



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113614232 A

(43) 申请公布日 2021.11.05

(21) 申请号 202080022952.7

马修·哈斯勒

(22) 申请日 2020.01.17

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

(30) 优先权数据

公司 11227

62/794,123 2019.01.18 US

代理人 张福誉 韩晓帆

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2021.09.18

C12N 15/113 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/014146 2020.01.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/150636 EN 2020.07.23

(71) 申请人 马萨诸塞大学

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 阿纳斯塔西娅·赫沃罗娃

布鲁诺·米格尔·达·克鲁兹·戈

迪尼奥

权利要求书7页 说明书37页 附图56页

(54) 发明名称

动态药代动力学修饰锚

(57) 摘要

提供了包含药代动力学 (PK) 修饰锚的治疗性寡核苷酸。提供了用于治疗疾病或病症的方法,其包括向对象施用包含一种或更多种PK修饰锚的治疗性寡核苷酸。

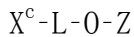
1. 化合物,其包含:

第一寡核苷酸,其中所述第一寡核苷酸包含至少16个连续核苷酸、5'末端、3'末端;和药代动力学(PK)修饰锚,其包含锚定寡核苷酸、任选接头和至少一个聚合物,其中所述锚定寡核苷酸包含与所述第一寡核苷酸互补的约5至约15个核苷酸或者由与所述第一寡核苷酸互补的约5至约15个核苷酸组成,并且其中所述聚合物为至少约2,000Da。

2. 权利要求1所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸的长度为约5至约15个核苷酸,或者长度为约5至约10个核苷酸。

3. 权利要求1所述的化合物,其中所述聚合物通过所述任选接头与所述锚定寡核苷酸有效地连接。

4. 权利要求1所述的化合物,其包含式(I):



(I)

其中:

O为所述第一寡核苷酸;

L为接头,并且是存在或不存在的;

X^c选自疏水部分、糖、肽、适配体和核酸,并且是存在或不存在的;并且

Z为所述PK修饰锚。

5. 权利要求1所述的第一寡核苷酸,其选自反义寡核苷酸(ASO)、合成miRNA、合成mRNA、单链siRNA和经修饰的CRISPR指导链。

6. 权利要求5所述的第一寡核苷酸,其包含:其中所述ASO是剪接转换ASO或核糖核酸酶H ASO。

7. 权利要求1至6中任一项所述的第一寡核苷酸,其包含与靶标的互补性。

8. 权利要求1至6中任一项所述的第一寡核苷酸,其包含与靶标的完全互补性。

9. 权利要求4所述的化合物,其中L包含乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸二酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、酰胺、氨基甲酸酯或其组合。

10. 权利要求4所述的化合物,其中X^c选自脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂、核苷类似物和内源性大麻素。

11. 权利要求4所述的化合物,其中X^c包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分或其衍生物。

12. 权利要求4所述的化合物,其中X^c对低密度脂蛋白和中密度脂蛋白之一或两者具有亲和力。

13. 权利要求4所述的化合物,其中X^c为具有少于三个双键的饱和或不饱和部分。

14. 权利要求4所述的化合物,其中X^c对高密度脂蛋白具有亲和力。

15. 权利要求4所述的化合物,其中X^c为具有三个或更多个双键的多不饱和部分。

16. 权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中所述至少一个聚合物选自疏水聚碳酸酯、聚酯、两亲嵌段共聚物、疏水嵌段聚合物、多糖和多肽。

17. 权利要求16所述的化合物,其中所述疏水聚碳酸酯是聚(DTR碳酸酯)。

18. 权利要求16所述的化合物,其中所述聚酯选自聚羟基链烷酸酯、聚己内酯、聚(羟基丁酸酯-羟基戊酸酯)、聚乙醇酸和聚乳酸。

19. 权利要求16所述的化合物,其中所述两亲嵌段共聚物选自聚乙烯吡咯烷酮、聚(2-

乙基-2-咪唑啉)、丙烯腈苯乙烯丙烯酸酯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺和聚乙二醇(PEG)。

20. 权利要求16所述的化合物,其中疏水嵌段共聚物选自聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)、聚(N,N-二乙基苯胺)、聚(二苯胺)和聚(甲基丙烯酸四氢糠酯)。

21. 权利要求16所述的化合物,其中所述多糖选自可溶性聚葡萄糖、不溶性聚葡萄糖、纤维素、糖原和支链淀粉。

22. 权利要求16所述的化合物,其中所述多肽是聚赖氨酸、聚精氨酸、聚丙氨酸、聚异亮氨酸、聚甲硫氨酸、聚苯丙氨酸、聚缬氨酸、聚脯氨酸和聚甘氨酸,及其任意组合。

23. 权利要求19所述的化合物,其中所述PEG的分子量选自约10,000Da、约20,000Da、约40,000Da、约60,000Da、约80,000Da和约100,000Da。

24. 权利要求1至23中任一项所述的化合物,其中所述PK修饰锚包含多于一个聚合物。

25. 权利要求24所述的化合物,其中所述PK修饰锚包含2、3或4个聚合物。

26. 权利要求1至25中任一项所述的化合物,其中所述第一寡核苷酸包含21、22、23、24、25、26、27或28个核苷酸并且所述聚合物是PEG。

27. 权利要求1至26中任一项所述的化合物,其中所述第一寡核苷酸包含一个或更多个经化学修饰的核苷酸。

28. 权利要求27所述的化合物,其中所述第一寡核苷酸是完全经化学修饰的或部分经化学修饰的。

29. 权利要求27所述的化合物,其中所述第一寡核苷酸包含一个或更多个锁核酸(LNA)或者一个或更多个肽核酸(PNA)。

30. 权利要求27所述的化合物,其中所述第一寡核苷酸包含一个或更多个S-受限乙基(cET)。

31. 权利要求27所述的化合物,其中所述第一寡核苷酸包含约50%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约55%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约60%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约65%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约70%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约75%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约80%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约85%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约90%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约95%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约96%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约97%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约98%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约99%的2'-甲氧基-核糖核苷酸或约100%的2'-甲氧基-核糖核苷酸。

32. 权利要求1至31中任一项所述的化合物,其中所述第一寡核苷酸包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸。

33. 权利要求1至32中任一项所述的化合物,其中所述第一寡核苷酸的核苷酸通过磷酸二酯键、硫代磷酸酯键或磷酸二酯键与硫代磷酸酯键的组合进行连接。

34. 权利要求1至33中任一项所述的化合物,其中:

(1) 所述第一寡核苷酸包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸,其中每个核苷酸为2'-甲氧基-核糖核苷酸或2'-氟-核糖核苷酸,并且来自所述第一寡核苷酸的5'末端的第2位和第14位的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;并且

(2) 所述第一寡核苷酸的核苷酸通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键与相邻核苷酸连接,其中来自所述3'末端的第1至6位或来自所述3'末端的第1至7位的核苷酸通过硫代磷酸酯键与相邻核苷酸连接。

35. 权利要求1至34中任一项所述的化合物,其还包含含有至少12个连续核苷酸、5'末端、3'末端的第二寡核苷酸;并且其中所述第一寡核苷酸的一部分与所述第二寡核苷酸的一部分互补。

36. 权利要求35所述的化合物,其中所述第二寡核苷酸包含缀合物部分X^c。

37. 权利要求35所述的化合物,其中所述第二寡核苷酸用接头L与X^c连接。

38. 权利要求35所述的化合物,其中L包括乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸二酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、酰胺、氨基甲酸酯或其组合。

39. 权利要求35所述的化合物,其中X^c连接在所述第二寡核苷酸的5'末端、所述3'末端、内部位置处或其混合处。

40. 权利要求35所述的化合物,其中X^c连接在所述第二寡核苷酸的3'末端。

41. 权利要求35所述的化合物,其中X^c选自脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂、核苷类似物和内源性大麻素。

42. 权利要求35所述的化合物,其中X^c包括N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分或其衍生物。

43. 权利要求35所述的化合物,其中X^c对低密度脂蛋白和中密度脂蛋白之一或两者具有亲和力。

44. 权利要求35所述的化合物,其中X^c为具有少于三个双键的饱和或不饱和部分。

45. 权利要求35所述的化合物,其中X^c对高密度脂蛋白具有亲和力。

46. 权利要求35所述的化合物,其中X^c为具有三个或更多个双键的多不饱和部分。

47. 权利要求1至46中任一项所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸与所述第一寡核苷酸完全互补。

48. 权利要求1至46中任一项所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸相对于所述第一寡核苷酸包含一个、两个、三个或四个错配。

49. 权利要求1至48中任一项所述的化合物,其中锚定寡核苷酸包含一个或更多个经化学修饰的核苷酸。

50. 权利要求49所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸是完全经化学修饰的或部分经化学修饰的。

51. 权利要求49所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸包含一个或更多个锁核酸(LNA)或者一个或更多个肽核酸(PNA)。

52. 权利要求49所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸包含一个或更多个S-受限乙基(cET)。

53. 权利要求1至52中任一项所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸包含交替的2'-O-甲基核糖核苷酸和2'-氟代核糖核苷酸。

54. 权利要求1至52中任一项所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸包含交替的2'-O-甲基核糖核苷酸和2'-氟代核糖核苷酸以及在5'末端和3'末端的至少两个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键。

55. 权利要求1至52中任一项所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸包含交替的2'-O-甲基核糖核苷酸和2'-氟代核糖核苷酸以及在每个核苷酸位置处的硫代磷酸酯核苷酸间键。

56. 权利要求1至53中任一项所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸包含在5'末端和3'

末端的至少两个相邻的2',4'-受限2'-O-乙基桥接核酸。

57. 权利要求1至56中任一项所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸包含在每个核苷酸位置处的2',4'-受限2'-O-乙基桥接核酸和在每个相邻核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键。

58. 权利要求1至57中任一项所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸包含交替的2'-O-甲基核糖核苷酸和2'-氟代核糖核苷酸以及在5'末端和3'末端的至少两个2',4'-受限2'-O-乙基桥接核酸。

59. 权利要求1至58中任一项所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸包含在每个核苷酸位置处的肽核酸。

60. 权利要求1至59中任一项所述的化合物,其中所述锚定寡核苷酸在5'末端、3'末端、内部位置处或其混合处与所述聚合物连接。

61. 权利要求1至60中任一项所述的化合物,其中所述寡核苷酸中的至少两个是交联的。

62. 权利要求1至61中任一项所述的化合物,其还包含纳米粒、嵌入剂、聚阳离子或其混合物。

63. 权利要求35至62中任一项所述的化合物,其中

- a) 所述第一寡核苷酸的长度为21个核苷酸至25个核苷酸;
- b) 所述第二寡核苷酸的长度为13个核苷酸至17个核苷酸;并且
- c) 所述锚定寡核苷酸的长度为5个核苷酸至8个核苷酸。

64. 权利要求35至62中任一项所述的化合物,其中

- a) 所述第一寡核苷酸的长度为21个核苷酸;
- b) 所述第二寡核苷酸的长度为13个核苷酸;并且
- c) 所述锚定寡核苷酸的长度为8个核苷酸。

65. 权利要求35至62中任一项所述的化合物,其中

- a) 所述第一寡核苷酸的长度为23个核苷酸;
- b) 所述第二寡核苷酸的长度为15个核苷酸;并且
- c) 所述锚定寡核苷酸的长度为8个核苷酸。

66. 权利要求35至62中任一项所述的化合物,其中

- a) 所述第一寡核苷酸的长度为25个核苷酸;
- b) 所述第二寡核苷酸的长度为17个核苷酸;并且
- c) 所述锚定寡核苷酸的长度为8个核苷酸。

67. 权利要求63至66中任一项所述的化合物,其中所述聚合物包含PEG。

69. 权利要求1至66中任一项所述的化合物,其中所述PK修饰锚影响寡核苷酸治疗剂在身体部位中随时间的稳定性,所述身体部位包括心、肾、肝、脾、肾上腺、胰腺、肺、血液、血浆、脑或其混合,

其中影响包括分布体积、曲线下面积、清除率、半衰期最大浓度、生物利用度的变化或其混合。

70. 权利要求35至68中任一项所述的化合物,其中所述第一寡核苷酸中的核苷酸数目包括与所述第二寡核苷酸和锚定寡核苷酸中的核苷酸相加后相同的数目。

71. 权利要求35至68中任一项所述的化合物,其中所述第一寡核苷酸中的核苷酸数目包括比所述第二寡核苷酸和锚定寡核苷酸中的核苷酸相加后更多的数目。

72. 权利要求35至68中任一项所述的化合物,其中所述第一寡核苷酸中的核苷酸数目包括比所述第二寡核苷酸和锚定寡核苷酸中的核苷酸相加后更少的数目。

73. 化合物,其包含:

第一寡核苷酸,其中所述第一寡核苷酸的长度为21个核苷酸,具有5'末端、3'末端,并且与靶标互补;

第二寡核苷酸,其中所述第二寡核苷酸的长度为13个核苷酸,具有5'末端、3'末端,并且与所述第一寡核苷酸的第1至13个核苷酸互补;以及

锚定寡核苷酸,其中所述锚定寡核苷酸的长度为8个核苷酸,具有5'末端、3'末端,并且与所述第一寡核苷酸的第14至21个核苷酸互补,

其中所述第二寡核苷酸在3'末端与包括胆固醇、二氯乙酸酯、二十二碳六烯酸或N-乙酰半乳糖胺的分子连接,

其中所述锚定寡核苷酸与分子量为10,000至40,000道尔顿的聚乙二醇聚合物连接,并且

其中所述第一寡核苷酸包含与所述第二寡核苷酸和所述锚定寡核苷酸二者的互补性以形成不对称双链体。

74. 权利要求1至73中任一项所述的化合物,其还包含药学活性载体。

75. 药物组合物,其包含权利要求1至74中任一项所述的化合物和可药用载体。

76. 用于在有此需要的患者中治疗疾病或病症的方法,其包括向所述患者施用权利要求1至75中任一项所述的化合物。

77. 治疗患有疾病或病症的患者的方法,其包括施用包含第一寡核苷酸、第二寡核苷酸和锚定寡核苷酸的不对称寡核苷酸双链体,其中所述锚定寡核苷酸包含药代动力学修饰部分,并且其中所述第一寡核苷酸可与所述第二寡核苷酸和所述锚定寡核苷酸二者配对以形成所述不对称寡核苷酸双链体。

78. 将化合物递送至对象的肝的方法,其包括向所述对象施用包含以下的化合物:

第一寡核苷酸,其中所述第一寡核苷酸包含至少16个连续核苷酸、5'末端、3'末端,并且包含与靶标的互补性;

第二寡核苷酸,其包含至少12个连续核苷酸、5'末端、3'末端,其中所述第一寡核苷酸的一部分与所述第二寡核苷酸的一部分互补,并且其中所述第二寡核苷酸包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分或其衍生物;以及

药代动力学(PK)修饰锚,其包含锚定寡核苷酸、任选接头和至少一个聚合物,其中所述锚定寡核苷酸包含与所述第一寡核苷酸互补的约5至约15个核苷酸,并且其中所述聚合物为至少约2,000Da。

79. 不对称双链体,其包含第一寡核苷酸链、第二寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链,其中每条寡核苷酸链包含至少一个经化学修饰的核苷酸,其中所述锚定寡核苷酸链包含药代动力学修饰部分,其中所述第二寡核苷酸链和所述锚定寡核苷酸链各自包含比所述第一寡核苷酸链更少的核苷酸,并且其中所述第一寡核苷酸链可与所述第二寡核苷酸链和所述锚定寡核苷酸链二者配对以形成所述不对称双链体。

80. 权利要求79所述的不对称双链体,其中所述第一寡核苷酸链包含10至50个核苷酸,其中所述第二寡核苷酸链包含10至50个核苷酸,并且其中所述锚定寡核苷酸包含5至15个核苷酸。

81. 权利要求79所述的不对称双链体,其中所述第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链形成具有双链体区域的siRNA或dsRNA。

82. 权利要求79所述的不对称双链体,其中双链体区域的长度为约10至约50个碱基对。

83. 权利要求79所述的不对称双链体,其中双链体区域的长度为约10至约15、约10至约20、约10至约25或约10至约30个碱基对。

84. 权利要求79所述的不对称双链体,其中双链体区域为13、14、15、16、17或18个碱基对。

85. 权利要求79所述的不对称双链体,其中所述第一寡核苷酸链的长度为至少16个核苷酸,其中所述第二寡核苷酸链的长度为至少11个核苷酸,并且其中所述锚定寡核苷酸的长度为约5至15个核苷酸。

86. 权利要求79所述的不对称双链体,其中所述第一寡核苷酸链的长度为约21至23个核苷酸,其中所述第二寡核苷酸链的长度为约13至16个核苷酸,并且其中所述锚定寡核苷酸的长度为约5至10个核苷酸。

87. 权利要求79所述的不对称双链体,其中所述第一寡核苷酸链的长度为21个核苷酸,其中所述第二寡核苷酸链的长度为13个核苷酸,并且其中所述锚定寡核苷酸的长度为8个核苷酸。

88. 权利要求79所述的不对称双链体,其中所述至少一个经化学修饰的核苷酸包括2'-O-甲基-核糖核苷酸、2'-氟-核糖核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸间键、锁核酸、2',4'-受限2'0-乙基桥接核酸、肽核酸或其混合物。

89. 权利要求79所述的不对称双链体,其中所述第二寡核苷酸链包含连接在5'末端、3'末端、内部位置处或其混合处的配体。

90. 权利要求89所述的不对称双链体,其中第二链的配体包括脂质、亲脂体、萜烯、糖、肽、蛋白质、烷基链、凝集素、糖蛋白、激素、药物、碳水化合物、抗体、适配体、维生素、阳离子型染料、生物活性缀合物、卟啉、多环芳烃、合成聚合物或其混合物。

91. 权利要求89所述的不对称双链体,其中第二链的配体包括脂肪酸、类固醇、开环类固醇、聚胺、神经节苷脂、核苷类似物、内源性大麻素、 ω -3脂肪酸、 ω -6脂肪酸、 ω -9脂肪酸、共轭亚麻酸、饱和脂肪酸或其混合物。

92. 权利要求89所述的不对称双链体,其中第二链的配体包括胆固醇、二十二碳六烯酸、共轭磷脂酰胆碱、N-乙酰半乳糖胺、二氯乙酸、上皮细胞黏附分子适配体、胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、双氢睾酮、1,3-双-(十六烷基)甘油、香叶基氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基、吩噻嗪或其混合物。

93. 权利要求89所述的不对称双链体,其中第二链还包含将所述配体与所述第二链连接的接头。

94. 不对称双链体,其包含长度为21个核苷酸的第一寡核苷酸链、长度为13个核苷酸的第二寡核苷酸链和长度为8个核苷酸的锚定寡核苷酸链,

其中每条寡核苷酸链包含交替的2'-氟-核糖核苷酸和2'-甲氧基-核糖核苷酸，

其中第一链包含在5'末端的两个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键和在3'末端的八个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键，

其中所述第二寡核苷酸链包含在5'末端的两个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键和在3'末端的两个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键，以及在3'末端与包括胆固醇、二氯乙酸酯、二十二碳六烯酸或N-乙酰半乳糖胺的分子连接的接头，

其中所述锚定寡核苷酸链包含在5'末端的七个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键，和在3'末端与药代动力学修饰部分连接的接头，所述药代动力学修饰部分包括分子量为10,000至40,000道尔顿的聚乙二醇聚合物，并且

其中所述第一寡核苷酸链可与所述第二寡核苷酸链和所述锚定寡核苷酸链二者配对以形成所述不对称双链体。

95. 治疗患有疾病或病症的患者的方法，其包括施用包含第一寡核苷酸链、第二寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链的不对称寡核苷酸双链体，其中所述锚定寡核苷酸链包含药代动力学修饰部分，并且其中所述第一寡核苷酸链可与所述第二寡核苷酸链和所述锚定寡核苷酸链二者配对以形成所述不对称寡核苷酸双链体。

96. 不对称发夹双链体，其包含发夹寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链，其中所述发夹寡核苷酸链包含突出端并且可与所述锚定寡核苷酸链配对以形成所述不对称发夹双链体，并且其中所述锚定寡核苷酸链包含药代动力学修饰部分。

97. 药物组合物，其包含含有第一寡核苷酸链、第二寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链的不对称寡核苷酸双链体，其中所述锚定寡核苷酸链包含药代动力学修饰部分，并且其中所述第一寡核苷酸链可与所述第二寡核苷酸链和所述锚定寡核苷酸链二者配对以形成所述不对称寡核苷酸双链体。

98. 通用锚定寡核苷酸，其包含约5至8个核苷酸的长度和在5'末端的药代动力学修饰部分，其中至少一个核苷酸包含化学修饰，其中所述锚定寡核苷酸可结合包含第一寡核苷酸链、第二寡核苷酸链的不对称寡核苷酸双链体，并且其中寡核苷酸锚的序列与所述第一寡核苷酸链在3'末端的区域互补。

99. 权利要求98所述的通用锚定寡核苷酸，其中第一链和锚定链包含的GC含量为约35至约100%。

动态药代动力学修饰锚

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年1月18日提交的美国临时申请序列号62/794,123的权益,其全部公开内容在此通过引用并入本文。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的基金号NS104022、HD086111和OD020012的政府支持下完成的。政府对本发明具有某些权利。

技术领域

[0005] 本公开内容涉及包含新的基于寡核苷酸的药代动力学(pharmacokinetic,PK)修饰锚的化合物,其具有用于RNA干扰(RNAinterference,RNAi)和其他基因治疗技术的有用应用。本文中描述的PK修饰锚被模式化(pattern)以能够有效调节治疗性寡核苷酸的吸收、分布和清除动力学,以增强治疗性寡核苷酸的组织分布。可在血液/血浆、脑脊液(cerebrospinal fluid,CSF)以及其他相关的体液/生物流体和组织中实现对吸收、分布和清除动力学的有效调节。

背景技术

[0006] 在脑脊液(CSF)注射之后,寡核苷酸很快被清除,其中小于1至2%的注射剂量保留在脑和脊髓中。在中枢神经系统应用中使用寡核苷酸治疗剂的被充分理解的问题之一是快速的CSF清除。在啮齿动物中,弹丸式注射足以支持在大多数脑中广泛的寡核苷酸分布,并且大量CSF流是分布背后的主要机制。快速的CSF清除限制了寡核苷酸向大脑深层结构的分布,并且是该平台(platform)用于治疗多种神经退行性病症的主要限制。

[0007] 类似地,当IV或SC施用时,寡核苷酸通过经过肾过滤的消除或通过网状内皮系统而被全身地快速去除。在肝、肾、骨髓和脾以外的次级组织中的保留是本领域中的真正挑战。

[0008] 仍然需要特征在于以下的自递送siRNA:有效的RISC进入,最小的免疫应答和脱靶(off-target)效应,无制剂情况下的有效细胞摄取,改善的吸收、分布和清除动力学以及有效的、特异性或功能性的组织分配。

发明内容

[0009] 本发明是基于如下化合物的发现的:该化合物包含新平台、动态药代动力学("PK")修饰锚,其中锚能够有效调节血液/血浆、CFS以及其他的体液/生物流体和组织中组分治疗性寡核苷酸的吸收、分布和清除动力学。本文中提供了嵌段共聚物(例如,泊洛沙姆(poloxamer)188等)的组,该嵌段共聚物作为非免疫原性PK修饰剂发挥作用并且与寡核苷酸化学品相容。

[0010] 在一个方面中,本公开内容提供了包含以下的化合物:第一寡核苷酸,其中第一寡核苷酸包含至少16个连续核苷酸、5'末端、3'末端;和药代动力学(PK)修饰锚,其包含锚定

寡核苷酸、任选接头和至少一个聚合物,其中锚定寡核苷酸包含与第一寡核苷酸互补的约5至约15个核苷酸或者由与第一寡核苷酸互补的约5至约15个核苷酸组成,并且其中聚合物为至少约2,000Da。

[0011] 在某些实施方案中,锚定寡核苷酸的长度为约5至约15个核苷酸,或者长度为约5至约10个核苷酸。

[0012] 在某些实施方案中,聚合物通过任选接头与锚定寡核苷酸有效地连接。

[0013] 在某些实施方案中,化合物包含式(I):

[0014] $X^c-L-O-Z$

[0015] (I)

[0016] 其中:

[0017] O为第一寡核苷酸;

[0018] L为接头,并且是存在或不存在的;

[0019] X^c 选自疏水部分、糖、肽、适配体和核酸,并且是存在或不存在的;

[0020] 并且

[0021] Z为PK修饰锚。

[0022] 在某些实施方案中,第一寡核苷酸选自反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide,ASO)、合成miRNA、合成mRNA、单链siRNA和经修饰的CRISPR指导链。

[0023] 在某些实施方案中,ASO是剪接转换ASO或核糖核酸酶H ASO。

[0024] 在某些实施方案中,第一寡核苷酸包含与靶标的互补性。

[0025] 在某些实施方案中,第一寡核苷酸包含与靶标的完全互补性。

[0026] 在某些实施方案中,L包括乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸二酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、酰胺、氨基甲酸酯或其组合。

[0027] 在某些实施方案中, X^c 选自脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂、核苷类似物和内源性大麻素。在某些实施方案中, X^c 包括N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分或其衍生物。在某些实施方案中, X^c 对低密度脂蛋白和中密度脂蛋白之一或两者具有亲和力。在某些实施方案中, X^c 为具有少于三个双键的饱和或不饱和部分。在某些实施方案中, X^c 对高密度脂蛋白具有亲和力。在某些实施方案中, X^c 为具有三个或更多个双键的多不饱和部分。

[0028] 在某些实施方案中,至少一个聚合物选自疏水聚碳酸酯、聚酯、两亲嵌段共聚物、疏水嵌段聚合物、多糖和多肽。在某些实施方案中,疏水聚碳酸酯是聚(DTR碳酸酯)。在某些实施方案中,聚酯选自聚羟基链烷酸酯、聚己内酯、聚(羟基丁酸酯-羟基戊酸酯)、聚乙醇酸和聚乳酸。在某些实施方案中,两亲嵌段共聚物选自聚乙烯吡咯烷酮、聚(2-乙基-2-噁唑啉)、丙烯腈苯乙烯丙烯酸酯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺和聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)。在某些实施方案中,疏水嵌段共聚物选自聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)、聚(N,N-二乙基苯胺)、聚(二苯胺)和聚(甲基丙烯酸四氢糠酯)。在某些实施方案中,多糖选自可溶性聚葡萄糖、不溶性聚葡萄糖、纤维素、糖原和支链淀粉。在某些实施方案中,多肽是聚赖氨酸、聚精氨酸、聚丙氨酸、聚异亮氨酸、聚甲硫氨酸、聚苯丙氨酸、聚缬氨酸、聚脯氨酸和聚甘氨酸,及其任意组合。在某些实施方案中,PEG的分子量选自约10,000Da、约20,000Da、约40,000Da、约60,000Da、约80,000Da和约100,000Da。

[0029] 在某些实施方案中,PK修饰锚包含多于一个聚合物。在某些实施方案中,PK修饰锚

包含2、3或4个聚合物。

[0030] 在某些实施方案中,第一寡核苷酸包含21、22、23、24、25、26、27或28个核苷酸并且聚合物是PEG。

[0031] 在某些实施方案中,第一寡核苷酸包含一个或更多个经化学修饰的核苷酸。在某些实施方案中,第一寡核苷酸是完全经化学修饰的或部分经化学修饰的。在某些实施方案中,第一寡核苷酸包含一个或更多个锁核酸(locked nucleic acid,LNA)或者一个或更多个肽核酸(peptide nucleic acid,PNA)。在某些实施方案中,第一寡核苷酸包含一个或更多个S-受限乙基(S-constrained-ethyl)(cET)。在某些实施方案中,第一寡核苷酸包含约50%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约55%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约60%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约65%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约70%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约75%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约80%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约85%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约90%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约95%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约96%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约97%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约98%的2'-甲氧基-核糖核苷酸、约99%的2'-甲氧基-核糖核苷酸或约100%的2'-甲氧基-核糖核苷酸。在某些实施方案中,第一寡核苷酸包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸。在某些实施方案中,第一寡核苷酸的核苷酸通过磷酸二酯键、硫代磷酸酯键或磷酸二酯键与硫代磷酸酯键的组合进行连接。

[0032] 在某些实施方案中,(1)第一寡核苷酸包含交替的2'-甲氧基-核糖核苷酸和2'-氟-核糖核苷酸,其中每个核苷酸为2'-甲氧基-核糖核苷酸或2'-氟-核糖核苷酸,并且来自第一寡核苷酸的5'末端的第2位和第14位的核苷酸不是2'-甲氧基-核糖核苷酸;并且(2)第一寡核苷酸的核苷酸通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键与相邻核苷酸连接,其中来自3'末端的第1至6位或来自3'末端的第1至7位的核苷酸通过硫代磷酸酯键与相邻核苷酸连接。

[0033] 在某些实施方案中,化合物还包含含有至少12个连续核苷酸、5'末端、3'末端的第二寡核苷酸;并且其中第一寡核苷酸的一部分与第二寡核苷酸的一部分互补。

[0034] 在某些实施方案中,第二寡核苷酸包含缀合物部分 X^c 。在某些实施方案中,第二寡核苷酸用接头L与 X^c 连接。在某些实施方案中,L包括乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸二酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、酰胺、氨基甲酸酯或其组合。在某些实施方案中, X^c 连接在第二寡核苷酸的5'末端、3'末端、内部位置处或其混合处。在某些实施方案中, X^c 连接在第二寡核苷酸的3'末端。在某些实施方案中, X^c 选自脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂、核苷类似物和内源性大麻素。在某些实施方案中, X^c 包括N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分或其衍生物。在某些实施方案中, X^c 对低密度脂蛋白和中密度脂蛋白之一或两者具有亲和力。在某些实施方案中, X^c 为具有少于三个双键的饱和或不饱和部分。在某些实施方案中, X^c 对高密度脂蛋白具有亲和力。在某些实施方案中, X^c 为具有三个或更多个双键的多不饱和部分。

[0035] 在某些实施方案中,锚定寡核苷酸与第一寡核苷酸完全互补。在某些实施方案中,锚定寡核苷酸相对于第一寡核苷酸包含一个、两个、三个或四个错配。

[0036] 在某些实施方案中,锚定寡核苷酸包含一个或更多个经化学修饰的核苷酸。在某些实施方案中,锚定寡核苷酸是完全经化学修饰的或部分经化学修饰的。在某些实施方案中,锚定寡核苷酸包含一个或更多个锁核酸(LNA)或者一个或更多个肽核酸(PNA)。在某些

实施方案中,锚定寡核苷酸包含一个或更多个S-受限乙基(cET)。在某些实施方案中,锚定寡核苷酸包含交替的2'-O-甲基核糖核苷酸和2'-氟代核糖核苷酸。在某些实施方案中,锚定寡核苷酸包含交替的2'-O-甲基核糖核苷酸和2'-氟代核糖核苷酸以及在5'末端和3'末端的至少两个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,锚定寡核苷酸包含交替的2'-O-甲基核糖核苷酸和2'-氟代核糖核苷酸以及在每个核苷酸位置处的硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,锚定寡核苷酸包含在5'末端和3'末端的至少两个相邻的2',4'-受限2'0-乙基桥接核酸。在某些实施方案中,锚定寡核苷酸包含在每个核苷酸位置处的2',4'-受限2'0-乙基桥接核酸和在每个相邻核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键。在某些实施方案中,锚定寡核苷酸包含交替的2'-O-甲基核糖核苷酸和2'-氟代核糖核苷酸以及在5'末端和3'末端的至少两个2',4'-受限2'0-乙基桥接核酸。在某些实施方案中,锚定寡核苷酸包含在每个核苷酸位置处的肽核酸。

[0037] 在某些实施方案中,锚定寡核苷酸在5'末端、3'末端、内部位置处或其混合处与聚合物连接。

[0038] 在某些实施方案中,寡核苷酸中的至少两个是交联的。

[0039] 在某些实施方案中,化合物还包含纳米粒、嵌入剂、聚阳离子或其混合物。

[0040] 在某些实施方案中,a)第一寡核苷酸的长度为21个核苷酸至25个核苷酸;b)第二寡核苷酸的长度为13个核苷酸至17个核苷酸;并且c)锚定寡核苷酸的长度为5个核苷酸至8个核苷酸。

[0041] 在某些实施方案中,a)第一寡核苷酸的长度为21个核苷酸;b)第二寡核苷酸的长度为13个核苷酸;并且c)锚定寡核苷酸的长度为8个核苷酸。

[0042] 在某些实施方案中,a)第一寡核苷酸的长度为23个核苷酸;b)第二寡核苷酸的长度为15个核苷酸;并且c)锚定寡核苷酸的长度为8个核苷酸。

[0043] 在某些实施方案中,a)第一寡核苷酸的长度为25个核苷酸;b)第二寡核苷酸的长度为17个核苷酸;并且c)锚定寡核苷酸的长度为8个核苷酸。

[0044] 在某些实施方案中,聚合物包括PEG。

[0045] 在某些实施方案中,PK修饰锚影响寡核苷酸治疗剂在身体部位中随时间的稳定性,所述身体部位包括心、肾、肝、脾、肾上腺、胰腺、肺、血液、血浆、脑或其混合,其中影响包括分布体积、曲线下面积、清除率、半衰期最大浓度、生物利用度的变化或其混合。

[0046] 在某些实施方案中,第一寡核苷酸中的核苷酸数目包括与第二寡核苷酸和锚定寡核苷酸中的核苷酸相加后相同的数目。在某些实施方案中,第一寡核苷酸中的核苷酸数目包括比第二寡核苷酸和锚定寡核苷酸中的核苷酸相加后更多的数目。在某些实施方案中,第一寡核苷酸中的核苷酸数目包括比第二寡核苷酸和锚定寡核苷酸中的核苷酸相加后更少的数目。

[0047] 在一个方面中,本公开内容提供了包含以下的化合物:第一寡核苷酸,其中第一寡核苷酸的长度为21个核苷酸,具有5'末端、3'末端,并且与靶标互补;第二寡核苷酸,其中第二寡核苷酸的长度为13个核苷酸,具有5'末端、3'末端,并且与第一寡核苷酸的第1至13个核苷酸互补;以及锚定寡核苷酸,其中锚定寡核苷酸的长度为8个核苷酸,具有5'末端、3'末端,并且与第一寡核苷酸的第14至21个核苷酸互补,其中第二寡核苷酸在3'末端与包括胆固醇、二氯乙酸酯、二十二碳六烯酸或N-乙酰半乳糖胺的分子连接,其中锚定寡核苷酸与分

子量为10,000至40,000道尔顿的聚乙二醇聚合物连接,并且其中第一寡核苷酸包含与第二寡核苷酸和锚定寡核苷酸二者的互补性以形成不对称双链体。

[0048] 在某些实施方案中,化合物还包含药学活性载体。

[0049] 在另一个方面中,本公开内容提供了包含上述化合物和可药用载体的药物组合物。

[0050] 在另一个方面中,本公开内容提供了用于在有此需要的患者中治疗疾病或病症的方法,其包括向所述患者施用上述化合物。

[0051] 在一个方面中,本公开内容提供了治疗患有疾病或病症的患者的方法,其包括施用包含第一寡核苷酸、第二寡核苷酸和锚定寡核苷酸的不对称寡核苷酸双链体,其中锚定寡核苷酸包含药代动力学修饰部分,并且其中第一寡核苷酸可与第二寡核苷酸和锚定寡核苷酸二者配对以形成不对称寡核苷酸双链体。

[0052] 在一个方面中,本公开内容提供了将化合物递送至对象的肝的方法,其包括向对象施用包含以下的化合物:第一寡核苷酸,其中第一寡核苷酸包含至少16个连续核苷酸、5'末端、3'末端,并且包含与靶标的互补性;第二寡核苷酸,其包含至少12个连续核苷酸、5'末端、3'末端,其中第一寡核苷酸的一部分与第二寡核苷酸的一部分互补,并且其中第二寡核苷酸包含N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分或其衍生物;以及药代动力学(PK)修饰锚,其包含锚定寡核苷酸、任选接头和至少一个聚合物,其中锚定寡核苷酸包含与第一寡核苷酸互补的约5至约15个核苷酸,并且其中聚合物为至少约2,000Da。

[0053] 在一个方面中,本公开内容提供了不对称双链体,其包含第一寡核苷酸链、第二寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链,其中每条寡核苷酸链包含至少一个经化学修饰的核苷酸,其中锚定寡核苷酸链包含药代动力学修饰部分,其中第二寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链各自包含比第一寡核苷酸链更少的核苷酸,并且其中第一寡核苷酸链可与第二寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链二者配对以形成不对称双链体。

[0054] 在某些实施方案中,第一寡核苷酸链包含10至50个核苷酸,其中第二寡核苷酸链包含10至50个核苷酸,并且其中锚定寡核苷酸包含5至15个核苷酸。

[0055] 在某些实施方案中,第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链形成具有双链体区域的siRNA或dsRNA。在某些实施方案中,双链体区域的长度为约10至约50个碱基对。在某些实施方案中,双链体区域的长度为约10至约15、约10至约20、约10至约25或约10至约30个碱基对。在某些实施方案中,双链体区域为13、14、15、16、17或18个碱基对。

[0056] 在某些实施方案中,第一寡核苷酸链的长度为至少16个核苷酸,其中第二寡核苷酸链的长度为至少11个核苷酸,并且其中锚定寡核苷酸的长度为约5至15个核苷酸。在某些实施方案中,第一寡核苷酸链的长度为约21至23个核苷酸,其中第二寡核苷酸链的长度为约13至16个核苷酸,并且其中锚定寡核苷酸的长度为约5至10个核苷酸。在某些实施方案中,第一寡核苷酸链的长度为21个核苷酸,其中第二寡核苷酸链的长度为13个核苷酸,并且其中锚定寡核苷酸的长度为8个核苷酸。

[0057] 在某些实施方案中,至少一个经化学修饰的核苷酸包括2'-O-甲基-核糖核苷酸、2'-氟-核糖核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸间键、锁核酸、2',4'-受限2'-O-乙基桥接核酸、肽核酸或其混合物。

[0058] 在某些实施方案中,第二寡核苷酸链包含连接在5'末端、3'末端、内部位置处或其

混合处的配体。

[0059] 在某些实施方案中,第二链的配体包括脂质、亲脂体、萜烯、糖、肽、蛋白质、烷基链、凝集素、糖蛋白、激素、药物、碳水化合物、抗体、适配体、维生素、阳离子型染料、生物活性缀合物、卟啉、多环芳烃、合成聚合物或其混合物。在某些实施方案中,第二链的配体包括脂肪酸、类固醇、开环类固醇、聚胺、神经节苷脂、核苷类似物、内源性大麻素、 ω -3脂肪酸、 ω -6脂肪酸、 ω -9脂肪酸、共轭亚麻酸、饱和脂肪酸或其混合物。在某些实施方案中,第二链的配体包括胆固醇、二十二碳六烯酸、共轭磷脂酰胆碱、N-乙酰半乳糖胺、二氯乙酸、上皮细胞黏附分子适配体、胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、双氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶基氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基、吩噻嗪或其混合物。

[0060] 在某些实施方案中,第二链还包含将配体与第二链连接的接头。

[0061] 在一个方面中,本公开内容提供了不对称双链体,其包含长度为21个核苷酸的第一寡核苷酸链、长度为13个核苷酸的第二寡核苷酸链和长度为8个核苷酸的锚定寡核苷酸链,其中每条寡核苷酸链包含交替的2'-氟-核糖核苷酸和2'-甲氧基-核糖核苷酸,其中第一链包含在5'末端的两个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键和在3'末端的八个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键,其中第二寡核苷酸链包含在5'末端的两个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键和在3'末端的两个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键,以及在3'末端与包括胆固醇、二氯乙酸酯、二十二碳六烯酸或N-乙酰半乳糖胺的分子连接的接头,其中锚定寡核苷酸链包含在5'末端的七个相邻的硫代磷酸酯核苷酸间键,和在3'末端与药代动力学修饰部分连接的接头,该药代动力学修饰部分包括分子量为10,000至40,000道尔顿的聚乙二醇聚合物,并且其中第一寡核苷酸链可与第二寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链二者配对以形成不对称双链体。

[0062] 在一个方面中,本公开内容提供了治疗患有疾病或病症的患者的方法,其包括施用包含第一寡核苷酸链、第二寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链的不对称寡核苷酸双链体,其中锚定寡核苷酸链包含药代动力学修饰部分,并且其中第一寡核苷酸链可与第二寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链二者配对以形成不对称寡核苷酸双链体。

[0063] 在一个方面中,本公开内容提供了不对称发夹双链体,其包含发夹寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链,其中发夹寡核苷酸链包含突出端并且可与锚定寡核苷酸链配对以形成不对称发夹双链体,并且其中锚定寡核苷酸链包含药代动力学修饰部分。

[0064] 在一个方面中,本公开内容提供了药物组合物,其包含含有第一寡核苷酸链、第二寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链的不对称寡核苷酸双链体,其中锚定寡核苷酸链包含药代动力学修饰部分,并且其中第一寡核苷酸链可与第二寡核苷酸链和锚定寡核苷酸链二者配对以形成不对称寡核苷酸双链体。

[0065] 在一个方面中,本公开内容提供了长度为约5至8个核苷酸的通用锚定寡核苷酸和在5'末端的药代动力学修饰部分,其中至少一个核苷酸包含化学修饰,其中锚定寡核苷酸可结合包含第一寡核苷酸链、第二寡核苷酸链的不对称寡核苷酸双链体,并且其中寡核苷酸锚的序列与第一寡核苷酸链在3'末端的区域互补。

[0066] 在某些实施方案中,第一链和锚定链包含的GC含量为约35至约100%。

附图说明

[0067] 通过以下结合附图对举例说明性实施方案的详细描述,将更全面地理解本发明的前述和其他特征和优势。本专利或申请文件包含至少一幅彩色附图。在提出请求并支付必要的费用之后,官方将提供带有彩色附图的该专利或专利申请公开的副本。

[0068] 图1图示性地示出了根据某些示例性实施方案的不对称siRNA的化学结构。在一个非限制性实例中,在此示出的经疏水修饰的siRNA (hydrophobically modified siRNA, hsiRNA) 由通过21个寡核苷酸 (21聚体) 反义链和包含疏水胆固醇部分的13聚体有义链形成的不对称双链体组成。不对称hsiRNA还包含具有与其连接的药代动力学 (PK) 修饰聚合物的互补寡核苷酸锚 (例如8聚体)。互补寡核苷酸锚 (例如8聚体) 与互补的反义链杂交。2'-O-甲基以黑色示出,2'-氟代以灰色示出,并且硫代磷酸酯键用红色连接号示出。

[0069] 图2图示性地示出了不对称siRNA和互补的包含寡核苷酸的锚的示例性构型。反义链包含可与寡核苷酸锚配对的突出端。在一个非限制性实例中,在此示出的是可与以下杂交的21聚体反义链:13聚体有义链和8聚体寡核苷酸锚;14聚体有义链和7聚体锚;15聚体有义链和6聚体锚;或16聚体有义链和5聚体锚。在某些实施方案中,杂交的寡聚体可包含一个、两个、三个或更多个错配。参见 (图24。)

[0070] 图3图示性地示出了包括亲水聚碳酸酯、嵌段共聚物 (例如,两亲嵌段共聚物、亲水嵌段共聚物或泊洛沙姆)、聚乙二醇和多糖 (例如,糊精或壳聚糖) 的PK修饰部分的示例性实施方案。

[0071] 图4图示性地示出了根据本文中另外描述的某些示例性实施方案的连接在一起的两个不对称siRNA双链体。如示出的,PK修饰部分与每个寡核苷酸锚连接,使得当寡核苷酸锚与siRNA双链体结合时,siRNA构建体包含两个PK修饰部分。在该实施方案中,顶部支架表示使用动态PK修饰锚,并且底部支架由稳定连接的PK修饰剂组成。不旨在受限于科学理论,给予顶部支架的动态性质,预期这将允许改善体内分布和保留。

[0072] 图5图示性地示出了将PK修饰部分与寡核苷酸连接的示例性构型。分支模式允许将多个PK修饰聚合物与每个寡核苷酸锚连接。在此示出了具有1、2、3或4个PK修饰聚合物的siRNA。

[0073] 图6图示性地示出了未缀合或与脂质缀合的不对称siRNA。示例性脂质包括但不限于胆固醇、二十二碳六烯酸缀合的磷脂酰胆碱 (PC-DHA)、二氯乙酸 (dichloroacetic acid, DCA) 或上皮细胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 适配体。

[0074] 图7图示性地示出了胆固醇缀合的siRNA和递送系统。合适的递送系统包括但不限于脂质纳米粒、外排体、微泡等。

[0075] 图8A至图8B示出了在静脉注射之后未缀合的 (图8A) 和胆固醇缀合的 (图8B) hsiRNA的血液/血浆循环时间和曲线下面积。在雌性FVB/N小鼠 (约9至12周龄) 中进行20mg/kg尾静脉注射。

[0076] 图9A至图9G示出了PK修饰锚对体内生物分布的作用。聚乙二醇 (PEG) 用作PK修饰聚合物。siRNA不对称双链体包含21聚体寡核苷酸反义链和13聚体寡核苷酸有义链。使用了完全硫代磷酸酯化的8聚体寡核苷酸锚。在雌性FVB/N小鼠 (约9至12周龄) 中进行20mg/kg尾静脉注射。在48小时之后,使用肽核酸杂交测定对反义链进行定量。显示了肝 (图9A)、脾 (图9B)、肾 (图9C)、肾上腺 (图9D)、心 (图9E)、胰腺 (图9F) 和肺 (图9G) 的hsiRNA的生物分布。

[0077] 图10A至图10C示出了通过mRNA表达测量的在静脉注射之后PK修饰锚对hsiRNA化合物递送的作用。测试肝(图10A)、肾(图10B)和脾(图10C)中的mRNA表达。在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg尾静脉注射。在注射之后48小时收集组织,并使用QuantiGene b-DNA测定对mRNA表达进行定量。

[0078] 图11A至图11C示出了在脑室内注射(图11A和图11B)和鞘内注射(图11C)之后,PK修饰锚对hsiRNA化合物在中枢神经系统中的体内生物分布的作用。在图11A中,将4nmol(或约250 μ g)的hsiRNA注射至侧脑室以导致约2nmol/脑室的浓度。在图11B中,将20nmol的hsiRNA注射至侧脑室以导致约10nmol/脑室的浓度。hsiRNA在小鼠脑中的分布在图11A和图11B中示出。在图11C中,将10nmol的hsiRNA通过鞘内注射在L5和L6之间进行注射。hsiRNA在小鼠脊柱中的分布在图11C中示出。在注射之后48小时收集小鼠脑和脊柱组织,并用DAPI(核,蓝色)进行染色。使用Leica DMi8荧光显微镜对脑和组织进行成像。

[0079] 图12示出了根据某些示例性实施方案的疏水聚碳酸酯聚合物。

[0080] 图13示出了根据某些示例性实施方案的聚酯聚合物。

[0081] 图14示出了根据某些示例性实施方案的两亲嵌段共聚物。

[0082] 图15示出了根据某些示例性实施方案的亲水嵌段共聚物。

[0083] 图16示出了根据某些示例性实施方案的多糖聚合物。

[0084] 图17示出了在IV施用之后的肾分布。

[0085] 图18示出了在IV施用之后的肝分布。

[0086] 图19示出了在IV施用之后的脾分布。

[0087] 图20示出了在皮下(subcutaneous, SC)施用之后的肾分布。

[0088] 图21示出了在SC施用之后的肝分布。

[0089] 图22示出了在SC施用之后的脾分布。

[0090] 图23示出了在SC施用之后的皮肤分布。

[0091] 图24图示性地示出了不对称siRNA和具有用于T_m优化的错配的互补的包含寡核苷酸的锚的示例性构型。

[0092] 图25图示性地示出了包含多种化学修饰的不对称siRNA的示例性构型。

[0093] 图26图示性地示出了用于递送其他类别的核苷酸,例如ASO(显示为例如与核糖核酸酶H或剪接转换相容)、微RNA、mRNA、CRISPR指导链等的动态寡核苷酸锚。

[0094] 图27图示性地示出了不对称siRNA和互补的包含寡核苷酸的锚的示例性构型。圆表示可用于靶向多种不同mRNA的siRNA构建体的多个动态寡核苷酸锚的固定序列。在某些实施方案中,反义链的长度提高至总共23个核苷酸。在某些实施方案中,第18至23位的核苷酸不与mRNA靶标杂交。在某些实施方案中,提供了可与靶向不同mRNA靶标的多种siRNA一起使用的固定/保守寡核苷酸锚定区域。在某些实施方案中,反义链的3'末端可与或可不与mRNA靶标完全互补。在某些实施方案中,使用5聚体至10聚体的锚。

[0095] 图28A至图28B图解地示出了PK修饰锚动态地改善了亲本hsiRNA化合物的血液/血浆循环时间。PK修饰锚在皮下注射之后增强了(图28A)未缀合的和(图28B)胆固醇缀合的hsiRNA的曲线下面积。PK修饰锚延迟了达到峰值的时间并且有效减缓了亲本hsiRNA化合物的清除动力学。在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg尾静脉注射。反义链通过如先前在Godinho et al. (2017) *Nucleic Acids Therapeutics*中描述的肽核酸(PNA)杂交测

定进行定量。简而言之,该测定使用与反义链杂交的cy3标记的PNA探针,随后通过HPLC进行定量。AUC是使用模型独立的梯形方法与GastroPlus、Simulations Plus一起来计算的。聚乙二醇(PEG)用作模型PK修饰部分,并且完全硫代磷酸酯化的8聚体用作模型锚以调节相应亲本as21-s13化合物的循环时间。PK修饰部分以及锚的长度和化学性质二者可根据递送目的/目标进行调整。

[0096] 图29图解地示出了PK修饰锚调节了亲本hsiRNA化合物的全身性体内生物分布。PK修饰锚在皮下注射之后显著影响了未缀合的(红色色调)和胆固醇缀合(黑色色调)的hsiRNA的生物分布。广义地,PK修饰部分改善了未缀合的寡向大多数器官的递送。在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)的肩胛骨之间进行20mg/kg皮下注射。在48小时之后通过PNA杂交测定对反义链进行定量。聚乙二醇(PEG)用作模型PK修饰部分,并且完全硫代磷酸酯化的8聚体用作模型锚以调节相应亲本as21-s13化合物的循环时间。PK修饰部分以及锚的长度和化学性质二者可根据递送目的/目标进行调整。

[0097] 图30示出了使用10kDa、20kDa和40kDa的PK修饰锚进行的凝胶迁移测定的结果。锚的结合在有和无胆固醇缀合物的不对称siRNA双链体上进行。不对称siRNA双链体反义链的长度为21个核苷酸,有义链的长度为13个核苷酸,并且与反义链尾互补的锚的长度为8个核苷酸。不对称siRNA双链体在有义链5'末端被Cy3标记。

[0098] 图31示出了当通过静脉内和皮下施用进行全身施用用于测量血液浓度谱和组织分布谱的代表性siRNA结构。

[0099] 图32A至图32F示出了与如图31所示的一组不对称siRNA双链体结构配对的PK修饰锚的血液浓度谱。聚乙二醇(PEG)用作PK修饰聚合物。siRNA不对称双链体包含21聚体寡核苷酸反义链和13聚体寡核苷酸有义链。使用了完全硫代磷酸酯化的8聚体寡核苷酸锚。在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg尾静脉注射。在48小时之后,使用肽核酸杂交测定对反义链进行定量。显示了未缀合的siRNA(图32A)、GalNAc缀合的siRNA(图32B)、DHA缀合的siRNA(图32C)、双分支的siRNA(图32D)、胆固醇缀合的siRNA(图32E)和DCA缀合的siRNA(图32F)的siRNA的血液浓度水平。

[0100] 图33A至图33F示出了与如图31所示的一组不对称siRNA双链体结构配对的PK修饰锚的组织分布谱。聚乙二醇(PEG)用作PK修饰聚合物。siRNA不对称双链体包含21聚体寡核苷酸反义链和13聚体寡核苷酸有义链。使用了完全硫代磷酸酯化的8聚体寡核苷酸锚。在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg尾静脉注射。在48小时之后,使用肽核酸杂交测定对反义链进行定量。显示了未缀合的siRNA(图33A)、GalNAc缀合的siRNA(图33B)、DHA缀合的siRNA(图33C)、双分支的siRNA(图33D)、胆固醇缀合的siRNA(图33E)和DCA缀合的siRNA(图33F)的siRNA的血液浓度水平。

[0101] 图34A至图34B示出了与如图31所示的未缀合的siRNA(图34A)或双分支的siRNA(图34B)配对的PK修饰锚的血液浓度谱。聚乙二醇(PEG)用作PK修饰聚合物。siRNA不对称双链体包含21聚体寡核苷酸反义链和13聚体寡核苷酸有义链。使用了完全硫代磷酸酯化的8聚体寡核苷酸锚。在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg皮下注射。在48小时之后,使用肽核酸杂交测定对反义链进行定量。

[0102] 图35A至图35B示出了与如图31所示的未缀合的siRNA(图35A)或双分支的siRNA(图35B)配对的PK修饰锚的组织分布谱。聚乙二醇(PEG)用作PK修饰聚合物。siRNA不对称双

链体包含21聚体寡核苷酸反义链和13聚体寡核苷酸有义链。使用了完全硫代磷酸酯化的8聚体寡核苷酸锚。在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg皮下注射。在48小时之后,使用肽核酸杂交测定对反义链进行定量。

[0103] 图36示出了用于具有PK修饰锚的适配体-siRNA嵌合体的递送方案。在荷瘤Balb-c小鼠中进行20mg/kg皮下注射。小鼠具有4T1E乳腺癌细胞系肿瘤和P815肥大细胞瘤肿瘤。

[0104] 图37A至图37B示出了与如图36所示的适配体-siRNA嵌合体配对的PK修饰锚的血液浓度谱(图37A)和组织分布谱(图37B)。适配体与EPCAM受体结合,用于递送至4T1E肿瘤。聚乙二醇(PEG)用作PK修饰聚合物。siRNA不对称双链体包含21聚体寡核苷酸反义链和13聚体寡核苷酸有义链。使用了完全硫代磷酸酯化的8聚体寡核苷酸锚。适配体与有义链3'末端缀合。在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg皮下注射。在48小时之后,使用肽核酸杂交测定对反义链进行定量。

[0105] 图38A至图38C示出了与未缀合的siRNA或双分支的siRNA配对的PK修饰锚的组织分布谱。siRNA通过静脉内或皮下施用进行递送。聚乙二醇(PEG)用作PK修饰聚合物。图38A示出了肝分布,图38B示出了脾分布,并且图38C示出了肾分布。

[0106] 图39示出了具有与未缀合的siRNA配对的PK修饰锚的小鼠胎盘的组织分布。siRNA通过皮下施用进行递送。如时间线所示,递送了两个20mg/kg剂量。使用妊娠的雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄,4只小鼠/组)并且在最后一次注射之后48小时收集组织。肽核酸(PNA)杂交测定用于反义定量。

[0107] 图40示出了sFlt-1mRNA沉默在具有与未缀合的siRNA配对的PK修饰锚的所选择组织中的效力。siRNA通过皮下施用进行递送。如时间线所示,递送了两个20mg/kg剂量。使用妊娠的雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄,6至8只小鼠/组)。分支DNA(branched DNA,bDNA)用于mRNA定量。测量靶mRNA,sFlt-1在胎盘、肝和肾组织中的水平。还测量了小鼠的重量谱,以证明使用PK修饰锚不会引起急性全身性毒性。还确定了一组血液化学和全血计数,以证明使用PK修饰锚不会引起急性全身性毒性。

[0108] 图41示出了通过静脉内或皮下施用将GalNAc缀合的siRNA递送至肝。比较了21-13-8和25-17-8siRNA-PK修饰锚的分布。25-17-8siRNA-PK修饰锚包含25-核苷酸反义链中第18至25位的核苷酸的保守序列,其构成不对称siRNA的反义链尾。这个8核苷酸的保守序列尾与8-核苷酸的锚互补。

[0109] 图42示出了使用与靶向不对称siRNA的HTT-mRNA配对的8-核苷酸或6-核苷酸PK修饰锚进行的凝胶迁移测定的结果。siRNA具有21-核苷酸反义链和13-核苷酸有义链。使用40kDa的PEG锚。使用siRNA与锚的1:1、1:2和1:4的摩尔比。

[0110] 图43示出了使用与靶向不对称siRNA的sFlt-1mRNA配对的8-核苷酸、7-核苷酸、6-核苷酸或5-核苷酸PK修饰锚进行的凝胶迁移测定的结果。siRNA具有21-核苷酸反义链和13-核苷酸有义链。使用40kDa的PEG锚。使用siRNA与锚的1:1、1:2和1:4的摩尔比。

[0111] 图44示出了使用与靶向不对称siRNA的sFlt-1mRNA配对的7-核苷酸、6-核苷酸或5-核苷酸PK修饰锚进行的凝胶迁移测定的结果。siRNA具有21-核苷酸反义链。7-核苷酸锚与14-核苷酸有义链配对。6-核苷酸锚与15-核苷酸有义链配对。5-核苷酸锚与16-核苷酸有义链配对。使用40kDa的PEG锚。使用siRNA与锚的1:1、1:2和1:4的摩尔比。

[0112] 图45图示性地示出了通用PK修饰锚序列的设计。在选择1下,从23-核苷酸反义链

的第18位核苷酸开始,将6-核苷酸的通用序列改造到反义链中。在选择1下的第一实例中,使用17-核苷酸有义链以及与反义链上的6-核苷酸通用序列互补的6-核苷酸锚序列。在选择1下的第二实例中,使用15-核苷酸有义链以及8-核苷酸锚序列,该8-核苷酸锚序列与反义链上的6-核苷酸通用序列互补并且其他2个核苷酸与反义链的第16和17位核苷酸互补,这将根据为反义链选择的靶序列而改变。在选择2下,从25-核苷酸反义链的第18位核苷酸开始,将8-核苷酸的通用序列改造到反义链中。在选择2下,使用17-核苷酸有义链以及与反义链上的8-核苷酸通用序列互补的8-核苷酸锚序列。

[0113] 图46A至图46B示出了靶Htt mRNA的mRNA沉默效力。采用23-核苷酸反义链序列(图46A)和25-核苷酸反义链序列(图46B)。在HeLa细胞中在72小时孵育情况下进行剂量响应。bDNA测定用于mRNA评估。将结果相对于HPRT或PP1B归一化。

具体实施方式

[0114] 本公开内容涉及包含药代动力学(PK)修饰锚的治疗性寡核苷酸(例如治疗性siRNA)。包含如本文中提供的PK修饰锚的治疗性寡核苷酸有效地调节在相关体液/生物流体(例如脑脊液和血浆)和其他组织中的吸收、分布和清除动力学。PK修饰锚能够功能性递送至多种组织,例如如,心、肾、肝、脾、肾上腺、胰腺、肺、血液(例如血浆)和脑组织。

[0115] 定义

[0116] 除非本文中另作限定,否则本文中使用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。在任何潜在歧义的情况下,本文中提供的定义优先于任何字典或外在限定。除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数形式,并且复数术语应包括单数形式。除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。术语“包括”以及其他形式例如“包含”和“含有”的使用不是限制性的。除非另有说明,否则本文中使用的没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。因此,例如,提及“蛋白质”包括多个/种蛋白质分子。

[0117] 总体而言,与本文中所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学以及杂交结合使用的命名法是本领域公知并且常用的那些。除非另作指示,否则本文中提供的方法和技术一般是根据本领域公知的并且如本说明书全篇所引用和论述的多种一般和更具体的参考文献中所描述的常规方法来进行。如本领域通常所实现或如本文中所描述的酶促反应和纯化技术是根据制造商的说明进行的。与本文中所描述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学结合使用的命名法以及本文中所描述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学的实验室程序和技术是本领域公知并且常用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0118] 为了可更容易地理解本公开内容,下面定义了选择的术语。

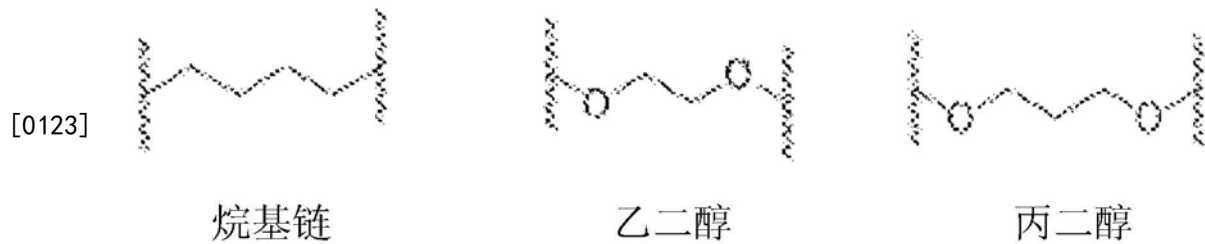
[0119] 本文中使用的术语“药代动力学修饰”或“PK修饰”是指可用于随时间修改治疗剂(例如,RNAi剂)浓度的化合物。在某些实施方案中,PK修饰剂在对象中在一个或多个位置(例如,在心、肾、肝、脾、肾上腺、胰腺、肺、血液(例如血浆)和/或脑组织中)中影响治疗剂的稳定性。改变的PK参数包括但不限于分布体积(V_d)、曲线下面积(area under the curve, AUC)、清除率(clearance, CL)、半衰期($t_{1/2}$)、最大浓度(C_{max})、生物利用度(F)等。

[0120] 本文中使用的术语“药代动力学修饰锚”、“PK修饰锚”或“Z”是指包含通过任选接头与聚合物连接的寡核苷酸锚的构建体。Z的寡核苷酸锚可与寡核苷酸,例如双链核酸序列

的突出端或单链核酸序列的一部分互补。通过寡核苷酸锚的杂交,聚合物可与寡核苷酸,例如双链核酸序列的突出端或单链寡核苷酸的一部分连接。Z的聚合物部分可包含PK修饰部分。

[0121] 在某些实施方案中,本文中所描述的聚合物(例如,PK修饰聚合物)直接与寡核苷酸锚(例如,无单独的接头)连接。

[0122] 在某些实施方案中,寡核苷酸锚通过提供官能团的接头与聚合物连接,由此聚合物与寡核苷酸锚连接。在某些实施方案中,接头可以是烷基链,例如从约一个碳高至约25个碳,或者明确限定的丙二醇或乙二醇链,例如约1至约25个单元。示例性接头是:



[0124] 在某些实施方案中,当与靶寡核苷酸杂交时,Z的寡核苷酸锚具有的GC含量为约35%至约100%。在某些实施方案中,当与靶寡核苷酸杂交时,Z的寡核苷酸锚具有的GC含量为约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%。

[0125] 在某些实施方案中,靶寡核苷酸包含在其3'末端的与寡核苷酸锚的固定或保守区域互补的固定或保守区域。在某些实施方案中,靶寡核苷酸的固定或保守区域与靶mRNA完全互补、部分互补或不互补。

[0126] 在某些示例性实施方案中,Z包含多于一个的聚合物。在某些示例性实施方案中,Z包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个聚合物。在某些示例性实施方案中,Z包含2、3、4或更多个聚合物。

[0127] 在某些示例性实施方案中,Z包含分子量从约2,000道尔顿(Da)至约100,000Da(包括其间的的所有值)变化的聚合物部分。在某些示例性实施方案中,聚合物的分子量为约2,000Da、约2,500Da、约3,000Da、约3,500Da、约4,000Da、约4,500Da、约5,000Da、约5,500Da、约6,000Da、约6,500Da、约7,000Da、约7,500Da、约8,000Da、约8,500Da、约9,000Da、约9,500Da或约10,000Da,包括其间的的所有值。在某些示例性实施方案中,聚合物的分子量为约10,000Da、约15,000Da、约20,000Da、约25,000Da、约30,000Da、约35,000Da、约40,000Da、约45,000Da、约50,000Da、约55,000Da、约60,000Da、约65,000Da、约70,000Da、约75,000Da、约80,000Da、约85,000Da、约90,000Da、约95,000Da或约100,000Da,包括其间的的所有值。在某些示例性实施方案中,聚合物的分子量为约2,000Da、约4,500Da、约10,000Da、约20,000Da、约40,000Da或约100,000Da。

[0128] 在某些示例性实施方案中,合适的聚合物可包括亲水聚碳酸酯、聚乙二醇(PEG)、嵌段共聚物(包括例如,两亲或亲水嵌段共聚物)、泊洛沙姆、多糖(包括例如,糊精或壳聚糖)和聚(乳酸-共-乙醇酸)(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)中的一种或任意组合。合适的PK修饰部分的示例性实施方案在图3中示出。

[0129] 在某些示例性实施方案中,PK修饰聚合物是包含多种类型的聚合物亚单元的杂交聚合物。示例性杂交聚合物是PEG-多肽。(De Marre A, et al.: Synthesis,

characterization, and in vitro biodegradation of poly(ethylene glycol) modified poly[5N-(2-hydroxyethyl-L-glutamine)]. *J Bioact Compat Polym* 1996, 11:85-99.76. Chen C, Wang Z, Li Z: Thermoresponsive polypeptides from pegylated poly-L-glutamates. *Biomacromolecules* 2011, 12:2859-2863.)

[0130] 在某些示例性实施方案中, Z中使用的聚合物包括PEG, 例如PEG-4、PEG-6、PEG-7、PEG-8、PEG-9、PEG-10、PEG-12、PEG-14、PEG-16、PEG-18、PEG-20、PEG-32、PEG-33、PEG-40、PEG-45、PEG-55、PEG-60、PEG-75、PEG-80、PEG-90、PEG-100、PEG-135、PEG-150、PEG-180、PEG-200、PEG-220、PEG-240、PEG-350、PEG-400、PEG-500、PEG-600、PEG-800、PEG-1000、PEG-1500、PEG-2000、PEG-4000、PEG-5000、PEG-6000、PEG-7000、PEG-8000、PEG-9000、PEG-14,000、PEG-20,000、PEG-23,000、PEG-25,000、PEG-45,000、PEG-65,000、PEG-90,000等中的一种或任意组合。

[0131] 在某些示例性实施方案中, Z中使用的聚合物包括泊洛沙姆。合适的泊洛沙姆包括但不限于泊洛沙姆118、泊洛沙姆188、泊洛沙姆288、泊洛沙姆338、泊洛沙姆407、泊洛沙姆1107或泊洛沙姆1307。市售的泊洛沙姆Synperonics (Croda Healthcare)、普朗尼克(Pluronic) (BASF) 和Kolliphor (BASF) 也是合适的。

[0132] 在某些示例性实施方案中, Z中使用的聚合物包括疏水聚碳酸酯, 例如如, 酪氨酸衍生的聚碳酸酯等(图12)。

[0133] 在某些示例性实施方案中, Z中使用的聚合物包括聚酯, 例如如, 聚羟基链烷酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHA)、聚己内酯(polycaprolactone, PCL)、聚(羟基丁酸酯-羟基戊酸酯)、聚乙醇酸(poly glycolic acid, PGA)、聚乳酸(poly lactic acid, PLA)等(图13)。

[0134] 在某些示例性实施方案中, Z中使用的聚合物包括嵌段共聚物, 例如两亲嵌段共聚物(例如, 聚(2-乙基-2-噁唑啉)(即Aquazol)、聚乙烯吡咯烷酮、丙烯腈苯乙烯丙烯酸酯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酸酰胺、聚乙二醇等)(图14)或亲水嵌段共聚物(例如聚(DMA)、聚(DEA)、聚(DPA)、甲基丙烯酸四氢糠酯、泊洛沙姆(例如, 泊洛沙姆188、泊洛沙姆407、泊洛沙姆338)等(图15)。

[0135] 在某些示例性实施方案中, Z中使用的聚合物包括多糖, 例如, 聚葡萄糖(例如, 可溶性淀粉、不可溶性淀粉)、小纤维素、甲壳素、糖原、直链淀粉、支链淀粉等(图16)。

[0136] 在某些示例性实施方案中, Z中使用的聚合物包括多肽, 例如聚赖氨酸、聚精氨酸或其他带正电荷或疏水氨基酸(例如, 聚丙氨酸、聚异亮氨酸、聚甲硫氨酸、聚苯丙氨酸、聚缬氨酸、聚脯氨酸、聚甘氨酸等, 以及其任意组合)。

[0137] 在某些示例性实施方案中, 优化核苷酸锚的解链点(T_m)以降低相关寡核苷酸的清除率。在某些示例性实施方案中, 锚的 T_m 为约37°C至约70°C, 包括其间的所有值。在某些示例性实施方案中, T_m 为约37°C、约38°C、约39°C、约40°C、约41°C、约42°C、约43°C、约44°C、约45°C、约46°C、约47°C、约48°C、约49°C、约50°C、约51°C、约52°C、约53°C、约54°C、约55°C、约56°C、约57°C、约58°C、约59°C、约60°C、约61°C、约62°C、约63°C、约64°C、约65°C、约66°C、约67°C、约68°C或约70°C, 包括其间的所有值。在某些示例性实施方案中, T_m 为约37°C至约40°C, 包括其间的所有值。在某些示例性实施方案中, T_m 为约40°C至约45°C, 包括其间的所有值。在某些示例性实施方案中, T_m 为约45°C至约50°C, 包括其间的所有值。在某些示

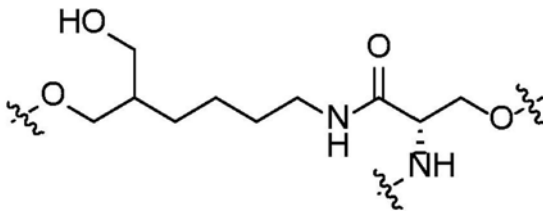
例性实施方案中, T_m 为约 50°C 至约 55°C , 包括其间的所有值。在某些示例性实施方案中, T_m 为约 55°C 至约 60°C , 包括其间的所有值。

[0138] 在某些示例性实施方案中, 多个 PK 修饰聚合物可与单链寡核苷酸、部分双链寡核苷酸或完全双链核酸双链体连接。示例性实施方案在图 5 中示出, 其示出了可用于将 PK 修饰聚合物与寡核苷酸锚连接的多种构型。在某些示例性实施方案中, PK 修饰聚合物可与寡核苷酸锚的 5' 末端和 3' 末端二者连接。在某些示例性实施方案中, 寡核苷酸锚的 3' 末端和 5' 末端二者包含多个 PK 修饰聚合物。某些示例性实施方案包括与寡核苷酸锚的 3' 末端、5' 末端或者 3' 末端和 5' 末端二者连接的 1、2 或 3 个 PK 修饰聚合物。

[0139] 在某些示例性实施方案中, Z 调节其中两个或更多个双链寡核苷酸连接在一起的分枝寡核苷酸的递送。在某些实施方案中, PK 修饰聚合物与双链寡核苷酸的寡核苷酸锚连接。在这样的构型中, 两个或更多个 PK 修饰锚可与连接的双链寡核苷酸连接。

[0140] 本文中使用的术语“L”是指接头。L 可选自乙二醇链、烷基链、肽、RNA、DNA、磷酸二酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、酰胺和氨基甲酸酯, 以及其任意组合。在某些实施方案中, L 通过第二寡核苷酸与 O 连接。在某些实施方案中, L 是二价接头。在某些实施方案中, L 是三价接头。

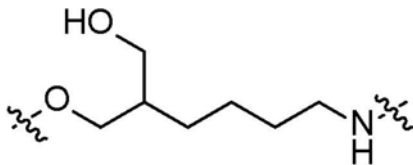
[0141] 在一个具体实施方案中, L 是三价接头 L1, 在本文中也称为 C7:



[0142]

(L1)

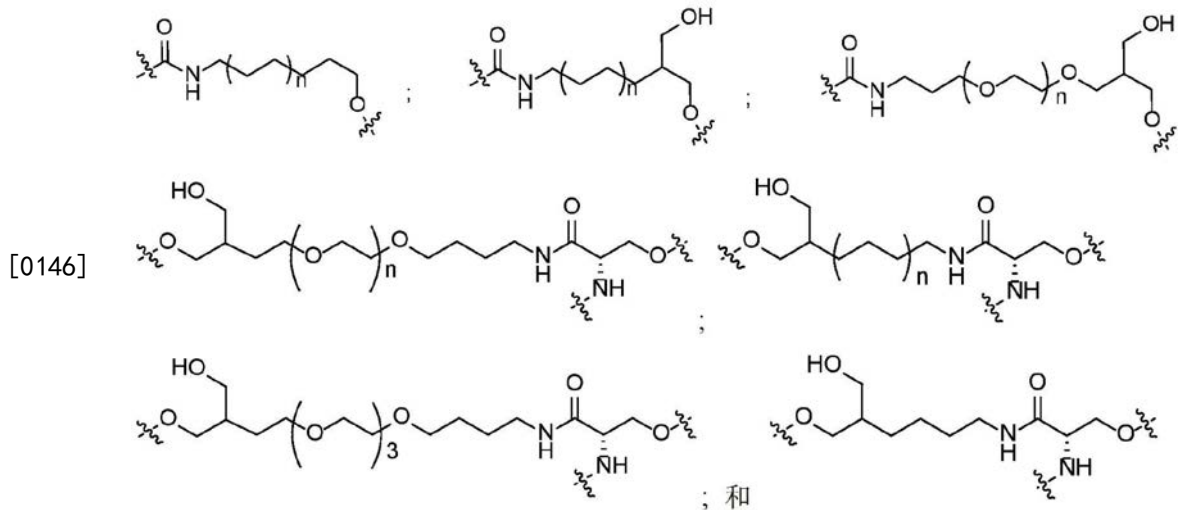
[0143] 在另一个具体实施方案中, L 是二价接头 L2:



[0144]

(L2)

[0145] 在另一个具体实施方案中, L 是选自以下的三价或二价接头:



[0147] 本文中使用的术语“X^c”是指对低密度脂蛋白和/或中密度脂蛋白具有亲和力的部分。在某些实施方案中，X^c为具有少于三个双键的饱和或不饱和部分。在某些实施方案中，术语“X^c”可指如下在本公开内容的“束缚配体”部分中所描述的束缚配体。在某些示例性实施方案中，X^c包括N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)部分或其衍生物。

[0148] 在某些示例性实施方案中，X^c对高密度脂蛋白具有亲和力。在一个相关实施方案中，X^c为具有三个或更多个双键(例如，具有三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个双键)的多不饱和部分。在一个具体实施方案中，X^c为具有三个双键的多不饱和部分。在一个具体实施方案中，X^c为具有四个双键的多不饱和部分。在一个具体实施方案中，X^c为具有五个双键的多不饱和部分。在一个具体实施方案中，X^c为具有六个双键的多不饱和部分。

[0149] 在某些示例性实施方案中，X^c选自脂肪酸、类固醇、开环类固醇、脂质、神经节苷脂和核苷类似物、以及内源性大麻素。

[0150] 在某些示例性实施方案中，X^c是神经调节脂质，例如内源性大麻素。内源性大麻素的非限制性实例包括但不限于花生四烯酸乙醇胺(anandamide)、花生四烯酰乙醇胺、2-花生四烯基甘油醚(诺拉丁醚(noladin ether))、2-花生四烯基甘油醚(诺拉丁醚)、2-花生四烯酰甘油和N-花生四烯酰多巴胺。

[0151] 在某些示例性实施方案中，X^c是 ω -3脂肪酸。 ω -3脂肪酸的非限制性实例包括但不限于十六碳三烯酸(hexadatrienoic acid,HTA)、 α -亚麻酸(alpha-linolenic acid,ALA)、十八碳四烯酸(searidonic acid,SDA)、二十碳三烯酸(eicosatrienoic acid,ETE)、二十碳四烯酸(eicosatetraenoic acid,ETA)、二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid,EPA,二十碳五烯酸(timnodonic acid))、二十一碳五烯酸(heneicosapentaenoic acid,HPA)、二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid,DPA,鳕鱼酸(clupanodonic acid))、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid,DHA,二十二碳六烯酸(cervonic acid))、二十四碳五烯酸和二十四碳六烯酸(鲱酸(nisinic acid))。

[0152] 在另一个实施方案中，X^c是 ω -6脂肪酸。 ω -6脂肪酸的非限制性实例包括但不限于亚油酸、 γ -亚麻酸(gamma-linolenic acid,GLA)、二十碳二烯酸、二高- γ -亚麻酸(dihomo-gamma-linolenic acid,DGLA)、花生四烯酸(arachidonic acid,AA)、二十二碳二烯酸、二十二碳四烯酸、二十二碳五烯酸(奥斯本酸(Osbond acid))、二十四碳四烯酸和二

十四碳五烯酸。

[0153] 在另一个实施方案中, X^c是 ω -9脂肪酸。 ω -9脂肪酸的非限制性实例包括但不限于油酸、二十碳烯酸、米德酸(mead acid)、芥酸和神经酸。

[0154] 在另一个实施方案中, X^c是缀合的亚麻酸。缀合的亚麻酸的非限制性实例包括但不限于 α -十八碳三烯酸、 β -十八碳三烯酸、兰花酸(Jacaric acid)、 α -桐油酸、 β -桐油酸、梓树酸(catalpic acid)和石榴酸(punicic acid)。

[0155] 在另一个实施方案中, X^c是饱和脂肪酸。饱和脂肪酸的非限制性实例包括但不限于辛酸、癸酸、二十二烷酸、月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山萘酸、木蜡酸和蜡酸。

[0156] 在另一个实施方案中, X^c是选自瘤胃酸(rumelenic acid)、 α -十八碳四烯酸、 β -十八碳四烯酸、波司戊酸(bosseopentaenoic acid)、松油酸(pinolenic acid)和罗汉松酸(podocarpic acid)的酸。

[0157] 在另一个实施方案中, X^c选自二十二烷酸(docosanoic acid, DCA)、二十二碳六烯酸(DHA)和二十碳五烯酸(EPA)。在一个具体实施方案中, X^c是二十二烷酸(DCA)。在另一个具体实施方案中, X^c是DHA。在另一个具体实施方案中, X^c是EPA。

[0158] 在另一个实施方案中, X^c是开环类固醇。在一个具体实施方案中, X^c是钙化醇。在另一个实施方案中, X^c是除胆固醇以外的类固醇。

[0159] 在另一个实施方案中, X^c选自烷基链、维生素、肽和生物活性缀合物(包括但不限于:鞘糖脂、多不饱和脂肪酸、开环类固醇、类固醇激素和固醇脂质)。

[0160] 在寡核苷酸的另一个实施方案中, X^c的特征在于选自以下范围的cLogP值:-10至-9、-9至-8、-8至-7、-7至-6、-6至-5、-5至-4、-4至-3、-3至-2、-2至-1、-1至0、0至1、1至2、2至3、3至4、4至5、5至6、6至7、7至8、8至9和9至10。

[0161] 本文中使用的术语“0”是指至少16个连续核苷酸的寡核苷酸, 所述寡核苷酸具有5'末端、3'末端和与靶标的互补性。在一个实施方案中, 寡核苷酸具有与靶标的充分互补性以进行杂交。在某些实施方案中, 互补性是>95%、>90%、>85%、>80%、>75%、>70%、>65%、>60%、>55%或>50%。在一个实施方案中, 寡核苷酸具有与靶标的完全互补性。在另一个实施方案中, 寡核苷酸具有与靶标的一个、两个、三个、四个或更多个错配。

[0162] 在一个实施方案中, 0包含一个或更多个经化学修饰的核苷酸。在一个具体实施方案中, 寡核苷酸包含交替的2'-甲氧基-核苷酸和2'-氟-核苷酸。在另一个具体实施方案中, 在寡核苷酸3'末端的第1和2位的核苷酸通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接。在另一个具体实施方案中, 在寡核苷酸3'末端的第1和2位的核苷酸和在寡核苷酸5'末端的第1和2位的核苷酸通过硫代磷酸酯键与相邻的核苷酸连接。在另一个具体实施方案中, 寡核苷酸包含在5'末端的第2和14位的每个位置处的核苷酸处的2'-氟代修饰, 以及在每个其他核苷酸位置处的2'-甲氧基修饰。

[0163] 在一个实施方案中, 0具有与靶标的完全同源性。在一个具体实施方案中, 靶标是哺乳动物的或病毒的mRNA。在另一个具体实施方案中, 靶标是所述mRNA的内含子区域。

[0164] 在一个实施方案中, 0包含不对称双链体。不对称双链体的有义链和反义链的长度可变化。在某些示例性实施方案中, 不对称双链体包含在反义链中的至少16个连续核苷酸和在有义链中的至少12个连续核苷酸。在一些实施方案中, 不对称双链体包含21聚体寡核

苷酸反义链和13聚体、14聚体、15聚体或16聚体寡核苷酸有义链。在一些实施方案中,不对称双链体包含22聚体寡核苷酸反义链和13聚体、14聚体、15聚体或16聚体寡核苷酸有义链。在一些实施方案中,不对称双链体包含23聚体寡核苷酸反义链和13聚体、14聚体、15聚体或16聚体寡核苷酸有义链。寡核苷酸锚的长度可相对于寡核苷酸有义链的长度而变化。在一些实施方案中,有义链是13聚体、14聚体、15聚体或16聚体寡核苷酸,并且寡核苷酸锚是8聚体、7聚体、6聚体或5聚体寡核苷酸(如图2中所示)。在某些实施方案中,杂交的寡聚物可包含一个、两个、三个或更多个错配(如图24中所示)。

[0165] 在一些实施方案中,不对称双链体包含23聚体寡核苷酸反义链和13聚体、14聚体、15聚体或16聚体寡核苷酸有义链。寡核苷酸锚的长度可相对于寡核苷酸有义链的长度而变化。在一些实施方案中,有义链是13聚体、14聚体、15聚体或16聚体寡核苷酸,并且寡核苷酸锚是10聚体、9聚体、8聚体、7聚体、6聚体或5聚体寡核苷酸。

[0166] 在某些实施方案中,0是治疗性RNA,例如ASO、ssRNA等,并且寡核苷酸锚是15聚体、14聚体、13聚体、12聚体、11聚体、10聚体、10聚体、9聚体、8聚体、7聚体、6聚体或5聚体寡核苷酸。

[0167] 如本文中在寡核苷酸序列的背景下所使用的,“A”表示包含碱基腺嘌呤的核苷(例如,腺苷或其经化学修饰的衍生物),“G”表示包含碱基鸟嘌呤的核苷(例如,鸟苷或其经化学修饰的衍生物),“U”表示包含碱基尿嘧啶的核苷(例如,尿苷或其经化学修饰的衍生物),并且“C”表示包含碱基胞嘧啶的核苷(例如,胞苷或其经化学修饰的衍生物)。

[0168] 术语“核苷酸类似物”或“经改变的核苷酸”或“经修饰的核苷酸”是指非标准核苷酸,包括非天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。示例性核苷酸类似物在任何位置处被修饰以便改变核苷酸的某些化学性质,但仍保留核苷酸类似物进行其预期功能的能力。可衍生的核苷酸位置的实例包括:第5位,例如5-(2-氨基)丙基尿苷、5-溴代尿苷、5-丙炔基尿苷、5-丙烯基尿苷等;第6位,例如,6-(2-氨基)丙基尿苷;针对腺苷和/或鸟苷的第8位,例如,8-溴代鸟苷、8-氯代鸟苷、8-氟代鸟苷等。核苷酸类似物还包括脱氮核苷酸,例如,7-脱氮-腺苷;0-经修饰的和N-经修饰的(例如烷基化的,例如N6-甲基腺苷,或如本领域另外已知的)核苷酸;以及其他经杂环修饰的核苷酸类似物,例如在Herdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2000 Aug. 10 (4): 297-310中描述的那些。

[0169] 核苷酸类似物还可包括对核苷酸的糖部分的修饰。例如,2'OH-基团可被选自H、OR、R、F、Cl、Br、I、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、COOR或OR的基团取代,其中R是经取代或未经取代的C1至C6烷基、烯基、炔基、芳香基等。其他可能的修饰包括在美国专利No. 5,858,988和6,291,438中描述的那些。

[0170] 术语“互补”是指表现出沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对的在核苷酸之间的关系,或指通过沃森-克里克碱基配对杂交以形成双链核酸的寡核苷酸。术语“互补性”是指与另一寡核苷酸部分或完全互补的寡核苷酸(例如,有义链或反义链)的状态。本文中描述的与第二寡核苷酸具有互补性的寡核苷酸可以是与第二寡核苷酸100%、>95%、>90%、>85%、>80%、>75%、>70%、>65%、>60%、>55%或>50%互补。

[0171] 如本文中在寡核苷酸序列的背景下所使用的,“A”表示包含碱基腺嘌呤的核苷(例如,腺苷或其经化学修饰的衍生物),“G”表示包含碱基鸟嘌呤的核苷(例如,鸟苷或其经化学修饰的衍生物),“U”表示包含碱基尿嘧啶的核苷(例如,尿苷或其经化学修饰的衍生物),

并且“C”表示包含碱基胞嘧啶的核苷(例如,胞苷或其经化学修饰的衍生物)。

[0172] 本文中使用的术语“3'末端”是指在核酸的核糖环的3'碳处包含未经修饰的羟基的核酸末端。

[0173] 本文中使用的术语“5'末端”是指包含与核酸的核糖环的5'碳连接的磷酸基团的核酸的末端。

[0174] 本文中使用的术语“核苷”是指由杂环碱基及其糖构成的分子。

[0175] 本文中使用的术语“核苷酸”是指在核苷的3'或5'糖羟基上具有磷酸基团的核苷。

[0176] 具有“与靶mRNA序列充分互补以指向靶特异性RNA干扰(RNAi)的序列”的链的RNAi物质,例如siRNA,意指该链具有通过RNAi足以触发对靶mRNA的破坏的序列。

[0177] 本文中使用的术语“分离的RNA”(例如,“分离的siRNA”或“分离的siRNA前体”)是指当通过重组技术产生时基本上不含其他细胞物质或培养基的RNA分子,或者当经化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物质的RNA分子。

[0178] 术语“区别性RNA沉默”是指RNA分子基本上抑制“第一”多核苷酸序列或“靶”多核苷酸序列表达同时基本上不抑制“第二”多核苷酸序列或“非靶”多核苷酸序列表达的能力,例如,当两个多核苷酸序列都存在于同一细胞中时。在某些实施方案中,靶多核苷酸序列对应于靶基因,而非靶多核苷酸序列对应于非靶基因。在另一些实施方案中,靶多核苷酸序列对应于靶等位基因,而非靶多核苷酸序列对应于非靶等位基因。在某些实施方案中,靶多核苷酸序列是编码靶基因的调节区(例如,启动子或增强子元件)的DNA序列。在另一些实施方案中,靶多核苷酸序列是由靶基因编码的靶mRNA。

[0179] 本文中使用的术语“siRNA”是指诱导RNA干扰(RNAi)途径的小干扰RNA。siRNA分子的长度可变化(一般为18至30个碱基对),并且包含与其靶mRNA的不同程度的互补性。术语“siRNA”包含两条单独链的双链体,以及可形成包含双链体区域的发夹结构的单链。

[0180] 本文中使用的术语“反义链”是指siRNA双链体的链,其包含与靶基因或mRNA的一些程度的互补性并且包含与siRNA双链体的有义链的互补性。

[0181] 本文中使用的术语“有义链”是指siRNA双链体的包含与siRNA双链体的反义链的互补性的链。

[0182] 本文中使用的术语“突出端”或“尾”是指在作为单链的有义链和反义链之一或二者的3'末端的3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个连续核苷酸,即不与siRNA双链体的另一条链碱基配对(即,不与其形成双链体)。

[0183] 本文中使用的术语“反义寡核苷酸”或“ASO”是指这样的核酸(例如RNA),其具有与靶RNA(例如,包含SNP的mRNA或包含SNP的前mRNA)的充分序列互补性以便以有效方式(例如,以有效抑制靶mRNA的翻译和/或靶前mRNA的剪接的方式)阻断靶RNA的区域。具有“与靶RNA充分互补的序列”的反义寡核苷酸意指反义物质具有足以掩蔽蛋白质的结合位点否则将调节剪接的序列,和/或反义物质具有足以掩蔽核糖体的结合位点的序列,和/或反义物质具有足以改变靶RNA的三维结构以阻止剪接和/或翻译的序列。

[0184] 在某些示例性实施方案中,本发明的siRNA是不对称的。在某些示例性实施方案中,本发明的siRNA是对称的。

[0185] 在某些示例性实施方案中,本发明的siRNA包含长度为约8至20个核苷酸或核苷酸类似物、长度为约10至18个核苷酸或核苷酸类似物、长度为约12至16个核苷酸或核苷酸类

似物、或长度为约13至15个核苷酸或核苷酸类似物的双链体区域(例如,约8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个碱基对的双链体区域)。

[0186] 在某些示例性实施方案中,本发明的siRNA包含一个或两个突出端。在某些实施方案中,siRNA的每个突出端包含至少约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9或约10个连续核苷酸。在某些实施方案中,本发明的siRNA的每个突出端的长度为约4、约5、约6或约7个核苷酸。在某些实施方案中,有义链突出端的核苷酸数目与反义链突出端的长度相同。在另一些实施方案中,有义链突出端具有比反义链突出端更少的核苷酸。在另一些实施方案中,反义链突出端具有比有义链突出端更少的核苷酸。

[0187] 在某些示例性实施方案中,本发明的siRNA包含各自长度为约10、约15、约20、约25或约30个核苷酸的有义链和/或反义链。在一些具体实施方案中,本发明的siRNA包含各自长度为约15至约25个核苷酸的有义链和/或反义链。在一些具体实施方案中,本发明的siRNA包含长度各为约20个核苷酸的有义链和反义链。在某些实施方案中,siRNA的有义链和反义链长度相同。在另一些实施方案中,siRNA的有义链和反义链长度不同。

[0188] 在某些示例性实施方案中,本发明的siRNA具有的总长度(从反义链的3'末端至有义链的3'末端)为约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50或约75个核苷酸。在某些示例性实施方案中,本发明的siRNA具有的总长度为约15至约35个核苷酸。在另一些示例性实施方案中,本发明的siRNA具有的总长度为约20至约30个核苷酸。在另一些示例性实施方案中,本发明的siRNA具有的总长度为约22至约28个核苷酸。在一些具体实施方案中,本发明的siRNA具有的总长度为约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29或约30个核苷酸。

[0189] 本文中使用的术语“经化学修饰的核苷酸”或“核苷酸类似物”或“经改变的核苷酸”或“经修饰的核苷酸”是指非标准核苷酸,包括非天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。示例性核苷酸类似物在任何位置被修饰以便改变核苷酸的某些化学性质,但仍保留核苷酸类似物进行其预期功能的能力。可进行衍生的核苷酸位置的实例包括以下:第5位,例如5-(2-氨基)丙基尿苷、5-溴代尿苷、5-丙炔基尿苷、5-丙烯基尿苷等;第6位,例如,6-(2-氨基)丙基尿苷;针对腺苷和/或鸟苷的第8位,例如,8-溴代鸟苷、8-氯代鸟苷、8-氟代鸟苷等。核苷酸类似物还包括脱氮核苷酸,例如,7-脱氮-腺苷;经O-修饰的和经N-修饰的(例如烷基化的,例如N6-甲基腺苷,或如另外本领域已知的)核苷酸;和其他经杂环修饰的核苷酸类似物,例如在Herdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2000 Aug. 10 (4): 297-310 中描述的那些。示例性化学修饰在图25中示出。

[0190] 核苷酸类似物还可包括对核苷酸的糖部分的修饰。例如,2'-OH-基团可被选自H、OR、R、F、Cl、Br、I、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、COOR或OR的基团替换,其中R是经取代或未经取代的C1至C6烷基、烯基、炔基、芳基等。其他可能的修饰包括在美国专利No. 5,858,988和No. 6,291,438中描述的那些。

[0191] 本文中使用的术语“代谢稳定的”是指包含2'-核糖修饰以用2'-O-甲基或2'-氟代基替换天然2'-羟基的RNA分子。在一些具体实施方案中,siRNA的双链体区域包含一个或两个2'-氟代修饰和/或者至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%或至少约94%的2'-甲氧基修饰。在某些示例性实施方案中,反义链包含两个2'-氟代修饰和至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%或

至少约94%的2'-甲氧基修饰。在某些示例性实施方案中,有义链包含至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的2'-甲氧基修饰。在某些示例性实施方案中,有义链不包含2'-氟代修饰并且包含至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的2'-甲氧基修饰。在某些示例性实施方案中,提供的单链RNA包含两个2'-氟代修饰和至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%或至少约94%的2'-甲氧基修饰。在某些示例性实施方案中,提供的单链RNA不包含2'-氟代修饰并且包含至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的2'-甲氧基修饰。

[0192] 本文中使用的术语“硫代磷酸酯”是指通过用硫取代磷酸基的一个或更多个氧而修饰的核苷酸的磷酸基。硫代磷酸酯还包含阳离子反离子(例如钠、钾、钙、镁等)。术语“硫代磷酸化核苷酸”是指与另一核苷酸具有一个或两个硫代磷酸酯键的核苷酸。在某些实施方案中,本发明的siRNA的单链尾包含硫代磷酸化核苷酸或由硫代磷酸化核苷酸组成。

[0193] 在一些实施方案中,本文所述的化合物、寡核苷酸和核酸可被修饰以包含图3中提供的一个或更多个核苷酸间键。在一些具体实施方案中,本文所述的化合物、寡核苷酸和核酸包含选自磷酸二酯和硫代磷酸酯的一个或更多个核苷酸间键。

[0194] 应当理解,本文提供的某些核苷酸间键,包括例如磷酸二酯和硫代磷酸酯,在生理pH下包含-1的形式电荷,并且所述形式电荷将被以下阳离子部分平衡:例如,碱金属例如钠或钾,碱土金属例如钙或镁,或者铵离子或胍离子。

[0195] 本文中使用的术语“脂质制剂”可指脂质体制剂,例如,其中脂质体用于与核酸形成纳米粒以促进核酸内化至细胞中。不受理论束缚,适合使用的脂质体是容易与细胞膜的磷脂双层结合的那些,从而允许核酸穿透细胞。在一个实施方案中,化合物包括纳米粒、嵌入剂、聚阳离子或其混合物。

[0196] 在某些实施方案中,本公开内容的化合物由式(I)表示:

[0197] $X^c-L-O-Z$

[0198] (I)

[0199] 其中线“-”表示“X^c”、“L”、“O”和“Z”之间的相互作用方式。在某些实施方案中,相互作用是通过碱基对互补性,例如寡核苷酸O和PK修饰锚Z的锚定寡核苷酸之间的碱基对互补性。在某些实施方案中,相互作用是通过共价键,例如X^c和L之间,或L和O之间的键。

[0200] 药物组合物和施用方法

[0201] 在一个方面中,本文提供了药物组合物,其包含治疗有效量的如本文所述的一种或更多种化合物、寡核苷酸或核酸,以及可药用载体。在一个实施方案中,药物组合物包含含有如本文所述的药代动力学修饰锚的一种或更多种双链、经化学修饰的核酸,以及可药用载体。在一个具体实施方案中,药物组合物包含含有如本文所述的药代动力学修饰锚的一种双链、经化学修饰的核酸,以及可药用载体。在另一个具体实施方案中,药物组合物包含含有如本文所述的药代动力学修饰锚的两种双链、经化学修饰的核酸,以及可药用载体。

[0202] 本发明涉及上述药剂用于如下文所述的治疗性治疗的用途。因此,本发明的调节剂(例如,RNAi剂)可被并入适合施用的药物组合物中。这样的组合物通常包含核酸分子、蛋白质、抗体或调节化合物和可药用载体。本文中使用的语言“可药用载体”旨在包括与药物

施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。这样的介质和药剂用于药物活性物质的用途是本领域公知的。除非在任何常规介质或药剂与活性化合物不相容的情况下,否则考虑其在组合物中的使用。也可将补充活性化合物并入组合物中。

[0203] 本发明的药物组合物被配制成与其预定的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外,例如静脉内(intravenous,IV)、皮内、皮下(subcutaneous,SC或SQ)、腹膜内、肌内、经口(例如吸入)、经皮(表面)、玻璃体内、关节内、鼻内、阴道内、经直肠、舌下和经黏膜施用。在某些示例性实施方案中,本发明的药物组合物通过包括但不限于纹状体内(intrastriatal,IS)施用、脑室内(intracerebroventricular,ICV)施用和鞘内(intrathecal,IT)施用(例如,通过泵、输注等)的施用途径递送至脑脊液(CSF)。用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液剂或混悬剂可包含以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂,例如苜醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张度(tonicity)的药剂例如氯化钠或右旋糖。pH值可用酸或碱,例如盐酸或氢氧化钠调节。肠胃外制剂可封装在安瓿、一次性注射器或者由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0204] 适用于可注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在具有水溶性时)或分散体,以及用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的并且在存在易注射性(easy syringability)的程度应是流体。其在制备和储存条件下必须是稳定的,并且必须被保护以免于微生物,例如细菌和真菌的污染行为。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及其合适的混合物。例如,通过使用例如卵磷脂的包衣,通过在分散体的情况下维持所需的粒径和通过使用表面活性剂可维持合适的流动性。防止微生物的作用可通过多种抗细菌剂和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在许多情况下,将适合在组合物中包含等张剂,例如糖、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)、氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过在该组合物中包含延迟吸收的药剂,例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0205] 无菌可注射溶液可通过将所需量的活性化合物与以上列举的成分中的一种或组合根据需要一起并入适当的溶剂中,随后过滤灭菌来制备。通常来说,分散体通过将活性化合物并入到无菌载剂中来制备,该无菌载剂包含基础分散介质和来自以上列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,示例性的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,所述干燥产生活性成分加来自其经预先无菌过滤的溶液的任何另外的期望成分的粉末。

[0206] 这样的化合物的毒性和治疗效力可通过细胞培养物或实验动物中的标准药物程序来确定,例如用于确定LD50(对50%群体致死的剂量)和ED50(在50%群体中治疗有效的剂量)。毒性和治疗作用之间的剂量比率是治疗指数并且其可以以比率LD50/ED50表示。表现出大治疗指数的化合物是特别合适的。尽管可使用表现出毒性副作用的化合物,但应注意设计将这样的化合物靶向至受影响组织的部位的递送系统以使对未感染细胞的潜在损

害最小化并且从而降低副作用。

[0207] 从细胞培养测定和动物研究中获得的数据可用于配制用于人的一系列剂量。在一些具体实施方案中,这样的化合物的剂量位于包括ED50且几乎没有毒性或没有毒性的一系列循环浓度内。剂量可在该范围内变化,这取决于所用的剂型和所用的施用途径。对于用于本发明方法的任何化合物,可从细胞培养测定中初始地评估治疗有效剂量。可在动物模型中配制剂量以实现包括如在细胞培养物中确定的EC50(即,实现半数最大响应的测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。还可通过确定动物模型中寡核苷酸的组织浓度与基因沉默作用来配制剂量。这样的信息可用于更准确地确定人中的可用剂量。例如,可通过高效液相色谱法测量血浆中的水平。

[0208] 治疗方法

[0209] 本文中使用的“治疗”被限定为向患者施加或施用治疗剂(例如,RNAi剂或载体或编码其的转基因),或向来自患有疾病或病症、患有疾病或病症的症状或者具有对疾病或病症的倾向的患者中的分离的组织或细胞系施加或施用治疗剂,目的是治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改进、改善或影响疾病或病症、疾病或病症的症状、或对疾病的倾向。

[0210] 在一个方面中,提供了通过向对象施用治疗剂(例如,RNAi剂或载体或编码其的转基因)来用于在对象中预防如上所述的疾病或病症的方法。处于疾病的风险中的对象可通过例如本文所述的诊断或预后测定中的任一种或组合来鉴定。预防剂的施用可发生在疾病或病症的特征性症状表现之前,以预防疾病或病症,或替代地延迟疾病或病症的进展。

[0211] siRNA分子的设计

[0212] 在一些实施方案中,本发明的siRNA分子是由有义链和互补的反义链组成的双链体,反义链具有与靶mRNA的充分互补性以介导RNAi。在一些具体的示例性实施方案中,siRNA分子具有的长度为约10至50个或更多个核苷酸,即每条链包含10至50个核苷酸(或核苷酸类似物)。在一些具体的示例性实施方案中,siRNA分子每条链具有的长度为约16至30,例如约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29或约30个核苷酸,其中一条链与靶区域充分互补。可将链进行比对,以使在未比对链末端有至少约1、约2或约3个碱基(即,在相对链中不存在互补碱基),以使当链退火时,在双链体的一端或两端存在约1、约2或约3个残基的突出端。可将链进行比对,以使在未比对链末端有约5、约6、约7或约8个碱基并形成突出端。siRNA分子可具有的长度为约10至50个或更多个核苷酸,即每条链包含约10至约50个核苷酸(或核苷酸类似物)。在一些具体的示例性实施方案中,siRNA分子每条链具有的长度为约16至约30,例如约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29或约30个核苷酸,其中一条链与靶序列基本互补,并且另一条链与第一条链相同或基本相同。

[0213] 通常来说,siRNA可通过使用本领域已知的任何方法,例如通过使用以下方案来设计:

[0214] 1.siRNA应对靶序列具有特异性。第一条链应与靶序列互补,并且另一条链与第一条链基本互补。在另一个实施方案中,靶序列在靶基因的编码区之外。示例性靶序列选自靶基因的5'非翻译区(5'untranslated region,5'-UTR)或内含子区域。在这些位点切割mRNA会消除相应蛋白质的翻译。来自靶基因其他区域的靶序列也适用于靶标。基于靶序列设计有义链。此外,具有较低G/C含量(35%至55%)的siRNA可比具有高于55%的G/C含量的

siRNA更有活性。因此,在一个实施方案中,本发明包括具有35%至55%的G/C含量的核酸分子。

[0215] 2. siRNA的有义链是基于所选靶位点的序列设计的。在一些具体的示例性实施方案中,有义链包含约10至约20个核苷酸,例如约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19或约20个核苷酸。在一些具体的示例性实施方案中,有义链包含约13、约14、约15或约16个核苷酸。然而,技术人员将理解,长度小于约10个核苷酸或大于约20个核苷酸的siRNA也可对介导RNAi发挥作用。因此,这样的长度的siRNA也在本发明的范围内,前提是其保留介导RNAi的能力。较长的RNA沉默剂已被证明会在某些哺乳动物细胞中引发干扰素或蛋白激酶R (Protein Kinase R, PKR) 响应,这可能是不期望的。在一些具体实施方案中,本发明的RNA沉默剂不引发PKR响应(即,长度足够短)。然而,更长的RNA沉默剂可能是有用的,例如,在无法产生PKR响应的细胞类型中,或在PKR响应已通过替代的方式下调或抑制的情况下。

[0216] 本发明的siRNA分子与靶序列具有充分互补性,以使siRNA可介导RNAi。一般而言,提供包含与靶基因的靶序列部分充分相同的核苷酸序列的siRNA,以影响RISC介导的靶基因切割。因此,在一些具体的示例性实施方案中,siRNA的有义链被设计为具有与靶标的一部分充分相同的序列。例如,有义链可与靶位点具有100%的同一性。然而,不需要100%的同一性。可实现有义链和靶RNA序列之间大于约80%的同一性,例如约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或甚至100%的同一性。本发明具有能够接受某些序列变异以提高RNAi的效率和特异性的优点。在一个实施方案中,有义链具有与靶区域约4、约3、约2、约1或约0个错配的核苷酸,并且另一条链与第一条链同一或基本相同,该靶区域例如野生型和突变等位基因之间相差至少一个碱基对的靶区域,例如包含功能获得性突变的靶区域。此外,具有1或2个核苷酸的小插入或缺失的siRNA序列也可对介导RNAi有效。替代地,具有核苷酸类似物替换或插入的siRNA序列可对抑制有效。

[0217] 序列同一性可通过本领域已知的序列比较和比对算法来确定。为了确定两个核酸序列(或者两个氨基酸序列)的百分比同一性,对序列进行用于最佳比较目的的比对(例如,可在第一序列或第二序列中引入空位用于最佳比对)。然后比较相应核苷酸(或氨基酸)位置处的核苷酸(或氨基酸残基)。当第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置相同的残基占据时,则分子在该位置处是相同的。两个序列之间的百分比同一性是由序列共享的相同位置的数目的函数(即, $\% \text{ 同源性} = \text{相同位置的数目} / \text{位置总数目} \times 100$),可选地针对引入的空位数目和/或引入的空位长度进行惩罚得分。

[0218] 序列的比较和两个序列之间的百分比同一性的确定可使用数学算法来完成。在一个实施方案中,在比对的具有充分同一性的序列的某部分上产生但不在具有低同一性程度的部分上产生的比对(即,局部比对)。用于序列比较的局部比对算法的一个非限制性实例是Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68的,按照Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77修改的算法。这样的算法被并入Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10的BLAST程序(2.0版)中。

[0219] 在另一个实施方案中,通过引入适当的空位来优化比对,并且在比对序列的长度上确定百分比同一性(即,空位比对)。为了出于比较目的而获得空位比对,可如Altschul

et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (17) :3389-3402中所述使用空位BLAST。在另一个实施方案中,通过引入适当的空位来优化比对,并且在比对序列的整个长度上确定百分比同一性(即,全局比对)。用于序列全局比较的数学算法的一个非限制性实例是Myers and Miller, CABIOS (1989) 的算法。这样的算法被并入ALIGN程序(2.0版),该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序用于比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表,空位长度罚分12和空位罚分4。

[0220] 3. siRNA的反义链或指导链的长度通常与有义链不同,并且包含互补核苷酸。在一个实施方案中,siRNA的链可以以这样的方式如具有约5、约6、约7、约8、约9或约10个核苷酸的3'突出端进行配对。突出端可包含对应于靶基因序列(或其互补序列)的核苷酸(或由对应于靶基因序列(或其互补序列)的核苷酸组成)。替代地,突出端可包含脱氧核糖核苷酸例如dT,或核苷酸类似物,或其他合适的非核苷酸物质(或由脱氧核糖核苷酸例如dT,或核苷酸类似物,或其他合适的非核苷酸物质组成)。突出的核苷酸可以是RNA或DNA。如上所述,期望选择其中突变体:野生型错配是嘌呤:嘌呤错配的靶区域。

[0221] 4. 使用本领域已知的任何方法,将潜在靶标与适当的基因组数据库(人、小鼠、大鼠等)进行比较,并排除与其他编码序列具有显著同源性的任何靶序列。用于这样的序列同源性搜索的一种这样的方法称为BLAST,其可在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)网站上获得。

[0222] 5. 选择一个或多个符合评价标准的序列。

[0223] 关于siRNA的设计和使用的更多一般信息可在“siRNA使用者指南”中找到,该指南可在Max-Plank-Institut fur Biophysikalische Chemie网站上获得。

[0224] 替代地,siRNA可在功能上限定为能够与靶序列杂交的核苷酸序列(或寡核苷酸序列)(例如,400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA、50°C或70°C杂交12至16小时;随后洗涤)。另外的示例性杂交条件包括在70°C下在1×SSC中或在50°C下在1×SSC、50%甲酰胺中杂交,随后在70°C下在0.3×SSC中洗涤;或者在70°C下在4×SSC中或在50°C下在4×SSC、50%甲酰胺中杂交,随后在67°C下在1×SSC中洗涤。预计长度小于50个碱基对的杂交体的杂交温度应比杂交体的解链温度(T_m)低5°C至10°C,其中 T_m 根据以下等式确定。对于长度小于18个碱基对的杂交体, T_m (°C) = 2(A+T碱基数目) + 4(G+C碱基数目)。对于长度为18至49个碱基对的杂交体, T_m (°C) = 81.5 + 16.6(log₁₀[Na⁺]) + 0.41(%G+C) - (600/N),其中N是杂交体中碱基数目,并且[Na⁺]是杂交缓冲液中钠离子的浓度(用于1×SSC的[Na⁺] = 0.165M)。用于多核苷酸杂交的严格条件的另外的实例在Sambrook, J., E.F. Fritsch, 和 T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 第9至11章,以及 *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F.M. Ausubel et al., 编辑, John Wiley & Sons, Inc., 第2.10和6.3至6.4节中提供,其通过引用并入本文。

[0225] 阴性对照siRNA应具有与所选siRNA相同的核苷酸组成,但与适当的基因组无显著序列互补性。这样的阴性对照可通过随机打乱所选siRNA的核苷酸序列来设计。可进行同源性搜索以确保阴性对照缺乏与适当的基因组中的任何其他基因的同源性。另外,阴性对照siRNA可通过将一个或多个碱基错配引入序列中来设计。

[0226] 6. 为了验证siRNA破坏靶mRNA的有效性,可将siRNA与靶cDNA一起在基于果蝇的体

外mRNA表达系统中进行孵育。用³²P进行放射性标记,新合成的靶mRNA在琼脂糖凝胶上进行放射自显影检测。切割的靶mRNA的存在指示mRNA核酸酶活性。合适的对照包括省略siRNA和使用非靶cDNA。替代地,选择与所选择的siRNA具有相同核苷酸组成但与适当的靶基因无显著序列互补性的对照siRNA。这样的阴性对照可通过随机打乱所选siRNA的核苷酸序列来设计。可进行同源性搜索以确保阴性对照缺乏与适当的基因组中的任何其他基因的同源性。另外,阴性对照siRNA可通过将一个或多个碱基错配引入序列中来设计。

[0227] siRNA可被设计为靶向上文描述的任何靶序列。所述siRNA包含与靶序列充分互补的反义链以介导靶序列沉默。在某些实施方案中, RNA沉默剂是siRNA。

[0228] 选择导致最优mRNA特异性和最大mRNA切割的siRNA-mRNA互补位点。

[0229] siRNA样分子

[0230] 本发明的siRNA样分子具有与靶mRNA的靶序列“充分互补”的序列(即,具有含有序列的链)以通过RNAi或翻译抑制指导基因沉默。siRNA样分子以与siRNA分子相同的方式进行设计,但有义链和靶RNA之间的序列同一性程度近似于miRNA和其靶标之间的观察到的序列同一性程度。一般来说,随着miRNA序列和相应靶基因序列之间的序列同一性程度降低,通过翻译抑制而不是RNAi来介导转录后基因沉默的趋势提高。因此,在一个替代实施方案中,在期望通过靶基因的翻译抑制进行转录后基因沉默的情况下,miRNA序列与靶基因序列具有部分互补性。在某些实施方案中,miRNA序列与分散在靶mRNA内(例如在靶mRNA的3'-UTR内)的一个或多个短序列(互补位点)具有部分互补性(Hutvagner and Zamore, Science, 2002; Zeng et al., Mol. Cell, 2002; Zeng et al., RNA, 2003; Doench et al., Genes&Dev., 2003)。由于翻译抑制的机制是协同的,因此在某些实施方案中可靶向多个互补位点(例如,2、3、4、5或6个)。

[0231] siRNA样双链体介导RNAi或翻译抑制的能力可通过靶基因序列和沉默剂在互补位点的核苷酸序列之间的非相同的核苷酸的分布来预测。在一个实施方案中,在期望通过翻译抑制进行基因沉默的情况下,互补位点的中心部分存在至少一个非相同的核苷酸,以使由miRNA指导链和靶mRNA形成的双链体包含中心“凸起(bulge)”(Doench J G et al., Genes&Dev., 2003)。在另一个实施方案中,引入了2、3、4、5或6个连续或不连续的非相同的核苷酸。可选择非相同的核苷酸以使其形成摆动碱基对(例如,G:U)或错配碱基对(G:A、C:A、C:U、G:G、A:A、C:C、U:U)。在另外的实施方案中,“凸起”以miRNA分子(例如,反义链)的5'末端的第12和13位核苷酸为中心。

[0232] 经修饰的RNA沉默剂

[0233] 在本发明的某些方面中,可对如上文所述的本发明的RNA沉默剂(或其任何部分)进行修饰,以进一步提高该药剂的活性。例如,上文描述的RNA沉默剂可用下文描述的任何修饰进行修饰。修饰可部分地用于进一步增强靶标识别、增强该药剂的稳定性(例如,防止降解)、促进细胞摄取、增强靶标效率、改善结合效力(例如与靶标的结合)、改善患者对药剂的耐受性和/或降低毒性。

[0234] 1) 增强靶标识别的修饰

[0235] 在某些实施方案中,本发明的RNA沉默剂可用不稳定核苷酸(destabilizing nucleotide)替换以增强单核苷酸靶标识别(参见于2007年1月25日提交的美国申请序列No. 11/698,689,和于2006年1月25日提交的美国临时申请No. 60/762,225,其二者均通过引

用并入本文)。这样的修饰可足以消除RNA沉默剂对非靶mRNA(例如野生型mRNA)的特异性,而不会明显影响RNA沉默剂对靶mRNA(例如功能获得性突变mRNA)的特异性。

[0236] 在一些具体实施方案中,本发明的RNA沉默剂通过在其反义链中引入至少一种通用核苷酸来修饰。通用核苷酸包含能够与四种常规核苷酸碱基(例如,A、G、C、U)中的任何一种无区别地进行碱基配对的碱基部分。可使用通用核苷酸,因为其对RNA双链体或由RNA沉默剂的指导链和靶mRNA形成的双链体的稳定性具有相对较小的影响。示例性通用核苷酸包括具有选自以下的肌苷碱基部分或肌苷类似物碱基部分的那些:脱氧肌苷(例如2'-脱氧肌苷)、7-脱氮-2'-脱氧肌苷、2'-氮杂-2'-脱氧肌苷、PNA-肌苷、吗啉代-肌苷、LNA-肌苷、氨基磷酸酯-肌苷、2'-O-甲氧乙基-肌苷和2'-OMe-肌苷。在一些具体实施方案中,通用核苷酸是肌苷残基或其天然存在的类似物。

[0237] 在某些实施方案中,本发明的RNA沉默剂通过在离特异性确定核苷酸(即识别疾病相关多态性的核苷酸)5个核苷酸内引入至少一个不稳定核苷酸来修饰。例如,可在离特异性确定核苷酸的5、4、3、2或1个核苷酸内的位置处引入不稳定核苷酸。在一些示例性实施方案中,在离特异性确定核苷酸3个核苷酸的位置处引入不稳定核苷酸(即,以使在不稳定核苷酸和特异性确定核苷酸之间有2个稳定核苷酸)。在具有两条链或链部分(例如siRNA和shRNA)的RNA沉默剂中,可在不包含特异性确定核苷酸的链或链部分中引入不稳定核苷酸。在一些具体实施方案中,在包含特异性确定核苷酸的相同链或链部分中引入不稳定核苷酸。

[0238] 2) 增强效力和特异性的修饰

[0239] 在某些实施方案中,本发明的RNA沉默剂可根据不对称设计规则进行改变以促进在介导RNAi中的增强效力和特异性(参见美国专利No.8,309,704、No.7,750,144、No.8,304,530、No.8,329,892和No.8309,705)。这样的改变促进siRNA(例如,使用本发明的方法设计的siRNA或从shRNA产生的siRNA)的反义链进入有利于有义链的RISC,以使反义链优先引导靶mRNA的切割或翻译抑制,并且因此提高或改善靶标切割和沉默的效率。在一些具体实施方案中,相对于RNA沉默剂的反义链3'末端(antisense strand 3'end, AS 3')和有义链5'末端(sense strand 5'end, S'5)之间的键强度或碱基对强度,通过降低所述RNA沉默剂的反义链5'末端(antisense strand 5'end, AS 5')和有义链3'末端(sense strand 3'end, S 3')之间的碱基对强度来增强RNA沉默剂的不对称性。

[0240] 在一个实施方案中,可增强本发明的RNA沉默剂的不对称性,以使在反义链的5'末端和有义链部分的3'末端之间的G:C碱基对少于在反义链的3'末端和有义链部分的5'末端之间的G:C碱基对。在另一个实施方案中,可增强本发明的RNA沉默剂的不对称性,以使在第一或反义链的5'末端和有义链部分的3'末端之间有至少一个错配碱基对。在一些具体实施方案中,错配碱基对选自G:A、C:A、C:U、G:G、A:A、C:C和U:U。在另一个实施方案中,可增强本发明的RNA沉默剂的不对称性,以使在第一或反义链的5'末端和有义链部分的3'末端之间有至少一个摆动碱基对,例如G:U。在另一个实施方案中,可增强本发明的RNA沉默剂的不对称性,以使有至少一个碱基对包含稀有核苷酸,例如肌苷(inosine, I)。在一些具体实施方案中,碱基对选自I:A、I:U和I:C。在另一个实施方案中,可增强本发明的RNA沉默剂的不对称性,以使有至少一个碱基对包含经修饰的核苷酸。

[0241] 3) 具有增强的稳定性的RNA沉默剂

[0242] 可修饰本发明的RNA沉默剂以改善血清或用于细胞培养的生长培养基中的稳定性。为了增强稳定性,可使3'-残基稳定以防止降解,例如,可选择3'-残基以使其由嘌呤核苷酸,特别是腺苷或鸟苷核苷酸组成。替代地,可接受由经修饰的类似物替换嘧啶核苷酸,例如由2'-脱氧胸苷替换尿苷,并且不影响RNA干扰的效率。

[0243] 在一个具体的方面中,本发明的特征在于RNA沉默剂可包含第一、第二和第三链,其中第一、第二和第三链中的任一条可通过用经修饰的核苷酸替换内部核苷酸来修饰,以使在与相应的未经修饰的RNA沉默剂相比,其体内稳定性增强。如本文所限定的,“内部”核苷酸是存在于除核酸分子、多核苷酸或寡核苷酸的5'末端或3'末端以外的任意位置的核苷酸。内部核苷酸可在单链分子内或在双链体或双链分子的链内。在一个实施方案中,有义链和/或反义链通过至少一个内部核苷酸的替换进行修饰。在另一个实施方案中,有义链和/或反义链通过替换至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个内部核苷酸进行修饰。在另一个实施方案中,有义链和/或反义链通过替换至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的内部核苷酸进行修饰。在另一个实施方案中,有义链和/或反义链通过替换所有内部核苷酸进行修饰。

[0244] 在一个具体实施方案中,RNA沉默剂(例如,第一寡核苷酸、第二寡核苷酸和第三寡核苷酸的任意组合)可任选地包含至少一种经修饰的核苷酸类似物。核苷酸类似物可位于靶特异性沉默活性,例如RNAi介导活性或翻译抑制活性基本上不受影响的位置处,例如在siRNA分子的5'末端和/或3'末端的区域中。特别地,末端可通过引入经修饰的核苷酸类似物来稳定。

[0245] 示例性核苷酸类似物包括经糖和/或经骨架修饰的核糖核苷酸(即,包括对第一寡核苷酸、第二寡核苷酸和/或第三寡核苷酸中任一种中的磷酸-糖骨架的修饰)。例如,可修饰天然RNA的磷酸二酯键以包含氮或硫杂原子中的至少一种。在示例性经骨架修饰的核糖核苷酸中,与相邻核糖核苷酸连接的磷酸二酯基团被经修饰的基团,例如硫代磷酸酯基团替换。在示例性经糖修饰的核糖核苷酸中,2'OH基团被选自H、OR、R、卤素、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂或ON的基团替换,其中R是C₁至C₆烷基、烯基或炔基并且卤素是F、Cl、Br或I。

[0246] 在一些具体实施方案中,修饰是2'-氟代、2'-氨基和/或2'-硫代修饰。具体的示例性修饰包括2'-氟-胞苷、2'-氟-尿苷、2'-氟-腺苷、2'-氟-鸟苷、2'-氨基-胞苷、2'-氨基-尿苷、2'-氨基-腺苷、2'-氨基-鸟苷、2,6-二氨基嘌呤、4-硫代-尿苷和/或5-氨基-烯丙基-尿苷。在一个具体实施方案中,2'-氟代核糖核苷酸是每个尿苷和胞苷。另外的示例性修饰包括5-溴代-尿苷、5-碘代-尿苷、5-甲基-胞苷、核糖-胸苷、2-氨基嘌呤、2'-氨基-丁酰基-苡-尿苷、5-氟-胞苷和5-氟-尿苷。2'-脱氧-核苷酸和2'-Ome核苷酸也可用于本发明的经修饰的RNA沉默剂部分内。另外的经修饰的残基包括脱氧脱碱基、肌苷、N3-甲基-尿苷、N6,N6-二甲基-腺苷、假尿苷、嘌呤核糖核苷和三唑核苷(ribavirin)。在一个具体的示例性实施方案中,2'部分是甲基,以使连接部分是2'-O-甲基寡核苷酸。

[0247] 在一个示例性实施方案中,本发明的RNA沉默剂(例如,第一寡核苷酸、第二寡核苷酸和第三寡核苷酸的任意组合)包含锁核酸(LNA)。LNA包含抗核酸酶活性(高度稳定)并且对mRNA具有单核苷酸识别力的经糖修饰的核苷酸(Elmen et al., *Nucleic Acids Res.*, (2005), 33 (1):439-447; Braasch et al. (2003) *Biochemistry* 42:7967-7975, Petersen

et al. (2003) Trends Biotechnol 21:74-81)。这些分子具有2'-O,4'-C-乙烯桥接核酸,其具有可能的修饰,例如2'-脱氧-2"-氟代尿苷。此外,LNA通过将糖部分限制在3'-内构象中来提高寡核苷酸的特异性,从而预组织核苷酸用于碱基配对并且将寡核苷酸的解链温度提高多至每碱基10°C。

[0248] 在另一个示例性实施方案中,本发明的RNA沉默剂(例如,第一寡核苷酸、第二寡核苷酸和第三寡核苷酸的任意组合)包含肽核酸(PNA)。PNA包含经修饰的核苷酸,其中该核苷酸的糖-磷酸部分被中性2-氨基乙基甘氨酸部分替换,该部分能够形成对核酸酶消化具有高度抗性并对分子赋予改善的结合特异性的聚酰胺骨架(Nielsen, et al., Science, (2001), 254:1497-1500)。

[0249] 在另一个示例性实施方案中,本发明的RNA沉默剂(例如,第一寡核苷酸、第二寡核苷酸和第三寡核苷酸的任意组合)包含磷酰二胺吗啉代寡聚物(phosphorodiamidate morpholino oligomer, PMO)。PMO包含具有与亚甲基吗啉环通过磷酰二胺基团而不是磷酸连接的标准核酸碱基的经修饰的核苷酸(Summerton et al. (1997) Antisense & Nucleic Acid Drug Development. 7 (3):187-95)。

[0250] 还提供了经核碱基修饰的核糖核苷酸,即包含至少一种非天然存在的核碱基而不是天然存在的核碱基的核糖核苷酸。可修饰碱基以阻断腺苷脱氨酶的活性。示例性经修饰的核碱基包括但不限于以下:在第5位修饰的尿苷和/或胞苷,例如5-(2-氨基)丙基尿苷、5-溴代尿苷;在第8位修饰的腺苷和/或鸟苷,例如8-溴代鸟苷;脱氮核苷酸,例如,7-脱氮-腺苷;O-和N-烷基化核苷酸,例如N6-甲基腺苷是合适的。应说明的是,上述修饰可组合。

[0251] 在另一些实施方案中,可以采用交联来改变RNA沉默剂的药代动力学,例如,增加其在体内的半衰期。因此,本发明包括具有两条互补核酸链的RNA沉默剂,其中两条链是交联的。本发明还包括与另一部分(例如与非核酸部分,例如肽)、有机化合物(例如,染料)等缀合或无缀合(例如,在3'末端)的RNA沉默剂。以这种方式修饰siRNA衍生物与相应的siRNA相比,改善了所得siRNA衍生物的细胞摄取或增强了所得siRNA衍生物的细胞靶向活性,可用于追踪细胞中的siRNA衍生物,或者与相应的siRNA相比,改善了siRNA衍生物的稳定性。

[0252] 另一些示例性修饰包括:(a) 2'修饰,例如,在有义链或反义链中,但特别是在有义链中在U上提供2'OMe部分,或在3'突出端,例如在3'末端(3'末端意指在分子的3'原子处或最多3'部分,例如最3'P或2'位置,如上下文所示)提供2'OMe部分;(b) 骨架的修饰,例如在磷酸骨架中用S替换O,例如在U或A或二者上提供硫代磷酸酯修饰,尤其是在反义链上;例如,用S替换P;(c) 用C5氨基接头替换U;(d) 用G替换A(序列变化优选位于有义链而不是反义链上);以及(d) 在2'、6'、7'或8'位置的修饰。一些示例性实施方案是其中这些修饰中的一种或更多种存在于有义链上而不是反义链上的那些实施方案,或其中反义链具有较少这样的修饰的实施方案。另一些示例性修饰包括以下:在3'突出端(例如在3'末端)使用甲基化P; 2'修饰(例如提供2'OMe部分)与对骨架的修饰(例如用S替换P,例如提供硫代磷酸酯修饰,或者在3'突出端(例如在3'末端)使用甲基化P)的组合;用3'烷基进行修饰;在3'突出端(例如在3'末端)用无碱基吡咯烷酮进行修饰;用甲氧萘丙酸(naproxen)、异丁苯丙酸(ibuprofen)或在3'末端抑制降解的其他部分进行修饰。

[0253] 4) 增强细胞摄取的修饰

[0254] 在另一些实施方案中, RNA沉默剂(例如,第一链寡核苷酸、第二寡核苷酸和第三寡

核苷酸的任意组合)可用化学部分进行修饰,例如,以增强通过靶细胞(例如神经元细胞)的细胞摄取。因此,本发明包括与另一部分(例如非核酸部分,例如肽)、有机化合物(例如,染料)等缀合或无缀合(例如,在有义链的3'末端)的RNA沉默剂。缀合可通过本领域已知的方法完成,例如使用以下方法:Lambert et al.,*Drug Deliv.Rev.*:47(1),99-112(2001)(描述了加载至聚氰基丙烯酸烷基酯(polyalkylcyanoacrylate,PACA)纳米粒上的核酸);Fattal et al.,*J.Control Release* 53(1-3):137-43(1998)(描述了与纳米粒结合的核酸);Schwab et al.,*Ann.Oncol.*5Suppl.4:55-8(1994)(描述了与嵌入剂、疏水基团、聚阳离子或PACA纳米粒连接的核酸);以及Godard et al.,*Eur.J.Biochem.*232(2):404-10(1995)(描述了与纳米粒连接的核酸)。

[0255] 在一个具体实施方案中,本发明的RNA沉默剂与亲脂性部分缀合。在一个实施方案中,亲脂性部分是包含阳离子基团的配体。在另一个实施方案中,亲脂性部分与siRNA的一条或两条链连接。在一个示例性实施方案中,亲脂性部分与siRNA有义链的一个末端连接。在另一个示例性实施方案中,亲脂性部分与有义链的3'末端连接。在某些实施方案中,亲脂性部分选自胆固醇、维生素E、维生素K、维生素A、叶酸或阳离子染料(例如Cy3)。在一个示例性实施方案中,亲脂性部分是胆固醇。另一些亲脂性部分包括胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、双氢睾酮、1,3-双-0(十六烷基)甘油、香叶氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆酸、二甲氧三苯甲基或吩噻嗪。

[0256] 5) 束缚配体

[0257] 另一些实体可束缚至本发明的RNA沉默剂。例如,配体束缚至RNA沉默剂以改善稳定性、与靶核酸的杂交热力学、靶向特定组织或细胞类型、或者细胞渗透性,例如通过内吞依赖或非内吞依赖机制。配体和相关修饰还可提高序列特异性,并且因此降低位点外靶向。束缚配体可包含可用作嵌入剂的一种或更多种经修饰的碱基或糖。这些通常位于内部区域,例如位于RNA沉默剂/靶双链体的凸起中。嵌入剂可以是芳族化合物,例如多环芳族化合物或杂环芳族化合物。多环嵌入剂可具有堆叠能力,并且可包含具有2、3或4个稠环的体系。本文所述的通用碱基可包含在配体上。在一个实施方案中,配体可包含通过切割靶核酸而有助于靶基因抑制的切割基团。切割基团可以是,例如,博来霉素(bleomycin)(例如,博来霉素-A5、博来霉素-A2或博来霉素-B2)、苝、菲咯啉(phenanthroline)(例如,0-菲咯啉)、聚胺、三肽(例如,lys-tyr-lys三肽)或金属离子螯合基团。金属离子螯合基团可包括,例如Lu(III)或Eu(III)大环复合体、Zn(II)2,9-二甲基菲咯啉衍生物、Cu(II)三联吡啶或吡啶,其可促进通过游离金属离子例如Lu(III)在凸起位点选择性切割靶RNA。在一些实施方案中,肽配体可束缚至RNA沉默剂以促进靶RNA,例如在凸起区域的切割。例如,1,8-二甲基-1,3,6,8,10,13-六氮杂环十四烷(环拉胺(cyclam))可与肽缀合(例如,通过氨基酸衍生物)以促进靶RNA切割。束缚配体可以是氨基糖苷类配体,其可使RNA沉默剂具有改善的杂交特性或改善的序列特异性。示例性的氨基糖苷类包括糖基化聚赖氨酸、半乳糖化聚赖氨酸、新霉素B(neomycin B)、妥布霉素(tobramycin)、卡那霉素A(kanamycin A)和氨基糖苷类的吡啶缀合物,例如Neo-N-吡啶、Neo-S-吡啶、Neo-C-吡啶、Tobra-N-吡啶和KanaA-N-吡啶。使用吡啶类似物可提高序列特异性。例如,与DNA相比,新霉素B具有对RNA的高亲和力,但序列特异性低。吡啶类似物,neo-5-吡啶对HIV Rev响应元件(Rev-response element,RRE)具有提高的

亲和力。在一些实施方案中,氨基糖苷类配体的胍类似物(胍糖苷)束缚至RNA沉默剂。在胍糖苷中,氨基酸上的胺基被交换为胍基。胍类似物的连接可增强RNA沉默剂的细胞渗透性。束缚配体可以是聚精氨酸肽、类肽或肽模拟物,其可增强寡核苷酸物质的细胞摄取。

[0258] 示例性配体通过介入系链直接或间接地与缀合配体的载体连接(例如共价连接)。在一些示例性实施方案中,配体通过介入系链与载体连接。在一些示例性实施方案中,配体改变其所并入的RNA沉默剂的分布、靶向或使用期(lifetime)。在一些示例性实施方案中,配体提供对选定靶标(例如分子、细胞或细胞类型、区室例如细胞或器官区室、组织、身体器官或区域)的增强的亲和力,如例如与缺失这样的配体的种类相比。

[0259] 示例性配体可改善转运、杂交和特异性特性,并且还可改善所得天然或经修饰的RNA沉默剂或者包含本文所述单体和/或天然或经修饰的核糖核苷酸的任意组合的聚合分子的核酸酶抗性。配体一般可包括以下:治疗修饰剂,例如用于增强摄取;诊断化合物或报道基团,例如用于监测分布;交联剂;核酸酶抗性赋予部分;和天然或不常见的核碱基。一些一般性实例包括亲脂剂、脂质、类固醇(例如,熊果醇(uvaol)、龙舌蓝皂苷配基(hecigenin)、薯蓣皂苷配基(diosgenin))、萜烯(例如三萜,例如,菝葜皂苷元(sarsasapogenin)、软木三萜酮(Friedelin)、表木栓醇(epifriedelanol)衍生的石胆酸)、维生素(例如,叶酸、维生素A、生物素、吡哆醛)、碳水化合物、蛋白质、蛋白质结合剂、整合素靶向分子、聚阳离子、肽、聚胺和肽模拟物。配体可包括天然存在的物质(例如,人血清白蛋白(human serum albumin,HSA)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein,LDL)或球蛋白)、碳水化合物(例如,右旋糖酐、短梗霉聚糖(pullulan)、甲壳素、壳聚糖、菊粉、环糊精或透明质酸)、氨基酸或脂质。配体也可以是重组或合成的分子,例如合成的聚合物,例如合成的聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括聚氨基酸是聚赖氨酸(polylysine,PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙醇酸)共聚物、二乙烯醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol,PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪。聚胺的实例包括:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、聚胺、假肽-聚胺、肽模拟物聚胺、树枝状聚合物聚胺、精氨酸、脘、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、聚胺的季盐或 α 螺旋肽。

[0260] 配体还可包括靶向基团,例如细胞或组织靶向剂,例如凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质,例如抗体,其与特定细胞类型例如肾细胞结合。靶向基团可以是促甲状腺素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性物质蛋白A、黏蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰-半乳糖胺、N-乙酰-葡糖胺、多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、转铁蛋白模拟肽、双膦酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸、维生素B12、生物素、或者RGD肽或RGD肽模拟物。配体的另一些实例包括染料、嵌入剂(例如吡啶和经取代的吡啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、texaphyrin、Sapphyrin)、多环芳烃(例如吩嗪、二氢吩嗪、菲咯啉、芘)、lys-tyr-lys三肽、氨基糖苷类、胍氨基糖苷、人工内切核酸酶、亲脂性分子、例如胆固醇(及其硫代类似物)、胆酸、胆烷酸、石胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、双氢睾酮、甘油(例如,酯类(例如,单、双或三脂肪酸酯,例如C₁₀、C₁₁、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、C₁₈、C₁₉或C₂₀脂肪酸)及其醚,例如C₁₀、C₁₁、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、C₁₈、C₁₉或C₂₀烷基;例如,1,3-双-O(十六烷基)甘油、1,3-双-O(十八烷基)甘油)、香

叶氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、硬脂酸(例如,二硬脂酸甘油酯)、油酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆酸、二甲氧三苯甲基或吩噻嗪)和肽缀合物(例如,触角肽(antennapedia peptide)、Tat肽)、烷化剂、磷酸、氨基、巯基、PEG(例如PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚氨基、烷基、经取代的烷基、经放射性标记的标志物、酶、半抗原(例如生物素)、转运/吸收促进剂(例如阿司匹林(aspirin)、萘普生、维生素E、叶酸)、合成的核糖核酸酶(例如咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吡啶-咪唑缀合物、四氮杂大环的Eu³⁺复合体)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0261] 配体可以是以下:蛋白质,例如糖蛋白;或肽,例如对共配体具有特异性亲和力的分子;或抗体,例如与特定细胞类型例如癌细胞、内皮细胞或骨细胞结合的抗体。配体还可包括激素和激素受体。配体还可包括非肽类物质,例如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。配体可以是例如脂多糖、p38 MAP激酶激活剂或NF- κ B激活剂。

[0262] 配体可以是物质,例如药物,其可例如通过破坏细胞的细胞骨架,例如通过破坏细胞的微管、微丝和/或中间丝来提高细胞对RNA沉默剂的摄取。药物可以是,例如,紫杉醇、长春新碱、长春碱、细胞松弛素、诺考达唑(nocodazole)、japlakinolide、拉春库林A(latrunculin A)、鬼笔环肽(phalloidin)、swinholid A、茚满新碱(indanocine)或myoservin。例如,配体可通过激活炎症响应来提高细胞对RNA沉默剂的摄取。具有这样的作用的示例性配体包括肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白介素-1 β 或 γ 干扰素。在一个方面中,配体是脂质或基于脂质的分子。在一些具体实施方案中,这样的脂质或基于脂质的分子结合血清蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)。结合HSA的配体允许将缀合物分配至靶组织,例如身体的非肾靶组织。例如,靶组织可以是包含肝的实质细胞的肝。其他可结合HSA的分子也可用作配体。例如,可使用萘普生或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可(a)提高对缀合物降解的抗性,(b)提高向靶细胞或细胞膜中的靶向或转运,和/或(c)可用于调节与血清蛋白,例如HSA的结合。基于脂质的配体可用于调节,例如,控制缀合物与靶组织的结合。例如,与HSA结合较强的脂质或基于脂质的配体将不太可能靶向肾,并且因此不太可能从身体清除。与HSA结合较弱的脂质或基于脂质的配体可用于将缀合物靶向肾。在一个具体实施方案中,基于脂质的配体结合HSA。基于脂质的配体可以以充分的亲和力结合HSA,以使缀合物将分布至非肾组织。然而,在一些具体实施方案中,亲和力没有强到不能逆转HSA-配体结合。在另一个具体实施方案中,基于脂质的配体与HSA弱结合或根本不结合,以使缀合物将分布至肾。也可使用靶向肾细胞的其他部分替换基于脂质的配体,或除了基于脂质的配体之外也可使用靶向肾细胞的其他部分。

[0263] 在另一个方面中,配体是被靶细胞例如增殖细胞摄取的部分,例如维生素。这些特别地可用于治疗以不期望的细胞增殖(例如恶性或非恶性类型的例如癌细胞的细胞增殖)为特征的病症。示例性维生素包括维生素A、维生素E和维生素K。另一些示例性维生素包括B族维生素,例如叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或者被癌细胞吸收的其他维生素或营养素。还包括HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

[0264] 在另一个方面中,配体是细胞渗透剂,例如螺旋细胞渗透剂。该物质可以是两亲性的。示例性物质是肽,例如tat或antennopedia。如果该物质是肽,则可对其进行修饰,包括肽基模拟物、转化异构体、非肽或假肽键以及D-氨基酸的使用。在一些具体实施方案中,螺

旋剂是任选地具有亲脂相和疏脂相的 α -螺旋剂。

[0265] 配体可以是肽或肽模拟物。肽模拟物(在本文中也称为寡肽模拟物)是能够折叠为类似于天然肽的限定三维结构的分子。肽和肽模拟物与寡核苷酸物质的连接可例如通过增强细胞识别和吸收来影响RNA沉默剂的药代动力学分布。肽或肽模拟物部分可以是约5至50个氨基酸长,例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。肽或肽模拟物可以是例如细胞渗透肽、阳离子肽、两亲性肽或疏水性肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树枝状聚合物肽、受限肽或交联肽。肽部分可以是L-肽或D-肽。在另一个替代方案中,肽部分可包括疏水性膜易位序列(membrane translocation sequence,MTS)。肽或肽模拟物可由DNA的随机序列编码,例如从噬菌体展示文库或一珠一化合物(one-bead-one-compound,OBOC)组合文库中鉴定的肽(Lam et al.,Nature354:82-84,1991)。在一些示例性实施方案中,通过并入的单体单元束缚至RNA沉默剂的肽或肽模拟物是细胞靶向肽,例如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(aspartic acid,RGD)-肽或RGD模拟物。肽部分的长度可在约5个氨基酸至约40个氨基酸的范围内。肽部分可具有结构修饰,例如以提高稳定性或直接构象特性。可利用下面描述的任何结构修饰。

[0266] 出于任何目的,本申请中可能引用的所有引用的参考(包括参考文献、专利、专利申请和网站)的内容均明确地通过引用整体并入于此,如同所述参考在本文中引用。除非另有指示,否则本公开内容将采用本领域公知的免疫学、分子生物学和细胞生物学的常规技术。

[0267] 本公开内容还通过引用整体并入分子生物学和药物递送领域中公知的技术。

[0268] 实施例

[0269] 实施例1.包含用于脑脊液和全身递送的动态药代动力学(PK)修饰锚的寡核苷酸

[0270] 1.1 PK修饰锚

[0271] 在治疗性寡核苷酸领域中的主要挑战是将非血清结合寡核苷酸在注射的几分钟内从脑脊液(CSF)和血液/血浆中清除。这种快速清除是将寡核苷酸递送至肝和肾以外的组织的主要限制因素。在中枢神经系统中,支持(behind)寡核苷酸通过大脑分布的主要机制是大量CSF流。寡核苷酸从中枢神经系统中迅速清除,这限制了在具有大且复杂大脑的生物体(包括人)中的分布。本文公开的PK修饰分子锚被图案化以能够有效调节治疗性寡核苷酸的吸收、分布和清除动力学以增强其组织分布。可以在血液/血浆、脑脊液(CSF)以及其他相关的体液/生物流体和组织中实现对吸收、分布和清除动力学的有效调节。本文公开的PK修饰分子锚调节CSF清除动力学并增强治疗性寡核苷酸在所有脑区的效力,其不依赖施用位点。

[0272] 所描述的PK修饰锚动态地调节治疗性寡核苷酸的尺寸,导致调节相对于组织摄取和分布的清除动力学。这个概念的动态本质是通过优化锚尺寸和化学组成来实现的。在此描述的PK修饰锚具有用于调节CSF清除率和调节全身清除的最优尺寸。另外,在此描述了用作药代动力学修饰部分的一组非免疫原性聚合物(包括泊洛沙姆188)和嵌段聚合物。

[0273] 1.2 PK修饰锚动态改善hsiRNA化合物的血液/血浆循环时间

[0274] 如图8所示,测试了PK修饰锚对经疏水修饰的siRNA(hsiRNA)的血液/血浆循环时间的作用。确定了PK修饰分子锚在静脉注射之后增强了无缀合的(图8A)和胆固醇缀合的(图8B)siRNA的循环时间和曲线下面积。聚乙二醇(PEG)用作模型PK修饰聚合物。具有硫代

磷酸化骨架的8聚体寡核苷酸用作模型寡核苷酸锚。PK修饰锚与包含21聚体寡核苷酸反义链和13聚体寡核苷酸有义链的不对称hsiRNA双链体杂交。PEG部分增加的长度显著改善了hsiRNA化合物的循环时间。

[0275] 在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg尾静脉注射。反义链通过如先前在Godinho et al.2017(Nucleic Acids Therapeutics)中所述的肽核酸(PNA)杂交测定进行定量。简而言之,该测定使用与反义链杂交的经cy3标记的PNA探针,随后通过HPLC进行定量。曲线下面积(AUC)是使用模型独立的梯形方法与GastroPlus、Simulations Plus一起来计算的。

[0276] 1.3 PK修饰锚调节hsiRNA化合物的全身体内生物分布

[0277] 如图9所示,测试了PK修饰锚对hsiRNA的生物分布的作用。相对于肝(图9A)、脾(图9B)、肾(图9C)、肾上腺(图9D)、心(图9E)、胰腺(图9F)和肺(图9G)测试了hsiRNA的定位。PEG用作模型PK修饰聚合物。具有硫代磷酸化骨架的8聚体寡核苷酸用作模型寡核苷酸锚。PK修饰锚与包含21聚体寡核苷酸反义链和13聚体寡核苷酸有义链的不对称hsiRNA双链体杂交。

[0278] 药代动力学修饰锚和寡核苷酸锚的多个实施方案是可能的。锚的长度和化学组成可根据递送目的或目标进行调整。如图9所示,药代动力学修饰锚在静脉注射之后显著影响无缀合和胆固醇缀合的hsiRNA的生物分布。图9示出了增加PEG部分的长度和改善无缀合的寡核苷酸向大多数器官的递送之间的正相关。

[0279] 在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg尾静脉注射。在48小时之后,通过PNA杂交测定对反义链进行定量。

[0280] 1.4 PK修饰锚在全身施用之后能够有效和强效的使基因沉默

[0281] 测试了PK修饰锚在静脉内施用之后将hsiRNA化合物递送至肝(图10A、图18)、肾(图10B、图17)和脾(图10C、图19)的能力以及随后的基因沉默。PK修饰锚在静脉内施用之后增强了hsiRNA化合物的递送。在48小时之后观察到生产性基因沉默。添加较大的PEG部分不会干扰基因沉默,这指示(不受科学理论约束)RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex,RISC)负载并活化与用单独的hsiRNA相当。

[0282] 在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg尾静脉注射。在注射之后48小时收集组织,通过如在Coles et al.2015中所述的QuantiGene b-DNA测定对mRNA进行定量。

[0283] PK修饰锚还在皮下施用之后将hsiRNA化合物递送至肾(图20)、肝(图21)、脾(图22)和皮肤(图23)。

[0284] 1.5 PK修饰锚在脑室内和鞘内注射之后调节hsiRNA化合物在中枢神经系统内的体内生物分布

[0285] 在小鼠脑室内注射(图11A和图11B)或鞘内注射(图11C)之后,测试了多种hsiRNA构建体对体内生物分布的作用。在图11A中,将4nmol(或约250 μ g)的hsiRNA注射至侧脑室以导致约2nmol/脑室的浓度。在图11B中,将20nmol的hsiRNA注射至侧脑室以导致约10nmol/脑室的浓度。hsiRNA在小鼠脑中的分布在图11A和图11B中示出。在图11C中,将10nmol的hsiRNA通过鞘内注射在L5和L6之间进行注射。hsiRNA在小鼠脊柱中的分布在图11C中示出。

[0286] hsiRNA构建体从21聚体寡核苷酸反义链和13聚体寡核苷酸有义链开始。经测试的多种连接物包括:仅胆固醇、仅胆固醇锚、胆固醇-2000Da PK修饰锚、胆固醇-4500Da PK修饰锚、仅无胆固醇的锚、无胆固醇的2000Da PK修饰锚、无胆固醇的4500Da PK修饰锚,无胆

固醇的仅hsiRNA。在注射之后48小时收集小鼠脑和脊柱组织,并用DAPI进行染色(核,蓝色)。使用Leica DMI8荧光显微镜对脑和组织进行成像。

[0287] PK修饰锚能够在脑室内注射之后在小鼠脑中独特地扩散和保留高度亲脂性缀合物(图11A)。将较大的PEG部分锚定至hsiRNA胆固醇缀合的化合物来改善在脑实质中的渗透。PK修饰锚能够在鞘内施用之后在小鼠脊柱中独特地扩散和保留高度亲脂性缀合物(图11B)。如对脑组织所观察到的,将较大的PEG部分锚定至hsiRNA胆固醇缀合的化合物来改善在脊髓实质中的渗透。

[0288] 1.6 PK修饰锚在皮下注射之后显著改善血液/血浆循环时间并且调节全身体内生物分布

[0289] PK修饰锚在皮下注射之后增强了(图28A)无缀合的和(图28B)胆固醇缀合的hsiRNA的曲线下面积。PK修饰锚在皮下注射之后显著影响无缀合的(红色调)和胆固醇缀合的(黑色调)hsiRNA的生物分布(图29)。

[0290] 实施例2. 包含动态药代动力学(PK)修饰锚的缀合寡核苷酸

[0291] 2.1 PK修饰锚

[0292] PK修饰锚与如图31所示的一组不同的缀合不对称siRNA配对。特别地,具有21个核苷酸的反义链和13个核苷酸的有义链的siRNA与胆固醇、DCA、DHA或GalNAc中的一种缀合。还测试了双分支的siRNA化合物,其中接头在有义链的3'末端连接两个siRNA。每个缀合不对称siRNA与包含40kDa PEG部分的PK修饰锚配对,其中所有核苷酸间键是硫代磷酸酯。

[0293] 2.2 PK修饰锚动态改善经静脉内施用的siRNA化合物的血液/血浆循环时间

[0294] 如图32所示,测试了PK修饰锚对缀合siRNA的血液/血浆循环时间的作用。确定了PK修饰分子锚在静脉注射之后增强无缀合的siRNA(图32A)、GalNAc缀合的siRNA(图32B)、DHA缀合的siRNA(图32C)、Di-siRNA(图32D)、胆固醇缀合的siRNA(图32E)和DCA缀合的siRNA(图32F)的循环时间和曲线下面积。

[0295] 在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg尾静脉注射。反义链通过如先前在Godinho et al.2017(Nucleic Acids Therapeutics)中所述的肽核酸(PNA)杂交测定进行定量。简而言之,该测定使用与反义链杂交的经cy3标记的PNA探针,随后通过HPLC进行定量。

[0296] 2.3 PK修饰锚调节经静脉内施用的siRNA化合物的全身体内生物分布

[0297] 如图33所示,测试了PK修饰锚对实施例2.2中的缀合siRNA的生物分布的作用。相对于胰腺、肺、心、肾上腺、脾、肾、肌肉和肝测试了siRNA的定位。与实施例2.2一样,测试了无缀合的siRNA(图33A)、GalNAc缀合的siRNA(图33B)、DHA缀合的siRNA(图33C)、Di-siRNA(图33D)、胆固醇缀合的siRNA(图33E)和DCA缀合的siRNA(图33F)。结果表明,PK修饰锚增强了缀合siRNA在多种组织中的生物分布。PK修饰锚还降低了缀合siRNA的肾积累。肾是清除组织,并且避开肾可提高缀合siRNA的血清半衰期和生物分布。

[0298] 这些结果还表明了PK修饰锚赋予GalNAc缀合的siRNA出乎意料的肝递送增强。如图33B所示,与无PK修饰锚的GalNAc缀合siRNA相比,具有PK修饰锚的GalNAc缀合siRNA的量增加了一倍以上。已知GalNAc缀合物促进siRNA的肝递送,然而,添加PK修饰锚促进肝递送的程度高于GalNAc缀合物,并且可用于增强GalNAc缀合的siRNA的治疗效力。

[0299] 2.4 PK修饰锚动态改善经皮下施用的siRNA化合物的血液/血浆循环时间如图34

所示,确定了PK修饰锚在皮下注射之后对无缀合的siRNA(图34A)和Di-siRNA(图34B)的血液/血浆循环时间的作用。

[0300] 在雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄)中进行20mg/kg皮下注射。反义链通过如先前在Godinho et al.2017(Nucleic Acids Therapeutics)中所述的肽核酸(PNA)杂交测定进行定量。

[0301] 2.5 PK修饰锚调节经皮下施用的siRNA化合物的全身体内生物分布

[0302] 如图35所示,测试了PK修饰锚对实施例2.4中的siRNA的生物分布的作用。相对于胰腺、肺、心、肾上腺、脾、肾、肌肉和肝测试了siRNA的定位。与实施例2.4一样,测试了无缀合的siRNA(图35A)和Di-siRNA(图35B)。

[0303] 2.6 PK修饰锚调节经皮下施用的适配体-siRNA嵌合化合物的血液/血浆循环时间和全身体内生物分布

[0304] 如图36和图37所示,测试了PK修饰锚对适配体-siRNA嵌合体的血液/血浆循环时间(图37A)和生物分布(图37B)的作用。结合EPCAM受体的适配体与siRNA有义链的3'末端缀合。

[0305] 在荷瘤Balb-c小鼠中进行20mg/kg皮下注射。小鼠包含4T1E细胞来源的肿瘤和P815细胞来源的肿瘤二者。有义链通过如先前在Godinho et al.2017(Nucleic Acids Therapeutics)中所述的肽核酸(PNA)杂交测定进行定量。在注射之后48小时收集组织用于测定。在该测定中,结合EPCAM的适配体-siRNA缀合物被表达EPCAM受体的4T1E肿瘤摄取,而P815肿瘤用作阴性对照。如图37A和图37B所示,与无PK修饰锚的适配体-siRNA缀合物相比,PK修饰锚增强了循环时间并将向靶肿瘤的递送的速度提高了2至4倍。

[0306] 2.7 PK修饰锚调节经静脉内和皮下施用的双分支siRNA化合物的全身生物分布

[0307] 如图38所示,通过比较静脉内和皮下注射,确定了PK修饰锚对无缀合的siRNA和Di-siRNA的生物分布的作用。相对于肝(图38A)、脾(图38B)和肾(图38C)测试了siRNA的定位。结果表明,在SC和IV施用之后,PK修饰锚增强了无缀合的siRNA和Di-siRNA亲本不对称siRNA向肝和其他二级分布器官的递送。PK修饰锚还降低了两种siRNA支架的肾清除。实验一式三份进行,示出了在每种条件下使用的三只小鼠中每只的荧光组织图像。

[0308] 2.8 PK修饰锚调节在胎盘中的全身体内生物分布

[0309] 如图39所示,确定了PK修饰锚对小鼠胎盘中的无缀合的siRNA的生物分布的作用。在怀孕的雌性FVB/N小鼠(约9至12周龄,4只小鼠/组)中进行了两次单独的20mg/kg皮下注射。在最后一次注射之后48小时收集组织。反义链通过如先前在Godinho et al.2017(Nucleic Acids Therapeutics)中所述的肽核酸(PNA)杂交测定进行定量。结果表明,与无PK修饰锚的siRNA相比,PK修饰锚在胎盘中的分布增加了十倍。

[0310] 2.9 PK修饰锚在胎盘中能够使基因沉默

[0311] 如图40所示,确定了PK修饰锚对小鼠胎盘中的无缀合的siRNA的靶mRNA沉默的作用。进行如实施例2.9中所述的实验。所采用的siRNA靶向sFlt-1mRNA。sFlt-1mRNA的相对水平使用分支DNA(bDNA)测定进行确定。结果表明,具有PK修饰锚的靶mRNA沉默与无PK修饰锚的siRNA相当。为了证明PK修饰锚不会引起急性全身毒性,确定了小鼠的重量谱(%重量增加)、血液化学物质和全血细胞计数。结果表明,注射盐水的对照组和注射PK修饰锚的小鼠的重量谱、血液化学物质和全血细胞计数相当。这些结果表明PK修饰锚不会引起急性全身

毒性。

[0312] 2.10 PK修饰锚与GalNAc缀合的siRNA一起调节体内肝生物分布

[0313] 如图41所示,确定了PK修饰锚与GalNAc缀合的siRNA一起对肝的生物分布的作用。该测定采用两种不同类型的不对称siRNA。第一种是具有21个核苷酸的反义链、13个核苷酸的有义链和8个核苷酸的锚(表示为21-13-8)的siRNA。第二种是具有25个核苷酸的反义链、17个核苷酸的有义链和8个核苷酸的锚(表示为25-17-8)的siRNA。结果表明,对于静脉内和皮下递送二者,以及在21-13-8siRNA形式和25-17-18siRNA形式二者中,PK修饰锚与无PK修饰锚的siRNA相比增强了在肝中的分布。这种增强对于肝中的肝细胞特别强烈。这些结果还表明了PK修饰锚赋予GalNAc缀合的siRNA意想不到的肝递送增强。如上实施例2.3所述。已知GalNAc缀合物促进siRNA的肝递送,然而,添加PK修饰锚促进肝递送的程度高于GalNAc缀合物,并且可用于增强GalNAc缀合的siRNA的治疗效力。

[0314] 实施例3. 保守的通用寡核苷酸锚序列的开发

[0315] 实施例1和实施例2的上述实验用靶向sFlt-1mRNA的不对称siRNA进行。该siRNA为21-13(反义链长度-有义链长度)形式。因此,存在8-核苷酸锚定序列可结合的8-核苷酸长的反义尾。靶向sFlt-1mRNA的不对称siRNA的尾序列采用富含G/C核苷酸的尾序列(G/C核苷酸含量为87.5%)。测试具有缺乏G/C核苷酸的序列的siRNA以确定PK修饰锚是否会成功与其靶反义链尾序列结合。sFlt-1siRNA序列和靶向Htt mRNA的siRNA序列在下文示出:

[0316] HTT10150:

[0317] 反义链,21个核苷酸:

[0318] V(mU)#(fU)#(mA)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mU)(fU)(mU)(fA)(mC)#(fU)#(mG)#(fA)#(mU)#(fA)#(mU)#(fA)#(mC)

[0319] PK修饰锚,8个核苷酸,具有40kDa PEG部分:

[0320] 40k(mG)#(fU)#(mA)#(fU)#(mA)#(fU)#(mC)#(fA)

[0321] PK修饰锚,6个核苷酸,具有40kDa PEG部分:

[0322] 40k(mG)#(fU)#(mA)#(fU)#(mA)#(fU)

[0323] sFLT1-2283:

[0324] 反义链,21个核苷酸:

[0325] V(mU)#(fA)#(mA)(fA)(mU)(fU)(mU)(fG)(mG)(fA)(mG)(fA)(mU)#(fC)#(mC)#(fG)#(mA)#(fG)#(mC)#(fG)#(mC)

[0326] 有义链,13个核苷酸:

[0327] (fA)#(mU)#(fC)(mU)(fC)(mC)(fA)(mA)(fA)(mU)(fU)#(mU)#(fA)

[0328] PK修饰锚,8个核苷酸,具有40kDa PEG部分:

[0329] 40k(mG)#(fC)#(mG)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fG)

[0330] 在上述序列中,“V”对应于5'乙烯基磷酸酯部分,“m”对应于2'-O甲基修饰,“f”对应于2'-氟代修饰,“#”对应于硫代磷酸酯核苷酸间键,“40k”对应于40kDa PEG部分,反义序列的粗体/下划线部分对应于PK修饰锚结合的8-核苷酸尾。如上所述,sFlt-1反义链尾和相应锚具有的G/C含量为87.5%,而Htt反义链尾和相应锚具有的G/C含量为25%。如图42所示,当与Htt siRNA的6核苷酸或8核苷酸锚一起使用时,在凝胶迁移测定中没有可检测的siRNA迁移。这在siRNA与锚的摩尔比为1:1、1:2和1:4时是正确的。结果表明,缺乏G/C含量

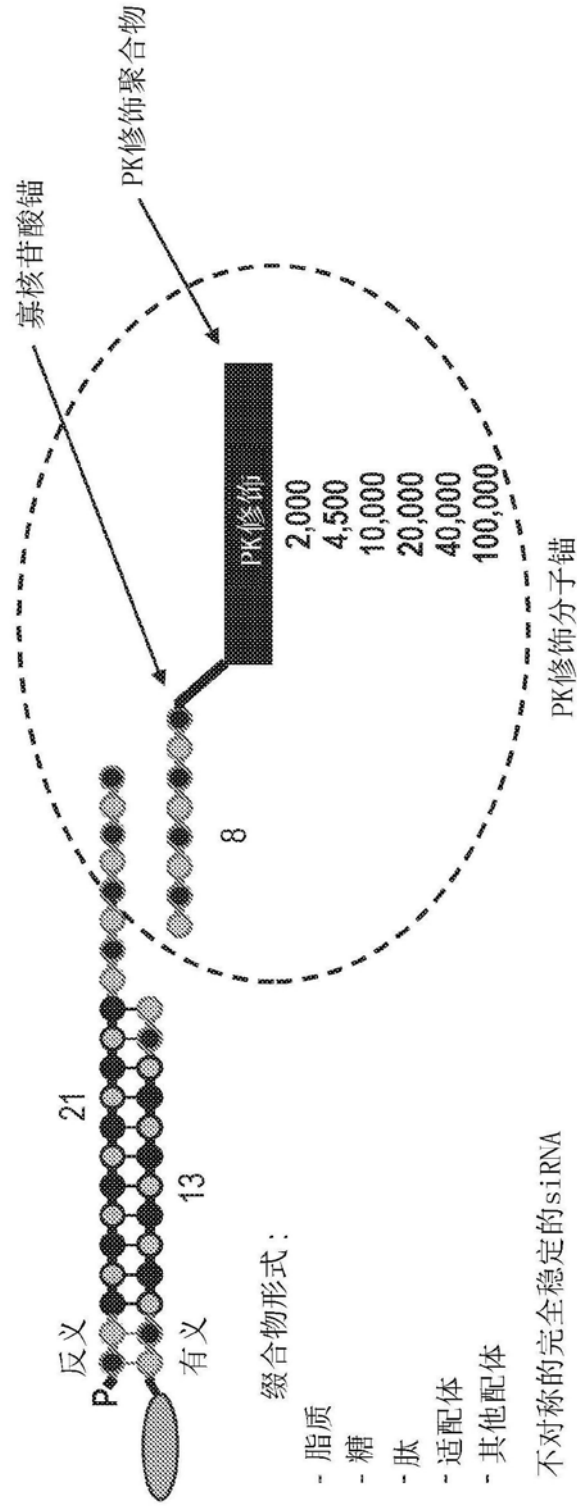
的尾序列不足以实现锚与尾序列的结合。

[0331] 在开发保守的通用锚和反义尾序列的努力中,改变锚和相邻有义链的长度以确定对锚与尾结合的作用。如图43所示,21-13siRNA与8-核苷酸锚、7-核苷酸锚、6-核苷酸锚和5-核苷酸锚一起使用。7-、6-和5-核苷酸锚在相邻有义链和锚之间的序列中各自包含空位(分别为1-、2-和3-核苷酸空位)。当在有义链和寡核苷酸锚内留有空位时,由于同轴堆叠的积极作用丧失导致结合效率降低。7-核苷酸锚需要四倍的摩尔量以能够在凝胶电泳测定中完全迁移。如图44所示,这种降低的结合效率可通过增加有义链的长度以关闭有义链和锚之间的空位来减轻。7-核苷酸锚、6-核苷酸锚和5-核苷酸锚分别与14-核苷酸有义链、15-核苷酸有义链和16-核苷酸有义链一起使用。凝胶迁移测定表明,与13-核苷酸有义链/7-核苷酸锚组合相比,使用14-核苷酸有义链连同7-核苷酸锚减轻了结合效率的降低。

[0332] 测试了多种选择以设计通用PK修饰锚序列。在选择1下,从23-核苷酸反义链的第18位核苷酸开始,将6-核苷酸的通用序列设计至反义链中。在选择1下的第一实例中,使用17-核苷酸有义链以及与反义链上的6-核苷酸通用序列互补的6-核苷酸锚序列。在选择1下的第二实例中,使用15-核苷酸有义链以及8-核苷酸锚序列,该8-核苷酸锚序列与反义链上的6-核苷酸通用序列互补并且其他2个核苷酸与反义链第16和17位核苷酸互补,这将根据为反义链选择的靶序列而改变。在选择2下,从25-核苷酸反义链的第18位核苷酸开始,将8-核苷酸的通用序列设计至反义链中。在选择2下,使用17-核苷酸有义链以及与反义链上的8-核苷酸通用序列互补的8-核苷酸锚序列(图45)。

[0333] 针对Htt mRNA靶标测试了上述三种替代的通用PK修饰锚序列方法。测量了靶Htt mRNA的mRNA沉默效力。在HeLa细胞中在72小时孵育的情况下进行剂量响应。bDNA测定用于mRNA评估。结果归一化为HPRT或PP1B。所有基于23-核苷酸的反义序列像完全互补的对照一样进行,除保守区位于第16位核苷酸的一个序列之外(图46A数据点,带框,“P3 Chol HTT 23-15 16nt (8个nt)”)。此外,所有基于25-核苷酸的反义序列像完全互补的对照一样进行。结果表明,保守的通用锚序列的使用可用于任何siRNA,从而克服在缺乏G/C含量的尾序列的情况下的任何问题(图46A至图46B)。

[0334] 除了上文进行的体外沉默实验之外,还确定了具有保守序列的PK修饰锚对生物分布的作用。该测定采用两种不同类型的不对称siRNA。第一种是靶向sFlt-1mRNA的siRNA,其具有21-核苷酸的反义链、13-核苷酸的有义链和8-核苷酸的锚(表示为21-13-8)。第二种是靶向ApoE mRNA的siRNA,其具有25-核苷酸的反义链、17-核苷酸的有义链和8-核苷酸的锚(表示为25-17-8)。25-17-8siRNA从反义链的第18位开始采用上述保守的通用尾序列。每个siRNA均具有用于肝递送的GalNAc缀合物。结果表明,对于静脉内和皮下递送二者,具有保守的通用尾序列的PK修饰锚与无保守序列的siRNA相比也增强了在肝中的分布(图41)。



缀合物形式：

- 脂质
- 糖
- 肽
- 适配体
- 其他配体

图1

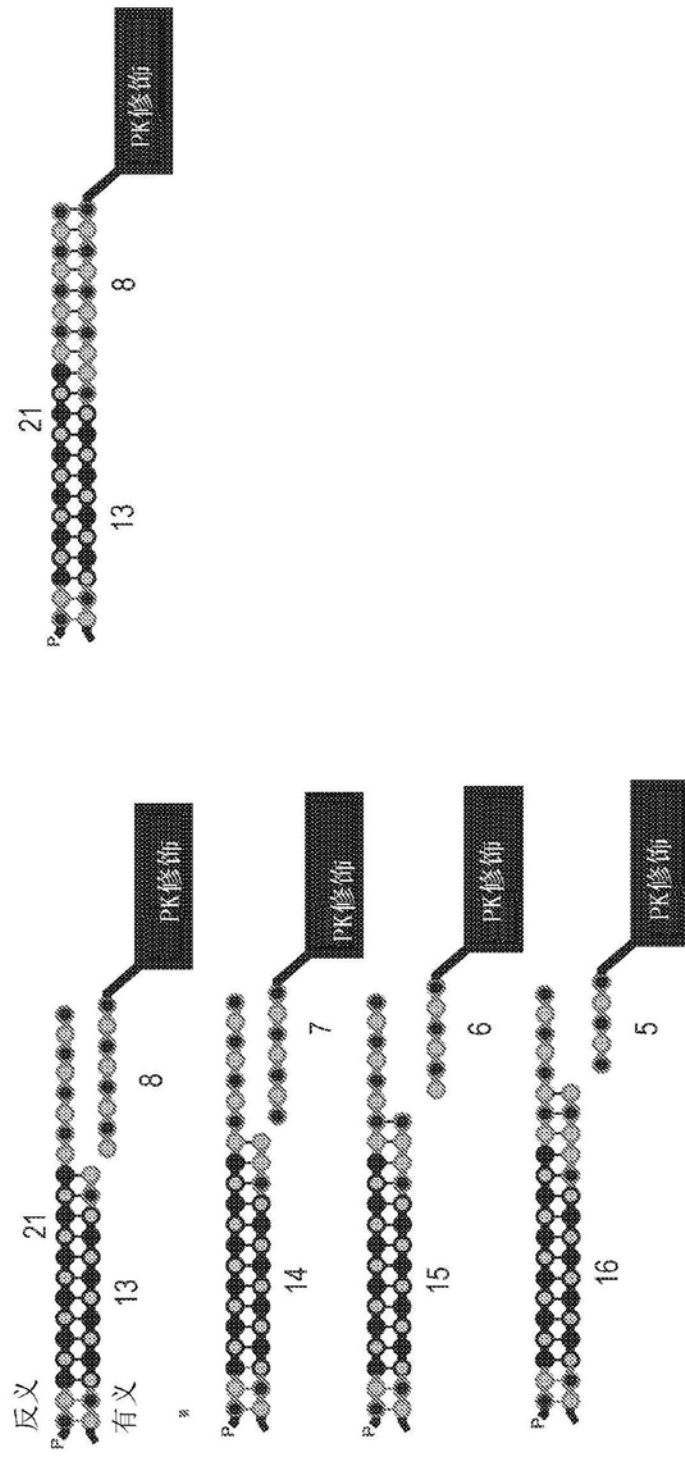


图2

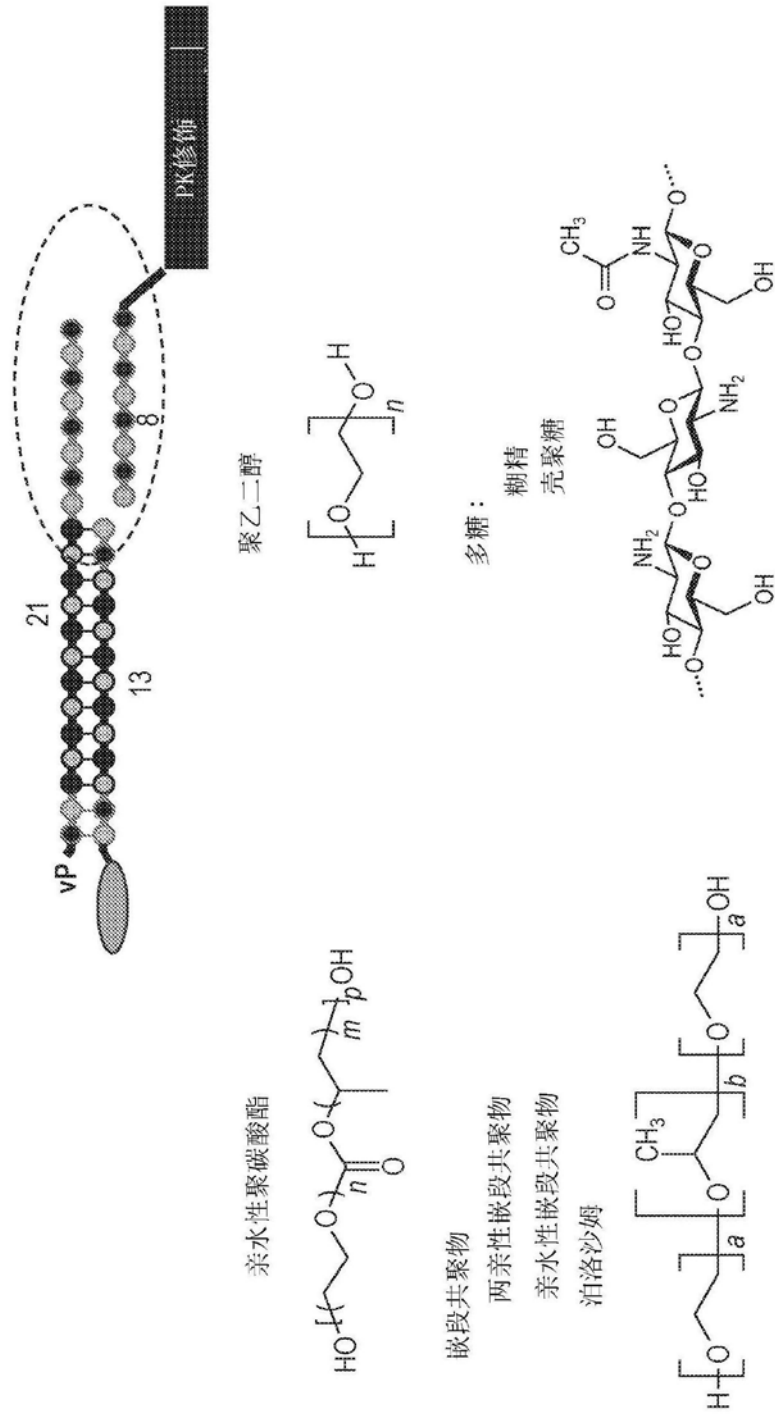


图3

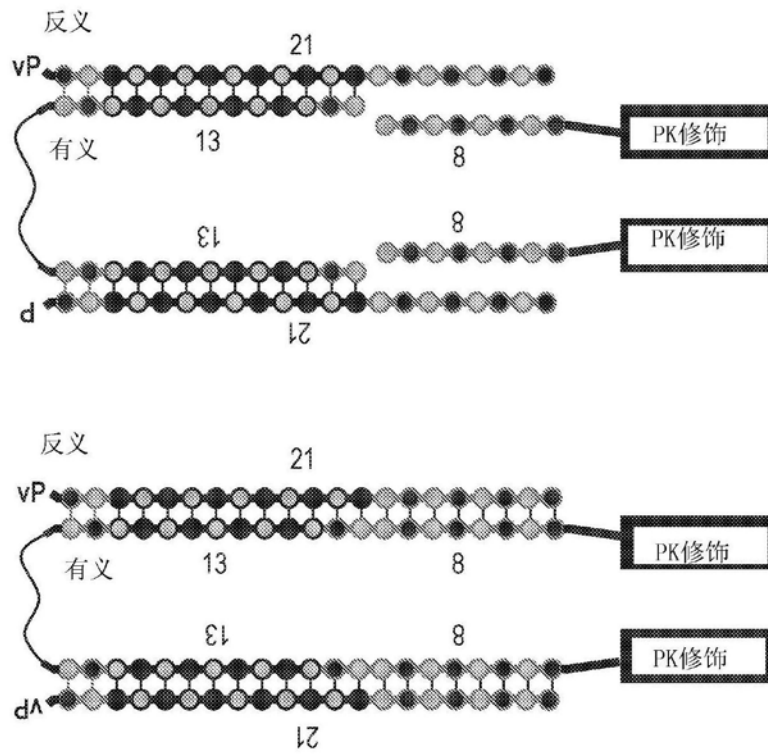


图4

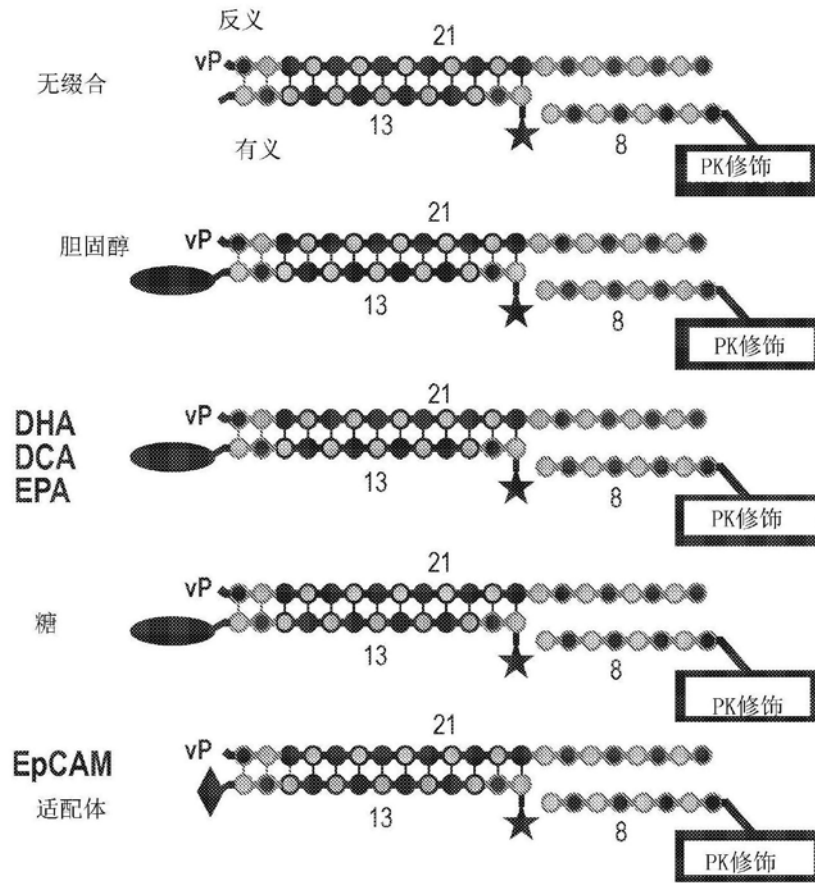


图6

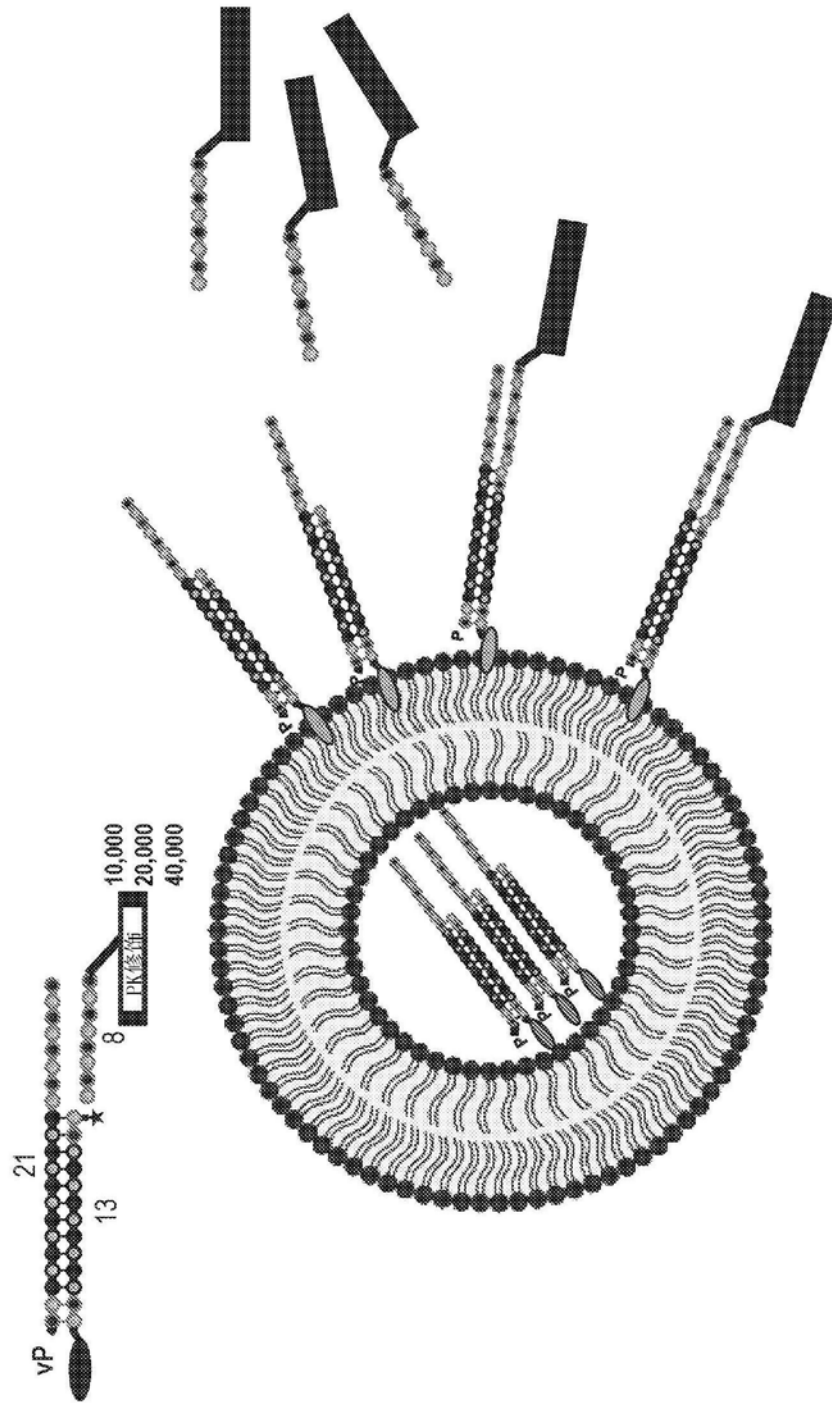


图7

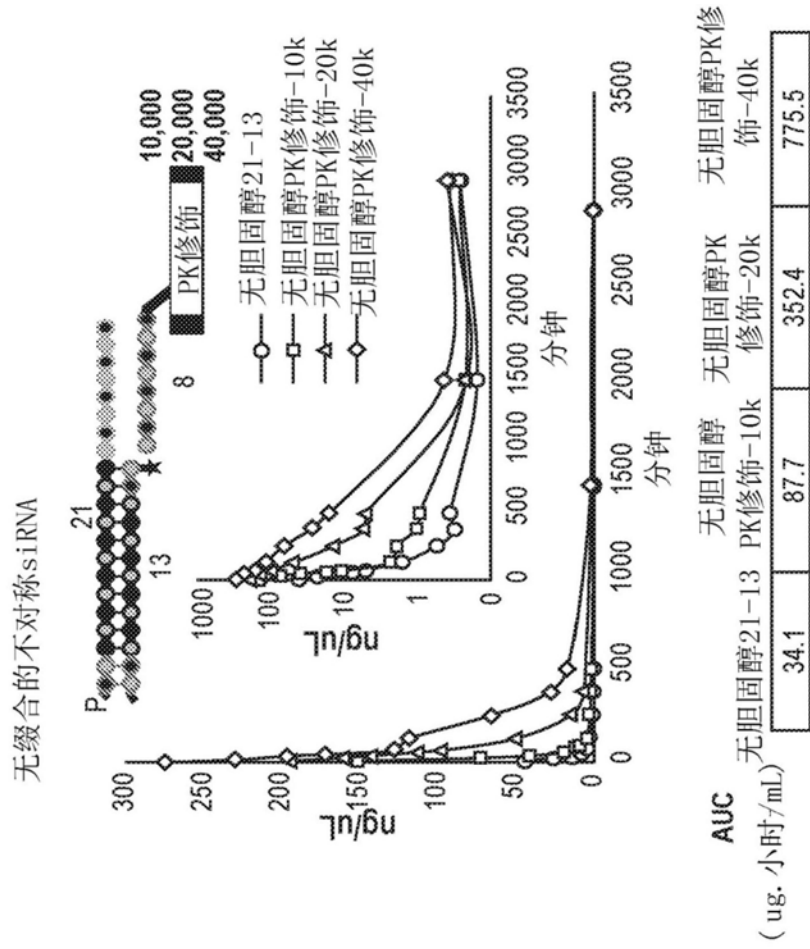


图8A

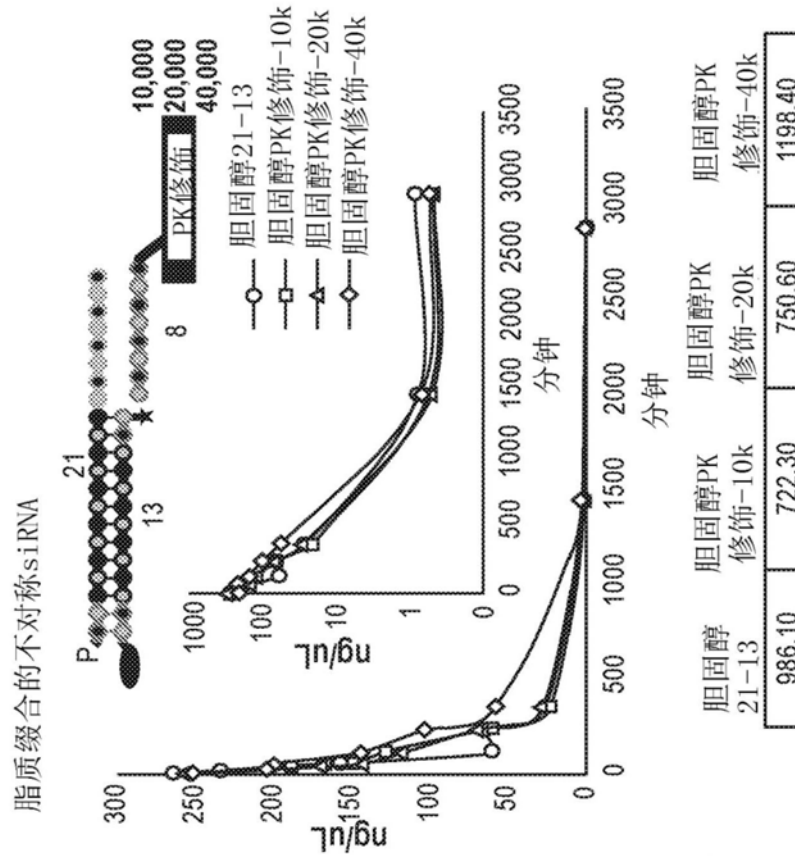


图8B

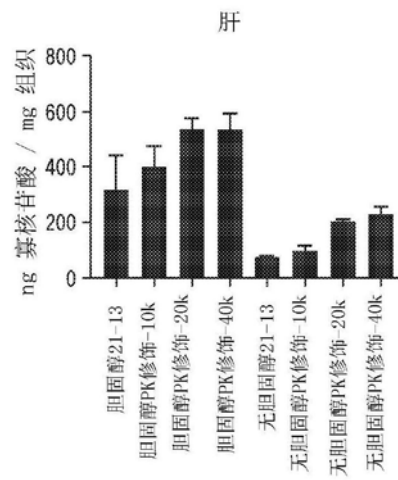


图9A

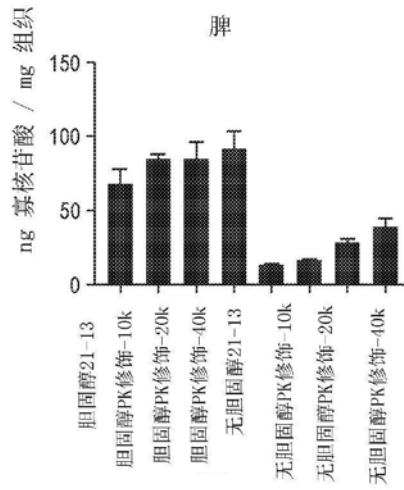


图9B

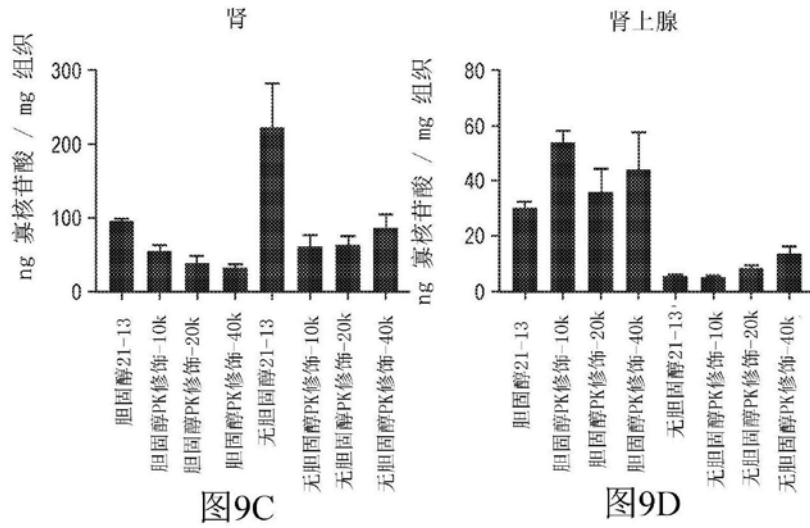


图9C

图9D

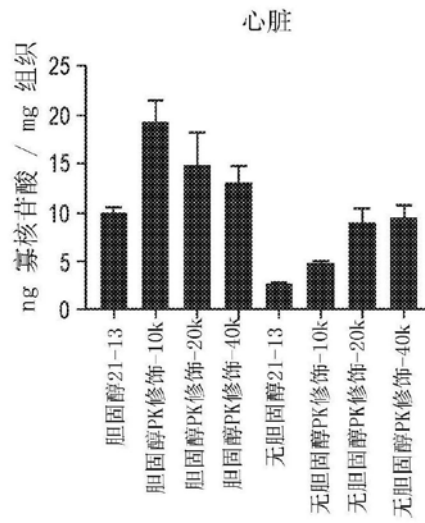


图9E

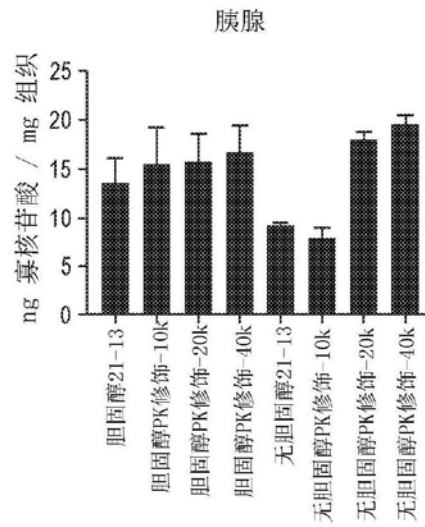


图9F

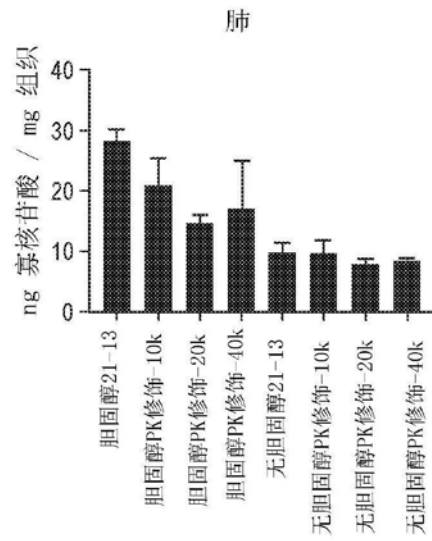


图9G

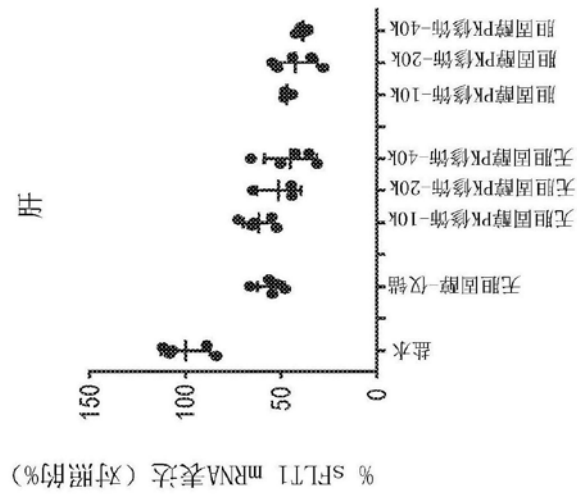


图10A

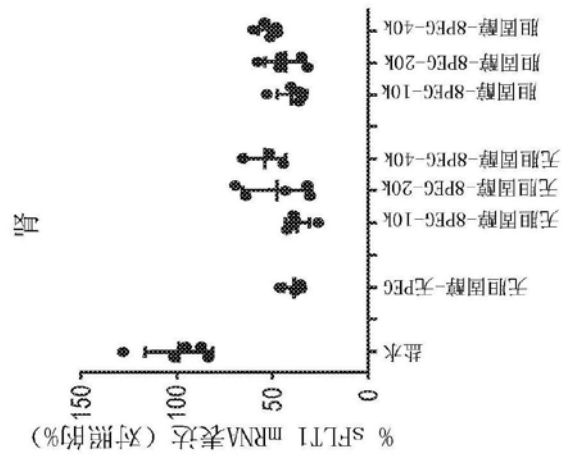


图10B

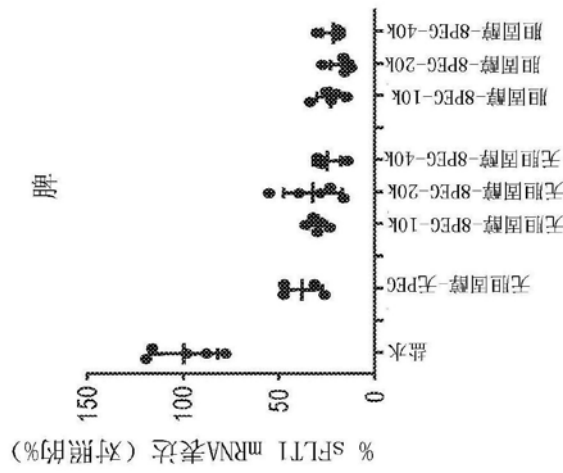


图10C

脑室内注射 (4 nmol = 2 nmol/脑室)

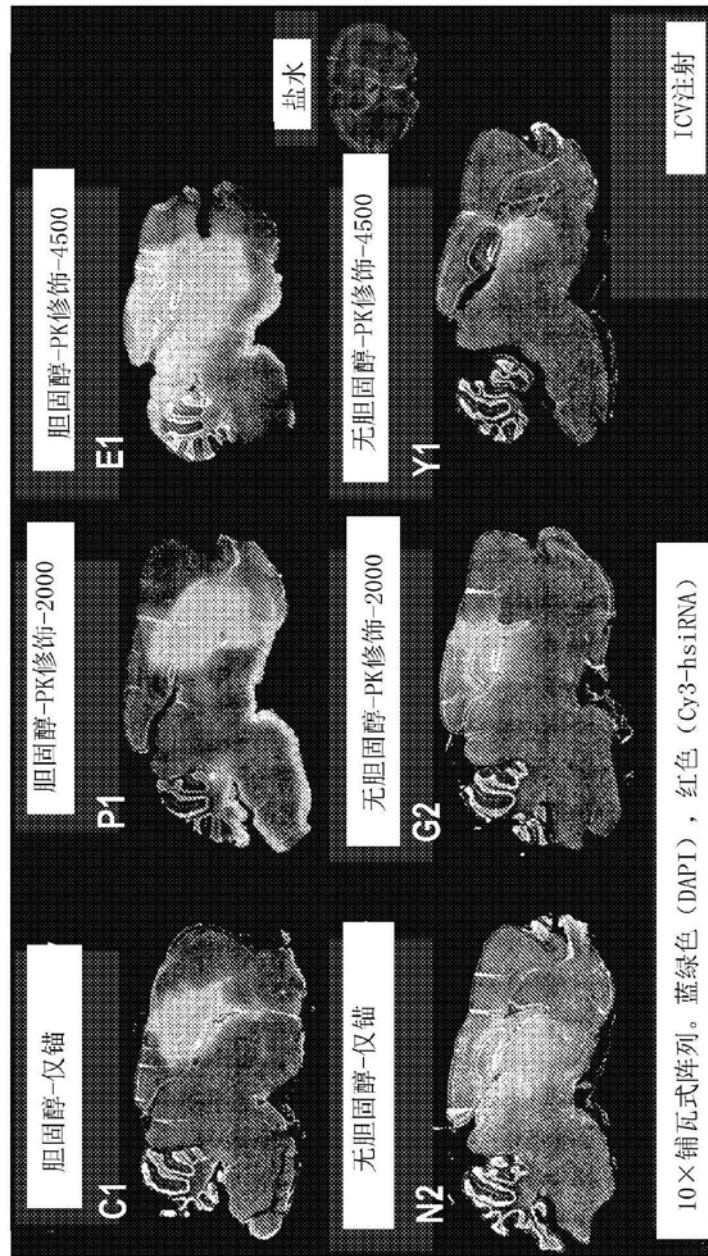


图11A

脑室内注射 (20 nmol = 10 nmol/脑室)

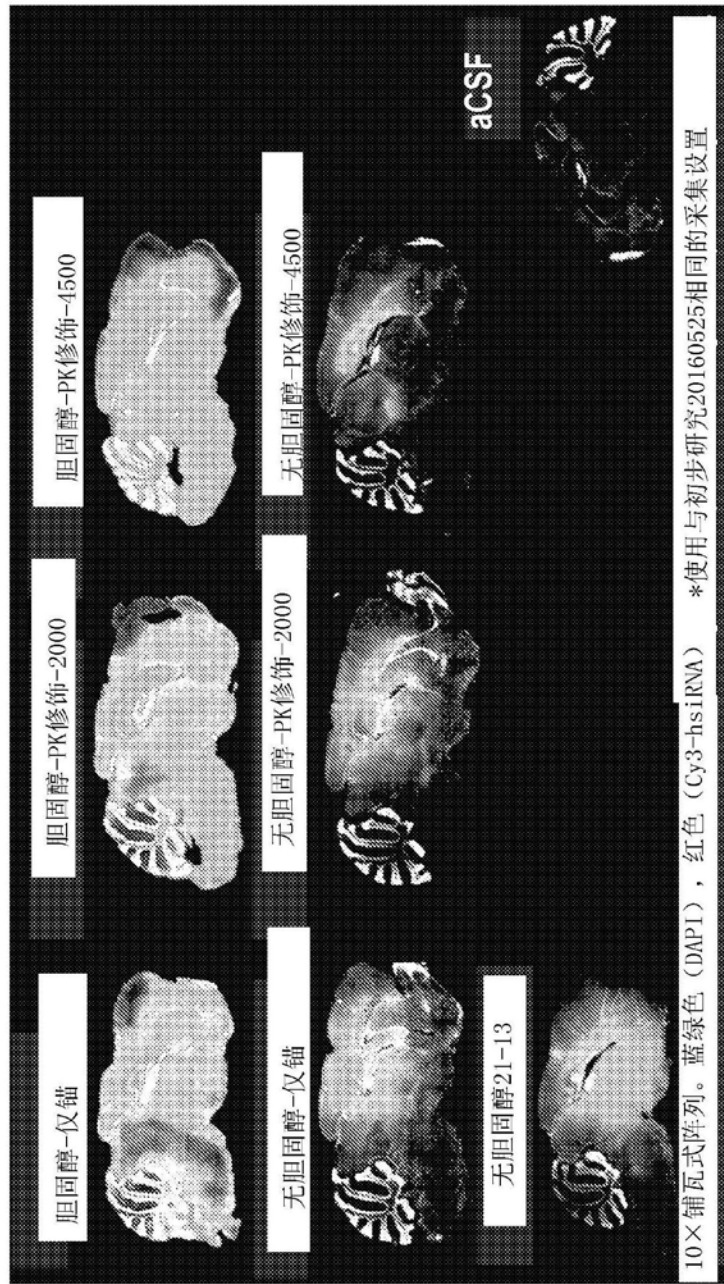


图11B

鞘内注射 (10 nmol, 在L5至L6之间注射)

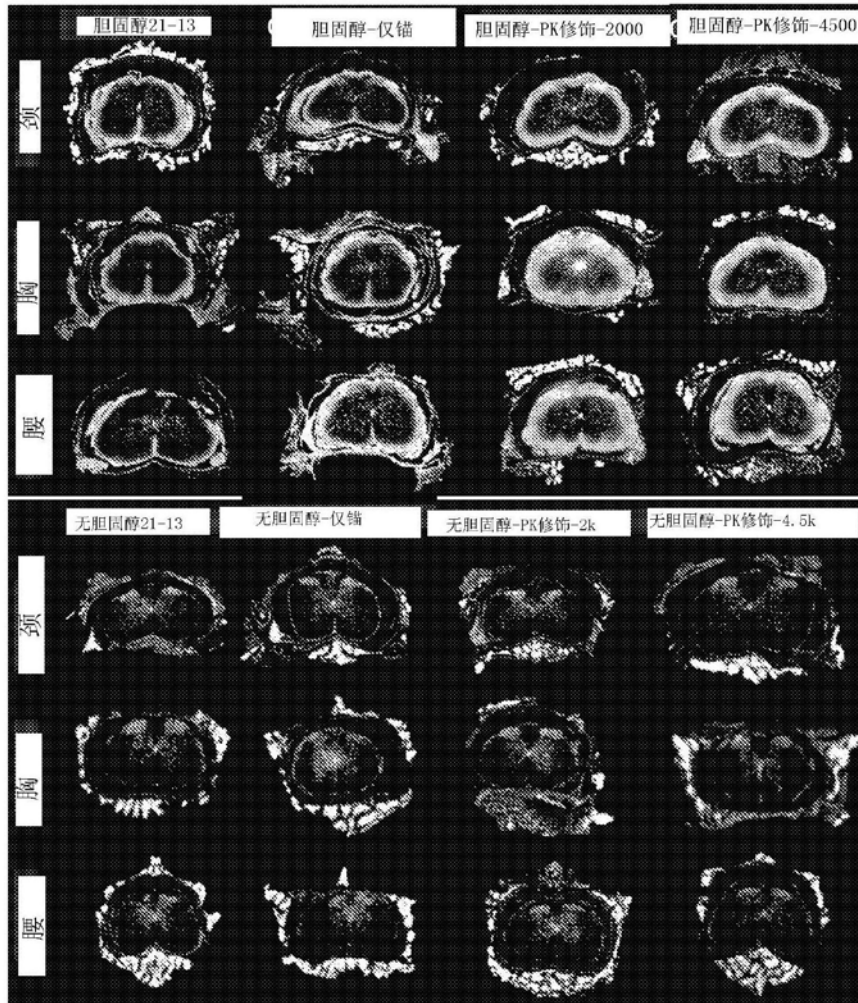
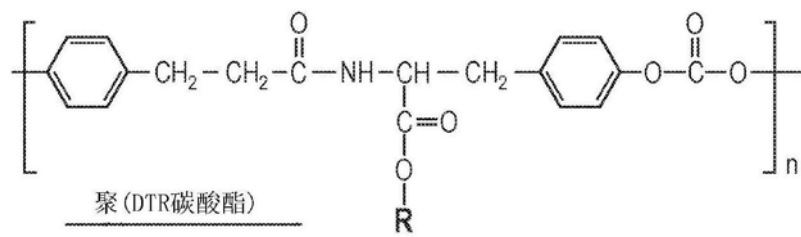


图11C



R = 烷基; $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$

图12

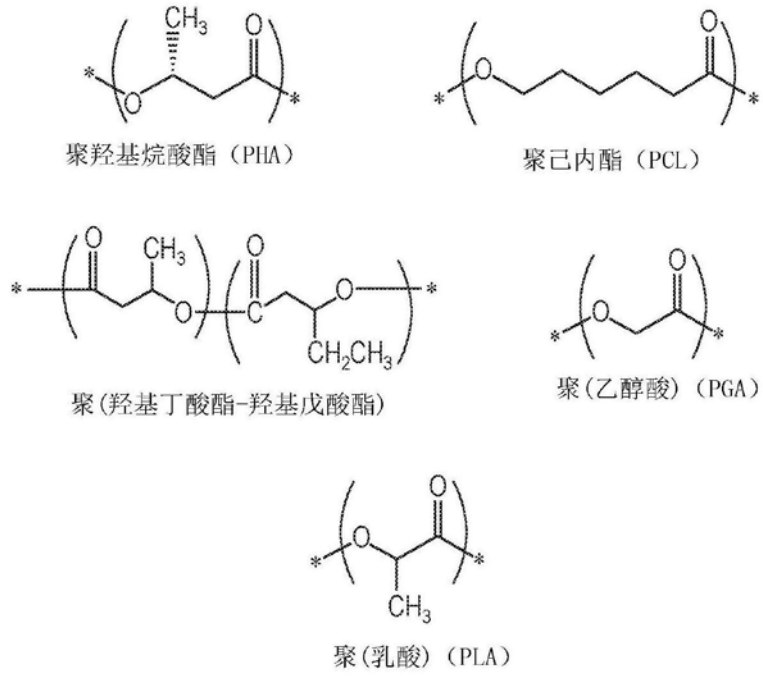


图13

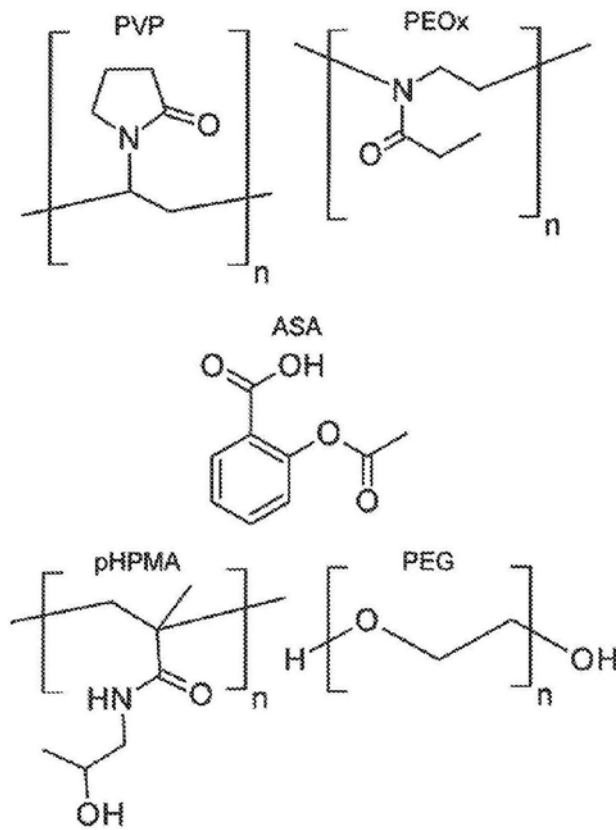


图14

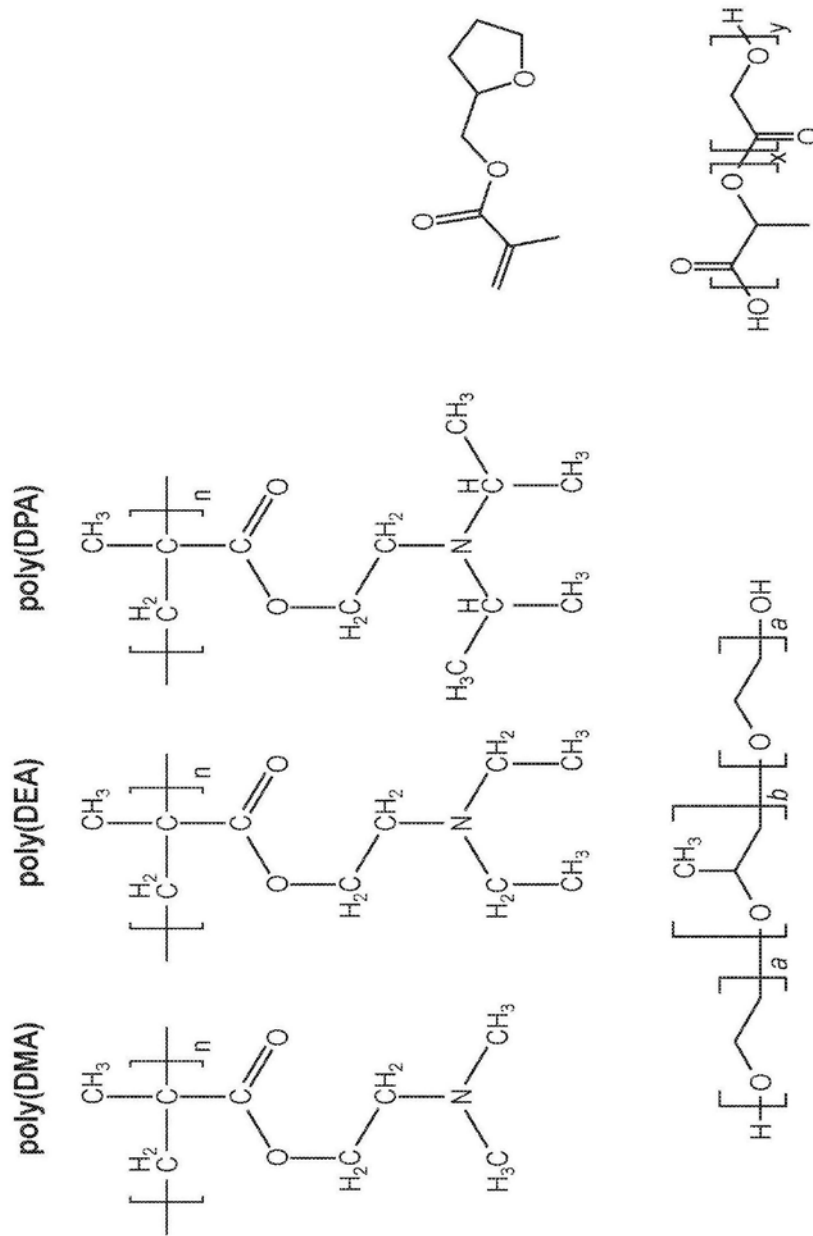


图15

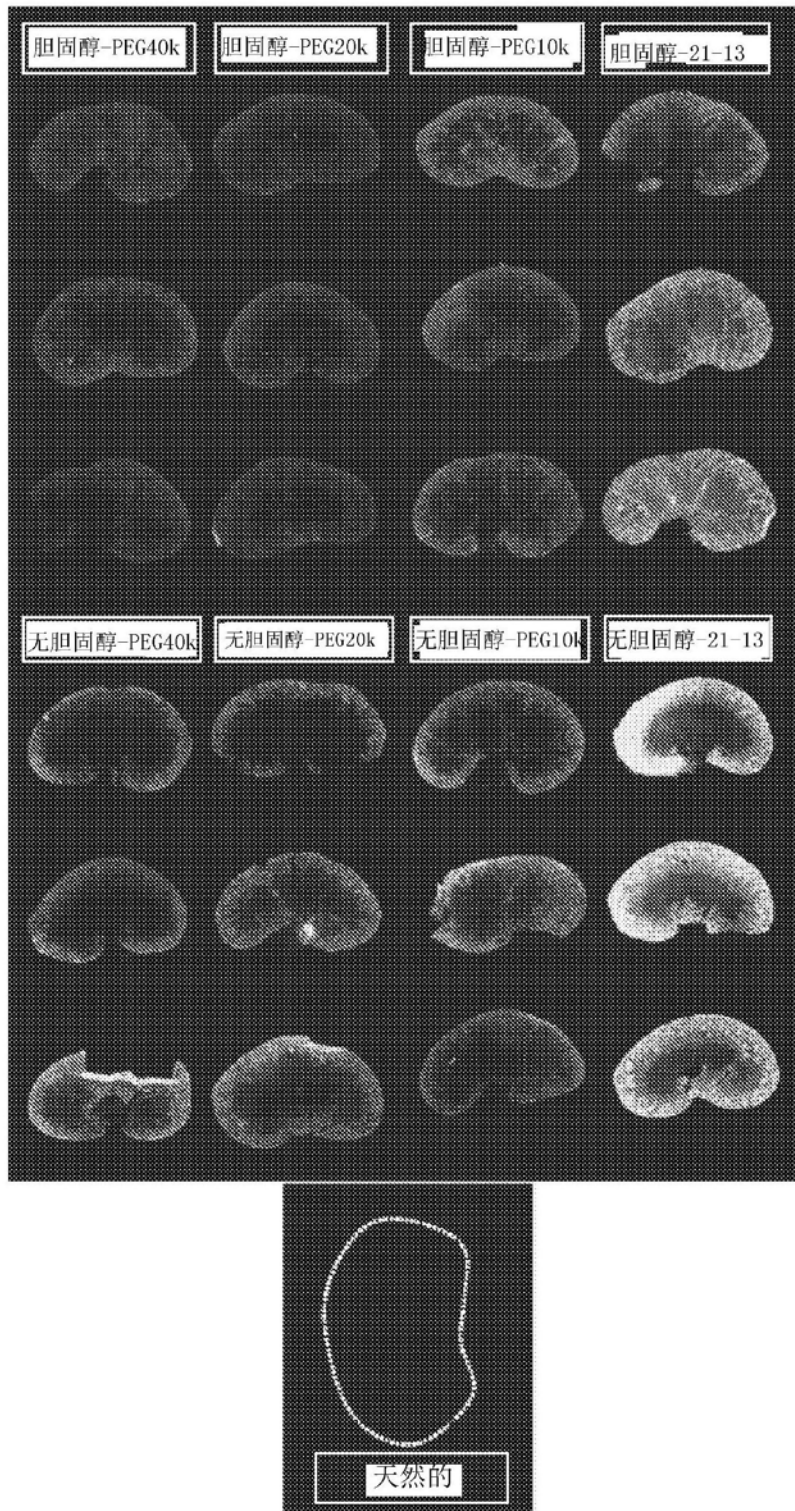


图17

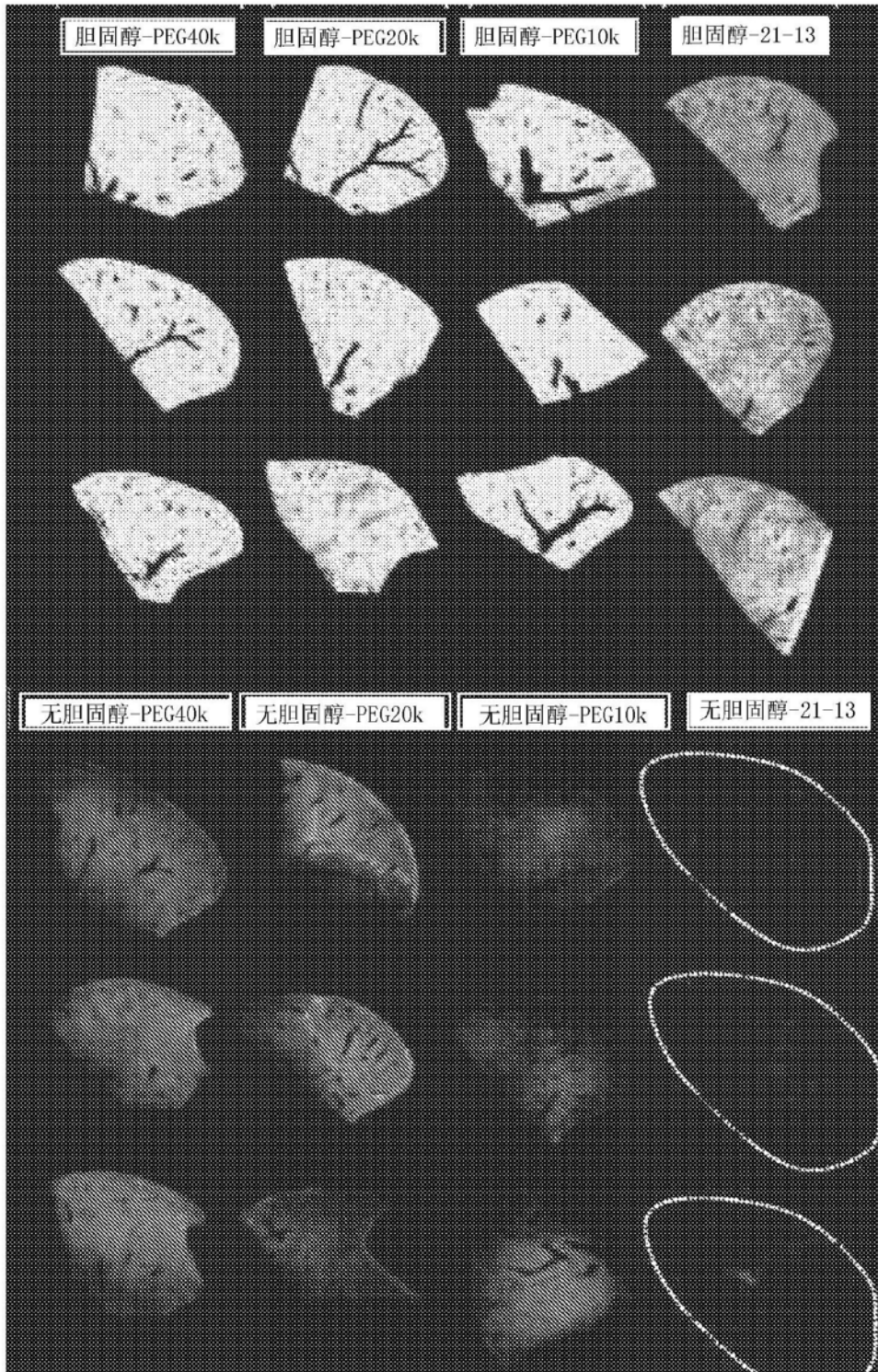


图18

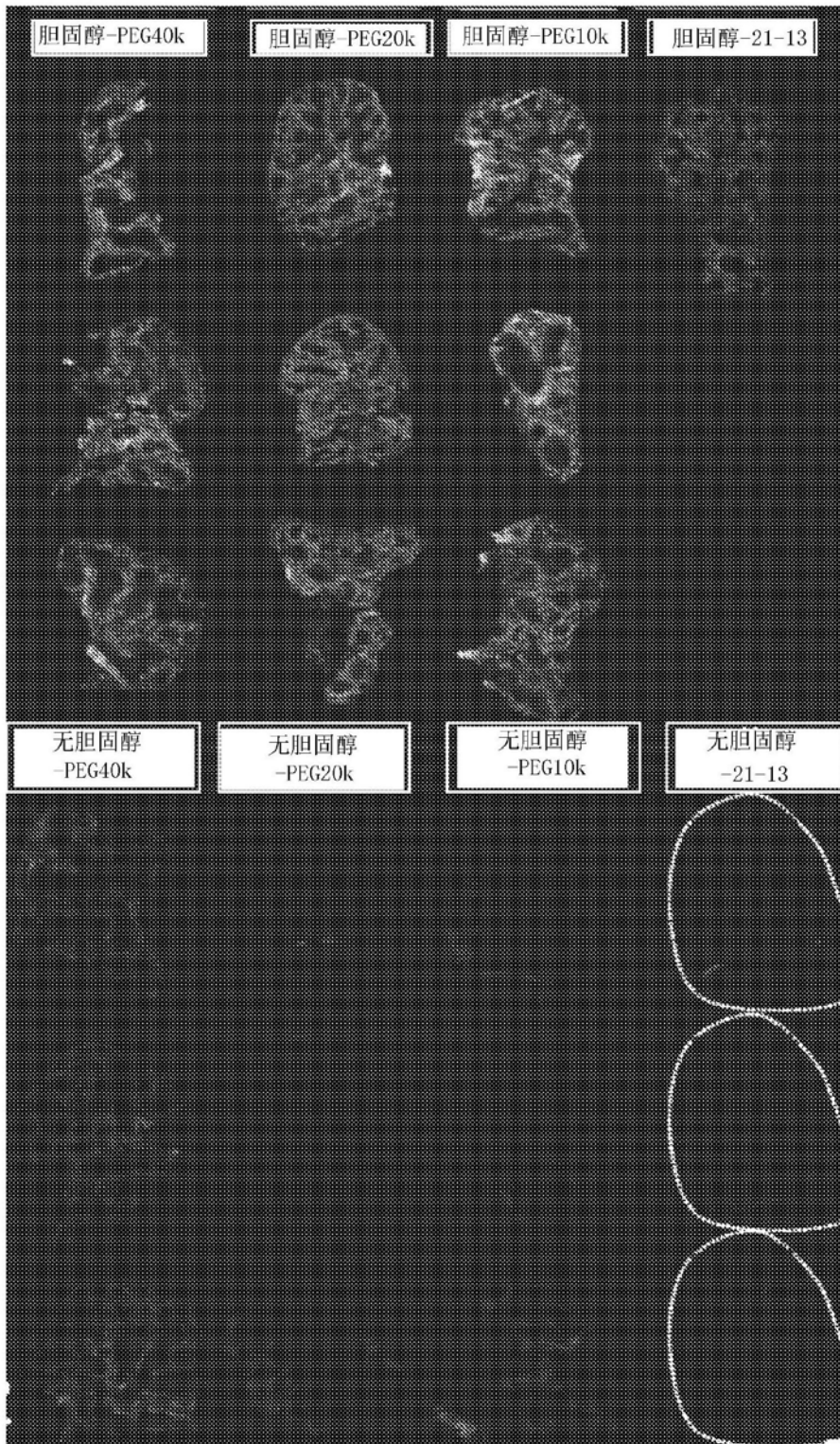


图19

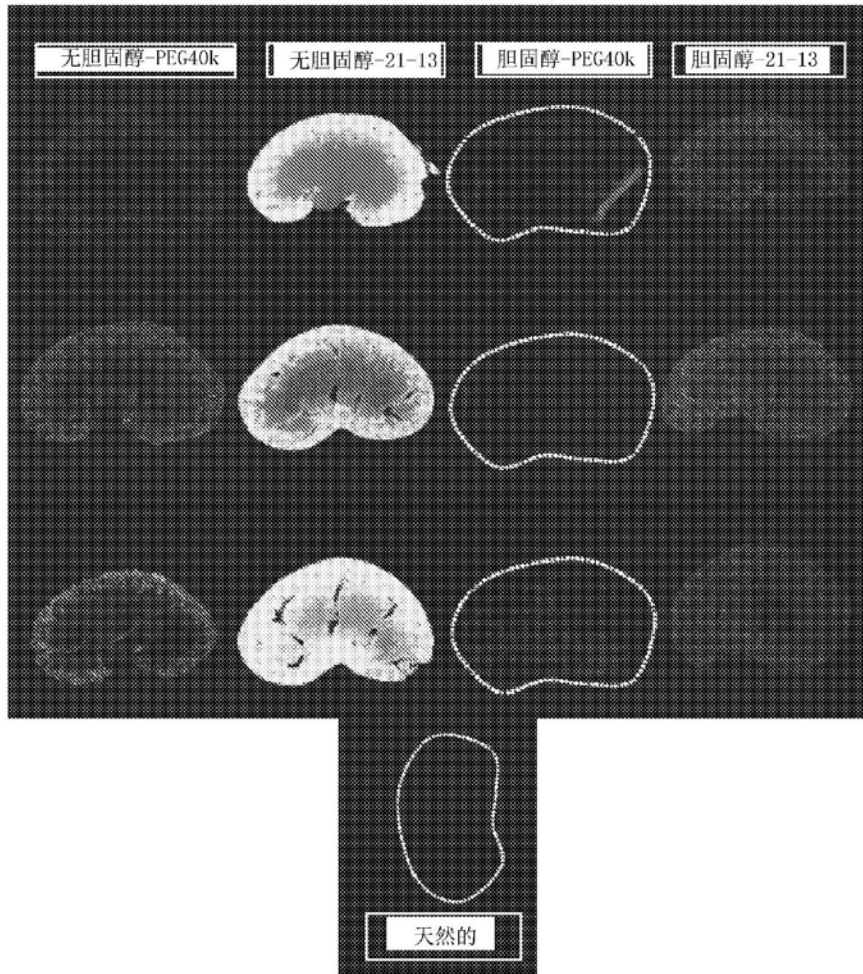


图20

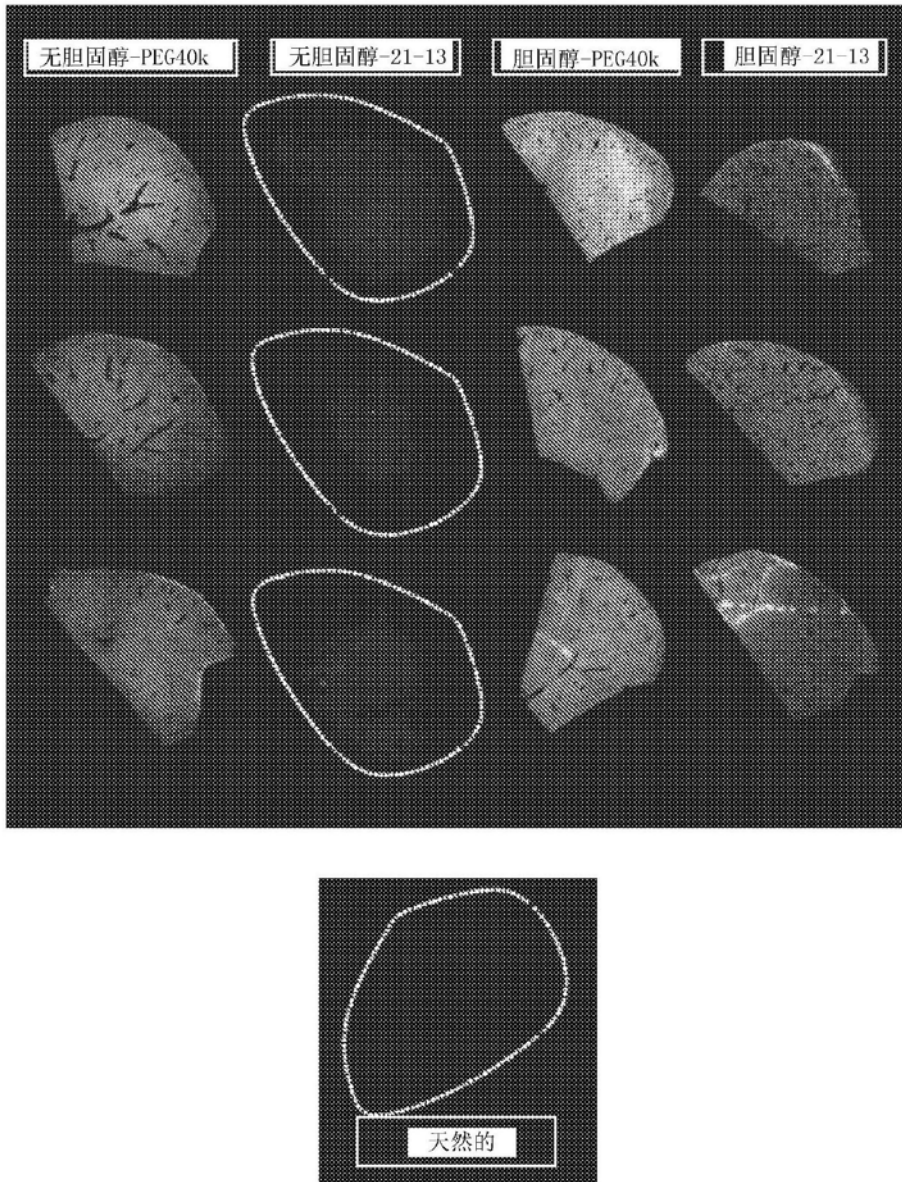


图21

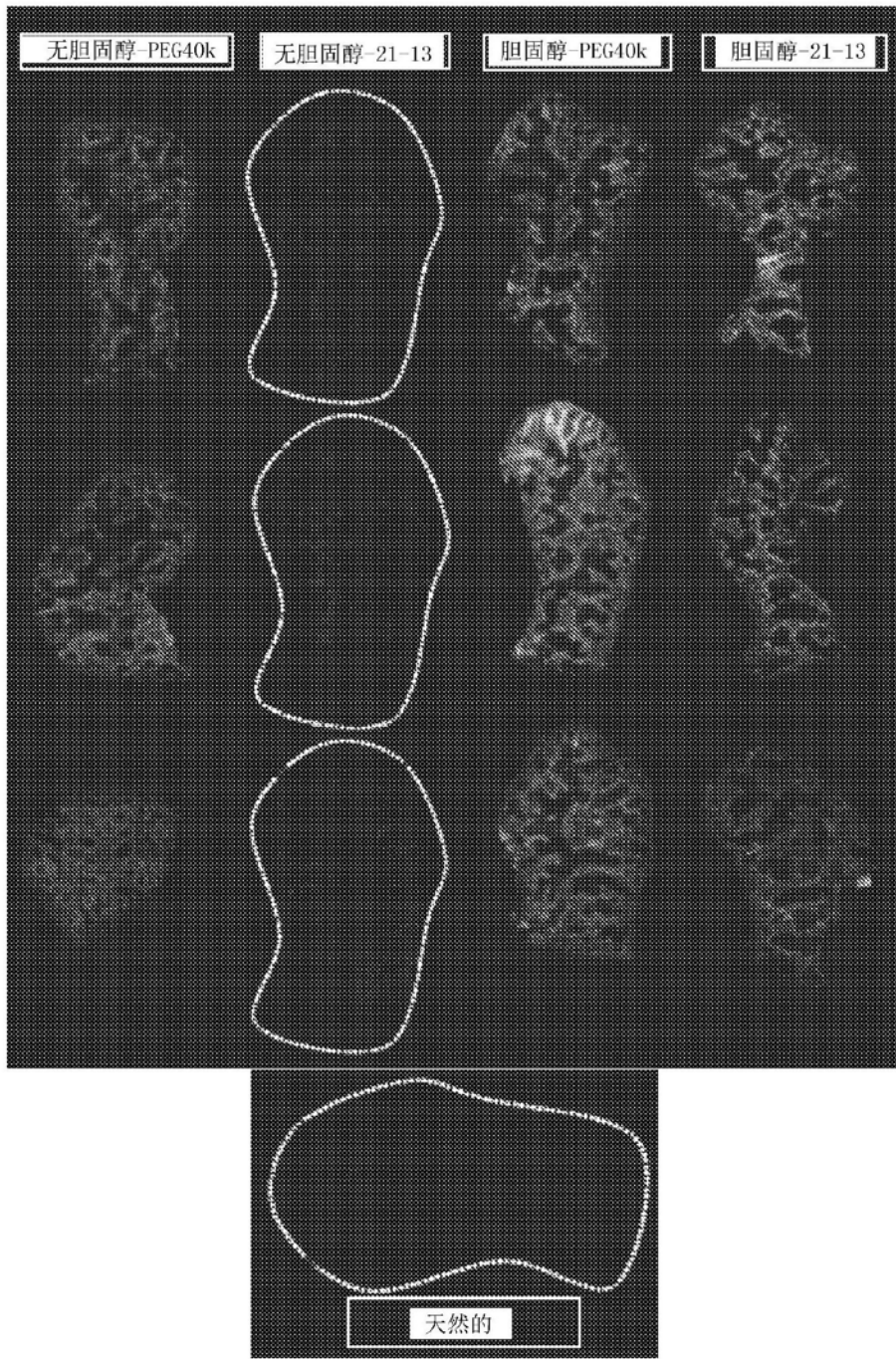


图22

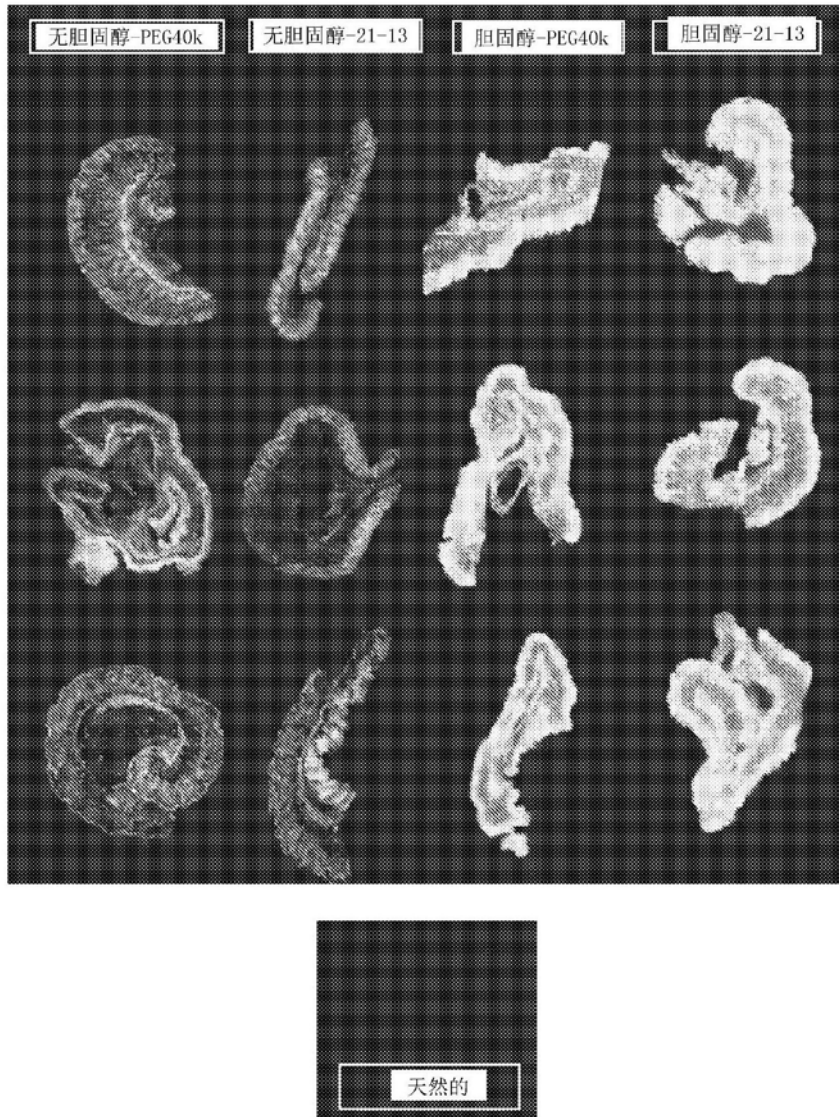


图23

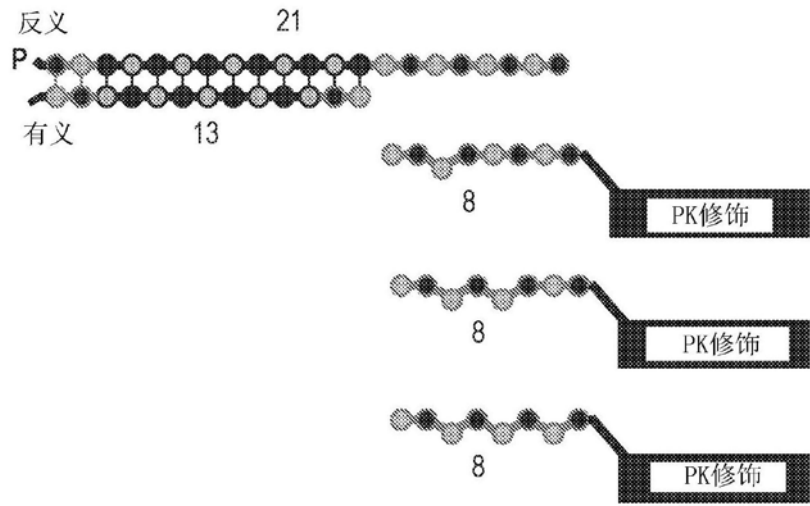


图24

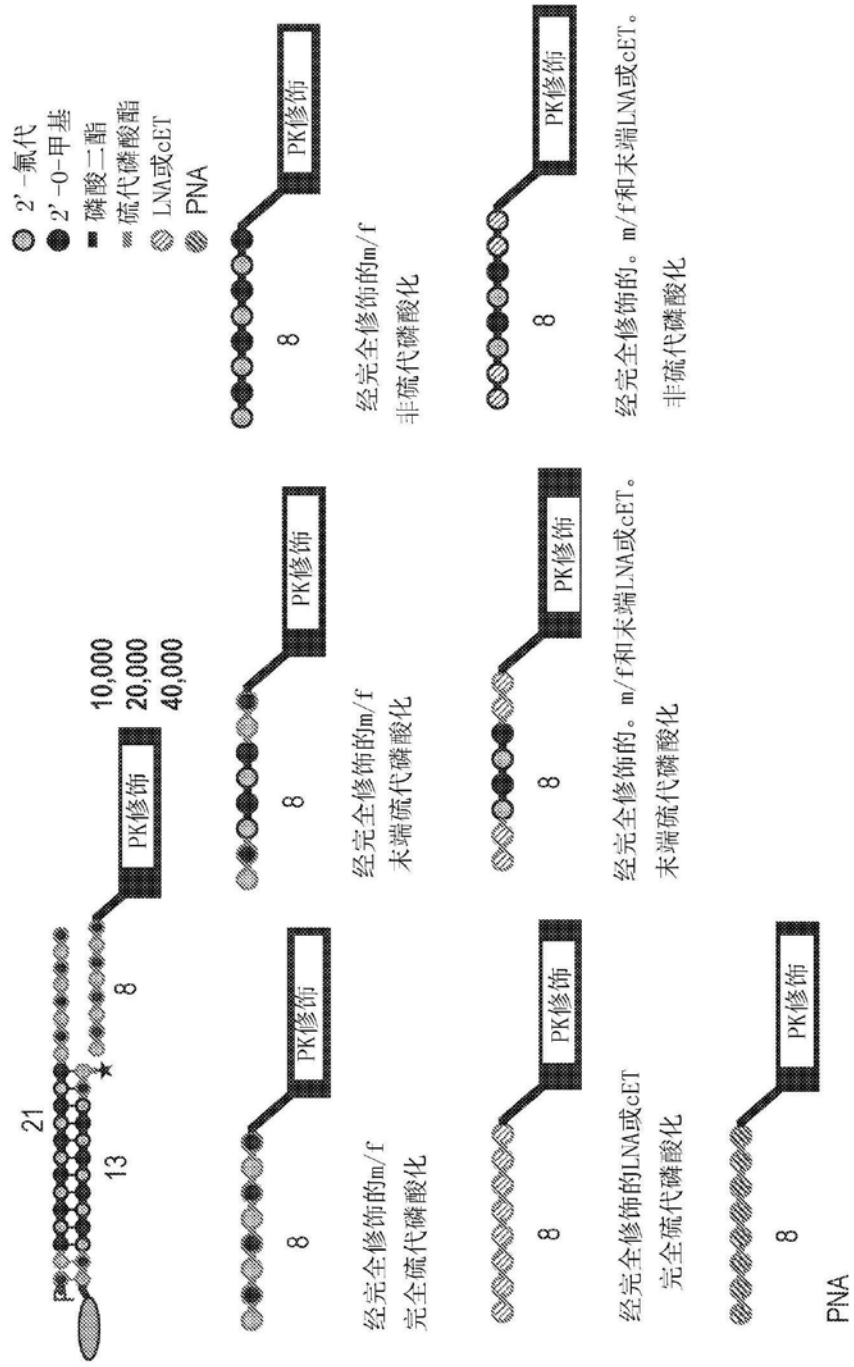


图25

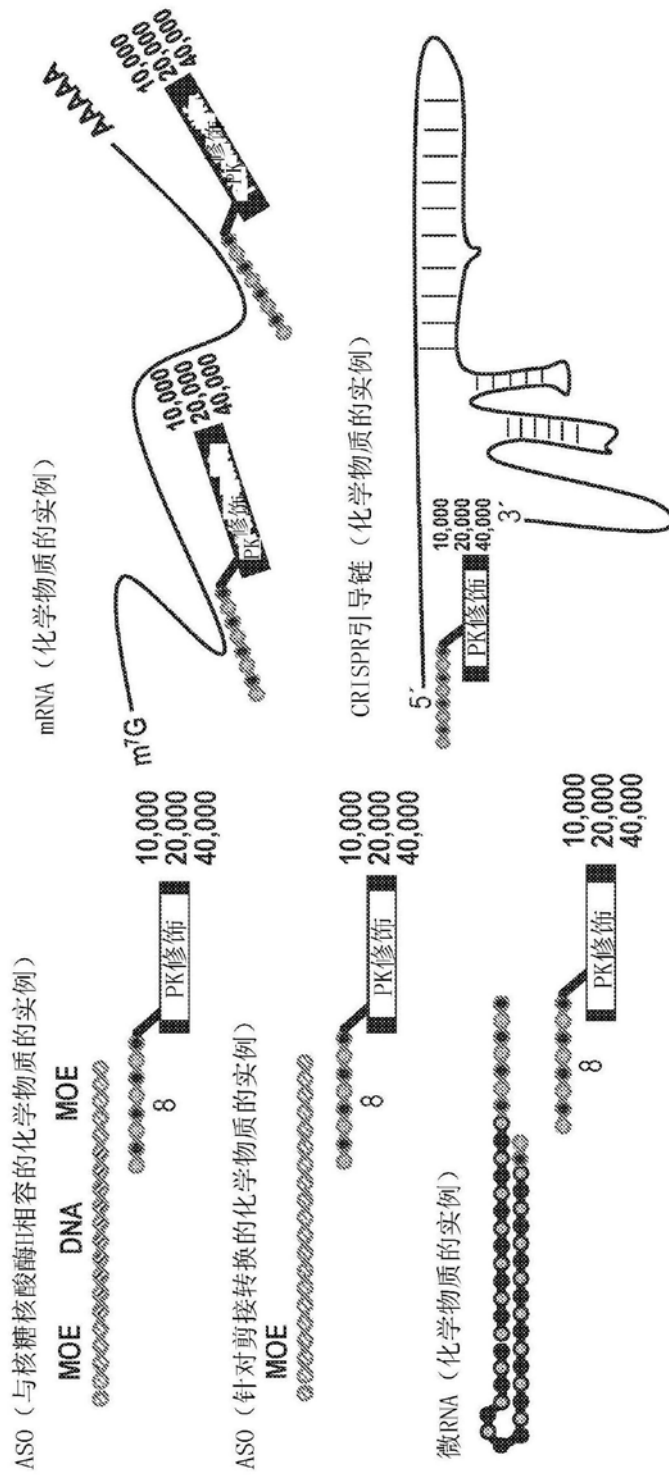


图26

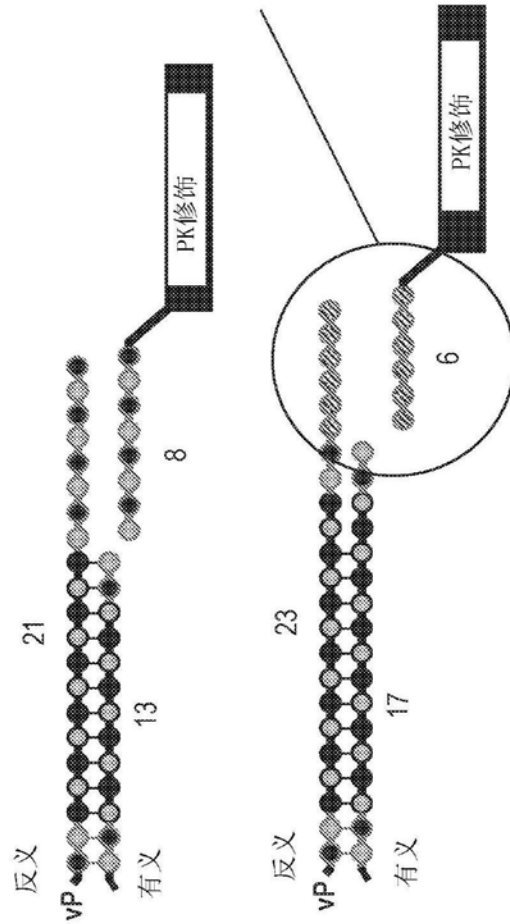


图27

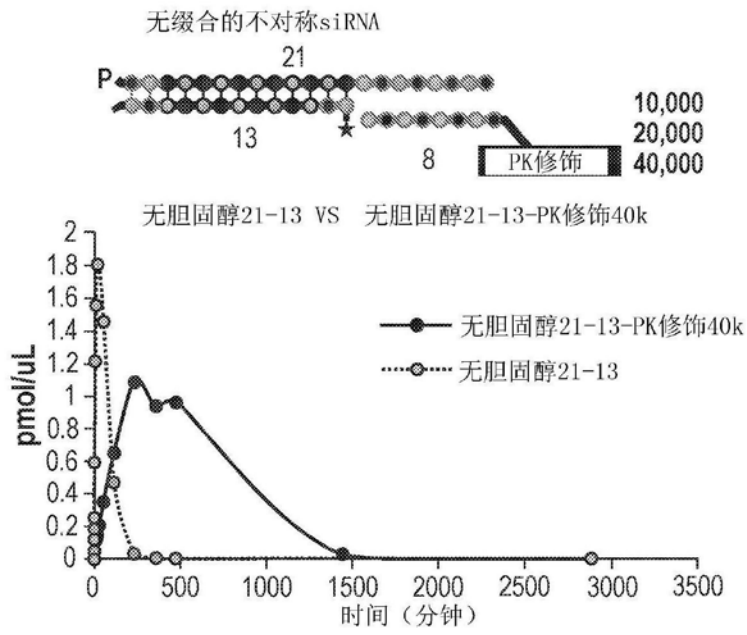


图28A

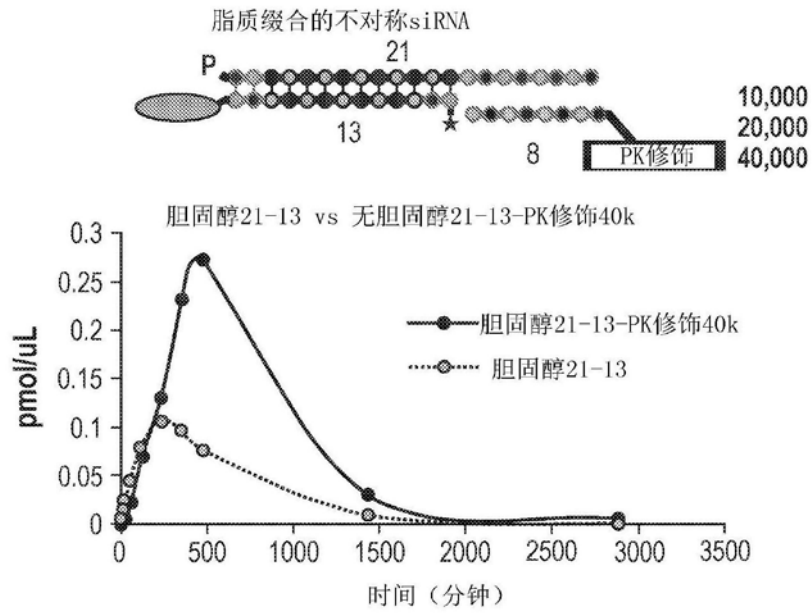


图28B

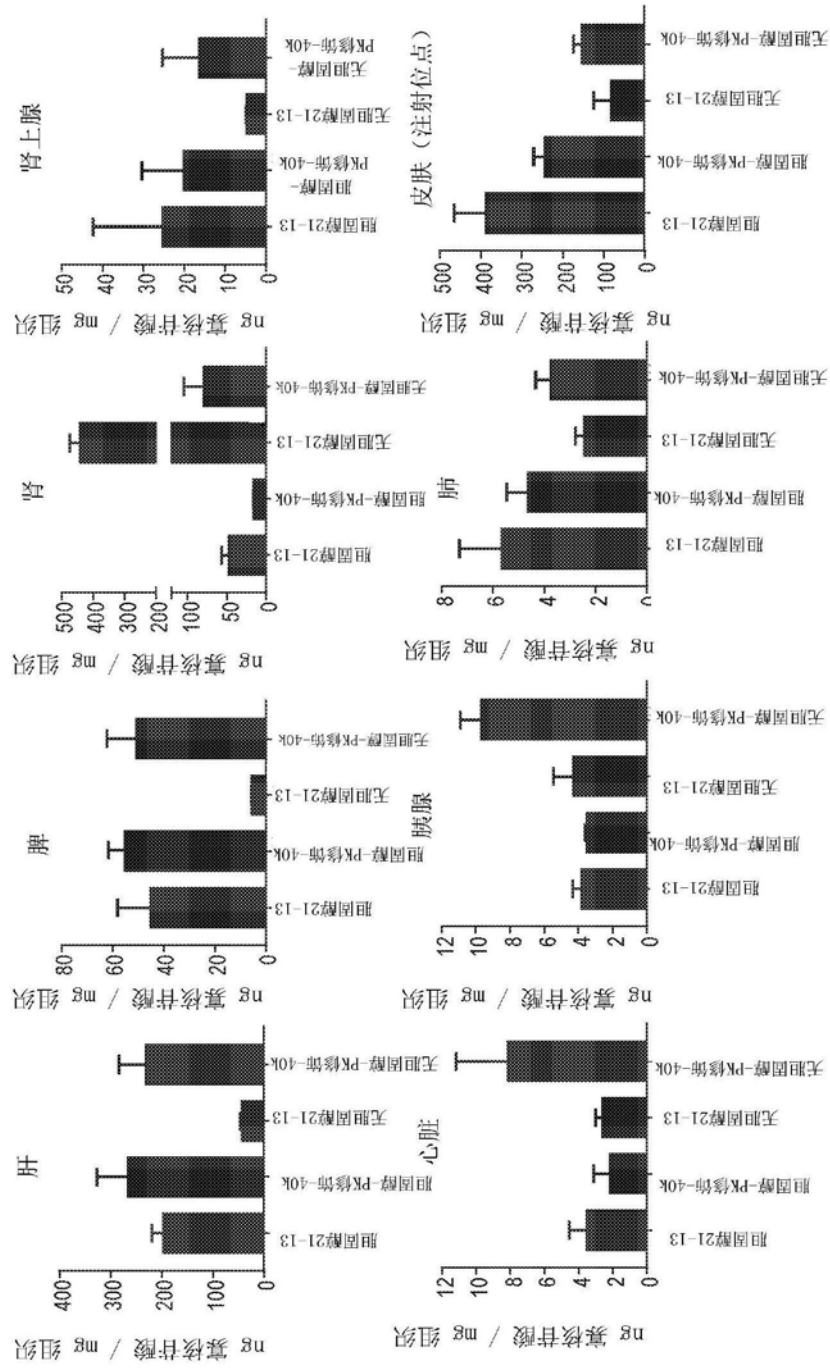


图29

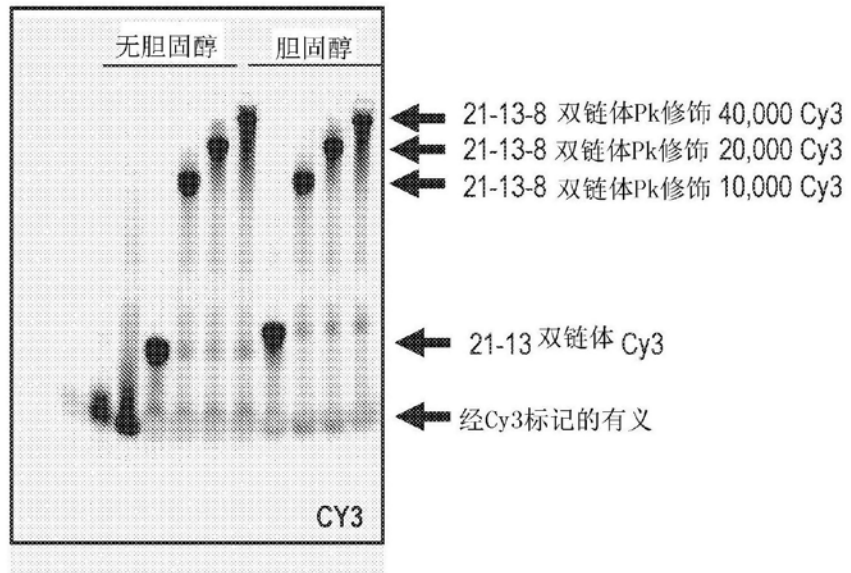


图30

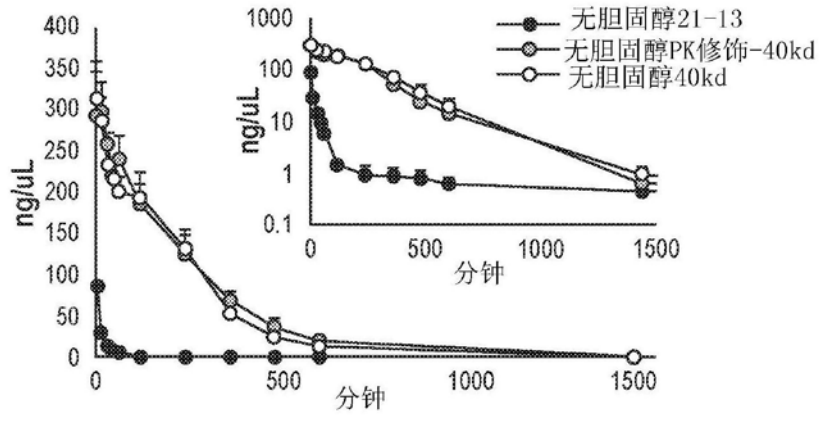


图32A

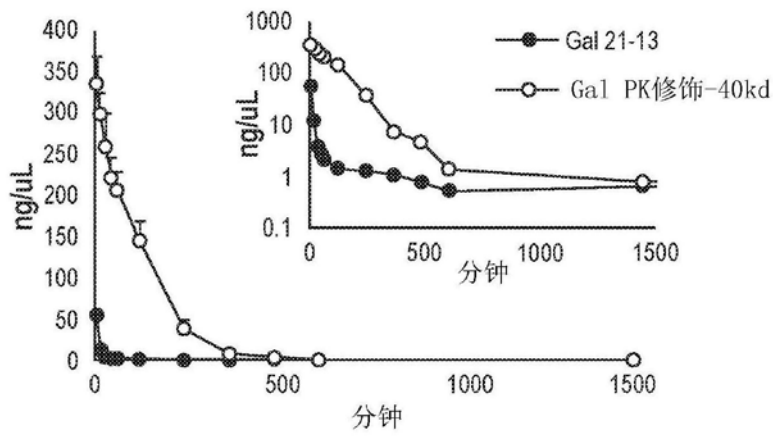


图32B

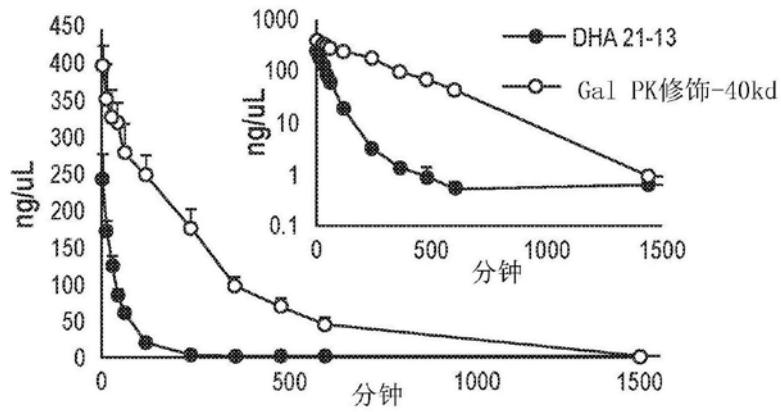


图32C

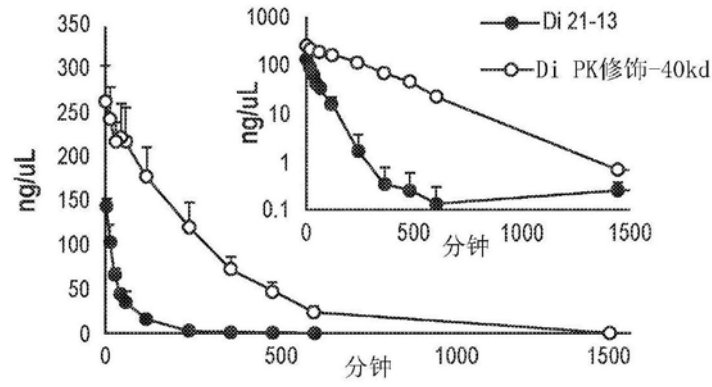


图32D

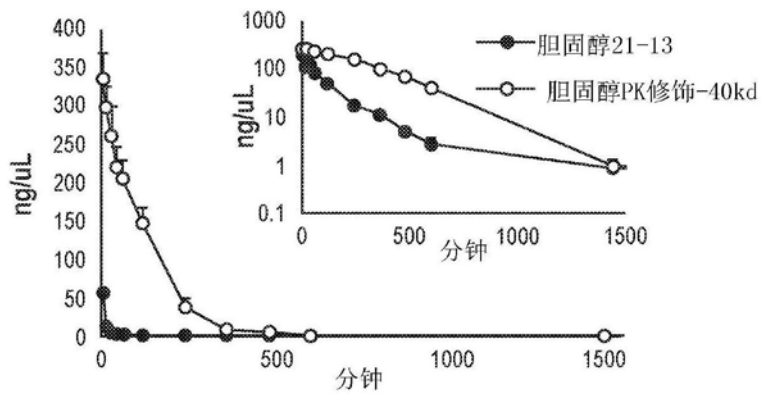


图32E

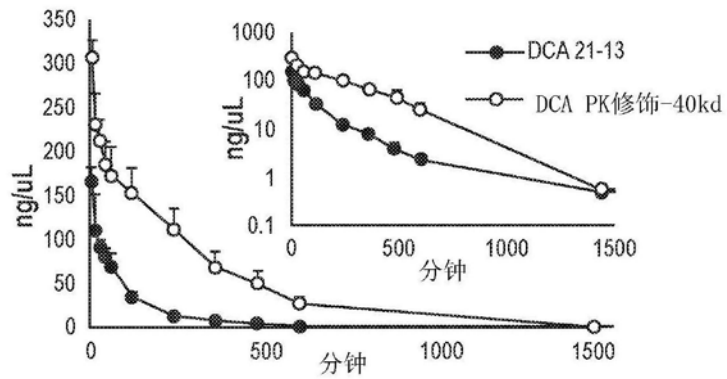


图32F

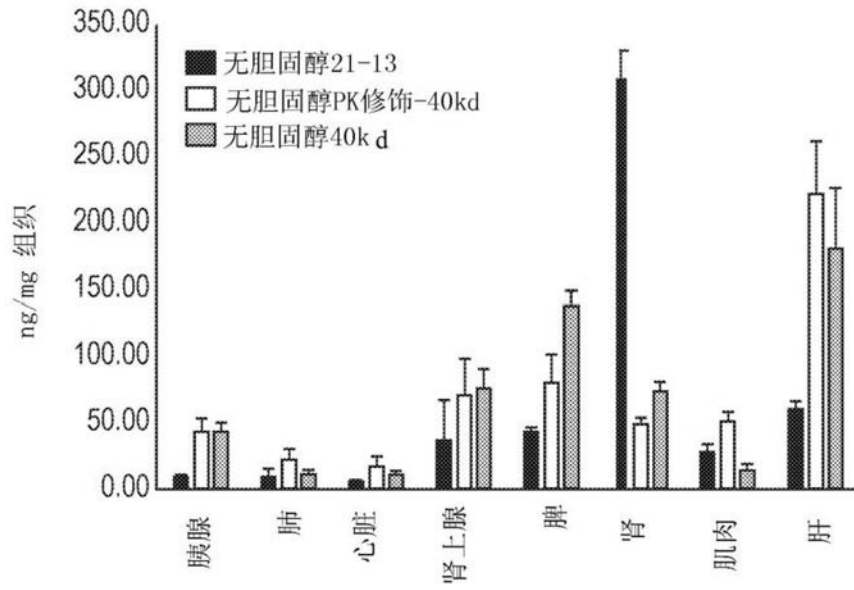


图33A

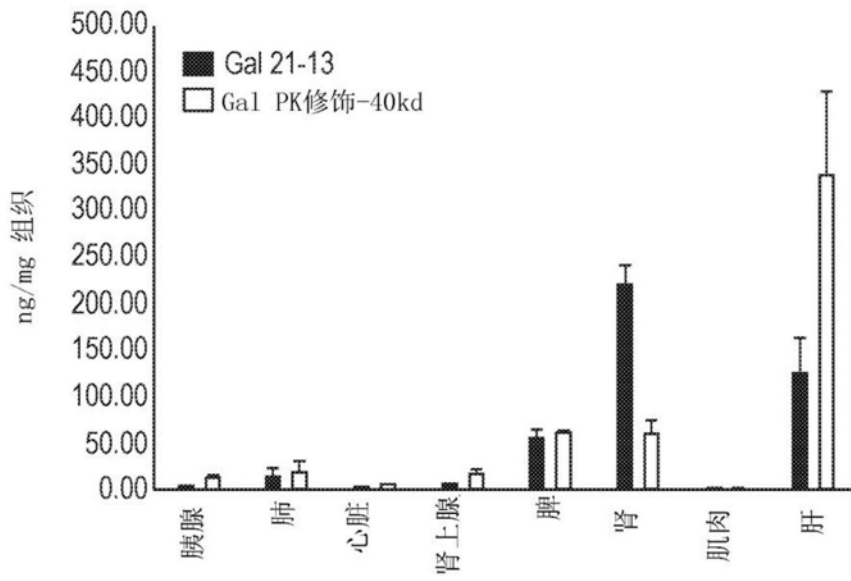


图33B

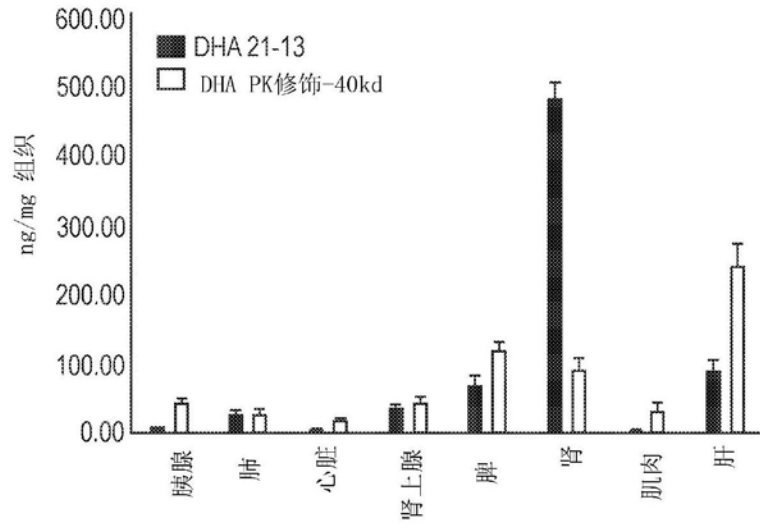


图33C

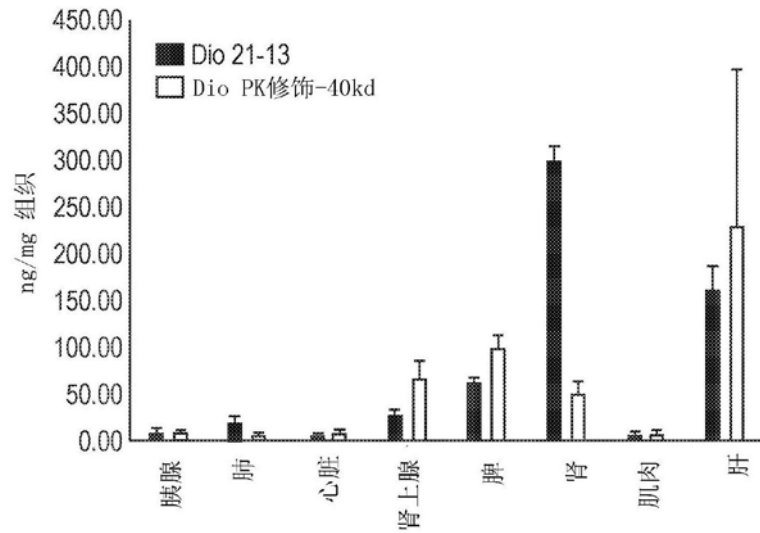


图33D

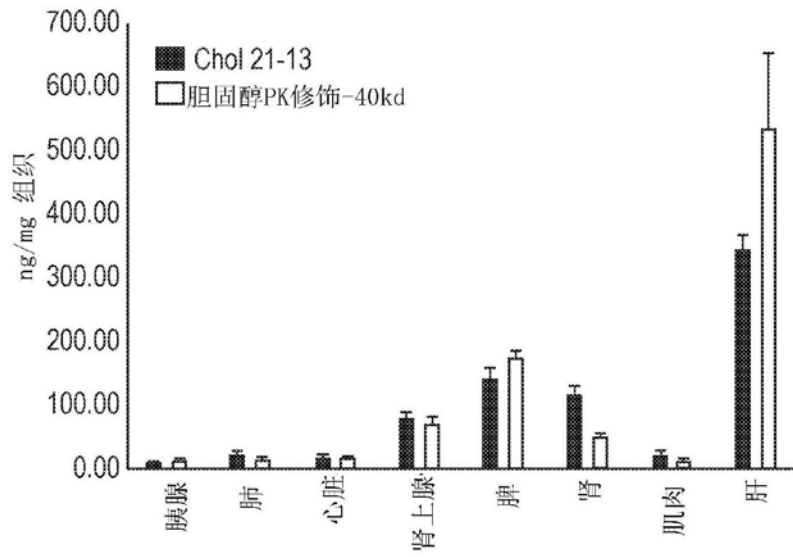


图33E

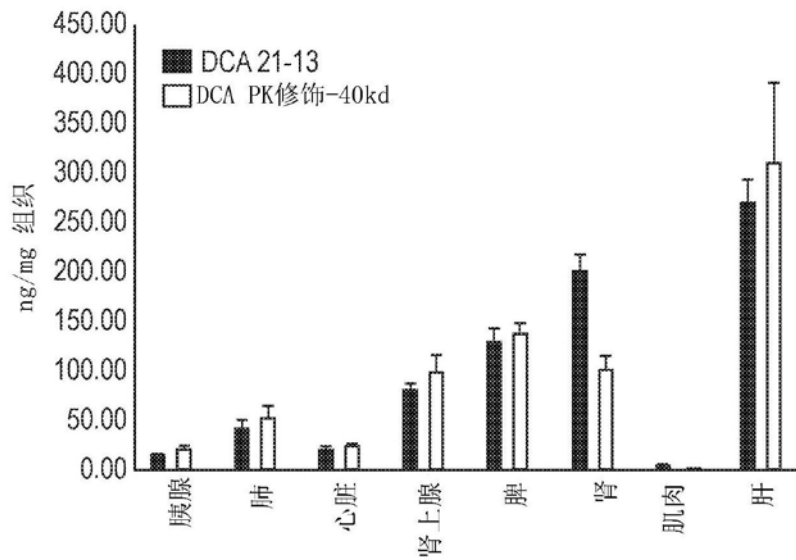


图33F

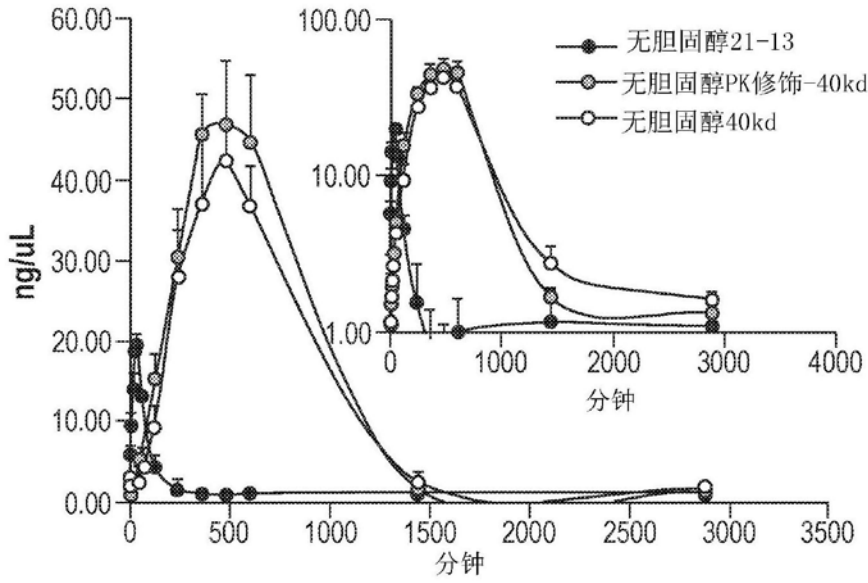


图34A

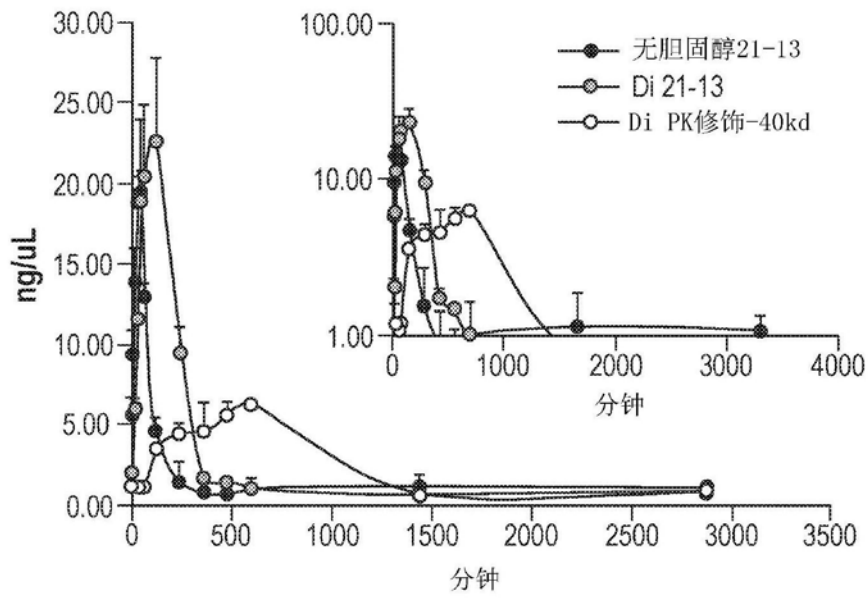


图34B

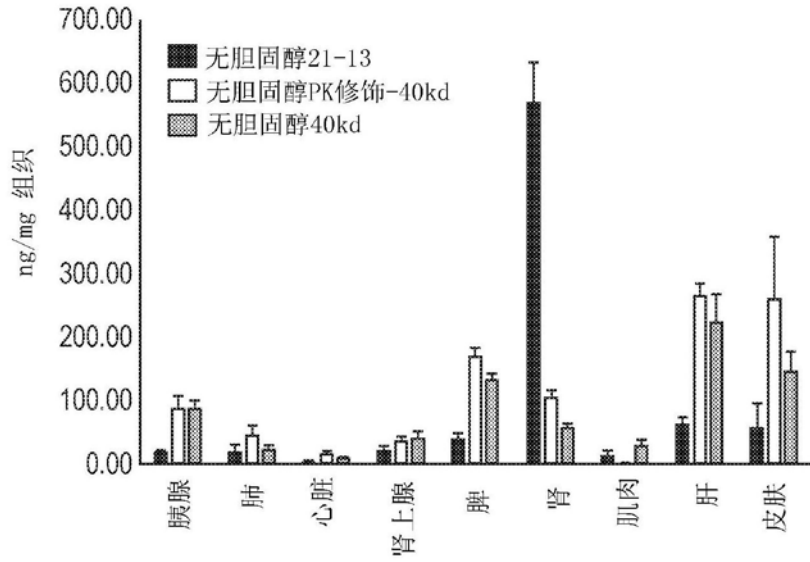


图35A

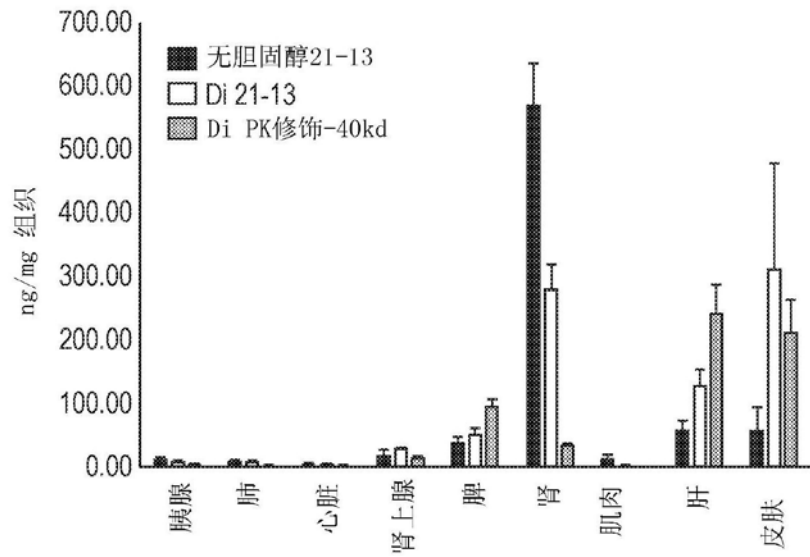


图35B

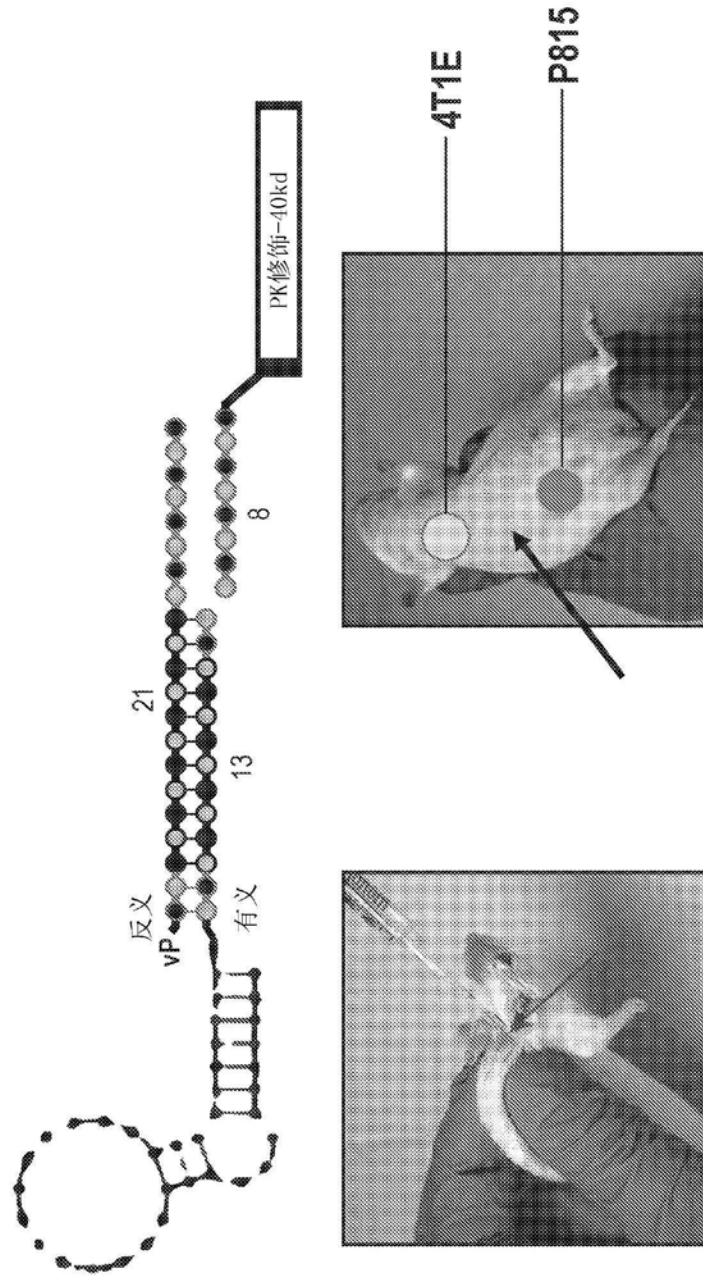


图36

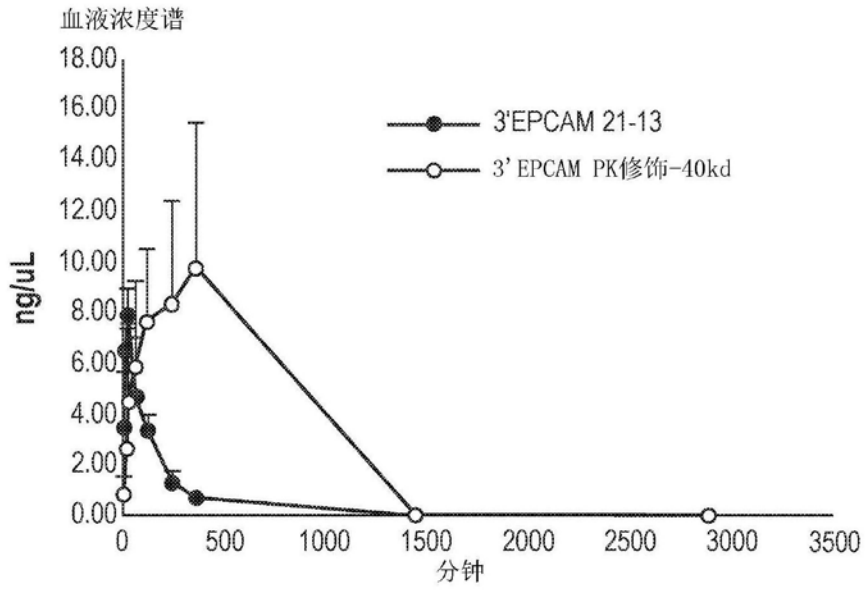


图37A

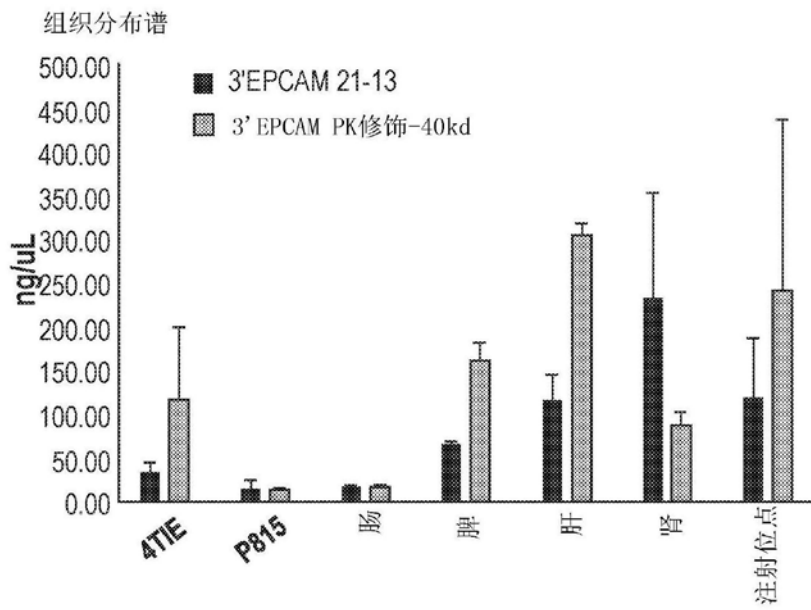


图37B

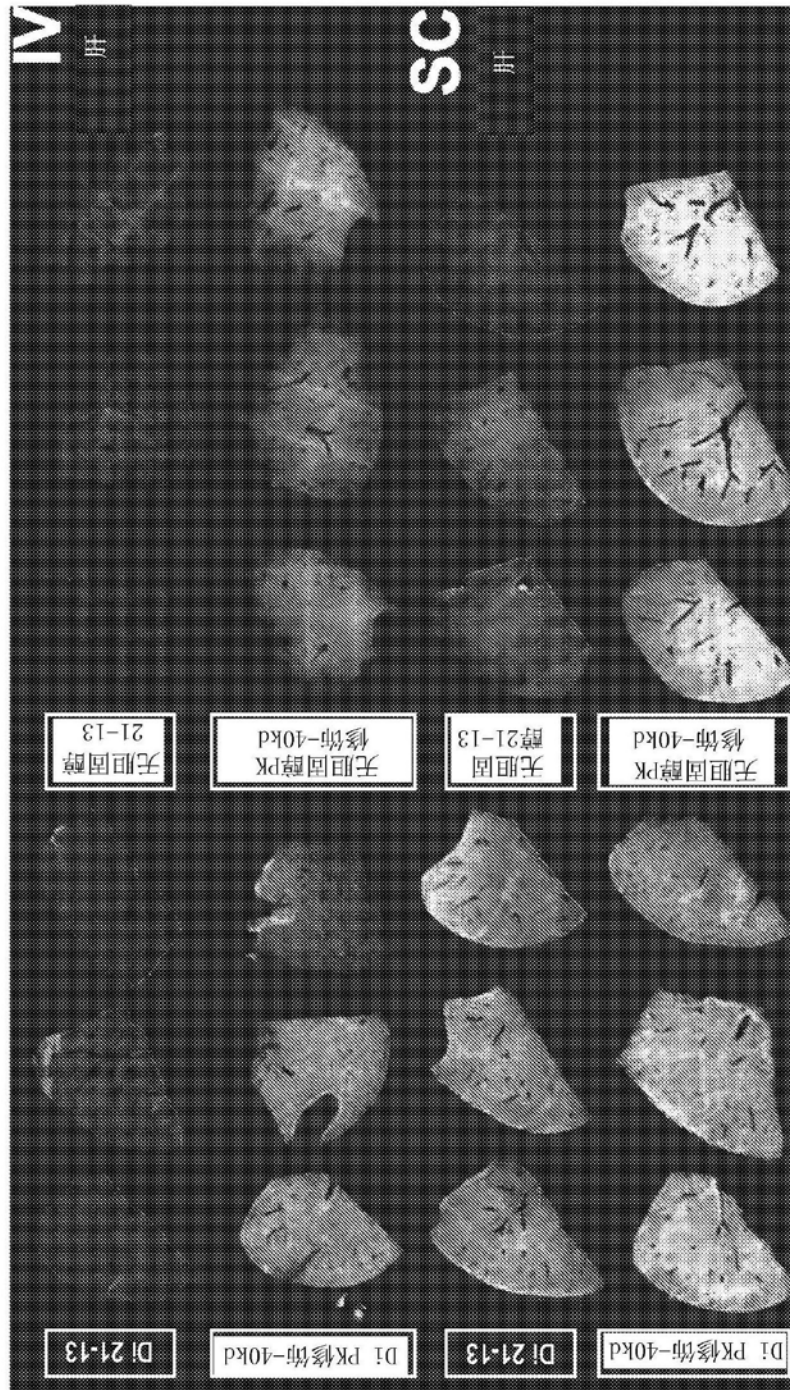


图38A

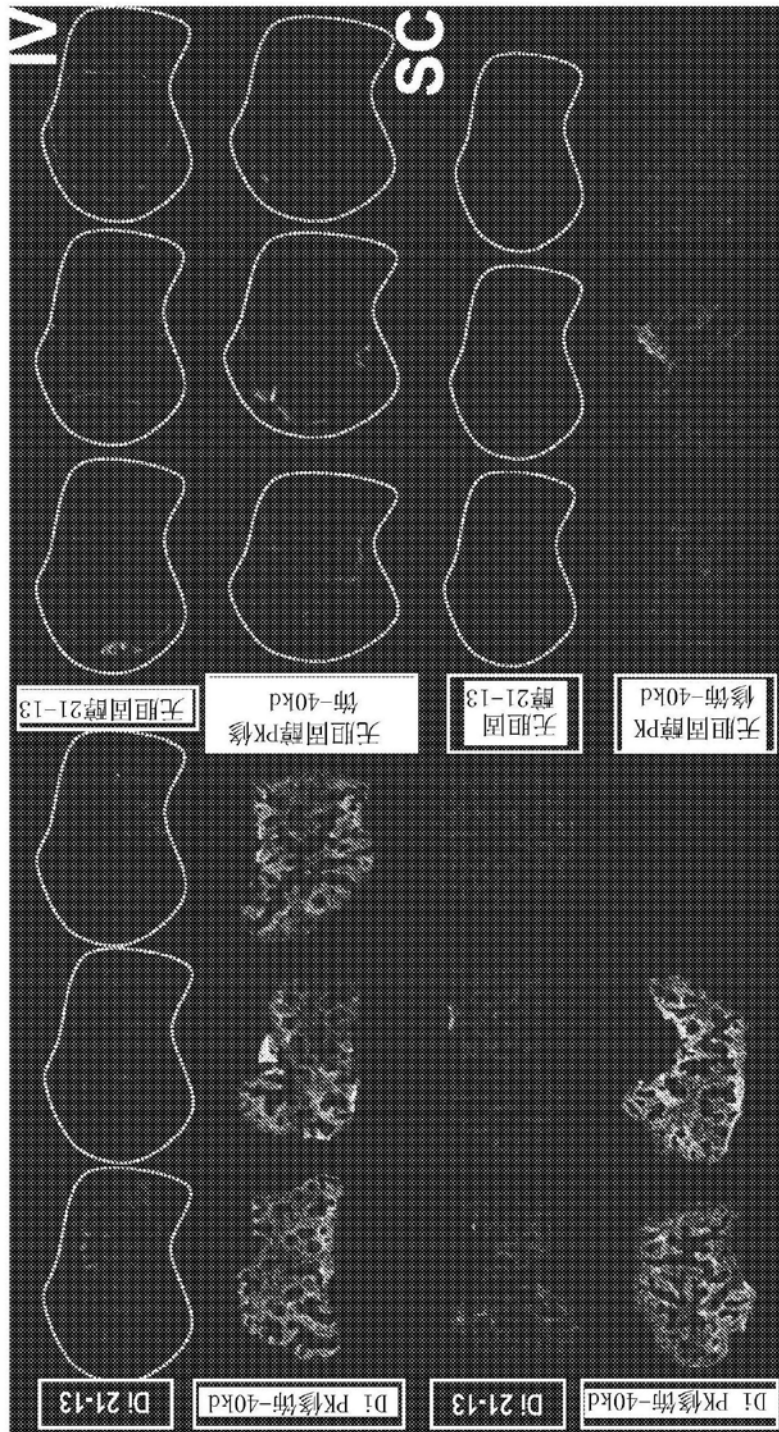


图38B

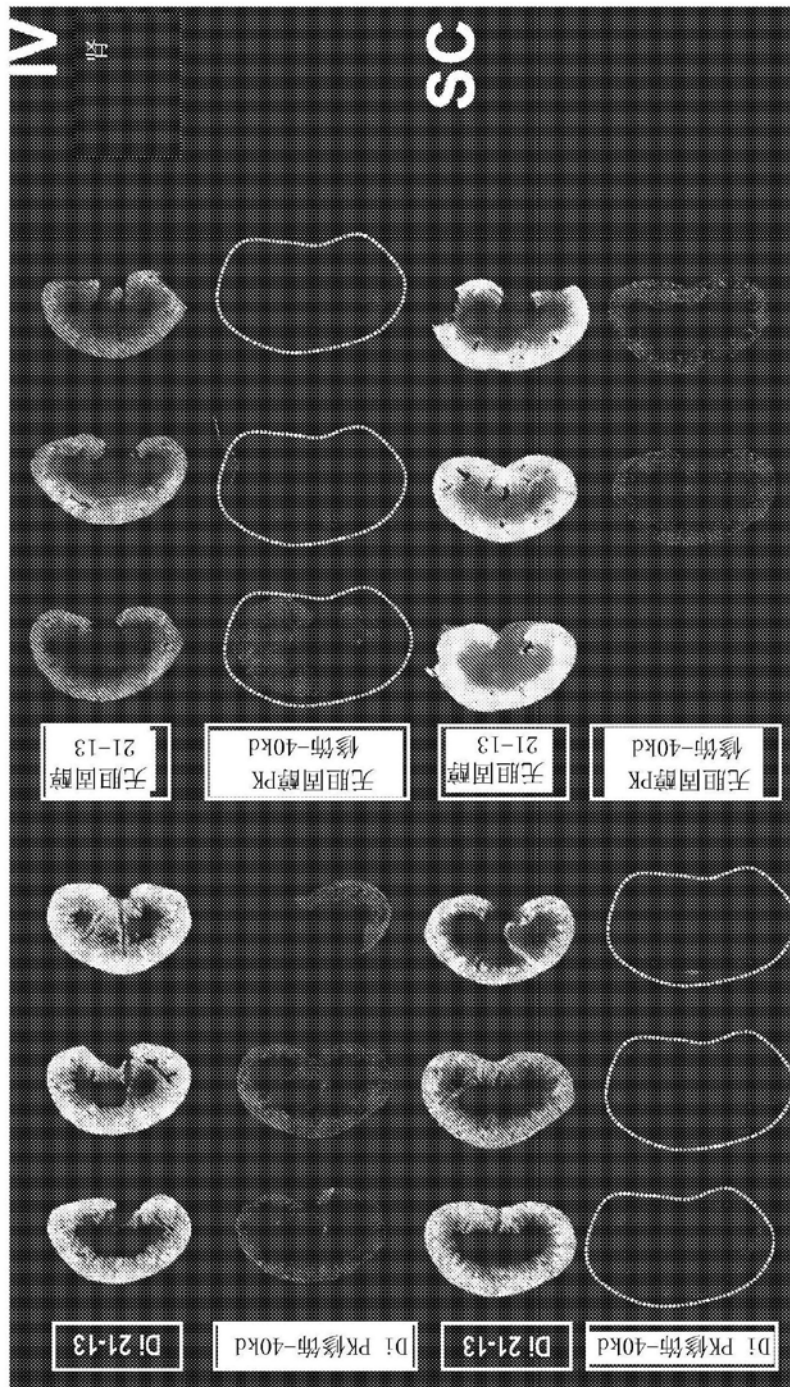


图38C

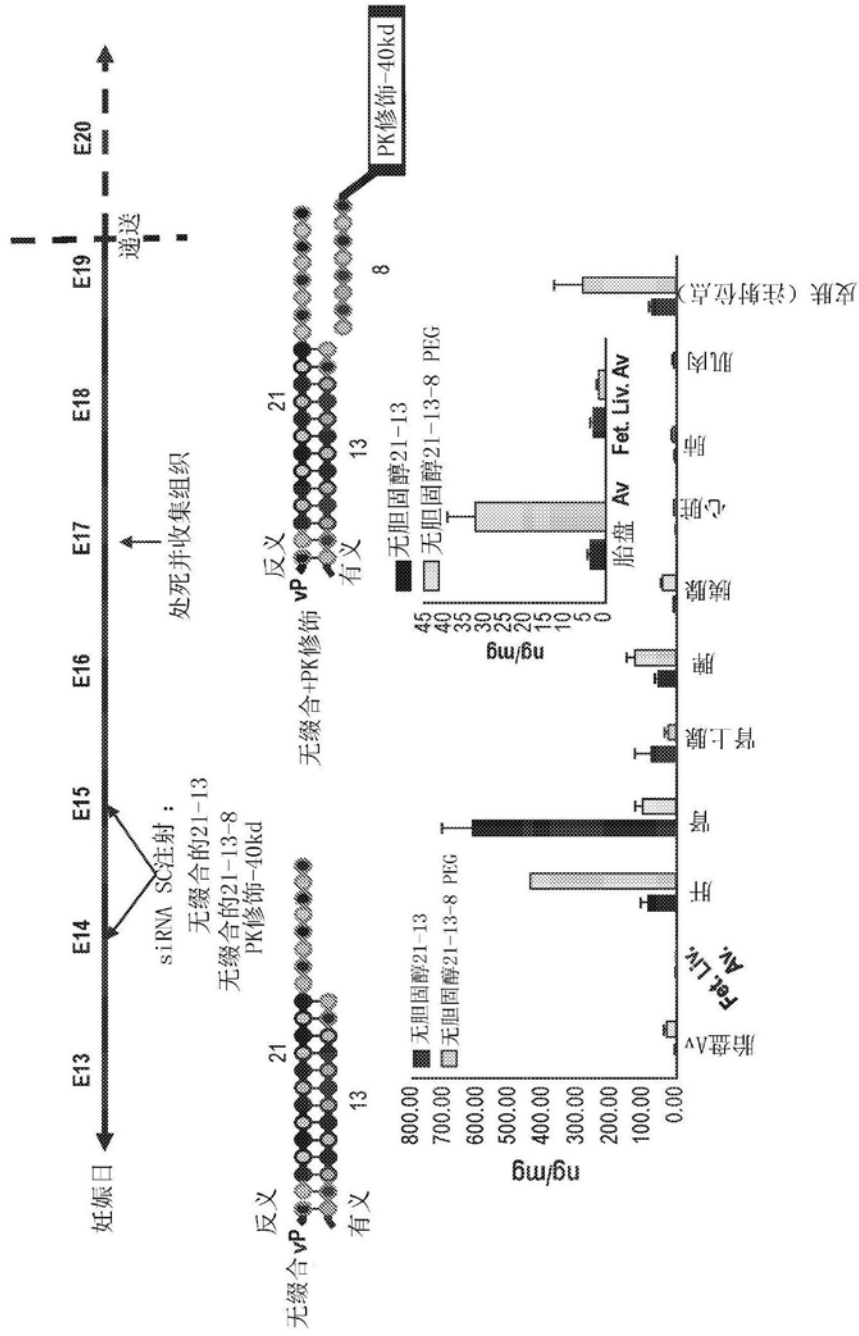


图39

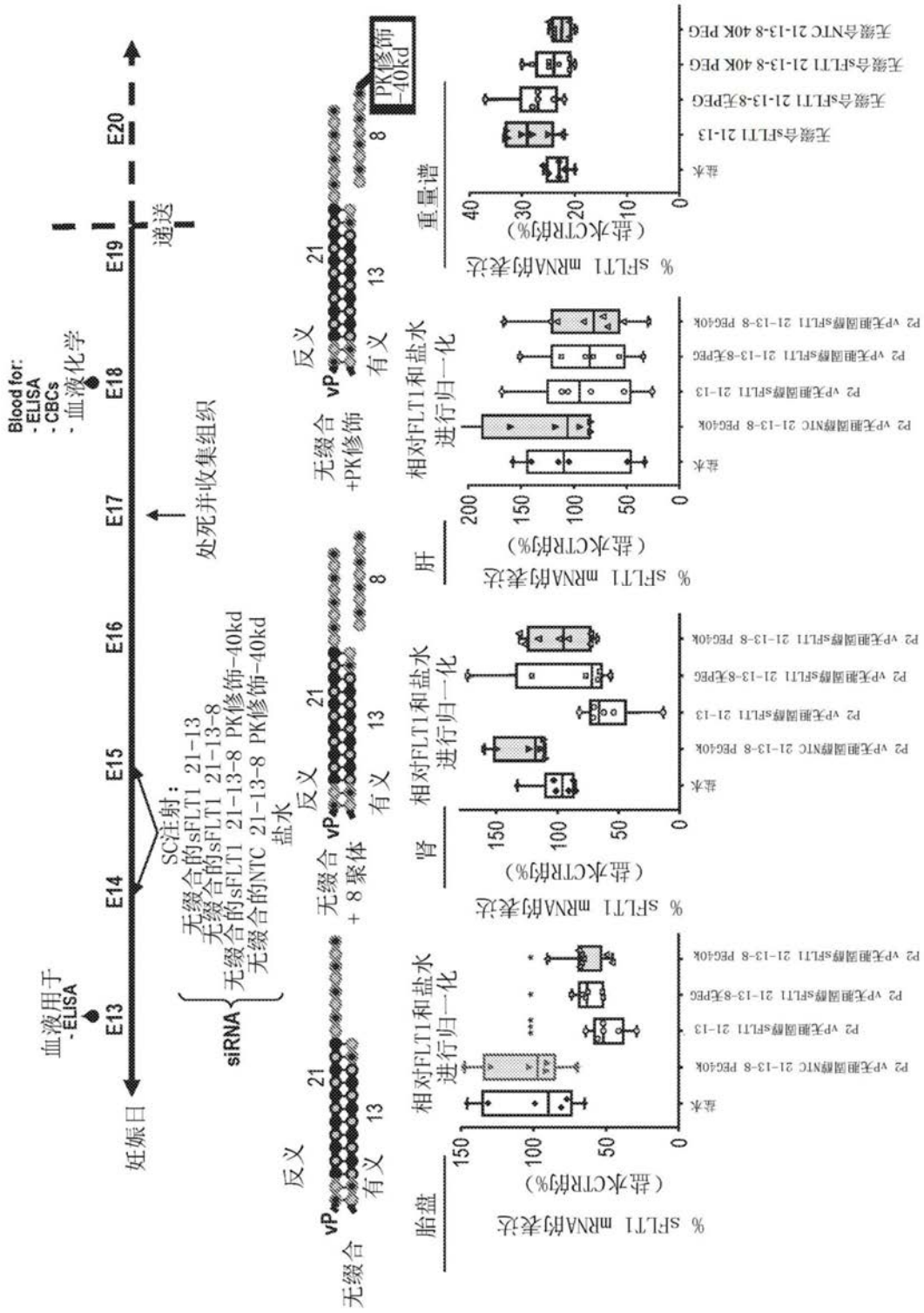


图40

单位	盐水					无胆固醇21-13					无胆固醇21-13-8					无胆固醇21-13-8 PK修饰-40kd					无胆固醇NTC PK修饰-40k										
	S4	S5	S6	A4	A5	A6	B4	B5	B6	C5	C6	C7	C8	D4	D5	D6	S4	S5	S6	A4	A5	A6	B4	B5	B6	C5	C6	C7	C8	D4	D5
ALB	g/dL	3.9	4.6	4.3	3.4	4	3.4	3.9	4	4	3.4	4	3.8	3.8	3.8	4	3.6	3.8	4	3.6	3.8	4	3.6	3.8	4	3.6	3.8	4	3.6	3.8	4
ALP	U/L	5	hem	5	16	8	14	15	5	5	16	5	12	24	25	34	20														
ALT	U/L	49	57	54	38	35	43	46	43	41	40	35	38	42	34	46															
AMY	U/L	2719	2902	2800	2525	2568	2357	2509	2696	2363	2580	2393	2298	2236	2702	2313															
TBIL	mg/dL	hem	hem	hem	0.2	0.2	0.2	0.2	hem	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3															
BUN	mg/dL	16	19	19	16	19	17	18	16	17	17	19	18	18	18	14															
Ca2+	mg/dL	10.9	11.3	11.6	10.7	11.1	11	11.5	11.9	8.8	11	10.6	11.4	11.1	10.7	11															
PHOS	mg/dL	6.9	8	7.4	6.9	7.2	7.5	7.5	8.5	7.9	6.9	7.7	8.3	7.4	8.5	8															
Cre	mg/dL	<0.2	hem	hem	<0.2	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	0.2	<0.2	0.3	<0.2	<0.2	0.3	0.3															
GLU	mg/dL	111	118	102	103	147	123	97	99	126	113	132	125	140	140	118															
Na+	mmol/L	144	---	145	146	146	146	145	150	149	148	142	148	151	151	152															
K+	mmol/L	hem	11.2	hem	8.3	>8.5	8	7.1	hem	hem	7.7	hem	hem	7.5	8	7.2	hem														
TP	g/dL	5.8	6.4	6.1	5.2	5.9	5.5	5.7	6.1	6	5.6	5.4	5.8	6	5.3	6.1															
GLOB	g/dL	1.9	---	1.7	1.8	1.9	2	1.8	2.1	2	1.7	1.8	2	2.1	1.7	2.1															
QC		OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK															
HEM		3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+															
LIP		1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+	1+	1+															
ICT		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															

血液化学物质

图40(续)

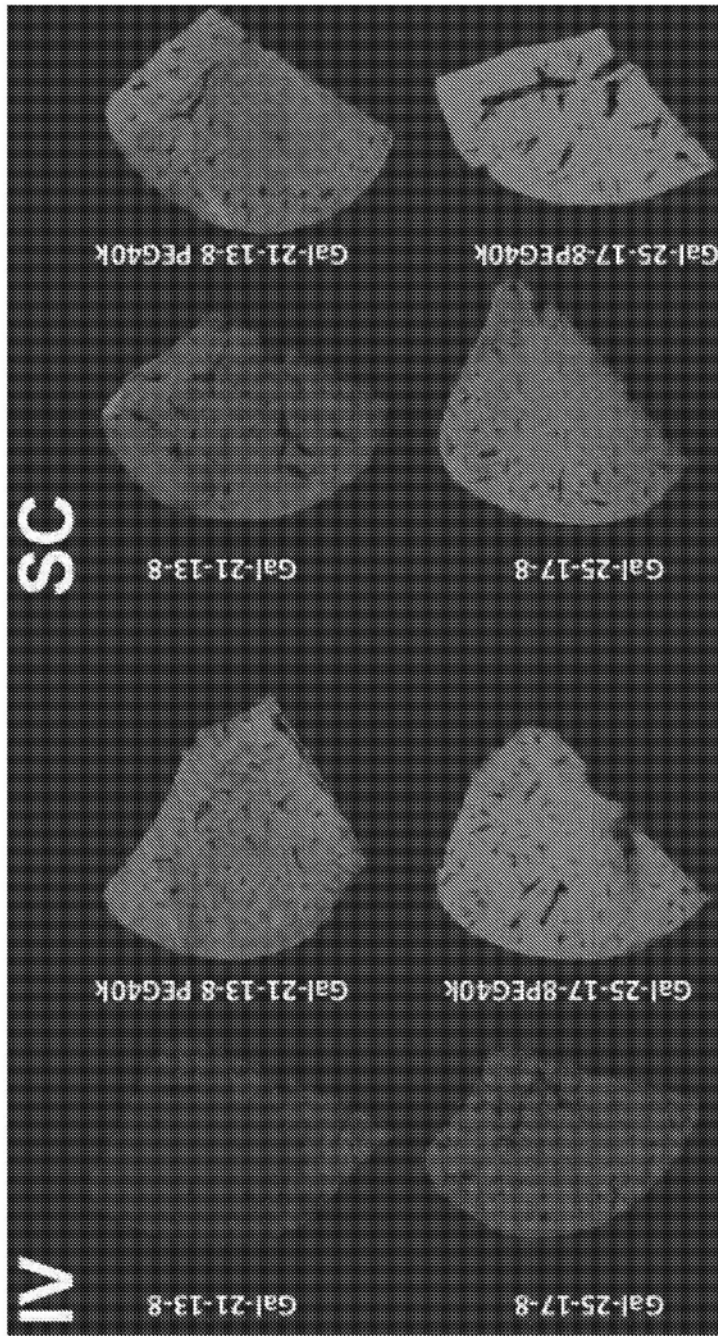


图41

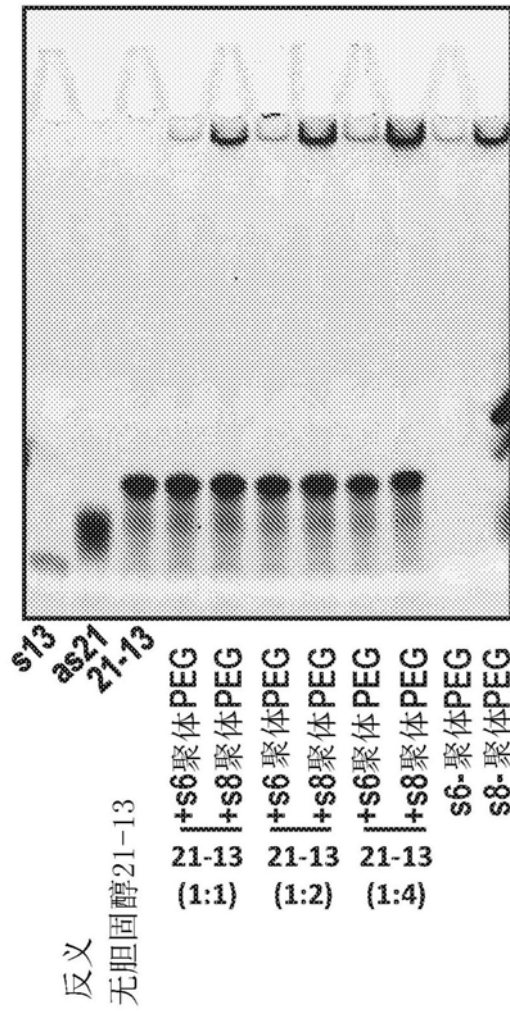


图42

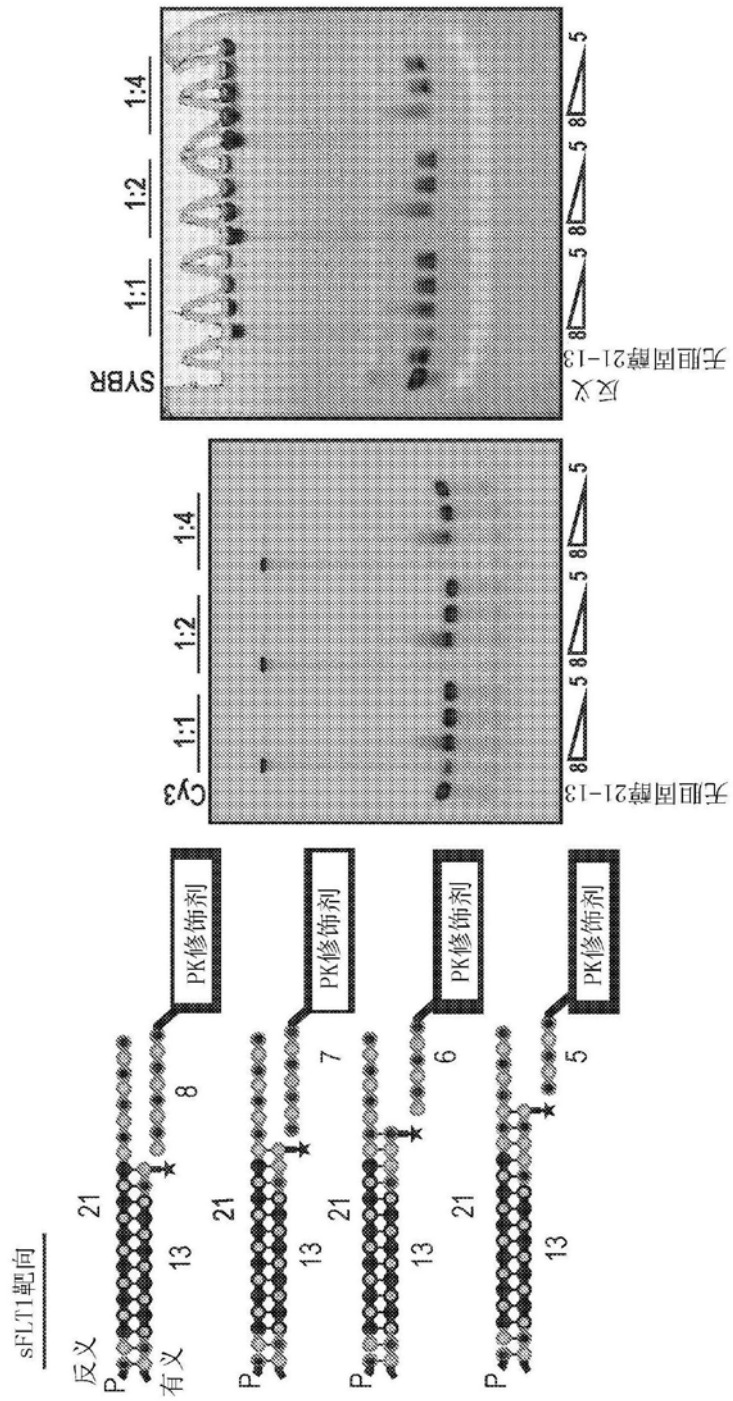


图43

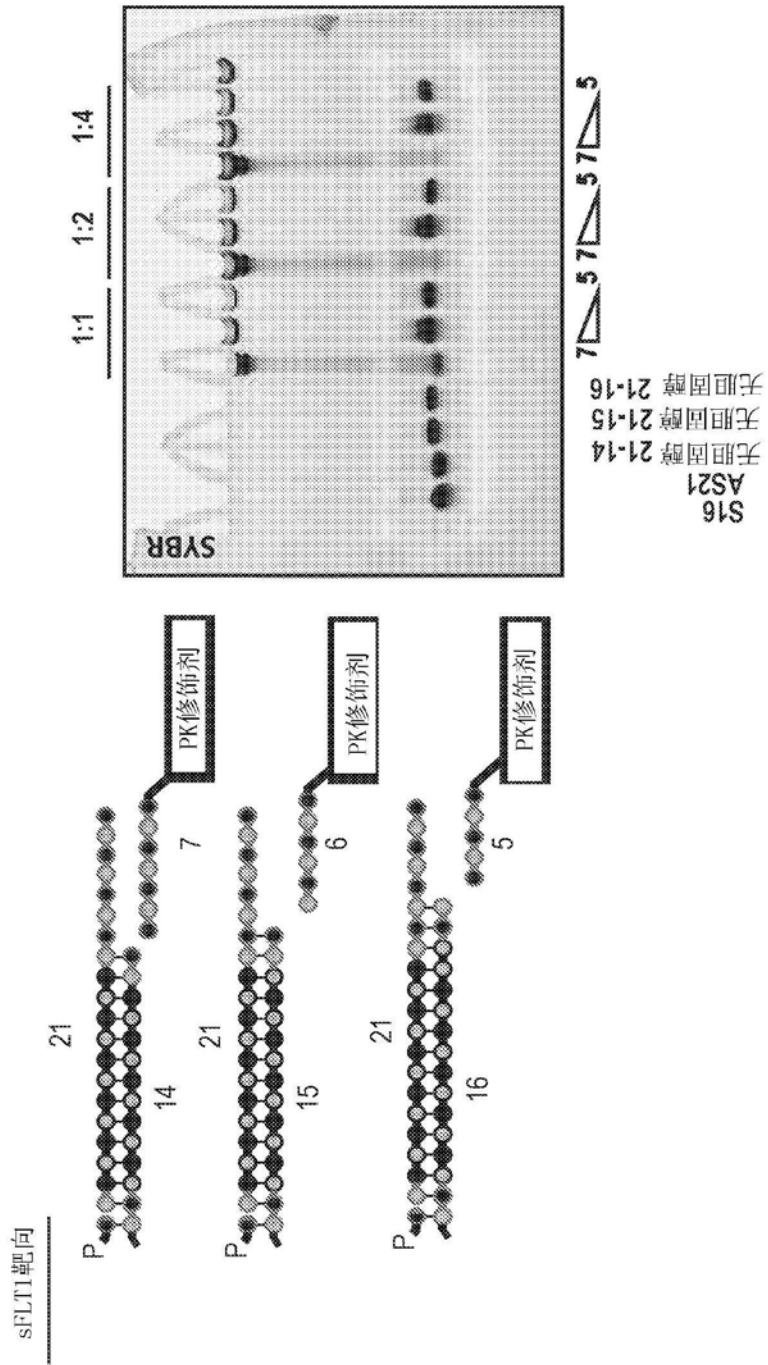


图44

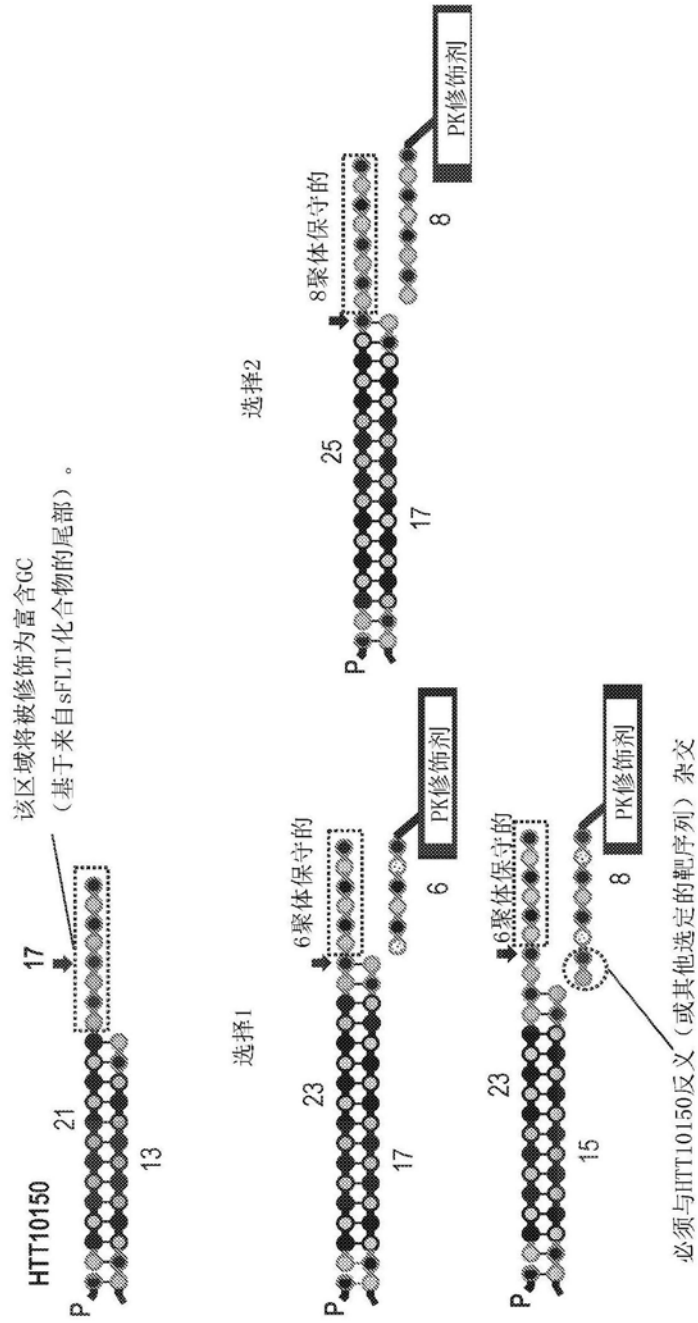


图45

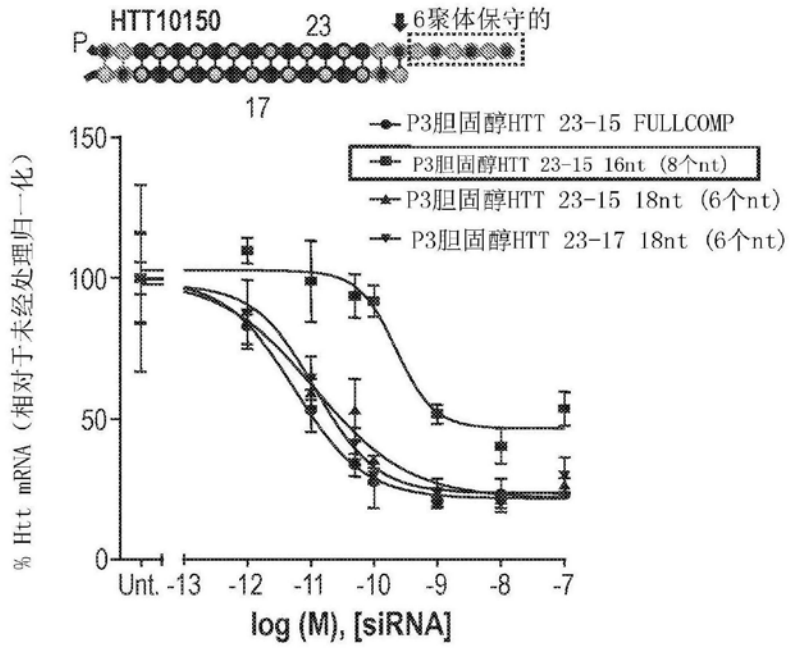


图46A

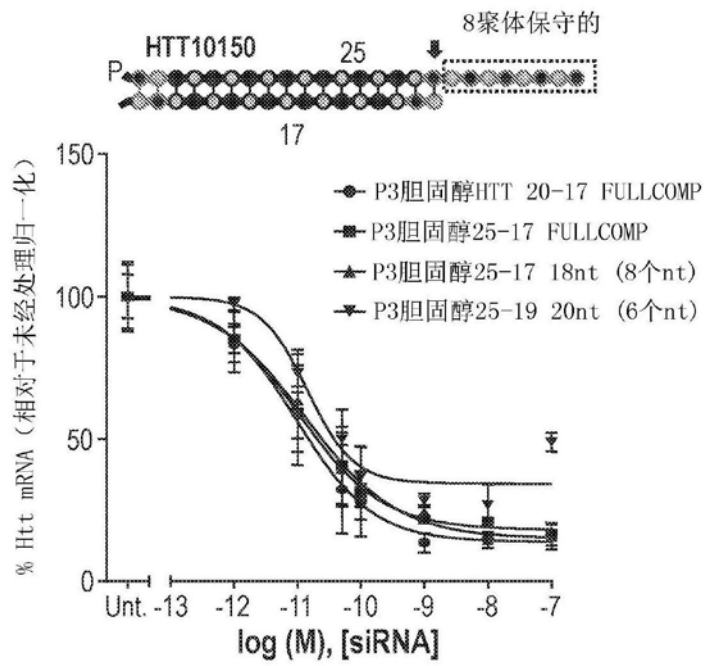


图46B