



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118792301 A

(43) 申请公布日 2024.10.18

(21) 申请号 202410921180.0

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2012.03.28

C12N 15/113 (2010.01)

(30) 优先权数据

61/468,830 2011.03.29 US

61/568,942 2011.12.09 US

(62) 分案原申请数据

201280024717.9 2012.03.28

(71) 申请人 阿尔尼拉姆医药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D·邦克罗特 布莱恩·贝当古

I·陶德贾斯卡

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理师 付文川

权利要求书1页 说明书107页

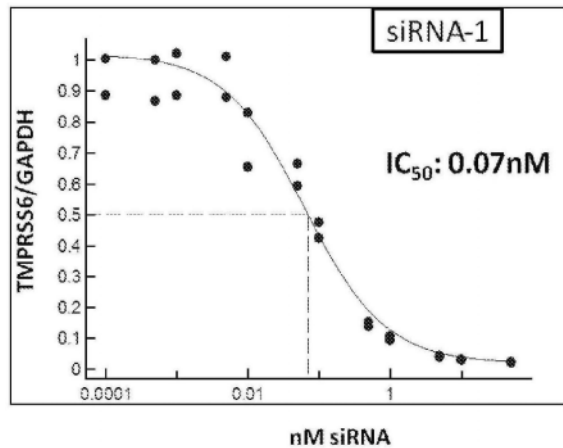
序列表(电子公布) 附图9页

(54) 发明名称

用于抑制TMPRSS6基因表达的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及用于抑制TMPRSS6基因表达的组合物和方法,具体而言,本发明涉及靶向TMPRSS6基因的双链核糖核酸(dsRNA)组合物,以及使用这类dsRNA组合物来抑制TMPRSS6表达的方法。



1. 一种用于抑制TMPRSS6表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包含一个有义链和一个反义链,该反义链包含与TMPRSS6转录物互补的一个区域,该区域包含与表2、3或4中列出的反义序列之一相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

2. 如权利要求1所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含至少一个修饰的核苷酸。

3. 如权利要求2所述的dsRNA,其中所述修饰的核苷酸的至少一个选自下组,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基的核苷酸和与胆甾烯基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基连接的末端核苷酸。

4. 如权利要求2所述的dsRNA,其中所述修饰的核苷酸选自下组,该组由以下各项组成:2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、非碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、磷酰胺酯和包含非天然碱基的核苷酸。

5. 如权利要求1所述的dsRNA,其中这一互补区域是至少17个核苷酸长度。

6. 如权利要求1所述的dsRNA,其中这一互补区域是在19个和21个核苷酸长度之间。

7. 如权利要求1所述的dsRNA,其中这一互补区域是19个核苷酸长度。

8. 如权利要求1所述的dsRNA,其中每个链不多于30个核苷酸长度。

9. 如权利要求1所述的dsRNA,其中至少一个链包含至少1个核苷酸的3'突出端。

10. 如权利要求1所述的dsRNA,其中至少一个链包含至少2个核苷酸的3'突出端。

用于抑制TMPRSS6基因表达的组合物和方法

[0001] 本申请是申请号为201280024717.9(202110863537.0),申请日为2012年3月28日,发明名称为“用于抑制TMPRSS6基因表达的组合物和方法”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2011年3月29日提交的美国临时申请61/468,830和2011年12月9日提交的美国临时申请61/568,942的权益。这些在先申请通过引用以其全文结合在此。

技术领域

[0004] 本发明涉及特异性抑制TMPRSS6基因的表达。

背景技术

[0005] TMPRSS6(跨膜蛋白酶,丝氨酸6)编码一种II型丝氨酸蛋白酶并且主要在肝脏中表达。TMPRSS6通过结合并且以蛋白酶解方式降解肝杀菌肽(hepcidin)激活物和造成肝杀菌肽水平下调的BMP辅助受体HJV(血幼素)影响肝脏中的铁水平。

[0006] TMPRSS6由以下组成:一个短N端胞质内尾、一个II型跨膜结构域、由两个胞外CUB(补体因子C1s/C1r、海胆胚生长因子和BMP(骨形态发生蛋白))结构域组成的茎区域、三个LDLR(A类低密度脂蛋白受体)结构域和C端胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域。在胞外结构域中也存在N-糖基化的共有序列位点并且在胞质内尾区域内存在潜在磷酸化位点。

发明内容

[0007] 在此描述了实现RNA诱导性沉默复合物(RISC)介导的TMPRSS6基因的RNA转录物切割的组合物和方法,例如在细胞或哺乳动物中。还描述了用于治疗由TMPRSS6基因表达引起的病理状况和疾病,例如以铁过多为特征的病症(例如,地中海贫血,例如,中间型 β -地中海贫血或 α -地中海贫血)的组合物和方法。还描述了用于减少或阻止铁吸收或动员,由此缓解某些病理状况中铁过量的组合物和方法。在此所述的方法和组合物对于治疗血色素沉着症(体内铁堆积)总体上是有用的。

[0008] 如在此使用,术语“iRNA”指一种物质,含有如在此限定该术语的RNA并且经RNA诱导的沉默复合物(RISC)途径介导RNA转录物的靶向切割。在一个实施例中,如在此所述的iRNA抑制细胞或哺乳动物中TMPRSS6的表达。可替代地,在另一个实施例中,iRNA上调细胞或哺乳动物中TMPRSS6的表达。

[0009] 在此表征的组合物中所包括的iRNA涵盖具有RNA链(反义链)的双链RNA(dsRNA),所述RNA链(反义链)具有长度为30个或更少核苷酸、总体上19-24个核苷酸的与TMPRSS6基因的mRNA转录物的至少部分基本上互补的区域。在一个实施例中,该dsRNA包含至少15个连续核苷酸的区域。

[0010] 在一个实施例中,抑制TMPRSS6基因表达的iRNA包括至少两个彼此互补的序列。iRNA包括具有第一序列的有义链和具有第二序列的反义链。反义链包含与编码TMPRSS6的mRNA的至少部分基本上互补的核苷酸序列,并且这一互补区域是30个或更少个核苷酸和至

少15个核苷酸长度。总体上,该iRNA是19个至24个,例如,19个至21个核苷酸长度。在一些实施例中,iRNA是从约15至约25个核苷酸长度,并且在其他实施例中,该iRNA是从约25至约30个核苷酸长度。一旦与表达TMPRSS6的细胞接触,则该iRNA抑制TMPRSS6基因的表达至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%或至少40%或更多,如通过如在此所述的方法时分析时。在一个实施例中,在稳定的核酸脂质粒子(SNALP)中配制TMPRSS6 iRNA。

[0011] 在一个实施例中,在此表征的iRNA包括选自表2、3或4的有义序列的dsRNA第一序列和选自表2、3或4的相应反义序列的第二序列。在此表征的iRNA分子可以包括天然存在的核苷酸或可以包括至少一个修饰的核苷酸,其包括但不限于2'-O-甲基修饰的核苷酸、具有5'-硫代磷酸酯基的核苷酸团和与胆甾烯基衍生物连接的末端核苷酸。可替代地,修饰的核苷酸可以选自:2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、非碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、磷酸胺酯和包含非天然碱基的核苷酸。总体上,这种修饰的序列将基于所述iRNA的第一序列,所述一序列选自表2、3或4的有义序列,和第二序列,所述第二序列选自表2、3或4的反义序列。

[0012] 在一个实施例中,在此表征的iRNA包括TMPRSS6 dsRNA的有义链,所述有义链具有选自SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:455、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:524、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:494、SEQ ID NO:445、SEQ ID NO:592、SEQ ID NO:47,和SEQ ID NO:540的序列;和由选自SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:456、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:525、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:495、SEQ ID NO:446、SEQ ID NO:593、SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:541的序列组成的反义链。

[0013] 在另一个实施例中,将含有靶向TMPRSS6的dsRNA的组合物给予至具有升高的铁水平(例如,在肝脏中升高的铁水平)的受试者。可以将具有升高的铁水平的受试者确定为受试者who具有升高的血清铁水平(例如,高于350 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、高于500 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 或超过1000 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 或更高)、升高的血清铁蛋白水平,或大于40%、大于45%、大于50%、大于60%或更多的转铁蛋白饱和水平。

[0014] 轻度至中度铁过量由由300-2500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的血清铁蛋白水平指示,而>2500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的水平与增加的心脏疾病风险相关。已经显示>1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的血清铁蛋白与原发性和继发性铁过量中的不良后果相关。绝经前女性中高于200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的血清铁蛋白水平和男性和绝经后女性中高于300 $\mu\text{g}/\text{L}$ 表示因血色素沉着症所致的原发性铁过量,并且高于1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的铁蛋白水平一般提示因铁过量所致的肝损伤。具有高于300 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 或2500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 或更高血清铁蛋白水平的受试者是接受靶向TMPRSS6的dsRNA治疗的候选者。

[0015] 在另一个实施例中,将含有靶向TMPRSS6的dsRNA的组合物给予至具有升高的转铁蛋白水平(例如,大于400 mg/dL 、大于500 mg/dL 、大于1000 mg/dL 或更高的转铁蛋白水平)的受试者。

[0016] 铁水平也可以通过TIBC(总铁结合容量)试验测量。TIBC试验测量如果转铁蛋白完全饱和时血液将携带的铁量。由于转铁蛋白由肝脏产生,所以TIBC可以用来监测者肝功能和营养。具有大于400 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、大于500 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 或大于1000 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 或更高TIBC值的受试者是接受靶向TMPRSS6的dsRNA治疗的候选者。

[0017] 在一个实施例中,dsRNA的给予降低例如肝脏中的或血清中的铁水平至少5%,例

如,至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、或至少60%或更多。在一些实施例中,与治疗前水平相比,将血清铁蛋白水平、血清转铁蛋白水平、转铁蛋白饱和水平或TIBC值中的一种或多种降低至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、或至少60%或更多。在另一个实施例中,铁水平的降低、血清铁蛋白水平的降低、转铁蛋白或转铁蛋白饱和水平的降低或TIBC值的降低维持至少5、10、20、30或40天或更长。

[0018] 在一个实施例中,至少部分地基于需要(与仅基于谁碰巧需要而选择患者相比)更低的铁水平选择受试者。

[0019] 在一个实施例中,如在此所述的iRNA靶向野生型TMPRSS6 RNA转录物,和在另一个实施例中,iRNA靶向突变转录物(例如,携带等位变体的TMPRSS6 RNA)。例如,本发明中表征的iRNA可以靶向TMPRSS6的多态性变体,例如单核苷酸多态性(SNP)。在另一个实施例中,iRNA靶向野生型和突变TMPRSS6转录物二者。仍在另一个实施例中,iRNA靶向TMPRSS6的转录物变体。

[0020] 在一个实施例中,本发明中表征的iRNA靶向TMPRSS6 RNA转录物的非编码区,例如5'或3'非翻译区。

[0021] 在一个实施例中,将本发明中表征的iRNA递送至肝脏,例如,肝脏的肝细胞或枯否细胞,例如,肥大性枯否细胞。

[0022] 在一个方面,本发明中表征的实施例提供含有本发明中表征的至少一种iRNA的细胞。所述细胞通常是哺乳动物细胞,如人细胞。

[0023] 在另一个方面,本发明中表征的实施例提供用于抑制有机体、通常人受试者中TMPRSS6基因表达的药物组合物。这种组合物一般包括在此所述的一种或多种iRNA和药学上可接受的载体或递送载体。在一个实施例中,该组合物用于治疗造成铁水平增加的失调,例如,血色素沉着症。例如,该组合物可用于治疗地中海贫血,如中间型 β -地中海贫血。

[0024] 在另一个实施例中,配制这种药物组合物用于给予在此所述的剂量方案,例如,每两个月不多于1次、每月不多于1次,每月不多于2次、每4周不多于1次、每3周不多于1次、每周不多于1次或每周不多于1次。在另一个实施例中,可以维持药物组合物的给予一个月或更长,例如,1个、2个、3个或6个月,或1年、或5年、或10年或更长时间,包括受试者的余生。

[0025] 在另一个实施例中,将含有在此所述的iRNA(例如,靶向TMPRSS6的dsRNA)的组合物随一种非iRNA治疗剂(例如已知治疗血色素沉着症或造成血色素沉着症的失调(如地中海贫血)的药物)一起给予。例如,本发明中表征的iRNA可以随治疗 β 地中海贫血(例如,中间型 β -地中海贫血)或与增加的铁水平相关的另一种失调的药物一起给予。

[0026] 在另一个实施例中,将TMPRSS6 iRNA给予至患者,并且随后将非iRNA药物给予至该患者(或反之亦然)。在另一个实施例中,将TMPRSS6 iRNA和非iRNA治疗剂同时给予。在一个实施例中,该药剂是例如影响铁水平的药剂,例如铁螯合剂(例如,去铁胺)或叶酸。

[0027] 在另一个方面,本文中提供一种通过进行以下步骤抑制细胞中TMPRSS6基因表达的方法:

[0028] (a) 向所述细胞引入双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括至少两个彼此互补的序列。该dsRNA具有包含第一序列的有义链和包含第二序列的反义链;所述反义链具有与编码TMPRSS6的mRNA的至少一部分基本上互补的互补区域,并且其中所述互补区域是30

个或更少核苷酸长度,即15-30个核苷酸长度,并且总体上是19-24个核苷酸长度,并且其中与表达TMPRSS6的细胞接触时,则所述dsRNA抑制TMPRSS6基因的表达至少10%、优选地至少20%、至少30%、至少40%或更多;并且

[0029] (b) 将步骤(a)中产生的细胞维持一段足以实现TMPRSS6基因的mRNA转录物降解的时间,因而抑制细胞中TMPRSS6基因的表达。

[0030] 在另一个方面,本发明提供对于激活细胞或哺乳动物中TMPRSS6基因表达有用的方法和组合物。

[0031] 在另一个方面,本发明提供一种通过进行以下步骤调节细胞中TMPRSS6基因表达的方法:

[0032] (a) 向所述细胞引入双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包括至少两个彼此互补的序列。该dsRNA具有包含第一序列的有义链和包含第二序列的反义链;所述反义链具有与编码TMPRSS6的mRNA的至少一部分基本上互补的互补区域,并且其中所述互补区域是30个或更少核苷酸长度,即15-30个核苷酸长度,并且总体上是19-24个核苷酸长度,并且其中与表达TMPRSS6的细胞接触时,则所述dsRNA调节TMPRSS6基因的表达至少10%、优选地至少20%、至少30%、至少40%或更多;并且

[0033] (b) 将步骤(a)中产生的细胞维持一段足以获得TMPRSS6基因的mRNA转录物降解或保护的时间,由此调节细胞中TMPRSS6基因的表达。

[0034] 在一个实施例中,该方法用于抑制肝细胞如肝细胞或枯否细胞中的基因表达。在另一个实施例中,该方法用于激活肝细胞中的基因表达。

[0035] 在其他方面,本发明提供用于治疗、预防、逆转或管理由TMPRSS6表达介导的病理过程(例如与血色素沉着症相关的失调)的方法。在一个实施例中,所述方法包括向需要这种治疗、预防、逆转或管理的患者给予治疗或预防有效量的在本发明中表征的一种或多种iRNA。在一个实施例中,患者患有地中海贫血,如中间型 β -地中海贫血。在另一个实施例中,给予靶向TMPRSS6的iRNA减轻或减弱患者中TMPRSS6介导的病症的至少一种症状(如与铁过量相关的症状,例如,关节痛、腹痛或虚弱)的严重性。

[0036] 在一个方面,本发明提供一种用于抑制细胞中TMPRSS6基因表达的载体。在一个实施例中,该载体包含与核苷酸序列有效连接的至少一种调节序列,其中所述核苷酸序列编码如在此所述的iRNA的至少一个链。

[0037] 在一个方面,本发明提供细胞,所述细胞含有用于抑制细胞中TMPRSS6基因表达的载体。该载体包含与核苷酸序列有效连接的至少一种调节序列,其中所述核苷酸序列编码如在此所述的iRNA之一的至少一个链。

[0038] 仍在另一个方面,本发明提供一种组合物,其含有与靶向参与病理疾病的第二基因的第二iRNA组合的TMPRSS6 iRNA并且对于治疗疾病,例如, β -地中海贫血有用。例如,第二iRNA可以靶向肝杀菌肽的负向调节物,如缺氧诱导因子,例如,HIF-1a或HIF-2a;GDF15;或TWSG1。在一个实施例中,第二iRNA靶向参与因 β -地中海贫血产生的第二失调的基因。例如,第二iRNA可以靶向参与糖尿病、血栓形成或骨量减少的基因。

[0039] 在下文描述中叙述本发明的不同实施例的详细内容。本发明的其他特征、目的和优点将从本描述及附图并且从权利要求书中变得明显。

附图说明

[0040] 图1是人TMPRSS6 mRNA的序列(参考序列NM_153609.2,GI:56682967,记录日期2011年1月23日,SEQ ID NO:1)。

[0041] 图2A和2B描绘靶向siRNA的两种化学修饰的TMPRSS6在减少原代小鼠肝细胞中TMPRSS6基因表达方面的效力。

[0042] 图3A和3B描绘LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)和LNP-TMPRSS6 siRNA-2(AD-46286)分别对WT C57BL/6小鼠中TMPRSS6和HAMP1基因表达的影响。

[0043] 图4描绘TMPRSS6 siRNA介导的对WT C57BL/6小鼠中TMPRSS6基因表达、HAMP1基因表达和血清铁水平影响的持续期。

[0044] 图5描绘TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默水平,所述TMPRSS6沉默水平是维持TMPRSS6 siRNA介导的对WT C57BL/6小鼠中HAMP1基因表达和血清铁水平的影响必需的。

[0045] 图6A和6B描绘TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对WT C57BL/6小鼠中血液学参数的影响。图6A描绘给予后6小时、24小时、48小时、72小时、7天和14天,TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对WT C57BL/6小鼠中血红蛋白(HBG)的影响。图6B描绘给予后6小时、24小时、48小时、72小时、7天和14天,TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对WT C57BL/6小鼠中红细胞比容的影响。

[0046] 图7描绘地中海贫血小鼠(Th3/+)中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对血清铁参数的影响,所述血清铁参数包括血清铁水平、不饱和铁结合容量(UIBC)水平和转铁蛋白饱和水平。

[0047] 图8A至8C描绘地中海贫血小鼠(Th3/+)中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对网织红细胞和红细胞参数的影响。图8A描绘对网织红细胞数目(%)的影响,图8B描绘对网织红细胞的血红蛋白含量(ChR)的影响,并且图8C描绘对成熟红细胞数目的影响。

[0048] 图9A至9D描绘地中海贫血小鼠(Th3/+)中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对血液学参数的影响。图9A描绘对血细胞比容(HCT)水平的影响,图9B描述对血红蛋白(HGB)的影响,图9C描述对红细胞(RBC)分布宽度(RDW)的影响,并且图9D描述对平均红细胞体积值(MCV)的影响。

[0049] 图10A至10C描绘地中海贫血小鼠(Th3/+)中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对脾脏和肝脏铁含量的影响。图10A描绘对脾脏总铁含量的影响,图10B描绘对脾重量的影响,并且图10C描绘TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对肝脏中铁浓度的影响。

具体实施方式

[0050] 在此描述了用于抑制细胞或哺乳动物中TMPRSS6基因表达iRNA和使用它们的方法,在所述细胞或哺乳动物中iRNA靶向TMPRSS6基因。还提供是用于治疗由基因表达引起的病理状况和疾病(如与升高的铁水平相关的病况)的组合物和方法。iRNA通过称作RNA干扰(RNAi)的过程指导mRNA的序列特异性降解。在一个替代实施例中,iRNA激活其中iRNA靶向TMPRSS6基因的细胞或哺乳动物中TMPRSS6基因的表达。

[0051] TMPRSS6作为HAMP基因表达的抑制剂在铁稳态方面发挥重要作用。HAMP基因编码肝激素-肝杀菌肽,它是铁稳态的核心调节物。肝杀菌肽与主要在吸收性肠细胞、肝细胞和巨噬细胞上定位的铁输出蛋白-膜铁转运蛋白(FPN1)结合。肝杀菌肽与膜铁转运蛋白胞外

结构域的结合导致膜铁转运蛋白的内化和降解,因此减少来自肠的膳食铁吸收和来自巨噬细胞和肝细胞的铁释放。HAMP基因表达可以响应BMP-辅助受体血幼素(HJV)介导的骨形态发生蛋白(BMP)/针对Decapentaplegic的母体的子代(Sons of Mothers Against Decapentaplegic, SMAD)依赖性信号转导级联受到刺激。TMPRSS6在中HAMP调节的关键作用是抑制BMP-介导的HAMP上调。TMPRSS6通过切割对BMP介导的HAMP上调必需的BMP辅助受体HJV而抑制BMP介导的HAMP上调;因此阻止BMP信号传导、SMAD转运至细胞核和HAMP转录激活。

[0052] 若干人类和小鼠研究已经证实TMPRSS6在HAMP调节和铁稳态中的作用(Du(杜)等人, *Science* (科学) 2008, 第320卷, 第1088-1092页; Folgueras(福格拉斯)等人, *Blood* (血液) 2008, 第112卷, 第2539-45页)。研究已经示出TMPRSS6中功能突变的丧失可能导致肝杀菌肽表达的上调,造成称作难治性缺铁性贫血的遗传性缺铁性贫血(IRIDA)(Finberg(芬伯格). *Seminars in Hematology* (血液学论文集) 2009, 第46卷, 第378-86页),其特征在于升高的肝杀菌肽水平、低色性小细胞性贫血、低平均红细胞体积(MCV)、低转铁蛋白饱和度、口服铁不良吸收和对肠胃外铁应答不全。然而,已经示出HAMP正调节物(例如, BMP1、BMP4和HFE)中功能突变的丧失下调肝杀菌肽表达并且造成铁过量失调(Milet(米莱特)等人, *Am J Hum Gen* (美国人类遗传学杂志) 2007, 第81卷, 第799-807页; Finberg(芬伯格)等人, *Blood* (血液) 2011, 第117卷, 第4590-9页)。在原发性铁过量失调(统称为遗传性血色素沉着症(HH))中,在以大规模无效血细胞生成为特征的贫血中和铁过量(继发性血色素沉着症),例如中间型 β -地中海贫血(TI)在中,肝杀菌肽水平低,尽管血清铁浓度和铁贮量升高。中间型 β -地中海贫血小鼠模型已经展示, TMPRSS6表达的丧失导致升高的肝杀菌肽水平(Finberg(芬伯格) 2010口头演讲:“TMPRSS6, an inhibitor of Hepatic BMP/Smad Signaling, is required for Hecpudin Suppression and Iron Loading in a Mouse Model of β -Thalassemia (“肝BMP/Smad信号传导抑制剂TMPRSS6是 β -地中海贫血小鼠模型中肝杀菌肽抑制和铁载量需要的), *American Society of Hematology Annual Meeting 2010* (2010年美国血液学学会年度会议), 摘要编号:164)。

[0053] 本发明描述了用于调节TMPRSS6基因表达的方法和iRNA组合物。在某些实施例中,使用TMPRSS6特异性iRNA减少或抑制TMPRSS6的表达,因而导致增加HAMP表达和降低的血清铁水平。因此,使用本发明中表征的RNA组合物抑制TMPRSS6基因表达或活性可以是旨在降低受试者中铁水平的疗法的有用方法。这类抑制对于治疗与升高的铁水平相关的失调,例如血色素沉着症或地中海贫血,例如, β -地中海贫血可以是有用的。

[0054] 在此所述的组合物的iRNA包括具有下述区域的RNA链(反义链),所述区域是30个或更少核苷酸长度,即,15-30个核苷酸长度,总体上19-24个核苷酸,与TMPRSS6基因的mRNA转录物的至少部分基本上互补。这些iRNA的使用使得靶向降解基因的mRNA成为可能,其中所述基因参与哺乳动物中与TMPRSS6表达相关的病理。非常低剂量的TMPRSS6 iRNA尤其可以特别且高效地介导RNAi,导致TMPRSS6基因表达的显著抑制。使用基于细胞的测定法,发明人已经展示靶向TMPRSS6的iRNA可以特别且高效地介导RNAi,导致TMPRSS6基因表达的显著抑制。因此,包括这些iRNA的方法和组合物对于治疗可能由TMPRSS6下调介的病理过程是有用的,例如用于治疗造成铁水平升高的失调,例如,血色素沉着症,或 β -地中海贫血,例如,中间型 β -地中海贫血。以下发明详述披露了怎样制造和使用含有iRNA的组合物以抑制

TMRSS6基因表达,连同用于治疗由这种基因的表达引起的疾病和病症的组合物和方法。

[0055] 在此表征的药物组合物的实施例也包括具有反义链的iRNA,连同药学上可接受的载体,其中所述反义链包含一个区域,所述区域是30个或更少核苷酸长度,总体上19-24个核苷酸,与TMRSS6基因的RNA转录物的至少部分基本上互补。本发明中表征的组合物的实施例也包括具有反义链的iRNA,其中所述反义链具有一个互补区域,所述互补区域是30个或更少核苷酸长度,总体上19-24个核苷酸,并且与TMRSS6基因的RNA转录物的至少部分基本上互补。

[0056] 因此,在一些方面,本发明中表征了含有TMRSS6 iRNA和药学上可接受的载体的药物组合物、使用所述组合物抑制TMRSS6基因表达的方法和使用所述药物组合物来治疗由TMRSS6基因表达引起的疾病的方法。

[0057] I. 定义

[0058] 出于便利,下文提供在本说明书、实例和所附权利要求中使用的某些术语和短语的含义。如果在本说明书的其他部分中某术语的用途和这个部分中所提供的其定义之间存在明显不一致性,则这个部分中的定义应当占优。

[0059] “G”、“C”、“A”、“T”和“U”各自通常表示分别含有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸苷和尿嘧啶作为碱基的核苷酸。然而,应当理解术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”也可以指修饰的核苷酸,如下文进一步详细描述,或代用替换部分。技术人员充分了解,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤和尿嘧啶可以由其他部分替换,而基本上不改变包含携带这类替换部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配对特性。例如,而不局限于,包含肌苷作为其碱基的核苷酸可以与含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸发生碱基配对。因此,含有尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以在此表征的dsRNA的核苷酸序列中由含有例如肌苷的核苷酸替换。在另一个实例中,寡核苷酸中任何地方的腺嘌呤和胞嘧啶可以分别地替换为鸟嘌呤和尿嘧啶,以形成与靶mRNA的G-U摇摆碱基配对。含有这类替换部分的序列适用于在此所述的组合物和方法。

[0060] 如在此使用,“跨膜丝氨酸蛋白酶6”(“TMSSR6”)指细胞中表达的一种具体的多肽。TMRSS6也称作matrptase-2、IRIDA(难治性缺铁性贫血)、跨膜蛋白酶丝氨酸6、II型跨膜丝氨酸蛋白酶6和膜结合的镶嵌丝氨酸蛋白酶matrptase-2。TMRSS6是约899个氨基酸长度的丝氨酸蛋白酶II型跨膜蛋白。TMRSS6含有多个结构域,例如,短内切结构域A跨膜结构域、海胆精子蛋白/肠肽酶结构域(SEA)结构域、两个补体因子/海胆胚生长因子结构域(CUB)、三个LDL-R类结构域(LDLA)和具有保守His-Asp-Ser三联体(HDS)的胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域。人TMRSS6 mRNA转录物的序列可以在(NM_153609.2(SEQ ID NO:1))处找到(图1)。

[0061] 如在此使用,术语“iRNA”指一种物质,其含有如本文中限定该术语的RNA并且经RNA诱导的沉默复合物(RISC)途径介导RNA转录物的靶向切割。在一个实施例中,如在此所述的iRNA实现TMRSS6表达的抑制。可替代地,在另一个实施例中,如在此所述的iRNA激活TMRSS6表达。

[0062] 如在此使用,“靶序列”指TMRSS6基因转录期间形成的mRNA分子(包括信使RNA(mRNA),是RNA加工初级转录物产物的产物)的核苷酸序列的连续部分。序列的靶部分将至少足够地长,以充当iRNA指导在这个部分或其附近切割的底物。例如,靶序列总体上将是9-36个核苷酸长度,例如,15-30个核苷酸长度,包括其之间的全部子范围。作为一个非限制

性实例,靶序列可以具有从15-30个核苷酸、15-26个核苷酸、15-23个核苷酸、15-22个核苷酸、15-21个核苷酸、15-20个核苷酸、15-19个核苷酸、15-18个核苷酸、15-17个核苷酸、18-30个核苷酸、18-26个核苷酸、18-23个核苷酸、18-22个核苷酸、18-21个核苷酸、18-20个核苷酸、19-30个核苷酸、19-26个核苷酸、19-23个核苷酸、19-22个核苷酸、19-21个核苷酸、19-20个核苷酸、20-30个核苷酸、20-26个核苷酸、20-25个核苷酸、20-24个核苷酸、20-23个核苷酸、20-22个核苷酸、20-21个核苷酸、21-30个核苷酸、21-26个核苷酸、21-25个核苷酸、21-24个核苷酸、21-23个核苷酸或21-22核苷酸。

[0063] 如在此使用,术语“包含序列的链”指寡核苷酸,包含通过使用标准核苷酸命名所指的序列而描述的核苷酸链。

[0064] 如在此使用并且除非另外说明,在用来相对于第二核苷酸序列描述第一核苷酸序列时,术语“互补的”指包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在某些条件下与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交和形成双链体结构的能力,如技术人员将理解。这类条件可以例如是严格条件,其中严格条件可以包括:400mM NaCl,40mM PIPES pH6.4,1mM EDTA,50°C或70°C持续12-16小时,随后洗涤。可以使用其他条件,如在如有机体内部可能遭遇的生理相关条件。技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用,确定最适宜于检验两个序列的互补性的条件集合。

[0065] 在iRNA内部(例如,在如在此所述的dsRNA内部)的互补序列包括包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一个或全部两个核苷酸序列的整个长度范围内的碱基配对。这类序列可以在本文中称作彼此“完全互补”。然而,其中第一序列相对于本文中第二序列称作“基本上互补”的情况下,这两个序列可以是完全互补的,或与双链体杂交至多到30碱基对(bp)时,它们可以形成一个或多个、但通常不多于5、4、3或2个错配碱基对,同时仍保留在最相关于它们的最终应用的条件下杂交的能力,例如,经由RISC途径抑制基因表达。然而,其中在两个寡核苷酸设计成杂交时形成一个或多个单链突出端的情况下,就确定互补性而言,这类突出端不应当视作错配。例如,出于在此所述的目的,仍可以将一个dsRNA包含长21个核苷酸的一个寡核苷酸和长23个核苷酸的另一个寡核苷酸称作“完全互补的”,其中更长寡核苷酸包含与较短寡核苷酸完全互补的21个核苷酸的序列。

[0066] 如在此使用,“互补”序列,也可以包括由非天然和修饰的核苷酸组成的非Watson-Crick(沃森-克里克)碱基对和/或碱基对或完全由其形成,只要以上关于它们杂交能力的要求得到满足。这类非Watson-Crick(沃森-克里克)碱基对包括但不局限于G:U摇摆或Hoogsteen碱基配对。

[0067] 术语“互补的”、“完全互补的”和“基本上互补的”在此可以相对于dsRNA的有义链和反义链之间或iRNA药物的反义链和靶序列之间的碱基匹配使用,如将从它们使用的上下文来理解。

[0068] 如在此使用,“与信使RNA(mRNA)的至少部分基本上互补”的多核苷酸指与感兴趣的mRNA(例如,编码TMPRSS6的mRNA)的连续部分基本上互补的多核苷酸。例如,如果一种多核苷酸与编码TMPRSS6的mRNA的非间断部分基本上互补,则该序列与TMPRSS6 mRNA的至少一部分互补。

[0069] 如在此使用,术语“双链RNA”或“dsRNA”指一种iRNA,它包含具有杂交双链体区的

RNA分子或分子复合物,所述杂交双链体区包含两条反平行和基本上互补的核酸链,所述核酸链将相对于靶RNA称作具有“有义”和“反义”方向。双链体区可以具有允许经RISC途径特异性降解所需靶RNA的任何长度,但是一般将范围从9至36碱基对长度,例如,15-30个碱基对长度。就9和36碱基对之间的双链体时,双链体可以具有在这个范围内的任意长度,例如,9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或36和其间的任何子范围,包括但不限于15-30碱基对、15-26碱基对、15-23碱基对、15-22碱基对、15-21碱基对、15-20碱基对、15-19碱基对、15-18碱基对、15-17碱基对、18-30碱基对、18-26碱基对、18-23碱基对、18-22碱基对、18-21碱基对、18-20碱基对、19-30碱基对、19-26碱基对、19-23碱基对、19-22碱基对、19-21碱基对、19-20碱基对、20-30碱基对、20-26碱基对、20-25碱基对、20-24碱基对、20-23碱基对、20-22碱基对、20-21碱基对、21-30碱基对、21-26碱基对、21-25碱基对、21-24碱基对、21-23碱基对或21-22碱基对。细胞中用Dicer和相似酶加工产生的dsRNA通常具有范围19-22的碱基对长度。dsDNA的双链体区的一个链包含与靶RNA的区域基本上互补的序列。形成双链体结构的两个链可以来自具有至少一个自身互补区域的单一RNA分子,或可以由两个或更多个独立RNA分子形成。其中双链体区由单个分子的两个链组成的情况下,该分子可以具有由形成双链体结构的一个链的3'-端和相应另一个链的5'-端之间的单条核苷酸链(本文中称作“发夹环”)分隔的双链体区。发夹环可以包含至少一个非配对的核苷酸;在一些实施例中,发夹环可以包含至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少20个、至少31个或更多个非配对的核苷酸。在dsRNA的两条基本上互补链由单独RNA分子构成的情况下,这些分子不需要共价连接,但是可以共价连接。在两个链借助发夹环之外的方式共价连接的情况下,连接结构称作“接头”。术语“siRNA”也在此用来指如上文所述的dsRNA。

[0070] 技术人员将认识到术语“RNA分子”或“核糖核酸分子”不仅包括如自然界中表达或存在的RNA分子,还包括包含如在此描述或如本领域已知的一个或多个核糖核苷酸/核糖核苷类似物或衍生物的RNA类似物和衍生物。严格地说,“核糖核苷”包括核苷碱基和核糖,并且“核糖核苷酸”是具有1个、2个或3个磷酸酯部分的核糖核苷。然而,如在此使用,术语“核糖核苷”和“核糖核苷酸”可以视为等同的。例如,如下文所述,可以在核碱基结构或在核糖-磷酸酯主链结构方面修饰RNA。然而,包含核糖核苷类似物或衍生物分子必须保留形成双链体的能力。作为非限制性实例,RNA分子也可以包含至少一个修饰的核糖核苷,其包括但不限于2'-O-甲基修饰的核苷,包含5'硫代磷酸酯基的核苷、与胆甾烯基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基连接的末端核苷、锁定核苷、非碱基核苷、2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷、2'-氨基修饰的核苷,2'-烷基修饰的核苷,吗啉代核苷、磷酰胺酯或包含非天然碱基的核苷,或其任意组合。可替代地,RNA分子可以包含至少两个修饰的核糖核苷、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个或更多个修饰的核糖核苷,直到dsRNA分子的整个长度。对于RNA分子中这些多个修饰的核糖核苷中的每一个,修饰不需要是相同的。在一个实施例中,经考虑用在此所述方法和组合物中的修饰RNA是具有形成所需双链体结构的能力并且经RISC途径允许或介导靶RNA特异性降解的肽核酸(PNA)。

[0071] 在一个方面,修饰的核糖核苷包括脱氧核糖核苷。在这种情况下,siRNA药物可以包含一个或多个脱氧核苷,包括例如脱氧核苷突出端或在dsRNA的双链部分内部的一个或多

个脱氧核苷。然而,不言自明的是在任何情况下术语“iRNA”不涵盖双链DNA分子。

[0072] 在一个方面, RNA干扰剂包括与靶RNA序列相互作用以指导靶RNA切割的单链RNA。不希望受理论约束, 引入植物和无脊椎动物细胞中长的双链RNA由称作Dicer的III型核酸内切酶分解成siRNA(Sharp(夏普)等人, *Genes Dev.* (基因与发育) 2001, 15:485)。核糖核酸酶Dicer将dsRNA加工成至具有特征性双碱基3'突出端的19-23碱基对短干扰性RNA(Bernstein(伯恩斯坦)等人, (2001) *Nature* (自然) 409:363)。这些siRNA然后掺入RNA诱导性沉默复合物(RISC)中, 在其中一种或多种解旋酶解开siRNA双链体, 这使得互补性反义链指导靶识别成为可能(Nykanen(尼坎宁)等人, (2001) *Cell* (细胞) 107:309)。与适当的靶mRNA结合时, RISC内部的一种或多种核酸内切酶切割靶以诱导沉默(Elbashir(艾尔巴希尔)等人, (2001) *Genes Dev.* (基因与发育) 15:188)。因此, 在一个方面, 本发明涉及了促进实现靶基因沉默的RISC复合物形成的单链RNA。

[0073] 如在此使用, 术语“核苷酸突出端”指从iRNA(例如, dsRNA)的双链体结构突出的至少一个非配对核苷酸。例如, 当dsRNA的一个链的3'-端延伸超过另一个链的5'-端时或反之亦然, 存在核苷酸突出端。dsRNA可以包含至少一个核苷酸的突出端; 可替代地, 该突出端可以包含至少2个核苷酸、至少3个核苷酸、至少4个核苷酸、至少5个或更多个核苷酸。核苷酸突出端可以包含核苷酸/核苷类似物(包括脱氧核苷酸/核苷)或由其组成。突出端可以处于有义链、反义链或其任意组合上。另外, 突出端的核苷酸可以存在于dsRNA的反义或有义链的5'端、3'端或两个末端上。

[0074] 在一个实施例中, dsRNA的反义链在3'端和/或5'端具有一个1-10核苷酸突出端。在一个实施例中, dsRNA的有义链在3'端和/或5'端具有一个1-10核苷酸突出端。在另一个实施例中, 将突出端中的一个或多个核苷酸替换为硫代磷酸核苷。

[0075] 如在此使用指dsRNA时, 术语“齐平的”或“平端化”意指在dsRNA的给定末端处不存在非配对的核苷酸或核苷酸类似物, 即, 没有核苷酸突出端。dsRNA的一个或两个末端可以是齐平的。在dsRNA的两个末端是齐平的情况下, 称dsRNA是平端化的。为清晰, “平端化”dsRNA是在两个末端齐平的dsRNA, 即, 在分子的任何末端处无核苷酸突出端。大多数情况下, 这种分子将在其整个长度范围内是双链的。

[0076] 术语“反义链”或“向导链”指iRNA(例如, dsRNA)的包括与靶序列基本上互补的区域的链。如在此使用, 术语“互补区域”指反义链上与序列(例如如本文定义的靶序列)基本上互补的区域。其中互补区域不与靶序列完全互补的情况下, 错配可以存在于分子的内部或末端区域内。通常, 最耐受的错配存在于末端区域内, 例如, 在5'和/或3'端的5、4、3或2个核苷酸内。

[0077] 如在此使用的术语“有义链”或“载客链”指包括下述区域的iRNA(例如, dsRNA)的链, 所述区域与如在此定义的术语那样的反义链区域基本上互补。

[0078] 如在此使用, 在一个实施例中, 术语“SNALP”指稳定的核酸-脂质粒子。SNALP代表包覆缩减的含水内部的脂质囊泡, 其中所述含水内部包含核酸(例如iRNA或从中转录出iRNA的质粒)。SNALP例如在美国专利申请公开号20060240093、20070135372中并且在国际申请号WO 2009082817中描述。本文中其他地方描述了“SNALP”配制品的实例。

[0079] 当谈及iRNA时, “引入细胞中”意指促进或实现摄入或吸收入细胞中, 如本领域普通技术人员所理解。吸收或摄取iRNA可以通过无协助扩散过程或主动细胞过程或通过助剂

或装置发生。这种术语的含义不局限于体外细胞；也可以将iRNA“引入细胞中”，其中所述细胞是活有机体的一部分。在这种情况下，引入细胞中将包括递送至有机体。例如，对于体内递送，可以将iRNA注射至组织部位中或全身给予。体内递送也可以借助 β -葡聚糖递送系统进行，例如美国专利号5,032,401和5,607,677和美国公开号2005/0281781中描述的那些，所述文献由此通过引用以其全文结合。体外引入细胞中包括本领域已知的方法，例如电穿孔法和脂质体转染法。另外的方法在下文描述或是本领域已知的。

[0080] 如在此使用，术语“调节表达”指与未处理的细胞中TMPRSS6的表达相比，在用如在此所述的iRNA组合物处理的细胞中至少部分“抑制”或部分“激活”TMPRSS6基因表达。

[0081] 术语“激活”、“增强”、“上调……的表达”、“增加……的表达”、等，只要它们涉及TMPRSS6基因，在此均指至少部分激活TMPRSS6基因的表达，如由TMPRSS6 mRNA的量增加所展示，其中可以从第一细胞或细胞群中分离或在其中检测到所述mRNA，在所述第一细胞或细胞群中TMPRSS6基因转录并且所述第一细胞或细胞群已经受到处理，使得与基本上与第一细胞或细胞群相同的但未受到如此处理的第二细胞或细胞群（对照细胞）相比，TMPRSS6基因表达增加。

[0082] 在一个实施例中，通过给予如在此所述的iRNA激活TMPRSS6基因表达至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在一些实施例中，通过给予本发明中表征的iRNA激活TMPRSS6基因至少约60%、70%或80%。在一些实施例中，通过给予如在此所述的iRNA激活TMPRSS6基因表达至少约85%、90%或95%或更多。在一些实施例中，与未处理的细胞中的表达相比，TMPRSS6基因表达在用如在此所述的iRNA处理的细胞中增加至少1倍、至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更多倍。通过小dsRNA激活表达例如在Li (李) 等人, 2006Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (美国国家科学院院刊) 103:17337-42中并且在US 20070111963和US2005226848中描述，所述文献的每一篇通过引用结合在此。

[0083] 术语“沉默”、“抑制……的表达”、“下调……的表达”、“抑制……的表达”等，只要它们涉及TMPRSS6基因，在此均指至少部分抑制TMPRSS6基因的表达，如由TMPRSS6mRNA的量减少所展示，其中可以从第一细胞或细胞群中分离或在其中检测到所述mRNA，在所述第一细胞或细胞群中TMPRSS6基因转录并且所述第一细胞或细胞群已经受到处理，从而与基本上与第一细胞或细胞群相同的但未受到如此处理的第二细胞或细胞群（对照细胞）相比，TMPRSS6基因表达被抑制。抑制程度通常以下式表述

$$\frac{(\text{对照细胞中的 mRNA}) - (\text{处理细胞中的 mRNA})}{(\text{对照细胞中的 mRNA})} \cdot 100\%$$

[0084]

(对照细胞中的 mRNA)

[0085] 可替代地，抑制程度可以就与TMPRSS6基因表达功能性联系的参数（例如，由TMPRSS6基因编码的蛋白的量或显示某种表型（例如，铁水平或铁吸收下降）细胞的数目）下降给出。原则上，可以在以组成型方式亦或通过基因组工程化而表达TMPRSS6的任何细胞中并且通过任何适当的测定法确定TMPRSS6基因沉默。

[0086] 例如，在某些情况下，通过给予本发明中表征的iRNA抑制TMPRSS6基因表达至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在一些实施例中，通过给予在此所述的iRNA抑制TMPRSS6基因至少约60%、70%或80%。在一些实施例中，通过给予如在此所述

的iRNA抑制TMPRSS6基因至少约85%、90%、95%、98%、99%、或更多。

[0087] 如本文中在TMPRSS6表达的情境下所用,术语“治疗或处理(treat和treatment)”、等指从由TMPRSS6表达介导的病理过程减弱或减轻。在本发明的上下文中在谈及下文描述的任何其他病况的情况下(除由TMPRSS6表达介导的病理过程之外的),术语“治疗或处理(treat和treatment)”、等意指减弱或减轻与这种病况(血色素沉着症(例如 β -地中海贫血))相关的至少一种症状,或减缓或逆转这种病况的进展或预期进展。

[0088] “降低”在疾病标记或症状的上下文中意指这种水平的统计显著的下降。下降可以是例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或更多,并且优选地降至作为不患这种失调的个体的正常范围内所接受的水平。

[0089] 如在此使用,短语“治疗有效量”和“预防有效量”指在治疗、预防或管理由TMPRSS6表达介导的病理过程或由TMPRSS6表达介导的病理过程的明显症状时提供治疗益处的量。治疗有效的具体量可以由普通医疗从业者轻易地确定,并且可以根据本领域已知的因素变动,例如,由TMPRSS6表达介导的病理过程的类型、患者病史和年龄、由TMPRSS6表达介导的病理过程的阶段和给予抑制由TMPRSS6表达介导的病理过程其他药剂。

[0090] 如在此使用,“药物组合物”包含药理有效量的iRNA和药学上可接受的载体。如在此使用,“药理有效量”、“治疗有效量”或简单地“有效量”指有效产生预期药理、治疗或预防结果的iRNA量。例如,如果在存在与疾病或失调相关的可度量参数的至少10%下降时即认为给定的临床治疗有效,则用于治疗这种疾病或病症的药物的治疗有效量是实现该参数下降至少10%所需要的量。例如,治疗有效量的靶向TMPRSS6的iRNA可以减少TMPRSS6蛋白水平至少10%。

[0091] 如在此使用,术语“地中海贫血”指遗传性隐性血液病。功能丧失突变导致构成血红蛋白的珠蛋白链之一的合成速率降低或不合成,并且造成正常珠蛋白不足。地中海贫血患者导致 α 珠蛋白(称作 α -地中海贫血)、 β 珠蛋白(称作 β -地中海贫血)或在罕有情况下 δ 珠蛋白的不足。在 α -地中海贫血中,过量的 β 链形成具有异常氧解离曲线的不稳定四聚体。 β -地中海贫血可以是轻型、重型或中间型的。

[0092] β 珠蛋白链由称作HBB(血红蛋白, β)基因的单基因编码。轻型 β -地中海贫血在携带一个突变 β -地中海贫血等位基因和一个野生型等位基因的患者中发生。这种疾病不影响血液铁水平,并且患者不需要治疗。当患者携带两个敲除突变 β -地中海贫血等位基因时,重型 β -地中海贫血发生。过量的铁在这些患者中积累,并且过量的铁主要储存在肥大性枯否细胞中。患有重型 β -地中海贫血患者一般采用长期输血疗法,铁螯合、脾切除术和同种异型造血移植治疗。当患者携带 β -地中海贫血基因的一个敲除等位基因和一个部分丧失功能的等位基因时,中间型 β -地中海贫血发生。过量的铁在这些患者中积累,并且过量的铁主要储存在肝细胞中。患有重型地中海贫血和中间型地中海贫血的患者出现贫血(缺氧),这导致EPO(红细胞生成素)增加和因此大幅度代偿性和无效的红细胞生成(在骨髓中通过干细胞产生红细胞)。患有中间型地中海贫血的患者有时发展肝脾肿大、黄疸、骨量减少、血栓形成事件、腿部溃疡、肺循环低血压、充血性心力衰竭、糖尿病、生长激素缺乏、甲状腺功能减退症、甲状旁腺功能减退、性腺功能减退和面部畸形。

[0093] 如在此使用,术语“血色素沉着症”指导致从胃肠道吸收过多铁的失调。血色素沉着症以两种形式出现:原发性和继发性。原发性血色素沉着症,美国最常见遗传病(估计每

200位至300位美国人中1位罹患),通常由造成吸收过多铁的特定遗传问题引起。继发性或获得性血色素沉着症可以由多种疾病(例如地中海贫血或铁粒幼细胞性贫血)引起。继发性血色素沉着症有时在溶血性贫血和慢性酒精中毒患者中发展。血色素沉着症的症状包括腹痛、关节痛、乏力、精力缺乏、虚弱、皮肤发暗(经常称作“古铜色化”)和体毛丢失。

[0094] 术语“药学上可接受的载体”指用于给予治疗剂的载体。这类载体包括但不局限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇及及它们的组合。该术语特别地排除细胞培养基。对于口服给予的药物,药学上可接受的载体包括但不局限于药学上可接受的赋形剂,例如惰性稀释剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、着色剂和防腐剂。适合的惰性稀释剂包括钠和碳酸钙、磷酸钠和钙和乳糖,而玉米淀粉和海藻酸是适合的崩解剂。粘合剂可以包括淀粉和明胶,而如果存在,则润滑剂通常将是硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。如果需要,片剂可以用多种材料(例如甘油单硬脂酸酯或甘油基二硬脂酸酯)包衣以延缓胃肠道中的吸收。下文进一步描述药物配制品所包括的药剂。

[0095] 如在此使用,“受试者”是哺乳动物,例如犬、马、猫、和其他非人灵长类。在一个优选实施例中,受试者是人类。

[0096] 如在此使用,术语“LNPXX”,其中“XX”是数字,也在本文中称作“AFX”。例如,LNP09也称为AF09并且LNP12也称为或称作AF12。

[0097] 如在此使用,术语“包含”或“包括”(comprising和comprises)用来指组合物、方法及其一种或多种相应组分,它们是本发明必需的,然而对于包含未指明的要素(是否必需与否)是开放的。

[0098] 如在此使用,术语“由……组成”指给定实施例所要求的那些要素。该术语允许不实质影响本发明中表征的这个实施例的一个或多个基本的和新颖的或功能性的特征的要素存在。

[0099] 术语“由……组成”指如在此所述的组合物、方法及其相应组分,这排除在该实施例的这个描述中没有提到的任何要素。

[0100] II. 双链核糖核酸(dsRNA)

[0101] 在此描述了调节TMPRSS6基因表达的iRNA药剂。在一个实施例中,iRNA药物包括用于抑制细胞或哺乳动物中(例如,在具有升高的铁水平的人中,例如在患有 β -地中海贫血或血色素沉着症的患者中)TMPRSS6基因表达的双链核糖核酸(dsRNA)分子。dsRNA包括反义链,所述反义链具有与TMPRSS6基因表达中形成的mRNA的至少一部分互补的互补区域。这一互补区域是30个或更少核苷酸长度,总体上19-24个核苷酸长度,并且其中当与表达TMPRSS6基因的细胞接触时,则所述dsRNA抑制TMPRSS6基因表达至少10%,如通过例如PCR或基于分支DNA(bDNA)的方法,或通过基于蛋白方法,如通过蛋白印迹法所测定。在一个实施例中,iRNA药物激活细胞或哺乳动物中的TMPRSS6基因表达。可以通过测量TMPRSS6 mRNA水平,例如通过bDNA或TaqMan®测定法,或使用例如蛋白印迹法或流式细胞技术通过测量蛋白水平,例如通过免疫荧光分析,测定细胞培养物中如COS细胞、HeLa细胞、原代肝细胞、HepG2细胞、原代培养物细胞中或在来自受试者的生物样品中的TMPRSS6基因表达。

[0102] dsRNA包括互补以便在其中将使用dsRNA的条件下杂交以形成双链体结构的两条RNA链。dsRNA的一个链(反义链)包括与靶序列基本上互补并且通常与靶序列完全互补的互补区域。靶序列可以源自TMPRSS6基因表达期间形成的mRNA的序列。另一个链(有义链)包括

与反义链互补的区域,从而在适合条件下组合时,这两个链杂交并形成双链体结构。通常,该双链体结构具有15和30之间并包括15和30碱基对长度,更通常地具有18和25之间并包括18和25碱基对长度,然而更通常地具有19和24之间并包括19和24碱基对长度,并且更通常地具有19和21之间并包括19和21碱基对长度。通常,与靶序列互补的区域具有15和30之间并包括15和30核苷酸长度,更通常地具有18和25之间并包括18和25核苷酸长度,然而更通常地具有19和24之间并包括19和24核苷酸长度,并且更通常地具有19和21之间并包括19和21核苷酸长度。在一些实施例中,iRNA具有15和20之间并包括15和20核苷酸长度,并且在其他实施例中,iRNA具有25和30之间并包括25和30核苷酸长度。如普通技术人员将认识,被靶向以便切割的RNA的靶向区域将最经常是更大RNA分子(往往mRNA分子)的部分。在相关的情况下,mRNA靶的“部分”是mRNA靶的连续序列,其长度足够作为RNAi指导的切割的底物(即,经RISC途径的切割)。在一些情况下,具有短至9个碱基的双链体的dsRNA可以介导RNAi指导的RNA切割。最经常地,靶将是至少15个核苷酸长度,优选地15-30个核苷酸长度。

[0103] 本领域普通技术人员将也认识到,双链体区是dsRNA的主要功能性部分,例如,9至36碱基对(例如,15-30碱基对)的双链体区。因此,在一个实施例中,为了达到被加工成导引所需RNA切割的(例如,15-30碱基对)功能性双链体,具有大于30碱基对的双链体区的RNA分子或RNA分子复合物是dsRNA。因此,普通技术人员将认识到在一个实施例中miRNA是dsRNA。在另一个实施例中,dsRNA不是天然存在的miRNA。在另一个实施例中,对靶向TMPRSS6表达有用的iRNA药剂不是在靶细胞中通过切割更大dsRNA产生的。

[0104] 如在此所述的dsRNA可以进一步包含一个或多个单链核苷酸突出端。这种dsRNA可以通过如下文进一步讨论的本领域已知的标准方法合成,例如,通过使用自动化DNA合成仪,例如从Biosearch,Applied Biosystems,Inc.公司可商购。在一个实施例中,TMPRSS6基因是人TMPRSS6基因。在另一个实施例中,TMPRSS6基因是小鼠或大鼠TMPRSS6基因。小鼠TMPRSS6 mRNA的序列可以按GenBank登录号NM_027902(GI:125656151,记录日期2010年12月28日)找到。大鼠TMPRSS6 mRNA的序列可以按GenBank登录号NM_001130556.1(GI:194474097,记录日期2011年1月17日)找到。在特定的实施例中,第一序列是包括表2、3或4中之一的有义序列的dsRNA有义链,并且第二序列包括表2、3或4中之一的反义序列的dsRNA反义链。使用靶序列和侧翼TMPRSS6序列,可以轻易确定在表2、3或4中提供的靶向靶序列中其他地方的替代性dsRNA物质。

[0105] 在一个方面,dsRNA将包括至少两个核苷酸序列,一个有义序列和一个反义序列,由此有义链选自表2、3或4中提供的序列组。在这个方面,两个序列的一个与两个序列的另一个互补,其中所述序列中的一者与TMPRSS6基因表达中产生的mRNA的序列基本上互补。就此,在这个方面,dsRNA将包括两个寡核苷酸,其中将一个寡核苷酸描述为表2、3或4中的有义链并且将第二寡核苷酸描述为来自表2、3或4的有义链的相应反义链。如本文中他处描述并且如本领域已知,与处在分立的寡核苷酸上相反,dsRNA的互补序列也可以作为单一核酸分子的自我互补区域而包含。

[0106] 技术人员充分知晓,由于特别有效诱导gRNA干扰,具有20和23之间碱基对、但是尤其21碱基对的双链体结构的dsRNA已经得到赞许(Elbashir(艾尔巴希尔)等人,EMBO 2001,20:6877-6888)。然而,其他人已经发现更短或更长的RNA双链体结构物也可以是有效的。在上文描述的实施例中,由于表2、3或4中提供的寡核苷酸序列的性质,在此所述的dsRNA可以

包括长度最小21nt的至少一个链。可以合理地预期,与上文描述的dsRNA相比,具有仅在一个末端或两个末端上短少数个核苷酸的表2、3或4中一个序列的更短双链体可以类似地有效。因此,根据本发明考虑这样的dsRNA,它们具有来自表2、3或4中一个序列的至少15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个连续核苷酸的部分序列并且在它们抑制TMPRSS6基因表达不多于5%、10%、15%、20%、25%或30%的能力方面与包含全序列的dsRNA不同。

[0107] 此外,表2、3或4中提供的RNA鉴定到TMPRSS6转录物中对RISC介导切割敏感的位点。就此,本发明进一步表征了靶向这类序列之一内的iRNA。如在此使用,如果一种iRNA促进在某个特定位点内部任何地方切割RNA转录物,则称这种iRNA靶向该转录物内部的这个具体位点。这种iRNA通常将包括来自表2、3或4中提供的一个序列的至少15个连续核苷酸,所述连续核苷酸与从TMPRSS6基因中的选择序列保持连续的区域所取得的额外核苷酸序列连接。

[0108] 尽管靶序列总体上是15-30个核苷酸长度,但是在这个范围内的具体序列指导任何给定靶RNA切割的适用性方面存在广泛变异。本文中所述的不同软件包和指导原则为鉴定任何给定基因靶的最佳靶序列提供指导,但是也可以采用经验性方法,其中将给定大小(作为非限制性实例,21个核苷酸)的“窗”或“罩”以逐字或图形方式(包括,例如,以计算机方式)置于靶RNA序列上,以便鉴定处于大小范围内的可能充当靶序列的序列。通过按初始靶序列位置上游或下游的一个核苷酸逐步移动序列“窗”,可以鉴定到下一个潜在靶序列,直至对选择的任何给定靶尺寸鉴定出全套的可能序列。这个方法,连同系统合成和测试鉴定的序列(使用如在此描述或如本领域已知的测定法)以鉴定表现最佳的那些序列,可以鉴定到用iRNA药物被靶向时,介导靶基因表达的最佳抑制作用的那些RNA序列。因此,尽管例如在表2、3或4中鉴定的序列代表有效的靶序列,但考虑了可以通过沿给定序列的上游或下游一个核苷酸“逐步推进该窗”以鉴定出具有相等或更好抑制特征的序列,实现抑制效率的进一步优化。

[0109] 另外,考虑对于鉴定的任何序列,例如表2、3或4中的序列,可以通过以下方式实现进一步优化:系统添加或移走核苷酸以产生更长或更短的序列,并且测试通过将更长或更短尺寸的窗从该点沿靶RNA向前或向后推进所产生的那些序列。再次地,使这种方法与产生新候选物靶联系,同时在如本领域已知或如在此所述的抑制测定法中基于这些靶序列测试iRNA的有效性,可以导致效率抑制的进一步改善。再者,可以例如通过引入如在此描述或如本领域已知的修饰核苷酸、添加或改变突出端或如本领域已知和/或本文中讨论的其他修饰,调节这类优化的序列以便进一步优化该分子(例如,增加血清稳定性或循环半寿期、增加热稳定性、增强跨膜递送、靶向特定位置或细胞类型、增加与沉默途径酶的相互作用、增加从内体放中等)作为表达抑制剂。

[0110] 如在此所述的iRNA可以含有一个或多个相对于靶序列的错配。在一个实施例中,如在此所述的iRNA含有不多于3个错配。如果iRNA的反义链含有相对于靶序列的错配,则优选错配区域不应当位于互补区域的中心内。如果iRNA的反义链含有相对于靶序列的错配,则优选错配区域应当局限于距互补区域5'或3'端的最末5个核苷酸内。例如,对于与TMPRSS6基因的某区域互补的23个核苷酸iRNA药物的RNA链而言,RNA链通常在中央13个核苷酸内不含任何错配。在此所述的方法或本领域已知的方法可以用来确定含有相对于靶序列的错配的iRNA是否有效抑制TMPRSS6基因表达。考虑带错配的iRNA在抑制TMPRSS6基因表

达的功效是重要的,尤其在已知TMPRSS6基因中的具体互补区域在群体内部具有多态性序列变异时。

[0111] 在一个实施例中,dsRNA的至少一个末端具有1至4个、总体上1或2个核苷酸的单链核苷酸突出端。具有至少一个核苷酸突出端的这类dsRNA相对于它们的平端化对应物,具备出乎意料优越的抑制性特性。仍在另一个实施例中,将iRNA(例如,dsRNA)的RNA化学修饰以增强稳定性或其他有益特征。本发明中表征的核酸可以通过本领域充分建立的方法合成和/或修饰,如在“Current protocols in nucleic acid chemistry(核酸化学实验室指南),”Beaucage(博凯奇),S.L.等人(编辑),John Wiley&Sons,Inc.(约翰·威利父子出版公司),纽约,纽约州,美国中描述的那些方法,所述文献因此通过引用结合在此。修饰包括例如(a)末端修饰,例如,5'端修饰(磷酸化、缀合、倒置键等)、3'端修饰(缀合、DNA核苷酸、倒置键等), (b)碱基修饰,例如,替换为稳定性碱基、去稳定性碱基或与扩充的配偶物库发生碱基配对的碱基、移除碱基(非碱基核苷酸)、或缀合的碱基, (c)糖修饰(例如,在2'位置或4'位置)或糖的替换,以及(d)主链修饰,包括修饰或替换磷酸二酯键。在在此所述的实施例中的有用的RNA化合物的具体实例包括但不限于含有修饰主链或无天然核苷间键的RNA。具有修饰主链的RNA包括在主链中不具有磷原子的那些,连同其他。出于本说明书的目的和如有时本领域中谈及,也可以将在其核苷间主链中不具有磷原子的修饰RNA视为寡核苷。在具体的实施例中,修饰的RNA将在其核苷间主链中具有磷原子。

[0112] 修饰的RNA主链包括例如,硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯,包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯、次磷酸酯、磷酰胺酯,包括3'-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯、硫代羰基磷酰胺酯、硫代羰基烷基磷酸酯、硫代羰基烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'键的硼烷磷酸酯、这些酯的2'-5'连接的类似物,和具有反转极性的那些酯,其中相邻对的核苷单位为3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'连接。也包括不同盐、混合盐和游离酸形式。

[0113] 教授制备以上含磷键的代表性美国专利包括但不限于美国专利号3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6,239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029; 和美国专利RE39464,所述文献的每一篇通过引用结合在此。

[0114] 其中不包括磷原子的修饰的RNA主链具有由短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键或者一个或多个短链杂原子核苷间键或杂环核苷间键形成的主链。这些包括具有以下结构的那些:吗啉代键(从核苷的糖部分中部分地形成);硅氧烷主链;硫化物、亚砷和砷主链;甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基主链;亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基主链;含烯的主链;氨基磺酸盐主链;亚甲亚氨基和亚甲胍基主链;磺酸酯和磺酰胺主链;酰胺主链;和具有混合N、O、S和CH₂组分部分的其他主链。

[0115] 教授制备以上寡核苷的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,

938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;和5,677,439,所述文献的每一篇通过引用结合在此。

[0116] 在适用于或考虑用于iRNA的其他RNA模拟物中,将核苷酸单位的糖和核苷间键即主链替换为新颖的基团。维持碱基单位用于与适当的核酸靶化合物杂交。一种这类寡聚化合物,已经显示具有优异杂交特性的RNA模拟物,称作肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,RNA的糖主链替换为含有酰胺的主链,尤其氨基乙基甘氨酸主链。核碱基保留并且直接或间接地与主链的酰胺部分的氮杂氮原子结合。教授制备PNA化合物的代表性美国专利包括但不限于美国专利号5,539,082;5,714,331;和5,719,262,所述文献的每一篇通过引用结合在此。对PNA化合物的其他教授内容可以在例如Nielsen(尼耳森)等人,Science(科学),1991,254,1497-1500中找到。

[0117] 本发明中表征的一些实施例包括具有硫代磷酸酯主链的RNA和具有杂原子主链的寡核苷,并且尤其上文所参考美国专利号5,489,677的 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [称作亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链]、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [其中天然磷酸二酯主链表述为 $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$],和上文所参考美国专利号5,602,240的酰胺主链。在一些实施例中,在此表征的RNA具有上文所参考美国专利号5,034,506的吗啉代主链结构。

[0118] 修饰的RNAs也可以含有一个或多个取代的糖部分。在此表征的iRNA(例如,dsRNA)可以在2'位置包括以下之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的 C_1 至 C_{10} 烷基或 C_2 至 C_{10} 烯基和炔基。示例性的适合修饰包括 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 和 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$,其中n和m是从1至约10。在其他实施例中,dsRNA在2'位置包括以下之一: C_1 至 C_{10} 低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、 SCH_3 、 OCN 、Cl、Br、CN、 CF_3 、 OCF_3 、 SOCH_3 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报道基团、嵌入剂、用于改善iRNA的药物代谢动力学特性的基团或用于改善iRNA的药效特征的基团、和具有相似特性的其他取代基。在一些实施例中,修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O- $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$,也称作2'-O-(2-甲氧乙基)或2'-MOE)(Martin等人,Helv.Chim.Acta,1995,78:486-504)即,烷氧基-烷氧基。另一个示例性修饰是2'-二甲基氨基氧乙氧基,即, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基团,也称作2'-DMAOE,如下文实例中所述,和2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域中也称作2'-O-二甲基氨基乙氧乙基或2'-DMAEOE),即,2'-O- $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2)_2$,也在下文实例中描述。

[0119] 其他修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)和2'-氟(2'-F)。也可以在iRNA的RNA上的其他位置处作出相似的修饰,尤其在3'端核苷酸上或在2'-5'连接的dsRNA中糖的3'位置和5'端核苷酸的5'位置。iRNA也可以具有糖模拟物,例如替代戊呋喃糖基糖的环丁基部分。教授制备这类修饰糖结构的代表性美国专利包括但不限于,美国专利号4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;和5,700,920,所述专利的某些由本申请共同所有,并且所述专利的每一篇通过引用结合在此。

[0120] iRNA也可以包括核碱基(经常在本领域中简称为“碱基”)修饰或置换。如在此使用,“未修饰”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基-腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),和嘧啶碱基-胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核碱基包括其他的合成和天然核碱基,例如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-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤尿嘧啶和胞嘧啶、5-炔丙基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤素、8-氨基、8-巯基、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤素、尤其5-溴、5-三氟甲基和其他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、7-去氮鸟嘌呤和7-去氮腺嘌呤和3-去氮鸟嘌呤和3-去氮腺嘌呤。其他的核碱基包括在美国专利号3,687,808中披露的那些、在Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine (在生物化学、生物技术和药物中修饰的核苷), Herdewijn (赫德维金), P. 编辑, Wiley-VCH 出版公司, 2008 中披露的那些; 在Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering (聚合物科学和工程的简明百科), 第858-859页, Kroschwitz (克罗施维茨), J.L. 编辑, John Wiley & Sons (约翰·威利父子出版公司), 1990 中披露的那些、由Englisch (英格里奇) 等人, Angewandte Chemie (应用化学), 国际版, 1991, 30, 613 披露的那些和由Sanghvi (桑格威), Y. S., 第15章, dsRNA Research and Applications (dsRNA 研究和应用), 第289-302页, Crooke (克鲁克), S.T. 和Lebleu (莱伯刘), B. 编辑, CRC Press 公司, 1993 披露的那些。这些核碱基的某些对于增加本发明中表征的寡聚化合物的结合亲和力和特别有用。这些核碱基包括5-取代的嘧啶、6-氮嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤, 包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-炔丙基尿嘧啶和5-炔丙基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶置换已经显示增加核酸双链体稳定性0.6°C-1.2°C (Sanghvi (桑格威), Y.S., Crooke (克鲁克), S.T. 和Lebleu (莱伯刘), B. 编辑, dsRNA Research and Applications (dsRNA 研究和应用), CRC Press 公司, Boca Raton (波卡拉顿), 1993, 第276-278页) 并且是示例性碱基置换, 甚至与2'-O-甲氧乙基糖修饰组合时更特别是这样。

[0121] 教授制备某些上述修饰的核碱基以及其他修饰的核碱基的代表性美国专利包括但不局限于上述的美国专利号3,687,808, 以及美国专利号4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672; 和7,495,088, 所述文献的每一篇通过引用结合在此, 和美国专利号5,750,692, 其也通过引用结合在此。

[0122] 也可以修饰iRNA的RNA以包含一个或多个锁核酸(LNA)。锁核酸是具有修饰核糖部分的核苷酸, 其中所述核糖部分包含连接2'碳和4'碳的额外桥。这种结构有效地“锁定”核糖处于3'-内结构构象。向siRNA添加锁核酸已经示出增加血清中的siRNA稳定性并且减少脱靶效应(Elmen (埃尔门), J. 等人, (2005) Nucleic Acids Research (核酸研究) 33 (1): 439-447; Mook (墨克), OR. 等人, (2007) Mol Canc Ther (分子癌症治疗) 6 (3): 833-843; Grunweller (格伦威尔勒), A. 等人, (2003) Nucleic Acids Research (核酸研究) 31 (12): 3185-3193)。

[0123] 教授制备锁核酸核苷酸的代表性美国专利包括但不限于以下:美国专利号6,268,490;6,670,461;6,794,499;6,998,484;7,053,207;7,084,125;和7,399,845,所述专利的每一份通过引用以其全文结合在此。

[0124] 本发明中表征的iRNA的RNA的另一种修饰涉及使RNA化学连接至一种或多种增强iRNA的活性、细胞分布、药物代谢动力学特性或细胞摄取的配体、部分或缀合物。这类部分包括但不限于脂质部分如胆固醇部分(Letsinger(莱廷格)等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国国家科学院院刊),1989,86:6553-6556)、胆酸(Manoharan(马诺哈兰)等人,Biorg.Med.Chem.Let.(生物有机化学与医药化学通讯),1994,4:1053-1060)、硫醚,例如,己基-S-三苯甲基硫醇(beryl-S-三tylthiol)(Manoharan(马诺哈兰)等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.(纽约科学院纪事),1992,660:306-309;Manoharan(马诺哈兰)等人,Biorg.Med.Chem.Let.(生物有机化学与医药化学通讯),1993,3:2765-2770)、巯基胆固醇(thiocholesterol)(Oberhauser(奥本豪森)等人,Nucl.Acids Res.(核酸研究),1992,20:533-538)、脂族链,例如,十二醇残余物或十一基残余物(Saison(塞森)-Behmoaras(贝毛拉斯)等人,EMBO J,1991,10:1111-1118;Kabanov(卡巴诺夫)等人,FEBS Lett.(欧洲生物化学学会联盟通讯),1990,259:327-330;Svinarchuk(斯瓦尔楚克)等人,Biochimie(生物化学),1993,75:49-54)、磷脂,例如,二鲸蜡基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-0-鲸蜡基-外消旋-甘油-3-磷酸酯(Manoharan(马诺哈兰)等人,Tetrahedron Lett.(四面体通讯),1995,36:3651-3654;Shea等人,Nucl.Acids Res.(核酸研究),1990,18:3777-3783)、多胺或聚乙二醇链(Manoharan(马诺哈兰)等人,Nucleosides&Nucleotides(核苷&核苷酸),1995,14:969-973)、或金刚烷乙酸(Manoharan(马诺哈兰)等人,Tetrahedron Lett.(四面体通讯),1995,36:3651-3654)、棕榈基部分(Mishra(米什拉)等人,Biochim.Biophys.Acta(生物化学与生物物理学学报),1995,1264:229-237)、或十八烷基胺或己基氨基-羧酰氧基胆固醇部分(Crooke(克鲁克)等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.(药理学与实验治疗学杂志),1996,277:923-937)。

[0125] 在一个实施例中,配体改变向其中并入该配体的iRNA药物的分布、靶向或寿命。在优选的实施例中,与例如不存在这样一种配体的物种相比,这种配体提供针对所选靶例如,分子、细胞或细胞类型(例如,肝脏细胞,如肝细胞)、区室(例如,细胞或器官区室、身体组织、器官或区域)的增强的亲和力。优选的配体将不参与双链体核酸中的双链体配对。

[0126] 配体可以包括天然存在的物质,如蛋白(例如,人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)或球蛋白);碳水化合物(例如,葡聚糖、茁霉多糖、壳多糖、壳聚糖、菊糖、环糊精或透明质酸);或脂质。配体也可以是重组或合成分子,如合成聚合物,例如,合成的聚氨基酸。聚氨基酸的实例包括以下聚氨基酸:聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯酸-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚磷嗪。多胺的实例包括:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、多胺、假肽-多胺、肽模拟物多胺、树状物多胺、精氨酸、脘、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子的卟啉、多胺季盐、或 α 螺旋肽。

[0127] 配体也可以包括靶向基团,例如,与指定的细胞类型如肾细胞结合的细胞或组织靶向剂,例如,凝集素,糖蛋白,脂质或蛋白,例如,抗体。靶向基团可以是促甲状腺激素、促

黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白A、黏蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双膦酸盐、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆酸、叶酸、维生素B12、维生素A、生物素、或RGD肽或RGD肽模拟物。

[0128] 配体的其他实例包括染料、嵌入剂(例如吡啶)、交联剂(例如补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、德克萨斯卟啉(texaphyrin)、噻啉(Sapphyrin)、多环芳烃(例如,吩嗪、二氢吩嗪)、人工核酸内切酶(例如EDTA)、亲脂性分子,例如,胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-0(十六烷基)甘油、香叶基氧己基、鲸蜡基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰)石胆酸、03-(油酰)胆烯酸、二甲氧基三苯甲基、或吩噻嗪肽缀合物(例如,触角足肽、Tat肽)、烷基化剂、磷酸酯、氨基、巯基、PEG(例如,PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射标记的标记、酶、半抗原(例如生物素)、转运/吸收促进剂(例如,阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成性核糖核酸酶(例如,咪唑、双咪唑、组胺、咪唑聚类、吡啶-咪唑缀合物、四氮杂大环类的Eu³⁺络合物)、二硝基苯基、HRP或AP。

[0129] 配体可以是蛋白,例如,糖蛋白,或肽,例如,对辅助配体具有特异亲和力的分子,或抗体,例如,与指定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞结合的抗体。配体也可以包括激素和激素受体。它们也可以包括非肽种类,如脂类、凝集素、糖类、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺多价甘露糖或多价岩藻糖。配体可以是例如脂多糖、p38MAP激酶的激活物,或NF- κ B的激活物。

[0130] 配体可以是例如通过破坏细胞骨架(例如,通过破坏细胞微管、微丝和/或中间丝)增加iRNA药物摄入细胞中的物质,例如,药物。药物可以例如是taxon、长春新碱、长春碱、松胞菌素、诺考达唑、促微丝聚合剂(japlakinolide)、红海海绵素A、鬼笔环肽、海洋苔藓素(swinholide)A、茛满诺星(indanocine)或myoservin。

[0131] 在一些实施例中,与如在此所述的iRNA连接的配体充当PK调节物。如在此使用,“PK调节物”指药物代谢动力学调节物。PK调节物包括亲油物质、胆酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白结合剂、PEG、维生素等。示例性PK调节物包括但不限于胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰甘油酯、磷脂、鞘脂、萘普生、布洛芬(ibuprofen)、维生素E、生物素等。包含许多硫代磷酸酯键的寡核苷酸也已知与血清蛋白结合,因此主链中包含多个硫代磷酸酯键的短寡核苷酸,例如,约5个碱基、10个碱基、15个碱基或20个碱基的寡核苷酸,也适用于本发明作为配体(例如作为PK调节配体)。此外,结合血清组分(例如血清蛋白)的适配体也适合用作在此所述的实施例中的PK调节配体。

[0132] 对于不能轻易穿过双层膜的大分子药物和亲水性药物分子,认为携裹于细胞内体溶酶体区室内是有效递送至其作用部位的最大障碍。近年来,已经创造许多方法和策略以解决这个问题。对于脂质体制剂,在制剂中使用融合性脂类已经是最常见方案(Singh(辛格),R.S.,Goncalves,(贡萨尔维斯)C.等人,(2004).On the Gene Delivery Efficacies of pH-Sensitive Cationic Lipids via Endosomal Protonation(经由内体质子化影响pH-敏感阳离子脂质的基因递送效率),A Chemical Biology Investigation(化学生物学研究).Chem.Biol.(化学&生物学)11,713-723.)。因质子化和/或pH诱导构象变化而显示出pH-敏感内体裂解活性的其他组分包括带电荷的聚合物和肽。实例可以在Hoffman(霍夫

曼), A.S., Stayton (斯特顿), P.S. 等人, (2002). Design of "smart" polymers that can direct intracellular drug delivery (设计可以指导胞内药物递送的“智能”聚合物), *Polymers Adv. Technol* (先进技术聚合物) .13, 992-999; Kakudo (角户), Chaki (恰基), T., S. 等人, (2004). Transferrin-Modified Liposomes Equipped with a pH-Sensitive Fusogenic Peptide: An Artificial Viral-like Delivery System (配备pH-敏感性融合肽的转铁蛋白修饰的脂质体: 人工病毒样递送系统), *Biochemistry* (生物化学) 436, 5618-5628; Yessine (亚辛), M.A. 和 Leroux (勒鲁), J.C. (2004). Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules (膜聚去稳定性阴离子: 生物大分子与脂质双层的相互作用和内体逃逸), *Adv. Drug Deliv. Rev.* (先进药物输送评论) 56, 999-1021; Oliveira (奥利韦拉), S., van Rooy (范鲁伊), I. 等人, (2007). 融合肽增强了改善iRNA诱导的癌基因沉默的内体逃逸. *Int. J. Pharm.* (国际制药学杂志) 331, 211-4. 它们已经总体上用于药物递送系统, 如脂质体或脂质复合体中。对于使用脂质体制剂的叶酸受体介导递送, 例如, 已经将pH-敏感性融合肽掺入脂质体中并且显示它通过改善摄取过程期间药物的卸载而增强活性 (Turk (特克), M.J., Reddy (瑞迪), J.A. 等人, (2002). Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs (在内体pH增强药物从叶酸靶向脂质体中释放的新颖pH-敏感肽的表征), *Biochim. Biophys. Acta* (生物化学与生物物理学学报) 1559, 56-68)。

[0133] 在某些实施例中, 本发明的内体裂解组分可以是示出pH依赖性膜活性和/或融合性的聚阴离子肽或肽模拟物。肽模拟物可以是设计成模拟肽的小蛋白样链。肽模拟物可以源自旨在改变分子特性的现存肽的修饰, 或使用非天然氨基酸或其类似物的肽样分子合成。在某些实施例中, 与肽相比时, 它们具有改善的稳定性和/或生物活性。在某些实施例中, 内体裂解组分在内体pH (例如, pH 5-6) 处采取其活性构象。“活性”构象是其中内体裂解组分促进内体裂解和/或本发明中表征的模块组合物或其任何组分 (例如, 核酸) 从内体转运至细胞胞质的构象。

[0134] 可以使用溶血测定法, 对化合物文库筛选它们在内体pH对中性pH时的差异性膜活性。由这种方法分离的有前景候选物可以用作本发明中表征的模块组合物的组分。一种鉴定用于本发明组合物和方法中的内体裂解组分的方法可以包括: 提供化合物文库; 使血细胞与该文库的成员接触, 其中控制其内出现接触的培养基的pH; 确定化合物是否在低pH (例如, 约pH 5-6) 对中性pH (例如, 约pH 7-8) 时诱导血细胞的差异性裂解。

[0135] 示例性内体裂解组分包括GALA肽 (Subbarao (苏巴拉奥) 等人, *Biochemistry* (生物化学), 1987, 26: 2964-2972)、EALA肽 (Vogel (沃格尔) 等人, *J. Am. Chem. Soc.* (美国化学学会志), 1996, 118: 1581-1586) 和它们的衍生物 (Turk (特克) 等人, *Biochem. Biophys. Acta*, (生物化学与生物物理学学报) 2002, 1559: 56-68)。在某些实施例中, 内体裂解组分可以含有将响应于pH变化而发生电荷或质子化变化的化学基团 (例如, 氨基酸)。内体裂解组分可以是直链的或分支的。内体裂解组分的示例性一级序列包括H₂N-

(AALEALAEALAEALAEALAEALAEAAAAGGC) - CO₂H (SEQ ID NO: 2); H₂N - (AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC) - CO₂H (SEQ ID NO: 3); 和H₂N - (ALEALAEALAEALAE) - CONH₂ (SEQ ID NO: 4)。

[0136] 在某些实施例中,可以将多于一种内体裂解组分掺入本发明中表征的iRNA药剂中。在一些实施例中,这将导致并入多于一种相同的内体裂解组分至iRNA药剂中。在一些实施例中,这将导致并入两种或更多种不同的内体裂解组分至iRNA药剂中。

[0137] 这些内体裂解组分可以通过例如在内体pH改变构象来介导内体逃逸。在某些实施例中,内体裂解组分可以在中性pH以随机卷曲构象存在并且在内体pH重排成一种两亲螺旋。作为这种构象转变的结果,这些肽可以插入内体的脂质膜中,造成内体内容物泄漏至细胞质中。因为构象转变是pH依赖的,所以内体裂解组分可以显示很少或不显示融合活性,同时在血液中循环(pH大约7.4)。如在此使用,“融合活性”定义为通过内体裂解组分导致脂质膜破裂的活性。融合活性的一个实例是通过内体裂解组分破坏内体膜,导致内体裂解或泄漏和本发明中表征的模块组合物(例如,核酸)的一种或多种组分从内体转运至细胞质中。

[0138] 除溶血测定法之外,如在此描述,适合的内体裂解组分可以由技术人员使用其他方法测试并鉴定。例如,可以通过例行方法(例如,以细胞测定法)测试化合物响应于例如根据pH环境的电荷变化的能力。在某些实施例中,将试验化合物与细胞组合或接触,并且允许细胞内化该试验化合物,例如,通过内吞作用。来自对照细胞的内体制品相比,随后可以通过使细胞和内体制品接触,产生内体制品。在来自接触的细胞与对照细胞的内体级分中,一种变化例如,下降,表示这种试验化合物可以作为融合剂发挥作用。可替代地,可以例如,通过显微术,例如,通过光学或电子显微术评价接触的细胞和对照细胞,以确定细胞中内体群体中的差异。试验化合物和/或内体可以被标记,例如以便将内体泄漏定量。

[0139] 在另一类型的测定法中,使用一种或多种测试或推定性融合剂,构建在此所述的iRNA药剂。iRNA药物可以进行标记以便轻易地看到。一旦iRNA药物由细胞摄取,可以评价内体裂解组分促进内体逃逸的能力,例如,通过制备内体制品,或通过显微技术,这使得细胞质中标记的iRNA药物的可视化成为可能。在某些其他实施例中,基因表达的抑制或任何其他生理参数可以用作内体逃逸的替代标记。

[0140] 在其他实施例中,圆二色光谱法可以用来鉴定显示pH依赖性结构转变的化合物。

[0141] 也可以进行一个两步骤测定法,其中第一测定法评价单独的试验化合物响应于pH变化的能力,并且第二测定法评价包含试验化合物的模块组合物响应于pH变化的能力。

[0142] 脂质缀合物

[0143] 在一种配体中,配体或缀合物是脂质或基于脂质的分子。这种脂质或基于脂质的分子优选地结合血清蛋白,例如,人血清白蛋白(HSA)。结合HSA的配体允许缀合物分布至靶组织,例如,身体的非肾靶组织。例如,靶组织可以是肝脏,包括肝脏的实质细胞。可以结合HSA的其他分子也可以用作配体。例如,可以使用萘普生或阿司匹林。脂质或基于脂质的配体可以(a)增加缀合物对降解的抵抗力,(b)增加靶向或转运至靶细胞或细胞膜中,和/或(c)可以用来调节与血清蛋白(例如,HSA)的结合。

[0144] 基于脂质的配体可以用来调节(例如,控制)缀合物与靶组织的结合。例如,与HSA更强烈结合的脂质或基于脂质的配体将更不可能被靶向肾并且因此更不可能从身体清除。与HSA更不强烈结合的脂质或基于脂质的配体可以用来使缀合物靶向肾。

[0145] 在一个优选实施例中,基于脂质的配体结合HSA。优选地,它以足够的亲和力结合HSA,从而缀合物将优选地分布至非肾组织。然而,优选的是这种亲和力并不是这样强,从而HSA-配体结合不能逆转。

[0146] 在另一个优选实施例中,基于脂质的配体微弱或根本不结合HSA,从而缀合物将优选地分布至肾。作为基于脂质的配体的替代或除它之外,也可以使用靶向肾细胞的其他部分。

[0147] 在另一个方面,配体是由靶细胞(例如,正在增殖的细胞)摄取的部分,例如,维生素。这些特别可用于治疗以不希望的细胞(例如,恶性或非恶性型,例如,癌细胞)增殖为特征的失调。示例性维生素包括维生素A、E和K。其他示例性维生素包括是B维生素,例如,叶酸、B12、核黄素、生物素、吡哆醛或其他维生素或由癌细胞摄取的养分。还包括HSA和低密度脂蛋白(LDL)。

[0148] 在另一个方面,配体是细胞渗透剂,优选地是螺旋形细胞渗透剂。优选地,该渗透剂是两亲的。一种示例性剂渗透剂是肽如tat或触角足蛋白。如果该渗透剂是肽,则它可以经修饰的,包括肽酰基模拟物、反演体、非肽键或假肽键和D-氨基酸的使用。螺旋形渗透剂优选地是 α -螺旋渗透剂,它优选地具有亲脂和疏脂相。

[0149] 细胞渗透肽

[0150] 适合随本发明一起使用的肽可以是天然肽,例如,tat或触角足肽、合成肽或肽模拟物。此外,这种肽可以是修饰的肽,例如肽可以包含非肽键或假肽键和D-氨基酸。肽模拟物(在本文中又称作寡肽模拟物)是能够折叠成与天然肽相似的限定三维结构的分子。肽和肽模拟物与iRNA药物的接合可以影响iRNA的药物代谢动力学分布,例如通过增强细胞识别与吸收。肽或肽模拟物部分可以是约5-50氨基酸长的,例如,约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸长。

[0151] 肽或肽模拟物可以例如是细胞渗透肽、阳离子肽、两亲肽或疏水肽(例如,主要由Tyr、Trp或Phe组成)。肽部分可以是树状肽、约束肽或交联肽。在另一个替代中,肽部分可以包括疏水性膜转运序列(MTS)。一种含有疏水性MTS的示例性肽是具有氨基酸序列AAVALLPAVLLALLAP(SEQ ID NO:5)的RFGF。含有疏水性MTS的RFGF类似物(例如,氨基酸序列AALLPVLLAAP(SEQ ID NO:6))也可以是靶向部分。肽部分可以是“递送”肽,它可以携带庞大的极性分子(包括肽、寡核苷酸和蛋白)跨过细胞膜。例如,已经发现来自HIV Tat蛋白(GRKKRRQRRRPPQ(SEQ ID NO:7))和果蝇触角足蛋白(RQIKIWFQNRMMKWKK(SEQ ID NO:8))的序列能够作为递送肽发挥作用。肽或肽模拟物可以由随机DNA序列编码,如从噬菌体展示文库或一珠一化合物(OBOC)组合文库中鉴定的肽(Lam(林)等人,Nature(自然),354:82-84,1991)。优选地,系至脂质的肽或肽模拟物是细胞靶向肽,例如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)肽或RGD模拟物。肽部分可以在长度上范围从约5个氨基酸至约40个氨基酸。肽部分可以具有结构修饰,例如以便增加稳定性或指导构象特性。可以利用下文描述的任何结构修饰。

[0152] RGD肽部分可以用来靶向肿瘤细胞,如内皮肿瘤细胞或乳癌肿瘤细胞(Zitzmann(兹曼)等人,Cancer Res.(癌症研究),62:5139-43,2002)。RGD肽可以促进dsRNA药剂靶向多种其他组织(包括肺、脾或肝脏)的肿瘤(Aoki(青木)等人,Cancer Gene Therapy(癌症基因治疗)8:783-787,2001)。优选地,RGD肽将促进iRNA药剂靶向肾。RGD肽可以是直链的或环状的,并且可以是修饰的,例如,糖基化或甲基化以促进靶向特定组织。例如,糖基化RGD肽可以递送iRNA药物至表达 $\alpha_v\beta_3$ 的肿瘤细胞(Haubner(哈布纳)等人,Jour.Nucl.Med.(核医学杂志),42:326-336,2001)。

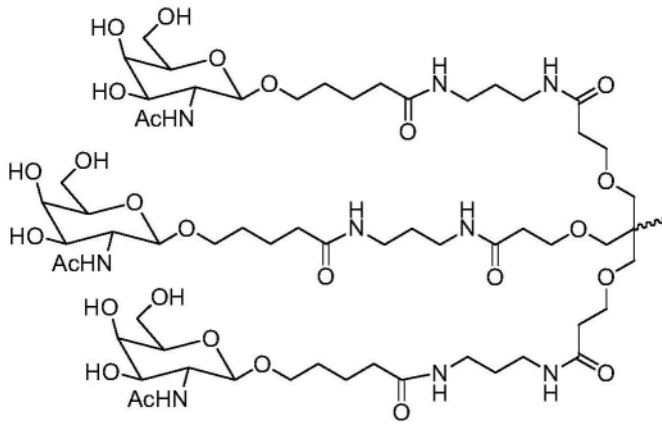
[0153] 可以使用靶向正在增殖的细胞中富集的标记的肽。例如,含有RGD的肽和肽模拟物可以靶向癌细胞,特别是显示 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白的细胞。因此,可以使用RGD肽、含有RGD的环状肽、包含D-氨基酸的RGD肽以及合成性RGD模拟物。除RGD之外还,可以使用靶向 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白配体的其他部分。通常,这类配体可以用来控制正在增殖的细胞和血管生成。

[0154] “细胞渗透肽”能够渗透细胞,例如,微生物细胞,如细菌或真菌细胞,或哺乳动物细胞,例如人类细胞。微生物细胞渗透肽可以例如是 α -螺旋型直链的肽(例如,LL-37或天蚕素P1)、含二硫键的肽(例如, α -防卫素、 β -防卫素或转抗菌肽)、或仅含一种或两种优势氨基酸的肽(例如,PR-39或indolicidin)。细胞渗透肽也可以包含核定位信号(NLS)。例如,细胞渗透肽可以是二重两亲肽,如MPG,其源自HIV-1gp 41的融合物肽结构域和SV 40大T抗原的NLS(Simeoni(西梅奥尼)等人,Nucl.Acids Res.(核酸研究)31:2717-2724,2003)。

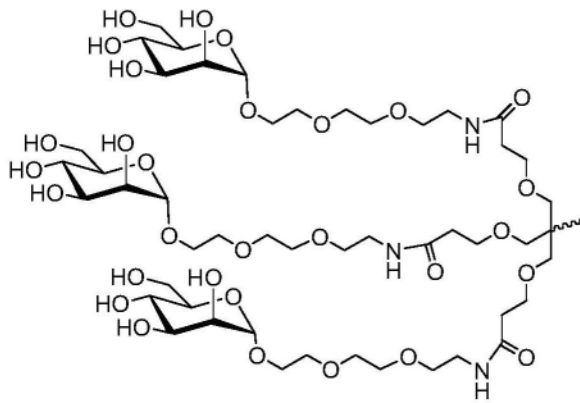
[0155] 糖缀合物

[0156] 在一些实施例中,在此所述的iRNA寡核苷酸进一步包括糖缀合物。如在此描述,糖缀合物有利于体内递送核酸连同适合体内治疗性用途的组合物。如在此使用,“碳水化合物”指一种化合物,该化合物是本身由具有至少6个碳原子、同时氧、氮或硫原子与每个碳原子结合的一个或多个单糖单位(它可以是直链的、分支的亦或环状的)组成的碳水化合物;或一种化合物,该化合物以由具有至少六个碳原子、同时氧、氮或硫原子与每个碳原子结合的一个或多个单糖单位(它可以是直链的、分支的或环状的)组成的碳水化合物作为其一部分。代表性碳水化合物包括糖(单糖、二糖、三糖和含有约4-9个单糖单位的低聚糖)和多糖如淀粉,糖原,纤维素和多糖树胶。特定单糖包括 C_5 以上(优选地 C_5-C_8)糖;二糖和三糖包括具有两个或三个单糖单位的糖(优选地 C_5-C_8)。

[0157] 在一个实施例中,糖缀合物选自下组,该组由以下各项组成:

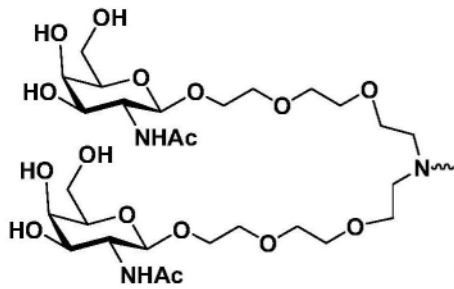


式 II,

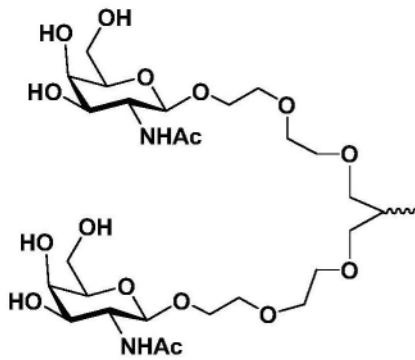


[0158]

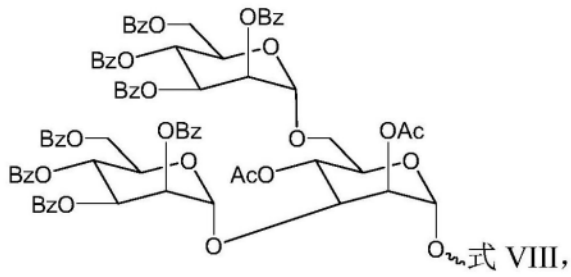
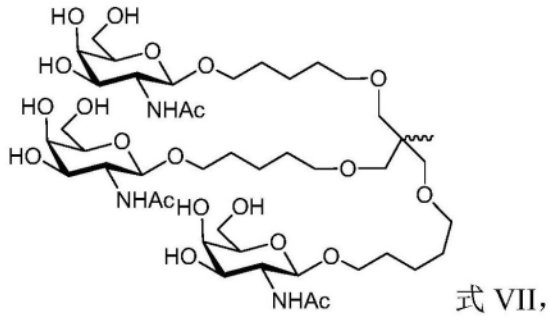
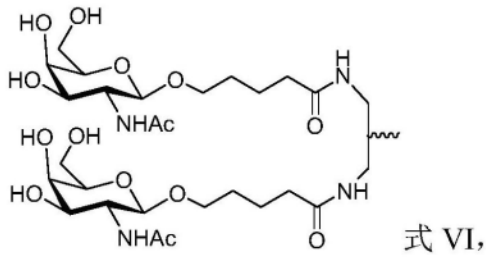
式 III,



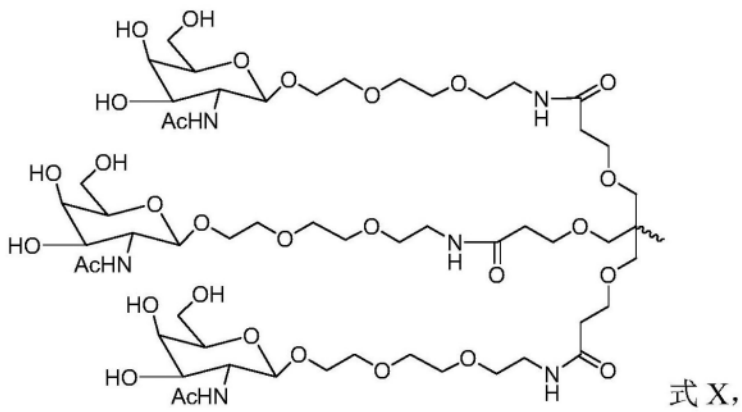
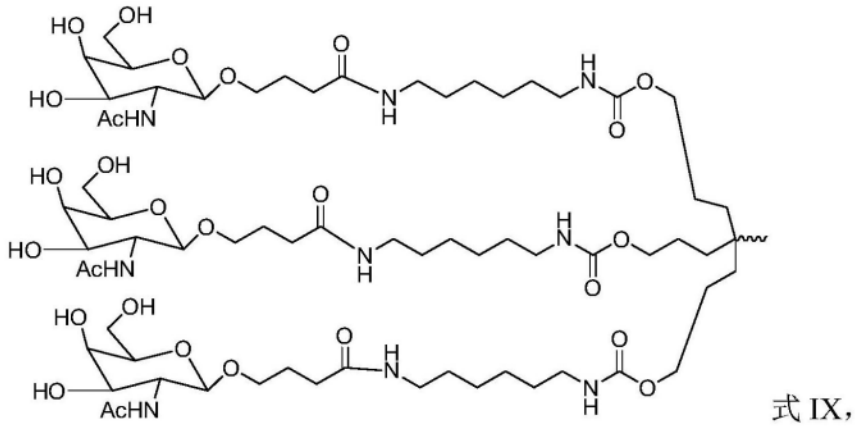
式 IV,

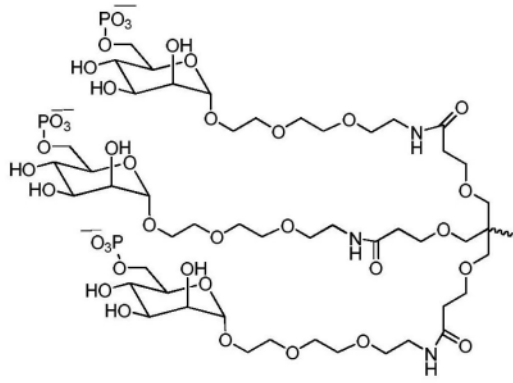


式 V,

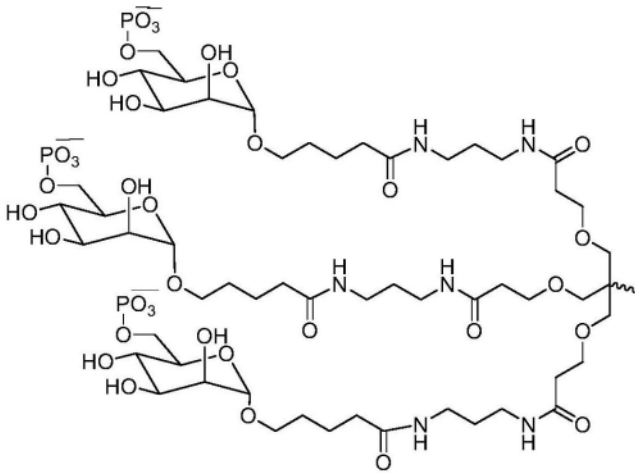


[0159]



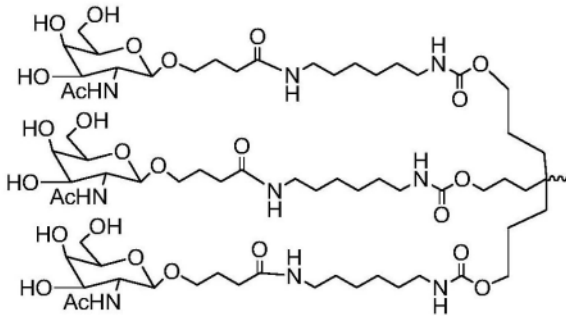


式 XI,

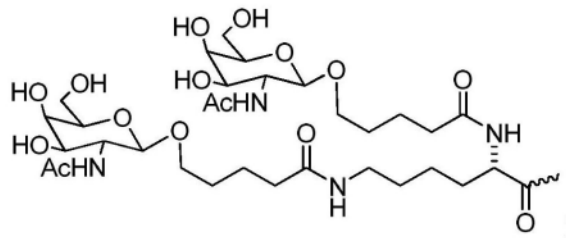


式 XII,

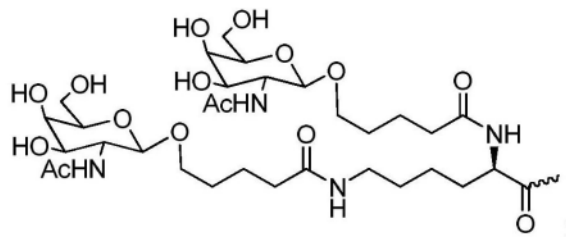
[0160]



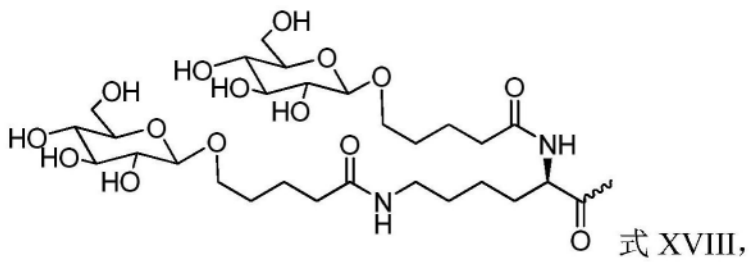
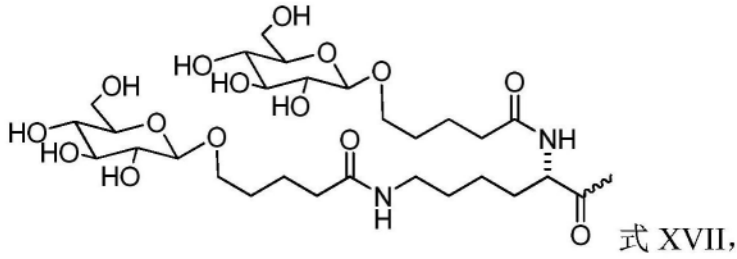
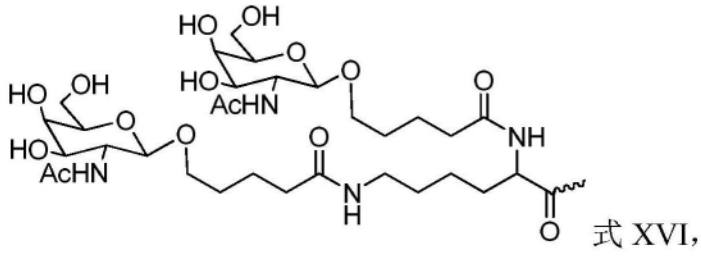
式 XIII,



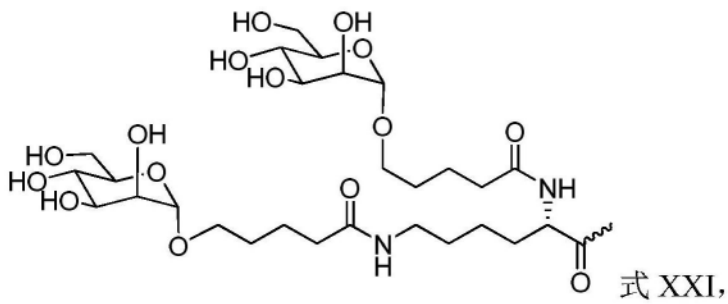
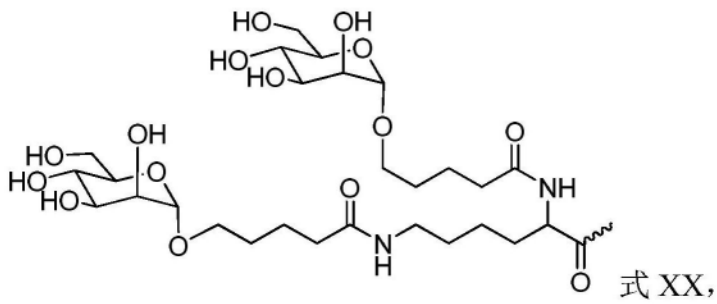
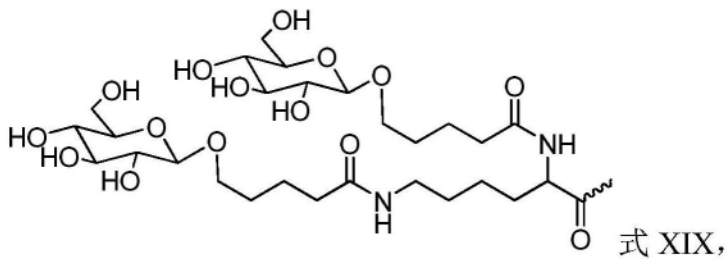
式 XIV,



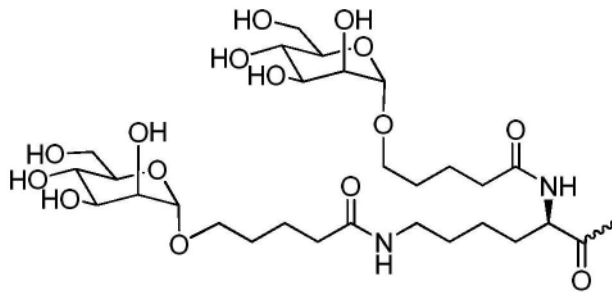
式 XV,



[0161]



[0162]

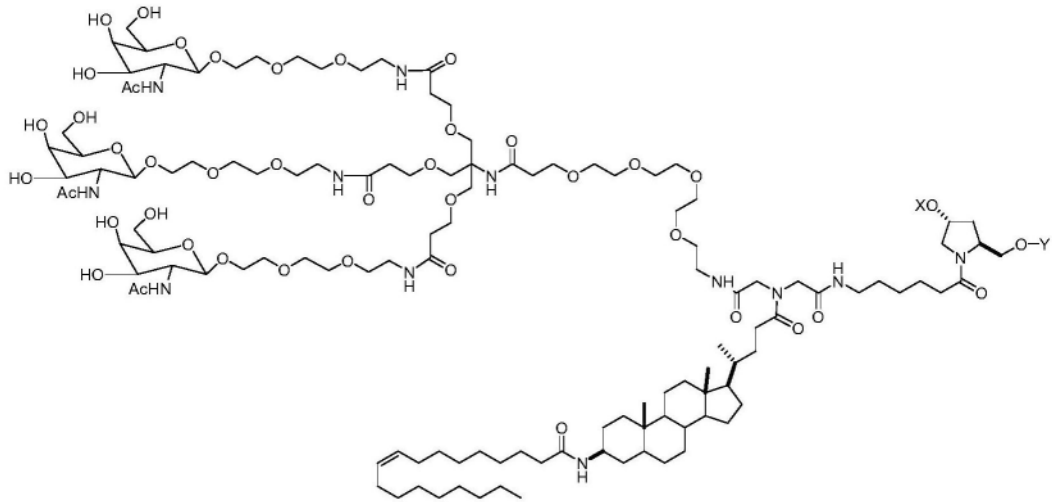


即,式II-式XXII。

式 XXII,

[0163] 用于在此所述的实施例中的另一种代表性糖缀合物包括但不限于,

[0164]



(式 XXIII) ,

[0165] 当X或Y之一是寡核苷酸时,另一个是氢。

[0166] 在一些实施例中,糖缀合物进一步包含其他配体例如,但不局限于PK调节物、内体裂解配体和细胞渗透肽。

[0167] 接头

[0168] 在一些实施例中,在此所述的缀合物可以借助各种接头与iRNA寡核苷酸连接,所述接头可以是可切割或不可切割的。

[0169] 术语“接头”或“连接基团”意指连接化合物的两个部分的有机部分。接头典型地包含直接键或原子,例如氧或硫,单位例如 NR^8 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 SO 、 SO_2 、 SO_2NH 或原子链,例如,但不局限于取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、杂环基烷基、杂环基烯基、杂环基炔基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基、环烯基、烷芳基烷基、烷芳基烯基、烷芳基炔基、烯基芳基烷基、烯基芳基烯基、烯基芳基炔基、炔基芳基烷基、炔基芳基烯基、炔基芳基炔基、烷基杂芳基烷基、烷基杂芳基烯基、烷基杂芳基炔基、烯基杂芳基烷基、烯基杂芳基烯基、烯基杂芳基炔基、炔基杂芳基烷基、炔基杂芳基烯基、炔基杂芳基炔基、烷基杂环基烷基、烷基杂环基烯基、烷基杂环基炔基、烯基杂环基烷基、烯基杂环基烯基、烯基杂环基炔基、炔基杂环基烷基、炔基杂环基烯基、炔基杂环基炔基、烷基芳基、烯基芳基、炔基芳基、烷基杂芳基、烯基杂芳基、炔基杂芳基,其中一个或多个亚甲基可以由中断或终止 O 、 S 、 $\text{S}(\text{O})$ 、 SO_2 、 $\text{N}(\text{R}^8)$ 、 $\text{C}(\text{O})$ 、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环基;其中 R^8 是氢,酰基、脂族基或取代的脂族基。在一个实施例中,接头具有1-24个原子,优选地4-24个原子,优选

地6-18个原子,更优选地8-18个原子,并且最优选地8-16个原子。

[0170] 可切割连接基是一种基团,它在细胞外部充分稳定,但是在进入靶细胞时则被切割以释放由接头固定在一起的两个部分。在一个优选实施例中,可切割连接基在靶细胞中或第一参比条件下(可以例如将其选择成模拟或代表胞内条件)的切割比受试者的血液或第二参比条件(可以例如将其选择成模拟或代表血液或血清中存在的条件)下快至少10倍或更优选地至少100倍。

[0171] 可切割连接基对切割剂(例如,pH、氧化还原电势或降解性分子的存在)不稳定。通常,切割剂在细胞内部比血清或血液中更占优势或发现以更高水平或活性存在。这类降解剂的实例包括:针对具体底物所选择或没有底物特异性的氧化还原剂,例如包括在细胞中存在的氧化酶或还原酶或可以通过还原作用降解氧化还原可切割连接基的还原剂,例如硫醇;酯酶;内体或可以产生酸性环境的物质,例如,产生五或更低pH的那些物质;可以通过作为广义酸发挥作用水解或降解酸可切割连接基的酶,肽酶(其可以具有底物特异性)、和磷酸酶。

[0172] 可切割键基团,例如二硫键,可以是对pH不稳定的。人血清的pH是7.4,而胞内平均pH略微更低,范围从约7.1-7.3。内体具有更大酸性pH,处于5.5-6.0范围内,并且溶酶体具有在约5.0的甚至更大酸性pH。一些接头将具有在优选的pH处被切割的可切割连接基,因而在细胞内部从配体释放阳离子脂质或释放至所需的细胞区室。

[0173] 接头可以包括由特定酶可切割的可切割连接基。并入接头中的可切割连接基的类型可以取决于待靶向的细胞。例如,靶向肝脏的配体可以经包括酯基的接头与阳离子脂质连接。肝细胞富含酯酶,并且因此这种接头将在肝细胞中比不富含酯酶的细胞类型中更高效地切割。富含酯酶的其他细胞类型包括肺、肾皮质和睾丸的细胞。

[0174] 在靶向富含酯酶的细胞类型(例如肝脏细胞和滑膜细胞)时,可以使用含有肽键的接头。

[0175] 通常,可以通过测试降解剂(或条件)切割候选物连接基的能力,评价候选可切割连接基的适用性。还将希望的是还测试候选可切割连接基在血液或与其他非靶组织接触时抵抗切割的能力。因此,可以测定在第一和第二条件之间针对切割的相对敏感性,其中选择第一条件以指示在靶细胞中的切割并且选择第二条件以指示在其他组织或生物流体例如血液或血清中的切割。可以在无细胞系统中、在细胞中、在细胞培养物中、在器官或组织培养中或在完整动物中实施评价。可能有用的是,在无细胞或培养条件下作出初步评价并且通过在完整动物中进一步评价来证实。在优选的实施例中,与血液或血清(或在经选择以模拟胞外条件的体外条件下)相比,有用的候选化合物在细胞(或在经选择以模拟胞内条件的体外条件下)中至少2、4、10或100倍地被切割。

[0176] 氧化还原可切割连接基

[0177] 一类可切割连接基是在还原或氧化时切割的氧化还原可切割连接基。可还原切割的连接基的实例是二硫连接基(-S-S-)。为了确定一种候选可切割连接基是否为适合的“可还原切割的连接基”或例如是否适合与特定iRNA部分和特定靶向剂一起使用,可以查询在此所述的方法。例如,可以通过使用模拟将在细胞(例如,靶细胞)中观察到的切割速率的本领域已知试剂与二硫苏糖醇(DTT)或其他还原剂孵育,评价一种候选物。该候选物也可以在选择成模拟血液或血清条件的条件下评价。在一个优选实施例中,候选化合物在血液中遭

切割最多10%。在优选的实施例中,与血液(或在经选择以模拟胞外条件的体外条件下)相比,有用的候选化合物在细胞(或在经选择以模拟胞内条件的体外条件下)中至少2、4、10或100倍地降解。可以使用标准酶动力学测定法在选择成模拟胞内介质的条件下并且与选择成模拟胞外介质的条件相比确定候选化合物的切割速率。

[0178] 基于磷酸酯的可切割连接基

[0179] 基于磷酸酯的可切割连接基由降解或水解磷酸酯基的物质切割。在细胞中切割磷酸酯基的物质的实例是酶,例如细胞中的磷酸酶。基于磷酸酯的连接基的实例是-O-P(O)(ORk)-O-、-O-P(S)(ORk)-O-、-O-P(S)(SRk)-O-、-S-P(O)(ORk)-O-、-O-P(O)(ORk)-S-、-S-P(O)(ORk)-S-、-O-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(ORk)-O-、-O-P(O)(Rk)-O-、-O-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-O-、-S-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-S-、-O-P(S)(Rk)-S-。优选的实施例是-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O-、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-、-O-P(S)(H)-S-。优选的实施例是-O-P(O)(OH)-O-。可以使用与上文描述的那些相似的方法评价这些候选物。

[0180] 酸可切割连接基

[0181] 酸可切割连接基是在酸性条件下切割的连接基。在优选的实施例中,酸可切割连接基在pH为约6.5或更低(例如,约6.0、5.5、5.0或更低)的酸性环境下或由通过可以充当广义酸的物质(例如酶)切割。在细胞中,特定低pH细胞器,如内体和溶酶体可以为酸可切割连接基提供切割环境。酸可切割连接基的实例包括但不限于脞、酯和氨基酸酯。酸可切割基团可以具有通式-C=NN-、C(O)O或-OC(O)。优选的实施例是与酯的氧附接的碳(烷氧基)是芳基、取代的烷基或叔烷基,例如二甲基戊基或叔-丁基时的情况。可以使用与上文描述的那些相似的方法评价这些候选物。

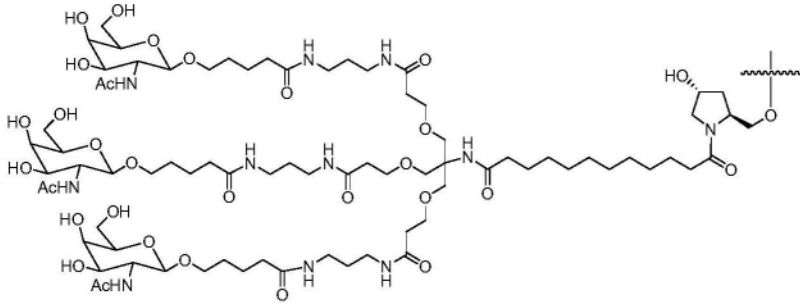
[0182] 基于酯的连接基

[0183] 基于酯的可切割连接基由酶(例如细胞中的酯酶和酰胺酶)切割。基于酯的可切割连接基的实例包括但不限于亚烷基、亚链烯基和亚炔基的酯。酯可切割连接基具有通式-C(O)O-或-OC(O)-。可以使用与上文描述的那些相似的方法评价这些候选物。

[0184] 基于肽的切割基团

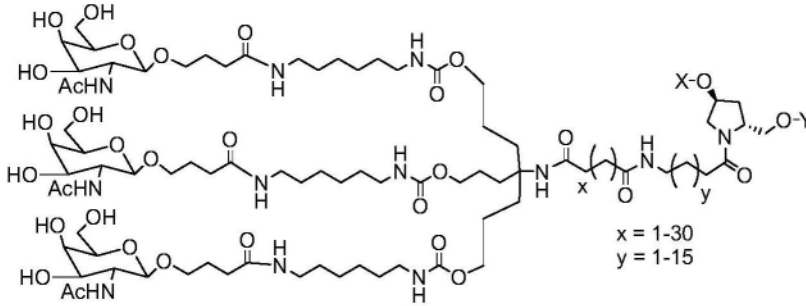
[0185] 基于肽的可切割连接基由酶(例如细胞中的肽酶和蛋白酶)切割。基于肽的可切割连接基是氨基酸之间形成以产生寡肽(例如,二肽、三肽等)和多肽的肽键。基于肽的可切割基团不包括酰胺基(-C(O)NH-)。酰胺基可以在任何亚烷基、亚链烯基或亚炔基之间形成。肽键是在氨基酸之间形成以产生肽和蛋白的特别类型的酰胺键。基于肽的切割基团通常限于氨基酸之间形成的产生肽和蛋白的肽键(即,酰胺键)并且不包括完整的酰胺官能团。基于肽的可切割连接基具有通式NHCHR^AC(O)NHCHR^BC(O)-,其中R^A和R^B是两个相邻氨基酸的R基团。可以使用与上文描述的那些相似的方法评价这些候选物。

[0186] 代表性糖缀合物其中接头包括但不限于,

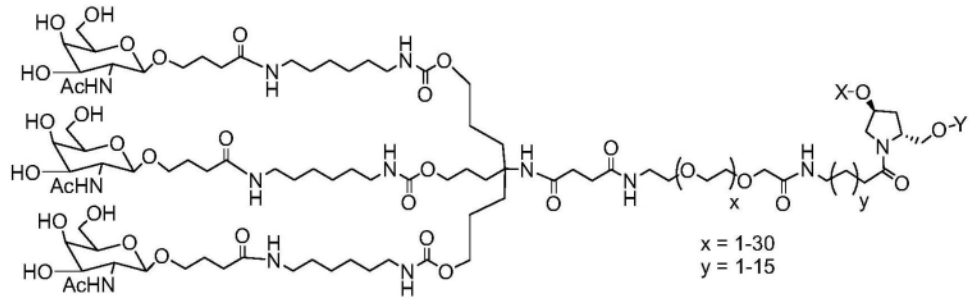


(式 XXIV)、

[0187]

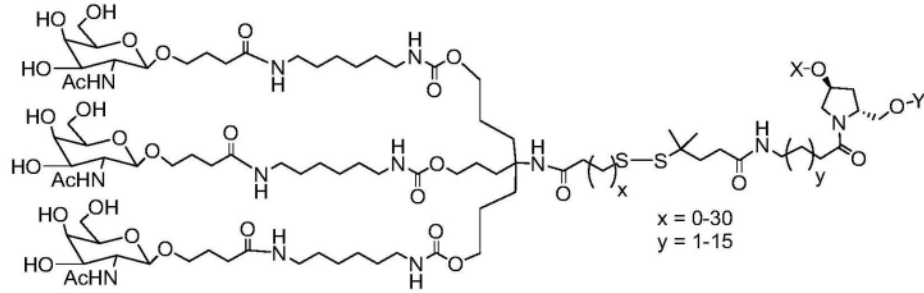


(式 XXV)、



(式

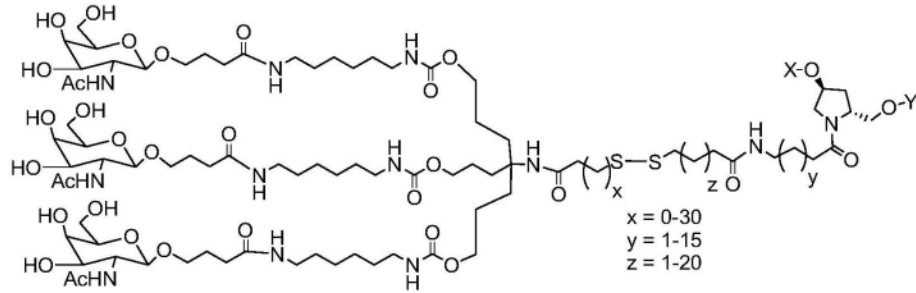
XXVI)、



(式

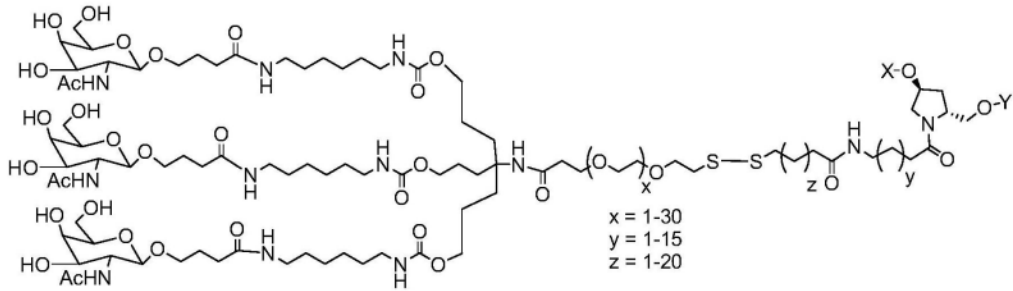
[0188]

XXVII)、



(式

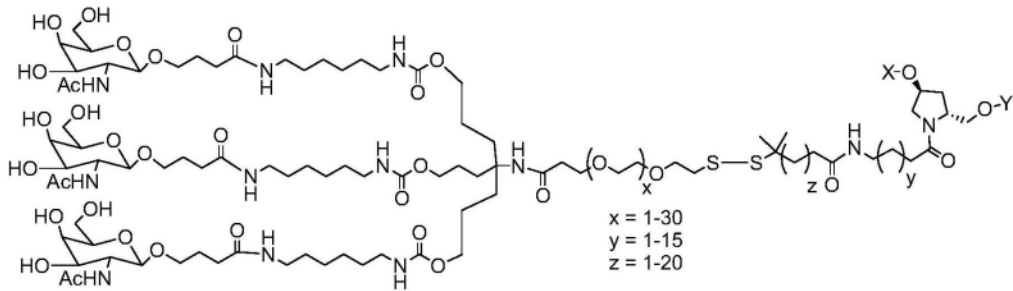
XXVIII)、



(式

XXIX)、和

[0189]



(式

XXX)、

[0190] 当X或Y之一是寡核苷酸时,另一个是氢。

[0191] 教授制备RNA缀合物的代表性美国专利包括但不限于,美国专利号4,828,979; 4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717,5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241;5,391,723;5,416,203,5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928和5,688,941;6,294,664;6,320,017;6,576,752;6,783,931;6,900,297;7,037,646;所述文献的每一篇通过引用结合在此。

[0192] 给定化合物中的全部位置不必要经统一修饰,并且实际上可以在单个化合物中或甚至在iRNA内部的单个核苷处掺入多于一个前述修饰。本发明也包括作为嵌合化合物的iRNA化合物。在本发明的情境下,“嵌合”iRNA化合物或“嵌合体”是含有两个或更多个化学上不同的区域的iRNA化合物,优选地dsRNA,所述区域的每个由至少一种单体单位(即在dsRNA化合物的情况下核苷酸)构成。这些iRNA一般含有至少一个区域,其中RNA经修饰,从而赋予iRNA增加的核酸酶降解抗性、增加的细胞摄取和/或增加的靶核酸结合亲和力。iRNA的额外区域可以充当能够切割RNA:DNA或RNA:RNA杂交分子的酶的底物。通过举例,RNA酶H是切割RNA:DNA双链体的RNA链的细胞核酸内切酶。因此,RNA酶H的激活导致RNA靶的切割,因而大大增强iRNA抑制基因表达的效率。因此,与杂交至相同靶区域的硫代磷酸酯脱氧dsRNA相比,可以在使用嵌合dsRNA时,经常用更短的iRNA获得可比较的结果。可以通过凝胶电泳和(如果需要)本领域已知的相关核酸杂交技术常规地检测到RNA靶的切割。

[0193] 在某些情况下,iRNA的RNA可以由非配体基团修饰。许多非配体分子已经与iRNA缀合以便增强iRNA的活性、细胞分布或细胞摄取,并且用于实施这类缀合的程序是在科学文献中可获得的。这类非配体部分包括脂质部分,例如胆固醇(Kubo(久保),T.等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.(生物化学与生物物理学研究通讯),2007,365(1):54-61; Letsinger(莱特辛格)等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国国家科学院院刊),1989,86:6553)、胆酸(Manoharan(马诺哈兰)等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.(生物有机化学与医药化学通讯),1994,4:1053)、硫醚,例如,己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan(马诺哈兰)等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.(纽约科学院纪事),1992,660:306;Manoharan(马诺哈兰)等人,Bioorg.Med.Chem.Let.(生物有机化学与医药化学通讯),1993,3:2765)、巯基胆固醇(Oberhauser(奥本豪森)等人,Nucl.Acids Res.(核酸研究),1992,20:533)、脂族链,例如,十二醇残余物或十一基残余物(Saison(塞森)-Behmoaras(贝毛拉斯)等人,EMBO J.,1991,10:111;Kabanov(卡巴诺夫)等人,FEBS Lett.(欧洲生物化学学会联盟通讯),1990,259:327;Svinarchuk(斯维纳楚克)等人,Biochimie(生物化学),1993,75:49)、磷脂,例如,二鲸蜡基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-0-鲸蜡基-外消旋-甘油-3-磷酸酯(Manoharan(马诺哈兰)等人,Tetrahedron Lett.(四面体通讯),1995,36:3651;Shea(谢)等人,Nucl.Acids Res.(核酸研究),1990,18:3777)、多胺或聚乙二醇链(Manoharan(马诺哈兰)等人,Nucleosides&Nucleotides(核苷&核苷酸),1995,14:969)、或金刚烷乙酸(Manoharan(马诺

哈兰)等人, *Tetrahedron Lett.* (四面体通讯), 1995, 36:3651)、棕榈基部分 (Mishra (米什拉) 等人, *Biochim. Biophys. Acta* (生物化学与生物物理学学报), 1995, 1264:229), 或十八烷基胺或己基氨基-羧酰氧基胆固醇部分 (Crooke (克鲁克) 等人, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (药理学与实验治疗学杂志), 1996, 277:923)。教授制备这类RNA缀合物的代表性美国专利已经在上文列出。常见缀合方案涉及合成在序列的一个或多个位置处携带氨基接头的RNA。氨基随后与正使用适当的偶联或活化试剂缀合的分子反应。在溶液相, 可以用仍与固相支持物结合的亦或在切割RNA后的RNA进行缀合反应。通过HPLC (高效液相色谱法) 纯化RNA缀合物一般提供纯的缀合物。

[0194] iRNA的递送

[0195] 可以按多个不同方式实现向对其有需求的受试者递送iRNA。可以通过向受试者给予包括iRNA (例如dsRNA) 的组合物, 直接进行体内递送。可替代地, 可以通过给予编码和指导iRNA表达的一种或多种载体间接地进行递送。

[0196] iRNA组合物的直接递送

[0197] 通常, 递送核酸分子的任何方法可以适应于随iRNA使用 (参见例如, Akhtar (阿赫塔尔) S. 和Julian (朱利安) RL. (1992) *Trends Cell Biol.* (细胞生物学趋向) 2(5):139-144 和WO 94/02595, 所述文献通过引用完整结合在此)。然而, 存在认为对体内成功递送iRNA分子重要的三种因素: (a) 所递送分子的生物学稳定性, (2) 防止非特异性作用, 和(3) 所递送分子在靶组织中的积累。可以通过局部给予, 例如通过直接注射或植入至组织中 (作为非限制性实例, 肿瘤) 或局部给予该制品, 使siRNA的非特异性作用最小化。局部给予至治疗部位使药剂的局部浓度最大化, 限制药物向全身组织的暴露, 所述全身组织否则可能受药剂损害或可能降解该药剂, 并且允许更低总剂量的iRNA分子给予。若干研究已经显示在局部给予iRNA时成功敲减基因产物。例如, 在食蟹猴中通过玻璃体内注射眼球内递送VEGF dsRNA (Tolentino (托伦蒂诺), MJ. 等人, (2004) *Retina* (视网膜) 24:132-138) 和在小鼠中视网膜下注射 (Reich (赖希), SJ. 等人, (2003) *Mol. Vis.* (分子视界) 9:210-216) 眼球内递送VEGF dsRNA均示出在年龄相关性黄斑变性的实验模型中防止血管新生。此外, 在小鼠中直接肿瘤内注射dsRNA缩减肿瘤体积 (Pille (皮尔), J. 等人, (2005) *Mol. Ther.* (分子治疗) 11:267-274) 并且可以延长带瘤小鼠的存活 (Kim (金姆), WJ. 等人, (2006) *Mol. Ther.* (分子治疗) 14:343-350; Li (李), S. 等人, (2007) *Mol. Ther.* (分子治疗) 15:515-523)。也已经示出通过直接注射将RNA干扰成功局部递至CNS (中枢神经系统) (Dorn (多恩), G. 等人, (2004) *Nucleic Acids* (核酸) 32:e49; Tan (谭), PH. 等人, (2005) *Gene Ther.* (基因治疗) 12:59-66; Makimura (牧村), H. 等人, (2002) *BMC Neurosci.* (BMC神经科学) 3:18; Shishkina (希什金娜), GT. 等人, (2004) *Neuroscience* (神经科学) 129:521-528; Thakker (塔克尔), ER. 等人, (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (美国国家科学院院刊) 101:17270-17275; Akaneya (阿卡尼亚), Y. 等人, (2005) *J. Neurophysiol.* (神经生理学期刊) 93:594-602 并且通过鼻内给予成功递送至肺 (Howard (霍华德), KA. 等人, (2006) *Mol. Ther.* (分子治疗) 14:476-484; Zhang (张), X. 等人, (2004) *J. Biol. Chem.* (生物化学杂志) 279:10677-10684; Bitko (比特科), V. 等人, (2005) *Nat. Med.* (自然医学) 11:50-55)。对于全身性给予iRNA用于治疗疾病, 可以将RNA修饰或可替代地使用药物递送系统递送; 两种方法均起到防止dsRNA被体内核酸内切酶和外切酶快速降解的作用。RNA或药用载体的修饰也可以允许iRNA组合物靶向至靶组织并

避免不想要的脱靶效应。iRNA分子可以通过化学缀合至亲脂性基团(例如胆固醇)进行修饰以增强细胞摄取和防止降解。例如,将与亲脂性胆固醇部分缀合的针对ApoB的iRNA全身注射至小鼠并且导致肝脏和空肠中apoB mRNA的敲减(Soutschek(扫特查克),J.等人,(2004) Nature(自然) 432:173-178)。iRNA与适配体的缀合已经在前列腺癌的小鼠模型中显示抑制肿瘤生长并介导肿瘤消退(McNamara(麦克纳马拉),J.O.等人,(2006) Nat. Biotechnol. (自然生物技术) 24:1005-1015)。在替代实施例中,可以使用药物递送系统(例如纳米粒子、树状物、聚合物、脂质体或阳离子递送系统)递送iRNA。带正电荷的阳离子递送系统促进(带负电荷的)iRNA分子的结合并且也在带负电荷的细胞膜增强相互作用以允许iRNA由细胞高效摄取。阳离子脂质、树状物或聚合物可以与iRNA结合或被诱导以形成包装siRNA的小泡或胶束(见例如, Kim(金姆)SH.等人,(2008) Journal of Controlled Release(控释杂志) 129(2):107-116)。小泡或胶束的形成进一步防止全身给予时iRNA的降解。用于制造和给予阳离子-iRNA复合物的方法很好地在本领域普通技术人员的能力范围内(参见例如, Sorensen(索伦森),DR.等人,(2003) J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 327:761-766; Verma(维尔马), UN.等人,(2003) Clin. Cancer Res. (临床癌症研究) 9:1291-1300; Arnold(阿诺德), AS等人,(2007) J. Hypertens. (高血压杂志) 25:197-205, 所述文献通过引用以其全文结合在此)。可用于全身性递送iRNA的药物递送系统的一些非限制性实例包括DOTAP(Sorensen(索伦森),DR.等人,(2003), 上文; Verma(维尔马), UN.等人,(2003), 上文)、Oligofectamine、“固体核酸脂质粒子”(Zimmermann(齐默尔曼), TS.等人,(2006) Nature(自然) 441:111-114)、心磷脂(Chien(钱), PY.等人,(2005) Cancer Gene Ther. (癌症基因治疗) 12:321-328; Pal(帕尔), A.等人,(2005) Int. J. Oncol. (国际肿瘤学杂志) 26:1087-1091)、聚乙烯亚胺(Bonnet(博奈特)ME.等人(2008) Pharm. Res. (药学研究) 8月16日电子出版先于印刷版; Aigner(艾格纳), A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. (生物医学与生物技术杂志) 71659)、Arg-Gly-Asp(RGD)肽(Liu(刘), S. (2006) Mol. Pharm. (分子药理学) 3:472-487)和聚酰胺型胺(Tomalia(托马利亚), DA.等人(2007) Biochem. Soc. Trans. (生物化学会汇刊) 35:61-67; Yoo(刘), H.等人,(1999) Pharm. Res. (药学研究) 16:1799-1804)。在一些实施例中,iRNA与环糊精形成用于全身性给予的复合物。用于给予iRNA和环糊精的药物组合物的方法可以在美国专利号7,427,605中找到,所述专利通过引用以其全文结合在此。

[0198] 载体编码的iRNA

[0199] 在另一个方面,靶向TMPRSS6基因的iRNA可以从插入DNA或RNA载体中的转录单位表达(参见,例如, Couture(库蒂尔), A等人, TIG. (1996), 12:5-10; Skillern(斯基尔伦), A.等人, 国际PCT公开号WO 00/22113, Conrad(康拉德), PCT公开号WO 00/22114, 和Conrad(康拉德), 美国专利号6,054,299)。取决于使用的特定构建体和靶组织或细胞类型,表达可以是瞬时的(在小时至周数量级上)或持久的(数周至数月或更长)。可以将这些转基因作为直链的构建体、环状质粒或可以是整合或非整合载体的病毒载体引入。转基因也可以如此构建以允许它作为染色体外质粒遗传(Gassmann(加斯曼)等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国国家科学院院刊) (1995) 92:1292)。

[0200] iRNA的单个链或多个链可以从表达载体上的启动子转录。在两条单独的链待表达以产生例如dsRNA的情况下,可以将两个单独表达载体共引入(例如,通过转染或感染)靶细胞中。可替代地,dsRNA的每条单独链可以由均位于相同表达质粒上的启动子转录。在一个

实施例中, dsRNA的链表达为接头多核苷酸序列连接的反向重复序列多核苷酸, 使得该 dsRNA具有茎-环结构。

[0201] iRNA表达载体通常是DNA质粒或病毒载体。与真核细胞相容的表达载体, 优选地与脊椎动物细胞相容的那些, 可以用来产生表达如在此所述的iRNA的重组构建体。真核细胞表达载体是本领域熟知的并且从多个商业来源可获得。典型地, 提供这类载体, 它们含有用于插入所需核酸区段的便利限制性位点。表达iRNA的载体的递送可以是全身性的, 例如通过静脉内或肌内给予, 通过给予至从患者移植出来、随后重新引入患者的靶细胞或通过允许向所需靶细胞引入的任何其他手段。

[0202] 可以将iRNA表达质粒作为与阳离子脂质载体(例如, Oligofectamine)或基于非阳离子脂质的载体(例如, Transit-TKO™)的复合物转染至靶细胞中。本发明也考虑了在一周或更长时间范围内用于iRNA介导的靶向靶RNA不同区域的敲减的多次脂质转染。可以使用不同已知方法监测载体向宿主细胞中的成功引入。例如, 瞬时转染可以用报道子, 例如荧光标记, 例如绿色荧光蛋白(GFP)发出信号。可以使用标记确保离体细胞的稳定转染, 其中所述标记向转染的细胞提供针对特定环境因素(例如, 抗生素和药物)的抗性, 例如潮霉素B抗性。

[0203] 可以随在此所述的方法和组合物一起使用的病毒载体系统包括但不限于(a)腺病毒载体; (b)逆转录病毒载体, 包括但不限于慢病毒载体、莫洛尼鼠白血病毒等; (c)腺联病毒载体; (d)单纯疱疹病毒载体; (e)SV40载体; (f)多瘤病毒载体; (g)乳头瘤病毒载体; (h)小RNA病毒载体; (i)痘病毒载体如正痘病毒, 例如, 痘苗病毒载体或禽痘病毒, 例如金丝雀痘病毒或鸡痘病毒; 和(j)辅助病毒依赖性或非腺病毒。复制缺陷型病毒也可以有利的。不同的载体将并入或将不并入细胞的基因组中。如果需要, 构建体可以包括病毒序列用于转染。可替代地, 构建体可以并入能够发生附加体型复制的载体(例如EPV和EBV载体)中。用于重组表达iRNA的构建体通常将需要调节元件, 例如, 启动子、增强子等, 以确保RNA在靶细胞中的表达。下文进一步描述针对载体和构建体考虑的其他方面。

[0204] 对于递送iRNA有用的载体将包括足以在所需靶细胞或组织中表达iRNA的调节元件(启动子、增强子等)。可以选择调节元件以提供组成型或调节/诱导型表达。

[0205] 可以精确地调节iRNA的表达, 例如, 通过使用对某些生理调节物(例如, 循环型葡萄糖水平或激素)敏感的诱导型调节序列(Docherty(多切蒂)等人, 1994, FASEB J. 8:20-24)。适于控制dsRNA在细胞中或在哺乳动物中表达的这类诱导型表达系统例如包括通过蜕皮素调节、通过雌激素、孕酮、四环素、二聚化的化学诱导物和异丙基- β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)调节。本领域普通技术人员将能够基于iRNA转基因的预期用途选择适当的调节/启动子序列。

[0206] 在一个特定实施例中, 可以使用含有编码iRNA的核酸序列的病毒载体。例如, 可以使用逆转录病毒载体(参见Miller(米勒)等人, Meth. Enzymol. (酶学方法) 217:581-599(1993))。这些逆转录病毒载体含有对于病毒基因组正确包装并整合入宿主细胞DNA必需的组件。将编码iRNA的核酸序列克隆至促进该核酸递送入患者的一种或多种载体中。关于逆转录病毒载体的更多细节可以在例如Boesen(波森)等人, Biotherapy(生物治疗) 6:291-302(1994)找到, 所述文献描述使用逆转录病毒载体递送mdr1基因至造血干细胞, 以便使得干细胞对化疗更耐受。说明基因治疗中逆转录病毒载体用途的其他参考文献是: Clowes(克

劳斯)等人, *J. Clin. Invest.* (临床研究杂志) 93:644-651 (1994); Kiem (金) 等人, *Blood* (血液) 83:1467-1473 (1994); Salmons (萨尔蒙斯) 和 Gunzberg (贡兹堡), *Human Gene Therapy* (人类基因治疗) 4:129-141 (1993); 和 Grossman (格罗斯曼) 和 Wilson (威尔逊), *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* (遗传学与发育新见) 3:110-114 (1993)。考虑使用的慢病毒载体例如包括基于HIV的载体, 这些载体在美国专利号6,143,520; 5,665,557; 和5,981,276中描述, 所述专利通过引用结合在此。

[0207] 也考虑腺病毒用于iRNA的递送。腺病毒是特别有吸引力的载具, 例如, 用于递送基因至呼吸道上皮。腺病毒天然地感染呼吸道上皮, 在那里它们引起轻微疾病。基于腺病毒的递送系统的其他靶是肝脏、中枢神经系统、内皮细胞、和肌肉。腺病毒具有能够感不分裂细胞的优点。Kozarsky (科扎斯基) 和 Wilson (威尔逊), *Current Opinion in Genetics and Development* (遗传学与发育新见) 3:499-503 (1993) 呈现了腺病毒基因治疗的综述。Bout (布特) 等人, *Human Gene Therapy* (人类基因治疗) 5:3-10 (1994) 展示了腺病毒载体转移基因至恒河猴呼吸道上皮的用途。基因治疗中使用腺病毒的其他实例可以在 Rosenfeld (罗森菲尔德) 等人, *Science* (科学) 252:431-434 (1991); Rosenfeld (罗森菲尔德) 等人, *Cell* (细胞) 68:143-155 (1992); Mastrangeli (马斯特兰杰利) 等人, *J. Clin. Invest.* (临床研究杂志) 91:225-234 (1993); PCT公开W0 94/12649; 和 Wang (王) 等人, *Gene Therapy* (基因治疗) 2:775-783 (1995) 中找到。用于表达本发明中表征的iRNA的合适AV载体、用于构建重组AV载体的方法和用于递送该载体至靶细胞中的方法在 Xia (夏) H 等人, (2002), *Nat. Biotech.* (自然生物技术) 20:1006-1010中描述。

[0208] 也考虑使用腺联病毒 (AAV) 载体 (Walsh (沃尔什) 等人, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (实验生物学与实验医学会会报) 204:289-300 (1993); 美国专利号5,436,146)。在一个实施例中, iRNA可以从具有例如U6亦或H1 RNA启动子或细胞巨化病毒 (CMV) 启动子的重组AAV载体作为两个单独的互补性单链RNA分子表达。用于表达本发明中表征的dsRNA的合适AV载体、用于构建重组AV载体的方法和用于递送该载体至靶细胞中的方法在 Samulski (萨穆尔斯基) R 等人, (1987), *J. Virol.* (病毒学杂志) 61:3096-3101; Fisher (费希尔) K J 等人, (1996), *J. Virol.* (病毒学杂志), 70:520-532; Samulski (萨穆尔斯基) R 等人, (1989), *J. Virol.* (病毒学杂志) 63:3822-3826; 美国专利号5,252,479; 美国专利号5,139,941; 国际专利申请号W0 94/13788; 和国际专利申请号W0 93/24641中描述, 所述文献的完整披露通过引用结合在此

[0209] 另一种优选的病毒载体是痘病毒, 例如痘苗病毒, 例如减毒痘苗病毒如修饰的安卡拉病毒 (MVA) 或 NYVAC、禽痘病毒, 例如鸡痘病毒或金丝雀痘病毒。

[0210] 可以通过将载体用来自其他病毒的包膜蛋白或其他表面抗原进行假病毒化或酌情通过置换不同的病毒衣壳蛋白, 调整病毒载体的嗜性。例如, 慢病毒载体可以是来自水泡性口炎病毒 (VSV)、狂犬病病毒、埃博拉病毒、Mokola 等的表面蛋白进行假病毒化。可以通过将载体工程化以表达不同血清型的衣壳蛋白, 使得 AAV 载体靶向不同的细胞; 见, 例如, Rabinowitz (拉宾诺维茨) J E 等人, (2002), *J. Virol.* (病毒学杂志) 76:791-801, 所述文献的完整披露通过引用结合在此。

[0211] 载体的药物制品可以包括可接受稀释剂中的载体, 或可以包括其中嵌入基因递送载具的缓慢释放基质。可替代地, 在可以从重组细胞完好地产生完整基因递送载体的情况

下,例如,逆转录病毒载体,药物制剂可以包括产生这种基因递送系统的一个或多个细胞。

[0212] III. 含有iRNA的药物组合物

[0213] 在一个实施例中,本文中提供含有iRNA和药学上可接受的载体的药物组合物。含有iRNA的药物组合物对于治疗与TMPRSS6基因的表达或活性相关的疾病或失调,例如由TMPRSS6表达介导的病理过程是有用的。基于递送模式配制这类药物组合物。一个实例是经配制用于经由肠胃外递送,例如,通过静脉内(IV)递送来全身性给予的组合物。

[0214] 在此表征的药物组合物以足以抑制TMPRSS6基因表达的剂量给予。通常,iRNA的适合剂量将处于每日接受者每千克体重0.01毫至200.0毫克范围内,通常处于每日每千克体重1至50mg范围内。例如,dsRNA可以按每单剂量0.05mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg或50mg/kg给予。药物组合物可以每日一次、或每周一次、或每月一次,或每隔一个月一次给予。组合物可以可替代地每周2次或每月2次或每2周、3周或4周一次给予。在一些实施例中,将iRNA作为两个、三个或更多个子剂量以适当的间隔在一整天或通过受控释放配制品,甚至使用连续输注或递送法给予。在这种情况下,每个子剂量中所含的iRNA必须相应地更少,以便实现每日总剂量。也可以将剂量单位复配用于在若干天内递送,例如,使用在若干天时间范围内提供持久iRNA释放的常规持续释放配置品。持续释放制剂是本领域熟知的并且对于在特定部位递送药物特别有用,例如可以随本发明的药剂一起使用。在这个实施例中,剂量单位含有相应的多个每日剂量。

[0215] 单一剂量对TMPRSS6水平的影响可以长久持续,使得后续剂量以不多于3、4或5天的间隔或以不多于1、2、3,或4周的间隔给予。

[0216] 技术人员将理解某些因素可能影响为有效治疗受试者所要求的剂量和时间计划,所述因素包括但不局限于疾病或失调的严重性、先前治疗、受试者的总体健康和/或年龄和存在的其他疾病。此外,用治疗有效量的组合物治疗受试者可以包括单次治疗或系列治疗。如本文中他处描述,使用常规方法或基于使用适宜动物模型的体内测试,可以估计本发明涵盖的各个iRNA的有效剂量和体内半寿期。

[0217] 小鼠遗传学的进展已经产生用于研究各种人疾病(如由TMPRSS6表达介导的病理过程)的多个小鼠模型。这类模型可以用于iRNA的体内测试,连同用于确定治疗有效剂量。适合的小鼠模型例如是含有表达人TMPRSS6的转基因的小鼠。

[0218] 本发明还包括了包含在本发明中表征的iRNA化合物的药物组合物和制剂。本发明的药物组合物可以按多个方式给予,这取决于是否需要局部或全身性治疗和取决于待治疗的区域。给予可以是局部给予(例如,通过透皮贴剂)、肺给予,例如,通过吸入或吹入粉末剂或气溶胶剂,包括采用雾化器;气管内、鼻内、表皮和透皮、口服或肠胃外给予。肠胃外给予包括静脉内、动脉内、皮下、腹内或肌内注射或输注给予;皮下给予,例如,借助植入的装置;或颅内给予,例如,通过实质内、鞘内或心室内给予。

[0219] iRNA可以按这样的方式递送以靶向具体组织,例如肝脏(例如,肝脏的肝细胞)。

[0220] 用于局部给予的药物组合物和制剂可以包括透皮贴剂、油膏剂、洗剂、乳膏剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体剂和粉末剂。常规的药用载体、含水、粉状或油质基质、增稠剂等可以是必需或想要的。涂布的避孕套、手套等也可以是有用的。适合的局部用制剂包括其中本发明中表征的iRNA与局部用递送剂如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的那些。适合的脂质和脂质体包括中性(例如,二油酰磷脂酰DOPE乙醇

胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴性(例如,二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子脂质和脂质体(例如,二油酰四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰磷脂酰乙醇胺DOTMA)。本发明中表征的iRNA可以封装于脂质体内或可以与其、特别是与阳离子脂质体形成复合物。可替代地,iRNA可以与脂质、特别是与阳离子脂质复合。适合的脂肪酸和酯包括但不限于花生四烯酸、油酸、二十烷酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、单油精、二月桂精、甘油基1-单癸酸酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、或C₁₋₂₀烷基酯(例如,肉豆蔻酸异丙酯IPM)、单酰甘油、二酰甘油或其可药用盐。局部用制剂在美国专利号6,747,014中详细描述,所述专利通过引用结合在此。

[0221] 脂质体制制品

[0222] 除微乳剂之外,存在已经研究并用于药物配制品的很多组织化表面活性结构。这些包括单层、胶束、双层和小泡。小泡,例如脂质体,已经引起巨大兴趣,由于从药物递送的观点看,它们的特异性和它们提供的作用持续期。如本发明中使用,术语“脂质体”意指由按照球状双层或双层排列的两性脂类组成的小泡。

[0223] 脂质体是单层或多层小泡,其具有由亲脂性材料和含水内部形成的膜。含水部分含有待递送的组合物。阳离子脂质体拥有能够与细胞壁融合的优点。非阳离子脂质体,虽然不能够与细胞壁高效融合,但是由体内巨噬细胞摄取。

[0224] 为了穿过完整的哺乳动物皮肤,脂质小泡必须在适合透皮梯度的影响下通过一系列细孔,每个细孔具有小于50nm的直径。因此,想要的是使用高度可变形并能够通过这类细孔的脂质体。

[0225] 脂质体的其他优点包括;从天然磷脂获得的脂质体是生物相容和生物可降解的;脂质体可以并入广泛类型的水溶性和脂溶性药物;脂质体可以在其内部区室中保护封装的药物免受代谢和降解(Rosoff(罗索夫),引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型),Lieberman(利伯曼),Rieger(里格尔)和Banker(邦克)(编辑),1988,Marcel Dekker,Inc.公司,纽约,纽约州,第1卷,第245页)。在制备脂质体制剂时的重要考虑事项是脂质体的脂质表面电荷、小泡尺寸和含水体积。

[0226] 脂质体可用于转移和递送有效成分至作用部位。因为脂质体膜在结构上与生物膜相似,所以当施加脂质体至组织时,脂质体开始与细胞膜合并并且随着脂质体和细胞的合并进展,脂质体内容物倾入其中有效药物可以发挥作用的细胞中。

[0227] 作为许多药物的递送模式,脂质体制制品已经成为充分研究的热点。存在日益增长的以下证据:对于局部给予,脂质体提供优于其他配制品的若干优点。这类优点包括减少与所给予药物的高全身性吸收、所给予药物在所需靶处的积累增加相关的副作用和给予多种(亲水性和疏水性)药物至皮肤中的能力。

[0228] 若干报道已经详述脂质体递送药剂(包括高分子量DNA)至皮肤中的能力。已经将化合物(包括镇痛药、抗体、激素和高分子量DNA)给予至皮肤。大多数施加导致靶向上表皮

[0229] 脂质体分成两大类。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,其与带负电荷的DNA分子相互作用以形成稳定的复合物。带正电荷的DNA/脂质体复合物与带负电荷的细胞表面结合并且内化于内体中。由于内体内部的酸性pH,脂质体破裂,释放它们的内容物至细胞胞质中(Wang(王)等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.(生物化学与生物物理学研究通讯),1987,

147,980-985)。

[0230] pH-敏感或带负电荷的脂质体包埋核酸而不与之复合。由于DNA和脂质均带有类似电荷,出现排斥而非复合物形成。然而,一些DNA包埋于这些脂质体的含水内部。pH-敏感脂质体已经用来递送编码胸苷激酶基因的核酸至培养的细胞单层。在靶细胞中检测到外源基因的表达(Zhou(周)等人,Journal of Controlled Release(控释杂志),1992,19,269-274)。

[0231] 一个主要类型的脂质体组合物包括除天然衍生的磷脂酰胆碱之外的磷脂。中性脂质体组合物例如可以由二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)或二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)形成。阴离子脂质体组合物通常由二肉豆蔻酰磷脂酰甘油形成,而阴离子融合脂质体主要由二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)形成。另一个类型的脂质体组合物由磷脂酰胆碱(PC)(例如像,大豆PC和卵PC)形成。另一个类型由磷脂和/或磷脂酰胆碱和/或胆固醇的混合物形成。

[0232] 若干研究已经评估了脂质体药物制剂至皮肤的局部递送。向豚鼠皮肤施加含有干扰素的脂质体导致皮肤疱疹疼痛减少,而经由其他手段递送干扰素(例如,作为溶液剂或作为乳剂)是无效的(Weiner(温纳)等人,Journal of Drug Targeting(药物靶向杂志),1992,2,405-410)。另外,一项额外研究测试了相对于使用含水系统给予干扰素时作为脂质体制剂的部分所给予的干扰素的功效,并且得出结论这种脂质体制剂优于水质给予(du Plessis(杜普莱西斯)等人,Antiviral Research(抗病毒研究),1992,18,259-265)。

[0233] 也已经检验非离子型脂质体系统以确定它们在递送药物至皮肤中的用途,特别是包括非离子表面活性剂和胆固醇的系统。包含Novasome™I(甘油基二月桂酸酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-十八烷基醚)和Novasome™II(甘油基二硬脂酸酯/胆固醇/聚氧乙烯-10-十八烷基醚)的非离子型脂质体制剂用来递送环孢菌素至小鼠皮肤的真皮中。结果表明这类非离子型脂质体系统有效促进环孢菌素A沉积至皮肤的不同层中(Hu(胡)等人,S.T.P.Pharma.Sci.(制药科学、技术与实践;制药学),1994,4,6,466)。

[0234] 脂质体也包括“立体稳定”脂质体,如在此使用,该术语指包一种或多种特化脂质的脂质体,其中所述特化脂质在掺入脂质体时导致相对于缺少这类特化脂质的脂质体而言增强的循环寿命。立体稳定脂质体的实例是这些,其中脂质体的小泡形成脂质部分的一部分(A)包含一种或多种糖脂,如单唾液酸神经节苷酯GM₁,或(B)用一种或多种亲水聚合物如聚乙二醇(PEG)部分衍生化。尽管不希望受任何具体理论约束,本领域中认为,至少对于含有神经节苷脂、鞘磷脂或PEG衍生化脂质的立体稳定脂质体,这些立体稳定脂质体的增强的循环半寿期源自向网状内皮系统(RES)的细胞中的摄取减少(Allen(艾伦)等人,FEBS Letters(欧洲生物化学学会联盟通讯),1987,223,42;Wu(吴)等人,Cancer Research(癌症研究),1993,53,3765)。

[0235] 包含一种或多种糖脂的各种脂质体是本领域已知的。Papahadjopoulos(帕帕哈乔泡洛斯)等人(Ann.N.Y.Acad.Sci.(纽约科学院纪事),1987,507,64)报道了单唾液酸神经节苷酯GM₁、硫酸半乳糖脑苷脂和磷脂酰肌醇改善脂质体的血液半寿期的能力。这些研究结果由Gabizon(加比宗)等人(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(美国国家科学院院刊),1988,85,6949)阐释。均授予Allen(艾伦)等人的美国专利号4,837,028和WO 88/04924披露了包含(1)鞘磷脂和(2)神经节苷脂GM₁或硫酸半乳糖脑苷脂的脂质体。美国专利号5,543,152(Webb(韦伯)等人)披露了包含鞘磷脂的脂质体。包含1,2-sn-二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱的脂质

体在WO 97/13499(Lim(林)等人)中披露。

[0236] 包含用一种或多种亲水聚合物衍生化的脂质的许多脂质体及其制备方法是本领域已知的。Sunamoto(砂本)等人(Bull. Chem. Soc. Jpn. (日本化学会通报), 1980, 53, 2778)描述包含非离子去垢剂 $2C_{12-15}G$ 的脂质体, 所述脂质体含有PEG部分。Illum(伊录姆)等人(FEBS Lett. (欧洲生物化学学会联盟通讯), 1984, 167, 79)报道了用聚合物二醇对聚苯乙烯粒子的亲水包覆导致显著增长的血液半寿期。通过接合聚二醇(例如, PEG)的羧基所修饰的合成磷脂由Sears(西尔斯)描述(美国专利号4, 426, 330和4, 534, 899)。Klibanov(克立巴诺夫)等人(FEBS Lett. (欧洲生物化学学会联盟通讯), 1990, 268, 235)描述了展示以下的实验: 包含用PEG或PEG硬脂酸酯衍生化的磷脂酰乙醇胺(PE)的脂质体具有显著增加的血液循环半寿期。Blume(布卢姆)等人(Biochimica et Biophysica Acta (生物化学与生物物理学学报), 1990, 1029, 91)将这类观察结果扩展至其他PEG衍生化的磷脂, 例如, 由二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)和PEG的组合组成的DSPE-PEG。授予Fisher(费希尔)的欧洲专利号EP 0445131 B1和WO 90/04384中描述了在它们的外表面上具有共价结合的PEG部分的脂质体。含有1-20摩尔%用PEG衍生化的PE的脂质体组合物及其使用方法由Woodle(伍德)等人(美国专利号5, 013, 556和5, 356, 633)和Martin(马丁)等人(美国专利号5, 213, 804和欧洲专利号EP 0496813 B1)描述。包含许多其他脂质缀合物的脂质体在WO 91/05545和美国专利号5, 225, 212(均授予Martin(马丁)等人)中和在WO 94/20073(Zalipsky(扎利普斯基)等人)中披露。WO 96/10391(Choi(崔)等人)中描述了包含PEG修饰的神经酰胺脂质的脂质体。美国专利号5, 540, 935(Miyazaki(宫崎)等人)和美国专利号5, 556, 948(Tagawa(田川)等人)描述了含有PEG的脂质体, 所述脂质体可以在它们的表面上用功能性部分进一步衍生化。

[0237] 包含核酸的多种脂质体是本领域已知的。授予Thierry(蒂埃里)等人的WO 96/40062披露了用于在脂质体中封装高分子量核酸的方法。授予Tagawa(田川)等人的美国专利号5, 264, 221披露了结合蛋白的脂质体并且声称这类脂质体的内容物可以包括dsRNA。授予Rahman(拉赫曼)等人的美国专利号5, 665, 710描述在脂质体中封装寡脱氧核苷酸的某些方法。授予Love(洛夫)等人的WO 97/04787披露了包含靶向raf基因的dsRNA的脂质体。

[0238] 传递体是又一个类型的脂质体, 并且是高度可变形的脂质聚集物, 它们是药物递送载具的诱人候选物。可以将传递体描述为脂质液滴, 所述脂质液滴是如此高度可变形的, 使得它们能够轻易渗透小于液滴的孔。传递体适用于这样的环境, 其中使用它们, 例如, 它们自我优化的(适应于皮肤中孔的形状)、具有自我修复性, 经常在不片段化的情况下抵达它们的靶并且经常自我装载。为了制造传递体, 可能向标准脂质体组合物添加表面边缘激活物, 通常是表面活性剂。传递体已经用来递送血清白蛋白至皮肤。已经示出传递体介导的血清白蛋白递送与皮下注射含有血清白蛋白的溶液同样有效。

[0239] 表面活性剂广泛用于配制品(例如乳剂(包括微乳剂))和脂质体中。将许多不同类型的(天然的和合成的二者)表面活性剂的特性分类和排序的最常见方式是使用亲水/亲油平衡值(HLB)。亲水基团(也称作“头部”)的性质提供了将配制品中所用的不同表面活性剂分类的最有用手段(Rieger(里格尔), 引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型), Marcel Dekker, Inc.公司, 纽约, 纽约州, 1988, 第285页)。

[0240] 如果表面活性分子没有离子化, 则将它划分为非离子表面活性剂。非离子表面活性剂广泛用于药物和化妆产品中并且是在广泛pH值范围内可用的。通常, 它们的HLB值范围

从2至约18,取决于它们的结构。非离子表面活性剂包括非离子酯,例如乙二醇酯、丙二醇酯、甘油基酯、聚甘油基酯、脱水山梨糖醇酯、蔗糖酯和乙氧基化酯。该分类中也包括非离子烷醇酰胺和醚,例如脂肪醇乙氧基化物、丙氧基化醇和乙氧基化嵌段聚合物。聚氧乙烯表面活性剂是非离子表面活性剂类别的最流行成员。

[0241] 如果表面活性分子在水中溶解或分散时携带负电荷,则将这种表面活性剂划分为阴离子性。阴离子表面活性剂包括羧化物,例如皂,酰基乳酸酯、氨基酸的酰基酰胺、硫酸酯(例如烷基硫酸酯和乙氧基化烷基硫酸酯)、磺酸酯(例如烷基苯磺酸酯)、酰基羟乙基磺酸酯、酰基牛磺酸酯和磺基琥珀酸酯、和磷酸酯。阴离子表面活性剂类别的最重要成员是烷基硫酸酯和皂。

[0242] 如果表面活性分子在水中溶解或分散时携带正电荷,则将这种表面活性剂划分为阳离子性。阳离子表面活性剂包括季铵盐和乙氧化胺。季铵盐是这个类别的最常用成员。

[0243] 如果表面活性分子具有携带正电荷亦或负电荷的能力,则将这种表面活性剂划分为两性的。两性表面活性剂包括丙烯酸衍生物、取代的烷基、N-烷基甜菜碱和磷酸酯。

[0244] 已经综述了表面活性剂在药品、配制品和在乳剂中的用途(Rieger(里格尔),引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型),Marcel Dekker,Inc.公司,纽约,纽约州,1988,第285页)。

[0245] 核酸脂质粒子

[0246] 在一个实施例中,本发明中表征的TMPRSS6 dsRNA完全封装于脂质配制品中,例如,以形成SPLP、pSPLP、SNALP或其他核酸-脂质粒子。如在此使用,术语“SNALP”指稳定的核酸-脂质粒子,包括SPLP。如在此使用,术语“SPLP”指包含封装在脂质小泡内的质粒DNA的核酸-脂质粒子。SNALP和SPLP典型地含有阳离子脂质、非阳离子脂质和防止粒子聚集的脂质(例如,PEG-脂质缀合物)。SNALP和SPLP对于全身性应用极其有用,因为它们能在静脉内(i.v.)内注射后显示延长的循环寿命和在远端部位积累(例如,与给予部位物理分隔的部位)。SPLP包括“pSPLP”,“pSPLP”包括封装的缩合剂-核酸复合物,如PCT公开号WO 00/70090中所述。本发明的粒子典型地具有约50nm至约150nm、更典型地约60nm至约130nm、更典型地约70nm至约110nm、最典型地约70nm至约90nm的平均值直径,并且基本上无毒。此外,在本发明的核酸-脂质粒子中存在时,核酸在水溶液中抵抗核酸酶降解。核酸-脂质粒子和它们制备方法在例如美国专利号5,976,567;5,981,501;6,534,484;6,586,410;6,815,432;和PCT公开号WO 96/40964中披露。

[0247] 在一个实施例中,脂质对药物比率(质量/质量比率)(例如,脂质对dsRNA比率)将处于从约1:1至约50:1、从约1:1至约25:1、从约3:1至约15:1、从约4:1至约10:1、从约5:1至约9:1或约6:1至约9:1的范围内。

[0248] 阳离子脂质可以例如是N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油基氧基丙胺(DODMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亚油基氨基甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油基氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油基氧基-3-吗啉代丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油基硫

代-3-二甲基氨基丙烷 (DLin-S-DMA)、1-亚油酰-2-亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷 (DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油氧基-3-三甲基氨基丙烷盐酸盐 (DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰-3-三甲基氨基丙烷盐酸盐 (DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油氧基-3-(N-甲基哌嗪)丙烷 (DLin-MPZ)、或3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙二醇 (DLinAP)、3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇 (DOAP)、1,2-二亚油基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷 (DLin-EG-DMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷 (DLinDMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环 (DLin-K-DMA) 或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-胺 (ALN100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯 (MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮烷二基)双十二烷-2-醇 (Tech G1),或其混合物。阳离子脂质可以包含从约20mol%至约50mol%或约40mol%在粒子中存在的总脂质。

[0249] 在另一个实施例中,化合物2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环可以用来制备脂质-siRNA纳米粒子。2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环的合成在2008年10月23日提交的美国临时专利申请号61/107,998中描述,所述专利通过引用结合在此。

[0250] 在一个实施例中,脂质粒子包括40%2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环:10% DSPC:40%胆固醇:10% PEG-C-DMG (摩尔百分数),同时粒度为 $63.0 \pm 20\text{nm}$ 并且siRNA/脂质比为0.027。

[0251] 非阳离子脂质可以是阴离子脂质或中性脂质,包括但不限于二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、二油酰磷脂酰甘油 (DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)、二油酰-磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺 (POPE)、二油酰-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基-环己烷-1-羧酸酯 (DOPE-ma1)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰乙醇胺 (DSPE)、16-0-单甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰-磷脂酰乙醇胺 (SOPE)、胆固醇,或其混合物。非阳离子脂质可以占从约5mol%至约90mol%、约10mol%、或约58mol% (如果包括胆固醇) 在粒子中存在的总脂质。

[0252] 抑制粒子聚集的缀合脂质可以例如是聚乙二醇 (PEG)-脂质,包括而不局限于PEG-二酰甘油 (DAG)、PEG-二烷基氧丙基 (DAA)、PEG-磷脂、PEG-脑苷脂 (Cer),或其混合物。PEG-DAA缀合物可以例如是PEG-二月桂基氧丙基 (Ci_2)、PEG-二肉豆蔻基氧丙基 (Ci_4)、PEG-二棕榈基氧丙基 (Ci_6) 或PEG-二硬脂基氧丙基 (C_8)。防止粒子聚集的缀合脂质可以占从0mol%至约20mol%或约2mol%在粒子中存在的总脂质。

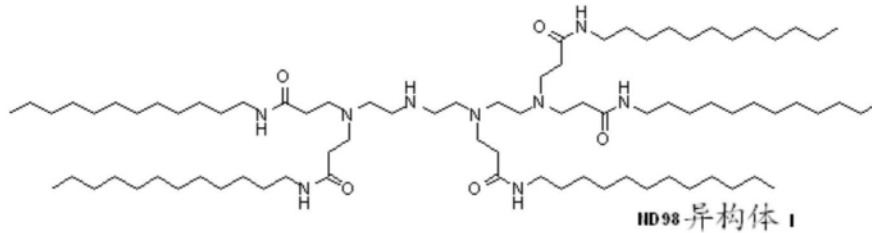
[0253] 在一些实施例中,核酸-脂质粒子以例如约10mol%至约60mol%或约48mol%在粒子中存在的总脂质进一步包括胆固醇。

[0254] LNP01

[0255] 在一个实施例中,脂质ND98.4HC1 (MW 1487) (参见2008年3月26日提交的美国专利申请号12/056,230,所述文献通过引用以其全文结合在此)、胆固醇 (Sigma-Aldrich) 和PEG-脑苷脂C16 (Avanti极性脂质) 可以用来制备脂质-dsRNA纳米粒子 (即,LNP01粒子)。可以如下制备每种组分在乙醇中的母液:ND98,133mg/ml;胆固醇,25mg/ml,PEG-脑苷脂C16,

100mg/ml。ND98、胆固醇和PEG-脑苷脂C16母液可以然后以例如42:48:10摩尔比合并。合并的脂质溶液可以与(例如,pH 5乙酸钠中的)含水dsRNA混合,使得乙醇终浓度是约35%-45%并且乙酸钠终浓度是约100-300mM。混合时,脂质-dsRNA纳米粒子典型地自发形成。取决于所需的粒度分布,可以使用例如热桶挤出机,例如Lipex挤出机(Northern Lipids, Inc公司),通过聚碳酸酯膜(例如,100nm截值)挤出生成的纳米粒子混合物。在一些情况下,可以省略挤出步骤。可以通过例如透析或切线流过滤实现乙醇移除和同时交换缓冲剂。缓冲剂可以与例如约pH 7,例如,约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3或约pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)交换。

[0256]



式 I

[0257] LNP01制剂例如在国际申请公开号W0 2008/042973中描述,所述文献由此通过引用结合。

[0258] 额外的示例性脂质-dsRNA配制品如下:

[0259]

	阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇/PEG-脂质缀合物 脂质:siRNA 比率
SNALP-1	1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷 (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/胆固醇/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂质:siRNA~7:1
S-XTC	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DPPC/胆固醇 57.1/7.1/34.4/1.4 脂质:siRNA~7:1
LNP05	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5

[0260]

	阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇 /PEG-脂质缀合物 脂质:siRNA 比率
		脂质:siRNA~6:1
LNP06	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂质:siRNA~11:1
LNP07	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA~6:1
LNP08	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂质:siRNA~11:1
LNP09	2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环 (XTC)	XTC/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-胺 (ALN100)	ALN100/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基 4-(二甲基氨基)丁酸酯 (MC3)	MC-3/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基)氮烷二基)双十二烷-2-醇 (C12-200)	C12-200/DSPC/胆固醇/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA10:1

[0261]

	阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇 /PEG-脂质缀合物 脂质:siRNA 比率
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂质:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc- PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂质:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂质:siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5

	阳离子脂质	阳离子脂质/非阳离子脂质/胆固醇 /PEG-脂质缀合物 脂质:siRNA 比率
[0262]		脂质:siRNA: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂质:siRNA: 10:1

[0263] DSPC:二硬脂酰磷脂酰胆碱

[0264] DPPC:二棕榈酰磷脂酰胆碱

[0265] PEG-DMG:PEG-二肉豆蔻酰甘油(C14-PEG,或PEG-C14)(平均分子量为2000的PEG)

[0266] PEG-DSG:PEG-二苯乙基甘油(C18-PEG,或PEG-C18)(平均分子量为2000的PEG)

[0267] PEG-cDMA:PEG-氨甲酰基-1,2-二肉豆蔻基氧丙胺(平均分子量为2000的PEG)

[0268] 包含SNALP(1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA))的配制品在2009年4月15日提交的国际公开号W02009/127060中描述,所述文献由此通过引用结合。

[0269] 包含XTC的配制品例如在2009年1月29日提交的美国临时系列号61/148,366;2009年3月2日提交的美国临时系列号61/156,851;2009年6月10日提交的美国临时系列号;2009年7月24日提交的美国临时系列号61/228,373;2009年9月3日提交的美国临时系列号61/239,686和2010年1月29日提交的国际申请号PCT/US2010/022614中描述,所述文献由此通过引用结合。

[0270] 包含MC3的制剂例如在2009年9月22日提交的美国临时系列号61/244,834、2009年6月10日提交的美国临时系列号61/185,800和2009年6月10日提交的国际申请号PCT/US10/28224中描述,所述文献由此通过引用结合。

[0271] 包含ALNY-100的制剂例如在2009年11月10日提交的国际专利申请号PCT/US09/63933中描述,所述文献由此通过引用结合。

[0272] 包含C12-200的制剂例如在2009年5月5日提交的美国临时系列号61/175,770、2010年5月5日提交的国际申请号PCT/US10/33777中描述,所述文献由此通过引用结合。

[0273] 如在此使用,术语“LNPXX”,其中“XX”是数字,在此也称作“AFXX”。例如,LNP09也称为AF09并且LNP12也称为或称作AF12。

[0274] 阳离子脂质的合成

[0275] 在本发明中表征的核酸粒子中使用的任何化合物,例如,阳离子脂质等可以通过已知的有机合成技术(包括在实例中更详细描述的方法)制备。除非另外指明,否则全部取代基如下文定义。

[0276] “烷基”意指含有1至24个碳原子的直链或支链、非环状或环状、饱和脂族烃。代表性饱和直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基、等;而饱和支链烷基包括异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、等。代表性饱和环状烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、等;而不饱和环状烷基包括环丙烯基和环己烯基、等。

[0277] “烯基”意指在相邻碳原子之间含有至少一个双键的如上文定义的烷基。烯基包括

顺式和反式异构体。代表性直链和支链烯基包括乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基、等。

[0278] “炔基”意指在相邻碳之间额外含有至少一个叁键的如上文定义的任何烷基或烯基。代表性直链和支链炔基包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基、等。

[0279] “酰基”意指其中在附接点处的碳用如下文定义的氧代基团替换的任何烷基、烯基或炔基。例如， $-C(=O)$ 烷基、 $-C(=O)$ 烯基和 $-C(=O)$ 炔基是酰基。

[0280] “杂环”意指5元至7元单环状或7元至10元双环状杂环，所述杂环是饱和、不饱和和或芳族的，并且含有1或2个独立选自氮、氧和硫的杂原子，并且其中氮杂原子和硫杂原子可以任选地氧化，并且氮杂原子可以任选地季铵化，包括其中前述任一杂环与苯环稠合的双环状环。杂环可以经由任何杂原子或碳原子附接。杂环包括如下文定义的杂芳基。杂环包括吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基 (piperizynyl)、乙内酰脲基 (hydantoinyl)、戊内酸胺基 (valerolactamyl)、环氧乙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、四氢嘧啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、等。

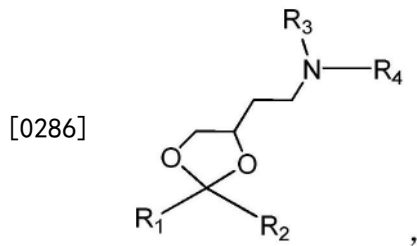
[0281] 术语“任选取代的烷基”、“任选取代的烯基”、“任选取代的炔基”、“任选取代的酰基”和“任选取代的杂环”意指，在取代时至少一个氢原子由取代基替换。在氧代取代基 ($=O$) 的情况下，替换两个氢原子。在这方面，取代基包括氧、卤素、杂环、 $-CN$ 、 $-OR^x$ 、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^x C(=O)R^y$ 、 $-NR^x SO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 和 $-SO_nNR^xR^y$ ，其中 n 是 0、1 或 2， R^x 和 R^y 是相同或不同的并且独立地是氢、烷基或杂环，并且所述烷基和杂环取代基的每一个可以进一步由以下取代基的一种或多种取代：氧代、卤素、 $-OH$ 、 $-CN$ 、烷基、 $-OR^x$ 、杂环、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^x C(=O)R^y$ 、 $-NR^x SO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 和 $-SO_nNR^xR^y$ 。

[0282] “卤素”意指氟、氯、溴和碘。

[0283] 在一些实施例中，本发明中表征的方法可能需要使用保护基。保护基方法学是本领域普通技术人员熟知的 (参见例如, *Protective Groups in Organic Synthesis* (有机合成中的保护基), Green (格林), T.W. 等人, Wiley-Interscience, 纽约城, 1999)。简而言之，在本发明的上下文内，保护基是减少或消除官能团的不想要的反应性的任何基团。可以将保护基添加至官能团以在某些反应期间掩蔽其反应性并且随后移除以显露原始官能团。在一些实施例中，使用“醇保护基”。“醇保护基”是减少或消除醇官能团的不想要的反应性的任何基团。可以使用本领域熟知的技术添加和移除保护基。

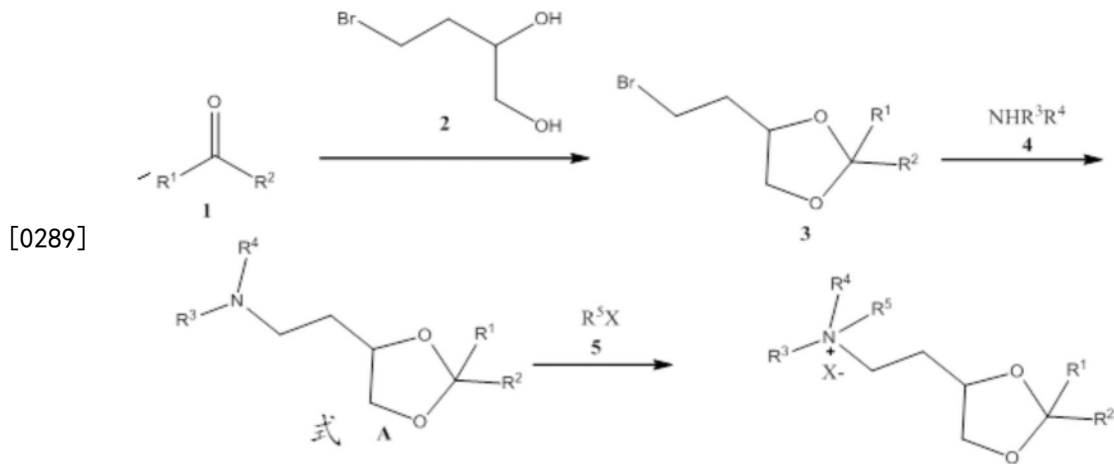
[0284] 式A的合成

[0285] 在一些实施例中，使用式A的阳离子脂质配制本发明中表征的核酸-脂质粒子：



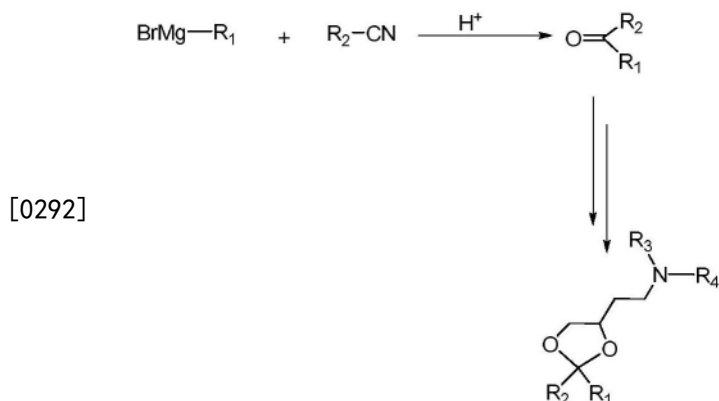
[0287] 其中 R_1 和 R_2 独立地是烷基、烯基或炔基,每种可以是任选取代的,并且 R_3 和 R_4 独立地是低级烷基或 R_3 和 R_4 可以是一起形成任选取代的杂环。在一些实施例中,阳离子脂质是XTC(2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环)。通常,可以通过以下反应方案1或2制造以上式A的脂质,其中除非另外指明,否则全部取代基如上文定义。

[0288] 方案1



[0290] 可以根据方案1制备脂质A,其中 R_1 和 R_2 独立地是烷基、烯基或炔基,每种可以是任选取代的,并且 R_3 和 R_4 独立地是更低级烷基或 R_3 和 R_4 可以是一起形成任选取代的杂环。可以购买或根据本领域普通技术人员已知的方法制备酮1和溴化物2。1和2的反应产生缩酮3。用胺4处理缩酮3产生式A的脂质。式A的脂质可以用式5的有机盐转化成相应的铵盐,其中X是选自卤素、氢氧化物、磷酸根、硫酸更等的阴离子反离子。

[0291] 方案2



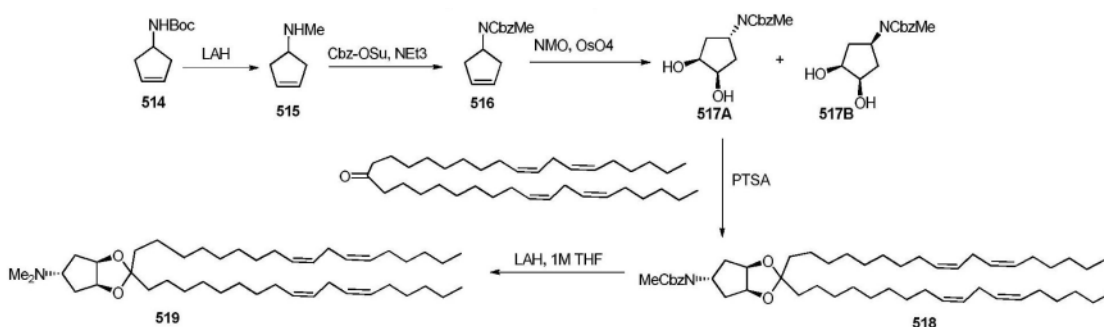
[0293] 可替代地,可以根据方案2制备酮1起始材料。可以购买或根据本领域普通技术人员已知的方法制备格氏试剂6和氰化物7。6和7的反应产生酮1。酮1转化成相应式A的脂质,如方案1中所述。

[0294] MC3的合成

[0295] 如下制备DLin-M-C3-DMA(即, (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯)。将(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-醇(0.53g), 4-N,N-二甲基氨基丁酸盐(0.51g)、4-N,N-二甲氨基吡啶(0.61g)和1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺)盐酸盐(0.53g)在二氯甲烷(5mL)中的溶液在室温搅拌过夜。将该溶液用稀盐酸洗涤,随后用稀碳酸氢钠水溶液洗涤。将有机部分用无水硫酸镁干燥,过滤并且在旋转蒸发器上移除溶剂。使用1%-5%甲醇/二氯甲烷洗脱梯度,使残余物通过硅胶柱(20g)。合并含有纯化产物的级分并且移除溶剂,产生无色油(0.54g)。

[0296] ALNY-100的合成

[0297] 使用以下方案3进行缩酮519[ALNY-100]的合成:



[0298]

[0299] 515的合成

[0300] 在0 °C在氮气氛下向双颈RBF(1L)中LiAlH₄(3.74g,0.09852mol)在200ml无水THF中的搅拌悬浮液缓慢添加514(10g,0.04926mol)在70mL THF中的溶液。在完成添加后,将反应混合物加温至室温并且然后加热至回流持续4小时。通过TLC监测反应的进程。在完成反应(借助TLC检测)后,将混合物冷却至0 °C并且通过小心添加饱和Na₂SO₄溶液淬灭。将反应混合物在室温搅拌4h并滤出。将残余物用THF充分洗涤。将滤液和洗涤液混合并用400mL二噁烷和26mL浓HCl稀释并且在室温搅拌20分钟。在真空下剥离挥发物以提供515盐酸盐,为白色固体。产率:7.12g ¹H-NMR(DMSO,400MHz):δ=9.34(宽,2H),5.68(s,2H),3.74(m,1H),2.66-2.60(m,2H),2.50-2.45(m,5H)。

[0301] 516的合成

[0302] 向250mL双颈RBF中化合物515在100mL无水DCM中的搅拌悬浮液添加NEt₃(37.2mL,0.2669mol)并在氮气氛下冷却至0 °C。在缓慢添加50mL无水DCM中的N-(苄氧羰酰氧基)-琥珀酰亚胺(20g,0.08007mol)后,允许反应混合物加温到室温。在反应结束(通过TLC检测2-3小时)后,将混合物用1N HCl溶液(1×100mL)和饱和NaHCO₃溶液(1×50mL)依次洗涤。然后用无水Na₂SO₄干燥有机层并且蒸发溶剂以给出粗制材料,所述粗制材料通过硅胶柱层析纯化以获得516,为粘性物质。产率:11g(89%)。¹H-NMR(CDCl₃,400MHz):δ=7.36-7.27(m,5H),5.69(s,2H),5.12(s,2H),4.96(br.,1H)2.74(s,3H),2.60(m,2H),2.30-2.25(m,2H)。LC-MS[M+H]⁺-232.3(96.94%)。

[0303] 517A和517B的合成

[0304] 将环戊烯516(5g,0.02164mol)溶解于单颈500mL RBF中的220mL丙酮和水(10:1)的溶液内,并且在室温向其添加N-甲基吗啉-N-氧化物(7.6g,0.06492mol),随后添加叔-丁醇中的4.2mL 7.6% OsO₄溶液(0.275g,0.00108mol)。在反应结束(约3小时)后,将混合物

通过添加固体Na₂S₂O₃猝灭并且将所产生的混合物在室温搅拌1.5小时。将反应混合物用DCM (300mL) 稀释并且用水 (2×100mL) 洗涤,随后用饱和NaHCO₃ (1×50mL) 溶液、水 (1×30mL) 并最终用盐水 (1×50mL) 洗涤。用无水Na₂S₂O₄干燥有机相并且在真空中移除溶剂。粗制材料的硅胶柱层析纯化提供了非对映异构体的混合物,所述非对映异构体由制备级HPLC分离。产率:约6g粗制物

[0305] 517A-峰-1 (白色固体), 5.13g (96%)。¹H-NMR (DMSO, 400MHz): δ=7.39-7.31 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.78-4.73 (m, 1H), 4.48-4.47 (d, 2H), 3.94-3.93 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 1.72-1.67 (m, 4H)。LC-MS- [M+H]⁻-266.3, [M+NH₄]⁺-283.5存在, HPLC-97.86%。通过X射线证实立体化学。

[0306] 518的合成

[0307] 使用类似于被描述用于合成化合物505的程序, 获得化合物518 (1.2g, 41%), 为无色油。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz): δ=7.35-7.33 (m, 4H), 7.30-7.27 (m, 1H), 5.37-5.27 (m, 8H), 5.12 (s, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.58-4.57 (m, 2H), 2.78-2.74 (m, 7H), 2.06-2.00 (m, 8H), 1.96-1.91 (m, 2H), 1.62 (m, 4H), 1.48 (m, 2H), 1.37-1.25 (br m, 36H), 0.87 (m, 6H)。HPLC-98.65%。

[0308] 用于合成化合物519的一般方法

[0309] 将化合物518 (1eq) 在己烷 (15mL) 中的溶液以逐滴方式添加至LAH在THF (1M, 2当量) 中的冰冷溶液。在完成添加后, 将混合物在40°C加热0.5h, 然后在冰浴上再次冷却。将混合物用饱和Na₂S₂O₄水溶液小心地水解, 然后经塞里滤料过滤并缩减成油。柱层析提供作为无色油获得的纯519 (1.3g, 68%)。¹³C NMR=130.2, 130.1 (x2), 127.9 (x3), 112.3, 79.3, 64.4, 44.7, 38.3, 35.4, 31.5, 29.9 (x2), 29.7, 29.6 (x2), 29.5 (x3), 29.3 (x2), 27.2 (x3), 25.6, 24.5, 23.3, 226, 14.1; 电喷雾MS (+ve): (M+H)⁺+C₄₄H₈₀N₂O₂的计算分子量为654.6, 观察到分子量为654.6。

[0310] 可以按相似方式表征通过标准方法亦或无挤出方法制备的配制品。例如, 配制品典型地通过视检表征。它们应当是不含聚集物或沉积物的发白半透明溶液。脂质-纳米粒子的粒度和粒度分布可以由光散射法使用例如Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern公司, 美国) 测量。粒子应当是大小约20-300nm, 例如40-100nm。粒度分布应当是单峰的。使用染料排阻测定法估计配制品连同封装部分中的总dsRNA浓度。配制的dsRNA的样品可以与RNA结合染料 (例如Ribogreen (分子探针)) 在配制品破坏性表面活性剂 (例如, 0.5% Triton-X100) 存在或不存在下孵育。制剂中的总dsRNA可以相对于标准曲线, 通过来自含有表面活性剂的样品的信号来确定。通过从总dsRNA含量扣除“游离”dsRNA含量 (如在表面活性剂不存在的情况下通过信号所测量) 确定封装部分。封装dsRNA的百分比典型地大于85%。对于SNALP配制品, 粒度是至少30nm、至少40nm、至少50nm、至少60nm、至少70nm、至少80nm、至少90nm、至少100nm、至少110nm和至少120nm。适合范围典型地是约至少50nm至约至少110nm、约至少60nm至约至少100nm或约至少80nm至约至少90nm。

[0311] 用于口服给予的组合物和配制品包括粉末或颗粒、微粒, 纳米颗粒、水或非水介质中的悬浮液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、小药囊、片剂或微型片剂。增稠剂、矫味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可以是想要的。在一些实施例中, 口服制剂是其中本发明中表征的dsRNA连同一种或多种增渗表面活性剂和螯合剂一起给予的那些。适合的表面活性剂包括脂肪酸和/或酯或其盐, 胆酸和/或其盐。适合的胆酸包括鹅脱氧胆酸 (CDCA) 和熊脱氧胆酸

(UDCA)、胆酸、脱氢胆酸、脱氧胆酸、葡糖胆酸(glucholic acid)、甘氨酸、甘氨酸脱氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺-24,25-二氢夫西地酸钠和二氢夫西地酸钠。适合的脂肪酸和酯包括但不限于花生四烯酸、十一烷酸、油酸、二十烷酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、单油精、二月桂精、甘油基1-单癸酸酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、或单酰甘油、二酰甘油或其可药用盐(例如,钠盐)。在一些实施例中,例如,使用增渗剂组合,与胆酸/盐组合的脂肪酸/盐。一个示例性组合是月桂酸、癸酸和UDCA的钠盐。其他增渗剂包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-鲸蜡基醚。本发明中表征的DsRNA可以经口以包括喷雾干燥粒子在内的颗粒形式递送或复合以形成微粒子或纳米粒子。DsRNA复合剂包括聚氨基酸;聚亚胺;聚丙烯酸酯;聚丙烯酸烷基酯、聚氧乙烷(polyoxethane)、聚氰基丙烯酸烷基酯;阳离子化明胶、白蛋白、淀粉、丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)和淀粉;聚氰基丙烯酸烷基酯;DEAE衍生化聚亚胺、短梗霉多糖、纤维素和淀粉。适合的复合剂包括壳聚糖、N-三甲基壳聚糖、聚-L-赖氨酸、多组氨酸、聚鸟氨酸、聚精胺、鱼精蛋白、聚乙烯基吡啶、聚硫代二乙基氨基甲基乙烯P(TDAE)、聚氨基苯乙烯(例如,对-氨基)、聚(氰基丙烯酸甲酯)、聚(氰基丙烯酸乙酯)、聚(氰基丙烯酸丁酯)、聚(氰基丙烯酸异丁酯)、聚(氰基丙烯酸异己酯)、DEAE-甲基丙烯酸酯、DEAE-丙烯酸己酯、DEAE-丙烯酰胺、DEAE-白蛋白和DEAE-葡聚糖、聚丙烯酸甲酯、聚丙烯酸己酯、聚(d,1-乳酸)、聚(DL-乳酸-共-乙醇酸(PLGA)、藻酸盐和聚乙二醇(PEG)。dsRNA的口服配制品和它们制备在美国专利6,887,906、美国Publn.No.20030027780和美国专利号6,747,014中详述,所述文献的每一篇通过引用结合在此。

[0312] 用于肠胃外、实质内(进入脑)、鞘内、心室内或肝内给予的组合物和配制品可以包括无菌水溶液剂,其也可以含有缓冲剂、稀释剂和其他适合的添加剂,例如,但不限于,增渗剂、载体混合物和其他药学上可接受的载体或赋形剂。

[0313] 本发明的药物组合物包括但不限于溶液、乳剂和含脂质体配制品。这些组合物可以从包括但不限于预制液体、自乳化固体和自乳化半固体的多种组分产生。特别优选是在治疗肝失调(例如肝癌)时靶向肝脏的配制品。

[0314] 本发明的药物配制品,其可以便利地以单位剂量形式提供,可以根据制药业中熟知的常规技术制备。这类技术包括使有效成分与一种或多种药用载体或赋形剂结合的步骤。通常,通过以下方式制备配制品:使有效成分与液体载体或精细分散的固体载体或二者均匀且密切地结合,并且然后根据需要进行该产物成形。

[0315] 本发明的组合物可以配制成许多可能剂型的任一种,例如,但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂、和灌肠剂。也可以将本发明的组合物配制为含水、不含水或混合介质中的悬浮液。含水悬浮液可以进一步含有增加悬浮液粘度的物质,包括羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮液也可以含有稳定剂。

[0316] 额外的制剂

[0317] 乳剂/

[0318] 可以将本发明的组合物制备和配制为乳剂。乳剂是典型地一种液体以直径通常超过 $0.1\mu\text{m}$ 的液滴形式分散于另一种中的多相系(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(安塞尔药物剂型和给药系统),Allen(艾伦),LV.,Popovich(波波维奇)NG.和Ansel(安塞尔)HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins

出版社(第8版),纽约,纽约州;Idson(伊德松),引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型),Lieberman(利伯曼),Rieger(里格尔)和Banker(邦克)(编辑),1988,Marcel Dekker, Inc.公司,纽约,纽约州,第1卷,第199页;Rosoff(罗索夫),引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型),Lieberman(利伯曼),Rieger(里格尔)和Banker(邦克)(编辑),1988,Marcel Dekker, Inc.公司,纽约,纽约州,第1卷,第245页;Block in Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型中的阻断),Lieberman(利伯曼),Rieger(里格尔)和Banker(邦克)(编辑),1988,Marcel Dekker, Inc.公司,纽约,纽约州,第2卷,第335页;Higuchi(希古契)等人,引自Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿氏药物科学),Mack Publishing Co.公司,Easton(伊斯顿),宾夕法尼亚州,1985,第301页)。乳剂经常是包含相密切混合和彼此分散的两种不溶混液的双相系统。通常,乳剂可以是油包水(w/o)或水包油(o/w)种类。当水相精细分散至本体油相中并作为微小液体分散至本体油相中时,所生成的组合物称作油包水(w/o)乳剂。可替代地,当油相精细分散至本体水相中并作为微小液体分散至本体水相中时,所生成的组合物称作水包油(o/w)乳剂。乳剂可以含有除分散相之外的额外组分以及可以在水相、油相中作为溶液亦或本身作为独立相存在的活性药物。如需要,药物赋形剂,例如乳化剂、稳定剂、染料和抗氧化剂也可以存在于乳剂中。药物乳剂也可以是由多于两个相组成的多重乳剂,例如,在水包油(o/w/o)和水包油包水(w/o/w)乳剂的情况下。这类复合制剂经常提供简单二元乳剂所不具备的某些优点。其中o/w乳剂的单个油液滴围绕小水滴的多重乳剂构成w/o/w乳剂。同样地,在油质连续相中稳定的水小球中封闭的油液滴的系统提供o/w/o乳剂。

[0319] 乳剂特征在于低或无热动力稳定性。经常,乳剂的分散相或不连续相充分分散于外部相或连续相中并且通过乳化剂或配制品粘度以这种形式维持。乳剂的任一相可以是半固态或固态,如乳液型油膏剂基质和乳膏剂就是这样。稳定乳剂的其他手段需要使用可以掺入乳剂的任一相中的乳化剂。乳化剂可以大致分成4类:合成性表面活性剂、天然存在的乳化剂、吸收基质和精细分散的固体(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(安塞尔药物剂型和给药系统),Allen(艾伦),LV.,Popovich(波波维奇)NG.和Ansel(安塞尔)HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins出版社(第8版),纽约,纽约州;Idson(伊德松),引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型),Lieberman(利伯曼),Rieger(里格尔)和Banker(邦克)(编辑),1988,Marcel Dekker, Inc.公司,纽约,纽约州,第1卷,第199页)。

[0320] 合成性表面活性剂,也称作表面活性试剂,已经发现在乳剂的配制中的广泛应用并且已经在文献中综述(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(安塞尔药物剂型和给药系统),Allen(艾伦),LV.,Popovich(波波维奇)NG.和Ansel(安塞尔)HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins出版社(第8版),纽约,纽约州;Rieger(里格尔),引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型),Lieberman(利伯曼),Rieger(里格尔)和Banker(邦克)(编辑),1988,Marcel Dekker, Inc.公司,纽约,纽约州,第1卷,第285页;Idson(伊德松),引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型),Lieberman(利伯曼),Rieger(里格尔)和Banker(邦克)(编辑),Marcel Dekker, Inc.公司,纽约,纽约州,1988,第1卷,第199页)。表面活性剂一般是两性的并且包含亲水部分和疏水部分。表面活性剂的亲水对疏水性质的比率已经称作亲水/亲油平衡值(HLB)并且是在制备

配制品时表面活性剂分类和选择的有价值工具。表面活性剂可以基于亲水基团的性质:非离子、阴离子、阳离子和两亲分成不同类别(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(安塞尔药物剂型和给药系统),Allen(艾伦),LV.,Popovich(波波维奇)NG.和Ansel(安塞尔)HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins出版社(第8版),纽约,纽约州;Rieger(里格尔),引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型),Lieberman(利伯曼),Rieger(里格尔)和Banker(邦克)(编辑),1988,Marcel Dekker, Inc.公司,纽约,纽约州,第1卷,第285页)。

[0321] 用于乳剂配制品中的天然存在的乳化剂包括羊毛脂、蜂蜡,磷脂、卵磷脂和阿位伯树胶。吸收基质拥有亲水特性,使得它们可以吸水以形成w/o乳剂,而仍保留它们的半固态一致性,例如无水羊毛脂和亲水矿脂。也已经使用精细分散的固体作为良好乳化剂,尤其与表面活性剂组合时在粘稠制剂中使用。这些包括极性无机固体,例如重金属氢氧化物、非溶胀粘土,例如膨润土、凹凸棒土、锂蒙脱石,高岭土、蒙脱土、胶态硅酸铝和胶态镁硅酸铝、颜料和非极性固体,例如碳或甘油基三硬脂酸酯。

[0322] 多种非乳化材料也包含于乳剂中并且对乳剂的特性有贡献。这些包括脂肪、油、蜡、脂肪酸、脂肪醇、脂肪酯、湿润剂、亲水胶体、防腐剂和抗氧化剂(Block(布洛克),引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型),Lieberman(利伯曼),Rieger(里格尔)和Banker(邦克)(编辑),1988,Marcel Dekker, Inc.公司,纽约,纽约州,第1卷,第335页;Idson(伊德松),引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型),Lieberman(利伯曼),Rieger(里格尔)和Banker(邦克)(编辑),1988,Marcel Dekker, Inc.公司,纽约,纽约州,第1卷,第199页)。

[0323] 亲水胶体或水胶体包括天然存在的树胶和合成聚合物,例如多糖(例如,阿位伯树胶、琼脂、海藻酸、角叉菜胶、瓜耳胶、卡拉亚胶和黄蓍胶)、纤维素衍生物(例如,羧甲基纤维素和羧丙基纤维素)和合成聚合物(例如,卡波姆、纤维素醚和羧乙烯基聚合物)。这些胶体在水中分散或溶胀以形成胶体溶液,所述胶体溶液通过围绕分散的液滴形成坚固界面膜并通过增加外部相的粘度使乳剂稳定。

[0324] 由于乳剂经常含有可以轻易支持微生物生长的许多成分,例如糖、蛋白、固醇和磷脂,所以这些制剂经常并入防腐剂。乳剂中包含的常用的防腐剂包括尼泊金甲酯、尼泊金丙酯、季铵盐、苯扎氯铵、对-羟基苯甲酸的酯和硼酸。也常添加抗氧化剂至乳剂配制品以防止配制品的劣化。所用的抗氧化剂可以是自由基清除剂,例如生育酚,没食子酸烷基酯、丁化羟基茴香醚、丁化羟基甲苯,或还原剂,例如抗坏血酸和焦亚硫酸钠,和抗氧化剂增效剂,例如柠檬酸、酒石酸和卵磷脂。

[0325] 经由皮肤途径、口途径和肠胃途径途径应用乳剂配制品和用于制造它们的方法已经在文献中综述(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(安塞尔药物剂型和给药系统),Allen(艾伦),LV.,Popovich(波波维奇)NG.和Ansel(安塞尔)HC.,2004,Lippincott Williams&Wilkins出版和(第8版),纽约,纽约州;Idson(伊德松),引自Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型),Lieberman(利伯曼),Rieger(里格尔)和Banker(邦克)(编辑),1988,Marcel Dekker, Inc.公司,纽约,纽约州,第1卷,第199页)。用于口服递送的乳剂制剂已经非常广泛地使用,由于易于配制连同从吸收和生物利用率的观点看有效(参见例如,Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and

Drug Delivery Systems (安塞尔药物剂型和给药系统), Allen (艾伦), LV., Popovich (波波维奇) NG. 和 Ansel (安塞尔) HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins 出版社 (第8版), 纽约, 纽约州; Rosoff (罗索夫), 引自 Pharmaceutical Dosage Forms (药物剂型), Lieberman (利伯曼), Rieger (里格尔) 和 Banker (邦克) (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc. 公司, 纽约, 纽约州, 第1卷, 第245页; Idson (伊德松), 引自 Pharmaceutical Dosage Forms (药物剂型), Lieberman (利伯曼), Rieger (里格尔) 和 Banker (邦克) (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc. 公司, 纽约, 纽约州, 第1卷, 第199页)。矿物油基质泻药、油性维生素和高脂营养制剂属于常见作为 o/w 乳剂口服给予的材料。

[0326] 在本发明的一个实施例中, 将 iRNA 和核酸的组合物配制为微乳剂。可以将微乳剂定义为水、油和两亲分子的系统, 所述系统是光学各向同性和热动力学稳定的单一液态溶液 (参见例如, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (安塞尔药物剂型和给药系统), Allen (艾伦), LV., Popovich (波波维奇) NG. 和 Ansel (安塞尔) HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins 出版社 (第8版), 纽约, 纽约州; Rosoff (罗索夫), 引自 Pharmaceutical Dosage Forms (药物剂型), Lieberman (利伯曼), Rieger (里格尔) 和 Banker (邦克) (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc. 公司, 纽约, 纽约州, 第1卷, 第245页)。典型地, 微乳剂是通过以下方式制备的系统: 首先在表面活性剂水溶液中分散油并且随后添加足够量的第四组分 (通常是中等链长度的醇) 以形成透明系统。因此, 也已经将微乳剂描述为两个不溶混性液体的热动力学稳定的各向同性清澈的分散体, 所述分散体由表面活性剂分子的界面膜稳定 (Leung (梁) 和 Shah (沙阿), 引自: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems (控释药物: 聚合物和聚合系统), Rosoff (罗索夫), M. 编辑, 1989, VCH Publishers 公司, 纽约, 第185-215页)。微乳剂通常经由组合三至五种组分来制备, 所述组分包括油、水、表面活性剂、辅助表面活性剂和电解质。微乳剂是否为油包水 (w/o) 或水包油 (o/w) 型取决于所用的油和表面活性剂的特性并且取决于结构和表面活性剂分子的极性头部和烃尾的几何堆积 (Schott (肖特), 引自 Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿氏药物科学), Mack Publishing Co. 公司, Easton (伊斯顿), 宾夕法尼亚州, 1985, 第271页)。

[0327] 已经广泛研究了利用相图的现象学方法并且对本领域普通技术人员, 该方法已经产生怎样配制微乳剂的广泛知识 (参见例如, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (安塞尔药物剂型和给药系统), Allen (艾伦), LV., Popovich (波波维奇) NG. 和 Ansel (安塞尔) HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins 出版社 (第8版), 纽约, 纽约州; Rosoff (罗索夫), 引自 Pharmaceutical Dosage Forms (药物剂型), Lieberman (利伯曼), Rieger (里格尔) 和 Banker (邦克) (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc. 公司, 纽约, 纽约州, 第1卷, 第245页; Block (布洛克), 引自 Pharmaceutical Dosage Forms (药物剂型), Lieberman (利伯曼), Rieger (里格尔) 和 Banker (邦克) (编辑), 1988, Marcel Dekker, Inc. 公司, 纽约, 纽约州, 第1卷, 第335页)。与常规乳剂相比, 微乳剂提供以下优点: 在自发形成的热动力学稳定液滴的配制品中溶解水不溶性药物。

[0328] 在制备微乳剂时使用的表面活性剂包括但不限于单独或与辅助表面活性剂组合的离子型表面活性剂、非离子表面活性剂、Brij 96、聚氧乙烯油基醚、聚甘油脂肪酸酯、四甘油单月桂酸酯 (ML310)、四甘油单油酸酯 (M0310)、六甘油单油酸酯 (P0310)、六甘油五

油酸酯 (PO500)、十甘油单癸酸酯 (MCA750)、十甘油单油酸酯 (MO750)、十甘油倍半油酸酯 (SO750)、十甘油十油酸酯 (DA0750)。通过渗入表面活性剂膜并因此因表面活性分子之间产生的孔隙空间而产生无序膜,辅助表面活性剂(通常是短链醇,例如乙醇、1-丙醇和1-丁醇)起到增加界面流动性的作用。然而,微乳剂可以在不使用辅助表面活性剂的情况制备并且无醇自乳化性微乳剂系统是本领域已知的。典型地,水相可以是但不局限于水、药物的水溶液、甘油、PEG300、PEG400、聚甘油、丙二醇和乙二醇的衍生物。油相可以包括但不局限于多种材料,例如Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸酯、中等链(C8-C12)单、二和三甘油酯、聚氧乙基化甘油基脂肪酸酯、脂肪醇、聚乙二醇化甘油酯、饱和聚乙二醇化C8-C10甘油酯、植物油和硅油。

[0329] 从药物增溶和增强药物吸收的观点看,微乳剂是特别有意义的。已经提出基于脂质的微乳剂(o/w和w/o二者)以增强药物(包括肽)的口服生物利用率(参见例如,美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;Constantinides(康斯坦丁尼德)等人,Pharmaceutical Research(药学研究),1994,11,1385-1390;Ritschel(瑞茨尔),Meth.Find.Exp.Clin.Pharmacol.(实验与临床药理学方法与成果),1993,13,205)。微乳剂提供以下优点:改进药物溶解、保护药物免遭酶水解、可能因表面活性剂引起的膜流动性和通透性改变而增强药物吸收、易于制备、比固体剂型易于口服给予、临床效力改善和毒性降低(参见例如,美国专利号6,191,105;7,063,860;7,070,802;7,157,099;Constantinides(康斯坦丁尼德)等人,Pharmaceutical Research(药学研究),1994,11,1385;Ho(何)等人,J.Pharm.Sci.(药物科学杂志),1996,85,138-143)。经常,微乳剂可以在环境温度使它们的组分聚拢时自发形成。在配制热不稳定药物、肽或iRNA时,这可以是特别有利的。微乳剂也已经有效在化妆品和药物应用中透皮递送活性组分。预期本发明的微乳剂组合物和配制品将促进iRNA和核酸从胃肠道的全身性吸收增加以及改善iRNA和核酸的局部细胞摄取。

[0330] 本发明的微乳剂也可以含有额外的组分和添加剂,例如脱水山梨糖醇单硬脂酸酯(Grill 3)、Labrasol、和改善配制品特性并增强本发明iRNA和核酸吸收的增渗剂。可以将本发明的微乳剂中所用的增渗剂划分为属于五大类之一--表面活性剂、脂肪酸、胆盐、螯合剂和非螯合性非表面活性剂(Lee(李)等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems(医药载体系统评论综述),1991,第92页)。上文已经讨论这些类别的每一种。

[0331] 增渗剂

[0332] 在一个实施例中,本发明采用不同增渗剂来实现向动物皮肤高效递送核酸,特别是iRNA。大多数药物在溶液中以离子化和非离子化两种形式存在。然而,通常仅脂溶性或亲脂性药物轻易地穿过细胞膜。已经发现如果待跨过的膜用增渗剂处理,甚至非亲脂性药物可以跨过细胞膜。除辅助非亲脂性药物跨细胞膜扩散之外,增渗剂还增强亲脂性药物的通透性。

[0333] 可以将增渗剂划分为属于五大类之一,即,表面活性剂、脂肪酸、胆盐、螯合剂和非螯合性非表面活性剂(见例如,Malmsten(马姆斯顿),M.Surfactants and polymers in drug delivery(药物递送中的表面活性剂和聚合物),Informa Health Care公司,纽约,纽约州,2002;Lee(李)等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems(医药载体系统评论综述),1991,第92页)。下文更详细地描述上文提到的增渗剂的每个类别。

[0334] 表面活性剂:与本发明有关,表面活性剂(或“表面活性试剂”)是在水溶液中溶解时降低溶液表面张力或水溶液和另一种液体之间的界面张力的化学实体,结果是增强通过粘膜吸收iRNA。除胆盐和脂肪酸之外,这些增渗剂还包括例如十二烷基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂基醚和聚氧乙烯-20-鲸蜡基醚(参见例如,Malmsten(马姆斯顿),M. Surfactants and polymers in drug delivery(药物递送中的表面活性剂和聚合物),Informa Health Care公司,纽约,纽约州,2002;Lee(李)等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems(医药载体系统评论综述),1991,第92页);和全氟化学乳剂,例如FC-43。Takahashi(高桥)等人,J.Pharm.Pharmacol.(药学与药理学杂志),1988,40,252)。

[0335] 脂肪酸:充当增渗剂的各种脂肪酸及其衍生物例如包括油酸、月桂酸、癸酸(正癸酸)、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、单油精(1-单油酰-外消旋-甘油)、二月桂精、辛酸、花生四烯酸、甘油1-单癸酸酯、1-十二烷基氮杂环庚-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、其C₁₋₂₀烷基酯(例如,甲基酯、异丙基酯和叔丁基酯)及其单和二甘油酯(即、油酸酯、月桂酸酯、癸酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、硬脂酸酯、亚油酸酯等)(见例如,Touitou(图伊杜),E.等人,Enhancement in Drug Delivery(药物递送中的增强),CRC Press公司,Danvers(丹佛斯),马萨诸塞州,2006;Lee(李)等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems(医药载体系统评论综述),1991,第92页;Muranishi(村西),Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems(医药载体系统评论综述),1990,7,1-33;El Hariri(艾尔哈里里)等人,J.Pharm.Pharmacol.(药学与药理学杂志),1992,44,651-654)。

[0336] 胆盐:胆汁的生理学作用包括促进脂类和脂肪维生素的分散和吸收(参见例如,Malmsten(马姆斯顿),M. Surfactants and polymers in drug delivery(药物递送中的表面活性剂和聚合物),Informa Health Care公司,纽约,纽约州,2002;Brunton(布鲁顿),第38章,引自:Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics(古德曼吉尔曼治疗学的药理学基础),第9版,Hardman(哈德曼)等人编辑,McGraw-Hill公司,纽约,1991,第934-935页)。不同天然胆盐和它们的合成性衍生物充当增渗剂。因此,术语“胆盐”包括天然存在的胆汁组分的任一种连同它们的合成性衍生物的任一种。适合的胆盐包括,例如,胆酸(或其可药用的钠盐,胆酸钠)、脱氢胆酸(脱氢胆酸钠)、脱氧胆酸(脱氧胆酸钠)、葡萄糖胆酸(葡萄糖胆酸钠)、甘氨酸胆酸(甘氨酸胆酸钠)、甘氨酸脱氧胆酸(甘氨酸脱氧胆酸钠)、牛磺胆酸(牛磺胆酸钠)、牛磺脱氧胆酸(牛磺脱氧胆酸钠)、鹅脱氧胆酸(鹅脱氧胆酸钠)、熊脱氧胆酸(UDCA)、牛磺-24,25-二氢夫西地酸钠(STDHF)、二氢夫西地酸钠和聚氧乙烯-9-月桂基醚(POE)(参见例如,Malmsten(马姆斯顿),M. Surfactants and polymers in drug delivery(药物递送中的表面活性剂和聚合物),Informa Health Care公司,纽约,纽约州,2002;Lee(李)等人,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems(医药载体系统评论综述),1991,第92页;Swinyard(斯温雅德),第39章,引自:Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿氏药物科学),第18版,Gennaro(真纳罗)编辑,Mack Publishing Co.公司,Easton(伊斯顿),宾西法尼亚州,1990,第782-783页;Muranishi(村西),Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems(医药载体系统评论综述),1990,7,1-33;Yamamoto(山本)等人,J.Pharm.Exp.Ther.(药理学与实验治疗学杂志),1992,263,25;Yamashita(山下)等人,J.Pharm.Sci.(药物科学杂志),1990,79,579-583)。

[0337] 螯合剂:螯合剂,如与本发明相联系使用,可以定义为通过与金属离子形成络合物从溶液除去金属离子的化合物,结果是增强iRNA通过粘膜的吸收。关于它们在本发明中作为增渗剂的用途,螯合剂具有附加的优点:还充当DNA酶抑制剂,因为大多数已表征的DNA核酸酶需要二价金属离子用于催化并且因此被螯合剂抑制(Jarrett(贾勒特), J.Chromatogr.(色谱法杂志),1993,618,315-339)。适合的螯合剂包括但不限于二钠乙二胺(EDTA)、柠檬酸、水杨酸酯(例如,水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸酯和高香子兰酸酯)、胶原蛋白的N-酰基衍生物、月桂醇聚醚-9和 β -二酮的N-氨基酰基衍生物(烯胺)(参见例如, Katdare(凯特戴尔), A.等人, Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery(药物、生物技术与药物输送系统赋形剂开发), CRC Press公司, Danvers(丹佛斯), 马萨诸塞州, 2006; Lee(李)等人, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems(医药载体系统评论综述), 1991, 第92页; Muranishi(村西), Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems(医药载体系统评论综述), 1990, 7, 1-33; Buur(伯尔)等人, J.Control Rel.(控释杂志), 1990, 14, 43-51)。

[0338] 非螯合性非表面活性剂:如在此使用,非螯合性非表面活性剂渗透增强化合物可以定义为作为螯合剂或作为表面活性剂展示不明显活性但是反而增强iRNA通过消化道粘膜吸收的化合物(参见例如, Muranishi(村西), Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems(医药载体系统评论综述), 1990, 7, 1-33)。这类别的增渗剂包括例如不饱和和环状脲、1-烷基-和1-烯基氮杂环-烷酮衍生物(Lee(李)等人, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems(医药载体系统评论综述), 1991, 第92页);和非甾体抗炎剂,例如双氯芬酸钠、吲哚美辛和保泰松(Yamashita(山下)等人, J.Pharm.Pharmacol.(药学与药理学杂志), 1987, 39, 621-626)。

[0339] 也可以添加在细胞水平增强摄取iRNA的物质至本发明的药物组合物和其他组合物。例如,阳离子脂质,例如lipofectin(Junichi等人,美国专利号5,705,188)、阳离子甘油衍生物和聚阳离子分子如聚赖氨酸(Lollo(洛洛)等人, PCT申请W0 97/30731)也已知增强细胞摄取dsRNA。可商购转染试剂的实例包括例如LipofectamineTM(Invitrogen公司; Carlsbad(卡尔斯巴德),加利福尼亚州)、Lipofectamine 2000TM(Invitrogen公司; Carlsbad(卡尔斯巴德),加利福尼亚州)、293fectinTM(Invitrogen公司; Carlsbad(卡尔斯巴德),加利福尼亚州)、CellfectinTM(Invitrogen公司; Carlsbad(卡尔斯巴德),加利福尼亚州)、DMRIE-CTM(Invitrogen公司; Carlsbad(卡尔斯巴德),加利福尼亚州)、FreeStyleTMMAX(Invitrogen公司; Carlsbad(卡尔斯巴德),加利福尼亚州)、LipofectamineTM2000CD(Invitrogen公司; Carlsbad(卡尔斯巴德),加利福尼亚州)、LipofectamineTM(Invitrogen公司; Carlsbad(卡尔斯巴德),加利福尼亚州)、RNAiMAX(Invitrogen公司; Carlsbad(卡尔斯巴德),加利福尼亚州)、OligofectamineTM(Invitrogen公司; Carlsbad(卡尔斯巴德),加利福尼亚州)、OptifectTM(Invitrogen公司; Carlsbad(卡尔斯巴德),加利福尼亚州)、X-tremeGENE Q2转染试剂(Roche公司; Grenzacherstrasse(格兰扎克街),瑞士)、DOTAP脂质体转染试剂(Grenzacherstrasse(格兰扎克街),瑞士)、DOSPER脂质体转染试剂(Grenzacherstrasse(格兰扎克街),瑞士)或Fugene(Grenzacherstrasse(格兰扎克街),瑞士)、Transfectam[®]试剂(Promega公司; Madison(麦迪逊),威斯康辛州)、TransFastTM转染试剂(Promega公司; Madison(麦迪逊),威斯康辛

州)、TfxTM-20试剂(Promega公司;Madison(麦迪逊),威斯康辛州)、TfxTM-50试剂(Promega公司;Madison(麦迪逊),威斯康辛州)、DreamFectTM(OZ Biosciences公司;马赛,法国)、EcoTransfect(OZ Biosciences公司;马赛,法国)、TransPass^a D1转染试剂(New England Biolabs公司;Ipswich(伊普斯威奇),马萨诸塞州,美国)、LyoVecTM/LipoGenTM(Invivogen公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、PerFectin转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、NeuroPORTER转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、GenePORTER转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、GenePORTER 2转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、Cytfectin转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、BaculoPORTER转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、TroganPORTERTM转染试剂(Genlantis公司;圣迭戈,加利福尼亚州,美国)、RiboFect(Bioline公司;Taunton(陶顿),马萨诸塞州,美国)、PlasFect(Bioline公司;Taunton(陶顿),马萨诸塞州,美国)、UniFECTOR(B-Bridge International公司;山景城,加利福尼亚州,美国)、SureFECTOR(B-Bridge International公司;山景城,加利福尼亚州,美国)或HiFectTM(B-Bridge International公司,山景城,加利福尼亚州,美国),连同其他

[0340] 其他物质可以用来增强所给予核酸渗透,这些物质包括二醇,例如乙二醇和丙二醇、吡咯,例如2-吡咯、氮酮和萜类,例如苧烯和薄荷酮。

[0341] 载体

[0342] 本发明的某些组合物也并入配制品中的载体化合物。如在此使用,“载体化合物”或“载体”可以指呈惰性(即,本身不拥有生物活性),但由体内过程识别为核酸的核酸或其类似物,其中所述体内过程通过由例如降解生物活性核酸或促进其从循环移除,降低具有生物活性的核酸的生物利用率。核酸和载体化合物的共给予(典型地后一种物质过量)可以导致肝脏、肾脏或其他外循环储库中回收的核酸量大幅度缩减,假定归因于该载体化合物和该核酸之间对共同受体的竞争。例如,与聚肌苷酸、硫酸葡聚糖、聚胞苷酸或4-乙酰氨基-4'-异硫氰酸芪-2,2'-二磺酸共给予时,肝组织中部分硫代磷酸酯化的dsRNA的回收可以减少(Miyao(宫尾)等人,DsRNA Res.Dev.(DsRNA研究与发育),1995,5,115-121;Takakura(高仓)等人,DsRNA&Nucl.Acid Drug Dev.(DsRNA&核酸药物开发),1996,6,177-183。

[0343] 赋形剂

[0344] 与载体化合物相反,“药用载体”或“赋形剂”是用于递送一种或多种核酸至动物的药学上可接受的溶剂、助悬剂或任何其他药理惰性溶媒。赋形剂可以是液体或固体并且根据头脑中计划的给予方式进行选择,从而与给定给定药物组合物的核酸和其他组分组合时,提供所需要的容积、一致性等。典型的药用载体包括但不限于、粘合剂(例如,预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等);填料(例如,乳糖和其他糖、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石、二氧化硅、胶态二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等);崩解剂(例如,淀粉、淀粉羟乙酸钠等);和润湿剂(例如,月桂基硫酸钠等)。

[0345] 不有害地与核酸反应的适合于非肠胃外给予的药学上可接受的有机或无机赋形剂也可以用来配制本发明的组合物。适合的药学上可接受的载体包括但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚

乙烯吡咯烷酮等。

[0346] 用于局部给予核酸的配制品可以包括无菌和非无菌水溶液剂、常见溶剂如醇中的非水溶液剂或核酸在液态或固态油基质中的溶液剂。溶液也可以含有缓冲剂、稀释剂和其他适合的添加剂。可以使用不有害地与核酸反应的适合于非肠胃外给予的可药学上可接受的有机或无机赋形剂。

[0347] 适合的药理学上可接受的赋形剂包括但不限于水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0348] 其他组分

[0349] 本发明的组合物可以额外地以本领域已建立的使用水平含有药物组合物中常规存在的其他辅助组分。因此,例如,组合物可以含有额外的相容性药物活性材料,例如,止痒药、止血药、局部麻醉药或抗炎剂,或可以含有在实际配制本发明组合物的不同剂型时有用的额外材料,例如染料、矫味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而,当添加时,这类材料不应当过度干扰本发明组合物的组分的生物活性。可以将配制品灭菌,并且如果需要,将其与并没有与配制品的这一种或多种核苷酸不利相互作用的助剂混合,所述的助剂例如是润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐类、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香物质等。

[0350] 含水悬浮液可以含有增加悬浮液粘度的物质,包括羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮液也可以含有稳定剂。

[0351] 在一些实施例中,本发明中表征的药物组合物包括(a)一种或多种iRNA化合物和(b)通过非RNAi机制发挥作用的一种或多种抗细胞因子生物药剂。这类生物制品的实例包括靶向IL1 β (例如,阿那白滞素)、IL6(例如,托珠单抗(tocilizumab))或TNF(例如,依那西普、英夫单抗(infliximab)、阿达木单抗或赛妥珠单抗(certolizumab))的生物制品。

[0352] 可以通过标准药理学方法在细胞培养物或实验动物中确定这类化合物的毒性和治疗功效,例如,确定LD50(对50%群体致死的剂量)和ED50(在50%群体中治疗有效的剂量)。毒性效果和治疗效果之间的剂量比是治疗指数并且它可以表述为LD50/ED50比。优选显示高治疗指数的化合物。

[0353] 从细胞培养物测定法和动物研究中获得的数据可以在配制人类中使用的剂量范围时使用。在此表征的组合物剂量总体上处于毒性低或无毒性情况下包括ED50的循环浓度的范围内。该剂量可以取决于所用的剂型和所用的给予途径在这个范围内部变动。对于用于本发明中表征的方法中的任何化合物,可以最初从细胞培养测定法中估计治疗有效剂量。可以在动物模型中配制一种剂量以实现化合物或(当适宜时)靶序列的多肽产物的循环血浆浓度范围(例如,实现所述多肽浓度降低),其中所述血浆浓度包括如在细胞培养物中所确定的IC50(即,试验化合物的实现症状的半数最大抑制的浓度)。这类信息可以用来更精确地确定用于人类中的剂量。可以测量血浆中的水平,例如,通过高效液相色谱法。

[0354] 除它们的给予之外,如上文讨论,在此所述的iRNA可以与有效治疗由TMPRSS6表达介导的病理过程的其他已知药剂组合给予。在任何情况下,基于使用本领域已知或在此所述的标准功效量值所观察到的结果,给予医师可以调整给予iRNA的量和时间。

[0355] 用于治疗由TMPRSS6基因表达引起的疾病的方法

[0356] 本发明具体涉及靶向TMPRSS6的iRNA和含有至少一种这样的iRNA的组合物用于

治疗TMPRSS6介导的失调或疾病的用途。例如,含有靶向TMPRSS6基因的iRNA的组合物用于治疗与升高的铁水平相关的失调,如地中海贫血(例如,中间型 β -地中海贫血或 α -地中海贫血)、原发性血色素沉着症、继发性血色素沉着症、严重幼体血色素沉着症、铁粒幼细胞性贫血、溶血性贫血、红细胞生成异常性贫血或镰状细胞贫血。在一个实施例中,TMPRSS6 iRNA用来治疗血红蛋白病。本发明中表征的TMPRSS6 iRNA也可以用来治疗因其他病状(例如慢性酒精中毒)所致的升高的铁水平。

[0357] 在中地中海贫血,骨髓合成量不足的血红蛋白链;这转而减少红细胞的产生并造成贫血。 α 亦或 β 链可以受影响,但是 β 地中海贫血更常见;新生儿是健康,因为它们的身体仍产生不具有 β 链的HbF;在生命的前几个月期间,骨髓转而产生HbA并且症状开始出现。

[0358] β -地中海贫血因伴有HBB基因的等位基因不表达(β^0)亦或低表达(β^+)的突变引起。 β -地中海贫血在严重性方面变化,取决于基因型,并且包括轻型/性状 β -地中海贫血(β/β^0 或 β/β^+)、中间型 β -地中海贫血(β^0/β^+)和重型 β -地中海贫血(β^0/β^0 或 β^+/ β^+)。

[0359] 中间型地中海贫血(TI)典型地出现轻微溶血,而重型 β -地中海贫血(TM)典型地伴以造成例如贫血和脾脏肿大的大量溶血;和高度无效的红细胞生成,这造成骨髓驱动(bone marrow drive)(骨骼肌变化、骨量减少)、增加的红细胞生成素合成、肝-脾肿大、补血药的消耗(巨幼细胞贫血),和血液中尿酸高。本发明中表征的iRNA,例如,TMPRSS6 iRNA,更适合治疗典型地伴随更为TI样的地中海贫血的铁过量(例如,用于治疗具有 β^0/β^+ 、 β/β^0 或 β/β^+ 基因型的个体)。

[0360] β -地中海贫血的症状也包括例如因疗法所致的并发症,例如,铁过量,这造成内分泌病、肝纤维化和心肌纤维化。给予靶向TMPRSS6的iRNA药剂可以有效治疗这些症状的一种或多种。

[0361] α -地中海贫血因伴有HBA1或HBA2基因的等位基因不表达(α^0)亦或低表达(α^+)的突变引起。 α -地中海贫血在严重性方面变化,这取决于基因型,并且包括轻型($-\alpha/\alpha\alpha$)、血红蛋白Bart胎儿水肿(α^0/α^0)、轻型 α -地中海贫血($--/\alpha\alpha$)、($-\alpha/-\alpha$)和HbH病($--/-\alpha$)。更低的 α -珠蛋白链产生,导致成人中 β 链过量 and 新生儿中 γ 链过量。过量的 β 链形成具有异常氧解离曲线的不稳定四聚体(称作4 β 链血红蛋白H或HbH)。给予靶向TMPRSS6的iRNA药物可以有效治疗具有 α -地中海贫血的受试者中的铁过量。

[0362] 血色素沉着症的症状包括例如腹痛、关节痛、乏力、精力缺乏、虚弱、皮肤发暗(经常称作“古铜色化”)和体毛脱落。给予靶向TMPRSS6的iRNA药物可以有效治疗这些症状的一种或多种。

[0363] 与铁过量相关的其他症状包括肝病(肝硬化、癌症)风险增加、心脏病发作或心力衰竭、糖尿病、骨关节炎、骨质疏松症、代谢综合征、甲状腺功能减退症、性腺功能低减和在一些情况下过早死亡。导致过量的铁不当管理也可以加速这类神经退行性疾病,例如阿尔茨海默病、早发型帕金森病、亨廷顿病、癫痫和多发性硬化。给予靶向TMPRSS6的iRNA,例如,在表2、3或4中描述的iRNA,可以治疗这些症状中的一个或多个,或预防因增加的铁水平而加重的疾病或失调发展或进展。

[0364] 本发明进一步涉及iRNA或其药物组合物例如与其他药物和/或其他治疗方法(例如与已知药物和/或已知治疗方法(例如,目前用于治疗这些失调的那些))组合时用于治疗与升高的铁水平相关的失调的用途。例如,在某些实施例中,靶向TMPRSS6的iRNA是给予与

例如铁螯合剂(例如,去铁胺)、叶酸、输血、静脉切开术、控制溃疡的药剂、增加胎儿血红蛋白水平的药剂(例如,羟基脲)、控制感染的药剂(例如,抗生素和抗病毒药)、治疗凝血栓形成状态的药剂或干细胞或骨髓移植组合。干细胞移植可以利用来自脐带(如来自亲属,例如,兄弟姐妹)的干细胞。示例性铁螯合剂包括去铁胺、地拉罗司(Exjade)、去铁酮、维生素E、小麦胚芽油、托可索仑(tocophersolan)和梨果仙人掌黄质(indicaxanthin)。

[0365] iRNA和额外的治疗剂可以在相同的组合物中,例如,肠胃外给予,或额外的治疗剂可以作为独立组合物的一部分或通过在此所述的另一种方法给予。TMPRSS6 iRNA和额外的治疗剂可以在相同的时间或在不同时间并且以任何顺序给予。

[0366] 本发明表征了向患有由TMPRSS6表达介导的疾病或失调(例如与升高的铁水平相关的失调)的患者给予靶向TMPRSS6的iRNA药物的方法。dsRNA的给予可以降低铁水平、降低铁蛋白水平和/或降低转铁蛋白饱和水平。例如,dsRNA的给予可以降低血清铁水平和/或降低血清铁蛋白水平。转铁蛋白饱和水平可以降低5%、10%、15%、20%、25%或更多。转铁蛋白饱和水平可以降低至50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、35%以下或更低。转铁蛋白饱和度是与血清转铁蛋白结合的铁的量的量度,并且对应于血清铁和总铁结合容量的比率。

[0367] “降低”在这种上下文下意指这种水平的统计上显著下降。下降可以是例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或更多,并且优选地降至作为不患这失调的个体的正常范围内所接受的水平。

[0368] 可以评估治疗或预防疾病的功效,例如通过测量病情进展、疾病缓解、症状严重性、疼痛减少,生活质量,维持治疗效果所要求的药物剂量、适于为了预防而正在治疗或靶向的给定疾病的疾病标记或任何其他可度量参数的水平。很好地处于本领域普通技术人员的能力范围内的是通过测量这类参数的任一个或参数的任何组合监测治疗或预防的功效。例如,可以针对给定治疗方案的功效,监测转铁蛋白饱和水平或血清铁蛋白水平。

[0369] 典型地对患者血液的样品进行铁水平试验。铁水平试验测量血清中由转铁蛋白携带的铁的量。TIBC(总铁结合容量)试验测量当转铁蛋白完全饱和时血液将携带的铁量。由于转铁蛋白由肝脏产生,所以TIBC可以用来监测者肝功能和营养。转铁蛋白试验是血液中转铁蛋白(也称作运铁蛋白)水平的直接量度。可以通过血清铁水平除以TIBC计算转铁蛋白的饱和水平。铁蛋白试验测量血液中储存由身体稍后使用的铁的蛋白的水平。

[0370] 在此所述的iRNA治疗可以用来治疗下述个体,所述个体具有升高的铁水平,如可以由血清中的铁水平所指示,例如,计量为大于350 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、大于500 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、大于1000 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 或更高的铁水平。在一个实施例中,血清中升高的铁水平例如大于15、20、25或30mg/g干重。

[0371] 在此所述的iRNA治疗可以用来治疗下述个体,所述个体具有升高的铁蛋白水平,如可以由血清中升高的铁蛋白水平所指示,例如,计量为大于300 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、大于500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、大于1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、大于1500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、大于2000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、大于2500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 或3000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 或更高的铁蛋白水平。

[0372] 在此所述的iRNA治疗可以用来治疗下述个体,所述个体具有升高的铁水平,如可以由血清中升高的转铁蛋白水平所指示,例如,计量为大于400mg/dL、大于500mg/L、大于1000mg/dL或更高的转铁蛋白水平。

[0373] 在此所述的iRNA治疗可以用来治疗下述个体,所述个体具有适度升高的铁水平,如可以由适度升高的转铁蛋白饱和水平所指示,例如,40%、45%、或50%或更高的饱和水

平。此外,在此所述的治疗也可以用来在仅具有转铁蛋白饱和度少量升高的个体中防止升高的铁水平。本领域普通技术人员可以容易地在接受用如在此所述的iRNA治疗的受试者中监测转铁蛋白饱和水平并且测定到转铁蛋白饱和水平降低至少5%或10%。

[0374] 在此所述的iRNA治疗可以用来治疗下述个体,所述个体具有升高的铁水平,如可以由大于400 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、大于500 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 或大于1000 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 或更高的TIBC值所指示。

[0375] 在一些实施例中,需要用TMPRSS6 siRNA治疗的个体具有降低的血细胞比容水平、降低的血红蛋白水平、增加的红细胞分布宽度、增加的网织红细胞数目、降低的成熟红细胞数目、增加的不饱和铁结合容量、减少的无效红细胞生成、减少的髓外血细胞生成和/或降低的HAMP1表达水平。

[0376] 可以通过测定血糖(葡萄糖)水平或 α 胎蛋白水平,通过超声心动图(例如,以便检验心脏功能)、心电图(ECG)(例如,以便检查心脏的电活动)、成像试验(例如CT扫描,MRI和超声)和肝功能检验进一步监测患者。可以对肝脏活组织检查样品测量过量铁染色或铁浓度以确认肝损伤的程度,例如,肝病阶段。

[0377] 当疾病状态的一个或多个参数上存在统计显著的改善,或通过未出现恶化或未发展多种症状(其中它们否则将是预期的)时,治疗或预防作用是明显的。作为实例,疾病的可度量参数上至少10%和优选地至少20%、30%、40%、50%或更多的有利变化可以表示有效治疗。也可以使用如本领域已知的给定疾病的实验动物模型,判定给定iRNA药物或这种药物的配制品的功效。当使用实验动物模型时,在观察到标记或症状的统计显著减少时,证实治疗的功效。

[0378] 可替代地,该功效可以由疾病的严重性减低度量,如诊断领域技术人员基于临床上接受的病情严重性分级量表所确定。

[0379] 可以向患者给予治疗量的iRNA,例如0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg或2.5mg/kg的dsRNA。iRNA可以通过静脉内输注给予持续一段时间,例如持续5分钟、10分钟、15分钟、20分钟或25分钟时间。将给予重复,例如,基于定期,例如每两周(即,每双周)持续一个月、两个月、三个月、四个月或更长时间。在初始治疗方案后,可以基于更低频率给予治疗。例如,在每两周给予持续三个月后,给予可以每月重复一次,持续六个月或一年或更长。iRNA的给予可以降低例如患者的细胞、组织、血液、尿或其他区室中的TMPRSS6水平至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%或更多。

[0380] 在给予全剂量的iRNA之前,可以向患者给予更小的剂量,例如5%输注反应,并且对其监测副作用,例如变态反应或症状恶化。在另一个实例中,可以对患者监测不想要的免疫刺激性效应,例如增加的细胞因子(例如,TNF- α 或INF- α)水平。

[0381] 与升高的铁水平相关的许多失调是遗传性的。因此,可以通过取得家族史鉴定需要TMPRSS6 iRNA的患者。医疗服务提供者,例如医生、护士或家族成员,可以在开具或给予TMPRSS6 dsRNA之前取得家族史。也可以在给予TMPRSS6 dsRNA至患者之前,对患者进行DNA检验以鉴定TMPRSS6基因中的突变。例如,可以根据GenBank登录号CAB07442.1(GI:1890180,2008年10月23日记录,通过鉴定两个HFE(血色素沉着症)基因突变C282Y和H63D)确认遗传性血色素沉着症的诊断。

[0382] 由于对TMPRSS6表达的抑制性作用,根据本发明的组合物或从其中制备的药物组

合物可以提高生活质量。

[0383] 用于调节TMPRSS6基因表达的方法

[0384] 仍在另一个方面,本发明提供一种调节(例如,抑制或激活)哺乳动物中TMPRSS6基因表达的方法。

[0385] 在一个实施例中,该方法包括给予本发明中表征的组合物至哺乳动物,使得减少靶TMPRSS6基因的表达,例如延长的持续时间,例如,至少两天、三天、四天或更长,例如,一周、两周、三周或四周或更长。减少靶TMPRSS6基因表达的作用优选地导致体内铁吸收和/或动员的减少。减少的铁吸收或动员可以由观察到血清铁蛋白水平、血清或肝脏铁水平和/或血清转铁蛋白饱和水平降低表现出来。在一些实施例中,与治疗前水平相比,血清铁蛋白水平、血清或肝脏铁水平或血清转铁蛋白饱和水平的一个或多个降低至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、或至少60%或更多。在一些实施例中,与治疗前水平相比,血清铁蛋白水平降低至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、或至少60%或更多。

[0386] 在另一个实施例中,该方法包括给予如在此所述的组合物至哺乳动物,使得与未治疗的动物相比,增加靶TMPRSS6基因的表达例如,至少10%。在一些实施例中,TMPRSS6的激活在延长的持续期内发生,例如,至少两天、三天、四天或更多天,例如,一周、两周、三周、四周或更多周。不希望受理论约束,通过稳定TMPRSS6 mRNA转录物、与基因组中的启动子相互作用和/或抑制TMPRSS6表达的抑制剂,iRNA可以激活TMPRSS6表达。

[0387] 对于本发明中表征的方法和组合物有用的iRNA特异性靶向目标TMPRSS6基因的(初级或加工)RNA。使用iRNA抑制这些TMPRSS6基因表达的组合物和方法可以如本文中他处描述那样制备和实施。

[0388] 在一个实施例中,该方法包括给予含有iRNA的组合物,其中iRNA包括核苷酸序列,所述核苷酸序列与待治疗的哺乳动物的TMPRSS6基因的RNA转录物的至少一部分互补。当待治疗的生物是哺乳动物(例如人)时,该组合物可以通过本领域已知的任何手段给予,包括但不局限于口服、腹膜内或肠胃外途径,包括颅内(例如,心室内、实质内和鞘内)、静脉内、肌内、皮下、透皮、气道(气溶胶)、经鼻、直肠和局部(包括颊部和舌下)给予。在某些实施例中,通过静脉内输注或注射这些组合物。

[0389] 在一个方面,本发明涉及如下的实施方案。

[0390] 1.一种用于抑制TMPRSS6表达的双链核糖核酸(dsRNA),其中所述dsRNA包含一个有义链和一个反义链,该反义链包含与TMPRSS6转录物互补的一个区域,该区域包含与表2、3或4中列出的反义序列之一相差不多于3个核苷酸的至少15个连续核苷酸。

[0391] 2.如实施方案1所述的dsRNA,其中所述dsRNA包含至少一个修饰的核苷酸。

[0392] 3.如实施方案2所述的dsRNA,其中所述修饰的核苷酸的至少一个选自下组,该组由以下各项组成:2'-O-甲基修饰的核苷酸、包含5'-硫代磷酸酯基的核苷酸和与胆甾烯基衍生物或十二烷酸双癸酰胺基连接的末端核苷酸。

[0393] 4.如实施方案2所述的dsRNA,其中所述修饰的核苷酸选自下组,该组由以下各项组成:2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、锁定核苷酸、非碱基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、磷酸酯和包含非天然碱基的核苷酸。

- [0394] 5. 如实施方案1所述的dsRNA,其中这一互补区域是至少17个核苷酸长度。
- [0395] 6. 如实施方案1所述的dsRNA,其中这一互补区域是在19个和21个核苷酸长度之间。
- [0396] 7. 如实施方案1所述的dsRNA,其中这一互补区域是19个核苷酸长度。
- [0397] 8. 如实施方案1所述的dsRNA,其中每个链不多于30个核苷酸长度。
- [0398] 9. 如实施方案1所述的dsRNA,其中至少一个链包含至少1个核苷酸的3'突出端。
- [0399] 10. 如实施方案1所述的dsRNA,其中至少一个链包含至少2个核苷酸的3'突出端。
- [0400] 11. 如实施方案1所述的dsRNA,进一步包含一个配体。
- [0401] 12. 根据权利11要求所述的dsRNA,其中该配体与该dsRNA的有义链的3'端缀合。
- [0402] 13. 如实施方案1所述的dsRNA,其中这一互补区域由表2、3或4的反义序列之一组成。
- [0403] 14. 如实施方案1所述的dsRNA,其中该dsRNA包含由选自表2、3或4的有义链序列组成的一个有义链和由选自表2、3或4的反义序列组成的一个反义链。
- [0404] 15. 一种细胞,含有如实施方案1所述的dsRNA。
- [0405] 16. 一种用于抑制TMPRSS6基因表达的药物组合物,包含如实施方案1所述的dsRNA。
- [0406] 17. 如实施方案16所述的药物组合物,进一步包含一种脂质配制品。
- [0407] 18. 如实施方案17所述的药物组合物,其中该脂质配制品是一种SNALP或XTC配制品。
- [0408] 19. 一种抑制细胞中TMPRSS6表达的方法,该方法包括:
- [0409] a) 向该细胞引入如实施方案1所述的dsRNA;并且
- [0410] b) 将步骤a)产生的细胞维持一段足以实现TMPRSS6基因的mRNA转录物降解的时间,由此抑制细胞中TMPRSS6基因的表达。
- [0411] 20. 如实施方案19所述的方法,其中该TMPRSS6表达被抑制至少30%。
- [0412] 21. 一种治疗由TMPRSS6表达介导的失调的方法,包括向需要这种治疗的人给予治疗有效量的如实施方案1所述的dsRNA或如实施方案16-18所述的药物组合物。
- [0413] 22. 如实施方案21所述的方法,其中该人患有与血色素沉着症相关的失调。
- [0414] 23. 如实施方案21所述的方法,其中该人患有 β -地中海贫血。
- [0415] 24. 如实施方案21所述的方法,其中该人患有中间型 β -地中海贫血。
- [0416] 25. 如实施方案23所述的方法,其中向受试者给予该dsRNA造成该受试者的血清中铁下降至少10%。
- [0417] 26. 如实施方案21所述的方法,其中该dsRNA以0.01mg/kg-5mg/kg该受试者体重的浓度给予。
- [0418] 27. 一种编码dsRNA的至少一个链的载体,其中所述dsRNA包含编码TMPRSS6的mRNA的至少一部分互补的区域,其中所述dsRNA是30个或更少碱基对长度,并且其中所述dsRNA靶向所述mRNA用于切割。
- [0419] 28. 如实施方案27所述的载体,其中这一互补区域是至少15个核苷酸长度。
- [0420] 29. 如实施方案27所述的载体,其中这一互补区域是19个至21个核苷酸长度。
- [0421] 30. 一种细胞,包含如实施方案27所述的载体。

[0422] 31.如实施方案1所述的dsRNA,其中该dsRNA包含由选自下组的序列组成的一个有义链,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:455、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:524、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:494、SEQ ID NO:445、SEQ ID NO:592、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:540;以及由选自下组的序列组成的一个反义链,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:456、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:525、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:495、SEQ ID NO:446、SEQ ID NO:593、SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:541。

[0423] 除非另外限定,否则本文中所有的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。虽然与在此所述的那些方法和材料相似或等同的方法和材料可以用于实践或测试本发明中表征的iRNA和方法,但是以下描述合适的方法和材料。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用完整地并入。在矛盾的情况下,本说明书(包括定义)将居主导。此外,所述材料、方法和实例仅是说明性的并且不意在是限制性的。

[0424] 实例

[0425] 实例1.干扰RNA(iRNA)合成

[0426] 试剂来源

[0427] 在此不确切给出试剂来源的情况下,这类试剂可以从任何分子生物学试剂供应商以分子生物学应用的品质/纯度标准获得。

[0428] 寡核苷酸合成

[0429] 申请人已经使用若干不同方法产生在此所述的iRNA分子。本实例描述一种已经使用的方法。普通技术人员可以使用本领域已知的任何方法制备如在此所述的iRNA。

[0430] 寡核苷酸在AKTAoligopilot合成仪上合成。市售可控孔度玻璃固相支持物(dT-CPG, 500 Å, Prime Synthesis)和具有标准保护基的RNA磷酰亚胺、5'-O-二甲氧基三苯甲基-N6-苯甲酰基-2'-叔-丁基二甲基甲硅烷基-腺苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰基乙基磷酰亚胺、5'-O-二甲氧基三苯甲基-N4-乙酰基-2'-叔-丁基二甲基甲硅烷基-胞苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰基乙基磷酰亚胺、5'-O-二甲氧基三苯甲基-N2-异丁酰基-2'-叔-丁基二甲基甲硅烷基-鸟苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰基乙基磷酰亚胺和5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-叔-丁基二甲基甲硅烷基-尿苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰基乙基磷酰亚胺(Pierce Nucleic Acids Technologies)用于寡核苷酸合成。2'-F磷酰亚胺、5'-O-二甲氧基三苯甲基-N4-乙酰基-2'-氟-胞苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰基乙基-磷酰亚胺和5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-氟-尿苷-3'-O-N,N'-二异丙基-2-氰基乙基-磷酰亚胺购自(Promega公司)。全部磷酰亚胺以乙腈(CH₃CN)中的0.2M浓度使用,除了以10% THF/ANC(v/v)中的0.2M浓度使用的鸟苷之外。使用16分钟偶联/再循环时间。活化剂是5-乙基硫代四唑(0.75M, American International Chemicals公司);对于PO-氧化,使用碘/水/吡啶并且对于PS-氧化,使用2,6-卢剔啶(1:1v/v)中的PADS(2%)。

[0431] 3'-配体缀合的链使用含有相应配体的固相支持物合成。例如,从从羟脯氨酸-胆固醇磷酰亚胺实施在序列中引入胆固醇单元。胆固醇经6-氨基己酸酯键系留至反-4-羟脯氨酸,以获得羟脯氨酸-胆固醇部分。5'-端Cy-3和Cy-5.5(荧光团)标记的iRNA从购自Biosearch Technologies公司的相应Quasar-570(Cy-3)合成。通过使用适当保护的配体-磷酰亚胺结构单元实现配体与5'-端和或内部位置的缀合。在5-(乙基硫代)-1H-四唑活化

剂存在下,延长的15分钟使无水 CH_3CN 中的磷酰亚胺0.1M溶液偶联至固态支持物结合的寡核苷酸。使用标准碘-水如报道(1)那样,或通过用叔丁基过氧化氢/乙腈/水(10:87:3)处理,以10分钟氧化等待时间缀合寡核苷酸,实施核苷酸间亚磷酸酯氧化成磷酸酯。通过使用硫转移试剂例如DDTT(购自AM Chemicals公司)、PADS和或Beaucage试剂将氧化亚磷酸酯成硫代磷酸酯,引入硫代磷酸酯。自行合成胆固醇磷酰亚胺并且以二氯甲烷中的0.1M浓度使用。胆固醇磷酰亚胺的偶联时间是16分钟。

[0432] 脱保护I(核碱基脱保护)

[0433] 在完成合成后,将支持物转移至100mL玻璃瓶(VWR)。从载体切下寡核苷酸,同时用80mL乙醇-氨的混合物[氨:乙醇(3:1)]在55°C持续6.5小时使得碱基和磷酸酯基团脱保护。将瓶在冰上短暂冷却并且然后将乙醇-氨混合物过滤至一个新250-mL瓶。CPG用2×40mL份的乙醇/水(1:1v/v)洗涤。随后通过旋转蒸发器将混合物的体积缩减至约30mL。然后混合物在干冰上冷冻并在离心真空浓缩机上在真空下干燥。

[0434] 脱保护II(2'-TBDMS基团的移除)

[0435] 将干燥的残余物重悬于26mL的三乙胺、三乙胺三氟化氢($\text{TEA} \cdot 3\text{HF}$)或吡啶-HF和DMSO(3:4:6)中并且在60°C加热90分钟以除去在2'位置的叔-丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)。反应随后用50mL的20mM乙酸钠猝灭并且调节pH至6.5。将寡核苷酸储存在制冷器中直至纯化。

[0436] 分析

[0437] 在纯化之前通过高效液相色谱法(HPLC)分析寡核苷酸,并且缓冲剂和柱的选择取决于序列和或缀合的配体的性质。

[0438] HPLC纯化

[0439] 通过反相制备性HPLC纯化配体缀合的寡核苷酸。通过阴离子-交换HPLC在自行装填的TSK凝胶柱上纯化未缀合的寡核苷酸。缓冲剂是10% CH_3CN 中的20mM磷酸钠(pH 8.5)(缓冲剂A)和10% CH_3CN ,1M NaBr中的20mM磷酸钠(pH 8.5)(缓冲剂B)。将含有全长寡核苷酸的级分汇集、脱盐并冻干。将约0.150D的脱盐寡核苷酸稀释于水中至150 μL ,并随后吸取至CGE和LC/MS分析专用小瓶中。随后通过LC-ESMS和CGE分析化合物。

[0440] iRNA制备

[0441] 对于iRNA的一般制备,将等摩尔量的有义链和反义链在1xPBS中在95°C加热5min并且缓慢冷却至室温。通过HPLC分析证实双链体的完整性。

[0442] 使用标准命名和确切地表1缩写表示核酸序列。

[0443] 表1:核酸序列表示中使用的核苷酸单体的缩写。将当理解在寡核苷酸中存在时这些单体是由5'-3'-磷酸二酯键相互连接。

缩写	核苷酸
A	腺苷
C	胞苷
G	鸟苷
T	胸苷

[0444]

缩写	核苷酸
U	尿苷
N	任何核苷酸 (G、A、C、T 或 U)
a	2'-O-甲基腺苷
[0445] c	2'-O-甲基胞苷
g	2'-O-甲基鸟苷
u	2'-O-甲基尿苷
dT	2'-脱氧胸苷
s	硫代磷酸酯键

[0446] 实例2.TMPRSS6 siRNA设计

[0447] 转录物

[0448] 设计并且合成靶向TMPRSS6的siRNA。设计使用来自NCBI Refseq collection的人转录物(NM_153609.2、SEQ ID NO:1,图1)。

[0449] 将siRNA双链体设计成与TMPRSS6基因具有100%同一性。

[0450] 设计总计人TMPRSS6衍生的655种有义siRNA寡聚物和655种反义siRNA寡聚物。寡聚物呈现于表2中。额外的人TMPRSS6衍生的有义和反义siRNA寡聚物呈现于表3中。具有修饰的人TMPRSS6衍生的有义和反义siRNA寡聚物呈现于表4中。

[0451] 表2.人TMPRSS6 dsRNA的有义序列和反义链序列

5'碱基在转录物上的位置 (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	有义序列 (5'至3')	SEQ ID NO:	反义序列(5'至3')	SEQ ID NO:
36	CUCUGGUGCGAGCUG ACCU	9	AGGUCAGCUCGCACCA GAG	10
[0452] 46	AGCUGACCUGAGAUG CACU	11	AGUGCAUCUCAGGUCA GCU	12
72	UCUGUGAGCUGUCUC GGCA	13	UGCCGAGACAGCUCAC AGA	14
78	AGCUGUCUCGGCACC CACU	15	AGUGGGUGCCGAGACA GCU	16
79	GCUGUCUCGGCACCC ACUU	17	AAGUGGGUGCCGAGAC AGC	18
100	AGUCACUGCCGCCUG	19	ACAUCAGGCGGCAGUG	20

[0453]

5'碱基在转录物上的位置 (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	有义序列 (5'至3')	SEQ ID NO:	反义序列(5'至3')	SEQ ID NO:
	AUGU		ACU	
104	ACUGCCGCCUGAUGU UGUU	21	AACAACAUCAGGCGGC AGU	22
105	CUGCCGCCUGAUGUU GUUA	23	UAACAACAUCAGGCGG CAG	24
107	GCCGCCUGAUGUUGU UACU	25	AGUAACAACAUCAGGC GGC	26
110	GCCUGAUGUUGUUAC UCUU	27	AAGAGUAACAACAUCA GGC	28
124	CUCUCCACUCCAAA AGGA	29	UCCUUUUGGAGUGGAA GAG	30
131	ACUCCAAAAGGAUGC CCGU	31	ACGGGCAUCCUUUUGG AGU	32
233	GUGAGGACUCCAAGA GAAA	33	UUUCUCUUGGAGUCCU CAC	34
311	CUUCGGCGGGGGUGC UACU	35	AGUAGCACCCCCGCCG AAG	36
313	UCGGCGGGGGUGCUA CUCU	37	AGAGUAGCACCCCCGC CGA	38
316	GCGGGGGUGCUACUC UGGU	39	ACCAGAGUAGCACCCC CGC	40
318	GGGGGUGCUACUCUG GUAU	41	AUACCAGAGUAGCACC CCC	42
319	GGGGUGCUACUCUGG UAUU	43	AAUACCAGAGUAGCAC CCC	44
329	UCUGGUAUUUCCUAG GGUA	45	UACCCUAGGAAAUAAC AGA	46
331	UGGUAUUUCCUAGGG UACA	47	UGUACCCUAGGAAAUA CCA	48
332	GGUAUUUCCUAGGGU ACAA	49	UUGUACCCUAGGAAAU ACC	50
363	GGUCAGCCAGGUGUA CUCA	51	UGAGUACACCUGGCUG ACC	52
367	AGCCAGGUGUACUCA GGCA	53	UGCCUGAGUACACCUG GCU	54
375	GUACUCAGGCAGUCU GCGU	55	ACGCAGACUGCCUGAG UAC	56
377	ACUCAGGCAGUCUGC GUGU	57	ACACGCAGACUGCCUG AGU	58
380	CAGGCAGUCUGCGUG UACU	59	AGUACACGCAGACUGC CUG	60
382	GGCAGUCUGCGUGUA CUCA	61	UGAGUACACGCAGACU GCC	62
383	GCAGUCUGCGUGUAC UCAA	63	UUGAGUACACGCAGAC UGC	64

[0454]

5'碱基在转录物上的位置 (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	有义序列 (5'至 3')	SEQ ID NO:	反义序列(5'至 3')	SEQ ID NO:
384	CAGUCUGCGUGUACU CAAU	65	AUUGAGUACACGCAGA CUG	66
389	UGCGUGUACUCAAUC GCCA	67	UGGCGAUUGAGUACAC GCA	68
391	CGUGUACUCAAUCGC CACU	69	AGUGGCGAUUGAGUAC ACG	70
392	GUGUACUCAAUCGCC ACUU	71	AAGUGGCGAUUGAGUA CAC	72
394	GUACUCAAUCGCCAC UUCU	73	AGAAGUGGCGAUUGAG UAC	74
406	CACUUCUCCCAGGAU CUUA	75	UAAGAUCCUGGGAGAA GUG	76
418	GAUCUUACCCGCCGG GAAU	77	AUUCCCGGCCGGGUAAG AUC	78
420	UCUUACCCGCCGGGA AUCU	79	AGAUUCCCGGCCGGGUA AGA	80
421	CUUACCCGCCGGGAA UCUA	81	UAGAUUCCCGGCCGGGU AAG	82
423	UACCCGCCGGGAAUC UAGU	83	ACUAGAUUCCCGGCCGG GUA	84
427	CGCCGGGAAUCUAGU GCCU	85	AGGCACUAGAUUCCCG GCG	86
428	GCCGGGAAUCUAGUG CCUU	87	AAGGCACUAGAUUCCCG GGC	88
446	UCCGCAGUGAAACCG CCAA	89	UUGGCGGUUUCACUGC GGA	90
447	CCGCAGUGAAACCGC CAAA	91	UUUGGCGGUUUCACUG CGG	92
502	CGCCUGGGAACUUAC UACA	93	UGUAGUAAGUUCCCG GCG	94
503	GCCUGGGAACUUACU ACAA	95	UUGUAGUAAGUUCCCA GGC	96
505	CUGGGAACUUACUAC AACU	97	AGUUGUAGUAAGUUCC CAG	98
517	UACAACUCCAGCUCC GUCU	99	AGACGGAGCUGGAGUU GUA	100
518	ACAACUCCAGCUCCG UCUA	101	UAGACGGAGCUGGAGU UGU	102
520	AACUCCAGCUCCGUC UAUU	103	AAUAGACGGAGCUGGA GUU	104
541	UUUGGGGAGGGACCC CUCA	105	UGAGGGGUCCUCCCC AAA	106
550	GGACCCUCACCGUC UUCU	107	AGAAGCAGGUGAGGGG UCC	108
563	GCUUCUUCUGGUUCA	109	AGAAUGAACCAGAAGA	110

[0455]

5'碱基在转录物上的位置 (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	有义序列 (5'至 3')	SEQ ID NO:	反义序列(5'至 3')	SEQ ID NO:
	UUCU		AGC	
566	UCUUCUGGUUCAUUC UCCA	111	UGGAGAAUGAACCCAGA AGA	112
593	AGCACCGCCGGCUGA UGCU	113	AGCAUCAGCCGGCGGU GCU	114
680	UCCCCUACAGGGCCG AGUA	115	UACUCGGCCCUGUAGG GGA	116
683	CCUACAGGGCCGAGU ACGA	117	UCGUACUCGGCCCUGU AGG	118
686	ACAGGGCCGAGUACG AAGU	119	ACUUCGUACUCGGCCC UGU	120
689	GGGCCGAGUACGAAG UGGA	121	UCCACUUCGUACUCGG CCC	122
710	CCGAGGGCCUAGUGA UCCU	123	AGGAUCACUAGGCCCU CGG	124
735	CAGUGUGAAAGACAU AGCU	125	AGCUAUGUCUUUCACA CUG	126
759	GAAUCCACGCUGGG UUGU	127	ACAACCCAGCGUGGAA UUC	128
760	AAUCCACGCUGGGU UGUU	129	AACAACCCAGCGUGGA AUU	130
766	ACGCUGGGUUGUUAC CGCU	131	AGCGGUAACAACCCAG CGU	132
767	CGCUGGGUUGUUACC GCUA	133	UAGCGGUAACAACCCA GCG	134
769	CUGGGUUGUUACCGC UACA	135	UGUAGCGGUAACAACC CAG	136
772	GGUUGUUACCGCUAC AGCU	137	AGCUGUAGCGGUAACA ACC	138
776	GUUACCGCUACAGCU ACGU	139	ACGUAGCUGUAGCGGU AAC	140
872	AGGACCUCAUGCUC AACU	141	AGUUUGAGCAUGAGGU CCU	142
878	UCAUGCUCAAACUCC GGCU	143	AGCCGGAGUUUGAGCA UGA	144
970	AUCACCUCGGUGUAC GGCU	145	AGCCGUACACCGAGGU GAU	146
973	ACCUCGGUGUACGGC UGCA	147	UGCAGCCGUACACCGA GGU	148
1033	AUCAUGGCGGUCGUC UGGA	149	UCCAGACGACCGCCA GAU	150
1034	UCAUGGCGGUCGUCU GGAA	151	UUCAGACGACCGCCA UGA	152
1067	GCUACUACGACCCCU UCGU	153	ACGAAGGGGUCGUAGU AGC	154

[0456]

5'碱基在转录物上的位置 (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	有义序列 (5'至 3')	SEQ ID NO:	反义序列(5'至 3')	SEQ ID NO:
1091	CCGUGCAGCCGGUGG UCUU	155	AAGACCACCGGCUGCA CGG	156
1106	UCUUCAGGCCUGUG AAGU	157	ACUUCACAGGCCUGGA AGA	158
1114	GCCUGUGAAGUGAAC CUGA	159	UCAGGUUCACUUCACA GGC	160
1118	GUGAAGUGAACCGA CGCU	161	AGCGUCAGGUUCACUU CAC	162
1133	CGCUGGACAACAGGC UCGA	163	UCGAGCCUGUUGUCCA GCG	164
1135	CUGGACAACAGGCUC GACU	165	AGUCGAGCCUGUUGUC CAG	166
1162	GUCCUCAGCACCCCG UACU	167	AGUACGGGGUGCUGAG GAC	168
1163	UCCUCAGCACCCCGU ACUU	169	AAGUACGGGGUGCUGA GGA	170
1168	AGCACCCCGUACUUC CCCA	171	UGGGGAAGUACGGGGU GCU	172
1185	CAGCUACUACUCGCC CCAA	173	UUGGGGCGAGUAGUAG CUG	174
1186	AGCUACUACUCGCCC CAAA	175	UUUGGGGCGAGUAGUA GCU	176
1190	ACUACUCGCCCCAAA CCCA	177	UGGGUUUGGGGCGAGU AGU	178
1195	UCGCCCCAAACCCAC UGCU	179	AGCAGUGGGUUUGGGG CGA	180
1211	GCUCCUGGCACCUCA CGGU	181	ACCGUGAGGUGCCAGG AGC	182
1231	CCCUCUCUGGACUAC GGCU	183	AGCCGUAGUCCAGAGA GGG	184
1244	ACGGCUUGGCCUCU GGUU	185	AACCAGAGGGCCAAGC CGU	186
1245	CGGCTTGGCCCTCTGG TTT	187	AAACCAGAGGGCCAAG CCG	188
1247	GCUUGGCCUCUGGU UUGA	189	UCAAACCAGAGGGCCA AGC	190
1254	CCUCUGGUUUGAUGC CUAU	191	AUAGGCAUCAACCAG AGG	192
1285	CAGAAGUAUGAUUUG CCGU	193	ACGGCAAUCAUACUU CUG	194
1288	AAGUAUGAUUUGCCG UGCA	195	UGCACGGCAAUCAUA CUU	196
1292	AUGAUUUGCCGUGCA CCCA	197	UGGGUGCACGGCAAUA CAU	198
1306	ACCCAGGGCCAGUGG	199	UCGUCCACUGGCCUCG	200

[0457]

5'碱基在转录物上的位置 (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	有义序列 (5'至 3')	SEQ ID NO:	反义序列(5'至 3')	SEQ ID NO:
	ACGA		GGU	
1310	AGGGCCAGUGGACGA UCCA	201	UGGAUCGUCCACUGGC CCU	202
1312	GGCCAGUGGACGAUC CAGA	203	UCUGGAUCGUCCACUG GCC	204
1313	GCCAGUGGACGAUCC AGAA	205	UUCUGGAUCGUCCACU GGC	206
1360	CAGCCCUACGCCGAG AGGA	207	UCCUCUCGGCGUAGGG CUG	208
1443	CGGUGUGCGGGUGCA CUAU	209	AUAGUGCACCCGCACA CCG	210
1447	GUGC GGGUGCACUAU GGCU	211	AGCCAUAGUGCACCCG CAC	212
1448	UGC GGGUGCACUAUG GCUU	213	AAGCCAUAGUGCACCC GCA	214
1451	GGGUGCACUAUGGCU UGUA	215	UACAAGCCAUAGUGCA CCC	216
1454	UGCACUAUGGCUUGU ACAA	217	UUGUACAAGCCAUAGU GCA	218
1486	UGCCUGGAGAGUUC CUCU	219	AGAGGAACUCUCCAGG GCA	220
1565	UGGAUGAGAGAAACU GCGU	221	ACGCAGUUUCUCUCAU CCA	222
1611	GGACAGCACAUGCAU CUCA	223	UGAGAUGCAUGUGCUG UCC	224
1613	ACAGCACAUGCAUCU CACU	225	AGUGAGAUGCAUGUGC UGU	226
1634	CCAAGGUCUGUGAUG GGCA	227	UGCCCAUCACAGACCU UGG	228
1646	AUGGGCAGCCUGAUU GUCU	229	AGACAAUCAGGCUGCC CAU	230
1649	GGCAGCCUGAUUGUC UCAA	231	UUGAGACAAUCAGGCU GCC	232
1654	CCUGAUUGUCUCAAC GGCA	233	UGCCGUUGAGACAAUC AGG	234
1662	UCUCAACGGCAGCGA CGAA	235	UUCGUCGCUGCCGUUG AGA	236
1687	UGCCAGGAAGGGGUG CCAU	237	AUGGCACCCCUUCCUG GCA	238
1696	GGGGUGCCAUGUGGG ACAU	239	AUGUCCCACAUGGCAC CCC	240
1699	GUGCCAUGUGGGACA UUCA	241	UGAAUGUCCCACAUGG CAC	242
1703	CAUGUGGGACA UUCA CCUU	243	AAGGUGAAUGUCCCAC AUG	244

[0458]

5'碱基在转录物上的位置 (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	有义序列 (5'至 3')	SEQ ID NO:	反义序列(5'至 3')	SEQ ID NO:
1723	CAGUGUGAGGACCGG AGCU	245	AGCUCCGGUCCUCACA CUG	246
1745	UGAAGAAGCCCAACC CGCA	247	UGCGGGUUGGGCUUCU UCA	248
1749	GAAGCCCAACCCGCA GUGU	249	ACACUGCGGGUUGGGC UUC	250
1830	CCCCUCCAGCCGCAU UGUU	251	AACAAUGCGGCUGGAG GGG	252
1897	CAGGUUCGGGGUCGA CACA	253	UGUGUCGACCCCGAAC CUG	254
1898	AGGUUCGGGGUCGAC ACAU	255	AUGUGUCGACCCCGAA CCU	256
1900	GUUCGGGGUCGACAC AUCU	257	AGAUGUGUCGACCCCG AAC	258
1935	CGCUGACCGCUGGGU GAUA	259	UAUCACCCAGCGGUCA GCG	260
1936	GCUGACCGCUGGGUG AUAA	261	UUAUCACCCAGCGGUC AGC	262
1938	UGACCGCUGGGUGAU AACA	263	UGUUAUCACCCAGCGG UCA	264
1941	CCGUGGGUGAUAAAC AGCU	265	AGCUGUUAUCACCCAG CGG	266
1997	UGCUGUGGACCGUGU UCCU	267	AGGAACACGGUCCACA GCA	268
2023	GUGUGGCAGAACUCG CGCU	269	AGCGCGAGUUCUGCCA CAC	270
2078	UCCUGCACCCGUACC ACGA	271	UCGUGGUACGGGUGCA GGA	272
2079	CCUGCACCCGUACCA CGAA	273	UUCGUGGUACGGGUGC AGG	274
2081	UGCACCCGUACCACG AAGA	275	UCUUCGUGGUACGGGU GCA	276
2186	CGCGCUCCACUUCU UCGA	277	UCGAAGAAGUGGGAGC GCG	278
2209	GGCCUGCACUGCUGG AUUA	279	UAAUCCAGCAGUGCAG GCC	280
2215	CACUGCUGGAUUACG GGCU	281	AGCCCGUAAUCCAGCA GUG	282
2283	GGAUGUGCAGUUGAU CCCA	283	UGGGAUCAACUGCACA UCC	284
2311	UGCAGCGAGGUCUAU CGCU	285	AGCGAUAGACCUCGCU GCA	286
2312	GCAGCGAGGUCUAUC GCUA	287	UAGCGAUAGACCUCGC UGC	288
2315	GCGAGGUCUAUCGCU	289	UGGUAGCGAUAGACCU	290

[0459]

5'碱基在转录物上的位置 (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	有义序列 (5'至 3')	SEQ ID NO:	反义序列(5'至 3')	SEQ ID NO:
	ACCA		CGC	
2320	GUCUAUCGCUACCAG GUGA	291	UCACCUGGUAGCGAUA GAC	292
2333	AGGUGACGCCACGCA UGCU	293	AGCAUGCGUGGCGUCA CCU	294
2335	GUGACGCCACGCAUG CUGU	295	ACAGCAUGCGUGGCGU CAC	296
2337	GACGCCACGCAUGCU GUGU	297	ACACAGCAUGCGUGGC GUC	298
2470	GGCUGUGGCCGGCCU AACU	299	AGUUAGGCCGGCCACA GCC	300
2471	GCUGUGGCCGGCCUA ACUA	301	UAGUUAGGCCGGCCAC AGC	302
2473	UGUGGCCGGCCUAAC UACU	303	AGUAGUUAGGCCGGCC ACA	304
2480	GGCCUAACUACUUCG GCGU	305	ACGCCGAAGUAGUUAG GCC	306
2482	CCUAACUACUUCGGC GUCU	307	AGACGCCGAAGUAGUU AGG	308
2483	CUAACUACUUCGGCG UCUA	309	UAGACGCCGAAGUAGU UAG	310
2485	AACUACUUCGGCGUC UACA	311	UGUAGACGCCGAAGUA GUU	312
2501	ACACCCGCAUCACAG GUGU	313	ACACCUGUGAUGCGGG UGU	314
2506	CGCAUCACAGGUGUG AUCA	315	UGAUCACACCUGUGAU GCG	316
2525	GCUGGAUCCAGCAAG UGGU	317	ACCACUUGCUGGAUCC AGC	318
2551	GGAACUGCCCCCUG CAA	319	UUUGCAGGGGGGCAGU UCC	320
2671	AGGAGGUGGCAUCUU GUCU	321	AGACAAGAUGCCACCU CCU	322
2674	AGGUGGCAUCUUGUC UCGU	323	ACGAGACAAGAUGCCA CCU	324
2678	GGCAUCUUGUCUCGU CCCU	325	AGGGACGAGACAAGAU GCC	326
2680	CAUCUUGUCUCGUCC CUGA	327	UCAGGGACGAGACAAG AUG	328
2681	AUCUUGUCUCGUCCC UGAU	329	AUCAGGGACGAGACAA GAU	330
2739	CAGCUGGGGGUCAAG ACGU	331	ACGUCUUGACCCCCAG CUG	332
2744	GGGGUCAAGACGUC CCCU	333	AGGGGACGUCUUGACC CCC	334

5'碱基在转录物上的位置 (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	有义序列 (5'至 3')	SEQ ID NO:	反义序列(5'至 3')	SEQ ID NO:
2746	GGGUCAAGACGUCCC CUGA	335	UCAGGGGACGUCUUGA CCC	336
2825	CCACUGCUGCCUAAU GCAA	337	UUGCAUUAGGCAGCAG UGG	338
2829	UGCUGCCUAAUGCAA GGCA	339	UGCCUUGCAUUAGGCA GCA	340
2835	CUAAUGCAAGGCAGU GGCU	341	AGCCACUGCCUUGCAU UAG	342
2857	CAGCAAGAAUGCUGG UUCU	343	AGAACCAGCAUUCUUG CUG	344
2894	GAGGUGCGCCCCACU CUGU	345	ACAGAGUGGGGCGCAC CUC	346
2958	CUUCGGAAGCCCCUG GUCU	347	AGACCAGGGGCUUCCG AAG	348
2960	UCGGAAGCCCCUGGU CUAA	349	UUAGACCAGGGGCUUC CGA	350
2962	GGAAGCCCCUGGUCU AACU	351	AGUUAGACCAGGGGCU UCC	352
2963	GAAGCCCCUGGUCUA ACUU	353	AAGUUAGACCAGGGGC UUC	354
2968	CCUGGUCUAACUUG GGAU	355	AUCCAAGUUAGACCA GGG	356
2970	CUGGUCUAACUUGGG AUCU	357	AGAUCCCAAGUUAGAC CAG	358
2975	CUAACUUGGGAUCUG GGAA	359	UUCCCAGAUCCCAAGU UAG	360
3006	CCAUCGGAGGGGACC CUCA	361	UGAGGGUCCCCUCCGA UGG	362
3045	UGGGCCUGCUGCCAC UGUA	363	UACAGUGGCAGCAGGC CCA	364
3046	GGGCCUGCUGCCACU GUAA	365	UUACAGUGGCAGCAGG CCC	366
3052	GCUGCCACUGUAAGC CAA	367	UUUGGCUUACAGUGGC AGC	368
3056	CCACUGUAAGCCAAA AGGU	369	ACCUUUUGGCUUACAG UGG	370
3071	AGGUGGGGAAGUCCU GACU	371	AGUCAGGACUCCCCA CCU	372
3174	GAAUAAAGCUGCCUG AUCA	373	UGAUCAGGCAGCUUUA UUC	374
3175	AAUAAAGCUGCCUGA UCAA	375	UUGAUCAGGCAGCUUU AUU	376
3180	AGCUGCCUGAUCAAA AAAA	377	UUUUUUUGAUCAGGCA GCU	378

[0460]

[0461] 表3.人TMPRSS6 dsRNA的未修饰的有义链和反义链序列

[0462]

双链体 ID	SEQ ID NO.: (有义)	有义 Trans 序列	在 NM_15 3609.2 中的位置	在 NM_15 3609.2 中的位置	SEQ ID NO.: (反义)	反义 Tran 序列
AD-46230.1	43	GGGGUGCUACUC UGGUAUU	319	319-337	44	AAUACCAGAGU AGCACCCC
AD-46231.1	111	UCUUCUGGUUCA UUCUCCA	566	566-584	112	UGGAGAAUGAA CCAGAAGA
AD-46232.1	131	ACGCUGGGUUG UUACCGCU	766	766-784	132	AGCGGUAACAAC CCAGCGU
AD-46233.1	193	CAGAAGUAUGA UUUGCCGU	1285	1285-1303	194	ACGGCAAUAUCAU ACUUCUG
AD-46234.1	259	CGCUGACCGCUG GGUGAUA	1935	1935-1953	260	UAUCACCCAGCG GUCAGCG
AD-46235.1	45	UCUGGUAUUUCC UAGGGUA	329	329-347	46	UACCCUAGGAAA UACCAGA
AD-46236.1	117	CCUACAGGGCCG AGUACGA	683	683-701	118	UCGUACUCGGCC CUGUAGG
AD-46237.1	133	CGCUGGGUUGU UACCGCUA	767	767-785	134	UAGCGGUAACA ACCCAGCG
AD-46238.1	203	GGCCAGUGGACG AUCCAGA	1312	1312-1330	204	UCUGGAUCGUCC ACUGGCC
AD-46239.1	263	UGACCGCUGGGU GAUAACA	1938	1938-1956	264	UGUUAUCACCCA GCGGUCA
AD-46240.1	51	GGUCAGCCAGGU GUACUCA	363	363-381	52	UGAGUACACCUG GCUGACC
AD-46241.1	379	CUACAGGGCCGA GUACGAA	684	684-702	380	UUCGUACUCGGC CCUGUAG

[0463]

AD-46242.1	135	CUGGGUUGUUA CCGCUACA	769	769- 787	136	UGUAGCGGUAA CAACCCAG
AD-46243.1	217	UGCACUAUGGCU UGUACAA	1454	1454- 1472	218	UUGUACAAGCCA UAGUGCA
AD-46244.1	604	CCUGGAGAGGU GUCCUUCA	2044	2044- 2062	605	UGAAGGACACCU CUCCAGG
AD-46244.2	604	CCUGGAGAGGU GUCCUUCA	2044	2044- 2062	605	UGAAGGACACCU CUCCAGG
AD-46245.1	53	AGCCAGGUGUAC UCAGGCA	367	367- 385	54	UGCCUGAGUACA CCUGGCU
AD-46246.1	119	ACAGGGCCGAGU ACGAAGU	686	686- 704	120	ACUUCGUACUCG GCCUGU
AD-46247.1	137	GGUUGUUACCGC UACAGCU	772	772- 790	138	AGCUGUAGCGG UAACAACC
AD-46248.1	381	UGUGAUGGGGU CAAGGACU	1534	1534- 1552	382	AGUCCUUGACCC CAUCACA
AD-46249.1	383	CUGGAGAGGUG UCCUUCAA	2045	2045- 2063	384	UUGAAGGACACC UCUCCAG
AD-46250.1	89	UCCGCAGUGAAA CCGCCAA	446	446- 464	90	UUGGCGGUUUC ACUGCGGA
AD-46251.1	121	GGGCCGAGUACG AAGUGGA	689	689- 707	122	UCCACUUCGUAC UCGGCCC
AD-46252.1	385	GGACCGACUGGC CAUGUAU	921	921- 939	386	AUACAUGGCCAG UCGGUCC
AD-46253.1	606	CAACGGCCUGGA UGAGAGA	1557	1557- 1575	607	UCUCUCAUCCAG GCCGUUG
AD-46253.2	606	CAACGGCCUGGA UGAGAGA	1557	1557- 1575	607	UCUCUCAUCCAG GCCGUUG
AD-46254.1	387	AGUUGAUCCCAC AGGACCU	2291	2291- 2309	388	AGGUCCUGUGG GAUCAACU

[0464]

AD-46255.1	91	CCGCAGUGAAAC CGCCAAA	447	447-465	92	UUUGGCGGUUU CACUGCGG
AD-46256.1	123	CCGAGGGCCUAG UGAUCCU	710	710-728	124	AGGAUCACUAG GCCUCGG
AD-46257.1	169	UCCUCAGCACCC CGUACUU	1163	1163-1181	170	AAGUACGGGGU GCUGAGGA
AD-46258.1	253	CAGGUUCGGGG UCGACACA	1897	1897-1915	254	UGUGUCGACCCC GAACCUG
AD-46259.1	293	AGGUGACGCCAC GCAUGCU	2333	2333-2351	294	AGCAUGCGUGGC GUCACCU
AD-46260.1	389	AAACCGCCAAAG CCCAGAA	455	455-473	390	UUCUGGGCUUU GGCGGUUU
AD-46261.1	125	CAGUGUGAAAG ACAUAGCU	735	735-753	126	AGCUAUGUCUU UCACACUG
AD-46262.1	183	CCCUCUCUGGAC UACGGCU	1231	1231-1249	184	AGCCGUAGUCCA GAGAGGG
AD-46263.1	257	GUUCGGGGUCG ACACAUCU	1900	1900-1918	258	AGAUGUGUCGA CCCCGAAC
AD-46264.1	391	UGUGUGCCGGCU ACCGCAA	2351	2351-2369	392	UUGCGGUAGCCG GCACACA
AD-46265.1	109	GCUUCUUCUGGU UCAUUCU	563	563-581	110	AGAAUGAACCA GAAGAAGC
AD-46266.1	393	AUUCCACGCUGG GUUGUUA	761	761-779	394	UAACAACCCAGC GUGGAAU
AD-46267.1	185	ACGGCUUGGCC UCUGGUU	1244	1244-1262	186	AACCAGAGGGCC AAGCCGU
AD-46268.1	395	UCGCUGACCGCU GGGUGAU	1934	1934-1952	396	AUCACCCAGCGG UCAGCGA
AD-46269.1	608	AGUGGUGACCU GAGGAACU	2538	2538-2556	609	AGUUCCUCAGGU CACCACU

[0465]

AD-46269.2	608	AGUGGUGACCU GAGGAACU	2538	2538- 2556	609	AGUUCCUCAGGU CACCACU
AD-46270.1	397	CAAGCAGGGGG ACAAGUAU	2612	2612- 2630	398	AUACUUGUCCCC CUGCUUG
AD-46271.1	399	UGAUGUCUGCUC CAGUGAU	2696	2696- 2714	400	AUCACUGGAGCA GACAUCA
AD-46272.1	359	CUAACUUGGGA UCUGGGAA	2975	2975- 2993	360	UUCCCAGAUCCC AAGUUAG
AD-46273.1	47	UGGUAUUUCCU AGGGUACA	331	331- 349	48	UGUACCCUAGGA AAUACCA
AD-46273.2	47	UGGUAUUUCCU AGGGUACA	331	331- 349	48	UGUACCCUAGGA AAUACCA
AD-46273.3	47	UGGUAUUUCCU AGGGUACA	331	331- 349	48	UGUACCCUAGGA AAUACCA
AD-46274.1	401	GAGGUGUCCUUC AAGGUGA	2050	2050- 2068	402	UCACCUUGAAGG ACACCUC
AD-46276.1	403	AAGCAGGGGGA CAAGUAUU	2613	2613- 2631	404	AAUACUUGUCCC CCUGCUU
AD-46277.1	331	CAGCUGGGGGUC AAGACGU	2739	2739- 2757	332	ACGUCUUGACCC CCAGCUG
AD-46278.1	405	CUUGGGAUCUG GGAAUGGA	2979	2979- 2997	406	UCCAUUCCCAGA UCCCAAG
AD-46279.1	407	GGUAUUUCCUA GGGUACAA	332	332- 350	408	UUGUACCCUAGG AAAUACC
AD-46280.1	409	GGCUACCGCAAG GGCAAGA	2359	2359- 2377	410	UCUUGCCCUUGC GGUAGCC
AD-46282.1	411	GCAGGGGGACA AGUAUUCU	2615	2615- 2633	412	AGAAUACUUGU CCCCCUGC
AD-46283.1	413	GCUCAGCAGCAA GAAUGCU	2851	2851- 2869	414	AGCAUUCUUGCU GCUGAGC

[0466]

AD-46284.1	415	UUGGGAUCUGG GAAUGGAA	2980	2980- 2998	416	UUCCAUCCCCAG AUCCTAA
AD-46285.1	417	CCAAAGCCCAGA AGAUGCU	461	461- 479	418	AGCAUCUUCUGG GCUUUGG
AD-46286.1	419	GCUACCGCAAGG GCAAGAA	2360	2360- 2378	420	UUCUUGCCCUUG CGGUAGC
AD-46286.2	419	GCUACCGCAAGG GCAAGAA	2360	2360- 2378	420	UUCUUGCCCUUG CGGUAGC
AD-46288.1	423	UGGUGGCAGGA GGUGGCAU	2664	2664- 2682	424	AUGCCACCUCCU GCCACCA
AD-46289.1	425	CCCACUCUGUAC AGAGGCU	2903	2903- 2921	426	AGCCUCUGUACA GAGUGGG
AD-46290.1	427	CUCACAGCCCAG ACCCUCA	3128	3128- 3146	428	UGAGGGUCUGG GCUGUGAG
AD-46291.1	429	CCUCUCUGGACU ACGGCUU	1232	1232- 1250	430	AAGCCGUAGUCC AGAGAGG
AD-46293.1	431	GUGGCAGGAGG UGGCAUCU	2666	2666- 2684	432	AGAUGCCACCUC CUGCCAC
AD-46294.1	433	UUCGGAAGCCCC UGGUCUA	2959	2959- 2977	434	UAGACCAGGGGC UUCCGAA
AD-46295.1	435	AGCUCAGCUGCC CUUUGGA	3157	3157- 3175	436	UCCAAAGGGCAG CUGAGCU
AD-46296.1	437	GGCCUGGAUGA GAGAAACU	1561	1561- 1579	438	AGUUUCUCUCAU CCAGGCC
AD-46297.1	439	UGGCAGGAGGU GGCAUCUU	2667	2667- 2685	440	AAGAUGCCACCU CCUGCCA
AD-46298.1	349	UCGGAAGCCCCU GGUCUAA	2960	2960- 2978	350	UUAGACCAGGG GCUUCCGA
AD-46299.1	421	GCUCAGCUGCCC UUUGGAA	3158	3158- 3176	422	UCCAAAGGGCA GCUGAGC

[0467]

AD-46299.2	421	GCUCAGCUGCCC UUUGGAA	3158	3158-3176	422	UCCCAAAGGGCA GCUGAGC
AD-46300.1	441	ACUGUGACUGU GGCCUCCA	1808	1808-1826	442	UGGAGGCCACAG UCACAGU
AD-46301.1	321	AGGAGGUGGCA UCUUGUCU	2671	2671-2689	322	AGACAAGAUGCC ACCUCCU
AD-46302.1	443	CCCCUGGUCUAA CUUGGGA	2967	2967-2985	444	UCCCAAGUUAGA CCAGGGG
AD-46303.1	445	UCAGCUGCCCUU UGGAAUA	3160	3160-3178	446	UAUUCCAAAGG GCAGCUGA
AD-46304.1	447	UCGGGGUCGACA CAUCUGU	1902	1902-1920	448	ACAGAUGUGUC GACCCCGA
AD-46305.1	449	GUCCCUGAUGUC UGCUGCA	2691	2691-2709	450	UGGAGCAGACA UCAGGGAC
AD-46306.1	355	CCCUGGUCUAAC UUGGGAU	2968	2968-2986	356	AUCCCAAGUUAG ACCAGGG
AD-46307.1	610	CAGCUGCCCUUU GGAAUAA	3161	3161-3179	611	UUAUUCCAAAG GGCAGCUG
AD-46307.2	610	CAGCUGCCCUUU GGAAUAA	3161	3161-3179	611	UUAUUCCAAAG GGCAGCUG
AD-46308.1	451	UCAUCGCUGACC GCUGGGU	1931	1931-1949	452	ACCCAGCGGUCA GCGAUGA

[0468] 表4.人TMPRSS6 dsRNA的修饰的有义和反义链序列

[0469]

双链体 ID	SEQ ID NO.: (有义)	有义序列	在 NM_15 3609.2 中的位置	在 NM_15 3609.2 中的位置	SEQ ID NO.: (反义)	反义序列
AD-	453	GGGGuGcuAcucuG	319	319-	454	AAuACcAGAGuA

[0470]

46230.1		GuAuudTsdT		337		GcACCCcdTsdT
AD-46231.1	455	ucuucuGGuucAuucuccAdTsdT	566	566-584	456	UGGAGAAUGAA CcAGAAGAdTsdT
AD-46232.1	457	AcGcuGGGuuGuuAccGcudTsdT	766	766-784	458	AGCGGuAAcAAC CcAGCGUdTsdT
AD-46233.1	459	cAGAAGuAuGAuuuGccGudTsdT	1285	1285-1303	460	ACGGcAAAUCuAu ACUUCUGdTsdT
AD-46234.1	461	cGcuGAccGcuGGGuAuAdTsdT	1935	1935-1953	462	uAUcACCcAGCGG UcAGCGdTsdT
AD-46235.1	463	ucuGGuAuuuuccuAGGGuAdTsdT	329	329-347	464	uACCCuAGGAAA uACcAGAdTsdT
AD-46236.1	465	ccuAcAGGGccGAGuAcGAdTsdT	683	683-701	466	UCGuACUCGGCC CUGuAGGdTsdT
AD-46237.1	467	cGcuGGGuuGuuAccGcuAdTsdT	767	767-785	468	uAGCGGuAAcAACcAGCGdTsdT
AD-46238.1	469	GGccAGuGGAcGAuccAGAdTsdT	1312	1312-1330	470	UCUGGAUCGUCc ACUGGCCdTsdT
AD-46239.1	471	uGAccGcuGGGuGAuAAcAdTsdT	1938	1938-1956	472	UGUuAUcACCcAGCGUcAdTsdT
AD-46240.1	473	GGucAGccAGGuGuAcucAdTsdT	363	363-381	474	UGAGuAcACCUGGCUGACCdTsdT
AD-46241.1	475	cuAcAGGGccGAGuAcGAAdTsdT	684	684-702	476	UUCGuACUCGGCCUGuAGdTsdT
AD-46242.1	478	cuGGGuuGuuAccGcuAcAdTsdT	769	769-787	479	UGuAGCGGuAAcAACCcAGdTsdT
AD-46243.1	480	uGcAcuAuGGcuuGuAcAAdTsdT	1454	1454-1472	481	UUGuAcAAGCcAuAGUGcAdTsdT
AD-46244.1	482	ccuGGAGAGGuGuccuucAdTsdT	2044	2044-2062	483	UGAAGGAcACCUCUCcAGGdTsdT
AD-482	482	ccuGGAGAGGuGu	2044	2044-	483	UGAAGGAcACCU

[0471]

46244.2		ccuucAdTsdT		2062		CUCcAGGdTsdT
AD- 46245.1	484	AGccAGGuGuAcuc AGGcAdTsdT	367	367- 385	485	UGCCUGAGuAcA CCUGGCuTsdT
AD- 46246.1	486	AcAGGGccGAGuA cGAAGudTsdT	686	686- 704	487	ACUUCGuACUCG GCCCUGuTsdT
AD- 46247.1	488	GGuuGuuAccGcuA cAGcudTsdT	772	772- 790	489	AGCUGuAGCGGu AAcAACCdTsdT
AD- 46248.1	490	uGuGAuGGGGucA AGGAcudTsdT	1534	1534- 1552	491	AGUCCUUGACCC cAUcAcAdTsdT
AD- 46249.1	492	cuGGAGAGGuGuc cuucAAdTsdT	2045	2045- 2063	493	UUGAAGGAcACC UCUCcAGdTsdT
AD- 46250.1	494	uccGcAGuGAAAcc GccAAdTsdT	446	446- 464	495	UUGGCGGUUuAc CUGCGGAdTsdT
AD- 46251.1	496	GGGccGAGuAcGA AGuGGAdTsdT	689	689- 707	497	UCcACUUCGuAC UCGGCCdTsdT
AD- 46252.1	498	GGAccGAcuGGccA uGuAudTsdT	921	921- 939	499	AuAcAUGGCcAG UCGGUCCdTsdT
AD- 46253.1	500	cAAcGGccuGGAu GAGAGAdTsdT	1557	1557- 1575	501	UCUCUcAUCcAG GCCGUUGdTsdT
AD- 46253.2	500	cAAcGGccuGGAu GAGAGAdTsdT	1557	1557- 1575	501	UCUCUcAUCcAG GCCGUUGdTsdT
AD- 46254.1	502	AGuuGAucccAcAG GAccudTsdT	2291	2291- 2309	503	AGGUCCUGUGG GAUcAACUdTsdT
AD- 46255.1	504	ccGcAGuGAAAccG ccAAAdTsdT	447	447- 465	505	UUUGGCGGUUuAc ACUGCGGdTsdT
AD- 46256.1	506	ccGAGGGccuAGu GAuccudTsdT	710	710- 728	507	AGGAUcACuAGG CCCUCGGdTsdT
AD- 46257.1	508	uccucAGcAccccGu AcuudTsdT	1163	1163- 1181	509	AAGuACGGGGUG CUGAGGAdTsdT
AD- 46258.1	510	cAGGuucGGGGuc	1897	1897-	511	UGUGUCGACCCC

[0472]

46258.1		GAcAcAdTsdT		1915		GAACCUGdTsdT
AD-46259.1	512	AGGuGAcGccAcGc AuGcudTsdT	2333	2333- 2351	513	AGcAUGCGUGGC GUcACCUdTsdT
AD-46260.1	514	AAAccGccAAAGcc cAGAAdTsdT	455	455- 473	515	UUCUGGGCUUU GGCGGUUUdTsdT
AD-46261.1	516	cAGuGuGAAAGAc AuAGcudTsdT	735	735- 753	517	AGCuAUGUCUUU cAcACUGdTsdT
AD-46262.1	518	cccucucuGGAcuAc GGcudTsdT	1231	1231- 1249	519	AGCCGuAGUCcA GAGAGGGdTsdT
AD-46263.1	520	GuucGGGGucGAc AcAucudTsdT	1900	1900- 1918	521	AGAUGUGUCGA CCCCGAACdTsdT
AD-46264.1	522	uGuGuGccGGcuAc cGcAAdTsdT	2351	2351- 2369	523	UUGCGGuAGCCG GcAcAcAdTsdT
AD-46265.1	524	GcuucuucuGGuucA uucudTsdT	563	563- 581	525	AGAAUGAACcAG AAGAAGCdTsdT
AD-46266.1	526	AuuccAcGcuGGGu uGuuAdTsdT	761	761- 779	527	uAAcAACcAGCG UGGAAUdTsdT
AD-46267.1	528	AcGGcuuGGccucu GGuudTsdT	1244	1244- 1262	529	AACcAGAGGGCc AAGCCGUdTsdT
AD-46268.1	530	ucGcuGAccGcuGG GuGAudTsdT	1934	1934- 1952	531	AUcACCcAGCGG UcAGCGAdTsdT
AD-46269.1	532	AGuGGuGAccuGA GGAAcudTsdT	2538	2538- 2556	533	AGUUCCUcAGGU cACcACUdTsdT
AD-46269.2	532	AGuGGuGAccuGA GGAAcudTsdT	2538	2538- 2556	533	AGUUCCUcAGGU cACcACUdTsdT
AD-46270.1	534	cAAGcAGGGGGA cAAGuAudTsdT	2612	2612- 2630	535	AuACUUGUCCCC CUGCUUGdTsdT
AD-46271.1	536	uGAuGucuGcuccA GuGAudTsdT	2696	2696- 2714	537	AUcACUGGAGcA GAcAUcAdTsdT
AD-46271.1	538	cuAAcuuGGGAucu	2975	2975-	539	UUCCcAGAUCcC

[0473]

46272.1		GGGAAAdTsdT		2993		AAGUuAGdTsdT
AD-46273.1	540	uGGuAuuuccuAGG GuAcAdTsdT	331	331-349	541	UGuACCCuAGGA AAuACcAdTsdT
AD-46273.2	540	uGGuAuuuccuAGG GuAcAdTsdT	331	331-349	541	UGuACCCuAGGA AAuACcAdTsdT
AD-46273.3	540	uGGuAuuuccuAGG GuAcAdTsdT	331	331-349	541	UGuACCCuAGGA AAuACcAdTsdT
AD-46274.1	542	GAGGuGuccuucAA GGuGAdTsdT	2050	2050-2068	543	UcACCUUGAAGG AcACCUCdTsdT
AD-46276.1	544	AAGcAGGGGGAc AAGuAuudTsdT	2613	2613-2631	545	AAuACUUGUCCC CCUGCUUdTsdT
AD-46277.1	546	cAGcuGGGGGucA AGAcGudTsdT	2739	2739-2757	547	ACGUCUUGACCC CcAGCUGdTsdT
AD-46278.1	548	cuuGGGAucuGGG AAuGGAdTsdT	2979	2979-2997	549	UCcAUUCCcAGA UCCcAAGdTsdT
AD-46279.1	550	GGuAuuuccuAGGG uAcAAdTsdT	332	332-350	551	UUGuACCCuAGG AAuACCdTsdT
AD-46280.1	552	GGcuAccGcAAGG GcAAGAdTsdT	2359	2359-2377	553	UCUUGCCCUUGC GGuAGCCdTsdT
AD-46282.1	554	GcAGGGGGAcAA GuAuucudTsdT	2615	2615-2633	555	AGAAuACUUGUC CCCCUGCdTsdT
AD-46283.1	556	GcucAGcAGcAAG AAuGeudTsdT	2851	2851-2869	557	AGcAUUCUUGCU GCUGAGCdTsdT
AD-46284.1	558	uuGGGAucuGGGA AuGGAAdTsdT	2980	2980-2998	559	UUCcAUUCCcAG AUCCcAAdTsdT
AD-46285.1	560	ccAAAGcccAGAA GAuGeudTsdT	461	461-479	561	AGcAUCUUCUGG GCUUUGGdTsdT
AD-46286.1	562	GcuAccGcAAGGGc AAGAAAdTsdT	2360	2360-2378	563	UUCUUGCCCUUG CGGuAGCdTsdT
AD-	562	GcuAccGcAAGGGc	2360	2360-	563	UUCUUGCCCUUG

[0474]

46286.2		AAGAAAdTsdT		2378		CGGuAGCdTsdT
AD-46288.1	564	uGGuGGcAGGAG GuGGcAudTsdT	2664	2664- 2682	565	AUGCcACCUCCU GCcACcAdTsdT
AD-46289.1	566	cccAcucuGuAcAGA GGcudTsdT	2903	2903- 2921	567	AGCCUCUGuAcA GAGUGGGdTsdT
AD-46290.1	568	cucAcAGcccAGAcc cucAdTsdT	3128	3128- 3146	569	UGAGGGUCUGG GCUGUGAGdTsdT
AD-46291.1	570	ccucucuGGAcuAcG GcuudTsdT	1232	1232- 1250	571	AAGCCGuAGUCc AGAGAGGdTsdT
AD-46293.1	572	GuGGcAGGAGGu GGcAucudTsdT	2666	2666- 2684	573	AGAUGCcACCUC CUGCcACdTsdT
AD-46294.1	574	uucGGAAGcccuG GucuAdTsdT	2959	2959- 2977	575	uAGACcAGGGGC UUCCGAAdTsdT
AD-46295.1	576	AGcucAGcuGccuu uGGAdTsdT	3157	3157- 3175	577	UCcAAAGGGcAG CUGAGCUdTsdT
AD-46296.1	578	GGccuGGAuGAGA GAAAcudTsdT	1561	1561- 1579	579	AGUUUCUCUcAU CcAGGCCdTsdT
AD-46297.1	580	uGGcAGGAGGuG GcAucuudTsdT	2667	2667- 2685	581	AAGAUGCcACCU CCUGCcAdTsdT
AD-46298.1	582	ucGGAAGcccuGG ucuAAdTsdT	2960	2960- 2978	583	UuAGACcAGGGG CUUCCGAdTsdT
AD-46299.1	584	GcucAGcuGccuuu GGAAdTsdT	3158	3158- 3176	585	UUCcAAAGGGcA GCUGAGCdTsdT
AD-46299.2	584	GcucAGcuGccuuu GGAAdTsdT	3158	3158- 3176	585	UUCcAAAGGGcA GCUGAGCdTsdT
AD-46300.1	586	AcuGuGAcuGuGGc cuccAdTsdT	1808	1808- 1826	587	UGGAGGCcAcAG UcAcAGUdTsdT
AD-46301.1	588	AGGAGGuGGcAuc uuGucudTsdT	2671	2671- 2689	589	AGAcAAGAUGCc ACCUCCUdTsdT
AD-46301.1	590	cccuGGucuAAcuu	2967	2967-	591	UCCcAAGUuAGA

	46302.1		GGGAdTsdT		2985		CcAGGGGdTsdT
	AD-46303.1	592	ucAGcuGccuuuGG AAuAdTsdT	3160	3160-3178	593	uAUUCcAAAGGG cAGCUGAdTsdT
	AD-46304.1	594	ucGGGGucGAcAc AucuGudTsdT	1902	1902-1920	595	AcAGAUGUGUCG ACCCCGAdTsdT
	AD-46305.1	596	GuccuGAuGucuGc uccAdTsdT	2691	2691-2709	597	UGGAGcAGAcAU cAGGGACdTsdT
[0475]	AD-46306.1	598	cccuGGucuAAcuuG GGAudTsdT	2968	2968-2986	599	AUCCcAAGUuAG ACcAGGGdTsdT
	AD-46307.1	600	cAGcuGccuuuGG AAuAAdTsdT	3161	3161-3179	601	UuAUUCcAAAGG GcAGCUGdTsdT
	AD-46307.2	600	cAGcuGccuuuGG AAuAAdTsdT	3161	3161-3179	201	UuAUUCcAAAGG GcAGCUGdTsdT
	AD-46308.1	602	ucAucGcuGAccGcu GGGudTsdT	1931	1931-1949	603	ACCcAGCGGUcA GCGAUGAdTsdT

[0476] TMPrSS6序列的合成

[0477] TMPrSS6 iRNA序列可以在MerMade192合成仪上以1 μ mol规模合成。

[0478] Endolight化学可以如下文详述那样应用。

[0479] 有义链中的全部嘧啶(胞嘧啶和尿苷)均含有2'-O-甲基碱基(2'-O-甲基C和2'-O-甲基U)。

[0480] 在反义链中,与核糖A核苷毗邻(指向5'位置)的嘧啶可以替换为它们的相应2'-O-甲基核苷。

[0481] 可以在有义序列和反义序列的3'端均引入一个双碱基dTsdT延长物。

[0482] 序列文件可以转换成文本文件,以便使其兼容在MerMade192合成软件中加载。

[0483] 合成、切割和脱保护

[0484] 使用磷酰亚胺化学,使用固相支持的寡核苷酸合成法合成TMPrSS6序列。

[0485] 以上序列的合成可以在96孔平板中以1 μ m规模进行。酰亚胺溶液可以按0.1M浓度制备并且可以使用乙基硫代四唑(乙腈中的0.6M)作为活化剂。

[0486] 可以在96孔平板中在第一步骤中使用甲胺和在第二步骤中使用氟化物试剂,切下合成的序列并使其脱保护。可以使用丙酮:乙醇(80:20)混合物沉淀粗制序列并且将沉淀物重悬于0.02M乙酸钠缓冲剂中。来自每种序列的样品可以通过LC-MS分析以确认身份,通过UV分析以便定量。也可以通过IEX色谱法分析所选择的样品集合以确定纯度。

[0487] 纯化和脱盐

[0488] 全部序列均可以在AKTA探索者纯化系统上,使用Source 15Q柱纯化。样品注射和采集可以在96孔(1.8mL深孔)平板中进行。与全长序列相对应的单峰可以收集于洗脱剂中。纯化的序列可以在SephadexG25柱上使用AKTA纯化仪脱盐。可以分析脱盐的TMPrSS6序列的浓度(通过在A260处UV测量)和纯度(通过离子交换HPLC)。单链可以然后进行复性。

[0489] 实例3.对TMPRSS6 siRNA双链体体外筛选TMPRSS6敲减活性

[0490] 对TMPRSS6 siRNA双链体筛选体外敲减TMPRSS6表达的能力。评价单剂量筛选、剂量反应筛选和宿主细胞的生存力。

[0491] 体外筛选:

[0492] 用于单剂量研究和剂量反应研究的细胞培养物和转染:

[0493] 将HeLa或Hep3B细胞(ATCC, Manassas (马纳萨斯), 弗吉尼亚州)在37°C在5%CO₂气氛下在补充有10%FBS、链霉素和谷氨酰胺(ATCC)的X(ATCC公司)中生长至接近汇合,之后,通过胰蛋白酶消化法从平板释放。通过添加14.8μl Opti-MEM外加每孔0.2μl Lipofectamine RNAiMax(Invitrogen公司, (卡尔斯巴德), 加利福尼亚州目录号13778-150)至每孔5μl siRNA双链体至96孔板中,并且在室温孵育15分钟,进行转染。随后添加含有约2×10⁴个HeLa或Hep3B细胞的80μl无抗生素的完全生长培养基至siRNA混合物。在RNA纯化之前,将细胞孵育24或120小时。单剂量实验以10nM和0.1nM双链体终浓度进行并且剂量反应实验以10、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005、0.00001nM双链体终浓度进行。

[0494] 使用DYNABEADS®mRNA分离试剂盒(Invitrogen公司,产品编号:610-12)分离总RNA:

[0495] 将细胞收获并且在150μl裂解/结合缓冲剂中裂解,然后使用Eppendorf® Thermomixer(混合速度在整个过程中自始至终相同)以850rpm混合5分钟。将十微升磁珠和80μl裂解/结合缓冲剂的混合物添加圆底平板并且混合1分钟。使用磁力支座捕获磁珠并且在不扰动磁珠的情况下移出上清液。在移出上清液后,将裂解的细胞添加至剩余的磁珠并且混合5分钟。在移出上清液后,将磁珠用150μl洗涤缓冲剂A洗涤两次并混合一分钟。再次捕获磁珠并移除上清液。将磁珠随后用150μl洗涤缓冲剂B洗涤,捕获,并且移出上清液。接下来,将珠用150μl洗脱缓冲剂洗涤,捕获,并且移出上清液。然后允许磁珠干燥两分钟。在干燥后,添加50μl洗脱缓冲剂并且在70°C混五分钟。将磁珠在磁体上捕获五分钟。将40μl上清液取出并且添加至另一块96孔平板。

[0496] 使用ABI高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems公司,Foster City(福斯特市),加利福尼亚州,目录号4368813)合成cDNA:

[0497] 按每个反应添加主混合物:2μl 10X缓冲剂,0.8μl 25XdNTP,2μl随机引物,1μl逆转录酶,1μl RNA酶抑制剂和3.2μl H₂O至10μl总RNA中。使用Bio-Rad C-1000或S-1000热循环仪(Hercules公司,加利福尼亚州)经以下步骤:25°C 10min,37°C 120min,85°C 5sec,4°C保持,产生cDNA。

[0498] 实时PCR:

[0499] 将2μl cDNA添加至50块384板孔平板(Roche公司目录号04887301001)中,每孔含有0.5μl GAPDH TaqMan探针(Applied Biosystems公司目录号4326317E)、0.5μl TMPRSS6 TaqMan探针(Applied Biosystems公司目录号Hs00542184_m1)和5μl Lightcycler 480探针主混合物(Roche目录号04887301001)的主混合物。使用ΔΔCt(RQ)测定法在ABI7900HT实时PCR系统(Applied Biosystems公司)中进行实时PCR。每种双链体以两次独立的转染测试并且每次转染一式两份测定,除非在总结表中另外指出。

[0500] 为了计算相对倍数变化,使用ΔΔCt方法分析实时数据并且针对以下测定法归一

化,所述测定法以用10nM AD-1955转染的细胞或模拟转染细胞进行。以利用XLFit的4参数拟合模型计算 IC_{50} 并且针对用AD-1955转染的细胞在相同的剂量范围归一化或针对其自身最低剂量归一化。

[0501] 生存力筛选。将HeLa或Hep3B细胞s(ATCC公司,Manassas(马纳萨斯),弗吉尼亚州)在37°C在5% CO₂气氛下在补充有10% FBS、链霉素和谷氨酰胺(ATCC)的X(ATCC)中生长至接近汇合,之后,通过胰蛋白酶消化法从平板释放。在第3和5日在用100、10、1、0.1、0.01和0.0001nM siRNA转染后的HeLa细胞和Hep3B细胞中测量细胞生存力。细胞以每孔 2.5×10^3 - 5×10^3 个细胞的密度铺种于96孔平板中。每种siRNA一式三份测定并且将数据平均化。包含靶向PLK1和AD-19200的siRNA作为生存力丧失的阳性对照并AD-1955作为阴性对照。PLK1和AD-19200导致生存力的剂量依赖性丧失。为测量生存力,将20ul CellTiter蓝(Promega公司)在3日和5日后添加至96孔平板的每个孔,并且在37°C孵育2小时。然后在分光光度计(Molecular Devices公司)中在 $560_{Ex}/590_{Em}$ 读取平板。生存力表述为来自三次重复转染的光单位的平均值+/-标准偏差。

[0502] 通过TMPRSS6 siRNA双链体体外敲减TMPRSS6表达

[0503] 表5呈现显示敲减Hep3B细胞中TMPRSS6的数据,所述Hep3B细胞用靶向TMPRSS6的siRNA转染。数据表达为相对于用阴性对照siRNA(AD-1955)转染的细胞,用靶向TMPRSS6的siRNA转染的细胞中剩余的TMPRSS6信使的分数。未处理的细胞(“未用药的”细胞)充当第二阴性对照。全部siRNA均测试至少2次,并且也一式两份进行qPCR反应。单剂量实验以10nM和0.1nM siRNA双链体终浓度进行。

[0504] 表5. 体外单剂量筛选中的TMPRSS6表达

[0505]

双链体 ID	10 nM Ave	0.1 nM Ave	10 nM SD	0.1 nM SD
AD-46230.1	0.89	1.14	0.036	0.145
AD-46230.1	0.85	1.22	0.039	0.063
AD-46231.1	0.11	0.29	0.017	0.007
AD-46232.1	0.78	0.87	0.03	0.023
AD-46233.1	0.6	0.98	0.033	0.046
AD-46234.1	0.79	1.06	0.082	0.068
AD-46235.1	0.18	0.87	0.009	0.066
AD-46235.1	0.18	0.96	0.009	0.132
AD-46236.1	0.15	1.06	0.007	0.036
AD-46237.1	0.81	0.98	0.043	0.027
AD-46238.1	0.71	0.99	0.069	0.031
AD-46239.1	0.83	1.3	0.035	0.073
AD-46240.1	0.89	0.99	0.027	0.079
AD-46240.1	0.88	1	0.009	0.034
AD-46241.1	0.6	0.9	0.029	0.029
AD-46242.1	0.81	0.91	0.016	0.049
AD-46243.1	0.82	0.87	0.029	0.066
AD-46244.1	0.19	0.43	0.018	0.028
AD-46245.1	0.48	0.79	0.148	0.016

[0506]

AD-46245.1	0.51	0.82	0.147	0.028
AD-46246.1	0.39	0.89	0.012	0.043
AD-46247.1	0.84	0.9	0.047	0.019
AD-46248.1	0.68	0.95	0.059	0.075
AD-46249.1	0.17	0.29	0.005	0.152
AD-46250.1	0.19	0.53	0.017	0.011
AD-46251.1	0.16	0.47	0.007	0.005
AD-46252.1	1.04	1.08	0.031	0.038
AD-46253.1	0.27	0.45	0.02	0.031
AD-46254.1	1.03	1.08	0.221	0.021
AD-46255.1	0.52	0.84	0.029	0.036
AD-46256.1	0.81	1.02	0.025	0.015
AD-46257.1	0.64	0.97	0.016	0.076
AD-46258.1	0.91	0.98	0.054	0.059
AD-46259.1	0.77	1.03	0.052	0.067
AD-46260.1	1.24	1	0.634	0.031
AD-46261.1	0.12	0.19	0.007	0.006
AD-46262.1	0.58	1.27	0.016	0.024
AD-46263.1	0.79	0.95	0.03	0.021
AD-46264.1	0.93	1.16	0.052	0.095
AD-46265.1	0.09	0.47	0.007	0.017
AD-46266.1	0.25	0.8	0.024	0.018
AD-46267.1	0.65	0.84	0.058	0.02
AD-46268.1	0.92	1	0.008	0.048
AD-46269.1	0.37	0.52	0.037	0.024
AD-46270.1	0.26	0.55	0.01	0.03
AD-46271.1	0.35	0.8	0.044	0.029
AD-46272.1	0.62	0.91	0.015	0.061
AD-46273.1	0.18	0.3	0.02	0.012

[0507]

AD-46274.1	0.88	0.85	0.04	0.016
AD-46276.1	0.33	0.64	0.024	0.024
AD-46277.1	0.85	0.89	0.12	0.026
AD-46278.1	0.24	0.7	0.019	0.059
AD-46279.1	0.55	0.79	0.008	0.025
AD-46280.1	0.96	0.84	0.059	0.042
AD-46282.1	0.21	0.47	0.017	0.004
AD-46283.1	0.62	1.01	0.05	0.03
AD-46284.1	0.42	0.78	0.016	0.019
AD-46285.1	0.37	0.86	0.014	0.042
AD-46286.1	0.19	0.49	0.019	0.027
AD-46288.1	0.65	0.88	0.052	0.032
AD-46289.1	0.89	0.92	0.062	0.032
AD-46290.1	0.83	0.9	0.035	0.029
AD-46291.1	0.65	0.87	0.014	0.014
AD-46293.1	0.31	0.68	0.012	0.054
AD-46294.1	0.25	0.7	0.015	0.031
AD-46295.1	0.2	0.42	0.004	0.029
AD-46296.1	0.43	0.83	0.012	0.043
AD-46297.1	0.3	0.6	0.009	0.017
AD-46298.1	0.91	0.91	0.08	0.008
AD-46299.1	0.26	0.57	0.018	0.052
AD-46300.1	0.98	0.91	0.037	0.024
AD-46301.1	0.65	0.87	0.018	0.051
AD-46302.1	0.92	1.01	0.021	0.048
AD-46303.1	0.13	0.43	0.008	0.019
AD-46304.1	1.11	1.01	0.016	0.056
AD-46305.1	0.21	0.73	0.029	0.011
AD-46306.1	0.84	0.96	0.114	0.092

[0508]	AD-46307.1	0.27	0.49	0.007	0.019
	AD-46308.1	0.69	0.83	0.02	0.024
	未用药的	1.04	1.06	0.021	0.018
	未用药的	1.07	1.29	0.065	0.059
	AD-1955	0.85	0.85	0.055	0.071
	AD-1955	1.1	0.97	0.034	0.04
	AD-1955	1	0.98	0.036	0.058
	AD-1955	1.04	0.98	0.053	0.049
	AD-1955	1.04	1.08	0.021	0.039
	AD-1955	0.98	1.19	0.049	0.058

[0509] 选择的TMPRSS6 siRNA双链体在体外剂量反应筛选中的 IC_{50}

[0510] 表6呈现从体外剂量反应筛选确定的所选择TMPRSS6 siRNA双链体的 IC_{50} 值。在Hep3B细胞中转染后第1日和第5日对10nM和0.1nM单剂量筛选中有效的TMPRSS6siRNA双链体(表5)以剂量反应方式测试TMPRSS6敲减活性。剂量反应实验以10、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005、0.00001nM siRNA双链体终浓度实施。为了归一化,相对于非靶向性对照AD-1955测量TMPRSS6的敲减,或测试以每种双链体的最低siRNA浓度所获得的值。

[0511] 表6.选择的TMPRSS6 siRNA双链体在体外剂量反应筛选中的 IC_{50}

双链体 ID	针对低剂量的归一化		针对 AD-1955 的归一化	
	第 1 日(nM)	第 5 日(nM)	第 1 日(nM)	第 5 日(nM)
AD-46250.1	0.57	0.08	0.22	0.04
AD-46265.1	0.14	0.07	0.2	0.03
AD-46231.1	0.07	0.04	0.06	0.02
AD-46251.1	0.27	0.1	0.37	0.07
AD-46261.1	0.04	0.09	0.08	0.05
AD-46253.1	0.78	0.07	0.35	0.13
AD-46244.1	0.14	0.13	0.2	0.32
AD-46269.1	0.06	0.57	0.07	1.16

[0513]

AD-46270.1	0.94	无 IC50	0	No IC50
AD-46282.1	1.16	No IC50	0.02	No IC50
AD-46297.1	0.05	No IC50	0.08	No IC50
AD-46299.1	0.01	3.89	0.03	0.69
AD-46303.1	0.01	2.47	0.03	0.04
AD-46307.1	1.02	0.02	2.68	0.15
AD-46273.1	0.23	0.03	0.72	0.1
AD-46286.1	0.22	0.46	0.53	0.46
AD-46249.1	0.27	1.96	0.31	5.87
AD-46295.1	0.76	0.31	0.24	0.1

[0514] 用TMPRSS6 siRNA双链体转染的HeLa和HEP3B细胞系的体外生存力筛选。

[0515] 表7呈现用TMPRSS6 siRNA双链体转染的HeLa和HEP3B细胞系的生存力数据。生存力数据表述为平均原始荧光单位,其中更小的值代表更低的生存力。误差表述为来自三次重复转染的标准偏差。

[0516] 表7.用TMPRSS6 siRNA双链体转染的HeLa和HEP3B细胞系的生存力。

[0517]

	HeLa 第3日 10nM	HeLa 第3日 1nM	HeLa 第3日 0.1nM	HeLa 第3日 0.01nM	HeLa 第3日 0.001nM	HeLa 第3日 0.0001nM	HeLa 第3日 10nM	HeLa 第3日 1nM	HeLa 第3日 0.1nM	HeLa 第3日 0.01nM	HeLa 第3日 0.001nM	HeLa 第3日 0.0001nM
AD-46250.1	5260	13504	29520	30542	30924	30956	150	62	272	220	799	751
AD-46265.1	12234	29940	32497	33323	32124	32882	968	884	1071	946	707	595
AD-46231.1	25177	28407	32021	32650	33375	32704	710	420	127	1697	356	667

[0518]

AD-46251.1	2952 8	3015 1	3021 5	3216 3	3174 3	31726		416	102	31	1588	518	1091
AD-46261.1	1667 7	2633 1	3059 4	3168 1	3284 7	31544		390	277	431	1375	681	583
AD-46253.1	2158 0	2888 7	3095 3	3168 4	3245 7	31491		1158	437	524	944	229	455
AD-46244.1	1323 0	1636 9	2654 5	3135 9	3275 3	32280		197	165	255	357	589	1318
AD-46269.1	9978	1951 4	2929 0	3083 9	3152 9	31173		597	360	1406	400	743	626
AD-46270.1	1754 3	1783 4	3118 0	3108 7	3279 3	31314		370	102 6	771	552	391	1293
AD-46282.1	2905 5	3242 1	3184 0	3100 6	3428 7	32185		446	618	430	855	323	133
AD-46297.1	8126	1669 6	2812 8	3392 8	3395 5	32322		193	598	733	895	126 6	392
AD-46299.1	3192 2	3019 6	3088 0	3044 7	3190 0	32608		1459	617	58	194	773	964
AD-46303.1	2730 9	2832 5	2797 5	2931 9	3031 0	30935		1363	572	421	295	306	95
AD-46307.1	3315 6	3324 0	3205 9	3307 2	3213 5	33307		667	258	775	1164	102	286
AD-46273.1	2446 5	2913 0	3041 7	3304 3	3463 9	31876		142	768	271	261	853	800
AD-46286.1	3640	9590	2971 3	3313 8	3287 7	30814		34	631	371	1185	164 1	599
AD-46249.1	1731 5	2559 1	3044 3	3159 9	3271 9	29855		981	258	578	482	141 2	886
AD-46295.1	3056 5	3173 0	3077 2	3177 7	3287 4	30916		403	261	1223	1880	981	441

AD-19200	9727	1575 2	3135 2	3252 1	3011 0	30650		648	699	763	1543	55	9
PLK	1166	1626	2784 9	2990 2	3051 2	30273		23	44	91	299	362	563
AD-1955	2650 2	3016 4	3026 7	3190 6	3330 9	30906		5669	134	353	645	233	696
未用药的	3282 1	3231 1	3080 5	3168 3	3323 8	31470		1455	631	555	557	288	164
未用药的	3359 4	3237 3	3200 5	3402 4	3562 9	33401		554	253	754	899	55	649
未用药的	3069 5	3065 1	2995 6	3137 7	3273 4	32527		304	299	807	874	646	225

[0519]

	HeLa a 第 5 日 10 nM	HeLa 第 5 日 1 nM	HeLa 第 5 日 0.1 nM	HeLa 第 5 日 0.01 nM	HeLa 第 5 日 0.001 nM	HeLa 第 5 日 0.0001 nM	HeLa 第 5 日 10 nM SD	HeLa 第 5 日 1 nM SD	HeLa 第 5 日 0.1 nM SD	HeLa 第 5 日 0.01 nM SD	HeLa 第 5 日 0.0 01n M SD	HeLa 第 5 日 0.00 01n M SD
AD-46250.1	2344	2550 2	4662 7	4498 6	4647 9	46070	44	191 6	157	913	598	2016
AD-46265.1	1041 1	4661 1	4872 5	4742 5	4723 8	47942	300	327	602	1479	214 5	1690
AD-46231.1	4107 9	4696 3	4857 5	4806 0	4746 7	48500	1645	319	243	998	182 1	1203
AD-	4255	4704	4908	4826	4775	48719	1597	420	162	1105	143	1232

[0520]

46251.1	1	4	8	9	5						4	
AD- 46261.1	3750 0	4644 1	4870 2	4795 3	4777 6	48878	689	441	451	1447	161 4	1159
AD- 46253.1	3177 2	4589 9	4860 6	4780 1	4769 3	49237	1310	65	648	1550	136 5	789
AD- 46244.1	1159 7	2804 6	4602 0	4741 3	4767 0	49430	967	527	395	1336	937	869
AD- 46269.1	1070 4	3773 5	4749 6	4762 9	4749 6	49194	317	161	198	1359	150 2	986
AD- 46270.1	1635 6	2628 4	4852 0	4801 1	4801 6	49358	382	663	497	1121	102 4	681
AD- 46282.1	2237 2	4232 7	4729 7	4747 8	4745 0	49349	656	715	343	1513	205 7	883
AD- 46297.1	4228	2699 3	4703 7	4726 9	4696 1	48993	41	657	593	1847	157 4	639
AD- 46299.1	4528 3	4548 5	4633 4	4396 6	4292 2	46772	1088	908	382	2057	358 0	1131
AD- 46303.1	4266 9	4635 8	4624 0	4562 4	4692 0	46764	849	183	791	890	90	539
AD- 46307.1	4771 0	4746 6	4797 4	4767 1	4791 1	48505	273	539	680	399	238	309
AD- 46273.1	3683 4	4501 8	4752 2	4791 2	4831 6	48804	680	432	104	619	308	248
AD- 46286.1	2970	3121 5	4750 4	4788 3	4806 2	48999	515	126 2	1093	826	87	541
AD- 46249.1	2035 6	4495 9	4853 4	4798 8	4805 3	49145	884	103 3	1238	1045	619	530
AD- 46295.1	4644 8	4801 4	4919 5	4865 4	4843 2	49355	685	102 1	746	1183	645	407
AD- 46244.1	2644	3577	3972	4837	4837	49509	725	100	1246	540	762	408

19200	4	2	4	7	3			9				
PLK	1105	1804	3725 8	4795 5	4789 3	49416	44	95	1110	781	474	515
AD-1955	4485 7	4727 2	4835 4	4805 0	4866 8	49721	322	388	756	880	585	490
未用药 的	4873 4	4845 4	4854 9	4724 6	4800 4	49067	850	303	743	1166	349	102
未用药 的	4831 8	4783 9	4525 2	4709 8	4712 8	48914	969	527	223	797	548	526
未用药 的	4518 9	4509 6	4550 8	4433 4	4517 7	47004	1327	938	579	1342	930	350

[0521]

	Hep 3B 第 3 日 10 nM	Hep3 B 第 3 日 1 nM	Hep3 B 第 3 日 0.1 nM	Hep3 B 第 3 日 0.01 nM	Hep3 B 第 3 日 0.001 nM	Hep3B 第 3 日 0.0001 nM	Hep 3B 第 3 日 10 nM SD	Hep 3B 第 3 日 1 nM SD	Hep 3B 第 3 日 0.1 nM SD	Hep 3B 第 3 日 0.01 nM SD	Hep 3B 第 3 日 0.0 01n M SD	Hep 3B 第 3 日 0.00 01n M SD
AD- 46250.1	4495	4905	6786	7022	6122	6033	225	105	56	85	151	49
AD- 46265.1	6453	6990	6917	6685	6165	5974	187	79	103	70	121	21
AD- 46231.1	6478	7042	6808	6444	6173	5987	97	19	35	66	131	69
AD- 46251.1	5663	5990	6084	6241	5869	6298	445	38	73	69	63	88

[0522]

AD-46261.1	5380	6025	5824	6325	5801	6076		376	14	29	67	81	65
AD-46253.1	5417	6078	5840	6113	5568	6503		549	29	103	81	20	72
AD-46244.1	4743	5479	5884	6078	6170	6593		29	43	51	168	60	70
AD-46269.1	2788	2958	5479	5878	5899	5739		64	14	97	215	80	22
AD-46270.1	4378	4720	5579	6127	6066	6522		235	94	167	17	43	260
AD-46282.1	5096	5932	6258	5988	6068	6724		101	34	32	107	59	20
AD-46297.1	1134	1325	4477	6051	6199	6626		40	64	80	101	134	55
AD-46299.1	5875	5836	6251	5872	6016	6726		47	64	39	54	81	104
AD-46303.1	6879	7060	6801	6793	6306	6827		43	32	59	60	126	65
AD-46307.1	6951	6826	6613	6511	6119	7093		97	148	46	82	97	91
AD-46273.1	6628	6749	6711	6839	6237	6958		122	24	59	59	48	109
AD-46286.1	5384	5405	5755	6469	6299	6207		81	5	45	33	95	58
AD-46249.1	3955	4239	5214	6549	6171	6537		141	70	134	37	35	27
AD-46295.1	6186	6535	5776	6500	6247	6252		96	34	141	35	41	35
AD-19200	2304	3860	5592	6634	6063	6111		95	24	43	41	67	74

PLK	1484	1668	3385	6283	5714	6015		36	52	130	94	112	143
AD-1955	5718	5826	5633	6356	6369	6460		27	60	16	80	108	122
未用药的	5799	6503	6350	6351	6002	6449		69	98	44	40	72	66
未用药的	5623	6550	5950	6103	5574	6489		23	49	37	82	59	93
未用药的	5895	6021	5550	5908	5573	6769		72	27	55	90	64	42

[0523]

	Hep 3B 第 5 日 10 nM	Hep3 B 第 5 日 1 nM	Hep3 B 第 5 日 0.1 nM	Hep3 B 第 5 日 0.01 nM	Hep3 B 第 5 日 0.001 nM	Hep3B 第 5 日 0.0001 nM		Hep 3B 第 5 日 10 nM SD	Hep 3B 第 5 日 1 nM SD	Hep 3B 第 5 日 0.1 nM SD	Hep 3B 第 5 日 0.01 nM SD	Hep 3B 第 5 日 0.0 01 nM SD	Hep 3B 第 5 日 0.00 01n M SD
AD- 46250.1	4758	5572	9636	1229 4	1107 9	10674		311	285	180	901	575	403
AD- 46265.1	9937	1254 3	1082 2	1343 0	1296 7	12089		323	171 4	1094	107	140 7	704
AD- 46231.1	1265 0	1378 6	1176 3	1376 5	1400 3	13857		1002	422	1551	177	213	320
AD- 46251.1	8543	9397	1058 1	1364 2	1299 0	13568		518	105 4	707	289	124 7	475
AD- 46261.1	1045 9	1170 0	1173 5	1376 4	1373 8	13210		148	130 8	459	277	712	210
AD-	1112	1212	1153	1421	1396	11946		473	153	772	262	679	1015

[0524]

46253.1	5	4	3	3	7			1				
AD- 46244.1	7330	7939	1042 8	1269 5	1358 4	11852	451	416	1104	61	358	1473
AD- 46269.1	2316	2442	1147 6	1362 1	1282 1	11090	507	623	574	299	831	298
AD- 46270.1	6643	5235	1177 4	1278 8	1348 7	11895	179	386	709	1032	635	760
AD- 46282.1	7767	1021 4	1265 0	1285 9	1298 0	11175	214	111 6	569	1282	925	169
AD- 46297.1	1012	1124	9438	1240 3	1206 3	11599	47	96	162	990	111 8	83
AD- 46299.1	1364 3	1339 6	1240 4	1211 3	1278 2	12913	1585	208 6	202	896	104 0	1209
AD- 46303.1	1056 7	1291 8	1061 7	1120 3	1118 9	11260	456	126 3	106	309	310	153
AD- 46307.1	1378 7	1408 9	1183 0	1351 2	1348 9	12773	208	467	900	60	504	203
AD- 46273.1	1380 1	1348 4	1271 9	1421 2	1430 5	12499	386	219	1250	382	128	176
AD- 46286.1	5783	6472	1099 0	1435 2	1442 4	12234	93	78	472	632	103	649
AD- 46249.1	3763	5086	1072 9	1429 3	1428 3	12608	269	124	453	570	443	633
AD- 46295.1	1487 0	1509 6	1128 9	1469 7	1433 6	12000	539	224	453	698	689	903
AD- 19200	1546	6337	1031 0	1426 1	1355 1	11486	132	379	456	250	646	754
PLK	1337	1636	6996	1466 1	1386 0	12555	31	79	759	740	423	296
AD-1955	1171	1256	1216	1450	1300	11077	1146	121	1289	392	140	56

	7	0	4	4	8			0			5	
[0525] 未用药的	1398	1487	1151	1402	1345	11399	404	316	267	412	635	114
	9	3	2	2	8							
[0525] 未用药的	1416	1455	1126	1424	1379	11771	197	426	230	640	664	888
	7	0	9	7	3							
[0525] 未用药的	1385	1463	1043	1348	1416	12808	231	115	474	546	177	1028
	7	2	2	5	4			0				

[0526] 实例4.TMPRSS6 siRNA双链体前导选择。

[0527] 为了选择用于进一步体内实验的特定TMPRSS6 siRNA,通过在HEP3B人肝癌细胞中转染,对化学修饰的siRNA筛选TMPRSS6基因沉默活性。选择两种高度有力的siRNA用于体内评价,所述siRNA具有最少的预测脱靶潜力和多物种反应性,包括对人类、食蟹猴、大鼠和小鼠的反应性。也在原代小鼠肝细胞中确认两种选择的TMPRSS6 siRNA的效力,其中TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)和TMPRSS6 siRNA-2(AD-46286)均展示强有力的TMPRSS6基因沉默活性,而TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)显示70pM的IC₅₀(图2A)并且TMPRSS6 siRNA-2(AD-46286)显示140pM的IC₅₀(图2B)。

[0528] 实例5.WT C57BL/6小鼠中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默的作用。

[0529] TMPRSS6 siRNA对WT C57BL/6小鼠中TMPRSS6和HAMP1 mRNA表达的影响。

[0530] 为了评价LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)和LNP-TMPRSS6 siRNA-2(AD-46286)的体内作用,经由尾静脉IV注射用1mg/kg LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)或LNP-TMPRSS6 siRNA-2(AD-46286)或LNP-AD-19551(靶向非哺乳动物基因萤光素酶的siRNA)对8周龄雌性WT C57BL/6小鼠给药。TMPRSS6 siRNA用LNP11(MC3)配制。给药后24小时处死小鼠,并且将肝脏摘除、快速冷冻并研磨成粉末。将少量(约20mg)肝脏粉末在裂解缓冲剂中破碎并且用于TaqMan®的mRNA分析。每组使用总计五只小鼠。数据表述为靶TMPRSS6 mRNA相对于β-肌动蛋白mRNA的LNP-Luc对照百分比。如图3A中所示,LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)和LNP-TMPRSS6 siRNA-2(AD-46286)特异性和强有力地以剂量依赖性方式抑制肝脏TMPRSS6 mRNA表达(数据表示平均值±标准偏差),分别是ED₅₀ 0.035mg/kg和ED₅₀ 0.18mg/kg。如图3B中所示,LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)和LNP-TMPRSS6 siRNA-2(AD-46286)也以剂量依赖性方式抑制肝脏HAMP1 mRNA表达。

[0531] WT C57BL/6小鼠中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6和HAMP1基因表达沉默的持续期。

[0532] 为了评价TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6和HAMP1基因表达敲减的持续期,八周龄WT C57BL/6小鼠经由尾静脉IV注射按单次1mg/kg剂量给予LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)、或LNP-Luc对照(LNP-AD-1955),或PBS;全部siRNA药剂均作为LNP11配制品递送。在6小时、24小时、48小时、3天、7天和14天处死小鼠。使用TaqMan®测定法分析肝脏中TMPRSS6和HAMP1的mRNA表达水平并且针对β-肌动蛋白归一化。每组使用5只小鼠,并且数据在图4中表示为平均值±标准偏差。如图4中所示,1mg/kg单次剂量的LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)在早至给药后6小时敲减TMPRSS6 mRNA表达,并且减少TMPRSS6 mRNA表达至LNP-Luc对照或PBS对照的约90%,持续期2周的时段。HAMP1基因表达在给药后24小时开始增加并且

维持2周时段的持续期,其中200%对照的最大增加在给药后14日出现(图4)。此外,使用Olympus AU400,将血清铁水平测定为转铁蛋白(Tf)饱和百分比。将转铁蛋白饱和水平计算为血清铁对总铁结合容量(TIBC)的比率并且表述为转铁蛋白饱和百分比。在给药后24小时开始,转铁蛋白饱和百分比减少约50%并且在2周时段内维持,表明血清中的循环型铁水平降低(图4)。TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默水平是维持TMPRSS6 siRNA介导的对WT C57BL/6小鼠中HAMP1基因表达和血清铁水平的影响必需的。

[0533] 为了评价TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默水平,所述TMPRSS6沉默水平是维持TMPRSS6 siRNA介导的对WT C57BL/6小鼠中HAMP1基因表达和血清铁水平的影响必需的,将C57BL/6小鼠用0.3mg/kg LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)、或LNP-Luc对照或PBS给药;全部siRNA药剂均作为LNP11制剂递送。在给药后5小时、24小时、48小时、3天、7天、14天、21天和28天处死小鼠。使用TaqMan®测定法分析TMPRSS6和HAMP1的mRNA表达水平并且针对B-肌动蛋白归一化。每组使用五只小鼠,并且数据在图5中表示为平均值±标准偏差。如图5中所示,给药后24小时实现最大减少TMPRSS6基因表达90%并且维持直至给药后3日。在给药后第七日,TMPRSS6基因表达减少约85%;HAMP1基因表达被诱导至对照的约250%;并且转铁蛋白饱和度(%)缩减约50%(图5)。在给药后第21日,TMPRSS6基因表达减少约40%;HAMP1基因表达已经正常化;并且血清铁水平,如转铁蛋白饱和度(%)所测量,开始返回至正常水平(图5)。总之,TMPRSS6 mRNA表达的最大敲减在给药后24小时实现并且截止给药后3周返回至约50%的正常表达水平;肝杀菌肽mRNA水平在早至给药后24小时增加并且维持至多到给药后七日;肝杀菌肽水平在给药后第十四日返回对照平;并且转铁蛋白饱和度(作为循环型铁水平的指示)在早至给药后24小时降低至对照水平的50%,并且接近第四周时正常化。因此图5中呈现的数据说明,需要超过50%的TMPRSS6沉默作用以维持LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)介导对HAMP1基因表达和血清铁水平的影响。

[0534] TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对WT C57BL/6小鼠中血液学参数的影响。

[0535] 为了评价TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对血液学参数(包括血红蛋白(HGB)和血细胞比容)的影响;WT C57BL/6小鼠用1mg/kg单次剂量的TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)或LNP-Luc对照或PBS给药;并且随后在给药后至多到两周的不同时间点处死。使用Advial20分析仪测定血液学参数,包括血红蛋白(HGB)、血细胞比容、平均红细胞体积(MCV)、平均值细胞的血红蛋白(MCH)、平均值细胞的血红蛋白浓度(MCHC)网织红细胞血红蛋白含量(Chr)。如图6A和6B中所示,Th3/+小鼠中TMPRSS6的沉默导致HGB减少(图6A),和WT C57BL/6小鼠中血细胞比容的降低(图6B)。对平均红细胞体积(MCV)、平均值细胞的血红蛋白(MCH)、平均值细胞的血红蛋白浓度(MCHC)和网织红细胞血红蛋白含量(Chr)存在相似的影响。

[0536] 实例6.地中海贫血小鼠(Th3/+)中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默的作用

[0537] 地中海贫血小鼠(Th3/+)中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对血清铁参数的影响。

[0538] 为了评价地中海贫血小鼠(Th3/+)中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对血清铁参数(包括铁水平、不饱和铁结合容量(UIBC)和Tf饱和度)的影响;将六周龄Th3/+小鼠经由尾静脉注射用1mg/kg单次剂量的LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)或LNP-Luc对照或PBS给药;并且给药后两周处死小鼠。每组使用五只小鼠,并且数据在图7中表示为平均值±标准

偏差,其中**表示P值<0.01并且***表示P值<0.001。如图7中所示,与对照PBS组相比,Th3/+小鼠中TMPRSS6的沉默导致血清铁、UIBC和Tf饱和度的显著减少。

[0539] 地中海贫血小鼠 (Th3/+) 中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对网织红细胞和红细胞参数的影响。

[0540] 为了评价地中海贫血小鼠 (Th3/+) 中,TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对网织红细胞和红细胞参数(包括网织红细胞数目、网织红细胞血红蛋白含量(ChR)和红细胞数目(RBC))的影响,将六周龄Th3/+小鼠经由尾静脉注射用1mg/kg单次剂量的LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)或LNP-Luc对照或PBS给药;并且给药后两周处死小鼠。使用Advia120分析仪测定网织红细胞和红细胞参数,包括网织红细胞数目、网织红细胞血红蛋白含量(ChR)和红细胞数目(RBC)。每组使用五只小鼠,并且数据在图8A-8C中表示为平均值±标准偏差,其中**表示P值<0.01并且***表示P值<0.001。如图8A和8B中所示,Th3/+小鼠中TMPRSS6的沉默导致网织红细胞数目连同网织红细胞血红蛋白含量(ChR)的显著降低。此外,Th3/+小鼠中TMPRSS6的沉默导致成熟红细胞数目(RBC)的显著增加(图8C),表明无效红细胞生成、髓外血细胞生成和红细胞生产的显著改善。

[0541] 地中海贫血小鼠 (Th3/+) 中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对血液学参数的影响。

[0542] 为了评价地中海贫血小鼠 (Th3/+) 中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对血液学参数(包括血细胞比容(HCT)、血红蛋白(HGB)、红细胞分布宽度(RDW)和平均红细胞体积值(MCV))的影响;将六周龄Th3/+小鼠经由尾静脉注射用1mg/kg单次剂量的LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)或LNP-Luc对照或PBS给药;并且给药后两周处死小鼠。使用Advia 120分析仪测定血液学参数,包括血细胞比容(HCT)、血红蛋白(HGB)、红细胞分布宽度(RDW)和平均红细胞体积值(MCV)。每组使用五只小鼠,并且数据在图9中表示为平均值±标准偏差,其中**表示P值<0.01并且***表示P值<0.001。Th3/+小鼠中TMPRSS6的沉默导致HCT的显著增加(图9A)、HGB的显著增加(图9B)、RDW的显著降低(图9C),和MCV的显著降低(图9D)。图9中呈现的数据显示给予LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)后这些血液学参数的β-地中海贫血表型正常化。

[0543] 地中海贫血小鼠 (Th3/+) 中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对地外周血形态的影响。

[0544] 为了评价地中海贫血小鼠 (Th3/+) 中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对外周血形态的影响;将六周龄Th3/+小鼠经由尾静脉注射用1mg/kg单次剂量的LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)或LNP-Luc对照给药;并且给药后两周处死小鼠。以10X放大率的迈-格/姬染色法示出与对照相比,用TMPRSS6 siRNA处理的Th3/+小鼠中的染色性明显下降,表示网织红细胞数目减少连同指向成熟红细胞形态正常化的总体趋势。以10X放大率的迈-格/姬染色法还显示与野生型对照动物相比时,用野生型TMPRSS6 siRNA动物引起轻微的红细胞大小不均。

[0545] 地中海贫血小鼠 (Th3/+) 中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对脾构造的影响

[0546] 为了评价地中海贫血小鼠 (Th3/+) 中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对脾构造的影响;将六周龄Th3/+小鼠经由尾静脉注射用1mg/kg单次剂量的LNP-TMPRSS6 siRNA-1(AD-46273)或LNP-Luc对照或PBS给药;并且给药后两周处死小鼠。以10X放大率的苏木精和

伊红 (H&E) 染色法示出与对照相比,用TMPRSS6 siRNA处理的Th3/+小鼠具有脾构造的正常化,包括髓样外红细胞生成的减少和白色髓小结的重新出现。

[0547] 地中海贫血小鼠 (Th3/+) 中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对脾脏和肝脏铁含量的影响。

[0548] 为了评价地中海贫血小鼠 (Th3/+) 中TMPRSS6 siRNA介导的TMPRSS6沉默对脾和肝脏铁含量的影响;将六周龄Th3/+小鼠经由尾静脉注射用1mg/kg单次剂量的LNP-TMPRSS6 siRNA-1 (AD-46273) 或LNP-Luc对照或PBS给药;并且给药后两周处死小鼠。每组使用5只小鼠,并且数据在图10A-10C中表示为平均值 \pm 标准偏差,其中**表示P值 <0.01 并且***表示P值 <0.001 。Th3/+小鼠中TMPRSS6的沉默导致脾脏铁含量和脾重量的显著降低(分别是图10A和图10B),表示髓外血细胞生成的正常化。也观察肝脏铁含量降低的趋势,但是它不是统计显著的(图10C)。

[0549] 以上结果表明,通过全身性给予所配制的siRNA对TMPRSS6的沉默增加HAMP表达至足以在中间型 β -地中海贫血的小鼠模型中改善表型的水平。因此,正在开发用于先天性铁过量失调的LNP-TMPRSS6-siRNA,所述先天性铁过量病症特征在于异常低的肝杀菌肽水平(例如,中间型 β -地中海贫血和遗传性血色素沉着症)。

[0550] 等同物

[0551] 利用不超出常规的实验,本领域那些普通技术人员会认识到,或将能够确定与本文中所述的本发明具体实施例的许多等同物。此类等同物意在由以下权利要求书涵盖。

```

1   cttgagccag acccagtcca gctctggtgc ctgccctctg gtgcgagctg acctgagatg
61  cacttccctc ctctgtgagc tgtctcggca cccacttgca gtcactgccg cctgatgttg
121 ttactcttcc actccaaaag gatgcccgty gccgaggccc cccagggtggc tggcgggcag
181 ggggacggag gtgatggcga ggaagcggag ccggagggga tgttcaaggc ctgtgaggac
241 tccaagagaa aagcccgggg ctacctccgc ctggtgcccc tgtttgtgct gctggccctg
301 ctctgtctgg cttcggcggg ggtgctactc tggatatttc tagggtaaaa ggcggagggtg
361 atggtcagcc aggtgtactc aggcagtctg cgtgtactca atcgccactt ctcccaggat
421 cttaccgccc gggaatctag tgccttccgc agtgaaccg ccaaagccca gaagatgctc
481 aaggagctca tcaccagcac ccgcctggga acttactaca actccagctc cgtctattcc
541 tttggggagg gacccctcac ctgcttcttc tggttcattc tccaaatccc cgagcaccgc
601 cggctgatgc tgagccccga ggtggtgagc gcaactgctg tggaggagct gctgtccaca
661 gtcaacagct cggctgcccgt cccctacagg gccgagtacg aagtggaccc cgagggccta
721 gtgatcctgg aagccagtgt gaaagacata gctgcattga attccacgct gggttgttac
781 cgctacagct acgtgggcca gggccaggtc ctccggctga aggggctga ccacctggcc
841 tccagctgce tgtggcacct gcagggcccc aaggacctca tgcctaaaac ccgctggag
901 tggacgtctg cagagtgccg ggaccgactg gccatgtatg acgtggcccg gcccctggag
961 aagagctca tcacctcggg gtacctctgc agccgcccagg agcccgtggt ggaggttctg
1021 gcgtcggggg ccatcatggc ggtcgtctgg aagaagggcc tgcacagcta ctacgacccc
1081 ttcgtgctct ccgtgcagcc ggtggtcttc caggcctgtg aagtgaacct gacgctggac
1141 aacaggctcg actcccaggg cgtcctcagc acccctactt tcccagcta ctactcgccc
1201 caaacccact gctcctggca cctcacggtg cctctctctg actacggctt gggcctctgg
1261 tttgatgect atgcaactgag gaggcagaag tatgatattg cgtgcaccca gggccagtgg
1321 acgatccaga acaggaggct gtgtggcttg cgcactctgc agccctacgc cgagaggatc
1381 cccgtggtgg ccacggccgg gatcaccatc aacttcacct cccagatctc cctcacgggg
1441 cccggtgtgc ggggtgacta tggcttgtac aaccagtccg acccctgccc tggagagttc
1501 ctctgttctg tgaatggact ctgtgtccct gcctgtgatg gggccaagga ctgccccaac
1561 ggccctggatg agagaaactg cgtttgcaga gccacattcc agtgcaaaag ggacagcaca
1621 tgcattctac tgcccagggt ctgtgatggg cagcctgatt gtctcaacgg cagcgacgaa
1681 gagcagtgcc aggaaggggt gccatgtggg acattcacct tccagtgtga ggaccggagc
1741 tgcgtgaaga agcccacccc gcagtgtgat gggcgggccc actgcaggga cggctcggat
1801 gaggagcact gtgactgtgg cctccagggc cctccagccc gcattgttgg tggagctgtg
1861 tcctccgagg gtgagtggcc atggcaggcc agcctccagg ttcggggctg acacatctgt
1921 gggggggccc tcatcgctga ccgctgggtg ataacagctg cccactgctt ccaggaggac
1981 agcattggcc ccacgggtgc gtggaccgtg ttctctggca aggtgtggca gaactcgcgc
2041 tggcctggag aggtgtcctt caaggtgagc cgcctgctcc tgcaccgta ccacgaagag
2101 gacagccatg actacgacgt ggcgctgctg cagctcgacc acccggtggt gcgctcggcc
2161 gccgtgcgcc ccgtctgctt gcccgcgcgc tcccacttct tcgagcccgg cctgcactgc
2221 tggattacgg gctggggcgc cttgcgcgag ggcggccccca tcagcaacgc tctgcagaaa
2281 gtggatgtgc agttgatccc acaggacctg tgcagcgagg tctatcgta ccaggtgacg
2341 ccacgcatgc tgtgtgccgg ctaccgcaag ggcaagaagg atgcctgtca gggtgactca
2401 ggtggtccgc tgggtgtgaa ggcactcagt ggccgctggt tccctggcgg gctggtcagc
2461 tggggcctgg gctgtggccc gcctaactac ttcggcgtct acaccgcat cacagggtgtg
2521 atcagctgga tccagcaagt ggtgacctga ggaactgccc cctgcaaag cagggcccac
2581 ctctggact cagagagccc agggcaactg ccaagcaggg ggacaagtat tctggcgggg
2641 ggtgggggag agagcaggcc ctgtggtggc aggaggtggc atcttgtctc gtcccctgatg
2701 tctgctccag tgatggcagg aggatggaga agtgccagca gctgggggtc aagacgtccc
2761 ctgaggaccc aggcccacac ccagcccttc tgccctccaa ttctctctcc tccgtcccct
2821 tcctccactg ctgcctaatt caaggcagtg gctcagcagc aagaatgctg gttctacatc
2881 ccgaggagtg tctgaggtgc gcccactctt gtacagaggc tgtttgggca gccttgctc
2941 cagagagcag attccagctt cggaaagccc ctcagagccc tggatctggt ggaatggaag
3001 tgcctccatc ggaggggacc ctcagagccc tggagactgc caggtgggce tgcctgccact
3061 gtaagccaaa aggtggggaa gtccctgactc caggtcctt gcccacccc tgctgccac
3121 ctgggcccctc acagcccaga cctcactggt gaggtgagct cagctgcccct ttggaataaa
3181 gctgcctgat caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

```

图1

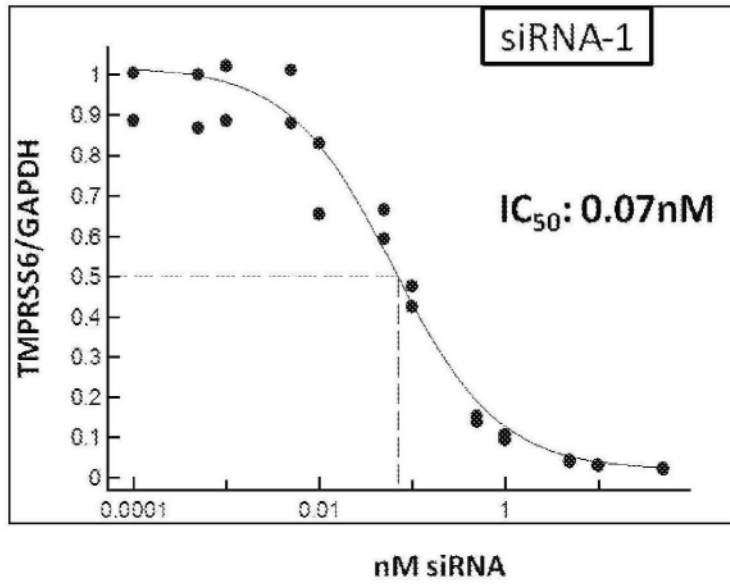


图2A

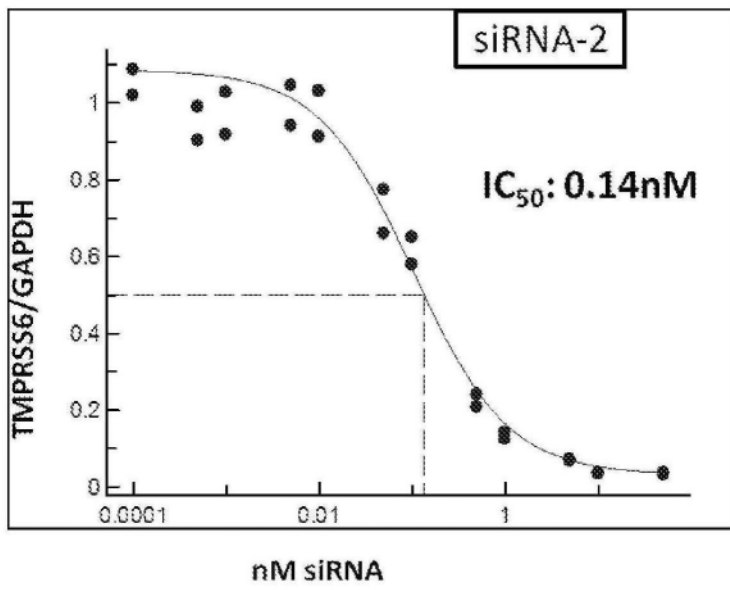


图2B

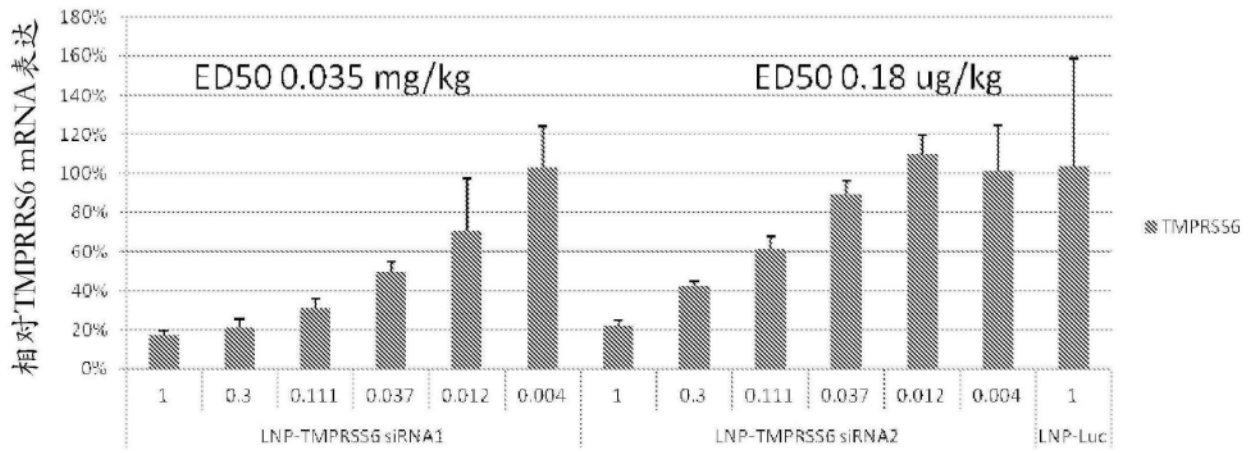


图3A

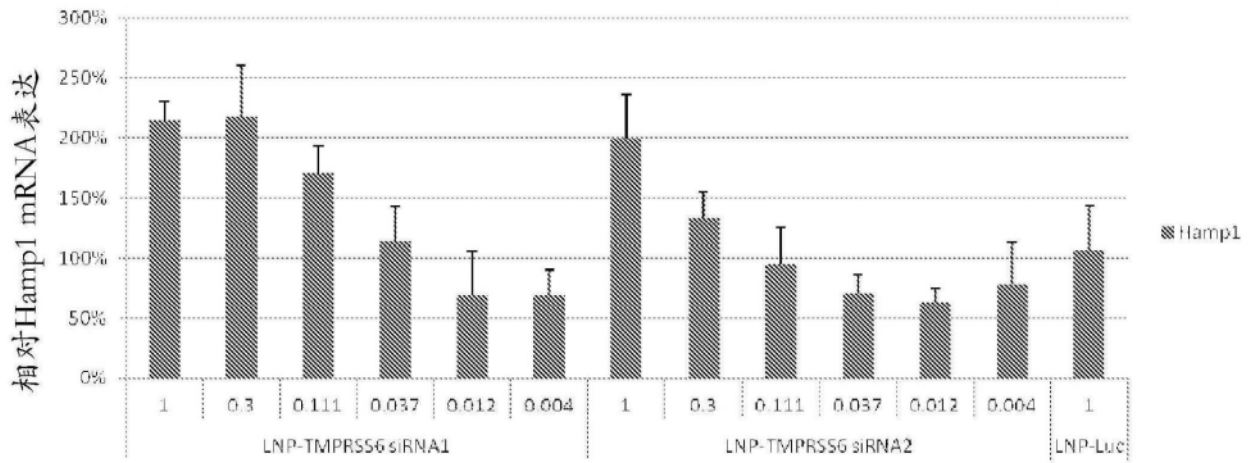


图3B

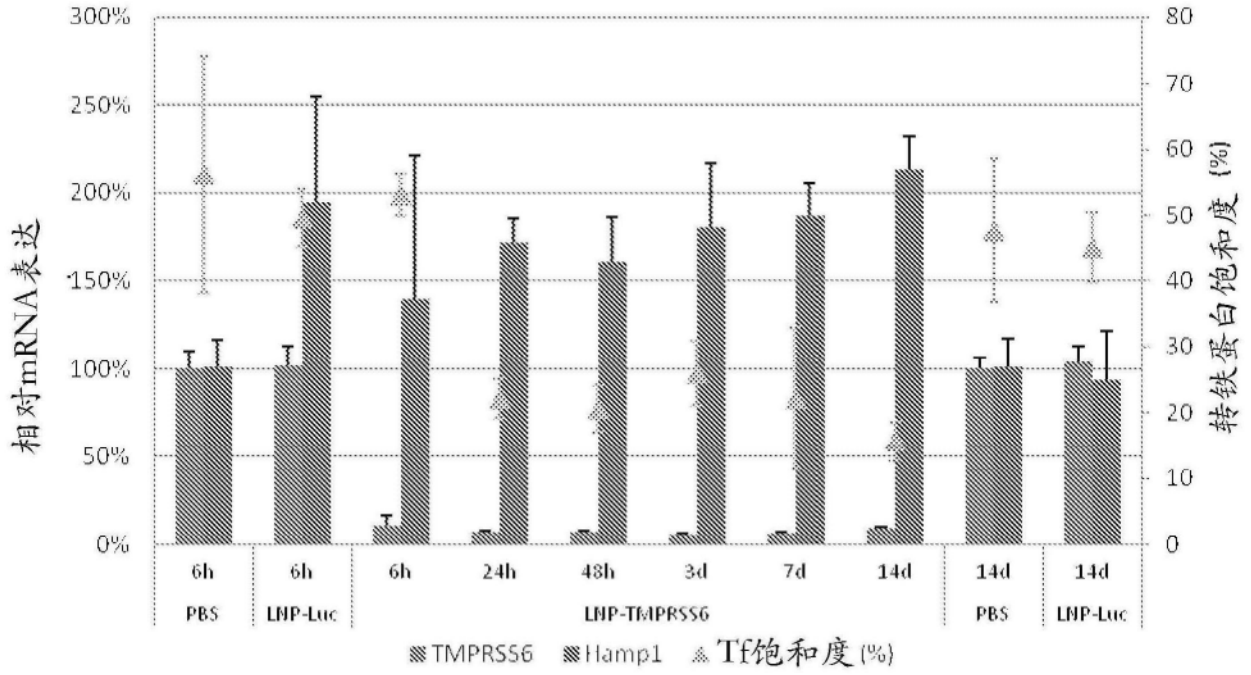


图4

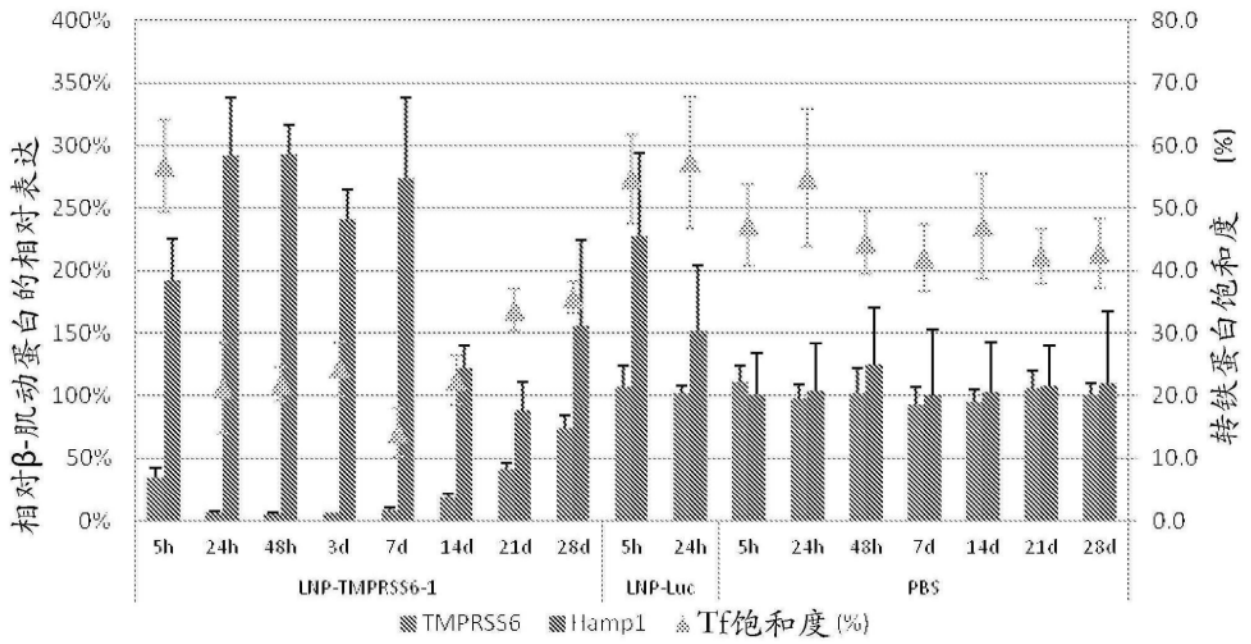


图5

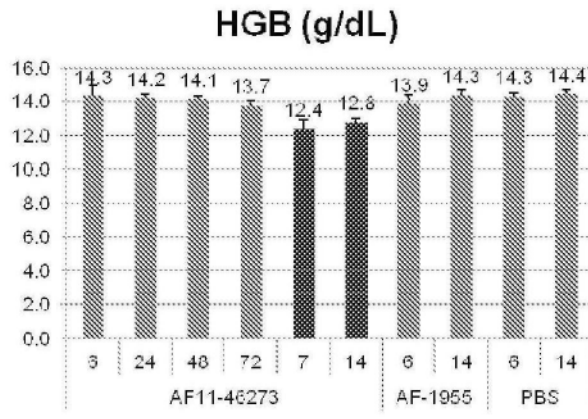


图6A

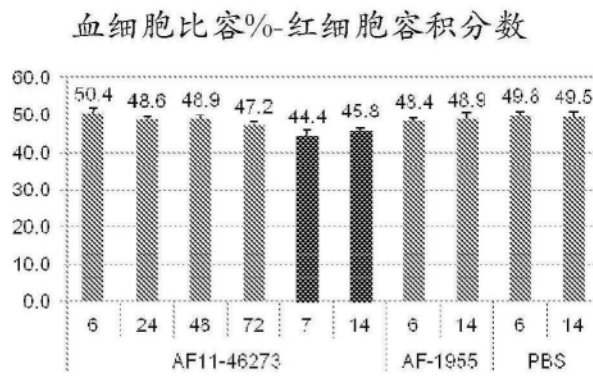


图6B

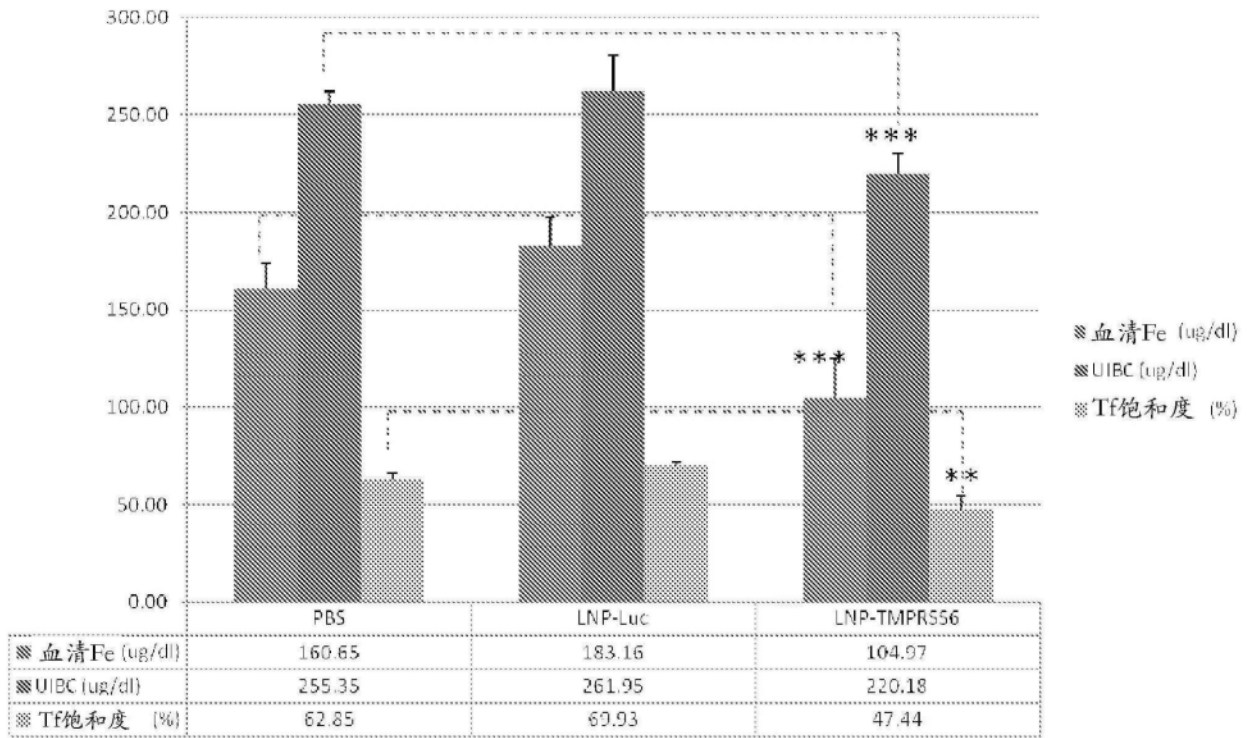


图7

网织红细胞 (%)

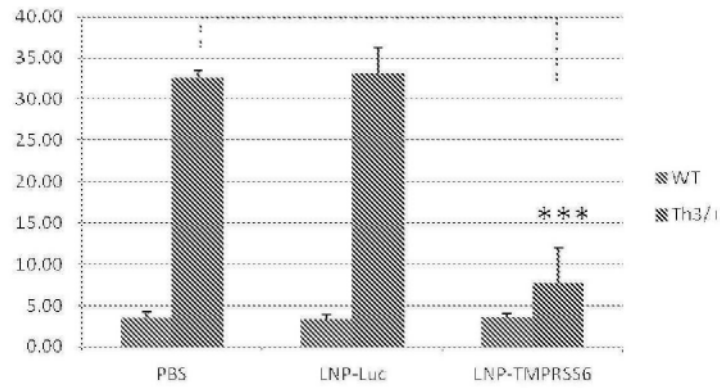


图8A

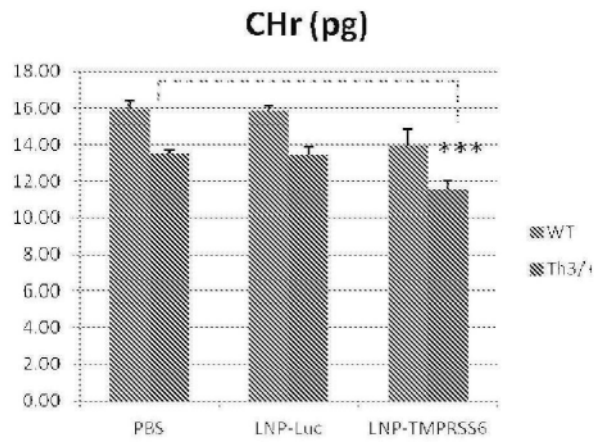


图8B

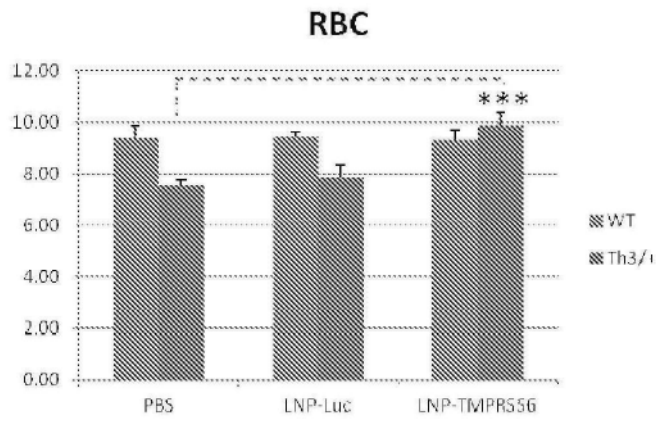


图8C

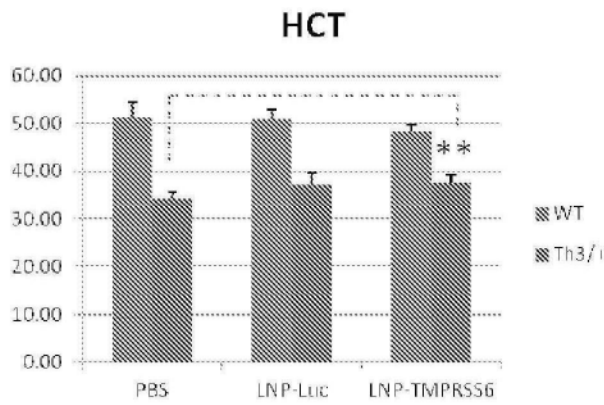


图9A

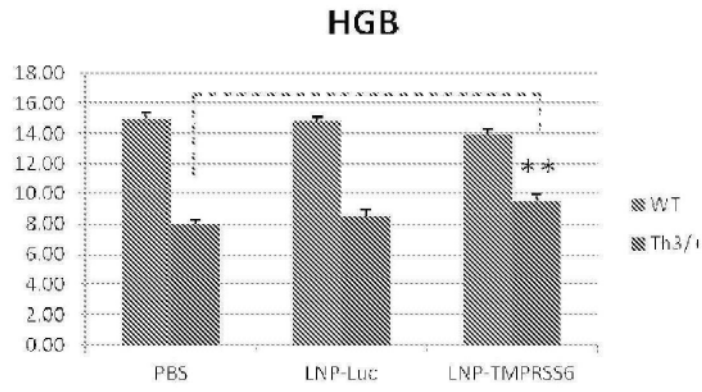


图9B

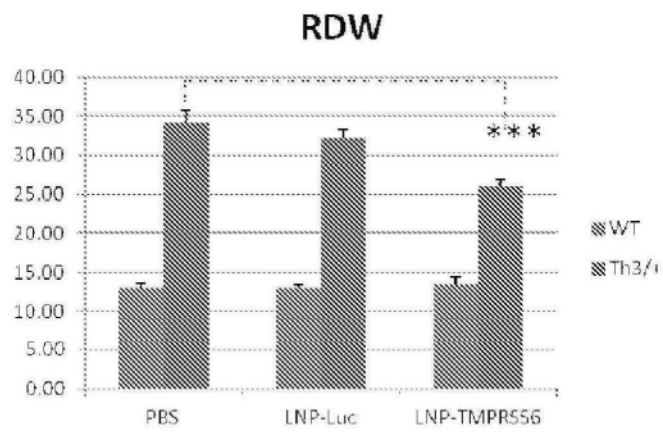


图9C

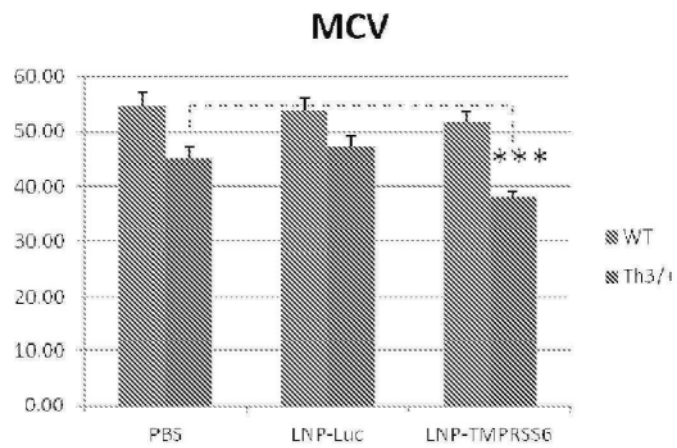


图9D

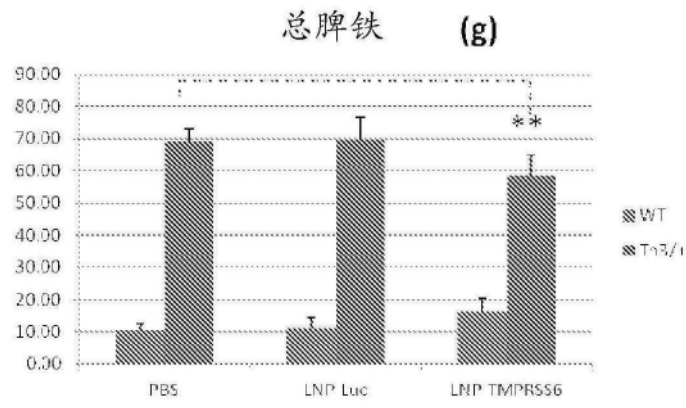


图10A

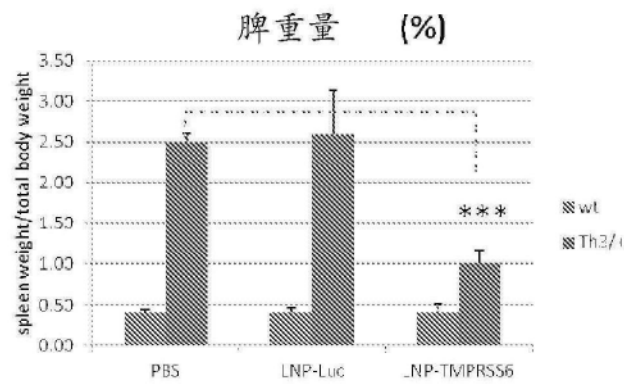


图10B

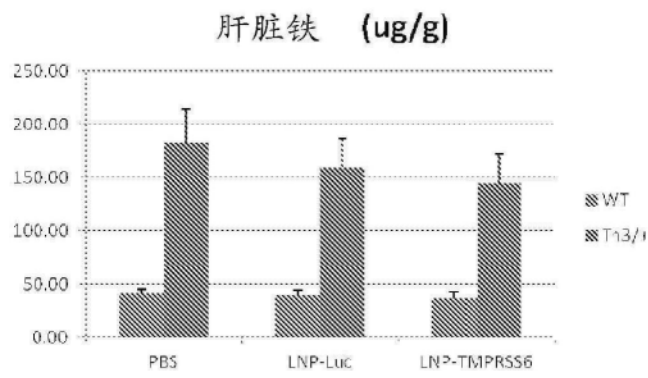


图10C