小鼠(每组4只动物)并在注射后2天处死。通过TAQman PCR定量TTR mRNA水平。在柱体上方显示敲减水平。将mRNA水平针对PTEN进行标准化。与标准磷酸二酯键(如在TTR CF02V20和TTR CF02V22中)相比,如在TTR CF02V21和TTR CF02V23中,在GalNAc接头系统中引入硫代磷酸酯显示出显著更高的效力。

[0301] 图3是示出小鼠中TTR敲减的持续时间的柱状图。用2mg/kg的单次皮下剂量处理小鼠(每组4只动物)并在给定时间点(注射后7、14、21和28天)处死。通过TAQman PCR定量TTR mRNA水平。在柱体上方显示敲减水平。将mRNA水平针对PTEN进行标准化。

[0302] 与并入标准Biessen/van Berkel型GalNAc接头的化合物TTRCF02(如结构ST13中)相比,本发明的siRNA缀合物的敲减持续时间更加显著且更持久。

[0303] 图4是示出小鼠中TTR敲减的剂量滴定的柱状图。用各剂量(3mg/kg、1mg/kg、0.3mg/kg、0.1mg/kg)处理小鼠(每组4只动物)。通过TAQman PCR定量TTR mRNA水平。将mRNA水平针对PTEN进行标准化。

[0304] 图5是示出TTR siRNA GalNAc缀合物STS016 L8和L9的TTR敲减的体外测定的柱状图。TTR CF02V23表示阳性对照。GN_Luc表示阴性对照。将mRNA水平针对PTEN进行标准化。

[0305] 图6是示出TTR siRNA GalNAc缀合物STS016 L4至L7的TTR敲减的体外测定的柱状图。TTR CF02V23表示阳性对照。GN_Luc表示阴性对照。将mRNA水平针对PTEN进行标准化。

[0306] 图7是示出小鼠中TTR敲减的体内效力的柱状图。用1mg/kg的单次皮下剂量处理小鼠(每组4只动物)。在每个时间点(注射后第8、15、22天)后取血并使用市售的鼠TTR特异性Elisa试剂盒分析TTR水平。

[0307] 图8是示出小鼠中PTEN敲减的体内效力的柱状图。用各剂量(1、3、10mg/kg)处理小鼠(每组4只动物)。通过TAQman PCR定量PTEN mRNA水平。证实了明显的剂量依赖性的PTEN敲减。

具体实施方式

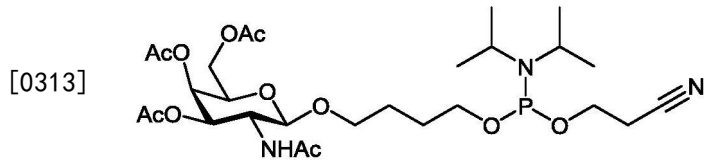
[0308] 实施例

[0309] 一般信息

[0310] 除非另有说明,否则所有反应均在氮气气氛下进行。在Bruker 400MHz Ultrashield™上记录NMR光谱,并且测定所有相对于TMS的化学位移(δ)。

[0311] 实施例1-GalNAc亚磷酰胺的合成:

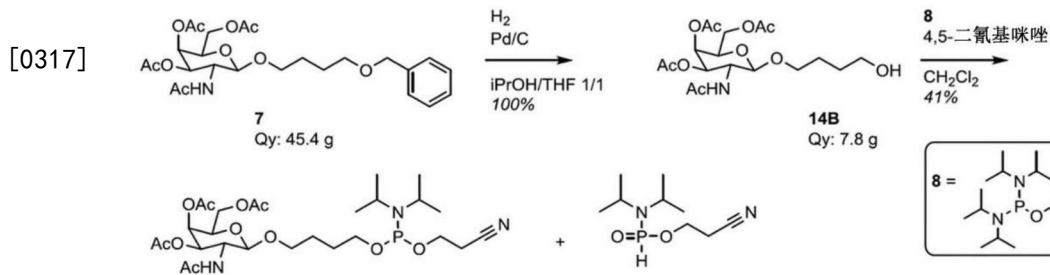
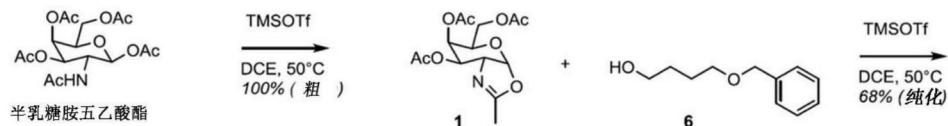
[0312] ST23



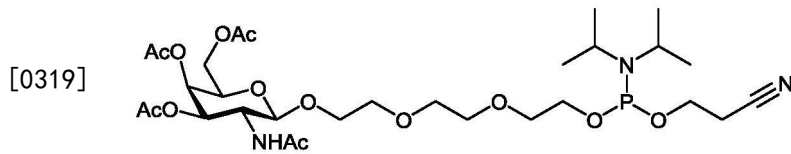
[0314] 各亚磷酰胺的合成基本上遵循Prakash et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 4127-4130 中描述的方法。

[0315] 将半乳糖胺五乙酸酯用三甲基硅烷基三氟甲烷磺酸酯活化,并与4-苄氧基1-丁醇反应。

[0316] 在氢解去除苄基保护基后,按照Dubber, 2003所述的方法将所得的醇转移到亚磷酰胺中。

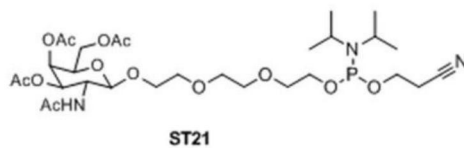
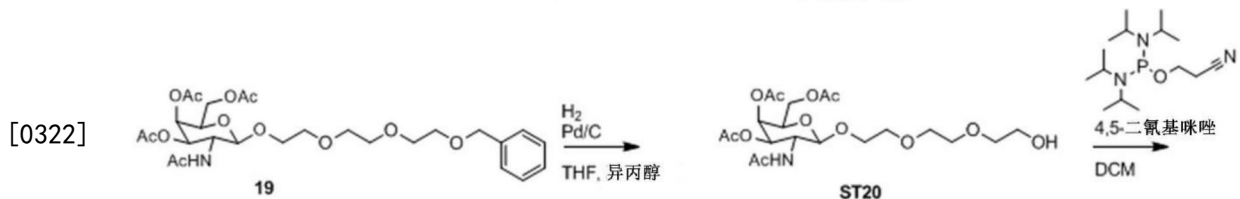
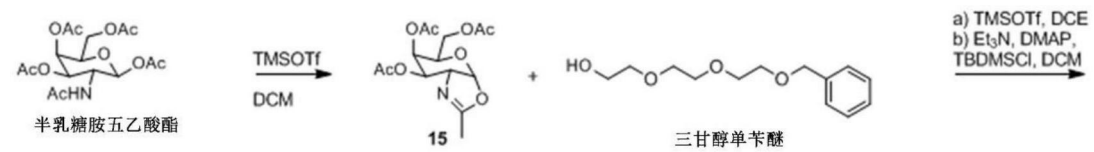


[0318] ST21:



[0320] 按照与上述相同的方法,用苄基保护的三甘醇作为起始物质合成ST21。

[0321] ST21



[0323] (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) -5-乙酰氨基-2-(乙酰氧基甲基)-6-(2-(2-(2-(苄氧基)乙氧

基)乙氧基)乙氧基)四氢-2H-吡喃-3,4-二基二乙酸酯(19)

[0324] 向15(64.2g,166mmol)的1,2-二氯乙烷(700mL)溶液中添加三甲基硅烷基三氟甲烷磺酸酯(22.10g,99mmol,18.04mL,0.6当量),将棕色悬浮液搅拌15分钟。添加研磨的4A分子筛(85g)并继续搅拌15分钟。在15分钟内通过逐滴添加来加入三甘醇单苄醚(51.8g,215mmol,47.5mL,1.3当量),并在室温下继续搅拌。在硅藻土塞上过滤反应混合物,然后用温热的二氯甲烷冲洗。通过倒入冰冷的饱和NaHCO₃水溶液(800mL)中来使滤液终止反应并剧烈搅拌。分离各层,水层用二氯甲烷(2×300mL)再萃取两次。将合并的有机层用水(600mL)和卤水(600mL)洗涤,在Na₂SO₄上干燥,过滤并真空浓缩,得到黄色油。通过快速柱色谱(5%-100%EtOAc的庚烷溶液)进行纯化,得到19和三甘醇单苄醚(64g)的混合物。将该物质溶于二氯甲烷(430mL)中,然后添加三乙胺(38.4g,380mmol,52.8mL,4当量)和DMAP(2.321g,19.00mmol,0.2当量)。然后,通过分批添加,加入TBDMSCl(21.47g,142mmol,1.5当量)并在室温下继续搅拌2小时。将反应混合物过滤,然后倒入冰冷的饱和NaHCO₃溶液(1L)中。分离各层,水层用二氯甲烷(2×300mL)再萃取两次。将合并的有机层用卤水(1L)洗涤一次并在Na₂SO₄上干燥。真空浓缩后,进行快速柱色谱(70%-100%EtOAc的庚烷溶液),得到为无色油状物的19(36g,产率30%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ7.38-7.28(m,5H),6.58(d,J=9.5Hz,1H),5.26(d,J=3.3Hz,1H),4.96(dd,J=11.2,3.4Hz,1H),4.79(d,J=8.6Hz,1H),4.53(d,J=1.3Hz,2H),4.28(dt,J=11.2,9.0Hz,1H),4.16-4.06(m,2H),3.88(dd,J=6.0,2.7Hz,2H),3.75(td,J=5.7,2.7Hz,4H),3.71-3.58(m,7H),2.15(s,3H),2.04(s,3H),1.97(s,3H),1.95(s,3H)。

[0325] (2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙酰氨基-2-(乙酰氧基甲基)-6-(2-(2-(2-(羟基乙氧基)乙氧基)乙氧基)四氢-2H-吡喃-3,4-二基二乙酸酯(ST20)

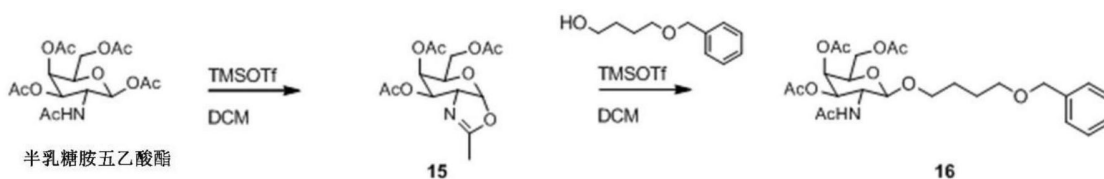
[0326] 向19(47.68g,84mmol)的四氢呋喃(330ml)和2-丙醇(330ml)溶液中添加10%活性炭载钯(12.92g,12.14mmol,1.45当量)。向反应混合物中充入氢气(气球)并在室温下继续搅拌过夜。将反应混合物在硅藻土上过滤并用温热的二氯甲烷冲洗。真空浓缩后,得到ST20(37g,产率94%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ7.81(d,J=9.2Hz,1H),5.22(d,J=3.3Hz,1H),4.97(dd,J=11.2,3.4Hz,1H),4.61(t,J=5.4Hz,1H),4.56(d,J=8.4Hz,1H),4.03(s,3H),3.88(dt,J=11.1,8.9Hz,1H),3.82-3.73(m,1H),3.63-3.45(m,9H),3.41(t,J=5.1Hz,2H),2.11(s,3H),2.00(s,3H),1.89(s,3H),1.78(s,3H)。

[0327] (2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙酰氨基-2-(乙酰氧基甲基)-6-(2-(2-(2-((2-氰基乙氧基)(二异丙基氨基)膦基)氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)四氢-2H-吡喃-3,4-二基二乙酸酯(ST21)

[0328] 向4,5-二氰基咪唑(961mg,8.13mmol,0.65当量)的无水乙腈(8mL)和无水二氯甲烷(40mL)溶液中添加研磨的4A分子筛(4.4g)。然后,通过注射器添加2-氰基乙基四异丙基磷酰二胺(4903mg,16.27mmol,5.16mL,1.3当量),并在室温下搅拌10分钟。然后,在10分钟内将ST20(6000mg,12.51mmol)的无水二氯甲烷(20mL)溶液添加到反应混合物中。在棉塞上过滤反应混合物,然后真空浓缩。通过快速柱色谱(10%-100%EtOAc的庚烷溶液)纯化两次,得到为浅黄色油状物的ST21(6.9g,产率74%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ7.81(d,J=9.3Hz,1H),5.21(d,J=3.4Hz,1H),4.97(dd,J=11.2,3.4Hz,1H),4.55(d,J=8.5Hz,1H),4.03(d,J=3.0Hz,3H),3.88(dt,J=11.2,8.9Hz,1H),3.82-3.45(m,16H),2.77(t,J=

6.1Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.13 (dd, J=6.8, 3.1Hz, 12H)。

[0329] ST23



[0330]



[0331] (3aR, 5R, 6R, 7R, 7aR) -5-(乙酰氧基甲基)-2-甲基-5,6,7,7a-四氢-3aH-吡喃并[3,2-d]噁唑-6,7-二基二乙酸酯(15)

[0332] 在室温下在30分钟内向半乳糖胺五乙酸酯(125g, 321mmol)的二氯甲烷(870mL)悬浮液中通过逐滴添加来加入三甲基硅烷基三氟甲烷磺酸酯(107g, 482mmol, 87mL, 1.5当量)。将反应混合物加热至40℃, 保持2小时, 然后将其冷却回室温, 并通过倒入冰冷的饱和NaHCO₃水溶液(1000mL)中来终止反应。分离各层, 水层用二氯甲烷(2×300mL)再萃取两次。将合并的有机层用水(500mL)和卤水(800mL)洗涤, 然后在Na₂SO₄上干燥。真空浓缩后, 得到为浅黄色油状物的15(109g, 粗产率103%)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 6.00(d, J=6.8Hz, 1H), 5.47(t, J=3.0Hz, 1H), 4.91(dd, J=7.4, 3.3Hz, 1H), 4.29-4.06(m, 3H), 4.03-3.97(m, 1H), 2.13(s, 3H), 2.07(d, J=1.0Hz, 6H), 2.06(d, J=1.3Hz, 3H)。

[0333] (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) -5-乙酰氨基-2-(乙酰氧基甲基)-6-(4-(苄氧基)丁氧基)四氢-2H-吡喃-3,4-二基二乙酸酯(16)

[0334] 向15(109g, 331mmol)的二氯甲烷(1200mL)溶液中添加粉末状的分子筛4A(75g), 然后在室温下搅拌15分钟。向混合物中添加4-苄氧基-1-丁醇(89g, 497mmol, 87mL, 1.5当量)并继续再搅拌15分钟。然后, 在15分钟内通过逐滴添加来加入三甲基硅烷基三氟甲烷磺酸酯(44.1g, 199mmol, 36.0mL, 0.6当量)。继续搅拌反应混合物2小时。在硅藻土塞上过滤混合物, 然后用二氯甲烷(200mL)冲洗一次。接着通过倒入冰冷的饱和NaHCO₃水溶液(1000mL)中来使滤液溶液终止反应。分离各层, 然后水层用二氯甲烷(2×500mL)再萃取两次。将合并的有机层用水(600mL)和卤水(600mL)洗涤, 然后在Na₂SO₄上干燥。真空浓缩后, 在用1%Et₃N(20%-80%EtOAc的庚烷溶液)中和的硅胶上通过快速柱色谱纯化, 得到缓慢结晶的为无色油状物的16(109g, 产率65%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 7.83(d, J=9.3Hz, 1H), 7.39-7.23(m, 5H), 5.21(d, J=3.5Hz, 1H), 4.96(dd, J=11.2, 3.5Hz, 1H), 4.48(d, J=8.5Hz, 1H), 4.44(s, 2H), 4.07-3.97(m, 3H), 3.87(dt, J=11.2, 8.8Hz, 1H), 3.72(p, J=5.3Hz, 1H), 3.49-3.37(m, 3H), 2.10(s, 3H), 1.99(s, 3H), 1.89(s, 3H), 1.76(s, 3H), 1.54(qd, J=8.0, 5.2, 4.6Hz, 4H)。

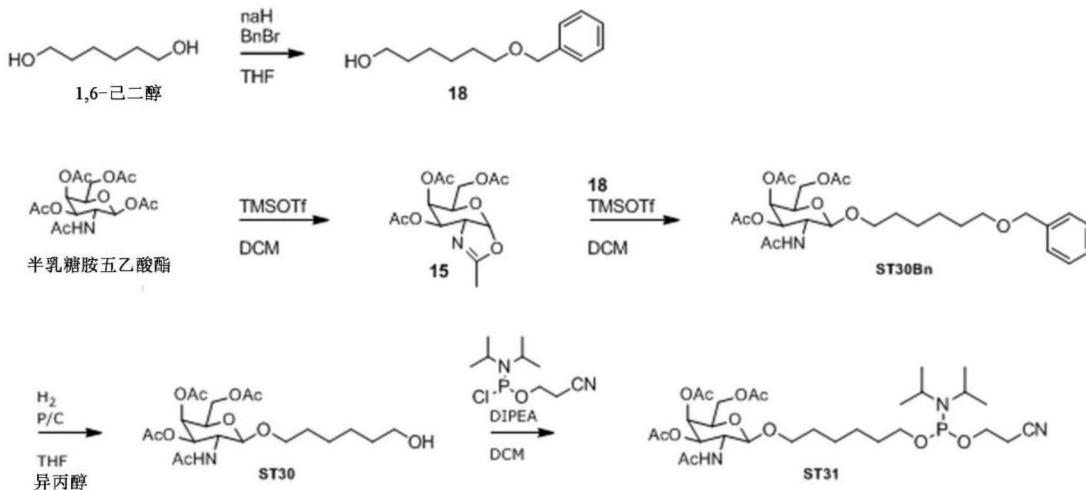
[0335] (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) -5-乙酰氨基-2-(乙酰氧基甲基)-6-(4-羟基丁氧基)四氢-2H-吡喃-3,4-二基二乙酸酯(17)

[0336] 向16 (109.6g, 215mmol) 的四氢呋喃 (1000mL) 和2-丙醇 (1000mL) 溶液中添加10% 钯碳 (17.17g, 16.13mmol, 10%, 0.075当量), 并且烧瓶充入氢气 (大气压)。在室温下继续搅拌反应混合物过夜。在硅藻土塞上过滤混合物并真空浓缩。用甲苯 (2×300mL) 和二氯甲烷 (2×300mL) 汽提该物质两次后, 得到为白色粘性固体的17 (87g, 产率97%)。¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ5.33 (dd, J=3.5, 1.0Hz, 1H), 5.05 (dd, J=11.3, 3.3Hz, 1H), 4.55 (d, J=8.5 Hz, 1H), 4.20-3.97 (m, 4H), 3.87 (dt, J=10.1, 5.8Hz, 1H), 3.60-3.48 (m, 3H), 3.30 (p, J=1.8 Hz, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.61 (dtd, J=16.8, 11.0, 10.1, 3.6Hz, 4H)。

[0337] (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) -5-乙酰氨基-2-(乙酰氧基甲基)-6-(4-(((2-氰基乙氧基)(二异丙氨基)膦基)氧基)丁氧基)四氢-2H-吡喃--3,4-二基二乙酸酯 (ST23)

[0338] 在氩气氛下, 向4,5-二氰基咪唑 (1.940g, 16.43mmol, 0.65当量) 的无水乙腈 (20mL) 和无水二氯甲烷 (20mL) 溶液添加研磨分子筛4A (9g)。然后, 通过注射器添加2-氰基乙基四异丙基磷酰二胺 (10.00g, 33.2mmol, 10.53mL, 1.31当量), 并在室温下搅拌10分钟。然后, 在10分钟内通过逐滴添加来加入17 (10.6g, 25.3mmol) 的无水二氯甲烷 (50mL) 溶液。再搅拌30分钟后, 将反应混合物在棉塞上过滤并真空浓缩。通过多个快速柱色谱步骤 (0-100% EtOAc 的庚烷溶液, 以及5% Et₃N) 对物质进行纯化, 得到为浅黄色油状物的ST23 (11.75g, 产率72%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ7.82 (d, J=9.2Hz, 1H), 5.21 (d, J=3.4 Hz, 1H), 4.96 (dd, J=11.2, 3.5Hz, 1H), 4.48 (d, J=8.5Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.93-3.82 (m, 1H), 3.78-3.65 (m, 3H), 3.64-3.49 (m, 4H), 3.48-3.40 (m, 1H), 2.76 (t, J=5.9Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.62-1.46 (m, 4H), 1.13 (dd, J=6.8, 3.6Hz, 12H)。³¹P NMR (162MHz, 氯仿-d) 147 (d, J=8.6Hz)。

[0339] ST31



[0341] 6-(苄氧基)己-1-醇 (18)

[0342] 在1小时内通过逐滴添加向冷却和剧烈搅拌的氢化钠 (90g, 2242mmol, 3.5当量) 的四氢呋喃 (500mL) 悬浮液中加入1,6-己二醇 (265g, 2242mmol, 3.5当量) 的四氢呋喃 (1000mL) 溶液。再搅拌30分钟后, 在30分钟内添加苄基溴 (76mL, 641mmol, 1当量) 的四氢呋喃 (500mL) 溶液。在完成添加后, 使反应混合物达到室温并继续搅拌过夜。将反应混合物冷却至5℃, 然后缓慢添加水 (200mL)。然后将混合物真空浓缩, 重新溶于二氯甲烷 (600mL) 中

并用水(3000mL)洗涤。将水层用二氯甲烷(3×500mL)再萃取三次。将合并的有机层用水(3×400mL)和卤水(1×500mL)洗涤,然后在 Na_2SO_4 上干燥并真空浓缩。通过重力柱色谱(0-50%EtOAc的庚烷溶液)进行纯化,得到18(25g,产率20%)。 ^1H NMR(400MHz,氯仿-d) δ 7.40-7.27(m,5H),4.50(s,2H),3.64(t,J=6.7Hz,2H),3.47(t,J=6.6Hz,2H),1.68-1.51(m,4H),1.47-1.31(m,4H),1.27(s,1H)。

[0343] (2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙酰氨基-2-(乙酰氧基甲基)-6-((6-(苄氧基)己基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4-二基二乙酸酯(ST30Bn)

[0344] 向15(28g,85mmol)的二氯甲烷(320mL)溶液中添加粉末状的分子筛4A(10g),然后搅拌5分钟。接着,添加18(26.6g,128mmol,1.5当量)并继续再搅拌15分钟。在15分钟内通过逐滴添加加入三甲基硅烷基三氟甲烷磺酸酯(9.26mL,51.0mmol,0.6当量)。在室温下继续搅拌2小时。将反应混合物在棉塞上过滤,然后用冰冷的饱和 NaHCO_3 水溶液(300mL)来终止反应。分离各层,用二氯甲烷(2×150mL)再萃取两次。将合并的有机层用水(150mL)和卤水(150mL)洗涤,然后在 Na_2SO_4 上干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱(20%-100%EtOAc的庚烷溶液)纯化,得到为无色油状物的ST30Bn(25g,产率55%)。 ^1H NMR(400MHz,氯仿-d) δ 7.38-7.27(m,5H),5.43(t,J=6.9Hz,1H),5.38-5.27(m,2H),4.71(d,J=8.3Hz,1H),4.50(s,2H),4.21-4.07(m,2H),3.96-3.81(m,3H),3.47(t,J=6.3Hz,3H),2.14(s,3H),2.05(s,3H),2.00(s,3H),1.94(s,3H),1.68-1.51(m,4H),1.44-1.30(m,4H)。

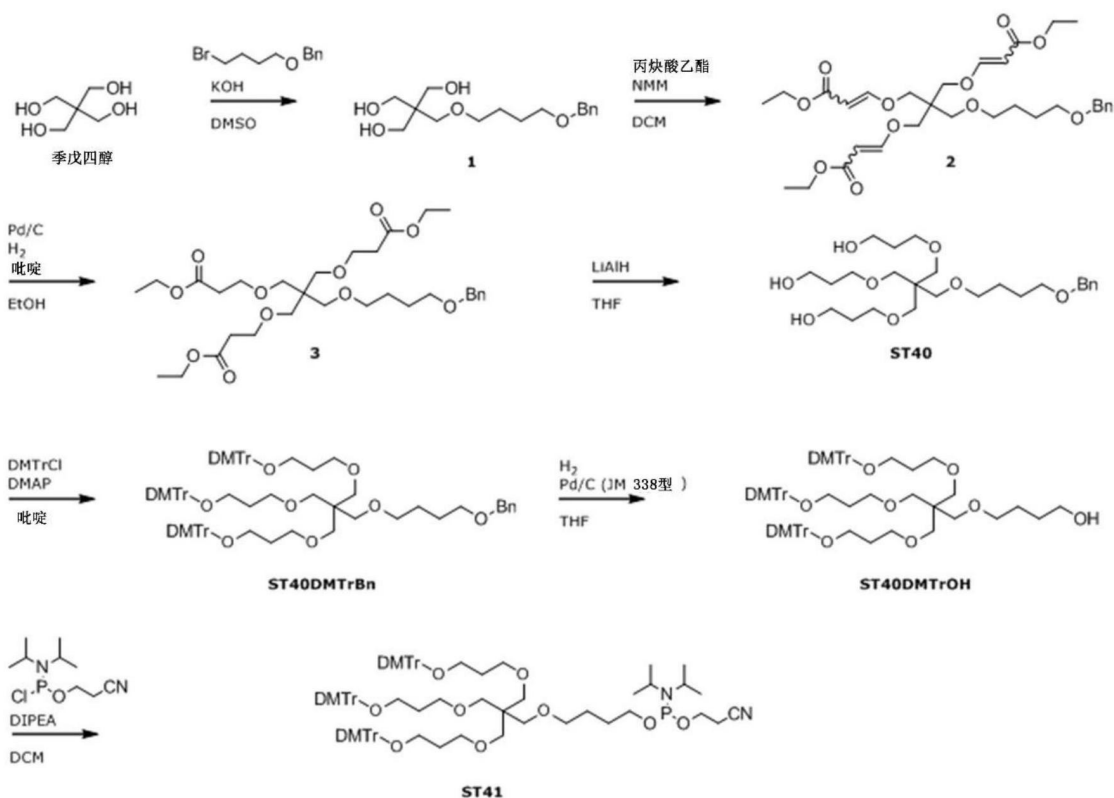
[0345] (2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙酰氨基-2-(乙酰氧基甲基)-6-((6-羟基己基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4-二基二乙酸酯(ST30)

[0346] 向ST30Bn(29g,54mmol)的四氢呋喃(250mL)和2-丙醇(250mL)溶液中添加10%钨碳(0.582g,0.547mmol,0.075当量)。向烧瓶中充入氢气(大气压)并在室温下继续搅拌混合物过夜。在硅藻土塞上过滤反应混合物,将滤液真空浓缩。用甲苯(2×200mL)和二氯甲烷(2×200mL)汽提两次后,得到为无色油状物的ST30(24g,产率99%)。 ^1H NMR(400MHz,甲醇- d_4) δ 5.37-5.26(m,1H),5.10-4.97(m,1H),4.67-4.48(m,2H),4.20-3.93(m,4H),3.92-3.77(m,1H),3.52(hept,J=9.4,8.1Hz,3H),3.36-3.23(m,1H),2.17-2.09(m,3H),2.05-1.98(m,3H),1.97-1.87(m,6H),1.63-1.45(m,4H),1.43-1.29(m,4H)。

[0347] (2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙酰氨基-2-(乙酰氧基甲基)-6-((6-((2-氰基乙氧基)(二异丙氨基)膦基)氧基)己基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4-二基二乙酸酯(ST31)

[0348] 在氩气气氛下,向ST30(21.2g,47.4mmol)的无水二氯甲烷(550毫升)溶液中添加DIPEA(83毫升,474mmol,10当量)和分子筛4A(30g)。将反应混合物冷却至温度0℃,然后在10分钟内逐滴添加2-氰基乙基N,N-二异丙基氯代亚磷酰胺(13.46g,56.9mmol,1.2当量)。继续搅拌混合物,同时使其在30分钟内升温。将反应混合物在棉塞上过滤,并直接涂覆在用 Et_3N 处理的二氧化硅(60g)上。通过快速柱色谱(10%-60%EtOAc的庚烷溶液,5% Et_3N)进行纯化,得到为黄色焦油状物的ST31,(24.8g,产率78%)。 ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 7.82(d,J=9.2Hz,1H),5.21(d,J=3.4Hz,1H),4.96(dd,J=11.3,3.4Hz,1H),4.48(d,J=8.5Hz,1H),4.02(s,3H),3.91-3.81(m,1H),3.79-3.63(m,3H),3.63-3.49(m,4H),3.45-3.37(m,1H),2.76(t,J=5.8Hz,2H),2.10(s,3H),2.00(s,3H),1.89(s,3H),1.77(s,3H),1.58-1.40(m,4H),1.37-1.22(m,4H),1.13(dd,J=6.8,3.9Hz,12H)。

[0349] 实施例2-三倍体(trebler)合成子ST41的合成



[0351] 2-((4-(苄氧基)丁氧基)甲基)-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇(1)

[0352] 向季戊四醇(160g, 1175mmol, 10当量)的二甲基亚砷(320mL)悬浮液中添加氢氧化钾(65.9g, 1175mmol, 10当量), 然后在室温下搅拌15分钟。然后, 在1.5小时内, 添加 4-苄氧基-1-溴丁烷(22.32mL, 118mmol, 1当量)的二甲基亚砷(107mL)溶液。完成添加后, 在室温下继续搅拌反应混合物过夜。通过添加3M HCl水溶液将反应混合物酸化至pH=2, 将当前得到的白色悬浮液在玻璃过滤器上过滤。将滤液用水(900mL)进一步稀释, 转移至分液漏斗中, 产物用二氯甲烷(3×200mL)萃取。将合并的有机层用水(4×200mL)洗涤, 在Na₂SO₄上干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱(50%-100%EtOAc的庚烷溶液)纯化浅黄色油状物, 得到为无色油状物的1(20.46g, 产率58%)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ7.41-7.27 (m, 5H), 4.50(s, 2H), 3.70(s, 6H), 3.52-3.43(m, 6H), 2.54(s, 3H), 1.71-1.64(m, 4H)。

[0353] 3,3'-((2-((4-(苄氧基)丁氧基)甲基)-2-((3-乙氧基-3-氧代丙-1-烯-1-基)氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基)二丙烯酸二乙酯(2)

[0354] 向1(20.46g, 68.6mmol)的二氯甲烷(300mL)溶液中添加N-甲基吗啉(33.9mL, 309mmol, 4.5当量)。将反应混合物在冰浴上冷却, 并通过单流来向反应混合物中添加丙炔酸乙酯(27.8mL, 274mmol, 4当量)。继续搅拌反应混合物15分钟, 然后使反应混合物升温至室温。2小时反应时间后, 将反应混合物真空浓缩, 得到深棕色油状物。通过快速柱色谱(0-37% EtOAc的庚烷溶液)纯化粗物质, 得到为黄色油状物的2(31.56g, 产率78%)。¹H NMR(400 MHz, 氯仿-d) δ7.54(d, J=12.6Hz, 3H), 7.39-7.28(m, 5H), 5.23(d, J=12.6Hz, 3H), 4.50(s, 2H), 4.16(q, J=7.1Hz, 6H), 3.87(s, 6H), 3.53-3.33(m, 6H), 1.69-1.55(m, 4H), 1.26(t, J=7.1 Hz, 12H)。

[0355] 3,3'-((2-((4-(苄氧基)丁氧基)甲基)-2-((3-乙氧基-3-氧代丙氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基)二丙酸二乙酯(3)

[0356] 向2(31.56g, 53.2mmol)的乙醇(1463mL)溶液中添加10%钯碳(2.83g, 2.66mmol, 0.05当量)和吡啶(2.153mL, 26.6mmol, 0.5当量)。向反应混合物中充入氢气(大气压)并在室温下继续搅拌混合物过夜。在硅藻土塞上过滤反应混合物,然后真空浓缩滤液。得到为黄色油状物的3(29.75g, 产率93%)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 7.38-7.27(m, 5H), 4.51(s, 2H), 4.13(q, J=7.1Hz, 6H), 3.64(t, J=6.5Hz, 6H), 3.48(t, J=6.2Hz, 2H), 3.39-3.33(m, 8H), 3.30(s, 2H), 2.52(t, J=6.5Hz, 6H), 1.70-1.56(m, 4H), 1.26(t, J=7.1Hz, 9H)。

[0357] 3,3'-((2-((4-(苄氧基)丁氧基)甲基)-2-((3-羟基丙氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))双(丙-1-醇)(ST40)

[0358] 将在无水四氢呋喃(331mL)中的2.4M氯化铝锂的四氢呋喃(76mL, 183mmol, 6.2当量)溶液冷却至0℃的温度。然后,以使温度保持在10℃以下的速度,通过逐滴添加来加入3(17.7g, 29.6mmol)的无水四氢呋喃(200mL)溶液。完成添加后,继续搅拌过夜,同时使反应混合物缓慢达到室温。将反应用四氢呋喃(100mL)进一步稀释,并冷却至0℃的温度。通过缓慢添加水(2.0mL)、4M NaOH水溶液(2.0mL)和水(6.0mL),使反应混合物终止反应。通过在水Na₂SO₄塞上过滤,去除白色沉淀物,然后用四氢呋喃冲洗两次。将滤液真空浓缩,通过快速柱色谱(0-10%MeOH的二氯甲烷溶液)进行纯化,得到为无色油状物的ST40(9.55g, 产率68%)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 7.39-7.27(m, 5H), 4.51(s, 2H), 3.74(q, J=5.2Hz, 6H), 3.58(t, J=5.5Hz, 6H), 3.49(t, J=6.1Hz, 2H), 3.40(s, 8H), 3.33(s, 2H), 3.27(s, 3H), 1.79(p, J=5.3Hz, 6H), 1.71-1.58(m, 4H)。

[0359] 8,8-双((3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)甲基)-1,1-双(4-甲氧基苯基)-1,16-二苯基-2,6,10,15-四氧杂十六烷(ST40DMTrBn)

[0360] 在氩气气氛下,通过用吡啶汽提两次从ST40(9.55g, 20.21mmol)去除残留的水,然后重新溶解在吡啶(464mL)中。向反应混合物中添加分子筛3A(20g)并继续搅拌15分钟。添加固体DMTrCl(30.8g, 91mmol, 4.5当量)并继续搅拌当前的深橙色混合物过夜。将反应物在棉塞上过滤,并将滤液用Et₃N中和的二氧化硅涂覆。通过快速柱色谱(0-40%EtOAc的庚烷溶液, 5%Et₃N)进行纯化,得到为黄色发泡油状物的ST40DMTrBn(25.3g, 产率84%)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 7.43-7.37(m, 6H), 7.33-7.21(m, 23H), 7.19-7.13(m, 3H), 6.82-6.75(m, 12H), 4.46(s, 2H), 3.74(s, 18H), 3.43(t, J=6.3Hz, 2H), 3.39(t, J=6.5Hz, 6H), 3.26-3.17(m, 10H), 3.06(t, J=6.4Hz, 6H), 1.78(p, J=6.4Hz, 6H), 1.64-1.49(m, 4H)。

[0361] 4-(3-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)-2,2-双((3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)甲基)丙氧基)丁-1-醇(ST40DMTrOH)

[0362] 向ST40DMTrBn(25.3g, 18.34mmol)的四氢呋喃(275mL)溶液中添加5%钯碳, Johnson Matthey 338型(5.85g, 2.75mmol, 0.15当量)。向烧瓶中充入氢气(大气压), 45分钟反应时间后,用氮气吹扫。将反应混合物在硅藻土塞上过滤并真空浓缩。通过快速柱色谱(0-40%EtOAc的庚烷溶液, 5%Et₃N)进行纯化,得到为白色发泡固体的ST40DMTrOH(11.95g, 产率50%)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 7.44-7.37(m, 6H), 7.34-7.21(m, 18H), 7.20-7.13(m, 3H), 6.83-6.75(m, 12H), 3.75(s, 18H), 3.60-3.53(m, 2H), 3.39(t, J=6.4Hz, 6H), 3.27(t, 2H), 3.22(s, 8H), 3.07(t, J=6.4Hz, 6H), 2.26(t, J=5.9Hz, 1H), 1.79(p, J=6.5Hz, 6H), 1.60-1.51(m, 4H)。

[0363] 4-(3-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)-2,2-双((3-(双(4-甲氧基

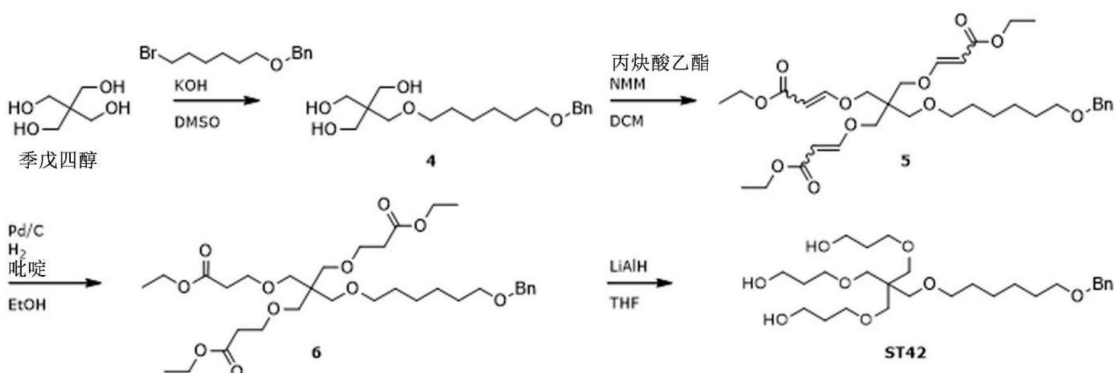
苯基) (苯基) 甲氧基) 丙氧基) 甲基) 丙氧基) 丁基 (2-氰基乙基) 二异丙基亚磷酰胺 (ST41)

[0364] 向ST40DMtrOH (11.95g, 9.27mmol) 的无水二氯甲烷 (162mL) 溶液中添加DIPEA (16.18mL, 93mmol, 10当量) 和分子筛4A (25g), 然后冷却至0°C的温度。接着, 在15分钟内通过逐滴添加向反应中加入2-氰基乙基N,N-二异丙基氯代亚磷酰胺 (2.61g,

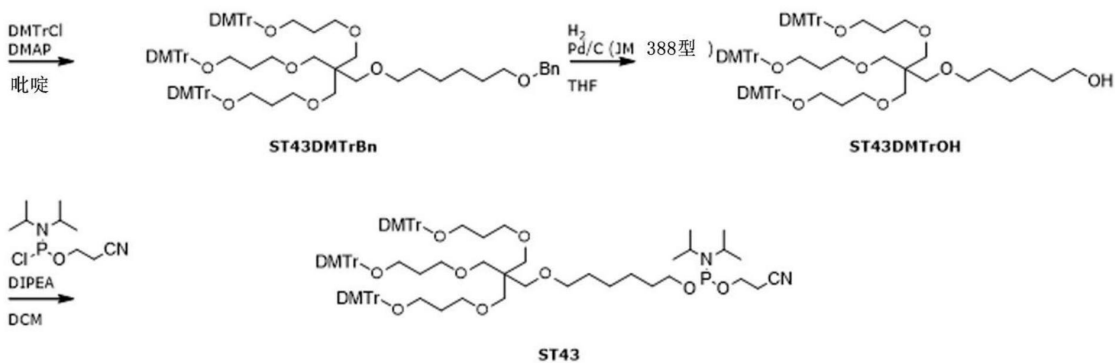
[0365] 11.03mmol, 1.2当量)。继续再搅拌反应混合物15分钟, 同时使其达到室温。将反应混合物在棉塞上过滤, 将滤液涂覆在用Et₃N处理的二氧化硅 (50g) 上。通过快速柱色谱 (0-35% EtOAc的庚烷溶液, 5%Et₃N) 进行纯化, 得到为无色焦油状物的ST41 (10.65g, 产率77%)。¹H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ7.44-7.37 (m, 6H), 7.33-7.21 (m, 18H), 7.20-7.13 (m, 3H), 6.83-6.75 (m, 12H), 3.86-3.70 (m, 20H), 3.67-3.50 (m, 4H), 3.39 (t, J=6.4Hz, 6H), 3.29-

[0366] 3.16 (m, 10H), 3.06 (t, J=6.4Hz, 6H), 2.57 (t, 2H), 1.78 (p, J=6.4Hz, 6H), 1.65-1.49 (m, 4H), 1.16 (dd, J=9.1, 6.8Hz, 12H)。

[0367] ST43



[0368]



[0369] 2-(((6-(苄氧基)己基)氧基)甲基)-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇(4)

[0370] 向季戊四醇 (55.2g, 406mmol, 10当量) 的二甲基亚砷 (110mL) 悬浮液中添加氢氧化钾 (22.76g, 406mmol, 10当量), 然后在室温下搅拌15分钟。接着, 在1.5小时内, 添加苄基6-溴己醚 (11g, 40.6mmol, 1当量) 的二甲基亚砷 (36.6mL) 溶液。完成添加后, 在室温下继续搅拌反应混合物过夜。通过添加3M HCl水溶液将反应混合物酸化至pH~1, 并将当前得到的白色乳浊液用水 (700mL) 进一步稀释, 转移至分液漏斗中, 产物用二氯甲烷 (4×70mL) 萃取。将合并的有机层用水 (3×70mL) 洗涤, 在Na₂SO₄上干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (50%-100%EtOAc的庚烷溶液) 纯化浅黄色油状物, 得到为无色油状物的4 (9.16g, 产率67%)。¹H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ7.38-7.27 (m, 5H), 4.50 (s, 2H), 3.70 (s, 6H), 3.49-3.39 (m, 6H), 2.83 (s, 3H), 1.66-1.52 (m, 4H), 1.45-1.28 (m, 4H)。

[0371] 3,3'-((2-(((6-(苄氧基)己基)氧基)甲基)-2-(((3-乙氧基-3-氧代丙-1-烯-1-基)氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙烯酸二乙酯(5)

[0372] 向2(9.1g,27.9mmol)的二氯甲烷(150mL)溶液中添加N-甲基吗啉(13.79mL,125mmol,4.5当量)。将反应混合物在冰浴上冷却,并通过单流向反应混合物中添加丙炔酸乙酯(11.30mL,112mmol,4当量)。继续搅拌反应混合物15分钟,然后使反应混合物升温至室温。反应2小时后,将反应混合物真空浓缩,得到深棕色油状物。通过快速柱色谱(0-30% EtOAc的庚烷溶液)进行粗物质纯化,得到为浅黄色油状物的5(15.85g,产率79%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.54(d,J=12.6Hz,3H),7.37-7.27(m,5H),5.23(d,J=12.6Hz,3H),4.50(s,2H),4.16(q,J=7.1Hz,6H),3.88(s,6H),3.46(t,J=6.5Hz,2H),3.41(s,2H),3.36(t,J=6.5Hz,2H),1.65-1.49(m,4H),1.43-1.21(m,13H)。

[0373] 3,3'-((2-(((6-(苄氧基)己基)氧基)甲基)-2-((3-乙氧基-3-氧代丙氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))二丙酸二乙酯(6)

[0374] 向5(15.85g,25.5mmol)的乙醇(750mL)溶液中添加10%钯碳(1.359g,1.277mmol,0.05当量)和吡啶(1.033mL,12.77mmol,0.5当量)。向反应混合物充入氢气(大气压)并在室温下继续搅拌过夜。在硅藻土塞上过滤反应混合物,然后真空浓缩滤液,得到为浅黄色油状物的6(15.27g,产率91%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.37-7.27(m,5H),4.50(s,2H),4.14(q,J=7.1Hz,6H),3.64(t,J=6.5Hz,6H),3.47(t,J=6.7Hz,2H),3.40-3.26(m,10H),2.52(t,J=6.5Hz,6H),1.69-1.46(m,4H),1.44-1.30(m,4H),1.26(t,J=7.1Hz,9H)。

[0375] 3,3'-((2-(((6-(苄氧基)己基)氧基)甲基)-2-((3-羟基丙氧基)甲基)丙烷-1,3-二基)双(氧基))双(丙-1-醇)(ST42)

[0376] 将6(19.27g,30.7mmol)的无水四氢呋喃(360mL)溶液冷却至0°C的温度。然后,在1小时内通过逐滴添加来加入2.4M氢化铝锂的四氢呋喃溶液(128mL,307mmol,10当量)。完成添加后,继续搅拌过夜,同时使反应混合物缓慢达到室温。冷却后,通过缓慢添加水(11.7mL)、4M NaOH水溶液(11.7mL)和水(35mL)使反应终止。通过在水Na₂SO₄塞上过滤,去除白色沉淀物,然后用四氢呋喃冲洗两次。将滤液真空浓缩,并通过快速柱色谱(0-6%MeOH的二氯甲烷溶液)进行纯化,得到为无色油状物的ST42(11.64g,产率72%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.38-7.27(m,5H),4.50(s,2H),3.74(t,J=5.4Hz,6H),3.58(t,J=5.5Hz,6H),3.47(t,J=6.6Hz,2H),3.40(s,6H),3.36(t,J=6.5Hz,2H),3.32(s,2H),3.29(s,3H),1.79(p,J=5.4Hz,6H),1.70-1.49(m,4H),1.44-1.28(m,4H)。

[0377] 8,8-双((3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)甲基)-1,1-双(4-甲氧基苯基)-1,18-二苯基-2,6,10,17-四氧杂十八烷(ST43DMTrBn)

[0378] 在氩气氛下,通过用吡啶汽提两次从ST42(4.00g,7.99mmol)去除残留的水,然后重新溶解在吡啶(165mL)中。向反应混合物中添加分子筛4A(8g)并继续搅拌15分钟。添加固体DMTrCl(13.54g,39.9mmol,5当量)并在室温下继续搅拌当前的深橙色混合物。2小时后,添加另外的DMTrCl(4.06g,11.98mmol,1.5当量)并继续搅拌过夜。将反应物在棉塞上过滤,并将滤液涂覆在Et₃N中和的二氧化硅(40g)上。通过快速柱色谱(0-35% EtOAc的庚烷溶液,5%Et₃N)进行纯化,得到为黄色发泡油状物的ST43DMTrBn(10.44g,产率86%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.43-7.37(m,6H),7.34-7.21(m,23H),7.19-7.12(m,3H),6.82-6.76(m,12H),4.47(s,2H),3.74(s,18H),3.41(dt,J=14.6,6.5Hz,8H),3.26-

[0379] 3.16 (m, 10H), 3.06 (t, J=6.4Hz, 6H), 1.78 (p, J=6.5Hz, 6H), 1.56 (p, 2H), 1.45 (p, J=6.6Hz, 2H), 1.38-1.21 (m, 4H)。

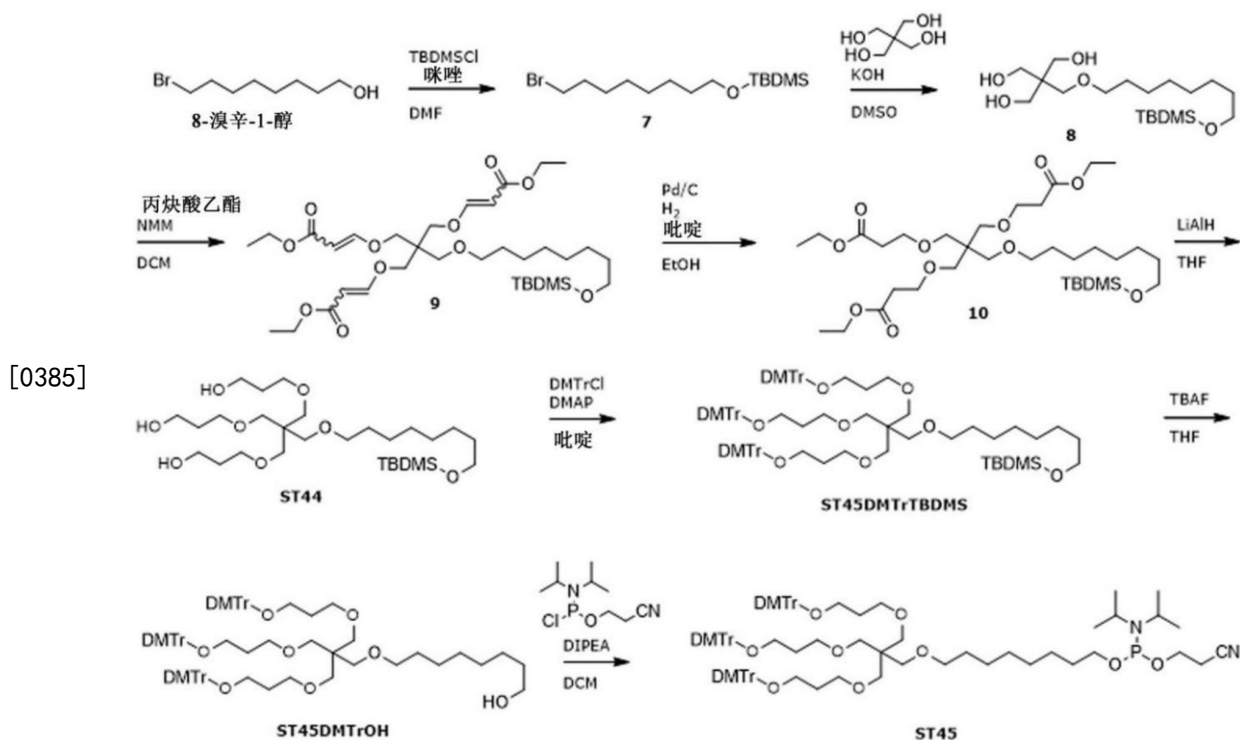
[0380] 6-(3-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)-2,2-双((3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)甲基)丙氧基)己-1-醇(ST43DMTrOH)

[0381] 向ST43DMTrBn (10.2g, 7.25mmol) 的四氢呋喃 (200mL) 溶液中添加5% 钨碳, Johnson Matthey338型 (2.313g, 1.08mmol, 0.15当量)。向烧瓶中充入氢气(大气压), 50分钟反应时间后, 用氮气吹扫。将反应混合物在硅藻土塞上过滤并真空浓缩。通过快速柱色谱 (0-40% EtOAc的庚烷溶液, 5%Et₃N) 进行纯化, 得到为白色泡沫的ST43DMTrOH (3.83g, 产率 38%)。¹H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ7.44-7.36 (m, 6H), 7.34-7.21 (m, 18H), 7.20-7.13 (m, 3H), 6.84-6.73 (m, 12H), 3.75 (s, 18H), 3.62-3.53 (m, 2H), 3.40 (t, J=6.4Hz, 6H), 3.27-3.16 (m, 10H), 3.07 (t, J=6.4Hz, 6H), 1.79 (p, J=6.4Hz, 6H), 1.56-1.41 (m, 4H), 1.37-1.23 (m, 5H)。

[0382] 6-(3-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)-2,2-双((3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)甲基)丙氧基)己基(2-氰基乙基)二异丙基亚磷酰胺(ST43)

[0383] 向ST43DMTrOH (3.83g, 2.76mmol) 的无水二氯甲烷 (50mL) 溶液中添加DIPEA (4.82mL, 27.6mmol, 10当量) 和分子筛4A (7g), 然后冷却至0°C的温度。接着, 在15分钟内通过逐滴添加向反应中加入2-氰基乙基N,N-二异丙基氯代亚磷酰胺 (0.948g, 4.00mmol, 1.45当量)。继续搅拌反应混合物15分钟, 同时使其达到室温。将反应混合物在棉塞上过滤, 将滤液涂覆在用Et₃N处理的二氧化硅 (10g) 上。通过快速柱色谱 (0-30%EtOAc 的庚烷溶液, 5%Et₃N) 进行纯化, 得到为无色焦油状物的ST43 (3.48g, 产率83%)。¹H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ7.44-7.37 (m, 6H), 7.33-7.20 (m, 18H), 7.19-7.13 (m, 3H), 6.83-6.75 (m, 12H), 3.87-3.69 (m, 20H), 3.66-3.51 (m, 4H), 3.39 (t, J=6.4Hz, 6H), 3.28-3.15 (m, 10H), 3.07 (t, J=6.4Hz, 6H), 2.60 (t, J=6.5Hz, 2H), 1.79 (p, J=6.4Hz, 6H), 1.58 (p, J=3.9Hz, 2H), 1.46 (p, J=6.7Hz, 2H), 1.39-1.23 (m, 4H), 1.17 (t, J=7.3Hz, 12H)。

[0384] ST45



[0386] ((8-溴辛基)氧基)(叔丁基)二甲基硅烷(7)

[0387] 向8-溴辛-1-醇(8g, 38.3mmol)的无水N,N-二甲基甲酰胺(10mL)溶液中添加咪唑(6.51g, 96mmol, 2.5当量)。一旦获得澄清溶液,则分批添加TBDMS-Cl(7.50g, 49.7mmol, 1.2当量)以观察最高温度达到40℃的放热反应。在室温下继续搅拌反应混合物过夜。将得到的黄色悬浮液用Et₂O(40mL)稀释,并用卤水(40mL)洗涤。将水层用Et₂O(2×40mL)再萃取两次,并将合并的有机层在Na₂SO₄上干燥。真空浓缩后,通过快速柱色谱(0-40%EtOAc的庚烷溶液)进行纯化,得到为无色油状物的7(11.73g, 产率95%)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 3.60(t, J=6.6, 1.7Hz, 2H), 3.41(t, J=6.9Hz, 2H), 1.85(p, J=7.0Hz, 2H), 1.60-1.37(m, 4H), 1.37-1.24(m, 6H), 0.89(s, 9H), 0.05(s, 6H)。

[0388] 2-(((8-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)辛基)氧基)甲基)-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇(8)

[0389] 向季戊四醇(16.84g, 124mmol, 10当量)的二甲基亚砷(45mL)悬浮液中添加氢氧化钾(6.94g, 124mmol, 10当量),并将其在室温下搅拌15分钟。然后,在2小时内,添加7(4g, 12.37mmol, 1当量)。完成添加后,在室温下继续搅拌反应混合物过夜。将反应混合物用Et₂O(3×150mL)萃取三次,并将所有有机层单独地用卤水(50mL)洗涤。然后将合并的水层用Et₂O(50mL)再萃取一次。将合并的有机层在Na₂SO₄上干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱(0-100%EtOAc的庚烷溶液)纯化浅黄色油状物,得到为无色油状物的8(0.53g, 产率11%)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 3.72(d, J=3.7Hz, 6H), 3.60(t, J=6.6Hz, 2H), 3.47(s, 2H), 3.42(t, J=6.5Hz, 2H), 2.73(s, 3H), 1.63-1.44(m, 4H), 1.30(s, 8H), 0.89(s, 9H), 0.05(s, 6H)。

[0390] 15,15-双(((3-乙氧基-3-氧代丙-1-烯-1-基)氧基)甲基)-2,2,3,3-四甲基-4,13,17-三氧杂-3-硅杂二十-18-烯-20-酸乙酯(9)

[0391] 向8(2.94g, 7.76mmol)的二氯甲烷(30mL)溶液中添加N-甲基吗啉(3.84mL, 34.9mmol, 4.5当量)和丙炔酸乙酯(3.7mL, 36.5mmol, 4.7当量)。观察到放热反应,并使用冰

浴将其冷却回20℃的温度。在室温下继续搅拌反应混合物过夜。将反应混合物真空浓缩,得到深棕色油状物。通过快速柱色谱(0-40%EtOAc的庚烷溶液)进行纯化,得到为浅黄色油状物的9(3.84g,产率73%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ7.54(d,J=12.6Hz,3H), 5.23(d,J=12.6Hz,3H), 4.16(q,J=7.1Hz,6H), 3.89(s,6H), 3.59(t,J=6.6Hz,2H), 3.42(s, 2H), 3.36(t,J=6.5Hz,2H), 1.56-1.45(m,4H), 1.35-1.22(m,17H), 0.89(s,9H), 0.05(s,6H)。

[0392] 15,15-双((3-乙氧基-3-氧代丙氧基)甲基)-2,2,3,3-四甲基-4,13,17-三氧杂-3-硅杂二十-20-酸乙酯(10)

[0393] 向9(3.84g,5.71mmol)的乙醇(167mL)溶液中添加10%钨碳(0.304g,0.285mmol,0.05当量)和吡啶(0.213mL,2.85mmol,0.5当量)。向反应混合物中充入氢气(大气压)并在室温下继续搅拌混合物过夜。在硅藻土塞上过滤反应混合物,然后真空浓缩滤液,得到为黄色油状物的10(3.86g,产率100%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ4.14(q,J=7.1Hz,6H), 3.64(t,J=6.5Hz,6H), 3.59(t,J=6.7Hz,2H), 3.40-3.28(m,10H), 2.53(t,J=6.5Hz,6H), 1.55-1.46(m,4H), 1.35-1.23(m,17H), 0.89(s,9H), 0.05(s,6H)。

[0394] 15,15-双((3-羟基丙氧基)甲基)-2,2,3,3-四甲基-4,13,17-三氧杂-3-硅杂二十-20-醇(ST44)

[0395] 将10(3.86g,5.69mmol)的无水四氢呋喃(67mL)溶液冷却至-5℃的温度。然后,在1小时内通过逐滴添加加入2.4M氯化铝锂的四氢呋喃溶液(24mL,57mmol,10当量)。完成添加后,继续搅拌过夜,同时使反应混合物缓慢达到室温。第二天,将反应混合物冷却至0℃的温度并通过分批添加硫酸钠十水合物(18.32g,56.9mmol,10当量)来终止反应。通过在水Na₂SO₄塞上过滤,去除白色沉淀物,然后用四氢呋喃冲洗两次。将滤液真空浓缩,并通过快速柱色谱(0-7%MeOH的二氯甲烷溶液)进行纯化,得到为浅黄色油状物的ST44(1.96g,产率60%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ3.75(t,J=5.3Hz,6H), 3.64-3.55(m,8H), 3.48-3.27(m,13H), 1.80(h,J=5.4,4.8Hz,6H), 1.58-1.46(m,4H), 1.36-1.25(m,8H), 0.89(s,9H), 0.05(s,6H)。

[0396] 8,8-双((3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)甲基)-1,1-双(4-甲氧基苯基)-20,20,21,21-四甲基-1-苯基-2,6,10,19-四氧杂-20-硅杂二十二烷(ST45DMTrTBDMS)

[0397] 在氩气氛下,通过用吡啶汽提两次从ST44(1.94g,3.51mmol)去除残留的水,然后重新溶解在吡啶(70mL)中。向反应混合物中添加分子筛4A(4g)并继续搅拌15分钟。在2小时内分批添加固体DMTrCl(4.16g,12.28mmol,3.5当量)。再过1.5小时后,添加另外的DMTrCl(2.38g,7.02mmol,2当量),并在室温下继续搅拌当前的深橙色混合物过夜。通过添加MeOH(4.4mL,109mmol,31当量)来终止反应,并将其搅拌15分钟。然后,将反应混合物在棉塞上过滤,并将滤液涂覆在Et₃N中和的二氧化硅(20g)上。通过快速柱色谱(0-100%EtOAc的庚烷溶液,5%Et₃N)进行纯化,得到为黄色发泡油状物的ST45DMTrTBDMS(0.44g,产率8%)。回收起始物质和中间物,产率60%。¹H NMR(400 MHz,氯仿-d) δ7.43-7.38(m,6H), 7.27(q,J=8.1,7.3Hz,18H), 7.19-7.13(m,3H), 6.81-

[0398] 6.76(m,12H), 3.76(s,18H), 3.58(td,J=6.5,3.0Hz,2H), 3.44(dt,J=33.9,6.4Hz,6H), 3.35-3.16(m,10H), 3.07(t,J=6.4Hz,6H), 1.79(h,J=6.3Hz,6H), 1.52-1.39(m,4H), 1.34-1.20(m,8H), 0.89(s,9H), 0.04(s,6H)。

[0399] 8-(3-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)-2,2-双((3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)甲基)丙氧基)辛-1-醇(ST45DMTrOH)

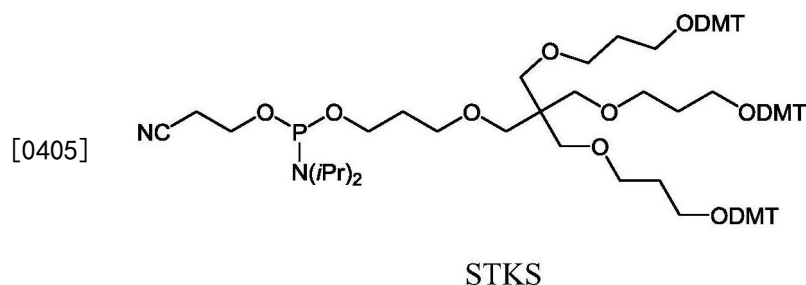
[0400] 向ST45DMTrTBDMS(2.20g,1.507mmol)的无水四氢呋喃(12mL)溶液中添加1M TBAF的四氢呋喃溶液(1.688mL,1.688mmol,1.12当量),将其在室温下搅拌过夜。将反应混合物真空浓缩,通过快速柱色谱(0-100%EtOAc的庚烷溶液,5%Et₃N)进行纯化,得到为无色油状物的ST45DMTrOH(1.74g,产率83%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.44-7.37(m,6H),7.34-7.21(m,18H),7.20-7.12(m,3H),6.82-6.75(m,12H),3.75(s,18H),3.59(q,J=6.5Hz,2H),3.40(t,J=6.5Hz,6H),3.26-3.15(m,10H),3.07(t,J=6.4Hz,6H),1.79(p,J=6.4Hz,6H),1.56-1.39(m,4H),1.37-1.20(m,9H)。

[0401] 8-(3-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)-2,2-双((3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙氧基)甲基)丙氧基)辛基(2-氰基乙基)二异丙基亚磷酰胺(ST45)

[0402] 向ST45DMTrOH(1.9g,1.412mmol)的无水二氯甲烷(25mL)溶液中添加DIPEA(2.466mL,14.12mmol,10当量)和分子筛4A(3.8g),然后冷却至0°C的温度。接着,在5分钟内通过逐滴添加向反应中加入2-氰基乙基N,N-二异丙基氯代亚磷酰胺(0.401g,1.694mmol,1.2当量)。继续再搅拌反应混合物15分钟,同时使其达到室温。将反应混合物在棉塞上过滤,将滤液涂覆在用Et₃N处理的二氧化硅(7.5g)上。通过快速柱色谱(0-100%EtOAc的庚烷溶液,5%Et₃N)进行纯化,得到为透明油状物的ST45(1.37g,产率59%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.44-7.37(m,6H),7.33-7.20(m,18H),7.19-7.13(m,3H),6.82-6.74(m,12H),3.88-3.70(m,20H),3.68-3.52(m,4H),3.39(t,J=6.4Hz,6H),3.30-3.15(m,10H),3.07(t,J=6.4Hz,6H),2.61(t,J=6.6Hz,2H),1.79(h,J=6.5,5.9Hz,6H),1.63-1.54(m,2H),1.50-1.40(m,2H),1.37-1.21(m,8H),1.17(t,J=6.4Hz,12H)。

[0403] 实施例3-核酸缀合物的合成

[0404] 所有寡核苷酸在AKTA oligopilot合成仪上合成。使用市售的固体支持物和2'-O-甲基RNA亚磷酰胺,2'-氟代、2'-脱氧RNA亚磷酰胺和市售的长三倍体亚磷酰胺(STKS)(Glen research)。寡核苷酸合成,去保护和纯化遵循本领域已知的标准程序。寡核苷酸和寡核苷酸缀合物合成由商业寡核苷酸制造商(Biospring, Frankfurt, Germany)进行。



[0406] GalNAc合成子(ST21、ST23、ST31)或三倍体合成子(STKS、ST41、ST43、ST45)的缀合是通过在标准亚磷酰胺偶联条件下将相应的亚磷酰胺偶联到寡链的5'末端来实现。使用标准市售硫醇化试剂(EDITH, Link technologies)来引入硫代磷酸酯。

[0407] 通过使用甲胺水溶液将单链从CPG上切下,并使用氯化钠梯度,将得到的粗制寡核苷酸在AKTA Pure HPLC系统上通过离子交换色谱(Resource Q, 6mL, GE Healthcare)纯化。将含有产物的级分合并,在尺寸排阻柱(Zetadex, EMP Biotech)上脱盐并冻干。

[0408] 对于双链体化,将等摩尔量的各单链溶解在水中并加热至80°C持续5分钟。冷却

后,将得到的双链体冻干。

[0409] 表2:寡核苷酸的质谱数据

	寡核苷酸	MS 实测值	MS 计算值
[0410]	反义链 (TTR 和 STS016)	6943 Da	6943.33 Da
	TTR CF02 有义链	8603.17 Da	8604 Da
	TTR CF02V20 有义链	8490.38 Da	8490.62 Da
	TTR CF02V21 有义链	8554.87 Da	8554.62 Da
	TTR CF02V22 有义链	8310.02 Da	8310.47 Da
	TTR CF02V23 有义链	8374.13 Da	8374.47 Da
	STS016 L4 有义链	8388 Da	8388.47 Da
	STS016 L5 有义链	8471 Da	8472.47 Da
	STS016 L6 有义链	8415 Da	8416.47 Da
[0411]	STS016 L7 有义链	8500 Da	8500.47 Da
	STS016 L8 有义链	8444 Da	8444.47 Da
	STS016 L9 有义链	8528 Da	8528.47 Da
	GN_Luc 反义	6260 Da	6259.93 Da
	GN_Luc 有义	7799 Da	7800.21 Da
	GN_PTENV10F 反义	6320.43 Da	6318 Da
	GN_PTENV10F 有义	7727.24 Da	7727.17 Da

[0412] 比较性核酸缀合物分子TTR CF02的合成

[0413] 寡核苷酸序列:

[0414] 反义链5' **u**(ps)**u**(ps)**a** uag agc aag aac acu g(ps)**u**(ps)**u** 3'

[0415] 有义链3'氨基己基 aau auc ucg uuc uug uga c(ps)a(ps)a 5'

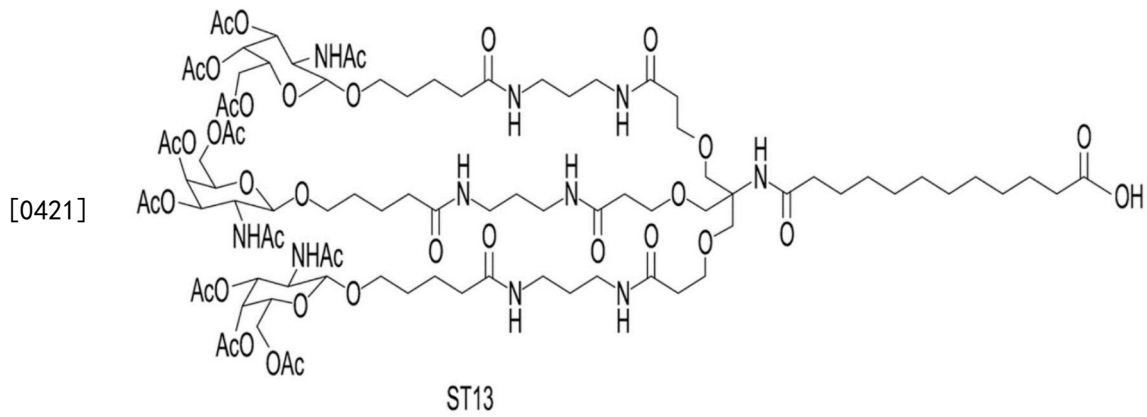
[0416] 修饰关键:

[0417] 粗体=2'OMe核糖核苷酸

[0418] 下划线=2'F/2'脱氧核糖核苷酸

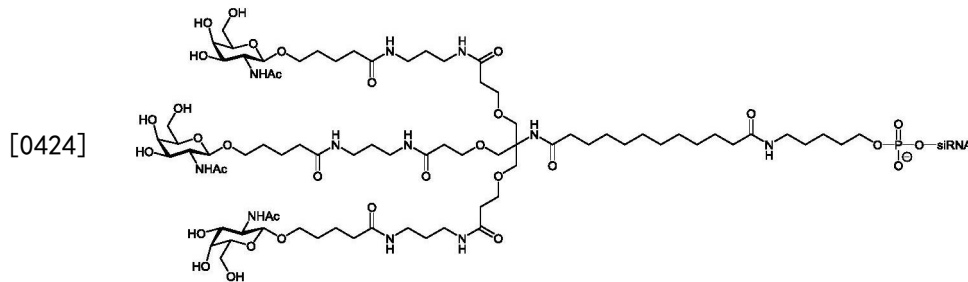
[0419] ps=硫代磷酸酯

[0420] 用GalNAc接头ST13的活化酯(NHS)在合成后修饰有义链:



[0422] ST13的合成和偶联类似于公开的方法 (Ostergaard, *Bioconjug Chem.* 2015 Aug 19; 26(8):1451-5) 进行, 不同之处在于使用NHS代替PFP活性酯。

[0423] 最终缀合物的结构 (TTR CF02):



[0425] 序列:

[0426] 以下序列的修饰关键:

[0427] 粗体=2'-甲基核糖核苷酸

[0428] 下划线=2'氟代/2'脱氧核糖核苷酸

[0429] ps=硫代磷酸酯键

[0430] TTR CF02:

[0431] 反义链 5' **u**(ps)u(ps)**a** uag agc aag aac acu g(ps)u(ps)**u** 3'

[0432] 有义链 3' a(ps)**a**(ps)u **auc ucg uuc uug uga** c(ps)**a**(ps)a 5'

[0433] TTR CF02V20

[0434] 反义链 5' **u**(ps)u(ps)**a** uag agc aag aac acu g(ps)u(ps)**u** 3'

[0435] 有义链 3' a(ps)**a**(ps)u **auc ucg uuc uug uga** caa STKS (ST21)₃ 5'

[0436] TTR CF02V21

[0437] 反义链 5' **u**(ps)u(ps)**a** uag agc aag aac acu g(ps)u(ps)**u** 3'

[0438] 有义链 3' a(ps)**a**(ps)u **auc ucg uuc uug uga** caa (ps) STKS (ps) (ST21)₃ 5'

TTR CF02V22

[0439] 反义链 5' **u**(ps)u(ps)**a** uag agc aag aac acu g(ps)u(ps)**u** 3'

[0440] 有义链 3' a(ps)**a**(ps)u **auc ucg uuc uug uga** caa STKS (ST23)₃ 5'

[0441] TTR CF02V23

[0442] 反义链 5' **u**(ps)u(ps)**a** uag agc aag aac acu g(ps)u(ps)**u** 3'

- [0443] 有义链3'a(ps)a(ps)u auc ucg uuc uug uga caa (ps) STKS (ps) (ST23)₃ 5'
- [0444] 以下序列的修饰关键:
- [0445] f表示2'氟代2'脱氧核糖核苷酸
- [0446] m表示2'0甲基核糖核苷酸
- [0447] (ps)表示硫代磷酸酯键
- [0448] STS016-L4
- [0449] 反义链:
- [0450] 5' mU(ps) fU(ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG(ps) fU(ps) mU 3'
- [0451] 有义链:
- [0452] 5' (ST23(ps))₃ ST41(ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA(ps) fA 3'
- [0453] STS016-L5
- [0454] 反义链:
- [0455] 5' mU(ps) fU(ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG(ps) fU(ps) mU 3'
- [0456] 有义链:
- [0457] 5' (ST31(ps))₃ ST41(ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA(ps) fA 3'
- [0458] STS016-L6
- [0459] 反义链:
- [0460] 5' mU(ps) fU(ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG(ps) fU(ps) mU 3'
- [0461] 有义链:
- [0462] 5' (ST23(ps))₃ ST43(ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA(ps) fA 3'
- [0463] STS016-L7
- [0464] 反义链:
- [0465] 5' mU(ps) fU(ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG(ps) fU(ps) mU 3'
- [0466] 有义链:
- [0467] 5' (ST31(ps))₃ ST43(ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA(ps) fA 3'
- [0468] STS016-L8
- [0469] 反义链:
- [0470] 5' mU(ps) fU(ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG(ps) fU(ps) mU 3'
- [0471] 有义链:
- [0472] 5' (ST23(ps))₃ ST45(ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC

fU mA fU (ps)mA(ps)fA

[0473] STS016-L9

[0474] 反义链:

[0475] 5' mU(ps)fU(ps)mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG(ps)
fU(ps) mU 3'

[0476] 有义链:

[0477] 5' (ST31 (ps))₃ST45(ps)fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC
fU mA fU (ps)mA(ps)fA 3'

[0478] GN Luc(非靶向对照)

[0479] 反义链:

[0480] 5' mU (ps) fC (ps) mGfAmAfGmUfAmUfUmCfCmGfCmGfUmA (ps) fC (ps) mG 3'

[0481] 有义链:

[0482] 5' (ST23 (ps))₃STKS (ps) fCmGfUmAfCmGfCmGfGmAfAmUfAmCfUmUfC (ps) mG (ps) fA
3'

[0483] GN_PTENV10F

[0484] 反义

[0485] 5' mU (ps) fA (ps) fAmGfUmUmCfUmAfGmCfUmGfUmGfGmU (ps) fG (ps) mG 3'

[0486] 有义

[0487] 5' (ST23 (ps))₃STKS (ps) fCmCfAmCfCmAfCmAfGmCfUmAfGmAfAmCfU (ps) mU (ps) fA
3'

[0488] 实施例4-小鼠TTR敲减的体内测定和持续时间

[0489] 以单次皮下注射300uL/kg向8周龄雄性C57BL/6J1aIHsd小鼠注射各剂量(每组4只动物)。

[0490] 在每个时间点处死小鼠,收获肝脏并使用TaqMan分析来分析TTR mRNA。

[0491] 体内靶基因表达:

[0492] 基本上根据Fehring et al.2014所述,从新鲜肝脏组织中分离总RNA:

[0493] 对于靶mRNA敲减分析,在处死小鼠后立即解剖组织并立即在液氮中快速冷冻。使用碳化钨珠粒(Qiagen,Hilden,Germany)将约20mg组织分布均匀在Mixer Mill MM 301(Retsch GmbH,Haan,Germany)中。用Invisorb Spin组织RNA迷你试剂盒(Invisorb Spin Tissue RNA MiniKit,Invitek,Berlin,Germany)从裂解物中分离总RNA。根据组织,使用25ng-100ng 总RNA来定量TaqMan RT-PCR,其中扩增子组自BioTez GmbH,Berlin,Germany获得:用ABI PRISM 7700序列检测器(软件:序列检测系统v1.6.3(ABI Life Technologies))或用StepOnePlus实时PCR系统(ABI),使用RT-PCR的标准方案(如Fehring et al.2014所述),用浓度分别为300nmol/l和100nmol/l的引物和探针进行TaqMan RT-PCR反应。通过使用Ct比较方法来计算TaqMan数据。将mRNA水平针对PTEN标准化。

[0494] 用于检测TTR mRNA的扩增子组

[0495] mmTTR:467U22 TGGACACCAAATCGTACTGGAA

[0496] mmTTR:550L22 CAGAGTCGTTGGCTGTGAAAAC

[0497] mmTTR:492U27FL ACTTGGCATTTCCTCCATGAATT

[0498] 用于检测PTEN mRNA的扩增子组

[0499] PTEN CACCGCCAAATTTAACTGCAGA

[0500] PTEN AAGGGTTTGATAAGTTCTAGCTGT

[0501] PTEN TGCACAGTATCCTTTTGAAGACCATAACCCA

[0502] 以1mg/kg的单次皮下剂量使用上述方法。注射后2天处死小鼠。测试的化合物是TTR CF02、TTR CF02V20、TTRCF02V21、TTRCF02V22和TTRCF02V23。与标准磷酸二酯键(TTR CF02V20和TTR CF02V22)相比,GalNAc接头系统(TTR CF02V21和TTR CF02V23)中硫代磷酸酯的引入显示了显著更大的效力。结果如图2所示。

[0503] 以单次皮下剂量为2mg/kg使用上述方法。在给定时间点(注射后7、14、21和28天)处死小鼠。测试的化合物是PTEN CF02(对照)、TTR CF02、TTR CF02V21和TTR CF02V23。结果如图3所示。

[0504] 实施例5-TTR CF02V21和TTR CF02V23的剂量滴定

[0505] 以单次皮下注射300uL/kg向8周龄雄性C57BL/6J1aIHsd小鼠注射各剂量(3mg/kg、1mg/kg、0.3mg/kg、0.1mg/kg)(每组4只动物)。使用PBS作为对照。两天后,处死小鼠,收获肝脏并使用TAQman分析来分析TTR mRNA。根据实施例4进行样品分析。

[0506] siRNA GalNAc缀合物TTR CF02V21和TTR CF02V23均以剂量依赖性方式非常有效地降低TTR水平。结果如图4所示。

[0507] 实施例6-各种TTR siRNA GalNAc缀合物的TTR敲减的体外确定

[0508] 在肝细胞测定中对各种TTR siRNA缀合物STS016 L4-L9的TTR敲减的体外确定进行确定。

[0509] 根据制造商的方案将原代肝细胞(Life technology)接种到6孔板中(每孔600,000个细胞),并与相应浓度的GalNAc缀合物一起孵育。孵育后24小时收获细胞,分离RNA并使用如实施例4中的Taqman分析进行分析。

[0510] 所有不同的siRNA GalNAc缀合物STS016 L4-L9对降低TTR水平非常有效。结果如图5和6所示。TTR CF02V23表示阳性对照。GN_Luc表示阴性对照。

[0511] 实施例7-小鼠中TTR敲减的体内测定和持续时间

[0512] 以单次皮下注射300uL/kg向8周龄雄性C57BL/6J1a1aHsd小鼠注射1mg/kg的剂量(每组4只动物)。

[0513] 在每个时间点(注射后第8、15、22天)后取血并使用市售的鼠TTR特异性Elisa试剂盒来分析TTR水平。

[0514] 所有不同的siRNA GalNAc缀合物STS016 L4-L9对降低TTR水平非常有效。结果如图7所示。

[0515] 实施例8-小鼠中PTEN敲减的体内测定

[0516] 以单次皮下注射300uL/kg向8周龄雄性C57BL/6J1aHhd小鼠注射各自的剂量(1、3、10mg/kg)(每组4只动物)。使用PBS作为对照。

[0517] 给药后2天,处死小鼠,收获肝脏并使用TAQman分析来分析PTEN mRNA。

[0518] 体内靶基因表达:

[0519] 基本上根据Fehring et al.2014所述,从新鲜肝脏组织中分离总RNA:

[0520] 对于靶mRNA敲减分析,在处死小鼠后立即解剖组织并立即在液氮中快速冷冻。使

用碳化钨珠粒(Qiagen,Hilden,Germany)将约20mg组织分布均匀在Mixer Mill MM 301 (Retsch GmbH,Haan,Germany)中。用Invisorb Spin组织RNA迷你试剂盒(Invisorb Spin Tissue RNA MiniKit,Invitek,Berlin,Germany)从裂解物中分离总RNA。根据组织,使用25ng-100ng 总RNA来定量TaqMan RT-PCR,其中扩增子组自BioTez GmbH,Berlin,Germany获得。用ABI PRISM 7700序列检测器(软件:序列检测系统v1.6.3(ABI Life Technologies))或用StepOnePlus实时PCR系统(ABI),使用RT-PCR的标准方案(如Fehring et al.2014所述),用浓度分别为300nmol/l和100nmol/l的引物和探针进行TaqMan RT-PCR反应。用于 PTEN的TaqMan探针与实施例4中描述的相同。

[0521] 结果如图8所示。证明了明显的剂量依赖性的PTEN敲减。

[0522] 参考文献:

[0523] 1.Fire,A.;Xu,S.;Montgomery,M.K.;Kostas,S.A.;Driver,S.E.;Mello,C.C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.*Nature* 1998,391 (6669),806-11.

[0524] 2.Elbashir,S.M.;Lendeckel,W.;Tuschl,T.,RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs.*Genes&development* 2001,15(2),188-200.

[0525] 3.Dubber,M.;Frechet,J.M.,Solid-phase synthesis of multivalent glycoconjugates on a DNA synthesizer.*Bioconjugate chemistry* 2003,14(1),239-46.

[0526] 4.Weigel,P.H.;Yik,J.H.,Glycans as endocytosis signals:the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors.*Biochim Biophys Acta* 2002,1572(2-3),341-63.

[0527] 5.Ishibashi,S.;Hammer,R.E.;Herz,J.,Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the minor receptor subunit.*J Biol Chem* 1994,269 (45),27803-6.

[0528] 6.Biessen,E.A.;Broxterman,H.;van Boom,J.H.;van Berkel,T.J.,The cholesterol derivative of a triantennary galactoside with high affinity for hepatic asialoglycoprotein receptor:a potent cholesterol lowering agent.*J Med Chem* 1995,38(11),1846-52.

[0529] 7.Akinc,A.;Querbes,W.;De,S.;Qin,J.;Frank-Kamenetsky,M.;Jayaprakash,K.N.; Jayaraman,M.;Rajeev,K.G.;Cantley,W.L.;Dorkin,J.R.;Butler,J.S.;Qin,L.;Racie,T.; Sprague,A.;Fava,E.;Zeigerer,A.;Hope,M.J.;Zerial,M.;Sah,D.W.;Fitzgerald,K.;Tracy,M. A.;Manoharan,M.;Koteliansky,V.;Fougerolles,A.d.;Maier,M.A.,Targeted Delivery of RNAi Therapeutics With Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms.*Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2010,18(7),1357-1364.

[0530] 8.Fehring,V.;Schaeper,U.;Ahrens,K.;Santel,A.;Keil,O.;Eisermann,M.;Giese,K.; Kaufmann,J.,Delivery of therapeutic siRNA to the lung endothelium via novel Lipoplex formulation DACC.*Mol Ther* 2014,22(4),811-20.

[0531] 9.Prakash,T.P.;Brad Wan,W.;Low,A.;Yu,J.;Chappell,A.E.;Gaus,H.;

Kinberger, G. A.; Østergaard, M. E.; Migawa, M. T.; Swayze, E. E.; Seth, P. P., Solid-phase synthesis of 5'-triantennary N-acetylgalactosamine conjugated antisense oligonucleotides using phosphoramidite chemistry. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2015, 25(19), 4127-4130.

[0532] 10. Li, L.-C.; Okino, S. T.; Zhao, H.; Pookot, D.; Place, R. F.; Urakami, S.; Enokida, H.; Dahiya, R., Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103(46), 17337-17342.

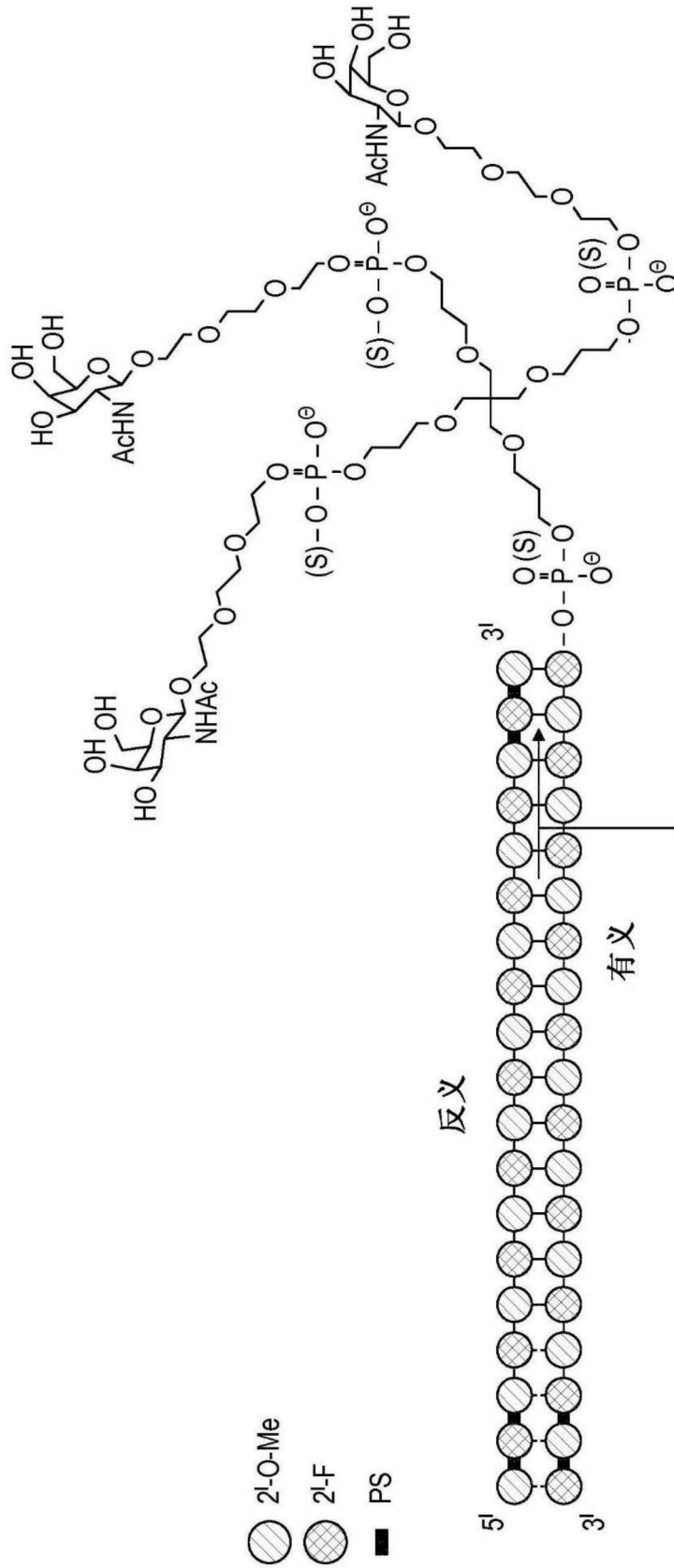


图1

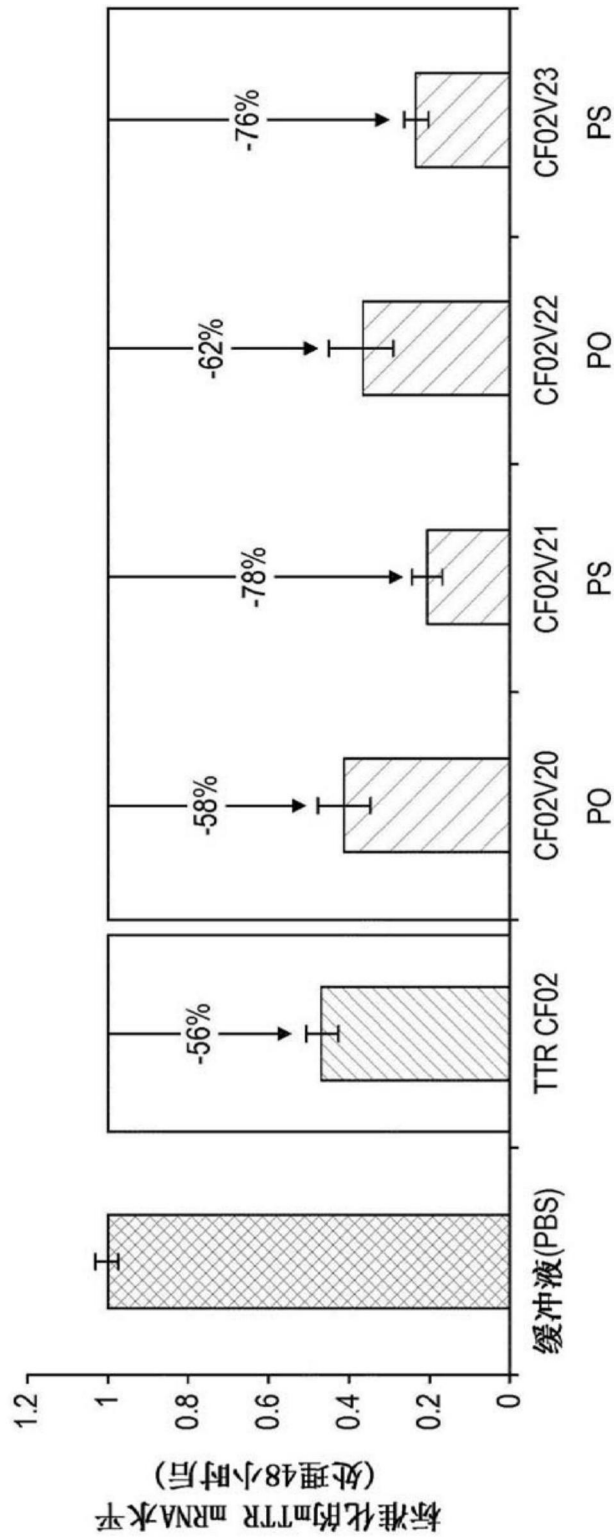


图2

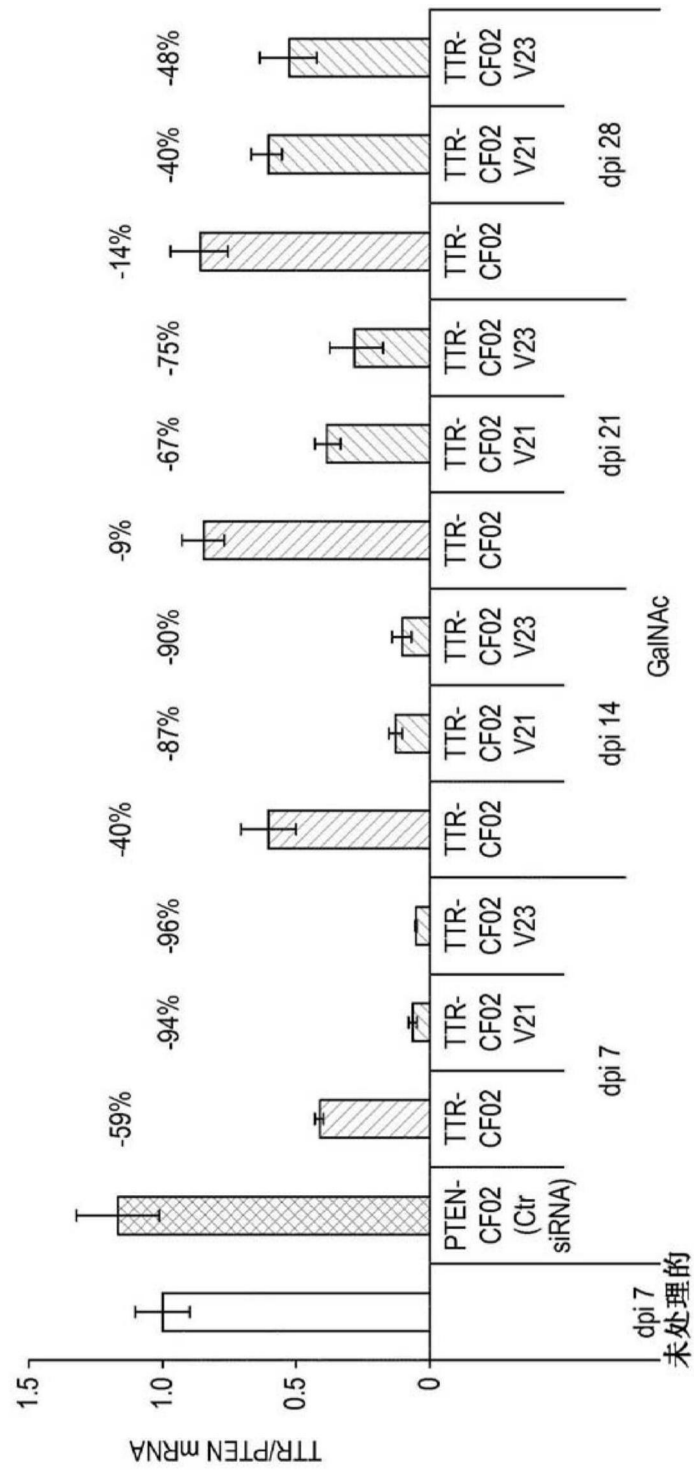


图3

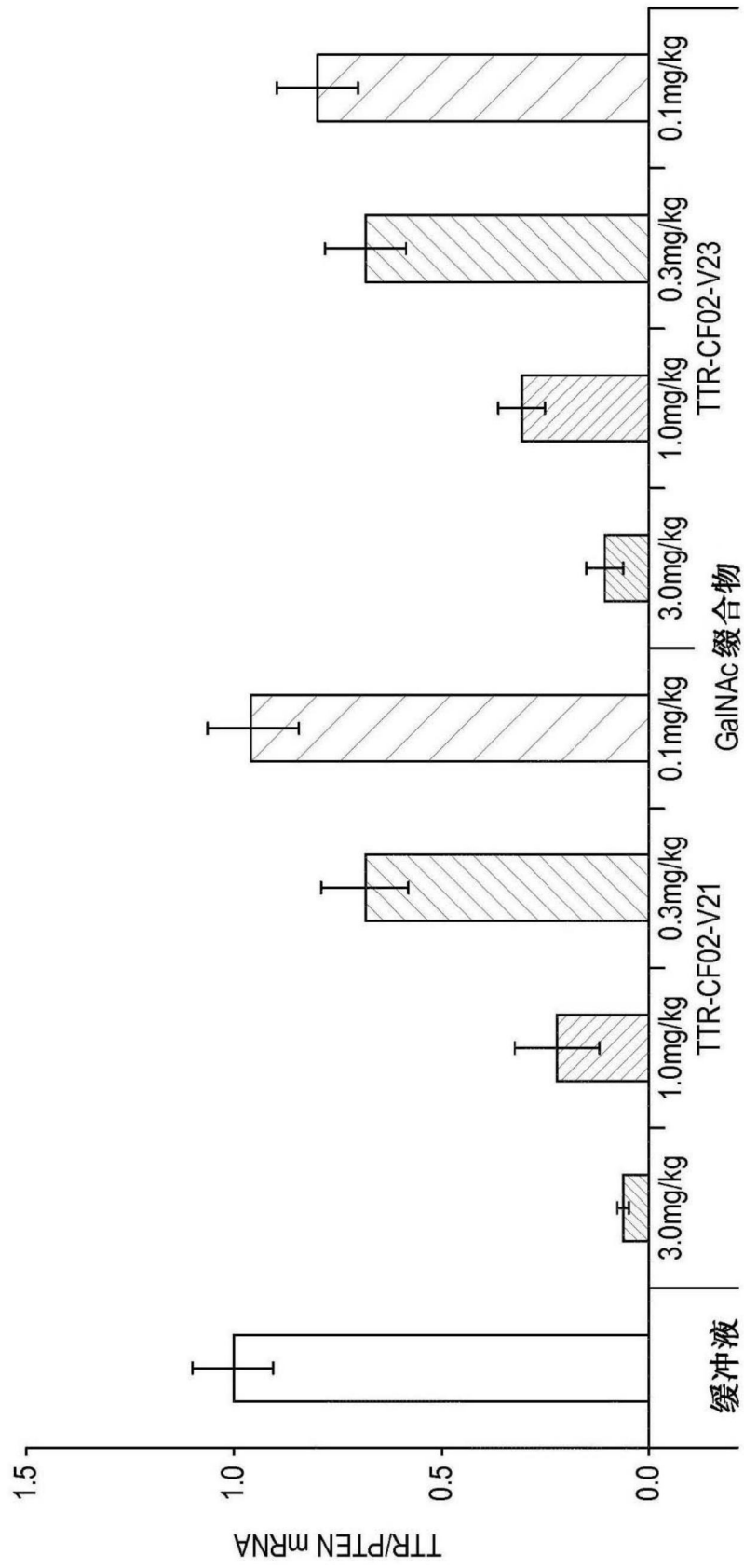


图4

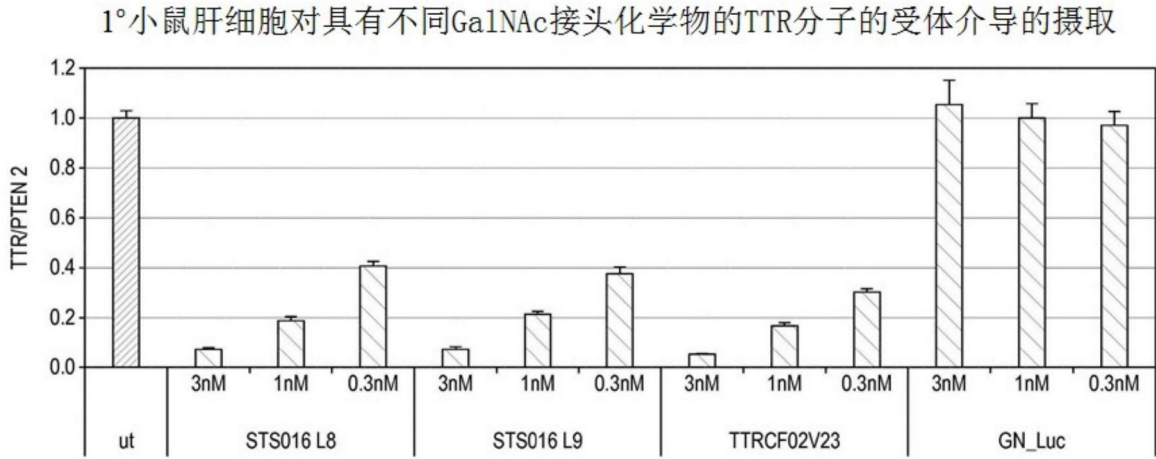


图5

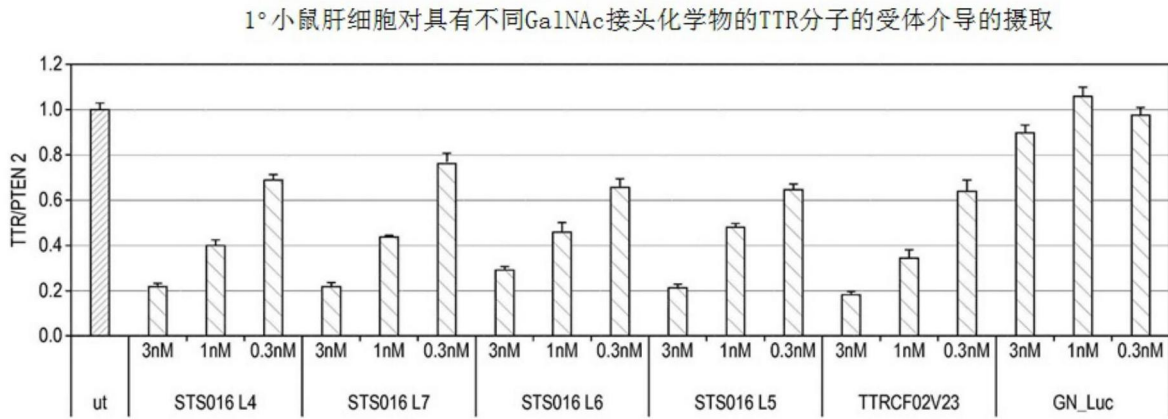


图6

在皮下给药1mg/kg GalNAc-TTR接头缀合物后的指定时间点时C57BL/6小鼠中的血清TTR(平均值±SD, n=4)

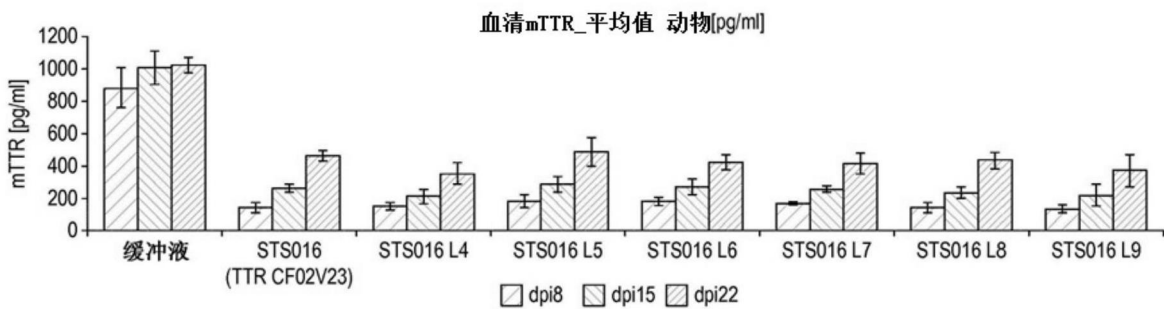


图7

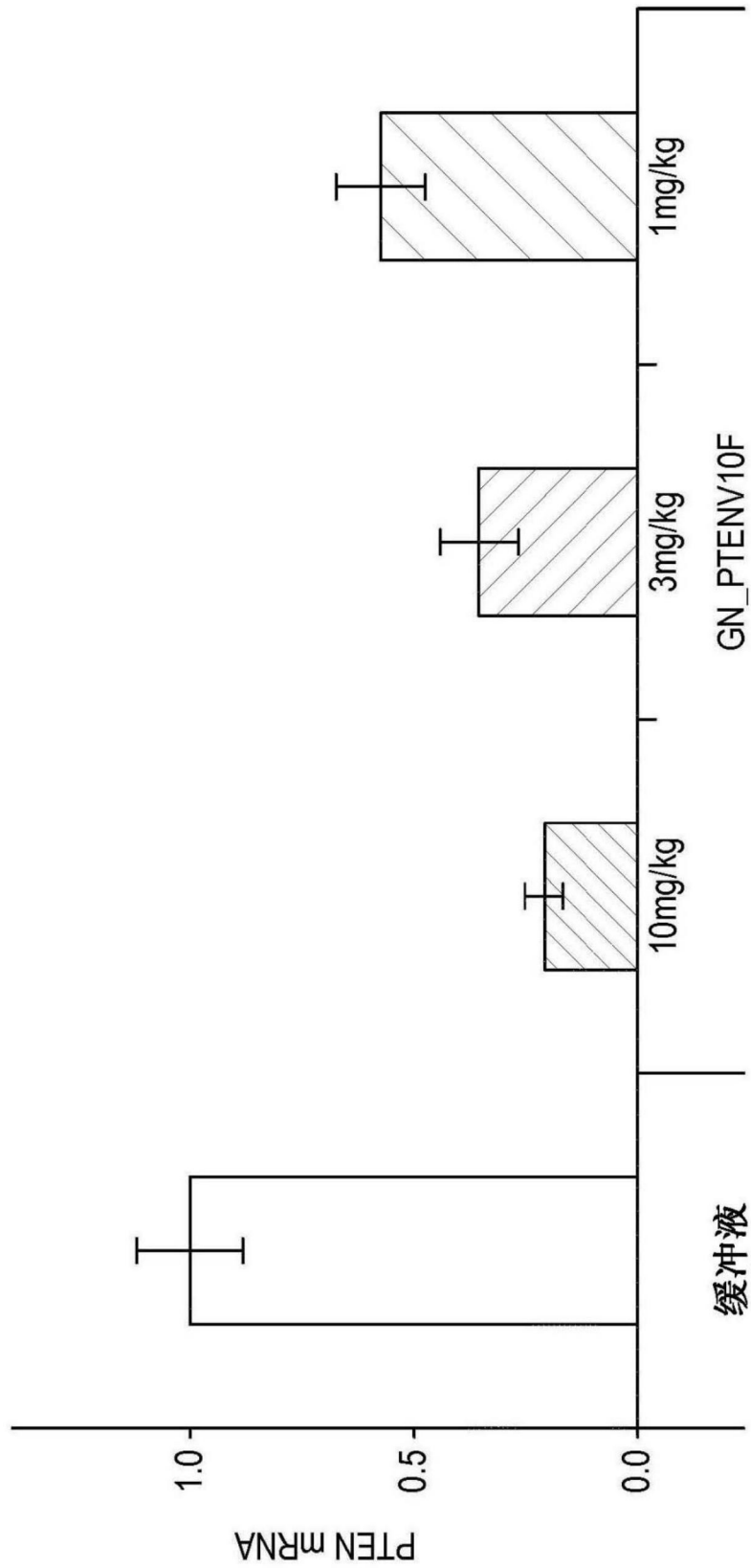


图8