



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101983241 A

(43) 申请公布日 2011. 03. 02

(21) 申请号 200880123480. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 11. 05

C12N 15/11 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/68 (2006. 01)

60/985, 552 2007. 11. 05 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/FI2008/050635 2008. 11. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02009/060124 EN 2009. 05. 14

(71) 申请人 波罗的科技发展有限公司

地址 爱沙尼亚塔林

(72) 发明人 马蒂·卡拉尔森 埃尔基·特鲁维

埃兰·奥斯佩特

塞西莉亚·萨米恩托 马特·萨尔玛

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

权利要求书 2 页 说明书 22 页 序列表 6 页

附图 11 页

(54) 发明名称

带有修饰碱基的寡核苷酸在核酸杂交中的应用

(57) 摘要

本发明涉及抑制靶核酸的表达,或者检测靶核酸或者靶核酸的 PCR 扩增,包括:将修饰的至少部分互补的寡核苷酸与所述靶核酸的链杂交,其中的寡核苷酸包括下列修饰的核碱基中的一种: 5- 巯基胞嘧啶,5- 巯基尿嘧啶,8- 巯基鸟嘌呤, 8- 巯基腺嘌呤,5- 羟基胞嘧啶,5- 羟基尿嘧啶, 8- 羟基腺嘌呤和 8- 羟基鸟嘌呤。

1. 一种抑制靶核酸表达的方法,所述方法包括:

将已知序列的靶核酸和具有与所述靶核酸的链至少部分互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸,在允许所述修饰的寡核苷酸与所述靶核酸的链杂交的条件下相接触,

其中杂交的修饰的寡核苷酸抑制靶核酸的表达,

其中修饰的寡核苷酸包含 5 到 150 个核碱基,并且

其中修饰的寡核苷酸的至少一个核碱基是修饰的核碱基,所述修饰的核碱基选自: 5- 巯基胞嘧啶,5- 巯基尿嘧啶,8- 巯基鸟嘌呤,8- 巯基腺嘌呤,5- 羟基胞嘧啶,5- 羟基尿嘧啶,8- 羟基腺嘌呤和 8- 羟基鸟嘌呤。

2. 权利要求 1 的方法,其中表达被抑制至少 20%。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中修饰的寡核苷酸是 RNA。

4. 权利要求 3 的方法,其中 RNA 是单链的。

5. 权利要求 3 的方法,其中 RNA 是双链的,并且其中 RNA 的至少一条链包含至少一个修饰的核碱基。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法,其中靶核酸在细胞中,并且接触包括将修饰的寡核苷酸导入到细胞中。

7. 权利要求 6 的方法,其中接触选自用修饰的寡核苷酸转化和转染细胞。

8. 权利要求 1-5 任一项的方法,其中靶核酸在生物体的细胞中,并且其中接触包括向生物体施用含有修饰的寡核苷酸和可药用载体的组合物。

9. 权利要求 8 的方法,其中生物体是哺乳动物。

10. 权利要求 9 的方法,其中生物体是人类。

11. 一种使用修饰的寡核苷酸检测靶核酸的方法,所述方法包括:

将靶核酸与修饰的寡核苷酸在允许所述修饰的寡核苷酸与所述靶核酸的链杂交的条件下相接触,

其中修饰的寡核苷酸包含与靶核酸链的序列至少部分互补的核碱基序列,以及

其中修饰的寡核苷酸的至少一个核碱基是修饰的核碱基,所述修饰的核碱基选自: 5- 巯基胞嘧啶,5- 巯基尿嘧啶,8- 巯基鸟嘌呤,8- 巯基腺嘌呤,5- 羟基胞嘧啶,5- 羟基尿嘧啶,8- 羟基腺嘌呤和 8- 羟基鸟嘌呤;并且

通过检测与靶核酸链杂交的修饰的寡核苷酸来检测靶核酸。

12. 权利要求 11 的方法,其中靶核酸被固定到固相载体上。

13. 权利要求 12 的方法,其中固定化的靶核酸是 DNA。

14. 权利要求 12 的方法,其中固定化的靶核酸是 RNA。

15. 权利要求 11-14 任一项的方法,其中检测是定量的。

16. 一种聚合酶链反应 (PCR) 方法,所述方法包括:

将模板核酸与修饰的寡核苷酸相接触,所述修饰的寡核苷酸包含与模板核酸的一部分充分互补的序列,从而允许所述修饰的寡核苷酸与所述模板核酸在 PCR 退火条件下杂交,

其中杂交的修饰的寡核苷酸用作 PCR 引物,用于在 PCR 扩增条件下产生第一条 PCR 产物链,以及

其中修饰的寡核苷酸包含 5 到 150 个核碱基,其中至少一个核碱基是修饰的核碱基,所述修饰的核碱基选自: 5- 巯基胞嘧啶,5- 巯基尿嘧啶,8- 巯基鸟嘌呤,8- 巯基腺嘌呤,5- 羟

基胞嘧啶,5-羟基尿嘧啶,8-羟基腺嘌呤和8-羟基鸟嘌呤。

17. 权利要求16的方法,其中PCR包括:

制备含有热稳定的DNA聚合酶、模板核酸、修饰的寡核苷酸和核苷酸的反应混合物。

18. 权利要求17的方法,其中PCR反应混合物还包含第二种寡核苷酸,它含有与靶核酸链的一部分或第一条PCR产物链的一部分之一互补的核苷酸序列。

19. 权利要求18的方法,其中第二种寡核苷酸是修饰的寡核苷酸,其中修饰的寡核苷酸含有5到150个核碱基,其中至少一个核碱基是修饰的核碱基,所述修饰的核碱基选自:5-巯基胞嘧啶,5-巯基尿嘧啶,8-巯基鸟嘌呤,8-巯基腺嘌呤,5-羟基胞嘧啶,5-羟基尿嘧啶,8-羟基腺嘌呤和8-羟基鸟嘌呤。

20. 权利要求16-19任一项的方法,其中模板核酸是DNA。

21. 权利要求16-19任一项的方法,其中模板核酸是RNA。

22. 权利要求16-21任一项的方法,其中扩增产物被实时定量。

23. 权利要求16-22任一项的方法,其中聚合酶链反应包含下列重复的步骤:将模板核酸变性,将修饰的寡核苷酸与模板核酸在退火条件下退火,以及通过延伸退火的修饰的寡核苷酸而合成聚合酶链反应产物。

24. 权利要求1-23任一项的方法,其中修饰的寡核苷酸包含可检测的标记。

25. 权利要求1-24任一项的方法,其中杂交条件包括pH在4到10之间。

26. 权利要求25的方法,其中pH在4到6之间。

27. 权利要求1-26任一项的方法,其中修饰的寡核苷酸具有10到100个核碱基的长度。

28. 权利要求1-26任一项的方法,其中修饰的寡核苷酸具有10到50个核碱基的长度。

29. 权利要求1-26任一项的方法,其中修饰的寡核苷酸具有20到30个核碱基的长度。

30. 权利要求1-29任一项的方法,其中修饰的寡核苷酸中0.5%到40%的核碱基包括巯基核碱基或羟基核碱基。

31. 在靶核酸的扩增方法中的改进,所述方法包括将与靶核酸的至少一部分互补的寡核苷酸引物退火至靶核酸,所述改进包括使用修饰的寡核苷酸作为寡核苷酸引物,其中修饰的寡核苷酸包含一个或多个修饰的核碱基,所述修饰的核碱基选自:5-巯基胞嘧啶,5-巯基尿嘧啶,8-巯基鸟嘌呤,8-巯基腺嘌呤,5-羟基胞嘧啶,5-羟基尿嘧啶,8-羟基腺嘌呤和8-羟基鸟嘌呤。

32. 权利要求31的改进,其中扩增方法是指数扩增方法。

33. 权利要求31的改进,其中扩增方法是聚合酶链反应(PCR)。

带有修饰碱基的寡核苷酸在核酸杂交中的应用

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2007 年 11 月 5 日提交的美国临时专利申请号 60/985,552 的优先权,该临时申请在此以其全文引为参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及含有特异性修饰的 DNA 碱基的修饰的寡核苷酸的应用,用于核酸杂交、核酸扩增(例如使用聚合酶链反应(PCR))和 siRNA 介导的基因沉默(RNAi)。

[0004] 发明背景

[0005] 寡核苷酸和修饰的寡核苷酸的应用在现代疗法中是极为重要的,并已经有详尽记录(Uhlmann 等, Antisense oligonucleotides: A new therapeutic principle. (反义寡核苷酸:新的治疗原理) Chemical Reviews 1990, 90:543-584; Crooke 等《反义研究和应用》(Antisense Research and Applications), CRC Press (1993); Mesmaekar 等, "Antisense oligonucleotides" (反义寡核苷酸), Acc. Chem. Res. 1995, 28:366-374; Stein. "The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed." (反义寡核苷酸的实验应用:困惑指南) J. Clin. Invest. 2001, 108, 641-644)。反义多核苷酸与 DNA 或 RNA 靶的特异性结合,可以使核酸的复制、转录或翻译失活,从而提供了用于控制疾病例如癌症和病毒感染的机制。因此,反义寡核苷酸与靶的结合可用于在各种不同的情况下改变基因表达,例如干扰病毒的生命周期或癌细胞的生长。

[0006] 结合性寡核苷酸的阵列,已经成为生物技术业和相关领域中越来越重要的工具。这些沉积在固相载体表面上的阵列应用于许多领域,包括药物筛选、核酸测序、突变分析等。

[0007] 例如,核酸杂交已经变成鉴定、测量和检测特定核酸在给定样品中的存在的越来越重要的手段。因此,医学诊断、法医、环境和食品检测,都受益于使用核酸杂交作为测试样品中给定生物污染物或微生物的存在或不存在的快速、简单和精确的方式。从机械上说,核酸杂交利用了单链核酸与具有互补核苷酸序列的核酸链的相应区域形成稳定的杂交体的能力。这样的杂交体通常由双链的双链体组成,尽管三链结构也是已知的。在核酸双链体中,每个碱基对都对稳定性有贡献。因此,双链体越短,每个单独的碱基对对双链体稳定性的相对贡献越大。因此,对于较短的寡核苷酸来说,完美匹配与错配之间稳定性的差异将较大。但是,因为短的寡核苷酸杂交弱,可以使用结合更强的核苷酸来增强它。

[0008] 已经开发了许多方法用于核酸的指数扩增。它们包括聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、自动维持序列扩增(3SR)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、链置换扩增(SDA)以及使用 Q-Beta 复制酶的扩增。PCR 的成功依赖于与 DNA 单链结合的引物的效率。同样,结合越强,在给定循环中扩增的 DNA 越多。

[0009] 目前认为,哺乳动物中 RNA 诱导的基因沉默涉及最少三种不同水平的控制:(i) 转录失活(siRNA 指导的 DNA 和组蛋白甲基化);(ii) 小干扰 RNA(siRNA) 诱导的 mRNA 降解;以及(iii) mRNA 诱导的转录弱化。通过 siRNA 产生的 RNA 干扰(RNAi)可以在多次细胞分

裂过程中长期持续和有效。因此,通过 siRNA 介导的方法评估基因功能以及开发用于过表达基因的疗法的能力,代表了激动人心的有价值的工具,将加速基因功能分析、药物靶验证和基因组范围的研究。

[0010] 在所有上述领域中,已经尝试了通过使用修饰的核苷酸来增加效率。因此,已经构建了许多在含氮碱基处具有修饰的寡核苷酸衍生物,包括将腺苷 6 位的氨基用氢取代产生嘌呤;将鸟苷的 6-酮基氧用氢取代产生 2-氨基嘌呤,或用硫取代产生 6-硫代鸟苷,以及将胸苷的 4-酮基氧用硫或氢取代,分别产生 4-硫代胸苷或 4-氢胸苷。所有这些核苷酸类似物可以用作反应试剂来合成寡核苷酸。同样地,已经报道了许多核苷酸衍生物具有呋喃核糖或呋喃脱氧核糖部分的修饰。大多数含有这样的修饰碱基的寡核苷酸的配制,是着眼于增加细胞摄入、核酸酶抗性和 / 或增加底物的结合。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明涉及含有修饰的核碱基的寡核苷酸,这增加了它们与互补核酸结合的能力,并可以增加它们与核酸互补链的杂交。依赖于所公开的化合物的寡核苷酸部分中修饰的核碱基的数量性质,化合物与互补靶核酸的结合能力,与典型的互补寡核苷酸相比,可以显著增加。

[0013] 本发明的主题是在核酸的杂交、聚合酶链反应 (PCR) 和 siRNA 介导的基因沉默 (RNAi) 中这样的修饰的寡核苷酸类似物的应用。本发明的一个方面是用作核酸杂交的标记探针的寡核苷酸类似物。该杂交尤其包括将探针与 DNA 杂交 (例如 Southern 杂交)、与 RNA 杂交 (例如 Northern 杂交),将探针与结合在芯片上的任何核酸序列杂交等。本发明的另一方面是在 PCR 反应过程中用作 PCR 引物的一种寡核苷酸类似物或一对或多对寡核苷酸类似物。这些 PCR 反应包括例如常规 PCR、实时 PCR、反向录 PCR 等,概括地说包括下述的所有不同反应,所述反应中发生磷酸二酯键的重复催化合成,通过用高温变性先前合成的双链核酸链来打断合成。本发明的另一方面是寡核糖核苷酸类似物,其与未修饰的寡核糖核苷酸或可以选择与另一个修饰的寡核糖核苷酸一起使用,以退火短干扰 RNA (siRNA),并使用该退火的 siRNA 来沉默与相应 siRNA 互补的核酸序列。所提到的 siRNA 可以使用转染、微注射、轰击、病毒载体或其他技术,导入到细胞中。所提到的沉默意味着例如靶核酸的序列特异性降解或靶核酸的序列特异性翻译抑制。

[0014] 有鉴于本发明的修饰的寡核苷酸超常的结合力,本发明的一个方面是抑制靶核酸表达的方法,包括将已知序列的靶核酸与具有与所述靶核酸的链至少部分互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸,在允许修饰的寡核苷酸与靶核酸的链杂交的条件下相接触,其中杂交的修饰的寡核苷酸抑制了靶核酸的表达,其中修饰的寡核苷酸包含 5 到 150 个核碱基,其中修饰的寡核苷酸的至少一个核碱基是修饰的核碱基,选自:5-巯基胞嘧啶,5-巯基尿嘧啶,8-巯基鸟嘌呤,8-巯基腺嘌呤,5-羟基胞嘧啶,5-羟基尿嘧啶,8-羟基腺嘌呤和 8-羟基鸟嘌呤。

[0015] 一个方面,靶核酸的表达被抑制至少 20%。在某些方面,靶核酸是 RNA,在其他方面修饰的寡核苷酸本质上是单链的。在某些方面,修饰的寡核苷酸与另一个寡核苷酸一起使用,并且是双链的,其中两条链中的至少一条链是含有至少一个修饰的核碱基的修饰的寡核苷酸。

[0016] 本发明的另一方面涉及细胞中的靶核酸,以及修饰的寡核苷酸与靶核酸的接触,

包括将修饰的寡核苷酸导入到细胞中。在这些方面的一些中,接触选自用修饰的寡核苷酸转化和转染细胞。

[0017] 在其他方面,靶核酸在生物体的细胞中,接触包括向生物体施用含有修饰的寡核苷酸和可药用载体的组合物。在某些实施方案中,组合物还包含投送载体,例如脂质体。在各种不同方面,生物体是哺乳动物,在其他方面是人类。

[0018] 除了上述之外,作为另外的情况,本发明包括了使用修饰的寡核苷酸检测靶核酸的方法,包括将靶核酸与修饰的寡核苷酸,在允许修饰的寡核苷酸与所述靶核酸(可以具有1、2条或更多的链,通常为1或2条链)的链杂交的条件下相接触,其中修饰的寡核苷酸包含与靶核酸链的序列至少部分互补的核碱基序列,并且其中修饰的寡核苷酸的至少一个核碱基是修饰的核碱基,选自:5-巯基胞嘧啶,5-巯基尿嘧啶,8-巯基鸟嘌呤,8-巯基腺嘌呤,5-羟基胞嘧啶,5-羟基尿嘧啶,8-羟基腺嘌呤和8-羟基鸟嘌呤;并且通过检测与靶核酸链杂交的修饰的寡核苷酸来检测靶核酸。

[0019] 在某些方面,靶核酸被固定化到固相载体上。在其他方面,固定化的靶核酸是DNA或RNA。在某些上述的方面,检测在本质上是定量的。例如,杂交的测量为靶核酸的量提供了绝对或相对的量度。

[0020] 本发明的另一方面是聚合酶链反应(PCR)方法,包括将模板核酸与修饰的寡核苷酸相接触,所述修饰的寡核苷酸包含与模板核酸的一部分充分互补的序列,从而允许修饰的寡核苷酸与模板核酸在PCR退火条件下杂交,其中杂交的修饰的寡核苷酸在PCR扩增条件下用作PCR引物,以产生第一条PCR产物链,并且其中修饰的寡核苷酸包含5到150个核碱基,其中至少一个核碱基是修饰的核碱基,选自:5-巯基胞嘧啶,5-巯基尿嘧啶,8-巯基鸟嘌呤,8-巯基腺嘌呤,5-羟基胞嘧啶,5-羟基尿嘧啶,8-羟基腺嘌呤和8-羟基鸟嘌呤。

[0021] 在某些方面,PCR包括制备含有热稳定DNA聚合酶、模板核酸、修饰的寡核苷酸和核苷酸(例如dATP、dTTP、dCTP、dGTP)的反应混合物。在PCR反应中使用的试剂,包括MgCl₂、缓冲液等,是众所周知的。

[0022] 在其他方面,PCR反应混合物还包含第二种寡核苷酸,它含有与靶核酸链的一部分或第一条PCR产物链的一部分之一互补的核苷酸序列。在各种不同方面,第二种寡核苷酸是修饰的寡核苷酸,其中修饰的寡核苷酸含有5到150个核碱基,其中至少一个核碱基是修饰的核碱基,选自:5-巯基胞嘧啶,5-巯基尿嘧啶,8-巯基鸟嘌呤,8-巯基腺嘌呤,5-羟基胞嘧啶,5-羟基尿嘧啶,8-羟基腺嘌呤和8-羟基鸟嘌呤。在某些方面,模板核酸是DNA,而在其他方面模板核酸是RNA。

[0023] 本发明还提供了其中扩增产物被实时定量的方法。

[0024] 在其他方面,聚合酶链反应包含使模板核酸变性、将修饰的寡核苷酸与模板核酸在退火条件下退火、以及通过延伸退火的修饰的寡核苷酸合成聚合酶链反应产物的重复的步骤。

[0025] 在本发明的某些实施方案中,修饰的寡核苷酸包含可检测的标记。

[0026] 在某些方面,本发明的方法提供的杂交条件包括4到10之间的pH。在其他方面,杂交条件包括4到6之间的pH。

[0027] 在本发明的某些变体中,预期本发明提供的修饰的寡核苷酸具有10到100个核碱基的长度。在各种不同的方面,修饰的寡核苷酸的长度为10到50个核碱基。在其他方面,

修饰的寡核苷酸的长度为 20 到 30 个核碱基。

[0028] 在某些方面,修饰的寡核苷酸中 0.5%到 40%的核碱基是巯基-或羟基-核碱基。

[0029] 除了上述之外,作为其他方面,本发明包括了以任何方式在范围上比上面具体提到的变体更窄的本发明的所有实施方案。例如,尽管出于简要的目的,本发明的情况已经可以用类属或值的范围进行描述作为参考,但应该理解,类属的每个成员和范围内的每个值或子范围都旨在作为本发明的方面。同样地,本发明的各种不同方面和特点可以组合,产生旨在处于本发明的范围之内其他方面。

[0030] 以单数形式(包括使用不带数量指示的名词形式)描述的本发明的方面,应该被理解为包括了包含一或一以上的实施方案,除非上下文明显需要较狭义的解释。术语“包含”旨在允许附加的要素或特点。

[0031] 尽管申请人发明了随附的权利要求书的整个范围,但随附的权利要求书不打算在其范围内包含其他人的现有技术的工作。因此,在专利局或其他团体或个人就权利要求范围内法定的现有技术提请申请人注意的情况下,申请人保留在可适用专利法规下行使修改权来重新限定所述权利要求的主题内容,以便从这样的权利要求范围内具体排除这些法定现有技术或法定现有技术的明显变体的权利。由这样的修改的权利要求书限定的本发明的变体也打算作为本发明的方面。

[0032] 附图简述

[0033] 图 1 描绘了浓度为 1pmol 的修饰的寡核苷酸的相对结合效率的多项式拟合。

[0034] 图 2 描绘了浓度为 5pmol 的修饰的寡核苷酸的相对结合效率的多项式拟合。

[0035] 图 3 描绘了修饰的寡核苷酸与 1ng DNA 的相对结合效率的多项式拟合。

[0036] 图 4 描绘了修饰的寡核苷酸与 5ng DNA 的相对结合效率的多项式拟合。

[0037] 图 5 描绘了修饰的寡核苷酸在杂交中的效率。

[0038] 图 6 描绘了修饰的寡核苷酸与 1.25ng 互补 mRNA 的相对结合效率的多项式拟合。

[0039] 图 7 描绘了修饰的寡核苷酸与 2.5ng 互补 mRNA 的相对结合效率的多项式拟合。

[0040] 图 8 描绘了对于不同靶浓度来说,寡核苷酸 f1 在不同 pH 值下相对结合效率的多项式拟合。

[0041] 图 9 描绘了对于不同靶浓度来说,寡核苷酸 f2 在不同 pH 值下相对结合效率的多项式拟合。

[0042] 图 10 描绘了修饰的寡核苷酸在 PCR 中的利用。显示了带有修饰碱基的寡核苷酸相对于 PCR 中增加的退火温度的适用性和效率。

[0043] 图 11 描绘了修饰的 siRNAs 对 eGFP 转入基因表达的影响。

[0044] 发明详述

[0045] 本发明提供了含有寡核苷酸的新的化合物,它具有用于反义和其他使用寡核苷酸的方法的性质。本发明的化合物包括具有一个或多个修饰的核碱基的反义和其他寡核苷酸,它们与天然核碱基具有高的结合效率。包含修饰的寡核苷酸的化合物可用于核酸的杂交、PCR 和 siRNA 介导的基因沉默(RNAi)。

[0046] 寡核苷酸

[0047] 在本发明的背景中,术语“寡核苷酸”是指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)的寡聚物或多聚物,或其模拟物、嵌合体、类似物和同系物。该术语包括由天然存在的核碱

基、糖和共价的核苷间（骨架）连键组成的寡核苷酸，以及具有非天然存在的部分的寡核苷酸，这些非天然存在的部分在例如与靶核酸杂交或与互补寡核苷酸相互作用时，以类似天然存在的寡核苷酸的方式发挥作用。这样的修饰的或取代的寡核苷酸与天然形式相比往往是优选的，因为它们具有期望的性质，例如细胞摄入增强、对靶核酸的亲合性增加和在存在核酸酶情况下稳定性增加。

[0048] 本发明的化合物与生物学配对物（例如 RNA 和 / 或 DNA）结合的增强的效率，是通过掺入修饰的核碱基或其他具有两性离子或离子互变异构体的类似物来获得的。本发明的化合物有至少一个核碱基具有修饰的核碱基或其他具有两性离子或离子互变异构体的类似物。在优选实施方案中，修饰的核碱基是选自 5- 羟基胞嘧啶和 8- 羟基鸟嘌呤的羟基核碱基，或选自 5- 巯基胞嘧啶、5- 巯基尿嘧啶、8- 巯基鸟嘌呤和 8- 巯基腺嘌呤的巯基核碱基。正如在引为参考的美国专利公布 US20070259830 和国际专利公布 WO 2007/125173 中证明的，在羟基核碱基或巯基核碱基与靶核酸的核碱基之间可以发生更稳定的氢键结合，因此它们可以被认为与互补核酸链更有效地结合。

[0049] 修饰的核碱基中酸性互变异构基团可以是任何其他的酸性基团，例如 -SH、-COOH、-SO₃H 等。

[0050] 在一个实施方案中，寡核苷酸包含 5- 羟基尿嘧啶阴离子的一种或多种互变异构形式。在另一个实施方案中，本发明的化合物包括羟基核碱基 5- 羟基胞嘧啶。在另一个实施方案中，羟基核碱基是 8- 羟基腺嘌呤及其阴离子的互变异构形式。本发明的另一个实施方案提供了由 8- 羟基鸟嘌呤及其阴离子的互变异构形式修饰的本发明的化合物。这些核碱基的互变异构形式在 WO 2007/125173 中更详细地描述，该专利在此引为参考。

[0051] 本文中考虑到的其他修饰的核碱基包括巯基修饰的核碱基。巯基修饰的嘧啶和嘌呤的合成在本技术领域是已知的（参见例如《杂环化合物化学：嘧啶》，增补本 1，第 16 册（Chemistry of Heterocyclic Compounds: The Pyrimidines, Supplement 1, Volume 16），D. J. Brown 主编，John Wiley & Sons, Inc., 1970, pp. 202-229；以及 Khalyullin 等“缩合的嘌呤”（Condensed purines），Pharmaceutical Chemistry Journal, 1992, 26: 270-284）。考虑到的巯基核碱基包括 5- 巯基胞嘧啶、5- 巯基尿嘧啶、8- 巯基鸟嘌呤和 8- 巯基腺嘌呤。

[0052] 在本文中使用时，每个羟基核碱基当与相对的核碱基稳定地形成氢键时，被认为与该核碱基互补。因此，在某些情况下，5- 羟基尿嘧啶与腺嘌呤互补，5- 羟基胞嘧啶与鸟嘌呤互补，8- 羟基腺嘌呤与尿嘧啶和 / 或胸腺嘧啶互补，8- 羟基鸟嘌呤与胞嘧啶互补。羟基核碱基与靶核酸的核碱基可以发生其他稳定的氢键键合，因此羟基核碱基被认为同与其发生稳定的氢键键合的靶核酸的核碱基互补。

[0053] 在本发明的给定化合物中，羟基核碱基和 / 或巯基核碱基的数量，是化合物的寡核苷酸部分的核碱基总数的至少 1% 到最高 100%。在本发明的化合物中存在一种以上羟基核碱基或巯基核碱基的情况下，羟基核碱基或巯基核碱基可以是相同的或不同的（以不同碱基和 / 或修饰类型的任何组合）。预期在本文描述的寡核苷酸中，10% 到 90%、20% 到 80%、30% 到 70%、40% 到 60% 或 50% 的核碱基是修饰的核碱基。此外，预期 10、20、30、40、50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 的核碱基是修饰的核碱基。

[0054] 本发明的化合物优选包含大约 5 到大约 150 个核碱基（即从大约 5 到大约 150 个连接的核苷）。本技术领域的普通专业人员将会认识到，本发明包含了长度为 5、6、7、8、

9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149 和 150 个核碱基的化合物。

[0055] 在一个优选实施方案中,本发明的化合物长度为 10 到 100 个核碱基。本技术领域的普通专业人员将会认识到,这包含了长度为 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100 个核碱基的化合物。

[0056] 在另一个优选实施方案中,本发明的化合物长度为 10 到 50 个核碱基。本技术领域的普通专业人员将会认识到,这包含了长度为 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 个核碱基的化合物。

[0057] 在另一个优选实施方案中,本发明的化合物长度为 20 到 30 个核碱基。本技术领域的普通专业人员将会认识到,这包含了长度为 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核碱基的化合物。

[0058] 特别优选的化合物是从大约 10 到大约 50 个核碱基的寡核苷酸,更优选是含有大约 20 到大约 30 个核碱基的寡核苷酸,在样品测试中用作抗病毒剂的化合物由 21 或 23 个核碱基构成。

[0059] 正如上面陈述的,寡核苷酸可以包含 100% 修饰的核碱基。照此,依赖于寡核苷酸的长度,寡核苷酸可以包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149 或 150 个修饰的核碱基,其中修饰的碱基是巯基核碱基或羟基核碱基。

[0060] 本发明的化合物任选还包含螯合性部分。螯合性部分起到金属配体的作用。它们能够稳定地螯合金属离子。某些金属配体复合物已被显示能够有效地切开磷酸二酯键。在具有反义活性的寡核苷酸中引入螯合性部分,由于其降解或切开靶核酸的一个或多个磷酸二酯键的能力,增加了寡核苷酸抑制靶核酸的功效。因此,本发明的化合物进一步包含了能够螯合金属离子的螯合性部分。金属离子选自镧、铈、镨、钆、铽、钇、铈、钆、铽、镱、铪、铌和钽。在一个方面,优选的离子是镧或镧离子。金属离子可以是任何稳定的离子,例如 +1、+2、+3、+4 或 +5 离子。优选的离子是 La(III)、Eu(III)、Ho(III) 和 Ce(IV)。

[0069] 术语“亚烷基”是指具有取代基的烷基。例如，术语“C1-3 亚烷基芳基”是指含有 1 到 3 个碳原子并被芳基取代的烷基。

[0070] 术语“卤”或“卤素”在本文中被定义为包括氟、溴、氯和碘。

[0071] 术语“芳基”，单独或组合地，在本文中被定义为单环或多环芳族基团，优选为单环或双环芳族基团，例如苯基或萘基。除非另有指明，否则“芳基”可以是未取代的或取代的，例如被一个或多个，特别是一个到三个下述基团取代：卤素、烷基、羟基、C(=O)OR、羟基烷基、烷氧基、烷氧基烷基、卤代烷基、卤代烷氧基、氰基、硝基、氨基、烷基氨基、酰基氨基、烷硫基、烷基亚硫酰基和烷基磺酰基。示例性的芳基包括苯基、萘基、四氢萘基、2-氯苯基、3-氯苯基、4-氯苯基、2-甲基苯基、4-甲氧基苯基、3-三氟甲基苯基、4-硝基苯基等。术语“芳基 C1-3 烷基”和“杂芳基 C1-3 烷基”被定义为具有 C1-3 烷基取代基的芳基或杂芳基。

[0072] 术语“杂芳基”在本文中被定义为含有一个或两个芳环的单环或双环环状系统，并在芳环中含有至少一个氮、氧或硫原子，它可以是未取代的或取代的，例如被一个或多个，特别是一个到三个取代基取代，所述取代基例如卤素、烷基、羟基、羟基烷基、烷氧基、烷氧基烷基、卤代烷基、硝基、氨基、烷基氨基、酰基氨基、烷硫基、烷基亚硫酰基和烷基磺酰基。杂芳基的例子包括噻吩基、呋喃基、吡啶基、噁唑基、喹啉基、异喹啉基、吡啶基、三唑基、异噻唑基、异噁唑基、咪唑基、苯并噻唑基、吡嗪基、嘧啶基、噻唑基和噻二唑基。

[0073] 术语“Het”被定义为含有一个或多个选自氧、氮和硫杂原子的单环、双环和三环基团。“Het”基团也可以包含与环相连的氧代基团(=O)。Het 基团的非限制性的例子包括 1,3-二氧戊环基、2-吡唑啉基、吡唑烷基、吡咯烷基、哌嗪基、吡咯啉基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、吗啉基、硫代吗啉基(thiopholinyl)、哌啶基、1,4-二噻烷基和 1,4-二噁烷。

[0074] 术语“羟基”被定义为 -OH。

[0075] 术语“烷氧基”被定义为 -OR，其中 R 是烷基。

[0076] 术语“烷氧基烷基”被定义为其中氢被烷氧基取代的烷基。术语“(烷硫基)烷基”与烷氧基烷基定义相似，除了存在硫原子而不是氧原子之外。

[0077] 术语“羟基烷基”被定义为附加到烷基上的羟基。

[0078] 术语“氨基”被定义为 -NH₂，术语“烷基氨基”被定义为 -NR₂，其中至少一个 R 是烷基，第二个 R 是烷基或氢。

[0079] 术语“酰基氨基”被定义为 RC(=O)N-，其中 R 是烷基或芳基。

[0080] 术语“烷硫基”被定义为 -SR，其中 R 是烷基。

[0081] 术语“烷基亚硫酰基”被定义为 RSO₂-，其中 R 是烷基。

[0082] 术语“烷基磺酰基”被定义为 RSO₃-，其中 R 是烷基。

[0083] 术语“硝基”被定义为 -NO₂。

[0084] 术语“三氟甲基”被定义为 -CF₃。

[0085] 术语“三氟甲氧基”被定义为 -OCF₃。

[0086] 术语“氰基”被定义为 -CN。

[0087] 根据修饰的核碱基数量的性质，含有与金属离子络合的螯合性部分的本发明化合物的计算核酸酶效率，与天然存在的核酸酶相比增加了高达 10³-10⁹ 倍，允许相应地降低有效浓度，并在同时保持化合物的高特异性。

[0088] 还考虑到了本发明的化合物的其他修饰。尽管寡核苷酸是本发明的化合物的优选

形式,但本发明还包括其他家族的化合物,包括但不限于寡核苷酸类似物和模拟物。

[0089] 其他被考虑用于本发明的组合物的方法的反义化合物,包括但不限于含有修饰的骨架(例如带有或不带有磷原子)或非天然的核苷间连键、寡聚核苷、不包含磷原子的修饰的寡核苷酸骨架的寡核苷酸,其中不包含磷原子的修饰的寡核苷酸骨架所具有的骨架由短链烷基或环烷基核苷间连键、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间连键、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间连键形成(例如吗啉代连键;硅氧烷骨架;硫醚、亚砷和砷骨架;甲乙酰基(formacetyl)和硫代甲乙酰基骨架;亚甲基甲乙酰基和硫代甲乙酰基骨架;核糖乙酰骨架;含有烯的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架,以及其他具有混合的N、O、S和CH₂成分部分的骨架),具有反向的极性的寡核苷酸,任选其中核苷酸单元的糖和核苷间连键(即骨架)二者都被新的基团取代的寡核苷酸模拟物,肽核酸(PNA),在2'位上具有一个或多个取代的糖部分的寡核苷酸,取代包括但不限于下列:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C₁到C₁₀烷基或C₂到C₁₀烯基和炔基,锁核酸(LNAs),其中2'-羟基连接到糖环的3'或4'碳原子上,从而形成了双环糖部分,具有合成和天然核碱基的寡核苷酸,这些核碱基包括但不限于5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟基甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-CH₃)尿嘧啶和胞嘧啶,以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫羟基、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代特别是5-溴、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤和7-脱氮杂腺嘌呤和3-脱氮杂鸟嘌呤和3-脱氮杂腺嘌呤。其他修饰的核碱基包括三环嘧啶,例如吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮),G-夹(G-clamps)例如取代的吩噻嗪胞苷(例如9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮),咔唑胞苷(2H-嘧啶并[4,5-b]吡啶-2-酮),吡啶并吡啶胞苷(H-吡啶并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)。修饰的核碱基也可以包含其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环、例如7-脱氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤、2-氨基吡啶和2-吡啶酮取代的核碱基,与伯或仲羟基包括但不限于螯合性部分、嵌入基团、报告分子、多胺、聚酰胺、聚乙二醇、聚醚、增强寡聚物的药效动力学性质的基团和增强寡聚物的药代动力学性质的基团化学结合的寡核苷酸。上面提出的修饰在WO 2007/125173中进一步描述,在此引为参考。

[0090] 典型的结合基团包括胆固醇、脂类、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、葱醌、吖啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。在本发明的背景中增强药效动力学性质的基团包括改善摄入、增加对降解的抗性和/或加强与靶核酸的序列特异性杂交的基团。

[0091] 本发明的化合物的其它修饰

[0092] 也考虑到了本发明的化合物的其他修饰。尽管寡核苷酸是本发明化合物的优选形式,但本发明还包含了其他家族的化合物,包括但不限于寡核苷酸类似物和模拟物,例如本文描述的那些。

[0093] 正如本技术领域公知的,核苷是碱基-糖的组合。核苷的碱基部分通常是杂环碱基。这种杂环碱基的两个最常见的类别是嘌呤和嘧啶。核苷酸是进一步包含了共价连接到核苷的糖部分上的磷酸基团的核苷。对于包含呋喃戊糖的核苷来说,磷酸基团可以连接到糖的 2'、3' 或 5' 羟基部分上。在形成寡核苷酸中,磷酸基团将相邻核苷彼此共价连接,形成了线性聚合化合物。进而,该线性聚合化合物的各个末端可以进一步连接,形成环状化合物,但是,一般来说线性化合物是优选的。此外,线性化合物可以具有内部核碱基互补性,因此可以致使产生完全或部分双链化合物的方式折叠。在寡核苷酸内,磷酸基团通常被称为形成了寡核苷酸的核苷间骨架。RNA 和 DNA 的正常连键或骨架是 3' 到 5' 磷酸二酯键。

[0094] 修饰的核苷间连键(骨架)

[0095] 考虑到的可用于本发明的反义化合物的具体例子包括含有修饰的骨架或非天然核苷间连键的寡核苷酸。正如在本说明书中定义的,具有修饰骨架的寡核苷酸包括了在骨架中保留了磷原子的寡核苷酸和骨架中没有磷原子的寡核苷酸。出于本说明书的目的,以及有时在本技术领域中也这样指称,在其核苷间骨架中不具有磷原子的修饰的寡核苷酸也可以被当作是寡核苷。

[0096] 考虑到的其中含有磷原子的修饰的寡核苷酸骨架包括例如:硫代磷酸酯,手性硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯,磷酸三酯,氨基烷基磷酸三酯,甲基和其他烷基磷酸酯包括 3' - 亚烷基磷酸酯、5' - 亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯,亚磷酸酯,磷酰胺酯包括 3' - 氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯,硫逐磷酰胺酯,硫逐烷基磷酸酯,硫逐烷基磷酸三酯,硒代磷酸酯和碲代磷酸酯,它们具有正常的 3' - 5' 连键,还有这些的 2' - 5' 连接的类似物,以及其中一个或多个核苷酸间连键是 3' 到 3'、5' 到 5' 或 2' 到 2' 连键的极性反向的所述骨架。考虑到的具有反向极性的寡核苷酸包括在最 3' 端的核苷酸间连键处的单个 3' 到 3' 连键,即单个反向的核苷残基,其可以是无碱基的(核碱基丢失或在其位置上具有羟基)。还包括各种不同的盐、混合盐和游离酸的形式。

[0097] 讲述了上述含磷连键的制备的代表性美国专利包括但不限于 U. S. :3,687,808, 4,469,863, 4,476,301, 5,023,243, 5,177,196, 5,188,897, 5,264,423, 5,276,019, 5,278,302, 5,286,717, 5,321,131, 5,399,676, 5,405,939, 5,453,496, 5,455,233, 5,466,677, 5,476,925, 5,519,126, 5,536,821, 5,541,306, 5,550,111, 5,563,253, 5,571,799, 5,587,361, 5,194,599, 5,565,555, 5,527,899, 5,721,218, 5,672,697 和 5,625,050,它们每个在此引为参考。

[0098] 考虑到的其中不包含磷原子的修饰的寡核苷酸骨架,具有由短链烷基或环烷基核苷间连键、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间连键、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间连键形成的骨架。它们包括具有吗啉代连键(一部分从核苷的糖部分形成)的骨架;硅氧烷骨架;硫醚、亚砷和砷骨架;乙酰基和硫代乙酰基骨架;亚甲基乙酰基和硫代乙酰基骨架;核糖乙酰基骨架;含有链烯的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架,以及具有混合的 N、O、S 和 CH₂ 组成部分的其他骨架。

[0099] 讲述了上述寡核苷酸的制备的代表性美国专利包括但不限于 U. S. :5,034,506, 5,166,315, 5,185,444, 5,214,134, 5,216,141, 5,235,033, 5,264,562, 5,264,564, 5,405,938, 5,434,257, 5,466,677, 5,470,967, 5,489,677, 5,541,307, 5,561,225,

5, 596, 086, 5, 602, 240, 5, 610, 289, 5, 602, 240, 5, 608, 046, 5, 610, 289, 5, 618, 704, 5, 623, 070, 5, 663, 312, 5, 633, 360, 5, 677, 437, 5, 792, 608, 5, 646, 269 和 5, 677, 439, 它们每个在此引为参考。

[0100] 修饰的糖和核苷间连键 - 模拟物

[0101] 在其他考虑到的寡核苷酸模拟物中,核苷酸单元的糖和核苷间连键(即骨架)都被新的基团取代。保留核碱基单元,用于与适合的靶核酸杂交。一种这样的化合物,已被显示出具有出色的杂交性质的寡核苷酸模拟物,被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,寡核苷酸的糖-骨架被含有酰胺的骨架、特别是氨基乙基甘氨酸骨架代替。核碱基被保留,并直接或间接结合到骨架的酰胺部分的氮杂氮原子上。讲述了PNA化合物的制备的代表性美国专利包括但不限于U.S. :5, 539, 082, 5, 714, 331 和 5, 719, 262, 它们每个在此引为参考。PNA化合物的其他讲述内容可以在Nielsen等, Science, 1991, 254 :1497-1500 中查到。

[0102] 本发明的某些实施方案是具有硫代磷酸酯骨架的寡核苷酸,和具有杂原子骨架的寡核苷酸,所述杂原子骨架特别是上面引用的美国专利 5, 489, 677 的 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [被称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI骨架]、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (其中天然的磷酸二酯骨架被表示成 $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$)、以及上面引用的美国专利 5, 602, 240 的酰胺骨架。还考虑到了具有上面引用的美国专利 5, 034, 506 的吗啉代骨架结构的寡核苷酸。

[0103] 修饰的糖

[0104] 修饰的寡核苷酸也可以含有一个或多个取代的糖部分。考虑到的寡核苷酸在2'位置处含有下述之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基,或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C₁到C₁₀烷基或C₂到C₁₀烯基和炔基。特别优选的是 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 和 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$,其中n和m是从1到大约10。其他优选的寡核苷酸在2'位置处包含下述之一:C₁到C₁₀低级烷基,取代的低级烷基,烯基,炔基,烷芳基,芳烷基,0-烷芳基或0-芳烷基,SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 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, RNA 切开基团, 报告基团, 嵌入基团, 用于改进寡核苷酸的药代动力学性质的基团, 或用于改进寡核苷酸的药效动力学性质的基团, 以及其他具有类似性质的取代基。考虑到的修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃, 也被称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), 即烷氧基烷氧基基团。其他考虑到的修饰包括2'-二甲基氨基氧基乙氧基, 即 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基团, 也被称为2'-DMAOE, 正如在本文下面的实施例中描述的, 以及2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本技术领域中也称2'-O-二甲基-氨基-乙氧基-乙基或2'-DMAEOE), 即 $2'-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, 也在本文下面的实施例中描述。

[0105] 其他考虑到的修饰包括2'-甲氧基(2'-O-CH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-烯丙基(2'-CH₂-CH=CH₂)、2'-O-烯丙基(2'-O-CH₂-CH=CH₂)和2'-氟(2'-F)。2'-修饰可以在阿拉伯糖(上)位或核糖(下)位中。优选的2'-阿拉伯糖修饰是2'-F。类似的修饰也可以在寡核苷酸的其他位置上进行, 特别是3'末端核苷酸上或2'-5'连接的寡核苷酸中的糖的3'位, 以及5'末端核苷酸的5'位。寡核苷酸也可以具有糖模拟物, 例如环丁基部分代替呋喃戊糖。讲述了这样的修饰糖结构的制

备的代表性美国专利包括但不限于 U.S. :4,981,957,5,118,800,5,319,080,5,359,044,5,393,878,5,446,137,5,466,786,5,514,785,5,519,134,5,567,811,5,576,427,5,591,722,5,597,909,5,610,300,5,627,053,5,639,873,5,646,265,5,658,873,5,670,633,5,792,747 和 5,700,920,它们每个在此以其全文引为参考。

[0106] 糖的其他优选的修饰包括锁核酸 (LNAs),其中 2' - 羟基连接到糖环的 3' 或 4' 碳原子上,从而形成了双环糖部分。连键优选为桥接 2' 氧原子和 4' 碳原子的亚甲基 $(-CH_2-)_n$ 基团,其中 n 是 1 或 2。LNAs 及其制备描述在 WO 98/39352 和 WO 99/14226 中。

[0107] 天然和修饰的核碱基

[0108] 寡核苷酸也可以包含核碱基(在本技术领域往往简称为“碱基”)修饰或取代。本文中使用的“未修饰”或“天然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核碱基包括其他合成的和天然的核碱基,例如 5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟基甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和 2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基 $(-C \equiv C-CH_3)$ 尿嘧啶和胞嘧啶,以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫羟基、8-硫代烷基、8-羟基和其他 8-取代腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代、特别是 5-溴、5-三氟甲基和其他 5-取代尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和 7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和 8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤和 7-脱氮杂腺嘌呤和 3-脱氮杂鸟嘌呤和 3-脱氮杂腺嘌呤。其他修饰的核碱基包括三环嘧啶,例如吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮),吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮),G-夹例如取代的吩噻嗪胞苷(例如 9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮),咔唑胞苷(2H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-2-酮),吡啶并吲哚胞苷(H-吡啶并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)。修饰的核碱基也可以包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环例如 7-脱氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤、2-氨基吡啶和 2-吡啶酮取代的核碱基。其他核碱基包括美国专利 No. 3,687,808 中公开的核碱基,在《聚合物科学和工程简明百科全书》858-859 页(The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,pages858-859),Kroschwitz 主编,John Wiley&Sons,1990 中公开的核碱基,由 Englisch 等,Angewandte Chemie,国际版(International Edition),1991,30:613 公开的核碱基,以及由 Sanghvi 在《反义研究与应用》第 15 章 289-302 页(Chapter 15,Antisense Research and Applications,pages289-302),Crooke 和 Lebleu 主编,CRC Press,1993 公开的核碱基。

[0109] 讲述了某些上面提到的修饰的核碱基以及其他修饰的核碱基的制备的代表性美国专利,包括但不限于上面提到的 U.S. 3,687,808,以及 U.S. :4,845,205,5,130,302,5,134,066,5,175,273,5,367,066,5,432,272,5,457,187,5,459,255,5,484,908,5,502,177,5,525,711,5,552,540,5,587,469,5,594,121,5,596,091,5,614,617,5,645,985,5,830,653,5,763,588,6,005,096 和 5,681,941,它们每个在此引为参考,以及美国专利 5,750,692,也在此引为参考。

[0110] 在共同拥有以及共同待决的申请号 _____ (代理人案号 (Attorney

Docket Number) 28113/43434B) 中, 以及 2007 年 11 月 5 日提交的美国临时申请号 60/985, 548 和 2008 年 5 月 30 日提交的美国临时申请号 61/057, 685 中, 也已考虑到了使用修饰的核碱基作为抗病毒剂, 它们在此以其全文引为参考。

[0111] 反义抑制

[0112] 本发明的化合物与靶核酸的杂交一般被称为“反义”。这样的杂交可以导致靶核酸翻译的抑制, 在本文中称为“反义抑制”。这样的反义抑制典型地是基于寡核苷酸链或区段的基于氢键键合的杂交, 使得至少一条链或区段被切开、降解或以其它方式变得不可操作。就此而言, 目前优选靶定用于这种反义抑制的特异性核酸分子及其功能。

[0113] 待抑制的 DNA 的功能包括复制和转录。复制和转录可以来自例如内源细胞模板、载体、质粒构建物等。待干扰的 RNA 的功能可以包括例如下述功能: RNA 易位到蛋白翻译位点、RNA 易位到细胞内远离 RNA 合成位点的位点、从 RNA 翻译蛋白、剪接 RNA 以产生一种或多种 RNA、和可以由 RNA 从事或促进的 RNA 参与的催化活性或复合物形成。在本发明的背景中, “调节”和“表达的调节”是指编码基因的核酸分子例如 DNA 或 RNA 的量或水平的增加(刺激)或降低(抑制)。抑制通常是表达的优选调节形式, mRNA 通常是优选的靶核酸。

[0114] 在本发明的背景中, “杂交”是指寡聚化合物的互补链的配对, 可以与术语“退火”互换使用。在本发明中, 优选的配对机制包括氢键键合, 其可以是寡聚化合物链的互补核苷或核苷酸碱基(核碱基)之间的 Watson-Crick、Hoogsteen 或反向 Hoogsteen 氢键键合。例如, 腺嘌呤和胸腺嘧啶是通过形成氢键而配对的互补核碱基。杂交可以在不同情况下发生。

[0115] 当化合物与靶核酸的结合干扰了靶核酸的正常功能, 从而导致活性丧失, 并且具有足够程度的互补性来避免了反义化合物与非靶核酸序列在特异性结合所需条件下的非特异性结合时, 反义化合物是可特异性杂交的, 所述特异性结合所需条件在体内分析或治疗性处理情况下是生理条件, 在体外分析情况下是用于执行分析的条件。

[0116] 在本发明的一个方面, 靶核酸的表达被抑制 20%。在其他方面, 靶核酸的表达被抑制至少 25%、或至少 30%、或至少 35%、或至少 40%、或至少 45%、或至少 50%、或至少 55%、或至少 60%、或至少 65%、或至少 70%、或至少 75%、或至少 80%、或至少 85%、或至少 90%、或至少 95%、或至少 99% 或以上。

[0117] 在体外条件的情况下, 杂交发生时的 pH 是重要的。正如本文下面公开的, 本发明的修饰的寡核苷酸与它们的靶的结合效率受到 pH 的影响。修饰的寡核苷酸与靶核酸的高效结合发生在大约 4 到 10 的 pH 范围内。在一个方面, 高效结合发生时的 pH 是大约 4。在各种不同情况下, 修饰的寡核苷酸与靶核酸的高效结合发生时的 pH 是大约 4.1、大约 4.2、大约 4.3、大约 4.4、大约 4.5、大约 4.6、大约 4.7、大约 4.8、大约 4.9、大约 5、大约 5.1、大约 5.2、大约 5.3、大约 5.4、大约 5.5、大约 5.6、大约 5.7、大约 5.8、大约 5.9、大约 6、大约 6.1、大约 6.2、大约 6.3、大约 6.4、大约 6.5、大约 6.6、大约 6.7、大约 6.8、大约 6.9、大约 7、大约 7.1、大约 7.2、大约 7.3、大约 7.4、大约 7.5、大约 7.6、大约 7.7、大约 7.8、大约 7.9、大约 8、大约 8.1、大约 8.2、大约 8.3、大约 8.4、大约 8.5、大约 8.6、大约 8.7、大约 8.8、大约 8.9、大约 9、大约 9.1、大约 9.2、大约 9.3、大约 9.4、大约 9.5、大约 9.6、大约 9.7、大约 9.8、大约 9.9 或大约 10。所有由这些示例性 pH 值限定的范围, 都被具体地考虑作为可供选择的方式, 定义本发明的体外实施方案。

[0118] 在本发明中,词组“严紧杂交条件”或“严紧条件”是指在该条件下本发明的化合物将与其靶序列杂交,但是与最少数量的其他序列杂交。严紧条件是序列依赖性的,在不同环境下将不同,在本发明的背景中,寡聚化合物与靶序列杂交的“严紧条件”由寡聚化合物的本性和组成以及研究它们的分析所决定。一组示例性的条件如下:在 42℃ 下在 50% 甲酰胺,5X SSC,20mM Na•PO₄,pH 6.8 中杂交;以及在 55℃ 下在 1X SSC 中洗涤 30 分钟。用于计算等价杂交条件和 / 或选择用于获得所需严紧性水平的其他条件的公式,是公知的。在本技术领域中,应该理解,等价的严紧条件可以通过改变温度和缓冲液或盐浓度来获得,正如在 Ausubel 等主编的《分子生物学方法》(Protocols in Molecular Biology), John Wiley&Sons(1994),pp. 6.0.3 到 6.4.10 中描述的。杂交条件的修改可以凭经验确定,或根据探针的长度和鸟嘌呤 / 胞嘧啶 (GC) 碱基配对的长度和百分率精确计算。杂交条件可以按照 Sambrook 等主编的《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York(1989), pp. 9.47 到 9.51 中的描述进行计算。

[0119] 本文中使用的“互补”是指寡聚化合物的两个核碱基之间精确配对的能力。例如,如果寡核苷酸(寡聚化合物)某个位置处的核碱基能够与靶核酸某个位置处的核碱基形成氢键,所述靶核酸是 DNA、RNA 或寡核苷酸分子,那么寡核苷酸与靶核酸之间形成氢键的位置被认为是互补的位置。寡核苷酸与其他 DNA、RNA 或寡核苷酸分子当每种分子中足够数量的互补位置被能够彼此形成氢键的核碱基占据时,它们是彼此互补的。因此,“可特异性杂交”和“互补”是可用于指示在足够数量的核碱基范围内存在足够程度的精确配对或互补性,导致在寡核苷酸和靶核酸之间发生稳定和特异性结合的术语。

[0120] 在本技术领域中,应该理解,反义化合物的序列不需与其可特异性杂交的靶核酸 100% 互补。此外,寡核苷酸可以一个或多个区段杂交,使得居间的或相邻的区段不参与杂交事件(例如环结构或发夹结构)。优选本发明化合物的寡核苷酸部分与靶核酸内的靶区域具有至少 70% 的序列互补性,更优选它们具有至少 85% 或 90% 的序列互补性,并可以与它们所靶向的靶核酸序列内的靶区域具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列互补性。例如,在本发明的化合物中,化合物的 20 个核碱基中的 18 个与靶区域互补并因此特异性杂交,则表示 90% 的互补性。在该例子中,剩余的未互补核碱基可以是成簇的,或被互补的核碱基分散,不是必需彼此或与互补的核碱基连续。因此,化合物长度为 18 个核碱基,具有 4(四)个两侧带有与靶核酸完全互补的两个区域的未互补核碱基,其将与靶核酸具有 77.8% 的总体互补性,因此将落于本发明的范围内。化合物与靶核酸区域的百分互补性可以使用本技术领域已知的 BLAST 程序(基本局域比对搜索工具)和 PowerBLAST 程序来常规确定(Altschul 等, J. Mol. Biol., 1990, 215: 403-410; Zhang 等, Genome Res., 1997, 7: 649-656)。对于具有羟基核碱基和 / 或合成的类似物(例如其他合成的核碱基)的本发明化合物来说,可以通过合成的类似物对靶核酸的特定核碱基的特异性来评估互补性。

[0121] 尽管反义化合物的优选形式是单链反义寡核苷酸,但在许多物种中,已经显示导入双链结构、例如双链 RNA(dsRNA) 分子,诱导了基因功能或其相关基因产物的强有力的和特异性的反义介导的降低。这种现象在植物和动物中都有发生,据认为与病毒防御和转座子沉默具有进化关联。

[0122] dsRNA 能够在动物中引起基因沉默的第一个证据,来自于 1995 年在线虫,线虫

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中的工作 (Guo 等, *Cell*, 1995, 81 :611-620)。Montgomery 等已经表明, dsRNA 的主要干扰效应是转录后的 (Montgomery 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95 :15502-15507)。在秀丽隐杆线虫中定义的由暴露于双链 RNA (dsRNA) 所产生的转录后反义机制, 从此后被命名为 RNA 干扰 (RNAi)。该术语已经被广义化, 是指涉及导入 dsRNA 引起内源靶 mRNA 水平的序列特异性降低的反义介导的基因沉默 (Fire 等, *Nature*, 1998, 391 :806-811)。最近, 已经显示, 事实上 dsRNAs 的反义极性的单链 RNA 寡聚物, 是 RNAi 的强有力诱导物 (Tijsterman 等, *Science*, 2002, 295 :694-697)。

[0123] 在本技术领域中还存在其他知识, 涉及与寡核苷酸类似但具有不同作用机制的试剂的使用, 包括小干扰 RNAs (siRNAs)、它们的前体和类似物, 以及被设计用于特异性结合和切开靶核酸的核酶。

[0124] 使用标记的寡核苷酸类似物用于杂交

[0125] 本文描述的寡核苷酸和化合物可任选被标记。本技术领域的普通专业人员能够通过多种手段中的任何一种来标记本发明的寡核苷酸。寡核苷酸可以用 ^{32}P 、 ^{35}S 或本技术领域的专业人员已知的任何其他放射性核素进行放射性标记。此外, 本发明的寡核苷酸可以进行荧光标记。可以使用的荧光标记物包括但不限于下列: 荧光素 (FITC)、CY-5、CY-5.5、CY-3、CY-2、CY-7、德克萨斯红、罗丹明等。

[0126] 这些标记的修饰的寡核苷酸被考虑用于本技术领域公知的分析中, 例如 Southern 和 Northern 印迹 (Sambrook 等主编《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning :A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press :Cold Spring Harbor, New York (1989))。本发明的另一方面是使用标记的修饰寡核苷酸与固定在固相载体例如芯片上的核酸杂交。本技术领域的普通专业人员将会理解, 这些芯片可以用于微阵列研究中。带有修饰的核碱基的标记寡核苷酸本身是本发明的一个方面。

[0127] 本发明的另一方面是本发明的修饰的寡核苷酸或修饰的寡核苷酸对或多个对, 用作 PCR 的引物。引物可用于本技术领域的专业人员已知的任何 PCR 方法, 包括但不限于常规 PCR、实时 PCR、反转录 PCR (RT-PCR) 等。

[0128] 对于本技术领域的普通专业人员来说, 众所周知, PCR 包括靶核酸变性、然后将寡核苷酸引物与变性的靶核酸链退火的重叠步骤 (正如在 Sambrook 等主编的《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning :A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press :Cold Spring Harbor, New York (1989) 中描述的)。然后通过热稳定 DNA 聚合酶的作用将该杂交的复合物延伸 (即根据靶核酸链的序列连续添加核苷酸)。热稳定 DNA 聚合物在本技术领域是已知的, 包括但不限于 Taq, Pfx 和 TaKaRa 聚合酶。

[0129] 用于 PCR 的参数例如进行退火的温度和延伸时间, 本质上是凭经验确定的, 并明确地在本技术领域的普通专业人员的能力范围内。

[0130] 本发明的化合物的使用

[0131] 本文描述的化合物可用于体外或体内限制基因的表达和病原体例如病毒的增殖, 病毒包括具有 DNA 基因组、RNA 基因组的病毒和使用反转录的病毒。也参见共同拥有以及共同待决的申请号 _____ (代理人案号 28113/43434B), 以及 2007 年 11 月 5 日提交的美国临时申请号 60/985, 548 和 2008 年 5 月 30 日提交的美国临时申请号 61/057, 685, 它们在此以其全文引为参考。因此, 化合物可以施用于经历或处于疾病状态的生物体。当施用于

生物体时,化合物可用于治疗由各种不同病原体引起的感染。本文使用的“治疗”是指将本发明的寡核苷酸施用于需要的对象,其剂量/量足以对对象的健康状况、病理和疾病产生期望的结果,或用于诊断目的。期望的结果可以包括在剂量的接受者中客观性或主观性的改善。“治疗”是指预防性治疗或治疗性治疗或诊断性治疗。诊断或治疗的“对象”是人类或非人类动物,包括哺乳动物或灵长动物。“治疗有效量”是指有效地产生对健康的目的有益效应的组合物的量。

[0132] 化合物可以用于调节免疫系统细胞的功能,所述免疫系统细胞例如特异性 B 细胞;特异性 T 细胞,例如辅助性细胞、抑制性细胞、细胞毒性 T-淋巴细胞 (C) 和自然杀伤 (NK) 细胞。使用本发明的化合物调节免疫功能,可用于治疗各种不同疾病,例如由病毒病原体引起的慢性疾病。

[0133] 可以选择能够通过任何涉及化合物的寡核苷酸与其靶序列结合的机制来干扰蛋白转录和/或表达的化合物。这些机制包括但不限于干扰加工、抑制跨核膜的运输、被内切核酸酶切割、形成复制酶复合物等。

[0134] 本文描述的化合物可用于感染性疾病的治疗。靶核酸序列包括但不限于病原性病毒例如 HIV、CMV、HSV、HCV 等的基因,以及编码这些病毒的宿主因子或以其他方式参与疾病发生和/或发展的基因。

[0135] 在癌症治疗中,靶核酸序列可以是与致癌基因或具有致癌性质的病毒、肿瘤抑制基因和相关基因有关的 DNA 或 RNA。此外,本发明的化合物也可以靶向与药物抗性相关的基因及其基因产物。

[0136] 靶向过程通常还包括在靶核酸内确定至少一个用于发生反义相互作用以便产生所需效应例如表达的调节的靶区域、区段或位点。在本发明的背景中,术语“区域”是指靶核酸的具有至少一种可鉴定的结构、功能或特征的部分。区段在靶核酸区域内。“区段”是指靶核酸内较小的区域或区域的子部分。本发明中使用的“位点”是指靶核酸内的位置。

[0137] 此外,考虑到了本文描述的组合物组合使用,以杂交相同病毒基因组内两个不同的区域或区段。对于靶的选择来说,考虑的因素包括:靶在病毒基因组的对于病毒繁殖来说重要的区域中的定位(靶必须是必需区域)。如果可能,优选的靶应该在病毒的不同株和基因型之间保守的区域中(通常这也表明该序列的功能重要性)。编码蛋白的高度保守结构域的区域是良好的靶;含有交叠的功能元件的区域(与顺式作用元件交叠的编码序列)也是良好的靶。

[0138] 此外,考虑到了靶位点应该具有的核苷酸组成要能够构建具有适宜的核苷酸含量和/或修饰的核碱基组成的寡核苷酸抑制剂,优选靶不含强的二级结构元件。此外,靶的序列不应该与必需的宿主基因、特别是宿主 mRNAs 的序列交叠。此外,修饰的核碱基的位置不应该与宿主序列匹配。应该避免成簇的 C 或 G 核苷酸(3 个或以上)。实验显示,编码区内部的靶位点好于非编码区中的靶位点,在 RNA 病毒的情况下,正链与负链相比是较好的靶。由于核酸破坏的独特机制(例如通过 RNase 或 DNase 复合物),不是必需将修饰的寡核苷酸靶向翻译起始序列。这与吗啉代寡核苷酸的情况相反,在那种情况下不能启动 RNA 降解,并且如果靶向含有翻译起始密码子的区域的话方最有效(或才有效)。对于本文描述的修饰的寡核苷酸不存在这样的限制。

[0139] 为了靶定两个或多个位点,每个位点应该满足上面提出的几个标准。靶的序列应

该是彼此不同并且不互补的,以避免寡核苷酸的聚集,并且靶可以呈现为来自同一个功能单位例如来自同一个酶或来自不同单位的不同序列。在大多数情况下,第二个选择是优选的,以便最小化产生抗性突变的可能性。本文中使用的术语“功能单位”是指在病毒复制或基因表达中具有功能的多肽或多核苷酸序列,例如不同的复制因子、转录因子等。结合相同功能单位的寡核苷酸结合不同的、但是位于同一多肽或多核苷酸功能单位中、例如在 HIV Tat 蛋白内的靶序列。本发明考虑到的结合不同功能单位的寡核苷酸,与在病毒复制或基因表达中具有不同功能的多肽或多核苷酸、例如 HIV Tat 和 Rev 基因或蛋白结合。本技术领域的普通专业人员可以容易地理解与病毒复制或基因表达相关的功能单位的含义。

[0140] 翻译起始密码子典型为 5' AUG (在转录的 mRNA 分子中;在相应的 DNA 分子中是 5' ATG),翻译起始密码子也称为“AUG 密码子”、“起始密码子”或“AUG 起始密码子”。少部分基因的翻译起始密码子具有 RNA 序列 5' GUG、5' UUG 或 5' CUG,并且 5' AUA、5' ACG 和 5' CUG 已被显示出在体内具有功能。因此,术语“翻译起始密码子”和“起始密码子”可以包含许多密码子序列,尽管在每种情况下起始氨基酸典型是甲硫氨酸(在真核生物中)或甲酰甲硫氨酸(在原核生物中)。在本技术领域中还已了解,真核和原核基因可以具有两种或多种可变(alternative)起始密码子,其任何一种可以优选用于在特定细胞类型或组织中,或在特定的一组条件下启动翻译。在本发明的背景中,“起始密码子”和“翻译起始密码子”是指体内用于启动从编码白介素 18 的基因转录而来的 mRNA 的翻译的密码子或多个密码子,无论这些密码子的序列如何。在本技术领域,已经得知基因的翻译终止密码子(或“终止密码子”)可以具有三种序列中的一种,即 5' UAA、5' UAG 和 5' UGA(相应的 DNA 序列分别是 5' TAA、5' TAG 和 5' TGA)。

[0141] 术语“起始密码子区”和“翻译起始密码子区”是指包含从翻译起始密码子开始在任一方向上(即 5' 或 3')大约 25 个到大约 50 个连续核苷酸的这样一个 mRNA 或基因部分。同样地,术语“终止密码子区”和“翻译终止密码子区”是指包含从翻译终止密码子开始在任一方向上(即 5' 或 3')大约 25 个到大约 50 个连续核苷酸的这样一个 mRNA 或基因部分。因此,“起始密码子区”(或“翻译起始密码子区”)和“终止密码子区”(或“翻译终止密码子区”)都是可以使用本发明的反义化合物有效地靶向的区域。

[0142] 开放阅读框架(ORF)或“编码区”在本技术领域已知是指翻译起始密码子与翻译终止密码子之间的区域,也是可以被有效靶向的区域。在本发明的背景中,优选的区域是涵盖了基因的开放阅读框架(ORF)的翻译起始或终止密码子的基因内区域。

[0143] 其他靶区域包括 5' 非翻译区(5' UTR),它在本技术领域已知是指 mRNA 从翻译起始密码子开始的 5' 方向中的部分,因此包括 mRNA 的 5' 帽位点与翻译起始密码子之间的核苷酸(或基因上的相应核苷酸),以及 3' 非翻译区(3' UTR),它在本技术领域已知是指 mRNA 从翻译终止密码子开始的 3' 方向中的部分,因此包括 mRNA 的翻译终止密码子与 3' 末端之间的核苷酸(或基因上的相应核苷酸)。mRNA 的 5' 帽位点包含通过 5'-5' 三磷酸酯键与 mRNA 的最 5' 端残基相连的 N7-甲基化的鸟苷残基。mRNA 的 5' 帽区被认为包括 5' 帽结构本身以及与帽位点相邻的前 50 个核苷酸。靶向 5' 帽区也是优选的。

[0144] 尽管某些真核 mRNA 转录本是直接翻译的,但有许多含有一个或多个被称为“内含子”的区域,它们在翻译前从转录本中切除。剩余的(因此是被翻译的)区域被称为“外显子”,被剪接在一起形成了连续的 mRNA 序列。在疾病涉及异常剪接、或疾病涉及特定剪接产

物的过量生产的情况下,靶向剪接位点、即内含子-外显子接点或外显子-内含子接点,也可能是特别有用的。由重排或缺失造成的异常融合接点,也是优选的靶位点。通过来自不同基因来源的两个(或多个)mRNAs的剪接过程产生的mRNA转录本,被称为“融合转录本”。也已了解,通过使用靶向例如DNA或mRNA前体的反义化合物,也能够有效地靶向内含子。

[0145] 从DNA的同样的基因组区域,可以产生可变RNA转录本。这些供选的转录本一般被称为“变体”。更具体来说,“mRNA前体变体”是从同样的基因组DNA产生的转录本,与从同样的基因组DNA产生的其他转录本的在它们的起始或终止位置上不同,并包含内含子和外显子序列二者。

[0146] 在剪接过程中,在切除了一个或多个外显子或内含子区域或其部分后,mRNA前体变体产生了较小的“mRNA变体”。因此,mRNA变体是加工过的mRNA前体变体,并且每个独特的mRNA前体变体必须总是产生独特的mRNA变体作为剪接的结果。这些mRNA变体也被称为“可变剪接变体”。如果没有发生mRNA前体变体的剪接,那么mRNA前体变体与mRNA变体相同。

[0147] 变体可以通过使用供选的信号起始或终止转录来产生,mRNAs前体和mRNAs可以拥有一个以上的起始密码子或终止密码子。源自于使用可变起始密码子的mRNA前体或mRNA的变体,被称为mRNA前体或mRNA的“可变起始变体”。使用可变终止密码子的那些转录本被称为mRNA前体或mRNA的“可变终止变体”。一种特殊类型的可变终止变体是“polyA变体”,其中所产生的多个转录本来自于转录机制对“polyA终止信号”之一的可变选择,从而产生了在独特的polyA位点处终止的转录本。在本发明的背景中,本文描述的变体类型也是优选的靶核酸。

[0148] 从下面的实施例,本公开的其他方面和详细情况将变得明了,这些实施例目的是说明性的而不是限制性的。

[0149] 实施例

[0150] 实施例 1

[0151] 修饰的/未修饰的反义寡核苷酸与互补的膜结合的未修饰有义寡核苷酸的结合

[0152] 下述每个专利申请以其全文引为参考:2006年5月3日提交的美国系列号60/797,448,以及2007年4月30日提交的11/742,384(以美国专利申请公布号US 2007/0259830公布)。

[0153] 为了比较含有一个或多个修饰寡核苷酸的寡核苷酸的相对结合效率,产生了修饰的寡核苷酸,并与未修饰的寡核苷酸的杂交效率进行比较。结合效率相对于杂交反应的pH进行测定。

[0154] 寡核苷酸含有修饰的碱基5-羟基胞嘧啶(C*)和8-羟基鸟嘌呤(G*)之一或二者。未修饰的寡核苷酸用作对照。寡核苷酸显示在表1中。

[0155] 表1

[0156]

寡核苷酸	序列
f	TCAGAACTTCAAACTACTTC (SEQ ID NO 1)

f1	TCAGAACTTCAAAACTA (C*) TTC (SEQ ID NO 2)
f2	TCAGAACTTCAAAA (C*) TACTTC (SEQ ID NO 3)
f3	TCA (G*) AACTTCAAAACTACTTC (SEQ ID NO 4)
f *	TCAGAACTTCAAAA (A*) CTA (C*) TTC (SEQ ID NO 5)

[0157] 在不同靶量 / 浓度下研究了修饰的寡核苷酸的相对结合效率的 pH 依赖性。使用 4 阶多项式, 对膜上互补寡核苷酸的浓度为 1pmol 情况下修饰寡核苷酸的结合效率相对于天然寡核苷酸的结合效率的数据进行了拟合, 相应的图在图 1 中给出。相对结合效率被定义为:

$$[0158] \quad E = \frac{D_{\text{mod}}}{D_{\text{nat}}}$$

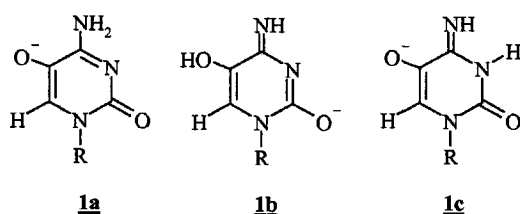
[0159] 其中 D_{mod} 是带有修饰的核碱基的寡核苷酸的结合效率, D_{nat} 表示天然寡核苷酸的结合效率。

[0160] 图 1 中显示的数据证明了修饰的寡核苷酸的结合效率对 pH 的强烈依赖性。这是由于存在互变异构体平衡, 因为修饰的碱基 5- 羟基胞嘧啶和 8- 羟基鸟嘌呤的阴离子以几种主要的质子移变互变异构体形式存在 (图式 1 和 2), 其比率可以显著依赖于周围介质 (溶液) 的 pH。

[0161] 不同互变异构体形式的结合效率可以显著不同, 导致了可观察到的结合效率对 pH 的强烈依赖性。

[0162] 图式 1

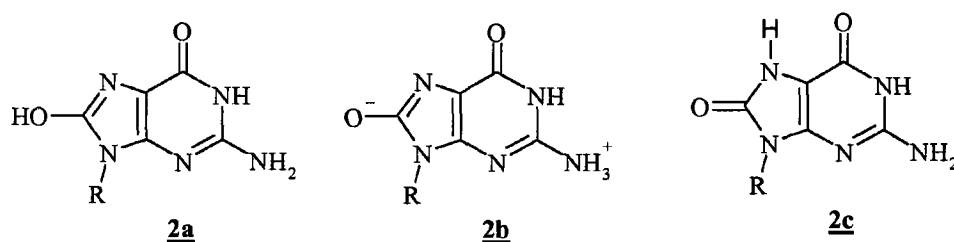
[0163]



[0164] 在 5- 羟基胞嘧啶阴离子的情况下, 互变异构体形式 1b 与互补的鸟嘌呤碱基的结合效率, 比胞嘧啶本身高大约 10^7 倍。互变异构体形式 1a 预计与胞嘧啶具有相似的结合效率, 而互变异构体形式 1c 与互补碱基具有降低的结合。

[0165] 图式 2

[0166]



[0167] 在 8- 羟基鸟嘌呤的情况下, 互变异构体形式 2b 与互补的胞嘧啶碱基的结合效率

也比鸟嘌呤本身高得多（高大约 10^7 - 10^8 倍）。互变异构体形式 2a 和 2c 预计与鸟嘌呤相比具有较小的结合效率。

[0168] 修饰的寡核苷酸的相对结合效率的 pH 依赖性,在大约 5.0-6.0 的 pH 值下具有清晰的最大值,而后在大约 pH = 7.5 时具有急剧的最小值。进一步增加 pH 导致修饰的寡核苷酸的相对结合效率再次显著升高。最高效率取决于修饰的本质 (5- 羟基胞嘧啶或 8- 羟基鸟嘌呤),以及取代在寡聚体中的位置 (对比寡核苷酸 f1 和 f2)。对修饰的寡核苷酸 f1 观察到了最高效率 (1.37)。

[0169] 在寡核苷酸浓度为 5pmol (图 2) 和 25pmol (数据未显示) 下,获得了修饰的寡核苷酸相对结合效率的类似 pH 依赖性。

[0170] 实施例 2、修饰的 / 未修饰的反义寡核苷酸与互补的膜结合 DNA 的结合

[0171] 使用同样的方法进行了类似的实验,以测量寡核苷酸与 DNA 的相对结合效率。仍然使用 4 阶多项式对每种修饰的寡核苷酸的数据进行拟合,相应的图在图 3 中给出。

[0172] 与寡核苷酸-寡核苷酸结合相反,在这种情况下,pH 依赖性具有三个极大值,但是最高的仍然在较低 pH 值下 (大约 pH = 4.5...5.0)。该极大值也明显高于寡核苷酸-寡核苷酸结合。对于修饰的寡核苷酸 f2 和 f1 来说,相对结合效率分别为 2.9 和 2.1。修饰的寡核苷酸的 pH 依赖性相对结合效率的其他两个最大值分别位于大约 pH = 7.5 和 pH = 10 (图 3)。

[0173] 显然,具有两个修饰 (包括 5- 羟基胞嘧啶和 8- 羟基鸟嘌呤) 的寡核苷酸 f*,具有平稳得多的相对结合效率对 pH 的依赖性 (图 3 和 4)。

[0174] 在膜上的 DNA 量为 5ng 的情况下,观察到了类似的相对结合效率的 pH 依赖性 (图 4)。

[0175] 实施例 3、修饰的寡核苷酸在杂交中的使用

[0176] 在图 5 的 A 图上,在变性条件下,在 5% 聚丙烯酰胺凝胶上,在 TBE 缓冲液中,通过电泳分析了 5ng 和 1ng 的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) RLI2 基因的 2kb 长的 cDNA。将凝胶在尼龙膜上进行电印迹,通过 UV 交联固定 DNA。将膜在 45°C 下,在 6x SSC, 2x Denhardt's 溶液, 0.1% SDS, pH 5.0 中,与 5 种序列全部一致的 ^{32}P 5' 标记的寡核苷酸杂交过夜。探针是 :f, f1, f2, f3 和 f* (参见表 1)。将膜在 45°C 下,用 2xSSC, 0.5% SDS, pH 5.0 洗涤两次,每次 10 分钟。使用 Molecular Imager Personal FX (BioRad) 检测放射活性信号。B 图,在 A 中显示的检测到的信号使用 ImageQuant TL (Amersham) 软件进行定量。相应的数据在图 5 上给出。

[0177] 实施例 4、修饰的 / 未修饰的反义寡核苷酸与互补的膜结合 mRNA 的结合

[0178] 使用同样的方法进行实验,测量了含有修饰的核碱基 (5- 羟基胞嘧啶和 5- 羟基鸟嘌呤) 的寡核苷酸与固定在膜上的互补天然 mRNA 的相对结合效率。mRNA 与修饰的核苷酸的相对结合效率的 pH 依赖性数据具有两个不同的极大值,最高的一个位于大约 pH = 5.8...6.2 (图 5)。

[0179] 在这种情况下,含有修饰的鸟嘌呤核碱基 (8- 羟基鸟嘌呤) 的寡核苷酸在极大值处的最高效率显示出比未修饰的寡核苷酸的效率高 1.5 倍。

[0180] 在膜上的 mRNA 量为 2.5ng 的情况下,观察到了修饰的寡核苷酸的相对结合效率的类似 pH 依赖性,极大值稍微移向更碱性一侧 (图 7)。

[0181] 实施例 5、修饰的寡核苷酸的相对结合效率对靶浓度的依赖性

[0182] 寡核苷酸中具有较高结合效率的互变异构体形式的存在, 可以导致它们在较低浓度下具有较高的相对结合效率。寡核苷酸-寡核苷酸实验中, 当有义和反义浓度相似时, 观察到了这样的行为。在图 8 中, 显示了在不同靶浓度 (1pmol, 5pmol, 25pmol) 下, 修饰的寡核苷酸 f1 的相对结合效率的 pH 依赖性。结果, 相对结合效率随着靶浓度的降低而增加。

[0183] 在修饰的寡核苷酸 f2 的情况下, 观察到了类似的依赖性 (图 9)。

[0184] 来自杂交实验的结论

[0185] 含有互变异构的修饰核碱基 (5- 羟基胞嘧啶和 / 或 8- 羟基鸟嘌呤) 的寡核苷酸与寡核苷酸、DNA 和 mRNA 中的互补序列的结合, 与天然寡核苷酸相比具有复杂的 pH 依赖性。典型地, 在相对结合效率 D 中存在 2 或 3 个不同的极大值。最高的相对效率, 依赖于使用的系统, 位于大约 pH = 4.8...6.2 的酸性 pH 值下。

[0186] 相对结合效率依赖于修饰的性质以及配对物的性质 (寡核苷酸, DNA 或 RNA)。目前发现的最高相对效率, 与未修饰的寡核苷酸的结合效率相比, 在 1.5...3 之间。

[0187] 实施例 6、在不同退火温度下修饰的寡核苷酸作为 PCR 引物

[0188] 通过 PCR 反应, 在 47、48.7、51.3、58.4、61.7、64.3、66.1、67.5 和 68 °C 的退火温度下, 扩增了拟南芥 RLI2 DNA 序列的 383bp 长的片段。片段使用未修饰的寡核苷酸 F (5' -TCAGAACTTCAAACTACTTC (SEQ ID NO 1), 对应于 AtRLI2 编码序列中的 nt 1638-1658), 和 R (5' -TTCATCAAACATGTAAATCTC (SEQ ID NO 6), 对应于 AtRLI2 编码序列中反向互补方向的 nt 2001-2021); 并平行地使用与 F 和 R 序列一致的含有两个修饰的寡核苷酸, 记为 f* (5' -TCAGAACTTCAAAACTACTTC (SEQ ID NO 5), 修饰的碱基被下划线) 和 r* (5' -TTCATCAAACATGTAAATCTC (SEQ ID NO 7), 修饰的碱基被下划线), 进行扩增。PCR 混合物含有 20pmol 每种引物, Mg²⁺ 终浓度为 2.5mM, 使用 25ng 相同的 383bp 长的片段作为模板。PCR 程序构成如下: 起始变性步骤 (95°C 2 分钟), 然后进行 30 个循环的变性 (95°C 40 秒)、退火 (47-68°C 40 秒) 和聚合 (72°C 40 秒)。PCR 的最后步骤是 72°C 10 分钟。产物在 1.7% 琼脂糖凝胶中, 在 TAE 缓冲液中通过电泳分离, 通过溴化乙锭染色和 UV 光可视化。

[0189] 图 10 中给出的结果证明了带有修饰碱基的寡核苷酸在 PCR 中的可应用性和功效。

[0190] 实施例 7、修饰的寡核苷酸在转染细胞中作为 siRNAs

[0191] 修饰的 siRNAs 对 eGFP 转基因表达的影响如下进行测量。将 HeLa-GFP (绿色荧光蛋白) 稳定转基因系生长在含有 5% 血清和 4mg/ml G418 (Geneticin, Sigma) 的 DMEM 上。使用 GFP siRNAs 的转染按照 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 方案中的描述, 在 24 孔板中 (每个孔 75,000 个细胞) 使用 DMEM 代替 Opti-MEM 进行。转染后 3 天, 将细胞重新悬浮在 PBS 中, 通过 GENios Pro TECAN 分析荧光水平 (在 535nm 处发射)。eGFP 表达水被显示为 HeLa-GFP 假转染系 (带有阴性对照 siRNA Alexa Fluor 546, Qiagen) 的荧光水平的百分率 (图 11)。用 GFP siRNA 转染的非转基因 HeLa 细胞被用作阴性对照。百分率和 SD 从 4 次平行的转染计算。下划线的核苷酸是修饰的。

[0192]

GFP siRNA :商业的“GFP-22siRNA” (Qiagen) SEQ ID NO		
5'	GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU	3' 8
3'	GCCGUUCGACUGGGACUUCAAG	5' 9
GFP siRNA ¹ :5' GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU 3' 8		
3'	GCCGUUCGACUGGGAC <u>U</u> UCAAG	5' 10
GFP siRNA ² :5' GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU 3' 8		
3'	GCCGUUCGACUGGGAC <u>U</u> <u>U</u> CAAG	5' 11
GFP siRNA ³ :5' GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU 3' 8		
3'	GCC <u>G</u> UUCGACUGGGACUUCAAG	5' 12
GFP siRNA ⁴ :5' GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU 3' 8		
3'	GCC <u>G</u> <u>U</u> UCGACUGGGACUUCAAG	5' 13

[0193] 实施例 8、修饰对杂交动力学的影响

[0194] 按照下述研究了修饰和未修饰的寡核苷酸之间杂交动力学的可能的差异。将 0.5、1、2.5、5 和 10ng 靶 DNA (在 2x SSC 中) 到尼龙膜上进行点印迹,在 45℃下,在 6x SSC, 2x Denhardts 溶液, 0.1% SDS, pH 5.0 中,与 5 种序列全部一致的 ³²P 5' 标记的寡核苷酸杂交过夜。探针是 :f, f1, f2, f3 和 f* (参见表 1)。在加入探针后,从第 10 分钟直到第 60 分钟,以 10 分钟的间隔获取时间点。将膜在室温下,用 2xSSC, 0.5% SDS, pH 5.0 洗涤两次,每次 10 分钟。使用 Molecular Imager Personal FX (BioRad) 检测放射活性信号。使用 lnV-t 方法计算假一级杂交 (Pseudo-first order hybridization) 速度常数。结果 (平滑过的相对速度常数) 在表 2 中给出。所有修饰的寡核苷酸与未修饰的寡核苷酸相比,具有较高的杂交速度,特别是在较小的底物量下。

[0195] 表 2、修饰的寡核苷酸相对于未修饰的寡核苷酸的相对杂交速度常数 k_{rel}

[0196]

寡核苷酸	底物量 m_s (ng)				
	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0
f	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
f1	2.33	2.02	1.75	1.28	1.26
f2	1.70	1.73	1.47	1.07	1.15
f3	3.40	2.55	2.43	1.97	1.93
f*	1.88	2.25	2.33	1.87	1.73

序列表

<110> 波罗的科技发展有限公司

<120> 带有修饰碱基的寡核苷酸在核酸杂交中的应用

<130> SCT102175-80

<160> 13

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 1

tcagaacttc aaaactactt c 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (18).. (18)

<223> 5-hydroxycytosine

<400> 2

tcagaacttc aaaactactt c 21

<210>3

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(15).. (15)

<223>5-hydroxycytosine

<400>3

tcagaacttc aaaactactt c 21

<210>4

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(4).. (4)

<223>8-hydroxyguanine

<400>4

tcagaacttc aaaactactt c 21

<210>5

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(14).. (14)

<223>8-hydroxyadenine

<220>

<221>modified_base

<222>(18).. (18)

<223>5-hydroxycytosine

<400>5

tcagaacttc aaaactactt c 21

<210>6

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<400>6

ttcatcaaac atgtaaatct c 21

<210>7

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221>modified_base

<222>(16).. (16)

<223>8-hydroxyadenine

<220>

<221>modified_base

<222>(19).. (19)

<223>8-hydroxyguanine

<400>7

ttcatcaaac atgtaaatct c 21

<210>8

<211>24

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic RNA

<400>8

cggcaagcug acccugaagu ucau 24

<210>9

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic RNA

<400>9

gaacuucagg gucagcuugc cg 22

<210>10

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic RNA

<220>

<221>modified_base

<222>(5).. (5)

<223>5-hydroxyuracil

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>5-hydroxycytosine

<400>10

gaacuucagg gucagcuugc cg 22

<210>11

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic RNA

<220>

<221>modified_base

<222>(4).. (4)

<223>5-hydroxycytosine

<220>

<221>modified_base

<222>(7).. (7)

<223>5-hydroxycytosine

<400>11

gaacuucagg gucagcuugc cg 22

<210>12

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic RNA

<220>

<221>modified_base

<222>(16).. (16)

<223>5-hydroxycytosine

<220>

<221>modified_base

<222>(20).. (20)

<223>5-hydroxycytosine

<400>12

gaacuucagg gucagcuugc cg 22

<210>13

<211>22

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>Synthetic RNA

<220>

<221>modified_base

<222>(15).. (15)

<223>8-hydroxyguanine

<220>

<221>modified_base

<222>(19).. (19)

<223>8-hydroxyguanine

<400>13

gaacuucagg gucagcuugc cg 22

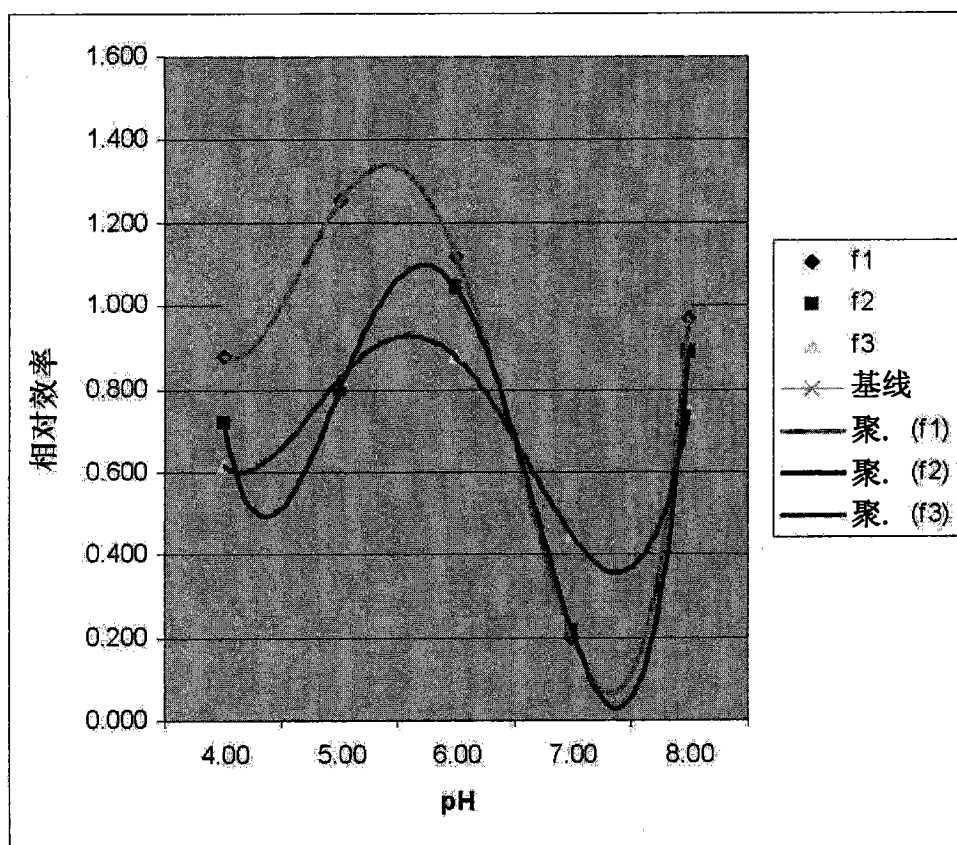


图 1

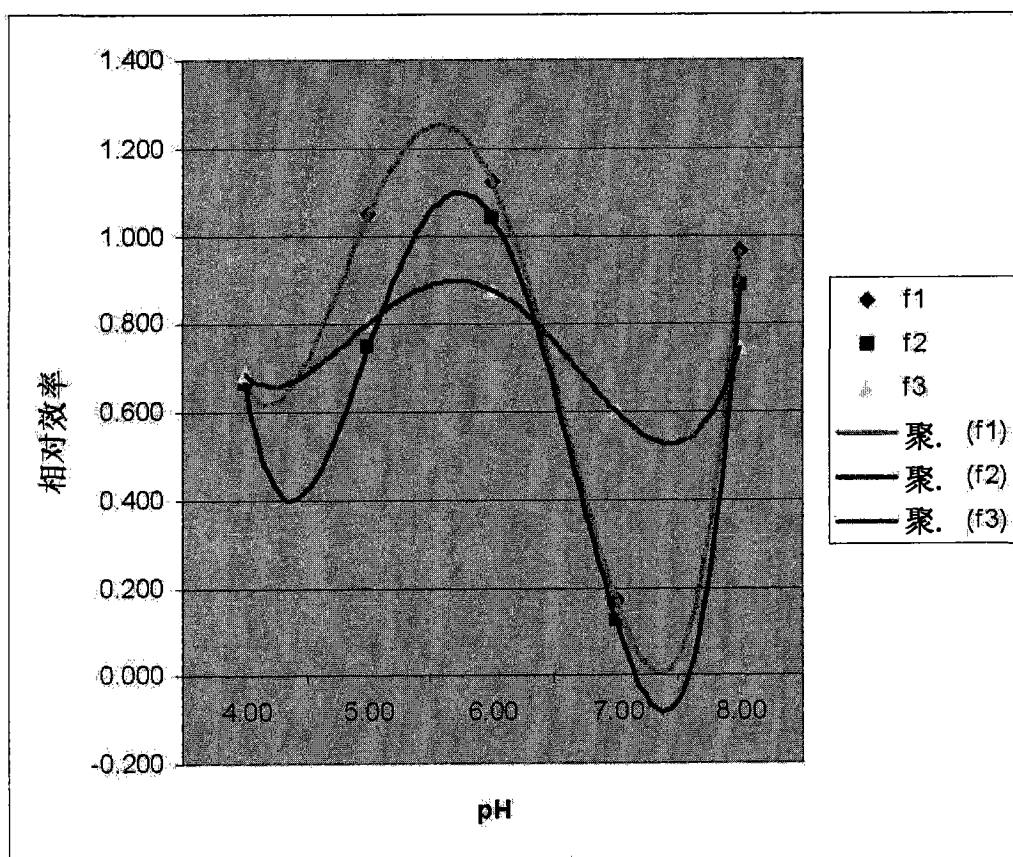


图 2

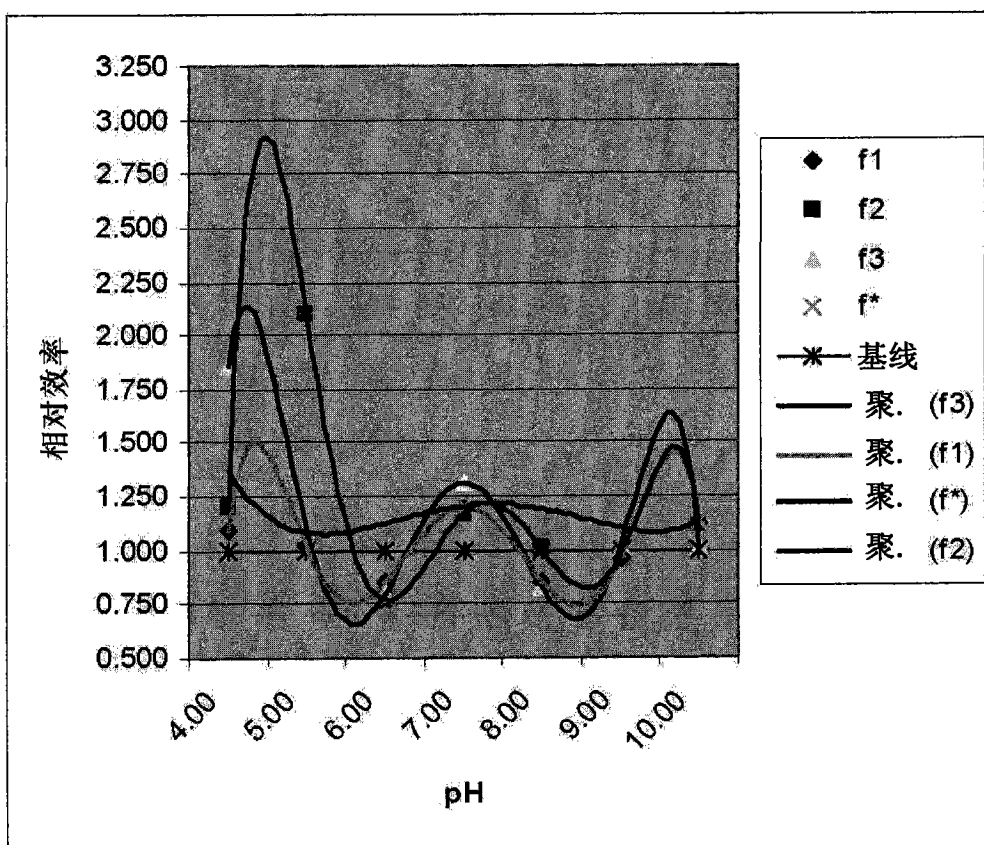


图 3

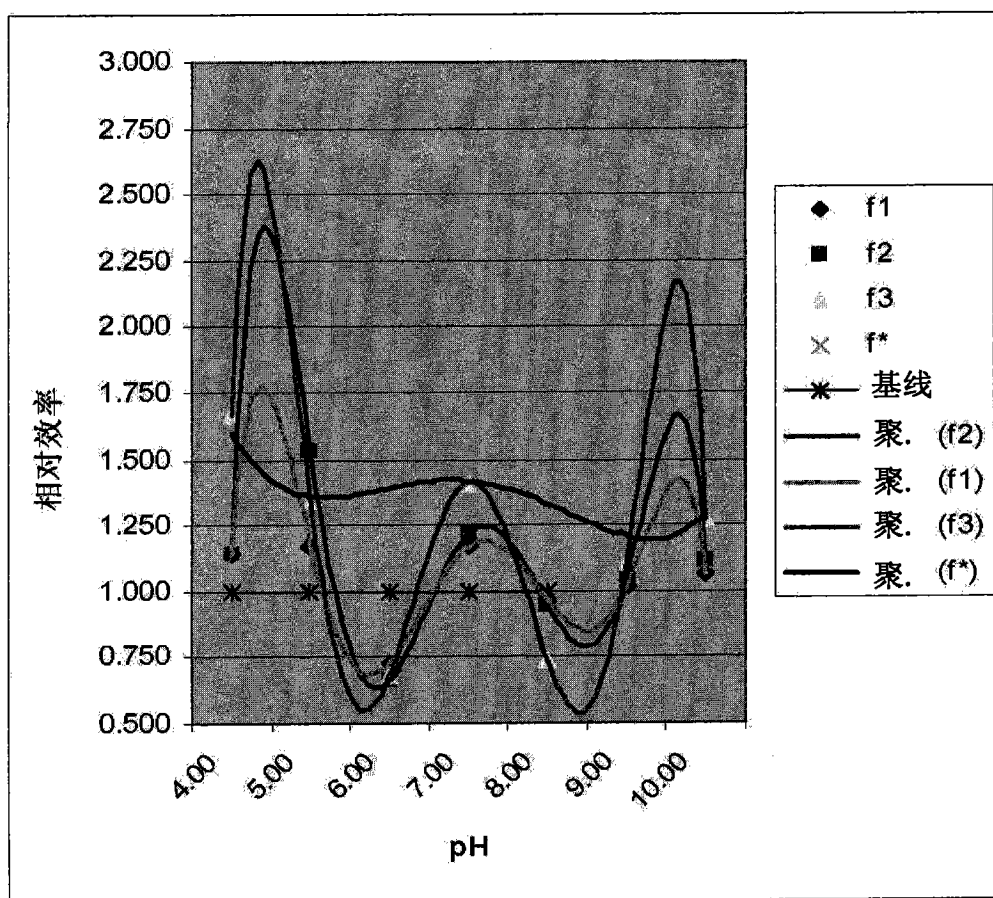


图 4

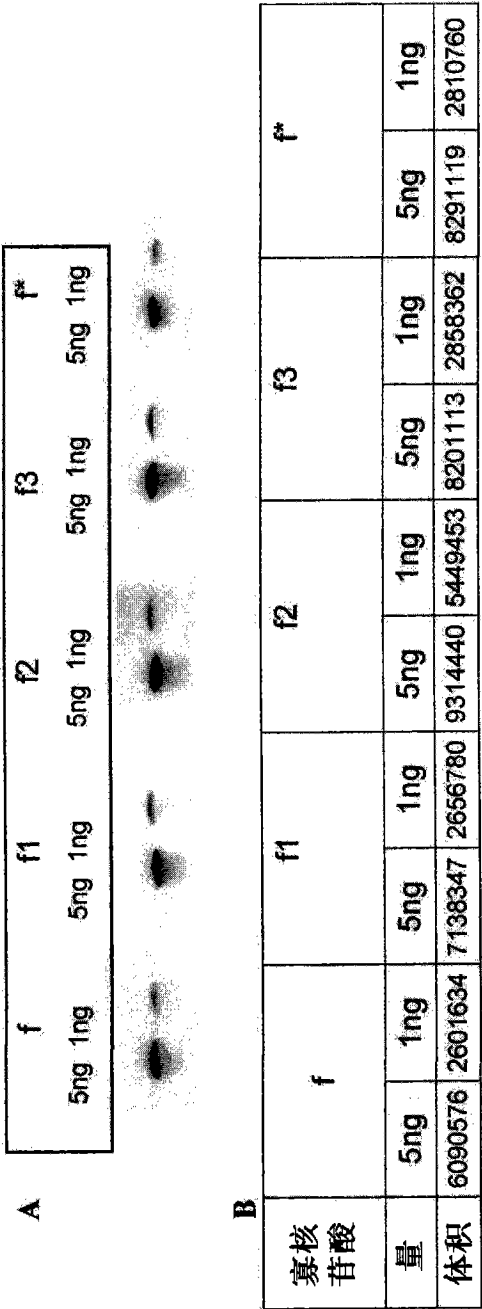


图 5

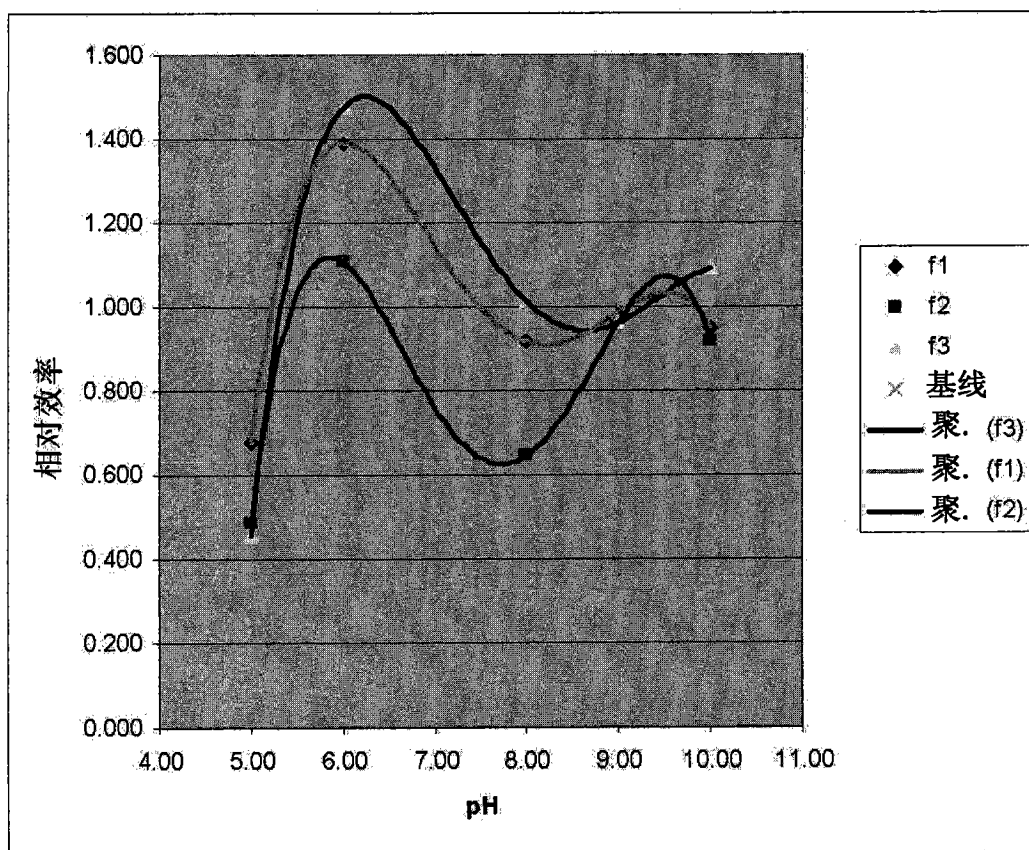


图 6

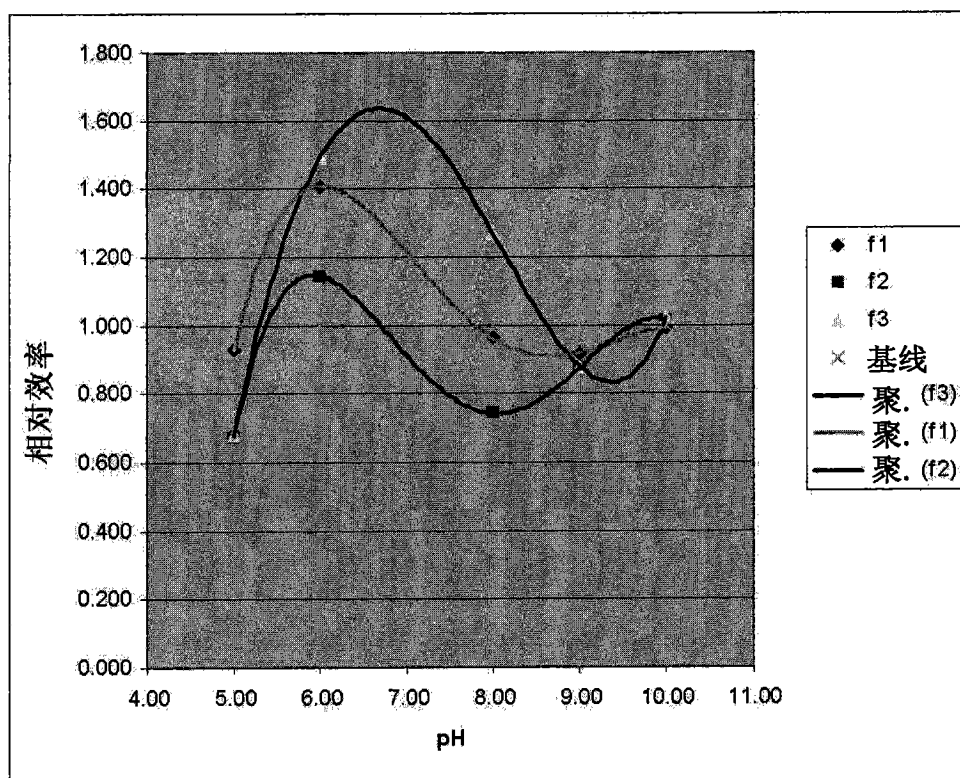


图 7

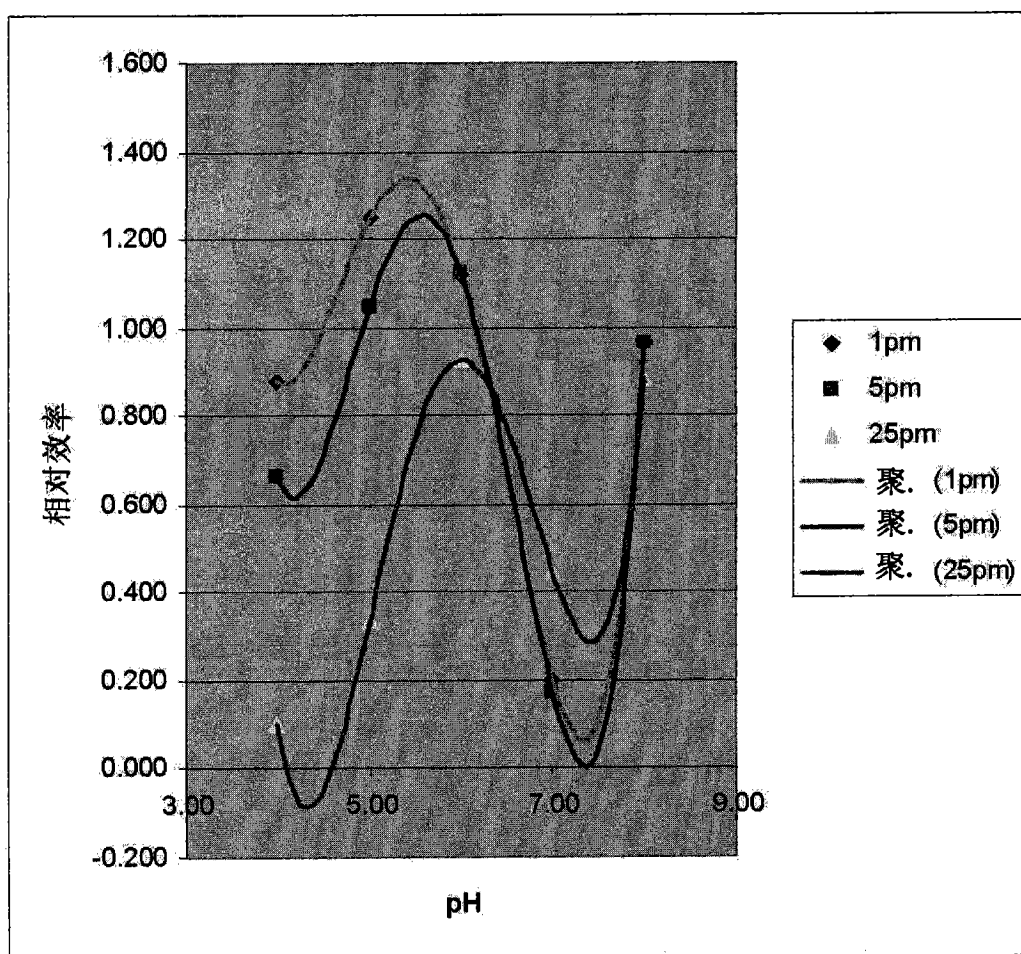


图 8

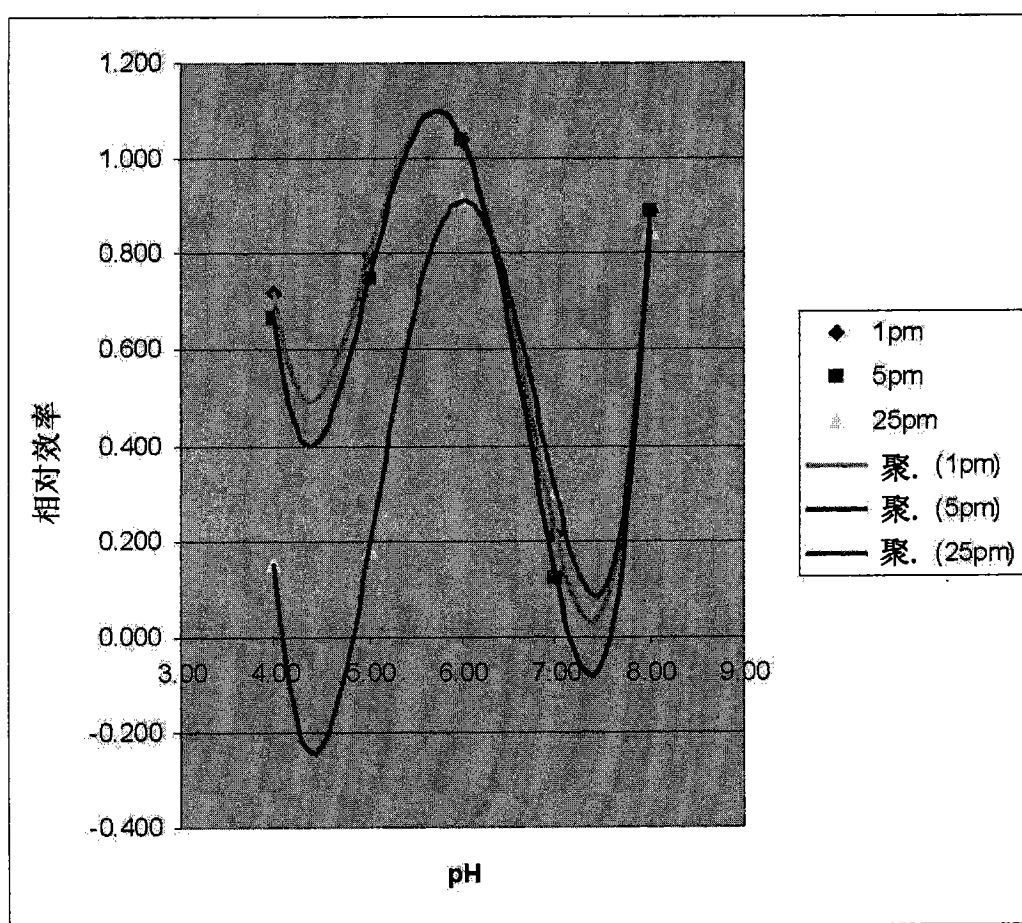


图 9

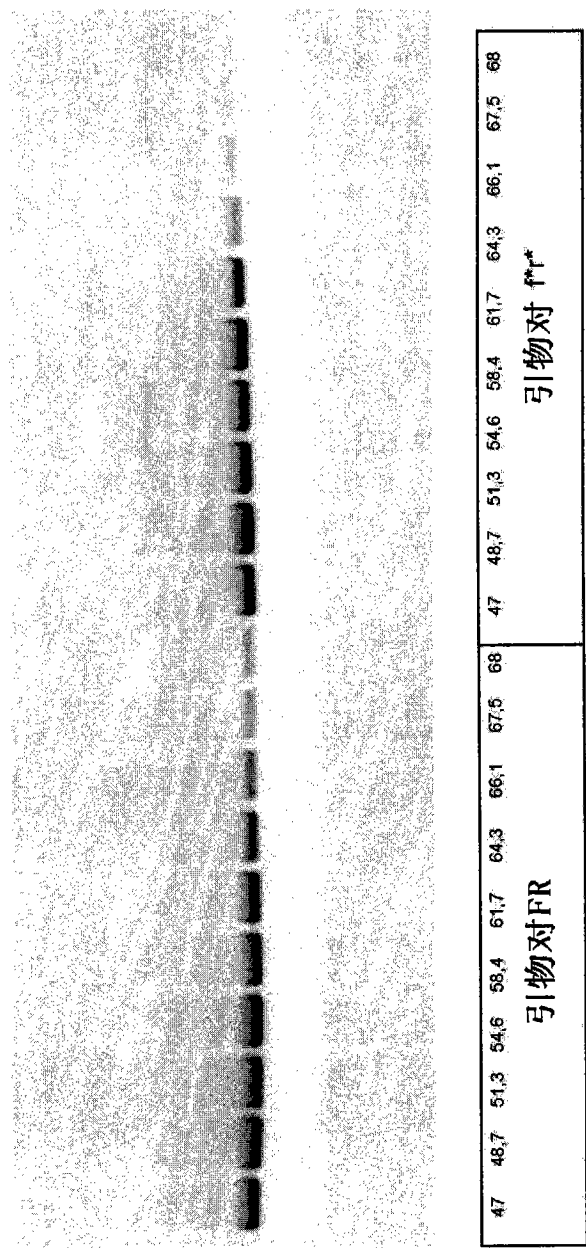


图 10

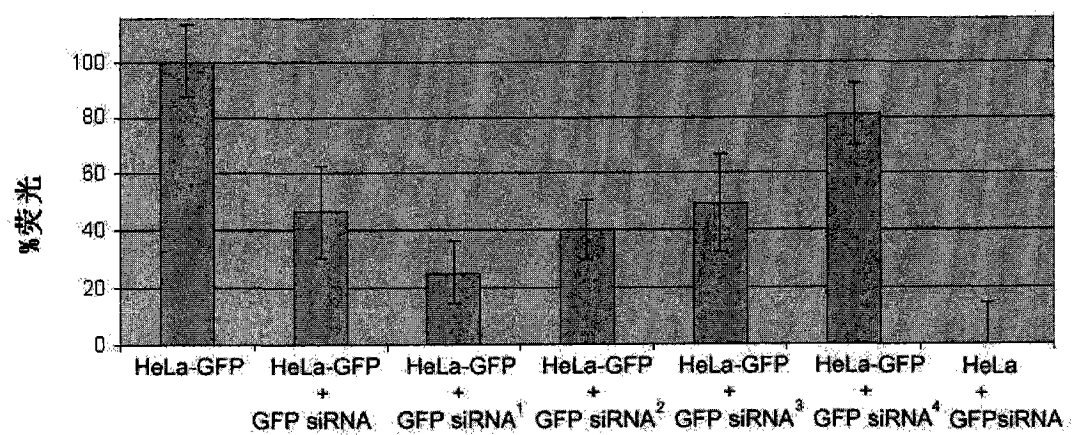


图 11