



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103974724 B

(45)授权公告日 2019.08.30

(21)申请号 201280059453.0

(22)申请日 2012.10.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103974724 A

(43)申请公布日 2014.08.06

(30)优先权数据
61/542,533 2011.10.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.06.03

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/058519 2012.10.03

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/052523 EN 2013.04.11

(73)专利权人 现代泰克斯公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 安东宁·德富热罗勒
阿坦恩·洛依 杰森·P·斯洛姆
S·西德奇 保罗·哈塔拉
斯蒂芬·邦塞尔

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

代理人 吴小瑛 张福根

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
C07H 21/02(2006.01)
C07H 21/04(2006.01)

(56)对比文件
US 20010143397 A1,2011.06.16,
审查员 张蕾

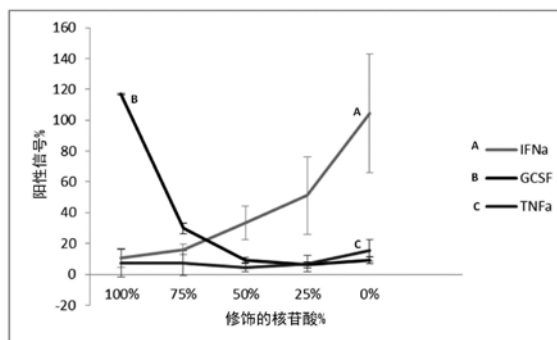
权利要求书1页 说明书250页
序列表3页 附图13页

(54)发明名称

修饰的核苷、核苷酸和核酸及其用途

(57)摘要

本发明提供了修饰的核苷、核苷酸和核酸以及使用它们的方法。



1. 一种编码目标多肽的分离的mRNA,所述分离的mRNA包含:

- (a) n个数量的连接的核苷的序列,
- (b) 包含至少一个Kozak序列的5'UTR,
- (c) 3'UTR,和
- (d) 至少一个5'帽结构,

所述分离的mRNA由核苷酸1-甲基假尿苷、腺苷、鸟苷和胞苷组成,其中所述分离的mRNA提供的蛋白与细胞因子的比率P:C对于TNF- α 为大于100,对于IFN- α 为大于100;并且其中所述P:C比率大于相应的包含假尿苷 ψ 而非1-甲基假尿苷的mRNA的P:C比率。

2. 如权利要求1所述的分离的mRNA,其进一步包含聚-A尾。

3. 如权利要求1所述的分离的mRNA,其是纯化的。

4. 如权利要求1所述的分离的mRNA,其中至少一个5'帽结构选自Cap0、Cap1、ARCA、肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'氟-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和2-叠氮基-鸟苷。

5. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-4中任一项所述的分离的mRNA和药学上可接受的赋形剂。

6. 权利要求1-4中任一项所述的分离的mRNA或权利要求5所述的药物组合物在制备用于在哺乳动物受试者中表达目标多肽的药物中的用途。

修饰的核苷、核苷酸和核酸及其用途

[0001] 关于序列表

[0002] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表文件,名称为M009SQLST.txt,创建于2012年10月3日,大小为9,859字节。电子格式的序列表中的信息以引用的方式整体并入本文。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求提交于2011年10月3日的名称为Modified Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, and Uses Thereof (修饰的核苷、核苷酸和核酸及其用途)的美国临时专利申请号61/542,533的优先权,将其内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0005] 本发明提供了使用修饰的核酸来调节细胞功能的组合物和方法。本发明的修饰的核酸可编码肽、多肽或多种蛋白。所编码的分子可以用作治疗剂(therapeutics)和/或诊断剂(diagnostics)。

背景技术

[0006] 天然存在的RNA是由四种基本的核糖核苷酸:ATP、CTP、UTP和GTP合成,但可含有转录后修饰的核苷酸。此外,在RNA中已鉴定出约100种不同的核苷修饰(Rozenski, J, Crain, P 和McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update. Nucl Acids Res 27: 196-197)。然而,还不清楚核苷修饰对免疫-刺激潜力和对RNA的翻译效率的作用。

[0007] 影响蛋白表达的现有方法中存在很多问题。例如,引入细胞中的异源DNA可以被子细胞(不论异源DNA是否已整合到染色体中)或后代继承。引入的DNA可以以某一频率整合到宿主细胞的基因组DNA中,造成对宿主细胞的基因组DNA的改变和/或损伤。此外,在制造蛋白前必须经过多个步骤。一旦进入细胞内部,DNA必须被转运到细胞核中,在细胞核中其被转录成RNA。然后由DNA转录的RNA必须进入细胞质,在细胞质中其被翻译成蛋白。对多个处理步骤的这种需要在生成目标蛋白前产生滞留时间。另外,也难以得到细胞中的DNA表达;DNA频繁地进入细胞,但不表达或不以合理的速率或浓度表达。这可能是当将DNA引入到细胞如原代细胞或修饰的细胞系时的特殊问题。

[0008] 在本领域中需要解决核酸的细胞内翻译的调节的生物学方法。

发明内容

[0009] 本发明尤其提供了修饰的核苷、修饰的核苷酸和修饰的核酸,其在被引入到细胞群中时,在体内和离体可显示出降低的先天免疫应答。

[0010] 本发明提供了可被分离或纯化的多核苷酸。这些多核苷酸可以编码一种或多种目标多肽并包含n个连接的核苷或核苷酸的序列,其中所述核苷或核苷酸包含至少一个与A、G、U或C核苷或核苷酸的化学结构相比修饰的核苷或核苷酸。多核苷酸也可以含有包含至少一个Kozak序列的5'UTR、3'UTR和至少一个5'帽结构。分离的多核苷酸还可以含有聚A尾

(poly-A tail)且可以被纯化。

[0011] 本发明的分离的多核苷酸还包含至少一个5'帽结构,其选自Cap0、Cap1、ARCA、肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'氟-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和2-叠氮基-鸟苷。

[0012] 本发明的多核苷酸的修饰可以是在多核苷酸所包含的核苷的核苷碱基和/或糖部分上。

[0013] 在一些实施方式中,修饰是在核碱基上,且选自假尿苷或N1-甲基假尿苷。

[0014] 在一些实施方式中,修饰的核苷不是假尿苷(ψ)或5-甲基-胞苷(m5C)。

[0015] 在一些实施方式中,在修饰的核酸中或在一个或多个单独的核苷或核苷酸中包括多个修饰。例如,对核苷的修饰可以包括一个或多个对核碱基和糖的修饰。

[0016] 在一些实施方式中提供了用于制备修饰的多核苷酸的新的构建块(例如,核苷和核苷酸)及其合成和生产方法。

[0017] 本发明还提供了包含本文所述的修饰的多核苷酸的药物组合物。其还可以进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂,所述赋形剂选自溶剂、水溶剂、非水溶剂、分散介质、稀释剂、分散剂、悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、脂质、类脂质(lipidoid)脂质体、脂质纳米颗粒、核-壳纳米颗粒、聚合物、脂复合物(lipoplexe)肽、蛋白、细胞、透明质酸酶、及它们的混合物。

[0018] 还提供了使用本发明的多核苷酸和修饰的核酸的方法。在这种情况下,多核苷酸可通过本领域中已知的任何方法进行配制,或通过包括皮内、皮下或肌肉注射的若干途径中的任何途径进行施用。

[0019] 本发明的修饰的核酸的施用可以经由两个或更多个相等或不等的分次剂量。在一些实施方式中,通过施用分次剂量的多核苷酸,受试者所产生的多肽的水平大于单次施用相同总日剂量的多核苷酸所产生的水平。

[0020] 修饰的核酸或编码的多肽的检测可以在受试者或患者的体液中进行,其中所述体液选自外周血液、血清、血浆、腹水、尿液、脑脊髓液(CSF)、痰液、唾液、骨髓、滑液、眼房水、羊水、耳垢、乳汁、支气管肺泡灌洗液、精液、前列腺液、考珀液(cowper's fluid)或预射精液、汗液、粪便物、毛发、泪液、囊肿液、胸膜和腹膜液、心包液、淋巴液、食糜、乳糜、胆汁、间质液、月经、脓、皮脂、呕吐物、阴道分泌物、粘膜分泌物、粪便水、胰液、窦腔灌洗液、支气管肺抽吸物、囊胚腔液(blastocyl cavity fluid)和脐带血。

[0021] 在一些实施方式中,施用是根据给药方案进行的,可历经几小时、几天、几周、数月或几年的时间,并且施用可以通过使用一种或多种装置来实现,所述装置选自多针注射系统;导管或管腔系统;和基于超声、电或辐射的系统。

[0022] 除非另有定义,本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。本文所述的方法和材料用于本发明;也可使用本领域已知的其它合适的方法和材料。材料、方法和实例仅是说明性的,并不旨在进行限制。所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目(database entries)和在此提及的其它参考文献以引用的方式整体并入本文。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0023] 本发明的其它特征和优点根据下面的详细描述和附图以及根据权利要求书是显然的。

附图说明

[0024] 上述和其它目的、特征和优点根据以下如附图中所示的本发明的具体实施方式的描述是显然的,其中在不同的视图中相同的参考字符是指相同的部件。附图不一定按比例绘制,而是将重点放在说明本发明的各种实施方式的原理。

[0025] 图1提供了N4-Me-CTP(化合物1的NTP)的分析结果的谱图。对于N4-甲基胞苷(N4-Me-胞苷,化合物1),图1A提供了在DMSO中的核磁共振(NMR)谱,图1B提供了在D₂O中的NMR谱,图1C提供了质谱(MS)结果,图1D是高效液相色谱法(HPLC)的结果。

[0026] 图2示出了N4-Me-CTP(化合物1的NTP)的HPLC结果。

[0027] 图3提供了2'-OMe-N,N-二-Me-CTP(化合物2的NTP)的分析结果。图3A提供了NMR波谱。图3B提供了MS结果。图3C提供了2'-O-甲基-N⁴,N⁴-二甲基胞苷(2'-OMe-N,N-二-Me-胞苷,化合物2)的HPLC结果。

[0028] 图4示出了2'-OMe-N,N-二-Me-CTP(化合物2的NTP)的HPLC结果。

[0029] 图5提供了5-甲氧基羰基甲氧基-UTP(化合物3的NTP)的HPLC结果。

[0030] 图6提供了3-甲基假尿苷(化合物4)的分析结果。图6A提供了3-甲基假尿苷(化合物4)的NMR波谱,图6B提供了3-甲基假尿苷(化合物4)的HPLC结果。

[0031] 图7提供了5-TBDMS-OCH₂-胞苷(化合物6)的分析结果。对于5-TBDMS-OCH₂-胞苷(化合物6),图7A提供了NMR谱,图7B提供了MS结果,图7C提供了HPLC结果。

[0032] 图8提供了5-三氟甲基尿苷(化合物8)的分析结果。对于5-三氟甲基尿苷(化合物8),图8A提供了NMR谱,图8B提供了MS结果,图8C提供了HPLC结果。

[0033] 图9提供了5-(甲氧基羰基)甲基尿苷(化合物9)的NMR谱结果。

[0034] 图10提供了蛋白(GCSF;线B)和细胞因子(干扰素- α (IFNa);线A;以及肿瘤坏死因子- α (TNFa);线C)表达的变化(variability)作为百分比修饰的函数的曲线图。

具体实施方式

[0035] 本发明尤其提供了修饰的核苷、修饰的核苷酸和修饰的核酸,其导入细胞群时显示改良的治疗性质,包括但不限于降低的先天免疫应答。

[0036] 由于本领域仍需要解决围绕编码多肽或其片段的核酸的细胞内翻译和加工的有效调节的无数屏障的治疗方法,本发明人已经表明,某些修饰的mRNA序列具有作为治疗剂的潜力,其好处超过逃避、避免或减少免疫反应。

[0037] 本发明通过提供基于核酸的化合物或编码目标多肽的多核苷酸(例如,修饰的mRNA)解决了这一需求,其所具有的结构和/或化学特征避免了本领域的一个或多个问题,例如,这样的特征,其用于优化基于核酸的疗法同时又保留了结构和功能的完整性,克服了表达的阈值,提高了表达率、半衰期和/或蛋白浓度,优化了蛋白定位,并避免了有害生物反应,如免疫应答和/或降解途径。

[0038] 本发明的部分内容提供了编码目标多肽的多核苷酸,其被化学修饰以改善一种或多种下述性质:组织中的稳定性和/或清除率,受体吸收和/或动力学,组合物的细胞进入,翻译机制的约束,mRNA半衰期,翻译效率,免疫逃避,蛋白生产能力,分泌效率(适用时),循环可达性,蛋白半衰期和/或细胞的状态、功能和/或活性的调节。

[0039] 本发明的修饰的核苷、核苷酸和核酸(包括此处所述的修饰的组合)具有使其更适

合作为治疗方法的优异的性质。

[0040] 已经确定,本领域的“全或无”模式非常不足以描述与修饰的mRNA的治疗效用相关的生物学现象。本发明人已经确定,为了改善蛋白的生产,可以考虑修饰的性质,或修饰的组合,百分比修饰和测量一个以上的细胞因子或度量(metric),以确定特定的修饰的mRNA的疗效和风险概况。

[0041] 在本发明的一个方面中,确定与未修饰的mRNA相比修饰的mRNA的有效性的方法包括测量并分析一种或多种其表达由给予本发明的外源核酸触发的细胞因子。将这些值与施用未修饰的核酸或与标准度量如细胞因子应答、聚IC (PolyIC)、R-848或本领域其它已知的标准相比较。

[0042] 本发明开发的标准度量的一个实例是测量细胞、组织或有机体中产生的编码的多肽(蛋白)的水平或量相对于细胞、组织或有机体中其表达的触发是施用或接触修饰的核酸的结果的一个或多个(或一组)细胞因子的水平或量之间的比率。这样的比率在此统称为蛋白:细胞因子比率或“PC”比率。PC比率越高,修饰的核酸(编码所测量的蛋白的多核苷酸)越有效。本发明的优选的PC比率(由细胞因子)可大于1、大于10、大于100、大于1000、大于10,000或更多。优选的是,修饰的核酸具有比具有不同的或未修饰的构建体的修饰的核酸更高的PC比率。

[0043] PC比率可以进一步由存在于多核苷酸中的百分比修饰限定。例如,归一化到100%修饰的核酸,可以测定作为细胞因子的函数(或风险)或细胞因子概况(profile)的蛋白生产。

[0044] 在一个实施方式中,本发明提供了通过比较修饰的核酸(多核苷酸)的PC比率且以化学组成(chemistries)、细胞因子或百分比修饰为变量,来确定任何特定的修饰的多核苷酸的相对效力的方法。

[0045] 在另一个实施方式中,化学修饰的mRNA基本上是无毒的和非致突变的。

[0046] 在一个实施方式中,修饰的核苷、修饰的核苷酸和修饰的核酸可以在大沟面上被化学修饰,从而干扰大沟结合配偶体(partner)的相互作用,其可能导致先天免疫应答。此外,这些修饰的核苷、修饰的核苷酸和修饰的核酸可用于传递有效负载(payload),如可检测剂或治疗剂,于生物学靶上。例如,核酸可通过连接于核碱基或糖部分的连接体(linker)共价连接到有效负载上,如可检测剂或治疗剂。也可以在体内和体外、细胞内或细胞外以及分析如无细胞分析中使用此处所述的组合物和方法。

[0047] 在一些实施方式中,本发明提供了包含核苷酸的化合物,核苷酸干扰了大沟相互作用(例如结合)配偶体与核酸的结合,其中核苷酸具有相对于大沟相互作用配偶体的降低的结合亲和力。

[0048] 在另一个方面,本发明提供了包含化学修饰的核苷酸,其中核苷酸具有改变的与大沟相互作用配偶体的结合。

[0049] 在一些实施方式中,化学修饰位于核碱基的大沟面,且其中化学修饰可以包括用氨基、SH、烷基(如甲基或乙基)或卤素(如氯或氟)替代或取代嘧啶核碱基的原子。

[0050] 在另一个方面,本发明提供了位于核苷酸的糖部分的化学修饰。

[0051] 在另一个方面,本发明提供了位于核酸的磷酸骨架的化学修饰。

[0052] 在一些实施方式中,化学修饰改变了核酸的大沟面的电学。

[0053] 在另一个方面,本发明提供了包含化学修饰的核苷酸,其中,与由相应的未修饰的核酸诱导的细胞的先天免疫相比,核苷酸降低了细胞的先天免疫应答。

[0054] 在另一个方面,本发明提供了包含至少两个核苷酸的核酸序列,核酸序列包含干扰大沟相互作用配偶体与核酸序列结合的核苷酸,其中核苷酸具有相对于大沟结合配偶体的降低的结合亲和力。

[0055] 在另一个方面,本发明提供了包含本文所述的化合物的组合物。在一些实施方式中,组合物是反应混合物。在一些实施方式中,组合物是药物组合物。在一些实施方式中,组合物是细胞培养物。在一些实施方式中,组合物进一步包含RNA聚合酶和cDNA模板。在一些实施方式中,组合物进一步包含选自腺苷、胞嘧啶、鸟苷和尿嘧啶的核苷酸。

[0056] 在另一个方面,本发明提供了制备包括具有生理活性的分泌蛋白的药物制剂的方法,其包括用本文所述的方法制备的药用核酸转染人类细胞的第一群体,其中分泌蛋白对人类细胞的第二群体有活性。

[0057] 在一些实施方式中,分泌蛋白能够与存在于第二集群的至少一个细胞的表面上的受体相互作用。

[0058] 在一些实施方式中,分泌蛋白能够与存在于第二群体的至少一个细胞的表面上的受体相互作用。

[0059] 在一些实施方式中,分泌蛋白是粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。

[0060] 在一些实施方式中,第二群体包含表达G-CSF受体的成粒细胞。

[0061] 在某些实施方式中,本文提供了包含一个或多个修饰的核酸的联合治疗剂,其中修饰的核酸包含编码增强哺乳动物受试者的免疫力的蛋白以及诱导抗体依赖性细胞毒性的蛋白的可翻译区。例如,提供了含有一个或多个编码曲妥珠单抗和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)的核酸的治疗剂。尤其是,此类联合治疗剂可用于对曲妥珠单抗产生诱导的抗性的Her2+乳腺癌患者。(参见,例如,Albrecht, Immunotherapy. 2 (6) :795-8 (2010))。

[0062] 在一个实施方式,需要本发明的化合物是稳定的。还可以理解的是,为清楚起见,在单独的实施方式中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施方式中以组合的形式提供。相反地,为了简洁起见,在单个实施方式中描述的本发明的各种特征也可以单独地或以任何合适的子组合的形式提供。

[0063] 本发明的修饰的核苷酸、核苷和多核苷酸

[0064] 此处,在核苷酸、核苷或多核苷酸(例如本发明的核酸,例如mRNA分子)中,术语“修饰”或恰当的时候的“修饰的”是指对A、G、U或C核糖核苷酸的修饰。通常,在本文中,这些术语并非旨在指在天然存在的5'末端的mRNA帽子部分的核糖核苷酸的修饰。在多肽中,术语“修饰”指的是相较于标准的20个氨基酸、部分的修饰。

[0065] 修饰可能是各种不同的修饰。在一些实施方式中,其中核酸是mRNA,编码区、侧翼区和/或末端区可以包含一个、两个或更多个(可任选不同的)核苷或核苷酸修饰。在一些实施方式中,引入到细胞的修饰的多核苷酸相比于未修饰的多核苷酸,可在细胞中显示出降低的降解。

[0066] 多核苷酸可以包括任何有用的如对糖、核碱基或核苷间的连接(linkage)(例如,对连接的磷酸盐/对磷酸二酯连接/对磷酸二酯主链)的修饰。例如,多核苷酸的大沟或核碱基的大沟面可包含一个或多个修饰。嘧啶核碱基(例如在大沟面)的一个或多个原子可以被

任选取代的氨基、任选取代的巯基、任选取代的烷基(如甲基或乙基)或卤素(如氯或氟)替换或取代。在某些实施方式中,修饰(例如,一个或多个修饰)存在于每个糖和核苷间的连接。本发明的修饰可以是核糖核酸(RNA)到脱氧核糖核酸(DNA)的修饰,例如,取代呋喃核苷(ribofuranosyl)环上的2'OH为2'H、苏糖核酸(TNA)、二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)或其杂合。另外的修饰在本文中进行了描述。

[0067] 如本文所述,本发明的多核苷酸基本上不诱导多核苷酸(例如,mRNA)引入其中的细胞的先天免疫应答。诱导的先天免疫应答的特征包括:1)增加促炎细胞因子的表达,2)激活细胞内PRR(RIG-I、MDA5等),和/或3)终止或减少蛋白翻译。

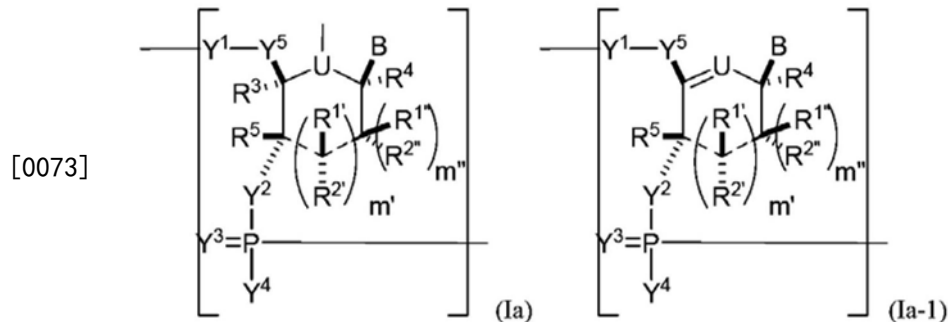
[0068] 在某些实施方式中,需要的是,导入到细胞内的修饰的核酸分子在细胞内被降解。例如,如果需要蛋白生产的精确时限(timing),则优选修饰的核酸分子的降解。因此,在一些实施方式中,本发明提供了含有降解结构域的修饰的核酸分子,其能够在细胞内以直接方式起作用。在另一个方面,本发明提供了包括核苷或核苷酸的多核苷酸,所述核苷或核苷酸可以干扰大沟相互作用(例如结合)配偶体与多核苷酸的结合(例如,其中相比于未修饰的核苷酸,修饰的核苷酸对大沟相互作用配偶体具有降低的结合亲和力)。

[0069] 多核苷酸可任选地包括其它试剂(例如RNAi诱导剂、RNAi剂、siRNA、shRNA、miRNA、反义RNA、核酶、催化性DNA、tRNA、诱导三螺旋形成的RNA、适体、载体等)。在一些实施方式中,多核苷酸可以包括一个或多个具有一个或多个修饰的核苷或核苷酸的信使RNA(mRNA)(即,修饰的mRNA分子)。这些多核苷酸描述如下。

[0070] 多核苷酸

[0071] 本发明的多核苷酸包括编码目标多肽的连接的核苷的第一区域、位于第一区域的5'末端的第一侧翼区以及位于第一区域的3'末端的第二侧翼区。

[0072] 在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n个连接具有式(Ia)或式(Ia-1)的核苷、或其药学上可接受的盐或其立体异构体:



[0074] 其中U是O、S、N(R^U)_{nu}或C(R^U)_{nu},其中nu为0至2的整数,且每个R^U独立地是H、卤素或任选取代的烷基;

[0075] ---是单键或不存在;

[0076] 每个R^{1'}、R^{2'}、R^{1''}、R^{2''}、R¹、R²、R³、R⁴和R⁵在存在时独立地是H、卤素、羟基、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氨基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基,或不存在;其中R³与R^{1'}、R^{1''}、R^{2'}、R^{2''}或R⁵中的一个或多个(例如,R^{1'}与R³、R^{1''}与R³、R^{2'}与R³、R^{2''}与R³或R⁵与R³)可以连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基,并与它们所连接的

碳一起提供任选取代的杂环基(例如,二环、三环或四环杂环基);其中, R^5 与 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{2'}$ 或 $R^{2''}$ 中的一个或多个(例如, $R^{1'}$ 与 R^5 、 $R^{1''}$ 与 R^5 、 $R^{2'}$ 与 R^5 或 $R^{2''}$ 与 R^5)可以连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基,并与它们所连接的碳一起提供任选取代的杂环基(例如,二环、三环或四环杂环基);并且其中 R^4 与 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{2'}$ 、 $R^{2''}$ 、 R^3 或 R^5 中的一个或多个可以连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基,并与它们所连接的碳一起提供任选取代的杂环基(例如,二环、三环或四环杂环基);

[0077] 每个 m' 和 m'' 独立地为0至3(例如,0至2、0至1、1至3、或1至2)的整数;

[0078] 每个 Y^1 、 Y^2 和 Y^3 独立地是O、S、Se、 $-NR^{N1}-$ 、任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基,其中, R^{N1} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基或不存在;

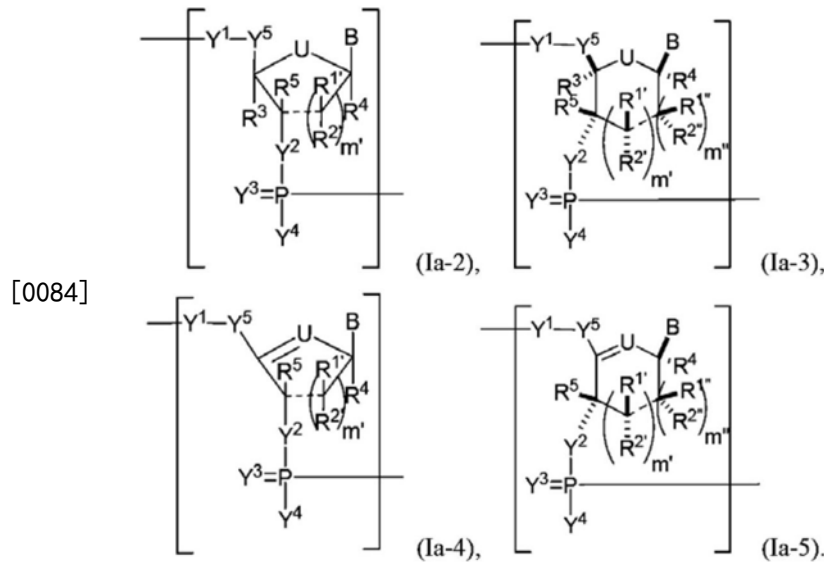
[0079] 每个 Y^4 独立地为H、羟基、巯基、硼烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基;

[0080] 每个 Y^5 独立地是O、S、Se、任选取代的亚烷基(例如亚甲基)或任选取代的杂亚烷基;

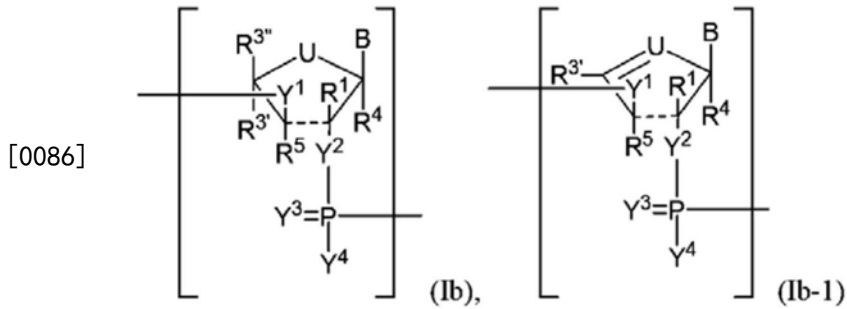
[0081] n 是1至100,000的整数;且

[0082] B是核碱基(例如嘌呤、嘧啶或它们的衍生物),其中B和 $R^{1'}$ 、B和 $R^{2'}$ 、B和 $R^{1''}$ 或B和 $R^{2''}$ 可以与它们所连接的碳一起任选地形成二环基团(例如,二环杂环基),或其中B、 $R^{1''}$ 和 R^3 或B、 $R^{2''}$ 和 R^3 可以任选地形成三环或四环基团(例如,三环或四环杂环基,如在本文中的式(IIo)-(IIp)中的三环或四环杂环基)。

[0083] 在一些实施方式中,多核苷酸包含修饰的核糖。在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括 n 个连接的具有式(Ia-2)-(Ia-5)的核苷或其药学上可接受的盐或其立体异构体。



[0085] 在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括 n 个连接的具有式(Ib)或式(Ib-1)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体:



[0087] 其中

[0088] U是O、S、N(R^U)_{nu}或C(R^U)_{nu},其中nu为0至2的整数,且每个R^U独立地是H、卤素或任选取代的烷基;

[0089] ---是单键或不存在;

[0090] 每个R¹、R^{3'}、R^{3''}和R⁴独立地是H、卤素、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基或不存在;且其中R¹和R^{3'}或R¹和R^{3''}可以一起形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基(例如,以产生锁核酸);

[0091] 每个R⁵独立地是H、卤素、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或不存在;

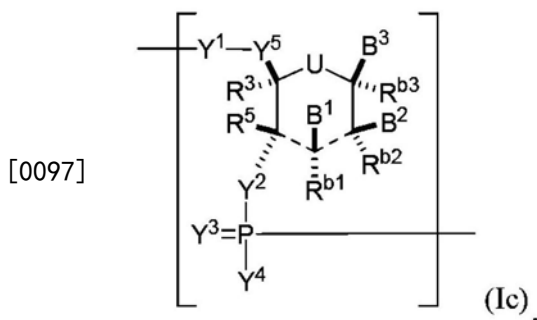
[0092] 每个Y¹、Y²和Y³独立地是O、S、Se、NR^{N1}-、任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基,其中,R^{N1}是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基;

[0093] 每个Y⁴独立地为H、羟基、巯基、硼烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基;

[0094] n是1至100,000的整数;和

[0095] B是核碱基。

[0096] 在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n个连接的具有式(Ic)的核苷或其药学上可接受的盐或立体异构体:



[0098] 其中

[0099] U是O、S、N(R^U)_{nu}或C(R^U)_{nu},其中nu为0至2的整数,且每个R^U独立地是H、卤素或任选取代的烷基;

[0100] ---是单键或不存在;

[0101] 每个B¹、B²和B³独立地是核碱基(例如,如本文所述的嘌呤、嘧啶或它们的衍生物)、

H、卤素、羟基、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基,其中 B^1 、 B^2 和 B^3 中的一个且只有一个是核碱基;

[0102] 每个 R^{b1} 、 R^{b2} 、 R^{b3} 、 R^3 和 R^5 独立地是H、卤素、羟基、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基;

[0103] 每个 Y^1 、 Y^2 和 Y^3 独立地是O、S、Se、 $-NR^{N1}$ -、任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基,其中, R^{N1} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基;

[0104] 每个 Y^4 独立地是H、羟基、巯基、硼烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基;

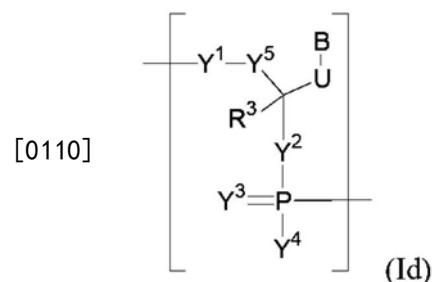
[0105] 每个 Y^5 独立地是O、S、Se、任选取代的亚烷基(例如亚甲基)或任选取代的杂亚烷基;

[0106] n 是1至100,000的整数;且

[0107] 其中包括U的环可以包括一个或多个双键。

[0108] 在具体实施方式中,包括U的环在 $U-CB^3R^{b3}$ 之间或在 $CB^3R^{b3}-C^{B2}R^{b2}$ 之间不具有双键。

[0109] 在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括 n 个连接的具有式(Id)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体:



[0111] 其中U是O、S、N(R^U)_{nu}或C(R^U)_{nu},其中 nu 为0至2的整数,且每个 R^U 独立地是H、卤素或任选取代的烷基;

[0112] 每个 R^3 独立地是H、卤素、羟基、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氮基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基;

[0113] 每个 Y^1 、 Y^2 和 Y^3 独立地是O、S、Se、 $-NR^{N1}$ -、任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基,其中, R^{N1} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基;

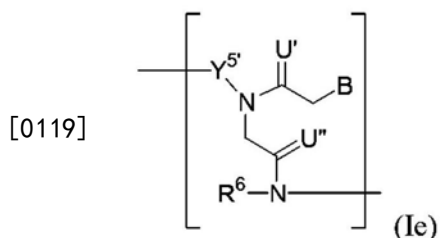
[0114] 每个 Y^4 独立地是H、羟基、巯基、硼烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基;

[0115] 每个 Y^5 独立地是O、S、任选取代的亚烷基(例如亚甲基)或任选取代的杂亚烷基;

[0116] n 是1至100,000的整数;且

[0117] B是核碱基(例如嘌呤、嘧啶或它们的衍生物)。

[0118] 在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n个连接的具有式(Ie)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体:



[0120] 其中每个U'和U''独立地是O、S、N(R^U)_{nu}或C(R^U)_{nu},其中nu为0至2的整数,且每个R^U独立地是H、卤素或任选取代的烷基;

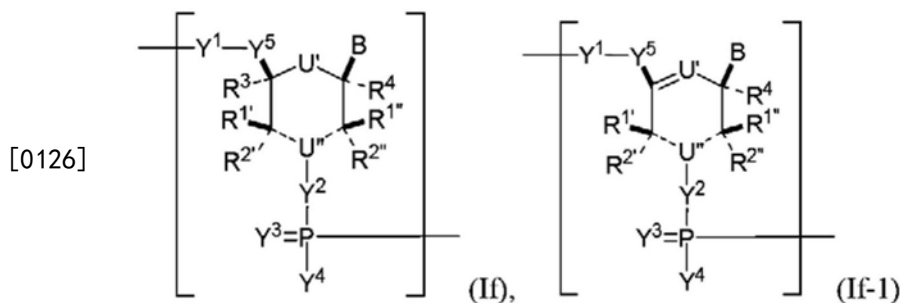
[0121] 每个R⁶独立地是H、卤素、羟基、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氨基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基;

[0122] 每个Y⁵独立地是O、S、任选取代的亚烷基(例如亚甲基或亚乙基)或任选取代的杂亚烷基;

[0123] n是1至100,000的整数;且

[0124] B是核碱基(例如,嘌呤、嘧啶或它们的衍生物)。

[0125] 在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n个连接的具有式(If)或(If-1)的核苷、或其药学上可接受的盐或其立体异构体:



[0127] 其中每个U'和U''独立地是O、S、N、N(R^U)_{nu}或C(R^U)_{nu},其中nu是0至2的整数,且每个R^U独立地是H、卤素或任选取代的烷基(例如,U'是O,U''是N);

[0128] ---是单键或不存在;

[0129] 每个R^{1'}、R^{2'}、R^{1''}、R^{2''}、R³和R⁴独立地是H、卤素、羟基、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氨基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、或不存在;并且其中R^{1'}和R³、R^{1''}和R³、R^{2'}和R³、或R^{2''}和R³可以一起形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基(例如,以产生锁核酸);每个m'和m''独立地是0至3(例如,0至2、0至1、1至3、或1至2)的整数;

[0130] 每个Y¹、Y²和Y³独立地是O、S、Se、-NR^{N1}-、任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基,其中,R^{N1}是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基、或不存在;

[0131] 每个Y⁴独立地是H、羟基、巯基、硼烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基；

[0132] 每个Y⁵独立地是O、S、Se、任选取代的亚烷基(例如亚甲基)或任选取代的杂亚烷基；

[0133] n是1至100,000的整数；和

[0134] B是核碱基(例如,嘌呤、嘧啶或它们的衍生物)。

[0135] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr))中,包括U的环具有一个或两个双键。

[0136] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr))中,每个R¹、R^{1'}和R^{1''}在存在时是H。在进一步的实施方式中,每个R²、R^{2'}和R^{2''}在存在时独立地是H、卤素(例如氟)、羟基、任选取代的烷氧基(例如甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基。在具体的实施方式中,烷氧基烷氧基是-(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR',其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个s2和s3独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,且R'是H或C₁₋₂₀烷基)。在一些实施方式中,s2为0,s1为1或2,s3为0或1,且R'是C₁₋₆烷基。

[0137] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr))中,每个R²、R^{2'}和R^{2''}在存在时是H。在进一步的实施方式中,每个R¹、R^{1'}和R^{1''}在存在时独立地是H、卤素(例如氟)、羟基、任选取代的烷氧基(例如甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基。在具体实施方式中,烷氧基烷氧基是-(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR',其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个s2和s3独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,且R'是H或C₁₋₂₀烷基)。在一些实施方式中,s2为0,s1为1或2,s3为0或1,且R'是C₁₋₆烷基。

[0138] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr))中,每个R³、R⁴和R⁵独立地是H、卤素(例如氟)、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基(例如甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基。在具体实施方式中,R³是H,R⁴是H,R⁵是H,或R³、R⁴和R⁵均为H。在具体实施方式中,R³是C₁₋₆烷基,R⁴是C₁₋₆烷基,R⁵是C₁₋₆烷基,或R³、R⁴和R⁵均为C₁₋₆烷基。在具体实施方式中,R³和R⁴都是H,且R⁵是C₁₋₆烷基。

[0139] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr))中,R³和R⁵连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基,并与它们所连接的碳一起提供任选取代的杂环基(例如,二环、三环或四环杂环基,如反式-3',4'类似物,其中R³和R⁵连接在一起以形成杂亚烷基(例如,-(CH₂)_{b1}O(CH₂)_{b2}O(CH₂)_{b3}-),其中每个b1、b2和b3各自独立地是0至3的整数)。

[0140] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、

(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr))中, R^3 与 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{2'}$ 、 $R^{2''}$ 或 R^5 中的一个或多个连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基,并与它们所连接的碳原子一起提供任选取代的杂环基(例如,二环、三环或四环杂环基, R^3 与 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{2'}$ 、 $R^{2''}$ 或 R^5 中的一个或多个连接在一起以形成杂亚烷基(例如,- $(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}$ -,其中每个 $b1$ 、 $b2$ 和 $b3$ 独立地是0至3的整数)。

[0141] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr))中, R^5 和 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{2'}$ 或 $R^{2''}$ 中的一个或多个连接在一起以形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基,并与它们所连接的碳一起提供任选取代的杂环基(例如,二环、三环或四环杂环基, R^5 和 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{2'}$ 或 $R^{2''}$ 中的一个或多个连接在一起以形成杂亚烷基(例如,- $(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}$ -,其中 $b1$ 、 $b2$ 和 $b3$ 各自独立地是0至3的整数)。

[0142] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr))中,每个 Y^2 独立地是O、S或 $-NR^{N1}$ -,其中 R^{N1} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基。在具体实施方式中, Y^2 是 NR^{N1} -,其中 R^{N1} 是H或任选取代的烷基(例如, C_{1-6} 烷基,如甲基、乙基、异丙基或正丙基)。

[0143] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr))中,每个 Y^3 独立地是O或S。

[0144] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr))中, R^1 是H;每个 R^2 独立地是H、卤素(例如氟)、羟基、任选取代的烷氧基(例如甲氧基或乙氧基)、或任选取代的烷氧基烷氧基(例如,- $(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$,其中 $s1$ 是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个 $s2$ 和 $s3$ 独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,且 R' 是H或 C_{1-20} 烷基,例如其中 $s2$ 为0, $s1$ 为1或2, $s3$ 为0或1,且 R' 是 C_{1-6} 烷基);每个 Y^2 独立地是O或 $-NR^{N1}$ -,其中 R^{N1} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基(例如,其中 R^{N1} 为H或任选取代的烷基(例如, C_{1-6} 烷基,如甲基、乙基、异丙基或正丙基));且每个 Y^3 独立地是O或S(例如S)。在进一步的实施方式中, R^3 为H、卤素(例如氟)、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基(例如甲氧基或乙氧基)、或任选取代的烷氧基烷氧基。在另一些实施方式中,每个 Y^1 独立地是O或 $-NR^{N1}$ -,其中 R^{N1} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、或任选取代的芳基(例如,其中 R^{N1} 为H或任选取代的烷基(例如, C_{1-6} 烷基,如甲基、乙基、异丙基或正丙基));且每个 Y^4 独立地是H、羟基、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基。

[0145] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr))中,每个 R^1 独立地是H、卤素(例如氟)、羟基、任选取代的烷氧基(例如甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基(例如,- $(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$,其中 $s1$ 是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个 $s2$ 和 $s3$ 独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,且 R' 是H或 C_{1-20} 烷基,例如其中 $s2$ 为0, $s1$ 为1或2, $s3$ 为0或1,且 R' 是 C_{1-6} 烷基); R^2 是H;每个 Y^2 独

立地是O或 $-NR^{N1}$ -,其中 R^{N1} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基(例如,其中 R^{N1} 为H或任选取代的烷基(例如, C_{1-6} 烷基,如甲基、乙基、异丙基或正丙基));且每个 Y^3 独立地是O或S(例如S)。在进一步的实施方式中, R^3 为H、卤素(例如氟)、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基(例如甲氧基或乙氧基)或任选取代的烷氧基烷氧基。在另一些实施方式中,每个 Y^1 独立地是O或 $-NR^{N1}$ -,其中 R^{N1} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基(例如,其中 R^{N1} 为H或任选取代的烷基(例如, C_{1-6} 烷基,如甲基、乙基、异丙基或正丙基));且每个 Y^4 独立地是H、羟基、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基或任选取代的氨基。

[0146] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IVl)和(IXa)-(IXr))中,包括U的环是 β -D(例如, β -D-核糖)构型。

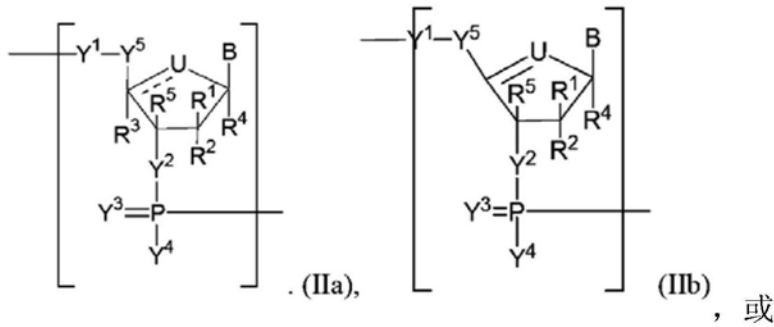
[0147] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IVl)和(IXa)-(IXr))中,包括U的环是 α -L(例如, α -L-核糖)构型。

[0148] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IVl)和(IXa)-(IXr))中,一个或多个B不是假尿苷(ψ)或5-甲基-胞苷(m^5C)。

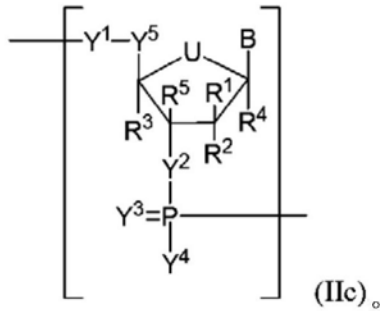
[0149] 在一些实施方式中, n 个B核碱基中的约10%至约100%不是 ψ 或 m^5C (例如, n 个B中的10%至20%、10%至35%、10%至50%、10%至60%、10%至75%、10%至90%、10%至95%、10%至98%、10%至99%、20%至35%、20%至50%、20%至60%、20%至75%、20%至90%、20%至95%、20%至98%、20%至99%、20%至100%、50%至60%、50%至75%、50%至90%、50%到95%、50%至98%、50%至99%、50%至100%、75%至90%、75%至95%、75%至98%、75%至99%和75%至100%不是 ψ 或 m^5C)。在一些实施方式中,B不是 ψ 或 m^5C 。

[0150] 在多核苷酸的一些实施方式(例如,式(Ia)-(Ia-5)、(Ib)-(If-1)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IVl)和(IXa)-(IXr))中,当B是选自胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶和腺嘌呤的未修饰的核碱基时, Y^1 、 Y^2 或 Y^3 中的至少一个不是O。

[0151] 在一些实施方式中,多核苷酸包含修饰的核糖。在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括 n 个连接的具有式(IIa)-(IIc)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体:

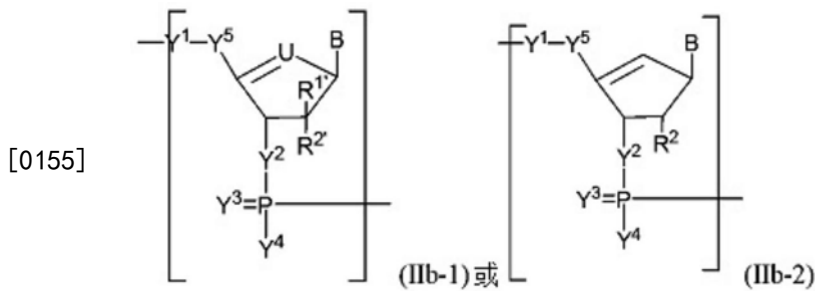


[0152]



[0153] 在具体实施方式中, U是O或C(R^U)_{nu}, 其中nu为0至2的整数, 且每个R^U独立地是H、卤素或任选取代的烷基(例如, U是-CH₂-或-CH-)。在其它实施方式中, 每个R¹、R²、R³、R⁴和R⁵独立地是H、卤素、羟基、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氨基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、或不存在(例如, 每个R¹和R²独立地是H、卤素、羟基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基; 每个R³和R⁴独立地是H或任选取代的烷基, 且R⁵为H或羟基), 且—为单键或双键。

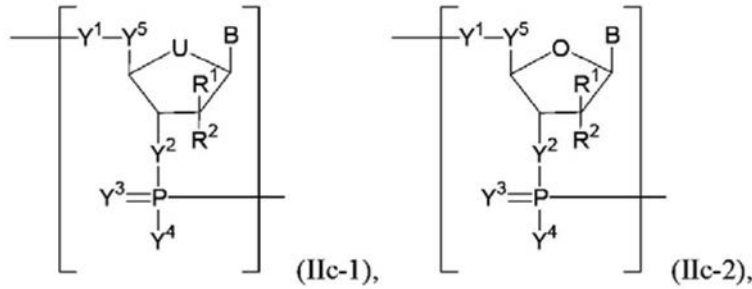
[0154] 在具体实施方式中, 多核苷酸(例如, 第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n个连接的具有式(IIb-1)-(IIb-2)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体:



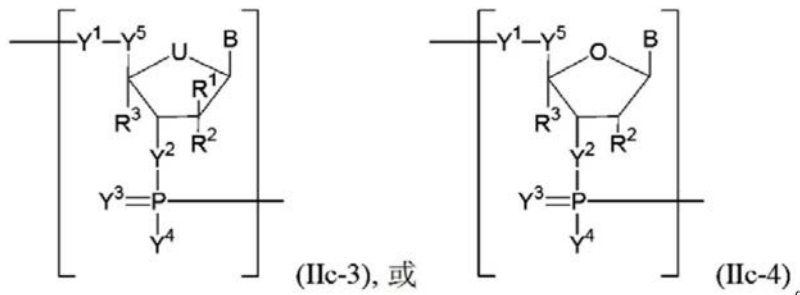
[0156] 在一些实施方式中, U是O或C(R^U)_{nu}, 其中nu为0至2的整数, 且每个R^U独立地是H、卤素或任选取代的烷基(例如, U是-CH₂-或-CH-)。在其它实施方式中, 每个R¹和R²独立地是H、卤素、羟基、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氨基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、或不存在(例如, 每个R¹和R²独立地是H、卤素、羟基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基, 例如, H、卤素、羟基、烷基或烷氧基)。在具体实施方式中, R²是羟基或任选取代

的烷氧基(例如甲氧基、乙氧基或本文所描述的任何烷氧基)。

[0157] 在具体实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n个连接的具有式(IIc-1)-(IIc-4)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体:

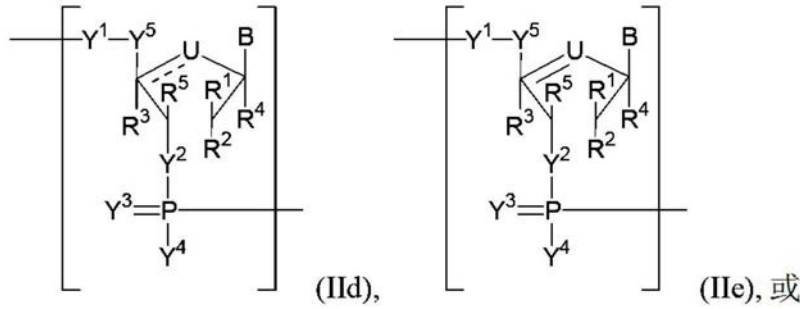


[0158]

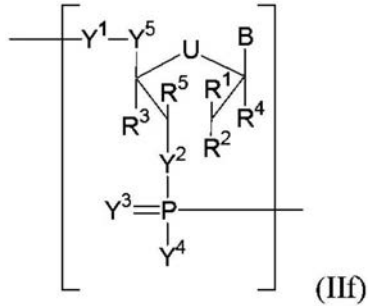


[0159] 在一些实施方式中,U是O或C(R^U)_{nu},其中nu为0至2的整数,且每个R^U独立地是H、卤素或任选取代的烷基(例如,U是-CH₂-或-CH-)。在一些实施方式中,每个R¹、R²和R³独立地是H、卤素、羟基、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的羟基烷氧基、任选取代的氨基、叠氨基、任选取代的芳基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基或不存在(例如,每个R¹和R²独立地是H、卤素、羟基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基,例如,H、卤素、羟基、烷基或烷氧基;且每个R³独立地是H或任选取代的烷基)。在具体的实施方式中,R²是任选取代的烷氧基(例如甲氧基或乙氧基或本文所描述的任何烷氧基)。在具体的实施方式中,R¹是任选取代的烷基,且R²是羟基。在其它实施方式中,R¹为羟基,且R²是任选取代的烷基。在进一步的实施方式中,R³是任选取代的烷基。

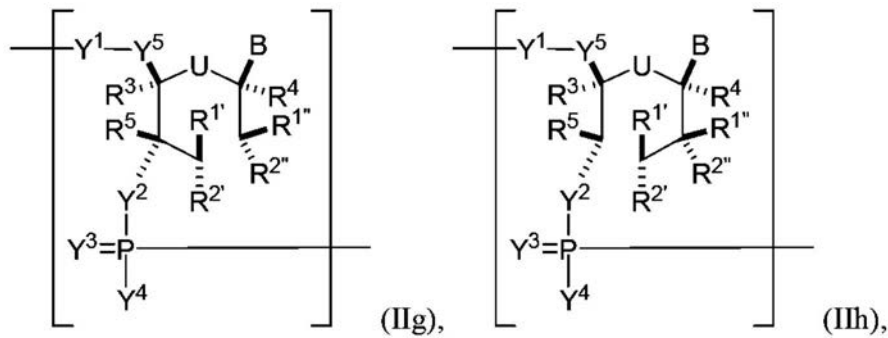
[0160] 在一些实施方式中,多核苷酸包括无环的修饰的核糖。在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n个连接的具有式(IIId)-(IIIf)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体:



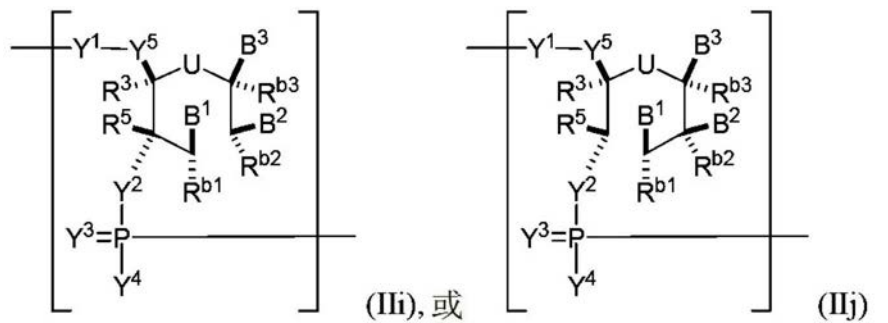
[0161]



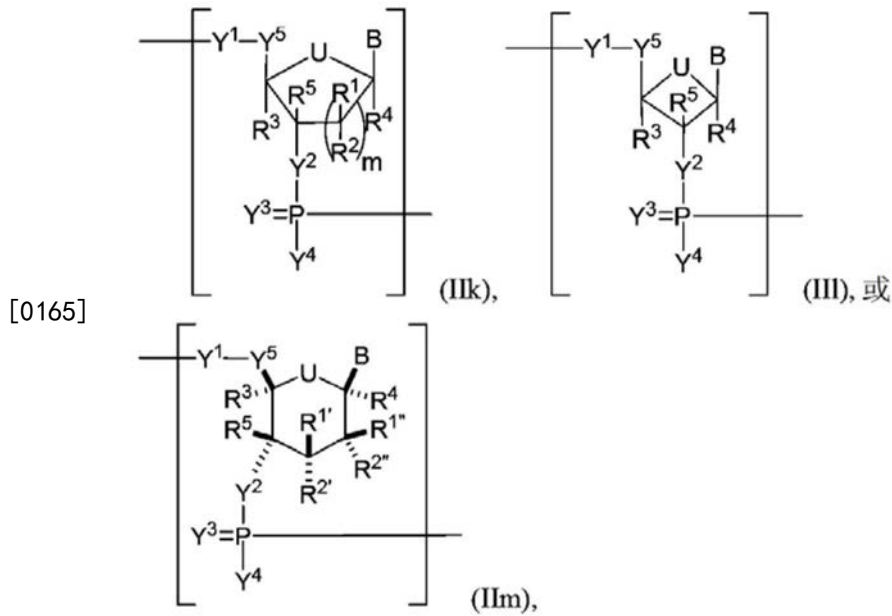
[0162] 在一些实施方式中,多核苷酸包括无环的修饰的己糖醇。在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n个连接的具有式(IIg)-(IIj)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体:



[0163]

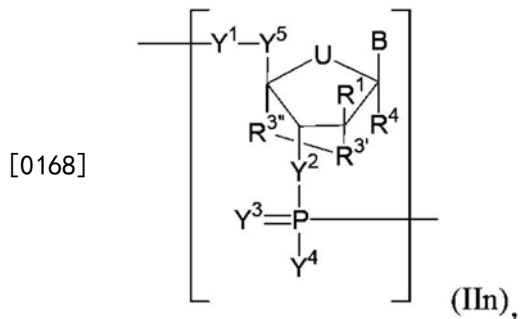


[0164] 在一些实施方式中,多核苷酸包括具有缩小的或扩大的核糖环的糖部分。在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n个连接的具有式(IIk)-(IIm)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体:



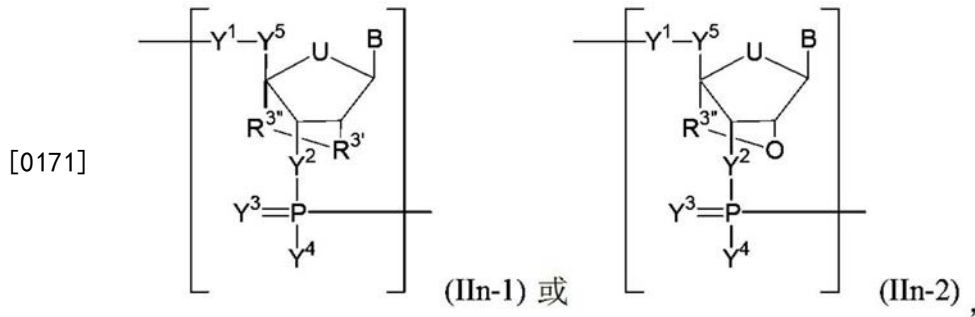
[0166] 其中每个 R^1 、 $R^{1'}$ 、 R^2 和 $R^{2'}$ 独立地是H、卤素、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、或不存在，并且其中 $R^{2'}$ 与 R^3 或者 $R^{2'}$ 与 R^3 可以一起形成任选取代的亚烷基或任选取代的杂亚烷基。

[0167] 在一些实施方式中，多核苷酸包括锁定的修饰的核糖。在一些实施方式中，多核苷酸（例如，第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区）包括n个连接的具有式(IIIn)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体：



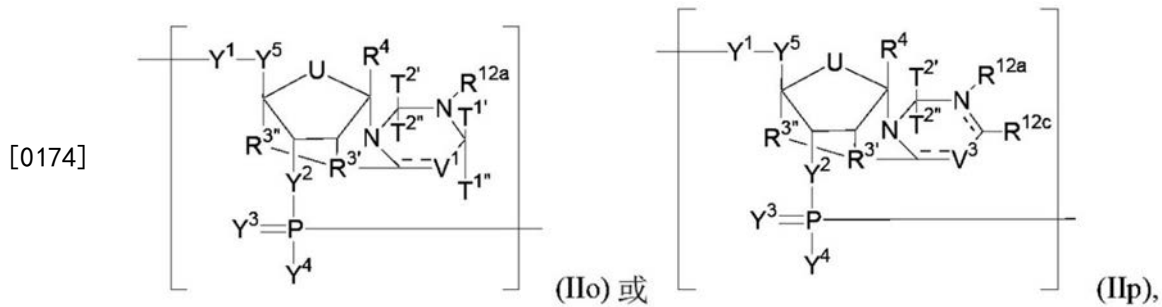
[0169] 其中 $R^{3'}$ 是O、S或 $-NR^{N1}$ ，其中 R^{N1} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基，且 $R^{3''}$ 是任选取代的亚烷基（例如， $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ）或任选取代的杂亚烷基（例如， $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ ）（例如， $R^{3'}$ 是O，且 $R^{3''}$ 是任选取代的亚烷基（例如， $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ））。

[0170] 在一些实施方式中，多核苷酸（例如，第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区）包括n个连接的具有式(IIIn-1)-(IIIn2)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体：



[0172] 其中 $R^{3'}$ 是O、S或 $-NR^{N1}$ -,其中 R^{N1} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的芳基,且 $R^{3''}$ 是任选取代的亚烷基(例如, $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)或任选取代的杂亚烷基(例如, $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2-$) (例如, $R^{3'}$ 为O,且 $R^{3''}$ 是任选取代的亚烷基(例如, $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$))。

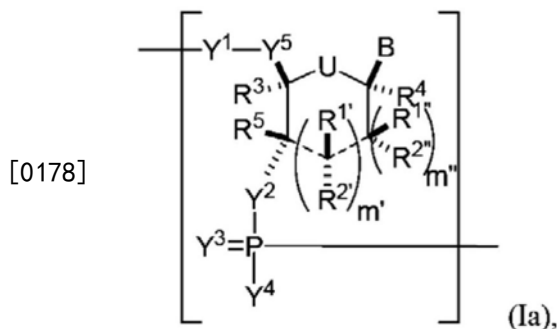
[0173] 在一些实施方式中,多核苷酸包括形成四环杂环基的锁定的修饰的核糖。在一些实施方式中,多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)包括n个连接的具有式(IIo)的核苷、或其药学上可接受的盐或立体异构体:



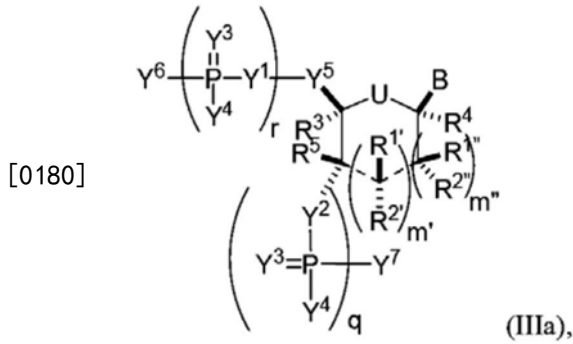
[0175] 其中 R^{12a} 、 R^{12c} 、 $T^{1'}$ 、 $T^{1''}$ 、 $T^{2'}$ 、 $T^{2''}$ 、 V^1 和 V^3 如本文所述。

[0176] 多核苷酸的任何式可以包括本文所述的一种或多种核碱基(例如,式(b1)-(b43))。

[0177] 在一个实施方式中,本发明提供了制备包含至少一个核苷酸的多核苷酸的方法,所述核苷酸干扰大沟相互作用配偶体与核酸的结合,其中多核苷酸包括n个如本文所定义的具有式(Ia)的核苷:



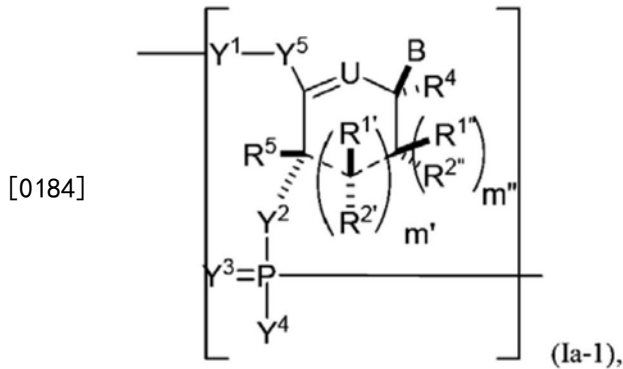
[0179] 所述方法包括使如本文所定义的式(IIIa)的化合物:



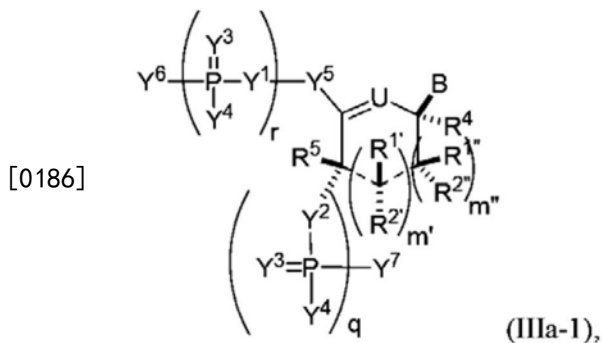
[0181] 与RNA聚合酶和cDNA模板反应。

[0182] 在进一步的实施方式中,本发明提供了扩增包含至少一个核苷酸的多核苷酸的方法,所述核苷酸干扰大沟结合配偶体与多核苷酸序列的结合,所述方法包括:使如本文所定义的式(IIIa)的化合物与引物、cDNA模板和RNA聚合酶反应。

[0183] 在一个实施方式中,本发明提供了制备包含至少一个核苷酸的多核苷酸的方法,所述核苷酸干扰大沟相互作用配偶体与核酸的结合,其中多核苷酸包括n个如本文所定义的具有式(Ia-1)的核苷:



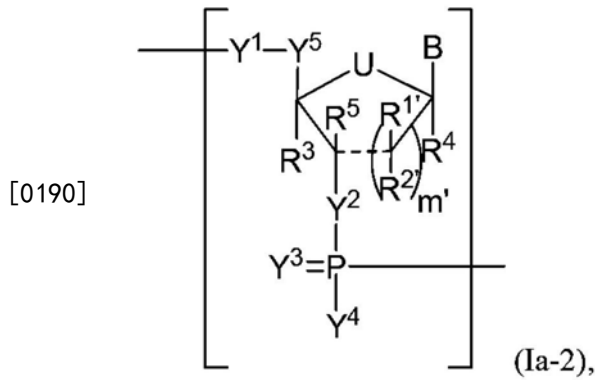
[0185] 所述方法包括使如本文所定义的式(IIIa-1)的化合物:



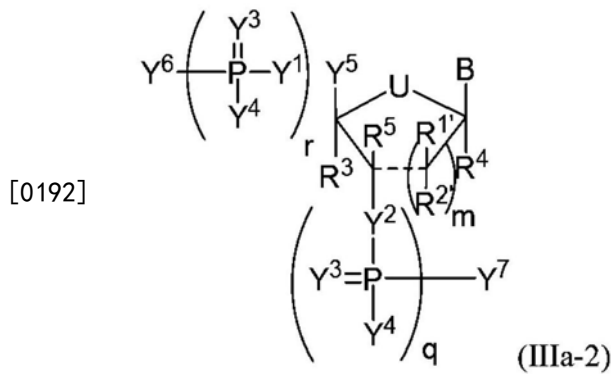
[0187] 与RNA聚合酶和cDNA模板反应。

[0188] 在进一步的实施方式中,本发明提供了扩增包含至少一个核苷酸的多核苷酸(例如,修饰的mRNA分子)的方法,所述核苷酸干扰大沟结合配偶体与多核苷酸序列的结合,所述方法包括:使如本文所定义的式(IIIa-1)的化合物与引物、cDNA模板和RNA聚合酶反应。

[0189] 在一个实施方式中,本发明提供了制备包含至少一个核苷酸的多核苷酸的方法,所述核苷酸干扰大沟相互作用配偶体与核酸序列的结合,其中所述多核苷酸包含n个如本文所定义的具有式(Ia-2)的核苷:



[0191] 所述方法包括使如本文所定义的式 (IIIa-2) 的化合物:



[0193] 与RNA聚合酶和cDNA模板反应。

[0194] 在进一步的实施方式中,本发明提供了扩增包含至少一个核苷酸的多核苷酸(例如,修饰的mRNA分子)的方法,所述核苷酸干扰大沟结合配偶体与多核苷酸的结合,所述方法包括使如本文所定义的式 (IIIa-2) 的化合物与引物、cDNA模板和RNA聚合酶反应。

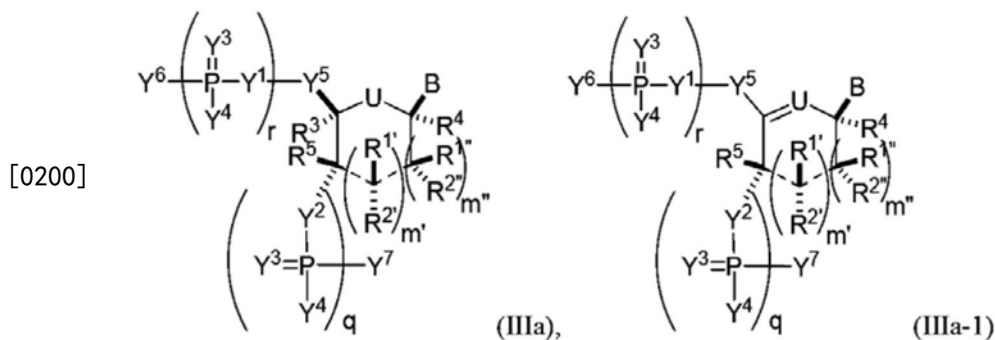
[0195] 在一些实施方式中,反应可被重复1至约7000次。在本文所述的任何实施方式中,B可以是式 (b1) - (b43) 的核碱基。

[0196] 多核苷酸可任选地包括本文中所述的5'和/或3'侧翼区。

[0197] 修饰的核苷酸和核苷

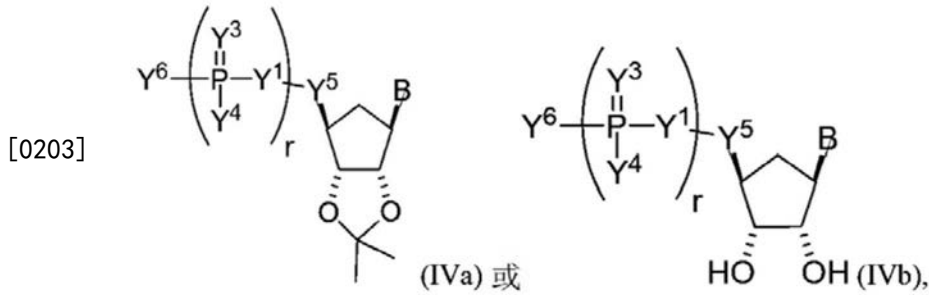
[0198] 本发明还包括多核苷酸(例如,修饰的RNA(或mRNA)分子)的构建块,例如,修饰的核糖核苷、修饰的核糖核苷酸。例如,这些构建块可以用于制备本发明的多核苷酸。

[0199] 在一些实施方式中,构建块分子具有式 (IIIa) 或 (IIIa-1) :



[0201] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中取代基如本文所述(例如,对于式 (Ia) 和 (Ia-1)),并且其中当B是选自胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶和腺嘌呤的未修饰的核碱基时,Y¹、Y²或Y³中的至少一个不是0。

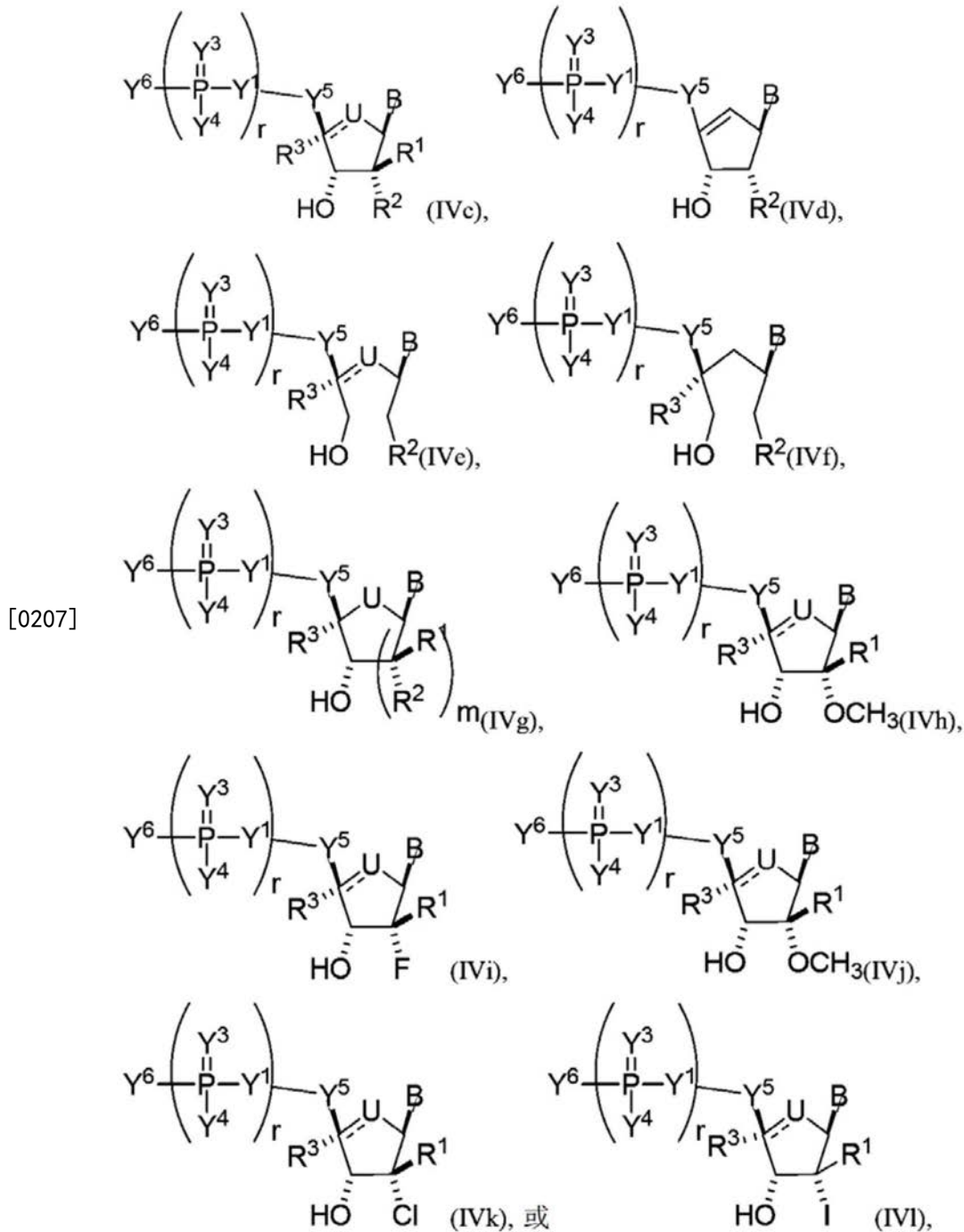
[0202] 在一些实施方式中,可被引入到多核苷酸中的构建块分子具有式 (IVa) - (IVb) :



[0204] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中B如本文所述(例如,(b1) - (b43)中的任何一个)。

[0205] 在具体的实施方式中,式 (IVa) 或 (IVb) 与修饰的尿嘧啶(如,式 (b1) - (b9)、(b21) - (b23) 和 (b28) - (b31) 中的任何一个,如式 (b1)、(b8)、(b28)、(b29) 或 (b30)) 结合。在具体的实施方式中,式 (IVa) 或 (IVb) 与修饰的胞嘧啶(如,式 (b10) - (b14)、(b24)、(b25) 和 (b32) - (b36) 中的任何一个,如式 (b10) 或 (b32)) 结合。在具体的实施方式中,式 (IVa) 或 (IVb) 与修饰的鸟嘌呤(例如,式 (b15) - (b17) 和 (b37) - (b40) 中的任何一个) 结合。在具体的实施方式中,式 (IVa) 或 (IVb) 与修饰的腺嘌呤(例如,式 (b18) - (b20) 和 (b41) - (b43) 中的任何一个) 结合。

[0206] 在一些实施方式中,可被掺入到多核苷酸中的构建块分子具有式 (IVc) - (IVk) :



[0208] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中B如本文所述(例如,(b1)-(b43)中的任何一个)。

[0209] 在具体实施方式中,式(IVc)-(IVk)中的一个与修饰的尿嘧啶(如,式(b1)-(b9)、(b21)-(b23)和(b28)-(b31)中的任何一个,如式(b1)、(b8)、(b28)、(b29)或(b30))结合。

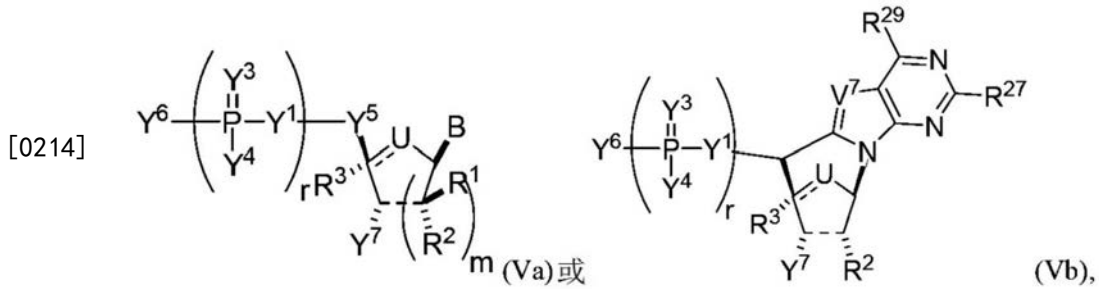
[0210] 在具体实施方式中,式(IVc)-(IVk)中的一个与修饰的胞嘧啶(例如,式(b10)-(b14)、(b24)、(b25)和(b32)-(b36)中的任何一个,如式(b10)或(b32))结合。

[0211] 在具体实施方式中,式(IVc)-(IVk)中的一个与修饰的鸟嘌呤(例如,式(b15)-(b17)和(b37)-(b40)中的任何一个)结合。

[0212] 在具体实施方式中,式(IVc)-(IVk)中的一个与修饰的腺嘌呤(例如,式(b18)-

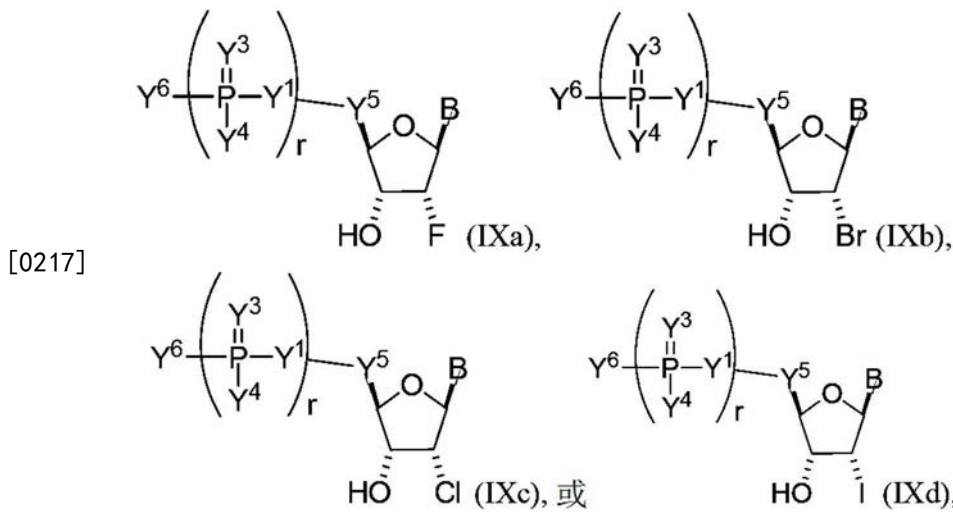
(b20) 和 (b41) - (b43) 中的任何一个) 结合。

[0213] 在其它实施方式中,可被掺入到多核苷酸的构建块分子具有式 (Va) 或 (Vb) :



[0215] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中B如本文所述(例如,(b1) - (b43) 中的任何一个)。

[0216] 在其它实施方式中,可被引入到多核苷酸中的构建块分子具有式 (IXa) - (IXd) :



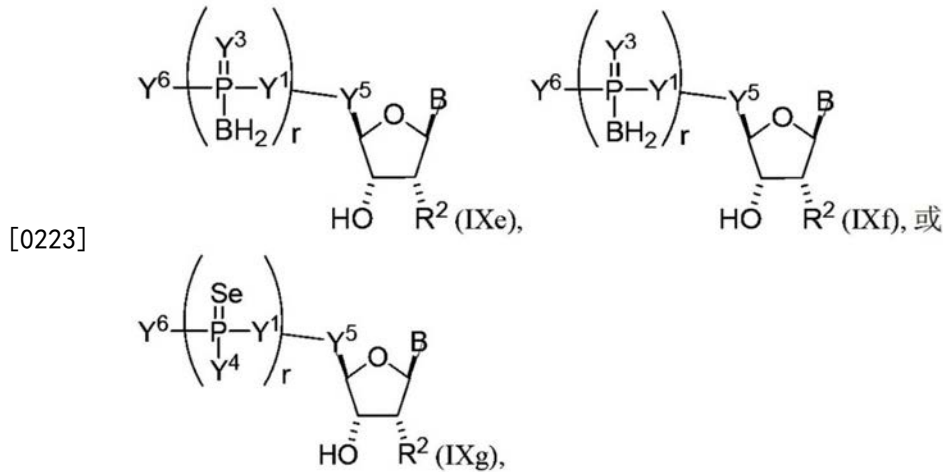
[0218] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中B如本文所述(例如,(b1) - (b43) 中的任何一个)。

[0219] 在具体实施方式中,式 (IXa) - (IXd) 中的一个与修饰的尿嘧啶(例如,式 (b1) - (b9)、(b21) - (b23) 和 (b28) - (b31) 中的任何一个,如式 (b1)、(b8)、(b28)、(b29) 或 (b30)) 结合。在具体实施方式中,式 (IXa) - (IXd) 中的一个与修饰的胞嘧啶(例如,式 (b10) - (b14)、(b24)、(b25) 和 (b32) - (b36) 中的任何一个,如式 (b10) 或 (b32)) 结合。

[0220] 在具体实施方式中,式 (IXa) - (IXd) 中的一个与修饰的鸟嘌呤(例如,式 (b15) - (b17) 和 (b37) - (b40) 中的任何一个) 结合。

[0221] 在具体实施方式中,式 (IXa) - (IXd) 中的一个与修饰的腺嘌呤(例如,式 (b18) - (b20) 和 (b41) - (b43) 中的任何一个) 结合。

[0222] 在其它实施方式中,可被掺入到多核苷酸中的构建块分子具有式 (IXe) - (IXg) :



[0224] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中B如本文所述(例如,(b1)-(b43)中的任何一个)。

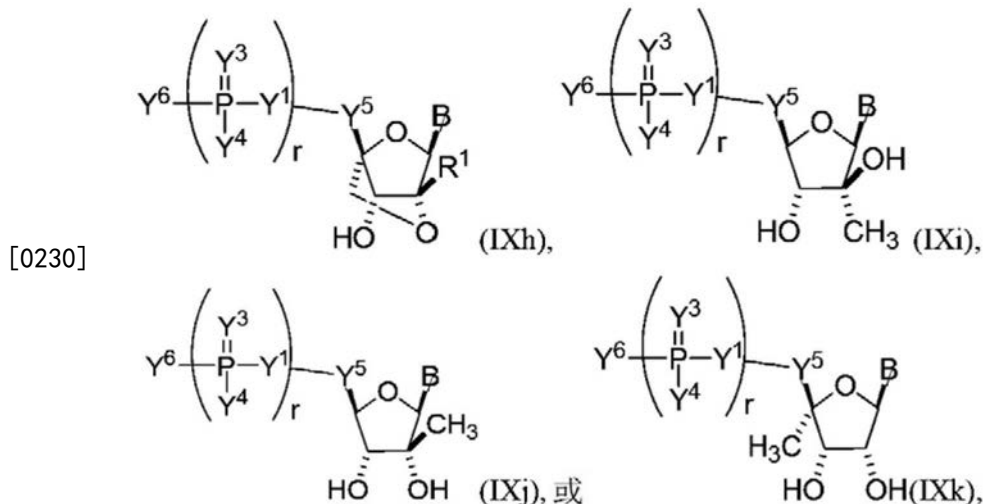
[0225] 在具体实施方式中,式(IXe)-(IXg)中的一个与修饰的尿嘧啶(例如,式(b1)-(b9)、(b21)-(b23)和(b28)-(b31)中的任何一个,如式(b1)、(b8)、(b28)、(b29)或(b30))结合。

[0226] 在具体实施方式中,式(IXe)-(IXg)中的一个与修饰的胞嘧啶(例如,式(b10)-(b14)、(b24)、(b25)和(b32)-(b36)中的任何一个,如式(b10)或(b32))结合。

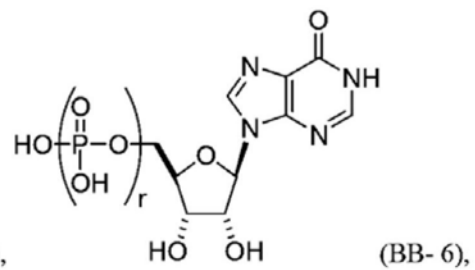
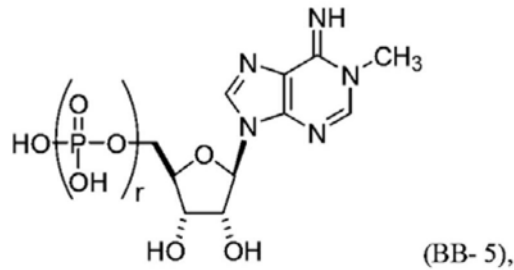
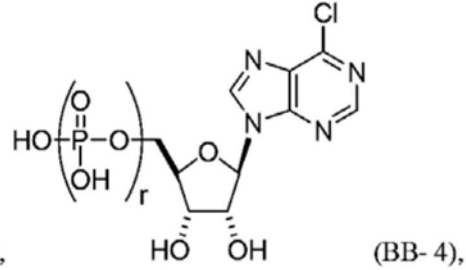
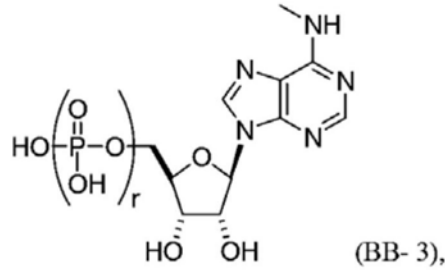
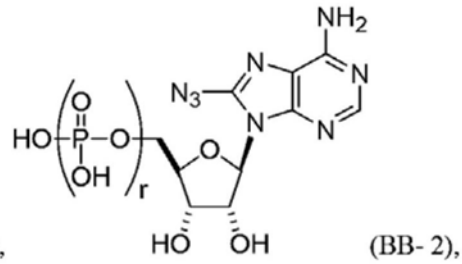
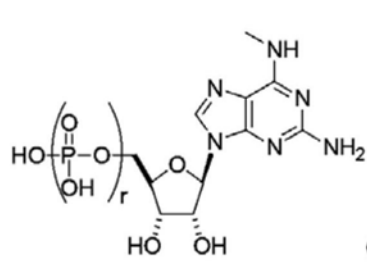
[0227] 在具体实施方式中,式(IXe)-(IXg)中的一个与修饰的鸟嘌呤(例如,式(b15)-(b17)和(b37)-(b40)中的任何一个)结合。

[0228] 在具体实施方式中,式(IXe)-(IXg)中的一个与修饰的腺嘌呤(例如,式(b18)-(b20)和(b41)-(b43)中的任何一个)结合。

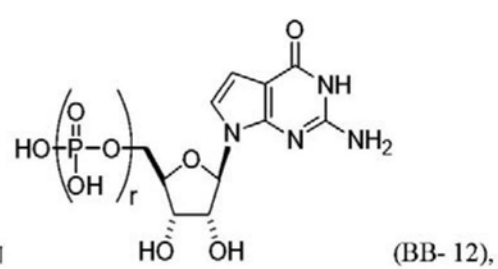
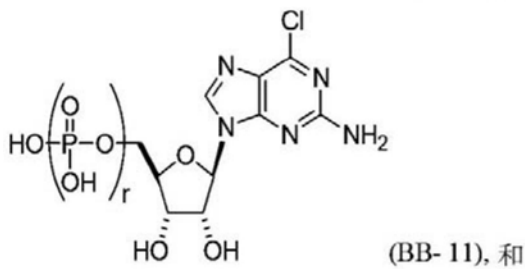
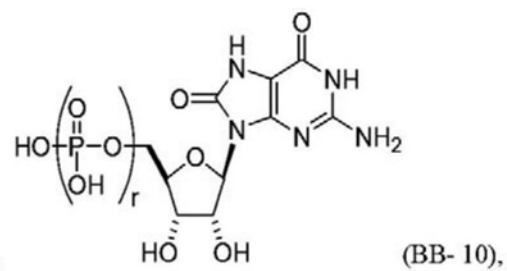
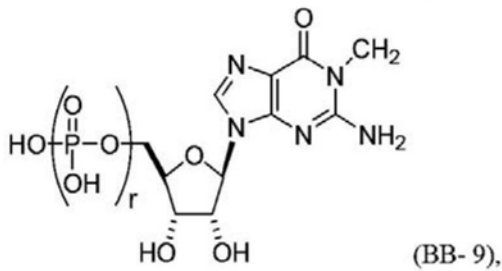
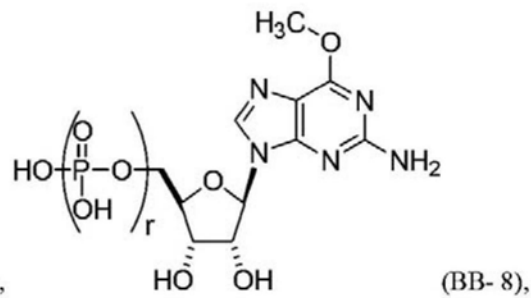
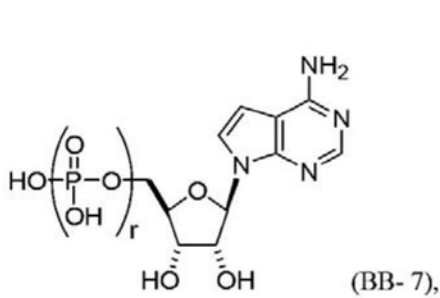
[0229] 在其它实施方式中,可被掺入到多核苷酸中的构建块分子具有式(IXh)-(IXk) :



[0231] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中B如本文所述(例如,(b1)-(b43)中的任何一个)。在具体实施方式中,式(IXh)-(IXk)中的一个与修饰的尿嘧啶(例如,式(b1)-(b9)、(b21)-(b23)和(b28)-(b31)中的任何一个,如式(b1)、(b8)、(b28)、(b29)或(b30))结合。在具体实施方式中,式(IXh)-(IXk)中的一个与修饰的胞嘧啶(例如,式(b10)-(b14)、(b24)、(b25)和(b32)-(b36)中的任何一个,如式(b10)或(b32))结合。

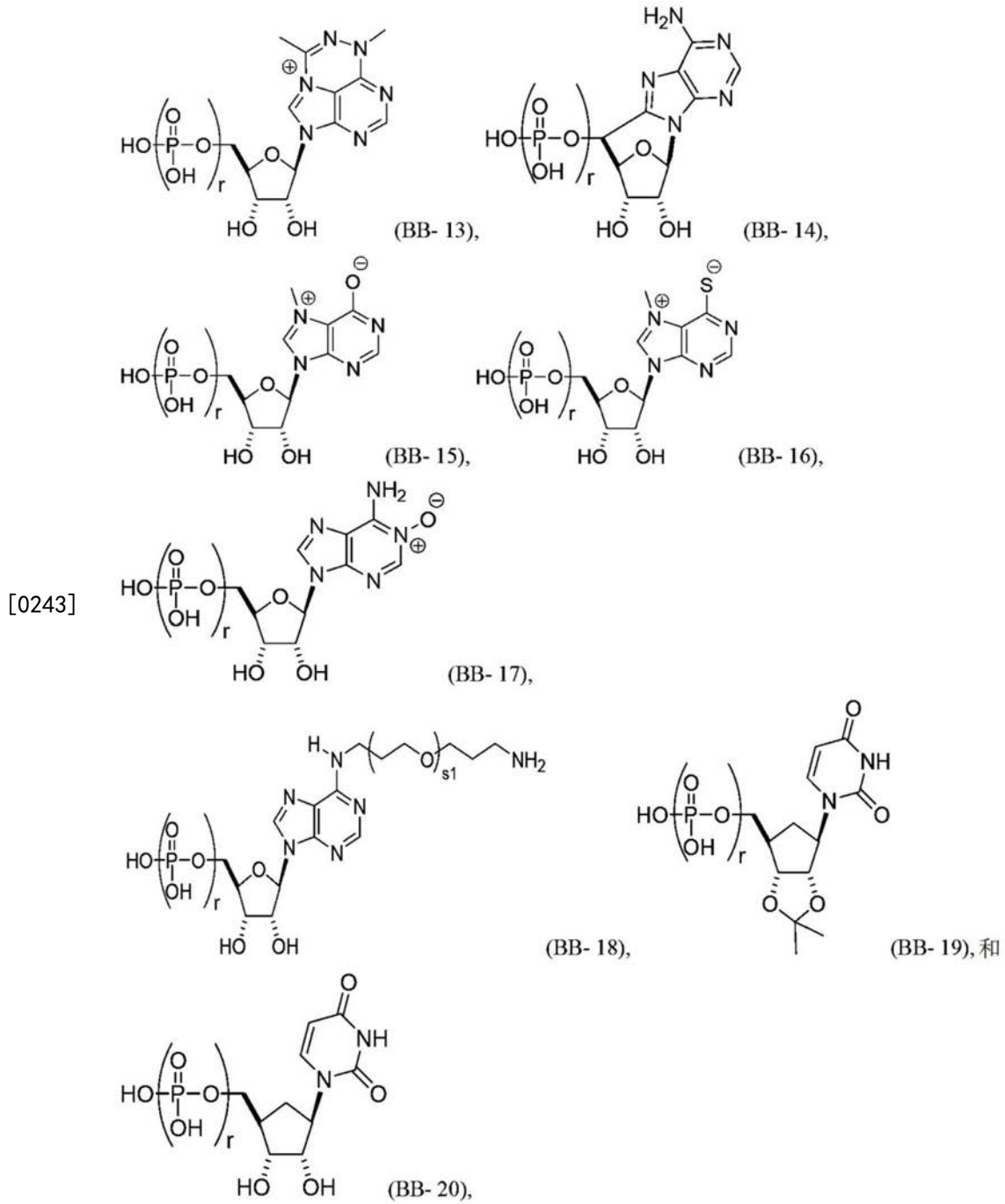


[0240]



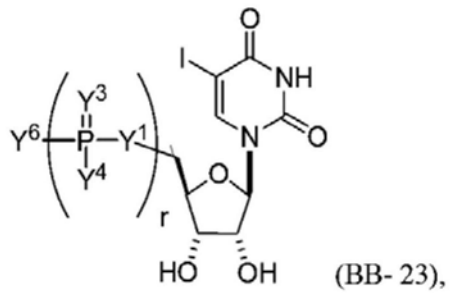
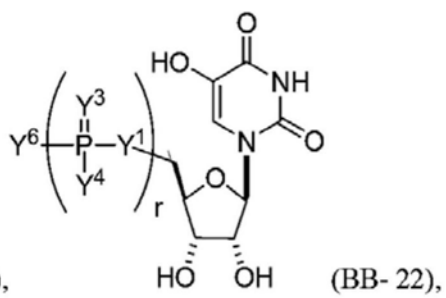
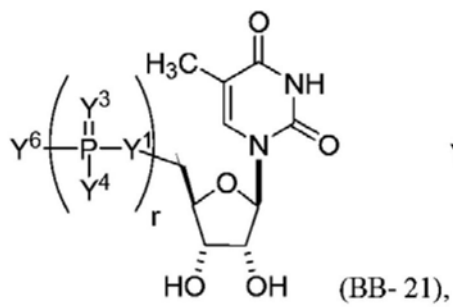
[0241] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中每个r独立地是0至5(例如,0至3、1至3或1至5)的整数。

[0242] 在一些实施方式中,可被掺入到多核苷酸中的构建块分子可以选自:

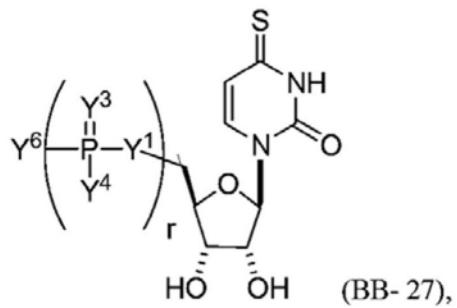
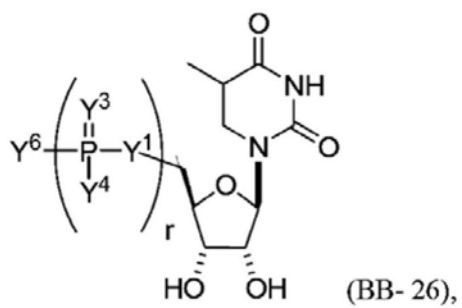
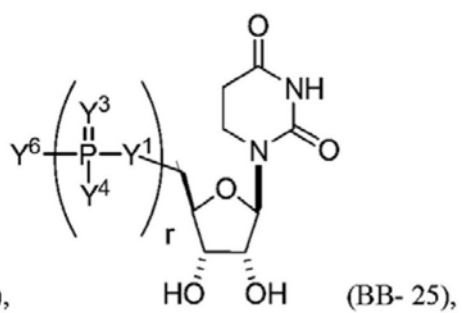
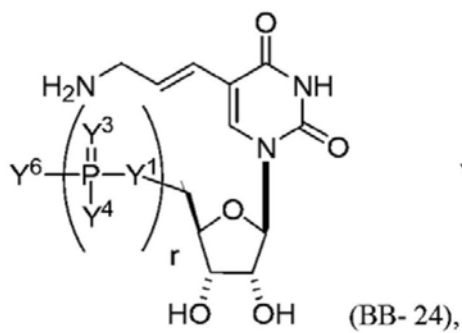


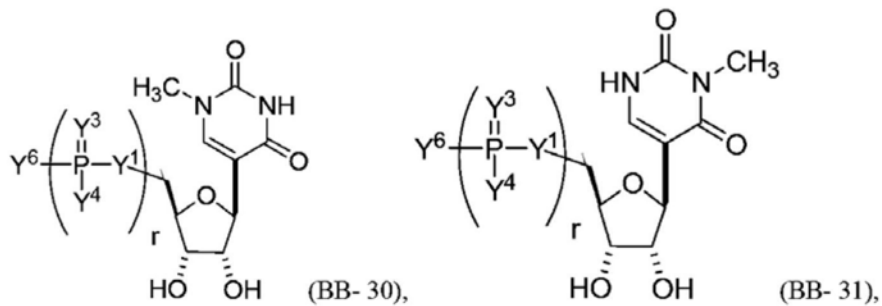
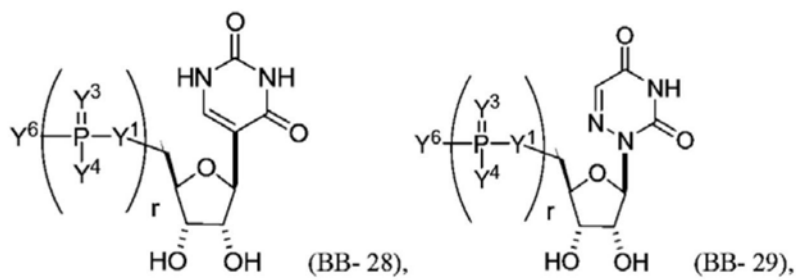
[0244] 或药学上可接受的盐或其立体异构体,其中每个 r 独立地是0至5(例如,0至3、1至3或1至5)的整数,且 s_1 如本文所述。

[0245] 在一些实施方式中,可被掺入到核酸(例如,RNA、mRNA和多核苷酸)中的构建块分子是修饰的尿苷(例如,选自:

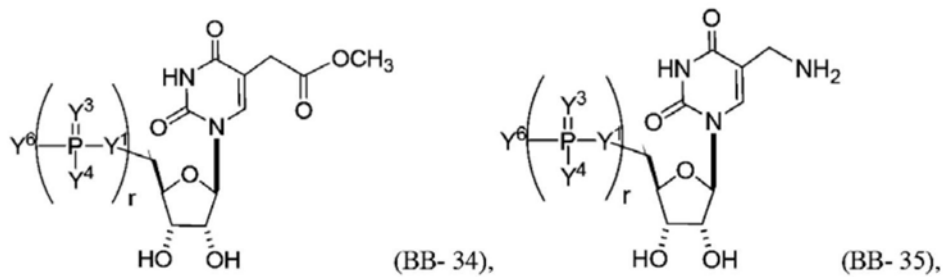
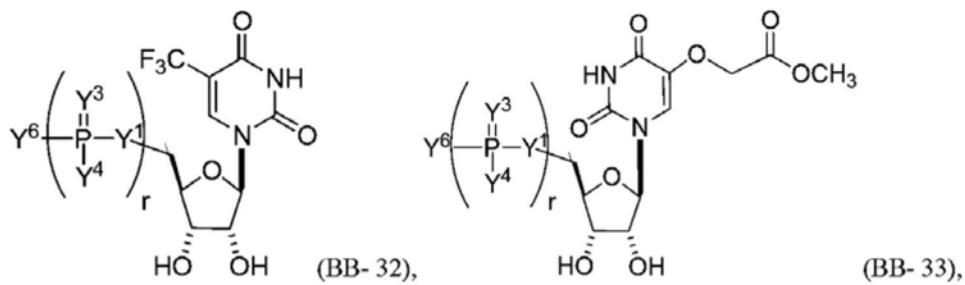


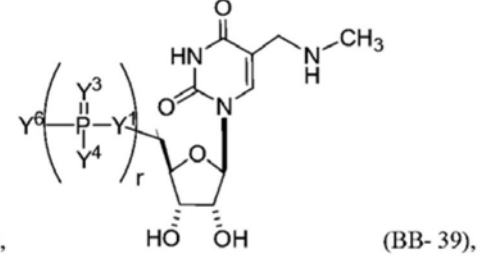
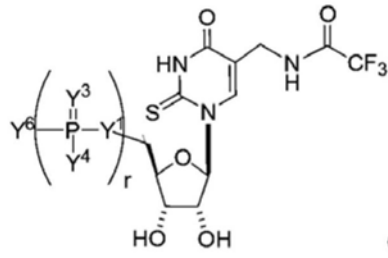
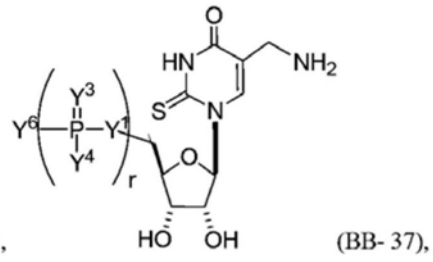
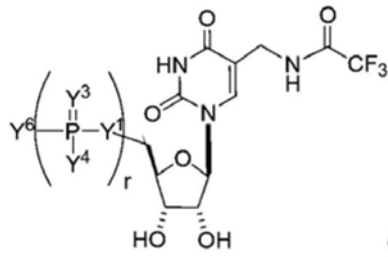
[0246]



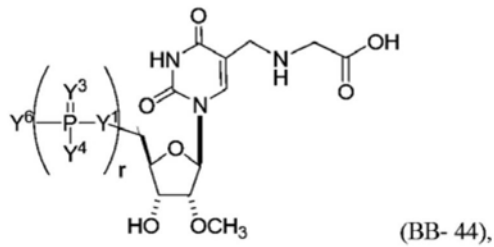
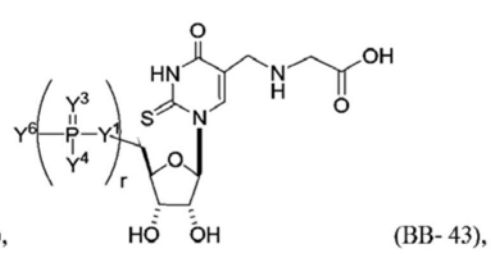
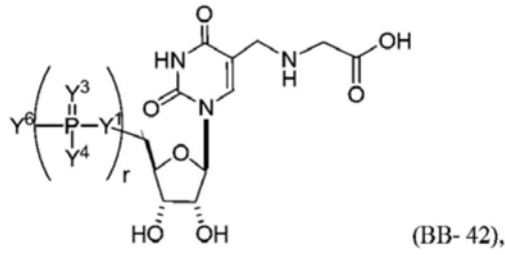
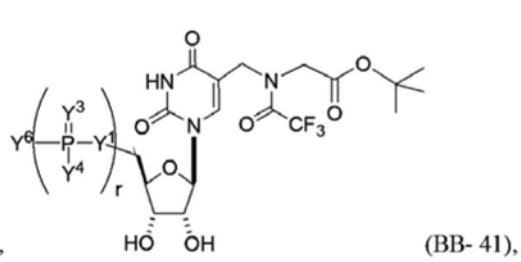
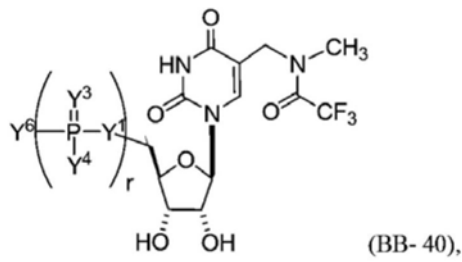


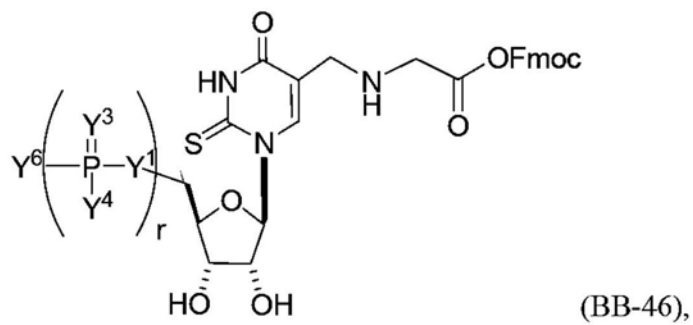
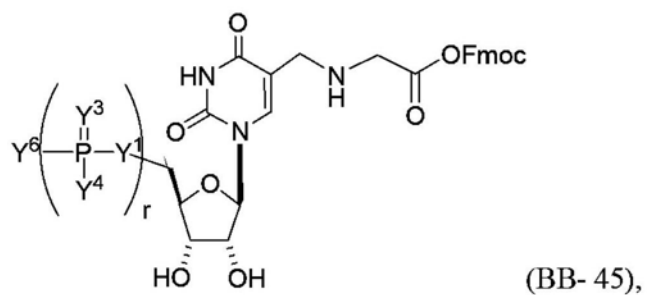
[0247]



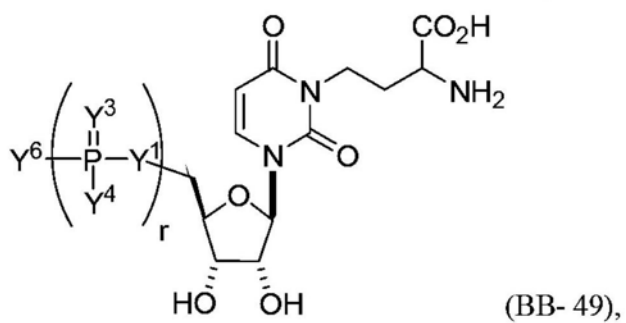
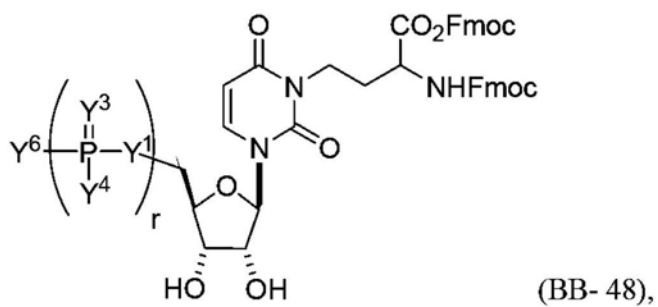
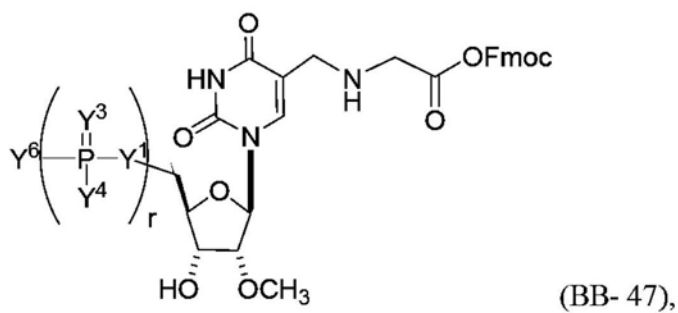


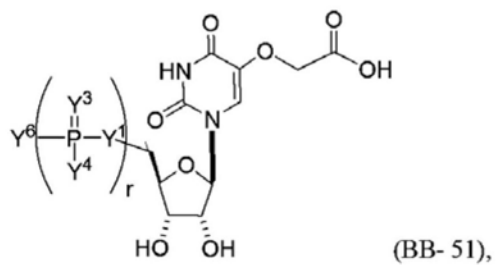
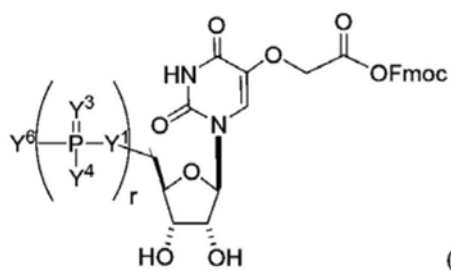
[0248]



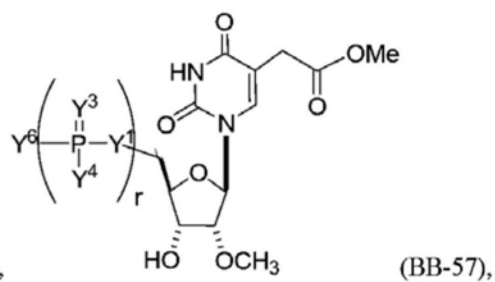
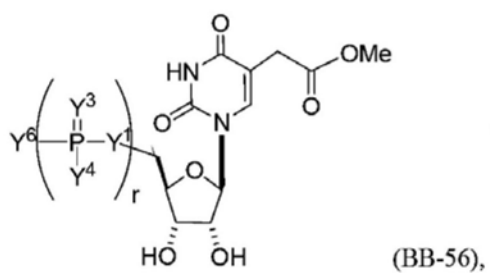
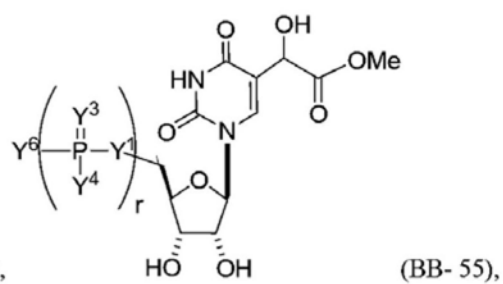
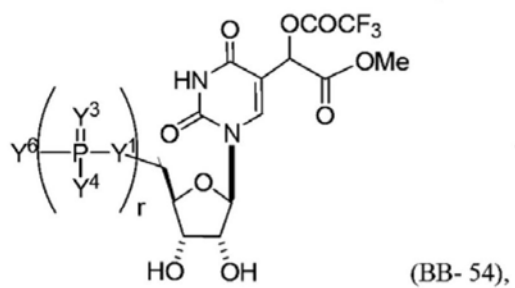
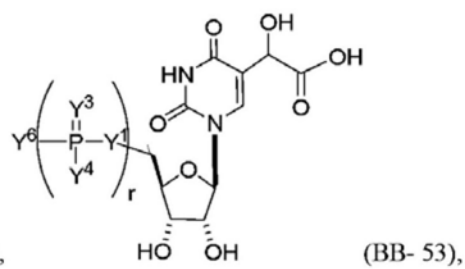
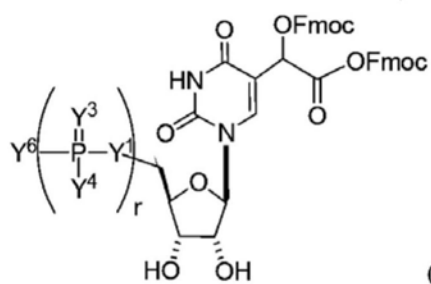


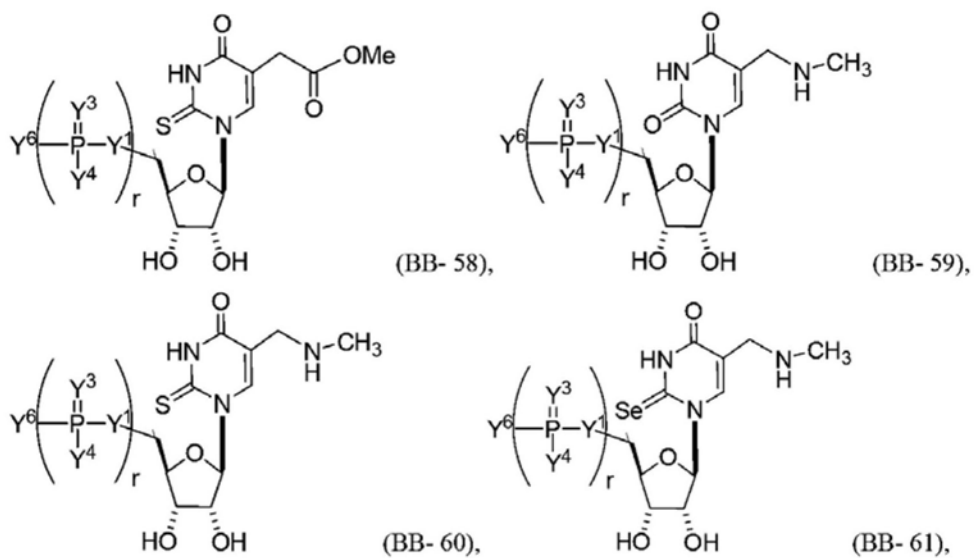
[0249]



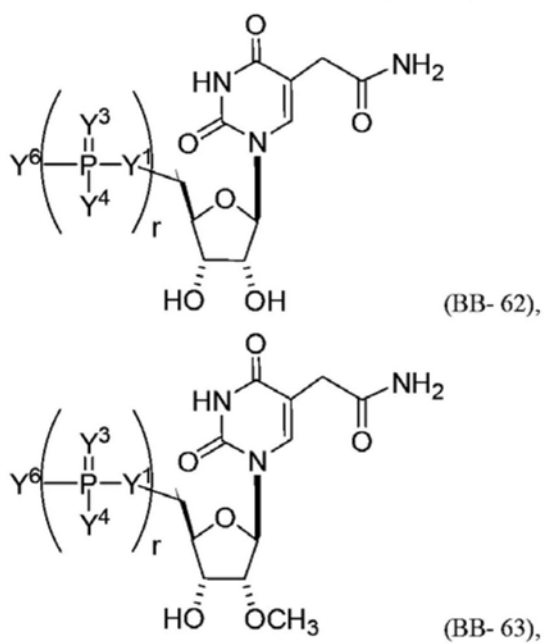


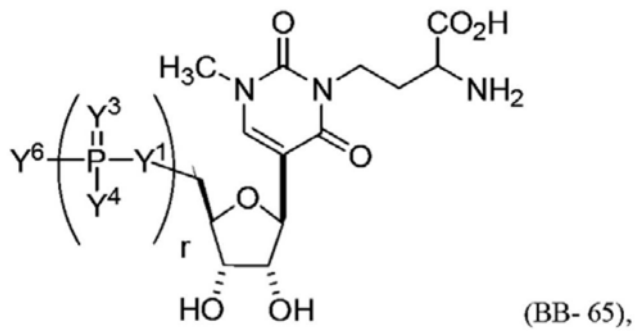
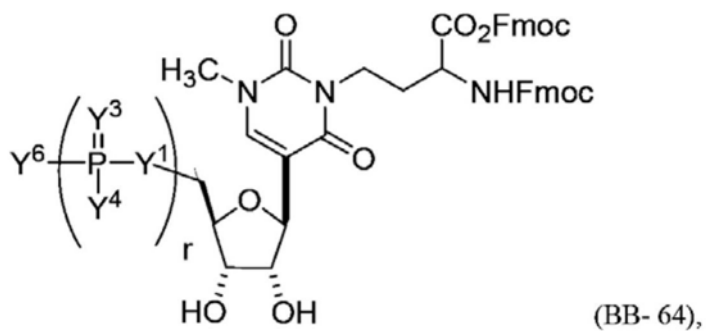
[0250]



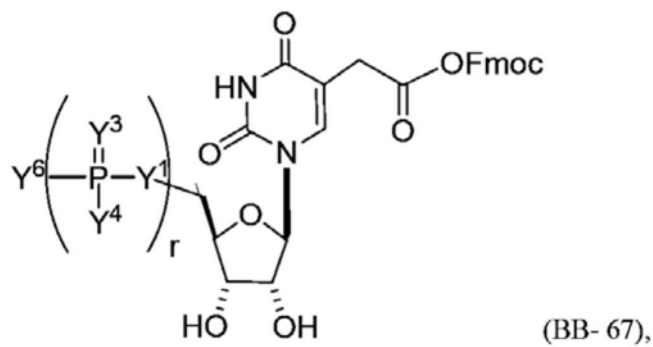
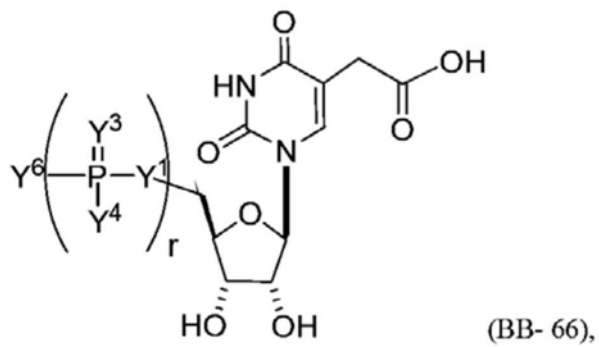


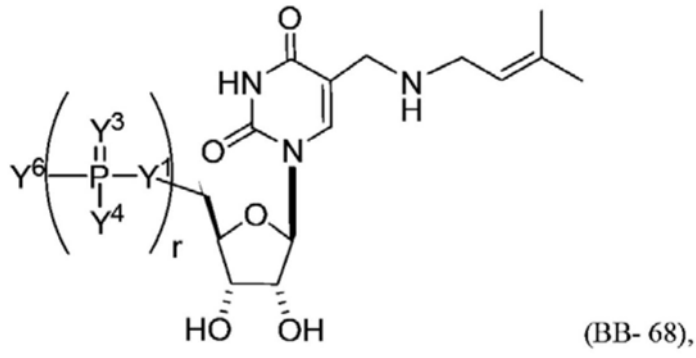
[0251]



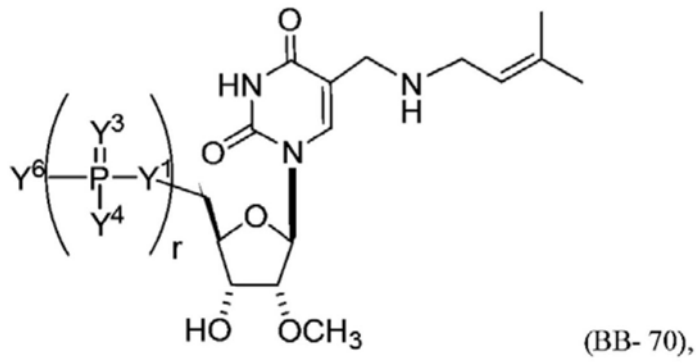
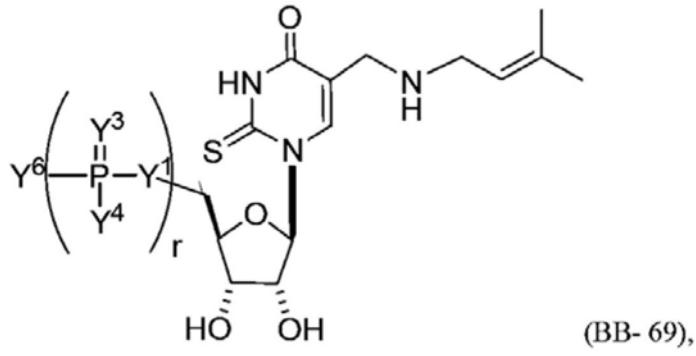


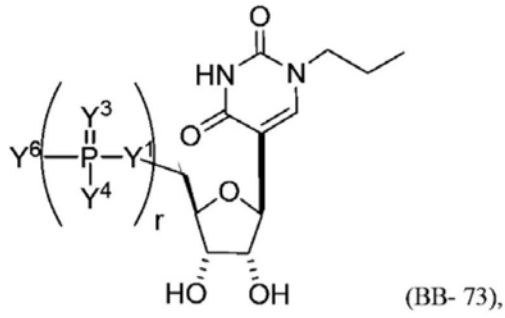
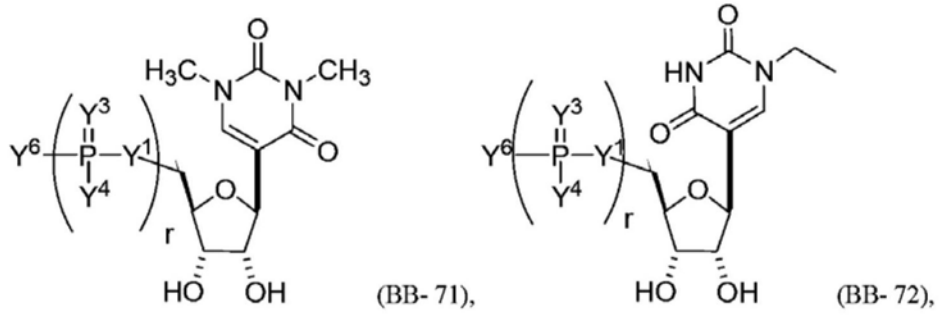
[0252]



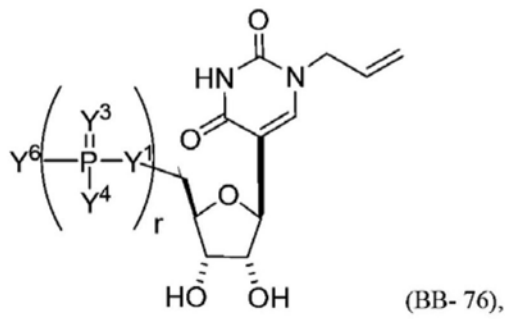
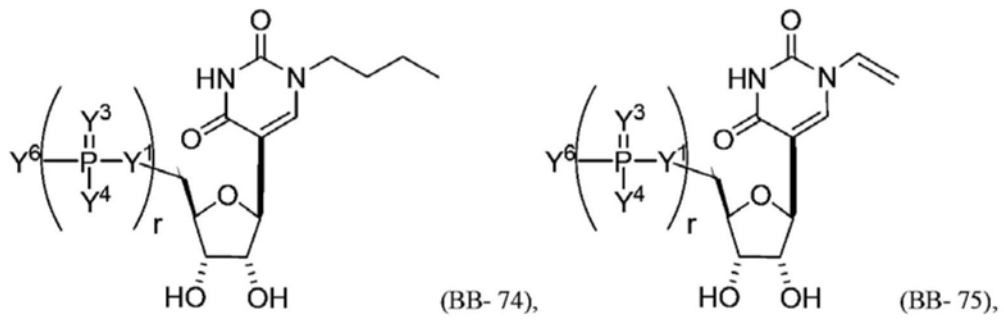


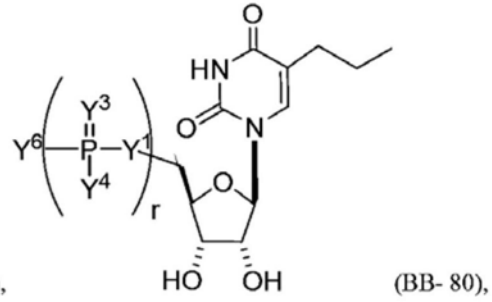
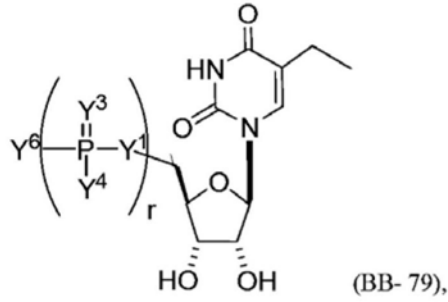
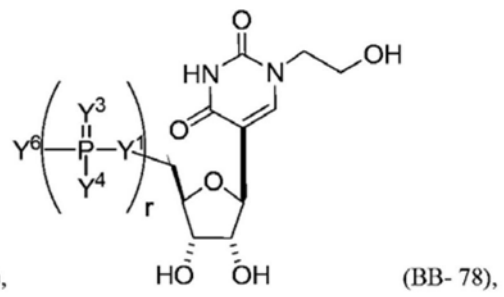
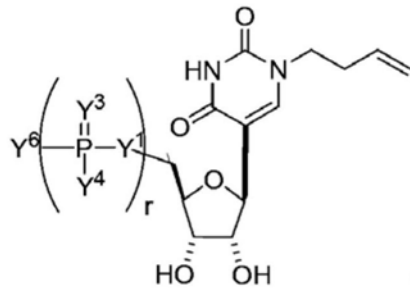
[0253]



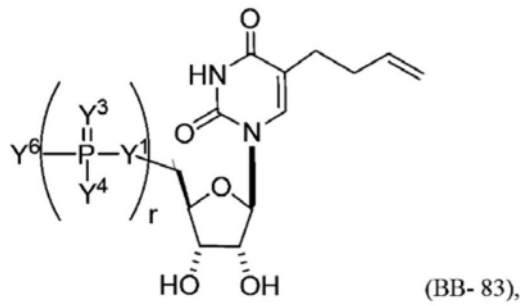
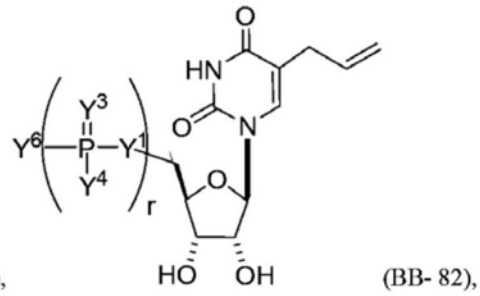
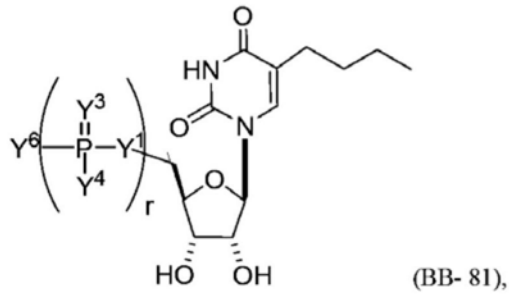


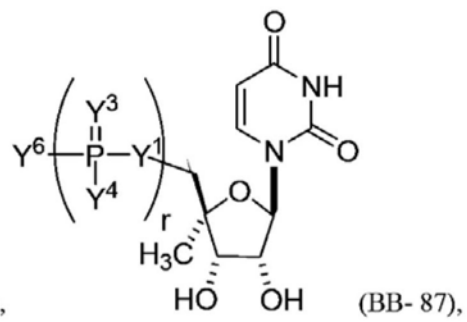
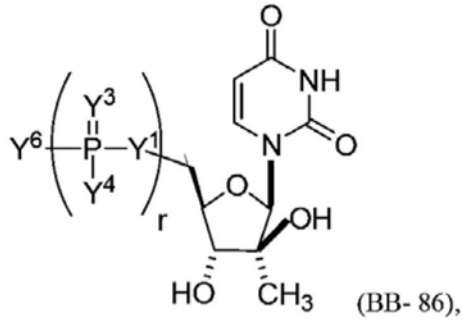
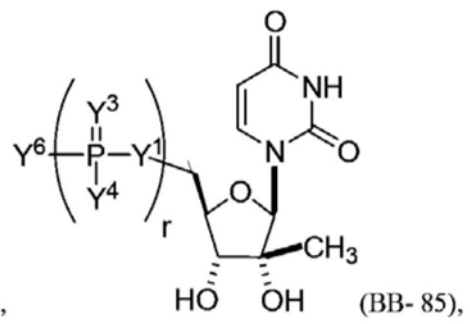
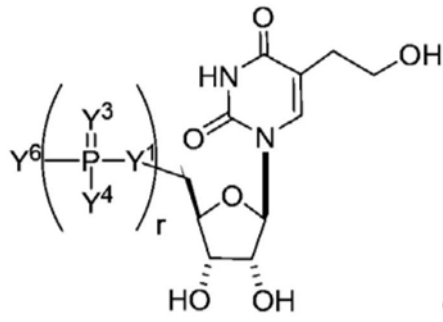
[0254]



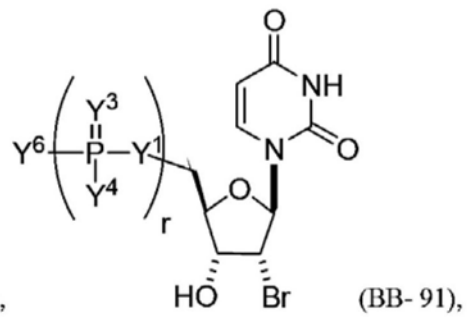
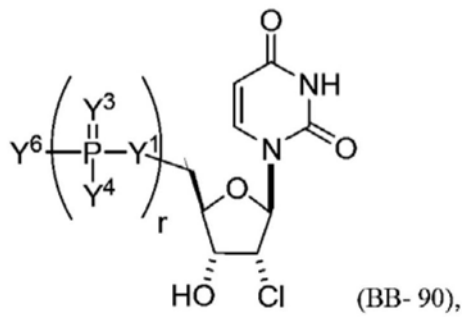
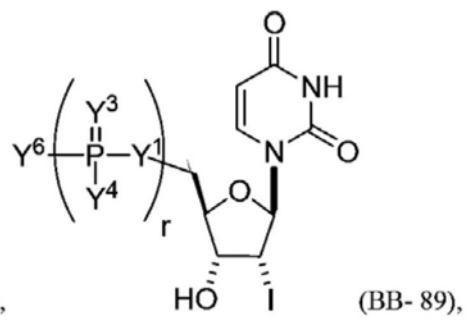
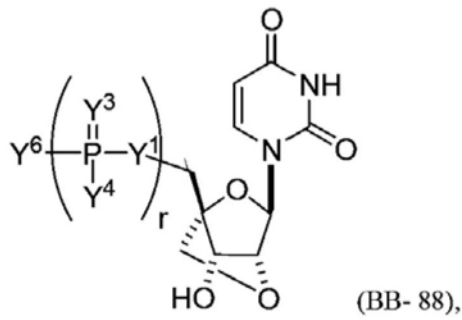


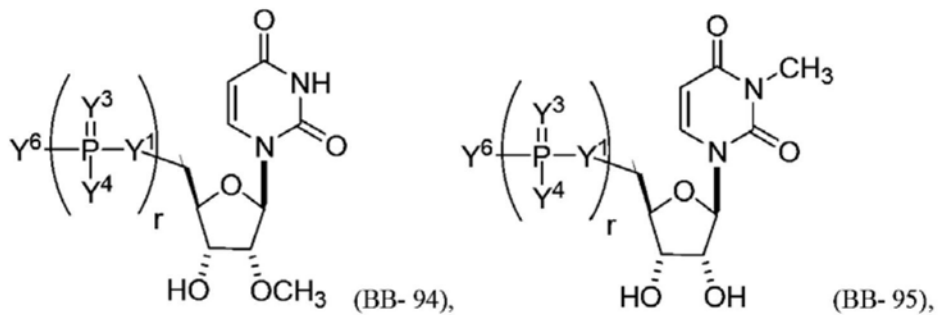
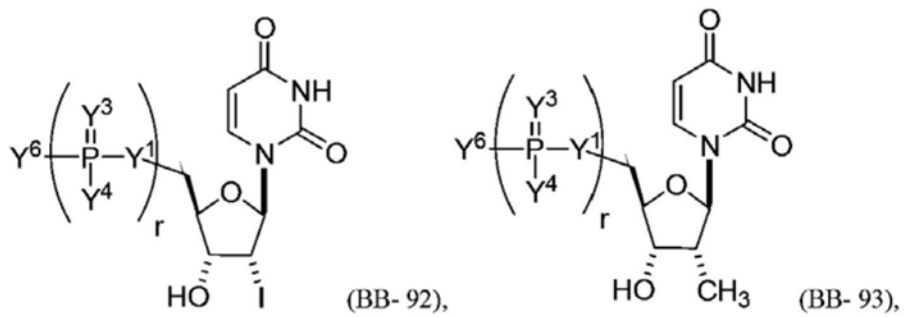
[0255]



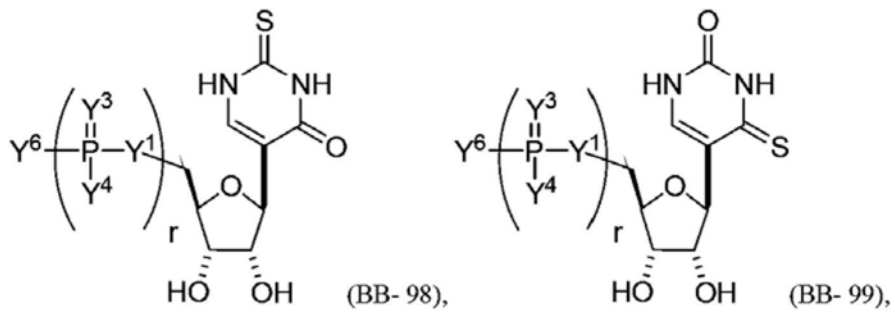
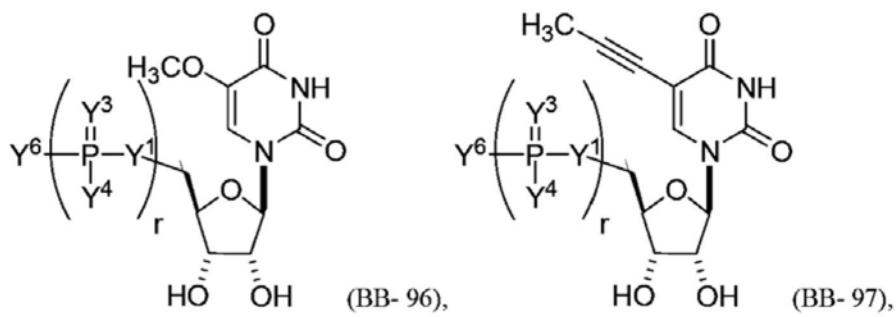


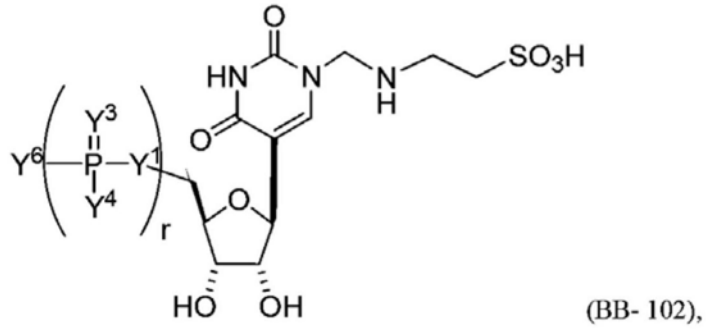
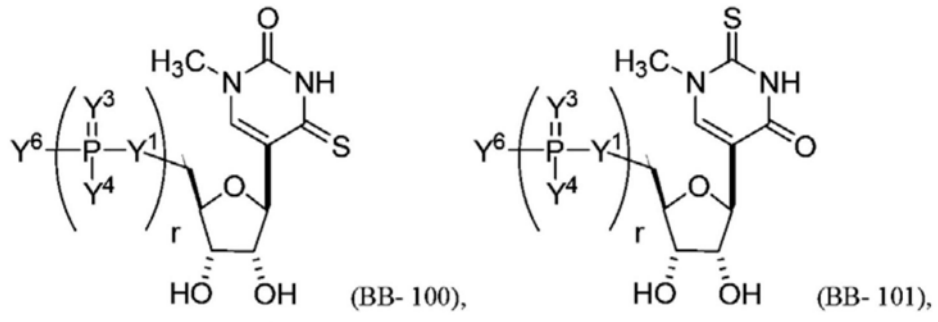
[0256]



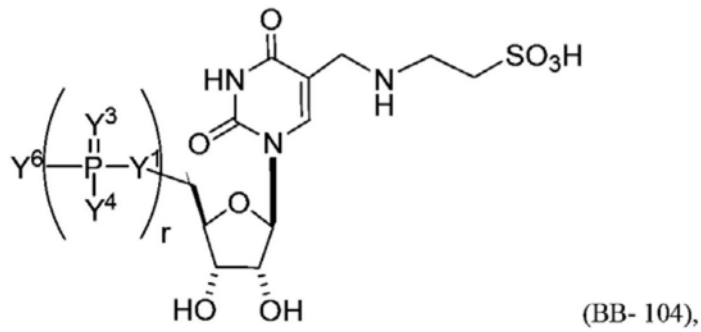
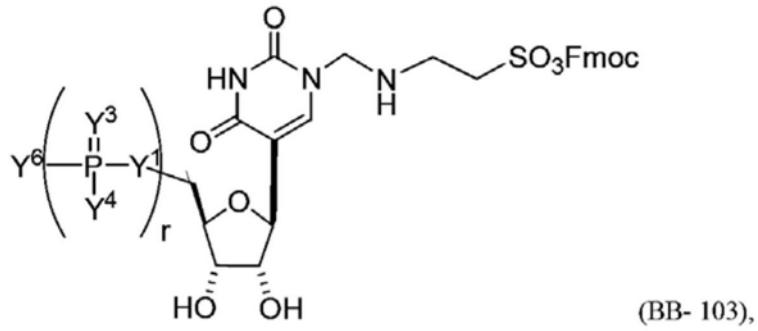


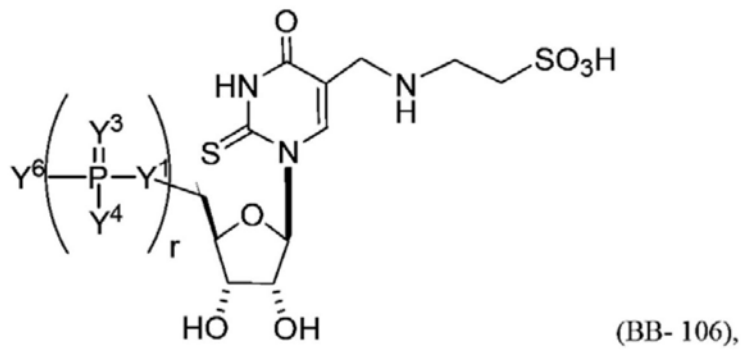
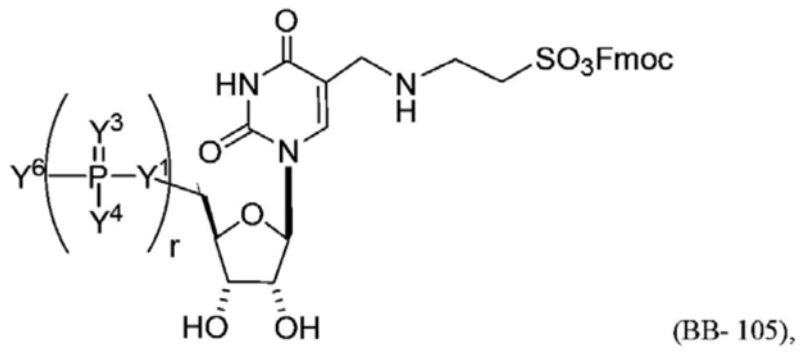
[0257]



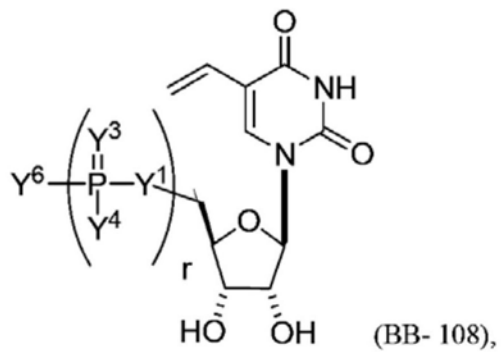
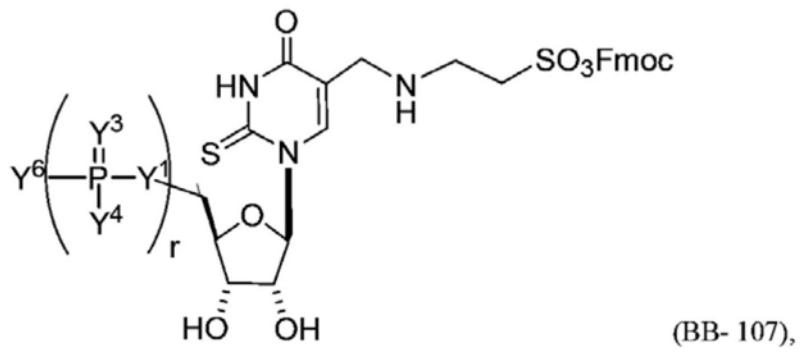


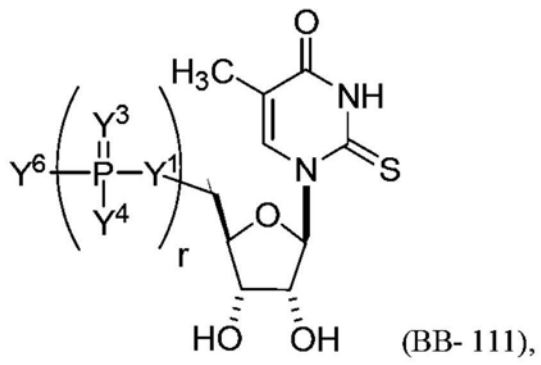
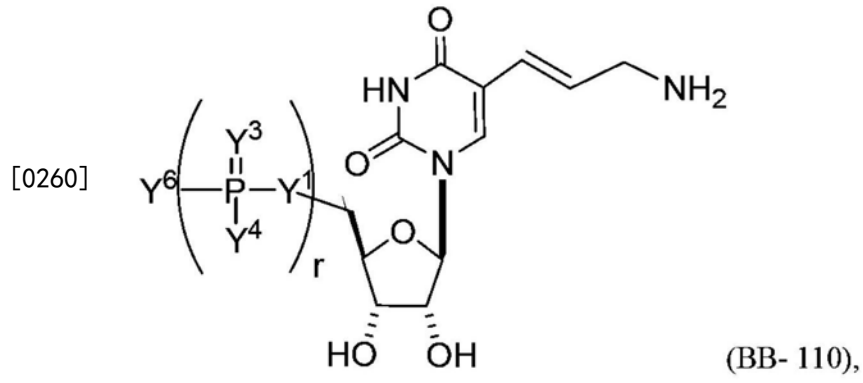
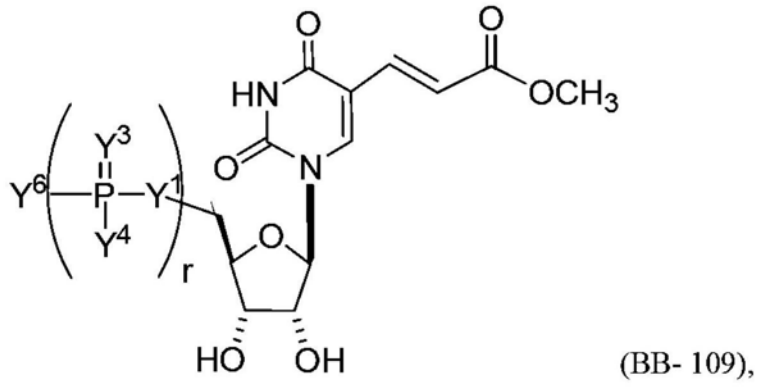
[0258]

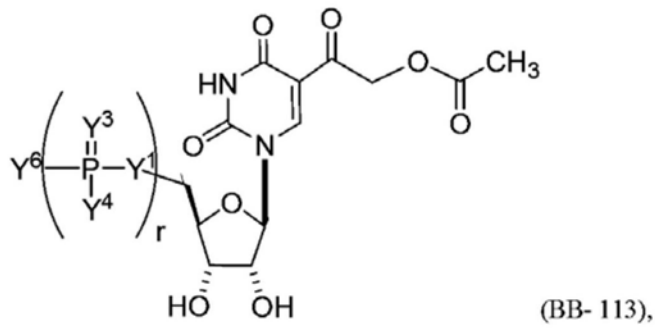
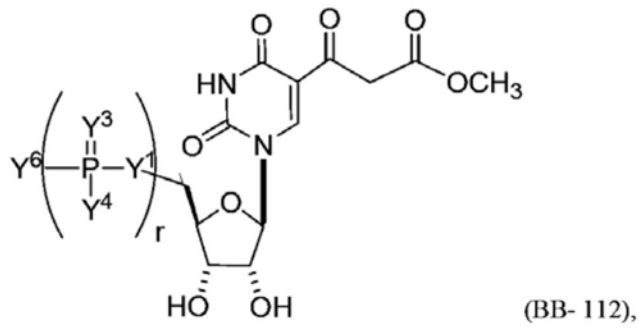




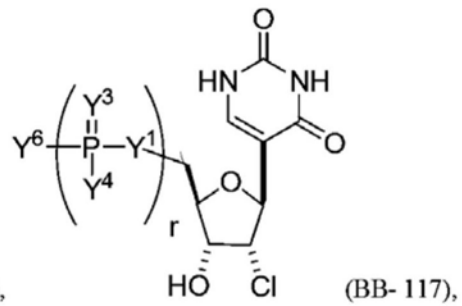
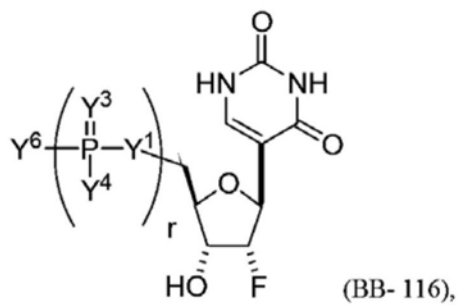
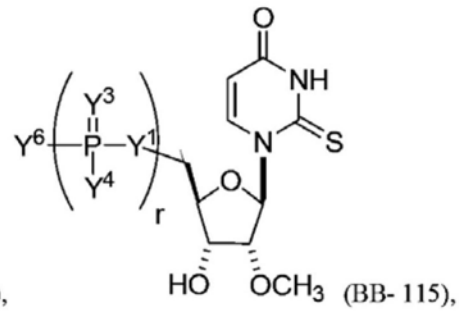
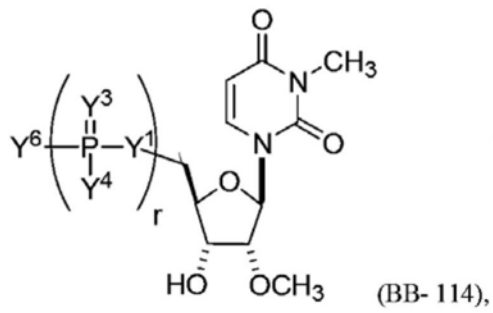
[0259]

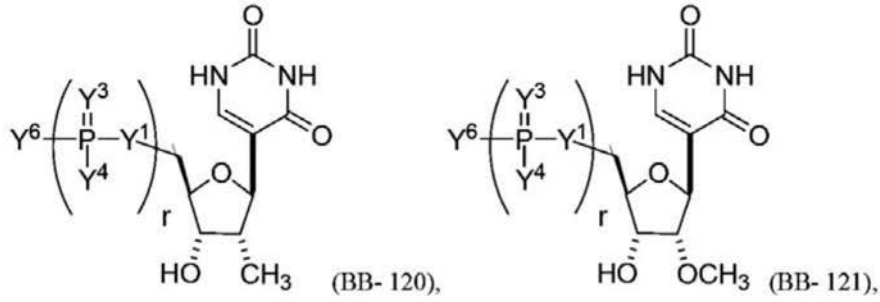
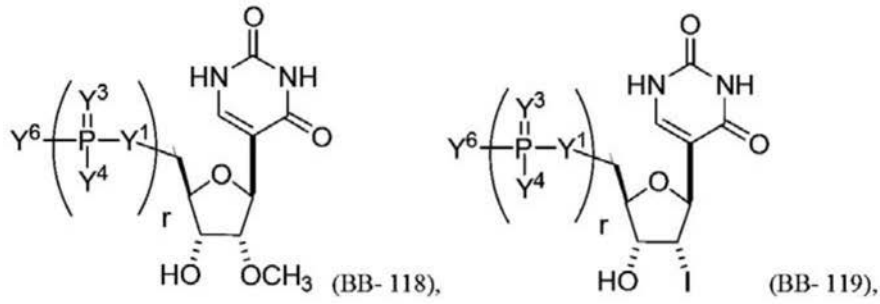




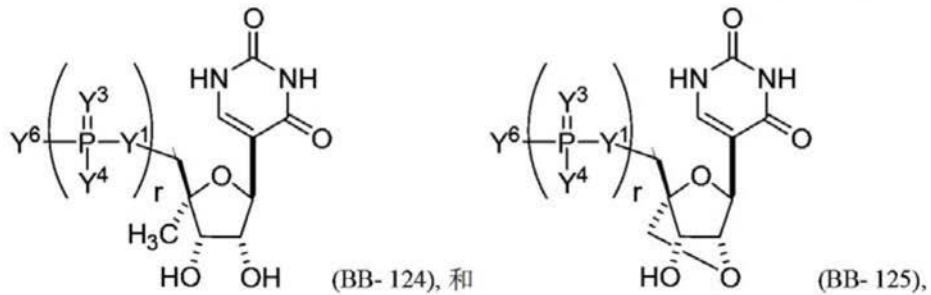
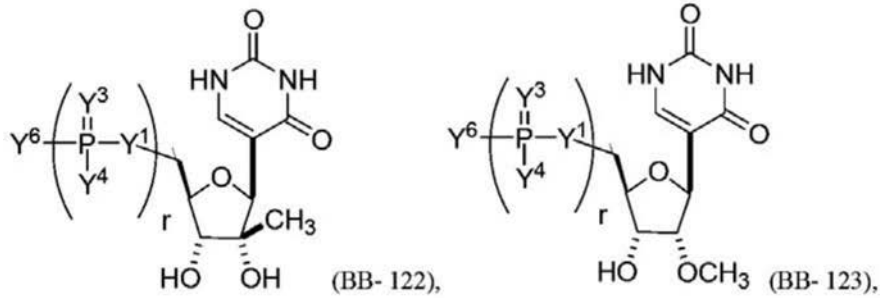


[0261]



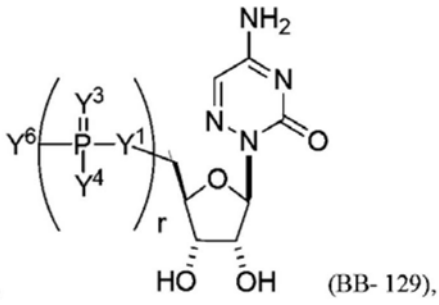
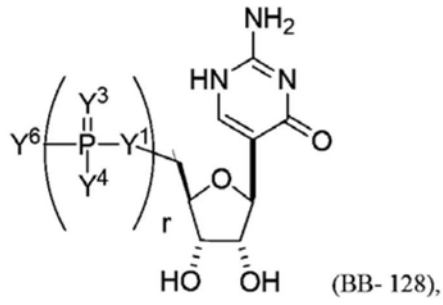
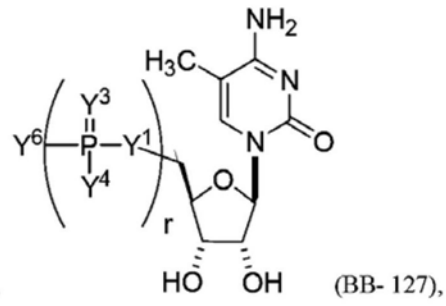
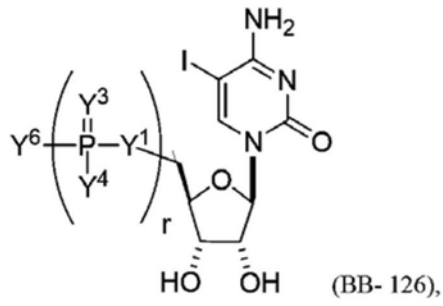


[0262]

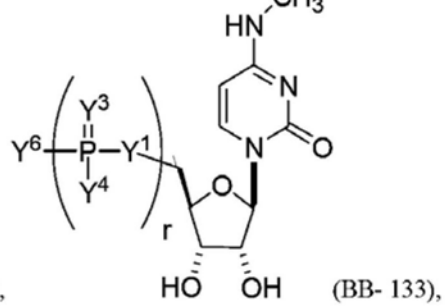
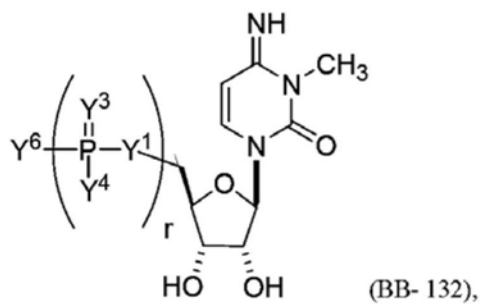
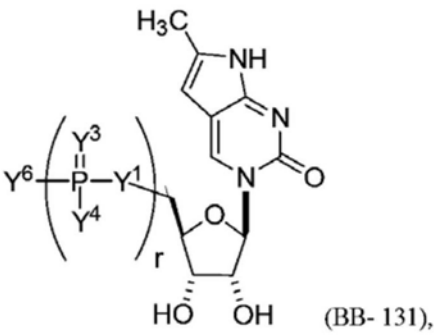
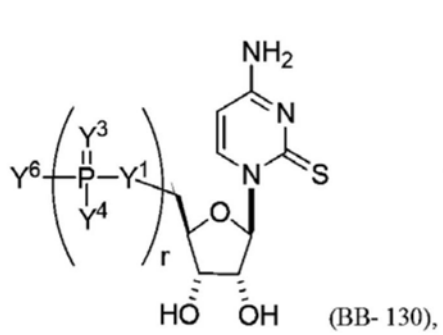


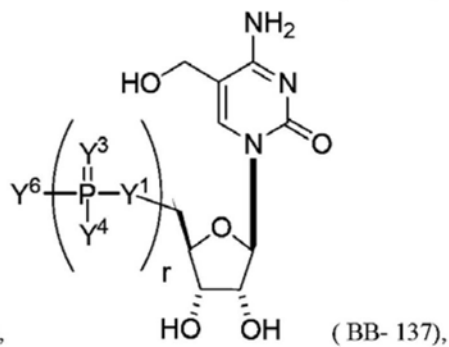
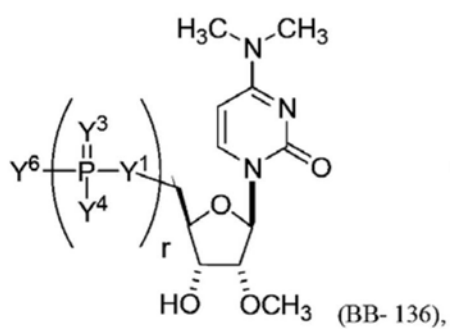
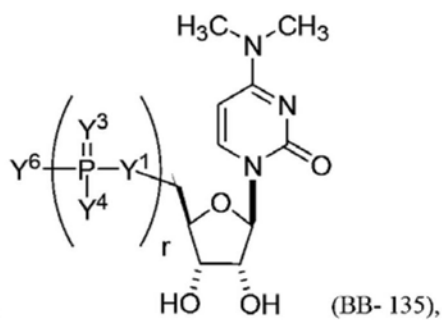
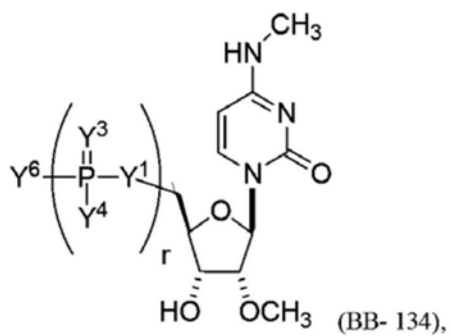
[0263] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中 Y^1 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^6 和 r 如本文所述(例如,每个 r 独立地为0至5(如0至3、1至3或1至5)的整数)。

[0264] 在一些实施方式中,可被掺入到多核苷酸中的构建块分子是修饰的胞嘧啶(例如,选自:

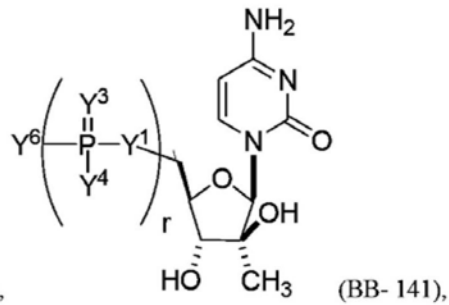
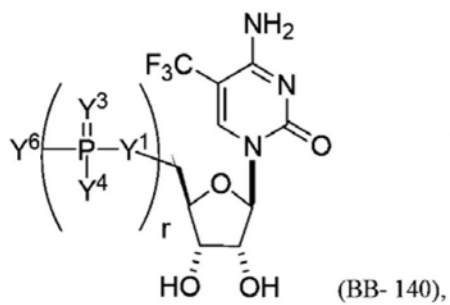
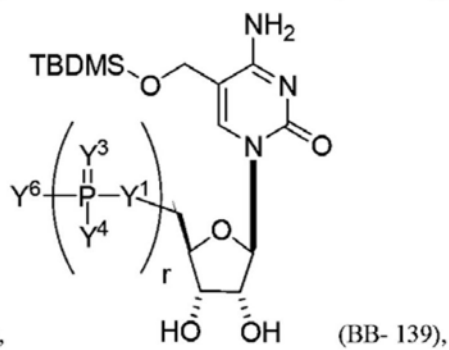
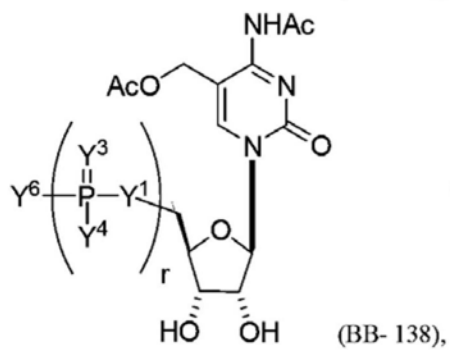


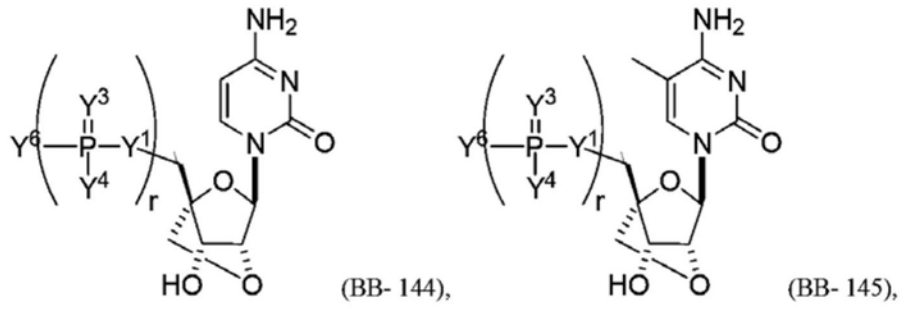
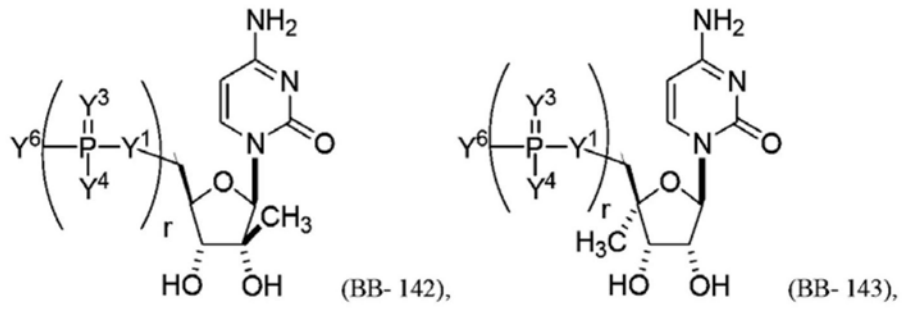
[0265]



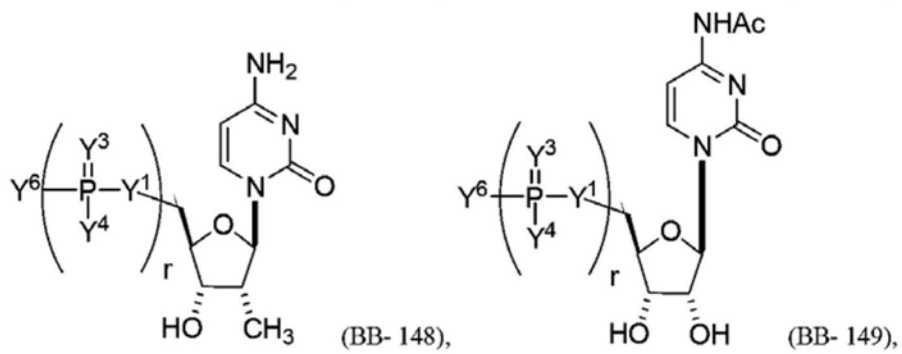
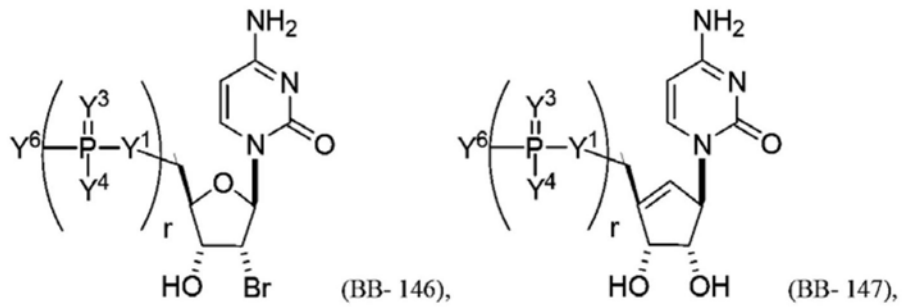


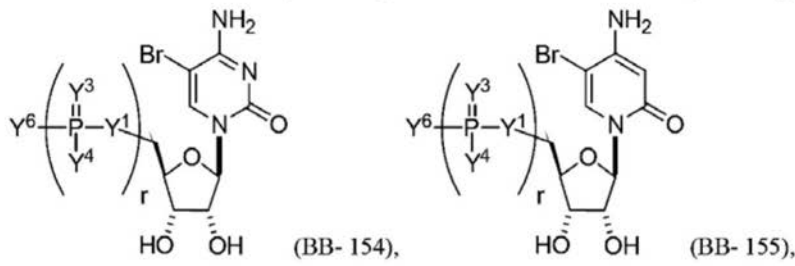
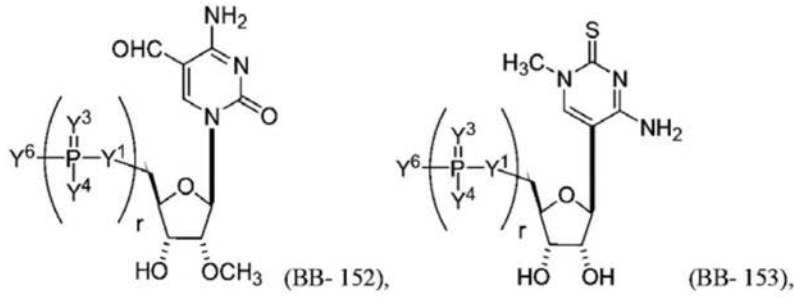
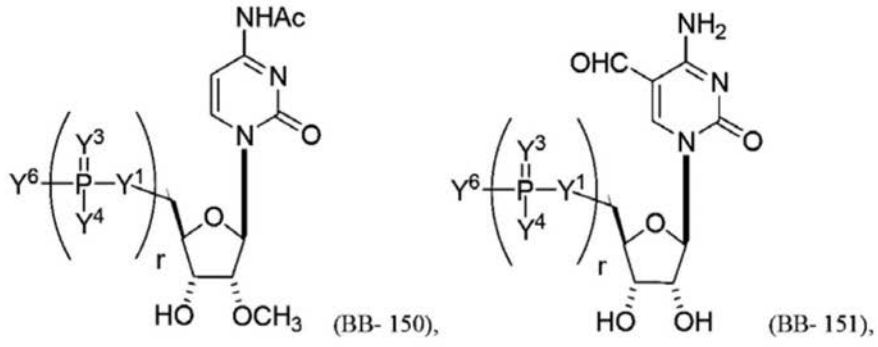
[0266]



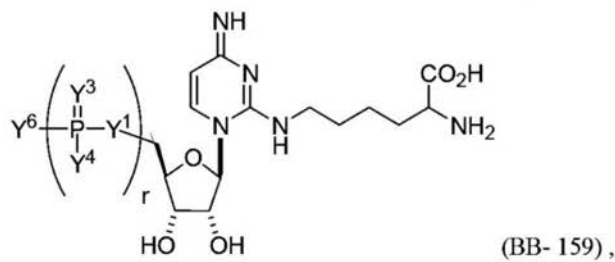
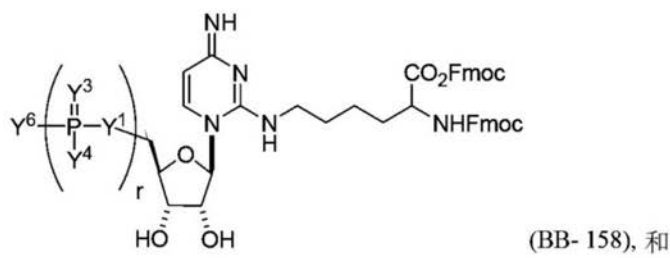
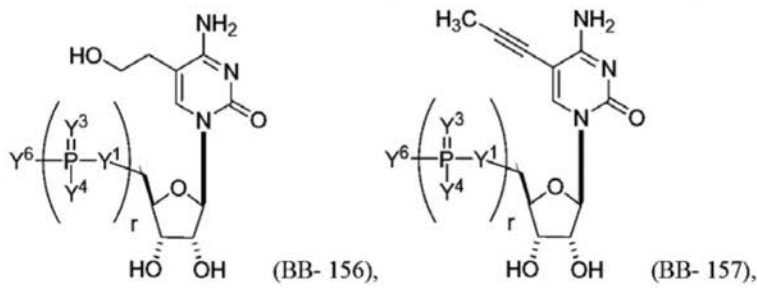


[0267]



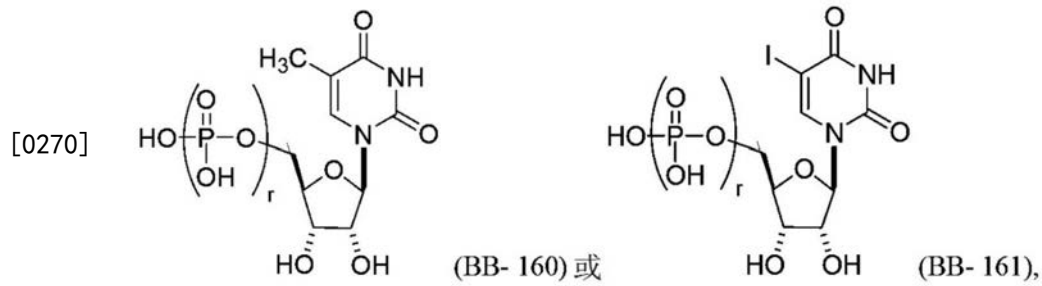


[0268]



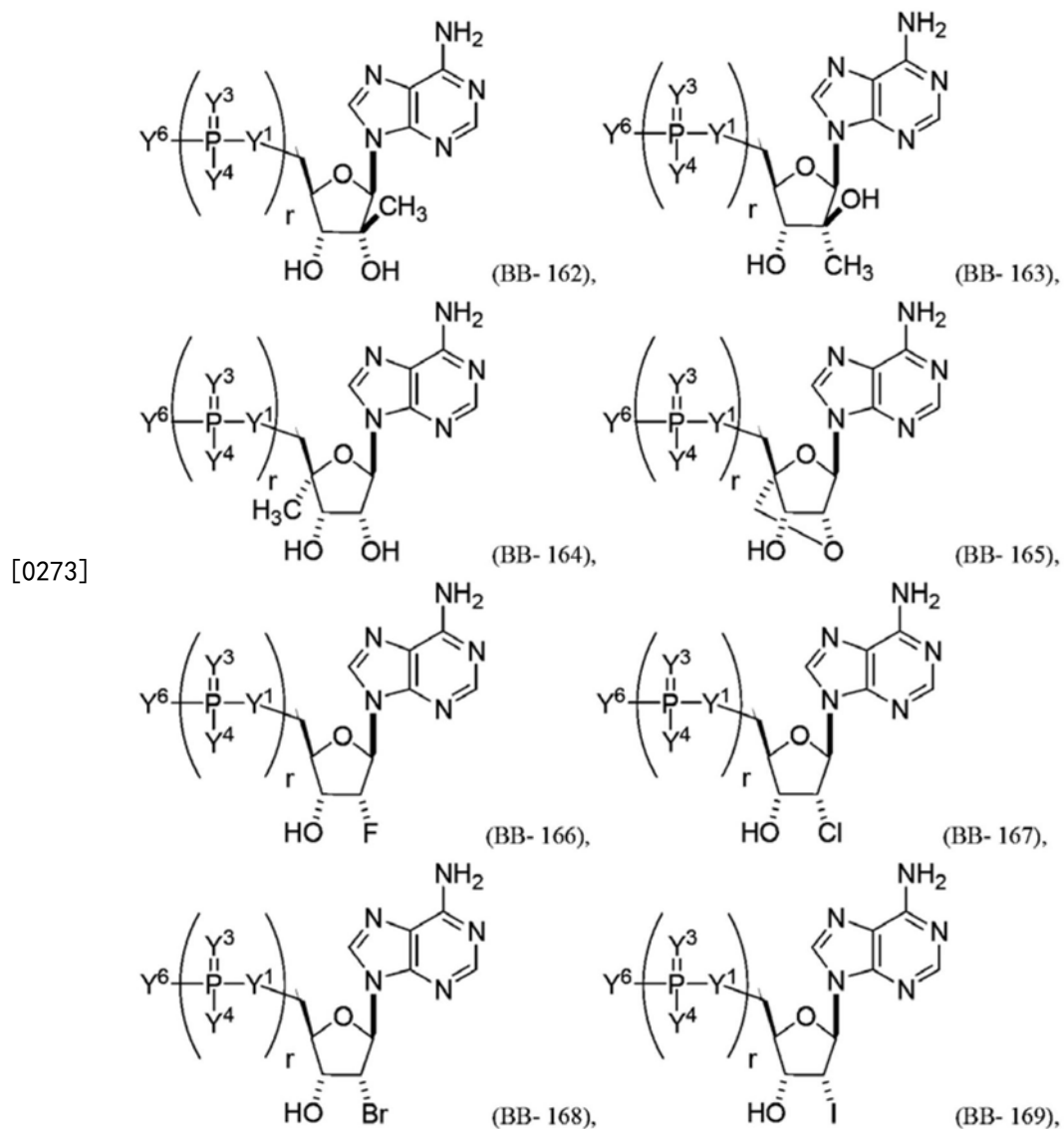
[0269] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中 Y^1 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^6 和 r 如本文所述(例如,每个 r 独立地为0至5(如0至3、1至3或1至5)的整数)。例如,可被掺入到多核苷酸中的构建块

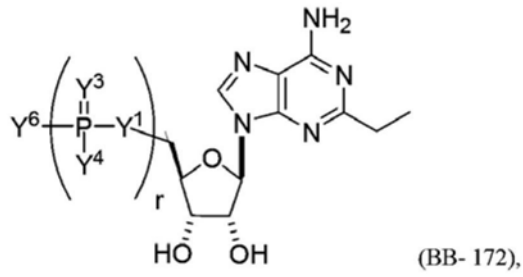
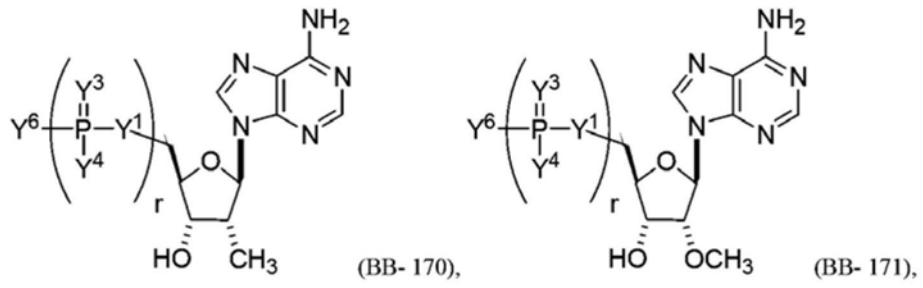
分子可以是：



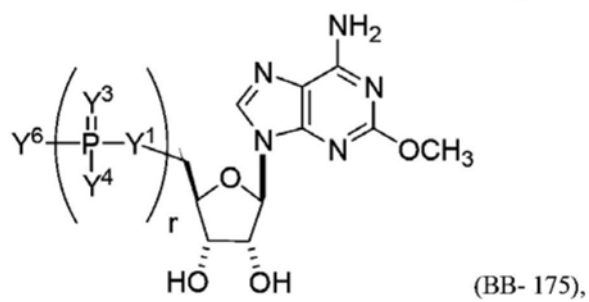
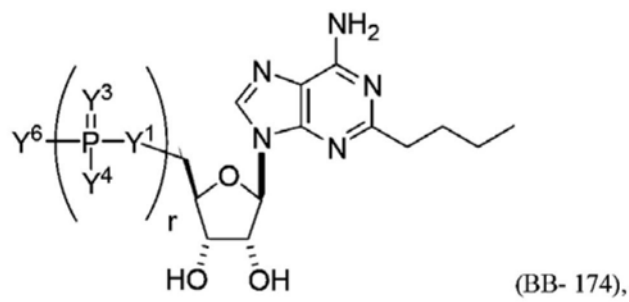
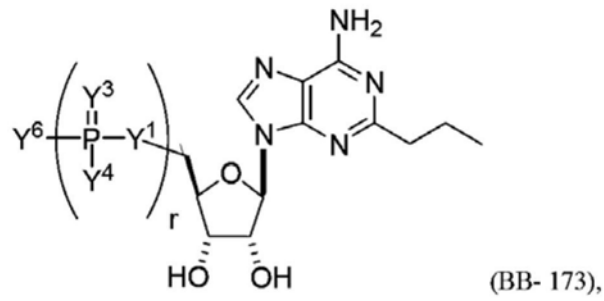
[0271] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中每个r独立地是0至5(例如,0至3、1至3或1至5)的整数。

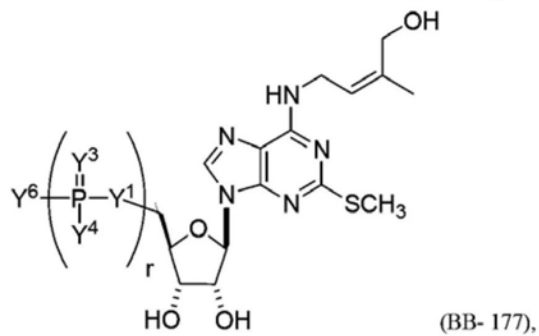
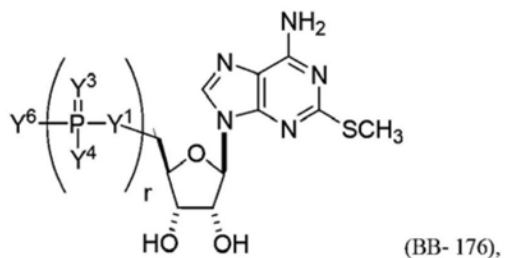
[0272] 在一些实施方式中,可被掺入到多核苷酸中的构建块分子修饰的腺苷(例如,选自:



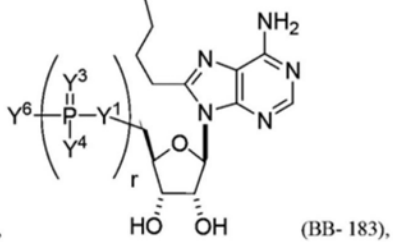
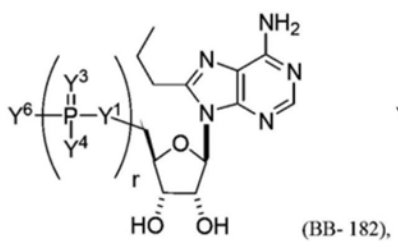
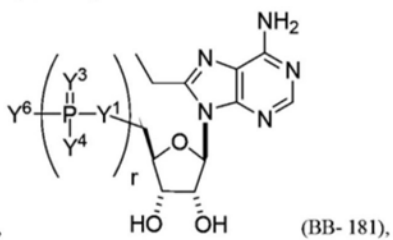
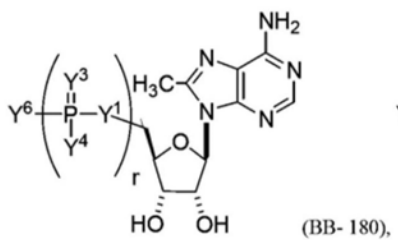
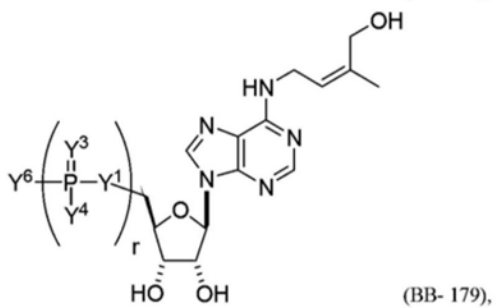
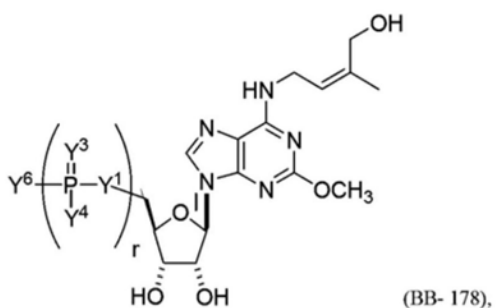


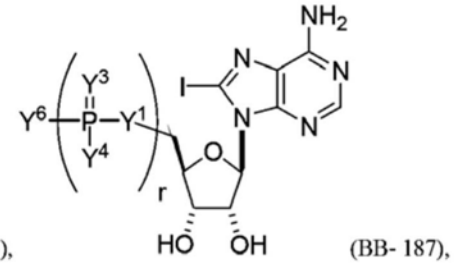
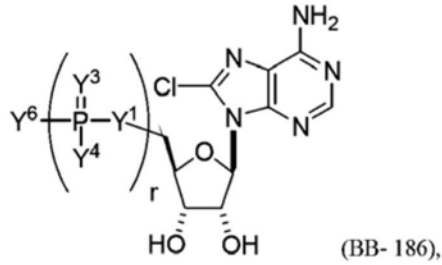
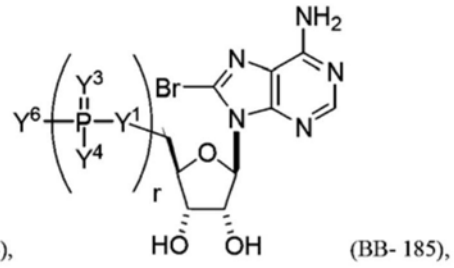
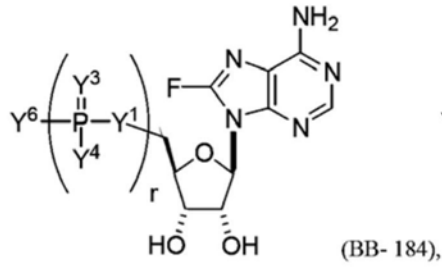
[0274]



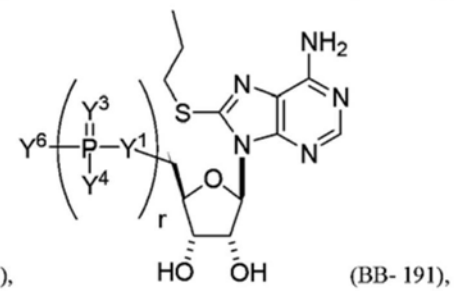
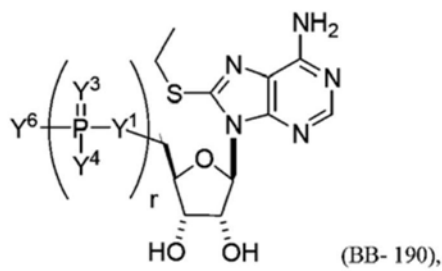
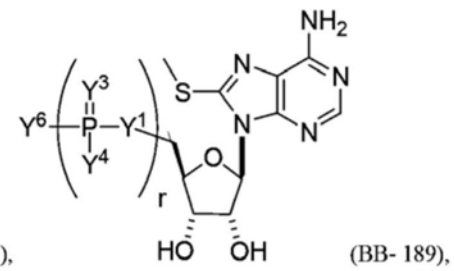
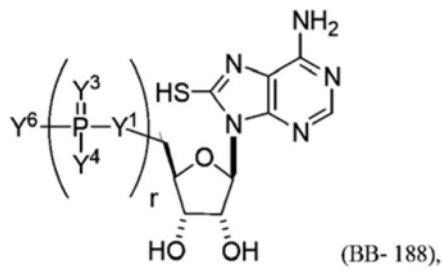


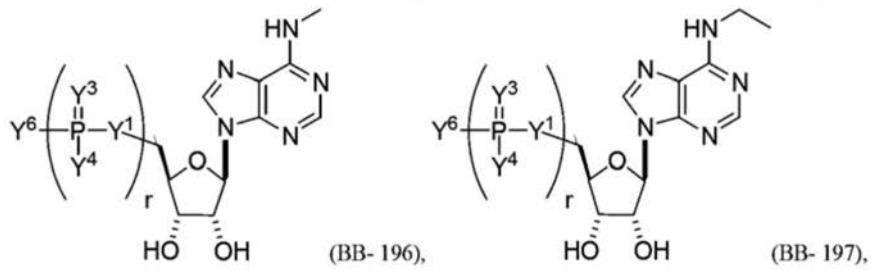
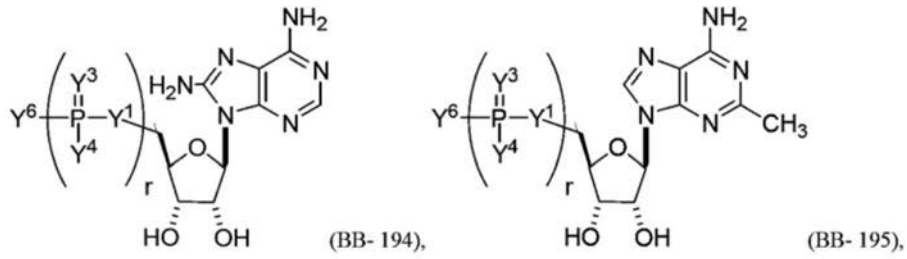
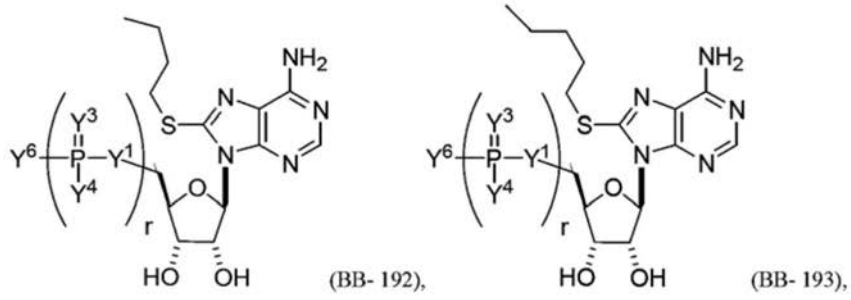
[0275]



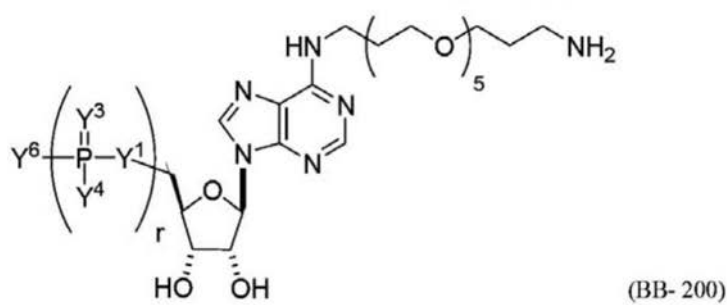
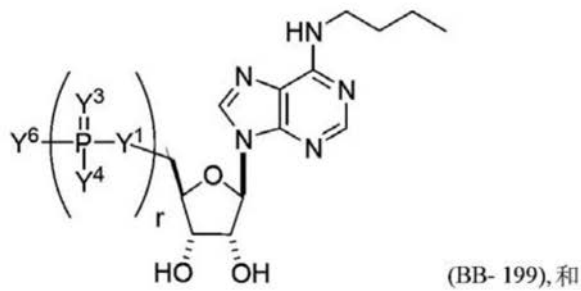
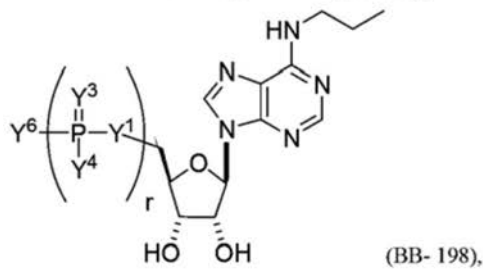


[0276]



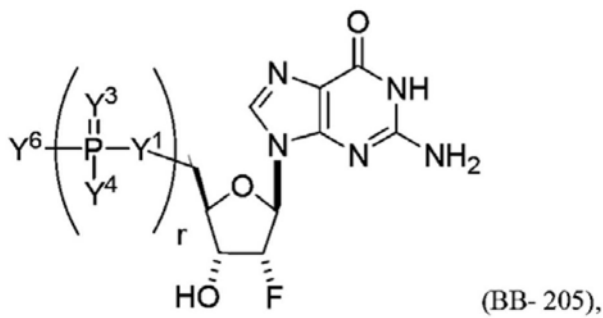
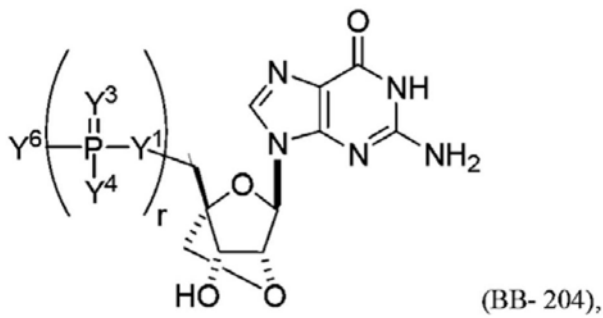
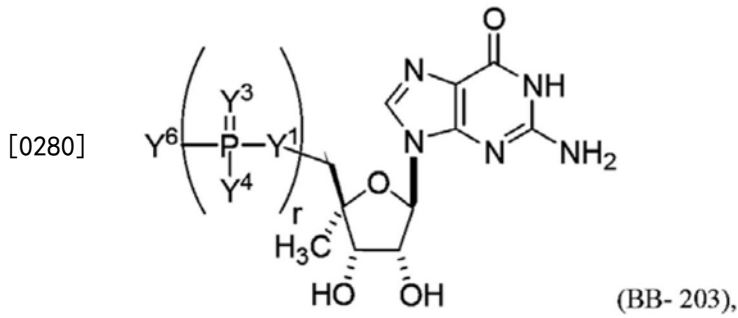
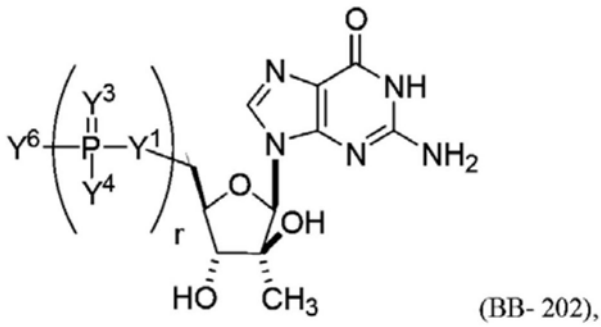
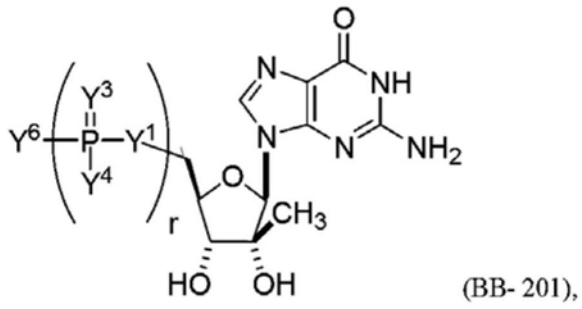


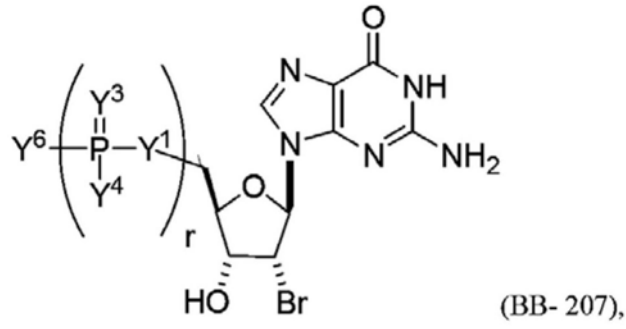
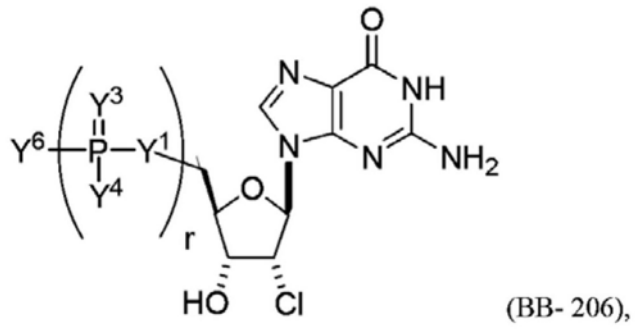
[0277]



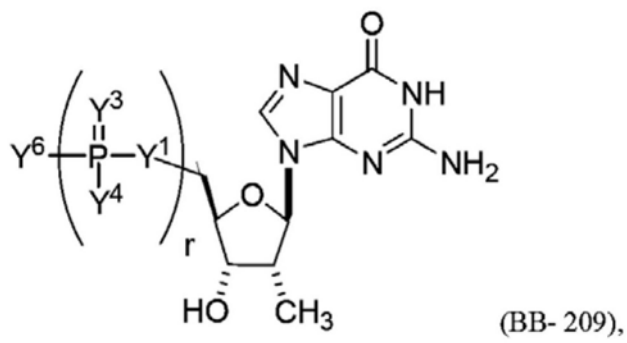
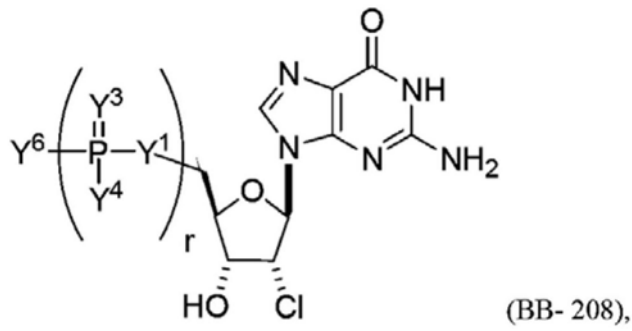
[0278] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中 Y^1 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^6 和 r 如本文所述(例如,每个 r 独立地为0至5(如0至3、1至3或1至5)的整数)。

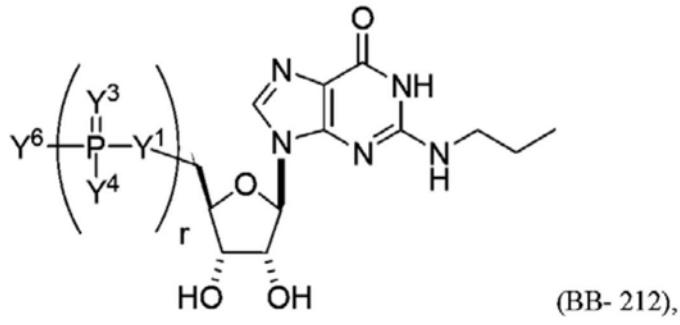
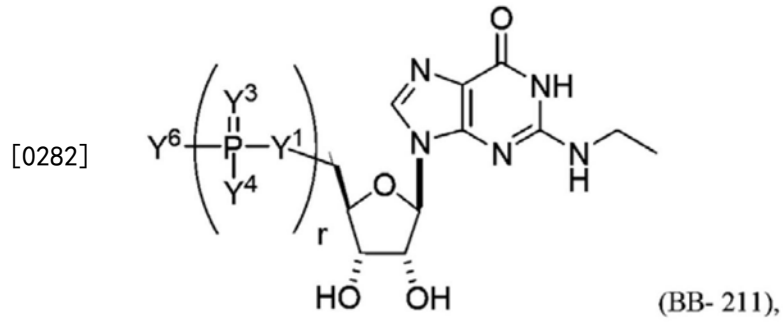
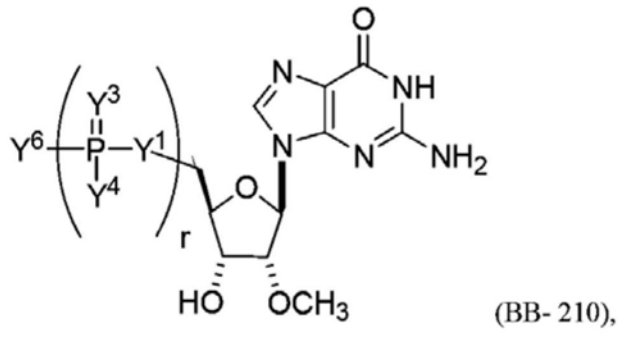
[0279] 在一些实施方式中,可被掺入到多核苷酸中的构建块分子是修饰的鸟嘌呤(例如,选自:

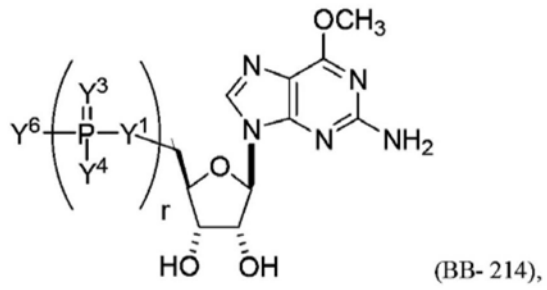
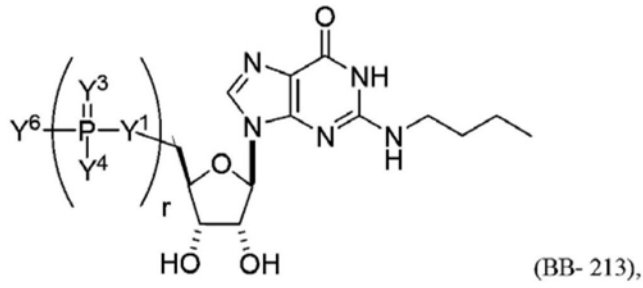




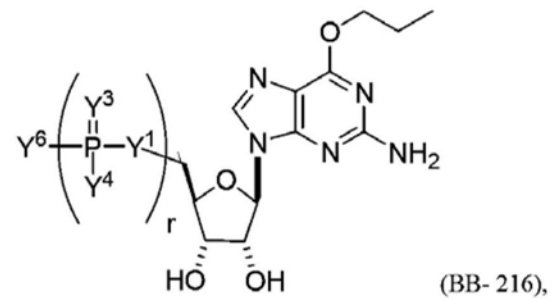
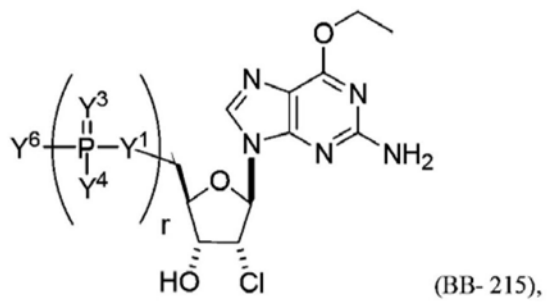
[0281]

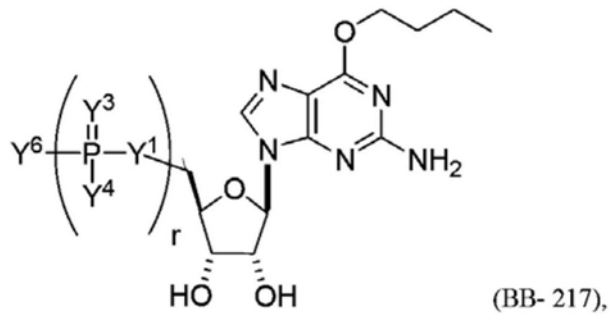




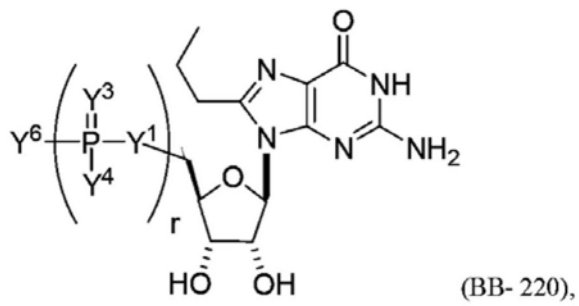
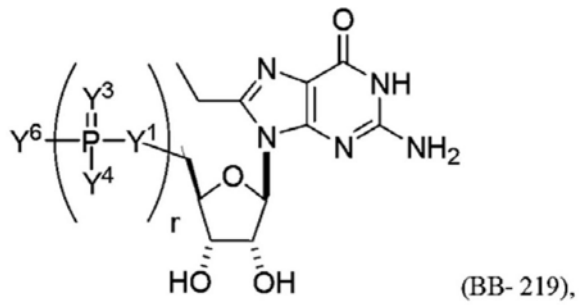
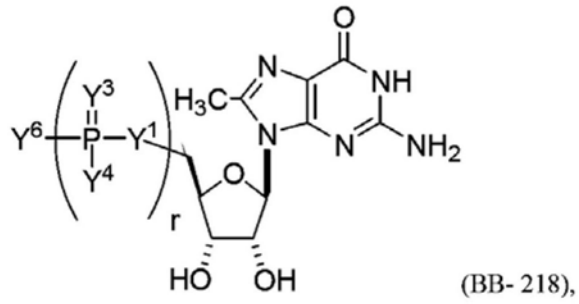


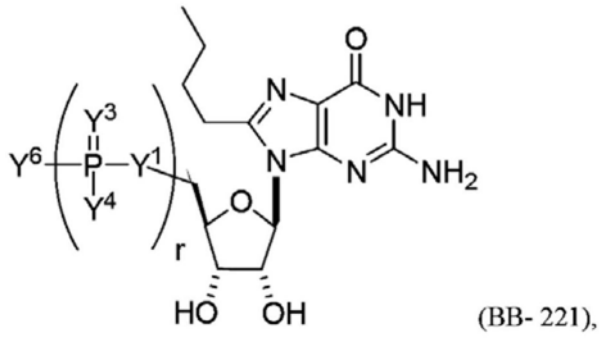
[0283]



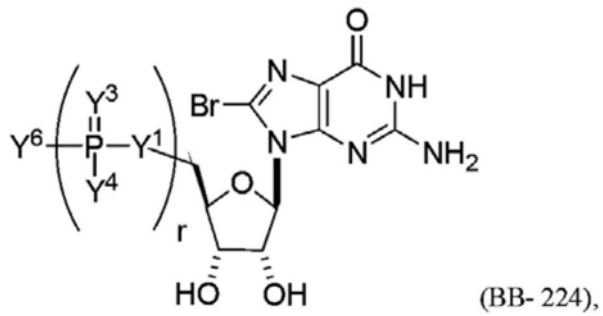
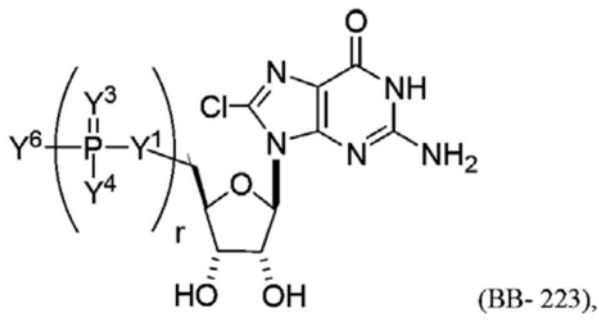
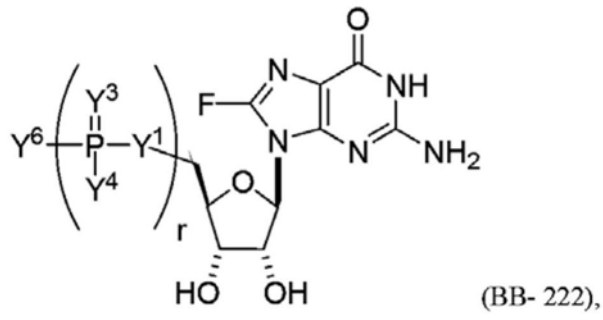


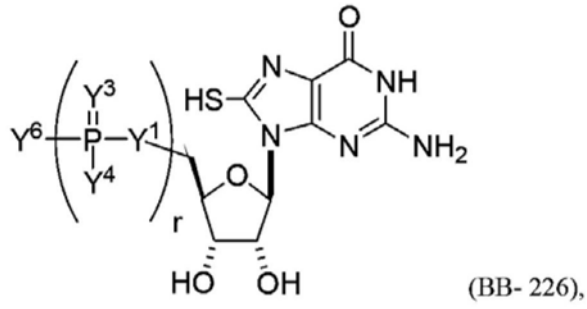
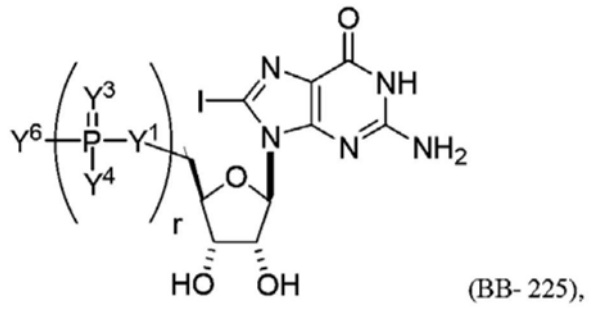
[0284]



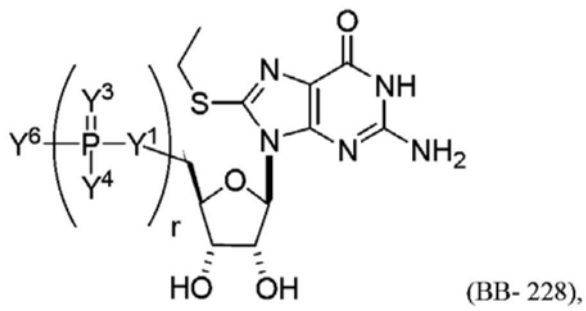
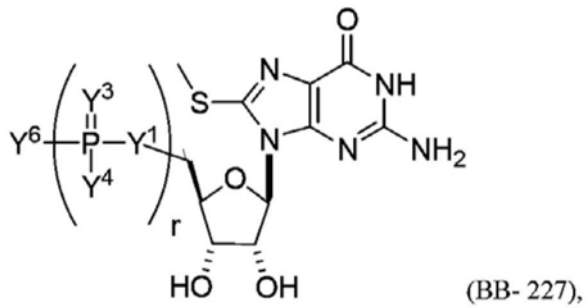


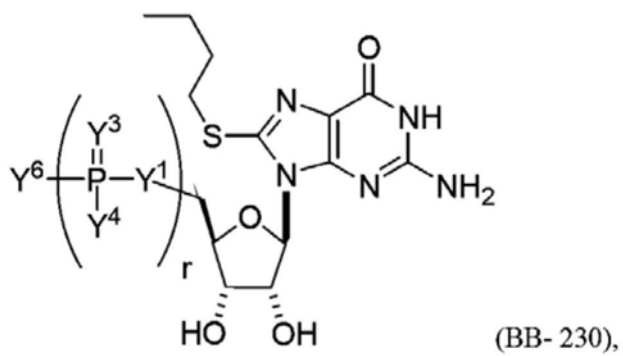
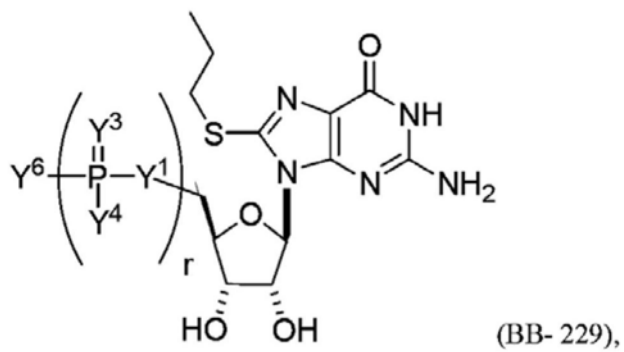
[0285]



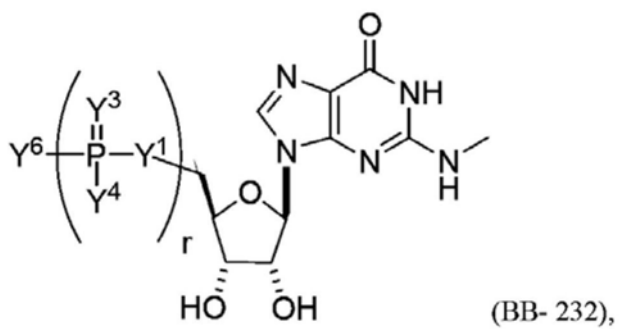
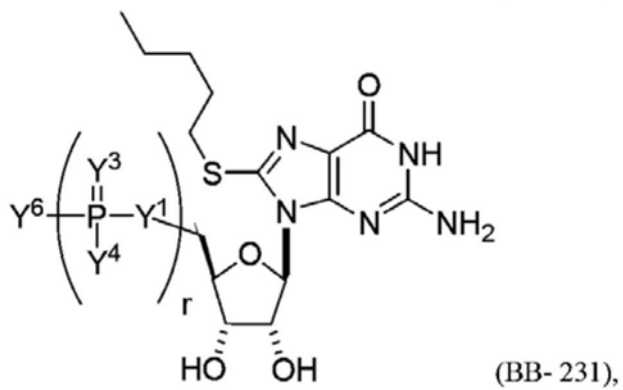


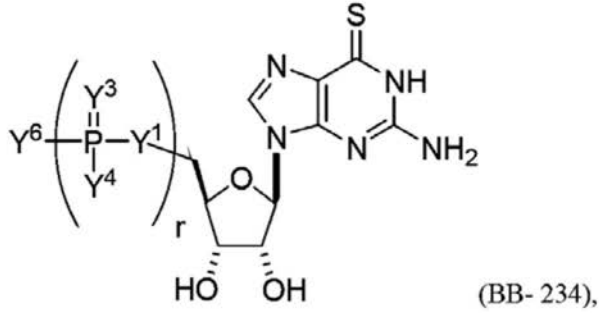
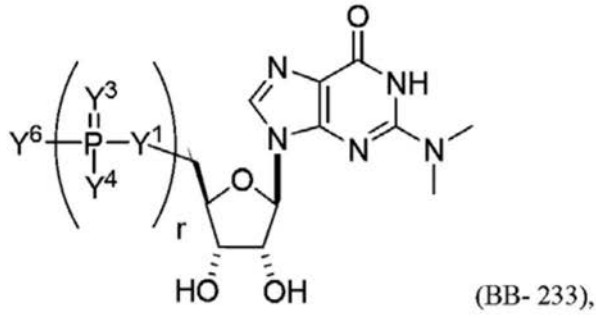
[0286]



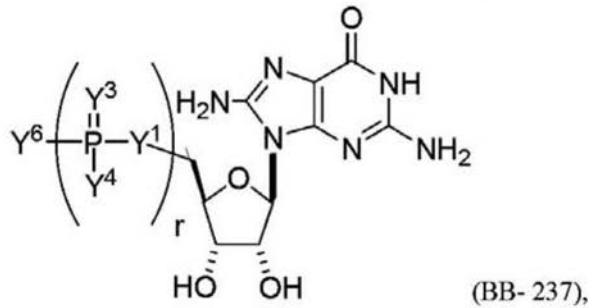
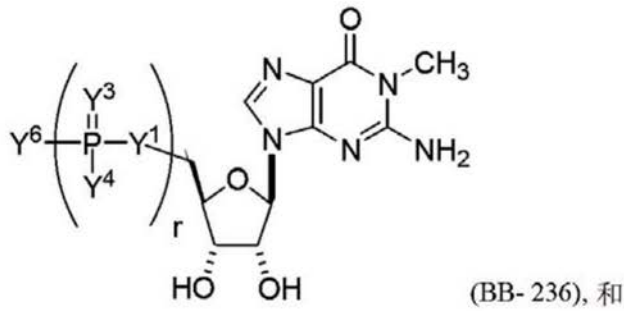
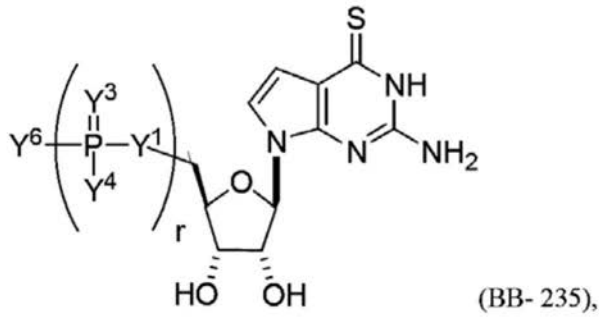


[0287]





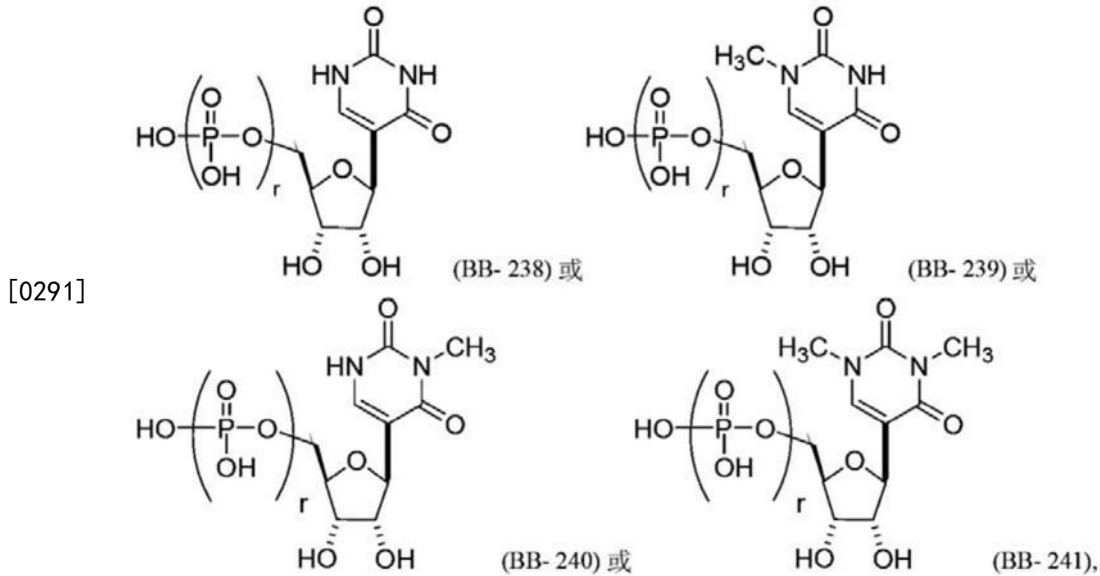
[0288]



[0289] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中 Y^1 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^6 和 r 如本文所述(例如,每个 r 独立地为0至5(如0至3、1至3或1至5)的整数)。

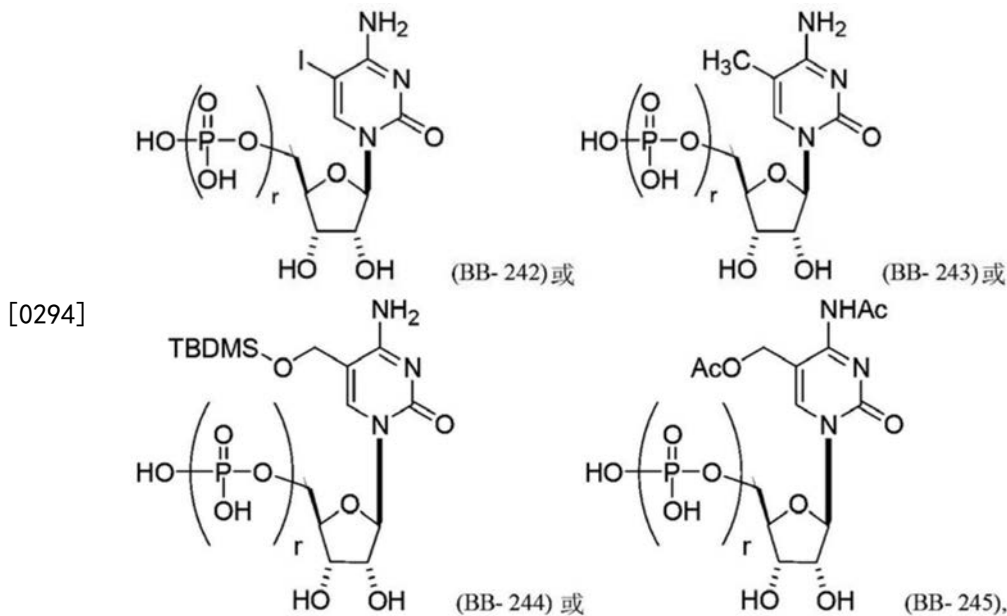
[0290] 在一些实施方式中,大沟的化学修饰可以包括用 N 替代在环(例如,嘧啶核苷如胞嘧啶或尿嘧啶的环)的C-5位的C基团(例如,用 $>NR^{N1}$ 基团替代C-5位的 $>CH$ 基团,其中 R^{N1} 为 H

或任选取代的烷基)。例如,可被掺入到多核苷酸中的构建块分子可以是:



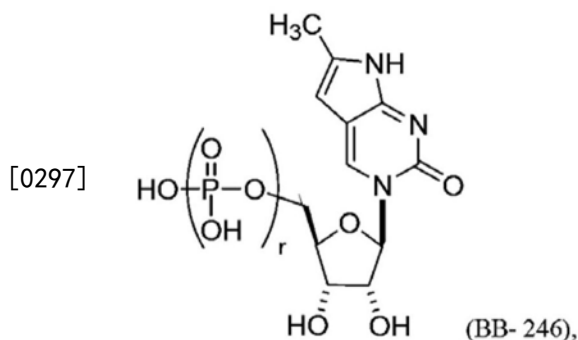
[0292] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中每个r独立地是0至5(例如,0至3、1至3或1至5)的整数。

[0293] 在另一个实施方式中,大沟的化学修饰可以包括用卤素(例如,Br、Cl、F或I)或任选取代的烷基(例如甲基)替代胞嘧啶的C-5位的氢。例如,可被掺入到多核苷酸中的构建块分子可以是:



[0295] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中每个r独立地是0至5(例如,0至3、1至3或1至5)的整数。

[0296] 在另一个实施方式中,大沟的化学修饰可以包括由在C-4位的NH₂和在C-5位的碳原子形成的稠环。例如,可被掺入到多核苷酸中的构建块分子可以是:



[0298] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中每个r独立地是0至5(例如,0至3、1至3或1至5)的整数。

[0299] 糖上的修饰

[0300] 可被掺入到多核苷酸(例如,如本文所述的RNA或mRNA)中的修饰的核苷和核苷酸(例如,构建块分子)可在核糖核酸的糖上进行修饰。例如,2'羟基(OH)可以用多个不同的取代基修饰和替代。2'-位的示例性的取代包括但不限于H、卤素、任选取代的C₁₋₆烷基、任选取代的C₁₋₆烷氧基、任选取代的C₆₋₁₀芳氧基、任选取代的C₃₋₈环烷基、任选取代的C₃₋₈环烷氧基、任选取代的C₆₋₁₀芳氧基、任选取代的C₆₋₁₀芳基-C₁₋₆烷氧基、任选取代的C₁₋₁₂(杂环基)氧基;糖(例如核糖、戊糖或本文所描述的任何糖);聚乙二醇(PEG)、-O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR,其中R是H或任选取代的烷基和n是0至20(例如,0至4、0至8、0至10、0至16、1至4、1至8、1至10、1至16、1至20、2至4、2至8、2至10、2至16、2至20、4至8、4至10、4至16、和4至20)的整数;“锁定的”核酸(LNA),其中2'-羟基通过C₁₋₆亚烷基或C₁₋₆杂亚烷基桥连接至同一核糖糖的4'-碳上,其中示例性桥包括亚甲基、亚丙基、醚或氨基桥;如本文所定义的氨基烷基;如本文所定义的氨基烷氧基;如本文所定义的氨基;和如本文所定义的氨基酸。

[0301] 一般而言,RNA包括糖基团核糖,其是具有氧的5元环。示例性的且非限制性的修饰的核苷酸包括替代核糖中的氧(例如,用S、Se或亚烷基,如亚甲基或亚乙基);添加双键(例如,以用环戊烯基或环己烯基替代核糖);核糖的环缩小(例如,以形成4元环的环丁烷或氧杂环丁烷);核糖的环扩大(例如,以形成具有额外的碳或杂原子的6或7元环,如还具有氨基磷酸酯主链的失水己糖醇、阿卓糖醇、甘露糖醇、环己基、环己烯基和吗啉基);多环形式(例如,三环;和“解锁”形式,如二醇核酸(GNA)(例如,R-GNA或S-GNA,其中核糖被连接到磷酸二酯键上的二醇单元替代)、苏糖核酸(TNA,其中核糖被 α -L-苏型呋喃糖基(threofuranosyl)-(3'→2')替代),和肽核酸(PNA,其中2-氨基-乙基-甘氨酸连接替代核糖和磷酸二酯主链)。糖基团也可以包含一个或多个具有与核糖上相应的碳相反的立体化学构型的碳。因此,多核苷酸分子可以包括含有例如阿拉伯糖作为糖的核苷酸。

[0302] 核碱基上的修饰

[0303] 本发明提供了修饰的核苷和核苷酸。如本文所述,“核苷”是指含有与有机碱基(例如,嘌呤或嘧啶)或其衍生物(在本文中也称为“核碱基”)结合的糖分子(例如,戊糖或核糖)或其衍生物的化合物。如本文所述,“核苷酸”被定义为包含磷酸酯基团的核苷。在一些实施方式中,本文所述的核苷和核苷酸通常在大沟面上进行化学修饰。示例性的且非限制性的修饰包括氨基、巯基、烷基、卤素基团或本文所述的任何修饰。修饰的核苷酸可以通过如本文所述的任何可用的方法进行合成(例如,通过化学、酶促或重组方法以包括一个或多个修

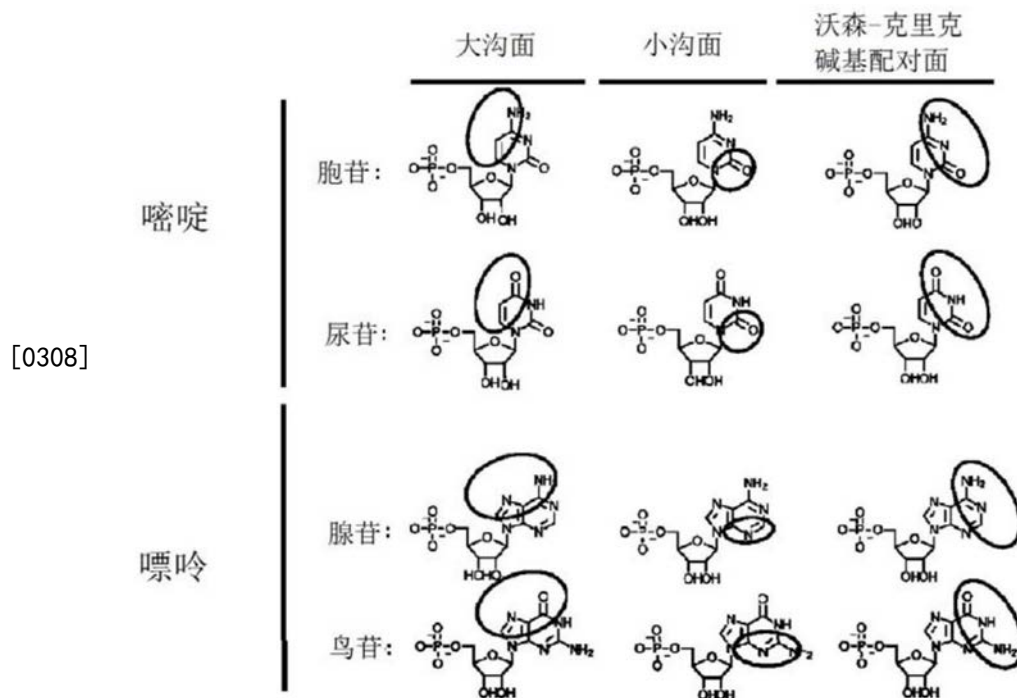
饰的或非天然的核苷)。

[0304] 修饰的核苷酸碱基配对不仅包括标准的腺苷-胸腺嘧啶、腺苷-尿嘧啶或鸟苷-胞嘧啶碱基对,还包括在包含非标准或修饰的碱基的核苷酸和/或修饰的核苷酸之间形成的碱基对,其中氢键供体和氢键受体的排列允许在非标准碱基和标准碱基之间或在两个互补的非标准碱基结构之间的氢键结合。这样的非标准碱基配对的一个实例是在修饰的核苷酸肌苷和腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之间的碱基配对。

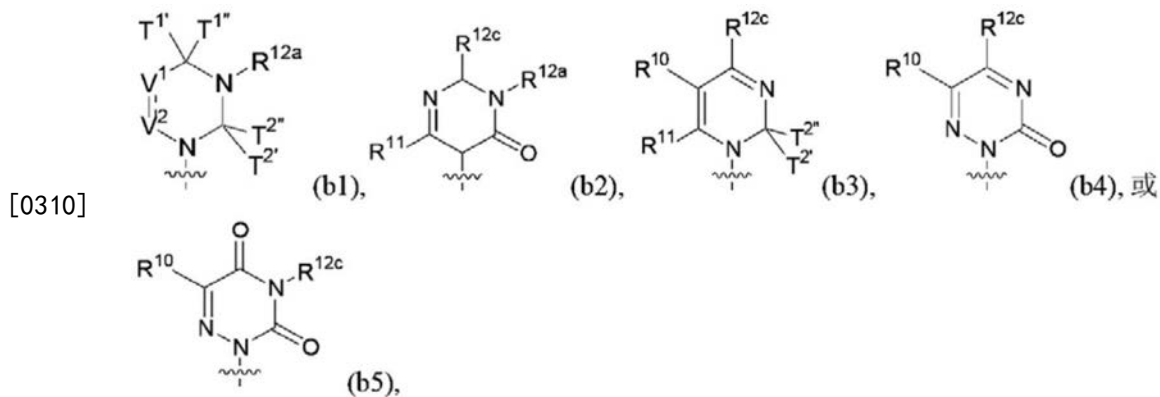
[0305] 修饰的核苷和核苷酸可包括修饰的核碱基。在RNA中发现的核碱基的实例包括但不限于腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶。在DNA中发现的核碱基的实例包括但不限于腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶。这些核碱基可以被修饰或完全替代,以提供具有增强性质(例如,对核酸酶的抗性、稳定性)的多核苷酸分子,并且这些性质可通过干扰大沟结合配偶体的结合而显示出来。例如,所描述的核苷和核苷酸可以在大沟面上进行化学修饰。在一些实施方式中,大沟的化学修饰可以包括氨基、巯基、烷基或卤素基团。

[0306] 下面的表1描述了各种标准的核苷酸的化学面。圆圈标示出各自化学区的原子。


[0307] 表1



[0309] 在一些实施方式中,B是修饰的尿嘧啶。示例性的修饰的尿嘧啶包括具有式(b1)-(b5)的那些修饰的尿嘧啶、或其药学上可接受的盐或立体异构体:



[0311] 其中

[0312]  为单键或双键；

[0313] 每个 $T^{1'}$ 、 $T^{1''}$ 、 $T^{2'}$ 和 $T^{2''}$ 独立地是H、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基或任选取代的硫代烷氧基，或者 $T^{1'}$ 与 $T^{1''}$ 或 $T^{2'}$ 与 $T^{2''}$ 合并为一体（例如，为 T^2 的形式）从而形成O（氧代）、S（硫代）或Se（硒代）；

[0314] 每个 V^1 和 V^2 独立地是O、S、N(R^{Vb})_{nv}或C(R^{Vb})_{nv}，其中 nv 为0至2的整数，且每个 R^{Vb} 独立地是H、卤素、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的卤代烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基（例如，用N-保护基团取代的，如本文所述的任何N-保护基团，例如，三氟乙酰基）、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的酰基氨基烷基（例如，用N-保护基团取代的，如本文所述的任何N-保护基团，例如，三氟乙酰基）、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、或任选取代的烷氧基羰基烷氧基（例如，用本文所述的任何取代基如那些选自用于烷基的(1)-(21)的那些取代基任选取代的)；

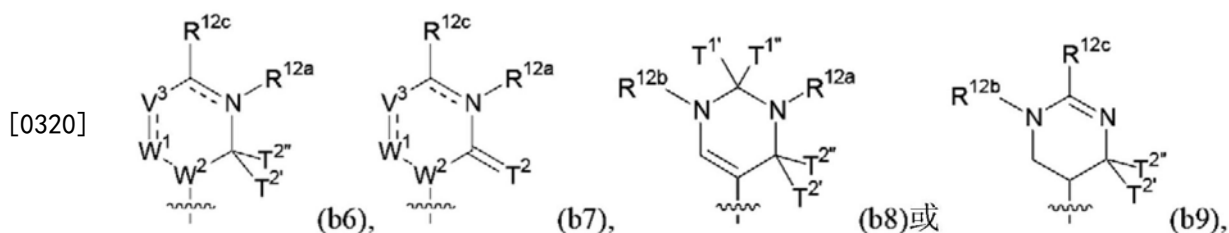
[0315] R^{10} 是H、卤素、任选取代的氨基酸、羟基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基烷基、或任选取代的氨基甲酰基烷基；

[0316] R^{11} 是H或任选取代的烷基；


[0317] R^{12a} 是H、任选取代的烷基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基、任选取代的羧基烷基（例如，用羟基任选取代的）、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基氨基烷基、或任选取代的氨基甲酰基烷基；且

[0318] R^{12c} 是H、卤素、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的氨基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基。

[0319] 其它示例性的修饰的尿嘧啶包括具有式(b6)-(b9)的那些修饰的尿嘧啶、或其药学上可接受的盐或立体异构体：



[0321] 其中

[0322]  为单键或双键；

[0323] 每个 T^1 、 $T^{1'}$ 、 $T^{2'}$ 和 $T^{2''}$ 独立地是H、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、或任选取代的硫代烷氧基，或者 T^1 与 $T^{1'}$ 合并为一体(例如为 T^1 的形式)或 $T^{2'}$ 与 $T^{2''}$ 合并如一体(例如为 T^2 的形式)，从而形成O(氧代)、S(硫代)或Se(硒代)，或每个 T^1 和 T^2 独立地是O(氧代)、S(硫代)或Se(硒代)；

[0324] 每个 W^1 和 W^2 独立地是 $N(R^{Wa})_{nw}$ 或 $C(R^{Wa})_{nw}$ ，其中 nw 是0至2的整数，并且每个 R^{Wa} 独立地是H、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基；

[0325] 每个 V^3 独立地是O、S、N(R^{Va}) $_{nv}$ 或C(R^{Va}) $_{nv}$ ，其中 nv 为0至2的整数，每个 R^{Va} 独立地是H、卤素、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基(alkheterocyclyl)、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基或任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷基(例如，用N-保护基团，如本文所述的任何N-保护基团，例如三氟乙酰基或磺基烷基取代的)、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的酰基氨基烷基(例如，用N-保护基团取代的，如本文所述的任何N-保护基团，例如三氟乙酰基)、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基酰基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷基(例如，用羟基和/或O-保护基团任选取代的)、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基氨基烷基或任选取代的氨基甲酰基烷基(例如，用本文所述的任何取代基，如选自用于烷基的(1)-(21)的那些取代基任选取代的)，并且其中 R^{Va} 和 R^{12c} 可以与它们所连接的碳原子一起形成任选取代的环烷基、任选取代的芳基或任选取代的杂环基(例如，5或6元环)；

[0326] R^{12a} 是H、任选取代的烷基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的羧基烷基(例如，用羟基和/或O-保护基团任选取代)、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基氨基烷基、任选取代的氨基甲酰基烷基、或不存在；

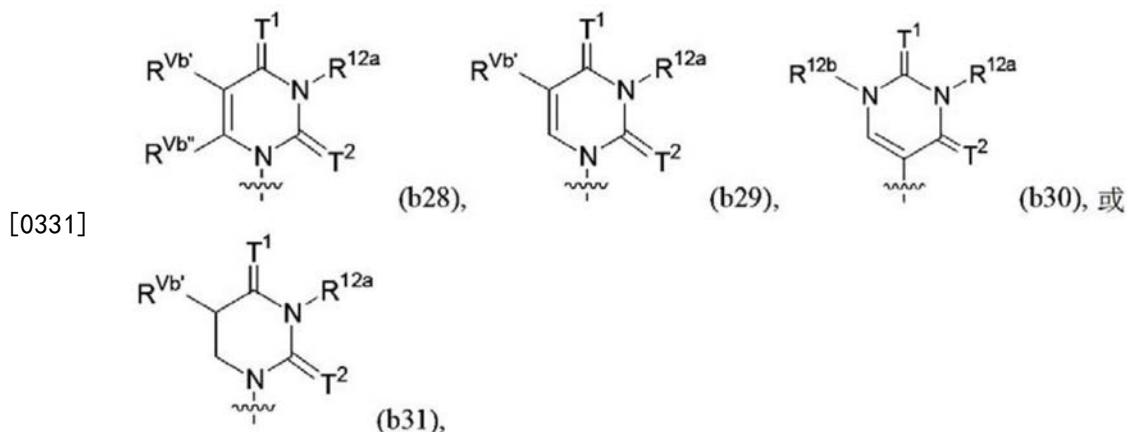
[0327] R^{12b} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的烷芳基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷氧基羰基酰基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷基(例如，用羟基和/或O-保护基团任选取代)、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基氨基烷基或任选取代的氨基甲酰基烷基，

[0328] 其中 R^{12b} 与 T^1 或 R^{12b} 与 R^{12c} 可以连接在一起以形成任选取代的杂环基；和

[0329] R^{12c} 是H、卤素、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基、任选

取代的氨基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基。

[0330] 进一步的示例性的修饰的尿嘧啶包括具有式 (b28) - (b31) 的那些：



[0332] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中

[0333] 每个 T^1 和 T^2 独立地是O(氧代)、S(硫代)或Se(硒代)；

[0334] 每个 $R^{Vb'}$ 和 $R^{Vb''}$ 独立地是H、卤素、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的卤代烷基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷基(例如,用N-保护基团,如本文所述的任何N-保护基团,例如三氟乙酰基或磺基烷基取代的)、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的酰基氨基烷基(例如,用N-保护基团,如本文所述的任何N-保护基团,例如三氟乙酰基取代的)、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基酰基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷基(例如,用羟基和/或O-保护基团任选取代的)、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基氨基烷基或任选取代的氨基甲酰基烷基(例如,用本文所述的任何取代基,例如选自用于烷基的(1)-(21)的那些任选取代的)(例如, $R^{Vb'}$ 为任选取代的烷基、任选取代的烯基或任选取代的氨基烷基,例如,用N-保护基团,如本文所述的任何N-保护基团,例如三氟乙酰基或磺基烷基取代的)；

[0335] R^{12a} 是H、任选取代的烷基、任选取代的羧基氨基烷基、任选取代的氨基烷基(例如,例如,用N-保护基团,如本文所述的任何N-保护基团,例如三氟乙酰基或磺基烷基取代的)、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基；和

[0336] R^{12b} 是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基(例如,例如,用N-保护基团,如本文所述的任何该基团,例如三氟乙酰基或磺基烷基取代的)、任选取代的烷氧基羰基酰基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基烷基或任选取代的氨基甲酰基烷基。

[0337] 在具体实施方式中, T^1 是O(氧代), T^2 是S(硫代)或Se(硒代)。在其它实施方式中, T^1 是S(硫代), T^2 是O(氧代)或Se(硒代)。在一些实施方式中, $R^{Vb'}$ 是H、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基。

[0338] 在其它实施方式中,每个 R^{12a} 和 R^{12b} 独立地是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基或任选取代的羟基烷基。在具体实施方式中, R^{12a} 是H。在其它实施方式中, R^{12a} 和 R^{12b} 都是H。

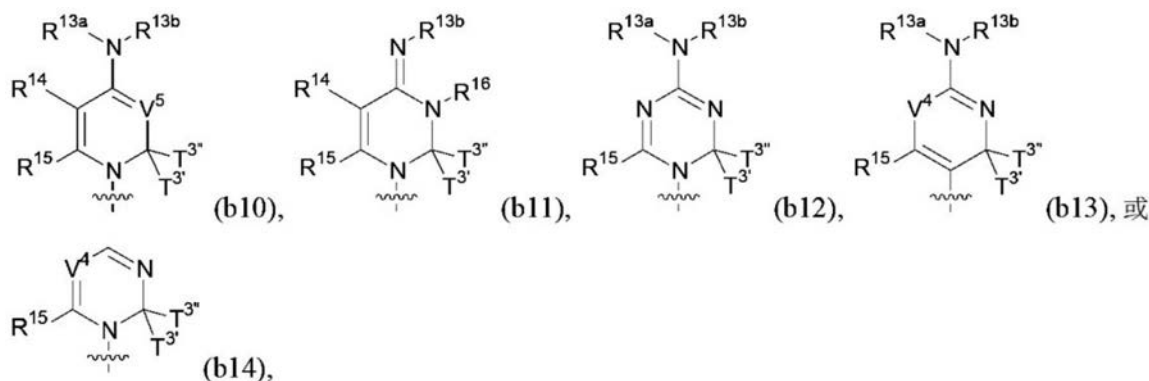
[0339] 在一些实施方式中, R^{12b} 的每个 $R^{Vb'}$ 独立地是任选取代的氨基烷基(例如,用N-保护基团,如本文所述的任何该基团,例如三氟乙酰基或磺基烷基取代的)、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基或任选取代的酰基氨基烷基(例如,用N-保护基团,如本文所述的任何该基团,例如三氟乙酰基取代的)。在一些实施方式中,任选取代的氨基烷基的氨基和/或烷基被任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的磺基烷基、任选取代的羧基(例如,用O-保护基团取代的)、任选取代的羟基(例如,用O-保护基团取代的)、任选取代的羧基烷基(例如,用O-保护基团取代的)、任选取代的烷氧基羰基烷基(例如,用O-保护基团取代的)或N-保护基团中的一个或多个取代。在一些实施方式中,任选取代的氨基烷基被任选取代的磺基烷基或任选取代的烯基取代。在具体的实施方式中, R^{12a} 和 $R^{Vb'}$ 都是H。在具体的实施方式中, T^1 是O(氧代), T^2 是S(硫代)或Se(硒代)。

[0340] 在一些实施方式中, $R^{Vb'}$ 是任选取代的烷氧基羰基烷基或任选取代的氨基甲酰基烷基。

[0341] 在具体的实施方式中,用于 R^{12a} 、 R^{12b} 、 R^{12c} 或 R^{Va} 的任取代基是聚乙二醇基团(例如, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$,其中 $s1$ 是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个 $s2$ 和 $s3$ 独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,和 R' 是H或 C_{1-20} 烷基);或氨基-聚乙二醇基团(例如, $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$,其中 $s1$ 是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个 $s2$ 和 $s3$ 独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,和各个 R^{N1} 独立地是氢或任选取代的 C_{1-6} 烷基)。

[0342] 在一些实施方式中,B是修饰的胞嘧啶。示例性的修饰的胞嘧啶包括式(b10)-(b14)的化合物、或其药学上可接受的盐或立体异构体:

[0343]



[0344] 其中

[0345] 每个 $T^{3'}$ 和 $T^{3''}$ 独立地是H、任选取代的烷基、任选取代的烷氧基或任选取代的硫代烷氧基,或者 $T^{3'}$ 与 $T^{3''}$ 合并为一体(例如为 T^3 的形式)从而形成O(氧代)、S(硫代)或Se(硒代);

[0346] 每个 V^4 独立地是O、S、N(R^{Vc})_{nv}或C(R^{Vc})_{nv},其中 nv 是0至2的整数,且每个 R^{Vc} 独立地是H、卤素、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基或任选取代的炔氧基(例如,用本文所述的任何取代基,如选自用于烷基的(1)-(21)的那些任选取代的),其中

R^{13b} 与 R^{Vc} 可以一起形成任选取代的杂环基；

[0347] 每个 V^5 独立地是 $N(R^{Vd})_{nv}$ 或 $C(R^{Vd})_{nv}$ ，其中 nv 是0至2的整数，且每个 R^{Vd} 独立地是H、卤素、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基或任选取代的炔氧基（例如，用本文所述的任何取代基，如选自用于烷基的(1)–(21)的那些取代基任选取代的）（例如， V^5 是-CH或N）；

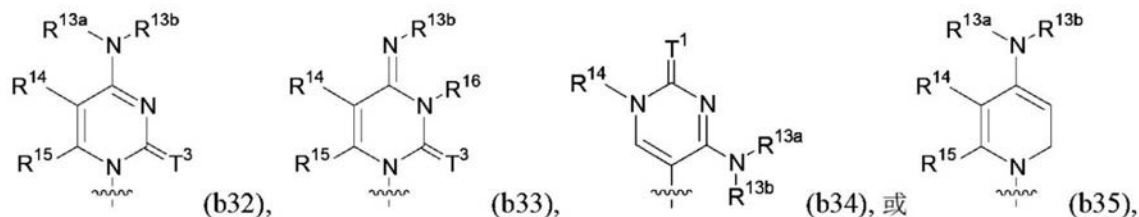
[0348] 每个 R^{13a} 和 R^{13b} 独立地是H、任选取代的酰基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基，其中 R^{13b} 与 R^{14} 可以一起形成任选取代的杂环基；

[0349] 每个 R^{14} 独立地是H、卤素、羟基、巯基、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的卤代烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基（例如，用O-保护基团取代的）、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的氨基（例如，-NHR，其中R是H、烷基、芳基或磷酰基）、叠氨基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基；和

[0350] 每个 R^{15} 和 R^{16} 独立地是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基或任选取代的炔基。

[0351] 进一步的示例性的修饰的胞嘧啶包括具有式(b32)–(b35)的那些修饰的胞嘧啶、或其药学上可接受的盐或立体异构体：

[0352]



[0353] 其中

[0354] 每个 T^1 和 T^3 独立地是O(氧代)、S(硫代)或Se(硒代)；

[0355] 每个 R^{13a} 和 R^{13b} 独立地是H、任选取代的酰基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基，其中 R^{13b} 与 R^{14} 可以一起形成任选取代的杂环基；

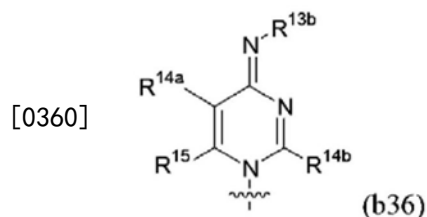
[0356] 每个 R^{14} 独立地是H、卤素、羟基、巯基、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的卤代烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基（例如，用O-保护基团取代的）、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的氨基（例如，-NHR，其中R是H、烷基、芳基或磷酰基）、叠氨基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基、任选取代的氨基烷基（例如，羟基烷基、烷基、烯基或炔基）、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基；和

[0357] 每个 R^{15} 和 R^{16} 独立地是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基或任选取代的炔基（例如， R^{15} 是H，和 R^{16} 是H或任选取代的烷基）。

[0358] 在一些实施方式中， R^{15} 是H，和 R^{16} 是H或任选取代的烷基。在具体的实施方式中， R^{14} 是H、酰基或羟基烷基。在一些实施方式中， R^{14} 是卤素。在一些实施方式中， R^{14} 和 R^{15} 都是H。在

一些实施方式中, R^{15} 和 R^{16} 都是H。在一些实施方式中, R^{14} 和 R^{15} 和 R^{16} 各自均是H。在进一步的实施方式中, R^{13a} 和 R^{13b} 各自独立地是H或任选取代的烷基。

[0359] 修饰的胞嘧啶的进一步的非限制性实例包括式 (b36) 的化合物、或其药学上可接受的盐或立体异构体:



[0361] 其中

[0362] 每个 R^{13b} 独立地是H、任选取代的酰基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基, 其中 R^{13b} 与 R^{14b} 可以一起形成任选取代的杂环基;

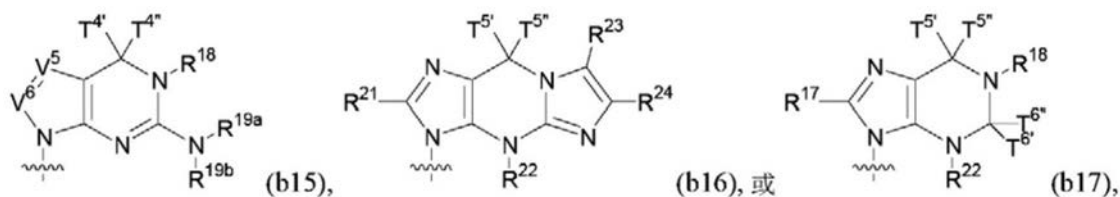
[0363] 每个 R^{14a} 和 R^{14b} 独立地是H、卤素、羟基、巯基、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的卤代烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基(例如, 用O-保护基团取代的)、任选取代的羟基烯基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基、任选取代的氨基烷氧基、任选取代的烷氧基烷氧基、任选取代的酰氧基烷基、任选取代的氨基(例如, $-NHR$, 其中R是H、烷基、芳基、磷酰基、任选取代的氨基烷基或任选取代的羧基氨基烷基)、叠氨基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的烷杂环基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基或任选取代的氨基炔基; 和

[0364] 每个 R^{15} 独立地是H、任选取代的烷基、任选取代的烯基或任选取代的炔基。

[0365] 在具体的实施方式中, R^{14b} 是任选取代的氨基酸(例如, 任选取代的赖氨酸)。在一些实施方式中, R^{14a} 是H。

[0366] 在一些实施方式中, B是修饰的鸟嘌呤。示例性的修饰的鸟嘌呤包括式 (b15) - (b17) 的化合物、或其药学上可接受的盐或立体异构体:

[0367]



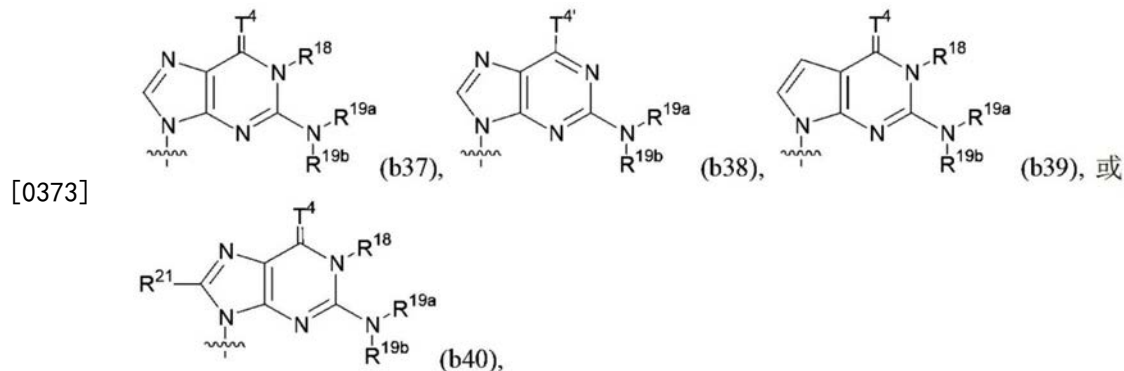
[0368] 其中

[0369] 每个 $T^{4'}$ 、 $T^{4''}$ 、 $T^{5'}$ 、 $T^{5''}$ 、 $T^{6'}$ 和 $T^{6''}$ 独立地是H、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基, 其中 $T^{4'}$ 与 $T^{4''}$ (例如为 T^4 的形式)或 $T^{5'}$ 与 $T^{5''}$ (例如为 T^5 的形式)或 $T^{6'}$ 与 $T^{6''}$ (例如为 T^6 的形式)合并为一体从而形成O(氧代)、S(硫代)或Se(硒代);

[0370] 每个 V^5 和 V^6 独立地是O、S、N(R^{Vd})_{nv}或C(R^{Vd})_{nv}, 其中nv是0至2的整数, 且每个 R^{Vd} 独立地是H、卤素、巯基、任选取代的氨基酸、氰基、脒、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基、任选取代的炔氧基(例如, 用本文所述的任何取代基, 如选自用于烷基的(1)-(21)的那些取代基任选取代的)、任选取代的硫代烷氧基或任选取代的氨基; 和

[0371] 每个 R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19a} 、 R^{19b} 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 和 R^{24} 独立地是H、卤素、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的氨基或任选取代的氨基酸。

[0372] 示例性的修饰的鸟苷包括式 (b37) - (b40) 的化合物、或其药学上可接受的盐或立体异构体：



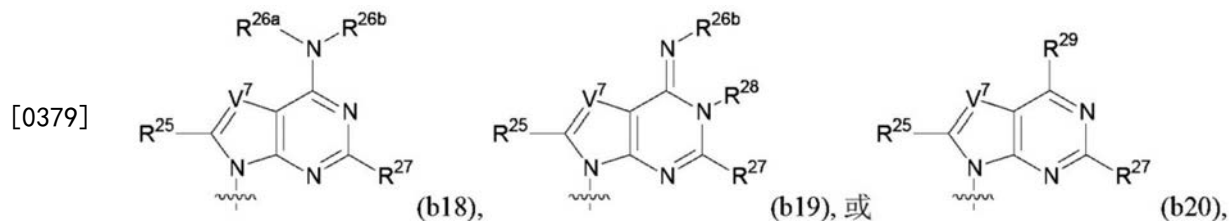
[0374] 其中

[0375] 每个 $T^{4'}$ 独立地是H、任选取代的烷基或任选取代的烷氧基，每个 T^4 独立地是O(氧代)、S(硫代)或Se(硒代)；

[0376] 每个 R^{18} 、 R^{19a} 、 R^{19b} 和 R^{21} 独立地是H、卤素、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的硫代烷氧基、任选取代的氨基或任选取代的氨基酸。

[0377] 在一些实施方式中， R^{18} 是H或任选取代的烷基。在进一步的实施方式中， T^4 是氧代。在一些实施方式中， R^{19a} 和 R^{19b} 各自独立地是H或任选取代的烷基。

[0378] 在一些实施方式中，B是修饰的腺嘌呤。示例性的修饰的腺嘌呤包括式 (b18) - (b20) 的化合物、或其药学上可接受的盐或立体异构体：



[0380] 其中

[0381] 每个 V^7 独立地是O、S、N(R^{Ve})_{nv}或C(R^{Ve})_{nv}，其中nv是0至2的整数，且每个 R^{Ve} 独立地是H、卤素、任选取代的氨基酸、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烯氧基或任选取代的炔氧基(例如，用本文所述的任何取代基任选，如选自用于烷基的(1) - (21)的那些取代基取代的)；

[0382] 每个 R^{25} 独立地是H、卤素、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的硫代烷氧基或任选取代的氨基；

[0383] 每个 R^{26a} 和 R^{26b} 独立地是H、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选取代的氨基甲酰基烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烷氧基或聚乙二醇基团(例如， $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ ，其中s1是1至10(例如，1至6或1至4)的整数，每个s2和s3独立地是0至10(例如，0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数，和R'是H或C₁₋₂₀烷基)；或氨基-聚

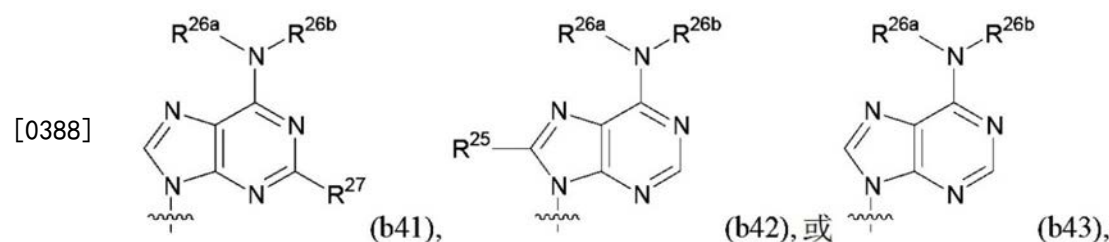
乙二醇基团(例如, $-\text{NR}^{\text{N}1}(\text{CH}_2)_{\text{s}2}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{\text{s}1}(\text{CH}_2)_{\text{s}3}\text{NR}^{\text{N}1}$, 其中 $\text{s}1$ 是 1 至 10 (例如, 1 至 6 或 1 至 4) 的整数, 每个 $\text{s}2$ 和 $\text{s}3$ 独立地是 0 至 10 (例如, 0 至 4、0 至 6、1 至 4、1 至 6 或 1 至 10) 的整数, 和各个 $\text{R}^{\text{N}1}$ 独立地是氢或任选取代的 C_{1-6} 烷基);

[0384] 每个 R^{27} 独立地是 H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基或任选取代的氨基;

[0385] 每个 R^{28} 独立地是 H、任选取代的烷基、任选取代的烯基或任选取代的炔基; 和

[0386] 每个 R^{29} 独立地是 H、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选取代的氨基甲酰基烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的烷氧基或任选取代的氨基酸。

[0387] 示例性的修饰的腺嘌呤包括式 (b41) - (b43) 的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体:



[0389] 其中

[0390] 每个 R^{25} 独立地是 H、卤素、巯基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的硫代烷氧基或任选取代的氨基;

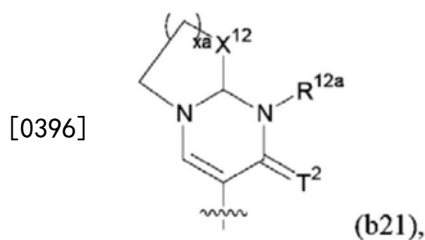
[0391] 每个 $\text{R}^{26\text{a}}$ 和 $\text{R}^{26\text{b}}$ 独立地是 H、任选取代的酰基、任选取代的氨基酸、任选取代的氨基甲酰基烷基、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的羟基烷基、任选取代的羟基烯基、任选取代的羟基炔基、任选取代的烷氧基、或聚乙二醇基团(例如, $-(\text{CH}_2)_{\text{s}2}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{\text{s}1}(\text{CH}_2)_{\text{s}3}\text{OR}'$, 其中 $\text{s}1$ 是 1 至 10 (例如, 1 至 6 或 1 至 4) 的整数, 每个 $\text{s}2$ 和 $\text{s}3$ 独立地是 0 至 10 (例如, 0 至 4、0 至 6、1 至 4、1 至 6 或 1 至 10) 的整数, 和 R' 是 H 或 C_{1-20} 烷基); 或氨基-聚乙二醇基团(例如, $-\text{NR}^{\text{N}1}(\text{CH}_2)_{\text{s}2}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{\text{s}1}(\text{CH}_2)_{\text{s}3}\text{NR}^{\text{N}1}$, 其中 $\text{s}1$ 是 1 至 10 (例如, 1 至 6 或 1 至 4) 的整数, 每个 $\text{s}2$ 和 $\text{s}3$ 独立地是 0 至 10 (例如, 0 至 4、0 至 6、1 至 4、1 至 6、或 1 至 10) 的整数, 且每个 $\text{R}^{\text{N}1}$ 独立地是氢或任选取代的 C_{1-6} 烷基); 且

[0392] 每个 R^{27} 独立地是 H、任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的硫代烷氧基或任选取代的氨基。

[0393] 在一些实施方式中, $\text{R}^{26\text{a}}$ 是 H, $\text{R}^{26\text{b}}$ 是任选取代的烷基。在一些实施方式中, 每个 $\text{R}^{26\text{a}}$ 和 $\text{R}^{26\text{b}}$ 独立地是任选取代的烷基。在具体的实施方式中, R^{27} 是任选取代的烷基、任选取代的烷氧基或任选取代的硫代烷氧基。在其它实施方式中, R^{25} 是任选取代的烷基、任选取代的烷氧基或任选取代的硫代烷氧基。

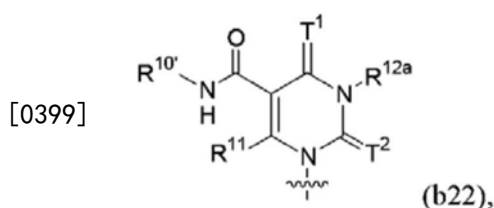
[0394] 在具体的实施方式中, 用于 $\text{R}^{26\text{a}}$ 、 $\text{R}^{26\text{b}}$ 或 R^{29} 的任选的取代基是聚乙二醇基团(例如, $-(\text{CH}_2)_{\text{s}2}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{\text{s}1}(\text{CH}_2)_{\text{s}3}\text{OR}'$, 其中 $\text{s}1$ 是 1 至 10 (例如, 1 至 6 或 1 至 4) 的整数, 每个 $\text{s}2$ 和 $\text{s}3$ 独立地是 0 至 10 (例如, 0 至 4、0 至 6、1 至 4、1 至 6、或 1 至 10) 的整数, 和 R' 是 H 或 C_{1-20} 烷基); 或氨基-聚乙二醇基团(例如, $-\text{NR}^{\text{N}1}(\text{CH}_2)_{\text{s}2}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{\text{s}1}(\text{CH}_2)_{\text{s}3}\text{NR}^{\text{N}1}$, 其中 $\text{s}1$ 是 1 至 10 (例如, 1 至 6 或 1 至 4) 的整数, 每个 $\text{s}2$ 和 $\text{s}3$ 独立地是 0 至 10 (例如, 0 至 4、0 至 6、1 至 4、1 至 6、或 1 至 10) 的整数, 且每个 $\text{R}^{\text{N}1}$ 独立地是氢或任选取代的 C_{1-6} 烷基)。

[0395] 在一些实施方式中,B可以具有式 (b21) :



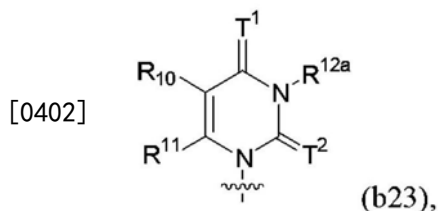
[0397] 其中 X^{12} 独立地是O、S、任选取代的亚烷基(例如亚甲基)、或任选取代的杂亚烷基, x_a 是0至3的整数,并且 R^{12a} 和 T^2 如本文所述。

[0398] 在一些实施方式中,B可以具有式 (b22) :



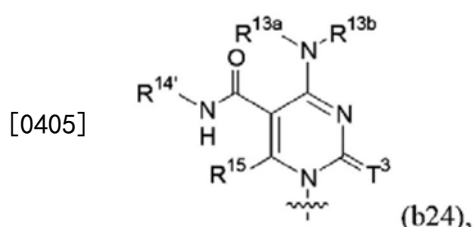
[0400] 其中 $R^{10'}$ 独立地是任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烷氧基羰基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基烷基、或任选取代的氨基甲酰基烷基,且 R^{11} 、 R^{12a} 、 T^1 和 T^2 如本文所述。

[0401] 在一些实施方式中,B可以具有式 (b23) :



[0403] 其中 R^{10} 是任选取代的杂环基(例如,任选取代的呋喃基、任选取代的噻吩基、或任选取代的吡咯基)、任选取代的芳基(例如,任选取代的苯基或任选取代的萘基)、或本文所述的任何取代基(例如,用于 R^{10} 的取代基);且其中 R^{11} (例如,H或本文所述的任何取代基)、 R^{12a} (例如,H或本文所述的任何取代基)、 T^1 (例如,氧代或本文所述的任何取代基)和 T^2 (例如,氧代或本文所述的任何取代基)如本文所述。

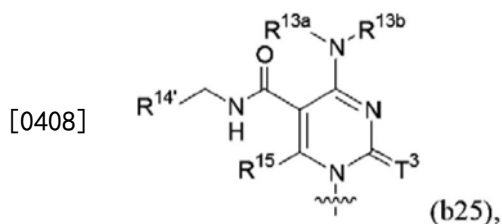
[0404] 在一些实施方式中,B可以具有式 (b24) :



[0406] 其中 $R^{14'}$ 独立地是任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的烷芳基、任选取代的烷杂环基、任选取代的氨基烷基、任选取代的氨基烯基、任选取代的氨基炔基、任选取代的烷氧基、任选取代的烷氧基羰

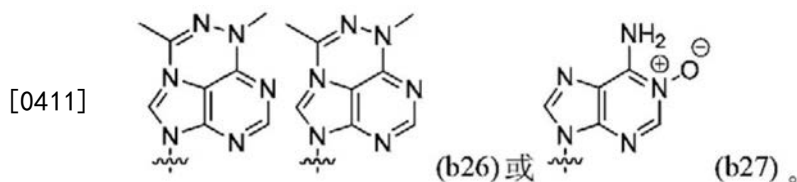
基烷基、任选取代的烷氧基羰基烯基、任选取代的烷氧基羰基炔基、任选取代的烷氧基羰基烷氧基、任选取代的羧基烷氧基、任选取代的羧基烷基、或任选取代的氨基甲酰基烷基，且 R^{13a} 、 R^{13b} 、 R^{15} 和 T^3 如本文所述。

[0407] 在一些实施方式中，B 可以具有式 (b25)：



[0409] 其中 $R^{14'}$ 是任选取代的杂环基 (例如，任选取代的咪唑基、任选取代的噻吩基、或任选取代的吡咯基)、任选取代的芳基 (例如，任选取代的苯基或任选取代的萘基)、或本文所述的任何取代基 (例如，用于 R^{14} 或 $R^{14'}$ 的)；和其中 R^{13a} (例如，H 或本文所述的任何取代基)、 R^{13b} (例如，H 或本文所述的任何取代基)、 R^{15} (例如，H 或本文所述的任何取代基) 和 T^3 (例如，氧代或本文所述的任何取代基) 如本文所述。

[0410] 在一些实施方式中，B 是选自胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤和尿嘧啶的核碱基。在一些实施方式中，B 可以是：



[0412] 在一些实施方式中，修饰的核碱基是修饰的尿嘧啶。示例性的具有修饰的尿嘧啶的核碱基和核苷包括假尿苷 (ψ)、吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、6-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-尿苷 (s^2U)、4-硫代-尿苷 (s^4U)、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基-尿苷 (ho^5U)、5-氨基烯丙基-尿苷、5-卤代-尿苷 (例如，5-碘-尿苷或 5-溴-尿苷)、3-甲基-尿苷 (m^3U)、5-甲氧基-尿苷 (mo^5U)、尿苷-5-氧基乙酸 (cmo^5U)、尿苷-5-氧基乙酸甲酯 ($mcmo^5U$)、5-羧基甲基-尿苷 (cm^5U)、1-羧基甲基-假尿苷、5-羧基羟基甲基-尿苷 (chm^5U)、5-羧基羟基甲基-尿苷甲酯 ($mchm^5U$)、5-甲氧基羰基甲基-尿苷 (mcm^5U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代-尿苷 (mcm^5s^2U)、5-氨基甲基-2-硫代-尿苷 (nm^5s^2U)、5-甲基氨基甲基-尿苷 (mnm^5U)、5-甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷 (mnm^5s^2U)、5-甲基氨基甲基-2-硒代-尿苷 (mnm^5se^2U)、5-氨基甲酰基甲基-尿苷 (ncm^5U)、5-羧基甲基氨基甲基-尿苷 ($cmnm^5U$)、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷 ($cmnm^5s^2U$)、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-尿苷 (5-*taurinomethyl-uridine*) (τm^5U)、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷 (τm^5s^2U)、1-牛磺酸甲基-4-硫代-假尿苷、5-甲基-尿苷 (m^5U ，即具有核碱基脱氧胸腺嘧啶)、1-甲基-假尿苷 ($m^1\psi$)、5-甲基-2-硫代-尿苷 (m^5s^2U)、1-甲基-4-硫代-假尿苷 ($m^1s^4\psi$)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷 ($m^3\psi$)、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷 (D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿苷、5-甲基-二氢尿苷 (m^5D)、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基-尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基) 尿苷 (acp^3U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基) 假尿苷 ($acp^3\psi$)、5-(异戊烯基氨基甲基) 尿苷

(inm^5U)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代-尿苷($\text{inm}^5\text{s}^2\text{U}$)、 α -硫代-尿苷、2'-O-甲基-尿苷(Um)、5,2'-O-二甲基-尿苷(m^5Um)、2'-O-甲基-假尿苷(ψm)、2-硫代-2'-O-甲基-尿苷(s^2Um)、5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(mcm^5Um)、5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(ncm^5Um)、5-羧基甲基氨基甲基-2'-O-甲基-尿苷(cmnm^5Um)、3,2'-O-二甲基-尿苷(m^3Um)、和5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基-尿苷(inm^5Um)、1-硫代-尿苷、脱氧胸苷、2'-F-阿糖-尿苷(2'-F-ara-uridine)、2'-F-尿苷、2'-OH-阿糖-尿苷、5-(2-甲氧甲酰基乙烯基)尿苷(5-(2-carbomethoxyvinyl)uridine)和5-[3-(1-E-丙烯基氨基)尿苷。

[0413] 在一些实施方式中,修饰的核碱基是修饰的胞嘧啶。示例性的具有修饰的胞嘧啶的核碱基和核苷包括5-氮杂-胞苷、6-氮杂-胞苷、假异胞苷(pseudoisocytidine)、3-甲基-胞苷(m^3C)、N4-乙酰基-胞苷(ac^4C)、5-甲酰基-胞苷(f^5C)、N4-甲基-胞苷(m^4C)、5-甲基-胞苷(m^5C)、5-卤代-胞苷(例如5-碘-胞苷)、5-羟甲基-胞苷(hm^5C)、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷(s^2C)、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、泽布拉林(zebularine)、5-氮杂-泽布拉林、5-甲基-泽布拉林、5-氮杂-2-硫代-泽布拉林、2-硫代-泽布拉林、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、赖西丁(lysidine)(k_2C)、 α -硫代-胞苷、2'-O-甲基-胞苷(Cm)、5,2'-O-二甲基-胞苷(m^5Cm)、N4-乙酰基-2'-O-甲基-胞苷(ac^4Cm)、N4,2'-O-二甲基-胞苷(m^4Cm)、5-甲酰基-2'-O-甲基-胞苷(f^5Cm)、N4,N4,2'-O-三甲基-胞苷(m^4_2Cm)、1-硫代-胞苷、2'-F-阿糖-胞苷、2'-F-胞苷和2'-OH-阿糖-胞苷。

[0414] 在一些实施方式中,修饰的核碱基是修饰的腺嘌呤。示例性的具有修饰的腺嘌呤的核碱基和核苷包括2-氨基-嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-卤代-嘌呤(例如,2-氨基-6-氯-嘌呤)、6-卤代-嘌呤(例如,6-氯-嘌呤)、2-氨基-6-甲基-嘌呤、8-叠氮基-腺苷、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基-腺苷(m^1A)、2-甲基-腺嘌呤(m^2A)、N6-甲基-腺苷(m^6A)、2-甲硫基-N6-甲基-腺苷($\text{ms}^2\text{m}^6\text{A}$)、N6-异戊烯基-腺苷(i^6A)、2-甲硫基-N6-异戊烯基-腺苷($\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$)、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷(io^6A)、2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷($\text{ms}^2\text{io}^6\text{A}$)、N6-甘氨酸基氨基甲酰基-腺苷(g^6A)、N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷(t^6A)、N6-甲基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷($\text{m}^6\text{t}^6\text{A}$)、2-甲硫基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷($\text{ms}^2\text{g}^6\text{A}$)、N6,N6-二甲基-腺苷(m^6_2A)、N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基-腺苷(hn^6A)、2-甲硫基-N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基-腺苷($\text{ms}^2\text{hn}^6\text{A}$)、N6-乙酰基-腺苷(ac^6A)、7-甲基-腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、 α -硫代-腺苷、2'-O-甲基-腺苷(Am)、N6,2'-O-二甲基-腺苷(m^6Am)、N6,N6,2'-O-三甲基-腺苷(m^6_2Am)、1,2'-O-二甲基-腺苷(m^1Am)、2'-O-核糖基腺苷(磷酸酯)($\text{Ar}(\text{p})$)、2-氨基-N6-甲基-嘌呤、1-硫代-腺苷、8-叠氮基-腺苷、2'-F-阿糖-腺苷、2'-F-腺苷、2'-OH-阿糖-腺苷和N6-(19-氨基-五氧杂十九烷基)-腺苷。

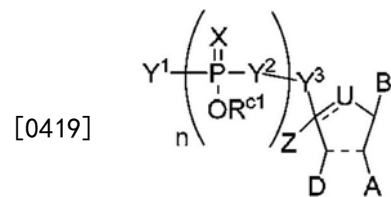
[0415] 在一些实施方式中,修饰的核碱基是修饰的鸟嘌呤。示例性的具有修饰的鸟嘌呤的核碱基和核苷包括肌苷(I)、1-甲基-肌苷(m^1I)、 γ 苷(wyosine)(imG)、甲基 γ 苷(mimG)、4-脱甲基- γ 苷(imG-14)、异 γ 苷(imG2)、怀丁苷(yW)、过氧怀丁苷(o_2yW)、羟基怀丁苷(OHyW)、修饰不完全的(undermodified)羟基怀丁苷(OHyW^*)、7-脱氮-鸟苷、薜苷

(queuosine) (Q)、环氧癸苷(oQ)、半乳糖基-癸苷(galQ)、甘露糖基-癸苷(manQ)、7-氰基-7-脱氮-鸟苷(preQ₀)、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟苷(preQ₁)、古嘌呤(G⁺)、7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷(m⁷G)、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基-肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基-鸟苷(m¹G)、N²-甲基-鸟苷(m²G)、N²,N²-二甲基-鸟苷(m^{2,2}G)、N²,7-二甲基-鸟苷(m^{2,7}G)、N²,N²,7-二甲基-鸟苷(m^{2,2,7}G)、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N²-甲基-6-硫代-鸟苷、N²,N²-二甲基-6-硫代-鸟苷、α-硫代-鸟苷、2'-O-甲基-鸟苷(Gm)、N²-甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m²Gm)、N²,N²-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m^{2,2}Gm)、1-甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m¹Gm)、N²,7-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷(M^{2,7}Gm)、2'-O-甲基-肌苷(Im)、1,2'-O-二甲基-肌苷(m¹Im)、2'-O-核糖基鸟苷(磷酸酯)(Gr(p))、1-硫代-鸟苷、06-甲基-鸟苷、2'-F-阿糖-鸟苷和2'-F-鸟苷。

[0416] 在一些实施方式中,可以在大沟面上对核苷酸进行修饰。例如,这样的修饰包括用烷基(例如甲基)或卤素替代尿嘧啶或胞嘧啶的C-5上的氢。


[0417] 核苷酸的核碱基可以独立地选自嘌呤、嘧啶、嘌呤或嘧啶的类似物。例如,核碱基可以各自独立地选自腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶或次黄嘌呤。在另一个实施方式中,核碱基也可以包括例如天然存在的和合成的碱基衍生物,包括吡唑并[3,4-d]嘧啶,5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物,2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶,6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫代尿嘧啶,8-卤代(例如8-溴)、8-氨基、8-巯基、8-硫代烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代(特别是5-溴)、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤,脱氮鸟嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,3-脱氮鸟嘌呤,脱氮腺嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,3-脱氮腺嘌呤,吡唑并[3,4-d]嘧啶,咪唑并[1,5-a]1,3,5三嗪酮,9-脱氮嘌呤,咪唑并[4,5-d]吡嗪,噻唑并[4,5-d]嘧啶,吡嗪-2-酮,1,2,4-三嗪,哒嗪和1,3,5三嗪。当核苷酸使用简写A、G、C、T或U描述时,每个字母是指代表性的碱基和/或其衍生物,例如,A包括腺嘌呤或腺嘌呤类似物,例如7-脱氮腺嘌呤)。


[0418] 在一些实施方式中,修饰的核苷酸是式XI的化合物:






XI

[0420] 其中:

[0421]  表示单键或双键;

[0422]  表示任意的单键;

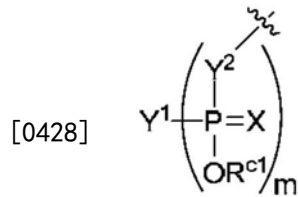
[0423] 当  表示单键时,U是O、S、-NR^a-、或-CR^aR^b-、或当  表示双键时,U是-CR^a-;

[0424] Z是H、C₁₋₁₂烷基或C₆₋₂₀芳基,或者当  表示双键时,Z不存在;和

[0425] Z可以是-CR^aR^b-并与A形成键;

[0426] A是H;OH;NHR,其中R=烷基或芳基;或磷酰基;硫酸酯(sulfate);-NH₂;N₃;叠氮基;-SH;N氨基酸;或包括1至12个氨基酸的肽;

[0427] D是H;OH;NHR,其中R=烷基或芳基;或磷酰基;-NH₂;-SH;氨基酸;包括1至12个氨基酸的肽;或式XII的基团:



XII

[0429] 或A和D与它们所连接的碳原子一起形成5元环;

[0430] X是O或S;

[0431] 每个Y¹独立地选自-OR^{a1}、-NR^{a1}R^{b1}和-SR^{a1};

[0432] 每个Y²和Y³独立地选自O、-CR^aR^b、-NR^c、S或包含一个或多个选自C、O、N和S的原子的连接体;

[0433] n是0、1、2或3;

[0434] m是0、1、2或3;

[0435] B是核碱基;

[0436] R^a和R^b各自独立地是H、C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、C₂₋₁₂炔基、或C₆₋₂₀芳基;

[0437] R^c是H、C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、苯基、苄基、聚乙二醇基团、或氨基-聚乙二醇基团;

[0438] R^{a1}和R^{b1}各自独立地是H或反离子;和

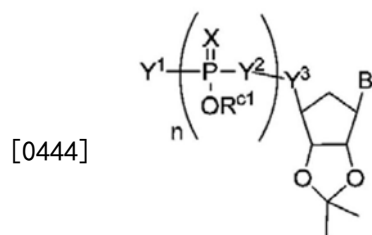
[0439] -OR^{c1}在pH约为1时是OH,或-OR^{c1}在生理pH下是O⁻;

[0440] 前提条件是包括变量A、B、D、U、Z、Y²和Y³的环不能是核糖。

[0441] 在一些实施方式中,B是选自胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤和尿嘧啶的核碱基。

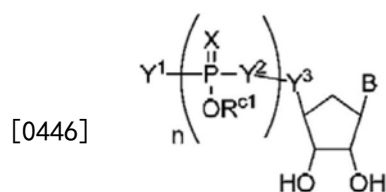
[0442] 在一些实施方式中,核碱基是嘧啶或其衍生物。

[0443] 在一些实施方式中,修饰的核苷酸是式XI-a的化合物:



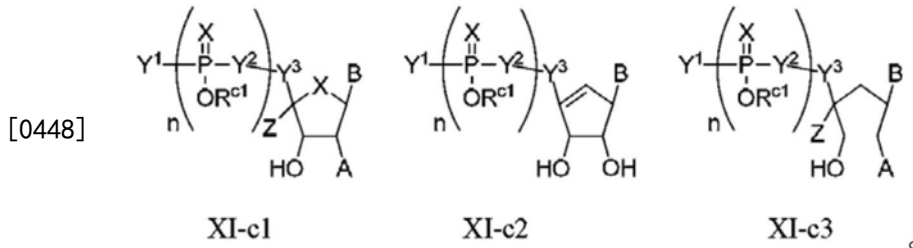
XI-a

[0445] 在一些实施方式中,修饰的核苷酸是式XI-b的化合物:

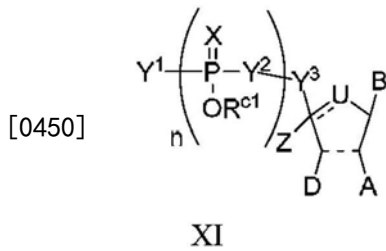


XI-b

[0447] 在一些实施方式中,修饰的核苷酸是式XI-c1、XI-c2或XI-c3的化合物:



[0449] 在一些实施方式中,修饰的核苷酸是式XI的化合物:



[0451] 其中:

[0452] \diagdown 表示单键或双键;

[0453] ---表示任意的单键;

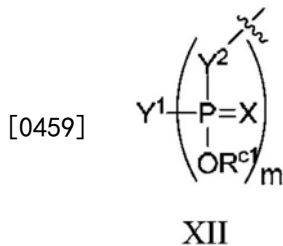
[0454] 当 \diagdown 表示单键时,U是O、S、-NR^a-或-CR^aR^b-,或当 \diagdown 表示双键时,U是-CR^a-;

[0455] Z是H、C₁₋₁₂烷基或C₆₋₂₀芳基,或者当 \diagdown 表示双键时,Z不存在;和

[0456] Z可以是-CR^aR^b-并与A形成键;

[0457] A是H、OH、硫酸酯、-NH₂、-SH、氨基酸、或包括1至12个氨基酸的肽;

[0458] D是H、OH、-NH₂、-SH、氨基酸、包括1至12个氨基酸的肽、或式XII的基团:



[0460] 或A和D与它们所连接的碳原子一起形成5元环;

[0461] X是O或S;

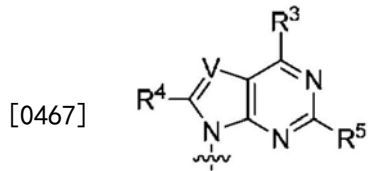
[0462] 每个Y¹独立地选自-OR^{a1}、-NR^{a1}R^{b1}和-SR^{a1};

[0463] 每个Y²和Y³独立地选自O、-CR^aR^b、-NR^c、S、或包括一个或多个选自C、O、N和S的原子
的连接体;

[0464] n是0、1、2或3;

[0465] m是0、1、2或3;

[0466] B是式XIII的核碱基:



XIII

[0468] 其中：

[0469] V是N或带正电荷的NR^c；

[0470] R³是NR^cR^d、-OR^a或-SR^a；

[0471] R⁴是H或可以任选地与Y³形成键；

[0472] R⁵是H、-NR^cR^d或-OR^a；

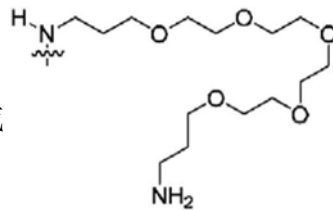
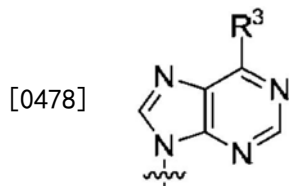
[0473] R^a和R^b各自独立地是H、C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、C₂₋₁₂炔基、或C₆₋₂₀芳基；

[0474] R^c是H、C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、苯基、苄基、聚乙二醇基团、或氨基-聚乙二醇基团；

[0475] R^{a1}和R^{b1}各自独立地是H或反离子；和

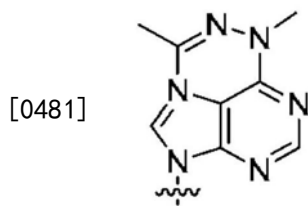
[0476] -OR^{c1}在pH约为1时是OH，或-OR^{c1}在生理pH下是O⁻。

[0477] 在一些实施方式中，B是：

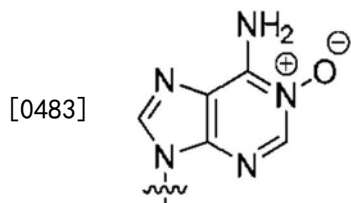


[0479] 其中R³是-OH、-SH或

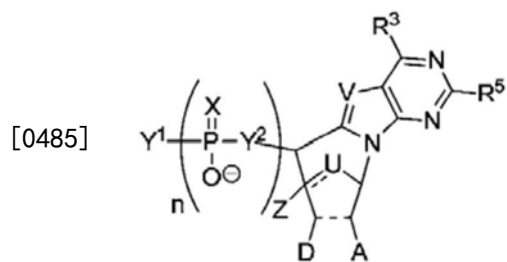
[0480] 在一些实施方式中，B是：



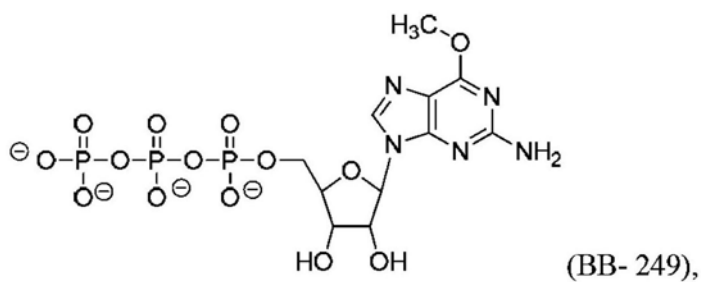
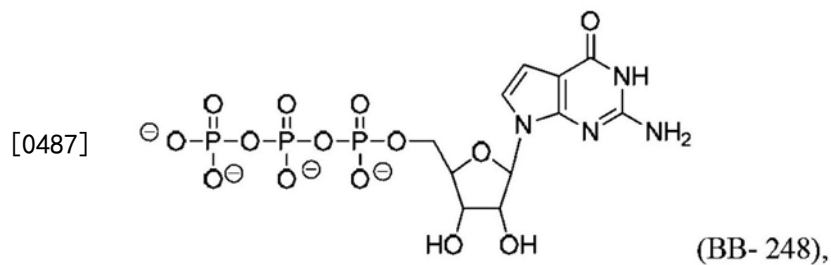
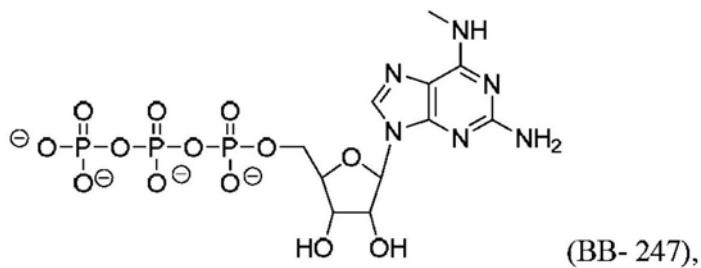
[0482] 在一些实施方式中，B是：

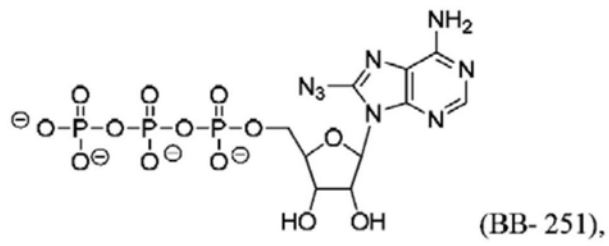
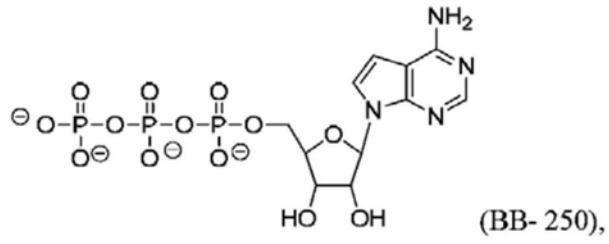


[0484] 在一些实施方式中，修饰的核苷酸是式I-d的化合物：

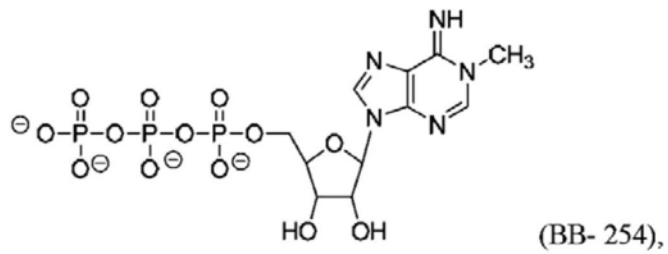
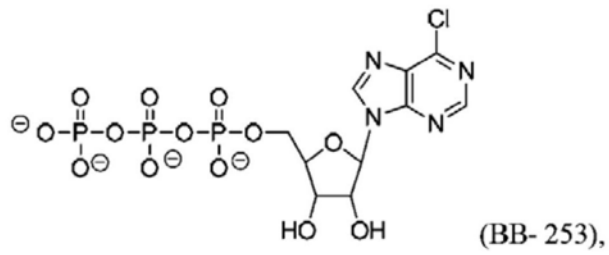
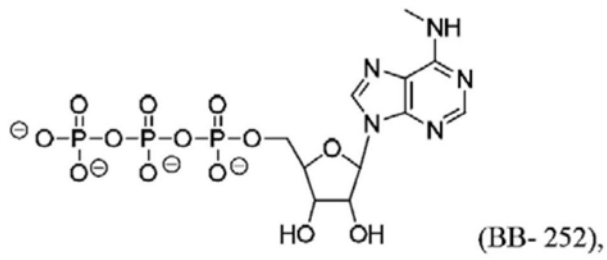


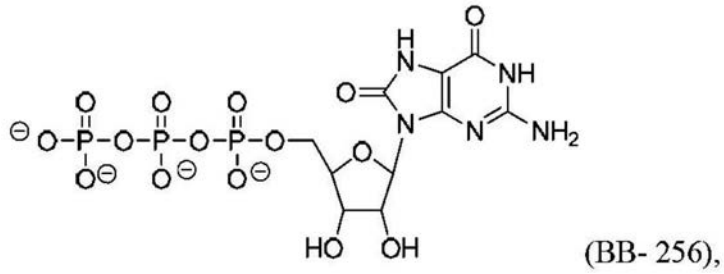
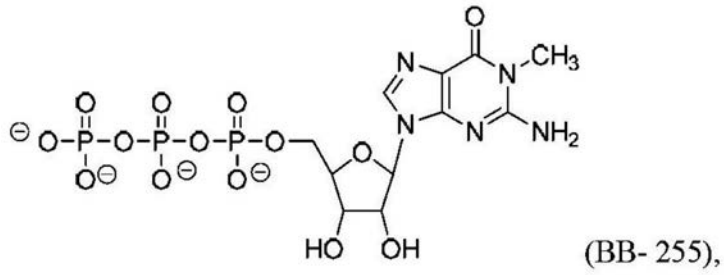
[0486] 在一些实施方式中,修饰的核苷酸是选自下列的化合物或其药学上可接受的盐:



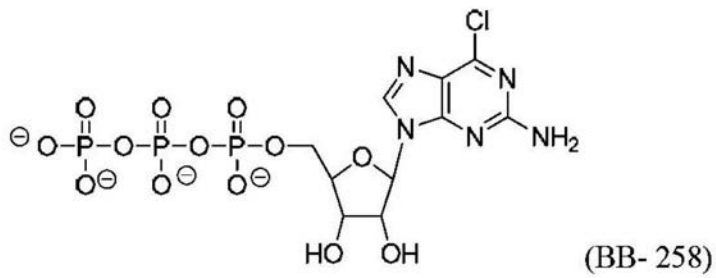
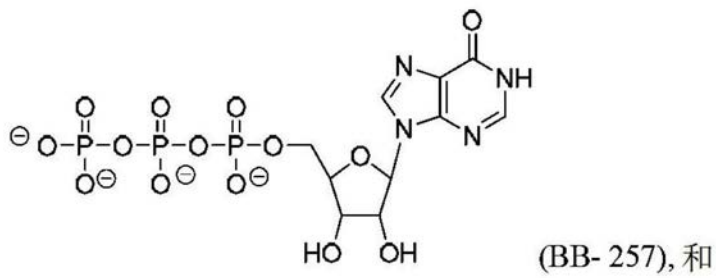


[0488]



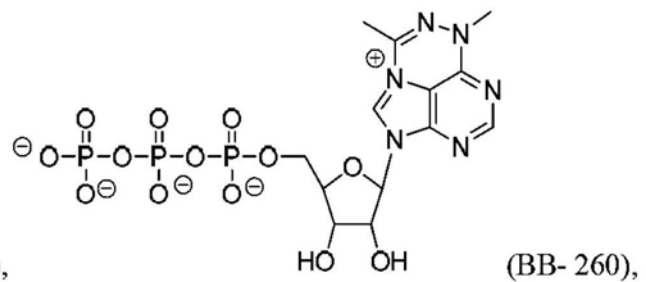
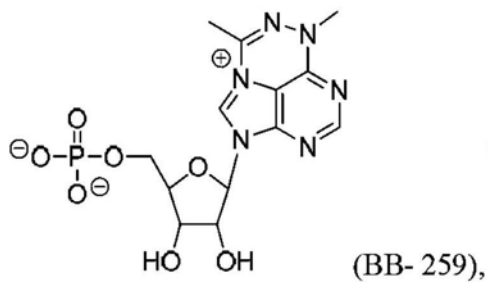


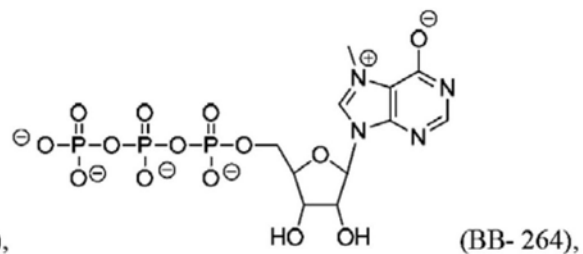
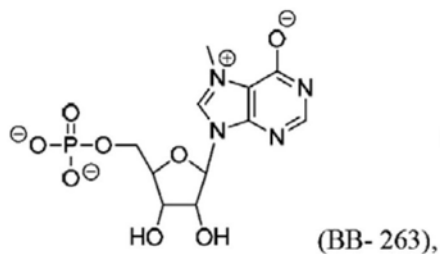
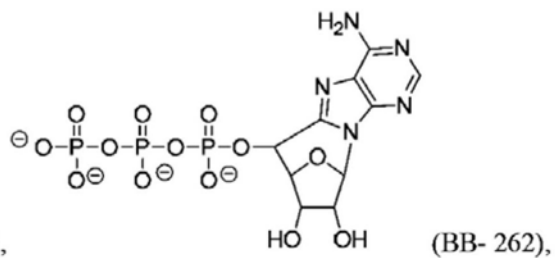
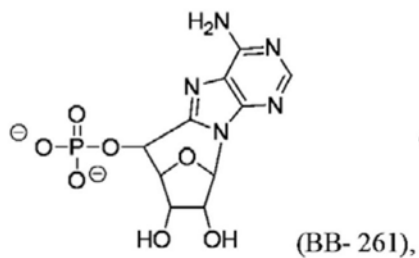
[0489]



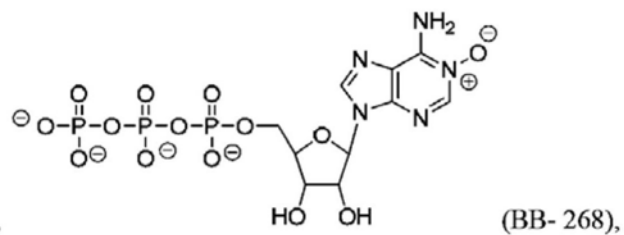
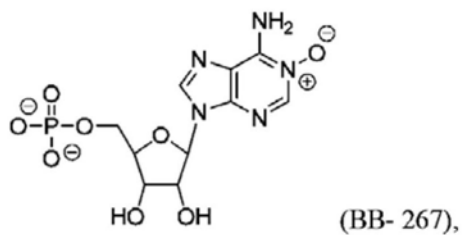
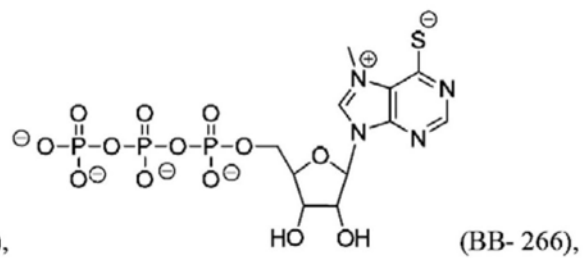
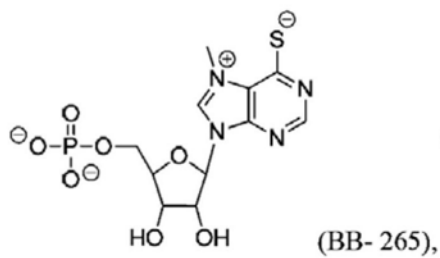
[0490] 在一些实施方式中, 修饰的核苷酸是选自下列的化合物或其药学上可接受的盐:

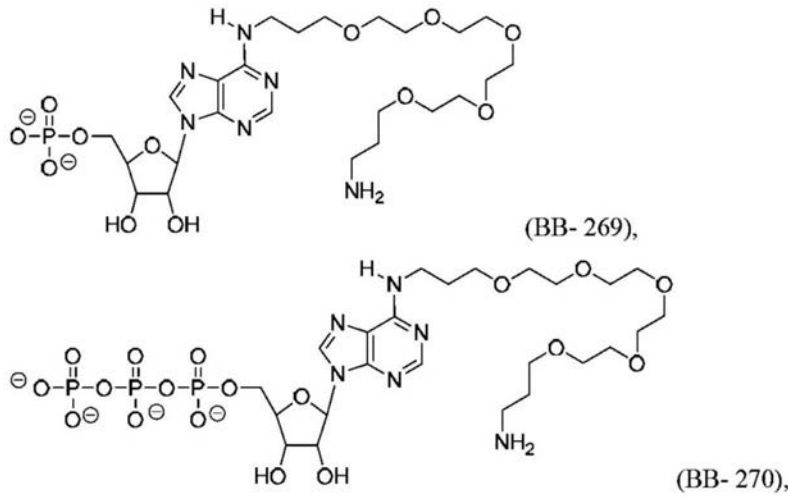
[0491]



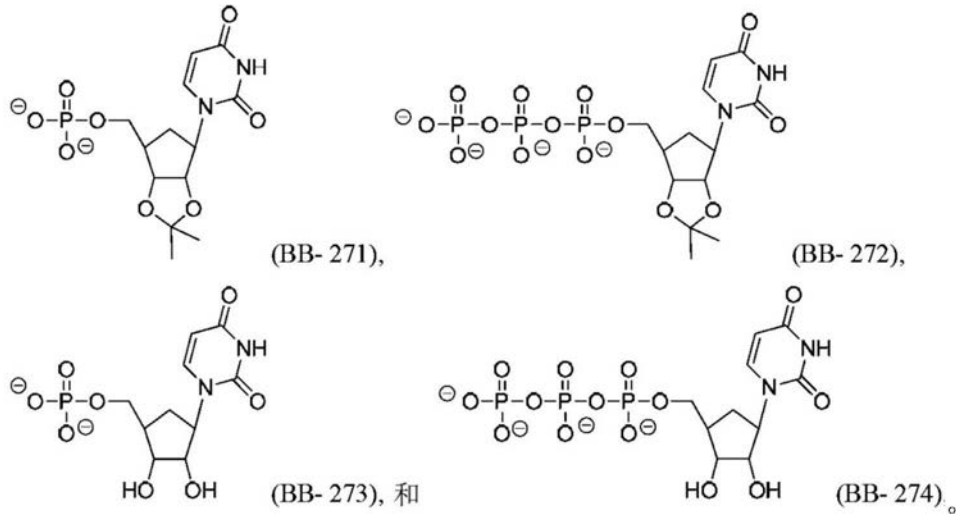


[0492]





[0493]



[0494] 在核苷间的连接上的修饰

[0495] 可被渗入到多核苷酸分子中的修饰的核苷酸可以在核苷间的连接(例如,磷酸酯主链)上进行修饰。本文中,在多核苷酸主链的背景下,短语“磷酸酯(phosphate)”和“磷酸二酯(phosphodiester)”可互换使用。可以通过用不同的取代基替代一个或多个氧原子对主链磷酸酯基团进行修饰。另外,修饰的核苷和核苷酸可包括用本文所述的另一核苷间的连接大规模地替代未修饰的磷酸酯部分。修饰的磷酸酯基团的实例包括但不限于硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenates)、硼烷磷酸酯、硼烷磷酸酯类(boranophosphate esters)、氢膦酸酯、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯(phosphorodiamidates)、烷基或芳基磷酸酯、和磷酸三酯。二硫代磷酸酯使两个非连接氧被硫替代。磷酸酯连接体也可以通过用氮(桥接的氨基磷酸酯)、硫(桥接的硫代磷酸酯)和碳(桥接的亚甲基-磷酸酯)替代连接氧进行修饰。

[0496] 提供 α -硫代取代的磷酸酯部分以通过非天然的硫代磷酸酯主链连接赋予RNA和DNA聚合物稳定性。硫代磷酸酯DNA和RNA在细胞环境中具有增加的核酸酶抗性并随后具有较长的半衰期。尽管不希望受到理论的束缚,预期硫代磷酸酯连接的多核苷酸分子通过细胞先天免疫分子的较弱的结合/激活也减少了先天免疫应答。

[0497] 在具体的实施方式中,修饰的核苷包含 α -硫代-核苷(例如,5'-0-(1-硫代磷酸酯)-腺苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-胞苷(α -硫代-胞苷)、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-鸟苷、5'-0-

(1-硫代磷酸酯)-尿苷、或5'-O-(1-硫代磷酸酯)-假尿苷)。

[0498] 根据本发明可以应用的其它核苷间的连接,包括不包含磷原子的核苷间的连接,如下文所述。

[0499] 修饰的糖、核碱基和核苷间的连接的组合

[0500] 本发明的多核苷酸可以包括对糖、核碱基、和/或核苷间的连接的修饰的组合。这些组合可以包括本文所述的任何一种或多种修饰。例如,本文所述的在式(Ia)、(Ia-1)-(Ia-3)、(Ib)-(If)、(IIa)-(IIp)、(IIb-1)、(IIb-2)、(IIc-1)-(IIc-2)、(IIn-1)、(IIn-2)、(IVa)-(IV1)和(IXa)-(IXr)中的任何核苷酸可以与本文所述的任何核碱基(例如,在式(b1)-(b43)中的核碱基或本文所述的任何其它核碱基的)组合。

[0501] 多核苷酸分子的合成

[0502] 用于根据本发明的用途的多核苷酸分子可以根据如本文所述的任何可用的技术进行制备。在本文所公开的多核苷酸分子的合成中使用的修饰的核苷和核苷酸可以从易得的起始原料使用下列常规方法和程序来制备。在提供了典型的或优选的工艺条件(如反应温度、时间、反应物的摩尔比、溶剂、压力等)的地方,本领域技术人员将能够优化和开发另外的工艺条件。最佳反应条件可随所用的特定的反应物或溶剂而变化,但这些条件可以由本领域技术人员通过常规的优化程序来确定。

[0503] 本文所述的方法可以根据本领域中已知的任何合适的方法进行监测。例如,可以通过光谱手段,如核磁共振光谱法(例如 ^1H 或 ^{13}C)、红外光谱法、分光光度法(例如UV-可见光的)或质谱法;或者通过色谱法,如高效液相色谱法(HPLC)或薄层色谱法监测产物的形成。

[0504] 本发明的多核苷酸分子的制备可以包括各种化学基团的保护和脱保护。本领域技术人员可以容易地确定对保护和脱保护的需要以及对适当的保护基团的选择。保护基团的化学反应(chemistry)可以参见例如Greene等人,Protective Groups in Organic Synthesis,第二版,Wiley&Sons,1991,其以引用的方式整体并入本文。

[0505] 本文所述的方法的反应可在合适的溶剂中进行,有机合成领域的技术人员可以容易地选择出合适的溶剂。合适的溶剂可以在反应所进行的温度(即溶剂的冻结温度至溶剂的沸腾温度范围内的温度)下与起始原料(反应物)、中间体或产物基本上不反应。给定的反应可在一种溶剂或多于一种溶剂的混合物中进行。依据特定的反应步骤,可以为特定的反应步骤选择合适的溶剂。

[0506] 可以通过本领域中已知的众多方法中的任何方法进行修饰的多核苷酸或核酸(例如,多核苷酸或修饰的mRNA分子)的外消旋混合物的拆分。一个示例方法包括使用“手性拆分酸”的分步重结晶,所述手性拆分酸是具有旋光性的成盐有机酸。适合用于分步重结晶方法的拆分剂是例如具有旋光性的酸,如D型和L型的酒石酸、二乙酰基酒石酸、二苯甲酰基酒石酸、扁桃酸、苹果酸、乳酸或各种具有旋光性的樟脑磺酸。外消旋混合物的拆分也可以通过在用具有旋光性的拆分剂(例如二硝基苯甲酰基苯基甘氨酸)填充的柱上洗脱来进行。本领域技术人员可以确定合适的洗脱溶剂组成。

[0507] 可以根据在以下文献中描述的合成方法制备修饰的核苷和核苷酸(例如,构建块分子): Ogata等人, J. Org. Chem. 74:2585-2588 (2009); Purmal等人, Nucl. Acids Res. 22(1):72-78, (1994); Fukuhara等人, Biochemistry, 1(4):563-568 (1962); 和 Xu等人, Tetrahedron, 48(9):1729-1740 (1992), 这些文献中的每一个均以引用的方式整体并入本

文。

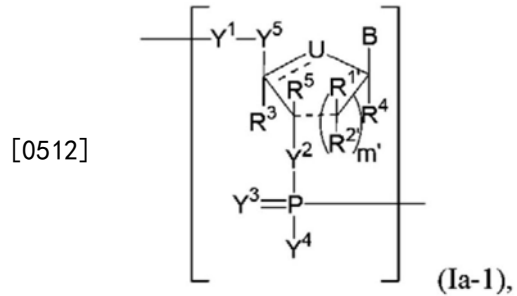
[0508] 可以沿着分子的整个长度对本发明的多核苷酸进行均匀的修饰 (uniformly modified) 或不均匀的修饰。例如,可以在本发明的多核苷酸中或其给定的预定序列区域中对一种或多种或所有类型的核苷酸 (例如嘌呤或嘧啶、或A、G、U、C中的任何一种或多种或全部) 进行均匀的修饰或不均匀的修饰。在一些实施方式中,对本发明的多核苷酸 (或其给定的序列区域) 中的所有的核苷酸X进行修饰,其中X可以是核苷酸A、G、U、C中的任何一个或组合A+G、A+U、A+C、G+U、G+C、U+C、A+G+U、A+G+C、G+U+C或A+G+C中的任何一个。

[0509] 在多核苷酸中的不同位置上可以存在不同的糖修饰、核苷酸修饰和/或核苷间的连接 (例如,主链结构)。本领域普通技术人员会理解,核苷酸类似物或其它的一种或多种修饰可以位于多核苷酸的任何一个或多个位置上,使得多核苷酸的功能基本上不降低。修饰也可以是5'或3'末端的修饰。多核苷酸可含有约1%至约100%的修饰的核苷酸 (相对于总体核苷酸含量或相对于一种或多种类型的核苷酸,即A、G、U或C中的任何一种或多种) 或任何中间百分比 (例如,1%至20%、1%至25%、1%至50%、1%至60%、1%至70%、1%至80%、1%至90%、1%至95%、10%至20%、10%至25%、10%至50%、10%至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至95%、10%至100%、20%至25%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至95%、20%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至95%、50%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至95%、70%至100%、80%至90%、80%至95%、80%至100%、90%至95%、90%至100%和95%至100%)。

[0510] 在一些实施方式中,多核苷酸包括修饰的嘧啶 (例如,修饰的尿嘧啶/尿苷/U或修饰的胞嘧啶/胞苷/C)。在一些实施方式中,多核苷酸分子中的尿嘧啶或尿苷 (统称为U) 可以被约1%至约100%的修饰的尿嘧啶或修饰的尿苷 (例如,1%至20%、1%至25%、1%至50%、1%至60%、1%至70%、1%至80%、1%至90%、1%至95%、10%至20%、10%至25%、10%至50%、10%至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至95%、10%至100%、20%至25%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至95%、20%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至95%、50%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至95%、70%至100%、80%至90%、80%至95%、80%至100%、90%至95%、90%至100%、和95%至100%的修饰的尿嘧啶或修饰的尿苷) 替代。修饰的尿嘧啶或尿苷可被具有单个独特的结构的化合物或被具有不同结构 (例如,如本文所述的,2、3、4或更多个独特结构) 的多个化合物替代。在一些实施方式中,多核苷酸分子中的胞嘧啶或胞苷 (统称为C) 可以被约1%至约100%的修饰的胞嘧啶或修饰的胞苷 (例如,1%至20%、1%至25%、1%至50%、1%至60%、1%至70%、1%至80%、1%至90%、1%至95%、10%至20%、10%至25%、10%至50%、10%至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至95%、10%至100%、20%至25%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至95%、20%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至95%、50%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至95%、70%至100%、80%至90%、80%至95%、80%至100%、90%至95%、90%至100%、和95%至100%的修饰的胞嘧啶或修饰的胞苷) 替代。修饰的胞嘧啶或胞苷可被具有单个独特结构的化合物或被具有不同结构 (例如,如本文所述的,2、3、4或更多个独特结构) 的多个化

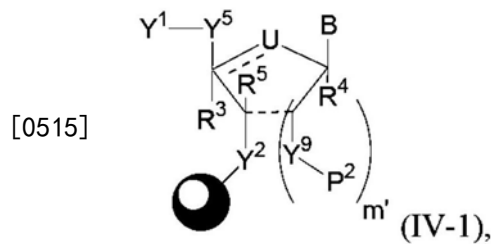
合物替代。

[0511] 在一些实施方式中,本发明提供了合成包括n个连接的具有式(Ia-1)的核苷的多核苷酸(例如,第一区域、第一侧翼区或第二侧翼区)的方法:

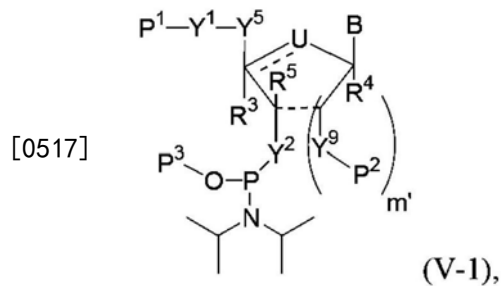


[0513] 所述方法包括:

[0514] a) 使式(IV-1)的核苷酸:

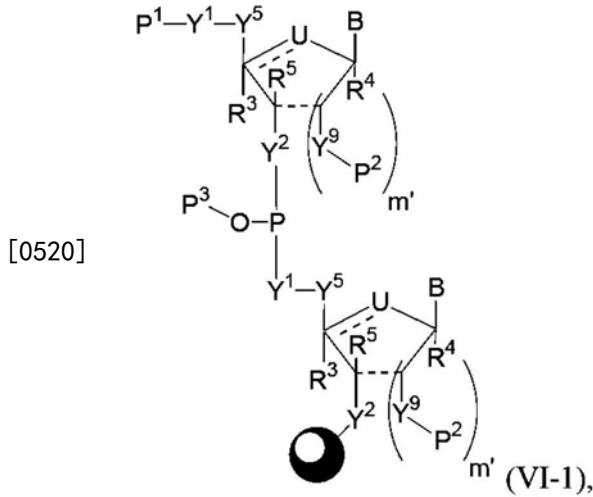


[0516] 与式(V-1)的亚磷酰胺化合物反应

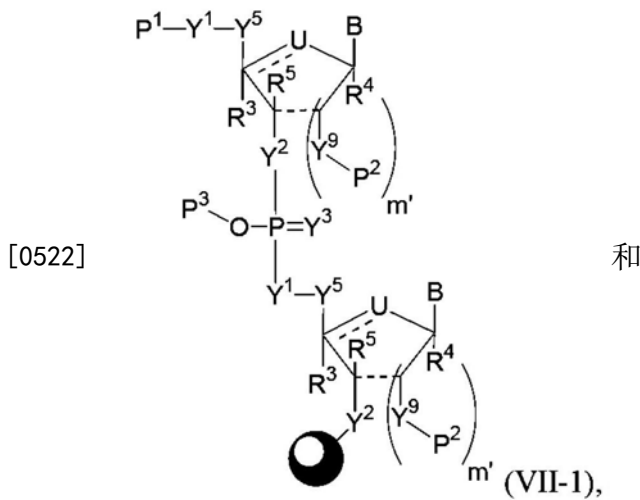


[0518] 其中, Y⁹是H、羟基、磷酰基、焦磷酸酯、硫酸酯、氨基、巯基、任选取代的氨基酸、或肽(例如,包括2至12个氨基酸);和每个P¹、P²和P³独立地是合适的保护基团;和●表示固相支持物;

[0519] 以获得式(VI-1)的多核苷酸:



[0521] b) 氧化或硫化式 (V) 的多核苷酸以得到式 (VII-1) 的多核苷酸:



[0523] c) 去除保护基团以得到式 (Ia) 的多核苷酸。

[0524] 在一些实施方式中,步骤a)和b)被重复1至约10,000次。在一些实施方式中,方法还包含选自A、C、G和U腺苷、胞嘧啶、鸟苷和尿嘧啶的核苷酸。在一些实施方式中,核碱基可以是嘧啶或其衍生物。在一些实施方式中,多核苷酸是可翻译的。

[0525] 多核苷酸的其它组分是可选的,并在一些实施方式中是有益的。例如,提供了5'非翻译区(UTR)和/或3'UTR,其中任何一个或这两个区域都可以独立地含有一个或多个不同的核苷酸修饰。在这样的实施方式中,核苷酸修饰也可以存在于可翻译区。还提供了含有Kozak序列的多核苷酸。

[0526] 核苷酸的组合

[0527] 在下面表2中提供了修饰的核苷酸和修饰的核苷酸的组合的更多实例。这些修饰的核苷酸的组合可用于形成本发明的多核苷酸。除非另有说明,修饰的核苷酸可以完全代替本发明的多核苷酸的天然核苷酸。作为非限制性实例,天然核苷酸尿苷可被本文所述的修饰的核苷取代。在另一个非限制性的实例中,天然核苷酸尿苷可以被本文所述的修饰的核苷中的至少一种部分地取代(例如,约0.1%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99.9%)。

[0528] 表2

[0529]

<u>修饰的核苷酸</u>	<u>修饰的核苷酸的组合</u>
α -硫代-胞苷	α -硫代-胞苷/5-碘-尿苷
	α -硫代-胞苷/N1-甲基-假尿苷
	α -硫代-胞苷/ α -硫代-尿苷

[0530]

	α -硫代-胞苷/5-甲基-尿苷
	α -硫代-胞苷/假尿苷
	约 50%的胞嘧啶是 α -硫代-胞苷
假异胞苷	假异胞苷/5-碘-尿苷
	假异胞苷/N1-甲基-假尿苷
	假异胞苷/ α -硫代-尿苷
	假异胞苷/5-甲基-尿苷
	假异胞苷/假尿苷
	约 25%的胞嘧啶是假异胞苷
	假异胞苷/约 50%的尿苷是 N1-甲基-假尿苷和约 50%的尿苷是假尿苷
	假异胞苷/约 25%的尿苷是 N1-甲基-假尿苷和约 25%的尿苷是假尿苷 (例如, 25% N1-甲基-假尿苷/75%假尿苷)
吡咯并-胞苷	吡咯并-胞苷/5-碘-尿苷
	吡咯并-胞苷/N1-甲基-假尿苷
	吡咯并-胞苷/ α -硫代-尿苷
	吡咯并-胞苷/5-甲基-尿苷
	吡咯并-胞苷/假尿苷
	约 50%的胞嘧啶是吡咯并-胞苷
5-甲基-胞苷	5-甲基-胞苷/5-碘-尿苷
	5-甲基-胞苷/N1-甲基-假尿苷
	5-甲基-胞苷/ α -硫代-尿苷
	5-甲基-胞苷/5-甲基-尿苷
	5-甲基-胞苷/假尿苷
	约 25%的胞嘧啶是 5-甲基-胞苷
	约 50%的胞嘧啶是 5-甲基-胞苷
	5-甲基-胞苷/5-甲氧基-尿苷
	5-甲基-胞苷/5-溴-尿苷

[0531]

	5-甲基-胞苷/2-硫代-尿苷
	5-甲基-胞苷/约 50%的尿苷是 2-硫代-尿苷
	约 50%的尿苷是 5-甲基-胞苷/约 50%的尿苷是 2-硫代-尿苷
N4-乙酰基-胞苷	N4-乙酰基-胞苷 /5-碘-尿苷
	N4-乙酰基-胞苷 /N1-甲基-假尿苷
	N4-乙酰基-胞苷 / α -硫代-尿苷
	N4-乙酰基-胞苷 /5-甲基-尿苷
	N4-乙酰基-胞苷 /假尿苷
	约 50%的胞嘧啶是 N4-乙酰基-胞苷
	约 25%的胞嘧啶是 N4-乙酰基-胞苷
	N4-乙酰基-胞苷 /5-甲氧基-尿苷
	N4-乙酰基-胞苷 /5-溴-尿苷
	N4-乙酰基-胞苷 /2-硫代-尿苷
	约 50%的胞嘧啶是 N4-乙酰基-胞苷/约 50%的尿苷是 2-硫代-尿苷
	苷

[0532] 本发明的发明人已经探索了某些修饰的核苷酸和核苷酸组合。这些结果公开于美国临时申请号61/404,413,其提交于2010年10月1日,名称为Engineered Nucleic Acids and Methods of Use Thereof(工程核酸及其使用方法);美国专利申请号13/251,840,其提交于2011年10月3日,名称为Modified Nucleotides,and Nucleic Acids,and Uses Thereof(修饰的核苷酸和核酸及其用途),现已被放弃;美国专利申请号13/481,127,其提交于2012年5月25日,名称为Modified Nucleotides,and Nucleic Acids,and Uses Thereof(修饰的核苷酸和核酸及其用途);国际专利公开号W02012045075,其提交于2011年10月3日,名称为Modified Nucleosides,Nucleotides,And Nucleic Acids,and Uses Thereof(修饰的核苷、核苷酸和核酸及其用途);美国专利公开号US20120237975,其提交于2011年10月3日,名称为Engineered Nucleic Acids and Method of Use Thereof(工程核酸及其使用方法);以及国际专利公开号W02012045082,上述文献以引用的方式整体并入本文。

[0533] 下面表3中提供了修饰的核苷酸的组合的更多实例。这些修饰的核苷酸的组合可用于形成本发明的多核苷酸。

[0534] 表3

[0535]

修饰的核苷酸	修饰的核苷酸的组合
具有一个或多个式(b10)的核碱基的修饰的胞苷	具有(b10)的修饰的胞苷/假尿苷
	具有(b10)的修饰的胞苷/N1-甲基-假尿苷
	具有(b10)的修饰的胞苷/5-甲氧基-尿苷
	具有(b10)的修饰的胞苷/5-甲基-尿苷
	具有(b10)的修饰的胞苷/5-溴-尿苷
	具有(b10)的修饰的胞苷/2-硫代-尿苷
	约 50%的用修饰的胞苷(b10)取代的胞苷/约 50%的尿苷是 2-硫代-尿苷
具有一个或多个式(b32)的核碱基的修饰的胞苷	具有(b32)的修饰的胞苷/假尿苷
	具有(b32)的修饰的胞苷/N1-甲基-假尿苷
	具有(b32)的修饰的胞苷/5-甲氧基-尿苷
	具有(b32)的修饰的胞苷/5-甲基-尿苷
	具有(b32)的修饰的胞苷/5-溴-尿苷
	具有(b32)的修饰的胞苷/2-硫代-尿苷
	约 50%的用修饰的胞苷(b32)取代的胞苷/约 50%的尿苷是 2-硫代-尿苷
具有一个或多个式(b1)的核碱基的修饰的尿苷	具有(b1)的修饰的尿苷/N4-乙酰基-胞苷
	具有(b1)的修饰的尿苷/5-甲基-胞苷
具有一个或多个式(b8)的核碱基的修饰的尿苷	具有(b8)的修饰的尿苷/N4-乙酰基-胞苷
	具有(b8)的修饰的尿苷/5-甲基-胞苷
具有一个或多个式(b28)的核碱基的修饰的尿苷	具有(b28)的修饰的尿苷/N4-乙酰基-胞苷
	具有(b28)的修饰的尿苷/5-甲基-胞苷
具有一个或多个式(b29)的核碱基的修饰的尿苷	具有(b29)的修饰的尿苷/N4-乙酰基-胞苷
	具有(b29)的修饰的尿苷/5-甲基-胞苷
具有一个或多个式(b30)的核碱基的修饰的尿苷	具有(b30)的修饰的尿苷/N4-乙酰基-胞苷
	具有(b30)的修饰的尿苷/5-甲基-胞苷

[0536] 在一些实施方式中,至少25%的胞嘧啶被式(b10) - (b14)、(b24)、(b25)或(b32) - (b35)的化合物替代(例如,至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约

85%、至少约90%、至少约95%或约100%的例如式 (b10) 或 (b32) 的化合物)。

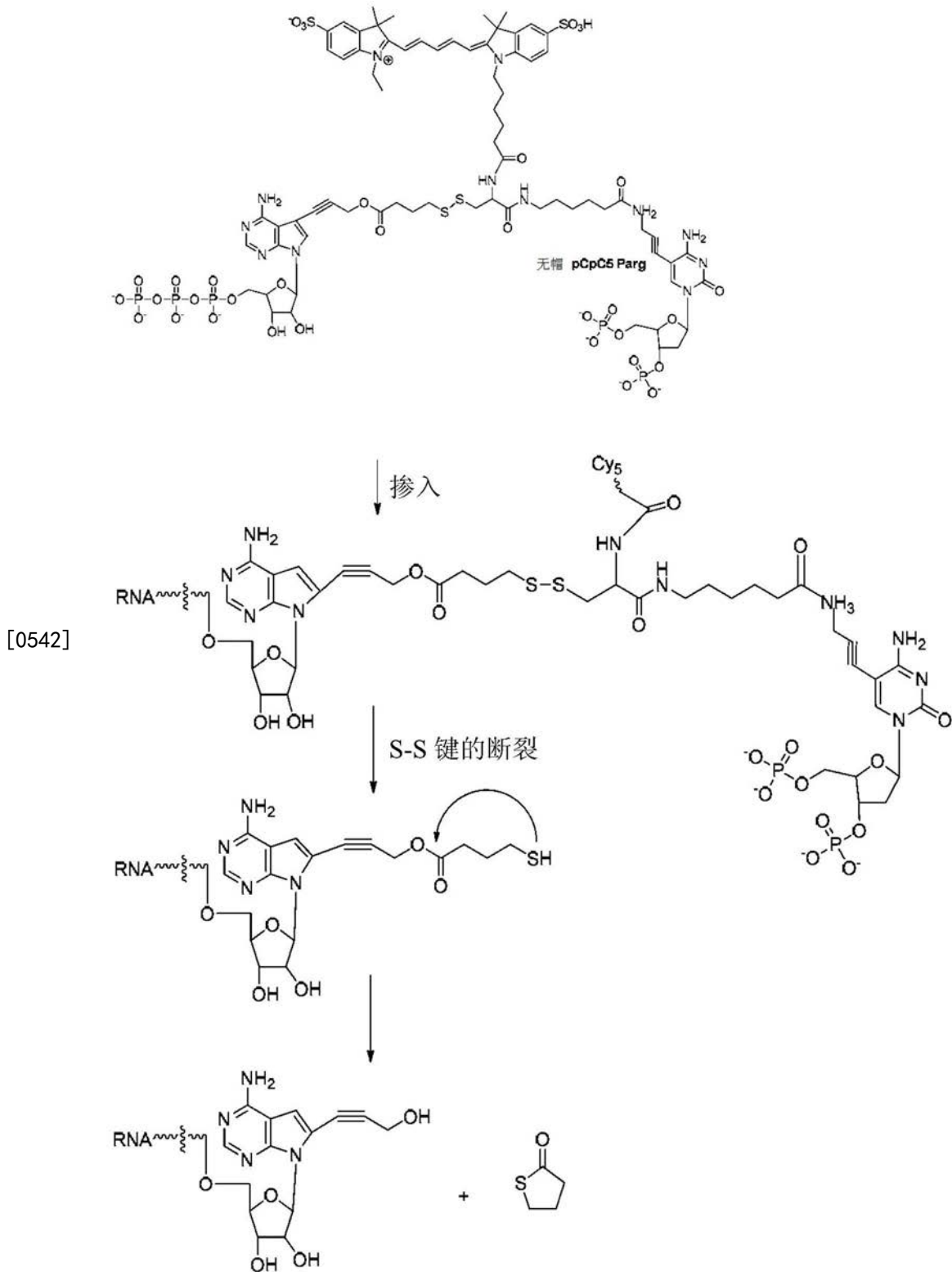
[0537] 在一些实施方式中,至少25%的尿嘧啶被式 (b1) - (b9)、(b21) - (b23) 或 (b28) - (b31) 的化合物替代(例如,至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%的例如式 (b1)、(b8)、(b28)、(b29) 或 (b30) 的化合物)。

[0538] 在一些实施方式中,至少25%的胞嘧啶被式 (b10) - (b14)、(b24)、(b25) 或 (b32) - (b35) (例如,式 (b10) 或 (b32)) 的化合物替代,并且至少25%的尿嘧啶被式 (b1) - (b9)、(b21) - (b23) 或 (b28) - (b31) (例如,式 (b1)、(b8)、(b28)、(b29) 或 (b30)) 的化合物替代(例如,至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%)。

[0539] 包括连接体和有效负载的修饰

[0540] 核苷酸的核碱基可以在化学上适当的任何位置共价连接于有效负载,例如可检测剂或治疗剂。例如,核碱基可以是脱氮-腺苷或脱氮-鸟苷,并且连接体可以连接在脱氮-腺苷或脱氮-鸟苷的C-7或C-8位置上。在其它实施方式中,核碱基可以是胞嘧啶或尿嘧啶,并且连接体可以连接于胞嘧啶或尿嘧啶的N-3或C-5位置。下面的图式1示出了示例性的修饰的核苷酸,其中核碱基腺嘌呤在7-脱氮-腺嘌呤的C-7碳位置连接于连接体。此外,图式1示出了引入到mRNA的3'端的具有连接体和有效负载(例如,可检测剂)的修饰的核苷酸。二硫键断裂和巯基在炔丙基酯上的1,2-加成释放可检测剂。其余结构(例如如图式1中的pApC5Parg所示的)是抑制剂。对于修饰的核苷酸的结构的基本原理是,拴系抑制剂(tethered inhibitor)在空间上干扰了聚合酶引入第二碱基的能力。因此,关键的是,系链足够长以影响该功能,且抑制剂处于抑制或禁止第二和之后的核苷酸进入生长的多核苷酸链中的立体化学取向中。

[0541] 图式1



[0543] 连接体

[0544] 本文所用的术语“连接体 (linker)”是指一组原子,例如10-1000个原子,并可以由原子或基团组成,所述原子或基团例如但不限于碳、氨基、烷基氨基、氧、硫、亚砷、磺酰基、羰基和亚胺。连接体可以在第一端连接于核碱基或糖部分上修饰的核苷或核苷酸,且在第二端连接于有效负载,例如,可检测剂或治疗剂。连接体具有足够的长度以便不干扰掺入到核酸序列中。

[0545] 可以被引入到连接体中的化学基团的实例包括但不限于烷基、烯烃、炔烃、酰胺基、醚、硫醚、或酯基团。连接体链也可以包含饱和、不饱和或芳香性环部分，所述环包括多环和杂芳环，其中杂芳环是含有1至4个杂原子N、O或S的芳基基团。连接体的具体实例包括但不限于不饱和的烷烃、聚乙二醇和葡聚糖聚合物。

[0546] 例如，连接体可以包括乙二醇或丙二醇单体单元，例如二甘醇、二丙二醇、三甘醇、三丙二醇、四甘醇、或四甘醇。在一些实施方式中，连接体可包括二价烷基、烯基、和/或炔基部分。连接体可包括酯、酰胺或醚部分。

[0547] 其它实例包括连接体内的可裂解部分，举例来说，例如二硫键(-S-S-)或偶氮键(-N=N-)，可以使用还原剂或光解作用裂解该可裂解部分。引入到连接体中并连接于修饰的核苷酸的可裂解键在裂解时导致例如核苷酸上的短“疤痕(Scar)”或化学修饰。例如，裂解后，得到的核苷酸碱基上的疤痕形成了修饰的核苷酸部分并被掺入到多核苷酸链中，该疤痕是不反应的且不需要被化学中和。这增加了可以在核酸聚合物模板的测序过程中引入后续核苷酸的便易性。例如，条件包括使用三(2-羧基乙基)膦(TCEP)、二硫苏糖醇(DTT)和/或用于裂解二硫键的其它还原剂。包括酰胺键的可选择性断裂的键可以例如通过使用TCEP或其它还原剂、和/或光解作用进行裂解。包括酯键的可选择性断裂的键可以例如通过酸水解或碱水解进行裂解。

[0548] 有效负载

[0549] 本文所述的方法和组合物可用于将有效负载传递到生物学靶点上。有效负载可以例如用于标记(例如，可检测剂如荧光团)或治疗目的(例如，细胞毒素或其它治疗剂)。

[0550] 有效负载：治疗剂

[0551] 在一些实施方式中，有效负载是治疗剂，如细胞毒素、放射性离子、化疗剂、或其它治疗剂。细胞毒素或细胞毒性剂包括任何对细胞有害的药剂(agent)。实例包括泰素(taxol)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、短杆菌肽D(gramicidin D)、溴化乙锭(ethidium bromide)、依米丁(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基蒽蒽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光辉霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1-去氢睾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素类(glucocorticoids)、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、嘌呤霉素(puromycin)、类美登素(maytansinoids)例如美登醇(maytansinol)(参见美国专利号5,208,020)、CC-1065(参见美国专利号5,475,092、5,585,499、5,846,545)和它们的类似物或同源物。放射性离子包括但不限于碘(例如碘125或碘131)、铯89、磷、钷、铯、钷、磷、钴、钷90、钷153和钷。其它治疗剂包括但不限于抗代谢药(例如甲氨蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶氨基烯咪胺(5-fluorouracil decarbazine)、烷化剂(例如，氮芥(mechlorethamine)、硫喷妥苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、CC-1065、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine,BSNU)和洛莫司汀(lomustine,CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、链脲霉素(streptozotocin)、丝裂霉素C和顺-二氯二氨铂(II)(cis-dichlorodiamine platinum,DDP)顺铂(cisplatin)、蒽环类(例

如柔红霉素(原称为道诺霉素(daunomycin))和多柔比星)、抗生素类(如更生霉素(dactinomycin)(原称为放线菌素)、博来霉素(bleomycin)、光辉霉素和氨茴霉素(anthracycline,AMC))和抗有丝分裂剂(如长春新碱、长春碱、泰素和类美登素)。

[0552] 有效负载:可检测剂

[0553] 可检测物质的实例包括各种有机小分子、无机化合物、纳米颗粒、酶或酶底物、荧光材料、发光材料、生物发光材料、化学发光材料、放射性材料和造影剂。这样的可光学检测的标记包括例如但不限于4-乙酰氨基-4'-异硫氰酸苾-2,2'-二磺酸(4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid);吖啶和衍生物:吖啶、吖啶异硫氰酸酯;5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS);4-氨基-N-[3-乙基磺酰基]苯基]萘二甲酰亚胺-3,5-二磺酸酯;N-(4-苯胺基-1-萘基)马来酰亚胺;邻氨基苯甲酰胺;BODIPY;亮黄(Brilliant Yellow);香豆素和衍生物;香豆素、7-氨基-4-甲基香豆素(AMC,香豆素120)、7-氨基-4-三氟甲基香豆素(香豆素151);花青染料;焰红染料(cyanosine);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diaminidino-2-phenylindole,DAPI)、5'5"-二溴焦赝酚-磺酸萘(5'5"-dibromopyrogallol-sulfonaphthalein)(溴焦赝酚红(Bromopyrogallol Red))、7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酸苯基)-4-甲基香豆素;二亚乙基三胺五乙酸酯;4,4'-二异硫氰酸二氢苾-2,2'-二磺酸;4,4'-二异硫氰酸苾-2,2'-二磺酸;5-[二甲基氨基]-萘-1-磺酰氯(DNS,丹磺酰氯);4-二甲基氨基苯基偶氮苯基-4'-异硫氰酸酯(DABITC);曙红和衍生物;曙红、曙红异硫氰酸酯、赤藓红和衍生物;赤藓红B、赤藓红异硫氰酸酯;乙锭(ethidium);荧光素和衍生物;5-羧基荧光素(FAM)、5-(4,6-二氯三嗪-2-基)氨基荧光素(DTAF)、2',7'-二甲氧基-4'5'-二氯-6-羧基荧光素、荧光素、荧光素异硫氰酸酯、QFITC(XRITC);荧光胺;IR144;IR1446;孔雀绿异硫氰酸酯;4-甲基伞形酮邻甲酚酞(4-methylumbelliferone ortho cresolphthalein);硝基酪氨酸;副品红;酚红,B-藻红蛋白;邻苯二甲醛(orthophthaldialdehyde);苾和衍生物:苾、苾丁酸酯、琥珀酰亚胺基1-苾;丁酸酯量子点;活性红4(Cibacron™亮红3B-A);若丹明(rhodamine)和衍生物:6-羧基-X-若丹明(ROX)、6-羧基若丹明(R6G)、丽丝胺若丹明B磺酰氯若丹明(Rhod)、若丹明B、若丹明123、若丹明X异硫氰酸酯、磺基若丹明B、磺基若丹明101、磺基若丹明101的磺酰氯衍生物(德克萨斯红);N,N,N',N'四甲基-6-羧基若丹明(TAMRA)、四甲基若丹明;四甲基若丹明异硫氰酸酯(TRITC);核黄素;玫红酸;铽螯合衍生物;花青-3(Cyanine-3)(Cy3);花青-5(Cy5);花青-5.5(Cy5.5)、花青-7(Cy7);IRD700;IRD800;Alexa647;La Jolta蓝;酞菁;和萘酞菁。在一些实施方式中,可检测标记是荧光染料,如Cy5和Cy3。

[0554] 发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括荧光素酶、萤光素和水母发光蛋白(aequorin)。

[0555] 合适的放射性材料的实例包括可直接或间接检测的 ^{18}F 、 ^{67}Ga 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 ^{82}Rb 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{133}Xe 、 ^{201}Tl 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (例如,如过钨酸盐(钨酸盐(VII)), TcO_4^-),或通过射电辐射的直接计数或通过闪烁计数可检测的其它放射性同位素。

[0556] 此外,可以使用造影剂,例如用于MRI或NMR、X射线CT、拉曼成像、光学相干断层扫描、吸收成像、超声成像或热成像的造影剂。示例性的造影剂包括金(例如金纳米颗粒)、钆(例如螯合Gd)、铁氧化物(例如超顺磁性氧化铁(SPIO)、单晶氧化铁纳米颗粒(MIONs)和超小超顺磁性氧化铁(USPIO))、锰螯合物(例如Mn-DPDP)、硫酸钡、碘化造影剂(碘海醇)、微

泡、或全氟化碳。

[0557] 在一些实施方式中,可检测剂是在激活后变为可检测的非可检测的前体。实例包括荧光四嗪-荧光团结构(例如,四嗪-BODIPY FL、四嗪-俄勒冈绿488(tetrazine-Oregon Green488)、或四嗪-BODIPY TMR-X)或酶激活的荧光剂(如PROSENSE (VisEn Medical))。

[0558] 当将化合物用例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶法标记时,酶标记是通过测定适当的底物到产物的转化来检测的。

[0559] 其中可以使用这些组合物的体外测定法包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)、免疫沉淀法、免疫荧光法、酶免疫测定法(EIA)、放射免疫测定法(RIA)和蛋白印迹(Western blot)分析。

[0560] 本文所述的标记之外的标记也涵盖在本发明中,包括其它可光学检测的标记。标记可以利用标准化学反应在任何位置连接于本发明的修饰的核苷酸,使得标记可以在可裂解的连接体裂解时从掺入的碱基上移除。

[0561] 有效负载:细胞穿透有效负载(Cell Penetrating Payloads)

[0562] 在一些实施方式中,修饰的核苷酸和修饰的核酸还可以包括可以是改善组合物的细胞内递送的细胞穿透部分或试剂的有效负载。例如,组合物可包括有助于递送到细胞内空间的细胞穿透肽序列,例如HIV源性TAT肽、穿膜肽(penetratins)、转膜肽(transportans)或hCT源性细胞穿透肽,参见,例如Caron等人,(2001)Mol Ther.3(3):310-8;Langel,Cell-Penetrating Peptides:Processes and Applications(CRC Press,Boca Raton FL2002);El-Andaloussi等人,(2005)Curr Pharm Des.11(28):3597-611;和Deshayes等人,(2005)Cell Mol Life Sci.62(16):1839-49。组合物也可以被配制成包括增强了组合物到细胞内空间的递送的细胞穿透剂,例如脂质体。

[0563] 有效负载:生物学靶点

[0564] 本文所述的修饰的核苷酸和修饰的核酸可用于将有效负载递送至存在特异性配体或可以生成特异性配体的任何生物学靶点。配体可以共价地或非共价地结合到生物学靶点上。

[0565] 示例性的生物学靶点包括生物聚合物,例如抗体、核酸如RNA和DNA、蛋白、酶;示例性的蛋白包括酶、受体和离子通道。在一些实施方式中,靶点是组织型或细胞型特异性标记物,例如在所选的组织或细胞类型上特异性地表达的蛋白。在一些实施方式中,靶点是受体,例如但不限于质膜受体和核受体;更具体的实例包括G蛋白偶联受体、细胞孔蛋白、转运蛋白、表面表达的抗体、HLA蛋白、MHC蛋白和生长因子受体。

[0566] 修饰的核苷酸的合成

[0567] 本文所述的修饰的核苷和核苷酸可以由易得的起始原料使用下列常规方法和程序来制备。可以理解,在给出了典型的或优选的工艺条件(即反应温度、时间、反应物的摩尔比、溶剂、压力等)的地方;除非另有说明,也可以使用其它的工艺条件。最佳反应条件可随所用的特定的反应物或溶剂而变化,但这些条件可以由本领域技术人员通过常规的优化程序来确定。

[0568] 本文所述的方法可以根据本领域中已知的任何合适的方法进行监测。例如,产物的形成可通过光谱手段如核磁共振光谱法(例如 ^1H 或 ^{13}C)、红外光谱法、分光光度法(例如UV-可见光的)或质谱法或通过色谱法如高效液相色谱法(HPLC)或薄层色谱法进行监测。

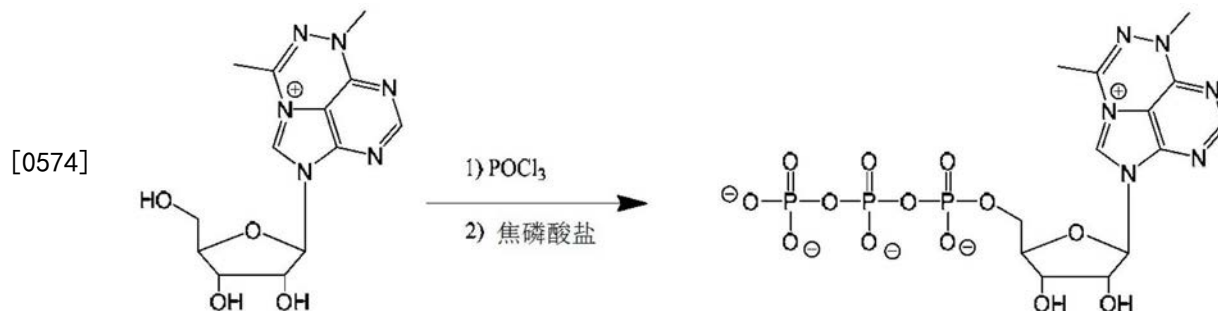
[0569] 修饰的核苷和核苷酸的制备可以包括各种化学基团的保护和脱保护。本领域技术人员可容易地确定对保护和脱保护的需要以及对适当的保护基团的选择。保护基团的化学反应可以参见例如Greene等人, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第二版, Wiley&Sons, 1991, 其以引用的方式整体并入本文。

[0570] 本文所述的方法的反应可在合适的溶剂中进行, 有机合成领域的技术人员可以容易地选择出合适的溶剂。合适的溶剂可以在反应所进行的温度(即溶剂的冻结温度至溶剂的沸腾温度范围内的温度)下与起始原料(反应物)、中间体或产物基本上不反应。给定的反应可在一种溶剂或多于一种溶剂的混合物中进行。依据特定的反应步骤, 可以为特定的反应步骤选择合适的溶剂。

[0571] 可以通过本领域中已知的众多方法中的任何方法进行修饰的核苷和核苷酸的外消旋混合物的拆分。一个示例方法包括使用“手性拆分酸”的分步重结晶, 所述手性拆分酸是具有旋光性的成盐有机酸。适合用于分步重结晶方法的拆分剂是例如具有旋光性的酸, 如D型和L型的酒石酸、二乙酰基酒石酸、二苯甲酰基酒石酸、扁桃酸、苹果酸、乳酸或各种具有旋光性的樟脑磺酸。外消旋混合物的拆分也可以通过在用具有旋光性的拆分剂(例如二硝基苯甲酰基苯基甘氨酸)填充的柱上洗脱来进行。本领域技术人员可以确定合适的洗脱溶剂组成。

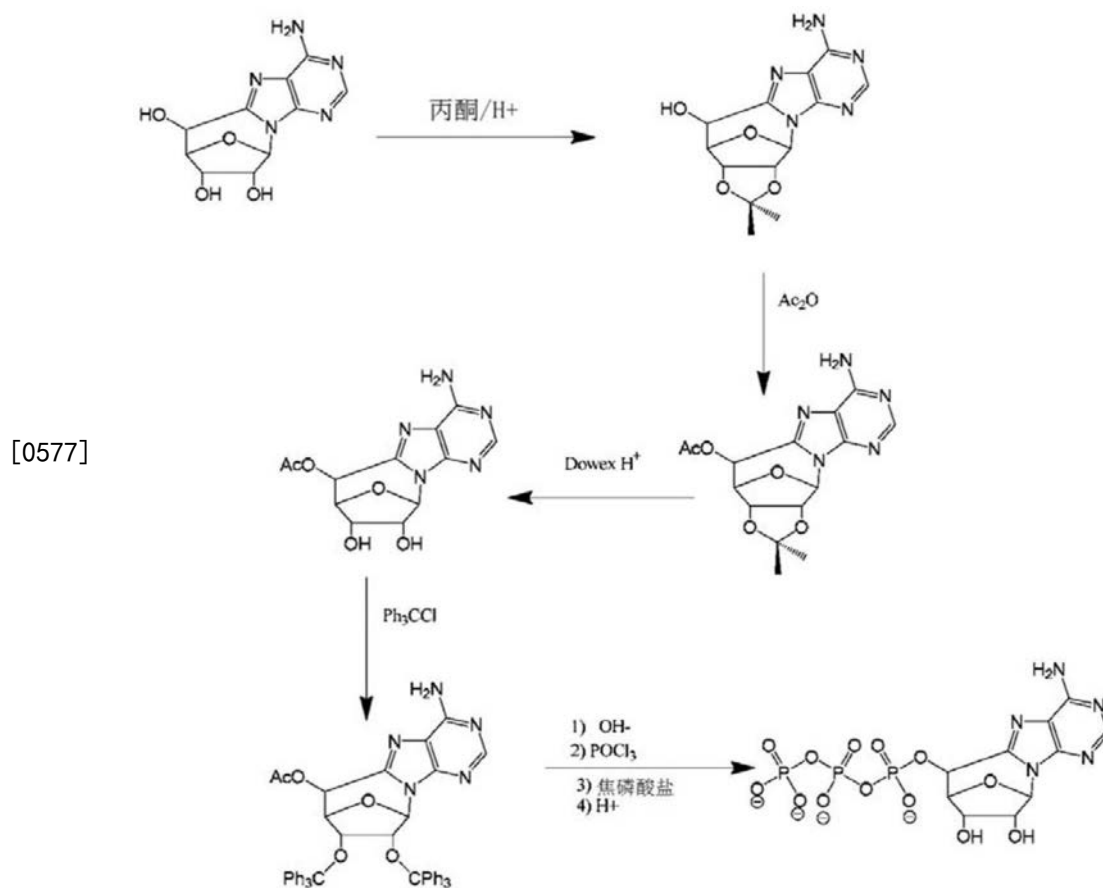
[0572] 在下面图式2至图式12中提供了掺入到多核苷酸(例如RNA或mRNA)中的修饰的核苷酸的示例性合成。图式2提供了用于核苷(包括修饰的核苷)的磷酸化的一般方法。

[0573] 图式2



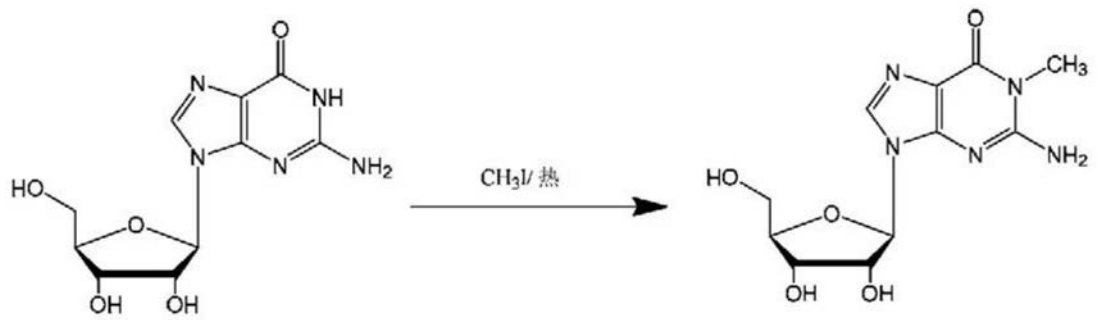
[0575] 可以使用各种保护基团来控制反应。例如, 图式3提供了使用多个保护和脱保护步骤来促进糖的5'位而不是2'和3'羟基基团的磷酸化。

[0576] 图式3

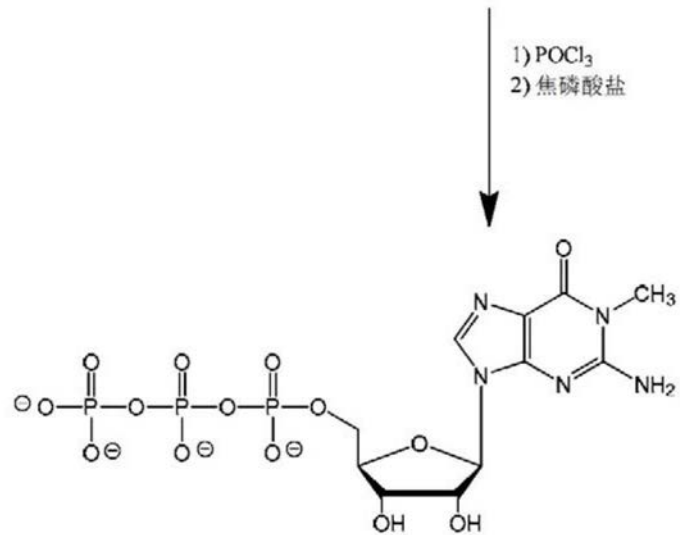


[0578] 可以用任何可用的方式来合成修饰的核苷酸。图式4、5和8分别提供了用于合成具有修饰的嘌呤核碱基的修饰的核苷酸的示例性方法；以及图式6和7分别提供了用于合成具有修饰的假尿苷或假异胞苷的修饰的核苷酸的示例性方法。

[0579] 图式4

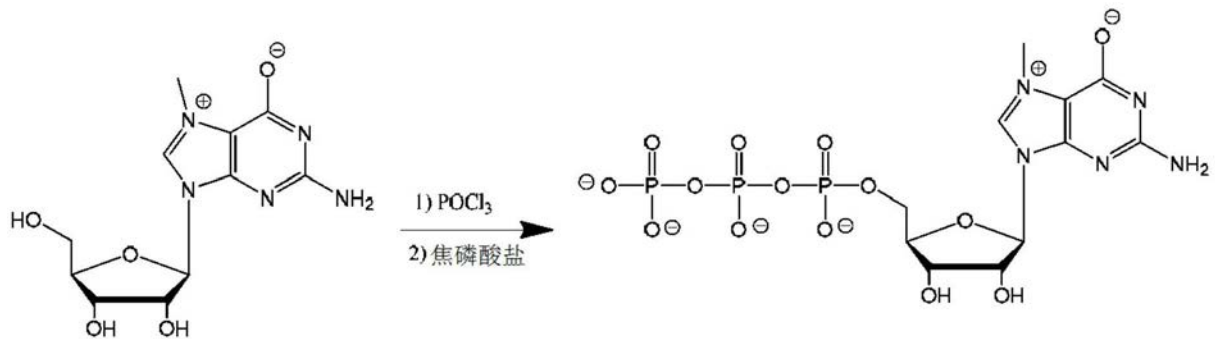


[0580]

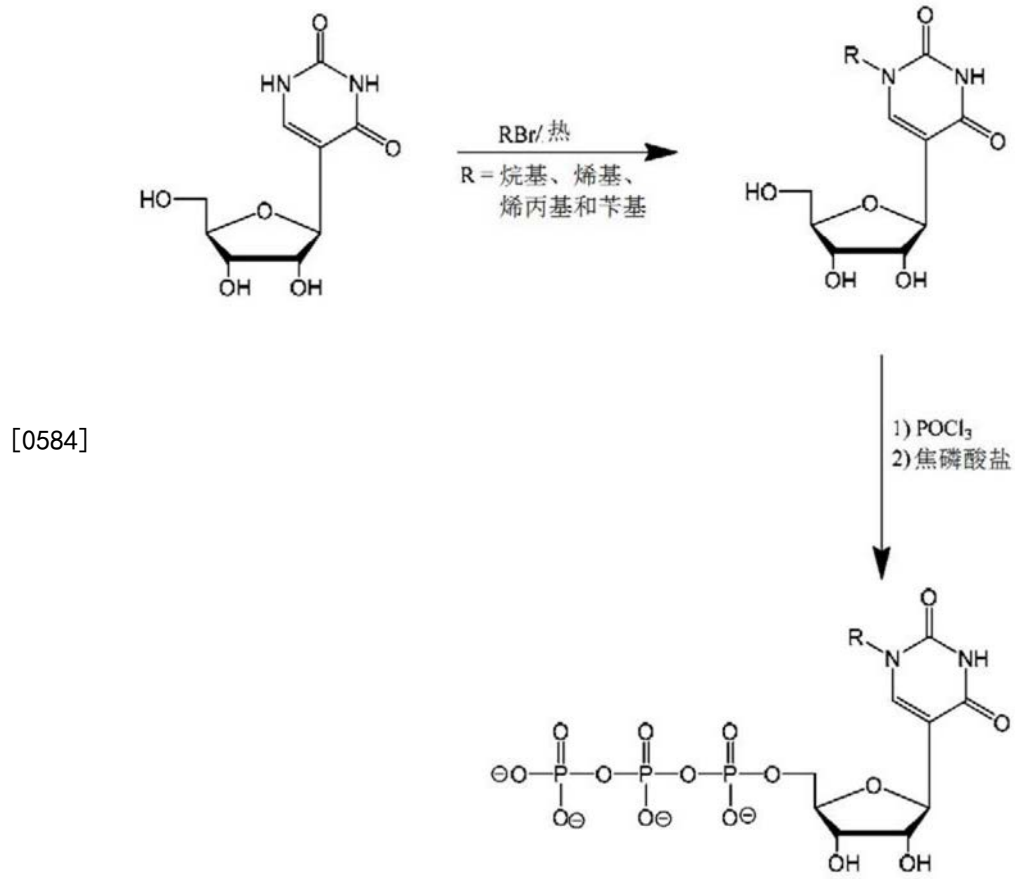


[0581] 图式5

[0582]

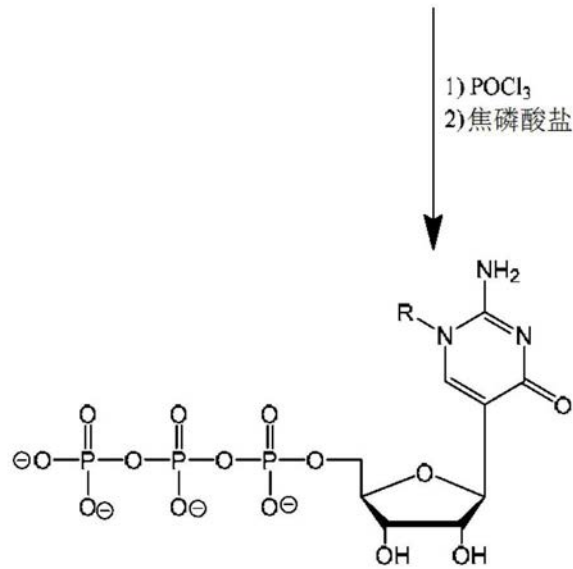


[0583] 图式6

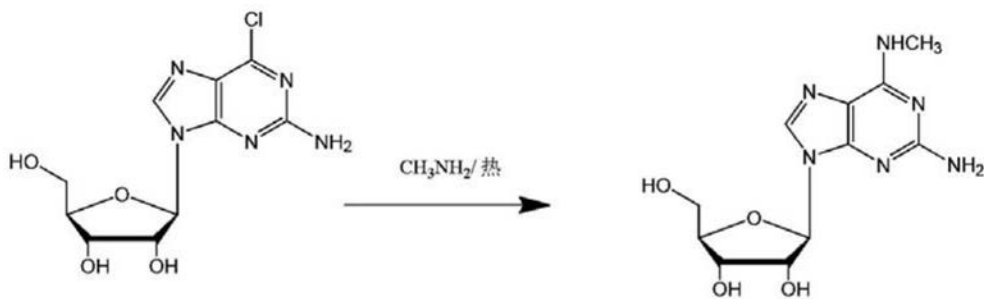




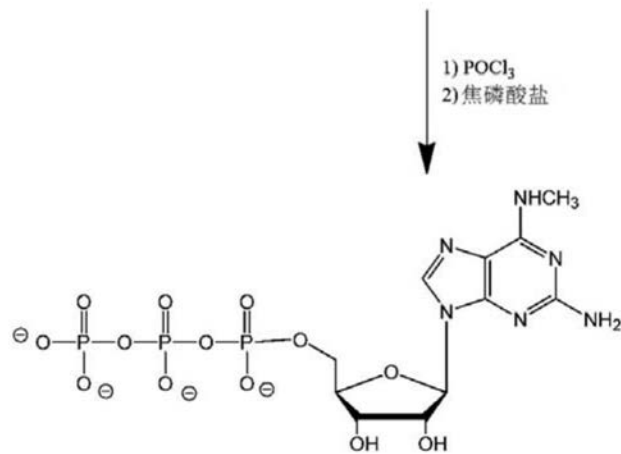
[0586]



[0587] 图式8



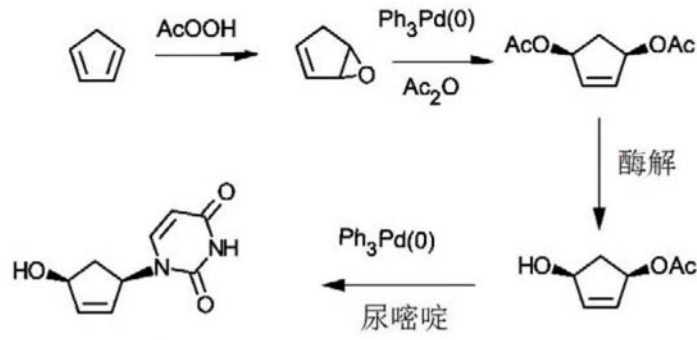
[0588]



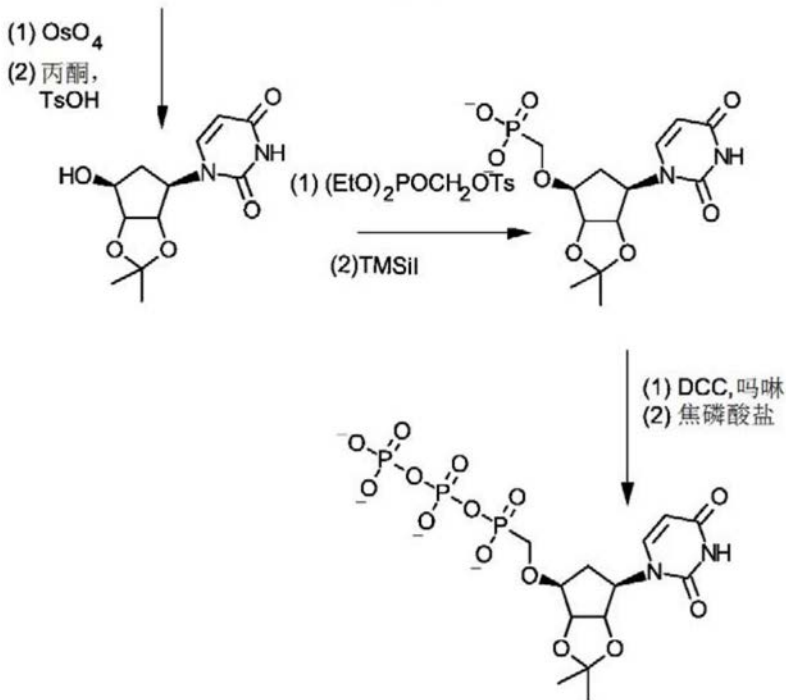
[0589] 图式9和10提供了修饰的核苷酸的示例性合成。图式11提供了用于生产核苷酸的

非限制性生物催化方法。

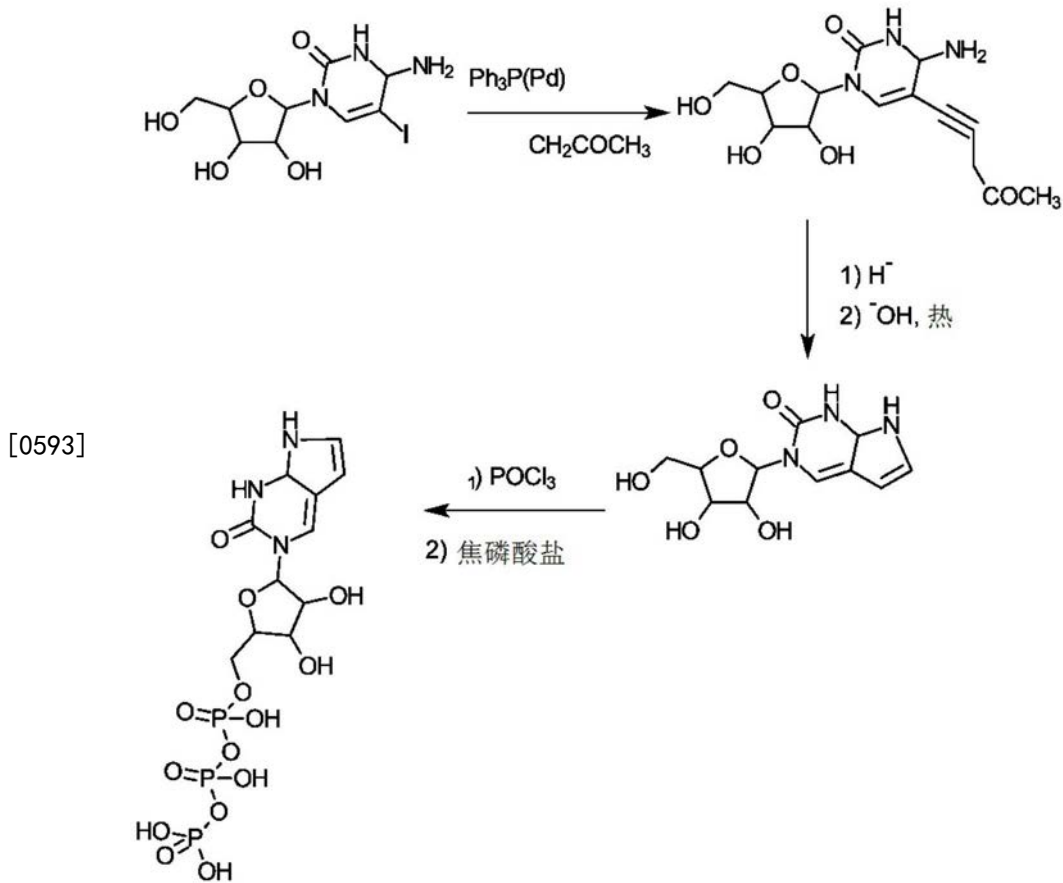
[0590] 图式9



[0591]

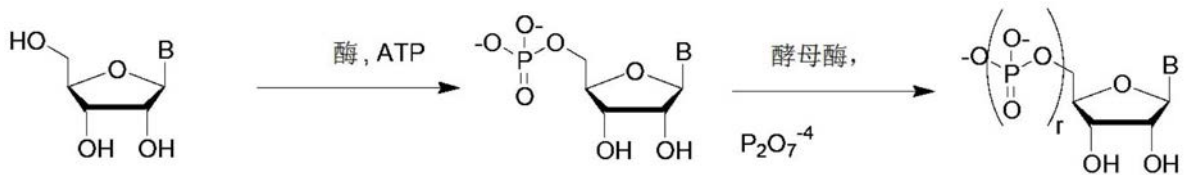


[0592] 图式10



[0594] 图式11

[0595]



[0596] 图式12提供了修饰的尿嘧啶的示例性合成,其中大沟面上的N1位置用如别处提供的 R^{12b} 修饰,且核糖的5'-位置被磷酸化。 T^1 、 T^2 、 R^{12a} 、 R^{12b} 和 r 如本文所述。这种合成以及其优化形式可以用于修饰其它嘧啶核碱基和嘌呤核碱基(参见,例如式(b1)–(b43))的大沟面,和/或安装一个或多个磷酸酯基团(例如,在糖的5'位置)。这种烷基化反应也可用于在本文所述的任何核碱基中在任何反应性基团(例如,氨基基团)(例如,在胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤的Watson-Crick碱基配对面中的氨基)上包括一个或多个任选取代的烷基基团。

[0597] 图式12

[0598]



[0599] 修饰的核苷和核苷酸也可以根据在下列文献中描述的合成方法进行制备:Ogata等人,Journal of Organic Chemistry74:2585-2588,2009;Purmal等人,Nucleic Research22(1):72-78,1994;Fukuhara等人,Biochemistry1(4):563-568,1962;和Xu等人,Tetrahedron48(9):1729-1740,1992,其中的每一个均以引用的方式整体并入本文。

[0600] 修饰的核酸

[0601] 本发明提供了含有一种或多种本文所述的修饰的核苷或核苷酸的核酸(或多核苷酸)(称为“修饰的核酸”),包括RNA如mRNA,其具有有益的性质,包括缺乏对引入mRNA的细胞的先天免疫应答的实质上的诱导。由于这些修饰的核酸提高了蛋白生产的效率、核酸的细胞内存留和所接触的细胞的活力,以及具有降低的免疫原性,具有这些性质的核酸在本文中也称为“增强的核酸”。

[0602] 此外,本发明提供了对大沟相互作用(例如结合)配偶体具有降低的结合亲和力的核酸。例如,核酸由至少一个如本文所述的在大沟面上被化学修饰的核苷酸组成。

[0603] 术语“核酸”在最广义上包括被或可被引入到寡核苷酸链中的任何化合物和/或物质。在此背景下,术语核酸与多核苷酸同义。用于根据本发明的用途的示例性核酸包括但不限于本文详细描述DNA、RNA包括信使RNA(mRNA)、其杂合物、RNAi诱导剂、RNAi剂、siRNAs、shRNA、miRNA、反义RNA、核糖酶、催化DNA、诱导三螺旋形成的RNA、适体、载体等中的一种或多种。

[0604] 本发明提供了包括可翻译区和一个、两个或多于两个的不同的核苷修饰的修饰的核酸。在一些实施方式中,相对于相应的未修饰的核酸,修饰的核酸在引入核酸的细胞中表现出降低的降解。示例性的核酸包括核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、苏糖核酸(TNA)、二醇核酸(GNA)、或它们的杂合物。在优选的实施方式中,修饰的核酸包括信使RNA(mRNA)。如本文所述,本发明的核酸基本上不诱导引入mRNA的细胞的先天免疫应答。

[0605] 在某些实施方式中,期望在细胞内降解引入到细胞中的修饰的核酸,例如如果期望蛋白生产的精确时限。因此,本发明提供了含有降解结构域的修饰的核酸,其能够在细胞内以直接方式起作用。

[0606] 核酸的其它组分是可选的,并在一些实施方式中是有益的。例如,提供了5'非翻译区(UTR)和/或3'UTR,其中任何一个或这两个都可独立地含有一个或多个不同的核苷修饰。在这样的实施方式中,核苷修饰也可以存在于可翻译区。本发明还提供了含有Kozak序列的核酸。

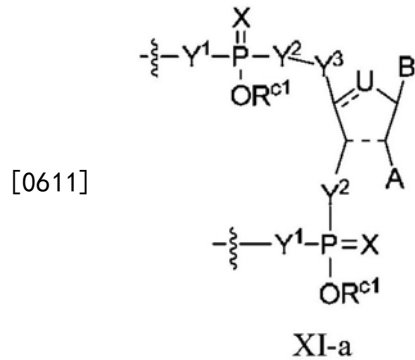
[0607] 此外,本发明提供了含有一个或多个能够从核酸上切除的内含子核苷酸序列的核酸。

[0608] 此外,提供了含有内核糖体进入位点(IRES)的核酸。IRES可以作为唯一的核糖体结合位点起作用,或可用作mRNA的多个核糖体结合位点之一。含有多于一个的功能性核糖体结合位点的mRNA可以编码由核糖体独立翻译的几种肽或多肽(“多顺反子mRNA”)。当核酸具有IRES时,还可任选地提供第二可翻译区。可以根据本发明使用的IRES序列的实例包括但不限于来自小核糖核酸病毒(例如FMDV)、害虫病毒(CFFV)、脊髓灰质炎病毒(PV)、脑心肌炎病毒(ECMV)、手足口病病毒(FMDV)、丙型肝炎病毒(HCV)、典型猪瘟病毒(CSFV)、鼠白血病病毒(MLV)、猴免疫缺陷病毒(SIV)或蟋蟀麻痹病毒(CrPV)的那些IRES序列。

[0609] 在另一个方面,本发明提供了包含至少两个核苷酸的核酸序列,该核酸序列包含

一个干扰大沟结合配偶体与核酸序列的结合的核苷酸,其中该核苷酸对大沟结合配偶体具有降低的结合亲和力。

[0610] 在一些实施方式中,核酸是式XI-a的化合物:



[0612] 其中:

[0613] \diagdown 表示任意的双键;

[0614] --- 表示任意的单键;

[0615] 当 \diagdown 表示单键时,U是O、S、 -NR^a -或 $\text{-CR}^a\text{R}^b$ -,或当 \diagdown 表示双键时,U是 -CR^a -;

[0616] A是H、OH、磷酰基、焦磷酸酯、硫酸酯、 -NH_2 、 -SH 、氨基酸、包括2至12个氨基酸的肽;

[0617] X是O或S;

[0618] 每个 Y^1 独立地选自 -OR^{a1} 、 $\text{-NR}^{a1}\text{R}^{b1}$ 和 -SR^{a1} ;

[0619] 每个 Y^2 和 Y^3 独立地选自O、 $\text{-CR}^a\text{R}^b$ 、 -NR^c 、S或包含一个或多个选自C、O、N和S的原子的连接体;

[0620] R^a 和 R^b 各自独立地是H、 C_{1-12} 烷基、 C_{2-12} 烯基、 C_{2-12} 炔基或 C_{6-20} 芳基;

[0621] R^c 是H、 C_{1-12} 烷基、 C_{2-12} 烯基、苯基、苄基、聚乙二醇基团、或氨基-聚乙二醇基团;

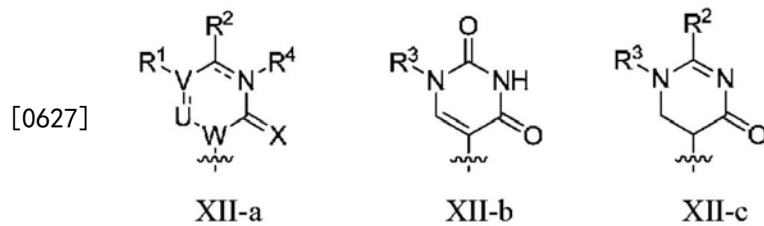
[0622] R^{a1} 和 R^{b1} 各自独立地是H或反离子;

[0623] -OR^{c1} 在pH约为1时是OH,或 -OR^{c1} 在生理pH下是 O^- ;和

[0624] B是核碱基;

[0625] 前提条件是包括变量A、B、D、U、Z、 Y^2 和 Y^3 的环不能是核糖。

[0626] 在一些实施方式中,B是式XII-a、XII-b或XII-c的核碱基:



[0628] 其中:

[0629] --- 表示单键或双键;

[0630] X是O或S;

[0631] U和W各自独立地是C或N;

[0632] V是O、S、C或N;

[0633] 其中,当V是C时, R^1 是H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烯基、 C_{1-6} 炔基、卤素或 -OR^c ,其中 C_{1-20} 烷基、


C₂₋₂₀烯基、C₂₋₂₀炔基各自任选地被-OH、-NR^aR^b、-SH、-C(O)R^c、-C(O)OR^c、-NHC(O)R^c或-NHC(O)OR^c取代；

[0634] 并且，其中当V是O、S或N时，R¹不存在；

[0635] R²是H、-OR^c、-SR^c、-NR^aR^b或卤素；

[0636] 或者当V是C时，R¹和R²与它们所连接的碳原子一起可形成5元或6元环，所述环任选地被1-4个选自卤素、-OH、-SH、-NR^aR^b、C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、C₂₋₂₀炔基、C₁₋₂₀烷氧基或C₁₋₂₀硫代烷基的取代基取代；

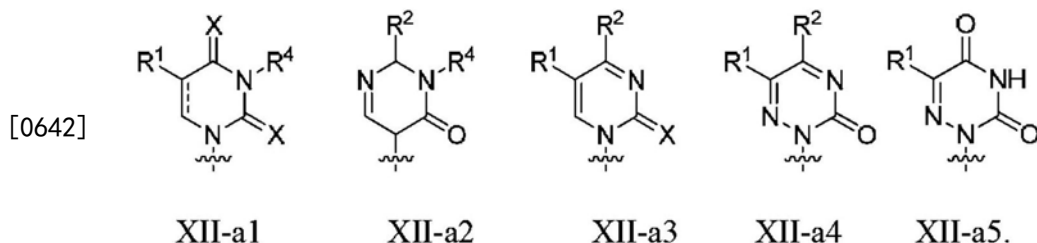
[0637] R³是H或C₁₋₂₀烷基；

[0638] R⁴是H或C₁₋₂₀烷基；其中当表示双键时，R⁴不存在，或N-R⁴一起形成被C₁₋₂₀烷基取代的带正电荷的N；

[0639] R^a和R^b各自独立地是H、C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、C₂₋₂₀炔基、或C₆₋₂₀芳基；和

[0640] R^c是H、C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、苯基、苄基、聚乙二醇基团、或氨基-聚乙二醇基团。

[0641] 在一些实施方式中，B是式XII-a1、XII-a2、XII-a3、XII-a4或XII-a5的核碱基：



[0643] 在一些实施方式中，核碱基是嘧啶或其衍生物。

[0644] 在一些实施方式中，核酸包括多个结构独特的式XI-a的化合物。

[0645] 在一些实施方式中，至少25%的胞嘧啶被式XI-a的化合物替代(例如至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%)。

[0646] 在一些实施方式中，至少25%的尿嘧啶被式XI-a的化合物替代(例如至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%)。

[0647] 在一些实施方式，至少25%的胞嘧啶和25%的尿嘧啶被式XI-a的化合物替代(例如至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%)。

[0648] 在一些实施方式中，核酸是可翻译的。

[0649] 在一些实施方式中，当核酸包括用连接体和有效负载(例如，如本文所述的)修饰的核苷酸时，用连接体和有效负载修饰的核苷酸位于核酸的3'端上。

[0650] 大沟相互作用配偶体

[0651] 如本文所述，短语“大沟相互作用配偶体(major groove interacting partner)”是指RNA识别受体，其通过与核苷酸或核酸的大沟面的相互作用(例如结合)来检测和响应于RNA配体。因此，包含如本文所述的修饰的核苷酸或核酸的RNA配体降低与大沟结合配偶体的相互作用，并因而降低先天免疫应答、或促炎细胞因子的表达和分泌、或这两者。

[0652] 示例大沟相互作用(例如结合)配偶体包括但不限于下列核酸酶和解旋酶。在膜内,TLR(Toll样受体)3、7和8可以响应于单链和双链RNA。在细胞质内,2类DEX(D/H)解旋酶和ATP酶的超家族的成员(members of the superfamily2class of DEX(D/H)helicases and ATPases)可以感应RNA以启动抗病毒应答。这些解旋酶包括RIG-I(维甲酸诱导基因I)和MDA5(黑素瘤分化相关基因5)。其它的实例包括遗传学和生理学实验室蛋白2(laboratory of genetics and physiology2,LGP2)、含HIN-200域的蛋白或含解旋酶域的蛋白。

[0653] 预防或减少先天细胞免疫应答

[0654] 术语“先天免疫应答(innate immune response)”包括对外源单链核酸(一般是病毒或细菌来源的)的细胞应答,该细胞应答涉及诱导细胞因子(尤其是干扰素)的表达和释放,和细胞死亡。在先天细胞免疫应答过程中,蛋白合成也减少了。虽然这有利于消除由引入外源核酸而触发的细胞中的先天免疫应答,但是本发明提供了基本上减少包括干扰素信号传导的免疫应答而不完全消除这种应答的修饰的核酸如mRNA。在一些实施方式中,与由相应的未修饰的核酸所诱导的免疫应答相比,免疫应答减少了10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%或大于99.9%。这样的减少可以通过1型干扰素的表达或活性水平或者干扰素调节基因如toll样受体(例如,TLR7和TLR8)的表达来测量。先天免疫应答的诱导的减少或缺乏也可通过对细胞群一次或多次施用修饰的RNA后降低的细胞死亡来测量;例如,细胞死亡是比施用相应的未修饰的核酸所观察到的细胞死亡频率少10%、25%、50%、75%、85%、90%、95%或超过95%。此外,细胞死亡可能影响少于50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%或少于0.01%的与修饰的核酸接触的细胞。

[0655] 在一些实施方式中,包括多核苷酸和/或mRNA分子的修饰的核酸以使感受细胞或生物体不诱导或仅诱导最低限度的免疫应答的方式进行修饰。对免疫应答的触发或激活的这种逃避或避免是本发明的修饰的多核苷酸的新功能。

[0656] 本发明提供了将修饰的核酸重复引入(例如转染)到靶细胞群中,例如在体外、离体或体内进行。接触细胞群的步骤可以被重复一次或多次(如2、3、4、5次或多于5次)。在一些实施方式中,使细胞群与修饰的核酸接触的步骤重复足够多的次数,从而达到细胞群中蛋白翻译的预定效率。考虑到通过核酸修饰提供的靶细胞群的降低的细胞毒性,这样的重复转染在体外和/或体内在大量的细胞类型中是可实现的。

[0657] 多肽变体

[0658] 本发明提供了编码变化的多肽的核酸,所述变化的多肽与参考多肽序列具有一定的同一性。如本领域已知的术语“同一性”是指如通过比较序列确定的,两个或更多个肽的序列之间的关系。在本领域中,“同一性”也意指如通过具有两个或更多个氨基酸残基的链之间的匹配数目确定的,肽之间的序列相关性的程度。“同一性”通过特定数学模型或计算机程序(即“算法”)处理的空位比对(如果有的话)测量了两个或更多个序列中较短序列之间的相同匹配的百分比。可以通过已知的方法容易地计算出相关肽的同一性。这些方法包括但不限于在下列文献中描述的那些方法:Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.编著,牛津大学出版社,纽约,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.编著,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of

Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编著, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编著, M. Stockton Press, New York, 1991; 和 Carillo 等人, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)。

[0659] 在一些实施方式中, 多肽变体具有与参考多肽相同或相似的活性。或者, 变体相对于参考多肽具有改变的活性(例如, 增大或降低)。一般而言, 如通过本文所述的和本领域技术人员已知的序列比对程序和参数确定的, 本发明的特定多核苷酸或多肽的变体与特定的参考多核苷酸或多肽具有至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。

[0660] 由本领域技术人员所认识到的, 蛋白片段、功能性蛋白域、和同源蛋白也被认为是在本发明的范围内。例如, 本文提供了参考蛋白的任何蛋白片段(意为多肽序列比参考多肽序列短至少一个氨基酸残基, 但其它完全相同), 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或大于100个氨基酸的长度。在另一个实例中, 根据本发明可以利用包括具有约20、约30、约40、约50或约100个氨基酸的拉伸物(Stretch)的任何蛋白, 其与本发明所述的任何序列具有约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或约100%的同一性。在某些实施方式中, 根据本发明利用的蛋白序列包括如本文提供的或参考的任何序列中所示的2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个突变。

[0661] 多肽库

[0662] 本发明还提供了含有核苷修饰的多核苷酸库, 其中多核苷酸独立地含有编码多肽的第一核酸序列, 所述多肽如抗体、蛋白结合配偶体、支架蛋白和本领域已知的其它多肽。优选地, 多核苷酸是适合直接引入到靶细胞寄主中的形式的mRNA, 其合成所编码的多肽。

[0663] 在某些实施方式中, 生产和测试了蛋白的多个变体, 其中每个都具有不同的一个或多个氨基酸修饰, 以确定在药代动力学、稳定性、生物相容性、和/或生物活性、或生物物理学性质如表达水平方面的最佳变体。这样的库可以含有 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或超过 10^9 种可能的变体(包括取代、一个或多个残基的缺失、和一个或多个残基的插入)。

[0664] 多肽-核酸复合物(Complexes)

[0665] 适当的蛋白翻译涉及许多与mRNA相关的多肽和核酸的物理聚集。本发明提供了蛋白-核酸复合物, 其含有具有一个或多个核苷修饰(例如, 至少两个不同的核苷修饰)的可翻译的mRNA和结合于mRNA的一个或多个多肽。通常, 以有效防止或减少引入复合物的细胞的先天免疫应答的量提供蛋白。

[0666] 不可翻译的修饰的核酸

[0667] 如本文所述, 提供了具有基本上不可翻译的序列的mRNA。当施用于哺乳动物受试者时, 这样的mRNA作为疫苗起作用。

[0668] 还提供了含有一个或多个非编码区的修饰的核酸。这样的修饰的核酸通常不被翻译, 但能够结合和螯合(sequester)一个或多个翻译机构组分(translational machinery component)如核糖体蛋白或转移RNA(tRNA), 从而有效地减少了细胞中的蛋白表达。修饰的核酸可以含有小核仁RNA(sno-RNA)、微小RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)或Piwi-相互作用RNA(piRNA)。

[0669] 修饰的核酸的合成

[0670] 用于根据本发明的用途的核酸可以根据任何可用的技术进行制备,所述技术包括但不限于化学合成、酶促合成(其通常被称为体外转录)、较长的前体的酶裂解或化学裂解等。合成RNA的方法是本领域已知的(参见,例如,Gait,M.J.(编著)Oligonucleotide synthesis:a practical approach,Oxford[Oxfordshire],Washington,DC:IRL Presss,1984;和Herdewijn,P.(编著)Oligonucleotide synthesis:methods and applications,Methods in Molecular Biology,v.288(Clifton,N.J.)Totowa,N.J.:Humana Press,2005;这两篇文献以引用的方式并入本文)。

[0671] 修饰的核酸不需要沿着分子的整个长度进行均匀的修饰。在核酸的各个位置可存在不同的核苷酸修饰和/或主链结构。本领域普通技术人员会理解,核苷酸类似物或一个或多个其它修饰可以位于核酸的任何一个或多个位置,从而使得核酸的功能基本上不降低。修饰也可以是5'或3'末端修饰。核酸可含有最小为1%和最大为100%的修饰的核苷酸,或任何中间百分比,如至少5%的修饰的核苷酸、至少10%的修饰的核苷酸、至少25%的修饰的核苷酸、至少50%的修饰的核苷酸、至少80%的修饰的核苷酸或至少90%的修饰的核苷酸。例如,核酸可以含有修饰的嘧啶,如尿嘧啶或胞嘧啶。在一些实施方式中,核酸中至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少80%、至少90%或100%的尿嘧啶被修饰的尿嘧啶替代。修饰的尿嘧啶可被具有单一独特结构的化合物替代,或可被具有不同结构(例如,2、3、4或更多个独特结构)的多个化合物替代。在一些实施方式中,核酸中至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少80%、至少90%或100%的胞嘧啶被修饰的胞嘧啶替代。修饰的胞嘧啶可被具有单一独特结构的化合物替代,或可被具有不同结构(例如,2、3、4或更多个独特结构)的多个化合物替代。

[0672] 通常,本发明的修饰的mRNA的最短长度可以是足够编码二肽的mRNA序列的长度。在另一个实施方式中,mRNA序列的长度足够编码三肽。在另一个实施方式中,mRNA序列的长度足够编码四肽。在另一个实施方式中,mRNA序列的长度足够编码五肽。在另一个实施方式中,mRNA序列的长度足够编码六肽。在另一个实施方式中,mRNA序列的长度足够编码七肽。在另一个实施方式中,mRNA序列的长度足够编码八肽。在另一个实施方式中,mRNA序列的长度足够编码九肽。在另一个实施方式中,mRNA序列的长度足够编码十肽。

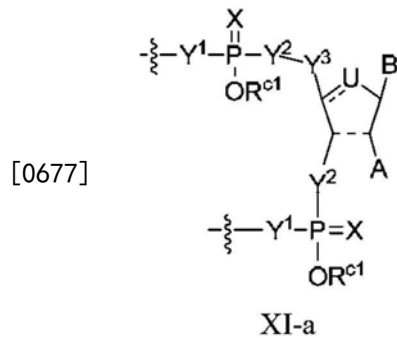
[0673] 修饰的核酸序列可以编码的二肽的实例包括但不限于肌肽和鹅肌肽。

[0674] 在另一个实施方式中,mRNA的长度大于30个核苷酸。在另一个实施方式中,RNA分子的长度大于35个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少40个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少45个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少55个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少60个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少60个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少80个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少90个核苷酸。在另一个实施方式中,长度是至少100个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少120个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少140个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少160个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少180个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少200个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少250个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少300个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少350个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少400个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少450个核苷酸。在另一个实

施方式中,长度为至少500个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少600个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少700个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少800个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少900个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少1000个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少1100个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少1200个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少1300个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少1400个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少1500个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少1600个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少1800个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少2000个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少2500个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少3000个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少4000个核苷酸。在另一个实施方式中,长度为至少5000个核苷酸或大于5000个核苷酸。

[0675] 例如,本文所述的修饰的核酸可使用核酸合成领域中的技术人员已知的方法进行制备。

[0676] 在一些实施方式中,本发明提供了制备核酸序列的方法,例如酶促方法,所述核酸序列包含干扰大沟结合配偶体与该核酸序列的结合的核苷酸,其中所述核酸序列包含式 XI-a 的化合物:



[0678] 其中:

[0679] 所述核苷酸对大沟结合配偶体具有降低的结合亲和力;

[0680] = 表示任选的双键;

[0681] --- 表示任选的单键;

[0682] 当 --- 表示单键时,U是O、S、 $\text{-NR}^a\text{-}$ 或 $\text{-CR}^a\text{R}^b\text{-}$,或当 = 表示双键时,U是 $\text{-CR}^a\text{-}$;

[0683] A是H、OH、磷酰基、焦磷酸酯、硫酸酯、 -NH_2 、 -SH 、氨基酸、包括2至12个氨基酸的肽;

[0684] X是O或S;

[0685] 每个 Y^1 独立地选自 -OR^{a1} 、 $\text{-NR}^{a1}\text{R}^{b1}$ 和 -SR^{a1} ;

[0686] 每个 Y^2 和 Y^3 独立地选自O、 $\text{-CR}^a\text{R}^b\text{-}$ 、 -NR^c 、S、或包含一个或多个选自C、O、N和S的原子的连接体;

[0687] R^a 和 R^b 各自独立地是H、 C_{1-12} 烷基、 C_{2-12} 烯基、 C_{2-12} 炔基或 C_{6-20} 芳基;

[0688] R^c 是H、 C_{1-12} 烷基、 C_{2-12} 烯基、苯基、苄基、聚乙二醇基团或氨基-聚乙二醇基团;

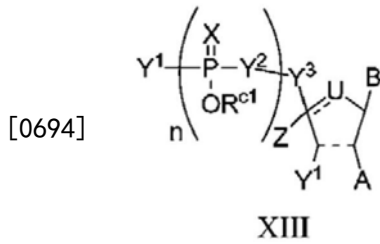
[0689] R^{a1} 和 R^{b1} 各自独立地是H或反离子;

[0690] -OR^{c1} 在pH约为1时是OH,或 -OR^{c1} 在生理pH下是 O^- ;和

[0691] B是核碱基;

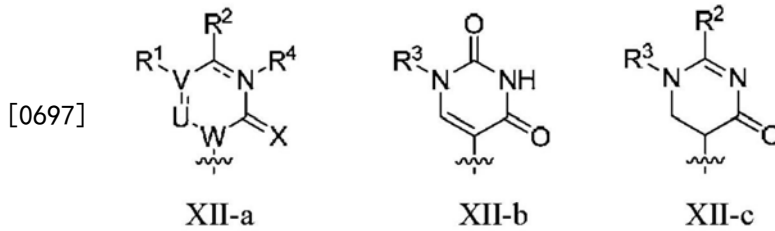
[0692] 前提条件是包括变量A、B、D、U、Z、 Y^2 和 Y^3 的环不能是核糖,

[0693] 所述方法包括使式XIII的化合物与RNA聚合酶和cDNA模板反应：




[0695] 在一些实施方式中，反应被重复1至约7000次。

[0696] 在一些实施方式中，B是式XII-a、XII-b或XII-c的核碱基：



[0698] 其中：

[0699]  表示单键或双键；

[0700] X是O或S；

[0701] U和W各自独立地是C或N；

[0702] V是O、S、C或N；


[0703] 其中，当V是C时，R¹是H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、卤素、或-OR^c，其中C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、C₂₋₂₀炔基各自任选地被-OH、-NR^aR^b、-SH、-C(O)R^c、-C(O)OR^c、-NHC(O)R^c或-NHC(O)OR^c取代；

[0704] 并且，其中当V是O、S或N时，R¹不存在；

[0705] R²是H、-OR^c、-SR^c、-NR^aR^b或卤素；

[0706] 或者当V是C时，R¹和R²与它们所连接的碳原子一起可形成5元或6元环，所述环任选地被1-4个选自卤素、-OH、-SH、-NR^aR^b、C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、C₂₋₂₀炔基、C₁₋₂₀烷氧基或C₁₋₂₀硫代烷基的取代基取代；

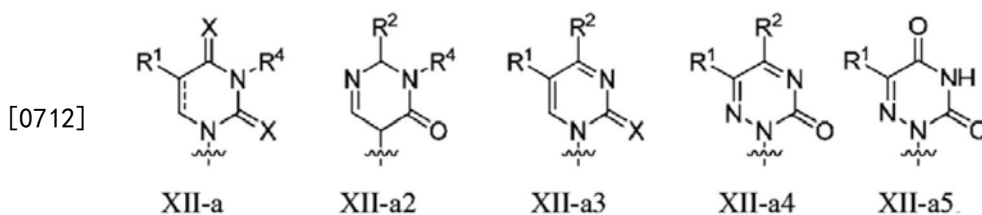
[0707] R³是H或C₁₋₂₀烷基；

[0708] R⁴是H或C₁₋₂₀烷基；其中当  表示双键时，R⁴不存在，或N-R⁴一起形成被C₁₋₂₀烷基取代的带正电荷的N；

[0709] R^a和R^b各自独立地是H、C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、C₂₋₂₀炔基或C₆₋₂₀芳基；和

[0710] R^c是H、C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、苯基、苄基、聚乙二醇基团或氨基-聚乙二醇基团。

[0711] 在一些实施方式中，B是式XII-a1、XII-a2、XII-a3、XII-a4或XII-a5的核碱基：

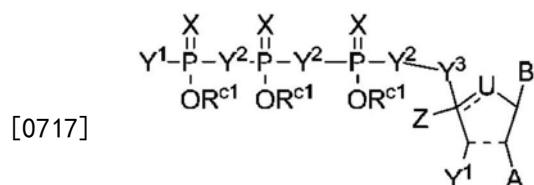


[0713] 在一些实施方式中,该方法进一步包括选自腺苷、胞嘧啶、鸟苷和尿嘧啶的核苷酸。

[0714] 在一些实施方式中,核碱基是嘧啶或其衍生物。

[0715] 在另一个方面,本发明提供了用于扩增核酸序列的方法,所述核酸序列包含干扰大沟结合配偶体与该核酸序列的结合的核苷酸,所述方法包括:

[0716] 使式XI-d的化合物与引物、cDNA模板和RNA聚合酶反应:



XI-d

[0718] 其中:

[0719] 所述核苷酸对于大沟结合配偶体具有降低的结合亲和力;

[0720] \backslash 表示单键或双键;

[0721] ---表示任意的单键;

[0722] 当 \backslash 表示单键时,U是O、S、-NR^a-或-CR^aR^b-,或当 \backslash 表示双键时,U是-CR^a-;

[0723] Z是H、C₁₋₁₂烷基或C₆₋₂₀芳基,或者当 \backslash 表示双键时,Z不存在;和

[0724] Z可以是-CR^aR^b-,并与A形成键;

[0725] A是H、OH、磷酰基、焦磷酸酯、硫酸酯、-NH₂、-SH、氨基酸、或包含1至12个氨基酸的肽;

[0726] X是O或S;

[0727] 每个Y¹独立地选自-OR^{a1}、-NR^{a1}R^{b1}和-SR^{a1};

[0728] 每个Y²和Y³独立地选自O、-CR^aR^b-,NR^c、S、或包含一个或多个选自C、O、N和S的原子的连接体;

[0729] n是0、1、2或3;

[0730] m是0、1、2或3;

[0731] B是核碱基;

[0732] R^a和R^b各自独立地是H、C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、C₂₋₁₂炔基或C₆₋₂₀芳基;

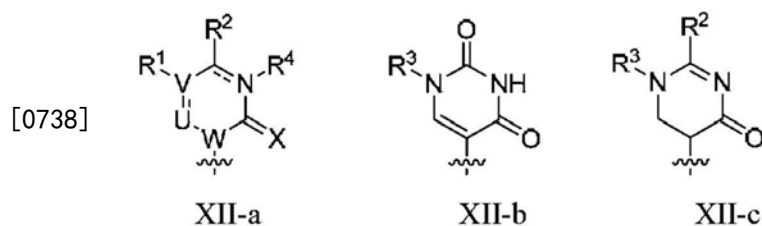
[0733] R^c是H、C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、苯基、苄基、聚乙二醇基团或氨基-聚乙二醇基团;

[0734] R^{a1}和R^{b1}各自独立地是H或反离子;和


[0735] -OR^{c1}在pH约为1时是OH,或-OR^{c1}在生理pH下是O⁻;

[0736] 前提条件是包括变量A、B、D、U、Z、Y²和Y³的环不能是核糖。

[0737] 在一些实施方式中,B是式XII-a、XII-b或XII-c的核碱基:



[0739] 其中：

[0740]  表示单键或双键；

[0741] X是O或S；

[0742] U和W各自独立地是C或N；

[0743] V是O、S、C或N；


[0744] 其中，当V是C时，R¹是H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、卤素、或-OR^c，其中C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、C₂₋₂₀炔基各自任选地被-OH、-NR^aR^b、-SH、-C(O)R^c、-C(O)OR^c、-NHC(O)R^c或-NHC(O)OR^c取代；

[0745] 并且，其中当V是O、S或N时，R¹不存在；

[0746] R²是H、-OR^c、-SR^c、-NR^aR^b、或卤素；

[0747] 或者当V是C时，R¹和R²与它们所连接的碳原子一起可形成5元或6元环，所述环任选地被1-4个选自卤素、-OH、-SH、-NR^aR^b、C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、C₂₋₂₀炔基、C₁₋₂₀烷氧基或C₁₋₂₀硫代烷基的取代基取代；

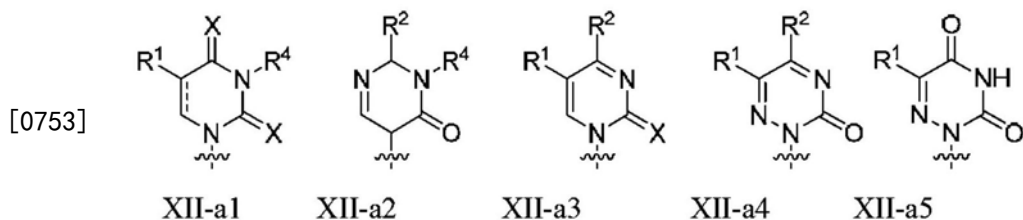
[0748] R³是H或C₁₋₂₀烷基；

[0749] R⁴是H或C₁₋₂₀烷基；其中当  表示双键时，R⁴不存在，或N-R⁴一起形成被C₁₋₂₀烷基取代的带正电荷的N；

[0750] R^a和R^b各自独立地是H、C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、C₂₋₂₀炔基或C₆₋₂₀芳基；和

[0751] R^c是H、C₁₋₂₀烷基、C₂₋₂₀烯基、苯基、苄基、聚乙二醇基团或氨基-聚乙二醇基团。

[0752] 在一些实施方式中，B是式XII-a1、XII-a2、XII-a3、XII-a4或XII-a5的核碱基：



[0754] 在一些实施方式中，方法进一步包括选自腺苷、胞嘧啶、鸟苷和尿嘧啶的核苷酸。

[0755] 在一些实施方式中，核碱基是嘧啶或其衍生物。

[0756] 在一些实施方式中，本发明提供了合成药用核酸的方法，该方法包括下列步骤：

[0757] a) 提供编码目标药用蛋白的互补脱氧核糖核酸 (cDNA) ；

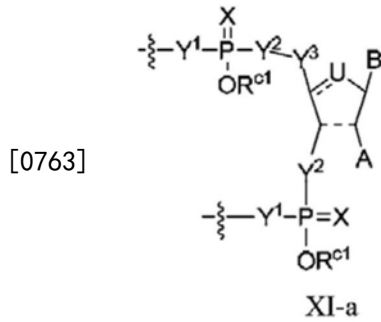
[0758] b) 选择已知干扰大沟结合配偶体与核酸的结合的核苷酸，其中该核苷酸对大沟结合配偶体具有降低的结合亲和力；和

[0759] c) 在一定条件下，使所提供的cDNA和所选择的核苷酸与RNA聚合酶接触，从而合成药用核酸。

[0760] 在进一步的实施方式中，药用核酸是核糖核酸 (RNA) 。

[0761] 在本发明的又一个方面中，修饰的核酸可以使用固相合成方法来制备。

[0762] 在一些实施方式中，本发明提供了合成包含式XI-a的化合物的核酸的方法：



[0764] 其中：

[0765] 表示任意的双键；

[0766] ——表示任意的单键；

[0767] 当 表示单键时，U是O、S、-NR^a-或-CR^aR^b-，或当 表示双键时，U是-CR^a-；

[0768] A是H、OH、磷酰基、焦磷酸酯、硫酸酯、-NH₂、-SH、氨基酸、包含2至12个氨基酸的肽；

[0769] X是O或S；

[0770] 每个Y¹独立地选自-OR^{a1}、-NR^{a1}R^{b1}和-SR^{a1}；

[0771] 每个Y²和Y³独立地选自O、-CR^aR^b-、NR^c、S、或包含一个或多个选自C、O、N和S的原子的连接体；

[0772] R^a和R^b各自独立地是H、C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、C₂₋₁₂炔基或C₆₋₂₀芳基；

[0773] R^c是H、C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、苯基、苄基、聚乙二醇基团或氨基-聚乙二醇基团；

[0774] R^{a1}和R^{b1}各自独立地是H或反离子；

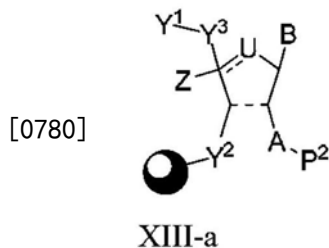
[0775] -OR^{c1}在pH约为1时是OH，或-OR^{c1}在生理pH时是O⁻；和

[0776] B是核碱基；

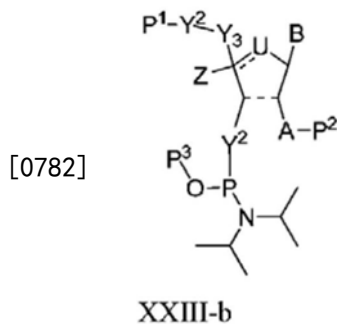
[0777] 前提条件是包括变量A、B、U、Z、Y²和Y³的环不能是核糖；

[0778] 所述方法包括：

[0779] a) 使式XIII-a的核苷酸：



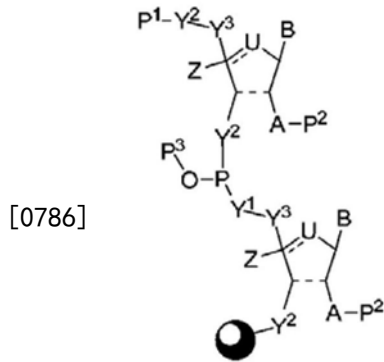
[0781] 与式XIII-b的亚磷酰胺化合物反应：



[0783] 其中: ●表示固相支持物;和

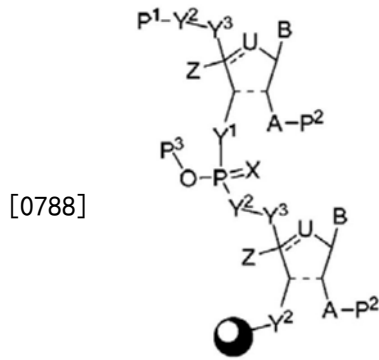
[0784] P^1 、 P^2 和 P^3 各自独立地是适合的保护基团;

[0785] 以产生式XIV-a的核酸:



XIV-a, 和

[0787] b) 氧化或硫化式XIV-a的核酸以得到式XIVb的核酸:

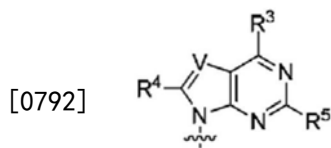


XIV-b

[0789] 和c) 去除保护基团以得到式XI-a的核酸。

[0790] 在一些实施方式中,方法还包括选自腺苷、胞嘧啶、鸟苷和尿嘧啶的核苷酸。

[0791] 在一些实施方式中,B是式XIII的核碱基:



XIII

[0793] 其中:

[0794] V是N或带正电荷的 NR^c ;

[0795] R^3 是 NR^cR^d 、 $-OR^a$ 或 $-SR^a$;

[0796] R^4 是H或可任选地与 Y^3 形成键;

[0797] R^5 是H、 $-NR^cR^d$ 或 $-OR^a$;

[0798] R^a 和 R^b 各自独立地是H、 C_{1-12} 烷基、 C_{2-12} 烯基、 C_{2-12} 炔基或 C_{6-20} 芳基;和

[0799] R^c 是H、 C_{1-12} 烷基、 C_{2-12} 烯基、苯基、苄基、聚乙二醇基团或氨基-聚乙二醇基团。

[0800] 在一些实施方式中,步骤a) 和b) 被重复1至约10,000次。

[0801] 修饰的核酸的用途

[0802] 治疗剂

[0803] 本文所述的修饰的核酸可以用作治疗剂。例如,可以对动物或受试者施用本文所述的修饰的核酸,其中修饰的核酸在体内被翻译以在动物或受试者中产生治疗肽。据此,本发明提供了用于治疗或预防人类和其它哺乳动物的疾病或病况的组合物、方法、试剂盒和试剂。本发明的活性治疗剂包括修饰的核酸、含有修饰的核酸或从修饰的核酸翻译得到的多肽的细胞、从修饰的核酸翻译得到的多肽、与含有修饰的核酸或从修饰的核酸翻译得到的多肽的细胞相接触的细胞、包含含有修饰的核酸的细胞的组织和包括包含含有修饰的核酸的细胞的组织的器官。

[0804] 本发明提供了利用本文所述的修饰的核酸诱导合成或重组多核苷酸的翻译以在细胞群中生产多肽的方法。这样的翻译可以在体内、离体、培养物中或体外进行。细胞群与有效量的含有具有至少一个核苷修饰和编码多肽的可翻译区的核酸的组合物相接触。在一定条件下接触该细胞群,使得核酸被定位于细胞群中的一个或多个细胞中并且在细胞中从核酸翻译得到重组多肽。

[0805] 至少部分地基于靶组织、靶细胞类型、施用方式、核酸的物理特性(例如,修饰的核苷的大小和程度)和其它的决定因素提供有效量的组合物。通常,有效量的组合物在细胞中提供有效的蛋白产量,优选比含有相应的未修饰的核酸的组合物更有效。提高效率可以通过增加的细胞转染(即核酸转染的细胞的百分比)、增加的从核酸到蛋白的翻译、降低的核酸降解(如例如,通过增加的从修饰的核酸到蛋白的翻译的持续时间所展示的)或降低的宿主细胞的先天免疫应答或提高治疗效用来展示。

[0806] 本发明的一些方面涉及在有需要的哺乳动物受试者中诱导重组多肽的体内翻译的方法。其中,使用本文所述的递送方法将有效量的含有具有至少一个核苷修饰和编码多肽的可翻译区的核酸的组合物施用于受试者。所提供的核酸的量和其它条件可使核酸定位于受试者的一个或多个细胞中并且使重组的多肽在细胞中从核酸进行翻译。一轮或多于一轮的核酸施用可靶向核酸所定位的细胞或该细胞所在的组织。

[0807] 本发明的其它方面涉及对哺乳动物受试者移植含有修饰的核酸的细胞。对哺乳动物受试者施用细胞是本领域技术人员已知的,如局部植入(例如,局部或皮下施用)、器官递送或全身性注射(例如,静脉注射或吸入),如细胞在药学上可接受的载体中的制剂。将含有修饰的核酸的组合物配制用于肌内、经动脉、腹膜内、静脉内、鼻内、皮下、内窥镜、经皮或鞘内施用。在一些实施方式中,组合物被配制用于缓释。

[0808] 施用治疗剂的受试者患有疾病、病症或有害病况或具有出现疾病、病症或有害病况的风险。基于可包括临床诊断、生物标记物水平、全基因组关联研究(GWAS)和本领域已知的其它方法,本发明提供了对受试者进行鉴定、诊断和分类的方法。

[0809] 在某些实施方式中,施用的修饰的核酸引导一种或多种提供功能性活性的重组多肽的生产,该功能性活性在翻译重组多肽的细胞中基本上不存在。例如,缺失的功能性活性在性质上可以是酶促的、结构性的或基因调控的。

[0810] 在其它实施方式中,施用的修饰的核酸引导一种或多种重组多肽的生产,所述重组多肽代替在翻译该重组多肽的细胞中基本上不存在的一个多肽(或多个多肽)。这种不存在可能是由于其编码基因或调控途径的基因突变。在其它实施方式中,施用的修饰的核酸引导一种或多种重组多肽的生产以补充在翻译该重组多肽的细胞中所存在的多肽(或多个

多肽)的量。或者,重组多肽起到拮抗在细胞中、细胞表面上存在的或从细胞分泌的内源蛋白的活性的作用。通常,内源蛋白的活性对受试者是有害的,例如,由于内源蛋白的突变导致改变的活性或定位。此外,重组多肽直接或间接地拮抗在细胞中、细胞表面上存在的或从细胞分泌的生物学部分的活性。被拮抗的生物学部分的实例包括脂质(例如胆固醇)、脂蛋白(例如低密度脂蛋白)、核酸、碳水化合物或小分子毒素。

[0811] 本文所述的重组蛋白被工程化用于定位于细胞内,潜在地定位于特定的隔室如细胞核内,或者被工程化用于从细胞分泌或转位到细胞的质膜上。

[0812] 如本文所述,本发明的修饰的核酸的有益特征是降低、逃避、避免或消除细胞对外源核酸的先天免疫应答的能力。本发明提供了用于在细胞或细胞群中进行免疫应答的滴定、减少或消除的方法。在一些实施方式中,细胞与含有第一剂量的包括可翻译区和至少一个核苷修饰的第一外源核酸的第一组合物接触,并且测定细胞对第一外源核酸的先天免疫应答的水平。随后,将细胞与第二组合物接触,第二组合物包括第二剂量的第一性外源核酸,第二剂量与第一剂量相比含有更少量的第一外源核酸。或者,细胞与第一剂量的第二外源核酸接触。第二外源核酸可以含有一个或多个修饰的核苷,其可以与第一外源核酸相同或不同,或者第二外源核酸可以不含有修饰的核苷。使细胞与第一组合物和/或第二组合物接触的步骤可以被重复一次或多次。此外,任选地测定细胞中的蛋白生产(例如,蛋白翻译)的效率,并且细胞可以被第一和/或第二组合物反复再转染直到达到靶蛋白生产的效率。

[0813] 用于疾病和病况的治疗

[0814] 本发明提供了用于通过替代缺失的蛋白活性或克服异常的蛋白活性来治疗或预防通过缺失或异常的蛋白活性表征的疾病的症状的方法。由于与病毒DNA载体相比,引入修饰的mRNA后快速启动蛋白生产,本发明的化合物特别有利于治疗急性疾病如脓毒病(sepsis)、中风(stroke)和心肌梗塞(myocardial infarction)。此外,本发明的修饰的mRNA的转录调节的缺乏有利于实现蛋白生产的准确滴定(titration)。多种疾病通过缺失的(或基本上减退的,使得不产生正常的蛋白功能)的蛋白活性来表征。这样的蛋白可以不存在、以非常低的量存在或基本上不起作用。本发明提供了通过引入包含有本文所提供的修饰的核酸的基于核酸或细胞的治疗剂来治疗受试者的这些病况或疾病的方法,其中修饰的核酸编码替代从受试者的靶细胞缺失的蛋白活性的蛋白。

[0815] 通过功能失调的或异常的蛋白活性表征的疾病包括但不限于癌症和增生性疾病、遗传性疾病(例如囊性纤维化(cystic fibrosis))、自身免疫性疾病、糖尿病、神经退行性疾病、心血管疾病和代谢性疾病。本发明提供了通过引入含有本文所提供的修饰的核酸的基于核酸或细胞的治疗剂来治疗受试者的这些病况或疾病的方法,其中修饰的核酸编码拮抗或通过其它方式克服在受试者的细胞中存在的异常蛋白活性的蛋白。

[0816] 功能失调的蛋白的具体实例是囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(CFTR)基因的错义或无义突变变体,其分别产生了导致囊性纤维化的CFTR蛋白的功能失调的或无功能的蛋白变体。

[0817] 因此,本发明提供了治疗哺乳动物受试者的囊性纤维化的方法,该方法在使细胞中存在有效量的CFTR多肽的条件下,使受试者的细胞与具有编码功能性CFTR多肽的可翻译区的修饰的核酸接触。优选的靶细胞是上皮细胞,如肺,并且根据靶组织来确定施用方法;即用于肺部递送,将RNA分子配制通过吸入施用。

[0818] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于治疗受试者的高脂血症(hyperlipidemia)的方法,该方法将编码分拣蛋白(Sortilin)(最近被基因组研究表征的蛋白)的修饰的mRNA分子引入到受试者的细胞群中,从而改善受试者的高脂血症。SORT1基因编码高尔基体反面网络(TGN)跨膜蛋白(称为分拣蛋白)。遗传研究表明,五分之一的个体中在SORT1基因的1p13基因座中具有单核苷酸多态现象rs12740374,其容易使这些个体具有低水平的低密度脂蛋白(LDL)和极低密度脂蛋白(VLDL)。存在于约30%的人中的每个拷贝的次要等位基因使LDL胆固醇改变8mg/dL,而存在于约5%的人中的两个拷贝的次要等位基因使LDL胆固醇降低16mg/dL。也已表明次要等位基因的携带者具有40%降低的心肌梗塞的风险。小鼠中体内功能性研究描述了SORT1在小鼠肝组织的过表达导致显著降低LDL-胆固醇的水平,降低多达80%,并且沉默SORT1使LDL胆固醇增加了约200%(Musunuru Ket al. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. Nature 2010; 466: 714-721)。

[0819] 细胞核酸递送的方法

[0820] 本发明的方法在体内、离体或在培养物中提高核酸到细胞群中的递送。例如,使含有多个宿主细胞(例如,真核细胞如酵母细胞或哺乳动物细胞)的细胞培养物与包含具有至少一个核苷修饰和任意的可翻译区的增强的核酸的组合物接触。组合物通常还含有转染试剂或其它可提高增强的核酸摄取到宿主细胞的效率的化合物。增强的核酸相对于相应的未修饰的核酸表现出在细胞群中增强的存留。增强的核酸的存留大于未修饰的核酸的存留。在一些实施方式中,其比未修饰的核酸的存留多至少约50%、75%、90%、95%、100%、150%、200%或多于200%。这种存留优点可以由一轮增强的核酸的转染来实现,或可在重复多轮的转染后获得。

[0821] 在一些实施方式中,将增强的核酸与一种或多种另外的核酸递送至靶细胞群。这种递送可以同时进行或递送增强的核酸先于递送一种或多种另外的核酸。另外的一种或多种核酸可以是修饰的核酸或未修饰的核酸。应当理解,最初存在的增强的核酸的基本上不诱导细胞群的先天免疫应答,而且,先天免疫应答不会被后来存在的未修饰的核酸激活。在这方面,如果期望存在于靶细胞群中的蛋白是从未修饰的核酸翻译得到的,增强的核酸可以本身不含有可翻译区。

[0822] 靶向部分

[0823] 在本发明的实施方式中,提供修饰的核酸以在体内或体外表达细胞的表面上的蛋白-结合配偶体或受体,其起到使细胞靶向至特定的组织空间或与特定部分相互作用的作用。合适的蛋白-结合配偶体包括抗体和其功能性片段、支架蛋白、或肽。此外,修饰的核酸可以被用于引导脂质、碳水化合物或其它生物部分的合成和胞外定位。

[0824] 永久性基因表达沉默

[0825] 通过表观遗传学方式使哺乳动物受试者的基因表达沉默的方法,包括能够引导序列特异性的组蛋白H3的甲基化以启动异染色质形成并减少特异性基因周围的基因转录用于沉默基因的目的的核酸,在该核酸中可翻译区编码一个或多个多肽。例如,Janus激酶2基因的功能获得性突变是骨髓增生性疾病家族的原因。

[0826] 可检测剂或治疗剂到生物学靶点的递送

[0827] 本文所述的修饰的核苷、修饰的核苷酸和修饰的核酸可以用于多个不同的情形,

在这些情形中期望将物质(“有效负载”)递送至生物学靶点,例如递送可检测物质用于靶点的检测,或递送治疗剂。检测方法可以包括体外和体内成像方法,例如免疫组织化学、生物发光成像(BLI)、磁共振成像(MRI)、正电子发射断层扫描(PET)、电子显微法、X射线计算机断层扫描、拉曼成像、光学相干断层扫描、吸收成像、热成像、荧光反射成像、荧光显微法、荧光分子断层成像、核磁共振成像、X射线成像、超声成像、光声成像、实验室测定法或需要标记/染色/成像的任何情况。

[0828] 例如,本文所述的修饰的核苷、修饰的核苷酸和修饰的核酸可用于重编程诱导型多能干细胞(iPS细胞),其可以用于直接追踪相对于在细胞簇中的全部细胞被转染的细胞。在另一个实例中,通过连接体连接到修饰的核酸上并被荧光标记的药物可以用于在体内如细胞内追踪该药物。其它的实例包括在可逆的药物递送至细胞的过程中使用修饰的核酸。

[0829] 本文所述的修饰的核苷、修饰的核苷酸和修饰的核酸可以用于将有效负载(例如可检测剂或治疗剂)细胞内靶向至特定的细胞器。示例性的细胞内靶向可以包括用于晚期mRNA加工的核定位、或连接于含有抑制剂的mRNA的核定位序列(NLS)。

[0830] 此外,本文所述的修饰的核苷、修饰的核苷酸和修饰的核酸可以用于将治疗剂递送至(例如活动物中的)细胞或组织。例如,本文所述的修饰的核苷、修饰的核苷酸和修饰的核酸可以用于递送高极性的化学治疗剂以杀死癌细胞。通过连接体连接于治疗剂的修饰的核酸可以促进膜渗透(member permeation),以使治疗剂运送至细胞中以到达细胞内靶点。

[0831] 在另一个实例中,修饰的核苷、修饰的核苷酸和修饰的核酸可以通过可裂解的连接体连接于病毒抑制肽(VIP)。可裂解的连接体将VIP和染料释放至细胞中。在另一个实例中,修饰的核苷、修饰的核苷酸和修饰的核酸可以通过连接体连接于ADP-核糖基化部分(ADP-ribosylate),其负责一些细菌毒素如霍乱毒素、白喉毒素和百日咳毒素的行为。这些毒素蛋白是在人类细胞中改变靶蛋白的ADP-核糖转移酶。例如,霍乱毒素ADP-核糖基化G蛋白,引起来自小肠的内衬的大量流体分泌物,而导致威胁生命的腹泻。

[0832] 药物组合物

[0833] 本发明提供了由修饰的mRNA生成的蛋白。药物组合物可任选地包含一种或多种另外的治疗活性物质。根据一些实施方式,提供了施用药物组合物的方法,所述药物组合物包含待递送到有需要的受试者的编码一种或多种蛋白的修饰的核酸。在一些实施方式中,对人类施用组合物。出于本发明的目的,短语“活性成分”通常是指本文所述的蛋白、编码蛋白的或含有蛋白的复合物。

[0834] 虽然本文提供的药物组合物的描述主要涉及适合施用于人类的药物组合物,但本领域技术人员可以理解这些组合物通常适合施用于所有种类的动物。为了使组合物适合施用于各种动物,对适合施用于人类的药物组合物的修改是可充分理解的,并且普通的兽医药理学技术人员可以仅通过常规的(如果有的话)实验来设计和/或实施这样的修改。预期施用药物组合物的受试者包括但不限于人类和/或其它灵长类动物;哺乳动物,包括商业上相关的哺乳动物,如牛、猪、马、羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠;和/或鸟类,包括商业上相关的鸟类,如鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0835] 本文所述的药物组合物的制剂可以通过药物学领域中已知的或将来开发的任何方法进行制备。通常,这些制备方法包括以下步骤:将活性成分与赋形剂和/或一种或多种其它辅助成分结合在一起,然后,必要和/或需要时,将产品成形和/或包装成所期望的单剂

量或多剂量单位。

[0836] 可以作为单次单位剂量和/或作为多个单次单位剂量来制备、包装和/或散装出售本发明的药物组合物。如本文所用,“单位剂量(unit dose)”是包含预定量的活性成分的药物组合物的个别量。活性成分的量通常等于施用给受试者的活性成分的剂量和/或这种剂量的便利分数,如这种剂量的二分之一或三分之一。

[0837] 本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何另外的成分的相对量可改变,这取决于治疗的受试者的身份、大小和/或病况,并且还取决于将要施用组合物的途径。举例来说,组合物可包含在0.1%和100% (w/w) 之间的活性成分。

[0838] 药物制剂可以额外地包含药学上可接受的赋形剂,如本文所用,其包括适合于期望的特定剂型的任何和所有的溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体溶媒、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。Remington的The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; 以引用的方式并入本文) 公开了在配制药组合物和用于其制备的已知技术中使用的各种赋形剂。除了任何常规的赋形剂介质与物质或其衍生物不相容,例如因产生了任何不期望出现的生物学效应或以有害的方式与药物组合物的任何一种或多种其它组分相互作用,其使用都涵盖在本发明的范围之内。

[0839] 在一些实施方式中,药学上可接受的赋形剂为至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯的。在一些实施方式中,赋形剂被批准用于人类和兽用。在一些实施方式中,赋形剂是经美国食品和药物管理局批准的。在一些实施方式中,赋形剂是医药级的。在一些实施方式中,赋形剂符合美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0840] 用于生产药物组合物的药学上可接受的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂、分散剂和/或成粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、粘合剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂和/或油。这些赋形剂可被任选地包括在药物制剂中。根据配方师的判断,在组合物中可存在赋形剂如可可脂和栓剂蜡、着色剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和/或香味剂。

[0841] 示例性的稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、糖粉等、和/或它们的组合。

[0842] 示例性的成粒剂和/或分散剂包括但不限于马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、羟乙酸淀粉钠、粘土、藻酸、瓜尔胶、柑橘渣(citrus pulp)、琼脂、膨润土、纤维素和木制品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚(乙烯基-吡咯烷酮)(交联维酮)、羧甲基淀粉钠(羟乙酸淀粉钠)、羧甲基纤维素、交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲纤维素)、甲基纤维素、预胶化淀粉(淀粉1500)、微晶淀粉、水不溶性淀粉、羧甲基纤维素钙、硅酸镁铝(硅酸镁铝(Veegum))、十二烷基硫酸钠、季铵类化合物等/和/或它们的组合。

[0843] 示例性的表面活性剂和/或乳化剂包括但不限于天然乳化剂(例如阿拉伯胶、琼脂、藻酸、藻酸钠、黄蓍胶、chondrux、胆固醇、黄原胶、果胶、明胶、蛋黄、酪蛋白、羊毛脂、胆固醇、蜡和卵磷脂)、胶质粘土(例如膨润土[硅酸铝]和Veegum®[硅酸镁铝])、长链氨基酸衍生物、高分子量醇(例如硬脂醇、鲸蜡醇、油醇、三醋精单硬脂酸酯(triacetin monostearate)、乙二醇二硬脂酸酯、单硬脂酸甘油酯、和丙二醇单硬脂酸酯、聚乙烯醇)、卡

波姆(例如羧基聚亚甲基、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物和羧基乙烯基聚合物)、角叉菜胶、纤维素衍生物(例如羧甲基纤维素钠、粉状纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素)、失水山梨糖醇脂肪酸酯(例如聚氧乙烯失水山梨糖醇单月桂酸酯[吐温®20]、聚氧乙烯失水山梨糖醇[吐温®60]、聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯[吐温®80]、失水山梨糖醇单棕榈酸酯[司盘(Span)®40]、失水山梨糖醇单硬脂酸酯[司盘®60]、失水山梨糖醇三硬脂酸酯[司盘®65]、单油酸甘油酯、失水山梨糖醇单油酸酯[司盘®80])、聚氧乙烯酯(例如聚氧乙烯单硬脂酸酯[卖泽(Myrij)®45]、聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚乙氧基化蓖麻油、聚氧亚甲基硬脂酸酯和Solutol®)、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯(例如克列莫佛®(Cremophor®))、聚氧乙烯醚(例如聚氧乙烯十二烷基醚[Brij®30])、聚(乙烷基-吡咯烷酮)、二甘醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、油酸钠、油酸钾、油酸乙酯、油酸、十二烷酸乙酯、十二烷基硫酸钠、普流尼克®F68(Pluronic®F68)、泊洛沙姆®188(Poloxamer®188)、西曲溴铵(cetrimonium bromide)、西吡氯铵(cetylpyridinium chloride)、苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、多库酯钠(docusate sodium)等、和/或它们的组合。

[0844] 示例性的粘合剂包括但不限于淀粉(例如玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露醇);天然和合成的胶(例如阿拉伯胶、藻酸钠、爱尔兰藓的提取物(extract of Irish moss)、panwar胶、印度树胶(ghatti gum)、依莎贝果壳粘液(mucilage of isapol husks)、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、醋酸纤维素、聚(乙烷基-吡咯烷酮)、硅酸镁铝(Veegum®)和落叶松阿拉伯半乳聚糖)、藻酸盐、聚氧化乙烯、聚乙二醇、无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸酯;蜡;水;醇等;和它们的组合。

[0845] 示例性的防腐剂可以包括但不限于抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸性防腐剂和/或其它防腐剂。示例性的抗氧化剂包括但不限于 α -生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯(acorbyl palmitate)、丁羟茴醚、丁羟甲苯、单硫代甘油、焦亚硫酸钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠和/或亚硫酸钠。示例性的螯合剂包括乙二胺四乙酸(EDTA)、一水柠檬酸、依地酸二钠、依地酸二钾、依地酸、富马酸、苹果酸、磷酸、依地酸钠、酒石酸和/或依地酸三钠。示例性的抗微生物防腐剂包括但不限于苯扎氯铵、苄索氯铵(benzethonium chloride)、苯甲醇、溴硝丙二醇、溴化十六烷基三甲铵、西吡氯铵、氯己定(chlorhexidine)、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲苯酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶(hexetidine)、咪脲(imidurea)、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、硝酸苯汞、丙二醇和/或硫柳汞(thimerosal)。示例性抗真菌防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠、和/或山梨酸。示例性醇防腐剂包括但不限于乙醇、聚乙二醇、苯酚、酚类化合物、双酚、氯丁醇、羟苯酸酯、和/或苯乙醇。示例性的酸性防腐剂包括但不限于维生素A、维生素C、维生素E、 β -胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢乙酸、抗坏血酸、山梨酸、和/或植酸。其它防腐剂包括但不限于生育酚、生育酚乙酸酯、甲磺酸次胍酯(deteroxime mesylate)、溴化十六烷基三甲铵、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁羟甲苯(butylated hydroxytoluened)(BHT)、乙二胺、十二烷基硫酸钠(SLS)、十二烷基醚硫酸钠(SLES)、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钾、焦亚硫酸钾、Glydant Plus®、Phenonip®、对羟基苯甲酸甲酯、

Germall®115、Germaben®II、Neolone™、卡松(Kathon)™和/或Euxyl®。

[0846] 示例性的缓冲剂包括但不限于柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙(calcium glubionate)、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、d-葡萄糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、丙酸、戊酮酸钙、戊酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸三钙、氢氧化钙磷酸盐(calcium hydroxide phosphate)、乙酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、氨基丁三醇、氢氧化镁、氢氧化铝、藻酸、无热原水、等渗盐水、林格溶液(Ringer's solution)、乙醇等、和/或它们的组合。

[0847] 示例性的润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、二氧化硅、滑石、麦芽、甘油山嵛酸酯(glyceryl behenate)、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、十二烷基硫酸镁、十二烷基硫酸钠等、和它们的组合。

[0848] 示例性的油包括但不限于扁桃油、杏仁油、鳄梨油、巴巴苏油、佛手柑油、黑加仑籽油、琉璃苣油、杜松油、甘菊油、菜籽油、香菜油、巴西棕榈油、蓖麻油、肉桂油、可可油、椰子油、鳕鱼肝油、咖啡油、玉米油、棉籽油、鹌鹑油、桉树油、月见草油、鱼油、亚麻籽油、香叶醇油、葫芦油、葡萄籽油、榛子油、海索草油、肉豆蔻酸异丙酯、荷荷巴(jojoba)油、夏威夷果(kukui nut)油、杂薰衣草油、薰衣草油、柠檬油、山苍子油、澳洲坚果(macademia nut)油、锦葵油、芒果籽油、白芒花籽油、貂油、肉豆蔻油、橄榄油、橙油、大西洋胃胸鲷(orange roughy)油、棕榈油、棕榈仁油、桃仁油、花生油、罂粟籽油、南瓜籽油、油菜籽油、米糠油、迷迭香油、红花油、檀香油、山茶花(sasquana)油、香薄荷(savoury)油、沙棘油、芝麻油、乳木果油、硅油、大豆油、向日葵油、茶树油、蓟油、椿(tsubaki)油、香根草油、核桃油和小麦胚芽油。示例性的油包括但不限于硬脂酸丁酯、辛酸甘油三酯、癸酸甘油三酯、环甲基硅酮、癸二酸二乙酯、二甲聚硅氧烷360、肉豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二烷醇、油醇、硅油、和/或它们的组合。

[0849] 用于口服和肠胃外施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、悬浮液、糖浆剂和/或酞剂。除了活性成分，液体剂型可包含本领域中常用的惰性稀释剂，如，例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂，如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(尤其是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇类和失水山梨糖醇的脂肪酸酯、和它们的混合物。除了惰性稀释剂外，口服组合物可包括佐剂，如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和/或香味剂。在肠胃外施用的某些实施方式中，组合物与增溶剂混合，所述增溶剂如克列莫佛®、醇、油、修饰的油、二醇、聚山梨醇酯、环糊精、聚合物、和/或它们的组合。

[0850] 可注射制剂，例如无菌可注射的水性或油性悬浮液可以使用适当的分散剂、润湿剂和/或悬浮剂通过本领域已知的技术进行配制。无菌可注射制剂可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂和/或溶剂中的无菌可注射的溶液、悬浮液和/或乳状液，例如为1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的媒介和溶剂有水、林格溶液U.S.P.、和等渗氯化钠溶液。无菌的固定油通常用作溶剂或悬浮介质。出于此目的，可以使用任何温和的(bland)固定油，包括合成的甘油单酯或二酯。脂肪酸如油酸可以用于可注射制剂的制备中。

[0851] 可注射制剂可以例如通过细菌截留过滤器过滤和/或通过将灭菌剂引入到使用前

可被溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质的无菌固体组合物形式中进行灭菌。

[0852] 为了延长有效成分的效果,经常期望延缓经皮下或肌内注射的活性成分的吸收。这可以通过使用水溶性差的结晶或非晶物质的液体悬浮液来实现。药物的吸收速率取决于其溶出速率,该溶出速率又可取决于晶体大小和晶型。或者,肠胃外施用的药物形式的延迟吸收通过将药物溶解或悬浮于油媒介中来实现。可注射的储库形式(depot forms)通过在可生物降解的聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中形成药物的微囊基质进行制备。根据药物与聚合物的比例和所使用的特定聚合物的性质,可以控制药物释放的速率。其它可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。储库可注射制剂通过将药物包封在与身体组织相容的脂质体或微型乳剂中进行制备。

[0853] 用于直肠或阴道施用的组合物通常是栓剂,其可通过将组合物与合适的非刺激性的赋形剂混合进行制备,所述赋形剂如可可脂、聚乙二醇或栓剂用蜡,其在室温下是固体但在体温下是液体,因此能在直肠或阴道腔内融化并释放活性成分。

[0854] 用于口服施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在这些固体剂型中,活性成分与至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂混合,所述赋形剂如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或填充剂或增量剂(例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸)、粘合剂(例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶)、湿润剂(例如甘油)、崩解剂(例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐、和碳酸钠)、溶液阻滞剂(例如石蜡)、吸收加速剂(例如季铵类化合物)、润湿剂(例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯)、吸收剂(例如高岭土和膨润粘土)、和润滑剂(例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠)、和它们的混合物。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况中,剂型可包含缓冲剂。

[0855] 相似类型的固体组合物可以用作使用如乳糖或奶糖以及高分子量的聚乙二醇等的赋形剂的软和硬填充明胶胶囊中的填充剂。片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可以制备成具有包衣和外壳,如肠溶衣和药物制剂领域中公知的其它包衣。其可任选地包含遮光剂并且可以具有任选地以延迟的方式仅在或优先在肠道的某一部分释放一种或多种活性成分的组合物。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡类。相似类型的固体组合物可以用作使用如乳糖或奶糖以及高分子量的聚乙二醇等的赋形剂的软和硬填充明胶胶囊中的填充剂。

[0856] 用于局部和/或经皮施用的组合物的剂型可包括软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、粉剂、溶液剂、喷雾剂、吸入剂和/或贴剂。通常,在无菌条件下将活性成分与药学上可接受的赋形剂和/或需要时任何需要的防腐剂和/或缓冲剂混合。另外,本发明涵盖透皮贴剂的使用,透皮贴剂通常具有使化合物受控递送到身体的额外优势。这类剂型可以例如通过在适当的介质中溶解和/或分散化合物来制备。或者或另外,可以通过提供速率控制膜和/或在聚合物基质和/或凝胶中分散化合物来控制速率。

[0857] 用于皮内递送本文所述的药物组合物的适当装置包括短针装置,如在美国专利4,886,499、5,190,521、5,328,483、5,527,288、4,270,537、5,015,235、5,141,496和5,417,662中所述的那些。皮内组合物可通过限制针进入皮肤的有效穿透长度的装置进行施用,所述装置如在PCT公开W099/34850中描述的那些装置及其功能等同装置进行施用。射流式注射装置是适合的,其经由液体射流式注射器和/或经由刺入角质层并产生到达真皮的射流的针将液体组合物递送到真皮。射流注射装置描述于例如美国专利5,480,381、5,599,302、

5,334,144、5,993,412、5,649,912、5,569,189、5,704,911、5,383,851、5,893,397、5,466,220、5,339,163、5,312,335、5,503,627、5,064,413、5,5206,39、4,596,556、4,790,824、4,941,880、4,940,460和PCT公开W097/37705和W097/13537中。使用压缩气体以加速粉末形式的疫苗穿过皮肤的外层到达真皮的弹道粉末(Ballistic powder)/颗粒递送装置是适合的。或者或另外,常规注射器可用于皮内施用的经典曼托法(classical mantoux method)。

[0858] 适合于局部施用的制剂包括但不限于液体和/或半液体制剂如搽剂、洗剂、水包油和/或油包水乳剂(如霜剂、软膏和/或糊剂)、和/或溶液和/或悬浮液。局部施用的制剂可以例如包含约1%至约10%(w/w)的活性成分,但活性成分的浓度可高至活性成分在溶剂中的溶解极限。用于局部施用的制剂可进一步包括一种或多种本文所述的其它成分。

[0859] 可以以适合于经口腔的肺部施用的制剂的形式制备、包装和/或销售药物组合物。这样的制剂可以包含干颗粒,所述干颗粒包含活性成分,且具有约0.5nm至约7nm或约1nm至约6nm范围内的直径。这样的组合物宜为干粉形式,以便使用包含干粉储存器的装置(可将推进剂流引导至所述干粉储存器以分散粉末)和/或使用自推进溶剂/粉末分散容器(诸如包含在密闭容器中的溶解和/或悬浮于低沸点推进剂的活性成分的装置)给药。这样的粉末包含颗粒,其中按重量计至少98%的颗粒的直径大于0.5nm并且按数量计至少95%的颗粒的直径小于7nm。或者,按重量计至少95%的颗粒的直径大于1nm并且按数量计至少90%的颗粒的直径小于6nm。干粉末组合物可包括固体细粉稀释剂如糖,且宜以单位剂量形式提供。

[0860] 低沸点推进剂通常包括在大气压下具有低于65°F的沸点的液体推进剂。通常,推进剂可占组合物的50%至99.9%(w/w),并且活性成分可占组合物的0.1%至20%(w/w)。推进剂可进一步包含其它成分,例如液体非离子型和/或固体阴离子型表面活性剂和/或固体稀释剂(其可以具有与包含活性成分的颗粒相同数量级的粒径)。

[0861] 配制用于肺部递送的药物组合物可以以溶液和/或悬浮液液滴的形式提供活性成分。这样的制剂可以作为包含活性成分的任选无菌的水性和/或稀醇溶液和/或悬浮液进行制备、包装和/或销售,并且宜使用任何喷雾和/或雾化装置进行施用。这样的制剂可以进一步包含一种或多种其它成分,包括但不限于调味剂如糖精钠、挥发性油、缓冲剂、表面活性剂、和/或防腐剂如羟基苯甲酸甲酯。通过这种施用途径提供的液滴的平均直径可以在约0.1nm至约200nm的范围内。

[0862] 本文所述的适用于肺部递送的制剂也可用于鼻内递送药物组合物。适用于鼻内施用的另一制剂是包含活性成分且平均粒径为约0.2 μ m至500 μ m的粗粉。这样的制剂以采取鼻烟的方式进行施用,即从保持靠近鼻孔的粉末容器中经鼻道迅速吸入。

[0863] 适用于经鼻施用的制剂可以例如包含少至约0.1%(w/w)至多至100%(w/w)的活性成分,并可包含一种或多种本文所述的其它成分。可以以适合于口腔施用的制剂制备、包装和/或销售药物组合物。这样的制剂可以例如是通过常规方法制备的片剂和/或锭剂的形式,并且可以例如包含0.1%至20%(w/w)的活性成分,剩余部分包含口服可溶解和/或可降解的组合物和任选的一种或多种本文所述的其它成分。或者,适合于口腔施用的制剂可包括包含活性成分的粉剂和/或气雾化和/或雾化的溶液和/或悬浮液。这些粉末化的、气雾化的和/或雾化的制剂在分散时可具有约0.1nm至约200nm范围内的平均粒径和液滴尺寸,并可以进一步包含一种或多种本文所述的任何其它成分。

[0864] 可以以适合于眼部施用的制剂形式制备、包装和/或销售药物组合物。这样的制剂可以例如是滴眼液形式,包括例如0.1/1.0% (w/w) 的活性成分在水性或油性液体赋形剂中的溶液和/或悬浮液。这样的滴剂可进一步包含缓冲剂、盐和/或一种或多种其它的本文所述的任何其它成分。其它有用的可眼部施用的制剂包括活性成分以微晶形式和/或在脂质体制剂中的那些制剂。预期滴耳液和/或滴眼液都涵盖在本发明的范围之内。

[0865] 药剂的配制和/或制造方面的一般考虑因素可参见,例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy第21版,Lippincott Williams&Wilkins,2005(以引用的方式并入本文)。

[0866] 施用

[0867] 本发明提供了包括对有需要的受试者施用根据本发明的蛋白或复合物的方法。蛋白或复合物或其药物组合物、成像组合物、诊断组合物或预防组合物,可以使用任何有效量和任何有效施用途径施用于受试者来预防、治疗、诊断或成像疾病、病症和/或病况(例如,与工作记忆衰退相关的疾病、病症和/或病况)。所需的确切的量依据受试者的种类、年龄和一般状况、疾病的严重程度、特定的组合物、其施用方式、其活性方式等随不同受试者而变化。本发明的组合物通常被配制成剂量单位形式,以便于施用和剂量均匀。然而,可以理解的是,本发明的组合物的总日用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。对于任何特定患者的具体的治疗有效的、预防有效的或适当成像的剂量水平取决于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重程度;所使用的具体化合物的活性;所使用的具体组合物;患者的年龄、体重、健康状况、性别和饮食;所使用的具体化合物的施用时间、施用途径、和排泄速率;治疗的持续时间;与所使用的具体化合物联合或同时使用的药物;以及医学领域公知的类似因素。

[0868] 待递送的蛋白和/或其药物、预防、诊断或成像组合物可以施用于动物,如哺乳动物(例如,人类、家养动物、猫、狗、小鼠、大鼠等)。在一些实施方式中,其药物组合物、预防组合物、诊断组合物或成像组合物施用于人类。

[0869] 根据本发明的待递送的蛋白和/或其药物组合物、预防组合物、诊断组合物或成像组合物,可以通过任何途径施用。在一些实施方式中,蛋白和/或其药物组合物、预防组合物、诊断组合物或成像组合物通过各种途径中的一种或多种施用,包括口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、皮下、心室内、经皮、皮内(interdermal)、直肠、阴道内、腹膜内、局部(例如通过粉剂、软膏剂、乳膏剂、凝胶剂、洗剂和/或滴剂)、经粘膜、经鼻、经口腔、肠内、经玻璃体、瘤内、舌下;通过气管内滴注、支气管滴注和/或吸入;作为口腔喷雾剂、鼻喷雾剂和/或气雾剂、和/或通过门静脉导管。在一些实施方式中,蛋白或复合物和/或其药物组合物、预防组合物、诊断组合物或成像组合物是通过全身性静脉内注射施用。在具体的实施方式中,蛋白或复合物和/或其药物组合物、预防组合物、诊断组合物或成像组合物可以静脉施用和/或口服施用。在具体的实施方式中,蛋白或复合物和/或其药物组合物、预防组合物、诊断组合物或成像组合物可以通过使蛋白或复合物穿过血-脑屏障、血管屏障或其它上皮屏障的方式进行施用。

[0870] 但是,本发明涵盖通过考虑药物递送科学中可能进展的任何适宜的途径来递送蛋白或复合物和/或其药物组合物、预防组合物、诊断组合物或成像组合物。

[0871] 通常,最适宜的施用途径取决于多种因素,包括蛋白或包含与至少一种待递送的

药剂相关的蛋白的复合物的性质(例如,其在胃肠道、血流等环境中的稳定性)、患者的情况(例如,患者是否能够耐受特定的施用途径)等。本发明涵盖通过考虑在药物递送科学中可能的进展的任何适宜的途径递送药物组合物、预防组合物、诊断组合物或成像组合物。

[0872] 在某些实施方式中,本发明的组合物以足以递送约0.0001mg/kg至约100mg/kg、约0.01mg/kg至约50mg/kg、约0.1mg/kg至约40mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、或约1mg/kg至约25mg/kg受试者体重的日剂量水平,一天一次或多次进行给药,以获得所需的治疗、诊断、预防或成像效果。可一天三次、一天二次、一天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周或每四周递送所需的剂量。在某些实施方式中,可使用多次施用(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多次施用)来递送所需的剂量。

[0873] 蛋白或复合物可以与一种或多种其它治疗剂、预防剂、诊断剂或成像剂联合使用。“联合(in combination with)”并不意指药剂必须在同一时间施用和/或被配制成一起递送,虽然这些递送方法都在本发明的范围之内。组合物可与一种或多种其它所需的治疗剂或医学程序同时或在之前或在之后施用。通常,每个药剂按照对该药剂确定的剂量和/或时间表进行施用。在一些实施方式中,本发明涵盖递送与药剂联合的药物组合物、预防组合物、诊断组合物或成像组合物,所述药剂提高它们的生物利用率、降低和/或改变它们的代谢、抑制它们的排泄和/或改变它们在体内的分布。

[0874] 可进一步理解,联合应用的治疗、预防、诊断或成像活性剂可以以单一组合物一起施用或以不同的组合物分别施用。通常,预期联合应用的药剂以不超过其单独应用时的水平的水平应用。在一些实施方式中,联合应用的水平比单独应用时的水平低。

[0875] 联合方案中所使用的治疗方法(治疗剂或程序)的特定组合将考虑所期望的治疗剂和/或程序与所期望要达到的治疗效果的相容性。还可理解,所使用的治疗方法可以对相同的病症达到所期望的效果(例如,根据本发明的用于治疗癌症的组合物可以与化疗剂同时施用),或它们可以达到不同的效果(例如,控制任何副作用)。

[0876] 试剂盒

[0877] 本发明提供了多种用于方便地和/或有效地实施本发明的方法的试剂盒。典型的试剂盒包括足够量和/或足够数量的组分以允许使用者对受试者进行多次治疗和/或进行多次实验。

[0878] 在一个方面中,本发明提供了用于蛋白生产的试剂盒,其包括包含可翻译区和核酸修饰的第一分离的核酸,其中该核酸能够逃避或避免诱导引入该第一分离的核酸的细胞的先天免疫应答;以及包装和说明书。

[0879] 在一个方面中,本发明提供了用于蛋白生产的试剂盒,其包含:包含可翻译区的第一分离的修饰的核酸,其以在被引入到靶细胞时有效产生期望量的由该可翻译区编码的蛋白的量提供;包含抑制性核酸的第二核酸,其以基本上抑制该细胞的先天免疫应答的量提供;以及包装和说明书。

[0880] 在一个方面中,本发明提供了用于蛋白生产的试剂盒,其包括包含可翻译区和核苷修饰的第一分离的核酸,其中该核酸表现出降低的由细胞核酸酶引起的降解;以及包装和说明书。

[0881] 在一个方面中,本发明提供了用于蛋白生产的试剂盒,其包括包含可翻译区和至

少两个不同的核苷修饰的第一分离的核酸,其中该核酸表现出降低的由细胞核酸酶引起的降解;以及包装和说明书。

[0882] 在一个方面中,本发明提供了用于蛋白生产的试剂盒,其包括包含可翻译区和至少一个核苷修饰的第一分离的核酸,其中该核酸表现出降低的由细胞核酸酶引起的降解;包含抑制性核酸的第二核酸;以及包装和说明书。

[0883] 在一些实施方式中,第一分离的核酸包含信使RNA (mRNA)。在一些实施方式中,mRNA包含至少一个选自下列的核苷:吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基尿苷、3-甲基尿苷、5-羧基甲基-尿苷、1-羧基甲基-假尿苷、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代-尿苷、5-甲基-尿苷、1-甲基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷、二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷或本文所公开的任何核苷。

[0884] 在一些实施方式中,mRNA包含至少一个选自下列的核苷:5-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷、N4-乙酰基胞苷、5-甲酰基胞苷、N4-甲基胞苷、5-羟基甲基胞苷、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、泽布拉林、5-氮杂-泽布拉林、5-甲基-泽布拉林、5-氮杂-2-硫代-泽布拉林、2-硫代-泽布拉林、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷或本文所公开的任何核苷。

[0885] 在一些实施方式中,mRNA包含至少一个选自下列的核苷:2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、2-甲基硫代-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、N6-甘氨酸基氨基甲酰基腺苷、N6-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷、2-甲基硫代-N6-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲基硫代-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤或本文所公开的任何核苷。

[0886] 在一些实施方式中,mRNA包括至少一个选自下列的核苷:肌苷、1-甲基-肌苷、γ-苷、怀丁苷、7-脱氮-鸟苷、7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基鸟苷、N2-甲基鸟苷、N2,N2-二甲基鸟苷、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷、N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷或本文所公开的任何核苷。

[0887] 在另一个方面中,本发明提供了用于蛋白生产的组合物,其包括包含可翻译区和核苷修饰的第一分离的核酸,其中该核酸表现出降低的由细胞核酸酶引起的降解;以及适合于第一核酸的可翻译区的翻译的哺乳动物细胞。

[0888] 定义

[0889] 在本说明书中的各处,以组或以范围公开了本发明的化合物的取代基。具体是指,

本发明包括所述组和范围内的成员的每一个独立的子组合。例如,术语“C₁₋₆烷基”具体是指独立地公开甲基、乙基、C₃烷基、C₄烷基、C₅烷基和C₆烷基。

[0890] 约:如本文所用,术语“约”是指所列举的值的+/-10%。

[0891] 联合施用(Administered in combination):如本文所用,术语“联合施用”或“联合的施用”是指同时或在使每个药剂对患者的作用可以有重叠的间隔内对受试者施用两种或更多种药剂。在一些实施方式中,其在另一个施用约60、30、15、10、5或1分钟内施用。在一些实施方式中,药剂的施用间隔足够紧密,使达到组合(例如,协同)作用。

[0892] 动物(Animal):如本文所用,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方式中,“动物”是指在任何发育阶段的人类。在一些实施方式中,“动物”是指在任何发育阶段的非人类动物。在某些实施方式中,非人类动物是哺乳动物(例如啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、羊、牛、灵长类动物或猪)。在一些实施方式中,动物,包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼类和虫类。在一些实施方式中,动物是转基因动物、基因工程动物、或克隆。

[0893] 目标抗原或所期望的抗原(Antigens of interest or desired antigens):如本文所用,术语“目标抗原”或“所期望的抗原”包括被本文所述的抗体及其片段、突变体、变体和改造体(alteration)免疫特异性地结合的那些蛋白和本文所提供的其他生物分子。目标抗原的实例包括但不限于胰岛素,胰岛素样生长因子,hGH,tPA,细胞因子,如白介素(IL),例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18;干扰素(IFN) α 、IFN β 、IFN γ 、IFN ω 或IFN τ ;肿瘤坏死因子(TNF)如TNF α 和TNF β 、TNF γ 、TRAIL;G-CSF、GM-CSF、M-CSF、MCP-1和VEGF。

[0894] 大约:如本文所用,术语“大约”或“约”,在应用于一个或多个目标值时,是指相似于所述参考值的值。在某些实施方式中,术语“大约”或“约”除非另有说明是指落入所述参考值值的任一方向(大于或小于)上的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的值内的值的范围,或者以其它方式从文中明显可见的(除非这样的数字超过可能值的100%)。

[0895] 缔合(Associated with):如本文所用,术语“缔合”、“缀合(conjugated)”、“连接(linked)”、“连接(attached)”和“栓系(tethered)”,当相对于两个或更多个部分使用时,意指该部分是直接地或通过一个或多个用作连接剂的另外的部分与另一个部分物理缔合或连接以形成足够稳定的结构,以使这些部分在结构所使用的条件例如生理条件下保持物理缔合。“缔合”不需要是严格地通过直接的共价化学键合。其也可以指足够稳定的离子键合或氢键键合或基于杂化的连接关系,以使“缔合”实体保持物理缔合。

[0896] 生物相容的(Biocompatible):如本文所用,术语“生物相容的”指与活细胞、组织、器官或系统相容,产生极少的至不产生损伤、毒性或被免疫系统排斥的风险。

[0897] 可生物降解的(Biodegradable):如本文所用,术语“可生物降解的”是指能够被活物的活动分解成无害产物。

[0898] 生物活性的(Biologically active):如本文所用,短语“生物活性的”是指在生物系统和/或有机体内具有活性的任何的物质的表征。例如,当施用于有机体时对该有机体具有生物作用的物质被认为是生物活性的。在具体的实施方式中,本发明的多核苷酸可被视为生物活性的,即使该多核苷酸的一部分是生物活性的或模拟被视为生物学相关的活性。

[0899] 化学术语:以下提供了从“酰基”至“巯基”的各种化学术语的定义。

[0900] 本文所用的术语“酰基”表示通过如本文所定义的羰基基团连接于母体分子基团上的氢或如本文所定义的烷基基团(例如,卤代烷基基团),并且其实例是甲酰基(即甲醛基团)、乙酰基、三氟乙酰基、丙酰基、丁酰基等。示例性的未取代的酰基基团包括1至7、1至11、或1至21个碳。在一些实施方式中,烷基基团进一步被如本文所述的1、2、3或4个取代基取代。

[0901] 本文所用的术语“酰基氨基”表示通过如本文所定义的氨基基团连接于母体分子基团上的如本文所定义的酰基基团(即 $-N(R^{N1})-C(O)-R$,其中R是H或任选取代的 C_{1-6} 、 C_{1-10} 或 C_{1-20} 烷基基团(例如卤代烷基),和 R^{N1} 如本文所定义)。示例性的未取代的酰基氨基包括1至41个碳(例如,1至7、1至13、1至21、2至7、2至13、2至21或2至41个碳)。在一些实施方式中,烷基基团进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基取代,和/或氨基基团是 $-NH_2$ 或 $-NHR^{N1}$,其中 R^{N1} 独立地是OH、 NO_2 、 NH_2 、 NR^{N2} 、 SO_2OR^{N2} 、 SO_2R^{N2} 、 SOR^{N2} 、烷基、芳基、酰基(例如,乙酰基、三氟乙酰基或本文所述的其它酰基)、或烷氧基羰基烷基,且每个 R^{N2} 可以是H、烷基或芳基。

[0902] 本文所用的术语“酰基氨基烷基”表示连接于氨基基团的如本文所定义的酰基基团,所述氨基基团又通过如本文所定义的烷基基团连接于母体分子基团(即, $-烷基-N(R^{N1})-C(O)-R$,其中R是H或任选取代的 C_{1-6} 、 C_{1-10} 或 C_{1-20} 烷基基团(例如卤代烷基),和 R^{N1} 如本文所定义)。示例性的未取代的酰基氨基基团包括1至41个碳(例如,1至7、1至13、1至21、2至7、2至13、2至21、或2至41个碳)。在一些实施方式中,烷基基团进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基取代,和/或氨基基团是 $-NH_2$ 或 $-NHR^{N1}$,其中 R^{N1} 独立地是OH、 NO_2 、 NH_2 、 NR^{N2} 、 SO_2OR^{N2} 、 SO_2R^{N2} 、 SOR^{N2} 、烷基、芳基、酰基(例如,乙酰基、三氟乙酰基或本文所述的其它酰基)、或烷氧基羰基烷基,且每个 R^{N2} 可以是H、烷基或芳基。

[0903] 本文所用的术语“酰氧基”表示通过氧原子连接于母体分子基团的如本文所定义的酰基基团(即, $-O-C(O)-R$,其中R是H或任选取代的 C_{1-6} 、 C_{1-10} 或 C_{1-20} 烷基基团)。示例性的未取代的酰氧基基团包括1至21个碳(例如,1至7、或1至11个碳)。在一些实施方式中,烷基基团进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基取代。

[0904] 本文所用的术语“酰氧基烷基”表示连接于氧原子的如本文所定义的酰基基团,所述氧原子又通过烷基基团连接于母体分子基团(即, $-烷基-O-C(O)-R$,其中R是H或任选取代的 C_{1-6} 、 C_{1-10} 或 C_{1-20} 烷基基团)。示例性的未取代的酰氧基烷基基团包括1至21个碳(例如,1至7、或1至11个碳)。在一些实施方式中,烷基基团进一步独立地被1、2、3或4个如本文所述的取代基取代。

[0905] 本文所用的术语“烷芳基”表示通过如本文所定义的亚烷基基团连接于母体分子基团的如本文所定义的芳基基团。示例性的未取代的烷芳基基团是7至30个碳(例如,7至16、或7至20个碳,如 C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基、 C_{1-10} 烷- C_{6-10} 芳基或 C_{1-20} 烷- C_{6-10} 芳基)。在一些实施方式中,亚烷基和芳基各自可以进一步被1、2、3或4个如本文对于各自的基团所定义的取代基基团取代。加上前缀“烷-”的其它基团以同样的方式进行定义,其中“烷”除非另有说明是指 C_{1-6} 亚烷基,并且所连接的化学结构如本文所定义。

[0906] 术语“烷环烷基”表示通过如本文所定义的亚烷基连接于母体分子基团的如本文所定义的环烷基基团(例如,1至4、1至6、1至10、或1至20个碳的亚烷基基团)。在一些实施方式中,亚烷基和环烷基各自可进一步被1、2、3或4个如本文对各自的基团所定义的取代基基

团取代。

[0907] 本文所用的术语“烯基”表示含有一个或多个碳-碳双键的2至20个碳(除非另有说明)(例如,2至6、或2至10个碳)的一价直链或支链基团,其实例是乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基等。烯基包括顺式和反式异构体。烯基基团可以任选地被1、2、3或4个取代基基团取代,所述取代基基团独立选自如本文所定义的氨基、芳基、环烷基或杂环基(例如杂芳基)或者本文所述的任何示例性烷基取代基基团。

[0908] 术语“烯氧基”表示式-OR的化学取代基,其中R除非另有说明是C₂₋₂₀烯基基团(例如,C₂₋₆或C₂₋₁₀烯基)。示例性的烯氧基基团包括乙烯氧基、丙烯氧基等。在一些实施方式中,烯基基团可以进一步被1、2、3或4个如本文所定义的取代基基团(例如,羟基基团)取代。

[0909] 术语“烷杂芳基”是指通过如本文所定义的亚烷基基团连接于母体分子基团的如本文所定义的杂芳基基团。示例性的未取代的烷杂芳基基团具有2至32个碳(例如,2至22、2至18、2至17、2至16、3至15、2至14、2至13或2至12个碳,如C₁₋₆烷-C₁₋₁₂杂芳基、C₁₋₁₀烷-C₁₋₁₂杂芳基或C₁₋₂₀烷-C₁₋₁₂杂芳基)。在一些实施方式中,亚烷基和杂芳基各自可以进一步被1、2、3或4个如本文对各自的基团所定义的取代基基团取代。烷杂芳基基团是烷杂环基基团的子集。

[0910] 术语“烷杂环基”表示通过如本文所定义的亚烷基基团连接于母体分子基团的如本文所定义的杂环基基团。示例性的未取代的烷杂环基基团具有2至32个碳(例如,2至22、2至18、2至17、2至16、3至15、2至14、2至13、或2至12个碳,如C₁₋₆烷-C₁₋₁₂杂环基、C₁₋₁₀烷-C₁₋₁₂杂环基或C₁₋₂₀烷-C₁₋₁₂杂环基)。在一些实施方式中,亚烷基和杂环基各自可以进一步被1、2、3或4个如本文对各自的基团所定义的取代基基团取代。

[0911] 术语“烷氧基”表示式-OR的化学取代基,其中R除非另有说明是C₁₋₂₀烷基基团(例如,C₁₋₆或C₁₋₁₀烷基)。示例性的烷氧基基团包括甲氧基、乙氧基、丙氧基(例如正丙氧基和异丙氧基)、叔丁氧基等。在一些实施方式中,烷基基团可以进一步被1、2、3或4个如本文所定义的取代基基团(例如,羟基或烷氧基)取代。

[0912] 术语“烷氧基烷氧基”表示被烷氧基基团取代的烷氧基基团。示例性的未取代的烷氧基烷氧基基团包括2至40个碳(例如,2至12或2至20个碳,如C₁₋₆烷氧基-C₁₋₆烷氧基、C₁₋₁₀烷氧基-C₁₋₁₀烷氧基或C₁₋₂₀烷氧基-C₁₋₂₀烷氧基)。在一些实施方式中,每个烷氧基基团可以进一步被1、2、3或4个如本文所定义的取代基基团取代。

[0913] 术语“烷氧基烷基”表示被烷氧基基团取代的烷基基团。示例性的未取代的烷氧基烷基基团包括2至40个碳(例如,2至12或2至20个碳,如C₁₋₆烷氧基-C₁₋₆烷基、C₁₋₁₀烷氧基-C₁₋₁₀烷基或C₁₋₂₀烷氧基-C₁₋₂₀烷基)。在一些实施方式中,烷基和烷氧基各自可以进一步被1、2、3或4个如本文对各自的基团所定义的取代基基团取代。

[0914] 本文所用的术语“烷氧基羰基”表示通过羰基原子连接于母体分子基团的如本文所定义的烷氧基(例如,-C(O)-OR,其中R是H或任选取代的C₁₋₆、C₁₋₁₀或C₁₋₂₀烷基基团)。示例性的未取代的烷氧基羰基包括1至21个碳(例如,1至11、或1至7个碳)。在一些实施方式中,烷氧基基团进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基取代。

[0915] 本文所用的术语“烷氧基羰基酰基”表示被如本文所定义的烷氧基羰基基团取代的如本文所定义的酰基基团(例如,-C(O)-烷基-C(O)-OR,其中R是任选取代的C₁₋₆、C₁₋₁₀或C₁₋₂₀烷基基团)。示例性的未取代的烷氧基羰基酰基包括3至41个碳(例如,3至10、3至13、3

至17、3至21、或3至31个碳,如C₁₋₆烷氧基羰基-C₁₋₆酰基、C₁₋₁₀烷氧基羰基-C₁₋₁₀酰基、或C₁₋₂₀烷氧基羰基-C₁₋₂₀酰基)。在一些实施方式中,每个烷氧基和烷基基团进一步独立地被1、2、3或4个如本文对各个基团所述的取代基(例如羟基基团)取代。

[0916] 本文所用的术语“烷氧基羰基烷氧基”表示被如本文所定义的烷氧基羰基基团取代的如本文所定义的烷氧基基团(例如,-O-烷基-C(O)-OR,其中R是任选取代的C₁₋₆、C₁₋₁₀或C₁₋₂₀烷基基团)。示例性的未取代的烷氧基羰基烷氧基包括3至41个碳(例如,3至10、3至13、3至17、3至21、或3至31个碳,如C₁₋₆烷氧基羰基-C₁₋₆烷氧基、C₁₋₁₀烷氧基羰基-C₁₋₁₀烷氧基或C₁₋₂₀烷氧基羰基-C₁₋₂₀烷氧基)。在一些实施方式中,每个烷氧基基团进一步独立地被1、2、3或4个如本文所述的取代基(例如,羟基基团)取代。

[0917] 本文所用的术语“烷氧基羰基烷基”表示被如本文所定义的烷氧基羰基基团取代的如本文所定义的烷基基团(例如,-烷基-C(O)-OR,其中R是任选取代的C₁₋₂₀、C₁₋₁₀或C₁₋₆烷基基团)。示例性的未取代的烷氧基羰基烷基包括3至41个碳(例如,3至10、3至13、3至17、3至21、或3至31个碳,如C₁₋₆烷氧基羰基-C₁₋₆烷基、C₁₋₁₀烷氧基羰基-C₁₋₁₀烷基或C₁₋₂₀烷氧基羰基-C₁₋₂₀烷基)。在一些实施方式中,每个烷基和烷氧基基团进一步独立地被1、2、3或4个如本文所述的取代基(例如,羟基基团)取代。

[0918] 本文所用的术语“烷氧基羰基烯基”表示被如本文所定义的烷氧基羰基取代的如本文所定义的烯基基团(例如,-烯基-C(O)-OR,其中R是任选取代的C₁₋₂₀、C₁₋₁₀或C₁₋₆烷基基团)。示例性的未取代的烷氧基羰基烯基包括4至41个碳(例如,4至10、4至13、4至17、4至21或4至31个碳,如C₁₋₆烷氧基羰基-C₂₋₆烯基、C₁₋₁₀烷氧基羰基-C₂₋₁₀烯基或C₁₋₂₀烷氧基羰基-C₂₋₂₀烯基)。在一些实施方式中,每个烷基、烯基和烷氧基基团进一步独立地被1、2、3或4个如本文所述的取代基(例如,羟基基团)取代。

[0919] 本文所用的术语“烷氧基羰基炔基”表示被如本文所定义的烷氧基羰基基团取代的如本文所定义的炔基基团(例如,-炔基-C(O)-OR,其中R是任选取代的C₁₋₂₀、C₁₋₁₀或C₁₋₆烷基基团)。示例性的未取代的烷氧基羰基炔基包括4至41个碳(例如,4至10、4至13、4至17、4至21、或4至31个碳,如C₁₋₆烷氧基羰基-C₂₋₆炔基、C₁₋₁₀烷氧基羰基-C₂₋₁₀炔基或C₁₋₂₀烷氧基羰基-C₂₋₂₀炔基)。在一些实施方式中,每个烷基、炔基和烷氧基基团进一步独立地被1、2、3或4个如本文所述的取代基(例如,羟基基团)取代。

[0920] 除非另有说明,本文所用的术语“烷基”包括1至20个碳(例如,1至10或1至6)的直链和支链的饱和基团。示例性的烷基基团是甲基、乙基、正-和异-丙基;正-、仲-、异-和叔-丁基;新戊基等,并且可以任选地被1、2、3个取代基,或在两个或更多个碳的烷基基团的情况下被4个取代基取代,所述取代基独立地选自:(1) C₁₋₆烷氧基;(2) C₁₋₆烷基亚磺酰基;(3) 如本文所定义的氨基(例如,未取代的氨基(即-NH₂)或取代的氨基(即,-N(R^{N1})₂,其中R^{N1}如对氨基所定义的);(4) C₆₋₁₀芳基-C₁₋₆烷氧基;(5) 叠氮基;(6) 卤素;(7) (C₂₋₉杂环基)氧基;(8) 羟基,任选地被O-保护基团取代;(9) 硝基;(10) 氧代(如甲醛(carboxyaldehyde)或酰基);(11) C₁₋₇螺环基;(12) 硫代烷氧基;(13) 巯基;(14) -CO₂R^A,任选地被O-保护基团取代,且其中R^A选自(a) C₁₋₂₀烷基(例如,C₁₋₆烷基),(b) C₂₋₂₀烯基(例如,C₂₋₆烯基),(c) C₆₋₁₀芳基,(d) 氢,(e) C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基,(f) 氨基-C₁₋₂₀烷基,(g) -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR'的聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个s2和s3独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,和R'是H或C₁₋₂₀烷基,和(h) -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)

s_3NR^{N1} 的氨基-聚乙二醇,其中 s_1 是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个 s_2 和 s_3 独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,和每个 R^{N1} 独立地是氢或任选取代的 C_{1-6} 烷基;(15) $-C(O)NR^B R^C$,其中每个 R^B 和 R^C 独立地选自(a)氢,(b) C_{1-6} 烷基,(c) C_{6-10} 芳基和(d) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基;(16) $-SO_2R^D$,其中 R^D 选自(a) C_{1-6} 烷基,(b) C_{6-10} 芳基,(c) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基和(d)羟基;(17) $-SO_2NR^E R^F$,其中每个 R^E 和 R^F 独立地选自(a)氢,(b) C_{1-6} 烷基,(c) C_{6-10} 芳基和(d) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基;(18) $-C(O)R^G$,其中 R^G 选自(a) C_{1-20} 烷基(例如, C_{1-6} 烷基),(b) C_{2-20} 烯基(例如, C_{2-6} 烯基),(c) C_{6-10} 芳基,(d)氢,(e) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基,(f)氨基- C_{1-20} 烷基,(g) $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$ 的聚乙二醇,其中 s_1 是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个 s_2 和 s_3 独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,和 R' 是H或 C_{1-20} 烷基,和(h) $-NR^{N1}(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^{N1}$ 的氨基-聚乙二醇,其中 s_1 是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个 s_2 和 s_3 独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,和每个 R^{N1} 独立地是氢或任选取代的 C_{1-6} 烷基;(19) $-NR^H C(O)R^I$,其中 R^H 选自(a1)氢和(b1) C_{1-6} 烷基,和 R^I 选自(a2) C_{1-20} 烷基(例如, C_{1-6} 烷基),(b2) C_{2-20} 烯基(例如, C_{2-6} 烯基),(c2) C_{6-10} 芳基,(d2)氢,(e2) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基,(f2)氨基- C_{1-20} 烷基,(g2) $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$ 的聚乙二醇,其中 s_1 是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个 s_2 和 s_3 独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,和 R' 是H或 C_{1-20} 烷基,和(h2) $-NR^{N1}(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^{N1}$ 的氨基-聚乙二醇,其中 s_1 是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个 s_2 和 s_3 独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,和每个 R^{N1} 独立地是氢或任选取代的 C_{1-6} 烷基;(20) $-NR^J C(O)OR^K$,其中 R^J 选自(a1)氢和(b1) C_{1-6} 烷基,和 R^K 选自(a2) C_{1-20} 烷基(例如, C_{1-6} 烷基),(b2) C_{2-20} 烯基(例如, C_{2-6} 烯基),(c2) C_{6-10} 芳基,(d2)氢,(e2) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基,(f2)氨基- C_{1-20} 烷基,(g2) $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$ 的聚乙二醇,其中 s_1 是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个 s_2 和 s_3 独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,和 R' 是H或 C_{1-20} 烷基,和(h2) $-NR^{N1}(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^{N1}$ 的氨基-聚乙二醇,其中 s_1 是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个 s_2 和 s_3 独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,和每个 R^{N1} 独立地是氢或任选取代的 C_{1-6} 烷基;和(21)脘。在一些实施方式中,这些基团中的每一个可以如本文所述被进一步取代。例如, C_{1-} 烷芳基的亚烷基基团可以进一步被氧代基团取代以得到相应的芳酰基取代基。

[0921] 本文所用的术语“亚烷基”和前缀“烷-”表示通过移除两个氢原子从直链或支链饱和和烃衍生的饱和二价烃基团,其实例是亚甲基、亚乙基、亚异丙基等。术语“ C_{x-y} 亚烷基”和前缀“ C_{x-y} 烷”表示具有 x 和 y 之间个碳的亚烷基基团。 x 的示例性的值是1、2、3、4、5和6, y 的示例性的值是2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18或20(例如, C_{1-6} 、 C_{1-10} 、 C_{2-20} 、 C_{2-6} 、 C_{2-10} 或 C_{2-20} 亚烷基)。在一些实施方式中,亚烷基可以进一步被1、2、3或4个如本文对烷基基团所定义的取代基基团取代。

[0922] 本文所用的术语“烷基亚磺酰基”表示通过-S(O)-基团连接于母体分子基团的烷基基团。示例性的未取代的烷基亚磺酰基是1至6、1至10、或1至20个碳。在一些实施方式中,烷基可以进一步被1、2、3或4个如本文所定义的取代基基团取代。

[0923] 本文所用的术语“烷基亚磺酰基烷基”表示被烷基亚磺酰基基团取代的如本文所定义的烷基。示例性的未取代的烷基亚磺酰基烷基基团具有2至12、2至20、或2至40个碳。在

一些实施方式中,每个烷基基团可以进一步被1、2、3或4个如本文所定义的取代基基团取代。

[0924] 本文所用的术语“炔基”表示包含碳-碳三键的具有2至20个碳原子(例如,2至4、2至6、或2至10个碳)的一价直链或支链基团,其实例是乙炔基、1-丙炔基等。炔基基团可以任选地被1、2、3或4个取代基基团取代,所述取代基基团独立地选自如本文所定义的芳基、环烷基或杂环基(例如杂芳基),或本文所述的任何示例性的烷基取代基基团。

[0925] 术语“炔氧基”表示式-OR的化学取代基,其中,除非另有说明,R是C₂₋₂₀炔基基团(例如,C₂₋₆或C₂₋₁₀炔基)。示例性的炔氧基基团包括乙炔氧基、丙炔氧基等。在一些实施方式中,炔基基团可以进一步被1、2、3或4个如本文所定义的取代基基团(例如,羟基基团)取代。

[0926] 本文所用的术语“脒”表示-C(=NH)NH₂基团。

[0927] 本文所用的术语“氨基”表示-N(R^{N1})₂,其中每个R^{N1}独立地是H、OH、NO₂、N(R^{N2})₂、SO₂OR^{N2}、SO₂R^{N2}、SOR^{N2}、N-保护基团、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、环烷基、烷环烷基、羧基烷基(例如,任选地被O-保护基团如任选取代的芳基烷氧基羰基基团或本文所述的任何O-保护基团取代)、磺基烷基、酰基(例如,乙酰基、三氟乙酰基或本文所述的其它酰基)、烷氧基羰基烷基(例如,任选地被O-保护基团如任选取代的芳基烷氧基羰基基团或本文所述的任何O-保护基团取代)、杂环基(例如杂芳基)、或烷杂环基(例如,烷杂芳基),其中这些所列举的R^{N1}基团中的每一个可以被任选取代,如本文中对各个基团所定义的;或2个R^{N1}结合以形成杂环基或N-保护基团,并且其中每个R^{N2}独立地是H、烷基或芳基。本发明的氨基基团可以是未取代的氨基(即-NH₂)或取代的氨基(例如,-N(R^{N1})₂)。在一个优选的实施方式中,氨基是-NH₂或-NHR^{N1},其中R^{N1}独立地是OH、NO₂、NH₂、NR^{N2}₂、SO₂OR^{N2}、SO₂R^{N2}、SOR^{N2}、烷基、羧基烷基、磺基烷基、酰基(例如,乙酰基、三氟乙酰基或本文所述的其它酰基)、烷氧基羰基烷基(例如,叔丁氧羰基烷基)或芳基,和每个R^{N2}可以是H、C₁₋₂₀烷基(例如,C₁₋₆烷基)或C₆₋₁₀芳基。

[0928] 本文所述的术语“氨基酸”是指具有侧链、氨基基团和酸基团(例如,-CO₂H的羧基基团或-SO₃H的磺基基团)的分子,其中氨基酸通过侧链、氨基基团或酸性基团(例如,侧链)连接于母体分子基团。在一些实施方式中,氨基酸通过羰基基团连接于母体分子基团,其中侧链或氨基基团连接于该羰基基团。示例性的侧链包括任选取代的烷基、芳基、杂环基、烷芳基、烷杂环基、氨基烷基、氨基甲酰基烷基和羧基烷基。示例性的氨基酸包括丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、羟基正缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、正缬氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、吡咯赖氨酸、硒代半胱氨酸、丝氨酸、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。氨基酸基团可以任选地被1、2、3个或者在2个或更多个碳的氨基酸基团的情况下被4个取代基取代,所述取代基独立地选自:(1) C₁₋₆烷氧基;(2) C₁₋₆烷基亚磺酰基;(3) 氨基,如本文所定义的(例如,未取代的氨基(即-NH₂)或取代的氨基(即-N(R^{N1})₂,其中R^{N1}是如对氨基所定义的);(4) C₆₋₁₀芳基-C₁₋₆烷基;(5) 叠氮基;(6) 卤素;(7) (C₂₋₉杂环基)氧基;(8) 羟基;(9) 硝基;(10) 氧代(例如甲醛或酰基);(11) C₁₋₇螺环基;(12) 硫代烷氧基;(13) 巯基;(14) -CO₂R^A,其中R^A选自(a) C₁₋₂₀烷基(例如,C₁₋₆烷基),(b) C₂₋₂₀烯基(例如,C₂₋₆烯基),(c) C₆₋₁₀芳基,(d) 氢,(e) C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基,(f) 氨基-C₁₋₂₀烷基,(g) -(CH₂)_{s2} (OCH₂CH₂)_{s1} (CH₂)_{s3}OR[']的聚乙二醇,其中s₁是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个s₂和s₃独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整

数,和R'是H或C₁₋₂₀烷基,和(h) -NR^{N1} (CH₂)_{s2} (CH₂CH₂O)_{s1} (CH₂)_{s3}NR^{N1}的氨基-聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个s2和s3独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,和每个R^{N1}独立地是氢或任选取代的C₁₋₆烷基;(15) -C(O)NR^B R^C,其中每个R^B和R^C独立地选自:(a)氢,(b)C₁₋₆烷基,(c)C₆₋₁₀芳基,和(d)C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基;(16) -SO₂R^D,其中R^D选自:(a)C₁₋₆烷基,(b)C₆₋₁₀芳基,(c)C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基,和(d)羟基;(17) -SO₂NR^E R^F,其中每个R^E和R^F独立地选自:(a)氢,(b)C₁₋₆烷基,(c)C₆₋₁₀芳基和(d)C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基;(18) -C(O)R^G,其中R^G选自:(a)C₁₋₂₀烷基(例如,C₁₋₆烷基),(b)C₂₋₂₀烯基(例如,C₂₋₆烯基),(c)C₆₋₁₀芳基,(d)氢,(e)C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基,(f)氨基-C₁₋₂₀烷基,(g) -(CH₂)_{s2} (OCH₂CH₂)_{s1} (CH₂)_{s3}OR'的聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个s2和s3独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,和R'是H或C₁₋₂₀烷基,和(h) -NR^{N1} (CH₂)_{s2} (CH₂CH₂O)_{s1} (CH₂)_{s3}NR^{N1}的氨基-聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个s2和s3独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,和每个R^{N1}独立地是氢或任选取代的C₁₋₆烷基;(19) -NR^H C(O)R^I,其中R^H选自:(a1)氢和(b1)C₁₋₆烷基,和R^I选自(a2)C₁₋₂₀烷基(例如,C₁₋₆烷基),(b2)C₂₋₂₀烯基(例如,C₂₋₆烯基),(c2)C₆₋₁₀芳基,(d2)氢,(e2)C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基,(f2)氨基-C₁₋₂₀烷基,(g2) -(CH₂)_{s2} (OCH₂CH₂)_{s1} (CH₂)_{s3}OR'的聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个s2和s3独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,和R'是H或C₁₋₂₀烷基,和(h2) -NR^{N1} (CH₂)_{s2} (CH₂CH₂O)_{s1} (CH₂)_{s3}NR^{N1}的氨基-聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个s2和s3独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,和每个R^{N1}独立地是氢或任选取代的C₁₋₆烷基;(20) -NR^J C(O)OR^K,其中R^J选自:(a1)氢和(b1)C₁₋₆烷基,且R^K选自:(a2)C₁₋₂₀烷基(例如,C₁₋₆烷基),(b2)C₂₋₂₀烯基(例如,C₂₋₆烯基),(c2)C₆₋₁₀芳基,(d2)氢,(e2)C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基,(f2)氨基-C₁₋₂₀烷基,(g2) -(CH₂)_{s2} (OCH₂CH₂)_{s1} (CH₂)_{s3}OR'的聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个s2和s3独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,和R'是H或C₁₋₂₀烷基,和(h2) -NR^{N1} (CH₂)_{s2} (CH₂CH₂O)_{s1} (CH₂)_{s3}NR^{N1}的氨基-聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,每个s2和s3独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6、或1至10)的整数,且每个R^{N1}独立地是氢或任选取代的C₁₋₆烷基;和(21)脒。在一些实施方式中,这些基团中的每一个可以如本文所述被进一步取代。

[0929] 本文所用的术语“氨基烷氧基”表示被如本文所定义的氨基基团取代的如本文所定义的烷氧基基团。烷基和氨基各自可以进一步被1、2、3或4个如本文对各自的基团所述的取代基基团(例如,CO₂R^A,其中R^A选自(a)C₁₋₆烷基,(b)C₆₋₁₀芳基,(c)氢,和(d)C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基,例如羧基)取代。

[0930] 本文所用的术语“氨基烷基”表示被如本文所定义的氨基基团取代的如本文所定义的烷基基团。烷基和氨基各自可以进一步被1、2、3或4个如本文对各自的基团所述的取代基基团(例如,CO₂R^A,其中R^A选自:(a)C₁₋₆烷基,(b)C₆₋₁₀芳基,(c)氢,和(d)C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基,例如羧基,和/或N-保护基团)取代。

[0931] 本文所用的术语“氨基烯基”表示,被如本文所定义的氨基基团取代的如本文所定义的烯基基团。烯基和氨基各自可以进一步被1、2、3或4个本文对各自的基团所述的取代基基团(例如,CO₂R^A,其中R^A选自:(a)C₁₋₆烷基,(b)C₆₋₁₀芳基,(c)氢,和(d)C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基,例如羧基,和/或N-保护基团)取代。

[0932] 本文所用的术语“氨基炔基”表示被如本文所定义的氨基基团取代的如本文所定义的炔基基团。炔基和氨基各自可以进一步被1、2、3或4个如本文对各自的基团所述的取代基基团(例如, $\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}}$, 其中 R^{A} 选自(a) C_{1-6} 烷基, (b) C_{6-10} 芳基, (c) 氢, 和(d) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基, 例如羧基, 和/或N-保护基团)取代。

[0933] 本文所用的术语“芳基”表示具有一个或两个芳环的单环、二环或多环碳环体系, 其实例是苯基、萘基、1,2-二氢萘基、1,2,3,4-四氢萘基、蒽基、菲基、芴基、茚满基、茚基等, 并且其可以任选地被1、2、3、4或5个取代基取代, 所述取代基独立地选自: (1) C_{1-7} 酰基(例如, 甲醛); (2) C_{1-20} 烷基(例如, C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基- C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基亚磺酰基- C_{1-6} 烷基、氨基- C_{1-6} 烷基、叠氨基- C_{1-6} 烷基、(甲醛)- C_{1-6} 烷基、卤代- C_{1-6} 烷基(例如, 全氟烷基)、羟基- C_{1-6} 烷基、硝基- C_{1-6} 烷基、或 C_{1-6} 硫代烷氧基- C_{1-6} 烷基); (3) C_{1-20} 烷氧基(例如, C_{1-6} 烷氧基, 如全氟烷氧基); (4) C_{1-6} 烷基亚磺酰基; (5) C_{6-10} 芳基; (6) 氨基; (7) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基; (8) 叠氨基; (9) C_{3-8} 环烷基; (10) C_{1-6} 烷- C_{3-8} 环烷基; (11) 卤素; (12) C_{1-12} 杂环基(例如, C_{1-12} 杂芳基); (13) (C_{1-12} 杂环基)氧基; (14) 羟基; (15) 硝基; (16) C_{1-20} 硫代烷氧基(例如, C_{1-6} 硫代烷氧基); (17) $-(\text{CH}_2)_q\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}}$, 其中 q 是0至4的整数, R^{A} 选自: (a) C_{1-6} 烷基, (b) C_{6-10} 芳基, (c) 氢, 和(d) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基; (18) $-(\text{CH}_2)_q\text{CONR}^{\text{B}}\text{R}^{\text{C}}$, 其中 q 是0至4的整数, 其中 R^{B} 和 R^{C} 独立地选自: (a) 氢, (b) C_{1-6} 烷基, (c) C_{6-10} 芳基, 和(d) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基; (19) $-(\text{CH}_2)_q\text{SO}_2\text{R}^{\text{D}}$, 其中 q 是0至4的整数, 且其中 R^{D} 选自(a) 烷基, (b) C_{6-10} 芳基和(c) 烷- C_{6-10} 芳基; (20) $-(\text{CH}_2)_q\text{SO}_2\text{NR}^{\text{E}}\text{R}^{\text{F}}$, 其中 q 是0至4的整数, 且其中每个 R^{E} 和 R^{F} 独立地选自(a) 氢, (b) C_{1-6} 烷基, (c) C_{6-10} 芳基, 和(d) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基; (21) 巯基; (22) C_{6-10} 芳氧基; (23) C_{3-8} 环烷氧基; (24) C_{6-10} 芳基- C_{1-6} 烷氧基; (25) C_{1-6} 烷- C_{1-12} 杂环基(例如, C_{1-6} 烷- C_{1-12} 杂芳基); (26) C_{2-20} 烯基; 和(27) C_{2-20} 炔基。在一些实施方式中, 这些基团中的每一个可以如本文所述被进一步取代。例如, C_{1-} 烷芳基或 C_{1-} 烷杂环基的亚烷基基团可以进一步被氧代基团取代, 以得到相应的芳酰基和(杂环基)酰基取代基基团。

[0934] 本文所用的术语“芳基烷氧基”表示通过氧原子连接于母体分子基团的如本文所定义的烷芳基基团。示例性的未取代的芳基烷氧基基团包括7至30个碳(例如, 7至16或7至20个碳, 如 C_{6-10} 芳基- C_{1-6} 烷氧基、 C_{6-10} 芳基- C_{1-10} 烷氧基、或 C_{6-10} 芳基- C_{1-20} 烷氧基)。在一些实施方式中, 芳基烷氧基可以被1、2、3或4个如本文所定义的取代基取代。

[0935] 本文所用的术语“芳基烷氧基羰基”表示通过羰基连接于母体分子基团的如本文所定义的芳基烷氧基基团(例如- $\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 烷基-芳基)。示例性的未取代的芳基烷氧基基团包括8至31个碳(例如, 8至17或8至21个碳, 如 C_{6-10} 芳基- C_{1-6} 烷氧基-羰基、 C_{6-10} 芳基- C_{1-10} 烷氧基-羰基、或 C_{6-10} 芳基- C_{1-20} 烷氧基-羰基)。在一些实施方式中, 芳基烷氧基羰基基团可以被1、2、3或4个如本文所定义的取代基取代。

[0936] 术语“芳氧基”代表式- OR' 的化学取代基, 其中, 除非另有说明, R' 是6至18个碳的芳基基团。在一些实施方式中, 芳基基团可被1、2、3或4个如本文所定义的取代基取代。

[0937] 本文所用的术语“芳酰基”表示通过羰基基团连接于母体分子基团的如本文所定义的芳基。示例性的未取代的芳酰基具有7至11个碳。在一些实施方式中, 芳基基团可被1、2、3或4个如本文所定义的取代基取代。

[0938] 术语“叠氮基”表示- N_3 基团, 其也可以表示为- $\text{N}=\text{N}=\text{N}$ 。

[0939] 本文所用的术语“二环”是指具有两个环的结构, 所述环可以是芳族或非芳族的。

二环结构包括如本文所定义的螺环基基团和共用一个或多个桥的两个环,其中所述桥可包括一个原子或包括两个、三个或更多个原子的链。示例性的二环基团包括二环碳环基团,其中第一环和第二环是如本文所定义的碳环基团;二环芳基基团,其中第一环和第二环是如本文所定义的芳基;二环杂环基基团,其中第一环是杂环基基团和第二环是碳环基(例如芳基)或杂环基(例如杂芳基)基团;和二环杂芳基基团,其中第一环是杂芳基基团和第二环是碳环基(例如芳基)或杂环基(例如杂芳基)基团。在一些实施方式中,二环基团可以被1、2、3或4个如本文对环烷基、杂环基和芳基基团所定义的取代基取代。

[0940] 本文所用的术语“硼烷基”表示 $-B(R^{B1})_3$,其中每个 R^{B1} 独立地选自H和任选取代的烷基。在一些实施方式中,硼烷基基团可被1、2、3或4个如本文对烷基所定义的取代基取代。

[0941] 本文所用的术语“碳环”和“碳环基”是指任选取代的 C_{3-12} 单环、二环或三环结构,其中环可以是芳族或非芳族的,由碳原子形成。碳环结构包括环烷基、环烯基和芳基基团。

[0942] 本文所用的术语“氨基甲酰基(carbamoyl)”表示 $-C(O)-N(R^{N1})_2$,其中每个 R^{N1} 的含义参见本文所提供的“氨基”的定义。

[0943] 本文所用的术语“氨基甲酰基烷基”表示被如本文所定义的氨基甲酰基基团取代的如本文所定义的烷基基团。烷基基团可进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基基团取代。

[0944] 本文所用的术语“氨基甲酰氧基(carbamyl)”是指具有 $-NR^{N1}C(=O)OR$ 或 $-OC(=O)N(R^{N1})_2$ 结构的氨基甲酸酯基团,其中每个 R^{N1} 的含义参见本文所提供的“氨基”的定义,且R是如本文所定义的烷基、环烷基、烷环烷基、芳基、烷芳基、杂环基(例如杂芳基)、或烷杂环基(例如烷杂芳基)。

[0945] 本文所用的术语“羰基”表示 $C(O)$ 基团,其也可以表示为 $C=O$ 。

[0946] 术语“甲醛(carboxyaldehyde)”表示具有 $-CHO$ 结构的酰基基团。

[0947] 本文所用的术语“羧基”意指 $-CO_2H$ 。

[0948] 本文所用的术语“羧基烷氧基”表示被如本文所定义的羧基基团取代的如本文所定义的烷氧基基团。烷氧基基团可以进一步被1、2、3或4个如本文对烷基所述的取代基基团取代,和羧基基团可以任选地被一个或多个O-保护基团取代。

[0949] 本文所用的术语“羧基烷基”表示被如本文所定义的羧基基团取代的如本文所定义的烷基基团。烷基基团可进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基基团取代,和羧基基团可以任选地被一个或多个O-保护基团取代。

[0950] 本文所用的术语“羧基氨基烷基”表示被如本文所定义的羧基取代的如本文所定义的氨基烷基基团。羧基、烷基和氨基各自可以进一步被1、2、3或4个如本文对各自的基团所述的取代基(例如, CO_2R^A ,其中 R^A 选自:(a) C_{1-6} 烷基,(b) C_{6-10} 芳基,(c) 氢,和(d) C_{1-6} 烷- C_{6-10} 芳基,例如,羧基,和/或N-保护基团,和/或O-保护基团)取代。

[0951] 本文所用的术语“氰基”表示 $-CN$ 基团。

[0952] 术语“环烷氧基”表示式 $-OR$ 的化学取代基,其中,除非另有说明,R是如本文所定义的 C_{3-8} 环烷基基团。环烷基基团可进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基基团取代。示例性的未取代的环烷氧基基团具有3至8个碳。在一些实施方案中,环烷基基团可进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基基团取代。

[0953] 本文所用的术语“环烷基”,除非另有说明,表示3至8个碳的一价饱和的或不饱和

的非芳族环烷基团,其实例是环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、二环庚基等。当环烷基基团包括1个碳-碳双键时,环烷基基团可被称为“环烯基”基团。示例性的环烯基基团包括环戊烯基、环己烯基等。本发明的环烷基基团可以任选地被下列基团取代:(1) C₁₋₇酰基(如甲醛);(2) C₁₋₂₀烷基(例如,C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基-C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷基亚磺酰基-C₁₋₆烷基、氨基-C₁₋₆烷基、叠氨基-C₁₋₆烷基、(甲醛)-C₁₋₆烷基、卤代-C₁₋₆烷基(如全氟烷基)、羟基-C₁₋₆烷基、硝基-C₁₋₆烷基、或C₁₋₆硫代烷氧基-C₁₋₆烷基);(3) C₁₋₂₀烷氧基(例如,C₁₋₆烷氧基,如全氟烷氧基);(4) C₁₋₆烷基亚磺酰基;(5) C₆₋₁₀芳基;(6) 氨基;(7) C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基;(8) 叠氨基;(9) C₃₋₈环烷基;(10) C₁₋₆烷-C₃₋₈环烷基;(11) 卤素;(12) C₁₋₁₂杂环基(例如,C₁₋₁₂杂芳基);(13) (C₁₋₁₂杂环基)氧基;(14) 羟基;(15) 硝基;(16) C₁₋₂₀硫代烷氧基(例如,C₁₋₆硫代烷氧基);(17) -(CH₂)_qCO₂R^A,其中q是0至4的整数,和R^A选自:(a) C₁₋₆烷基,(b) C₆₋₁₀芳基,(c) 氢,和(d) C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基;(18) -(CH₂)_qCONR^BR^C,其中q是0至4的整数,且其中R^B和R^C独立地选自:(a) 氢,(b) C₆₋₁₀烷基,(c) C₆₋₁₀芳基,和(d) C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基;(19) -(CH₂)_qSO₂R^D,其中q是0至4的整数,且其中R^D选自:(a) C₆₋₁₀烷基,(b) C₆₋₁₀芳基,和(c) C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基;(20) -(CH₂)_qSO₂NR^ER^F,其中q是0至4的整数,且其中每个R^E和R^F独立地选自:(a) 氢,(b) C₆₋₁₀烷基,(c) C₆₋₁₀芳基,和(d) C₁₋₆烷-C₆₋₁₀芳基;(21) 巯基;(22) C₆₋₁₀芳氧基;(23) C₃₋₈环烷氧基;(24) C₆₋₁₀芳基-C₁₋₆烷氧基;(25) C₁₋₆烷-C₁₋₁₂杂环基(例如,C₁₋₆烷-C₁₋₁₂杂芳基);(26) 氧代;(27) C₂₋₂₀烯基;和(28) C₂₋₂₀炔基。在一些实施方式中,这些基团中的每一个可以如本文所述被进一步取代。例如,C₁-烷芳基或C₁-烷杂环基的亚烷基基团可以进一步被氧代基团取代,以得到相应的芳酰基和(杂环)酰基取代基基团。

[0954] 本文所用的术语“非对映异构体(diastereomer)”是指彼此不为镜像且彼此不可重叠的立体异构体。

[0955] 本文所用的药剂的术语“有效量(effective amount)”是足以产生有益的或期望的结果如临床效果的量,并且,因此,“有效量”依赖于其所应用的情况。例如,在施用治疗癌症的药剂的情况下,药剂的有效量是,例如,与未施用药剂所获得的反应相比,足以达到本文所定义的治疗癌症的量。

[0956] 本文所用的术语“对映异构体(enantiomer)”意指本发明的化合物的各个独立的光学活性形式,其具有至少80%的光学纯度或对映体过量(如通过本领域标准方法测定的)(即,至少90%的一种对映异构体和至多10%的另一种对映异构体),优选至少90%,更优选至少98%。

[0957] 本文所用的术语“卤代”表示选自溴、氯、碘或氟的卤素。

[0958] 本文所用的术语“卤代烷氧基”表示被卤素基团(即,F、Cl、Br或I)取代的如本文所定义的烷氧基基团。卤代烷氧基可被1、2、3个或在两个或更多个碳的烷基基团的情况下被4个卤素取代。卤代烷氧基基团包括全氟烷氧基(例如,-OCF₃)、-OCHF₂、-OCH₂F、-OCCl₃、-OCH₂CH₂Br、-OCH₂CH(CH₂CH₂Br)CH₃和-OCHICH₃。在一些实施方式中,卤代烷氧基可以进一步被1、2、3或4个如本文对烷基所述的取代基取代。

[0959] 本文所用的术语“卤代烷基”表示被卤素基团(即,F、Cl、Br或I)取代的如本文所定义的烷基基团。卤代烷基可被1、2、3个或在两个或更多个碳的烷基基团的情况下被4个卤素取代。卤代烷基基团包括全氟烷基(例如,-CF₃)、-CHF₂、-CH₂F、-CCl₃、-CH₂CH₂Br、-CH₂CH(CH₂CH₂Br)CH₃和-CHICH₃。在一些实施方式中,卤代烷基基团可进一步被1、2、3或4个如本文

对烷基基团所述的取代基取代。

[0960] 本文所用的术语“杂亚烷基”是指其中一个或两个组成性碳原子各自被氮、氧或硫替代的如本文所定义的亚烷基基团。在一些实施方式中，杂亚烷基基团可进一步被1、2、3或4个如本文对亚烷基基团所述的取代基基团取代。

[0961] 本文所用的术语“杂芳基”表示如本文所定义的杂环基的子集，其是芳香性的：即，其在单环或多环体系内包含 $4n+2$ 个 π 电子。示例性的未取代的杂芳基基团具有1至12个（例如，1至11个、1至10个、1至9个、2至12个、2至11个、2至10个或2至9个）碳。在一些实施方式中，杂芳基被1、2、3或4个如本文对杂环基基团所定义的取代基取代。

[0962] 本文所用的术语“杂环基”，除非另有说明，表示5元、6元或7元环，其包含1、2、3或4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子。5元环具有0至2个双键，和6元和7元环具有0至3个双键。示例性的未取代的杂环基基团具有1至12个（例如1至11个、1至10个、1至9个、2至12个、2至11个、2至10个、或2至9个）碳。术语“杂环基”还代表具有桥连多环结构的杂环化合物，其中一个或多个碳和/或杂原子桥接单环的两个非相邻的原子，例如，奎宁环基基团。术语“杂环基”包括二环、三环和四环基团，其中任何上述杂环与以下环稠合：1、2或3个碳环，例如芳环、环己烷环、环己烯环、环戊烷环、环戊烯环；或另一个单环杂环，如吡啶基、喹啉基、异喹啉基、四氢喹啉基、苯并呋喃基、苯并噻吩基等。稠合的杂环基的实例包括萘烷和1,2,3,5,8,8a-六氢吡啶。杂环包括吡咯基、吡咯啉基、吡咯烷基、吡啶基、吡啶啉基、吡啶烷基、咪唑基、咪唑啉基、咪唑烷基、吡啶基、哌啶基、高哌啶基 (homopiperidinyl)、吡嗪基、哌嗪基、嘧啶基、哒嗪基、噁唑基、噁唑烷基、异噁唑基、异噁唑烷基、吗啉基、硫代吗啉基、噻唑基、噻唑烷基 (thiazolidinyl)、异噻唑基、异噻唑烷基、吡啶基、吡啶啉基、喹啉基、异喹啉基、喹啉基、二氢喹啉基、喹啉基、噌啉基、酞嗪基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、苯并噻二唑基、呋喃基、噻吩基、噻唑烷基、异噻唑基、三唑基、四唑基、噁二唑基（例如1,2,3-噁二唑基）、嘌呤基、噻二唑基（例如1,2,3-噻二唑基）、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、二氢噻吩基、二氢吡啶基、二氢喹啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、二氢异喹啉基、吡喃基、二氢吡喃基、二噻唑基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、苯并噻吩基等，包括它们的二氢和四氢形式，其中一个或多个双键被还原且被氢替代。其它示例性的杂环基包括：2,3,4,5-四氢-2-氧代-噁唑基；2,3-二氢-2-氧代-1H-咪唑基；2,3,4,5-四氢-5-氧代-1H-吡啶基（例如，2,3,4,5-四氢-2-苯基-5-氧代-1H-吡啶基）；2,3,4,5-四氢-2,4-二氧代-1H-咪唑基（例如，2,3,4,5-四氢-2,4-二氧代-5-甲基-5-苯基-1H-咪唑基）；2,3-二氢-2-硫代-1,3,4-噁二唑基 (2,3-dihydro-2-thioxo-1,3,4-oxadiazolyl)（例如，2,3-二氢-2-硫代-5-苯基-1,3,4-噁二唑基 (2,3-dihydro-2-thioxo-5-phenyl-1,3,4-oxadiazolyl)）；4,5-二氢-5-氧代-1H-三唑基（例如，4,5-二氢-3-甲基-4-氨基-5-氧代-1H-三唑基）；1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代吡啶基（例如，1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代-3,3-二乙基吡啶基）；2,6-二氧代-哌啶基（例如，2,6-二氧代-3-乙基-3-苯基哌啶基）；1,6-二氢-6-氧代嘧啶基 (1,6-dihydro-6-oxopyridinyl)；1,6-二氢-4-氧代嘧啶基（例如，2-(甲硫基)-1,6-二氢-4-氧代-5-甲基嘧啶-1-基）；1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代嘧啶基（例如，1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代-3-乙基嘧啶基）；1,6-二氢-6-氧代-哒嗪基（例如，1,6-二氢-6-氧代-3-乙基哒嗪基）；1,6-二氢-6-氧代-1,2,4-三嗪基（例如，1,6-二氢-5-异丙基-6-氧代-1,2,4-三嗪基）；2,3-二氢-2-氧代-1H-吡啶基（例如，3,3-二甲基-2,3-二氢-2-氧代-1H-吡啶基和2,3-二氢-2-氧代-3,3'-

螺丙烷-1H-吡啶-1-基); 1,3-二氢-1-氧代-2H-异-吡啶基; 1,3-二氢-1,3-二氧代-2H-异吡啶基; 1H-苯并吡啶基(例如, 1-(乙氧基羰基)-1H-苯并吡啶基); 2,3-二氢-2-氧代-1H-苯并咪唑基(例如, 3-乙基-2,3-二氢-2-氧代-1H-苯并咪唑基); 2,3-二氢-2-氧代-苯并噁唑基(例如, 5-氯-2,3-二氢-2-氧代-苯并噁唑基); 2,3-二氢-2-氧代-苯并噁唑基; 2-氧代-2H-苯并吡喃基; 1,4-苯并二噁烷基(1,4-benzodioxanyl); 1,3-苯并二噁烷基; 2,3-二氢-3-氧代, 4H-1,3-苯并噻嗪基; 3,4-二氢-4-氧代-3H-噻唑啉基(例如, 2-甲基-3,4-二氢-4-氧代-3H-噻唑啉基); 1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代-3H-噻唑啉基(例如, 1-乙基-1,2,3,4-四氢-2,4-二氧代-3H-噻唑啉基); 1,2,3,6-四氢-2,6-二氧代-7H-嘌呤基(例如, 1,2,3,6-四氢-1,3-二甲基-2,6-二氧代-7H-嘌呤基); 1,2,3,6-四氢-2,6-二氧代-1H-嘌呤基(例如, 1,2,3,6-四氢-3,7-二甲基-2,6-二氧代-1H-嘌呤基); 2-氧代苯并[c,d]吡啶基; 1,1-二氧代-2H-萘并[1,8-c,d]异噻唑基和1,8-亚萘基二甲酰胺基(1,8-naphthylenedicarboxamido)。另外的杂环包括3,3a,4,5,6,6a-六氢-吡咯并[3,4-b]吡咯-(2H)-基和2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-基、高哌嗪基(homopiperazinyl)(或二氮杂环庚烷基(diazepanyl))、四氢吡喃基、二噻唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、氧杂环庚烷基(oxepanyl)、硫杂环庚烷基(thiepanyl)、氮杂环辛烷基(azocanyl)、氧杂环辛烷基(oxecanyl)和硫杂环辛烷基(thiocanyl)。杂环基团还包括下式的基团



[0964] 其中, E' 选自 -N- 和 -CH-; F' 选自 -N=CH-, -NH-CH₂-, -NH-C(O)-, -NH-, -CH=N-, -CH₂-NH-, -C(O)-NH-, -CH=CH-, -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂O-, -OCH₂-, -O- 和 -S-; G' 选自 -CH- 和 -N-。本文所提及的任何杂环基团可以任选地被 1、2、3、4 或 5 个取代基取代, 所述取代基独立地选自: (1) C₁₋₇ 酰基(例如甲醛); (2) C₁₋₂₀ 烷基(例如, C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基-C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷基亚磺酰基-C₁₋₆ 烷基、氨基-C₁₋₆ 烷基、叠氨基-C₁₋₆ 烷基、(甲醛)-C₁₋₆ 烷基、卤代-C₁₋₆ 烷基(如全氟烷基)、羟基-C₁₋₆ 烷基、硝基-C₁₋₆ 烷基、或 C₁₋₆ 硫代烷氧基-C₁₋₆ 烷基); (3) C₁₋₂₀ 烷氧基(例如, C₁₋₆ 烷氧基, 如全氟烷氧基); (4) C₁₋₆ 烷基亚磺酰基; (5) C₆₋₁₀ 芳基; (6) 氨基; (7) C₁₋₆ 烷-C₆₋₁₀ 芳基; (8) 叠氨基; (9) C₃₋₈ 环烷基; (10) C₁₋₆ 烷-C₃₋₈ 环烷基; (11) 卤素; (12) C₁₋₁₂ 杂环基(例如, C₂₋₁₂ 杂芳基); (13) (C₁₋₁₂ 杂环基) 氧基; (14) 羟基; (15) 硝基; (16) C₁₋₂₀ 硫代烷氧基(例如, C₁₋₆ 硫代烷氧基); (17) -(CH₂)_qCO₂R^A, 其中 q 是 0 至 4 的整数, 且 R^A 选自: (a) C₁₋₆ 烷基, (b) C₆₋₁₀ 芳基, (c) 氢, 和 (d) C₁₋₆ 烷-C₆₋₁₀ 芳基, (18) -(CH₂)_qCONR^BR^C, 其中 q 是 0 至 4 的整数, 且其中 R^B 和 R^C 独立地选自 (a) 氢, (b) C₁₋₆ 烷基, (c) C₆₋₁₀ 芳基, 和 (d) C₁₋₆ 烷-C₆₋₁₀ 芳基; (19) -(CH₂)_qSO₂R^D, 其中 q 是 0 至 4 的整数, 其中 R^D 选自: (a) C₁₋₆ 烷基, (b) C₆₋₁₀ 芳基, 和 (c) C₁₋₆ 烷-C₆₋₁₀ 芳基; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^ER^F, 其中 q 是 0 至 4 的整数, 且其中每个 R^E 和 R^F 独立地选自 (a) 氢, (b) C₁₋₆ 烷基, (c) C₆₋₁₀ 芳基, 和 (d) C₁₋₆ 烷-C₆₋₁₀ 芳基; (21) 巯基; (22) C₆₋₁₀ 芳氧基; (23) C₃₋₈ 环烷氧基; (24) 芳基烷氧基; (25) C₁₋₆ 烷-C₁₋₁₂ 杂环基(例如, C₁₋₆ 烷-C₁₋₁₂ 杂芳基); (26) 氧代; (27) (C₁₋₁₂ 杂环基) 亚氨基; (28) C₂₋₂₀ 烯基; 和 (29) C₂₋₂₀ 炔基。在一些实施方式中, 这些基团中的每一个可以如本文所述被进一步取代。例如, C₁-烷芳基或 C₁-烷杂环基的亚烷基基团可以进一步被氧代基团取代, 以得到相应的芳酰基和(杂环基)酰基取代基基团。

[0965] 本文所用的术语“(杂环基)亚氨基”表示通过亚氨基基团连接于母体分子基团的

如本文所定义的杂环基基团。在一些实施方式中,杂环基基团可以被1、2、3或4个如本文所定义的取代基取代。

[0966] 本文所用的术语“(杂环基)氧基”表示通过氧原子连接于母体分子基团的如本文所定义的杂环基基团。在一些实施方式中,杂环基基团可以被1、2、3或4个如本文所定义的取代基取代。

[0967] 本文所用的术语“(杂环基)酰基”表示通过羰基基团连接于母体分子基团的如本文所定义的杂环基基团。在一些实施方式中,杂环基基团可以被1、2、3或4个如本文所定义的取代基基团取代。

[0968] 本文所用的术语“烃”表示仅由碳和氢原子组成的基团。

[0969] 本文所用的术语“羟基”表示-OH基团。在一些实施方式中,羟基基团可以被1、2、3或4个如本文中烷基所定义的取代基基团(例如,0-保护基团)取代。

[0970] 本文所用的术语“羟基烯基”表示被1至3个羟基基团取代的如本文所定义的烯基基团,前提条件是不超过一个的羟基基团可以连接于烷基基团的单个碳原子上,羟基烯基的实例是二羟基丙烯基、羟基异戊烯基等。在一些实施方式中,羟基烯基基团可以被1、2、3或4个如本文对烷基所定义的取代基基团(例如,0-保护基团)取代。

[0971] 本文所用的术语“羟基烷基”表示被1至3个羟基基团取代的如本文所定义的烷基基团,前提条件是不超过一个的羟基基团可以连接于烷基基团的单个碳原子上,羟基烷基的实例是羟基甲基和二羟基丙基等。在一些实施方式中,羟基基团可以被1、2、3或4个如本文对烷基所定义的取代基基团(例如,0-保护基团)取代。

[0972] 本文所用的术语“羟基炔基”表示被1至3个羟基基团取代的如本文所定义的炔基基团,前提条件是不超过一个的羟基基团可以连接于烷基基团的单个碳原子上。在一些实施方式中,羟基炔基可以被1、2、3或4个如本文对烷基所定义的取代基基团(例如,0-保护基团)取代。

[0973] 本文所用的术语“异构体(isomer)”意指本发明的任何化合物的任何互变异构体、立体异构体、对映异构体或非对映异构体。应当认识到,本发明的化合物可具有一个或多个手性中心和/或双键,因此作为立体异构体,如双键异构体(即,几何E/Z异构体)或非对映异构体(例如,对映异构体(即,(+)或(-))或顺式/反式异构体)存在。根据本发明,本文所述的化学结构和本发明的化合物,包括所有的相应的立体异构体,也就是,立体异构纯形式(例如,几何纯、对映异构纯或非对映异构纯)和对映异构体的和立体异构体的混合物,例如,外消旋体。本发明的化合物的对映异构体的和立体异构体的混合物通常可以通过公知的方法如手性相气相色谱法、手性相高效液相色谱法,使化合物作为手性盐复合物结晶或使化合物在手性溶剂中结晶,以拆分成其对映异构体或立体异构体组分。还可以由立体异构或对映异构纯的中间体、试剂和催化剂通过公知的不对称合成方法,获得对映异构体和立体异构体。

[0974] 本文所用的术语“N-保护的氨基”是指连接一个或两个如本文所定义的N-保护基团的如本文所定义的氨基基团。

[0975] 本文所用的术语“N-保护基团”表示旨在保护氨基基团在合成步骤过程中不参与不期望的反应的基团。常用的N-保护基团公开于Greene,“Protective Groups in Organic Synthesis”,第三版(John Wiley&Sons,纽约,1999),其以引用的方式并入本文。N-保护基

团包括酰基、芳酰基或氨基甲酰氧基基团,如甲酰基、乙酰基、丙酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、2-氯乙酰基、2-溴乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、邻苯二甲酰基、邻-硝基苯氧基乙酰基、 α -氯丁酰基、苯甲酰基、4-氯苯甲酰基、4-溴苯甲酰基、4-硝基苯甲酰基、和手性助剂如保护的或未保护的D、L或D、L-氨基酸如丙氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等;含磺酰基的基团,如苯磺酰基、对甲苯磺酰基等;氨基甲酸酯形成基团,如苄氧基羰基、对氯苄氧基羰基、对甲氧基苄氧基羰基、对硝基苄氧基羰基、2-硝基苄氧基羰基、对溴苄氧基羰基、3,4-二甲氧基苄氧基羰基、3,5-二甲氧基苄氧基羰基、2,4-二甲氧基苄氧基羰基、4-甲氧基苄氧基羰基、2-硝基-4,5-二甲氧基苄氧基羰基、3,4,5-三甲氧基苄氧基羰基、1-(对联苯基)-1-甲基乙氧基羰基、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基苄氧基羰基、二苯甲氧基羰基(benzhydryloxy carbonyl)、叔丁氧基羰基、二异丙基甲氧基羰基、异丙氧基羰基、乙氧基羰基、甲氧基羰基、烯丙氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、苄氧基羰基、4-硝基苄氧基羰基、苄基-9-甲氧基羰基、环戊氧基羰基、金刚烷氧基羰基、环己氧基羰基、苯硫基羰基等,烷芳基基团如苄基、三苯基甲基、苄氧基甲基等,和甲硅烷基基团如三甲基甲硅烷基等。优选的N-保护基团是甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、丙氨酰基、苯磺酰基、苄基、叔丁氧基羰基(Boc)和苄氧基羰基(Cbz)。

[0976] 本文所用的术语“硝基”表示-NO₂基团。

[0977] 本文所用的术语“O-保护基团”表示旨在保护含氧(例如苯酚、羟基或羰基)基团在合成步骤过程中不参与不期望的的那些基团。常用的O-保护基团公开于Greene, “Protective Groups in Organic Synthesis”, 第三版(John Wiley&Sons, 纽约, 1999), 其以引用的方式并入本文。示例性的O-保护基团包括酰基、芳酰基或氨基甲酰氧基基团,如甲酰基、乙酰基、丙酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、2-氯乙酰基、2-溴乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、邻苯二甲酰基、邻硝基苯氧基乙酰基、 α -氯丁酰基、苯甲酰基、4-氯苯甲酰基、4-溴苯甲酰基、叔丁基二甲基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基氧基甲基、4,4'-二甲氧基三苯甲基、异丁酰基、苄氧基乙酰基、4-异丙基苄氧基乙酰基、二甲基甲酰胺基(dimethylformamido)和4-硝基苯甲酰基;烷基羰基基团,如酰基、乙酰基、丙酰基、新戊酰基等;任选取代的芳基羰基基团,如苯甲酰基;甲硅烷基基团,如三甲基甲硅烷基(TMS)、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)、三异丙基甲硅烷基氧基甲基(TOM)、三异丙基甲硅烷基(TIPS)等;具有羟基的醚形成基团,如甲基、甲氧基甲基、四氢吡喃基、苄基、对甲氧基苄基、三苯甲基等;烷氧基羰基,如甲氧基羰基、乙氧基羰基、异丙氧基羰基、正异丙氧基羰基(n-isopropoxycarbonyl)、正丁氧基羰基、异丁氧基羰基、仲丁氧基羰基、叔丁氧基羰基、2-乙基己氧基羰基、环己氧基羰基、甲氧基羰基等;烷氧基烷氧基羰基基团,如甲氧基甲氧基羰基、乙氧基甲氧基羰基、2-甲氧基乙氧基羰基、2-乙氧基乙氧基羰基、2-丁氧基乙氧基羰基、2-甲氧基乙氧基甲氧基羰基、烯丙氧基羰基、炔丙基羰基、2-丁氧基羰基、3-甲基-2-丁氧基羰基等;卤代烷氧基羰基,如2-氯乙氧基羰基、2-氯乙氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基等;任选取代的芳基烷氧基羰基基团,如苄氧基羰基、对甲基苄氧基羰基、对甲氧基苄氧基羰基、对硝基苄氧基羰基、2,4-二硝基苄氧基羰基、3,5-二甲基苄氧基羰基、对氯苄氧基羰基、对溴苄氧基羰基、苄基甲氧基羰基等;和任选取代的芳氧基羰基基团,如苄氧基羰基、对硝基苄氧基羰基、邻硝基苄氧基羰基、2,4-二硝基苄氧基羰基、对-甲基-苄氧基羰基、间甲基苄氧基羰基、邻溴苄氧基羰基、3,5-二甲基苄氧基羰基、对氯苄氧基羰基、2-氯-4-硝基苄氧

基-羰基等);取代的烷基、芳基和烷芳基醚(例如,三苯甲基;甲硫基甲基;甲氧基甲基;苄氧基甲基;甲硅烷氧基甲基;2,2,2,-三氯乙氧基甲基;四氢吡喃基;四氢呋喃基;乙氧基乙基;1-[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]乙基;2-三甲基甲硅烷基乙基;叔丁基醚;对氯苯基、对甲氧基苯基、对硝基苯基、苄基、对甲氧基苄基、和硝基苄基);甲硅烷基醚(例如,三甲基甲硅烷基;三乙基甲硅烷基;三异丙基甲硅烷基;二甲基异丙基甲硅烷基;叔丁基二甲基甲硅烷基;叔丁基二苯基甲硅烷基;三苄基甲硅烷基;三苯基甲硅烷基;和二苯基甲基甲硅烷基);碳酸酯(例如,甲基、甲氧基甲基、9-芴基甲基;乙基;2,2,2-三氯乙基;2-(三甲基甲硅烷基)乙基;乙烯基、烯丙基、硝基苯基;苄基;甲氧基苄基;3,4-二甲氧基苄基;和硝基苄基);羰基保护基团(例如,缩醛和缩酮基团,如二甲基缩醛、1,3-二氧戊环等;缩羧酯(acylal)基团;和二噻烷基团,如1,3-二噻烷、1,3-二硫戊环等);羧酸保护基团(例如,酯基团,如甲基酯、苄基酯、叔丁基酯、原酸酯等;和噁唑啉基团。

[0978] 本文所用的术语“氧代”表示=O。

[0979] 本文所用的术语“全氟烷基”表示其中与烷基基团键合的每个氢基(hydrogen radical)已被氟基(fluoride radical)替换的如本文所定义的烷基基团。全氟烷基的实例是三氟甲基、五氟乙基等。

[0980] 本文所用的术语“全氟烷氧基”表示其中与烷氧基基团键合的每个氢基已被氟基替代的如本文所定义的烷氧基基团。全氟烷氧基的实例是三氟甲氧基、五氟乙氧基等。

[0981] 本文所用的术语“螺环基”表示两端都结合到母体基团的同一个碳原子上以形成螺环基基团的C₂₋₇亚烷基二基,以及两端都结合到同一个原子上的C₁₋₆杂亚烷基二基。形成螺环基基团的杂亚烷基基团可以包含1、2、3或4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子。在一些实施方式中,螺环基基团除了二基所连接的碳原子之外还包括1至7个碳。本发明的螺环基基团可以任选地被1、2、3或4个本文中提供的作为用于环烷基和/或杂环基基团的任选的取代基的取代基取代。

[0982] 本文所用的术语“立体异构体(stereoisomer)”是指化合物(例如,本文所述的任何式的化合物)可具有的所有可能的不同的异构体和构象形式,特别是基础分子结构的所有可能的立体化学和构象异构体形式、所有非对映异构体、对映异构体和/或构象异构体。本发明的一些化合物可以以不同的互变异构形式存在,所有这些不同的互变异构形式都包括在本发明的范围之内。

[0983] 本文所用的术语“磺基烷基”表示被-SO₃H的磺基基团取代的如本文所定义的烷基基团。在一些实施方式中,烷基可以进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基取代,和磺基可以进一步被一个或多个O-保护基团(例如,如本文所述的)取代。

[0984] 本文所用的术语“磺酰基”表示-S(O)₂-基团。

[0985] 本文所用的术语“硫代烷芳基”表示式-SR的化学取代基,其中R是烷芳基基团。在一些实施方式中,烷芳基基团可以进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基基团取代。

[0986] 本文所用的术语“硫代烷杂环基”表示式-SR的化学取代基,其中R是烷杂环基基团。在一些实施方式中,烷杂环基基团可进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基基团取代。

[0987] 本文所用的术语“硫代烷氧基”表示式-SR的化学取代基,其中R是如本文所定义的烷基基团。在一些实施方式中,烷基基团可以进一步被1、2、3或4个如本文所述的取代基基

团取代。

[0988] 化合物：本文所用的术语“化合物”意指包括所述结构的所有立体异构体、几何异构体、互变异构体和同位素。

[0989] 本文所述的化合物可以是不对称的（例如，具有一个或多个立体中心）。除非另有说明，预期包括所有的立体异构体如对映异构体和非对映异构体。含有不对称取代的碳原子的本发明的化合物可被分离成光学活性或外消旋形式。关于如何由光学活性原料制备光学活性形式的方法是本领域中已知的，例如通过外消旋混合物的拆分或通过立体选择性合成。在本文所述的化合物中也可以存在烯烃、C=N双键等多种几何异构体，所有这些稳定的异构体都包括在本发明中。描述了本发明的化合物的顺式和反式几何异构体，并且其可被分离为异构体的混合物或为单独的异构体形式。

[0990] 本发明的化合物还包括互变异构形式。互变异构形式是由于单键与相邻的双键的转换以及伴随的质子迁移形成的。互变异构形式包括质子转移的互变异构体，其是具有相同的经验式和总电荷的异构质子化态。质子转移的互变异构体的实例包括酮-烯醇对、酰胺-亚胺酸对、内酰胺-内酰亚胺对、酰胺-亚胺酸对、烯胺-亚胺对、和其中质子可以占据杂环体系的两个或更多个位置的环状形式，如1H-咪唑和3H-咪唑；1H-1,2,4-三唑、2H-1,2,4-三唑和4H-1,2,4-三唑；1H-异吡啶和2H-异吡啶；和1H-吡唑和2H-吡唑。互变异构形式可以处于平衡态或通过适当的取代在空间被锁定成一种形式。

[0991] 本发明的化合物也包括在中间体或最终化合物中出现的原子的所有同位素。“同位素”是指具有相同原子序数但因核中具有不同数量的中子而产生不同质量数的原子。例如，氢的同位素包括氘和氚。

[0992] 本发明的化合物和盐可以与溶剂或水分子组合通过常规方法制备以形成溶剂化物和水合物。

[0993] 保守的 (Conserved)：如本文所使用的，术语“保守的”是指，分别地，多核苷酸序列或多肽序列上的核苷酸或氨基酸残基是在相比较的两个或更多个序列的相同位置上未发生改变的那些核苷酸或氨基酸残基。相对保守的核苷酸或氨基酸是在比序列中其它部分出现的核苷酸或氨基酸更相关的序列中保守的那些核苷酸或氨基酸。

[0994] 在一些实施方式中，如果两个或更多个序列彼此具有100%的同源性，则称其为“完全保守的”。在一些实施方式中，如果两个或更多个序列彼此具有至少70%的同源性、至少80%的同源性、至少90%的同源性或至少95%的同源性，则称其为“高度保守的”。在一些实施方式中，如果两个或更多个序列彼此具有约70%的同源性、约80%的同源性、约90%的同源性、约95%、约98%或约99%的同源性，则称其为“高度保守的”。在一些实施方式中，如果两个或更多个序列具有至少30%的同源性、至少40%的同源性、至少50%的同源性、至少60%的同源性、至少70%的同源性、至少80%的同源性、至少90%的同源性或至少95%的同源性，则称其为“保守的”。在一些实施方式，如果两个或更多个序列具有约30%的同源性、约40%的同源性、约50%的同源性、约60%的同源性、约70%的同源性、约80%的同源性、约90%的同源性、约95%的同源性、约98%的同源性或约99%的同源性，则称其为“保守的”。序列的保守可应用于寡核苷酸或多肽的全长或可应用于其部分、区域或部件 (feature)。

[0995] 环状的 (Cyclic) 或环合的 (Cyclized)：本文所用的术语“环状的”是指存在连续的环。环状分子不需要是圆的，仅连接以形成的不间断的亚基链。环状分子如本发明的mRNA可

以是单个单元或多聚体,或者包含复合物或更高次序结构的一个或多个组分。

[0996] 细胞抑制的(Cytostatic):本文所用的“细胞抑制的”是指抑制、减少、制止细胞(例如,哺乳动物细胞(例如人类细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒、或它们的组合的生长、分裂或增殖。

[0997] 细胞毒性的(Cytotoxic):本文所用的“细胞毒性的”是指杀死细胞(例如,哺乳动物细胞(例如人类细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒、或它们的组合,或对细胞(例如,哺乳动物细胞(例如人类细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒、或它们的组合造成伤害、毒性或致死作用。

[0998] 递送(Delivery):本文所用的“递送”是指递送化合物、物质、实体、部分、负载物(cargo)或有效负载的行为或方式。

[0999] 递送剂(Delivery Agent):本文所用的“递送剂”是指至少部分地促进体内递送多核苷酸到靶细胞的任何物质。

[1000] 去稳定化的(Destabilized):本文所用的术语“不稳定的(destable)”、“去稳定化(destabilize)”或“去稳定化区域(destabilizing region)”是指比同一区域的初始的野生型或天然形式更不稳定的区域或分子。

[1001] 可检测标记(Detectable label):本文所用的“可检测标记”是指与另一实体连接、合并或缔合的一个或多个标记物、信号或部分,其易于通过本领域已知的方法进行检测,包括放射成像、荧光、化学发光、酶活性、吸光度等。可检测标记包括放射性同位素、荧光团、生色团、酶、染料、金属离子、配体如生物素、亲和素、链霉亲和素和半抗原、量子点等。可检测标记可以位于本文所述的肽或蛋白的任何位置。其可以在氨基酸、肽或蛋白内,或位于N-或C-末端。

[1002] 消化(Digest):本文所用的术语“消化”意指分解成更小的部分或组分。当涉及多肽或蛋白时,消化导致产生肽。

[1003] 远端的(Distal):本文所用的术语“远端的”意指远离中心或远离目标点或区域的。

[1004] 编码的蛋白裂解信号(Encoded protein cleavage signal):如本文所使用,“编码的蛋白裂解信号”指编码蛋白裂解信号的核苷酸序列。

[1005] 工程化的(Engineered):如本文所使用,当其被设计成具有与初始点、野生型或天然分子具有不同的特性或性质(不管是结构的还是化学的)时,本发明的实施方式是“工程化的”。

[1006] 表达(Expression):如本文所使用,核酸序列的“表达”是指下列一个或多个事件:(1)从DNA序列产生RNA模板(例如,通过转录);(2)RNA转录本的加工(例如,通过剪切、编辑、5'帽形成和/或3'末端加工);(3)RNA翻译成多肽或蛋白;和(4)多肽或蛋白的翻译后修饰。

[1007] 特征(Feature):本文所用的,“特征”是指特性、性质或区别性元素(element)。

[1008] 制剂(Formulation):本文所用的“制剂”包括至少一种多核苷酸和递送剂。

[1009] 片段(Fragment):本文所用的“片段”是指一部分。例如,蛋白的片段可以包含通过消化从培养细胞中分离得到的全长蛋白的多肽。

[1010] 功能性的(Functional):如本文所使用,“功能性的”生物分子是处于显示其特征性性质和/或活性形式的生物分子。

[1011] 同源性 (Homology): 如本文所使用, 术语“同源性”是指多聚分子之间的总相关性, 例如核酸分子之间 (例如, DNA分子和/或RNA分子) 和/或多肽分子之间。在某些实施方式中, 如果多聚分子序列具有至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的同一性或相似性, 则认为其彼此是“同源的”。术语“同源的”必要地是指至少两个序列 (多核苷酸或多肽序列) 之间的比较。根据本发明, 如果2个多核苷酸序列所编码的多肽的至少约20个氨基酸的至少一个片段 (stretch) 具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或甚至99%的同一性, 则认为其是同源的。在一些实施方式中, 通过编码至少4-5个独特指定的氨基酸片段的能力表征同源的多核苷酸序列的特征。对于长度小于60个核苷酸的多核苷酸序列, 通过编码至少4-5个独特指定的氨基酸片段的能力来确定同源性。根据本发明, 如果2个蛋白的至少约20个氨基酸的至少一个片段具有至少约50%、60%、70%、80%或90%的同一性, 则认为2个蛋白序列是同源的。

[1012] 同一性 (Identity): 如本文所使用, 术语“同一性”是指多聚分子之间的总相关性, 例如, 在寡核苷酸分子 (例如, DNA分子和/或RNA分子) 之间和/或在多肽分子之间。例如, 2个多核苷酸序列的百分比同一性的计算可以通过比对用于最佳比较目的的2个序列来实现 (例如, 可以在用于最优比对的第一和第二核酸序列的一个或两个中引入空位, 并且非同一的序列为了比较目的可以被忽略)。在某些实施方式中, 出于比较目的所比对的序列的长度是参考序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。然后, 比较在对应核苷酸位置上的核苷酸。当第一序列中的位置上的核苷酸与第二序列中的相应位置上的核苷酸相同时, 则在该位置的分子是同一的。2个序列之间的百分比同一性是序列共有的同一的位置数量的函数, 同时考虑空位的数量和每个空位的长度, 其也需要被引入到2个序列的最佳比对中。序列的比较和2个序列之间百分比同一性的确定均可以使用数学算法来完成。例如, 2个核苷酸序列之间的百分比同一性可以使用下述公开的方法来测定, 例如, Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编, 牛津大学出版社, 纽约, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编, Academic出版社, 纽约, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic出版社, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, 第一部分, Griffin, A.M. 和Griffin, H.G. 编, Humana出版社, 新泽西, 1994和Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和Devereux, J. 编, M Stockton出版社, 纽约, 1991; 其每个均通过引用并入本文。例如, 2个核苷酸序列之间的百分比同一性可以使用Meyers和Miller算法来测定 (CABIOS, 1989, 4:11-17), 其已被并入ALIGN程序 (版本2.0) 中并使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分。2个核苷酸序列之间的百分比同一性可以可选地使用使用NWSgapdna.CMP矩阵的GCG软件包中的GAP程序来测定。常用的用于测定序列之间的百分比同一性的方法包括但不限于公开于Carillo, H. 和Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48: 1073 (1988) 中的方法; 其通过引用并入本文。用于测定同一性的技术被编写于公开可得的计算机程序中。测定2个序列之间的同源性的示例性的计算机软件包括但不限于GCG程序包, Devereux, J. 等, Nucleic Research, 12 (1), 387 (1984), BLASTP、BLASTN和FASTA Altschul, S.F. 等, J.Molec.Biol., 215, 403 (1990)。

[1013] 抑制基因表达 (Inhibit expression of a gene): 如本文所使用, 短语“抑制基因表达”是指引起基因的表达产物的量的减少。表达产物可以是来自基因转录的RNA (例如,

mRNA) 或从基因转录的mRNA翻译的多肽。通常mRNA水平的降低导致其翻译的多肽的水平降低。表达的水平可使用用于测量mRNA或蛋白的标准技术来确定。

[1014] 体外 (In vitro): 本文所用的术语“体外”是指在人工环境中, 例如在试管或反应器中、在细胞培养物中、在皮氏培养皿 (Petri dish) 中等, 而不是在有机体 (例如, 动物、植物或微生物) 内发生的事件。

[1015] 体内 (In vivo): 本文所用的术语“体内”是指在生物体 (例如, 动物、植物或微生物, 或其细胞或组织) 内发生的事件。

[1016] 分离的 (Isolated): 本文所用的术语“分离的”是指与至少一些与其缔合的组分 (在自然环境或实验环境中) 分开的物质或实体。分离的物质相对于其曾缔合的物质可以具有不同的纯度水平。分离的物质和/或实体可以与至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或更多的最初与其缔合的其它组分分开。在一些实施方式中, 分离的物质为大于约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%纯。如本文所使用, 如果物质基本上不含其它组分, 则其是“纯”的。基本上分离的 (Substantially isolated): “基本上分离的”意指化合物基本上从其形成或检测的环境中分离出来。部分分离可以包括例如富含本发明的化合物的组合物。基本上分离可以包括含有按重量计至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%或至少约99%的本发明的化合物或其盐的组合物。用于分离化合物和其盐的方法是本领域中常规的。

[1017] 连接体 (Linker): 本文所用的连接体是指原子 (例如, 10-1,000个原子) 的基团, 并且可以由原子或基团组成, 所述原子或基团如但不限于碳、氨基、烷基氨基、氧、硫、亚砷、磺酰基、羰基和亚胺。连接体在第一端可以连接于核碱基或糖部分上的修饰的核苷或核苷酸, 以及在第二端可以连接于有效负载, 例如可检测剂或治疗剂。连接体可以具有足够的长度, 从而不干扰掺入到核酸序列。连接体可用于任何可用的目的, 如用于形成多聚体 (例如, 通过两个或更多个多核苷酸的连接) 或缀合物, 以及用于管理如本文所述的有效负载。可掺入到连接体中的化学基团的实例包括但不限于烷基、烯基、炔基、酰胺基、氨基、醚、硫醚、酯、亚烷基、杂亚烷基、芳基或杂环基, 其中的每一个可如本文所述被任选地取代。连接体的实例包括但不限于不饱和烷烃、聚乙二醇 (例如, 乙二醇或丙二醇单体单元, 如二甘醇、二丙二醇、三甘醇、三丙二醇、四甘醇或四甘醇)、和葡聚糖聚合物, 其它实例包括但不限于连接体内的可裂解部分, 如, 例如, 二硫键 (-S-S-) 或偶氮键 (-N=N-), 可以使用还原剂或光解使这些可裂解部分裂解。选择性可裂解键的非限制性实例包括酰胺键, 其可以例如通过使用三(2-羧基乙基)膦 (TCEP) 或其它还原剂和/或光解进行裂解; 以及酯键, 其可以通过例如酸性或碱性水解进行裂解。

[1018] 修饰的 (Modified): 本文所用的“修饰的”是指本发明的分子的改变的状态或结构。分子可用多种方法进行修饰, 包括化学、结构和功能修饰。在一个实施方式中, 本发明的mRNA分子例如在其涉及天然核糖核苷酸A、U、G和C时通过引入非天然核苷和/或核苷酸而被修饰。非典型的核苷酸如帽结构不被认为是“修饰的”, 尽管其与A、C、G、U核糖核苷酸的化学结构不同。

[1019] 天然存在的 (Naturally occurring): 本文所用的“天然存在的”意指在自然界中存在的且无需人工辅助。

[1020] 非人类脊椎动物 (Non-human vertebrate): 如本文所使用, “非人类脊椎动物” 包括除了人类之外的所有脊椎动物, 包括野生的和驯化的物种。非人类脊椎动物的实例包括但不限于哺乳动物, 如羊驼、白臀野牛、野牛、骆驼、猫、牛、鹿、狗、驴、大额牛、山羊、豚鼠、马、骆马、骡、猪、兔、驯鹿、绵羊、水牛和牦牛。

[1021] 脱靶 (Off-target): 如本文所使用, “脱靶” 是指在任何一个或多个靶、基因或细胞转录物上的任何未预料到的作用。

[1022] 开放阅读框 (Open reading frame): 如本文所使用, “开放阅读框” 或 “ORF” 是指在给定的读码框中的不包含终止密码子的序列。

[1023] 有效连接 (Operably linked): 如本文所使用, 短语 “有效连接” 是指两个或更多个分子、构建体、转录物、实体、部分等之间的功能性连接。

[1024] 互补位 (Paratope): 如本文所使用, “互补位” 是指抗体的抗原结合位点。

[1025] 患者 (Patient): 本文所用的 “患者” 是指可能寻求或需要治疗、要求治疗、正在接受治疗、将接受治疗的受试者, 或由于特定疾病或病况而处于受过培训的专业人员的照顾的受试者。

[1026] 任选取代的 (Optionally substituted): 在本文中 “任选取代的 X” (例如, 任选取代的烷基) 形式的短语意在表示等同于 “X, 其中 X 是任选取代的” (例如, “烷基, 其中所述烷基是任选取代的”)。其并非意在表示特征 “X” (例如, 烷基) 本身是任选的。

[1027] 肽 (Peptide): 本文所用的 “肽” 少于或等于 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。

[1028] 药学上可接受的 (Pharmaceutically acceptable): 短语 “药学上可接受的” 在本文中是指那些在合理的医学判断范围内, 适合用于与人类和动物的组织接触而没有过多毒性、刺激性、过敏反应、或其它问题或并发症, 与合理的利益/风险比相称的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[1029] 药学上可接受的赋形剂 (Pharmaceutically acceptable excipients): 本文所用的短语 “药学上可接受的赋形剂”, 如, 是指本文所述化合物之外且具有对患者基本上是无毒的和非炎性的性质的任何成分 (例如, 能够悬浮或溶解活性化合物的溶媒)。赋形剂可以包括: 例如抗粘附剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料 (颜料)、软化剂、乳化剂、填充剂 (稀释剂)、成膜剂或包衣、调味剂、香味剂、助流剂 (流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮或分散剂、增甜剂和水合水。示例性的赋形剂包括但不限于: 丁羟甲苯 (BHT)、碳酸钙、磷酸钙 (二元)、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预胶化淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、棕榈酸视黄酯、虫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、羟乙酸淀粉钠、山梨醇、淀粉 (玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素 A、维生素 E、维生素 C 和木糖醇。

[1030] 药学上可接受的盐 (Pharmaceutically acceptable salts): 本发明还包括本文所述的化合物的药学上可接受的盐。本文所用的 “药学上可接受的盐” 是指所公开的化合物的衍生物, 其中母体化合物通过存在的酸或碱部分转化成其盐形式 (例如, 通过使游离的碱基团与合适的有机酸反应) 而被修饰。药学上可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基如

胺的无机或有机酸盐；酸性残基如羧酸的碱金属盐或有机盐；等等。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐(hemisulfate)、庚酸盐(heptonate)、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性的碱或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等，以及无毒的铵、季铵和胺阳离子，包括但不限于铵、四甲铵、四乙铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。本发明的药学上可接受的盐包括本发明化合物的常规无毒盐，例如，由无毒的无机酸或有机酸形成的。本发明的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的母体化合物合成得到。通常，这样的盐可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量的适当的碱或酸在水中或在有机溶剂中或在这二者的混合物中反应进行制备；通常，非水介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。合适的盐的列举见于 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p.1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (编著), Wiley-VCH, 2008, 和 Berge 等人, Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), 其中的每一个以引用的方式整体并入本文。

[1031] 药代动力学 (Pharmacokinetic): 本文所用的“药代动力学”是指当涉及确定施用于活有机体的物质的命运时, 分子或化合物的任何或多个性质。药代动力学分为几个区域, 包括吸收、分布、代谢和排泄的程度和速率。这通常被称为 ADME, 其中: (A) 吸收是物质进入血液循环的过程; (D) 分布是物质在整个体液和身体组织中的分散或散布; (M) 代谢 (或生物转化) 是母体化合物不可逆地转化为子代谢物; 和 (E) 排泄 (或消除) 是指物质从体内的消除。在极少数情况下, 一些药物不可逆地蓄积在身体组织中。

[1032] 药学上可接受的溶剂化物 (Pharmaceutically acceptable solvate): 本文所用的术语“药学上可接受的溶剂化物”是指其中晶格中掺入了合适的溶剂分子的本发明的化合物。合适的溶剂在所施用的剂量上是生理上可耐受的。例如, 溶剂化物可从溶液 (包括有机溶剂、水或其混合物) 中通过结晶、重结晶或沉淀进行制备。合适的溶剂的实例是乙醇、水 (例如, 一水合物、二水合物和三水合物)、N-甲基吡咯烷酮 (NMP)、二甲亚砜 (DMSO)、N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF)、N,N'-二甲基乙酰胺 (DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑烷酮 (DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮 (1,3-dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2-(1H)-pyrimidinone) (DMPU)、乙腈 (ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苄醇、2-吡咯烷酮、苯甲酸苄酯等。当水是溶剂时, 溶剂化物被称为“水合物”。

[1033] 物理化学 (Physicochemical): 本文所用的“物理化学”意为具有或涉及物理和/或化学性质。

[1034] 预防 (Preventing): 本文所用的术语“预防”是指部分或完全延迟感染、疾病、病症和/或病况的发作; 部分或完全延迟特定的感染、疾病、病症和/或病况的一种或多种症状、特征或临床表现的发作; 部分或完全延迟特定的感染、疾病、病症和/或病况的一种或多种

症状、特征或表现的发作；部分或完全延迟感染、特定的疾病、病症和/或病况的进展；和/或降低出现与感染、疾病、病症和/或病况相关的病理的风险。

[1035] 前药(Prodrug)：本发明还包括本文所述的化合物的前药。本文所用的“前药”是指处于下列形式中的任何物质、分子或实体：断言该物质、分子或实体在发生化学或物理改变时充当治疗剂。前药可以通过某种方式被共价键合或螯合，并且其在施用于哺乳动物受试者之前、之时或之后释放或被转化成活性药物部分。前药可以以如下方式通过修饰在化合物中存在的官能团来制备：在常规操作中或在体内使修饰裂解成母体化合物。前药包括其中羟基、氨基、巯基(sulfhydryl)或羧基基团结合到任何基团上的化合物，其在施用于哺乳动物受试者时裂解以分别形成游离的羟基、氨基、巯基或羧基基团。前体药物的制备和使用在以下文献中有论述：T.Higuchi和V.Stella,“Pro-drugs as Novel Delivery Systems” A.C.S.Symposium Series的第14卷和Bioreversible Carriers in Drug Design,Edward B.Roche编著,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987,这两篇文献都通过引用的方式整体并入本文。

[1036] 增殖(Proliferate)：如本文所使用，术语“增殖”指生长、扩大或增加或导致快速生长、扩大或增加。“增殖性的(Proliferative)”指具有增殖的能力。“抗增殖性的(Anti-proliferative)”指具有抵销或不适合增殖性性质的性质。

[1037] 蛋白裂解位点(Protein cleavage site)：如本文所使用，“蛋白裂解位点”是指可以通过化学的、酶促的或光化学的手段实现氨基酸链受控裂解的位点。

[1038] 蛋白裂解信号(Protein cleavage signal)：如本文所使用，“蛋白裂解信号”指标志或标记多肽裂解的至少一个氨基酸。

[1039] 目标蛋白(Protein of interest)：如本文所使用，术语“目标蛋白”或“所需的蛋白”包括本文所提供的蛋白和其片段、突变体、变体和改变。

[1040] 近端的(Proximal)：如本文所使用，术语“近端的”指更近地位于中心或目标点或区域。

[1041] 纯化的(purified)：本文所用的“使纯化(purify)”、“纯化的”、“纯化(purification)”意指基本上纯或者除去不需要的组分、材料污物、杂质或瑕疵品。

[1042] 样品(Sample)：本文所用的术语“样品”或“生物样品”是指其组织、细胞或组成部分的子集(subset)(例如，体液包括但不限于血液、粘液、淋巴液、滑膜液、脑脊液、唾液、羊水、羊膜脐带血、尿液、阴道分泌物和精液)。样品还可以包括由整个有机体或其组织、细胞或组成部分的子集、或其碎片或部分制备的组织匀浆、裂解物或提取物，其包括但不限于，例如血浆、血清、脊髓液、淋巴液、皮肤外切片(external sections)、呼吸道、肠道和泌尿生殖道、泪液、唾液、乳汁、血细胞、肿瘤、器官。样品还指培养基如营养肉汤或凝胶，其可含有细胞组分如蛋白或核酸分子。

[1043] 信号序列(Signal Sequences)：如本文所使用，短语“信号序列”指能够指引蛋白的转运或定位的序列。

[1044] 显著的(Significant)或显著地(Significantly)：如本文所用的术语“显著的”或“显著地”与术语“基本上(substantially)”同义。

[1045] 单次单位剂量(Single unit dose)：本文所用的“单次单位剂量”是以一个剂量/一次/单途径/单点接触，即单次施用事件施用的任何治疗剂的剂量。

[1046] 相似性 (Similarity): 如本文所使用, 术语“相似性”指多聚分子之间如多核苷酸分子之间 (如DNA分子和/或RNA分子) 和/或多肽分子之间的总相关性。多聚分子彼此之间的百分比相似性的计算可以以与百分比同一性的计算相同的方式进行计算, 只是正如本领域所知, 百分比相似性的计算考虑了保守取代。

[1047] 分次剂量 (Split dose): 本文所用的“分次剂量”是指单次单位剂量或总日剂量分成两个或更多的剂量。

[1048] 稳定的 (Stable): 本文所用的“稳定的”是指足够稳健的以保持从反应混合物中分离至可用程度的纯度, 并优选能够配制成有效治疗剂的化合物。

[1049] 稳定化的 (Stabilized): 本文所用的术语“稳定化 (stabilize)”、“稳定化的”、“稳定化区域 (stabilized region)”意指使其稳定或变得稳定。

[1050] 受试者 (Subject): 本文所用的术语“受试者”或“患者”是指可以对其施用根据本发明的组合物的任何有机体, 例如出于实验、诊断、预防和/或治疗的目的。典型的受试者包括动物 (例如, 哺乳动物如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人类) 和/或植物。

[1051] 基本上 (Substantially): 本文所用的术语“基本上”是指表现出全部或接近全部的范围或程度的目标特性或性质的定性条件。生物学领域普通技术人员可以理解生物和化学现象很少 (如果有的话) 达到完成和/或进行到完全或实现或避免绝对的结果。因此, 术语“基本上”在本文中用于体现许多生物和化学现象中潜在缺少的固有的完全性。

[1052] 基本上相等 (Substantially equal): 如本文所使用的, 当其涉及剂量之间的时间差异时, 该术语是指加/减2%。

[1053] 基本上同时 (Substantially simultaneously): 如本文所使用的, 当其涉及多个剂量时, 该术语是指在2秒内。

[1054] 患有 (Suffering from): “患有”疾病、病症和/或病况的个体被诊断出具有或表现出疾病、病症和/或病况的一种或多种症状。

[1055] 易患…的 (Susceptible to): “易患”疾病、病症和/或病况的个体是尚未被诊断患有出疾病、病症和/或病况和/或尚未表现出疾病、病症和/或病况的症状, 但具有发展疾病或其症状倾向的个体。在一些实施方式中, 易患疾病、病症和/或病况 (例如, 癌症) 的个体可以通过下列一项或多项进行表征: (1) 与疾病、病症和/或病况的发展相关的遗传突变; (2) 与疾病、病症和/或病况的发展相关的遗传多态性; (3) 增加的和/或减少的与疾病、病症和/或病况相关的蛋白和/或核酸的表达和/或活性; (4) 与疾病、病症和/或病况的发展相关的习惯和/或生活方式; (5) 疾病、病症和/或病况的家族史和 (6) 暴露于和/或感染有与疾病、病症和/或病况的发展相关的微生物。在一些实施方式中, 易患疾病、病症和/或病况的个体将发展疾病、病症和/或病况。在一些实施方式中, 易患疾病、病症和/或病况的个体将不会发展疾病、病症和/或病况。

[1056] 合成的 (Synthetic): 术语“合成的”意指通过人工生产、制备和/或制造的。本发明的多核苷酸或多肽或其它分子的合成可以是化学合成或酶合成。

[1057] 靶细胞 (Targeted Cells): 如本文所使用, “靶细胞”指任何一个或多个目标细胞。细胞可以在有机体的体外、体内、原位或组织或器官内发现。有机体可以是动物, 优选哺乳动物, 更优选人类和最优选患者。

[1058] 治疗剂 (Therapeutic Agent): 术语“治疗剂”是指, 当对受试者施用, 具有治疗、

诊断和/或预防作用和/或引发所期望的生物和/或药理效应的任何药剂。

[1059] 治疗有效量 (Therapeutically effective amount): 本文所用的术语“治疗有效量”意指当施用于患有或易患感染、疾病、病症和/或病况的受试者, 足以治疗感染、疾病、病症和/或病况; 改善感染、疾病、病症和/或病况的症状; 诊断感染、疾病、病症和/或病况; 预防感染、疾病、病症和/或病况; 和/或延迟感染、疾病、病症和/或病况的发作的待递送的药剂 (例如核酸、药物、治疗剂、诊断剂、预防剂等) 的量。

[1060] 治疗有效结果 (Therapeutically effective outcome): 本文所用的术语“治疗有效结果”意指对于患有或易患感染、疾病、紊乱和/或病况的受试者, 足以治疗感染、疾病、病症和/或病况; 改善感染、疾病、病症和/或病况的症状; 诊断感染、疾病、病症和/或病况; 预防感染、疾病、病症和/或病况; 和/或延迟感染、疾病、病症和/或病况的发作的结果。

[1061] 总日剂量 (Total daily dose): 本文所用的“总日剂量”是24小时期间内给出的或规定的量。其可以作为单次单位剂量施用。

[1062] 转录因子 (Transcription factor): 如本文所使用, 术语“转录因子”指DNA结合蛋白, 其例如通过激活或抑制转录来调节DNA转录成RNA。某些转录因子单独影响转录调节, 而另一些与其它蛋白共同起作用。某些转录因子在一定条件下可以同时激活和抑制转录。通常, 转录因子结合与靶基因调节区中特异性共有序列高度相似的特异性靶序列。转录因子可以单独调节靶基因的转录或与其它分子复合调节靶基因的转录。

[1063] 治疗 (Treating): 本文所用的术语“治疗”是指部分地或完全地缓解、改进、改善、减轻特定感染、疾病、病症和/或病况; 部分地或完全地延迟特定感染、疾病、病症和/或病况的发作; 部分地或完全地抑制特定感染、疾病、病症和/或病况的进展; 部分地或完全地降低特定感染、疾病、病症和/或病况的严重程度; 和/或减少特定感染、疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征的发生率。例如, “治疗”癌症可以是指抑制肿瘤的存活、生长和/或扩散。出于降低出现与疾病、病症和/或病况相关的病理的风险的目的, 治疗可以施用于未表现出疾病、病症和/或病况的体征的受试者和/或仅表现出疾病、病症和/或病况的早期体征的受试者。

[1064] 未修饰的 (Unmodified): 本文所用的“未修饰的”是指以任何方式改变之前的任何物质、化合物或分子。未修饰的可以但并不总是是指生物分子的野生型或天然形式。分子可以进行一系列修饰, 从而使每个修饰的分子可以作为“未修饰的”起始分子用于后续的修饰。

[1065] 相等物和范围

[1066] 本领域技术人员仅通过使用常规实验就将认定或能确定许多本发明所述的具体实施方式的相等物。本发明的范围并不意图限于上述说明, 而是如所附的权利要求所限定的。

[1067] 在权利要求中, 冠词如“一” (a)、“一个” (an) 和“所述” (the) 可以表示一个或多个, 除非有相反的说明或可以从上下文明显片段。在组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或说明被认为是满足条件的, 只要一个、多于一个或所有的组成员存在于、使用于或以其它方式相关于给定产品或过程, 除非有相反的说明或可以从上下文明显片段。本发明包括其中恰好只有一个组成员存在于、使用于或以其它方式相关于给定产品或过程的实施方式。本发明包括其中有多于一个或所有的组成员存在于、使用于或以其它方式相关

于给定产品或过程的实施方式。

[1068] 还应当注意的是,术语“包含”指开放的和允许的,但并不需要包括其它要素或步骤。当在本文中使用了术语“包含”,则术语“由.....组成”也因此被包括和公开。

[1069] 如果给出了范围,则端点也包括在内。此外,应当理解的是,除非另有说明或可以从上下文和本领域普通技术人员的理解明显判断,表达为范围的值可以包括在本发明不同实施方式的所述范围内的达到范围下限的单位的十分之一的任何具体值或子范围,除非上下文中明确地另有说明。

[1070] 此外,应当理解的是,落在现有技术范围内的本发明的任何特定实施方式可以明确地被任何一项或多项权利要求所排除。由于这样的实施方式被认为是本领域技术人员已知的,其可以被排除,即使排除并未在本文中明确指出。本发明成分(compositions)的任何具体实施方式(如,任何核酸或其编码的蛋白;任何生产方法;任何使用方法等)可以出于任何原因从任何一个或多个权利要求中排除,不论是否与现有技术相关。

[1071] 所有引用的来源,例如参考文献、出版物、数据库、数据库条目和本文所引用的技术(art),都通过引用并入本申请,即使在引句(citation)没有明确声明。当引用的来源的陈述与本申请相矛盾时,以本申请的陈述为准。

[1072] 实施例

[1073] 本发明进一步描述了下列实施例,其不限制权利要求中所述的发明范围。

[1074] 实施例1. 修饰的mRNA的体外转录

[1075] A. 材料和方法

[1076] 本发明的修饰的mRNA用于体外转录的标准实验室方法和材料(除了核苷酸混合物包含修饰的核苷酸)来制备。目标基因的开放阅读框(ORF)侧翼具有含有强Kozak翻译起始信号的5'非翻译区(UTR)和用于依赖模板(templated)添加polyA尾给mRNA而不插入腺苷类似物的寡(dT)序列终止的 α -球蛋白3'UTR。合成含腺苷而不带有寡(dT)序列的mRNA,以允许转录后的poly(A)聚合酶的poly-(A)加尾。

[1077] 修饰的mRNA可以被修饰,以减少细胞先天免疫应答。减少细胞应答的修饰可以包括假尿苷(Ψ)和5-甲基-胞苷(5meC、5mc或m⁵C)。(参见,Kariko K等人,Immunity23:165-75(2005);Kariko K等人,Mol Ther16:1833-40(2008);Anderson BR等人,NAR(2010);通过引用并入本文)。

[1078] ORF也可包括各种上游或下游的附加(例如,但不限于 β -球蛋白、标签等),其可购自优化服务,例如但不限于DNA2.0(Menlo Park,CA),并可以包含可以具有Xba I识别位点的多克隆位点。获得构建体后,其可以重建和转化到化学感受态大肠杆菌中。

[1079] 在本发明中,使用NEB的DH5- α 感受态大肠杆菌。根据NEB说明书使用100ng的质粒进行转化。规程如下:

[1080] 一管NEB5- α 感受态大肠杆菌置于冰上10分钟以解冻。

[1081] 加入1-5 μ l的含有1pg-100ng的质粒DNA至细胞混合物中。仔细轻弹管4-5次以混合细胞和DNA。不要涡旋。

[1082] 将混合物置于冰上30分钟。不要混合。

[1083] 42°C热休克精确的30秒。不要混合。

[1084] 置于冰上5分钟。不要混合。

- [1085] 用移液器加入950 μ l的室温的SOC到混合物中。
- [1086] 置于37 $^{\circ}$ C 60分钟。剧烈振摇 (250rpm) 或旋转。
- [1087] 将选择性板温育至37 $^{\circ}$ C。
- [1088] 轻弹管和颠倒以彻底混合细胞。
- [1089] 将每个稀释度的50-100 μ l涂布于选择性板上并于37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。或于30 $^{\circ}$ C 孵育24-36小时或于25 $^{\circ}$ C 孵育48小时。
- [1090] 然后,使用单菌落来接种于5ml的含合适的抗生素的LB生长培养基中,然后生长5小时 (250RPM, 37 $^{\circ}$ C)。然后,在同样条件下,将培养物接种于200ml培养基中并生长过夜。
- [1091] 为了分离质粒 (高达850 μ g),使用Invitrogen公司的PURELINKTMHiPure Maxiprep 试剂盒 (Carlsbad, CA) 按制造商的说明书进行大量制备。
- [1092] 为了产生cDNA用于体外转录 (IVT),质粒 (示于图3的实例) 首先用限制性内切酶如Xba I线性化。使用Xba I的典型限制性酶切包括下述内容:质粒1.0 μ g;10X缓冲液1.0 μ l; Xba I酶1.5 μ l;蒸馏水补足至10 μ l;在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。如果以实验室规模进行 (<5 μ g),使用Invitrogen公司的PURELINKTMPCR Micro试剂盒 (Carlsbad, CA) 按生产商的说明书进行纯化。较大规模的纯化可能需要使用具有较大的承载能力的产品,例如Invitrogen公司的标准PURELINKTMPCR试剂盒 (Carlsbad, CA) 来进行。纯化后,使用NanoDrop定量线性化的载体并使用琼脂糖凝胶电泳分析以确认线性化。
- [1093] B. 修饰的mRNA的琼脂糖凝胶电泳
- [1094] 独立的修饰的mRNA (200-400ng于20 μ l的体积中) 上样到非变性1.2%琼脂糖E-凝胶的孔中 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 并根据制造商的规程跑胶12-15分钟。
- [1095] C. RT-PCR产物的琼脂糖凝胶电泳
- [1096] 独立的逆转录PCR产物 (200-400ng) 上样到非变性1.2%琼脂糖E-凝胶的孔中 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 并根据制造商的规程跑胶12-15分钟。
- [1097] D. NanoDrop修饰的mRNA的定量和UV光谱数据
- [1098] 将TE缓冲液 (1 μ l) 中的修饰的mRNA用于NanoDrop UV吸光度读数以定量来自体外转录反应的各个修饰的mRNA的产率 (UV吸收痕未示出)。
- [1099] 实施例2. 修饰的mRNA的转染
- [1100] A. 反向转染
- [1101] 对于在24孔的胶原蛋白包被的组织培养板中进行的实验,角质形成细胞以 1×10^5 的细胞密度接种。对于在96孔的胶原蛋白包被的组织培养板中进行的实验,角质形成细胞以 0.5×10^5 的细胞密度接种。对于每个待转染的修饰的mRNA,如所述的方法制备修饰的mRNA:RNAIMAXTM并于细胞附着到组织培养板之前的细胞接种的6小时内与细胞混合于多孔板。
- [1102] B. 正向转染
- [1103] 在24孔的胶原蛋白包被的组织培养板中,角质形成细胞以 0.7×10^5 的细胞密度接种,对于在96孔的胶原蛋白包被的组织培养板中进行的实验,角质形成细胞以 0.3×10^5 的细胞密度接种。角质形成细胞随后生长24小时以上至>70%的融合。对于每个待转染的修饰的mRNA,如所述的方法制备修饰的mRNA:RNAIMAXTM并在细胞接种和附着到组织培养板之后超过24小时转染到多孔板中的细胞上。

[1104] C. 修饰的mRNA翻译筛查:G-CSF ELISA

[1105] 角质形成细胞以>70%的融合生长于购自Invitrogen的补充有S7的EpiLife培养基中。用300ng的复合有RNAIMAXTM(购自Invitrogen)的所述化学修饰的mRNA反向转染角质形成细胞。或者,用300ng的复合有RNAIMAXTM(购自Invitrogen)的修饰的mRNA正向转染角质形成细胞。通过首先将RNA与无补充的5X体积稀释的EPILIFE®培养基在室温下孵育10分钟形成RNA:RNAIMAXTM复合物。

[1106] 在第二个瓶中,RNAIMAXTM试剂与无补充的10X体积稀释的EPILIFE®培养基在室温下孵育10分钟。然后,将RNA的瓶与RNAIMAXTM的瓶混合并室温孵育20-30分钟,然后以逐滴方式加入到细胞中。培养基中分泌的huG-CSF浓度在转染后18小时进行测量,每个化学修饰的mRNA一式三份。从转染的人类角质形成细胞分泌的人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)使用购自Invitrogen或R&D Systems (Minneapolis,MN)的ELISA试剂盒按制造商推荐的说明书进行定量。

[1107] D. 修饰的mRNA的剂量和持续时间:G-CSF ELISA

[1108] 角质形成细胞以>70%的融合生长于购自Invitrogen的补充有S7的EPILIFE®培养基中。用0ng、46.875ng、93.75ng、187.5ng、375ng、750ng或1500ng的复合有RNAIMAXTM(购自Invitrogen)的修饰的mRNA反向转染角质形成细胞。按所述方法形成修饰的mRNA:RNAIMAXTM复合物。培养基中分泌的huG-CSF浓度在转染后0、6、12、24和48小时后进行测量,每个浓度的各个修饰的mRNA一式三份。从转染的人类角质形成细胞分泌的人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)使用购自Invitrogen或R&D Systems的ELISA试剂盒按制造商推荐的说明书进行定量。

[1109] 实施例3. 针对修饰的核酸的细胞先天免疫应答:IFN-βELISA和TNF-αELISA

[1110] 为了检测细胞先天免疫应答,用酶联免疫吸附分析(ELISA)对体外转染的人类角质形成细胞所分泌的人肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、人干扰素-β(IFN-β)和人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)进行检测。

[1111] 角质形成细胞以>70%的融合生长于具有缺乏氢化可的松的人类角质形成细胞生长补充物的EPILIFE®培养基(购自Invitrogen)中。用0ng、93.75ng、187.5ng、375ng、750ng、1500ng或3000ng的复合有购自Invitrogen的RNAIMAXTM的所述化学修饰的mRNA反向转染角质形成细胞,按所述方法进行,一式三份。对于每个化学修饰的mRNA,在转染后24小时使用ELISA试剂盒(购自Invitrogen)依制造商的规程测定培养基中分泌的TNF-α。

[1112] 对于每个化学修饰的mRNA,在转染后24小时使用ELISA试剂盒(购自Invitrogen)依制造商的规程测定分泌的IFN-β。对于每个化学修饰的mRNA,在转染后24小时测定分泌的hu-G-CSF的浓度。使用购自Invitrogen或R&D Systems (Minneapolis,MN)的ELISA试剂盒依制造商推荐的说明书,定量转染的人角质形成细胞所分泌的人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。这些数据表明,通过测量示例性的1型细胞因子TNF-α和IFN-β,修饰的mRNA与天然和其它化学修饰的多核苷酸或参考化合物相比,能够诱发降低的细胞先天免疫应答。

[1113] 实施例4. 人粒细胞集落刺激因子修饰的mRNA所诱导的细胞增殖的分析

[1114] 人角质形成细胞于24孔胶原蛋白包被的TRANSWELL®(Corning,Lowell,MA)共培养组织培养板中以>70%的融合生长于补充有S7的EPILIFE®培养基(购自Invitrogen)中。用750ng复合有购自Invitrogen的RNAIMAXTM的所述化学修饰的mRNA反向转染角质形成

细胞,按所述方法进行,一式三份。如所述,形成修饰的mRNA:RNAIMAX™复合物。转染后6-8小时更换角质形成细胞培养基。转染后42小时,插有0.4μm孔径半渗透聚酯膜的24孔TRANSWELL®板被置于含有hu-G-CSF修饰的mRNA转染的角质形成细胞的培养板中。

[1115] 将人成粒细胞、Kasumi-1细胞或KG-1 (0.2×10^5 个细胞)接种到插入孔中,在共培养开始后42小时,于96孔板中的100-120μl体积内,使用CyQuant Direct Proliferation分析(Invitrogen)定量细胞增殖。编码修饰的mRNA、hu-G-CSF诱导的成粒细胞的细胞增殖表达为归一化到未转染的角质形成细胞/成粒细胞共培养对照孔的细胞增殖的百分比。在角质形成细胞和成粒细胞插入共培养孔中所分泌的hu-G-CSF浓度在共培养开始后42小时进行测量,每个修饰的mRNA一式两份。使用购自Invitrogen的ELISA试剂盒依制造商推荐的说明书定量分泌的人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。

[1116] 人角质形成细胞饲养细胞和未转染的人成粒细胞中转染的hu-G-CSF修饰的mRNA通过RT-PCR进行检测。根据制造商的说明书使用RNAEASY®试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)从样品细胞中提取和裂解总RNA。提取的总RNA进行RT-PCR,以使用PROTOSCRIPT®M-MuLV Taq RT-PCR试剂盒(New England BioLabs, Ipswich, MA)和hu-G-CSF-特异性引物依制造商的说明书特异性扩增修饰的mRNA-G-CSF。RT-PCR产物通过1.2%的琼脂糖凝胶电泳可视化。

[1117] 实施例5. 细胞毒性和细胞凋亡

[1118] 本实验证明了不同的修饰的mRNA体外转染的人角质形成细胞的细胞活力、细胞毒性和细胞凋亡。角质形成细胞以>70%的融合生长于补充有不含氢化可的松的人角质形成细胞生长补充物的EPILIFE®培养基(购自Invitrogen)中。用0ng、46.875ng、93.75ng、187.5ng、375ng、750ng、1500ng、3000ng或6000ng的复合有购自Invitrogen的RNAIMAX™的修饰的mRNA反向转染角质形成细胞。形成修饰的mRNA:RNAIMAX™复合物。培养基中分泌的huG-CSF浓度在转染后0、6、12、24和48小时进行测量,每个修饰的mRNA的每个浓度一式三份。使用购自Invitrogen或R&D Systems的ELISA试剂盒、依制造商推荐的说明书定量从转染的人角质形成细胞分泌的人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。细胞活力、细胞毒性和细胞凋亡在转染后0、12、48、96和192小时,使用购自Promega (Madison, WI)的APOTOX-GLO™试剂盒并根据制造商的说明书进行测量。

[1119] 实施例6. 共培养环境

[1120] 编码人粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)的、由不同化学修饰的核苷酸组成的修饰的mRNA可在共培养环境中刺激转染无能(transfection incompetent)细胞的细胞增殖。共培养物包括高度可转染的细胞类型,如人角质形成细胞,和转染无能的细胞类型,如白血细胞(WBC)。编码G-CSF的修饰的mRNA可被转染到高度可转染的细胞中,允许产生和分泌G-CSF蛋白到细胞外环境中,其中G-CSF以类旁分泌样的方式起作用,刺激表达G-CSF受体的白血细胞增殖。扩增的WBC群体可用于治疗免疫妥协的患者或部分重建免疫抑制患者的WBC群体,从而降低机会性感染的风险。

[1121] 在另一个实施例中,高度可转染的细胞如成纤维细胞用某些生长因子转染,以支持和模拟几乎不可转染的胚胎干细胞或诱导的多能干细胞的生长、维持或分化。

[1122] 实施例7. 修饰的核酸(修饰的mRNA)上的5'-鸟苷加帽

[1123] A. 材料和方法

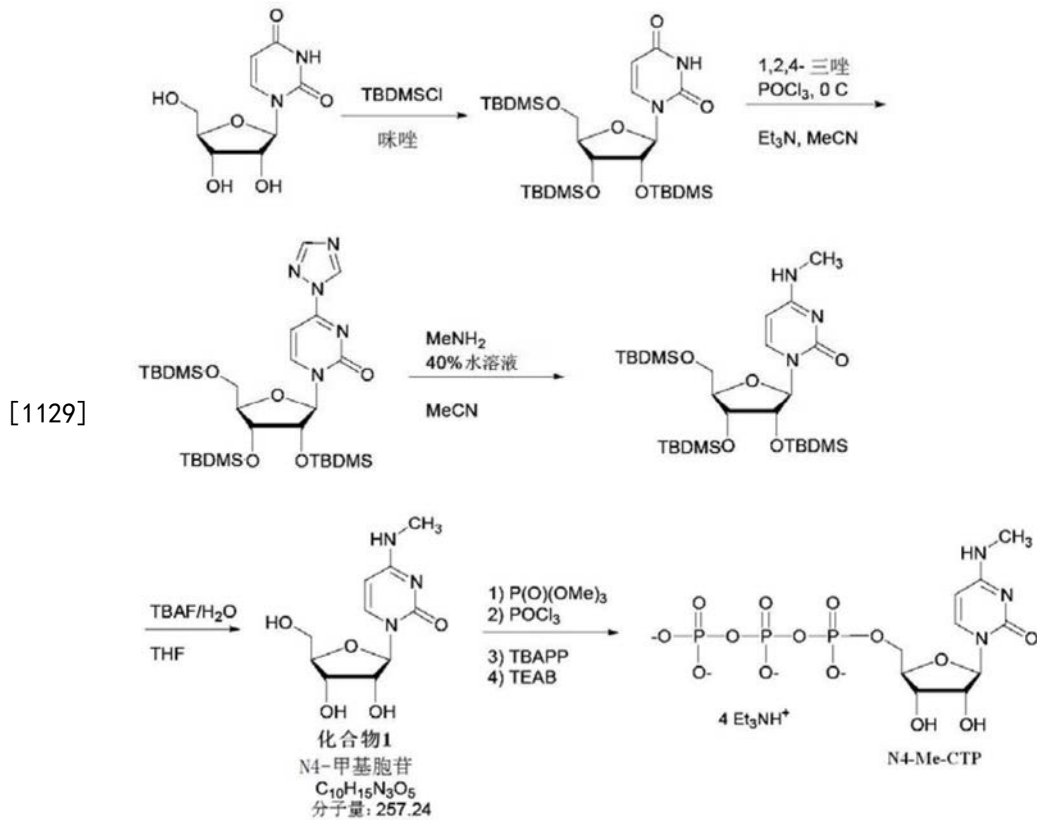
[1124] 克隆、基因合成和载体测序由DNA2.0公司(Menlo Park,CA)进行。用XbaI限制性酶切ORF并用于使用加尾或无尾PCR(tailed-or tail-less-PCR)的cDNA合成。加尾PCR的cDNA产物被用作修饰的mRNA合成反应的模板,合成反应使用25mM的各个修饰的核苷酸的混合物和CellScript MEGASCRIP™(Epicenter Biotechnologies, Madison, WI)完全mRNA合成试剂盒(所有的修饰的核苷酸是定制合成的或购自TriLink Biotech, San Diego, CA(除了吡咯并-C三磷酸购自Glen Research, Sterling VA);未修饰的核苷酸购自Epicenter Biotechnologies, Madison, WI)。于37°C进行4小时的体外转录反应。掺入腺苷类似物的修饰的mRNA用酵母poly(A)聚合酶(Affymetrix, Santa Clara, CA)加poly(A)尾。使用HiFi PCR2X MASTER MIX™(Kapa Biosystems, Woburn, MA)进行PCR反应。修饰的mRNA利用重组痘苗病毒加帽酶(New England BioLabs, Ipswich, MA)和重组2'-O-甲基转移酶(Epicenter Biotechnologies, Madison, WI)进行转录后加帽以生成5'-鸟苷帽1结构。帽2结构和多个帽2结构可以使用另外的2'-O-甲基转移酶来产生。体外转录的mRNA产物跑琼脂糖凝胶并可视化。用Ambion/Applied Biosystems(Austin, TX)的MEGAClear RNA™纯化试剂盒纯化修饰的mRNA。PCR使用PURELINK™PCR纯化试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA)。产物用NANODROP™UV吸光度(ThermoFisher, Waltham, MA)进行定量。在1.2%的琼脂糖凝胶上检验产物的品质、UV吸收品质和可视化。产物重悬于TE缓冲液。

[1125] B. 5'加帽的修饰的核酸(mRNA)结构

[1126] 在体外转录反应中,根据制造商的规程,使用下列化学RNA帽类似物伴随地完成修饰的mRNA的5'-加帽,以生成5'-鸟苷帽结构:3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G(ARCA帽);G(5')ppp(5')A;G(5')ppp(5')G;m7G(5')ppp(5')A;m7G(5')ppp(5')G(New England BioLabs, Ipswich, MA)。修饰的mRNA的5'-加帽可使用痘苗病毒加帽酶在转录后完成,以产生“帽0”结构:m7G(5')ppp(5')G(New England BioLabs, Ipswich, MA)。可以使用痘苗病毒加帽酶和2'-O-甲基转移酶二者产生帽1结构,以产生:m7G(5')ppp(5')G-2'-O-甲基。可以从帽1结构中产生帽2结构,即用2'-O-甲基转移酶使5'的倒数第三个核苷酸被2'-O-甲基化。可以从帽2结构中产生帽3结构,即用2'-O-甲基转移酶使5'的倒数第四个核苷酸被2'-O-甲基化。酶优选来自重组来源。

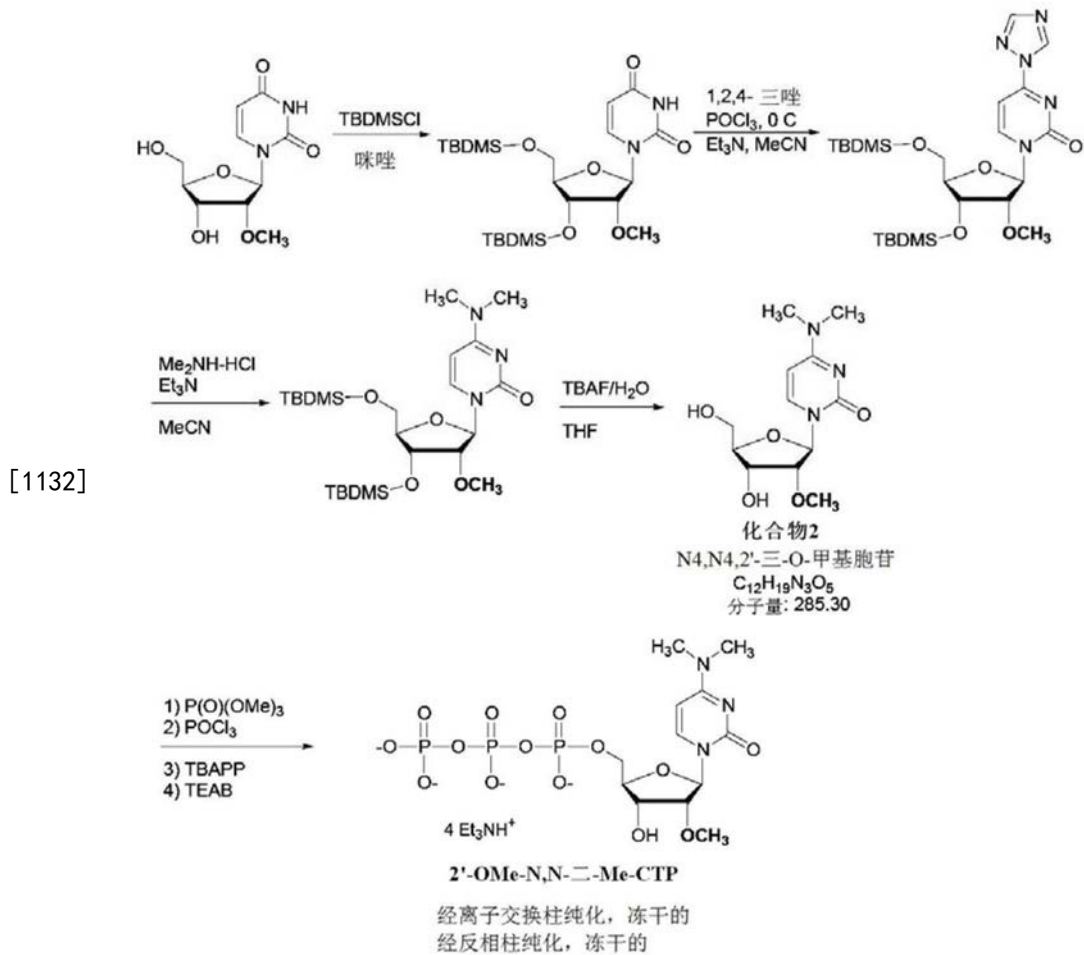
[1127] 当转染到哺乳动物细胞中时,修饰的mRNA具有12-18小时或超过18小时的稳定性,例如24、36、48、60、72或大于72小时。

[1128] 实施例8.N4-甲基胞苷(化合物1)和N4-甲基CTP(所述化合物的NTP)的合成



[1130] 将尿苷是甲硅烷基化以提供三甲硅烷基化的化合物,将其经柱纯化,用重蒸馏的 POCl_3 /三唑在无水条件下活化,然后用40%甲胺水溶液进行亲核取代。从而在色谱法纯化后获得N4-甲基-2',3',5'-三-O-TBDMS-胞苷。将获得的产物用TBAF脱保护,然后用乙醇-乙酸乙酯(3:1)溶剂体系纯化以得到化合物1。最终产物通过如下进行表征:NMR(在DMSO中);MS:258 (M+H)⁺,280 (M+Na)⁺和296 (M+K)⁺;以及HPLC:纯度,99.35% (图1A-1D)。HPLC,纯度98% (图2)。

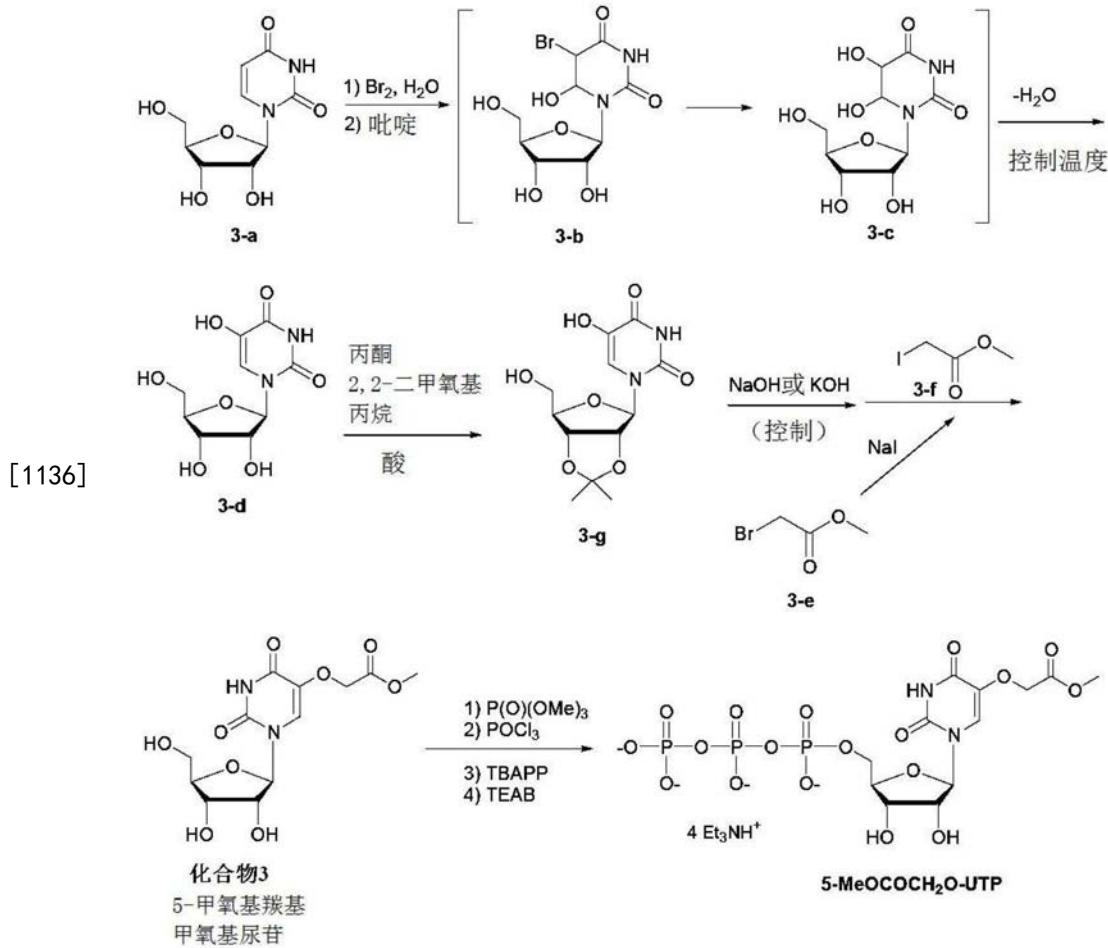
[1131] 实施例9.2'-OMe-N,N-二-Me-胞苷(化合物2)和2'-OMe-N,N-二-Me-CTP(所述化合物的NTP)的合成



[1133] 将2'-O-甲基尿苷是甲硅烷基化以得到二甲硅烷基化的化合物。将纯化的2'-O-甲基-3',5'-二-O-TBDMS尿苷在无水条件下用重蒸馏的POCl₃和咪唑活化,然后与二甲胺盐酸盐在三乙胺环境下进行亲核取代以捕获HCl。将中间化合物N4,N4,2'-三-O-甲基-3',5'-双-O-TBDMS尿苷通过快速色谱法纯化并获得白色泡沫状物。将获得的化合物用TBAF脱保护,然后纯化以提供~400mg的最终产物化合物2,为白色泡沫状物。ES MS:m/z308 (M+Na)⁺, 386 (M+H)⁺;HPLC:纯度,99.49% (图3A-3C)。

[1134] 为了合成相应的NTP,将70mg的核苷化合物2经离子交换柱和反相柱纯化后得到23mg的2'-OMe-N,N-二-Me-CTP。HPLC:纯度,95% (图4)。

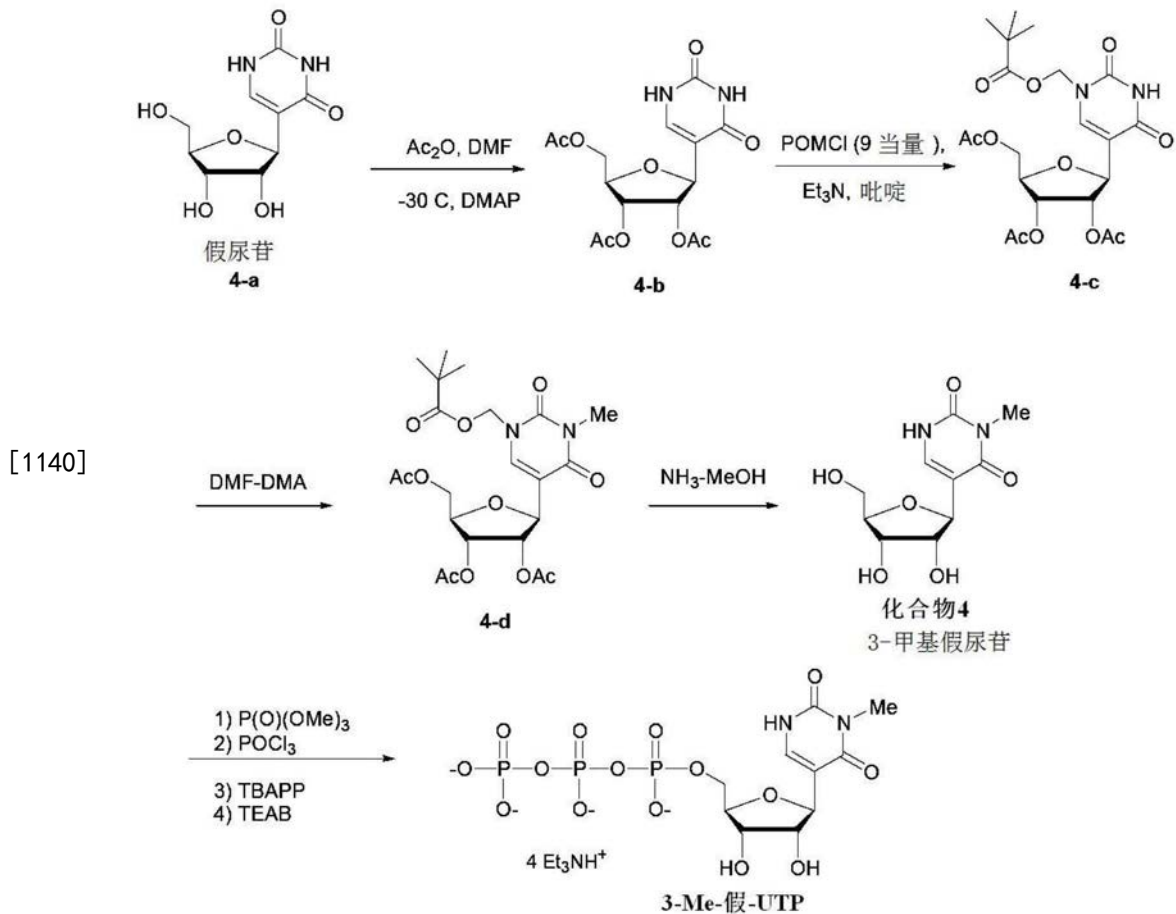
[1135] 实施例10.5-甲氧基羰基甲氧基尿苷 (化合物3) 和5-甲氧基羰基甲氧基-UTP (所述化合物的NTP) 的合成



[1137] 用过量的溴处理在水中的尿苷3-a,然后用空气冲洗以去除溴。在控制的速度和温度下用吡啶处理反应混合物。在反应过程中,逐渐将不稳定的溴代中间体3-b转化为二羟基中间体3-c,其可能经脱水得到稳定的5-羟基尿苷3-d。然后,用2',3'-异亚丙基基团保护5-羟基尿苷,得到化合物3-g。与化合物3-f反应获得化合物3。

[1138] 60-70mg的核苷经2次HPLC柱纯化和2次冻干步骤后获得>21 mg的期望的三磷酸酯。HPLC:纯度,98%(图5)。

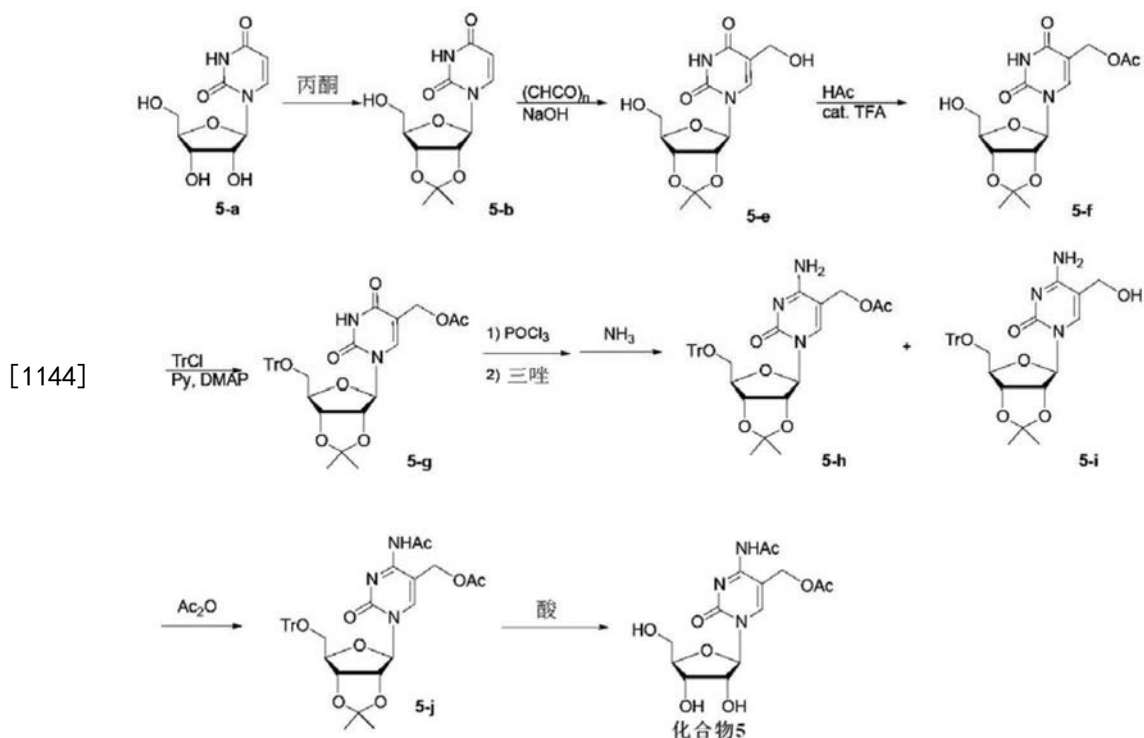
[1139] 实施例11. 3-甲基假尿苷(化合物4)和3-甲基假-UTP(所述化合物的NTP)的合成



[1141] 使假尿苷4-a与Ac₂O反应以获得乙酰基保护的假尿苷4-b。然后,用POM选择性地保护N1以得到化合物4-c。甲基化N3,然后进行脱保护,获得化合物4(~400mg)。分子式:C₁₀H₁₄N₂O₆,分子量:258.23g/mol;外观:白色固体,储存条件:在25℃下储存;HPLC:纯度,98.51%;¹H NMR(DMSO-d₆):δ11.17(d,1H,J=3.0Hz),7.56(d,1H,J=3.6Hz),4.91(d,1H,J=3.6Hz),4.79(t,1H,J=4.2Hz),4.70(d,1H,J=4.2Hz),4.49(d,1H,J=3.0Hz),3.82-3.88(m,2H),3.66-3.67(m,1H),3.57-3.61(m,1H),3.40-3.47(m,1H),3.09(s,3H);MS:281(M+Na)⁺(图6A和6B)。

[1142] 可以应用可选的途径来获得化合物4。例如,可以使假尿苷与O-保护基团(例如,如本文所述的,如TMS)反应和与N-保护基团(例如,如本文所述的,如在N1处的乙酰基)反应。然后,可以使核碱基的N3与烷基化剂(例如,二甲胺/二甲氧基甲基)反应以得到具有N-和O-保护基团的化合物4。最后,将得到的化合物脱保护(例如,在碱性条件下,如NH₃/MeOH)以得到化合物4。

[1143] 实施例12.N-Ac,5-Ac-OCH₂-胞苷(化合物5)的合成



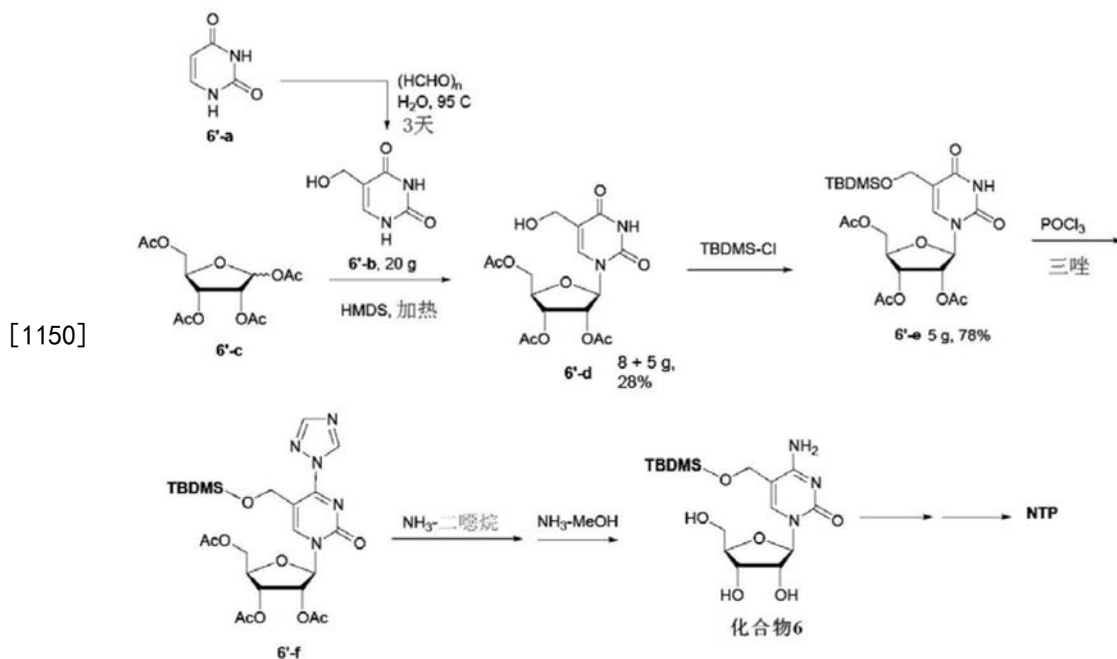
[1145] 对尿苷5-a进行保护以得到亚异丙基化合物5-b,使其与 $(\text{CHCO})_n$ 反应。使用乙酸和催化量的TFA以获得所期望的选择性乙酰化的化合物5-f (30%收率)。5'-OH基团的进一步三苯甲基化获得所期望的正交保护的化合物5-g。

[1146] 用 POCl_3 和三唑处理化合物5-g,以获得化合物5-h以及脱乙酰的化合物5-i。乙酰化这两个化合物获得二-乙酰化的完全保护的化合物5-j。在加热条件下,用乙酸对化合物5-j进行脱保护获得3种产物,其中之一是化合物5。

[1147] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干或蒸发(例如,从EtOH中)。

[1148] 可以应用可选的途径来获得化合物5,如通过以胞苷作为起始原料开始。在这类方法中,5-位可以与卤素或卤化剂(例如,本文所述的任何卤化剂,如 I_2 /间氯过氧苯甲酸)反应,其可被烷基化剂替换。而且,这类方法可以包括使用一个或多个N-或O-保护基团(例如,本文所述的任何N-或O-保护基团,如甲硅烷基化或乙酰化)以保护胞苷的氨基基团和/或糖部分的羟基基团。

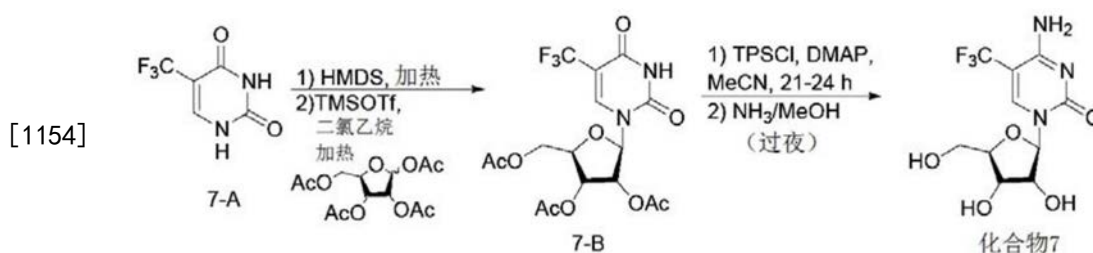
[1149] 实施例13.5-TBDMS-OCH₂-胞苷(化合物6)的合成



[1151] 糖基化5-羟基尿嘧啶化合物-b以得到化合物6'-d (28%收率), 将其甲硅烷基化以得到化合物6'-e。活化的保护的尿苷在进一步氨基化和脱保护后得到所期望的化合物6 (800mg的最终化合物)。分子式: C₁₆H₂₉N₃O₆Si; 分子量: 387.50g/mol; 外观: 白色固体, 储存条件: 在25°C储存; HPLC: 纯度, 97.57%; ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.81 (s, 1H), 7.40 (bs, 1H), 6.49 (bs, 1H), 5.79 (d, 1H, J=2.4Hz), 5.3-5.32 (m, 1H), 5.00-5.07 (m, 2H), 4.30-4.45 (m, 2H), 3.90-3.94 (m, 2H), 3.80-3.83 (m, 1H), 3.50-3.70 (m, 2H), 0.87 (s, 9H), 0.05 (s, 6H); MS: 388 (M+H)⁺, 410 (M+Na)⁺ (图7A-7C)。

[1152] 为了获得相应的NTP, 可以进行三磷酸酯反应 (例如, 本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地, 可以对NTP进行纯化 (例如, 使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干或蒸发 (例如, 从EtOH中)。

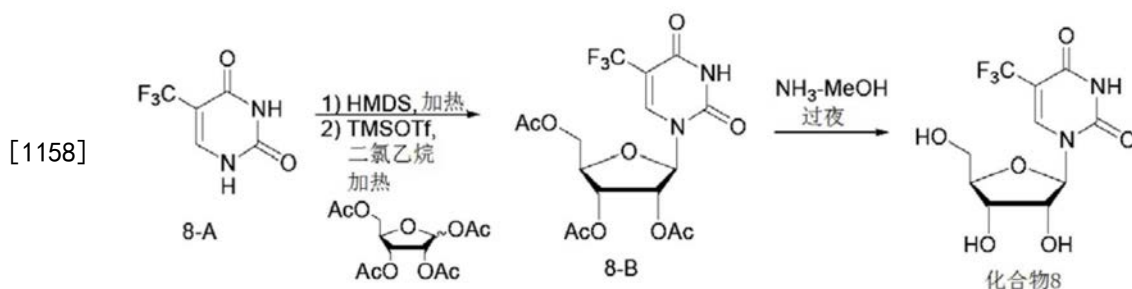
[1153] 实施例14.5-三氟甲基胞苷 (化合物7) 的合成



[1155] 糖基化化合物7-A, 得到化合物7-B, 将其用2,4,6-三异丙基苯磺酰氯 (TPSCl) 处理, 以活化羰基并促进还原性氨基化。脱保护得到化合物7。可以使用可选的活化剂代替TPSCl, 如2,4,6-三甲基苯磺酰氯。

[1156] 为了获得相应的NTP, 可以进行三磷酸酯反应 (例如, 本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地, 可以对NTP进行纯化 (例如, 使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干或蒸发 (例如, 从EtOH中)。

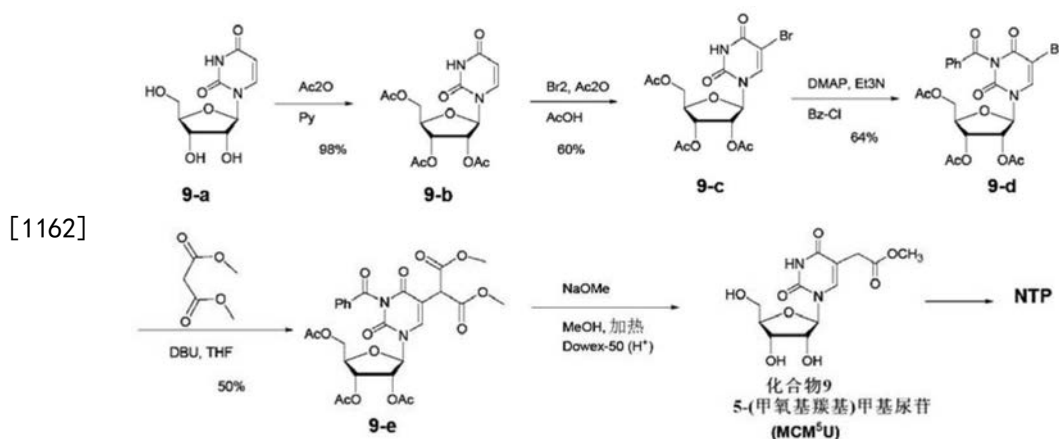
[1157] 实施例15.5-三氟甲基尿苷 (化合物8) 的合成



[1159] 用四-O-乙酰基核糖糖基化5-三氟甲基尿嘧啶8-A, 获得良好产率的所期望的三保护的5-三氟甲基尿苷8-B。进一步脱保护, 得到所期望的化合物8, 将其用NMR、MS和HPLC结果表征。MS: 313 (M+H)⁺, 335 (M+Na)⁺; HPLC: 纯度, 98.87%, (图8A-8C)。

[1160] 为了获得相应的NTP, 可以进行三磷酸酯反应(例如, 本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地, 可以将NTP纯化(例如, 使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如, 从EtOH中)。

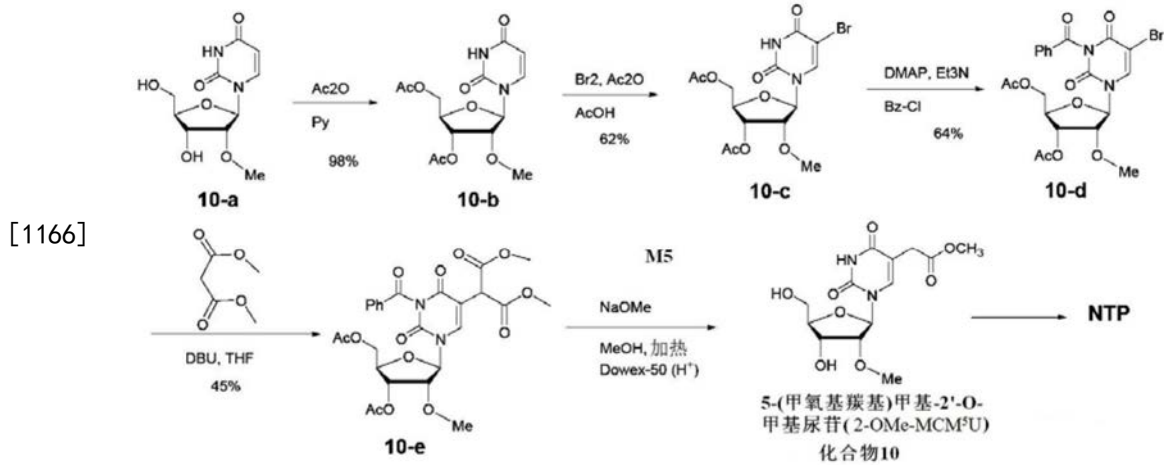
[1161] 实施例16.5-(甲氧基羰基)甲基尿苷(化合物9)的合成



[1163] 保护尿苷9-a以得到化合物9-b (98%收率)。在乙酸酐和乙酸的存在下, 用过量的溴溴化该化合物。获得5-溴代类似物9-c (60%收率) 并进一步苯甲酰化, 以获得所期望的化合物9-d (64%收率)。5-溴代化合物9-d在碱性条件下与丙二酸二甲酯进行缩合, 以得到芳基化的丙二酸酯和完全保护的二酯9-e (50%收率)。脱羧和脱保护之后, 获得化合物9, 通过NMR进行确认(图9)。

[1164] 为了获得相应的NTP, 可以进行三磷酸酯反应(例如, 本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地, 可以对NTP进行纯化(例如, 使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如, 从EtOH中)。

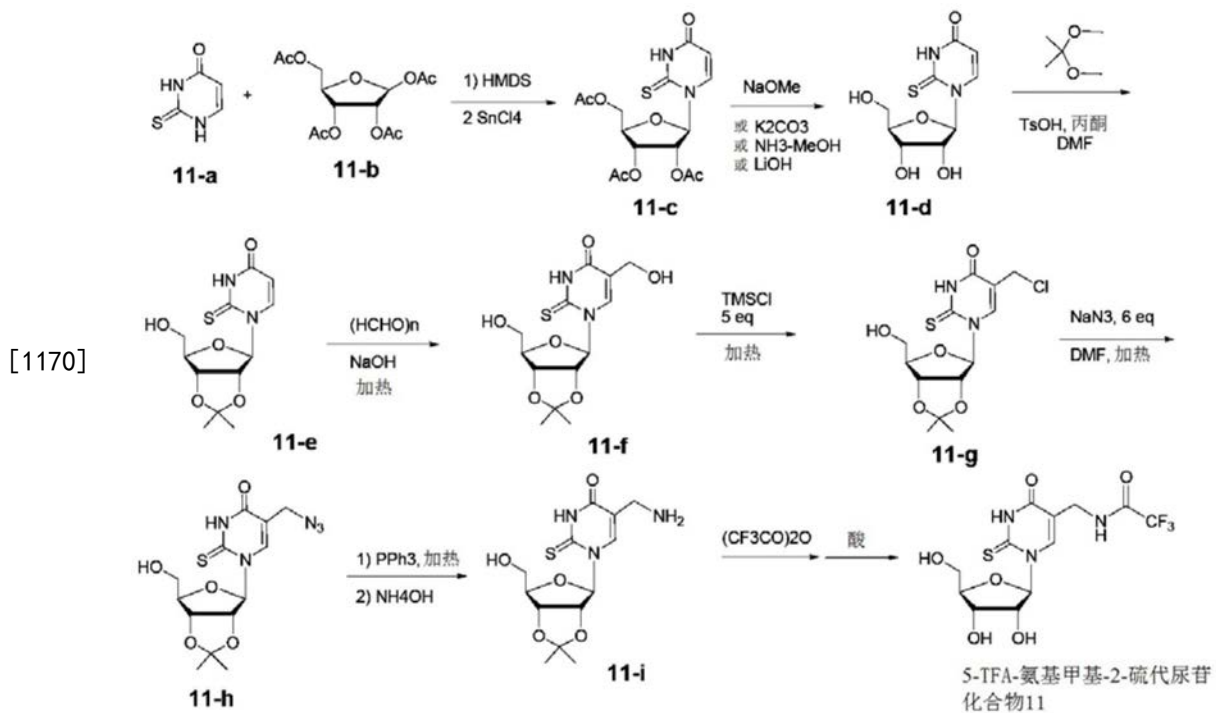
[1165] 实施例17.5-(甲氧基羰基)甲基-2'-O-甲基尿苷(2-OMe-MCM5U)(化合物10)的合成



[1167] 采用与上面化合物9的合成相似的策略,将2'-O-甲基尿苷10-a乙酰化和溴化,以得到化合物10-c。进一步苯甲酰化获得5-溴代类似物10-d,使其与丙二酸二甲酯缩合,得到所期望的产物10-e(45%收率)。脱羧和脱保护得到化合物10。

[1168] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干或蒸发(例如,从EtOH中)。

[1169] 实施例18.5-三氟乙酰基-氨基甲基-2-硫代尿苷(化合物11)的合成

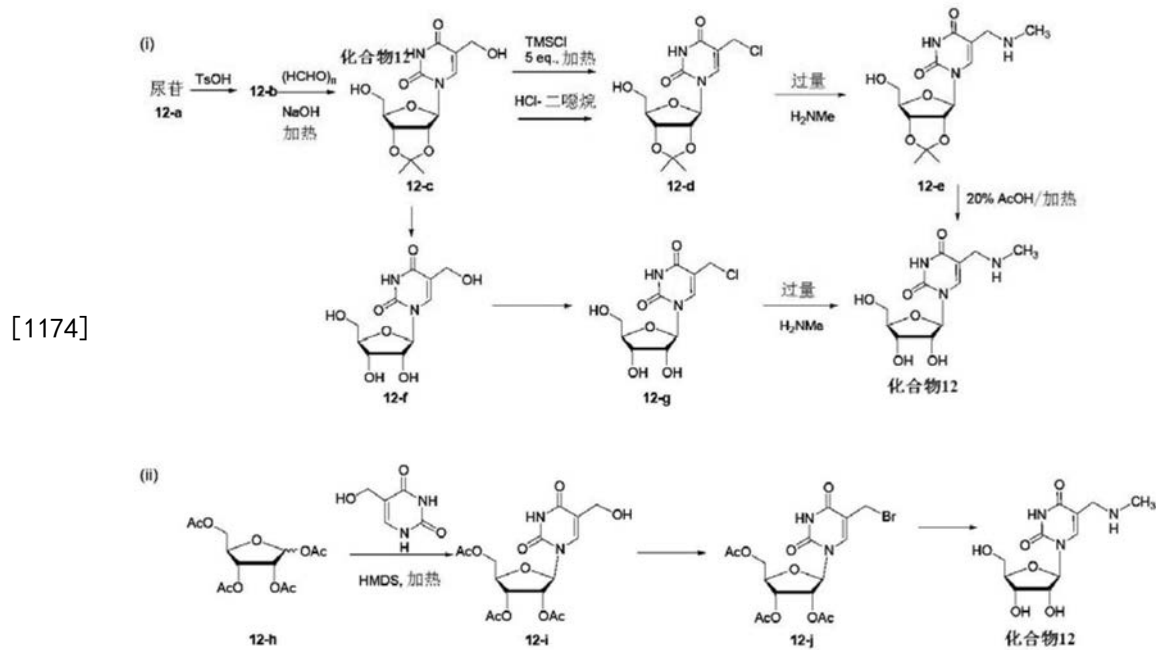


[1171] 糖基化2-硫代尿嘧啶11-a获得化合物11-c,其可以用任何可用的脱保护试剂进行脱保护,具体地说,LiOH提供所期望的产物11-d(80-90%收率)。亚异丙基保护获得化合物11-e(90%收率)。进一步5-羟基甲基化获得化合物11-f。进行氯化、叠氮化并进一步还原,获得甲胺化合物11-i,将其乙酰化,以获得化合物11。

[1172] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,

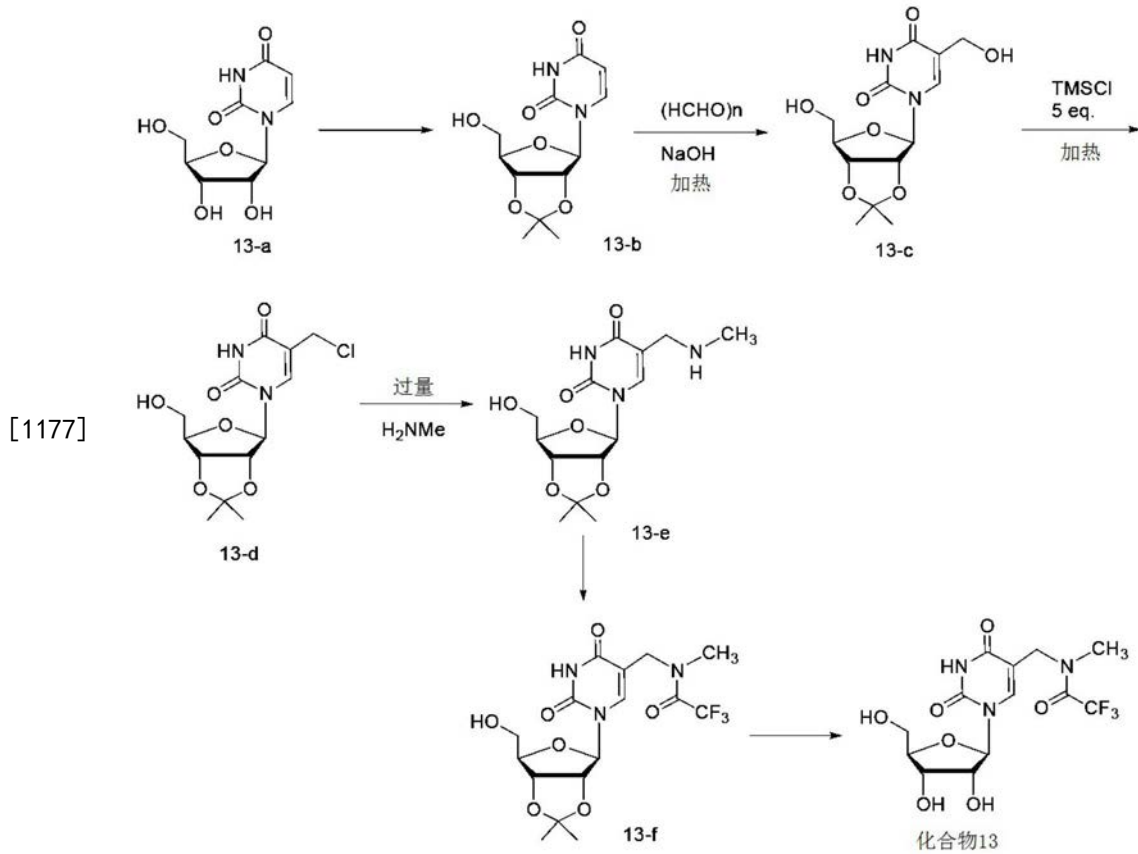
从EtOH中)。

[1173] 实施例19.5-甲基氨基甲基-2-尿苷(化合物12)的合成



[1175] 化合物12可以通过任何可用的方法来获得(例如,参见上面的图式(i)和(ii))。例如,可以对受保护的尿嘧啶进行糖基化并随后进行氨基化,以得到化合物12。可根据需要,进行其它保护、脱保护和活化步骤。为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

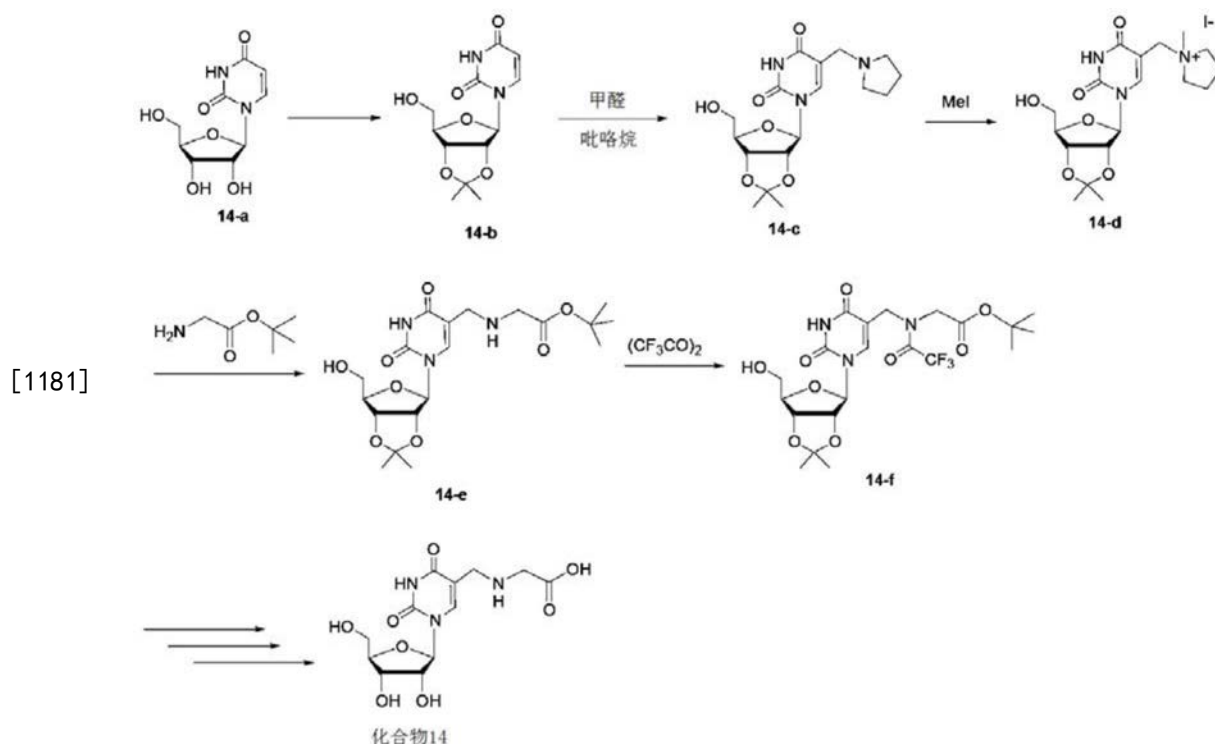
[1176] 实施例20.5-TFA-甲基氨基甲基-2-尿苷(化合物13)的合成



[1178] 用亚异丙基保护尿苷13-a,以获得化合物13-b,然后5-羟甲基化,以获得化合物13-c。氯化并随后进行氨基化,获得化合物13-e,可以对其进行保护,以获得13-f。随后脱保护得到化合物13。

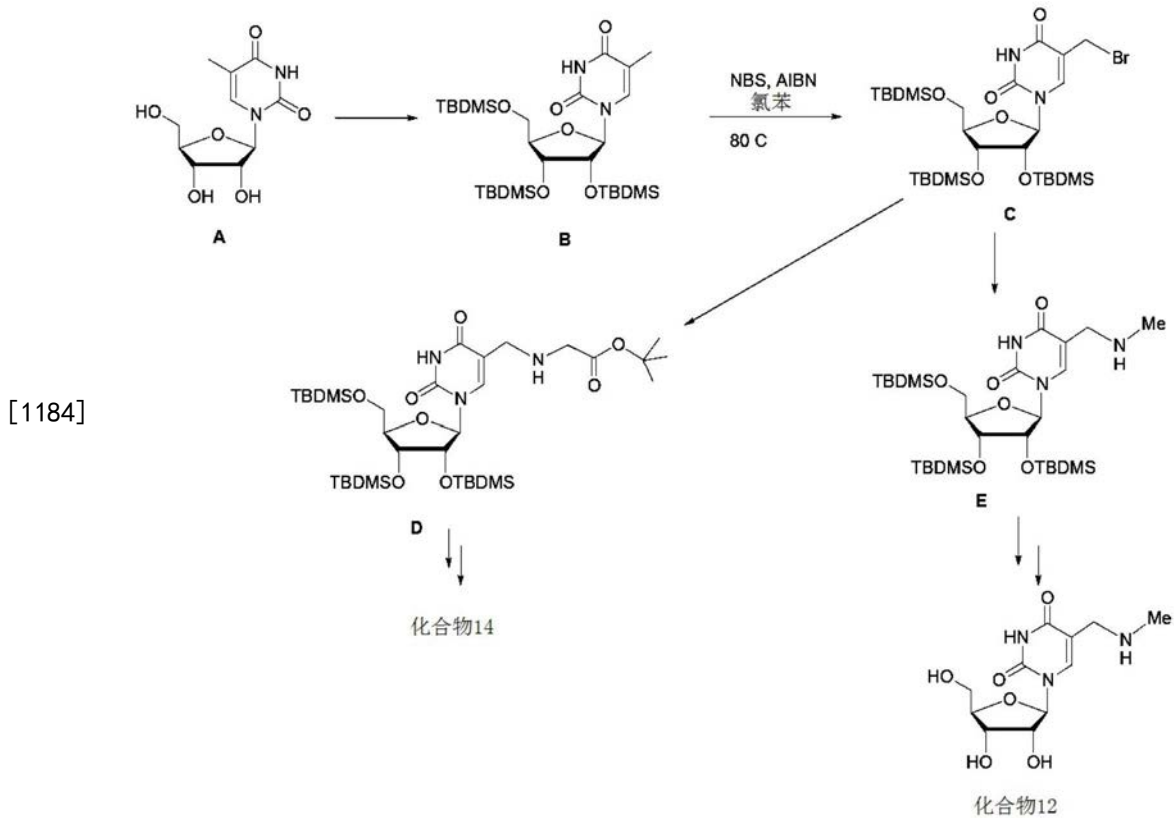
[1179] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

[1180] 实施例21.5-羧基甲基氨基甲基尿苷(化合物14)的合成



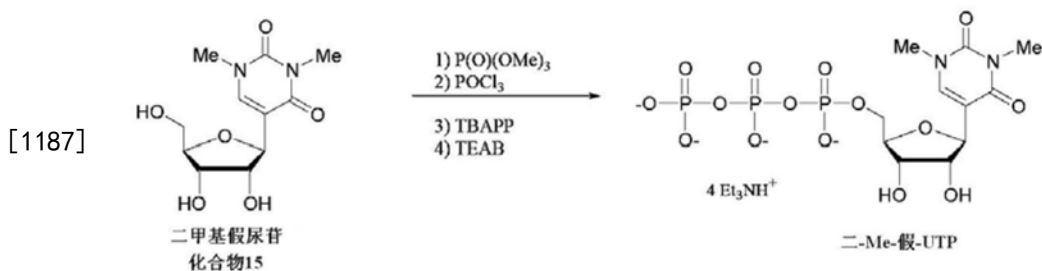
[1182] 用亚异丙基保护尿苷14-a,以获得化合物14-b,然后用曼尼西反应(Mannich reaction)进行5-氨基烷基化,以得到化合物14-c。甲基化获得季胺14-d。随后可使用氨基化和脱保护步骤来获得化合物14。为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

[1183] 实施例22.5-甲基氨基甲基-2-尿苷(化合物12)和5-羧基甲基氨基甲基-2-尿苷(化合物14)的可选合成



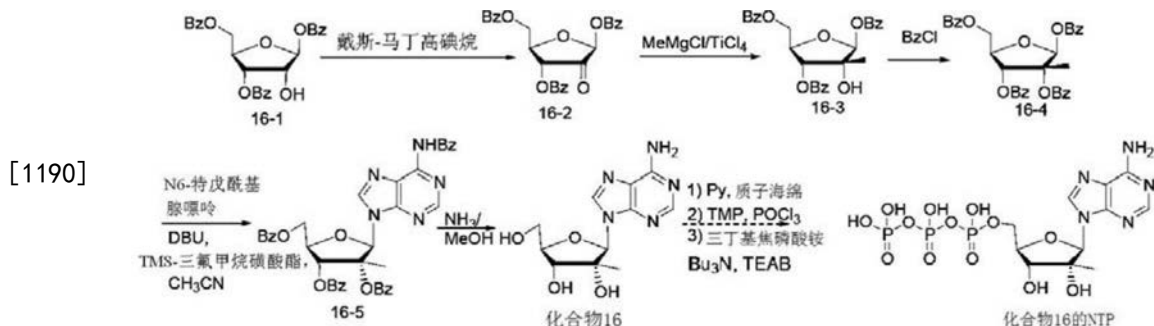
[1185] 除了上面对化合物12和14提供的那些策略外,也可以实施下列策略。可甲硅烷基化5-甲基尿昔A,以获得化合物B。自由基单溴化(radical monobromination)后,获得的中间体溴化物C可以用于制备化合物12和化合物14的类似物。随后将溴化物化合物C进行烷基氨基化,可获得化合物D和E,可对其进行脱保护,以分别获得化合物14和12。为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行被纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

[1186] 实施例23.二甲基-假尿昔(化合物15)和二甲基-假-UTP(所述化合物的NTP)的合成



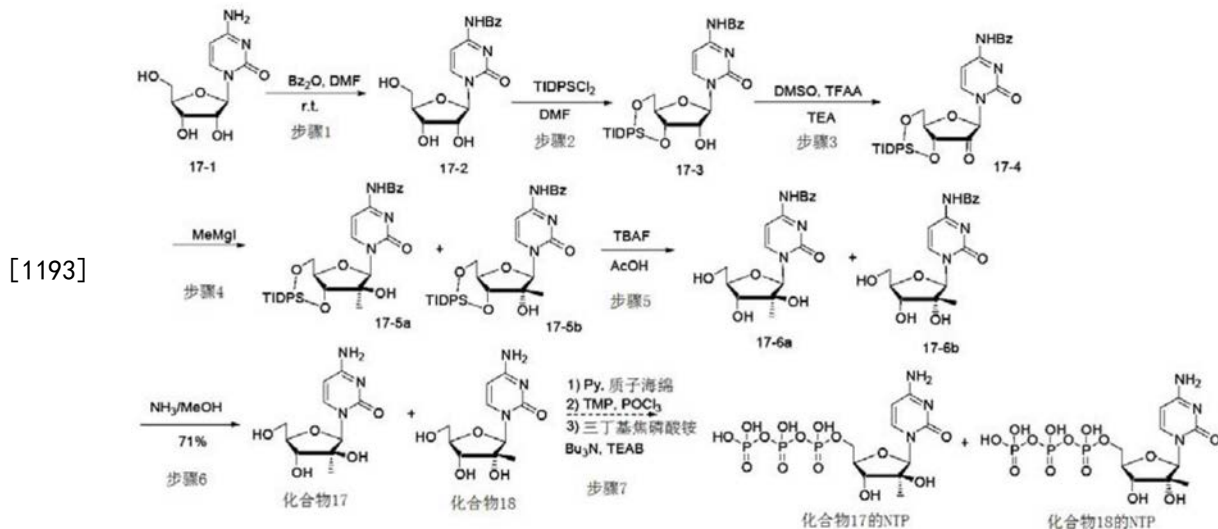
[1188] 可以通过任何可用的方法对核苷进行磷酸化。例如,如上所示,核苷可以与磷酰氯反应,并随后用单磷酸酯中间体和双(三丁基铵)焦磷酸盐(TBAPP)处理,得到三磷酸盐。

[1189] 实施例24.2'-C-甲基腺苷(化合物16)和2'-C-甲基ATP(所述化合物的NTP)的合成



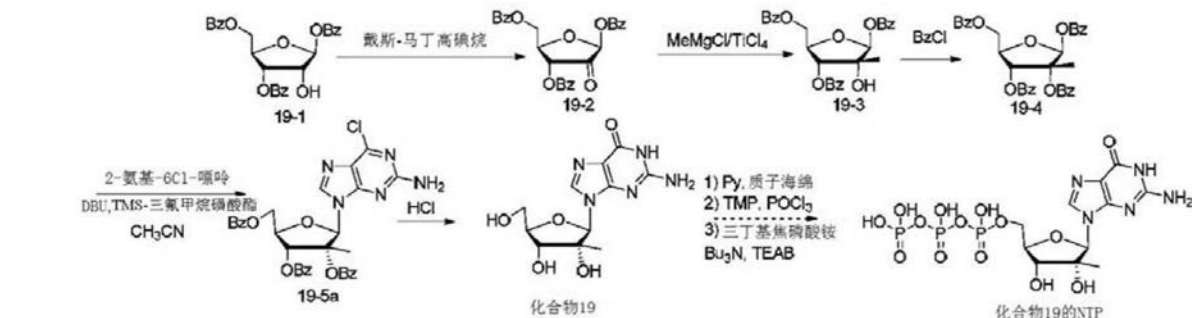
[1191] 由5g的化合物16-1中通过戴斯-马丁高碘烷(Dess-Martin periodane)反应制备约5g的化合物16-2。化合物16-2与MeMgI/TiCl4/-78℃反应,以获得化合物16-3,将粗化合物16-3(6g)直接与苄基氯反应,以制备化合物16-4。与核碱基反应并脱保护,得到化合物16(0.56g)。

[1192] 实施例25.2'-C-甲基-胞苷异构体(化合物17和化合物18)和2'-C-甲基UTP(所述化合物的NTP)的合成



[1194] 由20g的化合物17-1制备了约17.4g的化合物17-3。然后,进行2'-氧化和用MeMgI进行烷基化,获得300mg的化合物17-5a和80mg的化合物17-5b。由17.4g的化合物17-3分两批制备了约9g的化合物17-5a(约90%纯)和2.1g的化合物17-5b(纯)。进行N-和O-脱保护,获得化合物17和18。

[1195] 实施例26.2'-C-甲基鸟苷(化合物19)和2'-C-甲基GTP(所述化合物的NTP)的合成

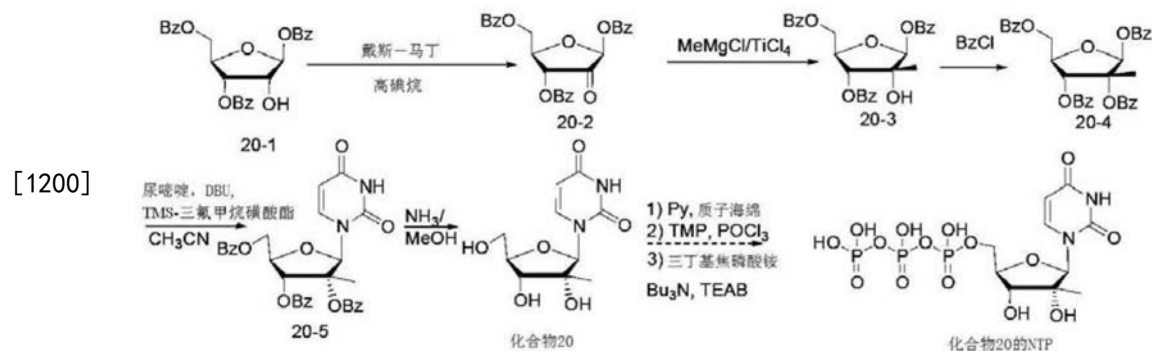


[1197] 2'-氧化受保护的核糖19-1并随后用MeMgCl进行烷基化,获得化合物19-3。对得到

的化合物进一步进行保护,以获得化合物19-4,由3.1g的化合物19-4制备了1.56g的化合物19-5a。随后氧化并脱保护,得到化合物19(约90%纯,50mg)。

[1198] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

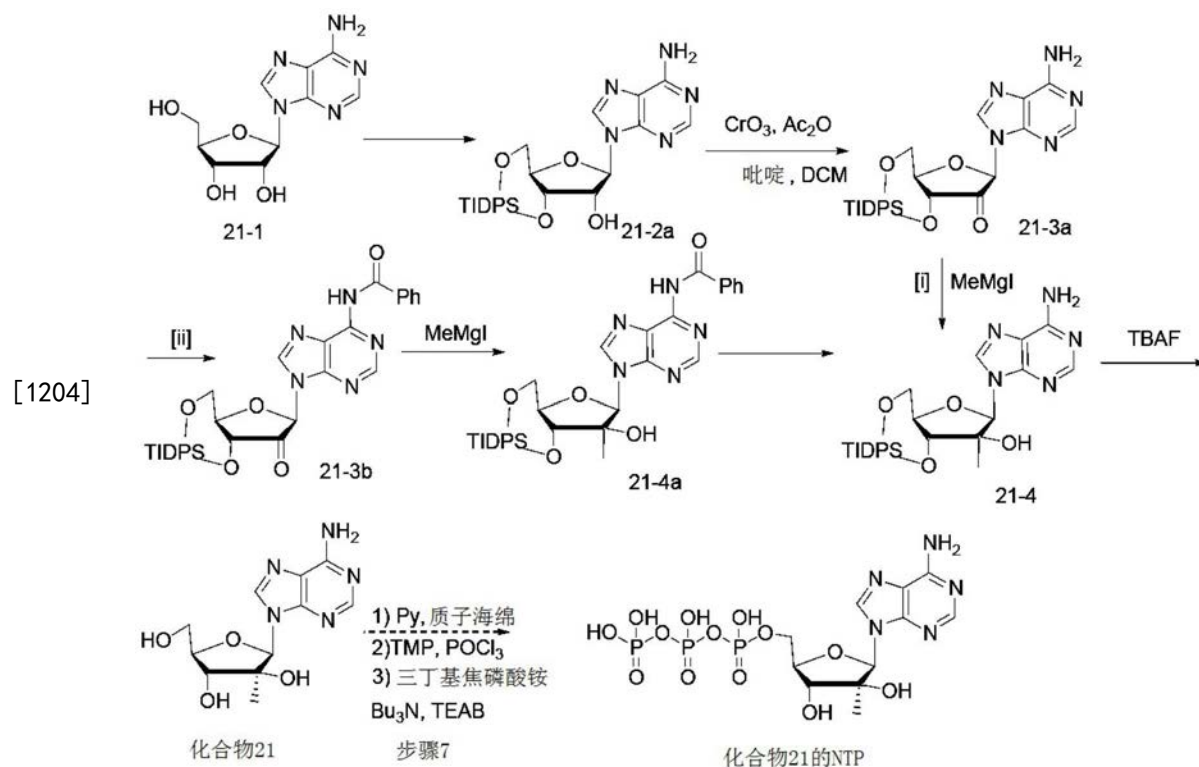
[1199] 实施例27. 2'-C-甲基尿苷(化合物20)和2'-C-甲基UTP(所述化合物的NTP)的合成



[1201] 2'-氧化受保护的核糖20-1并随后用MeMgCl进行烷基化,获得化合物20-3。进一步保护获得的化合物,以得到化合物20-4。与尿嘧啶反应并脱保护,获得纯的化合物20(50mg)。

[1202] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

[1203] 实施例28. (S)-2'-C-甲基腺苷(化合物21)和(S)-2'-C-甲基ATP(所述化合物的NTP)的合成

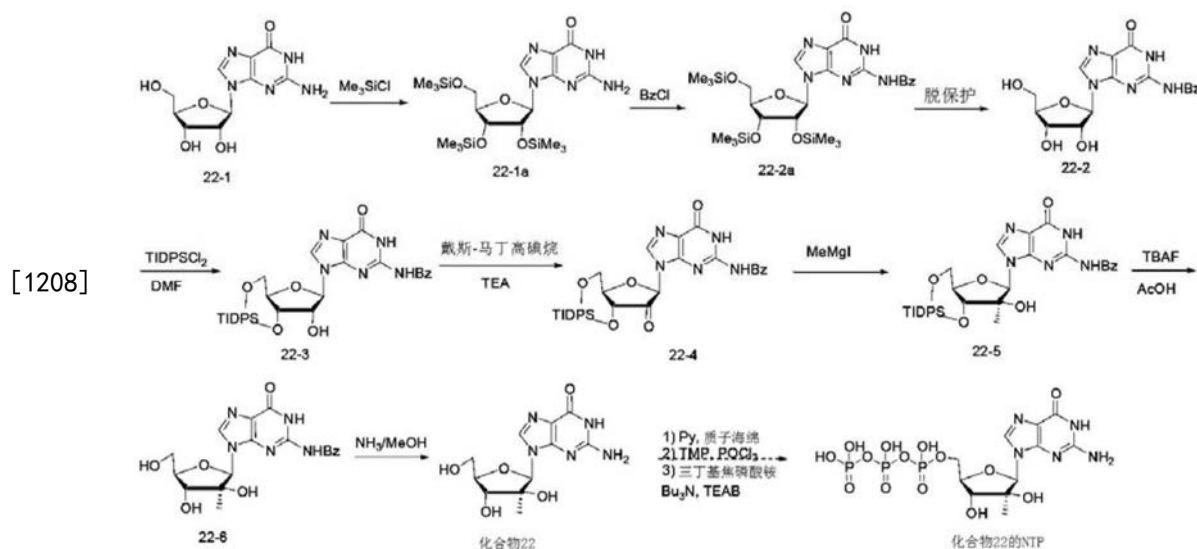


[1205] 保护化合物21-1(5g),以形成化合物21-2a,并铬氧化获得化合物21-3a。经路线

[i]进行烷基化(5当量的MeMgI在乙醚中,-50°C下),获得化合物21-4。任选地,收率可以经路线[ii]通过保护氨基基团以得到化合物21-3b,随后在2'-C位上进行烷基化以获得化合物21-4a得到提高。烷基化化合物21-3a以得到粗化合物21-4(3g,在该粗产物中有20%的化合物3a),其中,可任选地对产物进行纯化。使化合物21-4脱保护,得到化合物21(50%收率)。

[1206] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

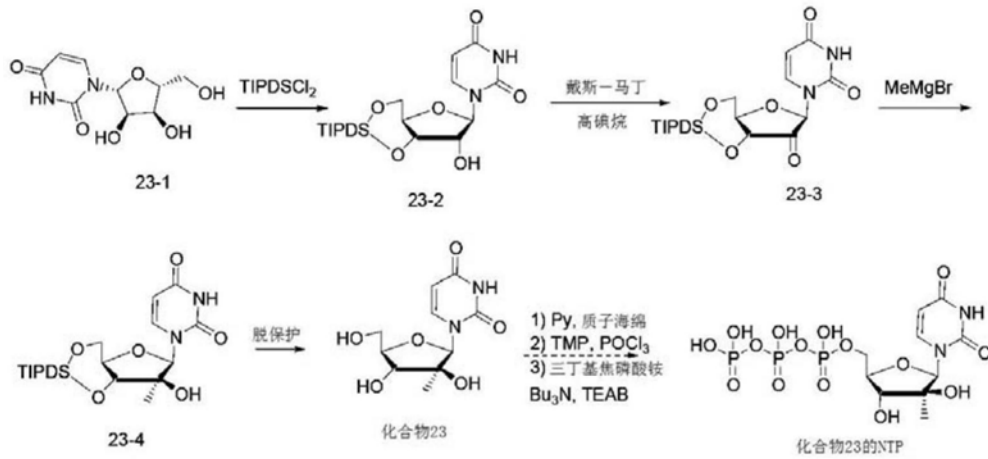
[1207] 实施例29. (S)-2'-C-甲基鸟苷(化合物22)和(S)-2'-甲基GTP(所述化合物的NTP)的合成



[1209] 经三个步骤甲硅烷基化约30g的化合物22-1,以得到化合物22-2。进一步保护,得到化合物22-3,分两批进行戴斯-马丁高碘烷氧化,得到化合物22-4(1.6g)。2'-C烷基化(5当量的MeMgI在乙醚中,-50°C至室温下)以获得化合物22-5,进一步进行脱保护步骤,获得化合物22。

[1210] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

[1211] 实施例30. (S)-2'-C-甲基尿苷(化合物23)和(S)-2'-C-甲基UTP(所述化合物的NTP)的合成

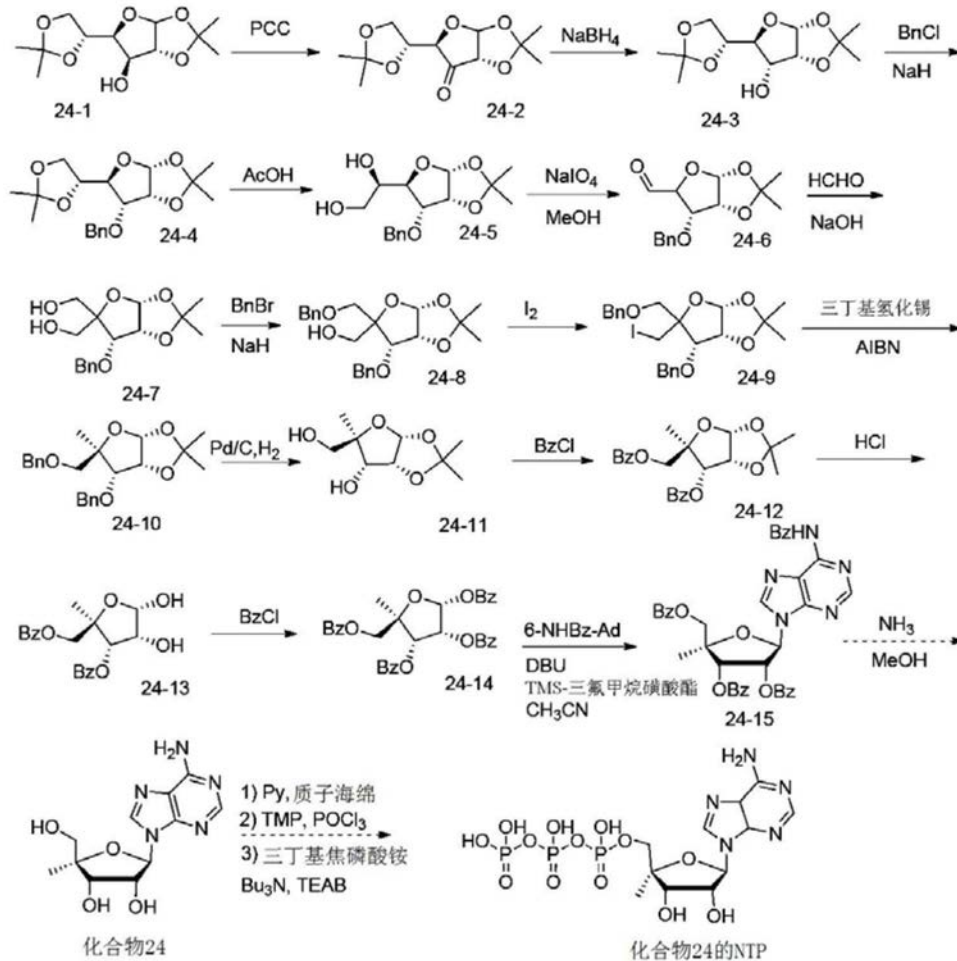


[1212]

[1213] 用TIPDSCl₂ (1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷) 保护尿苷23-1 (2.0g), 以得到化合物23-2。氧化得到化合物23-3, 并2'-C烷基化获得化合物23-4, 任选地可以在下一步骤之前用制备-HPLC对其进行纯化。然后, 脱保护, 获得所需的化合物23。

[1214] 为了获得相应的NTP, 可以进行三磷酸酯反应 (例如, 本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地, 可以对NTP进行纯化 (例如, 使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发 (例如, 从EtOH中)。

[1215] 实施例31.4'-C-甲基腺苷 (化合物24) 和4'-C-甲基ATP (所述化合物的NTP) 的合成



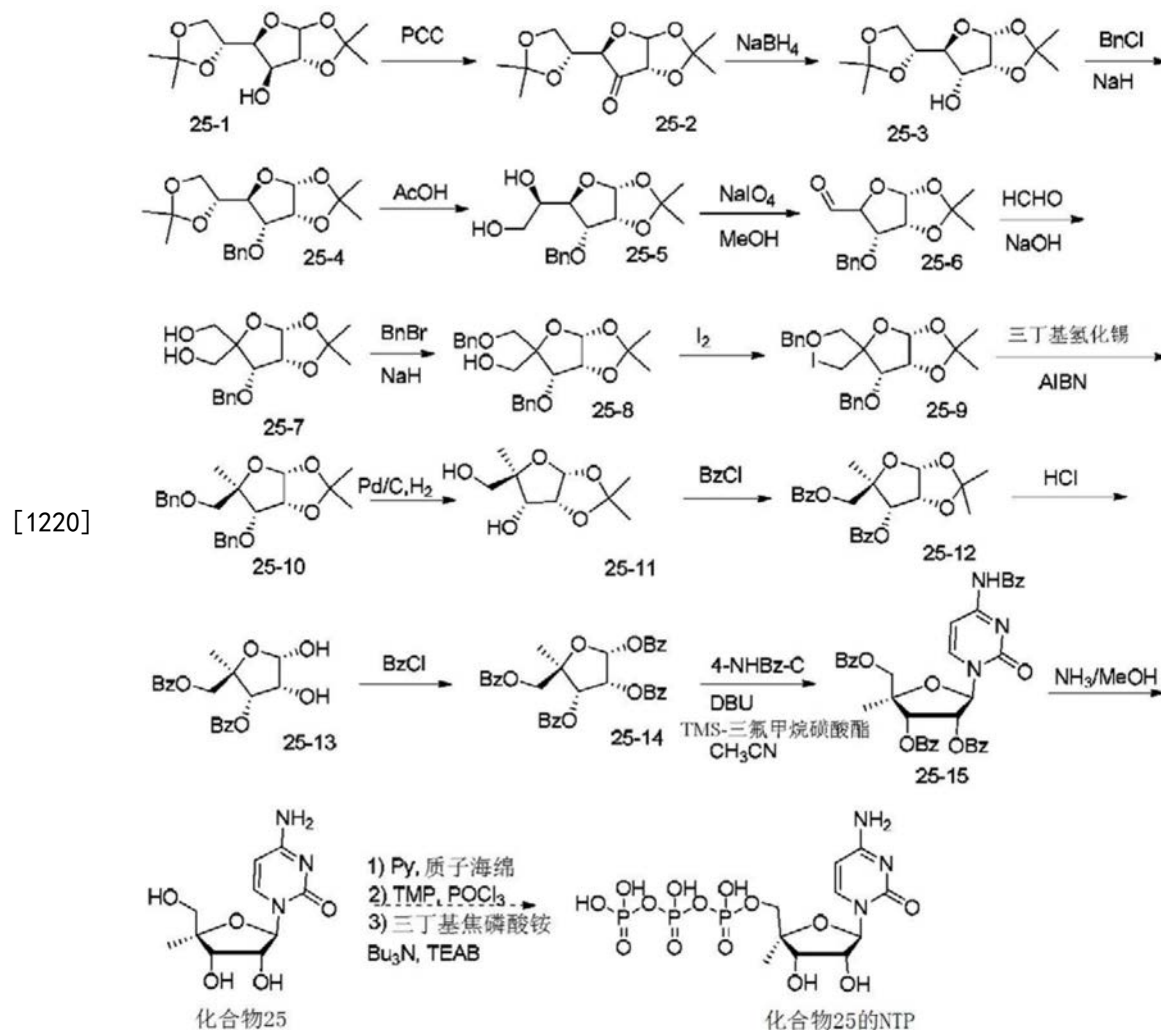
[1216]

[1217] 1,2:5,6-二-O-亚异丙基- α -D-呋喃葡萄糖24-1依次经氧化、还原和保护步骤进行

转化,以获得化合物24-4。可以使用任何可用的试剂,例如0.75当量的重铬酸吡啶鎓(PDC)与1当量的Ac₂O或1.2当量的戴斯-马丁高碘烷来实现获得化合物24-2的第一氧化步骤。随后脱保护、甲酰化和还原获得化合物24-7,随后进行保护和脱氧步骤,以获得化合物24-10。由1g的化合物24-10依次经保护和脱保护步骤制备了约0.4g的化合物24-14。加入N6-苯甲酰基腺嘌呤,随后脱保护,得到化合物24。

[1218] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

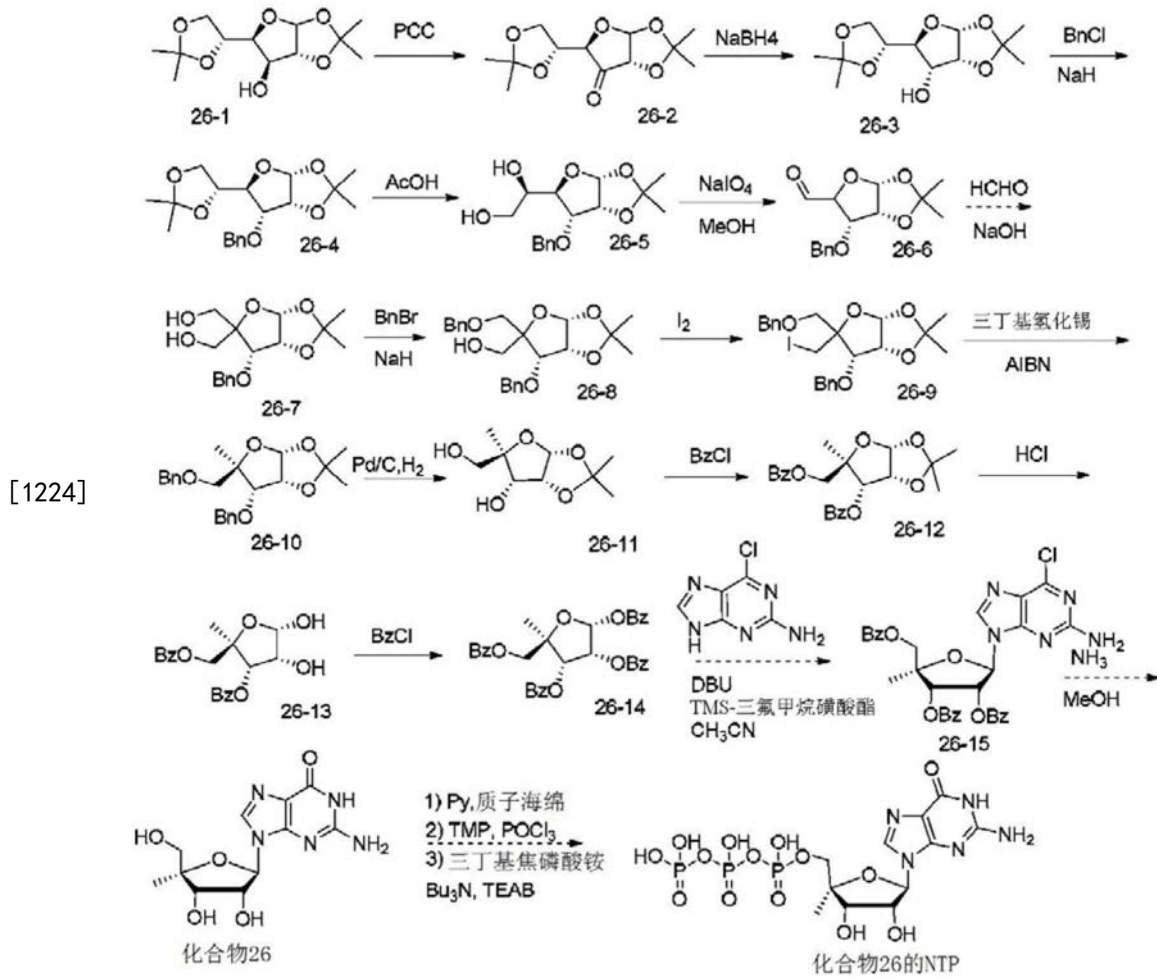
[1219] 实施例32.4'-C-甲基胞苷(化合物25)和4'-C-甲基CTP(所述化合物的NTP)的合成



[1221] 类似于上面对化合物24所提供的策略,用化合物25-1生产化合物25-14。加入胞苷,随后脱保护,得到化合物25。

[1222] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

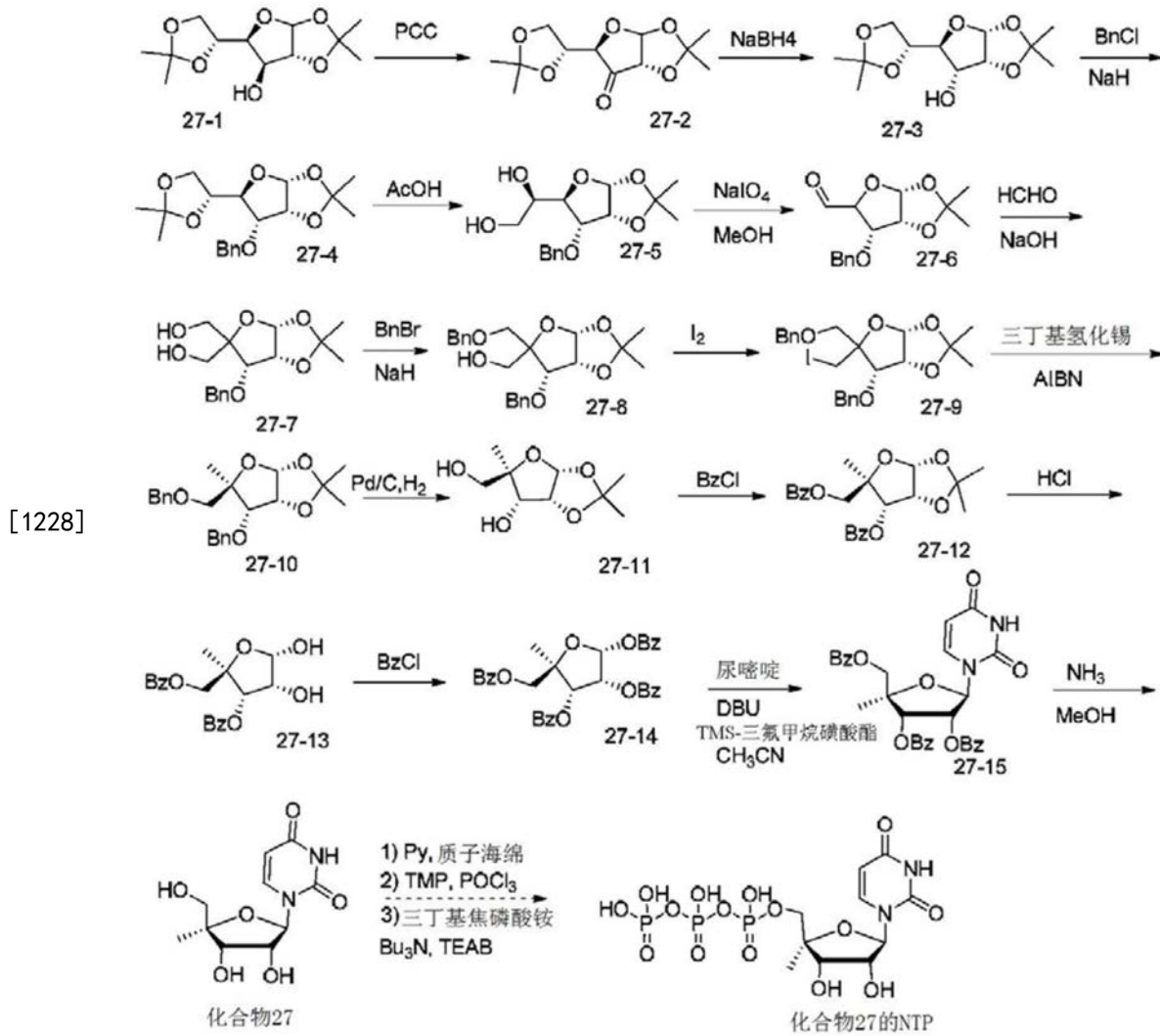
[1223] 实施例33.4'-C-甲基鸟苷(化合物26)和4'-C-甲基GTP(所述化合物的NTP)的合成



[1225] 类似于上面对化合物24所提供的策略,用化合物26-1生产化合物26-14。加入2-氨基-6-氯嘌呤,随后氧化,再脱保护,得到化合物26。

[1226] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

[1227] 实施例34.4'-C-甲基尿苷(化合物27)和4'-C-甲基UTP(所述化合物的NTP)的合成

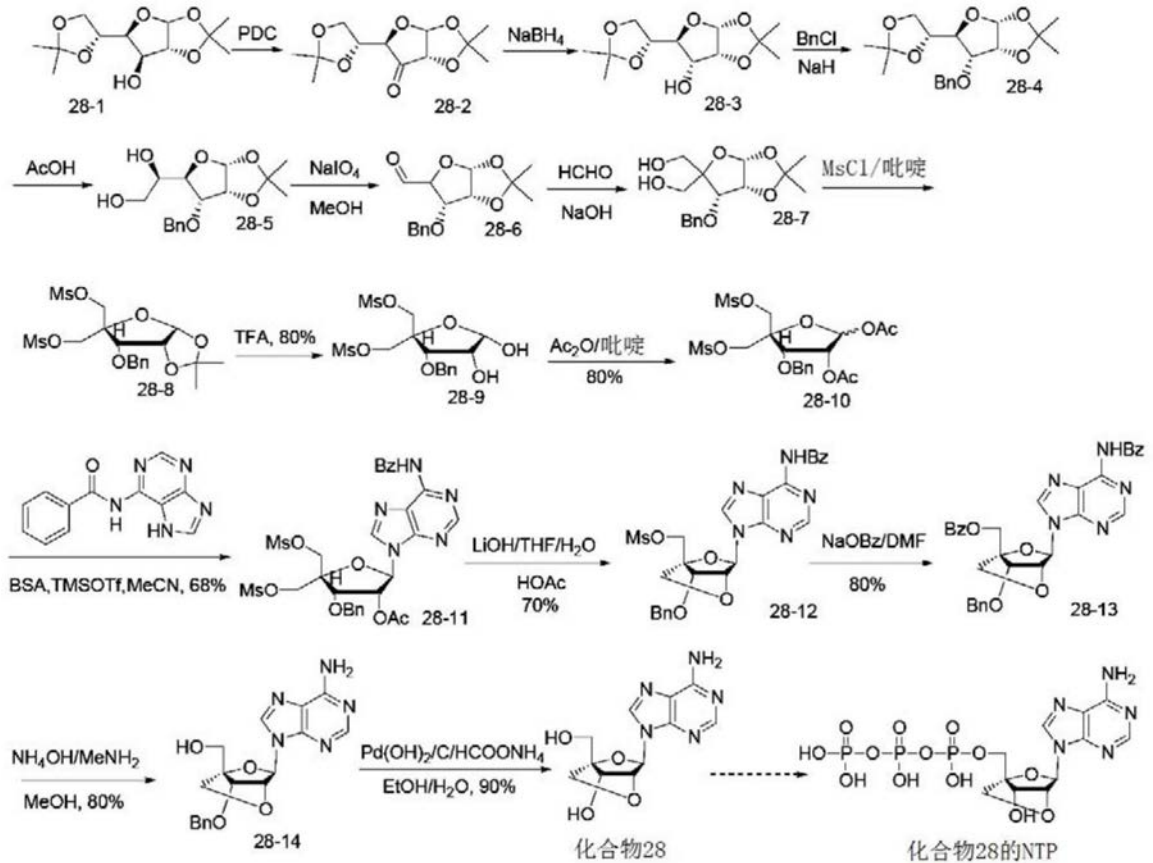


[1229] 类似于上面对化合物24所提供的策略,用化合物27-1生产化合物27-14。加入尿嘧啶,随后脱保护,得到化合物27。

[1230] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

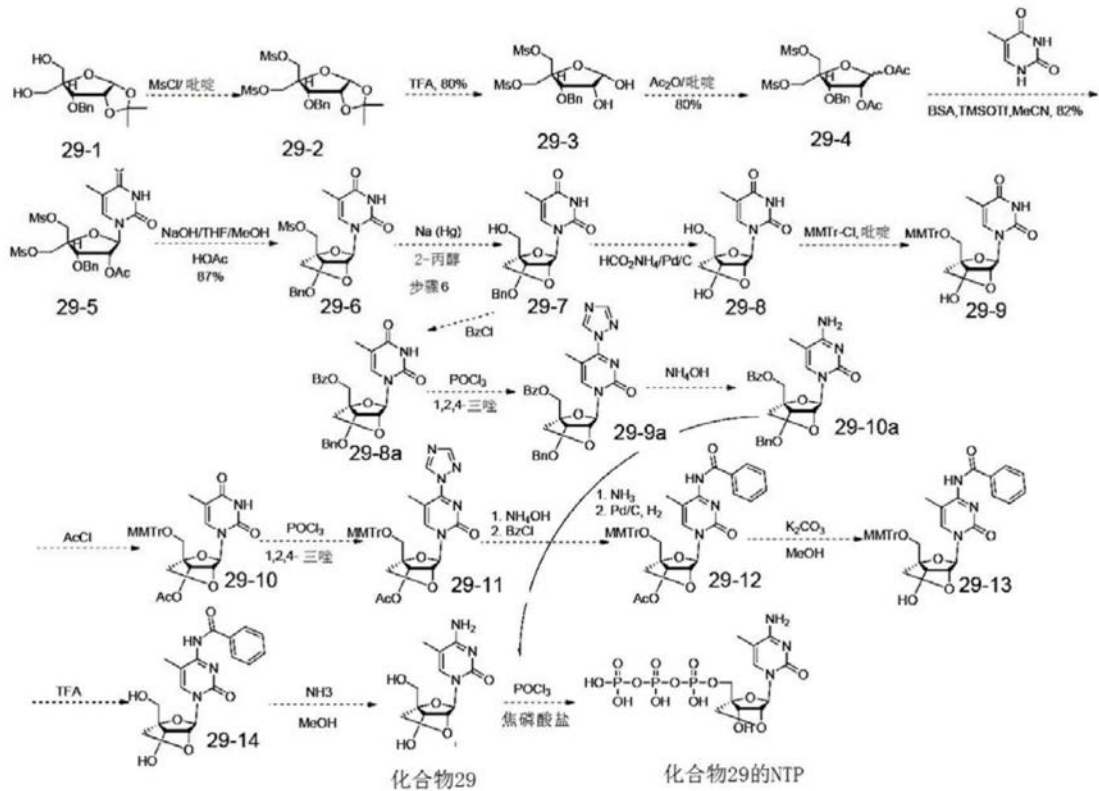
[1231] 实施例35.2'-0,4'-C-亚甲基腺苷(化合物28)和2'-0,4'-C-亚甲基ATP(所述化合物的NTP)的合成

[1232]



[1233] 类似于上面对化合物24所提供的策略,用化合物28-1生产化合物28-7。随后甲磺酰化、脱保护和乙酰化,获得化合物28-10,随后加入N6-苯甲酰基腺嘌呤,随后进行内部环合。经多个保护和脱保护步骤,获得化合物28。

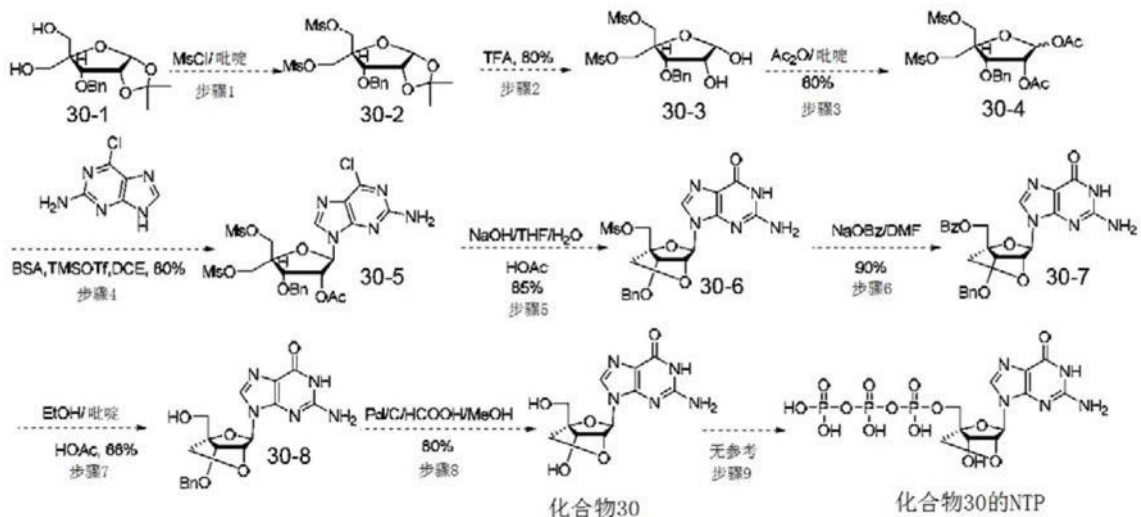
[1234] 实施例36.5-甲基-2'-0,4'-C-亚甲基胞苷(化合物29)和5-甲基-2'-0,4'-C-亚甲基CTP(所述化合物的NTP)的合成



[1236] 使呋喃醛糖化合物29-1经多个保护步骤反应,随后加入5-甲基尿嘧啶,以获得化合物29-5。随后经内部环合、脱保护、保护和氨基化步骤,得到化合物29。

[1237] 实施例37.2'-0,4'-C-亚甲基鸟苷(化合物30)和2'-0,4'-C-亚甲基GTP(所述化合物的NTP)的合成

[1238]

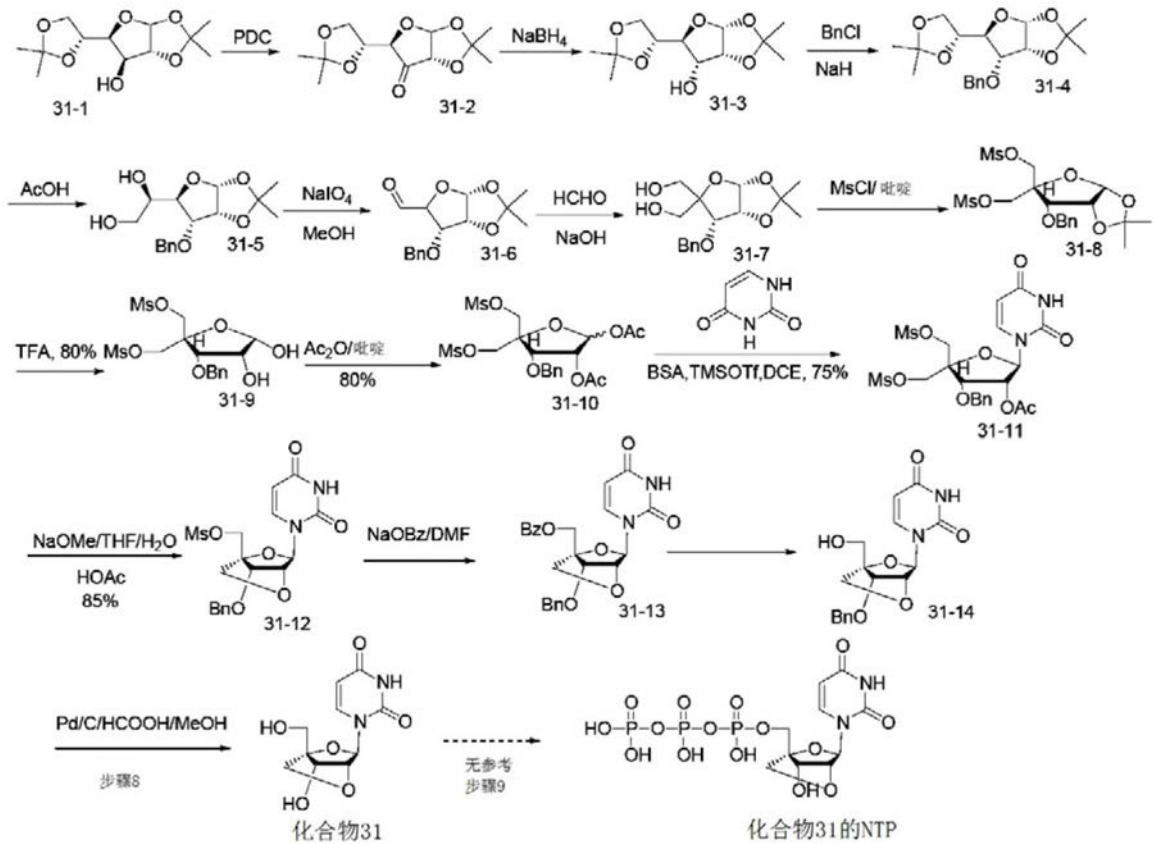


[1239] 类似于上面对化合物29所提供的策略,使呋喃醛糖化合物30-1经多个保护步骤反应,随后加入2-氨基-6-氯嘌呤,以获得化合物30-5。随后经内部环合、氨基化和脱保护步骤,得到化合物30。

[1240] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

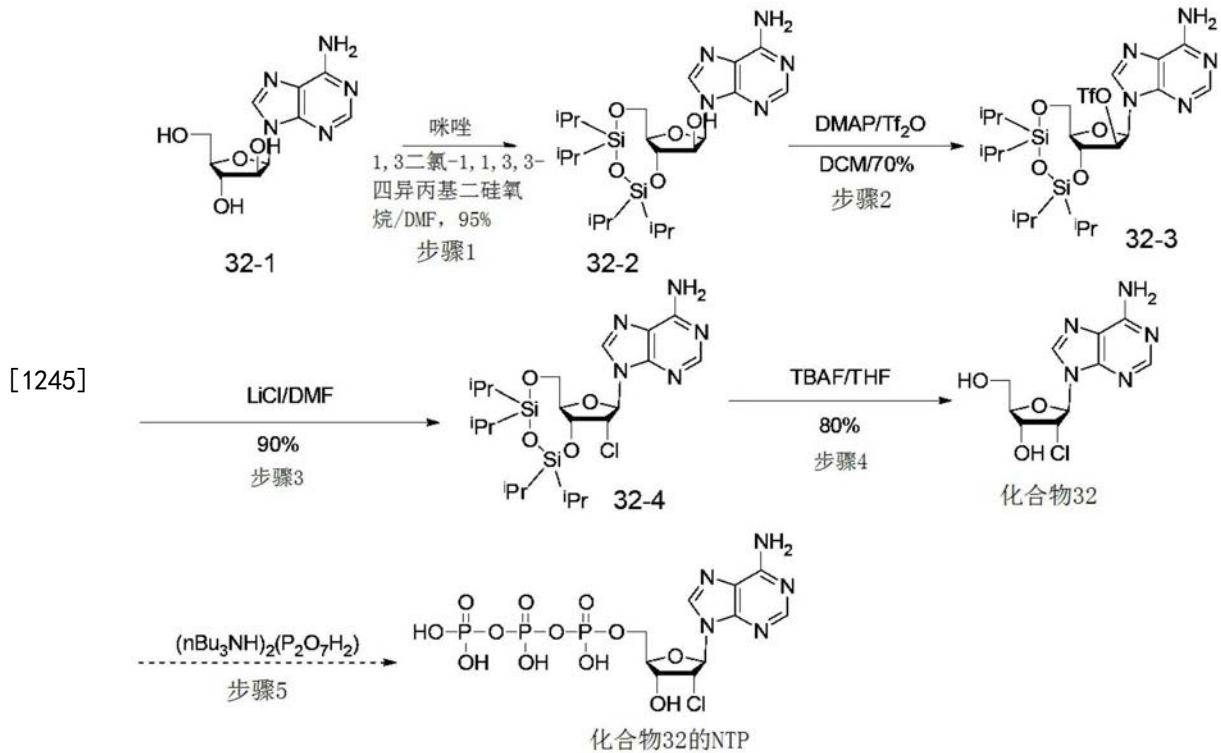
[1241] 实施例38.2'-0,4'-C-亚甲基尿昔(化合物31)和2'-0,4'-C-亚甲基UTP(所述化合物的NTP)的合成

[1242]



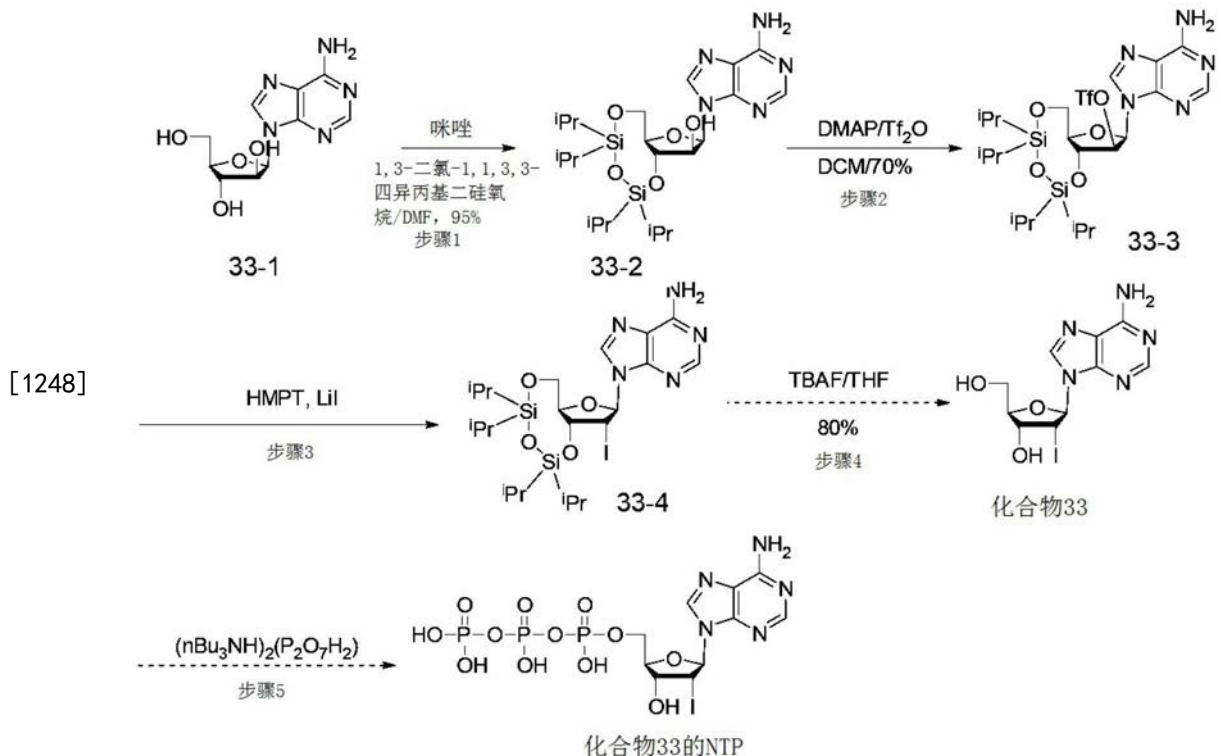
[1243] 类似于上面对化合物24所提供的策略,用化合物31-1生产化合物31-7。随后甲磺酰化、脱保护和乙酰化,得到化合物31-10。加入尿嘧啶,随后进行内部环合,获得化合物31-12,经多个保护和脱保护步骤,获得化合物31。随后进行三磷酸酯反应(例如,如本文所述的),获得化合物31的NTP,其可以任选地被纯化(例如,用HPLC)。

[1244] 实施例39.2'-氯腺苷(化合物32)和2'-氯ATP(所述化合物的NTP)的合成



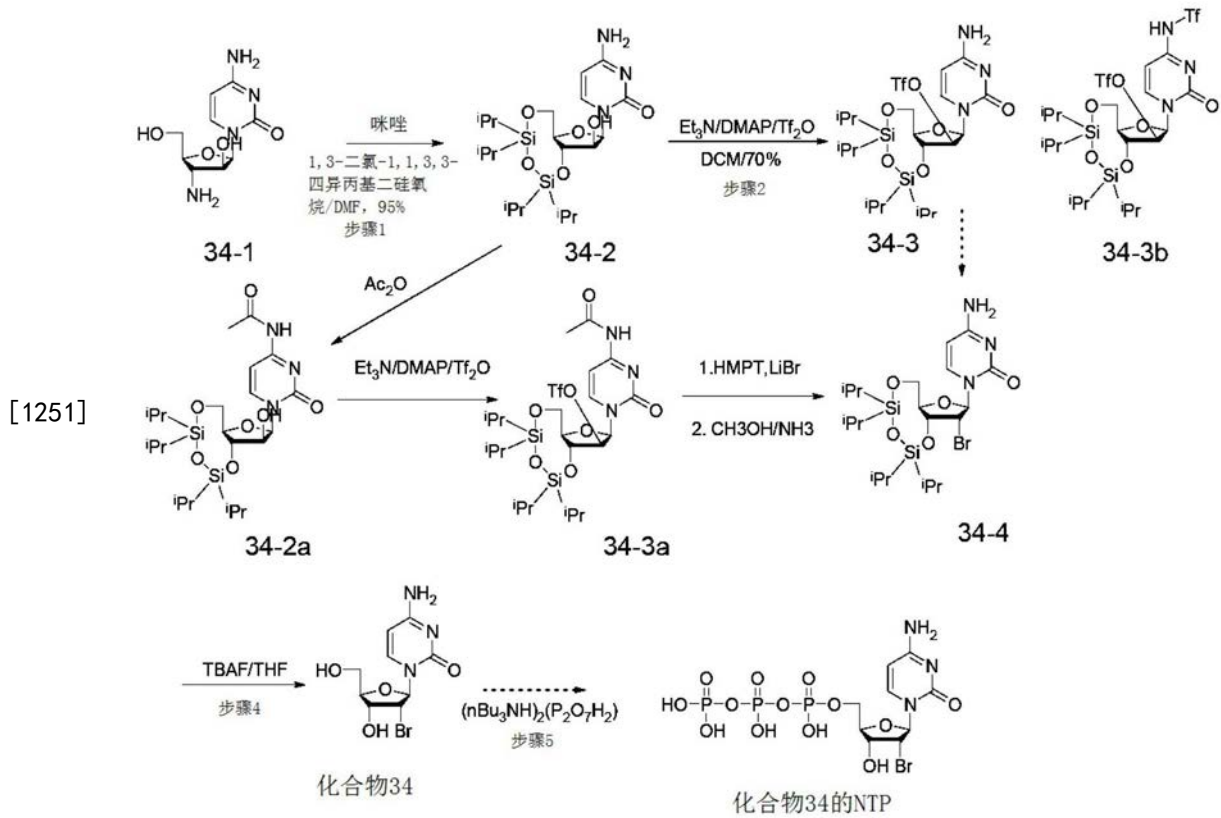
[1246] 使阿糖腺苷32-1经步骤1和2得到保护,再氯化,以得到化合物32-4。随后脱保护,得到化合物32,经三磷酸酯反应得到化合物32的NTP。

[1247] 实施例40.2'-碘代腺苷(化合物33)和2'-碘代ATP(所述化合物的NTP)的合成



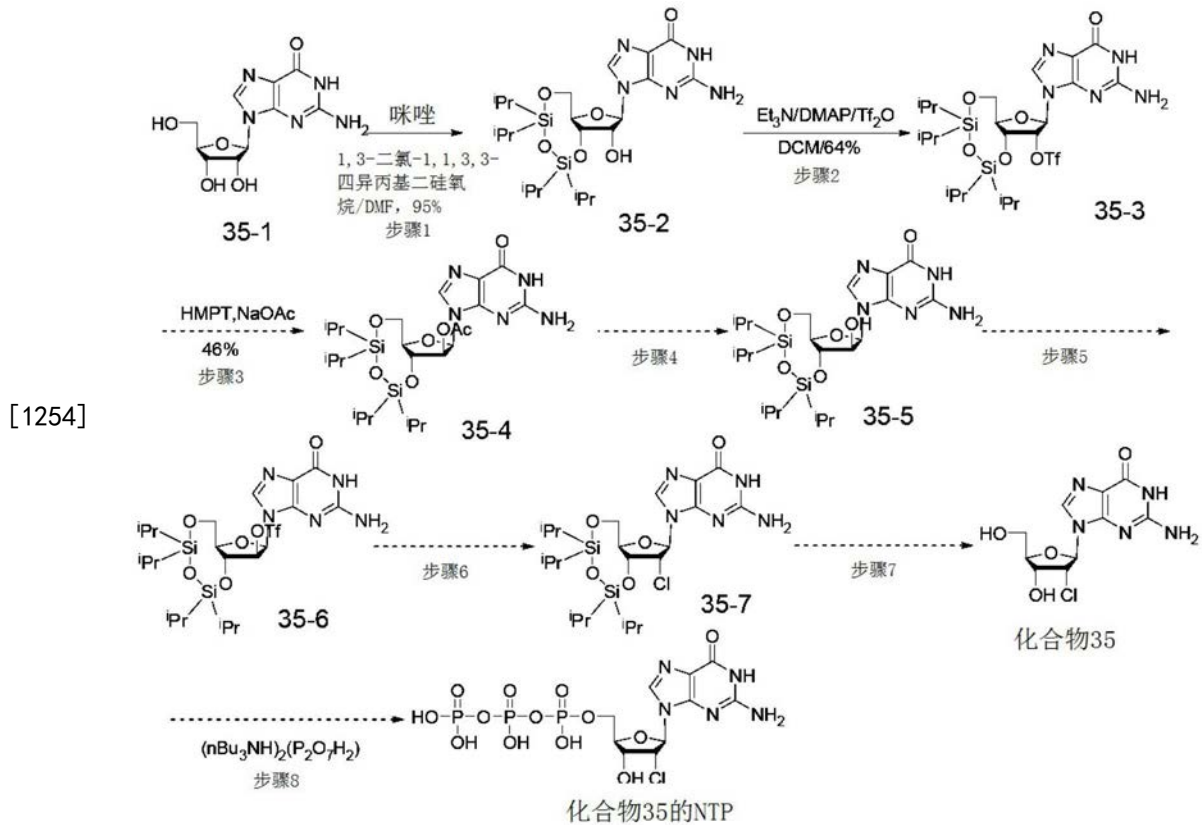
[1249] 使阿糖腺苷33-1经步骤1和2得到保护,随后碘化,以获得化合物33-4。随后脱保护获得化合物33,在DMF中进行三磷酸酯反应,获得化合物33的NTP。

[1250] 实施例41.2'-溴胞苷(化合物34)和2'-溴CTP(所述化合物的NTP)的合成



[1252] 使阿糖胞苷34-1在各种条件下得到保护,再溴化,以得到化合物34-4。任选地,化合物34-3a在任何可用的保护反应下,如(i) 1.5当量的 Et_3N , 1当量的DMAP, 1.2当量的 TfCl , 在DCM中(10mL); (ii) 3当量的DMAP, 1.2当量的 TfCl 在DCM中(15mL); 或(iii) 15当量的DMAP, 1.5当量的 Tf_2O , 在DCM中(15mL), 在 -10°C 至 0°C 下反应2小时可得到化合物34-4。具体地说, 根据反应条件(iii)得到55mg的化合物34-3a。随后脱保护获得化合物34, 并在DMF中进行三磷酸酯反应获得化合物34的NTP。粗产物34在进行磷酸化之前任选地被纯化。

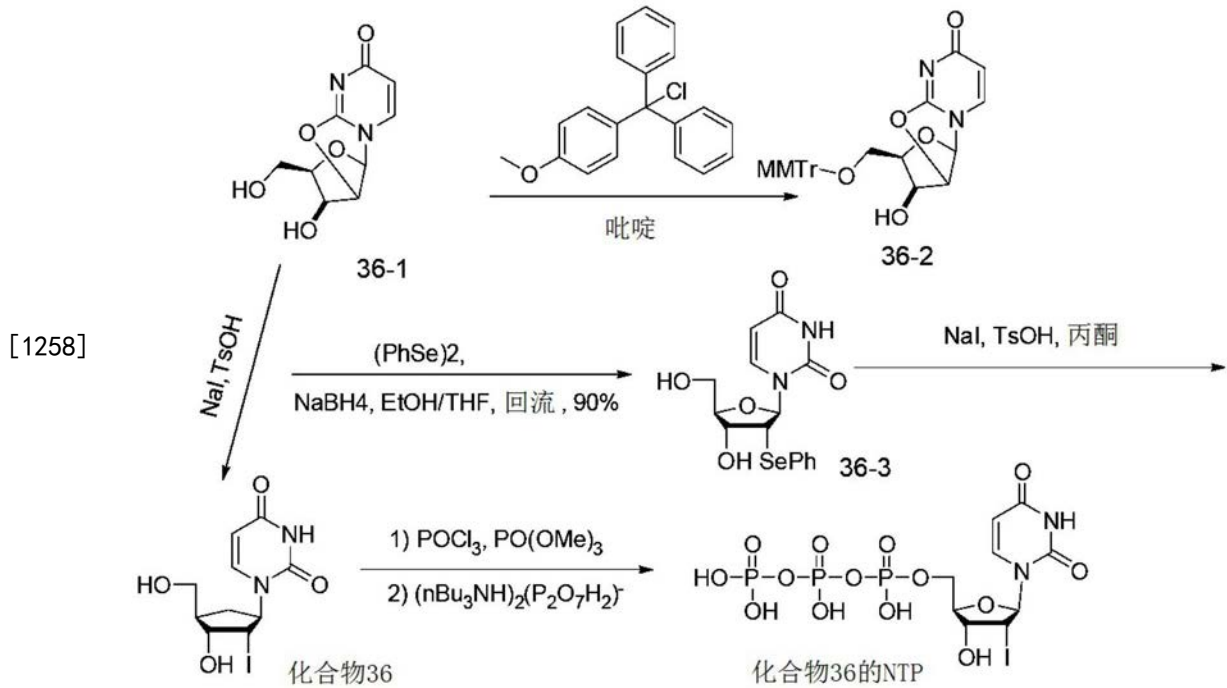
[1253] 实施例42. 2'-氯鸟苷(化合物35)和2'-氯GTP(所述化合物的NTP)的合成



[1255] 使鸟苷35-1在各种条件下得到保护,再乙酰化以得到化合物35-4。化合物35-2到化合物35-3的反应在下列条件下进行:2当量的DMAP,2当量的Et₃N,3当量的Tf₂O,在1,2-二氯乙烷中(10mL),40℃,4小时。纯化后获得约55mg的化合物35-3。

[1256] 所期望的化合物35可以通过任何可用的方法来获得。例如,如上所示,化合物35-4可以随后经保护、氯化 and 脱保护步骤处理,以获得化合物35。为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如,从EtOH中)。

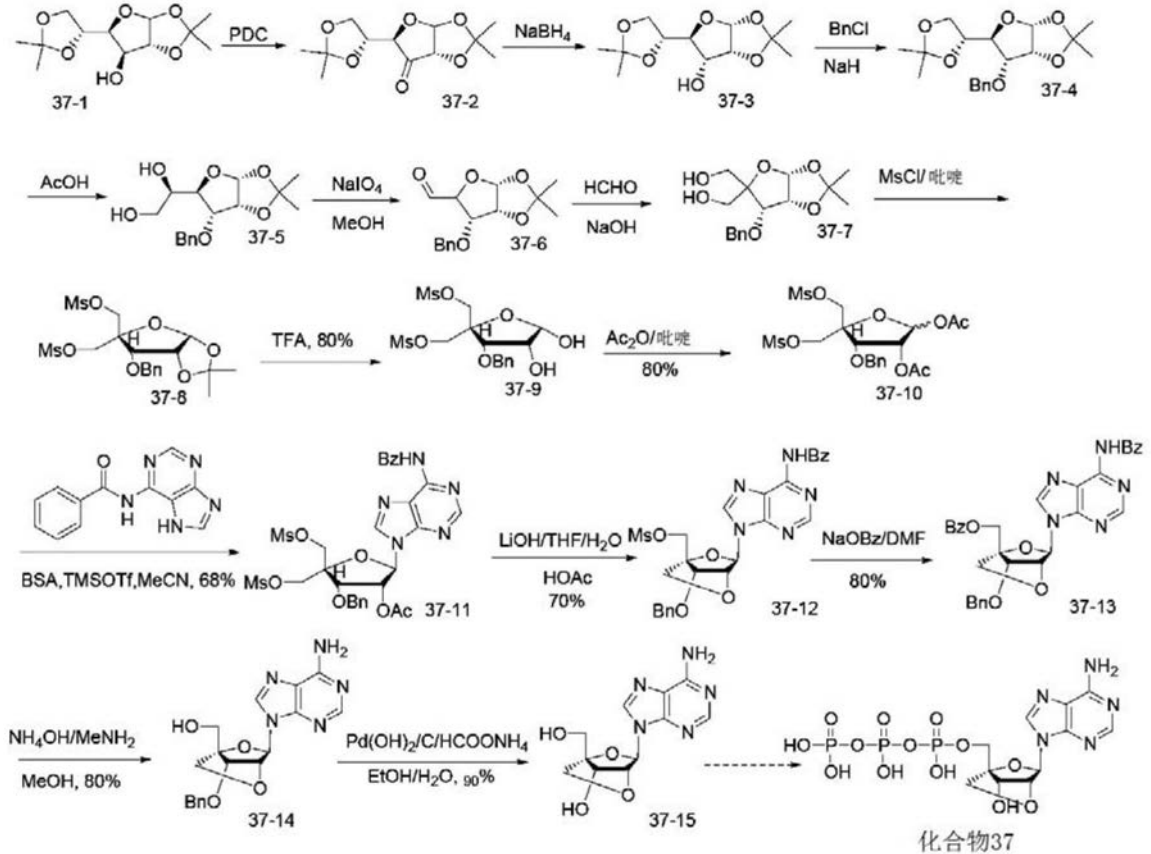
[1257] 实施例43.2'-碘尿苷(化合物36)和2'-碘UTP(所述化合物的NTP)的合成



[1259] 保护 $O^2, 2'$ -环尿昔36-1, 以获得化合物36-2。随后碘化, 任选地用硒介导, 获得化合物36。进行三磷酸酯反应, 以得到化合物36的NTP。任选地, 可以对NTP进行纯化(例如, 使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干、或蒸发(例如, 从EtOH中)。

[1260] 实施例44.2'-0,4'-C-亚甲基腺苷(化合物37)和2'-0,4'-C-亚甲基ATP(所述化合物的NTP)的合成

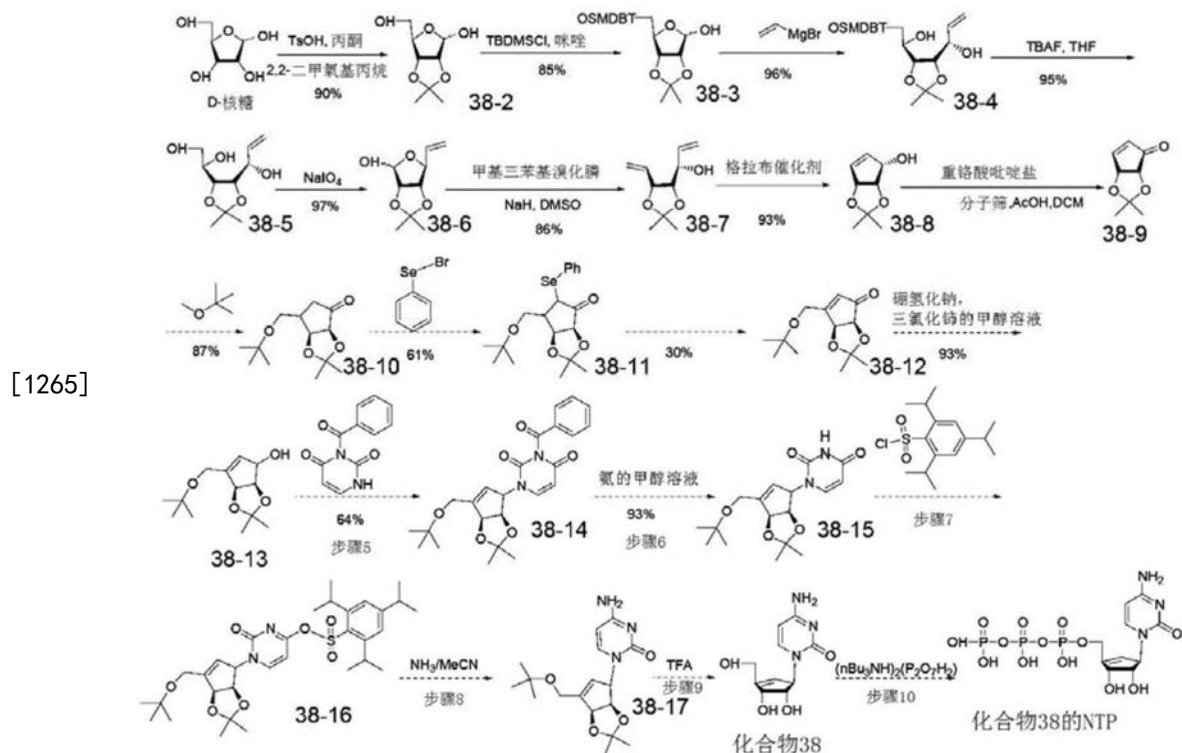
[1261]



[1262] 类似于上面对化合物24所提供的策略,用化合物37-1生产化合物37-7。随后甲磺酰化、脱保护和乙酰化得到化合物37-10。加入尿嘧啶,随后内部环合得到化合物37-12。经多个保护和脱保护步骤获得化合物37。

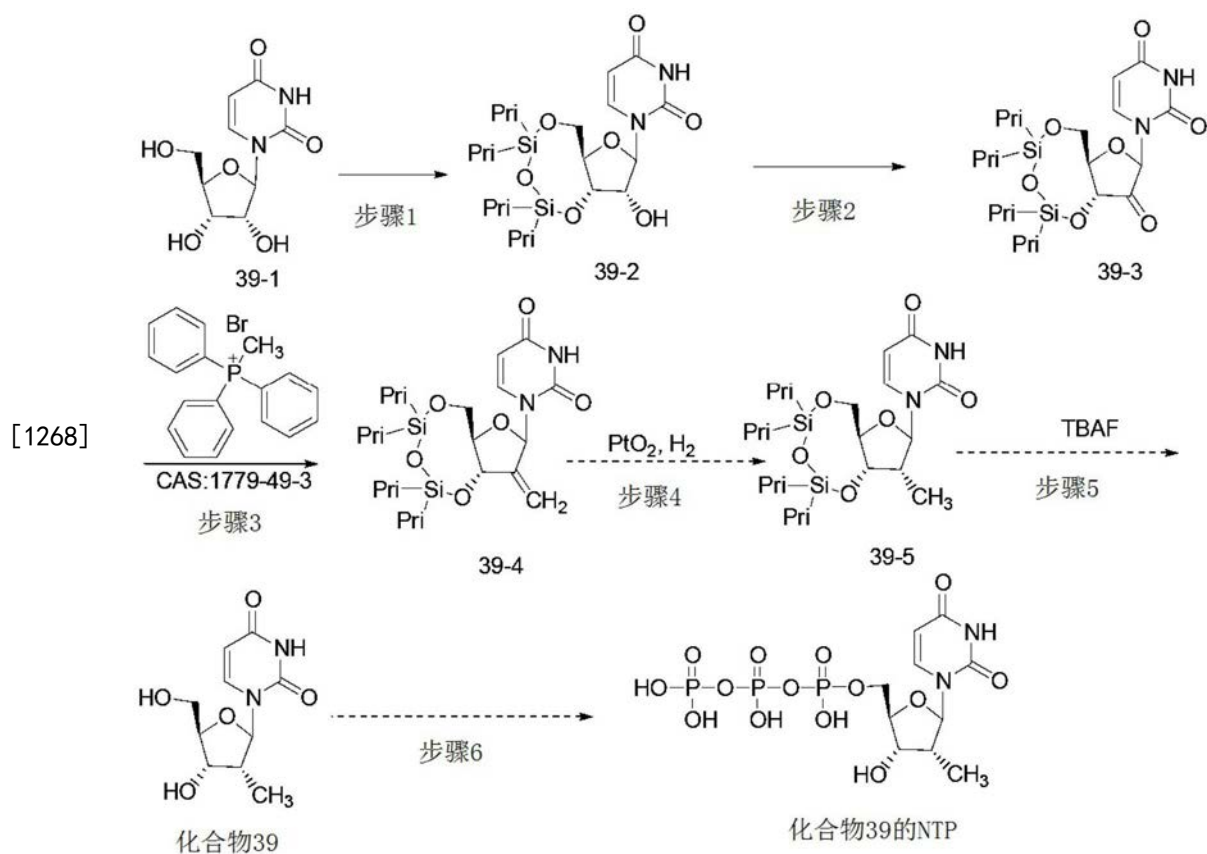
[1263] 为了获得相应的NTP,可以进行三磷酸酯反应(例如,本文所述的任何三磷酸酯反应)。任选地,可以对NTP进行纯化(例如,使用Sephadex DEAE-A25柱)、冻干或蒸发(例如,从EtOH中)。

[1264] 实施例45.环戊烯二醇胞苷(化合物38)和环戊烯二醇CTP(所述化合物的NTP)的合成



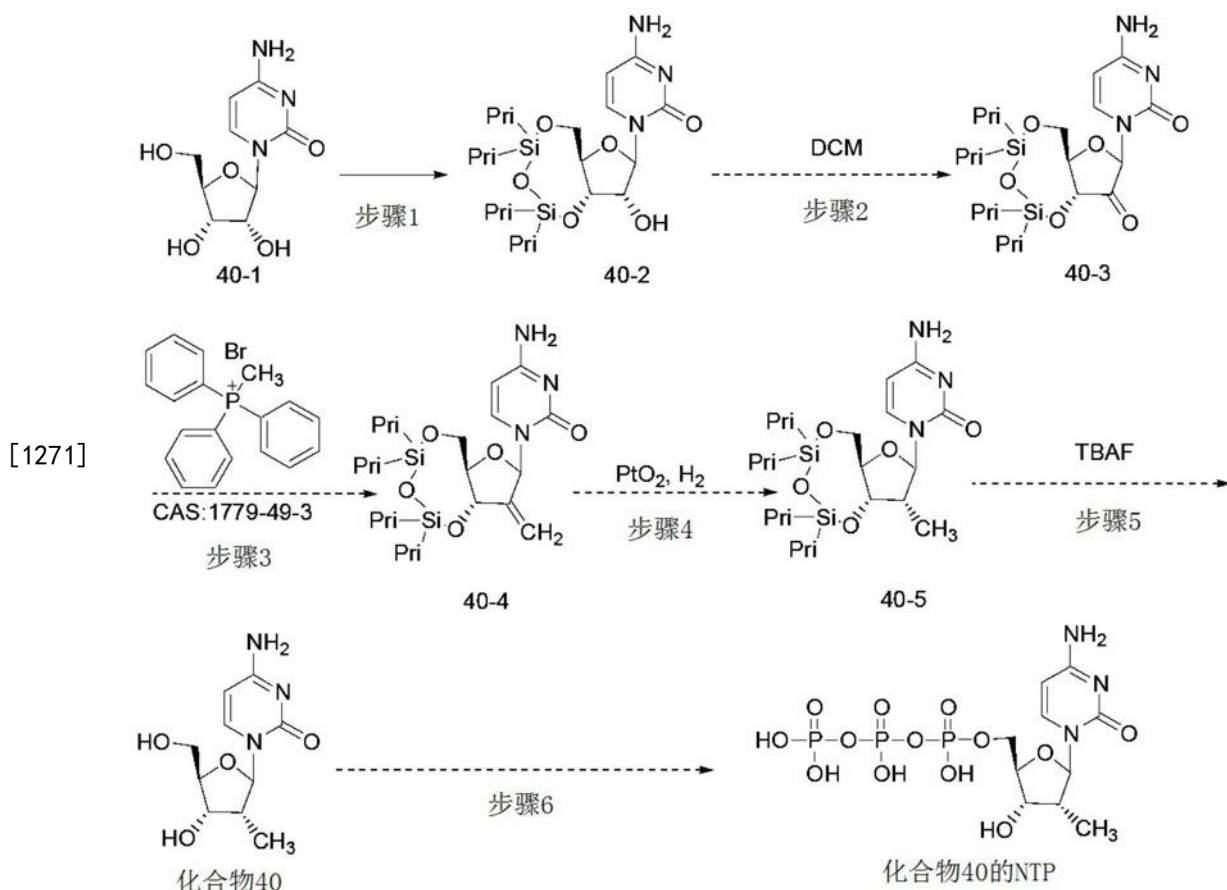
[1266] 保护D-核糖,然后烯丙基化,以获得化合物38-4,其随后进行环合和还原,以得到化合物38-7。烯炔易位,随后氧化,获得化合物38-9,进一步进行还原反应,并加入N-苯甲酰基尿嘧啶获得化合物38-14。经另外的脱保护和保护反应,获得化合物38,经三磷酸酯反应(例如,在任何可用的反应条件下,如本文所述的或美国专利号7,893,227中所述的,其通过引用的方式并入本文)获得化合物38的NTP。

[1267] 实施例46.2'-甲基尿苷(化合物39)和2'-甲基UTP(所述化合物的NTP)的合成



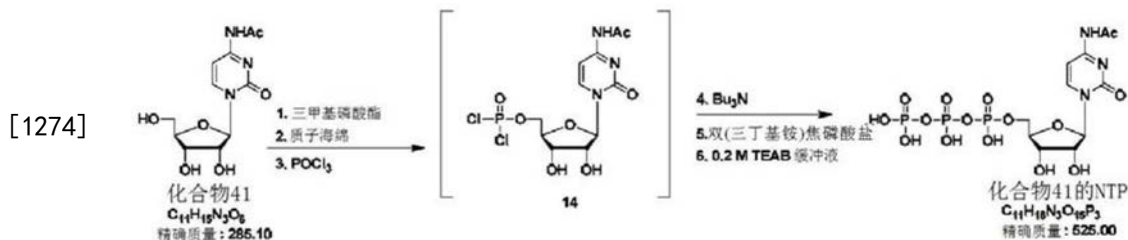
[1269] 保护尿苷39-1,然后用2当量的戴斯-马丁高碘烷进行氧化,以获得化合物39-3。随后经维蒂希反应(Wittig reaction)、氢化和脱保护步骤,获得化合物39。

[1270] 实施例47.2'-甲基胞苷(化合物40)和2'-甲基CTP(所述化合物的NTP)的合成



[1272] 保护胞苷40-1，然后氧化，以得到化合物40-3。随后经维蒂希反应、氢化和脱保护步骤，获得化合物40。

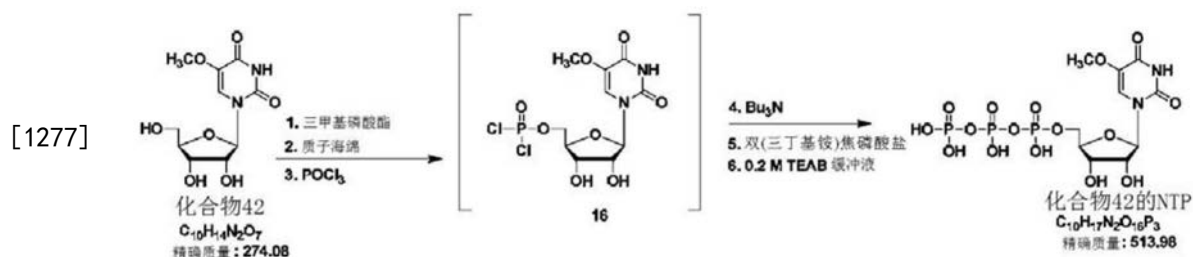
[1273] 实施例48.N-乙酰基胞苷(化合物41)和N-乙酰基CTP(所述化合物的NTP)的合成



[1275] 将N-乙酰基-胞苷(化合物41) (103.0mg, 0.36mmol) 的溶液加入到在1.0mL三甲基磷酸酯(TMP)和1.0mL的无水四氢呋喃(THF)中的质子海绵(115.72mg, 0.54mmol, 1.50当量)中。在0℃下搅拌溶液10分钟。将磷酰氯(POCl_3) (67.2 μL , 0.72mmol, 2.0当量) 逐滴加入到该溶液中, 之后在 N_2 气氛下保持搅拌2小时。2小时后, 使溶液与在2.5mL二甲基甲酰胺中的双三丁基铵焦磷酸盐(TBAPP或 $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (1.28g, 2.34mmol, 6.5当量) 和三丁胺(350.0 μL , 1.45mmol, 4.0当量) 的混合物反应。约15分钟后, 用24.0mL 0.2M的三乙基碳酸氢铵(TEAB)淬灭反应, 并将澄清溶液在室温下搅拌1小时。将反应混合物冻干过夜, 并将粗反应混合物经HPLC纯化(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18制备柱, 250 \times 21.20mm, 10.0微米, 梯度: 100%A/3.0分钟, 然后1%B/分钟, A=100mM TEAB缓冲液, B=ACN; 流速: 10.0mL/分钟; 保留时间: 16.81-17.80分钟)。将含有所期望的化合物的流份合并并冻干, 以产生化合物41的NTP。在 N_2 气氛下在火焰干燥的两颈烧瓶中进行三磷酸化反应。使用前, 将核昔和

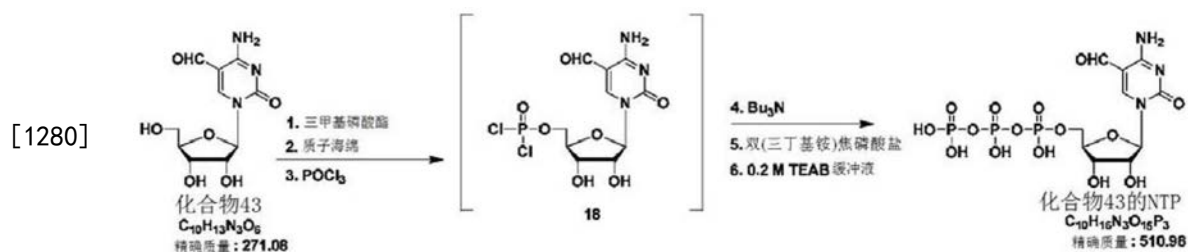
蛋白海绵在真空下用P₂O₅干燥过夜。单磷酸酯的形成通过LCMS监测。

[1276] 实施例49.5-甲氧基尿苷(化合物42)和5-甲氧基UTP(所述化合物的NTP)的合成



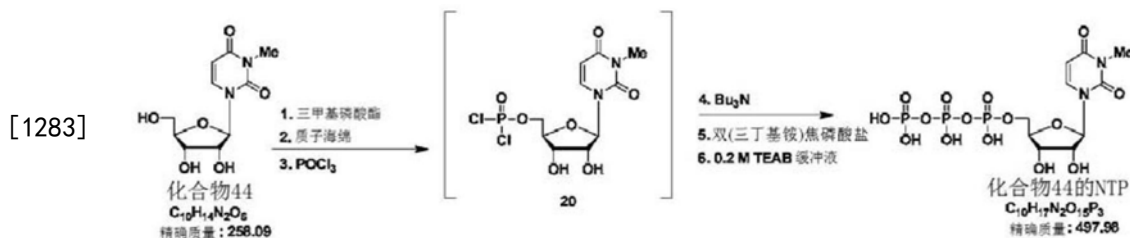
[1278] 将5-甲氧基尿苷(化合物42)(69.0mg, 0.25mmol, 加热使其溶解)的溶液加入到在0.7mL三甲基磷酸酯(TMP)中的质子海绵(80.36mg, 0.375mmol, 1.50当量)中,并在0℃下搅拌10分钟。将磷酰氯(POCl₃)(46.7μL, 0.50mmol, 2.0当量)逐滴加入到溶液中,之后在N₂气氛下保持搅拌2小时。2小时后,使溶液与在2.0mL二甲基甲酰胺中的双三丁基铵焦磷酸盐(TBAPP或(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(894.60mg, 1.63mmol, 6.50当量)和三丁胺(243.0μL, 1.00mmol, 4.0当量)的混合物反应。约15分钟后,用17.0mL 0.2M三乙基碳酸氢铵(TEAB)淬灭反应,并将澄清溶液在室温下搅拌1小时。将反应混合物冻干过夜,该粗反应混合物经HPLC纯化(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18制备柱, 250×21.20mm, 10.0微米, 梯度: 100% A 3.0分钟, 然后1%B/分钟, A=100mM TEAB缓冲液, B=ACN; 流速: 10.0mL/分钟; 保留时间: 16.57-17.51分钟)。将含有所期望的化合物的流份合并并冻干,以产生化合物42的NTP。在N₂气氛下在火焰干燥的两颈烧瓶中进行三磷酸化反应。使用前,将核苷和蛋白海绵在真空下用P₂O₅干燥过夜。单磷酸的形成通过LCMS监测。

[1279] 实施例50.5-甲酰基胞苷(化合物43)和5-甲酰基CTP(所述化合物的NTP)的合成



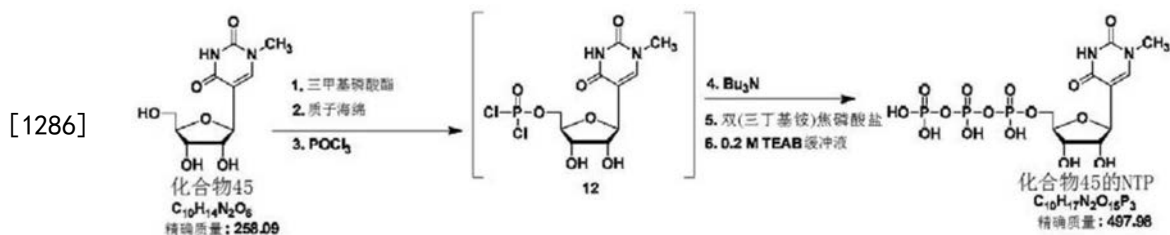
[1281] 将5-甲酰基胞苷(化合物43)(48.4mg, 0.18mmol, 加热使其溶解)的溶液加入到在0.7mL三甲基磷酸酯(TMP)中的质子海绵(57.86mg, 0.27mmol, 1.50当量)中,并在0℃下搅拌10分钟。将磷酰氯(POCl₃)(33.6μL, 0.36mmol, 2.0当量)逐滴加入到溶液中,之后在N₂气氛下保持搅拌2小时。2小时后,使溶液与在1.7mL的二甲基甲酰胺中的双三丁基铵焦磷酸盐(TBAPP或(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇)(642.0mg, 1.17mmol, 6.50当量)和三丁胺(175.0μL, 0.72mmol, 4.0当量)的混合物反应。约15分钟后,用12.0mL 0.2M的三乙基碳酸氢铵(TEAB)淬灭反应,并将澄清溶液在室温下搅拌1小时。将反应混合物冻干过夜,该粗反应混合物经HPLC纯化(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18制备柱, 250×21.20mm, 10.0微米; 梯度: 100% A 3.0分钟, 然后1%B/分钟, A=100mM TEAB缓冲液, B=ACN; 流速: 10.0mL/分钟; 保留时间: 17.04-17.87分钟)。将含有所期望的化合物的流份合并并冻干,以提供化合物43的NTP。在N₂气氛下在火焰干燥的两颈烧瓶中进行三磷酸化反应。在使用前,将核苷和蛋白海绵在真空下用P₂O₅干燥过夜。单磷酸酯的形成通过LCMS监测。

[1282] 实施例51.3-甲基尿苷(化合物44)和3-甲基UTP(所述化合物的NTP)的合成



[1284] 将3-甲基尿苷(化合物44) (45.80mg, 0.18mmol) 的溶液加入到在0.5mL三甲基磷酸酯(TMP)中的质子海绵(57.86mg, 0.27mmol, 1.50当量)中,并在0℃下搅拌10分钟。将磷酰氯(POCl₃) (33.6μL, 0.36mmol, 2.0当量)逐滴加入到该溶液中,之后在N₂气氛下保持搅拌2小时。2小时后,使溶液与在1.3mL二甲基甲酰胺中的双三丁基铵焦磷酸盐(TBAPP或(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) (652.0mg, 1.19mmol, 6.60当量)和三丁胺(175.0μL, 0.72mmol, 4.0当量)的混合物反应。约15分钟后,用12.0mL 0.2M的三乙基碳酸氢铵(TEAB)淬灭反应,并将澄清溶液在室温下搅拌1小时。将反应混合物冻干过夜,该粗反应混合物经HPLC纯化(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18制备柱, 250×21.20mm, 10.0微米; 梯度: 100% A 3.0分钟, 然后1%B/分钟, A=100mM TEAB缓冲液, B=ACN; 流速: 10.0mL/分钟; 保留时间: 18.52-19.57分钟)。将含有所期望的化合物的部分合并并冻干,以提供化合物44的NTP。在N₂气氛下在火焰干燥的两颈烧瓶中进行三磷酸化反应。使用前,将核苷和蛋白海绵在真空下用P₂O₅干燥过夜。单磷酸酯的形成通过LCMS监测。

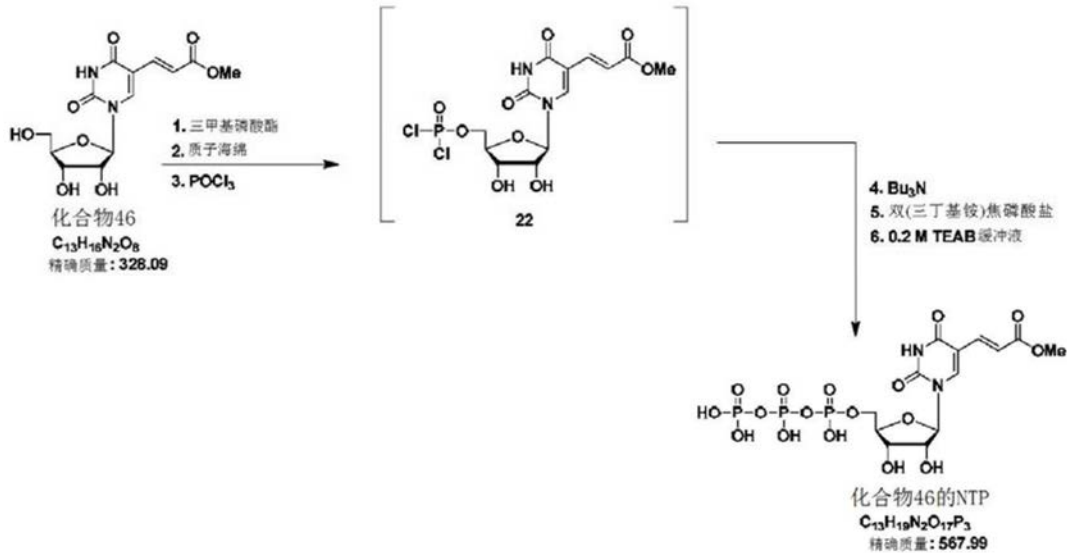
[1285] 实施例52.N1-甲基假尿苷(化合物45)和N1-甲基假UTP(所述化合物的NTP)的合成



[1287] 将N1-甲基假尿苷(化合物45) (96.6mg, 0.374mmol, 加热使其溶解) 的溶液加入到在0.8mL三甲基磷酸酯(TMP)中的质子海绵(120.0mg, 0.56mmol, 1.50当量)中,并在0℃下搅拌10分钟。将磷酰氯(POCl₃) (70.0μL, 0.75mmol, 2.0当量)逐滴加入到溶液中,之后在N₂气氛下保持搅拌2小时。2小时后,使溶液与在2.5mL的二甲基甲酰胺中的双三丁基铵焦磷酸盐(TBAPP或(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) (1.36g, 2.47mmol, 6.60当量)和三丁胺(362.0μL, 1.5mmol, 4.0当量)的混合物反应。约15分钟后,用17.0mL 0.2M的三乙基碳酸氢铵(TEAB)淬灭反应,并将澄清溶液在室温下搅拌1小时。将反应混合物冻干过夜,该粗反应混合物经HPLC纯化(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18制备柱, 250×21.20mm, 10.0微米; 梯度: 100% A 3.0分钟, 然后1%B/分钟, A=100mM TEAB缓冲液, B=ACN; 流速: 10.0mL/分钟; 保留时间: 15.91-17.01分钟)。将含有所期望的化合物的流份合并并冻干,进行三磷酸化反应以提供化合物45的NTP。该三磷酸化反应在N₂气氛下在火焰干燥的两颈烧瓶中进行。核苷和蛋白海绵在使用前在真空下用P₂O₅干燥过夜。单磷酸酯的形成通过LCMS监测。

[1288] 实施例53.5-甲氧基羰基乙烯基尿苷(化合物46)和5-甲氧基羰基乙烯基UTP(所述化合物的NTP)的合成

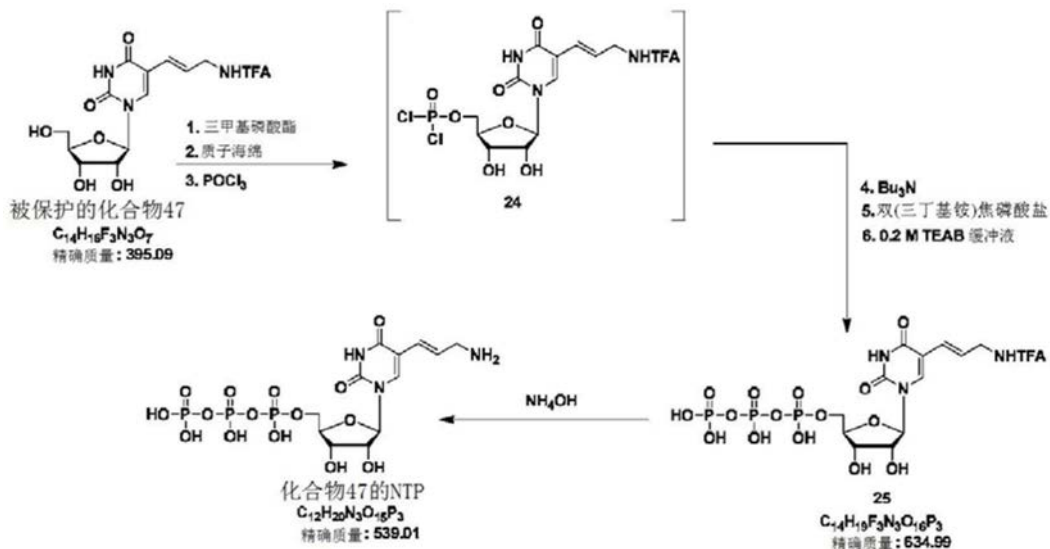
[1289]



[1290] 将5-甲氧基羰基乙烯基尿苷(化合物46) (102.0mg, 0.31mmol) 的溶液加入到在0.8mL三甲基磷酸酯(TMP)中的质子海绵(99.65mg, 0.46mmol, 1.50当量)中,并在0°C下搅拌10分钟。将磷酰氯(POCl₃) (57.8μL, 0.62mmol, 2.0当量) 逐滴加入到该溶液中,之后在N₂气氛下保持搅拌2小时。2小时后,使溶液与在2.5mL二甲基甲酰胺中的双三丁基铵焦磷酸盐(TBAPP或(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) (1.12g, 2.05mmol, 6.60当量) 和三丁胺(300.0μL, 1.24mmol, 4.0当量) 的混合物反应。约15分钟后,用20.0mL 0.2M的三乙基碳酸氢铵(TEAB) 淬灭反应,并将澄清溶液在室温下搅拌1小时。将反应混合物冻干过夜,该粗反应混合物经HPLC纯化(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18制备柱, 250×21.20mm, 10.0微米; 梯度: 100% A 3.0分钟, 然后1%B/分钟, A=100mM TEAB缓冲液, B=ACN; 流速: 10.0mL/分钟; 保留时间: 21.56–23.21分钟)。将含有所期望的化合物的流份合并并冻干,以提供化合物46的NTP。在N₂气氛下在火焰干燥的两颈烧瓶中进行三磷酸化反应。核苷和蛋白海绵在使用前在真空下用P₂O₅干燥过夜。单磷酸酯的形成通过LCMS监测。

[1291] 实施例54.5-氨基丙基尿苷(化合物47)和5-氨基丙基UTP(所述化合物的NTP)的合成

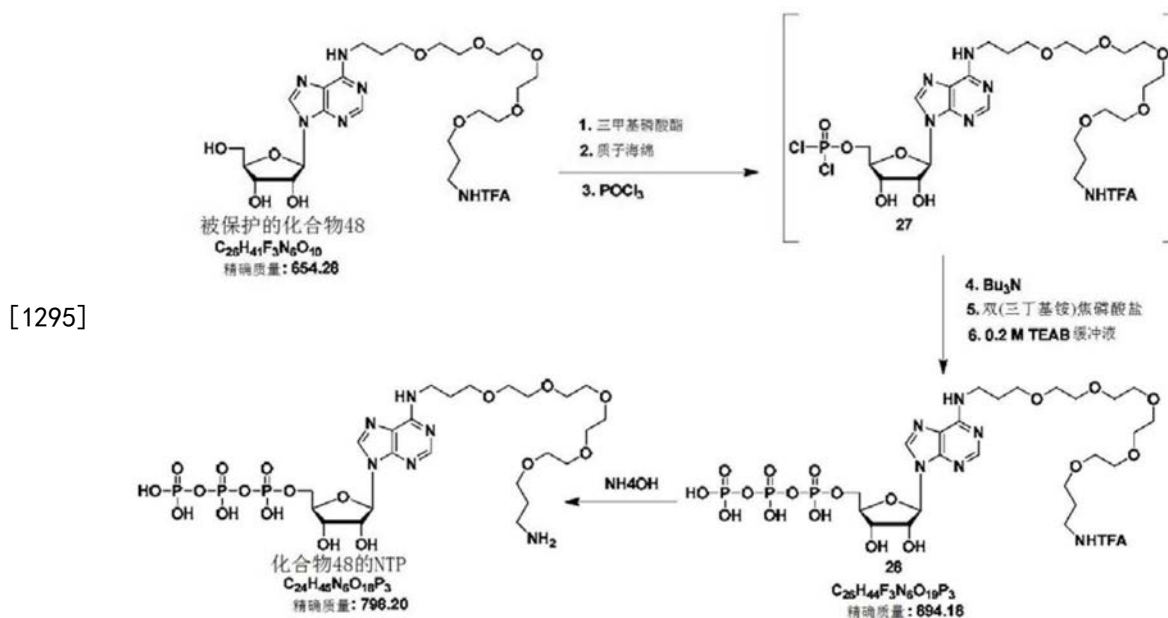
[1292]



[1293] 保护5-氨基丙基尿苷47,并将被保护的化合物47(86.0mg, 0.22mmol) 的溶液加

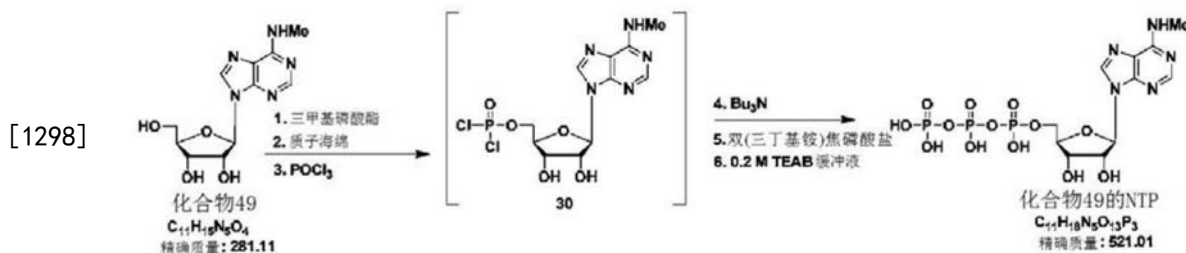
入到在0.7mL三甲基磷酸酯(TMP)中的质子海绵(70.7mg,0.33mmol,1.50当量)中,并在0℃下搅拌10分钟。将磷酰氯(POCl_3) (41.1 μL ,0.44mmol,2.0当量)逐滴加入到溶液中,之后在 N_2 气氛下保持搅拌2小时。2小时后,使溶液与在1.6mL二甲基甲酰胺中的双三丁基铵焦磷酸盐(TBAPP或 $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (784.6mg,1.43mmol,6.50当量)和三丁胺(213.0 μL ,0.88mmol,4.0当量)的混合物反应。约15分钟后,用15.0mL0.2M的三乙基碳酸氢铵(TEAB)淬灭反应,并将澄清溶液在室温下搅拌1小时。将18.0mL浓氢氧化铵加入到反应混合物中,以去除三氟乙酰基基团。然后将其储存搅拌过夜。将反应混合物冻干过夜,该粗反应混合物经HPLC纯化(Shimadzu,Kyoto Japan,Phenomenex C18制备柱,250 \times 21.20mm,10.0微米;梯度:100% A3.0分钟,然后1%B/分钟,A=100mM TEAB缓冲液,B=ACN;流速:10.0mL/分钟;保留时间:16.14-17.02分钟)。将含有所期望的化合物的流份合并并冻干,以提供化合物47的NTP。在 N_2 气氛下在火焰干燥的两颈烧瓶中进行三磷酸化反应。核苷和蛋白海绵在使用前在真空下用 P_2O_5 干燥过夜。单磷酸酯的形成通过LCMS监测。

[1294] 实施例55.N-PEG腺苷(化合物48)和N-PEG ATP(所述化合物的NTP)的合成



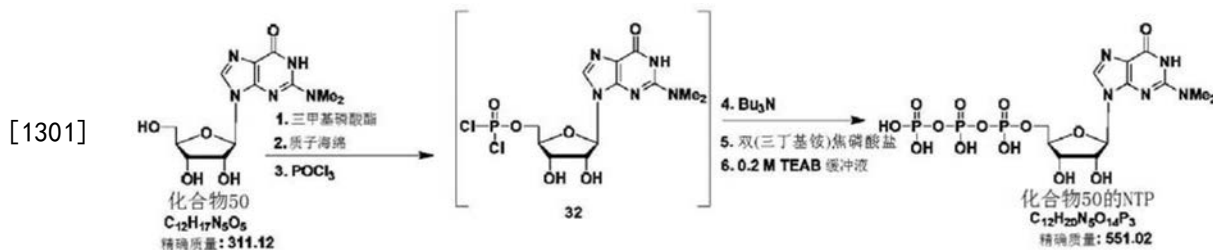
[1296] 保护N-PEG腺苷48,并将被保护的化合物48(100.0mg,0.15mmol)的溶液加入到在0.65mL三甲基磷酸酯(TMP)中的质子海绵(49.3mg,0.23mmol,1.50当量)中,并在0℃下搅拌10分钟。将磷酰氯(POCl_3) (28.0 μL ,0.3mmol,2.0当量)逐滴加入到该溶液中,之后在 N_2 气氛下保持搅拌2小时。2小时后,使溶液与在1.2mL二甲基甲酰胺中的双三丁基铵焦磷酸盐(TBAPP或 $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (537.7mg,0.98mmol,6.50当量)和三丁胺(146.0 μL ,0.6mmol,4.0当量)的混合物反应。约15分钟后,用10.0mL0.2M的三乙基碳酸氢铵(TEAB)淬灭反应,并将澄清溶液在室温下搅拌1小时。将18.0mL浓氢氧化铵加入到反应混合物中,以去除三氟乙酰基基团。然后将其储存搅拌过夜。将反应混合物冻干过夜,该粗反应混合物经HPLC纯化(Shimadzu,Kyoto Japan,Phenomenex C18制备柱,250 \times 21.20mm,10.0微米;梯度:100% A3.0分钟,然后1%B/分钟,A=100mM TEAB缓冲液,B=ACN;流速:10.0mL/分钟;保留时间:24.5-25.5分钟)。将含有所期望的化合物的流份合并并冻干,以提供化合物48的NTP。在 N_2 气氛下在火焰干燥的两颈烧瓶中进行三磷酸化反应。核苷和蛋白海绵在使用前在真空下用 P_2O_5 干燥过夜。单磷酸酯的形成通过LCMS监测。

[1297] 实施例56. N-甲基腺苷(化合物49)和N-甲基ATP(所述化合物的NTP)的合成

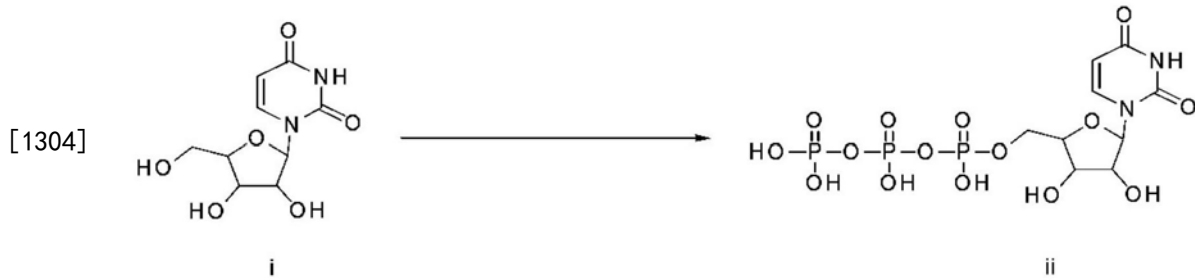


[1299] 将N-甲基腺苷(化合物49) (70.0mg, 0.25mmol) 的溶液加入到在0.7mL三甲基磷酸酯(TMP)中的质子海绵(79.29mg, 0.37mmol, 1.50当量)中,并在0℃下搅拌10分钟。将磷酰氯(POCl₃) (46.66μL, 0.50mmol, 2.0当量) 逐滴加入到该溶液中,之后在N₂气氛下保持搅拌2小时。2小时后,使溶液与在1.3mL二甲基甲酰胺中的双三丁基铵焦磷酸盐(TBAPP或(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) (888.85mg, 1.62mmol, 6.50当量)和三丁胺(241.0μL, 1.0mmol, 4.0当量)的混合物反应。约15分钟后,用16.0mL 0.2M的三乙基碳酸氢铵(TEAB)淬灭反应,并将澄清溶液在室温下搅拌1小时。将反应混合物冻干过夜,该粗反应混合物经HPLC纯化(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18制备柱, 250×21.20mm, 10.0微米; 梯度: 100% A 3.0分钟, 然后1% B/分钟, A=100mM TEAB缓冲液, B=ACN; 流速: 10.0mL/分钟; 保留时间: 19.62-20.14分钟)。将含有所期望的化合物的流份合并并冻干,以提供化合物49的NTP。在N₂气氛下在火焰干燥的两颈烧瓶中进行三磷酸化反应。核苷和蛋白海绵在使用前在真空下用P₂O₅干燥过夜。单磷酸酯的形成通过LCMS监测。

[1300] 实施例57. N,N-二甲基鸟苷(化合物50)和N,N-二甲基GTP(所述化合物的NTP)的合成



[1302] 将N,N-二甲基鸟苷(化合物50) (65.8mg, 0.21mmol) 的溶液加入到在0.7mL三甲基磷酸酯(TMP)中的质子海绵(68.58mg, 0.32mmol, 1.50当量)中,并在0℃下搅拌10分钟。将磷酰氯(POCl₃) (39.20μL, 0.42mmol, 2.0当量) 逐滴加入到该溶液中,之后在N₂气氛下保持搅拌2小时。2小时后,使溶液与在1.5mL二甲基甲酰胺中的双三丁基铵焦磷酸盐(TBAPP或(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇) (751.67mg, 1.37mmol, 6.50当量)和三丁胺(204.0μL, 0.84mmol, 4.0当量)的混合物反应。约15分钟后,用14.0mL 0.2M的三乙基碳酸氢铵(TEAB)淬灭反应,并将澄清溶液在室温下搅拌1小时。将反应混合物冻干过夜,该粗反应混合物经HPLC纯化(Shimadzu, Kyoto Japan, Phenomenex C18制备柱, 250×21.20mm, 10.0微米; 梯度: 100% A 3.0分钟, 然后1% B/分钟, A=100mM TEAB缓冲液, B=ACN; 流速: 10.0mL/分钟; 保留时间: 19.27-19.95分钟)。将含有所期望的化合物的部分合并并冻干,以提供化合物50的NTP。在N₂气氛下在火焰干燥的两颈烧瓶中进行三磷酸化反应。核苷和蛋白海绵在使用前在真空下用P₂O₅干燥过夜。单磷酸酯的形成通过LCMS监测。

[1303] 实施例58.用于NTPS的三磷酸酯合成的一般方法

[1305] 可以通过任何可用的方法对核苷i进行磷酸化,以获得三磷酸酯化合物ii。例如,可以将核苷加入到质子海绵和三甲基磷酸酯(TMP)中,并冷却(例如,至-40°C)。可以逐滴加入磷酰氯(POCl_3),之后与双三丁基铵焦磷酸盐(TBAPP或 $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$)和三丁胺反应。反应可以用三乙基碳酸氢铵(TEAB)快速淬灭。示例性的条件在美国专利号7,893,227中给出,其通过引用的方式并入本文。

[1306] 磷酸化反应之后,可以任选地将反应混合物冻干、纯化(例如,通过离子交换色谱法和/或HPLC)、或转化为钠盐(例如,通过溶解于MeOH中并加入高氯酸钠的丙酮溶液)。

[1307] 实施例59:用于产生cDNA的PCR

[1308] 用于制备cDNA的PCR方法采用Kapa Biosystems(Woburn,MA)的 $2\times$ KAPA HIFI™HotStart ReadyMix来进行。该系统包括 $2\times$ KAPA预混物12.5 μL ;正向引物(10 μM)0.75 μL ;反向引物(10 μM)0.75 μL ;模板cDNA100ng;和补足至25.0 μL 的蒸馏水。反应条件为95°C 5分钟,25个循环的98°C 20秒、再58°C 15秒、再72°C 45秒,然后72°C 5分钟。然后4°C终止。

[1309] 本发明的反向引物为mRNA中的poly-A120掺入了poly-T120。其它具有更长或更短的poly-T尾(track)的反向引物可以用来调节mRNA的poly-A尾的长度。

[1310] 反应使用Invitrogen的PURELINK™PCR Micro试剂盒(Carlsbad,CA)依制造商的说明书来提纯(最多5 μg)。较大的反应需要使用具有较大容量的产品来提纯。提纯后,cDNA使用NanoDrop定量并通过琼脂糖凝胶电泳进行分析,以确认cDNA是预期的大小。然后cDNA在进行体外转录反应之前进行测序分析。

[1311] 实施例60.体外转录(IVT)

[1312] 体外转录反应生成包含修饰的核苷酸的mRNA或修饰的RNA。采用天然的和非天然的NTP在内部制备输入的核苷酸三磷酸(NTP)混合物。

[1313] 典型的体外转录反应包括下述成分:

	模板 cDNA	1.0 μg
	10x 转录缓冲液(400 mM Tris-HCl pH 8.0, 190 mM MgCl_2 , 50 mM DTT, 10 mM 亚精胺)	2.0 μl
[1314]	定制 NTP (每个 25mM)	7.2 μl
	RNA 酶抑制剂	20 U
	T7 RNA 聚合酶	3000 U
	dH ₂ O	补足至 20.0 μl

[1315] 37°C 孵育3hr至5hr。

[1316] 将粗IVT混合物于4°C储存过夜,用于第二天的提纯。然后用1U不含RNA酶的DNA酶消化起始模板。37°C孵育15分钟后,使用Ambion的MEGACLEAR™试剂盒(Austin, TX)依制造商的说明书纯化mRNA。此试剂盒可以纯化高达500 μg 的RNA。提纯后, RNA使用NanoDrop进行定量并通过琼脂糖凝胶电泳进行分析,以确认RNA是适当的大小且没有RNA降解发生。

[1317] T7RNA聚合酶可以选自T7RNA聚合酶、T3RNA聚合酶和突变体聚合酶,例如但不限于能掺入修饰的NTP的新聚合酶以及下述参考文献中公开的聚合酶:Liu (Esvelt等人(Nature (2011) 472 (7344) :499-503和美国公布号20110177495,其识别可替代的启动子, Ellington (Chelliserrykattil和Ellington, Nature Biotechnology (2004) 22 (9) :1155-1160), 其描述了T7RNA聚合酶变体以转录2'-O-甲基RNA和 Sousa (Padilla和Sousa, Nucleic acids Research (2002) 30 (24) :e128), 其描述了T7RNA聚合酶的双突变体;以其整体并入本文。

[1318] 实施例61.mRNA的酶法加帽

[1319] 按下述步骤进行mRNA的加帽,其中混合物包含:IVT RNA60 μg -180 μg ,蒸馏水补足72 μL 。65°C孵育混合物5分钟,以变性RNA,随后立即转移到冰上。

[1320] 然后,规程包括混合10 \times 加帽缓冲液(0.5M Tris-HCl (pH8.0)、60mM KCl、12.5mM MgCl_2) (10.0 μL);20mM GTP (5.0 μL);20mM S-腺苷蛋氨酸(2.5 μL);RNA酶抑制剂(100U);2'-O-甲基转移酶(400U);痘苗加帽酶(鸟苷酸转移酶)(40U);蒸馏水(补足至28 μL);并在37°C孵育30分钟(对于60 μg 的RNA)或至多2小时(对于180 μg 的RNA)。

[1321] 然后,使用Ambion的MEGACLEAR™试剂盒(Austin, TX)依制造商的说明书纯化mRNA。提纯后,使用NANODROP™(ThermoFisher, Waltham, MA)定量RNA并用琼脂糖凝胶电泳进行分析,以确认RNA是适当的大小且没有发生RNA的降解。也可以通过进行反转录-PCR产生用于测序的cDNA来对RNA产物测序。

[1322] 实施例62.polyA加尾反应

[1323] 如果cDNA中没有poly-T,在提纯终产物之前必须进行poly-A加尾反应。通过混合加帽的IVT RNA (100 μL);RNA酶抑制剂(20U);10 \times 加尾缓冲液(0.5M Tris-HCl (pH8.0)、2.5M NaCl、100mM MgCl_2) (12.0 μL);20mM ATP (6.0 μL);poly-A聚合酶(20U);蒸馏水补足123.5 μL 并在37°C孵育30分钟完成反应。如果poly-A尾已经存在于转录物之内,那么加尾反应可以被跳过并直接使用Ambion的MEGACLEAR™试剂盒(Austin, TX)提纯(最多500 μg)。Poly-A聚合酶优选是表达于酵母中的重组酶。

[1324] 对于本文所述和所进行的研究, poly-A尾被编码于IVT模板中, 以包含长160个的核苷酸。然而, 应当理解, poly-A加尾反应的持续合成能力或完整性可能不总是导致刚好好的160个核苷酸。因此, 约160个核苷酸, 例如约150-165、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164或165个的poly-A尾都在本发明的范围之内。

[1325] 实施例63. 蛋白表达的筛选方法

[1326] A. 电喷雾电离

[1327] 制备可含有由施用给受试者的修饰的RNA编码的蛋白的生物样品并根据制造商的用于电喷雾电离(ESI)的规程、使用1、2、3或4个质谱分析仪进行分析。生物样品也可以使用串联ESI质谱系统进行分析。

[1328] 蛋白片段或全蛋白的模式与给定蛋白的已知对照比较, 通过比较来确定同一性。

[1329] B. 基质辅助激光解吸/电离

[1330] 制备可含有由施用给受试者的修饰的RNA编码的蛋白的生物样品并根据制造商的用于基质辅助激光解吸/电离(MALDI)的规程进行分析。

[1331] 蛋白片段或全蛋白的模式与给定蛋白的已知对照比较, 通过比较来确定同一性。

[1332] C. 液相色谱-质谱-质谱

[1333] 可包含由修饰的RNA编码的蛋白的生物样品用胰蛋白酶处理来消化其中所含的蛋白。所得到的肽通过液相色谱-质谱-质谱(LC/MS/MS)进行分析。肽在质谱仪中片段化, 以产生可以通过计算机算法与蛋白序列数据库匹配的诊断模式。消化的样品可以被稀释, 以获得给定蛋白的1ng或更小的起始物质。含有简单缓冲背景(例如水或挥发性盐)的生物样品适于直接的溶液内消化; 更复杂的背景(如洗涤剂、非挥发性盐、甘油)需要另外的提纯步骤, 以促进样品的分析。

[1334] 蛋白片段或全蛋白的模式与给定蛋白的已知对照比较, 通过比较来确定同一性。

[1335] 实施例64. 细胞因子研究: PBMC

[1336] A. PBMC的分离和培养

[1337] 从Research Blood Components(批号KP30928和KP30931)获得来自2个供体的置于肝素钠管中的50mL的人类血液。对于每个供体, 血液被收集并用DPBS(SAFC Bioscience59331C, 批号071M8408)稀释至70mL, 并平均分装于2个50mL锥形管中。将10mL的Ficoll Paque(GE Healthcare17-5442-03, 批号10074400)轻轻置于血层之下。将试管以2000rpm、低加速和低制动地离心30分钟。移走管并将血沉棕黄层PBMC层轻轻地转移到新的50mL锥形瓶中并用DPBS洗涤。将管以1450rpm离心10分钟。

[1338] 将上清液吸出并将PBMC沉淀重悬并在50mL的DPBS中洗涤。将试管以1250rpm离心10分钟。重复该洗涤步骤并将PBMC沉淀重悬于19mL的Optimem I中(Gibco11058, 批号1072088)并计数。将细胞悬浮液调整至 3.0×10^6 个细胞/ml活细胞的浓度。

[1339] 然后, 将这些细胞以每个供体每孔50 μ L铺在5个96孔的组织培养基处理过的圆底培养板中(Costar3799)。30分钟内, 每一孔中加入每孔50 μ L体积的转染混合物。转染后4小时之后, 培养基补充10 μ L的胎牛血清(Gibco10082, 批号1012368)。

[1340] B. 转染的制备

[1341] 将编码人类G-CSF的修饰的mRNA(mRNA序列示于SEQ ID NO:1; 约160核苷酸的polyA尾未示于序列中; 5'帽, 帽1)(包含任一的(1)天然NTP, (2)100%替代为5-甲基胞苷和

假尿苷或(3) 100%替代为5-甲基胞苷和N1-甲基假尿苷);编码荧光素酶的mRNA (IVT cDNA序列示于SEQ ID NO:2;mRNA序列示于SEQ ID NO:3,约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中,5'帽,帽1,在每个胞嘧啶位点都用5-甲基胞嘧啶完全修饰,在每个尿苷位点用假尿苷替代)(包含任一的(1)天然NTP或(2) 100%替代为5-甲基胞苷和假尿苷)且TLR激动剂R848 (Invivogen tlrl-r848) 稀释到38.4ng/ μ L,终体积为2500 μ L的Optimem I。

[1342] 另外,将110 μ L的Lipofectamine2000 (Invitrogen11668-027,批号1070962)用6.76mL的Optimem I稀释。在96孔板中,将9等份的135 μ L的各个mRNA、阳性对照(R-848)或阴性对照(Optimem I)加入到135 μ L的稀释的Lipofectamine2000中。将含有待转染材料的板孵育20分钟。然后将转染混合物以50 μ L每孔转移到人类PBMC板的每个孔。然后将板于37 $^{\circ}$ C孵育。在2、4、8、20和44小时时,从培养箱中取出各个板并将上清液冷冻。

[1343] 取出最后一块板之后,用人类G-CSF ELISA试剂盒 (Invitrogen KHC2032) 和人类IFN- α ELISA试剂盒 (Thermo Scientific41105-2) 分析上清液。每种条件一式两份进行。

[1344] C. 蛋白和先天免疫应答分析

[1345] 未修饰的和修饰的mRNA产生所编码的蛋白的能力随时间推移进行评估(G-CSF生产率),如通过检测干扰素- α 的生产测量mRNA触发先天免疫识别的能力一样。使用体外PBMC培养物是已接受的测量寡核苷酸免疫刺激潜力的方式 (Robbins等人, Oligonucleotides200919:89-102)。

[1346] 结果通过使用四参数逻辑曲线拟合添加到各个ELISA板的标准曲线中。表4和表5所示的是通过特异性的ELISA测定的来自3个独立的PBMC供体的G-CSF、干扰素- α (IFN- α) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的随时间的生产的平均值。

[1347] 在G-CSF ELISA中,在每个时间点都减去了来自Lipofectamine2000 (LF2000) 未处理条件的背景信号。数据表明,人外周血单核细胞的人类G-CSF蛋白的特异性生产在包含天然NTP的、100%替换为5-甲基胞苷和假尿苷或100%替换为5-甲基胞苷和N1-甲基假尿苷的G-CSF mRNA中均可以发现。通过使用5-甲基胞苷和N1-甲基假尿苷修饰的mRNA,相对于5-甲基胞苷和假尿苷修饰的mRNA,G-CSF生产显著增加。

[1348] 对于先天免疫识别,尽管相对于阳性对照 (R848, p (I) p (C)), 两种修饰的mRNA化学组成都巨大地阻止IFN- α 和TNF- α 的生产,化学组成之间确实存在着显著的差异。5-甲基胞苷和假尿苷修饰的mRNA导致低但可检测水平的IFN- α 和TNF- α 生产,而5-甲基胞苷和N1-甲基假尿苷修饰的mRNA导致不可检测到的IFN- α 和TNF- α 生产。

[1349] 因此,已经确定,除了需要评述多于一个的先天免疫应答的激活的细胞因子标记物,令人惊奇地发现是,修饰的组合提供了不同水平的细胞应答(蛋白生产和免疫激活)。已经显示,本研究中的修饰-N1-甲基假尿苷-带来了高于其它人所研究的5-甲基胞苷/假尿苷的标准组合的保护,产生2倍多的蛋白和几乎少150倍的免疫激活 (TNF- α)。

[1350] 考虑到PBMC包含大阵列的先天免疫RNA识别传感器并且也能翻译蛋白,其提供了有用的系统来测试这两种途径的相互依赖性。已知的是,可以通过激活这样的先天免疫途径来负面影响mRNA翻译 (Kariko等人, Immunity (2005) 23:165-175; Warren等人, Cell Stem Cell (2010) 7:618-630)。通过使用PBMC作为体外分析系统,可以建立翻译(在本申请中是G-CSF蛋白产生)和细胞因子生产(在本申请中是通过IFN- α 和TNF- α 蛋白生产例证的)之间的相关性。更好的蛋白生产与更低的先天免疫激活途径诱导相关,并且新的化学组成可以基

于该比率有利地进行判断(表6)。

[1351] 本研究中,均具有5-甲基胞嘧啶的2个化学修饰-假尿苷和N1-甲基假尿苷(-对于细胞因子IFN- α 的PC比率是4742/141=34和9944/1=9944。对于细胞因子TNF- α ,2个化学修饰分别具有153和1243的PC比率,其表明对于任一的细胞因子,N1-甲基假尿苷是优秀的修饰。在表4和表5中,“NT”是指未测试。

[1352] 表4.G-CSF

G-CSF: 3 供体平均 (pg/ml)	
G-CSF 5-甲基胞嘧啶/假尿苷	4742
G-CSF 5-甲基胞嘧啶/ N1-甲基假尿苷	9944
荧光素酶	18
LF2000	16

[1354] 表5. IFN- α 和TNF- α

[1355]

	IFN-α: 3 供体平均 (pg/ml)	TNF-α: 3 供体平均 (pg/ml)
G-CSF 5-甲基胞嘧啶/假尿苷	141	31
G-CSF 5-甲基胞嘧啶/ N1-甲基假尿苷	1	8
P(I)P(C)	1104	NT
R-848	NT	1477
LF2000	17	25

[1356] 表6.G-CSF相对于细胞因子的比率

[1357]

	G-CSF/ IFN- α (比率)		G-CSF/TNF- α (比率)	
	5-甲基胞嘧啶/假尿苷	5-甲基胞嘧啶/ N1-甲基假尿苷	5-甲基胞嘧啶/ 假尿苷	5-甲基胞嘧啶/ N1-甲基假尿苷
PC 比率	34	9944	153	1243

[1358] 实施例65. 修饰的mRNA的化学修饰范围

[1359] 已证明修饰的核苷,例如但不限于化学修饰5-甲基胞嘧啶和假尿苷降低了哺乳动物细胞中先天免疫应答并增加RNA的表达。令人惊奇且之前不为人所知的是,当特定核苷酸的化学修饰的量小于100%时,由这些化学修饰所表现的影响可以被滴定。先前的认为是,使用修饰的核苷的不完全替代可获得化学修饰的益处,并且已发表报道表明,直至修饰的核苷的取代水平低于50%,没有损失益处(Kariko等人,Immunity (2005) 23:165-175)。

[1360] 然而,现在已表明,化学修饰的益处直接与化学修饰的程度相关并且考虑到免疫应答的多个单一度量,这些益处也必须被考虑到。这样的益处包括增强的蛋白生产或mRNA翻译和减少的或避免刺激先天免疫应答,如通过细胞因子概况和免疫反应触发的度量所测量的。

[1361] 100%替代为修饰的核苷显示了增强的mRNA翻译和减少的或缺少先天免疫刺激。更少百分比的替代导致更少的mRNA翻译和更多的先天免疫刺激,未修饰的mRNA显示出最低的翻译和最高的先天免疫刺激。

[1362] 体外PBMC研究:百分比修饰

[1363] 480ng用5-甲基胞嘧啶(5mC)和假尿苷(假U)修饰的G-CSF mRNA或未修饰的G-CSF mRNA用0.4 μ L的Lipofectamine2000转染入来自3个正常血液供体(D1、D2和D3)的外周血单核细胞(PBMC)中。G-CSF mRNA(SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)用5mC和假U完全修饰(100%修饰)、不用5mC和假U修饰(0%修饰)或用5mC和假U部分修饰以使mRNA包含75%修饰、50%修饰或25%修饰。对照样品荧光素酶(mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1;完全修饰的5meC和假U)也用于G-CSF表达分析。对于TNF- α 和IFN- α ,也分析对照样品Lipofectamine2000、LPS、R-848、荧光素酶(mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1;完全修饰的5mC和假U)和P(I)P(C)。转染22小时后,收集上清液并进行ELISA,以测定蛋白表达。G-CSF的表达示于表7,IFN- α 和TNF- α 的表达示于表8。IFN- α 和TNF- α 的表达可能是来自G-CSF mRNA的转染的次级效应。表7、表8和图10表明,当mRNA是不完全修饰的时,G-CSF、干扰素 α (IFN- α)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的化学修饰的量是可滴定的,并且可滴定的趋势对于各个靶是不相同的。

[1364] 如上所述,使用PBMC作为体外分析系统时,可以建立翻译(在本发明中是G-CSF蛋白生产)和细胞因子生产(在本发明中,由IFN- α 蛋白生产例证)之间的相关性。更好的蛋白生产与更低的先天免疫激活途径的诱导相关,化学组成的百分比修饰可以基于该比率有利地进行判断(表9)。如从表7和表8所计算并示于表9中的,用5-甲基胞嘧啶和假尿苷进行的完全修饰,相比于未经任何修饰(天然的G-CSF mRNA),显示出好得多的蛋白/细胞因子生产

(对于IFN- α 是100倍,对于TNF- α 是27倍)。部分修饰显示出线性关系,即越少的修饰导致越低的蛋白/细胞因子比率。

[1365] 表7.G-CSF的表达

	G-CSF 的表达(pg/ml)		
	D1	D2	D3
100%的修饰	1968.9	2595.6	2835.7
75% 的修饰	566.7	631.4	659.5
50% 的修饰	188.9	187.2	191.9
25% 的修饰	139.3	126.9	102.0
0% 的修饰	194.8	182.0	183.3
荧光素酶	90.2	0.0	22.1

[1367] 表8. IFN- α 和TNF- α 的表达

[1368]

	IFN- α 的表达(pg/ml)			TNF- α 的表达(pg/ml)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
100%的修饰	336.5	78.0	46.4	115.0	15.0	11.1
75%的修饰	339.6	107.6	160.9	107.4	21.7	11.8
50%的修饰	478.9	261.1	389.7	49.6	24.1	10.4
25%的修饰	564.3	400.4	670.7	85.6	26.6	19.8

[1369]

0%的修饰	1421.6	810.5	1260.5	154.6	96.8	45.9
LPS	0.0	0.6	0.0	0.0	12.6	4.3
R-848	0.5	3.0	14.1	655.2	989.9	420.4
P(I)P(C)	130.8	297.1	585.2	765.8	2362.7	1874.4
仅有脂质	1952.2	866.6	855.8	248.5	82.0	60.7

[1370] 表9.PC比率和百分比修饰的效果

[1371]

%修饰	平均 G-CSF (pg/ml)	平均 IFN- α (pg/ml)	平均 TNF- α (p g/ml)	G-CSF/ IFN- α (PC 比率)	G-CSF/TNF- α (PC 比率)
100	2466	153	47	16	52
75	619	202	47	3.1	13
50	189	376	28	0.5	6.8
25	122	545	44	0.2	2.8
0	186	1164	99	0.16	1.9

[1372] 实施例66. 转染到PBMC中的修饰的RNA

[1373] 500ng用5-甲基胞嘧啶 (5mC) 和假尿苷(假U) 修饰的G-CSF mRNA或未修饰的G-CSF mRNA用0.4 μ L的Lipofectamine2000转染入来自3个正常血液供体 (D1、D2和D3) 的外周血单核细胞 (PBMC) 中。G-CSF mRNA (SEQ ID NO:1; 约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中; 5'帽, 帽1) 用5mC和假U完全修饰 (100%修饰)、不用5mC和假U修饰 (0%修饰) 或用5mC和假U部分修饰以使mRNA包含50%的修饰、25%的修饰、10%的修饰、5%的修饰、1%的修饰或0.1%的修饰。对照样品mCherry (mRNA序列示于SEQ ID NO:6; 约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中; 5'帽, 帽1; 完全修饰的5mC和假尿苷) 和用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF (对照G-CSF) 也用于G-CSF表达分析。对于肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和干扰素- α (IFN- α) , 也分析对照样品Lipofectamine2000、LPS、R-848、荧光素酶 (mRNA序列示于SEQ ID NO:3; 约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中; 5'帽, 帽1; 用5mC和假U完全修饰) 和P (I) P (C) 。转染6小时和18小时后, 收集上清液并进行ELISA, 以测定蛋白的表达。供体1的G-CSF、IFN- α 和TNF- α 的表达示于表10, 供体2的示于表11且供体3的示于表12。

[1374] 具有5-甲基胞苷和假尿苷的完全100%修饰在所有3个人类PBMC供体中都导致最多的蛋白翻译 (G-CSF) 并产生最少量的细胞因子。越少量的修饰导致越多的细胞因子生产 (IFN- α 和TNF- α) , 从而, 进一步突出了完全修饰对减少细胞因子和提高蛋白翻译的重要性 (如此处由G-CSF生产证明的) 。

[1375] 表10. 供体1

[1376]

	G-CSF (pg/mL)		IFN- α (pg/mL)		TNF- α (pg/mL)	
	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时
100% 修饰	1815	2224	1	13	0	0
75% 修饰	591	614	0	89	0	0
50% 修饰	172	147	0	193	0	0
25% 修饰	111	92	2	219	0	0
10% 修饰	138	138	7	536	18	0
1% 修饰	199	214	9	660	18	3
0.1% 修饰	222	208	10	597	0	6
0 % 修饰	273	299	10	501	10	0
对照 G-CSF	957	1274	3	123	18633	1620
mCherry	0	0	0	10	0	0
未处理	N/A	N/A	0	0	1	1

[1377] 表11. 供体2

[1378]

	G-CSF (pg/mL)		IFN- α (pg/mL)		TNF- α (pg/mL)	
	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时
100% 修饰	2184	2432	0	7	0	11
75% 修饰	935	958	3	130	0	0
50% 修饰	192	253	2	625	7	23
25% 修饰	153	158	7	464	6	6
10% 修饰	203	223	25	700	22	39
1% 修饰	288	275	27	962	51	66

[1379]

0.1% 修饰	318	288	33	635	28	5
0 % 修饰	389	413	26	748	1	253
对照 G-CSF	1461	1634	1	59	481	814
mCherry	0	7	0	1	0	0
未处理	N/A	N/A	1	0	0	0

[1380] 表12. 供体3

[1381]

	G-CSF (pg/mL)		IFN- α (pg/mL)		TNF- α (pg/mL)	
	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时	6 小时	18 小时
100% 修饰	6086	7549	7	658	11	11
75% 修饰	2479	2378	23	752	4	35
50% 修饰	667	774	24	896	22	18
25% 修饰	480	541	57	1557	43	115
10% 修饰	838	956	159	2755	144	123
1% 修饰	1108	1197	235	3415	88	270
0.1% 修饰	1338	1177	191	2873	37	363
0 % 修饰	1463	1666	215	3793	74	429
对照 G-CSF	3272	3603	16	1557	731	9066
mCherry	0	0	2	645	0	0
未处理的	N/A	N/A	1	1	0	8

[1382] 实施例67. 修饰的Microames回复突变筛选

[1383] 背景和方法

[1384] microames筛选是完全Ames预孵育分析的一个版本。其使用4个沙门氏菌试验菌株(TA97a、TA98、TA100和TA1535)和1个大肠杆菌菌株(WP2uvrA pKM101)检测移码和碱基对取代突变二者。菌株TA97a和TA98检测移码突变,TA100、TA1535和WP2uvrA pKM101检测碱基对取代突变。这种按比例缩小的Ames试验使用最少的化合物,在有和没有代谢激活(S9部分)时进行并使用多孔板。这样的试验是微生物分析,以检测试验化合物的潜在致突变性。

[1385] 在存在和不存在0.25、2.5、12.5、25、75和250 μ g/孔的代谢激活系统(ACROCLOR™1254诱导的大鼠肝S9微粒体部分)时,用于5-甲基胞苷、假尿苷或N'-甲基假尿苷检品的microAmes筛选用菌株TA97a、TA98、TA100、TA1535和WP2uvrA pKM101以一式两份进行试验。使用4个不同浓度的阳性对照化合物,以确保分析系统对已知的致突变化合物敏

感。DMSO用作载体对照。阳性和载体对照提供了预期的结果,表明microAmes筛选对检测诱变剂足够敏感。

[1386] 结果

[1387] 对于5-甲基胞嘧啶,在任何具有或不具有代谢激活的测试菌株中都未观察到沉淀物(precipitate)。在任何具有或不具有代谢激活的菌株中都未观察到细胞毒性(降低背景菌苔和/或回复体数)。与载体对照相比,在任何具有或不具有代谢激活的菌株中均未发现回复体菌落数有增加。因此,在microAmes筛选条件下,在具有或不具有代谢激活的菌株TA97a、TA98、TA100、TA1535和WP2uvrA pKM101中,高达250 μ g/孔的5-甲基胞苷都没有致突变性。

[1388] 对于假尿苷,在任何具有或不具有代谢激活的测试菌株中都未观察到沉淀物。在不具有代谢激活的菌株TA100中观察到细胞毒性(降低回复体数)。在任何具有或不具有代谢激活的其他菌株中都未观察到细胞毒性(降低背景菌苔和/或回复体数)。与载体对照相比,在任何具有或不具有代谢激活的菌株中均未观察到回复体菌落数有增加。因此,在该microAmes筛选条件下,在不具有代谢激活的菌株TA100中,高达75 μ g/孔的假尿苷没有致突变性,在具有或不具有代谢激活的菌株TA97a、TA98、TA1535和WP2uvrA pKM101中和不具有代谢激活的菌株TA100中,高达250 μ g/孔的假尿苷没有致突变性。

[1389] 对于修饰在任何具有或不具有代谢激活的测试菌株中都未观察到N1-甲基假尿苷沉淀物。在任何具有或不具有代谢激活的菌株中都未观察到细胞毒性(降低背景菌苔和/或回复体数)。与载体对照相比,在任何具有或不具有代谢激活的菌株中均未观察到回复体菌落数有增加。在该microAmes筛选条件下,在具有或不具有代谢激活的菌株TA97a、TA98、TA100、TA1535和WP2uvrA pKM101中,高达250 μ g/孔的N1-甲基假尿苷没有致突变性。发现N1-甲基假尿苷的致突变性比假尿苷的小。

[1390] 在该microAMES测试中5甲基胞苷、假尿苷和N1-甲基假尿苷的比较揭示其通常无诱变性。然而,特别值得注意的是假尿苷和N1-甲基假尿苷间的差别,其中假尿苷确实在1个细菌菌株中表现出细胞毒性反应,而N1-甲基假尿苷没有。这类microAMES测试常规作为化合物安全的临床预评估的一部分,并突出了N1-甲基假尿苷和假尿苷之间的重要差别。

[1391] 实施例68.核苷三磷酸(NTP)的毒性

[1392] 单独的或与其它碱基组合的天然的和修饰的核苷三磷酸(NTP)的细胞毒性在缺少转染试剂的人胚胎肾293(HEK293)细胞中进行分析。以30,000个细胞每孔的密度将HEK293细胞接种于96孔板中,每孔还具有0.75 μ l的RNAiMAX™(Invitrogen,Carlsbad,CA),每孔的总的孔体积为100 μ l。10 μ l的表12所示的NTP与10 μ l的脂质稀释物组合,孵育30分钟,形成复合物,然后将80 μ l的HEK293细胞悬浮液加入到NTP复合物中。

[1393] 天然的和修饰的NTP以2.1nM、21nM、210nM、2.1 μ M、21 μ M、210 μ M或2.1mM的浓度进行转染。组合的NTP以8.4nM、84nM、840nM、8.4 μ M、84 μ M、840 μ M和8.4mM的NTP总浓度进行转染。作为对照,修饰的G-CSF mRNA(SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1;完全修饰的5-甲基胞嘧啶和假尿苷)以8.4nM的浓度转染HEK293细胞。在加入到HEK293细胞后4、24、48和72小时,使用购自Promega的CYTO TOX-GLO™分析(Madison,WI)NTP和修饰的G-CSF mRNA的细胞毒性,依制造商的规程进行(除了裂解细胞时使用移液器抽吸而不是摇动板)。

[1394] 表13和表14显示了对于测试的每个NTP、NTP组合和对照的活细胞百分比。与未处理细胞相比,未观察到单独的NTP的毒性。这些数据表明,当以有效剂量的1,000,000倍引入修饰的mRNA时,引入哺乳动物细胞的单独的NTP(包括5-甲基胞苷、假尿苷和N1-甲基假尿苷)也是没有毒性的。

[1395] 表13. 单独的NTP的细胞毒性

[1396]

单独的 NTP 的细胞毒性								
	时间	剂量						
		2.1 mM	210 uM	21 uM	2.1 uM	210 nM	21 nM	2.1 nM
腺嘌呤	4 hr	90.03	85.97	91.20	90.23	90.36	93.21	93.48
	24 hr	88.42	87.31	86.86	86.81	86.94	87.19	86.44
	48 hr	93.71	90.55	89.94	89.80	89.17	91.13	92.12
	72 hr	97.49	94.81	93.83	94.58	92.22	93.88	95.74

[1397]

胞嘧啶	4 hr	90.51	89.88	91.41	90.49	88.95	93.11	93.34
	24 hr	86.92	86.33	85.72	86.70	86.12	86.16	85.78
	48 hr	94.23	87.81	87.28	87.73	85.36	88.95	88.99
	72 hr	97.15	92.34	92.22	88.93	88.22	91.80	94.22
鸟嘌呤	4 hr	90.96	90.14	91.36	90.60	90.00	92.84	93.33
	24 hr	86.37	85.86	85.93	86.13	86.35	85.50	85.41
	48 hr	93.83	87.05	88.18	87.89	85.31	87.92	89.57
	72 hr	97.04	91.41	92.39	92.30	92.19	92.55	93.72
尿嘧啶	4 hr	90.97	89.60	91.95	90.90	91.05	92.90	93.15
	24 hr	87.68	86.48	85.89	86.75	86.52	87.23	87.63
	48 hr	94.39	88.98	89.11	89.44	88.33	88.89	91.28
	72 hr	96.82	93.45	93.63	94.60	94.50	94.53	95.51
假尿苷	4 hr	92.09	92.37	91.35	92.02	92.84	91.96	92.26
	24 hr	88.38	86.68	86.05	86.75	85.91	87.59	87.31
	48 hr	88.62	87.79	87.73	87.66	87.82	89.03	91.99
	72 hr	96.87	89.82	94.23	93.54	92.37	94.26	94.25
5-甲基胞嘧啶	4 hr	92.01	91.54	91.16	91.31	92.31	91.40	92.23
	24 hr	87.97	85.76	84.72	85.14	84.71	86.37	86.35
	48 hr	87.29	85.94	85.74	86.18	86.44	87.10	88.18
	72 hr	96.08	88.10	92.26	90.92	89.97	92.10	91.93
N1-甲基假尿苷	4 hr	92.45	91.43	91.48	90.41	92.15	91.44	91.89
	24 hr	88.92	86.48	85.17	85.72	85.89	86.85	87.79
	48 hr	89.84	86.02	87.52	85.85	87.38	86.72	87.81
	72 hr	96.80	93.03	93.83	92.25	92.40	92.84	92.98
未处理	4 hr	92.77	--	--	--	--	--	--
	24 hr	87.52	--	--	--	--	--	--
	48 hr	92.95	--	--	--	--	--	--
	72 hr	96.97	--	--	--	--	--	--

[1398] 表14. 组合的NTP的细胞毒性

[1399]

组合的 NTP 的细胞毒性								
	时间	剂量						
		8.4 mM	840 uM	84 uM	8.4 uM	840 nM	84 nM	8.4 nM
假尿苷/ 5-甲基胞嘧啶/ 腺嘌呤/鸟嘌呤	4 hr	92.27	92.04	91.47	90.86	90.87	91.10	91.50
	24 hr	88.51	86.90	86.43	88.15	88.46	86.28	87.51
	48 hr	88.30	87.36	88.58	88.13	87.39	88.72	90.55
	72 hr	96.53	94.42	94.31	94.53	94.38	94.36	93.65
N1- 甲基假尿苷/5-甲基胞嘧啶/ 腺嘌呤/鸟嘌呤	4 hr	92.31	91.71	91.36	91.15	91.30	90.86	91.38
	24 hr	88.19	87.07	86.46	87.70	88.13	85.30	87.21
	48 hr	87.17	86.53	87.51	85.85	84.69	87.73	86.79
	72 hr	96.40	94.88	94.40	93.65	94.82	92.72	93.10
G-CSF 修饰的 mRNA	4 hr	na	na	na	na	na	na	92.63
	24 hr	na	na	na	na	na	na	87.53
	48 hr	na	na	na	na	na	na	91.70
	72 hr	na	na	na	na	na	na	96.36

[1400] 实施例69.BJ成纤维细胞中的先天免疫应答研究

[1401] 人原代包皮成纤维细胞(BJ成纤维细胞)购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)(目录号#CRL-2522)并在37°C、5%CO₂下培养于补充有10%胎牛血清的Eagle氏最低必需培养基(ATCC,目录号#30-2003)中。BJ成纤维细胞以0.5ml培养基中的300000细胞每孔的密度接种于24孔板中。250ng的具有帽0、帽1或无帽的用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰(gen1)或用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基假尿苷完全修饰(gen2)的修饰的G-CSF mRNA(mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)使用Lipofectamine2000(Invitrogen,目录号#11668-019)、依制造商的规程进行转染。也转染对照样品polyI:C(PIC)、Lipofectamine2000(Lipo)、天然荧光素酶mRNA(mRNA示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)和天然G-CSF mRNA。18小时后收获细胞,分离总RNA,使用RNeasy微试剂盒(目录号#74004)依制造商的规程用DNASE®处理。100ng的总RNA用于cDNA合成,其使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(目录号#4368814),依制造商的规程进行。然后,通过实时定量PCR,使用SybrGreen在Biorad CFX384仪器上依制造商的规程分析用于表达先天免疫应答基因的cDNA。表15显示了先天免疫应答转录物相对于管家基因HPRT(次黄嘌呤磷酸核糖转移酶)的表达水平,并表达为相对于HPRT的诱导倍数(fold-induction)。表中,标准度量组包括:RIG-I是视黄酸可诱导的基因1、IL-

6是白介素-6、OAS-1是寡腺苷酸合成酶1、IFN β 是干扰素- β 、AIM2是在黑色素瘤-2中不存在、IFIT-1是具有三四氨基酸重复1的干扰素诱导的蛋白、PKR是蛋白激酶R、TNF α 是肿瘤坏死因子 α 和IFN α 是干扰素 α 。

[1402] 表15. 先天免疫应答转录物水平

[1403]

成分	RIG-I	IL6	OAS-1	IFN β	AIM2	IFIT-1	PKR	TNF α	IFN α
天然的荧光素酶	71.5	20.6	20.778	11.404	0.251	151.218	16.001	0.526	0.067
天然的G-CSF	73.3	47.1	19.359	13.615	0.264	142.011	11.667	1.185	0.153
PIC	30.0	2.8	8.628	1.523	0.100	71.914	10.326	0.264	0.063
G-CSF Gen1-UC	0.81	0.22	0.080	0.009	0.008	2.220	1.592	0.090	0.027
G-CSF Gen1-帽0	0.54	0.26	0.042	0.005	0.008	1.314	1.568	0.088	0.038
G-CSF Gen1-帽1	0.58	0.30	0.035	0.007	0.006	1.510	1.371	0.090	0.040
G-CSF Gen2-UC	0.21	0.20	0.002	0.007	0.007	0.603	0.969	0.129	0.005
G-CSF Gen2-帽0	0.23	0.21	0.002	0.0014	0.007	0.648	1.547	0.121	0.035
G-CSF Gen2-帽1	0.27	0.26	0.011	0.004	0.005	0.678	1.557	0.099	0.037

[1404]

Lipo	0.27	0.53	0.001	0	0.007	0.954	1.536	0.158	0.064
------	------	------	-------	---	-------	-------	-------	-------	-------

[1405] 实施例70. 先天免疫应答的体内检测

[1406] 为了区分mRNA的不同化学修饰对体内蛋白生产和体内细胞因子反应的重要性, 雌性BALB/C小鼠 (n=5) 肌肉内注射具有帽1的5'帽的G-CSF mRNA (未修饰的GCSF mRNA) (mRNA序列示于SEQ ID NO:1; 约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中)、用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA (GCSF mRNA5mc/pU)、具有5'帽 (GCSF mRNA5mc/N1pU) 或没有5'帽 (GCSF mRNA5mc/N1pU无帽) 的用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA或

对照R848或5%蔗糖,如表16所述。

[1407] 表16.剂量表

[1408]

成分	途径	剂量 (ug/小鼠)	剂量 (ul)
未修饰的 GCSF mRNA	I.M.	200	50
GCSF mRNA 5mc/pU	I.M.	200	50
GCSF mRNA 5mc/N1pU	I.M.	200	50
GCSF mRNA 5mc/N1pU 无帽	I.M.	200	50
R848	I.M.	75	50
5%蔗糖	I.M.	-	50
未处理	I.M.	-	-

[1409] 给药后8小时收集血液。提供使用ELISA,用ELISA测定了G-CSF、TNF- α 和IFN- α 的蛋白水平。给药后8小时,从注射部位收集肌肉并使用实时定量聚合酶链式反应(QPCR)来确定肌肉内的RIG-I、PKR、AIM-2、IFIT-1、OAS-2、MDA-5、IFN- β 、TNF- α 、IL-6、G-CSF、CD45的mRNA水平。

[1410] 实施例71.先天免疫应答研究的体内检测

[1411] 雌性BALB/C小鼠(n=5)肌肉内注射具有帽1的5'帽的G-CSF mRNA(未修饰的GCSF mRNA)(mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中)、用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA(GCSF mRNA5mc/pU)、具有5'帽(GCSF mRNA5mc/N1pU)或没有5'帽(GCSF mRNA5mc/N1pU无帽)的用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA或对照R848或5%蔗糖,如表17所述。给药后8小时收集血液。通过使用ELISA,利用ELISA测定了G-CSF和干扰素- α (IFN- α)的蛋白水平并示于表17。

[1412] 如表17所示,未修饰的、5mc/pU和5mc/N1pU修饰的G-CSF mRNA导致在小鼠血清中人类G-CSF的表达。无帽的5mC/N1pU修饰的G-CSF mRNA在血清中没有显示出人类G-CSF的表达,突出了具有5'帽结构对于蛋白翻译的重要性。

[1413] 正如所预期的,仅在R848、5%蔗糖和未处理组中没有人类G-CSF蛋白的表达。重要的是,通过测量血清中小鼠的IFN- α ,发现细胞因子生产有显著的差异。正如所预期的,未修饰的G-CSF mRNA证实了体内的强烈的细胞因子反应(大于R848阳性对照)。5mc/pU修饰的G-CSF mRNA确实显示了在体内的低但可检测到的细胞因子反应,而5mc/N1pU修饰的mRNA没有显示在血清中的可检测到的IFN- α (并且与载体或未经处理的动物相同)。

[1414] 此外,5mc/N1pU修饰的mRNA的反应是一样的,无论其是否加帽。这些体内结果强化

了如下结论:1) 未修饰的mRNA产生了强烈的先天免疫响应;2) 通过5mc/pU修饰的100%掺入,其得以减少但并未消除;和3) 5mc/N1pU修饰的掺入导致无法检测到的细胞因子反应。

[1415] 最后,考虑到这些注射是在5%蔗糖(其本身没有影响)中,这些结果应该准确反映了这些修饰的免疫刺激潜力。

[1416] 由数据明显看出,N1pU修饰的分子产生了更多的蛋白,而同时很少或没有影响IFN- α 的表达。也很明显的是,对于此化学修饰,也需要加帽以用于蛋白产生。与未修饰的mRNA的PC比率(PC=9)相比较,748的蛋白:细胞因子比率意味着此化学修饰对于与IFN- α 相关的作用或生物影响是很优秀的。

[1417] 表17. 血清中的人类G-CSF和小鼠IFN- α

[1418]

成分	途径	剂量 (ug/小鼠)	剂量 (ul)	G-CSF 蛋白 (pg/ml)	IFN- α 的表达 (pg/ml)	PC 比率
未修饰的 GCSF mRNA	I.M.	200	50	605.6	67.01	9
GCSF mRNA 5mc/pU	I.M.	200	50	356.5	8.87	40

[1419]

GCSF mRNA5mc/N1pU	I.M.	200	50	748.1	0	748
GCSF mRNA5mc/N1pU 无帽	I.M.	200	50	6.5	0	6.5
R848	I.M.	75	50	3.4	40.97	.08
5%蔗糖	I.M.	-	50	0	1.49	0
未处理	I.M.	-	-	0	0	0

[1420] 实施例72:使用Lipoplex的体内递送

[1421] A. 人类G-CSF修饰的RNA

[1422] 包含与按体积计30%的RNAIMAXTM形成脂复合物的100 μ g的修饰的人G-CSF mRNA的两个版本中的一个(mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)(用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF(G-CSF)或用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基-假尿苷完全修饰的G-CSF(G-CSF-N1)的制剂经肌内(I.M.)递送150 μ l和经静脉(I.V.)递送225 μ l到C57/BL6小鼠中。

[1423] 3个对照组肌内施以100 μ g的修饰的荧光素酶mRNA(IVT cDNA序列示于SEQ ID NO:2;mRNA序列示于SEQ ID NO:3,约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中,5'帽,帽1,用5-甲基胞嘧啶完全修饰每个胞嘧啶,用假尿苷取代每个尿苷位点)(Luc-unsp I.M.)或静脉内施以150 μ g的修饰的荧光素酶mRNA(Luc-unsp I.V.)或肌内施以150 μ l的制剂缓冲液(缓冲液I.M.)。施用制剂6小时后收集血清,以通过人G-CSF ELISA测定小鼠血清中的人G-CSF蛋白的量,结果示于表18。

[1424] 这些结果表明,当以脂复合物制剂形式通过I.V.或I.M.给药途径递送时,5-甲基胞嘧啶/假尿苷和5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷修饰的人G-CSF mRNA都可导致血清中特异性的人G-CSF蛋白的表达。

[1425] 表18.血清中的人G-CSF (I.M.和I.V.注射途径)

[1426]

成分	途径	G-CSF (pg/ml)
G-CSF	I.M.	85.6
G-CSF-N1	I.M.	40.1
G-CSF	I.V.	31.0
G-CSF-N1	I.V.	6.1

[1427]

Luc-unsp	I.M.	0.0
Luc-unsp	I.V.	0.0
缓冲液	I.M.	0.0

[1428] B. 人G-CSF修饰的RNA的比较

[1429] 包含与按体积计30%的RNAIMAX™形成脂复合物的100μg的具有5-甲基胞嘧啶(5mc)和假尿苷(ψ)修饰的修饰的人G-CSF mRNA (G-CSF-Gen1-脂复合物)、盐水中的具有5mc和ψ修饰的修饰的人G-CSF mRNA (G-CSF-Gen1-盐水)、与按体积计30%的RNAIMAX™形成脂复合物的具有N1-5-甲基胞嘧啶(N1-5mc)和ψ修饰的修饰的人G-CSF mRNA (G-CSF-Gen2-脂复合物)、盐水中的具有N1-5mc和ψ修饰的修饰的人G-CSF mRNA (G-CSF-Gen2-盐水)、与按体积计30%的RNAIMAX™形成脂复合物的具有5mc和ψ修饰的修饰的荧光素酶(Luc-脂复合物)或盐水中的具有5mc和ψ完全修饰的荧光素酶mRNA (Luc-盐水)的制剂,经肌肉(I.M.)或皮下(S.C.)进行递送,用于每种施用方法的对照组为以80μl剂量给予C57/BL6小鼠的制剂缓冲液(F.缓冲液)。注射13小时后,收集每个小鼠的注射部位的血清和组织,并通过G-CSF ELISA进行分析,以比较人G-CSF蛋白水平。经肌肉给药和皮下给药的小鼠血清中的人类G-CSF蛋白的结果示于表19。

[1430] 这些结果表明,当经由I.M.或S.C.给药途径进行递送时,无论是在盐水制剂中或在脂复合物制剂中,5-甲基胞嘧啶/假尿苷和5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷修饰的人G-CSF mRNA均可导致血清中的特异性人G-CSF蛋白的表达。如表19所示,相对于5-甲基胞嘧啶/假尿苷修饰的人G-CSF mRNA,5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷修饰的人G-CSF mRNA通常表现出增加的G-CSF蛋白生产。

[1431] 表19.小鼠血清中的人类G-CSF蛋白

成分	G-CSF (pg/ml)	
	I.M.注射途径	S.C.注射途径
[1432] G-CSF-Gen1-脂复合物	13.988	42.855
GCSF-Gen1-盐水	9.375	4.614
GCSF-Gen2-脂复合物	75.572	32.107
GCSF-Gen2-盐水	20.190	45.024

[1433] Luc 脂复合物	0	3.754
Luc 盐水	0.0748	0
F.缓冲液	4.977	2.156

[1434] 实施例73. 多位点给药: 肌内和皮下

[1435] 以Gen1或Gen2 (5-甲基胞嘧啶 (5mc) 和假尿苷 (ψ) 修饰, G-CSF-Gen1; 或N1-5-甲基胞嘧啶 (N1-5mc) 和 ψ 修饰, G-CSF-Gen2) 修饰并在盐水中进行配制的人G-CSF修饰的mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1; 约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中; 5'帽, 帽1), 经肌内 (IM) 或皮下 (SC) 注射递送到小鼠中。每天注射4剂量或2x50ug (两个位点), 注射3天 (间隔24小时)。收集血液和CBC分析之前6小时施用第4个剂量。对照包括荧光素酶 (IVT的cDNA序列示于SEQ ID NO:2; mRNA序列示于SEQ ID NO:3; 约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中, 5'帽, 帽1, 用5-甲基胞嘧啶完全修饰每个胞嘧啶, 用假尿苷取代每个尿苷位点) 或制剂缓冲液 (F. 缓冲液)。将小鼠于第一个mRNA注射后72小时放血 (最后一个mRNA剂量后6小时), 以测定mRNA编码的人G-CSF对于中性粒细胞计数的效果。给药方案示于表20, 其是中性粒细胞计数的结果 (千/ μ L)。表20中, 星号 (*) 表示统计学显著性为 $p < 0.05$ 。对于肌内给药, 数据揭示了第3天时Gen1G-CSF mRNA的中性粒细胞计数高于对照4倍, Gen2G-CSF mRNA高于对照2倍。对于皮下给药, 数据揭示了第3天时Gen2G-CSF mRNA的中性粒细胞计数高于对照2倍。

[1436] 这些数据表明, 5-甲基胞苷/假尿苷和5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷-修饰的mRNA都可以具有生物活性, 如由血液中性粒细胞计数的特异性增加所证明的。

[1437] 表20. 给药方案

[1438]

Gr	处理	途径	N=	剂量 ($\mu\text{g}/\text{小鼠}$)	剂量体 积 ($\mu\text{l}/$ 小鼠)	剂量载体	中性 粒细 胞 千 / μL
1	G-CSF (Gen1)	I.M	5	2x50ug (4个剂量)	50	F. 缓冲液	840*
2	G-CSF	S.C	5	2x50ug (4个剂量)	50	F. 缓冲液	430

[1439]

	(Gen1)						
3	G-CSF (Gen2)	I.M	5	2x50ug (4个剂量)	50	F. 缓冲液	746*
4	G-CSF (Gen2)	S.C	5	2x50ug (4个剂量)	50	F. 缓冲液	683
5	Luc (Gen1)	I.M.	5	2x50ug (4个剂量)	50	F. 缓冲液	201
6	Luc (Gen1)	S.C.	5	2x50ug (4个剂量)	50	F. 缓冲液	307
7	Luc (Gen2)	I.M	5	2x50ug (4个剂量)	50	F. 缓冲液	336
8	Luc (Gen2)	S.C	5	2x50ug (4个剂量)	50	F. 缓冲液	357
9	F. 缓冲液	I.M	4	0 (4个剂量)	50	F. 缓冲液	245
10	F. 缓冲液	S.C.	4	0 (4个剂量)	50	F. 缓冲液	509
11	未处理	-	4			-	312

[1440] 实施例74. 静脉给药

[1441] 用5-甲基胞嘧啶 (5mc) 和假尿苷 (ψ) 修饰的 (Gen1) 或未修饰的并配制到10%脂复合物 (RNAIMAX™) 中的人G-CSF修饰的mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1; 约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中; 5'帽, 帽1) 经静脉内 (IV) 注射在0、2和4天以50 μg RNA剂量和100 μl 体积的方式递送到小鼠中。在1、5和8天测量中性粒细胞。对照包括非特异性哺乳动物RNA或仅制剂缓冲液 (F. 缓冲液)。在1、5和8天将小鼠放血, 以确定mRNA编码的人G-CSF对增加中性粒细胞计数的影响。给药方案示于表21, 其是中性粒细胞计数的结果 (千/ μL ; K/ μL)。

[1442] 对于静脉内给药, 数据揭示了第5天时G-CSF修饰的mRNA的中性粒细胞计数高于对照4至5倍的增加, 而对于未修饰的G-CSF mRNA或非特异性对照则没有。在最后一次注射后4天, 血球计数回到基准值。没有观察到白细胞种群中的其它变化。

[1443] 表21中,星号(*)表示与缓冲液相比,统计学显著性为 $p < 0.001$ 。

[1444] 这些数据表明,如通过血液中中性粒细胞计数的特异性增加所证明的,当经由I.V.给药途径递送时,脂复合物配制的5-甲基胞苷/假尿苷-修饰的mRNA可以具有生物活性。没有其它的细胞亚群被显著改变。相似给药的未修饰的G-CSF mRNA没有显示对中性粒细胞计数的药理作用。

[1445] 表21.给药方案

[1446]

Gr.	处理	N	剂量体积 (μ l/小鼠)	剂量载体	中性粒细胞 K/uL
1	G-CSF (Gen1) 1天	5	100	10% 脂复合物	2.91
2	G-CSF (Gen1) 5天	5	100	10% 脂复合物	5.32*
3	G-CSF (Gen1) 8天	5	100	10% 脂复合物	2.06
4	G-CSF (未修饰) 1天	5	100	10% 脂复合物	1.88
5	G-CSF (未修饰) 5天	5	100	10% 脂复合物	1.95
6	G-CSF (未修饰) 8天	5	100	10% 脂复合物	2.09
7	RNA 对照 1天	5	100	10% 脂复合物	2.90
8	RNA 对照 5天	5	100	10% 脂复合物	1.68
9	RNA 对照 8天	4	100	10% 脂复合物	1.72
10	F. 缓冲液 1天	4	100	10% 脂复合物	2.51
11	F. 缓冲液 5天	4	100	10% 脂复合物	1.31
12	F. 缓冲液 8天	4	100	10% 脂复合物	1.92

[1447] 实施例75:给药途径

[1448] 使用不同给药途径研究分次剂量。设计了在一个时间点利用多个皮下或肌肉内注射位点的研究,并用于研究增加修饰的mRNA药物暴露和提高蛋白生产的途径。除了检测所表达的蛋白产物,蛋白的生理功能评估也通过分析来自测试动物的样品来确定。

[1449] 令人惊奇的是,已确定,与单次单位剂量或多剂量方案相比,分次剂量的修饰的mRNA产生更多的蛋白生产和表型反应。

[1450] 分次剂量实验的设计包括使用在缓冲液中单独施用的或配制于30%脂复合物(RNAIMAX™)的人促红细胞生成素(EPO)修饰的mRNA(mRNA序列示于SEQ ID NO:5;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)或荧光素酶修饰的mRNA(mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)。剂量载体(缓冲液)由150mM NaCl、2mM CaCl₂、2mM Na⁺-磷酸(1.4mM磷酸二氢钠;0.6mM磷酸氢二钠)和0.5mM EDTA组成,pH6.5。使用氢氧化钠调节pH值,最终的溶液过滤除菌。5甲基C(5meC)修饰mRNA的每个胞嘧啶且假尿苷取代每个尿苷位点。

[1451] 每组的4只小鼠按表22列出的剂量表进行肌内(I.M.)、静脉内(I.V.)或皮下(S.C.)给药。注射13小时后,从所有小鼠中收集血清,从肌内和皮下组的注射位点收集组织,并从静脉内组收集脾、肝和肾脏。从肌内组和皮下组得出的结果示于表23。

[1452] 表22. 剂量表

[1453]

组	处理	途径	修饰的 mRNA 的剂量	总剂量	剂量载体
1	脂复合物-人 EPO 修饰的 mRNA	I.M.	4 x 100 ug + 30% 脂复合物	4x70 ul	脂复合物
2	脂复合物-人 EPO 修饰的 mRNA	I.M.	4 x 100 ug	4x70 ul	缓冲液
3	脂复合物-人 EPO 修饰的 mRNA	S.C.	4 x 100 ug + 30% 脂复合物	4x70 ul	脂复合物
4	脂复合物-人 EPO 修饰的 mRNA	S.C.	4 x 100 ug	4x70 ul	缓冲液
5	脂复合物-人 EPO 修饰的 mRNA	I.V.	200 ug + 30% 脂复合物	140 ul	脂复合物
6	脂复合物的-荧光素酶修饰的 mRNA	I.M.	100 ug + 30% 脂复合物	4x70 ul	脂复合物
7	脂复合物的-荧光素酶修饰的 mRNA	I.M.	100 ug	4x70 ul	缓冲液
8	脂复合物的-荧光素酶修饰的 mRNA	S.C.	100 ug + 30% 脂复合物	4x70 ul	脂复合物
9	脂复合物的-荧光素酶修饰的 mRNA	S.C.	100 ug	4x70 ul	缓冲液
10	脂复合物的-人 EPO 修饰的 mRNA	I.V.	200 ug + 30% 脂复合物	140 ul	脂复合物
11	制剂缓冲液	I.M.	4x 多剂量	4x70 ul	缓冲液

[1454] 表23. 小鼠血清中的人EPO蛋白(I.M.注射途径)

成分	EPO (pg/ml)	
	I.M.注射途径	S.C.注射途径
Epo-脂复合物	67.1	2.2
[1455] Luc-脂复合物	0	0
Epo-盐水	100.9	11.4
Luc-盐水	0	0
制剂缓冲液	0	0

[1456] 实施例76:使用不同脂质比率的体内递送

[1457] 修饰的mRNA递送到C57/BL6小鼠,以评估不同的脂质比率和由此产生的蛋白表达。100 μ g修饰的人EPO mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:5;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)与10%、30%或50%的RNAiMAX™形成脂复合物的制剂、100 μ g修饰的荧光素酶mRNA (IVT cDNA序列示于SEQ ID NO:2;mRNA序列示于SEQ ID NO:3,约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中,5'帽,帽1,5-甲基胞嘧啶完全修饰每个胞嘧啶且假尿苷替代每个尿苷位点)与10%、30%或50%的RNAiMAX™形成复合物的制剂或制剂缓冲液以单个70 μ l的剂量经肌肉施用于小鼠。注射13小时后收集血清进行人EPO ELISA,以测定每只小鼠中人EPO的蛋白水平。示于表24的人EPO ELISA的结果表明,对于每个不同百分比的RNAiMAX™,表达于肌肉内的修饰的人EPO均分泌到血清中。

[1458] 表24. 小鼠血清中的人EPO蛋白 (IM注射途径)

[1459]

成分	EPO (pg/ml)
Epo+10%RNAiMAX	11.4
Luc+10%RNAiMAX	0
Epo+30%RNAiMAX	27.1
Luc+30%RNAiMAX	0
Epo+50%RNAiMAX	19.7
Luc+50%RNAiMAX	0
F. 缓冲液	0

[1460] 实施例77:大鼠中修饰的RNA的体内递送

[1461] 修饰的mRNA的蛋白生产通过递送修饰的G-CSF mRNA或修饰的因子IX mRNA到雌性Sprague Dawley大鼠进行评估 (n=6)。大鼠注射了400 μ g (100 μ l中)的用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1) (G-CSF Gen1)、用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA (G-CSF Gen2) 或从5%蔗糖冻干形式中重建的用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的因子IX mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:6;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1) (因子IX Gen1)。注射后8小时收集血液,用ELISA测定血清中的G-CSF蛋白水平。表25示出了8小时后血清中的G-CSF蛋白水平。

[1462] 这些结果表明,G-CSF Gen1和G-CSF Gen2修饰的mRNA都在单次肌内注射后在大鼠中产生人G-CSF蛋白,并且当使用Gen2化学组成时,人G-CSF蛋白生产比Gen1化学组成更高。

[1463] 表25.大鼠血清中的G-CSF蛋白(I.M.注射途径)

[1464]

成分	G-CSF蛋白 (pg/ml)
G-CSF Gen1	19.37
G-CSF Gen2	64.72
因子IX Gen1	2.25

[1465] 实施例78.化学修饰:体外研究

[1466] A.PBMC中的体外筛选

[1467] 500ng用列于表26和表27的化学修饰完全修饰的G-CSF mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)用0.4 μ l Lipofectamine2000转染到来自3个正常血液供体的外周血单核细胞(PBMC)中。也分析了对照样品LPS、R848、P(I)P(C)和mCherry (mRNA序列示于SEQ ID NO:4;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中,5'帽,帽1;用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰)。收获上清液并冷冻贮存直至通过ELISA分析确定G-CSF蛋白的表达和细胞因子干扰素- α (IFN- α)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的诱导。G-CSF的蛋白表达示于表26,IFN- α 和TNF- α 的表达示于表27。

[1468] 表26中的数据证明,许多但不是全部的化学修饰可以用于在PBMC中有成果地产生人G-CSF。值得注意的是,100%的N1-甲基假尿苷取代证明了最高水平的人G-CSF生产(几乎高于假尿苷自身10倍)。当N1-甲基假尿苷与5-甲基胞苷组合使用时也产生了高水平的人G-CSF蛋白(这也比当假尿苷与5甲基胞苷组合时更高)。

[1469] 考虑到PBMC中蛋白生产和细胞因子生产之间呈反比关系,在表27中也可看到相似的趋势,其中N1-甲基假尿苷的100%取代未导致细胞因子诱导(类似于仅转染对照),而假尿苷显示了可检测到的细胞因子的诱导,其在背景之上。

[1470] 其它的修饰如N6-甲基腺苷和 α -硫代胞苷也增加了细胞因子刺激。

[1471] 表26.化学修饰和G-CSF蛋白表达

[1472]

化学修饰	G-CSF 蛋白表达 (pg/ml)		
	供体 1	供体 2	供体 3
假尿苷	2477	1,909	1,498
5-甲基尿苷	318	359	345
N1-甲基假尿苷	21,495	16,550	12,441
2-硫代尿苷	932	1,000	600
4-硫代尿苷	5	391	218
5-甲氧基尿苷	2,964	1,832	1,800
5-甲基胞嘧啶和假尿苷 (1 st 组)	2,632	1,955	1,373
5-甲基胞嘧啶和 N1-甲基假尿苷 (1 st 组)	10,232	7,245	6,214
2'氟代鸟苷	59	186	177
2'氟代尿苷	118	209	191
5-甲基胞嘧啶和假尿苷 (2 nd 组)	1,682	1,382	1,036
5-甲基胞嘧啶和 N1-甲基假尿苷 (2 nd 组)	9,564	8,509	7,141
5-溴代尿苷	314	482	291
5-(2-甲酯基乙烯基)尿苷	77	286	177
5-[3(1-E-丙烯基氨基)尿苷	541	491	550
α -硫代胞苷	105	264	245
5-甲基胞嘧啶和假尿苷 (3 rd 组)	1,595	1,432	955
N1-甲基腺苷	182	177	191

[1473]

N6-甲基腺苷	100	168	200
5-甲基胞苷	291	277	359
N4-乙酰基胞苷	50	136	36
5-甲酰基胞苷	18	205	23
5-甲基胞嘧啶和假尿苷 (4 th 组)	264	350	182
5-甲基胞嘧啶和 N1-甲基假尿苷 (4 th 组)	9,505	6,927	5,405
LPS	1,209	786	636
mCherry	5	168	164
R848	709	732	636
P(I)P(C)	5	186	182

[1474] 表27. 化学修饰和细胞因子表达

[1475]

化学修饰	IFN- α 表达 (pg/ml)			TNF- α 表达 (pg/ml)		
	供体 1	供体 2	供体 3	供体 1	供体 2	供体 3
假尿苷	120	77	171	36	81	126
5-甲基尿苷	245	135	334	94	100	157
N1-甲基假尿苷	26	75	138	101	106	134
2-硫代尿苷	100	108	154	133	133	141
4-硫代尿苷	463	258	659	169	126	254
5-甲氧基尿苷	0	64	133	39	74	111
5-甲基胞嘧啶和假尿苷 (1 st 组)	88	94	148	64	89	121
5-甲基胞嘧啶和 N1-甲 基假尿苷 (1 st 组)	0	60	136	54	79	126
2'氟代鸟苷	107	97	194	91	94	141
2'氟代尿苷	158	103	178	164	121	156
5-甲基胞嘧啶和假尿苷 (2 nd 组)	133	92	167	99	111	150
5-甲基胞嘧啶和 N1-甲	0	66	140	54	97	149

[1476]

基假尿苷 (2 nd 组)						
5-溴代尿苷	95	86	181	87	106	157
5-(2-甲酯基乙烯基)尿苷	0	61	130	40	81	116
5-[3(1-E-丙烯基氨基)尿苷	0	58	132	71	90	119
α -硫代胞苷	1,138	565	695	300	273	277
5-甲基胞嘧啶和假尿苷 (3 rd 组)	88	75	150	84	89	130
N1-甲基腺苷	322	255	377	256	157	294
N6-甲基腺苷	1,935	1,065	1,492	1,080	630	857
5-甲基胞苷	643	359	529	176	136	193
N4-乙酰基胞苷	789	593	431	263	67	207
5-甲酰基胞苷	180	93	88	136	30	40
5-甲基胞嘧啶和假尿苷 (4 th 组)	131	28	18	53	24	29
5-甲基胞嘧啶和 N1-甲基假尿苷 (4 th 组)	0	0	0	36	14	13
LPS	0	67	146	7,004	3,974	4,020
mCherry	100	75	143	67	100	133
R848	674	619	562	11,179	8,546	9,907
P(I)P(C)	470	117	362	249	177	197

[1477] B.HeLa细胞中的体外筛选

[1478] 转染前一天,20000个HeLa细胞(ATCC号CCL-2;Manassas,VA)通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies,Grand Island,NY)处理来收获,并以每孔总体积为100ul的EMEM培养基(补充有10%的FCS和1×Glutamax)接种在96孔细胞培养板(Corning,Manassas,VA)中。细胞于37℃、5%CO₂氛围下生长过夜。第二天,83ng具有表28所述的化学修饰的修饰的荧光素酶RNA(mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)稀释于终体积为10ul的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。Lipofectamine2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)用作转染试剂并且

0.2ul被稀释于终体积为10ul的OPTI-MEM中。室温孵育5分钟后,合并两种溶液并在室温孵育额外的15分钟。然后将20ul合并的溶液加入到含有HeLa细胞的100ul细胞培养基中并在室温下孵育。

[1479] 孵育18至22小时后,将表达荧光素酶的细胞用100ul Passive Lysis 缓冲液 (Promega, Madison, WI) 依制造商的说明书进行裂解。将等份的裂解物转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔板 (Corning, Manassas, VA) 中并与100ul 完全荧光素酶分析溶液 (Promega, Madison, WI) 合并。调整或稀释裂解物体积,直到对于产生最强信号的样品,检测到不超过2mio的每孔相对光单位 (RLU), 每个测试的化学组成的RLU示于表28。读板器是BioTek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT)。无试剂的板的背景信号为约200的每孔相对光单位。

[1480] 这些结果证明,许多但不是全部的化学修饰可用于有成果地在HeLa细胞中生产人G-CSF。值得注意的是,100%的N1-甲基假尿苷取代证明了最高水平的人G-CSF生产。

[1481] 表28. 荧光素酶的相对光单位

[1482]

化学修饰	RLU
N6-甲基腺苷 (m6a)	534
5-甲基胞苷 (m5c)	138,428
N4-乙酰基胞苷 (ac4c)	235,412
5-甲酰基胞苷 (f5c)	436
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试A1	48,659
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 测试A1	190,924
假尿苷	655,632
1-甲基假尿苷 (m1u)	1,517,998
2-硫代尿苷 (s2u)	3387
5-甲氧基尿苷 (mo5u)	253,719
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试B1	317,744
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 测试B1	265,871

[1483]

5-溴代尿苷	43,276
5(2碳乙烯基)尿苷	531
5(3-1E丙烯基氨基)尿苷	446
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试A2	295,824
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 测试A2	233,921
5-甲基尿苷	50,932
α -硫代胞苷	26,358
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试B2	481,477
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 测试B2	271,989
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试A3	438,831
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 测试A3	277,499
未修饰的荧光素酶	234,802

[1484] C.兔网织红细胞裂解液中的体外筛选

[1485] 荧光素酶mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)用列于表29的化学修饰进行修饰并稀释于无菌无核酸酶的水中,至10ul中250ng的最终量。将稀释的荧光素酶加入到40ul新鲜制备的兔网织红细胞裂解物中并在标准的1.5mL聚丙烯反应管(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)中于30℃、干燥的加热块上完成体外翻译反应。翻译分析用Rabbit Reticulocyte Lysate(核酸酶处理的)试剂盒(Promega,Madison,WI)依制造商的说明书完成。反应缓冲液补充有去除亮氨酸或甲硫氨酸的所提供的氨基酸储液的1对1混合物,产生含有允许有效体外翻译的足够量的两种氨基酸的反应混合物。

[1486] 孵育60分钟之后,通过将反应管置于冰上来停止反应。等份的含有修饰的荧光素酶RNA的体外翻译反应转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔板中(Corning,Manassas,VA)并与100ul完全荧光素酶分析溶液(Promega,Madison,WI)合并。调整或稀释体外翻译反应的体积,直到对于产生最强信号的样品,检测到不超过2mio的每孔相对光单位(RLU),每个测试的化学组成的RLU示于表29。读板器是BioTek Synergy H1(BioTek,Winooski,VT)。无试剂的板的背景信号为约200的每孔相对光单位。

[1487] 这些无细胞翻译结果与在HeLa中的蛋白生产结果非常好地关联,相同的修饰通常在两套系统中工作或不工作。一个值得注意的例外是,5-甲酰基胞苷修饰的荧光素酶mRNA在无细胞翻译系统中工作,而在基于HeLa细胞的转染系统中不工作。两个分析之间类似的差异也出现在5-甲酰基胞苷修饰的G-CSF mRNA中。

[1488] 表29. 荧光素酶的相对光单位

[1489]

化学修饰	RLU
N6-甲基腺苷(m6a)	398
5-甲基胞苷(m5c)	152,989
N4-乙酰基胞苷(ac4c)	60,879
5-甲酰基胞苷(f5c)	55,208
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试A1	349,398
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷,测试A1	205,465
假尿苷	587,795
1-甲基假尿苷(m1u)	589,758
2-硫代尿苷(s2u)	708
5-甲氧基尿苷(mo5u)	288,647
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试B1	454,662
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷,测试B1	223,732
5-溴代尿苷	221,879
5(2碳乙烯基)尿苷	225
5(3-1E丙烯基氨基)尿苷	211
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试A2	558,779
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷,测试A2	333,082

5-甲基尿苷	214,680
α -硫代胞苷	123,878
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试B2	487,805
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷,测试B2	154,096
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试A3	413,535
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷,测试A3	292,954
未修饰的荧光素酶	225,986

[1490] 实施例79.化学修饰:体内研究

[1491] A. 修饰的G-CSF mRNA的体内筛选

[1492] 将Balb-C小鼠 (n=4) 的每条腿都肌肉内注射由列于表30的化学修饰完全修饰并在1×PBS中配制的修饰的G-CSF mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)。也测试对照修饰的荧光素酶mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1;由假尿苷和5-甲基胞嘧啶完全修饰) 和对照PBS。8小时后收集血清,通过ELISA来测定G-CSF蛋白水平细胞因子水平。

[1493] 表30.G-CSF

[1494]

mRNA	化学修饰
G-CSF	假尿苷
G-CSF	5-甲基尿苷
G-CSF	2-硫代尿苷
G-CSF	4-硫代尿苷
G-CSF	5-甲氧基尿苷
G-CSF	2'-氟代尿苷
G-CSF	5-溴代尿苷
G-CSF	5-[3(1-E-丙烯基氨基)尿苷]
G-CSF	α -硫代胞苷
G-CSF	5-甲基胞苷
G-CSF	N4-乙酰基胞苷
G-CSF	假尿苷和5-甲基胞嘧啶
G-CSF	N1-甲基假尿苷和5-甲基胞嘧啶
荧光素酶	假尿苷和5-甲基胞嘧啶
PBS	无

[1495] B. 修饰的荧光素酶mRNA的体内筛选

[1496] 将Balb-C小鼠 (n=4) 皮下注射200ul含有由列于表31的化学修饰完全修饰并于1×PBS中配制的42至103 μ g修饰的荧光素酶mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)。也测试对照PBS。修饰的荧光素酶mRNA的剂量也列于表31中。给药8小时后将小鼠成像,以测定荧光素酶的表达。成像之前20分钟时,小鼠按150mg/kg腹腔内注射D-荧光素溶液。然后,将动物麻醉,并用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)获得图像。所测量的生物发光为整个小鼠的总通量(光子/秒)。

[1497] 如表31所证实的,所有的荧光素酶mRNA修饰的化学组成均表现出体内活性,除了2'-氟代尿苷。另外,1-甲基假尿苷修饰的mRNA表现出非常高的荧光素酶表达(比包含假尿苷的mRNA的表达高5倍)。

[1498] 表31. 荧光素酶筛选

[1499]

mRNA	化学修饰	mRNA 剂量(ug)	剂量体积(ml)	荧光素酶表达(光子/秒)
荧光素酶	5-甲基胞苷	83	0.72	1.94E+07
荧光素酶	N4-乙酰基胞苷	76	0.72	1.11E07
荧光素酶	假尿苷	95	1.20	1.36E+07
荧光素酶	1-甲基假尿苷	103	0.72	7.40E+07
荧光素酶	5-甲氧基尿苷	95	1.22	3.32+07
荧光素酶	5-甲基尿苷	94	0.86	7.42E+06
荧光素酶	5-溴代尿苷	89	1.49	3.75E+07
荧光素酶	2'-氟代鸟苷	42	0.72	5.88E+05
荧光素酶	2'-氟代胞苷	47	0.72	4.21E+05
荧光素酶	2'-氟代尿苷	59	0.72	3.47E+05
PBS	无	-	0.72	3.16E+05

[1500] 实施例80. 组合的荧光素酶修饰的mRNA的体内筛选

[1501] 将Ba1b-C小鼠(n=4)皮下注射200ul的100μg的由列于表32的化学修饰完全修饰并在1×PBS中配制的修饰的荧光素酶mRNA(mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)。也测试对照PBS。修饰的荧光素酶mRNA的剂量也列于表29。给药8小时后将小鼠成像,以测定荧光素酶的表达。成像之前20分钟时,小鼠按150mg/kg腹膜内注射D-荧光素溶液。然后,将动物麻醉,并用IVIS Lumina II成像系统(Perkin Elmer)获得图像。所测量的生物发光为整个小鼠的总通量(光子/秒)。

[1502] 如表32所证实的,所有的荧光素酶mRNA修饰的化学组成(组合的)都表现出体内活性。另外,修饰的mRNA(具有N4-乙酰基胞苷或5甲基胞苷)中存在N1-甲基假尿苷比与使用假尿苷进行测试的相同组合表现出更高的表达。总之,这些数据证明,含有N1-甲基假尿苷的荧光素酶mRNA提高了体内的蛋白表达,无论是单独使用(表31)还是与其它修饰的核苷酸组合使用(表32)。

[1503] 表32. 荧光素酶的筛选组合

[1504]

mRNA	化学修饰	荧光素酶表达 (光子/秒)
荧光素酶	N4-乙酰基胞苷/假尿苷	4.18E+06
荧光素酶	N4-乙酰基胞苷/N1-甲基假尿苷	2.88E+07
荧光素酶	5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	3.48E+07
荧光素酶	5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	1.44E+07
荧光素酶	5-甲基胞苷/其中 50%的尿苷被 2-硫代尿苷取代	2.39E+06
荧光素酶	5-甲基胞苷/假尿苷	2.36E+07
荧光素酶	5-甲基胞苷/N1-甲基-假尿苷	4.15E+07
PBS	无	3.59E+05

[1505] 实施例81. 修饰的RNA的稳定性

[1506] A. 修饰的RNA的储存

[1507] 进行稳定性实验,以获得对保留修饰的RNA的完整性的储存条件的更好理解。未修饰的G-CSF mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)、用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的G-CSF mRNA和用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰并与按体积计0.75%的RNAIMAX™形成脂复合物的G-CSF mRNA于50°C、40°C、37°C、25°C、4°C或-20°C储存。mRNA储存0小时、2小时、6小时、24小时、48小时、5天和14天之后,使用Bio-Rad EXPERION™系统通过凝胶电泳分析mRNA。修饰的、未修饰的和形成脂复合物的G-CSF mRNA也在通过凝胶电泳分析之前,在RNASTABLE® (Biomatrix公司, San Diego, CA) 中(40°C)或在水(-80°C或40°C)中储存35天。

[1508] 不加稳定剂的所有mRNA样品在4°C或-20°C储存2周后是稳定的。具有或不具有脂复合物的修饰的G-CSF mRNA相对于未修饰的G-CSF更稳定:储存于25°C(稳定超过5天对48小时)、37°C(稳定超过24小时对6小时)和50°C(稳定超过6小时对2小时)。未修饰的G-CSF mRNA、具有或不具有脂复合物的修饰的G-CSF mRNA耐受12次冻结/解冻循环。

[1509] 在40°C储存于稳定剂中的mRNA样品与在-80°C储存于水中的mRNA样品相比,在35天后表现出相似的稳定性,而在40°C储存于水中的mRNA在18天后表现出严重的降解。

[1510] 实施例82. BJ成纤维细胞中的细胞活力

[1511] 人原代包皮成纤维细胞(BJ成纤维细胞)获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)(目录号#CRL-2522)并于37°C、5%CO₂下培养于补充有10%胎牛血清的Eagle氏最低必需培养基(ATCC, 目录号#30-2003)中。BJ成纤维细胞以每孔130000个细胞(在0.5ml的培养基中)的密度接种于24孔板中。使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 目录号#11668-019)依制造商的规程转染250ng用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的(Gen1)或用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基假尿苷完全修饰的(Gen2)修饰的G-CSF mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷

酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)。也转染对照样品Lipofectamine2000 (LF2000) 和未修饰的G-CSF mRNA。每天转染修饰的mRNA或对照样品,持续4天。转染后的细胞的活力在第一次转染后的6小时和24小时(T1,6小时或T1,24小时)和第二次转染后的24小时(T2,24小时)和第四次转染后的24小时(T4,24小时)进行评估。

[1512] 为了测定细胞活力,完全去除培养基并用600u1无菌无Ca²⁺/Mg²⁺的PBS (Gibco/Life Technologies,Manassas,VA) 洗涤细胞一次,以洗去松散附着的细胞。去除并丢弃PBS。每孔中的洗净的成纤维细胞分别用220u1稀释的CELL TITER GLO® (Promega,目录号#G7570) 储液处理(CELL TITER GLO®储液用等量的无菌PBS进一步1:1稀释)。无菌枪头用于将细胞从板上刮离并加速裂解过程。

[1513] 对于两个时间间隔:T1、24小时和T2、24小时,使用可替代的步骤。如上所述,用PBS洗涤细胞,随后用胰蛋白酶/EDTA溶液(Gibco/Life Technologies,Manassas,VA)进行胰蛋白酶处理。分离细胞并收集于500u1含有胰蛋白酶抑制剂的培养基中。以1200rcf离心5分钟来收获细胞。将细胞沉淀重悬浮于500u1的PBS中。此细胞悬浮液置于冰上,并将100u1此细胞悬浮液与100u1未稀释的Cell Titer Glo溶液合并。

[1514] 然后,所有的CELL TITER GLO®裂解物在室温下孵育20分钟。20u1裂解物转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔板(Corning,Manassas,VA)并与100u1稀释的CELL TITER GLO®溶液合并。所用的读板器来自BioTek Synergy H1 (BioTek,Winooski,VT),并且绝对值用未处理的BJ成纤维细胞的信号归一化为100%细胞活力。BJ成纤维细胞的百分比活力示于表33。

[1515] 重要的是,所有这些实验都在无任何干扰素或其它细胞因子抑制剂的情况下进行,并且因此代表了不同mRNA的细胞毒性的精确测量。

[1516] 这些结果证明,用未修饰的mRNA进行的BJ成纤维细胞的反复转染导致细胞活力的损失,其在第一次转染后的24小时(T1,24小时)就很明显,并持续明显,并在随后的时间点更为显著。

[1517] 用5甲基胞苷和假尿苷修饰的mRNA重复转染也在第四个每日转染(T4,24小时)后24小时有明显的活力的损失。使用5甲基胞苷和N1-甲基假尿苷修饰的mRNA在此实验过程中没有观察到细胞活力的丧失。这些结果证明,当在重复转染条件下分析时,含有5甲基胞苷和N1-甲基假尿苷的mRNA提高了细胞活力。在大多数治疗性应用中,重复施用修饰的mRNA的能力是重要的,并且因此能这样做而没有产生细胞毒性的能力也是重要的。尽管不希望被理论所束缚,据信,单次转染后的响应基因可能导致蛋白生产、细胞因子诱导的降低,并最终导致细胞活力的损失。这些结果与含有N1-甲基假尿苷的mRNA所表现的相对于未修饰的mRNA和假尿苷修饰的mRNA二者的此方面的提高的特点相一致。

[1518] 表33.活力百分比

[1519]

	T1, 6 小时	T1, 24 小时	T2, 24 小时	T4, 24 小时
Gen 1 G-CSF	81	108	91	65
Gen 2 G-CSF	99	102	128	87
未修饰的 G-CSF	101	72	74	42
LF2000	99	80	114	106

[1520]

未处理的	100	100	100	100
------	-----	-----	-----	-----

[1521] 实施例83. BJ成纤维细胞中的先天免疫应答

[1522] 人原代包皮成纤维细胞 (BJ成纤维细胞) 获得自美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (目录号#CRL-2522) 并于37°C、5%CO₂下培养于补充有10%胎牛血清的Eagle氏最低必需培养基 (ATCC, 目录号#30-2003) 中。BJ成纤维细胞以每孔130000个细胞 (在0.5ml的培养基中) 的密度接种于24孔板中。使用Lipofectamine2000 (Invitrogen, 目录号#11668-019) 依制造商的规程转染250ng用5-甲基胞嘧啶和假尿苷完全修饰的 (Gen1) 或用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基假尿苷完全修饰的 (Gen2) 修饰的G-CSF mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1; 约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中; 5'帽, 帽1)。也转染对照样品Lipofectamine2000 (LF2000) 和未修饰的G-CSF mRNA (天然的G-CSF)。连续转染细胞5天。在每轮转染后4小时移除转染复合物。

[1523] 转染后每天依制造商的规程通过ELISA分析培养基上清液中的分泌的GCSF (R&D Systems, 目录号#DCS50)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和干扰素 α (IFN- α)。使用CELL TITER GLO® (Promega, 目录号#G7570) 在第一轮转染后的6小时和18小时和之后的每两天分析细胞的活力。在收获细胞的同时, 使用RNAEASY小型试剂盒 (目录号#74004) 依制造商的规程分离总RNA并用DNASE®处理。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒 (Applied Biosystems, 目录号#4368814) 依制造商的规程将100ng总RNA合成cDNA。然后, 依制造商的规程, 在Biorad CFX384仪器上使用SybrGreen通过实时定量PCR分析cDNA, 以分析先天免疫应答基因的表达。

[1524] 实施例84. 用野生型T7聚合酶进行的体外转录

[1525] 如上所述, 使用野生型T7聚合酶将荧光素酶mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:3; 约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中; 5'帽, 帽1) 和G-CSF mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1; 约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中; 5'帽, 帽1) 用列于表34-37中的不同化学组成和化学组成的组合进行完全修饰。

[1526] 翻译反应的产率通过分光光度测量 (OD260) 来测定, 荧光素酶的产率示于表34, G-CSF的产率示于表36。

[1527] F修饰的荧光素酶和G-CS mRNA也进行酶促加帽反应, 每个修饰的mRNA的加帽反应

通过分光光度测量 (OD260) 来评估产率并使用生物分析仪评估正确的大小。荧光素酶的加帽反应的产率示于表35,G-CSF的示于表37。

[1528] 表34. 荧光素酶的体外转录化学组成

化学修饰	产率 (mg)
N6-甲基腺苷	0.99
5-甲基胞苷	1.29
N4-乙酰基胞苷	1.0
5-甲酰基胞苷	0.55
假尿苷	2.0
N1-甲基假尿苷	1.43
2-硫代尿苷	1.56
5-甲氧基尿苷	2.35
5-甲基尿苷	1.01
α -硫代胞苷	0.83
5-Br-尿苷 (5Bru)	1.96
5 (2 甲酯基乙烯基) 尿苷	0.89
5 (3-1E 丙烯基氨基) 尿苷	2.01
N4-乙酰基胞苷/假尿苷	1.34
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基假尿苷	1.26
5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	1.38
5-甲基胞苷/5-溴代尿苷	0.12
5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	2.97
5-甲基胞苷/ 一半的尿苷被 2-硫代尿苷修饰	1.59
5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	0.90
5-甲基胞苷/假尿苷	1.83
5-甲基胞苷/N1 甲基假尿苷	1.33

[1530] 表35. 修饰的荧光素酶mRNA的加帽化学组成和产率

[1531]	化学修饰	产 率 (mg)
	5-甲基胞苷	1.02
	N4-乙酰基胞苷	0.93
	5-甲酰基胞苷	0.55
	假尿苷	2.07
	N1-甲基假尿苷	1.27
	2-硫代尿苷	1.44
	5-甲氧基尿苷	2
	5-甲基尿苷	0.8
	α -硫代-胞苷	0.74
[1532]	5-Br-尿苷 (5Bru)	1.29
	5 (2 甲酯基乙烯基) 尿苷	0.54
	5 (3-1E 丙烯基氨基) 尿苷	1.39
	N4-乙酰基胞苷/假尿苷	0.99
	N4-乙酰基胞苷/N1-甲基假尿苷	1.08
	5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	1.13
	5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	1.08
	5-甲基胞苷/ 一半的尿苷被 2-硫代尿苷修饰	1.2
	5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	1.27
	5-甲基胞苷/假尿苷	1.19
	5-甲基胞苷/N1 甲基假尿苷	1.04

[1533] 表36. 修饰的G-CSF mRNA的体外转录化学组成和产率

[1534]

化学修饰	产 率 (mg)
N6-甲基腺苷	1.57
5-甲基胞苷	2.05
N4-乙酰基胞苷	3.13
5-甲酰基胞苷	1.41
假尿苷	4.1

	N1-甲基假尿苷	3.24
	2-硫代尿苷	3.46
	5-甲氧基尿苷	2.57
	5-甲基尿苷	4.27
	4-硫代尿苷	1.45
	2'-F-尿苷	0.96
	α -硫代胞苷	2.29
	2'-F-鸟苷	0.6
	N-1-甲基腺苷	0.63
	5-Br-尿苷 (5Bru)	1.08
	5 (2 甲酯基乙烯基) 尿苷	1.8
[1535]	5 (3-1E 丙烯基氨基) 尿苷	2.09
	N4-乙酰基胞苷/假尿苷	1.72
	N4-乙酰基胞苷/N1-甲基假尿苷	1.37
	5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	1.85
	5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	1.56
	5-甲基胞苷/一半的尿苷被 2-硫代尿苷修饰	1.84
	5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	2.53
	5-甲基胞苷/假尿苷	0.63
	N4-乙酰基胞苷/2-硫代尿苷	1.3
	N4-乙酰基胞苷/5-溴代尿苷	1.37
	5-甲基胞苷/N1 甲基假尿苷	1.25
	N4-乙酰基胞苷/假尿苷	2.24

[1536] 表37. 修饰的G-CSF mRNA的加帽化学组成和产率

	化学修饰	产 率 (mg)
[1537]	N6-甲基腺苷	1.04
	5-甲基胞苷	1.08

	N4-乙酰基胞苷	2.73
	5-甲酰基胞苷	0.95
	假尿苷	3.88
	N1-甲基假尿苷	2.58
	2-硫代尿苷	2.57
	5-甲氧基尿苷	2.05
	5-甲基尿苷	3.56
	4-硫代尿苷	0.91
	2'-F-尿苷	0.54
	α -硫代-胞苷	1.79
	2'-F-鸟苷	0.14
[1538]	5-Br-尿苷 (5Bru)	0.79
	5 (2 甲酯基乙烯基) 尿苷	1.28
	5 (3-1E 丙烯基氨基) 尿苷	1.78
	N4-乙酰基胞苷/假尿苷	0.29
	N4-乙酰基胞苷/N1-甲基假尿苷	0.33
	5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	0.91
	5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	0.61
	5-甲基胞苷/ 一半的尿苷被 2-硫代尿苷修饰	1.24
	5-甲基胞苷/假尿苷	1.08
	N4-乙酰基胞苷/2-硫代尿苷	1.34
	N4-乙酰基胞苷/5-溴代尿苷	1.22
	5-甲基胞苷/N1 甲基假尿苷	1.56

[1539] 实施例85.用突变体T7聚合酶进行的体外转录

[1540] 使用突变体T7聚合酶 (Durascribe®T7转录试剂盒 (目录号DS010925) (Epicentre®, Madison, WI), 用列于表38-41的不同化学组成和化学组成的组合完全修饰荧光素酶mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1) 和G-CSF mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)。

[1541] 翻译反应的产率通过分光光度测量 (OD260) 测定, 荧光素酶的产率示于表38, G-CSF的示于表40。

[1542] 修饰的荧光素酶和G-CSF mRNA也进行酶促加帽反应, 每个修饰的mRNA的加帽反应

的产率通过分光光度测量 (OD260) 来评估, 并使用生物分析仪评估正确的大小。荧光素酶的加帽反应的产率示于表39, G-CSF的示于表41。

[1543] 表38. 修饰的荧光素酶mRNA的体外转录化学组成和产率

[1544]

化学修饰	产率 (ug)
2' 氟代胞嘧啶	71.4
2' 氟代尿苷	57.5
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试A	26.4
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 测试A	73.3
N1-乙酰基胞苷/2-氟代尿苷	202.2
5-甲基胞苷/2-氟代尿苷	131.9
2-氟代胞嘧啶/假尿苷	119.3
2-氟代胞嘧啶/N1-甲基假尿苷	107.0
2-氟代胞嘧啶/2-硫代尿苷	34.7
2-氟代胞嘧啶/5-溴代尿苷	81.0
2-氟代胞嘧啶/2-氟代尿苷	80.4
2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶	61.2
2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶/假尿苷	65.0
2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷	41.2
2-氟代鸟嘌呤/假尿苷	79.1
2-氟代鸟嘌呤/N1-甲基假尿苷	74.6
5-甲基胞苷/假尿苷, 测试B	91.8
5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷, 测试B	72.4
2' 氟代腺苷	190.98

[1545] 表39. 修饰的荧光素酶mRNA的加帽化学组成和产率

[1546]

化学修饰	产率 (ug)
2' 氟代胞嘧啶	19.2
2' 氟代尿苷	16.7
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试A	7.0
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 测试A	21.5
N1-乙酰基胞苷/2-氟代尿苷	47.5
5-甲基胞苷/2-氟代尿苷	53.2
2-氟代胞嘧啶/假尿苷	58.4
2-氟代胞嘧啶/N1-甲基假尿苷	26.2
2-氟代胞嘧啶/2-硫代尿苷	12.9
2-氟代胞嘧啶/5-溴代尿苷	26.5
2-氟代胞嘧啶/2-氟代尿苷	35.7
2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶	24.7

2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶/假尿苷	32.3
2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷	31.3
2-氟代鸟嘌呤/假尿苷	20.9
2-氟代鸟嘌呤/N1-甲基假尿苷	29.8
5-甲基胞苷/假尿苷,测试B	58.2
5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷,测试B	44.4

[1547] 表40. 修饰的G-CSF mRNA的体外转录化学组成和产率

[1548]

化学修饰	产率 (ug)
2' 氟代胞嘧啶	56.5
2' 氟代尿苷	79.4
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试A	21.2
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷,测试A	77.1
N1-乙酰基胞苷/2-氟代尿苷	168.6
5-甲基胞苷/2-氟代尿苷	134.7
2-氟代胞嘧啶/假尿苷	97.8

[1549]

2-氟代胞嘧啶/N1-甲基假尿苷	103.1
2-氟代胞嘧啶/2-硫代尿苷	58.8
2-氟代胞嘧啶/5-溴代尿苷	88.8
2-氟代胞嘧啶/2-氟代尿苷	93.9
2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶	97.3
2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶/假尿苷	96.0
2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷	82.0
2-氟代鸟嘌呤/假尿苷	68.0
2-氟代鸟嘌呤/N1-甲基假尿苷	59.3
5-甲基胞苷/假尿苷,测试B	58,7
5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷,测试B	78.0

[1550] 表41. 修饰的G-CSF mRNA的加帽化学组成和产率

[1551]

化学修饰	产率 (ug)
2' 氟代胞嘧啶	16.9
2' 氟代尿苷	17.0
5-甲基胞嘧啶/假尿苷,测试A	10.6
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷,测试A	22.7
N1-乙酰基胞苷/2-氟代尿苷	19.9
5-甲基胞苷/2-氟代尿苷	21.3
2-氟代胞嘧啶/假尿苷	65.2
2-氟代胞嘧啶/N1-甲基假尿苷	58.9

2-氟代胞嘧啶/2-硫代尿苷	41.2
2-氟代胞嘧啶/5-溴代尿苷	35.8
2-氟代胞嘧啶/2-氟代尿苷	36.7
2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶	36.6
2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞嘧啶/假尿苷	37.3
2-氟代鸟嘌呤/5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷	30.7
2-氟代鸟嘌呤/假尿苷	29.0

[1552]

2-氟代鸟嘌呤/N1-甲基假尿苷	22.7
5-甲基胞苷/假尿苷,测试B	60.4
5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷,测试B	33.0

[1553] 实施例86.2'0-甲基和2'氟代化合物

[1554] 产生用表42中的化学组成完全修饰版本的荧光素酶mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1) 并使用突变体T7聚合酶 (Durascribe®T7转录试剂盒(目录号DS010925) (Epicentre®,Madison,WI) 进行转录。包含2'氟代的mRNA使用Durascribe T7制备,但是,包含2'0甲基的mRNA不能使用Durascribe T7进行转录。

[1555] 2'0甲基修饰的mRNA的掺入可以使用其它突变体T7聚合酶 (Nat Biotechnol. (2004) 22:1155-1160;Nucleic Acid Res. (2002) 30:e138) 来完成。或者,2'0Me修饰可在转录后用酶促手段引入。

[1556] 在糖的2'基团的修饰的引入具有许多潜在的优势。同2'氟代取代一样,已知2'0Me取代可防止核酸酶的作用,并且也已经显示出,当掺入其它核酸如siRNA和反义时,其可消除先天免疫识别(Crooke编,Antisense Drug Technology,第2版;Boca Raton:CRC出版社,以其整体并入本文)。

[1557] 然后,将2'氟代修饰的mRNA转染到HeLa细胞中,以评估在细胞环境中蛋白的生产,并且同样的mRNA也在无细胞的兔网织红细胞系统中进行评估。对照未修饰的荧光素酶(天然的荧光素酶)用于两个转录实验中,对照未处理的和空转染的(仅有Lipofectamine2000)也在HeLa转染中进行分析,对照无RNA的也在兔网织红细胞裂解物(reticulysates)中进行分析。

[1558] 对于HeLa细胞转染实验,转染前一天,通过用胰蛋白酶-EDTA溶液 (LifeTechnologies,Grand Island,NY) 处理而收获20000个HeLa细胞(ATCC号CCL-2,Manassas,VA),并以每孔总体积100ul的EMEM培养基(补充有10%FCS和1×Glutamax)接种于96孔细胞培养板(Corning,Manassas,VA)中。细胞于37℃、5%CO2氛围下生长过夜。第二天,将83ng具有表42所示的化学修饰的包含2'氟代的修饰的荧光素酶RNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1) 稀释于终体积为10ul的OPTI-MEM (LifeTechnologies,Grand Island,NY) 中。使用Lipofectamine2000 (LifeTechnologies,Grand Island,NY) 作为转染试剂,0.2ul稀释于终体积为10ul的OPTI-MEM中。室温孵育5分钟后,将两种溶液合并并另外室温孵育15分钟。然后,将20ul合并的溶液加入到含有HeLa细胞的100ul细胞培养基中并在室温下孵育。孵育18至22小时后,表达荧

光素酶的细胞依制造商的说明用100 μ l Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI) 进行裂解。将等份的裂解物转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔板中 (Corning, Manassas, VA) 并与100 μ l完全荧光素酶分析溶液 (Promega, Madison, WI) 合并。调整或稀释裂解物体积,直到对于产生最强信号的样品,检测到不超过2mio的每孔相对光单位 (RLU), 每个测试的化学组成的RLU示于表42。读板器是BioTek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT)。无试剂的板的背景信号为约200的每孔相对光单位。

[1559] 对于兔网织红细胞裂解物分析,包含2'-氟代的荧光素酶mRNA稀释于无菌无核酸酶的水中,达到250ng、10ul的最终量,并加入到40ul新鲜制备的兔网织红细胞裂解物中,并在标准的1.5mL聚丙烯反应管 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 中于30 $^{\circ}$ C下在干燥的加热块上完成体外翻译反应。翻译分析用Rabbit Reticulocyte Lysate (核酸酶处理的) 试剂盒 (Promega, Madison, WI) 依制造商的说明书完成。反应缓冲液补充有去除亮氨酸或甲硫氨酸的所提供的氨基酸储液的1对1混合物,产生含有允许有效体外翻译的足够量的两种氨基酸的反应混合物。孵育60分钟之后,通过将反应管置于冰上来停止反应。

[1560] 等份的含有修饰的荧光素酶RNA的体外翻译反应转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔板中 (Corning, Manassas, VA) 并与100ul完全荧光素酶分析溶液 (Promega, Madison, WI) 合并。调整或稀释体外翻译反应的体积,直到对于产生最强信号的样品,检测到不超过2mio的每孔相对光单位 (RLU), 每个测试的化学组成的RLU示于表43。读板器是BioTek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT)。无试剂的板的背景信号为约160的每孔相对光单位。

[1561] 如表42和43所示,多个包含2'氟代的化合物在体外具有活性并产生了荧光素酶蛋白。

[1562] 表42. HeLa细胞

[1563]

化学修饰	浓度 (ug/ml)	体积 (ul)	产率 (ug)	RLU
2' 氟代腺苷	381.96	500	190.98	388.5
2' 氟代胞嘧啶	654.56	500	327.28	2420
2' 氟代鸟嘌呤	541,795	500	270.90	11,705.5

[1564]

2' 氟代尿苷	944.005	500	472.00	6767.5
天然的荧光素酶	N/A	N/A	N/A	133,853.5
空白	N/A	N/A	N/A	340
未处理	N/A	N/A	N/A	238

[1565] 表43. 兔网织红细胞裂解物

[1566]

化学修饰	RLU
2' 氟代腺苷	162
2' 氟代胞嘧啶	208
2' 氟代鸟嘌呤	371,509
2' 氟代尿苷	258
天然的荧光素酶	2,159,968

无RNA	156
------	-----

[1567] 实施例87. HeLa细胞中使用组合的修饰的荧光素酶

[1568] 为了评估2'氟代-修饰的mRNA与其它修饰组合的用途,如实施例86所示,使用野生型T7聚合酶(不包含氟代的化合物)或使用突变体T7聚合酶(包含氟代的化合物)转录一系列的mRNA。通过在HeLa细胞中的体外转染测试了所有的修饰的mRNA。

[1569] 转染前一天,通过用胰蛋白酶-EDTA溶液(LifeTechnologies,Grand Island,NY)处理而收获20000个HeLa细胞(ATCC号CCL-2,Manassas,VA),并以每孔总体积100ul的EMEM培养基(补充有10%FCS和1×Glutamax)接种于96孔细胞培养板(Corning,Manassas,VA)中。细胞于37℃、5%CO₂氛围下生长过夜。第二天,将83ng具有表44所示的化学修饰的修饰的荧光素酶RNA(mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)稀释于终体积为10ul的OPTI-MEM(LifeTechnologies,Grand Island,NY)中。使用Lipofectamine2000(LifeTechnologies,Grand Island,NY)作为转染试剂,0.2ul稀释于终体积为10ul的OPTI-MEM中。室温孵育5分钟后,将两种溶液合并并另外室温孵育15分钟。然后,将20ul合并的溶液加入到含有HeLa细胞的100ul细胞培养基中并在室温下孵育。

[1570] 孵育18至22小时后,表达荧光素酶的细胞依制造商的说明用100μl Passive Lysis Buffer(Promega,Madison,WI)进行裂解。将等份的裂解物转移至白色不透明的聚苯乙烯96孔板中(Corning,Manassas,VA)并与100μl完全荧光素酶分析溶液(Promega, Madison,WI)合并。调整或稀释裂解物体积,直到对于产生最强信号的样品,检测到不超过2mio的每孔相对光单位(RLU),每个测试的化学组成的RLU示于表44。读板器是BioTek Synergy H1(BioTek,Winooski,VT)。无试剂的板的背景信号为约200的每孔相对光单位。

[1571] 如表44所证明的,大部分的修饰组合导致产生功能性的荧光素酶蛋白的mRNA,其包括所有的不包含氟代的化合物和许多包含2'氟代修饰的组合。

[1572] 表44. 荧光素酶

[1573]

化学修饰	RLU
N4-乙酰基胞苷/假尿苷	113,796
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基假尿苷	316,326
5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	24,948
5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	43,675
5-甲基胞苷/一半的尿苷被50%的2-硫代尿苷修饰	41,601
5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	1,102
5-甲基胞苷/假尿苷	51,035
5-甲基胞苷/N1甲基假尿苷	152,151
N4-乙酰基胞苷/2'氟代尿苷三磷酸	288
5-甲基胞苷/2'氟代尿苷三磷酸	269
2'氟代胞嘧啶三磷酸/假尿苷	260
2'氟代胞嘧啶三磷酸/N1-甲基假尿苷	412
2'氟代胞嘧啶三磷酸/2-硫代尿苷	427
2'氟代胞嘧啶三磷酸/5-溴代尿苷	253

2'氟代胞嘧啶三磷酸/2'氟代尿苷三磷酸	184
2'氟代鸟嘌呤三磷酸/5-甲基胞苷	321
2'氟代鸟嘌呤三磷酸/5-甲基胞苷/假尿苷	207
2'氟代鸟嘌呤/5-甲基胞苷/N1甲基假尿苷	235
2'氟代鸟嘌呤/假尿苷	218

[1574]

2'氟代鸟嘌呤/N1-甲基假尿苷	247
5-甲基胞苷/假尿苷,测试A	13,833
5-甲基胞苷/N-甲基假尿苷,测试A	598
2'氟代胞嘧啶三磷酸	201
2'氟代尿苷三磷酸	305
5-甲基胞苷/假尿苷,测试B	115,401
5-甲基胞苷/N-甲基假尿苷,测试B	21,034
天然的荧光素酶	30,801
未处理	344
空白	262

[1575] 实施例88.G-CSF体外转录

[1576] 为了评估我们所有不同的化学修饰在第二开放读码框环境下的活性,我们用人类G-CSF mRNA重复了之前用荧光素酶mRNA所做的实验。使用野生型T7聚合酶(对于所有不包含氟代的化合物)或突变体T7聚合酶(对于所有包含氟代的化合物)将G-CSF mRNA(mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)用表45和46中的化学组成完全修饰。突变体T7聚合酶购买获得(Durascribe® T7Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®,Madison,WI))。

[1577] 表45和46的修饰的RNA体外转染到HeLa细胞中或加入到所述的兔网织红细胞裂解物(250ng的修饰的mRNA)。也分析了对照未处理的、空白转染的(仅有转染试剂)、用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基假尿苷完全修饰的G-CSF或用5-甲基胞嘧啶和N1-甲基假尿苷完全修饰的荧光素酶对照(mRNA序列示于SEQ ID NO:3,约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)。通过ELISA测定G-CSF蛋白的表达,数值示于表45和46。在表45中,“NT”是指未进行测定。

[1578] 如表45所示,许多但不是全部的化学修饰导致了人G-CSF蛋白的生产。这些来自基于细胞和无细胞翻译系统的结果关联很好,相同的修饰一般在两套系统中工作或不工作。一个值得注意的例外是,5-甲酰基胞苷修饰的G-CSF mRNA在无细胞翻译系统中工作,而在基于HeLa细胞的转染系统中不工作。两个分析之间类似的差异也出现在5-甲酰基胞苷修饰的荧光素酶mRNA中。

[1579] 如表46所证明的,许多但不是全部的G-CSF mRNA修饰的化学组成(当组合使用时)表现出体内活性。此外,修饰的mRNA(具有有N4-乙酰基胞苷或5甲基胞苷)中存在N1-甲基假尿苷比使用假尿苷测试的同样的组合表现出更高的表达。总之,这些数据表明,包含N1-甲基假尿苷的G-CSF mRNA导致体外蛋白表达提高。

[1580] 表45.G-CSF的表达

[1581]

化学修饰	HeLa 细胞的 G-CSF 蛋白 (pg/ml)	兔网织红细 胞裂解物的 G-CSF 蛋白 (pg/ml)
假尿苷	1,150,909	147,875
5-甲基尿苷	347,045	147,250
2-硫代尿苷	417,273	18,375
N1-甲基假尿苷	NT	230,000
4-硫代尿苷	107,273	52,375
5-甲氧基尿苷	1,715,909	201,750
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试 A	609,545	119,750
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 测试 A	1,534,318	110,500
2'-氟代鸟苷	11,818	0
2'-氟代尿苷	60,455	0
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试 B	358,182	57,875
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 测试 B	1,568,636	76,750
5-溴代尿苷	186,591	72,000
5-(2 甲酯基乙烯基) 尿苷	1,364	0
5-[3(1-E-丙烯基氨基) 尿苷	27,955	32,625
α -硫代胞苷	120,455	42,625
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试 C	882,500	49,250
N1-甲基腺苷	4,773	0
N6-甲基腺苷	1,591	0
5-甲基胞苷	646,591	79,375

[1582]

N4-乙酰基胞苷	39,545	8,000
5-甲基胞苷	0	24,000
5-甲基胞嘧啶/假尿苷, 测试 D	87,045	47,750
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 测试 D	1,168,864	97,125
空白	909	682
未处理	0	0
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 对照	1,106,591	NT
荧光素酶对照	NT	0

[1583] 表46.HeLa细胞中的组合化学组成

化学修饰	HeLa 细胞的 G-CSF 蛋白 (pg/ml)
N4-乙酰基胞苷/假尿苷	537,273
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基假尿苷	1,091,818
5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	516,136
5-甲基胞苷/5-溴代尿苷	48,864
5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	207,500
5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	33,409
[1584] N4-乙酰基胞苷/5-溴代尿苷	211,591
N4-乙酰基胞苷/2-硫代尿苷	46,136
5-甲基胞嘧啶/假尿苷	301,364
5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷	1,017,727
N4-乙酰基胞苷/2'氟代尿苷三磷酸	62,273
5-甲基胞苷/2'氟代尿苷三磷酸	49,318
2'氟代胞嘧啶三磷酸/假尿苷	7,955
2'氟代胞嘧啶三磷酸/N1-甲基假尿苷	1,364
2'氟代胞嘧啶三磷酸/2-硫代尿苷	0
2'氟代胞嘧啶三磷酸/5-溴代尿苷	1,818

	2'氟代胞嘧啶三磷酸/2'氟代尿苷三磷酸	909
	2'氟代鸟嘌呤三磷酸/5-甲基胞苷	0
	2'氟代鸟嘌呤三磷酸/5-甲基胞苷/假尿苷	0
	2'氟代鸟嘌呤三磷酸 /5-甲基胞苷/N1 甲基假尿苷	1,818
	2'氟代鸟嘌呤三磷酸/假尿苷	1,136
	2'氟代鸟嘌呤三磷酸/2'氟代胞嘧啶三磷酸/N1-甲基假尿苷	0
	5-甲基胞苷/假尿苷	617,727
[1585]	5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷	747,045
	5-甲基胞苷/假尿苷	475,455
	5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷	689,091
	5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 对照 1	848,409
	5-甲基胞嘧啶/N1-甲基假尿苷, 对照 2	581,818
	空白	682
	未处理	0
	荧光素酶 2'氟代胞嘧啶三磷酸	0
	荧光素酶 2'氟代尿苷三磷酸	0

[1586] 实施例89. 化学组成的筛选

[1587] 下列表(表47-49)总结了很多上述实施例中提出的不同化合物的体内和体外筛选数据。基于细胞的分析和无细胞翻译分析之间存在良好的相关性。相同的化学组成取代通常表现出良好的一致性,无论是在荧光素酶的环境中测试还是在G-CSF mRNA的环境中测试。最后,包含N1-甲基假尿苷的mRNA表现出非常高水平的蛋白表达并且在体内和体外仅具有极少甚至没有可检测的细胞因子刺激,并且在体外和体内都优于包含假尿苷的mRNA。

[1588] 荧光素酶mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:3;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)和G-CSF mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1)用表47和48中所述的天然和非天然存在的化学组成或用表48中所述的化学组成的组合进行修饰,并使用本文所述的方法进行测试。

[1589] 在表47和48中,“*”指使用突变体T7聚合酶(Durascribe® T7Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®,Madison,WI)进行的体外转录反应;“**”指使用突变体T7聚合酶(Durascribe® T7Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®,Madison,WI)进行的体外转录反应的第二次结果;“***”指在无细胞翻译(兔网织红细胞裂解物)中观察到的生产;HeLa细胞的蛋白生产通过“+”、“+/-”和“-”来判断;当是G-CSF PBMC时,“++++”表示大于6000pg/ml的G-CSF,“+++”表示大于3000pg/ml的G-CSF,“++”表示大于1500pg/ml

的G-CSF,“+”表示大于300pg/ml的G-CSF,“+/-”表示150-300pg/ml的G-CSF和背景为约110pg/ml;当是细胞因子PBMC时,“++++”表示大于1,000pg/ml的干扰素 α (IFN- α),“+++”表示大于600pg/ml的IFN- α ,“++”表示大于300pg/ml的IFN- α ,“+”表示大于100pg/ml的IFN- α ,“-”表示小于100pg/ml和背景为约70pg/ml;“NT”是指未测。在表48中,蛋白的生产使用突变体T7聚合酶(Durascribe® T7Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®, Madison,WI)进行评估。

[1590] 表47.天然存在的

[1591]

通用名(符号)	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	蛋白 (Luc; HeLa)	蛋白 (G-CSF; HeLa)	蛋白 (G-CSF; PBMC)	细胞因子 (G-CSF; PBMC)	体内蛋白 (Luc)	体内蛋白 (G-CSF)
1-甲基腺苷 (m ¹ A)	失败	合格	NT	-	+/-	++	NT	NT
N ⁶ -甲基腺苷 (m ⁶ A)	合格	合格	-	-	+/-	++++	NT	NT
2'-O-甲基腺苷 (Am)	失败*	未测	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-甲基胞苷	合格	合格	+	+	+	++	+	NT

[1592]

(m ⁵ C)								
2'-O- 甲 基 胞 苷 (Cm)	失 败 *	未 测	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2-硫代 胞 苷 (s ² C)	失 败	失 败	NT	NT	NT	NT	NT	NT
N ⁴ - 乙 酰 基 胞 苷 (ac ⁴ C)	合 格	合 格	+	+	+/-	+++	+	NT
5-甲酰 基 胞 苷 (f ⁵ C)	合 格	合 格	****	****	-	+	NT	NT
2'-O- 甲 基 鸟 苷 (Gm)	失 败 *	未 测	NT	NT	NT	NT	NT	NT
肌 苷 (I)	失 败	失 败	NT	NT	NT	NT	NT	NT
假 尿 苷 (Y)	合 格	合 格	+	+	++	+	+	NT
5-甲基 尿 苷 (m ⁵ U)	合 格	合 格	+	+	+/-	+	NT	NT
2'-O- 甲 基 *	失 败	未 测	NT	NT	NT	NT	NT	NT

[1593]

尿 昔 (Um)								
1-甲基 假 尿 昔 (m ¹ Y)	合格	合格	+	未测	++++	-	+	NT
2-硫代 尿 昔 (s ² U)	合格	合格	-	+	+	+	NT	NT
4-硫代 尿 昔 (s ⁴ U)	失败	合格		+	+/-	++	NT	NT
5-甲氧 基 尿 昔 (mo ⁵ U)	合格	合格	+	+	++	-	+	NT
3-甲基 尿 昔 (m ³ U)	失败	失败	NT	NT	NT	NT	NT	NT

[1594] 表48. 非天然存在的

[1595]

通用名	IVT (Luc)	IVT (G-C SF)	蛋 白 (Luc ; HeLa)	蛋 白 (G-CS F ; HeLa)	蛋 白 (G-CS F ; PBMC)	细胞因 子 (G-CSF ; PBMC)	体 内 蛋 白 (Luc)	体 内 蛋 白 (G-CS F)
2'-F-阿糖-鸟昔	失败	失败	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-阿糖-腺昔	失败	失败	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-阿糖-胞昔	失败	失败	NT	NT	NT	NT	NT	NT

[1596]

2'-F-阿糖-尿苷	失败	失败	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-鸟苷	失败 / 合格**	合格/ 失败**	+++	+/-	-	+	+	NT
2'-F-腺苷	失败 / 合格**	失败/ 失败**	-**	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-胞苷	失败 / 合格**	失败/ 合格**	+++	NT	NT	NT	+	NT
2'-F-尿苷	失败 / 合格**	合格/ 合格**	+++	+	+/-	+	-	NT
2'-OH-阿糖-鸟苷	失败	失败	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-阿糖-腺苷	未测	未测	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-阿糖-胞苷	失败	失败	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-阿糖-尿苷	失败	失败	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-Br-尿苷	合格	合格	+	+	+	+	+	
5-(2-甲酯基乙烯基)尿苷	合格	合格	-	-	+/-	-		
5-[3-(1-E-丙烯基氨基)尿苷 (aka Chem 5)]	合格	合格	-	+	+	-		
N6-(19-氨基-五氧杂十九基)A	失败	失败	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2-二甲基氨基鸟苷	失败	失败	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-氮杂-胞苷	失败	失败	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-硫代-胞苷	合格	合格	+	+	+/-	+++	NT	NT

[1597]

假-异胞苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-碘代-尿苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
α -硫代-尿苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-氮杂-尿苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
脱氧-胸苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
α -硫代-鸟苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
8-氧代-鸟苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
O6-甲基-鸟苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-脱氮-鸟苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-氯代-嘌呤	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
α -硫代-腺苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-脱氮-腺苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-碘代-胞苷	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

[1598] 表49中,HeLa细胞的蛋白生产通过“+”、“+/-”和“-”来判断;当指G-CSF PBMC时,“+++”表示大于6000pg/ml的G-CSF,“+++”表示大于3000pg/ml的G-CSF,“++”表示大于1500pg/ml的G-CSF,“+”表示大于300pg/ml的G-CSF,“+/-”表示150-300pg/ml的G-CSF和背景为约110pg/ml;当指细胞因子PBMC时,“++++”表示大于1,000pg/ml的干扰素 α (IFN- α),“+++”表示大于600pg/ml的IFN- α ,“++”表示大于300pg/ml的IFN- α ,“+”表示大于100pg/ml的IFN- α ,“-”表示小于100pg/ml和背景为约70pg/ml;“WT”指野生型T7聚合酶,“MT”指突变体T7聚合酶(Durascribe® T7Transcription试剂盒(目录号DS010925)(Epicentre®,Madison,WI)和“NT”是指未测。

[1599] 表49. 组合的化学组成

[1600]

胞苷类似物	尿苷类似物	嘌呤	IVT Luc	IVT (G-C SF)	蛋白 (Luc ; HeLa)	蛋白 (G-C SF; HeLa)	蛋白 (G-C SF; PBM C)	细胞因子 (G-CSF ; PBMC)	体内 蛋白 (Luc)
N4-乙酰	假尿苷	A,G	合格	合格	+	+	NT	NT	+

[1601]

基胞苷			WT	WT					
N4-乙酰基胞苷	N1-甲基假尿苷	A,G	合格 WT	合格 WT	+	+	NT	NT	+
5-甲基胞苷	5-甲氧基尿苷	A,G	合格 WT	合格 WT	+	+	NT	NT	+
5-甲基胞苷	5-溴代尿苷	A,G	合格 WT	合格 WT	未测	+	NT	NT	
5-甲基胞苷	5-甲基尿苷	A,G	合格 WT	合格 WT	+	+	NT	NT	+
5-甲基胞苷	50% 2-硫代尿苷; 50% 尿苷	A,G	合格 WT	合格 WT	+	NT	NT	NT	+
5-甲基胞苷	100% 2-硫代尿苷	A,G	合格 WT	合格 WT	-	+	NT	NT	
5-甲基胞苷	假尿苷	A,G	合格 WT	合格 WT	+	+	++	+	+
5-甲基胞苷	N1-甲基假尿苷	A,G	合格 WT	合格 WT	+	+	++++	-	+
N4-乙酰基胞苷	2-硫代尿苷	A,G	未测	合格 WT	未测	+	NT	NT	NT
N4-乙酰基胞苷	5-溴代尿苷	A, G	未测	合格 WT	未测	+	NT	NT	NT
N4-乙酰基胞苷	2 氟代尿苷三磷酸	A,G	合格	合格	-	+	NT	NT	NT
5-甲基胞苷	2 氟代尿苷三磷酸	A,G	合格	合格	-	+	NT	NT	NT
2 氟代胞嘧啶三磷酸	假尿苷	A,G	合格	合格	-	+	NT	NT	NT

[1602]

2 氟代胞嘧啶三磷酸	N1- 甲基假尿苷	A,G	合格	合格	-	+/-	NT	NT	NT
2 氟代胞嘧啶三磷酸	2-硫代尿苷	A,G	合格	合格	-	-	NT	NT	NT
2 氟代胞嘧啶三磷酸	5-溴代尿苷	A,G	合格	合格	-	+/-	NT	NT	NT
2 氟代胞嘧啶三磷酸	2 氟代尿苷三磷酸	A,G	合格	合格	-	+/-	NT	NT	NT
5-甲基胞苷	尿苷	A,2 氟代 GTP	合格	合格	-	-	NT	NT	NT
5-甲基胞苷	假尿苷	A,2 氟代 GTP	合格	合格	-	-	NT	NT	NT
5-甲基胞苷	N1- 甲基假尿苷	A,2 氟代 GTP	合格	合格	-	+/-	NT	NT	NT
2 氟代胞嘧啶三磷酸	假尿苷	A,2 氟代 GTP	合格	合格	-	+/-	NT	NT	NT
2 氟代胞嘧啶三磷酸	N1- 甲基假尿苷	A,2 氟代 GTP	合格	合格	-	-	NT	NT	NT

[1603] 实施例90.PBMC中的2'氟代化学组成

[1604] 修饰的G-CSF mRNA (mRNA序列示于SEQ ID NO:1;约160个核苷酸的polyA尾未示于序列中;5'帽,帽1) 引发先天免疫应答的能力通过测定干扰素- α (IFN- α) 和肿瘤坏死因子- α

(TNF- α)的产生来确定。使用体外PBMC培养是测量寡核苷酸的免疫刺激潜力的可行方法 (Robbins等人, Oligonucleotides 2009:89-102), 转染方法如本文所述。表50所示的是来自2或3个独立PBMC供体的干扰素- α (IFN- α) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 随时间的生产的平均值, 其通过特异性ELISA进行测定。也分析对照R848、P(I)P(C)、LPS和Lipofectamine 2000 (L2000)。

[1605] 关于先天免疫识别, 尽管两个修饰的mRNA化学组成相对于阳性对照 (R848、P(I)P(C)) 都很大程度阻止IFN- α 和TNF- α 的产生, 2'氟代化合物比其它组合降低干扰素- α 和TNF- α 的生产至甚至更低的程度, 且N4-乙酰基胞苷的组合提高了细胞因子谱。

[1606] 表50. IFN- α 和TNF- α

[1607]

	IFN-α: 3 供体平均 (pg/ml)	TNF-α: 2 供体平均 (pg/ml)
L2000	1	361
P(I)P(C)	482	544
R848	45	8,235
LPS	0	6,889
N4-乙酰基胞苷/假尿苷	694	528
N4-乙酰基胞苷/N1-甲基假尿苷	307	283
5-甲基胞苷/5-甲氧基尿苷	0	411
5-甲基胞苷/5-溴代尿苷	0	270
5-甲基胞苷/5-甲基尿苷	456	428
5-甲基胞苷/2-硫代尿苷	274	277
N4-乙酰基胞苷/2-硫代尿苷	0	285
N4-乙酰基胞苷/5-溴代尿苷	44	403
5-甲基胞苷/假尿苷	73	332
5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷	31	280
N4-乙酰基胞苷/2'氟代尿苷三磷酸	35	32

[1608]

5-甲基胞苷(cytodine) /2'氟代尿苷三磷酸	24	0
2'氟代胞苷三磷酸/N1-甲基假尿苷	0	11
2'氟代胞苷三磷酸/2-硫代尿苷	0	0
2'氟代胞苷三磷酸/5-溴代尿苷	12	2
2'氟代胞苷三磷酸/2'氟代尿苷三磷酸	11	0
2'氟代胞苷三磷酸/5-甲基胞苷	14	23
2'氟代胞苷三磷酸/5-甲基胞苷/假尿苷	6	21
2'氟代胞苷三磷酸/5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷	3	15
2'氟代胞苷三磷酸/假尿苷	0	4
2'氟代胞苷三磷酸/N1-甲基假尿苷	6	20
5-甲基胞苷/假尿苷	82	18
5-甲基胞苷/N1-甲基假尿苷	35	3

[1609] 其它实施方式

[1610] 可以理解的是,虽然本发明已结合其详细的说明进行了描述,前述描述旨在说明,并不限制本发明的范围,本发明的范围是由所附的权利要求所限定。其它方面、优点和修改均在下列权利要求的范围之内。

序列表

- <110> 现代治疗公司
- <120> 修饰的核苷、核苷酸和核酸及其用途
- <130> M009.20/2030.1009PCT
- <140> PCT/US12/XXXXX
- <141> 2012-10-03
- <150> 61/542,533
- <151> 2011-10-03
- <160> 6
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 758
- <212> RNA
- <213> 人类

[0001]

```

<400> 1
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauuaaag agccaccaug gccggucccg 60
cgacccaaaag cccaugaaa cuuauggccc ugcaguugcu gcuuuggcac ucggcccucu 120
ggacagucca agaagcgacu ccucucggac cugccucauc guugccgcag ucauuccuuu 180
ugaagugucu ggagcaggug cgaaagauuc agggcgaugg agccgcacuc caagagaagc 240
ucucgcgcac auacaaacuu ugccaucccg aggagcucgu acugcucggg cacagcuugg 300
ggauucccug ggcuccucuc ucguccuguc cgucgcaggc uuugcaguug gcagggugcc 360
uuucccagcu ccacuccggu uuguucuugu aucagggacu gcugcaagcc cuugagggaa 420
ucucgccaga auugggcccg acgcuggaca cguugcagcu cgacguggcg gauuucgcaa 480
caaccaucug gcagcagaug gaggaacugg ggauggcacc cgcgcugcag cccacgcagg 540
gggcaauccc ggccuuugcg uccgcguuuc agcgcagggc ggguggaguc cucguagcga 600
gccaccuuca aucauuuuug gaagucucgu accgggugcu gagacaucuu gcgcagccgu 660
gaagcgcugc cuucugcggg gcuugccuuc uggccaugcc cuuuucucu cccuugcacc 720
uguaccucuu ggucuuugaa uaaagccuga guaggaag 758

```

- <210> 2
- <211> 1838
- <212> DNA
- <213> 人类

```

<400> 2
taatacagact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggaa gatgcgaaga acatcaagaa gggacctgcc ccgttttacc ctttgagga 120
cggtagacga ggagaacacg tccacaaggc gatgaaacgc tacgccttg tccccggaac 180
gattgcgttt accgatgcac atattgaggt agacatcaca tacgcagaat acttcgaaat 240
gtcggtagag ctggcggaag cgatgaagag atatggtctt aacactaatc accgcacgt 300
ggtgtgttcg gagaactcat tgcagttttt catgccggtc cttggagcac ttttcatcgg 360
ggtgcagtc gcgccagcga acgacatcta caatgagcgg gaactcttga atagcatggg 420
aatctcccag cgcacggtcg tgtttgtctc caaaaagggg ctgcagaaaa tcctcaactg 480
gcagaagaag ctccccatta ttcaaaagat catcattatg gatagcaaga cagattacca 540
agggttcag tcgatgtata cctttgtgac atcgatttg ccgccagggt ttaacgagta 600
tgacttcgtc cccgagtcac ttgacagaga taaaaccatc gcgctgatta tgaattctc 660
gggtagcacc ggtttgceaa aggggggtgc gttgcccac cgcactgctt gtgtcgggtt 720
ctcgcacgct agggatccta tctttggtaa tcagatcatt cccgacacag caatectgtc 780
cgtggtacct tttcatcacg gttttggcat gttcacgact ctcggctatt tgatttgcgg 840
tttcagggtc gtacttatgt atcggttcga ggaagaactg tttttgagat ccttgaaga 900
ttacaagatc cagtcggccc tccttgtgcc aacgcttttc tcattctttg cgaatcgac 960
acttattgat aagtatgacc ttccaactc gcatgagatt gcctcagggg gagcgcctct 1020
tagcaaggaa gtcggggagg cagtgcccaa gcgcttccac cttcccggaa ttcggcaggg 1080
atacgggctc acggagacaa catcccgcat ccttatcac cccgagggtg acgataagcc 1140
gggagccgct ggaaaagtgg tccccttctt tgaagccaag gtcgtagacc tcgacacggg 1200
aaaaaccctc ggagtgaacc agaggggcca gctctgcgtg agagggcca tgatcatgct 1260
aggttacgtg aataaccctg aagcagcaga tgcgctgac gacaaggatg ggtggttga 1320
ttcgggagac attgcctatt gggatgagga tgagcacttc ttatcgtag atcgacttaa 1380
gagcttgatc aaatacaaag gctatcaggt agcgcctgcc gagctcgagt caatectgct 1440
ccagcacccc aacattttcg acgccggagt ggccgggttg cccgatgac acgagggtga 1500
gctgccagcg cccgtggtag tctcgaaca tgggaaaaca atgaccgaaa aggagatcgt 1560
ggactacgta gcatacacaag tgacgactgc gaagaaactg aggggagggg tagtctttgt 1620
ggacgaggtc ccgaaaggct tgactgggaa gcttgacgct cgcaaatcc gggaaatcct 1680
gattaaggca aagaaggcg ggaaaatcgc tgtctgataa gctgccttct gcgggcttg 1740

```

ccttctggcc	atgcccttct	tctctccctt	gcacctgtac	ctcttggctt	ttgaataaag	1800
cctgagtagg	aaggcggccg	ctcgagcatg	catctaga			1838

<210> 3
 <211> 1796
 <212> RNA
 <213> 人类

<400> 3

gggaaauaag	agagaaaaga	agaguaagaa	gaaauuaag	agccaccaug	gaagaugcga	60
agaacaucaa	gaagggaccu	gccccguuuu	accuuuugga	ggacgguaca	gcaggagaac	120
agcuccacaa	ggcgauaaaa	cgcucgcgcc	uggucccccg	aacgauugcg	uuuaccgaug	180
cacauuuuga	gguagacauc	acauacgcag	aaucuuucga	aaugucggug	aggcuggcgg	240
aagcgauгаа	gagauuuggu	cuuaacacua	aucaccgcag	cguggugugu	ucggagaacu	300
cauugcaguu	uuucaugccg	guccuuuggag	cacuuuucau	cggggucgca	gucgcgcag	360
cgaacgcacu	cuacaauagag	cgggaacucu	ugaauagcau	gggaaucucc	cagccgacgg	420
ucguguuuuu	cuccaaaaag	gggcugcaga	aaaucucuca	cgucgagaag	aagcucccca	480
uuauucaaaa	gaucaucauu	auggauagca	agacagauua	ccaaggguuu	cagucgaugu	540
auaccuuugu	gacaucgcac	uugccgccag	gguuuaacga	guaugacuuc	guccccgagu	600
cauuugacag	agauaaaacc	aucgcgcuga	uuauagaauu	cucggguagc	accgguuugc	660
caaagggggg	ggcguugccc	caccgcacug	cuugugugcg	guucucgcac	gcuagggauu	720
cuauuuugg	uaauacagau	auucccgaca	cagcaauccu	guccguggua	ccuuuucau	780
acgguuuugg	cauguucacg	acucucggcu	auuugauuug	cguuuucagg	gucguacuua	840
uguauccguu	cgaggaagaa	cuguuuuuga	gauccuuuca	agauuacaa	auccagucgg	900
cccuccuuuu	gccaacgcuu	uucucuuucu	uugcgaaauu	gacacuuuuu	gauaaguauu	960
accuuuccaa	ucugcaugag	auugccucag	ggggagcgcc	gcuuagcaag	gaagucgggg	1020
aggcaguggc	caagcgcuuu	caccuucccg	gaauucggca	gggauacggg	cucacggaga	1080
caacauccgc	gauccuuuau	acgcccagag	gugacgauaa	gccgggagcc	gucggaaaaa	1140
ugguccccuu	cuuuagaagc	aaggucguag	accucgacac	gggaaaaacc	cucggaguga	1200
accagagggg	cgagcucugc	gugagagggc	cgaugaucau	gucagguuac	gugaauaacc	1260
cugaagcgac	gaaugcgcug	aucgacaagg	augggugguu	gcauucggga	gacauugccu	1320
auuggggaug	ggaugagcac	uucuuuauuc	uagaucgacu	uaagagcuug	aucauuuaca	1380
aagcuaucua	ggaagcgccu	gccgagcucg	agucaauccu	gcuccagcac	cccaacauuu	1440
ucgagcgcgg	aguggccggg	uugcccgaug	acgacgcggg	ugagcugcca	gcggccgugg	1500
uaguccucga	acaugggaaa	acaaugaccg	aaaaggagau	cguggacuac	guagcaucac	1560
aagugacgac	ugcgaagaaa	cugaggggag	ggguagucuu	uguggacgag	gucccgaag	1620
gcuugacugg	ggaagcuuga	gcucgcaaaa	uccgggaaau	ccugauuaag	gcaaagaag	1680
gcgggaaaaa	cgucugucuga	uaagcugccu	ucugcggggc	uugccuucug	gccaugcccu	1740
ucuuucucc	cuugcaccug	uaccucuugg	ucuuugaaua	aagccugagu	aggaag	1796

[0002]

<210> 4
 <211> 854
 <212> RNA
 <213> 人类

<400> 4

gggaaauaag	agagaaaaga	agaguaagaa	gaaauuaag	agccaccaug	guauccaagg	60
gggaggagga	caacauggcg	aucaucaagg	aguucaugcg	auucaaggug	cacauggaag	120
guucggucua	cggacacgaa	uuuuaaaucg	aaggagaggg	ugaaggaagg	cccuauaag	180
ggacacagac	cgcgaaacuc	aaggucacga	aagggggacc	acuuccuuuc	gccugggaca	240
uuuuuucgcc	ccgguuuuug	uacgggucca	aagcauaugu	gaagcauucc	gccgauauuc	300
cugacuauuc	gaaacucagc	uuuuccgagg	gauucaagug	ggagcggguc	augaacuuiu	360
aggacggggg	uguagucacc	guaacccaag	acucaagccu	ccaagacggc	gaguucaucu	420
acaaggucaa	acugcggggg	acuaacuuc	cgucggaugg	gccggugaug	cagaagaaaa	480
cgauggggaug	ggaagcgua	ucggagagga	uguaccaga	agauggugca	uugaaggggg	540
agaucuaagc	gagacugaag	uugaaagaug	ggggacauua	ugaugccgag	gugaaaacga	600
cauacaaagc	gaaaagccg	gucgagcuuc	ccggagcgua	uaaugugauu	aucaaguugg	660
auuuuacuu	acacaauag	gacuacacaa	uugucgaaca	guacgaacgc	gcugagggua	720
gacacucgac	gggagggcaug	gacgaguugu	acaaaugaua	agcugccuuc	ugcggggcuu	780
gccuuucggc	caugcccuuc	uucucuccu	ugcaccugua	ccucuugguc	uuugaauaaa	840
gccugaguag	gaag					854

<210> 5
 <211> 725
 <212> RNA
 <213> 人类

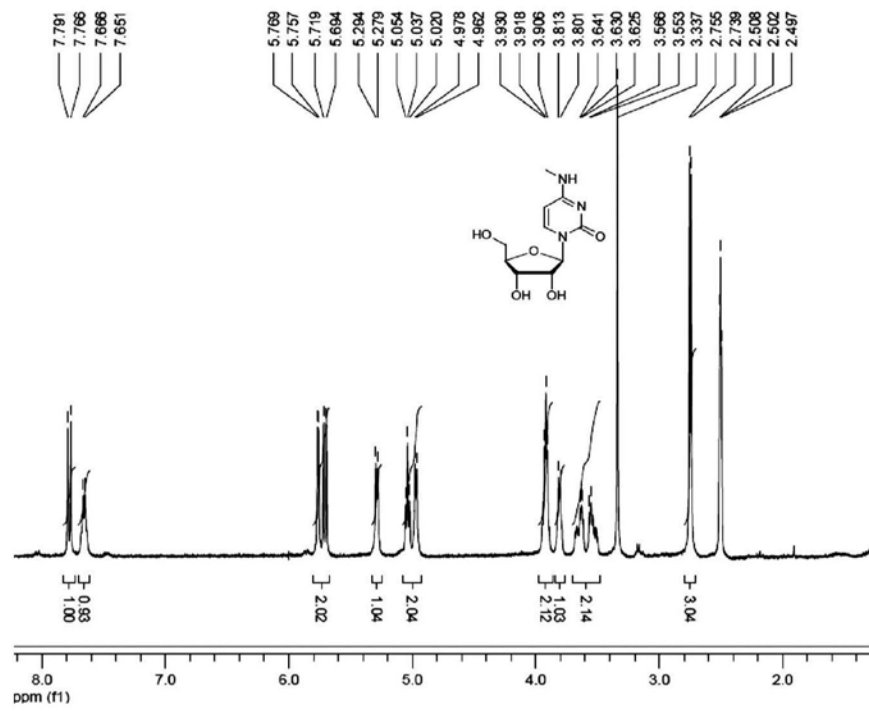
<400> 5

gggaaauaag	agagaaaaga	agaguaagaa	gaaauuaag	agccaccaug	ggagucgacg	60
aguuuccgc	gugguuugg	uugcugcugu	cgcucuugag	ccucccacug	ggacugccug	120
ugcugggggc	accaccaga	uugaucugcg	acucacgggu	acuugagagg	uaccuuucug	180
aagccaaaga	agccgaaaac	aucacaaccg	gaugcgcgga	gcacugcucc	cucaaugaga	240
acauuacugu	accggauaca	aaggucaauu	ucuaugcaug	gaagagaauu	gaaguaggac	300
agcagggccu	cgaagugugg	caggggcucg	cgcuuuuguc	ggagggcgug	uugcgggguc	360
aggccuccu	cgucaacuca	ucacagccgu	gggagcccu	ccaacuucuu	gucgaaaaag	420

cggugucggg	gcuuccgcagc	uugacgacgu	ugcuucgggc	ucugggcgca	caaaaggagg	480
cuauuuucgcc	gccugacgcg	gccuccgcgg	caccccuccg	aacgaucacc	gcggacacgu	540
uuaggaagcu	uuuuagagug	uacagcaauu	uccuccgcgg	aaagcugaaa	uuguauacug	600
gugaagcgug	uaggacaggg	gaucgcugau	aagcugccuu	cugcggggcu	ugccuucugg	660
ccaugcccuu	cuucucuccc	uugcaccugu	accucuuggu	cuuugaauaa	agccugagua	720
ggaag						725
<210>	6					
<211>	1536					
<212>	RNA					
<213>	人类					
<400>	6					
gggaaauaag	agagaaaaga	agaguaagaa	gaaauuaaag	agccaccaau	gcagcgcguc	60
aacaugauua	uggccgaauc	gccgggacuc	aucacaauuc	gccucuuggg	uuaucucuug	120
ucggcagaau	guaccguguu	cuuggaucac	gaaaacgcga	acaaaauucu	uaaucgcccg	180
aagcgguaaa	acuccgggaa	acuugaggag	uuugucagg	gcaaucuuga	acgagagugc	240
auggaggaga	aaugcuccuu	ugaggaggcg	agggaagugu	uugaaaaac	agagcgaaca	300
acggaguuuu	ggaagcaaua	cguagauggg	gaccagugug	agucgaauc	gugccucaau	360
gggggaucau	guaaagauga	caucaauagc	uaugaaugcu	ggugcccguu	uggguuuuua	420
gggaagaacu	gugagcugga	ugugacgugc	aacaucaaaa	acggacgcug	ugagcaguuu	480
uguaagaacu	cggcugacaa	uaagguagua	ugcucgugca	cagagggaua	ccggcuggcg	540
gagaaccaaa	aaucgucgga	gcccgagac	ccguucccuu	gugggagggu	gagcguuca	600
cagacuagca	aguugacgag	agcggagacu	guauuccccg	acguggacua	cguaacagc	660
accgaagccg	aaacaauccu	cgauaacauc	acgcagagca	cucaguccuu	caaugacuua	720
acgagggucg	uaggguguga	ggacgcgaaa	cccggucagu	ucccuggca	ggugguauug	780
aacggaaaaag	ucgauccuuu	uugggagggu	uccauuguca	acgagaagug	gauugucaca	840
gcggcacacu	gcguagaaac	aggagugaaa	aucacgguag	uggcgggaga	gcauaacauu	900
gaagagacag	agcacacgga	acaaaagcga	aaugucauca	gaaucuuucc	acaccuaaac	960
uauaacgcgg	caucaauuaa	guacaaucac	gacaucgcac	uuuuggagcu	ugacgaaccu	1020
uuggugcuua	auucguacgu	caccccuauu	uguauugccg	acaaagagua	uacaaacauc	1080
uucuugaaaa	ucggcuccgg	guacguaucg	ggcuggggca	gaguguucca	uaaggguaaga	1140
uccgcacugg	uguugcaaua	ccucagggug	ccccucgugg	aucgagccac	uuugucgagg	1200
uccaccaaau	ucacaaucua	caacaauaug	uucugucggg	gauuccauga	aggugggaga	1260
gauagcugcc	agggagacuc	aggggguccc	cacgugacgg	aagucgaggg	gacgucuuuu	1320
cugacgggaa	uuauucuaug	gggagaggaa	ugucgauga	aggggaaaua	uggcaucuc	1380
acuaaaagugu	cacgguaugu	caauuggauc	aaggaaaaga	cgaaacucac	gugaucagcc	1440
agcgcugccu	ucugcggggc	uugccuucug	gccaugcccu	ucuucucucc	cuugcaccug	1500
uaccucuugg	ucuuugaaua	aagccugagu	aggaag			1536

[0003]

A.



B.

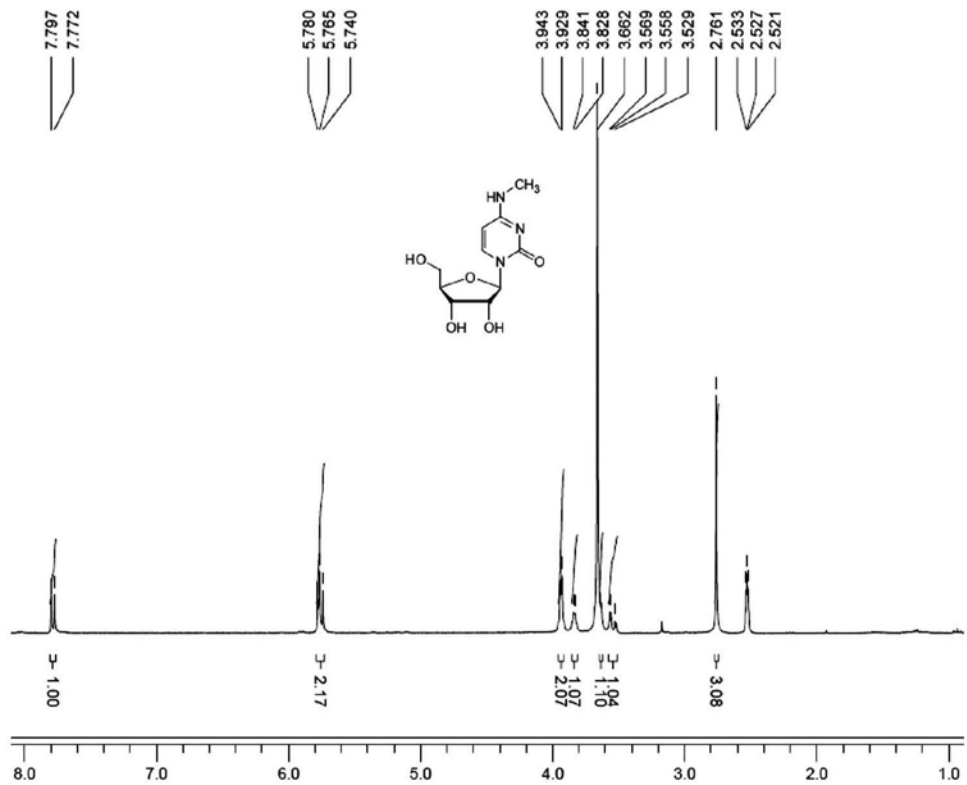
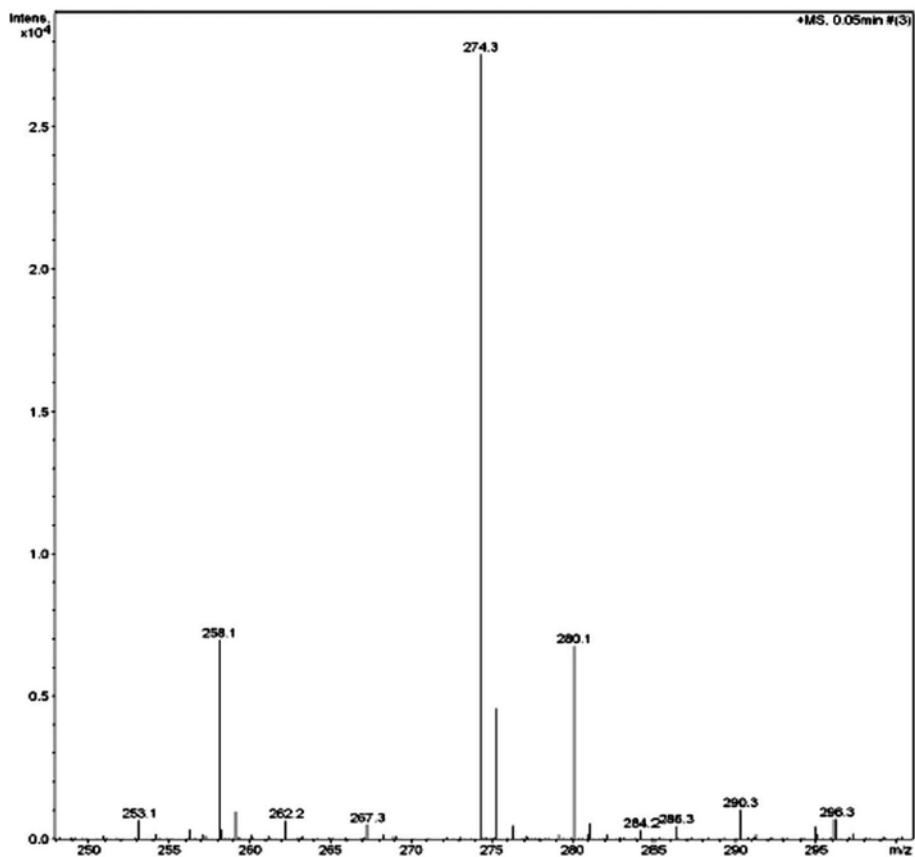
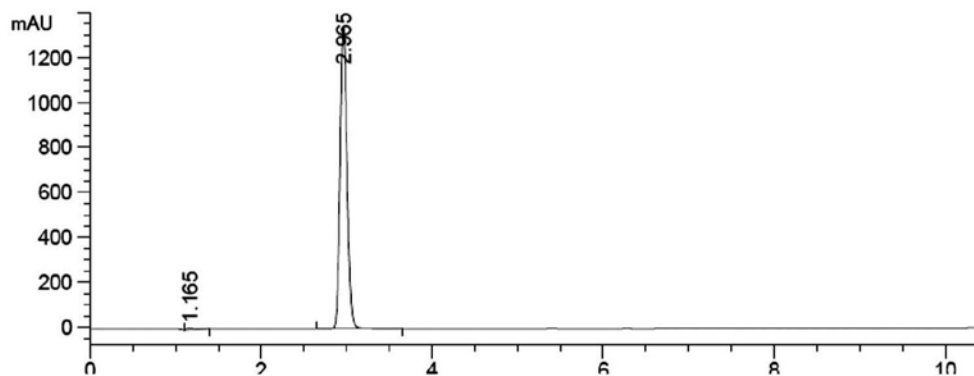


图1

C.

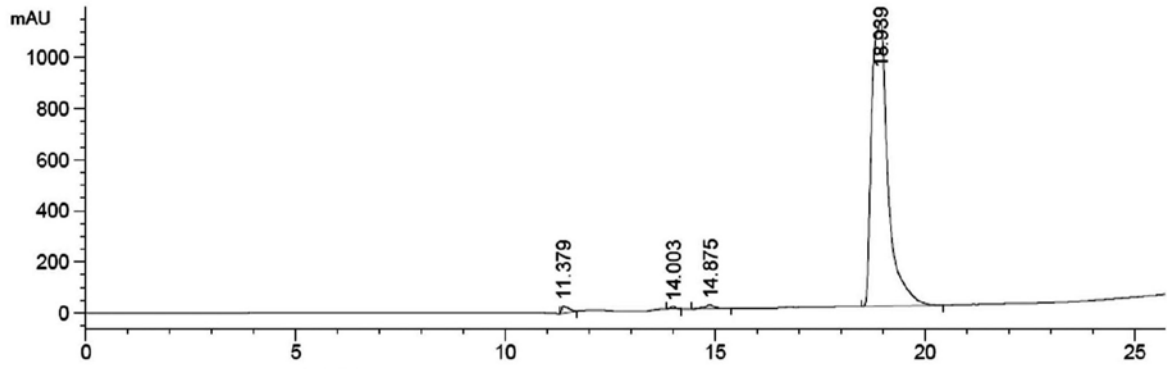


D.



峰 #	保留时间 [min]	类型	宽度 [min]	面积 mAU *s	高度 [mAU]	面积 %
1	1.165	BB	0.0854	49.00038	7.90421	0.6403
2	2.965	BB	0.0880	7603.66650	1340.77930	99.3597

图1续



峰 #	保留时间 [min]	类型	宽度 [min]	面积 mAU *s	高度 [mAU]	面积 %
1	11.379	BB	0.1425	300.16064	27.69099	0.9734
2	14.003	BB	0.1065	71.24556	10.35608	0.2311
3	14.875	BB	0.2088	222.77209	15.20542	0.7225
4	18.939	BB	0.3630	3.02414e4	1115.21118	98.0731

总计: 3.08355e4 1168.46368

图2

A.

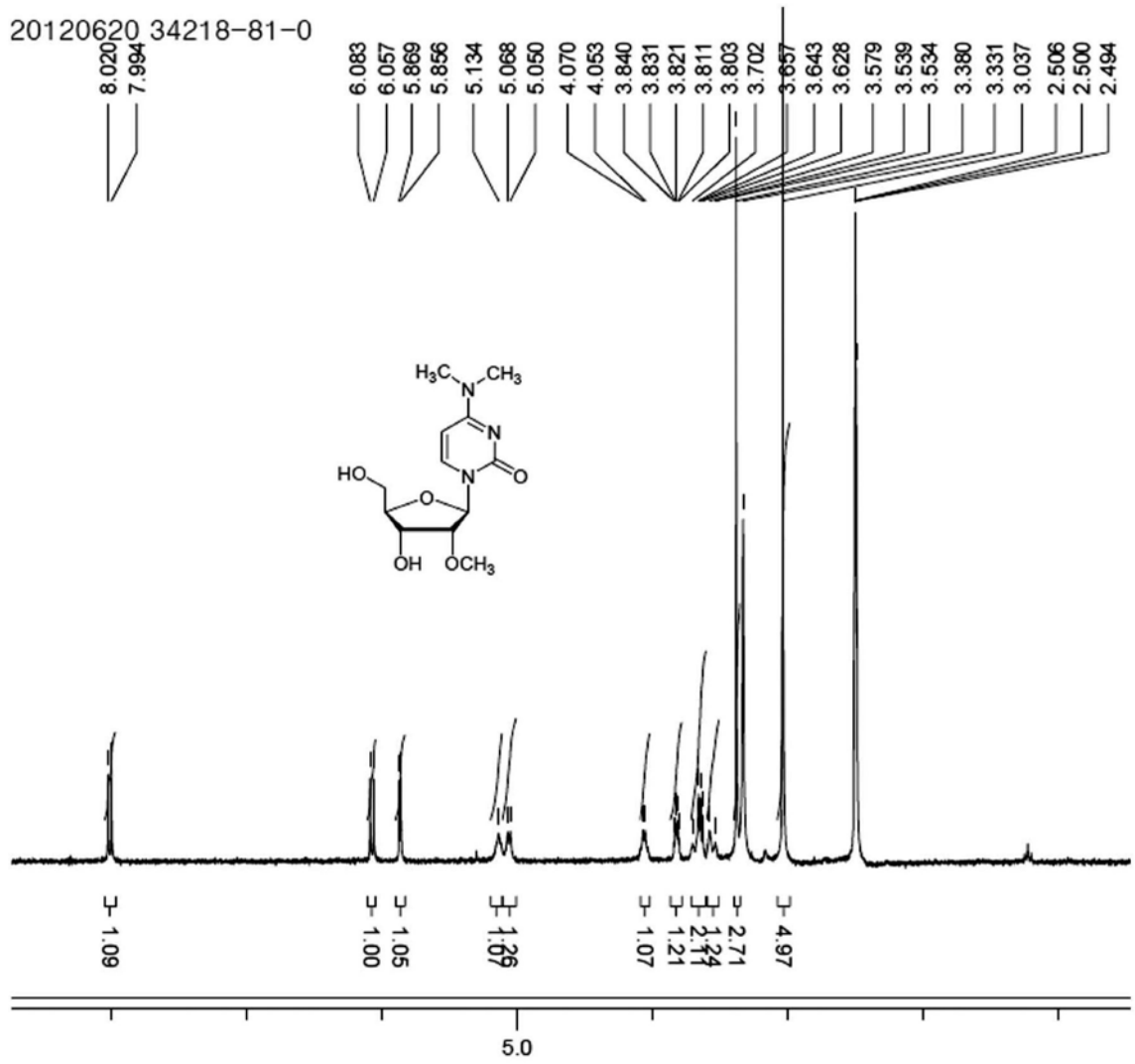
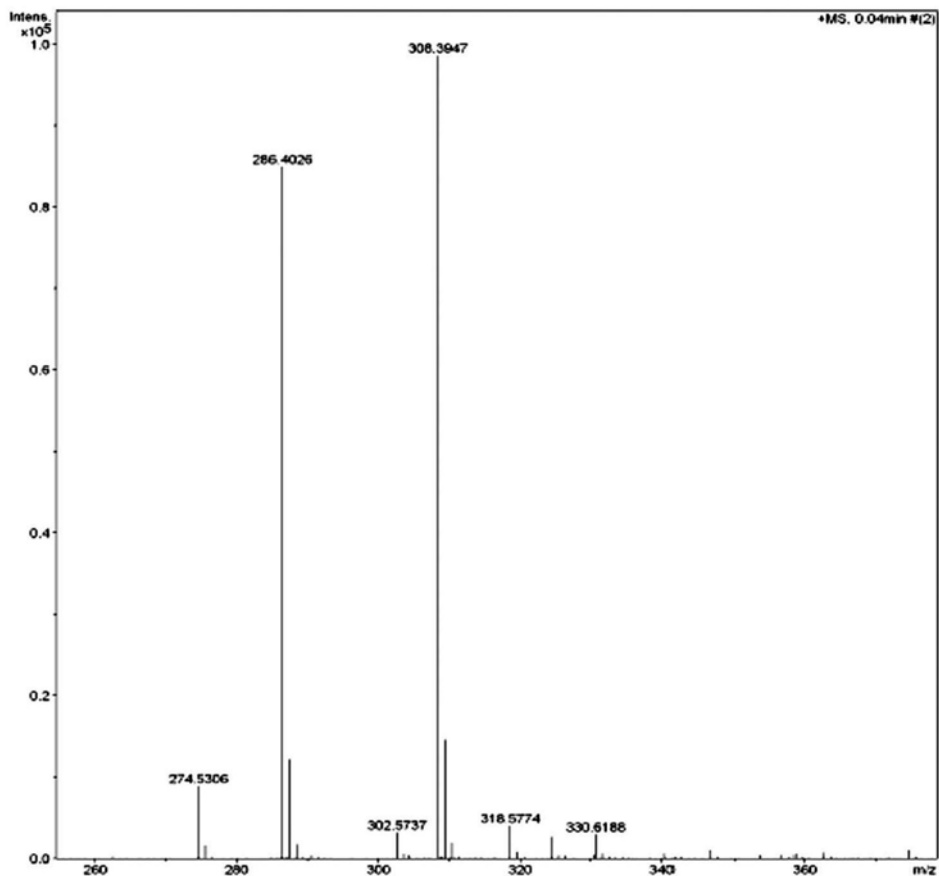
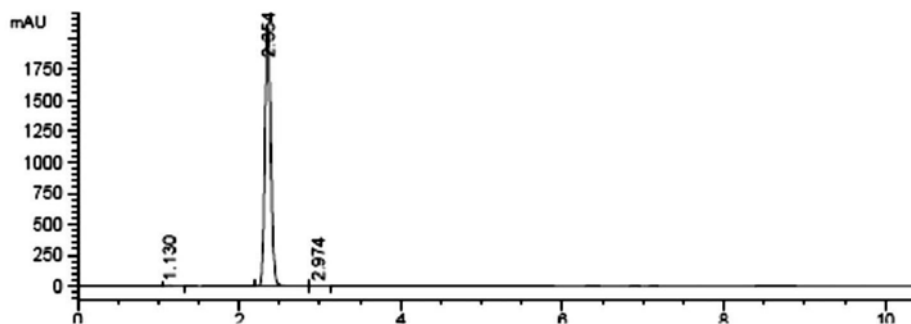


图3

B.



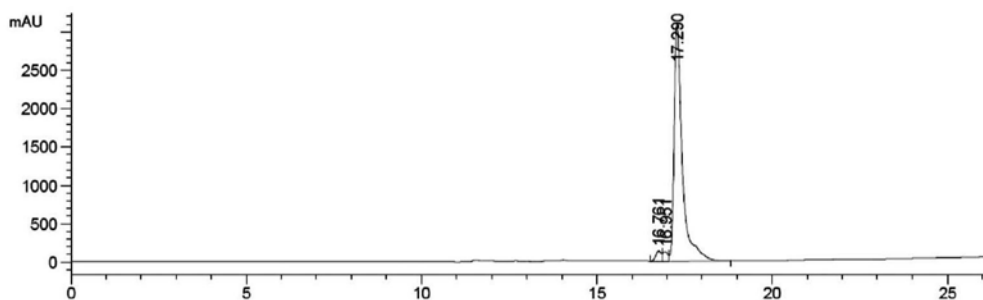
C.



信号1: VWD1 A, 波长=220 nm

峰 #	保留时间 [min]	类型	宽度 [min]	面积 mAU *s	高度 [mAU]	面积 %
1	1.130	BB	0.0661	37.51406	8.03561	0.3570
2	2.354	BB	0.0769	1.04566e4	2102.98633	99.4990
3	2.974	BB	0.0923	15.14040	2.56062	0.1441

图3续

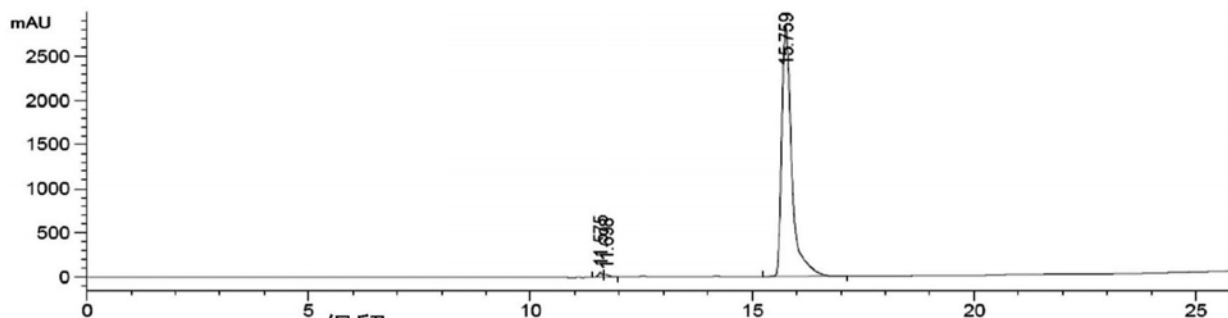


信号1: VWD1 A, 波长=220 nm

峰 #	保留时间 [min]	类型	宽度 [min]	面积 mAU *s	高度 [mAU]	面积 %
1	16.761	BV	0.1576	1363.03906	131.20972	2.5836
2	16.951	VV	0.1547	1289.82593	122.70110	2.4448
3	17.290	VB	0.2391	5.01047e4	3083.80176	94.9716

总计: 5.27575e4 3337.71257

图4



峰 #	保留时间 [min]	类型	宽度 [min]	面积 mAU *s	高度 [mAU]	面积 %
1	11.575	BV	0.0803	323.32678	57.39472	0.7124
2	11.698	VB	0.1234	239.96255	29.24231	0.5287
3	15.759	BB	0.2395	4.48198e4	2839.69604	98.7588

总计: 4.53831e4 2926.33308

图5

A.

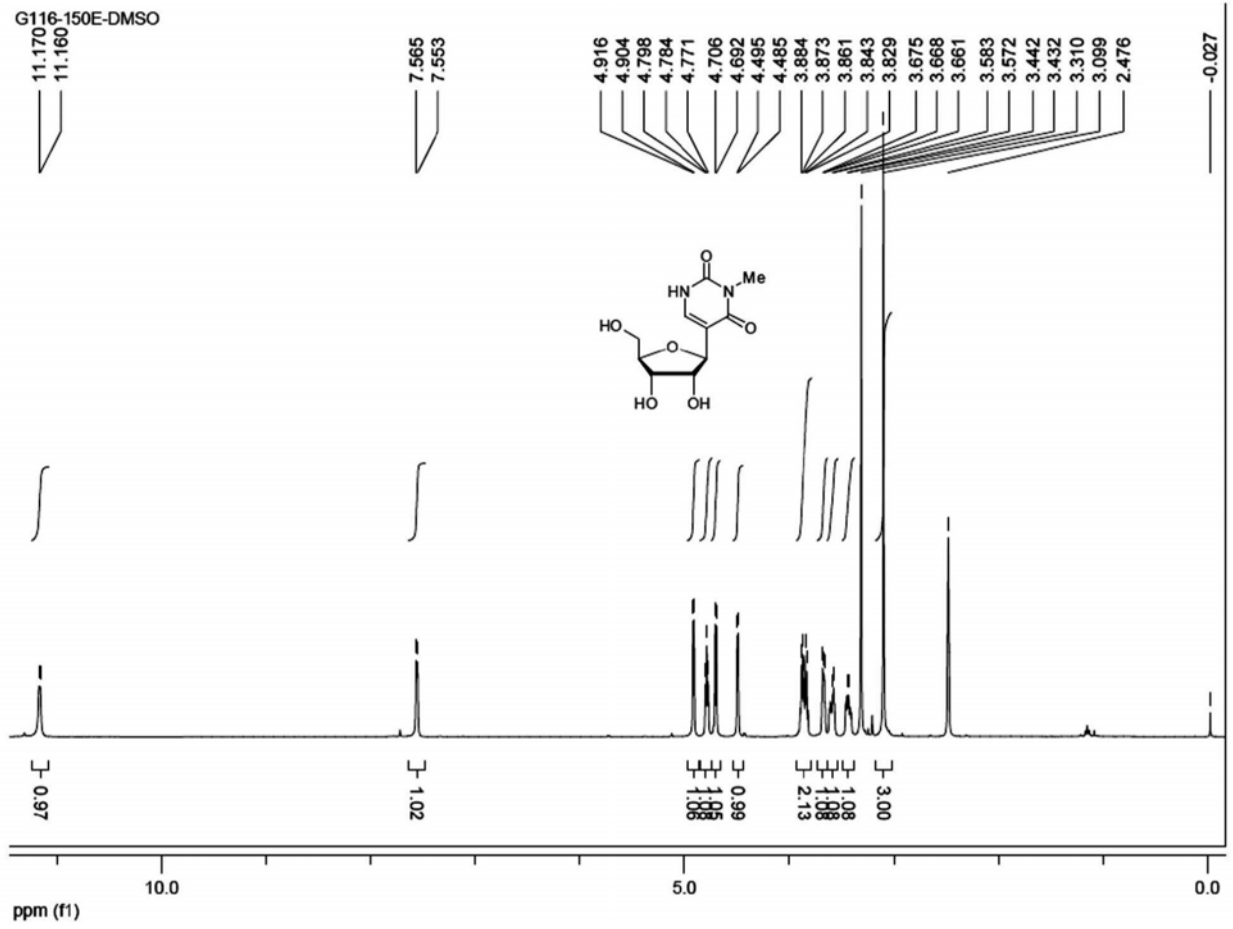
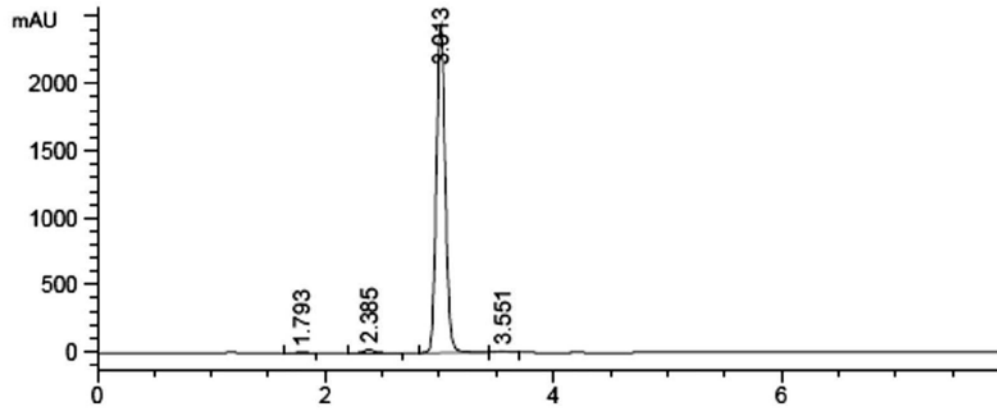


图6

B.



信号1:VWD1 A, 波长=220 nm

峰 #	保留时间 [min]	类型	宽度 [min]	面积 mAU *s	高度 [mAU]	面积 %
1	1.793	BB	0.0688	14.03317	3.01915	0.1020
2	2.385	BB	0.0754	123.03405	25.44002	0.8940
3	3.013	BB	0.0865	1.35581e4	2446.08813	98.5128
4	3.551	BB	0.0945	67.61845	11.31690	0.4913

总计: 1.37628e4 2485.86420

图6续

A.

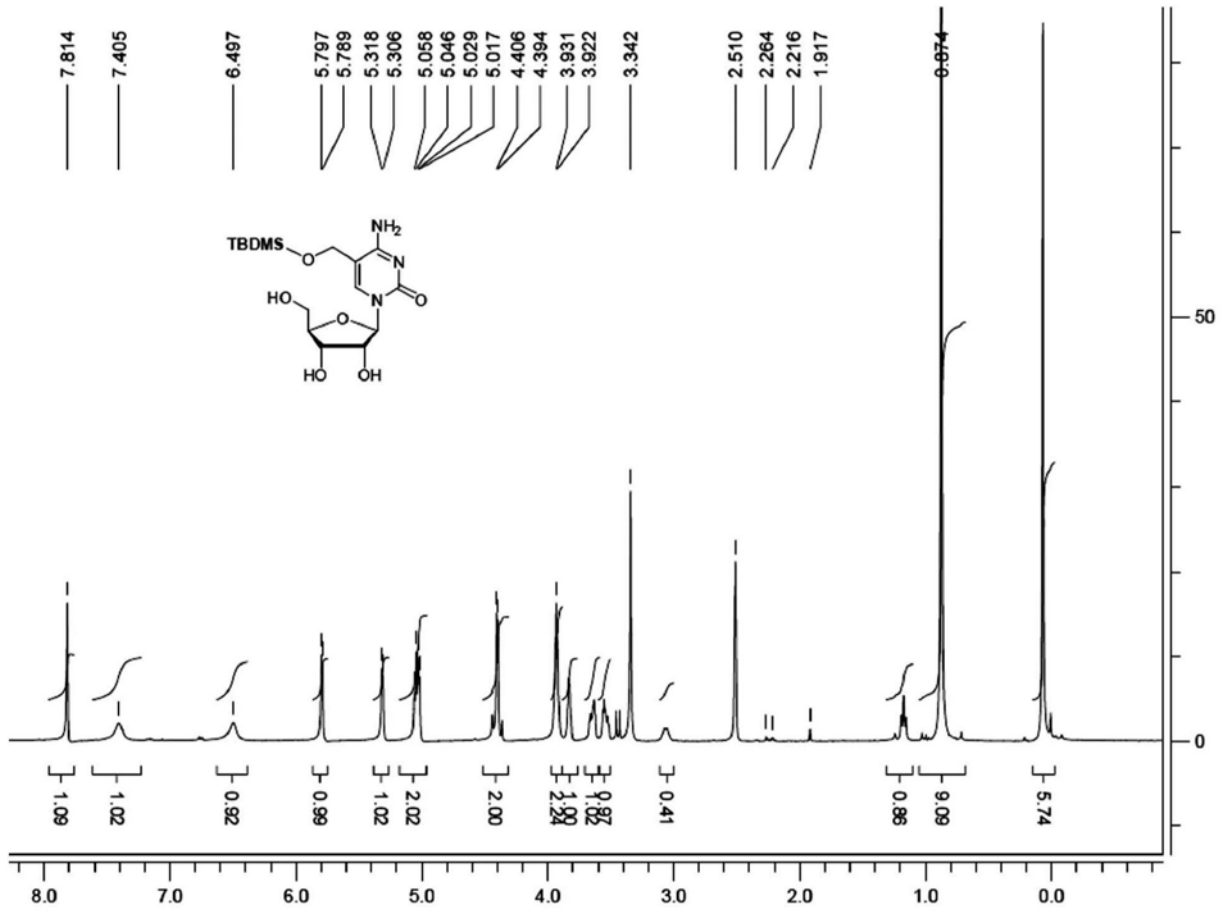
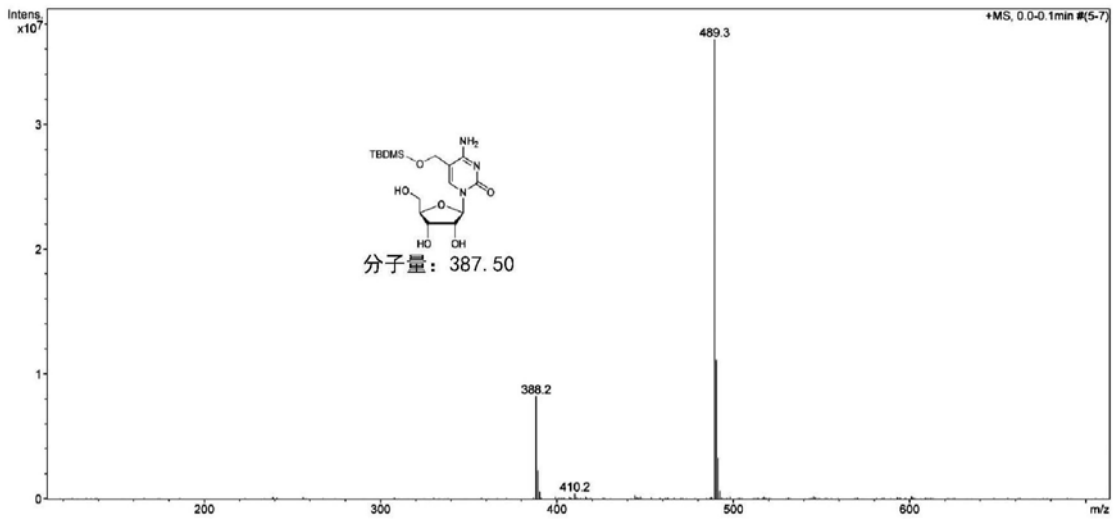
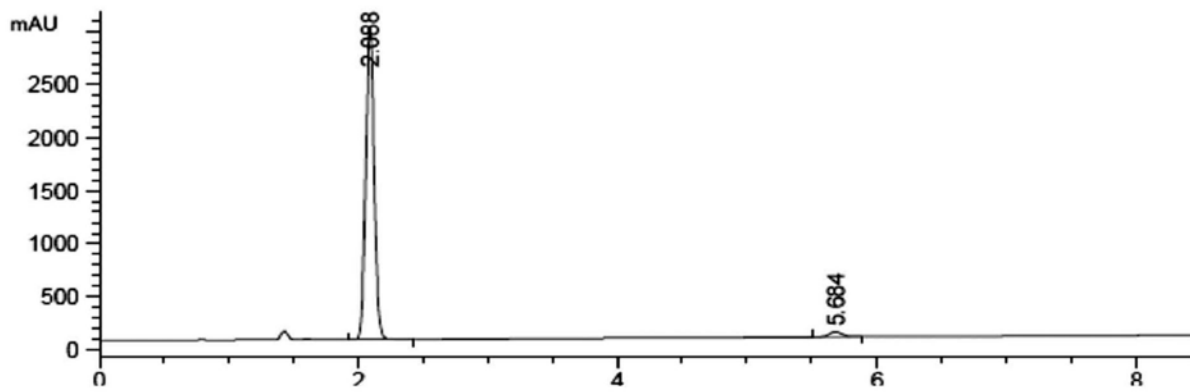


图7

B.



C.



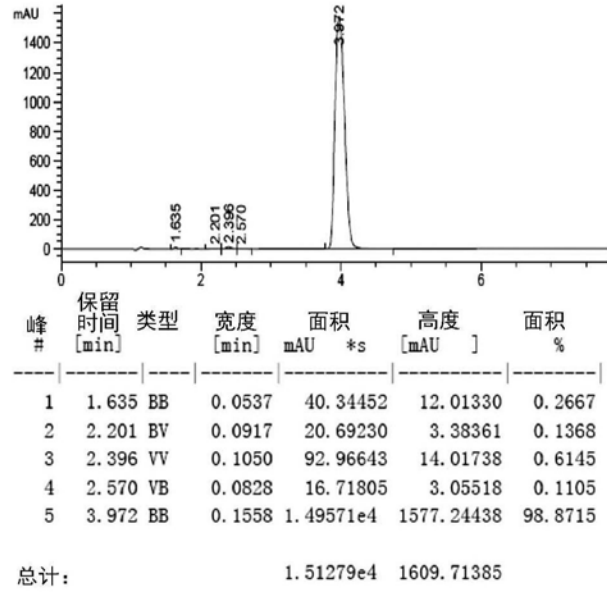
信号1:VWD1 A, 波长=220 nm

峰 #	保留时间 [min]	类型	宽度 [min]	面积 mAU *s	高度 [mAU]	面积 %
1	2.088	BB	0.0704	1.33371e4	2942.27563	97.5729
2	5.684	BB	0.1060	331.75055	48.51453	2.4271

总计: 1.36689e4 2990.79016

图7续

B.



C.

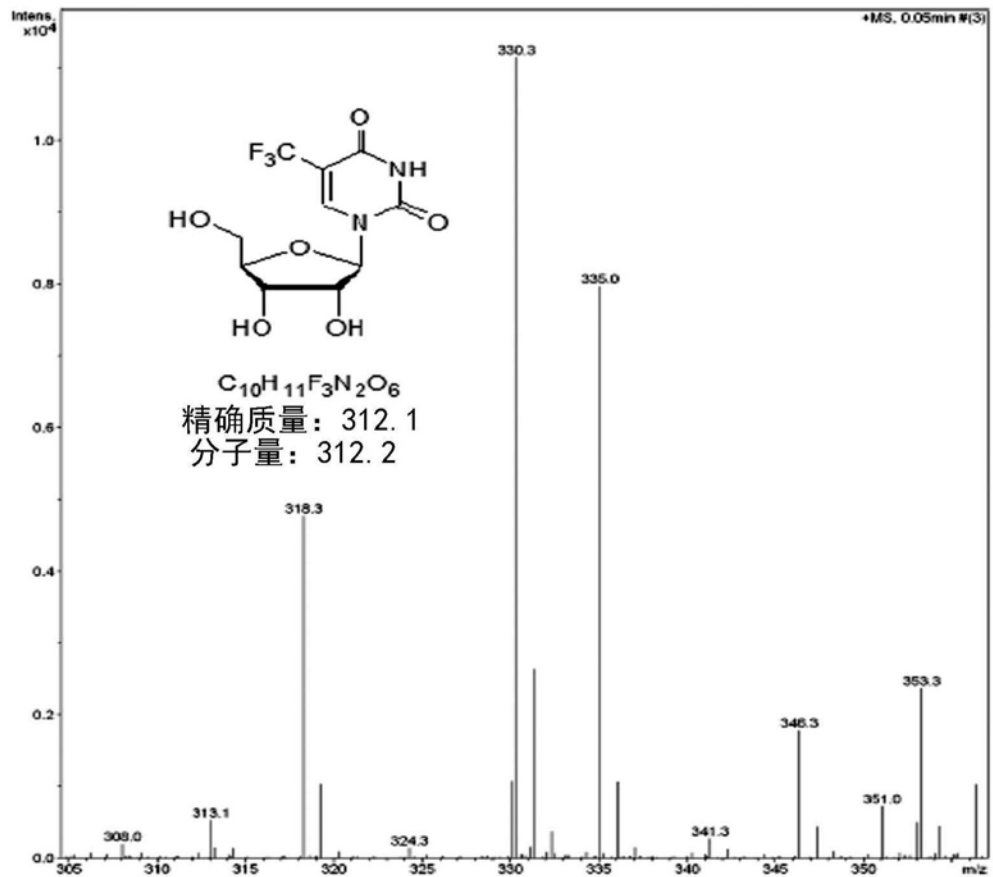


图8续

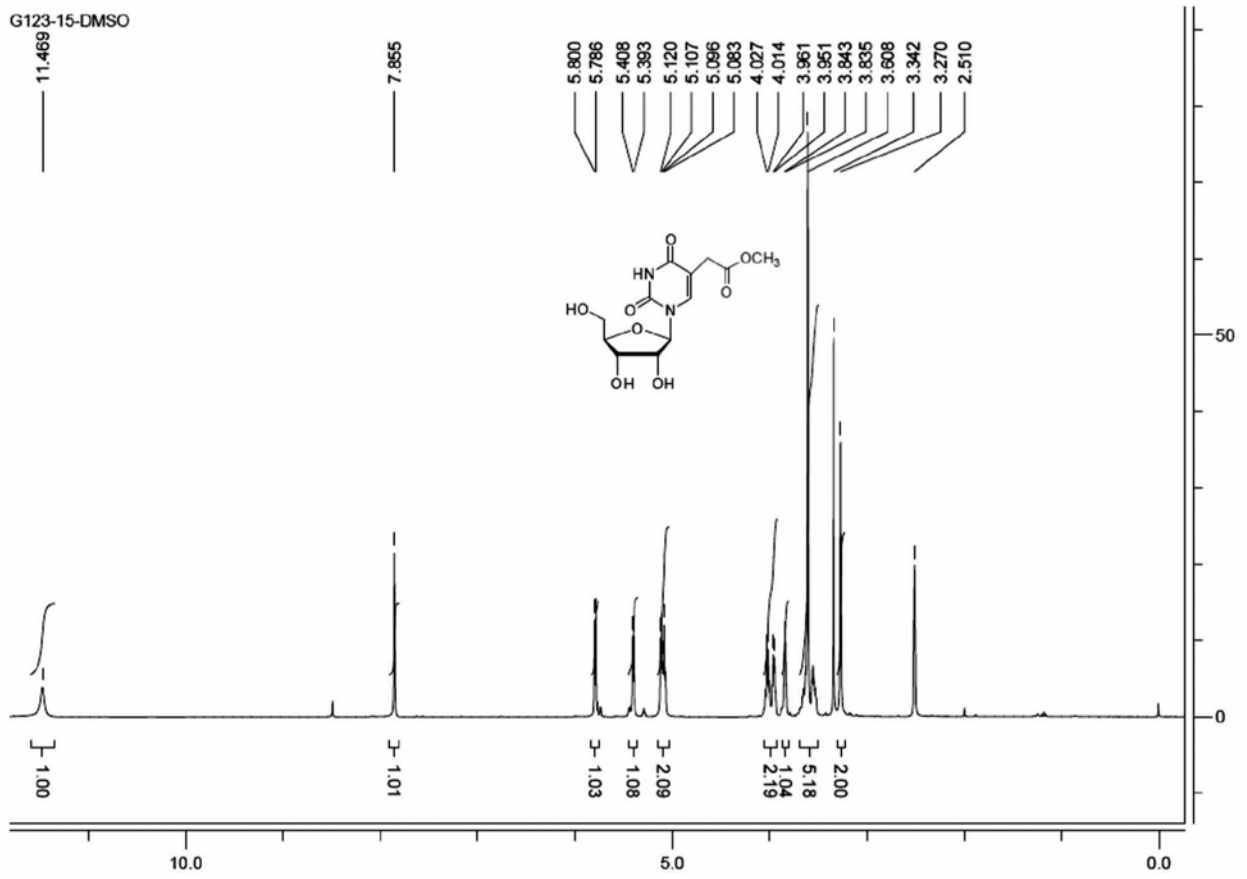


图9

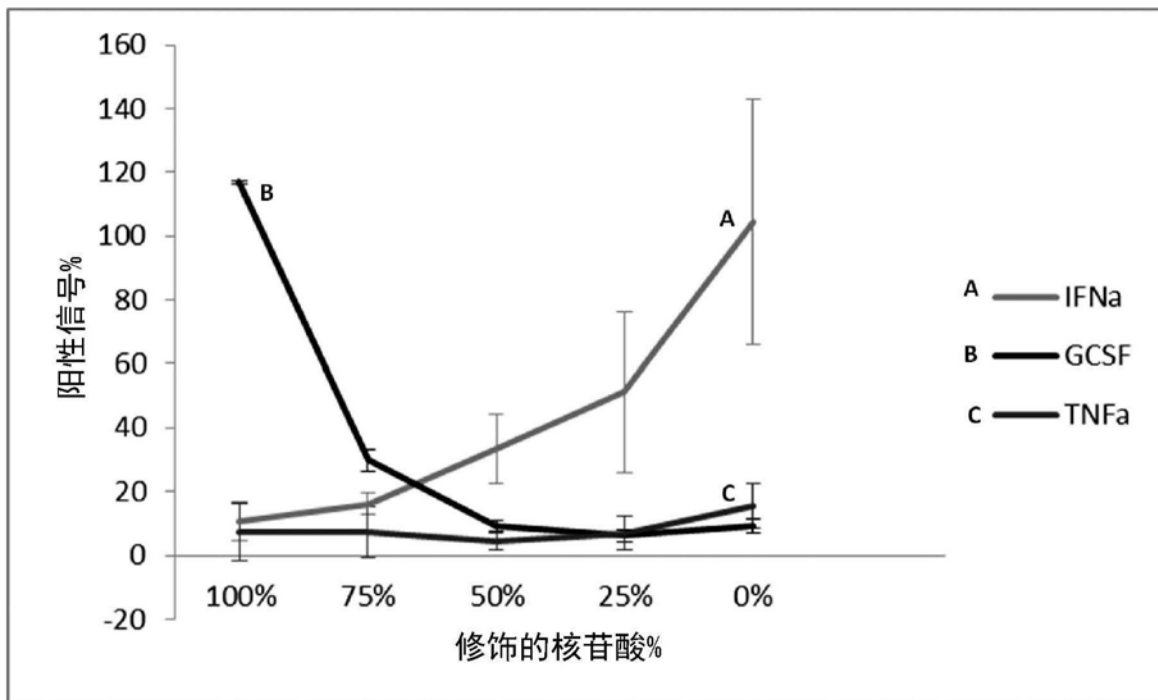


图10