



(10) 授权公告号 CN 114885604 B

(45) 授权公告日 2025.02.25

(21) 申请号 202080072338.1

(22) 申请日 2020.12.07

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114885604 A

(43) 申请公布日 2022.08.09

(30) 优先权数据  
62/945,042 2019.12.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.04.28

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2020/063676 2020.12.07

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02021/113851 EN 2021.06.10

(73) 专利权人 圣诺制药公司  
地址 美国盖瑟斯堡

(72) 发明人 吕晓勇 陆阳 大卫·M·埃文斯

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有  
限公司 32103

专利代理师 冯尚杰 周敏

(51) Int.Cl.  
A61K 35/17 (2006.01)  
C07K 14/705 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2019226940 A1, 2019.11.28  
MA et al. .“Peptide-Drug Conjugate: A  
Novel Drug Design Approach”.《Current  
Medicinal Chemistry》.2017,第24卷(第31期),  
第3373-3396页尤其是第2页图1、第12、14页.  
MA et al. .“Peptide-Drug Conjugate: A  
Novel Drug Design Approach”.《Current  
Medicinal Chemistry》.2017,第24卷(第31期),  
第3373-3396页尤其是第2页图1、第12、14页.

审查员 汪豪杰

权利要求书3页 说明书29页 附图16页

(54) 发明名称

用于靶向递送核酸的肽对接载体

(57) 摘要

本发明提供一种包含治疗性化合物(如 siRNA分子)和靶向配体的肽对接载体组合物,以及它们的制备和使用方法。该组合物和方法通过将靶向配体连接到化合物以提供增强的治疗效益,允许将治疗化合物靶向递送至受试者的细胞/组织,其中,受试者可以是动物或人类。

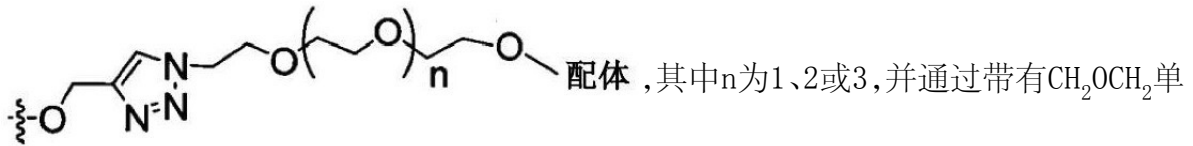
1. 一种化学构建体,其特征在于,所述化学构建体由与靶向配体共价连接的肽对接载体和寡核苷酸组成,所述肽对接载体为叠氮-PDoV1:HHH {LYS (PEG4-N3)} HHCKHHH、叠氮-PDoV2:HHH {LYS (PEG4-N3)} HHCRHHH或叠氮-PDoV3: {LYS (PEG4-N3)} HHHCHH,所述靶向配体与所述肽对接载体的半胱氨酸残基的侧链连接,所述寡核苷酸与所述肽对接载体的LYS (PEG4-N3)的N3连接,所述靶向配体为N-乙酰半乳糖胺。

2. 根据权利要求1所述的化学构建体,其特征在于,所述寡核苷酸包含siRNA、反义寡核苷酸、miRNA、saRNA、shRNA、适配体或诱饵寡核苷酸。

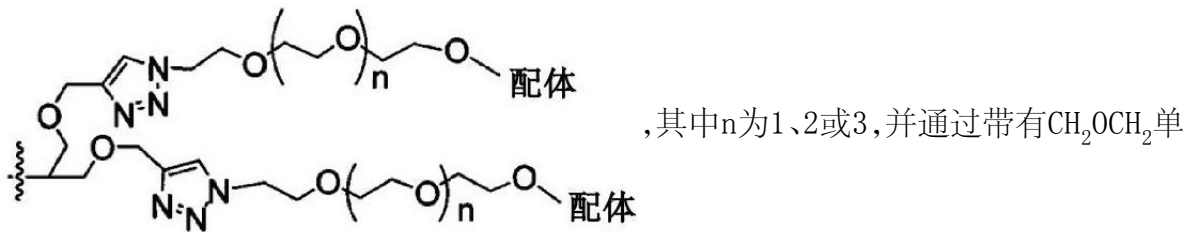
3. 根据权利要求2所述的化学构建体,其特征在于,所述寡核苷酸为siRNA或miRNA分子。

4. 根据权利要求1所述的化学构建体,其特征在于,所述化学构建体包含至少两个相同或不同的靶向配体,和/或,至少两个相同或不同的寡核苷酸。

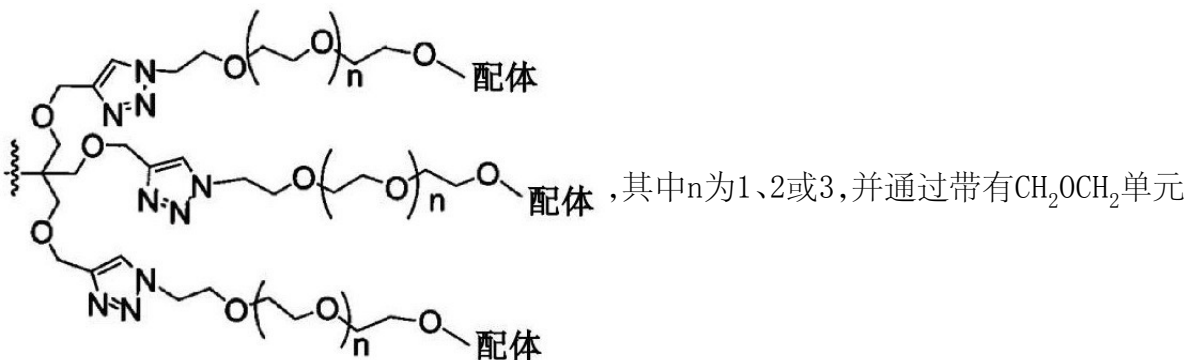
5. 根据权利要求1所述的化学构建体,其特征在于,所述靶向配体包含连接物-1,其中,所述连接物-1含有如下结构之一:



元的1,5-三唑环与桥相连;或



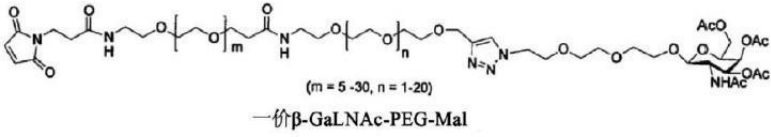
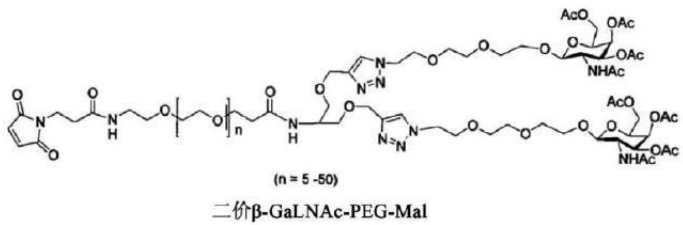
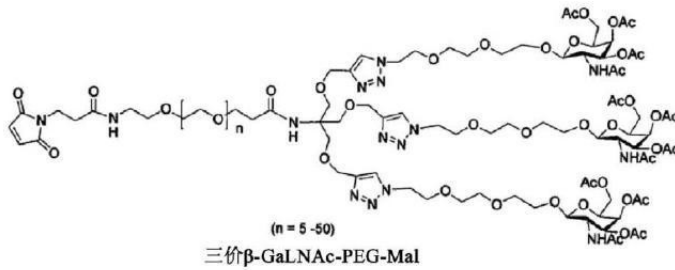
元的1,5-三唑环与桥相连;或



的1,5-三唑环与桥相连。

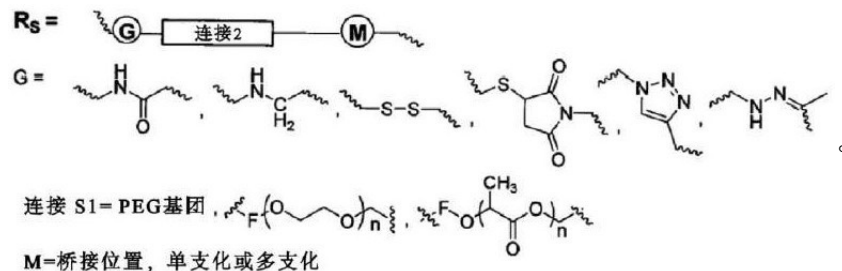
6. 根据权利要求5所述的化学构建体,其特征在于,所述靶向配体还包含聚乙二醇链-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-链,其中n为2-15之间的整数。

7. 根据权利要求6所述的化学构建体,其特征在于,所述靶向配体具有以下结构:

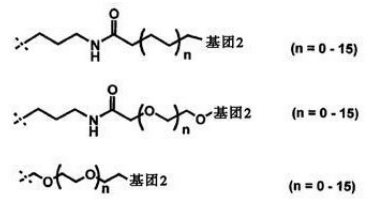


8. 根据权利要求1所述的化学构建体,其特征在于,所述寡核苷酸通过一个具有R<sub>s</sub>-连接物2-寡核苷酸结构的残基连接,其中连接物2为脂肪族链、聚乙二醇链、疏水性脂质链或亲水性链,连接物2的末端的基团2是与siRNA末端化学结合的反应位点。

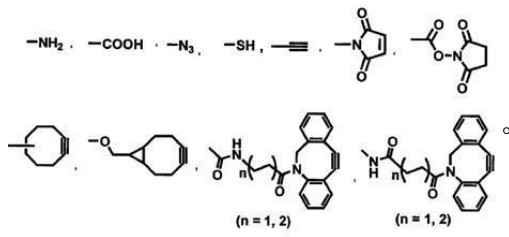
9. 根据权利要求8所述的化学构建体,其特征在于,



10. 根据权利要求8所述的化学构建体,其特征在于,其中连接物2为:



基团2为:



11. 根据权利要求1所述的化学构建体,其特征在于,所述寡核苷酸是长度为10-29个碱基的单链寡核苷酸的RNAi分子。

12. 根据权利要求11所述的化学构建体,其特征在于,所述寡核苷酸是包含两个互补的

单链寡核苷酸的双链RNAi分子,每个寡核苷酸的长度为10-29个碱基或19-27个碱基。

13. 根据权利要求1所述的化学构建体,其特征在于,所述寡核苷酸包含脱氧核糖核苷酸。

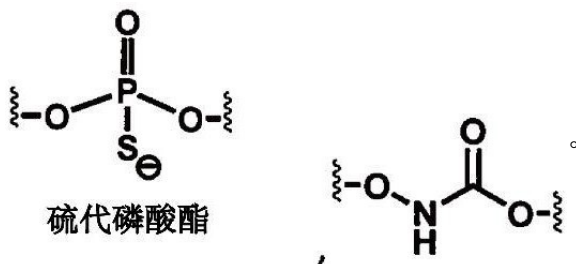
14. 根据权利要求1所述的化学构建体,其特征在于,所述寡核苷酸包含核糖核苷酸。

15. 根据权利要求1所述的化学构建体,其特征在于,所述寡核苷酸包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。

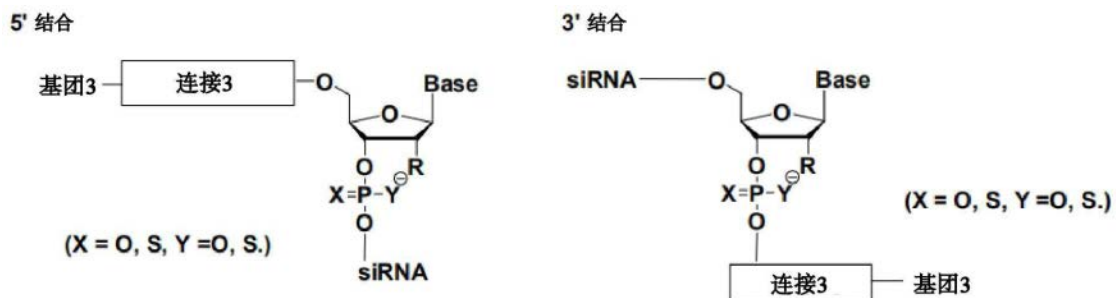
16. 根据权利要求1所述的化学构建体,其特征在于,所述寡核苷酸包含一个在2'位有至少一个或多个化学修饰核苷酸的siRNA分子。

17. 根据权利要求16所述的化学构建体,其特征在于,所述化学修饰核苷酸包含2'-O-甲基、2'-F、2'-O-甲氧基乙基、2'-O-烯丙基或2'-H修饰的核苷酸。

18. 根据权利要求8所述的化学构建体,其特征在于,所述寡核苷酸包含一个含有至少一个化学修饰的连接物的siRNA分子,所述连接物为:



19. 根据权利要求8所述的化学构建体,其特征在于,所述寡核苷酸在5'或3'端用连接物3进行化学修饰,结构如下:



其中,所述连接物3包含一个互补结合位点基团3,基团3可与连接物2共价反应以将配体-PDoV和核苷酸连接在一起。

20. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含权利要求1至19中任一项所述的化学构建体和药学上可接受的载体。

21. 根据权利要求20所述的药物组合物,其特征在于,所述药学上可接受的载体包含富含组氨酸-赖氨酸多肽聚合物HKP、HKP(H)或脂质体。

22. 根据权利要求20所述的药物组合物,其特征在于,所述药学上可接受的载体包含水和以下一种或多种盐或缓冲剂:无水磷酸二氢钾、氯化钠、七水合磷酸氢二钠、葡萄糖和磷酸盐缓冲盐水。

23. 权利要求1至19中任一项所述的化学构建体在制备将寡核苷酸递送至细胞的药物中的应用。

## 用于靶向递送核酸的肽对接载体

### [0001] 摘要

[0002] 本发明提供一种包含治疗性化合物(如siRNA分子)和靶向配体的肽对接载体组合物,以及它们的制备和使用方法。该组合物和方法通过将靶向配体连接到化合物以提供增强的治疗效益,允许将治疗化合物靶向递送至受试者的细胞/组织,其中,受试者可以是动物或人类。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及一种递送系统,包含与内涵体释放肽共价连接的单个或多个核酸,并进一步偶联至少一种小分子配体。本发明提供一种新的物质组合物,以及它们的制备和使用方法。通过选择配体和连接物,该递送系统可向肝脏和其他组织定向递送核酸分子。

### [0004] 发明的背景

[0005] 双链RNA已被证明可以沉默基因的表达(法尔等,自然。391:806-811(1998);艾尔巴希尔等,自然。411:494-498(2001)),并将其称之为RNA干扰或“RNAi”,或干扰RNA分子(RNAi)。短的干扰RNA(siRNA)诱导的RNAi调控在治疗各种人类疾病和其它无药可治的传统疾病发面显示巨大的潜力。基于RNA的治疗方法有三个主要优势,优于传统的小分子和抗体治疗方法。首先,一旦设计向特定的细胞类型或组织进行递送(如,将siRNA/反义寡核苷酸(ASO)递送至肝细胞;将ASO递送至中枢神经系统(CNS)),就极有可能将该细胞类型或组织中的每一个致病基因都作为靶标。第二,RNA治疗方法可以选择性地靶向单个基因,并可以很容易地经过设计以避免调控非靶标基因,而小分子抑制剂往往会击中多个目标,有未知的脱靶副作用。第三,与静态小分子和抑制剂不同,RNA治疗方法可以随着疾病(无论是癌症还是大流行性流感)的发展而改变其序列。这些特性为基于RNA的治疗方法提供了巨大的潜力,一旦递送问题得到适当解决,基于RNA的治疗方法可以治疗那些尚无药物治疗的疾病。

[0006] 在该领域,ASO、RNAi和mRNA化学的发展使其具有更好的稳定性并避免了先天免疫反应。与抗体或小分子开发相比,治疗性ASO和RNA化合物允许以相对较低的成本通过自动化合成仪进行大规模生产。然而,还有两个领域需要进一步发展:(a)使这些分子靶向特定的细胞类型或组织,最重要的是(b)设计出无毒的内涵体逃逸制剂。道迪,自然-生物技术。35:222-229(2017)。

[0007] 目前,市场上的ASO或RNAi药物有两种有效的递送方式,一种是基于脂质的纳米粒子,即脂质体,它包含有多种成分;另一种是靶向ASGPR(asialoglycoproteins receptor, 脱唾液酸糖蛋白受体)的GalNAc分子偶合的方法。

[0008] 递送至细胞内仍然是基于RNA的治疗方法的主要挑战,所有的递送路径最终都会走向内涵体逃逸。向肝脏递送ASO和siRNA已经有效地被ASGPR靶向的GalNAc-siRNA偶合体解决。由于未知的原因,ASGPR具有特别适合于大分子药物递送至肝细胞的特性,肝细胞在其细胞表面上表达数以百万计的ASGPR,这些ASGPR以惊人的速度循环,每10-15分钟循环一次[卡明斯R,麦克弗R。糖生物学基础。第二版第31章美国冷泉港实验室出版社,2009]。幸运的是,即使假定内涵体逃逸率小于0.01%,GalNAc递送方法仍然有效。然而,除了肝脏,目前

还没有临床证明的有效方法能将寡核苷酸或RNA递送至除肝脏细胞以外的其他组织。不幸的是,尚未有其它配体-受体系统能像ASGPR那样高水平地表达受体或如此迅速地循环到内涵体中。主要的原因之一是大多数的细胞表面受体的表达量在10000-100000之间(或更低),小窝蛋白和网格蛋白介导的内吞作用通常是每90分钟循环一次。朱利亚诺R.L,治疗用寡核苷酸的递送。核酸研究。44:6518-6548(2016)。

[0009] 除了GalNAc-RNA/ASO偶合体的成功,内涵体逃逸仍然是药物开发中需要解决的重点问题,这个问题也是所有基于RNA的治疗药物开发所要解决的问题。这就需要通过开发新的化学制品和材料来加强内涵体逃逸,以能够靶向除肝脏细胞以外的细胞或组织。经典的方法是使用小分子内涵体溶解制剂破坏或裂解内涵体,如氯喹和类似的分子。然而,在有效浓度下,这些内涵体溶解制剂会裂解细胞中的所有类型的内涵体,导致显著的毒性。

[0010] 另一种内涵体逃逸方法是将内涵体溶解肽或分子直接与RNA结合,这将严格限制其对含有RNA治疗药物的内涵体的作用。有多项临床研究采用包含胆固醇或膜裂解功能的成孔蜂毒肽来逃避内涵体的双分子动态多聚物(DPC)系统,但这些临床研究由于毒性都已经终止。伍德德尔C.1等,分子治疗。21:973-985(2013);侯等,生物技术进展。33:931-940(2015)。

[0011] 本发明提供一种与寡核苷酸和靶向配体偶合的内涵体释放肽,该构建体以无毒的方式增强了寡核苷酸向细胞质中的逃逸。本发明的构建体在本发明中被称为“肽对接载体”(PDoV)。

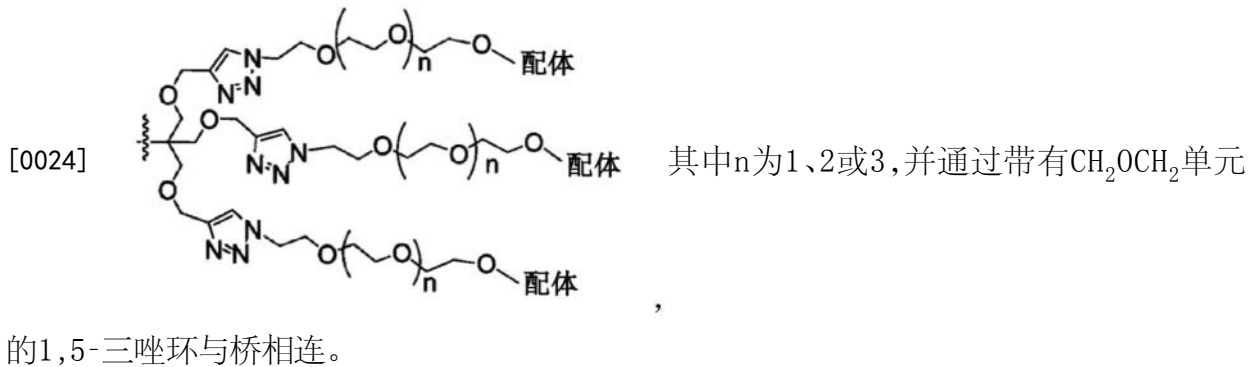
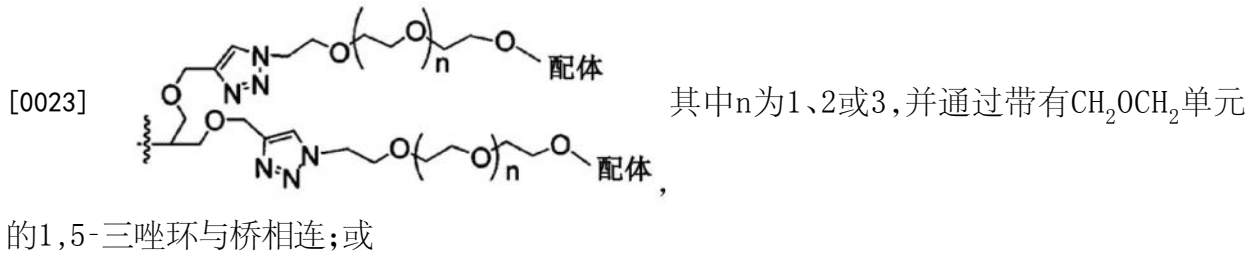
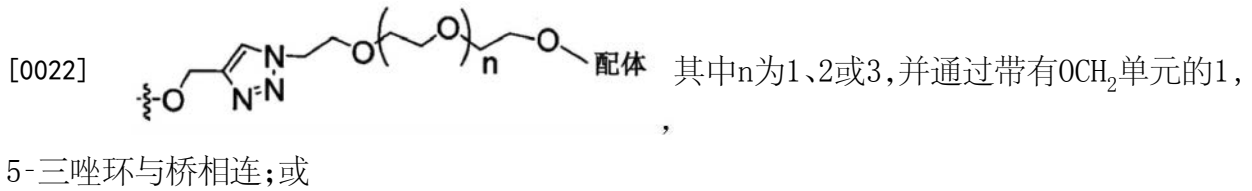
## 发明总结

[0012] 本发明提供了一种化学构建体,该化学构建体包含与(a)靶向残基和(b)第一治疗性寡核苷酸共价连接的肽对接载体(PDoV),还可以包含与第一治疗性寡核苷酸相同或不同的第二治疗性寡核苷酸。其中,PDoV可以含有组氨酸和赖氨酸的多个重复单元。在一个实施例中,靶向残基与脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)结合;寡核苷酸可以包含siRNA、反义寡核苷酸、miRNA、saRNA、shRNA、适配体、RNA酶、DNA酶、诱饵寡核苷酸或CpG基序。

[0013] 在这些构建体中,PDoV构建体可以含有一个内涵体释放基序,该内涵体释放基序可以含有至少两个相同或不同的靶向残基,和/或,至少两个相同或不同的治疗性寡核苷酸。

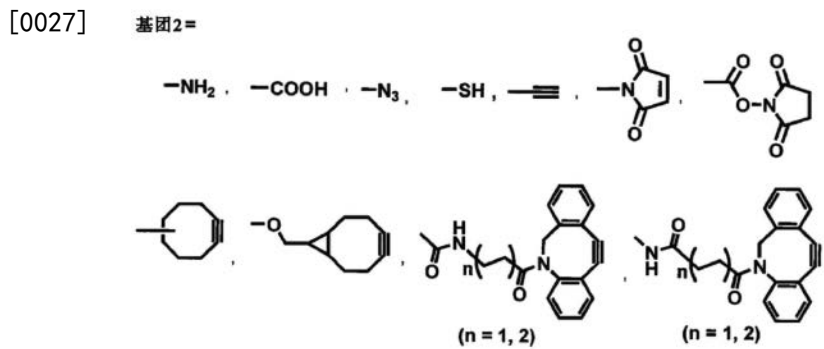
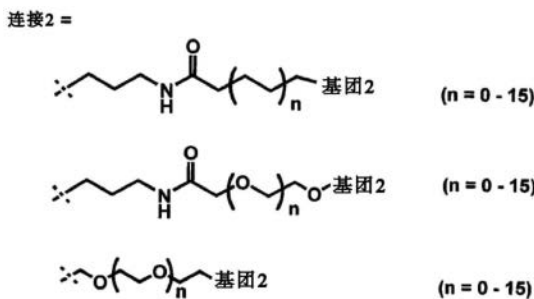
[0014] 上述构建体可以含有如下所示的结构之一,其中,位点X用于结合靶向配体,位点Y用于结合寡核苷酸,位点X和位点Y可以相同也可以不同;A为H、K、R、HH、HHH、HHH、HHK、HHHK的肽序列或任何其它含有至多5个氨基酸的内涵体释放短肽,B为H、K、R、HH、HHH、HHH、HHK和HHHK的肽序列或任何其它含有至多5个氨基酸的短肽、任何其他氨基酸或氨基酸与连接物的组合,D为寡核苷酸, $R_L$ 为配体, $R_S$ 为与寡核苷酸结合的连接物。





[0025] 配体连接到PDoV肽之间的连接物可以包含聚乙二醇链-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-链,其中n为2-15之间的整数。配体R<sub>1</sub>可通过一个连接物与PDoV肽相连,该连接物可包含硫醚、酰胺或三唑连接。

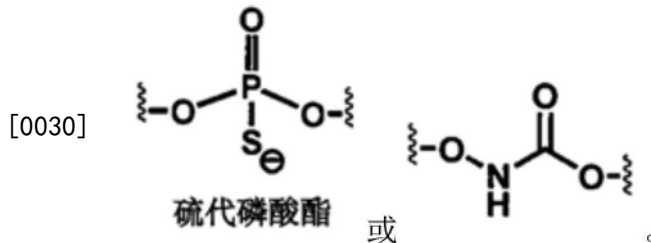
[0026] 在其它实施例中,寡核苷酸通过一个具有R<sub>5</sub>-连接物2-寡核苷酸结构的残基连接,其中连接物2为脂肪族链、聚乙二醇链、疏水性脂质链或亲水性链。末端的基团2是与siRNA末端化学结合的反应位点。



[0028] 寡核苷酸可以是长度为10-29个碱基的单链寡核苷酸的RNAi分子,或者可以是包

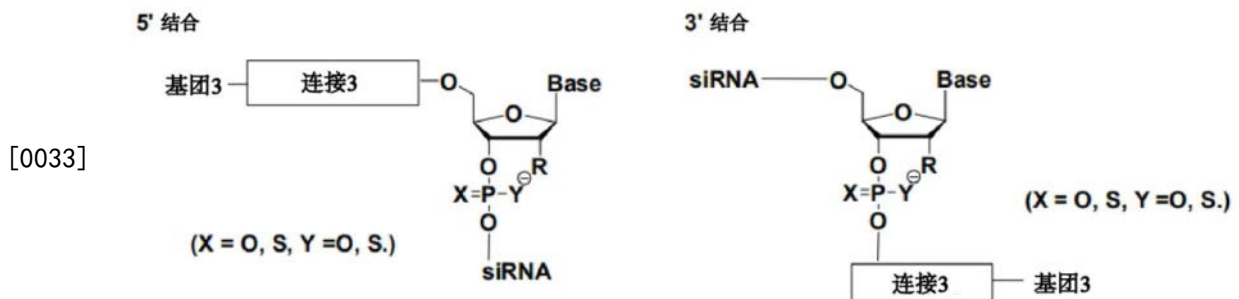
含两个互补的单链寡核苷酸的双链RNAi分子,每个寡核苷酸的长度为10-29个碱基或19-27个碱基。寡核苷酸可以包含脱氧核糖核苷酸和/或核糖核苷酸,寡核苷酸可以包含一个在2'位有至少一个或多个化学修饰的核苷酸的siRNA分子,例如,其中化学修饰的核苷酸包括2'-O-甲基、2'-F、2'-O-甲氧基乙基、2'-O-烯丙基或2'-H修饰的核苷酸。

[0029] 在其它实施例中,寡核苷酸可以包含一个含有至少一个化学修饰的连接物的siRNA分子,该连接是:



[0031] 在其他实施例中,siRNA或寡核苷酸在5'端或3'端用连接物3进一步进行化学修饰,其中连接物3包含一个互补结合位点基团3,基团3可与连接物2共价反应以将配体-PDoV和核苷酸连接在一起。

[0032] 在进一步的实施例中,上述构建体可以具有如下所示的结构:



[0034] 在这些构建体中,靶向配体可以选自由N-乙酰半乳糖胺(Ga1NAc)、半乳糖、半乳糖胺、N-缩醛半乳糖胺、N-丙酰半乳糖胺、N-丁酰半乳糖胺和适配体组成的群组。在另外的实施例中,靶向配体为肽,该肽选自由环状(c)RGD、APRPG、NGR、F3肽、CGKRR、LyP-1、iRGD(CRGDRCPDC)、iNGR、T7肽(HAIYPRH)、MMP2可切割八肽(GPLGIAGQ)、CP15(VHLGYAT)、FSH(FSH-p、33-53氨基酸、YTRDLVKDPPARPKIQKTF)、LHRH(QHTSYkcLRP)、胃泌素释放肽(GRPs)(CGGNHWAVGHLM)、RVG(YTWMPENPRPGTPCDIFTNRSKGKRASNG)、FMDV20肽序列(NAVPNLRGDLQVLAQKVART)、GLP或叶酸组成的群组。

[0035] 在这些构建体的任何一个中,肽可以包含氨基酸序列-HHK, -KHH, -HHH, -HHHK, -KHHH, -HHHHK, -KHHHH, -K(HHHK)<sub>n</sub> (n=1-8), -K(HHHHK)<sub>n</sub>(HHHK)<sub>m</sub> (n=1-4, m=1-8), K(HHHHK)<sub>n</sub>(HHHK)<sub>m</sub> (n=1-4, m=1-8), 例如,构建体可以包含具有序列-K(HHHHK)<sub>n</sub>(HHHK)<sub>m</sub>或K(HHHHK)<sub>n</sub>(HHHK)<sub>m</sub>的肽,其中n为1, m为3。该肽可以是内涵体释放肽或细胞穿透肽。

[0036] 本发明还提供了一种具有式为(H<sub>n</sub>K<sub>m</sub>)<sub>o</sub>X<sub>p</sub>Y<sub>q</sub>的肽,其中,H为组氨酸,K为赖氨酸,X和Y为选自氨基酸和连接物的功能单元,n为1-10,m为1-10,o为1-10,p为1-5,q为1-4。该肽可以包括至少两个用于结合靶向配体的结合位点。优选地,结合位点为赖氨酸或半胱氨酸。肽可以包含至少两个用于结合寡核苷酸的结合位点。该构建体可以包含式为(H<sub>n</sub>K<sub>m</sub>)<sub>o</sub>X<sub>p</sub>Y<sub>q</sub>的肽和至少一个通过至少一个偶联位点与该肽偶联的靶向配体,至少一个寡核苷酸可以通过至少一个偶联位点与该肽偶联。靶向配体可以选自由环状(c)RGD、APRPG、NGR、F3肽、CGKRR、

LyP-1、iRGD (CRGDRCPCDC)、iNGR、T7肽 (HAIYPRH)、MMP2可切割八肽 (GPLGIAGQ)、CP15 (VHLGYAT)、FSH (FSH-p、33-53氨基酸、YTRDLVKDPPARPKIQKTF)、LHRH (QHTSYkcLRP)、胃泌素释放肽 (GRPs) (CGGNHWAVGHLM)、RVG (YTWMPENPRPGTPCDIFTNRSKGKASNG)、FMDV20肽序列 (NAVPNLRGDLQVLAQKVART) 和GLP组成的组。寡核苷酸可以选自由siRNA、反义寡核苷酸、miRNA、saRNA、shRNA、适配体、RNA酶、DNA酶、诱饵寡核苷酸和CpG基序组成的组。

[0037] 本发明还提供了含有上述构建体和药学上可接受的载体的药物组合物,其中,药学上可接受的载体可以包含富含组氨酸-赖氨酸多肽聚合物HKP、HKP (H) 或脂质体,和/或,可包含水和以下一种或多种盐或缓冲剂:无水磷酸二氢钾NF、氯化钠USP、七水合磷酸氢二钠USP、葡萄糖和磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。

[0038] 本发明还提供将寡核苷酸递送至细胞的方法,该方法包括将用上述构建体或药物组合物与细胞接触。

[0039] 本发明还提供将寡核苷酸递送至肝细胞的方法,该方法包括用上述构建体与细胞接触。

[0040] 在这些方法中,寡核苷酸可以是siRNA分子,且该寡核苷酸可以被递送至哺乳动物体内的细胞或肝细胞,该细胞可以是人体细胞。

[0041] 本发明还提供了在哺乳动物中进行基因治疗的方法,该方法包括给予哺乳动物有效治疗剂量的上述构建体,其中,哺乳动物可以是人类。

[0042] 本发明还提供治疗哺乳动物癌症的方法,例如人类癌症,该方法包括给予哺乳动物有效治疗量的上述构建体。癌症可以是实体瘤,可以包含肝癌、结肠癌或胰腺癌。其中,肝癌可以是肝细胞癌、转移性结肠癌或转移性胰腺癌;上述构建体可直接注射到含有癌细胞的肿瘤中。

[0043] 附图简要说明

[0044] 图1、G-PDoV技术:[GalNAc]肽对接载体的设计底图,三价GalNAc共价结合在一个对接位点A上,寡核苷酸或siRNA分别结合在另外一个或两个对接位点B上。

[0045] 图2、G-PDoV技术:[配体]肽对接载体的设计底图,一价GalNAc共价结合在1至4个对接位点A上,寡核苷酸或siRNA分别结合在另外一个或两个对接位点B上。

[0046] 图3、肽对接载体 (PDoV) 设计为由组氨酸 (H)、赖氨酸 (K) 和功能单元X (氨基酸或功能连接物) 的多个重复单元组成的  $(H_n K_m)_o$  XY肽骨架结构,其中 $n=1-10$ , $m=1-10$ , $o=1-10$ , $p=1-5$ , $q=1-5$ 。HK重复单元已被证实具有良好的细胞穿透的能力,并可以促进内涵体释放,赖氨酸或各种功能单元X为用于结合配体的对接位点,Y为用于通过不同共价键结合寡核苷酸的对接位点。比如,位点①只能在配体如GalNAc或其他的靶向配体存在时反应,位点③只能在特定条件下与寡核苷酸和siRNA结合。

[0047] 图4、具有三个配体结合位点和多寡核苷酸位点的肽对接载体 (PDoV) 设计为由组氨酸 (H)、赖氨酸 (K)、功能单元X和Y (氨基酸或功能连接物) 的多个重复单元组成的  $(H_n K_m)_o$  X<sub>p</sub>Y<sub>q</sub>肽骨架,其中 $n=1-10$ , $m=1-10$ , $o=1-10$ , $p=1-5$ , $q=1-5$ 。HK重复单元已被证实具有良好的细胞穿透的能力,并可以促进内涵体释放,赖氨酸或各种功能单元X为用于结合配体的对接位点,Y为用于通过不同共价键结合寡核苷酸的对接位点。比如,位点①只能在配体如GalNAc或其他的靶向配体存在时反应,位点③只能在特定条件下与寡核苷酸和siRNA结合。

[0048] 图5、PDoV构建体的结构,PDoV构建体是一个插入了多个结合位点X和Y的细胞穿

透/内涵体释放肽,位点X用于结合靶向配体,位点Y用于结合多个寡核苷酸或核酸。以下是PDoV构建体的一些示例,A表示K、R、H、HH、HHH、HHHH、HHK、HHHK或其他短肽的序列,B表示K、R、H、HH、HHH、HHHH、HHK、HHHK或其他短肽的序列、其他氨基酸或氨基酸与连接物的组合,D表示寡核苷酸、siRNA、mRNA、适配体,RL表示配体,RS表示与寡核苷酸结合的连接物。

[0049] 图6、第一代PDoV的结构示例,其包含一个或两个寡核苷酸位点和一个配体偶合位点。

[0050] 图7、第二代PDoV的结构示例,其包含两个寡核苷酸位点和一个多价配体偶合位点。

[0051] 图8、PDoV的替代结构示例,其包含一个或两个寡核苷酸位点和一个多价配体结合位点。所述配体可以一个一个地偶联到PDoV骨架上。

[0052] 图9A、偶合位点的连接方式选择。化学基团Rs代表与PDoV肽载体上偶联寡核苷酸的“点击”样的反应部分,它可以是氨基、联氨、N-羟基丁二酰亚胺、叠氮基、炔烃、羧酸、硫醇、马来酰亚胺和其它化学反应性部分。

[0053] 图9B、连接方式的代表性示例。

[0054] 图9C、Rs-连接物2-siRNA偶联物中的连接物2,是肽和偶联位点之间的一种化学间隔体,能使得结合位点附着在连接物的末端位点。连接物2可以是脂肪族链、聚乙二醇链、其它疏水性脂质或亲水性链,末端的基团2是与siRNA末端化学结合的反应位点。

[0055] 图10、配体偶合位点的连接方式选择的示例。R<sub>L</sub>配体的连接方式可以根据单价GalNAc分子、双价GalNAc分子、三价GalNAc分子选择,偶联位点可以是马来酰亚胺/硫醇,或选自图9中所示基团2的结构。

[0056] 图11、siRNA-PDoV-配体化合物1结构的代表性示例。

[0057] 图12、siRNA-PDoV-配体化合物2结构的代表性示例。

[0058] 图13、siRNA-PDoV-配体化合物3结构的代表性示例。

[0059] 图14、选定的siRNA序列和结构修饰的清单。

[0060] 图15A显示了mTTR1-PDoV3-GalNAc3偶合体的体外连续稀释数据。

[0061] 图15B显示了mTTR1-PDoV2-GalNAc3偶合体的体外连续稀释数据。

[0062] 图15C显示了mTTR2-GalNAc3阳性对照偶合体的连续稀释数据。

[0063] 图15D显示了Aha1-GalNAc3阳性对照偶合体的体外连续稀释数据。

[0064] 发明的说明

[0065] 定义:

[0066] 如此处公开,“寡核苷酸”是指长度小于100个核苷酸(比如小于50个、小于30个或小于25个核苷酸)的化学修饰或未修饰的核酸分子(RNA或DNA),其可以是siRNA、microRNA、antimicroRNA、microRNA模拟物、dsRNA、ssRNA、适配体、三链形成的寡核苷酸。在一个实施例中,寡核苷酸是一个RNAi活性分子。

[0067] 如此处公开,“siRNA分子”或“RNAi分子”是双链寡核苷酸,是一种短的双链多核苷酸,在将分子引入到细胞后,干扰细胞中基因的表达。比如,siRNA分子靶向单链目标RNA分子并通过其中的互补核苷酸序列与目标RNA分子结合。根据本领域的惯例,当siRNA分子识别特定的核苷酸序列时,该序列是指双链分子中的有义链。组成分子的一个或多个核糖核苷酸可通过现有技术进行化学修饰。除了在一个或多个核苷酸的水平上被修饰外,寡核苷

酸的骨架还可以被修饰其他修饰包括使用小分子(如糖分子)、氨基酸、多肽、胆固醇或其它大分子结合到siRNA上。

[0068] “肽对接载体”(PDoV)指由特定序列的氨基酸制成的合成肽,其有多个结合位点,以便与一个或多个靶向配体和一个或多个寡核苷酸结合。上述肽对接载体含有功能基团,如疏水链或pH敏感残基,在PDoV递送到细胞后,有利于细胞内涵体中的寡核苷酸释放出来。

[0069] 本发明提供了使用具有增强治疗效益的干扰RNA分子的组合物和方法。这些组合物和方法通过将靶向配体与化合物连接起来,使治疗性化合物(如siRNA分子)能够靶向递送至受试者的细胞或组织,受试者可以是动物或人类。

[0070] 在一些实施例中,所述靶向配体可以通过生物正交共轭方法与内涵体释放肽结合,所述靶向配体尤其可以改善RNAi分子对选定靶标(如肝脏)的递送,在其它实施例中,靶向配体允许RNAi分子靶向递送至其他组织,如皮肤和大脑。

[0071] 所述靶向配体可以包含一个或多个靶向残基和一个或多个连接物。连接物通过点击化学、硫醇/马来酰亚胺化学或其他生物正交化学与siRNA和靶向配体共价连接。连接物优选为亲水性的,例如可以是水溶性柔性聚乙二醇,它足够稳定,并限制了一个或多个靶向基团之间的潜在相互反应。聚乙二醇已被验证是安全的,并与临床研究的治疗目的兼容。在一些实施例中,连接物可以为确定分子量的聚(L-乳酸) $n$ (其中 $n=5-20$ ),其中,酯键为酶活性或水解活性的。靶向配体可以包括一个或多个靶向残基、一个或多个具有反应性连接残基的连接物,它们通过点击化学、硫醇/马来酰亚胺化学或其他生物正交化学与siRNA和靶向配体共价连接。连接物反应性连接残基包括但不限于硫醇-马来酰亚胺连接物、炔基-叠氮三唑连接物、胺-NHS酰胺连接物。所有这些连接物都适用于共价连接靶向配体和治疗性化合物。

[0072] 在一些实施例中,此处公开的靶向配体包括一个或多个靶向残基、一个或多个具有反应性连接残基的连接物。连接物包括硫醇残基、马来酰亚胺残基、羧酸、胺、叠氮基或炔基等。

[0073] 在一些实施例中,此处公开的靶向特异性RNA的化合物可以通过RNA的3'或5'末端直接与内涵体释放对接肽结合,靶向配体(如N-乙酰半乳糖胺)也可以兼容的方式与相同对接肽结合。

[0074] 在一些实施例中,此处公开的靶向特异性RNA的化合物也可以直接与靶向配体(如N-乙酰半乳糖胺)结合,例如与RNA的3'或5'末端结合。在一些实施例中,RNA可以包含一个或多个修饰的核苷酸,如3'-O-甲基、3'-F或3'-MOE。在一些实施例中,RNA可以是RNAi活性分子,例如双链RNAi活性分子。在一些实施例中,此处公开的靶向配体与双链RNAi活性分子的正义链的5'或3'末端相连或双链RNAi活性分子的反义链的5'或3'末端相连。可替代地,靶向配体可与双链RNAi活性分子的正义链和反义链的3'/3",3'/5'或5'/5'末端都相连。

[0075] 靶向配体可以通过双链RNAi活性分子的正义链的3'或5'末端的磷酸酯、硫代磷酸酯或磷酸酯基团与RNAi活性分子共价键合。在一些实施例中,此处公开的靶向特异性RNA化合物是TGF $\beta$ 1或ApoB100的mRNA表达抑制特异性化合物。

[0076] PDoV以无毒的方式增强大分子物质逃逸到细胞质中,这使得RNAi疗法的有效递送成为可能。本发明提供了一种内涵体逃逸肽(PDoV),它能以无毒的方式促进大分子,如siRNA分子,逃逸至细胞质中。图1-4展示了PDoV平台的各种示例,在PDoV中,内涵体逃逸肽

同时作为RNA和靶向配体的对接位点连接物。在这种方法中,内涵体逃逸肽充当ASO/RNA和靶向配体的对接位点连接物,多个RNA分子可以与同一构建体结合,以实现针对不同靶标mRNA的siRNA分子的协同递送,为沉默多种疾病相关基因提供协同效益。富组氨酸和赖氨酸的多肽或富组氨酸和赖氨酸的线性肽已被证实在递送RNA时为有效的细胞穿透和内涵体释放剂。该肽包含一个富含组氨酸的结构域,其中组氨酸残基的咪唑环在pH值较低时( $\text{pH} < \sim 6$ )被质子化,并在内涵体中作为质子海绵发挥作用,从而导致内涵体脂质双分子层裂解以释放RNA。下面将更详细地描述PD<sub>0</sub>V上的结合位点。

[0077] 在接下来的几节中,将详细讨论每个组成部分,包括RNAi活性分子、靶向配体、RNAi活性分子与肽之间的连接物、配体与肽之间的连接物以及核内体释放对接肽。

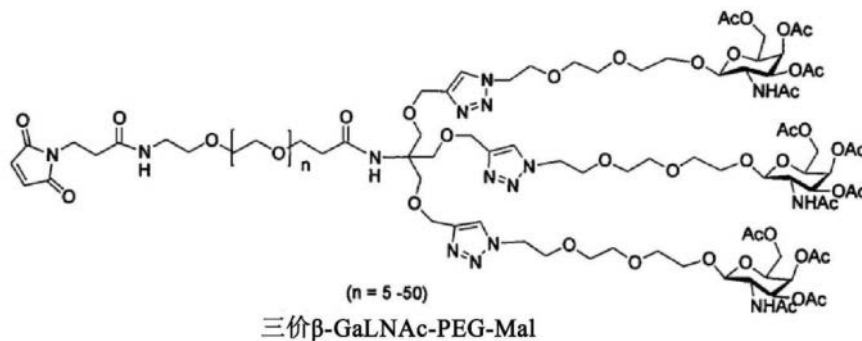
#### [0078] RNAi活性分子

[0079] RNAi活性分子是双链化合物,例如双链siRNA可以是anti-TGF $\beta$ 1或anti-ApoB100,可以是未修饰的,或在2'位进行2'-O-CH<sub>3</sub>、2'-F或2'-O-MOE化学修饰,在5'位进行-P(O)<sub>2</sub>=S(硫代磷酸二酯)修饰,或本领域中的其它化学修饰,如凝胶化或脂质功能化以提高RNAi的整体稳定性和生物利用率。

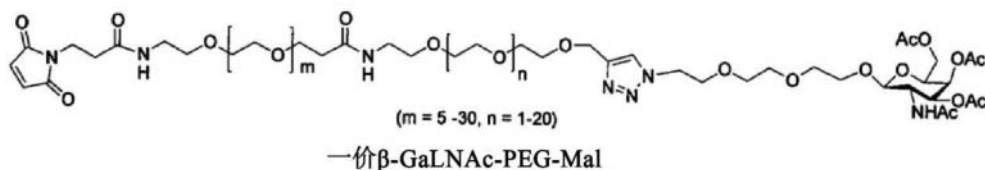
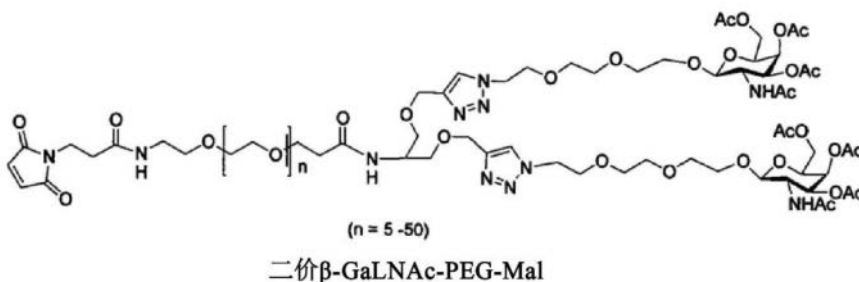
[0080] 在具体的实施例中,双链siRNA可以由图14中任何一个或多个双链的24、23、22、21、20、19、18、17或16个连续碱基对组成的衍生双链。

#### [0081] 靶向配体

[0082] 靶向配体可以是,例如,N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、半乳糖、半乳糖胺、N-缩醛半乳糖胺、N-丙酰半乳糖胺、N-丁酰半乳糖胺、cRGD、GLP肽或其它小分子。靶向配体通过共价键与肽进行共价连接,配体的数量可以是1,2或3个。此处公开的靶向配体具有以下结构:



[0083]



[0084] RNAi活性分子和肽之间的连接物

[0085] 用于配体结合的连接物Rs:化学基团Rs可以是用于将寡核苷酸与PDoV肽载体结合的各种类似于“点击”样的反应部分,它可以是氨基、联氨、N-羟基丁二酰亚胺、叠氮基、炔烃、羧酸、硫醇、马来酰亚胺或其它本领域已知的化学反应性残基,代表性的示例如图9所示。

[0086] 偶合体R<sub>s</sub>-linker2-siRNA中的连接物2是位于肽和结合位点之间的一种化学间隔体,能使得结合位点附着在连接物的末端位点上。连接物2可以是脂肪族链、聚乙二醇链、其它疏水性脂质或亲水性链,末端的基团2是与siRNA末端化学结合的反应位点。

[0087] 配体和肽之间的连接物

[0088] 此处公开的靶向配体和RNAi分子实体包括一个连接物-1,该连接物-1直接与siRNA和含有连接物3-配体的桥接物相连,并通过正义链的3'或5'末端直接与RNAi分子相连。连接物-1的间隔是一种选自线性聚乙二醇的结构,其中n可以是1-50的乙二醇单元数,或者聚(L-乳酸)的结构,其中n可以是1-50的乙酯重复单元数,或平均分子量在100-3500之间的单元重复数。

[0089] 结合位点可以是马来酰亚胺/硫醇,也可以从图10中的基团2列表中选择。

[0090] 内涵体释放对接肽

[0091] 优选地,肽对接载体(PDoV)具有一种配体结合位点和多个寡核苷酸位点。PDoV具有常规结构的肽骨架:(H<sub>n</sub>K<sub>m</sub>)<sub>o</sub>X<sub>p</sub>Y<sub>q</sub>,由组氨酸(H)、赖氨酸(K)和功能单元X和Y的多个重复单元组成,其中X或Y是氨基酸或选自连接物1和图10所示的功能基团的氨基酸衍生物,其中n=1-10,m=1-10,o=1-10,p=1-5,q=1-5。需要注意的是,在PDoV中的Y不是酪氨酸氨基酸一而是定义的功能性氨基酸或连接物。HK重复单元已被证明具有良好的细胞穿透的能力,并可以促进内涵体释放,赖氨酸残基或功能单元X可作为配体结合的对接位点,而Y则通过不同共价连接为结合寡核苷酸提供对接位点。图3展示了PDoV如何被共轭的示意图。比如,位点①只能在配体如GalNAc或其它靶向配体的存在下反应,位点③只能在特定条件下与寡核苷酸和siRNA结合,如图10所示的例子。

[0092] 可替代地,PDoV可具有三个配体结合位点和多寡核苷酸位点(见图4):它是一个由组氨酸(H)、赖氨酸(K)、功能单元X和Y(氨基酸或功能连接物)的多个重复单元组成的(H<sub>n</sub>K<sub>m</sub>)<sub>o</sub>X<sub>p</sub>Y<sub>q</sub>肽骨架,其中n=1-10,m=1-10,o=1-10,p=1-5,q=1-5。HK重复单元已被证实具有良好的细胞穿透的能力,并可以促进内涵体释放,赖氨酸或各种功能单元X为用于结合配体的对接位点,Y为用于通过不同共价键结合寡核苷酸的对接位点。比如,位点①只能在配体如GalNAc或其它的靶向配体存在时反应,位点③只能在特定条件下与寡核苷酸和siRNA结合。见图4所示。

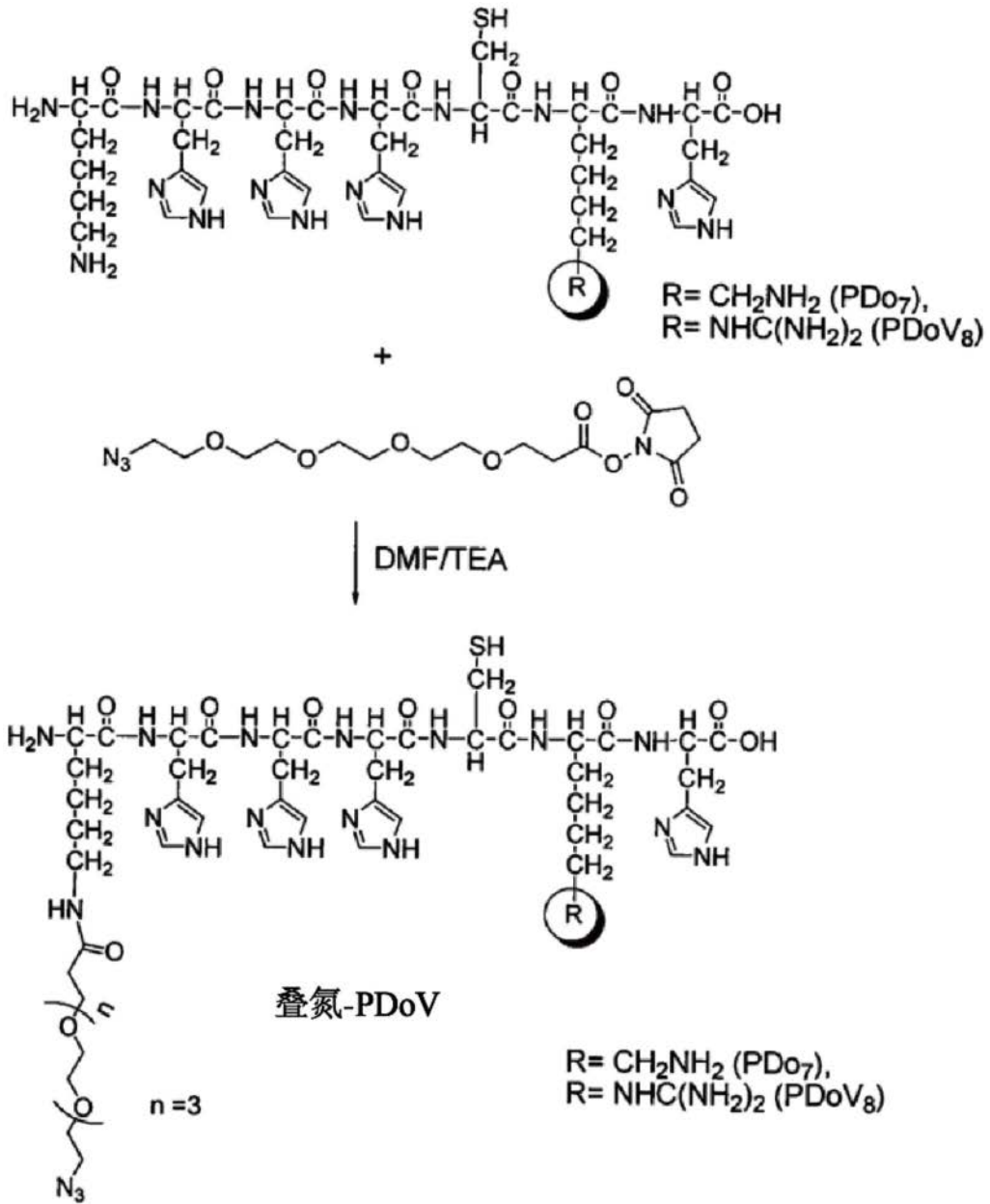
[0093] 在结构设计中,PDoV构建体是一个插入了多个结合位点X和Y的内涵体释放肽,位点X用于结合靶向配体,位点Y用于结合多个寡核苷酸或核酸。图5展示了PDoV构建体的一些示例,其中,A表示K、R、H、HH、HHH、HHHH、HHK、HHHK或其它短肽的序列,B表示K、R、H、HH、HHH、HHHH、HHK、HHHK或其它短肽的序列、其它氨基酸或氨基酸与连接物的组合,D表示寡核苷酸、siRNA、mRNA或适配体,RL表示配体,RS表示与寡核苷酸结合的连接物。在一些实施例中,肽的长度是5-15个氨基酸序列。

[0094] 在一些实施例中,PDoV具有如图6所示的结构。

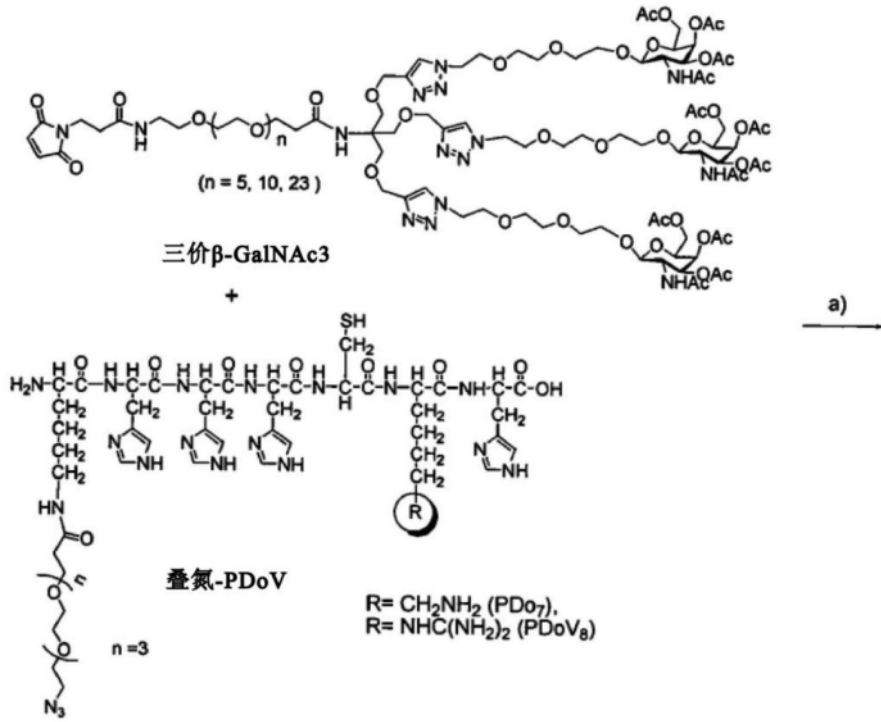
## 具体实施方案

[0095] 实施例1. siRNA-PDoV-配体化合物结构的代表性示意图实例,其中,一个或两个 siRNA可与PDoV肽结合。

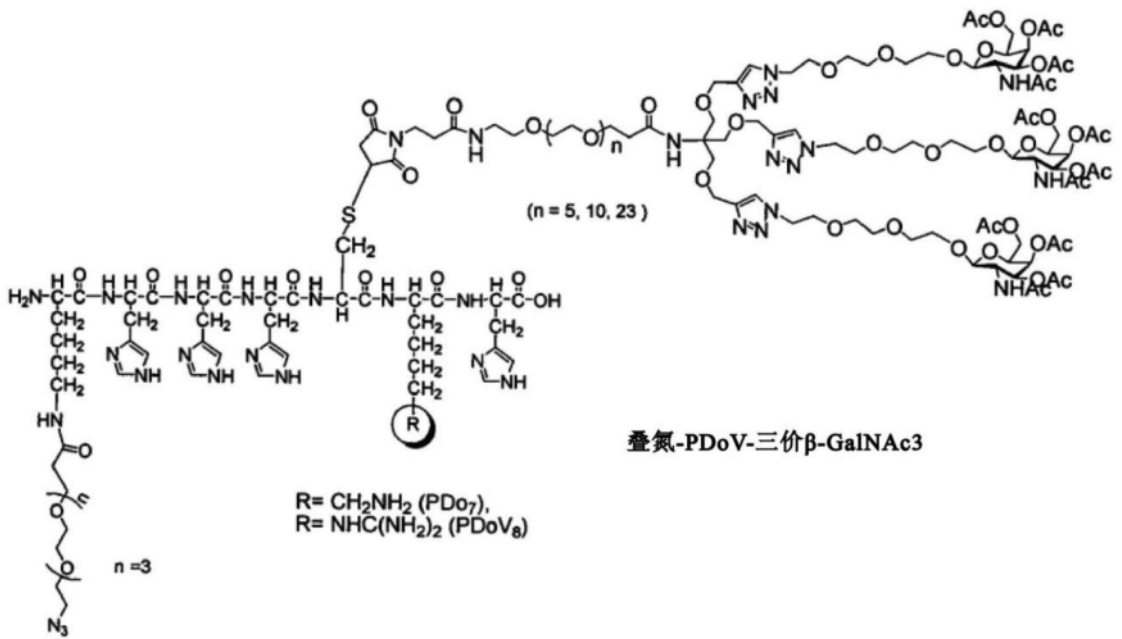
[0096] 步骤1. 肽的叠氮修饰



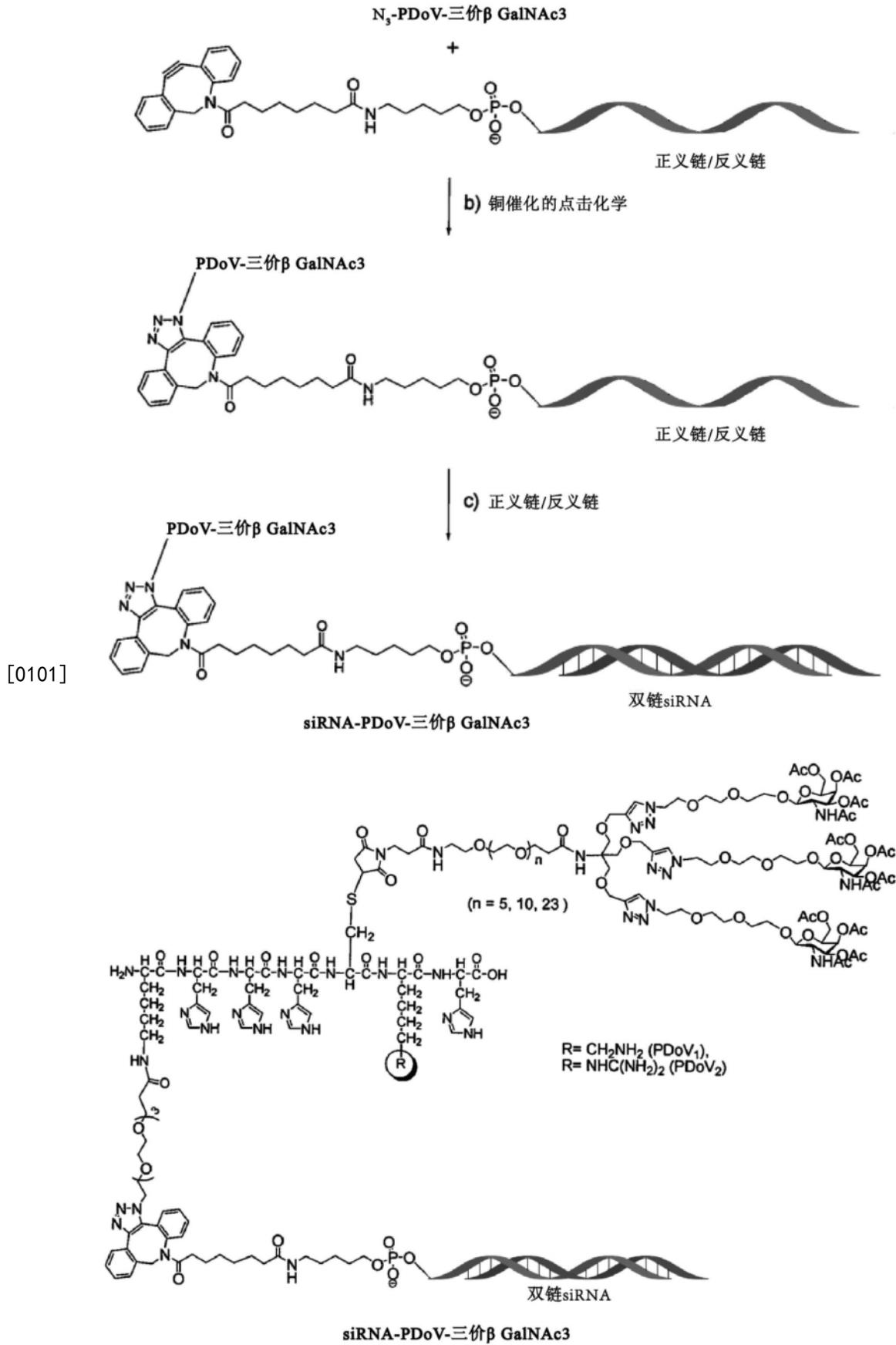
[0098] 步骤2. 靶向配体与肽的偶联



[0099]

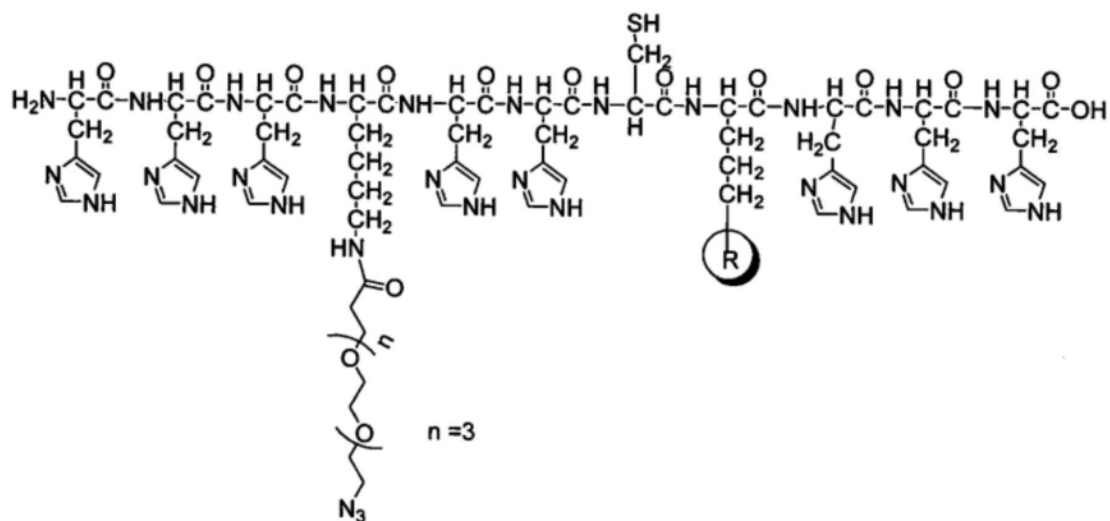
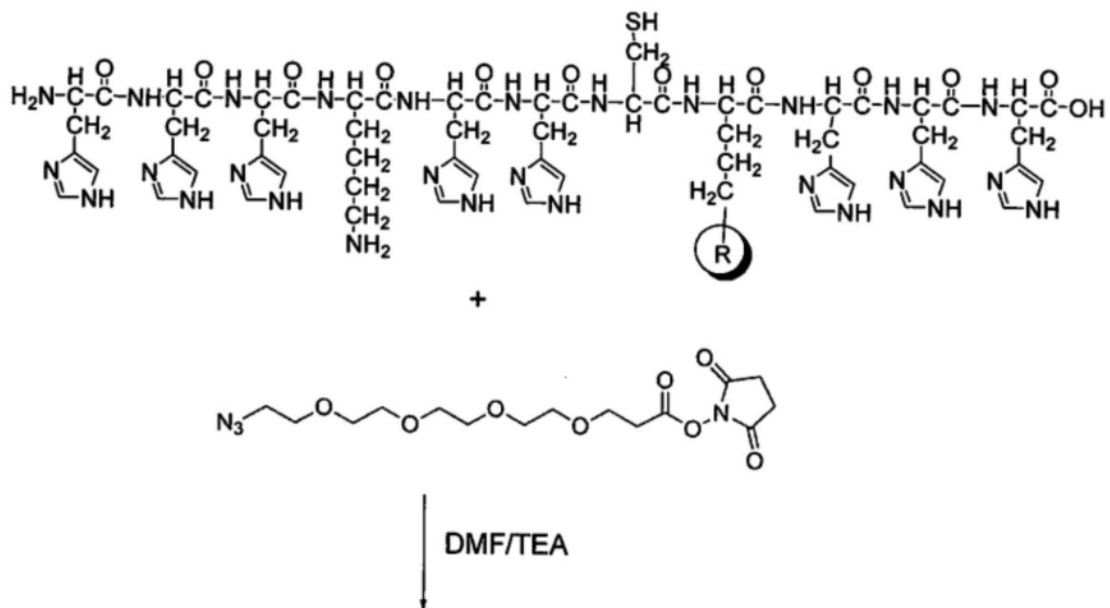


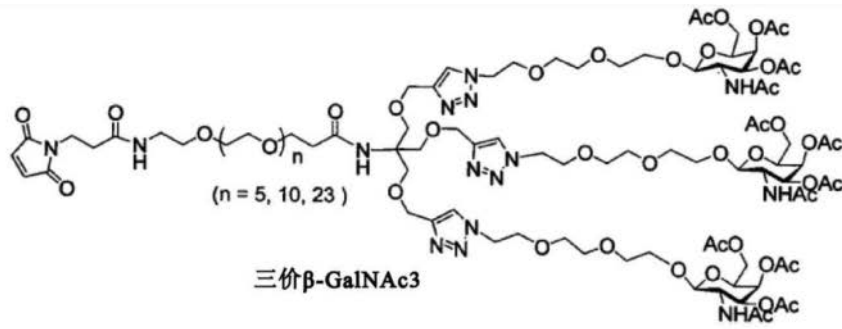
[0100] 步骤3和步骤4. 叠氮-PDoV-GalNAc3与寡核苷酸的偶联



[0102] 实施例2. siRNA-PDoV-配体结构的代表性示意图实例。

[0103] 步骤1. 肽的叠氮修饰

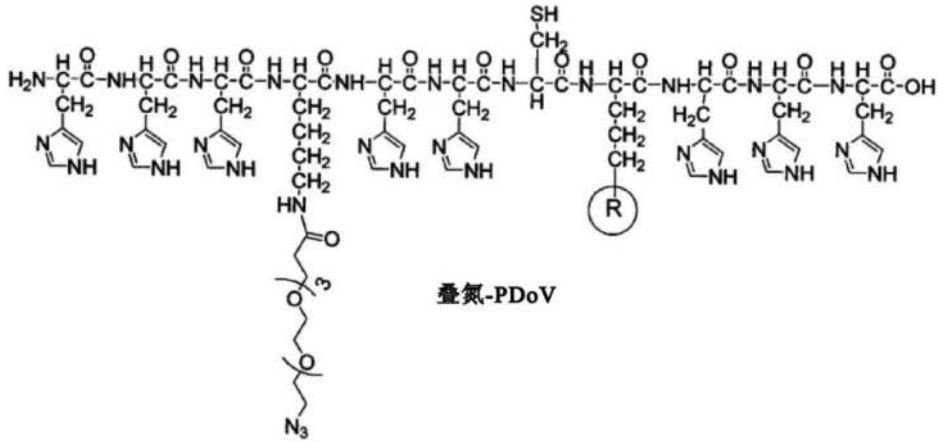




三价β-GalNAc3

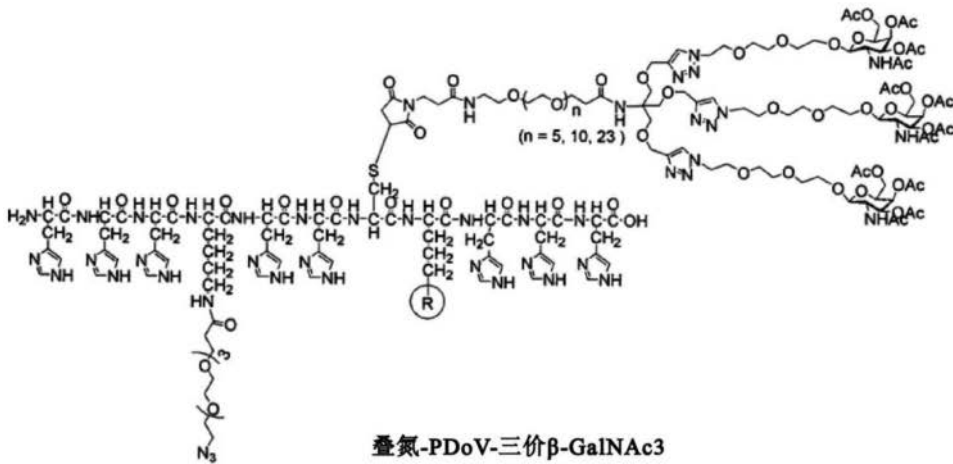
+

a)



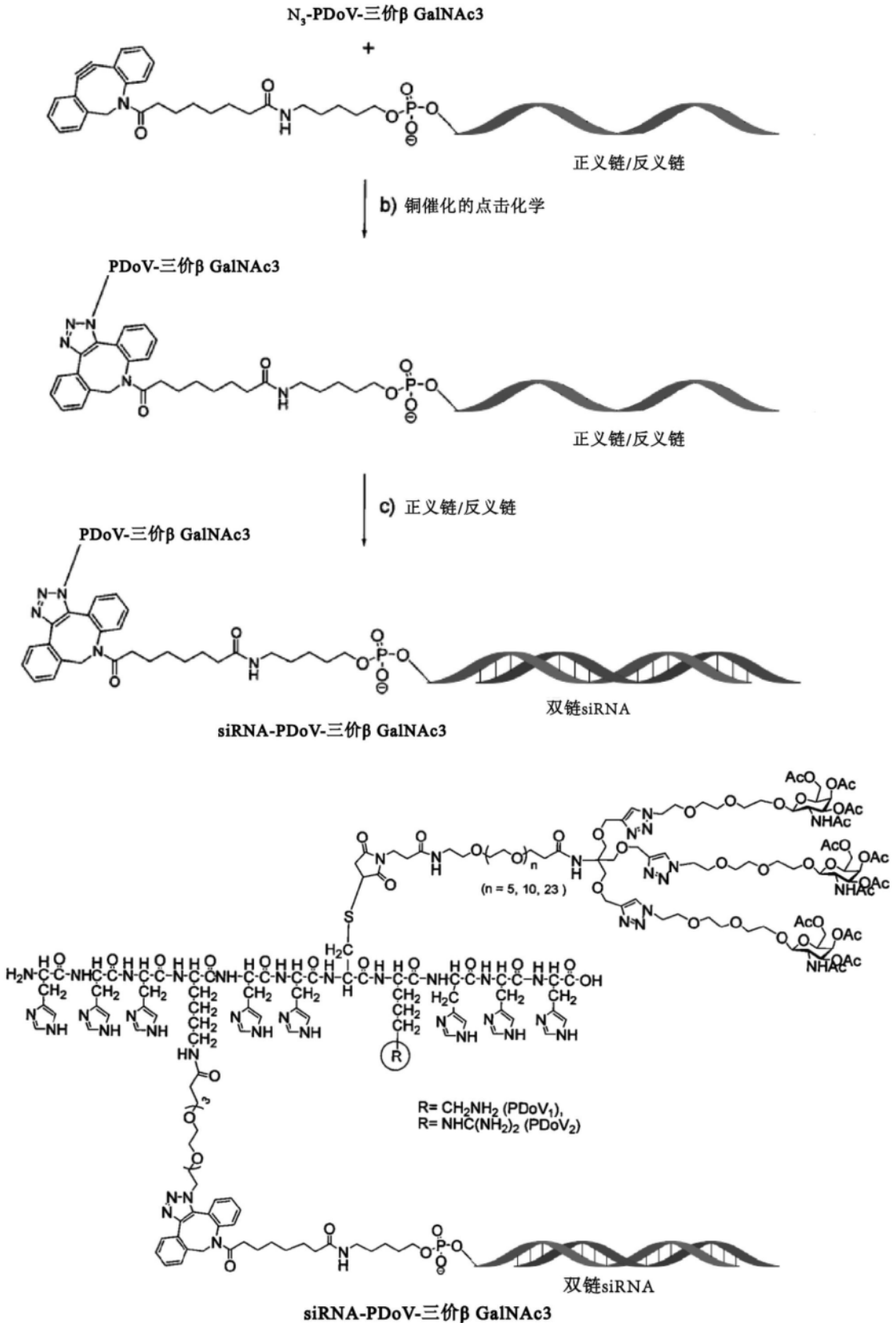
叠氮-PDoV

[0106]



叠氮-PDoV-三价β-GalNAc3

[0107] 步骤3和步骤4. 叠氮-PDoV-GalNAc3与寡核苷酸的偶联



[0108] 实施例3、

[0109] 叠氮-PDoV1 (1) 的合成与表征

[0110] 通过委托外包服务,使用序列中的标准氨基酸和赖氨酸-PEG4-N3修饰剂,自动肽合成仪合成了叠氮-PDoV肽(序列HHH {LYS (PEG4-N3)} HHCKHHH)。使用C-18反相HPLC对该肽

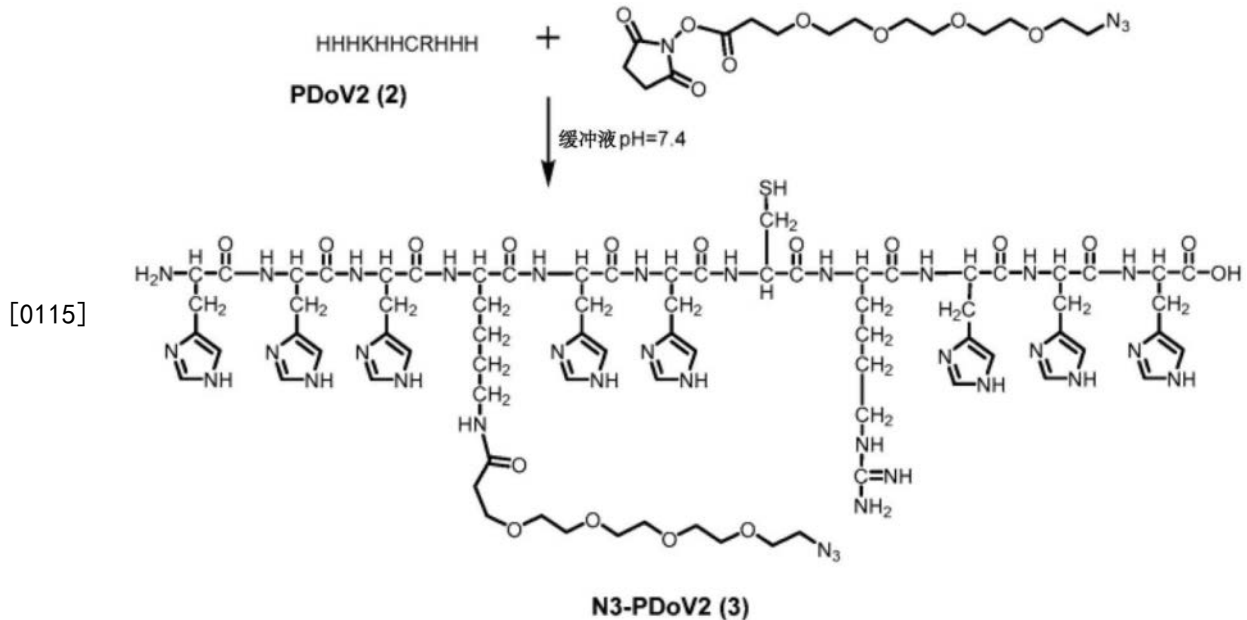
进行纯化,并用质谱和核磁共振氢谱( $^1\text{H}$  NMR)对其进行表征,分析数据与预期结构一致。

[0111] 实施例4、

[0112] PDoV2和叠氮-PDoV2的合成

[0113] PDoV2的合成,其序列为HHHKHHCRHHH。通过委托外包服务,使用序列中的标准氨基酸,自动肽合成仪合成了肽PDoV2(HHKHHCRRHHH)。使用C-18反相HPLC对该肽进行纯化,并用质谱对其进行表征,分析数据与预期结构一致。

[0114] 叠氮-PDoV2 (3) 的合成:



[0116] 叠氮连接物通过叠氮连接物的酯活化羧酸与PDoV2赖氨酸侧链的伯胺(2)之间形成酰胺键连接到肽对接载体2(PDoV2)上,形成化合物3。PDoV2肽HHKHHCRRHHH(42mg, 0.0280mmol)悬浮于1.0mL DMF中,加入三乙胺(39uL, 10eq),室温搅拌混合物20分钟。将叠氮-Peg4-NHS酯(54mg, 0.140mmol, 5eq)溶于20uL的DMF的溶液加入到反应混合物中,30分钟后反应混合物缓慢变为透明溶液,于室温下继续搅拌16小时。通过PDoV2完全转化的HPLC图监测反应混合物的TLC图(图1)。

[0117] 反应混合物用水(200uL)淬冷,用旋转蒸发器进行浓缩,通过半制备RP-C18柱的HPLC,使用梯度为10-90%的缓冲液B(0.1%三氟乙酸乙腈溶液),对粗提物进行纯化。叠氮-PDoV2(2)作为主要产品被分离出来,保留时间为10.5~11.5分钟。样品馏分经冻干得到化合物2的透明残油(44mg, 收率88%)。其质子和质谱分析结果如下: $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 图2)  $\delta$ 8.74(brd d, 8H)和 $\delta$ 7.35(brd d, 8H)与在 $\delta$ 6.00ppm以上的肽段中的8个组氨酸四唑相关的芳香氢一致。 $\delta$ 4.75-4.30(brd t, 11H)处所有11个氨基酸 $\alpha$ 碳上的次甲基氢、 $\delta$ 3.9-3.75(m, 100H)处与聚乙烯基团相关的乙烯氢; $\delta$ 3.6-2.75(m, 53H)和 $\delta$ 1.8-1.3(m, 12H)乙烯氢与赖氨酸、精氨酸和半胱氨酸的侧链质子相关。总的来说,在非芳香族区域观察到104个氢,多出41个氢,这些多余的氢相当于2个叠氮peg4基团。NMR数据与ESI-MS数据一致:预测m/z为1775.9Da、观察m/z为2323.5Da(图3),观察到的质量电荷比比预测值多547.6Da单位,多出的质量单位与两个叠氮-连接物的质量一致。

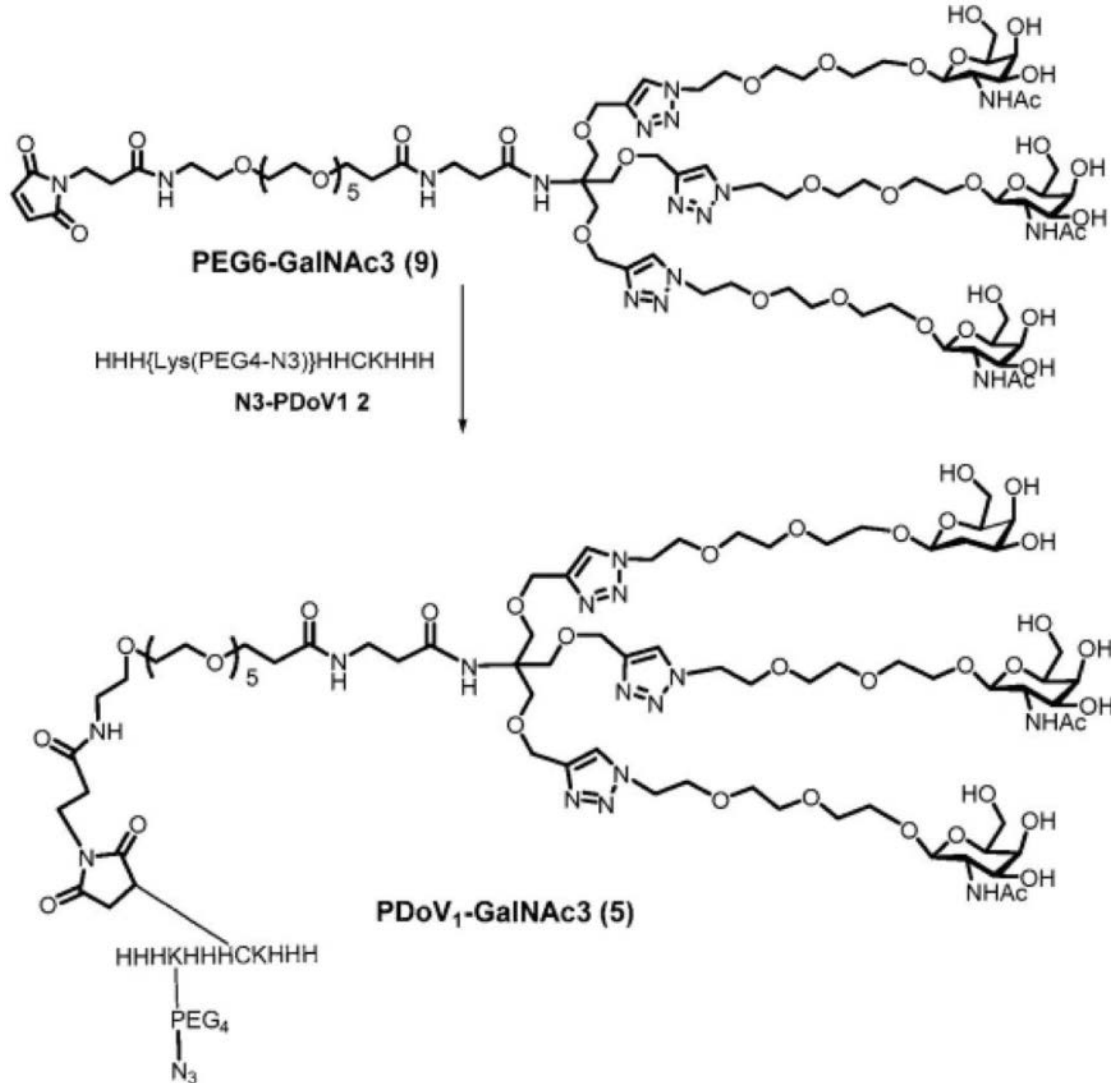
[0118] 实施例5、

[0119] 叠氮-PDoV3肽(4)的合成与表征

[0120] 使用序列中的标准氨基酸和赖氨酸-PEG4-N3修饰剂,通过固相自动合成法合成叠氮-PDoV3肽(序列({Lys(PEG4-N3)})HHHCHH)。采用C-18反相HPLC对该肽进行纯化,并用质谱和<sup>1</sup>H NMR对其进行表征,分析数据与预期结构一致。

[0121] 实施例6、

[0122] PDoV1-GaINAc3(5)的合成与表征



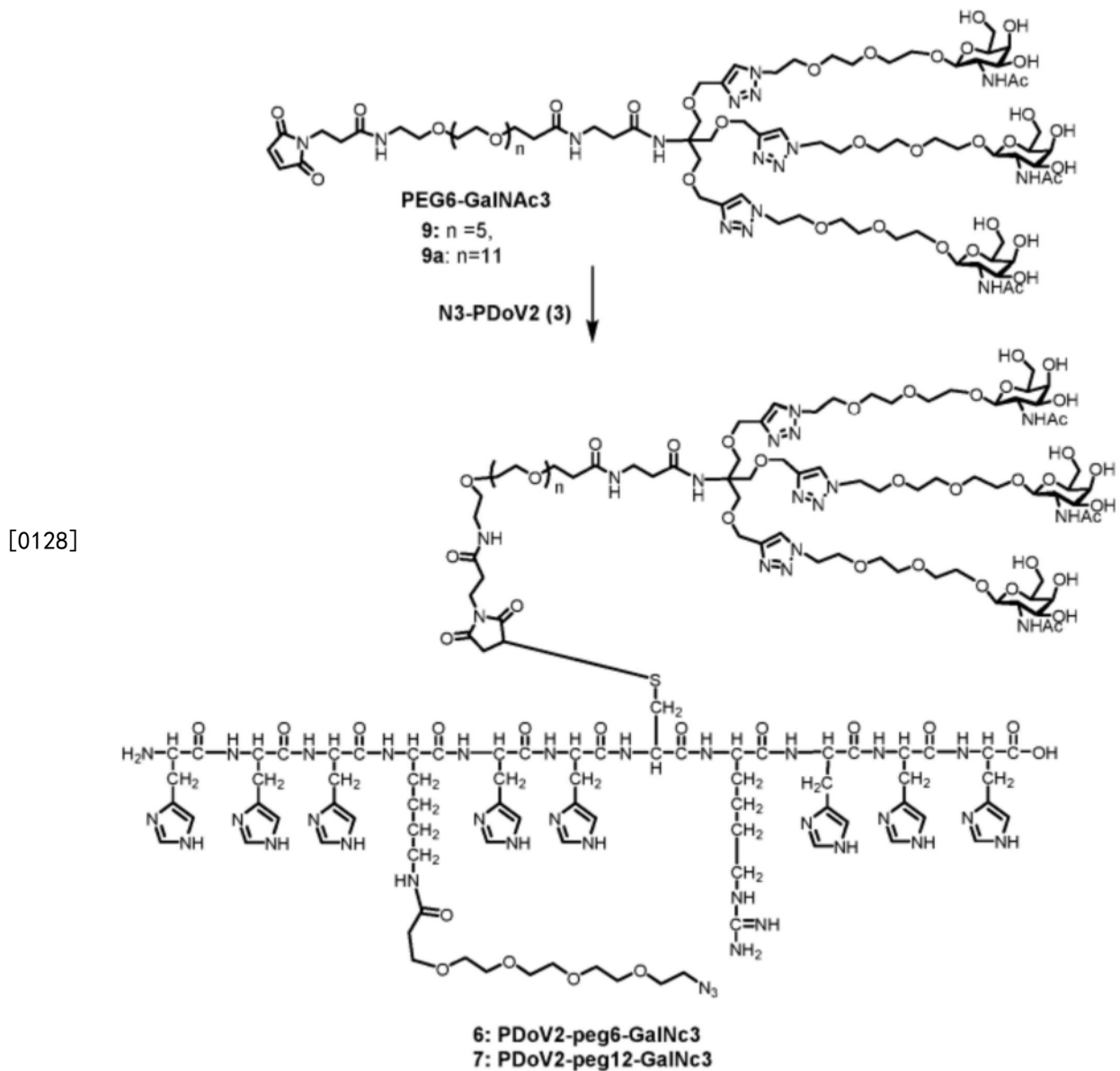
[0123]

[0124] 方案1:合成PDoV1-GaINAc3(5)

[0125] 将干燥DMF(400uL)中的PEG6-GaINAc3(9)(3.0mg,1.56μmol)添加至含有PDoV1 2(3.54mg,2.03μmol)的N3-磷酸盐缓冲液(1mL,pH=7.4)中,所得混合物在氮气环境下于25℃搅拌过夜。减压除去溶剂后,样品脱盐并通过PD-10柱进行纯化,得到纯品PDoV1-GaINAc3 5(5.1mg,白色固体,收率90%)。通过HPLC,使用反相C18柱和0.1%三氟乙酸乙腈溶液梯度洗脱对产品进行分析,保留时间Rt=4.877min,纯度大于90%。质谱分析(ESI,正离子模式):C<sub>154</sub>H<sub>240</sub>N<sub>48</sub>O<sub>55</sub>S计算值为3673.7,观察值为3674.8。

[0126] 实施例7、

[0127] PDoV1-GaINAc3 6和7的合成与表征



[0129] 方案2:PDoV2-连接物-GalNc3的制备

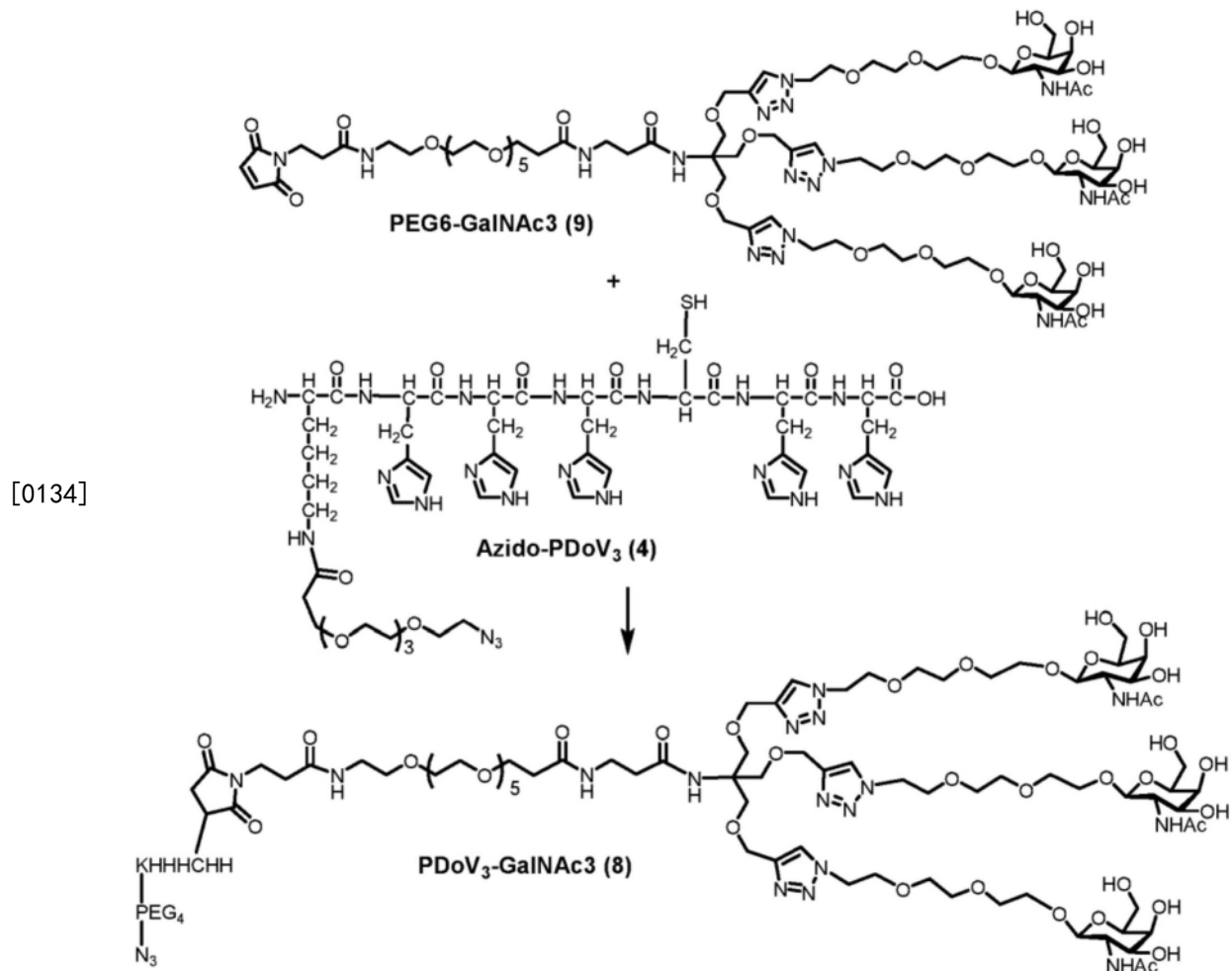
[0130] PDoV2-Peg6-GalNc3 (化合物6) 的制备: 将亲核试剂、化合物2 (49.8mg, 0.0243mmol) 溶解在pH为7.4的1.0mL脱气PBS缓冲液中, 三价GalNc3配体(9) (30.8mg, 0.0160mmol) 溶解于400uL的干燥DMF中。在干燥氩气下反应混合物再次脱气, 并在室温下搅拌过夜。反应混合物用水(100 $\mu$ L)淬灭, 然后按照Glen Research推荐的指南, 用1.0 $\mu$ mol Sephadex Nap柱脱盐。将洗脱液冻干, 通过半制备RP-C18柱的HPLC, 使用梯度为10-90%的缓冲液B(0.1%三氟乙酸乙腈溶液)对粗提物进行洗脱(图7)。产品保留时间为4.0min, 并作为油状物被分离出(39mg, 产率60%)。经修饰的寡核苷酸的质谱分析证实了PDoV2-peg6-GalNc3构建体的合成是成功的。

[0131] PDoV2-Peg12-GalNc3 (化合物7) 的制备: 化合物7叠氮-PDoV2 (4.9mg, 2.74 $\mu$ mol) 溶解在pH为7.4的1.0mL脱气PBS缓冲液中。将GalNc3配体 (3.0mg, 1.37 $\mu$ mol) 溶解于400uL的干燥DMF中。在干燥氩气下反应混合物再次脱气, 并在室温下搅拌一夜。反应混合物用水(100 $\mu$ L)淬灭, 然后按照Glen Research推荐的指南用1.0 $\mu$ mol Sephadex Nap柱脱盐。将洗脱液冻干, 通过半制备RP-C18柱的HPLC, 使用梯度为10-90%的缓冲液B(0.1%三氟乙酸乙

睛溶液)对粗提物进行洗脱(图4)。该产品作为主要产品形成,保留时间为4.2分钟,分离为白色粉末(4.4mg,收率81%)。质子NMR和MS分析:  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.94 (s, 3H, 三唑),  $\delta$  8.57-8.719 (m, 18H, 8组氨酸芳香烃),  $\delta$  4.75-4.30 (m, 14H, 氨基酸),  $\delta$  4.5 (d, 3H, 半乳糖),  $\delta$  2.05 (s, 9H)。NMR数据与ESI-MS数据一致。ESI-MS (正离子模式,  $m/z$ ):  $\text{C}_{168}\text{H}_{268}\text{N}_{50}\text{O}_{61}\text{S}$  计算值为3968.2, 观察值为3968.2。

[0132] 实施例8、

[0133] PDov3-GalNAc3(8)的合成



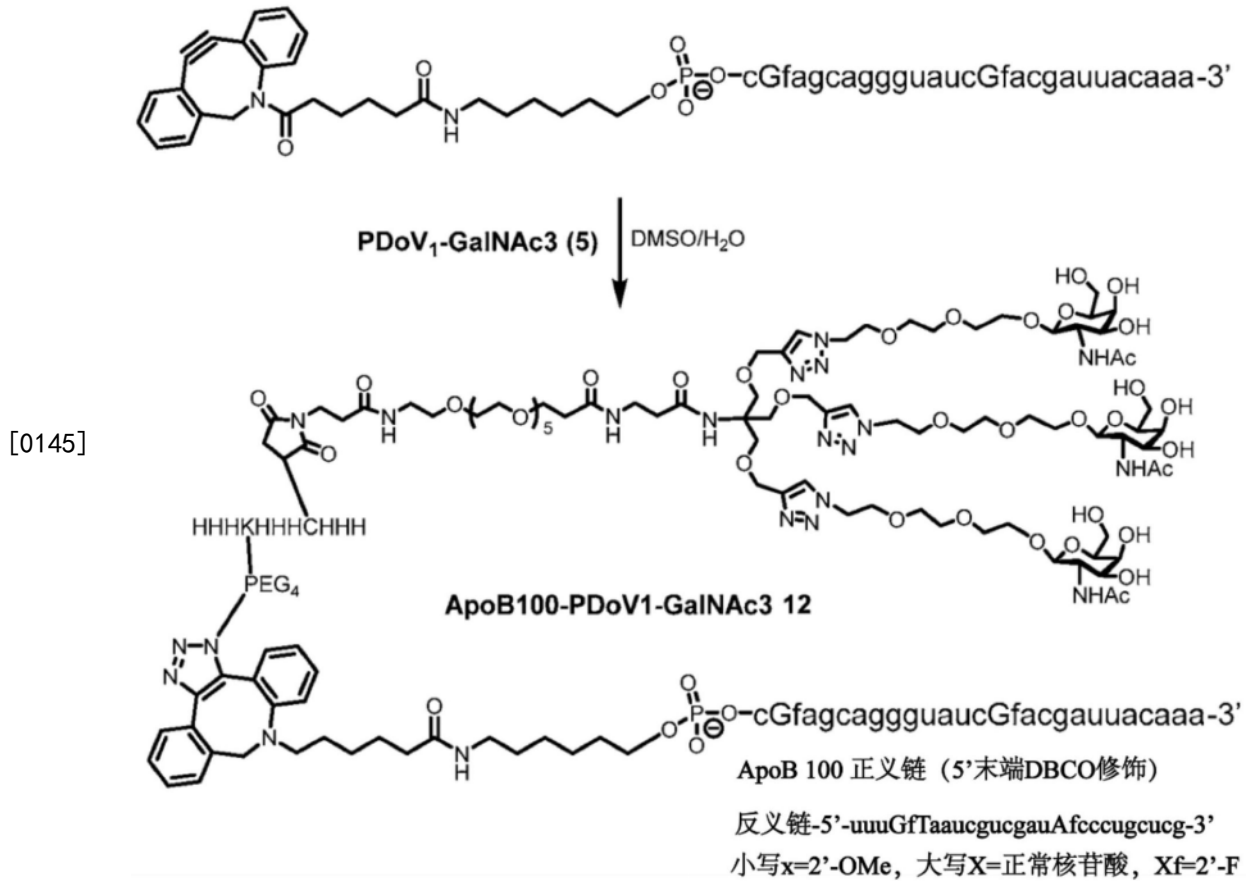
[0135] 方案3:PDov3-GalNAc3(8)的合成

[0136] PDov3-GalNAc3 (化合物8)的合成:  $25^\circ\text{C}$ , 氮气条件下, 将含有化合物4叠氮-PDov3 (47.0mg,  $38.9\mu\text{mol}$ ) 的DMF (1.5mL) 加入含有三价GalNAc (9) (50.0mg,  $25.9\mu\text{mol}$ ) 的磷酸缓冲液 (4mL, pH7.4) 的混合物中。由此产生的反应混合物在  $25^\circ\text{C}$  下搅拌12小时。通过HPLC监测反应, 直到GalNAc9被完全消耗。通过冻干除去溶剂, 用凝胶渗透柱色谱仪PD-10柱纯化粗提物, 得到纯品PDov3-GalNAc3化合物8 (70mg, 产率86.4%)。通过反相C-18柱的HPLC, 使用梯度为10-90%的缓冲液B (0.1%三氟乙酸乙腈溶液) 进行梯度洗脱, 保留时间  $R_t = 5.038$  分钟。MS (ESI, 正离子模式), 式  $\text{C}_{130}\text{H}_{207}\text{N}_{37}\text{O}_{51}\text{S}$  的分子质量为3134.45, 观察值为3136.35, 分析数据均与预期结构一致。

[0137] 实施例9、

[0138] 对照3-GalNAc3(11)的合成



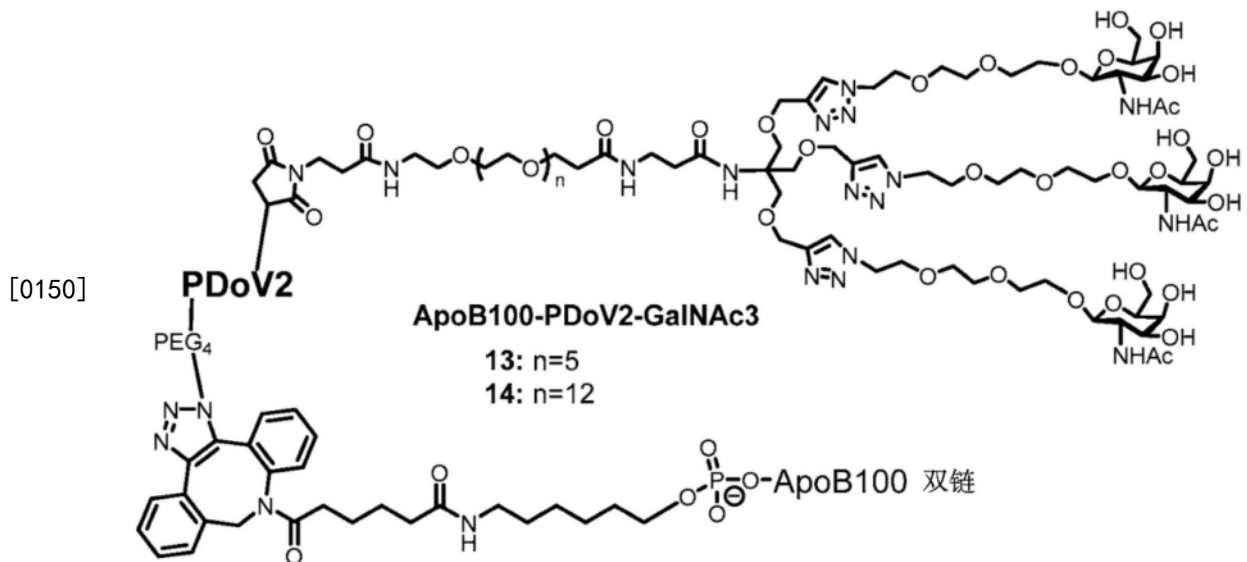


[0146] 方案5. ApoB100-PDoV1-GalNAc3 (12) 的合成

[0147] 将含有PDoV1-GalNAc3 5 (381 $\mu$ g, 0.104 $\mu$ mol) 的DMF (95 $\mu$ L) 加入含有ApoB100-正义链-5'-DBCO (500 $\mu$ g, 0.06.9 $\mu$ mol) 的无水RNase (250 $\mu$ L) 溶液中, 将得到的混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌2小时。减压除去溶剂后, 用Glen Gel PaK柱色谱仪纯化粗提物, 提供纯品ApoB100-PDoV3-GalNAc3化合物12 (0.66mg, 收率88%)。HPLC在PA200离子交换柱上进行, 使用pH=11的磷酸盐缓冲液,  $R_t = 13.015$ 分钟, 纯度>85%。MS (ESI, 正离子模式), 式 $C_{388}H_{510}N_{125}O_{208}P_{22}S$ 的计算值为10911.66, 观察值为10929.3 [M+H<sub>2</sub>O]。在与ApoB100反义链进行1:1退火 (95 $^{\circ}$ C 5分钟, 以1 $^{\circ}$ C/分钟左右的速度冷却到室温, 然后在-20 $^{\circ}$ C下保存) 后, 得到了最终的共轭双链ApoB100-PDoV1-GalNAc3 (12)。通过用染料标记的反义链ApoB100-Alexa647 (5'-uuuGfTaaucgucgauAfcccugcucg-Alexia647-3') 替换ApoB100反义链制得染料Alexa647标记的ApoB100-PDoV1-GalNAc3。通过HPLC和MS对该产品进行了表征, 分析数据都与预期结构一致。

[0148] 实施例11、

[0149] ApoB100-PDoV2-GalNAc3的合成与表征

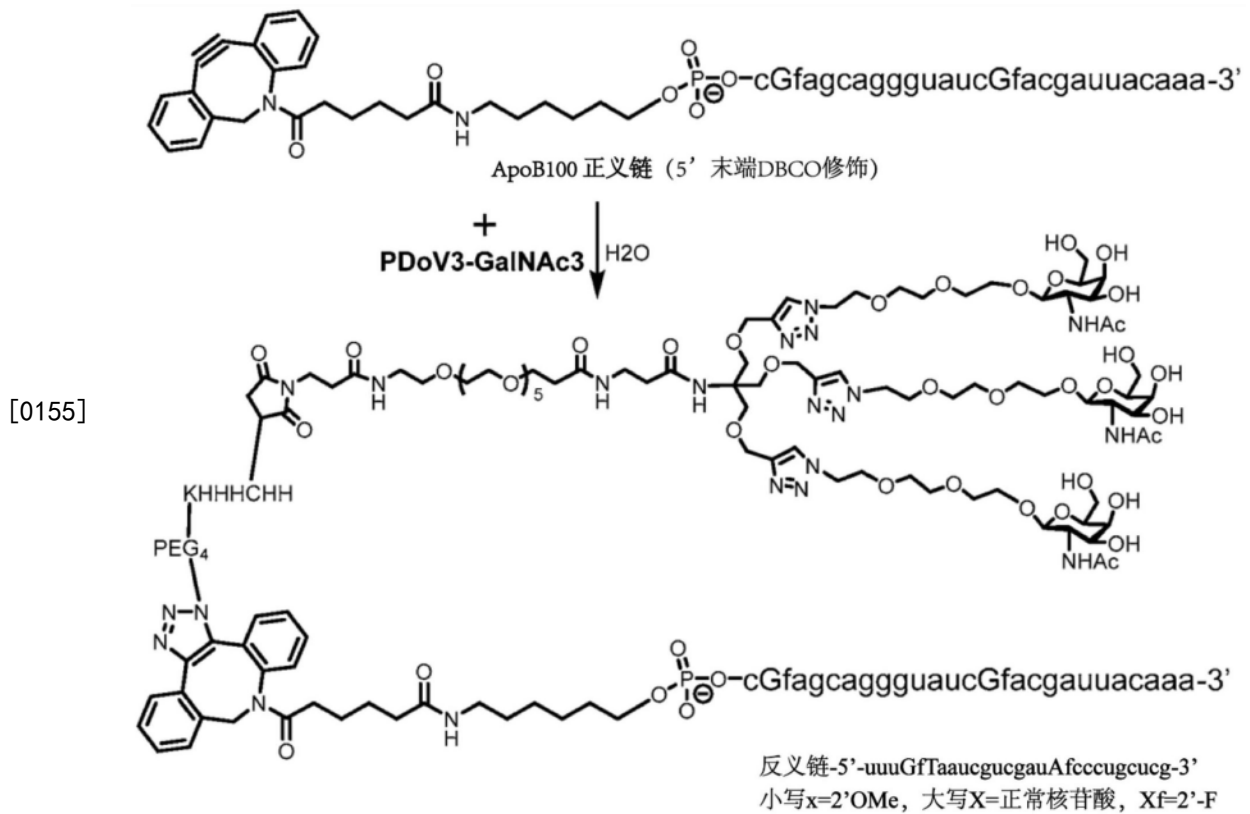


[0151] 通过PDoV2-GalNAc (6, 或7, 0.0341 $\mu$ mol, 1.5equiv.) 与ApoB100-SS-5' C6NHS (DBCO) (0.0227 $\mu$ mol) 反应制备ApoB100-PDoV2-GalNAc3 13, 其制备方法与ApoB100-PDoV1-GalNAc3 12的制备方法类似。首先, 将叠氮-PDoV2-GalNAc溶解在DMSO中, 比例为每150 $\mu$ L的DMSO中溶1mg叠氮化物; 其次, 将所得的叠氮化物溶液加入到含100D的5'-DBCO标记寡核苷酸的100 $\mu$ L无水的RNase中, 反应溶液混合物在室温下孵育3-4小时; 然后在Glen Gel-Pak<sup>TM</sup> 脱盐柱上脱盐, 以去除有机溶剂和任何未结合的肽。举个例子, 当PDoV2-PEG12-GalNAc 7是反应物时, 最终的ApoB100-PDoV2-GalNAc3 14为白色固体, 产率为77%。HPLC在PA200离子交换柱上进行, 使用pH=11的磷酸盐缓冲液, Rt=12.077分钟, 纯度>85%。MS (ESI, 正离子模式) 计算值为11551.4, 观察值为11553.5。在与反义链进行1:1退火 (95 $^{\circ}$ C 5分钟, 以1 $^{\circ}$ C/分钟左右的速度冷却到室温, 然后在-20 $^{\circ}$ C下保存) 后, 得到了最终的共轭双链ApoB100-PDoV1-GalNAc3 (14)。

[0152] 通过用染料标记的反义链 ApoB100-Alexa647 (5'-uuuGfTaaucgucgauAfcccugcucg-Alexia647-3') 替换ApoB100反义链制得染料Alexa647标记的ApoB100-PDoV1-GalNAc3。通过HPLC和MS对该产品进行了表征, 分析数据都与预期结构一致。

[0153] 实施例12、

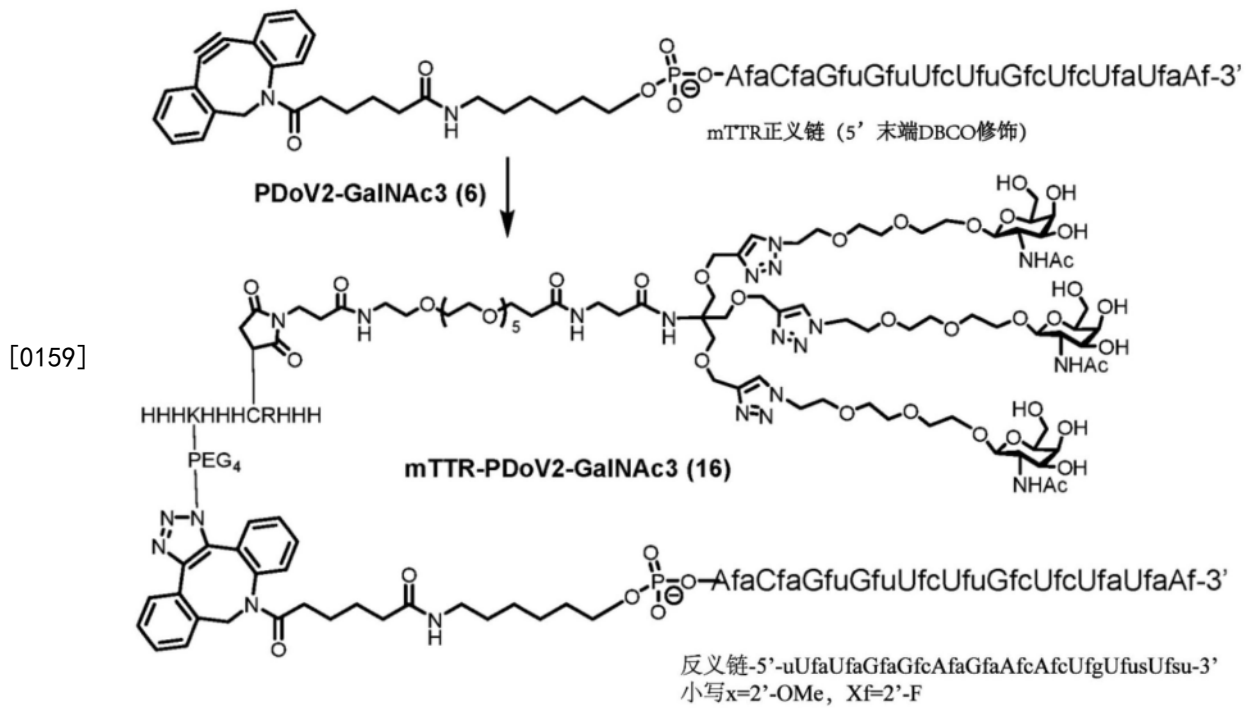
[0154] ApoB100-PDoV3-GalNAc3 15的合成与表征



[0156] 将PDoV3-GalNAc3 8 (150 $\mu\text{g}$ , 0.148 $\mu\text{mol}$ ) 加入到含有5'-DBCO-C6HN-APOB100正义链 (230.7 $\mu\text{g}$ , 0.0319 $\mu\text{mol}$ ) 的无水RNAse (200 $\mu\text{L}$ ) 中。该混合物在25 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌3小时, 冻干除去溶剂后, 用Glen GeI Pak柱纯化粗提物, 得到纯品化合物15正义链ApoB100-PDoV3-GalNAc3 (298 $\mu\text{g}$ , 收率90%)。HPLC在PA200离子交换柱上进行, 使用pH=11的磷酸盐缓冲液,  $R_t$  = 12.002分钟, 纯度>89%。与反义的1:1退火 (95 $^{\circ}\text{C}$  5分钟, 以大约1 $^{\circ}\text{C}$ /分钟的速度冷却到室温, 然后在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下储存) 提供了最终的双联体ApoB100-PDoV3-GalNAc3。在与反义链进行1:1退火 (95 $^{\circ}\text{C}$  5分钟, 以1 $^{\circ}\text{C}$ /分钟左右的速度冷却到室温, 然后在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存) 后, 得到了最终的共轭双链ApoB100-PDoV1-GalNAc3。通过用染料标记的反义链ApoB100-Alexa647 (5'-uuuGfTaaucgucgauAfcccugcucg-Alexia647-3') 替换ApoB100反义链制得染料Alexa647标记的ApoB100-PDoV1-GalNAc3。通过HPLC和MS对该产品进行了表征, 分析数据都与预期结构一致。

[0157] 实施例13、

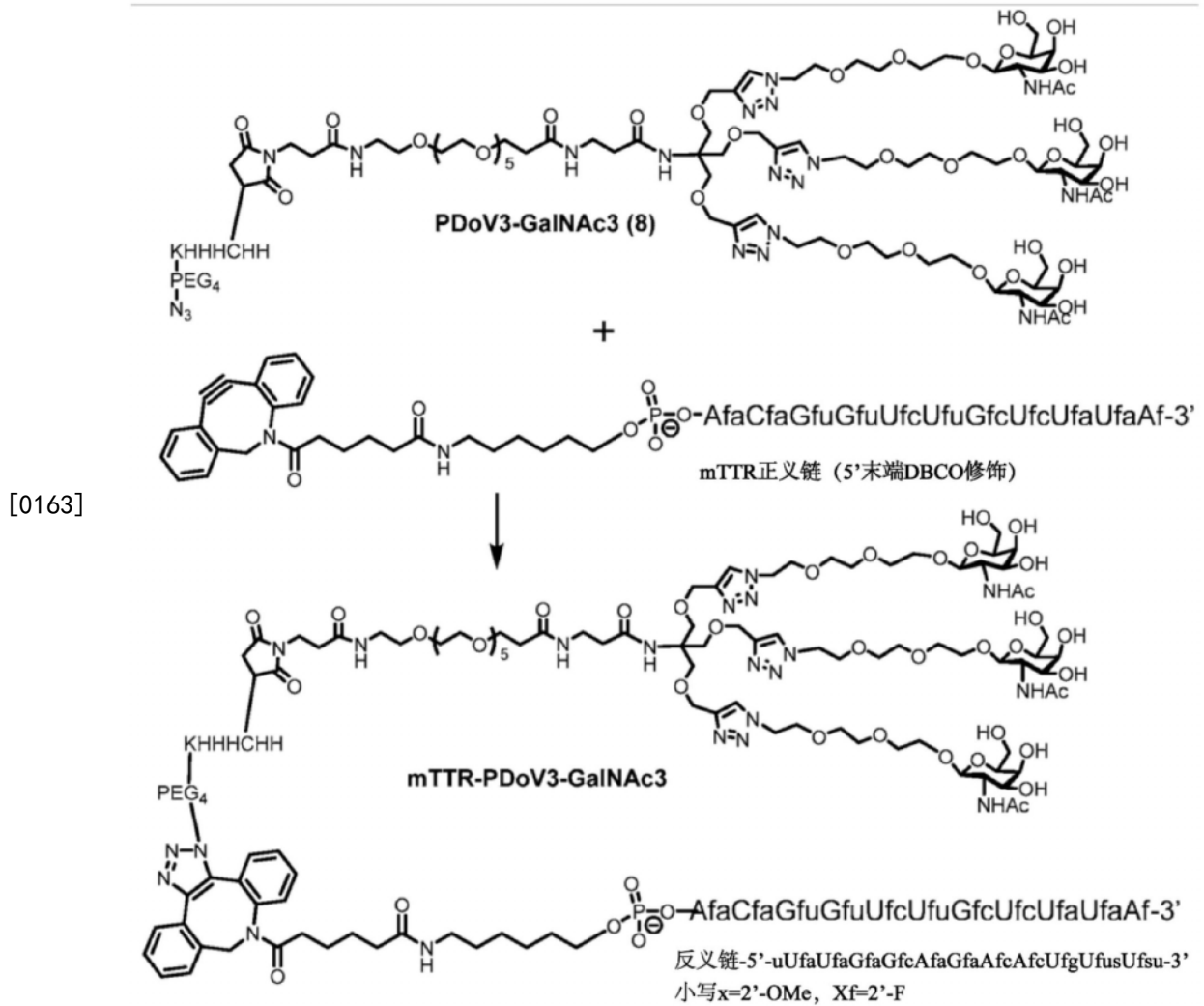
[0158] mTTR1-PDoV2-GalNAc3 16的合成与表征



[0160] 通过使用PDoV2-peg6-GalNAc 6 (0.547mg, 0.1374 $\mu$ mol) 和含有DBCO标记的mTTR1正义链 (0.5mg, 0.0687 $\mu$ mol) 的DMSO/水溶剂, 按照与合成mTTR1-PDoV3-GalNAc3类似的步骤制备mTTR1-PDoV2-GalNAc3。通过凝胶渗透柱色谱仪G25柱纯化粗提物得到纯品, 收率约为78%。在与反义链进行1:1退火 (95 $^{\circ}$ C 5分钟, 以1 $^{\circ}$ C/分钟左右的速度冷却到室温, 然后在-20 $^{\circ}$ C下保存) 后, 得到了最终的共轭双链mTTR1-PDoV2-GalNAc3 (16)。

[0161] 实施例14、

[0162] mTTR1-PDoV3-GalNAc3 17的合成与表征



[0164] 将含有PDoV3-GalNAc3 8 (996 $\mu\text{g}$ , 0.317 $\mu\text{mol}$ )的DMSO (99.6 $\mu\text{L}$ )溶液加入到含有mTTR1-正义链-5-DBCO (1.54mg, 0.212 $\mu\text{mol}$ )的无水RNAse (100 $\mu\text{L}$ )中。由此产生的混合物在25 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌2小时。减压除去溶剂后,用凝胶渗透柱色谱仪PD-10柱纯化粗提物,得到纯品正义链mTTR1-PDoV3-GalNAc3化合物17 (1.9mg, 产量85%)。HPLC在PA200离子交换柱上进行,使用pH=11的磷酸盐缓冲液,  $R_t$ =14.744分钟,纯度>85%。与反义链进行1:1退火 (95 $^{\circ}\text{C}$ 5分钟,以1 $^{\circ}\text{C}$ /分钟左右的速度冷却至室温,然后在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存)后,得到最终的共轭双链mTTR1-PDoV3-GalNAc3。

[0165] 实施例15、

[0166] ApoB100-PDOVn-GalNAc3偶合体的体外研究:

[0167] 采用Alexa647标记的siRNA-GalNAc偶合体 (ApoB100-PDOV1-GalNAc3-Alexa647, ApoB100-PDOV2-GalNAc3-Alexa647, ApoB100-PDOV2-GalNAc3-Alexa647)进行体外细胞吸收实验,其中Lipofectamine递送的Alexa 647标记的siRNA作为对照组。在转染实验中,采用ASGPR过表达的HepG2细胞和Huh7细胞与野生型细胞进行比较。5000个细胞接种于96孔板中过夜,用50nM的siRNA转染细胞2小时、24小时和48小时后,使用Hoechst染料对细胞核进行染色,在PBS中的Cytation成像站对细胞进行成像,图像以 $\times 20$ 放大率拍摄。获得的数据显示,ASGPR过表达的HepG2细胞比缺乏ASGPR过表达的野生型HepG2细胞对荧光标记物质的摄取量大得多。

[0168] 与没有ASGPR受体过表达的Huh7细胞相比,ASGPR过表达的Huh7细胞也显示出更大的吸收量,但其标记没有野生型HepG2细胞那么强烈。

[0169] PDoV1和PDoV2都证实了标记的siRNA递送至ASGPR过表达的HepG2细胞,但对野生型细胞的标记却很少或没有。在构建体上没有GalNac的情况下,我们没有看到ASGPR过表达的细胞有任何摄取。

[0170] 在随后的实验中,我们检查了PDoV1、PDoV2和PDoV3在ASGPR过表达的Huh7中的递送情况。与野生型细胞相比,PDoV2和PDoV3显示了对这些细胞的一些特异性吸收。PDoV1也显示了对这些细胞的一些递送,但不如PDoV2和PDoV3大,PDoV2在接触24小时后显示了明显的吸收。

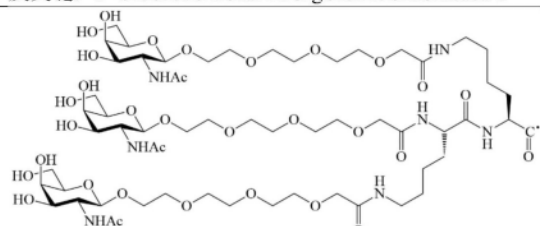
[0171] 实施例16、

[0172] mTTR-PDoVx-GalNac在原发性小鼠肝细胞中的体外研究:

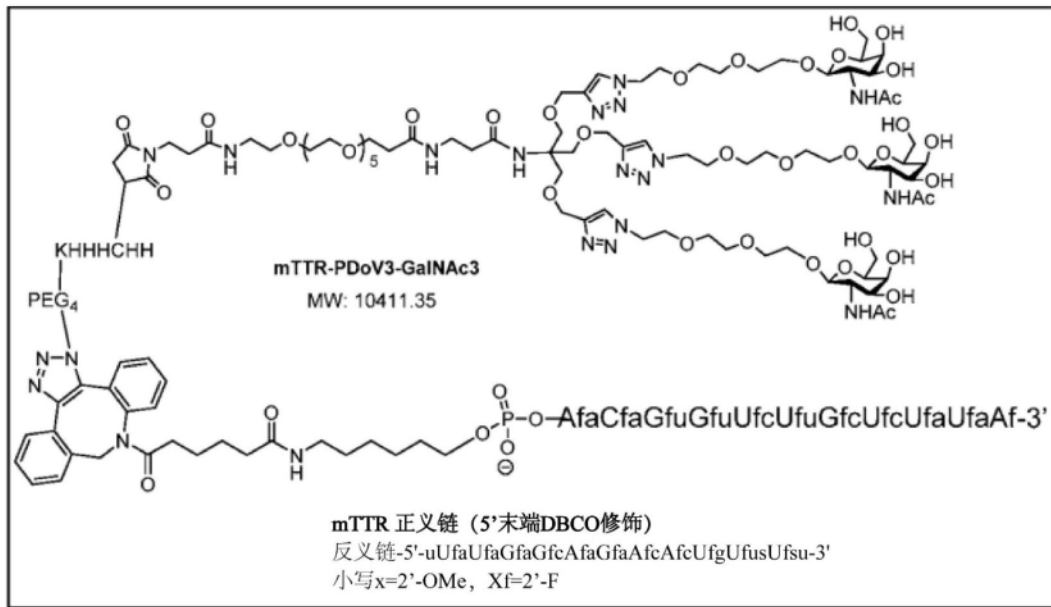
[0173] 使用原发性小鼠肝细胞对靶标TTR进行GalNac偶合的siRNAs (mTTR1-PDOV3-GalNac3,mTTR1-PDoV2-GalNac3,mTTR2-GalNac3阳性对照,mTTR2-GalNac3阳性对照)的剂量响应筛选。细胞密度为40000细胞/96孔,浓度从最高1 $\mu$ M 5倍稀释至最低3pM,细胞通过直接孵化72小时进行转染。通过bdNA检测读出数据,数据由XLfit软件进行分析。TTR信号归一化为gapdh,四次重复的平均值,模拟处理的细胞设置为1,XLfit用于计算IC50值。所用的原发性肝细胞购自德国Primacyt公司(批号MH181219),来自CD1小鼠,解冻后立即用siRNA处理。

[0174] 两个siRNA都是在3'端与三价GalNac簇结合,mTTR2siRNA序列是一个完全修饰的序列,在寡核苷酸上比mTTR1多了4个额外的PS连接物修饰。(奈尔等,美国化学学会杂志。136:16958-16961(2014))。Aha1-GaNAc3阳性对照被用作标准对照,针对管家ahsa1。将细胞裂解物与筛选目标或ahsa1特异性探针杂交,将其用作阴性和阳性对照。表e1列出了两个对照的siRNA序列和GalNac簇的结构。

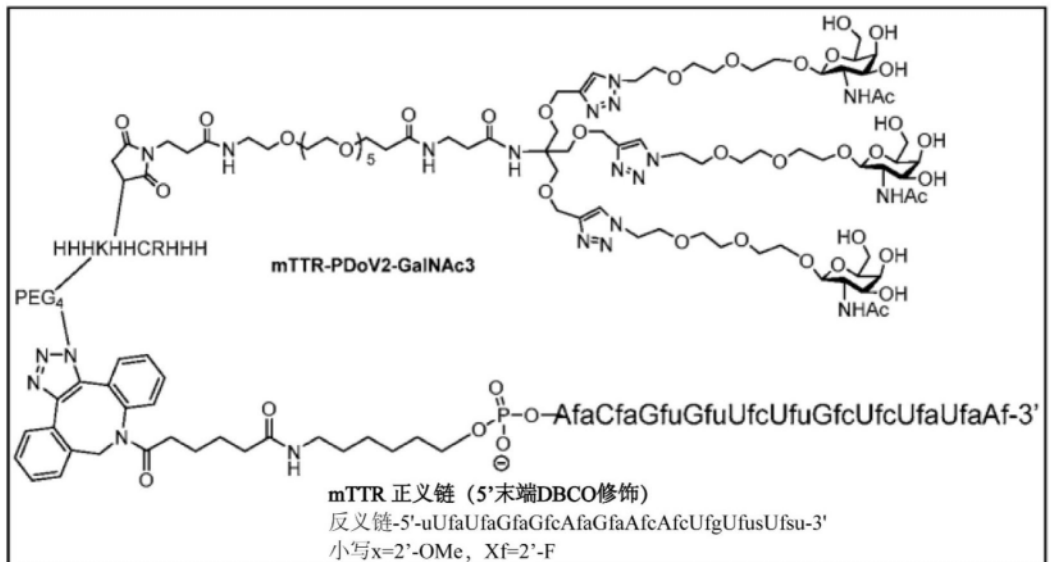
[0175] 表e1.对照的siRNA序列和靶标。

偶合体	靶标	序列
mTTR2-GaNAc3 阳性对照	鼠 TTR	正义链: AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf(NHC6)(GalNac3)-3' 反义链: 5'-usUfsaUfaGfaGfcAfaAfaAfcAfcUfgUfususu-3'
Aha1-GaNAc3 阳性对照	AHSA1	正义链: 5'-uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfgAfaAf(NHC6)(GalNac3)-3' 反义链: 5'-UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfasusu-3'
[0176] 对照偶合体上的三价 GaNAc3 配体		

[0177]



[0178]



[0179] 表e2.GalNAc偶合的siRNAs体外筛选的剂量响应总结

[0180]

化合物	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>80</sub> (μM)	Max.KD (%)
mTTR1-PDoV3-GalNAc3	0.0018	0.0048	97%
mTTR1-PDoV2-GalNAc3	0.0026	0.0071	97%
mTTR2-GalNAc3阳性对照	0.0001	0.0003	96%
Aha1-GalNAc3阳性对照	0.0015	0.0059	96%

[0181] mTTR1-PDoV3-GalNAc3的偶合体在体外的连续稀释数据:图15A:IC<sub>50</sub> = 1.82nM与文献报道的同样的siRNA序列21和寡核苷酸上的化学修饰(奈尔等,同上)的IC<sub>50</sub> = 1.39nM相当;图15B显示mTTR1-PDoV2-GalNAc3偶合体的体外连续稀释数据;图15C是mTTR2-GalNAc3阳性对照偶合体的体外连续稀释数据:mTTR2 siRNA序列是一个完全修饰的序列,在寡核苷酸上还有4个额外的PS连接修饰(Nair et al.,同上);图15D是Aha1-GalNAc3阳性对照偶合体的体外连续稀释数据。

[0182] 此处列出的所有出版物,包括已授权或已申请的专利,和所有可以通过链接地址、

编码或者其它方式访问的数据库条目,都通过参考文献的形式在此处全部披露。

[0183] 尽管本发明描述了特定的具体实施例,并且为了阐述清楚而列举了许多细节,显而易见的是对熟悉这一领域的技术人员来说,此发明容易受到额外实施例的影响,并且在不违背本发明的基本原理下,本文中某些特定的细节可以有各种不同的描述形式。

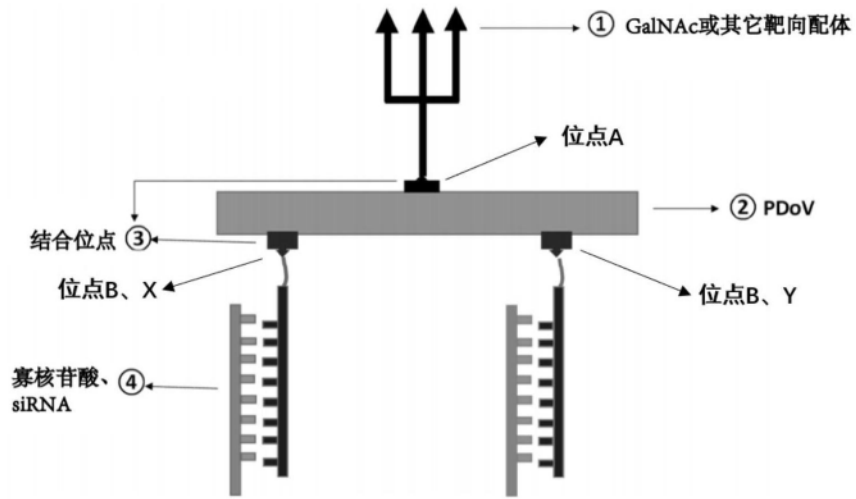


图1

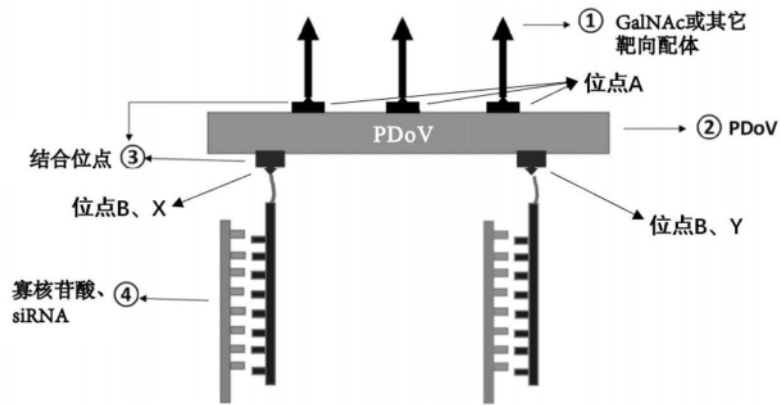


图2

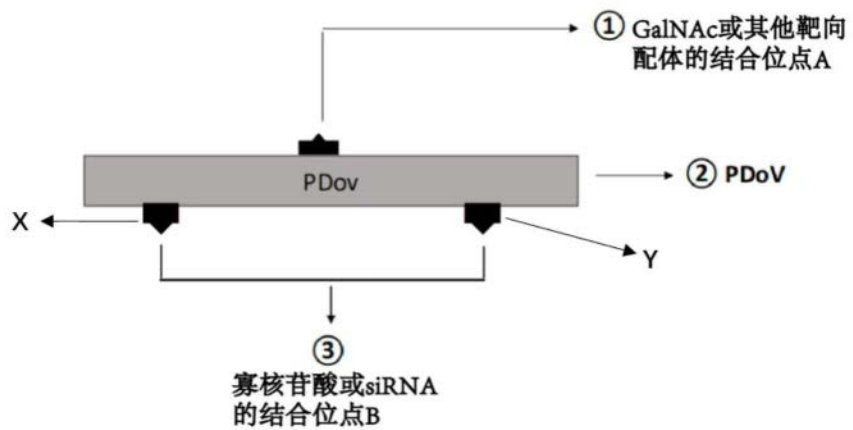


图3

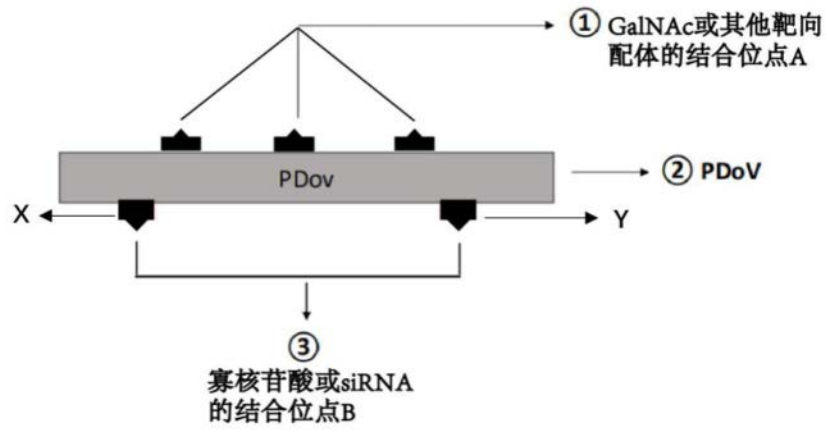


图4

PDoV 构建体的结构

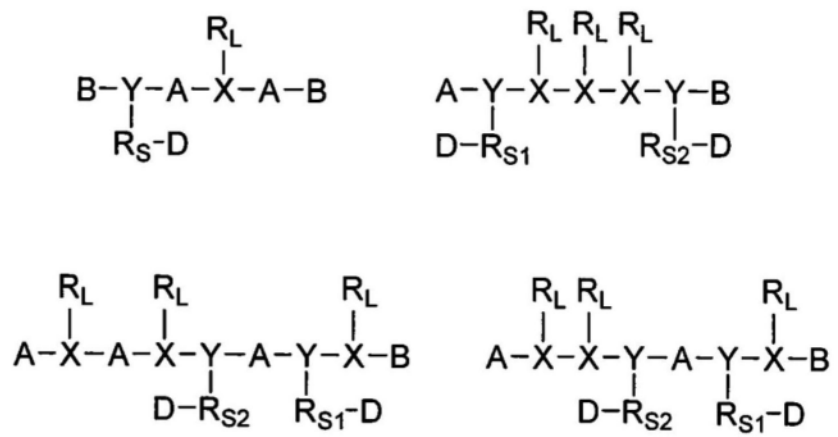
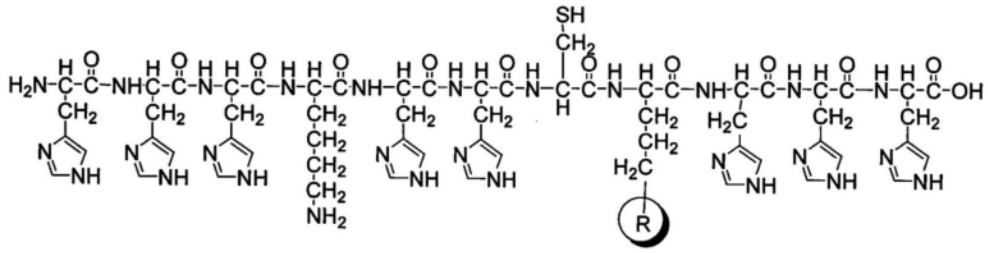
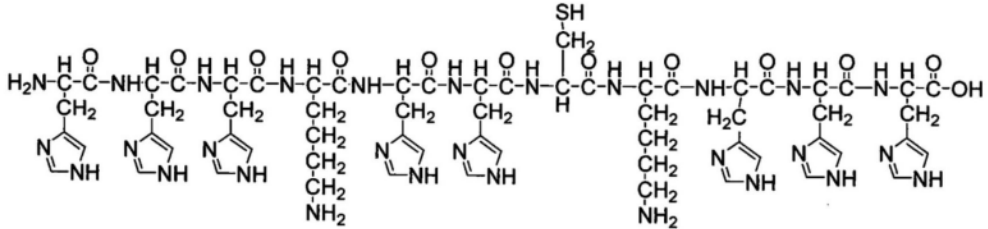


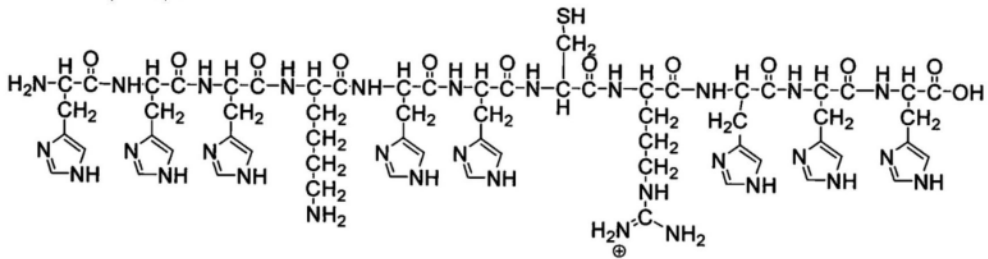
图5



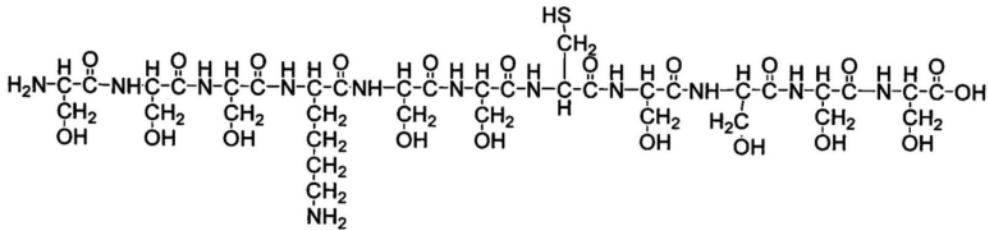
其中 R = CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (PDoV1),



其中 R = NHC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (PDoV2),



对照肽的示例,



其中, 肽序列较短:

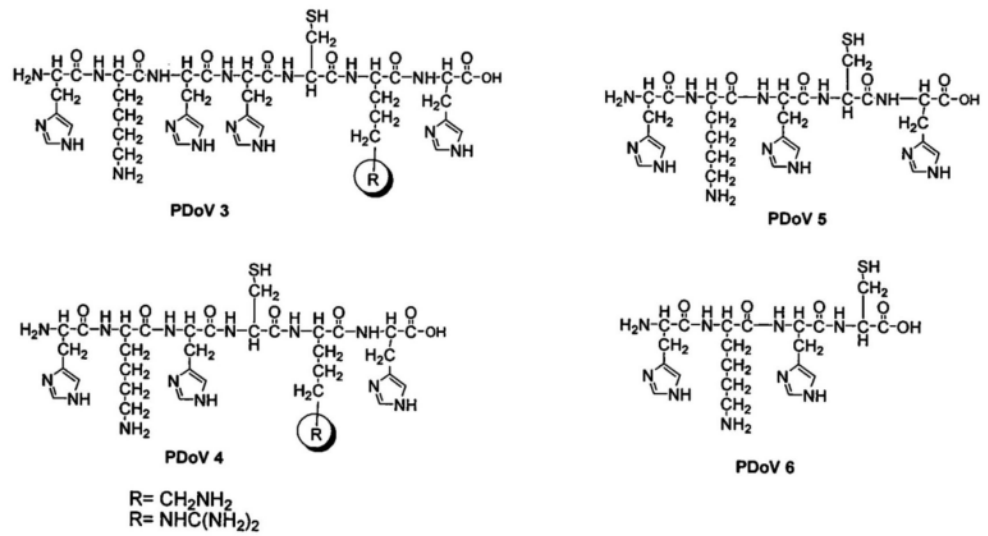
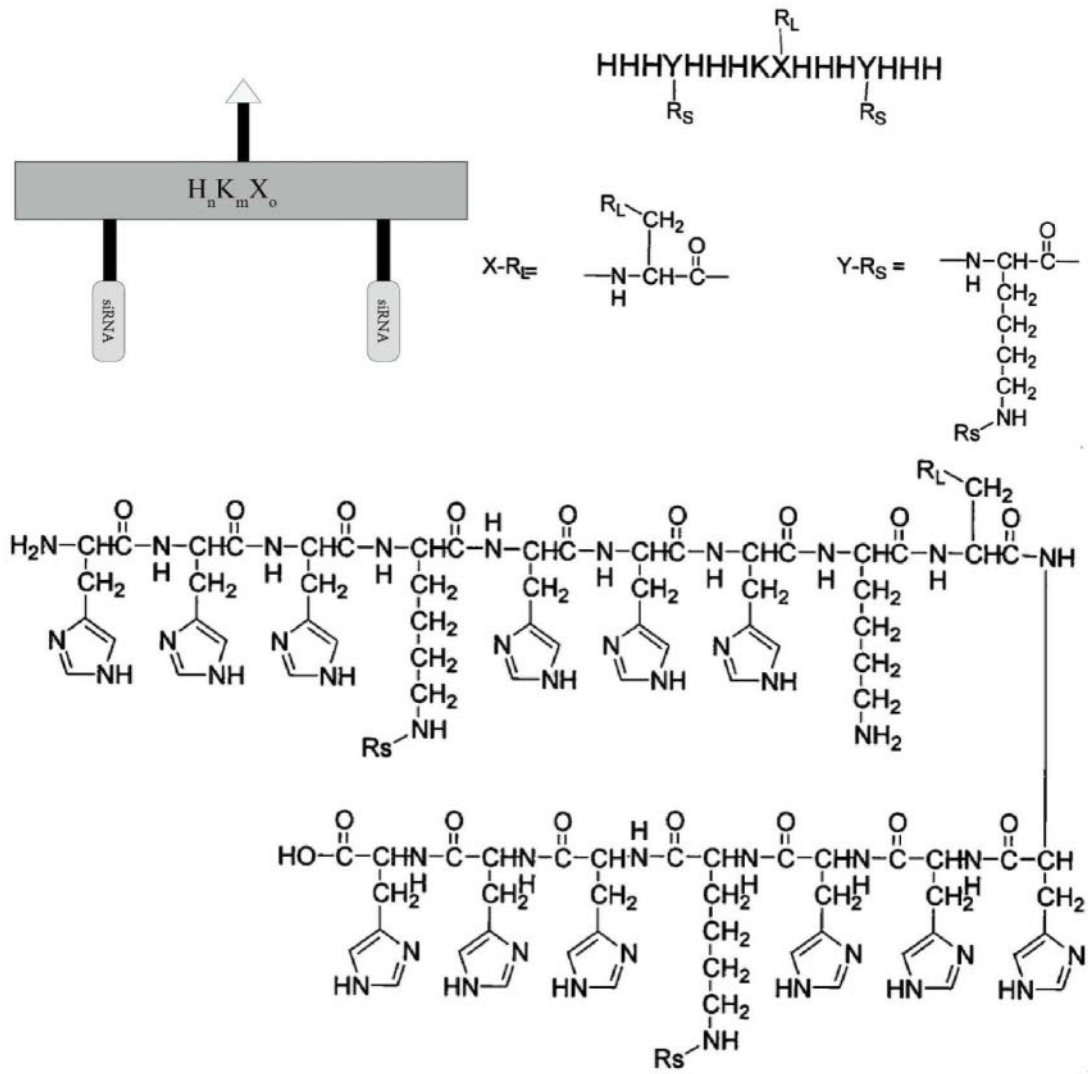


图6



X-R<sub>L</sub> = 配体结合位点, 如SH、N3、马来酰亚胺等

X-R<sub>S</sub> = siRNA、寡核苷酸结合位点

图7



偶合位点的连接物选择

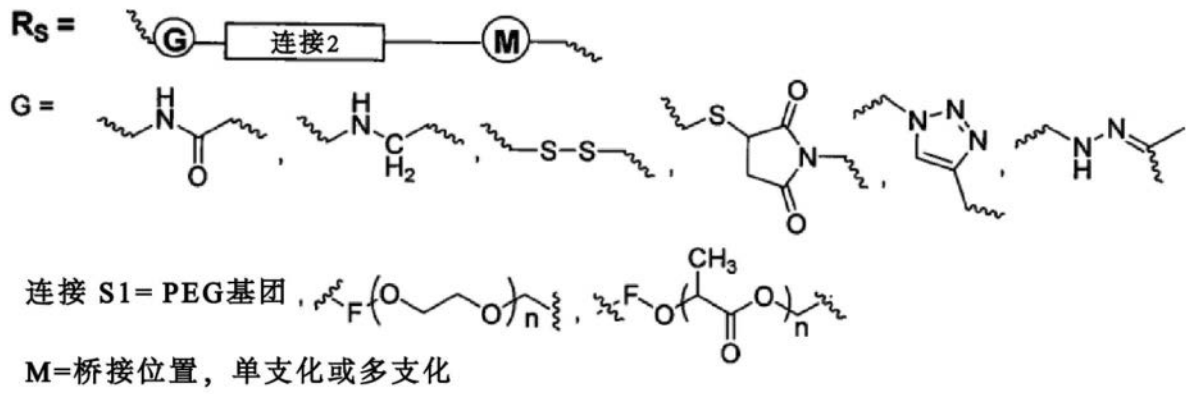


图9A

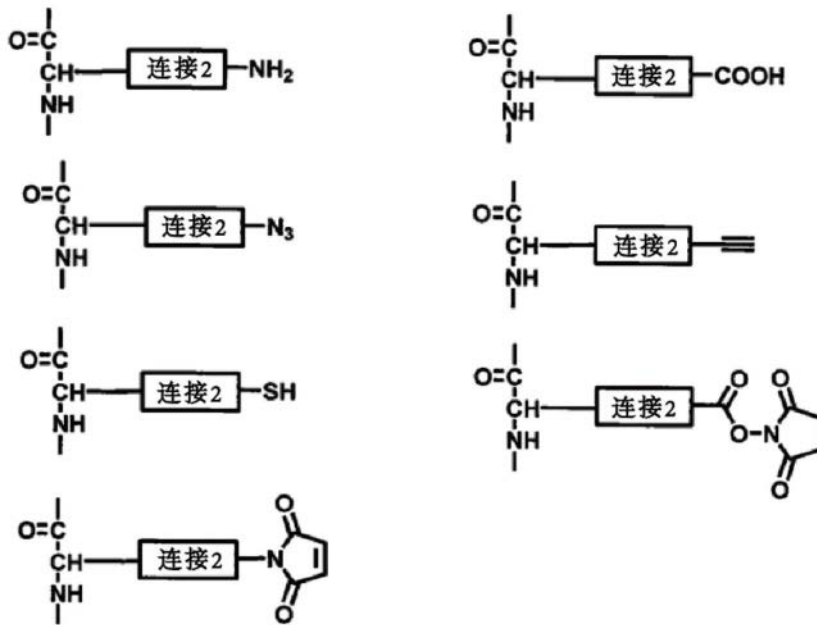
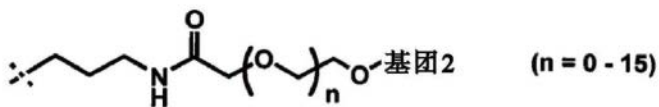
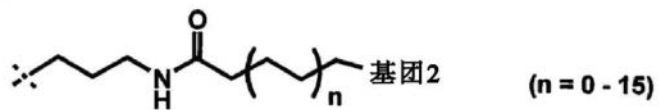


图9B

连接2 =



基团2 =

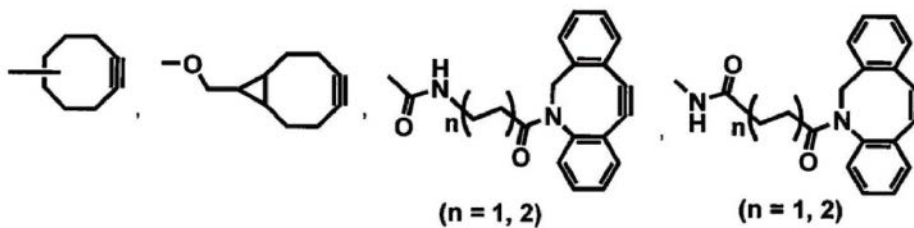
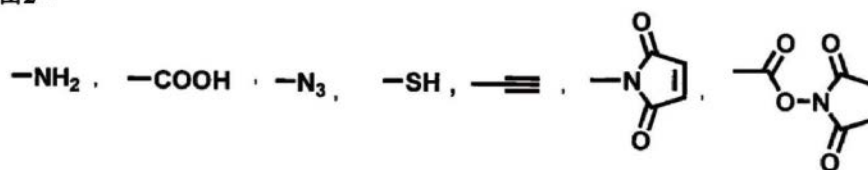


图9C





## siRNA-PDoV-配体化合物 2 结构的代表性示例

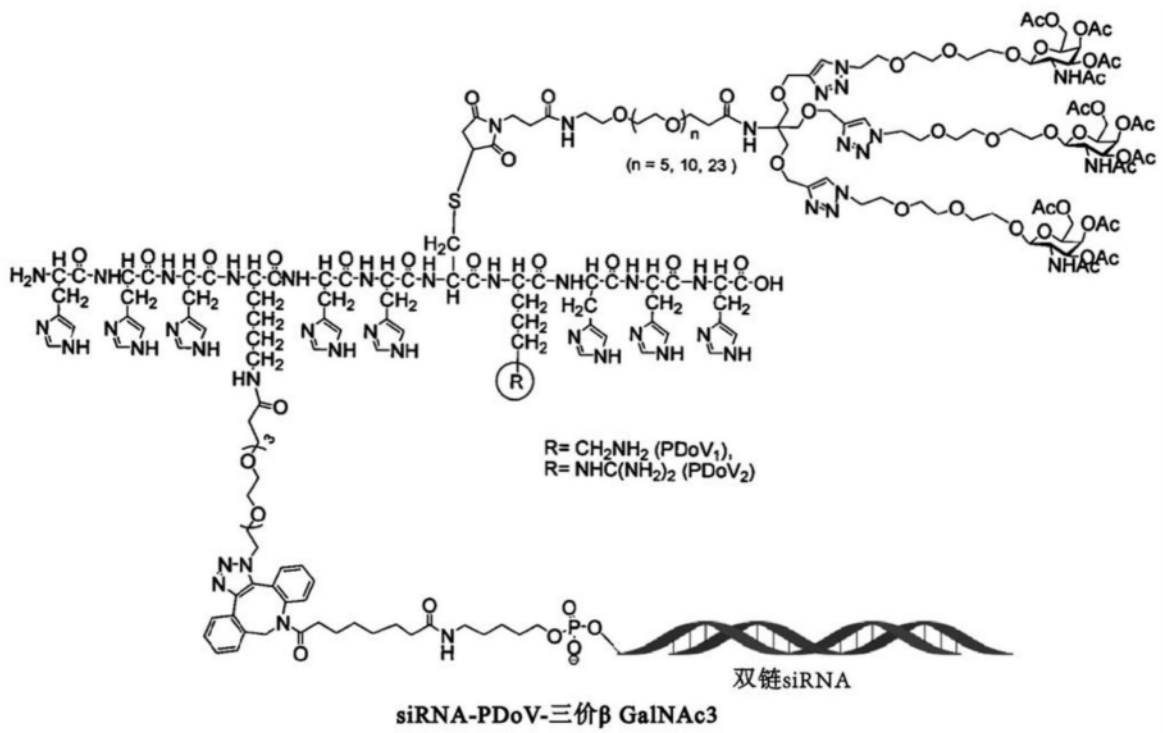


图12

siRNA-PDoV-配体化合物 3 结构的代表性示例。

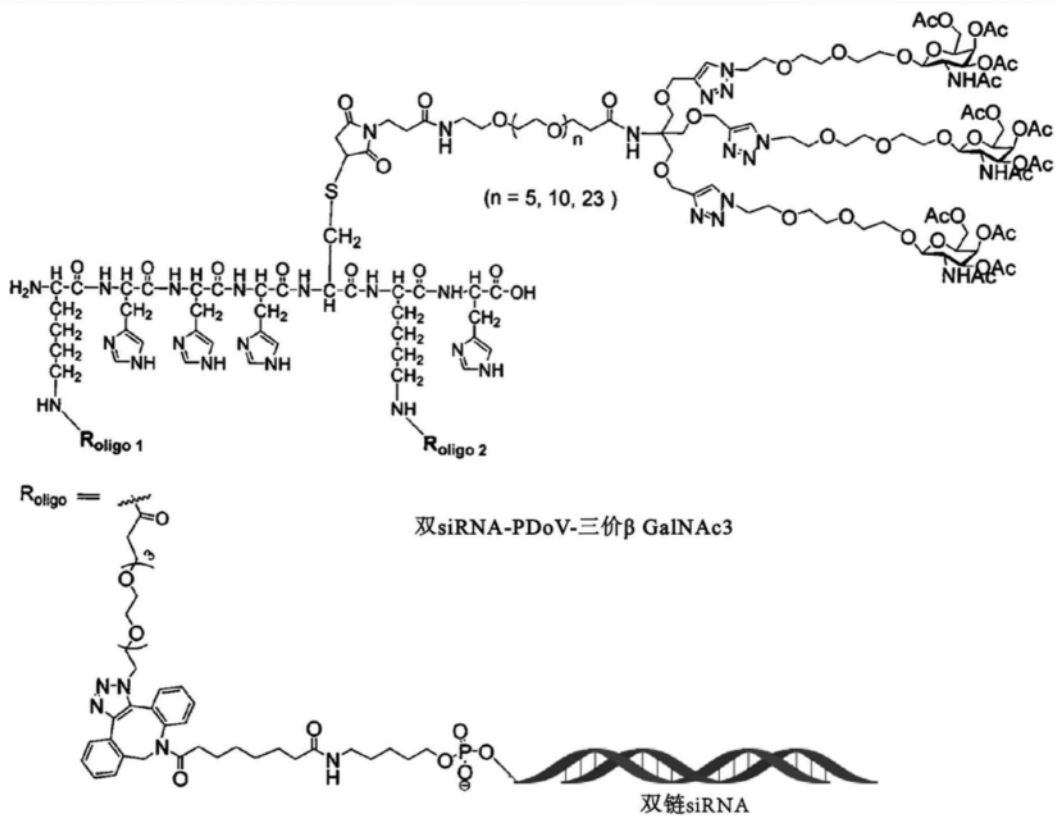


图13

选定的 siRNA 序列和结构修饰的清单

序列	序列和修饰
ApoB100a 正义链	5'-DBCO-C6NHS)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAA-3'(5'末端 DBCO 修饰)
ApoB100a 反义链	5'-uuGGAUcAAAUuAAGAUcCCU-3'
ApoB100b 正义链	5'-DBCO-C6NHS)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAA-3'(5'末端 DBCO 修饰)
ApoB100b 反义链	5'-uuGGAUcAAAUuAAGAUcCCU-(Fluor 647 fluoro)-3'
完全修饰	
ApoB100c 正义链	5'-(DBCO-C6NHS)(NHC6)ggaucUfuAfUfufuuuauccaa-3'
ApoB100c 反义链	5'-uUfggaUfcaaaauAfaGfaucccu-3'
mTTR1 正义链	5'-(DBCO-C6NHS)(NHC6)AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfaAf-3'
mTTR1 反义链	5'-uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu-3'
mTTR2 正义链	5'-(DECO-C6NHS)(NHC6)AfsasCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfaAf-3'
mTTR2 反义链	5'-usUfsaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu-3'
25NSC 对照正义链	5'-DBCO-C6NHS)(NHC6)cGfagcaggguaucGfacgaaucacaaa-3'
25NSC 对照反义链	5'-uuGfTaaucgucgauaAfccucgucg-3'
21NSC 对照正义链	5'-(DBCO-C6NHS)(NHC6)cagggAfuCfGfAfcgaaucacaaa-3'
21NSC 对照反义链	5'-uUfguAfaucgucgAfAfcucg-3'
备注	所有序列中的 2'-修饰; 大写字母表示 2'-OH 修饰; 小写字母表示 2'-OMe 修饰, 大写 X 为正常核苷酸, Xf=2'-F 修饰。

图14

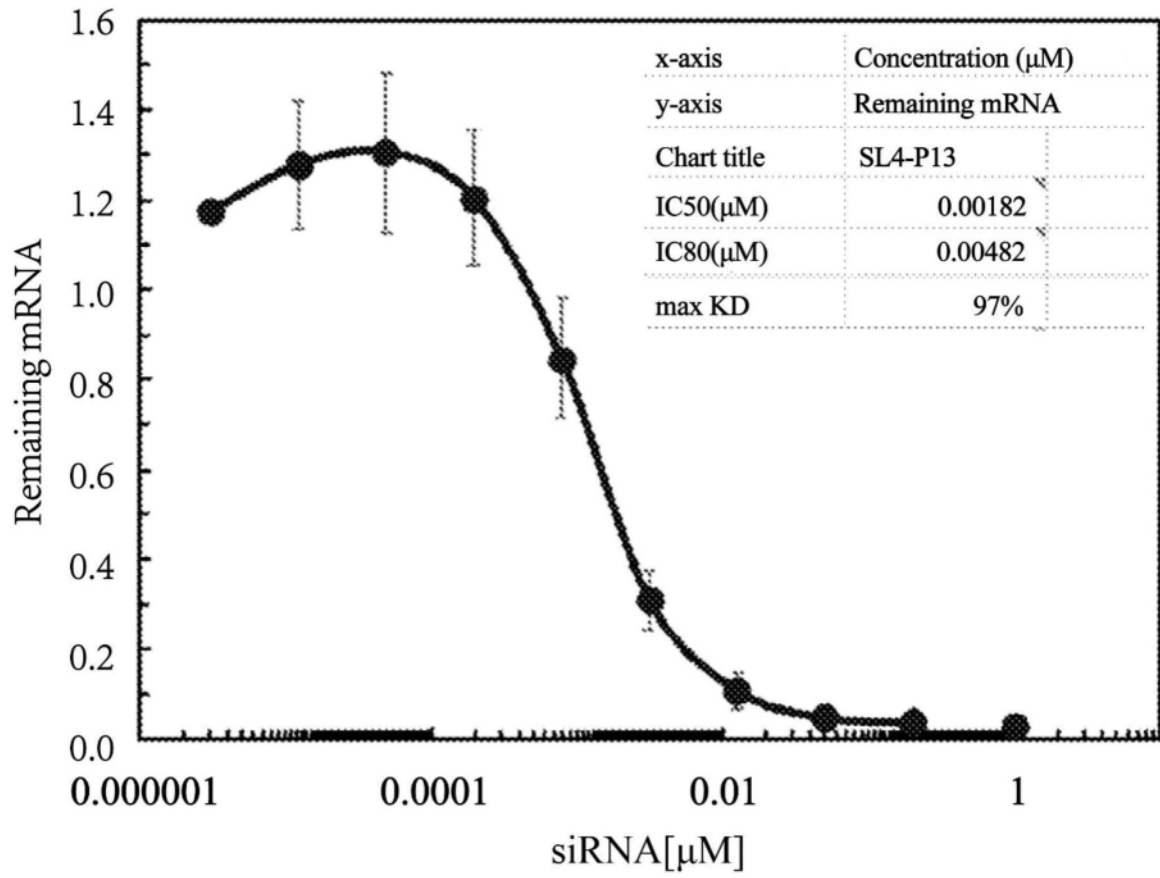


图15A

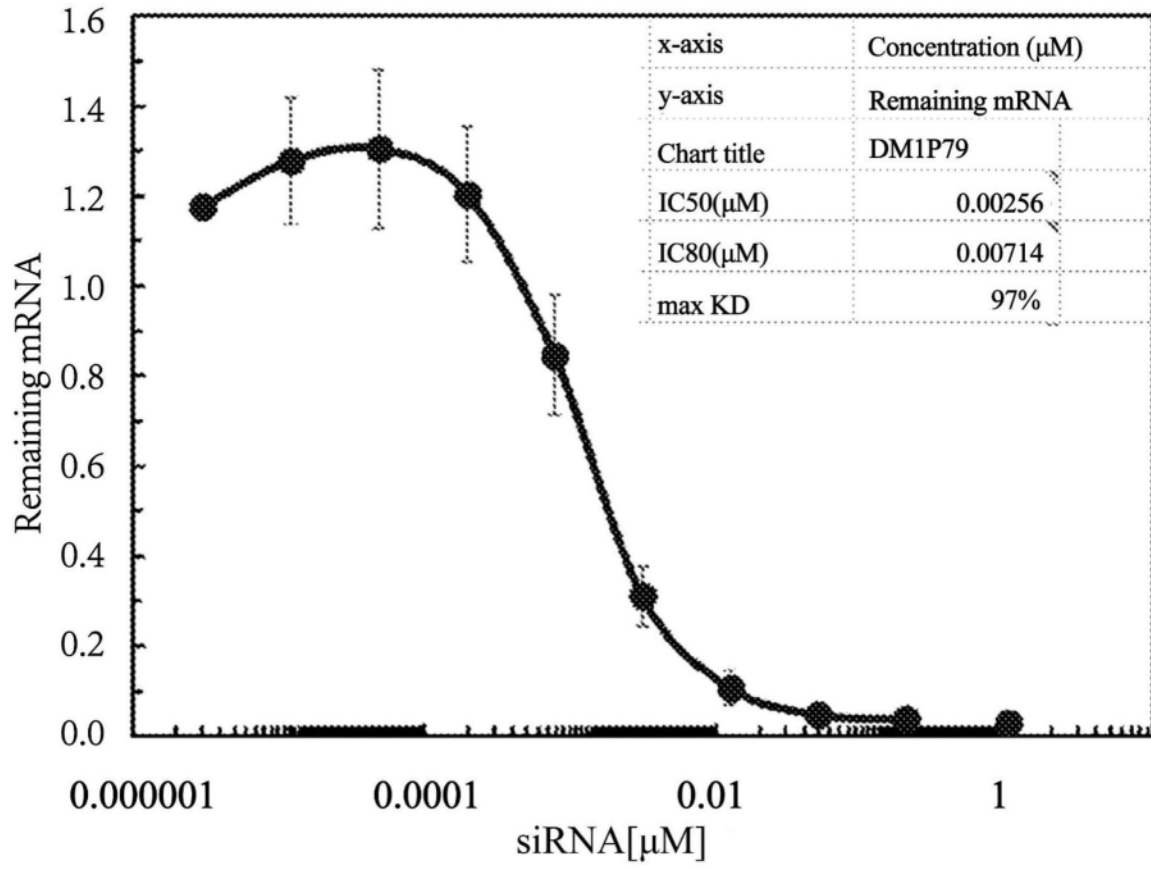


图15B

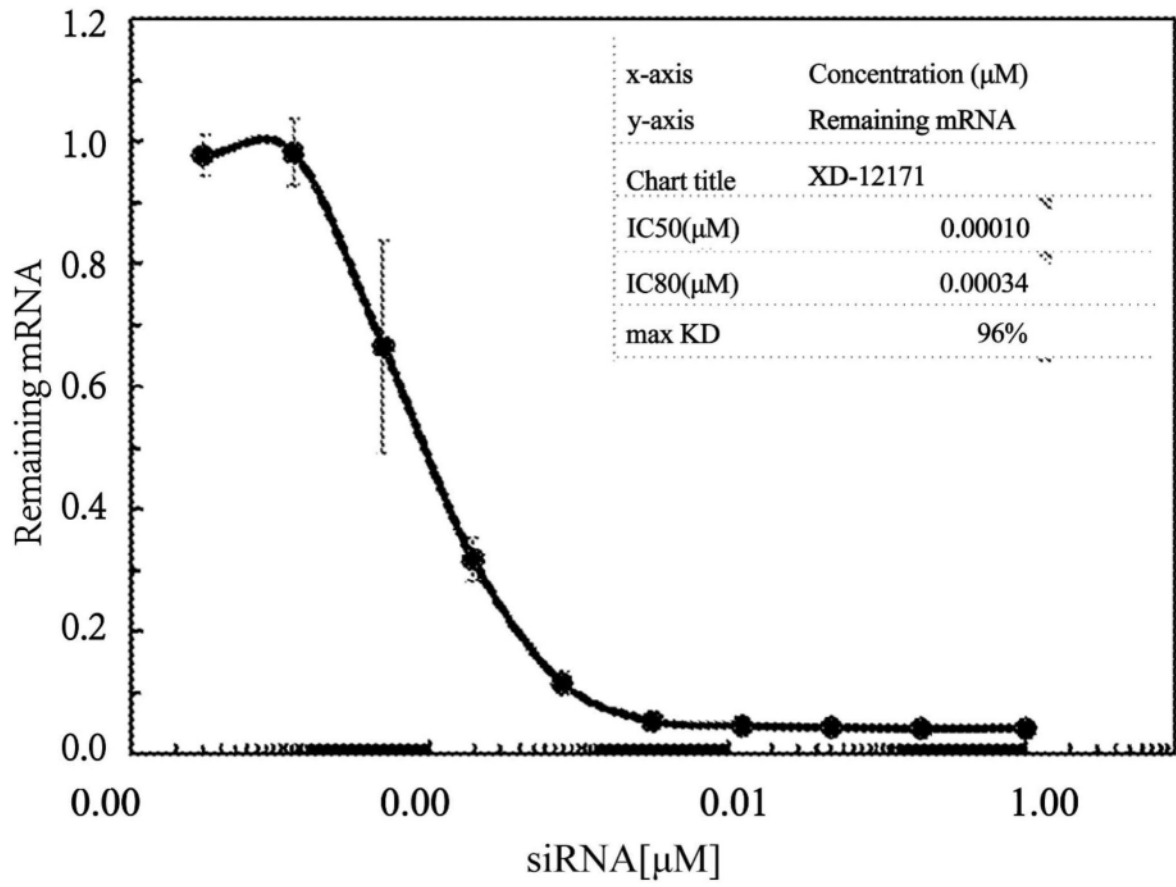


图15C

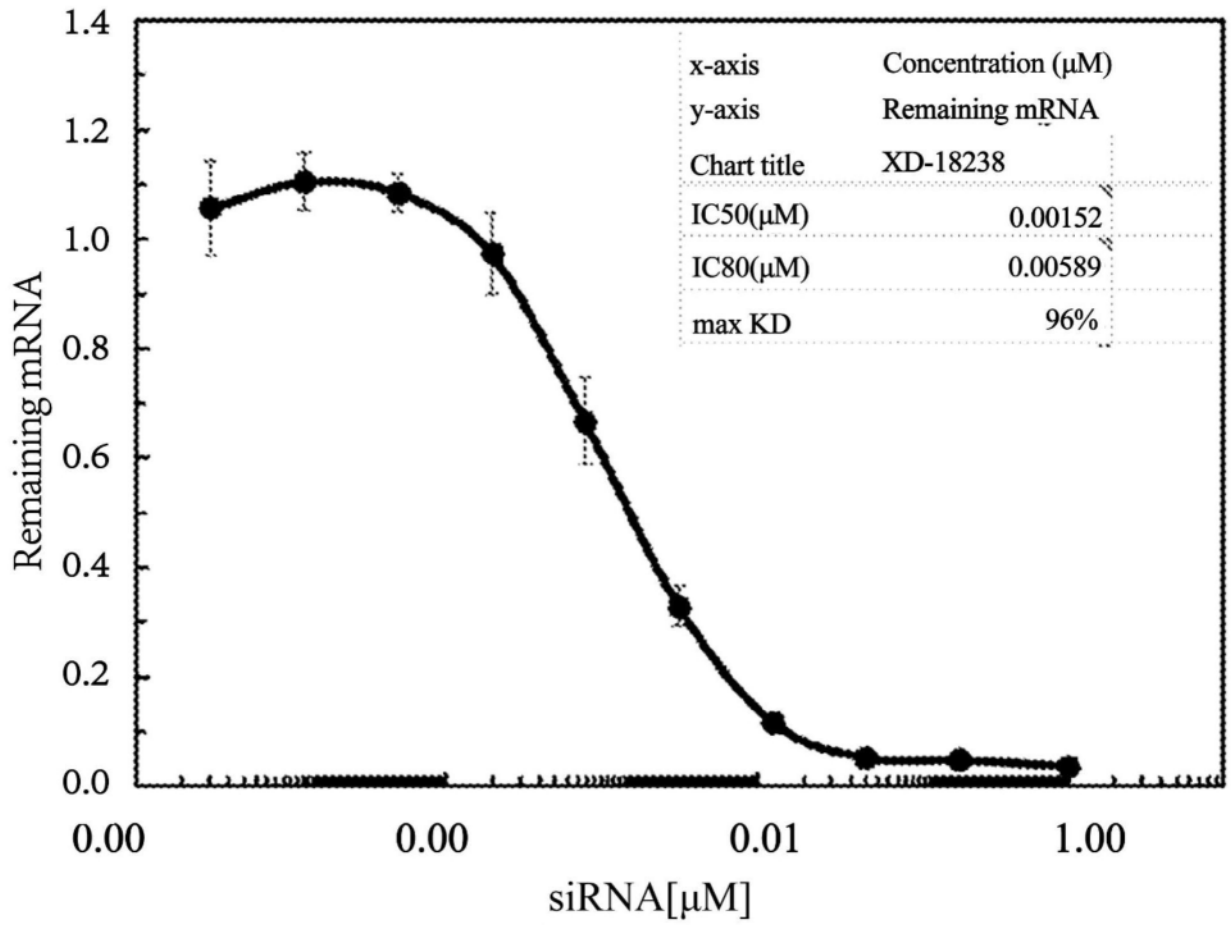


图15D