



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117126846 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 28

(21) 申请号 202310648137.7

(22) 申请日 2013.11.14

(30) 优先权数据

12192773.5 2012.11.15 EP

13153296.2 2013.01.30 EP

13157237.2 2013.02.28 EP

13174092.0 2013.06.27 EP

(62) 分案原申请数据

201380069256.1 2013.11.14

(71) 申请人 罗氏创新中心哥本哈根有限公司

地址 丹麦霍尔斯霍姆

(72) 发明人 N·阿尔贝克 H·F·汉森

S·卡姆勒 J·拉夫恩 H·奥姆

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 黄革生 隋晓平

(51) Int.Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 47/54 (2017.01)

A61P 3/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书97页

序列表(电子公布) 附图27页

(54) 发明名称

寡核苷酸缀合物

(57) 摘要

本发明涉及寡核苷酸治疗剂领域,并具体而言涉及共价附着缀合物、靶向基团或保护基团的可切割的区域,例如磷酸二酯区域以增强寡核苷酸性质,例如提高治疗指数的用途。

1. 长度为8-35个核苷酸的寡聚化合物,其包含三个区域:

i) 第一个区域(区域A),其是与其能够调节的核酸靶标互补的7-26个连续核苷酸的反义寡聚物,其中所述第一个区域包含至少四个核苷类似物,所述核苷类似物选自二环核苷类似物(例如LNA)和/或2'取代的核苷类似物并且其中第一个区域的核苷间连接为100%的非磷酸二酯的核苷间连接;

ii) 第二个区域(区域B),其通过磷酸二酯连接共价连接第一个区域的5'或3'核苷酸,其中区域B由通过磷酸二酯连接而连接的两个或三个连续DNA和/或RNA单元组成;和

iii) 第三个区域,其包含非核苷酸缀合物部分,其中第三个区域共价连接第二个区域。

2. 权利要求1的寡聚化合物,其中非磷酸二酯的核苷间连接选自硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和硼代磷酸酯。

3. 权利要求1-2任一项的寡聚化合物,其中所述核酸靶标选自microRNA、mRNA、lncRNA(长链非编码RNA)、snRNA、snoRNA和病毒RNA。

4. 权利要求1-3任一项的寡聚化合物,其中所述寡聚化合物的第一个区域包含gapmer、mixmer或totalmer。

5. 权利要求1-4任一项的寡聚化合物,其中所述寡聚化合物的第一个区域包含至少一个双环核苷酸类似物(LNA)。

6. 权利要求1-5任一项的寡聚化合物,其中所述第一个区域和所述第二个区域形成连续核苷酸序列。

7. 权利要求1-6任一项的寡聚化合物,其中所述第二个区域在第一个区域的5'。

8. 权利要求1-6任一项的寡聚化合物,其中所述第二个区域在第一个区域的3'。

9. 权利要求1-8任一项的寡聚化合物,其中区域B由序列AA,AT,AC,AG,TA,TT,TC,TG,CA,CT,CC,CG,GA,GT,GC,或GG的二核苷酸组成。

10. 权利要求1-8任一项的寡聚化合物,其中区域B由序列AAA,AAT,AAC,AAG,ATA,ATT,ATC,ATG,ACA,ACT,ACC,ACG,AGA,AGT,AGC,AGG,TAA,TAT,TAC,TAG,TTA,TTT,TTC,TAG,TCA,TCT,TCC,TCG,TGA,TGT,TGC,TGG,CAA,CAT,CAC,CAG,CTA,CTG,CTC,CTT,CCA,CCT,CCC,CCG,CGA,CGT,CGC,CGG,GAA,GAT,GAC,CAG,GTA,GTT,GTC,GTG,GCA,GCT,GCC,GCG,GGA,GGT,GGC,或GGG的三核苷酸组成。

11. 权利要求1-10任一项的寡聚化合物,其中所述第二个区域在第二个区域的末端核苷处共价连接第三个区域。

12. 权利要求1-11任一项的寡聚化合物,其中所述非核苷酸缀合物部分是固醇或糖类。

13. 权利要求12的寡聚化合物,其中所述非核苷酸缀合物部分是胆固醇或GalNac/GalNac簇。

14. 权利要求1-11任一项的寡聚化合物,其中所述第三个区域包含选自亲脂基团、蛋白质、肽、抗体或其片段、聚合物、报告基团、染料、受体配体、小分子药物、前体药物和维生素的部分。

15. 权利要求1-14任一项的寡聚化合物,其中所述第二个和第三个区域通过非核苷酸接头基团共价结合。

16. 权利要求1-15任一项的寡聚化合物,其中第二个和第三个区域之间的共价连接包含选自磷酸二酯、硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯或硼代磷酸酯基团,如磷酸二酯基团的基团。

17. 权利要求1-15任一项的寡聚化合物,其中第二个和第三个区域之间的共价连接包含磷酸二酯基团。

18. 药物组合物,其包含权利要求1-17任一项的寡聚化合物,和药学上可接受的稀释剂、载体、盐或佐剂。

19. 权利要求1-17任一项的寡聚化合物用于在细胞中抑制核酸靶标。

20. 权利要求1-17任一项的寡聚化合物用于医学。

21. 权利要求1-17任一项的寡聚化合物用于治疗医学疾病或病症。

22. 权利要求1-17任一项的寡聚化合物用于制备治疗疾病或病症,如代谢疾病或病症的药物的用途。

寡核苷酸缀合物

[0001] 本申请是申请日为2013年11月14日、发明名称为“寡核苷酸缀合物”的中国专利申请201380069256.1 (国际申请号PCT/EP2013/073858)的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及寡核苷酸治疗学领域,并具体而言涉及缀合物、靶向基团或保护基团增强寡核苷酸性质,例如提高治疗指数的用途。

[0003] 相关案例

[0004] 该申请要求EP12192773.5、EP13153296.2、EP13157237.2和EP13174092.0的优先权,其并入本文作为参考。

[0005] 发明背景

[0006] 已经广泛评估了用于siRNA的寡核苷酸缀合物,其中认为它们是获得充足的体内效能必需的。例如,参见W02004/044141涉及修饰的低聚化合物,其通过RNA干扰途径调节基因表达。低聚化合物包括一个或多个缀合物部分,其可以修饰或增强所附着的低聚化合物的药物动力学和药效学性质。

[0007] 相反,单链反义寡核苷酸在治疗上通常在不缀合或配制的情况下施用。用于反义寡核苷酸的主要靶组织是肝和肾,尽管通过反义形式也可以易于接近广泛的其他组织,包括淋巴结、脾、骨髓。

[0008] W02008/113832公开了LNA硫代磷酸酯gapmer寡核苷酸,其中所述侧翼区在LNA核苷之间或附近包含至少一个磷酸二酯。寡聚体优先靶向肾。

[0009] W02004/087931涉及包含酸可切割亲水聚合物(PEG)缀合物的寡核苷酸。

[0010] W0 2005/086775涉及使用治疗化学部分、可切割接头和标记结构域将治疗剂靶向递送到特定器官中。可切割接头可以是例如,二硫基、肽或限制性内切核酸酶可切割的寡核苷酸结构域。

[0011] W0 2009/126933涉及通过组合靶向配体与endosomolytic组分特定递送siRNA核酸。

[0012] W0 2011/126937涉及通过与小分子配体缀合靶向细胞内递送寡核苷酸。

[0013] W02009/025669涉及含有吡啶基二硫化物部分的聚合(聚乙二醇)接头。也参见Zhao等,Bioconjugate Chem.2005 16 758-766。

[0014] Chaltin等,Bioconjugate Chem.2005 16 827-836报道了用于将反义寡核苷酸掺入到阳离子脂质体中的胆固醇修饰的单、双和四聚体寡核苷酸,以产生树枝状(dendrimeric)递送系统。胆固醇通过赖氨酸接头缀合到寡核苷酸上。

[0015] 其他不可切割的胆固醇缀合物已经用于将siRNA和antagomirs靶向肝-参见例如,Soutscheck等,Nature 2004vol.432 173-178和Krützfeldt等,Nature 2005vol 438,685-689。对于部分硫代磷酸酯化的siRNA和antagomirs,发现胆固醇作为肝靶向实体的用途对于体内活性是至关重要的。

[0016] 本发明基于这样的发现,即通过核酸酶不稳定的核苷,如磷酸二酯连接的DNA或

RNA核苷的短区域,使用连接寡核苷酸的归巢设备实现寡核苷酸的高度有效的靶向递送。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明提供寡聚化合物,其包含三个区域:

[0019] i) 第一个区域(区域A),其包含7-26个连续核苷酸;

[0020] ii) 第二个区域(区域B),其包含1-10个核苷酸,其如通过核苷间连接基团,如磷酸二酯连接共价连接第一个区域的5' 或3' 核苷酸,其中

[0021] a. 第一个和第二个区域之间的核苷间连接是磷酸二酯连接并且[如紧紧]邻接第一个区域的第二个区域的核苷是DNA或RNA;和/或

[0022] b. 第二个区域的至少1个核苷是磷酸二酯连接的DNA或RNA核苷;

[0023] iii) 第三个区域(C),其包含缀合物部分、靶向部分、反应基团、激活基团,或阻断部分,其中所述第三个区域共价连接第二个区域。

[0024] 在一些实施方案中,区域A和区域B形成长度为8-35个核苷酸的单一连续核苷酸序列。

[0025] 在一些方面,可以认为第一个和第二个区域之间的核苷间连接是第二个区域的一部分。

[0026] 在一些实施方案中,在第二个和第三个区域之间具有含磷的连接基团。磷连接基团例如可以是磷酸酯(磷酸二酯)、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或硼代磷酸酯(boranophosphate)基团。在一些实施方案中,该含磷的连接基团定位在第二个区域和附着到第三个区域上的接头区域之间。在一些实施方案中,所述磷酸酯基团是磷酸二酯。

[0027] 因而,在一些方面,寡聚化合物包含至少两个磷酸二酯基团,其中至少一个是如本发明上文所述,另一个定位在第二个和第三个区域之间,任选地定位在接头基团和第二个区域之间。

[0028] 在一些实施方案中,第三个区域是激活基团,如用于缀合的激活基团。在这方面,本发明还提供包含区域A和B以及激活基团的激活寡聚体,例如适合于后续连接第三个区域,如适合于缀合的中间物。

[0029] 在一些实施方案中,第三个区域是反应基团,如用于缀合的反应基团。在这方面,本发明还提供包含区域A和B以及反应基团的寡聚体,例如适合于后续连接第三个区域,如适合于缀合的中间物。在一些实施方案中,反应基团可以包含醇基的胺,如胺基。

[0030] 在一些实施方案中,区域A除磷酸二酯外还包含至少1个,如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个核苷间连接,如(任选地独立)选自硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和硼代磷酸酯(boranophosphate),以及甲基磷酸酯的核苷间连接,如硫代磷酸酯。在一些实施方案中,区域A包含至少1个硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,区域A内至少50%,如至少75%,如至少90%的核苷间连接,如所有的核苷间连接不是磷酸二酯,例如是硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,区域A中的所有的核苷间连接不是磷酸二酯。

[0031] 在一些实施方案中,寡聚化合物包含反义寡核苷酸,如反义寡核苷酸缀合物。反义寡核苷酸可以是或可以包含第一个区域,和任选地第二个区域。在这方面,在一些实施方案中,区域B可以形成连续核碱基序列的部分,其与(核酸)靶标互补。在其他实施方案中,区域B可以缺少与靶标的互补性。

[0032] 或者说明,在一些实施方案中,本发明提供非磷酸二酯连接的,如硫代磷酸酯连接的寡核苷酸(例如反义寡核苷酸),其具有通过磷酸二酯连接而连接寡核苷酸的相邻核苷的至少一个末端(5' 和/或3') DNA或RNA核苷,其中所述末端DNA或RNA核苷进一步任选地通过接头部分共价连接缀合物部分、靶向部分或阻断部分。

[0033] 本发明提供包含本发明的寡聚化合物和药学上可接受的稀释剂、载体、盐或佐剂的药物组合物。

[0034] 本发明提供本发明的寡聚化合物用于在细胞中抑制核酸靶标。在一些实施方案中,在体外使用。在一些实施方案中,在体内使用。

[0035] 本发明提供本发明的寡聚化合物用于药物,如用作药剂。

[0036] 本发明提供本发明的寡聚化合物用于治疗医学疾病或病症。

[0037] 本发明提供本发明的寡聚化合物用于制备药剂以治疗疾病或病症,如代谢疾病或病症。

[0038] 本发明提供合成(或制造)寡聚化合物,如本发明的寡聚化合物的方法,所述方法包括:

[0039] a) 提供[固相]寡核苷酸合成支持物的步骤,以下之一附着到所述[固相]寡核苷酸合成支持物上[第三个区域]:

[0040] i) 任选地接头基团(-Y-)

[0041] ii) 基团X,其包含选自缀合物、靶向基团、保护基团、反应基团[例如,胺或醇]或激活基团(X-),或-Y-X基团的基团,

[0042] 和

[0043] b) 区域B后接区域A的[连续]寡核苷酸合成步骤,和/或:

[0044] c) 第一个区域(A)和第二个区域(B)的[顺序]寡核苷酸合成步骤,其中所述合成步骤后接

[0045] d) 添加第三个区域[包含亚磷酰胺]的步骤i) 任选地接头基团(-Y-)

[0046] ii) 基团X,其包含选自缀合物、靶向基团、保护基团、反应基团[例如,胺或醇]或激活基团(X-),或任选地-Y-X基团的基团

[0047] 随后是

[0048] e) 寡聚化合物从[固相]支持物上的切割,其中,任选地所述方法还包括选自以下的其他步骤:

[0049] f) 其中所述第三个基团是激活基团,激活所述激活基团以产生反应基团的步骤,随后是任选地通过接头基团(Y)向反应基团添加缀合物、保护基团、或靶向基团;

[0050] g) 其中所述第三个区域是反应基团,任选地通过接头基团(Y)向反应基团添加缀合物、保护基团、或靶向基团的步骤;

[0051] h) 其中所述第三个区域是接头基团(Y),向接头基团(Y)添加缀合物、保护基团或靶向基团的步骤

[0052] 其中步骤f)、g)或h)在从寡核苷酸合成支持物上切割寡聚化合物之前或之后进行。在一些实施方案中,所述方法使用标准的亚磷酰胺化学进行,并且如此在掺入到寡聚体中之前可以提供区域X和/或区域X或区域X和Y,如亚磷酰胺。请参见图5-10,其阐明了本发明方法的非限制性方面。

[0053] 本发明提供合成(或制造)寡聚化合物,如本发明的寡聚化合物的方法,所述方法包括

[0054] [连续]寡核苷酸合成第一个区域(A)和任选地第二个区域(B)的步骤,其中合成步骤后接添加第三个区域[包含亚磷酰胺]区域X(也称为区域C)的步骤,或Y,如包含选自缀合物、靶向基团、保护基团、功能基团、反应基团[例如,胺或醇]或激活基团(X-),或-Y-X基团的基团的区域,随后是从所述[固相]支持物上切割寡聚化合物。

[0055] 然而认识到可以在从固体支持物上切割后添加区域X或X-Y。或者,合成的方法可包括合成第一个(A),和任选地第二个区域(B),随后从支持物上切割寡聚体的步骤,还有向寡聚体添加第三个区域,如X或X-Y基团的后续步骤。例如可以通过在寡聚体合成的最后步骤(在支持物上)添加氨基亚磷酰胺单元完成第三个区域的添加,其可以在从支持物上切割后用于任选地通过X或Y(存在时)基团上的激活基团结合X或X-Y基团。在其中可切割接头不是核苷酸区域的实施方案中,区域B可以是非核苷酸可切割的接头,例如肽接头,其可以形成区域X(也称为区域C)的部分或可以是区域Y(或其部分)。

[0056] 在一些实施方案中,区域X(如C)或(X-Y),如缀合物(例如,GalNAc缀合物)包含激活基团,(激活的功能基团)并且在合成方法中,向第一个和第二个区域中添加激活缀合物(或区域x或X-Y),如氨基连接的寡聚体。可以通过标准的亚磷酰胺化学向寡聚体中添加氨基基团,例如作为寡聚体合成的最后步骤(其通常在寡聚体的5'末端产生氨基基团)。例如在寡核苷酸合成的最后步骤中,使用受保护的氨基-烷基亚磷酰胺,例如TFA-氨基C6亚磷酰胺(6-(三氟乙酰氨基)-己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺)。

[0057] 区域X(或如本文所提及的区域C),如缀合物(例如GalNAc缀合物)可以通过NHS酯方法被激活,然后添加氨基连接的寡聚体。例如,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)可以用作区域X(例如区域C),如缀合物,如GalNAc缀合物部分的激活基团。

[0058] 本发明提供通过本发明方法制备的寡聚体。

[0059] 在一些实施方案中,区域X和/或区域X或区域X和Y可以通过磷酸核苷连接,如本文所述的那些,包括磷酸二酯或硫代磷酸酯,或通过备选基团,如三唑基团共价结合(连接)区域B。

[0060] 本发明提供在需要治疗的受试者中治疗疾病或病症的方法,所述方法包括以治疗有效量向所述受试者施用包含本发明的寡聚化合物的药物组合物的步骤。

[0061] 本发明提供在细胞中抑制靶基因表达的方法,所述方法包括以有效降低靶基因在所述细胞中表达的量适当地向表达所述靶基因的细胞施用本发明的寡聚化合物。在一些实施方案中,所述方法在体外(即不在生物体内,但是可以在(例如离体)细胞或组织中)。在一些实施方案中,所述方法在体内。

[0062] 本发明还提供LNA寡聚体,其包含8-24个硫代磷酸酯连接的核苷的邻接区域,并进一步包含与LNA寡聚体邻接的1-6个DNA核苷,其中DNA之间,和/或DNA核苷附近的核苷间连接在生理学上不稳定,如是/是磷酸二酯连接。该LNA寡聚体可以是缀合物的形式,如本文所述,或可以例如是待用于后续缀合步骤的中间物。当缀合时,缀合物可以例如是或包含固醇,如胆固醇或生育酚,或可以是或包含(非核苷酸)糖类,如GalNAc缀合物,如GalNAc簇,例如三GalNAc,或如本文所述的另一缀合物。

[0063] 本发明提供LNA反义寡聚体(其在本文中 can 称作区域A),其包含反义寡聚体和唾

液酸糖蛋白受体靶向部分缀合物部分,如GalNac部分,其可以形成其他区域(称作区域C)的一部分。LNA反义寡聚体长度可以是7-30个,如8-26个核苷并且其包含至少一个LNA单元(核苷)。

[0064] 本发明提供共价结合(例如连接)(非核苷)糖类部分,如糖类缀合物部分的LNA反义寡聚体。在一些实施方案中,所述糖类部分不是线性糖类聚合物。然而该糖类部分可以是多价的,如例如2、3、4或4个相同的或不不同的糖类部分可以任选地通过接头或多个接头共价结合寡聚体。

[0065] 本发明提供包含反义寡聚体和包含糖类,如糖类缀合物部分的缀合物部分的LNA反义寡聚体(缀合物)。

[0066] 本发明提供包含本发明的LNA寡聚化合物和药学上可接受的稀释剂、载体、盐或佐剂的药物组合物。

[0067] 本发明提供本发明的寡聚化合物用于抑制细胞中的核酸靶标。在一些实施方案中,在体外使用。在一些实施方案中,在体内使用。

[0068] 本发明提供本发明的寡聚化合物用于药物,如用作药剂。

[0069] 本发明提供本发明的寡聚化合物用于治疗医学疾病或病症。

[0070] 本发明提供本发明的寡聚化合物用于制备用于治疗疾病或病症,如代谢疾病或病症的药剂的用途。

[0071] 附图简述

[0072] 图1:附着到激活基团(即受保护的反应基团-作为第三个区域)上的本发明寡聚体的非限制性图解。核苷间连接L可以是例如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基膦酸酯,如磷酸二酯。PO是磷酸二酯连接。化合物a)具有含有单个DNA或RNA的区域B,第二个与第一个区域之间的连接是PO。化合物b)具有通过磷酸二酯连接而连接的两个DNA/RNA(如DNA)核苷。化合物c)具有通过磷酸二酯连接而连接的三个DNA/RNA(如DNA)核苷。在一些实施方案中,区域B可以进一步通过其他磷酸二酯DNA/RNA(如DNA核苷)延伸。在每一化合物的左边图解了激活基团,并且其可以通过磷核苷连接基团,如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基膦酸酯,或在一些实施方案中通过三唑连接任选地连接区域B的末端核苷。化合物d)、e)和f)在区域B与激活基团之间还包含接头(Y),并且区域Y可以通过例如磷核苷连接基团,如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基膦酸酯,或在一些实施方案中通过三唑连接而连接区域B。

[0073] 图2:如图1中所示的等同化合物;然而,反应基团用于替代激活基团。所述反应基团在一些实施方案中可以是激活基团激活(例如去保护)的结果。该反应基团在非限制性实例中可以是胺或醇。

[0074] 图3:本发明化合物的非限制性图解。与图1相同的命名法。X在一些实施方案中可以是缀合物,如亲脂缀合物,如胆固醇,或另一缀合物,如本文所述的那些。此外或者, X可以是靶向基团或保护基团。在一些方面, X可以是激活基团(参见图1),或反应基团(参见图2)。X可以通过磷核苷连接基团,如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基膦酸酯共价附着区域B,或通过备选连接,如三唑连接进行连接(参见化合物d)、e)和f)中的L)。

[0075] 图4. 本发明化合物的非限制性图解,其中所述化合物在第三个区域(X)和第二个

区域(区域B)之间包含任选的接头。与图1相同的命名法。合适的接头如本文所公开,并且包括例如烷基接头,例如C6接头。在化合物A、B和C中,X和区域B之间的接头通过磷核苷连接基团,如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基膦酸酯附着区域B,或可以通过备选连接,例如三唑连接(Li)进行连接。在这些化合物中,Lii代表第一个(A)和第二个区域(B)之间的核苷间连接。

[0076] 图5a和b.5b显示本发明化合物的合成方法的非限制性实例。US代表寡核苷酸合成支持物,其可以是固体支持物。X是第三个区域,如缀合物、靶向基团、保护基团等。在任选的预先步骤中,向寡核苷酸合成支持物中添加X。另外可以获得早已附着X的支持物(i)。在第一个步骤中,合成区域B(ii),然后是区域A(iii),随后从所述寡核苷酸合成支持物上切割本发明的寡聚化合物(iv)。在备选方法中,预先步骤涉及提供附着区域X和接头基团(Y)的寡核苷酸合成支持物(参见图5a)。在一些实施方案中,X或Y(如果存在)通过磷核苷接头基团,如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基膦酸酯附着区域B,或可以通过备选连接,例如三唑连接进行连接。

[0077] 图6.在第三个区域(X)和第二个区域(B)之间包含接头(Y)的本发明化合物的合成方法的非限制性实例。US代表寡核苷酸合成支持物,其可以是固体支持物。X是第三个区域,如缀合物、靶向基团、保护基团等。在任选的预先步骤中,向寡核苷酸合成支持物中添加Y。另外可以获得早已附着Y的支持物(i)。在第一个步骤中,合成区域B(ii),然后是区域A(iii),随后从所述寡核苷酸合成支持物上切割本发明的寡聚化合物(iv)。在一些实施方案中(如所示),切割步骤后向接头(Y)添加区域X。在一些实施方案中,Y通过磷核苷接头基团,如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基膦酸酯附着区域B,或可以通过备选连接,例如三唑连接进行连接。

[0078] 图7.利用激活基团的本发明化合物的合成方法的非限制性实例。在任选的预先步骤中,激活基团附着到寡核苷酸合成支持物上(i),或另外获得具有激活基团的寡核苷酸合成支持物。在步骤ii)中,区域B在区域A之后合成(iii)。然后从寡核苷酸合成支持物上切割寡聚体(iv)。然后可以激活中间寡聚体(包含激活基团)(vI)或(viii)并任选地通过接头(Y)(ix)添加第三个区域(X)(vi)。在一些实施方案中,X(或Y,存在时)通过磷核苷连接基团,如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基膦酸酯附着区域B,或通过备选连接,如三唑连接进行连接。

[0079] 图8.本发明化合物的合成方法的非限制性实例,其中使用双功能性寡核苷酸合成支持物(i)。在该方法中,寡核苷酸在初始步骤(ii)-(iii)系列中合成,随后是第三个区域(任选通过接头基团Y)的附着,然后可以切割本发明的寡聚化合物(v)。或者,如步骤(vi)-(ix)中所示,第三个区域(任选地具有接头基团(Y))附着到寡核苷酸合成支持物上(这可以是任选的预先步骤)-或另外提供具有第三个区域(任选地具有Y)的寡核苷酸合成支持物,然后合成所述寡核苷酸(vii-viii)。然后可以切割本发明的寡聚化合物(ix)。在一些实施方案中,X(或Y,存在时)通过磷核苷连接基团,如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基膦酸酯附着区域B,或通过备选连接,如三唑连接进行连接。在一些实施方案中,在方法之前(如预先步骤),US包括添加双向(双功能)基团的步骤,所述基团允许独立合成寡核苷酸及将基团X、Y(或X和Y)共价附着到支持物上(如所示)-这例如可以使用三唑或核苷基团实现。然后可以从支持物上切割附着寡聚体的双向(双功能)基团。

[0080] 图9. 本发明化合物的合成方法的非限制性实例。在初始步骤中, 合成第一个区域(A) (ii), 随后是区域B。在一些实施方案中, 第三个区域然后任选地通过磷酸核苷连接(或例如三唑连接)附着到区域B上(iii)。然后可以切割本发明的寡聚化合物(iv)。当使用接头(Y)时, 在一些实施方案中, 步骤(v) - (viii)可以是以下: 合成区域B后, 添加接头基团(Y), 然后附着到(Y)上, 或在后续步骤中, 添加区域X(vi)。然后可以切割本发明的寡聚化合物(vii)。在一些实施方案中, X(或Y, 存在时)通过磷核苷连接基团, 如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基磷酯附着区域B, 或通过备选连接, 如三唑连接附着区域B。

[0081] 图10. 本发明化合物的合成方法的非限制性实例。在该方法中, 使用激活基团: 步骤(i) - (iii)参照图9。然而, 在寡核苷酸合成(步骤iii)后, 任选地通过磷酸核苷连接向区域B添加激活基团(或反应基团)。然后从支持物上切割寡核苷酸(v)。随后可以激活所述激活基团以产生反应基团, 然后向该反应基团(其可以是激活的激活基团或反应基团)添加第三个区域(X), 如缀合物、保护基团或靶向基团, 以产生寡聚体(vi)。如(vii) - (viii)中所示, 切割后, 添加接头基团(Y) (vii), 然后附着到(Y)上或在后续步骤中, 添加区域X以产生寡聚体(viii)。应该认识到在备选所有步骤(ii) - (viii)均可以在寡核苷酸合成支持物上进行, 并且在这种情况下, 可以进行从支持物上切割寡聚体的最终步骤。在一些实施方案中, 反应基团或激活基团通过磷核苷连接基团, 如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基磷酯附着区域B, 或通过备选连接, 如三唑连接进行连接。

[0082] 图11. 在体内利用胆固醇-缀合物沉默ApoB mRNA。利用单一剂量的1mg/kg未缀合的LNA-反义寡核苷酸(#3833)或以不同接头(表3)与胆固醇缀合的等摩尔量LNA反义寡核苷酸注射小鼠并在给药后第1、3、7和10天将其处死。从肝和肾中分离RNA并使其进行ApoB特异性的RT-qPCR A. 来自肝样品的ApoB mRNA的定量, 其针对GAPDH进行归一化并显示为等同盐水对照的平均值百分比B. 来自肾样品的ApoB mRNA的定量, 其针对GAPDH进行归一化并显示为等同盐水对照的平均值百分比。

[0083] 图12. 显示胆固醇C6缀合物, 其可用作本发明化合物中的X-Y-, 以及用于实施例中的特定化合物包括本发明的特定化合物。

[0084] 图13. 显示用于实验中的胆固醇、三价GalNac、FAM、叶酸、单价GalNac和生育酚缀合物的实例(例如图12的化合物)。

[0085] 图14. 在体内利用胆固醇缀合物沉默ApoB mRNA。利用单一剂量的1mg/kg未缀合的LNA-反义寡核苷酸(#3833)或以不同接头(表3)与胆固醇缀合的等摩尔量LNA反义寡核苷酸注射小鼠并在给药后第1、3、7、10、13和16天将其处死。从肝和肾中分离RNA并使其进行ApoB特异性的RT-qPCR A. 来自肝样品的ApoB mRNA的定量, 其针对GAPDH进行归一化并显示为等同盐水对照的平均值百分比B. 来自肾样品的ApoB mRNA的定量, 其针对GAPDH进行归一化并显示为等同盐水对照的平均值百分比。

[0086] 图15. 体内肝和肾中特异性LNA寡核苷酸的含量。利用单一剂量的1mg/kg未缀合的LNA-反义寡核苷酸(#1)或以不同接头(表4)与胆固醇缀合的等摩尔量LNA反义寡核苷酸注射小鼠并在给药后第1、3、7、10、13和16天将其处死。使用基于LNA的夹层ELISA方法测量LNA寡核苷酸含量。

[0087] 图16. 在体内利用胆固醇-缀合物沉默PCSK9 mRNA。利用单一剂量的10mg/kg未缀

合的LNA-反义寡核苷酸(#7)或以不同接头(表5)与胆固醇缀合的等摩尔量LNA反义寡核苷酸注射小鼠并在给药后第1、3、7和10天将其处死。从肝和肾中分离RNA并使其进行PCSK9特异性的RT-qPCR A. 来自肝样品的PCSK9 mRNA的定量,其针对BACT进行归一化并显示为等同盐水对照的平均值百分比B. 来自肾样品的PCSK9mRNA的定量,其针对BACT进行归一化并显示为等同盐水对照的平均值百分比。

[0088] 图17.可以使用的三GalNac缀合物的实例。缀合物1-4阐明了4种合适的GalNac缀合物部分,并且缀合物1a-4a指具有额外接头部分(Y)的相同缀合物,所述接头部分用于将缀合物连接到寡聚体上(区域A或生物可切割接头,如区域B)。波浪线代表与寡聚体的共价连接。还显示了胆固醇和生育酚缀合物部分的实例(5a和6a)。波浪线代表与寡聚体的共价连接。

[0089] 图18:实施例7a:FVII血清蛋白质水平

[0090] 图19:实施例7a:第4天肝中的FVII mRNA水平

[0091] 图20:实施例7a:第4天肝和肾中的寡核苷酸含量

[0092] 图21:实施例7b-FVII血清蛋白质水平

[0093] 图22:第24天肝中的FVII mRNA水平

[0094] 图23:第4天肝和肾中的寡核苷酸含量

[0095] 图24.利用不同的缀合物和PO-接头体内沉默ApoB mRNA。

[0096] 利用1mg/kg具有不同缀合物的ASO处理小鼠,所述缀合物不具有生物可切割接头、具有二硫代接头(SS)或具有DNA/PO-接头(PO)。从肝(A)和肾样品(B)中分离RNA并分析ApoB mRNA敲减。与盐水(=1)相比显示数据。

[0097] 图25.利用具有PO-接头的成环LNA ASO体外沉默靶标X mRNA。

[0098] 分别利用具有或不具有PO-接头的成环LNA ASO处理Neuro 2a细胞。6天后提取gymnosis mRNA并分析靶标X mRNA敲减。mRNA表达显示为模拟物处理样品的百分比。

[0099] 发明描述

[0100] 本发明涉及寡聚化合物,如反义寡核苷酸,其通过包含(例如1-10个)磷酸二酯连接的DNA或RNA核苷的短区域共价连接缀合物基团、靶向基团、反应基团、激活基团,或保护基团。

[0101] 寡聚体

[0102] 本发明使用寡聚化合物(本文中也称为寡聚体)用于调节,如抑制细胞中的靶核酸。寡聚体可以具有8-35个连续核苷酸的长度并包含7-25个连续核苷酸的第一个区域,和1-10个连续核苷酸的第二个区域,其中例如,第一个和第二个区域之间的核苷间连接是磷酸二酯,其连接第二个区域的第一个(或仅)DNA或RNA核苷,或区域B包含至少一个磷酸二酯连接的DNA或RNA核苷。

[0103] 在一些实施方案中,第二个区域可以包含其他DNA或RNA核苷,其可以是磷酸二酯连接的。第二个区域进一步共价连接第三个区域,其例如可以是缀合物、靶向基团、反应基团,和/或保护基团。

[0104] 在一些方面,本发明基于提供不稳定区域,连接第一个区域的第二个区域,例如反义寡核苷酸,和缀合物或官能团,例如靶向或保护基团。不稳定区域包含至少一个磷酸二酯连接的核苷,如DNA或RNA核苷,如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个磷酸二酯连接的核苷,如DNA或

RNA。在一些实施方案中,寡聚化合物包含可切割(不稳定)的接头。在该方面,可切割接头优选存在于区域B中(或在一些实施方案中,在区域A和B之间)。

[0105] 在本发明的上下文中,术语“寡聚体”指通过两个或多个核苷酸(即寡核苷酸)的共价连接形成的分子。在本文中,单个核苷酸(单元)也可以称为单体或单元。在一些实施方案中,术语“核苷”、“核苷酸”、“单元”和“单体”互换使用。将认识到,当指核苷酸或单体的序列时,指的碱基序列,如A、T、G、C或U。

[0106] 寡聚体由以下组成或包含长度为8-25个,如9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25个核苷酸,如长度为10-20个核苷酸的连续核苷酸序列。

[0107] 在多个实施方案中,本发明的化合物不包含RNA(单元)。在一些实施方案中,本发明的化合物,第一个区域,或第一个和第二个区域一起(例如作为单个邻接序列)是线性分子或合成为线性分子。寡聚体因而可以是单链分子。在一些实施方案中,寡聚体不包含例如至少3、4或5个连续核苷酸的短区域,所述短区域与同一寡聚体内的等同区域互补(即双链体)。在一些实施方案中,寡聚体可能不是(基本上)双链的。在一些实施方案中,寡聚体基本上不是双链的,如不是siRNA。

[0108] 在一些实施方案中,寡聚体可以包含第一个区域,其不包含例如至少3、4或5个连续核苷酸的短区域,所述短区域与相同第一个区域内的区域互补(即区域内双链体)。在该方面,在一些实施方案中,第一个寡聚体可能与非共价连接的互补链不形成杂交,例如不形成siRNA的部分。

[0109] 例如,在一些实施方案中,寡聚化合物包含互补性的区域,例如当第一个区域形成siRNA的部分时,或例如当第三个区域包含适体或阻断寡核苷酸时,本发明的寡聚化合物在一些实施方案中可能包含双链核酸的区域。在该实施方案中,例如形成长度为至少3个,如至少4个,如至少5个,如至少6个核苷酸的双链核酸区域可以在第三个区域内,或在第三个区域与例如第一个区域之间,或在一些实施方案中,第二个区域或横跨第一个和第二个区域的区域内(例如当第三个区域包含寡核苷酸阻断区域时)。

[0110] 在一些实施方案中,寡聚化合物不是具有(基本上)互补的寡核苷酸的双链体形式, -例如不是siRNA。

[0111] 在一些实施方案中,寡聚化合物是LNA寡聚体,例如LNA反义寡聚体(其在本文中可称为区域A),其包含反义寡聚体(本文中定义的区域B)和糖类缀合物(其可以称为区域C)。LNA反义寡聚体长度可以是7-30,如8-26个核苷酸并且其包含至少一个LNA单元(核苷)。在一些实施方案中,糖类部分不是线性糖类聚合物。

[0112] 在一些实施方案中,寡聚化合物是LNA寡聚体,例如LNA反义寡聚体(其在本文中可称为区域A),其包含反义寡聚体(本文中定义的区域B)和唾液酸糖蛋白受体靶向部分缀合物部分,如GalNAc部分(其可以称为区域C)。糖类部分可以是多价的,如2、3、4或4个相同的或不同的糖类部分可以共价结合寡聚体,任选地通过一个接头或多个接头(如区域Y)。

[0113] 第一个区域

[0114] 在一些实施方案中,第一个区域可以包含基于核酸的寡聚体,如反义寡核苷酸。在一些实施方案中,第一个区域包含或由以下组成:硫代磷酸酯连接的寡核苷酸,如长度为7-25个核苷酸的反义寡核苷酸。第一个区域可以包含至少一个修饰的核苷(如核苷类似物),如至少一个双环核苷(例如LNA)或2'取代的核苷。在一些实施方案中,第一个区域的一些或

全部核苷可以是修饰的核苷,在本文中也称为核苷类似物。在一些实施方案中,修饰的核苷是糖修饰的(例如包含除核糖或脱氧核糖以外的糖或糖替代物部分)。

[0115] 在一些实施方案中,第一个区域是反义寡聚体(反义寡核苷酸),如单链寡聚体,其包含与核酸靶标互补的序列。

[0116] 在一些实施方案中,第一个区域包含或是gapmer。在一些实施方案中,第一个区域包含或是mixmer。在一些实施方案中,第一个区域包含或是totalmer。

[0117] 在一些实施方案中,第一个区域包含至少一个,如至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或25个核苷类似物。在一些实施方案中,核苷类似物是(任选地独立地选自双环核苷类似物(如LNA),和/或2'取代的核苷类似物,如(任选地独立地)选自2'-O-烷基-RNA单元、2'-OMe-RNA单元、2'-氨基-DNA单元、2'-AP、2'-FANA、2'-(3-羟基)丙基和2'-氟-DNA单元,和/或其他(任选地)糖修饰的核苷类似物,如吗啉代,肽核酸(PNA)、CeNA、未连接的核酸(UNA)、己糖醇核酸(HNA)、双环-HNA(参见例如W02009/100320))。在一些实施方案中,核苷类似物增加了第一个区域对其靶核酸(或互补DNA或RNA序列)的亲和力。多种核苷类似物公开于Freier&Altmann;Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443和Uhlmann;Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3 (2), 293-213中,由此并入本文作为参考。

[0118] 在一些实施方案中,寡聚体如其第一个区域,如gapmer、mixmer或totalmer包含至少一个双环核苷酸类似物,如LNA。在一些实施方案中,第一个区域包含至少一个双环核苷类似物(例如LNA)和/或2'取代的核苷类似物。在一些实施方案中,存在于第一个区域中的核苷类似物均包含相同的糖修饰。在一些实施方案中,存在于第一个区域中的至少一个核苷类似物是双环核苷类似物,如至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16,例如所有核苷类似物(或在totalmer中是全部核苷)双环核苷类似物,如LNA,例如 β -D-X-LNA或 α -L-X-LNA(其中X是氧、氨基或硫代),或本文公开的其他LNAs包括但不限于(R/S)cET、cMOE或5'-Me-LNA。在一些实施方案中,寡聚体,或其第一个区域包含DNA和糖修饰的核苷类似物,如双环核苷类似物和/或2'取代的核苷类似物。在一些实施方案中,寡聚体或其第一个区域包含DNA和LNA核苷类似物。

[0119] W005013901、W007/027775、W007027894涉及fully 2'取代的寡聚体,如完全的2'-O-MOE。在一些实施方案中,寡聚体的第一个区域可以包含2'取代的核苷。W007/027775还涉及MOE、LNA、DNA混合物用于靶向microRNAs。

[0120] 在一些实施方案中,第一个区域或组合的第一个和第二个区域不包含多于4或5个相连DNA单元的区域。该第一个区域可以是(基本上)不能募集RNaseH。

[0121] 第一个区域共价连接第二个区域,如通过5'末端或3'末端核苷间连接,如磷酸二酯连接。磷酸二酯连接因而可以定位在区域A的5'最末核苷和区域B的3'最末核苷之间,和/或区域A的3'最末核苷和区域B的5'最末核苷之间。在该方面,在一些实施方案中,可能存在共价结合区域A的两个区域B,一个在区域A的5'末端,另一个在区域A的3'末端。两个区域B可以是相同的或不同的,并且它们可能任选地和独立地通过接头(Y)共价连接相同或不同的第三个区域。

[0122] 在一些实施方案中,第一个区域的一些或全部核苷可以是修饰的核苷,在本文中也称为核苷类似物,如糖修饰的核苷类似物,例如双环核苷类似物(例如LNA)和/或2'取代的核苷类似物。在一些实施方案中,存在于第一个区域中的核苷类似物均包含相同的糖修饰,例如其均是双环核苷类似物,如LNA,例如 β -D-X-LNA或 α -L-X-LNA(其中X是氧、氨基或硫代),或本文中公开的其他LNA,包括但不限于(R/S)cET、cMOE或5'-Me-LNA。

[0123] 在一些实施方案中,第一个区域的核苷间连接包含除磷酸二酯以外的至少一个核苷间连接,如区域A中的至少一个,如至少50%、如至少75%、如至少90%、如至少100%核苷间连接是除磷酸二酯以外的连接。在一些实施方案中,除磷酸二酯以外的核苷间连接是含硫的核苷间连接,如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和硼代磷酸酯,如硫代磷酸酯。

[0124] 第二个区域(区域B)

[0125] 第二个区域可以包含或由以下组成:通过磷酸二酯连接而连接第一个区域的至少一个DNA或RNA核苷。在一些方面,认为第一个和第二个区域之间的核苷间连接是区域B的一部分。

[0126] 在一些实施方案中,第二个区域包含或由以下组成:至少1-10个连接的核苷,如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连接的DNA或RNA核苷酸。认为DNA/RNA磷酸二酯的区域在提供可切割接头中重要的同时,区域B还包含糖修饰的核苷类似物,如在上文第一个区域下涉及的那些是可能的。然而,在一些实施方案中,区域B的核苷(任选地独立地)选自DNA和RNA。将认识到区域B的核苷包含天然发生的或非天然发生的核碱基。区域B包含至少一个磷酸二酯连接的DNA或RNA核苷(其在一些实施方案中可以是靠近区域A的第一个核苷)。如果区域B包含其他核苷,那么区域B还包含除磷酸二酯以外的其他核苷连接,如(任选地独立地)硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基膦酸酯。然而,在其他实施方案中,区域B中的所有核苷间连接是硫代磷酸酯。在一些实施方案中,区域B的所有核苷包含(任选地独立地)2'-OH核糖糖(RNA)或2'-H糖-即RNA或DNA。

[0127] 在一些实施方案中,第二个区域包含或由以下组成:至少1-10个(例如磷酸二酯)连接的DNA或RNA核苷,如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个(例如磷酸二酯)连接的DNA或RNA核苷酸。

[0128] 在一些实施方案中,区域B包含不多于3个或不多于4个连续的DNA或RNA核苷(如DNA核苷)。如此,区域B可以如此短以至于其不募集RNAseH,这是当区域B不形成单一邻接核碱基序列(其与靶标互补)的部分时可能重要的方面。在一些实施方案中也优选较短的区域B,例如长度为1-4nts,因为它们不太可能是序列特异性限制性内切核酸酶的靶标。如此,改变区域B对内切核酸酶切割的敏感性,并由此精细调节体内或甚至细胞内活性寡聚体的激活速率是可能的。适当地,如果需要非常快速的激活,那么可以使用较长的区域B和/或包含(例如细胞或组织特异性或差异表达的)限制性内切核酸酶的识别位点的区域B。

[0129] 如实施例中所阐明,区域B可以通过例如可以包含磷酸二酯连接的接头基团,和/或任选地合适的接头基团,如本文中提供的那些接头基团缀合到缀合物、靶向反应基团、激活基团或保护基团(X)上。例如,磷酸核苷连接(例如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯或甲基膦酸酯)或三唑基团。在一些方面,连接基团与区域A和B之间的连接基团相同,并且如此可以是磷酸二酯连接。在一些方面,连接基团是硫代磷酸酯连接。

[0130] 在一些实施方案中,第二个区域的DNA或RNA核苷酸独立地选自DNA和RNA核苷酸。

在一些实施方案中,第二个区域的DNA或RNA核苷酸是DNA核苷酸。在一些实施方案中,第二个区域的DNA或RNA核苷酸是RNA核苷酸。

[0131] 在第二个区域的上下文中,术语DNA和RNA核苷可以包含天然发生的或非天然发生的碱基(也称为碱基类似物或修饰的碱基)。

[0132] 在一些实施方案中,将认识到第二个区域可以进一步包含其他核苷酸或核苷酸类似物。在一些实施方案中,第二个区域仅包含DNA或RNA核苷。在一些实施方案中,当第二个区域包含多于一个核苷时,第二个区域中的核苷间连接包含磷酸二酯连接。在一些实施方案中,当第二个区域包含多于一个核苷时,第二个区域中的全部核苷间连接包含磷酸二酯连接。

[0133] 在一些实施方案中,第二个区域的至少两个连续核苷是DNA核苷(如至少3或4或5个连续DNA核苷酸)。在一些实施方案中,第二个区域的至少两个连续核苷是RNA核苷(如至少3或4或5个连续RNA核苷酸)。在一些实施方案中,第二个区域的至少两个连续核苷是至少一个DNA和至少一个RNA核苷。区域A和区域B之间的核苷间连接是磷酸二酯连接。在一些实施方案中,当区域B包含多于一个核苷时,至少一个其他核苷间连接是磷酸二酯-如靠近区域A的2个(或3或4或5)个核苷之间的连接基团。

[0134] 第二个区域在一侧(5' 或3')是第一个区域,例如反义寡核苷酸,并且通过缀合物部分或相似基团(例如阻断部分/基团,靶向部分/基团或治疗性小分子部分),任选地通过接头基团(即第二个区域与缀合物/保护基团等部分之间的)位于另一侧(3' 或5')。

[0135] 在该实施方案中,可以根据下式描述本发明的寡核苷酸:

[0136] 5'-A-PO-B(Y)X-3' 或 3'-A-PO-B(Y)X-5'

[0137] 其中A是区域A,PO是磷酸二酯连接,B是区域B,Y是任选的连接基团,并且X是缀合物、靶向、保护基团或反应或激活基团。

[0138] 在一些实施方案中,区域B包含3'-5' 或 5'-3' : i) 与区域A的5' 核苷酸的磷酸二酯连接, ii) DNA或RNA核苷,如DNA核苷,和 iii) 其他磷酸二酯连接

[0139] 5'-A-PO-B-PO-3' 或 3'-A-PO-B-PO-5'

[0140] 其他磷酸二酯连接连接区域B核苷与一个或多个其他核苷,如一个或多个DNA或RNA核苷,或可以任选地通过连接基团(Y) 连接X(是缀合物、靶向或保护基团或反应或激活基团)。

[0141] 在一些实施方案中,区域B包含3'-5' 或 5'-3' : i) 与区域A的5' 核苷的磷酸二酯连接, ii) 2-10个DNA或RNA磷酸二酯连接的核苷,如DNA核苷,和任选地 iii) 其他磷酸二酯连接:

[0142] 5'-A-[PO-B]_n-(Y)-X 3' 或 3'-A-[PO-B]_n-(Y)-X 5'

[0143] 5'-A-[PO-B]_n-PO-(Y)-X 3' 或 3'-A-[PO-B]_n-PO-(Y)-X 5'

[0144] 其中A代表区域A,[PO-B]_n代表区域B,其中n是1-10,如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,PO是区域B和X(或Y,如果存在)之间任选的磷酸二酯连接基团。

[0145] 在一些实施方案中,本发明提供根据(或包含)下式之一的化合物:

[0146] 5' [区域A]-PO-[区域B]3'-Y-X

[0147] 5' [区域A]-PO-[区域B]-PO 3'-Y-X

[0148] 5' [区域A]-PO-[区域B]3'-X

[0149] 5' [区域A]-PO-[区域B]-PO 3' -X

[0150] 3' [区域A]-PO-[区域B]5' -Y-X

[0151] 3' [区域A]-PO-[区域B]-PO 5' -Y-X

[0152] 3' [区域A]-PO-[区域B]5' -X

[0153] 3' [区域A]-PO-[区域B]-PO 5' -X

[0154] 区域B例如可以包含或由以下组成:

[0155] 5' DNA3'

[0156] 3' DNA 5'

[0157] 5' DNA-PO-DNA-3'

[0158] 3' DNA-PO-DNA-5'

[0159] 5' DNA-PO-DNA-PO-DNA 3'

[0160] 3' DNA-PO-DNA-PO-DNA 5'

[0161] 5' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 3'

[0162] 3' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 5'

[0163] 5' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 3'

[0164] 3' DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA-PO-DNA 5'

[0165] 在第二个区域中的序列选择:

[0166] 在一些实施方案中,当寡核苷酸区域A和B与互补的靶序列比对时,区域B不形成互补序列。

[0167] 在一些实施方案中,当寡核苷酸区域A和B与互补的靶序列比对时,区域B形成互补序列。在该方面,区域A和B一起可以形成与靶序列互补的单一邻接序列。

[0168] 在一些实施方案中,基于靶组织或细胞或亚细胞区室中存在的优势内切核酸酶切割酶来选择区域B中的碱基序列以提供最佳内切核酸酶切割位点。在该方面,通过从靶组织和非靶组织中分离细胞提取物,可以基于想要的靶细胞(例如肝/肝细胞)相比于非靶细胞(例如肾)中的优先切割活性选择用于区域B的内切核酸酶切割序列。在该方面,可以为想要的组织/细胞优化用于靶标下调的化合物的效能。

[0169] 在一些实施方案中,区域B包含序列AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、CC、CG、GA、GT、GC或GG的二核苷酸,其中C可以是5-甲基胞嘧啶,和/或T可以被U替换。在一些实施方案中,区域B包含序列AAA、AAT、AAC、AAG、ATA、ATT、ATC、ATG、ACA、ACT、ACC、ACG、AGA、AGT、AGC、AGG、TAA、TAT、TAC、TAG、TTA、TTT、TTC、TAG、TCA、TCT、TCC、TCG、TGA、TGT、TGC、TGG、CAA、CAT、CAC、CAG、CTA、CTG、CTC、CTT、CCA、CCT、CCC、CCG、CGA、CGT、CGC、CGG、GAA、GAT、GAC、CAG、GTA、GTT、GTC、GTG、GCA、GCT、GCC、GCG、GGA、GGT、GGC和GGG的三核苷酸,其中C可以是5-甲基胞嘧啶,和/或T可以被U替换。在一些实施方案中,区域B包含序列AAAX、AATX、AACX、AAGX、ATAX、ATTX、ATCX、ATGX、ACAX、ACTX、ACCX、ACGX、AGAX、AGTX、AGCX、AGGX、TAAX、TATX、TACX、TAGX、TTAX、TTTX、TTCX、TAGX、TCAX、TCTX、TCCX、TCGX、TGAX、TGTX、TGCX、TGGX、CAAX、CATX、CACX、CAGX、CTAX、CTGX、CTCX、CTTX、CCAX、CCTX、CCCX、CCGX、CGAX、CGTX、CGCX、CGGX、GAAX、GATX、GACX、CAGX、GTAX、GTTX、GTCX、GTGX、GCAX、GCTX、GCCX、GCGX、GGAX、GGTX、GGCX和GGGX的三核苷酸,其中X可以选自A、T、U、G、C及其类似物,其中C可以是5-甲基胞嘧啶和/或T可以被U替换。将认识到当指(天然发生的)核碱基A、T、U、G、C时,这些可以被充当等同天然核碱基(例

如具有互补核苷的碱基对)的核碱基类似物取代。

[0170] 在一些实施方案中,本发明的化合物可以包含多于一个缀合物基团(或多于一个官能团X-如缀合物、靶向、阻断或激活基团或反应或基团基团),如2或3个此类基团。在一些实施方案中,区域B是任选地通过[例如非核苷酸]接头基团共价连接至少一个官能团,如两个或三个官能团。在一些实施方案中,第一个区域可以共价连接(例如通过核苷间连接,如磷酸二酯连接)两个区域B,例如第一个区域的一个5' 和一个3',其中每一个区域B可以(任选地独立地)选自本文所述的区域B。在该方面,一个区域B可以具有一个或多个官能团,并且第二个区域B可以具有一个或多个官能团,其中每一个区域B的官能团可以独立地选自缀合物、靶向基团、保护基团或反应/激活基团。

[0171] 聚合寡聚化合物

[0172] 本发明提供聚合寡聚化合物,其可以包含第一个区域(区域A)、第二个区域(区域B)和第三个区域(区域C),其中所述第一个区域共价连接至少一个其他寡聚化合物(区域A'),其中所述第一个区域(区域A)和区域A' 通过生物可切割的接头(区域B') 共价连接,所述生物可切割接头可以是例如本文公开的第二个区域,例如至少一个磷酸二酯连接的DNA或RNA的区域(如DNA),如两个、三个、四个或五个磷酸二酯连接的DNA或RNA核苷(如DNA核苷)。在一些实施方案中,区域B和B' 具有相同的结构,例如相同数量的DNA/RNA核苷和磷酸二酯连接和/或相同的核碱基序列。在其他实施方案中,区域B和B' 可以不同。例如,此类聚合寡聚化合物可以具有结构,如:(5' -3' 或3' -5')缀合物-PO-ON-PO' -ON',其中缀合物是区域C,PO是区域B,PO' 是区域B', 并且ON 1是区域A,并且ON' 是区域A'

[0173] 应该理解区域A' 在一些实施方案中可以包含通过生物可切割的接头系列(或平行)连接的多种其他寡聚化合物(如其他2个或3个寡聚化合物),例如:缀合物-PO-ON-PO-ON' -PO"-ON",或缀合物-PO-ON-[PO-ON']n,其中n可以是例如1、2或3,并且每一个ON' 可以相同或不同的,并且如果不同可以具有相同或不同的靶标。

[0174] 多种缀合物寡聚化合物

[0175] 在一些实施方案中,寡聚化合物可以缀合多于一个缀合物区域(区域C),其可以相同或不同。例如,本发明的寡聚化合物可以具有结构,如下:(5' -3' 或3' -5')ON-PO' -Conj1-PO"-Conj2其中Conj1和conj2是两个缀合物基团,PO或PO"中的至少一个或两个是本文的区域B,并且ON是区域A。Conj1和Conj2可以相同或可以不同。例如,在一些实施方案中,Conj1和Conj2中的一个糖类或固醇缀合物,而另一个是亲脂缀合物,例如5' -3' 或3' -5' :ON-PO' -棕榈酰-PO"-Chol或ON-PO' -棕榈酰-PO"-GalNac。

[0176] 糖类缀合物部分(由前述公式中的GalNac代表(例如当用作conj1或conj2时))例如可以选自半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰-半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-丙酰-半乳糖胺、N-n-丁酰-半乳糖胺和N-异丁酰半乳糖胺。亲脂缀合物(例如当用作conj1或conj2,并且在前述公式中表示为棕榈酰时)可以是疏水基团,如C16-20疏水基团、固醇、胆固醇。例如在本文中公开了可以使用的其他糖类和亲脂基团。

[0177] 靶标

[0178] 在一些实施方案中,对于非限制性实例,本发明的寡聚体用于调节选自mRNA、microRNA、lncRNA(长链非编码RNA)、snRNA、snoRNA和病毒RNA的核酸(即靶标)。

[0179] 示例性但非限制性mRNA和microRNA靶标包括例如:

[0180] 癌症中指示的基因,如Hif1- α 、存活蛋白、Bcl2、Mcl1、Her2、雄激素受体、 β -连环蛋白、人转化生长因子TGF- β 2、ras、TNF- α 、c-RAF、HSPs例如Hsp27、eIF-4E(例如ISIS-EIF4ERx) STAT3(例如ISIS-STAT3Rx)、丛生蛋白(例如OGX-011)、AurkB、AurkA、PBK、miR-155、miR-21、miR-10b、mir-34(参见W02011088309)、miR-199a、miR-182、

[0181] 炎症中涉及的基因的mRNA,例如ICAM-1(例如Alicoforsen)、CD49d、VLA-4骨桥蛋白、miR-21(牛皮癣),

[0182] 其他医学相关mRNA靶标包括CTGF(局部纤维化)和c-Raf-激酶(眼部疾病)。miR-29(心脏纤维化)、因子XI(凝血)、因子VII(凝血)miR15miR-159(MI后模造(MI后模造)、miR-138(骨丢失)、mir-21(参见W012148952)和mir214(纤维化)-参见W02012012716。

[0183] 代谢疾病或病症靶标,如Apo-B(高LDL胆固醇,ACS)、ApoCIII(高血清TG,糖尿病)、Apo(a)(心血管疾病)、FGFR4(肥胖症)、GCCR(T2糖尿病)、GCGR(T2糖尿病)、PTP1B(T2糖尿病)、DGAT2(NASH)、PCSK9(高脂血症和相关病症)、MtGPAT(肥胖症和NAFLD)、miR-122(高胆固醇)、miR-33(代谢综合征、动脉粥样硬化)、miR-208(慢性心力衰竭)、miR-499(慢性心力衰竭)、miR-378(心脏代谢病)、mir-143(血管疾病)、miR-145(血管疾病)、miR-92(外周动脉疾病)、miR-375(糖尿病)、miR-27b(糖尿病)、miR-34a(糖尿病)、miR-199a、miR-27a(心脏病、局部缺血)、miR-338(糖尿病)。

[0184] 代谢疾病包括例如,代谢综合征、肥胖症、高脂血症、HDL/LDL胆固醇失调、血脂障碍、例如家族性复合高脂血症(FCHL)、获得性高脂血症、抗抑制素高胆固醇血症、冠状动脉疾病(CAD)和冠状动脉心脏病(CHD)、动脉粥样硬化、心脏病、糖尿病(I和/或II)、NASH、急性冠状动脉综合征(ACS),

[0185] 病毒病:miR-451(红细胞增多症)、miR-122(HCV)、HBV、HCV、BKV等。严重的且稀有的疾病包括SMN2(脊髓性肌萎缩)、TTR(TTR淀粉状蛋白病)、GHR(类肢端肥大症)、AAT(AATD相关的肝病)、Dystrophin(进行性假肥大性肌营养不良)。

[0186] 在一些实施方案中,本发明的寡聚体靶向肝表达的核酸,如肝表达的mRNA,如PCSK9、ApoB或MtGPAT。在一些实施方案中,本发明的寡聚体靶向PCSK9 mRNA。在一些实施方案中,本发明的寡聚体靶向ApoB mRNA。在一些实施方案中,本发明的寡聚体靶向肝表达的microRNA,如miR-122。

[0187] 在一些实施方案中,本发明的寡聚体能够下调(例如减少或去除)靶标(例如靶核酸)的表达。在这方面,本发明的寡聚体可以影响靶标的抑制。在一些实施方案中,本发明的寡聚体结合靶核酸并与正常表达水平相比导致至少10%或20%的表达抑制,更优选与正常表达水平(如在缺少寡聚体或缀合物的情况下的表达水平)相比导致至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%抑制。在一些实施方案中,当使用0.04-25nM,如0.8-20nM浓度的本发明化合物时看到该调节。在相同或不同实施方案中,表达抑制低于100%,如低于98%抑制、低于95%抑制、低于90%抑制、低于80%抑制、如低于70%抑制。可以例如通过方法如SDS-PAGE后跟使用针对靶蛋白质产生的合适抗体的western印迹测量蛋白质水平来测定表达水平的调节。或者,可以例如通过northern印迹或定量RT-PCR测量mRNA水平来测定表达水平的调节。当通过mRNA水平测量时,当使用适当剂量如0.04-25nM,如0.8-20nM浓度时,下调水平在一些实施方案中在缺少本发明的化合物、缀合物或组合物的情况下通常是正常水平的10-20%。

[0188] 本发明因而提供在表达靶标的细胞中下调或抑制靶标表达的方法,所述方法包括向所述细胞施用本发明的寡聚体或缀合物,以下调或抑制所述细胞中的靶标表达。适当地,细胞是哺乳动物细胞,如人细胞。施用在一些实施方案中可以在体外发生。施用在一些实施方案中可以在体内发生。

[0189] 本发明的化合物,如寡聚体及其缀合物可以靶向不同的靶标,如mRNA或microRNA或在肝中表达的其他核酸靶标(给出NCBI Genbank/Gene IDs的参考作为被本发明化合物靶向的序列的实例-Genbank/NCBI序列由此并入作为参考)。

[0190] ApoB

[0191] 在一些实施方案中,第一个区域(或第一个和第二个区域)形成单一的邻接核碱基序列,其与ApoB mRNA靶标(即靶标)ApoB-100 (NCBI Genbank ID NM_000384.2GI:105990531,由此并入作为参考)的相应区域互补。

[0192] 靶向ApoB的本发明化合物可以用于治疗急性冠状动脉综合征(参见W020100076248)。本发明因而提供本发明的寡聚体,其靶向ApoB100用于治疗急性冠状动脉综合征。本发明进一步提供治疗急性冠状动脉综合征的方法,其中所述方法包括向需要所述治疗的受试者施用本发明的寡聚体。

[0193] 靶向ApoB的本发明化合物可以用于治疗动脉粥样硬化。本发明因而提供本发明的寡聚体,其靶向ApoB100用于治疗动脉粥样硬化。本发明进一步提供治疗动脉粥样硬化的方法,其中所述方法包括向需要所述治疗的受试者施用本发明的寡聚体。

[0194] 靶向ApoB的本发明化合物可以用于治疗高胆固醇血症或高脂血症。本发明因而提供本发明的寡聚体,其靶向ApoB100用于治疗高胆固醇血症或高脂血症。本发明进一步提供治疗高胆固醇血症或高脂血症的方法,其中所述方法包括向需要所述治疗的受试者施用本发明的寡聚体。

[0195] 本发明提供体内或体外方法用于在表达ApoB的细胞中抑制ApoB,所述方法包括向所述细胞施用本发明的寡聚体或缀合物或药物组合物以在所述细胞中抑制ApoB。

[0196] 可以用作本发明的寡聚体/缀合物中的第一个区域的LNA寡聚体的实例包括例如在W02007/031081、W02008/113830、W02007131238和W02010142805中公开的那些,其由此并入作为参考。具体的优选化合物包括以下:

[0197] 5'-G_s^mC_sa_st_st_sg_sg_st_sa_st_sT_s^mC_sA-3' (SEQ ID NO 1)

[0198] 5'-G_sT_st_sg_sa_sc_sa_sc_st_sg_sT_s^mC-3' (SEQ ID NO 53)

[0199] 其中大写字母是β-D-氧LNA单元(核苷),小写字母是DNA单元,下标s是硫代磷酸酯连接,并且大写C前面的上标m阐明所有LNA胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。靶向ApoB的本发明化合物可以缀合将寡聚体靶向肝的缀合物(如本文所公开),如糖类或亲脂缀合物,如Gal1Nac缀合物或固醇缀合物(例如,胆固醇或生育酚)。缀合物可以是例如在寡聚化化合物的5'末端或3'末端(适当地通过区域B)。靶向ApoB的其他寡聚体公开于W003/011887、W004/044181、W02006/020676、W02007/131238、W02007/031081和W02010142805中。

[0200] PCSK9

[0201] 在一些实施方案中,第一个区域(或第一个和第二个区域)形成单一的邻接核碱基序列,其与PCSK9 mRNA靶标(即靶标)的相应区域互补,如人PCSK9 mRNA:NCBI Genbank ID NM_174936.3GI:299523249,由此并入作为参考。

[0202] 本发明提供本发明的寡聚体,其靶向PCSK9用作药剂,如用于治疗高胆固醇血症或相关病症,如选自动脉粥样硬化、高脂血症、高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症的病症,例如PCSK9的功能突变的获得、HDL/LDL胆固醇失调、血脂障碍,例如家族性高脂血症 (FCHL)、获得性高脂血症、抗抑制素的高胆固醇血症、冠状动脉疾病 (CAD) 和冠状动脉心脏病 (CHD)。

[0203] 本发明提供靶向PCSK9的本发明的寡聚体用于制造用于治疗以下疾病的用途:高胆固醇血症或相关病症,如选自动脉粥样硬化、高脂血症、高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症的病症,例如获得PCSK9的功能突变、HDL/LDL胆固醇失调、血脂障碍,例如家族性高脂血症 (FCHL)、获得性高脂血症、抗抑制素的高胆固醇血症、冠状动脉疾病 (CAD) 和冠心病 (CHD)。

[0204] 本发明提供治疗以下疾病的方法:高胆固醇血症或相关病症,如选自动脉粥样硬化、高脂血症、高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症的病症,例如PCSK9的功能突变的获得、HDL/LDL胆固醇失调、血脂障碍,例如家族性高脂血症 (FCHL)、获得性高脂血症、抗抑制素的高胆固醇血症、冠状动脉疾病 (CAD) 和冠心病 (CHD),所述方法包括向患有或可能患有高胆固醇血症或相关病症的患者施用有效量的靶向PCSK9的本发明寡聚体。

[0205] 本发明提供体内或体外方法用于在表达PCSK9的细胞中抑制PCSK9,所述方法包括向所述细胞施用靶向PCSK9的本发明寡聚体以在所述细胞中抑制PCSK9。

[0206] 以下是靶向人PCSK9 mRNA的寡聚体,并且可以用作本发明化合物中的区域A:

[0207] 5'-T_sG_s^mC_st_sa_sc_sa_sa_sa_sc_s^mC_s^mA-3' (SEQ ID NO 37)

[0208] 其中大写字母是β-D-氧LNA单元(核苷),小写字母是DNA单元,下标s是硫代磷酸酯连接,并且大写C前面的上标m阐明所有LNA胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。靶向PCSK9的本发明化合物可以缀合将寡聚体靶向肝的缀合物(如本文所公开),如糖类或亲脂缀合物,如GalNAc缀合物或固醇缀合物(例如,胆固醇或生育酚)。缀合物可以是例如在寡聚化合物的5'末端或3'末端(适当地通过区域B)。

[0209] 靶向PCSK9的其他寡聚体公开为SEQ ID NO 36-52,并且其他公开于W02008/043753、W02011/009697、W008/066776、W007/090071、W007/146511、W007/143315、W009/148605、W011/123621和W011133871中,其并入作为参考。

[0210] miR-122

[0211] 在一些实施方案中,第一个区域(或第一个和第二个区域)形成单一的邻接核碱基序列,其与microRNA-122如miR-122a(即靶标)的相应区域互补,如has-miR-122序列(miRBase release 20:MI0000442):

[0212] >hsa-mir-122MI0000442

[0213] CCUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCUAAACUAUCAAACGCCAUUAUCACACUAA
AUAGCUACUGCUAGGC

[0214] >hsa-miR-122-5p MIMAT0000421

[0215] UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG

[0216] miR-122已经表明在HCV感染中,其中其为维持感染所需的基本宿主因子。miR-122的抑制剂因而可以用于治疗丙型肝炎感染。

[0217] 靶向miR-122的本发明化合物可以用于治疗HCV感染。本发明因而提供本发明的寡聚体,其靶向miR-122用于治疗HCV感染。本发明进一步提供治疗HCV感染的方法,其中所述

方法包括向需要所述治疗的受试者施用本发明的寡聚体。

[0218] 本发明提供靶向miR-122的本发明寡聚体用于制造用于治疗HCV感染的药剂的用途。

[0219] 本发明提供治疗HCV感染的方法,所述方法包括向患有HCV感染的患者施用有效量的靶向miR-122的本发明寡聚体。

[0220] 本发明提供体内或体外方法用于在表达miR-122的细胞中,如HCV感染的细胞或HCV复制子表达细胞中抑制miR-122,所述方法包括向所述细胞施用本发明的寡聚体或缀合物或药物组合物以在所述细胞中抑制miR-122。

[0221] miR-122也已经表明在胆固醇代谢中,并且已经提示miR-122的抑制可以用于治疗以降低血浆胆固醇水平(Esau,Cell Metab.2006Feb;3(2):87-98.)

[0222] miR-122的抑制剂因而可以用于治疗以降低血浆胆固醇水平或用于治疗与升高的胆固醇水平相关的代谢疾病(相关病症),如选自动脉粥样硬化、高脂血症、高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、血脂障碍、冠状动脉疾病(CAD)和冠状动脉心脏病(CHD)的适应症。

[0223] 靶向miR-122的本发明化合物可以用于治疗升高的胆固醇水平或相关病症。本发明因而提供本发明的寡聚体,其靶向miR-122用于治疗升高的胆固醇水平或相关病症。本发明进一步提供治疗升高的胆固醇水平或相关病症的方法,其中所述方法包括向需要所述治疗的受试者施用本发明的寡聚体。

[0224] 本发明提供靶向miR-122的本发明寡聚体用于制造用于治疗升高的胆固醇水平或相关病症的药物的用途。

[0225] 本发明提供治疗升高的胆固醇水平或相关病症的方法,所述方法包括向患有所述病症的患者施用有效量的靶向miR-122的本发明寡聚体。

[0226] 本发明提供体内或体外方法用于在表达miR-122的细胞中,如HCV感染的细胞或HCV复制子表达细胞中抑制miR-122,所述方法包括向所述细胞施用本发明的寡聚体或缀合物或药物组合物以在所述细胞中抑制miR-122。

[0227] 靶向miR-122的寡聚体公开于W02007/112754、W02007/112753、W02009/043353中,并且可以是mixmers,如SPC3649,也称为miravirsen,参见下文,或细小LNA,如在W02009/043353(例如5'-ACACTCC-3',5'-CACACTCC-3',5'-TCACACTCC-3',其中大写字母是 β -D_氧LNA,完全的硫代磷酸酯LNA C是5-甲基胞嘧啶)中公开的那些。在一些实施方案中,靶向miR-122的寡聚体具有8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18(或19、20、21、22或23个核苷酸)的长度。在一些实施方案中,靶向miR-122的寡聚体,如横跨寡聚体长度所测量,是与miR-122完全互补的序列,并且优选包括序列5'-CACACTCC-3'。在一些实施方案中,靶向microRNA的寡聚体,如miR-122与横跨寡聚体长度的microRNA的相应区域互补,并且在一些实施方案中,寡聚体的3'核苷与microRNA的第一个、第二个、第三个或第四个5'核苷酸互补(即比对),如miR-122,如microRNA的第二个5'核苷酸,如miR-122。

[0228] 以下是靶向has-miR-122(人miR-122)的寡聚体,并且可以用作本发明化合物中的区域A。

[0229] Miravirsen:5'-^mC_sc_sA_st_st_sG_sT_sc_sa_s^mC_sa_s^mC_st_s^mC_s^mC-3'

[0230] 可以用于本发明上下文(区域A)中的其他miR-122靶向化合物公开于W02007/027894、W02007/027775中。

[0231] MtGPAT: (NCBI基因ID 57678-染色体:10;NC_000010.10(113907971..113975153,互补序列) 线粒体甘油-3-磷酸酰基转移酶1 (EC 2.3.1.15,也称为GPAT1、mtGPAT1、GPAM、mtGPAM) 在肝甘油三酯形成中起关键作用,其中高水平的mtGPAT1活性导致脂肪肝(hepatosteatosis),然而mtGPAT1的缺失产生低水平的肝甘油三酯和受刺激的脂肪酸氧化(参见W02010/000656,其公开了靶向mtGPAT的寡聚体)。靶向MtGPAT的本发明化合物可以用于治疗这样的状况,如超重、肥胖症、脂肪肝、hepatosteatosis、非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、胰岛素抵抗、糖尿病如非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)。

[0232] FactorVII (NCBI Gene ID 2155,NCBI J02933.1 GI:180333或EU557239.1GI:182257998)。本发明的寡聚体或缀合物可以靶向FactorVII,并由此抑制因子VII的产生,所述因子VII是组织因子凝血途径的关键组分。靶向FactorVII的本发明化合物可以用于治疗或预防血栓形成疾病(通常不引起出血)并且如心脏病发作、中风和血凝块或炎症状况。并入作为参考的W0 2013/119979和W0 2012/174154公开了靶向FVII的寡核苷酸化合物,其可以掺入到本发明的缀合物中。

[0233] Factor XI (NCBI Genbank BC122863.1GI:114108211) -因子XI,其是在肝中产生的凝血因子。高水平的因子XI与心脏病发作、中风和血凝块相关。并入作为参考的W0 2013/070771公开了靶向XI的寡核苷酸化合物,其可以掺入到本发明的缀合物中。靶向FactorXI的本发明化合物可以用于治疗或预防血栓形成疾病并且如心脏病发作、中风和血凝块或炎症状况,如关节炎和结肠炎。

[0234] ApoCIII (NCBI Genbank BC027977.1GI:20379764),其为调节血液中甘油三酯代谢的蛋白质。高水平的apoC-III与炎症、高甘油三酯、动脉粥样硬化和代谢综合征相关。靶向ApoCIII的本发明化合物可以用于降低血清甘油三酯水平或作为单一试剂或与其他降甘油三酯试剂组合用于治疗例如家族性乳糜微粒血综合征和严重的高甘油三酯。由此并入作为参考的W011085271公开了靶向ApoCIII的寡核苷酸化合物,其可以掺入到本发明的缀合物中。

[0235] Apo(a) (NCBI Genbank NM_005577.2GI:116292749) 在肝中抑制apo(a)的产生并被设计为提供直接方法以降低Lp(a),其为心血管疾病的独立危险因子。高水平的Lp(a)与动脉粥样硬化、冠状动脉心脏病、心脏病发作和中风的增加危险相关。Lp(a)促进动脉中不成熟斑点的积累或动脉粥样硬化。靶向Apo(a)的本发明化合物可以用于治疗例如动脉粥样硬化和冠状动脉心脏病。由此并入作为参考的W005000201和W003014307公开了靶向载脂蛋白(a)的寡核苷酸化合物,其可以掺入到本发明的缀合物中。

[0236] Hepatitis B(HBV) (参见例如NCBI D23684.1 GI:560092;D23683.1GI:560087;D23682.1 GI:560082;D23681.1 GI:560077;D23680.1GI:560072;D23679.1 GI:560067;D23678.1 GI:560062;D23677.1GI:560057;其全部由此并入作为参考)

[0237] 靶向HBV的寡聚体为本领域所熟知,例如参见W096/03152、W097/03211、W02011/052911、W02012/145674、W02012/145697、W02013/003520和W02013/159109。

[0238] 靶向HBV的本发明化合物可以用于治疗HBV感染。本发明因而提供本发明的寡聚体,其靶向HBV用于治疗HBV。本发明进一步提供治疗HBV感染的方法,其中所述方法包括向需要所述治疗的受试者施用本发明的寡聚体。

[0239] 本发明提供本发明的寡聚体或缀合物,其靶向乙型肝炎病毒(HBV)用作药物,如用于治疗乙型肝炎病毒感染或相关病症。

[0240] 本发明提供靶向乙型肝炎病毒(HBV)的本发明寡聚体或缀合物或药物组合物用于制造用于治疗乙型肝炎病毒感染或相关病症的药物的用途。

[0241] 本发明提供治疗乙型肝炎病毒感染或相关病症的方法,所述方法包括向患有所述乙型肝炎病毒的患者施用有效量的靶向HBV的本发明寡聚体或缀合物。

[0242] 本发明提供用于在感染HBV的细胞中抑制HBV复制的体内或体外方法,所述方法包括向所述细胞施用靶向HBV的本发明寡聚体或缀合物以抑制HBV复制。靶向HBV的LNA寡聚体的实例是(如在W02011/47312中公开)可以用作本发明的寡聚体(区域A)的5'-G_sA_sG_sG_sc_sa_st_sa_sg_sc_sa_sg_s^mC_sA_sG_sG-3'。其他化合物公开于W02011/47312的表1中,和W02011/052911、W02012/145674、W02012/145697、W02013/003520和W02013/159109中,由此并入作为参考。

[0243] RG-101是靶向miR-122的化合物并且包含GalNac缀合物,并且被开发用于通过Regulus Therapeutics治疗HCV。

[0244] ANGPTL3, (例如NCBI BC007059.1GI:14712025或BC058287.1GI:34849466)血管生成素样3-调节脂质、葡萄糖和能量代谢的蛋白质。具有升高水平的ANGPTL3的人具有与过早的心脏病发作的增加危险、增加的动脉壁厚度以及多种代谢异常,如胰岛素抗性相关的高脂血症。相反,具有较低水平的ANGPTL3的人具有较低的LDL-C和甘油三酯水平以及较低的心血管疾病危险。靶向ANGPTL3的本发明化合物可以用于治疗例如高脂血症和相关病症、代谢病症、动脉粥样硬化、冠状动脉心脏病或胰岛素抗性。由此并入作为参考的W011085271公开了靶向ANGPTL3的寡核苷酸化合物,其可以掺入到本发明的缀合物中。

[0245] 高血糖素受体或GCGR (BC112041.1GI:85567507;L20316.1GI:405189):高血糖素是与胰岛素作用相反并刺激肝产生葡萄糖,特别是2型糖尿病中的激素。在具有晚期糖尿病的患者中,不受控制的高血糖素作用导致血糖水平显著增加。因而,衰减高血糖素作用在具有严重糖尿病的患者中具有显著的葡萄糖降低效果。此外,降低GCGR产生更活跃的高血糖素样肽,或GLP-1,其为保护胰脏功能并增强胰岛素分泌的激素。靶向GCGR的本发明化合物可以用于治疗例如胰岛素抗性、高血糖、糖尿病,如1型或2型糖尿病,保护胰脏功能并控制血糖水平。W02007/134014公开了靶向GCGR的寡核苷酸化合物,其可以掺入到本发明的缀合物中。

[0246] 成纤维细胞生长因子受体4或FGFR4。(NCBI Gene 2264-NC_000005.9 (176513906..176525143)FGFR4在肝和脂肪组织中表达,并且指示其降低身体储存脂肪同时增加脂肪燃烧和能量消耗的能力。许多抗肥胖症药物作用于脑中以抑制食欲,这通常产生CNS副作用。靶向FGFR4的本发明化合物可以用于治疗例如胰岛素抗性、高血糖、糖尿病,如1型或2型糖尿病,预防肥胖症(例如当与抑制食欲的药物组合使用时),减少体重,和改善胰岛素敏感性、糖尿病,如1型或2型糖尿病并控制血糖水平。由此并入作为参考的W009046141和W012174476公开了靶向FGFR4的寡核苷酸化合物,其可以掺入到本发明的缀合物中。

[0247] 二酰基甘油酰基转移酶-2或DGAT-2 (NCBI GENE ID 84649):甘油三酯合成中的关键组分。抑制DGAT可以减少具有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的患者中的肝脂肪,还可以用于治疗2型糖尿病和胰岛素抗性。靶向DGAT-2的本发明化合物可以用于治疗NASH,以减少肝

脂肪,治疗糖尿病,如2型糖尿病,并治疗胰岛素抗性。由此并入作为参考的W005019418和W02007136989公开了靶向DGAT-2的寡核苷酸化合物,其可以掺入到本发明的缀合物中。

[0248] 糖皮质激素受体或GCCR(BC150257.1GI:152013043):糖皮质激素影响身体内的多种过程,并且过多水平的糖皮质激素可以对体内的许多组织和器官具有有害作用。库欣综合征是由延长暴露于高水平糖皮质激素中引起的罕见病。若不加治疗,具有库欣综合征的患者可以发生高血压、糖尿病并且免疫功能受损,并且具有增加的早期死亡危险。尽管存在用于库欣综合征的批准治疗,但是目前的医学与显著的副作用相关,如高血压和糖尿病,并且仍然存在对于这些患者的新疗法的高度未满足的医学需要。靶向GCCR-2的本发明化合物可以用于治疗库欣综合征和相关状况(如上文列出的那些)。由此并入作为参考的W007035759和W02007136988公开了靶向GCCR的寡核苷酸化合物,其可以掺入到本发明的缀合物中。

[0249] 补体组分C5(M57729.1 GI:179982):补体系统在免疫性中作为用于宿主防御的保护机制起重要作用,但是其失调在宽范围人类疾病中产生严重的威胁生命的并发症,其包括阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、非典型溶血性尿毒性综合征(aHUS)、重症肌无力、视神经脊髓炎等。靶向补体组分C5的本发明化合物可以用于治疗这些病症中的一种或多种。C5是遗传上和临床上验证的靶标;功能丧失人突变与对某些感染衰减的免疫防御相关并且静脉内施用抗C5单克隆抗体疗法已经在许多补体介导的疾病中证明了临床活性和耐受性。跨膜蛋白酶、丝氨酸6(Tmprss6)用于治疗 β -地中海贫血和铁超负荷病症。

[0250] α -1抗胰蛋白酶(AAT):(M11465.1 GI:177826)与以下相关的肝病—由此并入作为参考的W013142514公开了靶向AAT的寡核苷酸化合物,其可以掺入到本发明的寡聚体或缀合物中。靶向AAT的本发明化合物可以用于以下方法中,其用于在需要其的个体中降低AIAT mRNA和蛋白质表达并治疗、改善、预防、减缓进展,或终止纤维化的进展,如AIATD相关肝病,和肺部疾病,如AIATD相关的肺部疾病。

[0251] 转甲状腺素蛋白-TTR(BC005310.1GI:13529049):靶向TTR的本发明寡聚体可以用于治疗转甲状腺素蛋白淀粉状蛋白病或TTR淀粉状蛋白病,其为严重且稀有的遗传疾病,其中患者遗传了产生错误折叠形式的TTR的突变基因,所述错误折叠形式的TTR在组织中渐进地积累。在具有TTR淀粉状蛋白病的患者中,突变体和正常形式的TTR都可以在组织,包括心脏、周围神经和胃肠道中可以作为纤维积累。TTR纤维的存在干扰这些组织的正常功能,并且随着TTR蛋白纤维扩大,发生更多的组织损伤并且疾病恶化。TTR是在血液中运输甲状腺激素和视黄醇的载体蛋白。在具有TTR淀粉状蛋白病的患者中,突变体和正常形式的TTR在组织中可以作为纤维积累。本发明化合物可以用于治疗TTR淀粉状蛋白病。参见Benson等, Amyloid.2010Jun;17(2):43-9,和Ackermann等, Amyloid.2012Jun;19Suppl 1:43-4.)。可以用于本发明寡聚体或缀合物的靶向TTR的反义化合物公开于US8101743、W011139917和W010017509中,其通过参考由此并入。

[0252] 氨基酮戊酸合酶-1(ALAS-1)(BC011798.2GI:33877783;AK312566.1GI:164690365;NM_199166.2GI:362999012;NM_000688.5GI:362999011)。ALAS1是用于治疗卟啉病,如治疗肝卟啉病,包括急性间歇性卟啉病(AIP)的验证靶标。靶向ALAS-1的本发明化合物可以用于治疗这些病症。

[0253] 血管内皮生长因子或VEGF(GENE ID 7422,人序列:染色体:6;NC_000006.11

(43737946..43754224))。VEGF指示在癌症中。靶向VEGF的本发明化合物可以用于治疗过度增殖性疾病,如癌症,如肝癌。

[0254] 表1提供了可以被本发明化合物靶向的一组肝靶标,以及可以使用此类化合物治疗的医学适应症/病症(如患有相关病症的人)(参见Sehgal等,Liver as a target for oligonucleotide therapeutics,J.of Hepatology2013,In Press)。

[0255] 表1

[0256]

本发明的化合物可以靶向核酸(例如 mRNA 编码或 miRNA), 其选自	用于治疗疾病或病症, 如
AAT	AAT-LivD
ALDH2	酒精依赖性
HAMP 途径	贫血或炎症/CKD
miR-33	动脉粥样硬化
Apo(a)	动脉粥样硬化/高 Lp(a)
miR-7	肝癌
miR-378	心肌代谢疾病
miR-21	肝癌
Myc	肝癌
miR-122	HCV
5'UTR	HCV
5'UTR & NS5B	HCV

[0257]

NS3	HCV
TMPRSS6	血色素沉着症
抗凝血酶 III	血友病 A、B
ApoCIII	高甘油三酸酯血症
ANGPLT3	高脂血症
MTP	高脂血症
DGAT2	NASH
ALAS1	卟啉病
抗凝血酶 III	稀有的出血障碍
血清淀粉样蛋白 A	SAA-淀粉样蛋白病
因子 VII	血栓形成
生长激素受体	肢端肥大症
miR-122	丙型肝炎病毒
ApoB-100	高胆固醇血症
ApoCIII	高甘油三酸酯血症
PCSK9	高胆固醇血症
CRP	炎症病症
KSP 或 VEGF	肝癌
PLK1	肝癌
miR-34	肝癌
FGFR4	肥胖症
因子 IXa	血栓形成
因子 XI	血栓形成
TTR	TTR 淀粉样蛋白病
GCCR	2 型糖尿病
PTP-1B	2 型糖尿病
GCGR	库欣综合征
肝葡萄糖 6-磷酸转运蛋白-1	葡萄糖稳态、糖尿病、2 型糖尿病

[0258] 序列

[0259] 在一些实施方案中,寡聚体或其第一个区域包含连续核苷酸序列,其对应于靶核酸(即寡聚体靶向的序列)中存在的核苷酸序列的反义互补序列。表3提供了一组mRNA和miRNA靶标,其处于使用用于相关适应症的寡核苷酸化合物的临床前或临床开发中并因而

适合于被本发明化合物靶向。

[0260] 在一些实施方案中,靶标选自:miR-122、ApoB-100、ApoCIII、PCSK9、CRP、KSP、VEGF、PLK1、miR-34、FGFR4、因子IXa、因子XI、TTR、GCCR、PTP-1B、GCGR、AAT、ALDH2、HAMP途径、miR-33、Apo(a)、miR-7、miR-378、miR-21、Myc、miR-122、HCV基因组如HCV 5'UTR或HCV NS5B RNA或NS3 RNA、TMPRSS6、抗凝血酶III、ApoCIII、ANGPT3、MTP、DGAT2、ALAS1、抗凝血酶III、血清淀粉样蛋白A和因子VII。

[0261] 在一些实施方案中,当与靶序列杂交时,连续核苷酸序列包含不多于单个错配。

[0262] 在确定本发明寡聚体(或其区域)与核酸的靶区域,如本文公开的那些之间的“互补性”程度中,“互补性”的程度(也是“同源性”或“同一性”)表示为寡聚体(或其区域)的序列与与其最佳比对的靶区域(或靶区域的反向互补序列)的序列之间的百分比同一性(或百分比同源性)。通过计数2条序列之间相同的比对碱基数除以寡聚体中邻接单体的总数,并乘以100来计算百分比。在该比较中,如果存在空位,那么优选该空位是唯一的错配而非区域,其中空位内单体的数量在本发明寡聚体与靶区域之间不同。

[0263] 如本文所用,术语“同源的”和“同源性”与术语“同一性”和“同源性”可以互换。

[0264] 术语“对应于(corresponding to)”和“对应于(corresponds to)”指寡聚体的核苷酸序列(即核碱基或碱基序列)或连续核苷酸序列(第一个区域)与选自i)核酸靶标的反向互补序列的子序列的其他序列的等同连续核苷酸序列之间的比较。核苷酸类似物直接与其等同物或相应的核苷酸比较。在i)或ii)下对应于其他序列的第一条序列通常与第一条序列长度上的彼序列(如连续核苷酸序列)相同或,如本文所述,在一些实施方案中,其与对应序列具有至少80%同源性,如至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%同源性,如100%同源性(同一性)。

[0265] 术语“对应核苷酸类似物”和“对应核苷酸”旨在表示核苷酸类似物中的核苷酸与天然发生的核苷酸相同。例如,当核苷酸的2-脱氧核糖单元连接腺嘌呤时,“对应核苷酸类似物”含有连接腺嘌呤的戊糖单元(不同于2-脱氧核糖)。

[0266] 如本文所用的术语“反向互补序列”、“反向互补”和“反向互补性”与术语“互补序列”、“互补”和“互补性”可互换。

[0267] 寡聚体(第一个区域或第一个和第二个区域)的邻接核碱基序列因而可以与靶标,如本文所指的那些互补。

[0268] 在一些实施方案中,第一个区域或第一个和第二个区域形成单一的邻接核碱基序列,其与mRNA靶标的区域,如本文所指的那些互补,包括例如ApoB-100(NM_000384.2GI:105990531或PCSK9(NM_174936.3GI:299523249)。

[0269] 长度

[0270] 寡聚体包含或由以下组成:长度共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和35个连续核苷酸的连续核苷酸序列。

[0271] 在一些实施方案中,寡聚体包含或由以下组成:长度共10-22,如12-18、如13-17或12-16、如13、14、15、16个连续核苷酸的连续核苷酸序列。

[0272] 在一些实施方案中,寡聚体包含或由以下组成:长度共10、11、12、13或14个连续核苷酸的连续核苷酸序列。

[0273] 在一些实施方案中,本发明的寡聚体由不多于22个核苷酸、如不多于20个核苷酸、

如不多于18个核苷酸、如15、16或17个核苷酸组成。在一些实施方案中,本发明的寡聚体包含少于20个核苷酸。应理解,当为寡聚体或连续核苷酸序列长度给定范围时,其包括所述范围内提供的下限长度和上限长度,例如10-30(或在其之间),包括10和30。

[0274] 核苷和核苷类似物

[0275] 如本文所用的术语“核苷酸”指包含糖部分(或其类似物)、碱基部分和共价连接的基团(连接基团),如磷酸或硫代磷酸酯核苷酸间连接基团的糖苷,并且涵盖天然发生的核苷酸,如DNA或RNA,和非天然发生的核苷酸,其包含修饰的糖和/或碱基部分,其在本文中也称为“核苷酸类似物”。如此,单个核苷酸(单元)也可以称为单体或核酸单元。

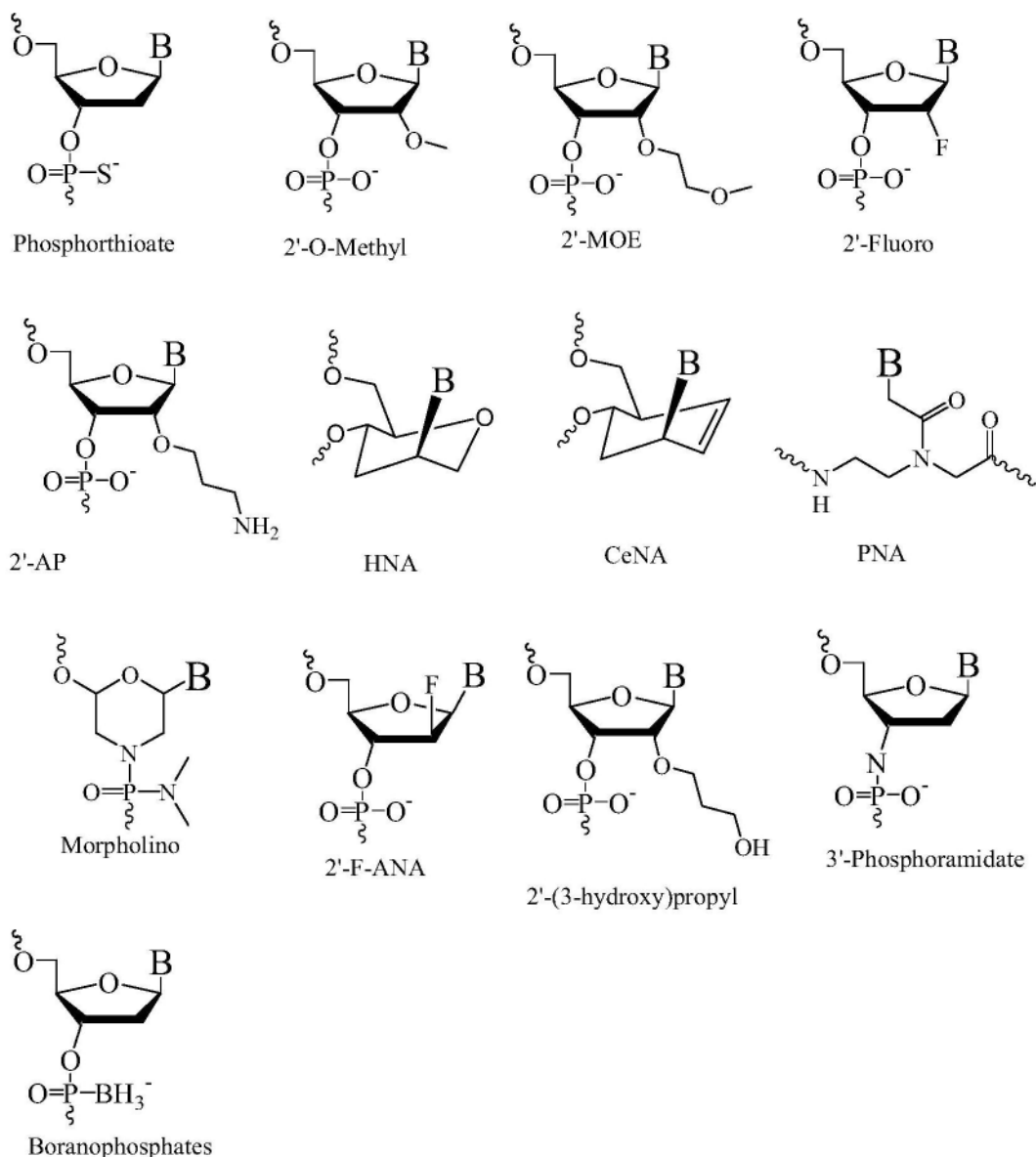
[0276] 将认识到,在本发明的上下文中,术语核苷和核苷酸用于指天然发生的核苷酸/核苷,如DNA和RNA,以及核苷酸/核苷类似物。

[0277] 在生物化学的领域中,术语“核苷”通常用于指包含糖部分和碱基部分的糖苷,并且因而可以当指核苷酸单元时使用,其在寡聚体的核苷酸之间通过核苷间连接共价连接。在生物技术的领域中,术语“核苷酸”经常用于指核酸单体或单元,并且像这样在寡核苷酸的上下文中其可以指碱基-如“核苷酸序列”,通常指核碱基序列(即暗示存在糖主链和核苷间连接)。同样,特别是在其中一个或多个核苷间连接基团被修饰的寡核苷酸的情况下,术语“核苷酸”可以指“核苷”,例如可以使用术语“核苷酸”,甚至当明确说明核苷之间的连接的存在或性质时。

[0278] 如本领域技术人员将认识到,寡核苷酸的5'末端核苷酸不包含核苷间连接基团,尽管可以包含或不包含5'末端基团。

[0279] 非天然发生的核苷酸包括具有修饰的糖部分的核苷酸,如二环核苷酸或2'修饰的核苷酸,如2'取代的核苷酸。

[0280] “核苷酸类似物”是天然核苷酸的变体,如由于在糖和/或碱基部分中具有修饰的DNA或RNA核苷酸。类似物原则上对寡核苷酸上下文中的天然核苷酸仅是“沉默的”或“等同的”,即对寡核苷酸作用于抑制靶基因表达的方式没有功能影响。然而该“等同的”类似物可能是有用的,例如如果它们更容易或便宜地制造,或对储存或制造条件更稳定,或代表标签或标记。然而,优选地,类似物将对寡聚体作用于抑制表达的方式具有功能影响;例如通过产生对靶标的增加的结合亲和力和/或对细胞内核酸酶增加的抗性和/或运输到细胞中增加的便利。例如,Freier&Altmann;Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 and Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213和方案1中描述了核苷类似物的具体实例:



[0281]

[0282] 方案1

[0283] 寡聚体因此包含或由天然发生的核苷酸的简单序列组成-优选2'-脱氧核苷酸(本文中一般称为“DNA”),但也可能是核糖核苷酸(本文中一般称为“RNA”),或此类天然发生的核苷酸与一个或多个非天然发生的核苷酸,即核苷酸类似物的组合。此类核苷酸类似物可以适当地增强寡聚体对靶序列的亲合力。

[0284] 合适的和优选的核苷酸类似物的实例由W02007/031091提供或在其中被参考。可以用于本发明寡聚体中的其他核苷酸类似物包括三环核酸,例如请参见W02013154798和W02013154798,其由此并入作为参考。

[0285] 在寡聚体中掺入增强亲和力的核苷酸类似物,如LNA或2'取代的糖可以允许特异结合寡聚体的大小减小,并且还可以在发生非特异性或异常结合之前减小寡聚体大小的上限。

[0286] 寡聚化合物,如反义寡核苷酸,如本文所指的化合物,包括区域A,并且在一些任选实施方案中,区域B可以含有一个或多个核苷,其中所述糖基团已经被修饰。此类糖修饰的核苷(核苷类似物)可能向反义化合物传递增强的核酸酶稳定性、增加的结合亲和力,或一

些其他有益的生物学性质。在一些实施方案中,核苷包含化学修饰的ribofiiranose环部分。

[0287] 在一些实施方案中,寡聚体或其第一个区域包含至少一个,如至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或25个核苷类似物,如糖修饰的核苷类似物。

[0288] 双环核苷类似物包括这样的核苷类似物,其包含连接核糖环的第二个和第四个碳的桥(或双基), (C4*-C2*桥或双基)。第2个和第4个碳之间双基的存在锁住核糖进入3' 内-(北) 构象,并且如此具有C2*-C4*双基的双环核苷类似物经常被称作锁定核酸(LNA)。在一些实施方案中,核苷类似物是(任选地独立地选自双环核苷类似物(如LNA),和/或2' 取代的核苷类似物,如(任选地独立地)选自2' -O-烷基-RNA单元、2' -OMe-RNA单元、2' -氨基-DNA单元、2' -AP、2' -FANA、2' -(3-羟基)丙基和2' -氟-DNA单元,和/或其他(任选地)糖修饰的核苷类似物,如吗啉代,肽核酸(PNA)、CeNA、未连接的核酸(UNA)、己糖醇核酸(HNA)、双环-HNA(参见例如W02009/100320),在一些实施方案中,核苷类似物增加了第一个区域对其靶核酸(或互补DNA或RNA序列)的亲合力。

[0289] 在一些实施方案中,寡聚体包含至少一个双环核苷酸类似物,如LNA。在一些实施方案中,第一个区域包含至少一个双环核苷类似物(例如LNA)和/或2' 取代的核苷类似物。在一些实施方案中,存在于寡聚体中的核苷类似物均包含相同的糖修饰。在一些实施方案中,存在于第一个区域中的至少一个核苷类似物是双环核苷类似物,如至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16,例如所有核苷类似物(除区域B的DNA或RNA核苷以外)是糖修饰的核苷类似物,如双环核苷类似物,如LNA,例如 β -D-X-LNA或 α -L-X-LNA(其中X是氧、氨基或硫代),或本文公开的其他LNAs包括但不限于(R/S)cET、cMOE或5'-Me-LNA。

[0290] 化学修饰的ribofiiranose环的实例包括,但不限于添加取代基基团(包括5'和2'取代基基团);非成对环原子桥接形成双环核酸(BNA);利用S、N(R)或C(R1)(R2)(R=H,C1-C2烷基或保护基团)替换核糖基环氧原子;及其组合。化学修饰的糖的实例包括,2'-F-5'-甲基取代的核苷(对于其他公开的5',2'-双取代核苷,参见,PCT国际申请W0 2008/101157,公开于8/21/08)、利用S取代核糖基环氧原子,在2'-位置具有其他取代(参见,公开的美国专利申请US2005/0130923,公开于2005年6月16日),或者,BNA的5'-取代(参见,PCT国际申请W0 2007/134181,公开于11/22/07,其中LNA被例如5'-甲基或5'-乙烯基团取代)。

[0291] 具有修饰的糖部分的核苷的实例包括,但不限于包含5'-乙烯基、5'-甲基(R或S)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃和2'-O(CH₂)₂₀CH₃取代基基团的核苷。2'位置上的取代基还可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、O-烯丙基、O-C₁-C₁₀烷基、OCF₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(Rm)(Rn)和O-CH₂-C(=O)-N(Rm)(Rn),其中Rm和Rn各自独立地是H或取代的或未取代的C₁-C₁₀烷基。

[0292] 如本文所用,“双环核苷”指包含双环糖部分的修饰的核苷。双环核苷的实例包括,不限于包含4'和2'核糖基环原子之间的桥的核苷。在一些实施方案中,本文提供的化合物包括一个或多个双环核苷,其中所述桥包含4'-2'双环核苷。此类4'-2'双环核苷包括,但不限于下式之一:4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4,-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-CH(CH₃)-O-

2'和4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2*,及其类似物(参见2008年7月15日出版的美国专利7,399,845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2',及其类似物(参见,2009年1月8日公布的PCT国际申请W02009/006478); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2',及其类似物(参见,2008年12月11日公布的PCT国际申请W02008/150729); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(参见,2004年9月2日公布的美国专利申请US2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2',其中R是H、C₁-C₁₀烷基或保护基团(参见,2008年9月23日出版的美国专利7,427,672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'(参见,Chattopadhyaya,等,J.Org.Chem., 2009,74,118-134);和4'-CH₂-C(=CH₂)-2',及其类似物(参见,2008年12月8日公布的PCT国际申请W0 2008/154401)。还参见,例如:Singh等,Chem.Comm.,1998,4,455-456;Koshkin等,Tetrahedron,1998,54,3607-3630;Wahlestedt等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,2000,97,5633-5638;Kumar等,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1998,8,2219-2222;Singh等,J.Org.Chem.,1998,63,10035-10039;Srivastava等,J.Am.Chem.Soc,129(26)8362-8379(Jul.4,2007);Elayadi等,Curr.Opinion Invens.Drugs,2001,2,558-561;Braasch等,Chem.Biol,2001,8,1-7;Oram等,Curr.Opinion Mol.Ther.,2001,3,239-243;美国专利号U.S.6,670,461、7,053,207、6,268,490、6,770,748、6,794,499、7,034,133、6,525,191、7,399,845;公布的PCT国际申请W0 2004/106356、W0 94/14226、W0 2005/021570和W0 2007/134181;美国专利公开号US2004/0171570、US2007/0287831和US2008/0039618;和美国专利系列号12/129,154、60/989,574、61/026,995、61/026,998、61/056,564、61/086,231、61/097,787和61/099,844;和PCT国际申请号PCT/US2008/064591、PCT/US2008/066154和PCT/US2008/068922。可以制备每个上述双环核苷,其具有一个或多个立体化学糖构型,包括例如 α -L-呋喃核糖和 β -D-呋喃核糖(参见PCT国际申请PCT DK98/00393,其作为W0 99/14226公布于1999年3月25日)。

[0293] 在一些实施方案中,BNA核苷的双环糖部分包括,但不限于在呋喃戊糖基糖部分的4'和2'位置之间具有至少一个桥的化合物,其中该桥独立地包含1或2-4个连接基团,其独立地选自-[CiRaXRb]-、-C(Ra)=C(Rb)-、-C(Ra)=N-、-C(=NRa)-、-C(=O)-、-C(=S)-、-O-、-Si(Ra)2-、-S(=O)_x-和-N(Ra)-;其中:x是0、1或2;n是1、2、3或4;Ra和Rb各自独立地是H、保护基团、羟基、C₁-C₁₂烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、取代的C₂-C₁₂炔基、C₅-C₂₀芳基、取代的C₅-C₂₀芳基、杂环基、取代的杂环基、杂芳基、取代的杂芳基、C₅-C₇脂环基、取代的C₅-C₇脂环基、卤素、OJ₁、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、COOJ₁、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、CN、磺酰(S(=O)₂-J₁)或sulfoxy(S(=O)-J₁);并且J₁和J₂各自独立地是H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、取代的C₂-C₁₂炔基、C₅-C₂₀芳基、取代的C₅-C₂₀芳基、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、杂环基、取代的杂环基、C₁-C₁₂氨基烷基、取代的C₁-C₁₂氨基烷基或保护基团。

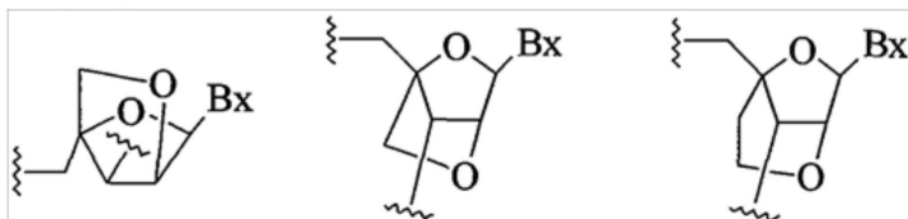
[0294] 在一些实施方案中,双环糖部分的桥是-[C(R_a)(R_b)]_n-、-[C(R_a)(R_b)]_n-O-、-C(R_aR_b)-N(R)-O-或-C(R_aR_b)-O-N(R)-。在一些实施方案中,所述桥是4'-CH₂-2'、4'-(CH₂)₂-2'、4'-(CH₂)₃-2'、4'-CH₂-O-2'、4*-(CH₂)₂-O-2'、4'-CH₂-O-N(R)-2'和4'-CH₂-N(R)-O-2'-,其中每一个R独立地为H、保护基团或C₁-C₁₂烷基。

[0295] 在一些实施方案中,通过异构构型进一步定义双环核苷。例如,包含4'-2'亚甲基-氧桥的核苷可以是 α -L构型或 β -D构型。先前, α -L-亚甲氧基(4'-CH₂-O-2')BNA's已经掺入到显示反义活性的反义寡核苷酸中(Frieden等,Nucleic Acids Research,2003,21,6365-

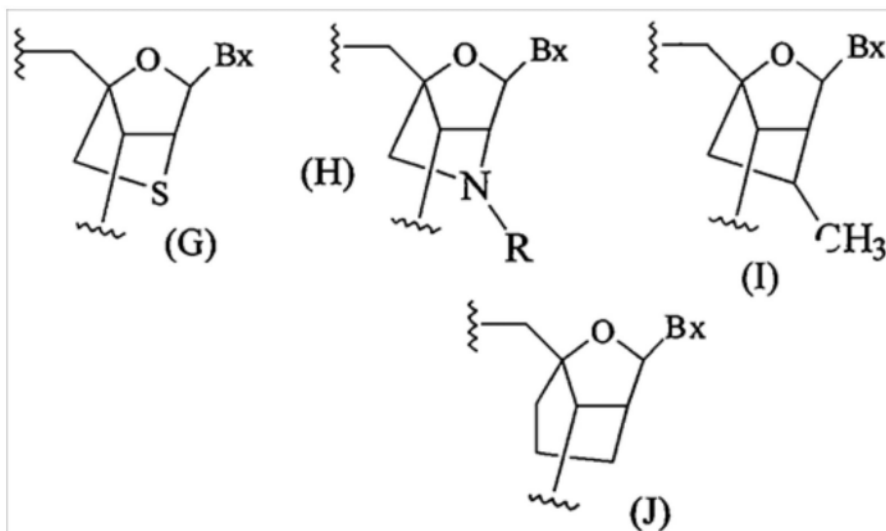
6372)。

[0296] 在一些实施方案中,双环核苷包括,但不限于(A) α -L-亚甲氧基(4'-CH₂-O-2') BNA, (B) β -D-亚甲氧基(4'-CH₂-O-2') BNA, (C) 亚乙基氧基(4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, (D) 氨基氧基(4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA, (E) 氧基氨基(4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA, (F) 甲基(亚甲氧基)(4'-CH(CH₃)-O-2') BNA, (G) 亚甲硫基(4'-CH₂-S-2') BNA, (H) 亚甲氨基(4'-CH₂-N(R)-2') BNA, (I) 甲基碳环(4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA, 和(J) 如下文所述的亚丙基碳环(4'-(CH₂)₃-2') BNA。

[0297]

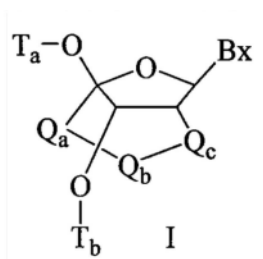


[0298]



[0299] 其中Bx是碱基部分,并且R独立地为H、保护基或C₁-C₂烷基。在一些实施方案中,具有式I的双环核苷:

[0300]



[0301] 其中:

[0302] Bx是杂环碱基部分;

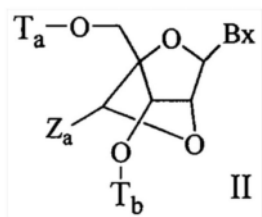
[0303] -Q_a-Q_b-Q_c-是-CH₂-N(R_c)-CH₂-、-C(=O)-N(R_c)-CH₂-、-CH₂-O-N(R_c)-、-CH₂-N(R_c)-O-或-N(R_c)-O-CH₂;

[0304] R_c是C₁-C₁₂烷基或氨基保护基团;并且

[0305] T_a和T_b各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分,或至支持物介质的共价附着。

[0306] 在一些实施方案中,具有式II的双环核苷:

[0307]



[0308] 其中:

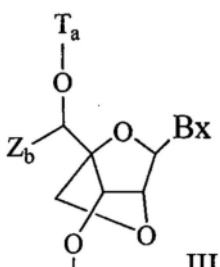
[0309] Bx是杂环碱基部分;

[0310] T_a 和 T_b 各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分,或至支持物介质的共价附着; Z_a 是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、取代的 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_2 - C_6 烯基、取代的 C_2 - C_6 炔基、酰基、取代的酰基、取代的酰胺、巯基或取代的硫代。

[0311] 在一些实施方案中,取代基团中的每一个独立地是取代基基团单或多取代的,所述取代基基团独立地选自卤素、氧、羟基、 OJ_c 、 NJ_d 、 SJ_c 、 $N3$ 、 $OC(=X)J_c$ 和 $NJ_eC(=X)NJ_cJ_d$,其中每一个 J_c 、 J_d 和 J_e 独立地为H、 C_1 - C_6 烷基或取代的 C_1 - C_6 烷基并且X是O或 NJ_c 。

[0312] 在一些实施方案中,具有式III的双环核苷:

[0313]



[0314] 其中:

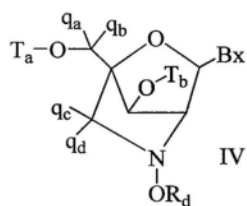
[0315] Bx是杂环碱基部分;

[0316] T_a 和 T_b 各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分,或至支持物介质的共价附着;

[0317] R_d 是 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、取代的 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_2 - C_6 烯基、取代的 C_2 - C_6 炔基或取代的酰基($C(=O)-$)。

[0318] 在一些实施方案中,具有式IV的双环核苷:

[0319]



[0320] 其中:

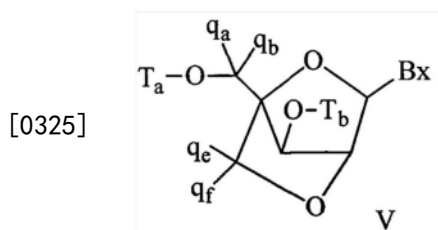
[0321] Bx是杂环碱基部分;

[0322] T_a 和 T_b 各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分,或至支持物介质的共价附着;

[0323] R_d 是 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、取代的 C_2 - C_6 炔基;每一个 q_b 、 q_c 和 q_d 独立地为H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、或取代的 C_2 - C_6 炔基, C_1 - C_6 烷氧基、取代的 C_1 - C_6 烷氧基、酰基、取代的

酰基、 C_1 - C_6 氨基烷基或取代的 C_1 - C_6 氨基烷基；

[0324] 在一些实施方案中,具有式V的双环核苷:



[0326] 其中:

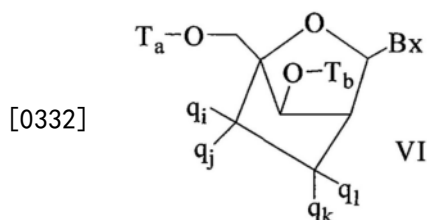
[0327] Bx是杂环碱基部分;

[0328] T_a 和 T_b 各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分,或至支持物介质的共价附着; q_a 、 q_b 、 q_c 和 q_d 各自独立地为氢、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基、取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、取代的 C_1 - C_{12} 烷氧基、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 或 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$;或 q_c 和 q_d 共同为 $=C(q_g)(q_h)$; q_g 和 q_h 各自独立地为H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基或取代的 C_1 - C_{12} 烷基。

[0329] 已经描述了亚甲氧基(4'- CH_2 -O-2')BNA单体腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶的合成和制备及其寡聚化,以及核酸识别性质(参见例如,Koshkin等,Tetrahedron,1998,54,3607-3630)。还在WO 98/39352和WO 99/14226中描述了BNA及其制备。

[0330] 也已经制备了亚甲氧基(4'- CH_2 -O-2')BNA、亚甲氧基(4'- CH_2 -O-2')BNA和2'-硫代-BNA的类似物{参见例如,Kumar等,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1998,8,2219-2222}。还已经描述了包含寡脱氧核糖核苷酸双链体作为核酸聚合酶的底物的锁定核苷类似物的制备(参见例如Wengel等,WO 99/14226)。此外,已经在本领域中描述了2'-氨基-BNA(新的构型受限的高亲和力寡核苷酸类似物)的合成(参见例如,Singh等,J.Org.Chem.,1998,63,10035-10039)。此外,已经制备了2'-氨基-和2'-甲基氨基-BNA's并且先前已经报道了其互补RNA的双链体的热稳定性。

[0331] 在一些实施方案中,双环核苷具有式VI:



[0333] 其中:

[0334] Bx是杂环碱基部分;

[0335] T_a 和 T_b 各自独立地是H、羟基保护基团、缀合物基团、反应性磷基团、磷部分,或至支持物介质的共价附着;每一个 q_i 、 q_j 、 q_k 和 q_l 各自独立地为H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基、取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、取代的 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、取代的 C_2 - C_{12} 炔基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、取代的 C_2 - C_{12} 烷氧基、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 或 $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$;并且 q_i 和 q_j 或 q_l 和 q_k 共同

为 $=C(q_g)(q_h)$; q_g 和 q_h 各自独立地为H、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基或取代的 C_1 - C_6 烷基。

[0336] 已经描述了具有4'- $(CH_2)_3$ -2'桥和烯基类似物,桥4'- $CH=CH-CH_2$ -2'的一种碳环双环核苷(参见例如,Freier等,Nucleic Acids Research,1997,25(22),4429-4443和Albaek等,J.Org.Chem.,2006,71,7731-7740)。也已经描述了碳环双环核苷的合成和制备以及其寡聚化和生物化学研究(参见例如,Srivastava等,J.Am.Chem.Soc.2007,129(26),8362-8379)。

[0337] 如本文所用,“4'-2'双环核苷”或“4'-2'双环核苷”指包含呋喃糖环的双环核苷,其包含连接2'碳原子和4'碳原子的桥。

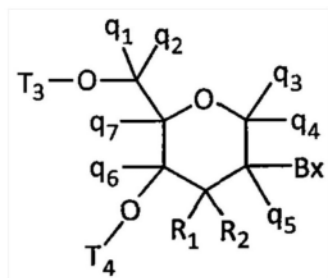
[0338] 如本文所用,“单环核苷”指包含修饰的糖部分(其不是双环糖部分)的核苷。在一些实施方案中,可以在任何位置修饰或取代核苷的糖部分或糖部分类似物。

[0339] 如本文所用,“2'-修饰的糖”表示在2'位置上修饰的呋喃糖。在一些实施方案中,此类修饰包括取代基,其选自:卤化物,包括但不限于取代的和未取代的烷氧基、取代的和未取代的硫烷基、取代的和未取代的氨基烷基、取代的和未取代的烷基、取代的和未取代的烯丙基、取代的和未取代的炔基。在一些实施方案中,2'修饰选自取代基,包括但不限于: $[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $0(CH_2)_nNH_2$ 、 $0(CH_2)_nCH_3$ 、 $0NH_2$ 、 $0CH_2C(=O)N(H)CH_3$ 和 $0(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$,其中m和n是从1至约10。其他2'-取代基基团也可以选自: C_1 - C_{12} 烷基;取代的烷基;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;杂环芳烷基;氨基烷基氨基;聚烷基氨基;取代的甲硅烷基;R;切割基团;报道基;嵌入剂;用于改善药物动力学性质的基团;和用于改善反义化合物的药效学性质的基团和具有相似性质的其他取代基。在一些实施方案中,修饰的核苷包含2'-MOE侧链(参见例如,Baker等,J.Biol.Chem.,1997,272,11944-12000)。已经描述该2'-MOE取代相比于未修饰的核苷与其他修饰的核苷,如2'-O-甲基、O-丙基和O-氨基丙基具有改善的结合亲和力。也已经显示具有2'-MOE取代基的寡核苷酸是体内使用的基因表达的反义抑制剂,其具有有希望的特征{参见例如,Martin,P.,He/v.Chim.Acta,1995,78,486-504;Altmann等,Chimia,1996,50,168-176;Altmann等,Biochem.Soc.Trans.,1996,24,630-637;and Altmann等,Nucleosides Nucleotides,1997,16,917-926)。

[0340] 如本文所用,“修饰的四氢吡喃核苷”或“修饰的THP核苷”表示具有六元四氢吡喃“糖”取代正常核苷中的呋喃戊糖残基的核苷(糖替代品)。修饰的THP核苷包括,但不限于本领域中称为己糖醇核酸(HNA)、anitol核酸(ANA)、manitol核酸(MNA){参见Leumann,CJ.Bioorg.and Med.Chem.(2002)10:841-854}、氟代HNA(F-HNA),或具有式X的那些化合物:

[0341] 式

[0342]



[0343] X其中独立地对于式X的所述至少一个四氢吡喃核苷类似物中每一个:

[0344] Bx是杂环碱基部分；

[0345] T_3 和 T_4 各自独立地是连接四氢吡喃核苷类似物与反义化合物的核苷间连接基团，或 T_3 和 T_4 之一是连接四氢吡喃核苷类似物与反义化合物的核苷间连接基团，和 T_3 和 T_4 中的另一个是H、羟基保护基团、连接的缀合物基团、或5'或3'-末端基团； q_1 q_2 q_3 q_4 q_5 、 q_6 和 q_7 各自独立地是H、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基、取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或取代的 C_2 - C_6 炔基； R_1 和 R_2 之一是氢，并且另一个选自卤素、取代的或未取代的烷氧基、NJ、 J_2 、SJ、 N_3 、 $OC(=X)J_1$ 、 $OC(=X)NJ_1J_2$ 、 $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$ 和CN，其中X是O、S和NJ₁并且每一个 J_1 、 J_2 和 J_3 独立地是H或 C_1 - C_6 烷基。

[0346] 在一些实施方案中，提供式X的修饰的THP核苷，其中 q_m 、 q_n 、 q_p 、 q_r 、 q_s 、 q_t 并且 q_u 各自是H。在一些实施方案中， q_m 、 q_n 、 q_p 、 q_r 、 q_s 、 q_t 和 q_u 中的至少一个不是H。在一些实施方案中， q_m 、 q_n 、 q_p 、 q_r 、 q_s 、 q_t 和 q_u 中的至少一个是甲基。在一些实施方案中，提供式X的THP核苷，其中 R_1 和 R_2 之一是F。在一些实施方案中， R_1 是氟并且 R_2 是H， R_1 是甲氧基并且 R_2 是H，并且 R_1 是甲氧基乙氧基并且 R_2 是H。

[0347] 如本文所用，“2'-修饰的”或“2'-取代的”指含糖的核苷，所述糖在2'位置上包含除H或OH以外的取代基。2'-修饰的核苷包括，但不限于具有非桥接2'取代基，如烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、O-烯丙基、O- C_1 - C_{10} 烷基、-OCF₃、O-(CH₂)₂-O-CH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)或O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)的核苷，其中R_m和R_n，各自独立地是H或取代的或未取代的 C_1 - C_{10} 烷基。2'-修饰的核苷可以进一步包含其他修饰，例如在糖的其他位置和/或核碱基上。

[0348] 如本文所用，“2'-F”指在2'位置上包含氟基团的糖。

[0349] 如本文所用，“2'-OMe”或“2'-OCH₃”或“2'-O-甲基”各自指含糖的核苷，所述糖在糖环的2'位置上包含-OCH₃基团。

[0350] 如本文所用，“寡核苷酸”指包含多个相连核苷的化合物。

[0351] 在一些实施方案中，修饰多个核苷中的一个或多个。在一些实施方案中，寡核苷酸包含一个或多个核糖核苷(RNA)和/或脱氧核糖核苷(DNA)。

[0352] 许多其他双环和三环糖替代品环系统也为本领域所知，其可用于修饰核苷用于掺入到反义化合物中{参见例如，综述文章：Leumann, J.C, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854}。该环系统可以经历许多额外的取代以增强活性。用于制备修饰的糖的方法为本领域技术人员所熟知。在具有修饰的糖部分的核苷酸中，维持核碱基部分(天然的、修饰的或其组合)用于与适当的核酸靶标杂交。

[0353] 在一些实施方案中，反义化合物包含具有修饰的糖部分的一个或多个核苷酸。在一些实施方案中，修饰的糖部分是2'-MOE。在一些实施方案中，2'-MOE修饰的核苷酸排列在gapmer基序中。在一些实施方案中，修饰的糖部分是cEt。在一些实施方案中，cEt修饰的核苷酸排列在gapmer基序的翼内。

[0354] 在一些实施方案中，在BNA(LNA)中， R^{4*} 和 R^{2*} 共同表示双基-O-CH(CH₂OCH₃)-(2' O-甲氧基乙基双环核酸-Seth等, 2010, J.Org.Chem)-以R-或S-构型。

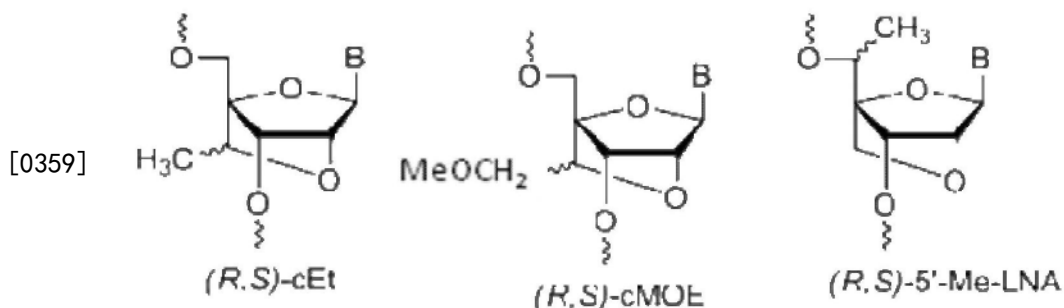
[0355] 在一些实施方案中，在BNA(LNA)中， R^{4*} 和 R^{2*} 共同表示双基-O-CH(CH₂CH₃)-(2' O-乙基双环核酸-Seth等, 2010, J.Org.Chem)-以R-或S-构型。

[0356] 在一些实施方案中，在BNA(LNA)中， R^{4*} 和 R^{2*} 共同表示双基--O-CH(CH₃)-。以R-或

S-构型。在一些实施方案中, R^{4*} 和 R^{2*} 共同表示双基- $O-CH_2-O-CH_2-$ -(Seth等,2010,J.Org.Chem)。

[0357] 在一些实施方案中,在BNA(LNA)中, R^{4*} 和 R^{2*} 共同表示双基- $O-NR-CH_3-$ -(Seth等,2010,J.Org.Chem)。

[0358] 在一些实施方案中,LNA单元具有选自以下基团的结构:



[0360] 寡聚体因此包含或由天然发生的核苷酸的简单序列组成-优选2'-脱氧核苷酸(本文中一般称为“DNA”),但也可能是核糖核苷酸(本文中一般称为“RNA”),或此类天然发生的核苷酸与一个或多个非天然发生的核苷酸,即核苷酸类似物的组合。此类核苷酸类似物可以适当地增强寡聚体对靶序列的亲合力。

[0361] 在寡聚体中掺入增强亲和力的核苷酸类似物,如BNA,(例如)LNA或2'取代的糖可以允许特异结合寡聚体的大小减小,并且还可以在发生非特异性或异常结合之前减小寡聚体大小的上限。

[0362] 在一些实施方案中,寡聚体包含至少1个核苷类似物。在一些实施方案中,寡聚体包含至少2个核苷酸类似物。在一些实施方案中,寡聚体包含3-8个核苷酸类似物,例如6或7个核苷酸类似物。在到目前为止最优的实施方案中,所述核苷酸类似物中的至少一个是BNA,如锁定核酸(LNA);例如至少3个或至少4个,或至少5个,或至少6个,或至少7个或8个核苷酸类似物可以是BNA,如LNA。在一些实施方案中,全部核苷酸类似物可以是BNA,如LNA。

[0363] 将认识到,当指仅由核苷酸组成的优选的核苷酸序列基序或核苷酸序列时,该序列定义的本发明寡聚体可以包含相应的核苷酸类似物代替所述序列中存在的一个或多个核苷酸,如BNA单元或其他核苷酸类似物,其升高寡聚体/靶双链体的双链体稳定性/ T_m (即,增强亲和力的核苷酸类似物)。

[0364] 优选的核苷酸类似物是LNA、如氧-LNA(如 β -D-氧-LNA,和 α -L-氧-LNA)、和/或氨基-LNA(如 β -D-氨基-LNA和 α -L-氨基-LNA)和/或硫代-LNA(如 β -D-硫代-LNA和 α -L-硫代-LNA)和/或ENA(如 β -D-ENA和 α -L-ENA)。最优选的是 β -D-氧基-LNA。

[0365] 在一些实施方案中,本发明寡聚体内存在的核苷酸类似物独立地选自例如:2'-O-烷基-RNA单元、2'-氨基-DNA单元、2'-氟代-DNA单元、BNA单元,例如LNA单元、阿拉伯核糖(ANA)单元、2'-氟代-ANA单元、HNA单元、INA(嵌入的核酸-Christensen,2002.Nucl.Acids.Res.200230:4918-4925,由此并入作为参考)单元和2' MOE单元。在一些实施方案中,在本发明寡聚体中仅存在一个上述类型的核苷酸类似物,如第一个区域或其连续核苷酸序列。

[0366] 在一些实施方案中,核苷酸类似物是2'-O-甲氧基乙基-RNA(2' MOE),2'-氟代-DNA单体或LNA核苷酸类似物,并且像这样,本发明的寡核苷酸可以包含核苷酸类似物,其独立

地选自这三种类型的类似物,或可以仅包含选自所述三种类型的一种类型的类似物。在一些实施方案中,所述核苷酸类似物中的至少一个是2'-MOE-RNA,如2、3、4、5、6、7、8、9或10个2'-MOE-RNA核苷酸单元。在一些实施方案中,所述核苷酸类似物中的至少一个是2'-氟代-DNA,如2、3、4、5、6、7、8、9或10 2'-氟代-RNA核苷酸单元。

[0367] 在一些实施方案中,本发明的寡聚体包含至少一个BNA,例如锁定核酸(LNA)单元,如1、2、3、4、5、6、7或8个BNA/LNA单元,如从3-7或4-8个BNA/LNA单元,或3、4、5、6或7个BNA/LNA单元。在一些实施方案中,全部核苷酸类似物是BNA,如LNA。在一些实施方案中,寡聚体可以包含两个 β -D-氧基-LNA,和以下LNA单元中的一个或多个:硫代-LNA、氨基-LNA、氧基-LNA和/或 β -D或 α -L构型的ENA或其组合。在一些实施方案中,全部BNA,如LNA,胞嘧啶单元是5'甲基-胞嘧啶。在本发明的一些实施方案中,寡聚体(如第一个和任选的第二个区域)可以包含BNA和LNA以及DNA单元。在一些实施方案中,LNA和DNA单元组合的总数是10-25,如10-24,优选10-20,如10-18,如12-16。在本发明的一些实施方案中,寡聚体、其第一个区域的核苷酸序列,如连续核苷酸序列由至少一个BNA,例如LNA组成,并且剩余的核苷酸单元是DNA单元。在一些实施方案中,寡聚体或其第一个区域仅包含BNA,例如LNA、核苷酸类似物和天然发生的核苷酸(如RNA或DNA,最优选DNA核苷酸),任选地具有修饰的核苷间连接,如硫代磷酸酯。

[0368] 术语“核碱基”指核苷酸的碱基部分并且涵盖天然发生的以及非天然发生的变体。因此,“核碱基”不仅涵盖已知的嘌呤和嘧啶杂环,还涵盖其杂环类似物和互变异构体。将认识到区域B的DNA或RNA核苷可以具有天然发生的和/或非天然发生的核碱基。

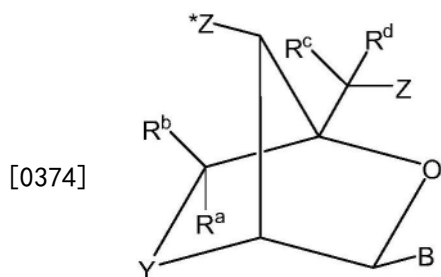
[0369] 核碱基的实例包括,但不限于腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、肌苷、二氨基嘌呤和2-氯-6-氨基嘌呤。在一些实施方案中,核碱基可以独立地选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、5-甲基胞嘧啶。在一些实施方案中,核碱基可以独立地选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和5-甲基胞嘧啶。

[0370] 在一些实施方案中,寡聚体中存在的核碱基中的至少一个是修饰的核碱基,其选自5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、肌苷、二氨基嘌呤和2-氯-6-氨基嘌呤。

[0371] LNA

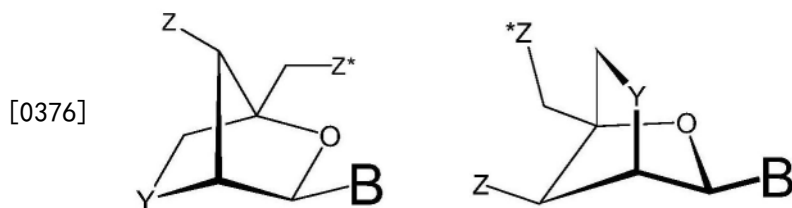
[0372] 术语“LNA”指双环核苷类似物,其包含C2*-C4*双基(桥),并且已知为“锁定核酸”。其可以指LNA单体,或当用于“LNA寡核苷酸”的上下文中时,LNA指含有一个或多个此类双环核苷酸类似物的寡核苷酸。在一些方面,双环核苷类似物是LNA核苷酸,并且这些术语因而可以互换使用,在此类实施方案中,两者的特征在于在核糖糖环的C2'和C4'之间存在接头基团(如桥)。

[0373] 在一些实施方案中,用于本发明寡核苷酸化合物中的LNA优选具有通式II的结构:

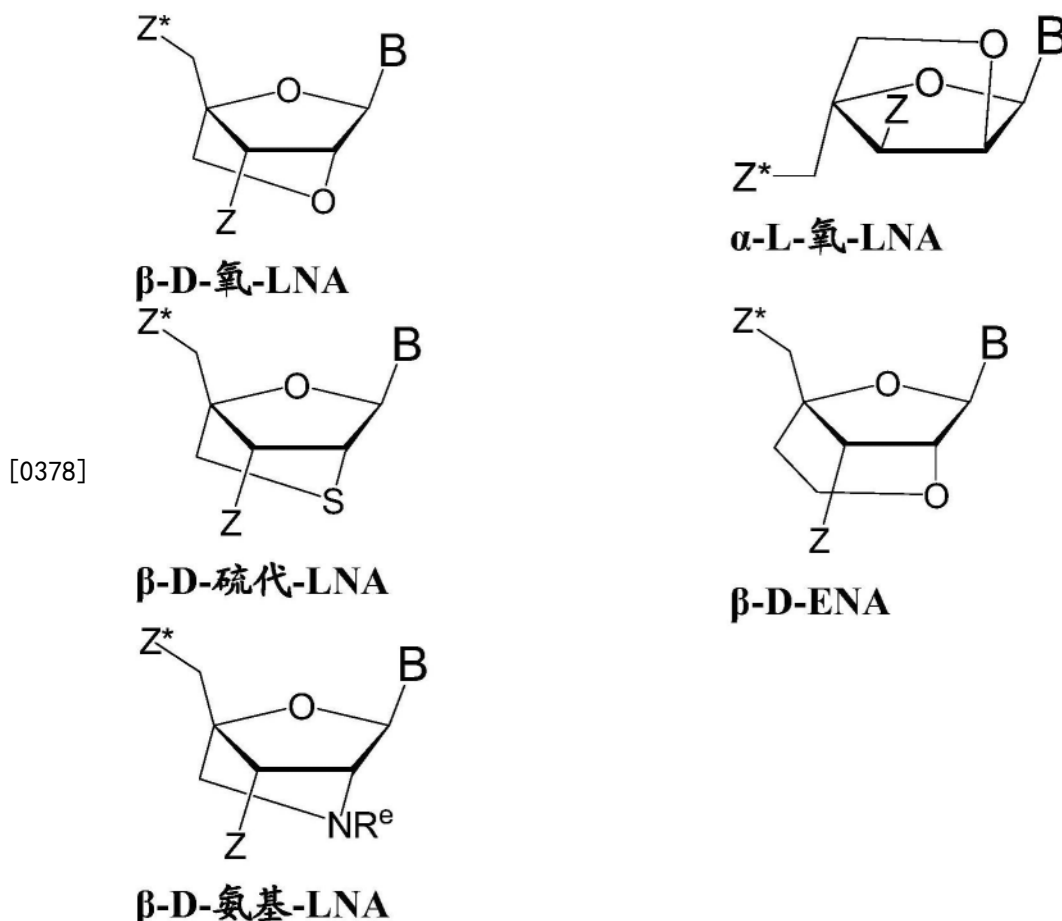


通式 II

[0375] 其中Y选自 $-O-$ 、 $-\text{CH}_2O-$ 、 $-S-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $N(R^e)$ 和/或 $-\text{CH}_2-$ ；Z和Z*独立地选自核苷间连接、 R^H 、末端基团或保护基团；B组成了天然的或非天然的核苷酸碱基部分(核碱基)，并且 R^H 选自氢和 C_{1-4} -烷基； R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 和 R^e 任选地独立地选自氢、任选取代的 C_{1-12} -烷基、任选取代的 C_{2-12} -烯基、任选取代的 C_{2-12} -炔基、羟基、 C_{1-12} -烷氧基、 C_{2-12} -烷氧基烷基、 C_{2-12} -烯氧基、羧基、 C_{1-12} -烷氧基羰基、 C_{1-12} -烷基羰基、甲酰、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳基羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳羰基、氨基、单-和二(C_{1-6} -烷基)氨基、氨基甲酰、单-和二(C_{1-6} -烷基)-氨基-羰基、氨基- C_{1-6} -烷基-氨基羰基、单-和二(C_{1-6} -烷基)氨基- C_{1-6} -烷基-氨基羰基、 C_{1-6} -烷基-羰基氨基、脲基、 C_{1-6} -烷酰氧基、磺基(sulphono)、 C_{1-6} -烷基磺酰氧基、硝基、叠氮基、sulphonyl、 C_{1-6} -烷硫基、卤素、DNA嵌入剂、光化学活性基团、热化学活性基团、螯合基团、报告基团和配体，其中芳基和杂芳基可以任选地被取代并且其中两个成对取代基 R^a 和 R^b 一起指示任选取代的亚甲基($=\text{CH}_2$)；和 R^H 选自氢和 C_{1-4} -烷基。在一些实施方案中， R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 和 R^e 任选地独立地选自氢和 C_{1-6} 烷基，如甲基。对于所有手性中心，发现不对称基团是R或S方向，例如两个示例性立体化学异构体包括 β -D和 α -L同工型，其可以阐释如下：



[0377] 特定的示例性LNA单元显示于下：



[0379] 术语“硫代-LNA”包含锁定的核苷酸,其中上文通式中的Y选自S或-CH₂-S-。硫代-LNA可以是β-D和α-L构型。

[0380] 术语“氨基-LNA”包含锁定的核苷酸,其中上文通式中的Y选自-N(H)-、N(R)-、CH₂-N(H)-和-CH₂-N(R)-,其中R选自氢和C₁₋₄-烷基。氨基-LNA可以是β-D和α-L构型。

[0381] 术语“氧-LNA”包含锁定的核苷酸,其中上文通式中的Y代表-O-。氧-LNA可以是β-D和α-L构型。

[0382] 术语“ENA”包含锁定的核苷酸,其中上文通式中的Y是-CH₂-O- (其中-CH₂-O-的氧原子附着到相对于碱基B的2'-位置上)。R^e是氢或甲基。

[0383] 在一些示例性实施方案中,LNA选自β-D-氧-LNA、α-L-氧-LNA、β-D-氨基-LNA和β-D-硫代-LNA,特别是β-D-氧-LNA。

[0384] RNA酶募集

[0385] 认识到寡聚化合物可以通过靶mRNA的非RNA酶介导的降解起功能,如通过翻译的位阻或其他方法,在一些实施方案中,本发明的寡聚体能够募集内切核糖核酸酶(RNase),如RNaseH。

[0386] 其优选为此类寡聚体,如区域A,或连续核苷酸序列,包含至少6个,如至少7个连续核苷酸单元,如至少8个或至少9个连续核苷酸单元(残基),包括7、8、9、10、11、12、13、14、15或16连续核苷酸,其当与互补靶RNA在双链体中形成时能够募集RNA酶。能够募集RNA酶的邻接序列可以是在如本文所述gapmer上下文中所指的区域Y'。在一些实施方案中,能够募集RNA酶的邻接序列,如区域Y'的大小可以更大,如10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个

核苷酸单元。

[0387] EP 1 222 309提供了用于测定RNA酶H活性的体外方法,其可以用于测定募集RNA酶H的能力。认为寡聚体能够募集RNA酶H,如果当与互补RNA靶标一起提供时,其具有使用EP 1 222 309的实施例91-95提供的方法学,使用仅DNA寡核苷酸测定的初始速率的至少1%,如至少5%,如至少10%,或多于20%的初始速率(如以pmol/l/min测量的),所述DNA寡核苷酸具有相同的碱基序列,但含有仅DNA单体,且没有2'取代,在寡核苷酸的全部单体之间具有硫代磷酸酯连接基团。

[0388] 在一些实施方案中,认为寡聚体基本上不能够募集RNA酶H,如果当与互补RNA靶标和RNA酶H一起提供时,如以pmol/l/min测量的初始速率低于使用EP 1 222 309的实施例91-95提供的方法学,使用等量仅DNA寡核苷酸测定的初始速率的1%,如低于5%,如低于10%,或低于20%,所述寡核苷酸没有2'取代,在寡核苷酸的全部核苷酸之间具有硫代磷酸酯连接基团。

[0389] 在其他实施方案中,认为寡聚体能够募集RNA酶H,如果当与互补RNA靶标和RNA酶H一起提供时,如以pmol/l/min测量的初始速率是使用EP 1 222 309的实施例91-95提供的方法学,使用等量仅DNA寡核苷酸测定的初始速率的至少20%,如至少40%,如至少60%,如至少80%,所述寡核苷酸没有2'取代,在寡核苷酸的全部核苷酸之间具有硫代磷酸酯连接基团。

[0390] 通常,形成连续核苷酸单元的寡聚体的区域当与互补靶RNA在双链体中形成时能够募集由核苷酸单元组成的RNA酶,其与RNA靶标形成DNA/RNA样双链体。本发明的寡聚体,如第一个区域可以包含核苷酸序列,其包含核苷酸和核苷酸类似物,并且可以例如是gapmer、headmer或mixmer的形式。

[0391] “headmer”定义为包含区域X'和与其邻接的区域Y'的寡聚体,区域Y'的5'-最末单体连接区域X'的3'-最末单体。区域X'包含非RNA酶募集核苷类似物的邻接序列并且区域Y'包含RNA酶可识别并可切割的DNA单体或核苷类似物单体的邻接序列(如至少7个邻接单体)。

[0392] “tailmer”定义为包含区域X'和与其邻接的区域Y'的寡聚体,区域Y'的5'-最末单体连接区域X'的3'-最末单体。区域X'包含RNA酶可识别并可切割的DNA单体或核苷类似物单体的邻接序列(如至少7个邻接单体),并且区域X'包含非RNA酶募集核苷类似物的邻接序列。

[0393] 其他“嵌合”寡聚体,称为“mixmers”由(i) RNA酶可识别并可切割的DNA单体或核苷类似物单体,和(ii)非RNA酶募集核苷类似物单体的交替组合物组成。

[0394] 在一些实施方案中,除了增强寡聚体对靶区域的亲和力以外,一些核苷类似物还介导RNA酶(例如,RNA酶H)结合和切割。因为 α -L-LNA(BNA)单体在一定程度上募集RNA酶H活性,所以在一些实施方案中,含有 α -L-LNA单体的寡聚体的空位区域(例如,本文所指的区域Y')由RNA酶H可识别且可切割的较少单体组成,并且在mixmer构建体中引入更大的柔性。

[0395] Gapmer设计

[0396] 在一些实施方案中,本发明的寡聚体,如第一个区域包含或是gapmer。gapmer寡聚体是包含核苷酸的邻接序列的寡聚体,其能够募集RNA酶,如RNA酶H,如至少6个或7个DNA核苷酸的区域,其在本文中称为区域Y'(Y'),其中区域Y'的5'和3'侧翼为增强亲和力的核苷

酸类似物区域,如能够募集RNA酶的核苷酸的邻接序列5'和3'的1-6个核苷酸类似物-这些区域分别称作区域X'(X')和Z'(Z')。gapmer的实例公开于W02004/046160、W02008/113832和W02007/146511。

[0397] 在一些实施方案中,能够募集RNA酶的单体选自DNA单体、 α -L-LNA单体、C4'烷基化的DNA单体(见PCT/EP2009/050349和Vester等,Bioorg.Med.Chem.Lett.18(2008)2296-2300,由此并入作为参考),和UNA(未连接的核酸)核苷酸(参见Fluiter等,Mol.Biosyst.,2009,10,1039由此并入作为参考)。UNA是未锁定核酸,通常其中已经去除了核糖的C2-C3 C-C键,形成未锁定的“糖”残基。优选地,所述gapmer包含式(5'-3'),X'-Y'-Z'的(多聚)核苷酸序列,其中区域X'(X')(5'区域)由以下组成或包含至少一个核苷酸类似物,如至少一个BNA(例如LNA)单元,如1-6个核苷酸类似物,如BNA(例如LNA)单元,并且;区域Y'(Y')由以下组成或包含至少5个连续核苷酸,其能够募集RNA酶(当与互补RNA分子,如mRNA靶标在双链体中形成时),如DNA核苷酸,并且;区域Z'(Z')(3'区域)由以下组成或包含至少一个核苷酸类似物,如至少一个BNA(例如LNA)单元,如1-6个核苷酸类似物,如BNA(例如LNA)单元。

[0398] 在一些实施方案中,区域X'由1、2、3、4、5或6个核苷酸类似物,如BNA(例如LNA)单元,如2-5个核苷酸类似物,如2-5个LNA单元,如3或4个核苷酸类似物,如3或4个LNA单元组成;和/或区域Z'由1、2、3、4、5或6个核苷酸类似物,如BNA(例如LNA)单元,如2-5个核苷酸类似物,如2-5个BNA(例如LNA单元),如3或4个核苷酸类似物,如3或4个BNA(例如LNA)单元组成。

[0399] 在一些实施方案中,Y'由以下组成或包含能够募集RNA酶的5、6、7、8、9、10、11或12个连续核苷酸,或能够募集RNA酶的6-10个,或7-9个,如8个连续核苷酸。在一些实施方案中,区域Y'由以下组成或包含至少一个DNA核苷酸单元,如1-12个DNA单元,优选4-12个DNA单元,更优选6-10个DNA单元,如7-10个DNA单元,最优选8、9或10个DNA单元。

[0400] 在一些实施方案中,区域X'由3或4个核苷酸类似物组成,如BNA(例如LNA),区域X'由8、9或10个DNA单元组成,并且区域Z'由3或4个核苷酸类似物组成,如BNA(例如LNA)。此类设计包括(X'-Y'-Z')3-10-3、3-10-4、4-10-3、3-9-3、3-9-4、4-9-3、3-8-3、3-8-4、4-8-3、3-7-3、3-7-4、4-7-3。

[0401] 其他gapmer设计公开于W02004/046160中,其由此并入作为参考。要求由此并入作为参考的美国临时申请60/977,409的优先权的W02008/113832涉及'shortmer' gapmer寡聚体。在一些实施方案中,本文呈现的寡聚体可以是此类shortmer gapmers。

[0402] 在一些实施方案中,寡聚体例如区域X'由共10、11、12、13或14个核苷酸单元的连续核苷酸序列组成,其中所述连续核苷酸序列包含或是式(5'-3'),X'-Y'-Z'其中;X'由1、2或3个核苷酸类似物单元组成,如BNA(例如LNA)单元;Y'由当与互补RNA分子(如mRNA靶标)在双链体中形成时能够募集RNA酶的7、8或9个连续核苷酸单元组成;并且Z'由1、2或3个核苷酸类似物单元组成,如BNA(例如LNA)单元。

[0403] 在一些实施方案中,X'由1个BNA(例如LNA)单元组成。在一些实施方案中,X'由2个BNA(例如LNA)单元组成。在一些实施方案中,X'由3个BNA(例如LNA)单元组成。在一些实施方案中,Z'由1个BNA(例如LNA)单元组成。在一些实施方案中,Z'由2个BNA(例如LNA)单元组成。在一些实施方案中,Z'由3个BNA(例如LNA)单元组成。在一些实施方案中,Y'由7个核苷酸单元组成。在一些实施方案中,Y'由8个核苷酸单元组成。在一些实施方案中,Y'由9个核

苷酸单元组成。在某些实施方案中,区域Y' 由10个核苷单体组成。在某些实施方案中,区域Y' 由以下组成或包含1-10个DNA单体。在一些实施方案中,Y' 包含1-9个DNA单元,如2、3、4、5、6、7、8或9个DNA单元。在一些实施方案中,Y' 由DNA单元组成。在一些实施方案中,Y' 包含 α -L构型的至少一个BNA单元,如 α -L构型的2、3、4、5、6、7、8或9个LNA单元。在一些实施方案中,Y' 包含至少一个 α -L-氧BNA/LNA单元或其中 α -L-构型的所有LNA单元是 α -L-氧LNA单元。在一些实施方案中,X' -Y' -Z' 中存在的核苷酸的数量选自(核苷酸类似物单元-区域Y' -核苷酸类似物单元):1-8-1、1-8-2、2-8-1、2-8-2、3-8-3、2-8-3、3-8-2、4-8-1、4-8-2、1-8-4、2-8-4或;1-9-1、1-9-2、2-9-1、2-9-2、2-9-3、3-9-2、1-9-3、3-9-1、4-9-1、1-9-4或;1-10-1、1-10-2、2-10-1、2-10-2、1-10-3、3-10-1。在一些实施方案中,X' -Y' -Z' 中的核苷酸的数量选自:2-7-1、1-7-2、2-7-2、3-7-3、2-7-3、3-7-2、3-7-4和4-7-3。在某些实施方案中,区域X' 和Y' 各自由三个BNA(例如LNA)单体组成,并且区域Y' 由8或9或10个核苷单体,优选DNA单体组成。在一些实施方案中,X' 和Z' 各自由两个BNA(例如LNA)单元组成,并且Y' 由8或9个核苷单元,优选DNA单元组成。在多个实施方案中,其他gapmer设计包括其中区域X' 和/或Z' 由3、4、5或6个核苷类似物组成的那些,如含有2' -O-甲氧基乙基-核糖糖(2' -MOE)的单体或含有2' -氟代-脱氧核糖糖的单体,并且区域Y' 由8、9、10、11或12个核苷组成,如DNA单体,并且其中X' -Y' -Z' 具有3-9-3、3-10-3、5-10-5或4-12-4个单体。其他gapmer设计公开于WO 2007/146511A2中,其由此并入作为参考。

[0404] 剪接转换寡聚体

[0405] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸是剪接转换寡聚体-即靶向pre-mRNA的寡聚体,其引起pre-mRNA的可变剪接。

[0406] 用于剪接转换寡聚体的靶标可以包括TNF受体,例如SSO可以是WO2007/058894、WO08051306 A1和PCT/EP2007/061211(由此并入作为参考)中公开的一种或多种TNFR SSO。

[0407] 剪接转换寡聚体通常(基本上)不能够募集RNA酶H,并且像这样一般不想要gapmer、tailmer或headmer设计。然而,mixmer和totalmer设计是用于SSO的合适设计。

[0408] 剪接转换寡聚体也已经用于在进行性假肥大性肌营养不良中靶向肌营养不良蛋白缺乏。

[0409] Mixmers

[0410] 大多数反义寡核苷酸是被设计为募集RNA酶(如RNA酶H)以降解其期望靶标的化合物。此类化合物包括DNA硫代磷酸酯寡核苷酸和gapmer、headmers和tailmers。这些化合物通常包含至少5或6个DNA核苷酸的区域,并且在gapmers的情况下,任一边侧翼是增强亲和力的核苷酸类似物。

[0411] 本发明的寡聚体可以通过RNA酶(如RNA酶H)不依赖性机制运转。通过非RNA酶H(或非RNA酶)机制运转的寡聚体的实例是mixmers和totalmers。

[0412] 术语'mixmer'指包含天然和非天然发生的核苷酸的寡聚体,其中与gapmers、tailmers和headmers相反,不存在多于5个连续的天然发生的核苷酸的邻接序列,并且在一些实施方案中,不多于4个连续的,如不多于3个连续的天然发生的核苷酸,如DNA单元。在一些实施方案中,mixmer不包含多于5个连续核苷类似物,如BNA(LNA),并且在一些实施方案中,不多于4个连续的,如不多于3个连续的核苷类似物,如BNA(LNA)。在此类mixmers中,剩余核苷例如可以在DNA核苷附近,和/或在非二环核苷类似物,如本文中涉及的那些,例如2'

取代的核苷类似物,如2'-O-MOE和或2' 氟。

[0413] 本发明的寡聚体可以是mixmers-的确多种mixmer设计作为寡聚体或其第一个区域(特别是当靶向microRNA(antimiRs)、mRNAs上的microRNA结合位点(Blockmirs)时)或作为剪接转换寡聚体(SSOs)是高度有效的。参见例如W02007/112754(LNA-AntimiRsTM)、W02008/131807(LNA剪接转换寡聚体)。

[0414] 在一些实施方案中,寡聚体或mixmer可以包含BNA和任选地被DNA核苷2' 取代的核苷类似物-参见例如W007027894和W02007/112754,其由此并入作为参考。特定实例包括寡聚体或第一个区域,其包含LNA、2'-O-MOE和DNA、LNA、2' 氟和2'-O-MOE、2'-O-MOE和2' 氟、2'-O-MOE和2' 氟和LNA或LNA和2'-O-MOE和LNA和DNA。

[0415] 在一些实施方案中,寡聚体或mixmer包含或由以下组成:核苷酸类似物和天然发生的核苷酸,或一种类型的核苷酸类似物和第二种类型的核苷酸类似物的重复模式的连续核苷酸序列。所述重复模式可以是例如所有第二个或所有第三个核苷酸是核苷酸类似物,如BNA(LNA),并且剩余的核苷酸是天然发生的核苷酸,如DNA,或是2' 取代的核苷酸类似物,如本文所涉及的2' 氟代类似物的2' MOE,或在一些实施方案中,其选自本文中所涉及的核苷酸类似物。认识到核苷酸类似物的重复模式,如LNA单元可以与固定位置上,例如5' 或3' 末端上的核苷酸类似物组合。

[0416] 在一些实施方案中,从3' 末端开始计数,寡聚体或mixmer的第一个核苷酸是核苷酸类似物,如LNA核苷酸。

[0417] 在一些实施方案中,从3' 末端开始计数,寡聚体或mixmer的第二个核苷酸(可以相同或不同)是核苷酸类似物,如LNA核苷酸。

[0418] 在一些实施方案中,从3' 末端开始计数,寡聚体或mixmer的第七个和/或第八个核苷酸(可以相同或不同)是核苷酸类似物,如LNA核苷酸。

[0419] 在一些实施方案中,从3' 末端开始计数,第一个和/或第二个寡聚体的第九个和/或第十个核苷酸(可以相同或不同)是核苷酸类似物,如LNA核苷酸。

[0420] 在一些实施方案中,寡聚体或mixmer的5' 末端(可以相同或不同)是核苷酸类似物,如LNA核苷酸。

[0421] 在一些实施方案中,上述设计特征可以整合到mixmer设计,如antimiR mixmers中。

[0422] 在一些实施方案中,寡聚体或mixmer不包含多于4个连续DNA核苷酸单元或3个连续DNA核苷酸单元的区域。在一些实施方案中,mixmer不包含多于2个连续DNA核苷酸单元的区域。

[0423] 在一些实施方案中,寡聚体或mixmer包含由至少2个连续核苷酸类似物单元,如至少2个连续LNA单元组成的至少一个区域。

[0424] 在一些实施方案中,寡聚体或mixmer包含由至少3个连续核苷酸类似物单元,如至少3个连续LNA单元的至少一个区域。

[0425] 在一些实施方案中,本发明的寡聚体或mixmer不包含多于7个连续核苷酸类似物单元的区域,如LNA单元。在一些实施方案中,本发明的寡聚体或mixmer不包含多于6个连续核苷酸类似物单元的区域,如LNA单元。在一些实施方案中,本发明的寡聚体或mixmer不包含多于5个连续核苷酸类似物单元的区域,如LNA单元。在一些实施方案中,本发明的寡聚体

或mixmer不包含多于4个连续核苷酸类似物单元的区域,如LNA单元。在一些实施方案中,本发明的寡聚体或mixmer不包含多于3个连续核苷酸类似物单元的区域,如LNA单元。在一些实施方案中,本发明的寡聚体或mixmer不包含多于2个连续核苷酸类似物单元的区域,如LNA单元。mixmer是可能包含不多于4个连续DNA核苷酸的DNA的一个或多个短区域的寡聚体,并且通常包含核苷酸类似物的交替区域(如LNA单元)和DNA核苷酸,任选地其他核苷酸类似物(例如,非LNA核苷酸类似物)的区域。Totalmers不包含DNA或RNA核苷酸(尽管可能包含DNA和RNA的类似物或衍生物)。

[0426] 在一些实施方案中,本发明的寡聚体(例如区域A)可能在一些实施方案中包含不多于4个连续的DNA核苷酸,或不多于3个连续的DNA核苷酸。

[0427] 以下实施方案可以应用于mixmers或totalmer寡聚体(例如,如区域A):

[0428] 本发明的寡聚体(例如区域A)在一些实施方案中可以包含LNA和非LNA核苷酸(如DNA或2'取代的核苷酸类似物)的至少两个交替区域。

[0429] 本发明的寡聚体在一些实施方案中可以包含下式的邻接序列:5'

[0430] $([\text{LNA核苷酸}]_{1-5} \text{和} [\text{非-LNA核苷酸}]_{1-4})_{2-12} \cdot 3'$ 。

[0431] 在一些实施方案中,连续核苷酸序列(或寡聚体)的5'核苷酸是LNA核苷酸。

[0432] 在一些实施方案中,连续核苷酸序列的3'核苷酸是核苷酸类似物,如LNA,或2、3、4、5 3'核苷酸是核苷酸类似物,如LNA核苷酸,或赋予寡聚体增强的血清稳定性的其他核苷酸类似物。

[0433] 在一些实施方案中,寡聚体的连续核苷酸序列具有式5' $([\text{LNA核苷酸}]_{1-5} - [\text{非-LNA核苷酸}]_{1-4})_{2-11} - [\text{LNA核苷酸}]_{1-5} 3'$ 。

[0434] 在一些实施方案中,寡聚体的连续核苷酸序列具有LNA和非-LNA核苷酸的2、3或4个邻接区域-例如包含式 $([\text{LNA核苷酸}]_{1-5} \text{和} [\text{非-LNA核苷酸}]_{1-4})_{2-3}$, 任选地具有其他3' LNA区域 $[\text{LNA核苷酸}]_{1-5}$ 。

[0435] 在一些实施方案中,寡聚体的连续核苷酸序列包含5' $([\text{LNA核苷酸}]_{1-3} \text{和} [\text{非-LNA核苷酸}]_{1-3})_{2-5}$, 任选地具有其他3' LNA区域 $[\text{LNA核苷酸}]_{1-3}$ 。

[0436] 在一些实施方案中,寡聚体的连续核苷酸序列包含5' $([\text{LNA核苷酸}]_{1-3} \text{和} [\text{非-LNA核苷酸}]_{1-3})_3$, 任选地具有其他3' LNA区域 $[\text{LNA核苷酸}]_{1-3}$ 。

[0437] 在一些实施方案中,非-LNA核苷酸是全部DNA核苷酸。

[0438] 在一些实施方案中,非-LNA核苷酸独立地或非独立地选自DNA单元、RNA单元、2'-O-烷基-RNA单元、2'-OMe-RNA单元、2'-氨基-DNA单元和2'-氟代-DNA单元。

[0439] 在一些实施方案中,非-LNA核苷酸(任选地独立地选自2'取代的核苷类似物,如(任选地独立地)选自2'-O-烷基-RNA单元、2'-OMe-RNA单元、2'-氨基-DNA单元、2'-AP、2'-FANA、2'-(3-羟基)丙基和2'-氟-DNA单元,和/或其他(任选地)糖修饰的核苷类似物,如吗啉代,肽核酸(PNA)、CeNA、未连接的核酸(UNA)、己糖醇核酸(HNA)、双环-HNA(参见例如W02009/100320),在一些实施方案中,核苷类似物增加了第一个区域对其靶核酸(或互补DNA或RNA序列)的亲和力。多种核苷类似物公开于Freier&Altmann;Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443和Uhlmann;Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213中,其由此并入作为参考。

[0440] 在一些实施方案中,非-LNA核苷酸是DNA核苷酸。在一些实施方案中,寡聚体或连

续核苷酸序列包含LNA核苷酸和任选地其他核苷酸类似物(如非-LNA核苷酸下列出的核苷酸类似物),其可以是增强亲和力的核苷酸类似物和/或增强血清稳定性的核苷酸类似物。

[0441] 在一些实施方案中,寡聚体或其连续核苷酸序列由所述核苷酸类似物的连续核苷酸序列组成。

[0442] 在一些实施方案中,寡聚体或其连续核苷酸序列由LNA核苷酸的连续核苷酸序列组成。

[0443] 在一些实施方案中,寡聚体或连续核苷酸序列长度是8-12,如8-10,或10-20,如12-18或14-16nts。

[0444] 在一些实施方案中,寡聚体或连续核苷酸序列长度能够与互补的单链RNA核酸分子以磷酸二酯核苷间连接形成双链体,其中所述双链体具有至少约60°C,如至少65°C的 T_m 。

[0445] T_m 测定的实例:寡核苷酸:将寡核苷酸和RNA靶标(PO)双链体在500ml无RNA酶的水中稀释至3mM,并与500ml 2x T_m -缓冲液(200mM NaCl,0.2mM EDTA,20mM磷酸钠,pH 7.0)混合。将溶液加热至95°C,3分钟,然后允许在室温下退火30分钟。在装配有Peltier温度程序仪PTP6的Lambda 40UV/VIS分光光度计上使用PE Templab软件(Perkin Elmer)测量双链体退火温度(T_m)。温度从20°C骤升到95°C,然后降至25°C,记录260nm处的吸收。解链和退火的一阶导数和局部最大值用于评估双链体 T_m 。

[0446] Totalmers

[0447] totalmer是单链寡聚体,其仅包含非天然发生的核苷,如糖修饰的核苷类似物。

[0448] 本发明的第一个区域可以是totalmers-的确多种totalmer设计作为寡聚体或其第一个区域(例如特别是当靶向microRNA(antimiRs)时或作为剪接转换寡聚体(SSOs)是高度有效的。在一些实施方案中,totalmer包含或由以下组成:至少一个XYX或YXY序列基序,如重复序列XYX或YXY,其中X是LNA并且Y是备选(即非LNA)核苷酸类似物,如2'-O-MOE RNA单元和2'-氟代DNA单元。上述序列基序在一些实施方案中例如可以是XXY、XYX、YXY或YYY。

[0449] 在一些实施方案中,totalmer包含或由以下组成:7-16个核苷酸之间的连续核苷酸序列,如9、10、11、12、13、14或15个核苷酸,如7-12个核苷酸之间。

[0450] 在一些实施方案中,totalmer的连续核苷酸序列包含至少30%,如至少40%,如至少50%,如至少60%,如至少70%,如至少80%,如至少90%,如95%,如100% BNA(LNA)单元。剩余单元可以选自本文所涉及的非LNA核苷酸类似物,其选自2'-O-烷基-RNA单元,2'-OMe-RNA单元,2'-氨基-DNA单元,2'-氟代-DNA单元,LNA单元,PNA单元,HNA单元,INA单元,和2' MOE RNA单元,或基团2'-OMe RNA单元和2'-氟代DNA单元的那些。

[0451] 在一些实施方案中,totalmer由以下组成或包含仅由LNA单元组成的连续核苷酸序列。在一些实施方案中,totalmer,如LNA totalmer长度在7-12核苷单元之间。在一些实施方案中,totalmer(作为寡聚体或其第一个区域)可以被microRNA靶向(即antimiRs)-如WO2009/043353所涉及,其由此并入作为参考。

[0452] 在一些实施方案中,寡聚体或连续核苷酸序列包含LNA核苷酸和任选地其他核苷酸类似物,其可以是增强亲和力的核苷酸类似物和/或增强血清稳定性的核苷酸类似物。

[0453] 在一些实施方案中,寡聚体或其连续核苷酸序列由所述核苷酸类似物的连续核苷酸序列组成。

[0454] 在一些实施方案中,寡聚体或其连续核苷酸序列由LNA核苷酸的连续核苷酸序列组成。

[0455] 通过寡聚体或其第一个区域的MicroRNA调节

[0456] 在一些实施方案中,寡聚体或其第一个区域是antimiR,其包含或由连续核苷酸序列组成,所述核苷酸序列对应于或与成熟的microRNA或其部分完全互补。由于microRNA通常在受试者中调节许多mRNAs的事实,所以认为本发明在控制microRNA的体内活性中的用途具有根本的重要性。因而非常想要失活治疗性antimiRs的能力。

[0457] 许多microRNAs与多种疾病相关。例如:可以通过本发明的治疗组合物治疗的治疗适应症的非限制性实例:

	microRNA	可能的医学适应症
	miR-1	心脏心律失常
[0458]	miR-21	成胶质细胞瘤、乳腺癌、肝细胞癌、结肠直肠癌、神经胶质瘤对细胞毒性药物的敏感性、心脏肥大
	miR-21、miR-200b 和 miR-141	对化学疗法的应答和胆管上皮癌生长的调节
	miR-122	高胆固醇血症、丙型肝炎感染、血色素沉着
	miR-19b	淋巴瘤和其他肿瘤类型
	miR-26a	人干细胞的成骨细胞分化
	miR-155	淋巴瘤、胰腺肿瘤发生、乳腺和肺癌
[0459]	miR-203	牛皮癣
	miR-375	糖尿病、代谢病症、从胰内分泌细胞诱导的葡萄糖胰岛素分泌
	miR-181	肌原细胞分化、自身免疫病症
	miR-10b	乳腺癌细胞侵入和转移
	miR-125b-1	乳腺、肺、卵巢和子宫颈癌
	miR-221 和 222	前列腺癌、人甲状腺乳头癌、人肝细胞癌
	miRNA-372 和-373	睾丸生殖细胞肿瘤
	miR-142	B-细胞白血病
	miR-17 – 19b 簇	B-细胞淋巴瘤、肺癌、肝细胞癌

[0460] 已经表明肿瘤抑制基因tropomyosin 1 (TPM1)mRNA是miR-21的靶标。已经表明重组胰岛素样生长因子 (Myotrophin) (mtpn)mRNA是miR375的靶标。

[0461] 寡聚体或其第一个区域因而可以是靶向(即包含或由其组成)连续核苷酸序列的antimir,所述核苷酸序列与上文列出的microRNAs之一的(对应区域)完全互补或包含不多

于一个与它的单个错配。

[0462] 因此,本发明的一些方面涉及治疗与microRNAs的表达相关的疾病,所述疾病选自感染性疾病,如病毒性疾病,如丙型肝炎病毒和HIV、脆性X综合征、炎性疾病、癌症,如慢性淋巴细胞性白血病、乳腺癌、肺癌和结肠癌。

[0463] MicroRNAs(miRNAs)是丰富种类的短的内源RNA,其通过与其靶标mRNA碱基配对充当基因表达的翻译后调节物。成熟的miRNA通过RNA酶III核糖核酸酶Drosha从较长的发夹转录物连续加工。成熟的microRNAs(miRs)通常在20-25个邻近RNA核苷酸之间。目前广泛地确定,若干microRNAs与医学状况和疾病相关,并且若干公司在基于寡聚体开发治疗剂,所述寡聚体模拟microRNAs或特异性地与特异的与疾病表型相关的microRNAs杂交-此类寡聚体在本文中分别称为microRNA模拟物和antimiR,并且寡聚体或其第一个区域在一些实施方案中可以是此类microRNA调节寡聚体。

[0464] 在一些实施方案中,本发明的寡聚体或其第一个区域由以下组成或包含对应于或与microRNA序列完全互补的连续核苷酸序列,如成熟的microRNA序列,如miRBase(http://microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/sequences/mirna_summary.pl?org=hsa)中公开的人microRNAs。在一些实施方案中,microRNA是病毒microRNA。在书写时,在miRbase 19中,miRBase(其全部由此并入作为参考)中有1600个前体和2042个成熟的人miRNA序列,包括每个人microRNA的成熟的microRNA序列。可以被寡聚体或其第一个区域靶向的其他人microRNAs包括公开于W008040355A中的那些,其由此并入作为参考。在一些实施方案中,本发明的寡聚体或其第一个区域由以下组成或包含对应于或与microRNA序列完全互补的连续核苷酸序列,所述microRNA序列选自hsa-miR19b、hsa-miR21、hsa-miR 122、hsa-miR 142a7b、hsa-miR 155和hsa-miR 375。在一些实施方案中,本发明的寡聚体或其第一个区域由以下组成或包含对应于或与microRNA序列完全互补的连续核苷酸序列,所述microRNA序列选自hsa-miR221和hsa-miR222。在一些实施方案中,本发明的寡聚体或其第一个区域由以下组成或包含对应于或与hsa-miR122(NR_029667.1GI:262205241),如成熟的has-miR-122完全互补的连续核苷酸序列。

[0465] 在一些实施方案中,当寡聚体或其第一个区域靶向miR-122,寡聚体用于治疗丙型肝炎感染。

[0466] AntimiR寡聚体

[0467] 优选的寡聚体或其第一个区域‘antimiR’设计和寡聚体公开于W02007/112754、W02007/112753、PCT/DK2008/000344和美国临时申请60/979217和61/028062中,其全部由此并入作为参考。在一些实施方案中,寡聚体或其第一个区域是antimiR,其为mixmer或totalmer。

[0468] AntimiR寡聚体是由以下组成或包含连续核苷酸序列的寡聚体,所述核苷酸序列与microRNA序列或其相应的子序列完全互补,或基本上互补(即可以包含一个或两个错配)。在这方面,认为antimiR可以包含与完全成熟的microRNA互补或基本上互补的连续核苷酸序列,或antimiR可以包含与成熟microRNA或pre-microRNA的子序列互补或基本上互补的连续核苷酸序列-该子序列(并且因而还有相应的连续核苷酸序列)长度通常是至少8个核苷酸,如长度为8-25个核苷酸,如9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24个核苷酸,如10-17或10-16个核苷酸,如12-15个核苷酸。

[0469] 已经提示了AntimiRs的许多设计,并且用于治疗用途的AntimiRs,如其连续核苷酸序列通常包含一个或多个核苷酸类似物单元。

[0470] 在一些实施方案中,antimiR可以具有本文所述的gapmer结构。然而,如在W02007/112754和W02007/112753中所解释,可以优选其他设计,如mixmers或totalmers。

[0471] 由此并入作为参考的W02007/112754和W02007/112753提供了antimiR寡聚体和antimiR寡聚体设计,在所述设计中所述寡聚体与成熟的microRNA互补。

[0472] 在一些实施方案中,antimiR的子序列对应于miRNA种子区域。在一些实施方案中,寡聚体的第一个或第二个3'核碱基对应于microRNA序列的第二个5'核苷酸。

[0473] 在一些antimiR实施方案中,如从寡聚体的3'末端区域测量的寡聚体的核碱基单元1-6(包含)与microRNA种子区域序列互补。

[0474] 在一些antimiR实施方案中,如从寡聚体的3'末端区域测量的寡聚体的核碱基单元1-7(包含)与microRNA种子区域序列互补。

[0475] 在一些antimiR实施方案中,如从寡聚体的3'末端区域测量的寡聚体的核碱基单元2-7(包含)与microRNA种子区域序列互补。

[0476] 在一些实施方案中,antimiR寡聚体在与miRNA种子区域互补的区域内的位置上包含至少一个核苷酸类似物单元,如至少一个LNA单元。antimiR寡聚体在一些实施方案中在与miRNA种子区域互补的区域内的位置上包含1-6或1-7个核苷酸类似物单元,如1-6和1-7个LNA单元。

[0477] 在一些实施方案中,本发明的antimiR长7、8或9个核苷酸,并且包含邻近核苷酸序列,其与人或病毒microRNA的种子区域互补,并且其中至少80%,如85%,如90%,如95%,如100%的核苷酸是LNA。

[0478] 在一些实施方案中,本发明的antimiR长7、8或9个核苷酸,并且包含邻近核苷酸序列,其与人或病毒microRNA的种子区域互补,并且其中至少80%的核苷酸是LNA,并且其中至少80%,如85%,如90%,如95%,如100%核苷酸间键是硫代磷酸酯键。

[0479] 在一些实施方案中,antimiR在从3'末端开始计数3-8的位置上包含一个或两个LNA单元。这对通过寡核苷酸:miRNA双链体(其是在结构上与RNA:RNA双链体相似的双链体)形成的A-螺旋的稳定性十分有利。

[0480] W02007/112754的第48页第15行-第51页第9行的表提供了抗microRNA寡聚体(即,可以是寡聚体或其第一个区域的antimiRs)的实例,并且其由此明确并入作为参考。

[0481] MicroRNA模拟物

[0482] 在一些实施方案中,寡聚体或其第一个区域是miRNA模拟物的形式,其可以被引入到细胞中以抑制一个或多个mRNA靶标的表达。miRNA模拟物通常与全长miRNA序列完全互补。miRNA模拟物是包含连续核苷酸序列的化合物,所述核苷酸序列与本文提供或参考的miRNA序列的一个或多个的相应区域同源。miRNA模拟物或antimiRs的用途可以用于(任选地)进一步抑制mRNA靶标,或沉默(下调)miRNA,由此抑制内源miRNA的功能,引起mRNA靶标的去抑制和增加的表达。

[0483] 适体

[0484] 在一些实施方案中,寡聚体或其第一个区域可以是治疗适体,其为spiegelmer。请注意适体还可以是配体,如受体配体,并且因而可以用作靶向部分(即区域3)。适体(也称为

Spiegelmers) 在本发明上下文中作为长度在20-50个核苷酸之间的核酸,其已经基于其构型结构而非核苷酸序列进行了选择-它们通过在体内直接结合靶标蛋白质而引发其治疗效果,并且它们因而不包含其靶标的反向互补序列-实际上它们的靶标不是核酸而是蛋白质。可以是寡聚体或其第一个区域的特定适体包括Macugen (OSI Pharmaceuticals) 或 ARC1779, (Archemix, Cambridge, MA)。在一些实施方案中,寡聚体或其第一个区域不是适体。在一些实施方案中,寡聚体或其第一个区域不是适体或spiegelmer。

[0485] siRNA复合体

[0486] 在一些实施方案中,寡聚体或其第一个区域可以是siRNA复合体的一部分-即siRNA复合体的反义或过客链。siRNA复合体能够介导RNA干扰。

[0487] 在一些实施方案中,siRNA复合体包含长度在17-25nts之间,如长度为18、19、20、21、22、23、24个核苷酸,如长度在21-23个核苷酸之间的两条单链寡聚体。在一些实施方案中,siRNA的正义和/或反义链可以包含3' 突出端,通常是1、2或3个核苷酸。适当地,正义或反义链可以包含一个或多个核苷酸类似物。

[0488] 在一些实施方案中,siRNA复合体是siLNA,如在W02004/000192、W02005/073378、W02007/085485 (其全部由此并入作为参考) 中所述的siRNA设计。siLNA是包含至少一个LNA单元的siRNA。

[0489] 在一些实施方案中,siRNA复合体是sisilNA,如在W02007/107162 (其由此并入作为参考) 中描述的那些。在一些实施方案中,本发明的寡聚体或其第一个区域是siRNA的正义链,并且像这样可以与靶标不互补 (实际上,可以与期望靶标同源)。

[0490] 在一些实施方案中,本发明的寡聚体或化合物不是siRNA或siLNA。

[0491] 核苷酸间连接

[0492] 本文所述的寡聚体 (例如第一个和第二个部分) 的核苷单体通过[核苷间]连接基团偶联在一起。适当地,每一个单体通过连接基团而连接3' 附近单体。

[0493] 本领域技术人员将理解,在本发明的上下文中,寡聚体末端的5' 单体不包含5' 连接基团,尽管其可以包含或可以不包含5' 末端基团。

[0494] 术语“连接基团”或“核苷酸间连接”旨在表示能够将两个核苷酸共价偶联在一起的基团。特定的和优选的实例包括磷酸基团和硫代磷酸酯基团。

[0495] 本发明的寡聚体的核苷酸或其连续核苷酸序列通过连接基团而偶联在一起。适当地,每一个核苷酸通过连接基团而连接3' 附近核苷酸。

[0496] 适当的核苷酸间连接包括在W02007/031091中列出的那些,例如在W02007/031091 (由此并入作为参考) 的第34页的第一段上列出的核苷酸间连接。

[0497] 其在一些实施方案中不是磷酸二酯连接或区域B,优选将核苷酸间连接从其正常磷酸二酯修饰成对核酸酶攻击更具抵抗力的一个,如硫代磷酸酯或硼代磷酸酯-可以被RNA酶H切割的这两个也允许在降低靶基因的表达中的反义抑制途径。

[0498] 可以优选如本文提供的合适的含硫(S) 核苷酸间连接,如硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯。如在gapmers、mixmers、antimirs剪接转换寡聚体和totalmers中还优选硫代磷酸酯核苷酸间连接,特别是对于第一个区域。

[0499] 对于gapmers,寡聚体中的核苷酸连接例如可以是硫代磷酸酯或硼代磷酸酯,以允许RNA酶H切割靶向的RNA。优选硫代磷酸酯用于改善的核酸酶抗性和其他原因,如便于制

造。

[0500] 在一个方面中,除第一个和第二个区域之间,和任选地区域B内的磷酸二酯连接,本发明的寡聚体的剩余核苷间连接外,核苷酸和/或核苷酸类似物通过硫代磷酸酯基团彼此连接。在一些实施方案中,第一个区域中核苷之间的至少50%,如至少70%,如至少80%,如至少90%,如所有核苷间连接不是磷酸二酯(磷酸酯),如其选自硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或硼代磷酸酯。在一些实施方案中,第一个区域中核苷之间的至少50%,如至少70%,如至少80%,如至少90%,如所有核苷间连接是硫代磷酸酯。

[0501] W009124238涉及寡聚化合物,其具有通过中性核苷间连接附着到3'或5'末端的至少一个二环核苷。本发明的寡聚体因而可以具有通过中性核苷间连接,如一个或多个磷酸三酯、甲基磷酸酯、MMI、酰胺-3、甲缩醛(formacetal)或硫甲缩醛(thioformacetal)附着到3'或5'末端的至少一个二环核苷。剩余的连接可以是硫代磷酸酯。

[0502] 缀合物、靶向部分和保护基团

[0503] 术语“缀合物”旨在表明通过将如本文所述的寡聚体共价附着(“缀合”)到一个或多个非核苷酸或非多核苷酸部分上形成的异源分子。非核苷酸或非多核苷酸部分的实例包括大分子试剂,如蛋白质、脂肪酸链、糖残基、糖蛋白、聚合物或其组合。通常蛋白质可以是用于靶蛋白质的抗体。典型的聚合物可以是聚乙二醇。

[0504] 因而,在多个实施方案中,本发明的寡聚体可以包含通常由核苷酸的邻接序列组成的多核苷酸区域,和其他非核苷酸区域。当涉及由连续核苷酸序列组成的本发明寡聚体时,化合物可以包含非核苷酸组分,如缀合物组分。

[0505] 在本发明的多个实施方案中,寡聚化合物连接配体/缀合物,其可以用于例如增加寡聚化合物的细胞吸收。W02007/031091提供了合适的配体和缀合物,其由此并入作为参考。

[0506] 在多个实施方案中,其中本发明的化合物由如本文公开的特定核酸或核苷酸序列组成,所述化合物还包含共价附着到所述化合物上的至少一个非核苷酸或非多核苷酸部分(例如,不包含一个或多个核苷酸或多核苷酸类似物)。

[0507] 在一些实施方案中,缀合物可以是亲脂缀合物或蛋白质(例如,抗体、酶、血清蛋白质);肽;维生素(水溶性的或脂溶性的);聚合物(水溶性的或脂溶性的);小分子包括药物、毒素、报告分子,和受体配体;糖类复合体;核酸切割复合体;金属螯合剂(例如,卟啉、得克萨斯卟啉(texaphyrins)、冠醚等);嵌入剂包括杂合光核酸酶(photonuclease)/嵌入剂;交联剂(例如,光活化的,氧化还原活化的),及其组合和衍生物。例如在W0 93/07883和U.S.Pat.No.6,395,492(其各自以其整体并入作为参考)中提供了许多合适的缀合物部分、其制备和与寡聚化合物的连接。还在Manoharan在Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S.T.Crooke, 编辑, Ch.16, Marcel Dekker, Inc., 2001和Manoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103(其各自以其整体并入作为参考)中的广泛综述中报道了寡核苷酸缀合物及其合成。

[0508] 缀合(到缀合物部分上)可以增强本发明寡聚体的活性、细胞分布或细胞吸收。此类部分包括,但不限于抗体、多肽、脂质部分,如胆固醇部分、胆酸、硫醚,例如己基-s-三苯甲基硫醇、硫代胆固醇、脂肪族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基、磷脂,例如二-十六烷基-外消旋-甘油或1,2-二-o-十六烷基-外消旋-甘油-3-h-磷酸三乙基铵、多胺或聚乙二醇

链、乙酸金刚烷、棕榈基部分、十八胺或己基氨基-羰基-氧基胆固醇部分。

[0509] 本发明的寡聚体还可以缀合到活性药物上,例如阿司匹林、布洛芬、磺胺药、抗糖尿病剂、抗菌剂或抗生素。

[0510] 在某些实施方案中,缀合的部分是固醇,如胆固醇。

[0511] 在多个实施方案中,缀合的部分包含或由以下组成:带正电的聚合物,如例如长度为1-50,如2-20,如3-10个氨基酸残基的带正电的肽,和/或聚氧烷撑,如聚乙二醇(PEG)或聚乙二醇-参见WO 2008/034123,其由此并入作为参考。

[0512] 缀合物的用途经常与增强的药物动力学或药效学(pharmecodynamic)动力性质相关。然而,缀合物基团的存在例如通过位阻防止杂交或核酸酶募集(例如RNA酶H或RISC募集)可以干扰寡核苷酸对其预期靶标的活性。本发明寡核苷酸(区域A)和缀合物部分(X)之间的DNA和/或RNA磷酸二酯区域(区域B)的使用允许改进的性质,这是由于缀合物基团的存在,同时保证一旦位于靶组织中,缀合物基团不妨碍寡核苷酸的有效活性。

[0513] 本发明的寡核苷酸在一些实施方案中任选地通过一个或多个接头共价附着到一个或多个缀合物基团上。所得的缀合物化合物与非缀合的寡聚化合物相比例如可以具有修改的增强性质,如修改的或增强的药物动力学、药效学和其他性质。可以修改或增强寡聚化合物的药物动力学性质的缀合物部分可以改善寡聚化合物的细胞分布、生物利用度、代谢、排泄、渗透性,和/或细胞吸收。可以修改或增强寡聚化合物的药物动力学性质的缀合物部分可以改善活性、对降解的抗性、序列特异性杂交、吸收等。在一些实施方案中,缀合物基团可以降低或防止寡核苷酸的适当活性,例如脱靶活性或非靶组织或器官中的活性。这可以通过使用阻断部分来实现,其例如可以是缀合物,共价附着到寡核苷酸(任选地通过接头)上的保护基团的存在可能防止或妨碍寡核苷酸杂交和/或活性。DNA/RNA磷酸二酯区域的切割(例如在预期靶位点上)去除了保护基团,允许活性寡核苷酸在预期位点上的递送。

[0514] 在一些实施方案中,本发明的化合物包含缀合物基团。

[0515] 将认识到,一个缀合物基团可以用于例如靶向特定组织,例如亲脂基团用于靶向肝,并且第二个缀合物基团可以用于提供其他益处,例如保护基团或其他治疗实体。合适的一个或两个缀合物/部分可以通过本发明的DNA/RNA磷酸二酯区域连接到寡核苷酸上。在一些实施方案中,缀合物在寡核苷酸的5'和/或3'末端通过接头共价结合到寡核苷酸上。在该方面,如果使用两个缀合物/部分基团,可以将一个连接到5'末端,另一个连接到3'末端。

[0516] 糖类缀合物

[0517] 在一些实施方案中,缀合基团选自糖类、亲脂部分、聚合物、蛋白质或肽、标记或染料、小分子,如小分子治疗部分、细胞表面受体配体。

[0518] 在一些实施方案中,缀合物是或包含糖类或包含糖类基团。在一些实施方案中,糖类选自半乳糖、乳糖、n-乙酰半乳糖胺、甘露糖和甘露糖-6-磷酸。在一些实施方案中,缀合物基团是或可以包含甘露糖或甘露糖-6-磷酸。糖类缀合物可以用于在组织范围内,如肝和/或肌肉中增强递送或活性。参见例如,EP1495769,WO99/65925, Yang等, Bioconjug Chem (2009) 20(2):213-21. Zatssepin & Oretskaya Chem Biodivers. (2004) 1(10):1401-17.

[0519] 在一些实施方案中,缀合物基团是糖类部分。此外,寡聚体还进一步包含一个或多个额外的缀合物部分,其亲脂或疏水部分特别有趣。这些例如可以充当药物动力学调节物,并且可以共价连接糖类缀合物,连接糖类缀合物到寡聚体上的接头或连接多个糖类缀合物

(多价的)缀合物的接头或寡聚体上,任选地通过接头,如生物可切割的接头。I

[0520] 在一些实施方案中,缀合物是或可以包含糖类或包含糖类基团。在一些实施方案中,糖类选自半乳糖、乳糖、n-乙酰半乳糖胺、甘露糖和甘露糖-6-磷酸。在一些实施方案中,缀合物基团是或可以包含甘露糖或甘露糖-6-磷酸。糖类缀合物可以用于在组织范围内,如肝和/或肌肉中增强递送或活性。参见例如,EP1495769,W099/65925,Yang等,Bioconjug Chem(2009)20(2):213-21。Zatsepin&Oretskaya Chem Biodivers. (2004)1(10):1401-17。

[0521] GalNAc缀合物

[0522] 本发明还提供寡核苷酸,如LNA反义寡聚体,其缀合到脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分上。在一些实施方案中,缀合物部分(如第三个区域或区域C)包含脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分,如半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰-半乳糖胺、n-乙酰半乳糖胺、N-丙酰-半乳糖胺、N-n-丁酰-半乳糖胺和N-异丁酰-半乳糖胺。在一些实施方案中,缀合物包含半乳糖簇,如N-乙酰半乳糖胺三聚体。在一些实施方案中,缀合物部分包含GalNAc(N-乙酰半乳糖胺),如单价的、二价的、三价的或四价的GalNAc。三价GalNAc缀合物可以用于将化合物靶向肝。GalNAc缀合物已经与甲基膦酸酯和PNA反义寡核苷酸一起使用(例如US 5,994517和Hangeland等,Bioconjug Chem.1995Nov-Dec;6(6):695-701)和siRNAs(例如W02009/126933、W02012/089352&W02012/083046)。GalNAc参考及其中使用的特定缀合物由此并入作为参考。W02012/083046公开了具有GalNAc缀合物部分的siRNAs,其包含可切割的药物动力学调节物,其适合用于本发明中,优选的药物动力学调节物是C16疏水基团,如棕榈酰、十六-8-烯酰、油烯基、(9E,12E)-十八-9,12-二烯酰、二辛酰和C16-C20酰基。‘046可切割的药物动力学调节物还可以是胆固醇。

[0523] ‘靶向部分(缀合物部分)可以选自:半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰-半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N丙酰-半乳糖胺、N-n-丁酰-半乳糖胺、N-异-丁酰半乳糖胺、半乳糖簇和N-乙酰半乳糖胺三聚体并且可以具有选自以下的药理学动力学调节物:具有16个或更多个碳原子的疏水基团、具有16-20个碳原子的疏水基团、棕榈酰、十六-8-烯酰、油烯基、(9E,12E)-十八-9,12-二烯酰、二辛酰和C16-C20酰基和胆固醇。公开于‘046中的某些GalNAc簇包括:(E)-十六-8-烯酰(C16)、油烯基(C18)、(9E,12E)-十八-9,12-二烯酰(C18)、辛酰(C8)、十二烷酰(C12)、C-20酰基、C24酰基、二辛酰(2xC8)。靶向部分-药物动力学调节物靶向部分可以通过生理学不稳定的键或例如二硫键或PEG接头而连接多核苷酸。本发明还涉及寡聚体和缀合物基团之间的磷酸二酯接头(这些在本文中称为区域B,并且适当地定位在LNA寡聚体和糖类缀合物基团之间)的用途。

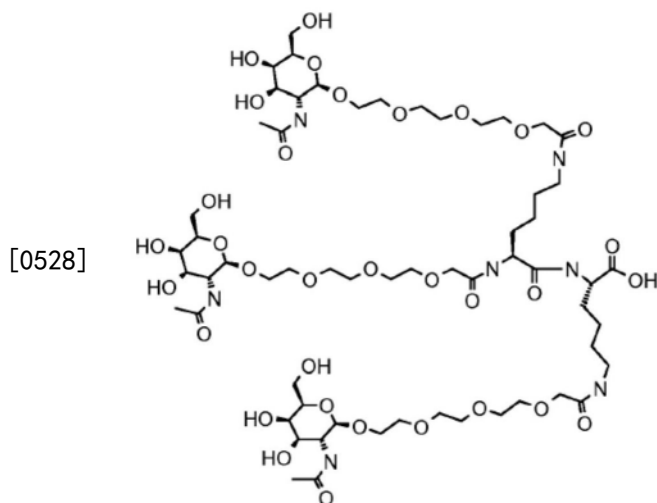
[0524] 为了在肝中靶向肝细胞,优选的靶向配体是半乳糖簇。

[0525] 半乳糖簇包含具有,例如包含两个-四个末端半乳糖衍生物的分子。如本文所用,术语半乳糖衍生物包括半乳糖和半乳糖的衍生物,其对脱唾液酸糖蛋白受体具有等于或高于对半乳糖的亲合力。末端半乳糖衍生物通过其C-1碳附着到分子上。脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPr)对肝细胞是独特的并且结合分支的半乳糖-末端糖蛋白。优选的半乳糖簇具有三个末端半乳糖胺或半乳糖胺衍生物,各自对脱唾液酸糖蛋白受体具有亲合力。更优选的半乳糖簇具有三个末端N-乙酰-半乳糖胺。本领域中常见的其他术语包括三触角半乳糖、三价半乳糖和半乳糖三聚体。已知三触角半乳糖衍生物簇以高于二触角或单触角半乳糖衍生物结构的亲合力结合ASGPr(Baenziger和Fiete,1980,Cell,22,611-620;Connolly等,1982,

1.Biol.Chern.,257,939-945)。需要多价来实现nM亲和力。根据WO 2012/083046,当与递送聚合物共同施用,对脱唾液酸糖蛋白受体具有亲和力的单个半乳糖衍生物的附着不能使RNAi多核苷酸在体内功能递送到肝细胞中。

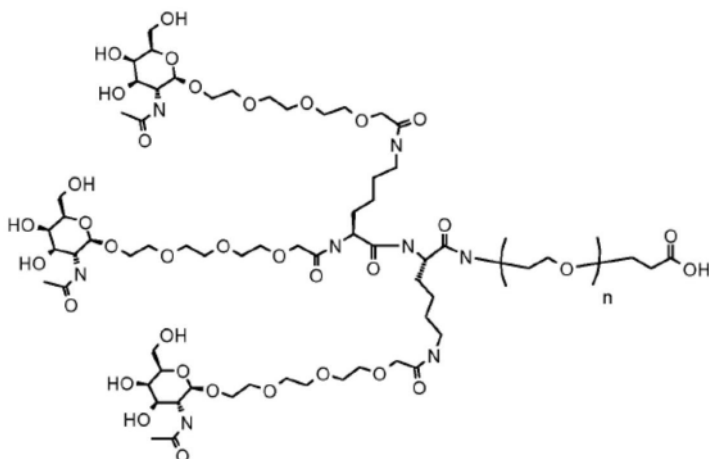
[0526] 半乳糖簇可以包含两个或优选三个半乳糖衍生物,其各自连接中心支点。半乳糖衍生物通过糖的C-1碳附着到中心支点上。半乳糖衍生物优选通过接头或间隔基(其可以是区域Y)连接支点。优选的间隔基是柔性亲水间隔基(美国专利5885968;Biessen等J.Med.Chern.1995第39卷第1538-1546页)。优选的柔性亲水间隔基是PEG间隔基。优选的PEG间隔基是PEG3间隔基。支点可以是任何小分子,其允许附着三个半乳糖衍生物并进一步允许支点附着到寡聚体上。示例性支点基团是二赖氨酸。二赖氨酸分子含有三个胺基团和羰基反应基团,三个半乳糖衍生物可以通过所述三个胺基团进行附着并且二赖氨酸可以通过所述羰基反应基团附着到寡聚体上。支点到寡聚体的附着可以通过接头或间隔基发生。优选的间隔基是柔性亲水间隔基。优选的柔性亲水间隔基是PEG间隔基。优选的PEG间隔基是PEG3间隔基(三个乙烯单元)。可以使用本领域已知的方法将半乳糖簇附着到寡聚体的3'或5'末端。

[0527] 优选的半乳糖衍生物是N-乙酰-半乳糖胺(GalNAc)。对脱唾液酸糖蛋白受体具有亲和力的其他糖可以选自:半乳糖胺、N-n-丁酰半乳糖胺,和N-异-丁酰半乳糖胺。已经研究了许多半乳糖衍生物对脱唾液酸糖蛋白受体的亲和力(参见例如:Jobst,S.T.和Drickamer,K.JB.C.1996,271,6686)或使用本领域常用的方法容易地确定。



[0529] 半乳糖簇的一个实施方案

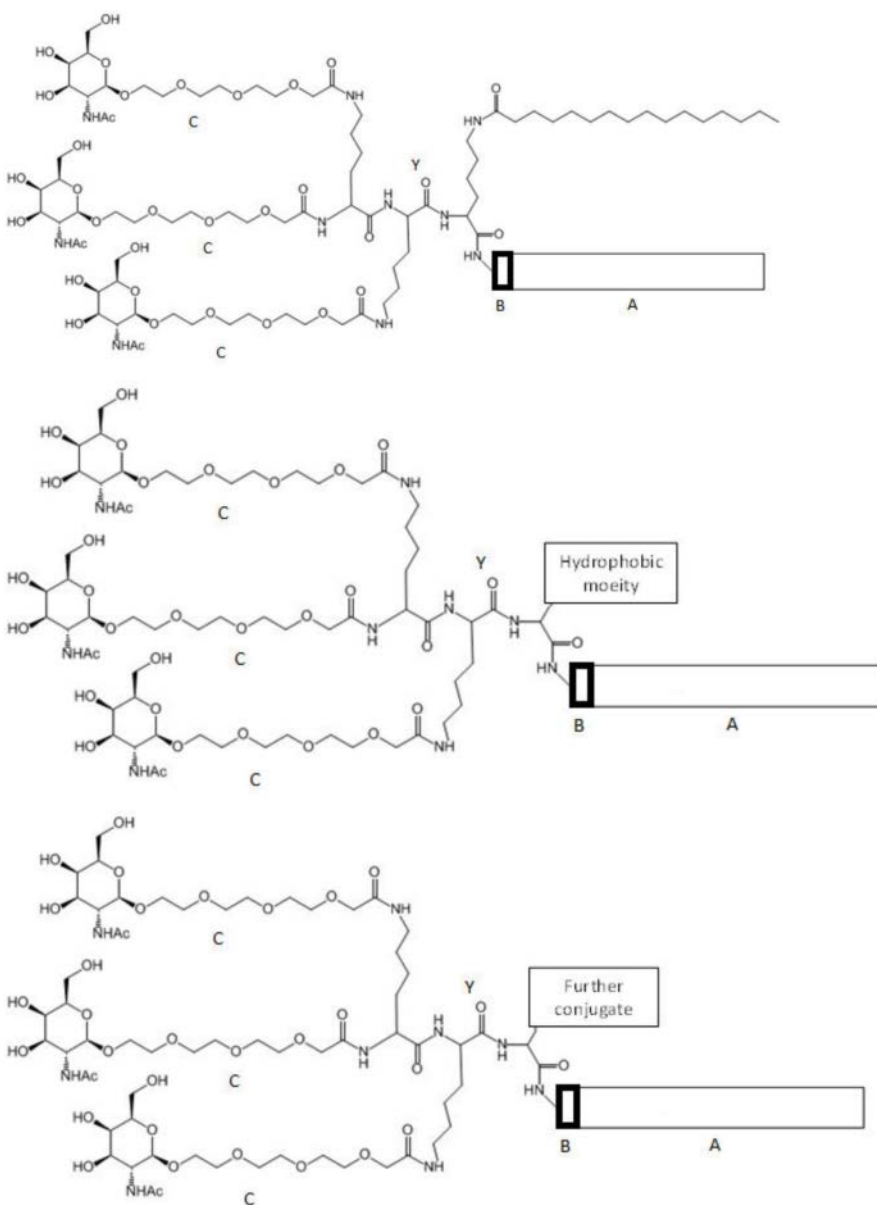
[0530]



[0531] 在支点和核酸之间具有PEG间隔基的半乳糖簇

[0532] GalNAc缀合物阐明于图1中。本发明的缀合物的其他实例阐明于下：

[0533]



[0534] 区域A例如是LNA反义寡核苷酸。

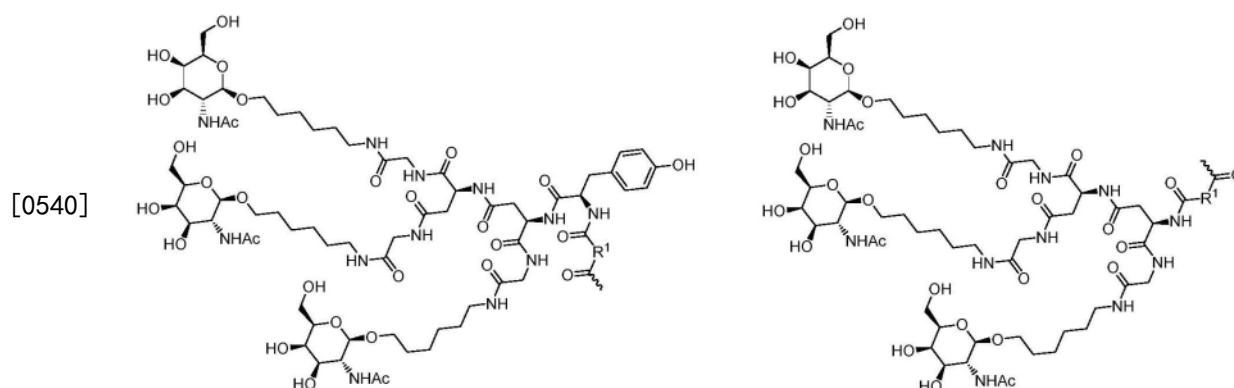
[0535] 如本文所述,糖类缀合物(例如GalNAc)因而可以通过生物可切割的接头,如本文所定的区域B和任选地区域Y(其在上述图表中阐明为二赖氨酸)连接寡聚体。

[0536] 当使用BNA或LNA寡聚体,如LNA反义寡核苷酸时,在上述GalNAc簇缀合物中的疏水或亲脂(或其他缀合物)部分(即药物动力学调节物)在何处是任选的。

[0537] 对于本研究中所用的特定GalNAc簇,Conj 1、2、3、4和Conj1a、2a、3a和4a参见图(其显示具有任选的C6接头,其连接GalNAc簇与寡聚体-参见图12和17)。

[0538] GalNAc簇的每个糖类部分(例如GalNAc)因而可以通过间隔基,如聚乙二醇接头(PEG),如二、三、四、五、六聚乙二醇接头结合寡聚体。如上所示,PEG部分在半乳糖糖部分和肽(显示了三赖氨酸)接头之间形成间隔基。

[0539] 在一些实施方案中,GalNAc簇包含肽接头,例如Tyr-Asp(Asp)三肽或Asp(Asp)二肽,其通过双基接头附着到寡聚体上(或区域Y或区域B),例如所述GalNAc簇可以包含以下双基接头:



[0541] R^1 是优选选自 $-C_2H_4-$ 、 $-C_3H_6-$ 、 $-C_4H_8-$ 、 $-C_5H_{10}-$ 、 $-C_6H_{12}-$ 、1,4-环己基($-C_6H_{10}-$)、1,4-苯基($-C_6H_4-$)、 $-C_2H_4OC_2H_4-$ 、 $-C_2H_4(OC_2H_4)_2-$ 或 $-C_2H_4(OC_2H_4)_3-$ 的双基。

[0542] 此外,糖类缀合物(例如GalNAc)或糖类-接头部分(例如糖类-PEG部分)可以通过支点基团,如氨基酸或肽共价结合(连接)寡聚体(或区域B),所述支点基团适当地包含两个或多个氨基酸基团(如3、4或5个),如赖氨酸、二赖氨酸或三赖氨酸或四赖氨酸。三赖氨酸分子含有四个胺基团和一个羧基反应基团,三个糖类缀合物基团,如半乳糖衍生物(例如GalNAc)和其他缀合物如疏水或亲脂部分/基团可以通过所述四个胺基团进行附着,三个赖氨酸可以通过所述羧基反应基团附着到寡聚体。其他缀合物,如亲脂/疏水部分可以附着到赖氨酸残基上,赖氨酸残基附着到寡聚体上。在一些实施方案中,缀合物(C)不是单价GalNAc。

[0543] 本发明还提供LNA反义寡核苷酸,其缀合到脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分上。在一些实施方案中,缀合物部分(如第三个区域或区域C)包含脱唾液酸糖蛋白受体靶向部分,如半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰-半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-丙酰-半乳糖胺、N-n-丁酰-半乳糖胺和N-异丁酰-半乳糖胺。在一些实施方案中,缀合物包含半乳糖簇,如N-乙酰半乳糖胺三聚体。在一些实施方案中,缀合物部分包含GalNAc(N-乙酰半乳糖胺),如单价的、二价的、三价的或四价的GalNAc。三价GalNAc缀合物可以用于将化合物靶向肝。GalNAc缀合物已经与甲基膦酸酯和PNA反义寡核苷酸(例如US 5,994,517和Hangeland等,Bioconjug Chem. 1995 Nov-Dec; 6(6):695-701)和siRNAs(例如W02009/126933、W02012/089352& W02012/083046)一起使用。GalNAc参考及其中使用的特定缀合物由此并入作为参考。

W02012/083046公开了GalNac缀合物部分,其包含可切割的药物动力学调节物,优选的药物动力学调节物是C16疏水基团,如棕榈酰、十六-8-烯酰、油烯基、(9E,12E)-十八-9,12-二烯酰、二辛酰和C16-C20酰基。‘046可切割的药物动力学调节剂还可以是胆固醇。‘046靶向部分可以选自:半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰-半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N丙酰-半乳糖胺、N-n-丁酰-半乳糖胺、N-异-丁酰半乳糖胺、半乳糖簇和N-乙酰半乳糖胺三聚体并且可以具有选自以下的药学动力学调节物:具有16个或更多个碳原子的疏水基团、具有16-20个碳原子的疏水基团、棕榈酰、十六-8-烯酰、油烯基、(9E,12E)-十八-9,12-二烯酰、二辛酰和C16-C20酰基和胆固醇。公开于‘046中的某些GalNac簇包括:(E)-十六-8-烯酰(C16)、油烯基(C18)、(9E,12E)-十八-9,12-二烯酰(C18)、辛酰(C8)、十二烷酰(C12)、C-20酰基、C24酰基、二辛酰(2x C8)。根据‘046,靶向部分-药物动力学调节物靶向部分可以通过生理学不稳定的键或例如二硫键或PEG接头而连接多核苷酸。

[0544] 其他缀合物部分可以包括例如寡糖和糖类簇,如Tyr-Glu-Glu-(氨基己基GalNac)₃(YEE(ahGalNac)₃;在肝细胞上结合Gal/GalNac受体的糖三肽,参见例如Duff,等,Methods Enzymol, 2000, 313, 297);基于赖氨酸的半乳糖簇(例如, L3G4; Biessen, 等, Cardovasc. Med., 1999, 214);和基于胆烷的半乳糖簇(例如,用于脱唾液酸糖蛋白受体的糖类识别基序)。其他合适的缀合物可以包括寡糖,其可以结合在脱唾液酸糖蛋白-受体(ASGP-R)上发现的糖类识别结构域(CRD)。含有寡糖和/或糖类复合体的实例缀合物部分提供于美国专利号6,525,031中,以其整体并入作为参考本文。

[0545] 药物动力学调节物

[0546] 本发明的化合物可以进一步包含一个或多个额外的缀合物部分,其亲脂的或疏水的部分特别有趣,如当缀合物基团是糖类部分时。这些亲脂的或疏水的部分可以充当药物动力学调节物,并且可以共价连接糖类缀合物,连接糖类缀合物到寡聚体上的接头或连接多个糖类缀合物(多价的缀合物)接头或到寡聚体上,任选地通过接头,如生物可切割的接头。

[0547] 寡聚体或缀合物部分因而可以包含药物动力学调节物,如亲脂的或疏水的部分。在W02012/082046中siRNA缀合物上下文中公开了此类部分。疏水部分可以包含C8-C36脂肪酸,其可以是饱和的或不饱和的。在一些实施方案中,可以使用C10、C12、C14、C16、C18、C20、C22、C24、C26、C28、C30、C32和C34脂肪酸。疏水基团可以具有16个或更多个碳原子。示例性合适的疏水基团可以选自:固醇、类固醇、棕榈酰、十六-8-烯酰、油烯基、(9E,12E)-十八-9,12-二烯酰、二辛酰和C16-C20酰基。根据W0’ 346,具有少于16个碳原子的疏水基团在增强多核苷酸靶向中有效性较低,但是它们可以以多个拷贝(例如2x,如2x C8或C10,C12或C14)来增强效力。用作多核苷酸靶向部分的药物动力学调节物可以选自:胆固醇、烷基基团、烯基基团、炔基基团、芳基基团、芳烷基基团、芳烯基基团和芳炔基基团,其各自可以是线性的、分支的或环形的。药物动力学调节物优选为烃类,仅含有碳和氢原子。然而,可以允许取代或杂原子,其维持疏水性,例如氟。

[0548] 令人惊讶的,本发明人已经发现与LNA寡聚体一起使用的GalNac缀合物不需要药物动力学调节物,并且像这样,在一些实施方案中,GalNac缀合物不共价连接亲脂的或疏水的部分,如本文所述的那些,例如不包含C8-C36脂肪酸或固醇。本发明因而还提供LNA寡聚体GalNac缀合物,其不包含亲脂的或疏水的药物动力学调节物或缀合物部分/基团。

[0549] 亲脂缀合物

[0550] 本发明的化合物可以是包含寡聚体 (A) 和亲脂缀合物 (C) 的缀合物。已经发现生物可切割的接头 (B) 在维持或增强此类寡聚体缀合物的活性中特别有效。在一些实施方案中, 缀合物基团 (C) 和或接头基团 (C) 包含亲脂基团。

[0551] 代表性缀合物部分可以包括亲脂分子 (芳香族和非芳香族的), 包括固醇和类固醇分子。亲脂缀合物部分可以用于例如对抗寡聚化化合物的疏水性质并增强细胞穿透。亲脂部分包括例如类固醇和相关化合物, 如胆固醇 (美国专利号 4,958,013 和 Letsinger 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1989, 86, 6553)、硫代胆固醇 (Oberhauser 等, Nucl Acids Res., 1992, 20, 533)、羊毛甾醇、粪甾醇、豆甾醇、麦角甾醇、钙化固醇、胆酸、脱氧胆酸、雌酮、雌二醇、雌三醇、黄体酮、己烯雌酚、睾酮、雄酮、去氧皮质酮、可的松、17-羟肾上腺皮质甾酮、其衍生物等。

[0552] 其他亲脂缀合物部分包括脂肪族基团, 如例如直链、分支和环形烷基、烯基和炔基。脂肪族基团可以具有例如 5 至约 50、6 至约 50、8 至约 50、或 10 至约 50 个碳原子。实例脂肪族基团包括十一烷基、十二烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、萜类、冰片基、金刚烷基、其衍生物等。在一些实施方案中, 脂肪族基团中的一个或多个碳原子可以被杂原子, 如 O、S 或 N 取代 (例如, 忙牛儿氧基己基)。其他合适的亲脂缀合物部分包括甘油的脂肪族衍生物, 如烷基甘油、双 (烷基) 甘油、三 (烷基) 甘油、甘油一酯、甘油二酯和甘油三酯。在一些实施方案中, 亲脂缀合物是二-己基癸基-消旋-甘油或 1,2-二-0-己基癸基-消旋-甘油 (Manoharan 等, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea, 等, Nuc.Acids Res., 1990, 18, 3777) 或其磷酸酯。饱和的和不饱和的脂肪官能团, 如例如脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、和脂肪胺也可以充当亲脂缀合物部分。在一些实施方案中, 脂肪官能团可以含有约 6 个碳至约 30 个或约 8 个至约 22 个碳。实例脂肪酸包括, 癸酸、辛酸、月桂酸、棕榈酸、肉豆蔻酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳烯酸等。

[0553] 在其他实施方案中, 亲脂缀合物基团可以是具有 6 至约 50、10 至约 50, 或 14 至约 40 个碳原子的多环芳族基团。实例多环芳族基团包括苣、嘌呤、吡啶、夹氧杂蒽、茛、菲、蒽、喹啉、异喹啉、萘、其衍生物等。其他合适的亲脂缀合物部分包括薄荷醇、三苯甲基 (例如, 二甲氧三苯甲基 (DMT))、吩噻嗪、硫辛酸、磷脂、醚、硫醚 (例如, 己基-S-三苯甲基硫醇)、其衍生物等。在本领域中, 如在例如 Saison-Behmoaras 等, EMBO J., 1991, 10, 1111; Kabanov 等, FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk 等, Biochimie, 1993, 75, 49; (Mishra 等, Biochim.Biophys.Acta, 1995, 1264, 229, 和 Manoharan 等, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651 中充分描述了寡聚化化合物的亲脂缀合物的制备。

[0554] 含有对低密度脂蛋白 (LDL) 具有亲和力的缀合物部分的寡聚化合物可以帮助提供有效的靶向递送系统。肿瘤细胞上 LDL 的受体的高表达水平使得 LDL 成为选择性递送药物到达这些细胞的有吸引力的载体 (Rump, 等, Bioconjugate Chem., 1998, 9, 341; Firestone, Bioconjugate Chem., 1994, 5, 105; Mishra, 等, Biochim.Biophys.Acta, 1995, 1264, 229)。对 LDL 具有亲和力的部分包括许多亲脂基团, 如类固醇 (例如胆固醇)、脂肪酸、其衍生物及其组合。在一些实施方案中, 具有 LDL 亲和力的缀合物部分可以是胆酸的二油酰酯, 如鹅脱氧胆酸和石胆酸。

[0555] 在一些实施方案中, 缀合物基团是或可以包含亲脂部分, 如固醇 (例如, 胆固醇、胆

固醇基、胆甾烷醇、豆甾醇、胆甾烷酸和麦角甾醇)。在一些实施方案中,缀合物是或可以包含胆固醇。参见例如,Soutschek等,Nature (2004) 432,173;Krützfeldt Nature 2005,NAR 2007。

[0556] 在一些实施方案中,缀合物是或可以包含脂质、磷脂或亲脂醇,如阳离子脂质、中性脂质、鞘类脂质,和脂肪酸如硬脂酸、油酸、反油酸、亚油酸、油酸、亚麻酸和肉豆蔻酸。在一些实施方案中,脂肪酸包含C4-C30饱和的或不饱和的烷基链。烷基链可以是线性的或分支的。

[0557] 在一些实施方案中,亲脂缀合物是或可以包含生物素。在一些实施方案中,亲脂缀合物是或可以包含甘油酯。

[0558] 亲脂缀合物,如胆固醇或如本文所公开的可以用于增强寡核苷酸至例如肝(通常是肝细胞)中的递送。

[0559] 以下参考文献涉及亲脂缀合物的用途:Kobylanska等,Acta Biochim Pol. (1999);46(3):679-91.Felber等,.Biomaterials (2012) 33(25):599-65;Grijalvo等,J Org Chem (2010) 75(20):6806-13.Koufaki等,Curr Med Chem (2009) 16(35):4728-42。Godeau等J.Med.Chem. (2008) 51(15):4374-6。

[0560] 聚合物缀合物

[0561] 缀合物部分还可以包括聚合物。聚合物可以提供更大的体积和多个官能团以影响缀合的寡聚化合物的穿透、细胞运输和定位。例如,寡聚化合物与聚合物的缀合引起的增加的水力半径可以帮助防止进入细胞核并促进定位在细胞质中。在一些实施方案中,聚合物基本上不降低细胞吸收或干扰与互补链或其他靶标的杂交。在其他实施方案中,缀合物聚合物部分具有例如少于约40,少于约30或少于约20kDa的分子量。此外,聚合物缀合物部分可以是水溶性的并任选地进一步包含其他缀合物部分,如肽、糖类、药物、报告基团,或其他缀合物部分。

[0562] 在一些实施方案中,聚合物缀合物包括聚乙二醇(PEG)及其共聚物和衍生物。PEG的缀合已经显示增加寡聚化合物的核酸酶稳定性。PEG缀合物部分可以是任何分子量,包括例如约100、约500、约1000、约2000、约5000、约10,000和更高。在一些实施方案中,PEG缀合物部分含有至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少15、至少20或至少25个乙二醇残基。在其他实施方案中,PEG缀合物部分含有约4至约10、约4至约8、约5至约7,或约6个乙二醇残基。还可以修饰PEG缀合物部分,从而末端羟基被烷氧基、羧基、酰基、氨基或其他官能团替换。其他缀合物部分,如报告基团,包括例如生物素或荧光素也可以附着到PEG缀合物部分上。PEG的共聚物也适合作为缀合物部分。例如在Bonora,等,Nucleosides Nucleotides,1999,18,1723;Bonora,等,Farmaco,1998,53,634;Efimov, Bioorg.Khim.1993,19,800;和Jaschke,等,Nucleic Acids Res.,1994,22,4810中描述了寡核苷酸的聚乙二醇缀合物的制备和生物活性。在美国专利号4,904,582和5,672,662(其各自以其整体并入作为参考)中描述了其他实例PEG缀合物部分和相应的缀合的寡聚化合物的制备。可以通过商业途径获得缀合一个或多个PEG部分的寡聚化合物。

[0563] 适合作为缀合物部分的其他聚合物包括多胺、多肽、聚甲基丙烯酸酯(例如,羟丙基甲基丙烯酸酯(HPMA))聚(L-丙交酯)、聚(DL-丙交酯-共-乙交酯(PGLA))、聚丙烯酸、聚乙烯亚胺(PEI)、聚烷基丙烯酸、聚氨基甲酸酯、聚丙烯酰胺、N-烷基丙烯酰胺、聚精胺(PSP)、

聚醚、环糊精、其衍生物及其共聚物。许多聚合物,如PEG和多胺具有存在于某些细胞中的受体,由此促进细胞吸收。多胺和其他含胺的聚合物在生理pH下可以以质子化形式存在,有效地对抗一些寡聚化合物的阴离子骨架,有效地增强细胞穿透。一些实例多胺包括多肽(例如多赖氨酸、多鸟氨酸、多组氨酸、多精氨酸,及其共聚物)、三乙四胺、精胺、多精胺、精脒、synnorspermidine、C-分支的精脒,及其衍生物。例如在Guzaev,等,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1998,8,3671;Corey,等,J Am.Chem.Soc,1995,117,9373;和Prakash,等,Bioorg.Med.Chem.Lett.1994,4,1733中描述了多胺缀合物的制备和生物活性。例如在Wei,等,Nucleic Acids Res.,1996,24,655和Zhu,等,Antisense Res.Dev.,1993,3,265中提供了寡核苷酸的实例多肽缀合物。树突聚合物也可以用作缀合物部分,如在美国专利号5,714,166(以其整体并入作为参考本文)中所描述的。如上为多胺和相关聚合物所讨论,其他含胺部分还可以充当适当的缀合物部分,这是由于例如在生理条件下阳离子种类的形成。实例含胺的部分包括3-氨基丙基、3-(N,N-二甲基氨基)丙基、2-(2-(N,N-二甲基氨基)乙氧基)乙基、2-(N-(2-氨基乙基)-N-甲基氨基氧基)乙基、2-(1-咪唑基)乙基等。G-夹部分还可以充当含胺缀合物部分(Lin,等,J.Am.Chem.Soc,1998,120,8531)。

[0564] 在一些实施方案中,缀合物可以是或可以包含聚合物,如选自聚乙二醇(PEG)、聚乙二胺(PAA)、聚氧化乙烯和聚乙烯亚胺(PEI)的聚合物。半乳糖、乳糖、n-乙酰半乳糖胺、甘露糖、甘露糖-6-磷酸,在一些实施方案中,聚合物是聚阳离子聚合物。在一些实施方案中,缀合物部分可以是或基于(包括)阳离子聚合物。许多研究已经证明阳离子聚合物,如阳离子白蛋白可以极大地增强至特定细胞类型和/或组织的递送(例如脑递送,参见Lu, W.et.al.(2005)J of Control Release 107:428-448)。考虑到这些分子的益处,缀合物部分可以是阳离子聚合物,如聚乙烯亚胺、树状聚合物、聚(烷基吡啶)盐或阳离子白蛋白。在一些实施方案中,是亲水聚合物。在一些实施方案中,聚合物是聚(乙烯吡咯烷酮)(PVP)。在一些实施方案中,聚合物是聚胺或聚酰胺(例如US7,816,337&US5525465。对于聚合物缀合物,参见例如Zhao等,Bioconjugate Chem 2005,16,758-766);Kim等,J.Control Release (2006) 116;123.Pettit等,Ther.Deliv. (2011) 2 (7):907-17。Yang等,Bioconjug Chem (2009) 20 (2):213-21。Winkler等(2009) Eur J Med Chem 44 (2):670-7。Zelikin等,Biomacromolecules (2007) 8 (9):2950-3。还参见W012092373,其涉及酶可切割的多核苷酸递送缀合物。

[0565] 蛋白质和肽缀合物

[0566] 其他缀合物部分可以包括蛋白质、亚基或其片段。蛋白质包括例如酶、报告酶、抗体、受体等。在一些实施方案中,蛋白质缀合物部分可以是抗体或其片段(Kuijpers,等,Bioconjugate Chem.,1993,4,94)。可以设计抗体以结合想要的靶标,如肿瘤和其他疾病相关抗原。在其他实施方案中,蛋白质缀合物部分可以是血清蛋白质,如HAS或糖蛋白,如脱唾液酸糖蛋白(Rajur,等,Bioconjugate Chem.,1997,6,935)。在仍然其他实施方案中,寡聚化合物可以缀合到RNAi相关的蛋白质、RNAi相关的蛋白质复合体、亚基及其片段上。例如,寡聚化合物可以缀合到Dicer或RISC上。嵌入剂和小沟结合剂(MGBs)还可以适合作为缀合物部分。在一些实施方案中,MGB可以含有重复的DPI(1,2-二氢-3H-吡咯并(2,3-e)吡啶-7-羧酸酯)亚基或其衍生物(Lukhtanov,等,Bioconjugate Chem.,1996,7,564和Afonina,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1996,93,3199)。合适的嵌入剂包括例如,多环芳香剂,如蔡、二

萘嵌苯、菲啶、苯菲啶、吩嗪、蒽醌、吡啶及其衍生物。杂合嵌入剂/配体包括光核酸酶/嵌入剂配体6-[[[9-[[6-(4-硝基苄胺基)己基]氨基]吡啶-4-基]羰基]氨基]己烯酰-五氟苯基酯。该化合物是吡啶部分(其为嵌入剂)和对-硝基苄胺基基团(其为光核酸酶)。在其他实施方案中,切割剂可以充当缀合物部分。切割剂可以促进靶标,如靶标核酸通过水解或氧化还原切割机制的降解。可以适合作为缀合物部分的切割基团包括例如,金属络合物、肽、胺、酶和含有核酸酶的活性位点的组分的构建体,如咪唑、胍盐、羧基、氨基基团等)。实例金属络合物包括例如,Cu-三联吡啶络合物、Fe-卟啉络合物、Ru-络合物和镧系元素络合物,如多种Eu(III)络合物(Hall,等,Chem.Biol,1994,1,185;Huang,等,J.Biol.Inorg.Chem.,2000,5,85;and Baker,等,Nucleic Acids Res.,1999,27,1547)。具有切割性质的其他金属络合物包括金属卟啉及其衍生物。具有靶标切割性质的实例肽包括锌指(美国专利号6,365,379;Lima,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1999,96,10010)。含有核酸酶活性位点组分的实例构建体包括bisimiazole和组胺。

[0567] 缀合物部分还可以包括肽。合适的肽可以具有2至约30,2至约20,2至约15,或2至约10个氨基酸残基。氨基酸残基可以是天然或非天然发生的,包括D和L异构体。在一些实施方案中,肽缀合物部分是pH敏感的肽,如融合肽。融合肽可以促进试剂如寡聚化合物内体释放到细胞质中。相信融合肽在酸性pH中改变构象,有效地失稳内体膜,由此增强内体内含物的细胞质递送。实例融合肽包括来自多粘霉素B、流行性感冒HA2、GALA、KALA、EALA、蜂毒素来源的肽、 α -螺旋肽或Alzheimer β -淀粉状蛋白肽等的肽。在例如Bongartz,等,Nucleic Acids Res.,1994,22,4681和美国专利号6,559,279和6,344,436中描述了缀合融合肽的寡核苷酸的制备和生物活性。可以充当缀合物部分的其他肽包括递送肽,其具有转运相对大的极性分子(包括肽、寡核苷酸和蛋白质)跨过细胞膜的能力。实例递送肽包括来自HIV Tat蛋白质的Tat肽和来自果蝇(Drosophila)触角蛋白质的Ant肽。在例如Astria-Fisher,等,Biochem.Pharmacol,2000,60,83中描述了Tat和Ant与寡核苷酸的缀合。在下文表I中提供了可以用作缀合物部分的这些及其他递送肽:

[0568] 缀合的递送肽可以帮助寡聚化合物控制定位在细胞的特定区域,包括例如细胞质、细胞核、核仁和内质网(ER)。通过细胞核定位信号(NLS)的缀合可以引起细胞核定位。相反,通过细胞核输出信号(NES)的缀合可以促进细胞质定位。适合用于在细胞核中定位缀合的寡聚化合物的肽包括例如,N,N-二棕榈基甘氨酸- α -apo E肽或N,N-二棕榈基甘氨酸-载脂蛋白E肽(dpGapoE)(Liu,等,Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol,1999,19,2207;Chaloin,等,Biochem.Biophys.Res.Commun.,1998,243,601)。还可以通过具有富含精氨酸和/或赖氨酸基序的肽,如HIV-1Tat、FXR2P和血管生成因子来源的肽促进细胞核或核仁定位(Lixin,等,Biochem.Biophys.Res.Commun.,2001,284,185)。此外,来自SV40抗原T(Branden,等,Nature Biotech,1999,17,784)的细胞核定位信号(NLS)肽可以用于向细胞的细胞核中递送缀合的寡聚化合物。具有细胞核或核仁定位性质的其他合适的肽描述于例如Antopol'sky,等,Bioconjugate Chem.,1999,10,598;Zanta,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1999(猿猴病毒40大肿瘤抗原);Hum.Mol.Genetics,2000,9,1487;和FEBSLett.,2002,532,36)。

[0569] 在一些实施方案中,用于细胞核或核仁定位的递送肽包含至少三个连续的精氨酸残基或至少四个连续的精氨酸残基。还可以通过含有RS、RE或RD重复基序的肽缀合物促进

细胞核定位 (Cazalla, 等, Mol Cell Biol, 2002, 22, 6871)。在一些实施方案中, 肽缀合物含有至少两个RS、RE或RD基序。

[0570] 可以通过例如缀合到信号肽KDEL (SEQ ID NO:18) 上引起寡聚化合物定位到ER上 (Arar, 等, Bioconjugate Chem., 1995, 6, 573; Pichon, 等, Mol. Pharmacol. 1997, 57, 431)。可以通过缀合到具有例如细胞核输出信号 (NES) 的肽上来促进寡聚化合物的细胞质定位 (Meunier, 等, Nucleic Acids Res., 1999, 27, 2730)。NES肽包括来源于HIV-1Rev的富含亮氨酸的NES肽 (Henderson, 等, Exp. Cell Res., 2000, 256, 213)、转录因子III A、MAPKK、PKI- α 、细胞周期蛋白B1, 和肌动蛋白 (Wada, 等, EMBO J., 1998, 17, 1635) 以及相关蛋白质。抗微生物肽, 如皮抑菌肽衍生物也可以促进细胞质定位 (Hariton-Gazal, 等, Biochemistry, 2002, 41, 9208)。含有RG和/或KS重复基序的肽也适合用于将寡聚化合物导向细胞质。在一些实施方案中, 肽缀合物部分含有至少两个RG基序、至少两个KS基序, 或至少一个RG和一个KS基序。如全文所用, “肽” 不仅包括本文叙述的特定分子或序列 (如果存在), 还包括其片段和包含全部或部分所述序列的分子, 其中保留了想要的功能性。在一些实施方案中, 肽片段含有不少于6个氨基酸。肽还可以含有保守的氨基酸取代, 其基本上不改变它的功能特征。可以在以下功能相似的氨基酸组中进行保守取代: 中性-弱疏水 (A、G、P、S、T)、亲水的酸性胺 (N、D、Q、E)、亲水的碱性的 (I、M、L、V) 和疏水的芳香族的 (F、W、Y)。肽还包括同源肽。可以根据百分比同一性, 使用例如BLSAT算法 (用于短序列的默认参数) 测量同源性。例如, 同源肽可以具有高于50、60、70、80、90、95或99的百分比同一性。用于将肽缀合到寡聚化合物, 如寡核苷酸上的方法描述于例如美国专利号6, 559, 279 (以其整体并入作为参考本文) 中。

[0571] 在一些实施方案中, 缀合物部分是或包含蛋白质或肽。在一些实施方案中, 肽是细胞穿透肽, 例如Penetratin、transportan、Peptaibol (例如trichorovin-XIIa (TV-XIIa))、TAT肽 (HIV)。在一些实施方案中, 肽是多精氨酸 (例如硬脂酰- (RxR) (4))。在一些实施方案中, 肽是N- (2-羟丙基) 异丁烯酰胺 (HPMA), 其含有四肽Gly-Phe-Leu-Gly (GFLG)。在一些实施方案中, 肽是 β -淀粉状蛋白肽。在一些实施方案中, 蛋白质或肽是抗体或其含有抗原结合位点的片段 (表位结合位点)。在一些实施方案中, 缀合物是或包含M6P-HPMA-GFLG (参见Yang等2009)。在一些实施方案中, 缀合物是或包含富含精氨酸的肽W02005/115479 - 还参见W009005793RGD肽。在一些实施方案中, 缀合物是或包含蛋白质载体 (例如白蛋白、白蛋白-PEG缀合物-RGD-PEG-白蛋白) (Kang等) 还参见W009045536。在一些实施方案中, 缀合物是或包含组氨酰化的低聚赖氨酸 (例如W00032764)。在一些实施方案中, 缀合物是或包含糖蛋白: 转铁蛋白-多聚阳离子 (例如US5354844、W09217210、W09213570)。在一些实施方案中, 缀合物是或包含脱唾液酸糖蛋白 (US5346696)。在一些实施方案中, 缀合物是或包含聚阳离子蛋白质 (例如US603095)。在一些实施方案中, 缀合物是或包含聚假赖氨酸缀合物 (例如W007113531)。

[0572] 报告物和染料缀合物基团

[0573] 适合作为缀合物部分的报告基团包括可以通过例如分光镜手段检测的任何部分。实例报告基团包括染料、荧光团、磷、放射性标记等。在一些实施方案中, 报告基团是生物素、荧光素、罗丹明、香豆素或相关化合物。报告基团还可以附着到其他缀合物部分上。在一些实施方案中, 缀合物是或包含标记或染料, 如荧光基团, 如FAM (羧基荧光素)。

[0574] 交联剂还可以充当缀合物部分。交联剂促进缀合的寡聚化合物与其他化合物的共

价连接。在一些实施方案中,交联剂可以共价连接双链核酸,有效地增加双链体稳定性并调节药物动力学性质。在一些实施方案中,交联剂可以是光活化的或氧化还原活化的。实例交联剂包括补骨脂素,其可以通过光激活促进核酸的链间交联(Lin,等,Faseb J,1995,9,1371)。其他交联剂包括例如,丝裂霉素C及其类似物(Maruenda,等,Bioconjugate Chem.,1996,7,541;Maruenda,等,Anti-Cancer Drug Des.,1997,12,473;和Huh,等,Bioconjugate Chem.,1996,7,659)。可以通过还原激活,如例如利用生物还原剂引起丝裂霉素C介导的交联(例如,NADPH-细胞色素c还原酶/NADPH系统)。其他光交联剂包括芳基叠氮化合物,如例如N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HSAB)和N-琥珀酰亚胺基-6(-4'-叠氮基-2'-硝基苯基-氨基)己酸酯(SANPAH)。缀合寡核苷酸的芳基叠氮化合物引起与核酸和蛋白质在放射后的交联。它们也可以与earner蛋白质(如KLH或BSA)交联。

[0575] 多种功能缀合物基团

[0576] 其他合适的缀合物部分包括例如聚硼烷、碳硼、金属聚硼烷、金属碳硼、其衍生物等(参见例如美国专利号5,272,250,其以其整体并入作为参考)。

[0577] 许多药物、受体配体、毒素、报告分子和其他小分子可以充当缀合物部分。小分子缀合物部分与某些受体或其他生物分子经常具有特定的相互作用,由此允许缀合的寡聚化合物靶向特定的细胞或组织。实例小分子缀合物部分包括霉酚酸(肌苷-5'-一磷酸二氢酶的抑制剂;用于治疗牛皮癣和其他皮肤病症)、姜黄素(对牛皮癣、癌症、细菌和病毒疾病具有治疗性应用)。在其他实施方案中,小分子缀合物部分可以是血清蛋白质,如人血清白蛋白(HSA)的配体。HSA的许多配体是已知的并且包括例如,芳基丙酸、布洛芬、华法林、保泰松、舒洛芬、卡洛芬、芬布芬、酮洛芬、阿司匹林、吲哚美辛、(S)-(+) - 普拉洛芬、dansylsarcosine、2,3,5-三碘苯甲酸、氟芬那酸、甲酰四氢叶酸、苯并噻嗪化物、氯噻嗪、diazepines、吲哚美辛、巴比妥酸盐、头孢菌素类、磺胺药物、抗菌药物、抗生素(例如,嘌呤霉素和巴马霉素)等。在例如W0 00/76554(其以其整体并入作为参考本文)中描述了寡核苷酸-药物缀合物及其制备。

[0578] 在一些实施方案中,缀合物可以是或包含小分子,如小分子药物或前药物。某些药物高效地靶向特定的靶组织或细胞,并且像这样它们可以用于将寡核苷酸靶向其预期的作用位点。此外,小分子本身可以具有治疗活性,通常是在一旦从缀合物的寡核苷酸组分中切割后。实例包括二磷酸盐(广泛用于治疗骨质疏松症并在靶向骨组织中有效)、抗癌药物和化学治疗剂(例如阿霉素或丝裂霉素-参见US5776907)。在一些实施方案中,药物可以是核苷类似物,如核苷聚合酶抑制剂。

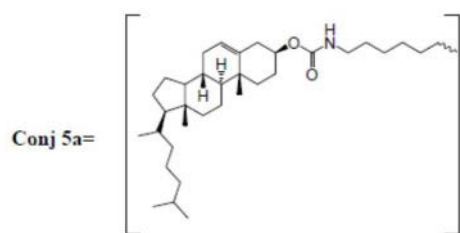
[0579] 在仍然其他实施方案中,小分子缀合物可以靶向或结合某些受体或细胞。已知T-细胞具有暴露的氨基基团,其可以与适当的分子形成席夫碱络合物。因此,含有官能团,如可以与暴露的氨基基团相互作用或反应的醛的小分子还可以是合适的缀合物部分。妥卡雷琐和相关的化合物可以以保持醛不与T-细胞靶标相互作用的方式缀合到寡聚化合物上。相信妥卡雷琐与T-细胞的相互作用通过席夫碱形成引起免疫系统的治疗增强(Rhodes,等,Nature,1995,377,6544)。

[0580] 在一些实施方案中,缀合物是或包含(例如细胞表面)受体配体。在一些实施方案中,缀合物是或包含叶酸盐受体配体,如叶酸基团-参见例如EP1572067或W02005/069994、W02010/045584)。其他细胞表面受体配体包括抗体及其片段、前列腺特异的膜抗原、神经元

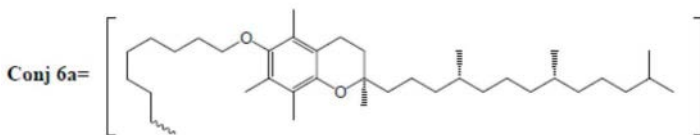
表面抗原(参见W02011/131693)。

[0581] 在一些实施方案中,缀合物部分是受体的配体或可以与(依次)结合受体的分子结合。该种类中包括的是胆汁酸、小分子药物配体、维生素、适体、糖类、肽(包括但不限于激素、蛋白质、蛋白质片段、抗体或抗体片段)、病毒蛋白质(例如壳体)、毒素(例如细菌毒素)等。该种类中还包括的是在自然界中是甾体的缀合物,例如胆固醇、胆甾烷醇、胆甾烷酸、豆甾醇、抗炎松、黄体酮、皮质酮、醛固酮、睾酮、雌二醇、麦角甾醇等,公开内容的优选的缀合物部分是胆固醇(CHOL)、胆甾烷醇(CHLN)、胆甾烷酸(CHLA)、豆甾醇(STIG)和麦角甾醇(ERGO)。在某些优选的实施方案中,缀合物部分是胆固醇。

[0582] 在一些实施方案中,缀合物包含甾醇,如胆固醇或生育酚,任选地包括接头,如脂肪酸接头,例如C6接头。在一些实施方案中,缀合物包含Conj5a或Conj 6a。



[0583]



[0584] 缀合物部分还可以包括维生素。已知维生素通过许多细胞运输系统运输到细胞内。通常,可以将维生素划分为水溶性的或脂溶性的。水溶性的维生素包括硫胺素、核黄素、烟碱酸或烟酸、维生素B6吡哆醛、泛酸、生物素、叶酸、B12钴胺酰胺辅酶、肌醇、胆碱和抗坏血酸。脂溶性的维生素包括维生素A家族、维生素D、维生素E生育酚家族和维生素K(和植醇)。相关的化合物包括类维生素A衍生物,如他佐罗汀和依曲替酯。在一些实施方案中,缀合物部分包括叶酸(叶酸盐)和/或一种或多种其多种形式,如二氢叶酸、四氢叶酸、亚叶酸、pteropolyglutamic acid、二氢叶酸盐、四氢叶酸盐、四氢蝶呤、1-氮杂、3-氮杂、5-氮杂、8-氮杂、10-氮杂、1,5-二氮杂、5,10-二氮杂、8,10-二氮杂和5,8-二氮杂叶酸盐类似物和抗叶酸剂。叶酸盐参与核酸的生物合成并因而影响细胞的存活和增殖。叶酸盐辅因子在嘧啶核苷生物合成所需的一碳转移中起作用。细胞因而具有将叶酸盐运输到细胞质中的系统。叶酸盐受体还倾向于在许多人癌症细胞中过量表达,并且已经报道了叶酸盐介导寡核苷酸靶向卵巢癌细胞(Li,等,Pharm.Res.1998,15,1540,以其整体并入作为参考本文)。核酸的叶酸缀合物的制备描述于例美国专利号如6,528,631(以其整体并入作为参考本文)中。

[0585] 维生素缀合物部分包括例如维生素A(视黄醇)和/或相关化合物。维生素A家族(类视黄醇),包括视黄酸和视黄醇通常通过其与特定蛋白质,如胞质溶胶视黄醇-结合蛋白类型II(CRBP-II),视黄醇-结合蛋白(RBP),和细胞视黄醇-结合蛋白(CRBP)的相互作用而被吸收并运输到靶组织中。维生素A家族的化合物可以通过发现于多个家族成员中的酸或醇官能团附着到寡聚化合物上。例如,视黄酸的酸部分的N-羟基琥珀酰亚胺酯缀合寡核苷酸下垂的接头上的胺功能可以导致维生素A化合物通过酰胺键连接寡聚化合物。同样,视黄醇可以转化成其亚磷酸酰胺,其用于5'缀合。 α -生育酚(维生素E)和其他生育酚(β - ζ)可以缀合

到寡聚化合物上以增强吸收,这是因为它们的亲脂特征。同样,维生素D及其麦角甾醇前体可以通过其羟基基团,通过激活羟基基团例如成为半琥珠酸酯缀合到寡聚化合物上。缀合然后可以直接到寡聚化合物上或从寡聚化合物下垂的氨基接头上。以相似方式缀合寡聚化合物的其他维生素包括硫胺素、核黄素、吡哆醇、吡哆胺、吡哆醛、脱氧吡哆醇。脂溶性维生素K和相关的含醌化合物可以通过羰基基团缀合到醌环上。维生素K的植醇部分也可以用于增强寡聚化合物与细胞的结合。

[0586] 可以在本发明化合物中用作缀合物的其他官能团包括咪唑缀合物-RNA酶A催化中心模拟物(多胺-咪唑缀合物)-参见Guerniou等Nucleic Acids Res (2007);35(20):6778-87。

[0587] 缀合物通常是非核苷酸部分。然而,在保护基团或靶向基团或核苷酸类似物小治疗剂的上下文中,认识到寡核苷酸可以通过本发明的DNA/RNA磷酸二酯区域共价连接核苷酸部分。适当地,如用于本发明的上下文的核酸基团在一些实施方案中缺少与寡核苷酸靶标(区域A)的互补性。

[0588] 在一些实施方案中,阻断或靶向部分是适体(参见例如Meng等,PLoS One (2012)7(4):e33434,W02005/111238&W012078637)。

[0589] 保护基团可以是或包含寡核苷酸区域,其与例如反义寡核苷酸的部分互补。在该方面,阻断寡核苷酸通过DNA/RNA磷酸二酯区域(区域b)和任选地接头共价结合反义寡核苷酸。阻断寡核苷酸在一些实施方案中因而能够与反义寡核苷酸形成双链体。适当地,阻断核苷酸序列(如第三个区域或区域C)是长度例如为3-10个核苷酸的短寡核苷酸序列,其与等同长度的第一个区域形成双链体(即与其互补)。在一些实施方案中,在第二个区域和保护基团之间使用接头。

[0590] 像递送肽,核酸也可以充当缀合物样部分,其可以影响缀合的寡聚化合物在细胞中的定位。例如,核酸缀合物部分可以含有聚A,其为聚A结合蛋白质(PABP)识别的基序,所述结合蛋白质可以将含聚A的分子定位在细胞质中(Gorlach,等,Exp.Cell Res.,1994,211,400)。在一些实施方案中,核酸缀合物部分含有至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少15、至少20和至少25个连续A碱基。核酸缀合物部分还可以含有一个或多个富含AU的序列元件(AREs)。AREs被ELAV家族蛋白质(其可以促进定位到细胞质中)识别(Bollig,等,Biochem.Biophys.Res.Comm.,2003,301,665)。实例AREs包括UUAUUUAUU和含有该基序的多个重复的序列。在其他实施方案中,核酸缀合物部分含有两个或多个AU或AUU基序。类似地,核酸缀合物部分还可以含有一个或多个富含CU的序列元件(CREs)(Wein,等,Eur.J.Biochem.,2003,270,350),其可以结合ELAV蛋白质家族的HuD和/或HuR。与AREs一样,CREs可以帮助将缀合的寡聚化合物定位到细胞质中。在一些实施方案中,核酸缀合物部分含有基序(CUUU)_n,其中例如n可以是1至约20,1至约15,或1至约11。(CUUU)_n基序之后或之前可以任选地是一个或多个U。在一些实施方案中,n是约9至约12或约11。核酸缀合物部分还可以包括hnRNP蛋白质(异源核糖核蛋白)的底物,其中一些参与核酸在细胞核与细胞质之间穿梭(例如hnRNP A1和hnRNP K;参见例如,Mili,等,Mol.Cell Biol,2001,21,7307)。一些实例hnRNP底物包括含有序列UAGGA/U或(GG)ACUAGC(A)的核酸。其他核酸缀合物部分可以包括Y字符串或其他束,其可以结合例如linRNP I。在一些实施方案中,核酸缀合物含有至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少15、至

少20和至少25个连续嘧啶碱基。在其他实施方案中,核酸缀合物可以含有多于50、多于60、多于70、多于80、多于90,或多于95百分比嘧啶碱基。

[0591] 其他核酸缀合物样部分可以包括如在Wang,等,Cell,2002,110,501中所述的pumilio(puf蛋白质)识别序列。实例pumilio识别序列可以包括UGUANAUR,其中N可以是任何碱基并且R可以是嘌呤碱基。可以通过含有AREs和/或CREs的核酸缀合物部分促进定位到细胞质中。充当hnRNP的底物的核酸缀合物样部分可以促进缀合的寡聚化合物定位到细胞质中(例如,hnRNP A1或K)或细胞核中(例如,hnRNP I)。此外,可以通过含有聚嘧啶束的核酸缀合物样部分促进细胞核定位。

[0592] 反应基团

[0593] 反应基团是用于化学合成中的基团,其在本发明上下文中可以用于“缀合”寡核苷酸,或另外将寡核苷酸共价连接到第三个区域(X)上,如缀合物、保护基团或靶向基团,或任选地接头(Y)。反应基团的实例是亚磷酸胺,其广泛用于寡核苷酸合成中。

[0594] 激活基团

[0595] 激活基团是可以被激活以形成反应基团的基团。在该方面,可以认为激活基团是受保护的反应基团,其在使得能够使用反应基团之前被去保护,例如在本文公开的合成/制造方法中。

[0596] 连接基团

[0597] 核苷连接是寡核苷酸中的核苷之间的连接基团,或当存在时,还可以描述将第三个区域(X或C)或接头(Y)附着到区域B上的基团-例如该接头可以是(含有)磷酸连接基团或三唑基团。

[0598] 阻断物基团(也称为阻断/阻断物部分)

[0599] 在一些方面,第三个区域是阻断区域。阻断物通常是缀合物或寡核苷酸(通常不与靶区域互补),其例如(但不限于)通过位阻或通过与第一个区域(或第一个和第二个区域)杂交防止或降低寡聚体的活性。(阻断的)活性可以是针对其预期靶标(靶标)或在一些实施方案中针对非预期靶标(脱靶)。

[0600] 本发明的寡聚化合物因而可以包含第一个区域,如gapmer或LNA gaper寡核苷酸(如式X' Y' Z的gapmer),第二个区域,其是生物可切割的接头,如本文所述的区域B,和第三个区域,区域C,其包含与第一个区域的相应部分互补的至少2个连续核苷,如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16个核苷酸的区域。在一些实施方案中,区域C的至少2个核苷,如3、4、5、6、7、8、9或10个核苷是高亲和力核苷类似物,如LNA(BNA)-在一些实施方案中,这些可以形成区域C的远端部分。区域C的高亲和力核苷类似物可以形成高亲和力的核苷类似物的邻接序列,其侧翼可以是其他核苷,如DNA核苷(还有区域C的部分,称为区域C的近端部分)。在一些实施方案中,区域C包含2-8(如3、4、5、6、&7个LNA(BNA))核苷,并且在同一个或不同的实施方案中,是2-16个DNA核苷(如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15)的区域。在一些实施方案中,区域B的远端部分包含高亲和力核苷酸类似物的邻接区域,例如2、3、4、5、6、7或8个LNA核苷酸的邻接区域。近端区域可以包含非LNA核苷酸的邻接区域,如本文所涉及的那些,如DNA核苷酸,如2-16个非LNA核苷酸的区域。然而,还理解近端区域可以包含高亲和力核苷酸类似物,包括LNA,但是作为LNA的邻接区域可以限制近端区域的构型柔性(认为其充当环),其一些实施方案中可以用于限制近端(或形成环的部分)中长串LNA的用途,如

不多于4个连续LNAs,如不多于3个连续LNAs,或不多于2个连续LNAs。

[0601] 在一些实施方案中,区域C中的其他核苷酸区域(如DNA核苷酸)与区域B形成邻接序列,即位于区域B的末端核苷酸近端,从而高亲和力核苷酸的区域在区域B的远端。在该实施方案中,区域B和区域C的近端部分(例如包含DNA核苷酸的区域)可以形成柔性环,其允许区域C的远端部分与第一个区域杂交。区域C的近端部分可以或可以不与区域A的相应部分互补。在一些实施方案中,区域C的远端部分与形成能够募集RNA酶H,如gapmer的空白区域(本文中称作区域Y')的区域的核苷酸互补。在该实施方案中,阻断区域(区域C)与空白区域或其部分形成双链体,由此阻断gapmer的中心区域与其他分子或靶标或脱靶相互作用可用性。本发明因而提供DNA硫代磷酸酯寡核苷酸(其通常用于gapmers的空白区域)的遗传毒性的解决方法,因为其允许靶组织或细胞内gapmer寡聚体(区域A)的可控激活。在该方面,阻断区域的使用可充当前体药物。认识到阻断区域(区域C或其远端部分)也可以指向寡聚体的其他区域,包括mixmer或totalmer寡聚体,或gapmer的侧翼区域,或横跨翼区和gapmer的空白区域。在该实施方案中,区域C(或其远端部分)与区域A(或区域A的部分)的杂交防止区域A的相应部分与生物分子杂交,并且因而还可以用于防止与其他生物分子非预期相互作用,增强特异性、组织特异的活性,并消除毒性危险。区域C的核苷酸之间的核苷间连接可以是除磷酸二酯以外的,如可以是硫代磷酸酯。

[0602] 靶向基团(也称为靶向部分)

[0603] 靶向部分是这样的基团,其在寡聚化合物上的存在引起生物分布的差异模式和/或寡聚化合物的细胞吸收。靶向基团可以是例如受体配体、抗体、激素或激素类似物、适体等。实例显示了胆固醇作为靶向基团的用途-胆固醇在肝细胞表面上被LDL受体识别,导致胆固醇缀合的寡核苷酸被优先吸收到肝中。实例还阐明了GalNac、生育酚和叶酸作为靶向基团的用途。

[0604] 寡聚体连接的生物可切割缀合物

[0605] 寡聚化合物可以任选地包含第二个区域(区域B),其定位在寡聚体(称为区域A)和缀合物(称为区域C)之间。区域B可以是接头,如可切割接头(还称为生理学不稳定的连接)。

[0606] 在一些实施方案中,本发明的化合物包含生物可切割接头(也称为生理学不稳定的接头,核酸酶敏感的生理不稳定连接,或核酸酶敏感的接头),例如磷酸核苷酸接头(如区域B)或肽接头,其将寡聚体(或连续核苷酸序列或区域A)结合到缀合物部分上(或区域C)。

[0607] 本发明的生物可切割接头指在靶组织中,例如肝和/或肾中对切割敏感(即生理学上不稳定)的接头。优选的是在靶组织中看到的切割速率高于在血清中发现的切割速率。在实施例6中发现了用于测定组织(例如肝或肾)中和血清中的切割水平(%)的合适方法。在一些实施方案中,本发明的化合物中的生物可切割接头(也称为生理学上不稳定的接头或核酸酶敏感的接头),如区域B在实施例6的肝或肾匀浆测定中至少约20%被切割、如至少约30%被切割、如至少约40%被切割、如至少约50%被切割、如至少约60%被切割、如至少约70%被切割、如至少约75%被切割。在一些实施方案中,如实施例6中的测定中所用,血清中的切割(%)少于约20%、如少于约10%、如少于5%、如少于约1%。

[0608] 本发明的生物可切割接头指在靶组织中,例如肝和/或肾中对切割敏感(即生理学上不稳定)的接头。优选的是在靶组织中看到的切割速率高于在血清中发现的切割速率。在实施例6中发现了用于测定组织(例如肝或肾)中和血清中的切割水平(%)的合适方法。在

一些实施方案中,本发明的化合物中的生物可切割接头(也称为生理学上不稳定的接头或核酸酶敏感的接头),如区域B在实施例6的肝或肾匀浆测定中至少约20%被切割、如至少约30%被切割、如至少约40%被切割、如至少约50%被切割、如至少约60%被切割、如至少约70%被切割、如至少约75%被切割。在一些实施方案中,如实施例6中的测定中所用,血清中的切割(%)少于约30%、少于约20%、如少于约10%、如少于5%,如少于约1%。

[0609] 在可以是相同的或不同的一些实施方案中,本发明的化合物中的生物可切割接头(也称为生理学上不稳定的接头,或核酸酶敏感的接头),如区域B对S1核酸酶切割敏感。可以使用实施例6中显示的S1核酸酶测定评估对S1切割的敏感性。在一些实施方案中,本发明的化合物中的生物可切割接头(也称为生理学上不稳定的接头或核酸酶敏感的接头),如区域B在根据实施例6中所用的测定与S1核酸酶温育120分钟后至少约30%被切割、如至少约40%被切割、如至少约50%被切割、如至少约60%被切割、如至少约70%被切割、如至少约80%被切割、如至少约90%被切割、如至少约95%被切割。

[0610] 核酸酶敏感的生理学不稳定连接:在一些实施方案中,本发明的寡聚体(也称为寡聚化合物)(或缀合物)包含三个区域:

[0611] i) 第一个区域(区域A),其包含10-18个连续核苷酸;

[0612] ii) 第二个区域(区域B),其包含生物可切割的接头

[0613] iii) 第三个区域(C),其包含缀合物部分、靶向部分、激活部分,其中第三个区域共价连接第二个区域。

[0614] 在一些实施方案中,区域B可以是磷酸核苷酸接头。例如,当缀合物是亲脂缀合物时,可以使用此类接头如脂质、脂肪酸、甾醇,如胆固醇或生育酚。磷酸核苷酸接头还可以用于其他缀合物,例如糖类缀合物,如GalNac。

[0615] 肽和其他接头

[0616] 在一些实施方案中,生物可切割的接头(区域B)是肽,如可以用于多GalNac缀合物,如三GalNac缀合物中的三赖氨酸肽接头。

[0617] 可以使用本领域已知的其他接头,包括二硫化物接头(在本文中也称为二硫代或二硫化物)。其他肽接头包括例如Tyr-Asp(Asp)三肽或Asp(Asp)二肽。

[0618] 磷酸核苷酸接头

[0619] 在一些实施方案中,区域B包含1-6个核苷酸,其如通过核苷间连接基团,如磷酸二酯连接共价连接第一个区域的5'或3'核苷酸,其中

[0620] a. 第一个和第二个区域之间的核苷间连接是磷酸二酯连接并且[如立即]邻接第一个区域的第二个区域的核苷是DNA或RNA;和/或

[0621] b. 第二个区域的至少1个核苷是磷酸二酯连接的DNA或RNA核苷;

[0622] 在一些实施方案中,区域A和区域B形成长度为10-22,如12-20个核苷酸的单一连续核苷酸序列。

[0623] 在一些方面,可以认为第一个和第二个区域之间的核苷间连接是第二个区域的部分。

[0624] 接头

[0625] 连接或接头是将一个目的化学基团或区段通过一个或多个共价键连接到另一个目的化学基团或区段上的两个原子之间的结合。缀合物部分(或靶向或阻断部分)可以直接

或通过连接部分(接头或系绳)-接头附着到寡聚化合物上。接头是双功能部分,其用于共价连接第三个区域,例如缀合物部分到寡聚化合物(如区域B)上。在一些实施方案中,接头包含链结构或重复单元,如乙二醇或氨基酸单元的寡聚体。接头可以具有至少两个官能团,一个用于附着到寡聚化合物上,另一个用于附着到缀合物部分上。实例接头官能团可以是亲电的用于在寡聚体或缀合物部分上与亲核基团反应,或是亲核的用于与亲电基团反应。在一些实施方案中,接头官能团包括氨基、羟基、羧酸、巯基、氨基磷酸酯、磷酸酯、亚磷酸酯、不饱和性(例如双键或三键)等。一些实例接头包括8-氨基-3,6-二氧杂辛酸(ADO)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、6-氨基己酸(AHEX或AHA)、6-氨基己基氧基、4-氨基丁酸、4-氨基环己基羧酸、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧基-(6-氨基-己酸)琥珀酰亚胺酯(LCSMCC)、m-马来酰亚胺-苯甲酸琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-e-马来酰亚胺-己酸琥珀酰亚胺酯(EMCS)、6-(β -马来酰亚胺-丙酰胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(SMPH)、N-(α -马来酰亚胺乙酸)琥珀酰亚胺酯(AMAS)、4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酸琥珀酰亚胺酯(SMPB)、 β -丙氨酸(β -ALA)、苯基甘氨酸(PHG)、4-氨基环己酸(ACHC)、 β -(环丙基)丙氨酸(β -CYPR)、氨基正十二烷酸(ADC)、allylene diols、聚乙二醇、氨基酸等。

[0626] 本领域已知广泛的其他接头基团,其可以用于将缀合物部分附着到寡聚化合物上。例如可以在Antisense Research and Applications,S.T.Crooke和B.Lebieu,编辑,CRC Press,Boca Raton,Fla.,1993,第303-350页中发现许多有用的接头基团的综述。二硫化物连接已经用于将寡核苷酸的3'末端连接到肽上(Corey,等,Science 1987,238,1401;Zuckermann,等,J Am.Chem.Soc.1988,110,1614;和Corey,等,J Am.Chem.Soc.1989,111,8524)。Nelson,等,Nuc.Acids Res.1989,17,7187描述了用于将生物素附着到寡核苷酸的3'末端的连接试剂。该试剂N-Fmoc-O-DMT-3-氨基-1,2-丙二醇可以从Clontech Laboratories(Palo Alto,Calif.)在名称3'-Amine下通过商业途径获得。其也可以在名称3'-Amino Modifier试剂下从Glen Research Corporation(Sterling,Va.)通过商业途径获得。该试剂还用于将肽连接到寡核苷酸上,如Judy,等,Tetrahedron Letters 1991,32,879所报道。用于连接到寡核苷酸的5'末端的类似商业化试剂是5'-Amino-Modifier C6。这些试剂可以通过商业途径从Glen Research Corporation(Sterling,Va.)获得。Krieg,等,Antisense Research and Development 1991,1,161利用这些化合物或类似的化合物将荧光素连接到寡核苷酸的5'末端上。其他化合物,如吡啶已经通过聚亚甲基连接附着到寡核苷酸的3'末端磷酸基团上(Asseline,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1984,81,3297)。任何上述基团均可用作单一接头或与一个或多个其他接头组合。

[0627] 在本领域中,如在W0 96/11205和W0 98/52614和U.S.Pat.Nos.4,948,882;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,580,731;5,486,603;5,608,046;4,587,044;4,667,025;5,254,469;5,245,022;5,112,963;5,391,723;5,510,475;5,512,667;5,574,142;5,684,142;5,770,716;6,096,875;6,335,432;和6,335,437(其各自以其整体并入作为参考)中提供了制备寡聚化合物的缀合物的接头及其用途。

[0628] 如本文所用,生理学上不稳定的键是不稳定的键,其在哺乳动物体内正常遇到的或与正常遇到的类似的条件下是可切割的(也称为可切割接头)。选择生理学上不稳定的连接基团,从而在某些生理学条件中存在时它们经历化学转化(例如切割)。哺乳动物细胞内条件包括在哺乳动物细胞中发现的或与在哺乳动物细胞中遇到的那些类似的化学条件,如

pH、温度、氧化或还原条件或试剂,和盐浓度。哺乳动物细胞内条件还包括通常存在于哺乳动物细胞中的如来自蛋白水解或水解酶的酶活性的存在。在一些实施方案中,可切割的接头对核酸酶敏感,所述核酸酶例如可以在靶细胞中表达,并且像这样,如本文详细说明,接头可以是短区域(例如1-10)磷酸二酯邻接的核苷,如DNA核苷,

[0629] 可以通过向细胞中添加药学上可接受的试剂起始化学转化(不稳定键的切割)或当含有不稳定键的分子到达适当的细胞内和/或细胞外环境时其自然地发生。例如,当分子进入酸化的内体中时可以切割pH不稳定的键。因此,可以认为pH不稳定的键是内体可切割的键。当暴露于酶,如存在于内含体或溶酶体或细胞质中时可以切割酶可切割的键。当分子进入细胞质的更还原性环境中时二硫键可以被切割。因此,可以认为二硫化物是细胞质可切割的键。如本文所用,pH不稳定的键是在酸性条件(pH<7)下被选择性破坏的不稳定键。此类键还称为内体不稳定的键,因为细胞内含体和溶酶体具有低于7的pH。

[0630] 激活的寡聚体

[0631] 在一些实施方案中,本发明提供激活的寡聚体-即用于合成本发明的寡聚体-例如缀合的寡聚体的中间物。在该方面,本发明的寡聚体在一些实施方案中可以包含如本文所述的区域A和区域B,并且区域B共价连接激活(或反应)基团,适合用于缀合寡聚体。

[0632] 如本文所用,术语“激活的寡聚体”指本发明的寡聚体,其共价连接(即,功能化)至少一个官能团部分,其允许将寡聚体共价连接到一个或多个缀合的部分上,即本身并非核酸的部分或单体,以形成本文所述的缀合物。通常,功能部分将包含化学基团,其能够通过例如腺嘌呤碱基的3'-羟基基团或环外NH₂基团共价键合到寡聚体上,优选为亲水的间隔基和能够结合缀合部分(例如氨基、巯基或羟基基团)的末端基团。在一些实施方案中,该末端基团不受保护,例如是NH₂基团。在其他实施方案中,末端基团例如受到任何合适的保护基团,如在“Protective Groups in Organic Synthesis”by Theodora W Greene和Peter G M Wuts,第3版(John Wiley&Sons,1999)中描述的那些的保护。适合的羟基保护基团的实例包括酯类,如乙酸酯、芳烷基基团,如苄基、二苯甲基,或三苯甲基,和四氢吡喃基。合适的氨基保护基团的实例包括苄基、 α -甲基苄基、二苯甲基、三苯甲基、苄氧基羰基、叔-丁氧基羰基,和酰基基团,如三氯乙酰基或三氟乙酰基。在一些实施方案中,功能部分是自我切割的。在其他实施方案中,功能部分是生物可降解的。参见例如美国专利号7,087,229,以其整体并入本文作为参考。

[0633] 在一些实施方案中,本发明的寡聚体在5'末端是功能化的,以允许将缀合的部分共价附着到寡聚体的5'末端上。在其他实施方案中,可以在3'末端功能化本发明的寡聚体。在仍然其他实施方案中,可以沿着骨架或在杂环碱基部分上功能化本发明的寡聚体。在仍然其他实施方案中,可以在独立地选自5'末端、3'末端、骨架和碱基的多于一个位置上功能化本发明的寡聚体。

[0634] 在一些实施方案中,在合成共价附着到功能部分上的一个或多个单体过程中合成本发明的激活的寡聚体。在其他实施方案中,利用还未功能化的单体合成本发明的激活的寡聚体,并且所述寡聚体在合成完成后被功能化。在一些实施方案中,利用含有氨基烷基接头的阻碍酯将寡聚体功能化,其中所述烷基部分具有式(CH₂)_w,其中w是从1-10的整数,优选约为6,其中所述烷基氨基基团的烷基部分可以是直链或支链,并且其中所述官能团通过酯基团(-O-C(O)-(CH₂)_w-NH)附着到寡聚体上。

[0635] 在其他实施方案中,利用含有 $(\text{CH}_2)_w$ -巯基(SH)接头的阻碍酯将寡聚体功能化,其中 w 是从1-10的整数,优选约为6,其中所述烷基氨基基团的烷基部分可以是直链或支链,并且其中所述官能团通过酯基团 $(-\text{O}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_w\text{SH})$ 附着到寡聚体上。

[0636] 在一些实施方案中,巯基激活的寡核苷酸与聚合物部分,如聚乙二醇或肽(通过二硫键的形成)缀合。

[0637] 可以通过本领域已知的任何方法并且特别是通过PCT公开号W0 2008/034122和其中实施例(以其整体并入本文作为参考)中公开的方法合成含有如上所述阻碍酯的激活的寡聚体。

[0638] 在仍然其他实施方案中,通过基本上如美国专利号4,962,029和4,914,210中的功能化试剂将巯基、氨基或羟基基团引入到寡聚体中以功能化本发明的寡聚体,即在一个末端上具有亚磷酰胺的基本上线性的试剂通过亲水间隔链连接到包含受保护的或不受保护的巯基、氨基或羟基基团的相反末端。此类试剂主要与寡聚体的羟基基团反应。在一些实施方案中,此类激活的寡聚体具有偶联寡聚体的5'-羟基基团的功能化试剂。在其他实施方案中,激活的寡聚体具有偶联3'-羟基基团的功能化试剂。在仍然其他实施方案中,本发明的激活的寡聚体具有偶联寡聚体的骨架上的羟基基团的功能化试剂。在仍然其他实施方案中,利用美国专利号4,962,029和4,914,210(以其整体并入本文作为参考)中所述的多于一种的功能化试剂将本发明的寡聚体功能化。在美国专利号4,962,029和4,914,210中公开了合成此类功能化试剂和将它们掺入到单体或寡聚体中的方法。

[0639] 在一些实施方案中,利用dienyl亚磷酰胺衍生物将固相结合寡聚体的5'末端功能化,随后通过Diels-Alder环化加成反应缀合去保护的寡聚体与例如氨基酸或肽。

[0640] 在多个实施方案中,含有2'-糖修饰,如2'-氨基甲酸酯取代的糖或2'-(0-戊基-N-苯二甲酰亚氨基)脱氧核糖糖的单体掺入到寡聚体中促进缀合的部分共价附着到寡聚体的糖上。在其他实施方案中,使用试剂,如例如5'-二甲氧基三苯甲基-2'-O-(e-邻苯二甲酰亚胺基氨基戊基)-2'-脱氧腺苷-3'--N,N-二异丙基-氰基乙氧基亚磷酰胺制备在一个或多个单体的2'位置上含有氨基的接头的寡聚体。参见例如Manoharan,等,Tetrahedron Letters,1991,34,7171。

[0641] 在仍然其他实施方案中,本发明的寡聚体在核碱基上可以具有含胺的功能部分,包括在N6嘌呤氨基基团上,在鸟嘌呤的环外N2上,或在胞嘧啶的N4或5位置上。在多个实施方案中,可以通过使用在寡聚体合成中早已功能化的商品化试剂实现该功能化。

[0642] 一些功能部分是可以商业途径获得的,例如异双功能和同双功能连接部分可以从Pierce Co. (Rockford, Ill.) 获得。其他市售连接基团是5'-Amino-Modifier C6和3'-Amino-Modifier试剂,两者均可从Glen Research Corporation (Sterling, Va.) 获得。5'-Amino-Modifier C6还可以从ABI (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.) 作为Aminolink-2获得,并且3'-Amino-Modifier还可以从Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, Calif.) 获得。

[0643] 合成和制造方法

[0644] 本发明还提供合成或制造本发明的寡聚体的方法。使用标准的寡核苷酸合成制备寡聚体,所述寡核苷酸合成通常在固相支持物,如通用支持物上进行。如图5-10中所阐明,例如可以通过第一个区域和第二个区域的连续合成,随后任选地通过接头(Y)添加(例如缀

合) 第三个区域 (X) 来合成本发明的寡聚体。当存在时, 区域Y可以结合区域B, 并且区域X随后添加到区域Y, 或区域Y和X可以在单个反应步骤中添加到区域B。

[0645] 或者, 寡聚体合成可以通过区域X, 或区域X和Y开始偶联寡核苷酸支持物柱, 随后连续寡核苷酸合成区域B, 然后是区域A来发生。

[0646] 或者, 附着到寡核苷酸合成支持物 (在开始步骤或预先步骤中) 上可切割的双向基团的使用允许这样的方法, 其中寡核苷酸区域B和A在双官能团的一个反应基团上合成, 并且区域X或区域X和Y在双官能团的第二个反应基团上合成, 其中所述寡核苷酸合成或向支持物上添加X (或X和Y) 可以以任何顺序或甚至一起发生。双官能团从支持物上的切割然后产生本发明的寡聚体。双官能团例如可以是核苷, 其中一个实体 (例如区域B或X或X-Y-) 附着到核苷的含磷酸的基团 (例如5' 或3' 基团) 上, 并且另一个 (例如区域B或X或X-Y-) 附着到例如核碱基上存在的反应基团上。

[0647] 或者, 区域X或X-Y-可以在寡核苷酸合成之后, 如在切割步骤之后结合寡聚体 (区域B)。本发明因而也涉及中间物寡聚体, 其包含区域A和B, 和附着到区域B上的反应或激活基团, 其随后用于将区域X或区域X和Y结合到区域B上。

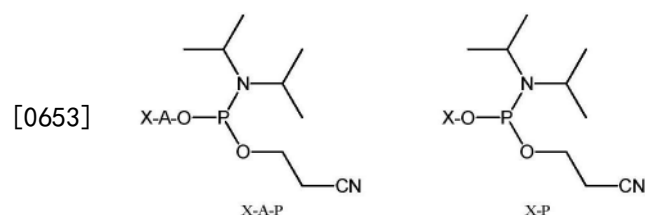
[0648] 区域Y或区域X可以连接区域B作为亚磷酰胺, 例如允许在单次寡核苷酸合成中形成寡聚体, 随后从寡核苷酸合成支持物 (US) 上切割寡聚体。在该方面, 在一些实施方案中, 区域B和区域X或Y之间的连接基团可以是含磷酸盐的基团, 如核苷连接, 如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼代磷酸酯、甲基膦酸酯或其他, 如本文所涉及的那些。或者, 可以使用其他化学连接, 如三唑基团。

[0649] 在一些实施方案中, 第三个区域 (X) 或X-Y-可以通过除5' 或3' 磷酸以外的基团, 例如通过另一位置上的反应基团, 例如反应基团, 如区域B中的核苷碱基上的胺连接区域B。

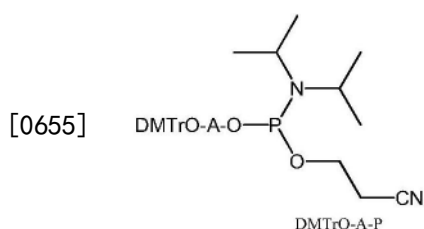
[0650] 寡核苷酸合成可以以5' -3' 方向发生, 或与大多数寡核苷酸合成典型具有的一样, 以3' -5' 方向发生。

[0651] 在一些非限制性实例中, 寡核苷酸-缀合物构建体可以以不同方式装配, 例如

[0652] A) 可以在能够合成硫代磷酸酯和磷酸二酯连接的寡核苷酸合成机器上制备构建体的B-A部分。然后可以任选地使用构建单元X-A-P (具有接头附着的缀合物部分) 通过标准的亚磷酰胺化学延长B-A, 以产生X-A-B-A, 或使用构建单元X-P (没有接头的缀合物部分) 产生X-B-A



[0654] B) 可以在能够合成硫代磷酸酯和磷酸二酯 (phosphodiester) 连接的寡核苷酸合成机器上制备构建体的B-A部分。然后可以任选地使用构建单元DMTrO-A-P, 随后使用构建单元X-P通过标准的亚磷酰胺化学连续延长B-A, 以产生X-A-B-A, 其在X和A部分之间具有PO或PS连接。



[0656] 可以在能够合成硫代磷酸酯和磷酸二酯 (phosphordiester) 连接的寡核苷酸合成机器上制备构建体的B-A部分。然后可以任选地使用构建单元PGN-A-P通过标准的亚磷酰胺化学连续延长B-A,以产生 $H_2N-A-B-A$ 。切割并去保护寡核苷酸后,寡核苷酸的游离胺可以与部分X缀合,其中X的官能团已经被激活以与寡核苷酸的末端伯胺反应。

[0657] 组合物

[0658] 本发明的寡聚体可以用于药物制剂和组合物中。适当地,此类组合物包含药学上可接受的稀释剂、载体、盐或佐剂。W02007/031091提供了合适的且优选的药学上可接受的稀释剂、载体和佐剂-其由此并入作为参考。在W02007/031091 (其也由此并入作为参考)中也提供了合适的剂量、制剂、施用途、组合物、剂量形式、与其他治疗剂的组合、前药制剂。

[0659] 反义寡核苷酸可以与药学上可接受的活性或惰性物质混合用于制备药物组合物或制剂。组合物和用于配制药组合物的方法依赖于许多标准,包括但不限于施用途、疾病程度或待施用的剂量。

[0660] 可以通过将反义化合物与合适的药学上可接受的稀释剂或载体组合在药物组合物中利用反义化合物。药学上可接受的稀释剂包括磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS)。PBS是适合用于待肠胃外递送的组合物中的稀释剂。

[0661] 包含反义化合物的药物组合物包括任何药学上可接受的盐、酯或此类酯的盐,或任何其他寡核苷酸,其在向动物,包括人施用后能够(直接或间接)提供生物学上有活性的代谢物或其残余物。因此,例如,公开内容还涉及反义化合物的药学上可接受的盐、前体药物、此类前体药物的药学上可接受的盐,和其他生物等同物。合适的药学上可接受的盐包括但不限于钠盐和钾盐。前体药物可以包括在反义化合物的一个或两个末端掺入额外的核苷,其在体内被内源核酸酶切割,以形成活性的反义化合物。在该方面,前体药物可以包含本发明的区域B和缀合物,靶向或阻断部分。在一些实施方案中,本发明的寡聚体是前体药物。

[0662] 本发明亲脂缀合物的使用允许本发明的寡聚体掺入到lipidoids或脂质体中,例如阳离子脂质体(例如阳离子脂质体SNALPs (稳定的核酸脂质颗粒)),其特别用于向肝中递送寡聚体,例如siRNAs。

[0663] 应用

[0664] 本发明的寡聚体可以作为研究试剂用于例如诊断、治疗和预防。

[0665] 在研究中,在一些实施方案中,此类寡聚体可以用于在细胞和实验动物中特异地抑制蛋白质的合成(通常通过降解或抑制mRNA并由此防止蛋白质形成),由此促进靶标的功能分析或其作为靶标用于治疗干预的有用性的评估。

[0666] 对于治疗,通过施用本发明的寡聚化合物来治疗怀疑患有可以通过调节靶标的表达来治疗的疾病或病症的动物或人。还提供的是通过施用治疗或预防有效量的一种或多种本发明寡聚体或组合物来治疗哺乳动物,如治疗人的方法,所述哺乳动物被怀疑患有或易

于患有与靶标表达相关的疾病或病症。通常以有效量施用本发明的寡聚体、缀合物或药物组合物。

[0667] 本发明还提供为制造用于治疗本文涉及的病症的药物所述的本发明化合物或缀合物的用途,或提供如本文涉及病症的治疗方法。

[0668] 本发明还提供用于治疗如本文涉及的病症的方法,所述方法包括向需要治疗的患者施用如本文所述的本发明的化合物,和/或本发明的缀合物,和/或本发明的药物组合物。

[0669] 医学适应症

[0670] 在一些实施方案中,疾病是癌症。在一些实施方案中,疾病是炎性疾病。在一些实施方案中,疾病是心血管疾病。

[0671] 在一些实施方案中,疾病或病症是心肌梗塞(MI)。

[0672] 在一些实施方案中,疾病或病症是或导致或与纤维化相关,如肝-纤维化、心脏纤维化或局部纤维化。

[0673] 在一些实施方案中,疾病或病症是血凝固障碍。

[0674] 在一些实施方案中,疾病或病症是或包含(导致或与其相关)骨丢失。

[0675] 在一些实施方案中,疾病或病症是肝疾病或病症。

[0676] 在一些实施方案中,疾病或病症是代谢病症,其可以例如是肝疾病或病症,和/或在一些方面是心血管疾病或病症。

[0677] 心血管/代谢疾病包括例如,代谢综合征、肥胖症、高脂血症、HDL/LDL胆固醇失调、血脂障碍,例如家族性复合高脂血症(FCHL)、获得性高脂血症、抑制素抗性、高胆固醇血症、冠状动脉疾病(CAD)、和冠状动脉心脏病(CHD)、动脉粥样硬化、心脏病、糖尿病(I和/或II)、NASH、急性冠状动脉综合征(ACS)、NASH、慢性心力衰竭、心血管疾病、心脏代谢病、高脂血症和相关病症、代谢综合征、动脉粥样硬化、慢性心力衰竭、脉管疾病、外周动脉疾病、心脏病、局部缺血、2型糖尿病、1型糖尿病。

[0678] 在一些实施方案中,疾病或病症选自代谢综合征、肥胖症、高脂血症、动脉粥样硬化、HDL/LDL胆固醇失调、血脂障碍,例如家族性复合高脂血症(FCHL)、获得性高脂血症、抑制素抗性、高胆固醇血症、冠状动脉疾病(CAD)和冠状动脉心脏病(CHD)。

[0679] 在一些实施方案中,疾病或病症选自慢性心力衰竭、心血管疾病、心脏代谢病、慢性心力衰竭、脉管疾病、外周动脉疾病、心脏病、局部缺血、急性冠状动脉综合征(ACS)。

[0680] 在一些实施方案中,疾病或病症是2型糖尿病、1型糖尿病。

[0681] 在一些实施方案中,疾病或病症是病毒病,如红细胞增多症、丙型肝炎、乙型肝炎、BKV、HIV。

[0682] 在一些实施方案中,疾病或病症是严重的且稀有的疾病(或遗传病症)。

[0683] 本发明还提供本发明的化合物在制造用于治疗疾病、病症或状况,如本文涉及的那些疾病、病症或状况的药物中用途。

[0684] 一般而言,本发明的一些方面涉及治疗患有或易于患有与靶标的异常水平相关的状况的哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的靶向靶标的包含一个或多个LNA单元的寡聚体。通常以有效量施用本发明的寡聚体、缀合物或药物组合物。

[0685] 本发明的有趣方面涉及如本文所定义的化合物用于制备用于治疗本文涉及的疾病、病症或状况的药物的用途。

[0686] 此外,本发明涉及治疗患有疾病或状况如本文涉及的那些的患者的方法。

[0687] 需要治疗的患者是患有或可能患有疾病或病症的患者。

[0688] 在一些实施方案中,如本文所用的术语‘治疗’指治疗现有的疾病(例如本文所指的疾病或病症),或预防疾病,即预防。因而将认识到如本文所涉及的治疗在一些实施方案中可以是预防性的。

实施例

[0689] 寡核苷酸列表

[0690] 在以下列表中,大写字母代表LNA核苷,如 β -D-氧LNA,小写字母代表DNA核苷。大写L是LNA,如 β -D-氧,而小写字母d是DNA核苷。LNA胞嘧啶任选地是5' 甲基胞嘧啶。区域A内的间核苷是硫代磷酸酯,而在区域B中是磷酸二酯(如所示)。区域A与B之间的核苷间连接是磷酸二酯,但当区域B>1个DNA核苷酸时,可以任选地是除磷酸二酯之外的连接(例如,可以是硫代磷酸酯)。在区域B和区域C之间任选地存在其他接头(Y),如C6接头。#指SEQ ID No.

[0691] ApoB靶向化合物

#	Seq (5' -3') (区域A)	可切割接头(区域B)	区域C-缀合物
1	GCattggtatTCA	无	无
2	GCattggtatTCA	无	胆固醇
3	GCattggtatTCA	SS	胆固醇
4	GCattggtatTCA	3PO-DNA (5' tca3')	胆固醇
5	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5' ca3')	胆固醇
6	GCattggtatTCA	1PO-DNA (5' a3')	胆固醇

[0693] PCSK9-小鼠特异性化合物

#	Seq (5' -3') (A)	可切割接头 (B)	缀合物 (C)
7	GTctgtggaaGCG	无	无
8	GTctgtggaaGCG	无	胆固醇
9	GTctgtggaaGCG	2PO-DNA (5' ca3')	胆固醇
10	GTctgtggaaGCG	2PO-DNA (5' ct3')	胆固醇

[0695] FVII (小鼠FVII)

#	Seq (5'-3')	可切割接头(B)	缀合物 (C)
11	LLdddddddddLLL	无	无
12	LLdddddddddLLL		GalNAc 簇
13	LLdddddddddLLL	2PO (ca)	GalNAc 簇
14	LLdddddddddLLL	SS	胆固醇
15	LLdddddddddLLL	2PO (ca)	胆固醇

[0698] 具有FAM标记缀合物的ApoB靶向化合物

#	Seq (5' -3')	可切割接头 (B)	缀合物 (C)
---	--------------	-----------	---------

16	GCattggtatTCA	3PO-DNA (5' tca3')	FAM
17	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5' ca3')	FAM
18	GCattggtatTCA	1PO-DNA (5' a3')	FAM
19	GCattggtatTCA	3PO-DNA (5' gac3')	FAM
20	GCattggtatTCA	no	FAM

[0700] 靶标X化合物(人治疗靶标)

[0701]	#	Seq (5' -3')	可切割接头 (B)	区域C (3' -末端中)
	21	LLLdddddL	3PO-DNA (5' tgc3')	5' - ddddL -3'
	22	LLLdddddL		5' - ddddL -3'
	23	LLLdddddL	3PO-DNA (5' tgc3')	5' - ddddL -3'
	24	LLLdddddL		5' - ddddL -3'

[0702] 在上述化合物中,区域C包含Seq (区域A) 的互补序列,从而区域C的3' 核苷酸与区域A的第8个核苷酸从5' 末端开始比对(形成碱基对)。区域C因而形成回环并与区域A在gapmer的3' 翼端形成8个碱基的杂交和DNA缺口区域的5个碱基,由此产生“前体药物”,其在接头区域(B) 被切割前是失活。

[0703] ApoB靶向化合物

	#	Seq (5'-3')	可切割接头(B)	缀合物
	25	GCattggtatTCA	无	叶酸
[0704]	26	GCattggtatTCA	SS	叶酸
	27	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	叶酸
	28	GCattggtatTCA	无	monoGalNAc
	29	GCattggtatTCA	SS	monoGalNAc
	30	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	monoGalNAc
	31	GCattggtatTCA	无	FAM
[0705]	32	GCattggtatTCA	SS	FAM
	33	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	FAM
	34	GCattggtatTCA	无	生育酚
	35	GCattggtatTCA	SS	生育酚
	36	GCattggtatTCA	2PO-DNA (5'ca3')	生育酚

[0706] PCSK9化合物

[0707]	#	Seq (5' -3')	接头	缀合物
	37	TGctacaaaacCCA	无	
	38	AATgctacaaaacCCA	无	
	39	AATgctacaaaacCCA	无	

40	GCtgtgtgagcttGG	无	
41	TGctgtgtgagctTGG	无	
42	TGCtgtgtgagctTGG	无	
43	TCCtggtctgtgtTCC	无	
44	TCCtggtctgtgttCC	无	
45	TGctacaaaacCCA	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇
46	AATgctacaaaacCCA	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇
47	AATgctacaaaacCCA	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇
48	GCtgtgtgagcttGG	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇
49	TGctgtgtgagctTGG	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇
50	TGCtgtgtgagctTGG	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇
51	TCCtggtctgtgtTCC	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇
52	TCCtggtctgtgttCC	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇

[0708] 猴研究化合物ApoB

[0709]	53	GTtgacactgTC	无	无
	5	GCatttggtatTCA	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇
	54	GTtgacactgTC	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇
	46	AATgctacaaaacCCA	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇
	49	TGctgtgtgagctTGG	2P0-DNA (5' ca3')	胆固醇

[0710] SEQ ID NO 53提供为SEQ ID NO 54的亲本化合物。

[0711] 小鼠实验:除非另有说明,小鼠实验可以如下进行:

[0712] 剂量施用和取样:

[0713] 使用7-10周龄的C57B16-N小鼠,动物是年龄和性别匹配的(雌性用于研究1、2和4,雄性用于研究3)。化合物静脉内注射到尾静脉内。对于中间血清取样,通过穿刺面静脉收集2-3滴血,从下腔静脉中获取最后的出血。在含有凝胶的血清分离管(Greiner)中收集血清并保持冷冻直至分析。

[0714] 利用在盐水中配制的单一剂量1mg/kg ASO(或所显示的量)或单独盐水,根据所示信息静脉内向C57BL6小鼠给药。在给药后例如第4天或第7天(或所示时间)处死动物并取样肝和肾。

[0715] RNA分离和mRNA分析:使用Qantigene mRNA定量试剂盒(“bDNA-测定”,Panomics/Affimetrix),根据制造商方案从组织进行mRNA分析。对于组织裂解物,通过在含有蛋白酶K的1ml裂解缓冲液中超声来裂解50-80mg的组织。裂解物直接用于bDNA测定,而不需要RNA提取。从Panomics获得定制设计用于靶标和GAPDH的探针组。为了分析,为靶基因获得的发光单位针对持家基因GAPDH进行归一化。

[0716] 在“Cobas INTEGRA 400plus”临床化学平台(Roche Diagnostics)上,使用10μl血清进行对ALT、AST和胆固醇的血清分析。

[0717] 为了定量因子VII血清水平,根据制造商的方案使用BIOPHEN FVII酶活性试剂盒(#221304,Hyphen BioMed)。

[0718] 为了寡核苷酸定量,荧光标记的PNA探针与组织裂解物中的目的oligo杂交。相同

的裂解物用于bDNA测定,其仅利用精确称量的量的组织。使用AEX-HPLC和荧光检测定量异源双链体。

[0719] 实施例1:化合物SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2、SEQ ID NO 3、SEQ ID NO 4和SEQ ID NO 5的合成

[0720] 在Expedite 8900/MOSS合成仪(Multiple Oligonucleotide Synthesis System)上使用亚磷酰胺方法或在4 μ mol范围上使用等同物在尿苷通用支持物上合成寡核苷酸。在合成结束时,在室温下使用氨水从固体支持物上切割寡核苷酸1-2小时,并在65℃下进一步去保护16小时。通过反相HPLC(RP-HPLC)纯化寡核苷酸并通过UPLC进行表征,通过ESI-MS进一步验证分子量。对于更详细内容参见下文。

[0721] 寡核苷酸的延伸

[0722] 通过使用乙腈中的0.1M 5'-O-DMT保护的amidite溶液和乙腈中的DCI(4,5-二氰基咪唑)(0.25M)作为激活剂进行 β -氰乙基-亚磷酰胺(DNA-A(Bz)、DNA-G(ibu)、DNA-C(Bz)、DNA-T、LNA-5-甲基-C(Bz)、LNA-A(Bz)、LNA-G(dmf)、LNA-T或C6-S-S接头)的偶联。对于最终的循环,以在DCM中0.1M使用市售的C6连接的胆固醇亚磷酰胺。通过使用氢化苍耳烷(在乙腈/吡啶9:1中0.01M)进行硫醇化用于引入硫代磷酸酯连接。使用在THF/吡啶/水7:2:1中的0.02M碘引入磷酸二酯连接。剩余试剂是通常用于寡核苷酸合成的一些试剂。

[0723] 通过RP-HPLC纯化:

[0724] 通过在Phenomenex Jupiter C18 10 μ 150x10 mm柱上的制备性RP-HPLC纯化粗化合物。0.1M乙酸铵pH 8和乙腈以5mL/分钟的流速用作缓冲液。冻干所收集的级分以给出通常作为白色固体的纯化化合物。

[0725] 缩写:

[0726] DCI:4,5-二氰基咪唑

[0727] DCM:二氯甲烷

[0728] DMF:二甲基甲酰胺

[0729] DMT:4,4'-二甲氧三苯甲基

[0730] THF:四氢呋喃

[0731] Bz:苯甲酰

[0732] Ibu:异丁酰基

[0733] RP-HPLC:反相高效液相层析

[0734] 实施例2:LNA反义寡核苷酸的设计

[0735] 用于实施例和附图中的寡聚体。SEQ#是实施例和附图中使用的标识。

[0736] 表2-

SEQ ID NO	化合物序列	注释
#1	5'-G _s ^{0m} C _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{0m} C _s ⁰ A ⁰ -3'	没有缀合的胆固醇的母体化合物
#2	5'-CHOL G _s ^{0m} C _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{0m} C _s ⁰ A ⁰ -3'	Chol-3833
#3	5'-Chol_C6 C6SSC6 G _s ^{0m} C _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{0m} C _s ⁰ A ⁰ -3'	Chol-SS-3833
#4	5'-Chol_C6 tcaG _s ^{0m} C _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{0m} C _s ⁰ A ⁰ -3'	Chol-3PO-3833
#5	5'-Chol_C6 caG _s ^{0m} C _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ^{0m} C _s ⁰ A ⁰ -3'	Chol-2PO-3833
#6	5'- Chol_C6 a G _s ⁰ mC _s ⁰ a _s t _s t _s g _s g _s t _s a _s t _s T _s ⁰ mC _s ⁰ A ⁰ -3'	Chol-1PO-3833
#7	5'- G _s ⁰ T _s ⁰ c _s t _s g _s t _s g _s g _s a _s a _s G _s ⁰ mC _s ⁰ G _s ⁰ -3'	没有缀合物的母体化合物
#8	5'- Chol_C6 G _s ⁰ T _s ⁰ c _s t _s g _s t _s g _s g _s a _s a _s G _s ⁰ mC _s ⁰ G _s ⁰ -3'	Chol-4061
#9	5'- Chol_C6 c a G _s ⁰ T _s ⁰ c _s t _s g _s t _s g _s g _s a _s a _s G _s ⁰ mC _s ⁰ G _s ⁰ -3'	Chol-2PO(ca)-4061
#10	5'- Chol_C6 c t G _s ⁰ T _s ⁰ c _s t _s g _s t _s g _s g _s a _s a _s G _s ⁰ mC _s ⁰ G _s ⁰ -3'	Chol-2PO(ct)-4061

[0739] 实施例3. 在体内利用胆固醇-缀合物敲减ApoB mRNA

[0740] 利用单一剂量盐水或1mg/kg未缀合的LNA-反义寡核苷酸(SEQ ID#1)或以不同接头与胆固醇缀合的等摩尔量的LNA反义寡核苷酸注射C57BL6/J小鼠并根据表3在第1-10天将其处死。

[0741] 从肝和肾中分离RNA并利用ApoB特异性引物和探针进行qPCR以分析ApoB mRNA敲减。

[0742] 结论:以具有磷酸二酯骨架的2或3个DNA(Seq#4和5)组成的接头的缀合ApoB LNA反义寡核苷酸的胆固醇显示对ApoB的肝特异性敲减的偏好(图11)。这表示与未缀合的化合物(Seq#1)相比,以及与具有稳定接头(Seq#2)和二硫化物(Seq.#3)的胆固醇缀合物相比,

在肝组织中ApoB mRNA敲减的效率和持续时间增加,并在肾组织中Seq#4和#5的敲减活性伴随着降低。

[0743] 材料和方法:

[0744] 实验设计:

[0745] 表3:

[0746]

	Gr. no.	动物 ID 号	动物 数量	动物品系/性 别/饲养	每天的化合物 剂量水平	剂量体积 10 时的浓 度 ml/kg	体重	处死
A	1	1-4	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	NaCl 0.9%	-	第-1、7 和 10 天	第 10 天
	2	5-8	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0.1 mg/ml	第-1、7 和 10 天	第 10 天
	3	9-12	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 2 1,2 mg/kg	0.12mg/ml	第-1、7 和 10 天	第 10 天

[0747]

	4	13-16	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 3 1,2 mg/kg	0.12mg/ml	第-1、7 和 10 天	第 10 天
	5	17-20	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 4 1,3 mg/kg	0.13mg/ml	第-1、7 和 10 天	第 10 天
	6	21-24	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 5 1,3 mg/kg	0.13mg/ml	第-1、7 和 10 天	第 10 天
B	7	25-28	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	NaCl 0.9%	-	第-1, 7 天	第 7 天
	8	29-32	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0.1 mg/ml	第-1, 7 天	第 7 天
	9	33-36	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 2 1,2 mg/kg	0.12mg/ml	第-1, 7 天	第 7 天
	10	37-40	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 3 1,2mg/kg	0.12mg/ml	第-1, 7 天	第 7 天
	11	41-44	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 4 1,3mg/kg	0.13mg/ml	第-1, 7 天	第 7 天
	12	45-48	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 5 1,3mg/kg	0.13mg/ml	第 1, 7 天	第 7 天
C	13	49-52	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	NaCl 0.9%	-	第 0, 3 天	第 3 天
	14	53-56	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0.1 mg/ml	第 0, 3 天	第 3 天
	15	57-60	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 2 1,2mg/kg	0.12mg/ml	第 0, 3 天	第 3 天
	16	61-64	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 3 1,2mg/kg	0.12mg/ml	第 0, 3 天	第 3 天
	17	65-68	4	C57BL/6J- ♀ - Chow	SEQ ID NO 4 1,3mg/kg	0.13mg/ml	第 0, 3 天	第 3 天

[0748]

D	18	69-72	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 5 1,3mg/kg	0.13mg/ml	第 0, 3 天	第 3 天
	19	73-76	4	C57BL/6J- ♀- Chow	NaCl 0.9%	-	第-1, 1 天	第 1 天
	20	77-80	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 1 1 mg/kg	0.1 mg/ml	第-1, 1 天	第 1 天
	21	81-84	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 2 1,2mg/kg	0.12mg/ml	第-1, 1 天	第 1 天
	22	85-88	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 3 1,2mg/kg	0.12mg/ml	第-1, 1 天	第 1 天
	23	89-92	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 4 1,3mg/kg	0.13mg/ml	第-1, 1 天	第 1 天
	24	93-96	4	C57BL/6J- ♀- Chow	SEQ ID NO 5 1,3mg/kg	0.13mg/ml	第-1, 1 天	第 1 天

[0749] 剂量施用。根据表3利用盐水中配制的10ml/kg BW(根据第0天的体重)化合物或单独盐水静脉内给药C57BL/6JBom雌性动物(到达时大概20g)。

[0750] 肝和肾组织的取样。利用70% CO₂-30% O₂麻醉动物并根据表3通过颈脱位法将其处死。将大肝叶的一半和一个肾切碎并浸入RNAlater中。

[0751] 总RNA分离和第一条链合成。使用Qiagen RNeasy试剂盒(Qiagen cat.no.74106), 根据制造商的说明书,在RLT裂解缓冲液的存在下,从通过珠碾磨匀浆的最多30mg组织中提取总RNA。使用来自Ambion的反转录酶试剂,根据制造商的说明书进行第一条链的合成。

[0752] 对于每一种样品,利用无RNA酶的H₂O调整0.5μg总RNA至(10.8μl)并将其与2μl随机十倍体(50μM)和4μl dNTP混合物(2.5mM的每一种dNTP)混合并加热至70℃,3分钟,其后将样品在冰上快速冷却。向每一种样品中加入2μl 10x缓冲液RT、1μl MMLV反转录酶(100U/μl)和0.25μl RNA酶抑制剂(10U/μl),随后在42℃温育60分钟,在95℃热失活酶10分钟,然后将样品冷却至4℃。cDNA样品以1:5稀释,使用Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x(Applied Biosystems Cat#4364103)和Taqman基因表达测定(mApoB,Mn01545150_m1和mGAPDH#4352339E),遵循制造商实验方案进行RT-QPCR,并在Applied Biosystems RT-qPCR仪器(7500/7900或ViiA7)上以快速模式进行处理。

[0753] 实施例4.在体内利用胆固醇-缀合物敲减ApoB mRNA并且LNA分布到肝和肾中

[0754] 利用单次剂量的盐水或1mg/kg未缀合的LNA-反义寡核苷酸(SEQ ID#1)或以不同接头缀合胆固醇的等摩尔量的LNA反义寡核苷酸注射C57BL6/J小鼠并根据表4在第1-16天将其处死。从肝和肾中分离RNA并利用ApoB特异的引物和探针进行qPCR以分析ApoB mRNA敲减。

[0755] 使用基于LNA的夹层ELISA方法测定肝和肾中的LNA寡核苷酸含量。

[0756] 结论:以具有磷酸二酯骨架的1、2或3个DNA (Seq#4、#5和#6) 组成的接头缀合ApoB LNA反义寡核苷酸的胆固醇显示对肝特异性敲减ApoB的偏好(图14)。这表示与未缀合的化合物(Seq#1)相比,肝组织中ApoB mRNA敲减的效率和持续时间增加,和肾组织中Seq#4、#5和#6的敲减活性伴随着降低。与未缀合的LNA寡核苷酸相比,胆固醇缀合的LNA反义寡核苷酸在肝中具有高得多的吸收而在肾中具有低得多的吸收(图15)。

[0757] 材料和方法:

[0758] 实验设计:

[0759]

表 4:

部 分	组 号	动物 ID 号	动物 数量	动物品系/性别/饲养	每天的化合物 剂量水平	剂量体积 10 时 的浓度 ml/kg	施用 途径	给 药 日期	体重, 日期	处死 日期
A	1	1-3	3	C57BL/6J/♀/Chow	盐水	-	iv	0	0, 1	1
	2	4-6	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1mg/kg	10.1 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	3	7-9	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 等 摩 尔 1.35mg/kg	0.135 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	4	10-12	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 等 摩 尔 1.28mg/kg	0.128 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	5	13-15	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 等 摩 尔 1.21mg/kg	0.121 mg/ml	iv	0	0, 1	1
B	6	16-18	3	C57BL/6J/♀/Chow	盐水	-	iv	0	0, 3	3
	7	19-21	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1mg/kg	10.1 mg/ml	iv	0	0, 3	3
	8	22-24	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 等 摩 尔 1.35mg/kg	0.135 mg/ml	iv	0	0, 3	3

[0760]

9	25-27	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 等摩尔 1.28mg/kg	0.128 mg/ml	iv	0	0, 3	3
10	28-30	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 等摩尔 1.21mg/kg	0.121 mg/ml	iv	0	0, 3	3
C 11	31-33	3	C57BL/6J/♀/Chow	盐水	-	iv	0	0, 3	3
12	34-36	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1mg/kg	10.1 mg/ml	iv	0	0, 7	7
13	37-39	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 等摩尔 1.35mg/kg	0.135 mg/ml	iv	0	0, 7	7
14	40-42	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 等摩尔 1.28mg/kg	0.128 mg/ml	iv	0	0, 7	7
15	43-45	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 等摩尔 1.21mg/kg	0.121 mg/ml	iv	0	0, 7	7
D 16	46-48	3	C57BL/6J/♀/Chow	盐水	-	iv	0	0, 7, 10	10
17	49-51	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 1 1mg/kg	10.1 mg/ml	iv	0	0, 7, 10	10
18	52-54	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 等摩尔 1.35mg/kg	0.135 mg/ml	iv	0	0, 7, 10	10

[0761]

19	55-57	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 尔 1.28mg/kg	等摩	0.128 mg/ml	iv	0	0,7,10	10
20	58-60	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 尔 1.21mg/kg	等摩	0.121 mg/ml	iv	0	0,7,10	10
21	61-63	3	C57BL/6J/♀/Chow	盐水	-	-	iv	0	0,7,13	13
22	64-66	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 1mg/kg	NO 1	10.1 mg/ml	iv	0	0,7,13	13
23	67-69	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 尔 1.35mg/kg	等摩	0.135 mg/ml	iv	0	0,7,13	13
24	70-72	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 尔 1.28mg/kg	等摩	0.128 mg/ml	iv	0	0,7,13	13
25	73-75	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 尔 1.21mg/kg	等摩	0.121 mg/ml	iv	0	0,7,13	13
26	76-78	3	C57BL/6J/♀/Chow	盐水	-	-	iv	0	0,7,14,16	16
27	79-81	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 1mg/kg	NO 1	10.1 mg/ml	iv	0	0,7,14,16	16
28	82-84	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 4 尔 1.35mg/kg	等摩	0.135 mg/ml	iv	0	0,7,14,16	16

[0762]

29	85-87	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 5 尔 1.28mg/kg	等摩	0.128 mg/ml	iv	0	0,7,14,16	16
30	88-90	3	C57BL/6J/♀/Chow	SEQ ID NO 6 尔 1.21mg/kg	等摩	0.121 mg/ml	iv	0	0,7,14,16	16

[0763] 剂量施用。根据表4利用盐水中配制的10ml/kg BW (根据第0天的体重) 化合物或单独盐水静脉内给药C57BL/6JBom雌性动物 (到达时大概20g) 。

[0764] 肝和肾组织的取样。利用70% CO₂-30% O₂麻醉动物并根据表4通过颈脱位法将其处死。将大肝叶的一半和一个肾切碎并浸入RNAlater中。

[0765] 总RNA分离和第一条链合成。使用Qiagen RNeasy试剂盒(Qiagen cat.no.74106), 根据制造商的说明书, 在RLT裂解缓冲液的存在下, 从通过珠碾磨匀浆的最多30mg组织中提取总RNA。使用来自Ambion的反转录酶试剂, 根据制造商的说明书进行第一条链的合成。

[0766] 对于每一种样品, 利用无RNA酶的H₂O调整0.5μg总RNA至(10.8μl)并将其与2μl随机十倍体(50μM)和4μl dNTP混合物(2.5mM的每一种dNTP)混合并加热至70℃, 3分钟, 其后将样品在冰上快速冷却。向每一种样品中加入2μl 10x缓冲液RT、1μl MMLV反转录酶(100U/μl)和0.25μl RNA酶抑制剂(10U/μl), 随后在42℃温育60分钟, 在95℃热失活酶10分钟, 然后将样品冷却至4℃。cDNA样品以1:5稀释, 使用Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x(Applied Biosystems Cat#4364103)和Taqman基因表达测定(mApoB, Mn01545150_m1和mGAPDH#4352339E), 遵循制造商实验方案进行RT-QPCR, 并在Applied Biosystems RT-qPCR仪器(7500/7900或ViiA7)上以快速模式进行处理。

[0767] 寡聚物含量夹层ELISA: 在给药后不同时间里在管中收集肝和肾样品(100mg)。向样品中加入缓冲液(pH 8.0 100mM NaCl、25mM EDTA、0.25mM Tris)、蛋白酶k(1%, Sigma P4850-5)和2Tungsten Carbide Beads(3mm)(Qiagen), 匀浆8分钟(Retsch MM300, 25Hz [1/s]), 并在37℃温育匀浆过夜。在使用前将样品14000g下旋转15分钟。

[0768] 在肾和肝中如上制备并处理标准1-100μg/g的LNA寡核苷酸。将标准和样品稀释至(100-5000ng/L) 150μl的35nM生物素化和洋地黄毒苷修饰的捕获和检测探针的溶液中(5x SSCT缓冲液[(750mM NaCl, 和75mM柠檬酸钠, 含有0.05% (v/v) Tween-20 pH 7.0)], 并混合1小时。将链霉抗生物素蛋白包被的(Nunc Immobilizer Streptavidin F96 CLEAR module plate Nunc Cat.No.436014)洗涤三次(5x SSCT缓冲液, 300μL)。将样品100μL转移到链霉抗生物素蛋白包被的平板中并在温和震荡下温育1小时。吸干孔并利用300μl的2x SSCT缓冲液(300mM NaCl+30mM柠檬酸钠, 含有0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.0)洗涤3次。向孔中加入在PBST(磷酸缓冲盐水, pH 7.2)中1:4000稀释的100微升抗Dig-AP Fab片段(Roche Applied Science, Cat.No.11 093 274 910)并在温和搅拌下在室温温育1小时。吸干孔并利用300μl的2x SSCT缓冲液洗涤3次。向每孔中加入100微升底物溶液(KPL BluePhos Microwell Phosphatase底物系统50-88-00)。震荡后在615nm处每5分钟分光光度计测量显色的强度。针对标准样品参考测试样品。

[0769] 实施例5: 在体内利用胆固醇缀合物敲减PCSK9 mRNA

[0770] 利用单次剂量的盐水或10mg/kg未缀合的LNA反义寡核苷酸(SEQ ID 7)或以不同接头缀合胆固醇的等摩尔量的LNA反义寡核苷酸注射NMRI小鼠并根据表5在第1-10天将其处死。

[0771] 从肝和肾中分离RNA并利用PCSK9特异性引物和探针进行qPCR以分析PCSK9 mRNA敲减。

[0772] 结论: 与未缀合的化合物(Seq#7)相比, 以及与具有稳定接头的胆固醇缀合物相比, 具有以具有磷酸二酯骨架的2个DNA(Seq#9和#10)组成的接头缀合PCSK9 LNA反义寡核苷酸的胆固醇显示PCSK9的增强的肝敲减(图16)。

[0773] 材料和方法:

[0774] 实验设计:

[0775]

表 5:

部分	组号	动物 ID 号	动物数量	动物品系/性别/饲养	每天的化合物剂量水平	剂量体积 10 时的浓度 ml/kg	施用途径	给药日期	体重, 日期	处死日期
A	1	1-3	3	NMRI/♀/Chow	盐水	-	iv	0	0, 1	1
	2	4-6	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	3	7-9	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 等摩尔 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	5	13-15	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 9 等摩尔 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	6	16-18	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 等摩尔 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 1	1
	7	19-21	3	NMRI/♀/Chow	盐水	-	iv	0	0, 3	3
B	8	22-24	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0, 3	3
	9	25-27	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 等摩尔 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0, 3	3
	11	31-33	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 9 等摩尔 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 3	3
	12	34-36	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 等摩尔 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 3	3

[0776]

C	13	37-39	3	NMRI/♀/Chow	盐水	-	iv	0	0, 7	7
	14	40-42	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0, 7	7
	15	43-45	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 等 摩尔 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0, 7	7
	17	49-51	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 9 等 摩尔 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 7	7
	18	52-54	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 等摩尔 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 7	7
D	19	55-57	3	NMRI/♀/Chow	盐水	-	iv	0	0, 7, 10	10
	20	58-60	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 7 10mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0, 7, 10	10
	21	61-63	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 8 等 摩尔 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0, 7, 10	10
	24	70-72	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 10 等摩尔 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0, 7, 10	10
A	25	73-75	3	NMRI/♀/Chow	盐水	-	iv	0	0, 1	1

[0777] 剂量施用。根据表5利用盐水中配制的10ml/kg BW(根据第0天的体重)化合物或单独盐水静脉内给药NMRI雌性动物(到达时大概20g)。

[0778] 肝和肾组织的取样。利用70% CO₂-30% O₂麻醉动物并根据表4通过颈脱位法将其处死。将大肝叶的一半和一个肾切碎并浸入RNAlater中。

[0779] 使用MagNa Pure 96Cellular RNA大容量试剂盒 (Roche cat no.5467535001), 根据制造商的说明书, 在MagNa Pure LC RNA分离组织缓冲液 (Roche cat.no 03 604 721 001) 的存在下, 从通过珠碾磨匀浆的最多10mg组织中提取总RNA。使用来自Ambion的反转录酶试剂, 根据制造商的说明书进行第一条链的合成。

[0780] 对于每一种样品, 利用无RNA酶的H₂O调整0.5μg总RNA至(10.8μl)并将其与2μl随机十倍体(50μM)和4μl dNTP混合物(2.5mM的每一种dNTP)混合并加热至70℃, 3分钟, 其后将样品在冰上快速冷却。向每一种样品中加入2μl 10x缓冲液RT、1μl MMLV反转录酶(100U/μl)和0.25μl RNA酶抑制剂(10U/μl), 随后在42℃温育60分钟, 在95℃热失活酶10分钟, 然后将样品冷却至4℃。cDNA样品以1:5稀释, 使用Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems Cat#4364103) 和Taqman基因表达测定 (mPCSK9, Mn00463738_m1和mActin#4352341E), 遵循制造商实验方案进行RT-QPCR, 并在Applied Biosystems RT-qPCR仪器(7500/7900或ViiA7)上以快速模式进行处理。

[0781] 实施例6. 不同DNA/PO接头的体外切割

[0782] 在S1核酸酶提取物(图6A)、肝或肾匀浆或血清中体外切割具有不同DNA/PO-接头(PO接头)的FAM-标记的ASOs。

[0783] 在核酸酶缓冲液(60U pr.100μL)中通过S1核酸酶体外切割具有不同DNA/PO-接头的FAM-标记的ASOs 100μM, 20分钟和120分钟(A)。通过向缓冲溶液中加入EDTA终止酶活性。然后使溶液在Dionex Ultimate3000上使用Dionex DNAPac p-100柱和10mM-1M范围内的梯度的高氯酸钠(pH 7.5)进行AIE HPLC分析。使用荧光检测器在615nm处和uv检测器在260nm处针对标准测定切割的和未切割的寡核苷酸的含量。

[0784]	SEQ ID NO	接头序列	20 分钟 S1 后 切割的百分比	120 分钟 S1 后 切割的百分比
	20	--	2	5
	18	a	29.1	100
	17	ca	40.8	100
	16	tca	74.2	100
	19	gac	22.9	n.d

[0785] 结论:PO接头(或如本文所述的区域B)导致缀合物(或基团C)被切掉, 并且接头的长度和/或序列组成可以用于调节区域B对核水解切割的敏感性。DNA/PO-接头的序列可以调节核酸酶S1提取物中20分钟后观察到的切割速率。用于区域B的序列选择(例如用于DNA/PO-接头)因而也可以用于调节血清和靶组织的细胞中的切割水平。

[0786] 利用寡核苷酸SEQ ID NO 16刺穿肝、肾和血清(B)至200μg/g组织的浓度。将从NMRI小鼠收集的肝和肾样品在匀浆缓冲液(0,5% Igepal CA-630、25mM Tris pH 8.0、

100mM NaCl、pH 8.0 (利用1N NaOH调节) 中匀浆。将匀浆在37℃温育24小时,然后利用苯酚-氯仿提取匀浆。使用上述HPLC方法针对标准测定从肝和肾以及从血清中提取的切割的和未切割的寡核苷酸的含量。

[0787]	Seq ID	接头 序列	24 小时后肝匀浆 中切割的百分比	24 小时后肾匀浆 中切割的百分比	24 小时后血浆中 切割的百分比
	16	tca	83	95	0

[0788] 结论:P0接头(或如本文所指的区域B)导致肝或肾匀浆中,但不是血清中缀合物(或基团C)从寡核苷酸上切割。

[0789] 注意:在上述测定中的切割指可切割接头的切割,寡聚体或区域A应该在功能上保持完整。上述测定中对切割的敏感性可以用于测定接头是生物可切割的还是生理学上不稳定的。

[0790] 实施例7a:FVII (1mg/kg) 的体内抑制

[0791] 使用共6个小鼠组 (n=3) 准备体内小鼠研究。以1mg/kg或与SEQ ID#12相比等摩尔向每只小鼠施用单次静脉内剂量的靶向FVII mRNA的LNA化合物。包括盐水对照组。在施用前的第1天将小鼠预先放血,并在施用后第1天和第2天进行后续放血。在第4天处死小鼠,并获得肝、肾和血液样品。对于研究设置参见表7。

[0792] 使用标准的测定技术测定因子VII血清水平、mRNA水平和寡核苷酸组织含量。

[0793] 结论:当与广泛使用的二硫代接头(二硫化物)(P0接头SEQ ID#15与SS接头SEQ ID#14相比)比较时,DNA/P0-接头(P0)在血清中改善FVII蛋白下调了用于FVII mRNA靶向的具有胆固醇缀合物的LNA寡核苷酸。使用GalNA作为缀合物,当与氨基连接的缀合LNA寡核苷酸(P0接头SEQ ID#13与氨基连接的SEQ ID#12相比)比较时,P0接头改善FVII蛋白的下调。已知GalNAc缀合物是生物可切割的(可能是由于肽接头),并且像这样,看起来P0接头还进一步增强靶细胞中活性和有效化合物的释放。这些数据与mRNA表达数据对应(图19)。肾和肝中的寡核苷酸组织含量显示缀合物如何改变分布(图20)。观察到两种胆固醇缀合的化合物给出了类似的分布(比较SEQ ID#14和#15),所以利用P0接头化合物(SEQ ID#15)的增强的mRNA和FVII蛋白质下调,可以观察到当与SEQ ID#14相比时,P0接头如何增强靶向FVII的LNA寡核苷酸的活性。

[0794] 材料和方法:

[0795] 实验设计:

[0796] 表7:

[0797]	组	化合物	给药后的终止时间点	组的大小	剂量 (d0)
--------	---	-----	-----------	------	---------

[0798]

				mg/kg
1	盐水	d4	3	none
2	SEQ ID #11	d4	3	1
3	SEQ ID #12			1
4	SEQ ID #13			1
5	SEQ ID #14	d4	3	1
6	SEQ ID #15	d4	3	1

[0799] 静脉内施用雌性小鼠,并且在第4天处死时取样肝、肾和血液。在给药前,还在给药后第1和2天进行额外的放血。

[0800] 实施例7b:FVII (0,1和0,25mg/kg) 的体内抑制

[0801] 使用共7个小鼠组 (n=3) 准备体内小鼠研究。以与SEQ ID#12相比以等摩尔量的0,1mg/kg或0,25mg/kg向每只小鼠施用单次静脉内剂量的靶向FVII mRNA的LNA化合物。包括盐水对照组。在施用前的第1天将小鼠预先放血,并在施用后第4、7、11、14和18天进行后续放血。在第24天处死小鼠,并获得肝、肾和血液样品。对于研究设置参见表8。

[0802] 使用标准的测定技术测定因子VII血清水平、mRNA水平和寡核苷酸组织含量。

[0803] 结论:当与广泛使用的二硫代接头 (P0接头SEQ ID#15与SS接头SEQ ID#14相比) 比较时,0,1mg/kg和0,25mg/kg的DNA/P0-接头 (P0) 提高了靶向的FVII mRNA具有胆固醇缀合物的LNA寡核苷酸的FVII蛋白下调 (图21)。使用GalNA作为缀合物,当与氨基连接的缀合LNA寡核苷酸 (P0接头SEQ ID#13与氨基连接的SEQ ID#12相比) 比较时,mRNA数据 (图22) 提示P0接头改善了下调。mRNA表达数据 (图22) 支持P0接头化合物 (SEQ ID#15) 相比于二硫代连接的缀合物 (SEQ ID#14) 的提高了活性。肾和肝中的寡核苷酸组织含量显示缀合物如何改变分布 (图23)。数据提示,在胆固醇缀合物和GalNAc缀合物的这些剂量范围内,P0接头增强了肝和肾中的吸收 (比较SEQ ID#14和#15并比较SEQ ID#13与#12)。

[0804] 材料和方法:

[0805] 实验设计:

[0806] 表8:

[0807]

组	化合物	给药后的终止时间点	组的大小	剂量 (d0) mg/kg
1	盐水	d24	3	无
2	SEQ ID #12	d24	3	0,1
3	SEQ ID #13	d24	3	0,1
4	SEQ ID #14	d24	3	0,1
5	SEQ ID #14	d24	3	0,25
6	SEQ ID #15	d24	3	0,1
7	SEQ ID #15	d24	3	0,25

[0808] 静脉内施用雄性小鼠,并且在第24天处死时取样肝、肾和血液。在给药前,还在给药后第4、7、11、14和18天进行额外的抽血。

[0809] 实施例8. 利用不同缀合物和P0接头体内沉默ApoB mRNA

[0810] 为了探究生物可切割的DNA/P0接头对额外缀合物的影响,利用盐水对照或利用单次剂量的1mg/kg kg亲本化合物#1或缀合单-GalNAc、叶酸、Fam或生育酚的等摩尔AS0(没有生物可切割接头、具有二硫代接头(SS)或具有DNA/P0接头(P0))静脉内处理C57BL6I小鼠。7天后,处死动物并从肝和肾样品中分离RNA,分析ApoB mRNA表达(图24)。

[0811] 结论:

[0812] 对于所有4种缀合物,DNA/P0接头相比于广泛使用的二硫代接头(比较#27与#26、#30与#29、#33与#32和#36与#35)在肝中改善了ApoB敲减。对于单-GalNAc和生育酚,DNA/P0接头甚至相比于未缀合的化合物(比较#30和#36与#1)在肝中改善了ApoB的敲减。与DNA/P0接头组合的生育酚显示将化合物从肾中重新指向肝中的能力(比较A和B,#36与#1)。

[0813] 材料和方法:

[0814] 实验设计:

[0815] 表9:

[0816]

组号	动物 ID 号	动物品系/性别/饲料	化合物 Seq ID, 剂量 1 mg/kg	施用途径	给药日期	处死日期
1	1-5	NMRI ♀ - Chow	1	i.v.	0	7
2	5-10	NMRI ♀ - Chow	28	i.v.	0	7
3	11-15	NMRI ♀ - Chow	29	i.v.	0	7
4	16-20	NMRI ♀ - Chow	30	i.v..	0	7
5	21-25	NMRI ♀ - Chow	25	i.v.	0	7
6	26-30	NMRI ♀ - Chow	26	i.v.	0	7
7	31-35	NMRI ♀ - Chow	27	i.v.	0	7
8	36-40	NMRI ♀ - Chow	NaCl 0.9%	i.v.	0	7

[0817]

组号	动物 ID 号	动物品系/性别/饲料	化合物 Seq ID, 剂量 1 mg/kg	施用途径	给药日期	处死日期
1	1-5	NMRI ♀ - Chow	1	i.v.	0	7
2	5-10	NMRI ♀ - Chow	31	i.v.	0	7
3	11-15	NMRI ♀ - Chow	32	i.v.	0	7
4	16-20	NMRI ♀ - Chow	33	i.v..	0	7
5	21-25	NMRI ♀ - Chow	34	i.v.	0	7
6	26-30	NMRI ♀ - Chow	35	i.v.	0	7

[0818]

组号	动物 ID 号	动物品系/性别/饲料	化合物 Seq ID, 剂量 1 mg/kg	施用途径	给药日期	处死日期
7	31-35	NMRI ♀ - Chow	36	i.v.	0	7
8	36-40	NMRI ♀ - Chow	NaCl 0.9%	i.v.	0	7

[0819] 剂量施用和取样。利用在盐水中配制的单次剂量的1mg/kg ASO或单独盐水,根据上表静脉内给药C57BL6小鼠。给药后第7天处死动物并取样肝和肾。

[0820] RNA分离和mRNA分析。从肝和肾样品中提取总RNA并使用branched DNA测定分析ApoB mRNA水平。

[0821] 实施例9.利用具有P0-接头的成环LNA ASO体外沉默靶标X mRNA

[0822] 保护基团在ASOs的耐受性、特异性或降低的脱靶效果方面可能是有益的,但是在保留原始的未阻断的ASO的活性方面是有挑战性的。作为保护基团的实例,我们使用通过非互补核苷酸延伸与寡核苷酸连接的互补序列,产生发夹环。环中未配对的碱基是具有磷酸二酯骨架(P0接头)的3DNA核苷酸或具有硫代磷酸酯骨架的相同DNA核苷酸。为了测试成环LNA-ASOs的活性,在gymnosis测定中利用1 μ M ASO处理Neuro 2a细胞,并且提取RNA,进行RT-QPCR以分析靶标X mRNA敲减(图25)。

[0823] 结论:具有P0接头的成环ASOs(Seq ID#21和#23)与没有P0接头的相同ASO序列(Seq ID#22和#24)相比显示提高的靶标X mRNA敲减。

[0824] 材料和方法:

[0825] N2a细胞中的gymnosis测定:

[0826] 将Neuro 2a(小鼠成神经细胞瘤)细胞以 1.8×10^4 细胞/孔接种到24孔平板中,并在DMEM+Glutamax(gibco-life,#61965-026)、2mM谷氨酰胺、10% FBS、1mM丙酮酸钠、25 μ g/ml庆大霉素中分别利用具有和没有P0接头的1 μ M成环LNA ASOs进行处理。

[0827] 总RNA分离和第一条链合成。在6天gymnosis后,使用Qiagen RNeasy试剂盒(Qiagen cat.no.74106),根据制造商的说明书提取总RNA。使用来自Ambion的反转录酶试剂,根据制造商的说明书进行第一条链的合成。

[0828] 对于每一种样品,0.5 μ g总RNA与2 μ l随机十倍体(50 μ M)和4 μ ldNTP混合物(2.5mM的每一种dNTP)混合并加热至70 $^{\circ}$ C,3分钟,其后将样品在冰上快速冷却。向每一种样品中加入2 μ l 10x缓冲液RT、1 μ lMMLV反转录酶(100U/ μ l)和0.25 μ l RNA酶抑制剂(10U/ μ l),随后在42 $^{\circ}$ C温育60分钟,在95 $^{\circ}$ C热失活酶10分钟,然后将样品冷却至4 $^{\circ}$ C。cDNA样品以1:5稀释,使用Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x(Applied Biosystems Cat#4364103)和针对靶标X的Taqman基因表达测定,遵循制造商的方案进行RT-QPCR,并在Applied Biosystems RT-qPCR仪器(ViiA7)上以快速模式进行处理。将靶标X mRNA表达针对 β 肌动蛋白mRNA表达(mBACT#4352341E)进行归一化,并与模拟mRNA水平进行比较。

[0829] 实施例10:非人灵长类研究

[0830] 该研究的主要目标是研究向猕猴单次缓慢推注注射抗PCSK9和抗ApoB LNA缀合的化合物7周后所选脂质标志物并在猴子中评估化合物的潜在毒性。该研究中使用的化合物是SEQ ID NOs 46和49,5和54,其在无菌盐水(0.9%)中以0.625和2.5mg/ml的初始浓度制备。

[0831] 使用至少24个月大小的雄性(PCSK9)或雌性猴子(ApoB),并自由获取自来水并且180g的MWM(E)SQC SHORT expanded饮食(Dietex France,SDS,Saint Gratien,France)将按每只动物每天进行分配。将根据当天笼中的动物数量计算每个笼子中分配的食物总量。此外,每天给予每只动物水果或蔬菜。在治疗期开始之前使动物适应研究条件至少14天的时间。在该期间内,将进行处理前研究。以例如0.25mg/kg或1mg/kg的剂量静脉内给药动物。剂量体积将是0.4mL/kg。每组使用2只动物。三周后,将分析数据并且可以起始使用较高或较低给药方案的第二组动物-初步给药设置是0.5mg/kg和1mg/kg,或低于基于第一数据组的设置。

[0832] 将在第1天施用剂量制剂。治疗后观察动物7周的时间,并且在第51天从研究中释

放。第1天对应于治疗时期的第一天。在研究之前和研究过程中记录临床观察和体重以及食物摄取(每组)。

[0833] 在以下时间点上取样血液并分析:

研究日期	参数
-8	RCP, L, Apo-B, PCSK9*, OA
-1	L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
1	给药
4	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, OA
[0834] 8	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
15	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
22	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
29	L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
36	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
43	L, PK, Apo-B, PCSK9* PK, OA
50	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA

[0835] RCP 0常规临床病理学, LSB=肝安全性生物化学, PK=药物动力学, OA=其他分析, L=脂质。

[0836] 血液生物化学:

[0837] 将在下文指示的时机为所有存活的动物测定以下参数:

[0838] • 全生物化学组(下文完整的列表)-在第8天、15天和50天,

[0839] • 肝安全性(仅ASAT、ALP、ALAT、TBIL和GGT)-在第4天、8天、22天和36天,

[0840] • 脂质谱(总胆固醇HDL-C、LDL-C和甘油三酯)和仅Apo-B-在第1天、4天、8天、22天、29天、36天和43天。

[0841] 将血液(大概1.0mL)放到肝素锂管中(使用ADVIA 1650血液生物化学分析仪): Apo-B、钠、钾、氯化物、钙、无机磷、葡萄糖、HDL-C、LDL-C、尿素、肌酸酐、总胆红素(TBIL)、总胆固醇、甘油三酯、碱性磷酸酶(ALP)、丙氨酸转氨酶(ALAT)、天冬氨酸转氨酶(ASAT)、肌酸激酶、 γ -谷氨酰转移酶(GGT)、乳酸脱氢酶、总蛋白、白蛋白、白蛋白/球蛋白比。

[0842] 血液分析: 仅在第-8天、-1天、4天、8天、15天、22天、29天、36天、43天和50天从组16动物中收集用于PCSK9分析的血液样品。

[0843] 将从每只动物合适的静脉内收集静脉血(大概2mL)到Serum Separating Tube (SST)中并允许在室温下凝固至少60 $\pm$ 30分钟。将在离心条件(设置以维持+4 $^{\circ}$ C)将血液1000g离心10分钟。将血清转移到3个单独的管中并储存于-80 $^{\circ}$ C直至在CitoxLAB France上使用ELISA方法(Circulex Human PCSK9 ELISA试剂盒, CY-8079, 证实用于来自猕猴的样品)进行分析。

[0844] 其他分析: W02011009697&W02010142805提供了用于以下分析的方法: qPCR、PCSK9/ApoB mRNA分析, 其他分析包括PCSK9/ApoB蛋白质ELISA、利用ELISA的血清Lp(a)分

析(Mercodia No.10-1106-01)、组织和血浆寡核苷酸分析(药物含量)、样品、标准和QC样品的提取、通过ELISA的寡核苷酸含量测定。

[0845] 实施例11:大鼠中的肝和肾毒性评估

[0846] 可以在啮齿类,如小鼠或大鼠中评估本发明的化合物的毒性谱。例如可以使用以下方案:使用年龄大概8周龄的Wistar Han Cr1:WI (Han)。在该年龄时,雄性应该称重大约250g。所有动物均可以自由接受SSNIFF R/M-H丸粒化的维持饮食(SSNIFF **Spezialdiäten** GmbH, Soest, Germany)和瓶中含有的自来水(利用0.22 μ m过滤器过滤)。使用10和40mg/kg/剂量的剂量水平(皮下施用)并在第1天和第8天给药。在第15天将动物安乐死。在第7天和第14天收集尿和血液样品。在第14天进行临床病理学评估。在研究前、施用的第一天和尸体解剖前1周测量体重。每天评估每组的食物消耗。6小时禁食后通过尾静脉获取血液样品。进行以下血清分析:红细胞计数、平均细胞容积、红细胞压积、血红蛋白、平均细胞血红蛋白浓度、平均细胞血红蛋白血小板计数、白细胞计数、具有细胞形态的差异白细胞计数、钠、钾、氯化物、无机磷、葡萄糖、尿素、肌酸酐、总胆红素、总胆固醇、甘油三酯、碱性磷酸酶、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、总蛋白、白蛋白、白蛋白/球蛋白比。尿分析进行 α -GST、 β -2微球蛋白、钙结合蛋白、丛生蛋白、半胱氨酸蛋白酶抑制剂C、KIM-1、骨桥蛋白、TIMP-1、VEGF和NGAL。将在Panel 1 (**MILLIPLEX**[®] MAP Rat Kidney Toxicity Magnetic Bead Panel 1, RKT1MAG-37K)下定量七种分析物(钙结合蛋白、丛生蛋白、GST- α 、KIM-1、骨桥蛋白、TIMP-1、VEGF)。将在Panel 2 (**MILLIPLEX**[®] MAP Rat Kidney Toxicity Magnetic Bead Panel 2, RKT2MAG-37K)下定量三种分析物(β -2微球蛋白、半胱氨酸蛋白酶抑制剂C、载脂蛋白-2/NGAL)。用于测定大鼠尿中这些生物标志物浓度的测定基于Luminex **xMAP**[®]技术。利用两种不同的荧光染料颜色编码利用抗 α -GST/ β -2微球蛋白/钙结合蛋白/丛生蛋白/半胱氨酸蛋白酶抑制剂C/KIM-1/骨桥蛋白/TIMP-1/VEGF/NGAL抗体包被的微球体。测定以下参数(使用ADVIA 1650的尿):尿蛋白、尿肌酐。定量参数:容积、pH(使用10-Multistix SG检测条/Clinitek 500尿分析仪)、比重(使用折光仪)。半定量参数(使用10-Multistix SG检测条/Clinitek 500尿分析仪):蛋白质、葡萄糖、酮、胆红素、亚硝酸盐、血液、尿胆素原、沉淀物的细胞学(通过显微镜检查)。定量参数:外观、颜色。处死后,测定体重和肾、肝和脾重量并计算器官与体重的比值。将获取肾和肝样品并冷冻或储存在福尔马林中。进行显微镜分析。

[0847] 本发明可以包括以下示例性实施方案:

[0848] 1. 长度为8-35个核苷酸的寡聚化合物,其包含三个区域:

[0849] i) 第一个区域(区域A),其包含7-26个连续核苷酸;

[0850] ii) 第二个区域(区域B),其包含1-10个核苷酸,所述区域如通过核苷间连接基团,如磷酸二酯连接共价连接第一个区域的5'或3'核苷酸,其中

[0851] a. 第一个和第二个区域之间的核苷间连接是磷酸二酯连接并且邻接第一个区域的第二个区域的核苷是DNA或RNA;和/或

[0852] b. 第二个区域的至少1个核苷是磷酸二酯连接的DNA或RNA核苷;

[0853] iii) 第三个区域,其包含缀合物部分、靶向部分、反应基团,或阻断部分,其中第三个区域共价连接第二个区域。

[0854] 2. 实施方案1的寡聚体,其中第一个区域的核苷间连接包含除磷酸二酯以外的至少一个核苷间连接,如区域A中的至少一个,如至少50%、如至少75%、如至少90%、如至少100%核苷间连接是除磷酸二酯以外的连接。

[0855] 3. 实施方案1或2的寡聚体,其中除磷酸二酯以外的核苷间连接是含硫的核苷间连接,如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和硼代磷酸酯,如硫代磷酸酯。

[0856] 4. 实施方案1-3任一项的寡聚体,其中所述第一个区域是反义寡聚体,其包含与核酸靶标互补的序列。

[0857] 5. 实施方案4的寡聚体,其中所述核酸靶标选自microRNA、mRNA。

[0858] 6. 实施方案1-5任一项的寡聚体,其中所述第一个区域包含至少一个核苷类似物。

[0859] 7. 实施方案6的寡聚体,其中所述寡聚体,如第一个区域,包含gapmer、mixmer或totalmer。

[0860] 8. 实施方案6或7的寡聚体,其中所述寡聚体,如第一个区域,包含至少一个双环核苷酸类似物(LNA)。

[0861] 9. 实施方案1-8任一项的寡聚体,其中所述第一个区域和所述第二个区域形成连续核苷酸序列。

[0862] 10. 实施方案1-9任一项的寡聚体,其中所述第二个区域在第一个区域的5'。

[0863] 11. 实施方案1-9任一项的寡聚体,其中所述第二个区域在第一个区域的3'。

[0864] 12. 实施方案1-11任一项的寡聚体,其中所述第二个区域包含至少两个,如至少三个连续核苷单元,所述单元选自DNA和RNA单元,其可通过磷酸二酯连接而连接。

[0865] 13. 实施方案1-12任一项的寡聚体,其中所述第二个区域在第二个区域的末端核苷(即3'或5'末端,取决于第一个区域的位置)处共价连接第三个区域。

[0866] 14. 实施方案1-13任一项的寡聚体,其中所述第三个区域包含非核苷酸部分,如缀合物基团,如固醇,例如胆固醇,或糖类,如GalNac/GalNac簇。

[0867] 15. 实施方案14的寡聚体,其中所述第三个区域包含选自亲脂基团(例如脂质、脂肪酸、固醇)、蛋白质、肽、抗体或其片段、聚合物、报告基团、染料、受体配体、小分子药物、前体药物和维生素的部分。

[0868] 16. 实施方案1-13任一项的寡聚体,其中所述第三个区域包含核酸或其聚合物,如适体,或阻断核苷酸序列。

[0869] 17. 实施方案1-16任一项的寡聚体,其中所述第三个区域包含靶向基团。

[0870] 18. 实施方案1-13任一项的寡聚体,其中所述第三个区域包含激活的基团。

[0871] 19. 实施方案1-18任一项的寡聚体,其中所述第二个和第三个区域通过接头基团共价结合。

[0872] 20. 实施方案1-19任一项的寡聚体,其中第二个和第三个区域之间的接头基团包含选自磷酸二酯、硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯或硼代磷酸酯基团的基团,如磷酸二酯基团。

[0873] 21. 药物组合物,其包含前述实施方案任一项的寡聚化合物,和药学上可接受的稀释剂、载体、盐或佐剂。

[0874] 22. 前述实施方案任一项的寡聚化合物用于在细胞中抑制核酸靶标。

[0875] 23. 前述实施方案任一项的寡聚化合物用于医学。

[0876] 24. 前述实施方案任一项的寡聚化合物用于治疗医学疾病或病症。

[0877] 25. 前述实施方案任一项的寡聚化合物用于制备治疗疾病或病症, 如代谢疾病或病症的药物的用途。

[0878] 26. 合成如实施方案1-25中所定义的寡聚化合物的方法, 所述寡聚化合物包含第一个区域、第二个区域和第三个区域, 和任选地接头区域(Y), 所述方法包括:

[0879] a) 提供[固相]寡核苷酸合成支持物的步骤, 以下之一附着到所述支持物上[第三个区域]:

[0880] i) 接头基团(-Y-)

[0881] ii) 选自缀合物、靶向基团、保护基团、反应基团[例如胺或醇]或激活基团(X-)的基团

[0882] iii) -Y-X基团

[0883] 和

[0884] b) 区域B后接区域A的[连续]寡核苷酸合成的步骤,

[0885] 和/或:

[0886] c) 第一个区域(A)和第二个区域(B)的[连续]寡核苷酸合成的步骤, 其中所述合成步骤后接

[0887] d) 添加第三个区域的步骤[亚磷酰胺包含]

[0888] i) 接头基团(-Y-)

[0889] ii) 选自缀合物、靶向基团、保护基团、反应基团[例如胺或醇]或激活基团(X-)的基团

[0890] iii) -Y-X基团

[0891] 后接

[0892] e) 从[固相]支持物上切割寡聚化合物

[0893] 其中, 任选地所述方法还包括选自以下的其他步骤:

[0894] f) 其中所述第三个基团是激活基团, 激活所述激活基团产生反应基团的步骤, 后接任选地通过接头基团(Y)向反应基团添加缀合物、保护基团或靶向基团;

[0895] g) 其中所述第三个基团是反应基团, 任选地通过接头基团(Y)向反应基团添加缀合物、保护基团或靶向基团的步骤,

[0896] h) 其中所述第三个基团是接头基团(Y), 向接头基团(Y)添加缀合物、保护基团或靶向基团的步骤

[0897] 其中在从寡核苷酸合成支持物上切割寡聚化合物之前或之后进行步骤f)、g)或h)。

[0898] 27. 在需要治疗的受试者中治疗疾病或病症的方法, 所述方法包括以治疗有效量向所述受试者施用包含本发明的寡聚化合物的药物组合物的步骤。

[0899] 28. 在细胞中抑制靶基因表达的方法, 所述方法包括以有效降低靶基因在所述细胞中表达的量适当地向表达所述靶基因的细胞施用本发明的寡聚化合物。

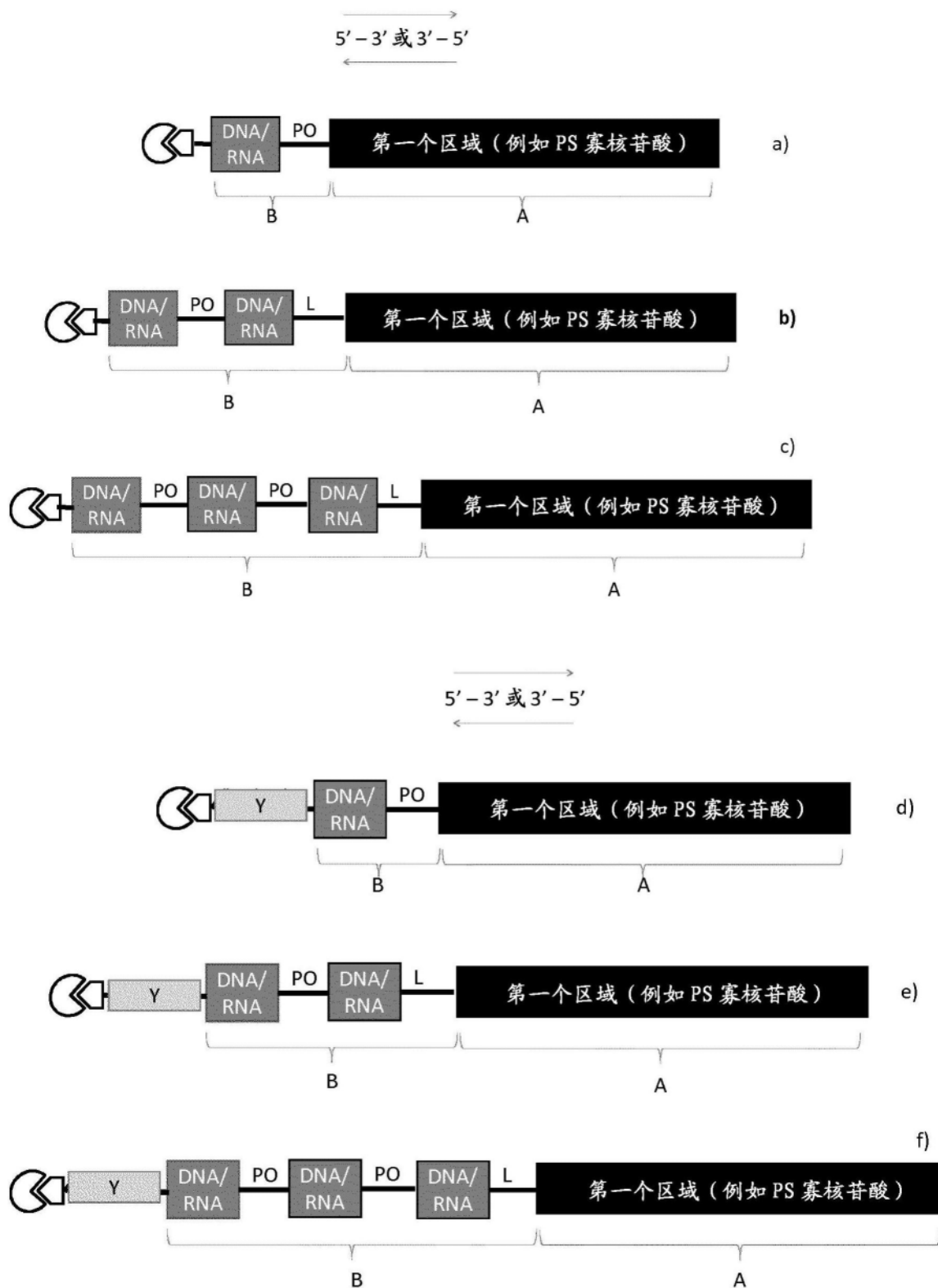


图1

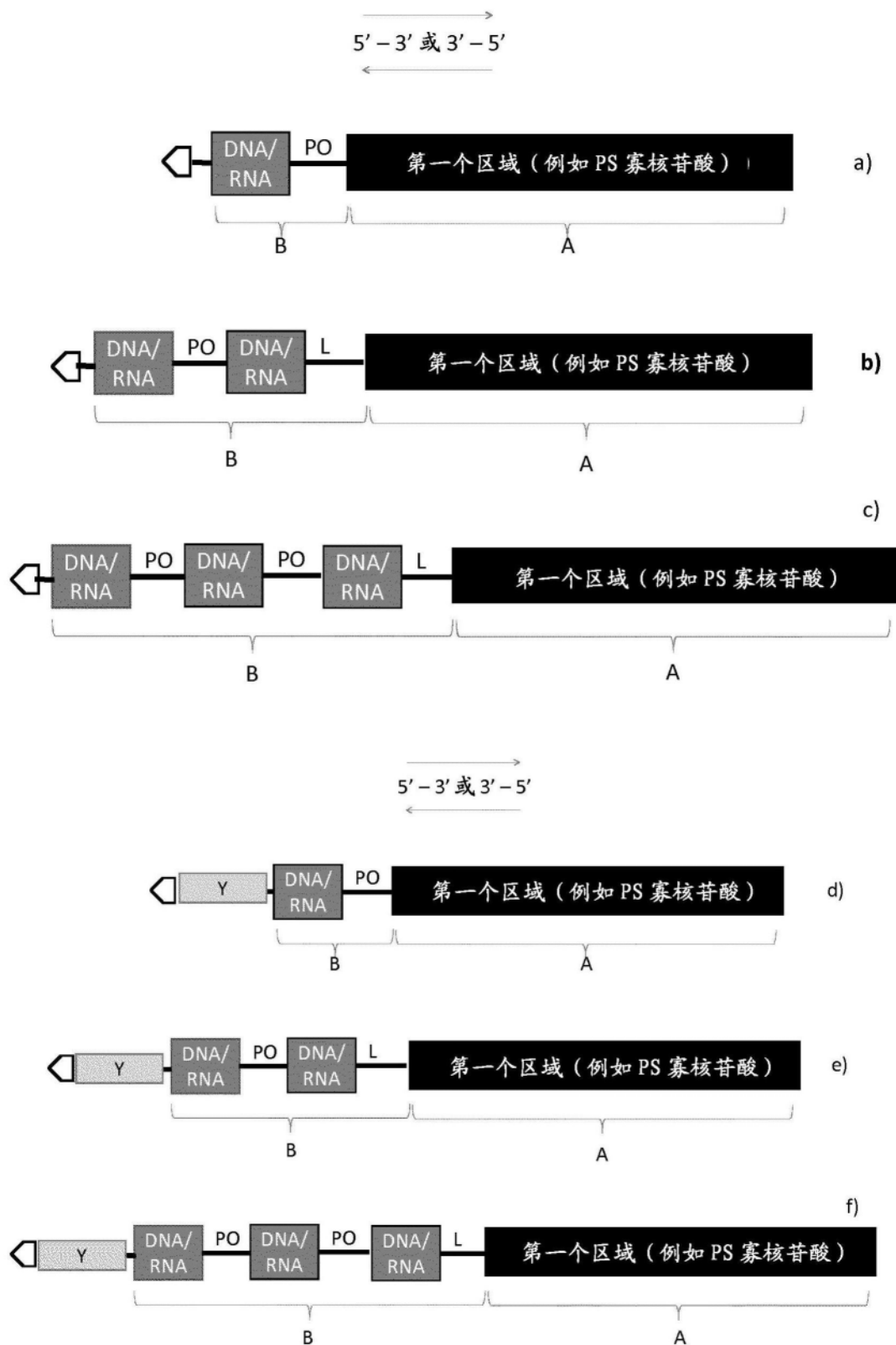


图2

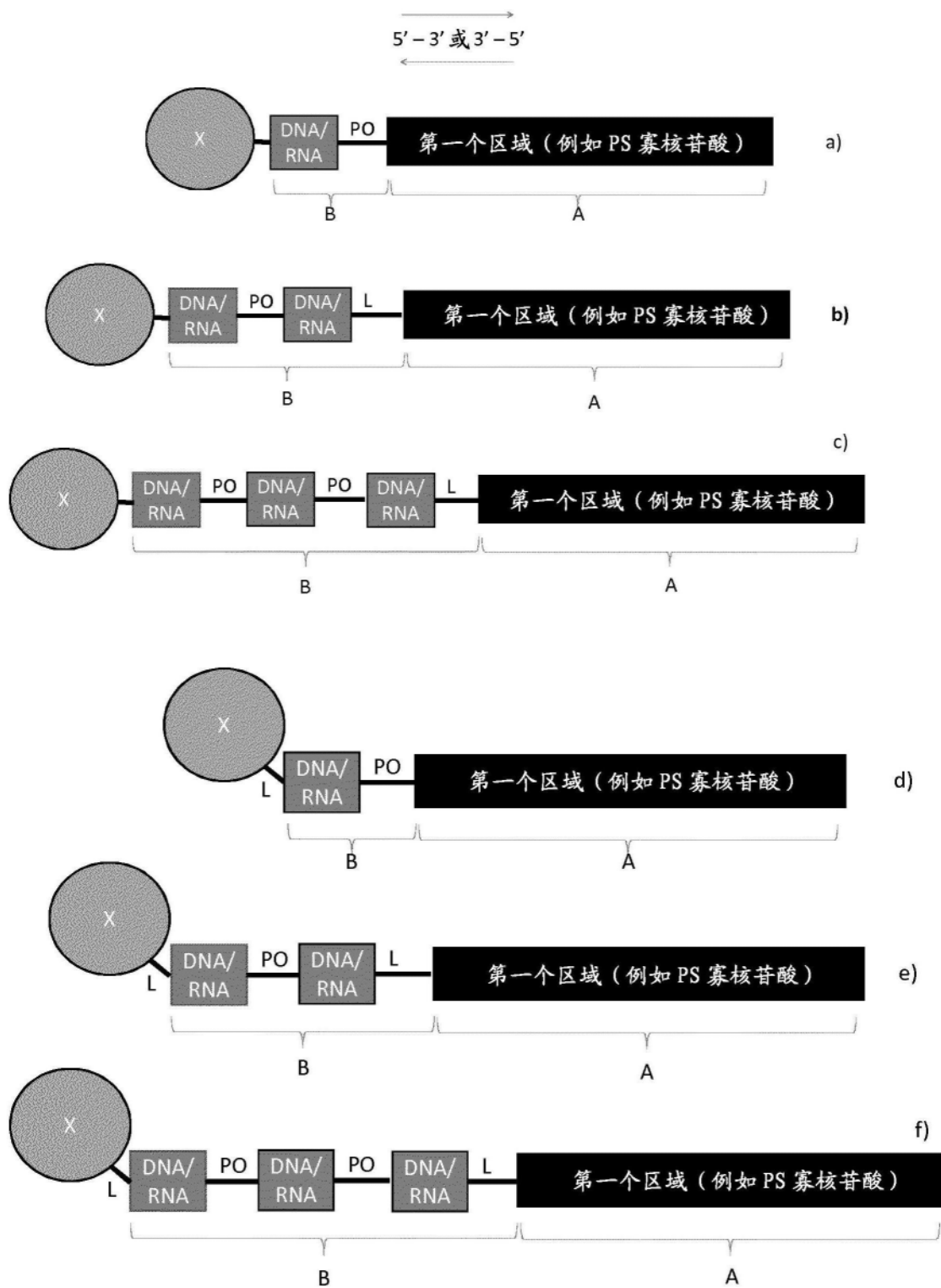


图3

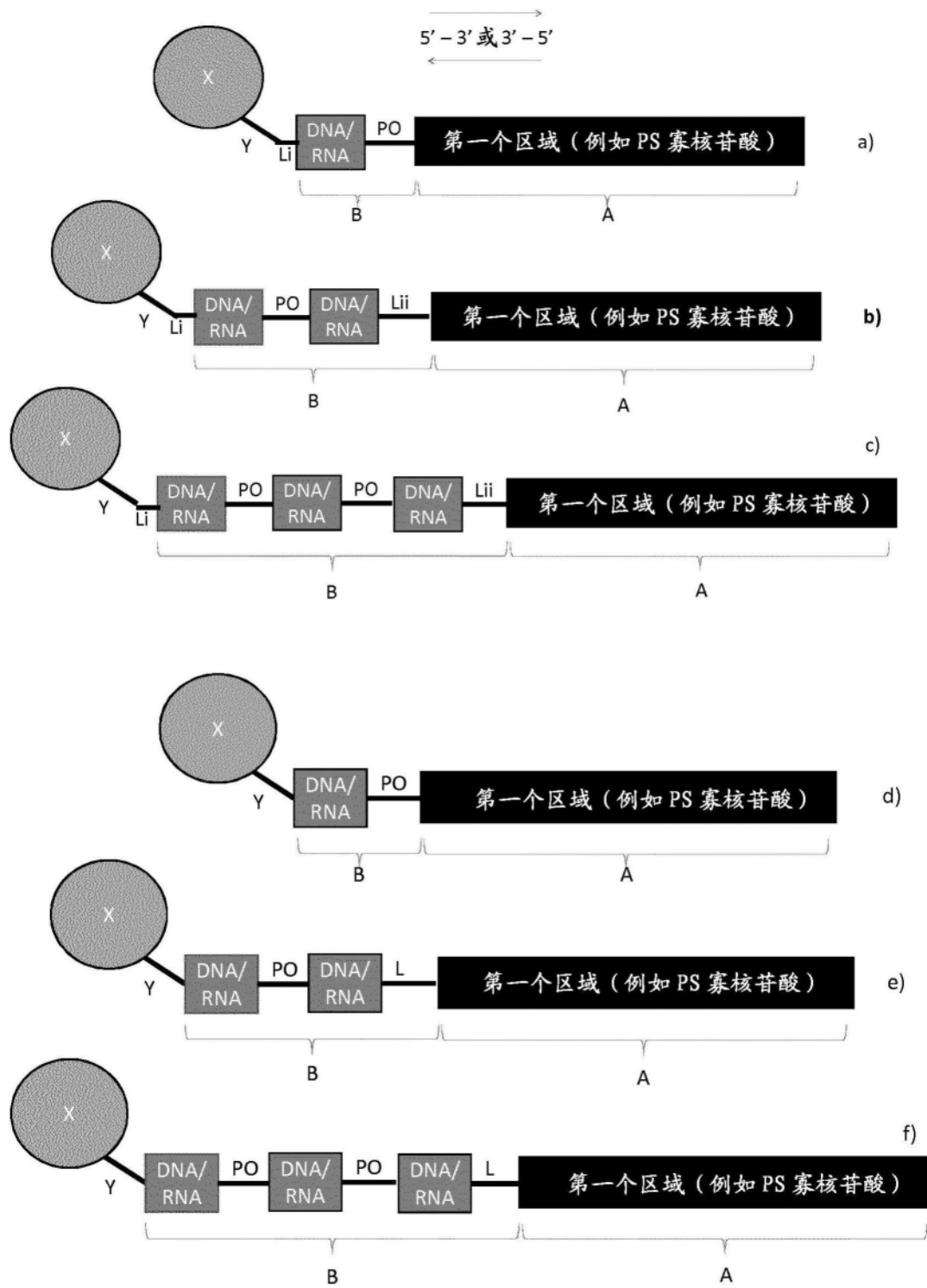


图4

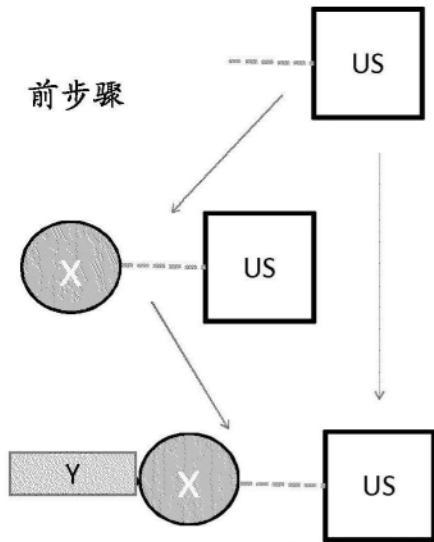


图 5a

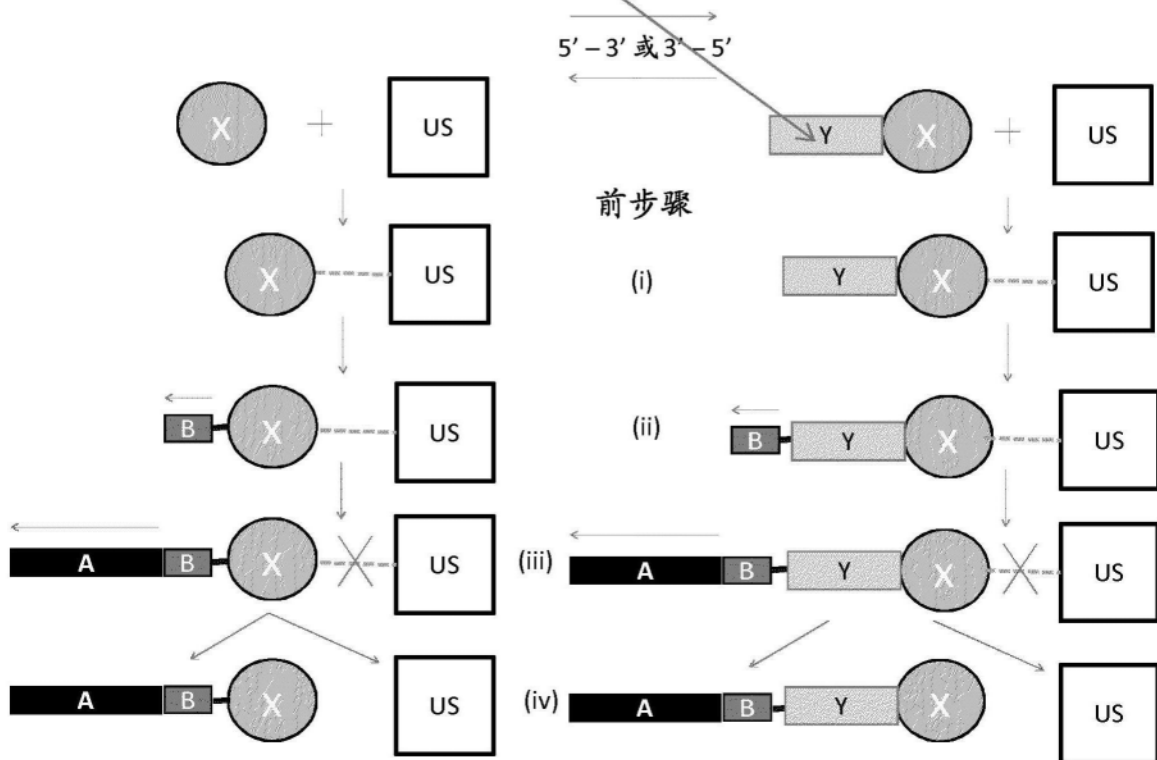


图 5b

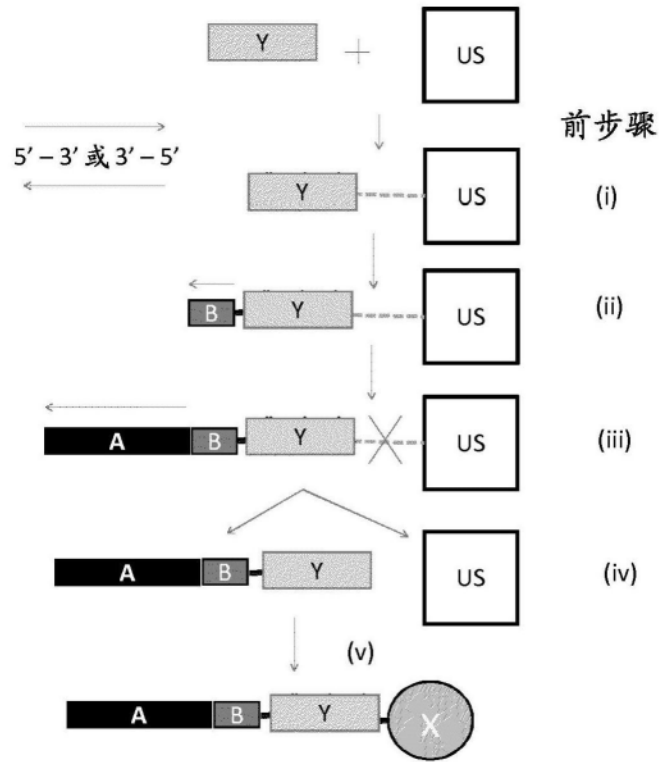


图6

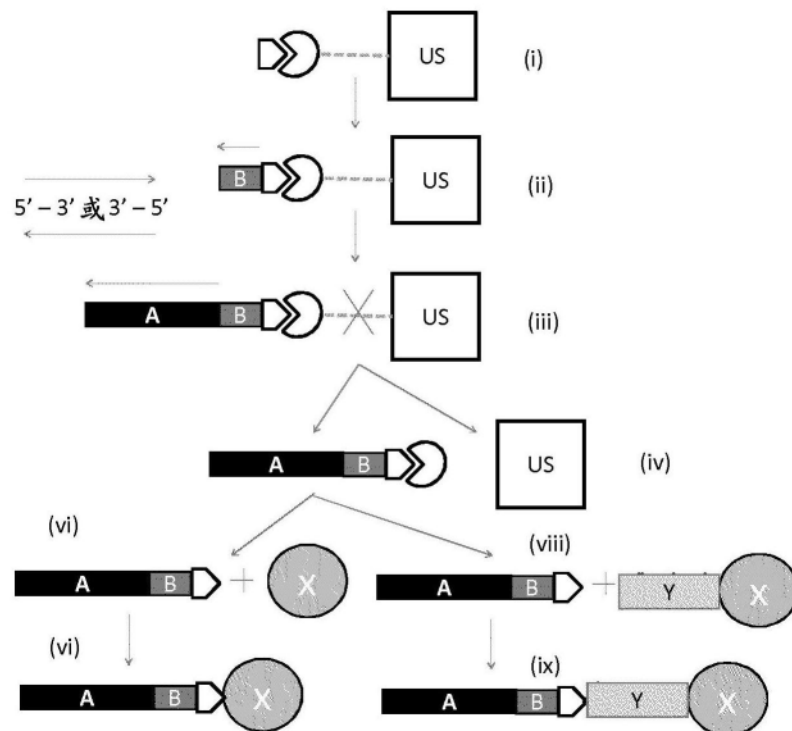


图7

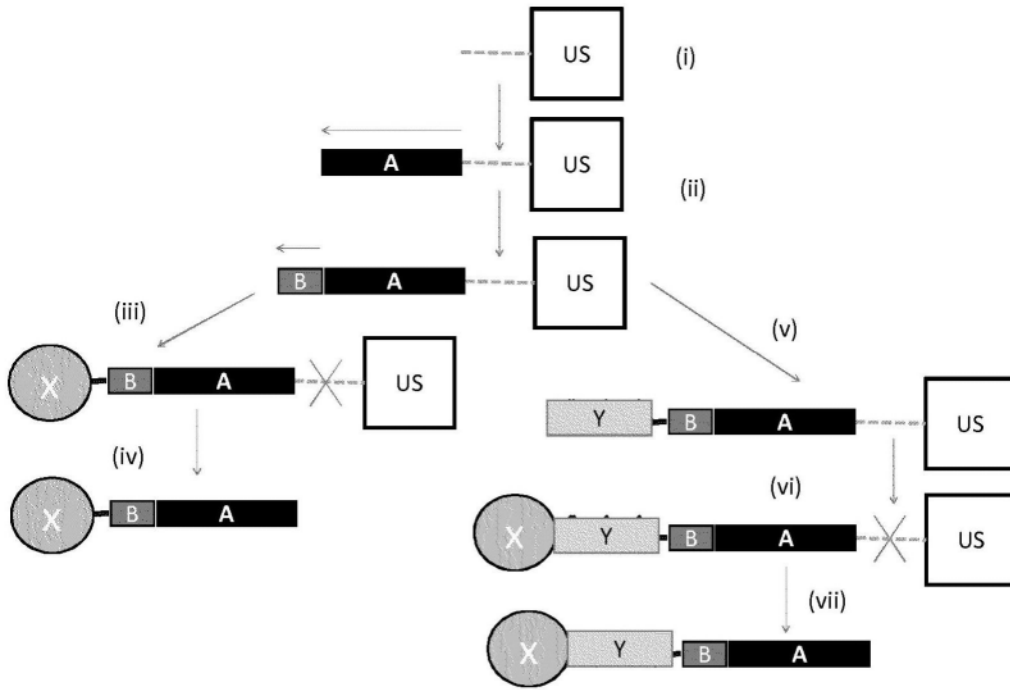


图9

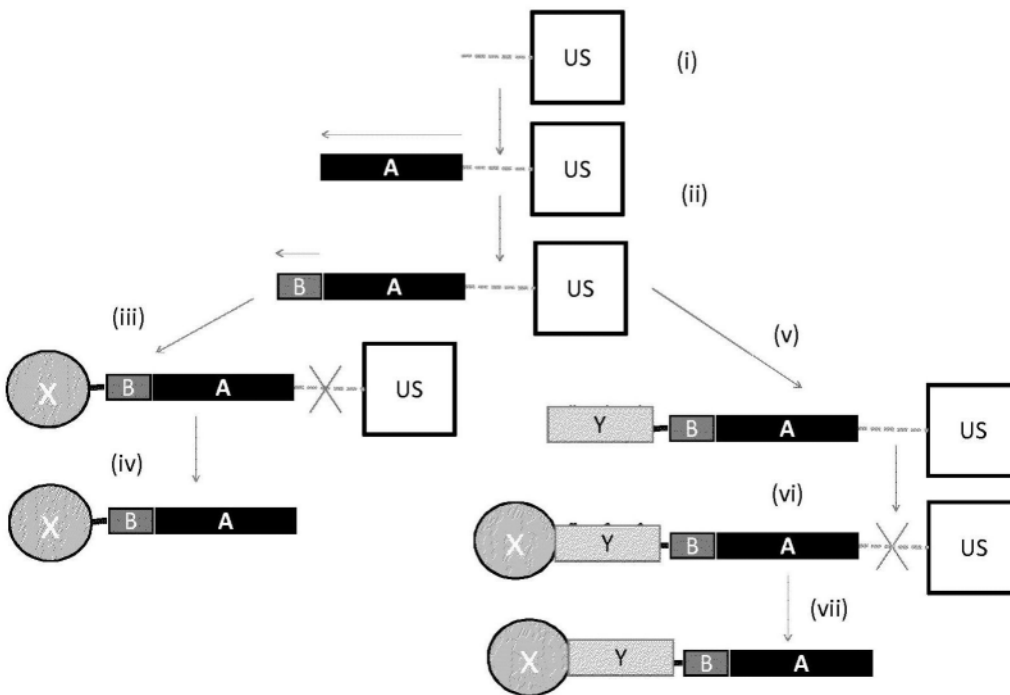


图10

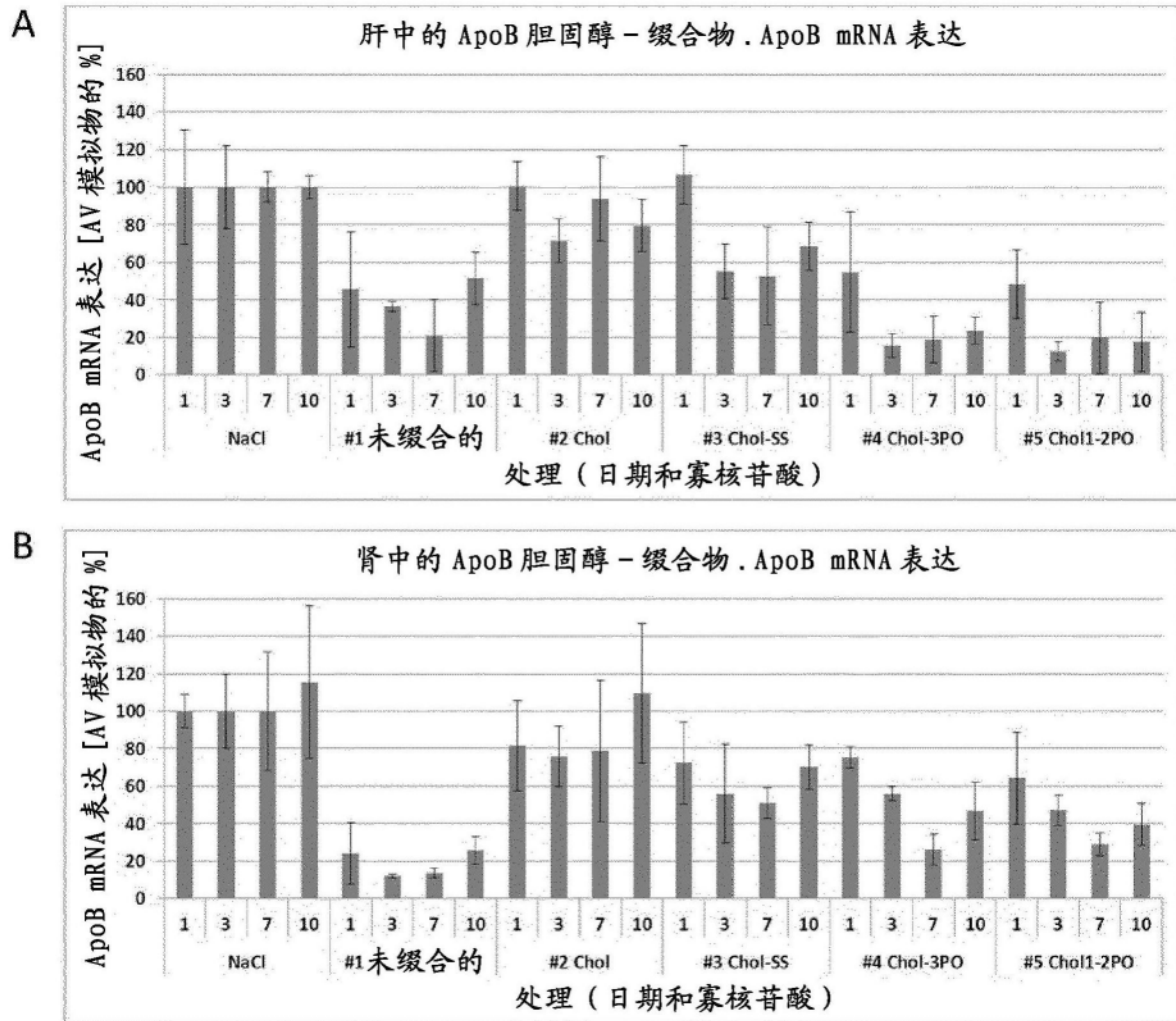


图11

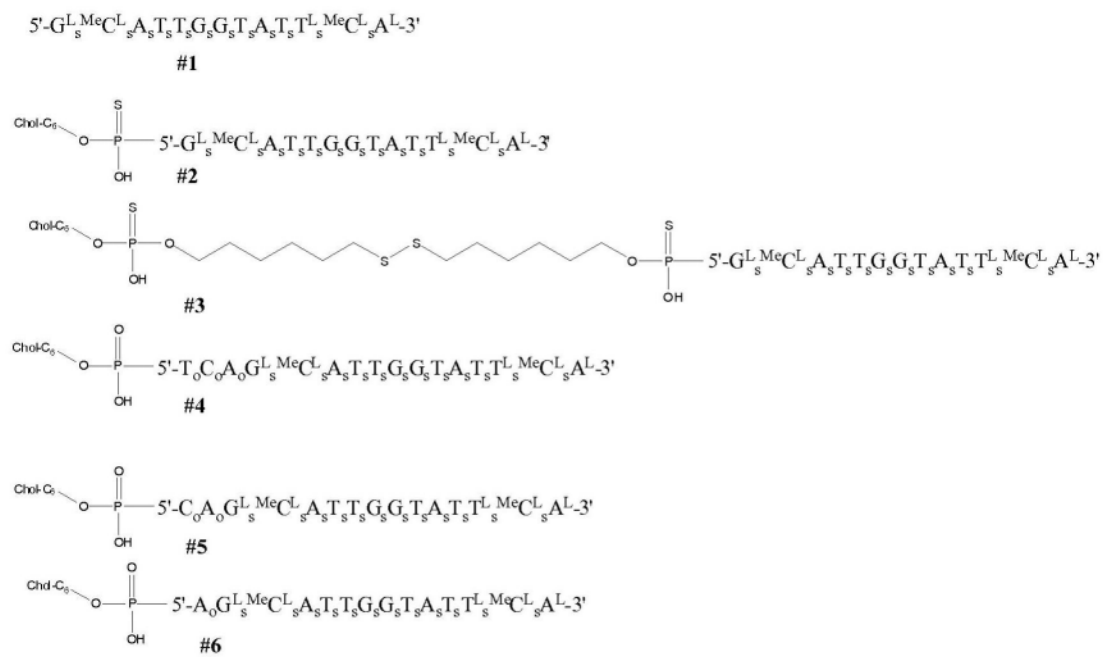


图12

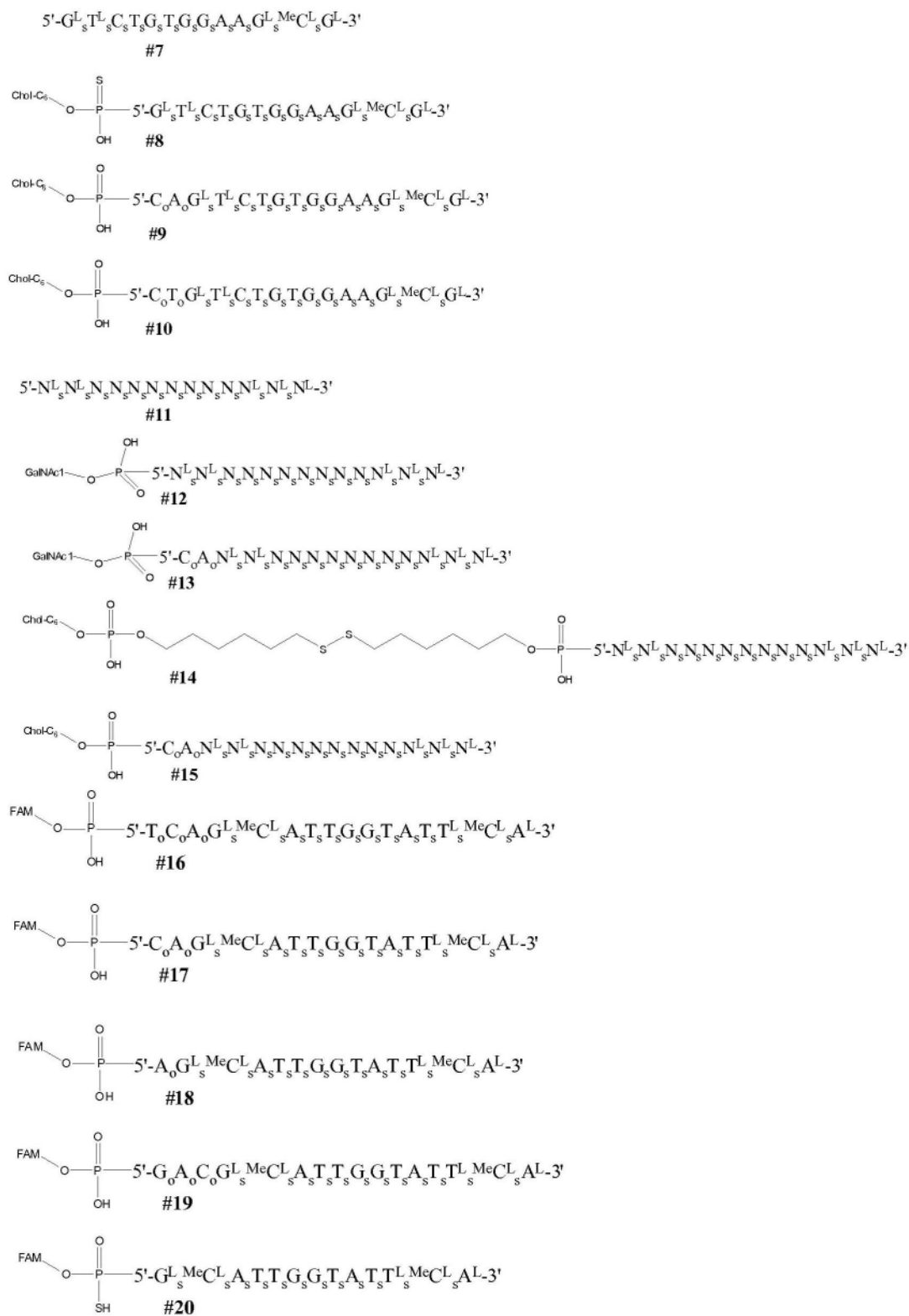
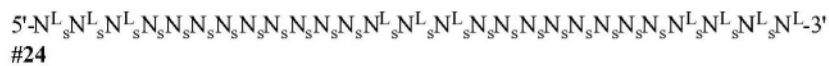
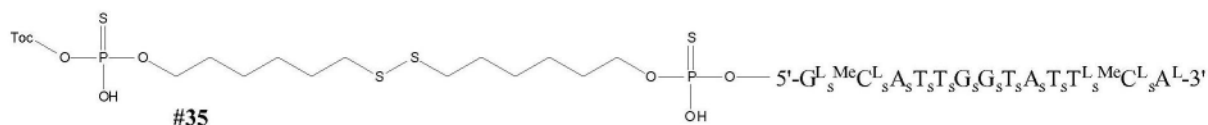


图12(续)



112


$$5'\text{-T}_s^{\text{L}}\text{G}_s^{\text{L}}\text{MeC}_s^{\text{L}}\text{T}_s\text{A}_s\text{C}_s\text{A}_s\text{A}_s\text{A}_s\text{C}_s^{\text{Me}}\text{C}_s^{\text{L}}\text{MeC}_s^{\text{L}}\text{A}_s^{\text{L}}\text{-3'}$$

SEQ ID 37

5'- A^L_s A^L_s T^L_s G^S_s C^T_s A^S_s A^S_s A^S_s A^S_s MeC^L_s MeC^L_s MeC^L_s A^L-3'

SEQ ID 38

5'-A^L_sA^L_sT^L_sG_sC_sT_sA_sC_sA_sA_sA_sC^{Me}_sC^L_sA^L_s-3'

SEQ ID 39

$$5'\text{-G}_s^{\text{L}}\text{MeC}_s^{\text{L}}\text{T}_s\text{G}_s\text{T}_s\text{G}_s\text{T}_s\text{G}_s\text{A}_s\text{G}_s\text{C}_s\text{T}_s\text{T}_s\text{G}_s^{\text{L}}\text{G}_s^{\text{L}}\text{-3'}$$

SEQ ID 40

5'-T^L_sG^L_sC^S_sT^S_sG^S_sT^S_sG^S_sA^S_sG^S_sC^S_sT^S_sT^L_sG^L_sG^L_s-3'

SEQ ID 41

5'-T_s^LG_s^LMeC_s^LT_sG_sT_sG_sT_sG_sA_sG_sC_sT_sT_s^LG_s^LG_s^L-3'

SEQ ID 42

5'-T₁L₁MeC₁L₁MeC₁L₁T₁G₁G₁T₁C₁T₁G₁T₁G₁T₁L₁MeC₁L₁MeC₁L₁-3'

SEQ ID 43

5'-T₅MeC₅MeC₅T₅G₅G₅T₅C₅T₅G₅T₅G₅T₅MeC₅MeC₅-3'

SEO ID 44



图12 (续)

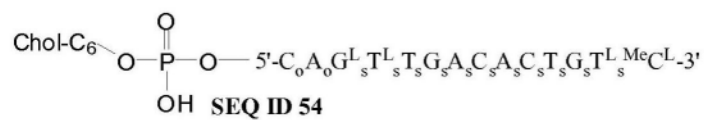
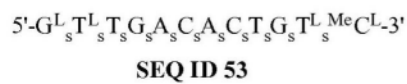


图12(续)

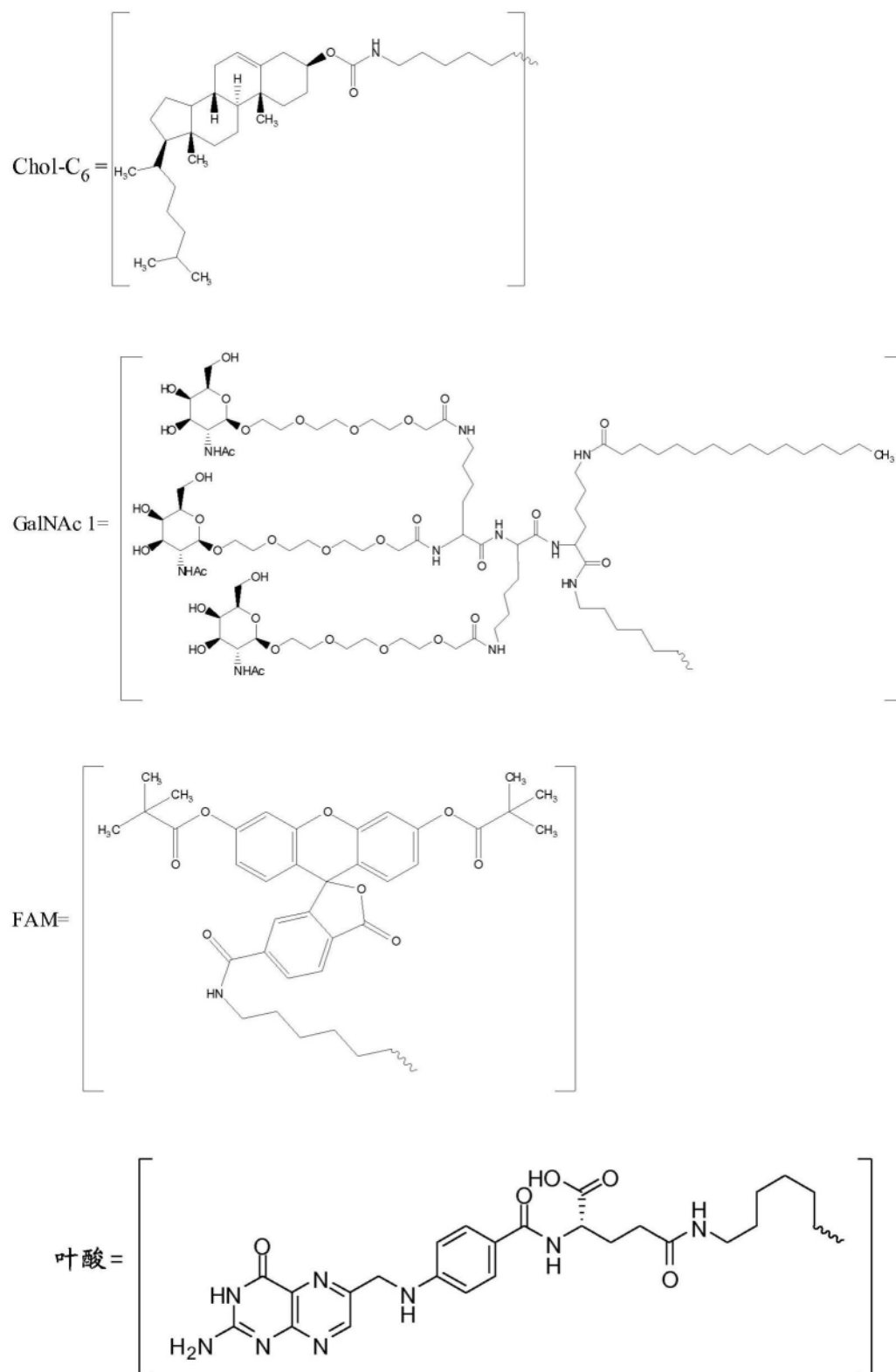


图13

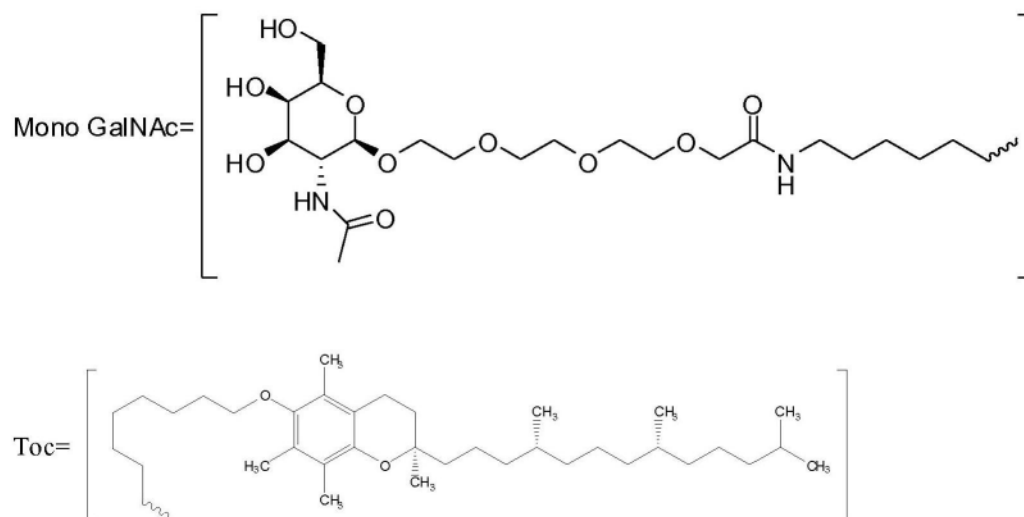
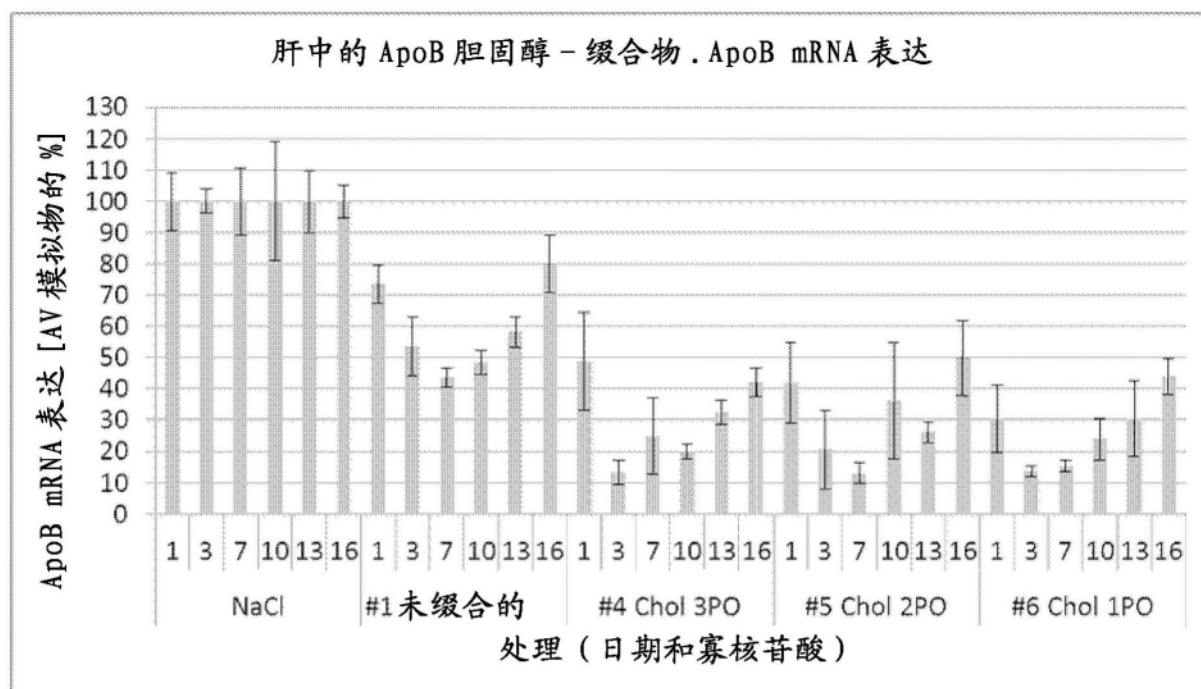


图13(续)

A



B

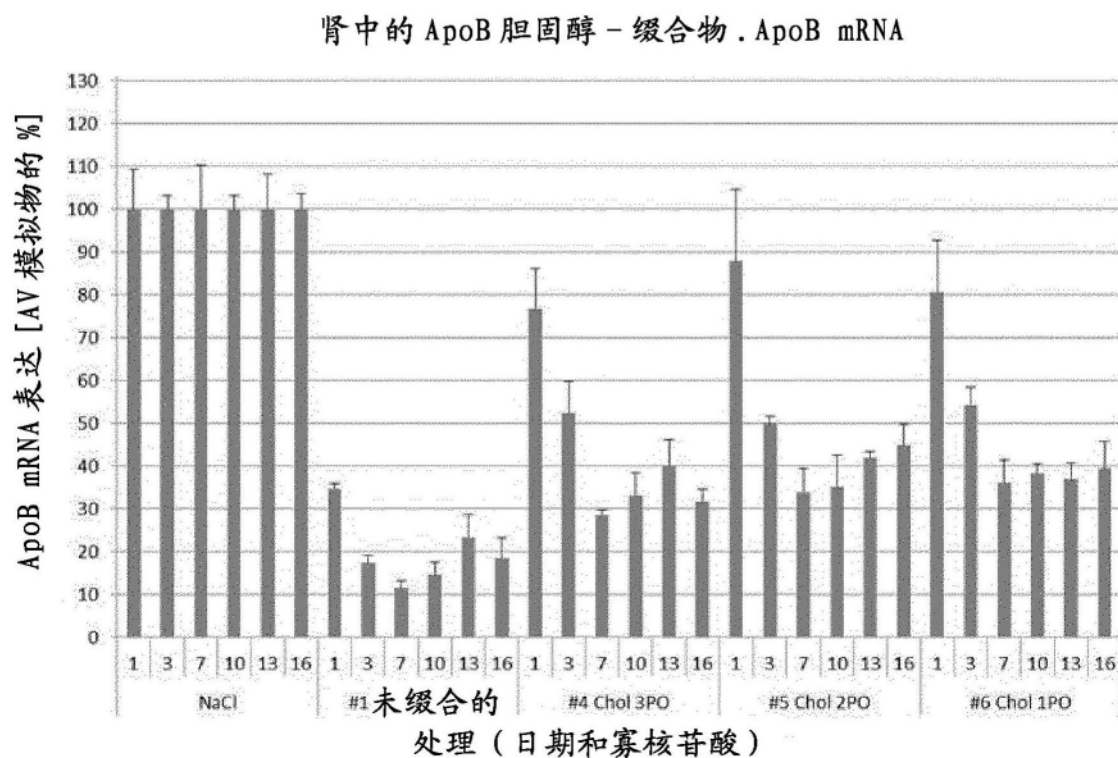
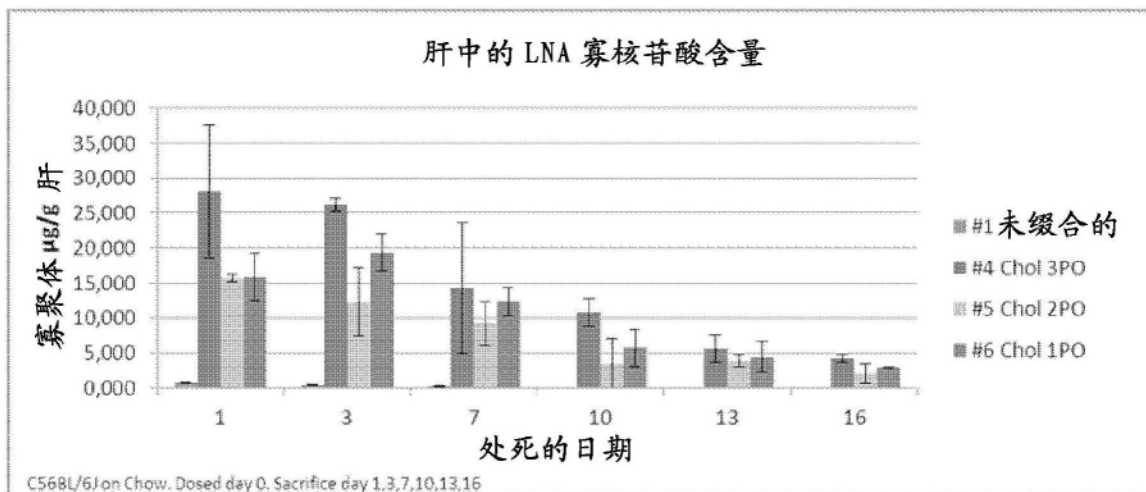


图14

A



B

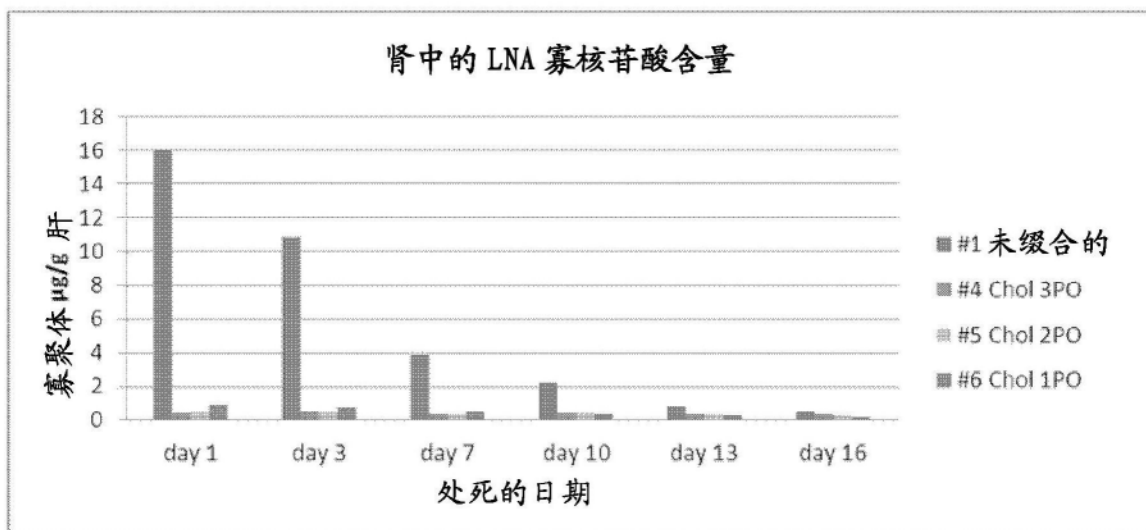
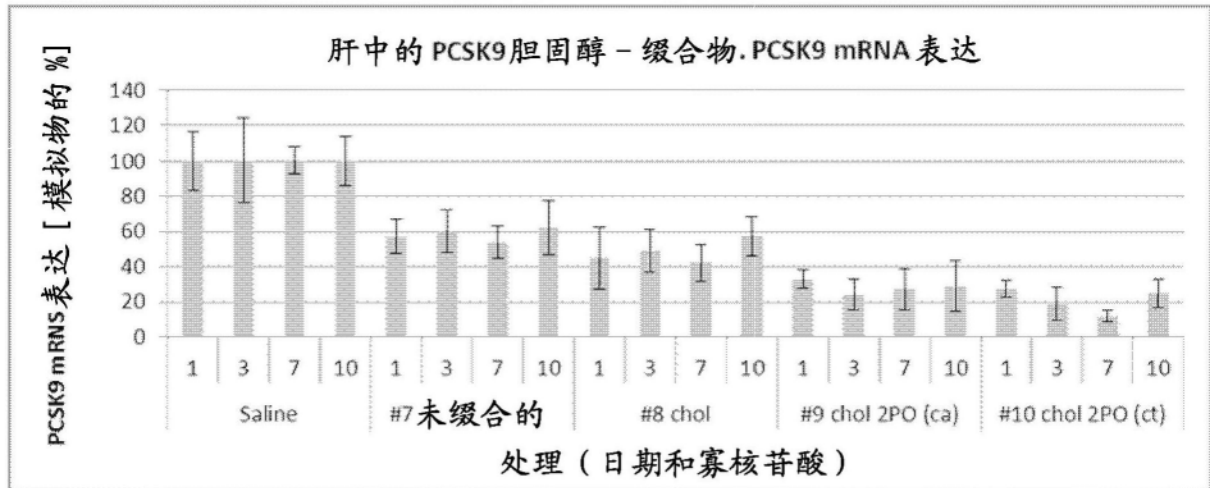


图15

A



B

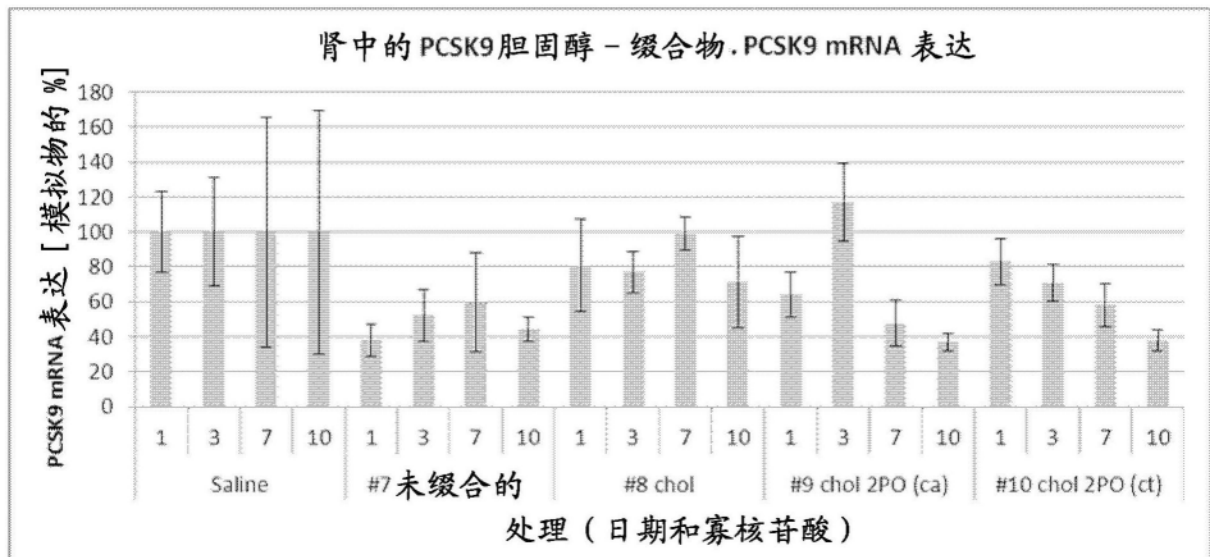


图16

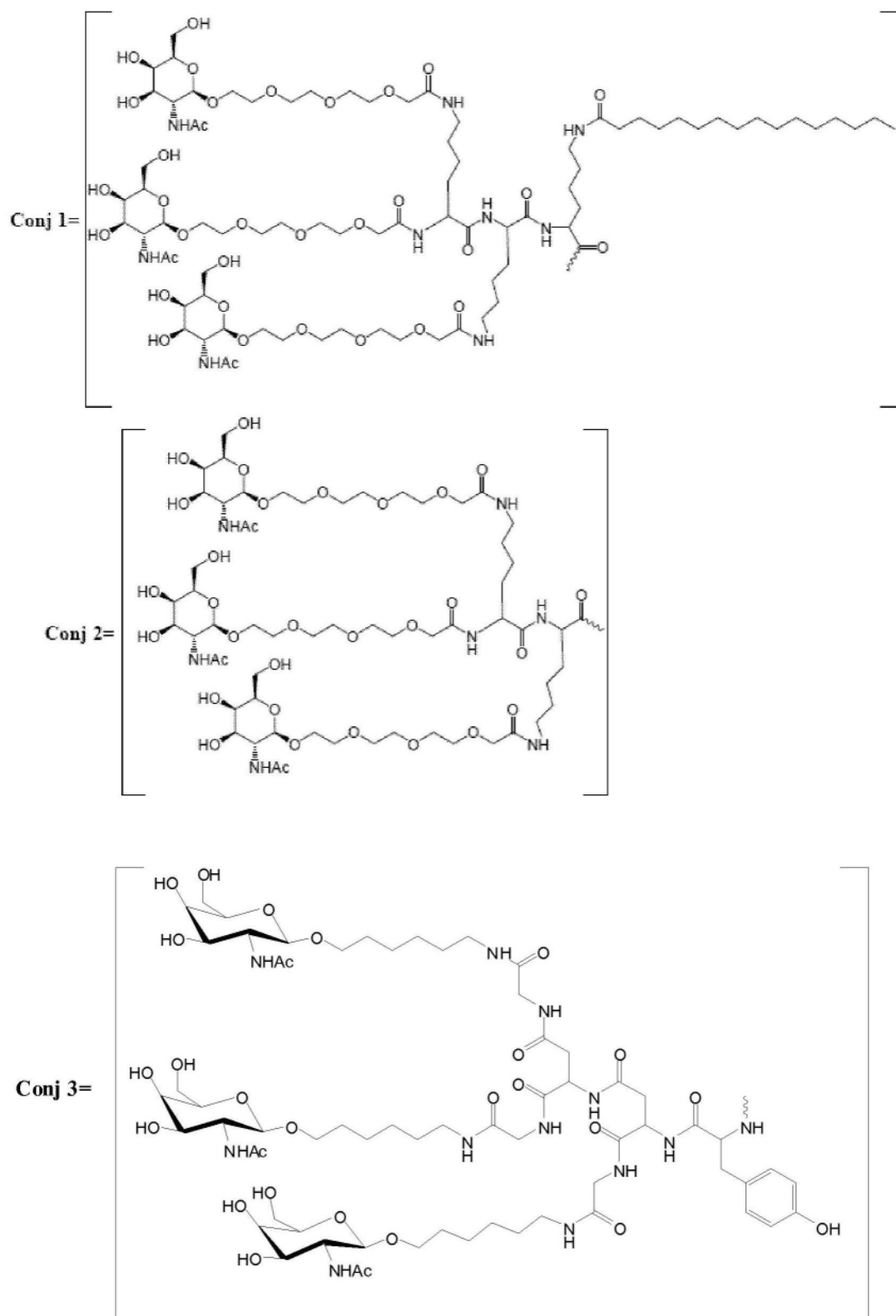


图17

Conj 4=

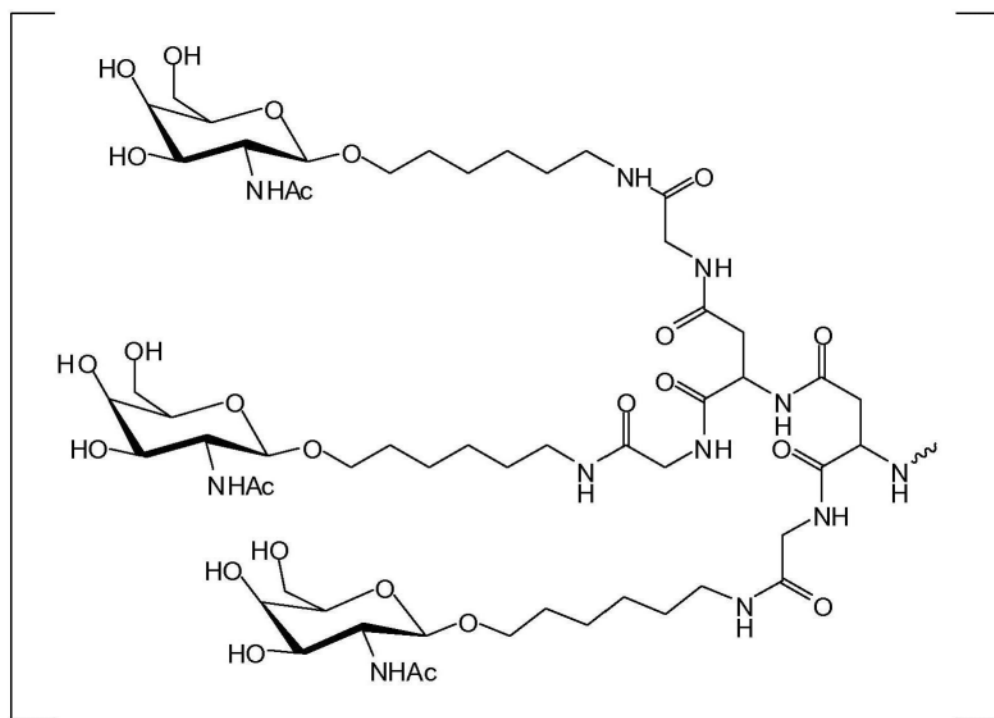


图17(续)

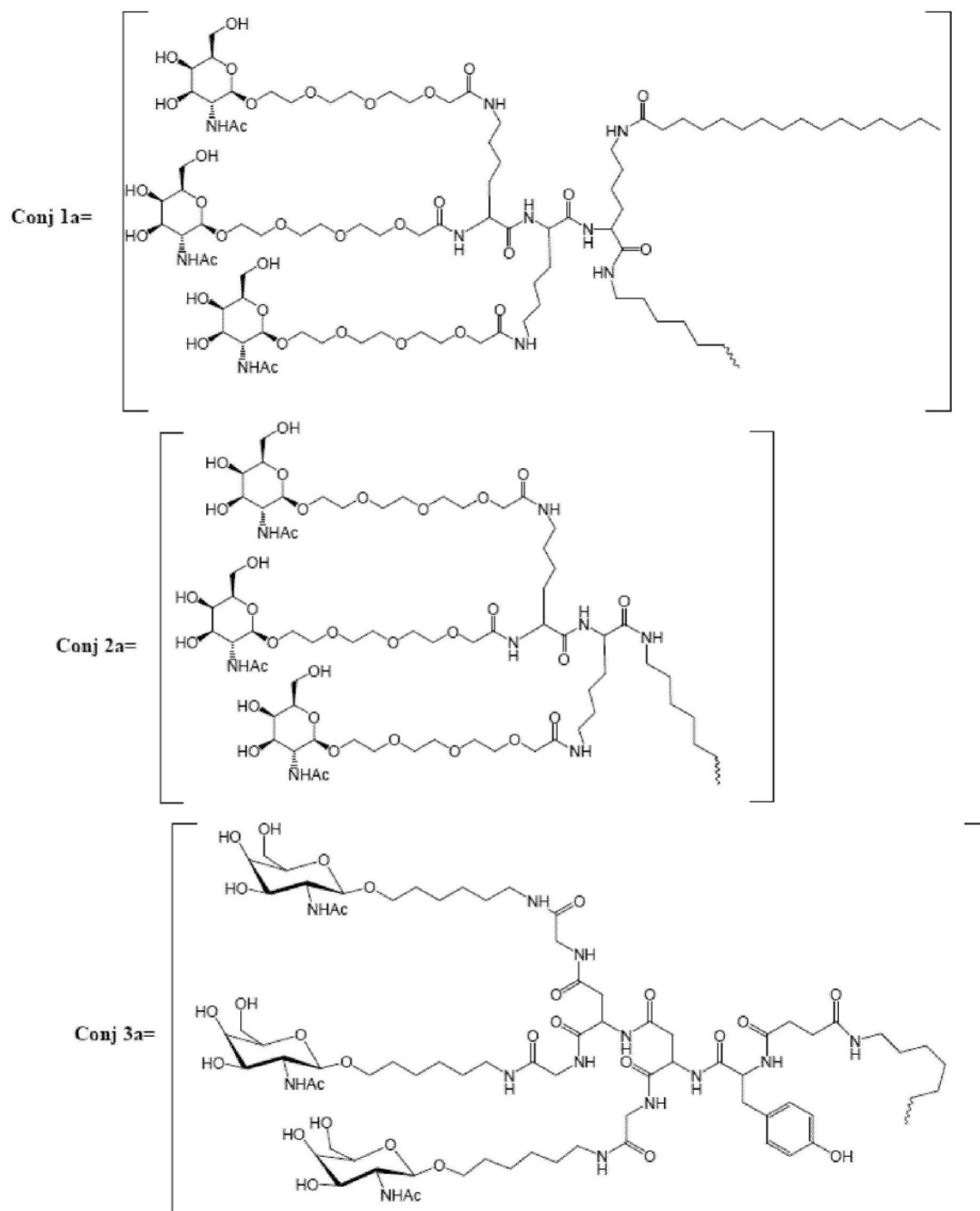


图17(续)

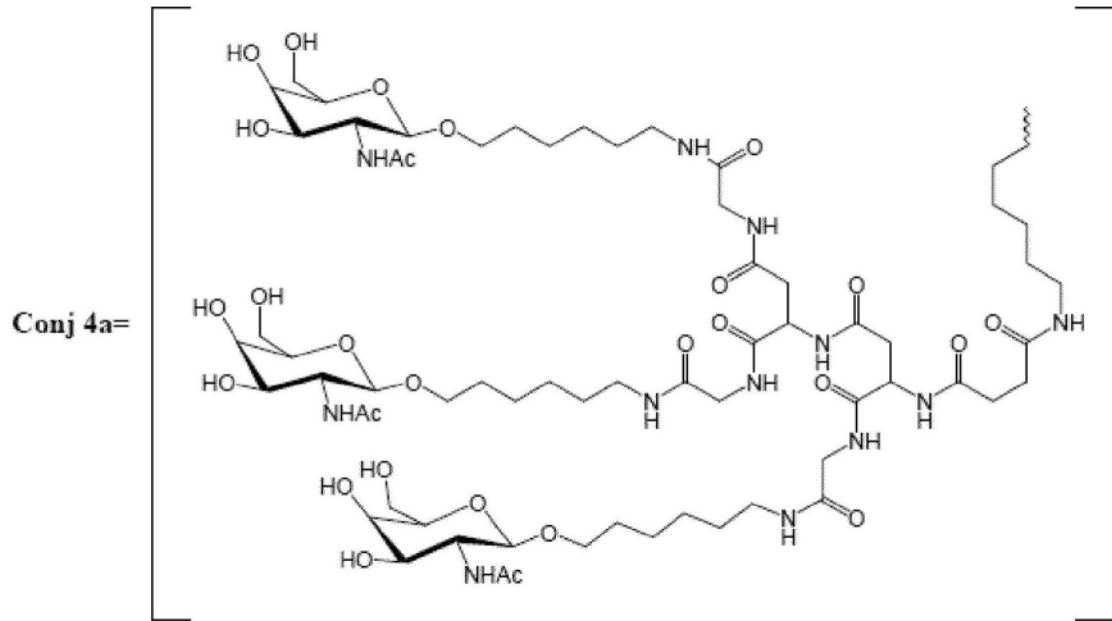


图17(续)

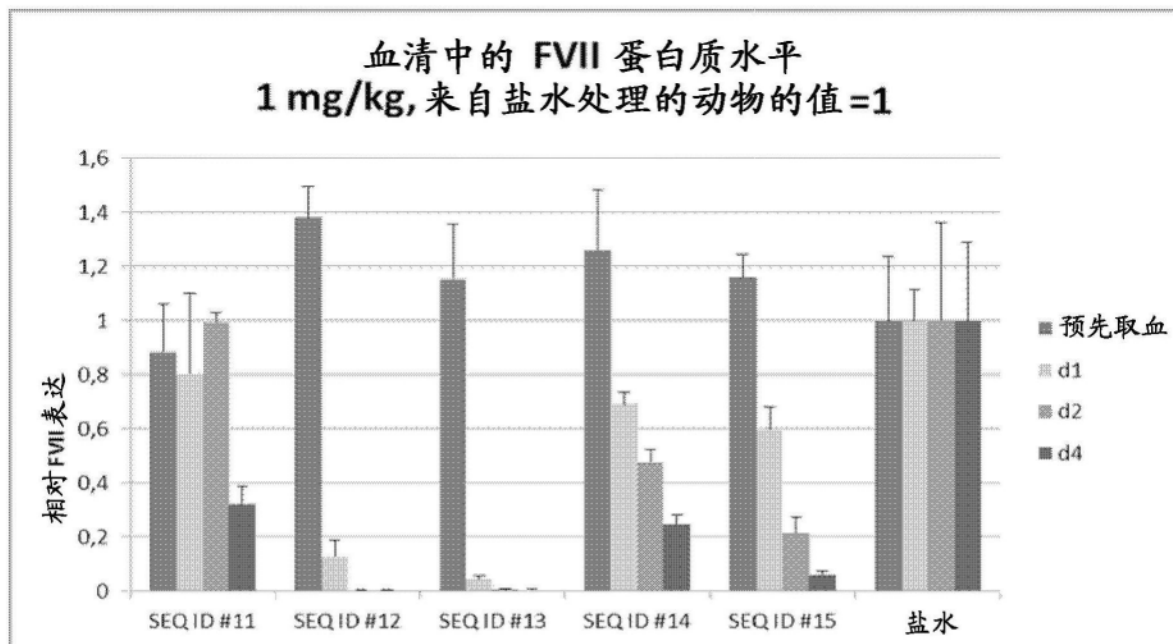


图18

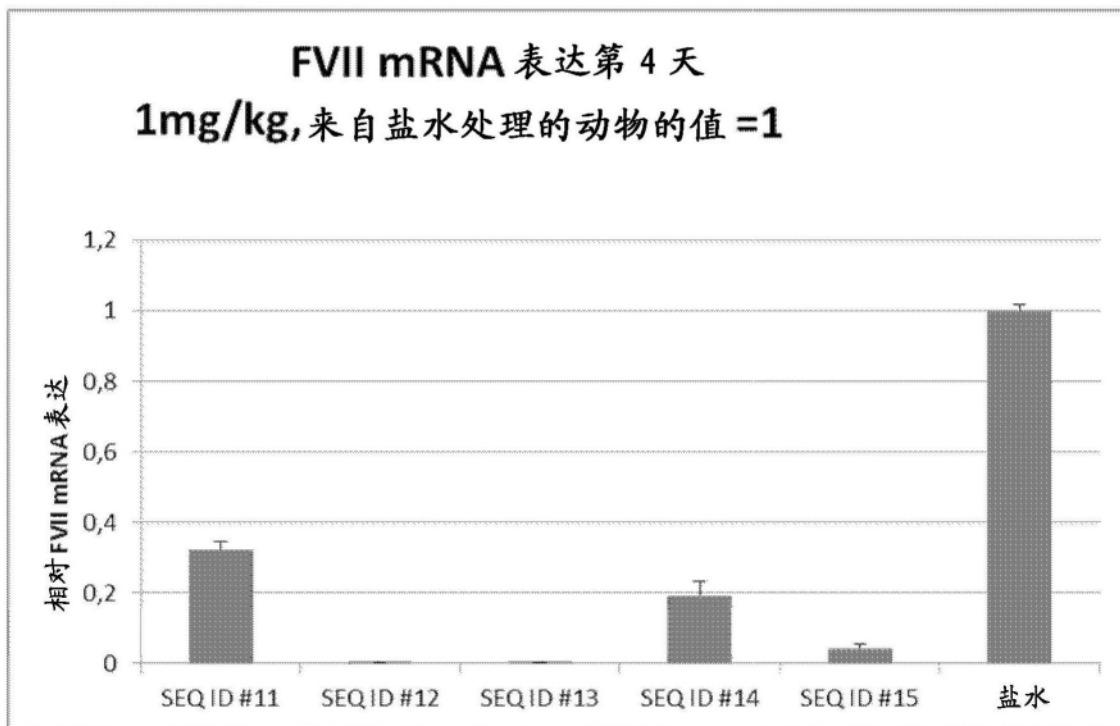


图19

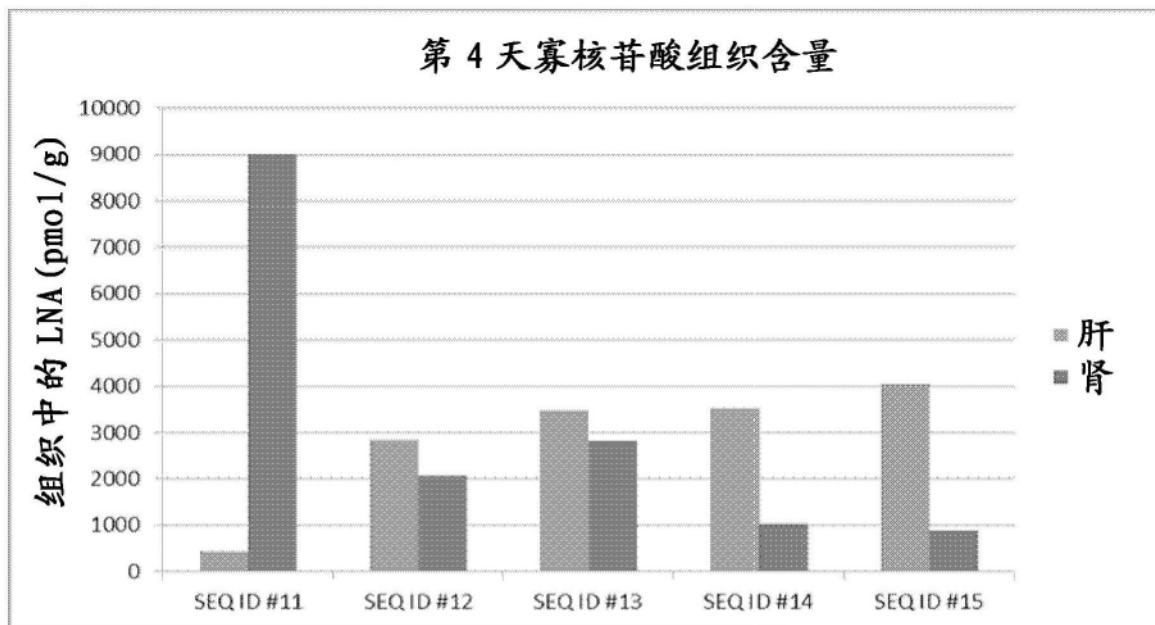


图20

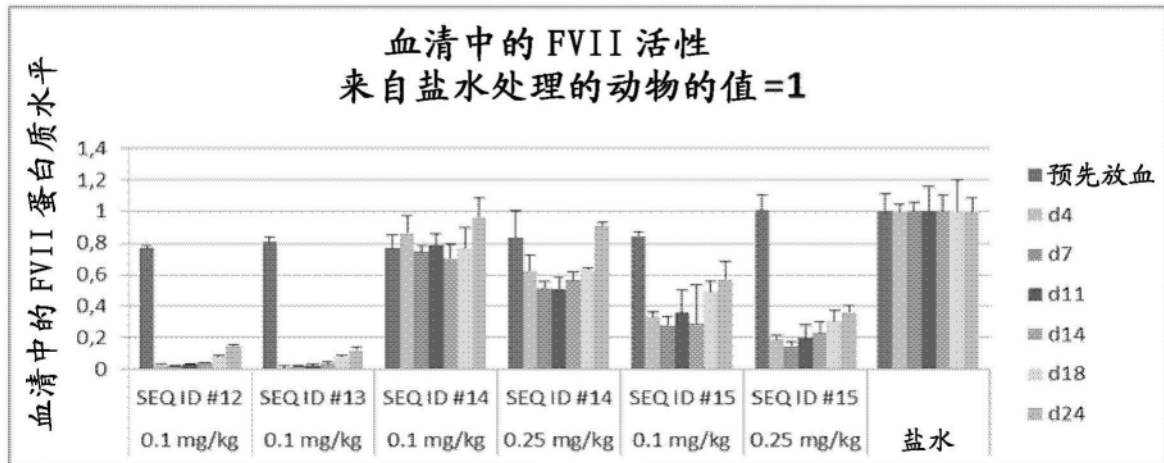


图21

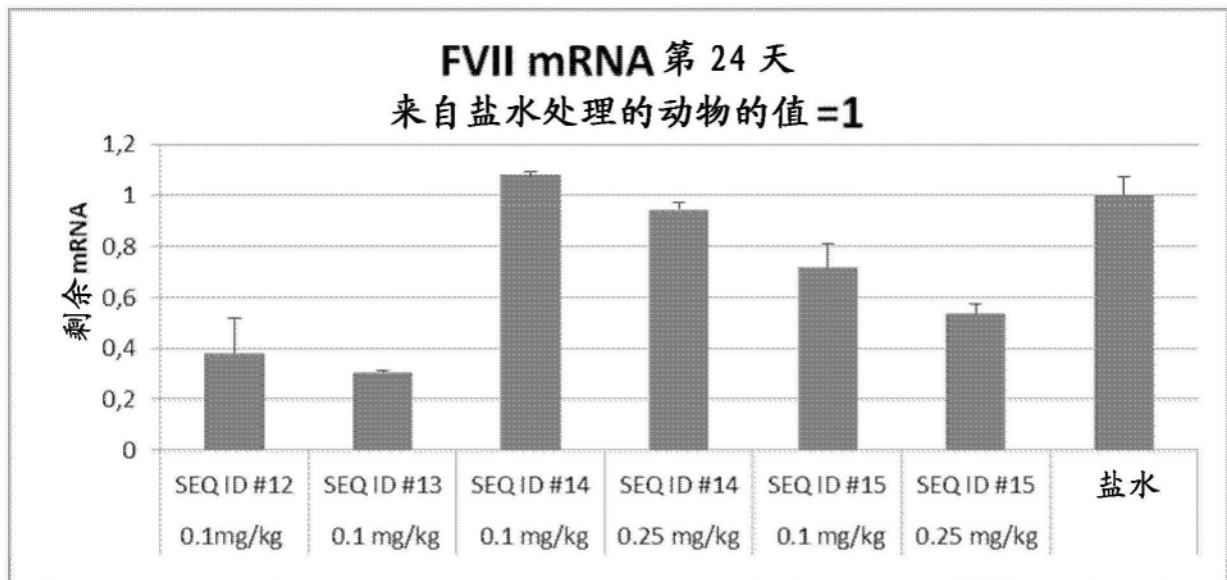


图22

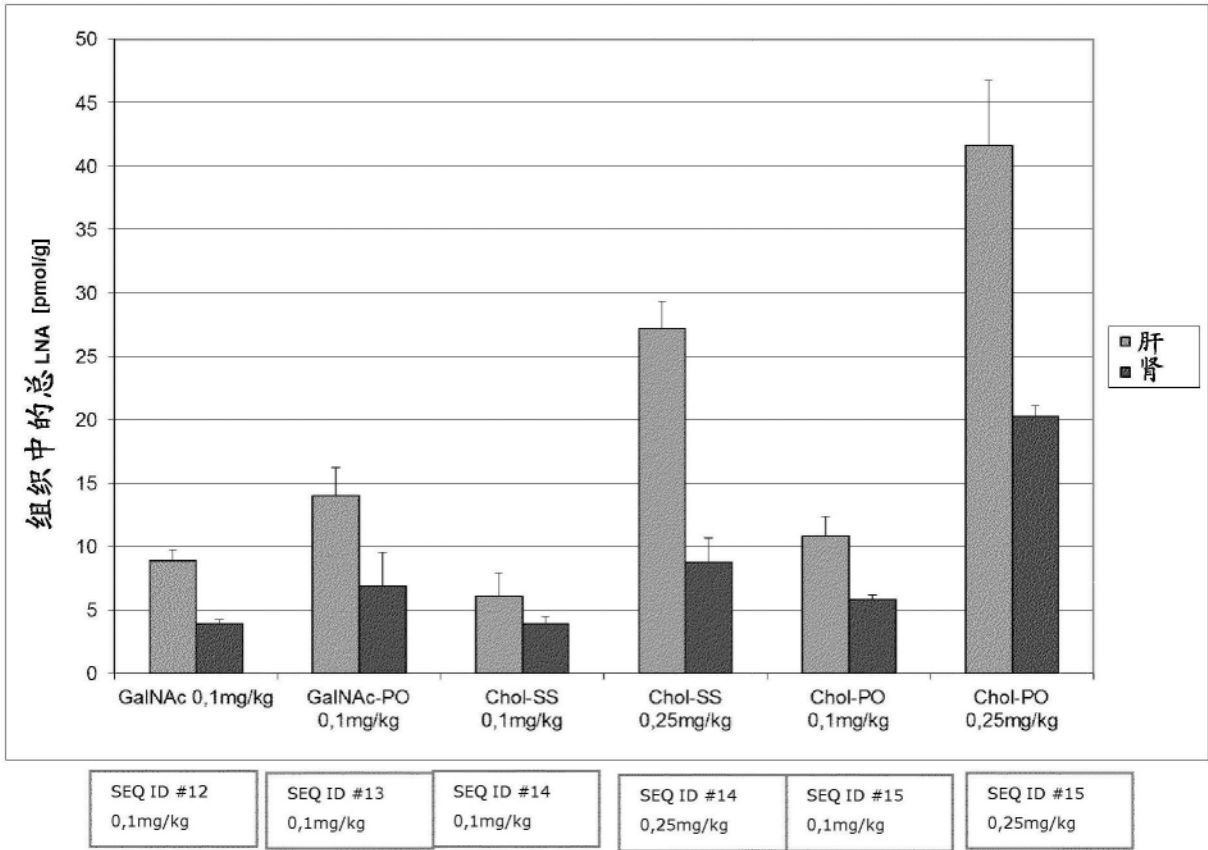


图23

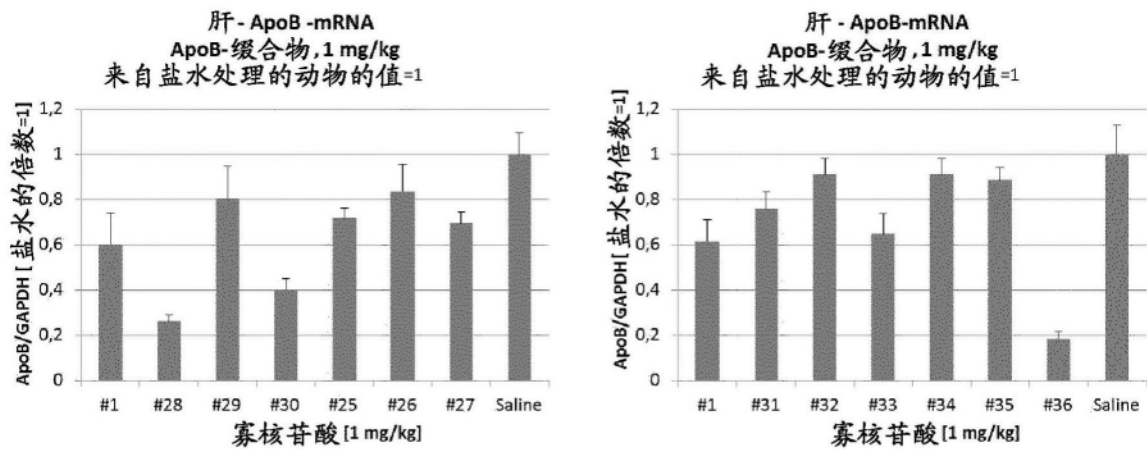
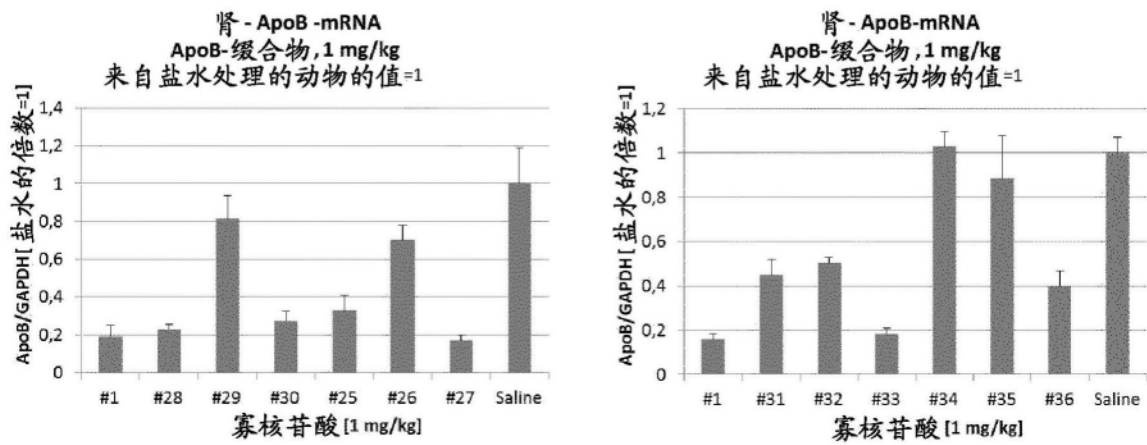
A**B**

图24

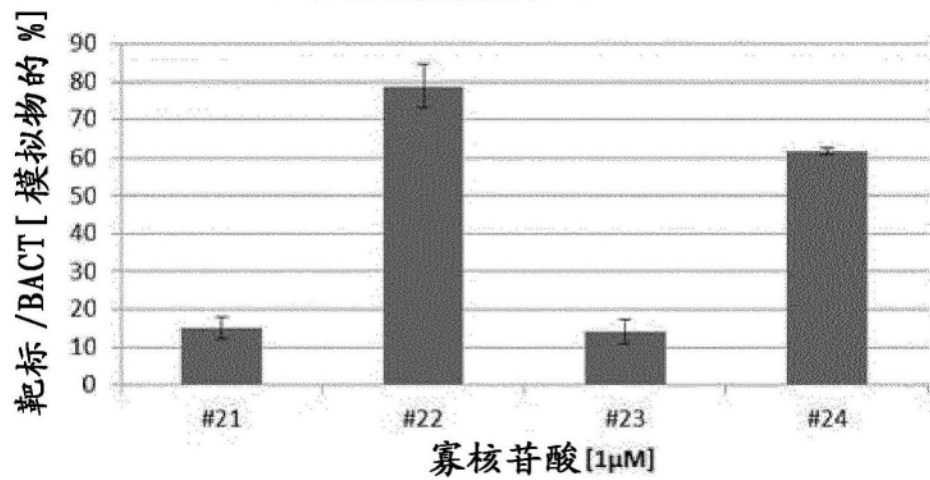
靶标 X mRNA 表达

图25