



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102459301 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201080029886. 2  
 (22) 申请日 2010. 05. 05  
 (30) 优先权数据  
 61/175, 690 2009. 05. 05 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2011. 12. 31  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2010/033729 2010. 05. 05  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02010/129672 EN 2010. 11. 11  
 (73) 专利权人 米拉根医疗公司  
 地址 美国科罗拉多州  
 (72) 发明人 W. S. 马沙尔 K. 瓦格尔  
 (74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
 11105  
 代理人 陈桢  
 (51) Int. Cl.  
 C07H 21/00(2006. 01)  
 (56) 对比文件  
 Guilhem Godeau et al. Lipid-Conjugated

Oligonucleotides via “Click Chemistry” Efficiently Inhibit Hepatitis C Virus Translation. 《J. Med. Chem.》. 2008, 第 51 卷第 4374-4376 页.  
 S. Matysiak et al. Acetal Oligonucleotide Conjugates in Antisense Strategy. 《Nucleosides and Nucleotides》. 2006, 第 16 卷第 855-861 页.  
 Thomas J. Lehmann et al. Synthesis and Properties of Bile Acid Phosphoramidites 5’ -Tethered to Antisense Oligodeoxynucleotides Against HCV. 《Bioorganic & Medicinal Chemistry》. 2001, 第 9 卷 (第 7 期), 第 1827-1835 页.

审查员 王险

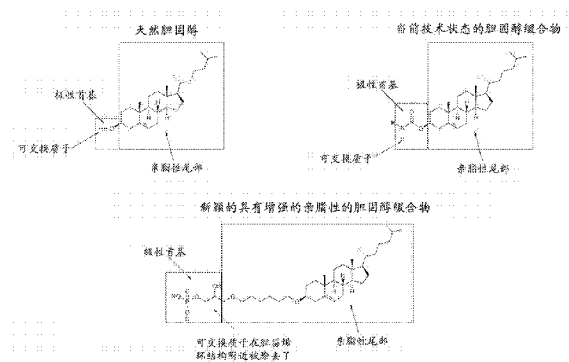
权利要求书2页 说明书26页  
 序列表8页 附图6页

(54) 发明名称

亲脂性多聚核苷酸缀合物

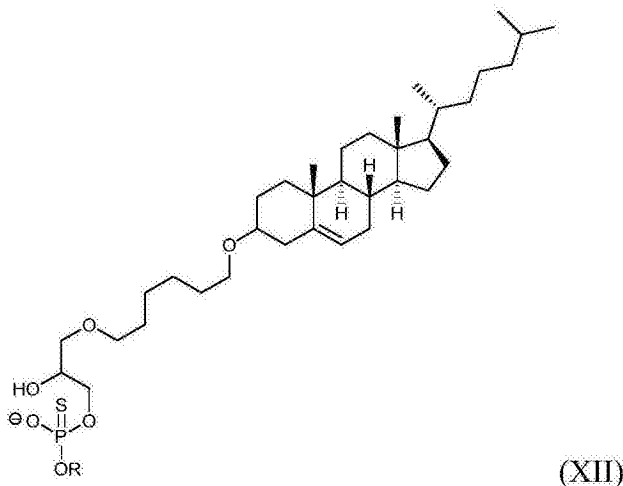
(57) 摘要

本申请公开了包括多聚核苷酸-胆固醇缀合物的亲脂性多聚核苷酸缀合物, 以及采用所述缀合物将治疗性多聚核苷酸递送至需要治疗的哺乳动物细胞或哺乳动物患者的方法。本公开进一步提供了合成亲脂性多聚核苷酸缀合物的方法。所述缀合物被设计为模拟或靶向细胞 miRNA。所述亲脂性部分, 诸如胆固醇或胆固醇衍生物, 与多聚核苷酸通过基本上呈线性的烃基团相间隔。由于在亲脂性部分附近缺少显著极性的基团和 / 或可交换质子, 所述亲脂性部分和细胞膜之间的相互作用增强了, 以提供向细胞中的有效进入。



CN 102459301 B

1. 亲脂性多聚核苷酸缀合物,包括以下结构:



其中 R 为通过 3' 位缀合至所述结构的多聚核苷酸。

2. 权利要求 1 的缀合物,其中多聚核苷酸为基于 DNA 的。
3. 权利要求 1 的缀合物,其中多聚核苷酸为基于 RNA 的。
4. 权利要求 1 的缀合物,其中多聚核苷酸具有经修饰的多聚核苷酸主链。
5. 权利要求 4 的缀合物,其中多聚核苷酸含有一个或多个硫代磷酸酯修饰。
6. 权利要求 1 的缀合物,其中多聚核苷酸具有一个或多个经修饰的核苷单元。
7. 权利要求 1 的缀合物,其中多聚核苷酸具有一个或多个单链区域和一个或多个双链区域。
8. 权利要求 7 的缀合物,其中多聚核苷酸为反义寡核苷酸、短干扰 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、单链 RNA (ssRNA)、微小 RNA (miRNA)、短发夹 RNA (shRNA) 或核酶。
9. 权利要求 8 的缀合物,其中多聚核苷酸为 antagomir。
10. 权利要求 8 或 9 的缀合物,其中多聚核苷酸在长度上为 5-50 个核苷酸。
11. 权利要求 8 或 9 的缀合物,其中多聚核苷酸在长度上为 18-30 个核苷酸。
12. 权利要求 8 或 9 的缀合物,其中多聚核苷酸包括与成熟 miRNA 100% 互补的序列。
13. 权利要求 8 或 9 的缀合物,其中多聚核苷酸包括与 SEQ ID NO:1 至 63 的成熟 miRNA 100% 互补的序列。
14. 权利要求 8 或 9 的缀合物,其中多聚核苷酸具有设计为模拟细胞 miRNA 的序列。
15. 权利要求 8 或 9 的缀合物,其中多聚核苷酸具有设计为模拟 SEQ ID NO:1 至 63 的 miRNA 的序列。
16. 权利要求 1 的缀合物,其中多聚核苷酸在 2' 或 4' 位包括一个或多个锁核酸、核酸肽主链和 / 或糖修饰。
17. 药物组合物,包括为递送至患者而制备的权利要求 1 的缀合物。
18. 权利要求 17 的药物组合物,其中缀合物被制备成胶态分散系统,大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠子、水包油乳剂、胶束、混合胶束或脂质体的形式。
19. 权利要求 18 的药物组合物,其中缀合物被制备成脂质体的形式且其中亲脂性部分将多聚核苷酸缀合物锚定至脂质体中。
20. 权利要求 17-19 任一项的药物组合物,其中组合物被制备成用于皮内递送、皮下递

送、肌内递送、腹膜内或静脉内递送的形式。

21. 权利要求 20 的药物组合物,其中组合物被制备成用于通过心脏导管系统给药的形式。

22. 根据权利要求 1-16 任一项的缀合物形式的多聚核苷酸在制备用于将多聚核苷酸递送至哺乳动物细胞的药物中的用途。

23. 权利要求 22 的用途,其中多聚核苷酸为 miRNA 或 miRNA 抑制剂。

24. 权利要求 23 的用途,其中患者患有与 miRNA 表达有关的病症。

25. 权利要求 24 的用途,其中所述病症为下述的一种或多种:心脏肥大、心肌梗死、心力衰竭、血管损伤和病理性心纤维化。

## 亲脂性多聚核苷酸缀合物

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2009 年 5 月 5 日提交的美国临时申请 61/175,690 的优先权,将其整体引入本申请中作为参考。

[0003] 电子提交的文本文件的描述

[0004] 电子提交的文本文件的内容整体引入本申请中作为参考:序列表的计算机可读形式的副本(文件名:MIRG\_01400W0\_SeqList\_ST25.txt,记录日期:2010年5月4日,文件大小10千字节)

### 技术领域

[0005] 本发明涉及用于将多聚核苷酸递送至细胞从而用于治疗、研究和/或诊断目的的亲脂性的核酸缀合物。本发明在某些实施方案中涉及靶向内源性微小 RNA (microRNA) 功能的多聚核苷酸的递送。

### 背景技术

[0006] 寡核苷酸治疗策略依赖于将亲水性、高度带电荷的以及阴离子核酸分子通过跨越构成细胞膜的疏水性磷脂双层递送至细胞质。已经研究了疏水性寡核苷酸缀合物增强细胞摄取的能力。例如胆固醇缀合物可以与脂蛋白结合,更具体地为 IDL 和 LDL 颗粒。所述颗粒含有 ApoE 和 ApoB-100 脂蛋白,其靶向 LDL 细胞表面受体并因此可以通过脂蛋白介导的胞吞作用而内摄(internalize)。这些受体主要在肝脏中发现,但也在脂肪组织、心脏和骨骼肌中发现。另外,亲脂性侧基可以通过嵌入至磷脂双层中从而协助将它们的缀合物“锚定”至细胞膜上,从而协助寡核苷酸的被动内摄作用。

[0007] 为了保持用于其所需的治疗作用的多聚核苷酸的功能上和结构上的完整性,这样的亲脂性分子或取代基必须与多聚核苷酸一起制造或连接至多聚核苷酸上。例如治疗性多聚核苷酸可以通过与大的和/或复杂的核糖核蛋白(RNP)复合物之间发生相互作用而起作用,和/或可以靶向这些复合物的 RNA 组分。因此,亲脂性修饰应当不损坏用于与细胞因子和分子靶标之间发生相互作用的多聚核苷酸的易接近性。

[0008] 微小 RNA (miR) 已经牵涉至很多生物学过程中,包括调节发育时机、凋亡、脂肪代谢以及造血细胞分化等,并由此代表了相对新的类型的治疗靶标。miR 为小的、非蛋白编码的长度为约 18 至约 25 个核苷酸的 RNA,并且当 mRNA 的序列完全互补时通过促进其降解,或当它们的序列含有错配时通过抑制翻译而起靶标 mRNA 阻抑物的作用。成熟的 miRNA 链结合至 RNA 诱导沉默复合体(RISC)中,在此其通过碱基对的互补性与其靶标 RNA 相结合。

[0009] 需要用于有效地将治疗性多聚核苷酸,包括 miR 和 miR 抑制剂递送至细胞,同时不实质上或显著性地削弱与分子靶标之间的相互作用的组合物和方法。

### 发明内容

[0010] 本发明提供了亲脂性多聚核苷酸缀合物,以及将治疗性多聚核苷酸递送至需要治

疗的哺乳动物细胞或哺乳动物患者的方法。本发明进一步提供合成亲脂性多聚核苷酸缀合物的方法。根据本发明,所述缀合物包括设计为模拟或靶向细胞 miRNA 的胆固醇和多聚核苷酸的缀合物。亲脂性部分,诸如胆固醇或胆固醇衍生物通过烃基与多聚核苷酸相间隔。由于亲脂性部分附近缺少显著极性的基团和 / 或可交换质子,本发明增强了亲脂性部分和细胞膜之间的相互作用从而实现了有效地进入细胞中。缀合物并不实质上或显著性地破坏多聚核苷酸发挥其治疗作用的能力。

[0011] 在一个方面,本发明提供亲脂性多聚核苷酸缀合物以及包含其的药物组合物和制剂。根据该方面,亲脂性部分可以为胆固醇或本申请所描述的类似的亲脂性结构,或与膜磷脂相结合的其它分子。多聚核苷酸可以是基于 DNA 或 RNA 的,和 / 或可以体现为一种或多种核酸修饰形式,例如诸如经修饰的多聚核苷酸主链或一种或多种经修饰的核苷单元。例如经修饰的主链可以为完全或部分的硫代磷酸酯 (phosphorothioate) 修饰的主链。例如可以为通过反义抑制模拟 miRNA 或靶向 miRNA 而设计多聚核苷酸序列。多聚核苷酸和亲脂性部分通过基本上呈线性的烃部分 (例如连接基) 相间隔以及共轭连接。例如,烃连接基可以缀合至多聚核苷酸的 5' 和 / 或 3' 末端。

[0012] 本发明的缀合物在亲脂性部分附近缺少显著极性的基团,诸如具有可交换质子的基团。例如,烃可以通过相对非极性的基团诸如醚或硫醚连接键缀合至亲脂性部分 (例如胆固醇),并且疏水性连接基可以包括约 3 至约 15 个碳原子。在亲脂性部分附近缺少显著极性例如具有可交换质子的基团使该部分在递送至细胞或患者时更好地嵌入至膜磷脂中。

[0013] 在第二个方面中,本发明提供将多聚核苷酸递送至哺乳动物细胞的方法,以及用于在哺乳动物患者中治疗或预防病症进展的方法。在该方面中,本发明包括给药多聚核苷酸,其作为与胆固醇或本申请所描述的其它亲脂性部分的缀合物。多聚核苷酸可以为 miRNA 或 miRNA 抑制剂 (例如具有设计为抑制 miRNA 的表达或活性的核苷酸序列)。在这样的实施方案中,患者患有与 RNA 表达诸如 miRNA 表达有关的病症。这样的病症包括,例如心脏肥大、心肌梗死、心力衰竭 (例如充血性心力衰竭)、血管损伤、再狭窄、和 / 或病理性心纤维化等等。

[0014] 在第三方面,本发明提供用于合成多聚核苷酸缀合物的方法。本发明提供合成在 5' 和 / 或 3' 末端结合,或沿着多聚核苷酸主链通过烃部分或连接基缀合的亲脂性部分的多聚核苷酸的方法。在某些实施方案中,若亲脂性部分为醇,诸如甾醇,亲脂性部分与具有合适的末端官能团的烃成醚。该醚连接的中间体可以进一步反应从而制备合适的与固相核酸合成相容的试剂。例如醚连接的中间体可以进一步反应从而制备用于转化成磷酸酯 (例如在多聚核苷酸的合成期间偶联至核苷酸的 5' 羟基) 的末端亚磷酰胺 (例如通过醚连接)。可替换地,或者另外,醚连接的中间体可以进一步反应从而制备合适的用于偶联 (例如通过酰胺化) 至用于核酸合成的合适的支持物的端基。

[0015] 可替换地,本发明提供用于在多聚核苷酸的合成完成之后,使用例如羰基加成 - 消除 / 还原胺化、酰胺化、马来酰亚胺 - 巯基偶联、水性狄尔斯 - 阿尔德 (aqueous Diels-Alder) 和 “点击” 化学的方法合成胆固醇与多聚核苷酸的缀合物的方法。

## 附图说明

[0016] 图 1 图示了与传统缀合物进行比较的本发明示例性的亲脂性 (胆固醇) 缀合物。

根据本发明,胆甾烯环结构的附近不具有极性基团,诸如具有可交换质子的那些。

[0017] 图 2 图示了根据本发明的示例性的缀合物的合成,包括用于在 5' 位 (6) 偶联至核苷酸的亚磷酸胺中间体以及用于偶联至固体支持物 (7) 的琥珀酸酯中间体的制备。

[0018] 图 3 图示了示例性的 3' - 胆固醇与锚定至固体支持物上的胆固醇连接的中间体的缀合物 (1-((二(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基))-12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)十二-3-醇功能化的 CPG) 的合成。

[0019] 图 4 图示了当寡核苷酸被互补的官能团功能化时,胆甾-5-烯-3-羟基烷醇 (A) 可以经修饰得到可经常规的生物缀合技术诸如酰胺化 (B)、狄尔斯-阿尔德生物缀合 (C) 和“点击”生物缀合 (D) 修饰的官能团。

[0020] 图 5 为响应于用于示于表 2 中的化学物质进行的 IV 注射的 miR-208 的 Northern 分析。

[0021] 图 6 显示了与注射了盐水的动物相比较响应于用标明的化学物质进行的 IV 注射的 miR-208 敲低的实时定量结果。

## 具体实施方式

[0022] 主动和 / 或被动细胞转运机制可得益于亲脂性侧基,包括对于磷脂双层而言是天然的那些,其应当会有效地填充于双层中。因此,本发明提供缀合物,其含有足够疏水性的连接基以有效地填充于磷脂双层中,从而增强多聚核苷酸缀合物对细胞膜的亲和力,或可替换地,提供可作为递送媒介物的脂质体或胶束。寡核苷酸-胆固醇型的缀合物通常使用胆甾醇基氨基甲酸酯连接 (linkage),所述连接导致含有紧密靠近甾环结构的可交换质子的极性基团。这些缀合物并不具有最佳的亲脂性质,且极性连接点可能会阻碍有效的磷脂双层的填充。

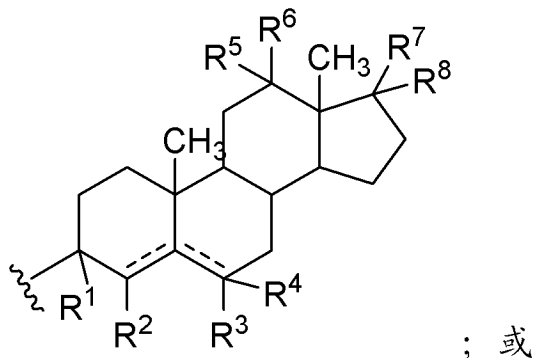
[0023] 本发明提供了亲脂性多聚核苷酸缀合物,以及将治疗性多聚核苷酸递送至需要治疗的哺乳动物细胞或哺乳动物患者的方法。本发明进一步提供合成亲脂性多聚核苷酸缀合物的方法。根据本发明,缀合物可被设计成靶向细胞 RNA,包括 miRNA。例如,缀合物可通过反义抑制靶向细胞 miRNA,或可被设计成模拟 miRNA。亲脂性部分,诸如胆固醇或其它亲脂性基团,通过烃连接基与多聚核苷酸相间隔。由于在亲脂性部分附近缺少显著极性的基团和 / 或可交换质子,本发明促进亲脂性部分与膜磷脂之间的相互作用,从而提供向细胞中的有效进入。缀合物并不实质上或显著性地破坏多聚核苷酸发挥其治疗作用的能力。

### [0024] 亲脂性部分和烃间隔物

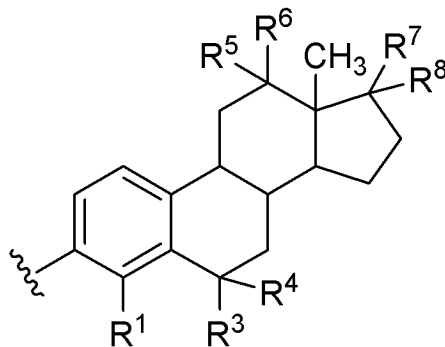
[0025] 亲脂性部分为能够嵌入至磷脂双层诸如细胞膜中的可溶于脂肪的部分,或递送媒介物诸如本申请所披露的脂质体或胶束。亲脂性部分可以通过醚或硫醚连接键缀合至烃间隔物 (如下所述)。示例性的亲脂性部分包括胆固醇和胆固醇衍生物 (包括胆甾烯、胆甾烷和胆甾二烯)、胆汁酸 (诸如胆酸、去氧胆酸和去氢胆酸)、甾醇、类固醇,或其它可溶于脂肪的醇或硫醇。在某些实施方案中,亲脂性部分为胆固醇或胆固醇衍生物,或如美国专利 7,202,227 中披露的胆酸或胆酸衍生物,其引入本申请中作为参考。这样的衍生物包括 C1-C4 烷基 (例如甲基) 取代的胆固醇或胆酸结构。

[0026] 例如,在某些实施方案中,胆固醇或衍生物可具有下述结构:

[0027]

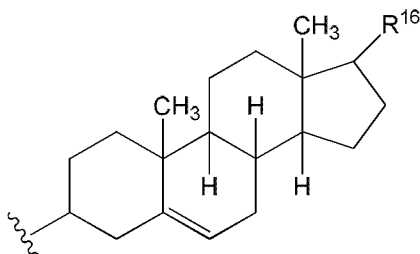


; 或



[0028] 在这样的结构中,  $R^1$ - $R^8$  中的每个为基本上非极性的基团。例如,  $R^1$ - $R^8$  中的每个可以独立地选自: 氢、烷基 (例如 C1-C6 烷基)、取代的烷基、任选取代的烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基) 和任选取代的烷氧基烷基。在某些实施方案中, 亲脂性部分具有下式, 其中 R 为烷基 (例如 C1-C10 烷基):

[0029]



[0030] 烃部分或间隔物使亲脂性部分 (如上所述) 与非亲脂性例如极性基团分离, 从而使亲脂性部分更好地与特别是膜磷脂之间在递送至患者或与哺乳动物细胞接触时发生相互作用。因此, 缀合物在亲脂性部分附近通常不具有可交换质子或其它极性基团 (例如羟基或酰胺)。通常, 距离亲脂性部分约 3- 约 15 个原子之内没有显著极性的基团和可交换质子。在某些实施方案中, 第一个显著极性的基团或可交换质子离亲脂性部分至少 6、7、8 或 9 个原子。

[0031] 烃间隔物可以通过相对非极性的键, 诸如醚或硫醚连接键缀合至亲脂性部分。例如, 若亲脂性部分为胆固醇或其它甾醇, 烃间隔物可与甾醇羟基基团之间用醚连接。

[0032] 在某些实施方案中, 烃间隔物包括 C2-C15 饱和或不饱和烃链 (例如亚烷基或亚烯基), 且可以被相对非极性的取代基取代。这样的取代基通常在所述的亲脂性部分附近不含有可交换质子或极性基团。例如, 取代基可以独立地选自烷基 (例如 C1-C6 烷基)、烷氧基 (例如 C1-C6 烷氧基) 和烷氧基烷基。若存在极性取代基, 它们距离亲脂性部分至少约 6、

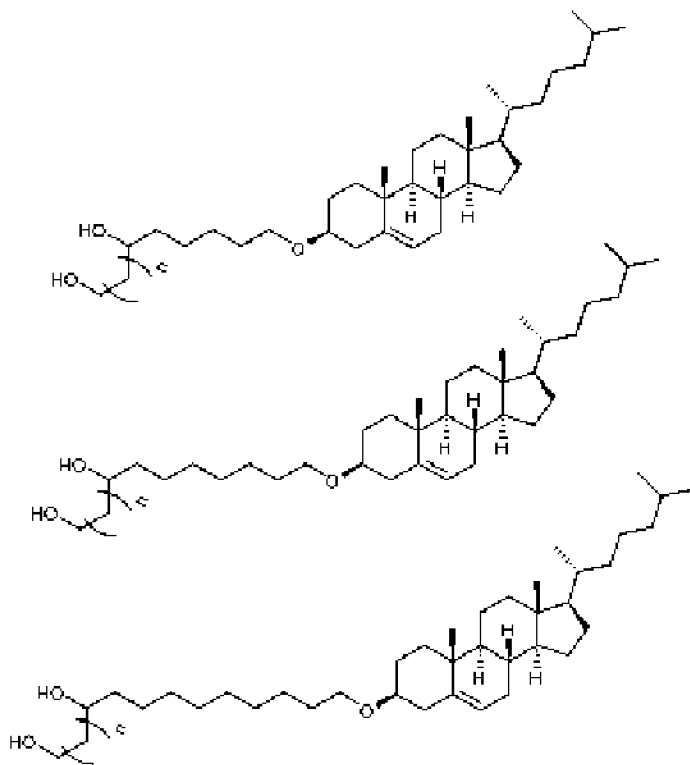
7、8 或 9 个原子。若为不饱和的，烃间隔物可以包括 1、2 或 3 个双键。在某些实施方案中，烃间隔物包括 C2-C10，或 C4-C8 饱和烃链。例如，烃间隔物可以包括 C4 或 C6 饱和烃。

[0033] 在某些实施方案中，烃链含有一个或多个杂原子（例如 1-5 个），诸如独立地选自 O、S 和 / 或 N 的杂原子。在某些其它实施方案中，烃链不具有任何杂原子，除非在某些实施方案中是所需的或由多聚核苷酸与末端之间通过醚或硫醚连接键的连接所导致的。

[0034] 烃间隔物在与亲脂性部分相对的末端上（例如通过核苷酸 5' 或 3' 位，或在沿多聚核苷酸主链的其它位置）缀合于多聚核苷酸。烃间隔物可以通过任何合适的官能团，包括磷酸二酯、醚、硫醚、酯、硫酯或酰胺缀合至多聚核苷酸上，例如结合至核苷酸的 5' 或 3' 位上。

[0035] 示例性本发明的缀合物可具有分别选自下述结构 (I)、(II) 和 (III) 的结构：

[0036]

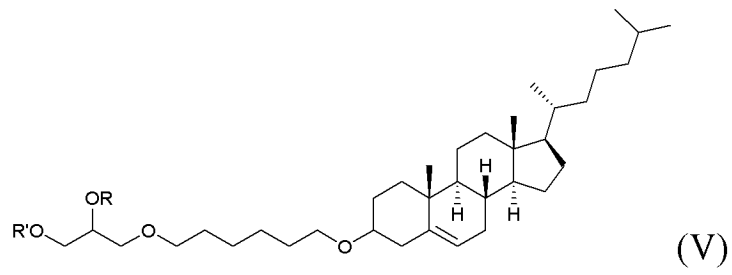
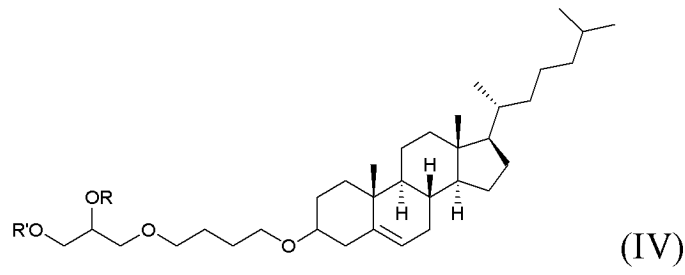


[0037] 其中 n 为 1 或 2，并且其中 R 可以为通过 3' 或 5' 位任选通过连接基连接的核苷酸或多聚核苷酸。

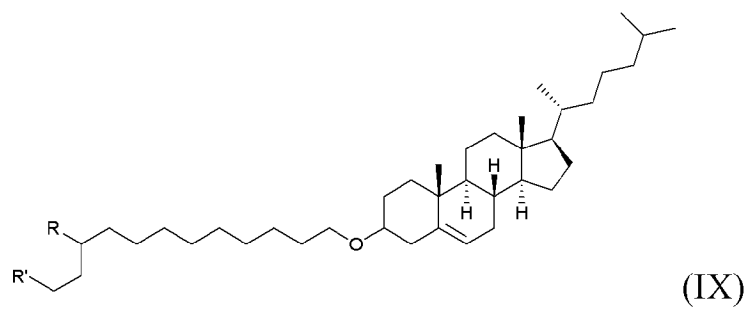
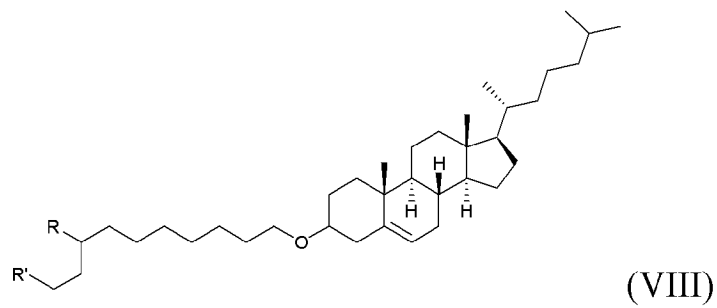
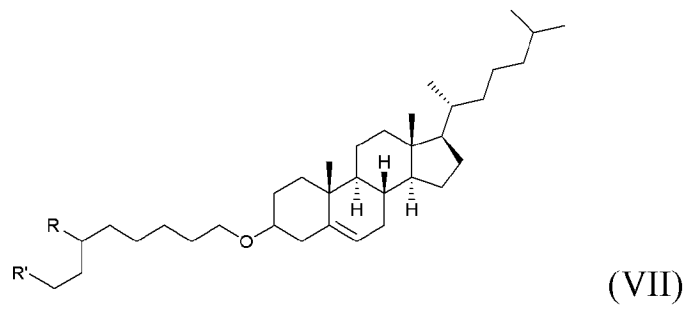
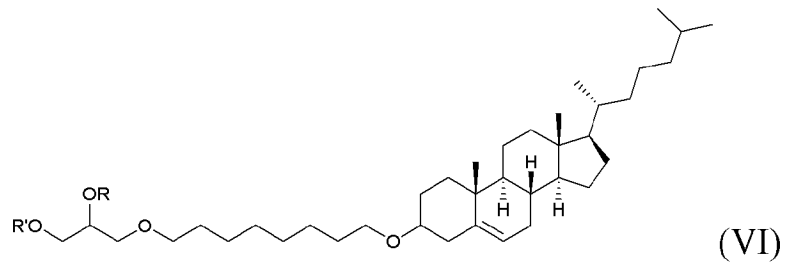
[0038] 此外，示例性的缀合物包括结构 (IV)-(VI)，其中 R 和 R' 中的每个为 H 或多聚核苷酸磷酸酯基团，以及结构 VII-IX，其中 R 和 R' 中的每个为 H、OH 或多聚核苷酸磷酸酯基团。

[0039]



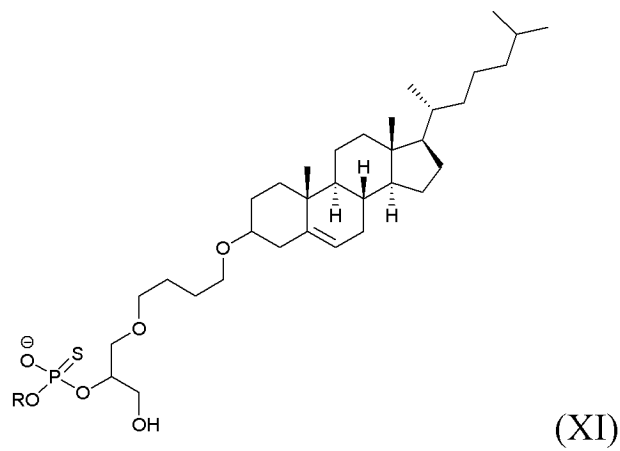
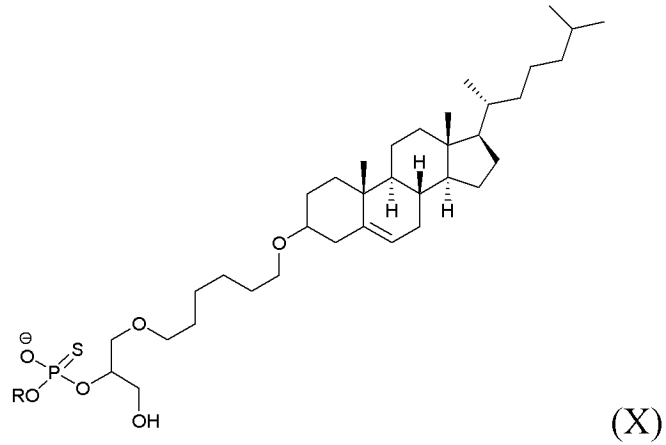


[0040]



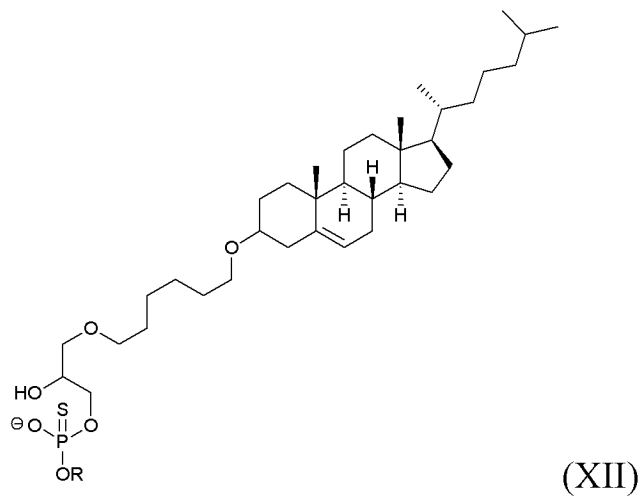
[0041] 在某些实施方案中, 缀合物为具有下述结构中的一种的 5' 缀合物, 其中 R 为多聚核苷酸链:

[0042]

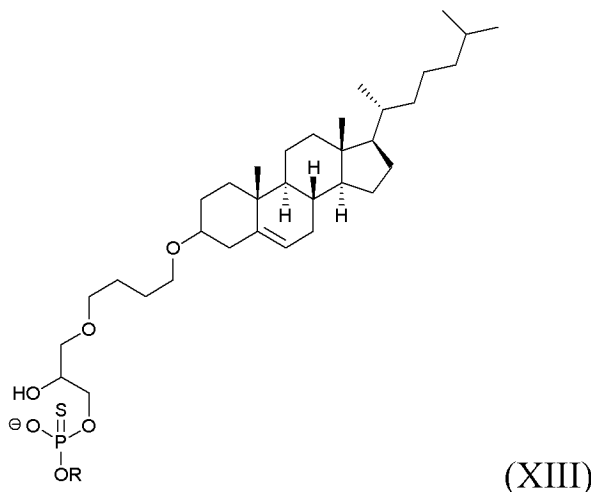


[0043] 在某些实施方案中,缀合物为具有下述结构中的一种的 3' 缀合物,其中 R 为多聚核苷酸链:

[0044]



[0045]



[0046] 多聚核苷酸

[0047] 本发明的化合物、组合物和方法可以使用各种多聚核苷酸（包括寡核苷酸）和其衍生物。多聚核苷酸可以基于 DNA 或 RNA，和 / 或可以体现为一种或多种核酸修饰形式，例如诸如经修饰的多聚核苷酸主链或一种或多种经修饰的核苷单元。多聚核苷酸或衍生物可具有一个或多个单链和 / 或一个或多个双链区域。多聚核苷酸可以为反义寡核苷酸、短干扰 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、单链 RNA (ssRNA)、微小 RNA (miRNA)、短发夹 RNA (shRNA) 或核酶。

[0048] 在某些实施方案中，化合物、组合物或方法使用缀合的 miRNA 抑制剂（例如反义抑制剂）。这样的抑制剂例如描述于 WO 2008/016924、WO2009/062169、WO 2009/058818、WO 2009/018492、WO 2009/018493、WO2009/012468 和 WO 2007/070483 中，据此将其整体引入本申请中作为参考。

[0049] 因此，多聚核苷酸可以为反义寡核苷酸。在某些实施方案中，反义寡核苷酸含有至少一个化学修饰（例如糖或主链修饰）。例如，反义寡核苷酸可以包括一个或多个经修饰的核苷酸，诸如 2' -O- 甲基 - 糖修饰。在某些实施方案中，反义寡核苷酸仅包括经修饰的核苷酸。在某些实施方案中，反义寡核苷酸也可包括一个或多个导致形成部分或全部硫代磷酸酯主链的硫代磷酸酯连接键。适合于抑制 miRNA 的反义寡核苷酸在长度上可以为约 5 至约 50 个核苷酸，诸如在长度上为约 10 至约 30 个核苷酸，或在长度上为约 20 至约 25 个核苷酸。在某些实施方案中，反义寡核苷酸在长度上为约 8 至约 18 个核苷酸，并且在其它实施方案中在长度上为约 12 至约 16 个核苷酸。反义寡核苷酸可以包括至少约 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 与成熟 miRNA 序列互补的序列（参见下述表 1）。在其它实施方案中，反义寡核苷酸包括 100% 与成熟 miRNA 序列互补的序列。本申请所使用的“互补的”或“碱基对”包括或仅涉及经典的沃森 - 克里克核苷酸碱基配对 (Watson-Crick nucleotide base-pairing)。在一个实施方案中，反义寡核苷酸为 antagomir。“antagomir”为单股的、任选经化学修饰的至少部分与 miRNA 序列互补的核糖核苷酸。

[0050] 在某些实施方案中，多聚核苷酸具有被设计为模拟细胞 miRNA，诸如列于表 1 中的 miRNA 的序列。在这些实施方案中的多聚核苷酸也可包括一个或多个经修饰的核苷酸，诸如 2' -O- 甲基 - 糖修饰，以及一个或多个硫代磷酸酯连接键。适合于模拟 miRNA 的多聚核苷酸在长度上可以为约 15 至约 50 个核苷酸，诸如在长度上为约 18 至约 30 个核苷酸，或在长度上为约 20 至约 25 个核苷酸。合成的 miRNA 可以包括至少约 75%、80%、85%、90%、

95%、96%、97%、98%或99%与成熟 miRNA 序列相同的序列（参见下述表 1）。在其它实施方案中，多聚核苷酸包括 100%与成熟 miRNA 序列相同的序列。

[0051] 多聚核苷酸可以主要由核糖核苷酸单元或脱氧核糖核苷酸单元组成，且可以具有一个或多个化学修饰。例如，多聚核苷酸可以包含一个或多个“构象限制的”或二环的糖核苷修饰 (BSN)，所述“构象限制的”或二环的糖核苷修饰 (BSN) 为在含有 BSN 的寡核苷酸和它们的互补的微小 RNA 靶标链之间形成的复合物提供增强的热稳定性。在某些实施方案中，多聚核苷酸包括，例如约 1 至 10 个锁核酸。“锁核酸” (LNA) 含有 2' -O, 4' -C- 亚甲基核糖核苷，其中核糖的糖部分处于“锁定的”构象。可替换地或此外，多聚核苷酸可以包括核酸肽 (PNA)，其含有基于肽的主链而不是糖 - 磷酸酯主链。在这些或其它实施方案中，多聚核苷酸含有一个或多个糖修饰和 / 或一个或多个主链修饰。示例性的糖修饰包括 2' 和 4' 修饰，诸如' -O- 烷基（例如 2' -O- 甲基，2' -O- 甲氧基乙基）、2' - 氟和 4' 硫修饰。示例性的主链修饰包括硫代磷酸酯、吗啉代或磷酸基羧酸酯连接（参见例如美国专利 6, 693, 187 和 7, 067, 641，将其整体引入本申请中作为参考）。

[0052] 在某些实施方案中，多聚核苷酸为 2' -O- 甲氧基乙基 gapmer。“gapmer”在 5' 和 3' 端含有 2' -O- 甲氧基乙基 - 经修饰的核糖核苷酸且在中心含有至少十个脱氧核糖核苷酸。这些“gapmer”能够触发独立于核糖核酸酶的 RNA 靶标的降解机制。

[0053] 已知多聚核苷酸的其它修饰（例如为增强稳定性和 / 或改善反义效果），并可以与本发明配合使用。示例性的修饰描述与美国专利 6, 838, 283 中，据此将其整体结合至本申请中作为参考。

[0054] 多聚核苷酸可以具有被设计为模拟或靶向 miRNA，诸如列于下述表 1 的 miRNA 的核苷酸序列。在某些实施方案中，被设计为抑制 miRNA 的多聚核苷酸可以具有相对于完全互补的 miRNA 序列（示于下述表 1 中）含有 1-5 个（例如 2、3 或 4 个）错配的序列。在其它实施方案中，被设计为模拟 miRNA 的多聚核苷酸可以具有相对于成熟 miRNA 序列（示于下述表 1 中）含有 1-5 个（例如 2、3 或 4 个）核苷酸置换的序列。这样的反义和有义序列可以被结合至 shRNA 或其它含有例如茎和环部分的 RNA 结构中。这样的序列可用于模拟或靶向 miRNA 功能等，从而用于治疗或改善心脏肥大、心肌梗死、心力衰竭（例如充血性心力衰竭）、血管损伤、和 / 或病理性心纤维化等等。示例性 miRNA 治疗用途公开于列于下述表 1 中的美国 PCT 专利参考文献中，据此将其中每篇整体引入本申请中作为参考。

[0055] 表 1

[0056]

<b>miRNA</b>	<b>miRNA 序列</b>	<b>SEQ ID NO:</b>	<b>参考</b>
1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	1	WO 2009/012468
100	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	2	WO 2009/012468
10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	3	WO 2009/012468
125b	UCCCUGAGACCCUAAAUUGUGA	4	WO 2009/012468
128	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	5	WO 2007/070483
133a	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	6	WO 2009/012468
133b	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA	7	WO 2009/012468
139	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG	8	WO 2009/012468
143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	9	WO 2007/070483
145	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	10	WO 2007/070483
150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	11	WO 2009/012468
15a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	12	WO 2009/062169

[0057]

<u>miRNA</u>	<u>miRNA 序列</u>	<u>SEQ ID</u> <u>NO:</u>	<u>参考</u>
15b	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	13	WO 2009/062169
16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	14	WO 2009/062169
181b	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	15	WO 2009/012468
195	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	16	WO 2009/012468
197	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	17	WO 2009/012468
199a	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	18	WO 2009/012468
199b	miR-199b-5p CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	19	US 61/047,005
	miR-199b-3p ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	20	
206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	21	WO 2007/070483
208a	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	22	WO 2008/016924
208b	AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU	23	WO 2009/018492
20a	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	24	US 60/950,565
21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	25	WO 2009/058818
214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	26	US 61/047,005
22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	27	WO 2009/012468
221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	28	WO 2009/012468
222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	29	WO 2009/012468
224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU	30	WO 2009/012468
23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	31	WO 2009/012468
26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	32	WO 2007/070483
26b	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	33	WO 2009/012468
28	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	34	WO 2009/012468
29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	35	WO 2009/018493

[0058]

<b>miRNA</b>	<b>miRNA 序列</b>	<b>SEQ ID NO:</b>	<b>参考</b>
29b	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	36	WO 2009/018493
29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	37	WO 2009/018493
30a	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	38	PCT/US2010/031147
30b	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	39	PCT/US2010/031147
30c	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	40	WO 2009/012468
30d	UGUAAACAUCCCGACUGGAAG	41	PCT/US2010/031147
30e	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG	42	PCT/US2010/031147
342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	43	WO 2009/012468
382	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	44	WO 2009/012468
422a	ACUGGACUUAGGGUCAGAAGGC	45	US 12/391,028
378	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	46	WO 2009/012468
424	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA	47	WO 2009/062169
483-3p	UCACUCCUCUCCUCCCGUCUU	48	WO 2009/012468
484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU	49	WO 2009/012468
486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	50	WO 2009/012468
497	CAGCAGCACACUGUGGUUUGU	51	WO 2009/062169
499	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU	52	WO 2009/018492
542-5p	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAGA	53	WO 2009/012468
92a	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	54	WO 2009/012468
92b	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	55	WO 2009/012468
let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	56	WO 2009/012468
let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	57	WO 2009/012468
let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	58	WO 2009/012468
let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	59	WO 2009/012468

[0059]



<b>miRNA</b>	<b>miRNA 序列</b>	<b>SEQ ID NO:</b>	<b>参考</b>
let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	60	WO 2009/012468
let-7f	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	61	WO 2009/012468
let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	62	WO 2009/012468
451	AAACCGUUACCAUACUGAGUU	63	US 61/286,546

[0060] 多聚核苷酸可带有 1-5 个如本申请所描述的那样缀合的亲脂性基团。亲脂性基团可以通过多聚核苷酸的 5' 或 3' 位缀合, 和 / 或通过形成例如磷酸酯缀合至多聚核苷酸主链上。在某些实施方案中, 多聚核苷酸在 5' 和 / 或 3' 末端带有一个或两个如本申请所描述的那样缀合的亲脂性基团。

#### [0061] 药物组合物和递送

[0062] 本发明的缀合物可以形成各种药物组合物。药物组合物将会以适合于预期应用的形式来制备。通常, 这将会需要制备基本上没有热原以及其它对人或动物有害的杂质的组合物。示例性递送 / 制剂系统包括胶态分散系统、大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠子和基于脂质的系统 (包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体)。适合于将本发明的核酸递送至心肌和骨骼肌组织的可商购的脂肪乳剂包括 Intralipid®、Liposyn®、Liposyn® II、Liposyn® III、Nutrilipid 和其它类似的脂质乳剂。用作体内递送媒介物的优选的胶体系为脂质体 (即人工膜囊)。这样的系统的制备和使用是本领域公知的。示例性的制剂也公开于 US 5,981,505 ;US 6,217,900 ;US 6,383,512 ;US 5,783,565 ;US 7,202,227 ;US 6,379,965 ;US 6,127,170 ;US 5,837,533 ;US 6,747,014 ;和 W003/093449, 据此将其整体引入本申请中作为参考。

[0063] 药物组合物和制剂可以使用合适的盐和缓冲液以提供稳定的并允许通过靶细胞摄取的递送媒介物。含水的本发明的组合物包括有效量的递送媒介物, 其包括溶解或分散于药学上可接受的载体或水性介质中的抑制剂多聚核苷酸或 miRNA 多聚核苷酸序列 (例如脂质体或其它复合物)。术语 " 药学上可接受的 " 或 " 药理学上可接受的 " 是指当给药至动物或人体时不产生不利的、过敏性的或其它不适当的反应的分子实体和组合物。如本申请中所使用的 " 药学上可接受的载体 " 可以包括一种或多种在制备药物 (诸如适合于给药于人的药物) 的用途中是可接受的溶剂、缓冲液、溶液、分散介质、包衣料、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。为药学活性物质而进行这样的介质和试剂的使用是本领域公知的。补充的活性成分也可以结合至组合物中。

[0064] 可以通过任何途径给药或递送根据本发明的药物组合物, 只要对于靶标组织而言通过该途径是有效的。例如, 可以通过皮内、皮下、肌肉、腹腔或静脉注射给药, 或通过直接注射至靶标组织 (例如心脏组织) 给药。包含 miRNA 抑制剂或包含 miRNA 序列的表达构建体的药物组合物也可以通过导管系统或隔离冠状循环的系统给药从而用于递送治疗剂至心脏。用于递送治疗剂至心脏和冠状脉管系统的各种导管系统是本领域已知的。一些适合于在本发明中使用的基于导管的递送方法或冠状隔离的方法的非限定性实例披露于美国专利 6,416,510 ;美国专利 6,716,196 ;美国专利 6,953,466、W02005/082440、W0

2006/089340、美国专利公开号 2007/0203445、美国专利公开号 2006/0148742 和美国专利公开号 2007/0060907 中,据此将其全部整体引入本申请中作为参考。

[0065] 组合物或制剂也可以胃肠外或腹膜内给药。作为说明,为游离碱或药学上可接受的盐形式的缀合物的溶液可以在水中适当地与表面活性剂(诸如羟丙纤维素)混合来制备。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇和其混合物和油中制备。在普通的贮藏和使用条件下,这些制剂通常含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0066] 适合于可注射应用或导管递送的药物形式包括,例如,无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。通常,这些制剂是无菌和液态的,达到存在可容易注射性的程度。制剂应当在制备和贮存条件下是稳定的并且应当被防腐以防止被微生物(诸如细菌和真菌)污染。合适的溶剂或分散介质可以含有,例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇,等等),其合适的混合物,以及植物油。可以例如通过使用包衣(诸如卵磷脂)、通过在分散体的情况下保持必需的粒径和通过使用表面活性剂来保持合适的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如尼泊金类、三氯叔丁醇、酚类、山梨酸、硫柳汞等实现对微生物作用的预防。在许多情况下,将会优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0067] 无菌可注射溶液可以通过将适量的缀合物以及任何其它所需成分(例如上面所列举的)一起结合至溶剂中来制备。通常,分散体是通过将各种灭菌的活性成分结合至含有碱性分散介质和其它所需成分(例如上面所列举的)的无菌媒介物中来制备的。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法包括从其先前的无菌过滤的溶液中产生活性物质以及任何所需的其它成分粉末的真空干燥和冷冻干燥技术。

[0068] 制备后,溶液优选以与剂型相容的方式以及治疗有效量给药。制剂可以容易地以各种剂型给药,诸如可注射溶液、药物释放胶囊等。例如,对于以水溶液胃肠外给药,溶液通常进行适当地缓冲,且液体稀释剂首先例如用足够的盐水或葡萄糖使其等渗。可以使用这样的含水溶液,例如用于静脉、肌内、皮下和腹膜内给药。优选地,使用那些本领域的技术人员已知的无菌含水介质,特别是在本公开的教导下。作为说明,可以将单剂量溶解于 1ml 等渗 NaCl 溶液中并且或者加入至 1000ml 皮下输液中或在预定的输注部位进行注射(参见例如"Remington's Pharmaceutical Sciences",第 15 版,第 1035-1038 和 1570-1580 页)。取决于被治疗的患者的状况,剂量将必然会发生一些变化。无论如何,负责给药的人员将会确定每个患者的合适的剂量。此外,对于人体给药,制剂应当满足 FDA 生物制品标准办公室(FDA Office of Biologics standards)所要求的无菌度、致热原性、总体的安全性和纯度标准。

#### [0069] 治疗方法

[0070] 本发明提供将多聚核苷酸递送至哺乳动物细胞的方法,以及用于在哺乳动物患者中治疗、改善或防止病症进展的方法。所述方法通常包括给药多聚核苷酸,其作为与胆固醇或本申请所描述的其它亲脂性部分的缀合物。多聚核苷酸可以为 miRNA 或 miRNA 抑制剂(例如具有被设计为抑制 miRNA 的表达或活性的核苷酸序列)。因此,患者可能患有与 RNA 表达(诸如 miRNA 表达)有关的病症。这样的病症包括,例如心脏肥大,心肌梗死、心力衰竭(例如充血性心力衰竭)、血管损伤、再狭窄、或病理性心纤维化。

[0071] 涉及下列病症诸如心脏肥大、心肌梗死、心力衰竭（例如充血性心力衰竭）、血管损伤、再狭窄和 / 或病理性心纤维化的 miRNA、且用于靶向 miRNA 功能的序列描述于 WO 2008/016924、WO 2009/062169、WO 2009/058818、WO 2009/018492、WO 2009/018493、WO 2009/012468、和 WO 2007/070483 中，据此将其整体引入本申请中作为参考。这样的 miRNA 和序列进一步列于表 1 中并在本申请中进行描述。

[0072] 可将同样在本申请中描述的药物组合物或制剂形式的亲脂性多聚核苷酸缀合物递送至患者。

[0073] 在某些实施方案中，患者具有一种或多种危险因子包括，例如长期存在的未受控的高血压、未纠正的心瓣膜病、慢性咽峡炎、近期发生的心肌梗死、心脏病和病理性肥大的先天易感性。可替换地或此外，患者可能已经被诊断为具有例如心脏肥大的遗传易感性，或可能有例如心脏肥大的家族史。

[0074] 在该方面中，本发明可提供改善的运动耐量、减少的住院时间、更高的生活质量、降低的死亡率和 / 或患有心力衰竭或心脏肥大的患者的降低的死亡率。

#### [0075] 合成缀合物的方法

[0076] 本发明进一步提供合成具有在 5' 和 / 或 3' 末端缀合或通过烃连接基缀合至多聚核苷酸主链的亲脂性部分的多聚核苷酸的方法。在该方面中，本发明包括使亲脂性部分与具有末端官能团的直链烃或环烃偶联以制备第一中间体，并制备具有适合于在固相多聚核苷酸合成期间结合至多聚核苷酸链的官能团的第二中间体。可替换地，该方法包括在多聚核苷酸的合成完成之后，使用例如羰基加成 - 消除 / 还原胺化、酰胺化、马来酰亚胺 - 巯基偶联，水性狄尔斯 - 阿尔德和“点击”化学，合成胆固醇与多聚核苷酸的缀合物。

[0077] 在某些实施方案中，若亲脂性部分为醇，诸如甾醇，该方法包括使亲脂性部分缀合至具有末端官能团的烃（本申请所描述的）。该步骤将会制备第一中间体，优选醚连接的中间体。例如，在某些实施方案中甾醇被醚化（通过甾醇羟基）至 C3-C15 烃。在某些实施方案中，烃为基本上线性的 C4-C8（例如 C4 或 C6）烃，其可以被取代的，并且其在主链中可以具有一个、两个或三个独立地选自 O, N 和 / 或 S 的杂原子。可替换地，烃包括 C5-C8 环烃，例如环己烷，或具有一个或两个杂原子的 5-8 元环状基团。

[0078] 使第一或醚连接的中间体进一步反应以制备合适的与固相核酸合成相容的第二中间体。例如，醚连接的中间体可以进一步通过一个或更多的步骤反应以制备用于在多聚核苷酸的合成期间转化成磷酸酯的亚磷酰胺中间体（例如通过醚连接键）。可替换地，或者另外，醚连接的中间体可以进一步通过一个或更多的步骤反应以制备用于偶联（例如通过酰胺化）至合适的支持物以形成多聚核苷酸链的 3' 末端的合适的端基。示例性的用于制备 5' 和 3' 缀合物的反应示于图 2 中。

[0079] 在某些实施方案中，包括亚磷酰胺中间体（示于图 2 中的 6 中）的制备，醚连接的中间体 (2) 端部的醇通过与亚磷酰化剂（诸如 2- 氰基乙基 N,N- 二异丙基氯亚磷酰胺）反应以制备亚磷酰胺。可以采用这些特别是其中不需要三苯甲基监测或额外的 amidite 偶联的实施方案。

[0080] 可替换地，具有用于制备亚磷酰胺的合适的羟基的其它中间体可以从 (2) 合成。例如，化合物 (2) 可以反应形成两种相互区别的通过至少一个碳原子，但优选 2 个或更多的碳原子隔开的羟基基团。示例性的用于将化合物 (2) 转化成具有相互区别的羟基的化合

物 (5) 的反应系列示于图 2 中。通过使胆固醇与甲苯磺酰氯反应形成的甲苯磺酸胆固醇酯 (1), 与 1,6- 己二醇在回流的 1,4- 二噁烷中经历  $S_{N1}$  反应。通过在 5- 位的烯的邻基参与作用, 专有地提供了  $3\beta$ - 异构体。所得的 (胆甾 -5- 烯 - $3\beta$ - 氧基) 己 -6- 醇 (2) 被转化成甲磺酸酯 (3), 其随后用于烷基化丙酮缩甘油 (solketal)。通过用三氟乙酸于湿的 THF 中的溶液处理使粗制的丙酮缩甘油衍生物脱保护, 得到 3-(6-(胆甾 -5- 烯 - $3\beta$ - 氧基) 己基氧基) 丙烷 -1,2- 二醇 (4)。使用标准方法, 将二醇的伯醇选择性地保护为 4,4'- 二甲氧基三苯甲基醚 (5)。剩下的仲醇可以通过与亚磷酰化剂 (诸如 2- 氰基乙基 N, N- 二异丙基氯亚磷酰胺) 反应转化成亚磷酰胺 (6), 并且随后在寡核苷酸合成循环中被用作标准的 amidite 单体。可替换地, 仲醇可以通过在 TEA 存在下用琥珀酸酐处理转化成琥珀酸酯 (7)。然后, 可将所得的羧酸酯通过 HBTU 偶联至过量的胺功能化的可控孔度玻璃 (CPG)。通过用乙酸酐“帽化”, 使过量的胺和 CPG 的任何游离表面氢氧化物呈非反应性。胆固醇功能化的 CPG 适合于 3'- 胆固醇修饰的寡核苷酸的合成。CPG 可以正好用作任何负载标准核苷的 CPG, 在自动化寡核苷酸合成中使用。

[0081] 因此, 在这些实施方案中, 从具有至少一个  $2^\circ$ - 醇和至少一个  $1^\circ$ - 醇的化合物制备第二中间体。根据这些实施方案, 在多聚核苷酸的合成期间, 一个羟基基团与核苷酸在链的 5'- 末端形成一个磷酸二酯连接键。在 5' 缀合物的情况下, 两个羟基基团将会容许在自动化合成器上进行三苯甲基监测反应和 / 或在胆固醇缀合物之后进行进一步的链伸长, 如果需要的话。

[0082] 在某些实施方案中, 包括制备用于偶联至固体支持物的第二中间体 (示于图 2 中的 7 中), 醚连接的中间体 (2) 的醇在若干步骤中反应以制备琥珀酸酯中间体 (或其它可从固体支持物中断裂的中间体)。用于制备 3' 缀合物的中间体将会, 如上所述, 优选具有两个羟基基团, 优选是相互区别的。例如, 可以从具有至少一个  $2^\circ$  羟基和至少一个  $1^\circ$  羟基的化合物制备用于偶联至固体支持物的中间体。用于将化合物 2 转化成具有相互区别的羟基的化合物 (5) 的示例性的反应系列示于图 2 中。在这些实施方案中, 在多聚核苷酸的合成期间, 核苷酸链将会脱去 (grow off) DMTr- 保护的  $1^\circ$ - 醇且缀合物部分将会通过在  $2^\circ$ - 羟基基团 (例如琥珀酸酯) 上的一些种类的可断裂连接键锚定至固体支持物上。

[0083] 本发明的可替换的实施方案包括在寡核苷酸合成完成之后加入醚连接的中间体 (2) 的衍生物。参见图 4。这可以例如通过反应如羰基加成 - 消除 / 还原胺化、酰胺化、马来酰亚胺 - 巯基偶联、水性狄尔斯 - 阿尔德和“点击”化学来完成。这些方法提供等同的胆固醇醚构造, 而不需要合成胆固醇 -amidite。例如, 胆甾 -5- 烯 - $3\beta$ - 氧基烷醇, 诸如化合物 (2), 可以容易地通过本领域的技术人员进行修饰以得到端部的醛、羧酸酯、胺、马来酰亚胺、硫醇、二烯、叠氮化物、炔或其它反应性部分。这些化合物可以进一步与用互补性官能团修饰的寡核苷酸反应, 所述官能团与末端功能化的胆甾 -5- 烯 - $3\beta$ - 氧基烷的反应性部分形成共价键。产物为这样的胆固醇缀合物, 其仍旧保持相对非极性的、基本上呈线性的与胆固醇部分的烷基氧基连接键, 并在亲脂性部分和任何含有可交换质子或其它基本上呈极性的官能团的基团之间保持 3 个或更多的原子距离。当被保护的合成的寡核苷酸链仍旧连接至固相时, 或在脱保护后当合成的寡核苷酸在溶液中时, 可以进行这些所谓的“合成后的生物缀合”。

[0084] 用于生物缀合的技术是公知的, 并且例如描述于 Hermanson GT, Bioconjugate

Techniques, Second Edition, Academic Press ;2nd edition(2008 年 4 月 1 日)。

[0085] 实施例

[0086] 核酸 (NA)-胆固醇缀合物得自于与容易获得的氯甲酸胆固醇酯反应的胺 (以在胆甾烯环结构的  $3\beta$  位置上得到氨基甲酸酯连接)。该系统在非常接近于亲脂性环结构的部位设置有具有可交换氢的极性基团。这会限制缀合物的亲脂性以及缀合物完全嵌入至任何脂双层或与其它亲脂性部分相结合的能力。参见图 1。本申请所描述的缀合物避免使用将具有可交换质子的极性基团置于紧靠胆甾烯环结构的位置的连接基 (图 1)。

[0087] 实施例 1: 示例性的缀合物的合成

[0088] 醚连接的胆固醇, 诸如胆固醇-O-HEX-OH (示于图 2 中的 2 中) 可用于产生 NA 缀合物。图 2 描绘了连接基 amidite 6 和琥珀酸酯 7 的合成 (在本申请中涉及“C6-Chol”)。它们可以分别用作常见的、化学合成的用通常可获得的合成试剂制备的寡核苷酸上的 5'-修饰 (化合物 6) 以及当通过酰胺化缀合至任何可商购的用于寡核苷酸合成的氨基支持物时的 3'-修饰 (化合物 7)。可替换地, 例如当不需要三苯甲基监测或额外的 amidite 偶联时, amidite 可以从醇诸如 2 制备从而用于 5'-端部缀合的寡核苷酸。

[0089] 通常, 烃间隔物在末端或靠近末端处含有羟基基团以形成磷酸酯。优选地, 具有通过至少一个碳, 但优选 2 个或更多个碳隔开的两个羟基基团。例如, 羟基可以通过其中一个为  $2^\circ$ -醇且另一个为  $1^\circ$ -醇进行区分。至少一个羟基基团对于与核苷酸在链的 5'-末端形成磷酸二酯连接而言是必须的。在 5'-胆固醇缀合物的情况下, 两个羟基基团将会容许在自动化合成器上进行三苯甲基监测反应和 / 或在胆固醇缀合物之后进行进一步的链伸长。4,4'-二甲氧基三苯甲基 (DMTr) 将会被置于例如一个羟基上, 亚磷酰胺 (即磷酸二酯前体) 将会位于剩余的羟基上, 其提供了更有效的亚磷酰胺偶联。

[0090] 3'-胆固醇缀合物将会需要两个羟基基团, 优选是相互区别的 (即一个为  $2^\circ$  且另外一个为  $1^\circ$ ), 其中核苷酸链将会脱去 DMTr-保护的  $1^\circ$ -醇且其缀合物部分将会通过在  $2^\circ$ -羟基基团上的一些种类的可断裂连接键锚定至固体支持物上。5'-缀合物将会在  $2^\circ$  位置上具有磷酸酯基团。

[0091] 在固相多聚核苷酸合成期间用于缀合的胆固醇-O-Hex 中间体的示例性合成如下所述。

[0092] 胆甾-5-烯- $3\beta$ -甲苯磺酸酯

[0093] 将胆固醇 (25.0g, 64.7mmol) 称量至 500mL 圆底烧瓶中并溶解于吡啶 (200mL) 中以得到冷却至  $0^\circ\text{C}$  的无色溶液。将甲苯磺酰氯 (24.65g, 129mmol) 称量至 100mL 圆底烧瓶中并溶解于吡啶 (40mL) 中以得到微黄色溶液。然后将甲苯磺酰氯溶液立刻加入至正在搅拌的胆固醇溶液中并使所得的反应混合物搅拌过夜, 并恢复至室温。用旋转蒸发器浓缩反应混合物以得到白色固体, 将其吸收至最小量的氯仿 (40mL) 中并通过加入甲醇 (500mL) 沉淀。过滤并用甲醇 (500mL) 和乙腈 (200mL) 洗涤所得的白色固体。将固体转移至 1L 圆底烧瓶中并高真空干燥过夜以得到 34.2g (98%) 的白色粉末。 $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.67 (3H, s); 0.80-1.75 (33H, m); 1.76-2.03 (5H, m); 2.20-2.30 (1H, m); 2.44 (4H, m); 4.25-4.35 (1H, m); 5.29 (1H, d,  $J = 5\text{Hz}$ ); 7.32 (2H, d,  $J = 8\text{Hz}$ ); 7.79 (2H, d,  $J = 8\text{Hz}$ )。

[0094] 胆甾-5-烯- $3\beta$ -氧基己-6-醇

[0095] 将胆甾-5-烯- $3\beta$ -甲苯磺酸酯 (15.0g, 27.7mmol) 和 1,6-己二醇 (65.5g,

555mmol) 称量至 500mL 圆底烧瓶中并溶解于 1,4-二噁烷 (300mL) 中以得到无色混悬液。将烧瓶装配于有效的回流冷凝器上并将反应混合物在 110°C 油浴中回流加热 17 小时。真空浓缩反应混合物并将残余物悬浮于 DI 水 (去离子水) (500mL) 中。用 EtOAc (2x150mL) 萃取水相并用水 (2x300mL) 和盐水 (1x150mL) 洗涤合并的有机相。用硫酸钠干燥有机相、过滤、浓缩并高真空干燥过夜以得到 12.85g (95%) 的淡黄色蜡状物。<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 0.67 (3H, s) ; 0.80-1.65 (42H, m) ; 1.75-2.05 (5H, m) ; 2.12-2.25 (1H, m) ; 2.30-2.40 (1H, m) ; 3.05-3.17 (1H, m) ; 3.45 (2H, dt, J = 6.5, 1.6Hz) ; 3.57 (2H, t, J = 6.6Hz) ; 5.34 (1H, d, J = 5.3Hz)。

[0096] 胆甾-5-烯-3β-氧基己烷-6-甲磺酸酯

[0097] 将胆甾-5-烯-3β-氧基己-6-醇 (12.84g, 26.4mmol) 称量至 500mL 圆底烧瓶中。向烧瓶中加入二氯甲烷 (100mL) 和三乙胺 (7.35mL, 52.7mmol), 用氩气冲洗并冷却至 0°C。在 5 分钟期间内将甲磺酰氯 (2.55mL, 32.96mmol) 滴加至正在搅拌的溶液中并将混合物在 0°C 另搅拌 1h。将饱和碳酸氢钠溶液 (150mL) 加入至混合物中, 后将混合物转移至转移至分液漏斗中。弃去水相并用新鲜的饱和碳酸氢钠溶液 (1x150mL) 和盐水 (1x50mL) 洗涤有机相。用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥有机相, 过滤并浓缩至干以得到 14.8g (99%) 的黄色蜡状物。<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 0.67 (3H, s) ; 0.80-1.65 (41H, m) ; 1.70-2.05 (5H, m) ; 2.12-2.23 (1H, m) ; 2.30-2.37 (1H, m) ; 3.00 (3H, s) ; 3.05-3.17 (1H, m) ; 3.45 (2H, dt, J = 6.5, 1.4Hz) ; 4.22 (2H, t, J = 6.6Hz) ; 5.34 (1H, d, J = 5.2Hz)。

[0098] 3-(6-(胆甾-5-烯-3β-氧基)己基氧基)丙烷-1,2-二醇

[0099] 将丙酮缩甘油 (2.92g, 27.5mmol) 称量至 200mL 圆底烧瓶中。用氩气冲洗烧瓶并加入甲苯 (40mL)。将 60% 的氢化钠于油中的混悬液 (3.14g, 131mmol) 立刻加入至正在搅拌的溶液中并将混合物在室温搅拌 30 分钟。将胆甾-5-烯-3β-氧基己烷-6-甲磺酸酯 (14.8g, 26.2mmol) 溶解于甲苯 (40mL) 中并将溶液缓慢加入至醇盐 (alkoxide) 溶液中。将烧瓶装配至回流冷凝器上并用氩气冲洗该仪器。将反应混合物回流加热并搅拌 17 小时。将反应混合物冷却至室温并用在 15 分钟期间内滴加至剧烈搅拌的反应混合物的乙醇于乙酸乙酯中的溶液终止反应。进一步用乙酸乙酯稀释反应混合物并用 10% 碳酸钠水溶液 (2x150mL) 洗涤。用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥有机相, 过滤并浓缩。

[0100] 将残余物复溶于 4 : 4 : 1 比例的四氢呋喃 : 三氟乙酸 : 水 (18mL) 中, 然后设定在室温搅拌 2 小时。反应混合物的 TLC (15% 丙酮 / 己烷) 显示在粗制的混合物中的所需的化合物的脱保护完成了。将反应混合物蒸发至干, 施加于 100g Biotage SNAP 硅胶柱上并用乙酸乙酯 / 己烷梯度洗脱 (0-35%, 2L, ~ 50mL/min) 以得到 4.90g (33%, 两步) 的无色蜡状物。<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 0.67 (3H, s) ; 0.80-1.65 (41H, m) ; 1.75-2.05 (5H, m) ; 2.12-2.40 (4H, m) ; 3.07-3.17 (1H, m) ; 3.40-3.57 (6H, m) ; 3.63 (1H, dd, J = 11.4, 5.2) ; 3.71 (1H, dd, J = 11.4, 3.9) ; 3.81-3.89 (1H, m) ; 5.34 (1H, d, J = 5.2Hz)。

[0101] 1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基)-3-(6-(胆甾-5-烯-3β-氧基)己基氧基)丙-2-醇

[0102] 将 3-(6-(胆甾-5-烯-3β-氧基)己基氧基)丙烷-1,2-二醇 (4.75g, 8.47mmol) 称量至带有搅拌棒的 200mL 圆底烧瓶。用氩气冲洗烧瓶, 加入吡啶 (30mL) 并搅拌下冷却至 0°C。将 DMTr-Cl (3.01g, 8.89mmol) 称量至 20mL 闪烁瓶中并溶解于吡啶 (17mL) 中。在

20 分钟期间内将 DMTr-Cl 溶液滴加至正在搅拌的二醇溶液中。使反应搅拌过夜,同时回升至室温。通过加入无水甲醇 (1mL) 使反应终止并将反应搅拌 30 分钟。将饱和碳酸氢钠溶液 (50mL) 加入至反应混合物中,搅拌混合物直到 CO<sub>2</sub>的释放终止。将混合物浓缩至干并在水 (100mL) 和乙酸乙酯 (100mL) 中分配。用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥有机相,过滤并浓缩。将残余物施加于 100g Biotage SNAP 柱上并用乙酸乙酯/己烷梯度洗脱 (10-20%, 1.5L, ~50mL/min) 以得到 3.50g (47.9%) 的无色、粘性油。<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 0.67 (3H, s) ; 0.87 (6H, dd, J = 6.6, 1.8Hz) ; 0.91 (3H, d, J = 6.6Hz) ; 0.93-1.60 (32H, m) ; 1.75-2.05 (5H, m) ; 2.15-2.25 (1H, m) ; 2.32-2.41 (1H, m) ; 2.42 (1H, d, J = 4.6Hz) ; 3.07-3.22 (2H, m) ; 3.39-3.57 (6H, m) ; 3.79 (6H, s) ; 3.80 (s, 1H) ; 3.90-3.98 (1H, m) ; 5.34 (1H, d, J = 5.3Hz) ; 6.78-6.85 (m, 4H) ; 7.14-7.25 (m, 1H) ; 7.26-7.34 (m, 6H) ; 7.40-7.44 (m, 2H)。

[0103] 4-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基)-3-(6-(胆甾-5-烯-3β-氧基)己基氧基)丙-2-基氧基)-4-氧代丁酸, TEA 盐

[0104] 将 1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基)-3-(6-(胆甾-5-烯-3β-氧基)己基氧基)丙-2-醇 (1.75g, 2.02mmol)、琥珀酸酐 (0.812g, 8.10mmol) 和 4-(二甲基氨基)吡啶 (25mg, 0.20mmol) 加入至 100mL 带有搅拌棒的圆底烧瓶中。向烧瓶中加入吡啶 (10mL)。将反应混合物在 80℃ 搅拌 8 小时并在 50℃ 搅拌 16h。将反应混合物真空浓缩并与 EtOH(3x20mL) 共蒸发以除去残余的吡啶。将残余物施加于 50g Biotage SNAP 柱上并以 ~40mL/min 的速度用 1L 60/30/10EtOAc/Hex/MeOH(3% TEA), 随后是 500mL 90/10DCM/MeOH(3% TEA) 洗脱以得到 1.31g (61%) 的无色蜡状物。<sup>1</sup>H(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 0.67 (3H, s) ; 0.86 (6H, dd, J = 6.6, 1.8Hz) ; 0.91 (3H, d, J = 6.6Hz) ; 0.93-1.60 (41H, m) ; 1.75-2.05 (5H, m) ; 2.15-2.25 (1H, m) ; 2.32-2.41 (1H, m) ; 2.51-2.72 (4H, m) ; 2.97 (6H, q, J = 7.3Hz) ; 3.07-3.25 (2H, m) ; 3.31-3.48 (4H, m) ; 3.52-3.61 (2H, m) ; 3.78 (6H, s) ; 5.19 (1H, quintet, J = 5.1Hz) ; 5.35 (1H, d, J = 5.4Hz) ; 6.78-6.85 (m, 4H) ; 7.14-7.25 (m, 1H) ; 7.26-7.34 (m, 6H) ; 7.40-7.44 (m, 2H)。

[0105] “胆固醇-0-Hex-LCAA-CPG”

[0106] 将 4-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基)-3-(6-(胆甾-5-烯-3β-氧基)己基氧基)丙-2-基氧基)-4-氧代丁酸, TEA 盐 (1.00g, 0.952mmol) 称量至 20mL 闪烁瓶中。向瓶中加入 6mL 2 : 1CAN : DCM。将 HBTU (0.343g, 0.904mmol) 加入至琥珀酸酯中, 随后加入三乙胺 (0.25mL)。在 200mL 圆底烧瓶中称量 LCAA-CPG (12.56g), 其中胺的负载量 (loading) 为 132 μmol/g。将 CPG 悬浮于 75mL 2 : 1CAN : DCM 中。将琥珀酸酯/HBTU 混合物立刻加入至 LCAA-CPG 混悬液中, 将烧瓶密封并在 25℃ 将合并的混合物在孵育的定轨摇床上以 250rpm 的速度振摇 4 小时。过滤 CPG, 并用 200mL CAN、DCM、DMF、水、甲醇, CAN 和 DCM 的等分部分洗涤。将 CPG 风干过夜。然后将 CPG 转移至干净的 200mL 圆底烧瓶中。向烧瓶中加入 40mL CAP A 溶液和 40mL CAP B 溶液, 用膜密封并在 25℃ 将内容物以 250rpm 的速度振摇 3 小时。然后过滤 CPG, 并用 200mL ACN、DCM、MeOH、水、MeOH、DMF、ACN、DCM 的等分部分充分洗涤。将 CPG 风干过夜。

[0107] 通过采用经变更的 Pon, R. T., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. 20003. 2.1-3.2.23 所描述的方法测量 CPG 负载。将 CPG (4.24mg) 称量至 20mL 闪烁瓶中。加入 5% 三氟乙酸于二氯乙烷中的溶液, 盖上瓶帽并振摇 1 分钟。通过 Thermo

Spectronic Genesys10 UV/Vis 分光光度计在 503nm 测量的溶液的吸光度为 2.114。用下式计算负载：

[0108]  $[(\text{体积, mL} \times \text{吸光度}) / 76 \text{ mL cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}] \times [1000 / \text{质量, mg}] = \text{以 } \mu\text{mol/g} \text{ 表示的负载, 得到: } [(10 \text{ mL} \times 2.114) / 76 \text{ mL cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}] \times [1000 / 4.24 \text{ mg}] = 66 \mu\text{mol/g}.$

[0109] “胆固醇-0-Hex-DMTr Amidite”

[0110] 将 1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基)-3-(6-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)己基氧基)丙-2-醇 (1.68g, 1.95mmol) 称量至带有搅拌棒的 200mL 圆底烧瓶中。用氩气冲洗烧瓶, 用膜密封并加入 DCM (10mL) 和 N,N-二异丙基乙基胺 (0.68mL, 3.89mmol)。将 2-氰基乙基 N,N-二异丙基氯亚磷酰胺 (0.48g, 2.0mmol) 滴加至正在搅拌的反应混合物中并将反应混合物搅拌 17 小时。用 DCM 50mL 稀释反应混合物并用饱和碳酸氢盐溶液 (2x50mL) 和盐水 (1x50mL) 洗涤。用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥有机相, 过滤并浓缩。将残余物施加于 25g Biotage SNAP 柱上并用乙酸乙酯/己烷梯度洗脱 (5-10%, 750mL, 25mL/min) 以得到 1.70g (82.1%) 的白色泡沫。<sup>1</sup>H (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  0.62 (3H, s); 0.80-1.57 (53H, m); 1.70-1.95 (5H, m); 1.96-2.02 (1H, m); 2.21-2.26 (1H, m); 2.57-2.72 (2H, d, J = 4.6Hz); 2.97-3.80 (m, 20H); 3.97 (1H, 五个一组, J = 5.3Hz); 5.26 (1H, d, J = 4.6Hz); 6.78-6.86 (m, 4H); 7.13-7.29 (m, 7H); 7.34-7.39 (m, 2H)。

[0111] 实施例 2: 1-((二(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基))-12-(胆甾-5-烯-3-氧基)十二-3-醇功能化的 CPG 的合成

[0112] 图 3 描绘了本申请所描述的可用作多聚核苷酸 3'-修饰的连接基结构 (III) 的合成。其合成步骤在下面进行更详细地描述。

[0113] 10-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)癸-1-醇

[0114] 在 500mL 圆底烧瓶中将甲苯磺酸胆甾醇酯 (10.0g, 18.5mmol) 和 1,10-癸二醇 (48.3g, 277mmol) 悬浮于二噁烷 (200mL) 中以得到白色混悬液。将烧瓶装配于温度传感器和回流冷凝器上。回流加热混合物并使其回流搅拌过夜。将反应混合物冷却至室温并过滤掉固体。真空浓缩溶液。将混合物重新溶解于甲醇 (250mL) 中, 并加入水 (ca. 40mL) 以沉淀出粗制的产物。过滤沉淀并真空干燥。进一步通过在 100g Biotage SNAP 柱上用 2L 的 0-25% EtOAc 于己烷中的梯度洗脱的柱色谱法纯化残余物。合并纯净的级份并浓缩以得到 7.85g (82%) 的白色固体。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.69 (3H, s); 0.85-1.66 (50H, m); 1.75-2.09 (5H, m); 2.14-2.29 (1H, m); 2.32-2.43 (1H, m); 3.14 (1H, tt, J = 11.2, 4.4Hz); 3.46 (2H, dt, J = 6.9, 0.4Hz); 3.65 (2H, t, J = 6.6Hz); 5.36 (1H, d, J = 5.3Hz)。

[0115] 10-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)正癸醛

[0116] 在 100mL 圆底烧瓶中将用固体支持的 2,2,6,6-四甲基哌啶基氧基, 自由基 (0.5g, 1.1mmol/g, 0.553mmol) 和 10-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)癸-1-醇 (3.00g, 5.53mmol) 悬浮于二氯甲烷 (20mL) 中以得到无色混悬液。将二乙酸碘苯 (1.958g, 6.08mmol) 加入至混合物中, 将混合物在室温搅拌过夜。过滤反应混合物并用 DCM 洗涤固体支持物。用饱和硫代硫酸钠 (2x20mL) 和盐水 (1x20mL) 洗涤合并的滤液。用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥有机相, 过滤并浓缩。通过用 100% DCM 为流动相的柱色谱法纯化所得的油状物以得到 2.70g (90%) 的无色蜡状物。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.69 (3H, s); 0.84-1.74 (47H, m); 1.76-2.09 (5H, m); 2.12-2.26 (1H, m); 2.32-2.40 (1H, m); 2.44 (2H, dt, J = 7.4, 1.9Hz); 3.14 (1H, tt, J =



11. 2, 4. 4Hz); 3. 46 (2H, t, J = 6. 9Hz); 5. 35 (1H, d, J = 5. 3Hz); 9. 78 (1H, t, J = 1. 9Hz)。

[0117] 12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)-3-羟基十二醛

[0118] 在干燥的 200mL 圆底烧瓶中, 在氩气下将 10-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基) 正癸醛 (2. 65g, 4. 90mmol) 溶解于 THF (10ml) 中以得到无色溶液。滴加 0. 5M((1, 3- 二氧杂环戊-2-基) 甲基) 溴化镁 (9. 80ml, 4. 90mmol) 的 THF 溶液, 并将得到的溶液在室温搅拌 4h。通过缓慢加入 100mL NaHCO<sub>3</sub> 溶液使所得溶液终止反应并用 EtOAc (3x100mL) 萃取。将合并的有机相用盐水 (1x100mL) 洗涤、用硫酸钠干燥、过滤并在 500mL 圆底烧瓶中浓缩。将原甲酸三甲酯 (10. 83ml, 98mmol)、PPTS (0. 246g, 0. 980mmol) 和甲醇 (10ml) 加入至烧瓶中并将内容物回流 2h。将溶液冷却至室温并蒸发至干。然后将残余物吸收至丙酮 (20ml) 和 1. 0N 盐酸 (4. 90ml, 4. 90mmol) 中并将其搅拌过夜。用水将反应混合物稀释至 200mL 并用乙酸乙酯 (3x100mL) 萃取。合并有机相, 用盐水 (1x50mL) 洗涤, 用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩。通过在 40g Biotage SNAP 柱上用 1L 0-50% 梯度洗脱的柱色谱法纯化所得的蜡状物。合并纯净的级份并蒸发至干以得到 12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)-3-羟基十二醛 (1. 97g, 3. 37mmol, 68. 7% 收率), 为无色蜡状物。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0. 69 (3H, s); 0. 85-1. 74 (49H, m); 1. 75-2. 13 (7H, m); 2. 14-2. 28 (1H, m); 2. 33-2. 44 (1H, m); 3. 14 (1H, tt, J = 11. 2, 4. 4Hz); 3. 46 (2H, t, J = 6. 8Hz); 3. 93-4. 10 (1H, m); 5. 36 (1H, d, J = 5. 2Hz); 5. 42-5. 55 (1H, m); 9. 78 (1H, s)。

[0119] 12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基) 十二-1, 3-二醇

[0120] 在 100mL 圆底烧瓶中, 将 12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)-3-羟基十二醛 (1. 90g, 3. 25mmol) 溶解于 1, 4- 二噁烷 (10ml) 中以得到无色溶液。缓慢加入 MeOH (5ml) 并仅加入足够量以使醛保持在溶液中。将四氢硼酸钠 (0. 184g, 4. 87mmol) 加入至正在搅拌的溶液中, 然后将溶液在室温搅拌 2 小时。通过加入 1N HCl (2mL) 使反应混合物终止反应。用水将混合物稀释至 100mL 并用乙酸乙酯 (3x50mL) 萃取。合并有机相, 用盐水 (1x50mL) 洗涤, 用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩以得到 12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基) 十二-1, 3-二醇 (1. 85g, 3. 15mmol, 97% 收率), 为无色蜡状物。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0. 69 (3H, s); 0. 83-2. 07 (58H, m); 2. 13-2. 28 (1H, m); 2. 32-2. 43 (1H, m); 3. 14 (1H, tt, J = 11. 2, 4. 4Hz); 3. 46 (2H, t, J = 6. 8Hz); 3. 60-4. 19 (3H, m); 5. 36 (1H, d, J = 5. 2Hz)。

[0121] 1-((二(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基))-12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基) 十二-3-醇

[0122] 在 100mL 圆底烧瓶中, 将 12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基) 十二-1, 3-二醇 (1. 80g, 3. 07mmol) 溶解于吡啶 (20ml) 中以得到无色溶液。在氩气下将混合物冷却至 0 $^{\circ}$ C, 同时搅拌。将 DMTr-Cl (1. 091g, 3. 22mmol) 称量至用膜密封的闪烁瓶中并溶解于吡啶 (10ml) 中以得到黄色溶液。将 DMTr-Cl 溶液滴加至二醇中。将反应混合物搅拌过夜同时恢复至室温。加入甲醇 (2mL) 并将混合物搅拌额外的 15 分钟。用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液将反应混合物稀释至 200mL 并用乙酸乙酯 (3x50mL) 萃取。合并有机相, 用盐水 (1x50mL) 洗涤, 用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩。通过用 1L 0-50% EtOAc 于己烷中的梯度洗脱的 40g Biotage SNAP 柱纯化所得的油状物。合并并蒸发纯净的级份以得到 1-((二(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基))-12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基) 十二-3-醇 (2. 60g, 2. 92mmol, 95% 收率), 为无色油状物。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0. 69 (3H, s); 0. 83-2. 09 (57H, m); 2. 14-2. 29 (1H,

m) ;2.33-2.44(1H, m) ;3.07-3.22(3H, m) ;3.47(2H, t, J = 6.9Hz) ;3.53-3.66(1H, m) ;3.81(6H, s) ;5.37(1H, d, J = 5.2Hz) ;6.80-6.88(4H, m) ,7.20-7.35(7H, m) ;7.40-7.49(2H, m)。

[0123] 4-((1-(二(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)十二-3-基)氧基)-4-氧代丁酸

[0124] 在 20mL 闪烁瓶中将 1-((二(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基))-12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)十二-3-醇 (0.5g, 0.562mmol) 和琥珀酸酐 (0.113g, 1.124mmol) 溶解于 DCM (10mL) 中以得到无色溶液。加入 TEA (0.313mL, 2.249mmol) 并将混合物设定为搅拌 17 小时。通过 TLC (25% EtOAc/Hex, PMA 显现) 判断反应完全。用 5% NaHPO<sub>4</sub> 溶液 (3x15mL) 和盐水 (1x15mL) 洗涤反应混合物。用硫酸钠干燥有机相, 过滤并浓缩至干, 未经进一步纯化就使用。<sup>1</sup>HNMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.70(3H, s) ;0.83-1.74(49H, m) ;1.77-2.12(5H, m) ;2.14-2.29(1H, m) ;2.33-2.44(1H, m) ;2.53-2.72(4H, m) ;3.00-3.09(2H, m) ;3.16(1H, tt, J = 11.2, 4.4Hz) ;3.48(2H, t, J = 6.8Hz) ;3.80(6H, s) ;4.85-5.00(1H, m) ;5.36(1H, d, J = 5.1Hz) ;6.78-6.90(4H, m) ,7.15-7.38(7H, m) ;7.40-7.49(2H, m) ;9.29(1H, bs)。

[0125] 1-((二(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基))-12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)十二-3-醇功能化的 CPG

[0126] 将 4-((1-(二(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-12-(胆甾-5-烯-3 $\beta$ -氧基)十二-3-基)氧基)-4-氧代丁酸 (0.35g, 0.36mmol) 称量至 20mL 闪烁瓶中。向瓶中加入 6mL 的 2 : 1CAN : DCM。向琥珀酸酐中加入 HBTU (0.137g, 0.35mmol), 随后加入三乙胺 (0.25mL)。在 100mL 圆底烧瓶中称量 LCAA-CPG (5.00g) 并负载 132  $\mu$ mol/g 胺。将 CPG 悬浮于 30mL 2 : 1CAN : DCM 中。将琥珀酸酐/HBTU 混合物立即加入至 LCAA-CPG 混悬液中, 将烧瓶密封并将合并的混合物在孵育的定轨摇床上以 250rpm 的速度在 25 $^{\circ}$ C 振摇 4 小时。过滤并用 200mL ACN、DCM、DMF、水、甲醇、CAN 和 DCM 的等分部分洗涤 CPG。将 CPG 风干过夜。然后将 CPG 转移至干净的 200mL 圆底烧瓶中。向烧瓶中加入 40mL CAP A 溶液和 40mL CAP B 溶液, 用膜密封并将内容物在 25 $^{\circ}$ C 以 250rpm 的速度振摇 3 小时。然后过滤并用 200mL ACN、DCM、MeOH、水、MeOH、DMF、ACN、DCM 的等分部分充分洗涤 CPG。将 CPG 风干过夜。

[0127] 通过采用经变更的 Pon, R. T., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. 2000 3.2.1-3.2.23 所描述的方法测量 CPG 负载。将 CPG (4.24mg) 称量至 20mL 闪烁瓶中。加入 5% 三氟乙酸于二氯乙烷中的溶液, 盖上瓶帽并振摇 1 分钟。通过 Thermo Spectronic Genesys10 UV/Vis 分光光度计在 503nm 测量的溶液的吸光度为 2.114。用下式计算负载:

[0128]  $[(\text{体积, mL} \times \text{吸光度}) / 76 \text{ mL cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}] \times [1000 / \text{质量, mg}] = \text{以 } \mu\text{mol/g} \text{ 表示的负载}$

[0129] 得到:

[0130]  $[(10 \text{ mL} \times 2.260) / 76 \text{ mL cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}] \times [1000 / 5.12 \text{ mg}] = 58 \mu\text{mol/g}$

[0131] 实施例 3: 合成后的胆固醇的引入

[0132] 通过这样的反应例如羰基加成-消除 / 还原胺化、酰胺化、马来酰亚胺-巯基偶联、水性狄尔斯-阿尔德和“点击”实现的合成后的胆固醇的引入也将会提供等同的胆固醇醚构造, 而不需要合成胆固醇-amidite。例如, 甲苯磺酸胆固醇酯可以被烷基化, 得到胆

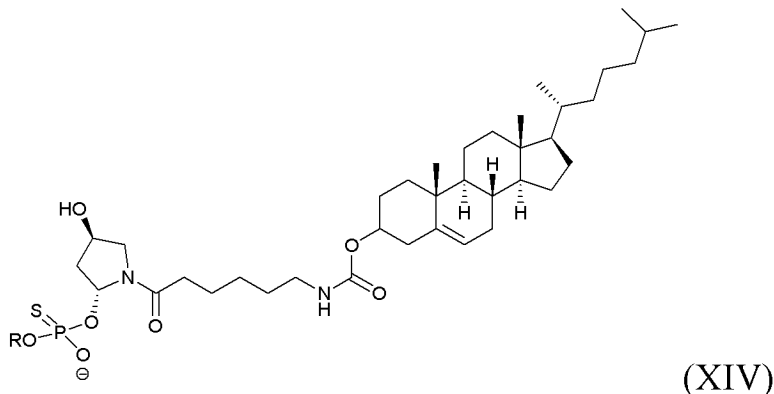
甾-5-烯-3 $\beta$ -羟基烷醇,其可以被进一步修饰以得到端部的醛、羧酸酯、胺、马来酰亚胺、硫醇、二烯、叠氮化物、炔或其它反应性部分,这些部分可以进一步与适当地经修饰的寡核苷酸反应以得到胆固醇缀合物,所述缀合物仍旧保持基本上非极性、基本上呈线性的与胆固醇部分的烷基氧基连接,并且在亲脂性部分和任何含有可交换质子或其它基本上呈极性的官能团的基团之间保持3个或更多的原子距离。参见图4。

[0133] 当寡核苷酸被互补的官能团功能化时,胆甾-5-烯-3-羟基烷醇(A)可以经修饰得到可经常规的生物缀合技术诸如酰胺化(B)、狄尔斯-阿尔德生物缀合(C)和“点击”生物缀合(D)修饰的官能团。

[0134] 实施例4:体内 miR-208 的心脏敲低 (cardiac knockdown)

[0135] 对于表2、4中所标明的所有化学物质,使用溶解于盐水中的同样的化学物质以及单独使用盐水(图5和6中的“sal”)作为对照(表2),将成年雄性C57B16小鼠通过其尾静脉以2x 80mg/kg的剂量注射的抗miR序列或错配(图5和6中的“mm”)序列。表2中的连接基1对应于本申请所描述的连接基结构(XI)和(XIII)。表2中的连接基2对应于本申请所描述的连接基结构(X)和(XII)。为进行对比,将结构(XIV)的连接基用作对照。

[0136]



[0137] 进一步地,硫代磷酸酯(PS)涉及其中最后两个5'-末端的核苷酸间的键为硫代磷酸酯连接,并且3'-末端的开始的5个核苷酸间的磷酸键为硫代磷酸酯连接的取代型式(包括在胆固醇连接基和寡核苷酸之间的磷酸连接键(phosphate linkage))。

[0138] 表2

[0139]

多聚核苷酸	硫代磷酸酯(PS)	胆固醇	缀合连接端	连接基
antagomir	有	有	3'	结构(XIV)
无 PS	无	无	-	-
PS	有	无	-	-
3' 胆固醇连接基#1, 无 PS	无	有	3'	连接基 #1
3' 胆固醇连接基#2, 无 PS	无	有	3'	连接基 #2
5' 胆固醇连接基#1	有	有	5'	连接基#1
3' 胆固醇连接基#1	有	有	3'	连接基#1
5' 胆固醇连接基#2	有	有	5'	连接基#2
3' 胆固醇连接基#2	有	有	3'	连接基#2

[0140] 最后注射后三天,处死动物并收集心脏、肝脏、肺脏和肾脏。从心脏组织中提取 RNA 以通过 RNA 印迹分析 (图 5) 和使用 miR-208 的实时 PCR 定量 (图 6) 确定对心脏 miR-208 表达的作用。这些数据用 antagomir 设计再次证实了有效的心脏敲低。然而,胆固醇或硫代磷酸酯的缺少使所述化学物质不可能建立显著性的体内 miR-208 的心脏敲低。胆固醇与寡核苷酸 (oligo) 的 5' 或 3' 末端的连接使用 C4 或 C6 连接基,表明两种连接基都适合于胆固醇的连接。相比于最初的 antagomir 对 miR-208 的作用,在寡核苷酸 (oligo) 的 3' 末端使用 C6 甚至诱导了更有效的 miR-208 的敲低 (图 5 和 6)。这些数据表明,不同于体外系统,脂质部分诸如胆固醇和硫代磷酸酯对于心肌细胞的敲低而言是合乎需要的,并且两种连接基 (5' 或 3') 对于胆固醇与寡核苷酸的连接而言是足够的,且能够建立可比性 (comparable) (如果与最初的 antagomir 的设计相比没有增强 miR-208 的敲低)。参见图 5。

#### [0141] 实验设计

[0142] miRNA 的 RNA 印迹法 (Northern blotting)

[0143] 为评价响应于不同的化学物质和缀合物的 miR-208 的敲低,进行了使用指向 miR-208 的探针的 RNA 印迹分析,所述探针用于检测心脏中 miR-208 的存在。使用 Trizol 试剂,从心脏收集总 RNA,其中 10  $\mu$ g 用于 RNA 印迹法。用电泳法将该末端 RNA 样品在 20% 丙烯酰胺变性凝胶上运行并转移至 Zeta- 探针 GT 基因印迹膜 (Bio-Rad) 上。转移后,将印迹 (blots) 交联并在 80°C 烘烤 1 小时。为使 miRNA 检测的灵敏度最大化,用 Starfire Oligos 试剂盒 (IDT, Coralville, IA) 和  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP (Amersham) 标记寡核苷酸探针。将探针在 39°C 快速杂交缓冲液 (Rapid-hyb buffer) (Amersham) 中杂交至膜上并过夜,之后在 39°C 将其用含有 0.1% SDS 的 0.5x SSC 洗涤两次,10 分钟。将印迹暴露,U6 探针将作为负载对照 (loading control) (U6 前面 :5-GTGCTCGCTTCGGCAGC-3 (SEQ ID NO :64),U6 后面 :5-AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTGCG-3 (SEQ ID NO :65))。放射性信号的强度将用于用磷光计和 ImageQuant (Bio-Rad) 定量分析表达中的倍性变化。

[0144] 实时 PCR 分析

[0145] 除 RNA 印迹分析外,发明人进行了 miRNA 特异性实时 PCR 分析以同时验证和定

量 miR-208 敲低的水平。来自每种组织样品的 2  $\mu$ g RNA 用于根据每家制造商的说明书 (Invitrogen Life Technologies Inc., Burlington, Ontario, Canada) 使用 Super Script II 逆转录酶产生 cDNA。在开始的在 95°C 使用购自 ABI 的 Taqman 探针持续 3min 的变性步骤之后, 将实时 PCR 在 95°C /30s 和 60°C /30s 循环 40 个周期。使用解离曲线软件 (Biorad) 例行地检查扩增的产物, 并使用相对的 Ct 方法比较转录物的量, 其中被归一化为内源性 SnoRNA 的量并相对于对照样品的靶标的量以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  给出。

[0146] 参考文献

[0147] Krieg, A. M., Tonkinson, J., Matson, S., Zhao, Q., Saxon, M., Zhang, L. M., Bhanja, U., Yakubov, L., and Stein, C. A. 1993. Modification of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides by a 5' -cholesteryl moiety increases cellular association and improves efficacy. Proc Natl Acad Sci USA 90:1048+-1052.

[0148] Bijsterbosch, M. K., Manoharan, M., Dorland, R., Waarlo, I. H. E., Biessen, E. A. L., and van Berkel, T. J. C. 2001. Delivery of cholesteryl-conjugated phosphorothioate oligodeoxynucleotides to Kupffer cells by lactosylated low-density lipoprotein. Biochem Pharmacol 62:627-633.

[0149] Manoharan, M., Tivel, K. L., Condon, T. P., Andrade, L. K., Barber-Peoch, I., Inamati, G., Shah, S., Mohan, V., Graham, M. J., Bennett, C. F., Crooke, S. T., and Cook, P. D. 1997. Conjugated antisense oligonucleotides. Nucleosides Nucleotides 16: 1129-1138.

[0150] Ghosh, YK, Visweswariah, SS, and Bhattacharya, S. 2002. Advantage of the Ether Linkage between the Positive Charge and the Cholesteryl Skeleton in Cholesterol-Based Amphiphiles as Vectors for Gene Delivery. Bioconjugate Chem, 13:378-384.

[0151] Ghosh, YK, Visweswariah, SS, and Bhattacharya, S. 2000. Nature of linkage between the cationic headgroup and cholesteryl skeleton controls gene transfection efficiency. FEBS Letters, 473:341-344.

[0152] Song, YK, Liu, F, Chu, S, and Liu, D. 1997. Characterization of Cationic Liposome-Mediated Gene Transfer In Vivo by Intravenous Administration. Hum Gene Ther, 8:1585-1592.

[0001]

## 序列表

<110> 米拉根医疗公司 (Miragen Therapeutics)  
 Marshall, William  
 Vagle, Kurt

<120> 亲脂性多聚核苷酸缀合物

<130> MIRG-014/00W0

<150> US 61/175,690  
 <151> 2009-05-05

<160> 65

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> 人类

<400> 1  
 uggaauguaa agaaguaugu au 22

<210> 2  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> 人类

<400> 2  
 aaccguaga uccgaacuug ug 22

<210> 3  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> 人类

<400> 3  
 uaccuguag aaccgaauu gug 23

<210> 4  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> 人类

<400> 4  
 uccugagac ccuaacuugu ga 22

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> 人类

<400> 5  
 ucacagugaa ccggucucu u 21

<210> 6  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> 人类

<400> 6  
 uuugguuccc uucaaccagc ug 22

<210> 7  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> 人类

<400> 7  
 uuugguuccc uucaaccagc ua 22

[0002]

<210> 8	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 8	
ucucacagugc acgugucucc ag	22
<210> 9	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 9	
ugagaugaag cacuguagcu c	21
<210> 10	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 10	
guccaguuuu cccaggaauc ccu	23
<210> 11	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 11	
ucucccaacc cuuguaccag ug	22
<210> 12	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 12	
uagcagcaca uaauguuug ug	22
<210> 13	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 13	
uagcagcaca ucauguuua ca	22
<210> 14	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 14	
uagcagcacg uaaaauuugg cg	22
<210> 15	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 15	
aacaucauu gcugucggug ggu	23
<210> 16	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 16	
uagcagcaca gaaaauuugg c	21

[0003]

<210> 17	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 17	
uucaccaccu ucuccaccca gc	22
<210> 18	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 18	
cccaguguuc agacuaccug uuc	23
<210> 19	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 19	
cccaguguuu agacuaucug uuc	23
<210> 20	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 20	
acaguagucu gcacauuggu ua	22
<210> 21	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 21	
uggaauгуaa ggaagugugu gg	22
<210> 22	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 22	
auaagacgag caaaaagcuu gu	22
<210> 23	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 23	
auaagacгаа caaaagguuu gu	22
<210> 24	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 24	
uaaagucuu auagucagg uag	23
<210> 25	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 25	
uagcuauca gacugauguu ga	22

[0004]



<210> 26	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 26	
acagcaggca cagacaggca gu	22
<210> 27	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 27	
aagcugccag uugaagaacu gu	22
<210> 28	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 28	
agcuacaauug ucugcugggu uuc	23
<210> 29	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 29	
agcuacaucu ggcuacuggg u	21
<210> 30	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 30	
caagucacua gugguuccgu uua	23
<210> 31	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 31	
aucacauugc cagggauuuc c	21
<210> 32	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 32	
uucaaguaau ycaggauagg yu	22
<210> 33	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 33	
uucaaguaau ucaggauagg u	21
<210> 34	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 34	

[0005]

aaggagcuca cagucuaauug ag	22
<210> 35	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 35	
uagcaccauc ugaaaucggu ua	22
<210> 36	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 36	
uagcaccauu ugaaaucagu guu	23
<210> 37	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 37	
uagcaccauu ugaaaucggu ua	22
<210> 38	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 38	
uguaaacauc cugacugga ag	22
<210> 39	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 39	
uguaaacauc cuacacucag cu	22
<210> 40	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 40	
uguaaacauc cuacacucuc agc	23
<210> 41	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 41	
uguaaacauc cccgacugga ag	22
<210> 42	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 42	
uguaaacauc cuugacugga ag	22
<210> 43	
<211> 24	
<212> RNA	
<213> 人类	

[0006]

<400> 43 ucucacacag aaaucgcacc eguc	24
<210> 44 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 44 gaaguuguuc gugguggaau cg	22
<210> 45 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 45 acuggacuua gggucagaag gc	22
<210> 46 <211> 21 <212> RNA <213> 人类	
<400> 46 acuggacuug gagucagaag g	21
<210> 47 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 47 cagcagcaau ucauguuuug aa	22
<210> 48 <211> 23 <212> RNA <213> 人类	
<400> 48 ucacuccueu ccucccgucu ucu	23
<210> 49 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 49 ucaggcucag uccccuccg au	22
<210> 50 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 50 uccuguacug agcugccccg ag	22
<210> 51 <211> 21 <212> RNA <213> 人类	
<400> 51 cagcagcaca cugugguuug u	21
<210> 52 <211> 21 <212> RNA <213> 人类	

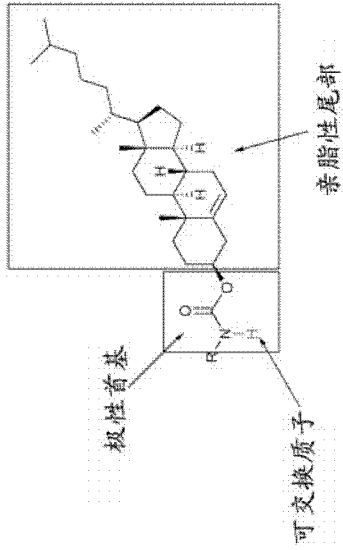
[0007]

<400> 52 uuagacuug cagugaugu u	21
<210> 53 <211> 23 <212> RNA <213> 人类	
<400> 53 ucgggauca ucaugucag aga	23
<210> 54 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 54 uauugcacu gucccgccu gu	22
<210> 55 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 55 uauugcacuc gucccgccu cc	22
<210> 56 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 56 ugagguagua gguuguauag uu	22
<210> 57 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 57 ugagguagua gguugugugg uu	22
<210> 58 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 58 ugagguagua gguuguauagg uu	22
<210> 59 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 59 agagguagua gguugcauag uu	22
<210> 60 <211> 22 <212> RNA <213> 人类	
<400> 60 ugagguagga gguuguauag uu	22
<210> 61 <211> 22 <212> RNA	

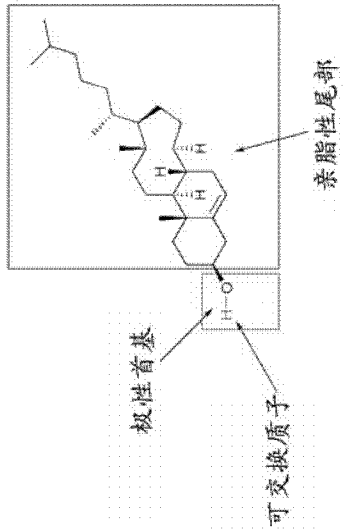
[0008]

<213> 人类	
<400> 61	
ugagguagua gauuguauag uu	22
<210> 62	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 62	
ugagguagua guuuguacag uu	22
<210> 63	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人类	
<400> 63	
aaaccguuac cauuacugag uu	22
<210> 64	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人类	
<400> 64	
gigctcgctt cggcagc	17
<210> 65	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人类	
<400> 65	
aaaatatgga acgcttcacg aatttgcg	28

当前技术状态的胆固醇缀合物



天然胆固醇



新颖的具有增强的亲脂性的胆固醇缀合物

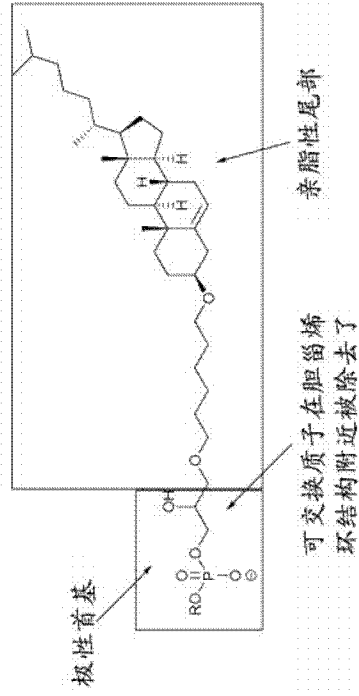


图 1

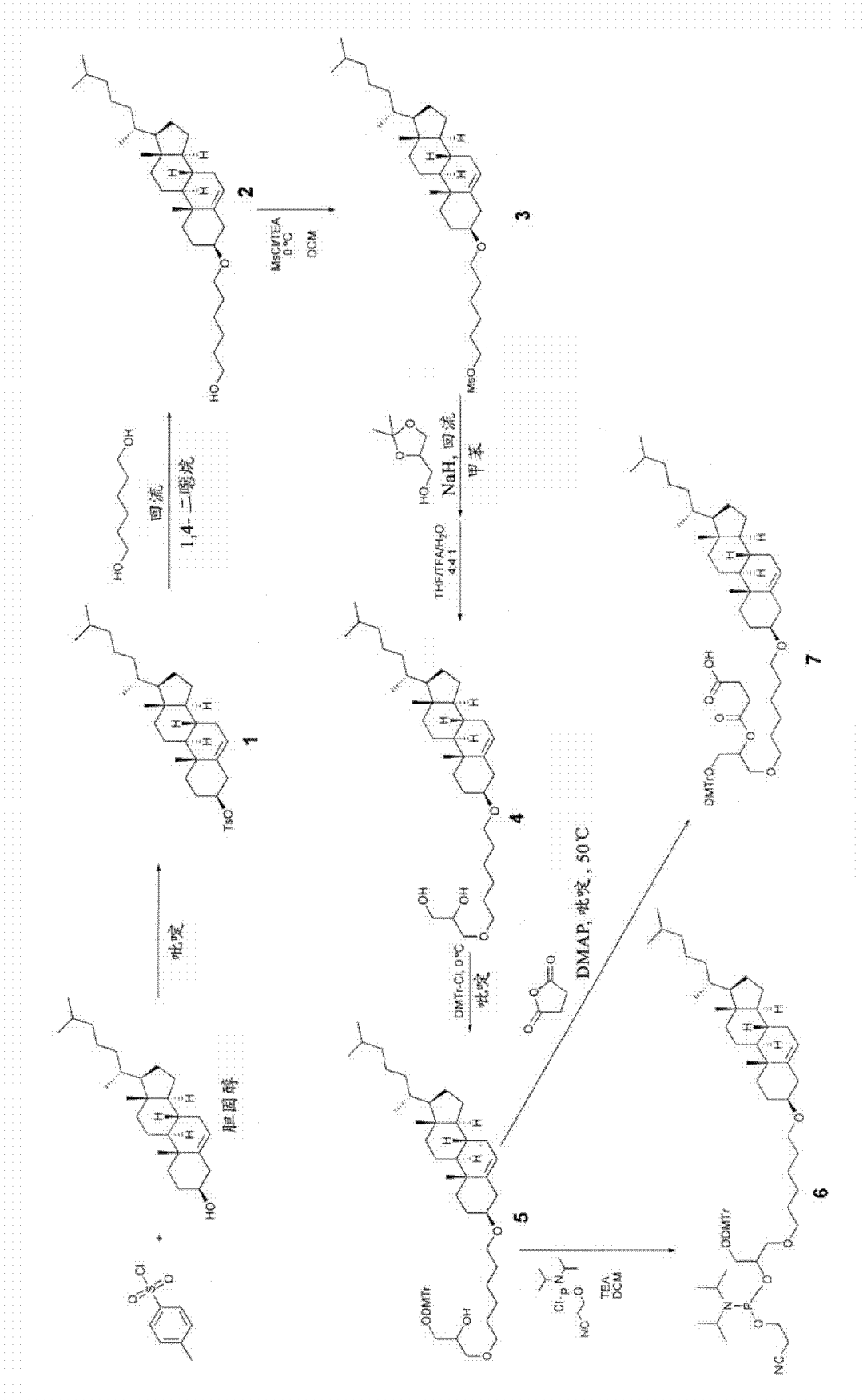


图 2

1-((二(4-甲氧基苄基)(苄基)甲氧基))-12-(胆甾-5-烯-3-氧基)十二-3-醇功能化的CPG的合成

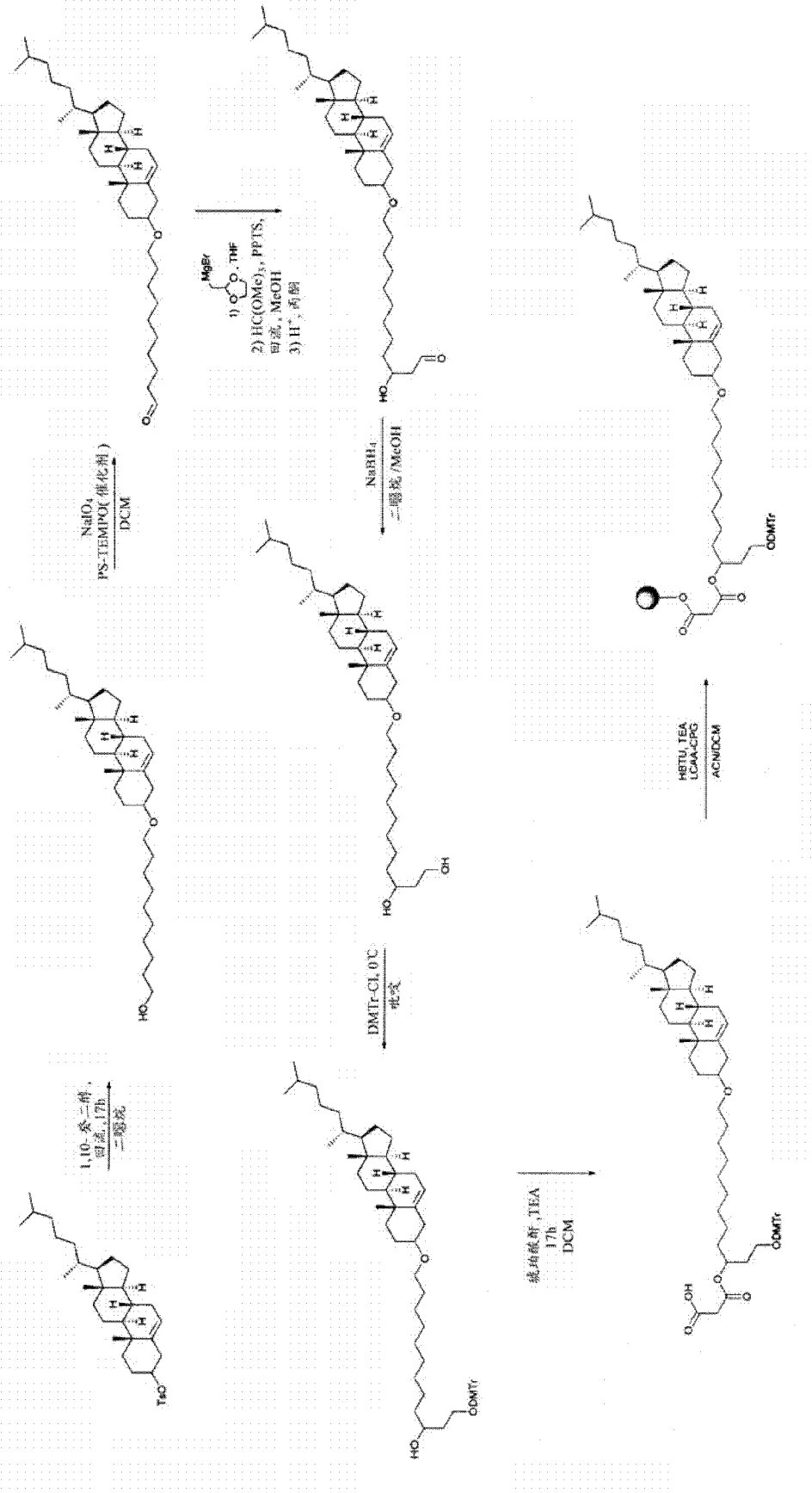


图 3



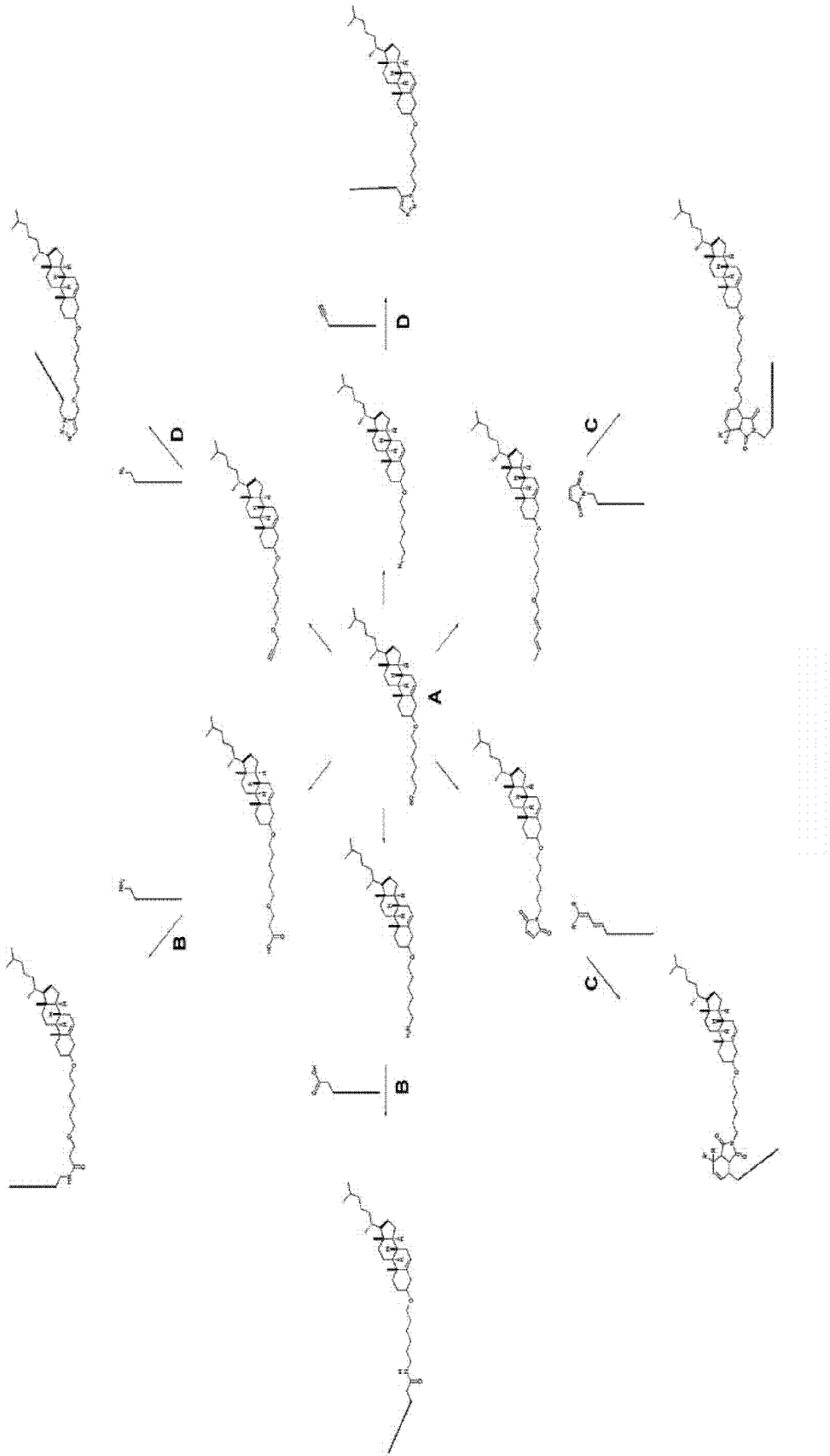


图 4

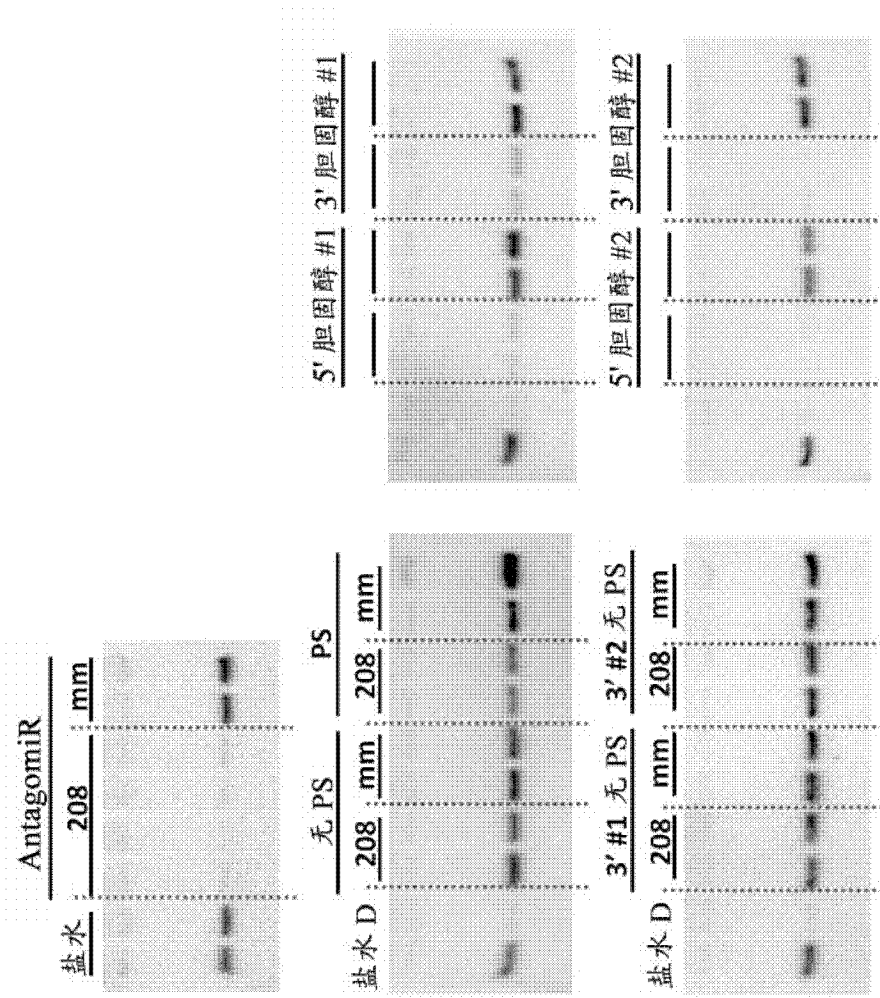


图 5

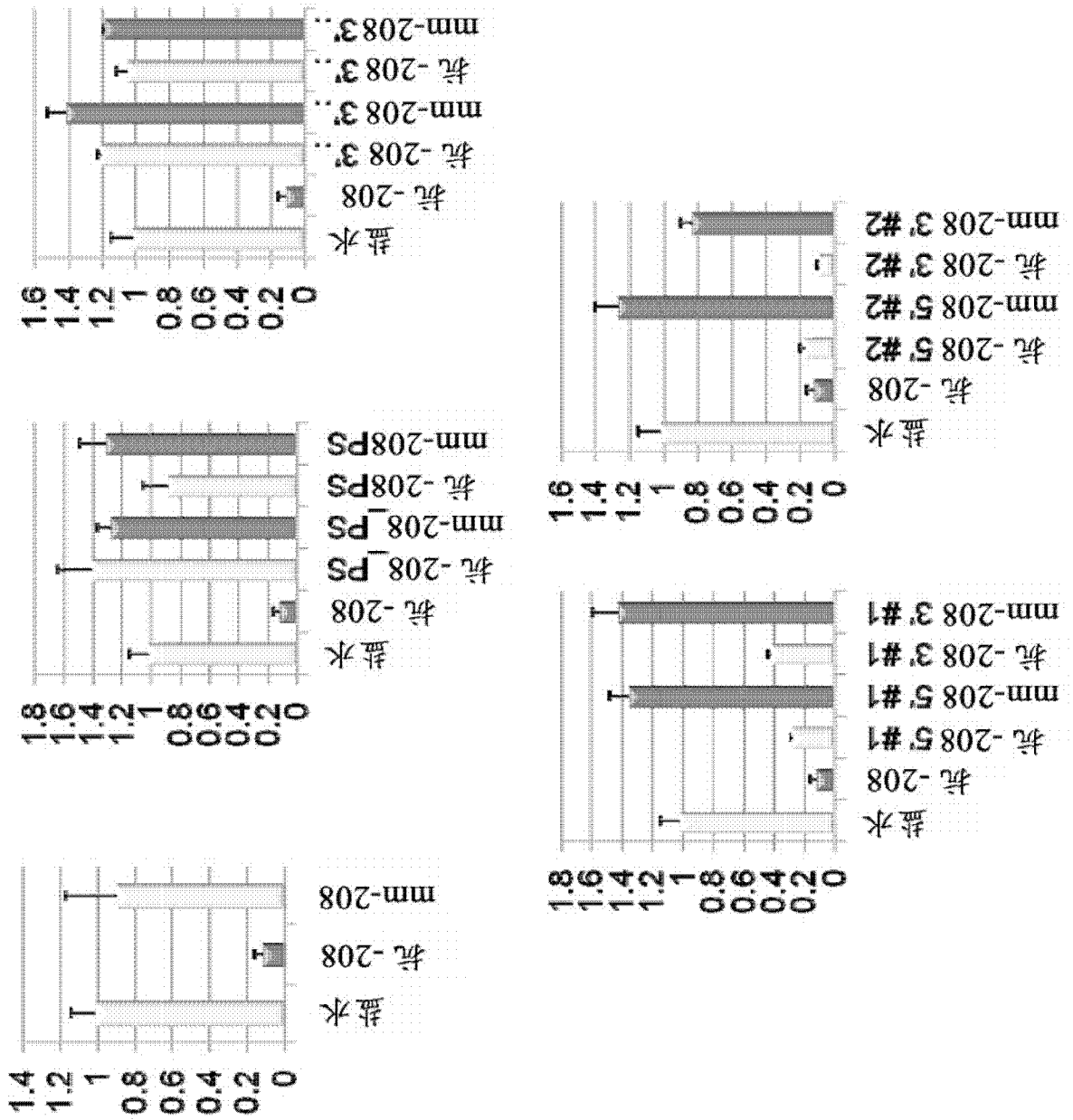


图 6